

第9回中四国支部講演会（例会）

日時：2004年6月12日（土）13:15～17:00

会場：鳥取大学工学部大学院棟 2F大講義室（鳥取市湖山町南4丁目101番地）

※JR鳥取大学前駅より徒歩5分。地図は以下のサイトをご覧ください。

（鳥取大学ホームページ→大学案内→マップ→鳥取地区）

http://www.tottori-u.ac.jp/main/japanese2/map_tottori.htm

プログラム：

（11:00～12:15）役員会

（12:15～13:15）評議員会

（13:15～17:00）一般講演

一般講演：発表13分，質問2分の予定

演題申込締切：2004年5月7日（金）

要旨締切：2004年5月21日（金）

※講演申込および要旨送付はメールにて送付下さい。

送付先：森 信寛（morinobu@muses.tottori-u.ac.jp）

また，要旨（44文字×13行）はWordの添付書類にてお願い致します。

多数の方のご参加を期待しております。

特に，学生の方には良い発表の機会かと思いますので是非ご参加下さい。

連絡先：

和泉好計（支部鳥取地区代表評議員、鳥取大学工学部生物応用工学科）

（TEL/FAX：0857-31-5267，E-mail：izumi@bio.tottori-u.ac.jp）

森 信寛（支部鳥取地区副代表評議員、鳥取大学大学院連合農学研究科）

（TEL：0857-31-5443，FAX：0857-31-5683，

E-mail：morinobu@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号 1 制ガン性エーテル型リン脂質の抗酸化物質誘導体の合成

○山本雅彦、玖村直紀、泉 実、中島修平、馬場直道 (岡山大・農)

[目的] 膜作用型制ガン性エーテル型リン脂質は種々のガン細胞に対して細胞死を誘導する一方、細胞内に活性酸素を発生させる事が知られており、培養ラット神経膠星状細胞に対して細胞毒を示す事が報告されている。本研究ではこのような欠点を回避するために抗酸化性物質を結合する新規エーテル型リン脂質の合成を試みた。

[方法] 2,2-Dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol の水酸基を Octadecyl 化した後、Isopropylidene 基を除去した。続いて *t*-Butyldimethylsilyl chloride で一級水酸基を選択的に保護し、2位の水酸基を Methyl iodide によって Methyl ether に変換した。その後、シリル基を 1%塩酸エタノール溶液で除去した。続いてこのアルコールの3位の水酸基に Pyridine 存在下、Phosphorus oxychloride と Choline tosylate を作用させてエーテル型リン脂質を得た。最後に過剰の抗酸化物質(コウジ酸又はアスコルビン酸)存在下、Phospholipase D を作用させて目的物質の合成を試みた。また、活性化リン酸エステルに抗酸化物質を直接作用させる方法も試みた。

[結果] コウジ酸又はアスコルビン酸を結合するエーテル型リン脂質と考えられる画分をシリカゲルカラムで分離し、それらは薄層クロマトグラフ上で予想される性質を示した。

講演番号 2 病原性細菌の産生する糖質抗原に発現する分岐コア糖鎖合成研究

○石井一之、久保浩之、山崎良平 (鳥取大・農)

病原性グラム陰性細菌の産生するリポオリゴ糖 (lipooligosaccharide, LOS) は、オリゴ糖とリピッド A が結合した複合糖脂質である。この LOS のオリゴ糖鎖のうち、変異の少ないコア糖鎖は、細菌感染予防のワクチン開発の標的として近年注目されている。このコア糖鎖には、共通構造であるヘプトース (Hep) 二糖が存在し、この二糖に短いオリゴ糖鎖が結合しており、これら Hep は、2,3 位、あるいは、3,4 位で分岐した構造をとる¹。

我々はこれら分岐構造のうち、前者の 2,3 分岐構造を有する Hep の合成を目的とした。今回、位置選択的シリル化による 3-*O*-シリル誘導体を高収率で合成し、この誘導体を使用して目的とする 2,3 分岐構造の合成を達成した²。

¹山崎良平, 化学と生物, 2003 (1), 41, 15-21. ²Ishii, K. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2004 (6), 1214-1227.

