

日本農芸化学会中部支部第 145 回例会
若手シンポジウム

「大学院生が語るバイオの魅力」

講演要旨集

日時:平成 17 年 12 月 3 日(土)

会場:高志会館(富山市千歳町 1-3-1)

日本農芸化学会中部支部事務局

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院生命農学研究科内

「大学院生が語るバイオの魅力」

日時 2005年12月3日(土) 入場無料
会場 パレプラン高志会館カルチャーホール(JR 富山駅正面口から徒歩7分)
富山市千歳町 1-3-1 Tel. 076-441-2255 Fax. 076-441-1770

プログラム

13:00 開会のあいさつ

日本農芸化学会中部支部長 北川泰雄

13:10-17:25 講演

- 13:10 レドックス制御機構を刺激する機能性食品因子
名古屋大学 博士3年 柴田貴広
- 13:25 植物の病害応答反応に関わる細胞膜ABCトランスポーターの発見
名古屋大学 博士3年 小八重善裕
- 13:40 ナミテントウ幼虫脱皮ホルモン受容体の構造解析
名城大学 修士1年 森下知奈
- 13:55 DNA複製のダイナミクス:一本のゲノムDNA上でDNA複製をとらえる
三重大学 博士2年 杉村和人
- 14:10 アブシジン酸代謝阻害剤の創製とその応用
静岡大学 博士1年 上野琴巳
- 14:25-14:40 休憩
- 14:40 食品成分と感情
静岡県立大学 博士3年 山田貴史
- 14:55 UDP-オリゴ糖の合成と生理活性研究
岐阜大学 博士2年 高久博直
- 15:10 エノキタケの子実体形成に関与する遺伝子群の解析
信州大学 博士3年 山田雅人
- 15:25 酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の機能解析 ストレスタンパク質の転写調節への関与
福井県立大学 博士2年 灰谷 豊
- 15:40 微生物が作る物質リポシドマイシンの化学合成
富山県立大学 博士2年 福西省平
- 15:55-16:10 休憩
- 16:10 タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼに対する高反応性配列探索系の確立
名古屋大学 修士2年 杉村禎昭
- 16:25 ラクトスタチン(IIAEK)の媒介する新しいコレステロール分解調節系の解明
岐阜大学 博士2年 森川健正
- 16:40 食品タンパク質に由来するペプチドによる昇圧酵素レニンの阻害
岐阜大学 修士2年 川端慎吾
- 16:55 シロイヌナズナ液胞膜の膜蛋白質複合体の網羅的探索
名古屋大学 修士1年 増村友昭
- 17:10 大腸菌由来 -グルタミルシステイン合成酵素と Buthionine sulfoximine との複合体のX線結晶構造解析
福井県立大学 博士2年 仁位 寛

17:25 閉会のあいさつ

日本生物工学会中部支部長 浅野泰久

18:00-20:00 懇親会 パレプラン高志会館内

演題「レドックス制御機構を刺激する機能性食品因子」

柴田貴広、中原寛子、内田浩二（名大院・生命農・応用分子生命科学）

はじめに

世界有数の長寿国となった日本は、同時に高齢化社会に突入し、さまざまな生活習慣病や老人介護の観点から大きな社会的問題を抱えている。単に長生きできればよいということではなく、生活の質 (Quality of Life; QOL) を視野に入れた長命のあり方が求められるようになってきている。特に、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患や認知症などの疾病は、社会生活に大きな影響を与え QOL を著しく低下させることから、その治療や予防に向けたさまざまな研究がなされている。その中で、神経細胞の分化促進や生存維持作用を有する神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) などの神経栄養因子群において、神経変性疾患に対する臨床的な応用が試みられている。しかしながら実際は、その実体がタンパク質である神経栄養因子を個体レベルで用いるのは容易ではないことから、神経栄養因子様作用を代替、もしくは増強するような低分子化合物の探索・創出が試みられている。こうした背景から、我々は NGF の作用を増強する食品由来低分子化合物の探索を行っている。本講演では、アブラナ科野菜に含まれる低分子化合物による神経細胞分化誘導とその作用機構に関する最新の知見を紹介する。

アブラナ科野菜に含まれる低分子化合物の同定とその作用機構の解明

神経変性疾患や老化に伴う認知症はライフスタイルに密接に関係しているということから、日常的に摂取しうる食品成分に注目し、中でも特に近年がん予防食品として知られているアブラナ科野菜に焦点を当てて研究を行った。神経細胞の分化誘導活性評価には、ラット副腎髄質褐色細胞腫である PC12 細胞を用い、この細胞の神経突起伸長を分化の指標とした。

まず、様々なアブラナ科野菜の酢酸エチル抽出物における神経突起伸長作用を評価した結果、抗がん活性のひとつの指標である解毒酵素誘導能と神経突起伸長活性の間に正の相関関係が認められ、中でもワサビに最も強い活性を見出した。さらにワサビ抽出物から活性成分を単離し、6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-HITC) を同定した。この化合物単独ではほとんど活性を示さないが、

ごく低濃度の NGF 存在下で顕著な突起伸長活性を有することが明らかとなった。この作用メカニズムを詳細に検討した結果、NGF レセプターのリン酸化を持続的なものにするということが明らかとなった。さらに、この NGF レセプターの持続的なリン酸化には、チロシン脱リン酸化酵素である PTP1B が関与していることが判明した。すなわち、6-HITC が PTP1B の活性を低下させることによりレセプターの持続的なリン酸化を引き起こし、NGF のシグナルを増強するという機構が示唆された。PTP1B は近年、細胞内レドックスに反応して活性が制御されるという報告がなされており、6-HITC も細胞内レドックス系に作用することにより、PTP1B の活性を制御している可能性が考えられた。

まとめ

本研究により、ワサビ由来イソチオシアネートである 6-HITC に NGF の増強作用があることが明らかとなった。これは 6-HITC に限らず、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファンなどにも同様の活性を見出している。このように、アブラナ科野菜には今まで知られていたがん予防効果だけでなく、神経変性疾患を含めた幅広い生活習慣病の予防効果が期待できる機能性食品群といえるのではないだろうか。6-HITC の作用機構に関してはまだ不明な点も残されており、さらに *in vivo* での作用も検討する必要があると思われる。こうした点を解明することによって、機能性食品因子の新たな一面を見出すきっかけになるかもしれない。

連絡先： 464-8601 名古屋市千種区不老町 Tel: 052-789-4126

植物の病害応答反応に関わる細胞膜 ABC トランスポーターの発見

小八重善裕, 関野哲郎, 吉岡博文, 中川強, Enrico Martinoia, 前島正義

(名古屋大学大学院 生命農学研究科、細胞ダイナミクス研究室)

植物は地球上のすべて生命と環境の源であり、人類の大切な食糧の源です。しかし、植物は常に病原体の攻撃にさらされており、世界では毎年数億人分の食糧が消滅しています。攻撃して多くの病原体に対して植物はどのような仕組みで身を守っているのかを解明することは、人類の食糧と環境を豊かに維持することに貢献できると考えられます

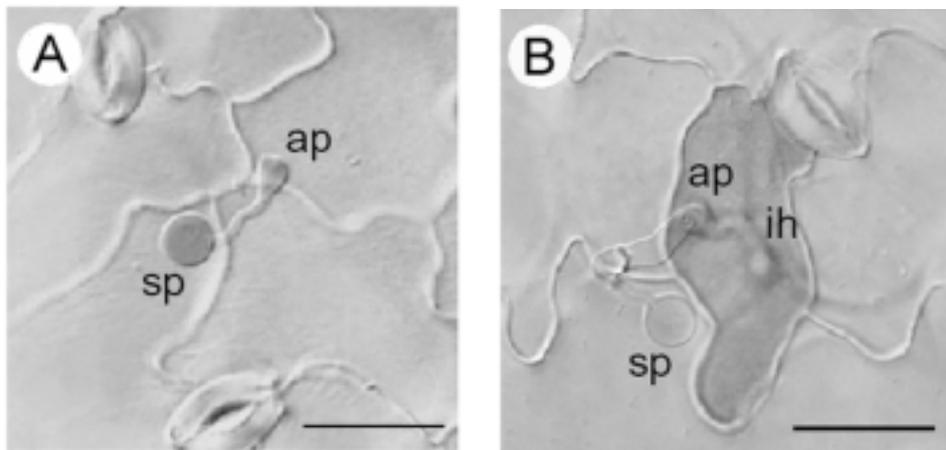
病原菌は特定の植物種、あるいは植物品種にのみ感染して発病させることができます。逆に言えば、植物はほとんどの病原体に対しては抵抗性を持つといえます(非宿主抵抗性)。多くの場合、植物は病原体の植物体内への侵入を、表皮細胞で完全にブロックすることで非宿主抵抗性を発揮します。

私たちの研究室は、実験モデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて、植物の非宿主抵抗性に必要なタンパク質 PDR8 を発見しました。PDR8 は ATP(アデノシン三リン酸)と結合する部分があることから ABC(ATP binding cassette)輸送体と呼ばれるタンパク質で、ATPの加水分解エネルギーを動力源とするポンプ型のタンパク質でした。PDR の名前は、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)において多様な物質を細胞外へ排出すると研究報告されていた多剤耐性排出ポンプ PDR(Pleiotropic Drug Resistance)の名に由来しています。私たちはこの PDR8 を特異的に検出することができる抗体を作製し、PDR8 が植物の細胞膜にあることを見出しました。このポンプが細胞の中から細胞の外へ病害抵抗性物質を輸送することにより、植物の非宿主抵抗性を発揮していると考えられます。

その証拠として、このポンプを失ったシロイヌナズナの遺伝子欠損株の葉に、本来はシロイヌナズナが抵抗性を示すジャガイモ疫病菌(*Phytophthora infestans*)を接種したところ、*P. infestans* の菌糸は葉の表皮細胞内へ侵入してしまい、激しい細胞死を引き起こしました。PDR8 が発現している細胞を青く染めることが出来る遺伝子組み換えシロイヌナズナを作製し、PDR8 が働いている細胞を調べたところ、PDR8 は葉の気孔(stoma)や、排水組織(hydathode)に多く発現し

ていることが分かりました。これらの組織は、病原体が植物の体内に侵入する通り道として知られる部分でした。PDR8 は植物の各器官（葉、根、茎、花）の中でも特に葉に多く発現しており、その中でも特に病原体の攻撃が激しい細胞において、病原体への抵抗反応に機能していると考えられました。

