

特 別 講 演

---

講 演 要 旨



## 特別講演

### マイナーな研究から：大腸菌のプログラム死と長期定常期

山田 守（山口大院・創科）

大腸菌は、栄養豊富な至適培養条件下で、誘導期、対数増殖期、定常期、死滅期、長期定常期を示す。四半世紀前の研究室立ち上げ時に、未知の研究領域にチャレンジしようと、大腸菌の定常期以降の生存機構を研究テーマとした。当時、シグマ S が定常期のプロモーター認識と転写開始に係る主要な因子であると認識され始めていたので、まず、プロモーター・ライブラリーを作製し、シグマ S に依存して転写されるものではなく、逆にシグマ S によって発現が抑制される遺伝子を探索し、5つの遺伝子 *ssn* (subject to RpoS-dependent negative regulation in stationary phase) を見出した。その内、*ssnA* は死滅期の CFU (colony forming unit) に影響する遺伝子で、破壊によって CFU が増大し、高発現によって細胞分裂が抑えられ増殖が強く抑制された。そこで、この抑制を解除するサプレッサー変異を *miniTn10* 処理によって獲得した。そのサプレッサーは、アンチシグマ E への *Tn10* 挿入変異であった。シグマ E はアンチシグマ E の結合によって不活性型に維持されているが、この株では *Tn10* 挿入によって恒常的に活性型となり、シグマ E レギュロンの発現が亢進していた。また、CFU は親株と変わらないが、培養液濁度が定常期に親株より大きく減少していた。この濁度の減少は溶菌によるもので、コロニー形成ができない細胞が特異的に破壊され、内容物が培地中に出ていることが確認された。その溶菌は定常期で顕著であった。シグマ E が関与することから遺伝子発現を伴うプログラム死として、そのカスケード解析をすすめたが、かなり遠回りをしてやっと、外膜蛋白質 *Omp* をターゲットとする、シグマ E レギュロンの small RNA (*micA*, *rybB* 等) が関与することを見出した。*Omp* のフォールディング・シャペロンである *PpiD* の発現抑制も同時に起こり、2重に *OmpA*, *OmpC*, *OmpW* などの生成を抑制し、これによって外膜が不安定となり溶菌に至ると推測された。親株でもシグマ E 依存性の溶菌が定常期で観察された。その誘因シグナルを探索したところ、対数増殖期後期から定常期初期にかけて細胞内酸化ストレスが急増し、これによって発生する異常タンパク質がシグマ E を活性型に変え、シグマ E 依存性の溶菌カスケードを発動すると推測された。以上の研究によって、シグマ E 依存性の溶菌カスケードを明らかにすると同時に、対数増殖期後半に酸化ストレスが蓄積すること、高温ストレスシグマとして発見されたシグマ E が対数増殖期後半に発動し、異常な細胞を溶菌によって細胞集団から排除すること、定常期の溶菌のほとんどはシグマ E 依存性であることが分かった。また、死滅期は一般的に細胞が死ぬものと考えられているが、CFU を積極的に減少させている現象かもしれない。

長期定常期は数年間続くことが示されており、その期間において、細胞集団の中で発生した生育優位性 (GASP) 細胞が次の細胞集団を形成する、すなわち、細胞集団のダイナミックな変遷が繰り返されると予想されている。ところが、シグマ E 依存性溶菌に係る small RNA の破壊株では長期定常期は初期に CFU が激減し、破綻することが分かった。また、破綻の直前に変異率が急増した。これらの結果から、シグマ E 依存性溶菌は、異常細胞の排除や次の細胞集団への栄養源供給等によって長期定常期形成に重要な役割を担っていることが推測された。続いて、長期定常期の細胞集団変遷の解析に次世代シーケンスが有効であることを示し、その解析において新規な GASP 変異を見出した。さらに、現在、細胞集団の変遷を可視化することを試みている。長期定常期における細胞集団の無数の変遷がどのような変異の累積によって達成されているか不明である。その究明のために、可視化と迅速な変異解析は有効な手段となる。長期定常期の研究は、自然界における生存戦略や進化の理解につながると同時に、慢性感染症に対する新たな抗生物質開発のためのターゲットを提供できる可能性もある。

## 特別講演

### 農芸化学の中の農薬化学

尾添嘉久（島根大・生資科）

農芸化学という学問の領域はかなり広く、私が学生だった頃の大会では様々な分野の研究発表を聴くことができた。しかし最近、微生物と食品をテーマとする発表が大半を占めるようになった印象が私にはある。発表が少なくなった分野のひとつに農芸化学の中でも重要な農薬化学がある。そこで今回、講演の機会をいただいた時に、食糧確保に必須な農業資材である農薬の化学の話をしてみようと思った。もちろん農薬化学全体の話などできないが、私が関わってきた昆虫のイオンチャネルと生体アミンレセプター研究のうち、今回は農薬化学の1トピックとして前者の話をしてみたいと思う。

農薬には、大きく分けて殺虫剤、殺菌剤、除草剤がある。殺虫剤は、現在、作用点の違いによって29種類に分類されている。神経細胞や筋細胞に存在するイオンチャネルは、その中でも最も重要な作用点である。我々のグループでは、殺虫剤ターゲットとして主に $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）作動性Cl<sup>-</sup>チャネル（GABA<sub>Cl</sub>）とL-グルタミン酸作動性Cl<sup>-</sup>チャネル（GluCl）の研究を行ってきた。

この研究の端緒は、約40年も遡る、二環式リン酸エステル（BP）という毒物の作用機構研究にある。ミミズ（*Metaphire communissima*）縦走筋において微小抑制性接合部電位を阻害したことから、GABA作動性神経系阻害がBPの毒性発現の原因であると推測された。さらに、BPの構造変換によって哺乳類に対する急性毒性を低下させ、昆虫に対する殺虫活性を高めることができることに興味を持った。当時、GABAレセプター（GABAR）の構造は不明であったが、リガンドの構造活性相関を手掛かりに、殺虫剤のターゲットとしてのGABAR研究を続けた。その後、殺虫剤フィプロニルが開発、上市された。しかし、この薬剤には問題も生じた。

1987年に、ウシ大脳皮質からGABARサブユニットcDNAがクローニングされ、GABARが5量体構造の膜タンパク質GABA<sub>Cl</sub>であることが初めて明らかにされた。この報告から、GABA<sub>Cl</sub>研究は急速に進展してきた。これによって、フィプロニルやGABAR研究用ツールとして開発されたリガンドの作用部位も解明することができた。

昆虫や線虫は、抑制性神経伝達物質のレセプターとしてGABA<sub>Cl</sub>のほかにGluClをもっており、この二つの似たチャネルの役割の違いを明らかにする必要がある。イエバエ（*Musca domestica*）体内での局在を調べたところ、GABA<sub>Cl</sub>とGluClの両方とも成虫頭部に高発現していたが、GABA<sub>Cl</sub>はキノコ体、触角葉、中心複合体などの脳部位に、GluClは主にラミナと呼ばれる視覚情報伝達経路の神経網に局在していた。このほか、末梢神経系でも局在の違いが見られ、二つのチャネルは部位によって棲み分けをしていることが分かった。

GABA<sub>Cl</sub>とGluClの薬理的観点からの研究も行った。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた二電極膜電位固定法により、GABA<sub>Cl</sub>がGluClより非競合的アンタゴニスト（フィプロニルなど）に対して高い感受性を示すことが分かった。これに対し、アゴニスト様作用を示すイベルメクチンはGABA<sub>Cl</sub>よりGluClに高活性を示した。これにより、両チャネルの薬理的な違いが明らかになった。

最近になって、昆虫GABA<sub>Cl</sub>が新規薬剤のターゲットとして再び注目されるようになった。培養細胞発現系を用いたスクリーニングによりベンズアミド系殺虫剤が発見され、さらにイソキサゾリン系外部寄生虫薬と殺虫剤が上市あるいは開発中である。これらの新規薬剤は、既存の殺虫剤フィプロニルとは違う部位に作用する点で重要である。我々は、現在、オルトステリック（アゴニスト結合）部位を第3の作用点として提唱しており、マルチターゲットサイトとしてのGABA<sub>Cl</sub>の更なる可能性を追究し続けている。

## 特別講演

### アミノ酸代謝関連酵素とペルオキシダーゼの機能解析

澤 嘉弘（島根大・生資科）

30年ほど前に松江しんじ湖温泉より単離した好温性シアノバクテリア *Phormidium lapideum* の窒素代謝系に興味を持ち、グルタミン合成酵素を精製し酵素化学的性質を検討したのが始まりである。それ以降、アラニンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ等のアミノ酸代謝関連酵素やペルオキシダーゼの酵素化学的性質の解明を中心に研究を行ってきた。いくつかの酵素はX線結晶構造解析にも成功し、構造機能相関から分子進化、さらに応用を目指した分子設計へと進展してきた。

#### DyP型ペルオキシダーゼ (AnaPX) の触媒機構

人工色素に高い分解活性を示す色素脱色型ヘム・ペルオキシダーゼ (DyP) は、広く生物界に分布している。ヘムは酵素分子内部に深く埋め込まれているため、基質であるバルキーな化合物は内部に侵入することができず、長距離電子移動によりラジカル化した酵素分子表面の Trp 残基あるいは Tyr 残基が脱色反応を触媒していると考えられている。

我々は、これまでシアノバクテリア *Anabaena* から AnaPX を見出し、その酵素学的性質、過酸化水素耐性向上、三次元構造等を報告してきた。DyP は SCOP データベースで 2 量体型  $\alpha+\beta$  バレル・スーパーファミリーに分類されることを特徴としているが、AnaPX は 4 量体構造を持っていることを明らかにした。最近、スピントラップ剤による修飾部位を nanoLC / MS/MS で解析することで AnaPX 分子表面のラジカル化部位が Tyr307 であることを明らかにした。

#### アミノ酸デヒドロゲナーゼの構造と機能、生理的役割

アスパラギン酸デヒドロゲナーゼ (AspDH) は、これまで好熱性細菌や超好熱アーキアで発見され、その分子特性、三次元構造が報告されている。共に NAD 生合成に関与する遺伝子群である *nadA* と *nadC* と共にオペロンを形成している。したがって、それらの遺伝子産物は、以前より L-アスパラギン酸オキシダーゼ(LAO)として知られている NadB 型の酵素としての役割を担っていると考えられる。

我々は、アーキア AspDH の相同性検索により常温菌より非 NadB 型 AspDH を見出し、それらの酵素特性と一部の機能改変や生理的役割について報告している。

#### アデニル化調節型グルタミン合成酵素 (GS) の分子進化

GS は、真核、原核生物に幅広く存在し、アキラルなアンモニアをキラルな L-グルタミンに変換する反応を触媒する酵素である。構成サブユニット数の違いにより GSI, GSII, GSIII に分類され、それぞれ 12 量体, 10 量体, 8 量体である。GSI は、さらにフィードバックで活性調節される GSI- $\alpha$  (FGS) とアデニル化修飾によって調節される GSI- $\beta$  (AGS) に分類される。GSI の分子進化系統樹は、プロテオバクテリア AGS は最も近縁なシアノバクテリア FGS から分子進化してきたことを示唆している。

これを実証するために、シアノバクテリア由来の FGS (AnaGS) の 7 残基置換および Asn355 を欠損した Mut7 $\Delta$ N355 を作製し、部分的な AGS の特性を示すことを明らかにした。最近、さらに解析を進め 9 残基あるいは 12 残基置換変異酵素に Asn355 欠損を加えた Mut9 $\Delta$ N355 や Mut12 $\Delta$ N355 が完全な AGS の特性を示すことを明らかにした。



一 般 講 演  
ト ピ ッ ク ス 賞 講 演

---

講 演 要 旨





A-1 小胞体品質管理に関わる  $\alpha$ -マンノシダーゼ二重欠損体の遊離糖鎖構造解析  
前田 恵, ○古田佳織<sup>1</sup>, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・農)

【目的】真核生物において、ミスフォールドした新生糖タンパク質は小胞体関連分解 (ERAD) 機構により小胞体 (ER) から細胞質へ逆輸送されプロテアソームで分解を受ける。その過程で、ミスフォールドした糖タンパク質上の糖鎖 ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) はプロセッシングを受ける。小胞体 (ER) 内腔で  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ 4 (MNS4),  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ 5 (MNS5) の作用により  $\alpha$ 1,2-マンノース残基が除去された  $\text{Glc}_1\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$  は、レクチンである OS9 によって認識され、推定トランスポーターによって細胞質へと逆輸送されると考えられている[1]。本研究では、植物における N-グリカンの生理機能を解明する研究の一環として、*A.thaliana* を用いて MNS4 および MNS5 の二重欠損体 (MNS4/5), OS9 欠損体における還元末端に GlcNAc を 1 残基有するハイマンノース型遊離 N-グリカン (GN1-HMT-FNGs) の糖鎖構造解析を行った。【方法・結果】*A.thaliana* の野生株と MNS4/5, OS9 欠損株について葉を液体窒素中で破碎後、0.1 N アンモニア水でオリゴ糖鎖を抽出し、透析後、透析外液を濃縮して陽・陰イオン交換に供し、中性糖を含む素通り画分を回収した。濃縮後、ゲルろ過により脱塩を行った。次いで、ピリジルアミノ (PA) 化法により中性糖鎖を蛍光標識した後、得られた PA 化糖鎖を RP-HPLC に供した。素通り画分から GN1-HMT-FNGs を回収し、SF-HPLC に供した。現在、 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ酵素消化及び MS, MS/MS 分析によって糖鎖構造解析を行っている。

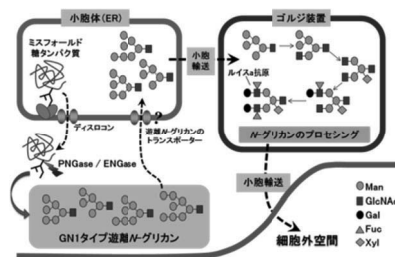
[1] Hüttner, S., et. al., *Plant Cell.*, **26**, 1712-1728 (2014).

A-2 小胞体中には遊離 N-グリカンが存在する  
○勝部 諒, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【背景・目的】分化成長中の植物に遍在する遊離 N-グリカン (FNGs) の生理機能解明研究の途上、我々は、イネ培養細胞の培養液、オオカナダモ、 $\alpha$ 1,3/4-Fucosidase 欠損 *Arabidopsis thaliana* から、還元末端側に 1 残基の GlcNAc を有する GN1 型植物複合型遊離 N-グリカン (GN1-PC-FNGs) を発見した。一方で、 $\alpha$ 1,3-Fuc/ $\beta$ 1,2-Xyl 残基含有の植物複合型 N-グリカンに作用するキトビナーゼ活性はこれまで見つかっておらず、GN1-PC-FNGs の存在を既知の代謝機構から説明することは困難である。そこで我々は FNGs の新たなプロセッシング経路 (右図) を提唱した[1]。本研究では、その仮説経路を直接的に立証するため、植物マイクロゾーム画分に含まれる FNGs の構造解析を行った。

【方法・結果】カボチャ (Kurokawa Amakuri) 胚軸を用いて、ショ糖密度勾配遠心法によりマイクロゾーム画分を調製した。ER の存在は ER- $\alpha$ -Glc'ase I, II 活性 (I, 可溶性タンパク質; II, 膜タンパク質) により確認した。内在する糖鎖を抽出、蛍光 (PA) 標識後、得られた PA 糖鎖を RP-, SF-HPLC, 各種酵素消化、質量分析により解析した。その結果、マイクロゾーム画分中に GN1 型及び GN2 型ハイマンノース型遊離 N-グリカンが存在することを初めて明らかにした。

[1] Maeda, M., and Kimura, Y. *Frontier in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2014.00429 (2014).



