

日本生物物理学会 第1回 中国四国支部大会 プログラム

平成20年5月10日(土) - 11日(日)

- ・10日 12:00~18:30 発表会・総会・懇親会 高知大学 朝倉キャンパス総合研究棟2F会議室1および生協食堂(高知市曙町2-5-1 <http://www.kochi-u.ac.jp/JA/m/acc.html>)
- ・11日 散策・情報交換会 高知県立牧野植物園(高知市五台山4200-6 <http://www.makino.or.jp/>)

<プログラム>

四国支部長 桐野 豊先生挨拶

12:00~12:10

1. モノアラガイ味覚嫌悪学習における神経伝達物質セロトニンを含む分子調節機構
○定本久世、伊藤悦朗(徳島文理大学香川薬学部)

12:10~12:20

2. ミツバチ MAPK プロモーター領域におけるメチル化レベルの季節変動
畠山 大(徳島文理大学 香川薬学部 機能生物学講座)

12:20~12:30

3. 非対称不飽和リン脂質二分子膜の圧力誘起相転移
○多田佳織¹、西本真琴¹、玉井伸岳²、松木 均²
(¹徳島大学大学院先端技術科学教育部, ²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部)

12:30~12:40

4. ジアシルホスファチジルコリン二分子膜の相挙動に及ぼすコレステロールの影響
○玉井伸岳、後藤優樹、松木 均
(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部)

12:40~12:50

5. カチオン性ポリペプチドと結合したタンパク質分子やナノパーティクルの脂質二分子膜透過
○植野 哲、嶋林三郎(徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系))

12:50~13:00

6. 生物種における HO の多様性について
○合屋 知彦、右田 たい子(山口大 農学部 生物機能)

13:00~13:10

7. タンパク質結合能の変化とウイルス適応進化の予測
○渡部輝明¹、岸野洋久²
(¹高知大学教育研究部医療学系、²東京大学農学生命科学研究科)

13:10~13:20

8. ケヤリ・アルギニンキナーゼにおける D-/L-アルギニンの結合部位の解明
○宇田幸司、鈴木知彦(高知大・理)

13:20~13:30

9. 2ドメイン型アルギニンキナーゼの機能解析
○多田 博、鈴木知彦(高知大学 大学院・理学研究科・生化学)

13:30~13:40

10. オウムガイ・アルギニンキナーゼにおいて Y89 と K328 が形成する水素結合の役割
○松本 保、宇田幸司、鈴木知彦(高知大・理)

—休憩—

13 : 50~14 : 00

11. 牛血清アルブミンに対するリガンド相互作用の比較研究

○西本真琴¹、多田佳織¹、玉井伸岳²、松木 均²

(¹徳島大学大学院先端技術科学教育部, ²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部)

14 : 00~14 : 10

12. 変異型ピリドキサミン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼの性質および立体構造解析

○吉金 優¹、横地奈菜¹、山崎正幸²、水谷公彦²、大西浩平³、三上文三²、林 秀行⁴、八木年晴¹

(¹高知大・農・農学, ²京大院・農・農学, ³高知大・総合研究セ, ⁴大阪医大・生化学)

14 : 10~14 : 20

13. タンパク質と麻酔薬の相互作用に関する研究

○秦 隆志, 窪内希恵, 則 光, 宮崎恵里香, 長山和史, 岡林南洋 (高知工業高等専門学校 物質工学科), 正鍔夕哉 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 佐竹 弘 (徳島大学 産学官プラザ), 西本真琴, 松木 均, 金品昌志 (徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部)

14 : 20~14 : 30

14. *Aeromonas sobria* セリンプロテアーゼ(ASP)の結晶構造解析

○津下英明, 宇都宮敬子 (徳島文理大学・健康科学研究所), 小林秀丈 (広島国際大学), 岡本敬の介 (岡山大学)

14 : 30~14 : 40

15. 新規 NMR 技術を用いた蛋白質のドメイン相対配向解析 I

- 分子回転異方性が強い蛋白質を例として

○上脇準一¹、楯 真一^{1,2} (¹広島大学・理・数理分子, ²PRESTO/JST)

14 : 40~14 : 50

16. 新規 NMR 技術を用いた蛋白質のドメイン相対配向解析 II

- 高分子量蛋白質への応用例

○岸本浩一¹、楯 真一^{1,2} (¹広島大学・理・数理分子, ²PRESTO/JST)

14 : 50~15 : 00

17. 大腸菌 yodA タンパク質の低分子化合物結合特性の検討

青木 拓¹、前村知美²、半野由依子²、柴垣明佳¹、○佐藤高則^{1,2}

(徳島大院・人間・自然環境¹、徳島大・総科²)

15 : 00~15 : 10

18. レチナールタンパク質で大腸菌に眼を作る

○奈良敏文¹、加茂直樹² (¹松大・薬・生物物理化学, ²北大院・薬・生物物理化学)

15 : 10~15 : 20

19. インフルエンザウイルスの感染行動

○堺 立也 (川崎医大・微生物)

15 : 20~15 : 30

20. バクテリアべん毛の3つのファミリー

○相沢慎一、藤井美加子、柴田敏史 (県立広島大学)

—休憩—

15 : 40~15 : 50

21. 高粘度条件下における根粒菌種 *Bradyrhizobium japonicum* の運動様式

○門馬和也、神戸正臣、相沢慎一 (県立広島大学)

15 : 50~16 : 00

22. 新規カドミウム耐性菌に関する研究

○溝渕翔子, 細川雄太 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 小林洋和, 鈴江裕二, 秦 隆志, 戸部 廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科)

16 : 00~16 : 10

23. 微生物に与えるマイクロバブルの影響

○細川雄太, 田村仁人 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 秦 隆志, 長山和史, 岡林南洋, 戸部 廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科), 武内秀樹 (高知工業高等専門学校 機械工学科)

16 : 10~16 : 20

24. バクテリオファージを指標とする新たな水環境評価

○田村仁人, 溝渕翔子, 細川雄太 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 澤 秀和, 谷脇さやか, 秦 隆志, 岡林南洋, 戸部 廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科), 藤田正憲 (高知工業高等専門学校)

