



公益社団法人 日本農芸化学会
中部支部 第165回例会

ミニシンポジウム

「日本発 商業化をめざす遺伝子組換え作物」

および

一般ポスター発表

平成24年10月27日(土)

会場：名古屋大学シンポジオン

13:00 開会挨拶・支部功労者表彰

ミニシンポジウム「日本発 商業化をめざす遺伝子組換え作物」

13:15 「野生植物の遺伝子資源を利用したバイオ燃料植物ヤトロファの分子育種」
明石欣也（鳥取大学 農学部）

14:00 「Transgenic Flowers for Everyone—研究の成果を消費者に届けるために
何が必要か」
大坪憲弘（農研機構 花き研究所）

15:00 一般ポスター発表

16:30 中部支部学術奨励賞および中部支部企業奨励賞表彰式
懇親会

野生植物の遺伝子資源を利用したバイオ燃料植物ヤトロファの分子育種

明石 欣也（鳥取大・農）

地球上において南北回帰線に挟まれた太陽光高照射地帯は、植物光合成による莫大なバイオマス生産能を有する地域である。またこれらの地域は生物資源の宝庫であり、植物においても多様な未利用遺伝子資源を保有すると期待される。これら遺伝子資源を探索し産業利用に向け開発を進めることへの関心は、南方諸国の研究者において特に強い。持続的な循環型社会の構築を目指す上で、バイオマス高生産能力を有するこれら現場の実情と、実用化を強く意識した領域横断型の研究開発、そして南方諸国において次世代を担う海外研究者との連携が重要であろう。

世界の乾燥地には、現地環境に高度に適応した砂漠植物が生存し、それらの一部は深根性など作物学的に重要な形質を具備することが知られている。アフリカ・ボツワナ共和国農務省研究部との共同研究で、カラハリ砂漠に自生する野生種スイカの分子生理研究を継続して遂行している。野生種スイカは乾燥に応答して根の伸長を顕著に促進させる。日本の栽培種スイカとの比較トランスクリプトーム解析により、Znフィンガー型転写因子であるCLZFB1が、乾燥下の野生種スイカ根において特異的に発現上昇することが見いだされた。また、CRES-T手法によりCLZFB1の発現を抑制させた形質転換スイカ毛状根では、根の伸長が抑制されるのに対し、CLZFB1を誘導型プロモーターにより過剰発現させた形質転換スイカ毛状根では、根の伸長が顕著に促進された。CLZFB1を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナにおいても、有意な根の伸長促進が観察された。これらの結果は、作物のストレス耐性およびバイオマス生産性の改良において、野生植物の遺伝子資源を用いた分子育種が有効であることを示唆している。上記の遺伝子およびその利用についての特許を、奈良先端大とボツワナ農務省が共同で国際出願し、多様な作物への展開が進められている。また、バイオ燃料植物ヤトロファの分子育種に本遺伝子を活用する研究を含む総合開発計画がJICA-JSTのSATREPSプロジェクトに採択され、実用化に向けた取り組みが進められている。

ヤトロファは、水分欠乏や高温に比較的強く、乾燥地や荒廃地でも栽培可能で、脂質含量の高い種子を生産する能力を有することから、次世代型バイオ燃料源の主力の一つとして注目される。しかしながら、世界におけるヤトロファ栽培は、乾燥・冷害など気象要因による生育阻害や、病虫害等による損害、また低い着果効率などから十分な生産を上げていない例も多く、栽培地の気候風土に合った農法開発と育種が望まれている。ヤトロファの様々な遺伝子の機能解析を行い、かつ分子育種によるヤトロファ生産性の改良を進めるために、インドネシア・ボゴール農業大学との共同研究で、インドネシアにおける主力品種であるIP-2Pを用いて、ヤトロファの遺伝子組み換え技術を開発した。選抜マーカーや除菌用薬剤などアグロバクテリア手法の様々な段階を改良することで、ヤトロファに外来遺伝子を高効率で導入する実験系を構築している。この技術を利用し、脂質組成の改変や、酸性土壌耐性、乾燥耐性などを指向した形質転換ヤトロファの作出と機能解析を進めている。本講演では、アジア・アフリカの海外パートナーと連携した野生植物の遺伝子資源の分子育種利用と、ヤトロファの生物工学技術の現状と展望について報告したい。

遺伝子組換え作物の実用化には莫大なコストと多大な労力、長い時間が必要であるため、市場規模が大きく商品寿命の長い主要穀物や油糧作物を対象が限られているのが現状である。また、組換えで付与される形質も病虫害・ストレス耐性や除草剤耐性等による収量増加と省力化のように主に生産者にメリットのあるものが優先されてきた。サントリーが1997年と2009年にそれぞれ販売を開始した青いカーネーション‘ムーンダスト’や青いバラ‘アプローズ’は、消費者に明確なメリットを提供する点で上記とは一線を画す画期的な商品であったが、これにかかる投資は後者だけでも20年・30億円と言われており、純粋に商業的な意味での回収は不可能と言われている。花きは国内だけでも毎年3,000～5,000もの新品種が市場に出ており、当然そのほとんどは商品寿命が短い。このような状況の下で組換え花きの商業利用を進めるためには、1品種あたりの開発と実用化ためのコスト・労力・時間を大幅に減らし、効率的に多数の品種を生み出すシステムを構築することが必要である。

私たちは、産総研の高木らによって開発された植物独自の遺伝子ノックアウト技法であるChimeric Repressor Gene Silencing Technology (CRES-T)法に着目し、内在遺伝子の機能を抑制することで花の色や形を変える技術の開発に2004年に着手した。その後、機能重複する複数の転写因子に対してもドミナントな抑制因子として働くキメラリプレッサーが基礎的な遺伝子機能解析のみならず高次倍数性作物の形質改変のツールとしても有効であることを、シロイヌナズナ（産総研）、キク、トレニア（花き研）、アサガオ（筑波大）、トルコギキョウ（山形農総研セ）、リンドウ、タバコ（岩手生工研）、シクラメン（北興化学）、ペチュニア、カーネーション、バラ（サントリー）での多数の組換え体作出と表現型解析を通じて明らかにしてきた。遺伝子機能や表現型の情報をデータベース化して公開<http://www.cres-t.org/fiore/public_db/>する一方で、植物種を問わず八重咲き形質や不稔形質を安定的に導入するための技術開発を集中的に進めた。この過程で作出した様々な組換え花きのうち、雄ずいと心皮の形成に関わる遺伝子の機能抑制により作出した『多弁咲きシクラメン』（図）は、1) 商業的な価値が高く、2) 雄ずい、雌ずいがなく完全に不稔化しており、3) 日本国内に交雑野生種が存在せず、4) 培養による増殖技術が日本独自のものであるなどの好条件を兼ね備えていることから、公的研究の成果としては初の組換え花きとして商業化を目指した研究開発を進めている。

本講演では、CRES-T法による新形質花きの開発事例や、今年度開始した『青色・多弁咲き・二重不稔シクラメン』の実用化プロジェクトを紹介しつつ、今後の日本での組換え体実用化の方向性や社会受容の敷居を下げていくための考え方、取り組みなどについても触れたい。

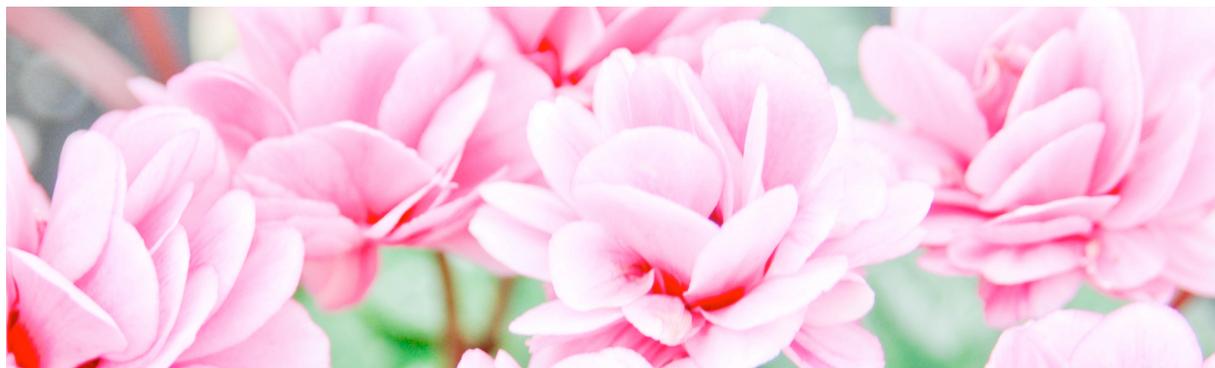


図. 花弁数が40～50枚に増加して不稔化した『多弁咲きシクラメン』（写真提供：北興化学工業(株)）

P01

フェルラ酸の肥満・糖尿病における炎症抑制および酸化ストレス制御に関する研究

○上野有紀¹, 西川佳那¹, 濱田愛¹, 山田雄太¹, 大池真央¹, 濱島佑弥¹, 池山将成¹, 大澤俊彦¹
(¹愛知学院大心身科学)

【目的】肥満・糖尿病の患者数は増加の一途をたどっており、その治療・予防の対策は急務とされている。2型糖尿病の発症要因として、エネルギーの過剰摂取による肥満症が注目されている。肥満症では、組織において酸化ストレスが亢進することが知られている。本研究では、多くの植物に含有するフェノール性化合物のフェルラ酸(FA)に着目した。FAはこれまでに抗酸化作用および抗腫瘍活性が報告されている。肥満を伴う2型糖尿病マウスにおいてFAによる血糖値低下が報告されているが、その作用機序の詳細は解明に至っていない。そこで本研究では脂肪細胞と糖尿病動物を用いて、FAによる、肥満・糖尿病由来の炎症抑制作用および酸化ストレス制御機序を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】マウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 は、10%FBS 含有 DMEM にて 24 ウェルプレートにて培養した。細胞が 100%コンフルエントに達した後に定法により分化誘導を行い、90%以上に分化した細胞を実験に用いた。分化誘導後 6 日目の細胞に 25 μ M あるいは 50 μ M の FA を前処理し、1 時間後に mouse TNF- α を 10 ng/ml となるように添加し、24 時間後に培養上清を回収し、IL-6 分泌量を定量した。その結果、TNF- α の添加により IL-6の分泌量が増加したのに対し、FA を前処理することにより、IL-6の分泌量は減少した。この結果から、FA は脂肪細胞において炎症を抑制する作用を示すことが明らかとなった。そこで、肥満を伴う 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスを通常飼料群、0.5% FA 含有飼料群に分け飼育し、血糖値、血清トリグリセリド等を測定した。その結果、FA の経口投与により、血清トリグリセリドの上昇抑制傾向が認められた。現在、炎症・酸化ストレスに関連するバイオマーカーおよび遺伝子発現量の測定中であり、この結果を報告する予定である。

P02

正常ヒト線維芽細胞における韃靼ソバ糖化液由来メラノイジンの老化抑制作用

○今井理恵¹, 久志本尚子², 片山茂^{1,2}, 中村宗一郎^{1,2} (¹信大農, ²信大院農)

【目的】

ソバは古くから健康食品として親しまれており、高血圧や糖尿病など生活習慣病に対する予防効果が期待されている。なかでも韃靼ソバはポリフェノールの一種であるルチンを多く含有していることから、機能性食品素材として活用すべく様々な研究が進められている。本研究では、韃靼ソバ全層粉を酵素処理して得た韃靼ソバ糖化液の機能性を調べることにした。今回は特に、韃靼ソバ糖化液中に含まれるメラノイジン(メイラード反応最終生成物)の抗老化作用を検討した。

【方法・結果】

韃靼ソバ糖化液(日穀製粉株式会社より提供)を XAD-2 カラムクロマトグラフィーに供し、70%エタノールでメラノイジン画分を溶出した。続いて、排除限界分子量 500-1000 の透析膜で透析し、凍結乾燥したものをメラノイジンとした。はじめに、分離した韃靼ソバ糖化液由来メラノイジン(TBメラノイジン)の抗酸化能について、ヒト正常線維芽細胞(TIG-1)を用いた *in vitro* アッセイによって検討した。TIG-1 細胞に TBメラノイジンを添加し 12 時間培養後、過酸化水素を添加し、酸化ストレスによる細胞老化を誘発した。その結果、細胞生存率は過酸化水素(終濃度 3mM)の添加により 36%まで低下した。一方、TBメラノイジン 50 μ g/ml を添加したところ、細胞生存率は 91%となり、有意な酸化ストレス軽減効果が認められた。このとき、細胞老化マーカーとして広く用いられている老化特異的ガラクトシダーゼアッセイにより老化細胞の検出をおこなったところ、老化細胞の減少が観察された。以上の結果より、TBメラノイジンは正常ヒト線維芽細胞に対する細胞老化抑制作用を有することが示された。

P03

ケールの長期摂取は老化促進モデルマウス (SAMP8) の Hsp70 および Hsp40 の発現を促進させる
○久志本尚子¹, 片山茂¹, 須藤祐人², 中村宗一郎¹ (¹信大院農, ²ヤクルトヘルスフーズ)

【目的】

高齢化社会の進展とともに、アンチエイジングへの関心は急速に高まっている。老化にともなう身体の機能低下は遺伝要因だけでなく食生活などの環境要因の影響も受けている。「青汁」の原料植物であるケールは、抗酸化成分を高含有していることが報告されている。本研究では、老化促進モデルマウス (Senescence-accelerated mice prone 8; SAMP8) を用いて、ケールの長期摂取による老化抑制効果を検討した。

【方法・結果】

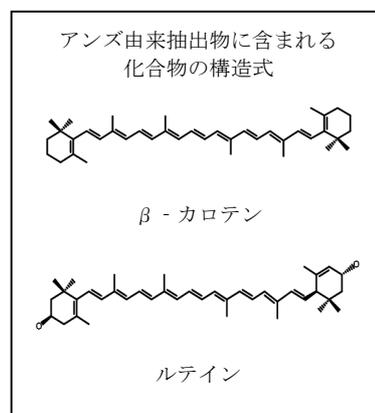
雄性 SAMP8 をコントロール群と 0.8% (w/w) ケール粉末混合飼料の摂取群 (以下、ケール摂取群と略す) の 2 群に分け、自由摂取で 16 週間飼育した。供試ケールには *Brassica oleracea* を用いた。摂取期間終了後、記憶学習能力の検討として、Morris 水迷路試験を実施した。その結果、Morris 水迷路試験において、ケール摂取群では、コントロール群と比較してゴールへの到達時間が有意に短縮され、脳機能の改善効果が示唆された。このことは脳での抗酸化酵素群の遺伝子の発現亢進によるものと予想したが、Mn-SOD および Cu/Zn-SOD 遺伝子の発現量に変動は見られなかった。肝臓の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、ケール摂取群において Hsp70 および Hsp40 といった分子シャペロンの関連遺伝子群の発現上昇が認められた。リアルタイム PCR 法により Hsp70 の mRNA 発現レベルを測定したところ、肝臓だけでなく脳においても顕著な発現上昇が認められた。さらに、脳内の Hsp70 タンパク質の発現レベルも顕著に増加することが確認された。以上の結果より、ケールの長期摂取による記憶学習能力の向上は、Hsp70 および Hsp40 の発現促進に起因することが示唆された。

P04

アンズ抽出物摂取が老化促進マウス SAMP8 の空間記憶認識能力維持に及ぼす影響
○杉山遥, 片山茂, 小川紘史, 中村宗一郎 (信大院農)

【目的】世界規模で進行を続ける人口高齢化の中で、今後ますます認知症患者の比率が増え続けることが予想されている。有効な認知症治療薬は未だ開発途上であるが、食品由来成分の中には *in vitro* 系でアミロイドβ蛋白質 ($A\beta_{1-42}$) のアミロイド線維形成抑制効果を示すものがあることはよく知られている。本研究では、 $A\beta_{1-42}$ を用いた *in vitro* 系だけでなく老化促進マウス (SAMP8) を用いた *in vivo* 系によってアンズ抽出物の抗認知症効果を調べたのでその結果を報告する。

【方法・結果】アンズ抽出物は、ジエチルエーテルにより抽出し、けん化したものを使用した。アンズ抽出物を用いて $A\beta_{1-42}$ に対する抗アミロイド効果をチオフラビン T 蛍光発色法 (ThT)、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察法、ドットブロット法によって調べた。その結果、ThT 法においてアンズ抽出物は高いアミロイド線維形成抑制効果を示すことが確認された。このことは透過型電子顕微鏡、ドットブロット法によっても追認された。そこで、SAMP8 を用いた実験を行った。すなわち、14 週齢の SAMP8 に 0.05% アンズ抽出物混飼料を 10 週間与え (自由摂取)、飼育後、Morris 水迷路試験を行い、ANY-maze を用いて空間記憶認識能力を調べた。また採取した脳の $A\beta$ 量を ELISA 法により測定した。その結果、アンズ抽出物摂取群ではコントロール群に比べて空間記憶認識能力の低下抑制効果と脳中の $A\beta_{1-42}$ 量の減少が確認された。このことから、アンズ抽出物には $A\beta_{1-42}$ の線維化を抑制する機能があり、このことで空間記憶認識能力の低下を防止したものと推察された。



THP-1 由来樹状細胞を用いたアレルゲン性評価法の開発

○久木田卓弥¹, 今井理恵², 片山茂^{1,2}, 穂山浩³, 中村宗一郎^{1,2} (¹信大院農, ²信大農, ³国立衛研)

【目的】

近年、加水分解小麦粉末を含有する医薬部外品および化粧品による食物アレルギーの発症が大きな問題となった。こうした背景から、食物アレルギー原因物質に対するハイスループット解析が可能な *in vitro* スクリーニングアッセイ系の確立が求められている。そこで本研究では、ヒト単球系細胞株である THP-1 を用いて、即時型アレルギー発症に関するアレルゲン性評価のためのアッセイ系の開発を目的とした。

