

日本農芸化学会中四国支部
第 2 7 回講演会

講 演 要 旨 集

日時：2010年6月5日（土）

場所：広島大学大学院生物圏科学研究科

日本農芸化学会中四国支部

日本農芸化学会中四国支部 第27回講演会（広島）

【プログラム】

13 : 00 （C206 講義室）

●開会の辞：世話人代表 水田 啓子（広島大学大学院生物圏科学研究科）

●特別講演：「チョコレートのサイエンス：生物学・化学・物理学のハーモニー」

佐藤 清隆（広島大学大学院生物圏科学研究科）

座長 江坂 宗春（広島大学大学院生物圏科学研究科）

13 : 40 （C206 講義室）

●学生奨励賞受賞講演

・受賞者講演1：「シトクロム *c* の安定性と折り畳みに対する補因子ヘムの影響」

山中 優（広島大院・生物圏）

座長 島本 整（広島大院・生物圏）

13 : 50

・受賞者講演2：「分裂酵母における相同組み換えを利用した簡便な遺伝子クローニング法」

松尾 祐児（島根大・生物資源，鳥取大院・連合農）

座長 川向 誠（島根大・生物資源，鳥取大院・連合農）

14 : 00

（休憩）

14 : 20

●一般講演

（A会場：C314，B会場：C315，C会場：C316，D会場：C308，E会場：C205）

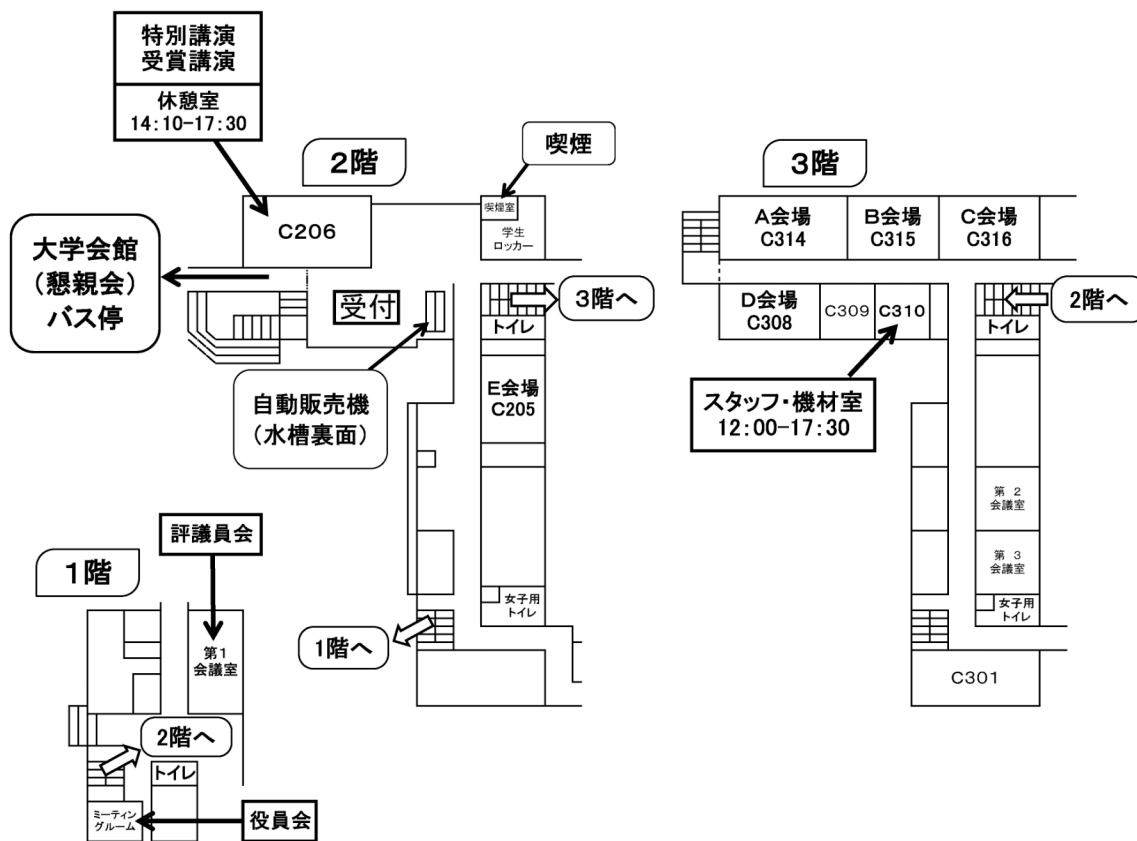
17 : 30-19 : 00

●懇親会

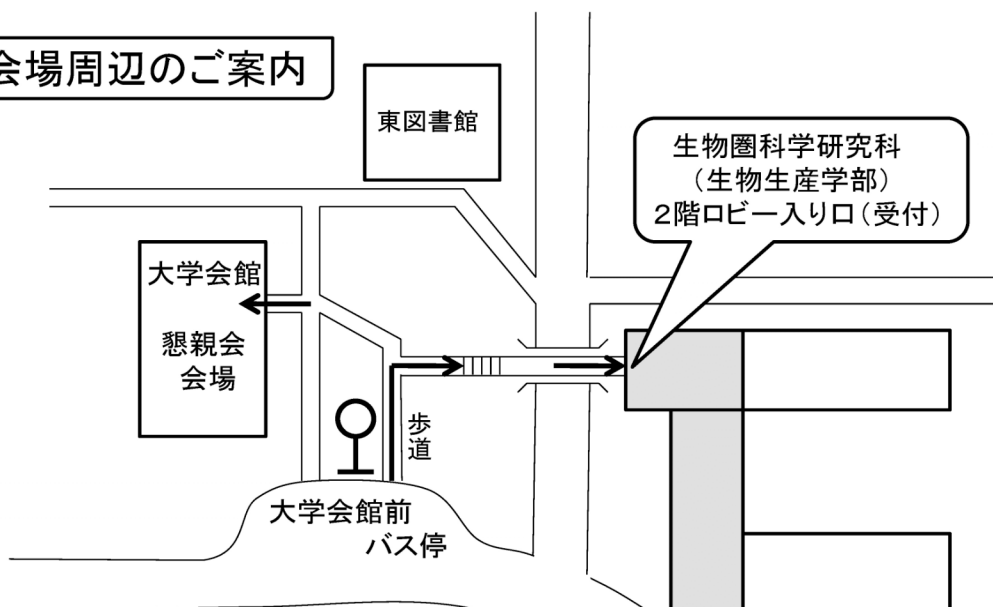
場 所：大学会館

参加費：一般（3,000円），学生（2,000円）

会場のご案内



会場周辺のご案内



6月5日 大学会館前発 西条駅行 バス時刻表

16:00 16:15 16:45 17:13 17:40 17:59 18:15

18:30 19:00 19:35 20:18 21:20(最終)

タクシー呼び出し(大学会館前のバス停でお待ち下さい)

東広島タクシー:082-423-2121 西条タクシー:082-423-2525

大学タクシー :082-425-5000

2009 年度日本農芸化学会中四国支部学生奨励賞受賞者一覧（順不同）

○大学院（博士）

鳥取大学大学院連合農学研究科	博士課程	大渡 康夫
鳥取大学大学院連合農学研究科	博士課程	松尾 祐児
鳥取大学大学院連合農学研究科	博士課程	中村 真也
鳥取大学大学院連合農学研究科	博士課程	Swapan Kumar Paul
岡山大学大学院自然科学研究科	博士課程	Md Anowar Hossain
広島大学大学院生物圏科学研究科	博士課程	山中 優
山口大学大学院医学系研究科	博士課程	Pattana Kakumyan

○大学院（修士）

鳥取大学大学院農学研究科	美籐 友博
鳥取大学大学院工学研究科	幡部 賢
島根大学大学院生物資源科学研究科	田中 優史
岡山大学大学院自然科学研究科	佐藤 瑞穂
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	野崎 阿季子
岡山理科大学大学院理学研究科	堀内 功典
岡山理科大学大学院総合情報研究科	柴崎 洋平
広島大学大学院生物圏科学研究科	竹中 聖
広島大学大学院生物圏科学研究科	佐野 涼子
近畿大学大学院システム工学研究科	立溝 博也
山口大学大学院農学研究科	増田 啓輔
香川大学大学院農学研究科	横野 香織

○学部

米子工業高等専門学校物質工学科	狩野 勇太
鳥取大学農学部生物資源環境学科	森本 正純
島根大学生物資源科学部生命工学科	大野 悠子
岡山大学農学部農芸化学コース	行本 千恵
岡山県立大学保健福祉学部栄養学科	森中 朋子
岡山県立大学保健福祉学部栄養学科	田中 あや
岡山理科大学理学部生物化学科	宮脇 良太
くらしき作陽大学食文化学部栄養学科	住岡 章子
広島大学生物生産学部	本田 絢子
近畿大学工学部生物化学工学科	山野 由美子
山口大学農学部生物機能科学科	畑中 啓佑
山口大学工学部応用化学科	酒井 翔平
宇部工業高等専門学校物質工学科	矢次 祐人
（独）水産大学校食品科学科	梶原 景子
香川大学農学部応用生物科学科	小笠原 知美
愛媛大学農学部生物資源学科	河上 絵里奈
高知大学農学部農学科	山川 匠
高知大学農学部農学科	鈴木 太郎

一般講演プログラム（発表10分，質疑2分）

<A会場：C314>

座長：北村憲司（広島大・自然科学研セ・遺伝子）

- 14:20 A-1 分裂酵母テロメア結合蛋白質Pot1とヘリケースRqh1のテロメア維持における機能解析
○高橋克典, 上野 勝(広島大院・先端物質)
- 14:32 A-2 分裂酵母テロメア結合蛋白質Pot1とヘリケースRqh1の染色体分配における機能解析
○廣本泰介, 上野 勝(広島大院・先端物質)
- 14:44 A-3 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導
○宮本昭弘, 柳本敏彰, 松崎浩明, 秦野琢之(福山大・生命工・生物工)
- 14:56 A-4 酵母とヒトの間で保存された染色体外遺伝因子の分配機構に関する研究
○岡田貴文, 堀籠智洋, 水田啓子(広島大院・生物圏)

15:08 休憩

座長：上野 勝（広島大院・先端物質）

- 15:16 A-5 温度感受性*ebp2*変異と合成的な生育障害を示す変異株の解析
○万クン, 岡田貴文, 水田啓子(広島大院・生物圏)
- 15:28 A-6 出芽酵母における*EBP2*と*BRX1*の機能的関連
○梅木悠花, 下地加織, 河崎鈴加, 水田啓子(広島大院・生物圏)
- 15:40 A-7 分裂酵母におけるEbp2の機能解析
○曲野美紀¹, 中川浩子¹, 五島徹也², 久米一規², 平田大², 水田啓子¹
(¹広島大院・生物圏, ²広島大院・先端研)
- 15:52 A-8 UBRユビキチンリガーゼによる低分子ペプチド・アミノ酸の利用制御
○北村憲司, 砂原恵美, 山下一郎(広島大・自然科学研セ・遺伝子)

16:04 休憩

座長：水田啓子（広島大院・生物圏）

- 16:12 A-9 SGA法による酵母クロマチン再編因子RSCの機能解析
○千原裕貴, 米田篤史, 湯川格史, 土屋英子(広島大院・先端物質)
- 16:24 A-10 酵母Rpd3/HDACの活性調節因子の探索
○大屋朋之, 釜谷和興, 湯川格史, 土屋英子(広島大院・先端物質)
- 16:36 A-11 酵母Rpd3/HDACの減数分裂における制御機構
○三瀧 勇, 湯川格史, 土屋英子(広島大院・先端物質)
- 16:48 A-12 酵母Rpd3/HDACの減数分裂における機能解析
○河村 浩, 浅田星太郎, 湯川格史, 土屋英子(広島大院・先端物質)

<B会場：C315>

座長：仲宗根薫（近畿大・工）

- 14:20 B-1 酵母細胞壁合成とエタノール発酵の関連性について
○渡辺大輔¹，平田愛子²，大矢禎一²，赤尾健¹，下飯仁¹
(¹酒類総合研究所，²東大院・新領域)
- 14:32 B-2 ゲノム情報を利用した清酒酵母の系統進化と醸造特性の解析
○石塚洋一朗¹，渡辺大輔²，赤尾健²，下飯仁^{1,2}
(¹広島大院・先端研，²酒類総合研究所)
- 14:44 B-3 清酒酵母と実験室酵母の交配による発酵速度と細胞増殖速度のQTL解析
○大石智恵¹，加藤拓²，渡辺大輔²，赤尾健²，下飯仁^{1,2}
(¹広島大院・先端研，²酒類総合研究所)
- 14:56 B-4 *Enterobacter aerogenes* HUC201株によるグリセロール含有バイオディーゼル廃液からのエタノール生産
○下吹越雅人，田島誉久，加藤純一，中島田豊(広島大院・先端物質)

15:08 休憩

座長：秋庸裕（広島大院・先端物質）

- 15:16 B-5 *Moorella* sp. HUC221株によるギ酸を基質とした酢酸生産
○村上直之，田島誉久，加藤純一，中島田豊(広島大院・先端物質)
- 15:28 B-6 中高温性有機溶媒耐性微生物の特性化とその活用
○片岡尚也¹，中島田豊¹，Alisa S. Vangnai²，Ajiraporn Kongpol²，加藤純一¹
(¹広島大院・先端物質，²Chulalongkorn Univ., Dept. of Biochem)
- 15:40 B-7 *Rhodococcus ruber*によるテトラヒドロフラン分解機構の解析
○田島誉久，林田直樹，松村楽，中島田豊，加藤純一(広島大院・先端物質)
- 15:52 B-8 *Pseudomonas putida* F1のトリクロロエチレンに対する負の走化性センサーの特定
○奥正太，林田通世，田島誉久，中島田豊，加藤純一(広島大院・先端物質)