16 : 20~16 : 30

25. 呼吸基質非存在下でミトコンドリアに誘起される透過性遷移の解析

○山本武範¹⁾、吉村勇哉^{1,2)}、山崎尚志²⁾、山下菊治³⁾、片岡正俊⁴⁾、寺田 弘⁵⁾、篠原康雄^{1,2)}

¹⁾ 徳島大疾患ゲノム、²⁾ 徳島大薬、³⁾ 徳島大歯、⁴⁾ 産総研、⁵⁾ 東京理大薬

16 : 30~16 : 40

26. ナメクジのにおい情報処理における GABA 神経伝達についての解析

○小林 卓, 松尾亮太, 伊藤悦朗 (徳島文理大学・香川薬学部・機能生物学講座)

16 : 40~16 : 50

27. 生物物理学と私--べん毛形成から筋肉遺伝子発現

香川弘昭 (岡山大学・理学部)

16 : 50~17 : 00

28. ヒスタミン H₁ 受容体発現ニューロンを脳部位特異的に破壊する遺伝子改変マウスの作製

○堀尾 修平¹⁾、三宝 誠²⁾、平林 敬浩³⁾、八木 健³⁾、小林 和人⁴⁾、福井 裕行¹⁾

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部¹⁾、生理学研究所行動・代謝分子解析センター²⁾、大阪大学大学院生命機能研究科³⁾、福島県立医科大学⁴⁾)

17 : 00~17 : 10

29. 野生型マウスの加齢による聴性脳幹反応の変化

○北村美一郎, 桐野 豊 (徳島文理大・香川薬・生物物理)

17 : 10~17 : 20

30. 運動記憶形成における小脳顆粒細胞シナプス機能の解明

○岸本泰司^{1,2)}、和田教男³⁾、桐野 豊¹⁾、狩野方伸²⁾、中西重忠³⁾

(¹⁾ 徳島文理大・香川薬・生物物理、²⁾ 阪大・医・細胞神経科学、³⁾ 大阪バイオサイエンス研)

—休憩—

17 : 30~18 : 10

・基調講演「細胞力覚の分子細胞生物物理学：膜、チャネル、細胞骨格の関係」

曾我部正博 (日本生物物理学会会長, 名古屋大学大学院・医学研究科・細胞生物物理)

