

ペプチドライゲースとリボソームによる協同的なペプチド新奇生合成機構の解明

大利 徹（北大院・工）

ペプチド系抗生物質の生合成では、リボソーム関与の生合成に加え、Non Ribosomal Peptide Synthase (NRPS) に代表されるリボソーム非関与の生合成機構も用いられる。NRPS では、A-ドメインによるアデニル化、T-ドメインへのロード、C-ドメインでの縮合反応によりペプチド結合が生成する。また、近年、ATP 依存のアミノ酸リガーゼ、tRNA 依存のアミノ酸転移酵素によるペプチド結合生成機構も報告されている。このようにペプチド系抗生物質の生合成には多様性があるが、ペプチド骨格そのものは上記の何れかの機構で生合成される。

放線菌が生産するペプチド系抗生物質、フェガノマイシン (PM) は、N 末のフェニルグリシン誘導体に続いて NVKDR と NVKDGPT の配列を有する二種類の構造が知られている。この多様性から判断すると、リボソーム関与の生合成とは考えにくく、また NRPS の場合も A-ドメインのアミノ酸の認識は比較的厳密であることから、どのような機構でこの C-末の多様性が導かれるか興味が持たれたことから、その生合成機構の解明を試みた。

PM の N 末にはフェニルグリシン誘導体が存在することから、バンコマイシンで本骨格の生成に関与することが証明されている DpgA (Type III PKS) 遺伝子をドラフトゲノム配列中に探索した結果、生合成遺伝子クラスターを見出した。本クラスターにはフェニルグリシン誘導体の生成と修飾に関与すると推定される酵素遺伝子群が存在したが、NVKDR と NVKDGPT を合成し得る巨大な NRPS は存在しなかった。そこで、クラスター内にペプチダーゼが存在したことも考慮し、ペプチド部分がリボソーム関与で合成される可能性を考え塩基配列を精査した結果、38 アミノ酸からなる遺伝子を見出した。このペプチドは NVKDR と NVKDGPT の両方の配列を含んでおり、C-末の多様性を良く説明できた。本遺伝子を欠失させた変異株では、PM の生産が消失したことから、NVKDR と NVKDGPT はリボソームにより供給されると結論づけた。しかし、DHFG とのペプチド結合を触媒する酵素に関しては候補遺伝子を見出せなかった。クラスター内には、A-ドメインを持つ NRPS 1 (649 アミノ酸)、T-ドメインを持つ NRPS 2 (81 アミノ酸)、C-ドメインを持つ NRPS 3 (441 アミノ酸) が存在したが、これまで NRPS の A-ドメインで活性化されたアミノ酸 (誘導体) に対し、ペプチドが求核剤となり C-ドメインで縮合されペプチド化合物を生成する例は無い。また、ATP 結合モチーフを持つ ORF も存在したが、ATP 結合モチーフを持つ酵素がペプチドを基質に用いた例もない。そこで、どちらがペプチド結合形成に関与するかを遺伝子破壊と組換え酵素を用いて詳細に検討したので紹介したい。

ホモポリアミノ酸およびホモオリゴアミノ酸を合成する新奇ペプチド合成酵素の反応メカニズム
濱野吉十（福井県大）

微生物によって生産されるペプチド化合物は、リボソーム関与あるいは非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成される。NRPS は、タンパク性アミノ酸以外のアミノ酸も基質として利用できることから、合成されるペプチド化合物の化学構造は多様である。その一方で、ペプチド鎖長 (アミノ酸残基数) については、NRPS のドメイン構造によって厳密に制御されており多様性は認められない。しかし、最近我々は、ペプチド鎖長に多様性があり、また、単純な化学構造である Poly(ϵ -L-lysine) (25~35 残基, **Fig. 1**) と streptothricin の β -リジンオリゴペプチド構造 (1~7 残基 **Fig. 2**) が、新規反応メカニズムを有する NRPS によって合成されることを見出した (*Nature Chem. Biol.*, 4, 766-772, 2008; *Nature Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012)。本講演では、これら新奇 NRPS の反応メカニズムと最近の知見について紹介する。

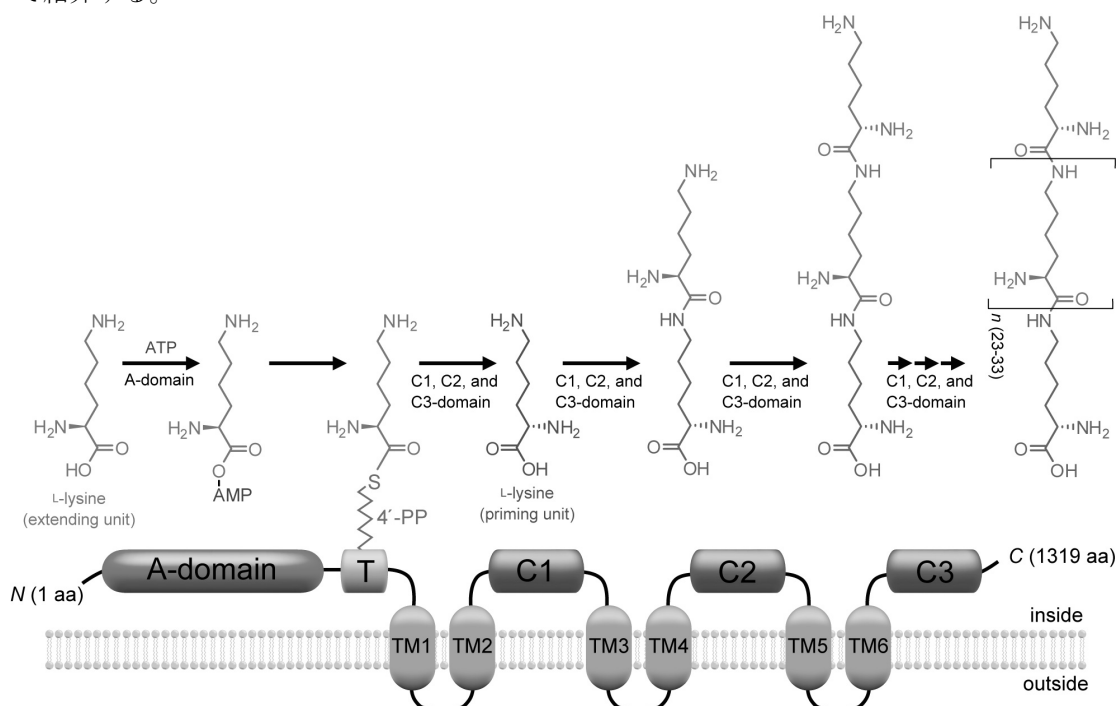


Fig. 1 Poly(ϵ -L-lysine)合成酵素のドメイン構造と反応メカニズム

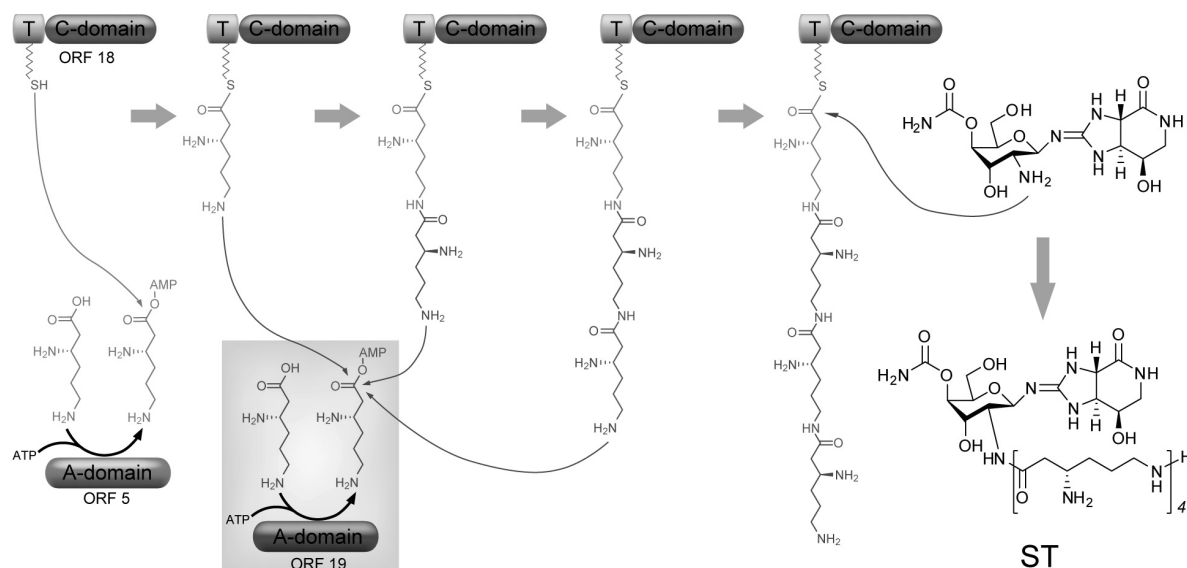


Fig. 2 streptothricin (ST)合成酵素の反応メカニズム

P01

大豆もやし中のイソフラボン含有量の定量

○大島綾華¹, 中田光彦², 柳瀬笑子¹ (¹岐阜大学応用生物科学部, ²(株) サラダコスモ)

【目的】

イソフラボンは、マメ科などの植物に存在するフラボノイド類であり、エストロゲン様活性や抗酸化活性等を示すことから機能性成分として注目されている。食品中では特に大豆に多く含まれており、さらにこれらイソフラボン含有量は大豆の成長に伴い変化することが知られている。そこで、本研究では大豆の発芽に伴う大豆イソフラボン含有量の経時的変化について検証し、より機能性の高い大豆もやしなどの段階であるかを調べることにした。またその際に、各イソフラボン類が豆部と根部でどのような存在比で分布しているかについても調べた。

【方法・結果】

凍結乾燥した発芽 0、2、4、6、7 日目の子大豆もやしを抽出し、HPLC を用いて定量を行なった。定量分析の結果、主要イソフラボンは Daidzin と Genistin 及びそのマロニル配糖体であることが分かった。また、総イソフラボン含有量は発芽 4 日目まで増加し、その後減少していた。この結果から、より機能性の高い子大豆もやしは発芽 4 日目であることが分かった。次に発芽 4 日目のサンプルについて、凍結乾燥後のもやしを豆部と根部に分け、同様の方法で抽出及び定量を行った。HPLC 定量分析の結果、豆部と根部において Genistein 型イソフラボンはほぼ均一に分布していることが分かった。一方、Daidzein 型イソフラボンはやや根部に多く、Glycitein 型イソフラボンは根部に多く存在していることが分かった。

P02

ゴマ由来セサミノールは生体内において α セクレターゼの発現を上昇させる

○杉山遥, 片山茂, 中村宗一郎 (信州大院農)

【目的】

アミロイド β ($A\beta$) はアルツハイマー病の原因タンパク質であり、 $A\beta$ 前駆体タンパク質 (APP) が β セクレターゼ及び γ セクレターゼにより切断されることで産生される。産生された $A\beta$ は線維伸長し、脳神経細胞表面に蓄積することで神経細胞死を引き起こす。こうして記憶障害や学習障害が生じアルツハイマー病の発症へと至るとされている。一方、APP が α セクレターゼと γ セクレターゼにより切断されると $A\beta$ の産生は抑制され、アルツハイマー病の発症が抑止されることも知られている。本研究では機能性食品として知られているゴマ由来セサミノールの $A\beta$ 過剰発現型老化促進マウス (SAMP8) への効果を検討した。

【方法・結果】

チオフラビン T (ThT) 蛍光発色法と透過型電子顕微鏡 (TEM) 法を用いてセサミン及びセサミノールの $A\beta_{1-42}$ 線維形成阻害効果を調べた。その結果、ThT 蛍光発色法と TEM 法の両方でセサミノールはセサミンに比べ、高い $A\beta$ 線維形成阻害効果を有することが確認された。そこで、16 週齢の雄性 SAMP8 に 0.05% セサミノール混合飼料を 4 ヶ月間自由摂取させた後、ELISA 法を用いて脳中の $A\beta$ 量を測定した。その結果、セサミノール摂取群では脳中の $A\beta$ 量は顕著に減少が確認された。これを受けて筆者らは $A\beta$ 量の減少には $A\beta$ 非産生酵素 α セクレターゼの活性化が寄与しているのではないかと考え、リアルタイム PCR 法とウエスタンブロッティング法を用いて $A\beta_{1-42}$ 産生経路に関与する ADAM10 (α セクレターゼの活性中心) と BACE1 (β セクレターゼの活性中心) の遺伝子及びタンパク質発現レベルを検証した。その結果、セサミノール摂取群では ADAM10 の発現が顕著に増加している事が認められた。以上の結果から、セサミノールは *in vitro* 系において $A\beta$ の線維形成を直接的に阻害し、*in vivo* 系においては α セクレターゼの産生を促進し $A\beta_{1-42}$ の産生を抑制することが明らかにされた。

Chlorogenic Acid and its Metabolites as Antimicrobial Agents

○Faisal Kabir, Shigeru Katayama, Haruka Sugiyama, Soichiro Nakamura
(Dept. of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University)

【Objectives】 Chlorogenic acid (CGA) is a natural chemical ester composing of caffeic acid and (-)-quinic acid and it may be metabolized to active compounds, such as benzoic acid, ferulic acid, hippuric acid, etc, within the living body. Since it is well-known some of them elicited not only bacteriostatic ability but also bactericidal effects, the antimicrobial activity and mechanism of action of CGA and its metabolites against a gram-negative bacterium *Escherichia coli* were investigated.

【Methods and Results】 *E. coli* IFO 3301 was used in this study. The susceptibility tests were performed using agar disc diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) was measured by two-fold serial microdilution method. Chlorogenic acid and its metabolites exhibited specific antimicrobial activity and corresponding MIC values. Ferulic acid, isoferulic acid, benzoic acid and hydroxy benzoic acid were showed a remarkable antimicrobial effect against *E. coli* under thermal stress at 50°C. *E. coli* cells (10⁶/ml) completely disappeared in 2 ml of PBS coexisting with 30 mM ferulic acid and isoferulic acid incubated at 50°C for 3 hours, followed by benzoic acid and hydroxy benzoic acid incubated at 50°C for 6 hours. These results indicate that CGA and its metabolites possess potent antimicrobial activities against *E. coli*.

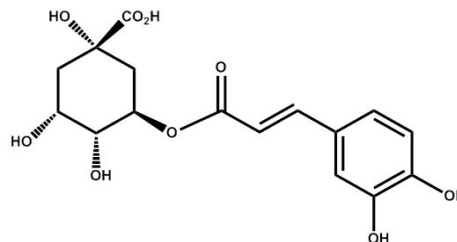


Fig 1: Chlorogenic acid

記憶改善効果を期待したステロイド配糖体の合成研究

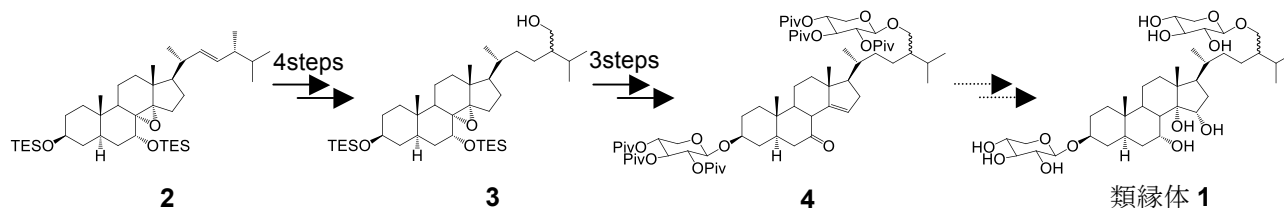
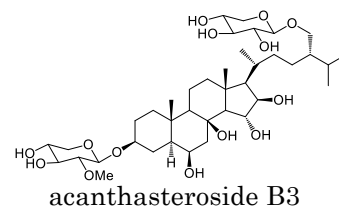
○谷田 貴弘, 羽賀 雅俊, 小鹿 一 (名大院生命農)

【目的】

Acanthasteroside B3 は沖縄産オニヒトデから単離された化合物で、加齢マウスに対して記憶改善効果を示すことから神経変性疾患治療薬のリードとして期待されるが、その大量供給には困難が伴う。そこで acanthasteroside B3 のような生理活性をもち、かつ構造を単純化したステロイド配糖体の合成研究が進められてきた。今回は水溶性の向上を目指し設計された類縁体 **1** の合成を目的とする。

【方法・結果】

Ergosterol から合成されるシリルエーテル **2** を出発物質として、側鎖へ水酸基を導入しアルコール **3** とした。次にエポキシドの開環条件およびアグリコンへの水酸基導入条件を検討し、開環には BF₃·Et₂O を、水酸基導入には OsO₄ を用いることにした。BF₃·Et₂O を用いて、エポキシドの開環を行いエノンに導いた後、グリコシル化を行うことでジグリコシド **4** とした。今後は OsO₄ によるジオール化および還元・脱保護を行い、類縁体 **1** を合成する予定である。



P05

An antifungal compound, methyl 3-*O*-methylgallate from Tunisian halophyte, *Tamarix aphylla*

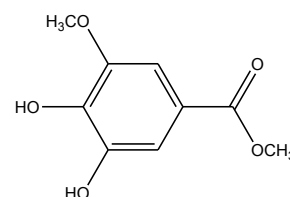
○ Asma Ben Hmidene¹, Zine Mighri² and Mitsuru Hirota¹ (¹ Faculty of Agriculture, Shinshu University, ² Faculty of science, University of Monastir, Tunisia)

Objectives:

Synthesized antifungal agents, such as *o*-phenylphenol (OPP) and ethyl *p*-hydroxybenzoate are used as food and/or cosmetic preservatives. The use of these chemicals are nowadays raising concerns related to food contamination and toxicity towards human. Thus, the search for less toxic antifungal agents is still required. In this study, we tried to search new antifungal compounds from some medicinal halophytes grown in Tunisia.

Methods and results:

Among some Tunisian halophytes, the methanol extract of *Tamarix aphylla* twigs showed remarked antifungal activity against *Fusarium oxysporium* and *Aspergillus awamori*. Bioassay guided isolation led to the purification of active compound, methyl 3-*O*-methylgallate (M3MG). Several related compounds, including M3MG, were synthesized and subjected to antifungal assay. Their MIC values were determined based on percent radial growth. Between the synthesized compounds, M3MG showed the strongest activity. Its effect (MIC 12 mM) was even stronger than OPP (MIC 18 mM) and ethyl *p*-hydroxybenzoate (MIC 19 mM) in the case of *Fusarium*. The structure activity relationship study revealed that methylation of meta-hydroxyl group in methyl gallate is a factor of antifungal efficiency enhancement.



