

日本農芸化学会中四国支部
第14回講演会

講演要旨集

日時:2006年1月28日(土)

場所:福山大学1号館

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14回講演会
福山大学グリーンサイエンス研究センター共催
プログラム

受賞講演・特別講演（1号館大講義室）

2005年度日本農芸化学会賞受賞講演(13:00-13:35)

「酵母 Ca^{2+} シグナルの機能に関する分子生物学的研究」

宮川 都吉（広島大学大学院・先端物質科学研究科）

座長 藤田 泰太郎（福山大・生命工・生物工）

2005年度農芸化学奨励賞受賞講演(13:35-14:00)

「動物の新規酵素の探索とホスホジエステラーゼ類に関する基盤的研究」

矢中 規之（広島大学大学院・生物圏科学研究科）

座長 秦野 琢之（福山大・生命工・生物工）

特別講演（14:00-14:35）

「葉緑体での活性酸素の生成と消去」

浅田 浩二（福山大学・生命工学部）

座長 里内 清（福山大・生命工・応用生物）

一般講演（14:45-17:20）

（A会場：中講義室 01104、B会場：中講義室 01105）

・次ページにプログラム・

一般講演プログラム（発表10分、質疑2分）

< A 会場：一号館中講義室 01104 >

座長 壺井 基夫（福山大・生命工・生物工）

14:45~

A 1 . 卵白タンパク質の加熱不溶化に及ぼすホスビチンの抑制効果と加熱ゲルへの適用

吉賀 陽子、 松富 直利

（山口大・農・生物機能）

14:57~

A 2 . 鶏卵白アルブミンのタンパク間相互作用に及ぼす SH 基の役割

中 嵩志、伊藤 一成、松富 直利

（山口大・農・生物機能）

15:09~

A 3 . 酵母での品質管理機構における鶏卵白アルブミンの糖鎖の役割

伊藤 一成、瀬利 亜紀子、松富 直利

（山口大・農・生物機能）

座長 山本 覚（福山大・生命工・生物工）

15:21~

A 4 . 出芽酵母 *spc110* 変異株の取得と解析

長松 浩史、松崎 浩明、秦野 琢之

（福山大・生命工・生物工）

15:33~

A 5 . 出芽酵母の染色体からのセントロメア配列切り出しによる細胞死の誘導

杉江 奈緒子、松崎 浩明、秦野 琢之

（福山大・生命工・生物工）

15:45~

A 6 . Comparison of structures of alcohol dehydrogenases and their expression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*

N. Lertwattanasakul¹, K. Sootsuwan¹, S. Limthong², P. Thanonkeo³, and M. Yamada¹, (¹Dep. of Biol. Chem., Fac. of Agri., Yamaguchi Univ., ²Dep.of Microbiol., Fac. of Sci., Kasetsart Univ., ³Dep. of Biotech., Fac. of Tech., Khon Kaen Univ.)

—休憩—

座長 岩本 博行 (福山大・生命工・応用生物)

16:02~

A 7 . 細胞分裂阻害物質 phenylahistin 生産系状菌 *Aspergillus ustus* 由来の
cyclo(Leu-Phe)酸化酵素により変換される新規二次代謝産物

神崎 浩, 杉原 孝治, 平田 里枝, 仁戸田 照彦

(岡山大院・自然科学)

16:14~

A 8 . *Eikenella corrodens* の表層レクチンによる歯周病原性

阿座上 弘行¹、秋道 宏美¹、中島 弘¹、恵比須 繁之²、加藤 昭夫¹

(¹山口大・農・生物機能、²阪大院・歯・保存)

16:26~

A 9 . 高温性水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* の硫黄酸化酵素群の解析

三宅 大輔¹、小田 高広²、西原 宏史²、三本木 至宏¹

(¹広島大院・生物圏、²茨城大農)

座長 松崎浩明 (福山大・生命工・生物工)

16:38~

A10. 超好熱菌 *Thermotoga maritima*, 及び *Pyrobaculum aerophilum* 由来

2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) の特徴と磁性化

野々下 理絵、吉原 久美子、下家 郁子、櫻庭 春彦、大島 敏久

(徳島大工・生物工)

16:50~

A11. 枯草菌の分岐鎖アミノ酸合成オペロン (*ilv-leu*) の転写制御解析

東條 繁郎、里村 武範、広岡 和丈、藤田 泰太郎

(福山大・生命工・生物工)

17:02~

A12. 枯草菌の脂肪酸分解レギュロンの機能解析

松岡 浩史、広岡 和丈、藤田 泰太郎

(福山大・生命工・生物工)

< B 会場：中講義室 01105 >

座長 廣瀬 順造（福山大・生命工・応用生物）

14:45~

B 1 . ポリスチレン表面に親和性を示すペプチドタグを付加した酵素の設計と特性解析
今石 大輔¹、熊田 陽一¹、今中 洋行¹、今村 維克¹、崎山 高明²、中西 一弘¹
（¹岡山大院・自然科学、²東京海洋大・海洋科学）

14:57~

B 2 . クローン化ヒドラターゼ-アルドラーゼの精製と、その逆反応を利用した - 不飽和ケトンの合成
田中 愛子、石井 一二三、滝澤 昇
（岡山理大・工・応用化学）

15:09~

B 3 . 植物起源の異なる澱粉の Naegeli amyloextrin の微細構造
堀端 哲也、中浦 嘉子、井ノ内 直良
（福山大・生命工・応用生物）

座長 井ノ内直良（福山大・生命工・応用生物）

15:21~

B 4 . イネ胚乳の澱粉分解酵素に関する研究
山崎 良樹、前川 雅彦、今野 晴義
（岡山大・資生研）

15:33~

B 5 . ウィスキー及びその樽材抽出物の生理活性
原口 博行¹、山崎 志穂¹、末光 友和¹、小玉 亜矢子¹、諏訪 芳秀²、輿水 精一²
（¹福山大・生命工・生物工、²サントリー）

15:45~

B 6 . キャベツの咀嚼に伴って生成するリゾホスファチジン酸
堀内 剛、田中 保、平野 薫、里内 清
（福山大・生命工・応用生物）

—休憩—

座長 太田 雅也 (福山大・生命工・生物工)

16:02~

B 7 . 共役エイコサペンタエン酸(EPA)の DNA ポリメラーゼ阻害活性とヒト癌細胞増殖抑制メカニズムの解析

瓜生 圭介¹、米澤 裕子²、都築 毅³、永塚 貴弘⁴、宮澤 陽夫⁴、吉田 弘美^{2,5}、
羽田 尚彦¹、水品 善之^{2,5}

(¹備前化成(株)、²神戸学院大・栄養、³宮城大・食産業、⁴東北大院・農、⁵神戸学院大・ライフサイエンス)

