

# 生物工学科 2007 年研究業績

## A. 研究発表

### 1. 論文

- (1) Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation

Hiroshi Matsuoka, Kazutake Hirooka, and Yasutaro Fujita  
*J. Biol. Chem.*, 282, 5180-5194 (2007)

The organization and function of the *Bacillus subtilis* YsiA regulon involved in fatty acid degradation were investigated. Northern and primer extension analyses indicated that this regulon comprises five operons, i.e. *lcfA-ysiA-B-ETF-B-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusM-L-K-J*, and *ywjF-acdA-rpoE*. YusJ and AcdA, YsiB and YusL, and YusK presumably encode acyl-CoA dehydrogenases, 3-hydroxyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase complexes, and acetyl-CoA C-acyltransferase, respectively, which are directly involved in the fatty acid beta-oxidation cycle. In addition, LcfA and YhfL are likely to encode long chain acyl-CoA ligases. On gel retardation and footprinting analyses involving the purified YsiA protein, we identified cis-sequences for YsiA binding (YsiA boxes) in the promoter regions upstream of *ysiA*, *ykuF*, *yusL*, *yhfL*, and *ywjF*, the equilibrium dissociation constants ( $K_d$ ) for YsiA binding being 20, 21, 37, 43, and 65 nM, respectively. YsiA binding was specifically inhibited by long chain acyl-CoAs with 14-20 carbon atoms, acyl-CoAs with 18 carbon atoms being more effective; out of long chain acyl-CoAs tested, monounsaturated oleoyl-CoA, and branched chain 12-methyltetradecanoyl-CoA were most effective. These in vitro findings were supported by the in vivo observation that the knock-out of acyl-CoA dehydrogenation through *yusJ*, *etfA*, or *etfB* disruption resulted in YsiA inactivation, probably because of the accumulation of long chain acyl-CoAs in the cells. Furthermore, the disruption of *yusL*, *yusK*, *yusJ*, *etfA*, *etfB*, or *ykuG* affected the utilization of palmitic acid, a representative long chain fatty acid. Based on this work, *ysiA*, *ysiB*, *ykuF*, *ykuG*, *yhfL*, *yusM*, *yusL*, *yusK*, *yusJ*, and *ywjF* can be renamed *fadR*, *fadB*, *fadH*, *fadG*, *lcfB*, *fadM*, *fadN*, *fadA*, *fadE*, and *fadF*.

- (2) Phylogenetic relationships and divergence times among dormice (Rodentia,

**Gliridae) based on three nuclear genes**

**Mitsuo Nunome, Shumpei P. Yasuda, Jun J. Sato, Peter Vogel, Hitoshi Suzuki**  
*Zool. Scr.*, 36 (6), 537–546 (2007)

We examined phylogenetic relationships among six species representing three subfamilies, Glirinae, Graphiurinae and Leithiinae with sequences from three nuclear protein-coding genes (apolipoprotein B, APOB; interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP; recombination-activating gene 1, RAG1). Phylogenetic trees reconstructed from maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) and Bayesian-inference (BI) analyses showed the monophyly of Glirinae (*Glis* and *Glirulus*) and Leithiinae (*Dryomys*, *Eliomys* and *Muscardinus*) with strong support, although the branch length maintaining this relationship was very short, implying rapid diversification among the three subfamilies. Divergence time estimates were calculated from ML (local clock model) and Bayesian-dating method using a calibration point of 25 Myr (million years) ago for the divergence between *Glis* and *Glirulus*, and 55 Myr ago for the split between lineages of Gliridae and Sciuridae on the basis of fossil records. The results showed that each lineage of *Graphiurus*, *Glis*, *Glirulus* and *Muscardinus* dates from the Late Oligocene to the Early Miocene period, which is mostly in agreement with fossil records. Taking into account that warm climate harbouring a glirid-favoured forest dominated from Europe to Asia during this period, it is considered that this warm environment triggered the prosperity of the glirid species through the rapid diversification. *Glirulus japonicus* is suggested to be a relict of this ancient diversification during the warm period.

**(3) Novel free ceramides as components of the soldier defense gland of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*)**

**Masaya Ohta, Fumito Matsuura, Gregg Henderson, and Roger A. Laine**  
*J. Lipid Res.*, 48, 656–664 (2007)

Of the lipid extracts of the defense secretion from the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, on HPTLC analysis, no glycolipids or phospholipids were detected, but free fatty acids and three novel ceramides were found (termed TL-1, TL-2 and TL-3). Free fatty acids were confirmed to be lignoceric acid (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0), as described previously (Chen *et al.*, 1999, *J. Chem. Ecol.* 25, 817-824). TL-1, TL-2 and TL-3 were characterized as ceramides differing in hydrophobicity based on results of MALDI-TOF MS analysis, mild alkaline treatment,

GC-MS analysis of fatty acid methylesters, and GC-MS analysis of sphingoid long chain bases (LCB) as trimethylsilyl-derivatives. Fatty acids in TL-1 and TL-2 were C18:0, C20:0, and C22:0, and those in TL-3 were 2-hydroxy C18:0, C20:0, and C22:0. The most predominant LCB in TL-2 was a novel trihydroxy C<sub>14</sub>-sphingosine, 1,3,9-trihydroxy-2-amino-6-tetradecene. TL-3 contained C<sub>18</sub>-sphinganine and two kinds of novel sphingadienines, 1,3-dihydroxy-2-amino-7,10-hexadecadiene and 1,3-dihydroxy-2-amino-11,14-eicosadiene. Although examination of the biological activities of these novel ceramides was beyond the scope of these studies, because of the miniscule quantities available from termite secretions, it will be interesting in the future to synthesize these molecules for biological testing.

(4) Regulatory role of RsgI in sigI expression in *Bacillus subtilis*

Kei Asai, Takafumi Ootsuji, Kazue Obata, Takashi Matsumoto, Yasutaro Fujita, and Yoshito Sadaie

*Microbiology*, 153, 92-101 (2007)

The sigma gene, *sigI*, of *Bacillus subtilis* belongs to the group IV heat-shock response genes and has many orthologues in the bacterial phylum Firmicutes. The *B. subtilis sigI* gene is considered to constitute an operon with *rsgI* (regulation of *sigI*, formerly *ykrI*). As little is known about either the structure and function of the *sigI-rsgI* operon or the SigI regulons, the role of RsgI in heat-inducible transcription of the *sigI-rsgI* operon was investigated, using Northern analysis and a heat-stable beta-galactosidase reporter assay. Heat-inducible, SigI-dependent transcription of the *sigI-rsgI* operon was stimulated greatly by disrupting *rsgI*. Yeast two-hybrid analysis showed direct interaction between the N-terminal portion of the presumed RsgI protein and SigI. Without RsgI function, induction of transcription of the *sigI-rsgI* operon upon transient heat stress depended on *dnaK* activity. However, transcription of the operon was induced during growth at prolonged higher temperature even without DnaK function. Without RsgI function, *sigI-rsgI* operon transcription was induced after the end of growth independent of any temperature shift in a sporulation medium and toward the end of growth in a rich complex medium. Furthermore, glucose addition resulted in a strong suppression of *sigI-rsgI* transcription. Therefore it is hypothesized that transcription of the *sigI-rsgI* operon of *B. subtilis* is negatively regulated by the putative transmembrane protein RsgI, which moderates SigI's sensitivity to heat shock or nutritional stress.

(5) Lipase-catalyzed Asymmetric Synthesis of Desprenyl-carquinostatin A and Descycloavandulyl-lavanduquinocin

Tominari Choshi, Yoshinari Uchida, Yukiko Kubota, Junko Nobuhiro, Mitsuhiro Takeshita, Takushi Hatano, and Satoshi Hibino  
*Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1060–1064 (2007)

An asymmetric synthesis of the core carbazole structure, 6-desprenyl-carquinostatin **3** and 6-descycloavandulyl-lavanduquinocin **3**, toward a total synthesis of carquinostatin A (**1**) and lavanduquinocin (**2**), has been established. Lipase QLM (Meito) catalyzed enantioselective acetylation of the racemic alcohol **6** gave the (-)-acetate **7** and the (+)-alcohol **6** with high enantioselectivity. The absolute stereochemistry of the (-)- and (+)-alcohol **6** have been determined to be *R*- and *S*-configurations, respectively, by the advanced Mosher method. In the same manner, the (-)-acetate **13** and the (+)-alcohol **12** have been obtained from the racemic alcohol **12**. The (*R*)-(-)-acetate **13**, derived from the (*R*)-(-)-acetate **7**, was the same as the (-)-acetate **13**, which has been determined to be (*R*)-configuration. Oxidation of the (*R*)-(-)-acetate **13** followed by hydrolysis afforded (*R*)-(-)-6-desprenyl-carquinostatin [and (*R*)-(-)-6-descycloavandulyl-lavanduquinocin] **3**. In addition, oxidation of the (*S*)-(+)-alcohol **12** provided (*S*)-(+)-**3**, which is the enantiomer of 6-desprenyl-carquinostatin A (*R*)-(-)-**3**.

(6) *Bacillus subtilis rapD*, a direct target of transcription repression by RghR, negatively regulates *srfA* expression

Mitsuo Ogura, and Yasutaro Fujita  
*FEMS Microbiol. Lett.*, **268**, 73–80 (2007)

The *Bacillus subtilis* genome encodes eleven Rap proteins, which are conserved tetratricopeptide-containing regulatory proteins. Of those characterized to date, all except RapI negatively regulate response regulators, including Spo0F, ComA and DegU, via protein-protein interactions. RapD has not yet been fully characterized. It was examined whether RapD inhibits the expression of *spoIIIE*, *srfA* and *aprE*, which are Spo0F-, ComA- and DegU-regulated genes, respectively. It was observed that multicopy *rapD* inhibited *srfA* expression, which suggests that RapD inhibits ComA. This was reinforced by the fact that multicopy *rapD* also blocked the expression of *rapC* and *rapF*, which belong to the ComA regulon. The expression of *rapD* was reported to depend on the extracytoplasmic function sigma factor SigX. DNA microarray analysis and gel

retardation assays revealed that *rapD* expression is directly repressed by RghR. Thus, the ComA regulon is regulated by *rapD* in a SigX- and RghR-dependent manner.

- (7) Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *ymaGH* operons and *ymaF* gene by two transcriptional repressors, LmrA and YxaF, in response to flavonoids

Kazutake Hirooka, Satoshi Kunikane, Hiroshi Matsuoka, Ken-ichi Yoshida, Kanako Kumamoto, Shigeo Tojo, and Yasutaro Fujita

*J. Bacteriol.* **189**, 5170–5182 (2007)

*Bacillus subtilis* LmrA is known to be a repressor that regulates the *lmrAB* and *ymaGH* operons; *lmrB* and *ymaG* encode a multidrug resistance pump and quercetin 2,3-dioxygenase, respectively. DNase I footprinting analysis revealed that LmrA and YxaF, which are paralogous to each other, bind specifically to almost the same *cis* sequences, LmrA/YxaF boxes, located in the promoter regions of the *lmrAB* operon, the *ymaF* gene, and the *ymaGH* operon for their repression and containing a consensus sequence of AWTATAtagaNYGgTCTA, where W, Y, and N stand for A or T, C or T, and any base, respectively (three-out-of-four match [in lowercase type]). Gel retardation analysis indicated that out of the eight flavonoids tested, quercetin, fisetin, and catechin are most inhibitory for LmrA to DNA binding, whereas quercetin, fisetin, tamarixetin, and galangin are most inhibitory for YxaF. Also, YxaF bound most tightly to the tandem LmrA/YxaF boxes in the *ymaGH* promoter region. The *lacZ* fusion experiments essentially supported the above-mentioned *in vitro* results, except that galangin did not activate the *lmrAB* and *ymaGH* promoters, probably due to its poor incorporation into cells. Thus, the LmrA/YxaF regulon presumably comprising the *lmrAB* operon, the *ymaF* gene, and the *ymaGH* operon is induced in response to certain flavonoids. The *in vivo* experiments to examine the regulation of the synthesis of the reporter beta-galactosidase and quercetin 2,3-dioxygenase as well as that of multidrug resistance suggested that LmrA represses the *lmrAB* and *ymaGH* operons but that YxaF represses *ymaGH* more preferentially..

