



日本農芸化学会中部支部第 159 回例会

ミニシンポジウム

「翻訳とその周辺：リボソームを巡る新展開」

および

一般ポスター発表

日時：平成 22 年 10 月 30 日（土）13:00～18:00

会場：名古屋大学 シンポジオン

13:00 開会の辞 支部長挨拶

ミニシンポジウム「翻訳とその周辺：リボソームを巡る新展開」

13:10 「リボソームが止まるとき何が起こるか？～翻訳異常の認識と品質管理の分子機構～」

稲田利文（東北大学大学院薬学研究科生命薬学専攻）

13:55 「コムギ胚芽無細胞翻訳系：膜タンパク質機能解析へのチャレンジ」

戸澤 譲（愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター）

14:40 休憩

15:00 一般ポスター発表

16:30 懇親会および中部支部企業奨励賞表彰式

リボソームが止まるとき何が起こるか？～翻訳異常の認識と品質管理の分子機構～

稲田利文（東北大・院薬）

生物の持つ複雑で巧妙な形態・機能の獲得には、RNA 段階での遺伝子発現制御機構（RNA プログラム）が重要な役割を果たす。これらの多様な RNA プログラムは、正確性を保証する RNA 品質管理機構の基盤の上に成立している。近年、新たな RNA 品質管理機構が次々と発見され、その分子機構の解析が進んでいる。我々は、翻訳反応の異常を認識し、異常 mRNA とその翻訳産物を分解する mRNA 品質管理機構について解析を行ってきた。

まず我々は、終止コドンを含まないノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質の発現が抑制される機構について解析を行った。その結果、ノンストップ mRNA の 3'末端のポリ(A)鎖が翻訳され、①合成中のポリリジン配列とリボソームとの相互作用により翻訳が抑制され、②合成途中の異常タンパク質がプロテアソームによって速やかに分解されることを見いだした^{1),2)}。この結果は、正常な mRNA では翻訳されないポリ(A)鎖が、ノンストップ mRNA において翻訳されること自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、品質管理機構において必須な役割を果たすことを明確に示している。真核生物 mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が、翻訳開始と mRNA 安定性制御に加えて、品質管理機構にも重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった。

次に、ポリ(A)鎖の翻訳自体がリボソームを停止させる機構について解析を行った。その結果、①連続した塩基性アミノ酸配列を持つ新生ポリペプチド鎖により強い翻訳アレストがおこること³⁾、②翻訳アレストに共役して異常タンパク質がプロテアソームにより分解され、Not4p が E3 ユビキチンライゲースとして機能すること³⁾、③塩基性アミノ酸配列による翻訳アレストにはリボソーム結合因子 Rack1 が必須であること⁴⁾、を明らかにした。ユビキチン反応の基質特異性は、E3 による特異的な基質認識に依存するが、Not4p の場合には翻訳アレストの結果としてリボソーム上に留まった新生ポリペプチド鎖を基質として認識すると考えられる。Not4p のリボソーム結合能がユビキチン化に必須かの検証が今後必要である。

ノンストップ mRNA の迅速な分解（NSD: Non-Stop Decay）には、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームが mRNA から解離することが必須であるが、その分子機構は不明であった。我々は、翻訳終結因子 eRF1/eRF3 複合体と相同性を持つ Dom34/Hbs1 複合体が、終止コドン非依存の翻訳終結反応に必須であることを見いだした⁵⁾。さらに、Dom34/Hbs1 複合体が、ノンストップ mRNA を迅速に分解する品質管理機構（NSD）に必須であることを見いだした。Dom34/Hbs1 複合体は、翻訳終結因子 eRF1/eRF3 複合体と相同性を持ち、①翻訳伸長阻害（アレスト）に依存した品質管理機構（NGD）と、②リボソームが翻訳活性を失った場合にリボソーマル RNA が迅速に分解される機構（NRD）のいずれにも関与する品質管理因子である。我々の実験結果により、「停滞したリボソーム」という共通した異常翻訳を認識し、3つの品質管理機構（NGD/NRD/NSD）を作動させる Dom34/Hbs1 複合体の普遍的な機能が明らかになった。最近の生化学的機能解析や結晶構造解析の結果⁵⁾と合わせて、Dom34/Hbs1 複合体が「停滞したリボソーム」を認識する分子機構について考察したい。

1) *EMBO J*, 2005; 2) *Genes Dev*, 2007; 3) *JBC*, 2009; 4) *EMBO Rep*, 2010; 5) *PNAS*, 2010

コムギ胚芽無細胞翻訳系：膜タンパク質機能解析へのチャレンジ

戸澤 譲 (愛媛大・無細胞セ)

膜タンパク質の多くは疎水的な領域を膜に貫通させることにより膜局在し、物質輸送と循環、シグナル授受に中心的役割を果たしている。膜タンパク質遺伝子は高等生物ゲノムの3割程度を占めると予想されているが、未だに機能不明なものが圧倒的に多い。タンパク質科学の領域で特に技術的ニーズが高いのが、機能型膜タンパク質の効率的生産技術の確立であるが、従来の組換え法には限界がある。細胞膜に“穴を開ける”膜輸送体を生きた細胞に発現させるには量的に限度があり、組換え法での膜タンパク質の多量生産が著しく困難であるのは当然である。一方、無細胞翻訳系は試験管内でタンパク質合成を行う「開放系」であるため、添加物を含めた反応液組成や反応温度など、諸条件を任意に変えることができるというメリットがある。タンパク質合成はリボソームのみならず数多くの翻訳因子が機能して成立する複合反応系だが、GFPなど視覚的マーカータンパク質の合成効率を指標として、翻訳活性を阻害しない様々な添加物のスクリーニングをすることも可能である。我々はこれらの長所を活かし、数年前より機能型膜タンパク質の試験管内合成系の確立を目指して無細胞翻訳系の改良に取り組んできた。機能型膜タンパク質を自在に扱うためには、まず合成タンパク質を可溶化状態で調製する必要がある。生物における膜タンパク質の存在形態を考えると、ベシクルに組込まれたプロテオリポソームの状態で扱えることが理想であるが、界面活性剤との相性次第ではプロテオミセルとして機能型膜タンパク質を扱うことも可能である。我々は、この2つの形状の長所を利用することにより、改良型無細胞翻訳系で幾つかの異なるタイプの膜タンパク質の合成・精製及び機能再構成に成功しているので、ここに紹介したい。

参考文献：Genji *et al* (2010) *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 638-642; Yamauchi *et al* (2010) *FEBS J* **277**, 3596-3607; Nozawa *et al* (2007) *Plant Cell Physiol* **48**, 1815-1820.

P 01

乳腺由来の新規脂肪細胞株の樹立と乳腺特異的な脂肪細胞分化制御の解析

○中谷 肇^{1,2} 青木直人¹ 岡島徹也^{2,3} 灘野大太² David Flint⁴ 松田 幹² (¹三重大生資
²名大院生命農 ³名大院医 ⁴SIPB, Strathclyde Univ.)

【目的】

乳の生産に重要な影響を持つと考えられる乳腺脂肪組織について、その分化調節メカニズムを *in vitro* で解析するために、乳腺脂肪組織より乳腺間葉系繊維芽細胞株の樹立を目指し、脂肪細胞分化に関わる因子の探索を試みた。

【方法・結果】

乳腺組織由来の初代培養細胞に、レトロウィルスを介して温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子を導入し、得られた繊維芽細胞様の株化細胞を MSF (Mammary Stromal Fibroblast) 細胞と命名した。MSF 細胞は 32°C で T 抗原を発現し、一定の増殖速度を示した。組織特異的なマーカー遺伝子の発現を RT-PCR で解析したところ、間葉系細胞に特異的な遺伝子の発現が認められた。乳腺の発達分化に関連するホルモンにより MSF 細胞の脂肪細胞への分化誘導を試みたところ、EHS ゲル中でインスリンとヒドロコルチゾンの共刺激により分化が誘導され、プロラクチン共存下で顕著に抑制された。また乳腺上皮細胞 (HC11 細胞) との共培養、および HC11 細胞の培養上清による分化誘導実験を実施したところ、いずれの場合も MSF 細胞の脂肪細胞への分化が抑制され、インスリン抵抗性に関与する遺伝子群の発現が有意に上昇していた。これらの結果より、乳腺の発達分化における脂肪細胞数の増減は、ホルモンと乳腺上皮細胞との相互作用により制御を受けていると考えられる。

P 02

ウシ乳汁には RNA を内包する膜小胞が存在し、RNA 輸送媒体として機能しうる

○長崎はるか¹, 秦 健敏¹, 村上耕介², 中谷 肇^{1, 2}, 山本泰也³, 松田 幹², 青木直人¹
(¹三重大院生資, ²名大院生命農, ³三重畜産研)

【目的】

近年、各種の細胞が分泌する膜小胞に遺伝情報が含まれ、膜小胞を介して mRNA や microRNA が細胞間を輸送され、さらに輸送された mRNA が標的細胞で翻訳されることが相次いで報告されている。このことから、細胞間コミュニケーション媒体としての膜小胞の機能に注目が集まっている。本研究では、乳汁に含まれる膜小胞が RNA を内包し、それが授乳を介して子 (仔) に輸送され、“個体間”での遺伝情報の運搬に関与する可能性を探ることを目的とした。

【方法・結果】

ウシ乳汁を段階的に遠心分離、超遠心分離することにより、直径およそ 100 nm の膜小胞を単離した。乳汁の RNase 活性は非常に高いにも関わらず、ウシ初乳および常乳 6 ml より調製した膜小胞にはそれぞれ約 1700 ng, 1000 ng の RNA (主に低分子 RNA) が含まれていた。膜小胞中の RNA の中には、ポリアデニル化された主要な乳タンパク質遺伝子の転写産物が存在し、5', 3'末端を標的としたリアルタイム PCR および *in vitro* 翻訳系によって、それらのうちの幾つかがインタクトな状態であることが確認された。加えて、乳腺機能および免疫系の調節に関連した microRNA が存在することも明らかとなった。さらに、これら乳汁膜小胞由来の RNA の一部は培養細胞に取込まれることも示された。膜小胞中の RNA が消化管を介して機能することを想定し、乳汁を酸性化したところ、RNA の収量や質にはほとんど影響しなかった。以上の結果より、乳汁に含まれる膜小胞は RNA を輸送することにより仔の消化管や免疫系の発達を制御する可能性が考えられる。

脂肪細胞は microRNA を内包する膜小胞を分泌する

○佐藤真広¹, 田中千絵¹, 小川瑠美子¹, 長崎はるか¹, 中川 嘉², 青木直人¹
 (¹三重大院生資, ²筑波大院人間総合)

【目的】

我々はアディポサイトカインに加え脂肪細胞がタンパク質やリン脂質に富む膜小胞 (ADM: adipocyte-derived microvesicle) を盛んに分泌することを見出した (*Endocrinology*, **148**, 3850-3862, 2007)。さらにごく最近になり, ADM が mRNA を内包し, ADM を介してマクロファージへと輸送されることを明らかにした (*Biochem Biophys Res Commun.*, **398**, 723-729, 2010)。本研究では ADM による標的細胞の機能制御を考慮し, ジーンサイレンシングや翻訳阻害に関与する microRNA (miRNA) が ADM に内包されるかどうか検討した。

【方法・結果】

マウス 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清を回収し, 超遠心分離 (100,000 x g, 2h) により ADM を調製し, TRIzol 試薬を用いて RNA 成分を抽出した。マイクロアレイ (アジレント) 解析, リアルタイム定量 RT-PCR (タカラバイオ) は定法に従った。マイクロアレイ解析の結果, ADM は 143 種の miRNA を内包することが明らかとなり, その中には分化過程で大きく発現変動するものや脂肪細胞の分化や機能発現に関与するものも含まれていた。mRNA の場合, ADM と供与脂肪細胞において, 分化程度や外界からの刺激に応じた発現量に強い相関を示したのに対し, miRNA では必ずしも相関を示さないものも存在した。同定されたほとんどの miRNA の発現量は供与細胞に比べて ADM の方が少なかったが, mRNA ほど発現量に大きな差は認められず, 標的細胞へ比較的多く取り込まれることが予想され, ADM を介した細胞間コミュニケーションにおける miRNA の重要性がうかがえる。現在 ADM に内包される miRNA の機能解析のためのアッセイ系を構築中である。

アリルオキシ炭酸エステルを出発物とする新規なエノレートの面選択的プロトン化反応

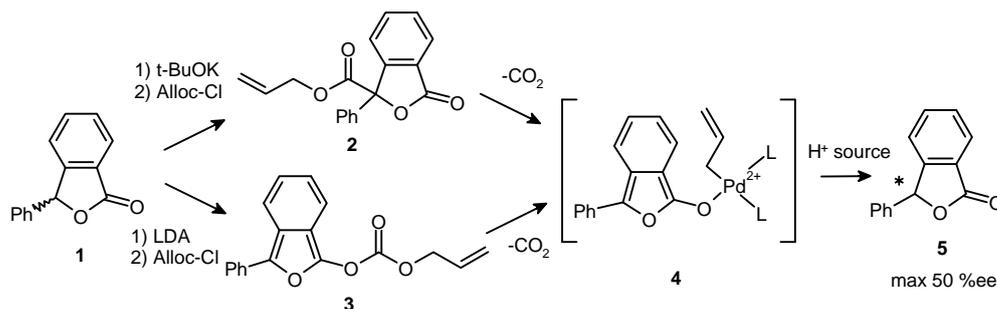
○加藤 修也、 稲垣 穰 (三重大学大学院 生物資源学研究所)

【目的】

我々はケト-エノール互変異性に着目した新規な不斉合成反応法の開発を行った。この反応は、出発物のラセミ体から脱プロトン化して得たエノールが、ケト型の化合物に戻るときに、面選択的にプロトン化を制御し、再び不斉中心を作ることに特徴を持っている。さらに、これまでの研究を発展させ、 γ 位に不斉プロトンを持つ化合物に着目して、電子が二重結合を伝わって反応開始点から隔たれた場所で受けとる新反応を目指した。

【方法と結果】

ラセミ体 **1** の γ 位のプロトンを引き抜き、クロロギ酸アリル (Alloc-Cl) でトラップし、C-Alloc 化した化合物 **2**、O-Alloc 化した化合物 **3** を得た。化合物 **2** および **3** を出発物質として、触媒量の光学活性塩基(DHQ)₂AQN、2 価のパラジウム Pd(OAc)₂、およびトリフェニルホスフィン存在下で反応させたところ、定量的に化合物 **5** が得られた。これまでのところ、化合物 **2** から 46 %ee (R) の **5** が得られ、化合物 **3** から 50 %ee (R) の **5** が得られた。このことから、化合物 **2** および **3** のいずれから出発しても、脱保護、脱炭酸し、**4** のような中間体を経て反応が起こり、Pd²⁺ が外れたのちに γ 位へ送られた電子がプロトンを受けとる機構で反応が進むと考えられた。



