

ミニシンポジウム

講演要旨

ミニシンポジウム講演

木質バイオマスリファイナリーシステムの構築

浅田元子（徳島大・生物資源）

石油代替原料を求める声は石油危機以来高まりながら現在に至る。生物資源であるバイオマスからの燃料製造が注目されるのは第二次石油危機以来であり、30年を超えるがエネルギー利用効率的にも、CO₂削減効率的にも現実利用に適するだけの研究結果が得られているとは言い難い。特に、リグノセルロース系バイオマスと呼称されるバイオマスはトウモロコシ等デンプン系と違い、その強固なリグニンネットワーク構造により前処理としての脱リグニンが困難である。その中でも我国ではスギ・ヒノキ間伐材は未利用のまま山間部に大量に放置されていることから、その有効利用法の確立が急務である。しかしながら、バイオエタノール生産に関してセルロースの糖化（グルコース化）に必要な酵素（セルラーゼ）が高価であるばかりでなく、活性が非常に低い（アミラーゼの1/50~1/100）ので、製造コストは経産省の目標価格（40円/L）の数倍となり現実的利用は困難である。

そのためリグノセルロース系バイオマス中の構成成分の内セルロース成分のみの利用でなくその他に関してもエネルギーとマテリアル両面で石油代替原料として利用し製造コストに見合う価格の製品にすべきである。つまり、バイオマスの全構成成分をエネルギーと機能性物質に有用変換できる効率的システム（リファイナリーシステム）の構築が必要である。その中にはリグノセルロース系バイオマスの全構成成分を有効利用するために、前処理、抽出、分離、ナノファイバー化、エタノール発酵、メタン発酵、樹脂化、成型等の各工程の最適化を図るとともにマテリアル高付加価値化を含む。

リグノセルロース系バイオマスをマテリアルとしても利用することにより、エネルギー製造コスト問題をブレイクスルーし、現存する高分子を石油由来製品代替物質として利用することでバイオマス有効利用方法の新しいステージを開拓できる。

ミニシンポジウム講演

希少糖生産関連酵素の X 線結晶解析

吉田裕美（香川大・総合生命セ）

希少糖とは、天然には微量にしか存在しない単糖とその誘導体であり、種類は約 50 種類以上にもなるが、その個々の糖の存在量の少なさから、希少糖についての研究には価値が見いだされていなかった。しかしながら、香川大学農学部の何森教授らによって、D-フルクトースから希少糖 D-プシコースへの変換を行うことができる酵素、D-タガトース 3-エピメラーゼが発見され、希少糖に関する研究が飛躍的に展開された。「イズモリング」と呼ばれる、単糖の構造が体系化され、糖異性化酵素（アルドース・ケトースの異性化、エピマー化を行う酵素）と酸化還元酵素を用いて希少糖を生産する戦略が考案され、これをもとに希少糖の大量生産技術の確立とその開発、希少糖の生理活性の探求が行われてきた。大量生産が可能になった D-プシコース (D-allulose; D-アルロース) は、血糖値上昇の抑制、内臓脂肪の蓄積の抑制効果などが見出され、医薬・食品産業において注目されるようになり、近年、FDA (U.S. Food and Drug Administration) にも認可された。

演者らのグループは、希少糖の生産に利用される酵素の構造に興味があり、これまでに複数の希少糖生産関連酵素の X 線構造を報告してきている。本発表では、希少糖生産に利用される糖異性化酵素の X 線結晶解析に基づいて、これまでに見出されてきたユニークな性質について紹介する。

ミニシンポジウム講演

ヒスチジンデカルボキシラーゼ活性を阻害する食品成分

新田陽子（岡山県大・保健福祉）

ヒスチジンデカルボキシラーゼ（HDC）はヒスチジンの脱炭酸反応によるヒスタミン生成を触媒する酵素である。ヒスタミンは胃酸分泌などの薬理作用が知られている他、アレルギー反応のケミカルメディエーターや、神経伝達物質としても知られている生理活性アミンである。ヒスタミンの作用制御の目的で、HDCの阻害物質の探索が長年に渡りなされてきたが、臨床に用いられる阻害物質は見つかっていない。これは、HDCが生体内で微量であることや、精製後の酵素が不安定であることなどから、多量の酵素を必要とするスクリーニングなどが十分に行えなかったことに一因がある。

ヒト由来活性型HDCの不安定性には、ジスルフィド結合によるオリゴマー化が関与することが2011年に判明し、オリゴマー化を防ぐような変異体を作成したところ、X線結晶構造解析が可能な結晶を得ることができた。その結晶はヒスチジンアナログ（HME）との共存下で得られ、HDCの補酵素であるピリドキサル5'-リン酸（PLP）とHMEとの複合体の構造から類推される酵素反応の過程は、従来PLPを介した反応（アミノ基転移反応など）において、反応が起きるとされる活性中心のリシン残基がある側とは反対側、すなわち溶媒側で起きていると考えられた。更にチロシン残基（Y334）が反応に関与できる位置にみられた。Y334はフレキシブルループ領域内にある残基で、基質が存在しない場合にはループ領域の立体構造は自在に変化していると考えられたが、基質が活性中心部位に入るとclosed conformationとなり、そのときのY334の位置が α 位の炭素にプロトンを与えられる位置にあると考えられた。ヒスタミン放出には脱炭酸後にプロトン付与がなされる必要がある。実際にY334F変異体は活性が1,000分の1以下となり、酵素反応に重要な残基であることを確認した。

阻害物質の探索では、基質アナログ以外に、Y334が反応に関与できなくなるような立体構造上の障害をもたらす物質も候補として考えられる。しかし、そのような物質の構造の特徴等はまだ不明であり、何万種類といった化合物のハイスループットスクリーニングが必要であると思われる。食品からのHDC阻害物質は、カテキン類やエラジタンニン類が同定され、その阻害のメカニズムについてはY334の作用阻害が考えられる。シンポジウムでは、HDCの活性を阻害する食品成分の特徴および現時点での応用について発表する。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 TALEN を用いたゲノム編集技術による GDE5 遺伝子欠損細胞の樹立とその形質の解析

○中村美奈子, 佐久間哲史¹, 加藤範久, 山本 卓¹, 矢中規之
(広島大院・生物圏,¹ 広島大院・理)

【目的】 glycerophosphodiester phosphodiesterase 5 (GDE5) は, glycerophosphocholine (GPC) を特異的に分解し, phosphatidylcholine や神経伝達物質 acetylcholine の前駆体として必須な栄養素 choline を生成する細胞内酵素である。当研究室では, siRNA 法による *Gde5* ノックダウンにより種々の培養細胞において GPC の著しい蓄積を生じることを確認しており, 細胞内の choline 供給における GDE5 の重要な役割が示唆されている。そこで本研究では, GDE5 の細胞機能を明らかにすることを目的として, ゲノム編集技術を用いて *Gde5* ノックアウト細胞の樹立を目指した。

【方法・結果】 *Gde5* 遺伝子座の酵素活性中心をコードする exon 8 近傍の intron 領域を切断する人工ヌクレアーゼ TALEN vector, および標的 exon の前後の相同ゲノム領域 (right arm および left arm) で puromycin 耐性遺伝子を挟み込んだ targeting vector を構築した。マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞にリポフェクション法により plasmid を導入後, puromycin 耐性による選抜と限界希釈法により組換え NHI-3T3 細胞を単離した。genomic PCR によって相同組換えが確認された 2 株を *Gde5* ノックアウト細胞 (GDE5 編集細胞) とし, real-time PCR 法により mRNA レベルでの *Gde5* の発現抑制を確認した。さらに, MTT assay と細胞数計測での増殖試験によって野生型 NHI-3T3 細胞と比較して GDE5 編集細胞で増殖性の低下が認められ, また EGF receptor 遺伝子の発現量が有意に上昇していたことから, GDE5 による細胞内の choline 供給が細胞増殖に関与することが示唆された。

A-2 白色脂肪組織の部位特異的な遺伝子発現解析—皮下脂肪組織, 内臓脂肪組織, 異所性脂肪組織の比較—

○鎌田奈都美, 金井すみれ¹, 真田洋平¹, 加藤紀久¹, 矢中規之¹
(広島大・生物生産,¹ 広島大院・生物圏)

【目的】白色脂肪組織は, その存在部位から皮下脂肪型, 内臓脂肪型, および異所性脂肪型に分類される。代謝性疾患などの病態発症への各脂肪組織の関与は大きく異なると考えられているが, 各脂肪組織の形質の差異を明らかにすることが極めて重要である。そこで, 各白色脂肪組織の特性の解明を目的として, 遺伝子発現解析などを通して詳細な比較解析を行った。

【方法・結果】遺伝性肥満 db/db マウスの鼠径部皮下脂肪組織, 内臓型脂肪組織である腸間膜脂肪組織, および精巣上体脂肪組織, さらに異所性脂肪型である心臓周囲脂肪組織より total RNA を調製し, real-time PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った結果, 炎症性マーカーである TNF α やマクロファージマーカーの発現量は皮下脂肪組織において低く, 一方で, 心臓周囲脂肪組織において UCP1 や PGC-1 α などの褐色脂肪マーカーの発現量が極めて高いことが明らかとなった。さらに, 白色脂肪組織マーカーとして捉えられている homeobox 型遺伝子 Hoxc6, Hoxc8, および Hoxc9 などが, 心臓周囲脂肪組織で発現量は極めて低く, 皮下脂肪組織において高発現していることも明らかとなった。

【考察・展望】炎症性マーカーの発現量が低かった皮下脂肪組織特異的に発現がみられた Hox ファミリー遺伝子は, 皮下脂肪型白色組織の形質を制御している可能性が考えられたため, 内臓型脂肪組織において過剰発現させることによって, 形質の変化を検証する予定である。

A-3 **パクチーエタノール抽出物の HeLa 細胞に対する細胞増殖抑制効果に関する研究**
○細谷美沙, 恩田浩幸¹, 西 甲介, 西本壮吾², 菅原卓也
(愛媛大院・農, ¹エスビー食品(株), ²石川県立大)

