

公益社団法人日本農芸化学会東北支部

第 147 回大会

日時：平成 24 年 10 月 6 日（土）

会場：弘前大学農学生命科学部

世話人：宮入一夫

- 10:00～11:48 一般演題
[A 会場（403 講義室）、B 会場（402 講義室）、C 会場（302 講義室）]
- 12:00～12:50 支部参加会 (203 講義室)
- 12:50～13:10 支部活動報告会 B 会場（402 講義室）
- 13:10～13:20 支部奨励賞・若手奨励賞授賞式 B 会場（402 講義室）
- 13:20～13:35 支部奨励賞受賞記念講演 B 会場（402 講義室）
座長 桑原重文（支部長）
「微生物・植物の生体膜輸送体の基質輸送メカニズムの解明」
(東北大学大学院工学研究科) 七谷 圭
- 13:35～14:05 農芸化学奨励賞受賞記念講演 B 会場（402 講義室）
座長 桑原重文（支部長）
「食品と生体の生理活性成分の分析手法開拓と応用」
(東北大学大学院農学研究科) 仲川清隆
- 14:20～15:10 特別講演 B 会場（402 講義室）
座長 吉田孝（弘前大・農学生命）
「エンド型グリコシダーゼの糖転移活性を利用したネオプロテオグリカンの合成とその応用」
(弘前大学大学院医学研究科 糖鎖医化学講座) 遠藤正彦
- 15:30～17:42 一般演題
[A 会場（403 講義室）、B 会場（402 講義室）、C 会場（302 講義室）]
- 18:00～19:30 懇親会（生協食堂 2 階スクーラム）

交通案内

弘前駅⇒会場（弘前大学農学生命科学部）

【徒歩】

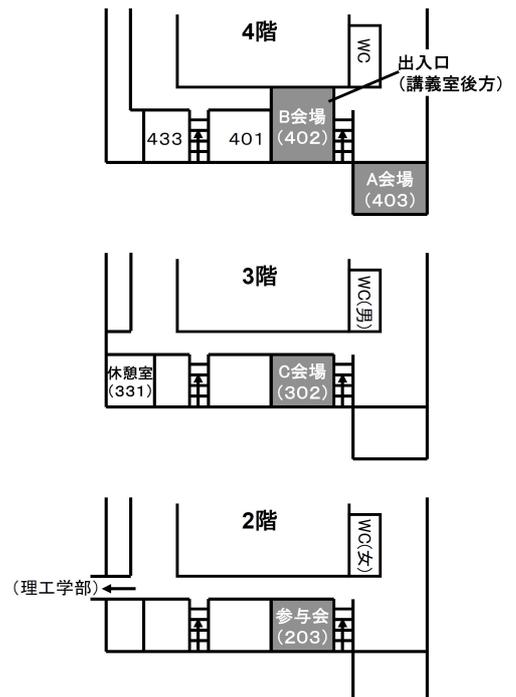
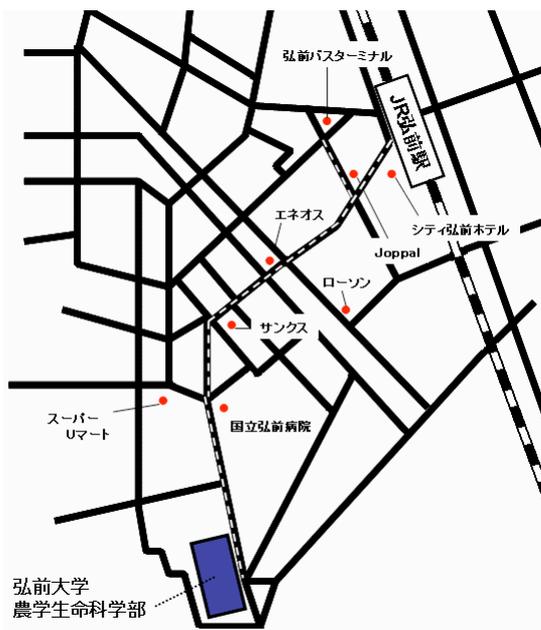
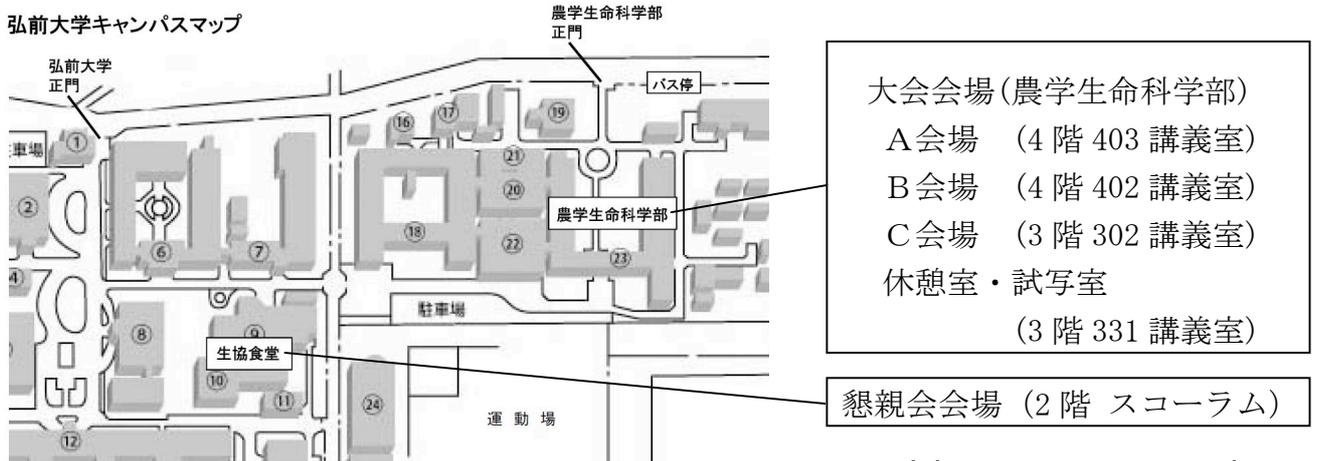
弘前駅中央口から徒歩 18 分

【バス】

弘前駅中央口を出て 3 番乗り場から乗車、農学生命科学部前下車
小栗山・狼森線 5、学園町線 68、自衛隊線（富田大通り経由）61
（所要 10 分強、180 円）

【タクシー】

弘前駅中央口タクシー乗り場（中央口出て右側すぐ）



平成 24 年度各賞受賞者

2012 年度農芸化学奨励賞

仲川 清隆 （東北大学大学院農学研究科）
「食品と生体の生理活性成分の分析手法開拓と応用」

2012 年度日本農芸化学会東北支部奨励賞

七谷 圭 （東北大学大学院工学研究科）
「微生物・植物の生体膜輸送体の基質輸送メカニズムの解明」

2012 年度日本農芸化学会東北支部若手奨励賞

田中 瑞己 （東北大学大学院農学研究科）
「麴菌における異種遺伝子由来の転写産物分解機構の解明」

永沢 友裕 （東北大学大学院農学研究科）
「特異な環状構造を有する生物活性天然物の全合成研究」

本間 太郎 （東北大学大学院農学研究科）
「健康寿命を延長する食生活の探索に関する研究」

一般講演

タイムテーブル

A会場

座長 清田洋正 (東北大)

- A01 10:12-10:24 norleptosphol C の全合成研究
○村井嘉晃、八木橋優希、橋本勝 (弘前大・農生)
- A02 10:24-10:36 シクロプロパンを組み込んだセルラーゼ反応遷移状態アナログの合成研究
○大場雄貴、久守未央奈、秋山奈菜子、橋本勝、(弘前大・農生)
- A03 10:36-10:48 抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチド類の全合成研究 ; アミノジオール誘導体の合成
○米田翔, 菊池真理, 武田祥, 今野博行 (山形大・院理工・バイオ化学)
- A04 10:48-11:00 チオアセタールを経由したペプチドアルデヒド合成法の開発
○瀬間義大¹、石井学¹、赤路健一²、今野博行¹
(¹山形大院理工・バイオ化学、²京都薬大)

座長 塩野義人 (山形大)

- A05 11:00-11:12 Plipastatin/Fengycin 構造混乱の終結(3) D-Tyr4-L-Tyr10 異性体の合成
○六車美沙、本間美保、橋本勝 (弘前大・農生)
- A06 11:12-11:24 Acortatarin A の全合成研究
○寺西貴昭、陰山真将、桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)
- A07 11:24-11:36 フッ素化シアル酸誘導体の合成とシアリダーゼ阻害活性
○田中皓祐¹、ノングラック・スリウィライジャロエン^{2,3}、佐藤宏樹¹、桑原重文¹、大類洋⁴、須原義智⁵、鈴木康夫²、清田洋正¹
(¹東北大院農・生物産業創成、²中部大・生命健康科学、³Tammasat Univ. (タイ)、⁴横浜薬科大、⁵芝浦工大)
- A08 11:36-11:48 カバノキより単離された転位型カリオフィレン誘導体の全合成研究
○ 廣川高史、桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)

— 昼食・支部参与会、活動報告会、授賞式・記念講演、特別講演 —

座長 田母神繁 (秋田県立大)

- A09 15:30-15:42 *Trichoderma* sp. の生産するテルペン類とステロイド様物質の構造決定
○安村良子、殿内暁夫、橋本勝 (弘前大・農生)

A10 15:42-15:54 新規4環式フシコカン Rouscellols A、Bの構造
○橋本勝^a、竹川大登^a、田中和明^a、福士江里^b、根平達夫^c、
(^a弘前大・農生、^b北大農、^c広島大・総合科学)

A11 15:54-16:06 糸状菌 *Chaetomium* sp. の生産する抗菌物質の構造
○竹川大登^a、橋本勝^a、殿内暁生^a、根平達夫^b
(^a弘前大・農生、^b広島大・総合科学)

A12 16:06-16:18 *Lambertella* 属によるマイコパラサイト現象の解明
○廣瀬あかね、工藤慎士、村上貴宣、橋本勝 (弘前大・農生)

座長 此木敬一 (東北大)

A13 16:18-16:30 昆虫食害が誘導するアレチマツヨイグサ揮発成分の天敵誘引活性と生合成
○野下浩二、阿部誠、田母神繁 (秋田県大・生資科)

A14 16:30-16:42 植物シグナル物質メチルジャスモン酸の移行・代謝・防御反応の誘導
○田母神繁、野下浩二、阿部誠 (秋田県立大・生物資源)

A15 16:42-16:54 マングローブ林より分離した糸状菌が生産する塩濃度依存性物質について
○渋谷史明、小関卓也、村山哲也、塩野義人 (山形大・農)

座長 橋本 勝 (弘前大)

A16 16:54-17:06 HILIC-ESI-Q-TOF-MS を用いたテトロドトキシン類縁体の微量分析法の検討
○工藤雄大、此木敬一、長由扶子、山下まり (東北大院・農)

A17 17:06-17:18 沖縄県阿嘉島産リングビアトキシン生産藍藻の 16S rDNA の部分塩基配列解析
○武田篤¹、長由扶子¹、佐久川さつき²、須田彰一郎³、此木敬一¹、山下まり¹ (¹東北大・院農、²沖縄県衛研、³琉球大・理)

A18 17:18-17:30 質量分析を用いたイチイ中のタキソール結合タンパク質の探索
○工藤佑馬、阿部晃大、長由扶子、山下まり、此木敬一 (東北大院農)

A19 17:30-17:42 食用キノコにおけるナラ枯れ病菌に対する生育阻害物質について
○芳賀真倫、小山浩正、小関卓也、村山哲也、塩野義人
(山形大学・農)

B会場

座長 岡野桂樹 (秋田県立大)

- B01 10:00-10:12 メラノーマ細胞のメラニン産生制御機構の解明
○三上真理¹、園木和典¹、伊藤美夏瀬¹、鈴木民夫²、片方陽太郎
(¹弘前大・農生 ²山形大・医)
- B02 10:12-10:24 ケラチノサイトの分化に伴うケラチン分子の時差的变化
○内海愛里、牛田千里、片方陽太郎 (弘前大・農生)
- B03 10:24-10:36 細胞性粘菌 *acetoacetyl-CoA thiolase* の細胞内局在性の新たな展開
○関場惇史、板垣祥子、大町鉄雄 (弘前大・農生)

座長 坂元君年 (弘前大)

- B04 10:36-10:48 アカフジツボキプリス幼生におけるリシルオキシダーゼの分布と機能の検討
○野尻元太¹、佐々木伸¹、高橋広明¹、尾崎紀昭¹、小黒・岡野美枝子²、野方靖行³、福沢世傑⁴、岡野桂樹¹
(¹秋田県立大、²ヤマザキ学園大、³電中研、⁴東大)
- B05 10:48-11:00 ミヤコグサ由来モチーフ B'-メチルトランスフェラーゼファミリー (B'-MTs) の機能解析
眞坂みなみ、藤田ゆり、吉澤結子、○水野幸一
(秋田県立大・生物資源)
- B06 11:00-11:12 ミカン科ミカン属由来モチーフ B'-メチルトランスフェラーゼファミリー (B'-MTs) の機能解析
○藤田ゆり、吉澤結子、水野幸一 (秋田県立大・生物資源)

座長 水野幸一 (秋田県立大)

- B07 11:12-11:24 シロイヌナズナ熱ショック転写因子 *HsfB1* 遺伝子の 5' 上流域に存在する保存配列は *HsfB1* タンパク質の翻訳を抑制する
朱旭君、○田中俊、スニール・クマル・タロール、トーマス・ベルベリッヒ¹、草野友延
(東北大・院生命、¹Biodiversity and Climate Research Center)
- B08 11:24-11:36 イネ由来の新規カドミウム耐性付与遺伝子の遺伝子産物は高システイン含量である
○井上雅貴、國廣俊太、齋藤達彦、松田大樹、倉俣正人、田口文緒¹、ショハブ・ユセフィアン²、トーマス・ベルベリッヒ³、草野友延
(東北大・院生命、¹農業生物資源研、²秋田県立大、³BiK-F)

座長 原口和朋（農研機構）

- B09 15:30-15:42 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼの基質特異性
○水野聖之、籠橋麻美、塩野義人、小関卓也（山形大農）
- B10 15:42-15:54 *Streptomyces* 属放線菌からのセルロース分解酵素遺伝子群の単離と解析
○友常久実子¹、土田美帆¹、春日和¹、小林正之¹、上松仁²、池田治生³、小嶋郁夫¹
(¹秋田県大、²秋田工業高等専門学校、³北里大・北里生命研)

座長 小関卓也（山形大）

- B11 15:54-16:06 *Arthrobacter* sp. L68-1 の DFAIII オリゴ糖合成酵素遺伝子のクローニングと塩基配列
原口和朋（農研機構・食品総合研究所）
- B12 16:06-16:18 ヒト甘味受容体タンパク質 hT1R2/hT1R3ATD の発現・精製
○佐藤沙知¹、大石佳奈²、大谷典正¹、井深 章子¹
(¹山形大学理・物質生命化、²山形大学大学院理工学研究科)
- B13 16:18-16:30 亜鉛要求型および基質特異性拡張型β-ラクタマーゼの結晶構造解析
○古山雄光¹、小栗拓馬²、石井良和³、奥野貴士²、大谷典正²、井深章子² (¹山形大学大学院理工学研究科、²山形大学理学部、³東邦大学医学部)

座長 吉田孝（弘前大）

- B14 16:30-16:42 麹菌の AmyR と MalR の細胞内局在と制御下遺伝子の発現解析
○鈴木空太、田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也
(東北大院農 生物産業創成)
- B15 16:42-16:54 麹菌のエノラーゼ遺伝子における選択的転写開始に関する配列の探索
○田路洋紀、高間充、新谷尚弘、五味勝也
(東北大院農・生物産業創成)
- B16 16:54-17:06 出芽酵母におけるリン酸代謝とオートファジーの関連性
○横田浩人、五味勝也、新谷尚弘（東北大・院農・生物産業創成科学）

座長 二井勇人（東北大）

- B17 17:06-17:18 大腸菌の L-アラニン排出輸送体 YgaW のトポロジー解析
○伊原航平、堀初弘、安藤太助、磯貝恵美子、米山裕
(東北大学院農学研究科・動物微生物学分野)
- B18 17:18-17:30 大腸菌細胞のリボソーム異常が引き起こす高浸透圧耐性
○樽澤武房¹、長谷要一²、武藤あきら^{1,2}、姫野依太^{1,2}
(¹弘前大・農生、²岩手大学大学院連合農学研究科)

C 会場

座長 殿内暁夫 (弘前大)

- C01 10:00-10:12 *Clostrisium beijerinckii* HU-1 株の水素生産能力評価と関連遺伝子解析
○佐藤圭、鈴木由麻、佐藤夕貴、園木和典 (弘前大院・農生)
- C02 10:12-10:24 ブタノール及び乳酸合成の抑制によるりんご搾り粕を原料としたバイオ水素生産の効率化
○鈴木由麻¹、佐藤圭¹、大山葉子²、園木和典^{1,2}
(¹弘前大院農生・応生工、²弘前大農生・分子生命)
- C03 10:24-10:36 担子菌ラッカーゼを発現したイネの細胞壁組成評価
○古川徹¹、古川佳世子²、濁川睦²、小口太一³、飯村洋介⁴、梶田真也⁵、伊藤幸博²、園木和典¹ (¹弘前大院農生、²東北大院農、³筑波大 GRC、⁴産総研つくばセ、⁵東農工大院 BASE)

座長 木村賢一 (岩手大)

- C04 10:36-10:48 キチタケ由来 IPP-isomerase の活性とゴム分子の鎖延長制御
○川田裕¹、井深章子²、大谷典正² (¹山形大院理工・²山形大理)
- C05 10:48-11:00 灰色カビ病菌を利用したケトン化合物の還元反応
○木立卓巳¹、長岐正彦³、井深章子²、大谷典正²
(山形大院・理工¹、山形大・理²、弘前大・理工³)
- C06 11:00-11:12 レニン及びアンギオテンシン変換酵素の新規阻害物質探索系の構築と応用
○高橋砂織¹、後藤猛²
(¹秋田県総合食品研究センター、²秋田大学・院・工学資源)

座長 大谷典正 (山形大)

- C07 11:12-11:24 オオウバユリ (*Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii*) 由来の酵母 Ca²⁺シグナル阻害物質の単離精製と構造、並びに生物活性
○阿部友美¹、越野広雪²、小川優子³、木村賢一^{1,3}
(¹岩手大院・農、²理研・基幹研、³岩手大・農)
- C08 11:24-11:36 PP2C 活性化物質 pisiferdiol の酵母 Ca²⁺シグナル伝達に対する作用機構の解析
○吉田潤¹、油井信弘²、小林幹³、水沼正樹⁴、大西素子⁵、木村賢一^{2,3} (¹岩手医大・共通教育セ、²岩手大院・連合農、³岩手大・農、⁴広島大院・先端物質、⁵中部大・応生)
- C09 11:36-11:48 軟骨魚類由来プロテオグリカンの新規抽出法の検討
○鈴木潤、北山昴、児島薫、吉田孝 (弘前大・農生)

— 昼食・支部参加会、活動報告会、授賞式・記念講演、特別講演 —

座長 前多隼人 (弘前大)

C10 15:30-15:42 LC-MS/MS による動脈硬化症者血中 PCOOH の精密定量分析
○加藤俊治¹、仲川清隆¹、浅井明²、及川眞一²、宮澤陽夫¹
(¹東北大院・農・機能分子解析学、²日本医科大・内分泌代謝)

C11 15:42-15:54 Anti-cancer effect of γ -T3 via proto-oncogene Hras-1 down regulation
○Gregor Burdeos, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa
(Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

C12 15:54-16:06 食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養
○小野瀬晋司¹、仲川清隆¹、池田亮一²、木村俊之³、山岸賢治³、宮澤陽夫¹ (¹東北大院農、²旭松食品、³東北農研セ)

座長 都築毅 (東北大)