16:14~

B 8 . 卵黄タンパク質分解物のヒトに対する降圧作用

金田 輝之¹、羽田 尚彦¹、野村 政孝²、青野 祥子²、高山 房子²、栗木 隆吉³、
戸部 和夫⁴、川崎 博己²

(¹備前化成(株)、²岡山大院・薬、³県畜産セ、⁴岡山大・保健セ)

16:26~

B 9 . 脂溶性物質のマイクロエマルジョンへの可溶化とバイオアベイラビリティの評価

眞鍋 珠美¹、田辺 創一¹、西村 敏英¹、長尾 昭彦²、上野 聡¹、佐藤 清隆¹、

(¹広島大院・生物圏、²食総研)

座長 原口 博行 (福山大・生命工・生物工)

16:38~

B10 . ステロイドホルモン受容体および他の NR ファミリーメンバーの協調的進化における2量体形成が果たす役割

阿部 俊之助、佐々木 栄二、岸田 太郎、海老原 清

(愛媛大・農)

16:50~

B11 . イエシロアリ兵隊カーストの額線分泌タンパク質の解析とその遺伝子のクローニング

板屋 剛、池口 陽子、藤島 夕子、太田 雅也、山本 覚、松浦 史登

(福山大・生命工・生物工)

17:02~

B12 . Aminopeptidase B 中の活性部位の性質

廣瀬 順造¹、深沢 加与子²、岩本 博行¹、松岡 昭治¹、西本 直代¹

(¹福山大・生命工・応用生物、²松本歯科大)

受賞講演・特別講演

講演要旨

酵母 Ca^{2+} シグナルの機能に関する分子生物学的研究

広島大学大学院・先端物質科学研究科 宮川 都吉

Ca^{2+} は、真核生物細胞のセカンドメッセンジャーとして広範な細胞機能の調節に関わっている。私は酵母をモデル真核生物として研究し、 Ca^{2+} シグナル伝達系のキー酵素 カルシニューリン (CaN) の遺伝子を発見し、生理機能を追究してきた。特に、真核生物で始めて Ca^{2+} を介する細胞周期制御を発見し、全貌を分子レベルで明らかにした。

(1) CaN 遺伝子の発見及び生理機能解明

Ca^{2+} 依存的にカルモデュリンに結合する酵母タンパク質の遺伝子スクリーニング法を考案し、動物 CaN 触媒サブユニットと相同性が高いタンパク質の遺伝子を得た。CaN は酵母の増殖に必須でなく、ストレス条件下の生命維持に必要なことを明らかにした。

(2) Ca^{2+} が関与する細胞周期チェックポイントの発見及び機構解明

Ca^{2+} シグナル活性化により細胞周期 G₂ 期進行が阻害され、芽の極性成長が誘発されることを発見した。 Ca^{2+} は CaN 及び Mpk1 MAP キナーゼ両経路を活性化し、両経路が協調して G₂ 期細胞周期エンジン (Cdc28/C1b) を不活性化する機構を明らかにし、細胞周期チェックポイントを構成する新規機構の概容を提示した。

本経路の変異株を体系的にスクリーニングする方法を考案し、約 500 株の変異株を分類し、予想される遺伝子すべてを含む 17 遺伝子座の変異を得た。未解明遺伝子を順次解析し、本機構に関して以下の成果を得た。

1) GSK3 キナーゼを介する細胞周期制御 動物の細胞分化において、GSK3 キナーゼは細胞の運命を決定する重要な局面で働く。酵母の GSK3 キナーゼ Mck1 が本機構に関与し、CaN と協調して細胞周期制御のキー分子 Hsl1 をプロテアソームによるタンパク質分解系へと導く機構を明らかにした。

2) 細胞形態形成におけるプロテインキナーゼ C の新機能 真核生物全般に保存され、増殖制御に特に重要な機能分子プロテインキナーゼ C (Pkc1) が本機構に関与することを見出した。酵母 Pkc1 は、MAP キナーゼ経路を活性化し、増殖に伴う細胞壁合成のダイナミックな制御に関わることが知られる。他の重要な機能の実体は不明であった。 Ca^{2+} による Pkc1 活性化は、G₁ サイクリン維持に必要で、これがアクチン制御を介し、芽を極性成長に導くことを明らかにした。形態形成/細胞壁合成と細胞周期を統合する重要な機能で、動物細胞の極性成長にも重要な示唆を与える。

3) S-アデノシルメチオニン (AdoMet) による細胞周期制御 生体分子メチル化反応のメチル基供与体として重要な AdoMet の代謝に関わる酵素 S-アデノシルホモシステイン (AdoHcy) 水解酵素の変異株を見出した。AdoMet 及び AdoHcy は共に G₁ サイクリンを低下させ、G₁ 期遅延を起こすことを見出し、AdoMet が細胞周期にも作用することを始めて明らかにした。ヒトの AdoMet 代謝異常は肝臓病、うつ病、アルツハイマー病をひき起こす。酵母における作用機構研究から、病因に関する知見が得られると期待される。

(3) Ca^{2+} シグナル伝達に作用する薬剤スクリーニング系の開発

Ca^{2+} シグナルの高活性化は G₂ 期制御を通し増殖停止を起こすことを利用し、シグナル経路阻害物質を「 Ca^{2+} による増殖阻害を解除する活性」を指標に簡便かつ特異性高く選抜するユニークなスクリーニング法を開発した。本法により CaN 阻害剤 (免疫抑制剤等)、GSK3 ファミリーキナーゼ阻害剤 (II 型糖尿病、アルツハイマー治療薬、抗がん剤)、Pkc1 阻害剤 (抗がん剤、鎮痛剤) 等、重要な疾病に関わる酵素の阻害剤が検出可能である。

動物の新規酵素の探索とホスホジエステラーゼ類に関する基盤的研究

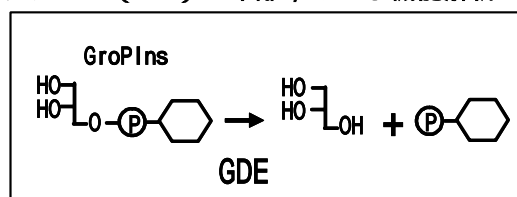
広島大学大学院・生物圏科学研究科 矢中 規之

1. cyclic GMP 特異的分解酵素 5 型ホスホジエステラーゼ (PDE5) の機能解析

医薬品のターゲットとなっている cyclic nucleotide ホスホジエステラーゼは、細胞内シグナル伝達物質である cyclic nucleotide の分解を担う重要な酵素である。cyclic GMP (cGMP) が一酸化窒素 (NO) や Na 利尿ペプチドなどの細胞内セカンドメッセンジャーとして血管弛緩作用を担う一方で、5 型ホスホジエステラーゼ (PDE5) は細胞内の cGMP の分解を担うことによって、cGMP の生理作用を負に調節する酵素として考えられていた。ヒト由来 PDE5 の cDNA、および遺伝子を単離した結果、ヒト PDE5 は 875 アミノ酸からなり、二つの cGMP 結合領域と触媒領域を持ち、cGMP に対する選択的な分解活性を示した。さらに、PDE5 は心臓や膵臓など幅広く発現し、冠動脈血管平滑筋細胞においても発現が認められた。以上のことから、PDE5 は心血管系における cGMP の細胞内濃度を規定する酵素としての役割が強く示唆された。