P 05

マイクロビーズディスプレイと無細胞タンパク質合成系を用いた糖鎖結合性タンパク質の新規解析法

○酒井謙¹ 児島孝明¹ 山川奈緒¹ 西浦佑二² 田中浩士² 高橋孝志² 佐藤ちひろ¹ 北島健¹
中野秀雄¹

(¹名大院・生命農・生命技術 ²東工大院・理工・応用化学)

【目的】

糖鎖はタンパク質、脂質等に結合し、生体内の様々な生理機能の制御に関与する化合物である。糖鎖結合性タンパク質(レクチン)は、糖鎖と結合するタンパク質であり、糖鎖の多様な機能発現に関与すると同時に、糖鎖機能解析の分子ツールとしても大きな力を発揮すると考えられている。本研究では、磁性マイクロビーズ上に提示させたレクチンと蛍光標識糖鎖との結合活性を、フローサイトメトリーにより迅速かつハイスループットに検出する新規手法の開発することを目的とする。

【方法・結果】

Siglec-7(CD328)は、免疫グロブリン様領域を N 末端に持ち、Neu5Ac α (2-8)Neu5Ac というジシアル酸(diSia)構造を認識するレクチンの一種である。本研究では、Siglec-7 を糖鎖結合タンパク質のモデルとした。Siglec-7 は GST 及び His タグとの融合タンパク質として無細胞タンパク質合成によって発現させ、His タグを介して磁性マイクロビーズ上に提示させた。このビーズ-タンパク質複合体に対して蛍光プローブである diSia-Rhodamine Green を加え、フローサイトメトリーにより Siglec-7 の糖鎖結合活性の検出を試みた。その結果、Siglec-7 を提示させたビーズ-タンパク質複合体において、有意な蛍光シグナルが確認された。本手法を用いることにより、生体内におけるレクチンの網羅的かつハイスループットな新規探索法への応用が期待される。

P 06

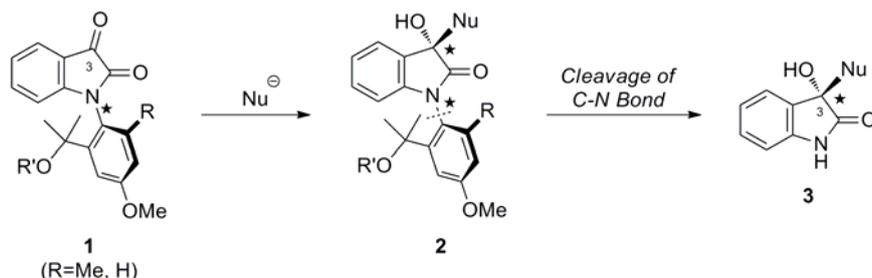
軸性キラリティを有する *N*-アリーールイサチンを基質とした立体制御法の開発
中崎敦夫¹, ○森 綾子¹, 小林 進², 西川俊夫¹ (¹名大院生命農, ²東理大薬)

【目的】

3 位に不斉炭素原子を有するオキシインドール骨格は、生理活性を示す天然物に広く見受けられ、この骨格の構築法は現在までに種々開発されている。今回我々は、3 位に不斉 3 級水酸基を有するオキシインドール **3** を合成する目的で、*N*-アリーールイサチン **1** の C-N 結合が作り出す軸性キラリティを利用した新たな立体制御法の開発を目指した。

【方法・結果】

市販の 3,5-キシレノールとインドールから合成したイサチン誘導体 **1** に求核剤を作用させて **2** の合成を試みた。この際、**1** の R' として様々な保護基を導入してジアステレオ選択性を検討した。その結果、R=H、R'=Me を導入した場合に最も高いジアステレオ選択性(7:1)で **2** を得ることができた。

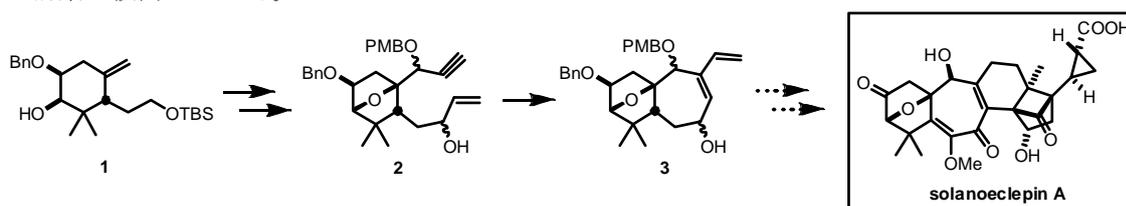


P 07

ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A の合成研究
○鳥居真衣、安立昌篤、西川俊夫（名大院生命農・応用分子生命科）

【目的】ソラノエクレピン A は、ジャガイモシスト線虫に対する孵化促進活性を持ち、三員環から七員環まで全ての炭素環を含む特異な構造を持った天然有機化合物である。本研究では、ソラノエクレピン A の全合成に向けて、左側部分に相当するオキサビシクロ骨格と七員環を持つジエン **3** の合成を検討した。

【方法・結果】D-パントラクトンからプロパルギル化とラジカル環化反応を用いてオレフィン **1** を合成した。続いて、ヨードエーテル化反応によってオキサビシクロ骨格を構築後、数工程を経てアルコール **2** を合成した。エンインメタセシスによる七員環構築を試みたところ、望むジエン **3** の合成に成功した。今後、シクロブテノン誘導体との Diels-Alder 反応によって、四員環を含む右側部分の構築を検討していく。



P 08

グルタルアルデヒドを用いたビーズディスプレイ法における DNA - 蛋白質複合体安定化法の確立
○三上友美子、松田英樹、松井大吾、兒島孝明、中野秀雄（名大院生命農・生命技術）

【目的】

当研究室では、エマルジョン PCR と無細胞蛋白質合成系を組み合わせたビーズディスプレイ法を開発し、FACS を用いた優良蛋白質変異体のハイスループットなスクリーニング系を確立した。上記ビーズディスプレイ法において形成される DNA - 蛋白質複合体中の DNA - 蛋白質間の連結は、ストレプトアビジン - ビオチン及び抗原 - 抗体という 2 つの非共有結合性相互作用を利用している。ストレプトアビジン - ビオチン間の結合は、非常に強固で安定であることがすでに知られている。しかし、抗原 - 抗体間の結合は、抗体の耐熱性及び pH 耐性が不十分であるために、本系を高温、低 pH のような特殊な環境下でのスクリーニングに応用することができなかった。そこで本研究では、従来の抗体を介した手法に比べて、より安定な DNA - 蛋白質複合体形成法を確立することを目的とした。

【方法・結果】

ビーズディスプレイ法により His-tag を付加した GST (GST-His) をビーズ上に提示させ、DNA - 蛋白質複合体を作製した。この複合体に対し、グルタルアルデヒドを用いて抗 GST 抗体 - GST-His 間に架橋を形成させた。熱処理及び pH 処理を行ない、抗原抗体反応による結合を解離させた後、蛍光標識された抗 GST 抗体による免疫染色を施した。得られた複合体をフローサイトメトリーで解析した結果、グルタルアルデヒド処理を行なった複合体でのみ、ビーズ上への GST-His 固定化による有意な蛍光シグナルが検出された。この手法は熱安定性、pH 耐性等蛋白質の機能改変を目的としたハイスループットスクリーニングへの応用が期待される。

α -リポ酸に対するシクロデキストリンの包接作用
 ○宮嶋孝太、石井剛志、中山 勉（静岡県大・食品栄養）

【目的】

α -リポ酸 (LA) は、生体内で補酵素として働くビタミン様物質であり、R 体 (*R*-LA) と S 体 (*S*-LA) の 2 種類の光学異性体が存在する。サプリメントの多くはラセミ体 (*R, S*-LA) であるが、生体で合成され補酵素として利用されるのは *R*-LA である。LA は疎水性の高い脂肪酸骨格を持つため水への溶解性が低い。そのため、サプリメントには LA の溶解性や安定性を高めるためにシクロデキストリン (CD) が添加されているものもある。本研究では内径の異なる CD を用いて *R*-LA と *S*-LA に対する包接作用 (CD との親和性、LA の溶解性) を評価し、CD を加えた際の溶解性や各種 CD に対する親和性の強弱を明らかにすることを目的とした。

【方法】

LA (*R*-LA および *S*-LA) を α -CD、 β -CD および γ -CD 存在下で水に溶解し、吸光度を測定することで、各種 CD が LA の溶解性に与える影響を評価した。また、LA を移動相に各種 CD を添加した逆相 HPLC に供し、得られた保持時間より各種 CD が LA の溶解性に与える影響を評価した。次に LA を α -、 β -および γ -CD カラムを備えた HPLC に供し、得られた保持時間から結合親和性を評価した。さらに、等温滴定カロリメトリーにより LA と各種 CD の熱力学定数や結合定数を算出した。

【結果】

LA の溶解性は CD を添加することにより高まり、その順序は β -CD > γ -CD > α -CD であった。LA と CD との親和性は β -CD > γ -CD > α -CD の順であり、溶解性の結果と一致した。*R*-LA と *S*-LA との間では CD を加えた際の溶解性や CD との親和性に大きな差異は認められなかった。現在、等温滴定カロリメトリーにより、LA と各種 CD の結合定数や結合様式の解析を進めている。

ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼ D の位置選択性の解析
 ○尾崎朱里、岩崎雄吾、中野秀雄 (名大院・生命農・生命技術科学)

【目的】放線菌由来ホスホリパーゼ D (PLD) は優れたホスファチジル基転移活性を有しており、様々なリン脂質合成に利用可能である。我々はこれまでに PLD の活性部位周辺に変異を導入することで、ホスファチジルイノシトール (PI) を合成可能な変異 PLD を創出した。受容体であるイノシトールには 6 つの非等価な水酸基が存在するため、変異 PLD により合成される PI には 6 種の位置異性体 (1-PI~6-PI) が存在しうる。しかし、W187X/Y191Y/Y385R (XYR、X は W 以外) 変異体では、(1) 1-PI と 3-PI のみが優先的に合成される (1,3 位選択性)、(2) 187 位の残基の違いにより 1-PI と 3-PI の合成比が大きく異なる、という特質が発見された。本研究では、種々の変異体を用いて、位置選択性を左右しうる各残基の役割について解析を行った。

【方法・結果】XYR 変異体に R385Y 変異を導入した W187X/Y191Y/R385Y (XYY) 変異体を作製した。このうち、FYY と WYY (野生型) 以外では PI 合成能を有していたが、1,3 位選択性は失われた。これより、(1) PI 合成能を有するには 187 位が小さい残基である、(2) 1,3 位選択性を有するには 385 R が必要であることが示唆された。

さらに、XYR 変異体に活性部位周辺の D190A 変異を導入した W187X/D190A/Y191Y/Y385R (XAYR) 変異体を作製した。その結果、XAYR 変異体では対応する XYR 変異体と比較して 3-PI がより優先的に合成され、3 位選択性が向上した。このことから、イノシトールの水酸基の認識において、190 位の残基が重要な役割を担うと考えられた。

トキイロヒラタケ由来ラッカーゼアイソザイムの麴菌による発現と機能解析
 ○松上公有, 野崎功一, 水野正浩, 神田鷹久, 天野良彦 (信州大院・工)

【目的】

担子菌が生産するラッカーゼは、ダイオキシン類や一部の染料を分解する特徴を有することから、環境修復技術としての利用が期待されている。これまでに、トキイロヒラタケ由来のラッカーゼが特にフタロシアン系染料に対し高い脱色活性を持つことを示し、9種類 (Lcc1~9) のアイソザイムの存在を明らかにした。そのうち4種類については麴菌による発現系の構築に成功し、rLcc2、rLcc9については一部の諸性質が解明されている。本研究は rLcc1、rLcc4 の精製及び酵素化学的性質の解明を目的としている。

【方法・結果】

硫酸銅を添加した SPY 培地にて rLcc4 を発現する遺伝子組換え麴菌を培養し、培養液中に rLcc4 の発現を確認した。本培養液を粗酵素液とし、硫酸分画後、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、諸性質を調べた。また、各精製 rLcc を用い、染料やリグニンモノマーに対する反応性を比較した。結果、精製した rLcc4 は SDS-PAGE により分子量 100 k 付近に単一バンドを示した。この値はアミノ酸配列から予測した分子量 56 k を大きく上回り、原因として糖鎖の過剰付加が考えられた。また、ABTS に対する比活性を 100% とすると、rLcc4 の染料脱色活性はその 1% 以下であったが、リグニンモノマーに対してはグアヤコール 0.35%、2,6-dimethoxyphenol(DMP) 41%、シリングアルダジンでは 57% であり、以前報告した rLcc2、rLcc9 に比べて、反応性は DMP に対して高く、グアヤコールに対しては低いことが明らかとなった。しかし、上記した全ての基質に対する rLcc4 の比活性は rLcc2、rLcc9 の 10 分の 1 以下の値を示した。

ラクタスタチンの媒介する新規肝臓コレステロール分解調節系
 ○井辰かおる, 後藤剛, 長岡利 (岐阜大学, 応用生物科学部)

【目的】

コレステロール 7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) は肝臓の胆汁酸生合成律速酵素であり、コレステロールの分解に関与している。本研究室の研究により、牛乳 β -ラクトグロブリン由来の血清コレステロール低減化ペプチドであるラクタスタチン (IIAEK) は、ヒト培養肝細胞 HepG2 において、CYP7A1 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした¹⁾。また、DNA マイクロアレイにおいては、CYP7A1 の mRNA レベルの有意な上昇に伴い、HNF-3 α の mRNA の有意な上昇を観察した。そこで本実験では、ヒト CYP7A1 遺伝子プロモーター上の HNF-3 結合領域などに注目し、ラクタスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性化機構を分子レベルで解明することを目的とする。