【目的】我々はこれまで、食用ハーブの保健機能評価を進めてきた。本研究では、パクチー葉部のエタノール抽出物の腫瘍細胞に対する細胞増殖抑制効果について検討した。

【方法・結果】ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞, ヒト肝臓がん細胞株 HepG2 細胞, マウス大腸がん細胞株 Colon26 細胞を前培養した後、パクチー葉部エタノール抽出物を含む培地で培養した。WST-8 を用いた吸光度法で細胞の増殖活性を測定した。その結果、HepG2 細胞および Colon26 細胞の増殖には影響しなかったものの、HeLa 細胞に対しては細胞増殖抑制効果を示した。そこで、HeLa 細胞に対する増殖抑制効果の経時変化を検討した結果、培養開始直後から HeLa 細胞の増殖活性の低下が確認された。細胞生存率をトリパンプルー色素排除試験法により測定したところ、細胞毒性は認められなかったことから、抽出物の効果は、増殖速度の抑制であることが推察された。そこで、細胞周期に及ぼす抽出物の影響を検討したところ、コントロールと比較して G1 期の細胞数の増加が認められ、細胞周期の進行が、G1 期で抑制されていることが推察された。Real-time RT-PCR 法により *p53* 遺伝子, *p21* 遺伝子の発現に及ぼす抽出物の影響を検討した。その結果、HeLa 細胞の *p53* および *p21* 遺伝子の発現量が有意に増加した。一方、R 点を通過すると誘導される *Cyclin A* および *Cyclin E* 遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した結果、いずれの遺伝子発現も、抽出物の作用により抑制された。これらのことより、パクチーエタノール抽出物は、HeLa 細胞の細胞周期を G1 期で抑制し、細胞の増殖を抑制することが明らかになった。

A-4 **パンの低糖化によるラット血糖値上昇の抑制**
○岸田太郎, 逢阪江理¹, 福田直大¹, 玉井敬久¹, 前田耕作², 内田敏之³
(愛媛大院・農, ¹愛媛県・産技研, ²(株)マエダ, ³(有)内田パン)

【背景・目的】急激な食後血糖値の上昇は肥満や糖尿病の原因の一つであり、高炭水化物な食品の問題点である。本研究は代表的な高炭水化物食品であるパンについて、難消化性澱粉、小麦粉よりも食物繊維を高含有するはだか麦粉、およびグルテンを主原料の小麦粉と代替することにより、低糖質化を試み、試作したパンの食後血糖値上昇をラット経口耐糖性試験により調べることを目的とした。【実験方法】対照区：小麦粉 100%、試験区 A：はだか麦粉 60%、難消化性澱粉 20%、グルテン 20%、および試験区 B：小麦粉 50%、難消化性澱粉 30%、はだか麦粉 10%、グルテン 10%の 3 試験区について、それぞれソフトフランス (SF) および菓子パン (SP) を製パンした。SD 系雄ラット 6 週齢を 4 日間精製飼料で予備飼育後一夜絶食し、各種パン凍結乾燥物 (30 メッシュスルー) を 3g または 1g 再給餌させ、4 時間または 3 時間経時的に尾静脈血を採取し、簡易血糖値測定装置にて血糖値を測定した (各試験区 8 匹)。【結果】3g 再給餌させた場合、SF および SP とも試験区 A および B で血糖値の上昇が抑えられ、SF では 3 時間目および 4 時間目、SP では 1 時間目には対照区より有意に低い値となった。すべての試験区で血糖値のピークは明確でなく、4 時間にわたって高い値を維持した。1g 再給餌した場合は SF の試験区 A においてのみ有意な血糖値上昇抑制が認められた。SF および SP とも、対照区の血糖値のピークは 1 時間目に明瞭に表れたが、試験区 A および B とも 2 時間目に不明瞭なピークが認められた。

A-5 大腸菌の非生物素材への付着に対する穀類の影響
○酒井仁美^{1,2}, 酒井 徹², 横井川久己男¹
(¹徳島大院・生物資源, ²徳島大院・医歯薬)

【目的】大腸菌は、非生物素材に対する付着性において素材の種類や食品成分の存在により異なる付着性を示すことが報告されている。本研究では、穀類成分存在下での非生物素材に対する大腸菌の付着性を明らかにする。

【方法】アマランサス（玄穀）、うるち米（精白米）、大麦（玄麦）、キヌア（精白粒）、小麦（玄麦）、そば（そば米）、とうもろこし（ポップ種、玄穀）、はと麦（精白粒）、もちあわ（精白粒）、もちきび（精白粒）、もち黒米（玄米）及びもち米（精白米）を粒または粉の状態で使用した。6 g の各試料に 30 ml の水を加え、攪拌しながら室温で 30 分抽出し、遠心分離後、上清を 20%抽出液とした。ポリスチレンもしくはステンレス製シャーレに各抽出液存在下で菌液を 30 分間接触させた。シャーレを生理食塩水で洗浄後、EMB 寒天培地を注ぎ 37°C で 24 時間培養し生育したコロニーを計測した。

【結果】すべての粒抽出液は、大腸菌のポリスチレン素材への付着を増加させた。しかしながら、大麦、キヌア、小麦、そば、もちあわ、もちきび、及びもち黒米の 7 種は粉末にしてから抽出を行うと、粒抽出した場合に比べ、大腸菌のプラスチック素材への付着数は減少した。これら 7 種のうち、大麦、キヌア及び小麦の粉末抽出液は、ポリスチレンおよびステンレス素材への大腸菌の付着を抑制する作用を示した。

A-6 Screening and analysis of edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin
○Badr Ali Hoida, Kaori Kanemaru¹, Kumio Yokoigawa¹
(Grad. Sch. Integr. Arts and Sci., Tokushima Univ., ¹Grad. Sch. Biosci. Bioind., Tokushima Univ.)

We screened edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin (Stx). Fourteen dry seaweeds (each 5 g) were suspended in 100 ml H₂O and autoclaved. After centrifugation, supernatant solutions obtained were used as 5% seaweed extracts. The amounts of Stx1 and Stx2 were determined by a reversed passive latex agglutination (RPLA) assay with 96-well microplates (V-bottom) and a Stx detection kit. When 0.1 ml of the extract was mixed with 0.4 ml of Stx solution (final conc.: 100 ng/ml), both Stx1 and Stx2 seemed to be well adsorbed by the extract of the *Enteromorpha linza* seaweed, called as *Usuba-aonori* in Japan. We purified the Stx-adsorbing substance from the *E. linza* seaweed by DEAE-Toyoparl and Hiloal 26/60 Superdex column chromatographies. The purified substance was an acidic polysaccharide with an average molecular mass of about 800 kDa. Apparent dissociation constants (*K_d*) of the polysaccharide to Stx1 and Stx2 were calculated as 1.9 and 3.5 μ M, respectively. The *E. linza* seaweed may have a potential use for preservation and treatment of infections by Stx-producing bacteria.

A-7 沈殿したポリ- γ -グルタミン酸の志賀毒素吸着性
○後藤月江, 達 牧子², 金丸 芳^{1,3}, 横井川久己男^{1,3}
(四国大・短大,¹ 徳島大院・総合科学,² 神戸女子短大,³ 徳島大・生物資源)

【目的】腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 は、わずかな細胞数でも容易に経口感染するという高い感染力が知られ、免疫学的に異なる2種類の志賀毒素 (Stx1, Stx2) を産生し、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群を引き起こして死に至る場合もある危険な細菌である。本菌による感染症の治療においては、抗生物質の使用が病態を悪化させる事例も報告されており、本菌による感染症の予防や治療のために安価で安全な Stx 吸着剤が望まれる。本研究ではポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) の Stx 吸着性について検討した。【方法】市販の平均分子量 1000 kDa の PGA 粉末に Stx1 または Stx2 と生理食塩水または PBS+0.5% BSA を混合し、37°C で 30 分間振とうさせた後、13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清と沈殿に分けた。上清を逆受身ラテックス凝集反応法 (VTEC-RPLA, デンカ生研) で志賀毒素定量を行った。さらに沈殿に生理食塩水と 1N NaOH を混合し、結合 Stx を解離させ、1N HCl を加えて中和後、同様に志賀毒素定量を行った。【結果及び考察】PGA (6 mg/ml) は Stx1 をほとんど吸着しなかったが、Stx2 をわずかに吸着した。混合液の違いによる吸着量の差はなかった。そこで PGA 量を増やし、飽和濃度以上で沈殿する PGA の志賀毒素吸着量を測定したところ、Stx1, Stx2 ともに吸着する結果となった。このことより、PGA は可溶性より沈殿型のほうが志賀毒素を吸着することがわかった。PGA は納豆の粘性物質の主成分で、安全で無味無臭の天然物であることから、安全な食品由来の志賀毒素吸着剤として、開発の可能性が示唆された。

A-8 Benzyl isothiocyanate mitigates acetaldehyde-induced cytotoxicity through an Nrf2-dependent upregulation of aldehyde dehydrogenase
○Yujia Liu, Momoko Yamanaka, Naomi Abe, Xiaoyang Liu, Beiwei Zhu¹,
Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ. ¹Sch. Food Sci. Technol., Dalian Polytech. Univ.)

Isothiocyanates are sulfur-containing phytochemicals with the general formula, R-N=C=S, and occur naturally as glucosinolate conjugates in cruciferous vegetables. Our group previously demonstrated that benzyl isothiocyanate (BITC), an ingredient of papaya, induces the phase 2 drug metabolizing enzymes. In this study, we investigated the modifying effect of BITC on the activity and gene expression of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in mouse hepatoma Hepal1c7 cells. The treatment of the cells with BITC dose-dependently enhanced the total ALDH activity and the gene expression of ALDHs as well as phase 2 enzymes including :quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase 1 (HO-1). Western blotting experiments revealed that BITC significantly induced not only the total protein expression, but also the nuclear translocation of Nrf2. Silencing Nrf2 by siRNA significantly modulated the gene expression of each ALDH. Since acetaldehyde is produced at the first step of ethanol oxidation, the effect of BITC on the acetaldehyde-induced cytotoxicity was examined. The pretreatment of Hepal1c7 cells with BITC significantly inhibited the acetaldehyde-induced cytotoxicity. These results suggested that BITC mitigates the acetaldehyde-induced cytotoxicity through the transcriptional regulation of ALDHs in an Nrf2-dependent manner.