このように植物が本来持つ病害抵抗性タンパク質について研究を重ね、将来植物そのものの耐病性を高めることに応用できれば、多くの農業生産の損失を防ぐことに役立つかもしれません。



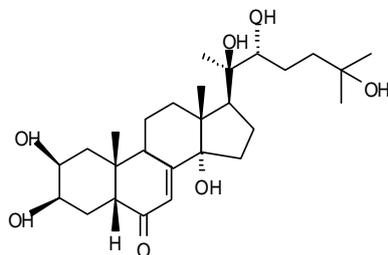
シロイヌナズナの表皮細胞と、接種したジャガイモ疫病菌 *P. infestans* の顕微鏡写真。(A) シロイヌナズナ野生株では孢子(sp: spore)が発芽するが、付着器(ap: appressorium)は表皮細胞を貫通できない。(B) PDR8 欠損株では付着器から感染糸(ih: infection hyphae)が伸びて表皮細胞を貫通している。菌糸の侵入を許した細胞は直ちに死ぬ(色のついた細胞)。PDR8 が病害抵抗性に重要であることがわかった。 Bar=100・m

ナミテントウ幼虫脱皮ホルモン受容体の構造解析演者

森下知奈、田村廣人（名城大院）

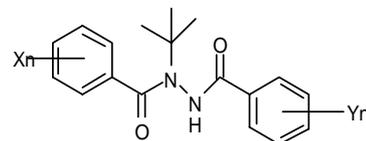
産業革命後、爆発的に増加した地球上の人口は、現在、約 60 億人となり、今後も増加の一途を辿っていきます。さらに、都市化や砂漠化などにより耕地面積は減少しつづけ、作物の供給量と消費量のバランスは既に崩壊し、地球上では飢餓に苦しむ人々が増えています。また、地球温暖化や異常気象など世界的な気候条件の変化なども生じており、この地球上で増え続ける人口を養っていくには、単位面積当たりの収量を上げる必要があります。しかし、種を播いた作物は、それらを害する昆虫、病原菌さらに雑草等によって被害を受け、その収穫量は減少します。従って、さらなる食糧増産および安定した食糧需給に対応していくためにはどうしても収穫量を減らさないようにするために農薬の利用が必須となります。しかし、環境中に多量に処理する農薬は、その環境毒性への対応が大きな課題となっています。

これまで害虫を防除する目的で広く利用されてきた殺虫剤は、神経機能を阻害する薬剤が主でありました。ところが、近年、人畜への選択毒性の観点から、昆虫だけが持っている生理機能を阻害・かく乱する昆虫生育阻害剤が注目されてきました。現在利用されている昆虫成育制御剤の一つに昆虫が脱皮するその機構をかく乱するものがあります。昆虫の脱皮は、主に脱皮ホルモンと呼ばれる物質によって調節されています。この脱皮ホルモンは、まず核内受容体と呼ばれるタンパク質の一種である脱皮ホルモン受容体 (ecdysone receptor : EcR) と ultraspiracle (USP) との複合体に結合します。次に、この脱皮ホルモン/EcR/USP 複合体が標的遺伝子(DNA)上の脱皮ホルモン受容体に応答する塩基配列に結合します。すると、脱皮に必要な遺伝子群の転写が活性化され、脱皮や変態が誘導されます。従って、この脱皮ホルモンの作用をかく乱することで昆虫を防除することができます。



20-Hydroxyecdysone

(脱皮ホルモン)



Dibenzoylhydrazine類縁体

(脱皮ホルモンアゴニスト)

1990年代後半に *N*-*tert*-butyl-*N*, *N*'-dibenzoylhydrazine (ジベンゾイルヒドラジン) を基本骨格に

有する一連の化合物が、脱皮ホルモン活性および殺幼虫活性を有することが見いだされました。このジベンゾイルヒドラジン類縁体は、非ステロイド型の脱皮ホルモンと同じ働きをする化合物(アゴニスト)で、脱皮ホルモンと同様に EcR に結合し、脱皮に必要な遺伝子の転写を調節します。しかし、これらの化合物は、人工的な化合物であるため、天然の脱皮ホルモンとは異なり昆虫体内で分解を受けません。従って処理された昆虫は、脱皮反応をかく乱され、不完全な脱皮を引き起こして死んでしまいます。ところが、人や家畜は、昆虫と同じホルモンを持っていないため、これらの化合物は人畜に対して毒性の低い化合物であり、現在有望な殺虫剤として実用化されています。しかし、近年、生物多様性への観点から、これらの化合物が、有用昆虫さらには甲殻類のような対象外の生物の内分泌かく乱も引き起こすのではないかと懸念されるようになってきました。従って、より環境に優しい殺虫剤を開発するためには、有用昆虫の EcR/USP と化合物との結合様式について詳細に研究することが必要になってきました。にもかかわらず、現在までに、害虫と称される様々な種類の昆虫の EcR 遺伝子の構造は明らかになっていますが、有用昆虫の EcR の構造解析はほとんど行われていません。より安全性の高い殺虫剤を開発するには、標的昆虫のみに作用する効果の確保が重要であることから、害虫の EcR だけではなく有益昆虫さらには甲殻類のような非標的生物の EcR を解析し、その成果を *in vitro* 系での合成化合物の評価に利用する必要があります。

ジベンゾイルヒドラジン類縁体の化学構造と殺虫活性との相関研究の結果、昆虫種により脱皮ホルモン受容体の構造が異なるため、昆虫種間でその殺虫活性が異なることが分かってきました。このことは、EcR の構造を解析することにより、有用昆虫と害虫など、昆虫種間で選択毒性の高い殺虫剤を開発できる可能性を示唆しています。さらに、化学農薬と天敵農薬の同時利用(総合的有害生物管理)が可能となり、より低薬量で使用できることから、環境により優しい害虫防除が実現できます。鞘翅目昆虫のテントウムシは、アブラムシ捕食性の益虫と、食植性の害虫との2種類があり、食性の異なるテントウムシの EcR の構造の比較が可能です。そこで本研究では、有用昆虫ナミテントウ *Harmonia axyridis* の EcR の構造解析を目的とし、有用昆虫であるナミテントウの EcR 遺伝子のクローニングとその塩基配列を決定したので報告します。より環境に優しい殺虫剤が開発され、地球上で飢餓に苦しむ人々が一日でも早く減少することを最終目標として研究しています。

連絡先：田村廣人 〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口1-501

TEL ; 052-838-2446 / FAX ; 052-835-7450、メール ; hirotoccmfs.meijo-u.ac.jp

DNA 複製のダイナミクス：一本のゲノム DNA 上で DNA 複製をとらえる

杉村和人、竹林慎一郎、緒方進、田口寛、奥村克純（三重大 生資 分子細胞生物学）

DNA(デオキシリボ核酸)はアデニン(A)・グアニン(G)・シトシン(C)・チミン(T)の4つの塩基、リン酸、糖からなる化学分子であり、遺伝情報を担う本体である。ワトソンとクリックにより DNA は二重らせん構造と呼ばれる二次構造をとることが発見され、両親から子へ遺伝情報を継承するためにとても理にかなった形をとって存在することがわかった。すなわち、一本の親鎖を鋳型にして娘鎖が新規に合成されることにより、同一の遺伝情報が次世代へと受け継がれる半保存的複製が可能となるのである。したがって、細胞の一つ一つがもつ全遺伝情報(ゲノム)の複製、概して DNA 複製は生命の維持と継承においてたいへん重要な細胞内活動であることが理解できる。私たちのからだを形成する 60 兆個にも及ぶ細胞内には、細胞一個あたり 30 億塩基対 X 2 もの DNA が存在するが、それは核と呼ばれる細胞内小器官の中に格納されている。しかしながら、長さにすると 2m にもなる DNA を、直径 10・ μ m 程の核の中にどのようにしてコンパクトにおさめられているのであろう？それは、酸性である DNA と安定的に結合することができる塩基性タンパク質のヒストンに DNA が巻き付くところに起因する。4 種類のヒストン、H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ 2 分子からなる 8 量体は、コアヒストンと呼ばれ、その周りに 146 塩基対の DNA が 1.75 回転で左巻きにまいている。この DNA とヒストンとの複合体は、ヌクレオソームと呼ばれる。さらに、ヌクレオソームとヌクレオソームの間のことをリンカーと呼ぶが、この部位にはリンカーヒストンと呼ばれるヒストン H1 が結合している。ヌクレオソームの連なりをクロマチンと呼ぶが、ヌクレオソームは核内で 5~7 個に一回転の割合でらせん構造をとっており、結果として DNA はかなりコンパクトな状態で核内におさめられている。したがって、細胞核内で起こる DNA 複製を理解する上では DNA は、ヒストンとの複合体という形で存在するという点を考慮に入れなければならない。また、膨大な長さの DNA を数時間のうちに完璧に複製するために、DNA 複製が始まる点(複製開始点)がゲノム DNA 上に数万個配置されていると推測されている。複製開始点から両方向に DNA 合成が行われるが、その形から複製フォークと呼ばれる。

これまでに我々は、哺乳類培養細胞を用いて、核内での DNA 複製の動態と制御機構を、主に蛍光顕微鏡を用いた可視化技術により解析してきた。具体的な方法としては、ビオチンなどで化学修飾したデオキシウリジン三リン酸(biotin-dUTP)を低張条件下で細胞核内に導入し、複製中の DNA 鎖にチミジンの代わりに取り