C13 16:06-16:18 クロモジ精油の抗炎症作用
○山崎真央、片方陽太郎、前多隼人 (弘前大・農学生命)

C14 16:18-16:30 パプリカ色素成分の脂質代謝調節作用および肥満における抗炎症作用
○中村望、前多隼人(弘前大・農学生命)

C15 16:30-16:42 魚油とフコキサンチンの併用による食事性肥満マウスに対する抗肥満作用
○菅野翔伍、本間公博、前多隼人 (弘前大・農学生命)

座長 仲川清隆 (東北大)

C16 16:42-16:54 ラット肝臓における脂肪酸合成酵素遺伝子の転写後調節機構の解析
○我妻紀代恵、白川仁、駒井三千夫 (東北大・院農・栄養)

C17 16:54-17:06 時代とともに変化した日本食がマウスの内臓脂肪蓄積に与える影響
○北野泰奈¹、本間太郎¹、治部祐里²、川上祐生²、都築毅¹、池田郁男¹ (¹東北大・院・農、²岡山県大・保福・栄養)

C18 17:06-17:18 抗 HIV レクチン・アクチノヒビンのペグ化誘導体の調製と諸性質
大林尚美¹、張 暁雪²、佐藤 陽¹、金 容必^{1,2}、前島雅美³、岩谷靖雅³、杉浦 互³、○田中晴雄^{1,2}
(¹いわき明星大薬、²いわき明星大院理工、³(独) 国立病院機構 名古屋医療センター・臨床研究センター)

特別講演

(B会場、402講義室)

「エンド型グリコシダーゼの糖転移活性を利用した
ネオプロテオグリカンの合成とその応用」

遠藤 正彦

(弘前大学大学院医学研究科 糖鎖医化学講座 特任教授)

座長：吉田 孝 (弘前大・農学生命)

エンド型グリコシダーゼの糖転移活性を利用した ネオプロテオグリカンの合成とその応用

弘前大学大学院医学研究科 糖鎖医化学講座 特任教授 遠藤正彦

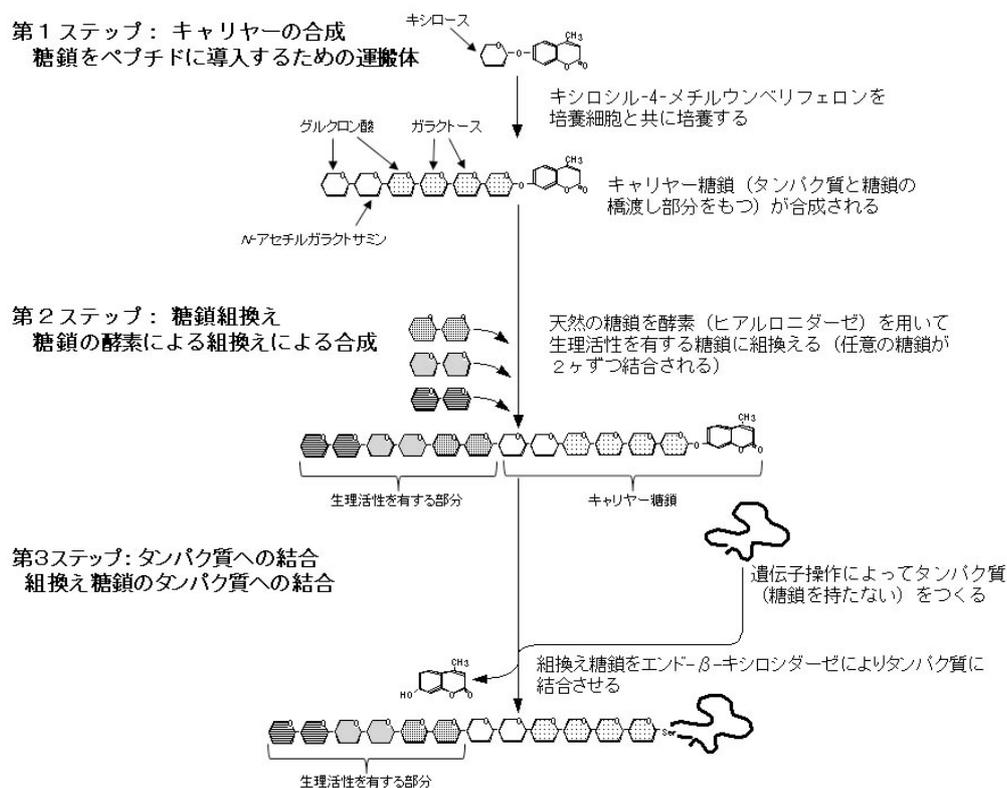
1. 研究の目的と背景

遺伝子工学は、様々な有用なリコンビナントタンパク質を生み出している。しかし、これらのタンパク質の中には、本来結合しているはずの糖鎖の欠落や不完全のため、そのタンパク質の生物活性発現に問題のあるケースが、インターフェロングammaやエリスロポエチンのように多数知られている。これは、遺伝子DNAに糖鎖合成に関する情報が含まれていないからである。

本研究は、あらかじめ生物活性をもった糖鎖を合成し、その糖鎖を糖鎖欠落または不完全のリコンビナントタンパク質に導入し、生物活性の回復もしくは新しい生物活性をもったタンパク質に変換するという新しい糖鎖工学の道を拓き、現在の遺伝子工学を補完しようとするものである。

2. 研究の対象、プロテオグリカンとは

プロテオグリカンは、動物細胞の表面もしくは細胞外マトリックスにあって、コラーゲン、ヒアルロン酸等とネットワークを形成し、細胞の生存母地、情報の伝達等の生物機能を担っている。この物質は数万~20万のコアタンパク質に、ウロン酸とN-アセチルヘキサミンの二糖を単位として、直鎖状に連なった分子量2~3万の糖鎖・グリコサミノグリカンが、1~80本結合した巨大複合糖質である。



3. 本研究の問題点とその克服：エンド型グリコシダーゼの逆反応としての糖転移反応の利用
グリコサミノグリカン糖鎖の化学合成は、高分子のため、また手間と時間と経費を要し、成功していない。糖転移酵素（グリコシルトランスフェラーゼ）を用いる *in vitro* の酵素合成は、基質特異性の高い多種類の酵素と、糖供与体（糖ヌクレオチド）の入手困難から成功していない。そこで我々は、糖鎖を加水分解するグリコシダーゼの、逆反応としての糖転移反応の条件を検討して、これを糖鎖合成に活用することとした。

4. エンド型グリコシダーゼを用いたグリコサミノグリカン糖鎖の再構築

- 1) ヒアルロニダーゼ（コンドロイチン硫酸とヒアルロン酸等の分解酵素）の加水分解反応よりも、糖転移反応を優位に進行させる反応条件を見出した（文献 1, 2）。
- 2) 糖転移反応は、基本的に供与体の非還元末端から、受容体の非還元末端に、ウロン酸-N-アセチルヘキソサミンの二糖単位で、転移されることを明らかにした。
- 3) このことを元に、天然型及び非天然型のグリコサミノグリカン糖鎖の合成に成功した。

5. エンド型酵素を用いた糖鎖のタンパクへの導入

- 1) プロテオグリカンのコアタンパクと糖鎖グリコサミノグリカンの橋渡し部位に作用する、三種のエンド型酵素を発見した（文献 3）。その中のエンド- β -キシロシダーゼを用いると、グリコサミノグリカン糖鎖をペプチド中のセリンに転移させることに成功した（文献 4, 5）。
- 2) 培養ヒト皮膚線維芽細胞の培地に、Xylosyl-4-methylumbelliferone を加えて培養すると、これを元に伸長する糖鎖が、糖鎖をタンパク質に導入するためのキャリアーとして有効であった（文献 6, 7）。

6. 再構築法の応用

- 1) 糖鎖再構築法を用いて、天然にある糖鎖及び今まで一度も発見されていない非天然型糖鎖、計 130 種を合成した（文献 8）。
- 2) プロテオグリカンの一種デコリン糖鎖を、再構築によって全く別の糖鎖に置換し、ネオプロテオグリカンを合成した（文献 9）。
- 3) ストレプトコッカス・ヒアルロニダーゼの基質特異性を明らかにするため、同酵素が作用すると予想されるすべての糖鎖構造を、糖鎖再構築により合成し、その特異性を明らかにした（文献 10）。
- 4) V 型コラーゲンに結合するコンドロイチン硫酸 E のドメイン糖鎖構造を、糖鎖再構築法により合成した（文献 11, 12）。
- 5) マラリア感染赤血球の胎盤への接着、流産等を起こすが、これを阻害する糖鎖の構造を糖鎖再構築により合成した（文献 13）。

【文献】

1. Takagaki, K. *et al.* *Biochemistry*, **33**, 6503–6507 (1994).
2. Saitoh, H. *et al.* *J. Biol. Chem.*, **270**, 3741–3747 (1995).
3. Takagaki, K. *et al.* *J. Biol. Chem.*, **265**, 854–860 (1990).
4. Takagaki, K. *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 220–224 (2002).
5. Ishido, K. *et al.* *J. Biol. Chem.*, **277**, 11889–11895 (2002).
6. Takagaki, K. *et al.* *J. Biochem.*, **109**, 514–519. (1991).

7. Nakamura, T. *et al.* *Biochem. J.*, **304**, 731–736 (1994).
8. Endo, M. and Takagaki, K. *Endoglycosidases, Biochemistry, Biotechnology, Application*, Kodansha and Springer, Tokyo and Heidelberg, 101–109, 181–197 (2006).
9. Iwafune, M. *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 1167–1170 (2002).
10. Takagaki, K. *et al.* *J. Biochem.*, **127**, 695–702 (2002).
11. Takagaki, K. *et al.* *J. Biol. Chem.*, **277**, 8882–8889 (2002).
12. Munakata, H. *et al.* *Glycobiology*, **9**, 1023–1027 (1999).
13. Achur, R. N., Kakizaki, I. *et al.* *Biochemistry*, **47**, 12635–12643 (2008).

農芸化学会奨励賞受賞記念講演
(B会場、402講義室)

「食品と生体の生理活性成分の分析手法開拓と応用」

仲川 清隆

(東北大学大学院農学研究科)

座長：桑原 重文 (支部長 東北大院・農)

食品と生体の生理活性成分の分析手法開拓と応用

東北大学大学院農学研究科 仲川清隆

はじめに

従来、分析が困難であった食品の機能性成分や疾病に深く関わる生体成分について、選択性の高い分析法、迅速なスクリーニング法、定量に必須な標準化合物の合成など一連の分析技術を構築し、“特徴的な生理活性成分を有する食品素材の生産性向上”および“疾病の発現や食品による予防の機構解明”に関する研究への応用を図ってきた。以下に、これらの研究成果の概略を記す。

①特徴的な生理活性を有する食品成分の

分析技術：スクリーニングから生産まで
イミノ糖 1-デオキシノジリマイシン

(1-deoxynojirimycin, DNJ) は、 α -グルコシダーゼを強く阻害する。生化学実験で阻害剤 (α -glucosidase inhibitor, α GI) として用いられるほど強力であり、HIV やゴースェ病、とくに糖尿病の予防・治療への活用が期待されている。しかし、DNJ を分析しようとする、ODS カラムを通過してしまうほど高極性で、さらに分子内に検出に有利な官能基がなく、こうした分析の困難さが本研究領域の展開の足かせとなっていた。そこで、DNJ の分離を親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) で達成し、蒸発型光散乱検出器 (ELSD) さらにはタンデム質量分析装置 (MS/MS) で検出を可能にして、定量性の高い分析法を構築した。本手法は DNJ の高度利用を実現できるとして、現在、国内外で広く活用されている。

次いで筆者らは、天然に DNJ が桑やカイコに特徴的に含まれていることに着目し、構築した分析法を駆使して、DNJ を高含有する桑品種を見出した。また、カイコへ DNJ を濃縮させる方法を提唱した。DNJ 高含有桑葉を用いて、抽出・加工条件を検討し、DNJ 量を担保した桑食品を作出した。この食品の摂取は、血糖値が高めの方の食後高血糖を良好に改善することができた。このように DNJ の確固たる α GI 作用を確認できたことから、吸収代謝の解明や安全性の検証を経て、DNJ は高血糖改善トクホや糖尿病予防食への展開が幾つかの企業により試みられている。

将来の大量安定供給に向けては、これを可能にする基盤知見として、枯草菌とその近縁種が DNJ を生産できることを確認し、DNJ 高生産菌を幾つか同定した。これらの高生産菌では炭素源の種類によって DNJ 前駆体 (2-アミノ-2-デオキシ-D-マンニトール) の生合成量が顕著に高まり、故にさらに多くの DNJ を生産させられる可能性を見出した。

他方、社会の高齢化により癌や糖尿病性網膜症をはじめとする血管新生病が増加し、大きな社会問題となっている。そこで筆者らは、食品や農水産物、天然資源から抗血管新生活性を有する成分を探索し、不飽和ビタミン E であるトコトリエノール (tocotrienol, T3) に強い活性を見出した。抗血管新生のメカニズムとして、T3 による血管内皮細胞の PI3K-Akt シグナル伝達経路の制御および癌細胞へのアポトーシス誘発を、細胞実験や腫瘍モデルラットなどを用いた動物実験で明らかにした。

自然界で、T3 は米の糠部に特徴的に含まれている。そこで、T3 を活かした米糠の高度利用を目的に、T3 の 4 つの異性体 (α -, β -, γ -, or δ -T3) と通常のビタミン E (α -, β -, γ -, or δ -トコフェロール, tocopherol, Toc) をサンプル処理も含めて 20 分程度で迅速に分析できる高速液体クロマトグラフ-蛍光検出器 (HPLC-FL) スクリーニング法を構築し、数百種の在来品種の米糠 T3 と Toc 量を数年間かけて調査して、Milyang23 などの T3 高生産品種を特定した。コシヒカリやハバタキなどの品種との掛け合わせを進め、T3 高生産品種 (通常の 3~4 倍の T3 生産量) の登録を今年度に計画している。

本研究の過程で、なぜ米の糠部に T3 が特徴的に分布しているのかに興味を抱き、糠をはじめとするイネの幾つかの部位の T3 や Toc 量を経時的に調べ、加えてビタミン E 生合成酵素の遺伝子発現を評価して、ホモゲンチジン酸ゲラニルゲラニル転移酵素 (homogentisate geranylgeranyl transferase, HGGT) の糠部での働きがとくに重要

であることを見出した。本知見をさらに T3 を高生産できる品種の作成へとフィードバックしている。

こうした研究成果は、特徴的な生理活性を有するものの、従来技術では分析が難しく、分子機能の基盤的理解が困難であった食品成分 (DNJ と T3) について、分析化学を重視しつつ、存在量と生理機能を明確にして、農芸化学・分析化学的手法で大量生産等の高度利用を可能にしようとするものであり、実生活への貢献が大きいと考えられる。

②疾病に深く関わる生体成分の分析技術：生体膜脂質の過酸化・糖化修飾、食品成分による制御認知症や動脈硬化などの疾病では、これらと脂質過酸化の関係が古くから示唆されている。この証明には、生体内の過酸化脂質 (脂質ヒドロペルオキシド) の正確な定量が必須である。しかし、高純度・安定なヒドロペルオキシド標準品は利用できず、長年の懸案であった。そこで筆者らは、2-メトキシプロペンなどのビニルエーテル化合物を活用し、ヒドロペルオキシド基を保護する高純度脂質ヒドロペルオキシド標準品の調製法を構築して、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) や高速液体クロマトグラフ-化学発光検出器 (CL-HPLC) による生体過酸化脂質の精密定量を可能にした。

これら LC-MS/MS と CL-HPLC 法を駆使して、アルツハイマー病患者の赤血球には過酸化リン脂質 (ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド, phosphatidylcholine hydroperoxide, PCOOH) の顕著な蓄積があり、逆にキサントフィル (極性カロテノイドのとくにルテイン) は低値であることを見出した。この逆相関のメカニズムには血中に漏出してくる β アミロイドの関わりがあることを提唱し、キサントフィルの補給は赤血球過酸化の防御に有用であることを動物実験とヒト試験で明らかにした。

動脈硬化患者では、血漿で PCOOH が高く、酸化低密度リポタンパク質 (OxLDL) 中の PCOOH が単球の内皮細胞への接着を亢進して、および内皮細胞の血管新生を惹起して、動脈硬化を悪化させる機構を提唱した。血漿 PCOOH の抑制にはカテキンが有効であることを認めた。また、C 型肝炎における

脂質過酸化を介した肝炎症機構を示すとともに、皮膚の過酸化にも興味を抱き、生活環境下の太陽光暴露によるヒト皮膚でのスクアレンヒドロペルオキシド (squalene hydroperoxide, SQOOH) の生成とその炎症作用を明らかにした。

過酸化脂質 (PCOOH) に加え、新たな変性脂質として生体膜のホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine, PE) と糖のメイラード産物であるアマドリ型糖化 PE

(Amadori-glycated phosphatidylethanolamine, Amadori-PE) をヒト血中から見出した。この Amadori-PE や後期脂質グリケーション産物の LC-MS/MS 分析法を構築し、高血糖下ではとくに Amadori-PE が増加することを明らかにした。Amadori-PE は糖尿病の初期で顕著に増えるため、新たな疾病マーカーとしての期待が大きい。次いで、Amadori-PE と糖尿病進展の関わりを調べ、Amadori-PE が脂質過酸化や血管新生を誘発して、糖尿病の増悪化に関与することを提唱した。加えて、脂質のグリケーションを抑制するためには、ビタミン B6 群のピリドキサルやピリドキサルリン酸が有効であることを示した。

こうした研究成果は、過酸化脂質 (PCOOH と SQOOH) や糖化脂質 (Amadori-PE) による細胞障害と疾病、これら疾病の食品成分による予防についての研究の開拓と発展に貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究は、東北大学大学院農学研究科生物産業創成科学専攻機能分子解析学分野において行ったものです。本研究を行う機会を与えていただき、学生時代から温かいご指導ご鞭撻を賜りました東北大学大学院農学研究科 教授 宮澤陽夫先生に心より御礼申し上げます。本研究の成果は、ともに研究を行わせていただいた大学や研究機関、産業界の研究者・技術者の皆様をはじめ、多くの関係の方々のご指導やご支援の賜物です。そして、卒業生・在学生の協力によって成し遂げたもので、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、本奨励賞の受賞にあたり、ご支援賜りました日本農芸化学会東北支部長 桑原重文先生をはじめとする諸先生に厚くお礼申し上げます。

平成 24 年度日本農芸化学会東北支部各賞受賞者

2012 年度日本農芸化学会東北支部奨励賞

七谷 圭 （東北大学大学院工学研究科）
「微生物・植物の生体膜輸送体の基質輸送メカニズムの解明」

2012 年度日本農芸化学会東北支部若手奨励賞

田中 瑞己 （東北大学大学院農学研究科）
「麴菌における異種遺伝子由来の転写産物分解機構の解明」

永沢 友裕 （東北大学大学院農学研究科）
「特異な環状構造を有する生物活性天然物の全合成研究」

本間 太郎 （東北大学大学院農学研究科）
「健康寿命を延長する食生活の探索に関する研究」

微生物・植物の生体膜輸送体の基質輸送メカニズムの解明

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻 七谷 圭

はじめに

生体膜輸送体は、細胞増殖、恒常性維持に重要な役割を果たすとともに、物質生産と深く関係する。我々は、代謝反応の初期段階にあたる基質の菌体内への輸送、最終段階にあたる生産物の菌体外への輸送というプロセスに着目し、物質の輸送をコントロールすることにより従来の物質生産システムよりも効率的な物質生産体系を構築することを最終目標としている。本研究では、その基盤研究として、生化学的な手法により膜輸送体の構造と機能を解析し、基質輸送メカニズムの解明に挑んだ。