## 2. 報文

(1) 枯草菌の脂肪酸分解に関与する YsiA レギュロンの構成と機能

松岡 浩史

福山大学生命工学部研究年報 (6), 1-24 (2007)

枯草菌の脂肪酸分解に関わる YsiA レギュロンの構成と機能を研究した。ノザン解析およびプライマー伸長解析により、このレギュロンが 5 オペロン (*lcfA-ysiA-B-etfB-A, ykuF-G, yhfL, yusM-L-K-J* および *ywjF-acdA-rpoE*) から構成されることを明らかにした。おそらく、YusJ と AcdA、YsiB と YusL、YusK は、それぞれアシル-CoA デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシル-CoA デヒドロゲナーゼ/エノイル-CoA ヒドラターゼ複合体、アセチル-CoA C-アシルトランスフェラーゼをコードしており、脂肪酸の  $\beta$ -酸化経路に直接的に関与している。加えて、LcfA と YhfL はおそらく長鎖アシル-CoA リガーゼをコードしている。精製した YsiA 蛋白質を用いたゲル移動度シフト解析およびフットプリント解析の結果、*ysiA*、*ykuF*、*yusL*、*yhfL* および *ywjF* の上流プロモーター領域内へ YsiA の結合する *cis*-配列 (YsiA-box) を同定することができた。それぞれの YsiA の DNA へ結合する平衡解離定数 (*K<sub>d</sub>*) は、20、21、37、43 および 65 nM であり、YsiA 結合能は 14 から 20 炭素数の長鎖飽和アシル-CoA により特異的に抑制され、炭素数 18 のアシル-CoA がより効果的であった。長鎖飽和アシル-CoA 以外の試験では、モノ不飽和オレオイル-CoA および分岐鎖 12-メチルテトラデカノイル-CoA が最も効果的であった。これら *in vitro* での発見は、*yusJ*、*etfA* または *etfB* 破壊によりアシル-CoA 脱水素反応が止められ、細胞内に長鎖アシル-CoA が蓄積されることにより YsiA が不活性化した *in vivo* 情報の結果により裏付けられた。さらに、*yusL*、*yusK*、*yusJ*、*etfA*、*etfB* または *ykuG* の破壊は、長鎖脂肪酸を代表するパルミチン酸の資化利用に影響を及ぼした。この研究により、*ysiA*、*ysiB*、*ykuF*、*ykuG*、*yhfL*、*yusM*、*yusL*、*yusK*、*yusJ* および *ywjF* を、*fadR*、*fadB*、*fadH*、*fadG*、*lcfB*、*fadM*、*fadN*、*fadA*、*fadE* および *fadF* (*fad*: fatty acid degradation) と改名した。

### 3. 口頭発表

- (1) Global regulation of fatty acid degradation through YsiA in *Bacillus subtilis*  
Hiroshi Matsuoka, Kazutake Hirooka, and Yasutaro Fujita  
4th Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms.  
14th International Conference on Bacilli, Green Park Resort, Tirrenia, Pisa,

Italy. Abstracts, T58 (2007-6)

The organization and function of the *Bacillus subtilis* YsiA regulon involved in fatty acid degradation were unveiled. This regulon comprises five operons, i.e., *lcfA-ysiA-B-etfB-A*, *ykuF-G*, *yhfL*, *yusM-L-K-J*, and *ywjF-acdA-rpoE*. YusJ and AcdA, YsiB and YusL, and YusK presumably encode acyl-CoA dehydrogenases, 3-hydroxyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase complexes, and acetyl-CoA C-acyltransferase, respectively, which are directly involved in the fatty acid  $\beta$ -oxidation cycle. In addition, LcfA and YhfL are likely to encode long-chain acyl-CoA ligases. On gel retardation and footprinting analyses involving the purified YsiA protein, we identified *cis*-sequences for YsiA-binding (YsiA-boxes) in the promoter regions upstream of *ysiA*, *ykuF*, *yusL*, *yhfL*, and *ywjF*. YsiA binding was specifically inhibited by long-chain acyl-CoAs with 14-20 carbon atoms, acyl-CoAs with 18 carbon atoms being more effective; out of long-chain acyl-CoAs tested, monounsaturated oleoyl-CoA and branched-chain 12-methyltetradecanoyl-CoA were most effective. These *in vitro* findings were supported by the *in vivo* observation that the knockout of acyl-CoA dehydrogenation through *yusJ*, *etfA*, or *etfB* disruption resulted in YsiA inactivation, probably due to the accumulation of long-chain acyl-CoAs in the cells. Furthermore, the disruption of *yusL*, *yusK*, *yusJ*, *etfA*, *etfB*, or *ykuG* affected the utilization of palmitic acid.

The *lcfA*, *ysiA*, *B*, *etfB*, *A*, *yhfL*, *yusL*, *K*, and *J* genes are induced upon carbon starvation. The *cres* responsible for this CcpA-mediated catabolite repression were identified in the coding regions of *lcfA*, *yhfL*, and *yusL*. Moreover, the crystallographic structure of YsiA was determined (1). This protein was unexpectedly found to contain one molecule of lauroyl-CoA, leading to identification of the amino acids were found forming hydrogen bonds with H and O atoms of lauroyl-CoA. Actually, 116 and 150 arginines were found to be involved in the interaction with a long-chain acyl-CoA.

1. Badger, J. et al. *Proteins* **60**, 787-796 (2005).

- (2) Novel free ceramides as components of the soldier defense gland of the formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*)  
Masaya Ohta, Tuyoshi Itaya, Yoko Kimura, Satoru Yamamoto, Yuko Miyao, Fumito Matsuura, Gregg Henderson, and Roger A. Laine  
*Glycobiology and Sphingobiology 2007*, Tokushima, Japan. Abstracts, p.128 (2007-3)

On HPTLC analysis, no glycolipids and phospholipids were detected but one spot corresponding to free fatty acids and three spots (termed TL-1, TL-2 and TL-3) migrating in the region of ceramides were detected in the lipids from the frontal gland secretions of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki). Free fatty acids were confirmed to be lignoceric acid (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0) as previously described (Chen et al., 1999). The TL-1, TL-2 and TL-3 were confirmed to be ceramides differing in their hydrophobicity based on the results of MALDI-TOF MS analysis, mild alkaline treatment, GC-MS analysis of fatty acid methylester, and GC-MS analysis of LCBs as TMS-derivatives. The structures of LCBs were further confirmed by GC-MS of aldehydes derived from LCBs by NaIO<sub>4</sub> oxidation and of alcohols derived from aldehydes by reduction with NaBH<sub>4</sub>. Double bond positions in LCBs were determined by GC-MS of polyhydroxy alcohols derived from alcohols by OsO<sub>4</sub> oxidation. Fatty acids in TL-1 and TL-2 were C18:0, C20:0 and C22:0 and TL-3 2-hydroxy C18:0, C20:0 and C22:0. The structures and composition of LCBs were quite unique. TL-1 contained only C18-sphinganine. The most predominant LCB in TL-2 was detected to be a novel trihydroxy C14-sphingosine, 1,3,9-trihydroxy-2-amino-6-tetradecene. TL-3 contained C18-sphinganine and two kinds of novel sphingadienines, 1,3-dihydroxy-2-amino-7,10-hexadecadiene and 1,3-dihydroxy-2-amino-11,14-eicosadiene.

Also, we compared protein profiles of soldier heads with those of workers of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* by SDS-PAGE. We identified a 24-KDa soldier specific protein (Cfsp1) that exists in frontal gland secretions. We determined the N-terminal and internal amino acid sequence of Cfsp1 using peptide mass fingerprinting method, and then cloned the *Cfsp1* cDNA. The Cfsp1 protein showed sequence homologies with known insect secretory carrier proteins, binding to hydrophobic ligands such as juvenile hormone.

(3) Genetic characterization of the wild-derived house mice in East Asia

Jun J. Sato, Yasunori Yamaguchi, Junpei Ueta, Hitoshi Suzuki, Wang Chunyan, Alexei P. Kryukov, Kazuyuki Mekada, Naoyuki Takahata, and Kazuo Moriwaki  
21th International Mammalian Genome Conference, Kyoto, Japan. Abstracts, p. 101 (2007-10)

Our previous studies showed that four Hemoglobin beta chain (*Hbb*) haplotypes, *d*, *p*, *w1*, and *w2* in the wild-derived house mouse, *Mus musculus*, have been established with the



complex history among different subspecies groups, *castaneus* and *musculus*. In the intergenic spacer region between *Hbb* b1 and b2 genes, recombination points were specified among these haplotypes, suggesting the existence of multiple recombination-inducing sequence factors. This implies that the *Hbb* locus might have possibility to reflect the past hybridization among different types of mice along with the detection of the recombination, and therefore possess useful property to characterize the genetic origins of the laboratory mice. In this study, the most polymorphic second intron sequences of both b1 and b2 genes were examined for 56 mice individuals collected from China, Japan, and Russia to trace the origin of the widely used laboratory strains and, in particular, to evaluate the origin of the Japanese mouse strain which was recently suggested to genetically contribute to the common laboratory strains. The Neighbor-joining analyses showed different patterns of similarity between b1 and b2 gene trees, in which the mice collected from Japan represented close affinity to the *p* and *d* haplotypes in the b1 gene tree and to the *p* and *w1* haplotypes in the b2 gene tree. This suggests that the Japanese mice possess the recombinant *p* haplotype and it is thus implied that the genome components of the widely used laboratory strains have also been associated with the complicated genealogies of the East Asian mice.

(4) Pinniped and Red Panda affinities elucidated using exon nucleotide sequences of five nuclear genes

Mieczyslaw Wolsan and Jun J. Sato

67th Annual Meeting, Society of Vertebrate Palaeontology, University of Texas, Austin, Texas, USA. Abstracts, p. 28A (2007-10)

Considerable long-standing controversy surrounds the phylogenetic affinities of seals, walrus, and sea lions (Pinnipedia) and red panda or lesser panda (*Ailurus fulgens*). Although the arctoid nature of the pinnipeds and red panda has convincingly been demonstrated on both morphologic and genetic grounds, there remains uncertainty about the phylogenetic positions of both taxa relative to the other arctoid Carnivora. Until most recently, the two major competing hypotheses of pinniped relationships were that the pinnipeds have a monophyletic origin from a bear-like ancestor or that they have a diphyletic origin, with sea lion (Otariidae) deriving from a bear-like ancestor and seals (Phocidae) deriving from an otter-, mustelid-, or musteloid-like ancestor. Red panda has previously been classified with bears (Ursidae) or raccoons (Procyonidae), grouped with giant panda in their own family, or considered a separate lineage of uncertain affinities.

Recent molecular studies have recovered red panda as a musteloid, placing it basally to a clade containing Procyonidae and Mustelidae (weasels, otters, zorillas, martens, badgers, and allies), but have failed to unambiguously resolve the position of this species relative to Mephitidae (skunks). We examined phylogenetic relationships among 42 species of Arctoidea (Ursidae, Pinnipedia, Musteloidea) using a concatenated sequence of 5497 exon nucleotides from five nuclear genes (APOB, BRCA1, RAG1, RBP3 [IRBP], VWF). Maximum parsimony, maximum likelihood, and Bayesian analyses of separate and combined data set resulted in well-resolved and –supported phylogeny reconstruction. Evidence from nuclear DNA evolution presented here contradicts the two major hypotheses of pinniped relationships and strongly suggests a monophyletic origin of the pinnipeds from an arctoid ancestor shared with Musteloidea to the exclusion of Ursidae. This evidence also provides the first robust support for the phylogenetic placement of red panda, identifying the species as the closest relative of the procyonid-mustelid clade, with the skunks as most basal musteloids.