A-3 各種アルキル化尿素によるシトクロム *c* の変性  
○小林伸弥, 藤井創太郎, 若井 暁<sup>1</sup>, 松林伸幸<sup>2</sup>, 三本木至宏  
(広島大院・生物圏,<sup>1</sup>神戸大・自然,<sup>2</sup>阪大・基礎工)

【目的】 尿素は変性剤としてだけでなく、近年盛んに行なわれる大腸菌などを用いた蛋白質の大量発現の際に問題となる封入体に対する溶解剤としても有用であることが知られている。本研究では、疎水性度の異なる各種アルキル化尿素を変性剤として用い、各変性剤の疎水性度の違いによって蛋白質変性に及ぼす効果の違いが生じるかを知ることを目的とする。より変性効果の高い変性剤は、溶解剤として有用性が高い。

【方法・結果】 本研究では、*Pseudomonas aeruginosa* 由来シトクロム *c*<sub>551</sub> (PAc<sub>551</sub>) を用いて、urea (U), N-methylurea (MU), N-ethylurea (EU), N-propylurea (PU), N-butylurea (BU) の五種を変性剤として変性実験を行なった。PAc<sub>551</sub> に、各変性剤を濃度別に希釈したものを加え、可視吸収スペクトルによりヘムに起因する Soret 帯吸収スペクトル変化を追うことで、各変性剤に対する PAc<sub>551</sub> の変性曲線を得た。得られた変性曲線を二状態転移モデルにより規格化することで変性中点  $C_m$ 、変性によるタンパク質の自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) とその変性剤濃度依存性 ( $m$ ) を算出し、変性剤ごとの変性効果を比較した。

その結果、PAc<sub>551</sub> に対しては変性剤の疎水性度が大きくなるほど変性効果が大きくなる傾向となった。本実験は、尿素より低濃度で高い変性効果を得られるアルキル化尿素の溶解剤としての有用性を示唆している。

A-4 海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株由来テトラチオン酸  
ハイドロラーゼに関する研究  
○大西萌映, 上村一雄<sup>1</sup>, 金尾忠芳<sup>1</sup> (岡山大・農,<sup>1</sup>岡山大院・環境生命)

【目的】 当研究室にて単離された海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株の異化的硫黄代謝を解明するために、その鍵酵素の1つであるテトラチオン酸ハイドロラーゼ遺伝子 (SH-*tth*) を本菌のプラスミドゲノムライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションにより単離した。我々は既に大腸菌を宿主とした組換え型 SH-Tth の諸性質 (反応最適 pH, NaCl の影響など) の検討を行ったが、今回は *A. thiooxidans* SH 株の菌体内における局在場所や生理的意義などについて検証することを目的とした。

【方法および結果】 本菌を 2% (w/v) NaCl を含む無機塩テトラチオン酸培地 (pH 4.0) で培養し、遠心分離にて集菌後、フレンチプレスで破碎した。通常の遠心分離により未破碎の菌体細胞を除去した上清を無細胞抽出液とし、これを 50,000×g, 1 時間の超遠心分離により可溶性画分と膜画分に分離した。そして膜画分を懸濁後再び超遠心分離した上清を膜抽出画分とした。それぞれの画分においてテトラチオン酸分解活性を測定した所、全ての画分において活性が検出された。さらに組換え型 SH-Tth をウサギに接種して作成した抗 SH-Tth 抗体を含む血清による Western Blot 解析結果は、全ての画分において本酵素の存在を確認した。このことから本酵素は、膜に局在し、遊離しやすい膜表在性のタンパク質であることが示唆された。またチオ硫酸 ( $S_2O_3^{2-}$ ), テトラチオン酸 ( $S_4O_6^{2-}$ ), 硫黄 ( $S_8$ ) の異なる基質において生育した菌体での SH-*tth* の発現と合成を RT-PCR と抗 SH-Tth 抗体を用いた Western Blot により解析した。これらの解析結果より、各生育基質における SH-Tth が関与した代謝を推定した。

A-5 ジベンゾチオフェンモノオキシゲナーゼ (TdsC) の基質特異性の改変  
○緒方裕哉, 浜本春香, 八木寿梓<sup>1</sup>, 鈴木宏和, 日野智也, 永野真吾, 大城 隆  
(鳥取大院・工, <sup>1</sup>鳥取大・工・GSC)

【目的】好熱菌 *Paenibacillus* sp. A11-2 由来のジベンゾチオフェンモノオキシゲナーゼ (TdsC) は, ジベンゾチオフェン (DBT) やベンゾチオフェン (BT) の硫黄原子に酸素を添加する反応と, Indole からインジゴを生成する反応に関与することがわかっている。同じ反応を触媒する酵素として *Rhodococcus erythropolis* 由来の DszC が知られているが, TdsC とは基質特異性や熱安定性が異なっている。すなわち, TdsC は DBT に対する活性が極めて低く, 熱安定性が高い。一方, DszC は DBT に高い活性を示すが, 熱安定性は低い。本研究室では TdsC の酵素-基質-補酵素複合体の立体構造をすでに解明しており, その情報を基に TdsC (Y93A) が DBT に高い活性を持つことを見出している。今回, DBT に作用し, 安定性がより高い酵素を取得することを目的に, 立体構造解析を基にしたさらなる TdsC の機能改変を試みた。

【方法・結果】TdsC と DszC の酵素-基質-補酵素複合体を比較したところ, 活性部位周辺を構成するアミノ酸残基はほぼ同じであるが, 唯一, TdsC の Tyr413 が DszC では Thr416 と異なる残基であった。そこで, TdsC の Tyr413 を Thr へ置換したところ, TdsC (Y413T) は DBT に対する活性を示さなかったが, TdsC (Y93A/Y413T) は TdsC (Y93A) よりも DBT に対する活性が上昇した。一方, 基質を BT と Indole にした場合は, TdsC (Y93A) と TdsC (Y93A/Y413T) は活性を示さなかったが, TdsC (Y413T) では両基質に対する活性が TdsC よりも上昇した。このことから, TdsC の Tyr413 は Tyr93 とともに, 基質特異性に影響を及ぼす残基であることが示唆された。

A-6 超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来グリセロール 1-リン酸デヒドロゲナーゼが示す新規な補酵素結合様式  
○林 順司, 山本香李, 米田一成<sup>1</sup>, 大島敏久<sup>2</sup>, 櫻庭春彦  
(香川大・農, <sup>1</sup>東海大・農, <sup>2</sup>阪工大・工)

【目的】アーキアのリン脂質の骨格はグリセロール 1-リン酸 (G1P) が利用され, これは真核生物や真正細菌が利用するグリセロール 3-リン酸と鏡像異性体の関係にある。G1P を生成する酵素として, アーキア特異的なグリセロール 1-リン酸デヒドロゲナーゼ (G1PDH) が存在しており, 本酵素はジヒドロキシアセトンリン酸から G1P を生成する。G1PDH の構造情報は不足しており, これまで *Methanocaldococcus jannaschii* 由来の酵素しか報告が無い。我々は超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* に G1PDH をコードすると推測されるホモログを見出し, その諸性質の解明と X 線結晶構造解析を行った。

【方法・結果】大腸菌における発現系を構築し, 種々のクロマトグラフィーによって精製酵素を得た。既知の G1PDH は全て NADH より NADPH に対して高い反応性を示すのに対し, 本酵素の NADPH に対する活性は NADH を用いたときのわずか 2.4%であった。しかしながら, 構造解析と HPLC 解析の結果, 結晶作製中に補酵素を添加していないにもかかわらず, 本酵素中に NADPH が結合していることが判明した。*M. jannaschii* 由来 G1PDH との構造比較において, 本酵素の NADPH は通常の補酵素結合部位から 2.5 Å ほど押出された状態で結合していることが観察された。本酵素の NADPH のアデニンリボース C2 リン酸基は Ser40 と Thr42 により強固に保持されていた。興味深いことに, 二重変異酵素 S40A/T42A は NADPH に対する高い反応性を獲得した。これらの結果は, NAD (P) 依存性デヒドロゲナーゼの補酵素特異性の決定メカニズムに新しいバリエーションが存在することを示唆している。

A-7 *Rhodococcus* 属由来低基質特異性 L-アミノ酸オキシダーゼの性質検討及び応用  
○村上佳穂, 伊藤菜奈子<sup>1</sup>, 今田勝巳<sup>1</sup>, 根本理子, 田村 隆, 稲垣賢二  
(岡山大院・環境生命,<sup>1</sup> 阪大院・理)

【目的】L-アミノ酸酸化酵素(LAO)は, L-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒し, この反応ではL-アミノ酸, 酸素, 水を消費し, アンモニア,  $\alpha$ -ケト酸, 過酸化水素が生成する。LAOの多くは補酵素にFADを有する。放線菌 *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 由来 LAO (wt-rzLAO)は現時点で最も基質特異性が低い LAO であり, 基礎と応用両面から期待され, 更なる研究が求められている。これまでに我々は発現系構築に成功したため, 今回は組換え rzLAO の性質検討及び X 線結晶構造解析を行った。【方法】酵素活性測定は, MBTH(3-Methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone-hydrochloride)法と, 4-Aminoantipyrine 法により行った。

【結果】最適反応条件の検討の結果, 本酵素の最適温度は 40°C, 最適 pH は 8.0 (リン酸カリウム緩衝液)であった。基質特異性の検討の結果, wt-rzLAO と同様に基質特異性が低いことが分かった。中でも, L-Ala, L-Lys, L-Orn, L-Gln, L-Asn に対する活性が高く, 分岐アミノ酸 L-Val, L-Leu, L-Ile, 酸性アミノ酸 L-Glu, L-Asp に対しては活性が低かった。また, D-Ala や Gly に対しては活性を示さなかった。いくつかの基質に対して速度論解析を行った。また組換え rzLAO の結晶化に成功し, 2.1 Å の分解能までの解析データが得られ, 分子置換法を用いて構造解析を行った。その結果, 本酵素は他の LAO と同様, FAD 結合ドメイン, 基質結合ドメイン, ヘリカルドメインから構成されていることが分かった。また同属の *R. opacus* 由来 LAO(roLAO)と比較して, 活性中心入り口の表面電荷がより負に帯電しており, これは組換え rzLAO の酸性アミノ酸に対する活性が roLAO より低い理由として考えられた。応用例についても報告する。

A-8 海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来キノン含有新規グリシンオキシダーゼの基質特異性と分子構造  
○溝端佐津紀, 根本理子, 田村 隆, 稲垣賢二 (岡山大院・環境生命)

【目的】グリシンオキシダーゼ (GlyOX) は, グリシンを酸化し, グリオキシル酸を生産する。これまでに報告の GlyOX は D-Ala 等に活性を示すため, グリシン定量には不向きである。最近 L-リシン  $\epsilon$ -オキシダーゼ生産菌である海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* に新規な GlyOX が見いだされた。本研究の目的は, *M. mediterranea* 由来 GlyOX の大腸菌発現・精製系を確立し, 本酵素の新規キノン生成機構を明らかにし, バイオセンサー等に応用することである。

【方法】*E. coli* Rosetta(DE3) pLysS/pRSFDuet-goxA-goxB の無細胞抽出液を DEAE-Toyopearl 650M, Sephacryl S 300-HR のカラムクロマトグラフィーに供して精製を行った。GlyOX (GoxA) 活性は, 反応生成物である過酸化水素の量を 4-アミノアンチピリン法で定量することで測定した。

【結果および考察】精製した組換え GlyOX の分子質量を測定したところ, 約 260 kDa であった。SDS 電気泳動法により算出されたサブユニットの分子質量が約 76 kDa であるため, 本酵素が四量体を形成していることが明らかとなった。本酵素は他の菌由来の GlyOX で報告されている D-Ala や D-Pro 等の D-アミノ酸やサルコシンに全く反応せず, グリシン以外の L-アミノ酸にも反応せず極めて厳格な基質特異性を示した。速度論解析の結果, グリシンに対する  $K_m$  値は 0.5 mM,  $k_{cat}$  は 13.4 s<sup>-1</sup>, であり, この  $k_{cat}$  は他の菌由来の酵素よりも有意に高かった。これらの結果は今までにない高感度なグリシン定量の可能性を示唆している。現在精製酵素を用いて結晶化を試みている。

## A-9 新規ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 の糖鎖構造解析

前田 恵, ○田邊千夏<sup>1</sup>, 長田年弘<sup>2</sup>, 佐々木英治<sup>2</sup>, 岡野光博<sup>3</sup>, 木村吉伸  
(岡山大院・環境生命,<sup>1</sup> 岡山大・農,<sup>2</sup> 大鵬薬品,<sup>3</sup> 岡山大院・医歯薬)

【目的】ヒノキ花粉から新たに見出されたアレルゲン Cha o3 は, セルラーゼドメインを有する糖タンパク質であり, 推定アミノ酸配列から複数の *N*-グリコシル化部位が存在することが示唆されている [1]。我々は既にスギ花粉アレルゲン (Cry j1, Jun a1) 及びヒノキ花粉アレルゲン Cha o1 に結合する *N*-グリカン構造を決定し, 花粉アレルゲンには共通して哺乳動物に対して抗原性を示す植物複合型糖鎖が結合していることを明らかにしている [2-4]。本研究では, 花粉症発症と抗原性糖鎖の相関を明らかにする研究の一環として, 新規ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 に結合する糖鎖構造解析を行った。

【方法・結果】精製 Cha o3 (308  $\mu$ g) をヒドラジン分解後, 遊離したオリゴ糖鎖を *N*-アセチル化, ピリジルアミノ化により蛍光標識した。RP-HPLC 及び SF-HPLC により糖鎖を分離後, ESI-MS, MS/MS 分析及び逐次酵素消化法により構造解析を行った。その結果, Cha o3 に結合する糖鎖は, Cha o1, Cry j1 及び Jun a1 と同様に, 主要構造は GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>Xyl<sub>1</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (39.0%) であった。一方, Cha o1 には見られなかった Lewis a エピトープ含有植物複合型糖鎖 Gal<sub>1</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>Xyl<sub>1</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (13.7%), Gal<sub>2</sub>Fuc<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>Xyl<sub>1</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (24.6%) も結合しており, 構造特性的には Cry j1, Jun a1 と高い相同性が見られた。 [1] Osada, T., *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**, 911-913.e7 (2016). [2] Kimura, Y., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 137-144 (2005). [3] Maeda, M. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1700-1705 (2005), [4] Kimura, Y., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 485-491 (2008).

## A-10 酸性 PNGase 過剰発現トマトの果実成熟に関わる遺伝子の発現解析

○藤川真奈, 前田 恵, 松丸千紘, 中野龍平, 梶浦裕之<sup>1</sup>, 三崎 亮<sup>1</sup>,  
藤山和仁<sup>1</sup>, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命,<sup>1</sup> 阪大・国際交流セ)

【目的】分化生長中の植物組織には, 遊離型 *N*-グリカン (free *N*-glycans, FNGs) が  $\mu$ M で存在する。我々は, FNGs の生理機能解明研究の一環として, 糖タンパク質の代謝機構において糖ペプチドからの FNGs 産生に関与する酸性ペプチド: *N*-グリカナナーゼ (aPNGase) に着目し, トマトに存在する aPNGase 推定遺伝子 6 つのうち 1 つ (*Solyc10g007330*, aPNGase-Le) について, 酵母 *Pichia pastoris* による発現系を構築し酵素活性を確認した [1]。さらに, aPNGase-Le 過剰発現トマトの果実 (T2 世代) では, aPNGase 活性の昂進, 植物複合型 FNGs の増加を確認するとともに, 成熟促進が観察された [2]。本研究では, 植物の分化生長に関わる FNGs の生理機能解明研究の一環として, aPNGase-Le 過剰発現トマト果実における細胞壁代謝関連酵素遺伝子及びエチレン応答関連酵素遺伝子の発現解析を行った。【方法・結果】aPNGase-Le 過剰発現トマトの果実 (Green, Orange, Red) 中の果実成熟関連遺伝子の発現を Real-time PCR により解析した。その結果, aPNGase-Le 過剰発現トマトの果実 Red において, 数種の細胞壁代謝関連酵素の遺伝子発現が顕著に増加する一方で, エチレン応答関連酵素遺伝子の発現は果実 Green において顕著に減少していることが明らかとなった。この結果は, aPNGase により生成した FNGs が細胞壁代謝関連酵素やエチレン関連酵素の遺伝子発現に関与することで, 果実成熟を促進する可能性を示唆するものであった。

[1] Hossain, Md. A., *et al.*, *J. Biochem.*, **147**, 157-165 (2010).

[2] 松丸ら 2016 年度日本糖質学会年会要旨集 p135.

A-11 昆虫細胞を用いたトマト  $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼ II (Fuc'ase SI2) の発現系構築  
前田 恵, ○辻森祐太<sup>1</sup>, Rahman Md. Ziaur, 木村吉伸  
(岡山大院・環境生命,<sup>1</sup>岡山大・農)

【目的】多くの植物糖タンパク質には  $\alpha$ 1,3 フコース (Fuc) 残基と  $\beta$ 1,2 キシロース (Xyl) 残基を有する植物複合型 N-グリカンが結合している。特に分泌型糖タンパク質には非還元末端にルイス a エピトープ (Gal  $\beta$ 1-3 [Fuc  $\alpha$ 1-4] GlcNAc  $\beta$ 1-) が存在する場合が多い。近年、糖タンパク質糖鎖の生合成や分解に関与する酵素群が植物の分化・成長に深く関与することが明らかになりつつある。我々は植物複合型 N-グリカンの代謝分解機構を解明する研究の一環として、トマト  $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼに注目した。トマト  $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼには 2 種の推定遺伝子 (*Solyc03g006980*, *Solyc11g006910*) が存在し、これまでに *Solyc03g006980* 遺伝子産物 Fuc'ase SI1 の酵素学的諸性質について報告した[1]。そこで本研究では *Solyc11g006910* の遺伝子産物である Fuc'ase SI2 の発現系構築を試みた。【方法・結果】Sf9 昆虫細胞で FLAG タグを C 末端に融合させた  $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼ II (Fuc'ase SI2) を発現させた。バキュロウイルス感染細胞から粗酵素液を抽出し、組み換え酵素をアフィニティークロマトで精製した。その結果、分子量 60 kDa を有し、至適 pH5.0 である Fuc'ase SI2 を単一精製することができた。 $\alpha$ -Fuc'ase SI-1 と同様にルイス a エピトープ中の  $\alpha$ 1-4 Fuc 残基, LNFP-III 中の  $\alpha$ 1-3 Fuc 残基には活性を示したが, Man<sub>1</sub>Xyl<sub>1</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (MFX), Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>1</sub> (GNF) の Fuc 残基には活性を示さなかった。その一方で, Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (GN2F) 中の Fuc 残基には活性を持つことが明らかになった。

[1] Rahman, Md. Z., et al., *J.Biochem.*, in press

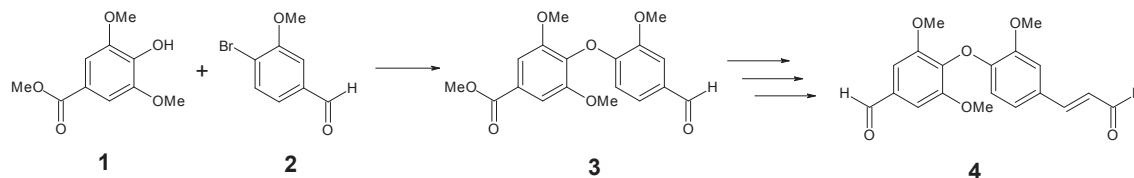
A-12 酸性ペプチド:N-グリカナーゼ遺伝子ノックアウト植物に存在する遊離 N-グリカン構造解析  
○上村亮太, 前田 恵, 秋山 剛, 三崎 亮<sup>1</sup>, 藤山和仁<sup>1</sup>, 木村吉伸  
(岡山大院・環境生命,<sup>1</sup>阪大・国際交流セ)

【目的】還元末端側にキトビオースユニットを有する複合型遊離 N-グリカン (FNGs)は、酸性ペプチド:N-グリカナーゼ (aPNGase) の作用により糖タンパク質の分解過程で生成すると考えられており、これらの FNGs は植物の分化生長に関わるシグナル分子としての機能が推定されている [1]。我々は既に、トマトの 6 種 aPNGase の内、1 種 (aPNGase-Le) については遺伝子クローニングを完了し、酵素学的諸性質を明らかにすると共に過剰発現株を樹立している [2,3]。過剰発現株では、FNGs の増加と酵素活性の顕著な上昇が確認されるとともに、果実成熟促進が観察されている[3]。本研究では、aPNGase 候補遺伝子を 2 種類 (*At3g14920*, *At5g05480*) のみ有する *A.thaliana* に着目し、aPNGase 候補遺伝子の二重欠損体の構築を行い、FNGs 構造解析を行った。【方法・結果】野生株と二重欠損株の地上部を液体窒素中で破碎後、0.1 N アンモニア水でオリゴ糖鎖を抽出後、透析を行った。透析外液から陽イオン交換、陰イオン交換、ゲルろ過により FNGs を精製した。FNGs をピリジルアミノ化により蛍光標識し、逆相 HPLC、順相 HPLC により FNGs を分離後、ESI-MS、MS/MS 分析及び酵素消化法により構造解析を行った。その結果、二重欠損体における FNGs 量の顕著な減少が確認されるとともに酵素活性の消失が確認されたが、顕著な形態変化は認められなかった。その一方で、aPNGase が関与しない FNGs 産生機構が存在することが示唆された。 [1] Priem, B., et al., *Plant Physiol.*, **98**, 399-401 (1992). [2] Hossain, A., et al., *J. Biochem.* **147**, 157-165 (2010). [3] Fujikawa, M., et al., *Glycoconj. J.*, **32**, 195 (2015)