2. 新規酵素群グリセロホスホジステル ホスホジエステラーゼ (GDE) の単離、および機能解析

微生物における GDE は、グリセロリン脂質の代謝に重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、骨形成を調節する新規因子の探索において、マウス骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化過程でユニークな発現パターンを示す新規因子 GDE3 を見



出した。GDE3 は 7 回膜貫通型タンパク質であり、動物において初めて見出された GDE である。さらに、HEK293 細胞における GDE3 の過剰発現では F-actin を消失させ、細胞の形態を球状化させた。最近の報告では、グリセロホスホイノシトール (GroPIns) のイノシトール環の 4 位がリン酸化された GPI-4P を動物細胞の培養液に添加した際、細胞膜のラフリングやストレスファイバーの形成を誘導し、アクチン骨格の再構成を引き起こす新たな水溶性情報伝達物質として注目されており、動物における GDE は、内在性の GroPIns を分解することにより細胞骨格系を調節すると予想される(上図)。さらに、ヒトゲノム配列より動物由来の GDE ファミリーを網羅的に探索した結果、新たに 3 種類の新規 GDE 相溶性遺伝子を見出した。GDE2 は GDE3 と同様に 7 回膜貫通型タンパク質であるが、マウス神経芽種 Neuro2A 細胞の神経様への分化誘導剤である retinoid による刺激によって GDE2 は著しく発現誘導され、GDE2 の過剰発現、および RNAi を用いた解析によって、GDE2 は retinoid による神経突起の伸長に必須であることを明らかにした。一方、膜貫通領域を持たない GDE5 は、N 末端に多糖類結合領域を有しており、骨格筋や心臓など糖利用が盛んな組織で強い発現が認められた。肥満 2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay の骨格筋では GDE5 mRNA の発現は著しく低下しており、さらに、マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化させた際や PPAR agonist によって GDE5 の発現が著しく誘導されることから、糖尿病や肥満などの病態の形成に関わっている可能性が示唆された。

以上のように動物由来 GDE ファミリーは、各組織において細胞骨格系に対する重要な生理機能を担う新たな酵素群である可能性は極めて高く、新たな創薬標的分子として期待される。

特別講演

葉緑体での活性酸素の生成と消去

福山大学・生命工学部 浅田 浩二

葉緑体は太陽光エネルギーの生化学エネルギーへの変換、これを利用するCO₂固定によって、年間に炭素として-800億トンの有機物を合成し、食糧や有機素材の供給のみでなく、地球環境の維持にも寄与している。植物は太陽エネルギーを12%(CO₂1分子固定に8光子)の効率で固定できるが、これは環境要因が最適で照度が低い場合に限られ、野外での固定効率は最高4%、地球全体では0.13%にすぎない。光合成は葉緑体チラコイド膜で進行する光エネルギーの吸収・集積、電荷分離・電子伝達によるNADPH、ATPの生成(P)と、ストロマでのCO₂固定反応(A)に分けられるが、太陽光照度は時々刻々変動し、P>Aの光エネルギー過剰条件下では、過剰の光子、電子がO₂を励起、還元し¹O₂、O₂⁻、H₂O₂、[•]OH(活性酸素、ROS)を生成し、光エネルギー固定効率を低下させる(光阻害)分子種となる。

活性酸素の生成 P>A条件下、光化学系I(PSI)でO₂の1電子還元によってO₂⁻が、PSIIの反応中心(P680)でP680⁺とQ_A⁻との再結合反応によって生ずる³P680*との反応によって¹O₂が生ずる。この他クロロフィル(Chl)の生合成、分解の異常で蓄積する中間体、蛋白質に結合していない遊離Chlは光増感反応によって¹O₂を生ずる。

活性酸素の消去 PSIで生じたO₂⁻はPSIに接着しているSODによって拡散律速の速さで不均化されH₂O₂+O₂となる。H₂O₂はアスコルビン酸(AsA)を電子供与体とするペルオキシダーゼ(APX)によってH₂Oに還元される。APXはリグニン合成のペルオキシダーゼと異なった性質をもち酵母のCyt cペルオキシダーゼと高い相同性をもっている。酸化されたAsA(AsAラジカル、デヒドロAsA)をAsAに還元再生するために必要な電子はH₂OからPSII→PSIを経て供給され、これをWater-Water(W-W)サイクルとよんでいる。AsAラジカルをNAD(P)Hによって還元するAsAラジカル・レダクターゼは有機ラジカルを基質とする初めての酵素である。一方、¹O₂、[•]OHは反応性が高く、拡散距離が1nm>であるため酵素のような高分子によって消去できず、¹O₂はチラコイド膜結合のカロチノイド、トコフェロールによって生成サイトで消去される。[•]OHのみを消去する分子はないが、H₂O₂、O₂⁻を迅速に消去し、Fe、Cuイオン-依存のHaber-Weiss反応による[•]OH生成を抑制している。

W-Wサイクルの生理機能 葉緑体のROS標的分子はストロマのCO₂固定サイクル酵素、ROS消去酵素であるAPX、PSII反応中心複合体(D₁)などであるが、W-Wサイクルの第一の機能は標的分子のROSによる酸化・失活の防御である。さらに、W-WサイクルはP>Aストレスを緩和する代替的電子伝達経路となり、プロトン勾配形成によるPSII電荷分離量子効率の低下、ATP/NADPH比の調節機能をもっている。一方、嫌気条件下PSIIで¹O₂生成が増加し、W-Wサイクルが³P680*の生成を抑制する。このようにPSIIで発生したO₂の大気への蓄積に伴いROS消去のために獲得されたW-Wサイクルは、代替的電子伝達経路としても機能し光阻害を抑制している。

一 般 講 演
講 演 要 旨

A 1 . 卵白タンパク質の加熱不溶化に及ぼすホスピチンの抑制効果と加熱ゲルへの適用
吉賀 陽子、 松富 直利 (山口大・農・生物機能)

(目的) 卵白タンパク質は、優れた食品機能を有するため、食品加工素材として広く使用されている。しかし、卵白は高い熱感受性のため、殺菌や加熱加工で容易に不溶化して、その機能性を失う。そのため、加熱温度に注意が必要である。我々は、卵黄中の高度リン酸化タンパク質であるホスピチン(PV)が、卵白タンパク質の加熱不溶化を抑制することを示し、加熱ゲルへの適用の結果を示す。

(方法) 卵白タンパク質の加熱不溶化に及ぼす PV の影響は、pH 5 ~ 8 において 80 、 10 分間加熱後、濁度変化を追跡して調べた。加熱ゲルは、12% (w/v)卵白濃度で pH 7、80 で 10 分間加熱して調製後、ゲル強度及び透明度を測定した。