講演番号 3 リポ多糖とリポオリゴ糖に発現する二糖ヘプトースの合成

○豊田清薫, 高城秋比古, 江原 郁, 成地健太郎, 一柳 剛, 山崎良平
(鳥取大・農)

病原性細菌の産生する複合糖質、リポオリゴ糖 (LOS) は、近年、感染予防のワクチンの標的として、注目されている (*J. Biol. Chem.*, **274**(1999)36550-36558)。一般に、これらのオリゴ糖鎖は、タンパクとのコンジュゲートとしてワクチンとして使用される。

本研究では、糖鎖コンジュゲート合成のモデル物質として、リポ多糖 (LPS) と LOS の共通のコア糖鎖である、Hep α 1-3Hep を選択し、この二糖の効率的合成とコンジュゲート合成に必要な、グリコシル化反応によるスペーサーの導入の二点を焦点とした。

Hep α 1-30ct 合成後、Hep α 1-3Hep に変換。引き続き、2 位に隣接基関与能を有する供与体を合成し、Hep α 1-30ct から供与体までの合成経路を確立した。更に、スペーサーを α 立体選択的導入することにより、LOS のオリゴ糖鎖コンジュゲート合成に必要な基礎条件を確立した。

講演番号 4 酸性糖 (KDO) の α -グリコシド合成

○一柳 剛, 山崎良平 (鳥取大・農)

我々は、細菌感染予防のためのワクチンの標的として、リポオリゴ糖の糖鎖 (OS) コンジュゲートの合成を行っている。この合成では、OS の還元末端の酸性糖 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (KDO) を α グリコシド結合でタンパクと効率的に縮合することが重要である。我々は、上記の命題を、タンパクと縮合可能な官能基を側鎖に持つイソシアン酸誘導体を使用し、KDO 2 位水酸基の求核能を利用した付加反応により達成することを考えた。

4, 5, 7, 8-tetra-*O*-acetyl KDO と 2-クロロエチルイソシアンとの付加反応では、分子内環化したスピロケタール体 (83%) とイソシアン酸が 2 分子付加した生成物 (11%) を合計収率 94% で得た。NMR スペクトル解析により、両生成物共に α ケタール構造を有することを決定した。アリール誘導体である 4-(クロロメチル)フェニルイソシアン酸との反応では、スピロケタール体のみを α 選択的に収率 81% で得た。この反応では、副反応としての 4 級アンモニウム塩の生成を押さえるために、極性溶媒の使用が適していることが明らかとなった。

結論：従来のグリコシル化反応とは異なり、KDO の 2 位水酸基の求核能を利用したイソシアン酸誘導体との付加反応により、KDO の α 選択的グリコシド合成を達成した。

講演番号 5 微生物由来酸性多糖のアクチノリザル植物根粒形成促進効果

○神崎 浩, 仙代真知子, 井上周子, 仁戸田照彦, 谷 千春, 笹川英夫 (岡山大・農)

【目的】我々は土壌より単離した *Xanthobacter* sp. KB3001 株により生産される酸性多糖 PS-1 が *Agrobacterium tumefaciens* に対する凝集活性を有し, その結果, 植物形質転換を促進することを明らかにしてきた。一方, アクチノリザル植物は *Frankia* 属放線菌による根粒形成のために, 低窒素土壌のような悪条件下でも生育することが知られている。*A. tumefaciens* による植物形質転換と *Frankia* 属放線菌による植物根粒形成はともに, 微生物の植物根部への付着で開始される現象であることから, PS-1 は *Frankia* 属放線菌のアクチノリザル植物への付着を促進し, その結果として根粒形成・窒素固定を促進するのではないかと考え, その効果の確認を行った。

【方法】*Frankia* 属放線菌として, ケヤマハンノキの根粒から単離した *Frankia* Ahi1 を, 植物としてオオバヤシャブシを用いて, 根粒形成試験を行い, 根粒数・窒素固定活性・植物重を測定した。窒素固定活性はアセチレンを還元して生成するエチレンを GC で定量することにより求めた。

【結果】*Frankia* Ahi1 を PS-1 で処理した後, オオバヤシャブシに接種したところ, PS-1 未処理の植物体に比べて, 根粒数の多い個体が認められた。また接種 60 日後のオオバヤシャブシ根部の窒素固定活性は PS-1 処理区で明らかに高く, 未処理区との間に有意差が認められた。

