

# 生物工学科 2014 年研究業績

## A. 研究発表

### 1. 論文

- (1) CcpA-mediated catabolite activation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon and its negation by either CodY- or TnrA-mediated negative regulation  
Yasutaro Fujita, Takenori Satomura, Shigeo Tojo, and Kazutake Hirooka  
*J. Bacteriol.*, **196**, 3793–3806 (2014)

The *Bacillus subtilis ilv-leu* operon functions in the biosynthesis of branched-chain amino acids. It undergoes catabolite activation involving a promoter-proximal *cre* which is mediated by the complex of CcpA and P-Ser-HPr. This activation of *ilv-leu* expression is negatively regulated through CodY binding to a high-affinity site in the promoter region under amino acid-rich growth conditions, and it is negatively regulated through TnrA binding to the TnrA box under nitrogen-limited growth conditions. The CcpA-mediated catabolite activation of *ilv-leu* required a helix face-dependent interaction of the complex of CcpA and P-Ser-HPr with RNA polymerase and needed a 19-nucleotide region upstream of *cre* for full activation. DNase I footprinting indicated that CodY binding to the high-affinity site competitively prevented the binding of the complex of CcpA and P-Ser-HPr to *cre*. This CodY binding not only negated catabolite activation but also likely inhibited transcription initiation from the *ilv-leu* promoter. The footprinting also indicated that TnrA and the complex of CcpA and P-Ser-HPr simultaneously bound to the TnrA box and the *cre* site, respectively, which are 112 nucleotides apart; TnrA binding to its box was likely to induce DNA bending. This implied that interaction of TnrA bound to its box with the complex of CcpA and P-Ser-HPr bound to *cre* might negate catabolite activation, but TnrA bound to its box did not inhibit transcription initiation from the *ilv-leu* promoter. Moreover, this negation of catabolite activation by TnrA required a 26-nucleotide region downstream of the TnrA box.

- (2) Structural characterization of a ligand-bound form of *Bacillus subtilis* FadR involved in the regulation of fatty acid degradation  
Masahiro Fujihashi, Taiga Nakatani, Kazutake Hirooka, Hiroshi Matsuoka,

Yasutaro Fujita, and Kunio Miki  
*Proteins*, **82**, 1301–1310 (2014)

*Bacillus subtilis* FadR (FadR(Bs)), a member of the TetR family of bacterial transcriptional regulators, represses five *fad* operons including 15 genes, most of which are involved in  $\beta$ -oxidation of fatty acids. FadR(Bs) binds to the five FadR(Bs) boxes in the promoter regions and the binding is specifically inhibited by long-chain (C14-C20) acyl-CoAs, causing derepression of the *fad* operons. To elucidate the structural mechanism of this regulator, we have determined the crystal structures of FadR(Bs) proteins prepared with and without stearyl(C18)-CoA. The crystal structure without adding any ligand molecules unexpectedly includes one small molecule, probably dodecyl(C12)-CoA derived from the *Escherichia coli* host, in its homodimeric structure. Also, we successfully obtained the structure of the ligand-bound form of the FadR(Bs) dimer by co-crystallization, in which two stearyl-CoA molecules are accommodated, with the binding mode being essentially equivalent to that of dodecyl-CoA. Although the acyl-chain-binding cavity of FadR(Bs) is mainly hydrophobic, a hydrophilic patch encompasses the C1-C10 carbons of the acyl chain. This accounts for the previous report that the DNA binding of FadR(Bs) is specifically inhibited by the long-chain acyl-CoAs but not by the shorter ones. Structural comparison of the ligand-bound and unliganded subunits of FadR(Bs) revealed three regions around residues 21-31, 61-76, and 106-119 that were substantially changed in response to the ligand binding, and particularly with respect to the movements of Leu108 and Arg109. Site-directed mutagenesis of these residues revealed that Arg109, but not Leu108, is a key residue for maintenance of the DNA-binding affinity of FadR(Bs).

- ( 3 ) A few decades of habitat fragmentation has reduced population genetic diversity: A case study of landscape genetics of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*  
Jun J. Sato, Tsukasa Kawakami, Yurina Tasaka, Masaya Tamenishi, and Yasunori Yamaguchi  
*Mammal Study*, **39**, 1-10 (2014)

The effects of a few decades of habitat fragmentation on the population genetic diversity of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*, in the forest region around Fukuyama University was assessed with approximate 300 bp nucleotide sequences of the

mitochondrial D-loop region. Two independently isolated internal populations within the campus showed a smaller number of haplotypes and lower haplotype and nucleotide diversity indices compared to those inhabiting a wide external forest area. Based on the *Hst* index, significant genetic differentiation was observed between geographically closely residing external and internal populations but not between distantly residing external populations, suggesting the presence of strong physical barriers between the external and internal populations. Fine-scale changes in the landscape configuration recorded in aerial photographs of Fukuyama University revealed plausible physical barriers and a correlation between isolation time and genetic diversity. The results suggest that the population genetic properties of forest dwelling mammals are sensitive to a few decades of short-term forest fragmentation created by artificial construction. Exploitation by humans should be conducted in harmony with wildlife ecology, such as by maintaining corridors, to achieve a wide habitat area for gene flow.

- (4) Molecular building blocks and their architecture in biologically/  
environmentally compatible soft matter chemical machinery  
Taro Toyota, Taisuke Banno, Sachiko Nitta, Masahiro Takinoue, Tomonori  
Nomoto, Yuno Natsume, Shuichi Matsumura, and Masanori Fujinami  
*J. Oleo Sci.*, **63**, 1085–1098 (2014)

This review briefly summarizes recent developments in the construction of biologically/environmentally compatible chemical machinery composed of soft matter. Since environmental and living systems are open systems, chemical machinery must continuously fulfill its functions not only through the influx and generation of molecules but also via the degradation and dissipation of molecules. If the degradation or dissipation of soft matter molecular building blocks and biomaterial molecules/polymers can be achieved, soft matter particles composed of them can be used to realize chemical machinery such as selfpropelled droplets, drug delivery carriers, tissue regeneration scaffolds, protocell models, cell-/tissuemarkers, and molecular computing systems.

- (5) Application of lipid extracts from *Solidago canadensis* to phytomonitoring  
of PCB126 in transgenic *Arabidopsis* plants  
Sayuri Shimazu, Masaya Ohta, and Hiroshi Ashida  
*Science of the Total Environment*, **492**, 240–245 (2014)

The aim of this study is to elucidate the effect of lipid extracts from *Solidago canadensis* for phytomonitoring of polychlorinated biphenyl (PCB) 126 in the transgenic *Arabidopsis* plant XgD2V11-6 carrying the recombinant guinea pig (g) aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene expression system. A lipid extract was prepared from *S. canadensis* and separated into simple lipid, glycolipid, and phospholipids fractions by silica gel column chromatography. Sterylglucoside (SG), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), and glucosyl ceramide were found in the glycolipid fraction. When the transgenic *Arabidopsis* plants were treated with the glycolipid fraction together with PCB126, PCB126-induced GUS activity significantly increased in the whole plant. Moreover, *S. canadensis*-derived SG, MGDG, and DGDG also significantly increased PCB126-induced GUS activity. These results indicated that glycolipids in *S. canadensis* enhanced the sensitivity of this monitoring assay.