込ませる。その後、様々な解像度レベルで複製 DNA 鎖に取り込まれた化学修飾ヌクレオチドを蛍光検出し、蛍光顕微鏡下で観察、解析する。核内で複製 DNA 鎖を見ると、細かい点状のシグナルが散在しており、それを複製フォーサイと呼ぶ。核によって複製フォーサイの数、大きさ、局在部位が異なっていたので、その特徴によってパターンの分類をした。すると、S 期の初期から後期にかけて、それぞれのパターンの出現頻度が異なり、S 期の時期によって DNA 複製が行われる場所が異なっていた。すなわち、S 期初期では遺伝子の転写が活発でクロマチンが緩んでいる領域(ユークロマチン領域)が複製し、後期では遺伝子の転写があまり活発ではなく、クロマチンが高度に凝縮している領域(ヘテロクロマチン)が複製していた。さらに、スライドガラス上に核を固定し、核から DNA を引き伸ばした標本上で複製 DNA 鎖を蛍光検出した。この解析法により、複製開始点の位置や複製フォークの進行を DNA 一本ずつについて解析することが初めて可能となる。この方法により複製フォークの進行速度を解析した結果、個々の複製フォークは進行速度が異なることがわかった。さらに、S 期の初期、中期、後期の細胞で解析したところ、S 期初期では複製フォークの進行は遅く、中期でさらに遅くなり、後期では最も速くなることがわかった。なぜ、緩んだクロマチン領域より凝縮したクロマチン領域を進行する複製フォークのほうが速いのかは現時点ではわからないが、おそらく同じ DNA 上で行われる転写活性と複製フォークが、ユークロマチン領域では拮抗しているからではないかと考えている。また、複製フォーク進行に必須のタンパク質 topoisomerase I と相互作用し、その機能を制御している因子として PARP-1(poly(ADP-ribose)polymerase-1) が存在する。PARP は NAD⁺ を基質として poly(ADP-ribose)基を標的タンパク質に付加することにより、機能制御していることが知られている。そこで、PARP 阻害剤である NU1025 を細胞に処理すると、複製フォークの進行が有意に加速した。また、特定のタンパク質の発現を効率よく抑制できる RNAi (RNA interference)法により PARP-1 の発現を抑制した細胞においても、複製フォークの進行が加速した。さらに、topoisomerase I 阻害剤である CPT で処理すると DNA 損傷を引き起こすが、NU1025、または PARP RNAi 処理によって DNA 損傷を起こした細胞でも複製フォークの進行が加速した。このことは、PARP-1 自身、もしくは PARP-1 と相互作用する topoisomerase I などの複製フォーク結合因子に対して、PARP-1 による poly(ADP-ribosyl)化が普段から起こっていて複製フォークの進行を制御しており、いざ DNA 損傷を感知すると、さらにその進行を制御するという、PARP-1 による新たな複製フォークの進行制御機構を示唆している。

アブシジン酸代謝阻害剤の創製とその応用

上野 琴巳 { 岐阜大学大学院連合農学研究科 (静岡大学) }

植物ホルモン 動物でいうホルモン(成長ホルモンやインスリン、エストロゲンなど)とは少し違うところもあるが、植物も「低濃度で生理活性を誘導する」化合物をもっている。アブシジン酸(アブシジン酸・ABA)は、その「低濃度で生理活性を誘導する化合物=植物ホルモン」の1つ、1960年代に構造が明らかになった比較的古い植物ホルモンである。はじめは、葉の離層形成を促進する物質としてワタから単離された。しかし同時期にカエデの休眠物質としても見つかり、現在は後者の生理作用、即ち種子の休眠(=発芽阻害)や伸長抑制効果を持つ植物ホルモンであると言われている(ちなみに離層形成はABAによって生合成されたエチレンの作用による)。また気孔の開鎖誘導や、植物が乾燥や高塩濃度などの環境ストレスに対する耐性を獲得するためにもABAは必要であるとされている。

生物の様々な生理現象はホルモンのわずかな濃度変化で誘導されるため、ホルモンの濃度は常に厳密に調節されている。そのため、生合成されたホルモンは生理現象を誘導し、必要がなくなれば速やかに代謝不活性化(分解)される。これはABAにおいても同じように行われている。乾燥などのストレスによってABAは生合成され、植物体内のABA濃度が高くなる。すると気孔は閉鎖するので、植物は体内の水分を保持できるようになる。しかしずっと気孔を閉じたままでは二酸化炭素を吸収できない。「気孔を閉じなさい」という指令を解除するために、不必要となったABAは代謝不活性化される。この「必要な時だけ濃度を上げてまた一定量に戻す」という、ABAの生合成と代謝不活性化のバランスはどのように調節されているのか。ABAを生合成するのも代謝不活性化するのも一連の酵素である。つまり生合成酵素の遺伝子と不活性化酵素の遺伝子は、いつどのように発現し作用しているのか。ABAの生合成に関する研究は、遺伝子レベルでさまざまなことが明らかになっている。しかしABAの代謝不活性化に関しては研究が進んでおらず、いくつかの代謝物が見つかり、そこに関わる酵素のうちABA 8'-水酸化酵素(P450モノオキシゲナーゼ)が明らかになった程度である(他の酵素は、あると言われていても遺伝子やアミノ酸配列は分かっていない)。そこでABAの類似物質(アナログ)を用いて、植物体内におけるABA濃度の調節メカニズム、特に代謝不活性化のメカニズムを明らかにしようというのが、最終的な研究目的である。

遺伝子が分かっているのに、なぜ ABA の類似物質を使うのか、と思われるかもしれない。確かにストレスを与えた時の遺伝子の発現量を調べれば、酵素の働いている時間をある程度予測できるかもしれない。しかし実際に植物体内で働いているのは、遺伝子の翻訳産物、即ち酵素である。酵素がどんな立体構造をしているのか、どのような化合物なら基質になるのか、遺伝子を見ているだけでは分からない。そんな時に活躍するのが低分子化合物である。低分子化合物は、そのまま薬として医療現場で使われたり、酵素を蛍光で可視化するような研究のツールになったりする。これまでは遺伝子と低分子化合物、即ち生物と化学が別々になったまま研究が進められていた。しかし現在は、それらが融合したような「ケミカルバイオロジー」という新しい分野で、新たな発見を得ようという流れになっている。そこで我々も「ケミカルバイオロジー」的な解析、つまり ABA アナログ（低分子化合物）をツールとして植物の生理現象を解明していこう、というわけである。

では、実際にはどのように研究を進めているのか。現在我々が注目しているのは唯一明らかになっている代謝酵素、ABA 8'-水酸化酵素である。まずはこの酵素の阻害剤を作ろうということで、合成、酵素阻害試験を日々行っている。そこで今回は、これら一連の実験について紹介する。

連絡先：

〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

TEL&FAX 054-238-4871

E-mail w5613005@ipc.shizuoka.ac.jp

食品成分と感情

山田貴史、横越英彦（静岡県立大学大学院生活健康科学研究科食品科学専攻）

近年、携帯電話やインターネットの普及など、いろいろなものが開発され、生活は豊かで便利になったが、同時にストレス社会といわれるようになったことも事実である。特に学校や会社などで感じる社会的ストレスにより、精神状態に大きな負荷がかかり悩みをもつ人が多くなり、「ひきこもり」や「キレル」などに見られるような大きな社会問題になっている。このような精神活動に対する疾患は、なぜ起こるのか現在も研究が盛んに行なわれており、治療することが非常に難しい。一方、食事が脳機能に及ぼす影響についての研究も盛んで、ブドウ糖、DHA（ドコサヘキサエン酸）などが記憶力や学習能力の向上に効果があると考えられている。そこで、食品が精神活動に及ぼす影響について多くの研究が行なわれるようになった。我々は、特に安らぎや、不安・うつといった精神状態に対する食品成分の影響を観察するために、ラットを用いた行動試験を取り入れた研究を行なっている。そのひとつとして T 字型高架式迷路を用いたカカオマスの抗不安作用についての研究があるので紹介する。

カカオマスは、ココアやチョコレートに使われる成分で、多くの体によいとされる成分を含んでいる。ココアやチョコレートには、気分を落ち着かせる作用があると考えられていることから、このカカオマスに気分を落ち着かせる作用があると推察し、T 字型高架式迷路試験で検討した。T 字型高架式迷路とは、ラットがぎりぎり通過できる程度の幅の、壁がない T 字型の道を、床から 70cm の高さに設置（つり橋のようなもの）し、その上をラットがどのように動くかを観察し、ラットがどのくらい不安を感じているかを測る装置である。動物は Wistar 系雄ラット(体重 300g)を用いた。T 字型高架式迷路試験開始の 30 分前にカカオマス溶液(1g/ kg B.W.)を経口投与(2ml/300g B.W.)し、試験を行った。試験終了後、血液、脳を採取し、脳内神経伝達物質量を測定した。その結果、カカオマスの投与により、T 字型高架式迷路試験で、コントロール群に比べ、回避潜時の増加を有意に抑制した。このことから、条件付けられた恐怖に関する抗不安効果が示された。また、脳内の神経伝達物質を測定したところ、不安と関係のある神経伝達物質であるセロトニンの量に変化があった。すなわち、今回の実験で見られた抗不安効果は、セロトニン作動

性神経系の活性を抑制することで起こると考えられた。

またこのほかにも我々の研究室では、お茶成分や、GABA など様々な食品成分の効果についても検討している。



カカオ豆

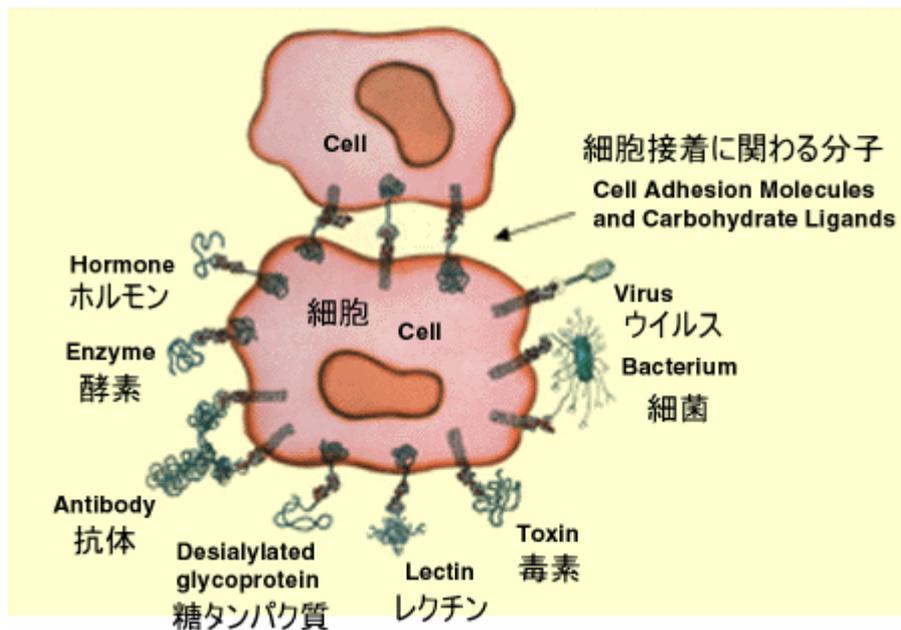
UDP - オリゴ糖の合成と生理活性研究

高久博直^{1,2}、佐藤淳平³、石田秀樹²、稲津敏行^{2,3}、石田秀治¹、木曾真¹

(¹岐大・連農、²野口研・糖鎖有機、³東海大・工)

