

**日本農芸化学会中四国支部
第8回講演会**

講演要旨集

日時：2004年1月24日（土） 13時 開会
場所：愛媛大学 農学部

日本農芸化学会中四国支部

プログラム

特別講演 (13:00~14:00)

(座長：玉井 洋一 愛媛大・農)

1. 塩基性ペプチドによる膜リパーゼ阻害

辻田 隆広 (愛媛大学医学部助教授)

(座長：木場洋次郎 愛媛大・農)

2. 癌および遺伝子治療をめざした細胞特異標的機能を有する人工細胞の創製

加藤 敬一 (愛媛大学工学部助教授)

一般講演 (14:15~17:00, 発表 10 分, 質問 2 分)

(座長：柿沼 喜己 愛媛大・農)

1. 化学合成独立栄養細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* 由来アコニターゼ

-大腸菌クローン株からの精製と性質検討-

○金原陽平¹、田村 隆¹、徳田千束²、中村淳雄²、田中英彦¹、稲垣賢二¹

(¹岡山大・農、²オリエンタル酵母・長浜生科研)

2. 酵母による阻害剤スクリーニング系の構築：ヒト型 GSK-3 β キナーゼ阻害剤

○本田 聡、水沼正樹、平田 大、宮川都吉 (広島大・先端研・分子生命)

3. RAF、SYN、PPAR、および MKRN 遺伝子ファミリーの協調的進化の解明とブリゲノム解析の果たした役割

○阿部俊之助、千葉殖幹、土居正宜、南埜泰孝、中筋洋子、Neena Mishra (愛媛大・農・生物資源)

(座長：岩本 徹 愛媛大・農)

4. 分裂酵母由来ピリドキサルレダクターゼの大量発現系の構築と酵素精製条件の改良

○松村一孝¹、黒川 優²、吉金 優¹、横地奈菜¹、森田友岳³、八木年晴¹

(¹高知大・農・生物資源、²京大・化研、³香川大・農・生命機能)

5. ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ活性を示す根粒菌由来-threo-アルドース-1-デヒドロゲナーゼのクローン化と酵素の精製および諸性質

○田所 実¹、吉金 優¹、横地奈菜¹、大西浩平²、八木年晴¹ (¹高知大・農・生物資源、²遺伝子実)

(座長：長野 隆雄 愛媛大・教育)

6. 世界の米胚乳澱粉の二、三の性質

○日比生秀雄¹、猪谷富雄²、堀端哲也¹、中浦嘉子¹、井ノ内直良¹

(¹福山大・生命工、²広島県立大・生物資源)

7. フィリピン原産米胚乳澱粉の構造と物理化学的性質

○武元麻友美¹、猪谷富雄²、堀端哲也¹、中浦嘉子¹、井ノ内直良¹

(¹福山大・生命工、²広島県立大・生物資源)

8. エストロゲン欠乏誘導性高コレステロール血症に対するかつお酵素分解残渣の影響

○撰 和男¹、松本淳一²、土居幹治²、岸田太郎¹、海老原 清¹

(¹愛媛大・農・生物資源、²マルトモ (株))

(座長：阿部俊之助 愛媛大・農)

9. 牛ラクtofエリン由来ペプチドによる HL-60 細胞のアポトーシス誘導

○吉原圭司、渡部保夫、玉井洋一 (愛媛大・農・生物資源)

10. *Bacillus thuringiensis* TK-E6 株由来新規細胞損傷タンパク質の機能解析

○小谷洋介¹、山際雅詩¹、武部 聡²、駒野 徹²、酒井 裕¹

(¹岡山大・工・生物、²近畿大・生物理工)

11. 双翅目昆虫特異的殺虫タンパク質 Cry11A の殺虫活性を決定している領域

○山際雅詩、坂川浩平、酒井 裕 (岡山大・工・生物)

12. *Pseudomonas putida* FERM P-18867 の細胞外膜多糖の分子構造

Yuriy A. Knirel¹、Alexander S. Shashkov¹、Sof'ya N. Senchenkova¹、安食雄介²、○福岡 聡³

(¹ロシア科学アカデミー・ND ゼリンスキー有機化学研究所、²山形県工業技術センター、

³産業技術総合研究所・四国センター)

13. 枯草菌のクエン酸サイクルに関与する遺伝子発現制御因子のマイクロアレイ解析

○里村武範、東條繁郎、吉田健一、藤田泰太郎 (福山大・生物工)

特別講演

講演要旨

特別講演 1 塩基性ペプチドによる膵リパーゼ阻害

愛媛大学総合科学研究支援センター 辻田隆広

魚の精巢由来のプロタミン、小麦ふすま由来のピューロサイオニン、酵母由来のポリリジンなどの塩基性ペプチドが強い膵リパーゼ阻害作用を持つことを発見した。これらの塩基性タンパク質は腸管での膵リパーゼ阻害を通じて、脂肪の分解・吸収を抑制し、肥満を予防し、高脂血症、動脈硬化症、糖尿病などの生活習慣病を予防すると考えられる。本演題では界面でのリパーゼの反応及び塩基性ペプチドの膵リパーゼ阻害機構について報告し、基質界面の重要性について述べたい。

