

生物工学科 2008 年研究業績

A. 研究発表

1. 論文

(1) *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*

Ken-ich Yoshida, Masanori Yamaguchi, Tetsuro Morinaga, Masaki Kinehara, Maya Ikeuchi, Hiroshi Ashida, and Yasutaro Fujita

J. Biol. Chem., **283**, 10415-10424 (2008)

The *iolABCDEFGHIJ* operon of *Bacillus subtilis* is responsible for *myo*-inositol catabolism involving multiple and stepwise reactions. Previous studies demonstrated that IolG and IolE are the enzymes for the first and second reactions, namely dehydrogenation of *myo*-inositol to give 2-keto-*myo*-inositol and the subsequent dehydration to 3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione. In the present studies the third reaction was shown to be the hydrolysis of 3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione catalyzed by IolD to yield 5-deoxy-D-glucuronic acid. The fourth reaction was the isomerization of 5-deoxy-D-glucuronic acid by IolB to produce 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid. Next, in the fifth reaction 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid was phosphorylated by IolC kinase to yield 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid 6-phosphate. IolR is known as the repressor controlling transcription of the *iol* operon. In this reaction 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid 6-phosphate appeared to be the intermediate acting as inducer by antagonizing DNA binding of IolR. Finally, IolJ turned out to be the specific aldolase for the sixth reaction, the cleavage of 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid 6-phosphate into dihydroxyacetone phosphate and malonic semialdehyde. The former is a known glycolytic intermediate, and the latter was previously shown to be converted to acetyl-CoA and CO₂ by a reaction catalyzed by IolA. The net result of the inositol catabolic pathway in *B. subtilis* is, thus, the conversion of *myo*-inositol to an equimolar mixture of dihydroxyacetone phosphate, acetyl-CoA, and CO₂.

(2) Molecular mechanisms underlying the positive stringent response of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids

Shigeo Tojo, Takenori Satomura, Kanako Kumamoto, Kazutake Hirooka, and Yasutaro Fujita

J. Bacteriol., **190**, 6134–6147 (2008)

Branched-chain amino acids are the most abundant amino acids in proteins. The *Bacillus subtilis ilv-leu* operon is involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids. This operon exhibits a RelA-dependent positive stringent response to amino acid starvation. We investigated this positive stringent response upon lysine starvation as well as decoyinine treatment. Deletion analysis involving various *lacZ* fusions revealed two molecular mechanisms underlying the positive stringent response of *ilv-leu*, i.e., CodY-dependent and -independent mechanisms. The former is most likely triggered by the decrease in the in vivo concentration of GTP upon lysine starvation, GTP being a corepressor of the CodY protein. So, the GTP decrease derepressed *ilv-leu* expression through detachment of the CodY protein from its cis elements upstream of the *ilv-leu* promoter. By means of base substitution and in vitro transcription analyses, the latter (CodY-independent) mechanism was found to comprise the modulation of the transcription initiation frequency, which likely depends on fluctuation of the in vivo RNA polymerase substrate concentrations after stringent treatment, and to involve at least the base species of adenine at the 5' end of the *ilv-leu* transcript. As discussed, this mechanism is presumably distinct from that for *B. subtilis rrn* operons, which involves changes in the in vivo concentration of the initiating GTP.

(3) Transgenic rice plants expressing human P450 genes involved in xenobiotic metabolism for phytoremediation

Hiroyuki Kawahigashi, Sakiko Hirose, Hideo Ohkawa, and Yasunobu Ohkawa
J. Mol. Microbiol. Biotechnol., **15**, 212–219 (2008)

Phytoremediation is the use of plants to remove xenobiotic compounds from the environment. Plants have the inherent ability to detoxify xenobiotic pollutants, but they are generally poor at degrading them. The introduction of genes involved in xenobiotic degradation is aimed at enhancing plants' potential further. Rice (*Oryza sativa*) is a good candidate for this purpose and has been transformed with genes encoding cytochrome P450 monooxygenases CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. The transgenic plants were more tolerant to various herbicides than nontransgenic Nipponbare rice plants, owing to enhanced metabolism by the introduced P450 enzymes. Transgenic plants were able to

remove atrazine and metolachlor from soil. Field testing and risk assessment are very important for developing transgenic plants for phytoremediation. Transgenic rice plants should become useful as herbicide-tolerant crops and for phytoremediation of xenobiotic pollutants in future.

- (4) Discovery of a new HBB haplotype w2 in a wild-derived house mouse, *Mus musculus*
 Jun J. Sato, Akio Shinohara, Nobumoto Miyashita, Chihiro Koshimoto, Kimiyuki Tsuchiya, Ikuyo Nakahara, Tetsuo Morita, Hiromichi Yonekawa, Kazuo Moriwaki, and Yasunori Yamaguchi
Mammalian Genome, 19, 155-162 (2008)

Genetic characterization of a wild-derived house mouse, *Mus musculus*, originally collected near Lake Balkhash in the Republic of Kazakhstan, was performed by examining protein polymorphisms and nucleotide sequences for the hemoglobin beta chain (HBB) subunits. Protein electrophoresis, which was performed on a cellulose-acetate plate, showed an independent mobility pattern representing a new, previously undiscovered haplotype. Neighbor-joining analyses of the HBB adult genes, i.e., HBB-T1 and HBB-T2, and the intergenic spacer region showed that the Lake Balkhash mouse possessed genomic components that were mixed from different haplotypes. Compared to the previously determined HBB haplotypes, *d*, *p*, and *w1*, the HBB-T1 gene and ca. 11 kb of the spacer region were most similar to the *w1* haplotype; however, the remainder of the spacer region and the HBB-T2 gene were most similar to the *d* haplotype but may represent a still uncharacterized and divergent haplotype. The recombination event is predicted to have occurred 2.5 kb upstream of the HBB-T2 gene, and may have occurred through intersubspecific hybridization between mice of the *musculus* subspecies group (with the *w1* haplotype) and the *castaneus* subspecies group (with the *d*-like haplotype). Alternatively, unknown subspecies group that is equidistantly divergent from each of these subspecies groups may have been involved. Our findings suggest reticulate evolution among the subspecies groups during the evolution of *M. musculus*.