B-1 *Acanthopanax senticosus* から単離された PTP-1B 阻害活性物質の合成  
○大西良弥, 野下俊朗, 濱田義和<sup>1</sup>, 齊藤安貴子<sup>1</sup>  
(県広大・生命環境, <sup>1</sup>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<sup>1)</sup>。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。なお本化合物の合成は中国四国支部第 45 回講演会で報告したが天然物のデータと一致しなかったため合成法を変更し, 単離された化合物の構造を合成化学的に確定することを目的とする。

【方法・結果】 先の報告では syringaldehyde と  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドとのカップリングを鍵反応とした合成経路を採用したが, 今回は以下に示す合成経路で合成をおこなった。エステル **1** とアルデヒド **2** とを, *N,N*-dimethylacetamide (DMA) を溶媒とし過剰量の銅粉と塩基を用いた条件による Ullmann ether 合成によってジアリールエーテル **3** へ導いた。ジアリールエーテル **3** から 3 ステップで目的としたジアルデヒド **4** を合成した。現在, **4** の異性体の合成を行い天然物の構造を検討中である。



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

B-2 グルタミン酸作動性塩素イオンチャンネルに作用するイベルメクチンの光反応性安息香酸誘導体の合成検討  
濱川未来, ○松尾美菜, 岡田州平, 池田 泉 (島根大・生資料)

【目的】 グルタミン酸作動性塩素イオンチャンネル (GluCl) は, 無脊椎動物の神経系や筋細胞に存在する神経伝達物質受容体である。グルタミン酸が GluCl に結合するとイオンチャンネルが開閉し, 細胞内に塩素イオンが流入することで細胞内が過分極し神経の興奮が抑制される。イベルメクチン (IVM) は, 放線菌 *Streptomyces avermitilis* が産生した殺虫・殺線虫活性をもつ 16 員環マクロライド, アベルメクチンの半合成駆虫薬であり, GluCl に結合するとイオンチャンネルの開閉状態が持続し, 塩素イオンが細胞内に過剰に流入することが知られている。本研究では光アフィニティーラベル法による GluCl における IVM 等のマクロライド結合部位の同定を目的とした, IVM の光反応性安息香酸誘導体の合成を検討している。

【方法・結果】 まず光反応基をもつ安息香酸類の合成を行った。光アフィニティーラベル化により光反応性プローブと共有結合した目的タンパク質の認識を可能にするためにビオチンの導入を考え, フェノール性水酸基をもつ 3-ブロモ-4-ヒドロキシ安息香酸を出発原料とし, 12 工程を経てトリフルオロメチルジアジリンを有する 4-ヒドロキシ安息香酸の合成を行った。次に IVM の光反応性安息香酸誘導体の合成経路を確立するために, IVM アグリコンに 3-ブロモ-4-ヒドロキシ安息香酸を導入した後に, 4 位のフェノール性水酸基へビオチンのエステル化や 2-(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)エチルブロミドとの反応を試みたが, 目的の化合物を得ることができなかった。そこで IVM アグリコンに結合する前に, 安息香酸類のフェノール性水酸基に 2-(Boc-アミノ)エチル基を導入する合成経路を検討した。

**B-3 高知県産ミソハギ (*Lythrum anceps*) の  $\alpha$ -glucosidase 阻害活性の解明**  
○田中結理, 森本ゆかり, 柏木丈弘, 金 哲史, 島村智子, 受田浩之<sup>1</sup>  
(高知大・農,<sup>1</sup>高知大・地域協働)

【目的】ミソハギ (*Lythrum anceps*) はミソハギ属ミソハギ科の多年草で、日本各地の湿地帯に群生している。開花期の地上部は止血作用や収斂作用をもつ千屈菜という生薬として、また山間部では天ぷらや和え物など食用として伝統的に利用されてきた。一方で、機能性に関する研究は未だ乏しい。本研究室では、ミソハギに高い  $\alpha$ -glucosidase 阻害活性を見出したことから、関与成分の単離と同定を試みた。

【方法】県内で採取し、乾燥させたミソハギ地上部 20 g を裁断、80% MeOH で抽出したものをミソハギ抽出物とした。この抽出液を液液分配、ODS 中圧カラム、逆相系 HPLC で順次分画した後、100 mg eq./mL における  $\alpha$ -glucosidase 阻害活性を、ラット腸管由来の酵素を用いて maltose 分解能を指標に評価した。単離した活性成分は NMR 及び LC-MS に供し構造を決定した。

【結果】高い活性 (95.4%) を示すミソハギ抽出物を液液分配し、 $\alpha$ -glucosidase 阻害活性を測定した結果水層 (90.6%)、酢酸エチル層 (60.6%) が高い活性を示した。水層を ODS 中圧カラムで分画し活性を評価すると、20% MeOH/水画分 (49.1%)、40% MeOH/水画分 (71.1%) に活性が認められた。20% MeOH 画分を逆相系 HPLC に供し、保持時間に従い 3 つに分画した後 200 mg eq./mL における活性を測定すると、Fr. 2 (33.1%) が最も高い活性を示した。そこで HPLC の分析条件を変更後、再分画し活性を評価した結果、Fr. 2-2 (45.0%) に活性が局在した。構造解析の結果、Fr. 2-2 より単離した化合物 1 は Ellagitannin の 1 種である granatin A と同定した。現在、他の活性画分の関与成分を単離・同定中である。

**B-4 休眠性の異なるジャコウアゲハの蛹及び成虫における表現形質の比較**  
平野翔吾, 松山真未子, 清永晋平, 北沢千里<sup>1</sup>, ○山中 明<sup>2</sup>  
(山口大・理,<sup>1</sup>山口大・教育,<sup>2</sup>山口大院・創科)

【目的】ジャコウアゲハの幼虫は、短日条件を経験すると、休眠性を変更することなく休眠蛹となる。一方、長日条件を経験した幼虫は通常、非休眠蛹となるが、日長条件以外の要因によって、一部の幼虫は休眠蛹となることが知られている。そのため、蛹は、長日非休眠蛹・長日休眠蛹・短日休眠蛹の 3 つに分類することができる。本研究では、これら 3 つの休眠性の異なる蛹及び成虫の表現形質に違いがあるかどうかを比較検討した。

【方法・結果】ジャコウアゲハ幼虫を長日 25°C 条件下で飼育し、長日非休眠蛹と長日休眠蛹を得た。長日非休眠蛹と長日休眠蛹の区別は、蛹化後、25°C において 30 日を経過しても羽化しなかった蛹を長日休眠蛹とした。短日 20°C 条件下で飼育した個体は、すべて短日休眠蛹となった。今回、休眠性の異なる蛹の頭胸部に現れた赤色斑ならびに羽化した成虫の毛状鱗粉に注目し、比較解析を行った。赤色斑の面積を ImageJ により解析した結果、頭胸部に占める赤色斑の割合は、個体差はあるものの長日非休眠蛹で最も大きく、長日休眠蛹および短日休眠蛹ではわずかであった。また、蛹のクチクラは、長日非休眠蛹 < 長日休眠蛹 < 短日休眠蛹の順で厚くなった。長日及び短日幼虫体内に存在する赤色斑の分泌腺の消長を解剖により観察したが、明瞭な差は認められなかった。また、各蛹から羽化した成虫を比較した結果、毛状鱗粉形成において若干の差異が認められた。以上の結果から、蛹や成虫に現れる表現形質は蛹の休眠性と関連していることが示唆された。



- B – 5** Comparison of pro-adipogenic effects between prostaglandin (PG) D<sub>2</sub> and its stable, isosteric analogue, 11-deoxy-11-methylene-PGD<sub>2</sub>  
○Pinky K. Syeda, M. Shahidur Rahman, Michael N. N. Nartey, M. Mazharul I. Chowdhury, Kohji Nishimura<sup>1</sup>, Hidehisa Shimizu, Mitsuo Jisaka, Fumiaki Shono<sup>2</sup>, Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., and <sup>1</sup>Center Int. Res. Sci., Shimane Univ.; <sup>2</sup>Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Prostaglandin (PG) D<sub>2</sub> is synthesized by the arachidonate cyclooxygenase (COX) pathway. PGD<sub>2</sub> is relatively unstable and dehydrated non-enzymatically into PGJ<sub>2</sub> derivatives serving as activators of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ), a nuclear hormone receptor. 11-Deoxy-11-methylene-PGD<sub>2</sub> (11d-11m-PGD<sub>2</sub>) is a novel chemically stable, isosteric analogue of PGD<sub>2</sub>. This study was undertaken to compare pro-adipogenic effects between PGD<sub>2</sub> and 11d-11m-PGD<sub>2</sub> in cultured preadipogenic 3T3-L1 cells. 11d-11m-PGD<sub>2</sub> was found to be significantly more potent than PGD<sub>2</sub> to simulate the storage of fats during the maturation phase of adipocytes. The transcript analysis revealed the up-regulated gene expression of two subtypes of cell-surface receptors for PGD<sub>2</sub>, namely DP1 and CRTH2 together with lipocalin-type PGD synthase. All of agonists for DP1, CRTH2, and PPAR $\gamma$  were effective to rescue adipogenesis attenuated by indomethacin, a COX inhibitor. The action of PGD<sub>2</sub> was appreciably suppressed by specific antagonists for DP1 and PPAR $\gamma$ , but not by that for CRTH2. By contrast, the effect of 11d-11m-PGD<sub>2</sub> was preferentially interfered by a specific antagonist for CRTH2 while other inhibitors had less inhibitory effects. These results suggest that 11d-11m-PGD<sub>2</sub> can primarily exert its pro-adipogenic action through the CRTH2 receptor.

- B – 6** Exogenous arachidonic acid up-regulates adipogenesis program of cultured preadipocytes during the differentiation phase without a cAMP-elevating agent  
○Michael N. N. Nartey, Pinky K. Syeda, M. Shahidur Rahman, M. Mazharul I. Chowdhury, Kohji Nishimura<sup>1</sup>, Hidehisa Shimizu, Mitsuo Jisaka, Fumiaki Shono<sup>2</sup>, Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., and <sup>1</sup>Center Int. Res. Sci., Shimane Univ.; <sup>2</sup>Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Confluent cultured 3T3-L1 preadipocytes have been usually pretreated for 2 days with the differentiation medium supplemented with dexamethasone, insulin, and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a cAMP-elevating agent, before being cultured in the maturation medium with insulin refed every 2 days to generate mature adipocytes. Omission of IBMX in the differentiation medium significantly attenuated adipogenesis program of cultured preadipocytes. However, pretreatment of cultured preadipocytes with exogenous arachidonic acid (AA) without IBMX stimulated storage of fats after the maturation phase of adipocytes following up-regulated gene expression of adipogenesis markers. The stimulatory effect of AA was appreciably suppressed in the presence of cyclooxygenase (COX) inhibitors. Prostaglandin (PG) I<sub>2</sub> and MRE-269, a selective agonist of the IP receptor, were efficacious to reverse the inhibitory effect of COX inhibitors. We found that exposure of cultured preadipocytes to AA without IBMX decreased the synthesis of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  known as anti-adipogenic PGs and enhanced the production of endogenous PGI<sub>2</sub> as determined by the quantification of 6-keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$ , a stable hydrolysis product of PGI<sub>2</sub>. These results indicate the specific role of endogenous PGI<sub>2</sub> in the stimulatory effect of AA on adipogenesis program during the differentiation phase of cultured preadipocytes in the absence of IBMX.

**B-7 多価糖鎖結合ポリマーが Th1, Th2 免疫応答に及ぼす免疫活性の解析**  
○板野紗月, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【目的】真核生物の殆どの分泌型タンパク質にはアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-グリカン) が結合する。これら植物糖タンパク質には、植物に特徴的に存在する  $\beta$  1,2 結合 Xyl 残基及び  $\alpha$  1,3 結合 Fuc 残基を含む植物抗原性糖鎖が見られ、哺乳動物に対して強い抗原性を有する。スギ花粉アレルゲン (Cry j1) には, Lewis a エピトープを有する植物抗原性糖鎖も結合しており, これら抗原性糖鎖の免疫活性に興味を持たれている。既に我々は遊離型植物抗原性糖鎖 (Man<sub>3</sub>Fuc<sub>1</sub>Xyl<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, M3FX) が Cry j1 特異的 Th2 細胞からの IL-4 産生を抑制することを見出している。この結果は植物抗原性糖鎖が花粉症治療薬のリード化合物になりうることを示唆している。そこで本研究では植物抗原性糖鎖に加えて, 真核生物に広く共通して存在するハイマンノース型糖鎖, 哺乳動物にのみ見られる動物複合型糖鎖の 3 種類の糖鎖を用いて, Th1, Th2 細胞に及ぼす免疫活性を解析した。【方法・結果】(1) 銀杏種子由来可溶性タンパク質, 大納言貯蔵タンパク質, 卵黄由来糖ペプチドから精製した Asn 糖鎖 (M3FX-Asn, Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Asn, NeuAc<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Asn) を, ポリマー骨格である  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) と縮合させた糖鎖ポリマーを調製した。アミノ酸組成分析の結果より,  $\gamma$ -PGA 1 分子につき約 1600 分子の Asn 糖鎖が結合していることを確認した。(2) 血液から得られたヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) ( $4 \times 10^5$  cells/well) を, 精製ツベルクリン (PPD) 及び (1) で調製した糖鎖ポリマーを用いて刺激し, 培養上清を用いて PPD 特異的 Th1 細胞からの INF $\gamma$  産生量を ELISA 法で解析した。

**B-8 BLM 阻害剤および微小管阻害剤共存下での抗癌作用の解析**  
○横尾悠希, 上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】

テロメアとは真核生物の染色体末端の DNA 反復配列と種々のタンパクから成る構造である。テロメアは細胞増殖に伴い短縮し一定長に達すると細胞は増殖を停止し致死となる。しかし, 約 15%の癌細胞では DNA 組換に基づく ALT と呼ばれる機構によりテロメアを伸長し不死化している。当研究室では分裂酵母において, DNA 組換によるテロメア伸長の中間体が蓄積すると微小管阻害剤への感受性が增大することを発見した(1)。そこで, 本研究では ALT により不死化するヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞株を用いて, テロメアでの組換中間体が蓄積すると考えられる条件での微小管阻害剤の細胞への影響を検証した。

【方法】

分裂酵母では組換によるテロメア伸長には RecQ ヘリカーゼファミリーの一員である Rqh1 が関与しており, テロメア保護タンパク Pot1 および Rqh1 のヘリカーゼ活性を欠損させた *pot1  $\Delta$ rqh1-hd* 二重変異株は微小管阻害剤への感受性が增大する(1)。そこで, 分裂酵母の Rqh1 にヒトで最も機能が近い BLM というタンパクの阻害剤を添加した。この時, テロメアでの組換中間体が蓄積していると仮定し, 微小管阻害剤を同時に添加することで両薬剤共存下での細胞の生存率を MTT アッセイにより測定した。発表では上記の薬剤単独の場合と両薬剤共存下での細胞の生存率について報告する。

参考文献 1. A. Nakano, *et al. Mol. Cell. Biol.* **34**, 1389-1397(2014)

- B-9 Ameliorative effect of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in herbs against NSAIDs-induced stomach ulcer  
OSheuli Afroz, MD. Motiur Rahman, Kentaro Kogure, Shiro Watanabe<sup>1</sup>,  
Kimio Takeda<sup>2</sup>, Tamotsu Tanaka  
(Fac. Pharm. Tokushima Univ., <sup>1</sup>Toyama Univ., <sup>2</sup>Smile Holdings Co. Ltd.)

Phosphatidic acid (PA) and lysophosphatidic acid (LPA) are naturally occurring bioactive phospholipids. They have been proven to mediate the wide variety of biological effects including maintenance of healthy gastrointestinal tract. Our previous study revealed the ameliorative effect of synthetic PA and LPA in NSAIDs-induced stomach ulcer. In this study, we determined the amount of PA and LPA in 21 traditional Chinese herbal medicines and examined the anti-ulcer effect of herbs lipids. Among all herbal medicines examined, Platycodon root (*Platycodon grandifloras*) was found to be PA-rich and Peony root (*Paenonia lactiflora*) was found to be both PA and LPA-rich herbs. They have extraordinarily higher LPA content compared to foods. We found that PA-rich Platycodon root and PA and LPA-rich Peony root lipids significantly ameliorate indomethacin-induced stomach ulcer. Whereas, PA and LPA-poor herbs, such as lipids from Moutan cortex (*Paenonia suffruticosa*), Pinellia tuber (*Pinellia ternate*), Zedoary rhizome (*Curcuma zedoaria*) and Poria sclerotium (*Poria cocos*), did not significantly reduce ulcer lesion. These results suggest that both PA and LPA in Peony and Platycodon root are active components to ameliorate NSAIDs-induced stomach ulcer. From these results, PA and LPA-rich herbs are considered to be the safer therapeutic supplement for reducing the NSAIDs-induced ulcer complications.