- (5) The origin and early diversification of the marten-wolverine clade Guloninae  
Mieczyslaw Wolsan and Jun J. Sato

International Symposium “Ecosystem Evolution of Baikalian Region and Adjacent Areas in Context of Global Change: Past, Present, Future” , Irkutsk, Bolshie Koty [Lake Baikal], Russia. Abstracts, p. 83 (2007–9)

Martens are medium-sized semiarboreal carnivores (feeding on small vertebrates) widely distributed throughout the forested regions of Eurasia and Americas. Wolverine is larger in size, mostly terrestrial, in winter feeds chiefly on reindeer and carrion, and occurs in the arctic and subarctic tundra and taiga regions of Eurasia and North America. Martens are generally classified in two genera, *Martes* (with the subgenera *Martes*, *Charronia*, and *Pekania*) and *Eira*. Wolverine is included in the genus *Gulo*. All these taxa are traditionally classified within the mustelid subfamily Mustelinae. Here we present evidence from multiple nuclear and mitochondrial DNA sequences that reveals the paraphyly of both the genus *Martes* and the subfamily Mustelinae, as generally circumscribed. The genus *Martes* is paraphyletic relative to the genera *Gulo* and *Eira*, and the subfamily Mustelinae is paraphyletic relative to the mustelid subfamilies Lutrinae (otters), Zorillinae (zorillas), and Helictidinae (ferret-badgers). Based on this evidence and in agreement with certain genetic and morphological findings reported previously, we consider *Pekania* a distinct genus and also recognize the genera *Martes*, *Gulo*, *Pekania*,

and *Eira* as parts of the distinct mustelid subfamily Guloninae Gray, 1825. The name Guloninae is here defined as the smallest clade containing *Martes foina*, *Gulo gulo*, *Pekania pennanti*, and *Eira barbara*. The name Mustelinae, in turn, is confined to the smallest clade containing *Mustela erminea* and *Neovison vison*. Our molecular-based divergence-time estimates for Guloninae indicate three major early radiation events at the Miocene-Pliocene transition. The origin of Guloninae and split into lineages leading to the *Pekania-Eira* and *Martes-Gulo* clades is dated at 6.6 Ma. The split into lineages leading to *Eira* and *Pekania* is dated at 6.5 Ma. The split into lineages leading to *Martes* and *Gulo* is dated at 5.2 Ma. These results, together with evidence from paleontology and biogeography, suggest that Guloninae originated in the late Miocene in the forested habitats of central Asian mountains from where the clade dispersed at the Miocene-Pliocene transition to North (*Pekania*) and South (*Eira*) Americas, and later to south-eastern Asia (subgenus *Charronia*), to northern Eurasia and North America (*Gulo*), and throughout Europe, western and northern Asia, and northern North America (subgenus *Martes*). This scenario is in good agreement with paleontological and paleogeographic evidence indicating that the Miocene-Pliocene transition was a critical period in Earth history, witnessing large-scale climatic and environmental transitions with rapid phylogenetic floral and faunal diversification linked with intercontinental and large-scale intracontinental overland dispersals.

(6) Coat color variations of the Japanese Marten, *Martes melampus*

Tetsuji Hosoda, Jun J. Sato, and Hitoshi Suzuki

Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics, MAPEEG-2007, Vladivostok and Vostok Marine Biological Station, Russia. Abstracts p. 13 (2007-9).

Two distinct populations of the Japanese marten, *Martes melampus*, which have the similar dark coat color in summer, are easily discernible by coat coloration in winter: a yellow phenotype more common to the Japanese islands and a dark brown phenotype observed in populations in Tsushima and Shikoku Islands, and the Kii peninsula. Because such a seasonal variation of the coat color is not observed among the closely related species of the genus *Martes* in Eurasian continent, it is postulated that the variation has been uniquely developed in the Japanese archipelago. Therefore the elucidation of the mechanism for such variation would provide meaningful insight into the factor in the Japanese archipelago which might shape the environmental adaptation. However, the

genetic population structures of the Japanese martens have not been assessed along with the coat color and it has thus been remained elusive whether the seasonal variant is fixed in the population or sporadically emerges. As a first step of this study, we determined and used sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene for characterizing the population structures of the Japanese marten. As the result, each yellow and dark brown color individual was not clustered with each other, indicating sporadic appearance of the seasonal color variant. This result might be due to that there is not resolving power in the cytochrome *b* gene or that two types with different coat colors are not fully differentiated so that their maternal mitochondrial genes were freely exchanged through the hybridization between these two color types. We are now analyzing another phylogeographic marker that shows higher substitution rate and the candidate genes that would be responsible for the coat color changes. Here we also report the coat color variation observed in the sable, *Martes zibellina*.

(7) Determination of the recombination point within hemoglobin beta adult genes of the wild derived house mouse, *Mus musculus*

Junpei Ueta, Jun J. Sato, Hitoshi Suzuki, Kazuyuki Mekada, Naoyuki Takahata, Kazuo Moriwaki, and Yasunori Yamaguchi

Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the Japan Society for Cell Biology (Fukuoka Convention Center, Fukuoka). Abstracts, p. 212 (2007-5)

Since the onset of considerable samplings in 1970s, many individuals of the wild derived house mouse, *Mus musculus*, in East Asia have been examined with morphometric, chromosomal, biochemical, and genetic data. Several variants of the hemoglobin beta chain (*Hbb*) have also been characterized by polymorphisms of the protein electrophoresis and nucleotide sequences. There are four *Hbb* haplotypes, *s*, *d*, *p*, and *w1* in the wild populations of the house mouse and the establishment of these haplotypes are closely associated with the diversification process of the main four subspecies groups, *baccorianus*, *castaneus*, *domesticus*, and *musculus*. In this study, by determining the nucleotide sequences of the b1 and b2 genes, we show that the *p* haplotype is the recombinant carrying the b1 gene of the *d* haplotype and the b2 gene of the *w1* haplotype. The recombination points were also specified within the intergenic spacer region between b1 and b2 genes, and it was suggested that the recombination events are possibly caused by tandem repeat sequences. There were nonsynonymous substitutions resulting in

changes of the amino acid nature among different haplotypes, implying that the recombination created different types of *Hbb* in the protein level. We discuss more about the differentiation of the mouse subspecies groups, the recombination events caused by hybridizations among different subspecies groups, and the role of the repeat sequences on the recombination mechanism within the genome.

**(8) Construction of the Wilson' s disease model cell by RNAi technology**

Shinsuke Kinoshita, Yoshiya Kanoh, Tadao Inoue, Hiroshi Nagashima, and Yasunori Yamaguchi

Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the Japan Society for Cell Biology (Fukuoka Convention Center, Fukuoka). Abstracts, p. 191 (2007-5)

Somatic stem cells are expected as a cell source for autologous transplantation because immunorejection could be avoided by using the somatic stem cells isolated from self-body. The Toge cell, one of the somatic stem cells derived from salivary gland, is found to be able to differentiate into the cell possessing characters of liver or pancreas cells. Applying this finding into regenerative medicine, it is proceeding to construct the model system that sick model pigs with liver or pancreas diseases are treated by the transplantation of the differentiated Toge cells. We are now constructing the nucleus donor cells to make sick model clone pig with Wilson's disease which is caused by deficiency in the *ATP7b* gene expression in human.

Since embryonic stem cells are not applicable for pig, it is impossible to reproduce genetic deficient pigs by knockout technology. Therefore we used RNAi technology to down-regulate the expression of the *ATP7b* gene by post-transcriptional silencing. Three target sequences were designed against the mRNA sequences of pig *ATP7b* gene deposited in the DNA database and inserted into the shRNA expression vector, and the vectors were transfected into Toge cells by electroporation. The cells were then screened by an antibiotic to obtain cloned cell populations possessing the shRNA expression vectors. The result of real time quantitative RT-PCR method for the mRNA extracted from the cloned cells showed that the expression level was reduced into 38% compared with normal Toge cells.

**(9) Determination of differentiation patterns of SGP cells by proteomics analysis**

Tomoyo Tsujita, Nobuhiro Ohno, Tadao Inoue, Yuichiro Kuwana, Naoko Izuno, Keizaburo Miki, Shiro Matsumoto, Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo, Yasunori Yamaguchi

Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the Japan Society for Cell Biology (Fukuoka Convention Center, Fukuoka). Abstracts, p. 82 (2007-5)

Somatic stem cells differentiate into only limited kinds of cell lineages, but its application to the cell transplantation is highly expected in the field of regenerative medicine because immuno rejection could be avoided by using the somatic stem cells isolated from self-body. Recent studies have shown that the SGP (Salivary gland progenitor) cell, a somatic stem cell derived from salivary gland, can differentiate into hepatic or pancreatic cell lineages in rats, mice, and pigs. Therefore the differentiated SGP cells have a potential to be applied to the cell transplantation into patients with liver or pancreatic diseases. However, to use these differentiated SGP cells, it is needed to check their differentiation status whether they could be enough to complement the lost caused by the diseases. So far, only major hepatic (e.g., albumin and alfa-fetoprotein) or pancreatic (e.g., glucagon and insulin) markers have been used to assess the differentiation status, but the other many proteins remain to be characterized. In this study, we examined the expression patterns of the porcine-derived tissue and cells including liver, immortal hepatic cells, the SGP cells, and the differentiation-induced SGP cells by two dimensional gel electrophoretic analyses. We could find different electrophoretic patterns specific to each sample. Further analyses such as shotgun proteomics would identify each specific protein.

(10) Function of DAF-21/Hsp90 in spermatogenesis of *C. elegans*

Nobuhiro Ohno, Tadao Inoue, Yasunori Yamaguchi

Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the Japan Society for Cell Biology (Fukuoka Convention Center, Fukuoka). Abstracts, p. 152 (2007-5)

The molecular chaperone has a role to fold a lot of newly translated proteins properly for maintenance of its function. Hsp90 has been shown to be involved in various protein folding. Because of the similarity in amino acid sequence, the function of Hsp90 is considered to be preserved among diverse organisms. We examined the function of the DAF-21 that is the Hsp90 homologue in nematodes, *Caenorhabditis elegans*, by using

RNAi methods.

It has been known that DAF-21 is strongly expressed in almost all cells throughout embryonic development, but the expression is decreased in somatic cells and restricted to only germ cells after larva stage. During the oogenesis of hermaphrodite, inhibition of the DAF-21 function by RNAi has been suggested to abnormally accelerate meiotic division without a stop at the prophase / metaphase transition stage in a cell cycle, as normally observed in the wild type nematode. Therefore DAF-21 is considered to have important roles during a series of gametogenesis, but the precise cellular function, especially in male spermatogenesis, has rarely been reported and therefore not been fully understood.

In this study, we found abnormal proliferation in sperm numbers in male gonad cells for individuals treated by RNAi to knockdown the function of DAF-21. We discuss the possibility that this phenomenon is governed by the same mechanism as suggested during oogenesis in hermaphrodite.

(11) Identification of DAF-21/Hsp90 interactors in *Caenorhabditis elegans*

Kazumasa Hirata, Akihiro Ino, Tadao Inoue, Yasunori Yamaguchi

Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the Japan Society for Cell Biology (Fukuoka Convention Center, Fukuoka). Abstracts, p. 79 (2007-5)

To understand the specific nature of the germ cells, it is necessary to elucidate the functions of a lot of existing proteins and the network interactions among them in the gonad cells.