18 : 10~18 : 30

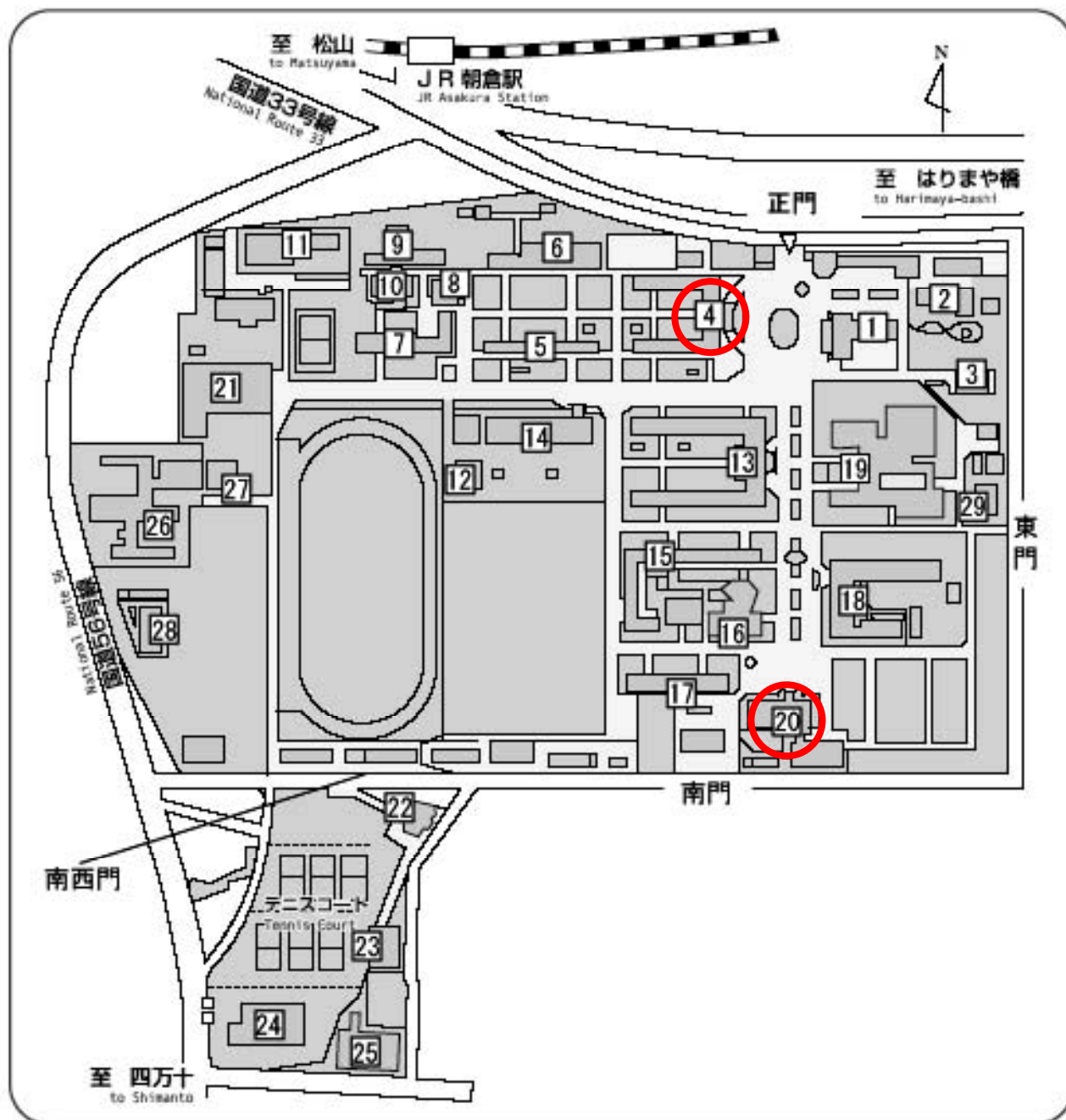
・総会

18 : 30~

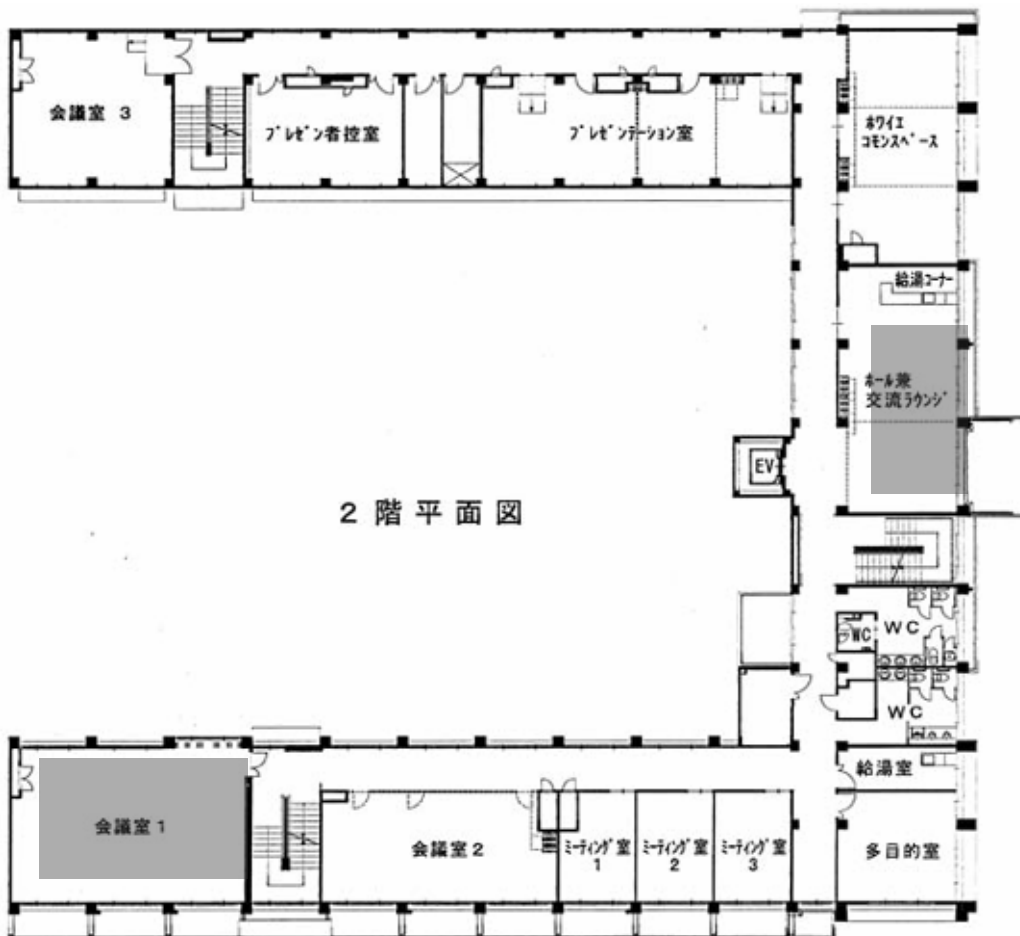
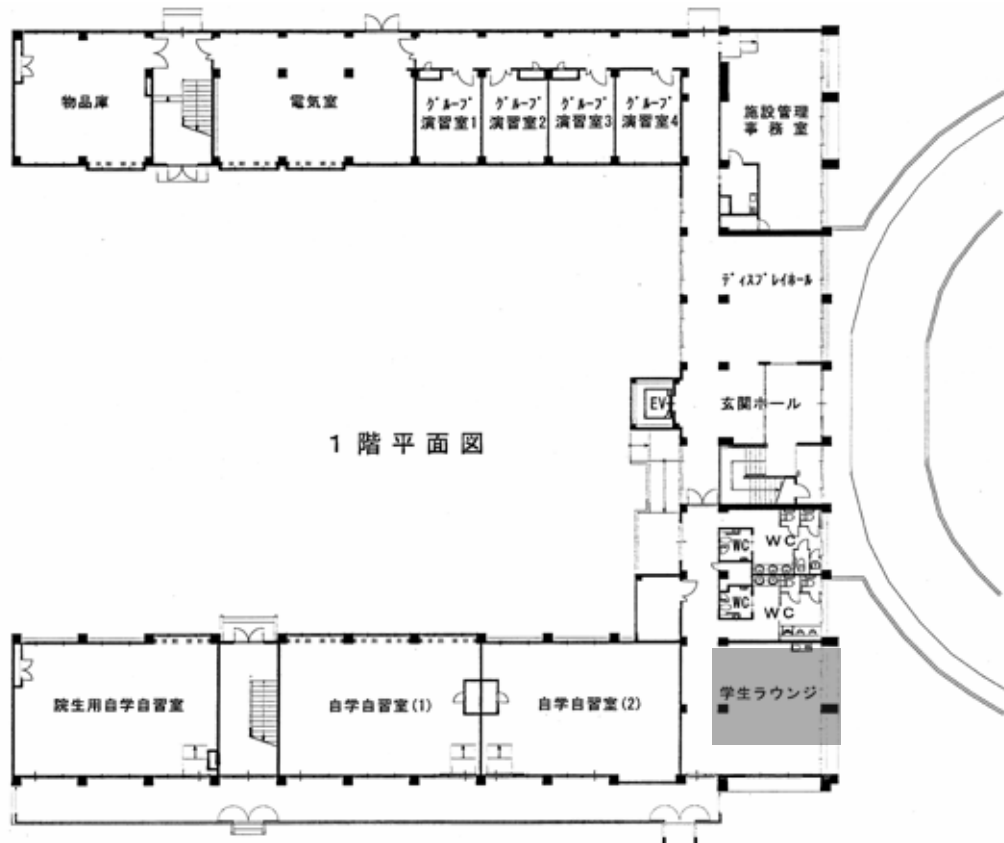
・懇親会

- ・会場は高知大学朝倉キャンパス総合研究棟2F会議室1です。
- ・総合研究棟は正門から入りすぐの建物（図の4番）です。1階入り口付近で受付をいたします。
- ・車でお越しの方は、正門前の守衛所で「生物物理学会支部大会」の参加者であることを告げ臨時の入構証を受け取り、指示に従いキャンパス内の駐車スペースに駐車して下さい。
- ・休憩スペースとしてホール兼交流ラウンジをご利用ください。1階の学生ラウンジに自動販売機があります。
- ・学会参加費は無料です。
- ・懇親会は生協（図の20番）で18:30からの予定です。会費は教職員3,000円、ポスドク院生1,000円、学部生は無料です。
- ・発表時間は10分、質問時間は基本的になしとし、休憩中または後日メール等でやりとりして下さい。
- ・発表にはWindows 2台、macを1台用意しますので、USBメモリにデータを入れてご持参下さい。ただし、PowerPoint 2007は不可とします。動画貼付等でファイルが重い場合は、ご自分のパソコンをお持ち下さい。

