

生物工学科 2015 年研究業績

A. 研究発表

1. 論文

- (1) Colonization history of the sable *Martes zibellina* (Mammalia, Carnivora) on the marginal peninsula and islands of northeastern Eurasia.

Gohta Kinoshita, Jun J. Sato, Ilya G. Meschersky, Sofiko L. Pishchulina, Leonid V. Simakin, Vyacheslav V. Rozhnov, Boris A. Malyarchuk, Miroslava V. Derenko, Galina A. Denisova, Lyubov V. Frisman, Alexey P. Kryukov, Tetsuji Hosoda, and Hitoshi Suzuki

J. Mammal., **96**, 172-184 (2015)

We examined the nucleotide sequences of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 gene (976 base pairs) for 279 individuals of the sable *Martes zibellina* (Carnivora, Mustelidae), derived from diverse areas throughout the regions of the Ural Mountains to the Russian Far East on the Eurasian continent and the peripheral peninsula (Kamchatka) and islands (Sakhalin, Hokkaido, and southern Kurils). The demographic history of the sable and its migration history to the eastern peripheral peninsula and islands were inferred using phylogeographic approaches. The analyses confirmed the previously found major lineages for the examined sables and further identified novel sublineages. Our data also support that a lineage, which is endemic to the eastern marginal islands (Sakhalin, Hokkaido, and southern Kurils), was produced by the demographic expansion of an ancestral lineage in the Eurasian continent. The most recent common ancestor of the Sakhalin, Hokkaido, and southern Kuril sables was estimated to exist during the Late Pleistocene. We also determined that another lineage exists on Sakhalin and is shared by the Far East Primorsky population. Our results indicate multiple migration events onto Sakhalin from the continent and suggest the importance of the formation of several straits to the distribution of sable lineages. Meanwhile, Kamchatka is dominated by a sole lineage which would also have followed the demographic expansion on the Eurasian continent. The Russian Far East was indicated as the source area for lineage diversifications; in this region, genetic diversity was relatively high, which is consistent with previous studies.

- (2) The production of coagulation factor VII by adipocytes is enhanced by tumor necrosis factor- α or isoproterenol

Nobuhiko Takahashi, Takayuki Yoshizaki, Natsumi Hiranaka, Osamu Kumano, Takeshi Suzuki, Masayasu Akanuma, Tomoo Yui, Kaoru Kanazawa, Mika Yoshida, Sumiyoshi Naito, Mikihiro Fujiya, Yutaka Kohgo, and Masahiro Ieko
Int. J. Obes., **39**, 747–754 (2015)

BACKGROUND: A relationship has been reported between blood concentrations of coagulation factor VII (FVII) and obesity. In addition to its role in coagulation, FVII has been shown to inhibit insulin signals in adipocytes. However, the production of FVII by adipocytes remains unclear.

OBJECTIVE: We herein investigated the production and secretion of FVII by adipocytes, especially in relation to obesity-related conditions including adipose inflammation and sympathetic nerve activation.

METHODS: C57Bl/6J mice were fed a low- or high-fat diet and the expression of FVII messenger RNA (mRNA) was then examined in adipose tissue. 3T3-L1 cells were used as an adipocyte model for in vitro experiments in which these cells were treated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) or isoproterenol. The expression and secretion of FVII were assessed by quantitative real-time PCR, Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assays.

RESULTS: The expression of FVII mRNA in the adipose tissue of mice fed with high-fat diet was significantly higher than that in mice fed with low-fat diet. Expression of the FVII gene and protein was induced during adipogenesis and maintained in mature adipocytes. The expression and secretion of FVII mRNA were increased in the culture medium of 3T3-L1 adipocytes treated with TNF- α , and these effects were blocked when these cells were exposed to inhibitors of mitogen-activated kinases or NF- κ B activation. The β -adrenoceptor agonist isoproterenol stimulated the secretion of FVII from mature adipocytes via the cyclic AMP/protein kinase A pathway. Blockade of secreted FVII with the anti-FVII antibody did not affect the phosphorylation of Akt in the isoproterenol-stimulated adipocytes.

CONCLUSION: Obese adipose tissue produced FVII. The production and secretion of FVII by adipocytes was enhanced by TNF- α or isoproterenol via different mechanisms. These results indicate that FVII is an adipokine that plays an important role in the pathogenesis of obesity.

(3) Molecular basis of sugar recognition by collectin-K1 and the effects of mutations associated with 3MC syndrome

Umakhanth Venkatraman Giriya, Christopher M Furze, Alexandre R Gingras, Takayuki Yoshizaki, Katsuki Ohtani, Jamie E Marshall, A Katrine Wallis, Wilhelm J Schwaeble, Mohammed El-Mezgueldi, Daniel A Mitchell, Peter CE Moody, Nobutaka Wakamiya, and Russell Wallis

BMC Biol. **13**, 27 (2015)

BACKGROUND: Collectin-K1 (CL-K1, or CL-11) is a multifunctional Ca(2+)-dependent lectin with roles in innate immunity, apoptosis and embryogenesis. It binds to carbohydrates on pathogens to activate the lectin pathway of complement and together with its associated serine protease MASP-3 serves as a guidance cue for neural crest development. High serum levels are associated with disseminated intravascular coagulation, where spontaneous clotting can lead to multiple organ failure. Autosomal mutations in the CL-K1 or MASP-3 genes cause a developmental disorder called 3MC (Carnevale, Mingarelli, Malpuech and Michels) syndrome, characterised by facial, genital, renal and limb abnormalities. One of these mutations (Gly(204)Ser in the CL-K1 gene) is associated with undetectable levels of protein in the serum of affected individuals.

RESULTS: In this study, we show that CL-K1 primarily targets a subset of high-mannose oligosaccharides present on both self- and non-self structures, and provide the structural basis for its ligand specificity. We also demonstrate that three disease-associated mutations prevent secretion of CL-K1 from mammalian cells, accounting for the protein deficiency observed in patients. Interestingly, none of the mutations prevent folding or oligomerization of recombinant fragments containing the mutations in vitro. Instead, they prevent Ca(2+) binding by the carbohydrate-recognition domains of CL-K1. We propose that failure to bind Ca(2+) during biosynthesis leads to structural defects that prevent secretion of CL-K1, thus providing a molecular explanation of the genetic disorder.

CONCLUSIONS: We have established the sugar specificity of CL-K1 and demonstrated that it targets high-mannose oligosaccharides on self- and non-self structures via an extended binding site which recognises the terminal two mannose residues of the carbohydrate ligand. We have also shown that mutations associated with a rare developmental disorder called 3MC syndrome prevent the secretion of CL-K1, probably as a result of structural defects caused by disruption of Ca(2+) binding during biosynthesis.

- (4) Flexibility of the coordination geometry at the N-site of Cu(II)₂ human serum-transferrin induced by the different orientations of Arg124
Toshiyuki Hata, Yu Shibata, Miku Okano, Asako Kodera, Misato Ueda, Hiroshi Iwamoto, Hisao Tomida, Hiroyuki Iwamoto, and Junzo Hirose
Biol. Pharm. Bull., **38**, 358–364 (2015)

The ESR spectra of dicupric human serum-transferrin (serum-Tf) were measured from -20 to 37°C in the liquid state (56% glycerol at pH 7.6). Two coordination geometries (types B-1 and B-2) with different ESR parameters were present at the N-site. The contents of the coordination geometry of type B-1 at the N-site increased as the temperature increased. The equilibrium constant between the coordination geometries of types B-1 and B-2 was determined by ESR spectra. The enthalpy value from type B-2 to B-1 was +5.3 kcal/mol, as obtained from a van't Hoff plot. The two conformational energies of the cluster models of the copper-binding site at the N-site of dicupric human serum-Tf, where the Arg124 residue was oriented in two different directions (conformations I and II), were calculated by Density Functional Theory, and the enthalpy value from conformation II to I was +2.1 kcal/mol. The enthalpy value was similar to that (+5.3 kcal/mol) obtained by the coordination geometrical change from type B-2 to B-1 in Cu(II)₂ serum-Tf. In conformations I and II, the residue of Arg124 at the N-site is located either far from or near the copper-binding site, respectively, and in both cases the coordination geometry of the cupric ions at the N-site has changed from a flattened tetrahedron to a trigonal bipyramid. This result implies that the ESR spectral change from type B-2 to B-1 is caused by the presence of two different orientations of Arg124 in the change from conformation II to I.