A-9 (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin converting enzyme activity through an autoxidation-dependent mechanism
OZhe Liu, Toshiyuki Nakamura, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata,
Yoshimasa Nakamura (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ)

Although dietary flavonoids, such as (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and luteolin, have been shown to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE) activity, the precise mechanisms still remain to be clarified. In this study, we investigated the molecular mechanisms involved in the ACE inhibition by EGCG, a major tea catechin. We first confirmed that the activity of recombinant human ACE was inhibited by EGCG in a dose-dependent manner. Co-incubation with Zn^{2+} showed no influence on the ACE inhibition by EGCG, whereas it completely counteracted the inhibitory effect of EDTA, a representative ACE inhibitor chelating Zn^{2+} at the active site of ACE. Although a considerable amount of hydrogen peroxide was produced during the incubation of EGCG, the treatment of ACE with hydrogen peroxide had little effect on the enzymatic activity. On the other hand, the co-incubation of EGCG with inhibitors of catechol oxidation, such as borate or ascorbic acid, significantly diminished the EGCG inhibition. A redox-cycling staining experiment revealed that rh-ACE was covalently modified by EGCG. Furthermore, Lineweaver-Burk plot analysis indicated that EGCG inhibited the ACE activity in an uncompetitive manner. These results strongly suggested that EGCG might allosterically inhibit the ACE activity through the oxidative conversion into an electrophilic quinone and subsequent binding to the ACE.

A-10 市販アオノリ中のベータカロテンの成分比較について
○小比賀秀樹¹, 垣田浩孝^{1,2} (¹産総研・健康工学, ²日本大・文理)

【目的】近年国民の健康志向が高まり、加工食品中の機能性成分の情報提供を求める声が消費者を中心に多く寄せられている。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。海藻は野菜よりも調理法が単純なため摂取しやすい。ベータカロテンはビタミン A (レチノール) 前駆体であり、ビタミン A が皮膚や粘膜の健康維持や夜間視力維持を助ける栄養素であることから注目を集めているカロテン類の一つである。原料海藻が異なる 3 種類のアオノリ製品中のベータカロテン含有量を比較することを目的とした。

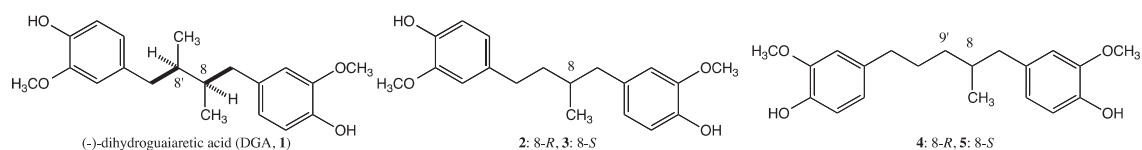
【方法・結果】アオノリ抽出液中のベータカロテンはアセトニトリル含有移動相を用いて C-18 逆相カラムにより分離した。検出は 450 nm を用いた。スジアオノリ粉末を試料として、抽出溶媒、抽出時間、酸化防止剤添加量を検討した。エタノールの方がアセトンよりもベータカロテン抽出量が多かった。酸化防止剤添加量の検討はベータカロテン標準試薬を用いて行った。酸化防止剤無添加では 4°C, 6 days 保存後にベータカロテンは放置前の約 60%まで面積が減少した。一方、10% Pyrogallol 添加した場合にはベータカロテン量は変動しなかった。最適化した抽出法を用いて分析した結果、スジアオノリ由来アオノリ製品がアオサやヒトエグサ由来製品よりも約 3 倍ベータカロテンを含んでいることが明らかになった。

A – 11 Effect of D-ketohexoses on rheological properties of chicken egg white frozen gels
O Mulyana Hadipernata ^{1,2}, Shigeru Hayakawa ³, Masahiro Ogawa ^{1,3}
(¹UGAS, Ehime Univ., ²IAARD, ³Fac. Agri., Kagawa Univ.)

The aim of this study was to examine the rheological properties of chicken egg white (EW) gels containing 10% D-ketohexose (D-fructose, D-allulose, D-tagatose, and D-sorbose) and to compare the effects of D-ketohexoses on freeze-thawing of EW gels with D-glucose (Glc), sucrose (Suc), and trehalose (Tre). The elasticity of EW gel was highest in D-allulose-, D-tagatose-, and Tre-gel. Also, D-ketohexose-gels showed significantly low expressible water and high breaking strength compared with Glc-, Suc-, and Tre-gel. Thus, D-ketohexoses can improve the rheological properties and water holding capacity of EW gels compared with the other sugars. Rheological properties of frozen stored ketohexose-gels were evaluated by repeating freeze-thaw cycle (freeze at -20°C , stored for 5 days, and thawed at 4°C for 16 h). The rheological properties of EW gels declined with repeating freeze-thaw cycle. In each cycle, D-ketohexose-gels retained high viscosity and high breaking stress compared with Glc-, Suc-, and Tre-gel. In addition, the expressible water of EW gels escalated with freeze-thaw cycle. D-Ketohexose-gels possessed higher water-holding capacity against freeze-thawing than the other sugar-gels. In conclusion, D-ketohexoses appreciably reduced the deterioration in the rheological properties of EW gels by freeze-thaw cycles. Thus, D-ketohexoses are useful to improve storage stability of frozen gel-type foods containing EW.

B-1 3,3'位にメトキシ基, 4,4'位に水酸基を持つ 8,9'-neolignan の両鏡像異性体の合成 ○西本明日香, 西脇 寿, 山内 聡 (愛媛大院・農)

【目的】これまでの研究で, (-)-dihydroguaiaretic acid (DGA, **1**)が, 抗菌活性, 抗ボウフラ活性, 抗カビ活性, 細胞毒性活性を有する事を見出した。また, **1** の 8'位のメチル基が欠ける norlignan **2, 3** も合成し生物活性試験を行ったところ, 8-*S*体 **3** が, HL-60 及び HeLa 細胞に対して **1** の 4 倍の細胞毒性活性を示した。そこで次に, フェニルプロパノイドが 2 単位 8 位と 9'位とで結合した neolignan **4, 5** の両鏡像異性体の生物活性を lignan 構造 **1**, norlignan 構造 **2, 3** と比較する事を目的として, **4** 及び **5** の合成を行った。



【方法・結果】*S*体の Evans の不斉補助基に 4-pentenoyl 基を導入した後, 4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde との Evans の *anti* アルドール縮合を行った。生じた 2 つの水酸基を還元的に除去した後, 4-benzyloxy-3-methoxystyrene との 2nd-Grubbs 触媒を用いたカップリング反応を行い, 最後に水素を用いた接触還元と水素化分解を行って 8*R*-**4** を得た。*R*体の Evans の不斉補助基を用いる事によって, 同様に 8*S*-**5** を得た。キラルカラムを用いてどちらも 99%ee である事を確認した。

B-2 天然物 keronopsin の全合成研究 ○吉田友輝, 糴間由幸 (米子高専・物質工)

【目的】海洋繊毛虫 *Pseudokeronopsis rubra* が生産する自己防御物質ケロノプシンは, 他の繊毛虫や鞭毛虫を死滅させる効果を有する。そのためケロノプシンは, 鞭毛虫ブルーストリパノソーマの寄生が原因となる, アフリカ睡眠病治療薬への応用が期待されている。しかしケロノプシンは, 同一分子内にピロン, 4 つの不飽和結合, ピロールが連結した複雑な構造をしており, 未だ化学合成されていない。先行研究では, ケロノプシンの逆合成解析を行い, ピロン環部分の出発物質をデヒドロ酢酸, 不飽和結合部分をプロパルギルアルコール, ピロール部分をピロールとし, 得られた各々の合成等価体同士を連結する方法にて検討した。しかし, 各合成等価体同士の連結や, ピロールへの臭素導入の制御が困難であったことから, 合成方法の見直しが必要となった。

【方法・結果】2013 年に Samala らにより, ジムノコンジュガチンの全合成経路が確立された。本研究では, ジムノコンジュガチンがケロノプシンの構造類縁体であること, ジムノコンジュガチンの合成段階が短いことから, ジムノコンジュガチンの合成方法を基にケロノプシンの合成経路を変更することにした。出発物質を 2-ピロールカルバルデヒドとし, Horner-Wadsworth-Emmons 反応によるエステル合成を鍵反応とした 8 工程の反応を経て, ピロン環を形成する方法を検討した。

B-3 リボースエーテル誘導体の合成と白血病細胞に対する増殖抑制活性 ○深井実優, 高倉千尋, 柳田 亮, 川浪康弘 (香川大・農)

【目的】D-グルコースの C-3 位エピマーで希少糖の一種である D-アロースはがん細胞増殖抑制活性を示し, C-6 位水酸基をアシル化すると白血病細胞株に対する増殖抑制活性が数十倍に向上する事が明らかにされた。さらに, D-アロースのフラノース型構造に類似したペントースである, D-リボースの C-5 位水酸基のアシル化誘導体も同様に白血病細胞に対して細胞増殖抑制活性を示した。本研究ではリボース誘導体のエステル結合が細胞内で加水分解される可能性を検討するため, D-リボースの C-5 位水酸基エーテル化誘導体を合成し, それらのがん細胞増殖抑制活性を調べた。

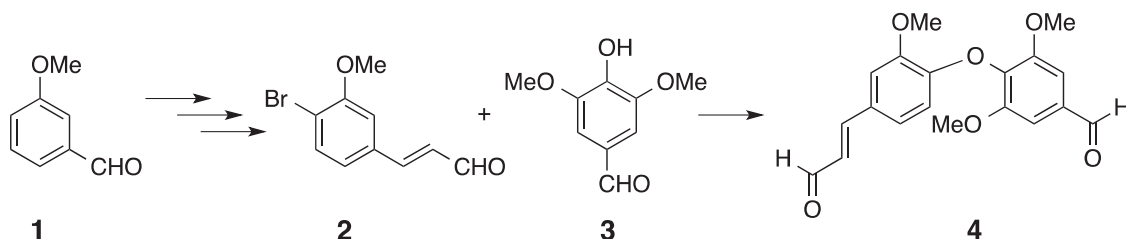
【方法・結果】D-リボースの C-1 位水酸基をメチルアセタール, 2, 3 位水酸基をアセドナイドで保護した後, 臭化デシル, 臭化ドデシル, 臭化テトラデシルを用いて C-5 位水酸基を位置選択的にエーテル化した誘導体を合成した。10~300 μ M の各リボースエーテル誘導体をヒト白血病 MOLT-4F 細胞株を播種したマクロプレートウェルに添加し, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 48 時間インキュベーションした後, 生細胞数を定量し, コントロール群に対する細胞増殖率を算出した。細胞増殖抑制試験の結果, リボースエーテル誘導体はアシル化誘導体よりわずかに高い抑制活性を示したことより, リボースアシル化誘導体は, エステル結合が細胞内で加水分解される前に抑制活性を示していることが示唆された。また, エーテル結合している直鎖の炭素数が 10~14 の間では, 細胞増殖抑制活性はほぼ同程度であることが分かった。