【方法・結果】

ヒト単球系細胞株 THP-1 は PMA および IL-4 存在下で4日間培養することで、樹状突起を有した CD11c および DC-SIGN 陽性の典型的な樹状細胞 (DC) 様に分化した。さらに、抗原提示分子の一つである HLA-DR, 補助刺激分子である CD86 の発現上昇をフローサイトメトリーにより確認した。このことより、PMA および IL-4 で分化誘導した DC 様 THP-1 が抗原提示能を有していることが示された。続いて、分化誘導した DC 様 THP-1 が、種々の抗原刺激に対して抗原提示が誘導されるか検討した。抗原として、オボアルブミン、オボムコイド (鶏卵), **Figure 1, Figure 2** (ソバ), β ラクトグロブリン (牛乳), Cry j 1 (スギ花粉), Der f 1 (ダニ) の7種類を用いた。その結果、それぞれの抗原刺激に応じて、HLA-DR ならびに CD86 の著しい発現上昇が認められた。一方、OVA をペプシン消化することで抗原提示能が低下することが示された。以上の結果より、DC 様 THP-1 が抗原提示能を指標としたアレルゲン性評価のための有用な手法であることが示された。

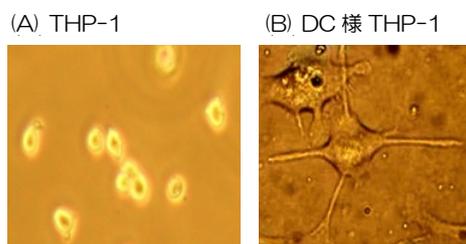


図1. THP-1の樹状細胞様への分化

遺伝子工学的手法で調製されたヒト型ステフィンA及びBの抗ウイルス活性に関する研究

○森本賢右, 片山茂, 中村宗一郎 (信大院農)

【目的】

ヒト型ステフィンA及びBは、ともにシスタチンファミリーに属する分子量約10 kDaのタンパク質性システインプロテアーゼインヒビターである。これらのタンパク質はヒトの細胞や組織内に普遍的に存在しており、細胞や組織に対して保護的な役割を果たしていることが知られている。また、これまでの研究によってシスタチンファミリーはウイルスの感染を抑制する効果を有することが示唆されている。そこで本研究では、酵母発現系を用いてヒト型ステフィンA及びBを調製し、それらの抗ウイルス活性を調べたので報告する。

【方法・結果】

ヒト型ステフィンA及びBのcDNAをピキア発現ベクターのマルチクローニングサイトにそれぞれ挿入し、これらで *Pichia pastoris* を形質転換し、酵母発現系を構築した。培養液中に分泌された組換え体はサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200) によって精製した。

抗ウイルス試験にはノロウイルスの代替として多用されているネコカリシウイルス (FCV) を用いた。感染宿主細胞にはネコ腎細胞 (CRFK) を用いた。コンフルエント化したCRFKにFCVと供試ステフィンの混合溶液を添加し、2日間培養した後、宿主細胞の生存率をMTT法で測定することによって抗ウイルス性を調べた。その結果、ヒト型ステフィンA及びBは、ともに強い抗ウイルス活性を示し、BはAに比べより強い活性を示すことが明らかにされた。チオフラビンTを用いてアミロイド形成性を、シスパリナリン酸を用いて分子表面疎水性を測定したところBはAに比べ、アミロイド形成も表面疎水性も高いことが明らかにされた。本研究によって、このような分子構造の違いが抗ウイルス性の強弱に寄与していることが示唆された。

β-1,3-glucan の気管支喘息モデルマウスにおける気管支保護作用

○松井亜依, 西尾昌洋, 平野彬尚, 磯野直人, 梅川逸人
(三重大学大学院生物資源学研究科)

【目的】

β-1,3-glucan は、β-glucose が β-1,3 型結合した多糖である。生物由来の β-1,3-glucan は、側鎖(β-1→6)があり、その間隔・側鎖の長さは多様である。本研究では酵素合成した側鎖のない β-1,3-glucan が、気管支喘息モデルマウスに与える影響を検討した。

【方法・結果】

雄性 BALB/c (7 週齢)マウスを用い、酵素合成した β-1,3-glucan (分子量約 1 万・glucose 重合度 70: DP70) を用いて実験を行った。まず、Ovalbumin (SIGMA 社)と Alum (Thermo 社)を混合したものを 1 週間毎に 3 回腹腔内注射を行った。その後 5 日間、超音波式ネブライザ (Omron 社)を用いて 1.0 mg/mL DP70 を毎日 20 分吸入した。続いて 5 日間、5 % Ovalbumin を毎日 30 分吸入し喘息誘発を行った (喘息誘発群: DP70-OVA 群・Control-OVA 群)。また、5 % Ovalbumin を生理食塩水 (生食) に置換えた群を喘息非誘発群とした (喘息非誘発群: DP70-S 群・Control-S 群)。これらの処置後、気管・肺・血液を分析した。

その結果、喘息誘発群において DP70-OVA 群は Control-OVA 群に比較して白血球数が有意に減少した。また、DP70-OVA 群は Control-OVA 群に比べて気管支平滑筋の厚さが有意に減少した。一方、喘息非誘発群においても、気管支平滑筋の厚さは Control-S 群に対して DP70-S 群は有意に減少した。

【考察】

Ovalbumin 誘発気管支喘息モデルマウスにおける β-1,3-glucan (DP70) 投与は、白血球数の増加を抑制し、気管支平滑筋の肥厚を抑制したことより、喘息発作に起因する喘息性気管支閉塞を β-1,3-glucan の吸入が抑えると考えられた。今後は、β-1,3-glucan の喘息性気管支閉塞における IgE レベルの測定とヘルパー T 細胞の関与について解明していく予定である。

プロアントシアニジン類の合成と抗腫瘍活性

(信州大学 大学院農学研究科 機能性食料開発学専攻^a, 信州大学 農学部 応用生命科学科^b,
京都薬科大学 創薬化学系^c)

○藤井 渉^a, 加藤 幸^a, 須田真人^a, 戸田一弥^b, 川口耕一郎^b, 藤井 博^b, 服部恭尚^c, 真壁秀文^a

【目的】ポリフェノール的一种であるプロアントシアニジン類は自然界に幅広く存在し、主に穀物や果物類に多く含まれている。その生理活性としては抗酸化活性を始め、抗動脈硬化活性、ガン細胞増殖抑制活性などが報告されている。しかし、プロアントシアニジン類は自然界より純粋な状態で単離することは困難であるために詳細な構造活性相関の研究は遅れている。

本研究ではプロアントシアニジン類のうちカテキンまたはエピカテキンのオリゴマーおよびガロカテキンとカテキンの重合体であるプロデルフィニジン B3 と C2 の合成を行い、ヒト前立腺ガン細胞における抗腫瘍活性試験を行ったので報告する。

【方法・結果】カテキンの 2~5 量体を Yb(OTf)₃ や AgOTf をルイス酸として用いて縮合反応を行うことにより合成した。また、エピカテキンの 2~4 量体は Yb(OTf)₃ を用いて合成した。一方、プロデルフィニジン類の合成は phloroglucinol と methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate を出発物質とし、16 段階で求電子剤を合成した。続いて、求電子剤と別途合成した求核剤を等量用いた Yb(OTf)₃ による縮合反応を行い、収率 86% で 2 量体を合成した。その後、全ての保護基を脱保護しプロデルフィニジン B3 (**2**) の合成を完了した。また同様に AgOTf を用いて 2 量体と単量体の縮合反応を行い、収率 73% で 3 量体を合成した。その後、全ての保護基を脱保護しプロデルフィニジン C2 (**1**) の合成を完了した。以上のようにして得られた化合物とポジティブコントロールとして epigallocatechin gallate (EGCG) を用いて、ヒト前立腺ガンの細胞に対してガン細胞増殖抑制試験を行った。その結果、プロデルフィニジン B3, C2 は EGCG と同程度の抗腫瘍活性を有していたが、カテキンやエピカテキンのオリゴマーは顕著な活性を示さなかった。

P09

ソロモン諸島産プロポリス由来新規プレニル化合物の単離とその抗菌活性

○乾 沙王里¹、細谷 孝博¹、島村 裕子¹、増田 修一¹、白藤 謙一²、Reuben T. Moli³、熊澤 茂則¹
(¹静岡県大院 食品栄養、²特定非営利活動法人 APSD、³NGO APSD SOLOMON)

【目的】

プロポリスとは、ミツバチが周辺の植物から採取した樹脂状物質を巣に蓄えたもので、生産地周辺の植生によって原料となる植物(起源植物)は異なる。一般的には、ポプラやバッカリスを起源植物とするプロポリスがよく知られているが、近年では、起源植物の不明なプロポリスも多数見つまっている。我々はこれまでに、沖縄産プロポリスからいくつかのプレニルフラボノイドを同定するとともに、その起源植物をトウダイグサ科のオオバギ(*Macaranga tanarius*)であることを明らかにした。今回、ソロモン諸島産プロポリスを入手したため、このプロポリスの成分研究と抗菌活性評価を行った。

【方法・結果】

まず、ソロモン諸島産プロポリスエタノール抽出物を HPLC で分析した。その結果、ソロモン諸島産プロポリスは沖縄産プロポリスと類似のピークパターンを示した。このことから、ソロモン諸島産プロポリスの起源植物は、沖縄産プロポリスと同様 *Macaranga* 属の植物であることが推測された。また、ソロモン諸島産プロポリス抽出物を各種クロマトグラフィーにより分画し、主なフェノール性成分を単離した。それらを、MS、NMR 等の各種分析機器を用いて構造解析し、5 個の新規プレニル化合物と 16 個の既知化合物を同定した。また、単離した化合物を用いて、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌活性を評価した。その結果、ソロモン諸島産プロポリスには、ストレプトマイシンと同等の高い抗菌活性を示す化合物が含まれていることを確認した。

P10

亜鉛トランスポーターZIP4 の発現を促進する大豆由来成分の単離・解析

○大倉克摩¹、高橋正和¹、橋本直子²、永尾雅哉²、神戸大朋²、大東 肇¹
(¹福井県大院生物資源、²京大院生命科学)

【目的】

亜鉛は、タンパク質の構造因子や酵素の補因子、細胞内シグナル伝達因子などとして重要な微量必須金属元素である。その欠乏症には味覚機能障害や皮膚疾患などが知られ、食事からの摂取が欠乏症の予防に最も重要である。ZIP4 は腸管吸収に必要な亜鉛トランスポーターであり、ZIP4 発現促進化合物の経口摂取には、亜鉛吸収効率の向上による欠乏症の予防・改善効果が期待される。本研究では各種食素材の探索結果から、特に強い ZIP4 発現促進活性を示す大豆抽出物に注目し、活性化化合物の精製を行った。また、*in vivo* 効果を検証するため亜鉛欠乏ラットにおける実験系の構築を検討した。

【方法・結果】

活性画分の確認には、ZIP4 発現細胞株である Hepa 細胞を用いた。この細胞をサンプル存在下で培養後、細胞破砕物を調製し、Western 解析によって ZIP4 発現促進活性を判定した。大豆抽出物 4.2 g を YMC-GEL ODS-A による逆相中圧カラムクロマトグラフィー等に供した結果、3 種類の化合物 S-1、S-2、S-3 をそれぞれ 30、61、64 mg 得た。これらは NMR より互いに関連した成分と推定できた。しかし、S-1 が濃度依存的に ZIP4 発現促進活性を示すことに対し、S-2 と S-3 には活性は認められなかった。

一方、実験動物による亜鉛欠乏症モデル系を構築するため、4 週齢の SD ラット(雄)を通常飼料で 5 日間予備飼育後、基本飼料を亜鉛欠乏飼料(F2ZnDD)に変えて 3 週間飼育した。その結果、亜鉛無添加食群では成育阻害や手足の皮膚炎が認められたが、亜鉛添加食群ではこれらの欠乏症が防止された。

3 品種の柿未成熟果実由来食物繊維の機能性比較 ○武川加奈子, 松本健司 (石川県立大)

【目的】

柿未成熟果実は胆汁酸吸着をメカニズムとした脂質代謝改善効果や 2 型糖尿病への有効性を有するということが我々の研究から明らかになり、新たな機能性食品素材として期待されている。しかしながら、柿の品種は非常に多く、実用化には機能性の高い品種の選別が必要である。今回、日本を代表する品種である富有柿（完全甘柿）と平核無柿（不完全渋柿）および干し柿として利用される蜂屋柿（完全渋柿）を用い、品種間の機能性の違いを明らかにすることを研究の目的とした。

【方法・結果】

柿未成熟果実を乾燥した後、水溶性成分を除去し、再乾燥後、柿由来食物繊維とした。胆汁酸の 1 つであるコール酸に対する吸着能を調べ、フラボノイド含量を測定した。さらに、セルロースの代わりに柿由来食物繊維を 2% 添加した高脂肪餌をマウス (C57BL/6, オス, n=7) に与え、10 週間の動物実験を行った。

胆汁酸吸着能は、富有柿が低く、平核無柿および蜂屋柿が有意に高く、フラボノイド含量にも同様の傾向がみられた。動物実験では、すべての柿摂取群で糞からの胆汁酸排泄が有意に増加し、*in vitro* での胆汁酸吸着能と同様の傾向がみられた。富有群は、糞中トリグリセリドが有意に増加したが、血液生化学値に大きな変化はみられなかった。平核無群は、糞中トリグリセリドおよび糞中遊離脂肪酸量が有意に増加、血糖値および血漿中遊離脂肪酸量が有意に減少、血漿中 non-HDL コレステロール値は減少傾向 (P=0.077) にあった。一方、蜂屋群は、血糖値、血漿中遊離脂肪酸量および血漿中 non-HDL コレステロール値が有意に減少した。以上の結果から、フラボノイド含量及び *in vitro* での胆汁酸吸着能は *in vivo* での効果の指標になること、また、甘柿よりも渋柿に血中脂質および血糖値の上昇抑制効果が期待できることが明らかになった。

新規抗リパーゼ鶏卵抗体による抗肥満作用

○広瀬麻衣¹, 安藤太志¹, ラハマンソフィクル², 梅田浩二², 児玉義勝², 島田昌也¹, 長岡利¹
(¹岐阜大応生, ²(株)イーダブルニュートリション・ジャパン)

【目的】

肥満の予防改善には、腸管内のリパーゼによる脂肪分解を阻害し、食餌由来の脂質吸収を抑制することが効果的な手段の一つである。本研究はより安全で有効性の高いリパーゼ阻害剤として、日常的に摂取される鶏卵由来の新規鶏卵卵黄抗体 (IgY) に着目した。豚由来腓リパーゼを免疫させた鶏の卵黄から抗リパーゼ鶏卵抗体 (Anti-lipase IgY)、対照としてリパーゼを免疫しない卵黄から鶏卵抗体 (Control IgY) をそれぞれ精製し、Anti-lipase IgY の腓リパーゼ阻害による脂質代謝への影響を *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

【方法・結果】

In vitro において、Anti-lipase IgY の濃度依存的な添加により、トリオレインからのオレイン酸生成量が減少し、リパーゼ活性が有意に低下した。*In vivo* にて、C57BL/6J 雄マウスに Anti-lipase IgY を配合した脂質エマルジョンを経口投与したところ、血漿トリグリセリド (TG) は低下傾向を示した。次に、同マウスに IgY を 8 日間にわたり経口および混餌投与したところ、Anti-lipase IgY 混餌投与群は IgY 無添加 (対照群) と比較して精巣上体脂肪重量が有意に減少した。さらに、同マウスに、IgY 無添加 (対照群)、0.2% Anti-lipase IgY (AY 群)、0.2% Control IgY (CY 群) の 3 群で 35 日間混餌投与を実施した。その結果、AY 群は対照群と比較して、脂肪組織重量が有意に低下するとともに、糞中の総脂質、胆汁酸、リン脂質、TG、遊離脂肪酸や肝臓 TG が有意に増加した。また、AY 群は CY 群と比較して肝臓総脂質、リン脂質、コレステロールが有意に減少した。以上の結果から、Anti-lipase IgY はリパーゼ活性の阻害により、腸管での脂質吸収抑制作用を介して、抗肥満作用を発揮することを発見した。Anti-lipase IgY の 0.2% の有効投与量は既知の食品成分では最強であり、製品化が大いに期待できると考える。なお、本研究は、JST 顕在化研究の支援を受けて実施したものである。

記憶改善効果を示すオニヒトデ由来ステロイド配糖体の体内動態

○山田 理紗¹、羽賀 雅俊¹、小鹿 一¹、間宮 隆吉²、鍋島 俊隆² (¹名大院生命農、²名城大薬)

【目的】

神経成長因子 (NGF) は、神経細胞の分化・生存維持に必須の因子である。沖縄産オニヒトデから発見したステロイド配糖体 *acanthasteroside B3* (以下 B3) は、NGF 様の神経突起伸長活性を示し、加齢および老化促進マウスに投与すると記憶・認知改善効果を示す。また、PC12 細胞 (神経モデル細胞) に対する NGF の作用を増強 (NGF 増強活性) する。しかし、B3 投与後のマウスの体内動態は不明であったため、本研究では、マウスの血液、脳への移行の解析、および B3 の NGF 増強活性効果について作用機構を調べることを目的とする。

【方法・結果】

B3 (10 mg/kg) を皮下注射してから 0、15、30、60、120 分後のマウスの血液、脳をそれぞれ取り出し、エタノールで抽出し、LC/MS を用いて定量分析した。また、同様の神経突起伸長活性と記憶・認知効果が見られた合成類縁体についてもマウスに投与し、体内動態を調べた。その結果、血液、脳ともに B3 の存在を確認することができた。血液では、皮下注射後 60 分で最大値 (2.0 μg/ml) に到達し、その後減少し始めた。脳でも、60 分後に最大値 (0.03 μg/g) に達し、投与した配糖体が血液を経由して脳に到達していることが確認できた。合成類縁体についても結果を報告する。また、PC12 細胞に NGF (0~40 ng/ml) と B3 (40 μM) を投与し、突起の変化を観察した。その結果、B3 は NGF による突起伸長作用を顕著に増強し、この増強活性に ERK の活性化が深く関与していることが明らかになった。