高知大学朝倉キャンパス・地図



総合研究棟・見取り図



牧野植物園・地図



注：牧野植物園のある五台山は、←印の方向に一方通行です。

<発表要旨>

モノアラガイ味覚嫌悪学習における神経伝達物質セロトニンを含む分子調節機構

○定本久世、伊藤悦朗（徳島文理大学香川薬学部）

軟体動物モノアラガイにおいては、古典的条件付けをはじめとする高度な学習行動が成立し、神経回路の研究も進んでいる。このため、動物行動の神経メカニズムを解析するのに有用な実験動物である。本研究では、味覚嫌悪学習を例にとり、行動レベルの変化を引き起こす神経機構について、細胞レベル、分子レベルを通じた解析を行っている。

モノアラガイの味覚嫌悪学習では長期記憶が成立し、特定セロトニン分泌細胞が重要な働きをする。また、同細胞からのセロトニン放出量変化に転写調節因子 CREB が関与することがわかっている。本研究では1) セロトニントランスポーター (SERT) 遺伝子のプロモーター領域における CRE 配列の存在、2) PKA 経路を介した SERT プロモーター領域の遺伝子発現誘導、3) 味覚嫌悪学習後の SERT mRNA 量増加を確かめた。これらの結果から、味覚嫌悪学習に関与して、PKA - CREB 経路を介したセロトニン放出量調節機構が働く可能性が示唆された。

ミツバチ MAPK プロモーター領域におけるメチル化レベルの季節変動

畠山 大（徳島文理大学 香川薬学部 機能生物学講座）

ミツバチは日齢や季節によって巣の内外での役割が変化するなどの社会性行動や、花の位置を記憶して 8 の字ダンスを用いて巣の仲間に伝えるという高次行動を示す。最近の研究により、新規の遺伝子発現がこれらの行動変容を制御すると考えられている。しかし、一般にゲノム DNA 中におけるシトシンのメチル化といったエピジェネティックな DNA 修飾により、新規遺伝子の転写活性は恒常的に抑制されている。そこで本研究では、記憶に関連すると予想され、プロモーター領域に CRE 配列を持つ MAPK に着目し、プロモーター領域におけるシトシンのメチル化レベルの季節変動を解析した。これまでの研究により、ミツバチ・ゲノム内におけるメチル化シトシンは転写部位にのみ存在し、プロモーター領域にはなく、同時に CpG 以外の配列でのメチル化も非常に稀であるとの報告がなされた。そして、夏季のミツバチでは花の位置を記憶するために盛んに遺伝子発現が行われており、プロモーター領域でのシトシンのメチル化レベルは低いと予想された。しかし、実験の結果、MAPK プロモーター領域において 4 個のシトシンが 70%以上の確率でメチル化を受けていた。また、その配列は CpA と CpC であり、これまでの報告を覆す結果が得られた。次に、MAPK プロモーター領域の、冬季のミツバチにおけるメチル化レベルを解析した。その結果、冬季のミツバチではどのシトシンもメチル化されていなかった。以上より、記憶に関与すると考えられる MAPK のプロモーター領域が、記憶が頻繁に行われる夏季のミツバチにおいて高度にメチル化されていることが明らかになり、ミツバチは哺乳類と異なり、シトシンのメチル化が逆に転写活性を促進させる可能性が示唆された。

非対称不飽和リン脂質二分子膜の圧力誘起相転移

○多田佳織¹、西本真琴¹、玉井伸岳²、松木 均²

(¹徳島大学大学院先端技術科学教育部、²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部)

深海生物の生体膜中には、sn-2 位にのみ二重結合を含む不飽和アシル鎖が導入された非対称不飽和リン脂質が比較的多く存在することが知られている。一般にアシル鎖へ二重結合が導入されると、リン脂質二分子膜の相転移温度が全体的に著しく低下するため、膜の流動性が増すと理解されている。しかし、不飽和リン脂質二分子膜の低温における相挙動、特にサブゲル(L_β)相に関する相挙動については未だ不明な点が多く、sn-1 位と sn-2 位のどちらに不飽和脂肪酸を有するかによって生じる物性等の違いについては未だ明らかにされていない。そこで本研究では、sn-2 位に不飽和脂肪酸を含む 1-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジルコリン(SOPC)、sn-1 位に不飽和脂肪酸を含む 1-オレオイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン(OSPC)を用い、アシル鎖の非対称性およびアシル鎖への二重結合の導入が二分子膜相挙動に及ぼす影響について検討した。

ジアシルホスファチジルコリン二分子膜の相挙動に及ぼすコレステロールの影響

○玉井伸岳、後藤優樹、松木 均
(徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部)

コレステロールは生体膜中に比較的多く存在し、様々な生体膜の機能発現に不可欠な膜構成成分である。Simons と Ikonen の提唱した細胞膜モデルにおいても、ラフトと呼ばれるドメイン構造形成にコレステロールの存在が密接に関連している。これまでに、代表的なリン脂質を用いた数多くのモデル膜研究により、コレステロールの存在がリン脂質二分子膜物性を大きく変化させ、温度・圧力変化に伴う構造変化(相転移)を複雑にし、さらには相転移そのものを不明瞭にすることが明らかにされている。そのため、多くの研究者がリン脂質-コレステロール混合二分子膜の相図の作成に挑戦してきたが、未だにコレステロール効果を包括的に説明可能な相図の完成には至っていない。我々は、これまでに Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene) をプローブとして用いた蛍光スペクトル観測ならびに示差走査熱量 (DSC) 測定により、いくつかのリン脂質とコレステロールとの二成分混合二分子膜について相図の作成を行ってきた。本発表では、作成された相図を示し、六方充填モデルを用いた相図の解釈について報告する。

カチオン性ポリペプチドと結合したタンパク質分子やナノパーティクルの脂質二分子膜透過

○植野 哲、嶋林三郎 (徳島大 院ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系))