- (5) Biogeographic view of *Apodemus* in Asia and Europe inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences
 Hitoshi Suzuki, Maria Grazia Filippucci, Galina N. Chelomina, Jun J. Sato, Keiko Serizawa, and Eviatar Nevo

Sequences of the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear IRBP, RAG1, I7, and vWF genes were used to assess the evolutionary history of major lineages of *Apodemus*, in particular to better understand dispersal between Asia and Europe. Our data show eight extant lineages of Late Tertiary origin: *A. agrarius*, *A. semotus*, *A. peninsulae*, *A. speciosus*, *A. argenteus*, *A. gurkha*, *A. mystacinus*, and *A. sylvaticus*. Monophyly of two European lineages (*A. mystacinus* and *A. sylvaticus*) and four Asian lineages (*A. agrarius*, *A. semotus*, *A. peninsulae*, and *A. speciosus*) was confirmed with high bootstrap support. Together with literature data, the available molecular data depict three crucial evolutionary events: 1) initial wide dispersal and subsequent radiation around 6 million years ago, 2) region-specific radiations in Europe and southern China around 2 million years ago, and 3) westward dispersal of *A. agrarius* to Europe in the Late Quaternary.

(6) Large-scale identification by shotgun proteomics of proteins expressed in porcine liver and salivary gland

Tomoyo Tsujita, DukJin Kang, Myeong Hee Moon, Nobuhiro Ohno, Tadao Inoue, Mitsuhiro Matsumoto, Yuji Kaji, and Yasunori Yamaguchi

Zool. Sci., 25, 129–138 (2008)

Protein catalogs containing a large number of proteins expressed in a variety of organs can be powerful tools for stem-cell research, because this requires accurate knowledge about how cells differentiate. Salivary gland progenitor (SGP) cells are somatic stem cells isolated from the salivary gland that can differentiate into hepatic or pancreatic cell lineages. Their differentiation state has been assessed by the expression of major protein markers, but to use these cells in regenerative medicine, it will be necessary to establish additional means of quality assessment. We examined the use of shotgun proteomics for porcine salivary gland (a source of SGP cells) and liver (a destination of differentiated SGP cells) for determining the state of SGP cell differentiation. Protein complexes from each organ were digested into peptides and separated by two-dimensional liquid chromatography involving strong cation-exchange chromatography followed by reversed-phase liquid chromatography. The separated peptides were analyzed by on-line electrospray ionization tandem mass spectrometry using a quadrupole-time of flight mass spectrometer (ESI Q-TOF MS/MS), and the spectra obtained were processed to search peptides against a mammalian database for protein identification. Using this method, we

identified 117 proteins in porcine salivary gland and 154 proteins in porcine liver. Of these, 72 and 109 were specific to salivary gland and liver, respectively, and some of these were previously shown to be organ specific. The current study can be utilized in the future as a basis to study the pattern of differentiation in protein expression by stem cells.

2. 報文

(1) *Saccharomyces* 属酵母における近縁種間の生殖隔離

杉原千紗、中野圭介、大野雄之、大和宏一郎、石橋修一、久富泰資
福山大学生命工学部研究年報 (7), 1-10 (2008)

系統的に近縁性を示す *Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces paradoxus* のヘテロタリック株を用いて、生殖隔離の実態を解析した。集団交雑法では種間交雑の接合率は *S. cerevisiae* の種内交雑のそれに比べて約半分まで減少したが、*S. paradoxus* の種内交雑の場合より約 5 倍上昇し、両種間で有意に雑種を形成できることが明らかとなった。DAPI で核を観察したところ、種間雑種細胞においても核が融合して 1 核になっていることが確認された。次に、種間雑種の胞子形成能を調べたところ、種間雑種は種内雑種に比べて約半分の胞子形成率を示し、DAPI による核観察においても、子囊中の 4 個の胞子に核が一つずつ分配されていることが確認された。そこで、種間雑種由来の胞子を顕微解剖器で分離したところ、それらの胞子はほとんど発芽しない(胞子発芽率は 4%未満)ことが明らかとなり、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の間には接合後隔離が生じていることが判明した。この接合後隔離の生起機構を明らかにするために、種間雑種の染色体編成を電気泳動核型解析法で調べたところ、種間雑種は必ずしも親株由来の全ての染色体を保持しているわけではなく、染色体に欠失や組換えが数多く生じていることがわかった。このように、配偶子不稔は、種間での染色体の不和合性に起因することが示唆された。また、*S. cerevisiae* の第 10 番染色体及び *S. paradoxus* の第 11 番染色体に異常が生じると胞子発芽能の欠損につながることが推定された。

3. 学会発表

(1) Global stringent control of carbon metabolism in *Bacillus subtilis*.

Yasutaro Fujita, Shigeo Tojo, and Kazutake Hirooka.

XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology,
Istanbul, Turkey, Abstract Book, p. 20 (2008-8).

The *B. subtilis ilv-leu* operon is involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids. This operon is not only under positive regulation through the CcpA protein, a major global regulator of carbon metabolism but also under negative control through two major global regulators of nitrogen metabolism (CodY and ThrA). Furthermore, the *ilv-leu* operon is under RelA-dependent positive stringent response to amino acid starvation. We investigated this positive stringent response upon an amino acid starvation of lysine. We revealed two molecular mechanisms underlying this positive stringent control of *ilv-leu*, which are CodY-dependent and -independent ones. The former is triggered by the decrease of the in vivo concentration of GTP upon lysine starvation, which is a corepressor of the CodY protein. So, the GTP decrease caused derepressed *ilv-leu* expression through detachment of the CodY protein from its *cis*-elements upstream of the *ilv-leu* promoter. The latter CodY-independent mechanism was found to involve the transcription initiation frequency, which depends on the substrate concentrations of RNA polymerase and the base species of the first and second initiation bases of the *ilv-leu* transcript. We investigated the stringent control of carbon metabolism by means of the transcriptome and metabolome analysis, and found that the above CodY-dependent and -independent stringent response played an essential role in overall regulation of the carbon metabolism from glucose to secreted compounds such as acetoin and acetate as well as to various amino acids via pyruvate. Especially, the CodY-independent negative stringent response was found to operate in the *ptsGHI* operon involved in glucose transport as well as in the *pdhABCD* operon forming acetyl-CoA from pyruvate, whereas the CodY-independent positive stringent response operated in the *pycA* gene producing oxaloacetate from pyruvate, in the *hom-thrCB* operon synthesizing threonine from homoserine, and in the *alsSD* operon producing acetoin, as observed in the *ilv-leu* operon. The molecular mechanism of these CodY-independent stringent responses was considered to be essentially the same mechanism involving the transcription initiation frequency, as described above in that of *ilv-leu*.