講演番号 6 *Penicillium decumbens* からのイネいもち病菌メラニン合成阻害物質について -第 3 報-

○藤井雄三、磯部菜菜、中島廣光* (米子高専・物質、*鳥取大・農)

【目的】イネいもち病は糸状菌 *Magnaporthe grisea* によって引き起こされる稲作の重要病害である。イネいもち病の感染とメラニン生成は密接に関係することから新規イネいもち病防除物質の可能性のあるメラニン生成抑制物質の検索を行なった。その過程で土壌分離糸状菌 *Penicillium decumbens* からメラニン生成抑制物質として decumbenone A を単離した。本研究は decumbenone A のいもち病菌に対する作用について検討することを目的とする。

【方法・結果】*M. grisea* (*Pyricularia oryzae* IFO 31177) を麦芽浸出液体培地で 28°C 振とう培養を行なった結果、4 日目からメラニン生成が確認できた。この結果より同様の条件で *M. grisea* を培養し、3 日目に decumbenone A および tricyclazole を添加し、さらに 4 日間培養した。培養後、菌体とろ液をアセトンで抽出し、得られたアセトン抽出物について酢酸エチルによる溶媒分画を行ない、酢酸エチル可溶中性区を得た。この画分について HPLC による分析を行なった結果、decumbenone A および tricyclazole の添加によって 2 種の代謝産物が顕著な増加を示すことが判明した。この 2 種の代謝産物を各種クロマトグラフィーによって単離し、¹H NMR および EI-MS データと文献検索よりそれぞれの化合物を pyriculol および dihydropyriculol であると同定した。

講演番号7 ハイポウイルスにコードされた多機能性パパイン様プロテアーゼ

鈴木信弘（岡山大・資生研）

ハイポウイルスは、クリ胴枯病菌（子のう菌）に感染し、宿主のクリに対する病原性を著しく低下させることから本病の生物防除因子として古くから利用されているマイコウイルスである。ハイポウイルスの1種 *Cryphonectria parasitica hypovirus 1* (系統 713) (CHV 1-EP713) のゲノムは約 12.7kbp の dsRNA からなり、(+) 鎖のみが2つの連続する ORF (ORF A, ORF B) を保有する。演者らは、パパイン様プロテアーゼ p29 と塩基性蛋白質 p40 をコードする ORF A に焦点を当て機能解析を進めている。p29 はプロテアーゼの活性中心を C 末端側に持ち、ORF A 前駆体蛋白質, p69, から G²⁴⁸/G²⁴⁹ で自己切断を行う。p29 が蛋白質分解酵素としてだけではなく、病徴決定・ウイルス複製・伝搬にも関与することが最近明らかとなった。すなわち、機能獲得・消失試験により p29 が 1) ウイルスが惹起する分生子形成の抑制、色素形成の抑制に必要であること、2) ウイルス複製量・分生子への垂直伝搬の効率を高めること、が示された。また、p29 による 1), 2) の作用は他の宿主系統、別種のウイルスに対しても働くことが明らかとなった。p29 遺伝子を改変し、より環境適応力の強いハイポウイルス（ウイルス伝搬効率を高く保持したまま孢子形成抑制能が低い）を作出できればクリ胴枯病菌の生物防除にも大きく貢献するであろう。

講演番号8 新規細胞損傷タンパク質 p29 による Jurkat 細胞のアポトーシス誘導

○山際雅詩、天野浩未、赤尾哲之*、水城英一*、大庭道夫**、酒井 裕

(岡山大院・自然科学、*福岡県工技セ、**九州大院・農)

[目的] *Bacillus thuringiensis* が産生する新規細胞損傷タンパク質 p29 は Jurkat 細胞に対して強い細胞損傷活性を有する。そこで、本研究では p29 による Jurkat の細胞死誘導機構の解明を目的とした。

[方法] p29 の細胞損傷活性の特異性を調べるために、いくつかの培養細胞に対して MTT アッセイを行い、細胞損傷活性を調べた。また、p29 を作用させた Jurkat 細胞における細胞死誘導過程について検討した。