16:04 休憩

座長：田島誉久（広島大院・先端物質）

- 16:12 B-9 イネ苗立枯病原菌*Burkholderia plantarii*と近縁病原菌との比較ゲノム解析
○山野由美子¹，内海龍太郎²，関根光雄³，小口晃央³，安海明百³，藤田信之³，
仲宗根薫¹(¹近畿大・工，²近畿大・農，³製品評価セ)
- 16:24 B-10 比較ゲノムによる好塩性アーキア遺伝子群の共通性
○仲宗根薫¹，関根光雄²，藤田信之²(¹近畿大・工，²製品評価セ)
- 16:36 B-11 油糧微生物ラビリンチュラ類における高度不飽和脂肪酸生合成機構の解析
○岩坂宏明，足達浩文，秋庸裕，河本正次，小埜和久(広島大院・先端物質)

<C会場 : C316>

座長：松原主典（広島大院・教育）

- 14:20 C-1 日本酒成分のGABA_A受容体に対する効果
○重森健介¹, 伊豆英恵², 江口将也¹, 須藤茂俊², 山田康枝¹
(¹近畿大・工, ²酒総研)
- 14:32 C-2 香気成分のNMDA型グルタミン酸受容体に対する効果
○増田修一¹, 青島 均², 山田康枝¹(¹近畿大・工, ²山口大院・医学系)
- 14:44 C-3 PQQの細胞増殖に対する効果
○藤原弘宣¹, 中森啓輔¹, 篠原達也¹, 松下一信², 山田康枝¹
(¹近畿大・工, ²山口大・農)
- 14:56 C-4 α-エチルグルコシドのホスホジエステラーゼ活性阻害効果
○伊藤賢太郎¹, 井上直美¹, 伊豆英恵², 須藤茂俊², 山田康枝¹
(¹近畿大・工, ²酒総研)

15:08 休 憩

座長：酒井裕（岡山大院・自然科学）

- 15:16 C-5 卵白由来降圧ペプチドの血管系細胞への影響
○水田千尋¹, 山内梨早², 金川沙夜³, 萱島知子⁴, 松原主典¹
(¹広島大院・教育, ²広島大・教育, ³サタケ, ⁴就実短期大生活科学)
- 15:28 C-6 マウスを使った清酒の生理的おいしさの検討
○人見学¹, 伊豆英恵², 橋口知一², 堀井幸江², 須藤茂俊²
(¹広島大院・先端研・分子生命, ²酒類研)
- 15:40 C-7 リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素を安定に発現するクローン化前駆脂肪細胞株の脂肪細胞への分化誘導に関する研究
○下田まみこ, 竹井瑛梨, 吉田衣里, 池田梨紗, 西村浩二, 地阪光生, 長屋敦, 横田一成(島根大院・生物生命科学)
- 15:52 C-8 Involvement of intracellular oxidative stress-sensitive pathway in phloxine B-induced photocytotoxicity in human T lymphocytes
○Hang Qi, Qian Wu, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
(Grad. Sch. Nat. Sci. Tech., Okayama Univ.)

16:04 休 憩

座長：山田康枝（近畿大・工）

- 16:12 C-9 細胞損傷蛋白質MM29kDの作用機構解析
○黒田将太¹, 石井裕子¹, 野間伊夫¹, 吉村彰¹, 千菊夫², 武部聡³, 早川徹¹, 酒井裕¹(¹岡山大院・自然科学, ²信州大・農, ³近畿大・生物理工)
- 16:24 C-10 無細胞タンパク質合成系によるスギ花粉アレルゲンの生産
○安井裕哉, 奥山里美, 秋庸裕, 出本麻里子, 河本正次, 小埜和久
(広島大院・先端物質)

<D会場：C308>

座長：上村一雄（岡山大院・自然科学）

- 14:20 D-1 ω -3系高度不飽和脂肪酸を含む混酸型トリアシルグリセロールの物性：
S-ALA-S/POPの2成分相挙動
○木河智恵¹，上野聡¹，佐藤清隆¹，溝部帆洋²，市岡建司²
（¹広大学院生物圏、²月島食品工業株式会社）
- 14:32 D-2 O/Wエマルションへの脂溶性物質の可溶化状態の安定性
○巽靖子，上野聡，佐藤清隆（広島大院・生物圏）
- 14:44 D-3 アオウキクサ151株の9-リポキシゲナーゼの解析
○長谷川よしの¹，石田雄二¹，高木一輝²，横山峰幸²，伊福欧二²，西村浩二³，
長屋 敦¹，横田一成¹，地阪光生¹
（¹島根大・生資科，²資生堂RC，³島根大・総科研センター）
- 14:56 D-4 アオウキクサ151株のアレンオキシド合成酵素の解析
○村上真梨恵¹，西村浩二²，長屋 敦¹，横田一成¹，横山峰幸³，伊福欧二³，
地阪光生¹（¹島根大院・生資科，²島根大・総科研センター，³資生堂RC）

15:08 休憩

座長：地阪光生（島根大院・生資科）

- 15:16 D-5 *Acidithiobacillus ferrooxidans*のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの解析
○菊本愛生，万代晃大，金尾忠芳，上村一雄（岡山大院・自然）
- 15:28 D-6 *Shewanella*属細菌由来相同cytochrome *c*の比較
○政成美沙¹，竹中聖²，若井暁²，為我井秀行³，栗原達夫⁴，三本木至宏²
（¹広島大・生物生産，²広島大院・生物圏，³日大・文理，⁴京大・化研）
- 15:40 D-7 高度好塩性アーキア由来塩依存性ATP加水分解活性に対するアニオンおよびカチオンの影響
○若井暁¹，仲宗根薫²，三本木至宏¹（¹広島大院・生物圏，²近畿大・工）
- 15:52 D-8 ジヒドロ葉酸還元酵素D27E変異体の機能解析
○大前英司¹，和田侑士¹，楯真一¹，月向邦彦¹，桑島邦博²
（¹広島大院・理，²自然科学研究機構・統合バイオ）

16:04 休憩

座長：大前英司（広島大院・理）

- 16:12 D-9 鶏卵白アルブミンの構造形成におけるS-S結合の役割
○石丸隆行¹，田中美穂¹，伊藤一成²，松富直利¹（¹山口大・農，²岡山産技セ）
- 16:24 D-10 不安定型オボアルブミンの品質管理機構
○田中俊平，石丸隆行，徳永良太，松富直利（山口大・農）
- 16:36 D-11 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ阻害物質生産菌 *Streptomyces anulatus*により
生産されるキチナーゼ阻害物質の予備的性状解析
○塩田博人，市川美里，神崎浩，仁戸田照彦（岡山大院・自然科学）

<E会場 : C205>

座長 : 阿座上弘行 (山口大・農)

- 14:20 E-1 Analysis of the genes essential for a linear topology of *Streptomyces replicons*
○ Yosi NINDITA, Zhisheng CAO, Kenji ARAKAWA, Haruyasu KINASHI
(Graduate School of AdSM, Hiroshima Univ.)
- 14:32 E-2 *Streptomyces rochei* 7434AN4株の線状ゲノムの末端構造解析
○曹志生, Yosi NINDITA, 楊英杰, 荒川賢治, 木梨陽康(広島大院・先端物質)
- 14:44 E-3 *Streptomyces rochei*の抗生物質生合成における転写活性化機構の解析
○鈴木敏弘, 望月進, 山本章治, 佐々木浩晃, 荒川賢治, 木梨陽康
(広島大院・先端物質)
- 14:56 E-4 ラン藻 (*Oscillatoria agardhii*) レクチンのNMR構造解析
○瀬野利直, 手島圭三, 池上貴久¹, 堀貫治(広島大院・生物圏, ¹阪大・蛋白研)

15:08 休 憩

座長 : 村田芳行 (岡山大院・自然科学)

- 15:16 E-5 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の菌体表層レクチンの精製と解析
○松永哲郎, 加藤昭夫, 阿座上弘行(山口大・農)
- 15:28 E-6 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー不活化因子の精製と解析
○長尾章子, Karim Minnatul, 松永哲郎, 加藤昭夫, 阿座上弘行(山口大・農)
- 15:40 E-7 イネにおけるプロリン生合成酵素の発現解析
○金鳳, 井野宏俊, 藤川愉吉, 江坂宗春(広島大院・生物圏)
- 15:52 E-8 トマト果実におけるアスコルビン酸蓄積機構の解明
○坂本真吾, 藤川愉吉, 江坂宗春(広島大院・生物圏)

16:04 休 憩

座長 : 荒川賢治 (広島大院・先端物質)

- 16:12 E-9 Roles of Hydrogen Peroxide Accumulation in Absciscic Acid Signaling in *Arabidopsis* Guard Cells
○Rayhanur Jannat, Misugi Uraji, Miho Morofuji, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori*, Yoshiyuki Murata
(Div. Biosci., Okayama Univ., *IPSR, Okayama Univ.)
- 16:24 E-10 Yeast Elicitor-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis*
○Md. Atiqur Rahman Khokon, Mohammad Anowar Hossain, Shintaro Munemasa, Misugi Uraji, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori*, Yoshiyuki Murata
(Div. Biosci., Okayama Univ., *IPSR, Okayama Univ.)
- 16:36 E-11 Involvement of Endogenous Absciscic Acid in Methyl Jasmonate-Induced stomatal closure in *Arabidopsis*
○Mohammad Anowar Hossain, Shintaro Munemasa, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori*, and Yoshiyuki Murata
(Div. Biosci., Okayama Univ., *IPSR, Okayama Univ.)

特別講演・受賞講演

講演要旨

特別講演

チョコレートのサイエンス：生物学・化学・物理学のハーモニー

佐藤 清隆（広島大学大学院生物圏科学研究科）

室温でパリッと割れる硬さを保ちながら口に入れると速やかに融け、口いっぱい甘さと苦さとまろやかな香りが広がるおいしさで人々を魅了するチョコレートは、「お菓子の王様」である。世界中のどこにいても、10人中9人がチョコレート好きである。残る一人は嘘をついているか、「チョコレートを食べると太る、にきびが出来る、虫歯になる、鼻血が出る」などの迷信にとらわれて「食わず嫌い」になっているに違いない。大好きなチョコレートを食べながらも、心の隅でこの迷信を払拭しきれない人が今も多い。一方で、チョコレートに含まれる栄養成分の機能性が注目され、むしろ最近では「チョコレートは健康に良い」というイメージのほうが強くなった。

チョコレートの原点はカカオ豆である。2006－2007 年の統計では世界のカカオ豆の生産量は 337 万トンで、アフリカが 233 万トン、アジアが 62 万トン、中南米が 41 万トンである。圧倒的にアフリカ産が多いが、カカオの故郷はアフリカではない。南米のアマゾン川上流やオリノコ川上流に展開する熱帯雨林が原産である。そこから、何百万年以上の間に、カカオの生育圏は動物によって中南米周辺に広がった。その地域へ初めての人類として到達したモンゴロイドの人々が、カカオを食べることを知った。それはせいぜい今から1万年ほど前である。最初は、カカオパルプを食べ、その後に焙炒した豆を食べた。はるかに下って、15世紀末に中南米に到達したヨーロッパ人によってカカオの栽培は世界中に広がった。

しかしカカオが栽培される地域が高温高湿の熱帯雨林地方に限られることは、現在でもまったく同じである。パリッと割れる原因である油脂:ココアバターの融点が 25～30℃であることで、カカオは熱帯でしか成育できない。カカオ豆が発芽し成長して葉を繁らせ、光合成で自立できるまでの栄養の多くをココアバターが担っているが、温度が低下してココアバターが結晶化すれば豆は発芽できないので、カカオの生育は熱帯に限られる。まさしくそれが原因で、カカオ豆の生産地で人々は「食べるチョコレート」は作れない。カカオバターを固めて「食べるチョコレート」にしたのは、カカオが涼しいヨーロッパに持ち込まれてからである。

アフリカを発して数万年の旅を経てそこに到達した人類が、チョコレートの原料であるカカオに初めて接してから、チョコレートを食べるまでの数千年を越える歴史を振り返ると、偶然と必然の織り成すサイエンスのハーモニーに満ちていることがわかる。意識するか否かにかかわらず、カカオからチョコレートを作る過程には、生物学は言うに及ばず、脂質科学、食品化学、食品物理学、食品栄養学、食品工学などが動員される。

農芸化学との関連で強調したいことは、「チョコレートは発酵食品」ということである。「発酵」と聞けば、ほとんどの人が日本酒やワインを思い浮かべるので、チョコレートと発酵が結びつくとはとても思えない。しかし、発酵なしではチョコレートが出来ないことは、世界のどこへ行っても間違いない。チョコレートにとっての発酵の目的はチョコレートのおいしさ、とりわけ独特の香りを作ることである。カカオ豆の発酵は豆の収穫後に速やかに行われるが、それは熱帯のカカオ農園における過酷な労働である。カカオの発酵で特徴的なのは、嫌気発酵につづいて好気発酵が必要なことで、それがあって初めて乾燥後の焙炒で生じる香り物質の前駆体が形成する。

講演では、おいしくて健康に良いチョコレートを生み出すまでにいたる歴史と現在に潜む、チョコレートのサイエンスハーモニーを概説する。

参考文献:チョコレートのロマンティック・サイエンス、佐藤清隆、古谷野哲夫、「油脂」(幸書房)に連載中。

2009 年度支部学生奨励賞受賞講演

1. シトクロム *c* の安定性と折り畳みに対する補因子ヘムの影響

山中 優（広島大院・生物圏）

シトクロム *c* (Cyt.*c*) は補因子としてヘムをもつ。ヘムは蛋白質内部のアミノ酸残基と相互作用している。これまでの研究から、ヘムは Cyt.*c* 安定性の要であり、ヘムが結合しなければ Cyt.*c* は折り畳まないと考えられてきた。しかし演者は、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* の Cyt.*c* (AA) が、ヘムが結合していないアポ型でも折り畳む事を見出した。相同蛋白質との構造比較から、AA には蛋白質の内部コアを形成する疎水性アミノ酸が他よりも 9 残基多い事がわかった。これらの残基による相互作用が、AA のホロ型（ヘムが結合した状態）の高い安定性とアポ型のヘム非依存的な折り畳みに寄与していると推測した。そこで、AA より安定性が低く、本来ヘム依存的に折り畳む常温菌 *Pseudomonas aeruginosa* の Cyt.*c* (PA) へ AA に存在する疎水性残基を 9 ヶ所同時に導入し、安定性と折り畳みを調べた。その結果 PA への残基導入により、ホロ型は安定化しなかったが、アポ型はヘム非依存的に折り畳むようになった。以上の結果は、①導入した残基がヘムと立体障害を起こすためにホロ型 PA 変異体の安定性は上昇せず、②導入した残基が内部コアを形成したためにアポ型が折り畳むようになった事を示唆する。ヘムは、蛋白質内部の疎水性アミノ酸と適切に相互作用しコアを形成することで、Cyt.*c* ポリペプチドの折り畳みと安定化に寄与していると考察した。