- (5) Development of chitosan-nanofiber-based hydrogels exhibiting high mechanical strength and pH-responsive controlled release
Sachiko Nitta, Shinobu Kaketani, and Hiroyuki Iwamoto
Eur. Polymer J., **67**, 50–56 (2015)

Developing naturally derived polymer-based hydrogels with high mechanical strength and a controlled release of loaded bioactive substances is essential in biomedicine and tissue engineering. Here, we report the fabrication of chitosan nanofiber (CNF)-based hydrogels (CNF-poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogel) with a semi-penetrating network structure comprising CNF and chemically-crosslinkable PEG diacrylate (PEGDA). Scanning

electron microscopy revealed a micro-porous structure, resulting from PEGDA gelation aligned with the bundles of CNF. CNF addition enhanced compressive rupture stress and Young's modulus, indicating that it strengthened the PEGDA hydrogels. Bovine serum albumin (BSA) was encapsulated in CNF-PEG hydrogels probably via the hydrophobic interaction between CNF and BSA. A pH decrease from 7.4 to 5.6 caused accelerated BSA release from the hydrogels due to the difference in their swelling degrees. These results indicated that CNF-PEG hydrogels could be utilized as a carrier for bioactive substances that demonstrates controlled release behavior and improved mechanical properties.

- (6) Regulation of the *rhaEWRBMA* operon involved in L-rhamnose catabolism through two transcriptional factors, RhaR and CcpA, in *Bacillus subtilis*
Kazutake Hirooka, Yusuke Kodoi, Takenori Satomura, and Yasutaro Fujita
J. Bacteriol., **198**, 830-845 2015 Dec

The *Bacillus subtilis rhaEWRBMA* (formerly *yuxG-yulBCDE*) operon consists of four genes encoding enzymes for L-rhamnose catabolism and the *rhaR* gene encoding a DeoR-type transcriptional regulator. DNase I footprinting analysis showed that the RhaR protein specifically binds to the regulatory region upstream of the *rhaEW* gene, in which two imperfect direct repeats are included. Gel retardation analysis revealed that the direct repeat farther upstream is essential for the high-affinity binding of RhaR and that the DNA binding of RhaR was effectively inhibited by L-rhamnulose-1-phosphate, an intermediate of L-rhamnose catabolism. Moreover, it was demonstrated that the CcpA/P-Ser-HPr complex, primarily governing the carbon catabolite control in *B. subtilis*, binds to the catabolite-responsive element, which overlaps the RhaR binding site. In vivo analysis of the *rhaEW* promoter-*lacZ* fusion in the background of *ccpA* deletion showed that the L-rhamnose-responsive induction of the *rhaEW* promoter was negated by the disruption of *rhaA* or *rhaB* but not *rhaEW* or *rhaM*, whereas *rhaR* disruption resulted in constitutive *rhaEW* promoter activity. These in vitro and in vivo results clearly indicate that RhaR represses the operon by binding to the operator site, which is detached by L-rhamnulose-1-phosphate formed from l-rhamnose through a sequence of isomerization by RhaA and phosphorylation by RhaB, leading to the derepression of the operon. In addition, the *lacZ* reporter analysis using the strains with or without the *ccpA* deletion under the background of *rhaR* disruption supported the involvement of CcpA in the carbon catabolite repression of the operon.

2. 報文

(1) ヒト及びアカネズミ毛根由来細胞の培養

山口泰典、古志直之、田下智亜紀

福山大学生命工学部研究年報 (14), 1-12 (2015)

培養正常細胞を低侵襲的に得る方法として、抜去した毛根部分から培養可能な細胞を得る方法を開発した。インフォームドコンセントを与えられた成人ボランティア 5 名より本人自身が容易に抜去できるまゆ毛を用いて、毛根に由来する正常細胞の培養を種々条件下で検討したところ、年齢や性別に関係なく簡易な方法で繊維芽細胞様の培養細胞を得ることが可能となった。それらの細胞の最適培養条件を明らかにすると共に、継代培養を重ねることによって細胞の増殖性がどのように変化するかを分析した。また、野生哺乳動物のひげまたは体毛の毛根部分からバイオリソースとして培養可能な細胞を得る目的で、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) をモデル動物とし、そのひげ及び体毛由来の細胞を培養できる簡易で効率の良い方法を開発した。

3. 学会発表

(1) 紅麴の新規食品機能である脂肪肝抑制機構の解析

吉崎隆之、本村 亘、吉崎由美子、高橋伸彦、高後 裕、山本 寛

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)、大会講演要旨集 on line (2015-3)

【目的】私たちの研究グループでは脂肪肝形成を阻止する新たな分子標的の探索を目的とし、高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスを使用してその分子メカニズムの解析を行い、その結果核内受容体である PPAR γ や脂肪滴表面構成分子 ADRP、そしてパンテテイナーゼ Vanin-1 が肝細胞内の脂肪蓄積に関与することなどを報告してきた (BBRC 2005, 336: 215-22, BBRC 2006, 340: 1111-8, JCBN 2012, 53: 163-9)。今回、私たちは血中コレステロールと中性脂肪を下げることなどで知られる“紅麴粉末”を本実験系に取り入れ、紅麴の脂肪肝抑制効果に関する知見を得たので報告する。

【方法】2 週齢の C57Bl/6Ncrj マウスに対して脂質カロリー比 82%の食餌に 10%

(w/w) の米粉または紅麴粉末を混ぜたものを投与した。1 週間おきにすべてのマウスの体重と血糖値を測定し、0 週、2 週、4 週間後それぞれのマウスについては肝重量および脂肪組織重量を測定した。同時に肝臓については組織切片を作製して HE 染色およびオイルレッド O 染色により脂肪肝の程度を評価し、さらにリアルタイム PCR により脂質代謝関連遺伝子の発現量変化を測定した。

【結果】 マウスへの高脂肪食投与による脂肪肝形成モデル実験系において、1 ヶ月間の紅麴粉末投与の結果、コントロールと比べて体重増加が抑えられること、血糖値の上昇を穏やかにすることを確認した。紅麴粉末を含む高脂肪食を投与開始後 2 週間および 4 週間の肝重量および脂肪組織重量の比較では、肝重量においては 2 週間、4 週間両方で、脂肪組織重量においては 2 週間では有意差はなかったものの、4 週間でコントロールと比べ増加が抑えられていることが分かった。次に、この時取り出した肝臓で作製した肝臓組織切片の HE 染色およびオイルレッド O 染色を行った。投与開始後 2 週間では HE 染色においてはコントロールと明確な差は認められなかったが、オイルレッド O 染色ではコントロールで脂肪が染色されているのに対し、紅麴粉末を与えた方ではほとんど染色されなかった。投与開始後 4 週間においては、HE 染色のコントロールで間隙のようなものが認められるのに対し、紅麴粉末を与えた方では異常は認められなかった。一方、オイルレッド O 染色ではコントロールが強く染色されたのに対し、紅麴粉末を与えた方では僅かに染色されただけだった。

紅麴粉末の投与によって既知の脂質代謝関連遺伝子の発現にどのような影響を与えているかを調べた。その結果、今回調べた遺伝子の中では cell death-inducing DNA Fragmentation Factor, alpha subunit -like effector A (CIDEA) の発現量がコントロールと比べ顕著な差が認められ、紅麴粉末の投与によってこの遺伝子の発現上昇を抑えていることが明らかとなった。

(2) 絶食、及び低温環境が α 酸化、 β 酸化及び ω 酸化経路による脂肪酸代謝に及ぼす影響

山本 覚、桑田尚平、宮尾夕子、吉崎隆之、太田雅也

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)、大会講演要旨集 on line (2015-3)