Hsp90 is one of proteins that have been reported to be expressed in germ cells of various organisms and it functions as molecular chaperone which maintain three-dimensional structures of a lot of functional proteins. Previously we have reported that DAF-21, the Hsp90 homologue of the *C. elegans*, is abundantly and continuously expressed in germ cells throughout the life of this organism. In this study, we explored the interacting proteins of the DAF-21 by using the method combining the immunoprecipitation-based interactor collection and the shotgun proteomics with LC-MS/MS system. Two kinds of immunoprecipitation methods by using protein G/A beads or ProteoChip were examined with the 608F monoclonal antibody which specifically recognizes DAF-21.

As the result, we could identify 27 and 41 proteins by the method using protein G/A beads and ProteoChip, respectively. However, few proteins were shared by these results of two methods. Only identified in both methods was Ribosomal protein small subunit

protein 8. In addition, there were no identified proteins previously reported to be interacted with DAF-21 by Yeast two-hybrid method. All of the evidence suggests that identification of some protein interactors should be conducted with combination of different methodologies.

- (12) The stress detection by using the hsp16-GFP transgenic *Carnorhabditis elegans*  
Yushi Nakagawa, Yasunori Yamaguchi  
Joint Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the Japan Society for Cell Biology (Fukuoka Convention Center, Fukuoka). Abstracts, p. 141 (2007-5)

It is estimated that tens of thousands of synthetic chemicals exist all over the environment, and the number increases year by year. However it is considered that we can identify only about 10% of chemical substances under the current technology. Therefore it is effective to establish a convenient method to visually detect the general toxicity instead of identifying tremendous kinds of chemical substances themselves one by one.

Heat shock proteins (Hsps) are abundantly expressed under various stress conditions and function as molecular chaperone maintaining normal three-dimensional structures of other proteins. In particular, Hsp16 of *C. elegans* are known to be largely expressed only under the stress conditions. To apply the nature of this gene as an index for the environmental toxicity, we are constructing the hsp16-GFP transgenic *C. elegans* so that we can detect fluorescence of GFP in nematodes under some stress conditions. At first step, the promoter region of Hsp16 gene was inserted into the GFP expression vector, and then the constructed plasmids were introduced into nematodes by microinjection to make transgenic (Tg) individuals. Under some stress conditions, Tg nematodes would show fluorescence due to the expression of the GFP. We could regard its intensity as an index of stress. Furthermore, we could measure the strength of stress by quantifying the amount of the mRNA of GFP with real time quantitative PCR method.

- (13) 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導  
牛島世里子、石井 仁、大澤英輔、松崎浩明、秦野琢之  
日本農芸化学会中四国支部第 17 回講演会 (香川・三木町)、講演要旨集、p. 14 (2007-1)
- (14) 枯草菌脂肪酸分解系の転写制御ネットワークの解明



松岡浩史、里村武範、広岡和文、藤田泰太郎

第1回日本ゲノム微生物学会年会（木更津）、要旨集、p. 21（2007-3）

グラム陽性細菌の枯草菌では、脂肪酸合成系遺伝子群を制御する FapR の存在は明らかにされていたが脂肪酸分解系遺伝子群およびその制御因子は不明であった。DNA マイクロアレイを用いた転写制御因子の網羅的機能解析研究により、脂肪酸分解に関わるであろう遺伝子群が YsiA で制御されていることが推察された。詳細な転写解析および *in vitro* の YsiA-DNA 結合試験の結果、脂肪酸分解に関わる 5 オペロンの 12 遺伝子の転写が YsiA 因子により抑制され、長鎖アシル CoA により脱抑制されることが判明した。また、この YsiA ダイマーへの長鎖アシル CoA 結合は 2 つのサブユニット由来のアミノ酸残基と相互作用する事が明らかになった。さらに、本研究により、YsiA レギュロンの構成遺伝子の 6 個が長鎖脂肪酸の資化に必須であることが判かり、このレギュロンを構成する 3 オペロンがグルコース飢餓によって誘導された。そこで、脂肪酸分解と糖代謝との関連性を検討したところ、これら 3 オペロンが CcpA に依存するカタボライト抑制の支配下であり、*in vitro* の解析によりこれらのオペロンのカタボライト応答エレメントを同定する事ができた。

(15) 枯草菌代謝制御ネットワークのカタボライト制御の分子機作

藤田泰太郎

日本農芸化学会 2007 年度大会（東京）、大会講演要旨集、日本農芸化学会功績賞受賞者講演要旨（受 11-12）（2007-3）

筆者は、過去 30 年以上の間、分泌酵素、ヌクレオシド等の生産に使われる有用な細菌である枯草菌のカタボライト制御研究を中核した代謝制御研究を展開してきた。カタボライト抑制とは、外界に炭素源としてグルコースが存在する限りは、解糖系を働かせることにより他の炭素源の分解系の酵素合成を抑制するという制御系であるが、1995 年、サイクリック AMP (cAMP) をもたず大腸菌のカタボライト抑制機構が適応され得ない、枯草菌のカタボライト抑制がカタボライト制御蛋白質 (catabolite control protein, CcpA) の関与する負の制御機構で説明できる事を明らかにした。1997 年、筆者も参画した枯草菌ゲノムプロジェクトにより、この菌の全塩基配列が決定され、ポストゲノムシーケンス時代に入った。筆者は、枯草菌の DNA マイクロアレイ解析技術を駆使した、転写制御ネットワーク研究を展開した結果、CcpA の関与するカタボライト制御を基軸とする代謝制御ネットワークを明らかにするに至った。以下筆者の研究業績を時系列で記載する。

## 1. 枯草菌の糖異化系オペロンの分子遺伝学的研究

1980年代初頭、大腸菌のラクトースオペロンのカタボライト抑制を対象に、カタボライト抑制機構はcAMPとその受容蛋白質であるCRPによる遺伝子発現の正の制御系と結論された。しかし、枯草菌等のグラム陽性菌の多くはcAMPをもたないこともあり、この正の制御系が多くの生物系に当てはめられるかどうか疑問視されていた。

枯草菌にはこのラクトースオペロンのような、カタボライト抑制の分子機作研究の対象にできる、分子レベルで解明された異化系オペロンが皆無であったので、グルコン酸資化系を対象として詳細な分子レベルでの研究を開始した。グルコン酸資化系の遺伝子群は一つのエペロンを構成しており、その誘導系にJacob-Monodのエペロン説が適用できることを、大腸菌等の腸内細菌以外の系では始めて実験的に立証した。このグルコン酸オペロンの先頭のエ遺伝子がそのリプレッサー遺伝子であり、この産物(GntR)の蛋白質機能研究の展開により、細菌のDNA結合制御蛋白質中の一群が、GntRファミリーと呼ばれ、その呼称が国際的に広く使用されるに至っている。

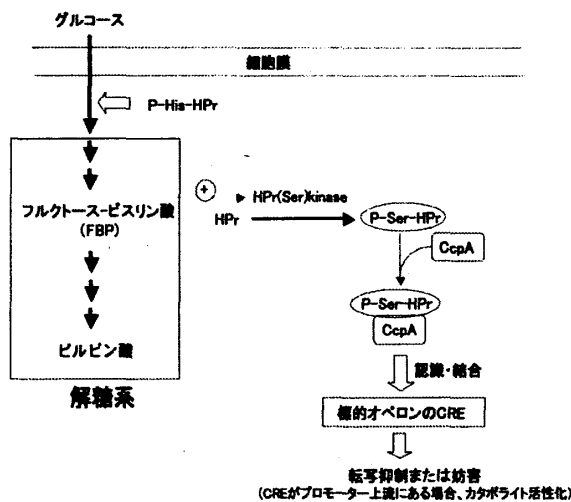


図1. 枯草菌等グラム陽性低GC細菌のカタボライト抑制の制御機構 (文献1)

## 2. 枯草菌カタボライト抑制の分子機作の解明

1970年代後半、筆者は枯草菌のカタボライト抑制には解糖系の中間産物であるフルクトース-ビスリン酸 (FBP) が関与していることを明らかにした。その後、上述の枯草菌のグルコン酸オペロンを対象にカタボライト抑制の分子機作の解明研究を開始した。1995年、図1に示す枯草菌 (おそらく、グラム陽性菌全般) のカタボライト抑制の制御機作を明らかにした (文献1)。すなわち、「培地中にグルコースが存在すると菌体内に取り込まれ解糖系にのり FBP の濃度を上昇させる。

FBP は、HPr 蛋白質のセリン残基を特異的にリン酸化する ATP 依存性のプロテインキナーゼの賦活剤であり、FBP の濃度上昇により細胞内の P-Ser-HPr 蛋白質の濃度も上昇する。そして、転写制御因子である CcpA 蛋白質が P-Ser-HPr 蛋白質と複合体を形成しカタボライト応答配列 (CRE) に結合し、転写制御を引き起こす。」というものであった。その後、筆者らが提唱したこのカタボライト抑制機作が定説化され、大腸菌のカタボライト抑制を説明する正の制御系より、この負の制御系の方が、真核生物を含むカタボライト抑制機構により普遍的に適用しうると考えられている。

### 3. 代謝制御ネットワークのカタボライト制御研究

1997 年、筆者が参画した日欧の国際協力プロジェクトにより、枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定された。それ以来、枯草菌研究はポストゲノムシーケンス時代に入った。筆者は、枯草菌の DNA チップを作成し、それを用いた DNA マイクロアレイ解析技術を確立し、枯草菌のトランスクリプトーム解析を可能とした。カタボライト抑制研究もゲノムレベルでの展開が可能となり、まず、CcpA と P-Ser-HPr の複合体が認識して結合する CRE 配列の詳細な解析を行い、そのコンセンサス配列を導き出した。このコンセンサス配列を利用したゲノムレベルでの解析で、140 個のカタボライト制御を受ける遺伝子を見い出した。また、イノシトールオペロンの CRE 配列の研究により、CRE 配列はそのコンセンサス配列の特徴より 2 種類に区別できる事を明らかにした。さらに、DNA マイクロアレイ解析とプロテオーム解析により、新規のカタボライト抑制を受ける遺伝子を多数同定した。この枯草菌のカタボライト抑制のゲノムレベルでの研究 (文献 2) は、我国の細菌のトランスクリプトーム解析研究公表の先駆けともなった。

DNA マイクロアレイ解析を用いた、代謝制御に関与する因子の支配するレギュロン解析とそれに続く分子生物学的解析により、図 2 に示す、代謝制御の基幹を構成すると思われるネットワークを提示できるようになった (文献 3)。すなわち、「炭素すなわちエネルギーの供給状態は FBP 量に反映され、炭素代謝のグローバルな転写制御蛋白質である CcpA の機能を制御する。グルコースの存在するなど炭素供給が充分な時は、CcpA と P-Ser-HPr の複合体による正の制御により、解糖を可能限り促進させ、生成したピルビン酸をアセトイン、酢酸、乳酸等に変換し、さらにピルビン酸からの分岐鎖アミノ酸合成に与る *ilv-leu* オペロンの転写を高める。このことは、蛋白質合成および枯草菌の脂肪酸の大部分を占める分岐鎖脂肪酸合成を促進し、ひいては細胞増殖の促進に繋がる。この際、アミノ酸等の窒素源が過剰に供給されていれば、細胞内の GTP と分岐鎖アミノ酸の上昇を感知するグローバルな転写代謝制御因子である CodY により *ilv-leu* オペロンの発現が抑えられ、また窒素源の供給が不十分な時は、グルタミン量の低下を感知できる、

グローバルな窒素供給制御因子である TnrA によって負に制御されて、増殖を抑制する。」という代謝制御ネットワークである、つまり CcpA と P-Ser-HPr の複合体によるカタボライト制御に基づく細胞総体としてバランスのとれた代謝制御ネットワークが作動しているという事が明確になった。