1. アスパラギン酸：アラニン交換輸送体の分子構造解析

アスパラギン酸：アラニン交換輸送体(AspT)の分子構造を明らかにするため、PhoA-, BlaM-fusion 法, Cysteine-scanning 法を用いた解析から、AspT が非常にユニークな二次構造を持つことを明らかにした^[1, 2]。特に、TM 5 – TM 6 間の約 180 アミノ酸残基からなる親水性の巨大なループ構造は、TrkA_C ドメインと呼ばれるドメイン構造が存在し、何らかのリガンドが結合し輸送制御に関わっているのではないかと推定された^[3]。

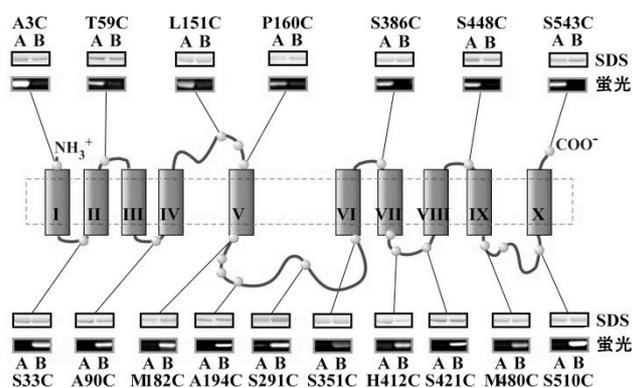


図1 アスパラギン酸：アラニン交換輸送体 AspT の二次構造

2. アスパラギン酸：アラニン交換輸送体の基質輸送メカニズムの解析

AspT の基質輸送メカニズムを明らかにするため、AAE ファミリーに属するトランスポーターで保存されているアミノ酸残基が多数存在する TM 3 に着目し、Cysteine-scanning 法による解析を行い、基質輸送に関与している可能性のある残基 Tyr75, Ser84 を見出した。さらに、AspT が基質である aspartate との結合により構造変化を起こし、periplasm 側に開口していたものが cytoplasm 側に開口した構造に変化し、alternating access mechanism によって基質を輸送していることを明らかにした^[4]。

3. アスパラギン酸：アラニン交換輸送体の基質認識

AspT を界面活性剤 n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) を用いて可溶化、精製する系を構築し、AspT の基質特異性に関する詳細な解析を行った。精製 AspT をプロテオリポソームに再構成し、外液に各 D, L- 型アミノ酸を添加し、L-Asp,

L-Ala の取り込み阻害を観察した。その結果、各アミノ酸はそれぞれ異なる阻害作用を示した。化合物の構造の比較から、AspT の基質となるには炭素骨格数が 3 から 5 で、 α 位もしくは β 位にアミノ基を有することが必要であることが示唆された。また、アスパラギン酸結合部位への基質の結合には、 β 位の極性が関与している可能性がある。また、L-Cys や L-Asp

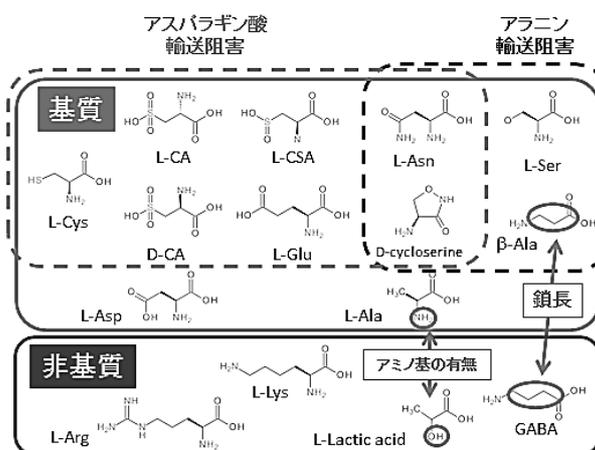


図 2 AspT の基質特異性

ログは L-Asp の取り込みを特異的に阻害したことから、AspT は L-Ala の結合サイトと L-Asp の結合サイトを独立して有する可能性が示唆された^[5]。

4. イオン輸送体による駆動力形成メカニズムの解析

生体膜の物質輸送の駆動力となるイオン濃度勾配（膜電位）の形成は重要な役割を果たしている。微生物・植物を用いた効率的な物質生産体系を構築に向けて、イオン輸送体の機能と発現メカニズムを検討した^[6]。

謝辞

本研究は、東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、生物産業創成科学専攻、工学研究科バイオ工学専攻において行ったものです。本研究を行う機会を与えていただき、学生時代から終始ご指導ご鞭撻を賜りました東北大学大学院農学研究科教授阿部敬悦先生に心より御礼申し上げます。Johns Hopkins 大学 Peter C. Maloney 先生、東北大学大学院工学研究科魚住信之先生には、多くの有意義なご助言、ご指導をいただきましたことを深く感謝申し上げます。また、本研究成果は、国内外の大学・企業の多くの共同研究者のご指導とご協力、および共に研究を行った多数の卒業生・在学生の多大なる努力によって成し遂げられました。最後になりましたが、本奨励賞の受賞にあたり、ご支援賜りました日本農芸化学会東北支部長桑原重文先生、ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] K. Nanatani, *et al.* (2005) *BBRC*, 328(1):20-26., [2] T. Fujiki, K. Nanatani, *et al.*, (2007) *J. Biochem.*, 141(1):85-91., [3] K. Nanatani, *et al.*, (2007) *J. Bacteriol.*, 189:7089-7097. [4] K. Nanatani *et al.*, (2009) *J. Bacteriol.*, 191: 2122-2132., [5] A. Sasahara, K. Nanatani, *et al.*, (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 29044-29052., [6] Salil Chanroj *et al.*, (2011) *J. Biol. Chem.*, 286:33931-33941.

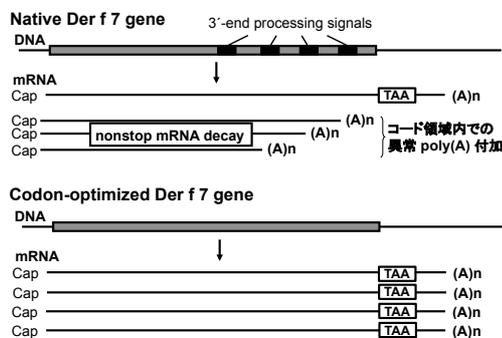
麹菌における異種遺伝子由来の転写産物分解機構の解明

東北大学大学院農学研究科 田中瑞己

麹菌は、異種タンパク質生産の有用な宿主としての利用が期待されているものの、自己タンパク質の生産量と比較して著しく生産量が低下することが問題となっている。本研究では、麹菌において異種遺伝子由来の転写産物量が減少する機構の解析を行った。

ダニアレゲンタンパク質 Der f 7 をモデルとして、コドン最適化効果について解析したところ、Der f 7 のコドンを麹菌のコドンに最適化して発現させることにより転写産物量が増加することが明らかとなった。また、コドン最適化した Der f 7 遺伝子では正常な転写産物が生成しているのに対し、ネイティブな Der f 7 遺伝子ではコード領域内に poly(A) 鎖が付加した異常な転写産物が生成していた(1)。コード領域内に poly(A) 鎖が付加した転写産物は翻訳終止コドンを欠いているため、異常 mRNA 分解経路によって積極的に分解される可能性が考えられた。そこで、麹菌において転写産物の安定性を調べる手法を確立し、Der f 7 転写産物の安定性を比較した。その結果、コドン最適化した Der f 7 転写産物と比較して、ネイティブな Der f 7 転写産物は著しく短い半減期を示した(2)。このことから、異常 poly(A) 付加が生じた転写産物が積極的に分解されることが示された。

次に、poly(A) 鎖が付加される位置を決定する配列要素 (3'-end processing signal) を調べるため、poly(A) 付加部位周辺の配列 dataset を構築し、統計学的な解析を行った。その結果、poly(A) 付加部位の周辺には複数の AU-rich な配列要素が存在することが明らかとなった(3)。コドン最適化することにより Der f 7 遺伝子の GC 含量が増加していることから、コドン最適化によって AT-rich な配列が除かれ、異常 poly(A) 付加が回避されることが示唆された。



異種遺伝子由来の転写産物分解機構のモデル図

原著論文

1. Tokuoka M, Tanaka M, Ono K, Takagi S, Shintani T, Gomi K (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**: 6538-6546.
2. Tanaka M, Tokuoka M, Shintani T, Gomi K (in press) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
3. Tanaka M, Sakai Y, Yamada O, Shintani T, Gomi K (2011) *DNA Res.*, **18**: 189-200.

謝辞

本賞の受賞に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜りました五味勝也先生、新谷尚弘先生、および徳岡昌文博士に厚く御礼申し上げます。また、共同研究者の酒井義文先生に感謝申し上げます。

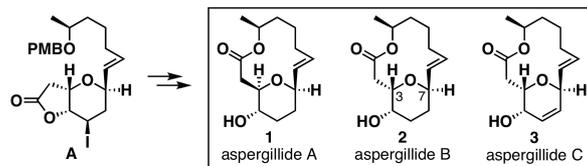
特異な環状構造を有する生物活性天然物の全合成研究

東北大学大学院農学研究科 永沢友裕

近年の目覚ましい有機合成化学の進歩は数多くの有用な反応を生み出し、極めて複雑な化学構造の構築をも可能にすることで天然物化学の発展や新規医薬・農薬の開発などに貢献してきたが、その一方で天然物合成の意義自体も重要視されるようになってきている。このような背景のもと、我々は顕著な生物活性を有する天然有機化合物に着目し、それらの効率的な新規合成法開発に取り組んできたのでその概要を紹介したい。

1. 細胞毒性物質 aspergillide A, B, C の全合成

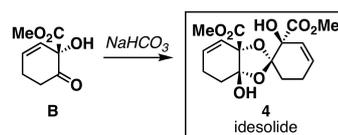
aspergillide A, B, C (**1**, **2**, **3**) は、海洋性糸状菌が生産する 14 員環マクロライドであり、数種の癌細胞に対して強力な細胞毒性を示す。我々は、**2**, **3** に含まれる還元型ピラン環の置換様式が 14 員環マクロライド型天然物としては前例のない 3,7-*trans* 型であること



に興味を抱き **1-3** の全合成に取り組んだ結果、共通中間体 **A** を経る **1, 2, 3** の統一的な全合成を達成した。**1, 3** については世界初の全合成であり、その過程で 3,7-*cis* 型の **1** は環内の *E* 型二重結合の存在により環化が進行しにくいことを明らかにした。

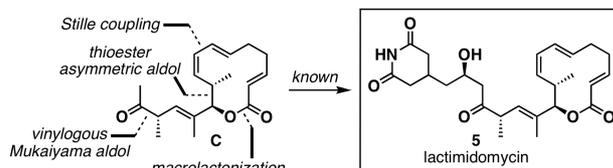
2. 一酸化窒素産生抑制物質 idesolide の全合成

落葉樹イギリスの果実から単離された idesolide (**4**) はミクログリア細胞における一酸化窒素産生を抑制することから、炎症治療薬リード化合物として期待されている。我々は、不斉エポキシ化反応等を経由して調製した単量体 **B** が重曹粉末との接触により効率的に非対称二量化を起こして **4** に変換されることを見出し、極めて特異なスピロ型天然物である **4** の高効率全合成を達成した。



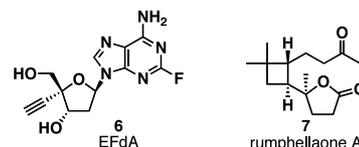
3. 癌細胞転移阻害物質 lactimidomycin の全合成研究

lactimidomycin (**5**) は放線菌が生産するグルタリイミド含有型マクロライドであり、各種癌細胞に対し強力な細胞毒性を示すとともに、極低濃度で (0.6 nM) ヒト由来癌細胞 MDA-MB-231 の転移を阻害するため、新規抗癌剤リード化合物として期待されている。我々は、3つの二重結合の存在により環化が難しい 12 員環ラクトン構造の形成を、 α -セレン置換型セコ酸のマクロラクトン化により克服するとともに、各種不斉反応を合成経路に効率的に組み込むことにより **C** の合成を完了した (**C** から **5** への変換は既知であるため、**5** の形式全合成に相当)。現在、保護基を全く使用しない合成経路を立案し、より効率的な **5** の全合成の完成を目指している。

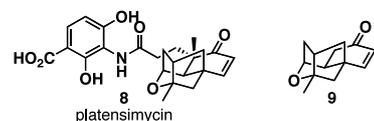


4. その他の生物活性有機化合物の合成研究 (共同研究)

ヌクレオシド系抗 HIV 活性物質 EFdA (**6**) の実用的全合成法の開発、および 4,5-*sec* カリオフィラン型細胞毒性物質 rumphellaone A (**7**) の初の全合成に成功した。また、抗生物質 platensimycin (**8**) の全合成研究の一環としてコア部分構造 **9** の合成を達成した。



本賞の受賞に際し、ご指導頂いた桑原重文先生をはじめ清田洋正先生ならびに山田てい子技官などの諸先生方に厚く御礼申し上げますと共に、東北大学農学部生物有機化学研究室の諸氏やご支援頂いた皆様により感謝申し上げます。



健康寿命を延長する食生活の探索に関する研究

東北大学大学院農学研究科 本間太郎

現在高齢化が進み、老化性疾患の患者数が増加している。老化を遅延し健康に高齢するための方法が切望され、その方法として食事に注目が集まっている。そこで、健康寿命の延長に有効な食事を科学的根拠をもって示し、現代の食生活を見直す食育の一助とすることを目指し、これまで研究を重ねてきた。本研究の発展により、人々のQOLの維持だけでなく、老化による社会的・経済的な損失を防ぐ効果も期待している。

初めに、メタボリックシンドロームの発症に関与し健康寿命に大きく関わっている脂質代謝系の加齢による変化について、マウスを用いて詳細に調べた。その結果、インスリン分泌を促進させる Hsd11β1 発現が肝臓で加齢依存的に上昇し、高インスリン血症の発症リスクが高まることを明らかとした (Honma T, *et al.*, 2011)。この分子は長期的な高脂肪食摂取によりさらに発現が上昇し (図 1)、高インスリン血症は進行した。過度のインスリン分泌は健康寿命を短縮させるため、高脂肪食のような食事が老化を促進する原因の一つを明らかにした (Honma T, *et al.*, 2012)。

続いて、健康有益性が多数報告されている食素材である魚油に着目し、魚油の長期摂取がマウスの寿命に与える影響を検討した。その結果驚くべきことに、魚油の多量摂取により生体内の酸化ストレスが上昇し、マウスの寿命は短縮した。一方、低用量の魚油では寿命の短縮は見られず、抗酸化剤との併用で寿命は延長することが示された。これにより、酸化されやすい魚油の多量・長期摂取には、抗酸化剤の強化などの対策が必要であることが示された (図 2) (Tsuchi T, *et al.*, 2011)。

次に、日本食が生体老化に与える影響について検討した。世界中から健康食として注目されている日本食であるが、日本食そのものの摂取による健康機能を科学的に評価した研究は少ない。そこで、時代と共に変化している様々な日本食を実際にマウスに摂取させ、生体老化に与える影響について検討した。その結果、1970-1980年の日本食に最も健康有益性が高いことを見出した (図 3) (Honma T, *et al.*, *in preparation*)。

本賞の受賞に際し、多くの御指導と御鞭撻を頂きました東北大学大学院農学研究科准教授、都築毅先生に厚く御礼申し上げます。また、日頃から本研究について議論して下さいた池田郁男教授をはじめ東北大学大学院農学研究科食品化学研究室の諸氏に深く感謝申し上げます。

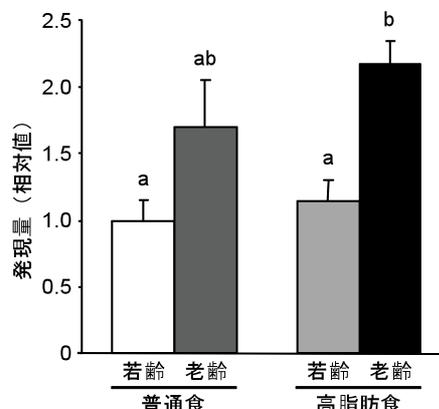


図1. 加齢及び高脂肪食摂取がマウスの肝臓Hsd11β1のmRNA発現量に与える影響
Mean ± SE, ^{a,b}P < 0.05

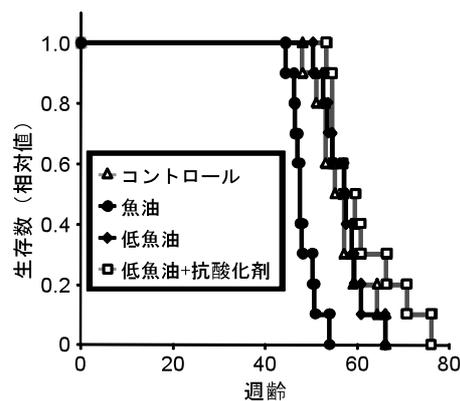


図2. 魚油の長期摂取がマウスの寿命に与える影響

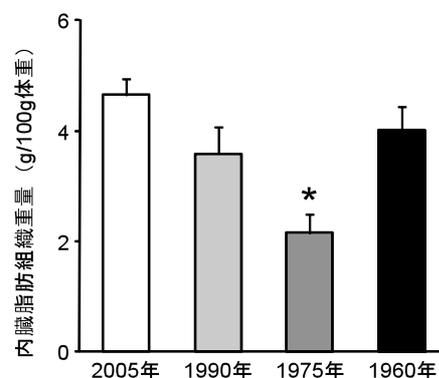


図3. 各年代の日本食摂取がマウスの内臓脂肪組織重量に与える影響
Mean ± SE, *P < 0.05 vs. 2005年

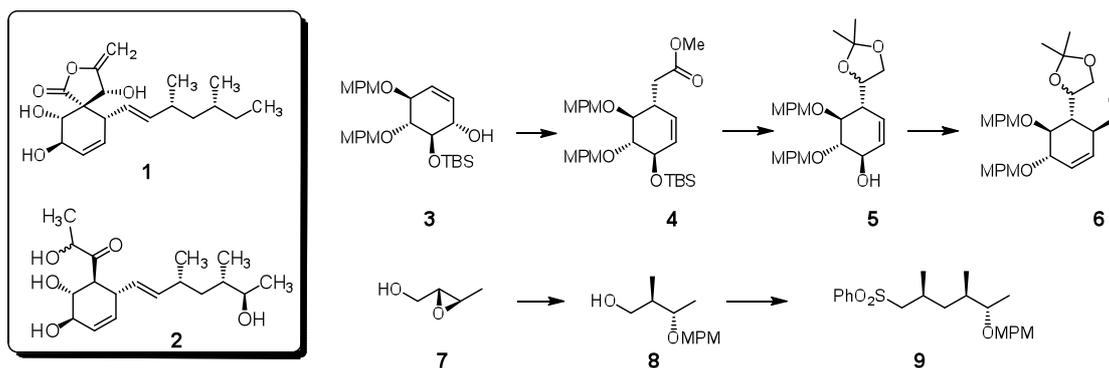
一般講演

A 会場
(403 講義室)

A01 norleptosphol C の全合成研究

○ 村井嘉晃、八木橋優希、橋本勝（弘前大・農学生命科学）

当研究室で *Leptosphaeria doliolum* から単離・構造決定した spiroleptosphol (1)、およびその類縁体の合成を目指して研究を展開している。報告者は、まずこれら化合物に共通する 4 置換シクロヘキセン構造の構築を検討した。D-グルコースより誘導した 3 を Claisen 転位により 4 としたのち、官能基変換を行い、5 を合成した。再び Claisen 転位を行ったのち酸化的開裂により 6 を得た。側鎖については、光学活性クロチルオキシド(7)にメチル基を導入して 8 を得ることに成功した。現在、8 の 9 への変換、さらに 6 と結合させて、norleptosphol (2) の鏡像体の合成を検討している。

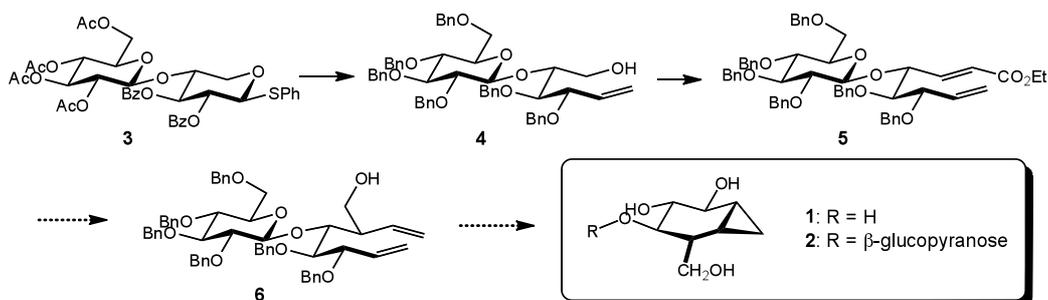


A02 シクロプロパンを組み込んだセルラーゼ反応遷移状態アナログの合成研究

○大場雄貴、久守未央奈、秋山奈菜子、橋本 勝
（弘前大・農生）

当研究室では、セルラーゼの詳細な機構解明を目的に、反応遷移状態ミミックの合成研究を行っている。これまでに、分子モデリングの結果をもとにシクロプロパンを組み込んだ構造が反応遷移状態を安定配座のまま再現し、反応サブサイトに強く結合すると期待、その合成法の開発として 1 を合成した¹。今回は認識部位である-2サブサイトにもグルコースを導入して、実際の生化学実験に適用可能と期待される 2 の合成研究を行った。

D-グルコースと D-キシロースからβ-グリコシル化を経て 3 としたのち、チオフェニル基を酸化的に加水分解後 Wittig 反応により 4 を誘導した。先に行った 1 の合成を参考に残った水酸基を酸化、さらに Wittig を行い、5 を合成した。現在、6 への変換、環化メタセシス、Simons-Smith 反応により 2 を得るべく、鋭意検討中である



1) Akiyama, Hashimoto *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2011, **75**, 1380.

