



公益社団法人 日本農芸化学会
中部支部 第 173 回例会

講演要旨集

受賞講演

平成 27 年度農芸化学奨励賞

および

シンポジウム

小胞輸送研究：分子機構から高次機能・応用への展開

平成 27 年 6 月 20 日(土)
名古屋大学農学部 第 3 講義室

公益社団法人 日本農芸化学会

中部支部 第 173 回例会

平成 27 年 6 月 20 日 (土)
名古屋大学農学部 第 3 講義室

13:00 開会挨拶

受賞講演 平成 27 年度農芸化学奨励賞

13:10 「立体構造に基づく糖質関連酵素の反応機構の解明と
ポストゲノミクスへの新展開」

伊藤 貴文 (福井県立大学生物資源学部)

13:40 「食品成分と内因性分子による生活習慣病の促進メカニズムと
予防に関する生物化学分析」

三好 規之 (静岡県立大学食品栄養科学部)

シンポジウム

「小胞輸送研究：分子機構から高次機能・応用への展開」

14:10 「ゴルジ局在型クラスリンアダプター分子の生理機能を探る
～モデル生物を使ったアプローチ～」

亀高 諭 (名古屋大学医学部保健学科)

(14:55～15:10 休憩)

15:10 「細胞内型ホスホリパーゼ A₁ ファミリーの細胞機能と
ノックアウトマウスによる痙攣性対麻痺症状の再現」

谷 佳津子 (東京薬科大学生命科学部)

15:55 「植物ゴルジ装置の構造・機能とその変換：
多糖・糖タンパク質の生合成・修飾系とそれらの制御を中心に」

松岡 健 (九州大学大学院農学研究院)

17:00 懇親会

立体構造に基づく糖質関連酵素の反応機構の解明とポストゲノミクスへの新展開

伊藤 貴文（福井県立大学・生物資源学部）

はじめに

糖質は、微生物から植物、動物に至るまで多様かつ豊富に存在し、エネルギー貯蔵や細胞形態維持に重要な機能を果たしている。他方、生物は、多糖を利用するために、あるいは、宿主へ感染・腐生・共生するために、多様な酵素と洗練された戦略を持って多糖を分解している。本研究では、新規酵素である細菌特異的不飽和糖質ヒドロラーゼ、糖質異性化酵素、細菌細胞表層発現型キチナーゼに特に着目し、構造生物学的手法を用いて、それらの基質認識や触媒反応に関わる分子機構の解明を行った。同時に、これまで機能が不明であったタンパク質の機能を立体構造に基づいて明らかにすることにより、ポスト構造ゲノミクスの重要性を示した。

1. 不飽和糖質ヒドロラーゼの構造・機能相関

重篤な感染症を引き起こす連鎖球菌は、多糖リアーゼを産生し、ヒアルロン酸やコンドロイチンといった動物細胞表層グリコサミノグリカン分解して宿主細胞に侵入する。その際、連鎖球菌は不飽和グルクロニルヒドロラーゼ (UGL) も協奏的に利用し、多糖リアーゼ反応産物である不飽和糖質を加水分解する。立体構造解析を中心とした解析の結果、UGL が新規な反応機構を示すことが明らかとなった。一般的な糖質加水分解酵素はグリコシド結合を水和し切断するが、UGL は非還元末端の不飽和糖に存在する二重結合を水和することで触媒反応を開始した。また、UGL の高次構造ホモログ YteR を枯草菌から見出し、機能不明であった YteR が、植物細胞壁ラムノガラクトuronanに由来する不飽和糖質に作用し、不飽和ガラクトuron酸を遊離する新規酵素であることを明らかにした。さらに、YteR のホモログ遺伝子は多数の植物病原性細菌にも含まれ、本酵素が植物の感染因子として働くことが示唆された。これらの知見によって、グリコシド結合の水和を介さない新規な糖質加水分解機構が提唱されただけでなく、ポスト構造ゲノム解析の有用性も示された。また、これらの酵素は細菌特異的であるため、その新規でかつ特異的な反応機構に基づいて、国内外で阻害剤研究が現在盛んに行われている。

2. 糖質異性化酵素の構造・機能相関

シアル酸の工業的生産に利用される腎臓由来 *N*-アシル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) は、*N*-アセチル-D-グルコサミンと *N*-アセチル-D-マンノサミンの 2-エピメリ化反応を触媒するが、血圧制御系レニン結合タンパク質としての機能も持つ。AGE の立体構造を決定した結果、基質結合部位の詳細な構造が明らかとなり、血圧制御学に重要な視座を与えることとなった。また、AGE 立体構造ホモログとしてサルモネラ菌由来タンパク質 YihS が見出され、機能解析の結果、YihS がグルコース、マンノース、およびフルクトースを基質とするイソメラーゼ/2-エピメラーゼであることが示された。そして、基質との複合体の立体構造に基づいて、 $(\alpha/\alpha)_6$ -バレル基本骨格による異性化反応機構が提示された。この反応機構は、工業用酵素キシロースイソメラーゼを代表とする既知の金属依存性異性化反応機構とは全く異なっていた。 $(\alpha/\alpha)_6$ -バレル異性化酵素は、金属依存性酵素の反応 pH の問題、つまり、アルカリ性の条件下でしか異性化反応を工業的に利用できなかった問題の解決に期待が持たれる。