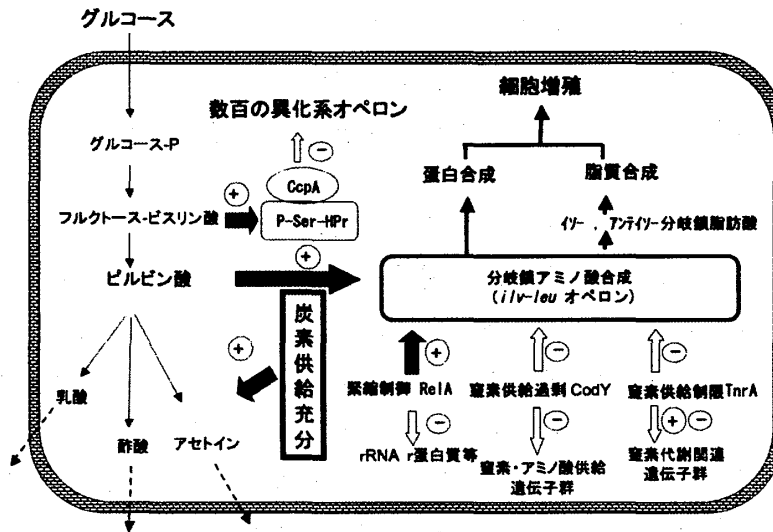


図2. カタボライト制御を介した異化代謝 (catabolism) と同化代謝 (anabolism) の結節 (文献3)

筆者の長年にわたる研究で明らかになった、カタボライト制御を中核に据える、CcpA 等のグローバル制御因子が関与する本基幹代謝制御ネットワークが、グラム陽性の低 GC 細菌で作動しているはオルソログ解析より明らかであり、さらに類似のネットワークが生物全般で機能していると考えら、今後の代謝制御ネットワーク研究の基盤知見を提供すると思われる。また、グラム陽性低 GC 細菌には、枯草菌や乳酸菌をはじめ多くの有用細菌が含まれ、これらの細菌を用いて効率よく有用物質を産生させるには、炭素源としての炭水化物を如何に効率よく有用物質に変換させるかが肝要である。本基幹代謝制御のネットワークの分子機作の解明は、有用物質産生系の効率化のためのネットワークの有効な改変方策を提示する。さらに、病原菌の多くはグラム陽性低 GC 細菌であり、それらの毒素産生機作にも、これらのグローバルな制御因子 CcpA や CodY が関与していると指摘され始めており、本基幹代謝制御ネットワークの解明は病原菌対策にも寄与すると期待される。

おわりに

本研究は、京都大学農学博士号を取得後、米国立衛生研究所 (NIH, National Institutes of Health) に赴き、Ernst Freese 博士のもとでの枯草菌糖代謝の酵素学および生理学的研究を端緒とする。4 年余りの滞米の後、浜松医科大学で枯草菌代謝の分子遺伝学的研究に着手し、藤田民枝氏、二橋純一博士、三輪泰彦博士 (現福山大学教授) らとグルコン酸オペロンの分子レベルでの解明研究を遂行

した。1987年、福山大学に赴任後、三輪博士らと枯草菌のカタボライト抑制の分子レベルでの研究を進めると共に、吉田健一博士（現神戸大学農学部）らとの枯草菌ゲノムの塩基配列決定、ゲノムの機能解析および転写制御ネットワーク研究を進め、さらに広岡和丈博士、東條繁郎博士らの協力を得て本研究を完成させるに至った。これら諸氏の共同研究に深謝すると共に、本研究を共にした博士研究員（C. Kang、山口弘毅、里村武範博士）や研究協力者、大学院生や学部学生に謝意を表します。

#### 主要文献

1. Fujita, Y., Miwa, Y., Galinier, A., and Deutscher, J. *Mol. Microbiol.*, 17, 953-960 (1995).
2. Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C.-M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., and Fujita, Y. *Nucleic Acids Res.*, 29, 683-692 (2001).
3. Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., and Fujita, Y. *Mol. Microbiol.*, 56, 1560-1573 (2005).

#### (16) ESI-MS/MSによる $\alpha$ -マンノシドーシス患者尿中高マンノース型糖鎖の解析

太田雅也、木村陽子、青山晃典、松浦史登

日本農芸化学会 2007 年度大会（東京）、大会講演要旨集、p.6 (2007-3)

複合糖質糖鎖の構造、機能に関する研究はポストゲノム研究において最も重要な分野の一つであり、糖鎖の簡便な分離、構造解析法は基盤技術として極めて重要である。*p*-アミノ安息香酸エチル (ABEE) 標識法は Sweeley らにより糖質の高感度質量分析のため開発されたものであるが、我々は糖タンパク質糖鎖の高感度分離分析法として発展させ、二次元糖鎖マッピングを公表すると共に、質量分析、NMR 分析への適応性を報告し、本法を用いて種々の生理活性糖タンパク質糖鎖の構造を明らかにしてきた。ESI-MS 法は、MALDI-MS 法と同様にタンパク質やオリゴ糖解析の常用法として用いられている。さらに MS/MS スペクトルで得られる情報は、単に糖鎖の配列だけでなく、糖の結合様式や結合位置を反映する特徴的なフラグメントパターンを示すことから、異性体の構造解析も行えるハイスループットな解析法として注目を浴びている。しかし、異性体構造の解析については、主に複合型糖鎖において進められ、高マンノース型糖鎖についての情報はあまり得られていない。そこで、我々は $\alpha$ -マンノシドーシス患者の尿中から単離した 32

種の ABEE-オリゴ糖の ESI-MS/MS 分析を行い、高マンノース型糖鎖構造とその MS/MS スペクトルとの間の構造特異的な相関を見出し、ESI-MS/MS 法が高マンノース型糖鎖の異性体構造解析において有効な手法であることを報告する。

- (17) 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導  
松崎浩明、石井仁、牛島世里子、大澤英輔、秦野琢之  
日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、大会講演要旨集、p. 27 (2007-3)

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。遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために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を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。そこで、*S. cerevisiae* をモデル生物として部位特異的組換えを利用したセントロメア配列の切り出しにより細胞死を誘導することを検討した。一倍体細胞で第 IV 番染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位配列 (RS) を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GAL1* プロモーター制御下で組換え酵素遺伝子 *R* が発現するプラスミドを導入し、ガラクトースによりセントロメア配列の切り出しが誘導される酵母を作製した。この細胞はグルコースプレートでは多数のコロニーが出現したが、ガラクトースプレートでは殆ど出現しなかった。さらに、ガラクトース液体培養での増殖はグルコース液体培養より遅く、生存率は低下した。従って、セントロメア配列の切り出しによって細胞死を誘導できた。現在、二倍体細胞の栄養増殖および胞子形成で細胞死を試みている。

- (18) 脂肪酸の  $\omega$  酸化と  $\beta$  酸化のクロスポイント  
宮尾夕子、岡田麦、岡崎早恵、木村和弘、山本 覚  
日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、大会講演要旨集、p. 78 (2007-3)

【目的】脂肪酸はエネルギー代謝の主要な基質として  $\beta$  酸化により代謝される一方、一部は  $\omega$  酸化および  $\beta$  酸化を受けて短鎖のジカルボン酸にまで代謝されると考えられている。我々は、脂肪酸の  $\omega$  酸化および  $\beta$  酸化経路における相互の関連性を明らかにすることを目的として、 $\omega$  酸化および  $\beta$  酸化に関わる諸酵素の両代謝経路中間体に対する特異性を検討している。今回、 $\omega$ -hydroxylase、acyl CoA synthetase 等の特異性を検討したので報告する。

【方法・結果】クロフィプレート存在下で培養したラット肝初代培養細胞では、培地に添加した 14C-パルミチン酸の約 7% が  $\omega$  酸化経路で代謝されることが示された。一方、 $\omega$  酸化経路の最初の酵素である  $\omega$ -hydroxylase は遊離の脂肪酸だけ

ではなくアシル CoA に対しても  $\omega$  水酸化活性を示すことが明らかとなった。また、 $\omega$  位に水酸基が導入された脂肪酸アシル CoA と肝細胞質をインキュベートしたところ dicarboxylyl-CoA を生成することが示された。さらに、肝ミトコンドリアの acyl CoA synthetase は  $\omega$ -ヒドロキシ脂肪酸にも特異性を示した。これらの結果より、 $\omega$  酸化からの  $\beta$  酸化への移行経路は複数存在することが示唆された。

(19) 湿度変化に対する酵母の応答

西平康隆、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、大会講演要旨集、p. 180 (2007-3)

【目的】我々は細胞周囲の水分ストレスを「乾燥=低湿度」と「浸透圧」とに区別し、各々に対する細胞の応答が同一か否かを調べることで、生物が湿度(大気中の水分子)変化に対する認識・応答機構を保持するかを知ろうとしている。

【方法・結果】酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の浸透圧耐性強度の異なる 2 株を用い、NaCl または sorbitol 添加の浸透圧付加培地と湿度(41~98%)とを種々組合せ、固体(寒天)培地上での細胞増殖、グリセロール蓄積および蛋白分子種の変動を追跡した。その結果、ドライ環境(湿度 41%)での細胞内グリセロールの増加は、浸透圧付加時ほど顕著ではなかった。SDS-PAGE 並びに二次元電気泳動による蛋白のパターンは、NaCl と sorbitol 存在下さらに固体培地上で各々異なったが、浸透圧上昇で起こる蛋白分子の変動は、湿度低下では認められなかった。ウェスタン解析で *Z. rouxii* の Hog1p の変動を調べたところ、湿度ストレスでの応答は浸透圧変化ほど顕著ではなかった。これらより、浸透圧付加と低湿度下での細胞の応答は、同一ではないことが示唆された。浸透圧感受性株において、ドライ環境下で増減の認められた蛋白分子種(34、36、42kDa 増、15、19、28、42、52kDa 減および 66kDa 出現)について同定を試みた。

(20) 酵母の Triacylglycerol 分泌変異株の解析

加藤薫、勝原沙紀、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、大会講演要旨集、p. 180 (2007-3)

【目的】我々は、*Trichosporon* 属酵母および *Saccharomyces cerevisiae* の triacylglycerol (TG) 分泌変異株を材料として TG 分泌(細胞外排出)に関わる分子機構を明らかにし、微生物による有用油脂の分泌発酵生産の実用化へつなげたいと考えている。

【方法と結果】*Trichosporon* 属酵母では、パルミトレイン酸を 30%以上含む TG

を菌体外蓄積する E228 変異株と、細胞内外への TG 膜輸送機構をもつと考えられる L-12 変異株を得た。L-12 変異株には、3 種の TG 結合タンパク質が存在することを示し、そのうち 2 種の N 末端アミノ酸配列を明らかにした。

一方、*Saccharomyces cerevisiae* の STG1 変異株は、TG を菌体外に漏出する。本変異株は細胞凝集性を示すため、純粋なクローンや分泌抑制に機能している野生型遺伝子を得ることが容易でないと判断された。そのため *S. cerevisiae* のゲノムのうち生育に必須でない遺伝子 (約 4800 個) を一つずつノックアウトした YKO コレクションから、TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングしている。現在までに TG 分泌の形質を示す変異として *trm9*、*hof1*、 $\Delta$ YDR049w、*vsp41* が候補としてあげられた。さらにスクリーニングを継続中である。

(21) 出芽酵母における *CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析

柳本敏彰、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、大会講演要旨集、p. 191 (2007-3)

