

支部創立15周年記念
日本農芸化学会中四国支部第42回講演会

講演要旨集

日時：2015年6月13日（土）13時10分開会

場所：鳥取大学 農学部



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42回講演会（例会）

会 場： 鳥取大学 農学部

開催日： 2015年6月13日（土）

11:00～12:00 幹事打合せ (大セミナー室)

12:10～13:00 支部参与会 (会議室)

13:10～13:55 中四国支部若手研究者による農芸化学の未来シンポジウム
(大講義室)

「生理活性ヘパラン硫酸オリゴ糖の化学合成」

武田尚子（鳥取大・産学地域連携）

「緑藻ユーグレナにおけるペルオキシレドキシシン/チオレドキシシンシステムを介した活性酸素種の代謝機構解明」

玉木 峻（鳥取大院・連農/島根大）

「オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の発現と機能に関する研究」

田中小百合（岡山大院・環境生命，^現(株)ファーマフーズ）

13:55～14:15 2015年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞授賞式，受賞講演
(大講義室)

「ペプチド分解酵素のアミノリシスによるペプチド結合の形成とその応用」

有馬二郎（鳥取大・農）

14:25～14:50 2015年度日本農芸化学会農芸化学奨励賞受賞講演
(大講義室)

「植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究」

藪田行哲（鳥取大・農）

14:50～15:20 特別講演
(大講義室)

「微生物における第4級アンモニウム化合物の分解経路・分解酵素」

森 信寛（鳥取大・農）

15:35～17:47 一般講演 (第3, 4, 6, 7講義室)

18:00～19:30 懇親会 (鳥取大学生協第2食堂)

一般講演 会場一覧表

会 場		講演番号	分 類
A	第3講義室	A-1 ～ A-11	微生物 A
B	第4講義室	B-1 ～ B-10	微生物 B
C	第6講義室	C-1 ～ C-11	有機・天然物
D	第7講義室	D-1 ～ D-11	動物・植物

一般講演 座長一覧表

会場		講演番号	座長
A	第3講義室	A-1 ～ A-4	田村 隆 (岡山大院・環境生命)
		A-5 ～ A-8	広岡和文 (福山大・生命工)
		A-9 ～ A-11	田淵光昭 (香川大・農)
B	第4講義室	B-1 ～ B-4	鈴木宏和 (鳥取大院・工)
		B-5 ～ B-7	三井亮司 (岡山理大・理)
		B-8 ～ B-10	櫻谷英治 (徳島大院・ソシオテクノ)
C	第6講義室	C-1 ～ C-4	金尾忠芳 (岡山大・環境生命)
		C-5 ～ C-7	武田尚子 (鳥取大・産学地域連携)
		C-8 ～ C-11	岩崎 崇 (鳥取大・農)
D	第7講義室	D-1 ～ D-4	有馬二郎 (鳥取大・農)
		D-5 ～ D-7	田中小百合 ((株)ファーマフーズ)
		D-8 ～ D-11	薮田行哲 (鳥取大・農)

注意)

1. パソコンを用いた口頭発表にて行います。操作は各発表者でお願いします。
2. 発表 9分，質疑応答 3分厳守で進行をお願いします。

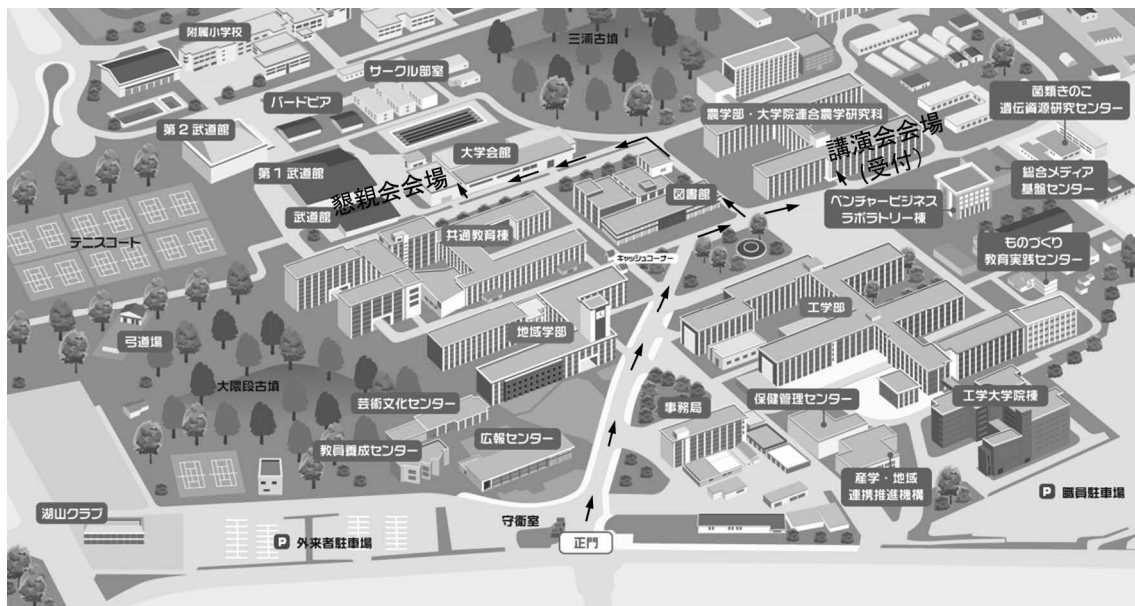
支部講演会（例会）会場案内

鳥取大学 農学部

（〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101）

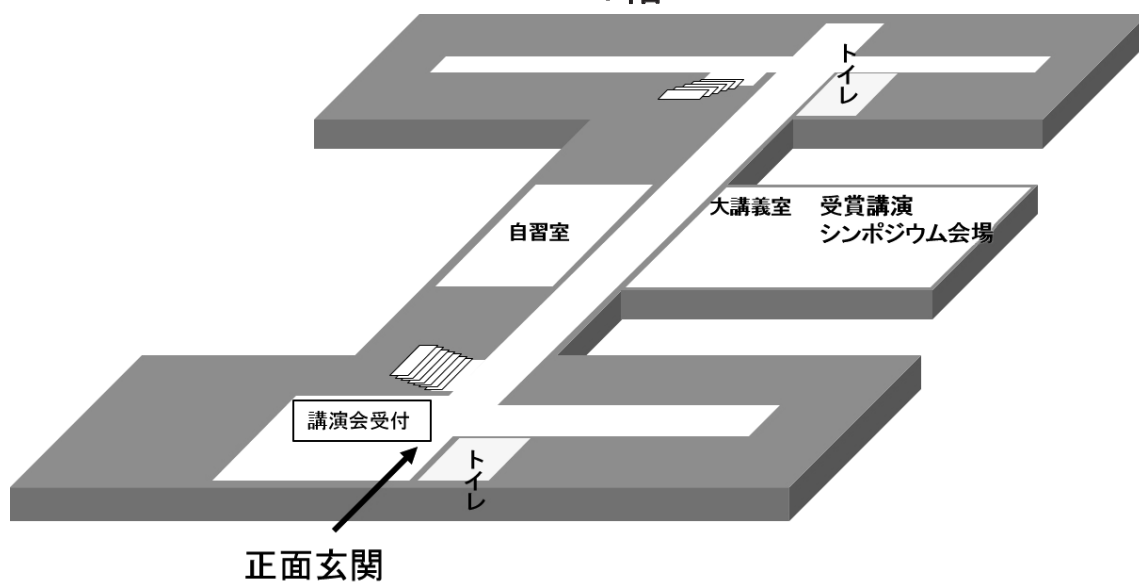
受付	1 階	玄関ホール
シンポジウム・受賞講演・特別講演会場	1 階	大講義室
一般講演	A 会場：2 階	第 3 講義室
	B 会場：2 階	第 4 講義室
	C 会場：3 階	第 6 講義室
	D 会場：3 階	第 7 講義室
幹事打合会会場	2 階	大セミナー室
支部参与会会場	2 階	会議室
休憩室	2 階	第 5 講義室

【構内案内図】

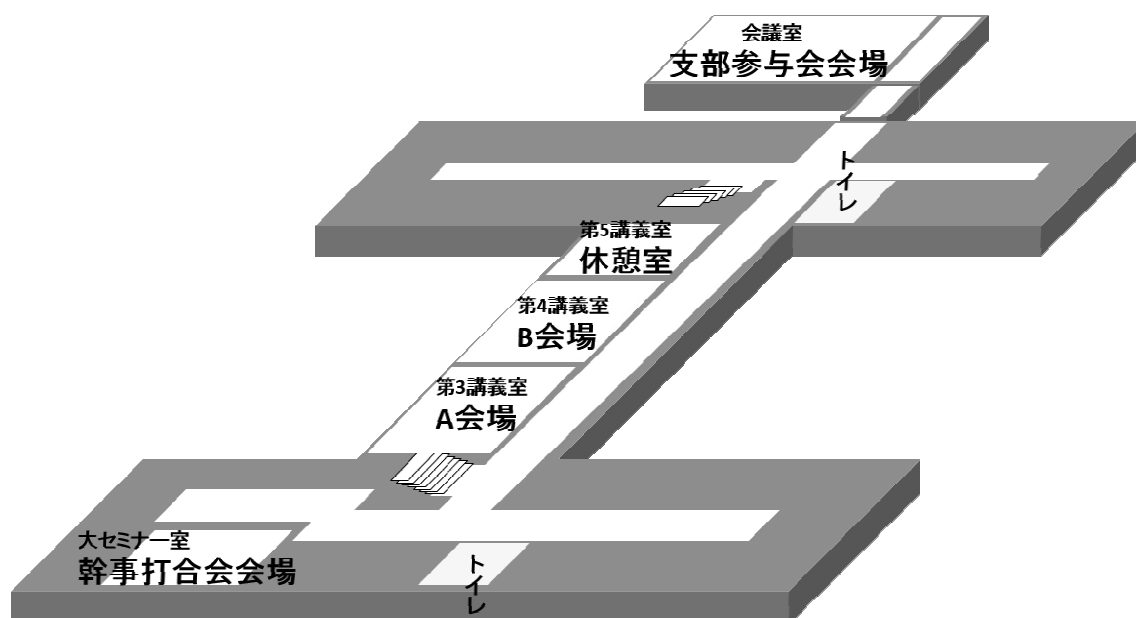


講演会会場

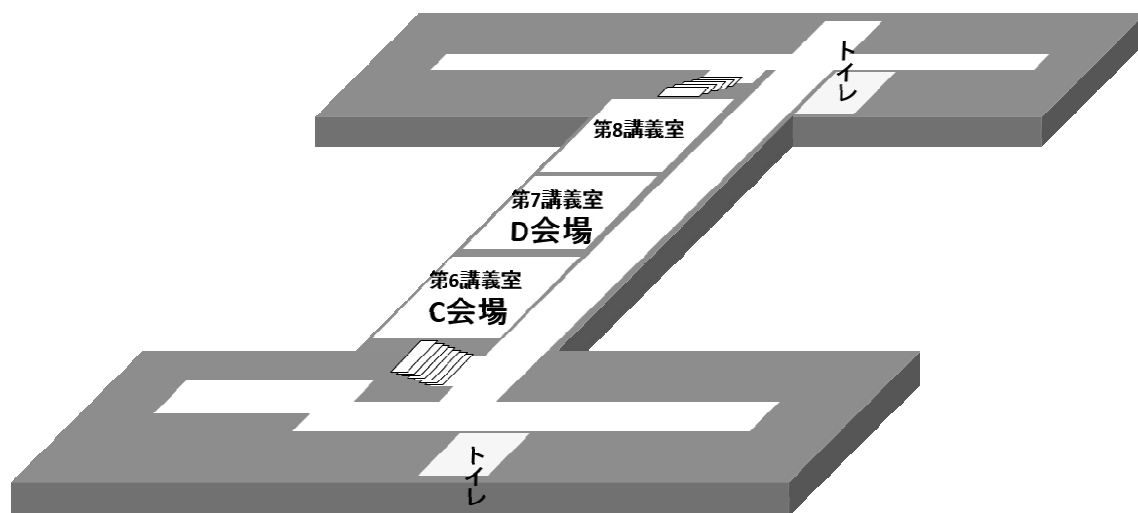
1 階



2 階



3階



講

演

会

プ

ロ

グ

ラ

ム

日本農芸化学会中四国支部第42回講演会（例会）

プログラム

会 場： 鳥取大学 農学部

開催日： 2015年6月13日（土）

11:00～12:00 幹事打合せ (大セミナー室)

12:10～13:00 支部参与会 (会議室)

13:10～13:55 中四国支部若手研究者による農芸化学の未来シンポジウム
(大講義室)

「生理活性ヘパラン硫酸オリゴ糖の化学合成」

武田尚子（鳥取大・産学地域連携）

「緑藻ユーグレナにおけるペルオキシレドキシン/チオレドキシンシステムを介した活性酸素種の代謝機構解明」

玉木 峻（鳥取大院・連農/島根大）

「オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の発現と機能に関する研究」

田中小百合（岡山大院・環境生命，^現(株)ファーマフーズ）

座長 河野 強（鳥取大・農）

13:55～14:15 2015年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞授賞式，受賞講演
(大講義室)

「ペプチド分解酵素のアミノリシスによるペプチド結合の形成とその応用」

有馬二郎（鳥取大・農）

座長 大城 隆（鳥取大院・工）

14:25～14:50 2015年度日本農芸化学会農芸化学奨励賞受賞講演
(大講義室)

「植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究」

藪田行哲（鳥取大・農）

座長 渡辺文雄（鳥取大・農）

14:50～15:20 特別講演
(大講義室)

「微生物における第4級アンモニウム化合物の分解経路・分解酵素」

森 信寛（鳥取大・農）

座長 稲垣賢二（岡山大院・環境生命）

一般講演プログラム

A 会場（第 3 講義室）「微生物 A」

- A-1 15:35 *Zymobacter palmae* の代謝改変による 2,3-butanediol の高効率発酵生産
○久本晴加, 近藤早紀, 原田尚志, 岡本賢治, 築瀬英司
(鳥取大院・生応工)
- A-2 15:47 *Zymomonas mobilis* の細胞表層提示酵素転写活性化遺伝子の機能解析
○山本知慧, 山本 翔, 原田尚志, 岡本賢治, 築瀬英司
(鳥取大院・生応工)
- A-3 15:59 細菌由来メバロン酸経路遺伝子群を用いた大腸菌テルペン基本代謝経路の強化
○島 貴紀, 千田大樹, 岡本賢治, 築瀬英司, 原田尚志
(鳥取大院・生応工)
- A-4 16:11 Cell Wall Integrity 経路に関与する *Slm1* 下流因子の探索
○橋井圭介, 八重佳織, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)
- A-5 16:23 酵母発現系による青枯病菌エフェクター RSc0608 の膜局在化および増殖阻害に関与する機能ドメインの解析
○北園喬斗, 忻 詩博, 加本佳大, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)
- A-6 16:35 分裂酵母においてゴルジ体を凝集させる Gmp ファミリーの機能解析
○大山拓朗, 児子隆英, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)
- A-7 16:47 分裂酵母におけるアグマチナーゼ欠損株の生理的影響に関する研究
○石田麻里絵, 青木克幸, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)