- (6) Scavenger receptor CL-P1 mediates endocytosis by associating with AP-2  $\mu$ 2  
SeongJae Jang, Katsuki Ohtani, Atsushi Fukuoh, Kenichiro Mori, Takayuki Yoshizaki, Noritoshi Kitamoto, YounUck Kim, Yasuhiko Suzuki, and Nobutaka Wakamiya  
*Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1840**, 3226–3237 (2014)

*Background:* Scavenger receptor CL-P1 (collectin placenta 1) has been found recently as a first membrane-type collectin which is mainly expressed in vascular endothelial cells. CL-P1 can endocytose OxLDL as well as microbes but in general, the endocytosis mechanism of a scavenger receptor is not well elucidated.

*Methods:* We screened a placental cDNA library using a yeast two-hybrid system to detect molecules associated with the cytoplasmic domain of CL-P1. We analyzed the binding and endocytosis of several ligands in CL-P1 transfectants and performed the inhibition study using tyrphostin A23 which is a specific inhibitor of tyrosine kinase, especially in  $\mu$ 2-dependent endocytosis and the site-directed mutagenesis in the endocytosis YXX $\Phi$  motif in CL-P1 cytoplasmic region. Furthermore, the SiRNA study of clathrin, adaptor AP-2 and dynamin-2 during the endocytosis of OxLDL in CL-P1 transfectant cells was carried out.

*Results:* We identified  $\mu$ 2 subunit of the AP-2 adaptor complex as a molecule associated with the cytoplasmic region of CL-P1. We demonstrated that AP-2 $\mu$ 2 was essential for CL-P1 mediated endocytosis of OxLDL in CL-P1 transfectant cells and its endocytosis

was also mediated by clathrin, dynamin and adaptin complex molecules.

*Conclusions:* Tyrosine-based YXXΦ sequences play an important role in CL-P1-mediated OxLDL endocytosis associated with AP-2μ2.

*General Significance:* This might be the first finding of the clear endocytosis mechanism in scavenger receptor CL-P1.

## 2. 報文

- (1) 福山バラの酵母プロジェクト -製パンへの適用-  
杉原千紗、花岡拓哉、池田達哉、久富泰資  
福山大学生命工学部研究年報 (13), 1-19 (2014)

本研究は、2016年7月1日の福山市市制施行100周年に向けた「チャレンジ100周年」事業に参加し、「ぬまくま夢工房」「福山市」「福山大学」の産官学が連携して地域社会の形成及び発展に寄与することを目的として行った。具体的には福山市園芸センター及びこだま食品株式会社試験農場で栽培されている43品種のバラを用いて、福山市・福山大学包括協定の下で産業に有用な野生出芽酵母の分離と実用化を目指した。その結果、398株の野生酵母を取得し、解析した222株中9株がワイン酵母OC2とほぼ同等の発酵性を示した。その中でも4株の高発酵性の野生出芽酵母は製パンにも適用出来ることがわかり、それぞれの酵母がもつ個性がパンの個性に表れるという驚きの事実が判明し、地域の特産としてブランド化できる道が示された。今後は、高発酵性の野生出芽酵母が得られたバラとその花に飛来する昆虫類についての詳細な研究を進めることが課題となる。

## 3. 学会発表

- (1) 枯草菌でのラムノース資化に関わる *yuxG-yu/BCDE* オペロンにコードされる各タンパク質の機能解析  
広岡和文、藤田泰太郎.  
日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京)、大会講演要旨集 on line (2014-3)

【目的】 土壌細菌である枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から浸潤する糖などの種々の有機化合物を栄養源として利用している。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする *yuxG-yuABCDE* オペロンを見出し、その制御機構を解析している。Yu1B は DeoR ファミリーに属する転写因子であり、DNase I フットプリント解析によりオペロン上流の 2 つの不完全なダイレトリプートを含む領域に結合することが示された。この結合様式を明らかにするために、Yu1B タンパク質の四次構造の決定を試みた。また、他の DeoR ファミリー転写因子の特性から類推すると、ラムノース代謝中間体でリン酸基を有するラムヌロース-1-リン酸が直接のエフェクターとして作用し、Yu1B の DNA 結合を解除してオペロンの発現を脱抑制することが予想された。ラムノースのラムヌロースへの異性化は Yu1E によって行われ、Yu1C はラムヌロースのリン酸化を行うと考えられる。Yu1B の DNA 結合に対する効果の検証に用いるラムヌロース-1-リン酸を調製することを目的に、Yu1E および Yu1C タンパク質を調製し、それぞれの酵素活性の測定を試みた。

【方法・結果】 *yu1B* 遺伝子断片を pColdIV ベクターに組み込んだプラスミドを構築し、これを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換した。得られた形質転換体を LB 培地を用いて 37°C で培養後、15°C に冷却して IPTG を添加することで目的タンパク質の発現を誘導した。菌体を超音波破碎して粗タンパク質抽出液を調製し、これを硫酸沈殿に供し、30-50%飽和沈殿画分を回収して透析後、DEAE 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、比較的高収率で精製 Yu1B タンパク質を得ることができた。現在ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて、溶液中の Yu1B タンパク質の分子量を算出し、四次構造の決定を行っている。また、*yu1E* および *yu1C* 遺伝子断片をそれぞれ pColdI ベクターに組み込み、N 末側に His タグを付加した状態で各タンパク質を発現させるプラスミドを構築した。これらをそれぞれ用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、上述の方法に従って目的タンパク質の発現誘導を行った。菌体から粗タンパク質抽出液を調製し、SDS-PAGE に供した結果、目的タンパク質の明確なバンドを確認することができた。現在各タンパク質のアフィニティカラムクロマトグラフィーによる精製とそれらの酵素活性測定を行っている。

(2) 油脂 (triacylglycerol) を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析

藤井洋紀、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京)、大会講演要旨集 on line (2014-3)

【目的】 油脂生産微生物のほとんどは、産物油脂を細胞内に蓄積する。我々は、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物の育種実験を行ってきた。産物油脂を細胞外に排出させることにより、生産能の強化と抽出コストの削減を目指している。これまで2種の酵母 (*Trichosporon* sp. および *Saccharomyces cerevisiae*) の triacylglycerol (TG) 分泌変異株を材料として、TGの細胞外排出機構の解析を行ってきた。今回は *S. cerevisiae* で得られた知見について報告する。

【方法・結果】 *S. cerevisiae* の STG1 変異株は、TGを菌体外に漏出する。STG1株の TG分泌 (Halo<sup>+</sup>) 形質は1遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection (YKO、約4800株) よりTG分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1株との交配試験並びに菌体外TGの検出を行った。その結果、*SPC72* 遺伝子がTG分泌抑制に関与していることが強く示唆された。親株 (YP1) の *SPC72* を破壊した (YP1/*SPC72*Δ) ところ、菌体外にTGが検出されるようになった。一方 *spc72* 株は、細胞内油滴 (Lipid droplet) の形態・配位に異常を生じ、また油滴タンパクの分子種にも変動が起こっていることが明らかとなった。Spc72pは622アミノ酸で構成されcoiled-coil構造を有し、SPBのouter-plaqueに局在する。その機能として、細胞質微小管や星状体微小管の形成・安定に関わることが示されている。変異遺伝子 *spc72* の塩基配列を親株のそれと比較した結果、ORFの上流414塩基から下流218塩基までに変異点は存在しなかった。RT-PCRを行い発現の有無や強弱を確認したが、どちらの株でも発現しており、有意差は認められなかった。なぜこのような結果になったか、その原因を解析するとともに、改めて相補試験を行い、他の候補遺伝子の関係についても検討している。

### (3) 出芽酵母において染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之、松崎浩明

日本農芸化学会 2014 年度大会 (東京)、大会講演要旨集 on line (2014-3)