[結果] p29 の Jurkat 及び MOLT-4 に強い細胞損傷活性を示し、HeLa には弱い活性を示した。一方、HEK293 には活性を示さなかった。p29 の Jurkat に対する細胞損傷活性は、EC₅₀ が 20 ng/ml であった。そこで、15 ng/ml 及び 50 ng/ml の濃度の p29 を Jurkat に投与し、細胞死誘導過程を調べたところ、15 ng/ml では投与後 6 時間でカスパーゼ 9 の活性化が最大となり、続いて投与後 9 時間でカスパーゼ 3 の活性化が最大となった。一方、50 ng/ml においても、投与後 3, 6, 9, 12 時間後においてカスパーゼの活性化を調べたが、活性化は検出できなかった。よって、p29 は低濃度において Jurkat に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。

講演番号 9 抗菌性ペプチド lebocin 領域を欠くエリ蚕の lebocin 様遺伝子

○鮑 艶原, 山野好章, 森嶋伊佐夫 (鳥取大・農)

我々は、昆虫の生体防御システムの解明を目的として、無菌的に飼育したエリ蚕を用いて細菌により特異的に誘導される遺伝子を探索している。本研究では、鱗翅目昆虫の lebocin 遺伝子と相同性のある cDNA をクローニングし、その構造ならびに誘導について解析した。Lebocin はカイコの免疫化血リンパから単離された 32 アミノ酸残基からなるプロリン残基に富む O-グリコシル化された抗菌性ペプチドである。カイコの lebocin cDNA は 179 アミノ酸残基からなる前駆体タンパク質をコードしており、これから抗菌活性を持つ mature lebocin が切り出されると考えられている。エリ蚕から単離した lebocin 様 cDNA は 162 アミノ酸残基をコードする ORF を含み、カイコ lebocin cDNA の "prosegment" 領域とは高い相同性があったが、mature lebocin に相当する配列を含んでいなかった。エリ蚕の lebocin 様遺伝子は、無処理幼虫では発現していないが、細菌あるいはペプチドグリカン (PGN) の注射により幼虫脂肪体などで誘導された。この遺伝子は生体防御に何らかの役割を果たしていると思われるが、この遺伝子のコードするタンパク質と有意な相同性のある配列は見つからず、その機能は不明である。

講演番号 10 病原性細菌の産生する糖質抗原の免疫化学分析

宮崎清香, ○建田 潮, 山崎良平 (鳥取大・農)

グラム陰性細菌の産生する複合糖質、リポオリゴ糖 (lipooligosaccharide, LOS) は、オリゴ糖と lipid A と呼ばれる脂質が結合した糖質抗原である。ナイセリア属に代表されるような細菌は、構造の異なるオリゴ糖鎖を生合成するため、結果として一菌株が抗原性の異なる数種のコンポーネントからなる LOS を産生する。それ故、LOS の抗原性は、PAGE により各コンポーネントを分離後 western 法によって分析される。

一般に、力価の高い抗体を用いた PAGE/western 分析により、 ~ 10 ng レベルの LOS を分析可能であるが、それ以下の量での LOS 分析は試みられていない。今回、我々は、化学発光基質を用いて LOS の PAGE/western 分析条件を検索した。その結果、発光基質を用いて、1 ng レベルの LOS でも PAGE/western 分析可能な条件を見いだした。また、力価の低い抗体を使用しても western 分析が可能であることを見だし、発光基質を用いる分析は、一般に良く用いられる水不溶性の基質を用いた免疫染色より優れていることを明らかとした。

講演番号 1 1 分裂酵母の O-結合型糖鎖付加に関与するマンノース転移酵素の解析

○鈴木章太郎、田中直孝、竹川 薫 (香川大・農)