- A-8 16:59 分裂酵母の分泌経路に存在するレクチン様タンパク質 Emp43 の解析
○神谷勇輝，川口宗馬，梨子木健人，鈴木章太郎，田淵光昭，
田中直孝
(香川大・農)
- A-9 17:11 スフィンゴ脂質合成遺伝子と遺伝学的相互作用する遺伝子の探索
○池田拓真，芳形茉美，船戸耕一
(広島大院・生物圏)
- A-10 17:23 Draft genome sequence of the acidophilic and halophilic sulfur-oxidizing
bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH
○Sultana Sharmin，金尾忠芳，上村一雄
(岡山大院・環境生命)
- A-11 17:35 放線菌 *Streptomyces incarntus* NRRL8089 のドラフトゲノム解析
○田村 隆，大島健志朗¹，服部正平¹，清水 瞳，根本理子，
稲垣賢二
(岡山大院・環境生命，¹東京大・先端研)

B 会場（第 4 講義室）「微生物 B」

- B-1 15:35 ステロール生産性 *Mortierella alpina* の形質転換系の確立
○湯浅雄介, 阪本鷹行¹, 清水 昌^{2,3}, 小川 順³, 櫻谷英治¹
(徳島大院・物質生命,¹ 徳島大院・ソシオテクノ,² 京都学園・バイオ環境,³ 京都大院・応用生命)
- B-2 15:47 枯草菌のラムノース異化に関わるオペロンの発現誘導物質の同定
○小土井祐介, 藤田泰太郎, 広岡和丈
(福山大・生命工)
- B-3 15:59 Effect of PON1, ABCB1C1236T and ABCB1C3435T polymorphisms on the anti-platelet response of clopidogrel in the Bangladeshi percutaneous coronary intervention patients
○Mohammad Safiqul Islam, Md. Siddiqui Islam¹, Mohd Nazmul Hasan Apu¹, Michael Nii Nartey, Abul Hasnat¹, Kazushige Yokota
(Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.; ¹Dept. Clin. Pharm., University of Dhaka.)
- B-4 16:11 植物由来 *Methylobacterium* 属のスクリーニングと PQQ 生産性の解析
○奥田 洋, 矢野裕之¹, 栞原浩誠, 大戸信明, 田中三男¹, 三井亮司¹
(丸善製薬(株), ¹岡山理大・理)
- B-5 16:23 好熱菌細胞内変異で創出された変異型 pUC レプリコンの大腸菌内特性
○田摩実咲, 小林淳平, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工, ¹鳥取大・GSC)
- B-6 16:35 好熱性バチラス属細菌へのプラスミド導入における接合伝達法の汎用性
○富永有里絵, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工, ¹鳥取大・GSC)
- B-7 16:47 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 が有する大型プラスミド pHTA426 の遺伝学的解析
○水野 樹, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工, ¹鳥取大・GSC)

- B-8 16:59 褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* による牛乳・ホエーからのエタノール生産
○川村紗瑠, 中川紗季, 金涌龍一, 原田尚志, 築瀬英司, 岡本賢治
(鳥取大院・工)
- B-9 17:11 RNA シャペロンを介した *Zymomonas mobilis* のストレス耐性強化
○大戸裕史, 滝上はる香, 原田尚志, 岡本賢治, 築瀬英司
(鳥取大院・生応工)
- B-10 17:23 *Cobetia* sp. 由来熱安定性アルギン酸リアーゼの特性評価
○藤瀬麻紗子, 八木寿梓¹, 鈴木宏和, 大城 隆
(鳥取大院・工, ¹鳥取大・GSC)

C 会場（第 6 講義室）「有機・天然物」

- C-1 15:35 魚類由来エラスチンの精製と形態観察
○森川祐未，鈴木宏和，大城 隆，八木寿梓¹
(鳥取大院・工，¹鳥取大・GSC)
- C-2 15:47 海藻成分を用いたアミロイド線維形成阻害
○木下竣貴，藤澤史帆¹，藤瀬麻紗子，鈴木宏和，大城 隆，八木寿梓²
(鳥取大院・工，¹鳥取大・工，²鳥取大・GSC)
- C-3 15:59 食用藻類からの有用物質の抽出効率の比較
○垣田浩孝，小比賀秀樹，江口結希
(産総研・健康工学)
- C-4 16:11 タデアイ由来新規フラボノイドの構造決定と 3-ヒドロキシ-3-メチル
グルタリル CoA レダクターゼ阻害活性
○徳山翔太^{1,2}，木村英人²，石原朋恵²，小川智史²，横田一成^{1,3}
(¹鳥取大院・連農，²寿製菓(株)，³島根大・生資)
- C-5 16:23 変性剤の疎水基がシトクロム *c* 変性に及ぼす影響
○小林伸弥，藤井創太郎，政成美沙，松林伸幸¹，三本木至宏
(広島大院・生物圏，¹大阪大・基礎工)
- C-6 16:35 脂肪酸合成経路阻害物質 platensimycin の合成研究
○清田洋正，佐野恵理子¹，桑原重文¹
(岡山大院・環境生命，¹東北大院・農)
- C-7 16:47 Hindsilactone A の合成研究
○稲見俊伸，野下俊朗¹，大内秀一²
(県広大院・生命システム，¹県広大・生命環境，²近畿大・薬)
- C-8 16:59 7-*O*-Alkyl hesperetin 類の脱顆粒抑制活性とヒアルロニダーゼ阻害活性
○野下俊朗，田井章博，池田 郁¹，三浦香織¹
(県広大・生命環境，¹県広大院・生命システム)

- C-9 17:11 カヤの実に含まれるマウス大腸ガン細胞増殖抑制物質
○高橋詩織，羽二生綾，葛間秀徳，柏木丈弘，金 哲史，渡邊浩幸¹，
前川穎司²
(高知大・農，¹高知県大・健康栄養，²(株)前川種苗)
- C-10 17:23 動物の消化器官に含まれるコンドロイチン硫酸の含有量と組成の分析
○上田健人，藤田裕之，武田尚子¹，田村純一
(鳥取大・地域環境，¹鳥取大・産学地域連携)
- C-11 17:35 オオムギ属植物における防御関連二次代謝産物の分布
○宇部尚樹，西坂美穂¹，武田 真²，石原 亨
(鳥取大院・農，¹鳥取大・農，²岡山大・植物研)

D 会場（第 7 講義室）「動物・植物」

- D-1 15:35 血管内皮におけるプレニルケルセチンによるヘムオキシゲナーゼ 1 誘導に関与するシグナル経路の検討
○庄野裕美, 齋藤豪紀, 佐藤伸哉, 河村知志, 根本尚夫, 寺尾純二, 向井理恵
(徳島大院・医歯薬)
- D-2 15:47 Suppressive effect of prenylflavonoids on atrogin-1 expression in C2C12 mouse myotubes
○林 珮儀, 齋藤豪紀, 河村知志, 根本尚夫, 寺尾純二, 向井理恵
(徳島大院・医歯薬)
- D-3 15:59 高血圧ラットにおける代謝制御ネットワーク
○磯田武志, 青木真美子, 山本由紀子¹, 山本和彦
(近畿大院・工, ¹近畿大・ライフサイエンス研)
- D-4 16:11 複数遺伝子クローニングシステムによるシロイヌナズナへの 5 遺伝子導入と発現解析
○税所利基, 芝原健太, 木村哲哉¹, 中川 強
(島根大・総科セ, ¹三重大院・生物資源)
- D-5 16:23 シロイヌナズナにおける被覆小胞による液胞輸送経路の解析
○高畑周平, 松波絵里香¹, 吉田昇平¹, 中川 強¹, 地阪光生, 長屋 敦, 横田一成, 西村浩二¹
(島根大・生物資源, ¹島根大・総科セ)
- D-6 16:35 ピオーネ加温ハウス栽培における CO₂ 施肥の影響
○森 泉, 河西康宏¹, 平松竜一²
(岡山大・植物研, ¹きびじ農業後継者ク, ²岡山県・倉敷農業普及指導セ)
- D-7 16:47 孔辺細胞内の一酸化窒素レベルと活性酸素種レベルがアブシシン酸誘導気孔閉口に与える影響
○仙波貴雅, Rayhanur Jannat, 森 泉¹, 宗正晋太郎, 中村宜督, 村田芳行
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大・植物研)

- D-8 16:59 ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口におけるアブシシン酸受容体 (PYR/PYL/RCAR) の関与
○銀 叶, 足立優司, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉¹, 村田芳行
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大・植物研)
- D-9 17:11 孔辺細胞内における GSSG に対する GSH 比のリアルタイム測定
○横井隆志, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉¹, 村田芳行
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大・植物研)
- D-10 17:23 イソチオシアネート基を持つ化合物に対する気孔応答
○大熊英治, Md. Sarwar Jahan, 宗正晋太郎, 中村宜督, 村田芳行
(岡山大院・環境生命)
- D-11 17:35 アリルイソチオシアネートによる内向き整流性 K⁺チャネルの抑制と光誘導気孔開口の阻害における Ca²⁺非依存性信号伝達経路
○叶 文秀, 大熊英治, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉¹, 村田芳行
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大・植物研)

中四国支部若手研究者による
農芸化学の未来シンポジウム

講 演 要 旨

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、細胞接着や組織の境界膜としての役割をもち、細胞外骨格となる重要な構成成分の一つである。特に、組織の境界膜として物質透過を制御し、巨大分子や正電荷をもつ分子フィルターとしての役割を担う。細胞表面では、ヘパラン硫酸特異的エンドグリコシダーゼ（ヘパラーゼ）による HSPG の分解と合成が繰り返行われている。一方、HSPG の糖鎖部分である HS は、抗凝血作用やがん細胞の血行性転移に関与することが知られている。腫瘍細胞が血管内に侵入し血流中から血管外へ浸出する血行性転移は、腫瘍細胞が血管内皮細胞の下に潜り込み、ヘパラーゼを放出することで基底膜の HS を分解し、腫瘍細胞が血管内から周辺組織に浸潤することが原因である。このように、基底膜の HS とヘパラーゼは密接に関与している。

HS は、GlcN-GlcA または GlcN-IdoA が繰り返結合したヘテロな構造をもつ直鎖多糖である。GlcN のアミノ基は、硫酸化されている場合とアセチル化されている場合がある。また HS は、GlcN の 3,6 位、GlcA と IdoA の 2,3 位水酸基が硫酸化される場合があり、様々な硫酸化パターンをもち、極めて複雑な構造をしている。一方、ヘパラーゼは様々な硫酸化パターンからなる HS の GlcA-GlcNS(6S) の糖間を特異的に認識し切断する¹。現在までに、ヘパラーゼに特異的な HS 構造は合成されていない。そのため本研究では、ヘパラーゼに特異的な GlcA-GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(6S) 型 HS 四糖の合成を行った。

グルコース (Glc) とマンノース (Man) から合成した共通二糖 (Glc1-4GlcN) を用いて、二糖供与体と受容体へと誘導し、これらを縮合して四糖の合成を試みた。脱離基として α -イミデートである二糖供与体を用いた縮合では、HS 四糖保護体の α 選択性は低かったことに加え、低収率であった。この原因として、イミドイル基の脱離より速く受容体が S_N2 的に反応したため、 β 体が生成されたと考えられる。そこで、アノマー位の脱離基をイミドイル基より脱離しやすい Cl に変更した。脱離基として Cl をもつ二糖供与体を用いた縮合では、高収率かつ α 選択的に HS 四糖保護体を得ることができたことから、 S_N1 反応が優勢となり、熱力学的に安定な α 体が得られたと考えられる。得られた HS 四糖保護体は、GlcN の 6 位水酸基の *O*-硫酸化と保護基の除去を行うことで、GlcA-GlcN(6S)-GlcA-GlcN(6S) 構造をもつ HS 四糖へと誘導した。最後に、GlcN のアミノ基の *N*-硫酸化を行い、目的とする GlcA-GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(6S) 型 HS 四糖の合成に成功した²。

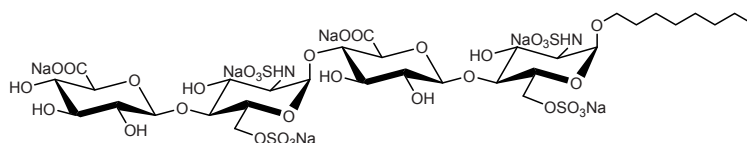


図 GlcA-GlcNS(6S)-GlcA-GlcNS(6S) 型 HS 四糖

References

1. Y. Okada *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 42488-42495 (2002).
2. N. Takeda *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **353**, 13-21 (2012).

シンポジウム講演

緑藻ユーグレナにおけるペルオキシレドキシシン／チオレドキシシンシステムを介した 活性酸素種の代謝機構解明

玉木 峻（鳥取大院・連農／島根大・生資科）

緑藻ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は運動を行う動物的特徴と光合成を行う植物的特徴を併せ持っており、独自の細胞構造や代謝系を持つ非常にユニークな真核微細藻類の一種である。近年では、ユーグレナの産業利用や代替え燃料としての活用が期待されている。当研究グループではこれまでに、ユーグレナにおける活性酸素種 (ROS) 代謝に着目し、研究を進めてきた。

ユーグレナはカタラーゼを持たず、細胞質にのみ局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が過酸化水素代謝に機能することを明らかにしてきた (Ishikawa *et al.*, *Biochem. J.*, 2010)。さらに、アスコルビン酸の再生系として機能するアスコルビン酸-グルタチオンサイクル構成酵素群も細胞質に局在し、このことは、ユーグレナにおける細胞質のレドックス制御の重要性を示唆している。その一方で、主要な ROS の発生源は葉緑体やミトコンドリアであり、それら細胞内コンパートメントにおける ROS 代謝機構は不明であった。また、ペルオキシレドキシシン (Prx) や、その再還元系であるチオレドキシシン (Trx) および NADPH 依存性 Trx レダクターゼ (NTR) から構成される Trx システムは、ほぼすべての生物種に広く分布し、ROS 代謝および細胞内レドックス制御において重要な役割を担っているが、ユーグレナの Prx や Trx システム構成酵素は未同定であった。そこで本研究では、Prx および Trx システムを介したユーグレナの ROS 代謝機構の解明を目的として、Prx および NTR の同定および機能解析を行った。

ユーグレナ発現遺伝子データベースより、4 つの Prx 遺伝子 (EgPrx1~4) および 3 つの NTR 遺伝子 (EgNTR1, -2, -C) の完全長 cDNA 配列情報を得た。相同性解析から、EgPrx1~3 は 2-Cys 型 Prx, EgPrx4 は II 型 Prx, EgNTR1 は Small 型 NTR, EgNTR2 は Large 型 NTR, EgNTRC は光合成生物に見られる NTR と Trx の融合酵素であることが示された。膜貫通ドメイン予測プログラム TMHMM および細胞内局在予測プログラム TargetP を用いた解析より、EgPrx1, EgPrx4, EgNTR2 は細胞質, EgPrx2, EgNTRC は葉緑体, EgPrx3, EgNTR1 はミトコンドリアへの局在が予測され、ユーグレナにおいて、Prx および Trx システムが各細胞内コンパートメントに分布することが示唆された。

ユーグレナ Prx および NTR の酵素学的性質を評価するために、組換え体酵素を大腸菌内で発現させ、HisTag アフィニティレジンを用いて精製酵素を得た。なお、EgNTRC は Trx ドメインを除き、EgNTRC Δ とした。活性測定から、組換え体 EgPrx および EgNTR はそれぞれ Prx および NTR 活性を示した。組換え体 EgPrx のカインेटィクスパラメーターは既知の植物由来 Prx と同程度であり、EgPrx が酵素として機能的であることが示唆された。一方、組換え体 EgNTR2 の触媒効率 (k_{cat}/K_m) は、EgNTR1 および EgNTRC Δ と比較して 30~46 倍高いことが示された。この結果は、NTR ファミリーにおける構造および触媒機構の差異に起因すると考えられる。