遺伝子組換え生物が野外で拡散した場合、環境へ及ぼす影響が危惧される。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外環境での拡散を防止することを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメアDNAを切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えた。そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの R-RS 部位特異的組換え系を利用

して染色体からセントロメアDNAを切り出して細胞死を誘導するシステムを開発した。このシステムは、まず、*S. cerevisiae*染色体のセントロメアDNAの両側に組換え標的部位 (RS) を同じ向きで挿入し、さらに、Rレコンビナーゼ発現プラスミドを導入した細胞を作製した後に、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第IV番染色体1本から切り出すことで、また、二倍体では第IV番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができた。しかし、切り出しを誘導しても僅かな数の生存細胞が出現した。そこで、今回は、生存細胞が出現する原因を解明し、生存細胞の出現を抑制することで、さらに生存率を低下させることを目指した。一倍体のプレート培養で出現した生存細胞クローンのセントロメア近傍の構造のPCR解析や、RS領域のDNAシーケンス解析から、生存細胞が出現した主な原因は、染色体から片方1個のRSが欠失して組換えが起こらなかったためであった。また、この欠失は全て、RS DNAの両端に存在するTCGA配列の間で起きており、同時に2個のRSが欠失したものは認められなかった。このことから、構造的にRSは欠失する可能性が示唆された。そこで、TCGA配列を改変することで欠失が抑制され、生存率をさらに低下させることができると考えている。

- (4) 脂肪細胞はイソプロテレノール刺激によって血液凝固因子第VII因子を分泌する  
高橋伸彦、吉崎隆之、平中奈津弥、赤沼正康、吉田美香、内藤澄悦、熊野 穰、  
高後 裕、家子正裕  
第57回日本糖尿病学会年次学術集会 (大阪)、抄録集 on line (2014-5)

【背景】血液凝固第VII因子(FVII)は凝固反応に関わるのみならず脂肪細胞のインスリンシグナルを阻害することが知られている。【目的】脂肪細胞におけるFVIIの産生や分泌について検討する。【方法】3T3-L1脂肪細胞の培地にβアドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノール(ISP)を添加し、培地へのFVII分泌についてWestern blot法およびELISA法を用いて検討した。【結果】ISPは時間および濃度依存性に3T3-L1脂肪細胞のFVII分泌を増加させた。この作用はisobutyl-methylxanthineで増強された。また、cAMPアナログ単独添加でもFVIIの分泌は増加した。さらにISPによるFVII分泌はPKA阻害剤H-89の前処置で減弱した。一方、ISPはFVII遺伝子発現に影響を与えなかった。【結語】ISPはcAMP-PKA経路を介して脂肪細胞のFVII分泌を増加させることが分かった。

- (5) 疎水化高分子を利用したコエンザイムQ10の可溶化と運搬  
金尾義治、山本繁史、上田修司、大田将洋、栗原大貴、山口泰典、平山文俊  
日本薬剤学会第29年会 (さいたま)、プログラム集、p.151 (2014-5)



コリコート IR(KOL)は、1本鎖のPEGに2本のPVA鎖が共有結合した分子量45,00DaのPVA-PEGグラフトポリマーである。また、クラスターデキストリン(CDex)は、分子内に環状構造を有するデキストリンである。高分子(462kDa)にもかかわらず、きわめて水溶性が高く、体内酵素により容易に消化される。本研究では、両親媒性の疎水化高分子を合成し、難溶性コエンザイムQ10(CoQ10)を内包・可溶化するナノ粒子の調製を行った。その結果、疎水化高分子は、CoQ10を最大15w/w%まで内包した。疎水基の導入率は1~6w/w%であった。X線回折とDSC分析によると、CoQ10はアモルファス状態で内包されていることが明らかとなった。CoQ10内包ナノ粒子を水に溶解すると、透明なコロイド溶液となり、100~150nmの粒子径を示した。また、ステアрил基を導入した疎水化高分子を用いたCoQ10内包ナノ粒子(4mgCoQ10/kg)をマウスに尾静注したところ、生分解性のCDexナノ粒子ではほとんど血中濃度を観測できなかったが、KOLナノ粒子では高い血中濃度を得ることができた。

(6) 哺乳類の進化遺伝学的研究：モロシヌスマウスの由来と環境適応の解明に向けて  
(森脇和郎賞 受賞講演)

佐藤 淳

第28回モロシヌス研究会(伊豆修善寺)、講演要旨集、p.13(2014-6)

マウスは生命科学や医学等の分野で生命機能を解明するモデル動物としての地位を確立した。一方で、ゲノムが解読され、遺伝子機能のアノテーションも進むマウスは生命環境モデルとしての役割も果たしている。つまり、野生哺乳類の由来や適応を解明するための知見と手法を提供する。生物多様性保全が喫緊の課題である現代社会において、このような生物と環境との相互作用をゲノムの視点で明らかにすることは重要である。本講演では、第一に、演者が森脇和郎先生と共に行ってきた野生由来マウスのヘモグロビン遺伝子における進化遺伝学的研究を紹介し、モロシヌスマウスの複雑な由来について議論する。成体で発現するヘモグロビンベータ鎖遺伝子はHBB-T1遺伝子とHBB-T2遺伝子の2つの遺伝子から構成され、これらの遺伝子間には約14kbのスペーサー領域が存在する。モロシヌスマウスが持つ*p*型ハプロタイプは、東南アジア系統の*castaneus*亜種グループが持つ*d*型ハプロタイプと東アジア系統の*musculus*亜種グループが持つ*wI*型ハプロタイプとの組み換え体であることが明らかとなった。スペーサー領域内には組み換え点が特定され、その周辺領域に特徴的なpolyT配列が見出された。モロシヌスマウスのゲノムには東アジアにおける亜種間交雑などの複雑な歴史が刻まれているようである。第二に、現在進行中である野生マウス集団の局所適応に関する

研究を紹介する。予備的な研究段階にあるが、北海道の野生マウス集団の旨味受容体遺伝子の多様性が非常に低く、選択的一掃を示唆する結果が得られている。最後に、森脇先生が遺された野生マウス由来ゲノム DNA バッテリーを用いた環境科学の推進を強調したい。

(7) 花や果実に棲息する高発酵性の野生出芽酵母の種多様性

杉原千紗、花岡拓哉、久富泰資

日本進化学会第 16 回大会 (高槻)、講演要旨集、p. 149 (2014-8)

福山市のバラ 43 品種、福山市のブドウ、世羅郡のブルーベリーから野生の出芽酵母の分離を試みた。その結果、バラの花からは 398 株、ブドウからは 41 株、ブルーベリーからは 29 株の野生酵母を取得出来た。それらの発酵性試験を行ったところ、バラの花から 9 株、ブドウから 24 株、ブルーベリーから 7 株の高発酵性の野生酵母株が得られた。これらの菌株の電気泳動核型と 18S rDNA を解析したところ、バラから 4 種、ブドウから 2 種、ブルーベリーから 2 種を明確に特定できた。バラ由来の高発酵性の野生酵母種は、果実からのそれらとは異なる酵母種であった。高発酵性の野生出芽酵母種は比較的香りの強いバラの品種から採取されており、香りにつられて飛来するハナムグリと呼ばれる昆虫が酵母を運搬していることが示唆された。また、花に持ち込まれた酵母群の中で特定の酵母種が、バラの蜜の糖組成などに応じて選択的に増殖してくる可能性も示唆された。なお、バラから分離された高発酵性の野生出芽酵母は製パンにも適用出来ることが分かり、地域の特産としてブランド化できる道が示された。今後、非発酵性の酵母の解析もあわせて進めて行きたいと考えている。