- B-10 立体規則性ポリγグルタミン酸イオンコンプレックス (PGAIC) の微細構造分析と抗菌性能評価  
○東内遥菜, 白米優一, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】本研究室では、化成ナイロンの主鎖構造を備えたポリγグルタミン酸 (PGA) と歯磨き粉等に含まれる「ヘキサデシルピリミジウムカチオン」との間で形成される PGA ポリイオンコンプレックス (PGAIC) の合成に成功した。該新素材は PGA 由来の接着性や、抗菌/抗ウイルス活性等を有するが、基盤ポリマー材料として用いる PGA の立体化学性により、PGAIC の性能に差が生まれることが指摘されはじめた。実際、超好塩古細菌の立体規則性 L-PGA を基材とする L-PGAIC には明確なプラスチック性 (融点  $T_m=60^\circ\text{C}$ ; 熱分解開始点  $T_d=240^\circ\text{C}$ ) が認められたが、立体規則性を欠く納豆 DL-PGA から得られた DL-PGAIC には融点は存在せず、代わりにガラス転移点 ( $T_g=-3^\circ\text{C}$ ) が認められた。今回、両者の結晶性や構造の違いによる抗菌性能への影響について調査した。

【方法・結果】広角 (WAXD) / 小角 (SAXS) X線散乱法で微細構造を分析した。L-PGAIC には結晶ピークが複数存在し、結晶部は高配向性ラメラ構造とされた。DL-PGAIC では非晶ピークがその大半を占めたことから、前者の方がより結晶性の高い超分子材料であることが判明した。次いで、各 PGAIC でコーティングされた合繊シートを大腸菌の培養 (液体) 培地に投入し、抗菌性を調べた。産業使用頻度の高い「水: アルコール混液」に曝した際の耐久性も調査した。その結果、L-PGAIC には高度な耐久性 (抗菌機能の持続性) が認められた。以上より、立体化学性を有するバイオ高分子の高機能材料化に当たっては、かかるキラル制御技術の充実が特に重要になるとの結論に達した。

B-11 先端機能バイオ新素材“ホモキラルポリγグルタミン酸”：レアメタル協同吸着能の発見とその制御  
○河本友輝，白米優一，芦内 誠（高知大・農）

【目的】ポリγグルタミン酸（PGA）は納豆ネバの主成分としてよく知られている。また，生分解性，生体適合性，超吸水性，金属イオン吸着性等の有用機能を備えたバイオ新素材としても注目されている。納豆菌以外でもPGAの生合成が認められ，その大半が極限環境微生物の範疇にあることは興味深い。実際，超好塩アーキアを用いた最新の発酵技術は，従来の納豆菌発酵法では不可能であった立体規則性（ホモキラル）PGAの合成を可能にした。ホモキラルPGAの先端的な産業利用への関心が高まる中，本バイオ新素材に優れたレアメタルイオン吸着能を見いだしたので報告する。

【方法・結果】ホモキラルPGAとポリアクリル酸（PAC）の本実験区に，ポリビニルアルコール〔非吸着区〕を追加し，産業上重要なレアメタルの $\text{Co}^{2+}$ ， $\text{Ni}^{2+}$ ， $\text{Mn}^{2+}$ ， $\text{In}^{3+}$ ， $\text{Ga}^{3+}$ ， $\text{Dy}^{3+}$ を実験対象とした。4-(2-Pyridylazo)resorcinol（PAR）を用いた比色定量法で吸着量を算出するとともに“ヒルの等温吸着式”を用いて解析し，吸着挙動における協同性の $n$ と親和性の $K_d$ を算出した。結果，PGAの三価イオンに対する吸着能は，汎用基材PACを遥かに凌駕した。前者特有の新機能まで発見された；PACの $n$ が“協同性なし”を示す $\sim 1$ の値である一方，PGAの $n$ は $\sim 20$ にも達したことから強力な協同性が示唆された。 $\text{In}^{3+}$ と $\text{Ga}^{3+}$ を対象に，かかる温度依存性についても調べたところ，両者は同族イオンであるにもかかわらず，その吸着挙動は明らかに異なる温度依存性を示すことが判明した。ホモキラルPGAには似通った金属イオンの識別機能が備わっている可能性が高く，先端機能新素材として注目に値する。

オミクス解析を利用した微細藻類ユーグレナのパラミロン合成・分解関連酵素遺伝子の探索

田中優史（島根大・生資科，JST/CREST）

微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は好気環境下で貯蔵多糖パラミロンを合成・蓄積し、その貯蔵量は細胞の乾燥重量に対して最大約 50%にまで達する。パラミロンは  $\beta$ -1,3-グルカンから成る高い結晶構造率を持った均一な顆粒（平均グルコース重合度 700）を形成しており、バイオフィルムやバイオプラスチックの原料として有用なほか、細胞内では嫌気環境下においてバイオ燃料としての利用が期待されているワックスエステル生産のための炭素源として利用されている。パラミロンは非常に強固な構造のため、*in vitro* では希アルカリ処理をしない限り酵素分解できないにもかかわらず、細胞内では嫌気や強光などのストレス環境下で容易に分解されるが、その代謝酵素やメカニズムについては未解明の問題である。

そこで、本研究では好気/嫌気に応答したパラミロンの合成/分解機構の解明を目的に、ユーグレナ発現遺伝子情報およびプロテオーム解析によるパラミロン代謝関連酵素の同定を試みた。RNA-seq 解析により、2 種類のパラミロン合成酵素候補遺伝子、PAramylon Synthase (PAS) 1 と PAS2, を見出した。両 PAS 遺伝子は複数回膜貫通タンパク質をコードし、N 末端側にグルコシドヒドロラーゼドメインと C 末端側に  $\beta$ -1,3-グルカン合成に関わる Glycosyl transferase 48 ドメインを有する特徴的な構造を持っていた。二本鎖 RNA 導入による PAS の遺伝子発現抑制の結果、PAS2-knockdown 株においてパラミロンの蓄積量が著しく減少した。このことから、PAS2 がパラミロン合成を担っていることが示唆された。

また、嫌気条件に応答したパラミロン分解系の解明を目的に、好気及び嫌気処理を 4 時間処理したユーグレナからパラミロン画分を調製し、この画分から可溶化したタンパク質を「パラミロン会合タンパク質」とし、これらタンパク質を nanoLC-ToF/MS により網羅的に同定・比較した。その結果、ペプチドカウント数が嫌気処理 4 時間で特異的に増加する 60 タンパク質が見いだされ、この中には endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase が含まれていた。このグルカナーゼは Glucoside hydrolase 81 ファミリーに属しており、シグナル配列と膜貫通ドメインを持った新規グルカナーゼであることが示された。同遺伝子の発現抑制を行った結果、嫌気処理後のパラミロン分解が有意に抑制されたことから、今回見出したグルカナーゼはパラミロン分解に関与することが強く示唆された。

C-1      パッチクランプ法によるシロイヌナズナ葉緑体膜イオンチャネル活性の直接測定  
○宗正晋太郎, 中村宜督, 村田芳行 (岡山大院・環境生命)

イオンチャネルやトランスポーターは、生体膜を介した物質輸送を調節するタンパク質であり、ほぼ全ての生体機能の維持に必要不可欠である。他のオルガネラと同様に、植物の光合成装置である葉緑体の膜（包膜とチラコイド膜）にも、イオンチャネル・トランスポーターなどの輸送体タンパク質が数多く存在し、光合成や環境ストレス耐性の制御など多くの重要な生理学的役割を果たしていることが最近明らかになってきた。しかしながら、これまでの葉緑体膜に局在する輸送体タンパク質の機能解析は、大腸菌や酵母など異種発現系を用いた *in vitro* 実験系によるものが主であり、葉緑体膜そのものを対象にしたネイティブ膜上での活性測定を行った例はほとんど存在しない。パッチクランプ法は生体膜を介したイオン輸送活性を電流として直接記録する電気生理学的手法である。これまでに葉緑体膜を対象にしたパッチクランプ法による解析は、エンドウやホウレンソウなどの非モデル植物に関して、わずかに数例報告があるのみである。我々はモデル植物であるシロイヌナズナの葉緑体膜を対象にしたパッチクランプ法を開発し、いくつかの特徴的なイオン輸送活性をとらえることに成功した。本発表では、そのうちの一つ、光照射に応答して活性化する葉緑体膜イオンチャネルについての解析結果を報告する。

C-2      Exogenous proline enhances the sensitivity of Tobacco BY-2 cells to arsenate  
○Mst Nur-E-Nazmun Nahar, Anna Yonezawa, Md Yeasin Prohdan,  
Toshiyuki Nakamura, Yoshimasa Nakamura, Shintaro Munemasa,  
Yoshiyuki Murata (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

A natural toxic element, arsenic, leads to various physiological and structural disorders in plants. An organic compatible solute, proline, is accumulated in plants under stress conditions. It is reported that proline plays roles in the mitigation of stresses in plants. However, the role of proline in plants under arsenate stress remains unclear. In this study, we investigated the effect of exogenous proline on tobacco bright yellow-2 (BY-2) cultured cells under arsenate stress. Arsenate did not affect the growth of BY-2 cells at 40  $\mu$ M and 50  $\mu$ M but inhibited it at 60  $\mu$ M. Proline did not change the cell growth at 0.5 mM to 10 mM but delayed it at 20 mM. In the presence of 40  $\mu$ M  $AsO_4^-$ , neither 0.5 mM proline nor 1 mM proline affected the cell growth but 10 mM proline inhibited it. Evans blue staining shows that 10 mM proline boosted the number of stained cells in the presence of 60  $\mu$ M  $AsO_4^-$ . Moreover, 10 mM proline decreased contents of total glutathione and reduced glutathione in the arsenate-treated cells. Taken together, our results indicate that exogenous proline does not alleviate arsenate toxicity in BY-2 cells but that proline enhances the sensitivity of BY-2 cells to arsenate.

**C-3 傷害によるオキシリピンバーストへのカルシウムによるリポキシゲナーゼ活性化の関与**  
○望月智史, 肥塚崇男, 松井健二 (山口大院・創科)

植物は昆虫による食害や病原菌の感染等の物理的刺激を受けると、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。植物は無傷な状態ではオキシリピンを生成せず、傷害を受けることにより *de novo* 合成でオキシリピンを急速に生成 (バースト) することが知られている。このオキシリピンバーストがどのように開始するのか、そのメカニズムは未だに解明されていない。

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、GLV, JA 生成の両方に LOX2 が寄与していることが知られている。LOX2 は葉緑体ストロマ局在で、基質はチラコイド膜脂質であるため、LOX 反応が常時進行するはずだが、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 の生成を促進すると考えられた。哺乳動物やサンゴでは、カルシウムイオンが LOX の活性化に必須であることが報告されている。そこでシロイヌナズナ葉をカルシウムイオン選択的なキレート剤である EGTA 存在下で破砕したところ、GLVs の生成が抑えられた。下流の HPL は EGTA では阻害されなかったため、植物であるシロイヌナズナでも同様にカルシウムイオンが LOX の活性化に関与していることが示唆された。

**C-4 植物組織破砕に伴うオキソフィトジエン酸生成には酸化修飾ガラクト脂質リパーゼが必須である**  
○荒井紀梨子, 肥塚崇男<sup>1</sup>, 松井健二<sup>1</sup> (山口大院・医 (農), <sup>1</sup>山口大院・創科)

【目的】「ジャスモン酸類」はジャスモン酸およびその類縁体の総称で、植物が外敵からの攻撃を受けた時に素早く生成され、攻撃者に対する防御応答誘導に寄与している。ジャスモン酸類合成経路では、葉緑体ガラクト糖脂質のリパーゼ加水分解による遊離脂肪酸生成が必須とされ、生成した脂肪酸が酸化、環化されてジャスモン酸前駆体であるオキソフィトジエン酸 (12-oxo phytodienoic acid : OPDA) が生成されると考えられているが、この反応に必須なリパーゼは数例を除いて特定されていない。一方シロイヌナズナ葉は葉緑体ガラクト糖脂質のアシル基がそのまま酸化、環化されて酸化修飾ガラクト糖脂質 (アラビドプシド) を生成する。本研究ではシロイヌナズナ葉の組織傷害に伴う急速な OPDA 生成に、リパーゼによるアラビドプシドの加水分解が関与するかどうかを明らかにする事を目的とした。

【方法・結果】シロイヌナズナ葉を破砕するとアラビドプシドと OPDA が数分以内に生成蓄積した。一方、OPDA 生成酵素のひとつアレンオキシドシンターゼ (AOS) ノックアウト変異体である *aos* 葉から調製した粗酵素液にアラビドプシドを添加すると OPDA が生成した。また、シロイヌナズナ野生株 (Col-0) 葉をリパーゼ阻害剤 (Tetrahydrolipstatin : THL) 存在下で破砕すると OPDA 生成が抑えられると同時にアラビドプシドが蓄積した。これらの結果から、シロイヌナズナ葉では組織傷害を受けるとガラクト脂質アシル基が加水分解を受けないまま酸化され、更に修飾を受けてアラビドプシドが生成し、その一部がリパーゼによって加水分解されることで遊離 OPDA が生成されることが示唆された。

C-5 サンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) におけるモノテルペン合成酵素遺伝子のクローニングとその発現酵素の特性解析  
○藤田芳勲, 飯島陽子<sup>1</sup>, 相田光宏<sup>2</sup>, 鈴木秀幸<sup>3</sup>, 松井健二<sup>4</sup>, 肥塚崇男<sup>4</sup>  
(山口大院・農,<sup>1</sup> 神奈川工大・応用バイオ,<sup>2</sup> 奈良先大・バイオサイエンス,<sup>3</sup> かずさ DNA 研・バイオ,<sup>4</sup> 山口大院・創科)

【目的】サンショウは香気寄与成分としてテルペン類を多く含むことが知られている。しかしながら、サンショウ香気成分の局在性及びその生合成酵素に関する知見は未だ数少ない。前回の香川大会では、2つのセスキテルペン合成酵素 (ZpTPS1, ZpTPS2) の機能解析について言及した。そこで本研究では、サンショウの品質を左右する重要な揮発性モノテルペンの生成に着目し、組織別およびステージ別の生成量を調査するとともに、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、20種類以上の揮発性テルペノイドが検出された。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、既知のモノテルペン合成酵素と高いアミノ酸相同性を持つ1つの遺伝子 *ZpTPS3* が見つかった。*ZpTPS3* 遺伝子を GST との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、酵素活性を測定したところ、反応主要生成物として  $\beta$ -phellandrene が検出された。さらに、サンショウ葉における *ZpTPS3* 遺伝子の転写産物の分布を *in situ* hybridization 法で解析すると、油胞を囲む上皮細胞で発現していることが明らかになった。以上の結果から、*ZpTPS3* 遺伝子は油胞特異的に蓄積しているモノテルペン類の生成に寄与していることが示唆された。

C-6 イネ科植物におけるジャスモン酸処理によるフェニルアミドの誘導  
○森本紀子, 上野琴巳<sup>1</sup>, 寺石政義<sup>2</sup>, 奥本 裕<sup>2</sup>, 森 直樹<sup>2</sup>, 石原 亨<sup>1</sup>  
(鳥取大院・農,<sup>1</sup> 鳥取大・農,<sup>2</sup> 京大院・農)

【目的】植物は病原菌感染や昆虫による食害などのストレスに应答し、桂皮酸類と生体アミンから構成されるフェニルアミド (PA) を生成・蓄積する。PA は植物界に広く分布しており、一部のイネ科植物でも病原菌感染などにより、蓄積が誘導される例が報告されている。本研究では、様々なイネ科植物の葉に傷害処理やジャスモン酸 (JA) 処理を行い PA の蓄積に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】播種後 2 週間のイネ科植物 (イネ, オオムギ, コムギ, ライムギ, エンバク, ヒエ, トウモロコシ, ソルガム) の第 3 葉を切り取り、蒸留水 (傷害処理) あるいは 1 mM の JA 溶液 (JA 処理) に浮かべ、一定時間後に蓄積した PA (桂皮酸類 5 種とアミン類 5 種からなる計 25 種) を LC-MS/MS を用いて定量した。

イネでは、傷害処理によってフェルロイルプトレシンなど複数の PA の蓄積が誘導されたが、JA はこれを抑制する傾向を示した。オオムギやライムギ, コムギでは *p*-クマロイルアグマチンやフェルロイルプトレシンの蓄積が傷害処理あるいは JA 処理によって誘導された。ヒエではカフェオイルプトレシンが、トウモロコシではクマロイルチラミンの蓄積が JA 処理により顕著に誘導された。エンバクやソルガムでも、蓄積量は微量であったが、これらの処理によっていくつかの PA が蓄積した。以上の結果から、傷害処理や JA 処理の影響は植物種ごとに異なっているが、PA の蓄積は広範なイネ科植物に存在するストレス应答であると推察された。



- C-7 アフリカ・ボツワナにおける自生ジャトロファ種子の化学組成および遺伝的多様性の解析 ○上野山遼, 只野翔大, Gwafila Chiyapo<sup>1</sup>, 石本雄大<sup>2</sup>, 七里吉彦<sup>3</sup>, 甲斐政親<sup>4</sup>, 足立香織<sup>5</sup>, 藤本高明, 難波栄二<sup>5</sup>, Charles Mazereku<sup>1</sup>, 明石欣也 (鳥取大院・農, <sup>1</sup>Dep. Agr. Res., Botswana, <sup>2</sup>JICA ボツワナオフィス, <sup>3</sup>森林総研・森林バイオ, <sup>4</sup>鳥取大・技術部, <sup>5</sup>鳥取大・生命機能)

【目的】ジャトロファ (*Jatropha curcas* L.) は、耕作不適地でも生育可能なトウダイグサ科の植物である。種子に含まれる油脂はバイオディーゼル用途に好適であり、次世代型バイオ燃料植物として期待されている。ボツワナ共和国では約80系統の固有ジャトロファ系統が見いだされており、それらの種子における化学組成やバイオマス収量、遺伝情報を収集することは、育種を推進するうえで重要である。そこで、これらボツワナ系統の種子における化学組成の特徴を理解し、また遺伝的相関を解明することで、ジャトロファの優良品種の作出に寄与することを目指した。【方法・結果】ジャトロファの種子からソックスレー法により油脂を抽出し、GCにより脂肪酸組成を解析したところ、油脂含量は重量比で28-58%の系統間差があり、バイオ燃料の組成として好適なオレイン酸の含量も38-62%の系統間差が認められた。また、毒性物質として知られるホルボールエステル量は、種子1 gあたり86-537 μgの範囲で系統間差が認められた。次に、遺伝的多様性を解明するため、次世代シーケンサ解析により得たジャトロファのSNP情報をもとに11本の染色体上にプライマーを作出し多型解析に供した。この結果を用いて分子系統樹を作製したところ、ボツワナ自生系統は大きく2つのクラスターに分類され、さらに小さなグループに分類されることを見出した。これらの結果は、ボツワナの自生ジャトロファ系統が、その化学組成および遺伝組成において大きな多様性を持つことを示唆する。今後、油脂含量などの農業的形質と、遺伝との関係について解明することに興味を持たれる。