ユーグレナ細胞における Prx および NTR の生理機能を評価するために、二本鎖 RNA をエレクトロポレーションによりユーグレナ細胞に導入することで、各遺伝子発現抑制細胞を作製した。スポットアッセイから、細胞質型の Prx1/4 発現抑制細胞において、顕著な生育速度の低下が示された。また、NTR1 または NTR2 の発現抑制細胞は有意な生育速度の低下を示し、特に NTR2 発現抑制細胞では、細胞サイズがコントロール細胞の約 3.4 倍に増加した。

これらの結果から、ユーグレナでは、葉緑体やミトコンドリアにおける ROS 代謝に Prx が関与するものの、細胞質型 Prx および Trx システムが ROS 代謝やレドックス制御を介して、正常な細胞生育や分裂に重要な役割を果たすことが示唆された (Tamaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014; *Plant Sci.*, 2015)。

シンポジウム講演

オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の発現と機能に関する研究

田中小百合（岡山大院・環境生命，^現（株）ファーマフーズ）

植物は、紫外線、高濃度塩類、乾燥等の環境ストレス下で、TCA サイクルやアミノ酸代謝の阻害、DNA 螺旋構造の崩壊といった傷害を生じる。このような障害を修復する酵素の 1 つである Nudix hydrolase (NUDX) に着目し、14 種類のオオムギ由来 Nudix hydrolase (HvNUDX) 遺伝子の探索、分類、ストレス応答、UV-C で発現量が増加する HvNUDX の構造と機能解析を以下の 4 つの項目に分類し研究を行った。

1) オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の同定と分類

シロイヌナズナに存在する 28 種類の NUDX アミノ酸配列と相同性を示すオオムギ由来遺伝子を BLAST 検索したところ、約 40-67%の相同性を示し、Nudix motif をコードする 14 種類の遺伝子を同定した。HvNUDX は 7 つの既知サブファミリーと 3 つの基質特異性未知のサブファミリーに分類された。また、ミナトカモジグサ、イネには AtNUDX と相同性を示したり Nudix motif をもつタンパク質をコードする遺伝子がそれぞれ 19, 23 種類存在した。結果、植物では NUDX の種類や機能が異なることを示唆した。

2) オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のストレス応答解析

非生物的ストレス (UV-C, 塩, 乾燥) 下におけるオオムギ幼芽の HvNUDX の発現量の変化を解析した結果、7 種類の HvNUDX (HvNUDX1, 2, 6, 7, 11, 12, 13) と 4 種類の HvNUDX (HvNUDX6, 7, 12, 14) がそれぞれ乾燥と UV-C で有意に発現が増加した。波長の異なる紫外線 (UV-A, -B, -C) をオオムギ幼芽に照射したところ、UV-A では HvNUDX4, UV-B では HvNUDX4, 6, UV-C では、HvNUDX6, 7, 12, 14 が発現増加し、このうち HvNUDX7, 12, 14 が UV-C 特異的に応答した。結果、HvNUDX は紫外線の種類によって応答性が異なることを明らかにした。

3) UV-C で誘導されるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のクローニングと機能解析

HvNUDX6, 7, 12, 14 の基質特異性を検討した。このうち HvNUDX12 の加水分解活性が最も高く酸化ヌクレオチド、ADP-ribose, dNTP, アデノシン四リン酸あるいはポリリン酸 (AP₄A, AP_nA) に対して活性を示し、幅広い基質特異性を有することが明らかとなった。HvNUDX12 の 8-oxo-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) 加水分解活性の V_{max} 値は ADP-ribose に比べ約 10 倍高いことから HvNUDX12 は主として、8-oxo-dGTP を加水分解することが推定された。また、HvNUDX12 遺伝子を導入した大腸菌では転写エラーが抑制された。

4) HvNUDX12 の基質特異性発現に関与するドメイン

HvNUDX12 の ADP-ribose pyrophosphatase で保存される 81 番目プロリン残基がアラニン残基となる変異酵素と、HvNUDX12 と AtNUDX26 の N 末端と C 末端を置換したキメラ酵素を構築し、基質特異性を検討した。HvNUDX12 の 81 番目プロリン残基は ADP-ribose 加水分解活性に重要ではないが、guanosine-3', 5'-tetraphosphate (ppGpp) 加水分解活性に関与していること、さらに HvNUDX12 の C 末側領域構造は 8-oxo-dGTP, AP₄A, AP₅A, ppGpp 加水分解活性に重要であることを明らかにした。

本研究により、植物には多様な NUDX が存在し環境ストレスに対する発現応答が異なること、同じサブファミリーに分類される NUDX であっても植物種の違いにより基質特異性や構造が異なること、植物が有する NUDX は環境ストレス耐性に関与する可能性について示唆することができた。

受 賞 講 演

講 演 要 旨

ペプチド分解酵素のアミノリシスによるペプチド結合の形成とその応用

有馬二郎（鳥取大・農）

【ペプチダーゼの副反応，アミノリシス】 酵素を生体から取出し，様々な条件の下で解析をすると，生体内では到底起こり得ない反応を目の当たりにすることがある。このような現象は副反応または Catalytic Promiscuity と呼ばれ，主に人工的な環境下で観察される。

多くのペプチダーゼにおいて，その生体内における本来の機能は，タンパク質／ペプチドに対する「加水分解」である。一方で，セリンペプチダーゼでは，加水分解と拮抗して，副反応としての「アミノリシス」が観察される。アミノリシスは，酵素反応の過程で形成されるアシル酵素中間体が求核攻撃される際，水分子に代わって別の分子のアミノ基が攻撃し，結果的にペプチド結合が形成される反応である（図 1）。特に，アミノ酸エステルが基質となると，多様なペプチド類が生成物として生じる。ペ

プチドは新奇な生理活性物質のプラットフォームであると共に，非標準アミノ酸も構成要素に含めると，その構造は無限であるため，我々は，セリンペプチダーゼのアミノリシスを機能物質探索・創製における新たなツールとして見立て，その応用に向けた研究を行った。

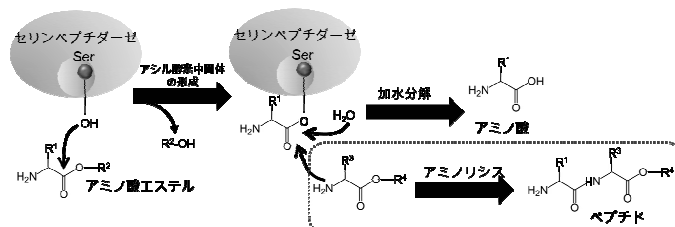


図 1 セリンペプチダーゼの本来の反応（加水分解）と副反応（アミノリシス）

【ペプチダーゼの副反応，アミノリシス】 酵素によるペプチド合成は既に報告されているが，その殆どが標準アミノ酸から構成されるペプチドであったため，我々は，D-アミノ酸やβ-, γアミノ酸など，非標準アミノ酸を認識できるセリンペプチダーゼを探索した。その結果，放線菌や緑膿菌，エリンギの子実体より，特殊なアミノ酸を広く認識する酵素が得られ，それらは期待通りにアミノリシスも触媒した。放線菌由来のセリンペプチダーゼ（DAH）はとりわけアミノリシスの効率がよく，現在は立体構造解析から構造的要因にも迫りつつある。

【生成物の多様性を利用した機能物質の探索】 続いて，アミノリシス触媒の特徴を最大限に活かした新たなテーマ，“機能物質探索ツールへの応用”を考案した。アミノリシスの結果得られる多様な生成物は，天然物化学や食品化学に倣った機能物質探索の「材料」と見立てられる。また，酵素反応は「混ぜるだけ」とすると共に，反応液は基本的に水溶液であるため，直接評価系に供すること可能である。まず我々は，DAH を使用し，約 1000 通りのアミノ酸やアミン類の組合せからなる酵素反応液を調製した。続いて酵素反応液を化合物ライブラリーとみなし，機能探索の対象として腫瘍細胞や細菌に対する毒性をとりあげ，新たな機能物質の探索に着手した。その結果，酵素反応液から腫瘍細胞特異的に毒性を示すペプチド D-Phe-Gly-OBzl 及び，グラム陽性菌に対する抗菌性ペプチド (D-Trp)₃-OMe が見つけれられた。

【最後に】 短いペプチドという限られた範囲ではあるが，アミノリシスで得られる生成物には，まだまだ魅力的な生理機能が隠されていると考えられる。今後は，さらにライブラリーを充実させ，新たな生理機能評価系を通した新奇機能物質の探索を試みていきたいと考えている。

植物における光酸化的ストレス応答のシグナル伝達に関する研究

藪田行哲（鳥取大・農）

植物は酸素発生型の光合成を行うため、酸素分子の過還元による活性酸素種（ROS）の生成は不可避である。さらに、光合成では消費しきれない強光による過剰な光エネルギーや、高温による光合成装置の異常などにより ROS の生成量は増大し、“光酸化的ストレス”と呼ばれる酸化傷害を引き起こす。それに対して植物は、様々なタンパク質の活性化/不活性化、新規タンパク質の発現誘導などを通じて種々の代謝をダイナミックに変化させることにより応答している。通常、このような代謝変化の制御には転写因子を含めた様々なシグナル伝達因子が関与するが、光酸化的ストレス応答に関わる因子やそれらによるシグナル伝達機構に関しては不明な点が多く残されている。光酸化的ストレスは植物が自然界で遭遇する機会が多く、その応答機構の解明は、生物が多様かつ巧妙に発達させてきたシグナル伝達機構の理解に知見を与えるだけでなく、食糧増産や環境問題の解決にも繋がると考え研究を行ってきた。本講演では一連の研究のうち、熱ショック転写因子（Hsf）を中心に紹介させていただく。

光酸化的ストレスに応答したシグナル伝達に関わる因子を同定するため、サブトラクション法によりシロイヌナズナから強光に応答して発現が誘導される遺伝子を単離した。それらには *HsfA2* などの転写因子やシグナル伝達に関わる遺伝子が含まれており、それらの光酸化的ストレス応答への関与が示唆された。また、多数の熱ショックタンパク質遺伝子（*Hsp*）が含まれ、光酸化的ストレス下でのタンパク質の修復に機能していると考えられた。次いで種々の代謝に関わる酵素遺伝子が含まれていた。これらの発現は、先に挙げた *HsfA2* などにより制御されていると考えられた。そこで、これら転写因子やシグナル伝達因子の光酸化的ストレス応答における役割を明らかにすることを試みた。

HsfA2 は光酸化的ストレスにより僅か 15 分以内で発現誘導されていた。過剰発現株を用いたマイクロアレイ解析により、*HsfA2* は *Hsp* だけでなく、ROS 代謝の鍵酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（*APX2*）やラフィノース属オリゴ糖（RFOs）合成の律速段階を触媒するガラクトキノール合成酵素 1（*GolSI*）などを含む様々な遺伝子の発現誘導に関与することが明らかになった。また、*HsfA2* 過剰発現シロイヌナズナは非常に厳しい光酸化的ストレスに対して耐性を示した。これらのことから、本転写因子は光酸化的ストレス応答の発端を担うキーレギュレーターであると考えられた。また、これら標的遺伝子の発現はプロモーター中に存在する熱ショックエレメント（HSE）を *HsfA2* が直接認識することにより制御されていた。さらに、*Hsp90* とプロテアソーム活性が *HsfA2* の発現制御に関与すること、*HsfA2* プロモーター中の HSE が *HsfA2* の発現誘導に重要であることを見出した。CRES-T ラインおよび T-DNA 挿入遺伝子破壊株を用いた解析やレポーターアッセイにより、*HsfA2* の発現は *HsfA1d* および *HsfA1e*（*HsfA1d/A1e*）が *HsfA2* プロモーター中の HSE を介して制御していることを明らかにした。さらに *HsfA1d/A1e* 二重遺伝子破壊株の解析により、*HsfA1d/A1e* は *HsfA2* に加え、*HsfA7a* や *HsfB1* など多くの *Hsf* の発現も誘導する、“*Hsf* シグナリングネットワーク”を形成し、光酸化的ストレス含む様々な環境ストレス応答の中心的役割を果たしていることが示唆された。

植物の光酸化的ストレスの認知に関して、細胞内レドックス変化やカルシウムイオンなどの関与が示唆されているが、その詳細な分子機構については不明な点が多く残されており、植物の光酸化的ストレス応答を理解する上で重要な課題であり、今後この解明に取り組んでいきたい。

特 別 講 演

講 演 要 旨

特別講演

微生物における第4級アンモニウム化合物の分解経路・分解酵素

森 信寛（鳥取大・農）

第4級アンモニウム化合物はコリン、グリシンベタイン、L-カルニチンなど、自然界に100種類以上存在する。コリンの生理機能として抗脂肪肝作用やメチル基転移作用が知られている。また、リン脂質やアセチルコリンの形で生体構成成分あるいは生理活性物質として動植物組織に広く分布している。グリシンベタインはある種の植物・微生物が浸透圧ストレスに曝されたときに細胞内に蓄積される物質である。L-カルニチンは脂肪酸がミトコンドリア内膜を通過する際の担体として働き、 β 酸化に不可欠な物質である。これらの物質の微生物による分解経路・分解酵素についての40年にわたる研究を振り返ってみます。

*コリン・ジメチルグリシン・サルコシン酸化酵素の発見

コリンを単一の炭素及び窒素源とした培地を用いて各種のカビ、酵母、放線菌類の好気的条件下でのコリン分解能を検討したところ、いくつかの菌株が良好な生育を示した。これら菌株のコリン分解酵素活性を検討したところ、今までに報告がない酸化酵素活性を見いだした。糸状菌 *Cylindrocarpus didymium* のコリン酸化酵素を初めて精製・単離し、諸性質を解明した。ほぼ同時に、グラム陽性細菌 *Arthrobacter globiformis* でもコリン酸化酵素が発見された。さらに、*C. didymium* からジメチルグリシン酸化酵素、サルコシン酸化酵素を見出し、それらの諸性質を明らかにした。現在、コリン酸化酵素、サルコシン酸化酵素は分析用酵素として臨床分析分野で活用されている。

*カルニチン脱水素酵素のスクリーニング

L-カルニチンの酵素分析を目的として、L-カルニチンに対する K_m 値が低いカルニチン脱水素酵素の探索を行った。カルニチンを炭素及び窒素源とした培地に生育できる細菌から L-カルニチン脱水素酵素活性を示す菌株を選択した。次に、無細胞抽出液を用いて、L-カルニチンに対する K_m 値を測定し、低い K_m 値を示す菌株を選定した。*Rhizobium* sp. YS-240 株より本酵素を精製・単離した。 K_m 値は従来の酵素と比べて $1/5 \sim 1/10$ の低い値を示した。

*コリン類縁体の分解経路

コリン類縁体（トリメチルアミノブタノール、トリメチルアミノプロパノール）を分解する微生物をスクリーニングした。トリメチルアミノブタノール (TMAB) 分解菌として *Pseudomonas* 属細菌と *Fusarium merismoides* var. *acetilereum* を見出し、各菌株から NAD 依存性 TMAB 脱水素酵素を精製し、諸性質を明らかにした。

*酵母によるコリンの分解

コリンを炭素及び窒素源として生育できる酵母を見出すことができなかったため、コリンを窒素源とした培地でスクリーニングしたところ、*Candida* 属酵母を見出した。コリンはトリメチルアミンとエチレングリコールに分解されていることを菌体反応で見出した。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A－1 *Zymobacter palmae* の代謝改変による 2,3-butanediol の高効率発酵生産
○久本晴加, 近藤早紀, 原田尚志, 岡本賢治, 築瀬英司 (鳥取大院・生応工)