<はじめに> 糖鎖は生体内に存在する核酸、タンパク質に次ぐ第3の生命鎖として知られている。それは、これらの分子がウイルス、細菌や細菌毒素、ホルモンなどに対して結合することができ、また細胞の識別、接着、情報伝達、分化・増殖、ガン化、免疫応答、炎症といった様々な細胞にまつわる生命現象に深く関わっていることが、近年の研究により明らかになってきたからである(図-1)。

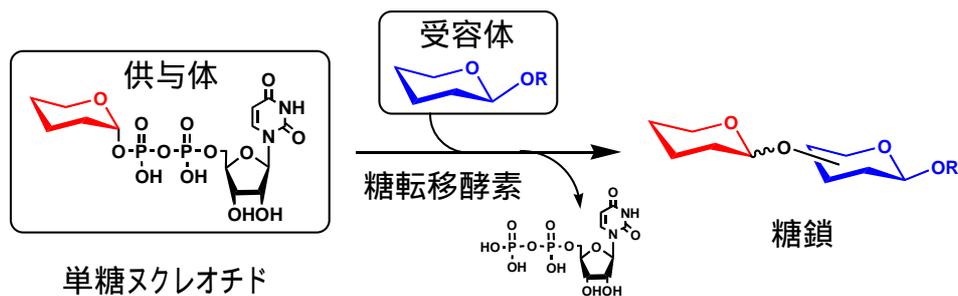
図-1. 細胞表層糖鎖と各種受容体タンパク質との相互作用



一方で、現状ではこれら糖鎖の機能を完全に解明することは出来ておらず、糖鎖の機能を明らかとする為の研究には糖鎖そのものを手に入れる必要がある。そしてその細胞から直接糖鎖を採ってくるという方法はとても難しいので、現在では目的とする糖鎖を合成することで手に入れる方法が用いられ、生体触媒(酵素)的手法と有機化学的手法の2種類が存在する。

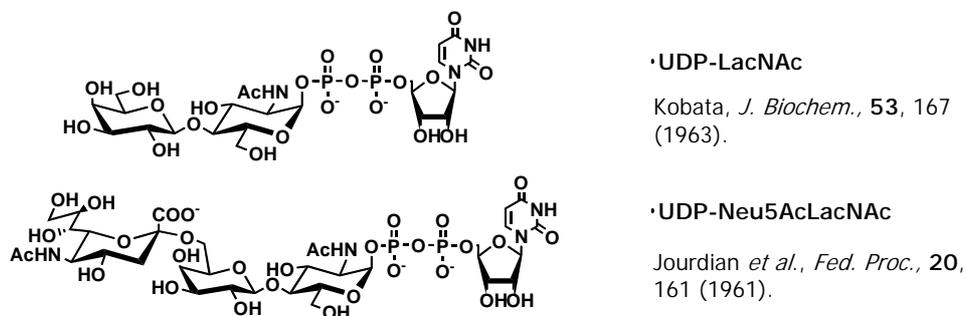
< 研究背景 > 生体内における糖鎖の合成は単糖ヌクレオチドを供与体とし、糖転移酵素により受容体の糖と結合することで行なわれている（前述の酵素的な合成手法の一つはこの反応を利用している）。（図 - 2）

図 - 2 . 生体内における糖鎖の合成



しかし、天然にはオリゴ糖にヌクレオチドが結合した UDP - オリゴ糖が存在していることが知られている。（図 - 3）

図 - 3 . 天然より単離されたUDP - オリゴ糖



これらの化合物はかなり昔に発見されているにも拘わらず、生体内においてどのような働きをしているのかが全くわかっていない。そこで演者らはこれらの化合物が糖転移酵素の供与体となる可能性に注目し、2種類のUDP - 2糖を有機化学的手法により合成を行なった。合成した化合物は既に発見されている糖転移酵素に対して供与体となりうるかを試験する予定である。

連絡先： E-mail : j6103006@guedu.cc.gifu-u.ac.jp

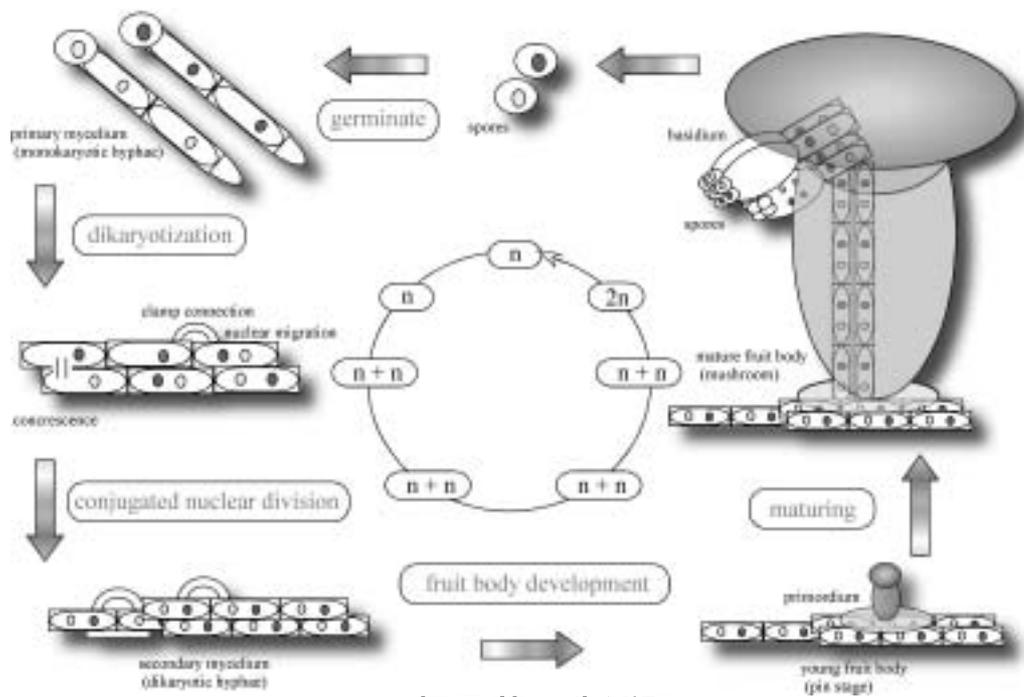
Tel : 058-293-2916

エノキタケの子実体形成に関与する遺伝子群の解析

山田 雅人¹、岡崎 光雄²、下坂 誠²

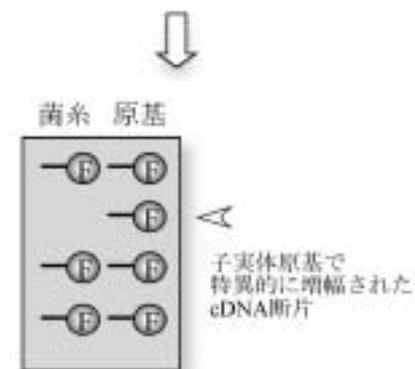
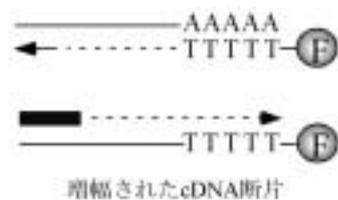
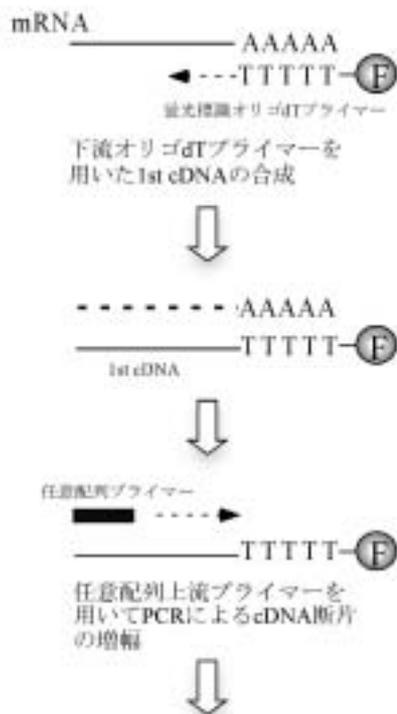
(¹信州大学大学院工学系研究科博士課程、²信州大学繊維学部応用生物学科)

きのこ（主に担子菌類の子実体）は食用として、また、独特の生理活性代謝物質の供給源として近年注目を集めている。しかし、子実体形成機構の分子レベルでの解明は未だ不十分である。本研究では、担子菌の子実体形成機構を解明するため、エノキタケ *Flammulina velutipes* を用いて子実体誘導時に特異的に発現する遺伝子群を単離し解析した。実験に用いた *F. velutipes* 工業生産株は、人工栽培において高い同調性で子実体を形成するため、この分化過程における遺伝子発現の変動を追跡しやすい。また、遺伝子の単離には、転写因子などの稀少な転写物を得ることを考慮して、操作に PCR ステップを含む fluorescence differential display (FDD)法を用いた。子実体誘導前の栄養菌糸と誘導後 10 日目の子実体原基から全 RNA を調製し、FDD 法により子実体原基特異的に発現する cDNA 断片を多数単離した。これまでに 75 断片について塩基配列を決定し、重複配列を除いた 46 断片の配列をデータベースに登録した (accession No. AB201060-AB201106)。この中、17 断片については、northern blot 解析により子実体原基特異的な発現が確認され、子実体形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された。BLASTX により相同なアミノ酸配列をもつタンパク質を検索した結果、29 cDNA 断片は機能既知のタンパク質と明らかな相同性を示した。この中には子実体形成との関連が推定されるものとして、シグナル伝達系に関わる GTP-binding protein、増殖に関わる growth factor、特異的なタンパク質分解に関わる ubiquitin-proteasome、酸化還元酵素 cytochrome P450、菌類の形態形成に関わる hydrophobin、菌類細胞壁の構成に関わる polysaccharide deacetylase などが含まれていた。これらの遺伝子の機能を解明することで担子菌キノコの子実体形成機構を解明し、子実体の効率的な人工栽培法の開発へと今後研究を展開していきたい。



担子菌の生活環

誘導前の複核菌糸と誘導後の子実体原基からRNAを調製し、以下の反応はそれぞれのサンプルに対して行った



複核菌糸体と原基由来の増幅cDNA断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動で比較し、付加した蛍光標識によりバンドを検出した