3. 細胞表層発現型キチナーゼの構造・機能相関

多糖キチンは、セルロースに次いで地球上に多く存在するバイオマスであり、その多彩な機能を利用する研究は盛んに行われてきた。しかし、重合した構造は非常に安定であり、分解は容易ではない。真菌細胞壁のみならずカニ殻に含まれるキチンをも強力に分解する細菌 *Paenibacillus* sp. FPU-7 (*P.* FPU-7) を土壌より見出した。そして、*P.* FPU-7 が、細胞外キチナーゼの他に分子量 15 万の新規なマルチドメイン型キチナーゼ ChiW を細胞表層に提示し、巧妙かつ強力な細胞表層多糖分解機構を有していることを明らかにした。一方、キチンのオリゴ糖には、高等動植物の生体防御機構を活性化するなどの機能が認められ、農業資材としての需要が急速に拡大しているが、その生産効率の低さと高い環境負荷が問題となっている。そのような背景の下、ChiW にオリゴ糖鎖を合成する強い糖転移活性を見出した。現在、タンパク質工学的手法を利用して、酵素機能の最適化を行い、機能性オリゴ糖合成法の確立に資する多くの知見を蓄積している。

おわりに

これら研究対象の酵素は、糖質の加水分解や異性化といった極めて一般的な化学反応を触媒するが、それらの反応機構を構造生物学に基づいて解析した結果、既知の反応とは全く異なる新規な反応機構を示すことが明らかとなった。これらの研究成果は、糖質関連酵素の分子設計の可能性を上げ、農薬や医薬の分子設計、産業分野における新規バイオプロセスの開発や代用酵素の利用、ならびに機能性オリゴ糖生産への画期的な展開をも可能とする。

謝 辞

本研究は、京都大学農学研究科食品生物科学専攻生物機能変換学分野および福井県立大学生物資源学部にて行われました。公私にわたり終始ご指導、ご鞭撻をいただいた京都大学名誉教授の村田幸作先生に深く感謝申し上げます。福井県立大学生物資源学部教授日比隆雄先生には、引き続き研究の機会を与えていただいたのみならず、多くのご助言と温かい励ましをいただきました。心より感謝申し上げます。本研究は、これまで所属してきました研究室に在籍された多くの方々や共同研究者の先生方のご指導の賜物であります。この場を借りて、深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日比隆雄先生に重ねてお礼申し上げます。

略 歴

伊藤 貴文

平成 11 年 3 月	京都大学農学部生物機能科学科 卒業
平成 13 年 3 月	京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 修了
平成 13 年 4 月	住友化学工業株式会社 入社
平成 15 年 2 月	京都大学大学院農学研究科 研究員 採用
平成 18 年 11 月	博士 (農学) 取得
平成 22 年 4 月	福井県立大学生物資源学部 助教 採用
平成 23 年 4 月	同 講師
平成 26 年 4 月	同 准教授

食品成分と内因性分子による生活習慣病の促進メカニズムと予防に関する生物化学分析

三好 規之（静岡県立大学・食品栄養科学部）

はじめに

豊かな食生活は、運動・睡眠と等しく健康維持に重要な生活習慣病予防戦略であり、生体制御異常を正常化する様々な食品栄養成分の作用メカニズム解析は、人類の健康増進・QOLの向上・健康長寿へと繋がる研究分野の重要な一翼を担っている。一方で、生体の恒常性維持機構の破綻は、生活習慣病をはじめとする様々な疾患の要因となるため、生物個体、組織、細胞の生理病理的変化を解析することは、疾患の予防と促進メカニズムを理解する上で非常に重要である。我々は、恒常性維持機構に関連する病態に依存した内因性分子の変化と食品成分による予防メカニズムに関する研究を展開してきた。