人工セルロソームにおけるファミリー3のCBMの働き

○吉田和生、米澤優希、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 (三重大院・生物資源学)

【目的】

セルロースを効率的に分解 (糖化) できる人工セルロソームの構築を目的としている。セルロースは植物細胞壁に含まれている未利用資源である。糖化することで製薬のための有用物質やバイオエタノール生産などを可能にし、環境問題解決の一助となる研究である。

【方法・結果】

遺伝子組換え技術を用いてファミリー3のCBM (CBM3)、*Clostridium thermocellum* の type I と type II および *Clostridium josui* のコヘシンを連結したキメラ骨格タンパク質 (mCip7L) と CBM3 のない mCip7N を作製した (図)。これらの骨格タンパク質と3種類のセルラーゼを用いて複合体を形成し、微結晶性セルロースを基質として酵素反応を行わせ、経時的に還元糖量を測定しCBM3の機能について検討した。その結果、mCip7Nで複合体を形成したものにおいて酵素単独のものより約1.2倍活性が上昇した。すなわち、複合体を形成することで活性は上昇した。さらに、CBM3をもったmCip7Lと複合体を形成すると活性は最大となった。酵素単独のものと比較して最大約2.2倍活性が上昇した。このことにより骨格タンパク質上のCBM3の働きによるセルロソームの活性が上昇することを示した。また、酵素単独のものとはmCip7Nで複合体を形成したものは、時間経過とともに分解速度が減少し、反応が頭打ちになったが、CBM3をもったmCip7Lでは反応速度の減少は見られなかった。これらの結果から複合体を形成することに加え、骨格タンパク質上にCBM3があることで分解速度が上昇すること、セルロースの結晶性領域の分解に寄与していることが示された。

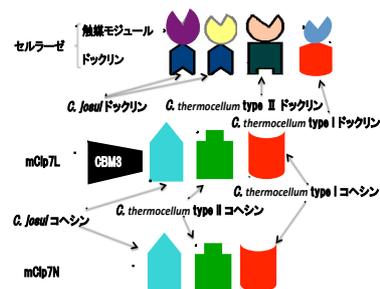


図.人工セルロソームのモデル

P15

Clostridium thermoCELLUM マンナーゼ Man5A の基質認識と触媒反応に及ぼす
ファミリー32 糖質結合モジュール (CBM32) の影響
○水谷公也, 粟冠真紀子, 木村哲哉, 粟冠和郎 (三重大院生資)

【目的】 Man5A (Cthe_0821) は N 末端側から触媒モジュール (CM)、ファミリー32 糖質結合モジュール (CBM32; F5F8 TypeC ドメイン)、ドックリンモジュールにより構成される。これまでの研究から CBM32 はアイボリーナッツマンナンなど不溶性基質に対する酵素活性を強化している事を明らかにした。また、CBM32 の有無によってマンナンの分解産物に変化する事から CBM32 が触媒モジュールの基質認識にも関与していると予想した。今回の実験では還元剤を用いて還元末端残基を修飾したマンノオリゴ糖を作成し、Man5A によるそれら基質の分解産物を解析する事で Man5A の基質認識機構と CBM32 との関係を詳しく調べた。

【方法・結果】 マンノトリオース、マンノテトラオース、マンノペンタオース、マンノヘキサオースの還元末端残基に存在するカルボニル基を水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元し、還元末端残基を糖アルコールへと変化させた基質を調製した。これらのマンノオリゴ糖を Man5A の触媒タンパク質 (rCM) と CBM を持つ触媒タンパク質 (rCM-CBM) とそれぞれ反応させ、加水分解産物を薄層クロマトグラフィーで調べた。その結果、水素化ホウ素ナトリウムで処理したマンノペンタオースを基質とした場合での rCM-CBM の分解産物ではマンノースが生じず、未処理の基質と異なる分解パターンを示した。また水素化ホウ素ナトリウムで処理したマンノヘキサオースでは未処理の場合と同様のマンノビオースとマンノペンタオースを主な分解産物として生じ、他の酵素反応の結果でも水素化ホウ素ナトリウム処理、未処理において共にほぼ同じ分解パターンを示した。この事から本酵素の CBM32 は非還元末端を認識・結合し、触媒モジュールに結合した非還元末端側から 4 番目と 5 番目の残基の間のグリコシド結合が切断される傾向が強い事が確認された。

P16

麹菌由来新規 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) レダクターゼの探索及びその機能解析
○竹浦賢吾, 森千明, 大穀未来, 余野圭司, 志水元亨, 加藤雅士
(名城大院 農)

【目的】

清酒の代表的な香り成分として、カブロン酸エチルや酢酸イソアミルが知られている。これらは酵母単独でも合成できるため、それらの生産能を強化した酵母の育種が盛んに行われている。一方、数多くある香り成分の中で清酒の香り増強に重要なロイシン酸エチルの生成機構については、酒の原料である米の中に含まれるロイシンを麹菌 *Aspergillus oryzae* がロイシン酸へと変換し、さらに酵母が作用することでロイシン酸エチルが生合成されると報告されている。それぞれ単独では生合成されず麹菌と酵母が共に作用することで初めて生成すること、ロイシンからロイシン酸の変換には麹菌が寄与することも明らかとなっている。しかし、麹菌のロイシン酸生合成経路については未知であり関与する酵素についての知見はない。そこで本研究ではロイシン酸の前駆体と考えられる 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) をロイシン酸に変換する酵素の探索を行った。将来的には、セルフクローニングにより MOA レダクターゼを高発現させた吟醸用麹菌を作製することで香味豊かなブランド吟醸酒生産への展開も期待できる。

【方法・結果】

麹菌のゲノム情報から MOA レダクターゼが属すると考えられる 2-ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する 7 種の遺伝子を選抜した。その遺伝子について大腸菌を宿主として組換え酵素を異種発現させ、精製を行った後、MOA 存在下における NADPH の減少をモニターすることで MOA レダクターゼ活性の有無を調べた。その結果、7 種の内 1 種は MOA レダクターゼ活性を有していた。また GC-MS 分析から反応生成物はロイシン酸であることも確認した。真核生物において MOA レダクターゼの報告はなく、今回見出したものが初めてとなる。

P17

放線菌ホスホリパーゼ A₂ の反応性に対する基質の sn-3 位の影響
○江場知聡, 中野秀雄, 岩崎雄吾 (名大院生命農)

【目的】

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) はリン脂質の sn-2 位エステル結合を加水分解して遊離脂肪酸とリゾリン脂質を生じる酵素である。本研究では放線菌 *Streptomyces violaceoruber* 由来ホスホリパーゼ A₂ (svPLA₂) の基質特異性をタンパク質工学的に改変し、油脂 (トリアシルグリセロール) の sn-2 位エステルを特異的に分解する酵素の創出を最終目的としている。本報では、sn-3 位の極性頭部が異なる種々のグリセロ脂質に対する分解活性を評価する事で、基質に求められる構造上の条件を考察した。

【方法・結果】

sn-3 位の極性頭部に種々の長さのアルキル鎖 (炭素数 0~6、10、14 および 18) を持つ人工リン脂質を調製し、それらに対する svPLA₂ の活性を測定した。その結果、炭素数 0 (ホスファチジン酸) に対しては微弱であった活性が炭素数が増えるに従い上昇し、炭素数 2 (ホスファチジルエタノール) に対して最大となり、さらに炭素数を増やすと逆に活性は低下することが明らかとなった。この結果から、本酵素の分解活性は、基質となるリン脂質の極性頭部のアルキル鎖の長さに大きく影響を受けること、さらにアルキル鎖の長さには最適値 (炭素数 2) があることが示された。

油脂はその sn-3 位に (1) 負電荷を与えるリン酸基を持たない、(2) 長鎖脂肪酸が結合している、という点でリン脂質と異なっている。従って svPLA₂ に油脂分解活性を付与するには、負電荷を持たない基質に対する親和性向上、長鎖アルキル基を sn-3 位に持つ基質に対する反応性向上という 2 つの課題を克服する必要があると考えられた。

P18

ホスファチジルイノシトール合成型ホスホリパーゼ D における
イノシトールの配向を決定するアミノ酸残基

○石田健, 田中秀俊, ダムニャノビッチ・ヤスミナ, 中野秀雄, 岩崎雄吾 (名大院・生命農)

【目的】

リン脂質の一種であるホスファチジルイノシトール (PI) には脂質代謝改善作用等の有効な生理機能が知られており、その食品、医薬分野への利用が期待される。本研究では元来 PI 合成能を持たない放線菌由来ホスホリパーゼ D (PLD) をタンパク工学的に改変することで同活性を付与する事に成功している。しかし、改変型 PLD による PI の合成反応では酵素のイノシトールに対する位置特異性が完全ではないため、天然型の 1-PI に加えてその位置異性体である 3-PI も合成されてしまうという問題があった。本研究では、改変 PLD をさらに改良してその特異性を高めることを目的とする。

【方法・結果】

現有する改変 PLD のうち、W187N/Y191Y/Y385R なる変異体 (以下 NYR) は 1-PI を最も優先的に生成する。NYR の基質結合部位に存在する 190 位 Asp 残基を他の全てのアミノ酸に置換した NXYR 変異 PLD 遺伝子を Overlapping PCR 法を用いて作製した。作製した変異遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた粗 PLD を用いて PI 合成反応を行い、生成する PI の異性体組成を LC-MS で分析した。その結果、190 位のアミノ酸によって 1-PI/3-PI 比は大きく変化した。特に、190 位を Ala, Pro, Val に置換した変異体 (NAYR, NPYR, NVYR) では親酵素と比較してその特異性が逆転し、3-PI を優先的に生成した。以上のことから、190 位のアミノ酸がイノシトールの配向を決定づける重要な残基である事が示唆された。

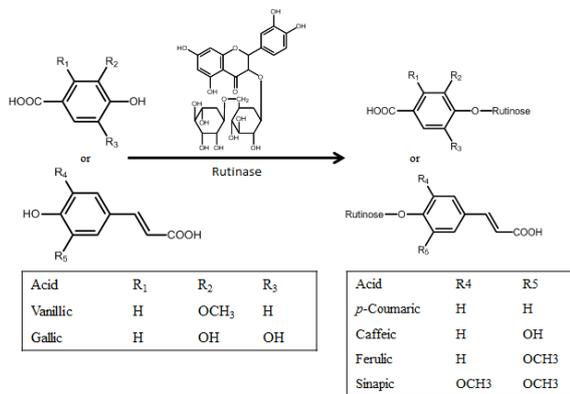
ルチン分解酵素ルチナーゼを用いた新規フェノール化合物配糖体ルチノシド合成の最適化
 ○山内雄貴, 片山茂, 加藤幸, 真壁秀文, 中村宗一郎 (信大院農)

【目的】

近年、フェノール化合物における様々な機能性効果が注目され、多くの研究報告がなされている。しかし、これらのフェノール化合物は難水溶性のものが多く、食品や化粧品への応用が困難で、使用範囲が限定されているのが現状である。これまでの研究で著者らは、ルチン分解酵素であるルチナーゼの逆反応を利用し、フェノール化合物にルチノースを結合させることで、天然には存在しない新規フェノール化合物配糖体ルチノシドを合成することに成功している。本研究では、反応系に用いるルチナーゼの量、標的フェノール化合物の量、反応時間等の最適化を行うことを目的とした。

【方法・結果】

ルチナーゼはダットンソバ (*Fagopyrum tataricum*) 種子から 3 種類のカラムクロマトグラフィー (DEAE-Sepharose→Sephacryl S-100→HiTrap SP) を用いて精製した。20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に所定濃度のフェノール化合物、ルチン及びルチナーゼを加え、40°C で 24 時間インキュベーションすることで合成を行い、その後、HPLC (Inertsil NH₂ カラム) にて新規合成されたルチノシドの精製を行った。現在 11 種類のフェノール化合物について、合成を確認している。得られたルチノシドは FAB-MS および NMR 解析によって分子量および構造式を確認した。反応条件についてフェノール化合物量、ルチン量、酵素量及びインキュベーション時間について最適化を行った結果、従来の手法よりも収率を約 30% 上昇させることが可能となった。



セルラーゼ反応における中高压処理の影響について

○栗原 聖¹, 藤田智之¹, 来山哲二², 采女信二郎² (¹信州大院農・機能食, ²ポエック)

【目的】バイオエタノールの原料となる植物系バイオマスのうち、セルロース系バイオマスは食品と競合しないことから、その利用が注目されている。筆者らは 100MPa 程度の中高压条件下でセルラーゼ反応を行い、加圧下で酵素活性が昂進することを見出した¹⁾。これまでに圧力依存性が認められた Celluclast 1.5L を用いて種々の条件検討を行い、中高压条件下で反応収率が向上することを報告した。今回は 3 種の基質を用いて中高压下でセルラーゼ反応を行い、反応収率への影響を評価した。また、少糖類添加による反応阻害への影響についても調査した。

【方法・結果】酵素はセルラーゼ Celluclast 1.5L (Novozymes 社) を用いた。基質は食品用ミルで粉砕した破砕濾紙、Avicel、Carboxymethylcellulose (CMC) を用いた。チャック付き袋に基質 100mg、0.25M 酢酸緩衝液 5ml (pH4.5) を入れ、酵素 1mg (1% 対基質重量) を添加し、常圧 (0.1MPa) または中高压 (90MPa 下)、50°C にて 24 時間または、48 時間反応した。反応液を遠心し、上清中の還元糖量を Somogyi-Nelson 法 (660nm) で定量した。また、反応系にグルコースまたはセロビオースを 10mg または 20mg 加え、同様に反応し、生成物阻害の影響を調査した。

反応 24 および 48 時間で産生糖量を比較した結果、Avicel では常圧時の反応に比べ、それぞれ 1.7、2.1 倍に増加した。破砕濾紙での産生糖量はいずれも 1.3 倍に増加した。一方、CMC を用いた場合には、反応時間当たりの産生糖量は増加したものの、中高压による効果は認められなかった。

反応系にグルコースまたはセロビオースを添加した結果、Avicel または濾紙を用いた場合には反応阻害は確認できなかった。可溶性基質である CMC を用いた場合、添加量に応じて産生糖量は減少し、特にセロビオース 20mg 添加では未添加の 6 割まで減少した。中高压条件下で反応を行うと、グルコース添加による阻害が緩和され、産生糖量が未添加程度まで回復した。この結果から、90MPa の加圧下での反応では生成物による阻害が軽減されることが示唆された。

1) 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集, p.144, 2B03p11 (2012)

バラにおける ALSV を用いたジーンサイレンシング法の確立

落合正樹, 伊藤洋章, 加藤大明, 白武勝裕, 竹本大吾, 太田垣俊吾, 松本省吾 (名大院生命農)

【目的】

切花や鉢物, 苗木などを含む花卉の生産量は減少傾向にあり, 消費者の購買意欲を向上させるためには高付加価値をもつ花卉品種の作出が重要である. バラは主要な花卉であるが, 現行のアグロバクテリウムを用いた形質転換は困難かつ可能な品種が限られており, 新奇形質の導入にはより効率の良い形質転換手法の確立が必須と言える. そこで本研究では, 新しい形質転換手法としてリング小球形潜在ウイルス (ALSV) によるウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) 法に着目し, バラでの感染系の確立を目標とした.

【方法・結果】

バラの園芸品種は限られた野生種の交雑により育種されてきた. 本研究ではその野生種の 1 種であるノイバラ (*Rosa multiflora*) を用いた. ALSV は, 感染性 cDNA クローンをコードするウイルスベクターにノイバラの *PDS* 遺伝子の部分配列を導入したものを作成し感染に用いた. ウイルスベクターはまずキノアに接種しウイルスの増殖を行い, そこからウイルスを含む totalRNA を抽出した. その後抽出した totalRNA をボンバードメント法によりノイバラに接種した. その結果, ALSV の感染および葉の白化が確認できる個体が得られた. *PDS* はカロテノイド生合成経路で働く酵素であり, 一般的に発現抑制された植物では白化が起きる. 更には, 白化が見られたノイバラの葉において *PDS* の mRNA 量の低下も確認された. 以上のことから, ノイバラにおいて ALSV の感染および目的遺伝子に対する VIGS の誘導が可能であることが証明された. 今後は新奇形質の獲得を目指し, 棘や花器官の形成に関与する遺伝子の VIGS による制御を行う予定である.

組織特異的プロモーターによる白色不朽菌リグニン分解酵素遺伝子の植物での発現解析に関する研究

○領木智哉¹, 小川拓也¹, 本田与一², 渡辺隆司², 野崎功一³, 天野良彦³, 中川強⁴, 粟冠真紀子¹, 木村哲哉¹, 粟冠和郎¹ (¹三重大院生物資源, ²京大院生存研, ³信州大院工, ⁴島根大遺伝子)

【目的】

近年, 芳香族化合物の環境中への蓄積が問題となっており, これらを低コストで除去することが望まれている. そこで我々は植物へ微生物由来の汚染物質分解酵素遺伝子を導入・発現させ, 汚染物質を持続的に分解する方法の開発を企てた. 導入遺伝子の発現による植物体への影響を回避するため, 葉又は根特異的プロモーター下流で, 広範な化合物分解能が報告されているヒラタケのマンガンペルオキシダーゼ遺伝子 (*mnp2*) と工業染料脱色能が報告されているトキイロヒラタケラッカーゼ遺伝子 (*lcc2*) をそれぞれシロイヌナズナで発現させ, 環境浄化能力の付与を目的とした.