子実体原基特異的に増幅されたcDNA断片を単離、解析した

Fluorescence Differential Disply 法概略図

ストレスにおける出芽酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の機能解析：
ストレスタンパク質の転写調節への関与
灰谷 豊、高木 博史（福井県大・生物資源）

酵母は、発酵生産環境において低温、凍結、乾燥、酸化、高浸透圧、高アルコール濃度、偏栄養など様々なストレスを受けるため、細胞内タンパク質中の非共有結合が切断され、表面に疎水性アミノ酸が露出して正常な構造や機能を失った異常タンパク質が生成し、有用機能の発現が著しく制限される。我々は、酵母を材料にストレスによって生じる細胞内の異常タンパク質の検知処理および生成回避の分子機構を解析している。これまでにタンパク質合成の際にプロリンと競合して取り込まれ、異常タンパク質を生成させるアゼチジン-2-カルボン酸に対して超感受性を示す変異株を分離した。この株では、酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 の WW3 ドメイン内に変異 (Ala401Glu) があり、細胞内タンパク質のミスフォールディングを誘導し、異常タンパク質を生成するストレス（完全培地での高温培養、熱ショック処理、過酸化水素・エタノール・塩化リチウム・アミノ酸アナログなどの添加培地での培養）に対しても感受性を示した（図 1）。

ユビキチンリガーゼ Rsp5 は、ユビキチンシステムにおいて標的タンパク質にユビキチンを結合する重要な酵素である。これらの結果から、我々は Rsp5 の新しい機能として、ストレスで細胞内に生じる異常タンパク質の選択的分解への関与を提唱している（図 2）。

そこで本研究では、ストレスで生じる異常タンパク質の修復機構に着目し、Rsp5 が heat shock protein などストレスタンパク質の誘導に及ぼす影響について解析した。ストレスタンパク質の遺伝子として、転写調節因子 Hsf1 が結合する HSE を有する *HSP42*、Msn2/4 が結合する STRE を有する *DDR2*、HSE と STRE を有する *HSP12* を用いた。各遺伝子上流約 500 bp を β -ガラクトシダーゼ遺伝子に連結したプラスミドを構築後、野生株と Rsp5 変異株に導入した。各形質転換体を完全培地で培養後、エタノール（終濃度 9%）を添加し、レポーターアッセイやノーザン解析、さらにマイクロアレイ解析によって各遺伝子の転写量を比較した。

レポーターアッセイの結果、エタノールストレス条件下において Rsp5 変異株では野生株に比べて各遺伝子の転写量が低く、Rsp5 がストレスタンパク質の転写に関与することが示された（図 3）。また、完全培地での高温培養、1M ソルビトールによる浸透圧ストレスにおいても同様の結果が得られた。さらに、これらのストレスタンパク質を Rsp5 変異株で過剰に発現させると、様々なストレス感受性を相補した。

これらの結果から、ストレスによって生成、蓄積すると考えられる異常タンパク質の処理には、Rsp5 による分解系とストレスタンパク質による修復系が相乗的に作用していると考えられた。また、Rsp5 の新しい機能として、転写調節因子のユビキチン化を介してストレスタンパク質遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された（図 4）。現在、Rsp5 が Hsf1 や Msn2/4 に及ぼす影響（ユビキチン化など）を調べている（本研究は生研センター基礎研究推進事業の一環である）。

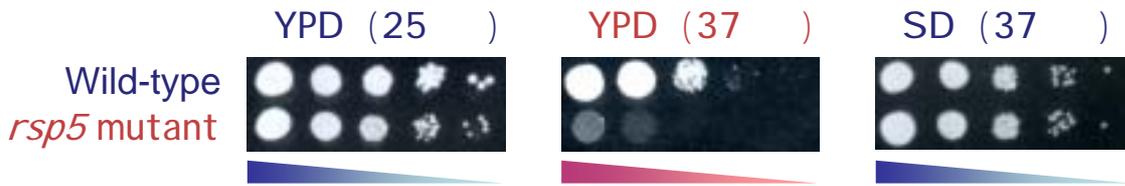


図1 *Rsp5* 変異株のストレス感受性

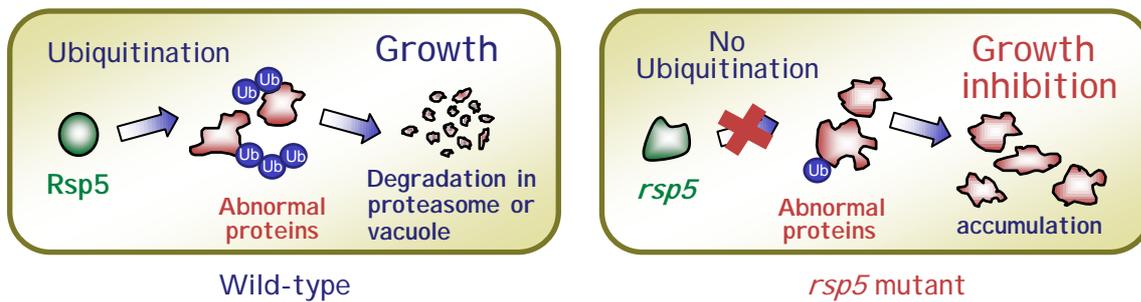


図2 *Rsp5* 変異株のストレス感受性のメカニズム

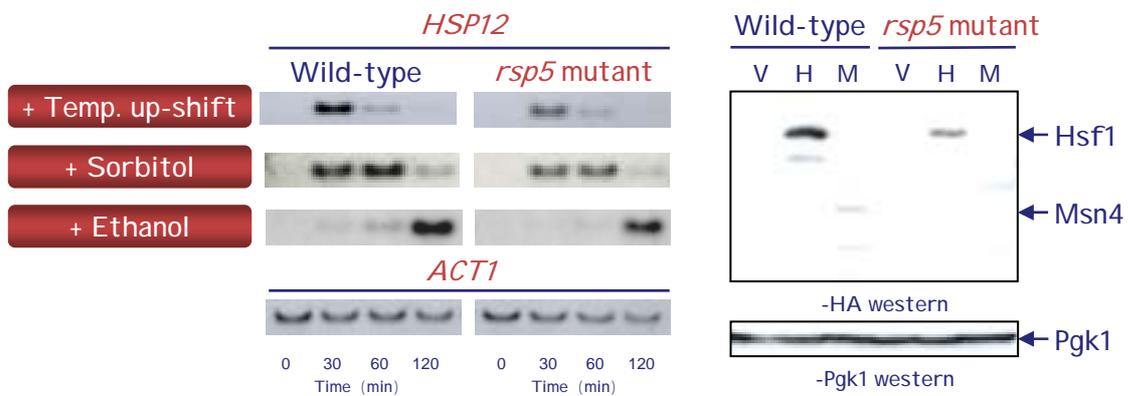


図3 野生株と *Rsp5* 変異株におけるストレスタンパク質の転写量と転写調節因子の発現量

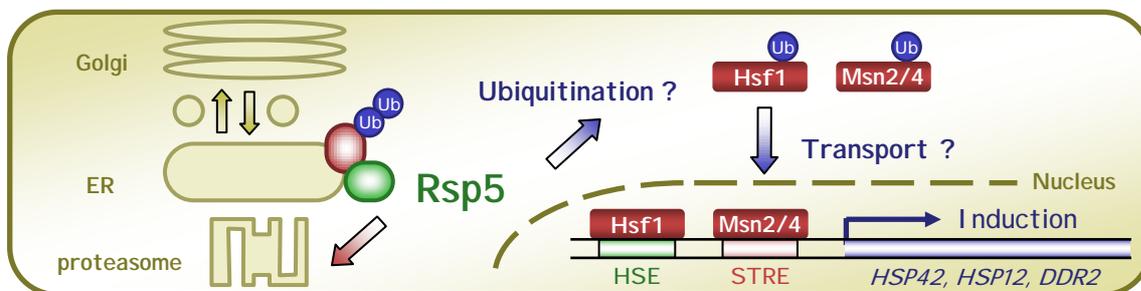
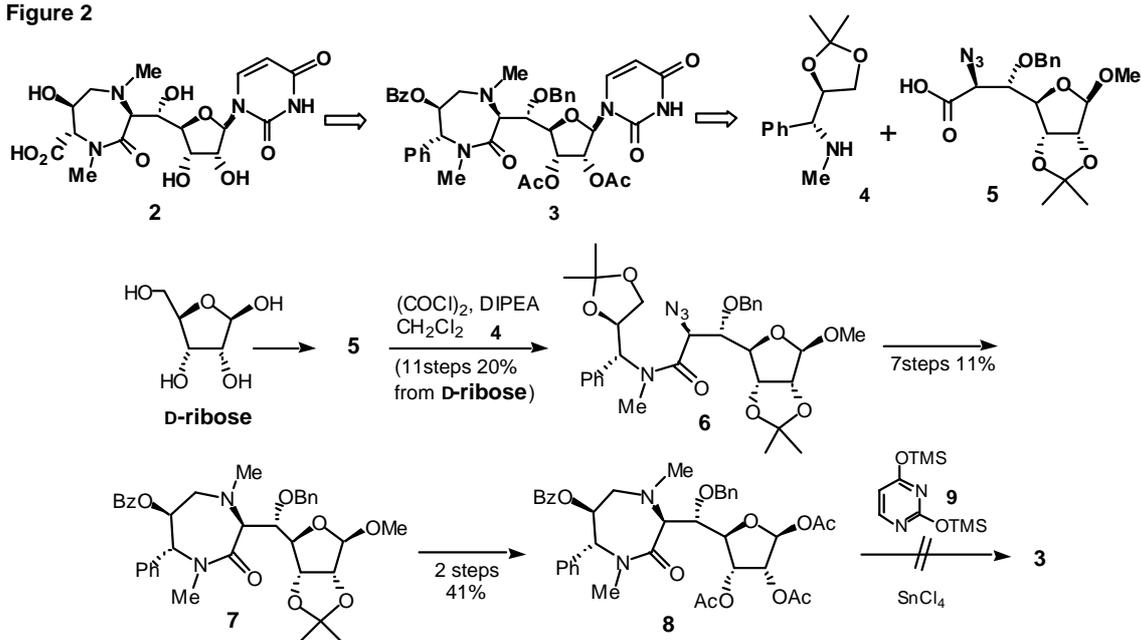