P06

Effects of gambir (*Uncaria Gambir* Roxb.) extract in a mouse model of allergic asthma

○ Pramita Sari Anungputri^{1,2}, Nami Nakagawa¹, Masahiro Nishio¹, Hayato Umekawa¹ (¹ Grad. School of Bioresources, Mie Univ., ² Fac. of Agriculture, Sriwijaya Univ., Indonesia)

【Introduction】

Allergic asthma is a respiratory inflammatory disease, characterized by reversible obstruction and hyper-responsiveness in airway. Th2 cytokines, such as IL4, stimulate production of allergen-specific IgE and may play important role in the pathophysiology of asthma. Gambier, Indonesian traditional food, has been reported to contain high amount of catechin. In this study, we examined the effect of gambir extract on mouse model of asthma induced by ovalbumin (OVA).

【Methods and Results】

The mice (ddY, male, 7 week) were sensitized using OVA and alum in subcutaneous injection for 3 times every 7th day. Then the mice were immunized by gambir extract using nebulizer for 5 days, followed by exposure to OVA for 5 days. Pathological study of lung tissues was performed by HE-stain. The leukocyte count and the IL4 production were measured in both blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). HE-stain showed that gambir extract-treated mice significantly reduced the airway smooth muscle thickness. Moreover, gambir extract had a tendency to reduce the levels of leukocyte and IL-4 both in blood and BALF. These observations suggest that gambir extract reduced airway inflammation of the lung tissue in a mouse model of allergic asthma.

Keywords: gambir extract, catechin, asthma

天然物由来の抗がん剤の効果にたいするヒト ABCG2 遺伝子の一塩基多型の影響の解析

○塚本めぐみ¹, 佐竹一紘², 田島靖浩², 中尾(若林)香菜子³, 石川智久⁴, 中川大¹(¹中部大応用生物, ²中部大院応用生物, ³静岡がんセンター, ⁴理研 CLST)

【目的】

肝臓・腎臓・小腸・脳などの組織に多く発現している ABC 輸送体 ABCG2 は, ABC 輸送体 ABCB1 と共に抗がん剤を排出することによってがん細胞に薬剤耐性を賦与する. つまり, これらの ABC 輸送体と抗がん剤との相互作用を理解することは, がんの化学療法を成功に導くうえで極めて重要である. 1 つの抗がん剤は複数の ABC 輸送体によって認識されることが知られているので, 本研究では, ABCB1 の基質である天然物由来の抗がん剤と ABCG2 との相互作用を解析すると共に, 抗がん剤との相互作用における ABCG2 遺伝子上に存在する一塩基多型の影響を解析した.

【方法・結果】

Flp-In System (Invitrogen 社)を利用して 12 番染色体の短腕領域に存在する FRT 配列に ABCB1 および ABCG2, ABCG2 の一塩基多型バリエーションをそれぞれ導入した細胞 (Tamura et al., *J. Exp. Ther. Oncol.*, 6, 1-11, 2006.)をそれぞれ 5×10^3 cells/well の密度で 96 well plate に播種し, 24 時間後に抗がん剤を添加して 72 時間培養した. このあと, MTT 試薬を培養系に添加し, 3 時間後に 20% SDS を添加して細胞を溶解した. これを一晩 CO₂ インキュベーター内に静置した後, 630 nm をリファレンス波長として, 570 nm における吸光度を測定して細胞の生存率を評価した. この結果, ABCB1 の基質として知られている抗がん剤の中でタキサン系抗がん剤が ABCG2 によって排出される可能性が見出され, ABCG2 遺伝子上に存在する一塩基多型の中で日本人の 3 人に 1 人が保有する ABCG2 Q141K を発現させた細胞では, 野生型の ABCG2 を発現させた細胞よりもタキサン系抗がん剤にたいして耐性を示すことを新たに見出した. これらの結果から, タキサン系抗がん剤をがん患者に投与する場合には, 遺伝子診断で患者の遺伝子型を把握してから投与およびその量を決定すべきであることが考えられる.

生薬シンイに含まれるリグナンの精製とヒト ABCB1 との相互作用解析

○三谷勇仁¹, 田島靖浩¹, 佐竹一紘¹, 崔鳳根², 車炳允², 永井和夫², 禹濟泰², 中川大⁴(¹中部大院応用生物, ²名大院生命農, ³中部大生物機能開発研究所, ⁴中部大応用生物)

【目的】

生薬は, 経験的に安全性が高く, 副作用が少ないと考えられている. そのため, その安全性についての科学的な証明は十分に行われていない. 本研究では, 生薬をより安全に使用できるようにするために, 薬物動態を規定する因子の一つである ABC 輸送体 ABCB1 との相互作用を評価した. なお, 生薬として, 鼻づまり, 鼻炎, 蓄膿症, 頭痛にたいして効能を発揮することが知られているシンイ (辛夷)を選択し, シンイにおける含有量が多い化合物を単離・精製し, ヒト ABCB1 との相互作用を Calcein assay および ATPase assay にて評価した.

【方法・結果】

シンイ (807 g)のメタノール抽出物を酢酸エチル, メタノール, ヘキサンを用いて分配し, オープンカラムクロマトグラフィーにてリグナン epimagnolin (5.05 g)および fargesin (3.27 g)を単離・精製した. これらのリグナンは sesamin と類似の構造を有していたので, 本研究では sesamin も含めて評価を行った. Calcein assay では, ABCB1 を安定発現する細胞を試験化合物と Calcein-AM を含む培養液中で培養し, 細胞内に蓄積した calcein を蛍光顕微鏡下で観察した. 一方, ATPase assay では, ABCB1 を含む細胞膜画分を試験化合物および ATP と混合し, ABCB1 が基質を認識する際に分解する ATP の量を 37℃の条件下で測定した. これらの結果, epimagnolin が存在した場合に calcein に由来する蛍光強度が最も強くなり, 最も多くの ATP が分解された. したがって, epimagnolin は ABCB1 の基質であり, シンイを他の薬物と併用する場合には併用薬物の薬物動態が変化する可能性に注意を払う必要があることが示唆された.

環状デプシペプチド destruxin E が骨吸収を抑制する構造の最適化に関する研究
 ○村瀬隼人¹, 田島靖浩¹, 佐藤寛^{2,3}, 石田恵崇², 吉田将人², 土井隆行², 中川大⁴
 (¹中部大院応用生物, ²東北大院薬, ³田辺三菱製薬, ⁴中部大応用生物)

【目的】

我々は、昆虫病原性糸状菌 *M.anisopliae* から単離された環状デプシペプチド系抗生物質 destruxinE が $ED_{50} = 4.8 \text{ nM}$ という低濃度において破骨細胞に形態異常をもたらして骨吸収を抑制することを見出し (Nakagawa et al., *Bone*, 33, 443-455, 2003.), 固相合成法を用いた destruxin E の全合成を世界に先駆けて達成している (Yoshida et al., *Org. Lett.*, 12, 3792-3795, 2010.). 本研究では、破骨細胞の形態異常をもたらす destruxin E の構造の理解および新規骨吸収抑制剤の開発に向けた destruxin E の構造の最適化を目的として、破骨細胞の形態にたいする destruxin E 類縁体の影響を評価した.

【方法・結果】

Slc:ddY マウスの脛骨および大腿骨から採取した骨髓細胞を 100 ng/ml GST-RANKL および $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ M-CSF, 1 ng/ml TGF- β_1 の存在下, $100\text{-mm diameter type I collagen-coated culture dish}$ 上で 72 時間培養して単核破骨細胞を得た. この単核破骨細胞を $3 \times 10^4 \text{ cells/well}$ の密度で half area 96 well plate に播種し, 100 ng/ml GST-RANKL および $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ M-CSF, 1 ng/ml TGF- β_1 存在下で 24 時間培養して多核破骨細胞を得た. 破骨細胞の形態にたいする destruxin E 類縁体の影響は, 多核破骨細胞を 100 ng/ml GST-RANKL および $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ M-CSF, 類縁体存在下で培養し, 24 時間後に破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの基質を用いて破骨細胞を染色した後, 光学顕微鏡下で破骨細胞の形態を観察して評価した. その結果, 評価した類縁体の中には, destruxin E よりも低濃度で破骨細胞に形態異常をもたらすものは存在しなかった. また, *N*-メチルアラニン残基を *N*-メチルバリンあるいは *N*-メチルイソロイシンに置換して *N*-メチルアラニン残基の側鎖を嵩高くした場合および β -アラニンをグリシンに置換した場合に活性の消失が認められた. これらの結果から, destruxin E の側鎖のみならず, 環状デプシペプチドの立体構造も破骨細胞の形態異常の誘導に重要な役割を担っていると考えられる.

静岡県産ワサビ葉の成分に関する研究
 ○吉田周平¹, 細谷孝博¹, 増田英樹², 熊澤茂則¹ (¹静岡県大院食品栄養, ²(株)田丸屋本店)

【目的】

ワサビ (*Wasabia japonica* Matsumura) はアブラナ科ワサビ属に属しており、根茎は古くから香辛料としてだけでなく、消臭剤や抗菌剤として用いられてきた。ワサビの研究はこの根茎に関するものが多く、葉の研究に関しては抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用、抗肥満作用などの報告があるが、その活性成分においては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ワサビ葉の活性成分に着目し、そこに含まれる成分の構造解析と同定を行い、その生理活性を評価することでワサビ葉の利用価値を高めることを目的とした。

【方法・結果】

ワサビ葉のメタノール抽出物をヘキサンと水、および酢酸エチルで順次分配した後、各種クロマトグラフィーにより分画し、いくつかの成分を単離した。それらを MS、NMR 等の各種分析機器を用いて構造解析し、9 種のフェニルプロパノイド、2 種のフラボノイド、2 種のテルペノイド、および 1 種のカロテノイドを同定した。単離した化合物のうち 6 種のフェニルプロパノイドおよび 2 種のフラボノイドを用いて FRAP assay による抗酸化試験を行ったところ、すべてのフェニルプロパノイドにおいて Trolox 以上の抗酸化能が認められ、また、Trolox の 2 倍以上の活性を示す化合物の存在も確認した。また、同定したカロテノイドは all-trans-lutein で、強い抗酸化能や視力改善作用を持つことで注目されている化合物であった。以上のようにワサビ葉には機能性を有する複数の化合物の存在が確認され、有効資源として利用できる可能性が見出された。

P11

南米原産植物 *Pterogyne nitens* 由来 nitensidine A とヒト ABCB1 との相互作用解析

○田島靖浩¹, 三谷勇仁¹, 佐竹一紘¹, 石川智久², Luis Octavio Regasini³, Vanderlan da Silva Bolzani³, Gert Fricker⁴, 中川大¹, Thomas Efferth⁵

(¹中部大院応生, ²理研 CLST, ³サンパウロ大化学, ⁴ハイデルベルク大薬, ⁵マインツ大薬)

【目的】

我々は、南米原産植物 *Pterogyne nitens* に含まれるグアニジンアルカロイド nitensidine A に骨粗鬆症治療薬候補としての可能性を見出した[1]. 本研究では、nitensidine A を実験動物に投与する際の体内動態を理解するために、薬物の体内動態に大きな影響を及ぼす ABC 輸送体 ABCB1 と nitensidine A との相互作用を解析することにした[2].

【方法・結果】

ヒト急性リンパ芽球性白血病・T リンパ球様細胞株 CCRF-CEM 細胞および CCRF-CEM 細胞を doxorubicin 処理して ABCB1 を過剰に発現させた CEM/ADR5000 細胞を用い、MTT assay および Calcein assay, ATPase assay を行うことによって、ABCB1 と nitensidine A との相互作用を解析した. MTT assay では、CCRF-CEM 細胞に比して CEM/ADR5000 細胞が nitensidine A にたいして耐性を示すことが見出され、ABCB1 の典型的な基質である verapamil を同時に投与することによって、この耐性が解除されることが見出された. Calcein assay では、CEM/ADR5000 細胞を nitensidine A と Calcein-AM を含む培養液中で培養し、細胞内に蓄積した calcein を蛍光顕微鏡下で観察した. この結果、verapamil を用いて試験した場合と同様に、nitensidine A は細胞による calcein の排出を抑制することが見出された. ATPase assay では、CEM/ADR5000 細胞から調製した ABCB1 を含む細胞膜画分を nitensidine A および ATP と混合し、ABCB1 が基質を認識する際に分解する ATP の量を 37℃の条件下で測定した. この結果、ATP の分解量は nitensidine A の濃度依存的に増加し、Hanes-Woolf プロットから $V_{\max} = 125 \mu\text{M}$, $K_m = 6.4 \mu\text{M}$ が算出された. また、本研究では、Autodock4 を用いて ABCB1 における nitensidine A 結合部位とその結合エネルギーの予測を行った. その結果、verapamil が結合すると予想される部位に nitensidine A が結合する可能性が示唆され、そのエネルギー値も verapamil を用いて算出した場合と近似していた. これらの結果から、nitensidine A は ABCB1 の基質であると考えられ、実験動物に投与する際に ABCB1 が nitensidine A の吸収に影響を及ぼすことが示唆された.

[1] Tajima et al., Cytotechnology, in press. [2] Tajima et al., Phytomedicine, in press.

P12

食中毒菌の毒素産生および活性に対するリンゴ由来プロアントシアニジン画分の抑制効果

○杉山由華¹, 島村裕子¹, 柳田顕郎², 増田修一¹ (¹静岡県立大学, ²東京薬科大学)

【目的】

我々はこれまでに、黄色ブドウ球菌の毒素産生抑制および毒素活性阻害成分をポリフェノール類から探索し、リンゴポリフェノール類にその活性を見出している. 本研究では、黄色ブドウ球菌の毒素産生および毒素活性に対するリンゴポリフェノール中のプロアントシアニジン画分（重合度別）の抑制効果を評価した.

【方法・結果】

黄色ブドウ球菌の毒素 staphylococcal enterotoxin A (SEA) の産生および SEA との結合親和性に対するリンゴ由来プロアントシアニジンの粗抽出画分および単量体～6 量体以上の画分の作用をウエスタンブロットを用いて調べた. ①SEA 産生に対する影響: 各画分（終濃度: 0.1～3.0 mM）を *Staphylococcus aureus* C-29（終濃度: $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL）と混合し、37℃で24時間培養後、SEA 量を測定した. ②SEA との結合親和性: SEA (5 $\mu\text{g/mL}$) と各画分（終濃度: 0.5～3.0 mM）を混合し、37℃で24時間反応させた後、SEA 量を測定した. その結果、3～6 量体画分において、毒素産生を抑制している可能性が示唆された. また、SEA に対する抗-SEA 抗体の結合は、2 量体以上の画分で用量依存的に阻害され、6 量体以上の画分で最も阻害効果が高かった. これらの結果より、プロアントシアニジンの重合度が上がるにしたがい、SEA 産生抑制効果および SEA 分子との結合親和性が高まる可能性が示唆された. 現在、各画分における毒素活性阻害能および SEA 遺伝子発現への影響について検討中である.

ポリフェノールによる視覚改善作用に関する研究

○望月佐紀¹, 細谷孝博¹, 片野雄太¹, 望月和樹², 大江絵美³, 小林沙織³, 合田敏尚¹, 熊澤茂則¹
 (¹静岡県大・食品栄養, ²山梨大・生命環境・地域食物, ³(株)わかさ生活)

【目的】

Retinol dehydrogenase 8 (RDH8) は、網膜に存在する感光物質ロドプシンの再合成経路の律速段階である all-trans-retinal (atRAL) から all-trans-retinol (atROL) への反応を触媒する酵素である。RDH8 は atRAL から atROL への反応において重要であり、RDH8 活性の低下は atRAL 代謝の遅延や網膜疾患の要因となることが報告されている。そのため、視覚改善には atRAL から atROL への還元反応を触媒する RDH8 を活性化することが必要だと考えられ、RDH8 を活性化する成分による視覚改善が期待されている。

本研究では、当研究室にて構築した RDH8 活性評価法を用い、視覚改善作用が報告されているアントシアニン及び眼病予防に効果的だと考えられている茶カテキンについて RDH8 活性への影響評価を行うことで、視覚改善作用を有する成分探索及びその作用機序を解明することを目的とした。

【方法・結果】

マウス胎児由来線維芽細胞 NIH3T3 において作製した RDH8 発現細胞を用いて、アントシアニンは Delphinidin-3-glucoside、Cyanidin-3-glucoside、Pelargonidin-3-glucoside の 3 種類、茶カテキンは Epigallocatechin gallate、Epicatechin gallate の 2 種類における RDH8 活性への影響評価を行った。

その結果、アントシアニン及び茶カテキンの添加により atROL 生成量が増加した。これより、アントシアニン及び茶カテキンの添加によって RDH8 活性が促進したことが考えられた。構造活性的評価により、アントシアニンでは B 環のヒドロキシ基 (OH 基) の数が多いほど atROL 生成量が多くなる傾向が見られた。今後、他のポリフェノールでも評価を行い、化学構造と RDH8 活性に与える影響の関連性についてさらに検証を進めていく予定である。

Metallothionein 遺伝子を導入した *Mentha arvensis* 形質転換体の解析

○栗田将平, 寺澤 聡, 田淵 晃 (信大農応用生命)

【目的】私達は、ニホンハッカ (*Mentha arvensis*) 形質転換植物体を用いたファイトレメディエーションの可能性を調べる目的で研究を行っている。既に、私達の研究室では、Agrobacterium 法により、ヒトの metallothionein 遺伝子 (MTL1) を導入した *M. arvensis* 形質転換体が 2 株 (Ma-B 株, Ma-C 株) 作出されている。これらの形質転換体の無菌植物体を用い、その銅耐性の調査を行った結果については、過去の総会において報告した。今回、私達は、Ma-B 株及び Ma-C 株の順化植物体を用いて、銅耐性及び銅蓄積性の調査を行った。また、銅耐性機構の解明への端緒として、まず、*M. arvensis* 親株から、液胞の抽出を試みた。

【方法・結果】*M. arvensis* 形質転換体, Ma-B 株あるいは Ma-C 株に 0~1,000 mg/L の銅を添加し、26°C, 16 時間明期で培養を行った。2 週間培養し、生育の観察を行った。その後、植物体を乾燥・灰化 (500~700°C) 後、濃塩酸 (約 6 M) に溶解した。さらに、0.1 M 塩酸で 200~400 倍に希釈後、原子吸光法により、銅濃度の測定を行った。その結果、Ma-B 株, Ma-C 株ともに、親株に比し生育は良好であった。植物体の一定重量あたりの銅の含有量は、栽培条件により、異なる値となった。一方、プロトプラストを調製した後、パーコール浮上法にて、酸性フォスファターゼ活性及びニュートラルレッド染色を指標として、*M. arvensis* 親株から液胞の抽出を試みた。

プロデルフィニジン類の合成と抗腫瘍活性

○藤井 渉^a, 加藤 幸^a, 戸田一弥^b, 松本桐子^b, 川口耕一郎^b, 河原誠一^c, 藤井 博^b, 服部恭尚^d, 真壁秀文^a (信州大学 大学院農学研究科 機能性食料開発学専攻^a, 信州大学 農学部 応用生命科学科^b株式会社サンクゼール^c, 京都薬科大学 創薬化学系^d)