リパーゼ反応は、水に溶けていない基質（脂質）に、水に溶けている酵素（リパーゼ）が作用する異相間の反応である。異相間の反応では反応が起こるためには、水相に存在する酵素は基質の表面に結合する必要がある。そして脂質相と水相との界面で酵素反応がおこる。この界面の容積は全体からみればわずかであるが、リパーゼ反応においては重要である。界面の性質によっては、いくら活性な酵素と十分量の基質が存在しても、全く酵素反応が起こらない場合がある。食事由来の脂肪は胆汁酸塩、リン脂質（ホスファチジルコリン）などと共にエマルジョンを形成し膵リパーゼの作用を受ける。塩基性ペプチドは胆汁酸の存在により、界面への結合が増加した。また塩基性ペプチドによる膵リパーゼ阻害はホスファチジルコリンで作成した基質では認められるが、ホスファチジルエタノールアミンやアラビアゴムで作成した基質では認められなかった。

塩基性ペプチドは、リパーゼの酵素蛋白と相互作用をするのでなく、基質界面の性質を変えることにより、リパーゼ反応を阻害すると推測された。

特別講演 2 癌および遺伝子治療をめざした細胞特異標的機能を有する人工細胞の創製

愛媛大学工学部 加藤敬一

1. はじめに

筆者らは、二段階乳化法により調製した Span80 を主成分とする脂質ベシクルを用いて、主に工業的利用に関する研究を、長年行ってきた。¹⁾ 近年、DDSへの期待が高まる中、この脂質ベシクルを薬物キャリアーとして用いて、癌治療や遺伝子治療のためのDDSに利用することを着想した。

本研究では、この脂質ベシクルに癌細胞表面の固有の分子を認識するリガンド、すなわち癌細胞への“ミサイル誘導装置”を装着して、癌細胞への標的機能を付与することを最初の目的とした。癌細胞表面の糖蛋白、糖脂質が、正常細胞と比べて増殖化、異常化することが最近次第に明らかになりつつある。そこで、それらの糖鎖を認識するレクチンを“ミサイル装置”のリガンドの一つとして検討した。^{2,3,4,5,6)} もう一つの方法は、脳腫瘍、肝臓癌、肺癌など、それぞれの癌細胞表面に固有に存在する分子抗原に対する抗体を、前述の“ミサイル誘導装置”としてベシクルに固定化することである。^{7,8,9,10,11)} このような二つの方法により、癌細胞などへの標的機能を有するベシクルを創製して、前述した癌治療などへ寄与しようとするものである。

2. 実験方法

大粒径ベシクルの調製は、二段階乳化法¹⁾によった。約4%のSpan80を溶解したヘキサン中にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などを添加して、ホモキサーで攪拌して一次乳化した後、エバポレーターでヘキサンを除去した。その後2%Tween80溶液で二次乳化した。このベシクル懸濁液をゲルフィルトレーションにより外液の界面活性剤を除いた。出来上がったベシクルはホモキサーの回転数を変化させて粒径を変化させたが、その粒子径は平均径で約3 μ mである。ESAは多くの場合、蛍光プローブFITC、XRITC、PI(Propidium Iodide)などで蛍光ラベルした。細胞の観察は共焦点レーザー蛍光顕微鏡(MERIDIAN)、フローサイトメトリー(BECTON DICKINSON, FACSCalibur, K21)を用いた。小粒径ベシクル(SLV)の調製は、プローブ型超音波ホモジナイザー(日本精機、US-150T)により行った。Span80とTween80を2:1の割合で混合し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、3分間超音波を照射する。電顕観察によると粒子径が数十から数百nmのベシクルが得られた。使用した細胞株は、ヒト大腸がん細胞(colo201)、ヒト乳がん細胞(MCF7)、ヒト乳腺細胞(MCF10:正常細胞として扱った)、ヒト子宮癌細胞(Hela細胞)およびヒトハイブリドーマ⁶⁾

(HB4C5:ヒトリンパ球とヒト腫瘍細胞を電気融合法により融合して得られた)である。細胞はプラスチックディッシュ上で、10%ウシ胎児血清(FCS)ERDF培地により培養した。

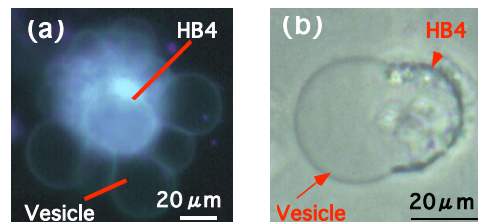


図1 ヒト肺癌リンパ腫由来のハイブリドーマHB4C5細胞とESA固定化ベシクルの特異結合を示す位相差顕微鏡写真(大粒径ベシクルを使用): (a)ベシクルとHB4C5の結合の様子、(b)ベシクルとHB4C5の細胞融合の様子

ブ型超音波ホモジナイザー(日本精機、US-150T)により行った。Span80とTween80を2:1の割合で混合し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、3分間超音波を照射する。電顕観察によると粒子径が数十から数百nmのベシクルが得られた。使用した細胞株は、ヒト大腸がん細胞(colo201)、ヒト乳がん細胞(MCF7)、ヒト乳腺細胞(MCF10:正常細胞として扱った)、ヒト子宮癌細胞(Hela細胞)およびヒトハイブリドーマ⁶⁾(HB4C5:ヒトリンパ球とヒト腫瘍細胞を電気融合法により融合して得られた)である。細胞はプラスチックディッシュ上で、10%ウシ胎児血清(FCS)ERDF培地により培養した。