(結果) PV は卵白及びオボトランスフェリン(OT)の加熱不溶化を抑制した。PV の抑制能は食塩の添加で低下した。併せて、ネイティブ電気泳動やゲルろ過分析から、PV は加熱変性した OT と静電的に相互作用し、OT や卵白の不溶化を抑制すると考えられた。一方、卵白ゲルは、PV 添加によって、白濁ゲルから透明ゲルに、しかも堅いゲルに改変された。PV の液卵白への添加は、高温殺菌でも、不溶物を生じない液卵白標品の調製を可能にするであろう。

A 2 . 鶏卵白アルブミンのタンパク間相互作用に及ぼす SH 基の役割
中 嵩志、伊藤 一成、松富 直利 (山口大・農・生物機能)

[目的] 鶏卵白アルブミン(OVA)はCys73とCys120の間にS-S結合を1つと、Cys11、Cys30、Cys376とCys382にフリーのSH基を4つ持っている。以前の研究において、OVAの加熱凝集や、リゾチームとの相互作用において、このSH基が重要な働きをすることを報告している。本研究は、OVAのタンパク質間の加熱相互作用において、どのSH基が作用しているのかを調べることを目的とした。

[方法] OVAの分子内で最もN末端側にあるCys11を欠損させた変異型OVA(Cys11 OVA)と、OVAの分子表面にフリーなSH基を作るため、Cys73を欠損させたS-S結合欠損変異体(Cys73 OVA)とを構築し、加熱凝集や他のタンパク質との相互作用についてwild OVAとの比較を行った。

[結果] Cys11 OVAはSH基を介した加熱凝集体を形成しなかったが、Cys73 OVAは凝集体を形成しやすくなった。このことから、OVAのCys11のSH基は、タンパク質間の加熱相互作用において重要な役割を果たしていること、そして分子内唯一のS-S結合は、OVAの加熱に対する構造安定性の維持に関与していることが示唆された。

A 3 . 酵母での品質管理機構における鶏卵白アルブミンの糖鎖の役割

伊藤 一成、瀬利 亜紀子、松富 直利 (山口大・農・生物機能)

[目的] 鶏卵白アルブミン(OVA)は、分子内に N 型糖鎖付加部位を 2 ヶ所(Asn-292, Asn-311)持っているが、卵白中の OVA は、モノグリコシル型(Asn-292)として存在している。本研究では、酵母発現系を用いて、この糖鎖の役割を解明する事を目的としている。

[方法] glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーターを持つ発現ベクターを用いて、高発現システムを持つとして知られるメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* で OVA の糖鎖付加部位に変異をかけた N292Q, N311Q, N292/311Q を発現分泌させた。

[結果] 野生型の発現分泌量と比較し、N311Q は同程度分泌されたが、一方 N292Q の分泌量は、極端に減少し、N292/311Q では検出できないレベルにまで激減した。これは、OVA の糖鎖付加が成熟・分泌に重要であり、併せて Asn-292 の糖鎖が重要であることがわかった。

A 4 . 出芽酵母 *spc110* 変異株の取得と解析

長松 浩史、松崎 浩明、秦野 琢之 (福山大・生命工・生物工)

S. cerevisiae における CEN5-HIS3 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株 HCH6 は染色体の核内配置の異常に加え、温度感受性であり、cell integrity の欠損が認められた。このことから核内配置と細胞質内配置がクロストークしている可能性が示唆された。SPB の構成タンパク質 Spc110p の変異株には cell integrity 欠損株の存在が報告されている。そこで、*spc110* 変異株を新たに単離し、核内配置と細胞質内配置のクロストークについて解析することにした。SPC110 遺伝子に PCR を用いてランダムに変異を導入した後、*S. cerevisiae* W303a を形質転換した。得られた形質転換体 145 個より、温度感受性株と増殖遅延株をそれぞれ 4 株ずつ取得した。温度感受性株は高温で細胞の肥大、低浸透圧感受性、細胞極性の消失など cell integrity に欠損が認められた。一方、増殖遅延株では cell integrity の欠損は認められなかった。現在、温度感受性株の Spc110p の変異部位を決定し、機能との相関を解析しようとしている。

A 5 . 出芽酵母の染色体からのセントロメア配列切り出しによる細胞死の誘導

杉江 奈緒子、松崎 浩明、秦野 琢之（福山大・生命工・生物工）

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。野外への拡散を防ぐために条件致死性質や不撻性質の付与が重要である。これら性質の付与に部位特異的組換えを利用して特定条件下で染色体からセントロメア配列を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。そこで、*S. cerevisiae* をモデル生物として細胞死の誘導を検討した。一倍体細胞で第一番染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位配列 (RS) を同方向に挿入した後、組換え酵素 R 生産プラスミドを導入し、ガラクトースでセントロメア配列の切り出しが誘導される酵母を作製した。得られた菌株は、グルコースプレートでは多数のコロニーが出現したが、ガラクトースプレートではほとんど出現しなかった。また、ガラクトース液体培養での細胞の生存率は低下した。これらの結果から、セントロメア配列の切り出しにより細胞死を誘導できることが分かった。さらに、二倍体細胞でも、第一番相同染色体の両方からセントロメアを切り出すことで細胞死を誘導できた。

A 6 . Comparison of structures of alcohol dehydrogenases and their expression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*

N. Lertwattanasakul¹, K. Sootsuwan¹, S. Limthong², P. Thanonkeo³, and M. Yamada¹, (¹Dep. of Biol. Chem., Fac. of Agri., Yamaguchi Univ., ²Dep. of Microbiol., Fac. of Sci., Kasetsart Univ., ³Dep. of Biotech., Fac. of Tech., Khon Kaen Univ.)

Alcohol dehydrogenases may be conserved in different yeast species, but the regulation and number of those genes vary. Four *K. marxianus* ADH (KmADH) genes were cloned and sequenced. Deduced amino acid sequences shared high similarity with the corresponding ADHs in *K. lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* except that KmADH4 showed a low similarity to the corresponding ADH in *S. cerevisiae*. The phylogenetic tree revealed that all KmADH isozymes seem to be a member of the zinc-containing ADH family. All four ADH genes were expressed in cells grown aerobically in the presence of glucose as a carbon source but the transcriptional levels of KmADH3 and KmADH4 were much lower than those of others at least in exponential phase, suggesting that KmADH1 and KmADH2 were mainly involved in ethanol production. KmADH2, KmADH3, and KmADH4 were expressed in cells grown in ethanol-containing medium for 6 h, among which KmADH4 was expressed higher than other two genes. These and the evidence that the KmADH4 expression increased in late stationary phase in glucose-containing medium suggest its major involvement in ethanol utilization.