B-4 エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus*) から単離された PTP-1B 阻害活性物質の合成研究

大西良弥, ○野下俊朗, 濱田義知¹, 齊藤安貴子¹
(県広大・生命環境, ¹大阪電通大院・工)

【目的】エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus*) から単離されたジアルデヒド **4** は, PTP-1B 阻害活性を示すことが報告されている¹⁾。我々はこれまで合成例のないジアルデヒド **4** の合成を行うことを目的とした。

【方法・結果】*m*-Anisaldehyde (**1**) から 4 ステップで α, β -不飽和アルデヒド **2** を調製した。**2** と syringaldehyde (**3**) とを *N,N*-dimethylacetamide (DMA) を溶媒として過剰量の銅粉を用いる古典的な条件による Ullmann ether 合成によるカップリングを行い目的化合物 **4** を合成した。しかし合成品の NMR データは天然物のそれと一致しなかったため, 別ルートでの合成を検討中である。

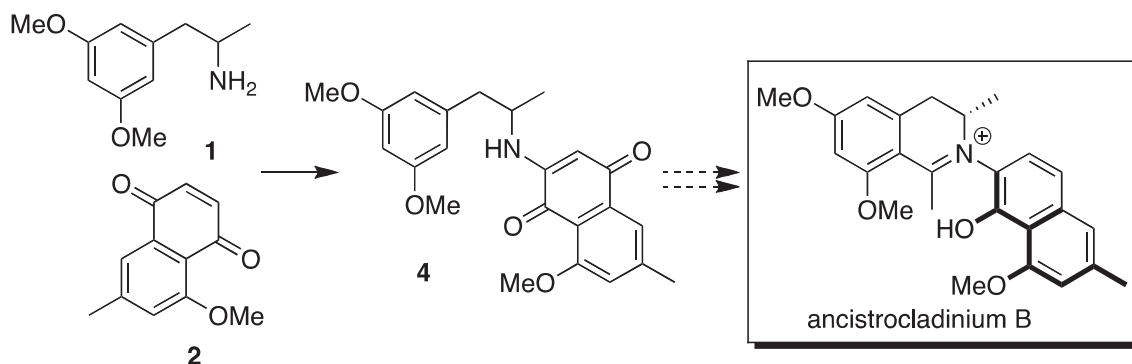


1) N. Li *et al.*, *Phytochemistry Lett.*, **13**, 286-289 (2015).

B-5 抗リーシュマニア原虫活性物質 Ancistrocladinium 類の合成研究
 ○清田洋正, 齋藤昭人¹, 高井桃子¹, 桑原重文¹
 (岡山大院・環境生命, ¹東北大院・農)

Ancistrocladinium B は, Bringmann らによりコンゴ産植物 *Ancistrocladus* sp. から単離された軸不斉を有するアルカロイドで, 内臓リーシュマニア原虫に抗虫活性を示す[1]。同グループにより全合成が達成されたが[2], 我々も異なるアプローチで合成研究を行っている。

アミン **1** のキノン **2** への共役付加反応により **3** を得た。ジヒドロイソキノリン環の形成とキノン部の還元により, ancistrocladinium B に導く計画である。



[1] G. Bringmann et al., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9348. [2] *Idem.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1151.

B-6 エンサイ根放出物からの植物生長抑制物質
 ○深井智穂, 古本敏夫 (香川大・農)

【目的】エンサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) はヒルガオ科サツマイモ属に属するつる性植物で, ヨウサイ, アサガオナ, 空心菜とも呼ばれる。耐暑性が強く, 中国南部や東南アジアで広く栽培されている緑黄色野菜で, ビタミンやミネラルなどを豊富に含むことから, 日本においても夏の健康野菜として需要が増加してきている。また, 分枝が盛んで容易に発根し, 匍匐して密生した群落を形成することから, カバークロップとしての利用のほか, 多湿を好み, 茎が中空で水上に浮かぶことから水質浄化にも利用できる多目的植物である。本研究では, エンサイの根から放出される植物生長抑制物質を単離・同定することを目的とした。

【方法・結果】露地栽培したエンサイの側枝を水耕液に挿し芽し, 2 週間発根のため前栽培した。新しい水耕液に交換して1週間後に水耕液を回収する操作を3回行った。回収した水耕液を固相抽出した後, 溶媒分画を行い, 酢酸エチル可溶性画分を得た。これをレタスを用いた生物検定を指標としてシリカゲルカラムクロマトグラフィー, TLC, 逆相 HPLC によって精製することで, 2 種類の生長抑制物質を単離した。¹H-NMR, クロマトグラフィーの挙動, UV 下での青色蛍光から, これらをクマリン誘導体であるウンベリフェロン (7-hydroxycoumarin) とスコポレチン (7-hydroxy-6-methoxycoumarin) と同定した。ウンベリフェロンは胚軸に対して 0.03 mM 以上, 根に対して 0.01 mM 以上で, スコポレチンは胚軸に対して 3 mM, 根に対して 1 mM 以上でレタスの生長を有意に抑制した。

B-7 重金属に対するバイオ燃料植物ジャトロファの生理・生長応答の解析
○山田みな美, Malambane Goitseone¹, 山田 智, 辻本 壽^{1,2}, 明石欣也
(鳥取大院・農,¹鳥取大院・連農,²鳥取大・乾燥地研)

【目的】ジャトロファは乾燥地での栽培が可能な油糧系バイオ燃料植物である。重金属汚染土壌でも生育可能であり、循環的エネルギー生産に加え重金属汚染環境の修復でも期待されるが、その生理特性の詳細は判明していない。本研究では、重金属に対するジャトロファの生理生長応答の理解を目的とした。

【方法・結果】水耕栽培において第1葉展開時に、5種類の重金属水溶液（カドミウム、クロム、銅、ニッケル、亜鉛）を異なる3濃度で付与し、12日後における地上部および地下部の形態、乾物生産量、重金属および主な必須元素含有量を解析した。その結果、10 μM以上の各種の重金属で処理したジャトロファでは生育遅延が観察され、特に銅及びニッケル処理区において生育阻害が顕著であった。銅、亜鉛、カドミウム処理区では、重金属付与後に新しく出現した第2葉において葉の黄化が観察された。付与した金属の植物体内蓄積量は金属種ごとに大きく異なり、一個体あたりの蓄積量はクロムが最も高く、次いで亜鉛およびカドミウムで高い傾向が見られた。生体毒性の高いカドミウムに関しては、その蓄積レベルは7.6 μmol/g DWに達し、他の一般樹木の報告値に比べ高い値を示した。カドミウムに対する応答をさらに解析した結果、カドミウム処理により根においてマンガン含有率が低下し、地上部では鉄含有率が低下していた。第2葉における蒸散速度とCO₂固定速度はコントロールに比べそれぞれ約33%と50%に低下していた。また根において総チオール化合物の蓄積量が増加しており、カドミウムに対する防御物質としてチオール化合物が誘導され、毒性緩和に寄与している可能性が示唆された。

B-8 サンショウの香気成分は油胞特異的に蓄積している；揮発性テルペノイドの分析と生合成酵素の機能解析
○藤田芳勲, 飯島陽子¹, 相田光宏², 鈴木秀幸³, 松井健二, 肥塚崇男
(山口大院・農,¹神奈川工科大・応用バイオ,²奈良先大・バイオサイエンス,³かずさDNA研・産業基盤)

【目的】サンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) は香気寄与成分として limonene や citronellal などのテルペノイド類を多く含むことが知られている。しかしながら、香気成分の局在性及び生合成酵素に関する知見は未だ数少ない。そこで本研究では、サンショウ葉で組織特異的に、特に油胞内特異的に蓄積している香気成分を分析するとともに、それら生合成酵素遺伝子の単離・機能解析を目的とした。

【方法・結果】サンショウ葉の油胞を針で潰し、油胞内に蓄積している香気成分をヘッドスペース SPME法で捕集してGC/MS分析を行った結果、揮発性テルペノイドを含む20種類以上の化合物が検出された。一方で、無傷の葉や葉肉を傷つけた葉ではほとんど化合物が検出されなかったことから、サンショウ葉の香気成分の多くが油胞内に局在していることが示唆された。他方、サンショウの遺伝子データベースをBLAST検索すると、既知のテルペン合成酵素と高いアミノ酸相同性を持つ4つの遺伝子 *ZpTPS1*~*ZpTPS4* が見つかった。このうち、*ZpTPS1* と *ZpTPS2* 遺伝子を His-tag タンパク質として大腸菌発現させ、*in vitro* で酵素活性を測定したところ、反応主要生成物としてそれぞれ β-caryophyllene と germacrene D が検出された。同様の結果が、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) 葉での一過的な過剰発現系においても得られた。これらの結果より、*ZpTPS1* は β-caryophyllene を、*ZpTPS2* は germacrene D を生成するセスキテルペン合成酵素をコードすることが明らかとなった。

B-9 シロイヌナズナリポキシゲナーゼ2は傷害刺激で活性化され、みどりの香りを生成する
○望月智史, 肥塚崇男, 松井健二 (山口大院・創成科学)

植物は昆虫による食害や病原菌の感染等の物理的的刺激を受けると、みどりの香り (GLVs) やジャスモン酸 (JA) などのオキシリピンを生成し、防御応答を行うことが知られている。これらオキシリピンは合成経路を共有しており、リノレン酸がリポキシゲナーゼ (LOX) による酸化を受け、その後ヒドロペルオキシドリアーゼ (HPL) による反応を受けるとGLVsが、アレンオキシドシンターゼ (AOS) とその後の反応を受けるとJAが生成される。植物はLOXのアイソザイムを複数所持し、GLVs生成とJA生成に特異的なLOXをそれぞれ別々に用意することでこの2つのオキシリピンの生成を制御しているとされている。