2. 分裂酵母における相同組み換えを利用した簡便な遺伝子クローニング法

松尾 祐児（島根大・生物資源，鳥取大院・連合農）

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では簡便・高効率かつ制限酵素に依存せずに遺伝子をプラスミドにクローニングする Gap-Repair Cloning（以下、GRC）がよく用いられている。GRC とは酵母内の相同組み換え活性を利用して断片化したプラスミドにプラスミドと相同な配列をもつ遺伝子をクローニングするという方法である。一方、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても GRC が可能であるとの報告はあるが、体系化されていないため一般的に用いられていない。そこで、我々はまず分裂酵母を用いた効率的な GRC にどのくらいの長さの相同配列が必要であるか検討を行った。制限酵素で断片化したプラスミド pREP1 と異なる長さの相同配列（20bp, 40bp, 80bp, 250bp, 500bp）を付加したオーレオバシジン耐性遺伝子の 2 つの DNA 断片で分裂酵母を形質転換して GRC の効率を求めた。すると 20bp という短い相同配列でも実用的な効率（20%）でクローニング可能ながことが分かった。さらに、同様の条件下で 2 つの PCR 産物と切断したプラスミド DNA を同時に形質転換して、連結させることも可能であることが分かった。以上の結果から分裂酵母の GRC は短い相同配列を用いても十分に実用的であることがわかった*。

*Matsuo et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74:685-689 (2010)

一般講演

講演要旨

A-1

分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 のテロメア維持における機能解析

○高橋克典, 上野 勝 (広大院・先端物質)

真核生物の線状染色体の末端領域はテロメアと呼ばれており、細胞の寿命やがんと密接に関係している。Pot1 は分裂酵母からヒトまで広く保存された一本鎖テロメア DNA 結合タンパク質であり、分裂酵母 *pot1* 破壊株のテロメアは消失し染色体が環状化することが知られている。当研究室では、分裂酵母の RecQ ヘリケース *rqh1* と *pot1* の二重変異株は、相同組換えによってテロメアが維持されること、微小管重合阻害剤 (TBZ) に感受性となること、染色体末端がパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で流れないことなどを明らかにしている。染色体分配に異常がある細胞は TBZ 感受性を示し、実際 *pot1 rqh1* 二重変異株では染色体分配に異常が見られた。また、組換え中間体や複製フォークの進行が停止することなどによって高次構造を形成している DNA は PFGE で流れないことから、*pot1 rqh1* 二重変異株は染色体末端が絡まっていることで、染色体分配が阻害されていることが示唆される。本発表では、一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA を用いることで、染色体末端の絡まりの実体について解析した結果を報告する。

A-2

分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 の染色体分配における機能解析

○廣本泰介, 上野 勝 (広大院・先端物質)

染色体末端に位置するテロメアは、テロメラーゼあるいは相同組み換えによって維持されている。分裂酵母のヘリケースである Rqh1 は相同組み換えの頻度を下げる働きをしている。Pot1 は、テロメア一本鎖結合タンパク質として、テロメアの保護に寄与している。分裂酵母 *pot1* 欠損株はテロメア DNA を消失するのに対し、当研究室では、*pot1rqh1* 二重変異株はテロメア DNA が組換えで維持されていることを発見している。また、*pot1rqh1* 二重変異株は微小管重合阻害剤 (TBZ) 感受性を示すことも発見している。TBZ は M 期に作られる微小管の重合を阻害することで染色体分配を阻害することが分かっているため、この二重変異株では染色体分配に異常がある可能性が考えられる。そこで本研究では、同株の染色体分配において異常があるのかどうかを確かめることを目的とし、同株の染色体分配を蛍光顕微鏡による生体ライブ観察を行った。その結果、同株では、M 期の初期で微小管の伸張がとまる菌体の頻度が高かった。このことから、*pot1rqh1* 二重変異株は染色体分配の初期に異常が起こっていることが示唆された。

A-3

出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導

○宮本昭弘、柳本敏彰、松崎浩明、秦野琢之（福山大・生命工・生物工）

遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐため遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが効果的である。そこで、我々は酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として部位特異的組換えを利用して染色体からセントロメア配列を切り出して細胞死を誘導することを検討した。まず、一倍体細胞においてIV番染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位を組み込み、レコンビナーゼ発現プラスミド（レコンビナーゼ遺伝子は *GAL1* プロモーター下流に連結）を導入した。この細胞でIV番染色体からセントロメア配列を切り出すことで細胞死を誘導できた（プレート培養での生存率: 約 4×10^{-5} ）。さらに、二倍体細胞でIV番相同染色体の両方から切り出すことで細胞死を誘導できた。しかし、この生存率は一倍体細胞よりも約 10 倍高かった。そこで、IV番に加えV番相同染色体からも切り出した結果、生存率は一倍体細胞と同程度に低下した。このように二倍体細胞で多数の染色体からセントロメア配列を切り出すことで細胞死の効率を向上できた。

A-4

酵母とヒトの間で保存された染色体外遺伝因子の分配機構に関する研究

○岡田貴文、堀籠智洋、水田啓子（広島大院・生物圏）

ヒトの癌ウィルスである EB ウィルス DNA の均等分配に、ヒト Ebp2 が関わる事が報告されている。一方、我々は、出芽酵母における染色体外遺伝因子 $2\mu\text{m}$ プラスミドの分配に酵母の Ebp2 が関わる可能性を示した。 $2\mu\text{m}$ プラスミドは酵母細胞にとって有益でないにもかかわらず、有糸分裂時に均等に分配されて保持される。それには、シス因子である STB 配列とプラスミド由来の Rep1 および Rep2 タンパク質が必要である。これまでに我々は、酵母のリボソーム生合成に必須な調節タンパク質 Ebp2 およびこれと相互作用する Rrs1 が、ともに Rep2 と相互作用し、 $2\mu\text{m}$ プラスミドの分配に関わる可能性を示した。今回、温度感受性 *ebp2* 株と *rrs1* 株が半許容温度において、野生株に比べて $2\mu\text{m}$ プラスミドを高頻度で脱落することを明らかにした。さらに ChIP 法を用いて、Ebp2 および Rrs1 が STB 配列と結合することを示した。Ebp2 と Rrs1 はリボソーム生合成の場である核小体におもに局在するが、核膜にも局在する。一方、*ebp2* 株と *rrs1* 株では非許容温度において *ebp2* と *rrs1* の核膜への局在がそれぞれ失われる。そこで、*Lac* オペレーター・GFP リプレッサーシステムを用いて、 $2\mu\text{m}$ プラスミドを可視化して蛍光観察した結果、 $2\mu\text{m}$ プラスミドが核膜に局在することを明らかにした。これらの結果から、核膜に局在する Ebp2 と Rrs1 が $2\mu\text{m}$ プラスミドの均等分配に重要な機能をもつことが示唆される。

A-5

温度感受性 *ebp2* 変異と合成的な生育障害を示す変異株の解析

○万クン、岡田貴文、水田啓子（広島大院・生物圏）

我々は出芽酵母の Ebp2 が 60S リボソームサブユニットのアセンブリに必須な機能を持つことを明らかにしている。*EBP2* と機能的に関連する遺伝子を探索する目的で、温度感受性 *ebp2-14* 変異と合成的な生育障害を示す変異株を取得し、*ard1* 変異を同定した。*Ard1* は *N*^ε-アセチルトランスフェラーゼ NatA 複合体の触媒サブユニットである。NatA はリボソームタンパク質をはじめ、多くのタンパク質を修飾するが、リボソーム生合成や翻訳に対する影響については知見がない。*ard1Δ*（破壊）は、単独ではリボソーム生合成に影響を及ぼさないが、*ebp2-14* の、60S リボソームサブユニットのアセンブリにおける欠陥を著しく強めることを明らかにした。一方、過剰発現により *ebp2-14* の温度感受性を抑圧する遺伝子として、リボソームタンパク質 L36 をコードする遺伝子を取得した。この過剰発現は、*ard1Δ ebp2-14* の、60S リボソームサブユニットのアセンブリにおける欠陥も抑圧した。重複遺伝子によりコードされる L36a と L36b のうち、L36a のみが NatA 複合体によりアセチル化されることが報告されている。酵母 two-hybrid 法により、Ebp2 が L36a および L36b と相互作用することを示した。これらの結果は、NatA によるアセチル化修飾がリボソーム生合成に重要な影響を及ぼすことを示す。

A-6

出芽酵母における *EBP2* と *BRX1* の機能的関連

○梅木悠花、下地加織、河崎鈴加、水田啓子（広島大院・生物圏）

出芽酵母において *EBP2* は生育に必須な遺伝子であり、Ebp2 のアミノ酸配列は酵母からヒトにまで高度に保存されている。これまでに私たちは、出芽酵母の Ebp2 がおもに核小体に局在し、60S リボソームサブユニットのアセンブリに必要な調節因子であることを明らかにしてきた。さらに、温度感受性 *ebp2-14* 変異と完全な合成致死性を示す変異として、4 つの *brx1* 変異（*brx1-52*、*brx1-102*、*brx1-172*、*brx1-227*）を同定した。*BRX1* は生育に必須な遺伝子であり、Brx1 は核小体に局在し、60S リボソームサブユニットのアセンブリに機能を持つ。4 つの *brx1* 変異についてそれぞれ単独変異株を作製したところ、3 株は野生株とほぼ変わらない生育を示し、1 株は弱い温度感受性を示した。なぜ *ebp2-14* と *brx1* の二重変異が完全な合成致死となるのかを明らかにするために、*GAL1* プロモーター制御下の *EBP2* を持つプラスミドに依存して生育する *ebp2-14 myc-brx1* 株を作製し、ガラクトース培地からグルコース培地にシフトすることにより、*ebp2-14 brx1* 二重変異の表現型を解析できる系を確立した。これにより、*ebp2-14 brx1* 二重変異によって、25℃という低温であっても、60S リボソームサブユニットが正常に合成されなくなることが分かった。また、Brx1 と Ebp2 の相互作用、さらにそれに及ぼす各変異の影響について解析した。

A-7

分裂酵母における Ebp2 の機能解析

○曲野美紀¹、中川浩子¹、五島徹也²、久米一規²、平田大²、水田啓子¹

(¹ 広島大院・生物圏、² 広島大院・先端研)

私たちは、出芽酵母の Ebp2 がおもに核小体に局在し、リボソーム生合成に必須であることを明らかにしてきた。また最近、出芽酵母の Ebp2 が核内膜に埋め込まれている SUN タンパク質 Mps3 との相互作用を介して核膜に局在し、核形態維持や染色体の恒常性維持に機能していることを見出している。分裂酵母においても、Mps3 のホモログである Sad1 が Ebp2 (以下 spEbp2) と相互作用することが報告されている。Sad1 はスピンドル極体の構成タンパク質であり、過剰発現させると核膜全体に観察される。網羅的な解析から、spEbp2 が生育に必須であり、おもに核小体に局在することが報告されているが、その詳細は不明である。そこで、spEbp2 の詳細な機能解析を行うことにより、リボソーム生合成と核の恒常性維持の分子機構の解明を目指している。

N 末端と C 末端にそれぞれ緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた spEbp2 を発現する株 (N 株と C 株とする) を作製したところ、C 株は N 株に比べて生育が遅かった。さらに C 株において、リボソーム量が減少しており、また、有糸分裂時に spEbp2 が均等に分配されないことを見出した。これらの結果は、spEbp2 がリボソーム生合成と核小体の分配に重要な機能を担っていることを示唆している。

A-8

UBR ユビキチンリガーゼによる低分子ペプチド・アミノ酸の利用制御

○北村憲司¹・砂原恵美²・山下一郎¹

(広島大・¹自然科学研セ・遺伝子、²工学部・発酵工学)

ヒトの Johanson-Blizzard 症候群は Ubr1 ユビキチンリガーゼの機能不全により起こるが、分解されるべき原因基質蛋白質は不明である。我々は、分裂酵母 *S. pombe* に存在するヒト Ubr1 類似の 2 種の蛋白質、Ubr1, Ubr11 の生理機能を調べている。多様な形質を示す Ubr1 欠損株に対して、*ubr11⁺* 遺伝子をノックアウトしても顕著な異常が無くその機能はこれまで不明だったが、Ubr11 欠損株はオリゴペプチド輸送体が発現せず細胞外ペプチドを全く利用できない事を見つけた。更に、ペプチド利用不能形質を回復させる抑圧変異の解析から、ペプチドのみならず数種のアミノ酸の利用も同様の調節を受ける事が明らかとなり、アミノ酸やペプチドを取込む複数の輸送体の発現や機能の調節が、共通の制御ネットワークの支配下にある事が示唆された。一部のアミノ酸やオリゴペプチドは自身が直接的な生理作用を持つが、それらの取込み制御に関してはいまだ不十分な知見しかない。Ubr11 欠損の抑圧遺伝子は Ubr11 ユビキチンリガーゼの基質である可能性が考えられ、抑圧変異の原因遺伝子の単離を試みるとともに、輸送体制御ネットワークの解明を目指している。