1. がん予防食品因子イソチオシアネート類の生理活性発現機構解析

イソチオシアネート(isothiocyanate; ITC)類は、キャベツやブロッコリーなどアブラナ科植物などに豊富に含まれている含硫化合物である。ITC類のがん予防に関する疫学研究および動物実験を精査すると、遺伝子多型や人種差、性差、生活習慣によって効果にバラつきはあるものの、ITC類あるいはITC類含有食品の摂取により特に肺・胃・大腸などでの発がんリスクを低減させるということに対して一定のコンセンサスは得られているようである。我々はこれまでに、最も強い生物活性を示すITCの一つであるbenzyl ITC(BITC)を用い、がん予防における細胞増殖抑制の役割およびその詳細な誘導分子機構について解析を行ってきた。その結果、BITCは細胞周期に依存した細胞死誘導活性を示すこと、特にG₂/M期にある細胞がBITCの細胞死シグナルに対して感受性が高いこと、また、休止期(G₀期)にある大腸組織由来線維芽細胞CCD-18Co細胞はBITCの細胞毒性に対して抵抗性を示すこと、さらにBITCの細胞毒性に対してp53が負のレギュレーターとして作用していることを明らかにし、BITCの増殖性がん細胞に対する選択的細胞毒性発現メカニズムを提唱してきた。ITC類によるがんの化学予防メカニズムについては、がん細胞増殖抑制以外にも、第I相および第II相解毒酵素の活性・発現制御、抗炎症活性、ヒストン脱アセチル化酵素阻害など多彩な生理活性の関与が示唆されており、我々は最近、ITC類が誘導するこれらのダイナミックな細胞内情報伝達経路の引き金を制御する標的タンパク質を詳細に解析する目的で、ITC類付加タンパク質の新規分析法を確立した。本分析法では、BITC(Mm=149.02992)とphenethyl ITC(PEITC, Mm=163.04557)が同様の標的分子・メカニズムで生理活性を発現させていることと、BITCとPEITCの相対質量が側鎖のメチレン基1分子に相当する14.01565異なることを利用し、ITC類結合タンパク質と結合部位を同定する。そのため、従来のプロテオミクス解析法で採用されてきたITC類のプローブ化や抗ITC抗体の調製、さらに電気泳動も必要としないことから、ITC付加物を安定に検出・同定することが可能である。本分析法を、ITC類を曝露した培養細胞の分析に応用し、ITC付加タンパク質を同定することに成功し、さらに遊離アミノ酸(Cys, Lys)やトリペプチド(グルタチオン)などへの低分子化合物へのITC付加物も同時に検出・同定することが可能であることが確認された。現在、本分析法を応用し、ITC類が示す多彩な生理活性の引き金となる鍵分子の同定について引き続き検討を行っている。

2. オゾン酸化コレステロール secosterol 類の新規同定・生成機構・細胞毒性

動脈硬化症や神経変性疾患の病変部位で高濃度に検出されている3β-hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al(secosterol-A)と、secosterol-Aがアルドール反応で転換した3β-hydroxy-5β-hydroxy-B-norcholestane-6β-carboxaldehyde(secosterol-B)は分子内にアルデヒド基を有する酸化コレステロールであり、酸化ストレスが重要な役割を果たしている慢性炎症を伴う生活習慣病において重要

な役割を果たしていることが示唆されている。我々は、secosterol を分子カチオンである 2-hydrazino-1-methylpyridine により誘導体化し、同位体標識 secosterol を用いた内部標準法により、生体試料中の secosterol を atto mole レベルで定量する LC-MS を用いた secosterol の高感度分析法を確立した。本分析法を応用し、エステル型コレステロールの酸化物であるエステル型 secosterol を健常人 LDL 画分より新規に検出・同定することにも成功している。さらに、secosterol およびエステル型 secosterol、また secosterol のアルデヒド基が酸化された secosterol 代謝物などは、いずれも非常に強力な細胞毒性を示すことを見出している。さらに secosterol は、血管内皮型、および神経型一酸化窒素合成酵素を強く阻害したことから、一酸化窒素産生阻害を介した炎症関連疾患病態の発症および進展に関与していることが示唆された。現在までに生体内における secosterol 生成メカニズムについては完全に解明されていないが、我々は、試験管内反応および培養細胞、炎症モデル動物を用いた解析より、一重項酸素およびオゾン様活性酸素種が関与する生体内酸化ストレスレベルに依存した複数の経路を提唱している。これらの結果より、secosterol および新規に検出同定したエステル型 secosterol を含む構造類似体は生体傷害性など病態を促進させる活性を示すことが強く示唆された。今後、secosterol 類が、酸化ストレスに関連する慢性炎症疾患の病態診断・予防戦略、新薬開発やリスク評価の指標としての応用が期待される。

おわりに

本研究では、生活習慣病予防戦略および診断法確立に向けた食品成分の機能性解析と病態に依存して生成する内因性分子の修飾物に関する分析を行った。特に、ITC 類の生物活性に関する解析では、細胞応答を詳細に分析することで、ITC 類による増殖性細胞への選択的な細胞死誘導活性を見だし、ITC 類の新しいがん予防メカニズムの可能性を提唱することができた。また、ITC 付加体や secosterol 類の分析法を新規に開発・改良することで、各分子の生成機構、生理活性発現メカニズムに新規知見を与え、生物活性を有する構造類似体を生体試料中から新規に同定することにも成功した。それゆえ今後は、生活習慣病診断に応用可能な内因性分子の分析と食品栄養成分の持つ生体調節作用に関する更なる検討を進め、人類の健康増進に資する研究・活動に取り組んでいきたい。

本研究は、静岡県立大学食品栄養科学部生化学研究室と名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学研究室で行われた。本研究の機会を与えて頂き、学生時代から今日まで終始ご指導ご鞭撻を賜りました大澤俊彦先生(名古屋大学名誉教授・現愛知学院大学教授)、内田浩二先生(名古屋大学教授)、中村宜督先生(名古屋大学・現岡山大学教授)、大島寛史先生(静岡県立大学教授)に深く感謝いたします。本研究は実に多くの先生方や学生・卒業生に支えられており、共同研究者の皆様の御協力により研究が進展しました。ここに深く感謝いたします。最後になりましたが、本賞にご推薦頂きました日本農芸化学会中部支部長の小鹿一先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

略歴

三好規之(みよしのりゆき)