真核生物の細胞核内には DNA が非常にコンパクトに収納されている。染色体の核内収納メカニズムを、染色体上の 2 点間 (*CEN5-HIS3* 間) の部位特異的組換えの効率を指標として解明しようとしている。これまでに、*S. cerevisiae* において *CEN5-HIS3* 間の組換え効率が、野生株 (CH53 株) に対して約 2.5 倍上昇した HCH6 変異株を取得した。この変異株は温度感受性で、高温で cell integrity に異常を示す。核内配置と cell integrity が同時に異常を示すことから核内配置と細胞内配置の間にクロストークが存在する可能性が示唆された。変異の原因遺伝子を解明するため cell integrity 経路で働く遺伝子の破壊株 11 株について温度感受性を調べた。その結果、*mpk1*  $\Delta$  株、*ssd1*  $\Delta$  株および *bck1*  $\Delta$  株の 3 株が温度感受性を示した。さらに、これら 3 株と HCH6 a 株を交雑して得た二倍体株の温度感受性を調べた結果、*ssd1*  $\Delta$  / HCH6 a 株のみ温度感受性を回復しなかった。これらの結果から、*SSD1* が HCH6 株の変異の原因遺伝子であると考えられた。そこで、CH53 株で *SSD1* を破壊した株および HCH6 変異株に *SSD1* DNA を導入した株を取得し、温度感受性と組換え効率を調べている。

(22) 枯草菌の脂肪酸分解系 (YsiA) レギュロンのカタボライト抑制による制御

松岡浩史、里村武範、広岡和丈、藤田泰太郎

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、大会講演要旨集、p. 199 (2007-3)

【目的】枯草菌では脂肪酸分解に関わる 12 遺伝子から構成される 5 オペロンの転



写が YsiA 因子により抑制され、長鎖アシル CoA によって脱抑制されることを明らかにした。本発表では、このレギュロンがグルコース飢餓によって誘導されることが観察されたため、脂肪酸分解系レギュロンとカタボライト抑制の関連性について検討した。【方法と結果】グルコース飢餓により誘導された 3 つのオペロンの周辺を検索したところ、カタボライト抑制を司る CcpA の結合部位である *cre* を ORF 内に見い出すことができた。そこで、*in vitro* で *cre* を含む DNA と CcpA の結合能を確認したところ、特異的な結合が見られた。さらに、プロモーターと *lacZ* を連結した構築を用いたレポーターアッセイにより、CcpA と *cre* に依存してカタボライト抑制が起こることを確認した。また、YsiA の標的破壊株を用いた生育実験により脂肪酸の資化に必須な 6 つの遺伝子を同定することができた。これにより、栄養源の枯渇によって脂肪酸を新たなエネルギー源とした分解系を促進させるという生存戦略の一つの制御系モデルを明らかにすることができた。

- (23) 枯草菌由来ケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼの機能解析および発現誘導解析  
広岡和丈、上岡みのり、藤田泰太郎  
日本農芸化学会 2007 年度大会（東京）、大会講演要旨集、p. 199 (2007-3)

【目的】枯草菌が有するケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼの遺伝子発現は、DNA 結合実験とレポーターアッセイから LmrA と YxaF の 2 つの転写因子によって負に制御され、ケルセチンを含む数種類のフラボノイドによって発現誘導されることが明らかとなった。そこで、この酵素の基質特異性と誘導物質との対応について、酵素活性が実際に 2 つの制御因子の支配下においてケルセチン添加によって誘導されるかについて解析を行った。【方法と結果】組換えタンパク質を用いて活性測定した結果、基質特異性と誘導物質は一部一致しないことがわかった。また、制御因子の片方あるいは両方が破壊された枯草菌株の活性測定から、両制御因子とも活性を抑制するが LmrA の寄与の方が大きいことがわかった。またケルセチンによる活性の誘導も確認された。興味深いことに酵素が構成的に発現するとケルセチンに対して高感受性を示し、著しく生育が阻害されたので、現在この現象について解析を行っている。

- (24) 枯草菌 *ilv-leu* オペロンの転写制御機作の解明  
東條繁郎、里村武範、熊本香名子、広岡和武、藤田泰太郎  
日本農芸化学会 2007 年度大会（東京）、大会講演要旨集、p. 199 (2007-3)

枯草菌 *ilv-leu* オペロンは、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)

生合成系に關与している。このオペロンの制御には、炭素代謝制御因子の CcpA 並びに窒素代謝制御因子の TnrA と CodY が働いていた。そこで、これらの制御因子がどのようにして *ilv-leu* オペロンの制御を行っているか解析を行った。

これら制御因子は、窒素源が豊富に存在する時は CcpA と CodY が作用し、窒素源が制限された時には TnrA と CcpA が作用する。そこで、これらの条件で各々がどのように結合しているかフットプリント解析等を用いて確認した。その結果、CcpA と CodY の場合では、CodY により CcpA の結合が解除されることが確認できた。しかし、CcpA と TnrA の場合では、両者が結合している事が分かった。この事は、TnrA による負の制御は、TnrA が結合する事により CcpA の結合を阻害するのではなく、TnrA が CcpA と RNA Polymerase との相互作用を阻害している事を示唆した。また、この *ilv-leu* オペロンは緊縮応答時に正の制御を受けている。プロモーターの極近傍で作動する制御について、転写開始点付近の塩基に変異を導入し、緊縮応答に反応する配列を明らかにした。

(25) ウィスキー樽材成分の生理活性

原口博行、梶島理恵子、諏訪芳秀、奥水精一

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、講演要旨集、p. 268 (2007-3)

[目的] ウィスキー標品及びその樽材の生理活性について、これまで糖尿病合併症に關与するアルドース還元酵素阻害作用や生体膜脂質過酸化抑制作用を報告してきた。今回、ウィスキー樽材に用いる *Quercus robur* 及び *Q. alba* に含まれる成分及び関連化合物の生理活性について報告する。

[方法と結果] アルドース還元酵素阻害作用を示す ellagic acid は生体内で urolithin A に代謝される。これもアルドース還元酵素を阻害し、赤血球での sorbitol の蓄積を抑制した。また、ellagic acid や urolithin A 及び樽材成分の eugenol や sinapic aldehyde はラット肝ミクロソーム及びミトコンドリア膜脂質の過酸化、DNA の酸化的断片化等に対して抗酸化的に働いた。さらに、これらの成分はミトコンドリア呼吸鎖酵素系の過酸化障害による機能低下に対して抑制的に保護することが分かった。conyferyl aldehyde や quercitrin は生成物として過酸化水素を生じ酸化傷害の原因ともなるモノアミン酸化酵素に対しても阻害作用を示した

(26) テンニンカ由来スチルベンの抗酸化活性

堤 麻理、村上敏之、田村幸吉、原口博行

日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、講演要旨集、p. 279 (2006-3)

[目的] テンニンカ (*Rhodomyrtus tomentosa*) は東南アジア熱帯から亜熱帯に生育し、その果実は食用に用いられる。この果実抽出物に強力な抗酸化作用が認められたので、Daiaion HP-20、シリカゲルクロマト、ODS カラム及び recycle HPLC を経て piceatannol 及びその 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside を得た。これらの生体膜脂質に対する抗酸化活性を報告する。

[方法と結果] piceatannol はラット肝ミクロソーム膜における NADPH 及び NADH 依存性、アスコルビン酸-Fe 系、また cytochrome P-450 依存性の脂質過酸化に対して同じ stilbene 系化合物である resveratrol より抑制効果を示した。また、スーパーオキシドアニオンに対する消去活性は piceatannol のほうが強力であった。piceatannol はミトコンドリアにおける NADH 及びコハク酸依存性、アスコルビン酸-Fe 系、また NADPH 依存性の過酸化脂質の生成も著しく抑制した。一方、配糖体には強力な抗酸化活性は認められなかった。さらに、piceatannol は過酸化傷害によるミトコンドリア呼吸鎖酵素系の活性低下を保護する効果を示した。

- (27) 出芽酵母における *CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析  
柳本敏彰、松崎浩明、秦野琢之  
日本農芸化学会中四国支部第 18 回講演会 (広島)、講演要旨集、p. 18 (2007-5)
- (28) 枯草菌代謝制御ネットワークの物質産生系への有効活用  
東條繁郎、熊本香名子、広岡和丈、藤田泰太郎  
2007 年度グラム陽性菌のゲノム生物学研究会 (大津)、要旨集、p. 2 (2007-9)
- (29) 枯草菌の LmrA および YxaF 制御因子によるフラボノイドに応答した重複制御の生理的意義についての解析  
広岡和丈、藤田泰太郎  
2007 年度グラム陽性菌のゲノム生物学研究会 (大津)、要旨集、p. 3 (2007-9)
- (30) 枯草菌代謝ネットワークのカタボライト制御の分子機作  
藤田泰太郎  
2007 年度日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会 (山口)、2007 年度日本農芸化学会功績賞受賞講演、講演要旨集、p. 19 (2007-9)
- (31) ヘモグロビン  $\beta$  鎖 b1-b2 遺伝子間組換えにより示唆された日本産ハツカネズミの起源

佐藤淳、上田純平、鈴木仁、高畑尚之、目加田和之、森脇和郎、山口泰典  
日本遺伝学会第79回大会(岡山)、要旨集、p. 94 (2007-9)

ハツカネズミ (*Mus musculus*) にはヘモグロビンベータ鎖遺伝子の多型として d、p、s、w1、w2 の 5 タイプが知られており、b1、b2 遺伝子塩基配列から p は d と w1 との、w2 は w1 と未知のタイプとの組換え体であることが示唆されている。本研究では、東アジア産の野性ハツカネズミについて、ヘモグロビンベータ鎖 b1、b2 遺伝子第 2 イントロンの塩基配列を決定したところ、日本産ハツカネズミは p と同様に、d と類似した b1 遺伝子と w1 と類似した b2 遺伝子を有することが示された。このことは日本産ハツカネズミが大陸で起きた亜種グループ間交雑により生じた組換え体の子孫であることを示唆する。

(32) 利用可能な全 DNA 塩基配列を用いた食肉目イタチ科の亜科分類

佐藤淳、Mieczyslaw Wolsan、細田徹治、鈴木仁

日本哺乳類学会 2007 年度大会(東京農工大学、府中)、要旨集、p. 92 (2007-9)

食肉目イタチ科の分類は亜科レベルで非常に混乱している。Gill (1872) による 8 亜科への分類以降、イタチ科における高次分類群は乖離・統合を繰り返し、2 亜科 (Wozencraft, 2005) から 15 亜科 (Pocock, 1921) まで、様々な亜科分類がなされてきた。この分類学的可塑性は亜科レベルにおける形態学的多様性に起因する。イタチ科は、草原、森林、ステップ、半砂漠、河川、海洋などを生息地とし、陸上、半水中、半土壌生活といった様々な生活型を持つ。それぞれの生態環境に適応することで引き起こされた形態形質の多様化が亜科レベルの分類を困難にしている。近年の分子系統学的研究により、分類の混乱は軽減されつつあるが、イタチ科の高次分類については未だ一致した見解が得られていない。本研究では、DNA データベース上の利用可能な塩基配列から、イタチ科とアライグマ科 52 種を対象に、核ゲノムから 25 座位とミトコンドリアゲノムから 16 座位を抽出・統合し、52 種×27,070 塩基対の超データ行列を用いて分子系統学的解析を行った。最節約法とベイズ法により推定された系統樹は亜科レベルにおいて一致し、強く支持された。得られた系統樹と過去の系統仮説、更に国際動物命名規約に従いイタチ科を以下の 9 亜科へ分類した: Guloninae (*Eira*, *Gulo*, *Martes*)、Helictidinae (*Melogale*)、Lutrinae (*Aonyx*, *Enhydra*, *Hydrictis*, *Lontra*, *Lutra*, *Lutrogale*, *Pteronura*)、Lyncodontinae (*Lyncodon*)、Mellivorinae (*Mellivora*)、Melinae (*Arctonyx*, *Meles*)、Mustelinae (*Mustela*, *Neovison*)、Taxidiinae (*Taxidea*)、Zorillinae (*Galictis*, *Ictonyx*, *Poecilogale*, *Vormela*)。更に、超データ行列

内の多くの未決定形質は十分な決定形質の下では系統推定に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

- (33) 出芽酵母における *GEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析  
柳本敏彰、神原将希、松崎浩明、秦野琢之  
日本農芸化学会 2007 年度中四国・西日本支部合同大会 (山口)、講演要旨集、p. 67 (2007-9)