【目的】 脂肪酸は主として脂肪酸 β 酸化経路で代謝され、エネルギー代謝の基質として利用される。しかし、一部の脂肪酸は脂肪酸 ω 酸化経路、 α 酸化により代謝されることを見出した。本研究では、これらの脂肪酸代謝の生理的意義を明らかにするため、絶食及び低温化での動態について検討した。

【方法】 脂肪酸 ω 酸化に関与するウサギ肝 Alcohol dehydrogenase (ADH) のア

イソザイムである ADH Class I、ADH Class II、ADH Class III) については、それぞれの cDNA をクローニングし大腸菌内で発現させた発現タンパク質を用いて、その基質特異性等を詳細に検討した。また、5 日間絶食処理を施したウサギの肝細胞質画分の ADH アイソザイムの活性を測定し、絶食時における変化を検討した。尿中に排泄される脂肪酸代謝物の検討には、実験動物にラット (SD、8 週齢、雌) を用いた。ラットを 24 時間絶食後、24℃及び 4℃でメタボリックケージ内で 24 時間飼育し、尿を回収した。回収した尿を $\phi 0.22 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過した後、凍結乾燥後メタノールで溶解し、メタノール-塩酸存在下でメチルエステル化した。これを GC-MS により同定、定量を試みた。内部標準には Brassylic acid (炭素数 13 のジカルボン酸) を用いた。

【結果】脂肪酸 ω 酸化経路の最初の反応である脂肪酸 ω 位の水酸化を触媒する Fatty acid ω -hydroxylase 活性は、絶食、糖尿病、抗高脂血症剤投与により優位に増加することをこれまでに明らかにしている。脂肪酸 ω 位の水酸化に続く ω 位水酸基の脱水素反応を触媒する Alcohol dehydrogenase については、 ω -ヒドロキシ脂肪酸に対する K_m ($27 \mu\text{M}$) が最も低く、肝に最も多量に発現している ADH Class I が脂肪酸 ω 酸化に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、絶食処理により ADH Class III が約 3 倍に誘導されることが明らかになった。一方、ラットの尿中に排泄される脂肪酸代謝生成物について検討した結果、脂肪酸が β 酸化、 ω 酸化、及び α 酸化を受けて生成したと推定される Pimelic Acid (炭素数 7)、Suberic acid (炭素数 8)、Azelaic acid (炭素数 9)、及び Sebacic acid (炭素数 10) のジカルボン酸がほぼ同程度量排泄されていることが示された。

一方、低温下で飼育したラットの尿中には Adipic acid (炭素数 6) が検出され、さらに奇数炭素数の Pimelic Acid、Azelaic acid が優位に増加することが示された。これらの結果より、脂肪酸 ω 酸化及び脂肪酸 α 酸化経路が脂肪酸代謝において恒常的に機能しており、飢餓時や低温化では脂肪酸 β 酸化経路を補足する代謝経路であることが強く示唆された。

尚、本研究は平成 24 年度～26 年度 文科省科研費 (課題番号 24650508) の支援を受けて実施した。

(3) キトサンナノファイバーがヒドロゲルの物性や機能性に与える影響

岩本博行、懸谷しのぶ、新田祥子

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)、大会講演要旨集 on line (2015-3)

【目的】近年加工技術の進歩に伴い多用な多糖類ナノファイバーが開発され、食品や医用材料分野での応用が広く期待されている。セルロースやキトサンを原料

とする多糖類ナノファイバーは、比表面積が大きいことから粘性が高く、優れた分散安定性、強度および弾性を有することから、食品安定化剤や増粘剤、医用材料分野での応用が検討されている。そこで本研究では、キトサンナノファイバー（CNF）を含有したゲルを作製し、CNFの添加がゲルの膨潤性、力学的特性および物質保持性に及ぼす影響を評価することにより、医用材料等への応用の可能性を検討した。

【方法】 本研究では、モデルゲルとして poly(ethylene glycol) (PEG)を用いた。PEG diacrylate (PEGDA)/CNF 混合懸濁液中にレドックス開始剤 APS/TEMED を加えて PEGDA の架橋反応を行い、CNF が系内で分散した semi-IPN 型均一ゲル (CNF-PEG gel) を作製した。ゲルの PEGDA/CNF 比や外部 pH がゲルの膨潤性、破断応力および含有物の放出性に与える影響を評価した。ゲルの内部構造は SEM により観察した。

【結果と考察】 作製した CNF 含有 PEG ゲル (CNF-PEG gel) は凍結乾燥後もその形状を維持したことから、CNF がゲルの立体保持に寄与していると考えられた。乾燥ゲルを超純水中に浸漬させたところ、約 30 分程度で平衡膨潤度に到達した。CNF-PEG gel の膨潤率は 5~10 程度であり、PEGDA 仕込み量に依存した。また、キトサンのアミノ基に由来する電荷の影響により、CNF-PEG gel は pH に依存した膨潤性を示した。CNF-PEG gel の圧縮破断応力は、PEGDA および CNF の仕込み量に大きく依存した。特に、CNF 量が増加するに従って破断応力が増大したことから、CNF の添加はゲルの高強度化をもたらすことが示唆された。CNF-PEG gel のタンパク質の封入や放出については、ゲルは効率よく BSA を封入する一方、タンパク質の放出挙動は外液バッファの pH やゲルの組成に依存した。低 pH 条件下では、ゲルからの BSA 放出速度が上昇する傾向が見られたが、ゲルに CNF を添加することで初期バーストが抑制された。最後に CNF-PEG gel の各種性質をもたらす要因を明らかにするため、ゲルの内部の構造を SEM で観察したところ、束状構造化した CNF に沿って PEGDA がゲル化することで、数十 μL の空孔を多く含む網目構造を有するゲルが形成されていることが分かった。また細孔径、空孔率はともに、CNF の仕込み量の増加に伴い増大した。以上の結果から、PEG gel に CNF を添加することにより、ゲルにナノファイバーに起因する網目構造が形成され、特異的な膨潤挙動、力学特性およびタンパク質放出特性をゲルに付与することがわかった。

(4) Triacylglycerol を分泌する酵母変異株の解析

秦野琢之、藤井洋紀、岡田桃子、松崎浩明

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)、大会講演要旨集 on line (2015-3)

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

【方法・結果】 *S. cerevisiae* の STG1 変異株は、TG を菌体外に漏出する。STG1 株の TG 分泌 (Halo⁺) 形質は 1 遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection (YKO、約 4800 株) より TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1 株との相補試験並びに菌体外 TG の検出を行った。その結果、候補遺伝子は 3 つに絞られた。親株 (YP1) の候補遺伝子をそれぞれ破壊したところ、菌体外に TG が検出されるようになった。候補遺伝子の塩基配列を親株のそれとそれぞれ比較した結果、いずれの候補遺伝子も ORF の上流数百塩基から下流数百塩基までに変異点は存在しなかった。STG1 株の微小管や核を観察すると *spc72D* 株と同様の形質を有していた。そこで *spc72D* 遺伝子の RT-PCR を行い発現の有無や強弱を確認したが、どちらの株でも発現しており、有意差は認められなかった。今後、候補遺伝子の発現量を定量して親株と比較し、差がないかを確認したい。

一方、これまでの知見をもとに、*S. cerevisiae* 以外の酵母で TG 分泌が可能であるかを確認することとした。全ゲノム配列が同定されている *Kluyveromyces lactis* と *Yarrowia lipolytica* を材料に用いて、*S. cerevisiae* の TG 分泌の表現型を示す遺伝子とのオルソログ遺伝子を破壊することで、TG 分泌型酵母を取得することを検討している。

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

松崎浩明、宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)、大会講演要旨集 on line (2015-3)

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。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐことを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導する方法が考えられる。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミド

の部位特異的組換えを利用してセントロメアDNAを切り出すことで細胞死を誘導することを検討している。セントロメアDNAの切り出しは、第IV番染色体のセントロメアDNAの両側に組換え標的部（RS）を同じ方向に挿入し、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第IV番染色体1本から切り出すことで、また二倍体では第IV番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができる。しかし、プレート上で僅かな数のコロニーが出現するので、生存率をさらに低下させるために生存細胞が出現する原因を解析した。一倍体の生存細胞（51クローン）のセントロメアDNA近傍のPCR解析やRS領域のシーケンス解析から、生存細胞が出現した原因は、主に染色体からRSが1個欠失し、切り出しが起こらなかったためと示唆された。RSの欠失は2個のTCGA配列を介して起こっている可能性が考えられるので、片方の配列をTA配列に置換した結果、生存率をさらに低下させることができた。この時、RSの欠失はある程度抑制されていた。また、生存細胞の中には、セントロメアDNAが切り出された細胞が低い割合で出現しており、生存原因について検討している。

(6) 枯草菌での2つの転写因子 Yu1B および CcpA を介したラムノース異化に関わるオペロンの制御機構

広岡和丈、小土井祐介、藤田泰太郎

日本農芸化学会 2015 年度大会（岡山）、大会講演要旨集 on line (2015-3)

枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から滲出する種々の有機化合物を栄養源としている。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする *yuxG-yu1BCDE* オペロンを見出し、その機能解析を行っている。ラムノースは、細胞壁ペクチン・根から分泌される粘液質・フラボノイド配糖体などの植物由来物質の構成成分であるので、根圏土壌中には比較的豊富に存在しており、枯草菌はこのオペロンを発現させてラムノース資化を行っていると考えられる。

これまでの研究から、DeoR ファミリーに属する Yu1B 転写因子は二量体を形成し、*yuxG* 上流の2つの不完全なダイレトリピートを含む領域に結合することが示されている。欠失 DNA プローブを用いたゲルシフト解析の結果、2つのダイレトリピートのうち、上流側に位置するものが Yu1B の DNA 結合に不可欠であり、下流側の方を欠失させた場合は Yu1B の結合親和性の低下と2段階のバンドシフトが観察された。これにより二分子の Yu1B 二量体が *yuxG* 上流制御領域に結合することが推定された。この制御領域には、カタボライト制御を司る CcpA の認識配列である *cre* が下流側のダイレトリピートと重なる形で存在しており、実際に

CcpA/P-Ser-HP_r 複合体が結合することが DNase I フットプリント解析で確認されている。*yuxG-yu1BCDE* オペロンの各遺伝子に pMUTIN プラスミドの挿入をもつ枯草菌株に *ccpA* 破壊をさらに導入して構築した各菌株と、*yuxG* プロモーターと *lacZ* との連結を *amyE* 座に導入した枯草菌株を用いてレポーター解析を行った結果、*yuxG* プロモーターの誘導は Yu1B、Yu1E、および Yu1C が存在する菌株を炭素源としてラムノースを添加した培地で生育させた場合にのみ検出された。このことから、Yu1B が制御領域に結合してオペロンの発現を負に制御しており、ラムノースイソメラーゼである Yu1E とラムヌロキナーゼである Yu1C によってラムノースが変換されて生じたラムヌロース-1-リン酸がエフェクターとして作用して、Yu1B による抑制を解除することが強く示唆された。また、Yu1B、Yu1E、Yu1C、および CcpA が存在する菌株をグルコースとラムノースの両方を添加した培地で培養すると、ラムノースによる誘導効果はグルコースが消費されるまで抑制されたことから、Yu1B が脱抑制されたとしてもグルコース存在下では CcpA によってカタボライト抑制を受けると考えられた。

(7) フレキシブルドッキングシミュレーションによる MAO-B 阻害活性の予測

秦 季之、木村 元、岩本博行.

日本薬学会第 135 年会 (神戸)、大会講演要旨集 on line (2015-3)

【はじめに】モノアミン酸化酵素 B(MAO-B)はアミン類の酸化的脱アミノ化反応を触媒する酵素で、ペントアンスレン骨格を有する化合物 (PA) が MAO-B 阻害活性を有することが見出されている。我々は、PA と MAO-B とのドッキングシミュレーションでは、複合体生成自由エネルギー (ΔG_b) の値が再現できない事を報告している。そこで今回は、阻害物質定数 (K_i) 既知の化合物と MAO-B とのフレキシブルドッキングシミュレーションでの複合体生成自由エネルギーの再現性から、フレキシブルドッキングの有用性を検討した。

【方法】1) K_i 既知の 4 種類の MAO-B 阻害剤 (Isatin, Farnesol, Chlorostyrylcaffeine, 1,4-Diphenyl-2-butene) を選択し、それらの最適化構造を MNDO-AM1 法で求めた。2) MAO-B の構造は Isatin の X 線構造解析結果 (PDB ID : 10JA) から得た。3) 阻害剤と酵素の構造を基にして、Autodock Vina により、活性中心を構成するアミノ酸残基 (Tyr60, Leu171, Cys172, Ile198, Ile199, Gln206, Tyr326, Leu328, Phe343, Tyr398, Tyr435) の側鎖構造を動かすフレキシブルドッキングによる複合体構造の予測を行った。得られた複合体の構造のうち、複合体生成自由エネルギーが最も低いものを候補構造とした。

【結果と考察】いずれの阻害剤も複合体構造は、補酵素 FAD のイソアロキサジン

環の近傍に配向していることから、フレキシブルドッキングで得られた複合体の構造は妥当であると考えられた。また複合体生成自由エネルギーは、 ΔG_b (実測) = $2.2 \times \Delta G_b$ (計算値) + 8.3、相関係数 0.995 と非常に良い相関関係が得られた。以上のことより、MA0-B の阻害活性の予測には、フレキシブルドッキングシミュレーションが有用である事が分かった。

(8) 瀬戸内海島嶼による隔離がアカネズミ集団の遺伝的多様性に与えた影響

佐藤 淳、田坂由里奈、山本祐哉、白石裕樹、前田康平、田坂僚也、高田靖司、植松 康、酒井英一、立石 隆、山口泰典

第 62 回日本生態学会 (鹿児島)、講演要旨集、G2-28 (2015-3)

本研究では、瀬戸内海島嶼において、アカネズミ *Apodemus speciosus* を対象に、島の隔離が集団の遺伝的分化と多様性に与える影響を評価した。向島、因島、生口島、大三島、伯方島、大島、大崎上島、上蒲刈島、下蒲刈島の島嶼に加えて、本州と四国から得られた計 170 個体を対象に、ミトコンドリアゲノムから Dloop 領域約 300bp の塩基配列を決定し、島嶼集団の遺伝的多様性を明らかにした。その結果、1) 島嶼集団の遺伝的多様性は本州や四国の集団と比較して低いこと、2) 島嶼集団のハプロタイプはそれぞれの島に固有であること、そして 3) それぞれの島嶼集団は主に本州由来のハプロタイプを持つことが明らかとなった。このことは、過去に本州集団が大島周辺まで分布域を広げており、瀬戸内海島嶼の隔離に伴い、それぞれの島で異なるハプロタイプが集団内に固定されたことを示唆する。同時に、島の隔離により集団サイズが減少し、それぞれの島の集団の遺伝的多様性が低下すると共に最終的に島嶼間で遺伝的分化が生じたと予想される。対照的に、味覚受容体遺伝子はそれぞれの島固有の多様性を示した。旨味受容体遺伝子 *Tas1r1* 約 400bp を用いて島嶼集団の遺伝的多様性を評価したところ、本州集団よりも多型的な集団 (向島) や、本州と同等の多型性を維持する集団 (因島、伯方島、大島)、Dloop と同様に遺伝的多様性が低い集団 (生口島、大三島) といった島固有の多様性が明らかとなった。DNA バーコーディング法で糞から同定した動植物の予備的なデータと共に島固有の餌環境に対する自然選択の有無について考察したい。

(9) ALTA 注四段階注射法における薬物動態と有害事象—ICG 蛍光法による可視化と lumogallion 染色による検証

山本 裕、北川雄光、藤井博史、高津章子、元井 信、家田浩郎、辻 順行、山本 覚
第 115 回日本外科学会定期学術集会 (愛知)、抄録集 on line (2015-4)

