

日本農芸化学会中四国支部
第36回講演会

講 演 要 旨 集

日時：2013年6月8日(土) 13時開会
場所：島根大学生物資源科学部

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36回講演会（例会）

会場：島根大学生物資源科学部

日時：2013年6月8日（土）

11:00～12:00 幹事打合せ （生物資源科学部1号館203号室）

12:00～12:50 支部参与会 （生物資源科学部1号館203号室）

13:00～13:10 2013年度支部奨励賞授賞式（生物資源科学部1号館101号室）

13:10～14:45 受賞講演 （生物資源科学部1号館101号室）

13:10～13:25 2012年度中四国支部学生奨励賞受賞講演

「シロイヌナズナの花粉発達における細胞内輸送小胞形成に関わるSec24の機能解析」

田中優史（鳥取連大・農／島根大）

13:25～13:50 2013年度中四国支部奨励賞受賞講演

「産業用酵素の同定および生化学的特性の解析」

今中洋行（岡山大院・自然科学）

13:50～14:15 2013年度中四国支部奨励賞受賞講演

「酢酸菌の膜酵素に関する研究」

薬師寿治（山口大院・医）

14:15～14:45 日本農芸化学会2013年度農芸化学奨励賞受賞講演

「植物の生長促進への利用に資する，枯草菌の転写応答機構の研究」

広岡和丈（福山大・生命工学）

15:00～17:32 一般講演（生物資源科学部3号館：202，205，209，211号室）

18:00～19:50 懇親会 （島根大学生協第2食堂）

島根大学松江キャンパスへのアクセス



* 松江市営バス

- 北循環線内回り 島根大学前下車 …所要時間約15分
- 大学・川津行 島根大学前下車 ……所要時間約20分
- 他に「平成ニュータウン」「あじさい団地」「東高校」などもあります。

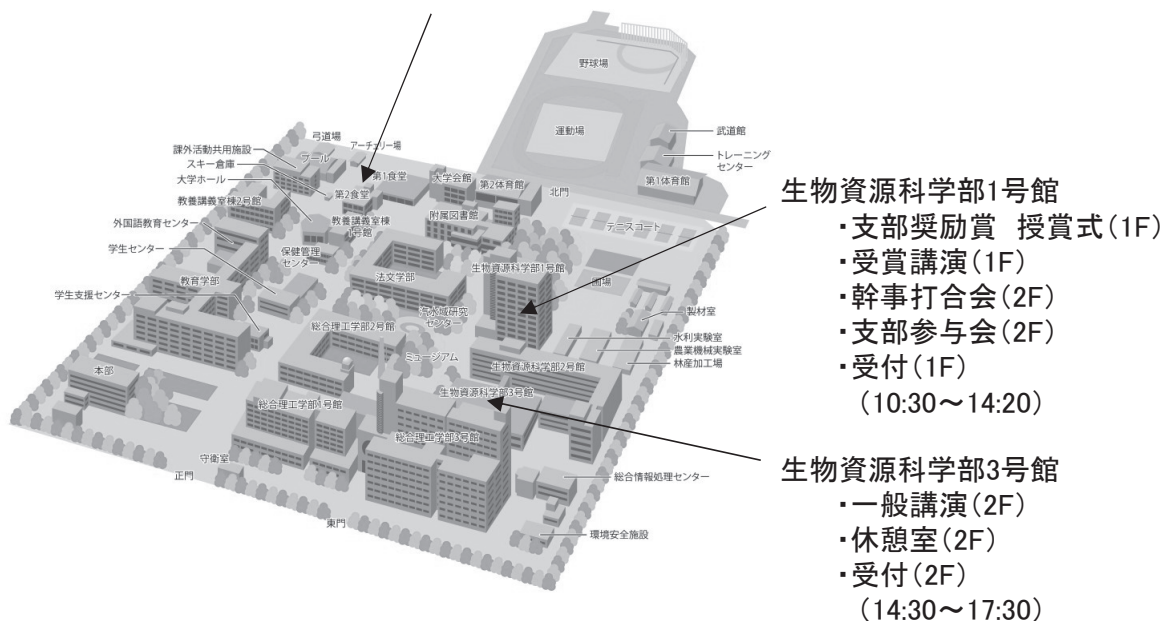
* 一畑(いちばた)バス

- 美保関(みほのせき)ターミナル 島根大学前下車 …所要時間約20分
- マリゲート 島根大学前下車 ……………所要時間約20分

* タクシーで …所要時間約10分

島根大学松江キャンパス キャンパスマップ

懇親会会場(第2食堂2F)(18:00~19:50)



- 生物資源科学部1号館
- ・支部奨励賞 授賞式(1F)
 - ・受賞講演(1F)
 - ・幹事打合せ(2F)
 - ・支部参与会(2F)
 - ・受付(1F)
- (10:30~14:20)

- 生物資源科学部3号館
- ・一般講演(2F)
 - ・休憩室(2F)
 - ・受付(2F)
- (14:30~17:30)

一般講演会場一覧(生物資源科学部3号館)

会場	講演番号	分類	会場責任者
A 202 講義室	A1-A12	微生物	戒能智宏 (島根大)
B 205 講義室	B1-B5・B6・B7-B11	タンパク質・天然物・代謝	中川 強 (島根大)
C 209 講義室	C1-C6・C7-C12	食品・植物	石川孝博 (島根大)
D 211 講義室	D1-D6・D7-D12	生理活性物質・動物	古田賢次郎 (島根大)

座長一覧表

会場	講演番号	座長
A 202 講義室	A-1 ~ A-4	田中直孝 (香川大)
	A-5 ~ A-8	船戸耕一 (広島大)
	A-9 ~ A-12	松尾安浩 (島根大)
B 205 講義室	B-1 ~ B-4	長屋 敦 (島根大)
	B-5 ~ B-8	薬師寿治 (山口大)
	B-9 ~ B-11	今中洋行 (岡山大)
C 209 講義室	C-1 ~ C-4	地阪光生 (島根大)
	C-5 ~ C-8	丸田隆典 (島根大)
	C-9 ~ C-12	西村浩二 (島根大)
D 211 講義室	D-1 ~ D-4	尾添嘉久 (島根大)
	D-5 ~ D-8	横田一成 (島根大)
	D-9 ~ D-12	山田康枝 (近畿大)

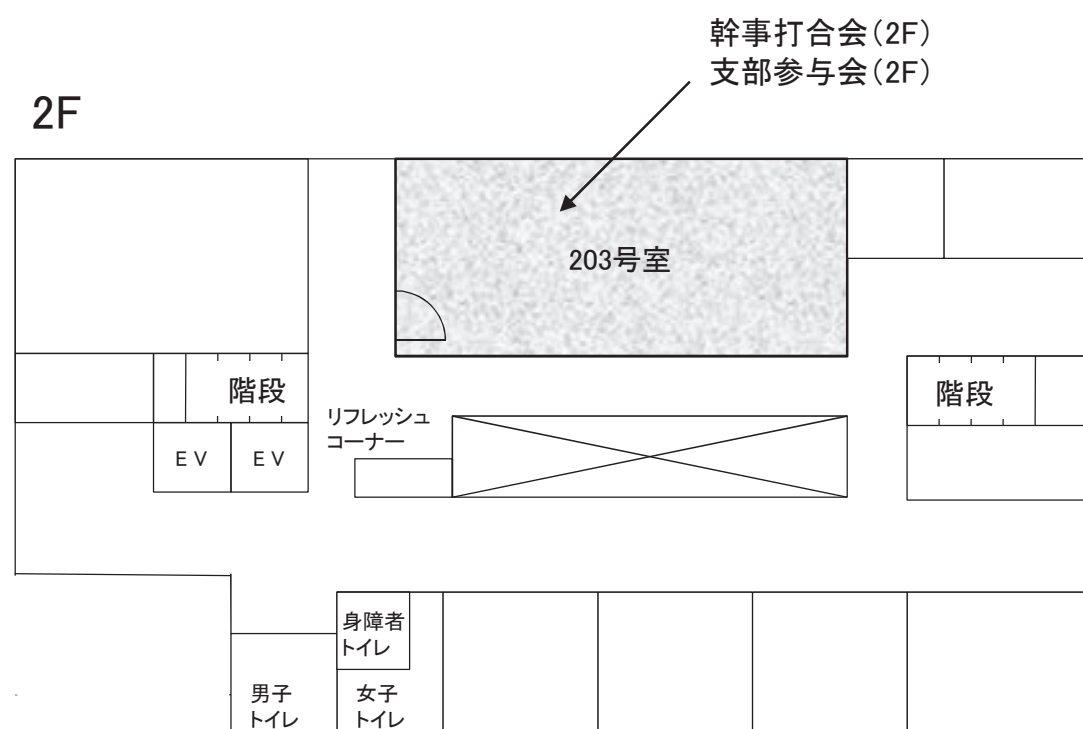
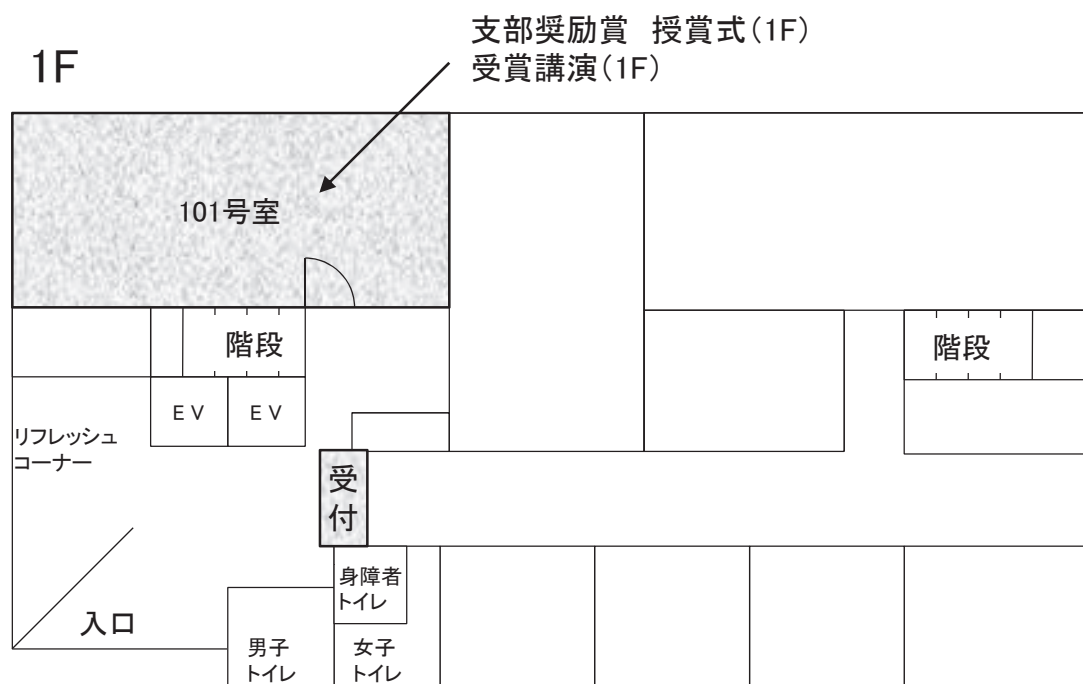
注)

1. 各自あるいは共同で、発表スライドを入れたコンピューターを持参ください。
2. 発表時間 9分、質疑応答 2分半、切り替え30秒で進行をお願いします。
3. 休憩時間を間にとりましたが、後半は16:20に開始してください。

会場案内図

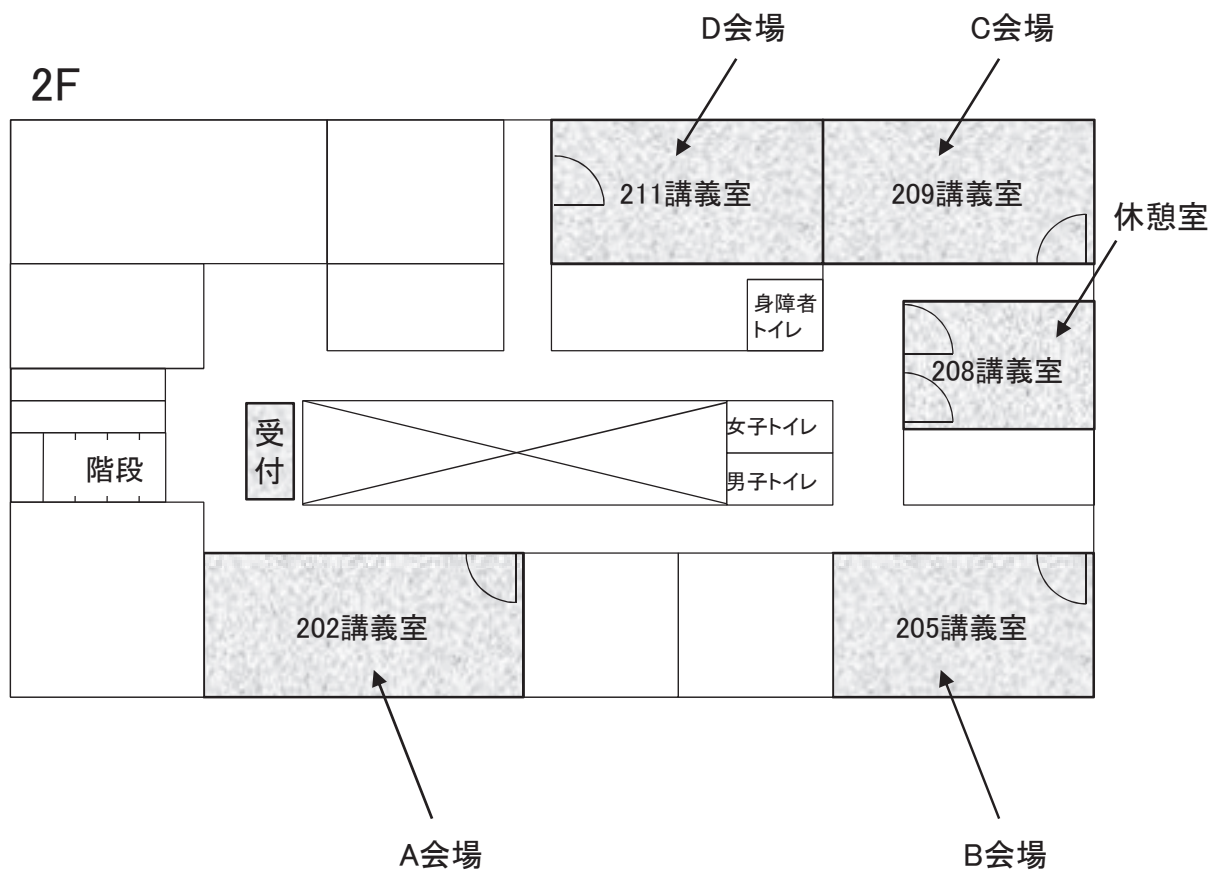
生物資源科学部1号館

- ・支部奨励賞 授賞式(1F)
- ・受賞講演(1F)
- ・幹事打合せ(2F)
- ・支部参与会(2F)
- ・受付(1F)(10:30～14:20)



生物資源科学部3号館

- ・一般講演(2F)
 - ・休憩室(2F)
 - ・受付(2F)
- (14:30~17:30)



賛 助 企 業

天野エンザイム(株) 岐阜研究所	(株)大愛
アルファー食品(株)	大興産業(株)
(株)井ゲタ竹内	大山乳業農業協同組合
池田糖化工業(株)	大山ハム(株)
(株)猪原商会 山口営業所	大洋香料(株)
(株)大熊	高塚ライフサイエンス(株)
大塚アグリテクノ(株)	(有)タグチ
大塚器械(株) 西条支店	中国ケミー(株)
岡山県酒造組合	帝國製菓(株)
社団法人岡山県農業開発研究所	鳥取科学器械(株)
オハヨー乳業(株)	(有)友田大洋堂
(株)海産物のきむらや	日本オリーブ(株)
片山化学工業(株) 岡山営業所	(株)日本総合科学
カバヤ食品(株)	白牡丹酒造(株)
機能性食品開発研究所	(株)林原
杏林予防医学研究所	備前化成(株)
協和発酵バイオ(株)	ひまわり乳業(株)
山口事業所生産技術研究所	(株)氷温研究所
キリンビール(株) 岡山工場	広島和光(株) 岡山営業所
近畿日本ツーリスト中国四国岡山支店	(株)扶桑理化
久保田商事(株) 広島営業所	プロテノバ(株)
高知酒造(株)	マルキン忠勇(株) 技術研究所
寿製菓(株)	丸善製菓(株)
(株)四国総合研究所	マルトモ(株)
四国乳業(株)	三島食品(株)
(株)シマヤ	(株)宮田薬品
新青山(株)	(株)無手無冠
神協産業(株)	ヤスハラケミカル(株)
(株)酔心山根本店	ヤマキ(株)
諏訪酒造(株)	(株)やまだ屋
正晃(株) 山口営業所	山本薬品(株)
仙味エキス(株)	ルナ物産(株)
(株)ソフィ	湧水製菓(株) 中央研究所