【目的】2,3-ブタンジオール (2,3-BDO) はブタジエン, メチルエチルケトン等を経て化成品基材として合成ゴム, インク, 香水, 殺虫剤, 可塑剤の原料となる。さらに高光学純度の 2,3-BDO は医薬品や液晶等の付加価値の高い合成素材となる可能性を有する。工業的にはナフサを用いて製造されるが, 現在, 石油資源の大量消費による環境問題が深刻化している。そこで, セルロース系バイオマスから高効率なバイオエタノール発酵を行う *Zymobacter palmae* に注目した。独自のゲノム解析から *Z. palmae* にエタノール合成に加え 2,3-BDO 合成経路を見出した。今回は *Z. palmae* の pathway engineering による 2,3-BDO の省エネルギー的な高効率生産を検討した。

【方法・結果】まず *Z. palmae* の培養条件によるグルコース発酵での生産物の挙動解析より, 静置 (微好気) 培養でのエタノールの高収率生産に対し, 通気攪拌を伴う (好気) 培養では 50 g/L グルコースより理論収率 89% の 2,3-BDO を生産した。これまで育種に成功した C5・C6 糖並行発酵菌を用い, キシロースからの発酵性を検討した所, 理論収率 74% の 2,3-BDO 生産に成功した。これまでの *Z. palmae* での 2,3-BDO 生産には通気攪拌に多くのエネルギーを要する為, 微好気条件での省エネルギー的 2,3-BDO 発酵生産を検討した。エタノール合成に重要なピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*pdh*) の欠損株を作製し, 微好気条件においてほぼ理論収率での 2,3-BDO 生産を可能とした。現在, *Z. palmae* の *pdh* 欠損株へのキシロース代謝系の導入を検討している。

A－2 *Zymomonas mobilis* の細胞表層提示酵素転写活性化遺伝子の機能解析
○山本知慧, 山本 翔, 原田尚志, 岡本賢治, 築瀬英司 (鳥取大院・生応工)

【目的】

複雑な膜構造をもつグラム陰性細菌である *Zymomonas mobilis* のシグナルペプチド非依存型酵素分泌機構の解明と有用酵素大量分泌系の構築を目的として, *Z. mobilis* における levansucrase と invertase の発現と分泌を促進する遺伝子群の機能を解析した。

【方法・結果】

これまでに, levansucrase と invertase を構成的に大量に分泌する *Z. mobilis* 親株に対して変異を導入し, 両酵素の発現と分泌が著しく低下した欠損変異株を取得するとともに, これら欠損変異を相補する 1.7 kbp の DNA 断片を親株のゲノム DNA からクローニングしている。さらに, 1.7 kbp 断片の塩基配列解析により, 断片上には 2 つの ORF (ORF1:327 bp, 108 a.a と ORF2:553 bp, 184 a.a) がコードされていると推定した。そこで, ORF1 と ORF2 を別々にサブクローニングし機能解析を検討した。ORF1 を導入した株では, levansucrase と invertase の酵素活性が著しく増加するとともに, 細胞表層およびペリプラズム画分への局在が観察され, 両酵素抗体を用いた Western-blotting 解析においても同様な挙動を確認することができた。また, RT-qPCR 解析において, ORF1 導入株における levansucrase に由来する mRNA 量の増加が確認できた。以上の結果から, ORF1 は levansucrase と invertase 遺伝子の転写活性化因子と考察した。

A-3 細菌由来メバロン酸経路遺伝子群を用いた大腸菌テルペン基本代謝経路の強化 ○島 貴紀, 千田大樹, 岡本賢治, 築瀬英司, 原田尚志 (鳥取大院・生応工)

【目的】

テルペン化合物は多様な生理活性を持つことから、様々な用途に実用されている。一方で、天然賦存量が稀少かつその構造複雑性故に、合成が困難な化合物も多く含まれる。そこで近年、バイオテクノロジーによる安定的かつ効率的な供給方法が期待されている。本研究では大腸菌を宿主とした効率的なテルペン類生産系の構築を目的に、細菌由来のメバロン酸 (MVA) 経路遺伝子群を対象に従来よりも高機能な遺伝子の選抜を行うことで、さらなる生産量の強化を目指している。

【方法・結果】

種々の細菌ゲノム情報を基に、MVA 経路遺伝子の探索と PCR クローニングを行った。その結果、多くの細菌においてクラスター構造を形成していることが確認されるとともに、複数の細菌由来 MVA 経路遺伝子群を取得した。これら遺伝子群について、既存の放線菌由来 MVA 経路遺伝子群との置換を行うことにより高機能遺伝子を選抜した。MVA 経路上流に位置する 3 酵素遺伝子 (acetyl-CoA acetyltransferase, HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase) と、下流 3 酵素遺伝子 (mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase, diphosphomevalonate decarboxylase) に分けて遺伝子置換を行った。その結果、上流 3 遺伝子の置換では生産量への影響が確認されなかったが、下流 3 遺伝子の置換により最大で 3 倍程度生産量増加が確認されたことから、本生産系における代謝律速ステップが明らかとなった。

A-4 Cell Wall Integrity 経路に関与する *SLM1* 下流因子の探索 ○橋井圭介, 八重佳織, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大・農)

高温ストレス時において酵母は、エイソソーム/MCC と呼ばれる形質膜ドメインに局在するアダプタータンパク質 *Slm1* を TORC2 によって構成される膜ドメイン MCT に移行させることにより、下流に存在する①Cell Wall Integrity (CWI) 経路の活性化、②アクチン細胞骨格の再構成、③変性膜タンパク質のエンドサイトーシスによる分解、などを介して最終的に高温ストレスに適応していると考えられている。我々は *Slm1* のより詳細な分子機能を解析する過程で、*Slm1* 過剰発現株が高温感受性を示すとともに、CWI 経路の MAP キナーゼである *Slk2* の恒常的な活性化を引き起こすこと、また、高温ストレス時における変性膜タンパク質のエンドサイトーシスに異常を示すことを明らかにしている。本研究では、*Slm1* 過剰発現による高温感受性の原因を遺伝学的に明らかにすることを目的とし、トランスポゾンを用いた抑圧変異株の単離を試みた。

我々は、トランスポゾン挿入ライブラリーを用いたスクリーニングにより *Slm1* 過剰発現時において高温条件下でも生育できる抑圧変異株を 5 株単離した。*Slm1* 過剰発現株は、高温ストレス時におけるアルギニン輸送体 *Can1* のエンドサイトーシスの異常、アルギニンアナログであるカナバニンに対して超感受性を示すが、抑圧変異株ではこれら表現型の回復が見られた。これら抑圧変異株 2 株について変異箇所を同定したところ、ストレス応答性遺伝子の発現に機能するヒストンアセチル化酵素複合体である SAGA コンプレックスの構成因子の中の二つの遺伝子が同定された。

A－5 酵母発現系による青枯病菌エフェクターRSc0608 の膜局在化および増殖阻害に関する機能ドメインの解析
○北園喬斗，忻 詩博，加本佳大，田中直孝，田淵光昭（香川大・農）

多くの植物病原菌はⅢ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して宿主細胞内の様々な生理機能を攪乱するエフェクターを直接注入している。エフェクターの機能解明は、病原菌の感染戦略を理解する上で重要であるにも関わらず、一次構造からエフェクターの分子機能を予測することは困難であり、未だに多くエフェクターの機能が解明されていない。本研究では酵母発現系を用いて機能未知な青枯病菌エフェクターRSc0608 の機能解析を目的とした。

RSc0608 の一次構造をもとにモチーフ検索を行ったところ、膜貫通ドメインを含めた機能を推定できるようなドメインが見られなかった。そこで、RSc0608 の機能ドメインを明らかにするため、NおよびC末端領域における各種欠損体を作製し、酵母で発現させることでその局在と増殖阻害活性について解析した。その結果、RSc0608 の細胞膜への局在化に必要なドメインがN末端に、増殖阻害活性を有するドメインがC末端に存在することが明らかになった。また、これらのドメインは独立しており、N末端の膜局在化ドメインには増殖阻害活性を抑制する自己阻害ドメインが一部重複して存在していることが示唆された。また、RSc0608 は酵母細胞内で内在性のキナーゼにより高度にリン酸化されており、このリン酸化は推定の自己阻害ドメインと一致すること、さらにリン酸化は膜への局在に依存することから、RSc0608 は細胞膜に局在し、リン酸化されることで機能を獲得していることが推測された。

A－6 分裂酵母においてゴルジ体を凝集させる Gmp ファミリーの機能解析
○大山拓朗，児子隆英，田淵光昭，田中直孝（香川大・農）

【目的】ゴルジ体は真核生物に見られるオルガネラの1つであり、一定の間隔で扁平な袋状の膜構造を形成し、タンパク質の糖鎖修飾や選別輸送の機能を有している。ゴルジ体の層板間にはゴルジマトリックスタンパク質と呼ばれる Coiled-coil を含んだタンパク質が存在し、ゴルジ体の構造保持や輸送機構に重要であることが知られているが、不明な部分が多い。分裂酵母のゴルジ体画分からの TOF-MS 解析により Gmp1 と Gmp2 を、Gmp1 のホモロジー解析により Gmp3 と Gmp4 を同定した。これらは機能未知であり、2次構造上の特徴として膜貫通領域やシグナルペプチドはないが、Coiled-Coil を有している。本研究では、互いに相同性の高い Gmp1, 3, 4 に着目し、その機能解析を行った。

【方法・結果】それぞれの破壊株を単離し、その表現型を解析した結果、分泌糖タンパク質の糖鎖修飾異常や輸送異常を示すことがわかった。また Gmp ファミリーを過剰発現させるとゴルジ体が凝集したような大きなドットが観察された。さらに、ゴルジ体マーカーと共発現させたところ、Gms1 を凝集させたことから Gmp ファミリーは過剰発現時にメディアルからトランス層板を凝集させていることが示唆された。各 gmp 破壊株にて Gmp ファミリーを過剰発現したところ、細胞質中へと拡散するものや、凝集が起らないものなど局在の変化が見られ、複合体を形成していることが示唆された。また、ゴルジマトリックスタンパク質は Coiled-Coil を介して他のタンパク質と相互作用していることが知られている。各 Gmp の Coiled-Coil 欠損体を作製し、各 gmp 破壊株で過剰発現した結果、局在の変化が見られた。

A-7 分裂酵母におけるアグマチナーゼ欠損株の生理的影響に関する研究
○石田麻里絵, 青木克幸, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】アグマチンは、アルギニンデカルボキシラーゼ (ODC) の作用でアルギニンから生合成されるポリカチオン性アミンである。近年、アグマチンはヒトやウシの脳内でシナプス小胞内に蓄積し、神経伝達機能に関わっていることが推測されているが、詳細な役割は不明である。現在、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ではアグマチンを経由するポリアミン合成経路が存在することが分かっている。そこで本研究では、分裂酵母のアグマチナーゼ (アグマチンから尿素を加水分解してプトレシンを合成する酵素) を欠損させ、この経路を遮断することで、どのような生理的影響があるのか研究することを目的とした。

【方法・結果】分裂酵母にはアグマチナーゼが 3 種類存在 (いずれもシグナルペプチドを有する) し、それぞれコードする遺伝子を *agm1*⁺, *agm2*⁺, *agm3*⁺ と命名した。各 *agm* 破壊株と三重破壊株を作製し、各種表現型を確認した結果、25 mM アグマチン、1 mM プトレシンになるように同時添加した培地では、*agm3* Δ 株と *agm1* Δ *agm2* Δ *agm3* Δ 株で生育が抑制された。これらの株に *agm3*⁺ を組み込んだプラスミドを入れて形質転換すると相補したことから、Agm3 は細胞内のアグマチン濃度の恒常性維持に関与していることが示唆された。また、WT を各 *agm* に GFP タグを付けたプラスミドで形質転換すると、いずれも液胞で大きなドット状に局在が観察されたため、各 Agm は液胞にて機能していることが示唆された。

A-8 分裂酵母の分泌経路に存在するレクチン様タンパク質 Emp43 の解析
○神谷勇輝, 川口宗馬, 梨子木健人, 鈴木章太郎, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)

【目的】分泌タンパクは粗面小胞体で合成され、その後小胞体内腔, ERGIC, ゴルジ体を経て、細胞外へと輸送される。ヒトにおいてこの ERGIC に存在する ERGIC-53 は特定のカーゴレセプターとして機能し、小胞体から ERGIC に小胞輸送を行うことが報告されている。しかし ERGIC のオルガネラとしての機能や、タンパク質の分泌に関してどのように関わるかについては詳細な解析が進んでいない。そこで分裂酵母においてヒト ERGIC-53 のホモログ *emp43*⁺ を取得し、解析を行った。

【方法・結果】Emp43 の局在を観察したところ、Emp43 は ERES (ER Exit Site) やゴルジ体とも異なるドット状区画に局在することがわかった。そこで Emp43 の C 末端細胞質領域に存在する局在モチーフと考えられた KYL モチーフをそれぞれアラニン置換した株、セリンで KYL モチーフをマスクした株、およびマスクした後ろにさらに KYL モチーフを付加した株を作製し、局在の変化や Mg²⁺ 感受性の相補から機能への影響を見た。その結果、KYL モチーフをアラニン置換した株すべてにおいて、局在の変化と Mg²⁺ 感受性が見られたため、機能が低下していることが示唆された。またセリンで KYL モチーフをマスクした株だけではなく、マスクした後ろにさらに KYL モチーフを付加した株においても局在の変化と Mg²⁺ 感受性が見られたため、Emp43 の機能には KYL モチーフのみではなく、細胞質領域の長さも重要であることが示唆された。

A-9 スフィンゴ脂質合成遺伝子と遺伝学的相互作用する遺伝子の探索
○池田拓真, 芳形茉美, 船戸耕一 (広島大院・生物圏)

【目的】スフィンゴ脂質合成酵素 Lcb1 にはキナーゼによってリン酸化を受けると考えられるアミノ酸配列が存在する。しかし、キナーゼによる Lcb1 のリン酸化を介した活性制御機構に関してはまったく明らかにされていない。そこで、温度感受性変異である *lcb1-100* と遺伝学的に相互作用するキナーゼ遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】出芽酵母のキナーゼライブラリーを *lcb1-100* 変異株に形質転換し、過剰発現させて、*lcb1-100* 変異株の生育に影響を与えるキナーゼ遺伝子を探索した。その結果、*lcb1-100* 変異株の温度感受性を抑圧する遺伝子が 20 種類、温度感受性を悪化させる遺伝子が 46 種類取得された。キナーゼを過剰発現させた場合に温度感受性が増強する株の中には *lcb1-100* 変異と関係なく生育に障害を引き起こす株もあると考えられる。そこで、野生株にキナーゼを過剰発現させた株と *lcb1-100* 変異株にキナーゼを過剰発現させた株を作製し比較した。すると、*lcb1-100* 変異依存的に温度感受性を強める遺伝子が 29 種類得られた。現在、*lcb1-100* と遺伝学的相互作用した 49 種類のキナーゼ遺伝子との二重変異株を作製し、機能的関連性を解析中である。

A-10 Draft genome sequence of the acidophilic and halophilic sulfur-oxidizing
bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH
○Sultana Sharmin, 金尾忠芳, 上村一雄 (岡山大院・環境生命)

Acidithiobacillus thiooxidans strain SH isolated from Seto Inland Sea is an acidophilic and halophilic sulfur-oxidizing bacterium. The organism grows autotrophically by utilizing energy derived from the oxidation of elemental sulfur and reduced inorganic sulfur compounds (RISCs). It is particularly interesting due to its role in bioleaching of salt-containing sulfide minerals. The genome sequence analysis has allowed a preliminary model to be built for genes involved in sulfur metabolism. The *A. thiooxidans* SH draft genome is 2,913,718 bp with a GC content of 53.41% distributed in 73 contigs. The sequence contains 45 tRNA, one 5S-16S-23S operon and 2,986 predicted protein-coding sequences. The genes potentially encoding RISC metabolizing enzymes were identified, including tetrathionate hydrolase (*tet*), sulfide quinone oxidoreductase (*sqr*), thiosulfate quinone oxidoreductase (*dox*), sulfur oxygenase reductase (*sor*), two copies of the sulfur oxidation complex (*sox*), and heterodisulfide reductase (*hdr*). Sulfur-oxidizing pathway was suggested according to the sequence analysis. We have newly identified a gene encoding protein catalyzing thiosulfate:ferricyanide oxidoreductase in strain SH. The gene was not found in sequences of other *A. thiooxidans* genomes. The sequence analysis of strain SH showed a considerable higher number of genes related to mobile elements (transposases and integrases). A transposase homologous to that of iron- and sulfur-oxidizing bacterium *A. ferrooxidans* was found just upstream of *tsd* gene, suggesting the result of horizontal gene transfer.