図4 Hsf1 と Msn2/4 の発現制御に関わる *Rsp5* の新たな役割

ことを計画しました。合成は、カルボン酸化合物とアミン化合物からアミドを作り、その後ジアゼパノン環を構築し、最後にウラシル基を導入するというルートで行いました。

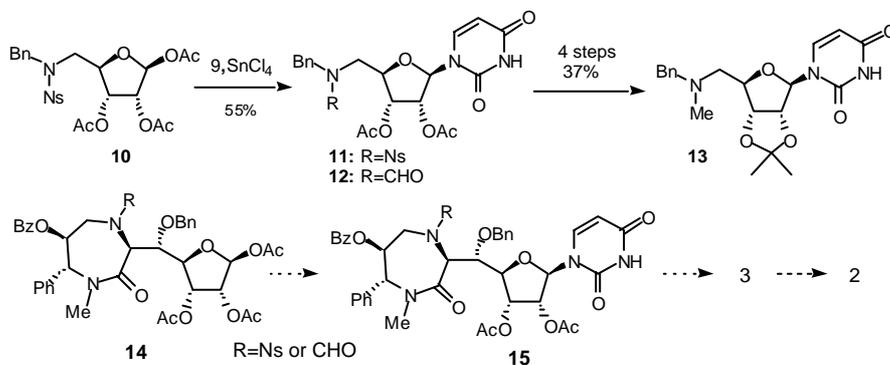
まず、D-ribose を出発物質として用い、カルボン酸部 (5) の合成を行います。これを、アミン部分 (4) とカップリングして、アミド (6) を得ました。その後、分子内還元的アミノ化を経てジアゼパノン環を構築し、*N*-メチル体 (7) へ導きました。続いて 8 へ変換し、ウラシルの導入を試みましたが、ジアゼパノン環 1 位の N のローンペアの塩基性がそれを阻害したため、目的とする 3 は全く得られませんでした。

Figure 2



そこで、Ns (ニトロベンゼンスルホンアミド) 基で N の塩基性を抑えたモデル化合物 (10) のを用いてウラシル基の導入を検討したところ、収率よくウラシル基の導入された化合物 (11) が得られました。同様に、ホルミル基を用いてのウラシル基の導入も検討を行い、化合物 (12) の合成にも成功しています。また Ns 基は脱保護の後、メチル基を有する 13 に変換することにも成功しています。今後は、Ns 基もしくはホルミル基で保護した基質 (14) を用いて、ウラシルの導入を行い 15 とし、化合物 (3) を経て分解物 (2) の合成を行う予定です。

Figure 3



タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼに対する高反応性配列探索系の確立

杉村禎昭、細野真代、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 (名大院農・応用分子生命科学)

<目的・背景>

トランスグルタミナーゼ(以下 TGase)はカルシウム依存的に2つのタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基との間にイソペプチド結合を形成し、両者を共有結合的に架橋する反応を触媒する一群の酵素である。またタンパク質中のグルタミン残基への一級アミンの取り込み反応も触媒することが知られている。

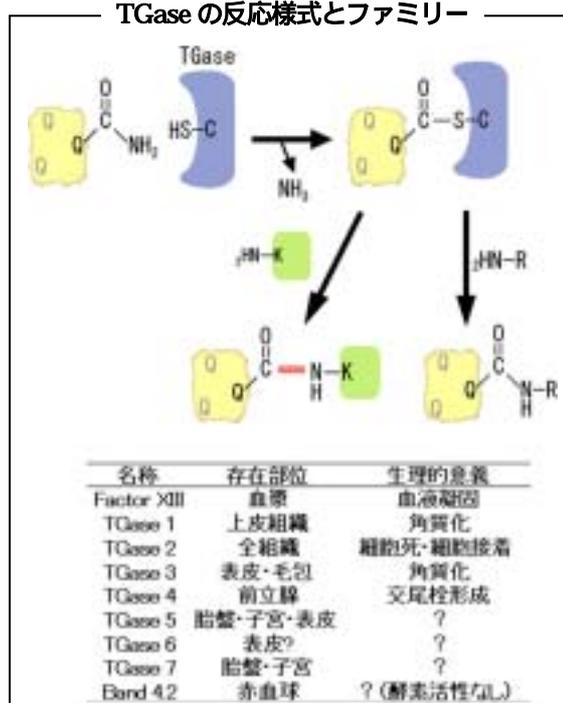
ヒトでは8種類ものアイソザイムが広範な組織において発現しており、皮膚表皮形成 (TGase 1, 3)、血液凝固 (Factor XIII)、細胞間接着・アポトーシス(TGase 2)など様々な生命現象に関与している。

それらの反応には、タンパク質中の特定のグルタミン残基のみが参与することから、TGaseの基質となるグルタミン残基には、周囲の分子構造などに、ある一定の法則性が存在すると考えられている。また、各アイソザイムがそれぞれ異なった機能を持つ、即ち基質とするタンパク質が異なることから、その法則性がアイソザイム間で異なっていることが予想される。

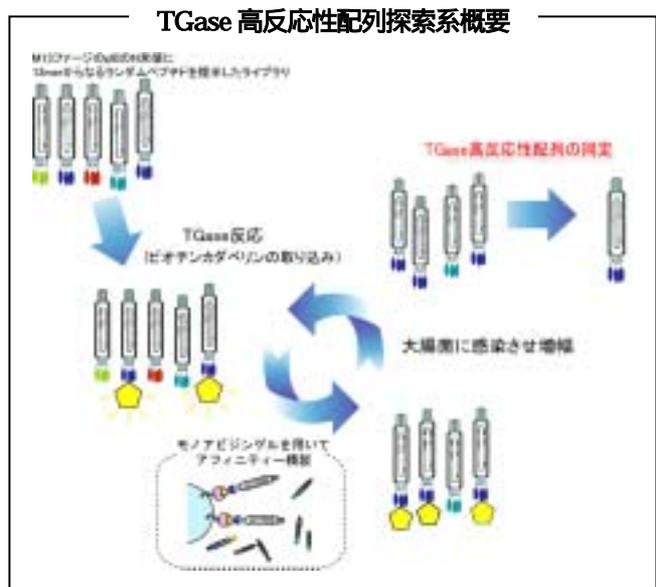
そこで今回我々は、「TGaseの基質となるグルタミン残基の周囲に法則性が存在すること」並びに「その法則性がアイソザイム間で異なること」の証明を目指し、ファージディスプレイ法を用い、TGaseに対する高反応性配列をランダムペプチドライブラリから探索する系の確立を試みた。

<方法・結果>

M13 ファージのマイナーキャプシドプロテインである pIII の N 末端に 12 残基からなるランダムペプチドを提示したライブラリを用い、これらをグルタミン残基側の基質と想定し、TGase を作用させ

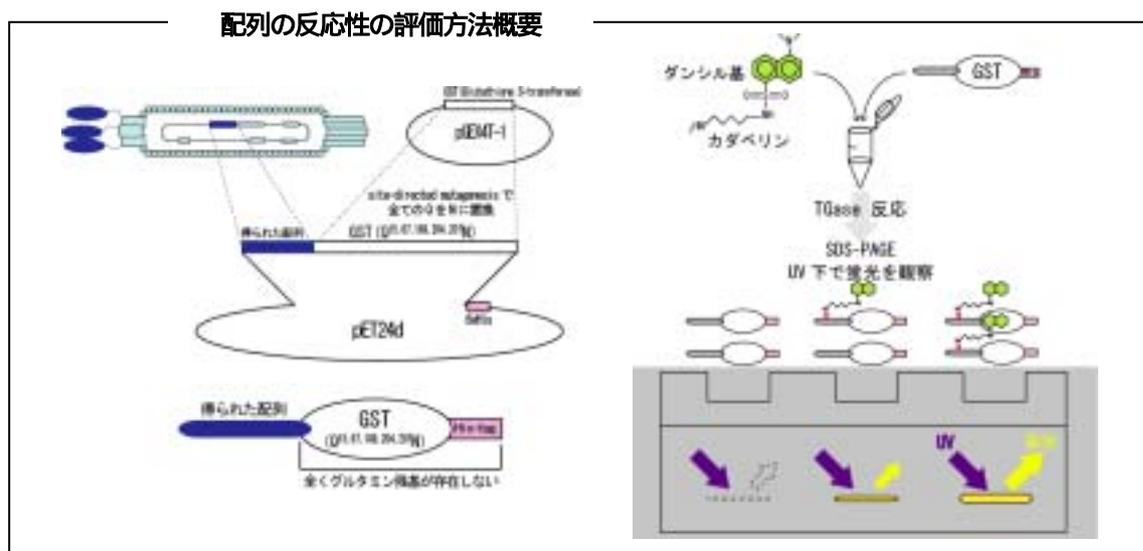


ビオチン標識した一級アミン（ビオチンカダベリン）を取り込ませた。その後、一級アミンの取り込み反応を受けた（=基質となった）ファージをアビジンを用いて精製することで、良好な基質となる配列を提示したファージを選出、これを大腸菌に感染させ増幅するという一連の操作を繰り返し、得られたファージ群から無作為にクローンを選別、塩基配列からその提示している配列を解析した。実験は最も主要なアイソザイムである TGase 2 と



Factor XIII についてそれぞれ行った。その結果どちらの場合においても、多くのクローンが共通する一次配列をそれぞれ有しており、またその配列はアイソザイム間で有意に異なっていた。

更にそれらの配列の TGase に対する反応性を確認・評価する目的で N 末端にこれらの配列を付与した組み換えタンパク質を作成し、蛍光標識した一級アミン（ダンシルカダベリン）の取り込み実験を行ったところ、多くのものが非常に高い反応性を示し、また一部のものは各アイソザイムに対する高い特異性を有していることが確認された。



ラクタスタチン(IIAEK)の媒介する新しいコレステロール分解調節系の解明

森川健正、近藤一男、金丸義敬、長岡 利 (岐阜大・応用生物科学部)