(五十音順)

講

演

会

プ

ロ

グ

ラ

ム

日本農芸化学会中四国支部第36回講演会（例会）

プログラム

2013年6月8日（土）

11:00～12:00 幹事打合せ （生物資源科学部 1号館203号室）

12:00～12:50 支部参与会 （生物資源科学部 1号館203号室）

13:00～13:10 2013年度中四国支部奨励賞 授賞式（生物資源科学部 1号館101号室）

13:10～14:45 受賞講演 （生物資源科学部 1号館101号室）

13:10～13:25 2012年度中四国支部学生奨励賞受賞講演

座長 中川 強（島根大・総科セ）

「シロイヌナズナの花粉発達における細胞内輸送小胞形成に関わる
Sec24の機能解析」

田中優史（鳥取連大・農／島根大）

13:25～13:50 2013年度中四国支部奨励賞受賞講演

座長 神崎 浩（岡山大院・環境生命）

「産業用酵素の同定および生化学的特性の解析」

今中洋行（岡山大院・自然科学）

13:50～14:15 2013年度中四国支部奨励賞受賞講演

座長 松井健二（山口大院・医）

「酢酸菌の膜酵素に関する研究」

薬師寿治（山口大院・医）

14:15～14:45 日本農芸化学会2013年度農芸化学奨励賞受賞講演

座長 江坂宗春（広島大院・生物生産）

「植物の生長促進への利用に資する，枯草菌の転写応答機構の研究」

広岡和丈（福山大・生命工学）

15:00～17:32 一般講演 （生物資源科学部 3号館）

18:00～19:50 懇親会 （島根大学生協第 2食堂）

一般講演プログラム

A 会場 (202 講義室) 「微生物」

- A-1 15:00 出芽酵母の小胞輸送における小胞体膜タンパク質 VAP ホモログの遺伝学的解析
○辛島健文¹, 梶原健太郎², 船戸耕一¹
(¹広島大院・生物圏, ²阪大・微研)
- A-2 15:12 酵母遺伝学的解析系を用いた青枯病菌エフェクター宿主標的因子の探索
○忻 詩博¹, Crina Popa², Marc Valls², 田中直孝¹, 田淵光昭¹
(¹香川大・農, ²バルセロナ大・遺伝学)
- A-3 15:24 分泌経路遮断時のシグナル伝達における GSK3 の機能解析
○矢吹友佳理, 児玉悠史, 坂本有木子, 水田啓子
(広島大院・生物圏)
- A-4 15:36 分裂酵母 *sam2* 変異株における CaCl₂ 感受性の原因遺伝子の同定
○伊藤有紀, 景山瑤子, 大石和義, 川向 誠
(島根大・生資)
- A-5 15:48 分裂酵母のプロテインキナーゼ A 調節サブユニット Cgs1 のユビキチン化の意義
○星田知也, 川向 誠, 松尾安浩
(島根大・生資)
- A-6 16:00 分裂酵母プロテインキナーゼ A によるスピンドルチェックポイント制御機構の解明
○酒井智健, 川向 誠, 松尾安浩
(島根大・生資)
- 16:12 休憩
- A-7 16:20 分裂酵母を用いたアグマチンを経由したポリアミン生合成経路の生理的役割の解析
○青木克幸, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)

- A-8 16:32 分裂酵母における α -マンノシダーゼ過剰発現による線状構造体形成機構の解析
○井上貴博, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)
- A-9 16:44 分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ 合成に関与する *Sjdps1*, *Sjdlp1* 遺伝子のクローニングと相補試験
○望月汐美, 戒能智宏, 川向 誠
(島根大・生資)
- A-10 16:56 α -リポ酸包接体が分裂酵母の生育に与える影響のラマン分光法による研究
○五十嵐良¹, 寺尾啓二², 中田大介², 生田直子², 安藤正浩³, 重藤真介⁴, 濱口宏夫⁴, 戒能智宏¹, 川向 誠¹, 山本達之¹
(¹島根大・生資, ²シクロケムバイオ(株), ³早稲田大, ⁴台湾国立交通大)
- A-11 17:08 大腸菌の長期定常期における生存機構の解析
○川口純平¹, 長里彩花², 村田正之¹, 長光博史¹, 高坂智之², 山田 守^{1,2}
(¹山口大院・医, ²山口大・農)
- A-12 17:20 微生物フローラ解析法, T-RFLP 法と DGGE 法の比較
○曾我夏実¹, 芦田裕之², 丸田隆典¹, 石川孝博¹, 澤 嘉弘¹
(¹島根大・生資, ²島根大・総科セ)

B 会場（205 講義室）「タンパク質・天然物・代謝」

- B-1 15:00 DsbA の活性中心配列 CXXC に導入したコンビナトリアル変異導入と機能解析
○田村 隆, 周藤慎也, 清遠亜紗子, 稲垣賢二
(岡山大院・環境生命)
- B-2 15:12 金表面親和性ペプチドを用いた機能的タンパク質固定化
○重森陽士郎, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, 高橋裕一郎
(岡山大院・自然科学)
- B-3 15:24 大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現に及ぼす諸因子の検討
○今中洋行¹, 三木駿也¹, 黒木健太郎², 今村維克¹, 中西一弘³
(¹岡山大院・自然科学, ²岡山大院・医歯薬学総合, ³中部大学・応用生物)
- B-4 15:36 バイオ分子間相互作用検出に及ぼすリガンドタンパク質固定化配向の影響
○松下瑠奈, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
(岡山大院・自然科学)
- B-5 15:48 *Bacillus* 属細菌由来カラギーナン分解酵素は幅広い基質特異性を持つ
○高橋 亮¹, 大西浩平²
(¹高知大院・農, ²高知大・総研セ)
- B-6 16:00 β -N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin の関連化合物の探索
○浅尾昂平, 神崎 浩, 仁戸田照彦
(岡山大院・環境生命)
- 16:12 休憩
- B-7 16:20 大腸菌による 1,3-ブタンジオール生産の効率化
○片岡尚也^{1,3}, VANGNAI Alisa S.², 田島誉久¹, 中島田豊¹, 加藤純一¹
(¹広島大院・先端物質, ²チュラロンコン大・理, ³現: 山口大・農)
- B-8 16:32 酢酸菌のガラクトン酸酸化系の探索
○玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝
(愛媛大・農)

- B-9 16:44 Cloning and characterization of the *adhB* gene encoding the cytochrome *c* subunit of the membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255, an alcohol oxidation-deficient strain
○Piyanat Charoenyingcharoen¹, Minenosuke Matsutani², Toshiharu Yakushi²,
Gunjana Theeragool¹, Kazunobu Matsushita²
(¹Grad. Sch. of Gen. Eng., Kasetsart Univ., ²Fac. of Agric., Yamaguchi Univ.)
- B-10 16:56 *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3255に見出された *sldBA* パラログ遺伝子のジ
ヒドロキシアセトン生産への寄与
阿野嘉孝¹, ○数井彩加¹, 種場理絵², 山本拓諒², 松谷峰之介², 丸山雅史¹,
薬師寿治², 松下一信²
(¹愛媛大・農, ²山口大・農)
- B-11 17:08 愛媛県東温市住民の血中リグナン濃度に関する疫学調査
○松木 翠¹, 斉藤 功², 江口依里², 丸山広達², 梶原秀平¹, 池田槇子¹,
村上 聖¹, 西脇 寿¹, 山内 聡¹, 岸田太郎¹, 海老原清¹, 谷川 武²
(¹愛媛大・農, ²愛媛大・医)

C 会場（209 講義室）「食品・植物」

- C-1 15:00 さぬきうどんの物性に対する手打ちと機械打ちの延伸方法の影響
○廣澤秀和¹，小野 誠²，真鍋正憲³，合谷祥一²
(¹香川大院・農，²香川大・農，³(株)大和製作所)
- C-2 15:12 減圧処理を利用した低濃度アルコール含有ウニ加工品の製造
○福田 翼，森山 実，古下 学，芝 恒男，原田和樹
(水大校・食品科学)
- C-3 15:24 ブリ胃廃棄物を利用したチャンジャ様発酵食品
○吉山 慧¹，福田 翼¹，犬塚由真²，古下 学¹，芝 恒男²，原田和樹¹
(¹水大校院・水産資源，²水大校・食品科学)
- C-4 15:36 電子スピン共鳴（ESR）法を用いた海藻の抗酸化能に関する研究
○崎村祥太郎¹，服部匡高²，福田 翼¹，和田律子²，原田和樹¹，村上崇幸³，
井上淳詞³
(¹水大校院・水産資源，²水大校・食品科学，³あじかん)
- C-5 15:48 電子スピン共鳴（ESR）法を用いた市販飲料の抗酸化能に関する研究
崎村祥太郎¹，服部匡高²，竹本尚未³，安藤真美⁴，北尾 悟⁴，福田 翼¹，
和田律子²，○原田和樹¹，田村良行⁵
(¹水大校院・水産資源，²水大校・食品科学，³園田学園女大，⁴大阪樟蔭女大，
⁵元羽衣国際大)
- C-6 16:00 魚肉タンパク質摂取による骨格筋萎縮への特異的な効果
○原 由真¹，魚住圭佑¹，安井万智¹，速水耕介²，横井香里²，水重貴文¹，
岸田太郎¹，海老原清¹
(¹愛媛大・農，²日本水産（株）生活機能研)
- 16:12 休憩
- C-7 16:20 複数遺伝子クローニングが可能な植物形質転換用リサイクルベクターシステ
ムの開発
○芝原健太¹，加藤 晃²，立木賢輔²，木村哲哉³，中川 強¹
(¹島根大・総科セ，²奈良先端・バイオ，³三重大院・生資)

- C-8 16:32 シロイヌナズナクラスリンエンドサイトーシスの積荷タンパク質の選別に関する研究
○松波絵里香¹, 安川大喜¹, 長屋 敦¹, 地阪光生¹, 横田一成¹, 中川 強², 西村浩二²
(¹島根大・生資, ²島根大・総科セ)
- C-9 16:44 シロイヌナズナ培養細胞を用いた VTC2 タンパク質の機能解析
○種子田隼人, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 石川孝博
(島根大・生資)
- C-10 16:56 葉緑体由来の酸化的シグナリング関連因子の同定と機能解析
○丸田隆典¹, 大和 開¹, 問田英里², 野志昌弘², 田茂井政宏², 澤 嘉弘¹, 石川孝博¹, 重岡 成²
(¹島根大・生資, ²近畿大・農)
- C-11 17:08 脂質組成と再構成ミトコンドリアキャリア蛋白質の膜輸送活性との関係
○野澤 彰, 戸澤 譲
(愛媛大・PROS)
- C-12 17:20 葉緑体のグアニル酸キナーゼは ppGpp 標的分子か?
○野村勇太¹, 戸澤 譲^{1,2}
(¹愛媛大院・理工, ²愛媛大・PROS)

D 会場 (211 講義室)「生理活性物質・動物」

- D-1 15:00 カキタンニン投与後のラット肝組織の遺伝子発現解析
○大渡康夫¹, 牧野正知¹, 勝部拓矢¹, 山崎雅之², 塩飽邦憲², 石島智子³,
中井雄治³, 阿部啓子³, 板村裕之⁴
(¹島根県産技セ, ²島根大・医, ³東大院・農生科, ⁴島根大・生資)
- D-2 15:12 タデ藍由来ポリフェノール成分の分析と抗酸化性
○石原朋恵¹, 木村英人¹, 小川智史¹, 秋廣高志², 横田一成^{2,3}
(¹寿製菓(株), ²島根大・生資, ³鳥取大院・連農)
- D-3 15:24 アスコルビン酸 2-グルコシドの抗酸化作用に対するトレハロースの増強効果
○小川智史¹, 道田真帆子¹, 木村英人¹, 中村優子², 有福一郎², 横田一成^{3,4}
(¹寿製菓(株), ²鳥取産技セ, ³島根大・生資, ⁴鳥取大院・連農)
- D-4 15:36 アフィニティークロマトグラフィーによる新規幼若ホルモン標的タンパク質
の探索
○西尾智基, 古田賢次郎
(島根大・生資)
- D-5 15:48 capsaicin 受容体 (TRPV1) 活性に作用する物質の検討
○佐藤崇弘¹, 青島 均², 山田康枝¹
(¹近畿大・工, ²山口大院・医)
- D-6 16:00 ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH に対する酸化ストレス保護効果
○中路昌志, 小川智弘, 藤原弘宜, 山田康枝
(近畿大・工)
- 16:12 休憩
- D-7 16:20 アルド及びケトヘキソース全異性体の線虫成長阻害活性
○砂古口博文¹, 吉原明秀², 森本兼司², 何森 健², 佐藤正資¹
(¹香川大・農, ²香川大・希少糖セ)
- D-8 16:32 希少糖 D-プシコースの線虫寿命延長活性とその作用メカニズム
○佐藤正資¹, 砂古口博文¹, 新谷知也², 大隈一裕², 何森 健³
(¹香川大・農, ²松谷化学, ³香川大・希少糖セ)

- D-9 16:44 ビタミン B₁₂ 欠乏線虫 (*Caenorhabditis elegans*) における記憶・学習障害について
○美藤友博, 三崎太平, 薮田行哲, 河野 強, 渡邊文雄
(鳥取大院・連農)
- D-10 16:56 ルミネッセントバイオセンサーを用いたオクトパミン受容体の薬理的解析
○林 剛志¹, 林 直孝², 今井哲弥², 尾添嘉久¹
(¹島根大・生資, ²大塚アグリテクノ (株))
- D-11 17:08 Pro-adipogenic effect of 11-deoxy-11-methylene-prostaglandin (PG) D₂, a stable, isosteric analogue of PGD₂ during the maturation phase of adipocytes
○Pinky Karim Syeda K. Fatema¹, Ferdous Khan¹, Kohji Nishimura², Mitsuo Jisaka¹, Tsutomu Nagaya¹, Fumiaki Shono³, Kazushige Yokota¹
(¹Fac. Life Environ. Sci., and ²Center Int. Res. Sci., Shimane Univ.; ³Fac. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)
- D-12 17:20 Biosynthesis of prostaglandin I₂ at different life stages of cultured adipocytes as determined by the immunological assay for its stable hydrolysis product
○Ferdous Khan¹, Mohammad Sharifur Rahman¹, Pinky Karim Syeda¹, Kohji Nishimura², Mitsuo Jisaka¹, Tsutomu Nagaya¹, Fumiaki Shono³, Kazushige Yokota¹
(¹ Fac. Life Environ. Sci., and ²Center Int. Res. Sci., Shimane Univ.; ³Fac. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

受 賞 講 演

講 演 要 旨

2012 年度中四国支部学生奨励賞

シロイヌナズナの花粉発達における細胞内輸送小胞形成に関わる Sec24 の機能解析

田中優史（鳥取連大・農／島根大）

真核細胞において小胞体膜上で合成されたタンパク質は分泌経路を構成するオルガネラを経て細胞外などへ運搬される。それらのオルガネラ間のタンパク質の輸送は輸送小胞と呼ばれる膜小胞を介して行われる。輸送小胞はオルガネラの膜の一部を切り取ることによって形成され、運搬されるタンパク質は、その形成とともに小胞内に積み込まれる。そして、タンパク質を積んだ小胞は標的となるオルガネラの膜と融合し、これによって小胞内部に積み込まれているタンパク質も標的オルガネラ内に移動する。

この輸送小胞の形成には細胞質に存在する被覆タンパク質が関わっており、膜の切り取りと積荷となるタンパク質の選別を行っている。分泌経路の初発である小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送は coat protein II (COP II) 複合体と呼ばれる被覆をもつ小胞が担っている。その被覆は低分子量GTP結合タンパク質である Sar1 と 2 種類のタンパク質複合体(Sec23/Sec24 複合体, Sec13/Sec31 複合体)から構成され、これらのタンパク質の連続的な会合によって COP II 小胞が形成される。まず、Sar1 が活性化されることによって小胞体膜と結合し、これを目印として Sec23/24 複合体が小胞体膜上に集合する。このとき、その複合体は適切な積荷を選別し捉える。さらに、Sec13/31 複合体が積荷を捉えた Sar1-Sec23/24 複合体を架橋することによって、小胞の出芽が起こる。

これらの被覆複合体の研究は出芽酵母や動物細胞を用いて盛んに行われているが、植物細胞では器官・個体レベルでの機能は知られていない。当研究室では、これら COP II 被覆の構成因子が植物の高次生命活動に関わっていると考え、Sec24 に注目して解析を行った。COP II 小胞形成過程において、Sec24 は小胞に取り込むべき積荷と直接結合することで、積荷の認識を行っていると考えられている。