平成 16 年 3 月	名古屋大学大学院生命農学研究科博士後期課程修了 博士(農学)
平成 16 年 5 月	米国 NIH Visiting Fellow
平成 17 年 9 月	東京大学医科学研究所 リサーチフェロー
平成 18 年 6 月	静岡県立大学 COE ポスドク
平成 19 年 9 月	静岡県立大学食品栄養科学部 助教 現在に至る

ゴルジ局在型クラスリンアダプター分子の生理機能を探る

～モデル生物を使ったアプローチ～

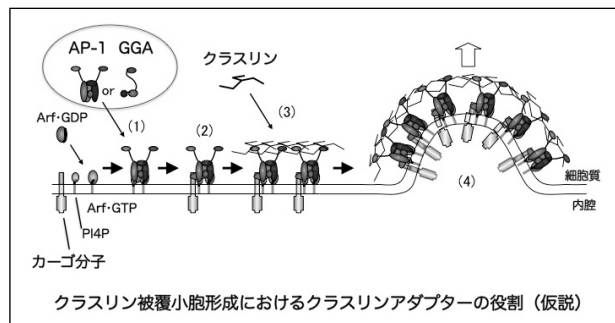
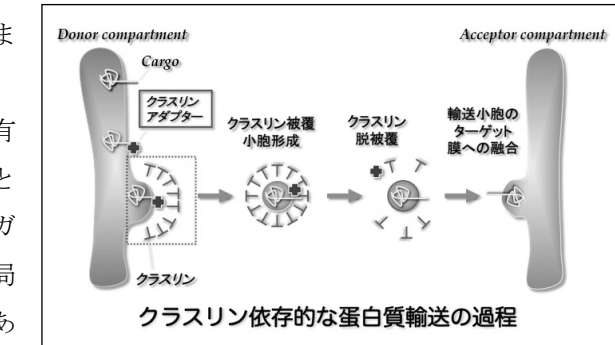
亀高 諭（名古屋大学・医学部保健学科）

はじめに

私達の体を構成している細胞は、脂質膜で囲まれた多数の細胞内小器官（オルガネラ）をもつ。個々のオルガネラはそれぞれ固有の生理機能を有し、それら生理機能がお互いに協調して働くことで、生命が維持されている。そして、このオルガネラ固有の機能は、そこで働く分子群が正確に局在することに支えられている。オルガネラ内腔あるいは膜上に存在する蛋白質が別のオルガネラに

移動する際には、輸送小胞と呼ばれる脂質膜の袋に詰め込まれ目的のオルガネラへ向かって輸送された後、膜脂質が融合することにより輸送が完了する（上図）。輸送小胞の形成には、コート（被覆）蛋白質と呼ばれる蛋白質が物理的な枠組みを作ることが重要で、ゴルジ体以後のオルガネラ間の輸送小胞形成においては主にクラスリンと呼ばれる被覆蛋白質が利用されている。

AP-1 複合体（Adaptor Protein Complex-1）はヘテロ 4 量体からなる蛋白質複合体で、トランスゴルジ網やエンドソームからの輸送小胞形成の際に、クラスリンを細胞質から小胞形成の場にリクルートする働きがあることからクラスリンアダプターと呼ばれている（右図）(1)。



モデル生物を使ったクラスリンアダプターの生理機能解析

これまで哺乳動物には AP-1 複合体と同等の働きをすると考えられる類縁分子として GGA（Golgi-localized, γ -adaptin ear domain containing protein）が見出されている。哺乳動物は GGA1~3 の 3 種類の GGA を持ち、AP-1 複合体のサブユニットについても複数の遺伝子のアイソフォームが見出されており、これら多数のアダプター分子が近傍でオーバーラップした機能を有していることから、RNAi 法などを用いた単分子発現抑制による生理機能解析がなかなか進まなかった。そこで、よりシンプルな遺伝子構成をもち、AP-1 複合体の各サブユニットがそれぞれ 1 遺伝子によりコードされ、GGA も 1 種類のみ存在するショウジョウバエをモデル生物として用い、これらクラスリンアダプター分子群の生理機能解析にトライした。

先行研究により、AP-1、GGA のクラスリンアダプターとしての分子機能がショウジョウバエからヒトまで良く保存されていることが示されていたこと(2)、ショウジョウバエは既に全ゲノムの遺伝子構造が明らかとなっており、個体レベルで遺伝子を網羅的にノックダウンするための RNAi ライブラリーも充実していること等から、個体を用いた遺伝子欠損による表現型解析や、遺伝学的な手法を用いた新規関連遺伝子の探索が可能であると考えられた。

ショウジョウバエを用いた AP-1 複合体の機能解析

AP-1 複合体の各サブユニットを様々な組織でノックダウンしたところ、眼特異的にノックダウンを行った際に、個眼の表面が形態異常を示す **rough eye** の表現型が見られた。更に個眼内部の光受容神経細胞のパターン（ラブドメア構造）に異常が見出された。この異常が光受容神経細胞の発生のどの時期に起こるのかを調べるために、これらの神経細胞が最初に運命付けられる 3 齢幼虫の **eye-disc** を単離し、形態学的、生化学的な解析を行った。その結果 AP-1 の欠失により、神経細胞の分化をコントロールする細胞膜表面受容体 **Notch** が細胞膜ではなくライソゾームへと誤輸送され、分解されていることが明らかとなった。**Notch** が分解することにより神経細胞のパターン形成に必要な側方抑制の機構が影響を受け、無秩序な神経分化が起こったと考えられる(3)。