(2) Recombinant P450s and AhRs: How they are improved in their functions

Hideo Ohkawa, and Hideyuki Inui

Cytochrome P450s (P450s or CYPs) occur widely in bacteria, plants, and animals. In eukaryotes, P450s are mostly membrane-bound on microsomes and in mitochondria. The microsomal P450s form electron transport chains together with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (P450 reductase), cytochrome b_5 (b_5), or both. P450 reductase transfers two electrons from NADPH/NADH to the heme of P450 for reduction of the ferrous-dioxygen complex after the binding of a substrate to P450. Both b_5 and NADH-cytochrome b_5 oxidoreductase (b_5 reductase) also contribute to the electron flow toward P450s.

We constructed a number of fused enzyme genes consisting of P450, P450 reductase, and b_5 cDNAs. Each of the fused genes was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). On the basis of results of P450 enzyme assays, we discuss the roles of the combination of P450, P450 reductase, and b_5 in P450-dependent monooxygenase activity, and in the interaction among P450, P450 reductase, and b_5 moieties of the fused enzymes. In animals, dioxins and related compounds specifically bind to aryl hydrocarbon receptors (AhRs) as ligands and express P450 1A1 gene (*CYP1A1*). Upon ligand binding, AhR translocates into nucleus and dimerizes with AhR nuclear translocator (Arnt). This heterodimer binds to the xenobiotic response element (XRE) in the promoter of *CYP1A1*, resulting in the gene expression. We constructed AhR-mediated β -glucuronidase (GUS) reporter gene expression system consisting of AhR, Arnt and a synthetic XRE-driven promoter responded to AhR ligands in transgenic tobacco plants. Then, we attempted to simplify the system by the construction of recombinant AhRs.

Based on the results of P450 enzyme assays and reporter assays, we discuss the factors related to the recombinant gene expression in heterologous systems, stability of the produced enzymes and receptors as well as improvement in their functions.

References

- [1] H. Inui, A. Maeda, and H. Ohkawa. Molecular characterization of specifically active recombinant fused enzymes consisting of CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome b_5 . *Biochemistry* **46**, 10213-10221 (2007)
- [2] S. kodama, K. Okada, H. Inui, and H. Ohkawa. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated reporter gene expression systems in transgenic tobacco plants. *Planta* **227**, 37-45 (2007)

(3) 枯草菌 *ilv-leu* オペロンの緊縮制御機作の分子レベルの解明

東條繁郎、熊本香名子、広岡和丈、藤田泰太郎

日本農芸化学会中四国支部第 20 回講演会（徳島）、講演要旨集、p. 15 (2008-1)

(4) 枯草菌におけるフラボノイド応答性転写制御系の機能解析

広岡和丈、藤田泰太郎

第2回日本ゲノム微生物学会年会（吹田）、要旨集、p. 23 (2008-3)

植物が滲出するフラボノイドに応答した転写制御系が、直接共生関係にない枯草菌にも存在することが明らかとなった。

LmrAとYxaFの両転写因子は、LmrAと薬剤排出ポンプLmrBをコードする *lmrAB* オペロンと、ケルセチン2, 3-ジオキシゲナーゼYxaGと推定膜タンパク質YxaHをコードする *yxGH* オペロン、そしてYxaFをコードする *yxaf* 遺伝子を負に制御し、ケルセチン等の特定のフラボノイドによって発現が誘導されることがわかった。また、重複して発現制御を行うものの両転写因子間で認識するフラボノイドが部分的に異なり、LmrAによる制御が支配的であることを明らかにした。YxaGの構成的発現によってケルセチンに対する感受性が著しく高まることから、枯草菌はYxaG活性が有害になるほど増大しないように二重制御を行うものと考えられる。

DNAマクロアレイ解析によって、転写因子YetLと推定モノオキシゲナーゼYetMの遺伝子で構成される *yetL-yetM* 系がフラボノイド応答性制御系として見出された。

YetLは両遺伝子を負に制御し、LmrA/YxaFとは異なるフラボノイド特異性で発現を誘導することがわかり、これらの知見は枯草菌におけるフラボノイド応答性制御ならびに代謝系の全体像解明につながると思われる。

(5) 枯草菌グルコマンナン利用オペロンの解析

山野井 玲、中舘 久、福井玲子、イーリーメン、藤田泰太郎、朝井 計、定家義人

第2回日本ゲノム微生物学会年会（吹田）、要旨集、p. 46 (2008-3)

枯草菌が持つグルコマンナン利用オペロン (*gmaBACDREFG*) の転写はセロピオースによって誘導され、逆にグルコマンナンオペロンに含まれるGmuRに抑制されることが、オペロン内遺伝子である *gmuR* の破壊転写融合株を用いることで分かっている。更に詳細に調べるために枯草菌、大腸菌でのシャトルベクタープラスミドで、過剰発現させたGmuRが枯草菌内でリプレッサーとして働くことを確認し、In

vitroでもGmuRがオペロンのプロモーターと直接結合することをゲル移動度シフト解析で確認した。次にマイクロアレイ解析を用いて *gmuR* 破壊株と野生株とで枯草菌の持つ遺伝子の転写量を網羅的に比較した。その結果 *gmuR* を破壊することで surfactin 合成である *srfA* オペロンは転写量が増加し、lichenan 利用である *lic* オペロンは転写量が減少した。*lic* オペロンはセロビオースで転写が誘導されることが分かっており、これはグルコマンナンオペロンと共通している。そこでグルコマンナンオペロンと lichenan オペロンの制御因子の関わりについて解析を試みている。

(6) 脂肪酸 ω 酸化経路に働くアルコール脱水素酵素の探索

岡崎早恵、宮尾夕子、櫻井陽子、塩田 縁、末崎紀子、山本 寛

日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 22 (2008-3)

【目的】脂肪酸 ω 酸化経路は脂肪酸のカルボキシル基と反対側の ω 位をカルボキシル基まで酸化する経路である。これまでに著者らは脂肪酸 ω 酸化経路に関与するウサギ肝の脂肪酸 ω 水酸化酵素 (CYP4A)、およびアルデヒド脱水素酵素について詳細に検討し、その基質特異性などについて報告してきた。しかし、 ω 酸化経路で働くアルコール脱水素酵素については十分に検討されていない。今回、ウサギ肝に存在する種々のアルコール脱水素酵素について基質特異性を中心に検討したので報告する。