分裂酵母の糖タンパク質にはタンパク部分の Asn 残基に糖鎖が結合する N-結合型糖鎖と Ser/Thr 残基に結合する O-結合型糖鎖の 2 種類の糖鎖が存在する。これまで分裂酵母において O-結合型糖鎖の生理的機能に関する報告は全くない。O-結合型糖鎖付加の最初のステップに関与するマンノース転移酵素は出芽酵母からヒトに至るまで 3 つのファミリーに分類され、分裂酵母においても各ファミリーに 1 つずつホモログ遺伝子 (*ogm1-3⁺*) が存在することがわかった。各遺伝子破壊株を解析した結果、*ogm1* 及び *ogm2* 遺伝子破壊株は細胞形態や胞子形成異常、温度感受性、各種薬剤感受性などを示し、O-結合型糖鎖が分裂酵母において重要な役割を果たすことがわかった。また Ogm タンパクは GFP 融合タンパク質の解析により粗面小胞体に局在していた。分裂酵母の分泌糖タンパク質マーカーであるインベルターゼの糖鎖分子量の変化および細胞表層の O-結合型糖鎖構造の変化から、Ogm の欠損は O-結合型糖鎖だけでなく N-結合型糖鎖の生合成にも影響を与えることが示唆された。さらに *ogm1* 破壊株は Ogm2 タンパクの過剰発現により部分的にその表現型が相補されることから、Ogm1 及び Ogm2 タンパクは部分的に重複した機能を有していることが示唆された。

講演番号 1 2 分裂酵母の細胞質における UDP-ガラクトース生合成機構の解析

○田中直孝、抜木弥生、竹川 薫 (香川大・農)

分裂酵母の糖タンパク質糖鎖はゴルジ体において多量のガラクトースが付加される。ガラクトース転移酵素の基質である UDP-ガラクトースは細胞質で合成された後、ゴルジ体膜に存在する Gms1p/UDP-ガラクトース輸送体を通じてゴルジ体内腔へ供給されるが、その詳細な生合成機構は明らかではない。本研究では UDP-ガラクトースの生合成に関与する分裂酵母 UDP-グルコース-4-エピメラーゼ遺伝子ホモログ (*uge1⁺*, *gal10⁺*) 及びガラクトース-1-リン酸ウリジル転位酵素ホモログ (*gal7*) のガラクトース付加への関与を調べた。*uge1⁺gal10⁺* 二重破壊株は著しい細胞形態異常、薬剤感受性を示し、細胞表層のガラクトースが検出されないことから、両タンパクが UDP-ガラクトースの合成に関与していることがわかった。興味深いことに二重破壊株をガラクトース培地上で生育させた場合にはガラクトースの付加が回復した。この回復は *gal7* 遺伝子の破壊によって再びガラクトース鎖欠損を生じるがわかった。この結果から分裂酵母の UDP-ガラクトースはグルコース培地では Uge1, Gal10 タンパクによって合成され、ガラクトース培地では細胞外のガラクトースを細胞内に取り込み Gal7 タンパクを介して合成されることが明らかになった。

講演番号 1 3 分裂酵母のホスファチジルイノシトール脱リン化酵素関連遺伝子の解析

○細見 昭、田中直孝、竹川 薫 (香川大・農)

ホスファチジルイノシトール(PI)のイノシトール環の 3', 4', 5' 各位にリン酸化や脱リン酸化を受けることにより各種ホスホイノシチド(PIPs)が合成され、これらの PIPs が細胞内小胞輸送やシグナリングに重要な役割を果たしている。出芽酵母の Sac1 タンパクは PI(4)P を PI に脱リン酸化する機能を、また Inp51/52/53 各タンパクは PI(4)P を PI に、PI(4, 5)P₂ を PI(4)P に脱リン酸化するホスファターゼである。分裂酵母ゲノムを検索したところ、*SAC1*, *INP51/52/53* 各ホモログ遺伝子が存在することがわかった。そこでこれらの遺伝子破壊株を取得して解析を行った。分裂酵母には *SAC1* 遺伝子のホモログが 2 つ存在し、うち 1 つ (SPBC19F5. 03) の破壊株は複数の細胞が連結する形態異常が見られた。分裂酵母の 3 つの *INP* ホモログ遺伝子は単独の遺伝子破壊株には細胞形態、液胞形態及び液胞タンパク質輸送などに異常は見られないが、2 つ (SPBC2G2. 02, SPAC9G1. 10c) を破壊した二重破壊株では *sac1* 遺伝子破壊株と同様に細胞形態に異常が見られた。さらに本株は孢子形成もできないことから両タンパクが細胞形態や孢子形成などの過程において部分的に重複した機能を果たしていることが示唆された。