[目的] 生物由来のある種の正荷電を持つペプチドは、膜透過性ペプチド (MTP) と称され細胞外より、遺伝子、タンパク等を細胞内に輸送する能力を有している。我々は、MTP 類似のカチオン性ポリペプチドがリポソーム膜を透過しリポソーム外水層から内水層へ移行することを見だし報告してきた。今回我々は、カチオン性ポリペプチド (poly(Arg)) と結合したタンパク質分子 (BSA) やナノパーティクル (ヒドロキシアパタイトナノ粒子 Hap) 複合体の巨大リポソーム (GV) 膜透過現象を共焦点レーザー顕微鏡等を利用し観察を行ったのでこれを報告する。

[実験] 蛍光ラベル化した BSA 若しくは Hap 粒子と poly(Arg) の複合体は、BSA 溶液または Hap 懸濁液に poly(Arg) 溶液を混合することで静電的に結合させ複合体を形成させた。測定に用いた負電荷型巨大リポソーム (10 ~ 20 μ m diameter) は、大豆レシチン (SBPL) を用いて調整した。

[結果と考察] SBPL リポソームに複合体溶液 (懸濁液) を作用させると、初めにリポソームの輪郭が光り始め、時間の経過とともに、リポソーム内部が光る過程が観測された。この結果は、BSA 並びに Hap 複合体のリポソーム膜透過過程を可視化したものといえる。また、BSA - poly(Arg) 複合体の場合リポソーム内水層における BSA, poly(Arg) の分布が異なっていることから、脂質膜透過後複合体の崩壊が起こっていることが明らかとなった。

生物種における HO の多様性について

○合屋 知彦、右田 たい子 (山口大 農学部 生物機能)

ヘムオキシゲナーゼ(HO)は酸素運搬体として多量のヘムを利用する哺乳動物において最初に発見された八本の α -ヘリックスから成る酵素である。HOはヘムを近位ヘリックス(A)と遠位ヘリックス(F)の間に挿入し、基質および補欠分子族として用いて、立体特異的に酸素化分解し、2つの中間体(α -ヒドロキシヘム、ベルドヘム)を経てビリベルディンIX α (BV)、遊離の鉄イオン、COへ分解する。また、HO遺伝子は哺乳動物を含むほとんどすべての生物種に保存されている。HOの役割は生物種によって様々であり、動物では主に鉄のリサイクルと不要になったヘムの分解である。一方、藻類を含む植物ではBVから光受容色素を合成している。生理的条件下において、動物では電子供与体としてNADPH/CPRを、植物ではNADPH/FNR/Fdを使用している。しかし、動植物では細胞内に豊富に存在するアスコルビン酸(Asc)を電子供与体としてHO反応に使用することもできる。

本研究では、バクテリア発現系を用いて作製したラット(rHO1)、シアノバクテリア(Syn HO1)、ダイズ(Gm HO1)、フグ(Pf HO)由来のHOの分子特性とAscを用いたヘム分解反応の比較を行った。動植物のHOのferric, Oxy, CO-heme複合体の分光学的特徴は類似していた。しかし、ヘムポケットの遠位側でヘム鉄に配位し、タンパク残基と相互作用する水分子のpK $_a$ はSyn HO1, Pf HO, Gm H1, rHO1 の順に高く、相互作用の強さは異なっていた。

Asc を電子供与体としたヘム分解反応では、ヘム分解の初速度は植物 HO(Syn HO1, Gm HO1)よりも動物 HO(rHO1, Pf HO)の方が速く、その結果、動物 HO では Oxy-heme の吸収も確認できた。それに対して、植物 HO ではヘム鉄の還元が遅く、Syn HO1 においては CO-ベルドヘムとベルドヘムの吸収が確認される。ところ

が、Gm HO1 では CO-ベルドヘムの吸収帯は確認できず、どの HO よりも CO とヘム鉄の親和性が低いことがわかった。最終生産物である遊離の BV の生成量は Pf HO において最も多かった。したがって、各生物種の HO 反応過程はそれぞれの用途に応じた調節が行われていると示唆される。

タンパク質結合能の変化とウイルス適応進化の予測

○渡部輝明¹、岸野洋久²

(¹高知大学教育研究部医療学系、²東京大学農学生命科学研究科)

近年多発している新興感染症の病因となる RNA ウイルスはヒト以外の動物を自然宿主としており、ウイルスの変異やヒトの活動などが原因となりヒトに偶然感染したことでヒトの病原体となったのである。ヒトの細胞受容体への結合を可能としヒトへ適応したウイルスは細胞受容体への結合能を維持しつつ生体防御機構からの攻撃をかわしていかなければならない。このような感染現象におけるウイルス側とヒト側の分子間での複雑な相互作用にウイルスの宿主への適応度を定義し、ウイルス変異の予測を行うことが目的である。タンパク質構造予測の手法と数理生物学的な手法を用いて、正常細胞、感染細胞、ウイルス、免疫グロブリンの4者からなる宿主生体内でのウイルスライフサイクルを適切に表現した動態方程式を解き、抗原性の変異したウイルスが既存ウイルスと置き換わるための条件を探る。方法の概要は以下の通りである。約4万構造が登録されているタンパク質構造データベースからの代表的な立体構造(約2000構造)を用いて局所環境におけるアミノ酸選好度とアミノ酸間相互作用を経験ポテンシャルの形で表現して、アミノ酸配列とタンパク質構造の適合度を測る。免疫グロブリンとウイルス膜タンパク質の複合体における結合能の評価を行うには結合状態と非結合状態における適合度を対比させればよいことが示される。この方法をヒトにおける受容体がタンパク質(ACE2)である SARS コロナウイルス (CoV) に対して適用し、ウイルス膜タンパク質のアミノ酸配列変異の蓄積に伴い適応度ランドスケープ上をどの様に移動するのかを明らかにする。抗体の結合部位の特質によりウイルスの適応進化速度に違いが出る事が判明した。

ケヤリ・アルギニンキナーゼにおける D-/L-アルギニンの結合部位の解明

○宇田幸司、鈴木知彦(高知大・理)