【方法・結果】

CYP7A1 遺伝子プロモーター部を含むルシフェラーゼプラスミドを一過性に HepG2 に導入し、ラクタスタチン (1mM) を添加した。その後、細胞を回収してルシフェラーゼアッセイにより転写活性を測定した。また、CYP7A1 遺伝子プロモーターの HNF-3 結合領域である siteA (-305~-277) 領域を変異させたプロモーター及び野生型 DNA を用いてゲルシフトアッセイを行い、HNF-3 α の結合を評価した。ルシフェラーゼアッセイの結果、HNF-3 結合領域に関して、-300~-286 領域の欠損においてラクタスタチンによる CYP7A1 遺伝子の転写活性化が消失した。また、ゲルシフトアッセイにおいて、siteA 領域は HNF-3 α と結合することが確認され、その結合は、siteA 領域の-297~-293 (AAACA) 領域の変異により失われた。以上の結果より、ラクタスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性化には HNF-3 α が関与することを発見した。

1) Biochem. Biophys. Res. Commun., 352, 697-702 (2007)

P 13

ビーズディスプレイ法を用いたフローサイトメトリーによるセルラーゼ活性の新規検出法の開発 ○森 翔也、松田 英樹、兒島 孝明、中野 秀雄（名大院生命農）

【目的】

近年、セルラーゼのバイオマス糖化における利用価値が高まっており、より強い分解活性を持つセルラーゼの創出が試みられている。この新規高機能セルラーゼの創出には、進化工学的手法が有効な手段の一つである。その際、作製した変異セルラーゼライブラリーをハイスループットにスクリーニングする必要がある。そこで本研究では、ビーズディスプレイ法と酵素反応を用いた、フローサイトメトリーによる大規模かつハイスループットなセルラーゼ活性のスクリーニング系の構築を試みた。

【方法・結果】

C 末端に His tag を付加した *Phanerochaete chrysosporium* 由来のエンドグルカナーゼ(EG)を作製し、抗 His tag 抗体を介して Streptavidin ビーズ上にこの EG をディスプレイした。このビーズ - 抗体 - EG 複合体(以下、EG ビーズ複合体)に対してグルコースオキシダーゼ(GOD)とペルオキシダーゼ(POD)、蛍光物質であるジクロロフルオレシニン(DCFH)を加え、フローサイトメトリーを用いた蛍光強度に基づくセルラーゼ活性の検出を行った。その結果、上記 EG ビーズ複合体と活性中心に変異を導入した不活性型 EG ビーズ複合体との間に顕著な蛍光シグナルの差が確認された。さらに、EG ビーズ複合体と不活性型 EG ビーズ複合体を 1:100 の割合で混合したモデルビーズライブラリーを調製し、セルソーターを用いてこのライブラリーからの EG ビーズ複合体の濃縮に成功した。これらの結果より、本手法は変異セルラーゼライブラリーのハイスループットスクリーニングに大きな力を発揮すると考えられる。

P 14

好気的環境下におけるエタノール生産と乳酸生成の抑制 ○高橋慎、佐々野和雄、渡辺昌規（¹ 広国院大院物質、² (株) 食協）

【目的】

これまでに、洗米排水を澱粉供給源、米糠を澱粉及び糖化酵素供給源として用いた、工業的バイオエタノール生産の可能性について検討を行ってきた。しかし、速醸法によるエタノール生成の場合、別途乳酸の添加が必要である他、乳酸菌による乳酸生成により、エタノール生産収率の低下が起こるなどの問題を有している。そこで本研究では、凝集性を有するエタノール生成酵母による好気的環境下でのエタノール生産の可能性と乳酸生成の抑制との相互関係について明らかにする事を目的とした。

【方法・結果】

凝集性酵母 (*Saccharomyces diastaticus* ATCC 60715)、及び非凝集酵母 (協会酵母 K-7) をそれぞれ供試菌体とした。培養液は GYP 培地及び米糠含有洗米排水を用い、培養液の好気条件はフラスコ容量を任意可変する事により設定した。GYP 培地を用いたエタノール生成試験を行った結果、好気、嫌気 (静置状態) の両条件下において、上記凝集性酵母の生成エタノール濃度の変化は無く、好気条件下においても嫌気条件下とほぼ同等のエタノール生成が確認された。それに対し、非凝集酵母である K-7 では、好気条件下における生成エタノール濃度は、嫌気条件下の約 50%に留まった。さらに、上記凝集性酵母による米糠含有洗米排水を用いたエタノール生成試験を行った結果、GYP 培地を用いた試験と同様に、好気条件下においても嫌気条件下とほぼ同等のエタノール生成が確認された。また乳酸生成量は、嫌気条件下と比べ、約 50%にまで抑制する事を確認した。以上の結果より、凝集性酵母の利用と培養工学的な好気条件の最適化により、エタノール生成能の維持と、乳酸生成の抑制双方の可能性が示唆された。

ホスホリパーゼを用いたホスファチジルイノシトール異性体の選択的合成

○永坂和寛, 岩崎雄吾, 中野秀雄 (名大院, 生命農, 生命技術科学)

【目的】

ホスホリパーゼ D(PLD)は、グリセロリン脂質の加水分解及びホスファチジル基転移反応を触媒する。この反応を利用すると様々なリン脂質が酵素的に合成可能である。

本研究室では放線菌由来 PLD を蛋白工学的に改変する事で、ホスファチジルイノシトール(PI)合成能を持つ変異 PLD を複数獲得している。天然型の PI はイノシトールの 1 位水酸基にホスファチジル基が結合した 1-PI であるが、変異 PLD により合成された PI はイノシトール環上の 6 個の水酸基が反応点となるために、位置異性体の混合物となる可能性がある。我々は変異 PLD の位置特異性解析により、1-PI を優先的に生成するもの(1-PI 優先型)や、3-PI を優先的に生成するもの(3-PI 優先型)を見いだしている。しかし、それら変異 PLD の位置特異性は完全ではないため、1-PI 優先型 PLD からは 3-PI が、3-PI 優先型 PLD からは 1-PI が副生するという問題があった。そこで本研究では、位置選択性の異なる複数の変異 PLD を組み合わせる事で、1-PI および 3-PI をそれぞれ高純度に合成することを目的とした。

【方法・結果】

化学合成した PI 異性体標品を用いた加水分解実験により、3-PI 優先型 PLD は 3-PI を 1-PI よりも優先的に加水分解できる事を確認した。この性質を利用し、1-PI 優先型 PLD で 1-PI を優先的に合成した後に 3-PI 優先型 PLD を用いて混在する 3-PI を優先的に分解するという 2 段階の酵素反応により、1-PI を高純度に調製することができた。

他方、3-PI 優先型 PLD を用いて 3-PI を合成し、混在する 1-PI を PI-特異的ホスホリパーゼ C により分解することで、ワンポットで 3-PI を高純度に調製する事もできた。

放線菌ホスホリパーゼ A₂ の大腸菌発現系の構築

○竹森大樹¹, 吉野健太¹, 岩崎雄吾¹, 中野秀雄¹ (¹名大院生命農)

【目的】

ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)は、リン脂質の 2 位エステル結合を加水分解する反応を触媒する酵素であり、油脂加工分野や有機成分分野等に幅広く用いられている酵素である。PLA₂ はそれまで真核生物のものしか知られていなかったが、2002 年に放線菌 *Streptomyces violaceoruber* 由来の分泌型 PLA₂ が報告された。本研究はこの放線菌由来 PLA₂ の大腸菌における大量発現系を確立し、PLA₂ を進化分子工学の手法に則り改良することを目的とする。

【方法・結果】

S. violaceoruber 由来 PLA₂ を、遺伝子のコドン頻度を大腸菌のものに最適化し、*pelB* シグナル配列を付加して pET システムにて発現させた結果、培養上清中に活性型の PLA₂ が確認できた。発現した PLA₂ の N 末端アミノ酸は本来の PLA₂ のものであり、*pelB* シグナル配列が正しく除去されていることを確認した。さらに、この発現系を用いて、レシチン含有培地上で PLA₂ 活性を検出する方法を開発した。これは白濁したレシチン含有培地上で PLA₂ 活性をクリアゾーンとして検出できるもので、酵素のハイスループットなスクリーニングを可能とするものである。現在 PLA₂ の変異遺伝子ライブラリーを用いて、トリアシルグリセロールの *sn*-2 位を特異的に分解できるような基質特異性の改変を行っている。2 位特異的リパーゼは未だ発見されておらず、同定されれば油脂加工分野のみならず、幅広い分野への応用も期待される。

ローヤルゼリー中の TRPA1 活性化成分

○寺田祐子¹, 成川真隆^{1,2}, 渡辺達夫^{1,2} (¹静岡県大院・食品栄養, ²Global COE Program)

【目的】

TRPA1・TRPV1の活性化はエネルギー代謝を亢進させることから、その活性化成分の摂取は消費エネルギーの増大に有効と考えられる。活性化成分の多くは香辛料中に含まれ、ワサビの辛味成分アリルイソチオシアネートは TRPA1を、トウガラシの辛味成分 カプサイシンは TRPV1を活性化する。無辛味食品からの活性化成分の探索の一環として、ユニークな食品であるローヤルゼリー中の TRPA1・TRPV1活性化成分を検討した。

【方法】

〈TRPA1・TRPV1活性の測定〉TRPA1またはTRPV1を発現させた HEK 細胞を用い、サンプル投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を FLEXstationTM II (Molecular Devices) にて測定し、活性を評価した。

〈食品の抽出と活性化成分の精製・定量〉凍結乾燥したローヤルゼリーをヘキサン、酢酸エチル、メタノールで順に抽出し、活性測定に用いた。また、TRPA1活性の見られたヘキサン画分から、固相抽出を用いて遊離脂肪酸を分取し、ガスクロマトグラフィー (GC) にて活性化成分の定量を行った。

【結果・考察】

ローヤルゼリー抽出物の TRPA1・TRPV1活性を測定したところ、ヘキサン画分に強い TRPA1活性が認められた。続いて、固相抽出を用いてヘキサン画分から遊離脂肪酸画分を分取し、GC 分析を行った。その結果、ヘキサン画分の50%が、ローヤルゼリーに特異的で含量の多い10-Hydroxy-2-decenoic acid (10-HDEA) と10-Hydroxydecanoic acid (10-HDAA) であった。TRPA1活性を純品にて測定したところ、両者は同等の TRPA1賦活能 [EC₅₀は10-HDEA 415 μ M (77 μ g/mL)・10-HDEA 557 μ M (101 μ g/mL)] を有していた。また、両者の含量から算出したヘキサン画分の EC₅₀は73 μ g/mLであった。この値は10-HDEA・10-HDAA の EC₅₀と近似であり、ヘキサン画分の活性は10-HDEA・10-HDAA によることがわかった。つまり、ローヤルゼリーは TRPA1活性化成分を含有し、主要なアゴニストは10-HDEA・10-HDAA であると判明した。

無細胞蛋白質合成系と一細胞 RT-PCR を用いた抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の新規取得法の開発

○原 亮太, 八幡 翔, 兒島 孝明, 中野 秀雄 (名大院・生命農・生命技術)

【目的】

近年、モノクローナル抗体は抗体医薬として注目を集めており、これまでに抜本的治療薬や予防薬が存在しなかった医療分野にも光明を与え始めている。当研究室では、SICREX 法 (Single-Cell RT-PCR linked *in vitro* Expression) という新規モノクローナル抗体取得法が開発されている。この方法は一細胞 RT-PCR と無細胞蛋白質合成系を組み合わせることにより、マウスの脾臓及びヒト末梢血のリンパ細胞からわずか2日で抗体が取得できる。本研究では、インフルエンザウイルスの表層蛋白質ヘマグルチニン (HA) ワクチンを抗原とし、この SICREX 法を用いてインフルエンザウイルスに対する抗体を取得することを目的とした。

【方法・結果】

標的抗原 HA 結合能を有する B 細胞の効率的な濃縮の為、B 細胞特異的抗原 CD19 に対する Alexa488 標識抗体及び、Cy-5 標識抗原 HA による二重染色を免疫性を与えたヒト末梢血由来 B 細胞に施し、FACS による 1 次スクリーニングを行った。獲得した B 細胞を限界希釈し、1 ウェルあたり 1 細胞となるように分注し、一細胞 RT-PCR および 2 段階の PCR により抗体の遺伝子を増幅した。次に無細胞蛋白質合成系での転写・翻訳反応に必要な T7 プロモーター、T7 ターミネーター配列などを抗体遺伝子に付加し、無細胞蛋白質合成を行った。合成した抗体の結合能を ELISA により測定し、抗原に対して高い結合能を保持する抗体遺伝子を取得した。現在、獲得した抗体の詳細な解析を行っている。

P 19

タンパク質と相互作用するポリフェノールの探索に関する研究

○土井 裕太, 石井 剛志, 吉田 綾子, 杉山 靖正, 熊澤 茂則, 中山 勉 (静岡県大・食品栄養)

【目的】

植物ポリフェノールは、化学構造の違いにより多様な生理作用を示す。近年、ポリフェノールとタンパク質との相互作用が生理機能の発現に重要であることが明らかとなっている。先行研究において、我々はポリフェノールとタンパク質との相互作用をスピンカラムにより簡便かつ迅速に測定する方法を開発した¹⁾。本研究では、開発した方法を用いて穀物およびベリー果実をスクリーニングし、タンパク質と親和性の高い植物ポリフェノールを明らかにする事を目的とした。

【方法】

ポリフェノールと BSA (ウシ血清アルブミン) をリン酸緩衝液中で 30 分間インキュベートした後、未結合のポリフェノールをゲルろ過により除去したものを試料とした。試料を 96 穴プレートに添加し、WST-8 (水溶性テトラゾリウム塩) の還元反応を利用したレドックスサイクリング染色を行うことで、相互作用を検出した。

【結果】

穀物では特に赤米のプロアントシアニジンと黒米のアントシアニンが高い親和性を示し、ベリー果実では Bilberry と Crowberry のアントシアニンが高い親和性を示した。特に高い親和性を示したベリー果実のアントシアニンは、B 環に水酸基を 3 つ有する Delphinidin の配糖体である Delphinidin-3-*O*-galactoside, Delphinidin-3-*O*-glucoside であった。

1) 吉田綾子, 石井剛志, 森 大気, 熊澤茂則, 中山 勉: タンパク質と親和性の高い植物ポリフェノールの検出法, 第 56 回日本食品科学工学会大会 (名古屋) 要旨集 p102

P 20

スウェーデン産ベリーの抗酸化活性およびクローベリーの成分分析

○水田 真央¹, 石川 千絵¹, 熊澤 茂則¹, Roger Uddstål²

(¹ 静岡県大・食品栄養, ² The Swedish Institute for Food and Biotechnology)