ALTA注は内痔核組織内に留まって薬理効果を発現することを前提に投与されているが、ICG 蛍光法で可視化した注入薬液は、想定を越えて肛門周囲から臀部、陰囊後面、膣壁、外性器、鼠径リンパ節等に認められた。症例報告された ALTA 注後に発症した臀部蜂窩織炎の切除組織標本の検索では、HE 染色で ALTA 注後に認められる膠原繊維や脂肪織の壊死組織像に近似した所見を認めた。さらに、Aluminum を選択的に染色し蛍光像として認める、lumogallion 染色を行うと、明らかな陽性所見を示し、臀部蜂窩織炎の発症に ALTA 注が直接関与していることが確認された。Rat の真皮に注入した ALTA+ICG 薬液は 1 時間後には、注入部皮膚に同心円状に組織固定した。また、rat の各組織標本の lumogallion 染色では、脳、肺、心、腎、肝等に陽性所見を認めた。ALTA 注四段階注射法における薬物動態と有害事象を解明することは、ALTA 注治療のより安全で有効な治療法確立に有用であると考える。

- (10) THP-1 マクロファージは lipopolysaccharide 刺激によって血液凝固第 VII 因子を分泌する

高橋伸彦、吉崎隆之、熊野 穰、鈴木健史、吉田美香、内藤澄悦、森谷 満、辻宏昌、高後 裕、家子正裕

第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会（山口）、抄録集 on line（2015-5）

【背景】血液凝固第 VII 因子(FVII)は凝固反応に関わるのみならずインスリンシグナルに影響を及ぼすことが知られている。FVII は主に肝臓で産生されるが、肥満の脂肪組織における FVII 遺伝子発現の増加や動脈硬化巣におけるマクロファージに一致した発現も報告されている。【目的】マクロファージにおける FVII の発現に関して細胞レベルでの検討を行う。【方法・結果】ヒト単球由来 THP-1 細胞における細胞内 FVII 蛋白の発現は単球からマクロファージに分化する過程で上昇した。分化させたマクロファージに対して lipopolysaccharide 処置を行うと、濃度および時間依存性に培地中への FVII 分泌が増加した。【考案】炎症と凝固の crosstalk の一端が示唆された。今後、この系の脂肪組織の炎症や代謝、動脈硬化病変の形成への関与の解明が期待される。

- (11) 変異型 Proteinase K を用いたオリゴペプチドの化学酵素合成 (Chemo-enzymatic synthesis of polypeptide using exo-type carboxypeptidase K)

新田祥子、立石綾香、岩本博行、沼田圭司

第 64 回高分子学会年次大会（札幌）、大会講演要旨集 on line（2015-5）

ポリペプチドは汎用の合成高分子では達成できない生理活性や分子構造を有し、様々な分野への応用が期待されている素材である。ポリペプチドを実用的な構造材料として利用するためには、固相合成法や組換え大腸菌を用いた生合成法といった既存の手法に比べ、高い合成効率を示す新たな合成法が求められている。

近年、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の逆反応もしくはアミノリシスを用いることで、アミノ酸もしくはアミノ酸エステルを重合してポリペプチドを合成する化学酵素合成が注目されている。ポリペプチドの化学酵素合成においては、重合と分解の平衡反応における反応定数が重要なファクターであり、モノマー濃度や分解反応を阻害する反応条件等、重合反応に最適な反応条件を確立することで、プロテアーゼによるペプチド合成が可能となる。

そこで本研究では、タンパク質分解酵素としてセリンプロテアーゼである Proteinase K を選択し、Proteinase K のアミノ酸エステル重合反応に対する反応性を評価した。さらに Proteinase K の基質ポケットに存在する Ala229 に対し、飽和変異導入することで、触媒活性部位およびその周辺の基質ポケットが、重合反応に与える影響を評価した。この結果から、高分子量化を妨げる基質ポケットの構造や、基質との相互作用へ与える効果について、飽和変異導入により得られる Proteinase K 変異体とアミノ酸間の基質特性について評価することを目指した。

Hydrophobic oligopeptides were chemo-enzymatically synthesized using Proteinase K mutants. By genetically manipulating amino acid sequences of an active site of Proteinase K, we estimated factors that affect the reactivity of Proteinase K on aminolysis reaction. Reactivity of each Proteinase K mutant was analyzed by measuring k_{cat}/K_m of aminolysis reaction, oligomer yield and the yield of hydrolytic by-products. Reactivity of each Proteinase K mutant was also compared with the wild-type Proteinase K. From these data, we synthesized oligopeptides with relatively higher molecular weight and oligomer yields.

(12) エキソ型 Carboxypeptidase Y を用いたポリペプチドの化学酵素合成

(Chemo-enzymatic synthesis of polypeptide using exo-type carboxypeptidase Y)

新田祥子、岩本博行、沼田圭司

第 64 回高分子学会年次大会（札幌）、大会講演要旨集 on line (2015-5)

Synthetic peptides have been paid much attention as a new material in biomedical application. While a couple of routes to synthesize peptides such as solid phase peptide synthesis (SPPS) and recombinant bacterial expression systems has been reported, chemo-enzymatic polymerization of amino acids esters has recently been studied as a new

route to produce peptides due to its enzymatic chemoselectivity, the absolute absence of racemization and a low number of processes.[1] Proteases are known as catalysts for hydrolysis, but they can also function as catalysts for the formation of peptide bonds (aminolysis). In such chemo-enzymatic peptide synthesis, endo-type proteases are often used as catalysts such as cysteine protease (papain, bromelain) and serine protease (α -chymotrypsin, proteinase K, trypsin, subtilisin). Hydrolysis and aminolysis often compete with each other when using endo-type proteases. [2]

In contrast to endo-type proteases, exo-type proteases may be an alternative to produce peptides without hydrolysis. Carboxypeptidase is one of the exo-type peptidases that recognizes only C-terminal groups of peptides. Therefore, peptides with high molecular weight may be obtained by using carboxypeptidase as a catalyst for aminolysis due to the reduction of hydrolysis of peptides' main chains. In this study, carboxypeptidase Y-catalyzed chemo-enzymatic polymerization of peptides was studied to aim the production of oligopeptides in high molecular weights and yields.

(13) Supermatrix phylogenetic analyses of the Cuban solenodon based on nuclear DNA sequences

Jun J. Sato

Symposium: Research and conservation of the Cuban solenodon, *Solenodon cubanus*: challenges and opportunities in Vth International Wildlife Management Congress (organized by Lazaro M. Echenique-Diaz and Satoshi D. Ohdachi) (Sapporo), Abstracts, p. 59 (2015-7)

The phylogenetic relationship among the Cuban solenodon (*Solenodon cubanus*) and its congeneric species, *S. paradoxus*, with species of the other three extant lineages within the order Eulipotyphla (Mammalia) has remained elusive despite much research. This has been because, among other reasons, tissue samples from the Cuban solenodon have seldom been obtained due to its rarity, and only museum samples have been examined. Therefore, only mitochondrial DNA (mtDNA), with higher copy numbers than nuclear DNA (nucDNA), had been available in previous studies, which, due to the severe saturation problem, may have affected phylogenetic analyses, resulting in overestimated divergence times. Tissue samples from recently captured living individuals enabled multiple nucDNA sequencing for this study (*Apob*, *Atp7a*, *Bdnf*, *Brca1*, and *Rag1*; in total 4,602 bp). Using the data matrix of 5 genes and 35 species from all four families, supermatrix phylogenetic analyses were conducted under maximum-parsimony,

maximum-likelihood, and Bayesian-inference criteria. These analyses confirmed the first branching of Solenodontidae followed by Talpidae, and the close affinity between Erinaceidae and Soricidae. Bayesian relaxed-molecular clock analyses showed that the divergence time between Cuban and Hispaniolan solenodons was 5.3 Ma., significantly different from that inferred by mtDNA (25 Ma), which was interpreted as consistent with the Caribbean geologic history. However, our analyses suggest that dispersal after the Caribbean island formation may have been an important factor for the establishments of the two solenodon species.