モデル植物のシロイヌナズナは6つLOXアイソザイムを持ち、JA生成はLOX2が主に寄与していることが知られている。しかしGLVs生成におけるLOXは未だ知られていなかった。そこでシロイヌナズナの各LOXノックアウト変異体を用いて代謝物分析を行ったところ、LOX2がGLVs生成にも必須であることが分かった。その上、LOX2は一部の炭素数5の揮発性成分の生成にも必須であり、JA生成と合わせて、シロイヌナズナにおいてLOX2は複数の機能を担っていることが証明された。LOX2は葉緑体ストロマ局在で、基質はチラコイドの膜脂質であるため、GLVsやJAが常時生成されるはずだが、植物は傷害を受けないとGLVsやJAを生成しない。よってLOX2は無傷な状態では不活性型で存在し、傷害刺激を受けると活性化され、GLVsやJAの生成を促進することが示唆される。そこでこのLOX2活性化機構を調査したところ、カルシウムイオンが活性化に関与していることが分かった。

B-10 サイクリン依存性キナーゼ PCK3/CDK18 による細胞運動調節機構の解明
○松田真弥¹, 川本晃平¹, 辻 明彦^{1,2}, 湯浅恵造^{1,2}
(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大院・生物資源)

【目的】PCK3 (PCK3) はサイクリン依存性キナーゼファミリーに属する Ser/Thr キナーゼであるが、その生体内における役割や下流シグナル伝達機構は不明のままである。ごく最近、我々はノックダウン解析により、PCK3が細胞の形態や運動の制御に関わることを見出し、生理機能解明への重要な手掛かりを得ることができた。そこで本研究は、PCK3による細胞運動調節機構の解明を目的とし、その下流シグナル伝達経路の特定を試みた。【方法・結果】まず初めに、各種抗リン酸化抗体を用いて、PCK3ノックダウンによる細胞運動制御シグナルの変動を解析した。その結果、PCK3をノックダウンしたHEK293T細胞において、細胞接着斑の構成因子である focal adhesion kinase 1 (FAK1) および Src の活性が上昇することを見出した。そこで、接着斑の形成に関わるタンパク質群について、PCK3との相互作用を調べた結果、FAK1 および α -actinin と結合することが明らかとなった。PCK3が発現していないHeLa細胞において、FAK1は接着斑に局在するが、PCK3の過剰発現によってFAK1の接着斑への局在が抑制され、PCK3と細胞質で共局在した。さらに、fibronectinでコーティングしたディッシュに細胞を播種し、0-60分後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法により解析した。播種10-30分後に、FAK1の活性化に関わる Tyr-397 のリン酸化の充進が認められたが、恒常活性型 PCK3 の過剰発現によって、そのリン酸化は顕著に抑制された。これらのことから、PCK3はFAK1の活性を負に制御し、細胞運動を調節していることが明らかとなった。

C-1 酵母 Arp2/3 複合体はスフィンゴ脂質の生合成を制御する
○衛藤克樹, 傳田寛人, 池田敦子, 芳形茉美, 岡野 樹, 張 章, 船戸耕一
(広島大院・生物圏)

【目的】 細胞膜を構成する脂質の一つであるスフィンゴ脂質は、ステロールとともに脂質ラフトを形成し、細胞内外の情報伝達やタンパク質の選別輸送など、生命活動において重要な役割を担っていると考えられている。そのため、細胞内のスフィンゴ脂質の量は常に正常に保たれている必要があり、その合成は厳密に制御されていると考えられる。出芽酵母では、スフィンゴ脂質の合成経路や合成に関わる遺伝子の多くがすでに同定されている。また近年、それらの遺伝子の機能を制御するメカニズムの一部は明らかとなってきているが、未だ多くの部分は不明のままである。そこで本研究では、スフィンゴ脂質のホメオスタシスに関与する遺伝子の探索を目的とした。

【方法・結果】 スフィンゴ脂質合成阻害剤ミリオシンとオーレオバシジン A に対する感受性に影響を与えた非必須遺伝子の破壊株について、複合スフィンゴ脂質であるイノシトールリン酸セラミド (IPC) の量を放射能標識したイノシトールで解析したところ、アクチンの極性に関与する遺伝子 *SHE4* の破壊が IPC 合成に影響を与えることが示された。そこで、アクチンの極性に中心的役割を持つ Arp2/3 複合体に注目した。この複合体の構成因子である Arp2, Arc35, Cmd1, Cka1/Cka2 の変異株の IPC 量をそれぞれ解析したところ、全ての変異株で IPC 量の増加が確認された。これらの結果から、Arp2/3 複合体は IPC の合成を負に制御する新たな調節体であることが示唆された。

C-2 出芽酵母におけるスフィンゴ脂質生合成と HOG 経路の機能的関連性
○傳田寛人, 池田拓真, 西山和恵, 船戸耕一 (広島大院・生物圏)

【研究背景】

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基を骨格にもつ脂質の総称であり、酵母からヒトに至るまで真核生物に広く分布している。生体膜の構成要素として重要ではあるが、それだけではなく、脂質分子自体が情報伝達因子として、あるいは情報伝達やタンパク質の選別の場合である脂質ラフトの構成因子としての働きも担っており、生体膜に関わる様々な生命現象に深く関わっていると考えられている。

【方法・結果】

本研究では、スフィンゴ脂質生合成と機能的関連のあるキナーゼ遺伝子を探索する目的で、酵母のキナーゼライブラリーを用いて、*lcb1-100* と *aur1-1* 変異株の温度感受性に影響を与える遺伝子の取得を試みた。その結果、HOG (High Osmolarity Glycerol) 経路で働く多くの遺伝子の過剰発現が変異株の生育に影響を与えることがわかった。そこで、次に、HOG 経路で働くキナーゼ遺伝子と *LCB1* や *AUR1* との二重変異株を作製し生育を調べたところ、合成的な生育障害を示したことから、両遺伝子間に遺伝学的的相互作用があることが明らかになった。さらに、HOG 経路の *HOG1* と *PBS2* の破壊株のスフィンゴ脂質の合成量を解析したところ、複合スフィンゴ脂質の 1 つ、イノシトールリン酸セラミド (IPC) の合成量の顕著な低下が観察された。以上の結果から、HOG 経路によるスフィンゴ脂質合成調節が酵母の生育に重要であることが示唆された。

C-3 TORC2によるリボソーム蛋白質遺伝子の転写制御
○矢吹友佳理, 衛藤克樹, 廣田彩香, 水田啓子, 船戸耕一 (広島大院・生物圏)

【目的】

TORC (Target Of Rapamycin Complex) には、構成因子と機能の異なる 2 つの複合体 TORC1 および TORC2 が存在する。TORC1 は栄養条件に応答して細胞成長を制御する主要な制御因子であり、その過程でリボソーム生合成にも関与することが知られている。一方で、TORC2 はアクチンの極性やスフィンゴ脂質合成の制御に関与することが報告されているが、その機能の多くは明らかにされていない。そこで本研究では、TORC2 の新たな機能の探索を試みた。

【方法・結果】

今回、TORC2 の構成因子の変異株および TORC2 の下流エフェクターの変異株において、リボソーム蛋白質遺伝子の転写量が減少することを見出した。このことから、TORC2 がリボソーム生合成を正に制御することが示唆された。さらに興味深いことに、TORC2 の下流エフェクターの変異株は、TORC1 の阻害剤であるラパマイシンに対して感受性を示した。これらの結果から、TORC2 によるリボソーム生合成調節は、TORC1 を介して行われる可能性が示唆された。

C-4 分裂酵母のアグマチナーゼ欠損株における生理的影響の研究
○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 (ADC) によって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り、後にアグマチナーゼ (アグマチンから尿素を加水分解してポリアミンであるプトレシンを合成する酵素) によってプトレシンへと代謝される。アグマチンは、近年ヒトやウシの脳内では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、真核生物での詳細な生理的機能は未だに不明である。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生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 種類存在し、それぞれコードする遺伝子を *agm1*⁺, *agm2*⁺, *agm3*⁺ と命名した。いずれの *Agm* もシグナルペプチドを有しており、他起源のアグマチナーゼと比較しても活性中心が高度に保存されていた。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。これらの株を *agm3*⁺ を組み込んだプラスミドで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。

C-5 膜局在依存性の増殖阻害を引き起こす機能未知エフェクターの制御機構の解明
○北園喬斗, 忻 詩博, 藤原祥子, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大院・生物資源)

植物や動物の病気の原因となるグラム陰性菌は、Ⅲ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して宿主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、病原菌の感染戦略の理解に役立つが、ほとんどのエフェクターが機能未知である。本研究では、その発現によって酵母に増殖阻害を引き起こす青枯病菌エフェクターの1つである RSc0608 について解析した。

これまでの解析で、RSc0608 欠失変異体の細胞内局在及び増殖阻害からドメインの推定を行った。その結果、RSc0608 が N 末端に膜局在化ドメイン及び自己阻害ドメインを、C 末端に増殖阻害ドメインを有するマルチドメインタンパク質であることが明らかになった。さらに、RSc0608 がリン酸化されることを見出し、そのキナーゼがカゼインキナーゼ 1 であることを以前に報告した。今回は、RSc0608 の膜局在化と増殖阻害の関係性について解析した。PSR1 は N 末端にあるシステイン残基を介して、パルミトイル化により細胞膜に局在することが報告されている。RSc0608 の N 末端 2-21 アミノ酸欠失変異体は酵母の膜に局在化せず、増殖阻害も示さない。この欠失変異体に PSR1 を融合したところ、膜局在化が可能になり、再び増殖阻害を示した。この結果によって、RSc0608 が酵母の膜に局在化することで増殖阻害活性を得ていることが明らかになった。さらに、PSR1 融合体は、パルミトイル化に関わるシステイン残基をセリンに置換し膜局在を不可能にした変異体よりも高度にリン酸化されていることが分かった。このことは、膜局在化がリン酸化に関与し、リン酸化が増殖阻害活性に必要であることを示唆する。

C-6 MCC/eisosome に局在する 4 回膜貫通タンパク質の機能解析
○橋井圭介, 八重佳織, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大院・生物資源)