- C-8 IAN family に属するシロイヌナズナ small G タンパク質 AIG1-4 の機能解析 ○松井亮太<sup>1</sup>, 久場 遥<sup>2</sup>, 秋山大宗<sup>3</sup>, 上野可南子<sup>2</sup>, 塩田真友<sup>3</sup>, 玉柴空輝<sup>2</sup>, 池田佳久<sup>4</sup>, 高坂智之<sup>1,5</sup>, 山田 守<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>山口大院・創科, <sup>2</sup>山口大院・医, <sup>3</sup>山口大・農, <sup>4</sup>チェコ パラツキー大・ハナ研究所, <sup>5</sup>山口大・微研セ)

【目的】Small G タンパク質の IAN family は、マウスではTリンパ球の分化や生存選択にて重要な役割を担う。一方、シロイヌナズナでは14個の IAN family (AIG1-1~14) が存在するが、病原抵抗性に関する AIG1-1 以外の機能は不明である。その中で、AIG1-4 の発現解析の結果、根毛細胞での発現が確認され、AIG1-4 とβチューブリンとの相互作用も示唆された。そこで本研究では、低 pH 誘導性の根毛形成の起点となりβチューブリンが構成分子である微小管の局在化に注目し、根毛細胞での AIG1-4 の機能解明を試みた。

【方法・結果】標的遺伝子へ特異的に変異を加えることが可能な CRISPR/Cas9 を用いて、新たな AIG1-4 欠損株の構築を行った。その結果、37 bp の欠失した株を構築した。本株および T-DNA 挿入変異株を用いて、発芽して5日後に低 pH による根毛発現誘導させた際の根毛原基数を野生株と比較した。その結果、野生株では低 pH によるストレスによって根毛原基数が増加したのに対し、2つの AIG1-4 欠損株では低 pH による根毛原基数の増加が確認されなかった。このことから、AIG1-4 は低 pH 誘導による微小管の凝集が起点となる根毛形成への関与が示唆された。また、低 pH 条件下での発芽率を比較した結果、AIG1-4 欠損株は野生株と比べて大幅に発芽率が上昇した。このことから、AIG1-4 は pH による発芽抑制機構にも関与する因子であることが示唆された。

### C-9 酸化環境における植物タンパク質の蛍光バイオイメージング

○岩瀬駿志, 吉田昇平<sup>1</sup>, 和田郁夫<sup>2</sup>, 森木公平, 清水英寿, 地阪光生, 横田一成, 中川 強<sup>1</sup>, 西村浩二<sup>1</sup>

(島根大・生資科, <sup>1</sup>島根大・総科研セ, <sup>2</sup>福島医大・細胞科学)

緑色蛍光タンパク質やその変異体蛍光タンパク質を用いて、エンドソームルーメンやアポプラスト（細胞壁）のような反細胞質領域におけるタンパク質の動態を可視化する場合は、細胞質領域と比べて困難であることが報告されている。その理由の一つに、これらタンパク質の合成の場である小胞体ルーメン内の酸化環境では、蛍光タンパク質のジスルフィド結合形成により蛍光融合タンパク質がオリゴマー化することが挙げられる。本研究では、各種蛍光タンパク質ごとに植物細胞中の酸化環境でのタンパク質の蛍光イメージングを検討した。その結果、酸化環境である小胞体内で合成された分泌タンパク質のアポプラストでの蛍光イメージングに関しては、システインフリーのシアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質や赤色蛍光タンパク質を用いた場合に良好な結果を与えた。特に、システインフリーのシアン蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質は高輝度であった。しかし黄色蛍光タンパク質はシステインフリー化の有無によらず、アポプラストでは可視化されなかった。また小胞体で合成された液胞ルーメンタンパク質の場合は、システインフリーのシアン蛍光タンパク質の利用が良好な結果となったが、黄色蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質はシステインフリー化の有無にかかわらず、どちらも高輝度であった。酸化環境下では、蛍光タンパク質のシステインは蛍光融合タンパク質のオリゴマー化の原因となることから、植物の反細胞質領域におけるタンパク質の蛍光イメージングには、特にシステインフリーのシアン蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質が適していることが強く示唆された。

### C-10 植物のストレス応答における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝のオルガネラクロストーク

○三富 弦, 寺井佑介, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典

(島根大・生資科)

【目的】活性酸素種、特に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は細胞毒性作用とシグナル機能の両方を有するため、その量的制御は植物のストレス応答・耐性能と密接な関係にある。興味深いことに、生成部位に依存した複数の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> シグナル伝達経路の存在と、それらのクロストークの生理学的重要性が示唆されてきているが、その詳細は不明である。葉緑体および細胞質ではアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が、ペルオキシソームではカタラーゼ (CAT) が主要な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去酵素であり、各酵素の協調的な作用によってシグナル伝達系がファインチューニングされると考えられる。そこで本研究では、強光ストレス応答の観点から H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝のクロストークを調べることを目的として、シロイヌナズナ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去酵素変異株である *apx1* (細胞質), *sapx tapx* (葉緑体) および *cat2* (ペルオキシソーム) とそれらの多重変異株を作出した。

【結果】過去の知見と一致して、*cat2* は強光ストレスに対して著しい感受性 (ブリーチング) を示し、この表現型は APX1 の欠損 (*cat2 apx1*) により回復した。それに対して *sapx tapx cat2* では、強光後の葉の退色が *cat2* よりも早い段階 (12 時間) で観察された。*cat2* の細胞死には酸化型グルタチオンの蓄積が関与するが、少なくとも強光照射 12 時間後のグルタチオンの酸化還元比に *cat2* と *sapx tapx cat2* 間での有意差は認められなかった。また、通常条件下の *cat2* で見られる地上部重量、葉面積および根の伸長の阻害も三重変異株で促進されていた。これらの結果から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成または蓄積部位の違いは植物の生育や強光ストレス感受性に異なる作用を持つことが明確になった。

C-11 シロイヌナズナのアスコルビン酸再生系の逆遺伝学的解析  
○寺井佑介, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典 (島根大・生資科)

アスコルビン酸は植物の成長や生存に不可欠な多機能性レドックス化合物である。その生理作用の多くは還元型に依存するため、酸化型からの再生が重要となる。二電子酸化型のデヒドロアスコルビン酸 (DHA) は、その特異的な還元酵素 (DHAR) の働きにより、グルタチオン依存的にアスコルビン酸へ再生されると考えられている。一方、DHA はタンパク質チオール基を容易に酸化し、自身は還元型へと戻りうるため、DHAR という特異的酵素の存在を疑問視する報告もある。そこで本研究では、シロイヌナズナに存在する3つのアイソフォームを全て欠損させた三重変異体 ( $\Delta dhar$ ) を用いて検証した。

DHAR 活性測定により、 $\Delta dhar$  がグルタチオン依存型の DHA 還元活性を持たないことが確認された。強光ストレスを付与した野生株および  $\Delta dhar$  におけるアスコルビン酸およびグルタチオンの定量結果から、DHAR はグルタチオンのレドックス制御には寄与するにも関わらず、アスコルビン酸レドックス状態にはほとんど影響しないことが示された。そこで、DHA 還元能力を調べるために、野生株および  $\Delta dhar$  の葉に DHA 溶液を処理した。その結果、いずれの株においても DHA 処理による著しい総アスコルビン酸量の増加が認められ、そのほとんどは還元型として検出されたが、植物体間での差は認められなかった。さらに、DHA 処理はグルタチオンレドックス状態に影響しなかった。これらの結果から、 $\Delta dhar$  のアスコルビン酸再生能力は野生株のそれと同程度であり、「DHAR 活性」に非依存的な DHA 還元系の存在が示された。

D-1 タデアイ葉由来のフラボノール配糖体とそれらのアグリコンの抗炎症作用  
○中井翔太<sup>1,2</sup>, 木村英人<sup>2</sup>, 地阪光生<sup>1,3</sup>, 横田一成<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>鳥取大院・連農, <sup>2</sup>寿製菓(株), <sup>3</sup>島根大・生資科)

【目的】タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) は染料原料として知られる一方で、食品原料の他、薬用植物として解毒、解熱、消炎などの目的で古くから利用されてきた。タデアイに含まれる抗炎症物質として tryptanthrin が知られている。最近、我々は、タデアイ葉に 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (TMF) をアグリコンとするフラボノール配糖体が多く含まれることを明らかにした。quercetin や kaempferol などのフラボノールの抗炎症作用は調べられているが、タデアイ葉の主要成分である TMF や TMF 配糖体については報告がない。そこで、本研究では、これらの成分の抗炎症作用について調べた。

【方法】タデアイ葉の 80%メタノール抽出物の TMF 配糖体量を HPLC にて定量した。また、抗炎症作用の評価のため、マウスのマクロファージ様 RAW264 細胞をリポ多糖で刺激したときの一酸化窒素とプロスタグランジン E<sub>2</sub> 生成に対する試験物の阻害作用を調べた。さらに、タデアイ葉の TMF 配糖体画分を ICR マウスに経口投与し、1 時間後の血中成分を分析した。【結果】アグリコンである TMF は、TMF 配糖体よりも強い抗炎症作用を示した。またタデアイ葉の成分では、tryptanthrin の抗炎症作用は最も強力であったが、TMF 配糖体は tryptanthrin に比べてはるかに豊富であった。TMF 配糖体を経口投与した ICR マウスの血中に TMF が検出された。従って、TMF 配糖体は動物の消化管で加水分解されて TMF が体内に吸収されることが確認された。以上より、フラボノール配糖体である TMF 配糖体はタデアイ葉の主要な成分であり、体内に取り込まれた TMF には抗炎症作用が期待できる。

D-2 腸管細胞におけるスカトールの作用メカニズムの解析  
○蔵田航一, 河原秀明, 清水英寿 (島根大・生資科)

【背景・目的】大腸ガンや炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）の罹患率の増加の原因として、動物性タンパク質の摂取過多が考えられているが、これら病態発症と高動物性タンパク質摂取との関係性については、未だ不明である。近年、様々な疾患の発症・進展に、腸内細菌の関与が指摘されている。そこで我々は、肉の摂取量増加に伴い、糞中における含有量が増加する事が明らかとなっている、食品タンパク質に存在するトリプトファンの腸内細菌代謝物であるスカトールに着目した。本研究は、腸管細胞に対するスカトールの影響と、その作用メカニズムを明らかにする事を目的とする。

【方法・結果】細胞増殖/生存について、MTS アッセイを用いて検証を行った。腸管細胞にスカトールを処理したところ、濃度依存的に細胞死の誘導が観察された。次に、細胞死の誘導に対するスカトールの作用経路を、ウェスタンブロット法を用いて同定を試みた。まず、細胞の増殖/生存や死に密接に関与する Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の活性化に焦点を当てた。スカトール刺激により、ERK, p38, JNK の活性化の上昇が確かめられた。以上の結果から、高濃度のスカトールによって活性化される MAPK のいずれかの分子が、腸管細胞の細胞死を誘導する事が示唆された。したがって、高食肉摂取に伴って腸内で発生する高濃度スカトールにより、炎症性腸疾患の発症・進展が導かれる可能性が示された。現在、腸管細胞におけるスカトールの細胞死を誘導する作用経路について、さらなる解析を進めているところである。

D-3 大腸がん細胞増殖に対するマイクロシスチン-LR の作用経路の同定  
○河原秀明, 蔵田航一, 清水英寿 (島根大・生資料)

【目的】湖沼の富栄養化に伴って発生するアオコは、マイクロシスチンと呼ばれる毒素を産生する。マイクロシスチンは、湖沼を水源とした飲料水だけでなく、そこで養殖された魚介類にも蓄積される事から、環境や生態系に与える影響だけでなく、近年、「食の安全」の面からも注目を集めている。マイクロシスチンを体内へ取り込んだ際の問題点の1つに、大腸ガンへの進展の関与が指摘されている。しかし、その進展メカニズムの詳細は、未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、毒性の最も強いマイクロシスチン-LR に着目し、大腸ガン細胞である Caco-2 細胞でのマイクロシスチン-LR の作用メカニズムを解析する事を目的とした。

【方法・結果】マイクロシスチン-LR 刺激によるヒト結腸ガン由来細胞 (Caco-2) の細胞増殖を、MTS アッセイを用いて測定したところ、濃度依存的に細胞増殖が導かれた。次に、細胞増殖に密接に関与する MAP キナーゼのリン酸化を調べたところ、マイクロシスチン-LR の刺激により、ERK, p38, JNK のリン酸化が観察された。そこで、それぞれの MAP キナーゼ経路に対する阻害剤を用いて、マイクロシスチン-LR による細胞増殖に与える影響を検討した。結果として、p38 と JNK の阻害剤で細胞増殖が抑えられた事から、マイクロシスチン-LR 依存的な細胞増殖には p38 と JNK の活性化が関与している事が明らかとなった。今後は、細胞増殖に関わるマイクロシスチン-LR による p38 と JNK の活性化に関与する細胞内シグナル伝達経路について同定を行っていく予定である。

D-4 Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway plays a negative role in anti-proliferative effect of benzyl isothiocyanate  
○Xiaoyang Liu, Chiaki Takano, Shintaro Munemasa, Toshiyuki Nakamura, Yoshiyuki Murata, and Yoshimasa Nakamura  
(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/FOXO pathway is a potent survival pathway that mediates resistance to the apoptotic effects of chemotherapy drugs and radiation therapy. Since drug-induced resistance is very common in colon cancer cells, combination therapy has been the most popular options to overcome drug-induced resistance. We have been focusing on an organosulfur compound derived from cruciferous vegetables, benzyl isothiocyanate (BITC), which activates not only cytostatic and cytotoxic signaling pathways but also cell survival pathways in several colorectal cancer cells. In the present study, we investigate the involvement of PI3K/Akt pathway in BITC-induced cell survival. Actually BITC activated the PI3K/Akt/FOXO pathway, whereas it inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells. PI3K selective inhibitors, LY294002 and NVP-BEZ235, significantly enhanced antiproliferation and apoptosis induced by BITC. These results suggested that the PI3K/Akt/FOXO pathway negatively regulates BITC-induced antiproliferation in human colorectal cancer cells. The present results provide evidence that the combination of BITC with the inhibitors of the survival pathway is a promising therapeutic strategy to ameliorate BITC-induced anti-cancer effects.

**D-5 ケルセチン配糖体代謝物のアルデヒドデヒドロゲナーゼ発現誘導作用**  
○栗田歩樹, Liu Yujia, 中島清花, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督  
(岡山大院・環境生命)

【目的】 飲酒等で摂取されたエタノールは、まずアセトアルデヒドに変換され、次に酢酸へと代謝されて無毒化される。しかし、後者の代謝が低下してアセトアルデヒド濃度が高くなると、頭痛、吐き気の症状を引き起こすだけでなく、アルコール性疾患のリスクを高める。従って、アセトアルデヒドから酢酸への変換を司るアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の発現を増強できれば、それらの予防に貢献するものと考えられる。最近、ケルセチン配糖体の腸内細菌代謝物が、薬物代謝酵素遺伝子の発現誘導を介して、生体内抗酸化作用を亢進することが明らかにされているが、エタノール代謝に対する影響は全く検討されていない。そこで本研究では、アセトアルデヒドに対して保護作用を示す食品成分を同定する目的で、ケルセチン配糖体代謝物の ALDH 活性及び遺伝子発現への影響を調査した。

【方法・結果】 ケルセチン配糖体の腸内細菌代謝物の中で比較的生成量の多い、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及び 3-hydroxyphenylacetic acid (OPAC) を Hepal1c7 細胞に処理し、ALDH 活性と遺伝子発現を測定した。その結果、DOPAC, OPAC は共に ALDH 活性及び遺伝子発現を増強した。続いて、DOPAC, OPAC を 6 時間前処理した細胞のアセトアルデヒド毒性に対する効果を検討した。その結果、両化合物はアセトアルデヒド誘導細胞死を完全に抑制した。以上の結果から、ケルセチン配糖体代謝物は、ALDH 遺伝子の発現増強を介してアセトアルデヒド代謝を亢進し、細胞保護作用を示すことが示唆された。現在、活性発現に必要な構造要因を明らかにする目的で、構造活性相関を検討している。

**D-6 デキストラン硫酸及びホスピチンによる蛋白質加熱凝集抑制機構の解明**  
○石丸隆行, 三宅 統, 松富直利 (宇部フロ短大・食物栄養)

【目的】 蛋白質は加熱等により変性し、しばしば白濁凝集を引き起こす。以前の研究で、乾燥卵白にホスピチン (PV), デキストラン硫酸 (DS) を添加することで、加熱による白濁凝集を抑制できることが報告されている。卵白に対する白濁凝集抑制の研究は行われているが、種々の蛋白質に対する白濁凝集抑制の研究は行われていない。そこで本研究では PV 及び DS が種々の蛋白質に対し、白濁凝集抑制能力があるか調べた。

【方法】 モデル蛋白質として、オボアルブミン (OVA),  $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ -LG), オボトランスフェリン (OT), ソーマチン (TAU), リゾチーム (LZ) の 5 種類を用いた。各蛋白質溶液, PV 及び DS を終濃度 0.05% になるように添加し、80°C で加熱後、白濁凝集を観察及び分子形態を解析した。

【結果及び考察】 PV, DS とともに LZ 以外の蛋白質に対して白濁凝集抑制能を示した。加熱後の分子形態を調べたところ、OVA,  $\beta$ -LG では可溶性凝集体を形成していた。OT, TAU に対しては可溶性凝集体形成を抑制していた。以上の結果から、PV, DS は様々な蛋白質に対し、低濃度で加熱凝集抑制能を示し、蛋白質によっては会合も抑制することができるため、幅広い分野で凝集抑制物質 (凝集抑制剤) として使えることが示唆された。

## D-7 オボアルブミンのアミロイド様繊維形成に対するデキストラン硫酸の影響 ○三宅 統, 石丸隆行 (宇部フコ短大・食物栄養)

【目的】鶏卵白アルブミン (OVA) は加熱により, アミロイド繊維のような規則的な繊維を形成することが知られている。本研究では蛋白質の加熱凝集に対し凝集抑制効果があるデキストラン硫酸 (DS) を用いて, オボアルブミンのアミロイド様繊維形成がどのように変化するのか調べた。

【方法】OVA 及び DS を終濃度 0.05% になるように緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 20 mM NaCl) に溶解し, 80°C, 30 分間加熱した。その後, 濁度測定, 分子形態及び構造変化の観察, 疎水表面の測定及びチオフラビン T によるアミロイド繊維形成を調べた。