A-9

SGA 法による酵母クロマチン再編因子 RSC の機能解析

○千原 裕貴、米田 篤史、湯川 格史、土屋 英子（広島大院・先端物質科学）

出芽酵母の ATP 依存性クロマチンリモデリング因子の一つである RSC 複合体は生育に必須であり、G₂/M 期の進行に必要な Nps1 を中心因子としてクロマチンの再編に働いている。当研究室で取得した *NPS1* 遺伝子温度感受性変異株 (*nps1-13* および *nps1-105*) は制限温度での細胞周期の停止 (G₂/M 期)、微小管重合阻害剤 TBZ 感受性、胞子形成率の低下など様々な表現型を示す。従って、RSC 複合体は体細胞分裂および減数分裂の両過程において様々な生理機能を有していると考えられるが、その詳細は明らかではない。そこで本研究では RSC と協調的に作用する因子を探索するため、SGA (Synthetic genetic array: Tong A. H., *et al.*, 2004) 法を用いて *nps1-105* 変異と合成致死性を示す遺伝子欠損株を網羅的に同定し、これらの遺伝子との機能関係について解析することにより RSC の作用機序の詳細および生理的意義について明らかにすることを目的とする。

SGA 解析により取得された株の欠損している遺伝子について機能及び局在情報に基づいた分類を行ったところ、クロマチン代謝やタンパク質合成といった RSC の関与が既知の生理機能を有する遺伝子群が取得された一方、今まであまり報告されていなかったミトコンドリア遺伝子群との機能関連が新たに示唆された。現在、RSC とミトコンドリアとの詳細な機能関係について解析を進めている。

A-10

酵母 Rpd3/HDAC の活性調節因子の探索

○大屋 朋之、釜谷 和興、湯川 格史、土屋 英子（広島大院・先端物質科学）

ヒト HDAC1 ホモログである出芽酵母 Rpd3 複合体は、栄養増殖時において、URS1 と呼ばれるシスエレメントを介し、減数分裂初期遺伝子 *IME2* の転写抑制に働いている。当研究室では、*IME2* の転写制御機構について詳細な解析を行う過程で、*IME2* の転写活性化時に URS1 配列周辺のヒストンがアセチル化されているにもかかわらず、Rpd3 複合体が URS1 配列上に局在していることを見出した。また、*in vitro* における解析により、この時期の Rpd3 複合体の HDAC 活性が、栄養増殖時に比べ低下していることがわかり、このことから Rpd3 が活性レベルでの調節を受けており、活性を抑制する因子の存在が示唆された。本研究では HDAC の活性を調節する因子の探索を行い、その制御機構について解明することを目的としている。これまでに、*IME2* と同様に Rpd3 が転写制御する *INO1* プロモーターにおける転写制御系を利用したスクリーニングを行い、いくつかの候補遺伝子を取得して、現在解析を進めているところである。今回はスクリーニング結果と、候補遺伝子の解析結果について報告する。

A-11

酵母 Rpd3/HDAC の減数分裂における制御機構

○三瀧 勇、湯川 格史、土屋 英子（広島大院・先端物質科学）

ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）はクロマチン構造を凝集させることにより、グローバルな遺伝子の転写抑制に働いている。ヒトHDAC1ホモログである出芽酵母のRpd3は、栄養増殖時にL型およびS型の二種類の複合体を形成しており、L型複合体はプロモーター領域のクロマチン構造に作用して転写抑制に働くのに対し、S型複合体はORF内のクロマチン構造に作用して偽転写開始点からの間違った転写開始を抑える働きがある。一方、減数分裂過程においてRpd3が欠損すると第一減数分裂が遂行できず、孢子形成不能になることが明らかにされているが、この必須機能の詳細については不明な点が多い。今回、我々はこの機能がL型、S型のいずれの機能によるものか調べるため、各複合体に特異的な構成因子の欠損株の孢子形成能を調べた。その結果、L型特異的な*sds3*欠損株の孢子形成能が野生株に比べて著しく低下することから、減数分裂過程ではL型複合体が主要に働くと考えられた。さらに、Sds3は減数分裂初期にGSK3依存的なリン酸化修飾を受け、恒常的にリン酸化され続けることを見出した。Sds3はL型複合体のHDAC活性に必須な構成因子であることから、L型複合体はSds3のリン酸化を介して何らかの機能調節を受け、減数分裂過程において必須機能を果たしている可能性が考えられた。現在、減数分裂過程におけるSds3のリン酸化の生理的意義について調べている。

A-12

酵母 Rpd3/HDAC の減数分裂における機能解析

○河村 浩、浅田 星太郎、湯川 格史、土屋 英子（広島大院・先端物質科学）

出芽酵母のヒストン脱アセチル化酵素をコードする *RPD3* 遺伝子の破壊株を孢子形成させようとすると、第一減数分裂の進行が著しく遅延し、孢子形成できないことが知られている。従って、Rpd3は減数分裂・孢子形成に必須な役割を果たしていると考えられるが、その詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、Rpd3 の機能について明らかにし、減数分裂におけるヒストン脱アセチル化の意義について解明することを目的とする。*rpd3* 破壊株では、減数分裂中期遺伝子群の転写活性化因子をコードする *NDT80* はほとんど転写されないことが知られている。まず、この知見を確認するために、*rpd3* 破壊株で *Ndt80* の発現量を調べた結果、*Ndt80* は発現していたが、野生株と比べて発現するタイミングが遅れていることが分かった。また、*NDT80* 自身のプロモーターを減数分裂初期で発現する *IME1* プロモーターに置換して *rpd3* 破壊株で発現させた結果、二回の核分裂は進行するが、成熟した孢子には至らなかった。これらの結果から Rpd3 は *NDT80* 転写活性化制御と、それ以降の孢子形成過程において重要な働きをしている可能性が示唆された。

B-1

酵母細胞壁合成とエタノール発酵の関連性について

○渡辺 大輔¹、平田 愛子²、大矢 禎一²、赤尾 健¹、下飯 仁¹

(¹ 酒総研、² 東大院・新領域)

清酒酵母は、清酒もろみにおいて高濃度のエタノールを生産する能力をもつが、この原因として、清酒酵母が細胞増殖を終えた後の休止期 (G_0 期) への移行に欠損を示し、エタノール濃度が上昇していくストレス環境下でも高い発酵力を維持できることが明らかになってきた。本研究では、休止期に特徴的な細胞壁の肥厚とエタノール発酵の関連性に着目した。

まず、清酒もろみ中の酵母を用いて解析した結果、清酒酵母は実験室酵母と比べて高いザイモリエース感受性を示すこと、また、酵母細胞壁の主要な構成成分であるグルカン層が清酒酵母では実験室酵母と比べて薄いことを明らかにした。次に、実験室酵母由来の細胞壁合成関連遺伝子破壊株を用いて発酵試験を行った結果、グルカン合成酵素 *FKS1* 及びその上流活性化因子である *WSC1*、*ROM2* の遺伝子破壊株のみが特異的に高い発酵力を示した。以上の結果から、清酒酵母はグルカン合成酵素の活性化における欠損が一因となって高発酵性を獲得したのではないかと推測される。

B-2

ゲノム情報を利用した清酒酵母の系統進化と醸造特性の解析

○石塚 洋一郎¹、渡辺 大輔²、赤尾 健²、下飯 仁^{1,2}

(¹ 広大院・先端研、² 酒類総合研究所)

清酒酵母は、清酒醸造において低温で高濃度のエタノールを生産するなど実験室酵母や他の醸造用酵母とは異なる性質を数多く持っている。また、清酒酵母と実験室酵母のゲノムは塩基配列レベルで約 96% は同一であり、残りのわずかな相違によって清酒酵母の醸造特性が決定されていることが明らかになってきた。本研究では、多種の酵母菌株のゲノム情報を用い、系統学的解析を行うと共に、清酒醸造特性との関連性の解析を行った。

当研究室で行った清酒酵母の全ゲノム解析結果を用いて系統樹の作成を行った。また、ゲノム情報のある酵母 42 株を用いて清酒小仕込み試験を行い、発酵力について統計解析を行った結果、清酒酵母グループは、清酒醸造において仕込み後半の発酵力が高いという特徴を示した。今後は、ゲノム情報と醸造特性データを用いて、系統関係や連鎖不平衡を考慮したゲノムワイド関連解析を予定している。

B-3

清酒酵母と実験室酵母の交配による発酵速度と細胞増殖速度の QTL 解析

○大石 智恵¹、加藤 拓²、渡辺 大輔²、赤尾 健²、下飯 仁^{1,2}

(¹ 広大院・先端研、² 酒総研)

清酒酵母と実験室酵母は同じ *Saccharomyces cerevisiae* に属しているが、清酒酵母は他の酵母に比べて醸造に適した数々の特徴を持っている。また、醸造にとって重要な性質の多くは複数の遺伝子が形質の発現に関与しており、形質が連続的な値を示すと考えられている。本研究では YPD 培地での細胞増殖速度を支配する量的形質遺伝子座 (QTL) の解析を行い、清酒発酵に関わる QTL と比較することで、優良酵母育種のための基礎データを得ることを目的とした。

清酒酵母きょうかい 7 号 (K7) の一倍体と K7 より発酵力の低い実験室酵母の一倍体 (X2180-1B) の交雑分離一倍体 100 株を用いて、YPD 培地での細胞増殖速度 (μ) を支配する QTL の解析を行った。その結果、 μ の QTL は清酒仕込試験 2 日目の発酵速度の QTL と極めて近い遺伝子座であることがわかった。この結果から、仕込初期の発酵速度を支配する遺伝子は細胞増殖速度を支配する遺伝子と同一であり、仕込初期の発酵速度は細胞増殖速度によって影響を受けていることが示唆された。

B-4

Enterobacter aerogenes HUC201 株によるグリセロール含有バイオディーゼル廃液からのエタノール生産

○下吹越雅人、田島誉久、加藤純一、中島田豊 (広大院先端分子生命機能)

【目的】近年、枯渇が危惧されている化石燃料に代わるバイオマスエネルギーの需要が高まってきている。バイオマスエネルギーの一種であるバイオディーゼル燃料 (BDF) は軽油の代替エネルギーとして期待されているが、生産する過程において副産物として高濃度グリセロール廃液が生成され、この処理法が問題となっている。本研究では高濃度グリセロール廃液から水素とエタノールを生産する *Enterobacter aerogenes* HU-201 株を用いて生産量を向上させる最適条件の検討を目的とした。

【方法及び結果】培地にアルカリ法により副産物として生成した高濃度グリセロール廃液 (初発 pH : 11.0) を基質として加え、BDF 濃度の影響をバイアルによる回分培養で測定した。結果、低濃度 (25~50g/L) で高エタノール収率となった。次に初発 pH の影響を調べるために基質濃度 25g/L、初発 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 で実験を行った。すると初発 pH によって収率が違い、pH 6.0 で最もエタノール収率が高くなった。従って pH はエタノール生産に大きな影響を与えていることが示唆された。現在、pH を厳密に制御するためにリアクターを立ち上げ、エタノール生産最適 pH の検討を行っている。

B-5

Moorella sp. HUC22-1 株によるギ酸を基質とした酢酸生産

○村上直之，田島誉久，加藤純一，中島田豊（広大院先端分子生命）

【目的】本研究室で単離された高熱性偏性嫌気性菌 *Moorella* sp. HUC22-1 株は、 H_2 と CO_2 から酢酸を生産するというユニークな特性を有する。しかし、水素ガスの溶解度は非常に低いので、十分量の水素を供給するためには、通気・攪拌に大きなエネルギーを必要とする。そこで、HUC22-1 株が糖などと同様に流加培養が可能なギ酸も資化できることに着目した。ギ酸は水素から容易に生産でき、将来の水素貯蔵物質の一つとして期待されている。そこで、本研究では、HUC22-1 株を用いてギ酸を基質とした効率的酢酸生産方法を検討した。

【方法及び結果】ギ酸を唯一の炭素源としたときの増殖特性を調べるために、初期 pH6.2、温度 55℃、ギ酸ナトリウム 50mM を添加して振盪培養を行った。その結果、ギ酸から量論的に酢酸を生成したことから、炭素源として十分利用可能であることがわかった。しかし、酢酸濃度を上げるためにギ酸ナトリウム濃度を増加させたところ、pH8 付近で増殖が停止し酢酸濃度の向上が制限された。そこで現在 pH を制御するためにギ酸ナトリウムにギ酸を混合した基質による pH 制御流加培養法を検討している。

B-6

中高温性有機溶媒耐性微生物の特性化とその活用

○片岡 尚也¹，中島田 豊¹，Alisa S. Vangnai²，Ajiraporn Kongpol²，加藤 純一¹

（¹広島大院・先端物質・分子生命，²Chulalongkorn Univ., Dept. of Biochem.）

【目的】生物機能を活用した生産技術は、親水性の世界で大きな成功を収めた。しかし、疎水性物質の生産では、石油化学プロセスが主流であり、生物による生産例はほとんど存在しない。理由として、疎水性物質の持つ生物毒性が挙げられる。本研究室では、有機溶媒に耐性を有する微生物の取得に成功している。本研究の目的は、有用微生物を育種・活用することで有機溶媒かつバイオ燃料として有望なブタノールを生産することである。

【方法・結果】まず、2% v/v n-ブタノール存在下で増殖可能な微生物を宿主と設定し、電気穿孔法による形質転換を試み、諸条件を検討した結果、高効率で形質転換できる技術を見出すことに成功した。次に、*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 株の染色体を鋳型にした PCR 法によるブタノール生産酵素遺伝子の取得を試み、目的酵素遺伝子の取得に成功した。現在、異種遺伝子発現のためのプロモーターの探索を行っている段階である。

B-7

Rhodococcus ruber によるテトラヒドロフラン分解機構の解析

○田島 誉久、林田 直樹、松村 楽、中島 田豊、加藤 純一（広島大院・先端物質・分子生命）

【目的】 テトラヒドロフラン（THF）は各種溶媒として幅広く使用されているが、その安定性ゆえに地下水などの環境中では長期にわたって残存し、環境汚染を引き起こすことが懸念されている。微生物による THF 分解機構が解明されれば、常温・常圧という温和な条件での THF 分解を可能とし、さらに分解により生成される代謝産物を有用物質として利用することもできる。そこで本研究では THF 資化微生物として単離した *R. ruber* の THF 分解遺伝子および代謝物の解析により、分解経路を解明することを目的としている。