- (14) 花(バラ)と果実(ブドウ)に棲息する野生酵母の解析とその実用性
杉原千紗、亀川裕生、西川賢一、吉川成美、花岡拓哉、久富泰資
日本進化学会第 17 回大会 (東京)、講演要旨集、p. 148 (2015-8)

広島県福山市のバラとブドウから発酵性を持つ野生酵母の分離を試みた。具体的には YM 液体培地にて集積培養し、これらを 5 種類の固形培地上で分離して、顕微鏡下で酵母の確認を行った後、グリセロール中で保存した。ダーラム法による発酵性試験を行ったところ、45 品種のバラから 713 株を分離し、そのうち 12 株 (1.7%) が、ブドウ (ニューベリーA) から 62 株を分離し、そのうち 16 株 (25.8%) が比較的高い発酵性を示した。電気泳動核型解析を行ったところ、バラからは 6 種類の電気泳動核型が得られ、*Torulaspora* 属、*Lachancea* 属、*Candida* 属、*Wickerhamomyces* 属といったユニークな野生酵母が認められた。一方、ブドウでは少なくとも 2 種類の異なる核型が存在し、*Saccharomyces* 属が得られ、採取する畑によって電気泳動核型が異なること、また年度をまたいでよく似た核型を示すことが分かった。今後、地域特有の発酵性食品 (パン、ワイン、味噌など) の製造において、これらの酵母を利用していきたいと考えている。また、バラとブドウで棲息する発酵性野生酵母の種類が異なることについても議論したい。

- (15) 枯草菌のラムノース異化に関わるオペロンの 2 つの転写因子 YuIB および CcpA による制御機構
小土井祐介、藤田泰太郎、広岡和文
2015 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 (大津)、プログラム・要旨集、要旨-32 (2015-8)

枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から滲出する種々の有機化合物を栄養源としている。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその

発現制御を担う転写因子をコードする *yuxG-yu1BCDE* オペロンを見出し、その機能解析を行っている。ラムノースは、細胞壁ペクチン・根から分泌される粘液質・フラボノイド配糖体などの植物由来物質の構成成分であるので、根圏土壌中には比較的豊富に存在しており、枯草菌はこのオペロンを発現させてラムノース資化を行っていると考えられる。

これまでの研究で、DeoR ファミリーに属する Yu1B 転写因子は二量体を形成し、*yuxG* 上流の 2 つの不完全なダイレトリピートを含む領域に結合することが示された。また、このオペロンの発現は CcpA によるカタボライト制御を受け、CcpA/P-Ser-HPr 複合体が下流側のダイレトリピートと重なるように存在する *cre* 配列を認識して結合することもわかった。

本研究において、欠失 DNA プローブを用いたゲルシフト解析を行った結果、2 つのダイレトリピートのうち、上流側に位置するものが Yu1B の DNA 結合に不可欠であることが示された。下流側の方を欠失させた場合は Yu1B の結合親和性の低下はみられなかったが、完全長プローブとの複合体とは異なる移動度を示し、この配列も Yu1B の結合様式に影響することが示唆された。また、他の DeoR ファミリー転写因子の特性から類推すると、Yu1B はレプレッサーとして機能し、ラムノース異化中間体であるラムヌロース-1-リン酸によって DNA 結合が解除されることでオペロンの脱抑制が起こると予想された。そこで、大腸菌由来ラムヌロキナーゼを用いてラムヌロースと ATP を反応させてラムヌロース-1-リン酸を調製し、これを Yu1B と DNA プローブを含む溶液に添加してゲルシフト解析を行ったところ、結合阻害効果が明確に認められた。また、酵素活性測定とゲルシフト解析から、Yu1E がラムノースをラムヌロースに異性化し、Yu1C がラムヌロースの 1 位をリン酸化することを示す証拠も得られた。さらに、*yuxG-yu1BCDE* オペロンの各遺伝子に pMUTIN プラスミドを挿入した枯草菌株に *ccpA* 破壊を導入して構築した各菌株を用いてレポーター解析を行った結果、*yuxG* プロモーターの誘導は Yu1B、Yu1E、および Yu1C が存在する菌株を炭素源としてラムノースを添加した培地で生育させた場合にのみ検出され、*in vitro* 系での実験結果を支持するものとなった。

(16) キトサンナノファイバーヒドロゲルの創製とバイオマテリアルへの応用

新田祥子、小松礼佳、石井泰生、岩本博行

日本応用糖質科学会平成 27 年度大会 (第 64 回) (奈良)、講演要旨集 p. 58 (2015-9)

【目的】キトサンは、生体適合性や抗菌性を備えた高機能生体材料であり、化粧品や医療分野など幅広い用途に利用されている。キトサンを water-jet 技術により微粉砕したキトサンナノファイバー (CNF) は、高い強度と高い比表面積を持ち、水

中で優れた分散安定性を持つことから、再生医工学分野での利用が期待されている。そこで本研究では、生理活性物質輸送担体や骨代替材料としての応用を目指して CNF 含有ヒドロゲルを作製し、その性状や特性について調べた。

【方法】 CNF（スギノマシン社製）懸濁液中で、PEG diacrylate (PEGDA) の化学架橋により CNF-PEG ゲルを作製し、その構造を SEM により観察した。PEGDA/CNF 比や外部 pH がゲルの膨潤性、破断応力および含有物の放出特性に与える影響を評価した。更に CNF-PEG ゲルを CaCl_2 溶液および Na_2HPO_4 溶液に交互浸漬して、CNF ゲル内部および表層に hydroxyapatite (HAp) 結晶を集積した複合材料 CNF-PEG-HAp ゲルを作製した。

【結果】 SEM 観察より、CNF-PEG ゲルは束状の CNF に沿って PEGDA がゲル化することにより、数十 μL の空孔を多く含む網目構造を持つことを見出した。また CNF-PEG ゲルは、CNF 仕込み比や外部 pH に依存した膨潤性を示した。さらに CNF 量の増加に従って破断応力が増大したことから、CNF 添加がゲルの高強度化をもたらすことが示唆された。次にゲルのリン酸化を試みたところ、FT-IR、XRD の結果から CNF-PEG ゲル内部および表層に HAp 結晶が生成していることを確認した。

(17) 植物の花や果実に棲息する高発酵性の野生出芽酵母について

久富泰資、吉川成美、亀川裕生、西川賢一、杉原千紗

日本植物学会第 79 回大会（新潟）、研究発表記録、p. 185（20015-9）

広島県福山市で栽培されている植物の花や果実に棲息している野生酵母の分離を行った。分離源としては、45 品種のバラの花、ニューベリーA のブドウ果実、彼岸桜のサクランボなどを用いた。また、分離した野生酵母を地域特性の高い発酵食品の開発に用いるため、エタノール発酵力の高い酵母種を選別した。

バラの花からは、713 株の野生酵母を分離することができた。発酵性を指標に選別を行ったところ、特に発酵性の高い 12 株の野生出芽酵母を取得することができた。これらの菌株の電気泳動核型解析及びリボソーム DNA の塩基配列解析を行ったところ、*Torulaspora* 属、*Zygosaccharomyces* 属、*Lachancea* 属、*Wickerhamomyces* 属、*Candida* 属などの酵母であることがわかった。

同様に、ブドウ果実やサクランボなどに棲息する野生酵母を分離して、高発酵性を示す菌株の解析を行ったところ、これらの分離源からは *Saccharomyces cerevisiae* が優先的に分離されることがわかった。糖分が多く含まれる果実には発酵性の高い *S. cerevisiae* が優先的に増殖していると示唆された。花や果実に棲息する酵母は昆虫が持ち込んだものであると考えられるので、これらの分離源に立ち寄る昆虫についても考察する必要がある。

これらの基礎的実験データを踏まえて、私たちは、地域特性の高い酵母を用いたユニークな発酵食品（パンやワインなど）の開発を進めている。これらについても具体的に触れたい。