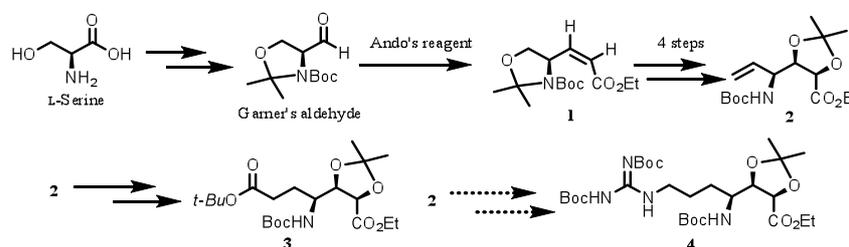
A03

抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチド類の全合成研究；
アミノジオール誘導体の合成

○米田翔, 菊池真理, 武田祥, 今野博行 (山形大・院理工・バイオ化学)

【目的】膜蛋白質ケモカインレセプターCXCR4/CCR5 を阻害することで抗 HIV 活性を示す化合物類の中に、海綿由来環状デプシペプチドが知られている。これらは異常アミノ酸, D-アミノ酸を多く含み N 末端に脂肪酸側鎖を有している。私たちの目的は、これらの全合成ならびに構造活性相関研究によって新たな CCR5 阻害剤の開発を行うことである。今回、環状デプシペプチド Callipeltin A ならびに、Homophymine A に含まれるアミノジオール誘導体の合成を検討した。

【方法と結果】アミノジオール誘導体は L-serine を出発原料に用い合成計画を立てた。まず、Garner' s アルデヒドに対し、安藤試薬による Horner-Wadsworth-Emmons 反応で Z 体 **1** を得た。さらにオスニウム酸化によるジオール化、Wittig 反応などを経て、中間体 **2** を 11 工程で合成した。その後オレフィンメタセシス反応など数工程で、目的とする化合物 **3** へ導くことができた。現在化合物 **4** への変換、及びスケールアップについて検討中である。



A04

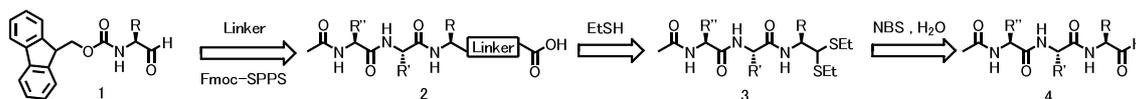
チオアセタールを経由したペプチドアルデヒド合成法の開発

○ 瀬間義大¹、石井学¹、赤路健一²、今野博行¹

(¹山形大院理工・バイオ化学、²京都薬大)

【目的】ペプチドアルデヒドはプロテアーゼ阻害剤として作用することが知られている。プロテアーゼには疾患の原因や細菌・ウィルスの感染機構において重要となるものもあり、阻害剤開発のために以前よりペプチドアルデヒドの合成が試みられてきた。ペプチド合成においては簡便にペプチドの伸長を行うことが可能な固相合成法がしばしば用いられるが、従来の固相合成法ではリンカー・樹脂からの切り出しが困難であるという課題が残されている。そこで本研究では、アセタール-チオアセタールを経由することで強酸の使用を回避したペプチドアルデヒド合成法の開発を試みた

【方法と結果】まずはじめに Fmoc アミノアルデヒド (1) を調製し、アセタールリンカーを導入した。その後リンカーの末端を樹脂に担持し、固相上でのペプチド鎖伸長後 BF₃・Et₂O 存在下 EtSH とアセタールの交換反応によりペプチドチオアセタール (3)、最後に NBS、H₂O による短時間の処理によってペプチドアルデヒド (4) に導いた。性質の異なった側鎖を有するアミノ酸を用いて、その反応性の違いを比較しつつそれぞれのペプチドアルデヒドの合成に成功した。

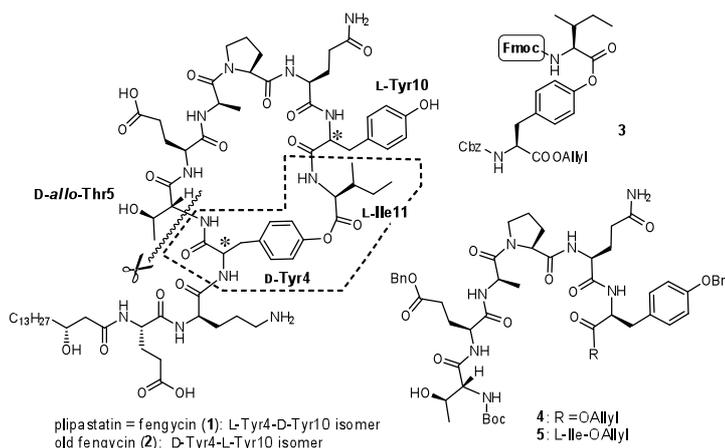


A05 Plipastatin/Fengycin 構造混乱の終結 (3) D-Tyr4-L-Tyr10 異性体の合成

○ 六車美沙、本間美保、橋本勝 (弘前大・農生)

Fengycin と Plipastatin はそれぞれ別物質と考えられてきたが、我々は最近、これらは同一物質であり、plipastatin として提唱されている L-Tyr4-D-Tyr10 異性体 **1** に収斂されることを報告した¹。旧来の fengycin の構造 (D-Tyr4-L-Tyr10 異性体 **2**) を合成し、そのスペクトルを比較すれば、これを最終的に確認することができるかと期待し、**2** の合成を計画した。

1, 2 は不安定なフェノール水酸基によるラクトン環を有しており、これの導入時期・方法が合成の鍵となる。当初、ユニット **3** を用いた収束的ルートを計画したが、**3** の Fmoc 基の除去と同時にエステル結合が切断される、即ち、エステルの導入前に Ile11 に Tyr10 と結合させておく必要性が判明した。以上の結果をもとに Tyr4/*allo*-Thr5 間で環構造を構築することとし、**4, 5** の合成を行った。



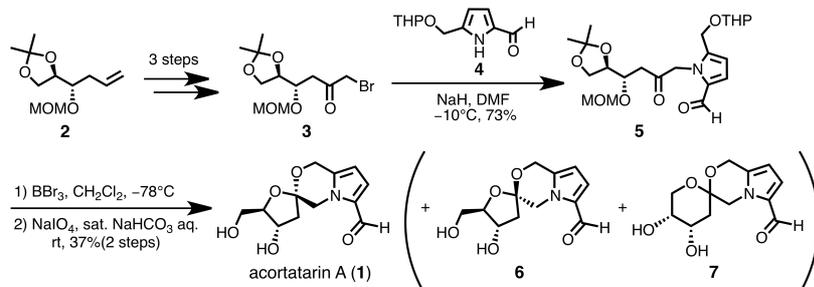
1) Honma, Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 3793 (2012).

A06 Acortatarin A の全合成研究

○ 寺西貴昭 陰山真将 桑原重文
(東北大院農・生物産業創成)

[目的] Acortatarin A (**1**) は天然には珍しいモルフォリン骨格を有しており、糖尿病性腎症に関わる活性酸素種生成阻害活性を有することが知られている¹。本研究では **1** の効率的な合成法の確立を目的とした。

[方法・結果] 既知のアルケン **2** に対して Wacker 酸化、ブロモ化を行いブロモケトン **3** を得た。**3** に対して pyrrole より別途調製した **4** を求核置換させることで **1** の全炭素骨格を有する **5** を良好な収率で得た。その後、**5** の保護基を一挙に外し、続く環の巻き込みにより目的とする **1** の生成を確認したが、この際 **6** および **7** も副生してきた。**1** と **7** の分離は困難であったので、**1**、**6**、**7** の混合物に対し NaIO_4 を作用させて、**7** の 1,2 ジオールを開裂した後、カラムクロマトグラフィーにより **1** と **6** を分離し、**1** の全合成を達成した。



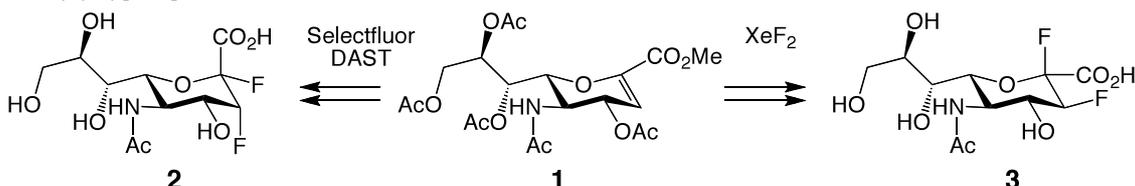
1) Tong, X. G. *et al.*, *Org. Lett.* 2010, 12, 1844.

A07 フッ素化シアル酸誘導体の合成とシアリダーゼ阻害活性

○田中皓祐¹、ノングラック・スリウィライジャロエン^{2,3}、佐藤宏樹¹、
桑原重文¹、大類洋⁴、須原義智⁵、鈴木康夫²、清田洋正

(¹東北大院農・生物産業創成、²中部大・生命健康科学、³Tammasat Univ.(タイ)、
⁴横浜薬科大、⁵芝浦工大)

シアリダーゼ阻害に基づくインフルエンザ治療薬として、現在リレンザやタミフルが用いられているが、頭痛、めまい、異常行動などの副作用や抵抗性株の出現から、新規な薬剤開発が求められている。我々は、シアル酸誘導体 **1**[1]から XeF₂、Selectfluor、DAST を用いてジフルオロ体(**2**, **3**)[2,3]を合成し、シアリダーゼ阻害活性を試験したので報告する。



[1] PMeindl, H.T

Chempy Monatsh. Chem. **1969**, *100*, 1295.

[2] A. G. W

Can. J. Chem. **2004**, *82*, 1581.

[3] T

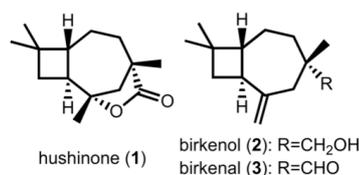
Nakajima, H. Hori, H. Ohri, H. Meguro, T

Agric. Biol. Chem. **1988**, *52*, 1209.

A08 カバノキより単離された転位型カリオフィレン誘導体の全合成研究

○ 廣川高史、桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】 Hushinone (**1**)、birkenol (**2**) および birkenal (**3**) はカバノキ *Betula sp.* の精油成分より単離・構造決定された、四/七員環がトランス縮環した天然物としては極めて稀な構造を有する転位型カリオフィレン誘導体である¹⁾。以前我々は Stork シクロブタン化反応²⁾がカリオフィレン誘導体に特徴的な四員環部位の構築に有効であると見出したが³⁾、同様の手法を用いて **1-3** の全合成が可能であると考へ、これらの初の全合成の達成を目的として研究に着手した。



【方法・結果】 先行研究の合成中間体 **4**³⁾を出発原料とし、ラクトン環の構築と官能基変換によりプロモ体 **5** へと導いた後、分子内アルキル化反応によって **1** の全合成を達成した。 **1** を強塩基で処理すると β-脱離によりラクトン環が開環して **6** が得られ、還元と酸化により **2** および **3** の全合成を達成した。



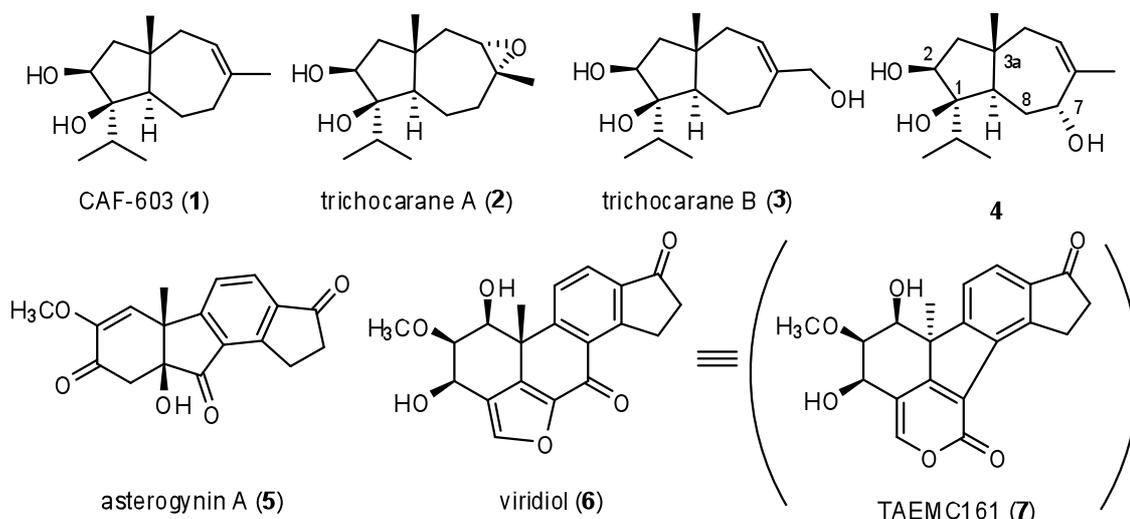
1) Klika, K. D. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2627. 2) Stork, G.; Cohen, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5270. 3) (a) Hirokawa, T. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 705. (b) Hirokawa, T.; Kuwahara, S. *Tetrahedron.* **2012**, *68*, 4581.

A09 *Trichoderma* sp. の生産するテルペン類とステロイド様物質の構造決定

○ 安村良子、殿内暁夫、橋本勝（弘前大・農学生命）

白神自然観察園の土壌から単離した *Trichoderma* sp. 培養液の酢酸エチル抽出物から6種の化合物(1)-(6)を見出した。構造解析の結果、1-3, 5, 6は文献のスペクトルデータと一致したが、4は新規化合物であった。4の7位水素は¹H NMRにおいて、立体化学決定に有用なNOEを与えなかったが、8位メチレンとの結合定数、および分子模型を用いた考察によりα-水酸基であると決定した。

6は、過去に構造7とされたこともあった。5と同時に得られたことを考慮すると、同じ縮環系を有する7の方が都合がよいとも考える。大会ではこの点についても考察する。

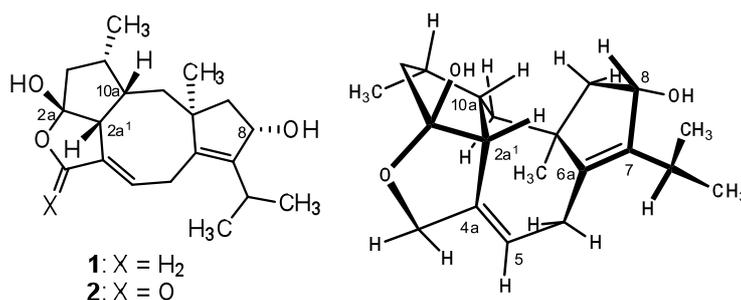


A10 新規4環式フシコカン Roussellols A, Bの構造

○ 橋本勝^a、竹川大登^a、田中和明^a、福士江里^b、根平達夫^c、
 (^a弘前大農生、^b北大農、^c広島大・総合科学)

草本タケ *Sasa veitchii* から単離した子嚢菌 *Rousoella hysteroioides* KT1651 の培養液から、Roussellols A (1)、B (2)を見出した。1の2a¹Hは、平面構造からは考えにくい8Hおよび側鎖イソプロピル基メチル水素との間にNOE相関を与えたが、下に示した立体構造を推定することにより説明できるが、分子モデリングによりこの構造が安定配座であることが判明した。この構造を帰属するに当たり、C2aアセタール炭素を119.5 ppmのシグナルとする必要があった。この化学シフトは通常のアセタールより若干高周波で共鳴しているがDFT/EDF2/6-31G*を用いた理論化学シフト計算はこれ

を支持した。また、1, 2はともに210 nm付近で正の分裂型コットンを与えた。これをその吸収波長からC4a=C5およびC6a=C7二重結合の相互作用によるもの帰属、さらに理論計算によりそれを再現して絶対配置を決定した。

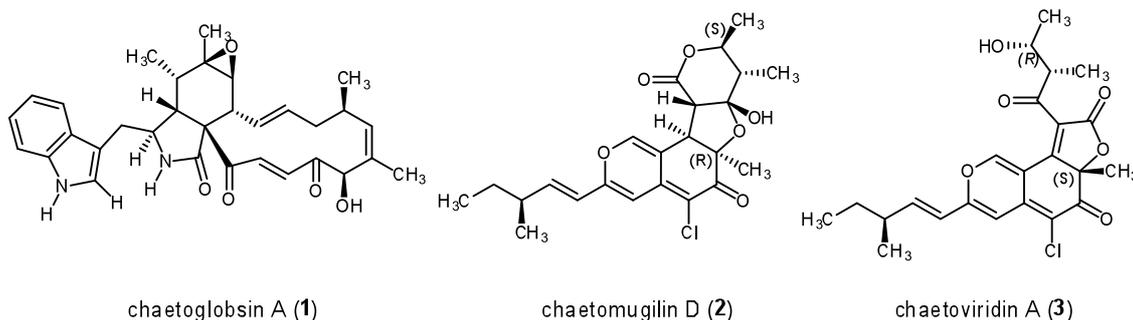


A11 糸状菌 *Chaetomium* sp.の生産する抗菌物質の構造

○ 竹川大登^a、橋本勝^a、殿内暁生^a、根平達夫^b
(^a弘前大・農生、^b広島大・総合科学)

金木町の水田土壌から単離した糸状菌 *Chaetomium* sp.の培養液は、イネゴマハガレ病菌に対して強い抗菌活性を示す。その成分を探索したところ、3種の抗菌物質を単離し、それらのスペクトルは chaetoglobsin A (1), と chaetomugilin D (2), および chaetoviridin A (3)と一致した

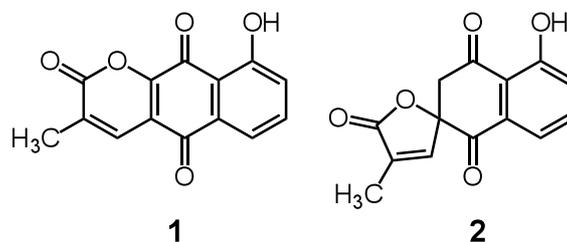
化合物 1-3 は *Chaetomium globosum* から単離されてきたが、別の培養液からであった。今回は同一培養液からの単離であり、共通の生合成中間体が想定される。その経路は不明だが、3は、化学的には2のC8,C2'位結合の酸化とラクトン環の巻き直しのみによって説明することができる。しかし、2,3には複数の立体化学に相違がみられる。発表ではこの点についても考察する。