【方法・結果】ウサギ肝 mRNA を鋳型として、デジェネレートプライマーを用いた RT-PCR 法によりアルコール脱水素に対する 4 種類の cDNA をクローニングした。これらの cDNA を大腸菌発現系を用いて発現させた。Class I に分類されるアルコール脱水素酵素は ethanol および 12-hydroxy lauric acid に対して触媒活性を示したが、octanol などの中鎖アルコールに対してほとんど活性を示さなかった。現在、他の 3 種類についても検討中である。

(7) リパーゼを用いる mannosylerythritol lipid のアシル化

荒木道陽、桜井絵梨香、玖村直紀、泉 実、中島修平、太田雅也、
松浦史登、馬場直道

日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、講演要旨集、p. 200 (2008-3)

【目的】 Mannosylerythritol lipid (MEL) は植物油脂を加えて培養した酵母培養液から発見されたバイオサーファクタントである。この化合物はマンニトールとエリスリトールからなる二糖類であり、マンニトール部分の 3 個の水酸基がアシ

ル化されている。最近、松浦らは MEL 生産の初期段階でエリスリトールの一級水酸基がアシル化された新規 MEL 誘導体が生産されていることを発見した。本研究では、この化合物の MEL からの酵素的合成を行った。

[方法・結果] MEL の THF 溶液にリパーゼ Novozyme 435 と vinyl palmitate または vinyl laurate を加え、40℃で8時間攪拌した後、その反応液から生成物と思われる画分をシリカゲルカラムで単離した。このものの ¹H-NMR, ESI/MS から MEL 分子中のエリスリトールの一級水酸基がアシル化された下記に示す誘導体である事が確認された。これらの合成法は MEL の生合成中間体の同定や MEL の新規脂肪酸誘導体の合成を可能にするものと期待される。

- (8) 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
日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 83 (2008-3)

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が野生株に対して約 2.5 倍上昇した HCH6 変異株を用いて解明しようとしている。この変異株は温度感受性で、細胞極性の消失や低浸透圧感受性を示す。セントロメアの核内配置及び cell integrity に異常を示すことから、核内配置と細胞質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。まず、HCH6 株の温度感受性の原因遺伝子を解明しようとした。cell integrity 経路の遺伝子の破壊株で *mpk1Δ* 株、*ssd1Δ* 株、*bck1Δ* 株が温度感受性を示した。相補性検定で *ssd1Δ* 変異のみが HCH6 株の変異を相補しなかった。また、HCH6 株に *SSD1* を導入することで温度感受性が回復した。従って、*SSD1* が原因遺伝子であると考えられた。さらに、組換え効率は、HCH6 株に *SSD1* を導入すると低下し、野生株で *SSD1* を破壊すると上昇し、*SSD1* の核内配置への関与が示唆された。また、*SSD1* の導入によって HCH6 株の細胞極性も回復した。今後、核内配置と細胞質内配置のクロストークにおける *SSD1* の関与をさらに検討する。

- (9) 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
日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 84 (2008-3)

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、*S. cerevisiae*をモデル生物として細胞死の誘導を検討した。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*GALI*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。二倍体細胞でも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で細胞死を誘導できた。現在、胞子形成で細胞死を試みている。

(10) 酵母の triacylglycerol 分泌変異株の解析

小郷貴之、小銭岡 恵、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 243 (2008-3)

【目的】我々は、*Trichosporon* 属酵母および *Saccharomyces cerevisiae* の triacylglycerol (TG) 分泌変異株における TG の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のに苦労している。そのため *S. cerevisiae* の非必須遺伝子のノックアウトコレクション (YKO、約 4800 株) から、TG 分泌の表現型 (halo⁺) を示す株をスクリーニングした。現在までに、halo⁺形質を示す株約 40 種が確認され、そのうち約 10 株が STG1 変異株との交雑で相補されなかった。これらの株を解析中。

(11) *Penicillium decumbens* による油脂からの液体アルカンの生産

秦野琢之、中島 奏、松崎浩明

日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 267 (2008-3)

【目的】我々は、食用廃油から液体燃料を回収する目的で、糸状菌 *Penicillium*

decumbens IFO-7091 を用いる微生物変換により、油脂（パーム核油等のトリアシルグリセロールまたは C8-12 の脂肪酸）から効率よく液体アルカン（Methylalkylketone(MAK)：液体燃料）を生産する技術の開発を目指している。今回は、バイオリアクター構築に用いるための菌体固定化担体について検討を加えた。

【方法と結果】菌体増殖を伴う発酵法では、パーム核油 10g を基質とし 28℃、4 日間の振とう培養で、約 1.7g の MAK (C7-13) を得た。このとき変換効率は 73% となった（基質消費量 2.3g）。この効率をさらに上げるため、リアクターの構築を目指すこととした。まず固定化酵素系構築の目的で、MAK 生産酵素類の単離を試みたが、活性は殆ど可溶化されなかった。そのため、休止菌体での生産を行うこととし、菌体固定化能と産物生産能の高い担体を探索している。現在までに、セルロース系担体、活性炭、スポンジ等を検討したが、いずれも良好な結果とはならなかった（本菌はセルラーゼを産生する）。今回は、各種不織布（PET、PP 繊維含む）への菌体の固定化と、MAK 生産性について検討した。

(12) 枯草菌 *ilv-leu* オペロンの緊縮制御機作の分子レベルの解明

東條繁郎、熊本香名子、広岡和丈、藤田泰太郎

日本農芸化学会 2008 年度大会（名古屋）、大会講演要旨集、p. 252 (2008-3)

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）生合成系に関与している。この *ilv-leu* オペロンは、アミノ酸飢餓に対して正の緊縮制御を受ける。この正の緊縮制御には二つの機構があり、RelA によって生成された ppGpp が IMP 脱水素酵素を阻害する事により GTP の濃度を減少させ CodY の結合を解除する事により起こる正の制御と転写開始点付近の塩基配列と GTP 濃度に依存した、転写開始の制御がある。後者の正の制御機構について、*lacZ* をレポーターとし *ilv-leu* オペロンの転写開始点付近の塩基に変異を導入し、*LacZ* 活性を測定した結果、緊縮応答に反応しない配列、さらには、負の制御を起こす配列を見出すことが出来た。そして、*in vitro* 転写系を用いて GTP と ATP 濃度変化と配列の関係について検討した結果、ATP 濃度に対する配列毎の差は無かったが、GTP 濃度変化に対しては正の制御を受ける配列では低濃度でもかなりの転写が見られたが負の制御を受ける変異配列では低濃度では、転写が見られなかった。即ち、細胞のエネルギー状態の指標である GTP の量が、緊縮応答を受ける *ilv-leu* オペロンの転写開始に強く影響する事が判明した。

(13) 枯草菌の *yetL-yetM* 遺伝子系におけるフラボノイドに応答した発現誘導機構の解

析.