【目的】

ベリー果実には赤色色素成分アントシアニンが豊富に含まれている。アントシアニンは抗酸化活性、脂質改善作用など様々な機能が報告されている。このような理由からベリー果実は機能性食品として注目されている。北欧スウェーデンに育つベリー果実には、有効利用されていないものが多く存在する。本研究ではスウェーデン産ベリーの有効性を見出すため、スウェーデン産ベリーの成分分析および抗酸化活性試験を行うこととした。

【方法・結果】

各種スウェーデン産ベリー (Bog bilberry, Cranberry, Crowberry, Dwarf cornel, Lingonberry, Rowanberry) の凍結乾燥試料を 80% MeOH (0.5% TFA) によって抽出し、HPLC 分析、アントシアニン含量測定、抗酸化活性試験 (ABTS 法, DPPH 法, FRAP 法, ORAC 法) を行った。抗酸化活性試験の結果、どの試験法においても Crowberry が最も高い活性を示した。Crowberry の高い抗酸化活性にはアントシアニン以外の成分も抗酸化活性に寄与しているものと考えられたため、それらの成分分析を行った。まず Crowberry の凍結乾燥試料を 60% EtOH (0.1% TFA) で抽出した。得られた抽出物をオープンカラムクロマトグラフィー, HPLC などに供し、含有成分を単離精製し、NMR, MS を用いていくつかの化合物を構造決定した。

韓国済州島産プロポリスの起源植物に関する研究

○下村 幸佑¹, 杉山 靖正¹, 中村 純², 安 木蓮³, 熊澤 茂則¹

(¹静岡県大・食品栄養,²玉川大・ミツバチ科学研究センター,³韓国東亜大・食品栄養)

【目的】

プロポリスは、セイヨウミツバチが周辺の植物の樹脂等を集めて巣内に塗布したものであり、その成分は採取地域の植物相の影響を強く受ける。当研究室では、世界各地で採集されるプロポリスを研究する過程で、これまでに韓国済州島産プロポリスが他の地域で採集されるいずれのプロポリスとも異なる成分組成を示すことを明らかにし、一つの新規 chalcone と khellactone 骨格を有する二つの既知化合物を同定した¹⁾。本研究は、このプロポリスのさらなる成分分析を行うことにより、同プロポリスの起源植物 (原料となっている植物) を解明することを目的とした。

【方法・結果】

韓国済州島産プロポリスのメタノール抽出物を、シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC に供し、含有成分を単離、精製した。単離した化合物は、NMR, MS 等の機器分析により構造決定した。また、これらの化合物を含む植物を調べ、多波長検出器付 HPLC を用いて同プロポリスとの成分組成の比較を行った。その結果、marmesin, angelichalcone, oxypeucedanin hydrate, xanthokeismin A をはじめとする既知化合物 8 個、新規化合物 7 個を単離、同定した。さらに、明日葉 (*Angelica keiskei*) が、韓国済州島産プロポリスと非常に相関性の高い成分組成を示すことを見出した。このことにより、同プロポリスの起源植物が明日葉である可能性が示唆された。

1) S. Kumazawa, S. Suzuki, M.-R. Ahn, M. Kamihira, Y. Udagawa, K. Bang, and T. Nakayama: A new chalcone from propolis collected on Jeju island, Korea. *Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 67–69 (2006).

分裂酵母の経時寿命延長因子である Ecl1 の発現機構の解析

○三輪由紀子¹、大塚北斗¹、内藤知佳子¹、村上浩士²、饗場浩文¹

(¹名大院・生命農学、²名市大院・医)

【目的】

近年、多くのモデル生物を用いた寿命研究から、種を超えて保存された寿命制御経路の存在が報告されている。遺伝子的操作が容易であり、比較的寿命が短いモデル生物は老化・寿命研究において広く用いられ、これらの研究はヒトの老化や病への理解につながると期待されている。我々は分裂酵母を用い、細胞レベルで経時寿命に影響する因子の解析を通して老化や寿命に関する普遍的なメカニズムを解明すべく研究を行っている。その中で近年、高発現することで分裂酵母の経時寿命を延長させる遺伝子 *ecl1*⁺ を発見した。しかし、この *ecl1*⁺ が具体的にどのようにして分裂酵母の経時寿命を延長しているのかについては依然不明である。本研究では Ecl1 の機能解明を目的とし、発現機構解析を行った。

【方法・結果】

酵母には、異なる定義をもつ 2 種類の寿命が存在する。その一つである「分裂寿命」は細胞の分裂能と定義され、もう一方の「経時寿命」は、分裂しない細胞集団の平均および最大生存期間と定義される。分裂酵母の「経時寿命」は増殖定常期へ進入後の生存率を経時的に測定することで解析できる。近年、我々は高発現することで経時寿命を延長させる遺伝子 *ecl1*⁺ を発見した。その経時寿命を延長させる具体的なメカニズムの解明を目的とし、本研究では Ecl1 の mRNA やタンパク質の発現量の変化に着目し、まず細胞周期や細胞増殖に従ったタンパク質の発現の変化について解析を行った。その結果、Ecl1 は細胞が対数増殖期から定常期に移行する際、発現量を上昇させることが分かった。この現象の要因としては窒素源の枯渇や炭素源の枯渇が予想され、これらの条件下における Ecl1 の発現を調べたところ、窒素源の枯渇により発現量が上昇することが明らかとなった。そこで、Ecl1 と窒素源の枯渇に応答する経路との関係について更なる解析を行った。

P 23

ビーズディスプレイ法によるチロシンキナーゼ Csk 新規活性検出法の確立

○長屋 貴士, 兒島 孝明, 中野 秀雄 (名大院生命農)

【目的】

プロテインキナーゼは細胞内において増殖・分化・免疫応答など生命活動の中心的な役割を担っている分子である。そのため創薬等多方面の分野でこれらの分子の網羅的機能解析法の確立が囑望されている。本研究は、磁性マイクロビーズ上に提示させた蛋白質をキナーゼによりリン酸化し、フローサイトメトリーを用いてリン酸化されたアミノ酸を検出するという新規活性検出技術の開発を試みることを目的とした。

【方法・結果】

GST 及び His タグと非受容体型チロシンキナーゼ Csk(C-terminal Src kinase)の基質ペプチド(EGQYQPQP, KKKKEEIYFFF)との融合蛋白質を無細胞合成系により発現させ、抗 His タグ抗体を固定化した磁性マイクロビーズ上に提示させた。このビーズ-蛋白質複合体に対して Csk によるリン酸化反応、FITC 標識抗リン酸化チロシン抗体による免疫染色を行いフローサイトメトリーによる活性検出を行った。その結果、Csk の基質ペプチドを保持するビーズにおいて基質間の特異性に対応した蛍光強度の差異を検出することができ、この検出法がプロテインキナーゼの基質スクリーニングにおいて効果的な手法であることが示唆された。現在、この手法を応用し、エマルジョン PCR を用いたビーズ-DNA ライブラリーを用いた Csk 基質スクリーニング手法の確立を試みている。

P 24

ペペリジンアルカロイド Azimic acid, Carpamic acid の合成研究

○小木曾将也, 真壁秀文 (信州大院農)

【目的】

1967年に *Azima tetracantha* と *Carica papaya* から二量体ペペリジンアルカロイドである azimine と抗腫瘍活性を有する carpaine が単離・構造決定された。本研究では azimine と carpaine をそれぞれ加水分解して得られる単量体のペペリジンアルカロイド azimic acid と carpamic acid を目的化合物とした。これらの構造的特徴として、2,6-*cis* 型のβ-ヒドロキシペペリジン環を有するカルボン酸であることが挙げられる。また、当研究室では2003年に2,6-*cis* 型のペペリジン環を有する(-)-cassineの全合成が達成された。そこで、本研究ではこの合成法を用い、2価パラジウム触媒による立体選択的な環形成反応を鍵反応として天然物を合成することを目的とし、azimic acid と carpamic acid の全合成を行うこととした。また、azimic acid と carpamic acid から二量体である azimine と carpaine も合成可能であると考えられる。

【方法・結果】

1,4-ブタンジオールを出発物質として Sharpless 不斉エポキシ化反応、光延反応などを経て、環化前駆体であるアリルアルコールを19段階で合成した。その後、2価パラジウム触媒である PdCl₂(MeCN)₂を用いて環化反応を行ったところ、*cis*、*trans* 選択比が98:2で目的とする2,6-*cis* 型のペペリジン環を得た。続いて、得られたペペリジン環部分と別途合成した側鎖部分とを第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒によるクロスメタセシスに供した後、脱保護と接触水素添加による二重結合の還元を行った。現在は、続く酸化の方法と二量体の合成法を検討している。

茶カテキンの LDL 受容体活性化機構

○森一浩, 齋藤裕樹, 後藤剛, 長岡利(岐阜大学・応用生物科学部)

【目的】

高い血漿 LDL レベルは動脈硬化症等のリスク増加につながる事が知られている。LDL レベルは主に肝臓で発現している LDL 受容体 (LDL-R) によって調節を受けるため、LDL-R を活性化する因子を探索し、その機構を解明することが求められている。当研究室では、茶に含まれるポリフェノールであるエピガロカテキンガレート (EGCG) がヒト肝臓細胞である HepG2 細胞において LDL-R mRNA レベルを上昇させ、また LDL を構成する主要タンパク質であるアポリポタンパク質 B レベルを減少させることを報告してきた。しかし、EGCG による LDL-R 活性化機構の詳細は未だ不明な点が多い。本研究では、HepG2 細胞における EGCG による LDL-R 活性化機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】

〈実験 1〉HepG2 細胞に JNK 経路、ERK 経路、p38 経路の阻害剤をそれぞれ添加し、EGCG を添加して 24 時間培養後、全 RNA を回収して LDL-R mRNA レベルに対する影響を検討した。また、LDL-R の代謝関連因子である PCSK9 の mRNA レベルへの影響も検討した。JNK 経路阻害群では、EGCG による LDL-R mRNA レベルの上昇が消失し、また、EGCG による PCSK9 mRNA レベルの有意な低下が観察された。〈実験 2〉HepG2 細胞に EGCG を添加して培養し、細胞質タンパク質を回収して、JNK 経路への影響を検討した。EGCG 添加群で JNK 経路の活性化が観察された。〈実験 3〉HepG2 細胞に LDL-R 遺伝子プロモーター部を含むルシフェラーゼプラスミドを遺伝子導入し、EGCG の転写活性化への影響を検討した。EGCG 添加による転写活性化は観察されなかった。以上の結果より、EGCG は JNK 経路を介して LDL 受容体を活性化することを発見した。

リグナンと相互作用をする血清中タンパク質の探索

○工藤絵美, 今井邦雄, 勝崎裕隆 (三重大院生資)

【目的】

ゴマには様々なリグナンが含まれている。ゴマを摂取した場合、このリグナンが様々な生物機能活性を示す。しかしリグナンがどの様に体内で輸送されるかは、まだ解明されていない。そこで、血液中でのリグナン輸送形態を検討することを目的として実験を進めることとした。リグナンの輸送には何らかの輸送タンパク質が関与すると仮定して、血清成分や主な血清中タンパク質を用いて、リグナンとの相互作用を検討した。

【方法・結果】

リグナンであるセサミンとセサモリンをゴマより得るために、各種クロマトグラフィーにより精製した。それらの構造確認は、質量分析および NMR により行った。得られたリグナンと血清成分を混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより相互作用の有無を確認した。まずセサミンと血清成分を混合してゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析したところ、高分子溶出画分にセサミンのピークが検出された。これは、血清成分中の何らかの高分子とセサミンが相互作用を持つことを示唆していた。そこで、血清成分中の輸送タンパク質として知られている、アルブミンと α 酸性糖タンパク質を用いて、同様にゲルろ過クロマトグラフィーによる分画、および HPLC による分析を行った。その結果、セサミンはアルブミンとは相互作用を示さないが、 α 酸性糖タンパク質とは相互作用を示すという結果が得られた。またセサモリンについても同様の実験を行ったが、セサモリンは血清成分とは相互作用を示すが、アルブミンや α 酸性糖タンパク質とは、相互作用を示さないことが示唆された。

ルイス酸を用いた procyanidin C2 の合成研究

○大泉由希子, 眞壁秀文 (信州大院農)

【目的】

Procyanidin 類はポリフェノール的一种であり、茶葉や穀物、リンゴやブドウなどの果実に多く含まれている。Procyanidin 類の生理活性は抗酸化作用を始め、動脈硬化抑制活性、発ガン抑制作用と多岐にわたる。しかし、植物体からの単離により純粋な試料を多量に入手することは困難である。また、現在までに報告されている合成例では、求電子剤に対し求核剤を過剰に用いているため効率的とは言えない。従って、本研究では基質を等量用いた縮合反応を行うことで、より効率的な合成方法の確立を目的とした。

【方法・結果】

本研究の目的化合物である procyanidin C2 は (+)-catechin の 3 量体であり、単量体の求電子剤と 2 量体の求核剤の縮合反応により合成できる。まず、(+)-catechin 由来の求電子剤と求核剤を等量用いた縮合反応により procyanidin 2 量体を合成した。2 量体の縮合反応において、種々の条件検討を行った結果、ルイス酸に $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ 、求電子剤のアルコキシル基にエトキシエチル基を用いた条件で 80% と高収率で 2 量体を合成することができた。次に、得られた 2 量体から合成した求核剤と別途 (+)-catechin から 3 段階で合成した単量体の求電子剤を等量用いて AgBF_4 による縮合反応を行った結果、収率 72% で procyanidin 3 量体を得ることができた。今後、保護基の脱保護を行い、目的化合物である procyanidin C2 の合成を完了する予定である。

生細胞蛍光イメージング技術を用いた Ca^{2+} シグナルによる細胞内物流システム制御機構の解析

○杉浦洋文, 柴田秀樹, 横山 健, 人見清隆, 牧 正敏 (名大院生命農)

【目的】

真核細胞のタンパク質の約 3 分の 1 が小胞体で合成されると見積もられている。小胞体に取り込まれたタンパク質は、その後、細胞外や機能すべきオルガネラに選別輸送される。COPII 小胞は、小胞体の特定の領域 ERES (endoplasmic reticulum exit site) から出芽する輸送小胞である。我々は、以前、5 つの EF-hand 構造を持つ Ca^{2+} 結合タンパク質 ALG-2 が、COPII 小胞外殻の構成タンパク質 Sec31A に Ca^{2+} 依存的に結合し ERES に動員されることを報告した。本研究では、細胞内物流システムにおける ALG-2 の生理的役割の解明を目指した。