【方法・結果】

組換え酵素を分泌させるためポプラセルラーゼ分泌シグナル (*cex*) と成熟体タンパク質の融合遺伝子 (*cexmnp2*, *cexlcc2*) を作製し, プロモーター交換型ゲートウェイバイナリーベクター R4pGWB401* を利用して葉特異的プロモーター (L15) または根特異的プロモーター (R10, PHT1-1500) 下流に上記遺伝子を連結し, シロイヌナズナに導入を行った. 得られた形質転換体を用いてレマゾールブリリアントブルー R (RBBR) の脱色能を調べ, 活性の高い株を選抜した. L15::*cexmnp2* および R10::*cexmnp2* を導入した株ではビスフェノール A の植物体への毒性が軽減されることを明らかにした. PHT1-1500::*cexlcc2* を導入した株では工業染料であるダイレクトブルー (DB1) と α -ナフトールオレンジ (AO20) の脱色能を確認した. 根特異的プロモーターである PHT1-1500 はリン酸欠乏下において発現が増すため, リン酸欠乏培地における PHT1-1500::*cexlcc2* 導入株による AO20 脱色試験の結果, 脱色能の明らかな上昇が見られた. *Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 624 (2008)

嫌気性菌 *Clostridium paraputrificum* の高発現ベクターの開発と代謝工学への応用
 ○大石拓馬, 黒岩千智, 佐伯謙二, 粟冠真紀子, 木村哲哉, 粟冠和郎 (三重大院生物資源)

【目的】

Clostridium paraputrificum M21 株は三重大学キャンパス土壌から単離された嫌気性細菌で、海洋バイオマス資源であるキチンを資化して短時間で増殖し、大量の水素を生産することが知られている。我々は *C. paraputrificum* M21 株を物質生産のプラットフォームとするため高発現ベクターの構築を行った。近年、化石燃料の高騰などからバイオマスからのエネルギー生産技術の改良はより重要性を増している。そこで *C. paraputrificum* M21 の水素生産能力に着目し、高発現ベクターを応用して代謝工学的に水素ガス生産の向上を目的とした。

【方法・結果】

C. paraputrificum M21 株の水素生産に関わる重要なヒドロゲナーゼ A 遺伝子(*hydA*)を単離していたが、発現解析を行っていなかった。そこで、*hydA* のプロモーター領域を特定するため 5'RACE 法を用いて転写開始点を決定した。さらに 5'側上流域 390 bp を PCR 法で増幅して大腸菌 GUS 遺伝子をレポーターとして *hydA* プロモーターの強さを測定した。その結果、すでに解析しているキチナーゼ A 遺伝子のプロモーターに比べて非常に弱いことが示された。*hydA* のプロモーターを遺伝子工学的に強いものに交換するため、他の *Clostridium* 属で発現が強いと報告されているフェレドキシン遺伝子(*fdx*)のプロモーターを使うことを考えた。*C. paraputrificum* M21 株の *fdx* のプロモーター領域 259 bp を用いて同様のレポーターアッセイを行ったところ、*hydA* プロモーターに対して 130 倍以上強いことが示された。そこで *fdx* プロモーター下で *hydA* を発現させたところ水素ガス生産性が 29 % 向上した。さらに代謝産物の解析から、生じた還元力が水素生産に向けたことがわかった。

ビーズディスプレイ法を用いた糸状菌由来リグニン分解酵素の
 ハイスループットスクリーニング系の構築

○二宮涼子¹、朱博¹、小林功²、兒島孝明¹、岩崎雄吾¹、中野秀雄¹ (¹名大院生命農、²農研機構)

【目的】

ビーズディスプレイ法とは、W/O エマルジョン中での一分子 PCR と無細胞蛋白質合成系とを組み合わせることで、マイクロビーズ上に蛋白質とそれをコードする遺伝子とを同時に提示できる技術である。セルソーター、マイクロ流路デバイスなどと組み合わせることで、ハイスループットな機能分子スクリーニングが可能である。

本研究では、木質バイオマス分解能の高いことが知られている白色腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) が産生するリグニン分解酵素の一つである Manganese peroxidase (MnP) の機能進化を目的に、MnP のビーズ上への提示とハイスループットアッセイ法の構築を目指した。

【方法・結果】

MnP は分子内に 5 個のジスルフィド結合を有する。そのため、無細胞蛋白質合成系で発現させた MnP は、正確なフォールディングがされていない不活性型のものが多いという問題があった。そこで、MnP の大腸菌由来無細胞蛋白質合成系に、ジスルフィド結合異性化酵素であるウシ PDI と DsbC を添加し、発現量の確認と活性測定を行った。その結果、DsbC の添加により、活性型 MnP の合成量を 2 倍増加させることに成功した。また、ビーズディスプレイ法とフローサイトメトリーを用いたスクリーニング系を MnP に応用するため、蛍光基質 Amplex Red を用いて MnP の活性を蛍光法により検出する系の構築を試みた。次に、無細胞蛋白質合成系で発現させた MnP をビーズ上に提示させ、その活性の検出に成功した。現在、セルソーターを用いたスクリーニング系について検討中である。

P25

酵母シグナルペプチドライブラリーを用いたシグナルペプチド最適化ツールの開発に関する研究
○ 原 翔一¹、菅原 知宏¹、佐原 健彦²、扇谷 悟²、河原崎 泰昌³、兒島 孝明¹、中野 秀雄¹
(¹名大院・生命農・生命技術、²産総研、³静岡県大院生活健康・食栄)

【目的】

酵母における異種タンパク質の分泌発現量・細胞表面提示量を向上させる手段として、シグナルペプチド配列を *Saccharomyces cerevisiae* 由来のそれに置換する手法がしばしば用いられる。しかしながら、酵母における異種タンパク質の分泌発現レベルは、用いるシグナルペプチド配列と標的タンパク質の組み合わせによって変化し、両者の間には適合性が存在する。本研究では、この適合性を網羅的に解析し、標的タンパク質に付加するシグナルペプチド配列を最適化するツール (Signal Peptide Optimization Tool; SPOT) の確立を目的とする。

【方法・結果】

本研究では、糸状菌 *Aspergillus oryzae* 由来β-ガラクトシダーゼをモデルタンパク質として、*S. cerevisiae* の分泌タンパク質・膜タンパク質由来のシグナルペプチド配列 60 種類を用いて、自身の目的とするタンパク質に対して最適なシグナルペプチド配列を網羅的に解析するシステムの確立を試みた。60 種類のシグナルペプチド配列をリモートカッター制限酵素で切断したのち、β-ガラクトシダーゼ遺伝子をそれぞれ酵母発現ベクターに組み込み、酵母シグナルペプチドライブラリーを調製した。このライブラリーを酵母に形質転換したところ、種々のβ-ガラクトシダーゼの分泌能を保持するクローンが得られ、また野生型のシグナルペプチド配列より向上した分泌能を有するシグナルペプチド配列の獲得に成功した。

P26

無細胞蛋白質合成系を用いたウサギモノクローナル抗体の効率的取得法の開発
○ 森本理紗, 山本広晃, 原亮太, 中野秀雄 (名大院生命農)

【目的】

モノクローナル抗体は近年、抗体医薬として注目を集めており、これまでに抜本的治療薬や予防薬が存在しなかった医療分野にも光明を与え始めている。現在のモノクローナル抗体取得法としては、ハイブリドーマ法が一般的である。しかし、この取得法は通常、3ヶ月程の作製期間を要するため迅速性に欠け、突発的な感染症が発生した際の治療薬生産法としては適さないことが問題視されている。それに対し、当研究室で開発された SICREX(single-cell RT-PCR linked in vitro expression)法は、細胞1個から2~3日で抗体を作り出すことができる。現在の SICREX 法では対象動物がマウスとヒトに限られている。しかしウサギ抗体の抗原決定部位のバリエーションはマウスに比べ豊富であり、かつウサギの免疫化や採血はヒトに比べ非常に容易である。そこで本研究では、ウサギを対象動物とした SICREX 法の確立と大腸菌 O157 を抗原とした特異的抗体の取得を目的とする。

【方法・結果】

まず、ウサギの抗体遺伝子配列に特異的なプライマーを設計し、その有効性を確認するためウサギ末梢血から単離した B 細胞からの遺伝子増幅を試みた。その結果、高い効率でのウサギ抗体遺伝子の増幅が確認された。また、設計したプライマーと改善後の反応条件下で大腸菌 O157 に対する抗体の取得を試みた。まず、抗原結合能を有した B 細胞を濃縮するため、抗原をコーティングした ELISA プレートで1次スクリーニングを行った。続いて、獲得した B 細胞 192 個について1ウェルあたり1細胞となるように分注し、SICREX を行った。ELISA を用いて全てのクローンの解析を行い、そのうちのいくつかについて *E. coli* O157 に対する有意な親和性を保持する抗体遺伝子獲得に成功した。

P27

ビーズディスプレイ法を用いた *in vitro* プロモーターハイスループットスクリーニング法の確立
○伊藤 祐里恵¹, 兒島 孝明¹, 大内 将司², 中野 秀雄¹ (¹名大院生命農, ²東大医科研)

【目的】

当研究グループは、DNA ライブラリーをビーズライブラリーに変換する技術、エマルジョン PCR を応用し、RNA リガーゼ活性を保持するリボザイムを用いたプロモーター活性の新規 *in vitro* 選別法を確立している。本研究ではこの選別法のさらなる効率化を目指し、高活性型クラス I リガーゼ・リボザイム、Clone 23 を用いたプロモーター活性の新規 *in vitro* ハイスループットスクリーニング法の開発を試みた。

【方法・結果】

本手法では、まず、各種プロモーターからリボザイム Clone 23 が転写されるような鋳型 DNA を、エマルジョン PCR によってビーズ上に固定化し、*in vitro* 転写ライゲーション共役反応を行う。このマイクロビーズ上に RNA 基質を固定化しておく事により、転写されたリボザイムは自身の活性によって、同一ビーズ上に提示される。このビーズに対して Cy5 標識プライマーを用いた逆転写反応によって蛍光標識を施し、フローサイトメトリーによる蛍光検出を行う事で、特定の RNA ポリメラーゼ・プロモーターの組み合わせにおける転写活性を検出する事が可能となる。T7 もしくは SP6 RNA ポリメラーゼを用い、各種プロモーターを保持した鋳型 DNA 固定化ビーズに対して本手法を試みたところ、T7 RNA ポリメラーゼを用いた場合は T7 プロモーター、SP6 RNA ポリメラーゼを用いた場合は SP6 プロモーターを保持するビーズにおいてのみ、顕著な蛍光が検出された。次に T7 プロモーター : SP6 プロモーター =1:1000 のモル比となるように混合したライブラリーを用いて、模擬スクリーニングを行った。T7RNA ポリメラーゼに対して高い転写活性をもつビーズ-DNA 複合体を FACS によって回収し、ライブラリーの濃縮率を検討したところ、2 ラウンド後において T7 プロモーター配列が 22 クローン中 3 クローンという頻度で確認され、濃縮率 136 倍という値が得られた。

P28

ビーズディスプレイを用いたDNA-糸状菌転写因子相互作用検出システム
○江崎 俊文、王 ハン輝、兒島 孝明、中野 秀雄 (名大院・生命農)

【目的】

当研究室では、水/油相エマルジョン内でビーズ固定化プライマーを用いて行う一分子PCR (W/OエマルジョンPCR) により、DNAライブラリーをビーズライブラリーに変換する技術を開発した。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の転写因子 AmyR を取り上げ、ビーズディスプレイを用いて構築したランダムライブラリーから転写因子 AmyR 結合サイトのハイスループット解析を目的としている。転写誘導因子 AmyR は、*Aspergillus* 属のアミラーゼ遺伝子群のプロモーター領域に結合し、転写を活性化する。

【方法・結果】

W/O エマルジョン PCR によってランダムライブラリー (N x 22) 一分子由来の DNA をマイクロビーズ上に増幅、固定化した。得られたビーズライブラリーに対し、大腸菌で発現した Ma1E タグ-AmyR タンパク質及び蛍光標識した抗 Ma1E タグ抗体を加えた。この時、転写因子の認識する DNA が固定化されたビーズ上では、ビーズ-DNA-蛍光標識抗体の複合体が形成され、これらの蛍光を有する複合体は Fluorescent cell-activated cell sorter (FACS) を用いて迅速に選択、分離される。分取したビーズを鋳型とした PCR によって DNA を回収し、これを用いて、次ラウンドのスクリーニング、配列情報解析、及び AmyR-DNA 結合親和性測定を行った。その結果、ランダムライブラリーから 5 ラウンドの連続セレクションおよび親和性解析によって、2 種類の転写因子 AmyR の結合モチーフの抽出に成功した。現在、*Aspergillus nidulans* のゲノムライブラリーを用いたスクリーニングを試みている。

P29

転写活性化ドメイン VP16 を持つ新規 Gateway バイナリーベクターの作成とその評価に関する研究

○川瀬敦嗣¹, 塚越啓央^{1,2,3}, 中川強⁴, 石黒澄衛¹

(¹名大院・生命農, ²名大・高等研究院, ³JST, さきがけ, ⁴島根大・遺伝子実験施設)

【目的】

転写因子を研究する上で、その機能が活性型か抑制型かを知ることは重要である。現在までに転写因子の機能を人為的に抑制型や活性化型に変換する方法が植物において開発されている。例えば転写抑制因子を活性型に変換することで、その転写抑制因子の標的遺伝子の発現量を上昇させることが可能となり、過剰発現とは逆の表現型を得ることができると推定される。そこで我々は転写活性化ドメインを Gateway バイナリーベクターにクローニングし、Gateway テクノロジーを用いたハイスループットな転写因子機能転換ベクターの構築を目的とした。

【方法・結果】

既存の pGWB バイナリーベクターを用いて、これらに強力な転写活性化ドメインである VP16 を二回直列に繋いだフラグメントを導入した。今回選択した pGWB ベクターは元々植物において強く発現する 35S プロモーターを保持している。作成した pGWB-VP16 ベクターに植物の根端の細胞機能転換を司る転写抑制因子 UPBEAT1(UPB1)の cDNA 領域を Gateway テクノロジーにより導入し、シロイヌナズナ Col-0 株に形質転換を行った。その結果、UPB1-VP16 を持つ植物体の根は *upb1-1* 遺伝子破壊株同様に野生型株より根が長くなった。さらに、根端のマイクロダイセクションを用いた遺伝子発現解析から UPB1 のダイレクトターゲット遺伝子の発現が野生型株よりも活性化されていることがわかった。

以上のことから、本研究で作成した新規 Gateway バイナリーベクターは植物体において転写因子の機能を活性化因子へと変換することができることが確認された。この新規ベクターと Gateway テクノロジーを用いることで転写因子の機能転換を通じた新たなツールを提供でき、研究の高効率化を実現できるものと期待している。

P30

メダカを用いたタンパク質架橋化酵素関連疾患のモデル生物の開発に関する研究

○斉藤麻衣¹, 樋口幾¹, 菅沼名津季¹, 小河亮太¹, 辰川英樹¹, 亀井保博², 人見清隆¹

(¹名大院創薬科学, ²基生研・動物機能解析センター)

【目的】

ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) は、飼育も含め遺伝子変異体の獲得がマウスに比べて容易であり、疾患治療や創薬シーズ探索のモデル生物としても注目されている。高等動物のタンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼは、タンパク質どうしを接着させて機能や構造の変換を行う酵素ファミリーである。ヒトでは 8 つのアイソザイムが存在するが、生理的意義の全容は解明されておらず、酵素活性の異常は様々な疾患をもたらす。本研究ではメダカを用いて、活性変異体の解析による本酵素の生理的意義の解明および関連疾患モデル生物作出を目的とした。

【方法・結果】

遺伝子検索により、メダカにはタンパク質架橋化酵素が 5 種類存在することを見出した。それぞれについて全配列を決定し、組換え型酵素を大腸菌において作製し、酵素についての生化学的な性質を明らかにした。生化学的性質や一次構造から、ヒトのアイソザイム 3 種に対応する酵素を決定できた。

そこでこのうち、ヒトの皮膚型酵素 (TG1) に相当するメダカ酵素 (OITGK) を対象にして、遺伝子変異によって本酵素活性を失っているメダカの作製を、TILLING 法と呼ばれる薬剤変異遺伝子ライブラリーを用いた方法で獲得した。またこれまで得ている、ヒト TG1 の高反応性基質ペプチドを用いて、活性の存在場所を可視化した結果、咽頭菌や表皮組織全体にわたり活性の存在を認めた。現在、皮膚表皮など上皮組織での形態や機能変化を中心に解析を進めている。

P31

高等動物の皮膚に存在する新規なタンパク質架橋化酵素に関する研究
○山崎梨沙, 鞍本克真, 清水由隆, 伊藤みほ, 辰川英樹, 人見清隆 (名大院創薬科学)

【目的】

タンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼは、高等動物の多彩な生命現象に必須な酵素ファミリーである。この酵素はタンパク質のグルタミン残基とリジン残基との間を、イソペプチド結合により架橋させ、機能や構造を変換させる。ヒトでは8種類のアイソザイム(TG1-TG7, FXIII)が組織特異的に存在するが、新規な酵素 TG6 については、その活性発現様式や生理的意義は不明である。

これまで我々は、天然の基質タンパク質を上回る反応性を有する、高反応性基質配列の探索を、フェージ提示型ペプチドライブラリを用いて行ってきた。本研究ではTG6の高反応性基質配列を同定し、得られるペプチド配列を活用して、酵素活性を発現する組織を解明することを目的とした。

【方法・結果】

M13 フェージ提示型ランダムペプチドライブラリを用いて、TG6 が好んで認識するグルタミン残基を含む基質配列を探索し、12 残基の高反応性基質配列を得る事に成功した。この配列は合成ペプチドとしても、アイソザイム特異性を保った高い反応性を持つ基質として機能した。そこで蛍光標識したペプチドを用い、全マウス切片に対して酵素活性を可視化したところ、主に皮膚表皮全般に検出した。

さらにビオチン標識したペプチドを用いて、マウス皮膚表皮を対象に特異的に反応する基質の検索を行った。その結果、皮膚に存在する既知のアイソザイム (TG1, TG3) が反応する基質とは、異なる基質分子種を検出し、TG6 が皮膚表皮に特異的に活性を有する事を見出した。

FEBS J 277, 3564 (2010), J Histochem Cytochem 59, 180 (2011)

P32

しょうがヘキササン抽出物の抗肥満作用に関する研究

○ 金岡秀明¹, 伊藤克², 矢野竹男¹, 奥村克純³, 籠谷和弘², 西村訓弘⁴

(¹三重大院地域イノベーション, ²辻製油(株), ³三重大院生物資源, ⁴三重大院医)