檀上佑介、花野有貴、広岡和文、藤田泰太郎

日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 252 (2008-3)

【目的】DNA マイクロアレイ解析によってフラボノイドによって誘導される遺伝子群候補として *yetL-yetM* 遺伝子系が見いだされた。*yetL* は MarR ファミリーに属する制御因子を、*yetM* はモノオキシゲナーゼをコードすると推定され、*YetL* がこれらの両遺伝子を抑制し、フラボノイドの添加によって発現が誘導されると予想され、これを検証した。【方法と結果】DNase I フットプリント解析により *yetL*、*yetM* 遺伝子のそれぞれの上流域に *YetL* が結合する保存配列が見いだされた。また、ゲルシフト解析から *YetL* が *yetL* よりも *yetM* プロモータに対して高い親和性を示すことがわかった。種々のフラボノイドを添加してゲルシフト解析を行った結果、いくつかのフラボノイドで結合の解除が見られた。現在、*in vivo* で各種のフラボノイドでの発現が誘導されるかを *lacZ* レポーター系で解析を進めている。

- (14) マウス及びモルモットのアリルハイドロカーボン受容体/レポーター遺伝子系を導入した形質転換植物による残留性有機汚染物質のバイオアッセイ

祇園景子、若井丈人、金 倫碩、殷 熙洙、乾 秀之、大川秀郎

日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、大会講演要旨集、p. 66 (2008-3)

[目的]モルモットアリル炭化水素受容体(AhR)及びタバコモザイクウイルス移行タンパク質(MP)を用いた組換え型転写因子を創製し、これらを介したレポーター遺伝子の誘導発現を指標にダイオキシン類をバイオアッセイする形質転換植物の作出・性能評価を試みた。[方法]AhR のリガンド結合領域に LexA DNA 結合領域 (LexA)と VP16 転写活性化領域(VP16)を結合した組換え型 AhR(XDV)と GUS レポーター遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナ XDV を作出した。さらに、形質転換植物 XDV に VP16、LexA と MP を結合した組換え型転写因子(VXM)遺伝子を導入した形質転換植物 XDV/VXM を作出した。これら形質転換植物をポリ塩化ビフェニル(PCB)含有培地で培養し、GUS 活性を測定した。[結果]形質転換植物 XDV を PCB126 で処理した場合、花茎における GUS 活性の増加は認められなかった。一方、形質転換植物 XDV/VXM では顕著に GUS 活性が増加した。従って、植物体 XDV/VXM の下部で XDV に PCB126 が結合して VXM の発現を誘導し、これが細胞間を移行して植物体上部で GUS の発現を誘導したと考えられる。本研究は科研費基盤(A)の補助を受けて行った。

(15) テンニンカ由来スチルベンの抗酸化活性

堤 麻理、加藤愛子、村上敏之、田村幸吉、原口博行

日本農芸化学会 2008 年度大会（名古屋）、大会講演要旨集、p. 279 (2008-3)

[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。この果実抽出物にミトコンドリア及びミクロソーム膜における強力な抗酸化作用が認められ、piceatannol 及びその 4'-O- β -D-glucopyranoside が単離された。今回は、特にミトコンドリアにおける活性酸素消去作用、膜機能保護作用について検討を加えた。

[方法と結果] piceatannol はラット肝亜ミトコンドリアにおけるスーパーオキシドアニオンを消去した、その効果は同じスチルベン系化合物である resveratrol より強力であった。また、インタクトなミトコンドリアにおける膜電位の変化による内容物の漏出を抑制した。テンニンカ由来スチルベンは先に報告し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と併せて、ミトコンドリア機能を酸化傷害から防御すると考えられる。

(16) 日本固有種ニホンテンの保全遺伝学的研究

佐藤 淳、細田徹治、尾関篤史、山口泰典、鈴木仁

第 55 回日本生態学会（福岡国際会議場、福岡）、要旨集、p. 296 (2008-3)

ニホンテン *Martes melampus* は食肉目イタチ科テン属に属する日本固有の哺乳類種であり、本州、九州、四国、対馬に自然分布する他、北海道では毛皮産業のために導入され、産業の衰退と共に野外に放たれた個体の子孫が分布を拡大している。本州、九州、四国に生息するホンダテンは冬季の毛色によりキテンとスステンに類別され、過去には別亜種として扱われたが現在は同一亜種とみなされている。一方、対馬に生息するツシマテンは別亜種としてみなされ、絶滅危惧 II 類 (VU) に指定されている。以上のようにニホンテンは毛色変異（ホンダテン）、島による地理的隔離（ツシマテン）、人為的移入（北海道のニホンテン）といった遺伝的多様性に影響を与える要因を歴史的に経験しているが、遺伝的集団構造は明らかではない。生物の保護、管理において重要な課題は保全の単位を明確にすることであり、遺伝的な集団構造を明らかにすることは必須である。本研究では、ニホンテン 24 個体（キテン 10 個体、スステン 11 個体、ツシマテン 3 個体）を対象に、母系遺伝するミトコンドリアゲノムより Cytochrome b 遺伝子と D-loop 領域、また父系、母系共に遺伝系譜の追跡が可能な核ゲノムより RAG1 遺伝子エクソン領域と PRKCI 遺伝子イントロン領域に着目し分子系統学的解析を行った。結果、集団構

造は毛色変異とは関連性を示さず、地域による遺伝的分化を示した。このことは調和配偶、あるいは適応が毛色に関して生じていないことを示唆する。また、ツシマテンは他のニホンテンとの遺伝的分化を示したが、同等の分化が東/西日本のホンドテン間で見られた。従って、保全単位の再考を要すると考えられる。

- (17) 出芽酵母における染色体核内配置と cell integrity との関係

柳本敏彰、山下俊太郎、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会中四国支部第 21 回講演会（岡山）、講演要旨集、p. 22（2008-5）

- (18) 酵母の triacylglycerol 分泌変異株の解析

小郷貴之、池本ひとみ、松崎浩明、秦野琢之

日本農芸化学会中四国支部第 21 回講演会（岡山）、講演要旨集、p. 22（2008-5）

- (19) 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、菊池正悦、秦野琢之

第 60 回日本生物工学会大会（仙台）、講演要旨集、p. 125（2008-8）

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。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 *GALI* 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、ガラクトースによって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。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遅く、生存率は低下した。したがって、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。また、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で細胞死を誘導できた。現在、組換え酵素遺伝子のプロモーターを孢子形成時に発現する *ZIP1* プロモーターに換えて孢子形成での細胞死を試みている。