3. 結果と考察

3.1 ESA 固定化ベシクルの開発

3.1.1 ESA の糖鎖認識

ESA はハイマンノース型の糖鎖構造を認識する海藻由来レクチンである。この認識が糖鎖特異的であることを確認するために、種々の糖鎖切断酵素で処理したハイブリドーマ HB4C5 細胞に対する ESA の結合を検討した。その結果、種々の糖鎖切断酵素による処理によっても、ESA の細胞表面への結合が抑制された。こうして、ESA が、糖鎖構造を認識して細胞に結合することが判明した⁵⁾

3.1.2 ESA によるアポトーシスの誘導

64 μ g/ml の ESA で2～3日培養された細胞（大腸ガン細胞 colo201、乳腺ガン細胞 MCF7）の DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動にかけた。アポトーシスが起るとエンドヌクレアーゼによる DNA の断片化が起こり、ヌクレオソーム単位で DNA が切断されていく。それが約 180bp の整数倍のラダーとなって現れてくる。実験の結果、どちらの癌細胞でも、これらの特徴が出ていることからプログラム死、即ちアポトーシスが誘導されていることが示唆された。⁵⁾

3.1.3 ESA 固定化ベシクルの各種癌細胞への特異結合実験

図1はESA固定化ベシクル (GLV) のHB4C5細胞に対する結合および融合を示す蛍光位相差顕微鏡写真である。⁴⁾ このような結合の特異的親和性をさらに詳しく検討するため、XRITCで蛍光ラベルしたESAを固定化したベシクル (SLV) を調製して、そのベシクルと各種癌細胞との親和性を検討した。その結果、HB4C5 (リンパ腫由来)、colo201 (大腸癌細胞株)、MCF-7 (乳腺癌細胞株) についてはXRITCの蛍光発光が認められ、ESA固定化ベシクルと癌細胞との特異親和性が示唆された。一方、臍帯由来正常線維芽細胞や乳腺細胞 (MCF10) に対しては親和性を示さず、内容物の導入も認められなかった。このことから、このESA固定化ベシクルが、癌細胞を標的とするDDSに対して有効であることが示唆された。^{2,3,5)}

3.1.4 ESA固定化ベシクルの癌細胞の増殖阻害、殺傷効果

癌細胞に結合したESAが、この癌細胞にどのような影響を及ぼすかについて、肺癌細胞MCF7および正常細胞とみなせるMCF10について検討した。その結果、ESAは癌細胞のMCF7に対して特異的に増殖阻害作用あるいは殺傷作用が観察されたが、MCF10ではその作用が観察されなかった。このことから ESAはある種の癌細胞に対してミサイル装置能と細胞殺傷能の二つの効果を備えていることが明らかとなり、今後の展開が期待される。

3.1.5 ESA のラットへの投入による ESA 特異抗体の産生と生体への安全性

フリーの ESA および ESA 固定化ベシクル(1匹あたりの ESA の注入量は 5 μ g)をラットに注入して、動物実験を行った。(実験条件の詳細は発表時に譲る)。フリーの ESA 投与のラットで約 20%、ESA 固定化ベシクル投与で約 30%の ESA 特異抗体が産出していることが判明した。この程度の抗体増加量が生体にどの程度の影響を与えるかは今後の検討に待つか、いずれにせよ初投与から採血までの間、どのラットも体重減少も無く約 5 週間健康に生存したことより、現段階でのこのベシクルの安全性が示唆された。

3.2 イムノベシクルの開発

3.2.1 ベシクル膜への固定化抗体の姿勢制御

ミサイル装置として抗体 (IgG) をベシクルに固定化する場合 (イムノベシクル)、抗原と特異結合する IgG

の F_{ab} がベシクルに対し外方向を向くように IgG 姿勢制御しなければならない。そこで、IgG (抗 IgM抗体) の F_c と親和性を有するプロテイン A を最初にベシクル膜表面に固定化し、その固定化プロテイン A に IgG を固定化することを試みた。プロテイン A の固定化には、Isothiocyanic Acid Dodecyl Ester (IADE) をアンカーとして用いて、その固定化率を高くした。このプロテイン固定化ベシクルに IgG を固定化することにより、前述の固定化 IgG の姿勢制御に成功した。^{4,7,9)}

3.2.2 カチオン性脂質を導入したイムノベシクルと HB4C5 細胞の特異結合実験

カチオンペプチド脂質 (CPL) を Span80 中に 30wt%混合したイムノベシクルを調製した (使用した抗体は抗 IgM抗体: 使用するモデル標的癌細胞 HB4C5 はその表面に IgM 抗体を産生し、分子抗原として認識させる)。上記のイムノベシクル中に PI で蛍光ラベルした DNA (さけ精巢由来) を内包した。このベシクルと HB4C5 細胞をインキュベートして検討した結果、ベシクルに内包した DNA の PI の蛍光が HB4C5 に観察されたことから DNA の HB4C5 細胞への導入が可能であることが判明した。^{4,7,9)} なお、筆者らはマクロファージの攻撃を回避する ステルスベシクル の開発にも取り組んでいるが、それらは発表時に譲る。