(8) 花や果実に棲息する酵母の多様性

久富泰資、花岡拓哉、吉川成美、杉原千紗

日本植物学会第 78 回大会 (川崎)、研究発表記録、p. 203 (2014-9)

私たちは、これまで、自然界に棲息する野生の出芽酵母の分離とその多様性の解析を行ってきた。今回は、大学が所在する福山市で栽培されているバラから野生出芽酵母を分離して、それらの種多様性を解析するとともに、高エタノール発酵性株を選別して、地場産品の開発に活かす道を探った。福山市は、2016 年に市制施行 100 周年を迎え、「100 万本のバラのまち」を市の特徴に掲げている。

福山市内の 2 箇所で栽培されているバラ 43 品種から花や実を採取し、微生物の集積培養を行った。5 種の培地を用いた分離培養を通して、総計 398 株の野生出

芽酵母を単離することができた。このうち、高発酵性の株に注目してスクリーニングを行ったところ、9株が市販のパン酵母と同程度の発酵性を示すことがわかった。電気泳動核型と18S rDNAの解析を通して、4種の同定に成功した。これらの研究を通して、バラの品種と棲息する酵母の間には相関があること、酵母はある種の昆虫を通して持ち込まれることが示唆された。一方、地場特有の酵母を用いた製パン試験を進めており、特徴のあるパンづくりに繋がることを提示できた。

(9) 枯草菌 *ilv-leu* オペロンの CcpA に依存するカタボライト活性化とその CodY あるいは TnrA に依存する負の制御によるキャンセル

広岡和丈、里村武範、東條繁郎、藤田泰太郎

平成 26 年度(2014 年度)グラム陽性菌ゲノム機能会議(鶴岡)、要旨集(2014-9)

枯草菌の分岐鎖アミノ酸合成に関与する *ilv-leu* オペロンは、CcpA と P-Ser-HPr の複合体のシスエレメント *cre* への結合により引き起こされるカタボライト活性化を受ける。この *ilv-leu* 発現の活性化は、アミノ酸に富む増殖条件では CodY の CodY 部位への結合による負の制御を受け、また窒素制限増殖条件では TnrA のそのボックスへの結合による負の制御を受ける。CcpA に依存した *ilv-leu* の活性化は CcpA と P-Ser-HPr を用いて生体外で再構成された。*lacZ*-融合解析により、この活性化は RNA ポリメラーゼと CcpA と P-Ser-HPr 複合体との相互作用でのヘリックス面依存性を示すことを明らかにし、また完全なカタボライト活性化を引き起こすためには *cre* 上流の 19-ヌクレオチド領域が必要であることを示した。DNase I フットプリント解析により、CodY-I+II 部位への CodY の結合が *cre* への CcpA と P-Ser-HPr 複合体の結合を競合的に妨害することが判った。この CodY への結合はカタボライト活性化をキャンセルするのみならず *ilv-leu* プロモーターからの転写の開始も阻害すると思われる。このフットプリント解析により、112 ヌクレオチド離れた TnrA ボックスと *cre* に TnrA と CcpA と P-Ser-HPr 複合体が同時に結合すること、また TnrA の結合のみで DNA 湾曲を引き起こすと思われた。このことは、TnrA ボックスに結合した TnrA と *cre* に結合した CcpA と P-Ser-HPr の複合体との相互作用がカタボライト活性化をキャンセルすることを示唆した。とはいえ、TnrA ボックスに結合した TnrA は *ilv-leu* プロモーターからの転写の開始を妨害しなかった。さらに、この TnrA 結合によるカタボライト活性化のキャンセルは、TnrA ボックスの下流の 26-ヌクレオチド領域を必要とした。

(10) 枯草菌のラムノース異化を制御する YulB 転写因子の機能解析

広岡和丈、小土井祐介、藤田泰太郎

## 平成 26 年度(2014 年度)グラム陽性菌ゲノム機能会議 (鶴岡)、要旨集 (2014-9)

枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から滲出する種々の有機化合物を栄養源としている。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする *yuxG-yuABCDE* オペロンを見出し、その機能解析を行っている。ラムノースは、細胞壁ペクチン・根から分泌される粘液質・フラボノイド配糖体などの植物由来物質の構成成分であるので、根圏土壌中には比較的豊富に存在しており、枯草菌はこのオペロンを発現させてラムノース資化を行っていると考えられる。

Yu1B は DeoR ファミリーに属する転写因子であり、DNase I フットプリント解析により *yuxG* 上流の 2 つの不完全なダイレトリピートを含む領域に結合することが示された。組換え Yu1B タンパク質を分子量マーカールと共にゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供した結果、Yu1B は溶液中で二量体を形成することがわかり、ゲルシフト解析の結果と合わせて、二分子の Yu1B 二量体が *yuxG* 上流制御領域に結合すると推定された。また、この領域には、カタボライト制御を司る CcpA の認識配列である *cre* が Yu1B の結合するダイレトリピートと重なる形で存在していた。CcpA とその活性化に必要な P-Ser-HPr の組換えタンパク質を用いたフットプリント解析により、CcpA 複合体のこの *cre* への結合が示されたが、Yu1B と CcpA 複合体の両方を添加した条件でのフットプリント解析では、CcpA 複合体の *cre* への結合は認められなかった。

他の DeoR ファミリー転写因子の特性から類推すると、ラムノース代謝中間体のラムヌロース-1-リン酸が直接のエフェクターとして作用し、Yu1B の DNA 結合を解除することが予想された。ラムノースのラムヌロースへの異性化は Yu1E によって行われ、Yu1C はラムヌロースのリン酸化を行うと考えられたので、各タンパク質を大腸菌で発現させて精製し、酵素活性を測定した結果、それぞれの酵素活性を有していることが確認された。

*yuxG-yuABCDE* オペロンの各遺伝子に pMUTIN プラスミドの挿入をもつ枯草菌株に *ccpA* 破壊をさらに導入して構築した各菌株と、*yuxG* プロモーターと *lacZ* との連結を *amyE* 座に導入した枯草菌株を用いてレポーター解析を行った結果、*yuxG* プロモーターの誘導は Yu1B、Yu1E、および Yu1C が存在する菌株を炭素源としてラムノースを添加した培地で生育させた場合にのみ検出され、ラムヌロース-1-リン酸が Yu1B のエフェクターであることが強く示唆された。また、Yu1B、Yu1E、Yu1C、および CcpA が存在する菌株をグルコースとラムノースの両方を添加した培地で培養すると、ラムノースによる誘導効果はグルコースが消費されるまで抑制された。これにより、Yu1B が脱抑制されたとしてもグルコース存在下では CcpA

によってカタボライト抑制を受けると考えられた。

(11) 出芽酵母における染色体からのセントロメアDNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

松崎浩明、宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之

第 66 回日本生物工学会大会（札幌）、講演要旨集、p. 114（2014-9）

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐことを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメアDNA を切り出し、細胞死を誘導する方法が考えられる。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメアDNA を切り出すことで細胞死を誘導することを検討している。セントロメアDNA の切り出しは、第IV 番染色体のセントロメアDNA の両側に組換え標的部位（RS）を同じ方向に挿入し、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第IV番染色体1本から切り出すことで、また二倍体では第IV 番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができる。しかし、プレート上で僅かな数のコロニーが出現するので生存細胞が出現する原因を解析した。一倍体の生存細胞のセントロメアDNA 近傍のPCR解析やRS領域のシークエンス解析から、生存細胞が出現した原因は、主に染色体から2個のRSのうち1個が欠失し、切り出しが起こらなかったためと示唆された。この結果に基づき、生存率をさらに低下させることを検討している。