A-11 放線菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 のドラフトゲノム解析
○田村 隆, 大島健志朗¹, 服部正平¹, 清水 瞳, 根本理子, 稲垣賢二
(岡山大院・環境生命,¹東京大・先端研)

【目的】放線菌 *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 は核酸系抗生物質シネフンギンを生産する。核酸系抗生物質は、抗ウイルス、抗原虫活性を持つ有用な二次代謝産物であるが、その多くは生産性が低いために活用されていない。核酸系抗生物質の工業的生産のために核酸系に特化したプラットフォーム宿主の構築が望まれる。本研究では、核酸系構成物質生産システムの整備を目的として本菌のドラフトゲノムシーケンスを解析した。【方法・結果】*S. incarnatus* から抽出した DNA からイルミナ 454 用ライブラリを作成して、GS FLX+でシーケンスを行った。715,821 断片の DNA を解読して 460,270,476 塩基の出力を得た。Newbler v2.8 による編集を行った結果、76 contig からなる 8,878,066 bp ドラフト配列を得た。MetaGenomeAnnotator を用いて 8,266 個の ORF の存在を予測した。ORF から導かれたアミノ酸配列を BlastKOALA で網羅的に相同性検索を行い、全 ORF の約 3 割を KEGG 代謝マップ上にアサインすることが出来た。解糖系、TCA 回路、核酸代謝やアミノ酸代謝など一次代謝には大きな欠失は認められなかった。シネフンギンはアデノシンとオルニチンが C-C 結合した構造であるが、尿素回路を構成するアルギナーゼの遺伝子が欠失しており、蓄積するアルギニンがシネフンギン生合成前駆体となることを示唆していた。

B-1 ステロール生産性 *Mortierella alpina* の形質転換系の確立

○湯浅雄介, 阪本鷹行¹, 清水 昌^{2,3}, 小川 順³, 櫻谷英治¹

(徳島大院・物質生命,¹ 徳島大院・ソシオテクノ,² 京都学園・バイオ環境,

³ 京都大院・応用生命)

[目的] 微生物の多くはエルゴステロールを生成するが, *Mortierella* 属糸状菌はデスモステロールをはじめとするユニークなステロール類を生成する。デスモステロールはコレステロールと同じステロイド骨格をもつことから側鎖切断酵素の基質となり, 医薬中間体であるステロイドホルモンの前駆体へと変換される。我々はこれまでに *Mortierella alpina* CBS754.68 のステロール生産性が高いことを見いだしており, 本菌のステロール生合成経路の解明や分子育種によるステロール生産には効率的な遺伝子組換え系の開発が必要となる。本研究では分子育種によるステロール生産を目指して, アグロバクテリウム法による *M. alpina* CBS754.68 の形質転換系の確立を試みた。

[方法・結果] 本研究では, 選択マーカーとしてピリミジン合成に関わるオロチン酸ホスホリボシル転移酵素をコードする *ura5* 遺伝子を導入した Ti プラスミド pBIG3ura5 を利用した。pBIG3ura5 を保持する *A. tumefaciens* と, *M. alpina* CBS754.68 Δ *ura5* の胞子を共培養することで遺伝子導入を試みた。共培養後, ウラシルを含まない合成培地で培養し, 生育した 14 株を取得した。この内 6 株からゲノムを抽出し, *ura5* 遺伝子のプロモーターに対応するフォワードプライマーと *ura5* 遺伝子に対応するリバープライマーを用いて PCR を行った結果, 6 株すべてにおいて約 1.3 kb の遺伝子断片が増幅されたことからアグロバクテリウム法による形質転換が成功したと考えられた。

B-2 枯草菌のラムノース異化に関わるオペロンの発現誘導物質の同定

○小土井祐介, 藤田泰太郎, 広岡和丈 (福山大・生命工)

【目的】枯草菌の *yuxG-yulBCDE* オペロンは, ラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする。また, このオペロンの発現は CcpA によるカタボライト抑制を受けることも明らかとなっている。YulB は DeoR ファミリーに属し, これに属する他の転写因子の特性から類推すると, YulB はレプレッサーとして機能し, YulE による異性化反応と YulC によるリン酸化反応によってラムノースから生じるラムヌロース-1-リン酸がエフェクター分子として YulB をオペロン上流域から解離させることで, オペロンの脱抑制が起こると予想された。この仮説を *in vitro* と *in vivo* の実験系で検証することとした。【方法・結果】YulB, YulE, YulC, および大腸菌由来ラムヌロキナーゼ (RhaB_{Ec}) をそれぞれ大腸菌で発現させ, 精製した。YulB 以外は His タグ融合タンパク質 (His-YulE, His-YulC, および His-RhaB_{Ec}) として調製した。His-RhaB_{Ec} を用いてラムヌロースと ATP を反応させ, ラムヌロース-1-リン酸を調製した。ゲルシフト解析にて, この化合物の YulB の DNA 結合に及ぼす影響を調べた結果, 明確な阻害効果がみられた。また, 酵素活性測定とゲルシフト解析から, YulE がラムノースをラムヌロースに異性化し, YulC がラムヌロースの 1 位をリン酸化することを示す証拠が得られた。オペロンの各遺伝子に pMUTIN プラスミドを挿入した枯草菌株に *ccpA* 破壊をさらに導入して構築した各菌株を用いてレポーター解析を行った結果, YulB, YulE, および YulC が存在する菌株をラムノースを炭素源にした培地で生育させた場合にのみ *yuxG* プロモーターの誘導が検出され, ゲルシフト解析の結果を支持するものとなった。

B－3 Effect of PON1, ABCB1C1236T and ABCB1C3435T polymorphisms on the anti-platelet response of clopidogrel in the Bangladeshi percutaneous coronary intervention patients ○Mohammad Safiqul Islam, Md. Siddiqui Islam¹, Mohd Nazmul Hasan Apu¹, Michael Nii Nartey, Abul Hasnat¹, Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.; ¹Dept. Clin. Pharm., University of Dhaka.)

The roles of polymorphisms of the genes coding for drug metabolizing enzymes, paraoxonase 1 (PON1) and ABC transport proteins (P-glycoprotein), in the effectiveness of clopidogrel still remain uncertain due to heterogeneity in the different studies. 110 Bangladeshi patients undergoing percutaneous coronary intervention and taking clopidogrel therapy were recruited in the Ibrahim cardiac hospital and research institute. Genotyping of PON1rs662, ABCB1C1236T, and ABCB1C3435T was performed by polymerase chain reaction restriction length polymorphism. Percent (%) inhibitions of P2Y₁₂ receptor of all patients was measured by the VerifyNow test. Variant genotypes AG and GG of PON1rs662 were found in 44 (44.45%) and 27 (24.55%) patients, respectively. The TC and TT genotypes of ABCB1C1236T were present in 51 (46.36%) and 45 (40.91%) patients and that of ABCB1C3435T were detected in 56 (50.91%) and 34 (30.91%) patients, respectively. Higher percent inhibition of P2Y₁₂ receptor was produced by both TC and TT genotypes of both ABCB1C1236T and ABCB1C3435T polymorphisms whereas lower percent inhibition of P2Y₁₂ receptor was found in case of AG and GG genotypes of PON1rs662 polymorphism compared with non-variant genotype (wild) that are not statistically significant. Our result indicates that PON1rs662, ABCB1C1236T and ABCB1C3435T can modify the action of clopidogrel but statistically no significant association was found in the Bangladeshi population.

B－4 植物由来 *Methylobacterium* 属のスクリーニングと PQQ 生産性の解析
○奥田 洋, 矢野裕之¹, 桑原浩誠, 大戸信明, 田中三男¹, 三井亮司¹
(丸善製薬(株), ¹岡山理大・理)

【目的】植物の生育に伴い、植物細胞間を埋めるペクチンのメチルエステルが加水分解されメタノールが生成することが知られている。このメタノールは植物葉上の優勢種である *Methylobacterium* 属細菌などの炭素源として利用される一方で *Methylobacterium* 側からは植物の生長を促す物質が供給され、共生関係が成り立っていることが明らかになってきている。微生物から供給される物質には植物ホルモンなどに加え、PQQ (ピロロキノリンキノン) が知られている。この PQQ は高い抗酸化活性を持つことで知られ、そのほかにもヒト細胞の増殖促進作用、高白内障作用、神経保護作用、神経成長因子の増強効果など様々な有効性を示す。そこで本研究では、食品や化粧品での利用が期待される PQQ を高生産する菌株を植物から分離することを試みた。

【方法と結果】各種の植物葉を採取し、メタノールを単一炭素源として生育する菌株を分離した。取得した 200 以上の菌株より良好な生育を示す株を選抜した。16SrRNA 遺伝子解析の結果、選抜されたすべてが *Methylobacterium* に属する菌株であった。これらの菌株が培養液中に分泌する PQQ を蛍光検出器を用いた HPLC により測定した結果、全ての菌株の培養液から PQQ が検出されたが、その中でも単位菌体量あたり高い生産性を示す菌株が見いだされた。これらは遺伝的に近いクラスターを形成しており、PQQ を高生産する可能性が示唆された。今後、培地条件の最適化などにより高生産条件の検討を行う予定である。

B－5 好熱菌細胞内変異で創出された変異型 pUC レプリコンの大腸菌内特性
○田摩実咲, 小林淳平, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工,¹鳥取大・GSC)

【目的】高変異性好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* MK480 細胞内における遺伝子変異を利用して、これまでに *G. kaustophilus* に高温下クロラムフェニコール耐性を付与する変異プラスミドを創出した。興味深いことに本プラスミドは、pUC レプリコンに 2 ヲ所の置換変異をもっており、我々はその変異型レプリコンについて詳細に解析している。本大会では、当該変異型レプリコンが pUC18 の大腸菌内特性に及ぼす影響について報告する。

【方法・結果】変異型レプリコンをもつ pUC 派生プラスミド (pUC18^a, pUC18^b, pUC18^{ab}) を pUC18 から構築した。これらは pUC 複製起点から 177 塩基下流 (pUC18^a), 250 塩基上流 (pUC18^b), もしくは両部位 (pUC18^{ab}) に置換変異をもつ。これらの大腸菌内コピー数を調べたところ、pUC18 のコピー数は培養温度による影響が大きく、高い培養温度ほど高いコピー数を示した。pUC18^a は、pUC18 と同様な温度依存性を示したが、コピー数は概して pUC18 よりも低かった。pUC18^b は、温度非依存性を示したが、やはり pUC18 よりも低コピーであった。ところが、pUC18^{ab} は比較的高いコピー数を示し、その特性は温度非依存的であった。また pBR322 型の複製レプリコンをもつ pUC18^y は、pUC18^{ab} と同様な温度非依存性を示したが、そのコピー数は pUC18^{ab} のものより低かった。以上の結果は、pUC18^{ab} が既知 ColE1 系プラスミドとは異なるコピー数特性をもって複製されることを示唆する。本プラスミドは広い温度範囲で安定に維持されたことから、新たな大腸菌遺伝学ツールとして有用かもしれない。

B－6 好熱性バチラス属細菌へのプラスミド導入における接合伝達法の汎用性
○富永有里絵, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工,¹鳥取大・GSC)

【目的】我々は、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 へのプラスミド導入において、大腸菌からの接合伝達が有用であることを見出した。本研究では、接合伝達によるプラスミド導入を他様々な好熱性バチラス属細菌 (*Geobacillus* 属細菌および好熱性 *Bacillus* 属細菌) について行い、本手法の汎用性を評価した。

【方法・結果】*G. kaustophilus* HTA426 株への接合伝達に至適化された大腸菌 BR408 株を、*Geobacillus* -*E. coli* シャトルプラスミド pUCG18T で形質転換した。得られた大腸菌から好熱菌 18 株への接合伝達効率を調べたところ、16 株について形質転換体を得られた (接合伝達率, $>10^{-7}$ recipient⁻¹)。形質転換体から抽出した DNA をアガロース電気泳動で分析したが、pUCG18T の明確なバンドは見られなかった。これは pUCG18T が低コピーで存在しているためと考えられる。実際に、PCR 分析では 13 株について pUCG18T の存在を検出できた。ただし、他 3 株については PCR 増幅ができないプラスミド領域が見出された。これは、好熱菌細胞内における pUCG18T 複製が不安定であり、プラスミドの欠失等が起こったためと考えられる。pUCG18T の汎用性について今後検討の余地があるが、以上の実験結果は、大腸菌 BR408 株を用いた接合伝達法が好熱性バチラス属細菌へのプラスミド導入に広く有用であることを示唆する。

B-7 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 が有する大型プラスミド pHTA426 の遺伝学的解析

○水野 樹, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工, ¹鳥取大・GSC)

【目的】*Geobacillus kaustophilus* HTA426 は、中等度好熱性のグラム陽性桿菌で、その全ゲノム解析から大型プラスミド pHTA426 を有することが示された。本プラスミドの複製機構に関する興味から、我々は pHTA426 の解析を行っており、これまでにプラスミドキュアリングに成功している。本大会では、pHTA426 の遺伝学的特徴、キュアリング、およびキュアリングが HTA426 株に及ぼす影響について報告する。

【方法・結果】pHTA426 は、48 kb からなる低コピー環状プラスミドで、46 個の遺伝子をもつ。それらの多く (20 個) は機能未知であるが、プラスミド複製のための遺伝子 (3 個) と II 型制限修飾系遺伝子 (2 個) も見出される。pHTA426 キュアリングを目的とし、まず pHTA426 上の II 型制限酵素遺伝子を耐熱性 β -ガラクトシダーゼ遺伝子に置換した。得られた株をアクリジンオレンジ含有培地で培養することでキュアリングを誘発し、X-gal 分解能を欠失した菌株をスクリーニングすることで、pHTA426 キュアリング株 MK633 を得た。MK633 株と親株の増殖速度は、LB 培地や一般的な最少培地中において大きな差異は見られなかった。当該キュアリングによって DNA メチル化酵素遺伝子も喪失したが、DNA 自発的変異の増加は見られず、メチル基依存的 DNA 修復系の不活性化もないことが示唆された。現在、キュアリングが他生物学的特性に及ぼす影響について調べている。

B-8 褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* による牛乳・ホエーからのエタノール生産

○川村紗瑠, 中川紗季, 金涌龍一, 原田尚志, 築瀬英司, 岡本賢治
(鳥取大院・工)

【目的】自然界で木質資源の循環に重要な働きをしている担子菌は、リグノセルロース分解のみならず生理活性物質の生産など多様な変換能を有する。我々は、国内で賄える未利用資源を対象にしたバイオマスリファインリーの構築を目的に、担子菌に潜在する新たな機能探索を進めている。本研究では、キシロースをはじめとする糖質からエタノールを効率的に生産可能な褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus*¹⁾ に着目し、消費期限切れの牛乳やチーズ製造時の副産物ホエーに対する発酵性を検討した。

【方法・結果】*N. lepideus* をラクトース、酵母エキスを含む培地に接種し、経日的にサンプリングしたろ液中の糖ならびにエタノール生産量を HPLC にて分析した。その結果、6 割以上の収率でエタノールの生産を認めた。次に、チーズホエーで本菌を培養したところ、同様の収率で含有するラクトースからエタノールを生産していた。そして、タンパク質や脂肪を含む牛乳にて発酵試験を行った結果、こちらも何も処理しないで直接的にエタノールを生産した。さらに、発酵に及ぼす脂肪含量の影響を調べるため、高脂肪乳と低脂肪乳間で比較したところ、両者において特に違いもなくエタノールを生産可能であった。以上の結果から、*N. lepideus* はタンパク質や脂肪の混在下でも、ラクトースからのエタノール変換能を安定して維持できることが明らかとなり、乳製品に関わる食品廃棄物のリサイクルに応用が期待できる性質が備わっていると考えられる。

¹⁾ K. Okamoto et al., *Enzyme Microb. Technol.*, **50**(2), 96-100 (2012).