【方法および結果】 THF を単一炭素源として生育する *R. ruber* のゲノムライブラリーより THF 分解に関わる DNA 領域を含む形質転換株を 6 株取得した。そのうち 4 株において同一サイズの挿入断片を有していることが示された。配列解析の結果、THF 分解に関与すると思われる遺伝子が含まれていることがわかった。現在、THF 分解への関与を明らかにするため、当該遺伝子の破壊や THF を資化しない株への導入および代謝物の解析による機能解析を行っている。

B-8

Pseudomonas putida F1 のトリクロロエチレンに対する負の走化性センサーの特定

○奥 正太、林田 通世、田島 誉久、中島 田豊、加藤 純一（広大院 先端物質 分子生命）

【目的】 トリクロロエチレン（TCE）分解細菌 *Pseudomonas putida* F1 株は、トルエンに曝露した場合、TCE に対して集積行動を示すことが報告されている。このような特定の化学物質を感知し、集積もしくは忌避を示す挙動を走化性と呼ぶ。F1 株はトルエン曝露下で TCE に集積行動（正の走化性）を示すが、トルエン非曝露株や高濃度 TCE に対しては忌避行動（負の走化性）を示す。これは F1 株が TCE に対して負の走化性機構を有する可能性を示唆しているが、負の走化性機構に言及した報告はほとんど無い。そこで、本研究は F1 株の TCE に対する負の走化性機構の解析を試みた。

【方法・結果】 本研究室では *Pseudomonas aeruginosa* PA01 株を用いて走化性機構の解析を行っており、PA01 株の TCE に対する負の走化性センサータンパク PctA の存在を明らかにした。そこで我々は F1 株における類似の走化性センサータンパクを探索し、PctA 様走化性センサー（PctA_{pp}）を見つけた。次に PctA_{pp} 遺伝子を破壊した F1 株を作成し、TCE に対する走化性応答を調べた。PctA_{pp} 遺伝子破壊株は野生株と比べて TCE への強い集積がみられた。また、PctA_{pp} を導入した PA01 株では非導入株と比べ TCE からの強い忌避が確認された。これらのことから、PctA_{pp} は F1 株の TCE に対する負の走化性センサーとして機能している可能性が強く示唆された。

B-9

イネ苗立枯病原菌*Burkholderia plantarii*と近縁病原菌との比較ゲノム解析

○山野由美子¹、内海龍太郎²、関根光雄³、小口晃央³、安海明百³、藤田信之³、仲宗根薫¹
(¹近畿大・工、²近畿大・農、³製品評価セ)

イネ苗立枯病原菌*Burkholderia plantarii* MAFF301723株は、グラム陰性βプロテオバクテリアサブグループに属する病原微生物であり、本病原性の原因は本菌株が生産するトロポロンにある。しかし、その生産に関わる遺伝子群、及び生産・制御機構等は解明されておらず、最近の報告でTCSやQSの関与が示唆されているがその詳細は不明である。我々は、「微生物ゲノム解析によるゲノム創薬」技術の確立を目的に、上記課題解決の切り口として、本菌株の全ゲノム解析を開始した。

まずはじめに、本染色体DNAからショットガン法により、塩基配列決定後、Phred/Phrapによりアッセンブル、InsilicoMolecularCloningにてアノテーションを行った。その結果、3つのレプリコン（染色体1；4.1Mb、染色体2；3.7Mb、プラスミド；0.2Mb）、合計約8.0Mbのゲノムサイズであることが明らかとなった。ORF予測により約6,800の遺伝子の存在が示唆され、*rrn*オペロンは5コピーであった。以上のデータを基に、ゲノム情報が明らかな同属と比較し、本菌株の病原性に関わる遺伝子を見出そうとした。今回は、同じイネ苗病を引き起こす*Burkholderia glumae*と、全くイネ苗病原性とは関わりのないウマやロバなどのウマ属に感染する鼻疽の原因菌*Burkholderia mallei*とを比較した。この比較により、イネ苗病の特徴的な遺伝子等を推定できるだろう。今後、様々な*Burkholderia* 属と比較解析していく事で、病原性に関わる共通遺伝子の解析を進める。

B-10

比較ゲノムによる好塩性アーキア遺伝子群の共通性

○仲宗根薫¹、関根光雄²、藤田信之² (¹近畿大・工、²製品評価セ)

高度好塩性アーキア*Haloarcula japonica* TR-1株は、石川県の塩田から分離された、至適塩濃度が20%の微生物である。TR-1株は、本菌株全体をシステムティックに理解するためのゲノム情報解析の基盤整備は行われてきていない。そこで我々は、高度好塩性アーキアのゲノム情報に基づく様々なレベルでの研究の基盤形成、またゲノム資源としての潜在性を最大限に利用する目的で、*H. japonica*の全ゲノムを解析した。

H. japonica TR-1 株の染色体 DNA よりショットガンライブラリーを作成し、8x 程度のcoverage でシーケンシング、約 4.2Mb のゲノム配列情報を得、アノテーションを行った。全ゲノムを解析の結果、5 つのレプリコン(3.0Mb, 613kb, 506kb, 95kb, 51kb), 約 4,057 の遺伝子の存在が示唆された。既にゲノム解析の終了している *H. marismortui* と TR-1 株とは同属であるばかりでなく、16SrDNA 解析からはお互いに非常に近縁であることが明らかであるものの、レプリコンの数(8 レプリコン)は異なり、また最大のレプリコンにおける必須遺伝子群に関してはオペロン構造の保存性が高いことが確認された。これまでに全ゲノムが解析された高度好塩性アーキアのゲノムサイズを比較すると2から5Mbと、大きく異なっており、これら高度好塩性アーキアゲノムの比較によって好塩性アーキア遺伝子群の共通性や多様性を考察したい。

B-11

油糧微生物ラビリンチュラ類における高度不飽和脂肪酸生合成機構の解析

○岩坂宏明、足達浩文、秋 庸裕、河本正次、小埜和久（広島大学院、先端、生命機能）

【目的】海洋微生物ラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸（DHA）やドコサペンタエン酸（DPA）などの高度不飽和脂肪酸（PUFA）を高濃度に蓄積することから、油脂関連産業への利用が期待されている。しかしながら、工業利用を意図した有用株育種の際に必要な PUFA 生合成機構の全容解明は、未だなされていない。本研究では、PUFA 生合成関連遺伝子の機能解析を目的として、当該遺伝子の破壊による表現型の変化について検討した。

【方法及び結果】ラビリンチュラ類 *Schizochytrium* 属 ATCC 20888 株における PUFA 生合成遺伝子群の情報を基に *Aurantiochytrium* 属 CB15-5 株のゲノム DNA から相同遺伝子の部分断片を PCR で取得した。その一部を形質転換プラスミドに組み込み、相同組み換えによって同遺伝子座を破壊したところ、DHA 要求性を示す変異株が得られた。脂肪酸組成解析の結果、DHA と同様の機構で生合成されると考えられる DPA の産生が、完全に抑制されていることがわかった。さらに、この変異株の DHA 要求性は、DHA 以外の PUFA によっても相補可能であることがわかった。

C-1

日本酒成分の GABA_A 受容体に対する効果

○重森健介¹、伊豆英恵²、江口将也¹、須藤茂俊²、山田康枝¹（¹近畿大・工、²酒総研）

【目的】 γ -アミノ酪酸（GABA）は中枢神経系において、抑制性シグナル伝達に働く主要な神経伝達物質のひとつであり、日本酒にも含まれている。酒類の抗不安及びリラックス効果が GABA_A 受容体応答の昂進等で確認されている。またエタノール自体だけでなく、エタノール以外の酒類成分が GABA_A 受容体応答を昂進することが報告されている。リラックス効果をもつエタノール以外の日本酒成分について調べるため、イオン交換樹脂で分画した成分を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞系に発現した GABA_A 受容体に対する効果を検討した。【方法・結果】アフリカツメガエルの卵母細胞に、ウシの GABA_A 受容体の cDNA から合成した $\alpha 1/\beta 1$ サブユニットの mRNA をインジェクションした。約 18~26 時間、20℃でインキュベーション後、二電極膜電位固定法により GABA を還流し、活性を測定した。4 種類の純米酒をイオン交換樹脂により分画（塩基性アミノ酸、中・酸性アミノ酸、有機酸、糖画分）し、各画分単独での GABA_A 受容体活性と最大活性を示す GABA 200 μ M 存在下での GABA_A 受容体活性への作用を検討した。4 種類の純米酒によって異なる GABA_A 受容体活性を示した。

C-2

香気成分の NMDA 型グルタミン酸受容体に対する効果

○増田修一¹, 青島 均², 山田康枝¹ (¹近畿大・工,²山口大院・医学系)

【目的】NMDA 受容体は脳に多く存在し, 高い Ca^{2+} 透過性を有するイオンチャネル型グルタミン酸受容体のひとつであり, 神経可塑性の中心的役割を担い, 記憶形成や学習に深く関与している. ラベンダーの香気成分である Linalool は抗けいれん, 抗不安, 鎮痛, 抗炎症等の効果があり, NMDA 受容体の活性と関連している可能性が報告されている. そこで, Linalool とそれ以外の香気成分 (Terpinene-4-ol, 1-octen-3-ol, cis-3-hexen-1-ol) の NMDA 受容体に対する効果を検討した. 【方法・結果】アフリカツメガエルの卵母細胞に NR1/NR2A および NR1/NR2B サブタイプ NMDA 受容体の mRNA をインジェクションし, 二電極膜電位固定法により活性を測定した. Terpinene-4-ol, Linalool とともに, NMDA 受容体の活性が阻害された. 両者共に濃度が高くなると阻害率が上がったため, 濃度依存的に活性を阻害することが分かった. また, NMDA 受容体の NR1/NR2A, NR1/NR2B 受容体の測定結果を比較すると, 両者共に NR1/NR2B に比べて NR1/NR2A を低濃度で阻害することが明らかとなった.

C-3

PQQ の細胞増殖に対する効果

○藤原弘宜¹, 中森啓輔¹, 篠原達也¹, 松下一信², 山田康枝 (¹近畿大・工,²山口大・農)

【目的】ピロロキノリンキノン (PQQ) は最初微生物の酸化還元酵素の補酵素として発見された. その後マウスまたはラットの動物実験で PQQ 欠乏による発育不全, 骨形成不全が報告された. また PQQ の存在は肝臓のミトコンドリア量を増加させ, マウス繊維芽細胞においては細胞増殖を促進することが報告されているが, 未だその生理作用には不明な点が多い. そのため PQQ の持つ生理作用がヒトの細胞にどのような影響を及ぼすか, ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-SH とヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 を用いて細胞増殖に対する効果を検討した. 【方法・結果】SK-N-SH と HepG2 の細胞を種々の濃度の PQQ 存在下で SK-N-SH は 48, 72 時間, HepG2 は 24, 48 時間培養し, MTT assay および Neutral Red assay で細胞増殖を測定した. SK-N-SH, HepG2 共に細胞増殖の促進が確認された. HepG2 ではミトコンドリア量の増加も確認された. 以上の結果より, PQQ はヒトの細胞においてもミトコンドリアの増殖に関与する可能性が示唆された.

C-4

α -エチルグルコシドのホスホジエステラーゼ活性阻害効果

○伊藤賢太郎¹, 井上直美¹, 伊豆英恵², 須藤茂俊², 山田康枝¹ (¹近畿大・工, ²酒総研)

【目的】環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(PDE)は, 細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP および cGMP を分解することで, 様々なシグナル伝達を調節している. マクロファージなどの炎症細胞に存在する PDE4 の阻害薬は炎症を抑えることで肝炎や喘息の薬として使われている. また, 清酒に含まれる α -エチルグルコシド(α -EG)は, マウスにおいてガラクトサミン誘発肝障害を抑制することが報告されている. α -EG の肝障害抑制効果を検討するためにヒト肝ガン由来細胞株 HepG2, ヒト白血病由来細胞株 HL60 と HL60 より分化誘導したマクロファージの PDE 活性への阻害効果を検討した. 【方法・結果】PDE 活性の測定には, HepG2, HL60 およびマクロファージの細胞を超音波処理後, 超遠心して得られた上澄み液をゲルろ過し, 低分子物質を除いた細胞質画分を用いた. PDE 活性は PDE によって開環された 5' -AMP をヌクレオチダーゼ処理することによって得られるリン酸を BIOMOL GREEN を用いて測定した. その結果, α -EG は, 各細胞の PDE 活性を阻害した.

C-5

卵白由来降圧ペプチドの血管系細胞への影響

○水田千尋¹, 山内梨早², 金川沙夜³, 萱島知子⁴, 松原主典¹

(¹ 広島大学大学院教育学研究科, ² 広島大学教育学部, ³ サタケ, ⁴ 就実短期大学生活科学科)

【目的】近年, 血圧降下剤が血管新生に対して抑制的に作用し, がんのリスクを低下させることが示されている. 従って, 食品由来の降圧ペプチドにも同様な効果が期待されている. そこで, 卵白由来降圧ペプチドの血管系細胞への影響について検討した.

【方法】経口投与により降圧作用が報告されている卵白由来ペプチド 1 (R-A-D-H-P-F ; EP1), 及びペプチド 2 (Y-A-E-E-R-Y-P-I-L ; EP2)を合成し実験に用いた. 血管新生抑制作用は, ラット動脈片を用いた評価及び, ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC)とヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC)を用いた血管細胞への影響を調べた.

【結果】EP1 及び 2 はラット動脈片の微小血管形成を 10 μ M で 10%程度, 100 μ M で 20%程度抑制した. また HUVEC の遊走を有意に抑制し (25 μ M $\geq$), 100 μ M で 40%程度抑制した. EP2 の N 末端及び C 末端の 3 アミノ酸残基を除去した各ペプチドも EP2 とほぼ同様の抑制効果を示した. 一方, EP2 の中央部分の 3 アミノ残基のみでは抑制効果を示さなかった. HUVEC の細胞増殖と血管様構造形成及び HASMAC の遊走に対して EP1 及び 2 の有意な抑制効果は認められなかったことから, 卵白由来降圧ペプチドは血管内皮細胞の遊走を特異的に抑制することが明らかになった.