【結果及び考察】DS の添加により, 加熱後の濁度上昇は抑制された。SDS-PAGE, Native-PAGE 及びゲルろ過 HPLC により, 分子形態を観察したところ, 分子形態には大きな変化はみられなかったが, DS の添加により, 凝集体の大きさが小さくなっていた。2 次構造及び 3 次構造は, DS を添加すると加熱後の 2 次構造が大きく変化していた。疎水表面及びチオフラビン T によるアミロイド繊維を測定したところ, 疎水性表面においては変化がみられなかったが, チオフラビン T の値は大きく上昇していた。以上の結果から, DS を添加すると OVA の加熱凝集体のサイズは小さくなるが, アミロイド繊維形成は起きやすくなることが示唆された。

## D-8 清酒醸造における原料米無機成分に関する研究 ○平尾 凌, 奥田将生<sup>1</sup>, 上用みどり<sup>1</sup>, 福田 央<sup>1</sup> (広島大院・生物圏,<sup>1</sup>酒総研)

【目的】清酒のブランド価値向上や輸出促進の観点から国レベルの地理的表示として, 平成 27 年に地理的表示「日本酒」が指定された。また, 国内の各地域においても地理的表示制度が活用され, 清酒の地域ブランドの価値が向上することが期待されている。そのため, 清酒の産地を証明する分析手法の開発が求められている。産地を判別する手法として, 農産物の分野では無機元素分析による手法が近年多数報告されているが, 清酒では報告されていない。一方, 産地判別の手法に用いられる無機元素に関して, 清酒醸造における意義については未だ不明な点が多い。そこで本研究では, 無機元素に関して清酒の産地特性や清酒醸造における意義について基礎的な知見を得るため, 産地や精米歩合の異なる原料米を用いて原料米の無機元素組成が清酒の無機元素組成及び発酵過程に及ぼす影響について検討した。

【方法】異なる精米歩合の原料米及び精米歩合が同一で異なる産地の原料米を用いて, 総米 180 g 又は 300 g の小仕込みを行い, 原料米の無機元素濃度と製成酒の無機元素濃度及びもろみでの発酵速度との関係を解析した。原料米, 製成酒の無機元素濃度はマイクロウェーブ分解後に ICP-AES, ICP-MS で定量した。

【結果】小仕込み試験の結果, B, Mg, Mn, Cs, As において原料米の濃度と製成酒の濃度との間に高い相関がみられた。また, 原料米の無機元素濃度ともろみ初期の炭酸ガス減少量との間には, 精米歩合の異なる試料を用いた場合は多くの元素において相関がみられたが, 産地の異なる原料米を用いた場合は高い相関を示す元素は少なく, K や P で高い相関がみられた。

## D-9 ナルトビエイの粕漬けにおける砂糖添加効果 ○福田 翼, 祇園雄大, 辰野竜平, 古下 学 (水大校・食品科学)

【目的】近年, ナルトビエイ (*Aetobatus narutobiei*) による食害が深刻化しており駆除が行われている。一方, 駆除されたナルトビエイは, 保存中に含有する尿素の分解によりアンモニアが発生するため, その利用が困難である。日本の伝統的な粕漬けは, 熟成した酒粕(踏込粕)を用いて製造される。本研究では, エイの新たな加工法の構築を目的に, 酒粕を用いたナルトビエイの粕漬け製造を試みた。

【方法】ナルトビエイは, 市販の冷凍品を用いた。20%濃度の食塩を添加し塩蔵(4℃・72時間), 水道水を用いて塩抜きを3時間行った。滅菌ガーゼに包み, 酒粕に漬け込んだ。踏込粕は, 無添加のものを業者より入手したものをを用いた。酒粕には砂糖を添加し, 砂糖添加濃度は0, 5, 10, 20%とした。

【結果】一般生菌数の経時変化を調査した結果, 粕漬けを行った場合, 時間経過と共に減少した。保存0週間目は $1.0 \times 10^5$  CFU/gとなったのに対し, 保存1ヶ月目において, 砂糖添加割合0%では $1.1 \times 10^5$  CFU/g, 20%では $1.1 \times 10^4$  CFU/gとなった。したがって, 砂糖添加割合が高い程, 増殖抑制効果が高い事が示唆された。一方, 粕漬け未処理の場合,  $2.0 \times 10^7$  CFU/gとなり, 腐敗レベルである $1.0 \times 10^6$  CFU/gに到達していた。各砂糖添加割合における官能評価を行った結果, 粕漬けによりアンモニア臭が低減されことが示唆された。また, 砂糖添加によりアルコール臭が感じられ, 最もアルコール臭が強かったのは砂糖添加割合が10%の時であった。色差を調査した結果, 粕漬けにより暗色化した。砂糖添加割合が高い程, 暗色化傾向が見られた。現在, 物理的特性ならびに化学的特性分析を実施している。

## D-10 酵素処理による軟化豚肉の加熱過程の粘弾性変化 ○梶原 翼, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

【目的】容易に食肉を軟化できる方法として, プロテアーゼを含む食材を利用した軟化調理法が増加している。しかし, 酵素処理及び加熱条件が食肉の食感(例えば, 破断応力と粘弾性)の経時変化に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。また, 食肉の硬さの測定では, 測定時に試料を破壊するため, 経時変化を測定することは困難である。そこで本研究では, 自作の動的粘弾性測定装置を用いて, 酵素処理した豚モモ肉の加熱過程における粘弾性変化を連続的に測定する方法を検討した。

【方法】市販の豚モモ肉を立方体状に整形し, パパイン溶液と共に真空包装し, 20℃で任意の時間, 酵素処理を施した。動的粘弾性測定装置の試料台に加熱用ヒータを取り付けたアルミニウム製容器を設置した。この容器に蒸留水と酵素処理後の試料を入れ, 茹で加熱を行いながら試料の動的粘弾性測定を行った。動的粘弾性測定では, 試料に対して圧縮の正弦波振動を印加し, 得られたリサージュ図から動的粘弾性パラメータ( $G'$ ,  $G''$ ,  $\tan \delta$ )を算出した。さらに, 同条件で軟化・加熱処理を施した試料の破断応力の経時変化を材料試験機(島津製作所 EZ-SX500N)により測定した。

【結果】酵素処理時間の増加に伴い, 試料の $\tan \delta$ は増加した。加熱時間の増加に伴い,  $\tan \delta$ は減少した後, 緩やかに増加した。加熱時間毎の試料の $\tan \delta$ と破断応力との間には, 良好な負の相関が認められた。以上の結果より, 動的粘弾性測定により, 加熱過程における酵素処理した軟化豚肉の粘弾性変化を連続的に測定できること, また,  $\tan \delta$ と破断応力との間に一定の関係があることが明らかになった。



D-11 蒸気吹き込み法による香辛料香気成分の食品中への無菌的導入  
○村上亮介, 川井清司, 村川秀樹<sup>1</sup>, 吉田充史<sup>1</sup>, 羽倉義雄  
(広島大院・生物圏, <sup>1</sup>オタフクソース(株))

【目的】蒸気吹き込み法とは、水と分散相となる精油の共沸混合蒸気を単孔ノズルより連続相中に吹き込むことでエマルジョンを調製する方法である。吹き込まれた共沸混合蒸気は、連続相中で凝縮しエマルジョン化する。本研究では蒸気吹き込み法により、香辛料の香気成分を共沸混合蒸気として抽出し、食品へ無菌的に導入する新たな食品加工技術について検討を行った。具体的には、蒸気吹き込み法の各過程において香辛料に付着した菌の生存・移動を確認し、無菌的な操作の実用性を検討した。

【方法・結果】実験試料には、未殺菌の粉末状香辛料（コリアンダー、ブラックペッパー、ターメリック）を用いた。自作の蒸気吹き込み装置を用い、試料を入れたフラスコ内に水蒸気を導入し、水蒸気蒸留の原理により香辛料の香気成分である精油を揮発させた。水蒸気と精油蒸気の混合蒸気を連続相となる滅菌生理食塩水中に単孔ノズルより吹き込み、香気成分含有モデル食品を調製した。調製後のモデル食品および、蒸気吹き込み操作前後の香辛料の微生物検査を行った。

蒸気吹き込み操作前の原料の発芽菌数はコリアンダーで  $1.8 \times 10^5$  cfu/g、ブラックペッパーで  $3.6 \times 10^6$  cfu/g、ターメリックで  $5.2 \times 10^6$  cfu/g であった。蒸気吹き込み法により調製したモデル食品では、3種類いずれの香辛料を用いた場合でも、菌は検出されなかった。従って、香辛料に付着している菌は混合蒸気の輸送管を通して連続相へ移動しないことが明らかになった。以上の結果より、蒸気吹き込み法により香辛料の香気成分を無菌的に食品に導入できることが明らかになった。

D-12 木村式自然栽培農地由来の清酒酵母にみられた t-PA 放出作用  
○高橋千里, 大杉忠則<sup>1</sup> (倉芸大院・機能物質, <sup>1</sup>倉芸大・生命)

【目的】近年、清酒の多様化、独自性開拓を目的に花、樹皮、土壌などの自然から清酒酵母の分離が試みられている。しかし、酸味や香気成分といった性質の差などの事例に限られることが多い。本研究では既存清酒酵母とは異なった生理的機能性を持った清酒の醸造を目的とした。

【方法】岡山県倉敷市にある木村式自然栽培農地のレンゲソウより酵母を分離した。分離には選択培地、同定は rDNA ITS-5.8S 領域の増幅とアガロースゲルによる電気泳動、および 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列シーケンスにより行った。分離した酵母を用いて総米 200 g の小仕込み試験を行った。醸造物を 3種類のイオン交換樹脂 (IRC76-AG, IR120B-H, ORLITE P-8) を用いて分画したのち凍結乾燥し、各分画の 40 倍濃縮液を得た。各分画濃縮液を、Hela 細胞に添加し t-PA 活性を協会酵母と比較した。

【結果】約 500 のサンプル中から *Saccharomyces cerevisiae* は 1 株のみ発見された。この酵母 (S-41) と、比較対象とした協会酵母 K-701 の醸造物を得た。アルコール度はそれぞれ 16.3%, 15.2% となった。醸造物の各分画を添加した HeLa 細胞培養と、フィブリン平板測定を行った結果、S-41 の R 区分 1 倍液では  $32.69 \text{ mm}^2$ 、2 倍濃縮液では  $13.08 \text{ mm}^2$ 、C 区分 2 倍濃縮液では  $13.61 \text{ mm}^2$  の溶解がみられた。K-701 では C 区分 4 倍希釈液では  $9.42 \text{ mm}^2$ 、16 倍希釈液では  $32.69 \text{ mm}^2$  であった。S-41 の R 区分 2 倍濃縮液では、6~48 時間にかけて経時的にフィブリン溶解活性は上昇した。さらに細胞数を計測した結果、細胞数当りの活性は高くなっており、t-PA 活性は亢進されたと考えられる。

E-1 植物に見出されたグリコシルイノシトールホスホセラミド特異的ホスホリパーゼ D の性質と分布

○辻 和樹, 藤原美奈, 伊藤 葵, 喜田孝史, 今井博之<sup>1</sup>, 小暮健太郎, 田中 保  
(徳島大・薬, <sup>1</sup>甲南大・理)

【目的】我々はキャベツ脂質をホモジナイズすると,  $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸を含有するフィトセラミド-1-リン酸 (PCIP) が生成することを見出している。この PCIP は, 植物における代表的スフィンゴリン脂質であるグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) がホスホリパーゼ D (PLD) 様式で加水分解されることで生じることも明らかにしている。今回, 我々はこの新規酵素活性 GIPC-PLD の細胞内分布などの酵素的性質を調べると共に植物界における分布についても調べた。

【方法・結果】植物組織のホモジネートより 13000×g の沈殿画分を得た。この膜画分を酵素源とし, 基質の GIPC と反応させた。反応混液より PCIP を単離し, 常法により定量を行い, 酵素活性を算出した。10 種の植物について調べた結果, GIPC-PLD 活性はシロイヌナズナを含むアブラナ科植物の根で高く検出され, キャベツでは外側の球葉よりも内側の若い球葉で高く検出された。また, マメ科である緑豆ではモヤシの段階で最も高い GIPC-PLD 活性を示し, その後成長に伴って減少した。膜画分の GIPC-PLD 活性は, 超音波処理を行うことで可溶性画分に移行することから, ゆるく膜に結合していると考えられた。以上より本酵素は, 植物の成長に関わっている可能性が考えられた。

E-2 *SHABONDAMA1* can regulate stomata cell cycle and growth in *Arabidopsis thaliana*

○Amit Kumar Dutta<sup>1,2</sup>, Tsuyoshi Nakagawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Int. Cen. Sci. Res. Shimane Univ., <sup>2</sup>UGSAS. Tottori Univ.)

In plants, Stomata are specialized leaf epidermis minute aperture structures surrounded by paired facing epidermal guard cells, where the size of the pore can be regulated based on turgor-driven changes in each guard cell. The *shabondama1* (*sha1*, a single recessive mutant) found in *Arabidopsis thaliana* mutagenized by EMS, showed disruption of guard mother cell development and undifferentiated stomata without pore. *SHA1* encode a DEAD/DEAH box helicase family protein. The *sha1* phenotypes were appeared 29 and 21 percent of total stomata of *sha1* mutant plants in cotyledons and leaves, respectively. Loss of *SHA1* function showed severe stem growth reduction during development and the height of mature plant were in average about 40% of wild type in optimum growth environment. The size of single guard cells area in *sha1* are relatively larger than WT guard cell and spherical shape. Defective *sha1* guard cells are found to be uninucleate, and 4C confirming that the *sha1* has cell cycle defect. *SHA1* is nuclear protein function in the stage of meristemoids to guard mother cell during development of guard cells.

E-3 Dual Site Gateway Binary Vector (DSpGWB) を用いて植物細胞内で 2 遺伝子を同量発現させる  
○横山頌弥, 西村浩二<sup>1</sup>, 中川 強<sup>1</sup> (島根大・生資科, <sup>1</sup>島根大・総科研セ)

アグロインフィルトレーション法は、シリンジを用いて生きた植物の葉にアグロバクテリウムを強制的に注入することにより、植物細胞に遺伝子を導入する方法である。この方法は、植物の葉のみにアグロバクテリウムを感染させ、導入遺伝子の一過的な発現を促す系であり、短期間で解析を行うことができるという利点を持っている。我々は、Gateway クローニングの技術を利用して 2 遺伝子を任意の組み合わせでクローニングできる Dual site Gateway binary ベクター (DSpGWB) を開発してきた。本研究では、2 種類の蛍光タンパク質をモデルとし、単一の蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだベクター (sGFP と mRFP, もしくは eCFP と eYFP) を有するアグロバクテリウム 2 種を混合して導入する方法 (従来の方法) と、Dual site Gateway binary ベクター [2つの蛍光タンパク質遺伝子 (sGFP と mRFP, もしくは eCFP と eYFP) を組み込んだもの] を有するアグロバクテリウム 1 種を用いて導入する方法 (新たな方法) とを比較し、同一細胞での発現効率や、個々の細胞における導入 2 遺伝子発現量の割合を検討した。また、ウエスタンブロッティングを用いた解析により、DSpGWB における 2 遺伝子の発現量の検討もおこなった。

今回は、蛍光輝度の測定・ウエスタンブロッティングの 2 つの観点から、Dual site Gateway binary ベクターを用いたアグロインフィルトレーションの系により、2 遺伝子を同レベルで発現させることができることを報告する。

E-4 Construction of new Gateway binary vector series of organelle localizing reporter  
○Sultana Mst Momtaz<sup>1,2</sup>, Amit Kumar Dutta<sup>1,2</sup>, Tsuyoshi Nakagawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Int. Cen. Sci. Res. Shimane Univ., <sup>2</sup>UGSAS. Tottori Univ.)

Gateway binary vectors have proved to be particularly useful for plant transformation studies where traditional cloning methods would have been prohibitively time consuming and laborious. We have developed new series of Gateway binary vectors pGWB4XX, pGWB5XX for plant transformation. For construction, highly efficient Gateway binary vectors with easy cloning of genes of interest pGWB400 and pGWB500 were used as backbone harboring the selection markers kanamycin and hygromycin resistance genes respectively. This new vector equipped with organelle localizing fluorescent protein such as sGFP and tagRFP for detecting fluorescent signal in restricted subcellular location i.e. peroxisome (Px), nucleus (NLS), endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria (Mt) within the plant cell. Transient expression experiment was successfully assayed by particle bombardment with CaMV35S promoter using Japanese leek to confirm localization of organelle localizing fluorescent protein. To compare sensitivity of new vector with traditional vector carrying normal fluorescent protein, I incorporated two specific and weak promoters i.e. p1PKβ1 (pyruvate kinase weakly expressed in leaves), pENTR-MYB21p:MYB21 (MYB21 weakly expressed in flower) with newly developed vectors by the Gateway LR reaction for consecutive gene expression, promoter activity detection and subcellular localization. These were used for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* for expression observation under confocal microscope. Gateway cloning system developed in this study is highly efficient and serves as a high-throughput platform for stable transformation in plants for functional genome research.