酵母細胞膜は 3 つの互いに重なり合うことのない膜ドメインを有しており、そのうちの一つである MCC (Membrane Compartment occupied by Can1) には eisosome と呼ばれる裏打ち構造が存在する。Eisosome は細胞膜が細胞質側に陥入した溝を形成する非常に安定した構造で、アミノ酸輸送をはじめとした様々なタンパク質が存在し、それらが eisosome の機能や構造に関与していると考えられるがその詳細は明らかにされていない。Eisosome には構造上非常に類似した六つの 4 回膜貫通タンパク質が存在し、Sur7 family (Sur7, Ynl194c, Pun1, Fmp45) と Nce102 family (Nce102, Fhn1) の二つのファミリーに分類される。これらのタンパク質はスフィンゴ脂質代謝や細胞壁合成に関与していることが報告されている。また、先行研究では、MCC/eisosome に局在するタンパク質 Slm1 を過剰発現時させると高温感受性を示し、その感受性は 4 回膜貫通タンパク質を一つでも欠損させると強まることから、4 回膜貫通タンパク質の eisosome の構造形成や機能に深く関与していることが考えられた。

本研究では eisosome に存在する 4 回膜貫通タンパク質を全て欠損させた六重変異株やさらに eisosome の主要な構成要素である Pil1 を欠損させた七重変異株を作製した。六重変異株の eisosome の構造を観察した結果、eisosome の構造異常が観察されたが、Nce102 欠損株でも同様の膜の陥入構造が伸びた構造が観察され、顕著な表現型の差は見られなかった。また、七重変異株は高温感受性や高浸透圧ストレス感受性を示し、4 回膜貫通タンパク質の eisosome 構造維持への関与が示唆された。

C-7 大腸菌呼吸鎖における Coq10 ホモログ YfjG の生理的役割

○岸本 大¹, 假屋貴大², 藤元奈保子², 右田たい子³, 高坂智之^{1,2},
山田 守^{1,2} (¹山口大院・創科, ²山口大院・医, ³山口大・農)

【目的】ユビキノン (UQ) 結合タンパク質が酵母において発見され, その遺伝子 (*coq10*) 欠損が UQ の生合成に影響を与えないが呼吸活性の阻害や活性酸素種への感受性をもたらすことなどから, そのタンパク質の生理学的機能に興味をもたれている。一方, 大腸菌は Coq10 ホモログとして YfjG をもつが, その機能は不明である。本研究では, YfjG の生理学的機能を解明することを目的としている。

【方法・結果】YfjG の機能や UQ やメナキノン (MQ) との相互作用の有無等を検討するために, *yfjG* 欠損株, *menA* 欠損株, *ubiA* 欠損株および *yfjG* 変異と MQ 合成に係る *menA* や UQ 合成に係る *ubiA* の欠損変異を組み合わせた *menA yfjG* 欠損株, *ubiA yfjG* 欠損株を構築し, その親株と生育, 呼吸活性, 活性酸素種の蓄積等の比較を行った。その結果, *yfjG* 欠損株は親株に比べ, 対数増殖期で生育の遅れが確認された。*menA yfjG* 欠損株や *ubiA yfjG* 欠損株をそれぞれ *menA* 欠損株や *ubiA* 欠損株と比較したところ, 二重欠損株において生育の低下が見られた。NADH オキシダーゼ活性を比較したところ, *yfjG* 欠損株は親株と比べ, 二重欠損株はそれぞれ対応する単欠損株と比べ, 活性の低下が見られた。また, 活性酸素種の蓄積の比較をしたところ, *yfjG* 欠損株, 二重欠損株においてより多くの蓄積が観察された。それらの結果および EPR 解析の結果等から, YfjG は UQ や MQ と相互作用し, キノンが電子運搬を行う際に安定化させるなど, 大腸菌呼吸鎖において重要な役割を担っていることが推測された。

C-8 Polyamine 高含有納豆の開発

○金 熙雄, 金 章源¹, 山本慎二¹, 李 海翊²
(韓国江原大院・医生命, ¹(株) NBE, ²韓国江原大・医生命)

【目的】

Polyamine は細胞の中に多量に存在する生理活性物質の一つで老化とともに進行する疾患を抑制する物質として注目を浴びている。日常的食品の中で納豆は polyamine 高含量群に属し polyamine の供給源として最適の食品とも言える。本研究では polyamine 高含有納豆を生産する目的で spermidine の生合成能力が増大した新しい納豆菌を稲藁から分離・同定・育種した。

【方法・結果】

韓国, 日本, 中国から収集した稲藁から分離した菌株を 5%大豆液体培地での polyamine 生産能が高い約 100 株を一次選抜し Bergey's Manual によって *Bacillus subtilis* に分類される 8 株を二次選抜した。8 株で各々納豆をつくり納豆製造適合性の高かつ polyamine の生産能の高い 1 株を選抜した。この菌は 16sRNA 分析で *Bacillus subtilis* に同定されたので NTG を用いる突然変異で polyamine の生産能力をさらに上げて *Bacillus subtilis* EE5 菌と命名した。EE5 菌が納豆に蓄積する主な polyamine は LC-MS-MS で spermidine に同定された。EE5 菌で発酵した納豆には約 240 $\mu\text{g/g}$ (wet) の polyamine が蓄積され一般納豆の約 40 $\mu\text{g/g}$ (wet) より高い polyamine 含有量を見せた。

C-9 *Tricholoma matsutake* 菌糸生育における D-及び L-アミノ酸の添加効果
○高橋啓子¹, 服部武文^{1,2}, 金丸 芳^{1,2}, 小山保夫^{1,2}, 横井川久己男^{1,2}
(四国大・生活科学,¹ 徳島大院・総合科学,² 徳島大院・生物資源)

【目的】マツタケ(*Tricholoma matsutake*)は特徴的な香りを有し、日本では人気の高いきのこであるが、共生菌根菌であるマツタケきのこの人工栽培は未だ成功していない。合成培地でのマツタケ菌糸の生育が極めて遅いことが、研究の進展を遅らせる原因の一つと考えられている。これまで、マツタケ菌糸の成長促進効果を示す物質として、チアミン、ニコチン酸、cAMP、D-イソロイシン等が報告されているが、十分な効果に至っていない。本研究では、D-及びL-アミノ酸の添加効果について検討した。

【方法】マツタケ菌糸は徳島県産マツタケから分離して培養した。本菌の培養は、太田浜田(OH)培地(1% glucose, 0.2% yeast extract, 0.05% HyponexTM, 1.5% agar, pH 5.1)を用い21℃で行い、生育した集落から内径4 mmのコルクボーラーで打ち抜いた菌糸塊を種菌として、各種D-及びL-アミノ酸を添加したOH培地で、成長促進効果を調べた。また、マツタケの菌糸ときのこの遊離アミノ酸含量は、UHPLCシステム(日本分光)を用いて測定した。菌糸のエネルギー代謝活性は、Colorimetric Microbial Viability Assay Kit(同仁化学研究所)を用いて測定した。

【結果】OH培地に各種D-及びL-アミノ酸を添加した時、L-Asp, L-Leu, L-Ile, D-Phe, D-Ileに有意な成長促進効果が見られた。マツタケのきのここと菌糸の遊離アミノ酸含量では、L-Asp, L-Leu, L-Ileがきのこより菌糸の方が少なく、これら三種類のアミノ酸はOH培地での生育に不足するアミノ酸と考えられた。また、D-Pheはエネルギー代謝を促進すると考えられた。

C-10 栄養条件が担子菌 *Coprinopsis cinerea* のオートファジーに及ぼす影響
○小川直紀, 大野聡一郎, 濱岡修平, 麻田恭彦, 渡邊 彰(香川大・農)

【目的】担子菌は、一般に生育環境が安定している時は菌糸状態で生育するが、栄養飢餓などの外的環境要因が加わることにより、栄養生長から生殖生長へとその生活様式を転換し子実体を形成すると考えられている。一方、バルクな細胞内分解機構であるオートファジーは、栄養飢餓に応答するだけでなく、発生や分化などの様々な生命現象にも密接に関与することが、近年、明らかとなってきた。以上のことから、本研究ではモデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* を対象に、担子菌の生長に深く関わる栄養状態がオートファジーに及ぼす影響について解析を行った。【方法および結果】まず、本研究で用いる栄養培地中の窒素源を制限した条件、または糖源を制限した条件で *C.cinerea* の培養を行ったところ、両条件において子実体の形成が促された。そこで次に、オートファジーの進行にともなって液胞に運搬され局在化することが知られているオートファジー関連タンパク質 Atg8(Cc.Atg8)と緑色蛍光タンパク質である AcGFP1の融合タンパク質(AcGFP1-Cc.Atg8)を発現するベクターを導入した *C.cinerea* 株を用いて解析を行った。その結果、栄養培地中の窒素源飢餓または糖源飢餓状態において液胞中への緑色蛍光の蓄積が観察され、*C.cinerea* において子実体形成を促す栄養条件がオートファジーの誘導に深く関わることを示唆された。

D-1 タンパク質の“リン酸化試薬”として有用な高活性型 CaM キナーゼ I の開発
○秋月一駿, 千賀由佳子¹, 片山将一², 茂里 康³, 亀下 勇, 石田敦彦⁴,
末吉紀行 (香川大・農,¹産総研・バイオメディカル,²立命館大・薬,
³産総研・健康工学,⁴広島大院・総合科学)

タンパク質を幅広くリン酸化できる“リン酸化試薬”としてのプロテインキナーゼは、リン酸化タンパク質の機能解析を行う上で非常に有用なツールとなる。当研究室では以前、大腸菌での大量発現を可能にした Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ II の活性断片 (CX-30K-CaMKII) を開発したが、不溶性画分にのみ発現することから、精製の際に変性や再生化などの煩雑なステップを要し、簡便には取得できないという問題点があった。本研究では、大腸菌発現系で取得した Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ I δ (CaMKI δ) の C 末端欠損変異体 CaMKI δ (1-299) は CX-30K-CaMKII よりも遥かに高い恒常的活性を示し、かつ可溶性画分に大量に発現することを明らかにした。CaMKI δ (1-299) は、アフィニティーカラムを用いた 1 ステップの簡便な精製法により、大腸菌培養液 1 L から 220 mg と大量に取得できた。次に、CaMKI δ (1-299) の安定性を CX-30K-CaMKII や既存の“リン酸化試薬”である cAMP 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット (PKAc) と比較したところ、40℃の熱処理に対しては CX-30K-CaMKII と PKAc は失活するのに対し、CaMKI δ (1-299) は安定して活性を保持した。最後に、比活性及び基質特異性を PKAc と比較したところ、比活性は CaMKI δ (1-299) の方が 5 倍ほど高く、PKAc があまりリン酸化しない塩基性タンパク質を CaMKI δ (1-299) は好んでリン酸化することが明らかとなった。以上の結果より、CaMKI δ (1-299) は単独または PKAc との組み合わせで用いることのできる“リン酸化試薬”として有用であることが示された。