【目的】

肥満は脂肪が過剰に蓄積した状態であり、脂質代謝異常、高血圧、糖尿病などと併発することでメタボリックシンドロームを引き起こす。肥満に対して有効な天然物由来の成分として茶に含まれるカテキンやぶどうの果皮に含まれるレスベラトロールが報告されている。また、しょうがの抗肥満作用に関する報告はあるが、分子細胞学的に解明された報告は少ない。そこで我々は、既報の知見をより明らかにするためにしょうがヘキササン抽出物(GHE)を調製し、その抗肥満作用のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】

初めにマウス前駆脂肪細胞株(3T3-L1)に分化誘導剤と同時に GHE を添加し、8日間培養後 Oil red O 染色を行い、脂肪細胞への分化に対する影響を評価した。その結果、GHE は濃度依存的に脂肪細胞への分化を促進した。このことより、GHE は脂肪細胞への分化を司る核内受容体 PPAR γ のリガンドとして作用すると推定し、レポーターアッセイを用いて PPAR γ への結合能を調べた結果、GHE はリガンド活性を示した。以上の結果を踏まえて、脂肪細胞における肥満関連遺伝子 PPAR γ , Adiponectin, aP2 の発現量を定量的 RT-PCR により解析した結果、GHE を添加した細胞群では各遺伝子の発現が有意に上昇した。この結果より、GHE は前駆脂肪細胞を小型脂肪細胞へと分化促進することが示唆された。

GHE は、PPAR γ リガンドとして作用することで小型脂肪細胞への分化を促進させ、抗肥満作用遺伝子 Adiponectin の発現上昇を促すことで、肥満を改善する食品素材として期待できる。

DNA メチル化レベル低下により DNA 損傷が誘導されるゲノム領域の同定
○吉村健¹, 奥村克純¹ (¹三重大院生資)

【目的】

DNA のメチル化は、遺伝子発現やクロマチン構造の制御に関わるエピジェネティック修飾のひとつである。一方、DNA メチル化酵素 (DNMT) の減少や阻害剤処理により DNA メチル化レベルを低下させると DNA 損傷が誘導されることから、DNA メチル化の維持はゲノム安定性に寄与していると考えられている。一方で、DNA 損傷により細胞のがん化や生活習慣病が引き起こされることも示唆されており、DNA メチル化レベルの低下がこれらの原因となりうる。そこで本研究では、DNMT 阻害剤処理によって DNA メチル化レベルを低下させた際に誘導される DNA 損傷領域の配列の特徴を明らかにし、ChIP-sequence 法により損傷領域を同定することを目的とした。

【方法・結果】

ヒト網膜上皮細胞 (RPE 細胞) を DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) で処理し、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により DNA 二本鎖切断マーカーである γ -H2AX の蓄積する領域を回収した後、ヒトセントロメア周辺の CpG リッチなリピート配列である human satellite 2 (Sat2), human satellite α (Sat α) の回収率をリアルタイム PCR により定量した。その結果、5-aza-dC 処理細胞において Sat2 や Sat α のような CpG リッチな配列において DNA 損傷が誘導されることが明らかとなった。また、次世代シーケンサーによる γ -H2AX 蓄積領域の網羅的配列解読を行ったところ、DNA 損傷が誘導される領域として CpG リッチなリピート配列である D4Z4 に含まれる DUX4 をはじめとするいくつかの遺伝子領域が同定できた。DUX4 は遺伝病の一つである顔面肩甲上腕筋ジストロフィー (FSHD) の原因遺伝子として報告されており、本研究で示した DNA メチル化レベルの低下による DNA 損傷誘導が FSHD の未解明な発症メカニズムを明らかにしうる手がかりとなるかもしれない。

DNA 受動的脱メチル化過程における DNA 損傷誘導機構の解明
—ヘミメチル化 DNA を認識する UHRF1 変異体の機能解析—
○川井良斗, 奥村克純 (三重大院生物資源)

【目的】 Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1 (UHRF1) は、DNA 複製直後に生じる親鎖 DNA だけがメチル化されたヘミメチル化 DNA のシトシン残基を特異的に認識し結合する SET and RING associated (SRA) ドメイン等を有することが知られている。また、UHRF1 は親鎖 DNA のメチル化パターンを娘鎖 DNA にコピーする機能を持つ DNA methyltransferase 1 (DNMT1) と直接相互作用し、DNMT1 が娘鎖 DNA にメチル基を付加するための足場としての機能をもつ。当研究室では DNMT1 阻害剤処理や DNMT1 を減少させた細胞で S 期に DNA 損傷が誘導されることを見出し、その際に UHRF1 が関与することを示唆するデータを得ており、我々は DNMT1 量の減少時にヘミメチル化 DNA から解離できない UHRF1 が複製フォーク進行の障害となり DNA 損傷が誘導されるのではないかと考えているが、その実体は不明である。本研究では、DNMT1 阻害後の DNA 損傷誘導機構を *in vitro* 再構成実験で明らかにする研究の一環として、UHRF1 の部位特異的変異体を作製し、ヘミメチル化 DNA との結合特性を解析することを目的とした。

【方法・結果】 タグとして HaloTag を用いた HaloTag 融合タンパク質発現ベクターを利用し、野生型 UHRF1、および SRA ドメインの直接ヘミメチル化 DNA へ結合するバインディングポケット領域のアミノ酸に変異を導入した UHRF1、SRA ドメインがメチル化 DNA と結合する際に二本鎖 DNA の構造を支える SRA フィンガー構造のアミノ酸に変異を導入した UHRF1 を組み込んだ各種 HaloTag 融合 UHRF1 発現ベクターを大腸菌にトランスフォーメーションし、発現誘導を行った。この大腸菌から HaloTag を標的とし各種 UHRF1 タンパク質の精製を行い、SDS-PAGE で確認後、各種 UHRF1 と 12 bp の合成ヘミメチル化 DNA との相互作用を Biacore で解析した。その結果、野生型 UHRF1 に比べて変異を持たせた UHRF1 は約 10 倍または 100 倍以上の解離定数を示し、これらの変異は結合能を低下させることが明らかとなった。

人工飼育法を利用した養菌性キクイムシ共生微生物群の解析

○¹三井規央 ¹田中太助 ²梶村恒 ¹志水元亨 ¹加藤雅士
(¹名城大院 農, ²名大院 生命農学)

【目的】

養菌性キクイムシは、マイカンギアと呼ばれる器官に微生物群を保有している。穿孔した木の内部に微生物群を植え、生育した菌体を餌とする昆虫である。我々は既に PCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法を用いて養菌性キクイムシ坑道内の菌叢解析を行い、アンブロシア菌として報告されている糸状菌のほかにも、いくつかの微生物が存在することを明らかにしてきた。今回、人工飼育により得られた坑道内微生物群集を DGGE 法により解析することにより、共生菌以外の菌の混入を防ぎ、明確な共生関係を調べることを目的とした。また、アンブロシア菌の栄養要求性についても詳細に検討した。

【方法・結果】

アイノキクイムシ(*Xyleborus interjetus*)を梶村ら²⁾の方法で人工飼育を行った。巣の坑道壁面から菌体を回収し、PCR-DGGE 法により解析した。その結果、天然試料の解析で検出された *Fusarium* 属糸状菌が人工飼育の試料中にも存在していることが明らかとなり、*Fusarium* 属糸状菌はアイノキクイムシの生育に重要な関係があることが示唆された。アイノキクイムシに人工飼育法を利用することで、季節が限定される天然試料とは異なり、1年中養菌性キクイムシを研究することが可能になった。また、アンブロシア菌の栄養要求性を調べた結果、チミジンおよびチアミンを必要とすることが明らかになった。以上の結果を総合して、養菌性キクイムシ坑道内の共生系の全体像を考察する。

1)鈴木ら 2010年度日本農芸化学会要旨集 p61

2)Takahiko MIZUNO and Hisashi KAJIMURA Appl. Entomol. Zool. 44(3): 363-370 (2009)

糸状菌比較ゲノムのための次世代シーケンサーによるアセンブル解析

○中谷和也, 山田雅人, 大内卓也, 磯貝泰弘, 橋本正治 (富山県大・生物工)

【目的】糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 は、深在性真菌症治療薬 micafungin の原体である FR901379 を生産する。本研究では、FR901379 とその類似物質であるエキノカンジン群物質の生合成遺伝子の単離を目的としている。そこで、エキノカンジン物質を生産する糸状菌の次世代シーケンサーによるゲノム解析を行うに当たり、まず2種の次世代シーケンサーRoche FLX と Illumina GAII を用いて *C. empetri* F-11899 のゲノムシーケンス解析を行い評価した。さらに、推定 FR901379 生合成遺伝子クラスターを基にエキノカンジン群物質を生産する糸状菌のゲノム解析を行った。

【方法・結果】一般的に FLX で得られるリード長は GAII のリード長より長いので、糸状菌のゲノムサイズ (数十 Mb) の *de novo* アセンブルには、長い contig 配列が得易い FLX が優位と考えられた。一方で、GAII は1リード長が約 75 b と短い、1ランあたりに得られる解析総塩基数が多く、コストパフォーマンスに優れている。そこで、FLX 単独アセンブルと GAII 単独アセンブルのコンティグ配列の並び替えを行いどれだけ一致するかを、解析ソフト GenomeMacher を用い視覚的に比較した。その結果、GAII、FLX の単独アセンブル配列はほぼ一致していた。この結果をもとに FR901379 の類似体である aculeacin A や echinocandin B を生産する *Aspergillus japonicas* var. *aculeatus*, *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*, また、FR901379 と側鎖や構成アミノ酸が異なるエキノカンジン物質を生産する *Coleophoma empetri* No. 14573, *Coleophoma crateriformis* No. 738, *Tolypocladium parasiticum* No. 16616 のゲノムシーケンス解析を HiSeq2000 (Illumina) により行った。その結果、4株それぞれのゲノムサイズをおよそ網羅できるコンティグ配列を得ることができ、推定される生合成遺伝子クラスターを見出すことが出来た。以上の結果より、糸状菌の *de novo* ゲノムアセンブルには、目的の遺伝子情報を得たい場合やおよそのゲノム情報を手に入れるためには、GAII や HiSeq2000 の解析が選択肢の一つになると考えられる。

機能的ゲノミクスによる植物の新規時計関連因子の探索

○神岡真理¹, 光田展隆², 大宮あけみ³, 山篠貴史¹, 高木優², 水野猛¹, 中道範人¹
 (¹名大院生命農, ²産業総合研究所, ³農研機構花き研)

【目的】

PSEUDO-RESPONSE REGULATOR(*PRR*)は植物の概日時計機能に関わる遺伝子群で、特に *PRR9*、*PRR7*、*PRR5* は冗長的な機能を持つ転写因子をコードし、自身はそれぞれ特有の日内時間に転写される。*PRR9* は日の出すぐ、*PRR7* は午前中、そして *PRR5* は昼から夕方にかけて転写誘導される。*PRR9* と *PRR7* の転写には、Myb 型の転写因子 CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 と LATE ELONGATED HYPOCOTYL が関わるが、*PRR5* の転写制御機構は不明のままである。

今回、私たちは *PRR5* の転写制御に関わる因子を機能的ゲノミクスアプローチによって探索し、その機能解析を行ったので、これを報告する。

【方法・結果】

発光レポーター系を用いて、*PRR5* 発現のピーク位相を決める発現制御領域を絞り込んだ。その領域に結合する転写因子を酵母 one-hybrid 法によりシロイヌナズナの転写因子ライブラリーからスクリーニングした。17 の陽性コロニーのベイトベクターを解析し、ある一つの進化的に保存された転写因子を取得した。この転写因子の C 末端側に強力な転写活性化ドメイン VP を結合させ、一過的に植物体に発現させると *PRR5* プロモーター活性を上昇させることができた。また、当該の転写因子の過剰発現株を用いてクロマチン免疫沈降を行い、沈降画分と input 画分に含まれる DNA を qPCR で解析した結果、この転写因子は *PRR5* プロモーター領域に結合することが示された。この転写因子の過剰発現株の時計関連の形質の観察も合わせて、この因子の時計機構への関わりを考察したい。

モリブデン濃度を調節する膜輸送システムに関する研究

○川嶋輝美¹, 飯田俊太郎¹, 藤原徹², 中西洋一¹ (¹名大院生命農, ²東大院農)

【目的】

微量必須元素であるモリブデン (Mo) は、モリブデン酸アニオン (MoO_4^{2-}) の形で膜輸送により細胞に取り込まれ、細胞内で Mo 補酵素に組み込まれて、生体内の炭素、窒素、硫黄の酸化還元反応に利用される。当研究室では、FRET 蛍光バイオプローブ MolyProbe を独自に開発して、動物細胞内の微量モリブデン酸の可視化に成功している。本研究では、MolyProbe をモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入し、細胞内のモリブデン酸を観察した。また、モリブデン酸濃度の調節に関わる膜輸送体の解明を目的とする。

【方法・結果】

レーザー共焦点顕微鏡を用いて、MolyProbe 発現株の蛍光を青色、黄色の 2 色で観測し、独自ソフトウェアを用いたイメージ解析により微小区画のモリブデン酸濃度を可視化した。シロイヌナズナの各器官・組織・細胞レベルで、モリブデン酸濃度に違いがあり、根端や種子のつけね部分などの一部の細胞では特に濃度が高いことがわかった。次に、細胞内 Mo 濃度を調節する膜輸送体について検討した。シロイヌナズナでは、モリブデン酸輸送体として細胞膜に局在する *AtMOT1* と、液胞膜に局在する *AtMOT2* が知られている。そこで、*mot1* 変異株、*mot1 mot2* 二重変異株に MolyProbe を導入し、モリブデンイメージ解析を行った。その結果、予想に反して、変異株の根では一部の細胞でモリブデン濃度が高くなることがわかった。このことから、植物の根に *MOT1*、*MOT2* 以外のモリブデン輸送体が存在することが示唆された。また、複数の輸送体によりモリブデンの流れが制御されていることが予想された。現在、新たに推定された膜輸送体を探索するべく、異種発現系を用いて候補分子の機能を検討中である。

シロイヌナズナにおけるイソチオシアネートの代謝に関する研究

○窪谷啓一郎¹, 田端杏子¹, 原崎安紀乃¹, 關谷次郎², 原 正和¹ (¹静岡大農, ²京都学園大バイオ)

【目的】

イソチオシアネート (ITC) は、主にアブラナ科植物が傷害を受けた時に発生する反応性に富む二次代謝産物である。ITC は抗菌性や動物忌避性を示すため、防御物質と考えられてきた。しかし、ITC 欠損株は、野生株同様、様々な病原菌に耐性を示すことが分かるなど、ITC の存在意義を再検討する必要が出てきた。以前、われわれは、ITC を散布した植物体の熱耐性が向上することを見出し、ITC が、植物のストレス耐性を制御する因子ではないかと推定した。ITC の植物における代謝は未解明であるが、これを明らかにすることは、植物の ITC 解毒機構や、ITC による熱耐性向上機構の解明に役立つと考えている。そこで本研究では、シロイヌナズナにおける ITC の代謝について調査した。

【方法・結果】

すでにわれわれは、ITC を投与したシロイヌナズナにおいて、グルタチオン (GSH) 含量が減少することを報告した。動物では、ITC は GSH とコンジュゲートを形成することが知られている。そこで、植物でも、同様の反応が起きているかを調査した。その結果、フェネチル ITC (PEITC) を投与したシロイヌナズナでは、PEITC と GSH のコンジュゲート (PEITC-GSH) が生じつつ、速やかに代謝されることが分かった。そこで、シロイヌナズナ粗酵素液に PEITC-GSH を加えたところ、PEITC-GSH をウシγ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) で反応させた際に生じる PEITC-CysGly が生じることが分かった。つまり、シロイヌナズナでは、PEITC-GSH が GGT によって分解されたといえる。現在、GGT 阻害剤試験などを実施し、本反応が GGT によるものであることを確認中である。本反応は、植物における ITC の解毒機構の一つであると考えられる。

シロイヌナズナデハイドリンによる酵素活性の変化

○門奈修平, 加藤雄成, 原正和 (静岡大農, 応生化)

【目的】

デハイドリン (LEA protein group2) は、植物が水ストレスを受けた際に蓄積する高親水性タンパク質であり、通常溶媒条件下では特定の構造をとらない天然変性タンパク質として振る舞う。デハイドリンは植物が極端な水ストレスを受けると、水分子に代わって酵素の表面と直接相互作用し、酵素の構造変化を防いでいるのではないかと示唆されている。しかし、デハイドリンの中には、非ストレス条件下でも高発現するものがあり、こうしたデハイドリンと酵素との相互作用はほとんど知られていない。われわれは、シロイヌナズナで恒常的に高発現するデハイドリン AtHIRD11 の生化学的な特徴付けを行い、金属結合やラジカル静止活性を証明してきた。本研究では、AtHIRD11 が酵素に対してどのような影響を与えるかを調査すべく、AtHIRD11 存在下での各種酵素の活性を測定、比較した。

【方法・結果】

AtHIRD11 は大腸菌発現系によって得た。用いた酵素は、catalase (CAT)、ascorbate oxidase (AOX)、horseradish peroxidase (POD)、glutathione reductase (GR) であった。活性測定の結果、AtHIRD11 は、CAT、POD、GR の活性を抑制した。更に、AtHIRD11 によるこれらの酵素活性の阻害には、最適な濃度があることから、AtHIRD11 の酵素阻害には選択性があり、AtHIRD11 は酵素の特定の部位と結合している可能性が推察できる。一方、ある濃度の金属イオンが、AtHIRD11 の酵素阻害反応を抑制し、本来の酵素活性に復元することも見出した。以上の結果、AtHIRD11 は、金属イオンと協調し、様々な酵素の活性をコントロールし、結果として植物の生理的ホメオスタシスに関与している可能性が示唆される。現在、更に多くの酵素を試験しており、AtHIRD11 の酵素阻害様式を追及している。

His リッチデハイドリンのアデノシン関連物質との結合に関する研究
 ○田中 莉子, 加藤 雄成, 原 正和 (静大農 応生化)