A 7 . 細胞分裂阻害物質 phenylahistin 生産系状菌 *Aspergillus ustus* 由来の cyclo(Leu-Phe)酸化酵素により変換される新規二次代謝産物

神崎 浩, 杉原 孝治, 平田 里枝, 仁戸田 照彦 (岡山大院・自然科学)

【目的】我々は *Aspergillus ustus* により生産される phenylahistin (PLH, cyclo(isoprenyl His-Phe)) から dehydrophenylahistin (PLH) を酵素合成し,それが強力な細胞分裂阻害活性を示すことを報告してきた 1)。 PLH の活性には PLH の構造が大きく関わっており,その類縁体を調製できれば,構造活性相関研究が進むと考えられる。*A. ustus* の代謝産物中に PLH 類縁体が存在していると考え,解析を行ったところ, PLH を高生産する膜面液体培養の条件検討において,新規代謝産物 (1) を見出したので,その化合物について報告する。

【方法と結果】化合物 1 は 55% MeOH を用いる ODS-HPLC で 14.0 min に溶出され, 330 nm に極大吸収を示すことから,我々がこれまでに報告している PLH,その幾何異性体,そして,以前に *A. ustus* の代謝産物として報告している cyclo(Phe- His) 2) とは異なる化合物であることが判明した。次に,我々が *Streptomyces albulus* 中に見出した,基質特異性が幅広く,さまざまな環状ジペプチドを対応する脱水素体に変換する,cyclo(Leu-Phe) 酸化酵素 3)でこの化合物を処理したところ,酵素反応が進行したことから,環状ジペプチド構造を有していることが判明した。

1) J. Antibiot., **55**, 1042 (2002), 2) 2003 年度農化大会要旨集 p 155, 3) J. Biosci.. Bioeng., **90**, 86 (2000)

A 8 . *Eikenella corrodens* の表層レクチンによる歯周病原性

阿座上 弘行¹, 秋道 宏美¹, 中島 弘¹, 恵比須 繁之², 加藤 昭夫¹

(¹山口大・農・生物機能、²阪大院・歯・保存)

Eikenella corrodens はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で、歯周炎患者の病変ポケットから頻りに分離される歯周病原性細菌の一つである。我々は本菌の菌体表層に N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)に特異的なレクチン様の付着因子が存在することを明らかにし、その解析を行ってきた。これまでに、本菌がこのレクチン様物質を介して、口腔内上皮細胞への付着、プラーク構成細菌との共凝集、赤血球の凝集、唾液由来糖タンパク質と異種細菌との架橋、マウス B 細胞の活性化などを行うことを示してきた。さらに、このレクチン様物質が炎症性疾患の病態と密接に関係する細胞接着分子 ICAM-1 を誘導することも明らかにした。このように、本菌の歯周病原性には菌体表層の GalNAc 特異的なレクチンが大きく関与していることが考えられる。

最近、我々は約 8.7kb のプラスミド DNA にコードされたリコンビナーゼがゲノム上のタイプ 4 線毛遺伝子領域に組換えを起こすことによって、本菌の GalNAc 特異的なレクチン活性を増加させることを発見した。また、この組換えによって菌体表層の線毛構造が消失し、コロニー形状も変化が見られた。さらに、本菌がポリスチレン表面上でバイオフィルムを形成することを明らかにし、このバイオフィルムの形成には GalNAc 特異的なレクチンが関与していることを示した。

A 9 . 高温性水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* の硫黄酸化酵素群の解析

三宅 大輔¹、小田 高広²、西原 宏史²、三本木 至宏¹

(¹広島大院・生物圏、²茨城大・農)

【目的】高温環境で生育する水素細菌には無機硫黄化合物をエネルギー源として生育できるものがある。私達はこれまでに、 β -proteobacteria に属する標題菌が硫黄酸化酵素(Sox)をコードする遺伝子を持つこと、およびチオ硫酸を酸化することを示している。今回、sox 遺伝子群の全配列を決定し、チオ硫酸の酸化を触媒する主要酵素を精製した。

【方法と結果】sox 遺伝子群の全配列：私達はすでに、標題菌の染色体から sox 遺伝子群を含む約 18kb の DNA 断片を得ている。その塩基配列を決定したところ、他の細菌由来のものと相同な計 10 個の sox 遺伝子群(*soxEFCDYZAXBH*, 全長 9.7 kb) がクラスターを構成していることが分かった。その 5' 側には、亜硝酸還元酵素をコードする *napC* が、3' 側には硫黄還元酵素の遺伝子が見つかった。SoxAX の精製：まず、チオ硫酸をエネルギー源として培養した標題菌をリゾチームで処理することでペリプラズム画分を抽出した。次に、陰イオン交換カラムを用いて c 型シトクロムを精製し、その N 末端配列を決定したところ、塩基配列から推定した SoxAX の配列であることが分かった。SDS ゲル上での SoxAX の分子量は、それぞれ 28 k、18 k であり、いずれもヘムを 1 つずつ持つタイプの酵素であった。

A 10 . 超好熱菌 *Thermotoga maritima*、及び *Pyrobaculum aerophilum* 由来 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) の特徴と磁性化

野々下 理絵、吉原 久美子、下家 郁子、櫻庭 春彦、大島 敏久

(徳島大・工・生物工)

DERA は 2 種の Aldehyde 間のアルドール縮合を触媒する酵素であり、抗腫瘍や抗ウイルス薬剤の合成中間体である Deoxyribose 誘導体の不斉合成への利用に高い有用性がある。我々は、安定性に優れている超好熱菌由来の DERA の機能開発を進めている。本研究ではゲノム情報から *Thermotoga maritima* 及び *Pyrobaculum aerophilum* に DERA の遺伝子ホモログを見出し、それらの大腸菌での発現系の構築、発現産物の精製と諸性質の解析を行った。また、2 種の DERA の有効利用を計る目的で、磁性化 DERA の調製を検討した。その結果、両超好熱菌由来の DERA は高い安定性を有し、2-Deoxyribose-5-phosphate(DRP)や 2-Deoxyribose の合成反応に有効利用できることを見出した。また、酵素活性を示す磁性化 DERA の調製に成功し、DRP の合成反応に利用できることを明かにした。

A 11 . 枯草菌の分岐鎖アミノ酸合成オペロン (*ilv-leu*)の転写制御解析

東條 繁郎、里村 武範、広岡 和丈、藤田 泰太郎 (福山大・生命工・生物工)

枯草菌 *ilv-leu* オペロンは、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)生合成系に関与している。この *ilv-leu* オペロンに対して、TnrA、CodY 及び CcpA が制御していることを明らかにしている。このように、グローバルな炭素代謝制御因子の CcpA 並びに窒素代謝制御因子の TnrA と CodY が一つのオペロンの制御に働いていることになり、炭素代謝と窒素代謝の主要な制御因子が密接に連動して一つのオペロンを多重に転写レベルで制御している唯一の例である。