C-6

マウスを使った清酒の生理的おいしさの検討

○人見学¹、伊豆英恵²、橋口知一²、堀井幸江²、須藤茂俊²

(¹広島大院・先端研・分子生命、²酒類研)

【目的】清酒はきき酒試験（清酒を口に含み、吐き出して評価）によって「口の中で感じるおいしさ」で評価されており、清酒を「生理的おいしさ^{*}」の視点から研究した例はこれまでにない。これら2つのおいしさを同時に満たして飲んでおいしく、体に優しい清酒を造るためには「生理的おいしさ」の検討が必要と考え、解析を行った。

【結果】これまでの研究により、飲酒時に起こるケトン体や遊離脂肪酸の上昇等、生理的に好ましくない状態を高嗜好性清酒が抑制し、生理的においしい清酒では飲酒時の体への負担が小さいことが示唆された^{**}。そこで、清酒中のアミノ酸、有機酸、香気成分、グルコースを分析し、嗜好性とこれらの成分の相関を調べ、グルコース、Ile、Leu で特に高い相関が見られた ($\gamma > 0.8$)。相関のある成分を低嗜好性清酒に高嗜好性清酒と同程度になるように添加し、二瓶選択試験でマウスに飲ませ、嗜好性に影響がある成分を調べた。この結果、嗜好性に影響を与える成分として Lys、Val などが見いだされたが、単一成分の添加によって低嗜好性清酒が高嗜好性清酒と有意に同等以上に好まれることはなく、単一成分の添加で高嗜好性を完全には説明できないことが示唆された。

^{*} 生理的おいしさ；飲食時の体調や、食べた後の生理的変化に影響されるおいしさ、^{**} *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 796-802 (2004)

C-7

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素を安定に発現するクローン化前駆脂肪細胞株の脂肪細胞への分化誘導に関する研究

○下田まみこ、竹井瑛梨、吉田衣里、池田梨紗、西村浩二、地阪光生、長屋 敦、横田一成
(島根大院・生物生命科学)

種々のプロスタグランジン (PG) は、脂肪細胞とその前駆脂肪細胞で生合成され、異なるライフステージで PG 種ごとに特異的な作用を示す。そのうち、我々は、脂肪細胞での PGD₂ の生合成調節と役割について注目している。リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、脂肪細胞の分化誘導過程で特異的に発現して PGD₂ の生成に関与する。さらに PGD₂ は、非酵素的に代謝されて核内受容体の活性化リガンドである PGJ₂ 誘導体に変換される。本研究では、PGD₂ と、それに由来する代謝産物の役割を探究する研究の一環として、L-PGDS の cDNA をセンス方向に含む発現ベクターで、マウスの前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞をトランスフェクトして、L-PGDS を安定に発現する細胞クローンを選抜し、脂肪細胞の機能変化に関する検討を行った。外因性アラキドン酸添加による即時性の PGD₂ 量を測定したところ、元の細胞やベクターのみのトランスフェクトと比較して、L-PGDS 安定発現株において有意な PGD₂ 生成の促進が観察された。一方、脂肪細胞の分化誘導後の成熟期における脂肪蓄積量は、L-PGDS の安定発現株で、著しく抑制された。以上より、前駆脂肪細胞内での L-PGDS の安定発現により、PGD₂ 生成とは独立の機構で、脂肪細胞分化プログラムが抑制されていると考えられる。

Involvement of intracellular oxidative stress-sensitive pathway in phloxine B-induced photocytotoxicity in human T lymphocytes

○Hang Qi, Qian Wu, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama University)

We have previously found that phloxine B (PhB)-induced photocytotoxicity was dependent on extracellular H₂O₂ production in HL-60 cells but not in Jurkat cells. In this study, we further investigated the molecular mechanism of PhB-induced photocytotoxicity in Jurkat cells. The pretreatment with N-acetylcysteine significantly inhibited PhB-induced phenomena including phosphorylation of c-Jun-N-terminal kinase (JNK), interferon (IFN)- γ gene expression and cytotoxicity in Jurkat cells. SP600125, a JNK-specific inhibitor, partially inhibited PhB-induced IFN- γ gene expression. Furthermore, AG490, an IFN- γ -signalling inhibitor, significantly inhibited not only PhB-induced photocytotoxicity but also hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in Jurkat cells. These results suggested that PhB-induced cell death was at least partly through intracellular oxidative stress-sensitive JNK/IFN- γ pathway.

細胞損傷蛋白質 MM29kD の作用機構解析

○黒田将太¹、石井裕子¹、野間伊夫¹、吉村彰¹、千菊夫²、武部聡³、早川徹¹、酒井裕¹
(¹岡山大・院・自然科学 ²信州大・農、³近畿大・生物理工)

MM29kD は *Bacillus thuringiensis* MM50G2 株に由来する細胞損傷蛋白質でヒト T 細胞性白血病細胞である Jurkat 細胞や MOLT-4 細胞、またヒト子宮ガン細胞である HeLa 細胞に損傷活性を示す。MM29kD は構造的な類似性から細胞膜にポアを形成する β Pore forming toxin (PFT) の一種であると考えられる。本研究グループでは MM29kD の作用機構に関する研究を進めており、ここではその成果のいくつかを紹介する。活性決定領域の境界を決定するため、さまざまな長さの N 末端及び C 末端を持つ MM29kD 変異体を作製、解析した。その結果、MM29kD の活性決定領域が I³⁰ から Y²⁷² の範囲であることが示唆された。LDH アッセイの結果、MM29kD は一般的な β PFT と同様に細胞膜にポアを形成することが示され、LDH の細胞外への流出は PEG4000 ではなく PEG6000 を添加することで抑制された。このことは MM29kD の形成するポアが直径 1.6nm から 2.7nm であることを示唆した。

無細胞タンパク質合成系によるスギ花粉アレルゲンの生産

○安井裕哉, 奥山里美, 秋 庸裕, 出本麻里子, 河本正次, 小埜和久
(広島大院・先端・生命機能)

【緒言】現行のスギ花粉症診断法では、スギ花粉粗抽出物が検査試薬として用いられている。ところが、スギ花粉中には多種のアレルゲン分子が存在し、患者によって感作分子種に顕著な個体差がある。従って、より効果的な免疫治療の実施に向けては分子レベルでの診断法の確立が必要となる。それを実現するためにはスギ花粉からの単離が困難な個々のアレルゲン分子の安定供給が求められ、当研究室ではこれまでに、バキュロウイルス-昆虫細胞系での当該アレルゲンの生産に成功している。本研究では、タンパク質合成条件の至適化がより容易な昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた活性型組換えアレルゲン分子生産法を確立することを目的とした。

【方法及び結果】スギ花粉症患者 IgE と高頻度で反応する 10 種のアレルゲンの各遺伝子を FLAG タグ融合タンパク質として発現するためのベクターを構築した。これを用いて調製した mRNA を無細胞系に供した結果、全てのアレルゲンを可溶性画分に発現させることができた。さらに、Cry j 2 については FLAG タグを介したアフィニティ精製を行い、目的タンパク質を濃縮した。ELISA によって IgE 結合活性を調べた結果、天然型との相関傾向が見られ、本生産法の有用性が示唆された。

D-1

ω-3 系高度不飽和脂肪酸を含む混酸型トリアシルグリセロールの物性:S-ALA-S/POP の 2 成分相挙動

○木河智恵¹・上野聡¹・佐藤清隆¹・溝部帆洋²・市岡建司²
(¹広島大学生物圏科学研究科、²月島食品工業株式会社)

α-リノレイン酸 (ALA) や DHA、EPA などのω-3 系高度不飽和脂肪酸(ω-3PUFA)は血中脂質濃度低下、抗炎症作用など健康への有用性が高い。これまで我々は示差走査熱量測定 (DSC) と X 線回折測定により、ω-3PUFA を含むトリアシルグリセロール (1,3 位にステアリン酸、2 位に ALA、DHA、EPA を結合した S-ALA-S、S-DHA-S、S-EPA-S) の融点と多形挙動、ならびにココアバターの主成分である SOS (0: オレイン酸) との 2 成分系相挙動を明らかにしてきた。その結果、S-ALA-S、S-EPA-S、S-DHA-S の融点はいずれも 30℃以上で室温では結晶多形を示すこと、SOS とは混晶状態をとることが確認された。本研究では、SOS と同様にココアバターの主成分である POP (P: パルミチン酸) と S-ALA-S の 2 成分での相挙動を DSC と放射光 X 線回折法により測定した。その結果、DSC 測定では、POP と S-ALA-S の純粋系を除く全ての混合試料で 1 つの多形につき 2 種類の融解ピークが観察された。放射光 X 線回折測定では、長面間隔を表す小角側にピークが 1 種類のみに見えたが、Igor pro という解析ソフトでピーク分離を行った結果、2 種類のピークが確認された。これらの結果から、S-ALA-S と POP の 2 成分系はどの割合でも、共晶状態をとることが判明した。SOS と S-ALA-S では混晶状態となるので、POP と S-ALA-S、および、SOS と S-ALA-S の 2 つの混合系の相挙動の相違は、ステアリン酸とパルミチン酸の差異に起因していると考えられる。

D-2

0/W エマルジョンへの脂溶性物質の可溶化状態の安定性

○巽靖子・佐藤清隆・上野聡（広島大学院生物圏）

植物ステロールや、脂溶性ビタミンなどのような脂溶性の生体機能物質は、消化・吸収過程において脂質油滴やミセルへ可溶化して運搬されている。通常これらの脂溶性物質は水に不溶であるだけでなく、油に対する溶解度も低い。そのため、例えば0/W エマルジョンの脂質油滴に可溶化させた際に、室温における保存・流通段階で可溶化が十分でない場合、これらの脂溶性物質の体内動態の機能性が著しく低下する。本実験では、脂溶性物質として植物ステロール（ β -シトステロール）を用いて、高温で液体油に溶解させた後にマイクロチャネル乳化法で0/W エマルジョンを作成し、それを5℃に保存させた状態における結晶化挙動を観察し、結晶化に及ぼす乳化剤と粒径の効果を検討した。

結晶化抑制効果を定量的に測定するため、顕微鏡で確認された結晶化したエマルジョンの油滴数を全体の油滴数（～400 個）で割った値を結晶化率として求めた。それにより、脂質油滴のサイズが30 μm から10 μm に減少することによって、結晶化が著しく抑制されることが判明した。さらに、使用した乳化剤によって油滴中における植物ステロールの結晶化挙動に違いがみられることも判明した。

D-3

アオウキクサ 151 株の 9-リポキシゲナーゼの解析

○長谷川よしの¹、石田雄二¹、高木一輝²、横山峰幸²、伊福欧二²、西村浩二³、長屋 敦¹、横田一成¹、地阪光生¹（¹島根大・生資科・生命工、²資生堂RC、³島根大・総科研センター）

アオウキクサ (*Lemna paucicostata*) 151株は、花芽形成の研究における代表的なモデル植物である。本植物の花芽形成に寄与する因子として、同441株より、9-Hydroxy-10-oxo-12(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (9,10-Ketol-octadecadienoic acid, KODA) およびノルエピネフリンが同定された(Yokoyama, 2000)。KODAは、 α -リノレン酸にリポキシゲナーゼ (LOX) およびアレンオキシド合成酵素が順次作用して生成すると予想されるが、アオウキクサのこれら酵素の詳細は不明である。そこで、アオウキクサの花芽誘導因子の生合成機構を解明する基礎として、これら酵素の解析を試みた。同441株の9-LOXは先の日本植物生理学会大会にて報告したので、今回、同151株の9-LOXについて報告する。アオウキクサ151株の全RNAからオリゴdT-プライマーを用いてcDNAを合成し、これを鋳型にPCRクローニングを試みたところ、4種類のLOX様cDNAクローンが得られた。その一つであるLpLOX1-151を、N末端にHis-タグを付加した融合タンパク質として大腸菌で発現させ、Ni-NTA樹脂を用いて精製した。LpLOX1-151はリノール酸および α -リノレン酸いずれともよく反応し、各々の9S-ヒドロペルオキシドを特異的に生成した。これらの結果より、LpLOX1-151はKODAの生合成に寄与していることが示唆された。

D-4

アオウキクサ151株のアレンオキシド合成酵素の解析

○村上真梨恵¹、西村浩二²、長屋 敦¹、横田一成¹、横山峰幸³、伊福欧二³、地阪光生¹
(¹島根大院生資科・生物生命科学、²島根大・総科研センター、³資生堂 RC)

アオウキクサ (*Lemna paucicostata*) 151 株では、9-Hydroxy-10-oxo-12(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (9,10-Ketol-octadecadienoic acid, KODA) およびノルエピネフリン誘導体の縮合体が花芽を誘導することが報告された (Yokoyama, 2001)。KODA の生合成経路として、 α -リノレン酸-9-ヒドロペルオキシド (9S-Hydroperoxyoctadecatrienoic acid, 9S-HPOT) に由来するアレンオキシドの非酵素的な水付加が想定される。アレンオキシドは、アレンオキシド合成酵素 (AOS) により効率的に生成されるが、アオウキクサの AOS の詳細は不明である。本研究では、アオウキクサ 151 株における花芽誘導因子の生合成機構を解明する基礎として、本植物の AOS を解析した。アオウキクサ 151 株の全 RNA からオリゴ dT-プライマーを用いて cDNA を合成し、これを鋳型に PCR クローニングを試みたところ、2 種類の AOS 様 cDNA クローンが得られた。その一つである LpAOS2-151 を、N 末端に His-タグを付加した融合タンパク質として大腸菌で発現させ、Ni-NTA 樹脂を用いて精製した。LpAOS2-151 は、13S-HPOT より 9S-HPOT に対して明らかな基質選択性を示した。また、9S-HPOT との反応生成物を HPLC にて分析したところ、KODA に相当する生成物が検出された。これらの結果より、LpAOS2-151 は KODA の生合成に寄与しうることが示唆された。

D-5

Acidithiobacillus ferrooxidans のチオ硫酸デヒドロゲナーゼの解析

○菊本 愛生、万代 晃大、金尾 忠芳、上村一雄 (岡山大院・自然)