AP-1 欠損の表現型を抑圧する遺伝子の探索

上記のように AP-1 複合体の欠損が **Notch** の細胞内発現量の低下を招くことが分かった。次に、AP-1 が **Notch** の細胞内輸送にどのように関わるかを明らかにする目的で、AP-1 ノックダウンの表現型を抑圧する遺伝子を探索したところ、AP-1 ノックダウンに加えてエンドサイトーシスに関わる **Dynamin** のノックダウンを行うこと（ダブルノックダウン）により AP-1 単独欠損による表現型が抑圧されることが分かった。また、AP-1 欠損細胞において、細胞膜表面で **Notch** を安定化すると考えられている分泌蛋白質 **Scabrous** が細胞内に蓄積することが示された。これらの結果より AP-1 を欠いた細胞中でも **Notch** の細胞表面への輸送は行われているが、**Notch** の細胞膜での安定性の低下から、エンドサイトーシスを介したライソゾームでの分解が更新している可能性が考えられる。

おわりに 本研究により示された AP-1-**Notch** の関係は、ショウジョウバエのみならず哺乳動物の器官形成におけるパターン形成においても重要であることが示されている。現時点で **Notch** が AP-1 に直接的に認識されているという証拠は得られていないが、アダプター分子の基本的な分子機能だけでなくその時空間的な調節機構が種を越えて保存されていることは興味深く、今後そのメカニズムを明らかにしていきたいと思っている。

- (1) Kametaka and Bonifacino 蛋白質核酸酵素 (2008) Vol.53, No.16: 2046-2052
- (2) Kametaka et al., J. Cell Sci. (2010) 123:460-471
- (3) Kametaka et al., J. Cell Sci. (2012) 125:634-648

略歴

亀高 諭（かめたか さとし）

平成 5 年 3 月 東京大学教養学部基礎科学科卒業

平成 7 年 3 月 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士前期課程修了

平成 7 年 4 月 日本学術振興会特別研究員(DC1)採用

平成 10 年 3 月 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士課程後期課程修了 博士（学術）

平成 11 年 4 月～17 年 3 月 大阪大学大学院医学系研究科解剖学講座 A1 助手

平成 15 年 4 月～19 年 3 月 米国国立衛生研究所（NICHD/NIH）ポスドク

平成 19 年 4 月～26 年 3 月 福島県立医科大学医学部解剖・組織学講座 講師

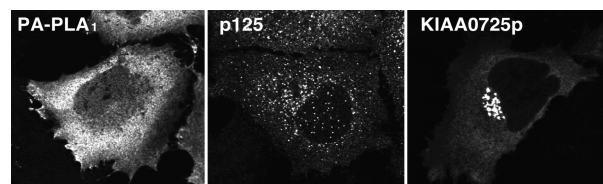
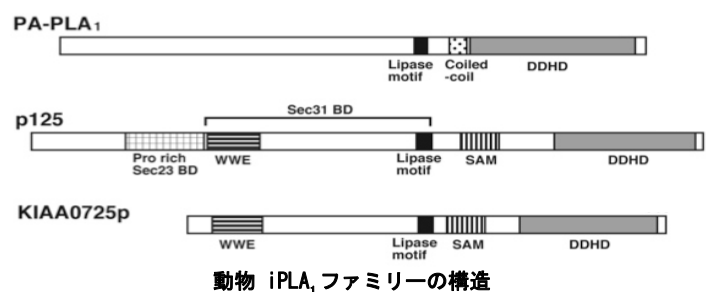
平成 26 年 4 月～ 名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻 教授

細胞内型ホスホリパーゼ A₁ ファミリーの細胞機能とノックアウトマウスによる痙性対麻痺症状の再現

谷 佳津子（東京薬科大学・生命科学部）

真核細胞の内部には様々なオルガネラが存在し、細胞機能の発現にはオルガネラ形成やオルガネラ間での物質輸送が必須である。オルガネラ形成に関わるタンパク質に関して様々な知見が蓄積している一方、膜の主成分である脂質の関与に関しては未だ不明な点が多い。ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) はリン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、2-アシルリゾリン脂質と脂肪酸を産生する酵素である。動物は 3 種の細胞内型ホスホリパーゼ A₁ (intracellular PLA₁: iPLA₁) (PA-PLA₁/DDHD1、p125/Sec23IP、KIAA0725p/DDHD2) を持つ。我々は動物 iPLA₁ が様々なオルガネラ膜に作用して、オルガネラの形態や物質輸送に寄与することを示してきた。さらに最近、ノックアウト (KO) マウスの作製により、生理機能の解析を進めている。

PA-PLA₁ は最初に発見された iPLA₁ であり、米国 Glomset らによって、ホスファチジン酸 (PA) に対する PLA₁ 活性を指標に精製・同定された。我々は小胞体からの分泌輸送を研究する過程で、輸送小胞である COPII 小胞のコート成分 Sec23 の結合タンパク質として p125 を、そしてそのホモログとして KIAA0725p を同定した。HeLa 細胞において PA-PLA₁ は専らサイトゾルに局在するが、p125 はサイトゾルに加えて、COPII 小胞が産生される小胞体サブドメイン ER exit sites にも局在する。KIAA0725p は p125 とよく似た構造を持つが、サイトゾルとゴルジ体に局在する (右図)。