- (34) 出芽酵母における性分化遺伝子の進化と生殖隔離  
福若純、久富泰資  
日本進化学会第 9 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 134 (2007-9)

出芽酵母においては性分化が明確であり、種形成の原動力となる生殖隔離が認められる。本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces naganishii* (*Kazachstania naganishii* と分類されることもある) を材料として、出芽酵母における交配前隔離の機構を性分化遺伝子の進化から探った。両種の酵母間では性的凝集や接合子形成は起こらないが、 $\alpha$  フェロモンに関しては種の障壁を越えて、性的交叉活性を示す。両種の  $\alpha$  フェロモン遺伝子の CDS を異種の  $\alpha$  型細胞に導入したところ、翻訳から分泌までの経路にはあまり差がなかった。しかし、 $\alpha$  フェロモン遺伝子上流調節領域には種特異性が認められた。また、*S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子を *S. naganishii* 細胞に導入したところ、ホモタリズムへの転換は見られなかった。それに対して、*S. cerevisiae* の *MATa* 遺伝子を導入した *S. naganishii* の  $\alpha$  型細胞は接合能の顕著な低下が認められた。つまり、*S. cerevisiae* の *MATa* 遺伝子が *S. naganishii* の *MATa* 遺伝子の機能発現を抑制することが示された。現在、*S. naganishii* の性分化遺伝子のスクリーニングも進めており、生殖隔離を包括的に理解できるように目指している。

- (35) パン酵母のミトコンドリア DNA 欠損株における呼吸系核遺伝子の発現  
杉原千紗、久富泰資  
日本進化学会第 9 回大会 (京都)、講演要旨集、p. 135 (2007-9)

共生説によると、真核生物のミトコンドリアは、好気性細菌の寄生に由来すると考えられている。しかし、核とミトコンドリアがどのように相互作用しているのかはまだ不明な点が多い。真核単細胞微生物であるパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、低濃度の臭化エチジウムを含む培地で培養すると、ミトコンドリ

ア DNA を完全に欠失した  $\rho^0$  株となり、呼吸欠損 (RD) を示す。我々は、ミトコンドリアで働く好気呼吸に関与する核性のタンパク質は  $\rho^0$  株では不要となり、その遺伝子の発現は抑制されるのではないかと考えた。そこで、呼吸系核遺伝子のうち TCA 回路に関与する 6 つの遺伝子を対象として、 $\rho^0$  株での発現をノーザン解析した。その結果、誘導期で *LSC1* (スクシニル CoA リガーゼの遺伝子) の発現の低下が認められ、特に低濃度グルコース条件下では、*LSC1* とそれに続く 2 つの遺伝子の発現が有意に低下していた。この条件下では、野生株 (RC) の TCA 回路が活発に回っており、発現の違いを明確に検出することができたと考えられる。今後は、他の呼吸系核遺伝子の発現解析並びに核由来の呼吸欠損株を用いた解析を進めたい。

(36) 出芽酵母における生殖隔離

久富泰資、福若純、杉原千紗

日本植物学会第 71 回大会 (野田)、研究発表記録、p. 191 (2007-9)

生物の種多様性は、進化の過程における種形成によって生じる。有性生殖世代もつ生物においては、種は遺伝子交換を行いうる生殖集団と定義され、種と種を隔てるバリアーは生殖隔離によってもたらされる。

本研究では、出芽酵母をモデルとして、2 段階の生殖隔離のシステム (交配後隔離：弱い隔離と交配前隔離：強い隔離) を解析した。

系統的に近縁な *Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces paradoxus* の種間では、接合子を生じ、種間雑種の生育と孢子形成が認められるが、孢子は発芽せずに不稔性を示す (交配後隔離)。この現象は、雑種細胞における染色体の不安定性 (染色体不和合性) に起因することを明らかにした。

系統的に遠縁な *S. cerevisiae* と *Saccharomyces naganishii* (*Kazachstania naganishii* として分類されることもある) の種間では、 $\alpha$  型の性フェロモンは交叉活性を示すが、性的細胞接着や接合子の形成には至らない (交配前隔離)。このような隔離のシステムを解明するには、性的細胞認識を支配する性分化遺伝子群の進化からアプローチする方法が優れている。そこで、性分化遺伝子ファミリーの発現制御のヒエラルキーに基づき、各階層の遺伝子の構造と機能を種間比較することで、性分化遺伝子群の進化がどのようにして交配前隔離につながったのかを検定している。

(37) 出芽酵母における *CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析

柳本敏彰、神原将希、松崎浩明、秦野琢之

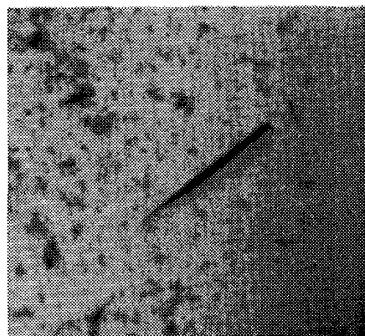
- 第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 11 (2007-11)
- (38) 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導  
上西芳典、岡田藍、弓岡由哲、松崎浩明、秦野琢之  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 12 (2007-11)
- (39) 油脂の微生物生産と有効利用に関する研究  
小郷貴之、小銭岡恵、中島奏、松崎浩明、秦野琢之  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 53 (2007-11)
- (40) 微生物機能を利用した米糠の有効利用並びに植物活力剤の開発に関する研究  
渡辺麻央、奥田容子、松崎浩明、秦野琢之  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 54 (2007-11)
- (41) 酵母の乾燥ストレス応答  
東紳太郎、松崎浩明、秦野琢之  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 55 (2007-11)
- (42) 線虫 *C. elegans* の食餌と化学物質に対する嗜好・嫌悪  
船曳未来、松坂望、松崎浩明、秦野琢之  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 58 (2007-11)
- (43) *Saccharomyces* 属の近縁種間における接合後隔離の解析  
中野圭介、杉原千紗、久富泰資  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 40 (2007-11)
- (44) *Saccharomyces* 属酵母における性分化遺伝子の種多様性  
田内直之、橋本賀陽、杉原千紗、久富泰資  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 41 (2007-11)
- (45) *GAL* 遺伝子群の座位に基づく *Saccharomyces* 属酵母の染色体進化  
吉村匡弘、山本慎吾、杉原千紗、久富泰資  
第 25 回 YEAST WORKSHOP (東広島)、講演要旨集、p. 87 (2007-11)
- (46) 枯草菌由来の転写因子 FadR<sub>Bs</sub> の結晶学的研究

中谷大河、藤橋雅宏、広岡和丈、藤田泰太郎、三木邦夫  
日本結晶学会 2007 年度年会（東京）、要旨集（2007-12）

FadR<sub>BS</sub> は、枯草菌の脂肪酸分解に関わる転写因子である。この因子は、DNA と結合して、脂肪酸 β 酸化に関わる遺伝子群で構成される 5 つのオペロンの転写を抑え、長鎖の脂肪酸 CoA との結合により DNA との結合能を失う。これにより、脂肪酸分解に関わる遺伝子群の転写が開始される。我々は、FadR<sub>BS</sub>-Stearoyl CoA 複合体や、FadR<sub>BS</sub>-DNA 複合体などの結晶構造解析を行うことにより、FadR<sub>BS</sub> の構造変化による転写制御機構を明らかにしたいと考えている。

本タンパク質の結晶は、PEG3350 を主な沈殿剤として、シッティングドロップ蒸気拡散法により得られた。この結晶を用いて、Photon Factory にて X 線回折実験を行った結果、2.20 Å 分解能の回折データを得た。この結晶の空間群は  $P2_12_12_1$ 、格子定数は  $a=70.3\text{Å}$ ,  $b=88.8\text{Å}$ ,  $c=199.9\text{Å}$  であり、非対称単位中に 6 分子存在すると仮定したとき、 $V_m=2.36\text{Å}^3/\text{Da}$  という妥当な値を得た。構造決定は、FadR<sub>BS</sub>-Dodecyl CoA 複合体の構造をモデルとした分子置換法により行い、現在  $R_{\text{work}}=23.2\%$ ,  $R_{\text{free}}=28.0\%$ まで精密化を進めている。

FadR<sub>BS</sub> は、ダイマーで機能することが知られており、結晶状態でもダイマーとして存在する。また、FadR<sub>BS</sub>-Dodecyl CoA はダイマーに対して補酵素が 1 分子結合しているのに対し、FadR<sub>BS</sub>-Stearoyl CoA では補酵素が 2 分子結合していた。これにより、ダイマーを形成するモノマーの位置関係に有意な差異が見られた。今回の発表では、これらの構造について詳細な比較を議論したい。



FadR<sub>BS</sub>-Stearoyl CoA の結晶

(47) 脂肪酸の β 酸化経路と ω 酸化経路の関係

山本 覚、宮尾夕子

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会（合同大会）（横浜）、  
講演要旨集、p. 376（2007-12）



【目的】 脂肪酸はエネルギー代謝の主要な基質として $\beta$ 酸化経路によりアセチル CoA に代謝される。しかし、脂肪酸の一部は $\omega$ 酸化経路を経由して $\beta$ 酸化を受け、最終的に短鎖のジカルボン酸にまで代謝されると考えられている。著者らは、脂肪酸の $\omega$ 酸化経路および $\beta$ 酸化に関わる諸酵素の両代謝経路中間体に対する特異性を検討している。今回、脂肪酸 $\omega$ 水酸化酵素、脂肪酸アシル CoA シンセターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ等の諸活性の特異性を検討したので報告する。

【方法・結果】 クロフィプレート存在下で培養したラット肝初代培養細胞では、培地に添加した $^{14}\text{C}$ -パルミチン酸の約7%が $\omega$ 酸化経路で代謝され、そのジカルボン酸を生成することが示された。一方、ラウロイル CoA を NADPH 存在下でウサギ肝ミクロソームとともにインキュベートした結果、ラウロイル CoA の $\omega$ 位に水酸基が導入されることが示された。同活性は抗 CYP4A2 抗体により阻害されること、また、肝ミクロソームによるラウリン酸 $\omega$ 水酸化活性がラウロイル CoA の存在により阻害されることから、 $\omega$ 酸化経路の最初の酵素である脂肪酸 $\omega$ 水酸化酵素は遊離の脂肪酸だけではなく脂肪酸アシル CoA に対しても $\omega$ 水酸化活性を示すことが明らかとなった。また、 $\omega$ 位に水酸基が導入された $\omega$ -ヒドロキシラウロイル CoA と肝細胞質画分をインキュベートしたところ、そのジカルボキシリル CoA を生成することが示された。さらに、肝ミトコンドリアの脂肪酸アシル CoA シンセターゼは $\omega$ -ヒドロキシラウリン酸にも特異性を示した。これらの結果より、脂肪酸の $\omega$ 酸化経路からの $\beta$ 酸化経路への移行経路は複数存在することが示唆された。

(48) 枯草菌の炭素代謝の緊縮制御の改変とリジン飢餓によるイソロイシン産生の効率化

藤田泰太郎、東條繁郎、熊本香名子、広岡和文

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会（合同大会）（横浜）、講演要旨集、p. 464 (2007-12)

有用物質の効率のよい発酵生産には、グルコース等の糖質の炭素を如何に効率よく有用物質合成に向かわせるかである。DNA マイクロアレイとメタボローム解析の結果、グルコースを炭素源として分岐鎖アミノ酸とくにイソロイシンを効率よく生産させるにはリジン飢餓条件が有効であるが、リジン飢餓に伴い緊縮制御がかかりグルコースの取り込みが顕著に減少する事が明らかになっている。このグルコースの取り込みを減少させないようにする方策およびイソロイシン発酵のリジン飢餓による効率化の研究を行ったところ次の事実が判明した。