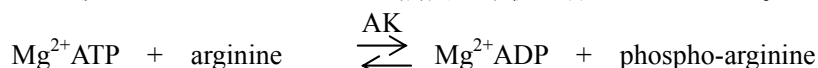
環形動物類のケヤリの生体内には高濃度で遊離 D-アルギニンが存在し、また、D-及び L-アルギニンを共に基質として利用することのできる特異なアルギニンキナーゼが存在している。また、このケヤリ・アルギニンキナーゼの基質結合部位の予測から、64, 89, 320 位のアミノ酸残基の基質認識と酵素触媒反応への関与が示唆された。そこで、これらのアミノ酸残基におけるアミノ酸置換変異体を作成し、その酵素活性の比較を行ってみることにした。その結果、L64, Y89, N320 へのアミノ酸置換変異体は酵素活性を大きく増減させ、これらのアミノ酸が酵素触媒反応に関与することが明らかとなった。特に、320 位のアミノ酸残基は、D-及び L-アルギニンの認識に関与することも予想された。

さらに、これら以外のアミノ酸残基の酵素機能への影響を探るため、80 種類を超えるアミノ酸置換変異体を作成し、それらの詳細な酵素活性について現在検討中である。

2ドメイン型アルギニンキナーゼの機能解析

○多田 博、鈴木知彦(高知大学 大学院・理学研究科・生化学)

エネルギー代謝に関わる酵素の一つであるフォスファージェンキナーゼ(phosphagen kinase: PK)のうち進化的に最も早い時期に存在していたのはアルギニンキナーゼ(arginine kinase: AK)であり、その役割は次のような可逆的な反応により細胞内の ATP 濃度を平衡に保つことにある。



AKは無脊椎動物において広く分布している。なかでもイソギンチャク(刺胞動物)や二枚貝(軟体動物)のAKの一部は、そのアミノ酸配列から、異常な2ドメイン型構造を取ることがわかっている。これら2ドメイン型AKの内、ヨロイソギンチャク(*Anthopleura japonicus*) AK (Anth.AK) に関して、2ドメイン(2D)、これを切り離れたドメイン1(D1)、ドメイン2(D2)のリコンビナント酵素(His-tag付加)を作成し、その活性を測定した。2Dの反応速度パラメーターで K_m^{app} 、 k_{cat} は 0.28 mM、 335 s^{-1} と極めて高い活性を示し、またD1およびD2はそれぞれ 0.35 mM、 155 s^{-1} と 0.41 mM、 239 s^{-1} となった。2Dの k_{cat} がD1やD2より高いことが注目される。

また、このAnth.AK 2D, D1, D2 の活性化エネルギー(E_a)を得るため 25°C, 22.5°C, 20°C, 17.5°Cにおける k_{cat} を求めArrhenius plotsから E_a を算出した。そして遷移状態理論に基づき ΔH^{0*} , ΔG^{0*} , ΔS^{0*} を計算した。その結果 2D, D1, D2 の E_a はそれぞれ 42.4 kJ/mole, 33.2 kJ/mole, 34.8 kJ/moleとなり、 ΔG^{0*} は 58.6 kJ/mole, 60.5 kJ/mole, 59.4 kJ/moleとなった。2DはD1, D2 に対して E_a が高く、 ΔG^{0*} が低い値となった。

AKがATPやアルギニンの基質と結合する時に重要な役割を担うアミノ酸の一つとしてカプトガニAKの立体構造の解析からAsp62 が同定されているが、Anth.AKにおいてもこのアミノ酸が保存されている。Asp62 の機能を探るため部位特異的変異導入法により変異型リコンビナント酵素を作成し、それを発現精製し、活性測定を行った。2DのD1 側D62A変異型では野生型に比べて触媒効率 k_{cat}/K_m^{app} はおおよそ半分程度に減少し、単体のD1/D62Aでも同程度減少した。またD1/D62Gでは 1/4 程度減少した。

オウムガイ・アルギニンキナーゼにおいて Y89 と K328 が形成する水素結合の役割

○松本 保, 宇田幸司, 鈴木知彦 (高知大・理)

アルギニンキナーゼにおいて、89 番目の Tyr は完全に保存されているアミノ酸残基である。カプトガニ・アルギニンキナーゼの X 線結晶構造解析によると、この Tyr は基質結合部位の近傍に位置しており、また、遷移状態でのみ 328 番目の Lys と水素結合を形成している。本研究では、オウムガイ・アルギニンキナーゼに部位特異的突然変異を導入し、水素結合の形成されない Y89F 変異体、及び K328A 変異体を作製することで、Y89 と K328 間の水素結合の重要性を検討した。

オウムガイ・アルギニンキナーゼ Y89F 変異体、K328A 変異体は、野生型酵素と比べ基質親和性は変化せず活性が減少した。このことから、Y89 と K328 の形成する水素結合は、活性に重要な影響をもつと推測される。現在、その水素結合の活性に対する影響を明確にするため、Y89 と K328 にさらなる変異の導入を進めている。

牛血清アルブミンに対するリガンド相互作用の比較研究

○西本真琴¹、多田佳織¹、玉井伸岳²、松木 均²

(¹ 徳島大学大学院先端技術科学教育部, ² 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部)

麻酔薬の作用機序を明確にするためには麻酔薬のような膜作用性リガンドと生体高分子(膜タンパク質や脂質二重膜)に働く特異的な相互作用および非特異的な相互作用を対比し、両相互作用の本質的な相違を示すことが非常に有効である。牛血清アルブミン(BSA)は古くから様々な生物化学的研究に用いられ、麻酔薬の作用機序研究に対しても多くの報告がなされている。我々は BSA をリガンド相互作用系のモデルタンパク質の一つとして選び、リガンド存在下の BSA 水溶液に対して示差走査熱量(DSC)測定および粘度測定を行い、BSA に対するリガンドの相互作用様式を追跡してきた。本発表では、BSA の熱安定性および体積挙動に与える吸入麻酔薬および長鎖脂肪酸の影響を示し、両リガンドの BSA に対する相互作用様式の相違について説明する。

変異型ピリドキサミン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼの性質および立体構造解析

○吉金 優¹、横地奈菜¹、山崎正幸²、水谷公彦²、大西浩平³、三上文三²、林 秀行⁴、八木年晴¹
(¹高知大・農・農学, ²京大院・農・農学, ³高知大・総合研究セ、⁴大阪医大・生化学)