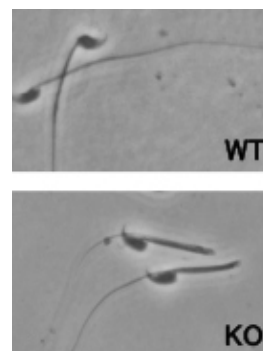


HeLa 細胞における iPLA₁ タンパク質の局在

ここ数年、PA-PLA₁ および KIAA0725p の変異がヒト遺伝性痙性対麻痺を引き起こすことが複数のグループから報告されている。遺伝性痙性対麻痺は下肢の進行性麻痺を主症状とする神経変性疾患であり、皮質脊髄路の異常が生じると考えられている。我々は、遺伝性痙性対麻痺を引き起こす KIAA0725p 点変異体の PLA₁ 活性を測定した。その結果、PLA₁ 活性の低下と臨床症状の程度との相関が観察され、酵素活性の欠損が痙性対麻痺発症の直接の原因である可能性を示した (Doi et al. (2014) Sci. Rep. 4, 7132)。我々が作製した PA-PLA₁ および KIAA0725p の KO マウスでは、一見したところ歩行障害は観察されなかった。そこで下肢運動機能をより詳細に解析した結果、KIAA0725pKO マウスでは生後 6 ヶ月になると下肢反射異常が発症し、加齢に伴い悪化することがわかった。また PA-PLA₁KO マウスでは下肢反射異常は見られなかったが、KIAA0725p と PA-PLA₁ のダブル KO マウスでは、生後 1 ヶ月から下肢反射異常と歩行障害を示し、生後 6 ヶ月では下肢が完全に麻痺することがわかった。組織切片解析において、KIAA0725p KO およびダブル KO マウスで脊髄運動神経の減

少が、またダブル KO マウスではさらに細胞体や細胞質領域にH Eで染色されない空胞が検出され、下肢運動異常を裏付けた。KIAA0725pKO マウスの海馬、大脳皮質、脊髄から初代培養細胞を樹立したところ、脊髄由来の神経細胞において神経突起伸長の著しい阻害が見られた。またヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、KIAA0725p を siRNA によって発現抑制したところ、神経突起伸長が阻害された。従って KIAA0725p はある種の神経細胞において神経突起伸長に重要であると考えられる。

in vivo で観察される神経異常のメカニズムを解明したいと考え、細胞レベルで解析を行った。HeLa 細胞で KIAA0725p を発現抑制するとゴルジ体の形態が崩れ、ゴルジ体から細胞膜への分泌輸送の部分的な阻害が観察された。また、PA-PLA₁ はミトコンドリア形成に関わることがわかった (Baba et al. (2014) J. Biol. Chem. 289, 11497)。ミトコンドリアは融合と分裂により、ダイナミックに形態を変化させるオルガネラである。HeLa 細胞で PA-PLA₁ を発現抑制するとミトコンドリアは伸長し、過剰発現すると断片化した。Mitochondrial PLD (MitoPLD) はミトコンドリア外膜のカルジオリピンから PA を産生することで、ミトコンドリアの融合を促進する。共発現実験の結果、PA-PLA₁ は MitoPLD が産生する PA を分解することがわかった。これらの結果は、PA-PLA₁ はミトコンドリア外膜上の PA 量を調節することにより、ミトコンドリアの形態を調節する可能性を示す。実際、*in vivo* において、ミトコンドリアの異常が PA-PLA₁ KO マウスの精子で観察された。精子は、頭部、ミトコンドリア鞘が存在する中片部、鞭毛を形成する尾部から成る。PA-PLA₁ KO マウス精子では、ミトコンドリア鞘の形成異常により、中片部と尾部の境目がヘアピン状に折れ曲がり運動能が著しく低下する (右図)。KIAA0725p KO マウスや p125 KO マウスではミトコンドリア鞘の異常は見られないことから、精子形成過程におけるミトコンドリア鞘形成には PA-PLA₁ が特異的に重要であると考えられる。KIAA0725p の発現抑制は HeLa 細胞ではミトコンドリア形態に影響を与えないが、マウス繊維芽細胞では影響が見られた。細胞種による PA-PLA₁ と KIAA0725p の役割の違いや、2 分子間で固有の機能と重複した機能がある可能性が考えられる。



PA-PLA₁ KO マウスの精子

以上の結果は、KIAA0725p と PA-PLA₁ が *in vivo* で神経機能に重要であること、また KIAA0725pKO マウスおよびダブル KO マウスが遺伝性痙性対麻痺のモデルマウスとして有用であることを示す。その原因として、細胞内輸送およびミトコンドリア外膜の脂質代謝の異常が考えられた。しかしながら、両機能が神経異常にどう関与するのかは現在のところ不明である。今後は、神経細胞における iPLA₁ の役割を解析し、オルガネラ形成と痙性対麻痺発症との関連を明らかにしていきたいと考えている。