(20) 米糠に対する海産酵母の作用

秦野琢之、早川元大、渡辺麻央、松崎浩明、浦野直人

第 60 回日本生物工学会大会（仙台）、講演要旨集、p. 133 (2008-8)

〔目的〕近年無洗米等の軽洗米の消費が伸びるにつれ、米糠も副産物として著量産出されることとなった。ビタミン等の有効成分の抽出が行われてはいるが、米糠をさらに有効利用しようとする研究は多くない。一方、海洋微生物（特に酵母）は多様な代謝経路を持つものが少なくない。そこで我々は、米糠の有効利用法開発の一助として、米糠に対する海産酵母の作用を調べている¹⁾。

〔方法・結果〕無洗米糠（TWR 糠、(株)サタケ提供、糊粉層含む）を水に 1% (W/V) 添加した米糠培地に試験菌を接種し、28℃で振とう培養した。試験菌株には相模川、東京湾、ソウギョ腸管などより分離した海産（水圏）酵母 43 株を用いた。培養上清を水溶性画分と脂質画分（クロロホルム抽出物）とに分け、各々 TLC ならびに HPLC で分析した。試験菌株のうち、ほとんど全てが米糠培地で生育した。生育した菌株の多くは、水溶性画分のうち TLC で低分子側にスポットを与えるメイン物質（スクロース）を消費したが、これを消費しない菌株も存在した。一方、脂質成分の消費は菌株により多様性が認められた。試験菌株の米糠成分の消費特性は、5 つ以上のタイプに分かれた。現在、新規に生じたスポット（ピーク）を与える物質を回収、同定を試みている。試験菌株のうち 7 株でアミラーゼ活性が、12 株でアルコール発酵能が認められた。そのため、米糠からの直接アルコール発酵ならびに脱脂米糠の酸加水分解物からのアルコール発酵について検討を加えた。また、試験菌の染色体 DNA 核型についても調べた。

¹⁾ 秦野ら：2006 年度日本生物工学会大会要旨集、p. 175

(21) 出芽酵母における接合前隔離と性分化遺伝子の進化

松浦健太郎、久富泰資

日本進化学会第 10 回大会（東京）、講演要旨集、p. 93 (2008-8)

エタノール発酵に用いられる *Saccharomyces cerevisiae* はポストゲノム解析のモデルともなっている。*Saccharomyces* 属に系統的に最も近縁な *Kazachstania* 属の 1 種 *K. naganishii* では当研究室でヘテロタリック株を単離した。両種間では α フェロモンの交叉活性があるが、性的凝集や接合子形成が起こらない接合前隔離が生じている。つまり、性的細胞認識を支配している性分化遺伝子の進化により、細胞間のコミュニケーションが途絶えたと考えられた。そこで、この接合前隔離の機構を明らかにするため、両種間で性分化遺伝子の機能の相違を調べた。

S. cerevisiae の α 接合型決定遺伝子は、*K. naganishii* の α 型細胞の接合能を有意に低下させることが明らかとなり、より詳細な解析を進めた。それと平行して、*K. naganishii* のゲノム DNA ライブラリーから性分化遺伝子をクローニングをする実験を進めた。現在、35 の候補クローンが得られており、その中には接合型遺伝子候補が 2 クローン、ホモタリズム遺伝子候補が 4 クローン取得できている。

(22) *Saccharomyces* 属酵母における近縁種間の生殖隔離

杉原千紗、中野圭介、大野雄之、大和宏一郎、石橋修一、久富泰資
日本進化学会第 10 回大会（東京）、講演要旨集、p. 93 (2008-8)

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵産業に古くから用いられ、ゲノムの全塩基配列もすでに解読されて、データベースが広く公開されている。*Saccharomyces* 属酵母の中で高い発酵能を持ち、比較的高い孢子形成率を示す 2 種の酵母 *S. cerevisiae* と *S. paradoxus* は系統的に近縁な関係にあるが、その生殖的な隔離については未知な点が多い。私たちはこれらのヘテロタリック株を交雑させて、接合をするか、孢子形成能をもつか、孢子形成した場合孢子が発芽するかどうかに注目して解析を進めた。その結果、雑種を形成し、孢子形成を行うことが確認出来たが、孢子的発芽がほとんど見られない接合後隔離が両種間に存在することが分かった。そこで、種間雑種株における染色体編成を調べてみると、親株由来の染色体に異常な体細胞組換えや欠失が生じていることが明らかとなり、染色体の不和合性によって生殖隔離が生起することが示唆された。特に、*S. cerevisiae* の第 10 番染色体及び *S. paradoxus* の第 11 番染色体に異常が生じると孢子的不稔に繋がることを示唆された。

(23) 枯草菌由来 YxaF 転写制御因子のフラボノイド認識応答機構の解析とその特異性の改変

広岡和丈、檀上佑介、佐々木真吾、藤田泰太郎
グラム陽性菌のゲノム生物学（平成 20 年度）研究会（代々木）、要旨集、p. 32 (2008-8)

(24) フラボノイドに応答する、枯草菌 *yetL-yetM* 遺伝子系の制御機構の解析

檀上佑介、花野有貴、広岡和丈、藤田泰太郎
グラム陽性菌のゲノム生物学（平成 20 年度）研究会（代々木）、要旨集、p. 33 (2008-8)

- (25) 枯草菌の緊縮制御時に作動する制御因子が関与しない新規ネットワークの解明
東條繁郎、広岡和文、藤田泰太郎
グラム陽性菌のゲノム生物学（平成 20 年度）研究会（代々木）、要旨集、p. 34
（2008-8）

- (26) 超行列法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
日本動物学会第 79 回大会（福岡大学、福岡）、要旨集、p. 107（2008-9）

食肉目イタチ科の亜科分類は混乱している。高次分類において乖離・統合が繰り返され、2～15 亜科まで様々な分類がなされてきた。あらゆる生態環境に適応したイタチ科の形態的多様性が一つの原因であると考えられる。本研究では、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 29 座位を統合した超行列（52 種×27,965 bp）を用いてゲノム系統学的解析を行った。最節約法とベイズ法による系統推定結果に基づきイタチ科を 9 亜科へ分類した。

- (27) 5つの核遺伝子エクソン領域を用いた鰭脚類とレッサーパンダの系統解析
佐藤 淳、Mieczyslaw Wolsan
日本哺乳類学会 2008 年度大会（山口大学、山口）、要旨集、p. 98（2008-9）