【目的】根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 由来ピリドキサミン (PM) -ピルビン酸アミノトランスフェラーゼは、PM とピルビン酸からピリドキサーール (PL) と L-アラニンへのアミノ基転移反応を触媒する。一般的なアミノトランスフェラーゼは、ピリドキサーール 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とするが、本酵素は PLP を要求せず、PLP の 5'-リン酸基を欠く PL を基質とする。我々は、これまで本酵素の酵素科学的性質や X 線結晶構造について明らかにしてきた。本酵素と PLP 依存性アミノトランスフェラーゼの全体構造や活性中心の構造は類似していた。しかし、本酵素のグルタミン酸 68 の側鎖が、PLP のリン酸基部分と競合するため、本酵素は PLP と結合できず、PL に特異的であることが推察された。そこで本研究では、Glu68 の変異酵素を作製し、その酵素科学的性質および X 線結晶構造について調べた。【方法および結果】Glu68 をアラニンもしくはグリシンに変異させた変異酵素を発現、精製した。Glu68 変異酵素は、吸収スペクトル解析より PLP と結合できることが明らかとなった。さらに、わずかながらピリドキサミン 5'-リン酸-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ活性を示した。これらの結果より、グルタミン酸 68 の側鎖によって、PLP との結合が妨害されて

いることが示唆された。現在、E68G 変異酵素 - PLP 複合体の 1.9 Å 解像度の X 線回折データを収集することに成功し、その構造を解析中である。

タンパク質と麻酔薬の相互作用に関する研究

○秦 隆志, 窪内希恵, 則 光, 宮崎恵里香, 長山和史, 岡林南洋 (高知工業高等専門学校 物質工学科), 正 鑄夕哉 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 佐竹 弘 (徳島大学 産学官プラザ), 西本真琴, 松木 均, 金品昌志 (徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部)

麻酔薬がタンパク質に与える影響に関して、ホタル発光酵素ルシフェラーゼや血清中運搬酵素アルブミン等を用い詳細な研究がおこなわれている。近年、牛血清アルブミン (BSA) に対する結合物質の挙動に関し、アルカン類似体の BSA への結合形式は一律でないこと、結合数の挙動に変曲点が生じることなどが見出されている。本研究では、麻酔薬の BSA への結合様式について麻酔薬選択性電極法を用い調査した。

BSA 溶液での電位応答曲線は、ある麻酔薬濃度以上でネルンストの勾配直線 (検量線) から麻酔薬の高濃度側へ“ズレ”る挙動を示した。この高濃度側への“ズレ”が観測されることは、BSA 溶液のバルク水中の麻酔薬濃度が減少することを意味し、これはつまり、麻酔薬の BSA への結合が生じていることを意味する。また、結合数の挙動は、麻酔薬の低濃度領域においては指数関数的な増加を示すものの、ある麻酔薬濃度に達すると結合数の増加の程度が変化する箇所が現れ、さらにその麻酔薬濃度以上では再び指数関数的な増加を示した。以上のように結合挙動は一律的な指数関数的増加を示さず、これは BSA に対する麻酔薬の結合形式が多段階的であることを示している。

Aeromonas sobria セリンプロテアーゼ(ASP)の結晶構造解析

○津下英明, 宇都宮敬子 (徳島文理大学・健康科学研究所), 小林秀丈 (広島国際大学), 岡本敬の介 (岡山大学)

Aeromonas はグラム陰性、無芽胞の通性嫌気性桿菌であり、淡水中に常在する。*Aeromonas sobria* は近年ヒトの病原菌として認識されるようになり、胃腸炎、敗血症、創傷感染症、髄膜炎、肺炎の感染症の原因菌として分離されている。特に *Aeromonas sobria* による敗血症は高い致死率を持ち、*Aeromonas sobria* のセリンプロテアーゼ(ASP)がその毒素として同定され、キニンの生成、トロンビンの生成に関わっている事がわかってきた。ASP は kexin/furin type のプロトタイプのセリンプロテアーゼであり、セリンプロテアーゼドメインと P ドメインを持つ。我々は ASP の分子構造を明らかにしその創薬の基盤を築くために、結晶構造解析を行った。重原子同型置換法によりその構造を決定し、1.65 Å で R 値 17.8%, R_{free}=24.5% の構造を得た。kexin/furin と比べて大きな違いはセリンプロテアーゼの活性ドメインにかぶさるように P ドメインから突き出した occluding region を持つ。活性部位は P1 ポケットに kexin/furin ではカルシウムが位置しているが、ASP ではそれがない。それにも関わらず低分子基質に対して、その P1, P2 の塩基的アミノ酸を好む基質特異性は変わらない。一方、高分子基質に対しては occluding region は重要な認識に働くと考えられ、この点を利用した特異的阻害剤設計に興味を持たれる。

新規 NMR 技術を用いた蛋白質のドメイン相対配向解析 I

・ 分子回転異方性が強い蛋白質を例として

○上脇準¹, 楯 真^{1,2} (¹広島大学・理・数理分子, ²PRESTO/JST)

我々は、蛋白質が機能を発現する際に生じるドメイン間の再配向など振幅の大きな構造変化と機能の相関に興味を持ち研究を進めている。NOE, ビシナルスピン結合など空間的に近距離の構造情報にもとづく従来の NMR 構造解析技術では、直接ドメイン間の相対配向を決定する事はできない。この NMR 構造解析の限界を克服する技術として、蛋白質を弱く配向させた状態で観測される核スピン双極子間相互作用の空間的異方性を利用してドメイン間相対配向を決定する新たな技術が開発された。しかし、この方法では対象蛋白質の NMR シグナルの T₂緩和速度が速い条件ではスペクトル測定が不可能であり、20 kDa 以上の蛋白質や分子回転異方性が強く出る蛋白質の場合には適用できないという応用上の限界があった。

我々は、この問題を克服するために 100 kDa を超える蛋白質であってもドメイン間相対配向を決定できる新規 NMR 技術 DIORITE 法を開発し、様々な蛋白質のドメイン間相対配向解析への応用を進めている。本発表

では、L字型の分子構造をもつ HMG ドメイン 2つからなる HMGB2 蛋白質の全体構造決定のために DIORITE 法を応用した例を示す。DIORITE 法の原理と実験の詳細を紹介し、双極子間相互作用を用いる従来法との対比で有効性を議論する予定である。

新規 NMR 技術を用いた蛋白質のドメイン相対配向解析 II - 高分子量蛋白質への応用例

○岸本浩一¹, 楯 真一^{1,2} (¹広島大学・理・数理分子, ²PRESTO/JST)