【目的】

LEA タンパク質グループ 2 のデハイドリンは、植物が非生物的ストレスを受けたときに蓄積するタンパク質であり、通常の溶媒条件では特定の二次構造を取らない天然変性タンパク質である。デハイドリンが高発現した植物体では、乾燥や低温ストレス耐性が向上するなど、植物のストレス耐性向上に関与することが知られている。しかし、その機能は未だ確定していない。当研究室では、シロイヌナズナで最も強く発現するデハイドリンである AtHIRD11 に金属結合性や酵素の失活保護、ラジカル発生抑制といった機能を見出してきた。さらに、AtHIRD11 のウンシュウミカンオーソログは、Zn²⁺ 依存的、かつ配列非特異的に核酸と結合することを示した。本研究では、デハイドリンの核酸結合様式を明らかにすることを目的に、ヌクレオチド及びその構成要素レベルで結合実験を行った。

【方法・結果】

AtHIRD11 は大腸菌発現系で調製した。ヌクレオチドとして、ATP を用いた。AtHIRD11 と、ATP 又はその関連物質を混合し、遠心式限外ろ過によって遊離低分子を分離した。遊離低分子は吸光度法によって定量し、1mol あたりの AtHIRD11 に結合する対象物質の量を、モル数として算出した。その結果、AtHIRD11 は Zn²⁺ 依存的に ATP、ADP、AMP、アデノシンと結合し、その結合にはリボースやリン酸基が関与しているが、アデニンは関与しないことが示された。この結果は、デハイドリンが核酸の配列に依存せずに結合することと矛盾しない。デハイドリンは、ストレス下で、核酸と非特異的に結合し、その安定化に関与することが示唆される。同時に、ATP などのエネルギー関連物質を保護する役割も考えられる。

シロイヌナズナの His-rich デハイドリン AtHIRD11 の機能研究
 ○加藤雄成¹, 篠田友里¹, 原正和¹, 近藤満², (¹静大・農, ²静大・理)

【目的】

デハイドリンは、植物が非生物的ストレスを受けた時に蓄積する LEA 蛋白質の一種である。デハイドリンを高発現させた植物では、低温及び乾燥ストレス耐性が向上するが、デハイドリンの分子機能は未だ判然としない。以前われわれは、デハイドリンが、ヒドロキシルラジカルスカベンジャーであることを示し、スカベンジングに必要なアミノ酸残基を特定した。さらに、シロイヌナズナの His リッチデハイドリン AtHIRD11 に、遷移金属由来の活性酸素種発生を抑制するラジカル静止活性があることを見出した。本研究では、AtHIRD11 のラジカル静止メカニズムを、ドメインレベルで調査した。その結果、天然変性蛋白質によるラジカル静止活性を決定づけるアミノ酸配列上の法則性を見出した。AtHIRD11 の金属結合時の物性変化と合わせて報告する。

【方法・結果】

大腸菌発現系で得た AtHIRD11 を、銅-アスコルビン酸ヒドロキシルラジカル発生系に添加したところ、ヒドロキシルラジカルのみならず過酸化水素の発生も効率よく阻害した。AtHIRD11 を 7 つのドメインに分割し、同じ系に供したところ、阻害活性には His 残基が必要であり、His に富むドメイン (D6) が活性に関与していることが分かった。さらに、各種変異ドメイン、14 種類の植物由来の AtHIRD11 オーソログの D6 を調査したところ、ドメイン中の His 含量が、阻害活性 (ID₅₀) とドメイン長との積と、負の相関にあることを見出した。この法則は、天然変性蛋白質のラジカル静止活性能力を判定する基準として利用できる。また、AtHIRD11 は重金属と共存することにより自己会合するが、自己会合はラジカル静止活性に必須ではないことを示した。最終的に、デハイドリンは、被ストレス植物において、金属由来のラジカル発生を抑制し、植物のストレス耐性を向上させる可能性が示唆された。

分裂酵母における経時寿命延長因子 Ecl1 の解析

○ 島崎嵩史¹, 大塚北斗¹, 内藤知佳子², 村上浩士³, 饗場浩文¹
 (¹名大院創薬科学, ²名大院生命農, ³埼玉大院理工)

【目的】

Ecl1 は過剰発現により分裂酵母の経時寿命を延長する遺伝子として当研究室で新規に発見された。Ecl1 は 80 アミノ酸程度の小さなタンパク質であり、既知のホモログ遺伝子が存在せず、予想できる機能ドメインも確認できていないため、その機能は未だに不明な点が多い。Ecl1 の過剰発現は H₂O₂ ストレスに対して耐性を示すことから、Ecl1 は経時寿命を延長するのみでなく、H₂O₂ ストレスの応答にも深く関与している。我々はこの Ecl1 と H₂O₂ ストレスとの関連に着目し、寿命とは異なった観点から Ecl1 の解析を試みた。

【方法・結果】

Ecl1 の過剰発現は H₂O₂ ストレスに対して耐性を示すが、反対に Ecl1 の欠損は H₂O₂ ストレスに対して感受性を示した。H₂O₂ ストレスによる *ecl1*⁺ の発現量の変化を調べた結果、H₂O₂ 添加後に *ecl1*⁺-mRNA 量が増加しており、H₂O₂ ストレスが *ecl1*⁺-mRNA の転写を誘導することが判明した。さらに、*ecl1*⁺ の翻訳開始点の 761bp 上流に分裂酵母の H₂O₂ ストレス応答に重要な転写因子である Atf1 の結合配列(TTACGT)が存在することから、H₂O₂ ストレスによる *ecl1*⁺ の転写誘導と Atf1 の関係について更なる解析を行った。

atf1⁺ の欠損株では H₂O₂ ストレスによる *ecl1*⁺ の発現量の増加が見られなかったことから、*ecl1*⁺ の転写誘導は Atf1 に依存することが明らかとなった。また、ChIP assay によって Atf1 が *ecl1*⁺ の上流に結合することが確認され、*ecl1*⁺ 上流の Atf1 結合配列を *kan^r* によって置換した Atf1 結合配列の欠損株では、H₂O₂ の添加による *ecl1*⁺ の転写誘導が起こらなかつたことから、H₂O₂ ストレスによる *ecl1*⁺ の転写誘導は *ecl1*⁺ の 761bp 上流の Atf1 結合配列に Atf1 が結合することによって起きることが示唆された。

分裂酵母における RACK1 ホモログ Cpc2 についての研究

○ 東剣虹¹, 大塚北斗², 古賀由梨枝¹, 内藤知佳子¹, 村上浩士³, 饗場浩文²
 (¹名大院生命農学, ²名大院創薬科学, ³埼玉大院理工)

【目的】

我々は、分裂酵母で発見した経時寿命延長因子 Ecl1 ファミリーの機能解析を行っている。その一環として、Two-Hybrid スクリーニングを用いて Ecl1 と相互作用する因子を探索した。取得した因子の中に RACK1 ホモログとして知られる Cpc2 がある。*cpc2* 欠損株における Ecl1 高発現の解析で、我々は興味深い表現型を得たが、解析の一環で *cpc2* 欠損株にベクターを導入したところ、本来全く孢子形成しない *cpc2* 欠損株が野性株と同等にまで孢子の形成が見られた。本研究はその原因の解明を目的とする。

【方法・結果】

我々は主に分裂酵母の野性株と *cpc2* 欠損株の両方を用いて比較実験を行った。野性株では Ecl1 を高発現することで、経時寿命の延長や *ste11*⁺ の発現の上昇が観察された。一方で *cpc2* 欠損株では、Ecl1 を高発現しても上記の表現型は弱くなる、或は全く見られなくなった。ところが、*h⁹⁰* 株を用いて孢子形成を調べたところ、本来全く孢子形成を行わない *cpc2* 欠損株にベクターを導入した株では、野性株と同等の接合率を示した。我々はその原因がベクターにあるのではないかと考え、ベクター上の LEU2 合成遺伝子に着目した。

我々は、ベクターを保持した細胞にはロイシンが豊富にあるのではないかと考えた。その状態を模倣するために、①通常の 4 倍量のロイシンを加えた培地での *cpc2* 欠損株、②ロイシン非要求性の *cpc2* 欠損株、のそれぞれの接合率を調べた。その結果、双方ともベクターを導入した株と同様の表現型を示した。他のアミノ酸についても調べたが、相補したのはロイシンのみであった。

以上のことから我々は、*cpc2* 欠損株における孢子形成欠陥はロイシン特異的に相補されることを突き止めた。

分裂酵母 *php2*⁺が経時寿命に与える影響に関する研究

琢磨和晃¹, 大塚北斗², 東剣虹¹, 村上浩士³, 饗場浩文² (¹名古屋大学大学院生命農学研究科, ²名古屋大学大学院創薬科学研究科, ³埼玉大学大学院理工学研究科)

【目的】高発現することにより分裂酵母の経時寿命延長を示す因子 *Ecl1* の出芽酵母ホモログ *ScEcl1* と *HAP2* が Two-Hybrid 法で相互作用することが報告された。今回我々は *Hap2* の分裂酵母ホモログである *Php2* の経時寿命への関与を調べた。

【方法・結果】*php2*⁺の欠損株 (以下 $\Delta php2$) を作製し、その経時寿命を測定したところ、 $\Delta php2$ 株では経時寿命が野生株に比べて長くなることを発見した。さらに $\Delta php2$ では、野生株に比べ呼吸活性が大きく低下しており、主に発酵によりエネルギーを得ていることが分かった。多くの生物種において、摂取するカロリーを制限する (カロリー制限) と、寿命が延長することが知られているが、分裂酵母においても野生株をグルコースが少ない培地で生育させる (カロリー制限状態) と栄養飢餓が起こり、経時寿命が長くなることを見出している。したがって $\Delta php2$ 株では、エネルギー変換効率のよい呼吸がほとんどできず、結果として発酵によりグルコースをより多く消費してエネルギーを獲得する必要があるため、通常量のグルコースを含んだ培地においても一種のカロリー制限 (栄養飢餓) 状態に陥り、寿命延長が起きていると考えた。

これを示すため、まず $\Delta php2$ 株のグルコース消費量を調べたところ、野生株より消費量が多いことがわかった。また $\Delta php2$ 株にグルコースを過剰に加えて経時寿命を測定すると、 $\Delta php2$ 株の寿命延長が抑制された。カロリー制限条件下で $\Delta php2$ 株を生育しても、さらなる寿命の延長は見られなかった。カロリー制限条件下で $\Delta php2$ 株を生育してもさらなる寿命の延長はみられなかった。さらに、分裂酵母がカロリー制限状態に置かれると、リン酸化による活性化が起こることが知られているストレス応答 MAP キナーゼ *Sty1* の活性化なども観察された。

以上の結果は、 $\Delta php2$ 株ではカロリー制限様の生理変化が生じることを示しており、これが経時寿命延長が起こった理由である結論した。

分裂酵母の新規経時寿命延長因子に関する研究

○小川真悟¹, 大塚北斗², 酒井枝里香², 川村英彰¹, 村上浩士³, 饗場浩文²
(¹名大院生命農, ²名大院創薬, ³埼玉大院理工)

【目的】分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、寿命研究において有用なモデル生物であり、これまでに経時寿命に様々に関与する因子が発見されている。我々は過去に、分裂酵母で過剰発現すると経時寿命を延長する遺伝子として *Ecl1* ファミリー遺伝子が発見した。しかし、*Ecl1* ファミリー遺伝子以外には、同様の効果を示す因子の解析はほとんど進んでいない。寿命は多様な因子が関与する複雑な制御下にあることが想定されるので、その理解のためには新たな寿命制御因子の解明が重要である。そこで、我々は過剰発現により分裂酵母の経時寿命を延長する新規遺伝子のスクリーニングを行うことにした。

【方法・結果】*S. pombe* 野生株由来のゲノム DNA を、制限酵素 *Sau3AI* で部分的に切断し DNA 断片を調製した。これらを分裂酵母内で安定な多コピープラスミド pLB-Dblet につなぎ合わせ *S. pombe* のゲノムライブラリーを作製した。このライブラリーを用いて *S. pombe* 野生株を形質転換し、様々な遺伝子の過剰発現株を作製した。約 3000 株の形質転換体を対象に、独自に開発した簡便な寿命測定法 (スポットアッセイ) により経時寿命を測定し、253 株の経時寿命延長候補株を取得した。次いで、これらの株についてより詳しく経時寿命を解析するため、経時的に colony forming unit を測定し、寿命延長効果の優れた株を 7 株同定した。さらに各株にクローニングされた DNA 断片中のどの遺伝子が寿命延長に関与しているか調べた。その結果、過剰発現で分裂酵母の経時寿命を延長する 7 個の遺伝子を新たに発見することができた。本研究ではこの中で、遺伝子 SPBC16A3.08c (以下 16A3.08c) に注目した。

16A3.08c の過剰発現により、分裂酵母の経時寿命延長が引き起こされる以外にも、高温・低温感受性、接合能が低下することを見出した。これらの表現型は、多くの生物に保存され、細胞の様々な機能に関わる TOR シグナル経路の遺伝子 *Tor1* の欠損株と同じであり、遺伝学的な解析の結果、16A3.08c と *Tor1* との関連を示唆することができた。

L-Cysteine は LDL 受容体を活性化させる
 ○田中裕真, 島田昌也, 長岡 利 (岐阜大学, 応用生物科学部)

【目的】

血漿低密度リポタンパク質 (LDL) レベルの増加は, 動脈硬化症のリスク上昇につながる事が知られており, 主に肝臓で発現している LDL 受容体 (LDLR) によって調節されている. よって, LDLR 活性化因子の探索, 及びその作用機構を解明は, 動脈硬化症の予防に対する新たな戦略の発見につながる. ごく最近, ヒトにおいて, 含硫アミノ酸を含まない食事を摂取することにより, 血漿トリグリセリドおよび血漿コレステロールが増加することが報告され, あらためて含硫アミノ酸の脂質代謝に対する作用が注目されているが¹⁾, その作用機構は未だ明らかにされていない. そこで, 本研究では, ヒト培養肝細胞 HepG2 を用いて, その作用機構の解明を目的とする.

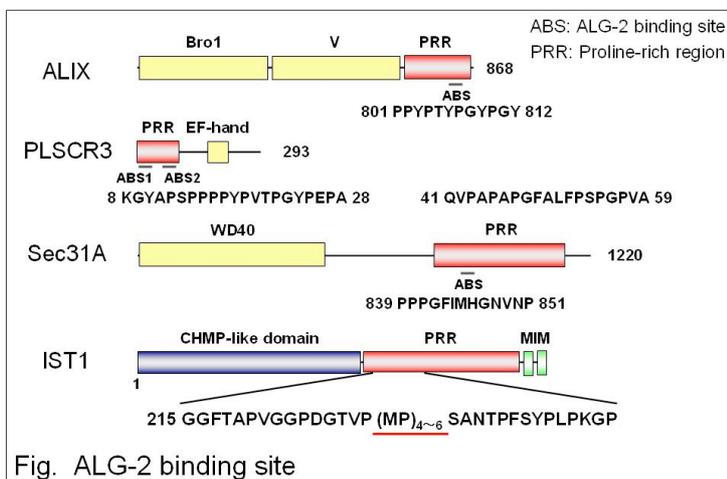
【方法・結果】

HepG2 に S-Methyl-L-Cysteine Sulfoxide, L-Cysteine, Taurine, N-Acetyl-L-Cysteine, L-Methionine を添加し, LDLR, HMG-CoA reductase, CYP7A1, SREBP2 の各 mRNA レベルへの影響並びに細胞毒性を検討した. なお, L-Cysteine 群については, LDLR タンパク質レベルへの影響も検討した. また, HepG2 に LDLR 遺伝子プロモーターを連結したルシフェラーゼプラスミドを遺伝子導入し, L-Cysteine の LDLR 遺伝子転写活性に対する影響を検討した. 以上の実験の結果, いずれの化合物も細胞毒性を示さず, L-Cysteine を添加した際のみ, LDLR が mRNA 及びタンパク質レベルで顕著に増加することが明らかとなり, また, L-Cysteine の添加により LDLR 遺伝子転写活性が増加することを発見した. コレステロール代謝調節における L-Cysteine の重要性が示唆された. L-Cysteine による LDLR 活性化は, これまでに報告がなく, 本研究の成果はアミノ酸による新規 LDLR 活性化機構の発見に繋がる可能性がある. 1) J. Nutr., 141, 1424-1431 (2011)

アポトーシス関連因子 ALG-2 の新規結合モチーフ
 ○奥村真弓¹, 柴田秀樹¹, 牧正敏¹ (¹名大院生命農)

【目的】 ESCRT (エンドソーム選別輸送複合体) は, 細胞分裂にも重要な機能を果たしており, ESCRT-III 関連因子である IST1 は特に細胞質分裂に関与すると考えられている. アポトーシス関連因子として同定された ALG-2 は, カルシウム依存的に Pro に富んだ領域 (PRR) をもつ様々な蛋白質と結合することが知られている. 本研究では IST1 が PRR をもつことに着目し, IST1 と ALG-2 が相互作用する可能性を検討した.

【方法・結果】 HEK293T 細胞にタグ付加 IST1 を発現させプルダウン実験を行ったところ, ALG-2 がカルシウム依存的にプルダウンされた. また IST1 と ALG-2 の相互作用には, IST1 の Met-Pro 繰り返し配列が重要であることが判明した. この配列は右に示す ALG-2 binding site (ABS) に含まれる二つのモチーフ: type 1, PPYP(X)nYP (X, variable; n = 4 in ALIX and PLSCR3); type 2, PXPGF (X, variable; Sec31A and PLSCR3) とは全く異なっている. そこで, ALG-2 と IST1 がどのように結合しているか調べるため, 二つの ABS との相互作用に重要な残基を置換した ALG-2 変異体を用いた GST プルダウン実験を行った. これにより, IST1 が type 1 や type 2 とは異なる結合様式を示すことが示唆された.