この度、TnrA、CodY 及び CcpA の 3 者に加えて緊縮応答に与る RelA がどのようにして *ilv-leu* オペロンの制御を行っているかの解析を行った。メタボローム解析により、各制御因子に関与する中間代謝産物の濃度に依存して、*ilv-leu* オペロンが制御されていることを実証した。また、CcpA による正の制御は、RNA ポリメラーゼとの相互作用によるものであることを明らかにした。さらに、*ilv-leu* オペロンのプロモーターとの *lacZ* 融合実験により、緊縮応答による GTP 濃度の低下が GTP 結合性調節因子である CodY の不活性により、このオペロンの発現を正に制御する事を証明すると共に、RelA に依存するが CodY に依存しないプロモーターの極近傍で作動する正の緊縮制御の存在を明らかにした。この後者の制御は GMP 合成酵素の阻害剤である decoynine の添加によっても引き起こすことができ、この緊縮制御にも GTP の濃度の低下が関与していることが示唆された。

A 12 . 枯草菌の脂肪酸分解レギュロンの機能解析

松岡 浩史、広岡 和丈、藤田 泰太郎 (福山大・生命工・生物工)

【目的】欠損株を用いた DNA マイクロアレイ解析により YsiA 制御因子の標的が脂肪酸分解系に関わる遺伝子群であることが推定された。枯草菌では、脂肪酸合成系遺伝子群を制御する FapR の存在は明らかにされていたが、分解系の制御因子に関しては未解決のままであった。そこで YsiA のレギュロン構成とその誘導物質を同定し、枯草菌の脂肪酸代謝制御系の全貌解明に挑んだ。

【方法と結果】DNA マイクロアレイ解析とノザン解析により、標的遺伝子候補として 12 遺伝子からなる 5 つのオペロンが見出された。さらにそれらのプロモーター領域 DNA と YsiA の結合能試験によって、20 bp のパンドロームから成る YsiA 結合配列を決定した。プライマー伸長解析により、その結合配列がレギュロンの転写を妨げるようにプロモーターの下流に位置することがわかった。また、様々な鎖長のアシル CoA を添加して YsiA-DNA 結合能試験を行ったところ、C14 ~ C20 の長鎖アシル CoA での YsiA の結合解除が観察された。以上により、YsiA 制御因子が脂肪酸分解に関わる 12 の遺伝子群を一括して負に制御し、その誘導物質が C14 ~ C20 の長鎖アシル CoA であることを明らかにしたことにより、枯草菌の脂肪酸分解制御系を解明することができた。

- B 1 . ポリスチレン表面に親和性を示すペプチドタグを付加した酵素の設計と特性解析
今石 大輔¹、熊田 陽一¹、今中 洋行¹、今村 維克¹、崎山 高明²、中西 一弘¹
(¹岡山大院・自然科学、²東京海洋大・海洋科学)

タンパク質の付着現象は固定化酵素、ELISA 法などの生化学的分析、プロテインチップの設計など、幅広い分野にわたり基礎的な現象である。その中でも酵素などの機能性タンパク質を固体表面に固定化して分析や反応に利用する場合、吸着方法は様々だが、ほとんどのものがタンパク質を直接固体に表面に吸着させ、配向などを無視してランダムに吸着させている。この場合、タンパク質の機能が著しく低下することが報告されている。しかし、固体表面に親和性を示すペプチドをタグとして機能性タンパク質に付加することで直接的な付着に伴う構造変化の抑制、および配向を制御することで機能性物質（基質、抗体など）が結合しやすい方向を向いた状態で固定化することが可能となり、活性低下を抑制でき、固定化した機能性タンパク質の機能向上が期待される。そこで本研究室で見出されたポリスチレン(PS)に高い親和性を示すペプチドのアフィニティータグとしての特性解析^{1,2)}及びタグ連結酵素 β -galactosidase（以下 β -Gal と記す）の調製を行い、PS latex への吸着挙動及び活性の変化について検討をした。タグ連結酵素の PS latex への固定化後の残存活性は野生型の酵素に比べ最大で約 5 倍、吸着量は最大で約 2 倍であった。1) T. Sakiyama, et al., J. Mol. Cat. B, 28, 207-214 (2004). 2) Y. Kumada et al., Biotechnol. Progress, in press (2006).

- B 2 . クローン化ヒドラターゼ-アルドラーゼの精製と、その逆反応を利用した β -不飽和ケトンの合成
田中 愛子、石井 一二三、滝澤 昇（岡山理大・工・応用化学）

[目的] *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 株の Naphthalene 代謝経路の PahE (Hydratase-aldolase) は、trans-o-Hydroxybenzylidenepyruvate (tHBPA) を Salicylate と Pyruvate に変換する。本研究では PahE が容易に逆反応 (aldolase 反応) を進行することから、逆反応での生成物の増加を指標にして pahE クローン化大腸菌から組換え酵素を単離精製し、いくつかの性質を検討した。

[方法と結果] PahE は、細胞抽出液より二段階の DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE で単一バンドとなった。分子量 37kDa、最適 pH6.5-7.0、最適温度 60℃、熱安定性については 50℃ 5 分加熱までは安定であったが、60℃ 5 分加熱で完全に失活した。逆反応による生成物は、HPLC により β -不飽和ケトンである tHBPA と同定された。

B 3 . 植物起源の異なる澱粉の Naegeli amyloextrin の微細構造

堀端 哲也、中浦 嘉子、井ノ内 直良 (福山大・生命工・応用生物)

【目的】植物起源の異なる澱粉、すなわちトウモロコシ(ノーマル, ワキシー)、コメ(コシヒカリ, アユノヒカリ)、アマランス、サツマイモ、カンナ、チューリップなどの穀類、根茎または球根から調製した澱粉の性質、それらの酸処理残渣(Naegeli amyloextrin)の微細構造について検討した。

【方法】植物起源の異なる澱粉の糊化特性は DSC 法で測定した。澱粉および澱粉を 15% 硫酸(w/w)に 25 で 80 日間浸漬して、Naegeli amyloextrin を調製し、その枝切り前後の単位鎖長分布をゲル濾過法および HPAEC-PAD 法により測定した。

【結果】25 で 80 日間酸処理の結果、酸加水分解率はカンナ澱粉が低く(26.6%)、コメ(アユノヒカリ)澱粉が高かった(64.7%)。HPAEC-PAD 法によるコメ(アユノヒカリ)の枝切り前の Naegeli-amyloextrin の鎖長分布では、直鎖および 1~3 本程度の枝を持つ分岐分子に相当する複数のピークが観察されたが、枝切り後ではいずれの分岐鎖も消失し、1つのピークが観察された。しかし、ゲル濾過法による枝切り後の Naegeli-amyloextrin の鎖長分布には、高分子側に溶出が観察された。

B 4 . イネ胚乳の澱粉分解酵素に関する研究

山崎 良樹、前川 雅彦、今野 晴義 (岡山大・資生研)

【目的】穀物種子が発芽するとき、一連の澱粉分解酵素活性が増加し、種子中の澱粉を分解し、発芽を促進すると考えられている。しかし、未発芽のイネ胚乳には グルコシダーゼと共に著量のプルラーゼが存在する。今回は、イネ胚乳の澱粉分解酵素について報告する。