【目的】

ポリフェノール的一种であるプロアントシアニジン類は自然界に幅広く存在し、主に穀物や果物類に多く含まれている。その生理活性としては抗酸化活性を始め、抗動脈硬化活性、ガン細胞増殖抑制活性などが報告されている。しかし、その一群であるプロデルフィニジン類は自然界より純粋な状態で単離することは困難であるために詳細な構造活性相関の研究は遅れている。本研究ではプロデルフィニジン類のうちカテキンまたはエピガロカテキンおよびガロカテキンの重合体であるプロデルフィニジン B1, B2, B3, B4 と C2 の合成を行い、ヒト前立腺ガン細胞における抗腫瘍活性試験を行ったので報告する。

【方法・結果】

昨年度は、プロデルフィニジン B3, C2 の合成について報告したが、今回は、プロデルフィニジン B1, B2, B4 の合成について報告する。まず、phloroglucinol と methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate を出発物質として求電子剤を合成した。続いて、求電子剤と別途合成した求核剤を等量用いたルイス酸による縮合反応を行い、B1 ではルイス酸に Yb(OTf)₃ を用いて収率 66%で、B2 ではルイス酸に AgBF₄ を用いて収率 76%で、B4 ではルイス酸に Yb(OTf)₃ を用いて収率 78%で 2 量体を合成し、それぞれ全ての保護基を脱保護することでプロデルフィニジン B1 (3), B2 (4), B4 (5) の合成を完了した。以上のようにして得られた化合物とポジティブコントロールとして epigallocatechin gallate (EGCG) を用いて、ヒト前立腺ガンの細胞に対してガン細胞増殖抑制試験を行った。その結果、合成した 3 種類の化合物は EGCG と同程度の抗腫瘍活性を有していたが、カテキンやエピカテキンのオリゴマーは顕著な活性を示さなかった。

キクイモ抽出物の花粉症軽減効果と有効成分の同定 ○野口将成, 真壁秀文, 片山茂, 中村宗一郎 (信大院農)

【目的】スギ花粉アレルギーは、日本国民の 5 人に 1 人が保持しているとされ、「国民病」とも言われており、食品由来の安全な花粉症軽減効果を持つ薬剤の開発が期待されている。こうして我々は、サポニンやフェノール性化合物などの多くの生理活性物質を含んでいるキクイモ (*Helianthus tuberosus*) に着目した。本研究ではキクイモ抽出物の花粉症軽減効果について調べ、その有効成分を特定することを目的としている。

【方法・結果】キクイモ粉末に 10 倍量の 70%メタノールを加え、室温で撹拌 (3min, 12,000 rpm) し粗抽出物を調製した。Cry j 1 溶液により感作を行った Balb/c マウス (雌, 5 週齢) に、粗抽出物を混合した飼料を 40 日間自由摂取させたのち、ひっかき・くしゃみ回数、血清中のヒスタミンおよび IgE 濃度を測定した。その結果、それぞれでコントロール群と比較して顕著に低下した。また、粗抽出物を HPLC 分析に供し、分取し画分 A~E を得た。Balb/c マウスの腸管パイエル板細胞に添加後、Cry j 1 刺激下で 3 日間培養し、培養上清中の IL-4 濃度を測定した。その結果、ピーク B に IL-4 産生抑制効果があることが示唆された。さらに、樹状細胞の抗原提示能に及ぼす影響について検討した。すなわち、THP-1 由来樹状細胞に画分 A~E を添加し、Cry j 1 刺激下で 3 日間培養して、MHC class II の構成分子である HLA-DR の発現量をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、画分 B において、顕著な HLA-DR 発現抑制効果が確認された。そこで、画分 B を EI-MS および NMR 解析に供し構造解析を行った結果、この成分は、カフェ酸誘導体 1-(3',4'-dihydroxycinnamoyl)cyclopentane-2,3-diol (図 1) と同定された。

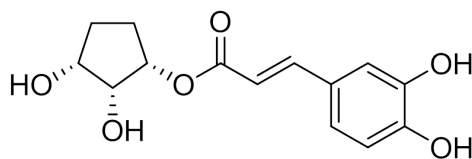


図 1. 有効成分の構造式

Procyanidin B2,B3-gallate 類の合成と抗腫瘍活性

○須田真人^a, 加藤 幸^a, 戸田一弥^b, 松本桐子^b, 川口耕一郎^b, 河原誠一^c, 服部恭尚^d, 藤井 博^b, 真壁秀文^a (信州大学大学院農学研究科 機能性食料開発学専攻^a, 信州大学農学部 応用生命科学科^b 株式会社サルクセル^c, 京都薬科大学 創薬科学系^d)

【目的】

Procyanidin 類は自然界においてブドウや茶葉に含有されるポリフェノールの一類であり, 抗酸化活性を筆頭に多くの生理活性が知られている. とりわけ gallate 誘導体には, DNA ポリメラーゼ阻害活性や抗腫瘍活性が報告されており, 重要な生理活性物質として注目を集めている. 本研究においては, 縮合剤に Yb(OTf)₃ を用い温和な条件で等量の基質の縮合を行い, gallate 誘導体である procyanidin B2-3-*O*-gallate, 3''-*O*-gallate, 3,3''-di-*O*-gallate 及び procyanidin B3-3-*O*-gallate, 3''-*O*-gallate, 3,3''-di-*O*-gallate の合成することを目的とした. また合成した gallate 誘導体を, ヒト前立腺癌細胞を用いた抗腫瘍活性試験に供することを目的とした.

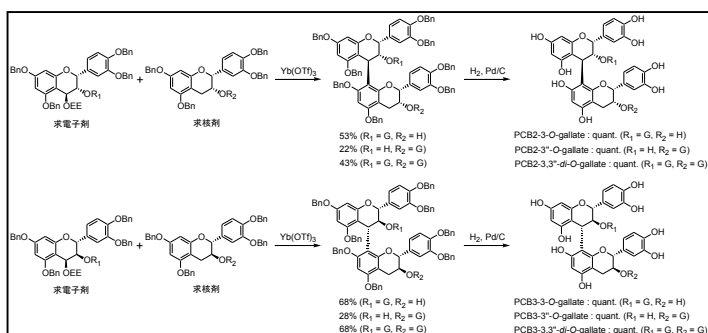
【方法・結果】

(+) -Catechin 及び(-) -epicatechin

を出発物質としてそれぞれ求電子剤・求核剤を合成し, それらを等量用いた Yb(OTf)₃ による縮合反応を行いそれぞれの中間体を合成した. 得られた中間体に対し Pd/C を用いた水素添加反応を行い, 目的化合物の合成を達成した.

合成した gallate 誘導体について

ヒト前立腺癌細胞を用いた抗腫瘍活性試験を行った所, 有意な活性が見られるが既に活性が知られる EGCG 及び prodelphinidin B3 と比較してやや弱い活性であることが判明した¹⁾.



- 1) Suda, M., Katoh, M., Toda, K., Matsumoto, K., Kawaguchi, K., Kawahara, S., Hattori, Y., Hujii, H., Makabe, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4935-4939.

DNA 結合タンパク質を用いたタンパク質の新規ビーズディスプレイ法の開発と

トランスグルタミナーゼアッセイへの応用

○溝口琢郎¹, Murzabaev Marsel¹, 小林功², 児島孝明¹, 人見清隆³, 中野秀雄¹

(¹名大院・生命農学、²農研機構・食総研、³名大院・創薬科学)

【背景と目的】

本研究室では、エマルジョン内での PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた機能性生体分子 *in vitro* ハイスループット解析手法、ビーズディスプレイ法の開発に成功している。しかしながら本手法を様々なタンパク質・酵素機能改変に用いるためには、ビーズ当たりの提示タンパク質分子数の増大と、提示タンパク質分子数の均一化が望まれる。本研究では、DNA 結合タンパク質である一本鎖 Cro (scCro) を用いたビーズディスプレイ法の改良を目的とした。

【方法と結果】

モデルペプチドを DNA 結合タンパク質である scCro との融合タンパク質として発現させ、その結合配列用いてビーズ上への提示量をしらべたところ、従来の抗エポトープタグ抗体を介した場合と比べ、顕著に高い提示量が確認された。また、より均一な液滴中で無細胞タンパク質合成反応を行う為、Flow focusing 技術を用いて作製したエマルジョン内で、無細胞タンパク質合成系による scCro の発現を行い、フローサイトメトリーによりビーズ上の scCro 提示量の解析を行った。その結果、Flow focusing によってエマルジョンを作製した場合の scCro 提示量は、従来のスターラーを用いた場合に比べより均一で、この技術がライブラリーの均一化に有効であることが示された。現在、架橋酵素であるマウス由来トランスグルタミナーゼ 2 のターゲット配列の探索に用い解析を進めている。

**Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase and Manganese Peroxidase
for Bead Display-based High-throughput Screening**

○ Bo ZHU, Ryoko NINOMIYA, Takaaki KOJIMA, Yugo IWASAKI, Hideo NAKANO
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【Purpose】

A cell-free protein synthesis system can produce various types of proteins directly from DNA templates such as PCR products, and therefore attracts great attention as an alternative protein synthesis system especially for high-throughput functional screening of proteins. Here, we report on successful expression of active horseradish peroxidase (HRP) and *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase (MnP) in an *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system for bead display-based high-throughput screening.

【Methods and results】

The reaction conditions of cell-free protein synthesis of HRP and MnP, such as the concentrations of hemin, calcium ions, glutathione and disulfide bond isomerase were optimized to increase the solubility and activity of the synthesized enzyme. Then, the cell-free synthesized HRP and MnP purified using the hemagglutinin tag showed similar and higher specific activity compared to the commercial wild-type enzymes, respectively, suggesting that the cell-free system can be used as a preparative method for efficient synthesis of disulfide bond-containing metalloenzymes such as HRP and MnP.

Moreover, the cell-free synthesis of HRP in hexadecane-based emulsion and its immobilization on microbeads were successful. The activity of immobilized HRP was detected by a tyramide-based fluorogenic assay using flow cytometer. A model bead library containing genes of wild-type HRP and inactive mutant was screened, and an enrichment of the wild-type gene from the library has been achieved. Thus, the bead display and fluorogenic assay are effective for high-throughput screening of HRP.

Clostridium josui のセルラーゼ遺伝子クラスターにコードされるファミリー9 セルラーゼの酵素特性
○織田拓, 寺田渉平, 汪亜運, 栗冠真紀子, 木村哲哉, 栗冠和郎 (三重大学)

【目的】

植物の細胞壁の主成分であるセルロースを分解し、燃料化、あるいは原料化するために、セルラーゼの利用が考えられる。*Clostridium josui* のゲノムにはセルラーゼ複合体であるセルロソームの成分をコードする遺伝子クラスターが存在する。今回我々は、この遺伝子クラスターに含まれる糖質分解酵素ファミリー9のセルラーゼ(Cel9A, Cel9B, Cel9C, Cel9D, Cel9E)に着目し、特に Cel9A 及び Cel9B の酵素特性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

C. josui のセルラーゼ遺伝子クラスター内にコードされている *cel9A*, *cel9B*, *cel9C*, *cel9D* および *cel9E* の遺伝子を、pET-28a プラスミドベクターを用いて、大腸菌 BL21 (DE3) で発現させ、酵素特性を調べた。これらの酵素の至適温度は約 45-60℃、至適 pH は 6.0-7.0 であった。また Cel9A, Cel9B, Cel9C 及び Cel9E は barley β -D-glucan に、Cel9D は Konjac glucomannan に高い活性が見られた。Cel9A 及び Cel9B の糖の分解様式を、薄層クロマトグラフィを用いて調べた。Cel9A は非還元末端から数えて 3 番目の β 1-4 グリコシド結合に高い加水分解活性を示し、また 2 番目の β 1-4 グリコシド結合にも低い活性が見られた。Cel9B は非還元末端側から数えて 2 番目の β 1-4 グリコシド結合に高い活性が見られた。さらに、Cel9A 及び Cel9B からそれぞれ CBM3c 及び CBM4 を除いたタンパク質を構築し、元の酵素と活性を比較した結果、Cel9A, Cel9B 共に酵素活性が低下した。以上のことから、Cel9A 及び Cel9B は共にプロセッシブなエンドグルカナーゼであり、両者に存在する CBM はこれらの酵素の活性発現に非常に重要であることが示唆された。

P21

セルロース系バイオマス分解細菌 *Clostridium josui* の
酵素複合体の糖質結合モジュールの結合特性
○市川俊輔¹, 荻田修一¹ (¹三重大院地域イノベ)

【目的】

セルロース系バイオマスは有用な再生可能資源である。エタノールなどの化合物に転換して利用するためにはバイオマスの酵素分解のステップを必要とするが、その効率は非常に悪い。この効率を向上させるために、さまざまな前処理法が模索されている。セルロース系バイオマス分解細菌 *Clostridium josui* 由来のセルロース結合タンパク質 (CBM3) の結合量を増加させるように前処理したバイオマスは、効率的に酵素分解できることが報告されている。本研究では、CBM3 の結合特性を明らかにすることによって、分解しやすいバイオマスの特徴の理解を目指した。

【方法・結果】

Clostridium josui CipA CBM3 (CBM3) 遺伝子をクローニングし、大腸菌にて発現させ、精製することにより、CBM3 溶液を調製した。CBM3 のセルロース系バイオマスを構成する多糖への結合性をマクロアレイ法により決定した。CBM3 はセルロースの結晶表面に結合するものと報告されてきたが、非結晶性セルロースである酸膨潤セルロースや、可溶性多糖であるキシログルカンへも結合することが明らかとなった。また、CBM3 とセルロース表面の結合反応を吸着等温解析にて詳細に調べた結果、CBM3 は複雑なセルロース表面の少なくとも 2 種以上の構造を認識して結合していることが明らかとなった。これらの結果は CBM3 がセルロース系バイオマス中の多様な構造へ結合することを示唆する。CBM3 の結合量はさまざまなバイオマス分解酵素が利用できる、バイオマス中の表面積の大きさを反映しているものと予想される。

P22

養菌性キクイムシと共生する新規 *Fusarium* 属糸状菌が生産する
セルロース分解酵素に関する研究

○竹浦賢吾¹, 田中大助¹, 梶村恒², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大 農, ²名大院 生命農学)

【目的】

キクイムシ類は、甲虫類ゾウムシ上科に属する昆虫である。養菌性キクイムシと呼ばれるグループはマイカンギアと呼ばれる器官をもち、そこに共生菌を保有している。養菌性キクイムシは樹木に穿孔して坑道を形成する際、保有している菌類を坑道壁面に接種し、その後、生育した菌類を摂取するという生活様式をもつことが知られている。養菌性キクイムシは樹木に坑道を形成するだけでなく、持ち込む菌により、木材質の低下や樹木の枯死を引き起こす。養菌性キクイムシが保有している菌類及び坑道内の菌は、木質を炭素源として生育していることから、セルロースを分解して栄養としていることが示唆されている。本研究でイチジクに寄生する養菌性キクイムシのアイノキクイムシ (*Euwallacea interjectus*) の保有するセルロース分解菌の単離をし、その菌のセルロース分解機構を解明することを目的とする。

【方法・結果】

人工飼育した *E. interjectus* の坑道内壁より試料を採取し、セルロースを単一の炭素源とした培地で集積培養することでセルロースを資化できる菌をスクリーニングした。単離した菌の 18S rDNA の塩基配列を決定し、BLAST 解析を行ったところ、*Fusarium solani* と 98%の同一性を示す新規の *Fusarium* 属糸状菌が見出された。この菌をセルロースを含む最少培地で培養後、培養濾液中の活性を測定したところ、培養 4 日目で高いセルラーゼ活性が検出された。したがって、分離された糸状菌はセルロース分解菌であることが分かった。グルコースのみ及びセルロースのみを炭素源とした培地で *Fusarium* 属を培養し、細胞外に分泌されたタンパク質をプロテオーム解析にて比較した。その結果、セルロース培地で多数のタンパク質が特異的に発現していることが明らかとなった。MALDI-TOF/TOF-MS 及び Mascot search を用いた解析についても併せて報告する。

中高圧処理によるセルラーゼの反応メカニズムについて

栗原聖¹, ○林秀太¹, 藤田智之¹, 来山哲二², 采女信二郎² (¹信州大院農・機能食, ²ポエック)

【目的】

セルロース系バイオマスは食品と競合しないことから、バイオエタノールの原料として注目されている。筆者らは 90MPa 程度の中高圧条件下でセルラーゼ活性が昂進することを見出した。これまでに圧力依存性が認められた Celluclast 1.5L を用いて反応条件の検討を行い、産生糖量の増加と加圧下におけるグルコースへの加水分解量が増加することを報告した¹⁾。本研究では、加圧下におけるセルラーゼ反応について、糖組成およびグルコシダーゼ活性をより詳細に検討し、加圧による効果を検証した。

【方法・結果】

セルラーゼは Celluclast 1.5L (Novozymes)、比較にはセルラーゼアミノ “4T” (天野エンザイム)、セルラーゼ “オノズカ” 3S (ヤクルト) を用いた。チャック付き袋に基質 (Avicel) 100mg、0.25M 酢酸緩衝液 5ml (pH4.5) を入れ、セルラーゼ 1 mg を添加し、常圧 (0.1MPa) または中高圧 (90MPa) 下、50 にて 6 24 時間反応を行った。反応後、煮沸し遠心した後上清を回収し、RI 検出器付 HPLC で分析した。また、*p*-ニトロフェニルグルコシド (*p*NPG) および D-グルコノ-1,5-ラクトンを用いてβ-グルコシダーゼ活性への影響を調査した。

常圧および加圧下における反応 24 時間後のセロビオース/グルコースの生成比率を求めた結果、Celluclast1.5L、セルラーゼアミノ “4T”、セルラーゼ “オノズカ” 3S の順で高くなり、加圧下における産生糖量の増加はグルコースの生成に起因していることが明らかとなった。

基質に *p*NPG を用いて、β-グルコシダーゼ活性を測定した結果、加圧下において酵素活性が昂進することを明らかにした。反応系中に阻害剤である D-グルコノ-1,5-ラクトンを添加し、同様の反応を行ったところ、セロビオースの生成が常圧・加圧ともに反応 6 時間以降で阻害されることを確認した。以上の結果から、Celluclast 1.5L 中のβ-グルコシダーゼが圧力に感受性を示すことが示唆された。

1) 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 2C12p11 (2013)

超高温性堆肥の温度と微生物群の経時的・空間的変化の解析

○福丸 琢人, 東 俊之, 坂井 勝, 栗冠 真紀子, 木村 哲哉, 栗冠 和郎 (三重大院・生資)

【目的】

100℃に近い高温による堆肥化では、有機物の分解速度が速いと考えられており、そのような環境中にどのような細菌が生息しているか関心が持たれる。過去の研究では、1 点もしくは数点を対象にした温度の経時的変化は明らかにされているが、空間的変化 (深さによる温度の違い) は詳細には解明されていない。そこで本研究では、超高温の堆肥化過程における温度と微生物群の経時的・空間的変化を解析することを目的とした。

【方法・結果】

堆肥化は、汚泥等を縦 13 m×横 7 m ×高さ 3 m に積み、下部より強制通気することにより行われる。堆肥にハンドオーガで穴を開け、熱電対を 25 cm 間隔で設置した竹の棒を差し込み、データロガーを用いて 1 週間程度温度測定を行った。その後、温度測定を行った地点まで側面より堆肥を除去し、堆肥表面から等間隔の深さで試料を採取した。採取後、残りの堆肥を積み上げた。積み上げた堆肥に再び温度測定装置を設置した。この一連の操作を繰り返した。採取した堆肥を用いて、生菌数 (培養法及び sFDA 法) と全菌数 (EB 法) を測定した。温度測定の結果、切り返し直後の温度は均一で 65℃程度であったが 150 cm より上の層では徐々に温度は上昇した。特に堆肥の最上層(25~75 cm)では最高で 90℃近くにまで達した。EB 法では経時的・空間的な変化は見られず、全菌数は 10⁹ 10¹⁰ cells/g で推移した。sFDA 法では、生菌数の空間的分布に違いは見られなかったが、培養法では、下層(225 cm)の生菌数は上層(25 cm)よりも多い傾向を示した。また、sFDA 法と培養法の両方において、堆肥化日数が経過するに伴い、生菌数が減少する傾向が見られた。以上の結果から、堆肥の温度が高温に維持され続けると、生菌数が減少することが明らかになった。

P25

コンポストからのセルロース分解好熱細菌の単離と同定および性質決定

○岡田 智八¹, Piyatheerawong Weera², 原 翔一¹, 兒島 孝明¹, 岩崎 雄吾¹, 中野 秀雄¹

(¹名大院・生命農学, ²Kohon Kaen Univ.・Tech.)