(12) MAMMAL STUDY-アジア哺乳類学の世界への発信

本川雅治、島田卓哉、佐藤 淳、押田龍夫

日本哺乳類学会 2014 年度合同大会（京都）、講演要旨集、p. 55（2014-9）

日本哺乳類学会が出版する Mammal Study は、現在 Web of Science Expanded に収録、国際学術雑誌としての認知が高まり、多くの国から論文が投稿されています。Mammal Study は何を指すか？ 会員と考えるために、本自由集会を企画しました。アジア哺乳類学の研究成果を積極的に世界に発信する役割、商業出版社に頼らない出版とコンテンツ保持の意義、日本から国際展開を目指す数少ない学術雑誌の戦略などについて、一緒に考えましょう。インパクトファクターは重要な指標ですが、それに固執して、雑誌の個性を失ってもよいでしょうか？ Mammal Study

は、良質な投稿論文と充実した査読体制にかかっています。それを支えるのが日本哺乳類学会の会員です。自由集会では、編集委員長と2名の編集幹事が *Mammal Study* や学術雑誌一般をめぐる最近の動向について話題提供を行い、その後に参加者で *Mammal Study* の将来について議論したいと思います。これから論文を書こうとする若手会員も含め、すべての会員の参加を期待します。

(話題提供)

1. *Mammal Study* はアジアの国際雑誌として何を指すか 本川雅治 (京都大学)

2. 論文不正について - 何が不正か? なぜ不正は無くならないのか?

島田卓哉 (森林総合研究所)

3. 文献の引用について- 投稿規定改定に向けて 佐藤 淳 (福山大学)

(13) 哺乳類分子系統学のこれから

篠原明男、佐藤 淳

日本哺乳類学会 2014 年度合同大会 (京都)、講演要旨集、p. 58 (2014-9)

近年の分子生物学と計算科学の発展は、哺乳類の進化の概要をある一定の成果として提示することに成功した。ミトコンドリアの cytochrome *b* 遺伝子に頼っていた時代はとうに過ぎ去り、複数の核遺伝子を用いたより精度の高い系統樹が次々と報告され、あらゆる分類群の進化学的な背景が明らかになりつつある。そして分子系統学は更なる発展を遂げて集団動態、適応、分類、保全など多岐にわたる生物学的課題を解決するための「応用的な手段」のひとつとして確立した。本自由集会では分子系統樹を最新の手法で応用している若手研究者の研究解説を通じて分子系統学の応用展開を考えたいと思い、下記の方々に講演をお願いした。

演題1: 複数の核遺伝子を用いたコアレスセント法によるナガスクジラ科の「種の系統樹」と「祖先集団サイズの推定 (米澤隆弘: 復旦大学・佐々木剛: 東京農大)

演題2: Species delimitation analyses of moles. (Kai He: 昆明動物学研究所)

演題3: 分子系統学と霊長目の適応進化—サルの味覚の地域変異の謎— (今井啓雄: 京都大学)

演題4: EDGE の現状と問題点—食肉目の分子系統学を例に— (佐藤 淳: 福山大学)

研究対象の分類群は違っても、日進月歩の分子系統学の世界を垣間見ることによって自分の研究に応用できる分子系統樹の利用例に出会う機会を提供できればと願っている。

(14) 福島第一原発事故後のアカネズミ野生集団の遺伝的多様性について

友澤森彦、坂本信介、佐藤 淳、山田文雄

日本哺乳類学会 2014 年度合同大会 (京都)、講演要旨集、p. 197 (2014-9)

福島第一原発事故によって放出された放射性物質が野生哺乳類の遺伝的多様性に影響をあたえるかどうかは住民および国際社会の大きな関心事であるが、環境中に放出された放射性物質が野生動物集団に与える影響やそれらのモニタリングの手法などについての情報は少ない。そこで本研究では汚染度の異なる複数の地点（福島県飯舘村、川内村、茨城県北茨城市）で 2011-2012 年に捕獲されたアカネズミ集団および全国から集められたサンプル（計 294 個体）を用いて、ミトコンドリア遺伝子（Cytb, 654 bp）の塩基配列およびマイクロサテライト遺伝子座 8 座位における新規突然変異の探索および遺伝的多様性の比較を試みた。その結果、マイクロサテライトのヘテロ接合度には有意な差は見られず ( $H_o = 0.85-0.9$ )、空間線量率に応じた変異の増加は見られなかった。また、飯舘村で Cytb の塩基多様度が有意に高かったものの、近年起こったと思われる新規の突然変異に限ってみると東北の 3 地点全てで高く空間線量率に応じた増加は見られなかった。以上の結果から、採集地点におけるアカネズミの遺伝的多様性に対する放射線被曝の影響は、元々の地域個体群が持つ遺伝的特性や個体の移出入などの要因による影響よりも小さい事が示唆された。

(15) 日本の哺乳類の毛色進化

佐藤 淳（招待講演）

日本動物学会 第 85 回大会（仙台）、第 10 回色素細胞シンポジウム ラボとフィールドをつなぐ色素細胞研究、講演要旨集、p. 58（2014-9）

哺乳類は主に夜行性の動物として多様化を果たし、その多くは 2 色系の色覚のみを有する。そのため毛色の多様性は他の脊椎動物と比較してそれほど顕著ではない。それでも尚、哺乳類の毛色は、捕食者や被食者からの隠蔽、種内及び種間のコミュニケーション、あるいは生理学的な理由により多くの変異を示す。日本列島においても毛色の地域変異及び季節変異を示す哺乳類が多く生息し、毛色の多様性は高い。本講演では、ニホンテン、クロテン、ニホンノウサギ、アカネズミ、クマネズミを対象として演者らが行ってきた毛色変異に関する研究を紹介する。特に、中立遺伝マーカーを用いた分子系統・系統地理学的研究により明らかにされつつあるこれらの動物の進化史を考慮し、*Mclr* や *Asip* 等の毛色関連遺伝子の多型と毛色変異との関連を見ることで、日本列島において、何故、哺乳類の毛色における多様性が高いのかを議論する。ニホンテンとニホンノウサギでは毛色変異と集団遺伝構造との不一致について、クロテンとアカネズミでは島に隔離された集団における毛色変異の成立過程について、そしてクマネズミでは人為的移入

が毛色変異に与えた影響について紹介する。

(16) キトサンナノファイバーからなる相互侵入網目ゲルの膨潤および物質封入特性の解析

新田祥子、懸谷しのぶ、岩本博行

第 63 回高分子討論会（長崎）（2014-9）

【緒言】近年、加工技術の進歩とともに、ナノメートルオーダーのファイバー状組織からなる多糖類が多く報告されるようになった。多糖類ナノファイバーはこれまでの多糖類と比較して比表面積が大きいことから、粘性が高く、そのため水中で分離することなく安定に存在することが可能である。さらに、多孔質構造を有し強度および弾性に優れるといった特徴を有する。しかしながら多糖類ナノファイバー単独では高粘度ゾル状態であるため、三次元構造体の構築は困難である。そこで、化学架橋によって作製されるゲル内にキトサンナノファイバーを介在させたセミ相互侵入網目構造を構築させることで、これまでに得られなかった力学的強度および弾性に優れたゲルの作製を目指した。さらに、高比表面積および多孔質構造に起因した高い物質接着性を示すことが期待されることから、タンパク質輸送担体といったバイオマテリアルとしての応用を目指した。