3.2.3 遺伝子導入の基礎実験

まず抗体を固定化していない前述のカチオニックベシクル (DNA はベシクルに外付け) を用いて、遺伝子導入の基礎実験を *in vitro* で開始した。リポーター遺伝子としては Luciferase 遺伝子を pcDNA3 に組み込んだ pcDNA3-luc を、また標的細胞にはヒト子宮癌の Hela 細胞を用いた。細胞に遺伝子を導入後、一過性の発現状態をルミネッセンスにより検出した。その結果、市販のものと同程度の発現が観察された。今後、上記のベシクルを用いた生体内での遺伝子導入を試みたい。

4.おわりに

脂質ベシクルを用いた DDS の研究において、*in vitro* と *in vivo* での実験結果はかなり異なっており、この点を研究プロセスの中で如何に効率よく進めていくかがこの研究のポイントになるように感じている。

文 献

1. K.Kato, A.Tsutanaga and M.Shinozaki, *Solv.Extr.Res.Dev.Japan*, **4**, 51-61 (1997)
2. 加藤敬一、微粒子工学大系第Ⅱ巻 応用技術「癌治療」、フジ・テクノシステム、694-698 (2002)
3. K. Kato, P. Walde, H.Mitsui, and N. Higashi, *Biotechnology and Bioengineering*, **84**, 415-423 (2003)
4. K.Kato,T.Sugahara,Y.Maruyama et. al: *Proc. of 16th International Conference of European Society for Animal Cell*, (Lugano, Swizerland), Kluwer Academic Publishers, 433-435 (1999)
5. T.Sugahara, K.Kato et.al: *Proc. of 11thInternational Biotechnology Symposium (Berlin)*, Vol. 3, 79-81 (2000)
6. 加藤敬一: *BIOINDUSTRY*, シーエムシー出版, **15**, No.10, 11-18 (1998)
7. K.Kato, T.Sugahara et.al: *Proc. of 11thInternatiol Biotechnology Symposium (Berlin)*, Vol. 3, 83-85 (2000)
8. T. Sugahara, Y. Ohama, A. Fukuda, M. Hayashi, A. Kawakubo and K.Kato, *Cytotechnology*, **36**, 93-99 (2002)
9. K.Kato,T.Sugahara, et. al: *Proc. of 16th International Conference of European Society for Animal Cell*, (Lugano, Swizerland), Kluwer Academic Publishers, 429-431 (1999)
10. 加藤敬一・川嶋真一ら: 第13回生体機能関連化学シンポジウム, 1C117 (1998)
11. 加藤敬一、川嶋真一、菅原卓也: *ケミカルエンジニアリング*, **5**, No.6, 49-55 (2000)

一般講演

講演要旨

講演番号 1 化学合成独立栄養細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* 由来アコニターゼ -大腸菌クローン株からの精製と性質検討-

○金原陽平¹、田村 隆¹、徳田千東²、中村淳雄²、田中英彦¹、稲垣賢二¹

(¹岡山大・農、²オリエンタル酵母・長浜生科研)

【目的】アコニターゼはクエン酸とイソクエン酸の可逆的変換を触媒し、TCA 回路において重要な役割を果たす酵素である。我々は、*Acidithiobacillus thiooxidans* 中に NAD⁺依存型のイソクエン酸脱水素酵素(ICDH)の存在を見出し研究を行っているが、その過程で ICDH の ORF 上流にアコニターゼ遺伝子の ORF を発見した。本菌は強酸性下で生育でき、元素硫黄及び還元型無機硫黄化合物をエネルギー源とし、二酸化炭素を炭素源として利用できる。しかし、特殊な生育条件のため生育速度が遅く、生産量も少ない。そこで大腸菌での発現系を構築し、精製及び性質検討を試みた。【方法】酵素活性は、イソクエン酸を基質とし、生じる反応中間体である *cis*-アコニット酸を 240 nm の吸光度の増大により測定した。【結果】アコニターゼ遺伝子を含んだ構築プラスミドを、*Escherichia coli* JM109 に形質転換し培養を行った後、無細胞抽出液の酵素活性を測定した。この結果、*E. coli* JM109 無細胞抽出液と比較すると約 5 倍になっており、発現が確認された。酵素精製のため、抽出液を DEAE-Sephrose に供した。部分精製酵素で性質検討を行った結果、pH 安定性は 7.5-8.0、至適 pH 8.0、熱安定性 37℃以下、至適温度 60℃、Km 値 2.39 (イソクエン酸)であった。ブタ心筋由来酵素と性能比較をした場合、基質に対する Km 値は、ほぼ同等であったが、熱安定性と鉄の親和性が低かった。

講演番号 2 酵母による阻害剤スクリーニング系の構築：ヒト型 GSK-3βキナーゼ 阻害剤

○本田 聡、水沼正樹、平田 大、宮川都吉

(広島大・先端研・分子生命)

【目的】GSK3βファミリープロテインキナーゼは、ヒトではインシュリン非依存性糖尿病(Ⅱ型糖尿病)やアルツハイマー病への関与が指摘されている。従って、この酵素をターゲットとする阻害剤には、これら疾病治療への効果が期待できる。出芽酵母ゲノム情報によれば、酵母には GSK-3βファミリープロテインキナーゼをコードする遺伝子が全部で4種 (*MCK1*, *MDS1*, *MRK1*, *YOL128c*)存在する。私たちは、*MCK1* の Ca²⁺シグナル伝達における機能関与を明らかにしてきた。本研究はその成果をもとに、酵母によりヒト型 GSK-3β阻害剤探索法の開発を目的としている。