【目的】CO₂ 排出量を削減し、持続可能な化学工業システムを構築するためには、再利用可能な生物由来の炭素源を利用するバイオリファイナリー技術確立する必要がある。しかしながら代替エネルギーの代表ともいえるバイオエタノールの原料の多くは穀物由来の糖であり、食糧との競合が問題となっている。このため、セルラーゼを用いたセルロース系バイオマス資源の利用する、新たなバイオプロセスが望まれている。

そこで本研究では、農業廃棄物を炭素源として利用するバイオプロセスに適した微生物の候補として、セルロースを唯一炭素源として生育しする好熱菌の探索を行った。

【方法・結果】バイオマスを主要原料とするコンポスト中の微生物を、カルボキシメチルセルロース (CMC) のみを炭素源とする培地を用い、50°Cで単離した。得られた菌株を CMC 培地で培養後 CongoRed 溶液で染色し、コロニー周辺でのハローを形成する菌株を選別した。さらにリン酸処理セルロース (PASC) もしくは CMC のみを炭素源とする培地での生育がみられた菌株を選別した。得られた菌株について、16s rRNA 遺伝子配列解析を行ったところ、それらは *Streptomyces* 属もしくは *Bacillus* 属および *Chitinophaga* 属に属する細菌であった。

現在それらの菌株が生産する疎水性物質や、セルラーゼ活性等を調べている。

P26

糸状菌セルラーゼの環境 pH 依存的発現誘導メカニズム

○國武絵美¹, 萩原大祐², 宮本健太郎¹, 金丸京子¹, 木村真¹, 小林哲夫¹

(¹名大院・生命農, ²千葉大・真菌センター)

【目的】糸状菌セルラーゼは植物性バイオマスの有効利活用に極めて有用と考えられており、その生産制御メカニズムの理解は産業応用に直結する。我々は *Aspergillus* 属におけるセルラーゼ遺伝子発現が経路特異的転写活性化因子 ManR と広域転写因子 McmA により協調制御されることを見出し、アルカリ pH 応答に関わる転写因子 PacC の制御下にあることも明らかにした。本研究では pH シグナリングと ManR/McmA 依存的発現制御との関連について解析した。

【方法・結果】*A. nidulans* では誘導物質セロビオースに応答して 7 種のセルラーゼ遺伝子が高発現する。野生株及び *pacC* 破壊株における酸性 (pH 4.2), アルカリ性 (pH 8.2) 液体培地でのこれら遺伝子の発現を qRT-PCR 法を用いて解析した。野生株ではいずれの遺伝子についても酸性条件よりもアルカリ条件において速やかな転写が観察され、*pacC* 破壊株ではどちらの条件においても激減していた。アルカリ条件でセロビオース誘導した際の野生株、*pacC* 破壊株での遺伝子発現を RNA-sequencing により網羅的に解析した結果、PacC 依存的に高発現する遺伝子群は ManR 制御下遺伝子群とほぼ一致した。これは PacC が ManR の活性を制御することを示唆するが、*pacC* 破壊は *manR* の発現に影響を与えなかった。PacC と ManR 両者により制御される遺伝子群には複数の推定糖輸送体遺伝子が含まれており、TLC 分析から *pacC* 破壊株ではセロビオースが残存していることが明らかとなった。以上から、PacC はセロビオースの取り込みを介して、ManR の活性を制御していると考えられる。本研究は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の一環として行われたものである。

P27

出芽酵母のアセトアルデヒドストレス耐性におけるグルタチオンおよびシステイニルグリシンの役割
○佐藤優太, 松藤淑美, 早川享志, 中川智行 (岐阜大院応生)

【目的】

アセトアルデヒド (AA) はタンパク質などの生体分子と付加体を形成することで強い細胞毒性を示すストレス化合物のひとつであるが、様々な生体内反応において必ず生成される代謝中間体でもある。特に、出芽酵母のアルコール発酵において AA は多量に生成されることから、出芽酵母は何らかの AA 毒性回避システムを保持していることが推察できる。我々はこれまでに、出芽酵母の AA 耐性機構にグルタチオン (GSH) が重要な役割を持つことを明らかにしており、還元型 GSH が直接 AA をトラップすることで AA による細胞毒性を軽減していると推定してきた¹⁾。一方、昨年、出芽酵母において GSH の分解経路による恒常性維持の新たな知見が報告され²⁾、AA ストレス耐性機構においても GSH 代謝中間体を考慮する必要性が生じてきた。そこで、本研究では GSH とその代謝恒常性の維持に関与する DUG 遺伝子群の AA 耐性機構における役割について解析することにした。

【方法・結果】

DUG 遺伝子群は、GSH から Cys-Gly を介して Cys を産生する代謝系をコードする遺伝子群であることから、これらの遺伝子欠損株 *dug1Δ*, *dug2Δ*, *dug3Δ* の AA 感受性について試験を行った。その結果、*dug2Δ* 株が AA 感受性を示したことから、GSH から Cys-Gly の生成に関与している *Dug2/3* が AA 耐性に重要な役割を持つと考えられる。また、AA ストレスは細胞内の GSH 量を著しく減少させることから、AA 耐性機構において AA と直接結合することにより毒性を下げる役割を持つと考えられてきた¹⁾。しかし、Cys-Gly も AA と強固に結合するため³⁾、GSH のみならずその代謝中間体 Cys-Gly も同様に AA 耐性に関与することが推測された。

¹⁾ *AMB* 97: 297 (2013), ²⁾ *JBC* 287: 4552 (2012), ³⁾ *Alcohol Clin Exp Res* 27: 1613 (2003).

P28

出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構における Adh1p および Ald6p の役割
○松山明加, 太田真由美, 田島彩奈, 早川享志, 中川智行 (岐阜大院応生科応用生命)

【目的】

アセトアルデヒド (AA) は、タンパク質や DNA などと生体内で付加体を形成することで毒性を示す揮発性化学物質である。AA はエタノール代謝過程で必ず産生されるほか、アルコール発酵における重要な代謝中間体でもある。このことから、出芽酵母は AA に対する何らかの耐性機構を獲得しているものと考えられる。本研究では、エタノール代謝において重要なはたらきを持つことが知られているアルコール脱水素酵素 (ADH) と AA 脱水素酵素 (ALD) に着目し、AA 耐性機構におけるエタノール代謝系の役割について検討した。

【方法・結果】

出芽酵母は 5 つの ADH アイソザイムと 5 つの ALD アイソザイムを持つ。まず ADH の四重欠損株のエタノールおよび AA に対する感受性を観察したところ、*adh2Δadh3Δadh4Δadh5Δ* 株が野生株よりも強いエタノールおよび AA 耐性能を示した。つまり、Adh1p が両ストレス耐性において重要な役割を持つことが推測された。一方、ALD 遺伝子欠損株のエタノールおよび AA 耐性能を観察したところ、*ald6Δ* 株が最も強い感受性を示した。また、*ald6Δ* 株の AA 消去能を観察したところ、*ald6Δ* 株は野生株よりも培地中の AA を減少させる能力が著しく低下していた。さらに、グルコースおよびグリセロール生育時における *ald6Δ* 株の AA 感受性を観察したところ、グルコース生育に比べてペントースリン酸経路 (PPP) では代謝されないグリセロール生育では、*ald6Δ* 株は AA に対して強い感受性を示した。よって、AA 耐性機構において Ald6p は AA の消去のみならず、PPP と共に NADPH 再生系としても重要な役割を果たしていることが推測される。

**メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* の異種遺伝子発現系への応用を目指した
新たな炭素源の探索と AOD アイソザイムの発現特性の解析**
○若山 敬嗣, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大応生科・応用生命)

【目的】

P. methanolica は、強力な発現力を持つメタノール誘導性 *MOD1* プロモータを有することから、その能力を利用した異種遺伝子発現系が開発され、広く利用されている。しかし、本酵母は発現応答が異なる 2 種のアルコールオキシダーゼ (AOD) 遺伝子 *MOD1* と *MOD2* を持ち、その遺伝子産物からなる AOD アイソザイムを持つ。つまり、両 AOD 遺伝子の発現特性を詳細に解析し、その能力を有効活用することで、より有益な新規異種遺伝子発現系への応用が期待できる。一方、メチロトロフ酵母のメタノール生育は高菌体収量が見込めないことから、生育促進かつ AOD 遺伝子発現を阻害しない新たな炭素源の選抜が急務である。このような背景から、本研究では *P. methanolica* AOD アイソザイムの発現特性の詳細を解析し、さらには両 AOD 遺伝子発現に最適な培養炭素源の選抜を目的とした。

【方法・結果】

P. methanolica の生育特性、さらには AOD アイソザイムの発現を阻害しない炭素源の選抜を目的に、様々な炭素源に 1%メタノールを添加した培地を作成し、その生育と AOD アイソザイムの発現特性を観察した。その結果、マンノース、アラビノース、セロビオースを炭素源とした場合、メタノールを添加した培地では、メタノールのみと比べ約 3 倍に菌体収率が上昇した。またこれらの AOD アイソザイムの発現を活性染色法にて観察したところ、Mod1p および Mod2p の発現が見られた。また、AOD アイソザイムの誘導時間を比較したところ、Mod1p は生育初期に誘導され、遅れて Mod2p の誘導が見られた。これらのことから、マンノースらを炭素源として利用することで高効率な有用タンパク質生産が期待され、メタノール濃度や誘導時間を制御することで 2 つの AOD プロモータを活用した新規異種遺伝子発現系への応用も期待できると推測される。

Simple, Rapid and Simultaneous Determination of Sugar and Ethanol Contents in Fermentation Medium
○Vioni Derosya, Naoto Isono, Akira Yamaoka, Ken-ichiro Suchara, Takaharu Kameoka, Atsushi Hashimoto
(Graduate School of Bioresources, Mie University)

【Purpose】

Low utilization of sago starch (*Metroxylon sagu*) as food source gives a possibility to use it for bioethanol production. Considering waste reduction, both starch and fiber of sago should be used in ethanol fermentation with glucose and xylose as the hydrolysis products. To accurately control the fermentation process, we tried to develop a simple, rapid and simultaneous determination of the sugar and ethanol contents in the medium based on the infrared spectroscopic information.

【Experimental Methods & Results】

The fermentation media containing different concentrations of glucose, xylose and ethanol in yeast nitrogen based (YNB) media were prepared for the infrared spectroscopic measurements. The spectra were collected using a Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer equipped with an attenuated total reflectance (ATR) accessory in the range from 4000 to 400 cm^{-1} .

The strongest peaks characterizing glucose, xylose and ethanol in YNB media were observed at 1036, 1050 and 1046 cm^{-1} , respectively. All calibration curves for each metabolite at these wavenumbers presented excellent linearities. Moreover, the intercepts of the calibration curves, which may theoretically show the absorbance of the medium without metabolite, were almost same as the experimental values. The metabolite contents in the mixture media were simultaneously calculated under the assumption that the spectral additivities could be satisfied. Consequently, the good agreements were observed between the actual and calculated values. This study could contribute the simple, rapid and simultaneous monitoring of the metabolites during bioethanol fermentation.

P31

組換え大腸菌によるホスホリパーゼ A₂-単鎖抗体融合タンパクの分泌発現とその利用
○岡野葵, 中野秀雄, 岩崎雄吾 (名大院生命農)

【目的】

組換え大腸菌による異種タンパク発現において、目的タンパク質が培地中に分泌されると有利である。本研究室では、*pelB* シグナル配列を付加した *Streptomyces violaceoruber* 由来ホスホリパーゼ A₂ (svPLA₂) を大腸菌で発現させたところ、培地中に分泌されることを見いだした。そこで本研究では、抗卵白リゾチーム単鎖抗体を svPLA₂ との融合タンパクとして発現させることで、分泌発現と ELISA への利用を目指した。

【方法・結果】

svPLA₂ の下流に抗卵白リゾチーム単鎖抗体を連結した発現プラスミドを構築し、pET システムを用いて発現させた。培養温度、誘導時間、各種シャペロンの利用等に関して発現条件を検討した結果、Skp シャペロンと共発現をすることで融合タンパク質の培養上清中への分泌がみられた。次に発現した融合タンパクを培養上清から精製したところ、100 mL のフラスコ培養から 0.1 mg の収量で精製タンパクが得られ、抗体活性を確認した。さらに、精製 PLA₂-scFv と PLA₂ の発色基質を用いることで抗原であるリゾチームの ELISA 検出が可能であった。

P32

ホスファチジルイノシトール合成活性を有するホスホリパーゼ D の 1-PI 特異性の向上
○黒岩千智、石田健、田中秀俊、中野秀雄、岩崎雄吾 (名大院・生命農・生命技術)

【目的】ホスファチジルイノシトール(PI)は脂質代謝改善作用などが認められる機能性リン脂質である。本研究室では、元来 PI 合成活性を持たない放線菌由来ホスホリパーゼ D(PLD)をタンパク工学的に改変することで、同活性を付与する事に成功した。しかし、改変型 PLD による PI の合成反応では、酵素の *myo*-イノシトールに対する位置特異性が完全ではないため天然型の 1-PI に加えて、その位置異性体である 3-PI も合成されてしまうという問題があった。そこで本研究では、1-PI の高純度合成を目的として、PI 合成型 PLD を改変することでさらなる位置特異性の向上を試みた。

【方法・結果】現有する改変型 PLD のうち、NYR(W187N/Y191Y/Y385R)変異体は 1-PI を優先的に生成し、その 1-PI/3-PI 比は約 76/24 である。NYR のイノシトール結合ポケットを構成する G186 から D190 の 5 残基からなるループ構造に着目し、それぞれの残基を他の 19 アミノ酸に置換した変異 *pld* 遺伝子を作製した。作製した変異遺伝子を実験室で発現させ、得られた粗 PLD を用いて PI 合成反応を行い、生成する PI の異性体組成を分析した。その結果、G186 および D189 への変異が選択性向上に有効であり、特に G186T 変異体では 1-PI/3-PI 比が約 90/10 程度に向上した。現在、G186 位と D189 位変異体の中から特異性の優れた 5 種類ずつを選択し、それらを掛け合わせた二重変異体の作製と位置選択性の評価を行っている。

P33

Uniform Emulsion for Biochemical Applications Using Inexpensive Flow-Focusing Device

○Marsel MURZABAEV¹, Takaaki KOJIMA¹, Isao KOBAYASHI², Hideo NAKANO¹

(¹Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., ²Food Engineering Div., National Food Research Inst.)

[Purpose]

Carrying out biochemical reactions such as PCR or cell-free protein synthesis in water-in-oil emulsion allows high-throughput screening of large libraries of biomolecules, where each droplet functions as an independent reactor. But droplets generated by bulk emulsification greatly vary in size, which leads to uneven distribution of reagents and causes difficulties in statistical analyses. Microfluidic devices can generate monodisperse emulsion but are expensive and require special equipment. We are working on development of inexpensive device which can generate monodisperse emulsion from biological samples.

[Methods and results]

We could make a relatively simple flow-focusing device which can produce monodisperse emulsion. It consists of two syringes driven by syringe pumps, standard fittings and tubes and a specially fabricated nozzle. This nozzle is made of a larger glass capillary for oil phase, smaller steel needle for water phase and a thin insulin needle for emulsification connected to the exit capillary. Using this device we could produce emulsion droplets that have an average diameter of 76.4 μm with coefficient of variation of 3.7%, which can be considered as monodisperse. Average volume was 0.000235 μl or 0.235 nL, which means 100 μl sample can be partitioned into around 425 500 compartments. We used PCR buffer with magnetic beads as a water phase, so this device can be used for emulsion PCR.