目的 高コレステロール (CHOL) 血症は、動脈硬化症の発症要因として極めて重要である。我々は牛乳の α -ラクトグロブリンから、腸由来培養細胞(Caco-2)のコレステロール(CHOL)吸収評価系とラットを用いた動物実験により、新しい血清 CHOL 低減化ペプチド(IIAEK: イソロイシン(I)-イソロイシン(I)-アラニン(A)-グルタミン酸(E)-リジン(K))。我々は IIAEK をラクタスタチンと命名した) を世界に先駆けて発見し報告した¹⁾。またヒト培養肝細胞 HepG2 において、ラクタスタチンは、肝臓に特異的に発現している CHOL 分解系の律速酵素である、CHOL 7 α -水酸化酵素(CYP7A1)の遺伝子発現を誘導することを発見した²⁾。CHOL 代謝改善ペプチド、特にオリゴペプチド(10 残基以下)の CHOL 代謝改善作用に関する研究は皆無である。本研究では、ラクタスタチンの CHOL 分解系の調節機構を解明するため、ラクタスタチンの CHOL 代謝関連遺伝子に対する影響を検討し、ラクタスタチンの CYP7A1 遺伝子発現誘導に関与するシグナル伝達経路を特定した。

方法 (1)HepG2 にラクタスタチンを添加して、それに伴う CHOL 代謝関連遺伝子の mRNA レベルをリアルタイム定量 PCR で定量した。(2)HepG2 をラクタスタチンと種々のシグナル伝達経路の阻害剤 (MAP キナーゼ阻害剤、カルシウムチャンネルブロッカー、cAMP 阻害剤)で培養後、CYP7A1 mRNA を定量した。(3)蛍光カルシウム指示薬 Fluo-3AM を導入した HepG2 にラクタスタチンを添加し、Fluo-3 の蛍光の測定及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光を観察した。

結果 (1)ラクタスタチンは無添加と比較して CYP7A1 mRNA レベルを特異的に有意に上昇させた。(2)MEK1/2 阻害剤 PD98059 及び L 型カルシウムチャンネルブロッカー-diltiazem の処理により、ラクタスタチンによる CYP7A1 mRNA の誘導は阻害された。(3)ラクタスタチンの添加により、無添加と比較して Fluo-3 の蛍光強度は有意に上昇し、diltiazem 処理によって抑制された。共焦点レーザー顕微鏡で観察した Fluo-3 の蛍光強度もラクタスタチン群において上昇を示した。これらのことから、ヒト培養肝細胞 HepG2 において、ラクタスタチンによる CYP7A1 の活性化(CHOL 分解系の促進)は、カルシウムチャンネルからのカルシウムの流入を伴い、MAP キナーゼに依存

している可能性が示唆された。

1) Nagaoka, S., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 11-17 (2001)

2) 第 58 回 日本栄養・食糧学会講演要旨集 p.66 (2004)

牛乳由来血清コレステロール 低減化ペプチドの発見・解析



血清コレステロール低減化ペプチド

I-I-A-E-K

(ラクタスタチン)



イソロイシン-イソロイシン-アラニン-グルタミン酸-リジン

Biochem . Biophys. Res . Commun. 281, 11-17(2001)

連絡先：長岡 利 電話：058-293-2931、E-mail：nagaoka@cc.gifu-u.ac.jp

食品タンパク質に由来するペプチドによる昇圧酵素レニンの阻害

○川端慎吾、中川 寛、白山敦子、川合晴子、鈴木文昭、中村征夫

(岐阜大・応用生物科学)

【背景】食品タンパク質のプロテアーゼ消化物からは、生理機能を持つ様々なペプチドが見出されている。一般にこのような生理活性ペプチドを見出すためには、対象とする生理的反応もしくは生化学的反応の評価系に、調べたいプロテアーゼ消化物の分画物を添加して、その影響を指標にした探索（スクリーニング）を行う。一方我々は、ゲノム解析に伴って増大する配列データベースを利用した新規スクリーニングの手法を使って、昇圧酵素レニンを阻害するペプチドを見出したので紹介したい。

高血圧症は心筋梗塞や脳卒中などを引き起こす深刻な生活習慣病の一つであり、近年急増している。毎日の食生活から発症を未然に防ぐことの重要性が提唱され、降圧作用が期待される食品が特定保健用食品として数多く市販されるようになってきている。それらの食品のほとんどには血圧調節において重要な役割を担っているレニン-アンジオテンシン系(RAS)の構成因子であるアンジオテンシン変換酵素(ACE)を阻害するペプチドが含まれている。図に示すように、RASの生化学的反応は酵素レニンが基質

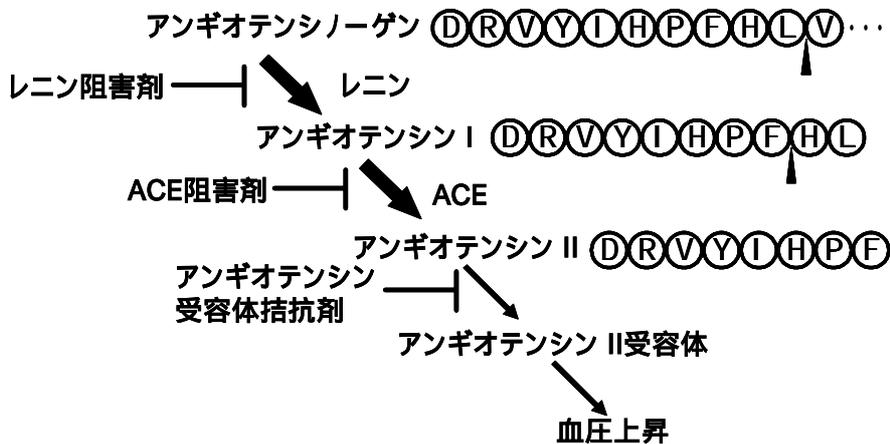


図 レニン-アンジオテンシン系 (RAS)

アンジオテシノーゲンを切断してアミノ酸 10 残基から成るアンジオテシン I を生成することで始まる。アンジオテシン I は ACE によって切断されてアンジオテシン II となり、受容体に結合することで血管の収縮や水分・Na⁺の貯留を促して血圧を上昇させる。我々は、レニンがアンジオテシノーゲンを切断する際に、基質中の His^{P5}-Pro^{P4}-Phe^{P3}(HPF)モチーフが重要な役割を担っていることを見

出し¹⁾、HPFモチーフを有するペプチドがレニン活性を阻害するであろうと考えた。そこでタンパク質配列データベースを検索した結果、HPFモチーフを有する様々な食品タンパク質を見出した。本研究ではオボアルブミン(OVA)、小麦種子貯蔵タンパク質 WSZ1a ならびに大麦種子貯蔵タンパク質 BSZ4 に注目し、これらのタンパク質に由来する 8 つのペプチド RADHPF(オボキニン III)、ADHPFLFLIK(OVA-X由来)、ADHPFLFFIR(OVA-Y由来)、DHPFLFLV、HPFLFLVR(WSZ1a由来)、VANHPFLFLIR、VANHPF、LFLIR(BSZ4由来)をデザインして、レニン阻害能を評価した。

【方法】遺伝子工学的手法を用いて、チオレドキシシン(TRX)のC末端にペプチドが付加した融合タンパク質(TRX-ペプチド)をコードするプラスミドを各々構築した。プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株に導入し、目的の TRX 融合タンパク質を生産する大腸菌株を選択した。コントロールとしてペプチドを融合させていない TRX を生産する大腸菌株も同様に作製した。各々の大腸菌株を培養し、浸透圧ショック法を用いて融合タンパク質を回収した。融合タンパク質は、付加されたポリヒスチジンタグを利用してアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。レニン阻害能は組換え型ヒトレニンと組換え型ヒツジアンギオテンシノーゲンを用いたアンギオテンシン 生成系に各々の融合タンパク質(300 μ M)を添加して、アンギオテンシン 生成量の減少として捉えた。レニン活性はペプチドを付加していない TRX を加えた時の活性を 100%として表した。TRX-ADHPFLFLIK、TRX-ADHPFLFFIR、TRX-DHPFLFLV、TRX-HPFLFLVR、TRX-VANHPFLFLIR については、様々な濃度で反応系に添加して阻害を解析した。

【結果・結論】TRX-ADHPFLFLIK、TRX-ADHPFLFFIR、TRX-DHPFLFLV、TRX-HPFLFLVR、TRX-VANHPFLFLIR(300 μ M)はレニン活性を各々25%、28%、57%、62%、58%阻害し、IC₅₀値は各々600、600<、270、75、80 μ Mであった。TRX-VANHPFLFLIRの阻害様式は競合阻害型を示し、K_i値は53 μ Mであった。TRX-RADHPF、TRX-VANHPF、TRX-LFLIR(300 μ M)はレニン阻害能を示さなかった。これらの結果から、HPFモチーフに加えてC末端側に複数のアミノ酸残基をもつペプチドがレニン阻害能を示すことが明らかとなった。

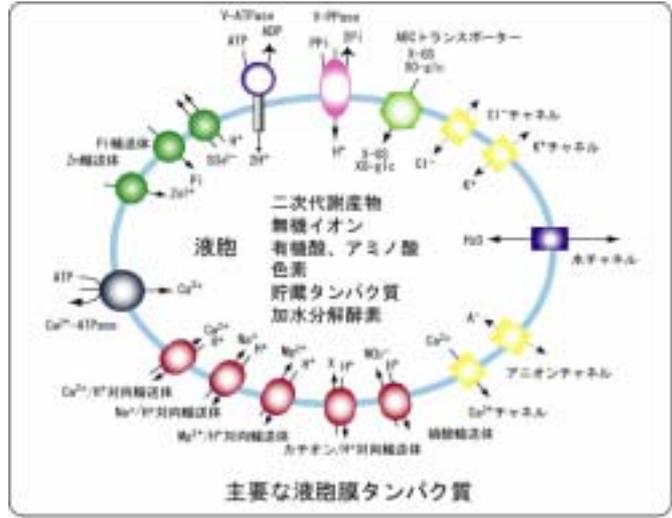
本研究は、(財)飯島記念食品科学振興財団、(財)タカノ農芸化学研究助成財団ならびに(財)東和食品研究振興会の助成を受けて行われた。1)中川ら、日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集、p. 123

液胞膜タンパク質複合体の網羅的解析

増村友昭、中西華代、前島正義、中西洋一 名大院・生命農

植物にある液胞は巨大な酸性オルガネラであり、物質の貯蔵・分解といった基本的な機能に加え、細胞質の pH 調節や Ca^{2+} シグナル伝達など動的な現象に関わる。細胞空間を充填することで、細胞