【方法・結果】4種の GSK-3βホモログを全て破壊した株を作成し、表現型を調べた結果、この四重破壊株は生存可能であったが、36℃において温度感受性を示した。この温度感受性は、ヒト GSK-3β遺伝子を導入することにより、野生株レベルにまで抑圧された。この株で GSK-3β阻害剤として知られる Li⁺の影響を調べた結果、温度感受性を示した。またヒト GSK-3β遺伝子を高発現すると Li⁺耐性を示した。これらの結果から、ヒト GSK-3βが酵母 GSK-3βキナーゼを機能的に代替できることが示された。これらの性質を利用して、ヒト型 GSK-3βキナーゼ阻害剤を効率的に探索する系の構築を行っている。

講演番号 3 RAF、SYN、PPAR、および MKRN 遺伝子ファミリーの協調的進化の 解明とブリゲノム解析の果たした役割

○阿部俊之助、千葉殖幹、土居正宜、南埜泰孝、中筋洋子、 Neena Mishra
(愛媛大・農・生物資源)

ヒト 3 番染色体 3p25 には神経シナプスの形成に関わる *SYN2*、脂肪代謝やアポトーシスに関わる *PPARG* および機能不明な *MKRN2* という遺伝子が並びその逆鎖上に *RAF1* 原ガン遺伝子が位置する。本研究では、魚類において *RAF1*、*ARAF*、*BRAF*、*MKRN1*、および *MKRN2* をクローニングし、*RAF* および *MKRN* ファミリーは魚類進化時に形成されたことを初めて明らかにした。さらにこれらの遺伝子と近傍の遺伝子群のゲノム上での位置関係を魚類とヒトで詳細に比較した結果、これら 4 つの遺伝子ファミリーは、脊椎動物進化の初期に 3p25 の並びを形成したのち少なくとも 2 個づつ組になって協調的に進化し、哺乳類(ヒト)の染色体上(6p21: *MKRN2*, *PPARG*; 7q34: *MKRN1*, *BRAF*; 22q12-13: *PPARA*, *SYN3*; Xp11: *SYN1*, *ARAF*) に分散していったことがわかり、一見無関係なこれら遺伝子群の間に進化上あるいは機能上の強い連関があることが示唆された。また、*RAF1* 下流のゲノム領域は進化上不安定な状態にあることも示された。この一連の研究で重要な役割を果たしたブリゲノム構造はフグとサケの中間を示した。これまでの約 5 万塩基対の解析の結果から、ブリゲノムは比較的コンパクトでサケやゼブラフィッシュにおけるような繰り返し配列が見られず、解析が容易であることがわかり、ゲノムプロジェクトに適していると考えられた。

講演番号 4 分裂酵母由来ピリドキサルレダクターゼの大量発現系の構築と 酵素精製条件の改良

○松村一孝¹、黒川 優²、吉金 優¹、横地奈菜¹、森田友岳³、八木年晴¹
(¹高知大・農・生物資源、²京大・化研、³香川大・農・生命機能)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来のピリドキサルレダクターゼは、アルド-ケトレダクターゼスーパーファミリーのファミリー 8 に属す酵素で、NADPH を電子供与体としてピリドキサルをピリドキシン(PN)に変換し、菌体外に PN を排出する機能を有すると考えられる。したがって、本酵素の高次構造は興味深い。高次構造解明のために、本酵素を大量に調製し結晶化する必要がある。本研究は、既に報告されている大腸菌発現系 (*E. coli* JM109/pTPLR3, 比活性 0.78U/mg) から大量発現系を構築し、効率的な精製条件の開発を目的とした。従来の発現プラスミド pTPLR3 の SD 配列を 3bp 延長したプラスミドを *E. coli* JM109 に導入し得られた形質転換体の粗抽出液中の本酵素比活性は 0.91 U/mg で、pTPLR3 を使用する系とほぼ同じであった。そこで次に、本酵素遺伝子を pET-21a ベクターに連結して *E. coli* BL21(DE3)に導入したところ、比活性 1.2~13U/mg の高発現株が得られた。37℃培養で、エタノール、グリセロール等を添加しても比活性は変化無かった。また、シャペロニンとの共発現系でも比活性は増加しなかった。しかし、23℃培養により比活性は 7.0~17U/mg に増加した。この菌体から、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーをすることなく精製酵素標品を得ることができた。

講演番号 5 ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ活性を示す根粒菌由来 D-threo-アルドース-1-デヒドロゲナーゼのクローン化と酵素の精製および諸性質

○田所 実¹、吉金 優¹、横地奈菜¹、大西浩平²、八木年晴¹

(¹高知大・農・生物資源、²遺伝子実)