E-5 イミダゾールジペプチドの定量分析のための微生物酵素の探索  
○橋本佳恰, 村松久司<sup>1</sup>, 島村智子<sup>1</sup>, 永田信治<sup>1</sup>  
(高知大・土佐さきがけプログラム, <sup>1</sup>高知大・農)

【目的】イミダゾールジペプチドの一種であるカルノシンとアンセリンは脊椎動物の骨格筋中に広く分布しており, 特にカツオやマグロ, 鶏の胸肉及び鯨などの筋肉に多く含まれている。カルノシンとアンセリンの機能性として抗酸化活性, 抗疲労効果, 老化防止などが報告されている。本研究では, イミダゾールジペプチドの定量分析に役立つ酵素を探索するためにカルノシン資化性微生物の単離を試みた。

【方法・結果】微生物分離源である土を 0.1 g ずつ 1 ml の生理的食塩水に懸濁し, 上清み液 5 µl を 2 ml のカルノシン液体培地 (0.5% カルノシン, 0.2% リン酸水素二カリウム, 0.2% リン酸二水素カリウム, 0.2% NaCl, 0.01% 硫酸マグネシウム, 0.01% 酵母エキス; pH 7.0) に加えて 30°C で 3 日間振とう培養した。白濁した培養液を生理的食塩水で 1000 倍希釈して同じ組成のカルノシン寒天培地に塗布し, 30°C で一晩静置培養して形成したコロニーを単離した。この方法で, 34 ヶ所で採取した土から 28 菌株のカルノシン資化性微生物を分離した。次に, 分離株をそれぞれカルノシン液体培地で培養して 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し, 氷上で超音波破碎して遠心分離した上清を粗酵素液とした。粗酵素液中の酸化酵素活性の測定は, 10 mM カルノシン, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2), 50 µg/ml 4-アミノアンチピリン, 10 U/ml ペルオキシターゼ, 0.3 mg/ml ADOS から成る反応液に粗酵素液を加えて開始した。反応液を 30°C で加温し, 一定時ごとに 542 nm の吸光度を測定した。その結果, 単離した 28 菌株のカルノシン資化性微生物のうち, 8 菌株の粗酵素液から酸化酵素活性が検出された。

E-6 *spaCBA* 遺伝子群に着目した *Lactobacillus* 属細菌 (乳酸菌) の比較ゲノム解析  
○森田英利, 藤 英博<sup>1</sup> (岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>九大・生体防御医学研)

【目的】乳酸菌において最大の菌種で構成される *Lactobacillus* 属は, 菌種菌株レベルで多くのゲノム情報が公開されてきた。従来, 乳酸菌は線毛をもっていないと考えられていたが, *L. rhamnosus* の *spaCBA* がコードするのは線毛タンパク質であり付着性に関与していることが明らかにされた (Lebeer, Appl Environ Microbiol, 2012)。本研究では *L. casei* グループの全ゲノム配列決定を行い, *spaCBA* に着目して他の *Lactobacillus* 属細菌との比較ゲノム解析を行った。

【方法・結果】 Sanger sequencing (3730xl DNA sequencers) と 454 pyrosequencing (GS-FLX sequencers) を組み合わせて, 公的菌株保存センターから分譲された *L. casei* ATCC 393 株, *L. paracasei* JCM 8130 株, *L. rhamnosus* ATCC 53103 株と, 本研究で市販の発酵乳から生菌分離された *L. paracasei* COM0101 株のゲノム配列を決定した。その結果, *Lactobacillus* 属で *spaCBA* を有するのは *L. casei* グループのみの特徴であった。これは, *Lactobacillus* 属の中で *L. casei* グループが分化した後, *spaCBA* 遺伝子群が水平伝播して *L. casei* グループゲノムに入り込み, その後, 種の分化が起きて *L. casei* グループに特異的な遺伝子群になったと推察される。COM0101 株では, *spaC* 遺伝子の途中で終始コドンが入って ORF が 2 つに分断されていた。ATCC 53103 株では negative 染色で線毛を確認でき, 本菌株の非常に強い付着性の機序は線毛の adhesion によるものであった。以上, *L. casei* グループの *SpaCBA* (線毛) の有無, すなわち本遺伝子群の保持は, 菌種特異的というより生育環境 (哺乳動物消化管とか乳環境など) によると考えられた。

E-7 分裂酵母の分泌経路において機能する Gmp 複合体の機能解析  
○大山拓朗, 寺島知里, 児子隆英, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】 ゴルジ体は分泌経路内のオルガネラの一つであり, ER から輸送されてきたタンパク質への糖鎖修飾, 細胞膜やエンドソームへの選別輸送を行う機能を有している。ゴルジ体の層板間やゴルジネットワークには, 配列内に coiled-coil 領域を含んだタンパク質が存在し, ゴルジ体の構造保持や小胞の係留, 層板の分裂や融合に関与していることが明らかになっているが, 詳細な機構に関しては不明な部分が多い。ゴルジ体内の輸送に関与しているタンパク質を同定する目的で, ゴルジ体画分の TOF-MS 解析を行った。網羅的に同定されたタンパク質群の中から配列内に coiled-coil 領域を持つ機能未知のタンパク質 Gmp1, Gmp2, Gmp3, Gmp4 を取得した。本研究では, 互いに相同性が高く, coiled-coil 領域を 3 ヶ所有している点から Gmp1, Gmp3, Gmp4 に着目し研究を行った。

【方法・結果】 それぞれの破壊株を取得し, 表現型解析した結果, 分泌糖タンパク質の糖鎖修飾異常を示すことが明らかになった。また Gmp ファミリーを過剰発現させると細胞内の数ヶ所に集約したドットが観察された。各オルガネラマーカースと共発現させたところ, 後期分泌経路の細胞小器官エンドソームに局在する, Vps35 と Gmp1 の局在が一致し, Gmp1 が後期分泌経路で機能することが推察された。さらに, Yeast two hybrid 法の結果から Gmp ファミリーが互いに直接相互作用していることが分かり, Gmp ファミリーが複合体を形成していることが推定された。また Gmp1 の局在は, 微小管合成阻害剤の処理や窒素飢餓培地による栄養の制限により細胞質中に拡散することが分かった。

E-8 分泌経路で機能するレクチン様タンパク質 Emp43 の解析  
○神谷勇輝, 川口宗馬, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

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

【方法・結果】 Emp43 の局在を観察したところ, Emp43 は ERES (ER Exit Site) やゴルジ体とも異なるドット状区画に局在することがわかった。*emp43* 欠損株の表現型を調べるため, 様々な金属イオンについて調べたところ, Mg<sup>2+</sup>感受性を示すことがわかった。また死亡時の形態観察を行ったところ, 細胞壁合成異常株で見られるような独特の細胞溶解を示すことが明らかとなった。他の Mg<sup>2+</sup>感受性株と比較したところ, *emp43* 欠損株は Mg<sup>2+</sup>添加後に素早い致死性を見せることがわかった。*emp43* 欠損株の Mg<sup>2+</sup>感受性の原因となるようなカーゴを探索するため, 分裂酵母過剰発現ライブラリーを用いて, *emp43* 欠損株の Mg<sup>2+</sup>感受性を相補する遺伝子を探索したところ, いくつかの遺伝子が取得できた。

E-9 Identification of coenzyme Q produced in various natural yeasts  
○Jomkwan Jumpathong, Ikuhisa Nishida, Kohei Nishino, Yasuhiro Matsuo,  
Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai  
(Fac. Life Environ. Sci. Shimane Univ.)

【Purpose】 Coenzyme Q (CoQ) is an essential component that functions as an electron carrier in the electron transport system in various organisms. CoQ type is defined by the number of isoprene units in the side chain of its structure. Humans exclusively produce CoQ<sub>10</sub>, which retains 10 units of the isoprene side chain. Aiming for the industrial use of CoQ<sub>10</sub> production, we sought to find high CoQ<sub>10</sub> producing yeasts isolated from natural sources. We also aimed to identify CoQ types such as CoQ<sub>11</sub> produced by various yeasts.

【Method and result】 Crude lipid extracts obtained from autoclaved yeasts were analyzed by normal phase TLC and fraction of CoQ was obtained. It was further analyzed by HPLC with ethanol as a solvent. From several isolated natural yeasts, strain #65 was defined as the highest natural CoQ<sub>10</sub> producer with the amount 5.03 times higher than that of *Schizosaccharomyces pombe*, a well-known CoQ<sub>10</sub> producer. In general, organisms produce more than one type of CoQ with close numbers of isoprene units. In many of the yeasts or yeast-like fungus isolates, compounds eluted later than CoQ<sub>10</sub> retention time were detected by HPLC. To identify the types of these products, they were assessed by LC/MS to determine the *m/z* value specific to each compound. There was two more *m/z* value increased than CoQ<sub>10</sub>. As a result of MS/MS analysis, the increased value was identified as partially hydrogenation in the side chain of CoQ<sub>10</sub>. Thus, we found that some yeasts produced CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>(H<sub>2</sub>).

E-10 分裂酵母 *pot1 rad9* 二重変異株の Fudr 感受性機構の解析  
○南結香子, Hossain M. Shamim, 田中大樹, 上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】ある種のがん細胞では高い頻度で環状染色体が見つかる。このようながん細胞において環状染色体の維持に必要な蛋白質を特異的に阻害することができれば、このようながん細胞を特異的に殺せる可能性がある。このことから環状染色体の維持に関係する蛋白質は、抗がん剤の分子標的と成り得る。当研究室では、分裂酵母をがん細胞の特徴を持たせたがん細胞ミミックモデル生物として用いて、がん細胞のあらたな脆弱性の発見を試みている。これまでに分裂酵母の DNA 修復に関係しているヘリケース Rqh1 が環状染色体の維持に必要なことを発見している (南部ら, Mol. Cell. Biol. 2013. p1175)。本研究では、Rqh1 以外に環状染色体の形成や維持に必要な遺伝子産物の探索を試みた。

【方法・結果】分裂酵母のテロメア維持因子 *pot1* を破壊するとテロメアが分解される。その後、染色体内で末端融合が起こった環状染色体を持った株が生き残る。環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子は、*pot1* と合成致死になることが予想される。そこで致死になる遺伝子を探した結果、DNA ダメージチェックポイントの活性化に必要な *rad9* と *pot1* の二重変異株が Fudr (2'-deoxy-5-fluoro-uridine) 存在下において致死になることを発見した。加えて、*rad9* と同様に 9-1-1 複合体を形成している *hus1* や *rad1* も *pot1* との二重変異株としたとき、Fudr 感受性となることがわかった。本研究では、Fudr が細胞周期のどの段階において作用しているかを調べた。また、*pot1 rad9* 二重破壊株が合成致死を抑圧する変異株を二種類取得したので、それらの結果についても紹介したい。

E-11 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 Bub1 と Bub3 の制御機構の解析  
○野路佳佑, 大宮早貴, 酒井智健, 山家雅之, 川向 誠, 松尾安浩  
(島根大・生資科)

分裂酵母でプロテインキナーゼ A (Pka1) は有性生殖, 塩ストレス, カルシウムシグナル, 糖新生などに関与していることが知られている。当研究室では, *pkal1Δ* が微小管重合阻害剤に感受性を示し, その解析から, スピンドルチェックポイント (SAC) を制御していることを見出した。スピンドルチェックポイントは, 有糸分裂期中期から後期への移行の際に, 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。SAC 因子はキネトコアに局在し, 活性化される。その局在は三層の階層構造に依存しており, 第 2 階層に位置する Bub1 と Bub3 は, 複合体を形成している。本研究では, Pka1 による Bub1-Bub3 の制御機構の解明することを目的とした。

Pka1 がタンパク質レベルで相互作用するかを酵母ツーハイブリッド法によって解析した。その結果, Pka1 は Bub1 と相互作用し, Bub3 とは相互作用しなかった。*pkal1Δ* で, Bub1 と Bub3 のキネトコア局在を解析したところ, Bub1 のキネトコア局在が低下していた。そこで, Pka1 が Bub1 を直接リン酸化しているかを解析したところ, 有糸分裂期において, 野生株で Bub1 のバンドシフトがみられるのに対して, *pkal1Δ* では, バンドシフトがほとんど見られなかった。以上のことから, SAC が活性化時に Pka1 が Bub1 と相互作用し, リン酸化することでキネトコア局在を制御していることが示唆された。

E-12 転写因子 Rst2 の高発現による細胞への影響  
○竹中航平, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資科)

分裂酵母のプロテインキナーゼ A である Pka1 は, 活性化時に核内に移行し, 下流因子をリン酸化制御している。Pka1 の標的の 1 つとして転写因子 Rst2 がある。Rst2 は, 減数分裂への移行では *stell1*, グルコース制限下では *fbp1* の発現を制御している。また網羅的な解析で Rst2 の高発現が, 細胞生育に影響をおよぼすことが報告されているが, その詳細は解明されていない。そこで, 本研究では *rst2* 遺伝子の高発現による細胞への影響を明らかにすることを目的とした。

*nmt1* プロモーター下で, *rst2* 遺伝子を高発現させた形質転換体(*nmt1-rst2*)を解析したところ, 明らかな生育の阻害がみられた。生育阻害の原因を明らかにするために, 細胞形態を観察したところ, 形態異常を示していた。細胞形態の異常は, 隔壁形成が増加した細胞と形態が丸くなったものがみられた。そこで, 隔壁を形成した細胞の割合を解析したところ, vector 株では約 5%であったが, *nmt1-rst2* 株では, 約 40%以上と大幅に増加していた。また, *nmt1-rst2* 株では, 約 10%で, マルチセプタムを形成している細胞が観察された。形態が丸くなったものを解析したところ, 形態形成に重要な微小管が湾曲していることが明らかになった。次に, *nmt1-rst2* 株での DNA 含量を解析した。その結果, *rst2* を高発現させて 48 時間の細胞において, DNA 含量が増加している細胞がみられた。

以上の結果から, *rst2* 遺伝子の高発現は細胞周期の有糸分裂期に影響をあたえることが示唆された。

## 代謝改変した大腸菌での“非天然化合物”1,3-ブタンジオールの生産

片岡尚也（山口大院・創科）

近年、低炭素社会実現のため、化石資源から産出される輸送燃料や各種化学物質・先端材料などの化成品を再生可能資源であるバイオマスから生産するバイオリファイナリー研究が世界で展開されている。これまでに、遺伝子組換えが容易、ゲノム情報が完備、代謝経路がよく知られている、増殖速度が速い、といった利点を持つ大腸菌等を宿主として分子育種することで、乳酸やエタノールといった一次代謝産物、テルペン類に代表される二次代謝産物の生産が報告されている。しかしこれらは、生物が天然に生産する報告例のある“天然化合物”であり、代謝経路が存在するものである。生産対象を“非天然化合物”にまで拡大することができれば、バイオプロダクションの幅を格段に向上させることができる。しかしそのためには、新規合成代謝経路の設計と、その細胞内での機能的な構築が必要になる。本講演では、我々のグループが構築に成功した“非天然化合物”1,3-ブタンジオール (1,3-BD) 生産大腸菌と代謝工学による生産の向上について紹介したい。

### 1. 1,3-BD 生産大腸菌の構築

1,3-BD は、炭素数4の光学活性ジオールであり、産業用ケミカルの原料やβ-ラクタム系抗生物質の重要中間体として広く用いられている。また、合成ゴムの中間体であるブタジエンに容易に化学変換できることから、合成ゴムのバイオベース化の観点からも注目されている化合物である。再生可能資源であるグルコースから1,3-BDを生産するべく、*Ralstonia eutropha* の持つポリヒドロキシ酪酸生合成経路と *Clostridium* 属細菌の持つブタノール発酵経路を構成する酵素の遺伝子を様々に組み合わせることで複数の1,3-BD合成代謝経路を設計し、大腸菌に導入、1,3-BD生産を評価した。その結果、*R. eutropha* 由来 *phaAB*、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 由来 *bld* を発現させた際に最大の1,3-BD生産が確認された。

### 2. 代謝工学による1,3-BD生産の向上

設計した1,3-BD合成代謝経路では、1,3-BDは、アセチル CoA を中間代謝物として3段階の還元反応（うち1反応はNADPH、残りの2反応はNAD(P)Hを還元力とする）を経ることで生成される。そのため、生産の効率化の戦略として、アセチル CoA 及び還元力供給の強化が有効であると考えられた。PdhR は、ピルビン酸脱水素酵素複合体をコードする *pdh* オペロンの負の転写制御因子であり、大腸菌の *pdhR* 欠損変異株は、アセチル CoA 及び NADH 供給が増加した表現型を示すことが明らかにされていた。そこで、*pdhR* 欠損変異株 ( $\Delta pdhR$  株) を作製し1,3-BD生産を評価した。その結果、 $\Delta pdhR$  株での1,3-BD収量は、親株と比較して1.24倍に増加した。次いで、もう一つの還元力であるNADPH供給の強化が1,3-BD生産に及ぼす影響を評価した。 $\Delta pdhR$  株での1,3-BD生産時、溶存酸素は低い値に保たれていたことから、培養を通して微好気状態であると考えられた。大腸菌は、微好気条件下ではピルビン酸をアセチル CoA へ変換する際に還元力をギ酸として放出する。そこで、ギ酸からNADPHを生じるギ酸脱水素酵素 (Fdh) をタンパク質工学的に作製し、1,3-BD合成代謝経路と共に  $\Delta pdhR$  株で発現させた。その結果、Fdhの共発現により1,3-BD収量はさらに1.2倍に増加した（親株と比較して1.55倍）。



## F-1 耐熱性 *Gluconobacter* 属酢酸菌における膜結合型グリセロール脱水素酵素の過剰発現

○尾崎聖士朗<sup>1</sup>, 鳥飼敬弘<sup>1</sup>, 松谷峰之介<sup>2</sup>, 片岡尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師寿治<sup>1,2,3</sup>,  
松下一信<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創科, <sup>3</sup>山口大・微研セ)

【目的】ビタミンCの前駆体を作る酢酸菌の一種 *Gluconobacter* は、アルコール脱水素酵素 (ADH)、アルデヒド脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素 (GLDH) など多くの細胞膜結合型酵素をもつ。これらは呼吸鎖とともに機能することで、生育に必要なエネルギーを産み出す。GLDH は多くの糖アルコール (Glycerol, D-Sorbitol, D-Arabitol, etc.) や D-Gluconate を酸化する。つまり本酵素は非常に広い基質特異性を持つユニークな酵素であり、その酸化生成物は産業的に有用なものが多い。GLDH は、ある法則に従う特定の構造を有する基質を幅広く酸化するが、最近、この法則に合わない L-Ribose を酸化することを見い出した。本酵素がこの新しい基質をどのように認識するのかを明らかにするため、構造解析を行うべく、酵素精製を試みている。

【方法・結果】耐熱性 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株の野生株は ADH を大量につくるため、GLDH の精製の妨げとなる。そこで、GLDH 精製を容易にするために、ADH 欠損株 ( $\Delta adhAB$ ) を構築し、GLDH の精製を行った。その結果、精製された GLDH にはグルコース脱水素酵素の混入が示唆された。さらに精製を容易にするため、GLDH 過剰発現プラスミドを構築し、ADH 欠損株を形質転換した。この組み換え *Gluconobacter* 株の膜画分は親株の4倍の GLDH 比活性を持っていた。この菌株を用いて GLDH の精製を行っているので、その結果を合わせて報告する。

## F-2 コリネ型細菌のグルタミン酸発酵におけるキノール酸化酵素の役割

○那須裕介<sup>1</sup>, 片岡尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師寿治<sup>1,2,3</sup>, 和田大<sup>4</sup>, 横田篤<sup>4</sup>,  
松下一信<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創科, <sup>3</sup>山口大・微研セ, <sup>4</sup>北大院・農)