D-2 ゼブラフィッシュ Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼ I γ (CaMKI γ) の機能解析
○遠山 拓, 千賀由佳子¹, 秋月一駿, 亀下 勇, 末吉紀行
(香川大・農,¹産総研・バイオメディカル)

【目的】 CaMKI γ は主に脳で発現している多機能性 CaM キナーゼの一つであり、概日リズムや神経細胞における樹状突起の伸長に関与していることが近年の研究で明らかにされている。しかし、器官形成における役割については不明な点が多い。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ初期発生時の CaMKI γ の役割を明らかにすることを目的とした。また、その過程でゼブラフィッシュの CaMKI γ には CaMKI γ a と CaMKI γ b の 2 つのアイソフォームがあることを見出し、それらの酵素学的諸性質を比較解析した。

【方法・結果】 CaMKI γ a と CaMKI γ b の相同性は 60.3% であり、特に触媒領域は 79.6% と高度に保存されていた。CaM オーバーレイおよび MBP を基質としたリン酸化アッセイを行ったところ、両者とも CaM 結合能を有し、上流キナーゼである CaMKK によってリン酸化された。しかし、CaMKK によるリン酸化の程度を比較すると、CaMKI γ b の方がよりリン酸化されやすいことが明らかとなった。次に RT-PCR によって mRNA の組織分布と発現時期を調べた。成魚組織では両者とも眼、脳、心臓での発現が顕著であったが、各組織での発現レベルを比較すると、全体的に CaMKI γ b の方が CaMKI γ a よりも多く発現していた。一方、初期胚における発現時期を比較すると、CaMKI γ a よりも CaMKI γ b の方が早い時点から発現していた。また、CaMKI γ のノックダウン解析では、眼の形成遅延や頭部に隆起が見られる奇形胚が多数観察された。以上の結果より、CaMKI γ はアイソフォーム間で異なる制御機構を有していると同時に、いずれも眼や脳の形成あるいは発達に関与している可能性が示唆された。

D-3 担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea* に存在する 2 種類の Calmodulin (CcCaM1 と CcCaM2) について
○山田寛樹, 小林博子, 金子啓祐, 山下雅史, 亀下 勇, 末吉紀行 (香川大・農)

Calmodulin (CaM) は Ca^{2+} 結合タンパク質であり, 細胞内 Ca^{2+} の濃度変化に応じて多種多様な標的タンパク質の機能を変化させることで様々な生命現象に関わっている。当研究室では, 担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea* に CaM の拮抗阻害剤である Trifluoperazine を添加すると菌糸成長が阻害されることを見出し, 菌糸成長において CaM が重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。しかし, 担子菌キノコにおける CaM を介した情報伝達機構には不明な点が多い。そこで本研究では, *C. cinerea* の CaM をクローニングし, その性質を調べることにした。興味深いことに, 哺乳動物には 1 種類しか存在しない CaM が *C. cinerea* には 2 種類 (CcCaM1 と CcCaM2) 存在した。RT-PCR 法を用いて *C. cinerea* 各成長ステージにおける CcCaM1/2 の発現変化を調べたところ, 両者共に全ステージで発現していた。CcCaM2 は C 末端に Cys 残基を持つことから, 二量体を形成する可能性が考えられたので, これら 2 種類の CaM の間に何らかの機能的相違があるのではないかと考え, 基本的性質や結合タンパク質への影響を比較解析した。2-メルカプトエタノール存在・非存在下で SDS-PAGE および Native-PAGE を行ったところ, CcCaM2 は分子間で二量体を形成することが明らかとなった。最後に, CcCaM1 と CcCaM2 のそれぞれに対して特異的に結合するタンパク質を得るために, CcCaM1/2 セファロースビーズを用いて菌糸体粗抽出液から CcCaM1/2 結合タンパク質を精製した。結合画分を MicroRotofor によって溶液中で等電点分離し SDS-PAGE で比較したところ, 両者間で結合の程度が異なるバンドが 10 種類検出された。

D-4 金属イオン依存性プロテインホスファターゼ 1H (PPM1H) とそのリン酸化部位 (Ser-210) を特異的に認識する抗体の作製
○成田拓人, 植田早紀, 小野内貴士, 櫻村明理, 亀下 勇, 末吉紀行
(香川大・農)

PPM1H は, 活性の発現に 2 価の金属イオンが必要な PPM ファミリーに属する Ser/Thr プロテインホスファターゼである。PPM1H は転写因子である Smad1/5/8 を脱リン酸化することにより, 骨分化を負に制御すると考えられているが, その制御機構については不明な点が多い。当研究室によるこれまでの研究で, 多機能性 CaM キナーゼの一つである CaMKI α によって PPM1H の Ser-210 がリン酸化されることが明らかになった。そこで本研究では, PPM1H の Ser-210 のリン酸化の意義を明らかにするために, PPM1H とそのリン酸化部位を特異的に認識する 2 種類の抗体の作製を試みた。抗 PPM1H 抗体の作製では, PPM1H の N 末端側 (1-195) のリコンビナント酵素を抗原としてマウスに免疫した。また抗リン酸化 PPM1H 抗体の作製では, PPM1H の Ser-210 周辺配列を基に合成したリン酸化ペプチド Cys-RTLTRAApSLRGGVGVGAP と KLH とのコンジュゲートを抗原としてウサギに免疫した。作製した抗 PPM1H 抗体を用いた Western Blotting (WB) において, マウスとゼブラフィッシュとヒトの PPM1H が 2 ng まで検出され, ゼブラフィッシュ臓器や初期胚においても内在性 PPM1H と思われるバンドが検出された。また Neuro2a 細胞に CaMKI α と PPM1H を共発現させてイオノマイシンで刺激したところ, 抗リン酸化 PPM1H 抗体を用いた WB において, イオノマイシン刺激に応じて増大するリン酸化 PPM1H のバンドが検出された。以上の結果より, 今回作製した抗体は内在性 PPM1H とリン酸化 PPM1H の検出に用いることができ, PPM1H の機能を解析するツールとして使用できることが判明した。

D-5 Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) の細胞内局在が変化する要因を解析するツールとしての抗体の作製
○志賀はる香, 大井愛海, 片山将一, 亀下 勇, 末吉紀行 (香川大・農)

CDKL5 遺伝子は X 染色体上に存在し, 主に脳に発現するプロテインキナーゼである。その変異は, 発達障害の一つである Rett 症候群を引き起こすことから, CDKL5 が神経機能において重要な働きをするものと考えられている。これまで CDKL5 は, 核と細胞質間で局在変化するという報告があるが, その機構は明らかにされていない。そこで本研究では, CDKL5 の細胞内局在が変化する要因について調べることを目的とし, その解析用ツールとして CDKL5 特異的抗体の作製を試みた。EGFP タグを付加した CDKL5 を HEK293T 細胞に発現させ, 局在を観察すると, EGFP-CDKL5 の局在は細胞間で異なることが明らかになった。同一細胞株でも細胞間で CDKL5 の局在の相違が見られたことから, CDKL5 の局在は細胞周期などの要因で変化する可能性が考えられた。また CDKL5 の細胞内局在について解析を行うため, EGFP タグと myc タグをそれぞれ付加した CDKL5 の細胞内局在を観察したところ, 両者の局在パターンに差が見られた。従って, CDKL5 の真の局在パターンについて解析を行うためには内在性 CDKL5 を検出する必要があることが判明した。しかし, 市販の抗体は内在性 CDKL5 を検出することが困難なため, CDKL5 の C 末端配列からなるペプチドをウサギに免疫し, 高感度な抗体の作製を試みた。作製した抗体の検出感度についてウェスタンブロット(WB)によって確認すると, 最も検出感度の高い抗体では 1.5 ng の精製 CDKL5 を検出できた。また, 細胞抽出液を用いた WB では内在性 CDKL5 と思われるバンドが検出された。以上の結果より, 今回作製した抗体は内在性 CDKL5 の解析用ツールとして有用であると考えられた。

D-6 *Pseudomonas cichorii* ST24 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼのデオキシケトヘキソースに対する反応性
○熊谷拓也, 吉原明秀¹, 秋光和也¹, 何森 健¹
(香川大・農, ¹香川大・国際希少糖研究教育機構)

【目的】*Pseudomonas cichorii* ST24 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) は基質特異性の広い酵素であり, D-タガトースと D-ソルボース間の可逆的なエピ化反応を触媒するだけでなく, ケトヘキソースやケトペントースの炭素第三位のエピ化反応も触媒する希少糖生産にとって重要な酵素である。本研究では炭素第一位もしくは炭素第六位がデオキシ化されたデオキシケトヘキソースに着目し, D-TE のデオキシケトヘキソースに対する反応性を評価した。

【方法・結果】*P. cichorii* ST24 由来組換え D-TE は HiTrap Q HP, HiTrap Phenyl HP, Resource Q カラムを用いたクロマトグラフィーによって単一に精製され, 単量体の分子量は 32 kDa であった。精製 D-TE を用いてデオキシケトヘキソースに対する反応性を HPLC で分析した。6-デオキシケトヘキソースに対して D-タガトースに対する活性を 100% とした時の相対活性は, 6-デオキシ-L-ソルボース 67.1%, 6-デオキシ-L-タガトース 64.4%, 6-デオキシ-D-タガトース 36.4%, 6-デオキシ-D-プシコース 14.1%, 6-デオキシ-L-プシコース 13.5%, 6-デオキシ-D-フルクトース 6.61%, 6-デオキシ-L-フルクトース 3.92%, 6-デオキシ-D-ソルボース 2.87% であった。本酵素の D-タガトースおよび D-プシコースに対する比活性は, それぞれ 67.0 U/mg, 42.3 U/mg であり 6-デオキシ-デオキシケトヘキソースに対する活性は決して低いものではないことを示している。

D-7 *Penicillium* sp. KU-1 株が生産する新規ポリオール酸化酵素の解析と希少糖生産への応用

○黒石川嵩幸, 新名大輔, 富田 遼, 吉原明秀¹, 何森 健¹, 麻田恭彦
(香川大・農, ¹香川大・国際希少糖研究教育機構)