【目的】二価鉄および還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源として生育する好酸性の化学合成独立栄養細菌である *Acidithiobacillus ferrooxidans* のチオ硫酸の代謝経路を明らかにすることを目的とする。【方法・結果】チオ硫酸脱水素酵素の活性は、 $K_3[Fe(CN)_6]$ を電子受容体に用いて、420 nm の吸光度の減少を測定することによって無細胞抽出液中に検出され、硫酸イオンが活性発現に必須であった。細胞内には膜局在性とペリプラズム局在性の 2 種類の酵素が存在していた。2 種類のクロマトグラフィーを用い、無細胞抽出液からペリプラズムに存在すると推測される酵素を 192 倍に精製した。本酵素はヘムを持たない酵素で、最適 pH 1.5、最適温度 約 70℃であった。無細胞抽出液の活性と異なり精製酵素の酵素活性は硫酸イオンで阻害され、亜硫酸イオンで活性化された。分子量は SDS-PAGE で約 25kDa と推定された。N-末端アミノ酸解析から決定された遺伝子の解析によって、本酵素遺伝子は、硫酸結合タンパク質をコードする遺伝子とオペロンを形成し、近傍にはチオ硫酸：キノン酸化還元酵素と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子も存在した。

D-6

Shewanella 属細菌由来相同 cytochrome *c* の比較

○政成 美沙¹、竹中 聖²、若井 暁²、為我井 秀行³、栗原 達夫⁴、三本木 至宏²

(¹ 広大・生物生産、² 広大院・生物圏、³ 日大・文理、⁴ 京大・化研)

【目的】極限環境微生物が生産する蛋白質は、一般的な生物のものとは異なり、それぞれの生息する苛酷な環境に適応した性質を持っている。本研究の目的は、極限環境微生物の中でも、特に好冷好圧菌に着目し、その蛋白質の環境適応機構を明らかにすることである。

【方法・結果】同属で異なる環境に生息する好冷好圧菌 *Shewanella violacea* と常温常圧菌 *Shewanella amazonensis* 由来の相同 cytochrome *c* (以下 SV、SA) について比較した。これらの機能を示す指標の一つである酸化還元電位は同じであった。一方、示差走査熱量測定によって熱安定性を比較すると、SV は SA より高い安定性を示した。一般に、高温環境適応の結果、熱安定性が上昇することが知られている。しかし、SV は低温環境由来であるため、SV の高い熱安定性の獲得は別の要因によるものと予測した。すなわち、SV の高圧適応の可能性である。そこで、好冷常圧菌である *Shewanella livingstonensis* 由来の cytochrome *c* (以下 SL) との比較が有効であると考えた。3 種の cytochrome *c* のアミノ酸配列を比較したところ、SL は SV および SA とそれぞれ 77.6%、88.2% 一致していた。今後は、SL を加えて、熱安定性や酵素活性について検討する。

D-7

高度好塩性アーキア由来塩依存性 ATP 加水分解活性に対するアニオンおよびカチオンの影響

○若井 暁¹、仲宗根 薫²、三本木 至宏¹ (¹ 広大院・生物圏、² 近畿大・工)

【目的】本研究では、ATP エネルギーに対する水の影響を調べることを目的とし、ATP 加水分解活性に対する塩の影響について検討する。高濃度の塩は水分活性の低い状態を導く。したがって、本研究では高度好塩性菌を使用する。高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* は 3.4 M NaCl 存在下で最もよく生育し、細胞内に高濃度の塩を取り込む salt-in 戦略によって高塩環境に適応している。したがって、本菌の蛋白質は、細胞内外の局在に関わらず高塩環境に曝されており、水の影響を調べる研究材料として適している。

【結果および考察】3.4 M NaCl 存在下で培養した菌体から膜画分を調製し、ATP 加水分解活性を測定した。活性はモル濃度レベルの各種塩存在下でのみ検出でき、水分活性が低い条件で ATP が加水分解されることが分かった。さらに、本菌の膜画分による ATP 加水分解には、カチオンとして Na⁺ イオンが、アニオンとして SO₄²⁻ イオンが効果的であった。以上の結果は、ATP 加水分解には、低い水分活性が要件となるのみならず、活性を最適化するようなアニオンとカチオンの選択性があることを示唆している。今後は、各種塩存在下での ATP 加水分解、および蛋白質—ATP 結合に伴う熱量変化を測定し、ATP エネルギーに対する水の影響を明らかにする。

D-8

ジヒドロ葉酸還元酵素 D27E 変異体の機能解析

○大前英司¹、和田侑士¹、楯真一¹、月向邦彦¹、桑島邦博²

(¹ 広島大学大学院理学研究科、² 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)

酵素の活性は緩衝液の種類や濃度、添加塩の種類や濃度などによって大きな影響を受ける。このことは周知の事実であるが、近年の構造生物学をベースにした構造機能相関や酵素反応機構の研究ではしばしば忘れられている。大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) も、リン酸緩衝液の使用や NaCl、KCl などの塩の添加により活性が低下することが古くから知られている [Baccanari DP *et al.* *Biochemistry* **14**, 5267 (1975)]。昨年、我々は偶然に NaCl を添加しても活性が低下しない DHFR の変異体を得たが、これは活性部位 Asp27 の Glu への変異 (D27E) であることがわかった。本変異体の酵素機能および CD・蛍光スペクトルを野生型と比較した結果、D27E 変異体では基質の結合部位が野生型よりも少し溶媒に露出した構造をしていると考えられた。このような水和量の変化は圧力に対する挙動に大きな変化をもたらすと考えられたため、酵素活性の圧力依存性を測定したところ、野生型 DHFR では加圧に従って活性が低下するのに対して、D27E 変異体では加圧に従って活性が増加することがわかった。これらの結果は、わずかメチレン 1 個の違いでも酵素の機能や溶媒環境への応答が大きく変化することを示しており、酵素機能の解析では測定条件の選択や変異の導入に細心の注意を払う必要があることを示している。

D-9

鶏卵白アルブミンの構造形成における S—S 結合の役割

○石丸隆行¹、田中美穂¹、伊藤一成²、松富直利¹

(¹ 山口大・農・生物機能、² 岡山県産業技術センター)

【目的】鶏卵白アルブミン (OVA) は 6 つシステイン (Cys) 残基を持っており、その内 C73-120 間でジスルフィド結合 (S—S 結合) を形成している。以前還元アルキル化した OVA の研究から、S—S 結合は構造安定性、プロテアーゼ抵抗性に関与していることが報告されている。しかし、化学修飾はしばしばその構造に影響を及ぼすことが知られる。そこで、本実験では大腸菌発現系を用いて、組み換え OVA を調製し、OVA の S—S 結合の役割を検証した。

【方法・結果】本来の S—S 結合部位に変異をかけた変異体 (C73A, C120A, C73/120A) を構築、精製し、構造解析を行った。変異体の高次構造は Wild と比較して有意な変化は見られなかったが、変性温度は低下した。また、refolding 実験を行ったところ、これら変異体は refold しなかった。さらにペプチドマッピング法で S—S 結合の位置を調べたところ、C11-30 間で S—S 結合を形成していることが分かった。次に、refolding 時にどの Cys 残基が S—S 形成に大切なのか調べた。Cys-11 または 30 を欠損させた時に、S—S 結合の形成が起こりにくく、特に Cys-30 を欠損させると半分以上 S—S を形成しなくなった。以上の結果より、OVA の refolding の際、S—S 結合の形成には Cys-30 が大切であることが示唆された。

D-10

不安定型オボアルブミンの品質管理機構

○田中俊平、石丸隆行、徳永良太、橋本繭花、松富直利（山口大・農・生物機能）

【目的】鶏卵白アルブミン(OVA)は、Asn-292、Asn-311 の位置にN型糖鎖付加配列を2ヶ所もっているが、Asn-292 位にのみ糖鎖が付加している。以前の研究で酵母発現系にて OVA を発現させたところ、Asn-292 位の糖鎖が分子シャペロンであるカルネキシン (Cne1p) と相互作用し、分泌経路へ誘導していることが考えられた。そこで、 α 1-antitrypsin の Z 変異体をモデルとして、OVA の E336K を構築し、品質管理について調べた。

【方法・結果】酵母 *S. cerevisiae* の wild 株およびカルネキシン欠損株、に wild, E336K, vector をそれぞれ導入し、発現・分泌させた。分泌されたものを Western blot によって確認すると、wild は確認できたが E336K では確認できなかった。また、 Δ CNE 株は wild 株と比較すると分泌量が増加していた。RT-PCR を行い、mRNA 量を確認したが、mRNA には変化は見られなかった。次に共免疫沈降法により OVA と Cne1p の相互作用を確認した。wild では相互作用を確認することができたが、E336K では確認することができなかった。そこで、蛍光免疫染色を用いて、細胞内での OVA の局在を調べると、E336K は凝集体を形成していた。以上の結果より、E336K は非常に凝集しやすく、Z 変異体と同じ挙動を示すことが示唆された。

D-11

β -N-アセチルグルコサミニダーゼ阻害物質生産菌 *Streptomyces anulatus* により生産されるキチナーゼ阻害物質の予備的性状解析

○塩田博人、市川美里、神崎浩、仁戸田照彦（岡山大院自然科学）

【目的】我々は、昆虫や糸状菌の生育に必須なキチン分解酵素の阻害物質の探索を行い、放線菌 *Streptomyces anulatus* の培養物から新規 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) 阻害物質 TMG-chitotriomycin を単離した。今回、*S. anulatus* が TMG-chitotriomycin と同時にキチナーゼ阻害物質を生産することを新たに見いだしたことから、その予備的性状解析と培養生産条件検討を行った。

【方法・結果】キチナーゼ阻害活性を示した培養上清から活性成分の精製を試みたところ、キチナーゼ阻害活性を有さない TMG-chitotriomycin を含む画分にキチナーゼ阻害物質が存在した。本画分は、放線菌キチナーゼに比べてハスモンヨトウ蛹キチナーゼを約7倍強く阻害した。さらに、本画分をメタノール溶液中で保温処理することにより、活性成分と推測される2つの化合物が TMG-chitotriomycin へと収束したため、それら活性化合物の構造は TMG-chitotriomycin と類似していることが示唆された。また、培養におけるキチナーゼ阻害活性の経時変化を調べたところ、培養生産の初期には昆虫キチナーゼ阻害活性が放線菌キチナーゼ阻害活性を大きく上回るものの、培養日数とともに後者が上昇して前者と同レベルになった。これらのことから、本化合物は培養初期に生産され、その後別のキチナーゼ阻害物質が生産されることが考えられた。

E-1

Analysis of the genes essential for a linear topology of *Streptomyces* replicons

○Yosi NINDITA, Zhisheng CAO, Kenji ARAKAWA, Haruyasu KINASHI

(Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of AdSM, Hiroshima University)

Streptomyces rochei 7434AN4 carries three linear plasmids pSLA2-L (210kb), -M (113kb), and -S (17kb), which have been sequenced by our laboratory. In our genome project of this strain, we tried to clone the telomere of the chromosome. Using 3.7 kb telomere fragment of pSLA2-L as a probe against several mutants that have a different plasmid profile, chromosomal end was identified as a 5 kb *Bam*HI fragment. However, the plasmidless mutant 2-39 did not show this fragment, neither did the two newly constructed plasmidless mutants, YN-P7 and YN-P145. Thus, it was speculated that chromosomal circularization might have occurred concomitant to a loss of three linear plasmids. The right ends of pSLA2-L and -M share 14.6 kb homology, carrying a helicase gene at the extreme end. To reveal the role of this terminal helicase in genome topology, we have disrupted this gene in strain 51252 (pSLA2-L⁺) and K3A12 (pSLA2-M⁺), the results of which will be described.

E-2

Streptomyces rochei 7434AN4 株の線状ゲノムの末端構造解析

○曹 志生、Yosi NINDITA、楊 英杰、荒川 賢治、木梨 陽康

(広大院・先端研・分子生命)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は3つの線状プラスミド (pSLA2-L, M, S) を有し、2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC)、ランカマイシン (LM) を生産する。当研究室では3つのプラスミドの全塩基配列を決定し、pSLA2-L が LC, LM 生合成遺伝子をコードしていること、pSLA2-M が ku70/80, CRISPR クラスターなどの生体防御関連遺伝子を有すること、pSLA2-S が末端複製遺伝子をもたないことなどを明らかにした。また、pSLA2-L と pSLA2-M の右末端 14.6kb は同じであり、それらの起源に興味をもたれた。私たちは現在、本株のゲノムプロジェクトを進めているが、ここではPCR法では決定できない染色体末端の塩基配列決定を目指した。

【方法、結果】 51252 株 (pSLA2-L のみをもつ) の total DNA を制限酵素で消化し、pSLA2-L の右末端 3.7kb DNA をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、pSLA2-L と染色体は同じ 0.5kb *Eco*RI 末端断片をもつこと、染色体はその内側に 5.0kb *Eco*RI-*Bam*HI 断片をもつことが明らかになった。後者をクローニングして塩基配列を決定したところ、染色体と pSLA2-L の右末端 3.1kb の配列は 98.5% 同じであった。これらの結果に基づいて、染色体と pSLA2-L, M の構造的相関・生成起源について考察する。

E-3

Streptomyces rochei の抗生物質生合成における転写活性化機構の解析

○鈴木敏弘、望月進、山本章治、佐々木浩晃、荒川賢治、木梨陽康
(広大院・先端研・分子生命)

【目的】 放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、2 つの抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)を生産し、それらの生合成遺伝子は線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされている。また、放線菌特有の γ -ブチロラクトン-リセプター制御系の遺伝子もコードされており、我々は *srrX* (GB 合成) $\rightarrow$ *srrA* $\rightarrow$ *srrY* という LC, LM 生産制御カスケードを明らかにした。本研究では、*srrY* の下流で作用している遺伝子の機能解析を行い、抗生物質生合成制御系の全容解明を目的とした。

【方法および結果】 pSLA2-L 上にコードされた 3 つの SARP 遺伝子 (*srrY*, *Z*, *W*) の遺伝子破壊および転写解析を行ったところ、LM 生合成において、*srrY* の下流に *srrZ* が位置していることが示唆された。さらに、SrrY タンパク質と、*srrZ* 上流のダイレトリピート (DR) 配列を含む DNA 断片とのゲルシフト解析を行ったところ、バンドシフトが観察された。以上により、*srrY-srrZ* という 2 つの SARP による直接的転写活性化機構を放線菌で初めて見出した¹⁾。また、 Δ *srrY* 株に *srrZ* を相補させたところ、LM のアグリコンが得られ、 Δ *srrZ* 株では、LM ポリケチド生合成の初発伸張反応を司る *lkmAI* の転写が抑制されていた。これより、*srrZ* は *lkmAI* を通して LM 生合成を制御していることが示唆された。¹⁾ Suzuki T, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 819-827 (2010).