【方法・結果】

HEK293 細胞に STREP タグを付加した Sec31A を発現させプルダウン実験を行なった結果、ALG-2 とともに Ca^{2+} /リン脂質結合タンパク質 annexin A11 (AnxA11) が Ca^{2+} 依存的に検出された。また、AnxA11 融合緑色蛍光タンパク質 (AnxA11-GFP) と Sec31A 融合赤色蛍光タンパク質 (Sec31A-RFP) を恒常的に発現する HeLa 細胞を作出し、ヒスタミン刺激により Ca^{2+} 振動を誘発したところ、AnxA11-GFP の Sec31A-RFP 陽性の ERES への周期的な動員が観察された。さらに、RNA 干渉法により ALG-2 の発現を抑制した細胞では、AnxA11 の周期的な集積は観察されず、さらにこの細胞に ALG-2 を強制発現させることで AnxA11 の集積が回復した。よって、ALG-2 が Sec31A と AnxA11 の会合を橋渡しし、AnxA11 を ERES へ動員していることが明らかとなった。次に、AnxA11 を比較的多く発現する HT1080 細胞を用いた間接蛍光抗体法により、内在性 AnxA11 が Sec31A 陽性の ERES に局在していることを確認した。また、Sec31A-GFP を恒常的に発現する HT1080 細胞を作出し、Sec31A と ERES 膜との結合を光褪色後蛍光回復法 (FRAP) により速度論的に解析した結果、ALG-2 及び AnxA11 の発現抑制により、Sec31A-GFP の ERES での安定に局在する割合が有意に減少していた。これらの結果から、ALG-2 は ERES に AnxA11 を動員し、Sec31A の ERES での安定な滞在に寄与していることが明らかとなった。

枯草菌テイコ酸枯渇株に関する研究

○柳澤信¹, 野沢純代¹, 志田敏夫¹ (信大院工学系応用生物)

【目的】枯草菌などのグラム陽性細菌は、細胞膜の外側に分厚い細胞壁を持っている。細胞壁は主にペプチドグリカンと陰イオンポリマーであるテイコ酸から構成されている。細胞壁のペプチドグリカンは主に菌体の形態維持に、テイコ酸は外環境からの影響、すなわち抗生物質や有害物質から菌体を保護すると考えられている。テイコ酸合成には8種類の一連のTag酵素が働く。その内2番目に働く酵素TagAが欠損すると、テイコ酸の合成が初期段階で阻害されて、細胞壁のテイコ酸は枯渇する。本発表では、テイコ酸合成酵素のTagAの発現を抑制することにより、人為的にテイコ酸を枯渇させた枯草菌の細胞形態および種々薬剤に対する感受性を調べた。

【方法・結果】TagAの発現をキシロース添加により調節することができる枯草菌変異株を用いた。野生株に比べ増殖がかなり遅く、野生株の約半分程度の菌体濃度で定常期を迎えた。TagA発現が抑制され、結果的にテイコ酸が枯渇した菌体の形態を観察したところ、不定形に肥大化する形態異常が生じていた。この形態異常を示している菌体は、培地にキシロースを添加してTagAの発現を誘導すると正常な桿菌状に戻った。このことからテイコ酸が桿菌の形態維持に重要な役割を担っていることが分かった。またテイコ酸枯渇株は遊走性を失うことが分かった。テイコ酸が枯渇した枯草菌の様々な薬剤(抗生物質、重金属イオン、界面活性剤など)に対する耐性(感受性)を拡散法によって調べた。その結果、細胞壁の合成を阻害する抗生物質や界面活性剤に対して感受性が増加した。重金属イオン(Mn²⁺, Cu²⁺)に対しては感受性が低下した。現在、形態異常が生じ、遊走性を失ったテイコ酸枯渇株の鞭毛の有無などについてより詳細な研究を進めている。

茶カテキン類とヒト血清アルブミンとの相互作用解析

○勝間田知治, 石井剛志, 中山 勉(静岡県大・食品栄養)

【目的】

茶カテキン類は、血中に最も多く存在するヒト血清アルブミン(HSA)と相互作用する。しかし、カテキン類とHSAとの結合構造に関する詳細は明らかになっていない。本研究では、カテキン類の化学構造の違いがHSAとの結合構造に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

カテキン類として、エピカテキン(EC)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(ECg)およびエピガロカテキンガレート(EGCg)を用いた。まず、4種のカテキン類をヒト血清中に加えてインキュベートした。各試料を一定量ずつゲル濾過カラムで分画し、各画分のタンパク質含量およびカテキン含量をそれぞれBradford法およびレドックスサイクリング染色法により解析した。これらの結果より、カテキン類が血清タンパク質と相互作用していることを確認した。次に、EGCgをセファロースビーズに結合させたEGCg結合ビーズを作製し、ヒト血清中でインキュベートした後に、プルダウン法により相互作用するタンパク質を精製した。精製したタンパク質は二次元電気泳動に供して質量分析法により解析した。その結果、カテキン類と親和性の高い血清タンパク質としてHSAを同定した。そこで、pHの異なる複数の緩衝液中にHSAを溶解し、4種のカテキン類を加えて抗酸化剤の存在下あるいは非存在下でインキュベートした。Native電気泳動あるいはSDS電気泳動に供した後に、レドックスサイクリング染色法により解析した。その結果、(1)EGCが他の3種のカテキン類に比べてHSAと共有結合し易いこと、(2)ガロイル基を有するECgやEGCgはHSAと非共有結合し易いこと、(3)B環に水酸基を2つ持つECやECgはHSAと共有結合し難いこと、(4)EGCgは酸化の影響により非共有結合だけでなく共有結合によってもHSAと相互作用することが確認された。

アンズ由来カロテノイドに期待されるアルツハイマー型認知症予防効果

○小川紘史, 片山茂, 中村宗一郎 (信大院農)

【目的】最近, 様々な食品中のポリフェノール類がアルツハイマー型認知症の予防に有効であることが明らかにされつつある。食品成分表を検索するとアンズは特に多くのカロテノイド類が含まれていることが示された。そこで, 本研究ではアンズからカロテノイド類を抽出し, アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイド- β ($A\beta$) を用いて, アミロイド線維形成阻害効果を調べることにした。加えて, 本研究ではアミロイドの細胞毒性には線維形成時に発生する活性酸素種 (ROS) の関与が示唆されている事から, ROS の消長についても追跡したので報告する。

【方法・結果】 $A\beta_{1-42}$ の線維形成は, チオフラビン T を用いた *in vitro* アッセイと, 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって行った。その結果, アンズのカロテノイド抽出物は優れた $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維形成阻害効果を示す事が明らかになった (図 1)。このことは, 抗 $A\beta$ オリゴマー抗体 A11 および抗 $A\beta$ 線維抗体 OC を用いたドットブロット解析によっても確認された。ラット副腎髄質褐色細胞胚由来の PC12 細胞を用いて, カロテノイド抽出物の抗アミロイド効果を調べた結果, 強い抗 ROS 活性を示す事が確認された。以上のように, アミロイド線維形成を物理的に阻害する効果と ROS 除去による細胞保護効果の 2 つの効果からアンズ由来カロテノイドはアルツハイマー型認知症予防が期待される事が示唆された。

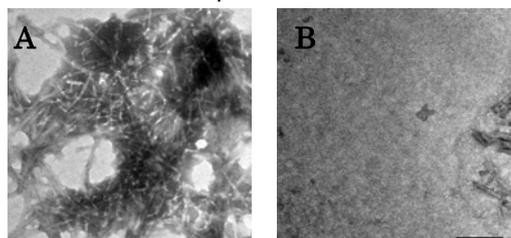


図 1 アミロイド線維形成の比較
(A) $A\beta_{1-42}$; (B) カロテノイド添加時の $A\beta_{1-42}$

置換基の違いによるフラボン類の抗変異原性の変化に関する研究

○池田龍一, 湊健一郎, 小原章裕 (名城大院農)

【目的】

これまでの報告により, OH 基が結合することにより, フラボン類の抗変異原性が増加することを明らかにした。しかし, 自然界では他に OMe 基が結合したものもあるため, それら, OH 基以外の置換基が抗変異原性に与える影響を調べる必要がある。そこで今回, 置換基として OH 基及び OMe 基を有するフラボン類を用い, これら置換基の違い (置換数, 置換位置) と抗変異原性との関連を検討することを目的とする。

【方法・結果】

本実験では, 置換数・置換位置が異なるフラボン類を用いた。抗変異原性試験は, *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA100 を用いた Ames 試験の変法である pre-incubation 法により, 直接変異原物質 (1-NP, 4-NQO, MNNG) 及び間接変異原物質 (Trp-P-1) に対する抑制率を測定した。さらに, Trp-P-1 に対する抗変異原性のメカニズムについて, 変異原物質や S9 mix に作用する脱変異原性または変異した遺伝子を修復する生物学的抗変異原性のどちらに起因するのか検討した。その結果, S9 mix に作用していることが示唆された。また, モノヒドロキシフラボンにおいては, 3-ヒドロキシフラボンが 1-NP に対して高い抗変異原性を示し, モノメトキシフラボンにおいては, 3-メトキシフラボンが高い活性を示した。よって, モノ置換フラボンの場合, C 環の 3 位に置換することで活性が高くなることがわかった。また, 3,4'-ジヒドロキシフラボンが 1-NP 及び Trp-P-1 に対して 3-ヒドロキシフラボンよりも高い活性を示した。一方, 3,2'-ジメトキシフラボンは, 3-メトキシフラボンよりも低い活性を示した。このことから, 置換数及び置換位置の変化により, 抗変異原性に差異が生じることが明らかになった。

血管平滑筋細胞の遊走における核小体タンパク質 B23 の機能解明
 ○濱口真梨子, 細川昌彬, 西尾昌洋, 梅川逸人 (三重大院生物資源)

【目的】

動脈硬化のメカニズムでは、血管平滑筋の増殖、遊走が動脈硬化形成のステップの一つとなっており、治療法として血管新生を惹起させる。一方、核小体タンパク質 B23 は、細胞増殖に関与する機能性タンパク質であることが知られている。そこで、血管新生に関わる血管内皮増殖因子(VEGF)に着目し、VEGF 刺激した血管平滑筋細胞における B23 の発現と局在を検討した。

【方法・結果】

ラット VSMC は胸部大動脈から摘出して、培養した。VSMC における血清の有無での効果を見るため、抗 B23 抗体及び α -アクチン抗体を用いた形態観察を行った。B23 は、無血清では核質や核周辺の細胞質に血清刺激では核小体に局在し、細胞増殖には B23 の核小体の局在が重要であることが示唆された。

A-10 はラット胎児胸部大動脈由来の細胞株で、VSMC の特性を持った細胞である。VEGF と A-10 の遊走の関係を調べるため、細胞を一定の幅で剥がし、12 時間後の傷幅を撮影、数値化した。血清処理が最も傷幅を減少させ、VEGF 処理も VEGF 未処理よりも傷幅を減少させた。

次に、VEGF 刺激による平滑筋細胞の遊走には、B23 の発現が関与しているのかを検討した。VSMC における B23 の発現量は、VEGF 未処理は減少したが、VEGF 刺激での減少はほとんどなかった。

一方、A-10 において VEGF 刺激は VEGF 未処理よりも B23 の発現を増加させた。

以上の結果より、VEGF は血管平滑筋細胞を遊走させ、その遊走に B23 が関与している可能性が示唆された。

B23 の神経細胞における細胞死について
 ○向井工智, 西尾昌洋, 梅川逸人 (三重大院生物資源)

【目的】

今研究は、真核細胞の増殖時に発現と核小体局在が生じるとされる多機能性タンパク質 B23 が、どのように非増殖細胞で機能しているのかの解析を目的とする。さらに、神経疾患の原因の一つと考えられるキノリン酸 (QA) が海馬神経細胞に損傷を起こすとき、どのように B23 が機能するのかを明らかにすることを目的とする。

【方法】

NB2a (マウス神経芽細胞) を用いて、分化誘導剤 (palmitoylcarnitine) で細胞を分化させ、軸索形成と分裂停止を生じさせた後、B23 を蛍光免疫染色した。

ラット (Wister, 雄性) での海馬の B23 の発現をウエスタンブロット法で検討した。海馬での B23 の細胞内局在を調べるため、凍結切片を作製し、蛍光免疫染色を行った。海馬で QA 刺激による細胞死誘導を起こし、B23 に対する影響を検討した。ラットを麻酔下で脳定位固定装置に固定し、左右脳室に PBS, 右脳海馬に 50 mM QA を 1 μ L 投与して 24hr 後、TUNEL 法を用いて QA による海馬でのアポトーシスについて検討した。また、B23 の蛍光免疫染色で QA による B23 の局在変化を確かめた。

損傷海馬の保護に ROCK 阻害剤 (fasudil) が効果を示すかの検討をした。ラットを脳定位固定装置に固定し、1 mM fasudil を 10 μ L 両脳室に投与し、QA を海馬に投与した。凍結切片にし、B23 と ROCK に関わる pB23/Thr198 の蛍光免疫染色を行った。

【結果】

B23 は NB2a の軸索形成と分裂停止で核および核正体に局在して、存在部位に変化が無いことが明らかとなった。正常なラットの海馬では B23 の発現が確認でき、局在は顆粒状細胞の核小体部位であった。QA 刺激で核小体に局在を示していた B23 が細胞質に移行した。QA 誘導のアポトーシスは、fasudil により TdT 陽性細胞の減少より抑制されることが確認できた。Fasudil を脳室に投与することで正常海馬に存在する pB23/Thr198 の核小体局在が消失することが明らかとなった。

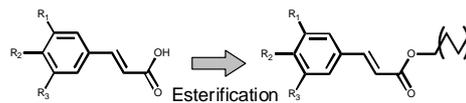
神経細胞ではアポトーシス初期で B23 が局在変化し、ストレスセンサーとして作用する可能性が考えられた。fasudil の効果として QA による神経損傷に対する保護が示された。

桂皮酸誘導体のリポフィル化は A β アミロイド線維形成阻害作用を向上する

○近藤葉月, 小川紘史, 森本賢右, 片山茂, 中村宗一郎 (信大院農)

【目的】種々のフェノール性化合物に, A β ペプチドのアミロイド線維形成を阻害する作用が知られている. これまでの研究で, この作用は, フェノール性化合物の疎水性に強く影響されることが示唆されている. また, 分子の疎水性は生理活性物質の生体内挙動において重要なファクターであることから, 本研究では, 桂皮酸誘導体をモデル化合物とし, これらの抗アミロイド作用にリポフィル化が及ぼす影響を調べた.