鰭脚類（アザラシ科、アシカ科、セイウチ科）とレッサーパンダ（レッサーパンダ科）は、それぞれ水生生活と草食という食肉目においては特徴的な適応を示すことで多くの研究者に注目されてきた。しかし、その系統学的位置付けについては他の食肉類と比較し特筆すべき混乱があった。これまでの鰭脚類における主な系統仮説は、アザラシ科とイタチ科、アシカ科とクマ科をそれぞれ近縁とする 2 系統仮説と、鰭脚類は単系統を形成し、クマ科と近縁とする仮説である。レッサーパンダについてはアライグマ科、ジャイアントパンダ、クマ科、スカンク科と近縁とする仮説と多岐により生じた独立な系統とする仮説である。過去のこれらの対立仮説は主に高度に特殊化した形態形質や進化速度の速いミトコンドリアゲノムに基づくものであるが、少なくとも漸新世以前であると考えられる鰭脚類とレッサーパンダの系統の分岐年代を考慮すると、両形質における強いホモプラシーの傾向が系統解析に与える悪影響を無視することはできない。本研究では、よりホモプラシーの影響が少ないことが予想される核ゲノム上の APOB、BRCA1、

RBP3、RAG1、VWF 遺伝子のエクソン領域計 5497bp を用いて分子系統学的解析を行った。最大節約法、最尤法、ベイズ法を用いた推定の結果、鰭脚類は単系統を形成し、イタチ上科（イタチ科、アライグマ科、レッサーパンダ科、スカンク科）に近縁であり、クマ科は鰭脚類とイタチ上科からなるクレードの姉妹系統であることが示された。また、レッサーパンダはイタチ科とアライグマ科からなるクレードに近縁であり、スカンク科がイタチ上科の中で最も基部に位置づけられた。これらの関係は全ての解析においてブートストラップ値 90%以上、事後確率 1.00 で支持され、鰭脚類の非単系統仮説とレッサーパンダについての対立系統仮説は全て統計的に有意に棄却された。以上の結果から、食肉目イヌ亜目における科レベルの系統関係がほぼ解明され、水生・草食適応は食肉類の進化の中で複数回独立に派生したことが示唆された。

(28) 核及びミトコンドリアDNAにおけるニホンテンの遺伝的多様性

細田徹治、佐藤 淳

日本哺乳類学会 2008 年度大会（山口大学、山口）、要旨集、p. 146 （2008-9）

ニホンテン *Martes melampus* は食肉目イタチ科テン属に属する森林性哺乳類であり、本州、九州、四国、対馬に自然分布する他、北海道では毛皮産業のために導入され、産業の衰退と共に野外に放たれた個体の子孫が分布を拡大している。本州、九州、四国に生息するホンドテンは冬季の毛色によりキテンとスステンに類別され、過去には別亜種として扱われたが現在は同一亜種とみなされている。一方、対馬に生息するツシマテンは絶滅危惧 II 類 (VU) に指定されており、現在別亜種とみなされているが、ホンドテンとの識別根拠は形態的にも遺伝的にも希薄である。以上のようにニホンテンは毛色変異（ホンドテン）、島による地理的隔離（ツシマテン）、人為的移入（北海道のニホンテン）といった遺伝的多様性に影響を及ぼす要因を歴史的に経験している。しかしながら、その集団内・集団間の遺伝的分化に関する知見は乏しい。本研究では、ニホンテン 49 個体を対象に、ミトコンドリアゲノム上の *Cytb* 遺伝子、ND2 遺伝子、そして DLOOP 領域の計 2814bp を用いて分子系統学的解析を行ったところ、東北、関東/中越、西日本、そして対馬の 4 つのタイプが検出された。特に対馬産ツシマテン 29 個体の単系統性は統計的に有意に支持された。また、ツシマテン集団内のミトコンドリア DNA における遺伝的多様性はホンドテンと比較し非常に小さかった。核ゲノムの解析においては、GHR 遺伝子と FES 遺伝子のイントロン領域の配列を決定し比較解析したところ、ホンドテンにおいて 6 つのヘテロ接合座位が観察されたが、対馬産個体からは検出されなかった。以上の結果はツシマテンの系統的特異性と遺伝的均質化を示し、

保全の単位として妥当な集団であることを示唆する。

(29) 出芽酵母の種多様性と生殖隔離

久富泰資、松浦健太郎、杉原千紗

日本植物学会第 72 回大会（高知）、研究発表記録、p. 191 (2008-9)

出芽酵母であるサッカロミセス科には、エタノール発酵に用いられる *Saccharomyces cerevisiae* が含まれ、その実験室株はポストゲノム解析のモデルとなっている。

筆者らは、種多様性を種分化の観点から明らかにする目的で、サッカロミセス科酵母の生殖隔離機構を研究している。*S. cerevisiae* が含まれる *Saccharomyces* 属から 1 種 (*S. paradoxus*) と *Saccharomyces* 属に最も近縁とされている *Kazachstania* 属から 1 種 (*K. naganishii*) をモデルに抽出し、ヘテロタリック株を分離した。

S. cerevisiae の実験室株を基準として、これらの酵母との間で生殖隔離の実態を解析した。*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間においては、雑種形成から胞子形成に至る過程は正常に進行するが、胞子に発芽能が認められず、接合後隔離が生じていることが明らかとなった。電気泳動核型解析を行ったところ、種間雑種においては両種から由来する染色体に不和合性が生じて、配偶子の不稔性につながることを示唆された。

S. cerevisiae と *K. naganishii* の種間においては、 α 性フェロモンの交叉活性はあるが、性的凝集や雑種形成は起こらず、接合前隔離が生じている。これは、性的な細胞認識を支配する性分化遺伝子の進化が主要因と考えられ、性分化に関与する遺伝子群の比較解析を進めた。特に、*S. cerevisiae* の接合型遺伝子 (*MAT*) の *K. naganishii* 細胞内における挙動を調べ、*MAT* 遺伝子機能の種多様性を明らかにした。

(30) 枯草菌におけるフラボノイド応答性 *yetL-yetM* 遺伝子系の制御機構の解析

檀上佑介、花野有貴、広岡和丈、藤田泰太郎

日本農芸化学会中四国支部 2008 年度大会（鳥取）、講演要旨集、p. 11 (2008-9)

(31) 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、菊池正悦、柳本敏彰、秦野琢之

日本農芸化学会中四国支部 2008 年度支部大会（鳥取）、講演要旨集、p. 52 (2008-9)