講演番号 1 4 分裂酵母呼吸欠損株の表現型の比較

○三木里沙、西岐良一、田中克典、中川 強*、松田英幸、川向 誠
(島根大・生物資源、*島根大・遺伝子)

これまでに、本研究室において、分裂酵母のユビキノン合成経路に関与する 9 種類の遺伝子破壊株を作製し、その表現型を調べたところ、最少培地上での生育遅延、酸化ストレス感受性、硫化水素の発生という特徴的な表現型を示すことを明らかにした。ユビキノンが電子伝達系の必須因子であることと同時に他の機能も有することより、他の電子伝達系因子の欠損株と表現型を比較することで、ユビキノンの生理的意義を検証することにした。そこで、分裂酵母のシトクロム *c* 遺伝子 (*cyc1*) 破壊株を作製し、ユビキノン合成欠損株との表現型の比較を行った。まず、*cyc1* 欠損株およびユビキノン合成欠損株の呼吸活性を、酸素電極および triphenyltetrazolium chloride 還元能を調べることにより評価したところ、これらの破壊株は呼吸活性を失っていることを確認した。また、*cyc1* 欠損株は、最少培地での生育遅延、酸化ストレス感受性、硫化水素の発生、定常期での生存率低下など、ユビキノン合成欠損株と同様の表現型を示すことがわかった。しかし、*cyc1* 欠損株はユビキノン合成欠損株より表現型が弱いことが判明した。このことはユビキノンが電子伝達系の成分として働く以上の機能を有することを示唆している。

講演番号 1 5 S-アデノシルメチオン高蓄積酵母変異株の取得と細胞周期制御への関与

○宮村和憲、水沼正樹、平田 大、宮川都吉

(広島大・先端研、広島大・酵母細胞プロジェクト研究センター)

S-アデノシルメチオン(AdoMet)は、たんぱく質、DNA など各種生体分子のメチル化反応におけるメチル基供与体として真核生物細胞の機能調節に重要である。酵母の Ca^{2+} 情報伝達経路による細胞周期制御を研究する過程で取得した *scz7* 変異株は、S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素遺伝子における変異(*sah1-1*)であった。細胞内に同酵素の基質 S-アデノシルホモシステイン(AdoHcy)の他に、その前駆体 AdoMet をそれぞれ野生株の 8.5 倍及び 37 倍量蓄積していた。AdoMet の構造類似体である AdoHcy は、各種メチル基転移酵素の競合阻害物質であるため有害だが、AdoHcy を高蓄積した変異株は、さらに AdoMet を蓄積することで致死性を回避できたと考えられる。*sah1-1* 株では細胞周期制御たんぱく質 Swe1p および Cln2p の蓄積が野生株に比べ著しく低下していた。細胞外から AdoMet を与えても、同様なたんぱく質レベルの変化と増殖の一時的 G_1 期遅延が観察され、AdoMet の細胞周期制御への関与が示唆された。ヒトでは AdoMet 欠乏による肝臓疾患、骨関節症、ガンやうつ病、アルツハイマー病など肉体及び精神面へのさまざまな影響が知られる。最近 SAHI 遺伝子欠損によるヒトの重篤な遺伝病も報告された。酵母 *sah1-1* 株は、これらの病因を分子レベルで解析するための良いモデル系と考えられる。M. Mizunuma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 6086 (2004)

講演番号 1 6 *Rhodotorula glutinis* の後成的アルミニウム耐性獲得機構

○田中陽子、川原孝哉、谷 明生、河合富佐子 (岡山大・資生研)