【方法・結果】各種桂皮酸誘導体と鎖長の異なる脂肪族アルコールを Novozym 435 存在下で 60°C, 1 週間インキュベーションし, エステルを合成した. 得られたリポフィル化桂皮酸誘導体は, 未修飾のものに対し, A β に対するアミロイド線維形成阻害作用の向上が認められた. 加えて, リポフィル化桂皮酸誘導体の疎水性度, Log P (octanol/water) を測定した結果, 生体吸収に必要な Log P > 5 を満たしていることが確認された. これらのことから, リポフィル化は桂皮酸誘導体の抗アミロイド活性向上の有用な手段であると明らかにされた.



R ₁	R ₂	R ₃	
H	H	H	Cinnamic acid
H	OH	H	Coumaric acid
OH	OH	H	Caffeic acid
OCH ₃	OH	H	Ferulic acid
OH	OCH ₃	H	Isoferulic acid
OCH ₃	OH	OCH ₃	Sinapinic acid

リポフィル化桂皮酸誘導体の構造

ヒト表皮型タンパク質架橋化酵素 (TGase 3) の高反応性基質配列の同定

○福井美奈, 山根亜沙佳, 伊藤みほ, 柴田秀樹, 牧正敏, 人見清隆 (名大院・生命農)

【目的】

タンパク質架橋化酵素であるトランスグルタミナーゼ (以下 TGase) 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架橋する酵素である. 本酵素は皮膚表皮形成に必須で, 表皮細胞の分化に伴い, 構造タンパク質を架橋重合する. ヒトでは 8 つのアイソザイムが存在するが, 表皮形成においては, TGase 1 と TGase 3 がこれを担っている. 我々はファージ提示型ランダムペプチドライブラリを用いて, 高い反応性を有する基質ペプチド配列を同定する検索系を確立し, 主要なアイソザイム (TGase 1, TGase 2, Factor XIII) について高反応性配列を得てきた. 本研究では同様のアプローチにより, TGase 3 の高反応性基質配列を得る事を目的とした.

【方法・結果】

12 残基のランダムなペプチドを提示するファージライブラリーと, ビオチン標識アミンとを TGase 3 で反応させ, 標識アミンを取り込んだファージを選別した. これを増殖させ, さらに架橋反応と選別を繰り返した. その結果, ファージに提示される配列にはグルタミン残基を含む一定の傾向が見られた. 選別した配列の反応性を評価するために, ペプチド配列を GST (glutathione-S-transferase) との融合タンパク質として大腸菌で発現・精製して解析し, 反応性の高い配列を選んだ. 最も反応性・特異性に優れていた配列の標識ペプチドを合成し, これが同様に高い反応性を有することを確認した. また, 選んだ配列についてはアラニン置換変異体を作製し, 反応に関わるアミノ酸残基について検討した.

Yamane and Fukui et al. FEBS J. 277, 3564-3574 (2010)

P 37

タンパク質架橋化酵素の高反応性基質ペプチドを活用したマウス全組織内酵素活性の可視化
○伊藤みほ¹、川本忠文²、柴田秀樹¹、牧正敏¹、人見清隆¹ (¹名大院生命農、²鶴見大学・歯)

【目的】タンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質中の特定のグルタミン残基とリジン残基とを、共有結合により架橋形成させる酵素である。高等動物では、8種類のアイソザイムが同定されており、生体内の様々な部位でそれぞれ異なったタンパク質を基質として架橋修飾することにより、多彩な生命現象に関与している。例えば TGase 1 は表皮細胞の角化を通じて皮膚形成に必須であり、TGase 2 は多様な組織に広く存在して細胞死や細胞接着に関与する。しかしまだ、これらの酵素群の詳細な局在部位や生理的役割については不明なことも多い。そこで本研究では、これまで得られた各 TGase の高反応性の基質配列(グルタミン残基供与)として働くペプチドを用いて、各組織におけるアイソザイム特異的な酵素活性の可視化を目的として実験を行った。

【方法・結果】マウス凍結組織切片を乾燥およびブロック後、FITC で蛍光標識した高反応性基質配列のペプチドを含む反応溶液を添加してインキュベートした。洗浄ののち、蛍光顕微鏡にて観察を行った。この操作により、内在性の TGase によって、リジン残基を提供するタンパク質と、高反応性基質配列ペプチドのグルタミン残基が架橋構造を形成した。組織切片の蛍光を観察したところ、架橋産物の検出が可能であった。いくつかの組織で条件検討後、7日齢マウスの全身凍結切片を用いて各臓器、組織での TGase の局在を解析した。その結果 TGase 1, TGase 2 について、生体内の各組織に存在する各アイソザイムの酵素活性を特異的にかつ高感度で可視化することができた。

J. Biol. Chem. 281, 17699 (2006), FEBS J. 275 5667(2008), J. Histochem. Cytochem. in press

P 38

DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine による DNA 複製依存的 DNA 二本鎖切断誘導には DNMT1 と UHRF1 が関与する
○中林 裕貴¹、杉村 和人²、境 和臣¹、伊藤 克¹、奥村 克純¹ (¹三重大院・生資・分子細胞生物学、²三重大院・医・機能プロテオミクス)

【目的】

5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)は DNA methyltransferases (DNMTs)の阻害剤であり、白血病と関連がある骨髄異形成症候群の治療薬の1つである。その作用機序として、DNA メチル化阻害によるがん抑制遺伝子の活性化がよく知られているが、一方、DNA 損傷を誘導することも示されている。しかし、5-aza-dC がどのようなメカニズムで DNA 損傷を誘導しているかについての詳細は不明である。本研究では、5-aza-dC の細胞毒性に関して、DNA 損傷誘導機構と DNA 損傷応答機構の観点からの解明を目指した。

【方法・結果】

5-aza-dC 処理細胞は S 期の進行が遅延し、G2 期で細胞周期は停止した。5-aza-dC 処理により γ -H2AX や Rad51 の foci 形成が核内で見られたことから、DNA 二本鎖切断が誘導されていることがわかった。また、 γ -H2AX foci の形成は S 期の間で一時的に起こり、複製中の DNA 領域と高頻度に共局在した。このことから、DNA-DNMTs 架橋構造が複製フォーク進行における障害物となっていることが推測された。実際、複製フォークの進行を molecular combing 法を用いて可視化解析したところ、5-aza-dC 処理により複製フォークの進行速度が著しく減速した。DNMT1 ノックダウンにより、5-aza-dC 処理による γ -H2AX レベルの上昇率は有意に抑制された。また、興味深いことに、ヘミメチル化 DNA に特異的に結合する UHRF1 ノックダウンによっても 5-aza-dC 処理後の γ -H2AX レベルの上昇は有意に抑制された。これらの結果から、5-aza-dC による DNA 損傷誘導は DNMT1 と UHRF1 のクロマチン DNA への不秩序な結合が原因であると考えられた。

分裂酵母の経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリーの機能発現に重要なアミノ酸の解析
 ○内藤知佳子¹, 大塚北斗¹, 村上浩士², 饗場浩文¹ (¹名大院生命農, ²名市大医)

【目的】

当研究室で発見された Ecl1, Ecl2, Ecl3 は、分裂酵母に高発現すると経時寿命を延長する小さなタンパク質であるが、これら Ecl1 ファミリータンパク質が経時寿命を延長する具体的な機構は不明である。

Ecl1 ファミリータンパク質間には 4 つのシステインが共通して保存されている。Cys 残基が細胞内で重要な役割を担う例が多数報告されていることから、Ecl1 ファミリーの機能においても Cys が重要な役割を担っている可能性があると考え、Ecl1 ファミリーに保存された Cys の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

Ecl1 の 4 つの Cys をそれぞれ Ser に置換した変異 Ecl1 を作製し、分裂酵母において高発現した際の表現型を解析した。その結果、いずれの Cys に変異を加えた場合にも、経時寿命延長や過酸化水素耐性の上昇といった Ecl1 高発現による効果が減退または完全に失われた。したがって、Ecl1 における 4 つの Cys の働きは等価であり、Ecl1 の機能には全ての Cys が存在する必要があることが分かった。さらに Cys 変異により、Ecl1 の mRNA 量は変化しないにも関わらずタンパク量が大きく減少することを見出した。Cys 変異によって Ecl1 タンパク質の安定性が減少する、あるいは翻訳が抑制されることによりタンパク質発現量が減少し、その結果経時寿命延長や過酸化水素耐性の上昇といった高発現の効果が失われたのではないかと考えている。更に、SH 試薬である AMS(4'-Acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid)を用いて解析を行ったところ、Ecl1 の 4 つの Cys は細胞内ですべて還元状態で存在しており、ジスルフィド結合や他の因子との共有結合は形成していないことが分かった。

ビタミン B₆ 摂取が大腸内環境に及ぼす影響

○陳 碧霄¹, 鷺津陽介², 山本紘平³, 中川智行^{1, 2, 3}, 早川享志^{1, 2, 3}
 (¹岐阜大応生研,²岐阜大応生,³岐阜大連農)

【目的】

大腸内環境は食事内容により、影響を受ける。近年、日本において高タンパク質、高脂肪、低食物繊維という食生活の欧米化により大腸内環境が悪化し、大腸ガンを含めた大腸疾患が増加している。アンモニア、フェノールや硫化水素などの腐敗産物が大腸粘膜と長時間接するため、様々な大腸疾患を引き起こすと考えられる。最近ではビタミン B₆ (B₆) 摂取量と大腸ガンとは逆相関があることが報告されている。また、今まで、B₆ の大腸ガン発症抑制効果についての実験はコホート研究で有効であることが示されている。本実験では、B₆ を添加した飼料がラットの大腸内環境に与える影響を検討した。

【方法・結果】

実験 1 では通常飼育条件下でラットに 1 mg PN-HCl/kg, 7 mg PN-HCl/kg, 35 mg PN-HCl/kg の 3 段階濃度の B₆ を含む飼料を投与し、B₆ 摂取量の多寡が大腸内環境にどのように影響するのかを検討した。実験 2 では、大腸内環境を悪化させるため、5%チロシンを加え、B₆ 摂取量の多寡による大腸内環境の改善効果について検討した。大腸内環境について調べるため盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量およびフェノール化合物(フェノール, *p*-クレゾール)の測定を行った。また、糞中の総 B₆ 量を測定し、尿中のフェノール化合物量も測定した。結果として、実験 1 では、B₆ 摂取量の増加による盲腸内のフェノール化合物量の減少方向および尿中のフェノール化合物量の有意な低下効果がみられた。一方、短鎖脂肪酸への影響は見られなかった。実験 2 では、B₆ 摂取量の増加による盲腸内のフェノール化合物量の有意な減少および尿中のフェノール化合物の減少方向が認められた。

香気成分 *n*-hexanal による神経伝達物質放出促進作用とその作用機序に関する研究

○加古大也¹, 小林葉子^{1,2}, 横越英彦¹

(¹ 静岡県大院・生活健康科学・グローバル COE, ² 桐生大・医療保健)

【目的】野菜や果物などに含まれる緑葉の香りはみどりの香りと呼ばれる。このみどりの香りの嗅覚を介さない刺激が神経伝達物質ドーパミンの放出を促進することを、ラット脳切片や神経様細胞、ラット生体を用いた研究から見出している。しかし、この放出に関わる作用機序は不明なままである。そこで、この作用機序について、ラット脳マイクロダイアリス法を用いて研究を行った。

【方法】ラット脳線条体部へ透析用プローブを挿入し、マイクロダイアリス法を用いてサンプル投与及び脳内物質の回収を同時に行った。線条体へ Ringer 液を灌流しドーパミン放出量が安定したことを確認した後、*n*-hexanal を灌流しドーパミン放出量の変化を測定した。また、カルシウムを含まない Ringer 液や細胞内カルシウム除去剤 BAPTA-AM を用いて *n*-hexanal によるドーパミン放出作用のカルシウム依存性について、ドーパミン再取り込み阻害剤 nomifensine を用いて再取り込みとの関連性について検討した。

【結果及び考察】*n*-hexanal を線条体へ灌流させることでドーパミンの放出量の有意な増加が見られた。0.01%*n*-hexanal によるドーパミンの増加は、細胞内外のカルシウム濃度を低下させることで抑制された。しかし、0.05%*n*-hexanal においては細胞外カルシウム濃度を減少させてもドーパミンの放出が見られた。ドーパミン再取り込み阻害剤を灌流させることでドーパミン量は増加し、さらに阻害剤存在下で 0.01%*n*-hexanal を灌流させるとドーパミン量は相加的に増加した。

以上から、*n*-hexanal はラット脳線条体においてドーパミンの放出を増加させ、その放出増加は細胞内外のカルシウムが関わること、再取り込み阻害作用による見かけのドーパミン量の増加ではないことが確認された。また、投与する *n*-hexanal の低濃度域と高濃度域で作用が異なる可能性も示唆された。

カテキンのルチノシル化はアレルギー改善作用を強化させる

○山内雄貴, 葛西雅博, 久木田卓弥, 片山 茂, 中村宗一郎 (信大農)

【目的】近年、花粉症などのアレルギー患者の増大が社会問題になっており、アレルギー症状の克服に関する研究が注目を集めている。フェノール化合物は抗酸化能や免疫制御能を持つことが知られている。そこで本研究では、フェノール化合物にルチノースという糖を付加することによってよりパワフルな免疫制御能を持つ新規配糖体の創製を試みた。

【方法・結果】カテキン、バニリン酸あるいはフェルラ酸とルチンを酢酸バッファー (pH5.0) に懸濁させた後、ルチナーゼ存在下で 40°C, 24 時間インキュベーションした。得られたルチノシル化フェノール化合物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離精製した。得られた新規配糖体 (図 1) を用いて、*in vitro* モデル実験系での Th1/Th2 バランス改善効果について検討した。

Balb/c マウスから採取した脾臓またはパイエル板細胞に、ルチノシル化フェノール化合物を添加して、オボアルブミン (OVA) 刺激下で、37°C, 5%CO₂, 72 時間培養し、これらの培養上清中の IL-4 および IFN- γ の動態を ELISA 法にて測定した。その結果、IL-4/IFN- γ 値は OVA 刺激によりコントロール区では顕著に上昇したが、ルチノシル化フェノール化合物を添加した系ではバックグラウンドのレベルまでに低下することが明らかにされた。この Th1/Th2 バランス改善効果は、カテキンルチノシド>バニリン酸ルチノシド>フェルラ酸ルチノシドの順となった。特に、カテキンのルチノシル化はアレルギー改善作用を強化させることが明らかとなった。



図 1 ルチノシル化カテキンの構造式

P 43

アミロイド誘発性変異シスタチンのアミロイド線維形成を阻害するフェノール酸エステルの分子モデリング

○森本 賢右, 近藤 葉月, 前田 悠樹, 片山 茂, 中村 宗一郎 (信州大農)