A12 *Lambertella* 属によるマイコパラサイト現象の解明

○ 廣瀬 あかね・工藤 慎士・村上 貴宣・橋本 勝 (弘前大・農生)

当研究室では *Lambertella* 属による *Monilinia* 属へのマイコパラサイト現象の機構解明研究を行っている。その過程で *Lambertella corni-maridis* の場合、lambertellin (1)は培養液で痕跡量しか検出されないが、1が自身にも毒性を示すため、生産後速やかに代謝されることが原因であると提唱した。これを検証するには1の分解物を特定し、培養液中で確認することが必要となる。我々は、同位体ラベルした1を用い、質量分析により解析することとした。ラベル1の添加により同様の質量分布を示す分子量 270 のシグナルを GCMS 保持時間 13.4 分に見出した。このピークは1を添加しない場合も検出されることから、1の分解物であり、上記仮説は正しいことを証明した。また1の添加により lambertellol C (2)が顕著に増大するが、ラベル1の添加実験において、2は同様の質量分布を示さないため、代謝産物ではないと考察した。



A13 昆虫食害が誘導するアレチマツヨイグサ揮発成分の天敵誘引活性と生合成

○ 野下浩二、阿部 誠、田母神繁（秋田県大・生資科）

【目的】昆虫食害に対する植物の防御反応のひとつとして、食害を受けた葉から天敵を誘引するテルペン類など特有の揮発成分が誘導的に生産・放出されることが知られている。我々は、ハムシに食害されたアレチマツヨイグサが、ピネンやオシメンなどテルペン類に加え、植物成分として比較的珍しいイソバレロニトリルを放出することを見出し、その機能と生合成に注目している。ハムシ食害を受けたアレチマツヨイグサには、ハムシを捕食する天敵カメムシが頻繁に見られることから、ハムシ食害で誘導される揮発成分の天敵カメムシに対する誘引活性を検討した。また、イソバレロニトリルの構造から、このニトリルの生合成前駆体がアミノ酸のロイシンであると考へ、その生合成経路を検討した。

【方法】植物ホルモン活性を持つジャスモン酸メチル (MeJA) がハムシ食害を再現することを利用し、MeJA 処理したアレチマツヨイグサ葉と蒸留水で処理した葉から放出される揮発成分に対する天敵カメムシの選好性を調べた。また、重水素標識したロイシンをアレチマツヨイグサ葉に吸わせ、MeJA 処理により揮発成分の生合成を誘導させ、重水素標識がイソバレロニトリルに取り込まれるかを GC-MS により調べた。

【結果と考察】天敵カメムシは、MeJA 処理葉から放出される揮発成分を有意に選好し、ハムシ食害で誘導される揮発成分が天敵カメムシの誘引に関わることが示唆された。また、ロイシンに由来する重水素はイソバレロニトリルに取り込まれることを確認した。さらに、3-メチルブチルアルドキシムにも重水素標識が取り込まれることを見出し、アレチマツヨイグサにおいて、ニトリルは対応するアミノ酸からアルドキシムを経て生合成されることが示唆された。

A14 植物シグナル物質メチルジャスモン酸の移行・代謝・防御反応の誘導

○ 田母神繁、野下浩二、阿部誠（秋田県立大・生物資源）

【目的】植物は傷害や食害に対する防御応答を備えている。メチルジャスモン酸 (MeJA) は、この防御応答を誘導するシグナル物質の一つであると考えられている。そこで、MeJA の移行性と代謝および防御反応の誘導活性を分子レベルで解析し、全身的な防御応答における MeJA の機能を明らかにすることを目的に実験を行った。

【方法】重水素標識した MeJA (d_2 -MeJA) を利用し、ヒナタイノコズチ茎葉部における MeJA の上位葉への移行性とジャスモノイルイソロイシン (JA-Ile) への代謝について調べた。同時にテルペンの放出を指標とし、上位葉での防御応答の誘導を調べた。ヒナタイノコズチの茎に d_2 -MeJA を与え、24 時間後に 3 つ上の上位葉中に含まれる d_2 -MeJA の代謝物を LC-MS/MS を使って定量した。また、上位葉から放出される揮発性化合物を捕集し、GC-MS で分析した。

【結果と考察】分析の結果、上位葉中に d_2 -JA および d_2 -JA-Ile の存在を確認した。また、上位葉中で内生の JA と JA-Ile が増加することも確認した。これらの結果から、茎葉部下方に与えられた d_2 -MeJA は茎を経由して上位葉に移動し、そこで活性体の d_2 -JA-Ile に代謝されることが示唆された。また、上位葉からセスキテルペンを主成分とする揮発性有機化合物の放出も確認したことから、傷害時に生成した MeJA は茎葉下部から上位葉に移動し、上葉で防御反応を誘導するシステミックなシグナル物質として機能し得ることが示された。不活性体の MeJA が移行先で活性体の JA-Ile に代謝され、そこで防御反応を誘導する機構は興味深い。以前の実験で、揮発性 MeJA は空中伝搬を介して隣接植物に吸収され、同様に代謝・活性化されることを見出している。MeJA は植物間だけではなく植物内でもシグナル物質として機能し得ると考えている。

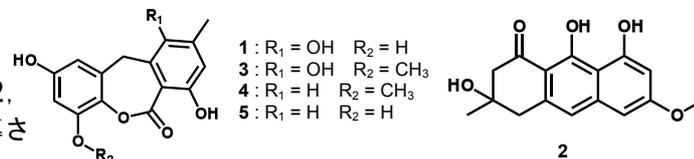
A15 マングローブ林より分離した糸状菌が生産する塩濃度依存性物質について

○ 渋谷史明、小関卓也、村山哲也、塩野義人 (山形大・農)

【目的】 マングローブ林に群生する塩性植物には、多種多様な内生菌が存在しており、天然物の探索源として注目されている。しかし、実際にそれら内生菌の環境適応力に着目し、物質生産能力を十分に引き出そうとした研究例は少ない。本研究では、塩性植物内生菌が塩 (NaCl) 添加培養により、誘導、もしくは新たに生産される物質の探索を目的とした。

【方法および結果】 マングローブ林より採取した植物分離糸状菌 40 株のうち、培養培地に海水と同程度の濃度の NaCl を添加することにより、二次代謝産物生産パターンが変化する菌株を探索した。その結果、*Eurotium rubrum* IM-26 株の培養抽出物の LC/MS 分析において、NaCl 添加により誘導される物質が認められたことから、IM-26 株が生産している物質を明らかにすることにした。IM-26 株の酢酸エチル抽出物を各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製、化合物 1 - 5 を単離し、構造解析を行った。各種機器分析の結果、化合物 1 は芳香族ラクトンを有する既知の eurotinone であることが分かり、化合物 3 - 5 もその類縁体であった。化合物 2 はアントラキノン系物質である既知の

torosachryson と決定した。また、1 - 5 は抗菌活性を有しており、1, 2, 5 は NaCl 添加培養により、生産誘導されることが分かった。



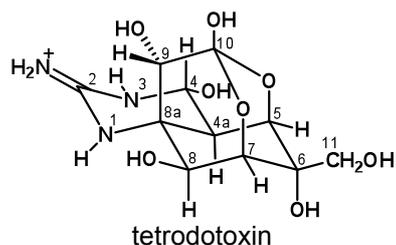
A16 HILIC-ESI-Q-TOF-MS を用いたテトロドトキシン類縁体の微量分析法の検討

○ 藤雄大、此木敬一、長由扶子、山下まり (東北大院・農)

【目的】 テトロドトキシン (tetrodotoxin; TTX) は多様な生物が持つ強力な神経毒である。TTX には多くの類縁体が存在し、これまでトリプル四重極型の質量分析器による LC-MS/MS を用いて TTX 類縁体の定量、及び新規類縁体の探索を行ってきた^{1,2)}。今回、Q-TOF (四重極-飛行時間) 型の質量分析器を用い、微量成分を含めた TTX 類縁体の一斉分析法を検討した。

【方法】 分離モードには HILIC を、質量分析器には Q-TOF MS の micrOTOF Q II (Bruker Daltonics) を用い、高分解能の Q1 scan で各 TTX 類縁体の分離及び TTX の定量性を調べた。更に MS/MS 条件の検討も行い、TTX 類縁体の主なプロダクトイオンの分子式を解析した。

【結果と考察】 カラム TSKgel Amide-80 (TOSOH, 2.0 x 150 mm)、溶媒 16 mM HCOONH₄, 0.5 mM HCOOH/H₂O-CH₃CN (3:7, v/v) の条件で各類縁体の分離を確認した。この条件下 TTX 2 pg - 2 ng の範囲で R² = 0.999 の良好な検量線が作成できた。また、TTX の主なプロダクトイオン m/z 162 の分子式が C₈H₈N₃O であることを確認し、このプロダクトイオンを指標とすることでより確実な TTX の同定が可能となった。この測定法は新規 TTX 類縁体の探索にも応用できると考えられた。

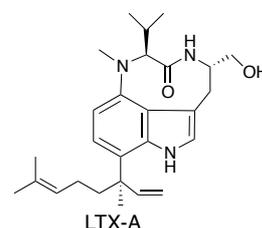


1) T. Nakagawa, J. Jang, M. Yotsu-Yamashita, *Anal. Biochem.*, **2006**, 352, 142-144.

2) Y. Kudo, T. Yasumoto, K. Konoki, Y. Cho, M. Yotsu-Yamashita, *Mar. Drugs*, **2012**, 10, 655-667.

A17 沖縄県阿嘉島産リングビアトキシン生産藍藻の 16S rDNA の部分塩基配列解析 ○武田篤¹、長由扶子¹、佐久川さつき²、須田彰一郎³、此木敬一¹、山下まり¹ (¹東北大・院農、²沖縄県衛研、³琉球大・理)

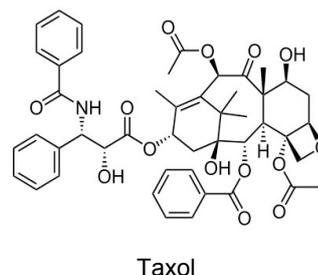
【目的】リングビアトキシン(lyngbyatoxin, LTX)類は、protein kinase C 活性化剤で、ハワイ産藍藻 *Moorea product* (過去の文献では *Lyngbya majuscula* と報告されていた)より生合成遺伝子が同定されている¹⁾。日本でも *M. product* は沖縄県にて皮膚炎を誘発したとの報告がある²⁾。しかし、アプリアトキシン(APTX)も LTX と同様の生理活性を有するため、原因毒を完全に同定する必要がある。2010年7月に沖縄県阿嘉島で採集された藍藻より LTX-A が検出されたので、LTX 生産藍藻種の同定を目指し、本研究では 16S rDNA の部分塩基配列解析を行った。【方法】上記有毒藍藻を顕微鏡下で 1 フィラメントずつ分離し、LC/MS 分析用に MeOH で抽出後、緩衝液で DNA を抽出した。MeOH 抽出液は LC/MS (SIM)に供し、LTX-A([M+H]⁺ m/z 438)を定量した。また、緩衝液で抽出した DNA をテンプレートとして PCR で藍藻の 16S rDNA の一部(662 bp)を特異的に増幅して TA クローニングした。目的のインサートを含む複数の大腸菌コロニーより、PCR 産物の塩基配列を解析した。【結果】藍藻 1 フィラメントの毒量は個体差が大きい、約 2-10 ng の LTX-A が検出され、APTX は検出されなかった。LTX 含量の比較的高いフィラメントから得られた 16S rDNA の塩基配列は、Oscillatoriaceae *Leptolyngbya* sp. (AY493584)と 97%一致した。



1) Edwards, D.J. et al., *JACS*, **2004**, 126, 11432-11433. 2) Osborne, N.J.T. et al., *Environmental International*, **2001**, 27, 381-392.

A18 質量分析を用いたイチイ中のタキソール結合タンパク質の探索 ○工藤佑馬・阿部晃大・長由扶子・山下まり・此木敬一 (東北大院農)

【目的】イチイ (*Taxus cuspidata*)より単離されたタキソール (Taxol)は微小管の脱重合を阻害し、抗がん剤として広く利用されている化合物である。しかし、タキソールがイチイ自身に与える生理作用やイチイの自己耐性機構は不明である。本研究ではイチイ中でタキソールの機能に影響を及ぼすタキソール結合タンパク質 (Taxol Binding Proteins, TBPs)の存在を仮定し、TBPs の探索を行った。

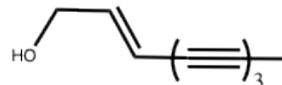


【方法】二次代謝産物から穏やかな分離条件でタンパク質の精製を進める過程で、二次代謝産物は内在性受容体から解離せず結合状態にあると想定した。この仮説に基づき、種々の精製段階で得られる各画分を有機溶媒で抽出した後、質量分析を行ってタキソールの有無を調べ、TBPs 含有画分を同定する方法を立案した。事前に、本法の有用性を確認するため、我々が報告済みのオカダ酸 (Okadaic Acid, OA)結合タンパク質 OABP2 を OA 含有生物であるクロイソカイメン (*Halichondria okadai*)から単離することにした。その上で、イチイ中の TBPs の探索を行った。【結果】まず、クロイソカイメンよりタンパク抽出液及び分離画分に含まれる OA を指標として OABP2 を分画することに成功した。その後、イチイ由来の粗抽出物を硫酸アンモニウム (硫酸)沈殿処理、続く陰イオン交換クロマトグラフィーを行って分画した結果、TBPs 含有画分を見出した。陰イオン交換クロマトグラフィー後に得られた TBPs 画分の単位タンパク質量あたりのタキソール結合量が硫酸沈殿処理後に比べ約 2 倍に上昇したことから、TBPs の濃縮を確認した。

A19 食用キノコにおけるナラ枯れ病菌に対する生育阻害物質について ○芳賀真倫、小関卓也、村山哲也、小山浩正、塩野義人（山形大学・農）

【目的】ナラ枯れは、ナラ枯れ病原菌によりナラやカシ類が枯れる植物病である。現在、多くの都道府県でナラ枯れの被害が確認されている。その一方で、ナラ枯れ枯死木の有効利用の一つとして、キノコ栽培の菌床に用いる研究が行われており、キノコ菌糸は、枯死木／健全木に関わらず、生育することが報告されている。そこで、本研究では、新たなナラ枯れ病原菌の生育抑制物質を得るために、キノコ類の培養菌糸体の培養物より、ナラ枯れ病原菌に対する生育阻害活性物質を探索した。

【方法および結果】5種の食用キノコの培養菌糸体について調べた結果、ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) の培養抽出物において、ナラ枯れ病原菌に対する生育阻害活性が認められたため、活性物質を明らかにすることにした。6.0Lのブナシメジの培養菌糸体について、活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、活性物質 1 とその類縁物質 2, 3 を単離した。化合物 1 は高分解能質量分析により、 $C_{10}H_{18}O$ と決定した。また、 ^{13}C -NMR スペクトルデータと、UV 吸収スペクトルデータ ($\lambda_{max} = 307, 288, 272, 257, 241, 231$) より、分子内に、1,3,5-トリイン構造を有していることが判明した。化合物 1 は二次元 NMR データ解析より、既知の 2(*E*)-decen-4,6,8-triyn-1-ol と決定した。化合物 2, 3 も同様に構造を解析した結果、2 は 1 の二重結合の還元体であり、3 は、9位と10位に水酸基が結合したジイン構造を有する新類縁物質であった。ナラ枯れ病原菌に対する生育阻害活性試験においては、1 は活性を示したものの、2, 3 は不活性であった。



一般講演

B会場

(402 講義室)

B01 メラノーマ細胞のメラニン産生制御機構の解明

○三上真理¹⁾ 園木和典¹⁾ 伊藤美夏瀬¹⁾ 鈴木民夫²⁾ 片方陽太郎¹⁾
(¹⁾弘前大院・農生 ²⁾山形大・医)

【目的】メラノーマ細胞の発生頻度や発生部位は人種や居住地によって大きく変化するため、発生原因やメカニズムの解明を目的に多くのメラノーマ細胞が樹立されているが、全ての樹立細胞が高いメラニン産生能を示しているわけではない。我々はこれまでに少なくとも3種のメラノーマ細胞、MNT-1, HM3K0, G361 でメラニン産生量が異なる (MNT-1 > HM3K0 > G361) ことを明らかにした。本研究では、これらメラノーマ細胞間のメラニン産生能に違いを引き起こす制御機構の解明を目的とした。

【結果と考察】チロシナーゼ抗体を用いた Western blot 解析から、上記3種類のメラノーマ細胞間ではチロシナーゼの分子量が異なり (MNT-1 > HM3K0 > G361)、この分子量の違いは糖鎖修飾の成熟度の違いによるものと推定された。一般に細胞内において、異常な、あるいは未成熟なタンパク質にシャペロン分子などが関与し、分解や処理される場合が少なくない。そこで熱ショックタンパク質の一種 (HSP70) とチロシナーゼの相互作用について検討した結果、メラニン産生量の少ない HM3K0 と G361 では、HSP70 とチロシナーゼとの間に相互作用が確認された。一方、MNT-1 はその作用を認めなかったことより、メラノーマ細胞におけるメラニン産生制御の一つとしてチロシナーゼの糖鎖修飾成熟度が存在し、メラニン産生に影響を与えているものと推定した。

B02 ケラチノサイトの分化に伴うケラチン分子の時差的变化

○内海愛里、牛田千里、片方陽太郎
(弘前大学大学院 農学生命科学研究科)

【背景と目的】ケラチンは上皮細胞の中間径フィラメントを構成する、線維状のタンパク質である。角化細胞 (ケラチノサイト) は分化に伴い、基底層から有棘層、顆粒層、角質層へと移行して生理学的に構築し機能している。基底層では K5/K14 ペアラーが発現しているが、分化に伴いその発現は減少する。一方、K1/K10 ペアラーは基底層では発現しておらず分化に伴って発現し、ケラチノサイトの機能を演じている。最近、Heat Shock Protein (HSP) 40 がこの分化過程で細胞内のケラチンの品質管理に関与していることを確認した*)。さらに In vitro でケラチノサイトの分化に伴い、K5/K14 から K1/K10 への時差的变化と K8/K18 が細胞生化学的に興味ある結果を得たが、その生理学的意義には不明な点が多く存在している。

【方法】ケラチノサイトの培養細胞株として HaCaT を使用した。カルシウム (最終濃度、6 mM) による細胞の分化誘導や p38MAPK の阻害剤による実験系のもとで、ケラチン分子の発現をタンパク質と mRNA レベルで解析した。

【結果】ケラチノサイトの分化に伴い K18 の発現は減少したが、p38MAPK の阻害によりケラチノサイトの分化を阻害すると、K18 の発現が増加した。さらに K18 の siRNA によるノックダウン実験では、分化マーカーである K10 や HSP27 の発現の増加を認めた。

【考察】これまでケラチノサイトの分化は、K5/K14 から K1/K10 への発現の推移と結論づけていたが、K18 の新たな関与が示唆された。ケラチノサイトの分化をケラチン (K8, K18) とシャペロンタンパク質 (HSP27, HSP40) の機能的側面から解析を進める予定である。

*) Yamazaki S. et al. *Int J Mol Med*, **29**, 165-168 (2012)

B03 細胞性粘菌 acetoacetyl-CoA thiolase の細胞内局在性の新たな展開 ○関場惇史、板垣祥子、大町鉄雄 (弘前大・農学生命)

【目的】 Acetoacetyl-CoA thiolase(AT)には、細胞内局在性からミトコンドリア型、ペルオキシソーム型及び細胞質型の3種類のATが存在することが知られている。我々は、以前、細胞性粘菌のcDNAライブラリーから単離したチオラーゼ遺伝子がAT(Ddthiolase)をコードしていることを示した。また、Ddthiolaseの細胞内局在性を検討し、ペルオキシソームに局在すること、更にペルオキシソームへの移行シグナルがPTS-2であることを明らかにした。そこで今回、DdthiolaseのN末端領域と細胞内局在性について詳細に検討した。