【実験】Chitosan nanofiber (ChitosanNF) (「BiNF-i-s キトサン」(株)スギノマシン製、重合度約 480、10 wt% (aq))と Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) (MW =700)を超純水中に分散させた後、開始剤 Ammonium persulfate (APS)水溶液を添加した。促進剤 *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,2-ethanediamine (TEMED)を添加し攪拌後、一定時間静置することで ChitosanNF-PEG ゲルを得た。ゲル作製時における PEGDA および ChitosanNF 懸濁液仕込み量やポリマー濃度が、作製した ChitosanNF-PEG ゲルの gel fraction および膨潤度に与える影響を評価した。次に ChitosanNF-PEG ゲルの力学的強度を評価するために、直径 13 mm、厚さ 6 mm のディスク状ゲルを用意し、クリープメータ (RE2-33005B、(株)山電)を用いて圧縮破断応力測定を行った(圧縮速度: 0.1 mm/sec)。最後に ChitosanNF-PEG ゲルのタンパク質封入、放出評価を行った。乾燥させた ChitosanNF-PEG ゲルを牛血清アルブミン(BSA)リン酸バッファー (pH 7.4, 0.2 M)溶液中に 2 時間浸漬した後、ゲルをそれぞれ酢酸バッファー(pH 5.6, 0.2 M)およびリン酸バッファー(pH 7.4, 0.2 M)中に置換し、外液の BSA 濃度を Protein Assay Rapid Kit (Wako 製)を用いて経時的に定量した。

【結果と考察】高粘度ゾル状態の ChitosanNF、PEGDA 混合懸濁液中、レドックス開始剤 APS/TEMED を用いて PEGDA の架橋反応を行うことで、ChitosanNF が系内で分散したセミ IPN 型均一ゲル (ChitosanNF-PEG ゲル) を作製することがで



きた。作製したゲルは ChitosanNF が立体保持に寄与しているため、凍結乾燥後もその形状を維持していた。乾燥ゲルを超純水中に浸漬させたところ、約 30 分程度で平衡膨潤度に到達した。ChitosanNF-PEG ゲルの膨潤度解析を行ったところ、PEGDA 仕込み量が増加するにしたがって架橋点間距離が減少するため gel fraction が増大し、膨潤度は低下した。また、ChitosanNF 懸濁液仕込み量が増加するに伴い水分量も増加するため gel fraction は減少したが、ChitosanNF 量による膨潤度への影響はさほどみられなかった。このことより ChitosanNF-PEG ゲルは ChitosanNF が PEGDA の網目構造に取り込まれたセミ IPN 構造を有しているといえた。ChitosanNF-PEG ゲルの圧縮破断応力は PEGDA および ChitosanNF 仕込み量に大きく依存し、特に ChitosanNF 量が増加するにしたがって破断応力が増大し、ナノファイバーの添加に起因した高強度のゲルが得られた。ChitosanNF-PEG ゲルからの BSA の放出挙動は外液バッファの pH やゲルの組成に依存した。低 pH 条件下において BSA 放出速度は上昇する傾向が見られたが、ChitosanNF を添加することで、BSA の初期バーストが抑制された。以上の結果より、ChitosanNF-PEG ゲルがナノファイバーに起因した特異的な膨潤挙動、力学特性およびタンパク質放出特性を有していることがわかった。

Abstract: ChitosanNF-PEG semi-IPN gels were prepared by crosslinking poly(ethylene glycol) diacrylate in the presence of chitosan nanofiber. Swelling property of ChitosanNF-PEG gels were first studied, results indicating that the swelling degrees and gel fractions were dependent on the amounts of PEGDA and ChitosanNF. Compressive rupture stress was also influenced by the composition of ChitosanNF-PEG gels. Encapsulation and releasing of BSA from ChitosanNF-PEG gels were also studied to evaluate their ability to utilize as a carrier for bioactive substances such as proteins.

- (17) 枯草菌 *ilv-leu* オペロンの CcpA に依存するカタボラト活性化とその CodY あるいは TnrA に依存する負の制御によるキャンセル

CcpA-mediated catabolite activation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon and its cancelling by either CodY- or TnrA-mediated negative regulation

藤田泰太郎、里村武範、東條繁郎、広岡和文

第 37 回日本分子生物学会年会（横浜）、要旨 on line (2014-11)

枯草菌の分岐鎖アミノ酸合成に関与する *ilv-leu* オペロンは、CcpA と P-Ser-HPr の複合体のシスエレメント *cre* への結合により引き起こされるカタボラト活性化を受ける。この *ilv-leu* 発現の活性化は、アミノ酸に富む増殖条件では CodY の CodY 部位への結合による負の制御を受け、また窒素制限増殖条件では TnrA の

そのボックスへの結合による負の制御を受ける。CcpA に依存した *ilv-leu* の活性化は CcpA と P-Ser-HPr を用いて生体外で再構成された。 *lacZ*-融合解析により、この活性化は RNA ポリメラーゼと CcpA と P-Ser-HPr 複合体との相互作用でのヘリックス面依存性を示すことを明らかにし、また完全なカタボライト活性化を引き起こすためには *cre* 上流の 19-ヌクレオチド領域が必要であることを示した。 DNase I フットプリント解析により、CodY-I+II 部位への CodY の結合が *cre* への CcpA と P-Ser-HPr 複合体の結合を競合的に妨害することが判った。この CodY への結合はカタボライト活性化をキャンセルするのみならず *ilv-leu* プロモーターからの転写の開始も阻害すると思われる。このフットプリント解析により、112 ヌクレオチド離れた TnrA ボックスと *cre* に TnrA と CcpA と P-Ser-HPr 複合体が同時に結合すること、また TnrA の結合のみで DNA 湾曲を引き起こすと思われる。このことは、TnrA ボックスに結合した TnrA と *cre* に結合した CcpA と P-Ser-HPr の複合体との相互作用がカタボライト活性化をキャンセルすることを示唆した。とはいえ、TnrA ボックスに結合した TnrA は *ilv-leu* プロモーターからの転写の開始を妨害しなかった。さらに、この TnrA 結合によるカタボライト活性化のキャンセルは、TnrA ボックスの下流の 26-ヌクレオチド領域を必要とした。

The *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids undergoes catabolite activation involving the *cre* site which is mediated by the complex of CcpA and P-Ser-HPr. This activation of *ilv-leu* expression is negatively regulated through CodY binding to the CodY-site under amino acid-rich growth conditions, and it is negatively regulated through TnrA binding to the TnrA-box under nitrogen-limited growth conditions. The CcpA-mediated catabolite activation of *ilv-leu* was reconstructed in vitro by use of CcpA and P-Ser-HPr. *lacZ* fusion analysis revealed that this activation exhibited face-of-the helix dependence of the interaction of the complex of CcpA and P-Ser-HPr with RNA polymerase, and required a 19-nucleotide region upstream of *cre* for full activation. DNase I footprinting indicated that CodY binding to the CodY-I+II site competitively prevented the binding of the complex of CcpA and P-Ser-HPr to *cre*. This CodY binding not only cancelled catabolite activation but also likely inhibited transcription initiation from the *ilv-leu* promoter. The footprinting also indicated that TnrA, and the complex of CcpA and P-Ser-HPr simultaneously bound to the TnrA-box and the *cre* site, respectively, which are 112-nucleotides apart; TnrA binding to its box was likely to induce DNA bending. This implied that interaction of TnrA bound to its box with the complex of CcpA and P-Ser-HPr bound to *cre* might cancel catabolite activation, but TnrA bound to its box did not inhibit transcription initiation from the *ilv-leu* promoter. Moreover, this cancelling of catabolite activation by

TnrA required a 26-nucleotide region downstream of the TnrA-box.