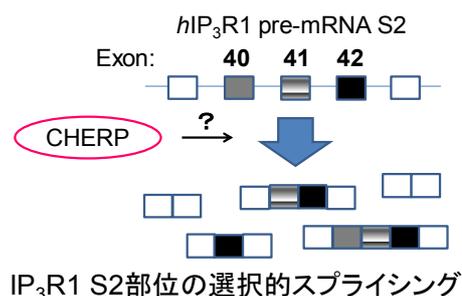
新規 ALG-2 相互作用因子 CHERP の pre-mRNA スプライシング制御における機能解析
 ○大杉桂奈江, 井元千晶, 柴田秀樹, 牧正敏 (名大院生命農・応用分子生命科)

【目的】

Ca²⁺結合蛋白質 ALG-2 の相互作用因子として我々が同定した CHERP は、T 細胞系では小胞体に局在し、細胞内 Ca²⁺動員制御に関わることが報告されていた。ところが、プロテオーム解析やその構造的特徴から、CHERP が pre-mRNA スプライシングに関わる蛋白質でもある可能性があった。我々は CHERP が pre-mRNA スプライシングにおいて機能する SR 蛋白質ファミリーが共通してもつ RS (Arg/Ser-rich) ドメインをもち、HeLa 細胞では、スプライシング因子が豊富に存在する核スペックルと呼ばれる核内構造物に局在することを明らかにした。本研究では、CHERP の SR 様蛋白質としての機能に注目し、選択的スプライシング制御への関与を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

GFP 融合 CHERP 全長および RS ドメイン欠損変異体の細胞内局在を観察した結果、全長はこれまでの報告とは異なり、小胞体ではなく主に核質に存在し、核スペックルに一部局在することを確認した。一方、RS ドメイン欠損変異体は、主に細胞質に局在するようになり、核への局在には RS ドメインが重要であることが判明した。ジグトニンによる前膜透過処理を行った HeLa 細胞を用いた免疫染色の結果、内在性 CHERP やスプライシング制御因子 SC35 が示す核スペックルへの、ALG-2 の特異的な集積が観察された。IP₃R1 について報告されている選択的スプライシングに対し、CHERP の影響を調べたところ、CHERP を発現抑制させた細胞では IP₃R1 のエキソン 42 を含む mRNA の割合が増加した。以上の結果から、CHERP が SR 様蛋白質として機能することが示唆された。



ESCRT 関連因子 calpain-7 が EGFR 下方制御に与える影響
 ○前本佑樹, 木曾里美, 柴田秀樹, 牧正敏 (名大院生命農)

【目的】

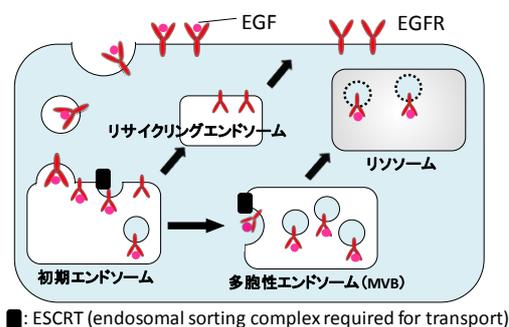
calpain は動物細胞内システインプロテアーゼで、一般的にはカルシウム依存的に基質を限定分解し、細胞をある特定の生理機能に導く調節酵素として知られている。

calpain-7 は一般的な calpain と異なり MIT ドメインというタンパク質結合領域を有している。

MIT ドメインは ESCRT タンパク質複合体が有しており、ESCRT はエンドサイトーシス経路における小胞輸送やその積荷タンパク質の分解に必要な複合体である。本発表では calpain-7 が代表的積荷分子で、多くのガン細胞において発現上昇や活性の上昇が見られており、病態の進行に重要な因子であることが知られている EGFR (epidermal growth factor receptor) の下方制御に与える影響について発表する。

【方法・結果】

前日に播種した HeLa 細胞に calpain-7 の siRNA をトランスフェクションした。さらにその 2 日後に無血清培地に交換することにより、細胞表面に EGFR を蓄積させ、3 時間後、再び 100 ng/μl の EGF 含有培地に交換し、時間経過をおって細胞を回収した。その結果コントロール siRNA に比べ calpain-7 ノックダウン細胞では EGFR 分解の遅れが観察された。次に、同様にノックダウンし、1 日後に calpain-7 を発現させる、レスキュー実験を行ったところ、野生型 calpain-7 の導入では分解の遅延が回復したが、calpain-7 の活性中心に変異を導入した、calpain-7^{C290S} 変異体の導入では回復しなかった。以上の結果から、calpain-7 が EGFR の下方制御に関与していることが明らかになった。



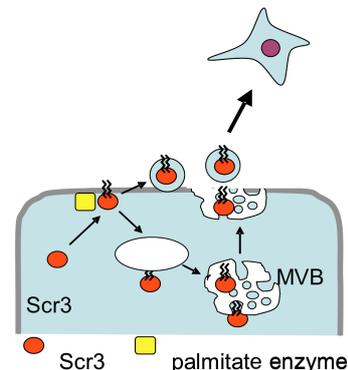
■: ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)

Phospholipid scramblase 3 のエキソソーム経路による細胞外分泌に関する研究

○犬塚達俊¹, 猪川亮¹, 陳岑¹, 木津久美子², 柴田秀樹¹, 成田宏史², 牧正敏¹(¹名大院生命農, ²京女大食物栄養)

【目的】

Phospholipid scramblase 3 (Scr3) はカルジオリピンの合成やミトコンドリアの内膜から外膜への移動に関与することやアポトーシスにおいて働くことなどが報告されている。また、Scr3 ノックアウトマウスでは腹部脂肪の蓄積、血中の脂質濃度の上昇、インシュリン抵抗性の生活習慣病症状を示すことが知られている。しかし、未だ Scr3 の局在や機能についての詳細は不明である。我々は、Scr3 の機能解明の足がかりとして細胞外分泌経路の特定を目的とし、研究を行った。



【方法・結果】

これまでに我々は Scr3 特異的認識モノクローナル抗体の取得、Scr3 を恒常発現する HEK293 細胞 (HEK293/Scr3) の樹立に成功した。これらを用いてショ糖密度勾配遠心分画法を行った結果、エキソソームが検出される密度の画分で Scr3 が検出された。また、パルミトイル化阻害剤である 2-bromopalmitate やパルミトイル化しない Scr3 変異体を使用し、Scr3 のパルミトイル化が細胞外分泌に重要であることも明らかにした。さらに、HeLa 細胞、3T3-L1 細胞(マウス脂肪前駆細胞)を Scr3 が含まれているエキソソームの存在下で培養した結果、細胞内に取り込まれた Scr3 を共焦点レーザー顕微鏡により検出した。これらの結果から、Scr3 はパルミトイル化依存的にエキソソーム経路を介し、細胞外に分泌され細胞間を移動する因子であると考えられる。

小胞体からのタンパク質の搬出におけるカルシウム結合タンパク質の生理的役割

○京卓志, 横山健, 山室南, 三宅博, 牧正敏, 柴田秀樹 (名大院生命農)

【背景・目的】粗面小胞体で新規に合成されたタンパク質は COPII 被覆小胞に積み込まれることで小胞体から搬出される。COPII 被覆小胞は ERES (endoplasmic reticulum exit site) と呼ばれる小胞体膜上の特別な領域に、細胞質に存在している被覆構成タンパク質が動員されることによって形成される。これまでに私たちは、5 つ連続した EF-hand を有するカルシウム結合タンパク質 ALG-2 が、被覆構成タンパク質の一つである Sec31A と相互作用し、ERES に局在することを見出している。また ALG-2 はホモダイマーを形成するためアダプタータンパク質として機能することが想定されている。実際私たちは ALG-2 の相互作用因子の一つであるアネキシン A11 (AnxA11) が ALG-2 依存的に ERES に動員されることを見出している。本研究では、小胞体からのタンパク質の搬出における 2 種のカルシウム結合タンパク質、ALG-2 と AnxA11 の生理的役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】まず、ALG-2、AnxA11 の発現抑制が ERES における Sec31A の動態に与える影響を、SGFP2 融合型 Sec31A (Sec31A-G) を恒常的に発現する細胞を用いて FRAP 解析により調べた。ALG-2、AnxA11 どちらの発現抑制細胞においても、ERES 膜に安定に局在化する Sec31A-G の割合が減少した。次に ALG-2、AnxA11 の発現抑制細胞を用いて、分泌経路の研究に広く用いられている水疱性口内炎ウイルス由来の温度感受性変異を有する糖タンパク質 VSV-G tsO45 の小胞体からの輸送を追跡した。その結果、ALG-2、AnxA11 の発現抑制によって VSV-G tsO45 の輸送が促進された。さらに ALG-2、AnxA11 の発現抑制細胞の電子顕微鏡観察を行ったところ、ゴルジ体付近の輸送小胞が小さくなる傾向があった。また現在、繊維状コラーゲンの輸送における ALG-2、AnxA11 の発現抑制の影響を解析している。繊維状コラーゲンは典型的な COPII 被覆小胞には収容できないほど巨大であり、その輸送の詳細なメカニズムは不明であるが COPII 被覆を必要とする。以上の解析結果から ALG-2 や AnxA11 の作用点を議論したい。

P53

正常乳腺細胞 MCF-10A における α_2 -アドレナリン受容体に対するフラボノイド類の影響

○山崎隼輔¹, 榊原啓之², 下位香代子^{1,3}

(¹静岡県立大学大学院 生活健康, ²宮崎大学 農学, ³静岡県立大学 薬食生命科学総合学府)

【目的】

現代はストレス社会と呼ばれ、人々は心理・社会的ストレスに常に曝されており、ストレスに過度にあるいは慢性的に曝露され続けると、生体機能に異常をきたし、その結果、様々な疾患が誘発される。我々はこれまでに、ストレス負荷時に分泌が増加するノルアドレナリンと乳がんの重要なリスク因子である4-OHE₂を正常乳腺細胞MCF-10Aに作用させると、 α_2 -アドレナリン受容体とATMを介して、DNA損傷の指標である γ -H2AXが誘導されることを明らかにした。一方、我々が日常生活において植物性食品から摂取しているフラボノイド類には様々な機能性があることが報告されている。そこで本研究では、フラボノイド類の α_2 -アドレナリン受容体への影響を γ -H2AXを指標にして検討した。

【方法・結果】

MCF-10A細胞にノルアドレナリン(3 nM)、フラボノイド類(ケルセチンとその代謝物(0.05、0.1、1 μ M))を1時間作用させた後、4-OHE₂(3 μ M)を添加した。1時間インキュベートした後、回収した細胞からタンパクを抽出し、 γ -H2AXをWestern blot法により検出した。その結果、ケルセチンとケルセチン抱合体は顕著に γ -H2AXの誘導を抑制したが、ケルセチンメチル化体は抑制効果を示さなかった。また、 α_2 -アドレナリン受容体へのBinding assayから、受容体への結合を阻害することがわかった。本結果は、ノルアドレナリンと4-OHE₂存在下で誘導される γ -H2AXの抑制には、カテコール構造が重要である可能性を示唆しているおり、フラボノイド類の新しい作用である。現在、他のフラボノイド類、或いはカテコール構造を有するフェノール酸を用いて、構造活性相関について検討中である。

P54

シアル酸認識レクチンシグレックによるマクロファージの活性調節

庄司徹, 財津芳紀, ○樋口廣士, 西島謙一, 飯島信司

(名古屋大院・工・遺伝子工学)

【目的】

高等細胞の持つシアル酸は細胞膜上の糖鎖末端に付加され、細胞機能の調節に関わっている。このシアル酸を認識するレクチンとして、主に免疫系の細胞に発現しているSiglecの存在が知られている。我々は自然免疫を担うマクロファージに着目し、Siglec-9がLPSなどの炎症誘導物質によるマクロファージの炎症活性を抑制することをこれまでに明らかにしている。

一方マクロファージは、従来から知られており、炎症反応を担うM1型だけでなく、炎症抑制や創傷治癒などを担うM2型というタイプが存在することが知られている。そこで、M2型を誘導するとされるIL-4に対するマクロファージの応答性にSiglec-9が与える影響について検討した。

【方法・結果】

マクロファージ様細胞株RAW264をIL-4で刺激し、M2マーカーとされるアルギナーゼIの発現をRT-PCRで解析した。その結果、Siglec-9発現RAW264細胞では、IL-4によるアルギナーゼIの発現が顕著に増加していた。また、細胞抽出液のアルギナーゼ活性を測定したところ、mRNAの発現量上昇を反映してSiglec-9発現細胞での活性が高いことが確認された。これらのことより、SiglecがマクロファージのIL-4反応性を高めることが示唆された。

ジャガイモ疫病菌からの新規エリシターの探索
○村田涼, Monjil M. Shahjahan, 川北一人, 小鹿一 (名大院生命農)

【目的】

ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* はジャガイモ等の葉や塊茎を軟化腐敗させる。従って、その防除は農業上極めて重要であるが、有望な方法の1つとして「エリシター」の応用が挙げられる。植物に病原菌が侵入すると活性酸素生成、ファイトアレキシン蓄積に代表される様々な抵抗反応が起こる。エリシターとは、このような植物の抵抗反応を誘導する生理活性物質の総称である。本研究ではジャガイモ疫病菌防除への応用を目指し、その菌体からのエリシターの探索を目的とする。

【方法・結果】

ジャガイモ疫病菌菌体のメタノール抽出を行い、活性酸素生成活性やファイトアレキシン誘導活性を示す粗抽出物を得た。その後、活性評価をしながら HPLC 等各種クロマトグラフィーを用いてエリシターを精製した。エリシター活性は、ジャガイモ培養細胞における活性酸素の生成を指標とした。その理由は、検出が簡便であると共に、活性酸素の生成は植物に防御応答を誘導する「緊急シグナル」であり、抵抗反応の初期に起こる現象だからである。精製により強～中程度の活性を示す 5 種の物質と、活性が微弱な 3 種の物質が得られた。これらについて、NMR、MS 等の分析機器を用いて構造解析を行った。その結果、8 種ともセラミドの一種であることが明らかになった。疫病菌からのセラミド抽出例は多く報告されているが、本研究において得られたセラミドのうち 4 種は新規物質であった。特に活性の強かった 2 種のセラミドをタバコ葉に接種したところ、植物個体においても活性酸素の生成を確認し、これらの物質が疫病菌のエリシターであることが明らかになった。

多変量解析を用いた ¹H-NMR による緑茶成分の分析
○久保田 通代, 細谷 孝博, 熊澤 茂則 (静岡県大院食品栄養)

【目的】

NMR (核磁気共鳴) は分子上の原子核の構造情報を得ることのできる手法であり、主に単一化合物を対象とした分子構造の解析法として利用されている。また、近年では、シグナルの積分値が対応する核の数に比例することを利用し、定量分析にも活用され始めている。さらに、特別な前処理なしで測定できることから、尿や血清中の代謝物の測定に利用され、NMR データを多変量解析することでメタボローム解析への応用も検討されている。このように NMR と統計的手法を組み合わせることで、非破壊的かつ簡便に多成分の定性・定量に基づいた特徴付けが可能となる。そこで、本研究では、本手法の食品成分分析への応用を目的として、世界各地の緑茶の ¹H-NMR スペクトルを測定し、定量分析および多変量解析を行った。

【方法・結果】

実験には日本を含めた 6 か国から集めた合計 33 種類の緑茶葉を用い、80°C の軽水で 3 分間抽出した後、重水を添加したものを NMR 測定用サンプルとした。NMR は Bruker BioSpin AVANCE III (400 MHz) を使用し、presaturation NOESY のパルスシーケンスにより軽水のピークを消去して ¹H-NMR スペクトルを測定した。シグナル強度からカフェインを始めとする緑茶の主成分の定量を行い、サンプルごとの含有量の違いを明らかにした。また、測定データは、多変量解析ソフト AMIX を用いて、0.2-10 ppm の範囲をバケット積分して解析した。その結果、それぞれの緑茶の分類に成功し、各サンプルの特徴となる成分組成を明確にすることができた。本手法は、1 度の測定でアミノ酸やカフェインなどの多成分を混合物のまま同時に検出できること、サンプルの前処理が不要なため通常飲む状態での測定が可能であること、HPLC カラムへの吸着などの測定中の成分の損出がないことから、品質管理や品質評価のための有用な手法であると考えられ、今後、様々な食品への応用が期待される。

カテキン類の酸化縮合反応に関する研究

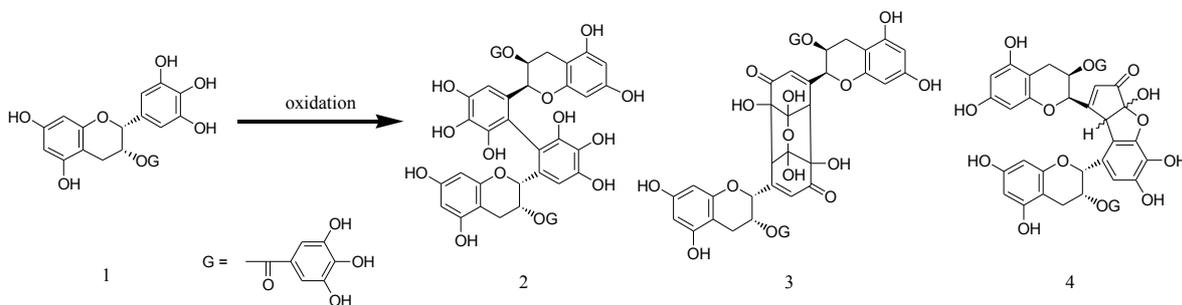
○戸松薫, 柳瀬笑子 (岐大院応生)

【目的】

カテキン類は、茶に含まれる成分であり、抗酸化作用、抗菌作用などを持つ化合物として注目を集めている。生葉中のカテキン類はウーロン茶や紅茶の製造過程で酸化的に縮重合し、それぞれの茶葉に特徴的な Oolongtheanine や Theaflavin などに変化することが知られている。本研究では、カテキン類の酸化縮合反応の解明を目的として(-)-EGCg (1)の酸化反応について検討した。