B-9 RNA シャペロンを介した *Zymomonas mobilis* のストレス耐性強化
○大戸裕史, 滝上はる香, 原田尚志, 岡本賢治, 築瀬英司
(鳥取大院・生応工)

【目的】地球温暖化問題を解決する代替エネルギーの一つとして、商用レベルでのセルロース系バイオエタノール製造が期待できる。これまでに、木質バイオマスからマイクロ波照射前処理工程と同時糖化並行発酵工程を組み合わせたバイオエタノール製造一貫プロセスを開発し、実証実験を行ってきた。今回は、コスト低減のため前処理工程で副生する発酵阻害物への耐性強化を目的とした。そこで、細菌のストレス耐性獲得に働く RNA シャペロン *Hfq* に着目し、*Zymomonas mobilis* の酢酸耐性の強化を検討した。

【方法・結果】木質バイオマス前処理物には酢酸塩が 2%程度副生されており、発酵阻害の原因となっている。*Z.mobilis* は酵母より酢酸耐性が 2 倍程度強いが、2%酢酸混在化では生育と発酵が著しく阻害された。そこで、*Z.mobilis* のゲノム情報に対し、大腸菌において酸耐性に働くとされる *hfq* ホモログ検索を行った。その結果、55%の相同性をしめす ORF を見だし、*Z.mobilis* のゲノム DNA から *hfq* ホモログをクローニングした。次に、クローニングした *hfq* ホモログを *Z.mobilis* の強力なプロモーター *Pgap* の制御下に連結して、組み換えプラスミド *pZA323-Pgap-hfq* を構築した。構築プラスミドを導入した *Z.mobilis* は 2%酢酸ナトリウム存在下での発酵性試験では、速やかな生育とともに 48 時間での 20 g/L グルコースの完全消費と理論収率に近いエタノール生産が確認できた。以上の結果から、*Z.mobilis* においても RNA シャペロン *hfq* を介したストレス耐性獲得機構が存在し、*hfq* の発現強化により酸耐性を獲得を示すことができた。現在、*hfq* の遺伝子発現レベルを解析している。

B-10 *Cobetia* sp.由来熱安定性アルギン酸リアーゼの特性評価
○藤瀬麻紗子, 八木寿梓¹, 鈴木宏和, 大城 隆
(鳥取大院・工,¹鳥取大・GSC)

【目的】バイオマス原料の一つとして海藻が注目されている。海藻表面のヌメリ成分の一つで粘質多糖類であるアルギン酸は海藻に多く含まれ、構成糖は β -D-マンヌロン酸と α -L-グルロン酸である。アルギン酸はマンヌロン酸のみが連なった polyM, グルロン酸のみが連なった polyG, マンヌロン酸とグルロン酸がランダムに並ぶ polyMG の各ブロックから構成される。アルギン酸を単糖類まで糖化することが可能となればバイオマスとしての利用が期待できる。そのためには、アルギン酸分解酵素の熱安定性、基質特異性の評価は重要である。本研究では海藻褐藻類ウミウチワを分離源として得られたアルギン酸資化性菌 *Cobetia* sp. NAP1 株が有するアルギン酸リアーゼの熱安定性等の特性評価を行った。

【方法・結果】アルギン酸リアーゼの酵素活性 (至適温度等) はアルギン酸ナトリウムを基質とし、アルギン酸が分解されたことによって生じる分解産物の炭素-炭素二重結合の増加を、232 nm の吸光度の経時変化から求めた。熱安定性評価は酵素を 60~90℃の各温度で 60 分間反応させ、氷中で冷却後、活性測定を行った。また基質特異性を評価するために polyM, polyG, polyMG の各ブロックを調製した。

本酵素の活性至適温度は 42℃付近であった。熱安定性においては、90℃で約 30%の残存活性があり、また 15 分反応後の残存活性は約 75%であったことから、これまで報告されている酵素よりも熱安定性があることがわかった。基質に関しては polyMG に対する特異性が比較的高かった。これらの結果から本酵素は他の酵素とは異なる性質を有しており、また熱安定性が高いことから本酵素の有用性が示された。

C-1 魚類由来エラスチンの精製と形態観察
○森川祐未, 鈴木宏和, 大城 隆, 八木寿梓¹
(鳥取大院・工,¹鳥取大・GSC)

【目的】生体内には多くの繊維性タンパク質が存在している。エラスチンは弾性繊維タンパク質として知られており、同じ繊維性タンパク質のコラーゲンと相互作用して機能している。エラスチンの生成量は加齢に伴い減少して皺の原因となる。エラスチンはヒトだけでなくブタ、ウシなどの哺乳類や魚類などにも存在する。エラスチンは生体に必須のタンパク質であるが、会合様式や形態等の物性に関する知見は少ない。また、生体必須のエラスチンは美容品や医薬品への利用が期待されている。エラスチンは魚の動脈球に存在しているが、その多くは廃棄されている。魚類由来のエラスチンは哺乳類よりも安全性が高く、また資源循環型社会の構築の中で、動脈球からエラスチンを抽出して応用することは重要である。本研究では、魚の動脈球からエラスチンを精製し、その形態を観察することを目的とした。

【方法・結果】ハマチ、カツオの動脈球よりエラスチンを精製した。さらに精製したエラスチンをシュウ酸で再可溶化／分解し、温度応答性 α -エラスチンと β -エラスチンに分離した。得られた精製エラスチン、 α -エラスチンと β -エラスチンの形態を走査型電子顕微鏡で観察した。精製エラスチンは紐状と粒状の混同した形態が観察された。 α -エラスチンは繊維状の形態が観察されたが、高倍率下では球状の構造体も観察された。 β -エラスチンは粒状の形態であった。これらの観察結果から、エラスチンは他の繊維性タンパク質と異なり、異なる会合形態を有する α -エラスチンと β -エラスチンが会合してエラスチンの超分子構造を形成していることが示唆された。

C-2 海藻成分を用いたアミロイド線維形成阻害
○木下竣貴, 藤澤史帆¹, 藤瀬麻紗子, 鈴木宏和, 大城 隆, 八木寿梓²
(鳥取大院・工,¹鳥取大・工,²鳥取大・GSC)

【目的】アミロイド線維は、タンパク質やペプチドの異常凝集によって形成する線維状の凝集体で、アミロイドーシス発症の原因産物である。アミロイドーシスは発症してからの根治的治療は難しいため、発症を予防することが重要である。予防方法については普段の生活からの予防（食事）に注目が集まっている。本研究では海藻多糖の一つであり、多くの生理活性を有しているフコイダンによるインスリンのアミロイド線維形成に対する阻害効果を調べることを目的とする。

【方法・結果】インスリンのアミロイド線維形成条件は、0.5 mg/ml インスリン、2 M 塩酸グアニジン、20 mM リン酸水素ナトリウム、pH 7.0 の条件で調製し、試料溶液を 37°C で振盪して形成させた。この試料溶液に加水分解した種々のフコイダンを添加してアミロイド線維形成の影響を調べた。アミロイド線維の有無は、アミロイド線維特異性蛍光色素 Thioflavin T による蛍光測定で確認した。

モズク、ガゴメコンブとアカモクフコイダンをインスリン溶液に添加した結果、アカモクフコイダンに顕著なインスリンのアミロイド線維形成の阻害効果が見られた。透過型電子顕微鏡観察からアカモクフコイダンを添加すると、アミロイド線維は形成せず、不定形な凝集体を形成していることがわかった。また、生理活性の要因とされるフコイダン中の硫酸基はアミロイド線維形成阻害には関与していないことが示唆された。このことからインスリンのアミロイド線維形成阻害には未解明のアカモクフコイダンの構造との相関が考えられた。

C-3 食用藻類からの有用物質の抽出効率の比較 ○垣田浩孝, 小比賀秀樹, 江口結希 (産総研・健康工学)

【目的】ビタミン A は夜間視力維持および皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素である。カロテンは体内でビタミン A (レチノール) に変換されることからカロテン含有食品の重要性が指摘されている。海藻のカロテン含量は緑黄色野菜よりは少ないが淡色野菜よりは多い。食品中の有用物質の定量には高効率な抽出方法の確立が必要であるが、生物材料ごとに抽出方法は千差万別である。そこで、本研究では食用海藻コンブ粉末から高効率でカロテンを抽出できる条件を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】北海道で採取したコンブを洗浄後、凍結乾燥した粉末を食用海藻試料として用いた。実験開始まで試料は窒素充填した遮光瓶中で冷蔵保管した。コンブ凍結乾燥粉末 1 g に抽出溶媒 20 mL を加えて、遮光条件下で 2 時間振とう後、遠心分離により上澄みと残渣を分離した。上澄みをろ過し HPLC に添加した。カロテン標準品として市販カロテン (和光純薬製) を用いた。抽出液中のカロテン濃度はクロマトグラムのカロテンピーク面積を用いて算出した。分離カラムとして C-18 逆相カラムを用いた。検出は A450nm を用いた。エタノール抽出液中のカロテン含量がアセトン抽出液中のカロテン含量よりも高かった。またアセトン抽出液のクロマトグラムではエタノール抽出液のクロマトグラムに比して夾雑物が多く見られた。カロテンについてはエタノール抽出の方がアセトン抽出よりも適していることが示唆された。現在、他の抽出溶媒についても検討を行い、最適な抽出条件を検討中である。

C-4 タデアイ由来新規フラボノイドの構造決定と 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼ阻害活性 ○徳山翔太^{1,2}, 木村英人², 石原朋恵², 小川智史², 横田一成^{1,3} (¹鳥取大院・連農, ²寿製菓 (株), ³島根大・生資)

【目的】タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) は染料原料として知られている一方で、薬用植物として解毒、解熱、消炎などの目的で古くから利用されてきた。本研究では、タデアイに含まれるポリフェノール類の同定およびそれらのコレステロール生合成経路の律速酵素である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG)-CoA レダクターゼに対する阻害活性について検討した。

【方法および結果】タデアイ葉の 80%メタノール抽出物を UPLC-ESI-TOF/MS^E にて分析した。タデアイ葉の 80%メタノール抽出物には 11 種のフラボノイド類 (化合物 1-11) が多く含まれていることを確認し、さらにそれらの構造を ¹³C-NMR, ¹H-NMR, 2D-NMR, IR, UV 等により確認した。化合物 7-10 は化合物 11 (3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone) をアグリコンとするフラボノール配糖体であり、そのうち化合物 8-10 はこれまでに報告のない新規物質であることが分かった。タデアイ葉 80%メタノール抽出物を DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーに供して、50%, 70%および 100%メタノールの順に溶出する各々の画分に分画した。各画分における HMG-CoA レダクターゼ阻害活性を測定したところ、化合物 7-11 が含まれる 100%メタノール画分において HMG-CoA レダクターゼ阻害活性が高いことを確認した。化合物 7-11 を単離して HMG-CoA レダクターゼ阻害活性を調べたところ、いずれの化合物も HMG-CoA レダクターゼ阻害活性を示すことを確認した。以上の結果より、タデアイに含まれるフラボノイド類は HMG-CoA レダクターゼ活性を抑制しコレステロール産生を低下させる可能性が示された。

C-5 変性剤の疎水基がシトクロム c 変性に及ぼす影響
 ○小林伸弥, 藤井創太郎, 政成美沙, 松林伸幸¹, 三本木至宏
 (広島大院・生物圏, ¹大阪大・基礎工)

【目的】 蛋白質の構造変化・変性は、構造形成・フォールディングの逆過程であり、蛋白質が変性剤によってどのように影響を受け、変性するかを解明することは、蛋白質の構造安定性に関わる相互作用を知ることに繋がる。つまり、蛋白質の変性する仕組みを知ること、蛋白質の構造形成にあたり何が安定性に寄与しているか解明することが出来る。

本研究では、疎水性度の異なる各種のアルキル化尿素を変性剤として用い、各変性剤の疎水性度の違いによって蛋白質変性に及ぼす影響の違いが生じるかを知ることを目的とする。

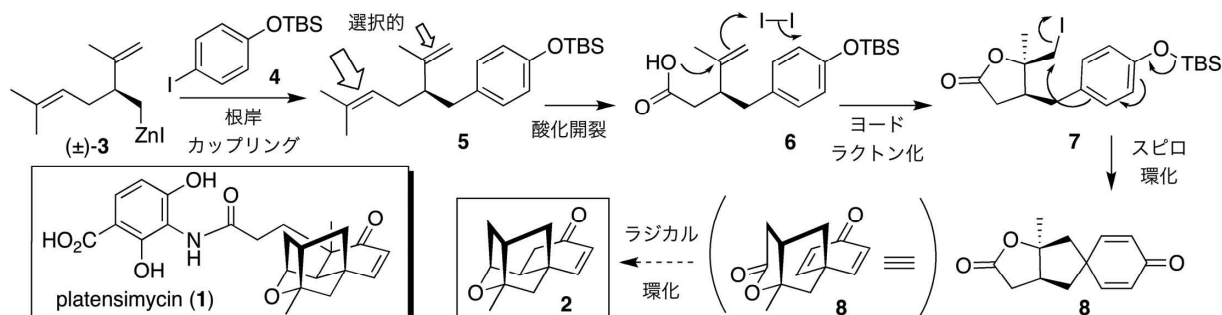
【方法・結果】 本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* 由来シトクロム c551 (PA) を用いて Urea, Monomethylurea (MMU), Monoethylurea (MEU) の三種を変性剤として変性実験を行なった。PA に、各変性剤を濃度別に希釈したものを加え、可視吸収スペクトルによりヘムに起因する Soret 帯吸収スペクトルを測定することで、各変性剤に対する PA の変性曲線を得た。得られた変性曲線を規格化することで変性中点 C_m を求め、変性剤ごとの変性効果の強弱を比較した。

その結果、PA に対しては疎水性度の大きい MEU, MMU, Urea の順に変性効果が大きいことが分かった。これにより、蛋白質の構造安定性に対して、疎水性相互作用が大きく寄与していると考えられた。

C-6 脂肪酸合成経路阻害物質 platensimycin の合成研究
 ○清田洋正, 佐藤恵里子¹, 桑原重文¹ (岡山大院・環境生命, ¹東北大院・農)

Platensimycin (**1**) は、2006 年土壌放線菌 *Streptomyces platensis* から単離された[1], 細菌の脂肪酸合成経路を選択的に阻害する抗生物質である。その特異な生物活性と構造から、新しい作用機序の薬剤リードとして注目を集め、数多くの合成研究が報告されている[2]。

ラバンジュロール誘導体 **3** とヨージド **4** の根岸カップリング成績体 **5** の三置換二重結合を選択的に酸化開裂し、カルボン酸 **6** を得た。これをヨードラクトン化したヨージド **7** のスピロ環化反応により鍵中間体 **8** を調製した。**8** 及び誘導体の環化反応によるテルペンコア骨格化合物 **2** への変換を検討中である。

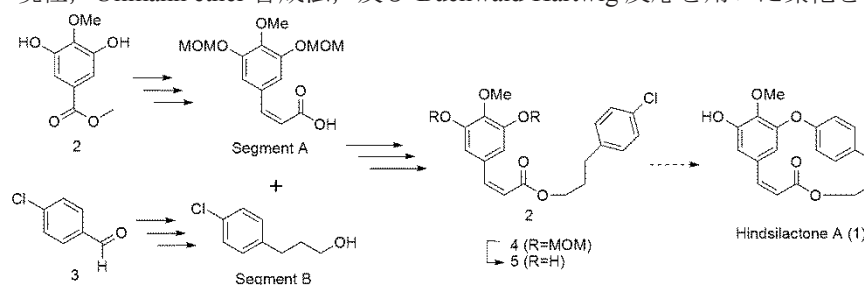


[1] J. Wang *et al.*, *Nature* **441**, 358 (2006). [2] M. Saleem *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 1534 (2011).