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

松崎浩明、宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之

第 67 回日本生物工学会大会（鹿児島）、講演要旨集、p. 93（2015-10）

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐことを目指している。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの部位特異的組換えを利用してセントロメアDNAを切り出すことで細胞死を誘導することを検討している。セントロメアDNAの切り出しは、第IV番染色体のセントロメアDNAの両側に組換え標的部（RS）を同じ方向に挿入し、ガラクトースによりレコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第IV番染色体1本から切り出すことで、また二倍体では第IV番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができる。生存率をさらに低下させるために生存細胞が出現する原因を解析した。一倍体の生存細胞（51クローン）のセントロメアDNA近傍のPCR解析やRS領域のシーケンス解析から、生存細胞が出現した主な原因は、染色体からRSが1個欠失し、切り出しが起らなかったためと示唆された。RSとして使用したDNAの両端にTCGA配列があり、RSの欠失は、それら2個のTCGA配列を介して起こっている可能性が考えられた。そこで、片方の配列をTA配列に置換した結果、生存率をさらに低下させることができた。この時、RSの欠失はある程度抑制されていた。また、生存細胞の中には、セントロメアDNAが切り出された細胞が低い割合で出現しており、生存原因について検討している。

(19) トリアシルグリセロールを分泌する酵母変異株の解析

秦野琢之、小原裕史、藤井洋紀、松崎浩明

第 67 回日本生物工学会大会（鹿児島）、講演要旨集、p. 284（2015-10）

【目的】油脂生産微生物のほとんどは、産物油脂を細胞内に蓄積する。我々は、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物の育種、すなわち産物油脂を細胞外に排出させることで、生産能の強化と抽出コストの軽減を目指している。今回は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の triacylglycerol (TG) 分泌変異株について報告する。

【方法・結果】*S. cerevisiae*のSTG1変異株は、TGを菌体外に漏出する。STG1株のTG分泌 (Halo⁺) 形質は1 遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection (YKO、約4800株) よりTG分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1株との相補試験並びに菌体外TGの検出を行った。その結果、候補遺伝子は3つに絞られた。親株 (YP1) の候補遺伝子をそれぞれ破壊したところ、菌体外にTGが検出されるようになった。候補遺伝子の塩基配列を親株のそれとそれぞれ比較した結果、いずれの候補遺伝子もORFの上流数百塩基から下流数百塩基までに変異点は存在しなかった。STG1株の微小管や核を観察すると *spc72*破壊株と同様の形質を有していた。そこで *spc72*遺伝子のRT-PCRを行い発現の有無や強弱を確認したが、どちらの株でも発現しており、有意差は認められなかった。一方これまでの知見をもとに、全ゲノム配列が同定されている *Kluyveromyces lactis* と *Yarrowia lipolytica* を材料に用いて、*S. cerevisiae* のTG分泌の表現型を示す遺伝子とのオルソログ遺伝子を破壊することで、TG分泌型酵母を取得することを検討している。

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

松崎浩明、宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之

第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)、
要旨 on line (2015-12)

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。我々は、条件致死性質や不稔性質の付与によって遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐことを目指している。それらの性質の付与には、部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア DNA を切り出し、細胞死を誘導する方法が考えられる。そこで、酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として pSR1 プラスミドの R-RS 部位特異的組換えを利用してセントロメア DNA を切り出すことで細胞死を誘導することを検討している。セントロメア DNA の切り出しは、第 IV 番染色体のセントロメア DNA の両側に組換え標的部 (RS) を同じ方向に挿入し、ガラクトースにより R レコンビナーゼの発現を誘導して行う。一倍体では第 IV 番染色体 1 本から切り出すことで、また二倍体では第 IV 番相同染色体の両方から切り出すことで、生存率が大きく低下し、細胞死を誘導することができる (一倍体の生存率: 1.4×10^{-5})。生存率をさらに低下させるために生存細胞が出現する原因を解析した。一倍体の生存細胞 (51 クローン) のセントロメア DNA 近傍の PCR 解析

やRS領域のシーケンス解析から、生存細胞が出現した主な原因は、染色体からRSが1個欠失し、切り出しが起らなかったためと示唆された。RSとして使用したDNAの両端にTCGA配列があり、RSの欠失は、それら2個のTCGA配列を介して起こっている可能性が考えられた。そこで、片方の配列をTA配列に置換した結果、生存率をさらに低下させることができた(生存率: 2.3×10^{-6})。この時、RSの欠失はある程度抑制されていた。また、生存細胞の中には、セントロメアDNAが切り出された細胞が低い割合で出現しており、出現原因について検討している。

(21) 枯草菌孢子形成のトリガー遺伝子である *kinB* の転写制御

藤田泰太郎、仁井里美、広岡和文

第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(神戸)、

要旨 on line (2015-12)

枯草菌の孢子形成のトリガー遺伝子(*kinB*)の転写は転写開始部位のアデニン塩基が関与する正の緊縮転写制御の下にあることを報告した(1)。*kinB* 遺伝子のプロモーター領域(-95/+10、+1は転写開始点)をレポーター遺伝子(*lacZ*)と融合させ、上流からの*kinB*プロモーターの欠失解析を行ったところ-65までの欠失はLacZ合成を上げなかったが、それ以上の-55までの欠失はLacZ合成を上昇させた。したがって、この部分(-65/-55)にある種の転写のレプレッサーが結合すると考えられた。このレプレッサーを探索したところ、孢子形成の開始に関与すると思われるCodYやAbrBではなく、バイオフィーム形成のマスターレプレッサーであるSinRであった。したがって、KinBの転写制御には、正の緊縮転写制御とSinRが関与していることが明らかになり、孢子形成のトリガーたる*kinB*発現制御が正の緊縮転写制御とSinRによる転写制御で定常期の代謝産物が関与する孢子形成の代謝制御を十分に説明できるか否か検討している。

1. Tojo et al. J. Bacteriol. 195:1656-1665 (2013)

(22) 毛根由来正常細胞の培養 ～現代版ノアの箱舟を目指して～

山口泰典、古志直之、田下智亜紀

第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(神戸)、Late-Breaking Abstracts、3LBA082 (2015-12)

「種の保全に努力しても絶滅が危惧される動物種を、絶滅後に復活させるには、今何ができるか」と考えたとき、「動物から正常体細胞を採取→液体窒素中で凍結保存→タイムカプセル状態→将来その動物が絶滅した場合、凍結細胞を解凍、培養→未来の進歩した技術で正常体細胞を万能細胞化→精子と卵子に分化誘導→

体外受精で得た受精卵を近縁種の子宮に移植して仔を得る]という戦略は、先端的技術の進歩を外挿すれば、空想ではなく十分に現実的である。その場合、1つの動物種についてできるだけ多数の個体から多様な遺伝的背景を持つ生細胞を凍結保存しておくことが重要である。このようなバイオリソースとしての培養正常細胞を超低侵襲的に得る方法として、抜去した毛根部分に着目し、ヒト、マウス、ハムスター、アカネズミをモデル動物として、まゆ毛とひげ毛根部に由来する細胞を簡易に培養する方法を開発した。毛根からは、繊維芽細胞以外にも、種々の形態の培養細胞が得られ、凍結保存が可能であった。

(23) Island biology of mice: molecular evolution of the taste receptor gene and diet analyses by DNA barcoding

Jun J. Sato

JSPS Core-To-Core Program. The 5th International Symposium on Asian Vertebrate Species Diversity (Thailand), Abstracts, p. 76 (2015-12)

Island populations of vertebrates are generally vulnerable and more prone to extinction because of various biotic and/or abiotic factors. Understanding how small island populations are adapted to the prevalent habitat and environment would provide crucial insights into suitable conservation strategies for endangered species whose population size is usually small. Variations in mitochondrial DNA (Dloop region) sequences were assessed in populations of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*, in the islands isolated in the Seto-Inland Sea in Japan. The result showed a low genetic diversity in all the examined island populations, suggesting a reduction in each population size. The genetic diversity of the umami and bitter taste receptor genes were evaluated as markers of potential adaptation on each island. Compared with the mitochondrial Dloop region, the taste receptor genes showed island-specific trends in their genetic diversity. Preliminary diet analyses using the mitochondrial *COI* and chloroplast *rbcL* genes as DNA barcoding markers showed that *A. speciosus* captured from February to May (spring) in the Seto-Inland Sea islands largely fed on insects (e.g., moths) and acorn-producing plants (e.g., *Quercus* species), suggesting that *A. speciosus* feeds on insect larvae emerging in spring and acorns hoarded during winter. Together with the taste receptor gene variations, the feeding ecological adaptation and its driving forces will be discussed. For comparison, the genetic diversity of the umami taste receptor gene in the house mouse, *Mus musculus*, populations from Hokkaido in Japan and continental Southeast Asia were evaluated and are reported as a possible candidate evidence of the

adaptation.