シロイヌナズナのゲノムには 3 種類の Sec24 ホモログ (AtSec24A, B, C) が存在し、我々は AtSec24B のノックアウト株 (*atsec24b-1*) と AtSec24C のノックダウン株 (*atsec24c-1*) を単離した。*atsec24b-1* と *atsec24c-1* では植物体の形態上の異常は見いだされなかったが、*atsec24b-1* では雄性配偶体である花粉を通した *atsec24b-1* アリルの次世代への伝達効率が低下していた。そこで、染色試薬を用いて花粉のバイアビリティーを調べたが、ほぼすべての花粉が正常に発達していることが示唆された。花粉は雌しべに受粉した後、花粉管を伸ばして胚珠まで精細胞を届ける。そこで、花粉管の発芽率を調べたところ、*atsec24b-1* の発芽率は野生株と比較して半分程度にまで低下していた。

さらに、植物の発達における Sec24 の機能を明らかにするために、*atsec24b-1* と *atsec24c-1* を掛け合わせたが、二重ホモ接合体は得られなかった。そこで、*atsec24b-1* と *atsec24c-1* の両アリルの次世代での分離を調べたところ、*atsec24b-1* と *atsec24c-1* の両アリルをもつ花粉に由来する次世代は見いだされなかった。*atsec24b-1* と *atsec24c-1* の二重ヘテロ接合体で発達過程の花粉を調べたところ、*atsec24b-1* と *atsec24c-1* の両アリルをもつ花粉は第一有糸分裂後に発達が停止することが示唆された。

花粉は第一有糸分裂後に精細胞の前駆細胞である雄原細胞を形成し、その雄原細胞がさらに分裂した後に、発芽に必要な物質の蓄積を行うことで成熟した花粉となる。これらの結果から AtSec24B は発芽に必要な物質の蓄積に関わり、また AtSec24C と協調して雄原細胞の形成過程にも関与していることが考えられた。

2013 年度中四国支部奨励賞

産業用酵素の同定および生化学的特性の解析

今中洋行（岡山大院・自然科学）

微生物、植物や動物などが生産する酵素は、一般に常温、常圧下で高い触媒活性を有し、反応選択性、基質特異性が高く、副反応もほとんど生じない。そのため、効率的に目的物質を合成でき、省エネルギープロセスの開発が可能である。これまでに数多くの有用酵素が発見され、現在においても洗剤を含む医薬分野、食品分野、環境分野など幅広い産業で活用されている。我々のグループでは産業応用の可能性を有する酵素の同定、機能発現制御を目指し、多様な酵素生産ポテンシャルを有する放線菌、枯草菌由来酵素について下記の研究を進めてきた。

- (1) 放線菌 *Streptomyces mobaraensis* の培養上清より新規アシラーゼ群 (*Sm*-PVA, *Sm*-ELA, *Sm*-SA, *Sm*-AA) を見出した。そして、これらの精製、特性解析、速度論的解析、遺伝子解析、酵素発現系の構築及び機能性食品素材などへの変換を目的とした検討を進めた。そのうちの一つである新規なアミノアシラーゼ(*Sm*-AA)について、遺伝子配列を決定後、*S. lividans* TK24 を宿主とした組換え *Sm*-AA を発現・精製し、生化学的特性について詳細に調べた。その結果、*Sm*-AA が幅広い基質認識能を有し、多様なアセチル化アミノ酸だけでなく、C2~C16 の、様々な長さの飽和脂肪酸からなる *N*-Acyl-L-Met を効率よく加水分解する興味深い酵素であることを明らかにした。
- (2) 枯草菌 *Bacillus circulans* の生産する β -ガラクトシダーゼに関して、これまでに報告例のなかった分子量約 195 kDa の酵素 (BgaD-A) を同定するとともに、当該酵素をコードする遺伝子のクローニングに成功した。また、*B. circulans* が、合成基質 2-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド (2-nitrophenyl β -D-galactopyranoside : ONPG) に対する分解活性が低く、ガラクトシル基転移活性が高い酵素を 3 種類 (BgaD-B, BgaD-C, BgaD-D) 生産することを見出した。これら β ガラクトシダーゼの欠失変異体をそれぞれ精製・同定するとともに、酵素反応の詳細について調べたところ、 β -ガラクトシド結合を加水分解するだけではなく、ガラクトシル基転移反応によりラクトースからプレバイオティクスとして利用できるガラクトオリゴ糖 (腸内ビフィズス菌増殖因子) を効率的に生成しうることがわかった。一方で、野生型 β ガラクトシダーゼ (BgaD) の C 末端領域に存在するジスコイジンドメインがガラクトオリゴ糖生産の抑制に働き、ガラクトオリゴ糖の蓄積を阻害していることを明らかにした。

本講演では(1)で示した *Sm*-AA を含む放線菌由来アシラーゼ群、(2)枯草菌由来 β -ガラクトシダーゼに関する、これまでの取り組みや現在の研究の詳細について発表したい。

酢酸菌の膜酵素に関する研究

薬師寿治（山口大院・医）

酢酸菌は、お酢をつくる微生物として古代から人類に親しまれてきた。近代的な発酵産業の中では、ビタミンC生産におけるソルボース発酵で酢酸菌の高い糖質酸化能が利用されてきた。微生物学上では、アルファプロテオバクテリアに属する絶対好気性グラム陰性桿菌である。分子系統学的に 10 を超える属が酢酸菌に分類されるが、古典的なイメージとしての酢酸菌は *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* の3株が中心となるであろう。これらは、様々なアルコール類、糖質類に対する高い酸化能が特徴であり、私たちの研究室では、それらを支配している種々の膜結合型脱水素酵素と末端酸化酵素の精製とキャラクターゼーションを行ってきた。なかでも、酢酸菌が営む酸化能の多様性は膜結合型脱水素酵素の多様性に支配されている。基質特異性のみならず、分子的な特徴にも多様性があるため、酵素の機能や分子構築に興味を持ち研究を展開している。これら脱水素酵素は、細胞質膜のペリプラズム側で、それぞれの基質を酸化し膜内のユビキノンを還元することが生理学的な役割である。本発表では、以下の3つの膜酵素に関する最近の知見を紹介したい。

ピロロキノリンキノン（PQQ）依存アルコール脱水素酵素（ADH）

本酵素は次に挙げるアルデヒド脱水素酵素と共に、エタノールからの酢酸発酵に関わる酵素である。*Gluconacetobacter* の本酵素は、3サブユニット（I, II, III）から成る *Acetobacter* や *Gluconobacter* のものとは異なり、サブユニット I, II のみから成り、分子構築に必要とされるサブユニット III を欠く。本菌のゲノムに存在するサブユニット III 遺伝子の破壊でも、サブユニット I と II だけの異種発現でも問題なく ADH を産生することができた。サブユニット I と II の特性が属間で異なることで、このような違いを説明することができると考え、さらに検討を重ねている。

モリブドプテリン（MCD）依存アルデヒド脱水素酵素

本酵素は 30 年以上も前に精製されていた。しかしその生理学的な役割については曖昧であったため、*Acetobacter* を用いて逆遺伝学的な解析を行った。本菌のゲノム解析から系統的に識別可能な2つの遺伝子セットが見いだされた。酢酸菌によく保存された方の遺伝子を破壊した変異株は、酢酸発酵を行うことができず、野生株に比べて顕著にアセトアルデヒドを蓄積した。

フラビン（FAD）依存ソルビトール脱水素酵素

本酵素は、ソルビトールをソルボースに酸化する酵素で、*Gluconobacter* に特徴的である。3つのサブユニットから成っているが、1つのサブユニットは Sec システムによってペリプラズムに輸送される一方、触媒能に関わる残り2つのサブユニットは、Tat システムによって運ばれると考えられている。Tat シグナルを削除した変異型遺伝子を発現させたところ、*in vitro* で活性を検出することができた。野生型酵素では、細胞質で活性を持つ成熟体形成を完了させてペリプラズムへ輸送されると考えられる。

興味深いことに、これら3つの酵素で、基質と反応するサブユニットは補欠分子族を含めて分子的に特徴的であるのに対し、ユビキノンの反応を司るサブユニットは比較的相同性が高い。頭だけをすげ替えたような形のように見えるこれらの酵素を、酢酸菌がどのように進化させてきたのか興味は尽きない。本研究は山口大学応用微生物学研究室で行われたものであり、研究を支えていただいた足立収生名誉教授と松下一信特命教授をはじめ研究員諸氏と学生諸君に感謝申し上げたい。

根圏に生息する枯草菌は、直接共生関係にはないが植物の生育促進に作用する有用根圏微生物である。根圏土壌には、糖やフラボノイド等、様々な有機化合物が植物から浸潤している。根粒菌がフラボノイドに応答して根粒形成遺伝子群を誘導するという知見をもとに、枯草菌も根圏環境を認識するためのシグナル分子としてフラボノイドを利用すると考え、フラボノイドで誘導される遺伝子群を探索し、3つの転写制御系を見出した。これらの転写因子と共に標的遺伝子群の機能を解析することで、フラボノイドを介した枯草菌と植物、あるいは他の根圏微生物との相互作用機構の解明を目指した。加えて、枯草菌での鉄や銅といった金属イオンの取り込み機構についての研究を行い、フラボノイド応答機構の知見と共に植物の生育促進あるいは土壌環境浄化への応用につなげることを目指した。

LmrA/QdoR 制御系がバシラス属で初めて見出されたフラボノイド応答性転写制御系である。互いにパラログスな LmrA と QdoR は、自身を含む5つの標的遺伝子群の各制御領域内にある同じ配列を認識・結合して発現を抑制し、ケルセチン等の特定のフラボノイド存在下で脱抑制する。標的遺伝子群のうち *lmrB* は薬剤排出ポンプを、*qdoI* はケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼをコードしており、枯草菌は栄養豊富である一方で抗菌性のフラボノイドや他の微生物が産生する抗生物質が存在する根圏環境をフラボノイドを介して感知し、それらに対処すべくフラボノイド分解と薬剤耐性を強化すると考えられた。また、2つの転写因子を不活化した枯草菌株はケルセチンに著しい感受性を示したが、その原因が過剰な QdoI 活性によるケルセチン分解中間体の急激な蓄積であると判明し、LmrA/QdoR の二重制御は *qdoI* 発現が致死レベルにならないよう厳密に調節するためにあると考えられた。

次いで、YetL 制御系が別のフラボノイド応答性制御系として見出された。この標的遺伝子群は、自身の遺伝子と推定モノオキシゲナーゼをコードする *yetM* で構成され、YetL のフラボノイド認識特異性は LmrA/YxaF とは全く異なるものであった。これらの転写制御系に加え、鉄イオン応答性転写抑制因子として知られる Fur が、本来のエフェクターである鉄イオンだけでなく、フィセチン等の特定のフラボノイドに対しても応答し、それによってシデロフォア合成系を含む40余りの標的遺伝子群が部分的に脱抑制されることが示された。これにより、植物はフラボノイドを介して枯草菌のシデロフォア生産を促し、自身の鉄イオンの取り込みに利用することが考えられた。

銅イオンは鉄イオンと共に生命活動に必須であるが、過剰になると細胞毒性を及ぼすので、そのホメオスタシスは極めて重要である。枯草菌では、CsoR と YcnK の2つの転写因子によって排出系と取り込み系のそれぞれの遺伝子群が抑制され、銅イオン過剰で排出系が、欠乏で取り込み系が脱抑制される。銅イオン取り込み系の制御機構の知見は、枯草菌を含めたグラム陽性菌では乏しく、本研究で解明した YcnK 制御系は以前の報告例とは異なるユニークなものであった。YcnK および CsoR 制御系を改変して取り込み能を高めることで、土壌を汚染する銅等の重金属を枯草菌細胞内に隔離する等の応用が期待される。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 出芽酵母の小胞輸送における小胞体膜タンパク質 VAP ホモログの遺伝学的解析

○辛島健文¹, 梶原健太郎², 船戸耕一¹ (¹ 広島大院・生物圏, ² 阪大・微研)

細胞が正常に機能するためには、細胞内で合成されたタンパク質や脂質が機能すべきオルガネラへ正しく輸送される必要がある。細胞内での物質輸送の 1 つに、ドナー膜から作られた輸送小胞がターゲット膜と融合することによって行われる小胞輸送がある。小胞輸送は細胞内外の環境変化に応じてタンパク質や脂質によって厳密に制御されていると考えられるが、制御のメカニズムはまだよく理解されていない。当研究室の以前の解析により、オキシステロール結合タンパク質ホモログである Osh をコードする遺伝子群の欠損は小胞体 (ER) からの輸送小胞の形成に必須な遺伝子 *SEC12* の変異株の高温での生育障害、タンパク質の輸送障害、ER exit site の形態異常を抑圧することが明かとなり、Osh は ER からの小胞の形成を負に制御する分子であることが示唆された。酵母に存在する 7 つの Osh の内、Osh1, Osh2, Osh3 は FFAT motif を有しており、小胞体膜タンパク質 VAP の酵母ホモログである Scs2 と結合することが知られている。そこで、本研究では、小胞輸送における Scs2 の役割について遺伝的解析を行なった。その結果、SCS2 を欠損させると *sec12* 変異株の高温での生育障害が抑圧された。また、ER からの小胞の形成に必要な *SEC12* 以外の遺伝子の変異株を用いた解析によって、SCS2 の破壊による抑圧は *sec12* 変異に特異的であることが示された。以上のことから、Scs2 は Osh との相互作用を介して ER からの小胞の形成を制御していることが示唆された。

A-2 酵母遺伝学的解析系を用いた青枯病菌エフェクター宿主標的因子の探索

○忻 詩博¹, Crina Popa², Marc Valls², 田中直孝¹, 田淵光昭¹
(¹ 香川大・農, ² バルセロナ大・遺伝学)

【目的】 多くの植物病原菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に直接注入し、様々な生理機能を攪乱することで感染を成立させる。エフェクターは病原菌の感染成立に大きく貢献しているが、その多くは分子機能が未だに解明されていない。エフェクターの分子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ことから、本研究では酵母遺伝的解析法を用いて青枯病菌から同定された特異的 AWR エフェクターファミリーの 1 つである AWR5(RSp1024)の標的因子の探索を目的とする。

【方法・結果】 RSp1024 を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に過剰発現させると増殖阻害を引き起こすことが明らかにされている。そこで、酵母ノックアウトライブラリーを用いて RSp1024 の酵母内標的因子と遺伝的に相互作用する遺伝子のスクリーニングを行った。これまでに、約 2800 株のスクリーニングから RSp1024 を過剰発現させた時に野生株と比較してより強い増殖阻害を起こした 26 の変異株を感受性株として取得した。また、これら変異株の原因遺伝子は酵母ミトコンドリア機能に関わるものが多く濃縮されていた。さらに、GFP を指標にした細胞内局在観察から RSp1024 がミトコンドリアに局在していることが分かった。これらのデータから RSp1024 がミトコンドリアの何らかの機能を阻害していることが予測された。今後は残りのスクリーニングを終わらせ、全ての RSp1024 標的因子と遺伝的相互作用する遺伝子を取得し、これらのデータを基に既存の網羅的遺伝的相互作用ネットワークから標的因子の同定を行う予定である。

A-3 分泌経路遮断時のシグナル伝達における GSK3 の機能解析

○矢吹友佳理, 児玉悠史, 坂本有木子, 水田啓子 (広島大院・生物圏)

【目的】出芽酵母において、分泌経路のどの段階を遮断しても、リボソームの生合成が転写レベルで抑制される。分泌経路の遮断は、細胞膜ストレスとして Wsc に感知され、そのシグナルが Pkc1 を経て核へと伝達される。当研究室では、このシグナル伝達に Rrs1 が関与することを見出した。Rrs1 は核小体で 60S リボソームサブユニットの生合成を調節する必須蛋白質である。さらに、Rrs1 と相互作用する蛋白質として、哺乳類のリン酸化酵素 GSK3 のホモログである Rim11 を同定した。今回、分泌経路遮断時のシグナル伝達における GSK3 の機能について検討した結果を報告する。

【方法・結果】出芽酵母には 4 つの GSK3 ホモログ遺伝子 *RIM11*, *MCK1*, *MRK1*, *YGK3* が存在する。それぞれの単独破壊株を用いて、分泌経路遮断時におけるリボソーム蛋白質遺伝子の転写への影響を解析した結果、*mck1* Δ株において、リボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制が部分的に解除されていた。さらに、4 つの遺伝子をすべて破壊した *gsk3-null* 株において、リボソーム蛋白質遺伝子の転写抑制解除の度合いが強まっていた。一方、*mck1* Δ株および *gsk3-null* 株を用いてポリソームパターンを解析したところ、野生株のパターンと比較して大きな違いは認められなかった。これらの結果は、GSK3 は分泌経路正常時のリボソーム生合成には関与していないが、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、Rim11, Mck1, Mrk1, Ygk3 が相補的に機能しており、Mck1 が特に重要な機能を持つことを示している。