ピリドキシン資化菌 *Microbacterium luteolum* 由来のピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ (PLDH) は NAD⁺を補酵素とし、ピリドキサル (PL) を 4-ピリドキソラクトン (4-PAL)へと酸化する反応を触媒する。この PLDH をコードする遺伝子配列を相同検索した結果、根粒菌 *Mesorhizobium loti* 由来の mlr3332 遺伝子が 45%の相同性を示した。この遺伝子が、PLDH をコードし、*M. loti* が PN 代謝系の酵素を有するかを調べるために、本遺伝子のクローニングとその発現酵素の性質を調べた。本遺伝子を pTrc99a ベクターに連結後、*E. coli* JM109 に導入し、本酵素の発現系を構築した。本組み換え体から得られた粗抽出液は、PLDH の比活性 0.091U/mg を示した。粗抽出液から本酵素を精製後、比活性は 0.14U/mg となった。この値は *M. luteolum* の酵素(347.1U/mg)と比べ非常に低く、本酵素は他の化合物を基質とすることが考えられた。本酵素は推定 L-フコースデヒドロゲナーゼと 69%の相同性を示すことから、様々な糖に対する活性を調べた。その結果、本酵素はL-フコースに対し最も高い活性を有するD-threo-アルドース-1-デヒドロゲナーゼであり、本酵素が *M. loti* において PLDH として機能しているとは考えにくいと思われた。

講演番号 6 世界の米胚乳澱粉の二、三の性質

○日比生秀雄¹、猪谷富雄²、堀端哲也¹、中浦嘉子¹、井ノ内直良¹

(¹福山大・生命工、²広島県立大・生物資源)

【目的】世界各地の品種米を同じ年に同じ水田で栽培して環境的要因をできるだけ統一した米の胚乳澱粉の構造および物理化学的特性を比較検討することにより、世界各地の異なる品種米の主として遺伝的要因の違いによる胚乳澱粉の性質の違いを明らかにすることを目的とした。

【方法】世界各地で栽培されているイネ品種を 2001 年に広島県立大学水田で栽培し、その精白米から冷アルカリ浸漬法により調製した胚乳澱粉を用いた。澱粉からアミロペクチンを精製し、澱粉および精製アミロペクチンのヨウ素親和性、酵素・クロマト法および HPAEC-PAD 法による構造特性、DSC による澱粉の糊化特性、RVA による澱粉の粘度特性などを常法により調べた。

【結果】見かけのアミロース含量は日本の米と比較して全般的に高く、また RVA のセットバック値は幅広く分布していた。セットバック値とアミロペクチンの超長鎖含量との間に高い正の相関関係があり、アミロペクチンの超長鎖が世界の米品種の胚乳澱粉中に幅広く存在していることが確認された。

講演番号 7 フィリピン原産米胚乳澱粉の構造と物理化学的性質

○武元麻友美¹、猪谷富雄²、堀端哲也¹、中浦嘉子¹、井ノ内直良¹

(¹福山大・生命工、²広島県立大・生物資源)

【目的】フィリピンには多数の米品種の存在が知られている。今回、主としてインディカ種のフィリピン原産米胚乳澱粉の構造と物理化学的性質を調べることを目的とした。

【方法】試料としてフィリピン原産米9品種と、比較のため日本で育成された米3品種を2001年に広島県立大学水田で栽培し、その精白米と精白米から冷アルカリ浸漬法により調製した胚乳澱粉を用いた。その胚乳澱粉のヨウ素複合体吸収曲線、酵素・クロマト法によるアミロース含量とアミロペクチンの鎖長分布、HPAEC-PAD法によるアミロペクチンの短鎖領域の側鎖長分布、RVAによる粘度特性、micro DSCⅢによる糊化特性、BAP法による老化性を調べた。

【結果】用いたインディカ種のウルチ米胚乳澱粉の見かけのアミロース含量はいずれも約30%であった。アミロペクチン中の非常に長い側鎖含量が5%以上の胚乳澱粉は、糊化後3日間の老化度が高かった。またアミロペクチンの短鎖割合が高いと、その澱粉の糊化温度が低くなる傾向が見られた。

講演番号 8 エストロゲン欠乏誘導性高コレステロール血症に対するかつお酵素分解残渣の影響

○撰 和男¹、松本淳一²、土居幹治²、岸田太郎¹、海老原 清¹

(¹愛媛大・農・生物資源、²マルトモ(株))

【目的】鰹節の酵素分解残渣(Bonito)をラットに与えると、血清コレステロール濃度の低下と糞中胆汁酸排泄量の増加が見られた。両者の関係を検証するうえで、肝臓で胆汁酸への変換に使われたコレステロールの補充が、血清、合成のどちらにより行われるかは重要な点である。本研究ではBonitoの摂取が肝臓のHMG-CoAレダクターゼ(HMGR)、LDLレセプター(LDLR)等のmRNA発現、中性ステロールの糞中排泄など血清コレステロール濃度、胆汁酸排泄に及ぼす因子の影響について検討することとした。

【方法】6ヶ月齢Wistar系雌ラットに卵巣摘出手術を施し、カゼイン25%飼料(C)またはCにタンパク含量が等しくなるようにBonitoを添加した飼料を与え、28日間飼育した。屠殺後、血清および肝臓のコレステロール濃度、糞中胆汁酸および中性ステロール量、肝臓の各mRNA量を測定した。

【結果】肝臓のLDLRのmRNA量はBonito投与により有意に増加した。HMGRのmRNA量に有意な差は認められなかった。中性ステロール排泄量はBonito投与により有意に増加した。

講演番号 9 牛ラクトフェリン由来ペプチドによる HL-60 細胞のアポトーシス誘導

○吉原圭司、渡部保夫、玉井洋一

(愛媛大・農・生物資源)