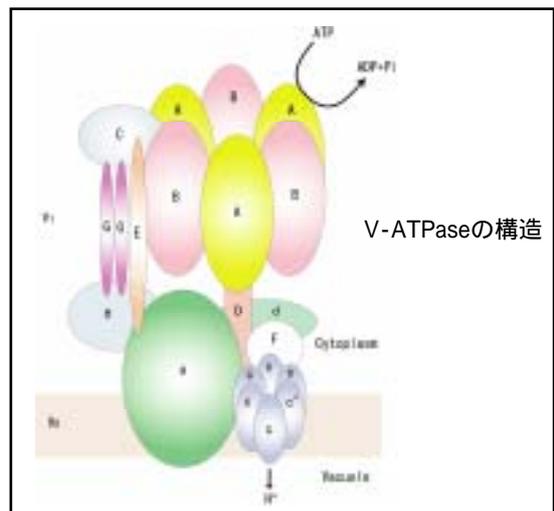
の伸長成長や気孔の開閉のような細胞運動にも関わっている。液胞にこのような機能を与えているのは液胞膜タンパク質とそれらを調節する相互作用ネットワークである。液胞膜タンパク質はこれまでに個々の 1 分子としての研究が進んできてはいるが、近年動物の細胞膜などで蛋白質同士が複合体を作ってシグナル伝達などを行っていることが分かってきて



いるので、液胞膜タンパク質も複合体を形成して機能しているものもあると考えられる。そこで、液胞の機能の全体像を知るためには膜タンパク質同士の相互作用や複合体の解析が必要である。

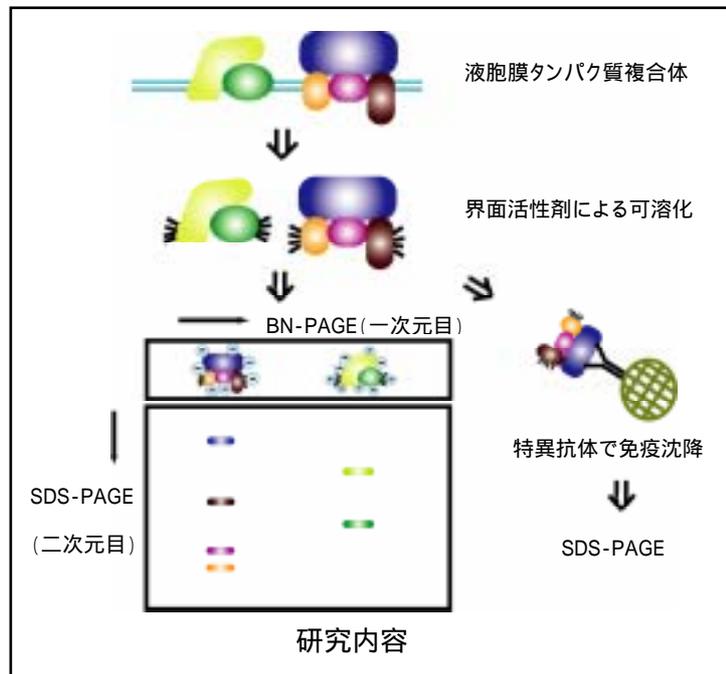
例えば、複合体の解析が進んでいるものとして液胞膜の主要たんぱく質である液胞型 ATPase が挙げられる。液胞型 ATPase は液胞の機能に深く関わっている酸性化を担う分子の 1 つでおよそ 730 kD の V0V1 複合体を形成していて ATP の分解・合成を触媒している V1 部と H^+ の輸送を担い液胞膜に内在している V0 部からなっていて、それぞれ 8 種類と 5 種類のサブユニットから構成されていることが知られている。

本研究では液胞の恒常性維持やイオン輸送に関わるトランスポーターやチャネルなどの膜輸送装置を中心に液胞膜のタンパク質複合体を網羅的に調べ、複合体とその構成サブユニットをデータベース化すること



を目的とした。

対数増殖期のシロイヌナズナ培養細胞 T87 から調整した液胞膜画分を界面活性剤で可溶化し、BN-PAGE、SDS-PAGE という分子量ごとに蛋白質を分離する方法で主要な膜タンパク質複合体とそれらを構成しているタンパク質（サブユニット）を分離した。その結果、複数サブユニットで構成される複合体の候補 22 個、1 種類のタンパク質が数個集まって機能しているホモ多量体の候補 24 個を検出した。並行して、シロ



イヌナズナの主要タンパク質である膜輸送装置に対する抗体（42種）を用いて抗原抗体反応を利用した検出方法（免疫プロット）で BN-PAGE 上での抗原タンパク質の分子量を決定した。また、これらの抗体を用いて可溶化した液胞膜画分の免疫沈降を行い、抗原タンパク質と複合体を形成するタンパク質の検索を行った。質量分析計を用いて検出された複合体の構成成分と思われるタンパク質を同定した。

連絡先：e-mail:i052031m@mbox.nagoya-u.ac.jp

大腸菌由来 γ -グルタミルシステイン合成酵素と Buthionine sulfoximine との複合体の X

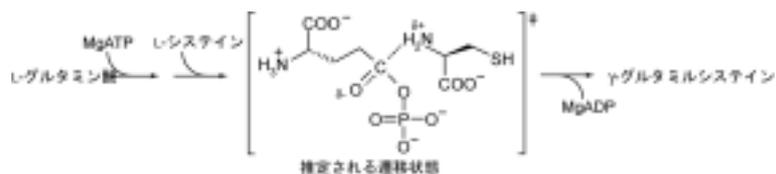
線結晶構造解析

仁位 寛, 日比 隆雄, 小田 順一 (福井県立大学大学院 生物資源学研究科

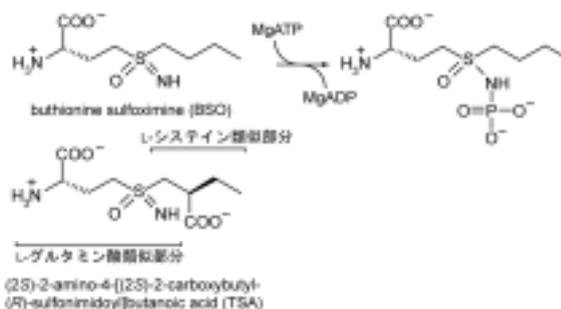
生物資源学専攻)

[目的] グルタミン酸、システイン、グリシンという 3 つのアミノ酸が結合してできるグルタチオンは、微生物・動物・植物の生体内に広く存在する生理活性ペプチドであり、生体内で生成した毒性のある過酸化物質の除去やシステインの貯蔵と輸送などといった重要な働きをしている。ところが、このように本来は有用であるはずのグルタチオンが、病原体により悪用されてしまうケースが知られている。ある種のガン細胞では抗ガン剤が効かなくなる薬剤耐性が問題となっているが、その一つのメカニズムとしてグルタチオンに抱合され細胞外に排出されてしまう機構が知られている。また、キネトプラスト科に属した一連の寄生原虫は、グルタチオンとスペルミジンから合成されるトリパノチオンを生産し、酸化障害からの防御に用いることも知られている。

グルタチオンは、ATP を利用する 2 段階の酵素反応により生合成され、第一段階では、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCS) の触媒作用によりグルタミン酸とシステインから γ -グルタミルシステインが、第 2 段階では、グルタチオン合成酵素の触媒作用により γ -グルタミルシステインとグリシンからグルタチオンが生成される。GCS がグルタチオン生合成を調節する鍵となる酵素であることから、グルタチオン生合成を抑制する本酵素の阻害剤は、ガン細胞の多剤耐性抑制や寄生原虫駆除を行う有効な薬剤となることが期待される。



γ -グルタミルシステイン合成酵素の推定反応機構



γ -グルタミルシステイン合成酵素の sulfoximine 型阻害剤

GCS の阻害剤としてよく知られる buthionine sulfoximine(BSO)は、グルタチオン生合成を抑制することを目的にガン細胞や寄生原虫に対する臨床試験や広範囲の生物種で酸化ストレスの研究に利用されてきた。しかし、BSO は生物種間における選択性が低いことに加えて、グルタミン合成酵素の阻害剤としても作用するなど、その特異性の低さに問題があった。より特異性の高い GCS 阻害剤を開発するためには、GCS の立体構造に基づいた BSO 認識機構の解析が求められる。そこで、大腸菌由来 GCS と BSO の複合体について X 線結晶構造解析を行った。

[結果と考察] 大腸菌由来 GCS - BSO - MgADP 複合体の結晶化は、PEG10,000 を結晶化剤として用いて行った。本複合体結晶の X 線回折データは SPring-8 の BL40B2 において到達分解能 2.3Å で収集した。得られた結晶の空間群は、 $P2_1$ (格子定数は $a=70.5 \text{ \AA}$, $b=97.6 \text{ \AA}$, $c=102.7 \text{ \AA}$, $\beta=109.5^\circ$) であった。精密化の結果、 R 値 21% (R_{free} 値 24%) のモデルを得た。

GCS - BSO - MgADP 複合体の構造解析の結果、予想されたように、ATP の γ 位リン酸基は BSO のスルホキシミド基に転移していた。これまでに、BSO スルホキシミド基に隣接する炭素原子上の水素をカルボキシル基に置換し、遷移状態アナログとして設計・合成した阻害剤 (TSA) を用いて、GCS との複合体の結晶構造解析を行ってきた。この新たに導入したカルボキシル基は、結合する基質システインの α -カルボキシル基に相当するため、TSA が結合するとこのカルボキシル基に水素結合するように Tyr241 と Tyr300 の側鎖が回転し、GCS のシステイン結合部位が誘導的に形成されることが既に明らかになっている。この GCS - TSA 複合体構造と比較すると、BSO が本酵素に結合した場合、Tyr300 側鎖のターンは起こらず、水素結合クラスターの形成ができないことが分かった。この Tyr300 側鎖のターンが誘導されないことが、BSO の阻害定数が TSA より約 500 倍大きく、酵素への親和性および選択性が低下している原因と考えられた。従って、このコンホメーション変化と水素結合のクラスターの形成を制御することが本酵素の強力な阻害剤の設計に重要であると考えられた。一方、Tyr300 とは異なり、Tyr241 の側鎖のターンは誘導されることが示唆された。この Tyr241 側鎖のコンホメーション変化は、Tyr241 の側鎖と BSO のグルタミン酸類似部分との CH- π 相互作用および Tyr241 と Gln144 との水素結合によって安定化されていると考えられ、この残基がシステインだけでなくグルタミン酸の認識にも関わっていることが示唆された。