A-4 分裂酵母 *sam2* 変異株における CaCl_2 感受性の原因遺伝子の同定

○伊藤有紀, 景山瑤子, 大石和義, 川向 誠 (島根大・生資)

【目的】分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、栄養枯渇条件下において有性生殖過程へと移行する。当研究室では、*S. pombe* の野生株を EMS 処理する事により得られた、栄養豊富な条件下でも有性生殖過程へ移行する 9 株の *sam* (skip starvation for mating)変異株の解析を進めている。これまでに *sam2*, 5, 6, 7 変異株は *pkal* 変異を有していること、*sam2* 変異株が特に強い CaCl_2 感受性を示すことが明らかになっている。これより本研究では、*sam2* 変異株の CaCl_2 感受性の原因遺伝子の特定を目的としている。

【方法・結果】1) *sam2* 変異株の CaCl_2 感受性のサプレッサースクリーニングにより、 CaCl_2 感受性を抑圧する *gsf1* を単離したが、*gsf1* は *sam2* 変異の原因遺伝子では無いことを明らかにした。*Gsf1* は分裂酵母の非性的凝集を制御する転写因子である。2) 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析より、*sam2* 変異株には *Pka1* に C358Y 変異と、 Ca^{2+} の細胞内濃度により制御される転写因子 *Prz1* に C602Y 変異が入っている事が明らかになった。次に CaCl_2 感受性テストを行ったところ、*sam2* 変異株および *prz1* Δ株は 0.05M CaCl_2 , *pkal* Δ株は 0.15M CaCl_2 以上で感受性を示した。*prz1* 変異を取り除いた *sam2* 変異株で、0.15M CaCl_2 感受性を示す株は、全て *pkal* 変異を保持していた。*sam2* 変異株より *pkal* 変異を除き、0.1M CaCl_2 感受性を示す株は、*Prz1* に C602Y 変異を保持していた。これより、*sam2* 変異株の CaCl_2 感受性の原因遺伝子として、1 つは *pkal*, もう 1 つは *prz1* である可能性を考えた。

A-5 分裂酵母のプロテインキナーゼ A 調節サブユニット Cgs1 のユビキチン化の意義

○星田知也, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資)

分裂酵母のプロテインキナーゼ A は触媒サブユニット(Pka1)と調節サブユニット(Cgs1)からなるヘテロ 4 量体であり, Cgs1 は cAMP が結合することにより Pka1 から解離し, Pka1 が活性化する。Pka1 は 356 番目のトレオニンがリン酸化され, Cgs1 は 104 番目のセリンがリン酸化される可能性が示唆されている。本研究では, プロテインキナーゼ A の機能を理解していく上で, リン酸化以外にも翻訳後修飾を受けるのではないかと考え, そのメカニズムを解明することを目的とした。

はじめに, Pka1 及び Cgs1 がリン酸化以外の翻訳後修飾を受けるのかどうかをユビキチン化, SUMO 化及び NEDD8 化に関して解析した。その結果, Pka1 はこれらの修飾を受けないのに対して Cgs1 はユビキチン化及び NEDD8 化されることが示唆された。そこで, 今回主要な翻訳後修飾であるユビキチン化が Cgs1 にどのように関係しているのかに焦点をおいて解析を行った。ユビキチン化は通常タンパク質分解のために起こる。そこで, Cgs1 のユビキチン化が分解を目的としているかを調べるために, プロテアソーム変異株(*mts2-1* 株)を用いて解析した。その結果, *mts2-1* 株では修飾された Cgs1 が経時的に検出された。このことから Cgs1 はユビキチン化され, タンパク質分解されていることが示唆された。ユビキチン化は一般的にアミノ酸中のリジン残基を介して行われる。Cgs1 の一次構造には 22 個のリジン残基があるため, どのリジン残基がユビキチン化を受けるのかを酵母ツーハイブリッド法によって同定した。その結果, 78, 87, 120, 126 番目の 1 つもしくは複数のリジン残基が関係していることが示唆された。

A-6 分裂酵母プロテインキナーゼ A によるスピンドルチェックポイント制御機構の解明

○酒井智健, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資)

細胞が分裂する際に異常が起こればガン化や細胞死が起こるため, 細胞周期ではいくつかのチェックポイントが存在している。有糸分裂期 (M 期) ではスピンドルチェックポイントがあり, これは細胞分裂の際に作られる姉妹染色分体が正しく分配できるように監視する細胞周期抑制機構である。

分裂酵母でプロテインキナーゼ A(PKA)は, 糖新生, 減数分裂過程への移行, ストレス応答, 老化などに関わっていることが報告されている。これまでに当研究室では Pka1 がスピンドルチェックポイントに関与していることを見出したことから, 本研究ではその詳細なメカニズムの解析を目的としている。

スピンドルチェックポイントのタンパク質は核内に存在し, M 期でキネトコアに局在する。そこで, *pka1Δ*における Mad2 の局在解析を行った。その結果, Mad2 のキネトコアへの局在が野生株に比較し, *pka1Δ*では低下していた。また, Mad2 と複合体を形成する Mad1 及び Mad3 も同様にキネトコア局在が低下していた。このことから Pka1 が Mad2 のキネトコアへの局在を制御することで Mad1, Mad2 及び Mad3 複合体形成に関与していることが示唆された。以上の結果から, *pka1Δ*においてキネトコアが正常に形成されていない可能性が示唆された。そこで, この可能性を解析するためにキネトコアタンパクである Mis6 および Mis12 の局在解析を行ったところ, これらのタンパク質のキネトコアへの局在は, 野生株と *pka1Δ* で変化はなかった。以上のことから Pka1 はスピンドルチェックポイントタンパク質のみのキネトコアへの局在に関与していることが示唆された。

A-7 分裂酵母を用いたアグマチンを経由したポリアミン生合成経路の生理的役割の解析

○青木克幸, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】ポリアミンはごく例外を除いたすべての生物に広く分布し全ての細胞内で作られる細胞増殖因子である。その生合成経路は主に2種あり、一つはほぼすべての生物が持っているオルニチンを経由した経路、もう一つはアグマチンを経由した経路で細菌、植物、無脊椎動物が単独または代替経路として有していることが報告されている。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においてはこの両方の経路を有している。近年、アグマチンはヒトやウシでは脳内のシナプス小胞内に蓄積し、神経伝達物質の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。そこで本研究では、アグマチンを経由したポリアミン生合成経路の生理的役割について解析することを目的とした。

【方法・結果】アグマチン、オルニチン、プトレシン（ポリアミンの一種）を培地に添加することで野性株に対してどのような影響が生じるか観察した。その結果、アグマチンは同濃度のオルニチン添加より強い感受性を示したことから、ポリアミンの生合成に関して、2つの経路は異なった役割を有することが示唆された。そこで次に、各 *agm*⁺（アグマチンからポリアミンを合成するアグマチナーゼという酵素をコードする、分裂酵母には3種ある）、*spa1*⁺（アンチザイムというポリアミン調節タンパク質をコードする）破壊株を作製し、アグマチン、オルニチンをそれぞれ添加した培地においてこれら菌株の表現型を検定したところ、アグマチン添加培地において *agm3Δ* 株は有意な回復が観察された。さらに、オルニチン添加培地において他菌株の生育は著しく抑制を受けたが、*agm3Δ* 株は全く影響を受けなかった。以上の結果から、アグマチンの生合成経路はオルニチン経路と密接に関連したポリアミンの生合成に関与していることが推測でき、アグマチンの生理的な役割の解明につながることを期待された。

A-8 分裂酵母における α -マンノシダーゼ過剰発現による線状構造体形成機構の解析

○井上貴博, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

出芽酵母では細胞質のタンパク質を液胞内へ輸送する経路として、窒素飢餓で非選択的に輸送するオートファジーと、恒常的に α -マンノシダーゼ (Ams1) やアミノペプチダーゼ 1 (Ape1) を輸送する Cvt (Cytoplasm-to-Vacuole Targeting) 経路がある。分裂酵母では Cvt 経路の存在は不明であるため、Ams1-GFP が栄養条件に応じて局在が変化するか蛍光顕微鏡で観察した。その結果、栄養条件では出芽酵母と異なり、液胞内ではなく細胞質に局在し、一部がドット状に観察されたことから分裂酵母では Cvt 経路が存在しないことが示唆された。興味深い事に窒素飢餓では3時間後に液胞中で線状構造として現れ、さらに数時間後には液胞の直径よりも長く伸長した様子が観察された。Ams1 は窒素飢餓時に液胞内へ局在を変えたことから、オートファジーにより運ばれているかどうかを確認した。各種 *atg* 遺伝子破壊株において、Ams1-GFP は液胞に輸送されず細胞質に拡散し、線状構造は観察されなかった。また、出芽酵母 Ape1 (Ams1 と複合体を形成し Cvt 経路によって液胞へ輸送される) と 29%の相同性を示す Aap1 を欠損させた場合、Ams1-GFP の効率的な液胞輸送に支障をきたすことが分かった。よって、分裂酵母の Ams1 は Cvt 経路ではなくオートファジーにより液胞内へ運ばれていることが分かった。さらに、オートファジックボディー分解の阻害 (*isp6Δ*) や、液胞内酸性化を阻害 (*vma1Δ*) した場合は線状化が見られないことから、オートファジックボディーが分解され、Ams1-GFP が酸性の環境にさらされる条件が線状構造形成に必要であることが考えられた。

A-9 分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ 合成に関与する *Sjdp1*, *Sjdlp1* 遺伝子のクローニングと相補試験
○望月汐美, 戒能智宏, 川向 誠 (島根大・生資)

【目的】 *Schizosaccharomyces japonicus* はミトコンドリアの呼吸鎖における電子伝達系の必須因子であるコエンザイム Q(CoQ)を生合成しないことが報告されている。しかしながら、2007 年に *S. japonicus* のゲノム配列が公開され、ほぼすべての CoQ 合成酵素遺伝子が保持されていることが明らかとなった。*S. pombe* の CoQ 合成酵素遺伝子であるデカプレニルニリン酸合成酵素遺伝子(*Spdps1*, *Spdlp1*)はヘテロテトラマーを形成して機能し、その破壊株 LJ1030(Δ *Spdps1*), RM19(Δ *Spdlp1*), LA1(Δ *Spdps1 Δ *Spdlp1*)は最少培地で生育遅延し、CoQ を合成出来ないことが知られている。そこで *Spdps1*, *Spdlp1* と相同性の高い *S. japonicus* の遺伝子をゲノムから単離し、*S. pombe* の遺伝子破壊株に導入することで表現型や CoQ 合成の回復が見られるかを指標として機能性を有しているかの検討を行った。*

【方法・結果】 *S. pombe* の *Spdps1*, *Spdlp1* と相同性がある *S. japonicus* の遺伝子を *Sjdp1*, *Sjdlp1* として、ゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し、*S. pombe* 発現用ベクターにクローニングした後、*S. pombe* LJ1030, RM19, LA1 に導入した。その結果、それぞれ破壊した遺伝子に相当する *S. japonicus* の遺伝子を導入した株において最少培地での生育遅延が回復した。生育が回復した株から CoQ を抽出し、HPLC で CoQ を測定したところ CoQ10 を主産物とするピークを検出した。以上の結果より、*S. japonicus* が保持している *Sjdp1* と *Sjdlp1* は CoQ の側鎖合成の機能を有していることが示唆された。

A-10 α -リポ酸包接体が分裂酵母の生育に与える影響のラマン分光法による研究
○五十嵐良¹, 寺尾啓二², 中田大介², 生田直子², 安藤正浩³,
重藤真介⁴, 濱口宏夫⁴, 戒能智宏¹, 川向 誠¹, 山本達之¹
(¹島根大・生資, ²シクロケムバイオ(株), ³早稲田大, ⁴台湾国立交通大)

【目的】 α -リポ酸は抗酸化剤の一種で、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの補酵素としても機能する。糖代謝促進や糖尿病の予防効果が知られている。ヒト体内で合成される α -リポ酸の R 体は単体では不安定なため、通常は 2 種類の光学異性体のラセミ体として薬剤に用いられるが、副作用も報告されている。近年、R 体を γ -シクロデキストリン (CD) で包接安定化した新規な薬剤が、シクロケム社により開発された。そこで、この包接体が生細胞に与える効果を、R 体と S 体で比較するために、分裂酵母を用いて生育曲線に与える影響を調べた。また、細胞代謝を、顕微ラマン分光法によって観察した。

【方法・結果】 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の野生株 (W.T.), Δ *dps1* 変異株と Δ *sod1* 変異株を最少培地で生育し、 α -リポ酸の R 体又は S 体、およびこれらの γ -CD 包接体の 4 種類の試薬を培地に添加した際の生育曲線を、濃度依存的に比較した。顕微ラマン分光測定によって、生きた分裂酵母のラマンシグナルを経時的に追跡した。 Δ *dps1* 変異株は、4 種類の試薬添加によって濃度依存的に生育遅延が回復した。高濃度の α -リポ酸単体添加は、 Δ *dps1* 変異株の生育を抑制したが、 γ -CD 包接体は、同じ濃度でも Δ *dps1* 変異株の生育を促進した。R 体と S 体の効果に差は見られなかった。 Δ *sod1* 変異株の生育は、4 種類のいずれの添加によっても回復しなかった。試薬類を添加した際の W.T.と Δ *dps1* 変異株細胞のラマンシグナルの変化は、全体として時間依存的に大きく変化しなかったが、ラマンマッピングの変化の詳細を、当日発表する予定である。

A-11 大腸菌の長期定常期における生存機構の解析

○川口純平¹, 長里彩花², 村田正之¹, 長光博史¹, 高坂智之², 山田 守^{1,2}
(¹ 山口大院・医, ² 山口大・農)

自然界において、栄養の枯渇は多くの生物にとって脅威であり、それに対抗するための様々な生存戦略を有している。グラム陰性菌では長期定常期における飢餓状態への集団適応として、栄養環境に適した表現型をもつ集団が先に存在する集団と入れ替わることで飢餓ストレスに対応する、長期定常期における増殖優位性 (GASP) が提唱されている。大腸菌で、栄養豊富な LB 培地において長期定常期にシグマ S 遺伝子に変異をもった細菌集団が報告されている¹⁾。さらに、*rpoS* 変異をもつ集団が、同じ培養液中で時間の経過とともに適応できなかった集団と入れ替わっている可能性が示唆されている²⁾。しかし、細菌集団の入れ替わりが実際に起きているのかも含めて、その詳細は未だ明らかになっていない。我々は、大腸菌が LB 培地において長期培養時に生菌数が周期変動していること、培養温度が長期生存に影響を与えることを明らかにした。さらに、長期定常期で重要な役割を果たすと考えられている *rpoS* 破壊株においても、野生株と同様の生菌数の周期変動が観察された。これは *rpoS* 非依存的な GASP の存在を示唆している。GASP の獲得に寄与する *rpoS* 以外の遺伝子に注目するため、長期定常期に採取した大腸菌のゲノム塩基配列を次世代シーケンスにより決定したところ、複数の遺伝子への変異を確認した。

1) Zambrano *et al.* (1993) *Science* 259:1757-1760

2) Zambrano and Kolter (1996) *Cell* 86:181-184

A-12 微生物フローラ解析法、T-RFLP 法と DGGE 法の比較

○曾我夏実¹, 芦田裕之², 丸田隆典¹, 石川孝博¹, 澤 嘉弘¹
(¹ 島根大・生資, ² 島根大・総科セ)

【目的】T-RFLP 法、DGGE 法は、ともに微生物の 16S rDNA の塩基配列の違いを利用して微生物群集の多様性を簡便に把握することができる方法である。T-RFLP 法では一般的に 4 塩基認識制限断片の位置から微生物種を比較する T-RF プロフィール分析が行われているが、精度よく断片サイズを決定できれば、16S rDNA データベースを基に精度の高い微生物種の特特定が可能である。今回は T-RFLP 法の最適解析条件の検討を行い、研究室保存の乳酸菌ライブラリーの解析を行い、従来の DGGE 法と比較を行ったので報告する。

【方法・結果】T-RFLP には 16S rDNA 遺伝子の領域 I (341-907) と領域 II (968-1378) を標的とする 2 つのプライマーセットを用いた。蛍光色素の相違によって生じるフラグメント解析値の誤差を ± 1 塩基以内に収めるため、当研究室で作製した 4 色蛍光標準フラグメントを基に補正式を作成した。解析前に各キャピラリーに標準フラグメントを流し、キャピラリーごとの補正式を毎回作成した。領域 I, II をそれぞれ制限酵素処理後混合し、GeneMapper 解析を行うことで単独サンプルの補正精度が向上した。制限酵素 Msp I, Hha I, Xsp I は多様精度が高く効果的であった。これら最適条件で、ケニア発酵乳より分離した乳酸菌ライブラリーを T-RFLP で解析を行ったところ、主に属レベルで同定することが可能となった。また、これら乳酸菌ライブラリーの領域 II を PCR 増幅後、DGGE 法で解析し、T-RFLP 法との比較を行った。