C-7 Hindsilactone A の合成研究
 ○稲見俊伸, 野下俊朗¹, 大内秀一²
 (県広大院・生命システム, ¹県広大・生命環境, ²近畿大・薬)

【目的】Hindsilactone A (1) はニシシギ科の *Celastrus hindsii* から単離され構造決定されたオキシネオリグナンである。本化合物はヒト癌細胞 HCT116 などに細胞毒性を示すことが報告されているものの全合成は未だ達成されていない。そこで本研究では hindsilactone A の全合成を目的とした。

【方法・結果】4-*O*-メチル没食子酸メチル (2) から 5 ステップで Segment A を, 4-クロロベンズアルデヒド (3) から 3 ステップで Segment B をそれぞれ合成した。得られた両 Segment を山口エステル化で重要中間体 4 とした。次いで 4 のメトキシメチル (MOM) 基を除去し, 環化前駆体であるエステル 5 の合成を完了した。現在, Ullmann ether 合成法, 及び Buchwald-Hartwig 反応を用いた環化を検討中である。



C-8 7-*O*-Alkyl hesperetin 類の脱顆粒抑制活性とヒアルロニダーゼ阻害活性
 ○野下俊朗, 田井章博, 池田 郁¹, 三浦香織¹
 (県広大・生命環境, ¹県広大院・生命システム)

【目的】代表的なフラバノンである hesperidin は柑橘類の果皮などに分布しており, 抗酸化, 抗菌, 抗アレルギー作用を持つことなどが報告されている。一方 RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制活性試験において hesperidin は脱顆粒を抑制しないものの, そのアグリコンである hesperetin は強い抑制活性を示すことが知られており, その活性には A 環 7 位水酸基の置換基が影響を与えていることが示唆される。しかし, この置換基に関する系統的な研究はなされておらず構造と活性の相関は明らかではない。そこで本研究では 7 位水酸基にアルキル基を導入した類縁体を調製し構造と活性の相関を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】既知の方法に従って hesperetin の 7 位水酸基にメチル基・エチル基・*n*-ブチル基およびベンジル基を導入した 7-*O*-alkyl hesperetin 類を用いてラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 の脱顆粒に対する抑制活性を β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性を指標として比較検討した結果, hesperetin の 7 位水酸基をメチル化した化合物は hesperetin および eriodictyol よりも高い脱顆粒抑制活性を示したのに対し, エチル基, *n*-ブチル基, ベンジル基が結合した化合物は抑制活性をもたないことが判明した。7-*O*-メチル化が脱顆粒抑制活性の亢進に繋がるとの先行知見はなく本研究で初めて明らかになったことである。一方, これらの 7 位水酸基を修飾した類縁体のヒアルロニダーゼ阻害活性は hesperetin と同等の弱い活性であり, 7 位水酸基の官能基置換は無効である事が判明した。

C-9 カヤの実に含まれるマウス大腸ガン細胞増殖抑制物質
○高橋詩織, 羽二生綾, 葛間秀徳, 柏木丈弘, 金 哲史, 渡邊浩幸¹,
前川穎司² (高知大・農,¹高知県大・健康栄養,²(株)前川種苗)

【目的】カヤは高知県でも盛んに栽培されているイチイ科カヤ属に属する雌雄異株の常緑針葉高木である。生長は極めて遅く主な用途である碁盤や将棋盤の材料として利用できるようになるには 300 年もかかる。その間の間伐により出た木材や実などは利用法がなく、ほとんどが破棄処分されている。そこでこれらの資源を有効利用するために、カヤに含まれる機能性成分の探求を行い、これまでにカヤの実に含まれる抗酸化物質等を明かとしてきた。本研究では、カヤの実由来のマウスの大腸ガン細胞増殖抑制物質の単離と構造解析を行った。

【方法・結果】カヤの実を MeOH で抽出し、得られた粗抽出物を水と Hexane で液々分配し、細胞試験を行った結果、Hexane 層に粗抽出物と同等のマウスの大腸ガン細胞増殖抑制活性が認められた。そこで、これをシリカゲル中圧カラムにチャージし、5%, 10%, 30%, 50%, 70% Ether/Hexane (E/H), 100% Ether で順次溶出させたところ、5%, 10%, 30%, 70% E/H 画分に活性が認められ、その中でも特に 5%, 30% E/H 画分に強い活性が見られた。このうち、30% E/H 画分を順相系のカラムを用いて HPLC で 4 つの画分に分離したところ、単独のピークに元の画分と同等の活性が認められた。このピークに含まれる化合物を単離・精製し、NMR 等の各種機器分析に供した結果、カヤ実中の成分として報告されている 18-hydroxyferruginol であると示唆された。

C-10 動物の消化器官に含まれるコンドロイチン硫酸の含有量と組成の分析
○上田健人, 藤田裕之, 武田尚子¹, 田村純一
(鳥取大・地域環境,¹鳥取大・産学地域連携)

【目的】コンドロイチン硫酸 (CS) はグリコサミノグリカン的一种であり、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-ガラクトサミンからなる二糖繰返し構造をもつ直鎖多糖である。CS は、硫酸基の数や配置によって、A 型や E 型のようなサブクラスに分類される。CS は動物に普遍的に存在しており、生物や部位によって CS の硫酸化パターンや含有量が異なることが知られている。本研究では、異なる動物における消化器官に含まれる CS の硫酸化パターンと含有量に注目した。ここでは、ブタ・ニワトリ・コイ・マグロのそれぞれの消化器官などに含まれる CS を部位ごとに単離し、その含有量と硫酸化パターンについて解析したので報告する。

【方法と結果】対象となる動物の消化器官を部位別に粉砕し、脱脂、タンパク質分解とエタノールによる粗糖鎖の沈殿形成を行った。得られた粗糖鎖は、イオン交換樹脂と透析、ゲルろ過を用いて精製した。精製糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC により二糖単位まで分解し、HPLC によって得られた不飽和二糖の組成分析を行った。その結果、いずれのサンプルにおいても CS の含有が確認され、硫酸化パターンと含有量を明らかにした。また、それぞれのサンプルにおいて、硫酸化パターンと硫酸化度にある程度の共通した傾向がみられた。

C-11 オオムギ属植物における防御関連二次代謝産物の分布
○宇部尚樹, 西坂美穂¹, 武田 真², 石原 亨¹
(鳥取大院・農,¹鳥取大・農,²岡山大・植物研)

【目的】オオムギ属は 31 種に分類され、ゲノム構成から 4 群 (H, Xa, Xu, および I) に大別される。オオムギ属植物には、防御関連二次代謝産物として、トリプトファン経路に由来するベンゾキサジノン類 (Bx 類) やグラミンが存在する。加えて、ヒドロキシ桂皮酸アミドの *p*-クマロイルアグマチン (*p*-CA) およびその二量体のホルダチン A (HA) なども蓄積することが知られている。しかし、オオムギ属植物におけるそれら化合物の分布については不明な点が多い。本研究では、オオムギ属の代表的な種における防御関連二次代謝産物の分布を調査し、進化の過程でそれぞれの化合物の合成経路をどのように獲得あるいは喪失したのかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】オオムギ属 10 種の幼苗から、メタノール抽出を行った。抽出液を逆相 HPLC により分析し、Bx 類、グラミン、*p*-CA、および HA の蓄積を調べた。I クレードの種は全て Bx 類を蓄積した。また、グラミン蓄積の有無で種間差がみられた。*p*-CA と HA の顕著な蓄積は見られなかった。Xa クレードに属する *Hordeum marinum* は、Bx 類のみを蓄積した。Xu クレードの *H. murinum* はいずれの化合物も蓄積しなかった。H クレードの *H. vulgare* ssp. *vulgare* と *H. vulgare* ssp. *spontaneum* は Bx 類を蓄積せず、*p*-CA と HA を顕著に蓄積した。*H. vulgare* の大部分の系統がグラミンを蓄積したが、蓄積しない品種もみられた。Bx 類がイネ科植物に広く分布することを考えると、オオムギ属植物の進化の過程において、Bx 類の生合成が欠落し、HA の生合成が獲得されることにより、防御機構のシフトが生じたものと考えられた。

D-1 血管内皮におけるプレニルケルセチンによるヘムオキシゲナーゼ 1 誘導に関するシグナル経路の検討
○庄野裕美, 齋藤豪紀, 佐藤伸哉, 河村知志, 根本尚夫, 寺尾純二, 向井理恵
(徳島大院・医歯薬)

【目的】ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) は、酸化ストレスから細胞を保護する生体防御機構として重要な抗酸化酵素であり、血管内皮細胞の機能維持に重要な役割を果たしている。これまでに、プレニル基が結合したケルセチン (Q) は Q に比べて血管内皮細胞における HO-1 誘導活性が高く、なかでも 6 位にプレニル基が結合した 6-プレニルケルセチン (6PQ) は最も高い誘導活性を有することをわれわれは明らかにした。HO-1 遺伝子発現には転写因子 Nrf2 とその上流に位置する MAPK 経路が関与するという報告がある。そこで本研究は、血管内皮での HO-1 誘導における 6PQ の優越性と、誘導機構への Nrf2 および MAPK 経路の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) に Q, 5'-プレニルケルセチン, 6PQ, 8-プレニルケルセチンを 3 時間処理後の細胞内量を比較した結果、6PQ が最も顕著に蓄積することが示された。6PQ の 1 時間処理では、Nrf2 量の細胞内増加と核内移行が確認されたが、HO-1 誘導能が低い Q にも Nrf2 量の増加効果が確認された。したがって 6PQ による HO-1 の誘導には Nrf2 以外の転写因子の関与も存在することが推察された。次に、ERK, p38 あるいは JNK のリン酸化阻害剤と 6PQ を HUVEC に同時に作用させたところ、ERK と p38 のリン酸化阻害剤によって 6PQ による HO-1 の誘導が抑制された。

以上の結果から、6PQ の細胞内高蓄積性が高い HO-1 誘導活性の一因であることが示唆された。さらに 6PQ による HO-1 誘導には ERK と p38 のリン酸化が必要であることが明らかになった。

D-2 Suppressive effect of prenylflavonoids on atrogen-1 expression in C2C12 mouse myotubes.
○林 珮儀, 齋藤豪紀, 河村知志, 根本尚夫, 寺尾純二, 向井理恵
(徳島大院・医歯薬)

【Purpose】Prenylflavonoids that have potential biological effects are found in *Leguminosae*, *Moraceae* and *Guttiferae*. Skeletal muscle is the largest tissue in the body, and it plays an important role in protein maintenance. Atrogen-1/MAFbx (atrogin-1), one of ubiquitin ligase E3s, is critical in developing muscle atrophy. Our preceding study demonstrated that prenylation of flavonoids is advantageous in the prevention of muscle atrophy by suppressing atrogen-1 expression (Mukai, *PLoS One*, 2012). In this study, we estimated suppressive effect of prenylflavonoids on the expression of atrogen-1 in mouse C2C12 myotubes.

【Method/result】C2C12 mice myoblasts were grown up in DMEM including 10% fetal bovine serum, and then DMEM containing 2% horse serum was used for differentiation for 48 hours. LPS was treated to myotubes at 100 ng/ml for 2 hours in order to induce atrogen-1 expression. Prenylflavonoids was treated at 10 μ M for 4 hours prior to LPS stimulation to estimate the suppressive effect. Total RNA was isolated and cDNA was obtained. Real time PCR was performed to measure the relative expression of atrogen-1. The relative expression of LPS was 2.58-fold compared with control cells. 6-Prenylquercetin (6PQ) was the most effective prenylflavonoid in the suppression of atrogen-1 expression among three prenylflavonoids we synthesized for this study. Cellular uptake of 6PQ was higher than that of non-prenylated quercetin. Higher uptake into the cell may be one of the reasons to explain this suppressive effect. 6PQ will be a promising flavonoid for the prevention of muscle atrophy.