【目的】

フェノール化合物はアミロイド線維形成を阻害・抑制することが知られており、また、その阻害効果は、フェノール酸の疎水性の度合いによって変化することがこれまでの研究で示唆されている。そこで本研究では、遺伝性アミロイド性脳出血症の原因である変異ヒト型シスタチン (L68Q cystatin C) を標的タンパク質として用い、クロロゲン酸やカフェ酸といったフェノール酸に炭素数の異なる脂肪族アルコールをエステル化させ、そのアミロイド阻害効果を調べ、より強い抗アミロイド能を持つフェノール酸エステルの分子モデリングを試みた。

【方法・結果】

第 68 位のロイシンをグルタミンに部位指定突然変異させた L68Q ヒト型シスタチン C の cDNA をピキア発現ベクターのマルチクローニングサイトに挿入し、これを用いて *Pichia pastoris* を形質転換した。こうして創製した組換え酵母を 30°C, 3 日間振とう培養し、培養液中に分泌された L68Q シスタチンを限外濾過とサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製し、実験に用いた。一方、Novozym435 を用いてクロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸に炭素数の異なるアルキルアルコールを付加し、疎水性の異なるフェノール酸エステルを調製した。精製はオープンカラム (BUTYL TOYOPEARL またはシリカゲル) を用いて行った。また、アミロイド阻害効果は、チオフラビン T 蛍光発色法によって評価した。その結果、エステル化によってフェノール酸のアミロイド阻害効果が改善されることが明らかにされ、その効果の度合いは鎖長と相関関係にあることが示された。

P 44

DNA 複製ストレスに応答したセントロメア周辺ヘテロクロマチンの転写とヒストン修飾の解析

○金岡秀明¹, 杉村和人², 奥村克純¹ (¹三重大院・生資・分子細胞生物学、²三重大院・医・機能プロテオミクス)

【目的】

細胞は紫外線や化学物質、さらには自らの代謝産物によって DNA の複製の障害(複製ストレス)を受けるが、複製ストレス応答機構によって正常な状態を保っている。しかし、複製ストレス応答が機能しないと、細胞老化、細胞死または変異につながり、ひいては臓器の機能の低下や、ガン化に到る。

本研究ではストレス応答時のクロマチンのエピジェネティクスと転写の関係を解析できるマウスセントロメア周辺ヘテロクロマチン領域を対象とした。この領域は H3K9me3 などに富み、転写不活性なヘテロクロマチンを形成維持している。しかし近年、この領域を構成する反復配列(MaSat)由来の転写産物の存在が確認され、またその転写活性は細胞周期を通して制御されていることが示された。一方、この領域のエピジェネティクスを乱すような薬剤など、ある特定のストレスに応答して MaSat の転写が劇的に上昇することが見出された。その結果、セントロメア構造の崩壊を招くことも示されている。そこで、本研究では DNA 複製ストレスを与えた時のセントロメア周辺ヘテロクロマチンの転写活性への影響およびヒストン修飾の解析を目的とした。

【方法・結果】

マウス繊維芽細胞を、DNA 合成阻害剤であるアフィジコリンで処理し、転写活性なクロマチンに高頻度で見られるヒストン H3.3 の局在を解析したところ、H3.3 はセントロメア周辺ヘテロクロマチンに局在、蓄積することが判明した。そこで、セントロメア周辺ヘテロクロマチン領域を構成する MaSat の転写産物量を RT-PCR により解析すると、非処理細胞と比べて MaSat の転写は減少していた。また、ヒストン修飾を解析した結果、セントロメア周辺ヘテロクロマチンには非処理細胞と同様に転写不活性な修飾が局在していた。以上の結果から、複製ストレスによりセントロメア周辺ヘテロクロマチンのヒストン修飾に変化はないが、H3.3 がこの領域に局在することがマウス繊維芽細胞の一種の複製ストレス応答と考えられる。

大豆成分の脂質代謝におよぼす影響
○吉城由美子, 市川美緒, 為本祐二 (石川県立大学)

【目的】

大豆は、古くから高脂血症や高コレステロール血症の改善作用が知られており、冠状動脈性心疾患を低減させ、健康維持に対し有用である。そこで、本研究では、生活習慣病の原因となる肥満に着目し、大豆の脂質代謝への影響を調べた。高脂肪食摂取時における脂肪の代謝に大きく関与する酵素ならびに脂肪蓄積により変化するアディポサイトカインの mRNA 発現を中心に調べ、大豆 whey と配糖体画分の脂質代謝への影響と肥満抑制作用の機構解明を目的とし行った。

【方法・結果】

実験は C57BL/6J 系マウス (雄、4 週齢) を用い、実験群をコントロール食群 (CO 群)、大豆 whey 画分食群 (CW 群)、大豆配糖体画分食群 (CS 群)、高脂肪食群 (HF 群)、高脂肪食+whey 画分食群 (HW 群)、高脂肪食+大豆配糖体画分食群 (HS 群) の 6 群とし、66 日間飼育した。

体重は飼育開始 11 日目から H グループに有意な体重増加が見られ ($P<0.05$)、H グループ内では飼育 21 日目の HW 群で体重が有意 ($P<0.05$) に減少した。肝臓組織を HE 染色した結果、HF 群では組織の変形と核数の減少が顕著であったのに対し、HW 群の肝臓脂肪断面積が小さく、大豆 Whey 画分が肝臓組織への脂肪蓄積に影響することが示唆された。アディポサイトカインの mRNA 発現量を調べた結果、大豆 Whey 画分にはアディポネクチンの mRNA 発現量を増加し、IL-6 の mRNA 発現量を低減させる作用のあることが明らかとなった。

酵母細胞壁由来グルコマンナン修飾はソバ主要アレルゲン Fag e 1 の抗原提示を抑制する

○石川えり¹, 片山茂¹, 穂山浩², 手島玲子², 中村宗一郎¹ (¹信大院農, ²国立衛研)

【目的】近年、食品由来成分による食物アレルギーの改善が脚光を浴びている。我々はこれまでにソバ主要アレルゲン Fag e 1 に酵母細胞壁由来グルコマンナン (YGM) を化学的に共有結合させた低アレルゲン化抗原 (Fag e 1-YGM 複合体) をソバアレルギーモデルマウスに経口投与するとアレルギー症状が抑制することを見出している。本研究では樹状細胞様 THP-1 細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を構築し、そのメカニズムの解明を試みた。

【方法・結果】ヒト単球系細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および IL-4 を各 20 ng/ml 添加し 4 日間培養することによって、樹状細胞様 THP-1 (DC-SIGN⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺) への分化誘導を行った。一方、普通ソバ粉末より精製した Fag e 1 と YGM を重量比 1 : 1 の割合で混合溶解し、凍結乾燥した後 60°C, RH65% の条件にて一週間ドライヒーティングし複合体を調製した。Fag e 1, YGM, あるいは Fag e 1-YGM 複合体を樹状細胞様 THP-1 に添加し 3 日間培養した後、フローサイトメトリーに供した。その結果、YGM および Fag e 1-YGM 複体の添加は、CD86 および HLA-DR の発現量を低下させることが明らかになった。このことから、YGM およびその複合体には抗原提示細胞の抗原提示能を抑制する効果があると考えられ、Fag e 1-YGM 複合体を抗原特異的アレルギー改善素材として利用できる可能性が示された。

P 47

アフリカ大陸と南米大陸と日本中部地区の生物多様性に関する研究

○高村仁（高村生命科学研究所）

目的; 15億年～10億年前シアノバクテリア[水の華]より進化発生したクロロフィールにより生成されたオゾン層は地球上の紫外線を減少させた。アフリカ大陸は、霊長類の進化、大型哺乳類を頂点としたピラミット型生態系を形成した。南米はアンデス山脈、パンタナール大湿原帯、アマゾン川周辺の熱帯多雨林の鳥類では猛禽類「コンドル」を頂点としたピラミット型生態系を形成している。森林の生物多様性恒常性維持について研究を目的とすると共に、人類の白血球の染色体の Hisutone8 量体の損傷 DNA 修復酵素の生物進化の関連性について研究をしたので報告する。方法; 昭和34年5月1日～平成22年8月30日の52年間に渡り、馬籠村、蛭川村5社690本、西穂高岳、木曾御岳、白馬岳、潮の岬、那智の滝、篠島、日間賀島、蜷塚貝塚、875本、長良川船伏山～藍川橋、瑞浪市の社寺林112社、44588本、オワフ島、キリマンジェロ平原、セレンゲッティ大平原、ンゴロンゴロ大草原、パンタナール大湿原、サンパウロ州、イグアスの滝周辺、インターバレイ熱帯多雨林サントス市海岸の熱帯多雨林を調査比較した。人類の白血球染色体中に存在する損傷 DNA の修復酵素 Hisutone8 量体を寒天培養し金魚、蛤、あさりに投与オシロコープのパルス観察により判定した。

結果; 病弱金魚、蛤、あさりの Hisutone8 量体投与結果は、生命活動は活性化を示した。瑞浪市社寺林は南方系: 中間系: 北方系=1.6: 9.6: 2.5、恵那市蛭川村=17: 23: 1.0であった。蜷塚貝塚遺跡は、南方系: 中間系: 北方系: 亜熱帯系 3.0: 4.0: 1.4: 1.0であった。高山帯に於ける森林限界以上は23種の高山帯植物との稀少動物生態系は、危機にあった。森林の活性化水素、オゾンは、病原菌、黴の分解、抗酸化剤として生物多様性を恒常化した。

P 48

プロテオミクスによる哺乳類リボソームにおける不均一性の解析

○杉原 圭彦、佐土原 英司、本多 弘樹、日野 真吾、岡島 徹也¹、松田 幹、灘野 大太
(名大院生命農・¹名大院医)

【目的】

近年飛躍的に進んだゲノム解析から、哺乳類におけるリボソームタンパク質遺伝子の座位と構造が明らかになった。また同時に、リボソームタンパク質遺伝子に高い相同性を示す多くのパラログ遺伝子がゲノム上に散在することが見出された。これらの多くは偽遺伝子と推定されるが、コード領域を含み mRNA を発現している遺伝子の存在も少数ながら報告されている。パラログ遺伝子の産物がタンパク質レベルで発現しているのか、リボソームに含まれて機能しているのか、さらに生体において何らかの役割を果たすのか、現在までのところ多くが明らかにされていない。こうした状況を踏まえ我々は、哺乳類リボソームの構成タンパク質をプロテオミクス的手法によって解析してきた。

【方法・結果】

げっ歯類（主にマウス）の精製リボソームに含まれる構成タンパク質を RFHR 二次元電気泳動法によって分離し、各スポットをゲル内消化後質量分析に供した。泳動条件等の改良により、リボソームタンパク質 79 種類のうち 78 種を 1 枚のゲル上で検出することが可能になった。泳動ゲル上のリボソームタンパク質 L22 の近傍にあったマイナースポットから、そのパラログであるリボソームタンパク質 L22-like 1 が新たに同定された。また精巢リボソームから、リボソームタンパク質 L10 および L39 のそれぞれのパラログである L10-like および L39-like が同定された。mRNA レベルでの臓器分布解析からもこれら 2 種類のパラログが精巣特異的に発現していることが示された。細胞内で新規合成された L39-like タンパク質はリボソーム生合成の場である核小体に運ばれた後に、細胞質においてリボソーム大サブユニットの構成成分として翻訳途中のポリソームに存在することが判明した。

3 種類の脂肪酸合成関連酵素のマウス乳汁中への分泌

○森屋ひと美¹、内田佳奈¹、岡島徹也²、松田幹¹、灘野大太¹ (¹名大院・生命農, ²名大院・医)

【目的】

乳腺は、妊娠を期に発達と退縮のサイクルを繰り返すという特徴をもった哺乳類特有の組織である。当研究室において、泌乳中期（泌乳 10 日目、L10）および退縮初期（退縮誘導 2 日後、I2）のマウス乳汁タンパク質を比較して、L10 乳汁において多く存在しているものとして脂肪酸合成酵素（fatty acid synthase, FAS）および ATP-クエン酸リアーゼ（ATP citrate lyase, ACL）が質量分析により同定された。FAS と ACL は脂肪酸の新規合成に関与する酵素であり、本来は細胞質ゾルに存在するにも関わらず泌乳期の乳汁中に存在した。そこで本研究では、乳腺上皮細胞における脂肪滴形成と乳汁への分泌、およびこれらの脂肪酸合成関連酵素との関連性に注目し、マウス乳腺上皮から分泌される脂肪酸合成関連酵素について、解析を進めた。

【方法・結果】

FAS、ACL および脂肪酸合成の律速酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ（acetyl CoA carboxylase, ACC）が、マウス L10 乳汁に多く存在することをイムノブロット解析によって明らかにした。次に、これら 3 種類の酵素が非特異的に乳汁に混入した可能性を検証するため、乳汁および乳腺組織中のタンパク質含量をイムノブロット解析により比較した。その結果、他の細胞質タンパク質よりもはるかに多く乳汁中に存在することがわかり、選択的に乳汁に濃縮されていることが示された。さらに遠心分離による乳汁の分画およびトポロジー解析の結果から、乳汁中において 3 種類の酵素が乳脂肪球内部に局在することが示された。また、乳腺におけるタンパク質レベルおよびメッセジレベルを解析した結果、3 種類のタンパク質の発現レベルが L10 から I2 にかけて経時的に低下することが示された。乳腺上皮細胞では、FAS、ACL および ACC が乳脂肪球の細胞内前駆体である脂肪滴と相互作用し、脂肪滴の成長に関わっているのではないかと考えられる。

ニワトリ卵-精子相互作用に関与する糖タンパク質の構造と特性

○新井真由美¹、奥村裕紀²、西尾俊亮¹、岡島徹也³、灘野大太¹、松田幹¹(¹名大院生命農・応用分子生命科, ²名城大院農・応用生物化, ³名大院医・生化 2)

【目的】

ニワトリ卵膜は 2 つの主要糖タンパク質（ZP1、ZP3）から構成されており、卵細胞や胚を保護すると同時に受精において精子レセプターとしての機能がある。さらに卵-精子間の認識・相互作用において糖鎖の重要性が示唆されているが、詳細は明らかではない。本研究ではニワトリ卵膜構成糖タンパク質および精子先体胞付近の膜に存在する糖タンパク質について構造と特性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