B-1 DsbA の活性中心配列 CXXC に導入したコンビナトリアル変異導入と機能解析

○田村 隆, 周藤慎也, 清遠亜紗子, 稲垣賢二 (岡山大院・環境生命)

【目的】大腸菌 DsbA は活性中心に Cys-Pro-His-Cys の配列を持ち、ペリプラズム空間に分泌された蛋白質に SS 架橋を導入する。2つの Cys 残基間のアミノ酸配列が酸化還元電位を支配し、DsbA の場合は CPHC 配列モチーフが強い酸化力を与えると考えられてきた。本研究では Cys 残基間のジペプチド配列にコンビナトリアル変異を導入して機能解析を行った。DsbA は性絨毛 F ピリ形成に必須なのでバクテリオファージ M13 の感染能を利用して変異 DsbA 機能を評価した。

【方法・結果】[CXXC] コンビナトリアル変異により 23 種類の変異遺伝子が得られた。これを *E. coli* JCB472 (*F'* *dsbA*) に形質転換し力価 200 pfu の M13 ファージを感染させてプラーク形成能を測定した。野生型 DsbA よりもプラーク形成を 40 倍以上高くする DsbA[CDIC] が同定された。その酸化還元電位は -172 mV であり野生型 DsbA (-122 mV) よりも酸化力の弱い酵素であった。同様の電位をもつ DsbA[CRIC] は野生株と同程度のプラーク形成能しか示さず、他の変異型 DsbA の酸化還元電位も測定した結果、酸化還元電位と DsbA の細胞内機能とは直接的な関係がないことが示された。タンパク質を正しくフォールディングする機能であるジスルフィドイソメラーゼ活性について速度論解析を行った結果、CDIC 型 DsbA は野生型、CRIC 型に比較して高い初速度を示した。インスリン還元活性やシャペロニン活性では三者の違いは見られず、DsbA の細胞機能は正しいジスルフィド架橋を触媒する速度論的性質と相関することが示された。

B-2 金表面親和性ペプチドを用いた機能的タンパク質固定化

○重森陽士郎, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行, 高橋裕一郎
(岡山大院・自然科学)

【目的】金は耐食性、導電性及び低い電気抵抗など優れた性質を有することから電子部品、触媒、コーティング剤などとして工業的に汎用されている。一方、バイオテクノロジー分野においても、バイオセンサー、バイオチップ、バイオ燃料電池などの様々なデバイスの基盤として利用されている。その場合、金表面上におけるタンパク質などの機能性生体分子の構造維持および配向制御は極めて重要な技術要素である。そこで、本研究は、独自に単離した 6 アミノ酸からなる新規な金表面親和性ペプチド(Au3-tag)を用いた金表面への機能的タンパク質固定化法について検討・評価することを目的とした。

【方法・結果】N 末端あるいは C 末端に Au3-tag を連結した超好熱始原菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 Esterase(EstAf)の発現ベクターをそれぞれ構築した。それらを用いて大腸菌 Rosetta2(DE3)を形質転換した後、発現タンパク質を精製した。その後、各種 Au3-tag 連結 EstAf を用いて、金表面吸着時後の残存活性測定、表面プラズモン共鳴法(SPR)による固定化特性解析を行った。そして、タグ連結末端の変更、タンデム化などの連結様式が固定化に及ぼす影響を調査した。その結果、Au3-tag 連結末端の差異により残存活性の違いが見られ、吸着時の配向性による構造変化の影響が示唆された。また、Au3-tag の両末端への連結やタンデム化により大幅な残存活性および吸着量の増加が見られた。以上の結果より、Au3-tag が金表面へのタンパク質の固定化に利用できるだけでなく、タンデム化などを通じて機能向上が可能であることが示唆された。

B-3 大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現に及ぼす諸因子の検討

○今中洋行¹, 三木駿也¹, 黒木健太郎², 今村維克¹, 中西一弘³
(¹岡山大院・自然科学, ²岡山大院・医歯薬学総合, ³中部大学・応用生物)

【目的】 放線菌 *Streptomyces mobaraensis* の培養上清より見出した ϵ -リジンアシラーゼ (Sm-ELA) について、我々のグループでは、酵素の大量取得を目指し、大腸菌を宿主とした組換えタンパク質 (rSm-ELA) 発現系の構築に取り組んできた。その結果、培地成分の変更やコドン改変等のアプローチにより rSm-ELA 発現の質の向上が可能であることがわかった。そこで本研究では、rSm-ELA の最適発現条件探索を通じ、コドン分布、培地成分、発現誘導条件などの諸因子が Sm-ELA などの難発現タンパク質の活性体取得に及ぼす影響について検討・評価することを目的とした。

【方法・結果】 各種 Sm-ELA 配列を導入した rSm-ELA 発現ベクターを用い、大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) を形質転換した後、各種培地中、終濃度 0.1 mM の IPTG あるいは自動発現誘導用の各種糖を適量添加し、20°C、24 時間の条件で rSm-ELA の発現誘導を行った。SDS-PAGE により発現解析を行い、酸性ニンヒドリン法により培地あたりの酵素活性を測定した。発現条件を検討した結果、タンパク質発現に適した塩濃度があること、カタボライト抑制による翻訳抑制や、N 源、C 源の過剰添加による charged-tRNA の確保などが活性体の取得に重要であることが示唆された。また、コドン最適化人工遺伝子を用いた発現検討も行い、発現総量だけでなく、活性体発現にも効果的であることがわかった。さらに、コドン改変に関しては、開始コドン近傍のレアコドンを一カ所置換するのみでも十分な活性発現効果がみられた。

B-4 バイオ分子間相互作用検出に及ぼすリガンドタンパク質固定化配向の影響

○松下瑠奈, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行 (岡山大院・自然科学)

【目的】 細胞内に存在するタンパク質、核酸などのバイオ分子群は、相互作用を介して各種機能の制御を担っている。これらの分子間相互作用を *in vitro* で精密に再現し、評価できれば、生命現象を正確に理解するための優れた汎用技術となる。そこで本研究では、独自に確立した親水性ポリスチレン親和性ペプチド (PS-tag) を介した機能的バイオ分子固定化法を用い、ペプチド-タンパク質間相互作用検出系をデザインし、リガンドタンパク質の固定化配向が相互作用検出感度に及ぼす影響について調査した。モデルとして、Serine acetyltransferase (SAT) の C 末端ペプチドと O-Acetylserine sulphydrylase (OASS) との相互作用を用いた。

【方法・結果】 N 末端あるいは C 末端に PS-tag を連結した *Escherichia coli* 由来 OASS (それぞれ PS-OASS, OASS-PS), およびアミノ酸 10 残基からなる各種 SAT C 末端ペプチド (SAT C10) を連結した超高温熱始原菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 Esterase (EstAf) をそれぞれ調製した。そして、各種 OASS を親水性 PS プレート表面上に固定化し、各種 SAT C 末端ペプチドとの相互作用を調べた。その結果、ペプチド配列による親和性の違いに応じた相互作用がそれぞれ検出された。一方、PS-tag 連結末端の差異による OASS 固定化検出量に差は見られなかったのにもかかわらず、OASS-PS は、PS-OASS に比べて相互作用の検出量および検出感度の著しい低下が見られた。したがって、OASS の固定化配向が狙い通りに制御され、相互作用部位の位置が変化し、立体障害の影響を受けたことが示唆された。

B-5 *Bacillus* 属細菌由来カラギーナン分解酵素は幅広い基質特異性を持つ

○高橋 亮¹, 大西浩平² (¹高知大院・農, ²高知大・総研セ)

【背景】カラギーナンは紅藻類の細胞壁に生産される硫酸基結合ガラクトースポリマーであり、主に κ , ι , λ の3種類のカラギーナンが産業的に利用されている。カラギーナンを生産するキリンサイは養殖が可能で、食料と競合しないバイオ燃料の糖源として有望である。カラギーナンをバイオ燃料生産の原料として用いるためには糖化处理が必要であることから、当研究室ではカラギーナン分解微生物のスクリーニングを行い、カラギーナンを唯一の炭素源として利用できる *Bacillus* 属細菌 KLC17 を単離している。これまでに KLC17 が有するカラギーナン分解酵素をコードする *cglA* の遺伝子領域の特定やクローニング、諸性質の特徴づけ等を報告してきたが、本学会では CglA の基質特異性と酵素速度論的解析、および *cglA* 遺伝子近傍にコードされている推定カラギーナン分解関連遺伝子群について考察する。

【結果と考察】 κ , ι , λ -カラギーナンそれぞれの基質に対する分解活性試験の結果、CglA は試験した3種類すべてのカラギーナンを分解可能であった。CglA の反応速度は κ , ι , λ の順に低くなり、カラギーナンの硫酸化が多いほど活性が低下する結果となった (κ , ι , λ -カラギーナンの繰り返し二糖単位中の硫酸基結合数はそれぞれ1個, 2個, 3個である)。各基質に対する CglA の酵素速度論パラメータは、 κ , ι , λ についてそれぞれ $V_{\max}$ ($\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg protein}$) = 46 ± 4 , 27 ± 1 , 11 ± 2 , K_m (%) = 0.87 ± 0.12 , 0.83 ± 0.06 , 0.46 ± 0.18 であった。これまでに知られているカラギーナン分解酵素はいずれも厳密な基質特異性を示しており、本 CglA が広い基質特異性を示す要因についての検討が必要である。また、ドラフトゲノム解析によって得られた *cglA* 遺伝子近傍領域の解析の結果、 α -galactosidase や複数の sulfatase, extracellular solute-binding protein, sugar ABC transporter 等をコードする遺伝子が存在していた。KLC17 はこれらの遺伝子産物を用いてカラギーナンの分解と取り込みを行っている可能性が示唆される。

B-6 β -N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin の関連化合物の探索

○浅尾昂平, 神崎 浩, 仁戸田照彦 (岡山大院・環境生命)

【目的】当研究室では、新規 β -N-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) 阻害物質 TMG-chitotriomycin (HU-1) を *Streptomyces anulatus* NBRC13369 株培養液中より見出した。さらに、HU-1 特有のプロダクトイオン (m/z 348) を選択的に検出する LC/MS/MS により本菌株培養液中に2種類の HU-1 類縁体が確認された。本研究では、HU-1 と同じ陽イオン性の化合物を選択的に分画する前処理と LC/MS を組み合わせて本菌株培養液中から HU-1 関連化合物の探索を行った。

【方法・結果】培養液の前処理として2種類の陽イオン交換固相抽出を検討し、抽出画分を LC/MS に供した。逆相-強陽イオン交換ミックスモード固相抽出分画物では主成分として HU-1 を検出したが、HU-1 関連化合物と考えられるピークは検出されなかった。一方、逆相-弱陽イオン交換ミックスモード固相抽出分画物では HU-1 と異なる化合物 KA-1 を主成分として検出した。還元末端を有するオリゴ糖であることからアノマー分離して溶出される HU-1 と同様に、KA-1 は2つのピークに分離して溶出された。さらに、KA-1 はマスペクトルにおいて HU-1 より 84 Da 大きい分子量関連イオンピークを示し、その MS/MS において HU-1 に特徴的なプロダクトイオン (m/z 348) が検出された。以上のことに加え、KA-1 は先に示した HU-1 類縁体とは異なる分子量関連イオンピークを示したことから、新規 HU-1 関連化合物であることが示唆された。この KA-1 が含まれる画分は高い GlcNAcase 阻害活性を示したことから、HU-1 と同様に KA-1 は GlcNAcase 阻害物質である可能性が考えられた。

B-7 大腸菌による 1,3-ブタンジオール生産の効率化

○片岡尚也^{1,3}, VANGNAI Alisa S.², 田島誉久¹, 中島田豊¹, 加藤純一¹
(¹広島大院・先端物質, ²チュラロンコン大・理, ³現: 山口大・農)

【背景・目的】近年, 化石資源枯渇の懸念や環境問題への関心の高まりから, 化石資源依存型から再生可能資源依存型の物質生産へと注目が移行している。1,3-ブタンジオール (1,3-BD) は, 医薬・農薬の分野で利用されているジオールであり, 天然に産出された報告例のないケミカルである。再生可能資源を原料とした 1,3-BD 生産例はほとんど存在せず, 唯一の報告例は, *Ralstonia eutropha* 由来 *phbA*, *phbB* 及び *Clostridium acetobutylicum* 由来 *adhE* を大量発現させた *Escherichia coli* HB101 での生産であり, その収量, 収率は, 工業生産に適応するレベルではなかった。そこで本研究では, 効率的な 1,3-BD の生産技術の確立を目的に設定し, 研究に着手した。

【方法・結果】まず, 1,3-BD の高生産を達成するにあたり, 1,3-BD 生合成遺伝子の最適化を行った。報告例で採用されていた酵素 PhbA, PhbB, AdhE のアイソザイム遺伝子を用いて, 様々な遺伝子の組み合わせを持つベクターによる *E. coli* MG1655 *lacI*^Δ 形質転換株を作製し, 生産性を評価した。その結果, AdhE の代わりに *C. saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld を利用することで, 生産性が 3.9 倍になることを見出した。次に, 生産性を効率化すべく, 発酵槽を用いて, pH, 攪拌速度の最適化を行った。その結果, pH5.5, 攪拌速度 425 rpm, 通気量 1.0 vvm に制御した回分培養により, 40 g/L グルコースから収量 8.88 g/L, 収率 44.4%, 最大生産速度 3.63 mM/h で 1,3-BD を生産する結果を得た。さらに, 最適化した条件下での流加培養による 1,3-BD 生産を試みたところ, 収量 15.8 g/L, 収率 37.2%, 最大生産速度 3.74 mM/h の結果を得た。

B-8 酢酸菌のガラクトuron酸酸化系の探索

○玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝 (愛媛大・農)

【目的】酢酸菌は自然界では花や腐敗した果実などを好み, そこに豊富に含まれている糖や糖酸, 糖アルコールを強力に酸化する能力をもつ。酸化発酵と呼ばれるこれらの反応は細胞膜に局在した酵素群の機能によるものであり, これまでにさまざまな基質に対応する酵素活性が見出されている。花や果実はセルロースと複合多糖類ペクチンから成り, その腐敗過程ではペクチン構成糖であるガラクトuron酸 (GalUA) が生成されていると考えられる。本研究では, これまでに検討されていなかった酢酸菌における GalUA 酸化系の存在を確認することを目的とした。

【方法・結果】柑橘果皮を分離源としたスクリーニングにより酢酸菌を分離した。分離菌および研究室保存株を培養して細胞膜画分を調製した。人工電子受容体 Ferricyanide を用いたアッセイ法により, 調査した全ての酢酸菌の細胞膜に GalUA 酸化活性が確認できたことから, 以後, *Gluconobacter oxydans* NBRC 12528 を用いて検討を行った。本菌は GalUA を単一炭素源とする培養では生育せず, グリセロールを添加することで生育したが, 培地中の GalUA 量には変化はみられなかった。休止菌体および細胞膜画分を用いて GalUA と直接振とう反応させると反応液中の GalUA 量が減少したことから, 細胞膜画分に GalUA 酸化活性の存在が確認できた。グルクロン酸に対しても同様の反応が確認できたことから, 酢酸菌はuron酸を広く酸化することが示された。

- B-9 Cloning and characterization of the *adhB* gene encoding the cytochrome *c* subunit of the membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255, an alcohol oxidation-deficient strain
O Piyanat Charoenyingcharoen¹, Minenosuke Matsutani², Toshiharu Yakushi²,
Gunjana Theeragool¹, Kazunobu Matsushita²
(¹Grad. Sch. of Gen. Eng., Kasetsart Univ., ²Fac. of Agric., Yamaguchi Univ.)

Membrane-bound, PQQ-dependent alcohol dehydrogenase (PQQ-ADH) is a key enzyme involved in ethanol oxidation in acetic acid bacteria. PQQ-ADH is located on the periplasmic side of the cytoplasmic membrane and consists of subunits I, II, and III encoded in the *adhA*, *adhB*, and *adhS* genes, respectively. In this study, we aim to characterize *adhB* gene from *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255 (formerly *Gluconobacter suboxydans* subsp. α IFO3255) having no ethanol oxidation activity because of deficiency in subunit II, the cytochrome *c* subunit of PQQ-ADH. The *adhB* gene from *G. thailandicus* NBRC3255 was revealed having one nonsense mutation in the signal sequence for translocation to the periplasmic space when compared with the *adhB* gene from *G. thailandicus* NBRC3172. *G. thailandicus* NBRC3255 was transformed with the *adhB* genes from the two strains by using a broad-host-range plasmid pBBR1MCS-4. The transformant harboring *adhB* from NBRC3172 but not from NBRC3255 restored an ADH activity dependent on subunit II.