略歴

谷佳津子 (たにかつこ)

金沢市生まれ。昭和 58 年金沢大学理学部化学科卒業。昭和 60 年名古屋大学大学院理学研究科修士課程修了。東京大学応用微生物研究所・技官、米国スローン・ケッタリングがん研究所・ポスドクトラルフェローを経て、平成 6 年東京薬科大学・生命科学部・講師。同助教授・准教授を経て、平成 20 年より同教授。博士 (農学)。

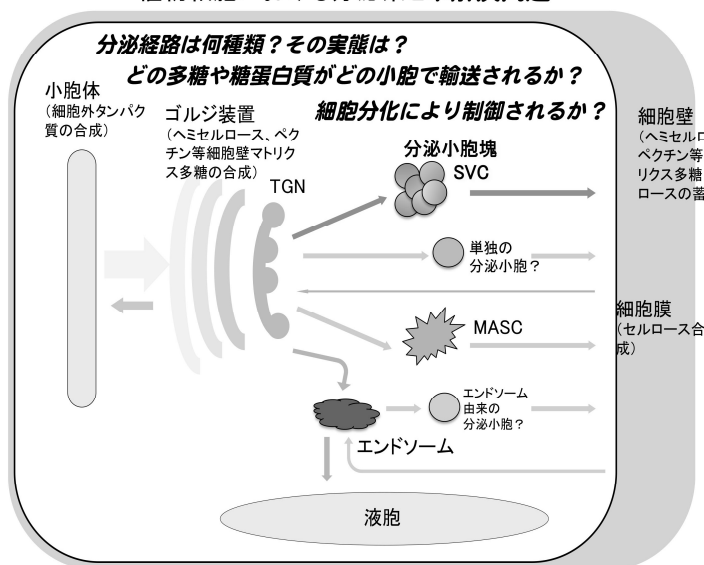
植物ゴルジ装置の構造・機能とその変換：
多糖・糖タンパク質の生合成・修飾系とそれらの制御を中心に
 松岡 健（九州大学・農学研究院）

真核生物の中で、高等植物のとした生存戦略は、葉緑体により自立的にエネルギーを獲得出来ることの強みを発揮するため、広い葉を広げて光を受けると共に、これらの葉を支える為に動くことを止め、地面に根を下ろして上部に伸長することを選んだ。その結果、100mを越える高さの樹木などの巨大化も可能となった。このような特徴は、植物の体制が、レンガ様に積み上げられた形の規定された細胞からなることによる。

植物細胞の形は、細胞外に構築された多糖とタンパク質、フェノール性ポリマーであるリグニンを主成分とする細胞壁の形とに規定され、その形の維持は細胞の中で水によりパンパンに膨らんだ液胞により行われる。細胞壁多糖のうち、セルロースは細胞膜で合成されるが、ヘミセルロースとペクチンはゴルジ装置で合成され、細胞外へと分泌される。また細胞壁タンパク質は小胞体で合成され、ゴルジ装置へと運ばれ、ここで液胞に向かうタンパク質と仕分けられ、細胞外または細胞膜に輸送される。この過程で、細胞壁蛋白質の多くは、プロリン(Pro)残基への4-ヒドロキシプロリン(Hyp)残基への変換、Hyp残基への糖鎖修飾、セリン(Ser)残基へのガラクトース付加、GPI-アンカーの付加などの各種の修飾を、液胞タンパク質にも見られるN-型糖鎖修飾と共に受けることが知られる¹⁾。また、液胞は水・有機酸やその他のイオンを貯蔵する場であるだけでなく、オートファジーによる分解の場合もあるため、多種の加水分解酵素が液胞内に存在している。従って、成長期にある細胞のゴルジ装置は多量の細胞壁多糖や細胞壁タンパク質を合成・加工する場として主に働き、一方成熟した細胞や細胞が栄養欠乏に曝された際には液胞へのタンパク質の分泌経路からの仕分けにかなりの機能を割くと想定される。

植物細胞における分泌系と未解決問題

この10年程度の間、植物のゴルジ装置における細胞壁多糖合成関連の研究が盛んになされ、細胞壁糖鎖合成酵素遺伝子の同定が進みつつある。また植物特異的なタンパク質への糖や糖鎖の修飾に関する酵素については、我々等が以前から解析を進めているPro残基のHyp残基への変換酵素(P4H)²⁾と共に、一昨年、松林氏（元 名古屋大学生命農学研究科生理活性物質化学研究室、現理学研究科細胞間シグナル研究グループ）らのグループからHyp残基へのアラビノース転移酵素の同定³⁾が、アメリカのグループからはHyp残基へのガラクトース転移酵素の同定⁴⁾が報告され、また我々は昨年Ser残基へのガラクトース転移酵素⁵⁾を報告するなど、基本的な酵素の同定が進みつつある。また我々を含む、アルゼンチンの