P34

牛乳由来タンパク質ラクトフォリンの感染阻害作用に関する研究

○大野翔平¹, 稲垣瑞穂², 山田佳太³, 鈴木徹⁴, 松田幹⁵, 高橋毅⁶,
杉山誠², 中込とよ子⁷, 中込治⁷, 矢部富雄^{1,2,4}, 金丸義敬^{1,2,4}

(¹岐阜大院応生, ²岐阜大応生, ³近畿大薬, ⁴岐阜大院連農,

⁵名古屋大院生命農, ⁶(株)明治・研究本部, ⁷長崎大院医歯薬総合)

【目的】

牛乳由来タンパク質ラクトフォリン (28 kDa, 以下 LP28) および 18 kDa フラグメント (以下 LP18) は、ヒトロタウイルスに対して感染阻害作用を示すことを我々は報告してきた。また、LP18 の分子修飾としてアミノ酸 77 位の N 結合型糖鎖をもつことがわかっている。これまでに、LP18 の示す感染阻害作用は、ウイルスに直接的に接しなくとも起こり得ること、さらに LP18 は、N 結合型糖鎖を介して細胞に取り込まれることを見出している。これらの 2 点の観察から、LP18 は細胞内に取り込まれたのち、感染阻害作用機構に関与していることが推測される。そこで本研究では、感染阻害作用には LP18 が細胞内に取り込まれることが必須であるか検証することを目的とする。

【方法・結果】

LP18 の N 結合型糖鎖を酵素的に除去したサンプル (N 型糖鎖除去 LP18) を調製し、アカゲザル腎臓由来細胞 MA104 を用いて、ヒトロタウイルスとサンプルが直接接しない感染阻害試験を行った。サンプルから酵素処理後の N 型糖鎖を限外濾過により除去しようとする、完全に糖鎖を除去しきれず、感染阻害作用を示したため、SDS-PAGE あるいは native-PAGE を用いてサンプルの精製を試みた。その結果、SDS は LP の感染阻害能に対して影響をもつものの、native-PAGE による精製では、サンプルが本来もつ感染阻害能を保持することがわかった。現在、native-PAGE による N 型糖鎖除去 LP18 の精製および感染阻害試験を試みている。この結果から、LP18 が感染阻害作用を示すためには N 型糖鎖を介して細胞に侵入することが必須であるのかどうかが明らかになるだろう。

Arthrobacter sp. H10-2 の DFAI オリゴ糖合成酵素○原口和朋¹ (¹農研機構・食品総合研究所)

【目的】

チコリなどの植物に多糖類イヌリンが含まれている。イヌリンに微生物酵素を作用させることによりオリゴ糖 DFAI (ディーエフエーワン) が生産される。DFAI は砂糖の 50% 程度の甘味を有し、低カロリー甘味料などとしての利用が期待される。今回青森県内 (弘前市) から採取した土壌試料からイヌリンを資化する細菌 H10-2 株を分離した。本菌株は培養上清中にイヌリンから DFAI オリゴ糖を生成する酵素を生産することが判明した。本菌株について分類・同定に関する検討を行うとともに、本酵素を精製し酵素学的な諸特性を解明することを目的として検討を行った。

【方法・結果】

分離された H10-2 株について、グラム染色、16S リボソーム DNA の塩基配列の決定など、分類学的な検討をおこなった。本菌株のリボソーム DNA の塩基配列は *Arthrobacter ramosus* のそれと 98.6% のホモロジーを示した。しかし、分子系統解析の結果 *Arthrobacter* の既知の種とは異なり、種レベルで独立した分子系統位置を示した。これらの結果から、本菌株は *Arthrobacter* sp. H10-2 と同定された。本菌株が培養上清に生産する DFAI オリゴ糖合成酵素 [EC4.2.2.17] をイオン交換クロマト、疎水クロマトなどによって電気泳動的に均一に精製した。精製の過程で比活性は約 35 倍に上昇し、収率約 17% で精製酵素を得ることができた。本酵素の反応至適 pH は 5.5、反応至適温度は 40℃ であった。耐熱性について検討すると 75℃、30 分まで安定という結果が得られた。本酵素の分子量を SDS-PAGE で推定すると 39kDa という価が得られた。

嫌気性細菌の生産する黄色色素 (YAS) とセルラーゼ活性に関する研究

○栗冠真紀子, 木全翔太郎, 木村哲也, 栗冠和郎 (三重大院生資)

【目的】

嫌気性細菌の中には培養中に YAS を生産する菌がいる。*Clostridium thermocellum* や *Clostridium josui* を不溶性セルロースを基質として培養した際、増殖中に YAS を生産する。本研究では、*C. thermocellum* の生産する YAS のセルラーゼ活性に及ぼす効果を報告する。

【方法・結果】

C. thermocellum ATCC27405 株を不溶性セルロース (フナセル) を基質として培養し菌体を回収し、これにアセトンを追加して YAS を抽出した。抽出した YAS をフナセルに吸着させ、これを酵素反応の基質とした。YAS を吸着させたフナセルを基質とした場合、*C. thermocellum* の天然セルロソーム、*C. thermocellum* のセルラーゼである Cel9K、Cel8A、Cbh9A の活性は、YAS を吸着していないフナセルを基質とした時に比べて、それぞれ 2.8 倍、2.0 倍、0.8 倍、2.0 倍と増加した。また Cel9K、Cel8A、Cbh9A を成分として構築した人工ミニセルロソームの活性は 2.5 倍に増加した。一方、*C. josui* の Cel9E や *Paenibacillus barcinonensis* の Cel48C に対しては酵素活性を増加させることはなかった。

モデル生物としてのメダカにおけるタンパク質架橋化酵素の生化学的研究
 ○小河亮太、菅沼名津季、菊田紋華、高田佑紀、渡辺優子、辰川英樹、人見清隆
 （名大院創薬科学）

【目的】

ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) は、飼育も含め遺伝子変異体の獲得がマウスに比べて容易であり、創薬シーズ探索のモデル生物としても注目されている。高等動物のタンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼは、カルシウム依存的にタンパク質架橋による機能変換を行う酵素ファミリーである。ヒトでは 8 つのアイソザイムが存在するが、生理的意義の全容は不明で、酵素活性の異常は様々な疾患の要因となる。本研究ではメダカを用いて、関連疾患モデル生物作出を最終目的に本酵素の生化学的解析を行った。

【方法・結果】

遺伝子検索により、メダカにはタンパク質架橋化酵素が 7 種類存在することを見出した。それぞれについて全配列を決定した。酵素の一次構造から、ヒトのアイソザイムに対応するオルソログ（相同遺伝子）酵素 5 種を決定した。またどのアイソザイムにも該当しない、2 種のオルソログも見出した。

それらについて、大腸菌もしくは昆虫細胞発現系によって、組換え蛋白質を得ることができたため、生化学的な解析を行った。さらに 4 種の組換えタンパクについてはモノクローナル抗体を作製した。野生型メダカ組織切片とモノクローナル抗体を用いて、各酵素の組織分布を明らかにした。現在は TALEN 法もしくは、TILLING 法と呼ばれる手法によって、遺伝子欠失変異体の作製を行っており、本酵素活性が低下・欠損したメダカの表現型を解析している。

タンパク質架橋化酵素の生体内組織分布の解析
 ○大橋慎太郎、阿部奈都美、辰川英樹、人見清隆（名大院創薬科学）

【背景・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 TGase）は、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基間をカルシウム依存的に架橋化する酵素ファミリーである。TGase は哺乳類では 8 種のアイソザイムが存在しており、様々な組織で特異的に発現して、血液凝固や皮膚形成などの生理的役割を果たしているが、これらのアイソザイムの詳細な組織分布については、未だ明らかになっていない点が多い。本研究ではマウスの全身切片を用いて TGase の局在部位を網羅的に検出し、基礎的なデータを得ることを目的とする。全身切片の活性可視化や免疫染色ではアイソザイムすべてを捉えることは現状困難であるため、まず、アイソザイムごとの mRNA レベルでの存在パターンについて RT-PCR, Real-Time PCR, *in situ* hybridization を用いて解析を行った。初めに主要なアイソザイムである TGase1, TGase2 についての評価を行った。

【方法・結果】

RT-PCR によってマウスの 21 種類の組織における mRNA レベルの分布を明らかにした。また、Real-Time PCR によって TGase1 が目、皮膚、心臓、脾臓、また、TGase2 が目、心臓、腎臓、肝臓において高い発現量を示すことを明らかにした。*In situ* Hybridization を用いてマウス新生児の全組織切片における TGase1, TGase2 の mRNA レベルでの局在分布を可視化することに成功した。結果、TGase1 は脾臓、胸腺、皮膚、肝臓において発現が見られ、TGase2 はこれらの部位に加えて脊椎、胃、腎臓においても発現が認められた。今後、他のアイソザイムにおいても、定量的・網羅的な解析を順次進めていく。

P39

高反応性基質ペプチドを用いた腎臓におけるタンパク質架橋化酵素の活性検出
○古川健太郎、山崎梨沙、山根美樹、辰川英樹、人見清隆（名大院創薬科学）

【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、高等動物における生命機能に対して多様な役割を果たし、タンパク質中の特定のグルタミン残基とタンパク質中のリジン残基の間にイソペプチド結合を形成する酵素である。TGase は特定のグルタミン残基を認識して反応中間体を形成するため、グルタミン残基との反応様式が重要となる。ヒトでは 8 種類のアイソザイムが存在するが、反応する基質のグルタミン残基の周囲の構造は異なり、特異性が生じる。我々は各 TGase に対する、12 残基からなる高反応性基質配列(グルタミン残基側の基質)をランダムペプチドライブラリからスクリーニングして取得した。

本研究ではこの高反応性基質ペプチドを用いて、腎臓を含めほとんどの組織に存在する TG2 と、腎臓に局在するが生理学的意義が不明な新規アイソザイムである TG7 の両者について、リジン残基側の基質探索を目的とした。

【方法・結果】

TG2、TG7 それぞれに対する高反応性基質ペプチド（ビオチン標識）をマウス腎臓抽出液と反応させた。内在性 TGase によって標識基質ペプチドと架橋されたリジン残基側の基質タンパク質の反応産物について二次元電気泳動を行い、アビジン過酸化酵素で検出した。その結果、明らかに両者で異なる架橋産物が得られ、それぞれの酵素に特異的な基質が検出されていることを見出した。一方で、標識基質と架橋されたリジン側の基質を得るために、アビジンゲルによる精製を行ったところ、それぞれに対して特異的な架橋反応産物が得られた。現在、質量分析法によってその基質の同定を試みている。 Kuramoto and Yamasaki et al. Arch. Biochem. Biophys, (2013)

P40

ゼブラフィッシュを用いた DNA 複製フォークの可視化
○東山恵理子¹、栗谷健志¹、アヴシャル恵理子²、緒方進¹、田丸浩²、奥村克純¹
（三重大院生資・¹生命機能、²水圏生物）

【目的】

真核生物の DNA 複製は細胞周期の S 期に起こり、複製フォークは複製開始点 (*ori*) から両方向に進行する。長大な染色体 DNA は、ある程度まとまった領域ごとに S 期の特定のタイミングで複製する複製ドメインを形成しており、ゲノムの安定性を保っていると考えられている。しかし、胚発生の過程で形成・確立されると考えられる「複製タイミングドメイン」がいつどのような制御のもとに形成されるのかについての詳細は分かっていない。この現象を明らかにするために、ゼブラフィッシュに注目した。ゼブラフィッシュは、受精卵からの発生過程が透明な体を通して観察できる上、発生速度が速く受精後約 72 時間で主要臓器が完成する。また、脊椎動物であるため、主要臓器・組織の発生・構造がヒトとよく似ており、研究のモデル生物として広く用いられている。今回は、DNA 複製に関してデータの少ないゼブラフィッシュについて、まずは体細胞由来の培養細胞を用いて DNA 複製フォークの可視化を行い、ヒト培養細胞と比較すること、さらに、ゼブラフィッシュ初期胚について複製標識法等を検討することを目的とした。

【方法・結果】

培養細胞として AB.9 細胞(ゼブラフィッシュ尾ヒレ由来細胞株)を用い、まずは細胞の増殖速度の測定や、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析を試みた。DNA 複製部位の可視化には、分子コーミング法という、DNA 分子を一分子単位で櫛状に均一な伸びで顕微鏡用カバーガラスに張り付ける方法を用いた。細胞をハロゲン化ヌクレオシドで複製標識し、DNA ファイバー上に複製部位を蛍光検出・顕微鏡イメージングして、複製部位の長さを測定することで、DNA 複製フォークの進行速度解析を試みた。一方、ゼブラフィッシュ初期胚についても複製標識法を検討し、胚発生時における DNA 複製部位を DNA ファイバー法で可視化することに成功した。

深海微生物 *Shewanella violacea* 由来 AP エンドヌクレアーゼに関する研究
 ○佐久間一石¹, 志田敏夫¹ (¹信大院 理工学系 応用生物)

【目的】

DNA 損傷のうち核酸塩基が脱離した糖リン酸骨格の部分を AP 部位(apurinic/aprimidinic site)と呼び、この AP 部位を認識して隣接するホスホジエステル結合を切断する DNA 修復酵素を AP エンドヌクレアーゼという。今までに、原核生物から高等真核生物まで様々な生物の AP エンドヌクレアーゼについて研究がされてきた。しかし、深海微生物の AP エンドヌクレアーゼに関してはいまだ研究されていない。本研究では深海という超高压、低温下で働いていると思われる深海微生物 *Shewanella violacea* 由来 AP エンドヌクレアーゼ(SviExo)の特性を調べた。

【方法・結果】

SviExo を発現するプラスミドを構築し、大腸菌で大量発現させ、His タグアフィニティークロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。合成 DNA を用いて SviExo の酵素活性を調べたところ、AP エンドヌクレアーゼと 3'→5'エキソヌクレアーゼの活性を持っていることが分かった。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は大腸菌 ExoIII のそれよりも強かった。SviExo の至適反応条件は 34℃、250 mM NaCl、pH 9 であった。酵素活性は、34℃より高温側では急激に低下し、低温になるに従って緩やかに低下することが分かった。これらのことより、かなりの低温域でも活性を保持しているのに反して、至適温度以上では変性が起こりやすいことが推測された。SviExo の熱安定性を調べたところ、他の生物種の AP エンドヌクレアーゼと比較し、熱安定性が非常に低いことが分かった。現在、SviExo 変異体を作製し、熱安定性が低い原因について詳細な研究を進めているところである。

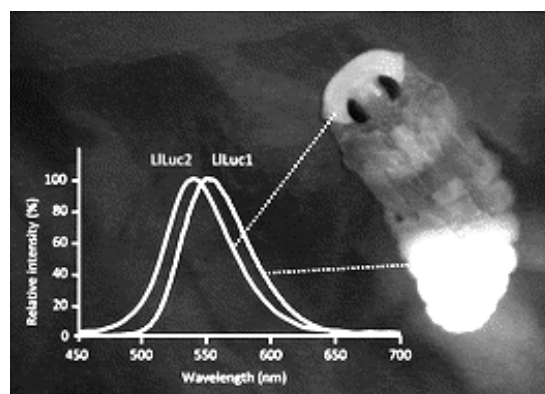
ヘイケボタルから見つけた新規ルシフェラーゼアイソフォームとその卵および蛹の発光への関与
 ○別所学, 古橋麻奈, 佐川進吾, 大場裕一 (名大院生命農)

【目的】

ホタルは、成虫の発光器だけでなく、卵や蛹もぼんやり発光することが古くから知られている。蛹の発光については、蛹の体が半透明であるために、蛹の中で形成された成虫型発光器の光が透けているのだと考えられていた。ホタルの発光は、発光基質ルシフェリンと発光酵素ルシフェラーゼ、ATP、Mg²⁺によって引き起こされる。ヘイケボタル *Luciola lateralis* には、黄緑色の発光色を示すルシフェラーゼが見つかり、幼虫および成虫の発光器の発光に使われていることが分かっている。しかし、われわれの観察により、卵と蛹は緑色の発光をしていることがわかり、既知ルシフェラーゼとは別のルシフェラーゼの関与が示唆された。本研究では、ヘイケボタルを用いて、卵と蛹の発光に関わる因子を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】

ヘイケボタルから、これまでに知られていたルシフェラーゼ(*LlLuc1*)とは異なるルシフェラーゼ遺伝子 *LlLuc2* を同定した。次に、リアルタイム PCR を用いて 2 つのルシフェラーゼ遺伝子の各成長段階での発現パターンを解析した。さらに、*in vitro* と *in vivo* で発光スペクトルを比較した。これらの結果から、卵では *LlLuc2* が発現していることが明らかになった。また、蛹では *LlLuc1* と *LlLuc2* の両遺伝子が発現しており、成虫型発光器からの黄緑色の光は *LlLuc1* に由来し、体全体のぼんやりとした緑色の光は *LlLuc2* に由来することが明らかとなった。



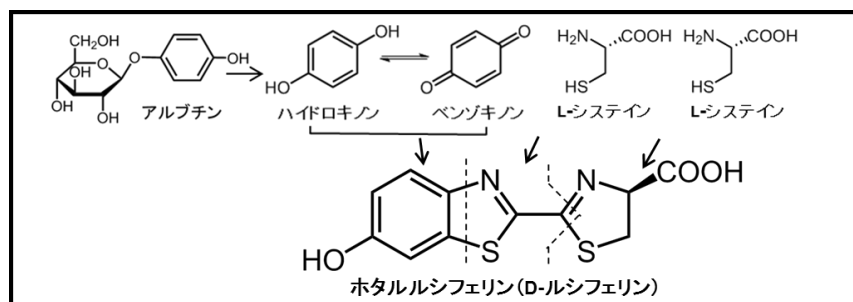
ホタルルシフェリンの生合成経路に関する研究
○蟹江秀星, 吉田尚生, 大場裕一 (名大院生命農)

【目的】

本研究は、ホタルの発光基質であるホタルルシフェリンの生合成単位を明らかにすることを目的とする。ホタルの発光酵素（ルシフェラーゼ）の遺伝子はすでに解明されており、バイオイメージング技術として生命科学分野で広く利用されている。その一方で、ホタルルシフェリンの生合成経路は未だ明らかではない。われわれは、その生合成酵素を明らかにすることで新しいイメージング技術につながると考え、生合成経路の解明を行っている。

【方法・結果】

ホタルルシフェリンの生合成単位を明らかにするために、予想される生合成基質の安定同位体標識体をヘイケボタル成虫に注射し、24 時間後に注射個体のホタルルシフェリンを LC/ESI-TOF-MS を用いて分析した。その結果、ホタルルシフェリンが 2 分子の L-システインと 1 分子のベンゾキノンあるいはハイドロキノンから生合成されることが明らかとなった。またホタル体内には、ハイドロキノンのかわりにアルブチン（ハイドロキノンの配糖体）が存在することが明らかとなった。このことは、毒性の強いハイドロキノンを遊離の状態ではなく、配糖体としてホタルが保有していることを示唆する。



メタン生成アーキア *Methanosarcina acetivorans* 由来新奇プレニルレダクターゼの機能解析
○小川拓哉, 磯部圭祐, 森健, 吉村徹, 邊見久 (名大院生命農)

【目的】アーキアには構造的に特異なイソプレノイド化合物が数多く見出される。アーキアの膜脂質の炭化水素鎖はイソプレノイドであるが、しばしば還元や水酸化、分子内環化、二量化といった修飾を受けている。また、複数種のアーキアから呼吸鎖キノンやその類縁体、糖キャリア脂質が単離され、多様な様式でイソプレノイド鎖が部分飽和していることが報告されている。しかし、それらの生合成経路のほとんどは不分明である。現在、我々は大腸菌を宿主としたアーキア型膜脂質生産系を用いて、未同定の膜脂質生合成酵素を探索している。本発表では、その過程で発見した新奇プレニルレダクターゼについて報告する。

【方法と結果】*M. acetivorans* のゲノムにコードされるカロテノイド生合成酵素のホモログ遺伝子に注目した。同遺伝子をアーキア型膜脂質生産大腸菌株に導入し、脂質抽出物を LC-MSⁿ 分析に供した。その結果、イソプレノイド鎖として、二重結合が 1 カ所還元されたグラニルグラニル基を有するアーキア型膜脂質の生産が示唆された。そこで、組換え酵素を取得して特性評価を行った。同酵素はグラニルグラニル基をもつ化合物に特異的であり、生成物の GC-MS 解析の結果から、還元部位は ω-末端の二重結合 1 カ所のみであることが示された。これまでに同定されたアーキアの糖キャリア脂質は、ω-末端側の 1 つないし複数の二重結合が飽和したドリコールである。また、*M. acetivorans* において膜脂質のイソプレノイド鎖の完全飽和を触媒する酵素、グラニルグラニルレダクターゼは我々が既に同定している。以上のことは、今回見出された還元酵素が膜脂質よりも糖キャリア脂質の生合成に関与する可能性を支持しており、この点に関する分析結果も併せて報告したい。