- B-10 *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3255に見出された *sldBA* パラログ遺伝子のジヒドロキシアセトン生産への寄与
阿野嘉孝¹, 〇数井彩加¹, 種場理絵², 山本拓諒², 松谷峰之介², 丸山雅史¹,
薬師寿治², 松下一信² (¹愛媛大・農, ²山口大・農)

【目的】ゲノム解析の結果より, *G. thailandicus* NBRC 3255 のゲノムに *sldBA* のパラログ遺伝子が見出された¹⁾。*sldBA* は *Gluconobacter* 属酢酸菌に特徴的なキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) の構造遺伝子であり, L-ソルボースやジヒドロキシアセトン (DHA) の工業生産に重要である。本研究では, 新たに見出された *sldBA* パラログ遺伝子の DHA 生産への寄与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】*G. thailandicus* NBRC 3255 の *sldA* (NBRC3255_0235) に *Kan^r* カセットを挿入し, *sldA* 破壊株 ($\Delta sldA$) を作製した。また, *sldBA* オペロンをクローニングし, 広域発現ベクター pBBRMCS-4 へライゲートして $\Delta sldA$ へ導入することで, 相補株 (*sldBA*/ $\Delta sldA$) を作製した。これら変異株の GLDH 活性を人工電子受容体 PMS-DCIP を用いたアッセイ法で確認すると, 破壊株では完全に活性は消失し, 相補株で完全に回復した。また, DHA 生成活性をレゾルシノール法, TLC による発色で確認したが, 同様の傾向が見られた。これらの結果から, 本菌の DHA 生産には既知の遺伝子のみが寄与しており, 新たに見出された *sldBA* パラログ遺伝子 (NBRC3255_0025, 0026) は DHA 生産には寄与しないことが示された。現在, パラログ遺伝子の破壊株を作製し, 解析を進めている。

1) Matsutani M, *et al.*, Draft genome sequence of dihydroxyacetone-producing *Gluconobacter thailandicus* strain NBRC 3255, *Genome Announc.*, **1** (2) e00118-13 (2013)

B-11 愛媛県東温市住民の血中リグナン濃度に関する疫学調査
○松木 翠¹, 斉藤 功², 江口依里², 丸山広達², 梶原秀平¹, 池田槇子¹,
村上 聖¹, 西脇 寿¹, 山内 聡¹, 岸田太郎¹, 海老原清¹, 谷川 武²
(¹愛媛大・農, ²愛媛大・医)

【目的】リグナンは広範な食品に存在しており、大豆イソフラボンと並び食品成分中の植物エストロゲンとして注目されている。リグナンは腸内細菌により代謝され血中等に分布する。リグナンは日本での疫学的報告がほとんどないことから、本研究では愛媛県東温市の住民 396 名について、主要なリグナンである Matairesinol (MAT), Secoisolarisiresinol (SECO), Enterodiol (END), Enterolacton (ENL)の血中濃度を UPLC-ToF-MS 法で測定した。

【方法】平成 21 年度から平成 22 年度にかけて、愛媛県東温市にて高血圧、糖尿病、脳卒中、心筋梗塞などの生活習慣病の予防を目的とした詳細検診を実施している疫学研究：東温スタディの参加者、1039 名（男性 334 名、女性 705 名）を対象にした。リグナン濃度調査には、その内 396 名の血清を用いた。リグナンは、血清から抽出を行って分析サンプルとし、超高速液体クロマトグラフ(UPLC, Acquity ultra performance LC, Waters)－四重極飛行時間型(Q-TOF)質量分析器(MS/MS)で測定した。

【結果】本研究のほとんどの被験者で ENL が高濃度で存在した。これは、諸外国の疫学調査と比べ高い濃度であり、日本人の食生活が関連していることを示唆した。SECO の濃度は MAT に比べはるかに高く検出されたことから、主なリグナンソースである可能性がある。測定した各リグナンは、食事データや血液検査結果等との相関を検討している。

C-1 さぬきうどんの物性に対する手打ちと機械打ちの延伸方法の影響

○廣澤秀和¹，小野 誠²，真鍋正憲³，合谷祥一²
(¹香川大院・農，²香川大・農，³(株)大和製作所)

【目的】讃岐うどんには大きく分けて、手打ちうどんと機械打ちうどんがある。この両者は食感が異なると言われているが、その原因は定かではない。本研究では麺棒あるいは、機械のローラーを用いて延伸した生地を茹でて得たうどんの違いを、破断強度試験及びX線解析によって調べた。

【方法】小麦粉と塩水を混ぜて生地を作り、28℃で2時間熟成し、2分間生地を足踏みで捏ね、18℃で一晩熟成させた。この生地を2つに分け、手打ちでは麺棒で延伸し、機械打ちでは製麺機のローラーで延伸した。それぞれを製麺機で切り、生麺とした。生麺を10分間茹で、20℃の冷却水で1分間冷却し、これをサンプルとした。そのサンプルを用いて、茹でた直後から2分毎にクリープメーター（山電）で破断強度測定を行った。さらに茹で伸びによるでんぷんの結晶状態変化を確認するためNano-Viewer（リガク）でX線解析を行った。上記と同様に作製した茹麺を厚さ1mmほどに切り、ワッシャーまたはU字版に入れ、カプトン膜で覆ったものをサンプルとした。

【結果】16回の測定結果を統計処理したところ、歪率70~80%時の弾性率、破断応力、破断歪において、部分的に手打ちうどんの値が高い傾向を示した。さらにX線解析の結果からでんぷんの結晶構造は側面部分と中心部分で違いはあるものの、30分以内の時間において変化は確認されなかった。このことから、茹で麺の表面部分は完全に糊化し、延伸方法による違いは見られないと考えられるが、中心部分はデンプン構造に差はないにもかかわらず延伸方法によって何らかの影響を受けていることが示唆された。

C-2 減圧処理を利用した低濃度アルコール含有ウニ加工品の製造

○福田 翼，森山 実，古下 学，芝 恒男，原田和樹（水大校・食品科学）

【目的】アルコール含有ウニ加工品は、消費者の嗜好性変化からアルコール濃度の低減化が求められている。しかし、ウニ加工品におけるアルコールは、ウニの自己消化作用低減化による硬さ維持、細菌増殖の抑制およびカロチノイド色素による紅橙色の鮮明化などの働きがあり必要不可欠である。したがって、ウニ加工品の品質（硬さ・細菌数・色差）を維持しながらアルコールを低減化させる手法の開発が求められている。一方、減圧によるアルコール除去は、安価で簡便な加工手法である。そこで、本研究では減圧処理によるアルコール含有ウニ加工品のアルコール低減化を試み、アルコール含有ウニ加工品への影響を調査した。

【方法・結果】市販アルコール（9.6%）含有ウニ加工品を常温減圧処理を行った。その結果、時間経過と共にアルコール濃度は減少し、60秒処理で6.3%、180秒処理で5.3%、360秒処理で4.4%となった。一方、水分含有量は変化がなかった。減圧処理されたウニ加工品を滅菌したビンに詰め、35℃条件下で3ヶ月間保存試験を行った。保存試験は、貯蔵弾性率（硬さ）・色差・一般生菌数により評価を行った。その結果、保存期間中の貯蔵弾性率は変化しなかった。同様に、一般生菌数の増加も確認されなかった。一方、色差では、L*（明度指数）、a*およびb*（共に色度座標）は時間経過と共に数値の変化がみられたが、未処理試料と同等の変化であった。したがって、減圧処理をしたアルコール含有ウニ加工品は、アルコール濃度が低減されながらも、ウニ加工品の品質を維持している事が明らかとなった。

C-3 ブリ胃廃棄物を利用したチャンジャ様発酵食品

○吉山 慧¹, 福田 翼¹, 犬塚由真², 古下 学¹, 芝 恒男², 原田和樹¹
(¹水大校院・水産資源, ²水大校・食品科学)

【目的】日本で最も養殖漁獲量が多いブリ内臓の廃棄物量は、9,600 t/年と推測される。ブリ内臓廃棄物は有効利用法がなく大半が焼却処分をされている。ブリ内臓廃棄物は筋肉よりも軟らかく遊離アミノ酸量も低いいため嗜好性が低い。一方、韓国伝統食品のチャンジャは内臓の中でも硬い胃を塩蔵しコチュジャンに漬け込んだ嗜好性の高い高級食品である。また、コチュジャンは *Aspergillus* 属菌を用いた唐辛子味噌であり、プロテアーゼなどの酵素を含む。そこで高プロテアーゼ活性のコチュジャンを製造し、ブリ胃廃棄物のチャンジャ様発酵食品への可能性を調査した。

【方法・結果】まず、*Aspergillus* 属 13 菌株を用いたコウジの酸性プロテアーゼ生産性を調査し、スクリーニングを行った。結果、黄コウジ (269±25.1 U/g -substrate-), *A. awamori* (102±13.7 U/g -substrate-), 吟クール S (64±16.7 U/g -substrate-)を選定し、さらに韓国の伝統的コウジの Meju (78±2.4 U/g -substrate-)をコチュジャン製造に用いた。コチュジャン熟成期間中の酸性プロテアーゼ活性を調査した結果、いずれのコウジにおいても時間経過と共に活性は減少する傾向が見られた。45 日間熟成したコチュジャンでは、黄コウジ (40±3.6 U/g -substrate-), *A. awamori* (22±3.3 U/g -substrate-), 吟クール S (25±2.6 U/g -substrate-)および Meju (10±3.6 U/g -substrate-)であった。塩蔵したブリ胃廃棄物の内皮と外皮でチャンジャを製造し遊離アミノ酸量を測定した結果、いずれの場合も遊離アミノ酸量の増大が確認された。この結果より、ブリの胃廃棄物利用の可能性が示唆され、チャンジャ様水産発酵食品の創生が可能となった。

C-4 電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いた海藻の抗酸化能に関する研究

○崎村祥太郎¹, 服部匡高², 福田 翼¹, 和田律子², 原田和樹¹, 村上崇幸³, 井上淳詞³ (¹水大校院・水産資源, ²水大校・食品科学, ³あじかん)

【目的】海藻には抗酸化成分が多く含まれていると報告がある。我々が海藻を食する際には、加熱など加工処理を行う場合が多い。本研究では 10 種類の海藻を用いて、加熱した試料と非加熱の試料の抗酸化性の違いを、電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて調べた。

【方法】試料は、褐藻綱に属するカジメ、アカモク、ヒジキ、ワカメ、コンブ (乾燥, 生), アラメ, モズク, 紅藻綱に属するカイガラアマノリ, ノリ の 10 種類の試料を用いた。各試料を 100℃ 10 分間で加熱した場合と、同時間で常温に浸漬した場合に分けた。加熱した海藻の溶液を 100℃溶液, 常温で浸漬しただけの海藻溶液を 20℃溶液と名付けた。一方、同様に加熱や常温で浸漬した海藻を粉碎した溶液を 100℃海藻溶液, 20℃海藻溶液と名付けた。ESR 法は、日本電子社製 ESR 装置 (JES-FR30) を用いて、フェントン反応を利用したヒドロキシルラジカル捕捉活性性能の変化から抗酸化能を評価した。

【結果】ESR 法による測定結果では、ヒジキは、100℃加熱すると表層でも内部でも、常温に比べて抗酸化能が増大し、高い抗酸化能を示した。一方、アカモクは、加熱してもしなくても、表層でも内部でも、高い抗酸化能を示した。すなわち、褐藻綱ヒバマタ目ホンダワラ科のヒジキとアカモクは、ヒドロキシルラジカル捕捉活性性能が高いと結論したが、加熱の影響に違いが見られた。これらの結果は、ORAC 法で調べたペルオキシラジカル消去活性性能が高い褐藻綱コンブ目のカジメの結果と異なっていた。

なお、カイガラアマノリの試料を譲り受けた山口県庁に謝意を表す。

C-5 電子スピン共鳴（ESR）法を用いた市販飲料の抗酸化能に関する研究
崎村祥太郎¹，服部匡高²，竹本尚未³，安藤真美⁴，北尾 悟⁴，福田 翼¹，
和田律子²，○原田和樹¹，田村良行⁵（¹水大校院・水産資源，²水大校・食品科
学，³園田学園女大，⁴大阪樟蔭女大，⁵元羽衣国際大）

【目的】さまざまな市販飲料の抗酸化能については、意外にも研究が少ない。そこで、本研究では、市販飲料について、抗酸化能の一つの指標であるヒドロキシルラジカル捕捉活性能について調べたので、報告を行う。

【方法】試料は、ジュース系、茶系、コーヒー系、スポーツドリンク系などの市販の24種類の飲料を用いた。ヒドロキシルラジカル捕捉活性能は、電子スピン共鳴（ESR）法を用い、フェントン反応で発生するヒドロキシルラジカルを、DMPO-OH・スピニアダクトの捕捉で調べた。ESR装置は、日本電子社製のJES-FR30を用い、測定には偏平型水溶液セルES-LC12を用いた。抗酸化能の評価は、低磁場から2番目の測定ピークと内部標準物質のMn²⁺ピークの相対強度から計算して得られたIC₅₀値で行った。

【結果】飲料原液を100%と定義した時に、IC₅₀値が0.50%以下の抗酸化能が高いと認識できた飲料は、野菜ジュース系であり、その平均値は0.36%であった。ORAC法などのペルオキシラジカル捕捉活性能測定法では、抗酸化能が高く出る茶系飲料は、ヒドロキシルラジカル捕捉活性能のIC₅₀値の平均値が6.81%であり、抗酸化能は低く出た。また、スポーツドリンク系などの原料濃度が低いと思われる飲料では、平均値が1.25%という比較的高い抗酸化能を示した。市販飲料の原料濃度や添加物によっても抗酸化能が大きく異なることが予想されるが、ペルオキシラジカルとヒドロキシルラジカルの両捕捉活性能の相関の調査は、今後の検討課題である。

C-6 魚肉タンパク質摂取による骨格筋萎縮への特異的な効果

○原 由真¹，魚住圭佑¹，安井万智¹，速水耕介²，横井香里²，水重貴文¹，
岸田太郎¹，海老原清¹（¹愛媛大・農，²日本水産（株）生活機能研）

【目的】魚食の有用性は古くから着目されているが、魚の可食部の大半を占めるタンパク質の機能性についてはあまり検討されていない。我々は加工食品として広く利用されているスケトウダラのタンパク質に着目し、その機能性について検討した。これまでの研究で脂質代謝への影響を検討する中で、スケトウダラ魚肉タンパク質（APP）を含む高脂肪飼料をラットに与え、運動負荷をかけずに8週間摂取させたところ、カゼイン摂取と比較して骨格筋である腓腹筋および長趾伸筋重量で有意な増加が認められた。そこで本研究では、APP摂取による筋肉増強作用が、筋萎縮に対しても有益な効果を示すかを検証するため、後肢ギプス固定による筋萎縮ラットを用いて、骨格筋重量の回復効果を調べた。

【方法】5週齢のSD系雄ラットに高脂肪飼料（High fat - Casein）を与え、右後肢にギプス固定を行い2週間飼育した。その後、ギプスを外し、高脂肪飼料下でタンパク質源をそれぞれCasein、APPとした群に分けた。回復期間として3週間飼育した後解剖を行い、固定を行っていない左後肢を正常値として骨格筋重量の回復速度を比較した。

【結果】ギプス固定によりヒラメ筋と腓腹筋では非固定肢と比較して有意な重量減少が確認できたが、長趾伸筋重量には変化がなかった。3週間の回復期間後、骨格筋重量はCasein群と比較して、APP群で採取した全ての筋組織で有意な重量増加が見られ、固定肢、非固定肢でそれを確認することができた。

C-7 複数遺伝子クローニングが可能な植物形質転換用リサイクルベクターシステムの開発

○芝原健太¹, 加藤 晃², 立木賢輔², 木村哲哉³, 中川 強¹
(¹島根大・総科セ, ²奈良先端・バイオ, ³三重大院・生資)

【目的】近年, タンパク質複合体の細胞内機能, 局在の研究のために複数種の遺伝子を簡便に植物へと導入し, 安定発現が可能な遺伝子導入技術の開発が必要となった。我々は LR 反応を繰り返して遺伝子を同一のベクターに順次クローニングする方法の開発を進めてきた。これまでに attL5-Pro-attR1-attR2-T_{NOS}-attR4-attR3-attL6 の構造を持つ pRED ベクターと attL4-attR5-attR6-attL3 の変換用ベクターを交互に用いて Gateway カセットのリサイクルを行うシステムを構築しており, 現在までに本システムを利用して 5 つの発現ユニットを導入した。本システムでは複数遺伝子の安定発現を目指し, 各遺伝子ユニットの間に HSP ターミネーターや MD8 (matrix attachment region) が組み込まれており, 今回はプロモーターに NOS プロモーターを, レポーターに G3GFP, mRFP, GUS, LUC, XYL の 5 種類を用い, 両者について比較検討をおこなったので報告する。