(18) 出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析

宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之、松崎浩明

第 37 回日本分子生物学会年会（横浜）、要旨 on line (2014-12)

本研究では、遺伝子組換え生物の拡散防止策として、遺伝子組換え生物に条件致死性質を付与し、特定の条件下で細胞死を誘導することを目的としている。そこで、出芽酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用したセントロメア DNA の切り出しにより細胞死を誘導することを検討している。一倍体細胞において第 IV 番染色体上のセントロメア DNA の両側に標的部 (RS) を挿入し、さらにレコンビナーゼ発現プラスミドを導入した株を作製した。レコンビナーゼ遺伝子は、GAL1 プロモーターの制御下にあり、ガラクトース培地で培養することでセントロメア DNA が切り出される。切り出しの誘導で生存率は、 $1.4 \times 10^{-5}$  まで低下し、細胞死を起こすことに成功した。しかし、第 IV 番染色体の切り出しを誘導してもプレート上で僅かな数の生存コロニーが出現した。そこで、細胞死誘導の効率を改善するために生存細胞の生存原因を解明することにした。プレート培養での第 IV 番染色体からの切り出しにおける生存細胞 51 株について染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動解析およびセントロメア近傍 DNA の構造解析を行った。その結果、大半が 2 個の RS の片方が欠失しており、これにより切り出しが起こらなかったことが示唆された。この欠失は全て、RS の両端に存在する共通の配列間で起きており、同時に 2 個の標的部が欠失したものは認められなかった。このことから、構造的に RS は欠失する可能性があると考えられる。そこで、欠失を抑制するため原因と考えられる配列を改変した結果、 $2.3 \times 10^{-6}$  まで生存率が低下した。また、その他の生存細胞の中には染色体パターンに変化が生じているものや、セントロメア DNA を切り出したにもかかわらず生育する個体が存在しており、生存原因との関係を調べている。今後は、これらの現象が発生するメカニズムを解明し、細胞死誘導の効率改善を検討する。

(19) Evolutionary distinctiveness and genetic diversity in mammals.

Jun J. Sato (Invited speaker)

International Symposium: Status and Trends in Genetic Diversity under Changing Environments (organized by Tetsukazu Yahara), Kyushu University, Fukuoka, Japan, No Abstract (2014-2)

- (20) タイコブラ毒液中に含まれる $\alpha$ 1-アドレナリン受容体結合物質のN末端側部分アミノ酸配列の解析  
本屋敷敏雄、中村景子、太田雅也、Anthony T. TU、五郎丸 毅  
日本薬学会 134 年会（熊本）、大会講演要旨集 on line（2014-3）
- (21) 主にマスカット・ベリーAを原料とする広島県産赤ワインの味覚分析  
吉本和旦、堀端哲也、岩本博行  
日本農芸化学会中四国支部第 39 回講演会（福山）、講演要旨集、p. 30  
（2014-5）
- (22) 両親媒性ミセル“PTMC-*b*-PECA-*b*-PTMC micelle “の化学酵素合成と pH 依存的薬物放出  
新田祥子、沼田圭司、岩本博行  
日本農芸化学会中四国支部第 39 回講演会（福山）、講演要旨集、p. 22  
（2014-5）
- (23) 出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析  
宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之、松崎浩明  
日本農芸化学会中四国支部第 39 回講演会（福山）、講演要旨集、p. 28（2014-5）
- (24) 油脂 (triacylglycerol) を分泌する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株の解析  
藤井洋紀、松崎浩明、秦野琢之  
日本農芸化学会中四国支部第 39 回講演会（福山）、講演要旨集、p. 28（2014-5）
- (25) 枯草菌のラムノース異化に関わる *yuxG-yu/BCDE* オペロンがコードするタンパク質群の機能解析  
小土井祐介、藤田泰太郎、広岡和丈  
日本農芸化学会中四国支部第 39 回講演会（福山）、講演要旨集、p. 21（2014-5）
- (26) 疎水性高分子を用いたコエンザイム Q10 内包ナノ粒子の調製と評価  
金尾義治、山本繁史、上田修司、大田将洋、栗原大貴、山口泰典、平山文俊  
第 30 回日本 DDS 学会学術集会（東京）、プログラム予稿集、p. 199（2014-7）

- (27) 油脂 (triacylglycerol) を分泌する酵母変異株の解析  
藤井洋紀、岡田桃子、松崎浩明、秦野琢之  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 101 (2014-11)
- (28) 糸状菌 *Penicillium decumbens* を用いた燃料アルカンの生産  
熊丸翔太、松崎浩明、秦野琢之  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 102 (2014-11)
- (29) 線虫の化学物質受容体の出芽酵母での発現の試み  
竹丸純平、秦野琢之、松崎浩明  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 103 (2014-11)
- (30) 出芽酵母の染色体核内配置における *SSD1* の機能  
野津将磨、秦野琢之、松崎浩明  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 104 (2014-11)
- (31) 海産酵母の米糠に対する作用-米糠からの直接アルコール発酵の試み-  
平井晴樹、松崎浩明、秦野琢之  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 105 (2014-11)
- (32) 出芽酵母における染色体からのセントロメア DNA の切り出し誘導時に出現する生存細胞の解析  
片岡伸雅、宮本昭弘、秦野琢之、松崎浩明  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 106 (2014-11)
- (33) 産官学連携での「福山バラの酵母」による製パン  
吉川成美、杉原千紗、久富泰資  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 85 (2014-11)
- (34) 植物発酵エキスから分離された酸耐性酵母の解析  
青木穂波、杉原千紗、久富泰資  
第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 86 (2014-11)
- (35) 酵母 *Kazachstania naganishii* における動原体配列 (CEN) の特定  
岩村弥永子、杉原千紗、久富泰資

第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 87 (2014-11)

(36) 酵母 *Kazachstania naganishii* の生活環に関わる遺伝子の解析

小林真子、杉原千紗、久富泰資

第 32 回 YEAST WORKSHOP (呉)、講演要旨集、p. 88 (2014-11)

(37) 複合糖質の構造と機能について～食品の安全性の考え方と微量分析法

太田雅也

2014 年広島文教食物栄養研究会 (広島) (2014-11)

## B. 総説

(1) Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion

Kazutake Hirooka

*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1471-1484 (2014)

*Bacillus subtilis* collectively inhabits the rhizosphere, where it contributes to the promotion of plant growth, although it does not have a direct symbiotic relationship to plants as observed in the case of rhizobia between leguminous plants. As rhizobia sense the flavonoids released from their host roots through the NodD transcriptional factor, which triggers transcription of the nod genes involved in the symbiotic processes, we supposed that *B. subtilis* utilizes certain flavonoids as signaling molecules to perceive and adapt to the rhizospheric environment that it is in. Our approaches to identify the flavonoid-responsive transcriptional regulatory system from *B. subtilis* resulted in the findings that three transcriptional factors (LmrA/QdoR, YetL, and Fur) are responsive to flavonoids, with the modes of action being different from each other. We also revealed a unique regulatory system by two transcriptional factors, YcnK and CsoR, for copper homeostasis in *B. subtilis*. In this review, we summarize the molecular mechanisms of these regulatory systems with the relevant information and discuss their physiological significances in the mutually beneficial interaction between *B. subtilis* and plants, considering the possibility of their application for plant cultivation.