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるデンプン分解酵素遺伝子群の
転写活性化因子 AmyR の非誘導条件下での細胞質局在様式の解析
○角健太¹, 牧田智裕², 奥村裕紀¹, 志水元亨¹, 小林哲夫², 加藤雅士¹
(¹名城大学院・農, ²名大院・生命農)

【目的】

Aspergillus 属のデンプン分解酵素群の生産は、転写活性化因子 AmyR によって制御される。*A. nidulans* において AmyR は生理的誘導物質であるイソマルトース (IM) が存在すると、細胞質から核内へ移行し、アミラーゼ遺伝子のプロモータ領域に結合することでアミラーゼ遺伝子の発現を誘導していることが報告されている。しかしながら、非誘導条件下において AmyR が細胞質でどのように細胞質に局在化しているかについては十分解析されていない。本研究では、GFP を融合した AmyR を *A. nidulans* で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、非誘導条件下における GFP-AmyR の局在を詳細に解析することを目的とした。

【方法・結果】

GFP-AmyR を発現する *A. nidulans* SGZ5 をグルコースを炭素源とする培地で培養後、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM700 型) のタイムラプス機能を用いて、GFP-AmyR の局在様式を経時的に解析したところ、細胞質に均質に局在するのではなく、繊維状の構造体に付着し、かつ、菌体方向に沿って振動するように局在していた。さらに、Rhodamine phalloidin を用いて細胞骨格タンパク質を染色したところ、GFP-AmyR の局在部位と一致していた。以上の結果は、AmyR が細胞質ではアクチンフィラメントに付着し、局在していると考えられた。さらに、アクチンフィラメントの端に結合し、重合を阻害するアクチン重合阻害剤のサイトカラシ D (CD) を添加したところ、GFP-AmyR の核内移行が観察された。また、アクチンフィラメントを切断し、単量体アクチンと結合してこれを隔離し、アクチンを脱重合させるアクチン重合阻害剤のミカロライド B (MB) を添加したところ、同様に GFP-AmyR の核内移行が観察された。これらのことから AmyR とアクチンフィラメントが相互作用し、細胞質で局在していることが示唆された。

担子菌 *Coprinopsis cinerea* のプロテオーム解析による子実体形成機構の研究
○相島奈央¹, 山田知佳¹, 志水元亨^{1,2}, 加藤雅士^{1,2} (¹名城大 農, ²名城大院 農)

【目的】

担子菌は、光照射や温度など環境変化に応じて菌糸体から子実体への形態変化を行う。このため、担子菌は細胞分化および形態形成機構を解明するにあたり、極めて興味深いターゲットとなると考えられた。しかしながら、子実体形成機構については完全に明らかとなっていない。担子菌 *Coprinopsis cinerea* は、ゲノムプロジェクトが完了しており、短期間で子実体が形成されることから担子菌類のモデル生物として用いられている。本研究では、プロテオーム解析法を利用することで、*C. cinerea* の子実体に特異的に発現するタンパク質を探索することを目的としている。

【方法・結果】

C. cinerea を Yeast Malt Glucose 培地に接種後 3 日間 (30 °C) 暗所下にて培養した。既報に従い 4 日目からは 12 時間の明暗サイクルで培養することで子実体形成を誘導した。形成した子実体と菌糸体からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行ったところ、それぞれ 300 を超えるスポットが検出された。そのうち菌糸体に特異的に発現するものが 30、子実体に特異的に発現するものが 40 検出された。ゲル上に検出されたスポットを切り出しトリプシン処理した。MALDI-TOF/TOF-MS にて解析することで得られた質量スペクトルから、MASCOT サーチを行い菌糸体と子実体で発現するタンパク質を同定した。現在、100 を超えるスポットについて同定ができています。この中には子実体に特異的に発現することが報告されているガレクチンも含まれていた。また、子実体に特異的に発現したレクチンや hypothetical protein をコードする遺伝子についてリアルタイム PCR を行い、mRNA レベルでも子実体に特異的に発現していることを確認した。現在、さらにその遺伝子の高発現株やノックダウン株を形質転換により作製し、子実体特異的に発現していたタンパク質が子実体形成に与える影響を解析している。

黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 産生株の溶菌に影響する環境因子の解明

○柴田昌治, 島村裕子, 増田修一 (静岡県立大学大学院)

【目的】

我々は, これまでに 2 種の黄色ブドウ球菌株のコロニーが偶然接触した際に, 一方のブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA) 産生株のコロニーが溶菌し, 他方の非産生菌株に SEA 遺伝子が伝播するという新たな知見を明らかにしている. そこで本研究では, コロニー間での SEA 遺伝子伝播の頻度は菌の増殖環境により大きく変化すると考え, SEA 産生株の溶菌に影響を及ぼす環境因子や条件について検討を行った.

【方法・結果】

SEA 産生株として *Staphylococcus aureus* No.29 (EM^r, SEA⁺, 溶菌株), 非産生株として *S. aureus* No.77 (KM^r, SEA⁻) を供試菌株として, コロニー間での SEA 産生株の溶菌を促進する条件を検討した. その結果, No.29 株および No.77 株の培養 6 時間 (対数増殖期) の培養液を pH 6.0 の寒天培地に塗布し, 37 °C でコロニーを形成させたところ最も多くのコロニーが溶菌した. また培地成分は生育状況が良く, NaCl 濃度が高い (7.5%) 場合に溶菌コロニーが多く形成された. これらの結果より, コロニーが接触する際の寒天培地上での生育速度が溶菌に影響している可能性が示唆された. また, MgCl₂ (100 mM) の添加によって溶菌コロニーの形成が抑制される傾向が認められた. さらに, No.29 株と No.77 株を混合すると, 各菌株の単独培養時と比較して, バイオフィーム形成能の上昇が認められた. バイオフィームは菌の固体表面への付着に伴い, 特定の遺伝子の発現が高められることから, 現在, バイオフィーム形成時の SEA 遺伝子発現量について検討している.

cis-縮環を有する多環性骨格の立体選択的構築

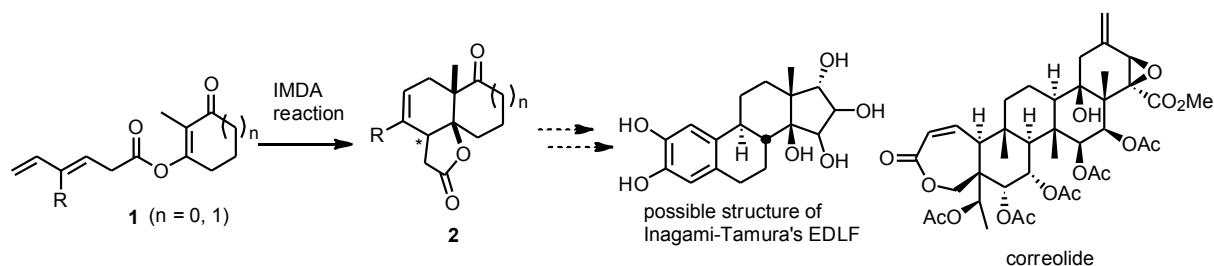
○池田 藍, 中崎敦夫, 西川俊夫 (名大院生命農)

【目的】

cis-縮環を有する多環性骨格は, 内因性ジギタリス様物質 (EDLF) や K⁺チャネル阻害活性を持つコレオリドなどのようなステロイドやテルペンに広く見受けられる基本骨格である. 本研究では, 分子内 Diels-Alder (IMDA) 反応により *cis*-縮環構造を立体選択的に構築し, 多環性化合物の効率的な合成を目指した.

【方法・結果】

市販の 2-メチルブテナールから 5 段階で調製したエノールエステル **1** の IMDA 反応を検討した. その結果, エノールエステルの環の員数によらず, 望む *cis*-縮環した三環性ケトン **2** を得ることが出来た. 講演時には, IMDA 反応の条件検討と EDLF への変換についても議論する.

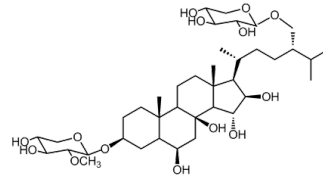


オニヒトデ由来の神経突起伸長活性物質に関する研究

○原田翔太、山田理紗、小鹿 一（名大院生命農）

【目的】

近年の高齢化に伴いアルツハイマー型認知症の患者数は大きく増加しているが、根本的治療法は確立されていない。NGF（神経成長因子）は神経細胞の分化・生存に必須の因子として神経変性疾患治療薬として期待されたが、投与法に課題がある。当研究室において神経モデル細胞である PC12 細胞を用いた NGF 様物質の探索を行った結果、沖縄産オニヒトデ *Acanthaster planci* より acanthasteroside B3 が単離され、マウスに対する記憶改善効果も判明した。本研究では、オニヒトデから acanthasteroside B3 以外に NGF 様物質を探索すること、および acanthasteroside B3 の作用機構を明らかにすることを目的とした。



acanthasteroside B3

【方法・結果】

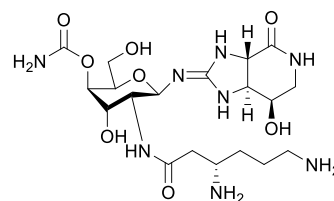
オニヒトデ湿重量 9.6 kg をメタノール抽出し、ODS カラムによって 4 画分に分離した。このうち acanthasteroside B3 を含む画分 (Fr. 2) を silica gel カラムによって分離し、神経突起伸長活性を示す 2 つの画分 Fr. 2-2、Fr. 2-6 を得た。このうち Fr. 2-6 より acanthasteroside B3 (70 mg) を純粋に得た。また、Fr. 2-2 を神経突起伸長活性を指標に分離を進め、活性を示す物質を得たが収量が微量であったため、量上げを行い構造決定を行う予定である。

一方、精製した acanthasteroside B3 を用いて作用機序の解析も行った。Acanthasteroside B3 は PC12 細胞に対する NGF の突起伸長活性を増強する。培地中で 3 時間以上インキュベートした NGF を PC12 細胞に投与すると活性の低下が見られたが、acanthasteroside B3 を共存させると活性はある程度保持されたことから、acanthasteroside B3 は NGF の安定化に寄与していることを示唆した。今後、さらに詳細に作用機構を解析する予定である。

Streptothricin 生合成遺伝子破壊株における生合成中間体の同定

丸山千登勢¹、○本山賢人¹、泉川美穂²、新家一男³、小松護⁴、池田治生⁴、濱野吉十¹(¹ 福井県大, ²JBIC, ³産総研, ⁴北里大)

【目的】streptothricin (ST) は、その構造に streptolidine lactam、carbamoyl gulosamine、 β -lysine を有する抗生物質であり、放線菌によって生産される。ST は、強い抗菌活性を示すとともに、真核生物に対しても毒性を示すことから臨床利用には至っていない。streptolidine lactam 構造は、ST の生理活性に重要であることが知られていることから、この化学構造を生合成工学によって改変できれば、新たな医薬品リード化合物の創製につながると考えられる。最近我々は、ST 生合成遺伝群を取得し、



Streptothricin

orf18 遺伝子の破壊株から streptolidine lactam と carbamoyl gulosamine のみからなる生合成中間体 streptothrisamine を同定した (*Nature Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012)。そこで本研究では、その他の遺伝子破壊株から ST 生合成中間体の同定を行った。【方法・結果】コスミドベクターにクローニングされている ST 生合成遺伝子群の各種遺伝子を λ -Red recombinase を利用して in-frame による遺伝子破壊を行った。破壊遺伝子を含む遺伝子群 (約 34 kb) を染色体組込み型ベクターにクローニングし、異種放線菌 *Streptomyces avermitilis* SUKA17 株に導入した。得られた形質転換体の培養液を LCMS で分析したところ、carbamoyl transferase をコードする *orf17* 遺伝子破壊株において、decarbamoyl-N-acetyl streptothrisamine と予想される化合物が検出された。さらに、*orf8*、*orf11*、*orf13* 遺伝子の破壊株においては、streptolidine lactam の生合成中間体と思われる化合物を検出したので、これら研究成果について報告する。

天然物由来の抗がん剤耐性機構におけるヒト ABCG2 の翻訳後修飾の関与の解析
 ○佐竹一紘¹, 塚本めぐみ², 三谷勇二¹, 田島靖浩¹, 中尾(若林)香葉子³, 石川智久⁴,
 中川大² (¹中部大院応用生物, ²中部大学応用生物, ³静岡がんセンター, ⁴理研 CLST)

【目的】

肝臓・腎臓・小腸・脳などの組織に多く発現している ABC 輸送体 ABCG2 は, 抗がん剤を排出することによってがん細胞に薬剤耐性を賦与する膜タンパク質であり, 分子間ジスルフィド結合を形成してホモ二量体として機能すると共に, *N* 結合型の糖鎖修飾を受ける. 本研究では, 分子間ジスルフィド結合と *N* 結合型糖鎖付加が起こらない ABCG2 を用いて, ABCG2 による抗がん剤耐性機構における ABCG2 の翻訳後修飾の関与を検討した.

【方法・結果】

Flp-In System (Invitrogen 社)を利用して 12 番染色体の短腕領域に存在する FRT 配列に野生型の ABCG2(WT)および *N* 結合型糖鎖付加が起こらない ABCG2(N596Q), 分子間ジスルフィド結合が起こらない ABCG2(C603G), 分子間ジスルフィド結合と *N* 結合型糖鎖付加のいずれも起こらない ABCG2(N596Q/C603G)をそれぞれ導入した. これらの細胞の抗がん剤にたいする感受性をベクターのみを導入した細胞と比較した結果, いずれの ABCG2 を発現する細胞もベクターのみを導入した細胞と比して顕著な SN-38 および Mitoxantrone 耐性を示した. 一方, ABCG2(N596Q)あるいは ABCG2(C603G), ABCG2(N596Q/C603G)を発現する細胞は, ABCG2(WT)を発現する細胞と比して高い SN-38 感受性を示した. ABCG2 を発現する細胞間で ABCG2 mRNA 量に差は認められなかったが, ABCG2(N596Q)および ABCG2(C603G), ABCG2(N596Q/C603G)の細胞内存在量はいずれも ABCG2(WT)の約 2 分の 1 であった. これらの結果は, 分子間ジスルフィド結合と *N* 結合型糖鎖が ABCG2 の細胞内存在量を規定する重要な因子であることを示している. また, これらの結果から, 分子間ジスルフィド結合と *N* 結合型糖鎖のいずれを欠いても ABCG2 が細胞に薬剤耐性を賦与できることを示された.

ブラシノステロイド受容体阻害剤の創出

○野武晃¹, 轟泰司^{1,2}, 中野雄司^{3,4}, Michael Hothorn⁵ (¹静大院農, ²静大グリーン研, ³理化学研究所・基幹研究所, ⁴JST-CREST, ⁵Max-Planck-Society)

シロイヌナズナのブラシノステロイド (BR) 受容体 (BRI1, BRL1, および BRL3) は BR と複合体を形成し, 共受容体であるキナーゼ (SERK1-4) と細胞膜の内外で相互作用することでシグナル伝達を誘導し, 細胞伸長や光形態形成などの BR 応答を引き起こす. 一昨年報告された BRI1-ブラシノライド (BL) 複合体の結晶構造を見ると, BL は主としてステロイド環のβ面および側鎖端部で BRI1 と相互作用している. 一方, ステロイド環のα面上は, 構造活性相関研究において BR 活性に強く寄与することがわかっている A 環 2α,3α-diol も含めて広く空いており, BRI1 との相互作用は殆ど見られない. このことは, BL はβ面で BRI1 に結合しつつ, α面, 特に A 環 2α,3α-diol を介して SERKs と相互作用することで, BRI1 と SERKs のそれぞれの細胞外ドメインを接着させる役割を担う分子であることを強く示唆した. そこで演者らは, BL の 2α,3α-diol をアセトニドに変換した BL-2,3-acetonide を合成して生物活性を調べると, BR 生物活性はほぼ消失しており, 代わりに BR に対する拮抗活性を有していた. つまり, BL-2,3-acetonide は BRI1 には結合するが, SERKs には結合できないリガンド (BRI1 アンタゴニスト) である可能性が示唆された. 作用機序の更なる検討を視野に, 2 位および 3 位水酸基のどちらの改変が BRI1 アンタゴニスト活性に有効であるのかを探索するための化合物を創出した. 合成コストを鑑み, BL ではなく, BL とほぼ同等の活性を有するホモブラシノライド (HBL) を母核とし, 2-*O*-alkyl-HBL と 3-*O*-alkyl-HBL をそれぞれ数種合成し, 生物活性を比較した結果, 2-*O*-alkyl-HBL のみが BL 拮抗活性を示した. この結果をもとに現在, 更なる構造改変を行っている.