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* は界面活性剤の添加やビオチンの制限によってグルタミン酸を培地中に放出することが知られている。また、グルタミン酸生産は通常、好通気条件下で行われるのにもかかわらず、呼吸鎖とグルタミン酸生産の関係は未だ不明な点が多い。本研究では呼吸鎖とグルタミン酸生産の関係を解明するため、*C. glutamicum* において主にプロトン駆動力を生成するキノール酸化酵素の関与を解析した。

【方法】*C. glutamicum* ATCC13032 を親株としてキノール酸化酵素欠損株  $\Delta Cytbd$  ( $\Delta cydAB$ ),  $\Delta Cytbc_1$  ( $\Delta qcrCAB$ ) を構築し、ビオチン制限条件下でグルタミン酸発酵培養を行った。また、ビオチン添加の影響を解析するため、ビオチンを発酵培地に添加せず初期植菌量を低下することで前培養液から本培養液へのビオチンの持ち込みを抑え、ビオチン枯渇条件として培養を行った。

【結果】通常のビオチン制限条件下において、 $\Delta Cytbd$  は親株と同様の生育を示し、グルタミン酸を生産した。一方で、 $\Delta Cytbc_1$  はグルタミン酸を生産せず代わりに有機酸を蓄積した。加えて、親株の1.6倍ほどの比糖消費速度を示した。この表現型は、*C. glutamicum* ATCC14067 を親株として構築された F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素活性低下株 (F-172-8 株) で観察されており、F-172-8 株においては、ビオチンの枯渇、初期植菌量の低下によりグルタミン酸生産が復帰していた。そこで、同様にして、 $\Delta Cytbc_1$  を解析したところ、グルタミン酸の生産が復帰した。

F-3 プラスミドキュアリングが好熱菌にもたらす有用効果  
水野 樹, 八木寿梓<sup>1</sup>, 大城 隆, ○鈴木宏和  
(鳥取大院・工, <sup>1</sup>鳥取大・工・GSC)

【目的】好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 は大型プラスミド pHTA426 を有する。我々は、本好熱菌を宿主とした遺伝子発現ツールの開発を進めているが、その一環として MK244 株 (HTA426 派生株) から pHTA426 をキュアリングした MK633 株を構築した。本会では、MK633 株の有用特性を総括した上で、その有用特性がどのような原理で付与されたのかを考察する。

【実験と結果】MK633 株は MK244 株よりも最大菌体密度、異種タンパク質生産レベル、形質転換効率、プラスミドの維持安定性において優れていた。その一方で、自発的変異率や増殖速度は同等であった。つまり、pHTA426 のキュアリングによって多くの有用特性が *G. kaustophilus* に付与された。

【考察】上述した有用特性のうち、形質転換効率とプラスミド安定性の向上については、pHTA426 にコードされていた制限修飾系がなくなったことで説明できた。最大菌体密度と異種タンパク質生産レベルの向上については、プラスミドの複製および維持に要するエネルギー負荷の軽減が理由と考察している。*G. kaustophilus* の染色体 (3.54 Mb) に対して pHTA426 (47.9 kb) の長さは 1.3% に過ぎず、pHTA426 には推定プラスミド分配遺伝子も含まれていることから、そのコピー数は 1 から 2 と推察できる。しかし、ヌクレオチドは高温下で不安定性であることから、好熱菌においては、維持すべき DNA が微細に増加しただけでも、高い負荷がかかるのかもしれない。本考察は、好熱菌ゲノムサイズが中温菌ゲノムサイズよりも概して小さい事実によっても支持された。

F-4 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における異種遺伝子発現に有用な新規プロモーターの探索  
○水野 樹, 村田くるみ<sup>1</sup>, 奥村友太<sup>1</sup>, 八木寿梓<sup>2</sup>, 大城 隆, 鈴木宏和  
(鳥取大院・工, <sup>1</sup>鳥取大・工, <sup>2</sup>鳥取大・工・GSC)

【目的】我々は、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 を宿主とした遺伝子発現ツールの開発を進めており、これまでに推定マルトース代謝遺伝子群のプロモーター ( $P_{gk704}$ ) が本好熱菌内における遺伝子発現に有用であることを見出した。しかしながら、本プロモーターのより詳細な特性 (温度依存性など) については明らかにされておらず、また本プロモーターは大腸菌内においても機能してしまうらしく、その下流に (推定) 毒性遺伝子がクローニングできない。本研究は、 $P_{gk704}$  プロモーターの解析および改良と、代替プロモーターの探索を目的とした。

【実験と結果】以前に構築した *Escherichia coli*-*Geobacillus* シェトルプラスミドの  $P_{gk704}$  下流に、黄色蛍光タンパク質の遺伝子をクローニングした。大腸菌内と HTA426 株内において、得られたプラスミドから発現する黄色蛍光タンパク質量を測定したところ、 $P_{gk704}$  は大腸菌内でも高度に機能すること、ならびに好熱菌内では 60°C よりも 50°C で高度に機能することが示唆された。大腸菌における機能性が抑制された改変プロモーターの取得を目的とし、本プラスミドの  $P_{gk704}$  上流および下流領域を部分的に削除したプラスミドを構築した。得られたプラスミドからの大腸菌および好熱菌内における黄色蛍光タンパク質発現を調べたところ、大腸菌内発現が抑制され、かつ好熱菌内での発現がおよそ維持された改変プロモーターを同定できた。より有用なプロモーターを探索するために、*G. kaustophilus* HTA426 において高発現する遺伝子を RNA シークエンスにより解析した。

F-5 好熱菌転位因子の転位反応を誘発する因子は何か  
○田摩実咲, 竹谷達成<sup>1</sup>, 八木寿梓<sup>2</sup>, 大城 隆, 鈴木宏和  
(鳥取大院・工,<sup>1</sup>鳥取大・工,<sup>2</sup>鳥取大・工・GSC)

【目的】以前に我々は, T7 RNA polymerase 遺伝子を含むプラスミド pGKE79-*T7pol* を構築し, その自然変異発生によって変異型プラスミド pGKE79-*T7polE1* を得た。興味深いことに, pGKE79-*T7polE1* をもった好熱菌 (*Geobacillus kaustophilus* HTA426) 細胞内では複数の転位因子が転位するが, そのような現象は pGKE79-*T7pol* をもった好熱菌では見られない。本研究では, 好熱菌において起こる転位反応を詳細に解析した。

【実験】転位因子の転位は, *G. kaustophilus* MK536 を用いて分析した。MK536 株は, 本来の *pyrF* 遺伝子を欠失しており, その一方で非機能的プロモーターと連結した *pyrF* 遺伝子全長を染色体上にもつ。結果として MK536 株はウラシル要求性を示すが, 転位因子が *pyrF* 遺伝子全長の上流に挿入されると, 極性効果により *pyrF* 遺伝子が発現するため, ウラシル原栄養性を示す。そこでウラシルを含まない最少培地中で生育するコロニー数を全細胞数で割った値を転位頻度と定義し, MK536 株などにおける転位因子の転位頻度を分析した。

【結果と考察】MK536 [pGKE79-*T7polE1*]における転位は, 60–65°C において高頻度だった。ウラシル原栄養性株は保温 2 日目以降から出現したことから, 本転位は誘導的と考えられる。MK536 [pGKE79-*T7pol*]では, 有意な転位は見られなかった。よって転位は pGKE79-*T7polE1* に依存すると思われたが, MK536 株においても同程度の転位が見られた。発表では, 転位の誘発因子についても考察する。

F-6 海藻分解性好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 による海藻分解と遺伝子改変  
○富永有里絵, 藤井健太, 八木寿梓<sup>1</sup>, 大城 隆, 鈴木宏和  
(鳥取大院・工,<sup>1</sup>鳥取大・工・GSC)

【目的】*Geobacillus thermodenitrificans* OS27 は, 海藻多糖類の資化性に基づき紅藻キョウノヒモから単離された好熱菌で, 高温条件下で褐藻ワカメを分解できる。本研究では, OS27 株ならびに OS27 株を遺伝子工学的に改変したセルラーゼ生産株が分解できる海藻を広く調べた。

【実験】生ワカメは市販のものを利用した。他海藻類は鳥取県沿岸から採取した。超好熱性アーキア由来セルラーゼ遺伝子を *Geobacillus-E. coli* シャトルプラスミド (pGKE75) にクローニングし, 得られたプラスミド pGKE75-*PH1171* で OS27 株を形質転換することで, OS27cel 株を得た。好熱菌株は, 海藻 (約 1 cm 四方) を含む培地中で 7 日間, 60°C で培養した。培養液中の糖質は, フェノール硫酸法を用いて定量した。海藻分解は, 培養液をフィルター (1 mm メッシュ) ろ過した後の残存物乾燥重量を比較することで評価した。

【結果と考察】OS27 株は, 大腸菌から接合伝達によって効率よく形質転換できた。試した 8 種の海藻のうち, OS27 株は 4 種を有意に分解した。OS27cel 株は, 6 種の海藻を広く分解した。残り 2 種については, いずれの株も分解できなかった。OS27 株は, 3 種の海藻分解過程において培地中の遊離糖濃度を有意に上昇させた。異種セルラーゼ遺伝子の発現は, OS27 株による糖遊離にほとんど貢献しなかったが, OS27cel 株による高効率かつ広範囲な海藻分解は, OS27 株の遺伝子改変によって, その海藻分解能を飛躍的に向上させられる可能性を示唆している。

F-7 高温性プロピオン酸酸化細菌のコハク酸酸化に関与する酵素の機能的特徴  
○津島由佳<sup>1</sup>, 石口貴之<sup>2</sup>, 高坂智之<sup>1,3</sup>, 山田 守<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創科, <sup>2</sup>山口大院・農, <sup>3</sup>山口大・微研セ)

【目的】嫌気的環境におけるプロピオン酸酸化経路において、コハク酸酸化反応はエネルギー的に進みにくい。これまで中温性細菌において、コハク酸酸化に膜電位を必要とすることが推察されている。高温性プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (SI) は、ゲノム解析の結果から、2種類のコハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH1, SDH2) を有すると予測された。本研究では、SDH1 と SDH2 がコハク酸酸化を担っているのか、また SI がコハク酸を酸化する際に膜電位を必要とするのかを解析した。

【方法・結果】遺伝子構造解析により SDH1 は膜に、SDH2 は細胞質に存在すると予測された。そこで、培養した SI 菌体より膜画分と可溶性画分を調製し、酵素活性を測定した。両画分においてコハク酸酸化活性が確認されたが、電子受容体に Q1 を用いたところ、膜画分のみで活性がみられた。一方、NADH を電子受容体とするフマル酸還元活性は可溶性画分のみで確認された。膜画分はピルビン酸で培養した際に高い活性を示し、可溶性画分はフマル酸で培養した際に高い活性を示した。次に、膜電位のコハク酸酸化への関与を調べるため、プロピオン酸を基質として SI 細胞から水素が放出されている時に、脱共役剤を添加したところ水素放出が抑えられた。以上の結果より、SI のプロピオン酸酸化時に機能するコハク酸デヒドロゲナーゼは SDH1 であり、そのコハク酸の酸化には膜電位を必要とすることが示唆された。さらに、SDH2 は主にフマル酸還元酵素として機能している可能性が示唆された。

F-8 中等度酸性鉱山廃水から分離した新規な鉄酸化細菌の性質  
○山本康次郎, 金尾忠芳, 赤堀文雄<sup>1</sup>, 高田 潤<sup>2</sup>, 上村一雄  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>卯根倉鉱業 (株), <sup>2</sup>岡山大院・自然科学)

【目的】黄鉄鉱の酸化によって形成される酸性鉱山廃水は、 $Fe^{2+}$ や重金属イオンを含んでおり、河川や湖の酸性化や重金属汚染を引き起こす。そのため、現在は、pH 2 付近で生育する鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* によって  $Fe^{2+}$ を  $Fe^{3+}$ に酸化した後、 $CaCO_3$  で中和して  $Fe^{3+}$ を沈殿物として除去したのち放流する方法が用いられている。鉱山廃水処理は、鉱山内に鉱石が存在する限り続くため、処理コストの低減が望まれている。 $Fe^{2+}$ の酸化処理を pH 3.5 付近で行えば、中和処理に要するコストの低減化が期待できるため、中等度酸性環境から pH 3.5 付近で増殖する鉄酸化細菌の単離・培養を試みた。

【方法】岡山県美咲町柵原鉱山の鉱山廃水処理施設および、柵原鉱山旧坑道内貯留池よりサンプルを採取した。サンプルから DNA を抽出し、PCR 増幅した 16S rDNA を用いて DGGE 解析によって微生物叢を調べた。また、採取したサンプルからの鉄酸化細菌の単離には、上層に  $Fe^{2+}$ と無機塩からなる APPW 寒天培地 (pH 3.5)、下層に従属栄養菌 (*Acidiphilium cryptum*) を含む寒天培地の二重層法を用いた。単離した菌の同定は 16S rDNA の解析によって行い、最適な培養温度や pH の検討を行った。

【結果】サンプルの DGGE 解析によって、鉄酸化細菌である *Ferrovum* および *Gallionella* に近縁な細菌が検出された。また、重層培地上に形成されたコロニーを単離し、16S rDNA を解析した結果、*Ferrovum myxofaciens* および *Gallionella capsiferriformans* に近縁な細菌であることが分かった。また、*Ferrovum* の生育培地の沈殿物を走査型電子顕微鏡で観察を行ったところ、特徴的な構造物が観察された。

F-9 チオ硫酸で生育した海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* の末端酸化酵素の性質  
○吉野永里子, 金尾忠芳, 上村一雄 (岡山大院・環境生命)

【背景と目的】*A.thiooxidans* SH株は、最適増殖 pH が 4.0, 2.0%の NaCl 存在下で最適な増殖を示す好酸性好塩性の海洋性硫黄酸化細菌である。本菌のチオ硫酸代謝経路を明らかにするため、フェリシアニドを電子受容体に用いて、チオ硫酸デヒドロゲナーゼが精製された。酵素はキノンを電子受容体に用いることが明らかにされている。還元されたキノンの酸化機構を明らかにするため、チオ硫酸増殖細胞のユビキノール酸化酵素の精製と性質の検討を試みた。

【方法】酵素活性は、ユビキノール (Q<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) の酸化に伴う 275 nm の吸光度の増加によって測定した。チオ硫酸生育細胞から膜画分を調製し、界面活性剤 (n-ドデシル-β-D-マルトピラノシド) を用いて膜タンパク質を可溶化した。各種カラムクロマトグラフィーによってユビキノール酸化酵素の精製を試み、最終標品を用いて、酵素の性質検討を行った。

【結果考察】ゲノム解析の結果、SH株には4種のbdタイプのユビキノール酸化酵素と2種のoタイプのユビキノール酸化酵素あるいはシトクロム酸化酵素と推定される遺伝子が存在していた。スペクトル解析の結果、可溶性画分には524, 554, 568, 608 nmのピークが確認され、シトクロムc, bもしくはaの存在が示唆された。これまでの精製標品には、566 nmにピークが観察され、チオ硫酸生育細胞ではbd型のユビキノール酸化酵素ではなく、bo型のユビキノール酸化酵素がチオ硫酸酸化に関与していることが示唆された。最終標品の反応最適 pH は4.5で、硫酸イオン (200 mM) で活性化された。

F-10 放線菌の *rpoB* 遺伝子改変を目的としたマーカーレスゲノム改変技術  
○小川沙織, 中島佑里子, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆 (岡山大院・環境生命)

【目的】放線菌 *Streptomyces incarnatus* の RNA ポリメラーゼ *rpoB* 遺伝子の rif-1 領域に任意の多重変異を導入するためのゲノム改変技術を確立した。【方法と結果】*S. incarnatus* の *rpoB* 遺伝子をクローニングして、その5'末端500 bpを削除したORF断片を接合伝達ベクターpK18mobに連結した。次にPCRを用いてrif-1領域の4残基 (D447, S453, H457, R460) の組合せによる多重変異を導入した。*E. coli* 17S-1による異種間接合伝達-相同組換えによりリファンピシン (Rif), カナマイシン (Km) 耐性を指標として選抜した。Rif耐性はrif-1改変の表現形としてKm耐性はpK18mobにコードされたマーカー遺伝子による。継体培養によってRif耐性は保持されていたがKm耐性は容易に脱落した。PCRとシーケンス解読により2回目の相同組換えが起きてKm耐性マーカーが欠落したことが確認された。放線菌ではSacBなどによる淘汰圧がなくてもベクター配列の切り出しが起きて、多重変異を残した改変 *rpoB* が再構成されることが示された。

- F –11 Characterization of nanoemulsion prepared from self-emulsifying rifampicin and its antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* and *Stap. epidermidis* isolated from acne  
OM. Mazharul I. Chowdhury, K. Begum<sup>1</sup>, A. Sarker<sup>2</sup>, I. Jahan. Shimu<sup>2</sup>, Reza-ul Jalil<sup>3</sup> (Dept. of Life Sci. and Biotechnol. Shimane Univ.; <sup>1</sup>Dept. of Pharmacy, ASA Univ.; <sup>2</sup>Dept. of Pharmacy, Primeasia Univ.;<sup>3</sup>Dept. of Pharmaceut. Technol., Univ. of Dhaka)

Three different self-emulsifying drug delivery systems of rifampicin (SEDD-R) were made using oleic acid and different surfactants such as Tween 80, Chremophor RH 40 and Chremophor EL designated as RN-TW, RN-CRH and RN-CEL. These self-emulsifying systems were converted to rifampicin nanoemulsion by adding water under sonication. The resulting particle sizes were found to be 192.7 nm, 183.4 nm and 179.2 nm for RN- CEL, RN-CRH and RN-TW, respectively using Zetasizer. Drug content, entrapment efficiency, *in vitro* drug release and pH stability tests was performed. Drug content and entrapment efficiency for RNTW, RN-CRH and RN-CEL were found as 0.9945% & 0.9835%, 0.9720% & 84.31% and 74.58 % & 56.89%, respectively. The release of drug from RN-TW, RN-CRH and RN-CEL occurred for 450, 330 and 240 minutes, respectively. The pH stability study demonstrated that all formulations retained maximum drug at pH 5.8. Antibacterial effect of the preparations was evaluated against *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated from acne and showed effective results.

## 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
- ・杏林予防学研究所
- ・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)
- ・鳥取サイエンス(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)
- ・丸善製薬(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)

2017年1月5日 現在60社