研究者を中心とした国際共同研究により、複数存在する P4H の機能について、細胞壁構造タンパク質であるエクステンシンの複数の Pro 残基の段階的な Hyp 残基への変換にヘテロダイマーを形成した酵素が関わっていること⁵⁾など、解析が進みつつある。しかしながら、植物細胞中に何種のゴルジ装置から細胞膜に至る経路が存在するか、ゴルジ装置の機能を始めとした植物細胞における小胞輸送系の機能が細胞の分化の際などにどのように制御されているかに等、植物の小胞輸送系関連では多くの未解明の問題が残されている（図）。

現在我々は、細胞の生長過程での遺伝子発現パターンが大きく変動するタバコ培養細胞 BY-2 株を主な研究材料として、細胞の生長過程と細胞を栄養飢餓に曝した際のゴルジ装置を、微細形態⁷⁾、蛍光マーカー蛋白質の変動等を解析することにより進めている。そこで本講演では、植物に特徴的なゴルジ装置の機能の理解とそれを発揮する装置の解析が現在どこ迄進んでいるか、またその構造等の変化の解析についてどのようなことが判り始めているかについて、最近報告された知見に我々の未発表データを交えながら紹介し、まだ多くの謎に包まれている植物のゴルジ装置関連の研究について、どのような方向を目指して研究を進めることが望まれるかについて議論したい。

- 1) 松岡 健 (2011) *生物工学会誌* **89**, 646-648
- 2) Yuasa, K., et al., (2005) *Plant J.* **41**, 81-94.
- 3) Ogawa-Ohnishi, M. et al., (2013) *Nature Chem. Biol.* **9**, 726-730
- 4) Basu D. et al., (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 10132-10143.
- 5) Saito F. et al., (2014) *J. Biol. Chem.* **289**, 20405-20420.
- 6) Velasquez SM. et al., (2015) *Mol. Plant* **8**, 734-746.
- 7) Toyooka K. et al., (2014) *Plant Cell Physiol.* **55**, 1544-1555.

略歴

松岡 健 (まつおかけん)

昭和61年3月 名古屋大学農学部農芸化学科卒業

平成2年4月～平成3年4月 日本学術振興会特別研究員(DC, PD)

平成3年3月 名古屋大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程後期課程修了, 農学博士

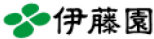
平成3年5月～平成12年9月 名古屋大学 農学部, 大学院生命農学研究科 助手

平成8年9月～平成10年9月 Visiting Associate Research Biochemist,
Dept. of Molecular Cell Biology, University of California, Berkeley.

平成12年10月～平成19年3月 理化学研究所 植物科学研究センター チームリーダー

平成18年10月～ 現在 九州大学 農学研究院 教授

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

	天野エンザイム(株) 岐阜研究所	http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/
	イチビキ(株) 研究開発部	http://www.ichibiki.co.jp/
	(株)伊藤園 生産本部	http://www.itoen.co.jp/
	加藤化学(株) 技術部	http://www.katokagaku.co.jp/
	(株)岐阜セラツク製造所 品質保証部	http://www.gifushellac.co.jp/
	(株)三和化学研究所 三重研究所	http://www.skk-net.com/
	敷島製パン(株) 研究部	http://www.pasconet.co.jp/
	(株)真誠	http://www.shinsei-ip.ne.jp/
	新日本化学工業(株) 研究部	
	太陽化学(株) ニュートリション事業部	http://www.taiyokagaku.com/
	辻製油(株)	http://www.tsuji-seiyu.co.jp/
	東海物産(株) 食品研究所	http://www.tokaibsn.co.jp/
	中日本氷糖(株)	http://www.nakahyo.co.jp/
	(株)ニッポンジーン	http://www.nippongene.com/
	フジ日本精糖(株) 研究開発室	http://www.fnsugar.co.jp/
	物産フードサイエンス(株) 研究開発センター	http://www.bfsci.co.jp/
	ポッカサッポロフード&ビバレッジ(株) 中央研究所	http://www.pokkasapporo-fb.jp/
	(株)Mizkan-Holdings 中央研究所	http://www.mizkan.co.jp/company/



ヤマモリ(株) 桑名工場

<http://www.yamamori.co.jp/>



養命酒製造(株) 中央研究所

<http://www.yomeishu.co.jp/>

協力企業（五十音順）

アサヒビール(株) 名古屋工場	金印(株) 研究開発部	(株)東洋発酵
旭松食品(株) 食品研究所	サンエイ糖化(株) 素材開発部	東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所
アステラス製薬(株) CSR 部	サンジルス醸造(株) 生産本部	名古屋製酪(株) 中央研究所
伊藤忠製糖(株) 品筆保証室	敷島スターチ(株) 技術開発室	日本食品化工(株) 研究所
伊那食品工業(株)	大和製罐(株) 総合研究所	三井農林(株) 食品総合研究所
科研製薬(株) 生産技術研究所	竹本油脂(株) 情報調査室	名糖産業(株) 食品開発部
カネハツ食品(株) 技術部	デザイナーフーズ(株)	盛田(株) 小鈴谷工場
キリンビール(株) 名古屋工場	東海漬物(株) 漬物機能研究所	

公益社団法人 日本農芸化学会中部支部
第 173 回例会 講演要旨集

発行者：堀尾 文彦（日本農芸化学会中部支部 支部長）
名古屋市千種区不老町 名古屋大学 東山キャンパス内
発行日：平成 27 年 6 月 20 日