P53

PP2C 活性化物質 glabridin の RANKL/RANK シグナル伝達経路に対する作用

○秋山智美¹, 青山友果¹, 木村賢一², 池原強³, 禹済泰¹, 大西素子¹

(¹中部大応生, ²岩手大農, ³(株)トロピカルテクノセンター)

【目的】プロテインホスファターゼ 2C(PP2C)は、PPM ファミリーに属する Ser/Thr ホスファターゼであり、ストレス応答や細胞周期の制御に関与することが知られている。我々はこれまでに、PP2C が破骨細胞分化因子(RANKL)によって活性化されるシグナル伝達経路を抑制し、破骨細胞分化を負に制御することを報告してきた。また、PP2C 活性化物質として見出した glabridin が、RANKL によって活性化する MAPK シグナル伝達経路を抑制し、NFATc1 の発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害することを明らかにした。しかしながら、glabridin の作用点については未だ明らかではない。そこで RANKL/RANK シグナル伝達経路における glabridin の作用機序について、より詳細に検討したので報告する。

【方法・結果】マウスマクロファージ・単球由来 RAW264 細胞における RANKL/RANK シグナル伝達経路への glabridin の影響は、ウエスタン・ブロット法により検討した。まず、RANKL によって活性化する NF- κ B シグナル伝達経路への glabridin の影響を調べた結果、glabridin は I κ B のリン酸化と IKK α/β のリン酸化をともに抑制することが分かった。IKK は NF- κ B の結合タンパク質として知られる I κ B のリン酸化と分解を引き起こし、NF- κ B を活性化することが知られている。このことから、glabridin は NF- κ B の活性化を抑制する可能性が示唆された。さらに、MAPK シグナル伝達経路と NF- κ B シグナル伝達経路の共通の因子であり、PP2C β の基質として知られる TAK1 のリン酸化に対する glabridin の影響を調べたところ、glabridin は TAK1 のリン酸化を抑制した。以上の結果から、glabridin は PP2C β を活性化することによって、TAK1 のリン酸化を抑制し、RANKL/RANK シグナル伝達経路を阻害する可能性が示唆された。

P54

苦味受容体 TAS2R14 はカテキンの苦味を受容する¹⁾

○山崎豊実¹, 成川真隆², 望月峰子¹, 三坂巧², 渡辺達夫¹(¹静岡県大・院・食栄, ²東大・院・農生科)

【目的】

緑茶に含まれるカテキン類は苦味を呈する。苦味は 25 種類存在する苦味受容体により感知されることが知られている。そこで、本研究では培養細胞を用いてカテキンの苦味を認識する苦味受容体の同定を試みた。

【方法・結果】

ヒト苦味受容体 hTAS2Rs とキメラ G タンパク質 Ga16gust44 を HEK293T 細胞に共発現させ、カルシウム感受性蛍光色素を取り込ませた 96 well プレートにまいた。FLEXstationTM II にて、カテキン投与後の細胞内カルシウムイオン濃度[Ca²⁺]_i の増加量を測定し評価した。その結果、既知のカテキンの苦味受容体 TAS2R 39²⁾の他に TAS2R14 発現細胞でもカテキン投与後、[Ca²⁺]_i の増加が見られたため、この 2 つの苦味受容体がカテキンの苦味受容体であることがわかった。TAS2R39 の方がより低濃度のカテキンにより活性化されたため、カテキンの苦味は主に TAS2R39 で受容されと考えられる。TAS2R39 では EC₅₀ が一番強いアゴニストであったのに対し、TAS2R14 では EGCg がもっとも低濃度で活性化させることが明らかになった。

1) T. Yamazaki, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77** (9) (2013), in press

2) M. Narukawa, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 620-625 (2011)

アジサイの組織培養カルスの誘導と成分分析

○大原健史¹, 吉田久美², 津呂正人² (¹名大院情報科学, ²名城大農)

【目的】

アジサイ (*Hydrangea macrophylla*) の装飾花 (萼) の花色はアントシアニンによるものであり, 同一のアントシアニン (デルフィニジン 3-グルコシド) を含みながらも, 液胞の pH, 液胞内の助色素の組成およびアルミニウムイオンによって青, 紫, 赤と連続的に変化する. 一方, アジサイは強い酸性土壌耐性を持つことでも知られ, 最近我々のグループは, 初めて細胞膜型および液胞型のアルミニウム輸送体を明らかにした. 生物学・園芸学研究のみならず, 花色変異の仕組みやアルミニウム耐性機構, さらに, 食品や飲料への色素応用を目指す上でも, アジサイの組織培養カルスの誘導は重要であるが, これまで極めて困難とされ, ほとんど報告がない. 本研究は, アジサイから組織培養カルスを誘導し, この安定的な維持とアントシアニン生産条件の確立によるアジサイの花色に関わる分子機構の解明を目的として行った.

【方法・結果】

アジサイ (品種鳴海青および鳴海赤) の葉を成長点培養することにより無菌植物体を得た. この無菌植物体から展開した葉を取り, 植物成長調整物質・固形培地の炭素源および窒素源, 光照射の条件検討をおこなうことにより, カルス誘導を試みた. 0.3% のグラナムを含む MS 培地に 5 mg/L の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を添加したのち, 24℃, 16 時間明条件 (4500 lx) で 3 ヶ月間培養するとカルスの旺盛な増殖と強い着色が促進されることがわかり, 表面に赤紫色の色素細胞を持つカルスの形成および増殖に成功した. カルスを液体窒素で凍結後抽出し, HPLC により成分分析を行った. 主色素は萼の色素と異なり, シアニジン 3-グルコシドおよびシアニジン 3-サンプビオシドであることが明らかとなった. 助色素の組成も若干の違いが認められた. 培地にアルミニウムを添加したが, カルスの青色化は認められなかった. 花弁と未分化細胞 (カルス) では異なる生合成制御が行われていることが明らかとなった. 現在, 液体培養条件も検討中である.

リン酸およびピロリン酸濃度は植物の形態形成に明確な影響を及ぼす

○福田菜由¹, 瀬上紹嗣¹, Ali Ferjani², 前島正義¹ (¹名大院・生命農, ²東京学芸大・教育・生命)

【目的】

シロイヌナズナの液胞膜プロトンピロホスファターゼ (H^+ -PPase) は, 細胞質ピロリン酸 (PPi) の加水分解エネルギーと共役してプロトン液胞内に能動輸送する機能を持つ. PPi は, 核酸やタンパク質, 糖質などの合成の際に副産物として生成する. PPi の過剰な蓄積は, これらの重要な分子の合成反応を化学平衡論的に抑制阻害するので, 細胞質中の PPi を適切な濃度に保つことは代謝調節上重要である.

H^+ -PPase の機能欠損株 *fugu5* を, 窒素源として NO_3^- のみを含む MGRL 水耕培地で生育させると, 葉身と葉柄の間の細胞が枯死し, 本葉が萎縮する生育異常が観察された. 本研究は, 本葉の萎縮表現型を引き起こす原因物質は何か, また H^+ -PPase の欠損によって起こるプロトンの輸送機能欠損と PPi の蓄積のどちらに起因するのかを明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

酵母由来の可溶性 PPase である IPP1 を導入した *fugu5* を用いて, 生育比較を行った. その結果, IPP1/*fugu5* は表現型を示さず, WT と同様に生育した. 可溶性 PPase によって PPi を除去したことで表現型が抑制されたことから, この表現型は PPi の過剰な蓄積が原因で起こることが示唆された. また, 培地に NH_4^+ を添加する, あるいは培地にネットを敷き培地と葉の接触を防止することで表現型の出現を抑制できることが判明した. NH_4^+ の働きについては判明していないが, 表現型を示している機能欠損株は正常に生育している機能欠損株よりもリン酸 (Pi) 含量が多いことから, 葉の先端の排水組織から過剰に取り込まれた Pi が表現型の出現の一因となっていることが示唆された. すなわち, 過剰の Pi は PPi の分解を化学平衡論的に抑制するので, PPi の蓄積に繋がると考えている.

P57

植物の生理活性ペプチドのプロセッシング酵素に関する研究

○加藤成人¹, 近藤竜彦¹ (¹名大院生命農)

【目的】

植物の様々な組織はすべて、茎頂分裂組織 (SAM) に存在する少数の幹細胞に由来する。シロイヌナズナより単離された *clavata* 変異株は、SAM が肥大化するという表現型を示す。この変異の原因遺伝子の一つである *CLV3* はペプチドホルモンの前駆体をコードしている。*CLV3* の化学的自体は C 末端付近の保存領域 (CLE モチーフ) に由来する 13 残基の修飾ペプチドであり、4、7 残基目の Pro が水酸化され、7 残基目にはさらに糖鎖修飾を受けている。

これまでの *CLV3* の翻訳後修飾に関する研究から、カリフラワーの抽出液中に、*CLV3* 前駆体タンパク質中の CLE モチーフの最初の Arg の N 末端側を切断する酵素活性があることが報告されている。

そこで本研究では、カリフラワーから調製したアポプラスト抽出液を精製出発原料として、*CLV3* 前駆体切断活性を有する酵素を単離・同定することを目的とする。

【方法・結果】

カリフラワーの可食部から調製したアポプラスト液を、組換えタンパク質として調製した *CLV3* 前駆体と混合し、反応後の粗ペプチド画分の MALDI-TOF MS を測定した結果、予想通り Arg 残基の N 末端側での切断が確認された。

そこで次に、このアポプラスト液を陽イオン交換クロマトグラフィーに供した結果、2 つの離れた画分に酵素活性が確認された。同様に陰イオン交換クロマトグラフィーによってアポプラスト液を分画した結果、やはり 2 つの画分に活性が確認された。この活性画分を SDS-PAGE に供したところ、80 kDa 付近に複数のバンドが観察された。本会ではこれらの分画法を組み合わせで精製した結果についても合わせて発表する予定である。

P58

植物の生理活性ペプチドの翻訳後修飾に関する研究

○能瀬遥, 田邊有貴恵, 近藤竜彦 (名大院生命農)

【目的】

植物の地上部の多くの組織は、茎頂分裂組織 (SAM) に存在する幹細胞に由来する。*CLV3* 遺伝子は、幹細胞数の調節を負に制御する生理活性ペプチドの前駆体をコードしており、生理活性を持たない前駆体が、プロリン残基の水酸化、糖修飾を受けた後、プロテアーゼによる切断を受け、生理活性を持つ成熟型ペプチドになると考えられている。しかし、この過程に関与する酵素等に関してはまだ不明な点が多い。そこで、本研究ではまず、*CLV3* のプロリン残基の水酸化の機構について明らかにすることで、将来的に成熟型のペプチドを容易に得る手法を確立することを目的とする。

【方法・結果】

シロイヌナズナゲノム上には、ヒトやタバコのプロリン-4-水酸化酵素 (P4H) との相同性から、P4H ホモログ遺伝子が 11 個コードされていることが報告されている。成熟型 *CLV3* ペプチドを生産する能力があることが判っているシロイヌナズナカルスから total RNA を調製し RT-PCR を行った結果、カルスにおいては 11 個のうち 8 個の P4H ホモログが発現していることが分かった。そこで、この 8 個の遺伝子を実験室用発現ベクターにクローニングし、組換えタンパク質を得た。同様に調製した *CLV3* 前駆体タンパク質を基質として *in vitro* 酵素反応を行った結果、*CLV3* 前駆体の CLE モチーフに存在するプロリン残基を水酸化することのできる P4H を複数発見した。

GFPの二量体化がオルガネラの形態に与える影響についての研究
 ○瀬上紹嗣, 牧野沙知, 三宅愛, 浅岡真理子, 前島正義 (名大院生命農)

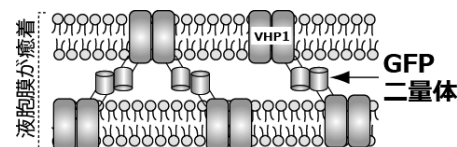
【目的】

我々は、モデル植物シロイヌナズナの液胞膜に局在するプロトンポンプ AtVHP1 の GFP 融合タンパク質が、中央液胞膜に加えてバルブ構造と呼ばれる機能未知の液胞膜サブドメインに強く蓄積することを見出した。本研究では、特に VHP1-GFP が多く発現する分裂・伸長活性の高い細胞でバルブ構造が多いことに注目し、バルブ構造の形成条件とその生理的意義をつきとめることを目的とする。

【方法・結果】

VHP1-GFP 発現量の異なるライン間においてバルブ構造の数を比較したところ、発現量の高いラインで顕著にバルブ構造が増加していた。しかし、内在性 VHP1 の有無はバルブ構造の数にまったく影響していないことから、バルブ構造は GFP 分子の数に依存して増加していることを明らかにした。そこで、GFP の弱い二量体化作用($K_d = 110 \mu\text{M}$)に注目し、単量体化変異として知られる Ara206Lys 変異を GFP に導入したところ、発現量に関わらずバルブ構造がまったく見られなくなった。つまり、バルブ構造は近接した液胞膜同士が GFP の逆平行型の二量体化により強固に癒着した結果の産物であることが明らかとなった。本研究は、GFP の二量体化は無視できるレベルの力ではなく、高い発現量・適切な立体構造・及び膜間接着が起こる場所という条件を満たした場合、オルガネラの形態にまで影響を与えることを目に見える形で明確に示している。

現在出回っているオワンクラゲ GFP 及び YFP など類縁体は、様々な研究に対して致命的な影響を与える可能性があるため、Ara206Lys の導入による単量体化を強く勧める。



気孔分化を調節する stomagen の普遍性に関する研究
 ○西澤美智¹, 村上一馬², 入江一浩², 近藤竜彦¹, 坂神洋次¹ (¹名大院生命農, ²京大院農)

【目的】

現存する高等植物では、ほとんどの植物において気孔の形成が観察される。近年のシロイヌナズナを用いた研究から、気孔分化を正に制御する分泌型ペプチドホルモンとして stomagen が同定された。これまで、ゲノムが解読された多くの植物種において stomagen オルソログ遺伝子が見つかったが、成熟型 stomagen の構造や機能に関しては、シロイヌナズナ以外の植物では未だ報告がない。本研究では、ハクサイ、ダイズを用いて stomagen の普遍性について調べることを目的とする。

【方法・結果】

まず、ペプチド合成機を用いてハクサイおよびダイズ stomagen オルソログを合成した。合成 stomagen を添加した液体培地で生育させたハクサイの表皮を観察した結果、気孔密度が上昇し、気孔クラスターが形成された。一方ダイズでは、合成ペプチド処理による気孔密度の上昇を観察することは出来なかった。

また、抗 stomagen 抗体を用いた免疫沈降実験により、微量 stomagen の検出方法を確立し、これを用いて天然 stomagen の検出を試みた。シロイヌナズナ野生株のアポプラスト抽出を行い、免疫沈降実験を行った結果、天然 stomagen を検出することができた。さらに、同様の方法でハクサイ、ダイズのアポプラスト抽出液について免疫沈降実験を行った結果、両者から stomagen オルソログの分子量とほぼ一致するシグナルを検出することに成功した。これらの結果より、ハクサイやダイズでも、シロイヌナズナ同様、stomagen オルソログはプロセッシングを受けた C 末端 45 残基のペプチドとして機能していることが強く示唆された。

P61

ラクタスタチンは ABCA1 発現低下を介してコレステロール吸収を抑制する
○小室あゆ美, 山本達記, 木地裕美、大畑愛美、島田昌也、長岡利 (岐阜大学, 応用生物科学部)

【目的】

当研究室で発見された牛乳 β -ラクトグロブリン由来の新規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、ヒト腸モデル細胞である Caco-2 細胞においてコレステロール吸収を抑制することを明らかにした。しかし、その詳細な分子機構は不明な点が多い。そこで本研究では、分化 Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 試験においてラクタスタチンの媒介する新しいコレステロール吸収調節系を解明することを目的とした。

【方法・結果】

分化 Caco-2 細胞に、コレステロールミセルと 2mM ラクタスタチンを含む培地を 24 時間添加し、コレステロールを腸細胞の基底膜 (体内) 側に輸送する ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)、コレステロール 27 位水酸化酵素 (CYP27A1) やその他のコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA レベルへの影響を検討した。なお、ABCA1 についてはタンパク質レベルへの影響も検討した。また、分化 Caco-2 細胞にヒト ABCA1 遺伝子プロモーターを連結させた luciferase プラスミド (野生型-928 +107) 及び、その変異体を一過性に導入し、コレステロールミセルと 2mM ラクタスタチンを含む培地 (12 時間添加) の ABCA1 遺伝子転写活性に対する影響を検討した。その結果、ラクタスタチンは ABCA1 遺伝子転写活性を低下させ、mRNA およびタンパク質レベルを有意に低下させた。また、ABCA1 遺伝子プロモーターの-126 +107 領域 (転写因子 LXR/RXR の結合領域-77~-55 を含む) を持つ変異体を用いた試験では ABCA1 遺伝子転写活性が低下した。ラクタスタチンは CYP27A1 の mRNA レベルを有意に減少させた。以上より、ラクタスタチンは ABCA1 遺伝子の転写に作用し、mRNA 及びタンパク質レベルを低下させることを明らかにした。また、ラクタスタチンによる ABCA1 の発現低下には、CYP27A1 及び転写因子 LXR/RXR が関与する可能性が示唆された。

P62

茶カテキン (EGCG) による LDLR 受容体活性化は PCSK9 や Annexin A2 が媒介する
○北村幸平, 三島周平, 島田昌也, 長岡 利 (岐阜大学, 応用生物科学部)

【目的】

高い血漿低密度リポタンパク質 (LDL) レベルは動脈硬化症等のリスクを増大させることが知られている。LDL レベルは主に肝臓で発現している LDL 受容体 (LDLR) により調節される。近年、LDLR タンパク質の分解を促進する因子として Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) が同定され、血漿 LDL レベルに影響を与える新たな因子として注目を集めている。我々は、茶に含まれる主要なポリフェノールである Epigallocatechin gallate (EGCG) がヒト培養肝臓細胞 HepG2 において、LDLR mRNA レベルを増加させることを報告した (*Br. J. Nutr.* 107, 769-773 (2012))。そこで、本研究では EGCG による LDLR mRNA レベル上昇作用の機構解明及び PCSK9 や Annexin A2 (PCSK9 分解促進因子) に対する EGCG の影響について、HepG2 細胞を用いて解析することを目的とした。

【方法・結果】

HepG2 細胞に JNK, ERK, p38 の各経路の阻害剤及び EGCG を添加し、24 時間後の LDLR mRNA レベルを測定した結果、EGCG の作用が ERK 経路の阻害剤添加により消失した。続いて、EGCG 及び Annexin A2 抗体を添加し、24 時間後の LDLR mRNA レベルを測定した結果、EGCG の作用が抗体添加により消失した。また、PCSK9 のタンパク質及び mRNA レベルへの影響も検討し、EGCG は培地中 PCSK9 タンパク質を著減させたが、mRNA には影響しなかった。3, 12, 18 時間後の PCSK9 mRNA 及び培地中 PCSK9 タンパク質への EGCG 添加影響を検討した結果、mRNA は有意に変化しなかったが、培地中タンパク質は EGCG の 3 時間添加でも著減していた。以上の結果より、EGCG は PCSK9 の顕著な減少を誘導するとともに、Annexin A2→ERK 経路を介して LDLR mRNA レベルを増加させる新規メカニズムを介して、LDL 受容体を活性化することを発見した。

**脂肪前駆細胞 3T3-L1 分化における分泌小胞エクソソームに含まれる
PLSCR3 の発現解析および発現抑制の影響**
○猪川亮、犬塚達俊、高原照直、柴田秀樹、牧正敏（名大院・生命農）

PLSCR (phospholipid scramblase、以下 Scr)は Tubby スーパーファミリーに属し、従来、脂質二重膜においてリン脂質を混合させる酵素だと考えられていた。しかし最近、Scr1 遺伝子をノックアウトしてもリン脂質混合が依然として起こること、および、リン脂質を生体内で混合させる真の因子である TMEM16F の存在が明らかとなり、Scr 蛋白質ファミリーはスクランブラーゼ活性とは異なる別の機能をもつと考えられている。これまで Scr3 はカルジオリピンの合成やアポトーシスへの関与などが報告されている。また、我々はこれまでに細胞外に Scr3 が分泌され、エクソソームという膜小胞に存在することを明らかにした。さらに Scr3 ノックアウトマウスは腹部脂肪の蓄積、血中の脂質濃度の上昇、インスリン抵抗性の生活習慣病症状を示すことが知られている。本研究では、Scr3 発現と脂質蓄積の関係を明らかにするために、マウスの脂肪前駆細胞株である 3T3-L1 細胞を用いて解析を行った。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における Scr3 発現量を mRNA レベルとタンパク質レベルで比較した。18S rRNA をリファレンス遺伝子として定量的リアルタイム PCR 法を行ったところ、Scr3 の mRNA 存在量は分化後で約 70 %減少した。一方、Scr3 特異的抗体を用いたウエスタンブロットでは、細胞内に存在する Scr3 タンパク質の量は分化後で約 80 %減少し、脂肪細胞分化前後で細胞外に分泌される Scr3 タンパク質の量に差は認められなかった。また、3T3-L1 細胞分化誘導前に Scr3 をノックダウンすると分化誘導後、トリグリセリド蓄積量が減少した。これらのことから Scr3 は 3T3-L1 細胞分化に関与していると考えられる。