【方法】イネ胚乳 1 kg を 5%食塩含有の 50 mM 酢酸緩衝液(pH 5.3) 2 L 中に浸漬して、ホモゲナイザー (Nissei Excel Auto-Homogenizer) で 12,000 rpm, 2 分間破碎した。その上澄液を酵素液として以下の研究に使用した。酵素活性の定量は HPLC により行った。

【結果】酵素液を可溶性澱粉とプルランに作用させると、プルラン分解活性が可溶性澱粉分解活性よりも明らかに高かった。また、可溶性澱粉分解産物はグルコースのみであったが、プルラン分解産物はマルトトリオース以外に複数の転移生成物が認められた。その主要転移生成物は Bio-Gel P2 カラムでマルトペンタオースとマルトヘプタオースの間に検出されたが、HPLC の分離パターンはマルトヘキサオースと異なった。その転移生成物は市販のプルラーゼで完全に分解され、マルトトリオースを遊離した。これらの結果からイネ胚乳には グルコシダーゼ以上にプルラーゼが多く存在すること、そのプルラーゼは転移活性を有していることが明らかになった。

B 5 . ウィスキー及びその樽材抽出物の生理活性

原口 博行¹、山崎 志穂¹、末光 友和¹、小玉 亜矢子¹、諏訪 芳秀²、輿水 精一²
(¹福山大・生命工・生物工、²サントリー)

[目的]食品の素材あるいは保存に用いられる多くの植物については様々な生理活性や生体機能調節能が調べられている。我々はウィスキー及びその貯蔵・熟成に用いる樽材成分の生理機能について、糖尿病合併症に深く関与するアルドース還元酵素に対する阻害作用を報告した(1)。今回、生体内過酸化反応に対するウィスキー樽材成分の抑制作用について検討を加えた。

[方法と結果]ラット肝ミクロソーム及び亜ミトコンドリア粒子における膜脂質の過酸化、DNA の酸化的断片化等に対して、ウィスキーは熟成期間の長いブランド及び原酒ほど強い抑制効果が認められた。ウィスキー樽材に用いる *Quercus robur* 及び *Q. alba* 等のアルコール抽出液にも同様の抗酸化活性が認められた。また、脳ミトコンドリアで過酸化水素を生成し酸化ストレスの一因ともなる *monoamine oxidase* に対しても *Quercus* 属植物抽出物は阻害作用を示した。それらに含まれる有効成分として *ellagic acid*、*coniferyl aldehyde*、*eugenol*、*sinapic aldehyde* 等が明らかとなった。さらに、*sinapic aldehyde* 及び *eugenol* はミトコンドリアの過酸化障害による機能低下を抑制することが明らかとなった。

(1)2005 年度日本糖尿病合併症学会講演要旨集 p.68 (神戸)

B 6 . キャベツの咀嚼に伴って生成するリゾホスファチジン酸

堀内 剛、田中 保、平野 薫、里内 清
(福山大・生命工・応用生物)

キャベツはホスホリパーゼ D 活性が強く、ホモジネーションに伴い活性化され多量のホスファチジン酸が生成する。今回、ホスファチジン酸に加えてリゾホスファチジン酸が生成することを見出した。このリゾホスファチジン酸は煮沸したキャベツからは検出されず、生キャベツより抽出することによって検出された。そこで生キャベツよりアセトンパウダーを調製し、これを合成ホスファチジン酸に加えてインキュベートしたところ、1位もしくは2位の脂肪酸が切断されたリゾホスファチジン酸がほぼ等量検出された。従ってキャベツにはホスホリパーゼ D に加えてホスホリパーゼ A が存在し、これらの活性によりリゾホスファチジン酸が生成するものと考えられた。

リゾホスファチジン酸は血液や唾液などの体液に存在するリゾ型リン脂質メディアーターで、細胞増殖活性を有し創傷治癒ホルモンとして機能すると考えられている。生キャベツの摂取に伴うリゾホスファチジン酸の生成および消化管内での粘膜修復の可能性について現在検討中である。

B 7 . 共役エイコサペンタエン酸(EPA)の DNA ポリメラーゼ阻害活性とヒト癌細胞増殖抑制メカニズムの解析

瓜生 圭介¹、米澤 裕子²、都築 毅³、永塚 貴弘⁴、宮澤 陽夫⁴、吉田 弘美^{2,5}、羽田 尚彦¹、水品 善之^{2,5}

(¹備前化成(株)、²神戸学院大・栄養、³宮城大・食産業、⁴東北大院・農、⁵神戸学院大・ライフサイエンス)

【背景と目的】我々は長鎖のシス型不飽和脂肪酸が高等生物の DNA ポリメラーゼ (pols) と DNA トポイソメラーゼ (topos) を選択的に阻害すること、また高度不飽和脂肪酸 (EPA) の共役型 (cEPA) が、EPA より強く pols および topos を阻害することを見出した。そこで、ヒト前骨髄性白血病細胞を用いて、cEPA の酵素阻害活性と細胞増殖との関係、さらに細胞周期制御酵素との関係について調べた。

【結果】細胞毒性試験において、cEPA は EPA より強く、ヒト前骨髄性白血病細胞の増殖を阻害した。さらに cEPA は、G1/S 期で細胞周期を阻止し、細胞周期関連酵素、サイクリン A および E を増加させて、細胞のチミジンの取り込みを阻害した。同時にアポトーシスを誘導した。

【考察】cEPA は、topos ではなく複製作用をもつ pols を阻害することで、DNA 転写作用の第一段階の進行を妨げていると考えられる。また cEPA は抗癌剤として機能する可能性が示唆された。

B 8 . 卵黄タンパク質分解物のヒトに対する降圧作用

金田 輝之¹、羽田 尚彦¹、野村 政孝²、青野 祥子²、高山 房子²、栗木 隆吉³、戸部 和夫⁴、川崎 博己² (¹備前化成(株)、²岡山大院・薬、³県畜産セ、⁴岡山大・保健セ)

【目的】天然物由来タンパク質の酵素分解物がアンジオテンシン変換酵素(ACE)活性を阻害し、血圧を低下させることが知られている。我々は鶏卵の卵黄に着目し、脱脂卵黄タンパク質を酵素処理して得た酵素分解物(卵黄ペプチド)が ACE 活性を阻害し、SHR 高血圧ラットに対し単回経口投与で血圧を有意に低下させることを明らかにしている。本研究では、卵黄ペプチドのヒトに対する降圧効果について検討を行うことを目的とした。

【方法】予め試験計画を説明し、文書で同意を得た血圧が高め(収縮期血圧 135 ~ 145mmHg、拡張期血圧 85 ~ 95mmHg)のボランティア 20 人を無作為に 2 群に分け、無作為二重盲検法で実施した。1 群にはプラセボ錠を、もう 1 群は卵黄ペプチドを 90mg 含む錠剤を 1 回 4 錠、1 日 3 回を 3 週間服用した。血圧はボランティア各自が家庭用血圧計で朝と夜に測定した。血圧値は 1 回につき 3 回繰り返して測定し、最も低い値を採用した。