- (24) 枯草菌のラムノース異化に関わるオペロンの発現誘導物質の同定
小土井祐介、藤田泰太郎、広岡和丈
日本農芸化学会中四国支部第 42 回講演会（鳥取）、講演要旨集、p. 31（2015-6）
- (25) 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
上田賢一、秦野琢之、松崎浩明
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 19（2015-11）
- (26) 油脂 (triacylglycerol) を分泌する酵母変異株の解析
小原裕史、松崎浩明、秦野琢之
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 20（2015-11）
- (27) 海産酵母のアオサに対する作用 —アオサからのバイオエタノール生産は可能か—
垣見泰介、松崎浩明、秦野琢之
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 21（2015-11）
- (28) 線虫の化学物質受容体の出芽酵母での発現の試み
佐藤慶宗、秦野琢之、松崎浩明
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 22（2015-11）
- (29) 糸状菌 *Penicillium decumbens* を用いた燃料アルカンの生産
高田浩輔、松崎浩明、秦野琢之
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 23（2015-11）
- (30) 酵母 *Kazachstania naganishii* において生活環を支配する新規遺伝子の解析
小川航平、杉原千紗、久富泰資
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 25（2015-11）
- (31) 産学官で推進する「福山バラの酵母プロジェクト」
亀川裕生、杉原千紗、久富泰資
第 33 回 YEAST WORKSHOP（倉敷）、講演要旨集、p. 26（2015-11）
- (32) 福山産のブドウから分離した野生酵母の解析とワイン醸造への適用

下野成康、杉原千紗、久富泰資

第 33 回 YEAST WORKSHOP (倉敷)、講演要旨集、p. 27 (2015-11)

- (33) 植物発酵エキスから分離した野生酵母の耐酸性と高い胞子形成能について

林 克憲、杉原千紗、久富泰資

第 33 回 YEAST WORKSHOP (倉敷)、講演要旨集、p. 28 (2015-11)

B. 総説

C. 著書

D. その他

- (1) 産官学連携に基づく「福山バラの酵母」によるユニークなパンの開発

久富泰資

第 29 回バイオテクノロジー研究成果発表会 (広島) (2015-1)

- (2) 福山大ワイン 味・香り好評

吉崎隆之

中国新聞、2015 年 1 月 21 日、28 面、記事掲載 (2015-1)

- (3) 動物によって味の感じ方がちがう

佐藤 淳

自然史学会連合 (監修)・子供の科学 (特別編集)『理科好きな子に育つ ふしぎのお話 365 - 見てみよう、さわってみよう 体験型読み聞かせブック』2015 年 2 月 10 日刊行 (誠文堂新光社) 情報提供: p. 307 (2015-2)

- (4) バラ酵母の発見者、田尻の杏の酵母にも

久富泰資

経済リポート、2015 年 3 月 10 日、1512 号、p. 23、記事掲載 (2015-3)

- (5) 「福山バラの酵母」による地域特有のユニークなパンの開発

久富泰資

第1回福山六次産業研究会（福山）（2015-3）

- (6) ハッコウについて学ぼう - バラの酵母でパンづくり
久富泰資
あきたかた子ども理科教室 AKSS（安芸高田）（2015-3）
- (7) バラ酵母パン - 福山特産に（産学官協力、夢も膨らむ）
久富泰資
中国新聞、2015年3月27日、24面、記事掲載（2015-3）
- (8) 環境健康科学の研究拠点の形成
藤田泰太郎
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「環境健康科学の研究拠点の形成」
平成22年度～平成26年度研究成果報告書（2015-3）
- (9) Made in 福山 - パンの出来上々（市制100年、商品化に期待）
久富泰資
朝日新聞、2015年4月8日、23面、記事掲載（2015-4）
- (10) バラ酵母パン - 福山の特産に（地元企業、大学など連携し開発中）
久富泰資
山陽新聞、2015年4月9日、25面、記事掲載（2015-4）
- (11) 来年目途に地産の酵母を発売へ - バラやニューベリーAなど
久富泰資
経済レポート、2015年4月10日、1515号、p.27、記事掲載（2015-4）
- (12) 六次産業化視野に、バラとぶどうの酵母で製パン
久富泰資
ビジネス情報、2015年4月10日、1179号、p.18、記事掲載（2015-4）
- (13) 生物工学科が推進する地域活性化を促す2つのプロジェクト
久富泰資
さんサンメルマガ、2015年5月15日、15号、p.1-2（2015-5）

- (14) 大学発！美味しいバイオ 福山ワインを福山特産品に！「福山大学ワインプロジェクト」
吉崎隆之、山本覚、久富泰資
生物工学会誌、**93**、pp. 366-367 (2015-6)
- (15) 優秀な研究開発で志願者増に - ばら酵母で人気学科に
久富泰資
経済レポート、2015年6月10日、1521号、p. 8-9、記事掲載 (2015-6)
- (16) オンリーワンの生物生産品開発 - 生物工学科、地域特性活かす
久富泰資
中国新聞、2015年6月21日、17面、記事掲載 (2015-6)
- (17) ものづくりで夢に挑む - 産学連携 (地域と大学)
久富泰資
中国新聞、2015年6月24日、24面、記事掲載 (2015-6)
- (18) 福山バラの酵母の発見と地域特有なパンの開発
久富泰資
盈進高等学校 招待講義 (福山) (2015-7)
- (19) 「福山バラの酵母」でおいしいパンをつくる！
久富泰資
第4回市民のための健康フェア(福山市医師会主催) 講義と実習(福山) (2015-7)
- (20) 日本哺乳類学会論文賞 受賞「Sato JJ, Kawakami T, Tasaka Y, Tamenishi M, Yamaguchi Y (2014). A few decades of habitat fragmentation has reduced population genetic diversity: A case study of landscape genetics of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*. Mammal Study 39 (1): 1-10.
佐藤 淳
Vth International Wildlife Management Congress (2015-7)
- (21) 福山バラの酵母による地域特有のユニークなパンの開発
久富泰資
2015年度福山大学研究成果発表会、研究成果発表集 2015年度版、p. 38 (2015-8)

- (22) 福山大学ワインプロジェクト
吉崎隆之
2015 年度福山大学研究成果発表会、研究成果発表集 2015 年度版、p. 37 (2015-8)
- (23) 福山産の酵母を使った 2 つのプロジェクト
久富泰資
リビングふくやま、2015 年 9 月 12 日、1441 号、1・6 面、記事掲載 (2015-9)
- (24) 枯草菌のラムノース異化に関わるオペロンの 2 つの転写因子による制御機構
広岡和丈、小土井祐介、藤田泰太郎
第 26 回大学間交流会 (福山)、プログラム・要旨集、p. 24 (2015-9)
- (25) 瀬戸内に生息する動物の由来と環境適応様式の解明
佐藤 淳、渡辺伸一
福山大学 学内研究助成 成果発表会 (2015-11)
- (26) 福山大学ワインプロジェクト、新カリキュラム始動！
吉崎隆之
福山大学学報、146 号、p. 4 (2015-12)
- (27) Molecular Phylogenetics and Evolution of Carnivoran Mammals
Jun J. Sato
Special Lecture in Department of Zoology, University of Yangon (Yangon, Myanmar) (2015-12)