- (32) ウサギ肝のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムの脂肪酸 ω 酸化における役割
宮尾夕子、岡崎早恵、山本 覚
日本農芸化学会中四国支部 2008 年度大会 (鳥取)、講演要旨集、p. 32 (2008-9)
- (33) アフリカツメガエルの 2 種のチモシン β 4 様タンパク質の生理機能
山本 覚、竹中 諒、宮尾夕子
日本農芸化学会中四国支部 2008 年度大会 (鳥取)、講演要旨集、p. 36 (2008-9)
- (34) 免疫化学測定の実際と課題
大川秀郎、嶋津小百合
生物化学的測定研究会第 13 回 (2008 年) 学術シンポジウム (福岡)、講演要旨集、
p. 21-28 (2008-10)
- (35) *Saccharomyces* 属酵母における近縁種間の生殖隔離
渡辺正則、杉原千紗、久富泰資
第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 24 (2008-11)
- (36) サッカロミセス科酵母における属間の生殖隔離と性分化遺伝子の進化
松浦健太郎、石原雄太、富田貴則、杉原千紗、久富泰資
第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 25 (2008-11)
- (37) 酵母 *Kazachstania naganishii* の第 V 番染色体上の遺伝子配置
奥村麻理絵、杉原千紗、久富泰資
第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 26 (2008-11)
- (38) 油脂の微生物生産と有効利用に関する研究
小郷貴之、池本ひとみ、川瀬匡貴、松崎浩明、秦野琢之
第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 14 (2008-11)
- (39) 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
菊池正悦、松崎浩明、秦野琢之
第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 15 (2008-11)
- (40) 酵母の乾燥ストレス応答

鎌谷弘和、松崎浩明、秦野琢之

第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 16 (2008-11)

- (41) 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
早川元大、森田 翔、松崎浩明、秦野琢之

第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 17 (2008-11)

- (42) 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
山下俊太郎、柳本敏彰、松崎浩明、秦野琢之

第 26 回 YEAST WORKSHOP (松江)、講演要旨集、p. 18 (2008-11)

- (43) 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、菊池正悦、柳本敏彰、秦野琢之

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (合同大会) (神戸)、
講演要旨集、p. 512 (2008-12)

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 *GALI* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子 *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、孢子形成過程で発現する *ZIP1* プロモーターの制御下でレコンビナー

ゼ遺伝子を発現させ、配偶子の細胞死を検討する。また、複数の染色体からセントロメア配列を切り出して細胞死の効率向上を検討する。

(44) 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、山下俊太郎、松崎浩明、秦野琢之

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会（合同大会）（神戸）、講演要旨集、p. 590（2008-12）

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おり、染色体上で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あり、高温で 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、細胞形態と DNA 含量は G1 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質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 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。相補性検定で *ssd1Δ* 株のみ HCH6 株の変異を相補せず、HCH6 株に野生型の *SSD1* 遺伝子を導入すると温度感受性や細胞極性が回復した。さらに、組換え効率は *SSD1* の導入で低下した。また、塩基配列の解析から HCH6 株の *Ssd1* 遺伝子は 231 番目の C が T に置換され、ナンセンス変異が導入されていた。これらの結果から、HCH6 株の変異の原因遺伝子は *SSD1* であると考えられた。今後、*SSD1* を介するネットワークを解明し、核内配置と細胞質内配置のクロストークが存在する可能性についてさらに検討していく。

B. 総説

C. 著書

(1) 増殖基礎環境

秦野琢之

微生物増殖学の現在・未来、福井作蔵・秦野琢之編・監修、pp. 23-44、地人書館
(2008)

すべての微生物の増殖に係わる学問・技術を「微生物増殖学」と定義し、微生物学の新しい統合的方法論の誘導と創造の途を模索する書籍を編・監修した。本書の第一章「増殖基礎環境」において、物理環境、化学環境、生物環境と増殖について概説した。また増殖環境の人為構築と増殖基礎環境の目指すところについて述べ、今後の微生物増殖学の展開に今まで見落としてきたいくつかの概念を活用する提案をおこなった。

(2) バイオハザード

松崎浩明

微生物増殖学の現在・未来、福井作蔵・秦野琢之編・監修、pp. 158-168、地人書館
(2008)

人類は、微生物を改良するために、変異処理、接合、遺伝子組換え技術、細胞融合技術など様々な育種技術を開発してきた。これらの技術を利用してこれまで自然界に存在しなかった新しい生物が造成される。このことは、ヒトの健康に有害な生物や生態系に悪影響を及ぼす生物が地球上に出現する危険性を含んでいる。人類は、このような生物によるバイオハザードが起こる危険性を常に認識し、それに対する予防と対策を怠ってはいけない。本書の第六章 6-4「バイオハザード」において、バイオハザードが起こる理由、バイオハザードの具体例、バイオハザードに対する法律・省令、バイオハザードに対する予防と対策について概説した。また、微生物育種の未来を想像し、それによるバイオハザードについても言及した。

(3) エーテル結合に作用する酵素

山本 寛、浅田浩二

酵素ハンドブック 第3版、八木達彦ほか編、pp. 618-619、朝倉書店 (2008)

D. その他

- (1) 巻頭言「生物化学総合管理学の社会人教育」
大川秀郎
化学生物総合管理 4, 145 (2008-12)

- (2) 環境とバイオテクノロジー
大川秀郎
日本農学賞受賞記念 信州大学農学部特別講演会－農学研究のフロンランナー
(2008-5)

- (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
2007 年度報告書、p. 302 (2008-3)

- (4) 枯草菌炭素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、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
2008 年度合同班会議 (神戸)、予稿集 A15 (2008-8)

- (5) 枯草菌の多剤耐性に関与する *yusOP* オペロンの転写制御機構の解析
広岡和丈、檀上佑介、松岡浩史、藤田泰太郎
平成 20 年度 六大学交流会 (三田)、要旨集 (2008-9)

- (6) 枯草菌におけるフラボノイド応答性 *yetL-yetM* 遺伝子系の制御機構の解析
檀上佑介、花野有貴、広岡和丈、藤田泰太郎
平成 19 年度 六大学交流会 (三田)、要旨集 (2008-9)

- (7) 枯草菌のゲノムと環境
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 5 回公開講演会「環境・健康の質の
向上を目指すグリーンサイエンスの展開」、講演要旨集、p. 7 (2008-10)

- (8) 枯草菌炭素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 (東條繁郎)

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20年度領域横断微生物研究会（加賀）（2008－11）