生体内で様々な生理活性を発揮する乳タンパク質として、近年注目を集めているものにラクトフェリン(LF)がある。そこで本研究室では牛 LF を酵素消化し、HL-60 細胞に対して細胞増殖抑制活性のあるペプチドの同定を行ってきた。本研究では、得られたペプチドのなかでも活性が強いと思われる2つのペプチド(C-4 と C-3 と命名)について、その増殖抑制機構について検討した。

増殖抑制活性は MTS 法で測定した。C-3 よりも C-4 の方が強い抑制活性をもち、C-4 の IC₅₀ は約 70 μM であった。また各ペプチド添加後の細胞の形態変化、DNA の断片化等の検出により、両ペプチドとも細胞にアポトーシスを誘導している可能性が高いと推測された。また、C-4 のアポトーシス誘導は濃度依存性を示した。

今後は本ペプチドによるアポトーシス誘導のメカニズムを解明することが、医薬品や食品としての利用において重要と思われる。

講演番号 10 *Bacillus thuringiensis* TK-E6 株由来新規細胞損傷タンパク質の機能解析

○小谷洋介¹、山際雅詩¹、武部 聡²、駒野 徹²、酒井 裕¹

(¹岡山大・工・生物、²近畿大・生物理工)

【目的】*Bacillus thuringiensis* TK-E6 株はヒト白血病ガン細胞 Jurkat に対して強い細胞損傷能を有するタンパク質を産生する。これまでの研究により、この細胞損傷タンパク質は 29 kDa の新規なタンパク質 (p29) であることが分かっている。そこで、本研究ではこの p29 の機能解析を目的とした。

【方法】p29 の大腸菌における発現系を構築し、その精製方法を検討した。精製 p29 の Jurkat に対する細胞損傷能を MTT assay により調べた。また、p29 を投与した Jurkat 細胞における染色体 DNA の断片化をアガロースゲル電気泳動により調べた。

【結果】大腸菌で発現させた p29 は Jurkat に対して強い細胞損傷能を示した。また、p29 によって Jurkat 細胞の染色体 DNA 断片化が確認されたことから、p29 は Jurkat のアポトーシスを引き起こす可能性が考えられた。

講演番号 11 双翅目昆虫特異的殺虫タンパク質 Cry11A の殺虫活性を決定している領域

○山際雅詩、坂川浩平、酒井 裕
(岡山大・工・生物)

【目的】 *Bacillus thuringiensis* が産生する双翅目昆虫特異的殺虫タンパク質 Cry11A の活性型分子は 36 kDa と 32 kDa のヘテロダイマーからなり、アカイエカ幼虫に対して強い殺虫活性を有する。本研究では、Cry11A の 36 kDa と 32 kDa 断片の機能解析を目的とした。

【方法】 36 kDa と 32 kDa 断片をそれぞれ GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)との融合タンパク質として発現させ、アカイエカ幼虫に対する殺虫活性及び、作用点である中腸上皮細胞膜に対する結合性を調べた。また 36 kDa 断片の C 末端側を欠失させた変異体についても同様に調べた。

【結果】 36 kDa 及び 32 kDa 断片は各々単独では殺虫活性を示さず、共存させた場合のみ活性を示した。36 kDa 断片は膜に結合したが、32 kDa 断片は結合しなかった。また 36 kDa 断片の C 末端側 104 アミノ酸を欠失した変異体は 32 kDa と共存させても殺虫活性を示さず、Cry11A の Gly²⁵⁷ から Arg³⁶⁰ の領域が殺虫活性の発現に重要であることがわかった。

講演番号 12 *Pseudomonas putida* FERM P-18867 の細胞外膜多糖の分子構造

Yuriy A. Knirel¹、Alexander S. Shashkov¹、 Sofya N. Senchenkova¹、
安食雄介²、○福岡 聡³

(¹ロシア科学アカデミー・NDゼリンスキー有機化学研究所、

²山形県工業技術センター、³産業技術総合研究所・四国センター)

グラム陰性細菌類の細胞表層リポ多糖は、免疫増強活性やサイトカインの産生など、多彩な生物活性を示す。我々はこれまでに植物軟腐病菌 *Erwinia carotovora* のラフ型株リポ多糖の全体構造、脂質部分の高次構造と生物活性との関係などを解明している。本研究では、海水から分離した *Pseudomonas putida* FERM P-18867 リポ多糖の α -多糖部分に関する構造解析結果を報告する。

リポ多糖は凍結乾燥した菌体より 90%フェノール-水法により抽出し、遠心加速度 100,000g での超遠心分離により、核酸などを除去・精製した。試料は脂質部分と多糖部分とに加水分解 (2%酢酸、100℃、2h) し、多糖部分をゲルクロマト精製後、重水を溶媒に用いて 2D ROESY など各種パルスシーケンス法により NMR 測定し、糖鎖構造を解析した。その結果、以下に示すラムノース 2 個とマンノース 1 個からなるブロックの繰り返し構造を有することが分かった。



講演番号 13 枯草菌のクエン酸サイクルに関与する遺伝子発現制御因子 のマイクロアレイ解析

○里村武範、東條繁郎、吉田健一、藤田泰太郎

(福山大・生物工)