D-3 高血圧ラットにおける代謝制御ネットワーク
○磯田武志, 青木真美子, 山本由紀子¹, 山本和彦
(近畿大院・工, ¹近畿大・ライフサイエンス研)

【目的】高血圧症や糖尿病, 脂質代謝異常をリスクファクターとするメタボリックシンドロームは, 遺伝的要因を基礎とし環境要因が発症や疾患の進展に深く関与している。これらの発症には, 関連する様々な因子が関わり, 疾患のネットワークを形成している。各々の疾患に関連する因子が他の疾患においても重要な役割を果たしている。病態時における, 細胞内での代謝機構や転写調節の乱れにより炎症やアポトーシスなどを誘発し発症に至ると考えられる。このように, 疾患の発症機構は非常に複雑であるため解明には至っておらず研究の進展が望まれている。細胞内エネルギーセンサーとして知られる AMPK (AMP-activated protein kinase) は, 代謝調節のもっとも重要な因子の一つで, AMP により活性化されるセリン/スレオニンキナーゼである。Foxo (Forkhead box protein) 転写因子ファミリーは, 代謝をはじめ幅広い生体反応に関わっている。本研究では, 高血圧自然発症ラット (SHR/kpo, SHRSP/kpo, M-SHRSP/kpo) を用い, 各臓器における AMPK や Foxo など, 代謝関連因子の遺伝子発現や多型を解析し, 高血圧症と代謝制御ネットワークとの関連性を調べた。

【方法・結果】ラットの各組織から全 RNA を抽出し, cDNA 合成を行い RT-PCR 法により目的遺伝子の発現量を調べた。また, 増幅された遺伝子の塩基配列を調べ遺伝子多型を確認した。最も血圧が高く, 脳卒中発症頻度も高い M-SHRSP/kpo の肝臓では, G6Pase (Glucose 6-phosphatase) の発現が見られず, 血糖調節機構に重大な問題を抱えていることが示唆され, 関連する糖や脂質代謝経路に興味を持たれる。

D-4 複数遺伝子クローニングシステムによるシロイヌナズナへの 5 遺伝子導入と発現解析
○税所利基, 芝原健太, 木村哲哉¹, 中川 強
(島根大・総科セ, ¹三重大院・生物資源)

近年, タンパク質複合体の細胞内機能や局在の解析などを目的として複数遺伝子を簡便に植物に導入し, かつ安定に発現させることができる植物形質転換システムが必要となっている。本研究室では Gateway テクノロジーを用いた植物用複数遺伝子形質転換システムの開発を進めている。Gateway テクノロジーでは目的の DNA 配列の前後に att 配列を付加したエントリークローンを初めに作製し, その後 att 配列の組み換え反応を触媒する酵素によって部位特異的組み換え反応を制御することで種々のベクターに目的の DNA 配列を挿入することができる。この組み換えシステムを用いた Gateway リサイクリングクローニングシステムでは制限酵素の認識配列などを気にする必要なく, どのような遺伝子であっても同様の部位特異的組み換え反応を繰り返すことで簡便に複数の遺伝子を持つ発現ベクターを作製することができる。これまでに, 共通して用いるプロモーターに NOS プロモーターを用い, さらに核マトリックス付着領域 MD8 を全ての NOS プロモーターの上流に組み込むことで複数遺伝子の発現が安定化することが BY-2, トマトにおいて示唆されており, 5 遺伝子の同時発現が確認されている。シロイヌナズナにおいても MD8 を組み込んだ 3 遺伝子コンストラクトと MD8 を組み込んでいない 3 遺伝子コンストラクトをそれぞれ導入した植物の発現を比較することで MD8 が複数遺伝子の安定発現に有効に働くことが示唆されている。今回はこのクローニングシステムによって作製した 5 遺伝子コンストラクトをシロイヌナズナに導入し, それぞれの遺伝子の発現を解析したので結果を報告する。

D－5 シロイヌナズナにおける被覆小胞による液胞輸送経路の解析
○高畑周平，松波絵理香¹，吉田昇平¹，中川 強¹，地阪光生，長屋 敦，
横田一成，西村浩二¹（島根大・生物資源，¹島根大・総科セ）

クラスリン被覆小胞（Clathrin-coated vesicle, CCV）は，植物タンパク質の膜小胞輸送を担う主要な輸送小胞であり，植物タンパク質をトランスゴルジ網（TGN）から液胞へと輸送する液胞輸送経路と細胞膜（PM）からのエンドサイトーシス経路の少なくとも2つの経路を担っていると考えられている。CCVの被覆タンパク質はクラスリンとアダプタータンパク質（Adaptor protein, AP）複合体の二種類の被覆タンパク質からなる。AP複合体は多様な輸送経路を分担しており，ヘテロ四量体から構成され，そのサブユニットである μ アダプチンはCCVで運ばれる積荷タンパク質を選抜することが広く知られている。植物の液胞選別受容体（VSR）はTGNにおいて液胞タンパク質を特異的に選抜し，液胞への輸送を担う一回膜貫通型受容体である。これまでに当研究室の解析により，シロイヌナズナVSR4は主にTGN，後期エンドソーム（LE）あるいはPMに局在することが示されている。シロイヌナズナVSR4はCCVによる液胞輸送経路によりTGNからLEまで輸送されると，LE内で液胞タンパク質を遊離し，リサイクル経路によりTGNに輸送されて再利用されることが考えられているが，VSR4を認識する輸送小胞側の仕組みの詳細は明らかではない。そこで本研究ではVSR4の細胞質領域の積荷認識配列に着目し，VSR4と膜輸送小胞の被覆タンパク質間の相互作用について，二分子蛍光相補（Bimolecular fluorescence complementation）法により解析を行った。その結果，VSR4のTGNとLE間の輸送にクラスリン-AP1複合体とレトロマー複合体が関わることが強く示唆された。

D－6 ピオーネ加温ハウス栽培におけるCO₂施肥の影響
○森 泉，河西康宏¹，平松竜一²
（岡山大・植物研，¹きびじ農業後継者ク，²岡山県・倉敷農業普及指導セ）

【目的】 岡山県は生食用ブドウの加温栽培が盛んである。樹勢の改善と日照不足の解消を目的として，1500 ppm程度のCO₂施肥をする場合があるが，その有効性については農家の間でも意見が分かれている。本研究では，CO₂施肥の効果を明らかにするために，岡山県総社市のピオーネの生産圃場を使い，CO₂施肥区と慣行区において光合成特性および成長，果皮におけるアントシアニン蓄積を測定し比較した。

【方法・結果】 初期成長を比較するために，葉面積指数（LAI）を調査した。開花後，新梢を摘心するまでの時期ではCO₂施肥区でLAIが最大40%増加していた。およそ70%が開花し，ジベレリン処理に適した日が，CO₂施肥区では4日早まった。また，出荷適期もおおよそ1週間早まった。

明け方のハウス内のCO₂濃度は慣行区ではおよそ900 ppmであり，施肥区ではおよそ1800 ppmだった。いずれの区でも日の出からCO₂濃度は徐々に低下し，ハウス内の気温が30℃に達してビニールを解放すると380 ppm程度になりこれは夕方まで継続した。午前8時以前・正午・午後5時以降の典型的な条件を模した条件で，両区の光合成速度を測定した。午前8時以前の条件でのみ光合成速度に有意差が見られ，CO₂施肥区が高かった。結果からCO₂施肥区では高CO₂濃度による光合成の低下調節が抑制されていることが示唆された。

果皮のアントシアニン蓄積はCO₂施肥により影響されなかった。

D-7 孔辺細胞内の一酸化窒素レベルと活性酸素種レベルがアブシシン酸誘導気孔閉口に与える影響

○仙波貴雅, Rayhanur Jannat, 森 泉¹, 宗正晋太郎, 中村宜督, 村田芳行
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・植物研)

【目的】植物には、一对の孔辺細胞に囲まれた気孔と呼ばれる小孔がある。植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) は、乾燥ストレスに応答して生合成され、気孔閉口を誘導する。その結果、蒸散による水分損失が減少する。ABA 信号伝達における活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素の関与が明らかになっている。

カタラーゼは ROS 消去酵素の一つである。過去の研究より、シロイヌナズナカタラーゼ欠損変異株 (*cat3-1*, *cat1 cat3*, *cat2-1*) では、野生株と比べて ABA 未処理の場合、恒常的な ROS 蓄積が増加しているにも関わらず、気孔の開度に差は見られないことが明らかとなった。しかし、カタラーゼ欠損変異株において、ABA によって誘導される ROS 蓄積の増加と気孔閉口は、野生株と比べて増強されていた。これらの結果は、恒常的な ROS レベルの上昇ではなく、ABA によって誘導される ROS レベルの上昇が気孔閉口誘導に必要であることを示す。しかし、ABA 信号伝達経路において、ROS の下流で働く一酸化窒素レベルが気孔の開度の制御に与える影響は調べられていない。本研究ではカタラーゼ欠損変異株を用いて、それらを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】カタラーゼ欠損変異株における恒常的な ROS レベルの上昇が一酸化窒素蓄積に与える影響と、一酸化窒素ドナー (sodiumnitroprusside と *S*-nitroso *N*-acetylpenicillamine) が誘導する気孔閉口と一酸化窒素蓄積とに与える影響を調べた。これらの実験結果は、恒常的な一酸化窒素蓄積ではなく、ABA によって誘導された一酸化窒素蓄積が気孔閉口を誘導することを示唆した。

D-8 ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口におけるアブシシン酸受容体 (PYR/PYL/RCAR) の関与

○銀 叶, 足立優司, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉¹, 村田芳行
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・植物研)

【目的】ジャスモン酸メチル (MeJA) は、植物の傷害刺激の応答および防御を調節する植物ホルモンである。MeJA は、気孔閉口を誘導し、活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素 (NO) の産生、および細胞質アルカリ化を引き起こす。また、植物ホルモンの一種であるアブシシン酸 (ABA) も気孔閉口誘導、ROS や NO 産生および細胞質アルカリ化を引き起こす。MeJA 誘導気孔閉口には内生の ABA が要求されること、さらに ABA 受容体により直接制御されるタンパク質脱リン酸化酵素 2C 型 (PP2Cs) が MeJA 誘導気孔閉口に関与することが明らかにされている。以上のことから MeJA 信号伝達経路への ABA 信号伝達の初期応答因子の関与が予想されるが、その詳細な機構は未解明である。そこで本研究では、ABA 信号伝達の初期応答における重要であり、PP2Cs を直接制御する ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR の MeJA 誘導気孔閉口における関与を調査した。

【方法・結果】ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR の変異体として *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* 四重変異体と *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4/pyl5/pyl8* 六重変異体を使用した。四重変異体では MeJA 処理による気孔閉口は野生株と変わらなかった。一方、六重変異体では MeJA 処理による気孔閉口は抑制された。四重変異体孔辺細胞において MeJA による ROS と NO の産生および細胞質アルカリ化が誘導されたが、六重変異体孔辺細胞において ROS の産生は誘導されなかった。野生株の葉では、MeJA 処理により ABA 量がわずかに増加した。

D-9 孔辺細胞内における GSSG に対する GSH 比のリアルタイム測定
○横井隆志, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉¹, 村田芳行
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大・植物研)

【目的】植物は乾燥ストレスに応答し、一对の孔辺細胞で形成される小孔である気孔を閉口する。乾燥ストレスに応答した気孔閉口は、植物ホルモンであるアブシシン酸 (ABA) 信号伝達を介して誘導される。還元型グルタチオン (GSH) は細胞内に多く存在するトリペプチドである。孔辺細胞内の GSH は ABA 誘導気孔閉口を負に制御するが、その具体的なメカニズムは明らかになってはいない。また、孔辺細胞内における GSH 濃度は、ABA 誘導気孔閉口に伴い減少することが過去の研究により明らかになっているが、その減少メカニズムも明らかになってはいない。孔辺細胞内における酸化型グルタチオン (GSSG) に対する GSH の比は、ABA 誘導気孔閉口に伴う GSH 濃度変化、さらには GSH による ABA 誘導気孔閉口の制御機構を理解するための重要な手掛かりとなるが、同一孔辺細胞における非破壊的かつリアルタイムでの測定する方法はいまだ確立されてはいない。本研究の目的は、蛍光プローブを用いた孔辺細胞における GSSG に対する GSH の比を測定する系を確立し、ABA 誘導気孔閉口に関する GSH の役割を解明することである。

【方法・結果】本研究では、孔辺細胞で特異的に発現する GC1 遺伝子のプロモーターを用いて、GSSG に対する GSH の比に応答する蛍光プローブタンパク質を発現するシロイヌナズナを作出した。その後、作出した遺伝子組換え植物が ABA 処理に応答した気孔閉口を起こすかどうか、そして GSH 除去試薬を用いて、孔辺細胞内のグルタチオン濃度比の変化に応答して蛍光プローブが作動するかを確かめた。

D-10 イソチオシアネート基を持つ化合物に対する気孔応答
○大熊英治, Md. Sarwar Jahan, 宗正晋太郎, 中村宜督, 村田芳行
(岡山大院・環境生命)

気孔は植物表面に存在する一对の孔辺細胞に囲まれた小孔である。植物は、種々の低分子化合物に応答した気孔の開閉運動を行う。

イソチオシアネート (ITC) は、求電子性の ITC 基 ($-N=C=S$) を持つ低分子化合物である。ベンジル ITC とスルフォラファンがベルベットリーフの成長を抑制すること、フェネチル ITC などが、シロイヌナズナの成長を抑制することなどが報告されているが、ITC の孔辺細胞での生理的役割に関する報告は少ない。

我々は以前の研究で、アブラナ科植物に含まれるグルコシノレートの分解物であるアリル ITC が孔辺細胞での活性酸素種の蓄積およびグルタチオンの減少を伴い、気孔閉口を誘導することを示した。しかし、アリル ITC 誘導気孔閉口のメカニズム、例えば ITC 基の孔辺細胞での役割は明らかではない。

本研究では、四種類の ITC (アリル ITC, ベンジル ITC, フェネチル ITC, およびスルフォラファン) が気孔口径、孔辺細胞内の活性酸素種の蓄積およびグルタチオンの蓄積に与える影響を調査し、ITC 基に対する気孔の応答メカニズムを解明する手がかりを得ることを目的とした。

D-11 アリルイソチオシアネートによる内向き整流性 K^+ チャネルの抑制と光誘導気孔開口の阻害における Ca^{2+} 非依存性信号伝達経路
○叶 文秀, 大熊英治, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉¹, 村田芳行
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・植物研)

孔辺細胞は、葉の表皮にある気孔を形成し、乾燥、傷および病原菌の侵入など様々な非生物的または生物的刺激に応答する。イソチオシアネートは、作物であるアブラナやモデル植物であるシロイヌナズナのようなアブラナ科植物に存在するグルコシノレートの分解産物であり、主に葉などが損傷したときに生成する。シロイヌナズナにおいて、アリルイソチオシアネート (AITC) は、孔辺細胞の細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) 上昇および気孔開口を誘導する。しかし、AITC が誘導する気孔運動における $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇の役割は十分に解明されていない。本研究では、シロイヌナズナを材料として、AITC が誘導する気孔運動における $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇の役割を調査した。

AITC は、濃度依存的に光誘導気孔開口を阻害した。 Ca^{2+} のキレート剤 (グリコールエーテルジアミン四酢酸)、原形質膜 Ca^{2+} チャネル阻害剤 (La^{3+}) および環状アデノシン二リン酸リボース合成阻害剤 (ニコチンアミド) は、AITC が誘導する孔辺細胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇を阻害したが、光誘導気孔開口は阻害しなかった。AITC は、 Ca^{2+} 非依存的に孔辺細胞原形質膜内向き整流性 K^+ チャネルの活性を阻害した。以上の結果から、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇は AITC による向き整流性 K^+ チャネルの抑制と光誘導気孔開口阻害には必要ではないことが示された。

賛 助 企 業

- ・(株)旭製作所
- ・天野エンザイム(株) 岐阜研究所
- ・アルファー食品(株)
- ・アルファバイオ(株)
- ・(株)井ゲタ竹内
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・岡山県酒造組合
- ・(社)岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・(株)海産物のきむらや
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・(株)機能性食品開発研究所
- ・杏林予防医学研究所
- ・協和発酵バイオ(株)
山口事業所生産技術研究所
- ・キリンビール(株) 岡山工場
- ・(株)近畿日本ツーリスト中国四国岡山支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・(株)サンキ精機
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)酔心山根本店
- ・正晃(株) 山口営業所
- ・(株)大愛
- ・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)
- ・高塚ライフサイエンス(株)
- ・(有)タグチ
- ・中国ケミー(株)
- ・帝國製菓(株)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製菓(株)
- ・マルトモ(株)
- ・(株)宮田薬品
- ・ヤスハラケミカル(株)
- ・ヤマキ(株)
- ・(株)やまだ屋
- ・(有)藍布屋 (五十音順)

2015年5月3日現在 58社

日本農芸化学会中四国支部第42回講演会

世話人：大城 隆

連絡先：鳥取大学大学院 工学研究科

T E L：0857-31-5269

E-mail：ohshiro@bio.tottori-u.ac.jp

支部からのお知らせ

1. 日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会（中四国支部第43回講演会）
開催日：2015年9月17日（木）～18日（金）
場 所：愛媛大学
内 容：シンポジウム，一般講演
講演申込締切：7月31日（金）
講演要旨締切：8月7日（金）
世話人：柿沼喜己（愛媛大学）
2. 支部創立15周年記念第44回講演会（支部例会）
開催日：2016年1月23日（土）
場 所：岡山県立大学
内 容：受賞講演，一般講演
世話人：伊藤秀之（岡山県立大学）

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒783-8502 高知県南国市物部乙 200
高知大学総合研究センター
遺伝子実験施設内
支部ホームページ：<http://jsbba-cs.jp>
E-mail：jsbbacs@kochi-u.ac.jp