ビタミン B₆ 欠乏誘導性高ホモシステイン血症に対する赤ピーマンおよびハウレンソウの改善効果
○世森大樹¹、山本紘平²、中川智行^{1,2}、稲熊隆博³、宮下達也⁴、砂堀 諭⁴、早川享志^{1,2}
(¹岐大院応生科,²岐大院連合農学,³帝塚山大,⁴カゴメ株式会社)

【目的】

ビタミン B₆ (B₆) はメチオニン代謝に関わる補酵素である。これまで B₆ 欠乏は高ホモシステイン (Hcy) 血症を引き起こし、高 Hcy 血症は葉酸強化により改善できることを明らかにし、B₆ 欠乏時における葉酸の重要性を指摘した。本研究では、B₆ を多く含む食品である赤ピーマンと葉酸を多く含むハウレンソウの B₆ 欠乏誘導性高 Hcy 血症改善に対する有効性について検討した。

【方法・結果】

実験①：4 週齢の Wistar 系雄ラットを 6 群に分け (n=7)、飼料 1 kg 中に 9 g の L-Met を含むコントロール飼料 (C 食) と B₆ 欠乏飼料 (D 食)、および飼料中の赤ピーマン粉末の含有量が 0.49%、0.98%、1.97%、3.94%となるように添加した B₆ 欠乏飼料を与えた。D 群に対するペアフィーディングを行い、35 日間飼育し、解剖した。解剖後、血漿 Hcy 濃度などを測定した。実験②：ラットを 6 群に分け (n=7)、C 食と D 食、および飼料中の含有量が 1.98%、3.97%、7.94%となるようにハウレンソウ粉末を添加した B₆ 欠乏飼料と含有量が 0.061% となるように B₆ を添加した B₆ 添加飼料を与え、実験①と同様に実験を行った。その結果、実験①では、血漿 Hcy 濃度は C 群と比較して D 群で上昇し、D 群と比較して赤ピーマン 0.49%添加で十分改善された。実験②では、血漿 Hcy 濃度は C 群と比較して D 群で上昇し、D 群と比較してハウレンソウ 1.98%添加で十分改善された。以上の結果から、B₆ 欠乏による Met 代謝異常は少量の赤ピーマンまたはハウレンソウ添加により改善されることを明らかにした。

新規（プロ）レニン受容体結合タンパク質の同定と解析

○戸松千裕, 荒川和希, 廣瀬ひとみ, 中川千春, 海老原章郎, 鈴木文昭, 中川寅（岐大応用生物科学）

【目的】（プロ）レニン受容体 [(P)RR] は昇圧酵素レニンおよびその不活性前駆体プロレニンをリガンドとする一回膜貫通型受容体である。(P)RR は主に細胞内部に存在しており、C 末端の細胞質領域に小胞体局在シグナルを持つことが報告されている。しかし、(P)RR の C 末端領域(膜貫通領域および細胞質領域)を欠損させても大部分が細胞内に存在したことから、N 末端の細胞外領域を介して特定の分子と結合することで細胞内に局在している可能性が考えられた。そこで本研究では、(P)RR の細胞内局在機構に関する新しい知見を得ることを目的として、推定上の(P)RR 結合タンパク質を探索した。

【方法】FLAG タグで標識した組換え型ヒト(P)RR [以下 FLAG-h(P)RR] を安定発現するヒト胎児腎臓由来細胞(293T)を樹立した。FLAG-h(P)RR の細胞内局在は、細胞を抗 FLAG タグ抗体と細胞小器官マーカーに対する抗体を用いて二重染色した後、蛍光顕微鏡と共焦点顕微鏡で観察した。(P)RR 結合タンパク質を得るために、FLAG-h(P)RR 発現細胞から細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体が結合したビーズを用いた免疫沈降によって FLAG-h(P)RR およびそれに結合するタンパク質を回収した。得られたタンパク質複合体を SDS-PAGE で分離後、銀染色によってタンパク質バンドを可視化した。目的タンパク質は質量分析により同定した。結合の性質はプルダウンアッセイにより解析した。

【結果・考察】FLAG-h(P)RR の局在は大部分が小胞体マーカーと一致した。FLAG-h(P)RR 発現細胞を用いた免疫沈降の結果、ネガティブコントロールには無い、推定分子量約 70 k のバンド(p70)が検出された。(P)RR と p70 の結合はカルシウム濃度依存的に増加した。これらの結果から、(P)RR の細胞内局在機構として、細胞質領域に存在する小胞体局在シグナルに加えて、細胞外領域でのカルシウム濃度依存的な p70 との結合という新しい機構が存在する可能性を見出した。

メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* AOX1 の酸素応答における Cyc1p の役割○岡田 一真¹, 栗本 将太¹, 早川 享志^{1,2}, 中川 智行^{1,2} (¹岐阜大院応生, ²岐阜大応生)

【目的】

メチロトロフ酵母のメタノール代謝は、ペルオキシソーム (Ps) 局在型アルコールオキシダーゼ (AOX) による酸素依存的なメタノール酸化により開始される。一方、メタノール代謝の末端にあたるミトコンドリア (Mt) 呼吸鎖のシトクロム c オキシダーゼも多量の酸素を基質として要求することから、メタノール代謝を円滑に行うために Mt-Ps 間の酸素消費バランスを調節するシステムが存在すると考えられる。本研究では、呼吸鎖を構成する因子シトクロム c (Cyc1p) に着目し、*Pichia pastoris* における PpCyc1p の AOX1 発現への関与について解析を行った。

【方法・結果】

AOX1 プロモータの発現挙動を観察したところ、好気条件下では高い発現レベルを示したが、嫌気条件下ではその発現は完全に抑制されていた。つまり、*P. pastoris* は酸素状態を認識し、それに合わせて AOX1 の発現を制御していることが示された。同様に PpCYC1 プロモータの発現挙動を観察したところ、低酸素条件下では、グルコース、メタノールともに好気条件に比べその転写活性は半分以下にまで低下していた。このことは PpCYC1 の発現は、出芽酵母 CYC1 と同様に酸素依存的に転写が制御されていることを示している。さらに、遺伝子破壊株 *Ppccyc1Δ* 株を作製し、その表現系を解析した。*Ppccyc1Δ* 株においてメタノール代謝酵素群の発現誘導を観察したところ、カタラーゼ活性およびホルムアルデヒド脱水素酵素活性は野生株と同程度の誘導が観察されたが、AOX 活性は野生株に比べて著しく低値を示した。また、AOX1 プロモータ活性も野生株と比較して、*Ppccyc1Δ* 株は低値を示した。以上のことから、AOX の発現誘導において PpCyc1p は重要な役割を持つことが推測された。

Pichia pastoris フルクトース-1, 6-ビスリン酸アルドラーゼアイソザイムの機能と役割
○福岳寛隆, 早川享志, 中川智行 (岐阜大応生科応用生命)

【目的】

メチロトロフ酵母はメタノール代謝の際、ペルオキシソーム内でメタノールを酸化し、代謝中間体のホルムアルデヒドをキシルロース 5-リン酸 (Xu5P) に固定することで、メタノール由来炭素を細胞構成成分に導いている。この Xu5P の供給のため、代謝中間体をペントースリン酸経路へ導くフルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) が重要な役割を担っていることが推測される。これまで FBA は解糖系酵素として十分な研究がなされてきたが、メタノール代謝における重要性や機能に関する詳細な報告はほとんどない。そこで本研究では *P. pastoris* のメタノール代謝に関与する FBA の解析を行った。

【方法・結果】

P. pastoris において FBA の酵素活性を測定したところ、メタノールにおいて強い誘導が見られた。そこでゲノムデータベースを調べたところ、Class-II FBA と高い相同性を示す 2 つの遺伝子 *PpFBA1* および *PpFBA2* を見いだした。また、それぞれの発現応答を観察したところ *PpFBA1* はグルコースにおいて、*PpFBA2* はメタノールにおいて高い発現レベルを示した。また、メタノール誘導条件下において FBA の細胞内局在を観察したところ、PpFba2p がペルオキシソーム移行シグナルを有するものの、その局在は細胞質であった。これらのことから、*P. pastoris* は FBA を 2 種もっており、両者は共に細胞質局在型酵素ではあるが、PpFba1p は解糖系に関与する構成酵素、PpFba2p はメタノールにより誘導されるメタノール代謝に関与する新規 FBA であることが示唆された。

レアアースはメチロトロフ細菌のメタノール生育の鍵因子である
○日比野歩美¹, 三井亮司², 谷明生³, 田代晋也¹, 早川享志¹, 中川智行¹
(¹岐阜大院応生科応用生命, ²岡山理大理生化, ³岡山大資源植物科研)

【目的】

メタノールを唯一の炭素源として利用できるメチロトロフ細菌は、主要な植物共生細菌として知られている。近年、植物の葉部表層に存在する主要タンパク質が同定され、そのひとつとして *Methylobacterium extorquens* 由来 XoxF が同定された¹⁾。私たちのグループでは XoxF の機能解析を進める中、XoxF1 がレアアース (REE) 依存型メタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) であることを初めて見だし、その機能的解析を行ってきた。本研究では、*M. extorquens* AM1 株のメタノール生育における REE の特異性と XoxF1 の機能発現における REE の役割について解析を行った。

【方法・結果】

メタノール生育における金属依存性を観察したところ、Ca のみならず、REE である La, Ce, Pr, Nd を添加した培地で AM1 株は十分なメタノール生育を示した。AM1 株は Ca 依存型 MDH 遺伝子として *mxoF* を、La 依存型 MDH 遺伝子として *xoxF1* を持つことから²⁾、それぞれの遺伝子破壊株 $\Delta mxoF$ 株、 $\Delta xoxF1$ 株を用いてメタノール生育を観察した。その結果、 $\Delta mxoF$ 株は Ca ではメタノール生育を示さず、 $\Delta xoxF1$ 株は REE ではほとんど生育できないのみならず、Ca でも生育遅延が観察された。さらに野生株のホルムアルデヒド生育を観察したところ、金属による生育の相違は見られなかった。以上より、AM1 株のメタノール生育において、REE は MDH の活性発現に大きく影響を与えており、メチロトロフ細菌の植物葉上での機能発現にも大きく関与していることが推測された。

¹⁾ Delmotte et al., 2009. PNAS 106: 16428, ²⁾ Nakagawa T et al., 2012. PLoS ONE 7: e50480.

出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構におけるチアミンの機能と役割

○久保田和花, 早川享志, 中川智行 (岐阜大 応生科 応用生命)

【目的】

出芽酵母はエタノール発酵の過程で代謝中間体としてアセトアルデヒド (AA) を産生するが, この AA により自らの代謝が阻害される. このため, 出芽酵母はエタノール発酵の際, AA の毒性を回避する必要がある. Aranda らは出芽酵母の AA 誘導性遺伝子群を報告しており, これらにはチアミン合成系 (*THI4*, *THI6*) とチアミン輸送系 (*THI7*, *THI72*) が含まれていた¹. このことは, 出芽酵母が AA ストレス下でチアミンを要求している可能性を示しており, チアミンが AA 耐性機構における鍵因子のひとつであることが推測されるものの, その詳細は明らかではない. そこで, 本研究では出芽酵母の AA 耐性機構におけるチアミンの重要性を明らかにする.

【方法・結果】

出芽酵母は, 生育培地へのチアミンの添加量に比例して AA 耐性能を獲得したことから, チアミンが AA 耐性において重要な役割を持つことが明らかとなった. そこで, *thi4Δ* 株, *thi6Δ* 株, *thi7Δ* 株, *thi72Δ* 株の AA 感受性を観察したところ, *thi7Δ* 株のみが AA 感受性を示し, 出芽酵母は細胞外からチアミンを活発に取り込むことで AA 耐性能を獲得していることが示された. また, チアミンの AA との反応性を *in vitro* で観察したところ, チアミンは直接 AA との反応性を示さなかった. よって, チアミンは AA スカベンジャーとしての機能はなく, 細胞内で補酵素として AA 耐性に寄与していることが推測された. チアミンはトランスケトラーゼの補酵素であり, トランスケトラーゼが機能するペントースリン酸経路は NADPH 供給系として AA 耐性機構で重要な役割を持つ². これらのことより, AA ストレス下ではチアミンが重要な補因子であり, NADPH を多量に供給するペントースリン酸経路の活性発現において重要な役割を持つことを示した.

1) Aranda A, *et al.* (2004) *Appl Environ Microbiol*, 70: 1913. 2) Matsufuji Y, *et al.* (2008) *Yeast*, 25: 825.

分裂酵母の新規経時寿命延長因子 *oga1⁺* の同定と解析○酒井枝里香¹, 大塚北斗¹, 小川真悟², 川村英彰², 村上浩士³, 饗場浩文¹(¹ 名大院創薬, ² 名大院生命農, ³ 中央大院理工)

【目的】

分裂酵母は, 寿命研究において有用なモデル生物であり, これまでに様々な経時寿命延長遺伝子が発見されている. 経時寿命は分裂しない状況下での細胞集団の生存率と定義される. 本研究は, 高発現により分裂酵母の経時寿命を延長する新たな遺伝子の探索とその機能の解析を目的としている.

【方法・結果】

分裂酵母のゲノミクライブラリーを用いて, 約 3000 株のスクリーニングを行った. その結果, 7 個の経時寿命延長遺伝子を発見した. この中から機能が未知であった *SPBC16A3.08c* (以下, *16A3.08c*) に注目し解析を行った. *16A3.08c* の遺伝子産物は *in vitro* でグアニン四重鎖構造 (G4) に結合する出芽酵母の Ylr150w タンパク質とアミノ酸配列上の類似性を示し, *16A3.08c* 自身も G4 と *in vitro* で結合した. さらに, *16A3.08c* は出芽酵母 Ylr150w 欠損株のカフェイン感受性を相補した. これらの結果から *16A3.08c* は Ylr150w の機能的ホモログだと示唆されたため, *oga1⁺* (ortholog of G4-associated protein) と命名した. *oga1⁺* の過剰発現により, 経時寿命延長を引き起こす他にも高温・低温感受性, 接合能の低下などを示すことが明らかとなった. また, *oga1⁺* のホモログである Ylr150w は, 寿命の制御に関わると示唆された TOR 経路に関与していると予測されている. 過去に報告された, TOR 経路の構成因子である *tor1⁺* を欠損した株の表現型は Oga1 高発現株の表現型と類似していた. そのため, *oga1⁺* が *tor1⁺* の下流で負に制御されているという可能性が示唆された.

経時寿命延長因子 Ecl1 は H₂O₂ ストレスに応答して転写因子 Atf1 により活性化される

○島崎嵩史¹, 大塚北斗¹, 内藤知佳子², 村上浩士³, 饗場浩文¹

(¹名大院 創薬科学, ²名大院 生命農, ³中央大 理工)

【目的】

Ecl1 は高発現により分裂酵母の経時寿命を延長する遺伝子として当研究室で新規に発見された。Ecl1 は 80 アミノ酸の小さなタンパク質であり、既知のホモログ遺伝子が存在せず、予想できる機能ドメインも確認できていないため、その機能は未だに不明な点が多い。Ecl1 の高発現は H₂O₂ ストレスに対して耐性を示すことから、Ecl1 は経時寿命の延長に加え、H₂O₂ ストレスの応答にも深く関与していることが想定されている。我々はこの Ecl1 と H₂O₂ ストレスとの関連に着目し、寿命とは異なった観点から Ecl1 の解析を試みた。

【方法・結果】

Ecl1 の高発現は H₂O₂ ストレスに対して耐性を示すが、反対に Ecl1 の欠損は H₂O₂ ストレスに対して感受性を示した。H₂O₂ ストレスによる *ecf1*⁺ の発現量の変化を調べた結果、H₂O₂ 添加後に *ecf1*⁺-mRNA 量が増加しており、H₂O₂ ストレスが *ecf1*⁺-mRNA の転写を誘導することが判明した。さらに、この転写誘導が分裂酵母の H₂O₂ ストレス応答において重要な役割を担う Sty1 MAPK に依存することが明らかとなったため、その下流で機能する転写因子 Atf1 と *ecf1*⁺ の H₂O₂ ストレスによる転写誘導との関係について更なる解析を行った。

atf1⁺ の欠損株では H₂O₂ ストレスによる *ecf1*⁺ の発現量の増加が見られなかったことから、*ecf1*⁺ の転写誘導は Atf1 に依存することが明らかとなり、さらに ChIP assay によって Atf1 が *ecf1*⁺ の上流に直接結合することが確認された。他方、Ecl1 の高発現によってカタラーゼをコードする *ctt1*⁺ 遺伝子の発現上昇が起こるが、この発現上昇や、H₂O₂ 耐性の上昇は *atf1*⁺ 欠損株においても認められた。加えて、Sty1-Atf1 経路を活性化すると Ecl1 非依存的に *ctt1*⁺ の発現が上昇した。これらの結果から、Atf1 は Ecl1 に依存する経路ならびに依存しない経路で *ctt1*⁺ の発現誘導を行う可能性が示唆された。

分裂酵母は Fe, Zn の枯渇で性分化を起こす

○石田麻衣子¹, 大塚北斗¹, 内藤知佳子², 村上浩士³, 饗場浩文¹

(¹名大院創薬科学, ²名大院生命農, ³中央大理工)

【目的】

分裂酵母は、栄養豊富な条件下で有糸分裂を行い、栄養が枯渇すると分裂を停止する。その際、細胞同士が接合し、減数分裂を経て胞子を形成する。この過程を性分化と言い、窒素源や炭素源の枯渇下で誘導されることが知られている。

当研究室では、高発現すると分裂酵母の経時寿命を延長する新規な相同遺伝子群 *ecf1*⁺, *ecf2*⁺, *ecf3*⁺ (Extender of Chronological Lifespan) を見出し、これらを Ecl1 ファミリーと命名した。しかしその働きに関しては不明な点が多い。これまでに Ecl1 ファミリーを高発現すると、接合や胞子形成率が上昇することを見出している。本研究では Ecl1 ファミリーと性分化との関係性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

分裂酵母野生株では炭素源や窒素源の枯渇や、定常期に入ることによって性分化が起こる。我々は、*ecf1*⁺, *ecf2*⁺, *ecf3*⁺ がすべて欠失した株では炭素源や窒素源の枯渇による性分化誘導は正常に起こるものの、定常期に入った後の性分化が起こらないことを発見した。このことは、分裂酵母において性分化を引き起こす環境要因が炭素源と窒素源の枯渇以外にも存在し、この新規な外的要因に応答した性分化に Ecl1 ファミリーが関与することを示唆した。そこで Ecl1 ファミリーが関わる要因の探索のため、種々の培地を調製し詳細に性分化の解析を行った。その結果、分裂酵母は鉄や亜鉛の枯渇に応答して性分化を誘導すること、さらにこれに Ecl1 ファミリーが関与することが明らかになった。これらの成果は、鉄や亜鉛の微量元素の枯渇シグナルが酵母の性分化プロセスに関わることを初めて示したものである。