卵胞より調製した卵膜を用い蛍光抗体法で染色したところ、未成熟および成熟卵胞のいずれも繊維状の構造が観察された。ZP3 は卵膜表面全体的に分布し、特に染色強度が強く観察された。さらに、組換え ZP3 が精子先体付近に結合したことから、ZP3 の精子との相互作用への関与が示唆された。一方、O-結合型糖鎖を認識するジャカリンレクチンでニワトリ精子の蛍光レクチン染色を行ったところ、先体部分に特異的な蛍光シグナルが観察された。カルシウムイオノフォア（A23187）処理により精子先体反応を誘導すると、ジャカリン陽性の 25kDa 糖タンパク質が精子から遊離した。この糖タンパク質は超遠心分離後の上清画分に存在し、膜から遊離したことが示唆された。また、精子を窒素キャピテーター破碎し超遠心分離の沈殿画分として調製した精子膜画分を用いてジャカリンレクチンブロット解析を行ったところ、25kDa 付近に 2 本のバンドが検出された。25kDa のジャカリン陽性糖タンパク質は精子先体付近の膜に存在するが、卵膜との結合に伴う先体反応により膜から遊離すると推定された。このジャカリン陽性糖タンパク質について、先体反応後の精子の卵膜貫通と細胞膜融合の段階での役割を想定し、現在、大量調製と分子の同定を進めている。

母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の探索

○浅野有香¹, 村上耕介^{1,3}, 鈴木さやか¹, 灘野大太¹, 宇理須厚雄², 岡智一郎³, 片山和彦³, 松田 幹¹ (¹名大院生命農・応用分子生命科、²藤田保衛大・小児科、³国立感染研ウイルス第二)

【目的】

ウイルス感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルスは、乳幼児で症状が重篤化することが報告されている。一方で、母乳中にはノロウイルス感染抑制因子が含まれ、その一つが組織血液型抗原糖鎖であることが示唆されている。本研究では、ウイルス様粒子 (VLPs) を用いて、組織血液型抗原糖鎖とは異なるウイルス結合因子を探索し、その一つをラクトフェリン (LF) と同定した。さらに、ラクトフェリンとノロウイルスとの結合様式を解析した。

【方法・結果】

ヒトノロウイルスカプシドタンパク質 VP1 をバキュロウイルス発現系により過剰発現させ、ゲノムを含まない中空のウイルス様粒子 (VLPs) を調製し、電子顕微鏡観察によりウイルスと類似の粒子状形体を持つことを確認した。7名の母親から採取された母乳の乳清を用いた VLPs リガンドブロットの結果、いずれの検体においても 80kDa の VLPs 陽性バンドが検出された。このバンドは免疫ブロットにより検出された LF の位置と一致し、質量分析により LF と同定された。精製 LF を用いて、異なるヒトノロウイルス株 VLPs との結合を調べた結果、ウイルス株により結合性が異なるが、必ずしも組織血液型抗原糖鎖との結合特異性とは相関しなかった。さらに、LF と VLPs との結合様式を解明するために、LF のトリプシン分解断片と VLPs との結合性を調べた結果、約 35kDa の分解断片に結合し、この断片は N-型および O-型糖鎖を含む N-端側ドメインと同定された。LF のノロウイルス感染抑制作用を評価するために、VLPs と LF を反応させた後、ヒト腸上皮様 Caco2 細胞に添加し培養した。洗浄後、細胞を溶解して免疫ブロットにより細胞に結合した VLPs を検出した結果、LF 濃度依存的に VP1 のバンド強度が低下した。この結果から、母乳 LF がノロウイルスの腸上皮細胞への結合を抑制する可能性が示唆された。

乳汁における GlyCAM-1/Lactophorin の局在解析と機能探索

○可児利英¹, 鈴木さやか¹, 日野真吾¹, 岡島徹也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名大院医・生化 2)

【目的】

マウス GlyCAM-1 とウシ Lactophorin(Lph)は、アミノ酸配列とドメイン構造の類似性からホモログタンパク質であると考えられている。マウス GlyCAM-1 はリンパ節の血管内皮細胞により分泌され、高内皮性細静脈内皮に結合することが知られている。一方、乳腺組織及び乳汁中存在する GlyCAM-1/Lph は、乳脂肪球皮膜画分に含まれていることは知られているが、局在の詳細や機能は明らかにされていない。本研究では、GlyCAM-1/Lph の機能を探る手掛かりとして、乳汁中での分布や哺乳期仔マウスの消化管における分布、局在を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

マウス乳汁を分画し、GlyCAM-1 特異抗体で免疫ブロットを行った結果、GlyCAM-1 は乳清及び乳脂肪画分で検出された。さらに、マウス乳汁を 10%-70%ショ糖密度勾配超遠心分離免疫ブロットにより分布を解析した結果、GlyCAM-1 は低密度の乳脂肪球画分に含まれた。次に、マウスとウシの乳汁から乳脂肪球画分を調製し、各特異抗体で免疫染色を行い蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、乳脂肪球皮膜マーカーである MFG-E8 やブチロフィリンと同様に乳脂肪球表面に GlyCAM-1/Lph が検出された。次に、マウス GlyCAM-1 と C 末端に存在する両親媒性 α -ヘリックスを欠損させた Δ C-GlyCAM-1 を GFP 融合タンパク質として S2 細胞で発現・分泌させた。培養上清に分泌された可溶性 GFP-GlyCAM-1 をアフィニティーカラムで分離精製し乳脂肪球画分に添加後、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、GlyCAM-1 は乳脂肪球皮膜に局在したが、 Δ C-GlyCAM-1 は検出されなかったことから、GlyCAM-1 は両親媒性 α -ヘリックスを介して膜に結合する表在性膜タンパク質であることが示唆された。また、哺乳期仔マウスの胃を摘出して、GlyCAM-1 を免疫染色して蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、胃の粘膜上皮付近が染色されたことから、仔マウスの胃内では一部は消化されずに、乳脂肪球とともに残存することが示唆された。

日本農芸化学会中部支部 平成22年度役員等名簿
(平成22年10月30日現在 敬称略)

支部長・理事

小林哲夫 名古屋大学大学院生命農学
(本部理事, 英文誌編集委員会)
副支部長
牧正敏 名古屋大学大学院生命農学
(本部評議員, 学術活動強化委員会)
山口庄太郎 天野エンザイム(株)
庶務幹事
松林嘉克 名古屋大学大学院生命農学
灘野大太 名古屋大学大学院生命農学
会計幹事
山篠真史 名古屋大学大学院生命農学
監事
山上圭吾 (株)ミツカングループ本社
(本部評議員)
前島正義 名古屋大学大学院生命農学

評議員 (50音順)

浅野泰久 富山県立大学生物工学研究センター
飯島信司 名古屋大学大学院工学
池田正人 信州大学農学部 (本部評議員)
石井良憲 カネハツ食品(株)開発技術室
石田秀治 岐阜大学応用生物科学部
(連絡評議員)
磯部洋祐 (株)J-オイルミルズ
今井邦雄 三重大学大学院生物資源
(本部評議員)
岩崎行玄 福井県立大学 (本部評議員)
氏田稔 名城大学農学部
碓氷泰市 静岡大学農学部
(本部評議員)
梅川逸人 三重大学大学院生物資源
梅田幸一 天野エンザイム(株)
裏地達哉 物産フードサイエンス(株)
榎本俊樹 石川県立大学 (連絡評議員)
遠藤克秋 竹本油脂(株)
大澤俊彦 愛知学院大学心身科学部
大塚正盛 サンエイ糖化(株)研究開発部
(本部評議員)
奥村克純 三重大学大学院生物資源
(和文誌編集委員会)
小倉光雄 東海大学海洋研究所
小鹿一 名古屋大学大学院生命農学
(本部理事)
岡戸信夫 新日本化学工業(株)
尾仲宏康 富山県立大学
片桐孝夫 (株)ポッカコーポレーション
片山新太 名古屋大学エコトピア科学研究所
片山正人 産業技術総合研究所中部センター
加藤康夫 富山県立大学
加藤丈雄 愛知県産業技術研究所
食品工業技術センター
加藤化学(株)技術部
金本仁 焼津水産化学工業(株)
川口光朗 東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所
川上文清 豊橋技術科学大学
菊池洋 名古屋大学大学院生命農学
北島健 名古屋大学大学院生命農学
木元久 福井県立大学
熊澤茂則 静岡県立大学食品栄養科学部
(連絡評議員)
倉根隆一郎 中部大学応用生物学部
黒川洋一 福井県立大学 (連絡評議員)
酒井坦 静岡県立大学食品栄養科学部
坂神洋次 名古屋大学大学院生命農学
(本部評議員, 授賞選考委員会)
栗冠和郎 三重大学大学院生物資源
(本部評議員, 英文誌編集委員会)
佐野元昭 金沢工業大学ゲノム生物工学研究所
佐野佳之 名糖産業(株)食品開発部
下位香代子 静岡県立大学環境科学研究所
下村吉治 名古屋大学大学院生命農学
(英文誌編集委員会)

ジュネジャ レカ ラジュ
太陽化学(株)研究所
朱政治 太陽化学(株)研究所
(本部評議員)
杉山公男 静岡大学農学部
杉山雅彦 フジパン(株)本社生産部
鈴木隆元 石川県立大学
鈴木文昭 岐阜大学応用生物科学部
関口順一 信州大学繊維学部
千菊夫 信州大学農学部
竹内俊彦 キリンビール(株)名古屋工場
竹尾忠一 伊藤園(株)中央研究所
田中晶善 三重大学大学院生物資源
田原康孝 静岡大学農学部
玉置真司 敷島スターチ(株)技術開発部
田村廣人 名城大学農学部
轟泰司 静岡大学農学部 (連絡評議員)
戸倉政雄 アサヒビール(株)名古屋工場
長岡利 岐阜大学応用生物科学部
(本部評議員, 英文誌編集委員会)
中川寅 岐阜大学応用生物科学部
中野秀雄 名古屋大学大学院生命農学
中村洵 イチビキ(株)技術開発センター
中村宗一郎 信州大学農学部 (連絡評議員)
中山俊裕 (株)岐阜セラック製造所技術部
南条文雄 三井農林(株)食品総合研究所
(本部評議員)
西川俊夫 名古屋大学大学院生命農学
(本部評議員)
根岸晴夫 中部大学応用生物学部
芳賀聖一 名城大学農学部
橋本正治 富山県立大学工学部
早川享志 岐阜大学応用生物科学部
(本部評議員)
原脩 名城大学薬学部
久松眞 三重大学大学院生物資源
日野資弘 アステラス製薬(株)生物工学研究所
平井浩文 静岡大学農学部
廣田満 信州大学農学部
深田理 ヤマモリ(株)
藤田智之 信州大学農学部
二又克之 科研製薬(株)生産技術研究所
星野一宏 富山大学大学院理工学研究部
堀尾文彦 名古屋大学大学院生命農学
(英文誌編集委員会)
本多裕之 名古屋大学大学院工学
前島正義 名古屋大学大学院生命農学
(本部評議員)
真壁秀文 信州大学農学部
間瀬民生 椛山女学園大学生活科学部
松田幹 名古屋大学大学院生命農学
(産学官学術交流委員会)
三島敏 中部大学応用生物学部 (本部評議員)
水野猛 名古屋大学大学院生命農学
村澤久司 旭松食品(株)
森上敦 名城大学農学部 (連絡評議員)
森山龍一 中部大学応用生物学部
山内亮 岐阜大学応用生物科学部
(本部評議員)
吉村徹 名古屋大学大学院生命農学
(本部評議員, 広報委員会)
米田祐康 (株)ニッポンジーン
渡辺達夫 静岡県立大学食品栄養科学部
(英文誌編集委員会)
渡邊修治 静岡大学創造科学技術大学院

日本農芸化学会中部支部 維持会員企業（五十音順）

	アサヒビール（株）名古屋工場	http://www.asahibeer.co.jp/
	旭松食品（株）食品研究所	http://www.asahimatsu.co.jp/
	アステラス製薬（株）CSR 部	http://www.astellas.com/jp/
	天野エンザイム（株）岐阜研究所	http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/index.html
	イチビキ（株）研究開発部	http://www.ichibiki.co.jp/
	（株）伊藤園中央研究所	http://www.itoen.co.jp/
	伊藤忠製糖（株）	http://www.itochu-sugar.com/
	科研製薬（株）生産技術研究所	http://www.kaken.co.jp/
	加藤化学（株）	http://www.katokagaku.co.jp/
	カネハツ食品（株）技術部	http://www.kanehatsu.co.jp/
	（株）岐阜セラツク製造所	http://www.gifushellac.co.jp/
	キリンビール（株）名古屋工場	http://www.kirin.co.jp/
	金印（株）	http://www.kinjirushi.co.jp/
	サンエイ糖化（株）	http://www.sanei-toka.co.jp/
	サンジルシ醸造（株）	http://www.san-j.co.jp/
	（株）三和化学研究所三重研究所	http://www.skk-net.com/
	（株）J-オイルミルズ	http://www.j-oil.com/
	敷島スターチ（株）	http://www.shikishima-starch.co.jp/index.html
	新日本化学工業（株）	http://www.e-snc.co.jp/
	太陽化学（株）研究所	http://www.taiyokagaku.com/jp/index.html
	大和製罐（株）清水研究所	http://www.daiwa-can.co.jp/

	竹本油脂（株）情報調査室	http://www.takemoto.co.jp/
	竹屋（株）研究所	http://www.takeya-miso.co.jp/
	東海物産（株）食品研究所	http://www.tokaibsn.co.jp/
	東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所	http://www.toyobo.co.jp/index.htm
	中日本冰糖（株）	http://www.nakahyo.co.jp/
	名古屋製酪（株）	http://www.sujahta.co.jp/
	物産フードサイエンス（株）	http://www.bfsci.co.jp/
	（株）ニッポンジーン	http://www.nippongene.com/
	日本食品化工（株）研究所	http://www.nisshoku.co.jp/
	フジ日本精糖（株）	http://www.fnsugar.co.jp/
	フジパン（株）本社生産部	http://www.fujipan.co.jp/company/index.html
	（株）ポッカコーポレーション	http://www.pokka.co.jp/
	三井農林（株）食品総合研究所	http://www.mitsui-norin.co.jp/
	（株）ミツカングループ本社	http://www.mizkan.co.jp/company/
	名糖産業（株）	http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/index.html
	盛田（株）小鈴谷工場	http://www.moritakk.com/
	焼津水産化学工業（株）	http://www.y SKF.jp/
	ヤマモリ（株）	http://www.yamamori.co.jp/
	養命酒製造（株）中央研究所	http://www.yomeishu.co.jp/