E-4

ラン藻 (*Oscillatoria agardhii*) レクチンの NMR 構造解析

○瀬野利直、手島圭三、池上貴久¹、堀貫治 (広島大院・生物圏、¹ 阪大・蛋白研)

【目的】 ラン藻 (*Oscillatoria agardhii*) 由来のレクチン (OAA) はアミノ酸 132 残基からなる分子量 13,925 の水溶性蛋白質で、マンノース高含有糖鎖を認識する大変面白い性質をもつ。我々は異種核 NMR 測定法を用いて、OAA の三次元構造を決定してマンノース高含有糖鎖を特異的に認識する機構の解明を目指している。

【結果と考察】 大腸菌に発現させた ¹⁵N、¹³C ダブルラベル化 OAA を定法に従い大量調製した。¹H、¹⁵N-HSQC スペクトルを測定したところ、主鎖アミド基 (NH 基) を中心に約 180 個の予想されるほとんど全てのピークが確認されたので、この蛋白質は NMR 測定に適していることがわかった。

¹³C の帰属は CBCANH、CBCA(CO)NH を用いて CA、CB の連鎖帰属を行い、HN(CA)CO、HNCO を用いて CO の連鎖帰属を行った。その結果、132 残基中、CA は 131 残基、CB は Gly を除く 108 残基中 107 残基、CO は 129 残基を帰属した。また、主鎖アミド基の ¹⁵N は 123 残基を帰属した。次に、NOESY-HSQC、TOCSY-HSQC を用いて ¹H の連鎖帰属を行い、HN は N 末端と Pro を除く 127 残基中 123 残基、HA は 111 残基を帰属した。NMR 測定から明らかにした水素結合の位置、主鎖の二面角情報およびプロトン間の NOE 情報から計算した OAA の全体構造について報告する。

E-5

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の菌体表層レクチンの精製と解析

○松永哲郎、加藤昭夫、阿座上弘行（山口大・農・生物機能）

Eikenella corrodens は菌体表層に GalNAc に特異的なレクチン様の付着因子を有し、これを介して歯面や歯肉への付着、口腔内異種細菌との共凝集、炎症性サイトカインの誘導などに関与することが報告されており、このレクチンが本菌の歯周病原性に大きく関与すると考えられている。以前、菌体表層画分からレクチンの精製を試みたが、分子量 500 kDa 以上の複合体として部分精製されたのみであった。また、複合体を構成するタンパク質をコードする遺伝子のクローニングを試みたが、レクチンをコードする遺伝子はクローニングされていない。そこで、レクチンの病原性を解明するため、菌体表層レクチンの精製を行った。

E. corrodens 1073 の菌体を超音波処理後、Triton X-100 を用いて可溶化した。その抽出液の上清を GalNAc を固定化したアフィニティークロマトに供し、GalNAc 溶出画分を得た。この画分を SDS-PAGE、Streptococcus sanguinis 凝集活性試験、GalNAc プローブによるウェスタンブロット解析を用いて調べたところ、約 90 kDa の GalNAc 特異的レクチンタンパク質の精製を確認した。

E-6

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー不活化因子の精製と解析

○長尾章子、Karim Minnatul、松永哲郎、加藤昭夫、阿座上弘行（山口大・農・生物機能）

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィーム形成にはオートインデューサー 2 (AI-2) を介したクオラムセンシングが関与する。本菌は対数増殖期中期から後期にかけて AI-2 を産生するが、定常期に入るとその産生量は著しく減少し、その後バイオフィーム形成が増加した。このことから、定常期特異的に AI-2 を不活化する因子が存在する可能性が示唆された。そこで、AI-2 の不活化機構と本菌の病原性との関わりを解明するため、AI-2 不活化因子の精製を試みた。

E. corrodens 1073 を定常期まで培養後、遠心分離し菌体上清を得た。この上清を硫酸分画し、各画分と AI-2 を混合後、37℃で 5 時間インキュベートし、残存する AI-2 活性を *Vibrio harveyi* BB170 をセンサー株として測定した。その結果、30%硫酸画分の添加により、著しい活性の低下が見られた。また、この画分は AI-2 様活性を示す MHF に対しても不活化が見られた。したがって、本菌は AI-2 の分解または不活化酵素を産生する可能性が示唆された。さらに、この画分を陰イオン交換クロマトに供し、AI-2 不活化因子の粗精製を行った。

E-7

イネにおけるプロリン生合成酵素の発現解析

○金 鳳、井野 宏俊、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院・生物圏）

【目的】 プロリンは植物の生長に必須である共に、環境ストレスに対して重要な機能を発揮する。特に乾燥や塩ストレスに対してプロリンは細胞内に高濃度に蓄積し、植物の水ポテンシャルを低下させ、膨圧を保ち脱水を防いでいる。その生合成経路はグルタミン酸から2種のプロリン生合成酵素（ $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase:P5CS, $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase:P5CR）によって生合成される。本研究では単子葉植物であるイネを用いてプロリン生合成酵素の発現解析を行った。

【方法・結果】 イネにおいて塩ストレスによって細胞内プロリン含量とP5CS及びP5CRともにmRNA発現が増加し、プロリン代謝酵素であるプロリン脱水酵素などのmRNA発現量は低下した。また塩ストレスによるクロロフィル含量と細胞生存率の減少が培地中にプロリンを添加することによって抑制された。次いでイネ培養細胞を用いてP5CR過剰発現株を作製したところ、その過剰発現株はP5CS過剰発現株と同様にプロリン含量が増加し、塩ストレスに対して抵抗性が認められた。また、それら2種のプロリン生合成酵素過剰発現株はいずれも褐変が抑制され、老化を抑制している可能性が認められた。

E-8

トマト果実におけるアスコルビン酸蓄積機構の解明

○坂本 真吾、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院・生物圏）

【目的】 植物でアスコルビン酸は、蓄積量の制御により様々な生理応答を制御する重要な物質である。これまでのところ、植物果実でアスコルビン酸蓄積がどのように制御されているのか不明であった。本研究では、トマト果実におけるアスコルビン酸蓄積について、果実内での生合成か、果実外からの流入かを検討すると共に、果実内での生合成経路について検討した。

【方法・結果】 本研究では、トマトの矮性品種でマイクロトムの果実を用い、成熟進行とアスコルビン酸量変動の解析を行った。その結果、果実の成熟に伴いアスコルビン酸の蓄積量が増加する事を明らかにした。さらに切除果実を追熟させアスコルビン酸量を測定したところ、追熟した切除果実では、アスコルビン酸量の増加は、確認できなかった。そこで、果実にはアスコルビン酸を生合成する能力があるか、及び、機能する生合成経路を検討するため、果実内に生合成経路に関連する代謝物を注入し、アスコルビン酸量への影響を調べた。その結果、マンノース経路に関連するL-ガラクトースで、顕著にアスコルビン酸量が増大した。

E-9

Roles of Hydrogen Peroxide Accumulation in Absciscic Acid Signaling in *Arabidopsis* Guard Cells.

○Rayhanur Jannat, Misugi Uraji, Miho Morofuji, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori*, Yoshiyuki Murata (Div. Biosci., Okayama Univ., *IPSR, Okayama Univ.)

Reactive oxygen species (ROS), especially hydrogen peroxide (H_2O_2), is one of the important second messengers in abscisic acid (ABA) signaling in guard cells. Catalase is one of major H_2O_2 scavengers that play an important role in controlling cellular H_2O_2 levels. To investigate roles of endogenous ROS in guard cell signaling, we examined ABA induced stomatal closure, second messengers ROS and nitric oxide (NO) productions and cytosolic alkalization in *cat3-1* and *cat1 cat3* mutant plants. Under normal condition, neither *cat3* nor *cat1 cat3* double mutation affects stomatal aperture while these mutation reduced catalase activity and increased ascorbate peroxidase activity and ROS and NO accumulation. ABA induced more stomatal closure in these mutants than in wild type along with ROS and NO production and cytosolic alkalization like wild type. These results suggest that transient change of ROS level could be closely involved in ABA signaling during ABA-induced stomatal closure.

E-10

Yeast Elicitor-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis*

○Md. Atiqur Rahman Khokon, Mohammad Anowar Hossain, Shintaro Munemasa, Misugi Uraji, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori*, Yoshiyuki Murata (Div. Biosci., Okayama Univ., *IPSR, Okayama Univ.)

It is well-known that yeast elicitor (YEL) induces stomatal closure but YEL signaling in guard cells remains to be clarified. We investigated ROS production, NO production, and $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation in *Arabidopsis* guard cells treated with YEL. YEL induced stomatal closure in wild type plants and induced ROS accumulation in wild type guard cells. A peroxidase inhibitor, SHAM, inhibited YEL-induced stomatal closure and ROS accumulation. Neither *atrbohD atrbohF* mutation nor an NADPH oxidase inhibitor, DPI, affects them. An NO scavenger, cPTIO, inhibited YEL-induced stomatal closure, which was abolished by SHAM. YEL elicited $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation, which was inhibited by SHAM but not by *atrbohD atrbohF* mutation. These genetical and pharmacological evidences indicate that YEL induces stomatal closure accompanied with ROS production mediated by SHAM-sensitive peroxidases and NO production downstream of ROS production.

Involvement of Endogenous Absciscic Acid in Methyl Jasmonate-Induced stomatal closure in *Arabidopsis*

○Mohammad Anowar Hossain, Shintaro Munemasa, Yoshimasa Nakamura, Izumi C. Mori*, and Yoshiyuki Murata (Div. Biosci., Okayama Univ., *IPSR, Okayama Univ.)

Absciscic acid (ABA)- and methyl jasmonate (MeJA)-induced stomatal closure require oscillation in cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$). We investigated effects of an inhibitor of ABA biosynthesis, fluridon, and *aba2-2* mutation on ABA- and MeJA-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation using guard cells expressing Ca^{2+} reporter yellow cameleon 3.6 (YC3.6). In wild type plants, fluridon did not inhibit either ABA-induced stomatal closure or ABA-elicited guard cell $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation but fluridon inhibited both MeJA-induced stomatal closure and MeJA-elicited guard cell $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations. The *aba2-2* mutation did not inhibit either ABA-induced stomatal closure or ABA-elicited guard cell $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation but suppressed MeJA-induced stomatal closure and MeJA-elicited guard cell $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation. In the presence of 0.1 μ M ABA which does not induce stomatal closure in wild type, MeJA induced stomatal closure and elicited guard cell $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation in *aba2-2* mutants like wild-type plants. These results suggest that endogenous ABA could be involved in MeJA signal transduction to lead stomatal closure in *Arabidopsis* guard cells.

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	大山乳業農業協同組合
天野エンザイム (株)	大山ハム (株)
アルファー食品 (株)	大洋香料 (株)
(株) 井ゲタ竹内	高塚ライフサイエンス (株)
池田糖化工業 (株)	(有) タグチ
(株) 猪原商会	中国ケミー (株)
(株) 大熊	帝國製菓 (株)
大塚化学 (株)	鳥取科学器械 (株)
大塚器械 (株)	(有) 友田大洋堂
岡山県酒造組合	日本オリーブ (株)
社団法人岡山県農業開発研究所	(株) 日本総合科学
オハヨー乳業 (株)	白牡丹酒造 (株)
(株) 海産物のきむらや	(株) 林原生物化学研究所
片山化学工業 (株) 岡山営業所	備前化成 (株)
カバヤ食品 (株)	ひまわり乳業 (株)
機能性食品開発研究所	(株) 氷温研究所
杏林予防医学研究所	広島和光 (株) 岡山営業所
協和発酵バイオ (株)	(株) 扶桑理化
キリンビール (株) 岡山工場	プロテノバ (株)
近畿日本ツーリスト (株)	ペロリ
久保田商事 (株)	(有) 丸浅苑
高知酒造 (株)	マルキン忠勇 (株)
寿製菓 (株)	丸善製菓 (株)
(株) サカタ	マルトモ (株)
(株) サタケ	三島食品 (株)
(株) 四国総合研究所	(株) 宮田薬品
四国乳業 (株)	(株) 無手無冠
(株) シマヤ	ヤスハラケミカル (株)
新青山 (株)	(株) やまだ屋
神協産業 (株)	(株) 山田養蜂場
(株) 酔心山根本店	山本薬品 (株)
諏訪酒造 (株)	両備ホールディングス(株) 事業開発部
正晃 (株)	ルナ物産 (株)
仙味エキス (株)	湧永製菓 (株)
(株) ソフィ	(五十音順)
大興産業 (株)	

日本農芸化学会中四国支部第 27 回講演会

代表世話人： 水田啓子

連絡先： 広島大学大学院生物圏科学研究科

Tel: 082-424-7923

E-mail: kei7mizuta@hiroshima-u.ac.jp

支部からのお知らせ

○ 日本農芸化学会中四国支部第28回講演会（大会）

開催日：2010年9月24日（金）～25日（土）

場 所：香川大学農学部

世話人：麻田恭彦（香川大学農学部）

講演申込締切：2010年8月10日（火）

講演要旨締切：2010年8月24日（火）

Tel：087-891-3112, Fax：087-891-3021

E-mail：asaday@ag.kagawa-u.ac.jp

○ 日本農芸化学会中四国支部第29回講演会（例会）

開催日：2011年1月22日（土）

場 所：徳島大学薬学部

世話人：徳村 彰（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

Tel：088-633-7248, Fax：088-633-9572

E-mail：tokumura@ph.tokushima-u.ac.jp

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒761-0795

香川県木田郡三木町池戸2393

香川大学農学部内

<http://jsbba-cs.jp>

2010年（平成22年）6月5日発行