【方法】細胞分画法によりペルオキシソームを含む沈殿画分と上清画分(細胞質)を調製し、SDS-PAGEを行った後、抗チオラーゼ抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。また、粘菌に発現した種々のチオラーゼ-GFP融合タンパク質の細胞内局在性を蛍光顕微鏡観察により検討した。

【結果と考察】細胞分画法による解析において、Ddthiolaseは大部分が沈殿画分に検出され、また、わずかに上清細胞質画分にも検出された。Ddthiolaseの16位にメチオニンが存在することから、N末端15アミノ酸残基を欠損した Δ N15 Ddthiolaseの細胞内局在性を検討した結果、細胞質に局在した。また、Ddthiolase過剰発現株の細胞質画分に分子量のわずかに異なる2分子種、long formとshort formが検出された。プロセッシング実験の結果、long formはPTS-2を含む前駆体で、short formは16位メチオニンコドンから翻訳されるPTS-2を欠いた細胞質Ddthiolaseであることがわかった。以上の結果は、Ddthiolaseがペルオキシソームと細胞質に局在するdual-localizing酵素であることを示唆している。

B04 アカフジツボキプリス幼生におけるリシルオキシダーゼの分布と機能の検討 ○野尻元太¹、佐々木伸¹、高橋広明¹、尾崎紀昭¹、小黒-岡野美枝子²、野方靖行³、 福沢世傑⁴、岡野桂樹¹ (1秋田県立大、²ヤマザキ学園大、³電中研、⁴東大)

【目的】我々はアカフジツボキプリス幼生の接着剤分泌器官であるセメント腺から2種類のリシルオキシダーゼ様タンパク質をコードする遺伝子を同定した。本研究の目的は、これらの遺伝子産物が幼生セメントの硬化に関与するか否かを実験的に検証することである。

【方法】1)免疫染色：探索キプリス幼生と付着キプリス幼生をグルタルアルデヒド固定し、切片を作製した。一次抗体にはC末端ペプチド配列に対する抗ペプチド抗体を用いた。2)組換えタンパク質の作製：タンパク質発現にはpETシステムを用いた大腸菌発現系と*Brevibacillus*分泌発現系を用いた。3)活性測定の開発：Amplex-redを用いた過酸化水素検出法と新規のアルデヒド検出法を検討した。

【結果と考察】1)リシルオキシダーゼ抗体陽性部位は探索キプリス幼生では接着剤の貯蔵器官であるセメント腺と表皮に見られた。一方、付着キプリス幼生では付着器官先端の接着剤が硬化した部位に見られた。これらの結果はリシルオキシダーゼが接着剤の一部を構成し、接着剤の硬化に関与することを強く示唆している。2)リシルオキシダーゼはN末端側が切断されて活性を持つと予想されたため、さまざまにN末端側を除いた組換えタンパク質を作製し、さまざまなフォールディング条件を調べている。3)酵素活性を測定する方法の開発についても報告する。

B05 ミヤコグサ由来モチーフ B'-メチルトランスフェラーゼファミリー (B'-MTs) の機能解析

眞坂みなみ、藤田ゆり、吉澤結子、○水野幸一（秋田県立大・生物資源）

【背景・目的】モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いてマメ科植物特有の代謝産物に関する分子遺伝学的解析が進められている。一方 B'-MTs は、植物の生長制御に関わる化合物のメチル化を行う酵素群であり、本研究室でコーヒーから単離同定したカフェインシンターゼもその一員である。本研究ではマメ科植物において B'-MTs 酵素群がどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】ミヤコグサ EST データベースに対して B'-MTs 相同遺伝子群の探索を行い、候補遺伝子を選抜した。平行してミヤコグサの花器より調製した RNA を用いて cDNA を合成した。これを鋳型として候補遺伝子の配列をもとに作製したプライマーを用いて PCR を行い、最終的に候補遺伝子の全長を単離した。これらを pET-23d に挿入し、大腸菌で組換え型酵素を生産した。酵素活性は [¹⁴C-methyl] S-adenosyl-L-methionine をメチル基供与体とし生成物の放射活性を薄層クロマトグラフィーおよび液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【結果】相同遺伝子群の探索より 7 種類の候補遺伝子を単離した (*Lj-tMT1*~*7*)。種々のメチル基受容化合物を基質として酵素活性を測定した結果、*Lj-tMT4* はジャスモン酸メチルトランスフェラーゼ (*Lj-JAMT1*) であり、*Lj-tMT7* がインドール酢酸 (IAA) メチルトランスフェラーゼ (*Lj-IAAMT1*) であることが判明した。*Lj-IAAMT1* の至適 pH は 7.0、至適温度は 30°C であった。

B06 ミカン科ミカン属由来モチーフ B'-メチルトランスフェラーゼファミリー (B'-MTs) の機能解析

○藤田ゆり、吉澤結子、水野幸一（秋田県立大・生物資源）

【背景・目的】ミカン科ミカン属において、花器にカフェインが存在するとの報告があり、虫媒との関係も議論されているが、その生合成経路は未だに不明のままである。本研究ではミカン科ミカン属のカフェイン生合成においてもコーヒーやチャと同様に B'-MTs の酵素が関与しているとの仮説のもと、代表的な品種であるミカン (*C. unshiu*) とスダチ (*C. sudachi*) を材料に、カフェイン合成系酵素 (CS) 遺伝子の単離をめざしている。

【方法】ミカン科ミカン属 EST データベースに対して B'-MTs 相同遺伝子の探索を行い、カフェイン合成系酵素遺伝子の候補遺伝子を選抜した。また、ミカンおよびスダチの花器より調製した RNA を用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、候補遺伝子の配列をもとに作製したプライマーを用いて PCR を行い全長を単離した。これらを pET-23d に挿入し、大腸菌で組換え型酵素を生産した。活性は [¹⁴C-methyl] S-adenosyl-L-methionine をメチル基供与体とし生成物の放射活性を薄層クロマトグラフィーおよび液体シンチレーションカウンターにて検出した。

【結果】得られた 6 つの候補遺伝子について活性試験を行ったところ、2 つの遺伝子が B'-MTs の典型的な基質であるジャスモン酸またはサリチル酸をメチル化する酵素をコードすることが判明した。これらをそれぞれ *Cit-JAMT1*、および *Cit-SAMT1* と命名した。*Cit-JAMT1* は 366、*Cit-SAMT1* は 370 アミノ酸残基からなり、至適 pH はそれぞれ pH 8.5 および 7.5 であった。さらにミカン属中で比較的高濃度 (285 nmol/g FW) のカフェインを含むレモン花器を用いて cDNA ライブラリーを調製し、これより新奇 CS 候補遺伝子を得て、現在機能解析を行っている。

B07 シロイヌナズナ熱ショック転写因子 *HsfB1* 遺伝子の 5' 上流域に存在する保存配列は HsfB1 タンパク質の翻訳を抑制する
朱 旭君、○田中 俊、スニール・クマル・タロール、トーマス・ベルベリッヒ¹、
草野友延（東北大・院生命、¹Biodiversity and Climate Research Center）

【目的】植物に細胞死を引き起こす因子としてシロイヌナズナ熱ショック転写因子 *HsfB2b* を同定した。シロイヌナズナは 21 種の熱ショック転写因子遺伝子を持ち、クラス B には他に 4 種が含まれる。これら 4 種の細胞死誘導活性を調べる過程で、*HsfB1* タンパク質の翻訳は転写後制御を受けていることを認めた。本研究では、転写後制御の機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】細胞死誘導活性は、ジャガイモウイルス X を基本骨格として持つベクターにシロイヌナズナ由来の cDNA を組み込んだコンストラクトを、アグロバクテリウムを介してベンサミアナタバコの葉に接種し判定した。

【結果】1) 5 種のクラス B 熱ショック転写因子遺伝子のうち *HsfB2b* と *HsfB1* の遺伝子産物は細胞死誘導活性を有していた。2) *HsfB2b* と *HsfB1* が細胞死を誘導するのは、植物細胞の核に因子が局在することと転写抑制活性を持つことが必要であった。すなわち、他の *HsfB2a*、*HsfB3* そして *HsfB4* は転写抑制活性を持たないことを明らかにした。3) *HsfB1* 全長 cDNA をベンサミアナタバコに導入したところ、転写物は検出されるものの翻訳産物が検出されなかった。4) この現象には、5-leader 領域に存在する進化的に保存された短い ORF が関与していた。

B08 イネ由来の新規カドミウム耐性付与遺伝子の遺伝子産物は高システイン含量である
○井上雅貴、國廣俊太、齋藤達彦、松田大樹、倉俣正人、田口文緒¹、
ショハブ・ユセフィアン²、トーマス・ベルベリッヒ³、草野友延
（東北大・院生命、¹農業生物資源研、²秋田県立大、³BiK-F）

【目的】植物を用いた重金属除染技術、いわゆるファイトレメデーション法、の確立を目指し、イネ由来のカドミウム耐性付与遺伝子を単離・特徴付けを行うことを目的とした。

【方法】イネ（品種日本晴）由来の cDNA を酵母発現ベクターにクローニングし、ライブラリーを作成した。カドミウム感受性酵母を用いたスクリーニングにより、カドミウム耐性付与遺伝子を同定した。

【結果】1) 約 3×10^5 の cDNA を選抜し、6 種のカドミウム耐性付与遺伝子を得た。このうち 1 種が新規であった。2) 本遺伝子は、穂の形態を支配する原因遺伝子として報告があったが、重金属耐性との関連報告はなかったことからさらに特徴付けを行った。3) 重金属特異性を調べたところ、Cu に対して耐性を示したが、Co、Ni、Mn 等には耐性を示さなかった。4) 本 cDNA は 426 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていたが、そのうち 120 アミノ酸がシステインであった。5) システイン残基がより局在している 170-426 アミノ酸領域とそれ以外(1-169)の領域とに分けたコンストラクトをそれぞれ構築し、酵母でのカドミウム耐性付与能を調べた所、前者の領域にのみ耐性付与が見られた。6) 本 cDNA を過剰発現したトランスジェニック植物のカドミウム反応性の結果についても報告する。

B09 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼの基質特異性

○水野聖之、籠橋麻美、塩野義人、小関卓也（山形大農）

【目的】タンナーゼはタンニンなどに存在する没食子酸のエステル結合（デブシド結合）を加水分解する酵素で、ワインや茶飲料の清澄工程に利用されている。*A. oryzae* タンナーゼ遺伝子はフェルラ酸エステラーゼ遺伝子と類似し、 α/β ヒドロラーゼを分類する ESTHER データベースではタンナーゼファミリーに分類される。しかし、タンナーゼとフェルラ酸エステラーゼの基質特異性の違いについては明らかにされていない。今回は、*A. oryzae* タンナーゼとフェルラ酸エステラーゼの基質特異性の違いについて解析した。

【方法】*A. oryzae*RIB40 由来のタンナーゼ遺伝子(*AotanA*)とフェルラ酸エステラーゼ遺伝子(*AofaeB*)はゲノム情報を基にクローン化し、*Pichia pastoris* を用いて発現させた。タンナーゼ活性は没食子酸メチルを基質に Sharma ら¹⁾に従い分光光学的な方法により、フェルラ酸エステラーゼ活性はフェルラ酸メチルを基質に HPLC を用いて測定した。

【結果】SDS-PAGE からリコンビナント AoFaeB は 60kDa 程度、AoTanA は 45kDa-70kDa の幅広いバンドを示した。脱糖鎖処理後では、AoFaeB は 55kDa にシフトし、AoTanA は 30kDa と 34kDa の二つのバンドを示した。AoTanA はネイティブな精製酵素でも二つのバンドを示し、特異なプロセッシングが示唆された。基質特異性は AoTanA が没食子酸エステルを加水分解し、フェルラ酸エステルは加水分解しなかった。AoFaeB は AoTanA と逆の基質特異性を示した。このように、2つの酵素の基質特異性の相違は基質の構造に由来すると考えられた。

1. Sharma, S., et al. *Ana. Biochem.*, 279, 85-89 (2000).

B10 *Streptomyces* 属放線菌からのセルロース分解酵素遺伝子群の単離と解析

○友常久実子¹、土田美帆¹、春日 和¹、小林正之¹、上松 仁²、池田治生³、小嶋郁夫¹ (¹秋田県大、²秋田工業高等専門学校、³北里大・北里生命研)

【目的】稲わらや林業により生じる林地残材などのセルロース系バイオマス(CB)には、セルロースなど多糖類が多く含まれているが有効利用されていない。これまで数種の *Streptomyces* 属放線菌からセルラーゼやその遺伝子が報告されているが、抗生物質生産放線菌の多くはセルロースの資化能が低く、CB で十分に生育するという報告がない。我々はCBを発酵原料として抗生物質を生産できる放線菌の育種を目的として、天然より分離したセルラーゼ高分泌性放線菌よりセルラーゼ遺伝子群の単離と解析、およびその発現を行った。

【方法・結果】秋田県内外の土壌サンプルより約 4,000 株の放線菌を分離し、カルボキシメチルセルロース(CMC)を分解するセルラーゼ活性の検定(CMC アッセイ)により、セルラーゼ高分泌性の放線菌 2 株を選抜した。これら 2 株は、*Streptomyces thermocarboxydus* C42 および *Streptomyces argenteolus* M178 と同定された。これら 2 種のゲノム DNA について、*Streptomyces lividans* を宿主としてそれぞれショットガンクローニングを行い、CMC アッセイによりセルラーゼ高分泌性クローンを複数単離した。これらクローンの遺伝子解析を行い、C42 株からは glycoside hydrolase (GH) family 5 の *ce1A* と GH9 family の *ce11*、M178 株からは GH5 family の *ce1A* と GH12 family の *ce1B* というエンド型セルラーゼの遺伝子群を見出した。さらに、これら遺伝子群の発現カセットを構築して *S. lividans* に導入し、親株と同等以上の CMC 分解活性を発現させた。

B11 *Arthrobacter* sp. L68-1 の DFAIII オリゴ糖合成酵素遺伝子のクローニングと塩基配列

○原口和朋（農研機構・食品総合研究所）

【目的】イヌリンはチコリなどの植物に含まれる多糖類である。イヌリンに酵素を作用させることによりオリゴ糖 DFAIII が生成する。DFAIII はミネラルの吸収促進の機能がある。このため DFAIII を配合した製品が薬局、コンビニエンスストア等で市販されている。*Arthrobacter* sp. L68-1 株は耐熱性の DFAIII オリゴ糖合成酵素を生産する。本酵素の遺伝子のクローン化および塩基配列の決定について検討した。

【方法】精製した酵素蛋白の N-末端付近及び内部のアミノ酸配列に基づいてプライマーを化学合成した。PCR 反応を行い、酵素遺伝子の一部が増幅された PCR 産物を得た。これをハイブリ用のプローブとして用い、サザンハイブリ、コロニーハイブリにより目的とする遺伝子のクローンを得た。

【結果】酵素遺伝子の塩基配列の解析の結果、32 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドがコードされていることが示された。シグナルペプチドが切れた成熟酵素は 410 アミノ酸残基からなると推察された。塩基配列から計算される native 酵素(単量体)の分子量は 43.7 kDa であった。遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は *Arthrobacter* sp. H65-7 のそれと 77.4% のホモロジーがあることが示された。酵素遺伝子を含む、短めの PCR 産物を得てベクターとつないだ。これを *E. coli* で発現させることにより活性のあるクローン化 DFAIII オリゴ糖合成酵素を得た。

B12 ヒト甘味受容体タンパク質 hT1R2/hT1R3ATD の発現・精製

○佐藤 沙知¹⁾、大石 佳奈²⁾、大谷 典正¹⁾、井深 章子¹⁾

(¹⁾ 山形大学理・物質生命化、²⁾ 山形大学大学院理工学研究科)

【目的】

ヒトは味を舌の上皮層に分布する味蕾で受容する。味覚受容体は味細胞の細胞膜表面に存在する膜タンパク質であるが発現量が少なく、このことから精製・結晶化が難しい。そこで、ヒト甘味受容体タンパク質 hT1R2/hT1R3 細胞外ドメイン(ATD)の大腸菌での大量発現系構築を試みた。

【方法および結果】

ヒト甘味受容体細胞外ドメインをマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現させたところ、SDS-PAGE 電気泳動により発現が確認された。次に TEV プロテアーゼ処理により融合タンパク質の切断を行ったが、反応温度や反応時間を変えても切断できなかった。MBP と hT1R ATD のフォールディングによって TEV protease 認識部位が埋まっている可能性が考えられたため、MBP と TEV プロテアーゼ認識部位の間に新たに 18 アミノ酸残基を導入し発現させ、融合タンパク質の切断が行われるかを検討した。

B13 亜鉛要求型および基質特異性拡張型β-ラクタマーゼの結晶構造解析

○古山雄光¹, 小栗拓馬², 石井良和³, 奥野貴士², 大谷典正², 井深章子²
(¹山形大学大学院理工学研究科, ²山形大学理学部, ³東邦大学医学部)

【目的】細菌は主としてβ-ラクタマーゼを生産することでβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性を獲得する。本研究では、現在臨床で使用されている第三世代セフェムやカルバペネム系薬剤に対して分解活性を有する複数のβ-ラクタマーゼについて結晶構造解析を目的に大腸菌での発現と精製を行った。

【方法・結果】カルバペネム系を含むほぼすべてのβ-ラクタム剤を分解する亜鉛要求型β-ラクタマーゼの IMP-18 は大腸菌を宿主として発現させた。培養を行って培地を回収、硫酸沈殿を行い80%硫酸分画により沈殿を回収した。透析による脱塩後、TOYOPEARL CM-650S 陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製した。得られた精製サンプルを限外ろ過で濃縮したところ沈殿を生じた。この濃縮サンプルを SDS-PAGE にかけてところ、目的酵素に由来するバンドがスミアになっていた。本酵素は亜鉛要求型であるので、亜鉛イオンをバッファーに添加したところ沈殿は形成されなくなった。これより本酵素の精製には亜鉛添加が不可欠であることが示唆された。

カルバペネム系をも分解する活性を獲得したオキサシリナーゼ OXA-23 についても、発現・精製条件の検討を進めている。

B14 麹菌の AmyR と MaIR の細胞内局在と制御下遺伝子の発現解析

○鈴木空太、田中瑞己、新谷尚弘、五味勝也
(東北大学 農学研究科 生物産業創成科学専攻)

【目的】麹菌のデンプン分解酵素生産にはアミラーゼ系遺伝子群を直接制御する転写因子 AmyR とマルトース取り込み系を制御する転写因子 MaIR の2種の転写因子が関与していることが明らかとなっている。A. nidulans においては AmyR が活性化と協調的に核移行することが報告されている(1)。麹菌において MaIR は AmyR に先行して活性化されると予想されるが、その活性化機構は明らかとなっていない。本研究では各種炭素源培養時における AmyR、MaIR 制御下遺伝子の発現解析、および細胞内局在解析を行うことで、AmyR、MaIR の活性化機構の解明を目指した。

【方法】AmyR や MaIR に制御される遺伝子はグルコースによるカーボンカタボライトリプレッションを受けることから、カーボンカタボライトリプレッションに関与する転写因子 *creA* 破壊株を用いてノーザン解析を行い、AmyR、MaIR 制御下遺伝子の挙動を調べた。また AmyR、MaIR の細胞内局在解析を行うため、それぞれの N 末端側に sGFP を連結した融合タンパク質をそれぞれ菌体内で発現させ、蛍光顕微鏡を用いて細胞内局在解析を行った。

【結果】*creA* 破壊株のノーザン解析の結果、AmyR 制御下の遺伝子はグルコースによっても発現が誘導されたのに対し、MaIR 制御下の遺伝子は発現が誘導されなかった。また sGFP-MaIR の細胞内局在解析を行った結果、sGFP-MaIR は調べた全ての炭素源培養時において核局在していた。現在、sGFP-AmyR についても各種炭素源培養時における細胞内局在解析を進めている。