【目的】枯草菌のクエン酸サイクルに関与する遺伝子は様々な HTH 蛋白質によって厳密に発現が調節されている。また、クエン酸、フマル酸、コハク酸、リンゴ酸といったクエン酸サイクルの中間産物の取り込みや代謝に関する遺伝子は二成分制御系応答制御因子である CitT、DctR、YufM によって調節されている。しかし、クエン酸サイクルの全ての遺伝子発現制御機構が明らかにされているわけではない。そこで、本研究ではクエン酸サイクルに関与する遺伝子の発現ネットワークを明らかにする為に転写因子変異株とその親株との DNA マイクロアレイ解析を行った。

【方法・結果】クエン酸サイクルの遺伝子を制御している転写因子変異株とその親株を最少培地で培養し、DNA マイクロアレイ解析で転写産物の比較を行った。その結果、*citZ*、*citB* を制御することが知られている転写制御因子 CcpC のターゲットとして新たな標的遺伝子候補 (*acsA*、*dctP*) を抽出することに成功した。また、機能未知 2 成分制御系である YcbA-YcbB がグルタミンの取込み、代謝に関与する遺伝子の発現を調節していることが示唆された。現在、これらの抽出された標的遺伝子候補が直接これらの転写制御因子に制御されているかどうかを検討している。

日本農芸化学会 中四国支部 維持会員

(株) アプロサイエンス	(株) タダノ
天野エンザイム (株) 岐阜研究所	中外テクノス (株)
アルファー食品 (株)	中国ケミー (株)
(株) 井ゲタ竹内	中国醤油醸造協同組合
池田糖化工業 (株)	(株) 千代田テクノル
(有) 宇部理化工業所	帝國製薬 (株)
馬路村農業協同組合	東洋電化工業 (株)
(株) えひめ飲料	東和科学 (株)
王子製紙 (株) 米子工場	土佐鶴酒造 (株)
(株) 大愛	鳥取科学器械 (株)
大熊 (株)	鳥取サイエンス (株)
大塚化学 (株)	鳥取三洋電機 (株)
大塚器械 (株)	(有) 友田大洋堂
大塚製薬 (株) 分子医科学研究所	日清ハム (株)
岡山県酒造組合連合会	日東酵素 (株)
社団法人岡山県農業開発研究所	日本オリーブ (株)
お多福醸造 (株)	(株) 日本総合科学
片山化学工業(株)岡山営業所	日本食研 (株)
(株) カワニシ	バイオアイ (株)
機能性食品開発研究所	(株) バイオバンク
杏林予防医学研究所	白牡丹酒造 (株)
キリンビール (株) 岡山工場	(株) 林原生物化学研究所
久保田商事 (株) 広島出張所	(株) ビー・シー・オー
高知酒造 (株)	ひまわり乳業 (株)
酒井酒造 (株)	(株) 氷温研究所
(株) サカタ	広島ガス (株) 技術開発部
佐竹製作所 穀物研究所	広島和光 (株) 福山営業所
サッポロワイン (株) 岡山ワイナリー	(株) ヒロセイ
(株) 四国総合研究所	備前化成
四国乳業 (株) 研究所	(有) 福辰
(株) シマヤ	富士産業 (株)
十八盛酒造 (株)	(株) 扶桑理科
神協産業 (株)	(株) マグノール

(株) 酔心山根本店
住友製薬 (株) 愛媛バイオ工場
諏訪酒造 (株)
正晃 (株)
セイレイ工業 (株)
仙味エキス (株)
ダイイチダルマ食品 (株)
大興産業 (株)
大山乳業農業協同組合
大山ハム (株)
大洋香料 (株)
高木酒造 (株)
高塚薬品 (株)
(有) タグチ

マナック (株)
マルキン忠勇 (株)
丸善製薬 (株)
マルトモ (株)
三島食品 (株) 研究所
(株) 無手無冠
ヤスハラケミカル (株)
(株) やまだ屋
(株) 山田養蜂場
山本薬品 (株)
ルナ物産 (株)
両備バス (株)
湧永製薬 (株) 広島事業所

(五十音順)

日本農芸化学会中四国支部 第8回講演会

世話人代表：海老原 清

連絡先：愛媛大学農学部

Tel/Fax : 089-946-9847

E-mail : ebihara@agr.ehime-u.ac.jp

Information

- 支部評議員会は 12 時から愛媛大学農学部で行います。

今後の中四国支部活動予定

(詳しくは中四国支部ホームページ<http://home.hiroshima-u.ac.jp/jsbbacs/index.html>をご覧ください。)

●日本農芸化学会 2004 年度大会

日時：2004 年 3 月 28 日（日）～31 日（水）

場所：広島国際会議場、 広島大学東広島キャンパス

大会実行委員長：佐藤清隆（広島大学大学院生物圏科学研究科）

●第 9 回中四国支部講演会（例会）

日時：2004 年 6 月 12 日（土）

場所：鳥取大学工学部

世話人：和泉好計（鳥取大学工学部）

●第 10 回中四国支部講演会（2004 年度支部大会）

日時：2004 年 9 月 17 日（金）～18 日（土）

場所：徳島大学蔵本キャンパス

大会実行委員長：寺尾純二（徳島大学医学部栄養学科）

日本農芸化学会中四国支部

〒739-8530 東広島市鏡山 1 丁目 3 番 1 号

広島大学大学院先端物質科学研究科内

<http://home.hiroshimau.ac.jp/jsbbacs/index.html>

2004 年（平成 16 年）1 月 24 日発行