【結果および考察】卵黄ペプチド群はプラセボ群と比較して、服用 1 週間後から朝および夜の収縮期血圧の低下が見られ、3 週間後で最も低下し、プラセボ群との間に有意差が認められた。

B 9 . 脂溶性物質のマイクロエマルジョンへの可溶化とバイオアベイラビリティの評価

眞鍋 珠美¹、田辺 創一¹、西村 敏英¹、長尾 昭彦²、上野 聡¹、佐藤 清隆¹ (¹広島大院・生物圏、²食総研)

【緒言】マイクロエマルジョンを FDS(Food Delivery System)へ利用する前段階として、脂溶性物質のマイクロエマルジョンへの溶解性改善を検討するとともに、小腸モデルとして汎用されるヒト結腸ガン由来株化細胞 caco-2 細胞を用いて、脂溶性物質を内包したマイクロエマルジョンの透過量を測定した。

【実験方法と結果】難水溶性物質であるトリストエアリンのマイクロエマルジョンへの溶解量は、マイクロエマルジョンと同成分からなるミセルや油分への溶解量と比較して 4~20 倍に上昇した。次に、パルミチン酸を内包した平均粒径 10nm のマイクロエマルジョンのバイオアベイラビリティについて、caco-2 細胞を透過性膜状に単層培養したものをを用いて検討した。蛍光標識されたパルミチン酸 1.7 μg を管腔(apical)側に添加し 2 時間透過試験を行ったところ、基底(basal)側へ 0.012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のパルミチン酸が透過した。さらに、マイクロエマルジョン中の蛍光パルミチン酸は、主に細胞内経路を介して細胞を透過したと考えられた。

B 10 .ステロイドホルモン受容体および他の NR ファミリーメンバーの協調的進化における 2 量体形成が果たす役割

(Role of dimer formation in coordinated evolution of steroid hormone receptors and other nuclear receptors)

阿部 俊之助、佐々木 栄二、岸田 太郎、海老原 清 (愛媛大・農)

我々は *MKRN2* をブリで最初に発見して以来、*SYN2*、*PPARG*、*MKRN2* および *RAF1* の並びとその周辺の遺伝子の並びを解析することによって、ヒト染色体 3p21-25 の祖先領域が脊椎動物の進化の過程で重複し特有の遺伝子ファミリーが形成されたことを明らかにしてきた。また、この領域には *PPARG* のほか、*RARB*、*THRB* および *NR2C2*(*TR4*) が存在する。他の NR スーパーファミリーについてもホヤ、魚類およびヒトとの間でゲノム構造比較をしたところ、それらは Exon/Intron 境界をいくつか共有するとともに *RXR* を祖先とすることがわかった。これらのうち、エストロゲン受容体 (*ESR*) は *VDR* と *GCCR* の祖先とわかれて 6 番染色体に、アンドロゲン受容体 (*AR*) は独特の分子進化をして *VDR* や *GCCR* から分岐し X 染色体に移行した。また NR スーパーファミリーは *WNT*、*STAT*、*CTNN* などとも協調進化した。これらの遺伝子産物の 2 量体形成能が機能の "ゆらぎ" や "クロストーク" を許容することによって、NR ファミリーの多様性と多機能が協調的に進化したと考えられた。

B11. イエシロアリ兵隊カーストの額腺分泌タンパク質の解析とその遺伝子のクローニング

板屋 剛、池口 陽子、藤島 タ子、太田 雅也、山本 覚、松浦 史登
(福山大学・生命工・生物工)

[目的]シロアリは、ミツバチやアリと同様に社会性昆虫に該当し、一つのコロニーの中ではっきりとした階級に分けられている。このうち兵隊カーストは、防衛活動に専念する個体で、他の階級の個体とは体の構造が大きく異なり、頭部の額腺から忌避作用をもった分泌液を分泌することが知られている。この額腺分泌液は、形態的特徴と並び兵隊カースト特有の性質を示すことから、分泌液中の解析は、シロアリの分化に関する知見を与えるものと考えられる。

[方法]額腺分泌液のタンパク質を電気泳動により分離精製し、分子量 24KDa の位置に認められた主要タンパク質の N-末端配列並びにトリプティックペプチドの MALDI-TOF/MS 及び MS/MS 解析によりアミノ酸配列を解析した。続いて得られたアミノ酸配列を基に作製したプライマーを用い RACE-PCR 法にてこのタンパク質の cDNA のクローニングを行った。

[結果]分離精製された 24KDa のタンパク質の N-末端及びトリプティックペプチドの MS/MS 解析により得られた配列を基にタンパク質のデータベース検索を行ったが、該当するタンパク質は認められず、この額腺分泌タンパク質は新規タンパク質であることが強く示唆された。RACE-PCR 法で得られた cDNA の全塩基配列を決定したところ、この cDNA 塩基配列中には、MS/MS 解析で得られたアミノ酸配列が存在していることから、この cDNA が、額腺分泌液の 24KDa タンパク質の遺伝子であることが示唆された。

B12. Aminopeptidase B 中の活性部位の性質

廣瀬 順造¹、深沢 加与子²、岩本 博行¹、松岡 昭治¹、西本 直代¹
(¹福山大・応用生物、²松本歯科大)

Aminopeptidase B (ApB) は、アミノ末端に Arg、Lys (プラスの電荷を持つ残基) があるペプチドから、特異的に Arg、Lys を切り出すエキソペプチダーゼである。深沢らは、ラット肝の ApB のアミノ酸配列を c-DNA から決定し、亜鉛ペプチダーゼに特有なモチーフ配列 HEXXH を見出した。そこで、我々と深沢らは HEXXH(324-328) 部分に亜鉛イオンが結合しているかどうかを検討するために、種々の部位特異的変異体を調製し、酵素中の亜鉛量と酵素活性を測定したところ、モチーフ配列の二つのヒスチジン残基と、モチーフ配列から 19 残基離れた Glu347 に亜鉛イオンが配位している事を証明した。今回我々は、ApB を融合タンパク質として大腸菌から大量精製する事に成功したので、酵素中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換え、電子スピン共鳴スペクトルを測定した。その結果、金属イオンは、かなり歪んだ平面四配位構造で、酵素に結合していることが判った。また、亜鉛イオンは、酵素に 10⁻¹ 3M の解離定数で強く結合している事も判った。また、深沢との共同研究で、基質である Arg 及び Lys のプラス電荷を認識する残基を決定するため、ApB 中の負電荷を持つ Glu 及び Asp 残基を置き換えた部位特異的変異体を調製し、酵素活性を測定したところ、ApB の Aps405 が基質である Arg 及び Lys のプラス電荷を認識する残基である事が示唆された。