本研究は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた。

1) Murakoshi *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 1629-1635 (2012)

B15 麹菌のエノラーゼ遺伝子における選択的転写開始に関与する配列の探索

○ 田路洋紀、高間充、新谷尚弘、五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

【目的】 麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の EST 解析ならびにゲノム解析の結果、解糖系の重要な酵素であるエノラーゼ遺伝子 (*enoA*) において、5' 非翻訳領域に 440bp もの長いイントロンの存在が予想されるとともに、培養条件により異なる転写開始点が生じている可能性が見出された。さらなる解析の結果、培養時の糖新生と解糖に関わる炭素源の違いにより、上流と下流からの転写開始点を使い分けており、それらは約 500bp も離れていることが分かった。また、下流からの転写開始点は上流から転写された mRNA のイントロン内に存在することも明らかとなった。糖代謝という生物の基幹代謝経路における酵素遺伝子において、このような現象は初めて見出されたものであるが、その機構や生理的意義は不明である。本研究ではこれらの解明に向けて、転写開始に関わる配列や転写因子の同定を目指している。

【方法・結果】 *enoA* 遺伝子のプロモーターを含む上流領域を約 100bp 単位で欠失させたものに、大腸菌由来の β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を連結させた deletion series を作製し、レポーターアッセイを行った。また、転写に重要であると推定される配列に部位特異的変異を導入したものについても同様の解析を行った。その結果、deletion series 間において著しい活性の変化が認められた領域が複数個所存在したことから、この領域内に転写因子が結合するような選択的転写開始に重要な配列が存在する可能性が示唆された。さらに、イントロンならびにそのスプライシング配列の変異におけるレポーターアッセイの結果についても報告する。

B16 出芽酵母におけるリン酸代謝とオートファジーの関連性

○ 横田浩人、五味勝也、新谷尚弘（東北大・院農・生物産業創成科学）

【目的】 オートファジーとは、真核生物において細胞質成分をオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体に取り囲み、リソソーム・液胞へ輸送して分解する機構であり、栄養飢餓などのストレス条件に応答して誘導されることが知られている。出芽酵母において顕著に誘導される窒素飢餓に比べて、リン酸飢餓で誘導されるオートファジーに関する知見は少ない。出芽酵母の液胞内には多量のリン酸がポリリン酸として貯蔵されており、リン酸飢餓時にリン酸源として機能することが考えられた。そこで、出芽酵母のリン酸代謝とリン酸飢餓誘導性オートファジーの関連性について解析を行った。

【方法】 オートファジーの活性を二種類のマーカータンパク質を用いて測定した。一つはオートファゴソーム形成に関与し、自身もオートファゴソームに取り込まれる Atg8 の N 末端に GFP タグを融合した GFP-Atg8、もう一つはプラスミドのマルチクローニングサイト由来のペプチドが融合した CFP(CFP*)である。両者ともオートファジー依存的に液胞へ輸送され、液胞内プロテアーゼによる分解を受けるが、Atg8・ペプチド部分が分解されるのに対してプロテアーゼ耐性な GFP・CFP 部分は液胞内に蓄積する。この蓄積をウェスタンブロット法によって検出してオートファジー活性の指標とし、リン酸飢餓誘導性オートファジーの解析を行った。

【結果】 リン酸飢餓誘導性オートファジーは窒素飢餓誘導性オートファジーと比較してその誘導が遅延することが分かった。さらに、ポリリン酸の蓄積や液胞からのリン酸の排出に関与する遺伝子の破壊株では野生株に比べてリン酸飢餓誘導性オートファジーの誘導が早くなることが観察されたため、オートファジーとポリリン酸の代謝の間に関連性があることが示唆された。

B17 大腸菌のL-アラニン排出輸送体 YgaW のトポロジー解析

○伊原航平、堀 初弘、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕
(東北大学院農学研究科・動物微生物学分野)

【目的】当研究室では大腸菌において初めてとなるL-アラニン特異的な排出輸送体 YgaW を同定することに成功した。YgaW の詳細な機能解析を行うためには YgaW の膜トポロジーに関する情報が必須である。そこで本研究では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をレポーターとした遺伝子融合法を用いて、YgaW の膜トポロジー解析を行った。

【方法】YgaW は 149 アミノ酸残基からなる内膜タンパク質であり、膜トポロジー予測プログラム TMHMM による解析から YgaW は 4 回膜貫通領域を有していることが示唆された。そこで、GFP を結合させる YgaW の融合部位として、親水性のループを構成するアミノ酸残基を標的としたプライマーを設計し、PCR 法を用いて融合遺伝子を構築した。そして、この融合遺伝子を含んだ発現ベクターを大腸菌に導入した形質転換体の GFP の蛍光強度を測定して活性の評価を行った。

【結果】GFP は細胞質内でのみ正しい立体構造をとることができるため、融合したアミノ酸残基が細胞質内に局在する場合は活性をもつことができる。各融合タンパク質の GFP の活性を測定したところ C 末端のアラニン残基に融合したもので活性が認められたことから、YgaW の C 末端は細胞質内に局在していると考えられる。その他の残基に融合したものについては GFP の活性を確認することができなかった。今後は活性が見られなかったアミノ酸残基の局在を別のレポータータンパク質等を使って調べる必要がある。

B18 大腸菌細胞におけるリボソーム異常が引き起こす高浸透圧耐性

○樽澤武房¹、長谷要一²、武藤あきら^{1,2}、姫野俵太^{1,2}
(¹弘前大学大学院 農学生命科学研究科, ²岩手大学大学院連合農学研究科)

【背景】外界の浸透圧が高くなると細胞から水分子が流失する。この脱水作用に対して、細胞は K⁺イオンや浸透圧調整物質 (osmolyte) を取り込むことで水和状態に回復し、浸透圧変化に適応する。このような応答は発現しているタンパク質レベルの早期的な応答と、シグナル伝達を受けて活性化される転写レベルの応答に分けて理解されてきており、特に σ^S を介した転写応答にはグローバル転写制御物質である ppGpp が関連しているとされている。我々はバクテリアリボソームの小サブユニットの生合成因子のひとつである RsgA タンパク質について研究してきたが、この過程で *rsgA* 遺伝子欠損株 ($\Delta rsgA$) が高浸透圧条件に耐性を示すことを発見した。 $\Delta rsgA$ 株は通常の培養条件下では生育速度は野生型よりも著しく遅く、未成熟なリボソームを細胞内に蓄積する。これまで浸透圧応答は転写制御を中心にそのメカニズムが説明されてきたが、高浸透圧に対する耐性増強にリボソームが関与するというのは新たな知見であった。本研究ではリボソームと浸透圧応答の関連性を調査し、 $\Delta rsgA$ 株の浸透圧耐性のメカニズム解明を目指した。

【結果と考察】*rsgA* 欠損株で見出されていた高浸透圧耐性の表現型が、リボソーム 30S サブユニットの生合成因子に加え、50S サブユニットの生合成因子や非必須リボソームタンパク質など、リボソームに関与するさまざまな因子の遺伝子の欠損によってもたらされることが確認された。また、翻訳阻害剤の中に、野生型大腸菌の高浸透圧耐性を増強するものが数種類見つかった。これらの翻訳阻害剤はリボソームの生合成というよりは 70S リボソームの翻訳活性に影響していると考えられた。これらの結果から、翻訳機構に何らかの障害を受けることが高浸透圧ストレスに対する耐性増強を導いていることが示唆された。

一般講演

C会場

(302 講義室)

C01 *Clostrisium beijerinckii* HU-1 株の水素生産能力評価と関連遺伝子解析

○佐藤 圭、鈴木 由麻、佐藤 夕貴、園木 和典
(弘前大院 農生)

【目的】青森県は未利用バイオマスが多く存在し、日照時間が非常に短いという特徴を持つ地域である。またバイオマス種は地域で異なるので、それらを効率的に利用する微生物種がその地域に存在すると想定される。そこで本研究は、地域の未利用バイオマスを原料とした水素発酵法を検討するため、青森県土壌から新たに単離した微生物の水素生産能力と関連遺伝子解析を行った。

【結果と考察】農業残渣から単離した HU-1 株は、様々な栄養条件下で良好に生育ができ、至適 pH6 と比較的低い条件下でも標準株より高い水素発酵能力を示したが、水素生産に寄与しない乳酸を生成する特徴を示した。Lactate dehydrogenase (Ldh) をコードする *ldh* 遺伝子の発現を抑制することで水素収率の向上が期待できるが、乳酸生成を抑制すると細胞内の酸化還元バランスが崩れる事が想定されるので、*ldh* 遺伝子の発現を抑制すると同時にヒドロゲナーゼによる NADH 酸化反応を強化する必要がある。そこで、HU-1 株に複数存在する *ldh* とヒドロゲナーゼの遺伝子を対象に qRT-PCR を行い、水素生産向上のための育種を考察した。その結果、乳酸生成の際に発現が確認された L-LDH をコードする Cbei4072 と Cbei4903 のホモログ遺伝子発現を抑制し、[Fe-Fe]ヒドロゲナーゼをコードする Cbei0327 と Cbei1773 のホモログ遺伝子発現を強化する事で、HU-1 株の水素収率が向上する事が示唆された。

C02 ブタノール及び乳酸合成の抑制によるりんご搾り粕を原料としたバイオ水素生産の効率化

○鈴木由麻¹、佐藤 圭¹、大山葉子²、園木和典^{1,2}
(弘前大院農生・応生工、²弘前大農生・分子生命)

【目的】青森県は日照時間が少なく、また糖質を多く含む未利用バイオマスが大量に排出される特徴を有する地域であるため、光合成に依存したエネルギー生産は適さず、糖質を原料とした暗発酵プロセスの適応が望ましい。我々はこれまでに、青森県で毎年排出されるりんご搾り粕を原料として水素を生産可能な *Clostridium beijerinckii* HU-1 株について解析を行ってきた。本報告では、HU-1 株によるりんご搾り粕を原料としたバイオ水素生産の効率化についての検討結果を報告する。

【結果】HU-1 株を用いた水素発酵 (1 L 培養) の至適条件下で、糖質としてグルコースを用いた fed-batch 培養を行った結果、収率は 1.3 mol-H₂/ mol-glc であった。NADH 酸化を伴うブタノール及び乳酸がそれぞれ 0.21 mol/ mol-glc、0.16 mol/ mol-glc の収率で生産されたため、まずブタノール合成の抑制を検討した。アシルアルコール耐性変異株の中から、試験管培養において顕著にブタノール合成が抑制された株を 20 株以上単離した。これらの変異株の水素生産能力の評価としてジャーファーメンター培養を行った結果、収率は 1.5 mol-H₂/ mol-glc に増加した。一方、HU-1 株を用いてりんご搾り粕を原料とした batch 培養を行った結果、乳酸がほとんど生成されないことが見出された。したがって、ブタノール合成が抑制された変異株及び乳酸を合成しないりんご搾り粕の使用により、さらなる水素生産の向上が期待できる。

C03 担子菌ラッカーゼを発現したイネの細胞壁組成評価

○ 古川徹¹、古川佳世子²、濁川睦²、小口太一³、飯村洋介⁴、梶田真也⁵、伊藤幸博²、園木和典¹

(¹弘前大院農生、²東北大院農、³筑波大 GRC、⁴産総研つくばセ、⁵東農工大院 BASE)

【目的】リグニンはりグノセルロース中のセルロースの単離を困難にするとともに、セルラーゼを吸着して酵素の不活性化を引き起こすため、リグノセルロースの糖化を阻害する要因の一つである。そこで本研究ではリグニン含量の少ないイネの作出を目指し、担子菌由来のリグニン分解酵素であるラッカーゼ (CvL3) のイネ体内における発現が及ぼす植物体への効果を評価した。

【結果】イネにおけるトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターを用いた CvL3 の発現は植物体の枯死を引き起こした。これは CvL3 がイネ体内で全身一過性発現したことでなんらかの構造異常をもたらした植物体の維持が困難になったためと推測した。そこで CvL3 を細胞壁中のセルロース近傍に局在させるために、CvL3 の C 末端にセルロース結合ドメイン (CBD) を連結した融合タンパク (CvL3-CBD) を同プロモーター制御下で発現させたところ、枯死せず生育した個体を得られた。CvL3 活性が検出された CvL3-CBD 形質転換イネについて解析を進めたところ、コントロール系統と比較してリグニン含量が有意に減少した個体も得られた。また、形質転換体はコントロール系統と比較してマトリックス多糖含量およびセルラーゼによる糖化性が増加していた。本研究の一部は形質転換植物研究拠点事業、弘前大学若手研究者支援事業の支援を受けて実施した。

C04 キチチタケ由来 IPP-isomerase の活性とゴム分子の鎖延長制御

○川田 裕¹、井深 章子²、大谷 典正² (1 山形大院理工・2 山形大理)

【序論】 *Hevea brasiliensis* (パラゴムノキ) から得られる天然ゴムは、巨大分子であるため構造解析、生合成機構の解明が困難である。しかし、*Lactarius* (チチタケ属) キノコから得られるゴムは分子量数万程度と低分子量体であるため、天然ゴムの解析モデルとして有用であり、キノコゴム生合成の解明が天然ゴム生合成の解明につながると期待される。キノコゴム生合成は IPP (イソペンテニルニリン酸) が重合のモノマーに、その異性体である DMAPP (ジメチルアリルニリン酸) が開始基質になることがわかっている。そして、これら二つの異性体の相互変換を触媒する酵素が IPP isomerase である。キチチタケの菌糸体と子実体とで生合成されるゴム鎖長は異なることが分かっている。そこで、IPS がゴム鎖長決定機構に関与していると考え、分化の前後でゴムの分子量の異なるキチチタケの IPS を Real time PCR を用いて定量実験を行った。

【実験・結果】 キチチタケ子実体は新潟県神林村にて採取し、キチチタケ菌糸体は NBRC より購入後マツタケ培地で培養した。これらの試料から Total RNA を抽出して逆転写反応により cDNA を合成した。合成した 2 種類の cDNA は同じ濃度になるよう調整を行った。次に、特異的増幅の確認を行い、絶対定量法により遺伝子の定量を行った。検量線は分子数を計算しやすいように、プラスミドに遺伝子をサブクローニングしたものを用いた。得られたデータを解析し分化の前後による IPP isomerase の mRNA 発現量比較を行ったところ IPP isomerase の mRNA の発現量は菌糸体の子実体の 2.15×10^3 倍と明確な差が見られた。ゴム鎖長はモノマーと開始基質の比で決まりモノマーが多ければ長鎖、開始基質が多ければ短鎖のゴムが合成される。この結果から IPP isomerase がゴム合成の鎖延長制御へ関与していると考えられる。

C05 灰色カビ病菌を利用したケトン化合物の還元反応

○ 木立卓巳¹⁾、長岐正彦³⁾、井深章子²⁾、大谷典正²⁾
(山形大院・理工¹⁾、山形大・理²⁾、弘前大・理工³⁾)

【目的】 化学反応への生体触媒の利用は、常温・常圧、中性付近 pH の水性溶媒の温和な条件下で反応が進行するので、熱・圧力や有機溶媒不要など、環境への負荷が少ない理想的な化学合成プロセスである。これまでも生体触媒を利用した加水分解、酸化、還元、プレニル化や配糖化等に利用が検討されてきた。特に、プロキラルな基質を使用する場合は、光学活性のある物質が生成される場合が多い。しかし、生体触媒を利用した反応は、大量培養の管理に手間がかかるため工業的な応用までは至っていない。本研究では、植物には多大な被害を与えるが人畜には無害なため、取り扱いが容易な灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) を生体触媒として利用した化学反応の基本となる還元反応を試みた。

【方法】 *B. cinerea* は PS (Potato Sucrose) 寒天培地で培養した後に、PS 液体培地に移してから DMSO に溶かした基質を添加した。基質には 9-fluorenone、9-fluorenone を使用した。基質添加後、時間ごとに培養液 1 mL を採取し、ジエチルエーテルで抽出を行った。HPLC、GC-MS、NMR を併用して解析し、経時変化を取った。

【結果と考察】 HPLC で測定した時、基質として 9-fluorenone を添加した場合は、初め 8.4 min 付近に原料のピークが確認できた。しかし、基質添加後 5 時間目では原料のピークがほぼ消え、16.5 min 付近に新たなピークが現れた。この部分を分取し GC-MS と NMR で構造解析を行った結果、9-fluorenone であると特定できた。以上のことから、*B. cinerea* 由来の芳香族ケトンを原料としたそのアルコール体への還元反応酵素の活性が確認できた。

C06 レニン及びアンギオテンシン変換酵素の新規阻害物質探索系の構築と応用

○ 高橋砂織¹⁾、後藤 猛²⁾
(¹⁾秋田県総合食品研究センター、²⁾秋田大学・院・工学資源)

【目的】 レニン及びアンギオテンシン変換酵素 (ACE) は、レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構において重要な役割を担っている。これら酵素の活性測定には RIA、ELISA や合成ペプチドと蛍光試薬を組み合わせた測定方法など多くの活性測定法が考案されている。しかしながら、いずれの方法においても複数の反応操作が必要で簡便迅速な活性測定方法の開発が望まれていた。本研究においては、レニン及び ACE の蛍光消光基質を用いた簡便迅速な活性測定方法の開発とその応用について報告する。

【方法】 組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系により発現し、ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。ウサギ肺由来 ACE 及び組換え型ヒト ACE は Sigma 社製及び R&D Systems 社製を用いた。N 末端に *N*-メチルアントラニル酸 (Nma) をまた C 末端側にリシンの ϵ アミノ基にジニトロフェニル基 (Lys (Dnp)) を導入した各種蛍光消光基質を合成した。

【結果】 これまでに、ブタレニン用蛍光消光基質として Nma-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Lys (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ を開発している。これを基礎にヒトレニン用蛍光消光基質として Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ を開発した。また、組換え型レニンと上記合成基質を用いた迅速レニン阻害物質探索系を構築し、各種食材よりレニン阻害物質を探索するとともに構造解析を行った。一方、ACE の蛍光消光基質として Nma-His-Phe-Pro-Lys (Dnp)-Pro や Nma-Phe-His-Lys (Dnp) などを開発した。

C07 オオウバユリ (*Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii*) 由来の酵母 Ca^{2+} シグナル阻害物質の単離精製と構造、並びに生物活性

○阿部友美¹、越野広雪²、小川優子³、木村賢一^{1,3}
(¹岩手大院・農、²理研・基幹研、³岩手大・農)

【目的】遺伝子変異酵母を用いた Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質の探索の過程で、オオウバユリ (*Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii*) のメタノール可溶性画分に活性を見出した。そこで本研究では、オオウバユリの果実由来の酵母 Ca^{2+} シグナル阻害物質の単離精製と構造、並びに生物活性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 Ca^{2+} 超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株 (*zds1Δ erg3Δ pdr1/3Δ* 株) の、高濃度の Ca^{2+} 存在下における増殖抑制回復活性 (生育円活性) を用いたスクリーニングにより、オオウバユリの果実のメタノール可溶性画分に、400 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で生育円活性が認められた。そこで、ブタノール抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル=5:1)、逆相 HPLC (90%メタノール+0.1%酢酸) により単離精製を行い、28.3 g の果実画分から、17.5 mg の白色粉末状の活性物質を得た。単離された活性物質は、高分解能 EI-MS で分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ を示したが、各種 NMR による分析では 8(14), 15-isopimaradien-18-oic acid と 7, 15-isopimaradien-18-oic acid の 3:1 の混合物であることが示唆された。今回、オオウバユリに初めて両化合物が含まれていること、並びにそれらに酵母 Ca^{2+} シグナル伝達阻害活性があることが明らかとなった。