1. 分岐鎖アミノ酸合成に関わる *ilv-leu* オペロンのアミノ酸飢餓による正の制

御は、GTP 低下による CodY による負の制御の解除とこのオペロンの転写開始点近傍に存在する *cis*-配列を介した正の制御である事を明らかにしている。後者の制御の *cis*-配列を特定するため、転写の開始点に塩基置換を導入したところ、(+1) への G の置換がやや、(+2) の G への置換が大きく影響し、とくに後者の置換は負の制御にまで転換した。*ilv-leu* オペロンの *in vitro* の転写系を組み、RNA ポリメラーゼの基質である GTP と ATP の量を変動させ run-off 転写産物の量を測定したところ、(+2) の G への置換が GTP の濃度の低下に極めて sensitive になる事が判った。この事実は、*ptsGHI* オペロンの緊縮制御が作動しないようするための貴重な知見を提供した。

2. 野生株と *codY* 変異株を用いたメタボローム解析により、*codY* 変異が分岐鎖アミノ酸合成を上昇させるという事がわかった。また、リジン欠乏で緊縮制御をかけた場合も分岐鎖アミノ酸合成が高まった。さらに、イソロイシンの前駆体であるスレオニン合成に関わる *hom-thrC-thrB* オペロンがリジン欠乏そのもので誘導される事が判明した。

- (49) 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導  
松崎浩明、上西芳典、岡田藍、秦野琢之  
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会（合同大会）（横浜）、  
講演要旨集、p. 279 (2007-12)

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。遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが重要である。条件致死性質や不稔性質の付与に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配列を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。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たセントロメア配列の切り出しにより細胞死を誘導することを検討した。まず、一倍体細胞において第 IV 番染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位配列 (RS) を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GAL1* プロモーター制御下で組換え酵素遺伝子 *R* が発現するプラスミドを導入し、ガラクトースによりセントロメア配列の切り出しが誘導される酵母を作製した。次に、この細胞のガラクトースおよびグルコースプレートにおける増殖を調べた結果、グルコースプレートでは多数のコロニーが出現したが、ガラクトースプレートではほとんど出現しなかった。さらに、ガラクトース液体培養での増殖はグルコース液体培養よりも遅く、細胞の生存率は低下した。したがって、一倍体細胞においてセントロメア配列の切り出しによって細

胞死を誘導できた。さらに、二倍体細胞において第 IV 番相同染色体の両方からセントロメア配列を切り出すことによって細胞死を誘導できた。この時、二倍体細胞での生存率は、一倍体細胞に比べ高く、細胞死の効率は一倍体細胞の方が良かった。今後、胞子形成過程で発現するプロモーターの制御下で組換え酵素遺伝子を発現させ、配偶子の細胞死を検討する。また、細胞死を誘導しても生育してきた細胞について、その原因を検討する。

(50) 出芽酵母における *CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析

柳本敏彰、神原将希、松崎浩明、秦野琢之

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会（合同大会）（横浜）、講演要旨集、p. 461 (2007-12)

真核生物の細胞核内には、膨大な遺伝情報をもつ染色体 DNA が非常にコンパクトに収納されている。染色体上での組換え、修復、DNA 複製、遺伝子発現などの多彩な機構が円滑に行われるのは、核内収納態様すなわち核内構造のおかげである。そこで、我々は、染色体の核内収納メカニズムを、*CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率を指標として解明しようとし、既に、*CEN5-HIS3* 間の組換え効率が、野生株 (CH53 株) に対して約 2.5 倍上昇した HCH6 変異株を取得した。この変異株は、*CEN5* 座、*HIS3* 座、スピンドル極体 (SPB) の配置からセントロメアの核内配置が異常であることが示唆された。さらに、この変異株は温度感受性で、高温において cell integrity に異常を示した。このとき細胞は増殖を停止して丸く肥大し、DNA 含量は 1C で G<sub>1</sub> 期の様相を示したが、SPB は倍加し対極に存在した。また、アクチンやキチンの局在が消失し細胞極性が失われた。核内配置と cell integrity の異常が同時に起こることから核内配置と細胞内配置の間にクロストークが存在する可能性が示唆された。HCH6 変異株の変異の原因遺伝子を解明するため cell integrity 経路で働く遺伝子の破壊株 11 株について温度感受性を調べた結果、*mpk1Δ* 株、*ssd1Δ* 株および *bck1Δ* 株の 3 株が温度感受性を示した。さらに、これら 3 株と HCH6 変異株を交雑して得た二倍体株のうち、*ssd1Δ*/HCH6 変異株のみが温度感受性を回復しなかった。これらの結果から、*SSD1* が HCH6 変異株の変異に大きく関与している可能性が示唆された。そこで、CH53 株の *SSD1* の破壊と HCH6 変異株への *SSD1* の導入が組換え効率に及ぼす影響を検討した結果、組換え効率は *SSD1* 導入株では低下し、*ssd1* 破壊株では上昇し、染色体の核内配置に *SSD1* が関係していることが示唆された。現在、顕微鏡下で細胞内や核内の構造を観察し、*SSD1* 遺伝子が核内配置と細胞内配置のクロストークに関係しているかどうかを検討している。

(51) イエシロアリ (*Coptotermes formosanus*) 兵隊カーストの額腺分泌タンパク質の解析

太田雅也、板屋 剛、丸山益資、宮尾夕子、山本 寛、松浦史登

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 (合同大会) (横浜)、  
講演要旨集、p. 751 (2007-12)

[目的] シロアリは、ミツバチやアリと同じ社会性昆虫で、一つのコロニー中ではっきりとした階級に分かれている。このうち兵隊カーストは、他の階級の個体とは体の構造が大きく異なり、頭部の額腺から忌避作用をもった分泌液を分泌することが知られている。我々は、イエシロアリ兵隊アリの額腺分泌液中に揮発性テルペンや炭化水素などの低分子有機物質の他に、長鎖飽和脂肪酸や新規長鎖塩基を含むセラミド<sup>1)</sup>に加えて、低分子量のタンパク質が存在することを見出した。この額腺分泌液は、単に化学防衛物質としてだけでなく、分化関連物質としての機能をもつと考えられる。そこで、本報告では、分泌液中のタンパク質について報告する。

[方法・結果] イエシロアリ兵隊アリの額腺分泌液から得られた水溶性画分を電気泳動で分析したところ、約 24 kDa の位置にほぼ単一のタンパク質が認められた。このタンパク質は、働きアリの虫体中には認められなかったことから、兵隊アリに特異的に発現しているタンパク質 (Cfsp1) であることがわかった。この Cfsp1 の N-末端配列を元に cDNA のクローニングを行い、665 bp で 160 個のアミノ酸残基から成る ORF をコードしている cDNA を得た。この Cfsp1 は、オオシロアリ兵隊アリ特異遺伝子のコードするリポカリン様タンパク質と高い相同性を示し、昆虫のリポカリンタンパク質と全く同じ位置に保存された 4 カ所のシステイン残基が存在していることから、脂溶性ホルモン結合タンパク質として機能していると考えられた。現在、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた組換え型 Cfsp1 を免疫して得られた抗体により Cfsp1 の局在を調べるとともに、脂肪酸やセラミドとの結合試験、ホルモン様活性 (誘引・忌避作用) などの生理活性を検討している。

## B. 総説

(1) Regulation of fatty acid metabolism in bacteria

Yasutaro Fujita, Hiroshi Matsuoka, and Kazutake Hirooka

In *Escherichia coli*, the main player in transcription regulation of fatty acid metabolism is the FadR protein, which is involved in negative regulation of fatty acid degradation and in positive and negative regulation of the cellular processes related to it, as well as in positive regulation of the biosynthesis of unsaturated fatty acids in a concerted manner with negative regulation of FabR. On the other hand, *Bacillus subtilis* possesses two global transcriptional regulators, FadR (YsiA) and FapR. *B. subtilis* FadR represses fatty acid degradation, whereas FapR represses almost all the processes in the biosynthesis of saturated fatty acids and phospholipids. Furthermore, *Streptococcus pneumoniae* FabT represses the genes of fatty acid biosynthesis that are clustered in its genome. Long-chain acyl-CoAs appear to be metabolic signals for fatty acid degradation by bacteria in general, and antagonize the FadR protein from either *E. coli* or *B. subtilis*. However, malonyl-CoA is a metabolic signal for fatty acid and phospholipid biosynthesis by Gram-positive low-GC bacteria, and it antagonizes FapR. These would be the primary aspects for understanding the elaborate and complex regulation of fatty acid metabolism in bacteria to maintain membrane lipid homeostasis.

## C. 著書

- (1) Carbon catabolite control and metabolic networks mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*  
Yasutaro Fujita, Yasuhiko Miwa, Shigeo Tojo, and Kazutake Hirooka  
In *Global Regulatory Network in Bacillus subtilis*, edited by Yasutaro Fujita. pp. 91–110, Transworld Research Network, Kerala, India (2007)

In *Bacillus subtilis* and close relatives, global regulation of carbon catabolite control occurs on the binding of the complex of CcpA (catabolite control protein A) and P-Ser-HPr (seryl-phosphorylated form of a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system) to the catabolite responsive elements (*cre*) of the target operons, the constituent genes of which are roughly estimated to number three hundred. The complex of CcpA and P-Ser-HPr triggers the expression

of several genes involved in the formation of acetate and acetoin, which are major extracellular products of *B. subtilis* grown on glucose. It also triggers the expression of an anabolic operon (*ilv-leu*) involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids which subsequently leads to cell propagation. On the other hand, this complex represses many genes and operons, which include an entrance gene for the TCA cycle (*citZ*), several transporter genes for TCA cycle-intermediates, some respiration genes, and many catabolic and anabolic genes involved in carbon, nitrogen and phosphate metabolism as well as for certain extracellular enzymes and secondary metabolites. Thus, CcpA-mediated metabolic networks play a major role in the coordinate regulation of catabolism and anabolism to ensure the optimum cell propagation in the presence and absence of preferred carbohydrates such as glucose.

## D. その他

- (1) Molecular Phylogeny of the Family Mustelidae (Carnivora, Mammalia)

Jun J. Sato

A Thesis presented to Graduate School of Environmental Earth Sciences, Hokkaido University, for the Doctor's Degree of Environmental Earth Science. p. 1-239 (2007-3)

- (2) 高マンノース型糖鎖のESI-MS/MSによる構造解析

松浦 史登

第三回 Metabolome Informatics ワークショップ (鶴岡) (2007-7)

- (3) 枯草菌代謝制御ネットワークの物質産生系への有効活用

藤田泰太郎、西岡孝明、広岡和文

文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノム」4領域  
2006年度報告書 (2007-2)

- (4) 枯草菌代謝制御ネットワークの物質産生系への有効活用

藤田泰太郎、西岡孝明、広岡和文

文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノム」4領域  
2007年度合同班会議 (大阪)、予稿集、A-K05 (2007-6)

- (5) 枯草菌脂肪酸分解系の転写制御ネットワークの解明  
松岡浩史、里村武範、櫻村美穂、熊本香名子、広岡和丈、藤田泰太郎  
平成19年度 五大学交流会（玉野）、要旨集（2007-9）
- (6) 枯草菌代謝制御ネットワークの物質産生系への有効利用  
東條繁郎、熊本香名子、広岡和丈、藤田泰太郎  
平成19年度 五大学交流会（玉野）、要旨集（2007-9）
- (7) 枯草菌代謝制御ネットワークの物質産生系への有効活用  
藤田泰太郎、西岡孝明、広岡和丈  
文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「ゲノム」4領域、平成19年度領域横断微生物研究会（広島）（2007-9）
- (8) 枯草菌代謝制御ネットワークのカタボライト制御  
藤田泰太郎  
福山大学グリーンサイエンス研究センター第4回公開講演会「微生物による環境の改善と有用物質の産生をめざして、土壌細菌の底力：放線菌と枯草菌」、講演要旨集、p. 2（2007-9）