【方法・結果】本システムを利用して 4 つ又は 5 つのレポーター遺伝子を組み込んだ発現クローンを構築し, アグロバクテリウムを介してタバコ培養細胞 BY-2 に導入した。得られたクローン導入 BY-2 において, 各レポーターの顕鏡解析, GUS と LUC レポーターの定量化を行った。一つのクローン導入 BY-2 につき独立的な 18 ラインをすべて同条件で観察した。その結果, すべてのレポーターの発現が観察された。定量解析より, T_{HSP} より MD8 タイプの方がレポーターの発現量が多いことが示された。以上の結果から, 本システムで複数遺伝子を安定発現させるためには MD8 の方が適していると結論付けた。

C-8 シロイヌナズナクラスリンエンドサイトーシスの積荷タンパク質の選別に関する研究

○松波絵里香¹, 安川大喜¹, 長屋 敦¹, 地阪光生¹, 横田一成¹, 中川 強², 西村浩二² (¹島根大・生資, ²島根大・総科セ)

【目的】クラスリン被覆小胞 (CCV) は, タンパク質をトランスゴルジ網からリソソームや液胞に輸送する機能, あるいはエンドサイトーシスによって細胞膜タンパク質を種々のエンドソームに輸送する機能をもつ。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 AP 複合体の二種類から構成される。AP 複合体は 2 つの大サブユニット, 1 つの中サブユニット, 1 つの小サブユニットからなる 4 量体から構成される。AP 複合体には AP1 から AP5 の 5 種類があり, 特に AP2 はクラスリンエンドサイトーシスに関わることが報告されている。AP 複合体の中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が, 植物の μ アダプチンと積荷タンパク質との相互作用については不明な点が多い。本研究では, シロイヌナズナの μ 2 アダプチンと積荷タンパク質との相互作用を解析したので報告する。

【方法・結果】遺伝子銃を用いて植物組織で一過的に発現させたシロイヌナズナの μ 2 アダプチンと種々の細胞膜タンパク質との相互作用を二分子蛍光相補法 (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) により解析した。その結果, μ 2 アダプチンはそれら細胞膜タンパク質と相互作用した。従って, 植物のクラスリンエンドサイトーシスにおいても動物と同様に μ 2 アダプチンは積荷タンパク質を選別する機能を持つことが強く示唆された。

C-9 シロイヌナズナ培養細胞を用いた VTC2 タンパク質の機能解析

○種子田隼人, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 石川孝博 (島根大・生資)

【目的】植物においてアスコルビン酸は mM オーダーの高濃度で存在し, 抗酸化物質としての働きのみならず, 補酵素や細胞の伸張・周期制御, 遺伝子発現調節など多機能性分子として様々な役割を担っている。シロイヌナズナは D-マンノース/L-ガラクトース経路を主要経路としてアスコルビン酸を生合成し, この経路に関わる遺伝子はこれまでにすべて同定されている。同経路構成酵素遺伝子のうち GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼをコードする *VTC2* 遺伝子は, 最も顕著な光応答性を示すことから, 未解明のアスコルビン酸生合成光調節機構の鍵を握っていると推測されている。本研究では, シロイヌナズナ懸濁培養細胞に着目して *VTC2* の機能解析を試みた。

【方法・結果】CaMV35S プロモーターの制御下, *VTC2* および推定核移行シグナルを Ala 残基に置換した変異 *VTC2* (*mutNLS*) と GFP との融合タンパク質発現用コンストラクトを作製し, アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ懸濁培養細胞に形質転換した。共焦点レーザー顕微鏡による局在解析により, 植物体の場合と同様に *VTC2* では細胞質と核に GFP 蛍光が観察されたのに対し, *mutNLS* では細胞質にのみ GFP 蛍光が観察された。*VTC2* との相互作用タンパク質を探索するため, GFP 抗体を用いたプルダウンアッセイを行った。nanoLC/MS を用いた解析の結果, いくつかのタンパク質と相互作用する可能性が示唆された。また, 推定リン酸化部位(S171/S173, S335/S351)をそれぞれ Ala 残基に置換した変異 *VTC2* 発現用コンストラクトを作製し, 形質転換細胞の解析も行った。

C-10 葉緑体由来の酸化的シグナリング関連因子の同定と機能解析

○丸田隆典¹, 大和 開¹, 問田英里², 野志昌弘², 田茂井政宏², 澤 嘉弘¹, 石川孝博¹, 重岡 成² (¹島根大・生資, ²近畿大・農)

【目的】活性酸素種 (ROS) はシグナルとして植物のストレス応答に関与している。最近, 我々はエストロゲン誘導型 RNAi 法によるチラコイド膜結合型 APX (tAPX) の誘導抑制系を構築し, マイクロアレイ解析により葉緑体由来の H₂O₂ に応答する候補遺伝子群 (Responsive to tAPX silencing; RTS) を約 800 個同定した (J. Biol. Chem. 287, 11717-29, 2012)。さらに, RTS 遺伝子群の機能分類および生理学的解析により, 葉緑体由来の H₂O₂ は特異的なシグナル作用を持ち, 植物ホルモンとのクロストークを介して生物学的および非生物学的ストレス応答に関与することを明らかにした。そこで, 葉緑体由来の H₂O₂ シグナリングの分子機構を明らかにするために, RTS 遺伝子群の包括的な逆遺伝学的解析を行った。

【方法・結果】RTS 遺伝子群から酸化的シグナリングにおいて重要な役割を担う遺伝子を同定するために, 各遺伝子の欠損株および転写因子の優性抑制株を整備し, それらのパラコート, エリシターおよび植物ホルモンに対する感受性を評価した。その結果, 合計 20 のストレス/ホルモン感受性変異株が得られ, 原因遺伝子にはフェニルプロパノイドやγ-アミノ酪酸合成に関与する酵素に加え, 数多くの転写因子が含まれていた。さらに, 個々の遺伝子の機能解析から, Homeodomain Leucine Zipper や Basic Helix-Loop-Helix 転写因子が酸化的シグナリングにおいて重要な役割を持つことが示された。

C-11 脂質組成と再構成ミトコンドリアキャリア蛋白質の膜輸送活性との関係

○野澤 彰, 戸澤 譲 (愛媛大・PROS)

【目的】真核生物の細胞には核, ミトコンドリア, 小胞体など様々なオルガネラが存在する。それぞれのオルガネラの膜系を構成する脂質の分子種やその割合は膜系ごとに異なっていることが知られている。本研究では, 膜系の脂質組成が膜タンパク質の活性に与える影響を調査することを目的とし, ミトコンドリア内膜に局在する膜輸送体蛋白質ミトコンドリアキャリアの輸送活性に対するカルジオリピンの影響を解析した。カルジオリピンはミトコンドリア内膜では全リン脂質の約20%を占める主要な脂質である。

【方法・結果】リポソーム添加型無細胞合成法により酵母ミトコンドリアキャリア蛋白質 GGC1 を合成し, プロテオリポソームに再構成後 GTP/GTP ホモ交換輸送活性を測定した。このとき, 合成時と再構成時に加えるリポソームにカルジオリピンを添加したものとアズレクチンのみのものの2種類の脂質組成のリポソームを使用し, 輸送活性に対するカルジオリピンの影響を調べた。その結果, カルジオリピンを添加した方が約4倍の輸送活性を示した。次に他のミトコンドリアキャリア蛋白質においてもカルジオリピンの添加による活性上昇が見られるのかについて検討した。酵母のミトコンドリアキャリア蛋白質ファミリーに属する S-アデノシルメチオニン輸送体 SAM5 を用いて解析した結果, SAM5 においてもカルジオリピンの添加により輸送活性が上昇することが確認された。以上の結果より, 膜輸送体蛋白質の活性に膜の脂質組成が大きな影響を与えることが明らかになった。

C-12 葉緑体のグアニル酸キナーゼは ppGpp 標的分子か?

○野村勇太¹, 戸澤 譲^{1,2} (¹愛媛大院・理工, ²愛媛大・PROS)

【目的】バクテリアは ppGpp を介した緊縮制御により, 栄養飢餓時の複製, 転写, 翻訳, プリンヌクレオチド合成を調節する。近年では, 光合成真核生物の葉緑体でも ppGpp 合成系の存在が明らかとなった。維管束植物において同定された ppGpp 合成酵素の一つ CRSH は種子形成の必須遺伝子である。我々はこれまでに ppGpp が葉緑体翻訳系に対し阻害的作用を持つことを明らかにし, 植物における ppGpp の標的分子の1つが葉緑体翻訳系であると報告した (Nomura *et al. Plant. Mol. Biol.* **78**, 185, 2012)。今回, 我々は葉緑体プリンヌクレオチド合成制御における ppGpp の機能的役割を解析した。枯草菌のグアニル酸キナーゼが ppGpp の標的分子となるとの報告を踏まえ, 葉緑体のグアニル酸キナーゼに対する ppGpp の作用を解析したので結果を報告する。

【方法・結果】イネ由来の葉緑体局在型グアニル酸キナーゼ (GK)および細胞質局在型 GK, 枯草菌由来 GK をそれぞれ大腸菌にて発現・精製し, *in vitro* での活性測定を行った。その結果, 各酵素は GMP を基質とした GDP 合成活性を有することを確認した。そこで, 各酵素に対して ppGpp を添加して反応させ, 触媒活性への影響を検証した。その結果, ppGpp 制御系を持つイネ葉緑体および枯草菌の GK は ppGpp 濃度依存的に GDP 合成活性が著しく低下することを明らかにした。一方, ppGpp 制御系がないイネ細胞質 GK については ppGpp による阻害的效果は見られなかった。以上の結果は, 葉緑体プリンヌクレオチド合成制御において, GK が ppGpp の標的分子となることを示唆する。

D-1 カキタンニン投与後のラット肝組織の遺伝子発現解析

○大渡康夫¹, 牧野正知¹, 勝部拓矢¹, 山崎雅之², 塩飽邦憲², 石島智子³,
中井雄治³, 阿部啓子³, 板村裕之⁴

(¹ 島根県産技セ, ² 島根大・医, ³ 東大院・農生科, ⁴ 島根大・生資)

【目的】柿渋の主成分であるカキタンニンには、抗酸化性、二日酔い防止効果、血圧上昇抑制、美白効果、抗菌作用など多様な機能性が報告されている。しかし、そのカキタンニンの機能性について、遺伝子発現変化を網羅的に解析した報告はほとんどない。本研究では、DNA マイクロアレイを用いて肝臓の遺伝子発現の変動を網羅的に解析し、カキタンニンの生体へ及ぼす影響を遺伝子レベルで解明することを目的とした。

【方法・結果】7週齢の Wistar 系雄ラットを1週間の予備飼育後、対照群（滅菌水道水）と実験群（カキタンニンを含むカキ抽出液）の各群8匹ずつに分け、定時に検体1mLを一日一回、4日間、胃ゾンデ投与した。投与期間中は通常餌（CE-2）、飲料水を自由に摂取できるようにし、最終投与日の4時間後から絶食させ、翌日に解剖した。摘出した肝臓からRNAを抽出し、Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Arrayを用いたDNA マイクロアレイ解析を行った。データをqFARMS法で正規化した後、rank products法による二群間比較を行い、false discovery rate (FDR) < 0.05 のプローブセットを有意に発現変動した遺伝子として抽出した。血液生化学検査の結果、実験群では対照群に比べ、統計学的に有意差は認められなかったものの、上昇を抑制する傾向にあった。また、DNA マイクロアレイの結果、実験群においてアルコール代謝関連の遺伝子群が有意に発現上昇していた。今回の結果により、肝臓におけるアルコール代謝に対し、カキタンニンは遺伝子レベルで影響していることが示唆された。

D-2 タデ藍由来ポリフェノール成分の分析と抗酸化性

○石原朋恵¹, 木村英人¹, 小川智史¹, 秋廣高志², 横田一成^{2,3}

(¹ 寿製菓(株), ² 島根大・生資, ³ 鳥取大院・連農)

【目的】タデ藍 (*Polygonum tinctorium* Lour.) は染料原料として有名であるが、薬用植物としても解毒、解熱、消炎などの目的で古くから利用されていた。近年、タデ藍の生理活性成分について、抗炎症、抗酸化、抗菌、抗アレルギーなどの薬理作用が報告されている。本研究では、タデ藍のポリフェノール成分の分析と抗酸化性について検討した。

【方法・結果】タデ藍（葉、茎）1kgを、3倍容量のメタノールで攪拌しながら室温で3時間、抽出した。この抽出物を減圧濃縮後、吸着剤の DIAION HP-20 を用いたカラムクロマトグラフィーに供して、水、50%メタノール、100%メタノールの順で溶出する各々の画分に分離した。それぞれの画分を減圧乾固した後、UPLC-ESI/MSにかけて分離して、ネガティブモードで質量分析を行った。その結果、50%メタノール画分では、カフェ酸、クロロゲン酸、及びケルセチン類縁化合物を確認した。一方、100%メタノール画分には、ケンフェロールとその類縁化合物が確認された。次に、50%メタノール画分と100%メタノール画分の抗酸化性を、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性と活性酸素吸収能力 (ORAC) の試験法により評価した。DPPH ラジカル消去能については、50%メタノール画分が100%メタノール画分より高い活性を示したが、ORAC法による評価では、100%メタノール画分により強い活性が認められた。以上より、それぞれの画分に含まれている抗酸化性物質の作用様式が異なることが示された。

D-3 アスコルビン酸 2-グルコシドの抗酸化作用に対するトレハロースの増強効果

○小川智史¹、道田真帆子¹、木村英人¹、中村優子²、有福一郎²、横田一成^{3,4}
(¹寿製菓(株), ²鳥取産技セ, ³島根大・生資, ⁴鳥取大院・連農)

L-アスコルビン酸 (AsA) は、抗酸化作用を示す重要な食品成分であるが、化学的に不安定で自然に酸化されやすく、また、銅や鉄などの重金属イオンと共存下で活性酸素種を発生させるなどの問題点もある。L-アスコルビン酸 2-グルコシド (AA-2G) は、AsA の C-2 位の水酸基とグルコースの C-1 位の α -水酸基が脱水縮合したものであり、AsA に比べ金属イオンなどの作用に対して安定である。また、AA-2G は、遊離の AsA に比べて、より持続的な抗酸化作用を示すことが報告されている。一方、トレハロースは穏やかな甘味を有し、饅頭などの餡の色焼けを抑制するなど機能性を持つ食品原料として使用されている。本研究では、AA-2G の抗酸化作用に対するトレハロースの特異的な相互作用を探索した。リノール酸に対する過酸化作用を検討した結果、AsA は、 Fe^{3+} の存在下においてリノール酸の過酸化反応を促進したのに対し、AA-2G は、そのような促進効果を示さなかった。また、AsA と Fe^{3+} の共存下で引き起こされるリノール酸の過酸化反応を、トレハロースは濃度依存的に阻害した。さらに、種々の抗酸化能の測定により、AA-2G の抗酸化作用に対するトレハロースの効果を検討した。その結果、ペルオキシラジカルの消去活性を評価する活性酸素吸収能力による試験法による分析で、トレハロース自体では抗酸化作用を示さない濃度で、AA-2G の抗酸化作用がトレハロースにより濃度依存的に増強された。対照的に、AsA の抗酸化作用に対するトレハロースの増強効果は観察されなかった。これらの結果から、AA-2G とトレハロースを食品中で併用することで、さらなる抗酸化作用での有効性が期待できる。

D-4 アフィニティークロマトグラフィーによる新規幼若ホルモン標的タンパク質の探索

○西尾智基、古田賢次郎 (島根大・生資)

幼若ホルモン (JH) は昆虫特有のホルモンであり、脱皮・変態をはじめとした様々な生理調節機構への関与が知られているが、その分子レベルでの作用機構に関しては未だ不明な部分が多い。そこで本研究では、JH 標的タンパク質の同定を目的とし、JH より高い生理活性を示し化学的に安定な JH アゴニストであるピリプロキシフェンおよび、固相担体としてナノ磁性微粒子である FG ビーズを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、新規 JH 標的タンパク質の単離を試みた。

まず、ピリプロキシフェンを FG ビーズに固定するために必要なアミノ基をピリプロキシフェンのピリジン環 5 位に導入した後、FG ビーズへの固定化を行った。ビーズへの結合率を超高速液体クロマトグラフィー (UFLC) を用いて確認したところ、十分な結合量が確認できた。そこで、ピリプロキシフェン固定化済 FG ビーズと、カイコ 5 齢幼虫の脂肪体および筋肉を含む表皮由来の可溶化タンパク質抽出液を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、ビーズに結合したタンパク質を SDS-PAGE、銀染色により検出した。様々な条件を検討した結果、界面活性剤として 0.05% n-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) を加えて抽出したタンパク質抽出液を用いたところ、ピリプロキシフェンによって溶出されるタンパク質が複数確認できた。