目的: 赤色酵母 *Rhodotorula glutinis* IF01125 株 はアルミニウム(Al)を含む pH4 の培地で培養すると、長いラグの後に生育を始める。段階的に Al 濃度を上げた培養を繰り返すことにより、耐性の最低誘導濃度 5 microM から 4000 microM にまで耐性である株を得ることが出来た。このようにして得た耐性株は Al 非存在下での培養を繰り返しても耐性を失わなかった。このことは Al 存在下での培養によって菌の性質が変化していることを示す。本研究の目的は、野生株及び得られた耐性株の遺伝子の発現量の違いを調べ、耐性を付与する遺伝子の特定と耐性獲得機構の解明を目指す。**方法:** Differential Display 法を用いてそれぞれ mRNA の発現プロファイルを野生株・耐性株両方において比較し発現量の異なる遺伝子を同定した。**結果及び考察:** 野生株・耐性株で発現量の差異が見られた遺伝子には主にミトコンドリア(mt)の活性に関わるものが見られた。mtDNA にコードされると考えられる、これらの遺伝子断片をプローブとしたサザン解析の結果、いくつかのプローブが同じゲノム DNA 断片にハイブリッドを形成し、さらに耐性が上がるほど強いシグナルが見られた。また、電子顕微鏡での観察の結果、耐性株ではミトコンドリアの量が増加していた。このことから耐性レベルが増加することはミトコンドリアの増幅と関連していることが示唆された。

講演番号 1 7 大腸菌由来キシロース代謝系酵素遺伝子群を導入した *Zymobacter palmae* のキシロース発酵特性

○佐藤 大、岡本賢治、築瀬英司（鳥取大・工）

【目的】未利用バイオマス資源からのクリーンなバイオ燃料生産を目的として、木質系バイオマスの酸処理糖化液から高効率でエタノールを発酵生産できる菌株の代謝工学的育種を検討している。これまでに、エタノール高速度発酵細菌である *Zymomonas mobilis* の育種を報告しているが、今回は新規なエタノール発酵細菌として分離された *Zymobacter palmae* にヘミセルロース成分に由来するキシロース発酵性の代謝工学的な付与を行った。

【方法と結果】*Zb. palmae* にキシロース発酵性を付与するためには、キシロースをペントースリン酸経路へと導く酵素系の導入が必要である。まず、独自に開発した宿主-ベクター系を用いて、大腸菌由来のキシロースイソメラーゼ遺伝子 (*xyIA*) とキシロキナーゼ遺伝子 (*xyIB*) を導入した。しかし、これら遺伝子の発現は認められたにもかかわらず、形質転換株はキシロース発酵性を示さなかった。そこで、生成したキシロースリン酸を効率よくフルクトースやグリセルアルデヒド3-リン酸へと変換させるために、ペントースリン酸経路上のトランスアルドラーゼ遺伝子 (*tal*) とトランスケトララーゼ遺伝子 (*tktA*) を導入した。4種の酵素遺伝子を導入した *Zb. mobilis* は4%キシロースから理論収率のエタノールを生産した。

講演番号 1 8 Nicotinoprotein: Formaldehyde dismutase の NAD(H) 保持機能の解析

○北口順一、岡本賢治、築瀬英司（鳥取大・工）

【目的】グリーンケミストリーにおける立体選択的、位置選択的な酸化還元プロセスには、各種の酸化還元酵素の利用が期待されている。酸化還元酵素のなかでも、NAD/NADP を補酵素とする酸化還元酵素には工業的にも重要なものが多く、反応に伴う NAD/NADH の再生系が工夫されている。ホルムアルデヒド耐性の *Pseudomonas* が生産する Formaldehyde dismutase (FDM) は酵素タンパク質に NAD(H) が結合した Nicotinoprotein に分類される。本研究では、FDM の補酵素保持構造の特徴を解明し、これら特徴を NAD/NADP 依存型酸化還元酵素に導入することにより、反応系に電子受容体の添加やその再生系を必要としない新規な酸化還元酵素の構築を目的としている。今回は、FDM に予測した NAD(H) 保持構造を構成するアミノ酸残基の機能解析を行った。

【方法と結果】FDM の構造解析から推定した活性中心は触媒 Zn 結合部位と Rossmann fold と呼ばれる NAD(H) 結合モチーフに加え、NAD の adenine 部位を取り巻くループ構造に特徴が認められた。そこで、ループ構造を構成するアミノ酸残基に変異を導入した変異 FDM を構築した。その結果、アミノ酸置換による FDM の基質特異性に変化は認められなかったが、蛍光分析により求めた酵素タンパク質に結合した NAD(H) 含量に低下が観察された。