【目的】本研究では, 当研究室により土壌から単離された *Penicillium* sp. KU-1 株が生産する新規ポリオール酸化酵素の生産条件ならびに諸性質の解析を行うとともに, 希少糖生産への応用性について検討することを目的とした。

【方法・結果】本酵素活性の測定は, D-ソルビトールを基質として反応を行い, 生成する過酸化水素をペルオキシダーゼ法により定量することによって行った。*Penicillium* sp. KU-1 株が生産するポリオール酸化酵素は, 固体培養により菌体外に生産されるが, 米ぬか固体培地よりも小麦フスマ固体培地で培養を行った方が高い生産性を示した。また, 本菌を培養の途中で低温環境に移行することにより, 本酵素の生産性が上昇した。小麦フスマ培地抽出液より本酵素の精製標品 (収率 0.15%, 精製倍率 126 倍) を得た。本酵素は分子量約 55 kDa のサブユニットをもつホモダイマー酵素であることが示唆された。本酵素は, 10 時間のインキュベーションにより 20°C 以下で安定, pH6.0 以上で 10 時間まで安定であった。最適反応温度は 40°C であり, 最適反応 pH は pH8.0 であった。また, 本酵素は各種糖アルコールに対して幅広い基質特異性を示し, 最も良好な基質はエリスリトール (100) であり, 次いで D-アラビトール (86), リビトール (71), D-ソルビトール (68) の順に高い活性を示した。アルドースやケトースに対しては全く活性が認められなかった。また, D-ソルビトールを基質とする本酵素反応により, 従来大量生産系の確立されていなかった希少糖である L-グルースが高収率で生産できることが明らかとなった。

D-8 放線菌由来 L-メチオニン脱炭酸酵素を用いた新規な L-メチオニン定量法の開発

○林 将也, 岡田 茜, 根本理子, 稲垣純子¹, 田村 隆, 稲垣賢二
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大院・医歯薬)

【目的】ヒト必須アミノ酸 L-メチオニン (L-Met) の血中濃度は通常, 低値で一定に保たれている (13.5 - 36.8 μ M)。高値の場合 (1.5 - 20 mM) は, 先天性メチオニン代謝異常症の他, 心筋梗塞や脳梗塞, 認知症あるいは骨粗鬆症の可能性が疑われるため, 血中の L-Met 定量は医学的観点から重要である。L-Met の酵素的定量法として, ビタミン B₆ 酵素 L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL) あるいは変異型フェニルアラニン脱水素酵素による定量法が開発されているが, 1 次関数的に定量できないあるいは分岐鎖アミノ酸の影響を受ける。L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) はビタミン B₆ 酵素であり, L-Met の脱炭酸を触媒して 3-メチルチオプロピルアミン及び CO₂ を生じる。本研究の目的は, 放線菌由来の MetDC を用いた L-Met の新規な酵素的定量法の開発である。【方法】*metdc* 遺伝子を放線菌ゲノムからクローニングし pET-52b ベクターを用いて発現プラスミドを構築し, *E. coli* BL21(DE3) に導入した。組換え MetDC は, 菌体粗酵素液からアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。酵素活性は, アミン酸化酵素を併用した 4-アミノアンチピリン法により H₂O₂ を定量して決定した。【結果】MetDC は L-Met を低濃度 (5 - 50 μ M) から高濃度 (0.25 - 15 mM) まで, 1 次関数的に定量可能であることが示唆された。MGL を用いた従来法より, 迅速で正確な定量が可能であることから, MetDC はヒト血中 L-Met の定量にも有望と考えられる。

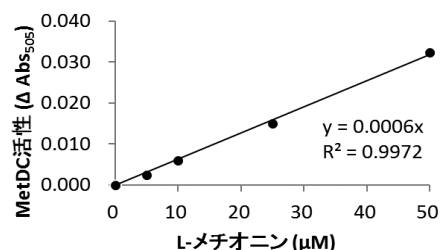


図. MetDC を用いた L-Met 定量

D-9 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c'* の構造と CO・NO 結合能に関する環境適応能の解析

○藤井創太郎, 山根大典, 山中 優¹, 丸野孝弘², 三本木至宏
(広島大院・生物圏, ¹奈良先大・物質, ²阪大院・工学研)

【背景・目的】 シトクロム *c'* は細菌から見出されるヘム蛋白質である。ホモダイマーを形成し、1つのサブユニットは4-ヘリックスバンドル構造をとる。二原子ガスである CO・NO に対する結合能を有しているが、O₂ は結合しない。当研究室では、至適生育温度 52°C 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c'* (PHCP) を研究対象とし、常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来のもの (AVCP) よりも熱に対する安定性が高いことを見出した。本研究では、PHCP の安定化機構と高温条件での PHCP の二原子ガス結合能について調べることで、構造面および機能面での環境適応性を解明する。

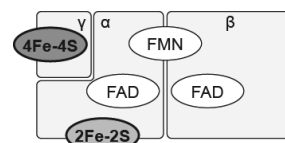
【方法・結果】 これまでに PHCP の X 線結晶構造を決定している。PHCP と AVCP の構造比較から、安定化に寄与するアミノ酸残基を推定し、PHCP のアミノ酸側鎖を AVCP に近づけるような変異体 (F11T, T17E, T18F, A20G, Q39A, F71D, L76V, Q116A) を作製した。昇温に伴う CD スペクトルの変化から安定性を測定すると、全ての変異体で安定性が低下し、さらにこれらの変異を同時に加えることでその安定性は大幅に低下した。この結果から、PHCP はヘム周辺およびサブユニット界面に位置するアミノ酸側鎖の相互作用で安定化していることが明らかとなった。また、PHCP を高温条件下で CO や NO を結合させ、吸収スペクトル測定を行った。60°C で CO や NO を結合することから、高温条件下でもガス結合能を有することが明らかとなった。以上の結果は、PHCP はガス結合の機能を有しながら構造を安定化していることを示唆する。

D-10 電子スピン共鳴分析で明らかになったフラビン依存性オピン脱水素酵素に含まれる鉄硫黄クラスター

○渡辺誠也, 田嶋邦彦¹, 松井一直¹ (愛媛大院・農, ¹京工繊大院・工学科学)

【目的】 ノパリンやオクトピンなどのオピン類を資化するフラビン依存性オピン脱水素酵素は α , β , γ の3つのサブユニットからなるヘテロ 12 量体で、古細菌由来の L-プロリン脱水素酵素や細菌由来の D-ヒドロキシプロリン脱水素酵素と相同性がある。 α -と β -サブユニットには1分子ずつの FAD が、その境界面には1分子の FMN が結合している。さらに、 α -と γ -サブユニットには異なる鉄硫黄クラスター結合モチーフが見られるが、その存在の明確な証拠と触媒活性に及ぼす役割は不明だった。

【方法・結果】 3つのサブユニットの遺伝子を異なるプラスミドに乗せた大腸菌の発現・精製系を構築した。40 K での電子スピン共鳴 (ESR) 測定では2種類の異なる鉄硫黄クラスターに由来する分子種の存在が示唆され、このうち片方は 60 K でシグナルが消失することから [4Fe-4S] クラスターであると思われた。 γ -サブユニットの結合モチーフを破壊した変異体のスペクトルは、温度依存的なシグナル変化が見られない典型的な [2Fe-2S] クラスターのものであった。これより、本酵素の α -サブユニットには [2Fe-2S] クラスターが、 γ -サブユニットには [4Fe-4S] クラスターが結合していることが分かった。[2Fe-2S] クラスターの欠失は大腸菌での発現量の大幅な低下と活性の減少をもたらし、立体構造維持と触媒活性に重要なことが示唆された。一方、[4Fe-4S] クラスターにはそうした機能は見られなかったが、フラビン補因子との空間的距離は近いと考えられた。Ref.) Watanabe et al. PLoS One 10(9), e0138434 (2015)



D-11 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3 のアミノ酸ラセマーゼの酵素化学的解析

○川上竜巳, 櫻庭春彦¹, 大森勇門², 大島敏久²

(徳島大・生物資源,¹香川大・農,²大阪工大・工)

【目的】これまでの研究で, 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3 は 10 種類のアミノ酸に対して要求性を示すが, そのうち 8 種類は L-アミノ酸の代わりに D-アミノ酸を添加した培地でも増殖できることを見出した。このことは, これらの D-アミノ酸を取り込んで L-アミノ酸に変換していることを示している。この変換に関与する酵素として新規なアミノ酸ラセマーゼを見出した。本研究では, この酵素の機能構造解析を行うため, 大腸菌発現系を構築して, 組換え酵素の酵素化学的性質を解析した。

【方法・結果】酵素遺伝子を pET ベクターに導入し大腸菌での発現を試みたが, ほとんどは封入体として発現したため, 可溶性画分に発現する条件を検討した結果, シャペロンとの共発現が有効であることを明らかにした。組換え酵素は, 酸性条件での熱処理と疎水クロマトグラフィーによって均一に精製できた。本酵素は PLP を補酵素とする 2 量体構造をとることも分かった。アミノ酸ラセマーゼ活性の測定は, OPA と N-BOC-L-Cys によってジアステレオマー誘導体化したアミノ酸を逆相 HPLC によって分離・定量することで解析した。各アミノ酸と反応させ, 基質特異性を解析した結果, Phe, Leu, Met, Trp, Tyr を中心に幅広いアミノ酸に対して反応性を示した。これらの D-アミノ酸は *P. horikoshii* が増殖可能な D-アミノ酸であり, この酵素が *P. horikoshii* の D-アミノ酸培地での増殖に重要な役割を果たしていることを示している。このほか, 各基質に対する速度論解析や酵素の結晶化スクリーニングも行ったので併せて報告する。

賛助企業

- ・(株)旭製作所 岡山営業所
- ・天野エンザイム(株) 岐阜研究所
- ・アルファ食品(株)
- ・アルファバイオ(株) 岡山営業所
- ・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
- ・AuB(株)
- ・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)
- ・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
- ・杏林子防学研究所
- ・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 広島支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)サンキ精機
- ・(株)サン・クロレラ
- ・(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)ソフィ
- ・(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)
- ・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
- ・(有)ビーエムステーション
- ・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
- ・八幡物産(株) (五十音順)

2016年5月16日現在 59社