D-5 capsaicin 受容体 (TRPV1) 活性に作用する物質の検討

○佐藤崇弘¹, 青島 均², 山田康枝¹ (¹近畿大・工, ²山口大院・医)

【目的】capsaicin 受容体 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TRPV1) は皮膚, 脳, 神経等に多く発現し, 43℃以上の刺激や辛味成分である capsaicin など活性化する Ca イオンチャネルであり, 痛みにも深く関与している。TRPV1 の活性化は抗肥満, 抗炎症作用があり, 活性抑制は頭痛を抑制する作用がある。新たに TRPV1 に作用する物質を見つけるためにアフリカツメガエルの卵母細胞にウシの TRPV1 を発現させ, 受容体活性に作用する物質を探索し, その活性を測定した。

【方法・結果】アフリカツメガエルの卵母細胞をコラゲナーゼ処理し, 卵胞膜除去後, TRPV1 の mRNA を卵母細胞に注入し受容体を発現させた。二電極膜電位固定法により膜電位を -70 mV に固定し, capsaicin を卵母細胞に発現した受容体に還流して得られる Ca イオンの流入による電流を測定した。

TRPV1 の capsaicin の濃度反応曲線を求め, TRPV1 の特異的阻害剤である capsazepine での阻害効果を確認した。その他に偏頭痛薬に用いられている sumatriptan, 日本酒に含まれているアミン類 (spermine, agmatine, 2-phenylethylamine), TRPV1 への効果が示唆されている raspberryketone の効果を検討した。capsaicin 1 μM 存在下で sumatriptan, spermine, agmatine, 2-phenylethylamine, raspberryketone いずれも阻害活性を示した。特に agmatine は高い活性阻害を示した。今後も, 様々な食品から TRPV1 に作用する物質を見つけ, 機能性食品の開発や, 痛みを軽減する薬品への応用の可能性を検討する。

D-6 ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH に対する酸化ストレス保護効果

○中路昌志, 小川智弘, 藤原弘宜, 山田康枝 (近畿大・工)

【目的】神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱であるため, この脆弱性を改善できればアルツハイマーなどの酸化ストレスに原因の一端があると考えられている病気の症状の改善につながる。6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) は神経細胞に特異的に作用する神経毒で, 活性酸素を産生させる。本研究では, ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH に 6-OHDA と強力な酸化剤である過酸化水素 (H₂O₂) を作用させ, 抗酸化物質として知られている植物や母乳に含まれるピロロキノリンキノン (PQQ) 及びミツバチ産品の一つであるプロポリスの細胞保護効果を検討した。

【方法・結果】SK-N-SH 細胞を 2.0×10⁵/ml に調整し 96 穴プレートに播種し, 24 時間 37℃ 5%CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後様々な濃度の PQQ 及びプロポリスを添加し 10 分間インキュベート後, 6-OHDA を 50 μM, 100 μM 添加 24 時間後, H₂O₂ を 10 mM 添加 10 分後, MTT アッセイ法により細胞生存数を求め, 抗酸化効果を検討した。

PQQ は 6-OHDA 50 μM での酸化ストレスによる細胞死を 0.1, 0.5 μM で抑制し, 保護効果を確認することができ, それ以上の濃度の PQQ では保護効果が見られなかった。プロポリスでは 0.5 μg/ml で H₂O₂ による酸化ストレスに対する保護効果が見られた。以上の結果から PQQ 及びプロポリスには細胞保護効果があることが示された。

D-7 アルド及びケトヘキソース全異性体の線虫成長阻害活性

○砂古口博文¹, 吉原明秀², 森本兼司², 何森 健², 佐藤正資¹
(¹香川大・農, ²香川大・希少糖セ)

【目的】 熱帯から亜熱帯域にかけて広範に寄生虫病が蔓延している。なかでも、消化管寄生線虫（回虫、蟯虫、鉤虫など）の感染者数は全世界で10億人以上と見積られている。しかし、寄生線虫症治療に使用される薬剤は非常に限定されており、薬剤抵抗性線虫の出現が問題視されている。これは家畜の消化管線虫症においても同様である。このような背景から、従来の抗線虫薬とは全く異なる作用モードを持つ薬剤の開発が望まれている。本研究では、単糖を骨格とした創薬リードの探索を目的として、アルドヘキソース異性体全16種(D-, L-アロース, アルトロース, グルコース, マンノース, グロース, イドース, ガラクトース, タロース)及びケトヘキソース異性体全8種(D-, L-プシコース, フルクトース, ソルボース, タガトース)の線虫成長阻害活性を調査した。

【方法・結果】 線虫 *Caenorhabditis elegans* 第一期幼虫 (L1) を同調培養により得た。試験容器には24ウェルカルチャープレートを用い、各ウェルに試料を含んだ液体培地と、L1幼虫約10頭を入れ、20°Cで静置培養を行った。72時間後、線虫個体の顕微鏡写真を撮影し、その写真を画像解析ソフト (ImageJ) によって処理し、各個体の投影面積を算出した。対照線虫の平均面積値を基準として、線虫の成長を50%阻害する濃度 (IC₅₀ 値) をプロビット法で計算した。その結果、D-フルクトースのC3エピマーであるD-プシコースが53 mMと最も活性が強く、次いでD-ガラクトースのC2エピマーであるD-タロースが197mM, D-グルコースのC3エピマーであるD-アロースが221 mMであった。それ以外の異性体については167mM (3% w/v) でもほとんど成長阻害活性は認められなかった。以上から、単糖の立体異性は線虫の成長阻害活性に大きく影響を与えることが明らかになった。

D-8 希少糖 D-プシコースの線虫寿命延長活性とその作用メカニズム

○佐藤正資¹, 砂古口博文¹, 新谷知也², 大隈一裕², 何森 健³
(¹香川大・農, ²松谷化学, ³香川大・希少糖セ)

【目的】 摂取カロリーの制限により寿命が延長することが、ショウジョウバエ、マウス、サル、線虫など多くの実験動物で知られている。ヒトにおいてもカロリー制限は、加齢性疾患の発症を遅らせ、寿命を延ばすと考えられている。しかし、生涯にわたってカロリー制限食を続けるのは困難である。そこで、摂取することによりカロリー制限と同等な効果を得ることができる物質、カロリー制限模倣物質の開発が注目されている。ノンカロリー甘味料である希少糖 D-プシコースがカロリー制限模倣物質として働き、動物の寿命を延長する効果があるのではないかと考え、老化研究のモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて研究を行った。

【方法・結果】 同調培養をして得た *C. elegans* 抱卵成虫を、被験試料を含む液体培地に移し、1日おきに生死の判定を行いながら生存している虫のみを新しい培地に移しかえた。これをすべての線虫が死亡するまで繰り返して、培養を続け、平均寿命を算定した。28 mM D-プシコースを含む培地で培養された線虫の平均寿命は25.1日、対照線虫20.9日となり約2割の寿命延長が認められた。

カロリー制限を行うと各種の抗酸化酵素の発現が増強され、結果として寿命が延長すると考えられている。このことが、D-プシコースを処理した線虫にも当てはまるか検討するため、処理線虫のカタラーゼ活性を測定した。ショ糖密度勾配遠心フローティング法を用いて、生きている線虫のみを分離し、ホモジナイズし、得られたライセートの酵素活性を測定した。その結果、28 mM D-プシコース処理線虫のカタラーゼ活性は対照の約3倍となった。この結果から、D-プシコース処理による寿命延長効果の一つの要因は線虫の酸化ストレス耐性を上昇させたことによるものと考えられた。また、DCFH-DA法によりD-プシコース処理線虫ライセート中のROS濃度は減少していることを確認した。

D-9 ビタミン B₁₂ 欠乏線虫 (*Caenorhabditis elegans*) における記憶・学習障害について
○美藤友博, 三崎太平, 藪田行哲, 河野 強, 渡邊文雄 (鳥取大院・連農)

【目的】ホモシステイン (Hcy) は様々な過程で活性酸素種 (ROS) の発生に関与し、種々の疾病を引き起こすことが報告されているが、ビタミン B₁₂ (B₁₂) 欠乏と酸化ストレス障害の関連性は不明である。本研究ではヒトのモデル生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて B₁₂ 欠乏線虫を調製し、B₁₂ 欠乏と酸化ストレス障害の関連性について検討すると共に B₁₂ 欠乏線虫における記憶・学習障害の解析を行った。

【方法】M9 最小培地で培養した大腸菌 (OP50 株) を B₁₂ 制限食餌として、線虫を 5 世代継代的に生育させ B₁₂ 欠乏線虫を調製した。Hcy を HPLC で測定し、ROS の産生に関与する NADPH 酸化酵素活性をルミノメーターで測定した。代表的な ROS である過酸化水素と活性酸素種は比色法で定量し、酸化ストレスマーカーとして脂質過酸化物を TBARS 法で、酸化タンパク質は DNPH 法を用いて測定した。また、NaCl と餌の関連付けを利用した連合学習 Assay 法を用いて B₁₂ 欠乏線虫の記憶・学習障害を評価し、B₁₂ 欠乏性の記憶・学習障害と酸化ストレスの関連性を検討した。

【結果・考察】B₁₂ 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較し Hcy が顕著に蓄積し、NADPH 酸化酵素活性の上昇も観察された。また、過酸化水素や活性酸素種が顕著に蓄積していた。さらに、過酸化脂質やカルボニル化タンパク質が有意に蓄積していた。さらに B₁₂ 欠乏線虫では顕著な記憶・学習能の低下が観察されたが、B₁₂ の供給により酸化ストレスマーカーと記憶・学習能は顕著な回復を示し、B₁₂ 欠乏と酸化ストレス障害の関連性が明らかとなり、記憶・学習障害も密接に関与していることが示唆された。

D-10 ルミネッセントバイオセンサーを用いたオクトパミン受容体の薬理学的解析

○林 剛志¹, 林 直孝², 今井哲弥², 尾添嘉久¹
(¹島根大・生資, ²大塚アグリテクノ (株))

【目的】オクトパミン (OA) は、昆虫などの無脊椎動物に特異的に存在し、記憶や学習、糖脂質代謝、睡眠、産卵などの調節を行う生体アミンの 1 つである。カイコ幼虫の神経組織からクローニングされたオクトパミン受容体 BmOAR2 は 7 回膜貫通型 GPCR であり、HEK-293 細胞に安定発現させた BmOAR2 は、OA を結合して、共役する Gs タンパク質を活性化し、さらにエフェクターであるアデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化する。その結果、細胞内セカンドメッセンジャー cAMP のレベルが上昇する。本研究では、ハイスループットスクリーニングができるルミネッセンスバイオセンサーを用いて BmOAR2 リガンドの活性測定ができるか検討したので報告する。

【方法・結果】BmOAR2/HEK-293 細胞に、cAMP 結合によって発光シグナルが増加する変異ルシフェラーゼを共発現させたのち、各リガンドを作用させた時の発光強度を測定して、細胞内 cAMP レベルの変化を調べた。測定の結果、OA、デメチルクロルジメホルム (DMCDM)、ナファゾリン (Nap)、フェントラミン (Phe) でアゴニスト活性が、また、クロロプロマジン (Chl)、ミアンセリン (Mia)、エピナスチン (Epi) でアンタゴニスト活性が確認され、これまでの実験結果と同様の傾向が見られた。よって、今回構築したアッセイ法は、BmOAR2/HEK-293 細胞内の cAMP レベル変化を測定する方法として適していると考えられるので、今後、96 ウェルプレートを用いて新規リガンドのスクリーニングができるか検討する予定である。

- D – 11 Pro-adipogenic effect of 11-deoxy-11-methylene-prostaglandin (PG) D₂, a stable, isosteric analogue of PGD₂ during the maturation phase of adipocytes
 OPinky Karim Syeda K. Fatema¹, Ferdous Khan¹, Kohji Nishimura², Mitsuo Jisaka¹, Tsutomu Nagaya¹, Fumiaki Shono³, Kazushige Yokota¹ (¹Fac. Life Environ. Sci., and ²Center Int. Res. Sci., Shimane Univ.; ³Fac. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Prostaglandins (PGs) exert modulatory effects on adipogenesis with opposite actions depending on the type of PG species. Of these, PGD₂ is known to serve as a pro-adipogenic factor by converting to PGs of J₂ series, which are activators of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), a master regulator of adipogenesis. PGD₂ and PGJ₂ derivatives can also interact with sub-types of cell-surface membrane receptors as well as PPAR γ . In this study, we evaluate the effect of 11-deoxy-11-methylene-PGD₂ (11d-11m-PGD₂), a chemically stable isosteric analogue of PGD₂ wherein the 11-keto group is replaced with an exocyclic methylene, on fat storage during the maturation phase of cultured adipocytes. The up-regulation of adipogenesis was curtailed in the presence of cyclooxygenase (COX) inhibitors. This suppression was rescued by the treatment with 11d-11m-PGD₂ along with COX inhibitors, indicating a pro-adipogenic effect of the stable PGD₂ analogue. The stimulatory effect of 11d-11m-PGD₂ was more preferentially inhibited by an antagonist for DP2/CRT2 than by a DP1 agonist. The results suggest the predominant role of the DP2/CRT2 receptor in the pro-adipogenic effect of 11d-11m-PGD₂ during the maturation phase of adipogenesis.

- D – 12 Biosynthesis of prostaglandin I₂ at different life stages of cultured adipocytes as determined by the immunological assay for its stable hydrolysis product
 OFerdous Khan¹, Mohammad Sharifur Rahman¹, Pinky Karim Syeda¹, Kohji Nishimura², Mitsuo Jisaka¹, Tsutomu Nagaya¹, Fumiaki Shono³, Kazushige Yokota¹ (¹ Fac. Life Environ. Sci., and ²Center Int. Res. Sci., Shimane Univ.; ³Fac. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Prostaglandin (PG) I₂ alternatively called prostacyclin is an unstable metabolite synthesized by the arachidonate cyclooxygenase pathway. Biosynthesis of PGI₂ has not been determined comprehensively at different life stages of adipocytes. PGI₂ is rapidly hydrolyzed to the stable product of 6-keto-PGF_{1 α} in biological fluids. Therefore, the generation of PGI₂ can be quantified as the amount of 6-keto-PGF_{1 α} . In this study, we attempted to develop a solid-phase enzyme-linked immunoassay (ELISA) using a mouse antiserum specific for 6-keto-PGF_{1 α} . According to the typical calibration curve of our ELISA, 6-keto-PGF_{1 α} can be quantified from 0.8 pg in an assay. The evaluation of our ELISA revealed the higher specificity of our antiserum without cross-reaction with other related prostanoids while it exhibited only the cross-reaction of 1.5% with PGF_{2 α} . The resulting ELISA was applied to the quantification of 6-keto-PGF_{1 α} generated endogenously by cultured 3T3-L1 cells at different stages. The cultured cells showed the highest capability to generate 6-keto-PGF_{1 α} during the maturation phase of 4-6 days, after which the accumulation of fats occurred increasingly up to later stages. The combined findings implicate the potential contribution to the up-regulation of adipogenesis during the maturation phase of adipocytes.

日本農芸化学会中四国支部第36回講演会

主 催：日本農芸化学会中四国支部

共 催：島根大学

世話人：川向 誠

連絡先：島根大学生物資源科学部

T E L：0852-32-6587

E-mail：kawamuka@life.shimane-u.ac.jp

支部からのお知らせ

1. 第37回講演会（関西支部，中四国支部，西日本支部合同支部大会）

開催日：2013年9月5日（木）～6日（金）

場 所：県立広島大学広島キャンパス

内 容：シンポジウム，受賞講演，一般講演

講演申込締切：7月12日（金）

講演要旨締切：7月26日（金）

世話人：武藤徳男（県立広島大学生命環境学部）

2. 第38回講演会（支部例会）

開催日：2014年1月25日（土）

場 所：香川大学農学部

内 容：受賞講演，一般講演

世話人：合谷祥一（香川大学農学部）

3. 第23回市民フォーラム

「食と農を科学する－日本発の農芸化学・ビタミン学研究」

開催日：2013年9月7日（土）

場 所：中国新聞ホール（広島市中区）

内 容：招待講演

世話人：武藤徳男（県立広島大学生命環境学部）

4. 第16回若手研究者シンポジウム

開催日：2013年11月2日（土）

場 所：高知大学物部キャンパス

内 容：招待講演

世話人：大西浩平（高知大学総合科学系）

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1

岡山大学大学院環境生命科学研究科

農生命科学専攻生物機能化学講座内

支部ホームページ：<http://jsbba-cs.jp>

E-mail：nouka_chushi@okayama-u.ac.jp

2013年（平成25年）6月8日発行