(2) 植物の生育に深くかかわる根圏微生物のフラボノイド応答 – 植物の生育促進に働

くメカニズムー

広岡和文

化学と生物, 52, 560-562 (2014)

筆者は、根粒菌や菌根菌のように枯草菌も根圏環境を認識するシグナル分子としてフラボノイドを利用すると考え、フラボノイド応答性を示す 3 つの転写制御系 (LmrA/QdoR、YetL および Fur による制御系) を見出した。これらのうち、互いにパラログスな LmrA と QdoR は、標的遺伝子群の各制御領域内の同じ配列を認識・結合して発現を抑制し、ケルセチンなどの特定のフラボノイドの存在下で脱抑制する。標的遺伝子群には、多剤耐性に関わる輸送体とフラボノール分解に関わる酵素の遺伝子も含まれており、枯草菌は栄養豊富である一方で抗菌性のフラボノイドや他の微生物が産生する抗生物質も存在する根圏環境をフラボノイドを介して感知し、それらに対処すべくフラボノイド分解と薬剤耐性を強化すると考えられた。また、Fur は鉄イオン応答性転写抑制因子として知られるが、本来のエフェクターである鉄イオンだけでなく、フィセチンなどに対しても応答し、鉄キレート剤であるシデロフォアの合成系を含む標的遺伝子群が部分的に脱抑制されることが示唆された。

## C. 著書

- (1) Creation of novel technologies for extracellular protein production toward the development of *Bacillus subtilis* genome factories  
Katsutoshi Ara, Kenji Manabe, Shenghao Liu, Yasushi Kageyama, Tadahiro Ozawa, Masatoshi Tohata, Keiji Endo, Kazuhisa Sawada, Nozomu Shibata, Akihito Kawahara, Kazuhiro Saito, Hiroshi Kodama, Yoshiharu Kimura, Katsuya Ozaki, Yoshinori Takema, Hiroshi Kakeshita, Kouji Nakamura, Kunio Yamane, Takeko Kodama, Junichi Sekiguchi, Takuya Morimoto, Ryosuke Kadoya, Shigehiko Kanaya, Yasutaro Fujita, Fujio Kawamura, and Naotake Ogasawara  
Microbial Production, From Genome Design to Cell Engineering (Eds: Hideharu Anazawa and Sakayu Shimizu), Chapter 1, Springer Japan (Tokyo), pp.1-16 (2014)

*Bacillus subtilis* has been widely used for the industrial production of useful proteins because of its high protein secretion ability and safety. We focused on genome reduction as a new concept for enhancing production of recombinant enzymes in *B. subtilis* cells

based on detailed analysis of the genome mechanism. First, we reported that a novel *B. subtilis* strain, MGB874, depleted 20.7 % of the genomic sequence of the wild type by rationally designed deletions to create simplified cells for protein production. When compared with wild-type cells, the productivity of cellulase and protease from transformed plasmids harboring the corresponding genes was markedly enhanced. These results indicate that a bacterial factory specializing in the production of substances can be constructed by deleting the genomic regions unimportant for growth and substance production from *B. subtilis*. Second, deletion of the *rocDEF-rocR* region, which is involved in arginine degradation, was found to contribute to the improvement of enzyme production in strain MGB874. The present study indicated that our results demonstrated the effectiveness of a synthetic genomic approach with reduction of genome size to generate novel and useful bacteria for industrial uses. Furthermore, the design of the changes in the transcriptional regulatory network of the nitrogen metabolic pathway in *B. subtilis* cells could facilitate the generation of improved industrial protein production.

- (2) 《最新》動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術  
山口泰典他 148 名著、菅原 隆編  
第 2 章、第 6 節、培養のシミュレーション・評価技術 [3] 動物細胞培養の増殖測定、(株)技術情報協会、pp. 302-305 (2014-4)

種々の培養細胞増殖度測定方法の長所と短所について執筆した。

- (3) 線虫学実験  
山口泰典他 50 名著、水久保隆之・二井一禎編  
3 章 線虫を用いた環境毒性学実験法 3.2 産仔数測定による毒性の評価法、京都大学学術出版、pp. 163-164 (2014-10)

エレガンス線虫の産仔数を利用した毒性の定量的検出方法について執筆した。

## D. その他

- (1) 市花バラの酵母で地元の名産品を産官学の連携で開発  
久富泰資



- 経済リポート、2014年2月1日、1472号、p.27、記事掲載（2014-2）
- (2) バラ：パンで「花咲く」  
久富泰資  
朝日新聞、2014年2月2日、26面、記事掲載（2014-2）
- (3) バラの酵母菌でパン作り  
久富泰資  
毎日新聞、2014年2月12日、26面、記事掲載（2014-2）
- (4) 枯草菌緊縮制御ネットワークの全貌の解明とその応用  
藤田泰太郎  
科学研究費助成事業、基盤研究（B）「枯草菌緊縮制御ネットワークの全貌の解明とその応用」平成23～25年度研究成果報告書（2014-3）
- (5) 2014年2月15～16日 GDR 2<sup>nd</sup> Meeting in 九州大学に参加して。  
佐藤 淳  
日本進化学会ニュース 15（1）：9-12（函館）（2014-3）
- (6) 「福山バラの酵母」プロジェクト  
久富泰資  
福山大学学報、140号、p.10（2014-4）
- (7) きらり名物教授 -バラの酵母でパン開発-  
久富泰資  
中国新聞、2014年6月15日、24面、記事掲載（2014-6）
- (8) 「福山バラの酵母」で地域発のパンづくり！  
杉原千紗  
第14回生命工学部公開授業-ヒラメキは食から-（福山）（2014-6）
- (9) モロシヌス研究会 森脇和郎賞 受賞  
佐藤 淳  
第28回モロシヌス研究会（伊豆修善寺）、講演要旨集、p.13（2014-6）

- (10) 枯草菌の炭素代謝と孢子形成の緊縮転写制御  
藤田泰太郎、広岡和丈  
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「環境健康科学の研究拠点の形成」平成 22  
～26 年度研究成果発表会（福山）（2014-9）
- (11) 植物の生育促進への利用に資する、枯草菌の転写応答機構の研究  
広岡和丈、藤田泰太郎  
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「環境健康科学の研究拠点の形成」平成 22  
～26 年度研究成果発表会（福山）（2014-9）
- (12) 地域に眠る酵母菌を発掘し花開かす  
久富泰資  
福山大学平成 26 年度公開講座-ひと・まち・くらし-（福山、三原）（2014-9）
- (13) 「福大ワイン」で大学の知名度アップ  
久富泰資  
経済レポート、2014 年 10 月 20 日、1498 号、p. 19、記事掲載（2014-10）
- (14) 二つの転写因子 YuiB と CcpA による枯草菌のラムノース異化に関わる  
*yuxG-yuiBCDE* オペロンの制御領域  
広岡和丈、小土井祐介、藤田泰太郎  
第 25 回大学間交流会（高石）、要旨集、p. 14（2014-10）
- (15) 遺伝子に残された進化の痕跡～パンダやアザラシは旨みを感じていない？～  
佐藤 淳  
2014 年度福山市西部市民大学特別講座（2014-11）
- (16) 生物工学科が推進する「福山大学ワインプロジェクト」  
久富泰資  
福山大学学報、142 号、p. 4（2014-12）