【方法・結果】

各種酸化剤を用いて化合物 1 の酸化反応を検討したところ、いずれの条件下においても B 環部のみが酸化され、gallate 部が酸化されたものは得られなかった。得られた生成物は酸化剤の種類によって異なり、Pd/C や $K_3[Fe(CN)_6]$ を用いると Theasinensin A (2) 及び化合物 3 が、 $CuCl_2$ を用いると化合物 2 が得られ、化合物 3 は得られなかった。さらに、化合物 2 から Oolongtheanine-3'-O-gallate (4) への酸化反応を試みたところ、反応は進行せず化合物 4 は得られなかったが、 $CuCl_2$ で酸化後、 $CuCl_2$ を除去し直接加熱すると僅かではあるが化合物 4 が得られることが分かった。



5-O-アシル化キナ酸類の実用的合成

○渡邊紀之¹, 鈴木昌子¹, 関口由起子¹, 尾山公一², 近藤忠雄¹, 吉田久美¹(¹ 名大院情報科学, ² 名大物国セ)

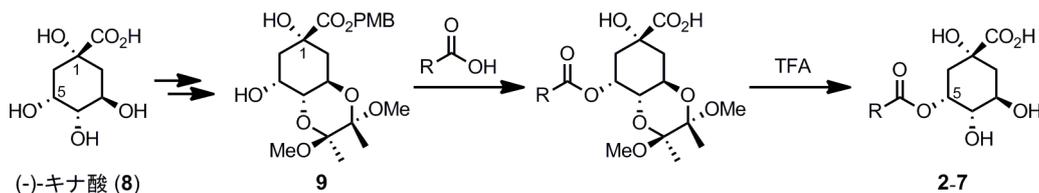
【目的】

アジサイ (*Hydrangea macrophylla*) の青色ガク片は、デルフィニジン 3-グルコシド (1) が、 Al^{3+} と錯形成し、更にキナ酸誘導体 (2, 3) が助色素として作用して発色する。既に我々はアジサイの着色細胞の分析データから、青色発色する条件を見出している。しかし、この青色色素は水溶液中でのみ存在し、NMR シグナルがブロード化する等、機器分析による構造解析が困難である。そこで、種々の助色素類縁体 (2-7) を合成し、これを用いて青色色素を再構築することで構造情報を得られるものと考えた。

【方法・結果】

キナ酸 (8) の 1 位カルボン酸を PMB (*p*-methoxybenzyl) 基で保護した鍵中間体 9 を分子設計し、アシル化反応と脱保護反応の条件最適化を行って、5-O-アシル化キナ酸の実用的合成法を開発した。

原料 8 から収率 79% で 9 を合成した。田辺らのエステル化法¹⁾を改良し、*i*-Pr₂Net を加えることでさらに強力なエステル化反応を開発した。9 にこのエステル化反応を適用することによって 6 種類の 5-O-アシル化キナ酸を合成した。



RCO = カフェオイル (2), *p*-クマロイル (3), シンナモイル (4),
ナフトイル (5), ベンゾイル (6), フェニルエチルカルボニル (7)

1) Tanabe et al. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1209.

青色アジサイのアルミニウム輸送遺伝子に関する研究

○根岸孝至¹、大島健志朗²、服部正平²、金井雅武³、真野昌二³、西村幹夫³、吉田久美¹(¹ 名大院情報科学、² 東大院新領域、³ 基生研細胞生物)

【目的】

青色系統の花のほとんどは、アントシアニンに由来する。中性から弱酸性の花弁液胞内で真の青色を発色するには、2価、3価の金属イオンとアントシアニンとが錯体形成することが必要である。アジサイ (*Hydrangea macrophylla*) は酸性土壌耐性植物で、ガク片の青色発色には、アルミニウムイオン (Al) が必須であることがわかっている。しかし、Al の細胞内へ、そして、液胞への輸送に関わる遺伝子は全く同定されていなかった。今回、アジサイの細胞内、及び、液胞への Al 輸送に関わる遺伝子の単離と機能解明を行なった。

【方法・結果】

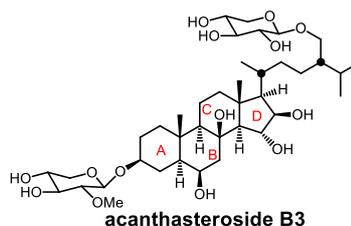
アジサイガク片 cDNA ライブラリーのうち、約 12000 の遺伝子の配列を読み、マイクロアレイを作製した。配列情報から予測される局在と機能から液胞膜トランスポーター候補を選び出し、酵母アルミニウム感受性株により機能を確認し液胞型 Al 輸送体遺伝子 (*HmVALT*) を同定した。さらに、細胞膜に局在する Al トランスポーター遺伝子候補を選び出し、同様の活性試験により細胞膜に局在する Al 輸送体遺伝子も取得した (*HmPALT1*)。いずれもアクアポリンファミリーに属していた。これらの遺伝子をシロイヌナズナに導入した過剰発現株を作製し、Al に対する感受性を調べた。*HmVALT* 導入株は Al 耐性に、*HmPALT1* 導入株は Al 感受性になった。これらの結果から、それぞれの遺伝子が、ガク片での Al の細胞への取り込み、それに続く液胞への隔離に関わる遺伝子であることが明らかになった。

Negishi et al., PLoS One, 7, e73189 (2012).

オニヒトデ由来のステロイド配糖体、アカンサステロサイド B3 の合成研究

○合田麗加¹、中崎敦夫¹、西川俊夫¹ (¹ 名大院生命農)

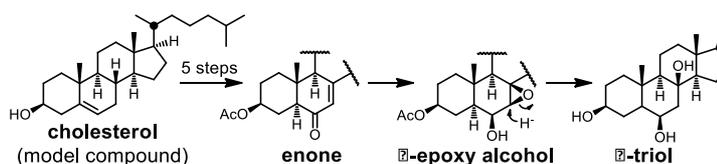
【目的】アカンサステロサイド B3 は、小鹿らにより沖縄のサンゴ礁に生息するオニヒトデから単離されたステロイド配糖体である¹。この化合物はマウスの記憶改善効果を示すため、神経変性疾患の医薬品リード化合物として期待されているが、天然からの大量供給は困難である。本研究では、この化合物の安定供給をめざし、市販ステロイドからアカンサステロサイド B3 の化学合成法の開発を目的としている。



【方法・結果】本研究では、安価なデヒドロエピアンドロステロンを原料とし、(1) B 環への水酸基導入、(2) D 環への水酸基導入、(3) 側鎖の合成および (4) グリコシル化を行い、アカンサステロサイド B3 を合成する計画である。

まず、コレステロールを用いたモデル実験において、B 環への水酸基の導入法を検討した。文献に従い、コレステロールから 5 工程でエノンへと誘導した²。続いて、エノンの立体選択的なアリルアルコールへの還元およびエポキシ化を行い、β-エポキシアルコールを合成した。最後にエポキシドを開環することで、B 環へ 2 つの水酸基の導入を達成した。

現在、デヒドロエピアンドロステロンの D 環への水酸基導入法および側鎖合成法について検討しており、併せて報告する。

1) WO 2006/090910. 2) N. V. Kovganko et al., *Chemistry of Natural Compounds*, 2000, 36, 377.

5, 11-ジデオキシテトロドトキシンの全合成

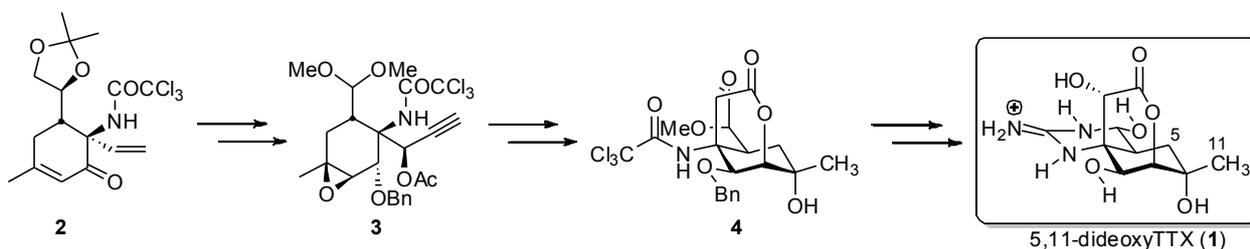
○今津拓也¹, 安立昌篤¹, 磯部 稔², 西川俊夫¹ (¹名大院生命農, ²台湾国立精華大)

【目的】

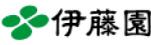
フグ中毒の原因物質であるテトロドトキシシン (TTX)は、電位依存性 Na^+ チャネルの強力な阻害活性を持つ天然有機化合物である。我々は、TTX 類の強力な生理活性と特異な化学構造に興味を持ち、これまでに TTX と 5 つの類縁体の合成を報告してきた。また、当研究室で合成を達成した 5,11-dideoxyTTX (**1**)が、近年天然型の類縁体であることが報告された。本研究では、TTX の生合成中間体として有力な 5,11-dideoxyTTX (**1**)の標識体の合成を目的として、5,11-dideoxyTTX (**1**)の改良合成法を検討した。

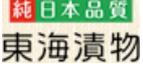
【方法・結果】

エノン **2** に対して、あらかじめアセトニド脱保護と 1,2-ジオールの切断を行いアセタールへと変換し、過去の合成法に従ってエポキシ化とアセチレンの導入を行うことで環化前駆体 **3** を合成した。続いて、アセチレンを酸化的に切断し分子内のエポキシドを開環した後、分子内アセタール化によってラクトン **4** を得た。最後に、2段階でグアニジンを導入した後、すべての保護基を除去し 5,11-dideoxyTTX (**1**)の全合成を達成した。また、生合成研究のための ^{15}N 標識体の合成にも成功した。



日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

	アサヒビール（株）名古屋工場	http://www.asahibeer.co.jp/
	旭松食品（株）食品研究所	http://www.asahimatsu.co.jp/
	アステラス製薬（株）CSR 部	http://www.astellas.com/jp/
	天野エンザイム（株）岐阜研究所	http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/index.html
	イチビキ（株）研究開発部	http://www.ichibiki.co.jp/
	（株）伊藤園中央研究所	http://www.itoen.co.jp/
	伊藤忠製糖（株）	http://www.itochu-sugar.com/
	伊那食品工業株式会社 伊那食品工業(株)	http://www.kantenpp.co.jp/
	科研製薬（株）生産技術研究所	http://www.kaken.co.jp/
	加藤化学（株）	http://www.katokagaku.co.jp/
	カネハツ食品（株）技術部	http://www.kanehatsu.co.jp/
	（株）岐阜セラック製造所	http://www.gifushellac.co.jp/
	キリンビール（株）名古屋工場	http://www.kirin.co.jp/
	金印（株）	http://www.kinjirushi.co.jp/
	サンエイ糖化（株）	http://www.sanei-toka.co.jp/
	サンジルシ醸造（株）	http://www.san-j.co.jp/
	（株）三和化学研究所三重研究所	http://www.skk-net.com/
	（株）J-オイルミルズ	http://www.j-oil.com/
	敷島スターチ（株）	http://www.shikishima-starch.co.jp/index.html
	敷島製パン(株) 研究部	http://www.pasconet.co.jp/
	（株）真誠 企画開発部	http://www.shinsei-ip.ne.jp/
	新日本化学工業（株）	http://www.e-snc.co.jp/

	太陽化学（株）研究所	http://www.taiyokagaku.com/
	大和製罐（株）清水研究所	http://www.daiwa-can.co.jp/
	竹本油脂（株）情報調査室	http://www.takemoto.co.jp/
	辻製油（株）	http://www.tsuji-seiyu.co.jp/
	デザイナーフーズ（株）	http://www.designerfoods.net/
	東海漬物（株）漬物機能研究所	http://www.kyuchan.co.jp/
	東海物産（株）食品研究所	http://www.tokaibsn.co.jp/
	（株）東洋発酵	http://www.toyohakko.com/
	東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所	http://www.toyobo.co.jp/
	中日本氷糖（株）	http://www.nakahyo.co.jp/
	名古屋製酪（株）	http://www.sujahta.co.jp/
	（株）ニッポンジーン	http://www.nippongene.com/
	日本食品化工（株）研究所	http://www.nisshoku.co.jp/
	フジ日本精糖（株）	http://www.fnsugar.co.jp/
	物産フードサイエンス（株）	http://www.bfsci.co.jp/
	（株）ポッカコーポレーション	http://www.pokka.co.jp/
	三井農林（株）食品総合研究所	http://www.mitsui-norin.co.jp/
	（株）ミツカングループ本社	http://www.mizkan.co.jp/company/
	名糖産業（株）	http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/index.html
	盛田（株）小鈴谷工場	http://www.moritakk.com/
	ヤマモリ（株）	http://www.yamamori.co.jp/
	養命酒製造（株）中央研究所	http://www.yomeishu.co.jp/

平成 24 年度 日本農芸化学会中部支部 支部役員および支部参与
(平成 24 年 10 月 1 日現在 敬称略, 括弧内は本部役職)

支部長・理事

牧 正敏 名古屋大学大学院生命農学
(本部理事)

副支部長

小鹿 一 名古屋大学大学院生命農学
山口庄太郎 天野エンザイム(株)
(代議員, 和文誌編集委員)

庶務幹事

岩崎雄吾 名古屋大学大学院生命農学
石黒澄衛 名古屋大学大学院生命農学

会計幹事

中西洋一 名古屋大学大学院生命農学

支部幹事

大島芳文 (株)ミツカングループ本社
小林哲夫 名古屋大学大学院生命農学
(代議員, 英文誌編集委員会,
産学官学術交流委員会)

奥村克純 三重大学大学院生物資源
(和文誌編集委員会)

尾仲宏康 富山県立大学 ※年度内はそのまま

加藤雅士 名城大農学部

河原崎泰昌 静岡県立大学食品栄養科学部

大久保勉 太陽化学(株) 研究所 (代議員)

中川 寅 岐阜大学応用生物科学部

中村宗一郎 信州大学農学部 (代議員)

村田健臣 静岡大学農学部

支部参与 (50 音順)

浅野泰久 富山県立大学生物工学研究センター
(授賞選考委員会)

飯島信司 名古屋大学大学院工学

池田正人 信州大学農学部

石田秀治 岐阜大学応用生物科学部

今井邦雄 三重大学大学院生物資源

岩崎行玄 福井県立大学

岩本悟志 岐阜大学応用生物科学部

梅川逸人 三重大学大学院生物資源 (代議員)

衛藤英男 静岡大学農学部

榎本俊樹 石川県立大学 (代議員)

遠藤克秋 竹本油脂(株)

大澤俊彦 愛知学院大学心身科学部

大塚正盛 サンエイ糖化(株) 素材開発部

小倉光雄 東海大学海洋研究所

岡戸信夫 新日本化学工業(株) 研究部

角田隆巳 伊藤園(株) 生産本部

片桐孝夫 (株)ポッカコーポレーション
(代議員)

片山新太 名古屋大学エコトピア科学研究所

加藤丈雄 愛知県産業技術研究所

食品工業技術センター

加藤康夫 富山県立大学 ※支部幹事代理

金政 真 中部大学応用生物学部

菊池 洋 豊橋技術科学大学

北島 健 名古屋大学大学院生命農学

木下徹也 加藤化学(株) 技術部

倉根隆一郎 中部大学応用生物学部

黒川洋一 福井県立大学

粟冠和郎 三重大学大学院生物資源

佐藤俊郎 (株)J-オイルミルズ

佐野元昭

佐野佳之

下位香代子

下坂 誠

下村吉治

ジュネジャ

レカ ラジュ

鈴木隆元

鈴木文昭

千 菊夫

高橋正和

田中晶善

玉置真司

田村廣人

築地輝夫

徳山真治

戸塚篤史

長岡 利

中野秀雄

中山 勉

中山俊裕

南条文雄

西川俊夫

西村篤寿

芳賀聖一

服部静夫

早川亨志

原 脩

原 正和

久松 眞

日野資弘

廣田 満

深田 理

藤田智之

二又克之

星野一宏

朴 龍洙

堀尾文彦

本多裕之

前島正義

真壁秀文

間瀬民生

松田 幹

三澤博之

水野 猛

村澤久司

森上 敦

森田達也

森山龍一

山内 亮

山田康弘

吉村 徹

米田祐康

渡邊重夫

渡辺達夫

金沢工業大学ゲノム生物工学研究所

名糖産業(株) 食品開発部

静岡県立大学環境科学研究所

信州大学農学部

名古屋大学大学院生命農学

(英文誌編集委員)

太陽化学(株) 研究所

石川県立大学

岐阜大学応用生物科学部

信州大学農学部

福井県立大学

三重大学理事・副学長

敷島スターチ(株) 技術開発室

名城大学農学部

キリンビール(株) 名古屋工場

静岡大学農学部

日本食品化工(株) 研究所

岐阜大学応用生物科学部

名古屋大学大学院生命農学

静岡県立大学食品栄養科学部

(株)岐阜セラック製造所技術部

三井農林(株) 食品総合研究所

名古屋大学大学院生命農学

イチビキ(株) 技術開発部

名城大学農学部

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所

岐阜大学応用生物科学部 (代議員)

名城大学薬学部

静岡大学農学部

三重大大学院生物資源

アステラス製薬(株) 生物工学研究所

信州大学農学部

ヤマモリ(株)

信州大学農学部

科研製薬(株) 生産技術研究所

富山大学大学院理工学研究部

静岡大学農学部

名古屋大学大学院生命農学

(代議員, 英文誌編集委員)

名古屋大学大学院工学

名古屋大学大学院生命農学

信州大学農学部

相山女学園大学生生活科学部

名古屋大学大学院生命農学

アサヒビール(株) 名古屋工場

名古屋大学大学院生命農学

旭松食品(株)

名城大学農学部 (代議員)

静岡大学農学部

中部大学応用生物学部

岐阜大学応用生物科学部

カネハツ食品(株) 技術部

名古屋大学大学院生命農学

(広報委員)

(株)ニッポンジーン

物産フードサイエンス(株)

静岡県立大学食品栄養科学部

(英文誌編集委員)