C08 PP2C 活性化物質 pisiferdiol の酵母 Ca^{2+} シグナル伝達に対する作用機構の解析

○吉田 潤¹、油井信弘²、小林 幹³、水沼正樹⁴、大西素子⁵、木村賢一^{2,3}
(¹岩手医大・共通教育セ、²岩手大院・連合農、³岩手大・農、⁴広島大院・先端物質、⁵中部大・応生)

【目的】ヒノキ科植物サワラから得られた PP2C 活性化物質 pisiferdiol¹⁾ は、 Ca^{2+} 感受性の遺伝子変異酵母株 (*zds1Δ erg3Δ pdr1/3Δ*) に対して生育円活性を示す。そこで PP2C と Ca^{2+} シグナル伝達との関連を解析するために、pisiferdiol の作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】Pisiferdiol の Ptc1p (酵母の PP2C ホモログ) に対する作用を、野生酵母株 (WT) と *ptc1Δ* 株の Li 感受性試験により検討した。また、pisiferdiol のカルシニューリン (CN) に対する影響を、0.3 M CaCl_2 存在下における *pmc1Δ* 株に対する生育円活性と、0.1 M CaCl_2 存在下における *CDRE::lacZ* レポーター遺伝子発現の阻害活性により検討した。

【結果と考察】Pisiferdiol は、WT に対して Li 存在下 (0.16 M) において Li 非存在下より低濃度で阻止円を示すのに対し (6.25 $\mu\text{g}/\text{spot}$)、*ptc1Δ* 株では Li 存在下 (0.05 M) と非存在下において同濃度で阻止円を示した (25 $\mu\text{g}/\text{spot}$)。Pisiferdiol は、 Ca^{2+} 存在下の *pmc1Δ* 株に対して 25 $\mu\text{g}/\text{spot}$ から濃度依存的な生育円を示し、62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で *CDRE::lacZ* レポーター遺伝子の発現を 87%阻害した。これまでの結果と合わせると、pisiferdiol は遺伝子変異酵母株において Ptc1p の活性化を介して CN Cnb1p の発現を抑制する結果、Cdc28p を活性化する可能性が示唆された。

¹⁾ N. Aburai, et al., *Phytomedicine*, 17, 782-788 (2010)

C09 軟骨魚類由来プロテオグリカンの新規抽出法の検討

○鈴木 潤、北山 昂、児島 薫、吉田 孝
(弘前大・農学生命科学部)

【目的】プロテオグリカン (PG) は、複数の糖鎖がコアタンパク質に共有結合した複合糖タンパク質であり、その糖鎖はグリコサミノグリカンと呼ばれる。PG は生体内に広く分布し、軟骨組織では細胞外マトリックス構成成分の一つとして、コラーゲンやヒアルロン酸と複合体を形成し軟骨の弾力性、水分保持の役割を担っている。

PG の抽出法としてはグアニジン塩酸塩を用いた報告が多く見られる。しかし、グアニジン塩酸塩は強力なタンパク質変性剤であり、更に PG 以外の夾雑物も多く抽出される為に精製が難しくなるという欠点がある。そこで本研究では、PG のコアタンパク質を変性させる事なく、かつ効果的に PG を精製できる抽出法について検討を行った。

【方法】軟骨魚類であるエイ、特に東北地方近海で漁獲されるガンギエイの軟骨を対象とした。抽出には 4%酢酸を使用し、2 4 時間毎に抽出液を交換した。抽出液からアルコール沈殿により PG を回収し、グリコサミノグリカン中のウロン酸量とタンパク質量を測定した。又、PG としての分子量や糖鎖構造を調べた。

【結果と考察】ガンギエイ軟骨を酢酸で複数回抽出する事で夾雑物の少ない PG 画分が得られ、その後の PG の精製操作を簡略化することが可能となった。今回報告する方法は、今後の PG 研究に十分応用できると考えられる。

C10 LC-MS/MS による動脈硬化症者血中 PCOOH の精密定量分析

○ 加藤俊治¹、仲川清隆¹、浅井明²、及川真一²、宮澤陽夫¹
(¹東北大院・農・機能分子解析学、²日本医科大・内分泌代謝)

【目的】当研究室では、ヒト血中の過酸化脂質 (ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド、PCOOH) を高感度に分析できる CL-HPLC 法や LC-MS/MS 法を開発し、膜リン脂質の過酸化と心血管疾患の関係解明を進めてきている。動脈硬化症では、心臓の左前下行枝 (狭窄の頻度が最も高い冠動脈) に狭窄ができはじめると、血中の PCOOH 濃度が高まることから、動脈硬化の初期病変形成に関与する PCOOH の重要性が新たに解明されつつある。しかし、LC-MS/MS 法による PCOOH 定量は幾つかの要因に左右される。本研究では、血漿 PCOOH の定量性に深く関わる要因として、1. 標品純度、2. PCOOH に特異的な MS/MS MRM 検出、3. 血漿からの PCOOH 回収率、4. MS/MS イオンサプレッション回避による定量性の担保について検討し、LC-MS/MS によるヒト血漿 PCOOH の精密定量を可能にした。【方法と結果】1. 2-メトキシプロペンを用いて、2 位にリノール酸ヒドロペルオキシドを有する高純度 PCOOH (>95%) を調製し、PCOOH の精密定量の標品に使用した。2. MS/MS では親イオンに新しく PCOOH の Na 付加体イオンを用いた。TOF による精密質量解析により、この Na 付加体はヒドロペルオキシドの位置に特異的なフラグメントを引き起こすことがわかった。また MRM に合わせた新しい HPLC 条件を構築し、安定した PCOOH の定量を可能とした。3. PCOOH の添加回収試験では、抽出過程に PCOOH の分解がみられたので、その分解を回避できる抽出法を検討し、高い回収率 (87.1%) が得られるようにした。4. これらの分析・抽出法では MS のイオンサプレッションは完全に回避できており、血中 PCOOH をより正確に定量することが可能となった。種々の臨床サンプルの分析を行ったところ、健常者に比べ、動脈硬化性疾患発症リスクの高い患者の血中 PCOOH は高値であることを確認した。

C11 Anti-cancer effect of γ -T3 via proto-oncogene Hras-1 down regulation

○Gregor Burdeos, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa

(Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

[Introduction] Vitamin E is the generic name for tocopherol (Toc) and tocotrienol (T3), which have saturated and unsaturated side chains, respectively. Previous reports showed the potential anti-cancer effect of T3 both in vitro and in vivo by inducing cell cycle arrest, down-regulation of c-Myc, activation of p53, and caspase-8. But however, the mechanism behind in this biological activity is still needs to be verified due to the complexity of the different processes involve in cancer pathways. Recently, we found new mechanisms of the anti cancer effect of T3 (especially γ -T3) by regulation of proto-oncogene Hras-1 in mouse hepatocellular carcinoma hepa 1-6 cells.

[Methods] Mouse hepatocellular carcinoma hepa 1-6 cells were incubated in experimental medium containing 0-50 μ M γ -T3 in 24 h. After 24 h of incubation, cellular proliferation was measured. Gene expression of Hras-1 in different time intervals (6, 12, and 24 hours) was measured. Moreover, Western blotting analysis for Hras-1 was also investigated.

[Results] γ -T3 treatment to hepa 1-6 cells showed significant cytotoxic effect at higher dose (20-50 μ M γ -T3 concentrations). RT-PCR analysis showed significant down regulation of Hras-1 gene expression level especially at 6 and 12 hours incubation time. Furthermore, Western blotting analysis revealed significant down regulation of Hras -1 intracellular protein. Therefore, the current findings demonstrated the possibility of Hras-1 gene as the novel target for the anti-cancer effect of T3.

C12 食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養

○小野瀬晋司¹, 仲川清隆¹, 池田亮一², 木村俊之³, 山岸賢治³, 宮澤陽夫¹

(¹東北大院農, ²旭松食品, ³東北農研セ)

【目的】アザ糖 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) は α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) を示し、糖尿病の予防と治療への活用が期待されている。ある種の放線菌や枯草菌の培養液には α -GI 活性が認められ、その主体が DNJ によると推定されている。すなわち、微生物、とくに醗酵食品由来の枯草菌等に DNJ を生産させることができれば、新たな DNJ 供給源になる可能性がある。本研究では、①DNJ 生産が推定されている *Bacillus subtilis* DSM704 の菌体と培養液を LC-MS/MS で調べ、DNJ 生産を確認しようとした。次いで、②食展開できる枯草菌等に DNJ を高生産できるのか、③培養条件で生産性を変えられるのか、これらを明らかにしようとした。

【方法と結果】①DSM704 の菌体と培養液を分析し、DNJ 生産を LC-MS/MS で確認した。さらに、DNJ と同程度に、DNJ 前駆体 (2-アミノ-2-デオキシ-D-マンニトール, ADM) の存在を見出した。次に、②醗酵食品由来の菌株 (約 750 株) から、最も α -GI 活性が高かった 2 種の菌株の 16SrRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、それらが枯草菌とその類縁菌 (*Bacillus subtilis* B4, *Bacillus amyloliquefaciens* AS385) であることがわかった。これらが確かに DNJ を高生産することを確認した。③B4 と AS385、比較として DSM704 を種々の条件で培養した。DSM704 に比べ、B4 と AS385 の DNJ 生産量は多く、培地にソルビトールを加え培養するとさらに生産することがわかった。DNJ の最大生産量は約 0.5 g/L 培地であり、培養液には同程度の量の ADM が含まれていた。ADM から DNJ へ変換することで、極めて多量の DNJ を生産でき、十分な DNJ 供給源となると考えられる。そこで、現在、DNJ 生合成に関わる遺伝子発現をリアルタイム PCR で調べるとともに、全ゲノムが解析されている *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を用いた評価を進めている。

C13 クロモジ精油の抗炎症作用 ○山崎真央、片方陽太郎、前多隼人（弘前大・農学生命科学）

【目的】クロモジ (*Lindera umbellata*) は日本原産のクスノキ科の樹木で、その精油は化粧品や食品の香料に使用されている。主な成分は Linalool、Geranyl acetate で、抗白血病や抗真菌、抗バクテリア活性を有することが報告されている。本研究ではマウス由来マクロファージ様 (RAW264.7) 細胞を用いてクロモジ精油の抗炎症効果とそのメカニズムについて検討した。

【方法】RAW264.7 細胞を前培養の後、LPS (Lipopolysaccharide) 0.1 $\mu\text{g/ml}$ とクロモジ精油、Linalool, Geranyl acetate をそれぞれ 25、50 $\mu\text{g/ml}$ ずつ添加した。24 時間後に培地および細胞を回収した。炎症の指標となる培地の NO_2^- 濃度を Griess 法で測定した。IL-6、TNF- α 、iNOS、COX-2 の mRNA 発現量の変化を real-time RT-PCR 法により測定した。細胞培養培地中の IL-6 と TNF- α の濃度は ELISA 法により測定した。また細胞内でのタンパク質の発現とリン酸化の確認は Western Blot 法で評価した。

【結果】クロモジ精油を添加した細胞では、LPS 刺激によって誘導された NO_2^- 濃度の上昇が添加濃度に依存して抑制された。また、IL-6、iNOS、COX-2 mRNA 発現量の低下が確認された。さらに、培地内のサイトカイン濃度も添加濃度に依存して低下した。また細胞内に発現した COX-2、iNOS タンパク質発現の低下および NF- κB のリン酸化の低下が確認された。これらのことからクロモジ精油による抗炎症作用が示された。

C14 パプリカ色素成分の脂質代謝調節作用および肥満における抗炎症作用 ○中村望、前多隼人（弘前大・農学生命科学）

【目的】パプリカ (*Capsicum annuum L.*) 色素中に含まれる赤色のカロテノイドであるカプサンチン、カプソルビンは、分子中に酸素を持つキサントフィルに分類され、血中の HDL-コレステロールを上昇させるなど生活習慣病の予防効果が報告されている。本研究では、培養細胞を用い、カプサンチン、カプソルビンの脂肪細胞での脂質代謝調節、肥満による炎症状態の改善作用について検討した。

【方法】カプサンチン、カプソルビンを 5、10 μM の濃度でマウス由来 3T3-L1 脂肪細胞に添加し、脂肪細胞の分化に与える効果を glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性にて評価し、脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現量の変化を real time RT-PCR 法にて評価した。3T3-L1 脂肪細胞培養上清で刺激したマウス由来マクロファージ様細胞 (RAW264.7) にカプサンチン、カプソルビンを添加し、炎症に関わる遺伝子の発現量の変化を real time RT-PCR 法にて評価した。

【結果】カプソルビン添加群ではカプサンチン添加群よりも高い脂肪細胞の分化促進効果を示し、さらにアディポネクチン mRNA 発現量が増加した。また、炎症状態の RAW264.7 細胞にカプサンチン、カプソルビンを添加することによって、炎症に関わる COX2、iNOS の mRNA の発現量が抑制された。これらの結果から、パプリカに含まれるカロテノイドの肥満による疾患の予防・改善作用が示唆された。

C15

魚油とフコキサンチンの併用による食事性肥満マウスに対する抗肥満作用

○菅野翔伍、本間公博、前多隼人（弘前大学・農学生命・生物資源学科）

【目的】フコキサンチン(Fx)はワカメなどの褐藻類に含まれるカロテノイドの一種である。Fxは白色脂肪組織にUCP1(uncoupling protein 1)を発現させ、脂質代謝を亢進する作用を示すことが報告されている。また糖尿病肥満モデルマウスを用いた実験で、魚油とともに投与することでその効果が高まることも報告されている。本研究では正常マウス(C57BL/6J)に対し、高脂肪食とともにFxと魚油を併用投与した場合の作用について検討した。

【方法】4週齢のC57BL/6J雄マウスを30%の脂質を含む高脂肪食で4週間、実験飼育をおこなった。実験群はコントロール群(ラード23%、大豆油7%)、魚油群(ラード23%、大豆油3.5%、魚油3.5%)、魚油+Fx群(ラード23%、大豆油3.4%、魚油3.5%、Fx0.1%)の3群でおこなった。解剖の後、脂肪組織重量、血漿脂質成分の測定をおこなった。また熱産生に関するUCP1の白色脂肪組織(WAT)、褐色脂肪組織(BAT)でのmRNAとタンパク質の発現量についてReal-time RT-PCR法、Western blot法にて測定した。

【結果】実験飼育期間中に3群間の体重の変化、及び摂食量に有意な差は認められなかった。一方、魚油+Fx群においてコントロール群と比較し、WAT重量が有意に減少した。また、WAT、BATにおけるUCP1のmRNAとタンパク質の発現の上昇傾向が認められた。更に血漿中のトリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、LDLコレステロールの低下も認められた。これらのことからFxと魚油の併用投与は食事性肥満誘導マウスに対して、脂質代謝亢進による脂肪組織重量減少効果にあわせて、血漿脂質成分の改善効果を示すことが明らかとなった。

C16

ラット肝臓における脂肪酸合成酵素遺伝子の転写後調節機構の解析

○我妻紀代恵、白川 仁、駒井三千夫（東北大・院農・栄養）

【目的】脂肪酸合成酵素遺伝子（以下、FASN）は、NADPH 依存的にパルミチン酸を合成する酵素である。肝臓におけるFASN mRNA量に着目すると、摂食後急激に増加し、その後短時間で低下する。mRNA量は、転写と分解の速度で決定するが、FASN mRNAの急激な低下の機構は十分に明らかではない。本研究では、ラットを用いて摂食後に変化する肝臓FASN mRNAについて、その分解に焦点を置き解析を行った。

【方法】24時間絶食後させたSD系雄性ラット（6週齢）に、高炭水化物無脂肪食を2時間摂食させ、経時的に解剖した。肝臓由来トータルRNAを調製し、FASN mRNA量を定量RT-PCR法で測定した。さらに、プライマー伸長法によりラットFASN mRNAの分解とその切断部位を推定した。またRNA分解に関わるmiRNAの相対発現量を定量RT-PCR法で測定した。

【結果】定量RT-PCRの結果から、FASN mRNA量は摂食時では絶食時の約3倍、給餌後6時間で約6倍に増加し、10時間以降では絶食時と同値となった。プライマー伸長法により得たcDNAを鋳型として、FASN mRNAの翻訳領域(ORF)、3'-UTRをPCRにより測定した。その結果、絶食・摂食時のPCR産物量は各所で差がないが、給餌後6時間では、3'-UTRに比べORFで測定したPCR産物量が1/3に減少し、3'-UTRの特定領域で、RNAが切断されることが示唆された。次にFASN mRNA分解に関わると推定されるmiRNAの発現量を測定すると、給餌後増加が観察された。以上から、摂食後に起こるFASN mRNA減少の一部は、miRNAにより誘因される可能性が示唆された。

C17 時代とともに変化した日本食がマウスの内臓脂肪蓄積に与える影響

○北野泰奈¹、本間太郎¹、治部祐里²、川上祐生²、都築 毅¹、池田郁男¹
(¹東北大・院・農、²岡山県大・保福・栄養)

【目的】日本人の平均寿命は着実に延び、現在世界有数の長寿国となった。この要因には、医学の進歩や生活水準の向上の他に、独自の食生活の影響が非常に大きいと考えられている。そのため、日本食は世界中から健康食として注目されている。しかし、日本食に特徴的な食品成分の研究は勢力的に行われているが、日本食の素材や調理法を含めた特徴に着目し、健康有益性を科学的に証明した研究はほとんどない。また、日本食は、時代とともに変化し、日本ではメタボリックシンドロームの罹患率が年々増加している。そのため、現代の日本食が本当に健康に有益か疑わしい。よって本研究では、どの時代の日本食が健康維持に有益かを、マウスを用いて詳細に検討した。

【方法】管理栄養士の指導の下、国民健康・栄養調査に基づいて1960、1975、1990、2005年の食事献立を作成し、再現した。それらを凍結乾燥・粉碎したものを試験飼料とし、ICR mice (4wk、♂)に4週間自由摂食させた。試験期間終了後、屠殺し、各種分析に供した。

【結果】1975年の日本食を与えた群で白色脂肪重量が最も少なかった。一方、1990年、2005年の日本食を与えた群は白色脂肪重量が多かった。さらに1975年の日本食を与えた群は脂肪細胞のサイズが最も小さく、1990年の日本食を与えた群は最も大きかった。以上より、時代とともに変化してきた日本食において、1975年頃の日本食が内臓脂肪を蓄積しにくく、肥満になりにくいことが示唆された。

C18 抗 HIV レクチン・アクチノヒビンのペグ化誘導体の調製と諸性質

大林尚美¹、張 暁雪²、佐藤 陽¹、金 容必^{1,2}、前島雅美³、岩谷靖雅³、
杉浦 亙³、○田中晴雄^{1,2}(¹いわき明星大薬、²いわき明星大院理工、
³(独)国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター)

[目的]現在用いられている HIV/AIDS に対する多剤併用療法は、ウイルスの複製を抑制できるが細胞から細胞への感染阻止が非効率的で、患者体内からウイルスを除去できない一因であると考えられている(Sigal et al, Nature, 477, 95-98, 2011)。本研究では、gp120 の高マンノース型糖鎖に特異的に結合する放線菌由来の 114 アミノ酸からなる抗 HIV レクチンであるアクチノヒビン(AH)のポリエチレングリコール(PRG)修飾により、細胞から細胞への感染を効率的に阻止できる抗 HIV 薬の開発を目指す。

[方法] AH は、新属・新種の放線菌 *Longispora albida* の培養液から精製したものをを用いた。プロテアーゼに対する安定性は、SDS-PAGE により調べた。ペグ化には、片方又は両端にアルデヒド基を有する PEG をを用いた。生物活性は、組換え細胞を用いる合法体形成阻害活性及び抗ウイルス活性により評価した。

[結果及び考察] AH は、含水有機溶媒にも溶解して活性を保持している特異なタンパク質であり、各種プロテアーゼ及び血清処理でも分解されなかった。得られた 5kPEG-AH 及び 10kPEG-AH では、溶解性は改善されるが活性は低下した。一方、AH-5kPEG-AH は、AH の数倍の抗 HIV 活性を示し、各種のプロテアーゼに対しても安定であることから抗 HIV 薬としての開発が期待される。