蛋白質は、リガンド結合などによりドメイン再配向をともなう大きな振幅の分子構造変化により機能発現に必要な分子形態へと変化する。従来このような分子形態変化は、リガンド結合の有無による結晶構造の変化として観測された。しかしながら、柔軟な分子形態変化を示す蛋白質は、結晶場によるドメイン配向の変化を受ける可能性があり蛋白質の分子形態変化と機能制御機構の関係を系統的に解析する上で完全なデータを我々に与えてくれない可能性がある。分子形態変化による蛋白質の機能制御機構の正確な解析には、溶液状態での分子形態変化を直接捉える必要がある。

私たちは、NMR を用いて大きな振幅の分子構造変化（分子形態変化）を原子分解能で定量的に解析することを目的として、独自の NMR 構造解析技術である DIORITE 法の開発を進めてきている。DIORITE 法は、従来の NMR 構造解析の分子量限界をはるかに超える 100kDa 程度の蛋白質まで対象として、ドメインの相対配向変化を定量的に観測することを可能とする技術である。

今回の発表では、分子量が 30kDa を超える mRNA キャッピング酵素を対象とした DIORITE 法によるドメイン間配向解析の結果と、その実験法の詳細を報告する。

大腸菌 yodA タンパク質の低分子化合物結合特性の検討

青木 拓¹, 前村知美², 半野由依子², 柴垣明佳¹, ○佐藤高則^{1,2}
(徳島大院・人間・自然環境¹, 徳島大・総科²)

重金属やアミトロール(AT)で発現誘導され、大腸菌ストレス応答タンパク質の一種である yodA は、一次構造比較や X 線結晶構造解析による三次元立体構造などから、C 末端領域に金属結合部位を持つこと、ABC transporter や lipocalin ファミリーと一部相同なアミノ酸配列を持つことが明らかとなっているが、yodA の金属以外の低分子結合能については報告がない。そこで本研究では、大腸菌 yodA タンパク質の種々の物質との結合能を、野生型 yodA および N 末端 22 残基欠損体(Δ N22)を用いて検討した。

yodA の分子内 Tyr または Trp 蛍光を指標として、種々の物質を添加に伴う蛍光強度の減少を測定した。低分子化合物としては、(1)AT および dNTP (2) 脂肪酸および脂質 5 種、(3) 複素式化合物 3 種、(4)芳香族化合物 3 種を検討し、yodA に対しそれぞれ添加し、30°C、10 分間保温後、蛍光スペクトルを測定した。その結果、化合物添加により yodA の最大蛍光強度は濃度依存的に減少し、特に dNTP, Quercetin および 8-ANS で顕著に見られた。また、野生型と Δ N22 において、蛍光減少の濃度依存性に顕著な差異は見られなかった。このことから yodA は極性基を有する芳香族化合物結合能を有し、N 末端領域はこの特性に関与していないことが明らかとなった。

レチナールタンパク質で大腸菌に眼を作る

○奈良敏文¹、加茂直樹² (¹松大・薬・生物物理化学, ²北大院・薬・生物物理化学)

pPR-pHtrII 間のシグナル伝達の分子機構を明らかにする目的で、大腸菌走化性レセプター Tsr(*EcTsr*)との機能的複合体作成を試みた。pPR-pHtrII 間相互作用に重要と考えられる 3カ所のアミノ酸側鎖を *EcTsr* に導入し(A32E、W194S、V206N : ESNと表記)、pPR と共に大腸菌 HCB339 株(*tsr*⁻, *tar*⁻, *tap*⁻, *trg*⁻)に発現した。この組み換え体の 500 nm の光照射に対する応答を解析したが、はっきりした光応答は見られなかった。そこで、さらに 3カ所(A209L、K215G、S217D)の変異導入を検討した。その結果、ESNLG 変異 Tsr が野生型 pPR との共発現で 1 秒の光照射に忌避応答を示すことが分かった。

この結果が、Tsr が走気性レセプター Aer と相互作用の結果示す blue-light taxis である可能性を排除するために、次に、UU1250 株(*aer*⁻, *tsr*⁻, *tar*⁻, *tap*⁻, *trg*⁻)で同様の観察を行った。1/8 秒の 500 nm 光照射に対する泳ぎを観察した結果、野生型 Tsr では見えないが、Tsr(ESN)及び Tsr(ESNLG)変異体が pPR との共発現で忌避応

答を示すことが分かった。大腸菌走化性レセプター Tsrを介して、pPR からの光シグナルを大腸菌内でべん毛まで伝えることが出来たと考えている。

インフルエンザウイルスの感染行動

○堺 立也 (川崎医大・微生物)

インフルエンザウイルスは、宿主の細胞のエンドサイトーシスを利用し細胞内に侵入することで感染を成立させている。ところでウイルス感染の場である呼吸器の上皮組織は繊毛でおおわれており、気管に吸い込まれたウイルスは先ずこの繊毛に吸着すると考えられる。しかし繊毛の表面ではエンドサイトーシスはおきない。そこで感染を成立させるためウイルスは繊毛の根元にもぐりこみ、さらに被覆ピットのようなエンドサイトーシスのおきる細胞膜の特定の領域へと移動しなければならない。運動装置を持たないウイルスがどのようにして移動しているのだろうか。ところで、インフルエンザウイルスの表面には、ヘマグルチニン(HA)とよばれる膜蛋白質が 500 分子程度存在する。HA はシアロ糖鎖との結合し、ウイルス粒子を細胞表面に吸着させる機能を持つ。一方、細胞表面には多数のシアロ糖蛋白質やシアロ等脂質が存在すると考えられるため、ウイルスは HA-シアロ糖鎖結合を入れ換えることで細胞表面を移動することができるのではないだろうか。上記の仮説を検証するため、シアロ糖蛋白質でコートしたカバーガラス表面におけるウイルスの行動を全反射顕微鏡を使い観察した。その結果、ウイルスがガラス表面を二次元的に運動することがあきらかになった。今回は、このウイルス運動の特徴および運動パターンの宿主特異性について報告する。

バクテリアべん毛の3つのファミリー

○相沢慎一、藤井美加子、柴田敏史 (県立広島大学)

The bacterial flagellum transforms its shape into several distinguishable helical shapes (polymorphs) under various environmental conditions. Polymorphs of each type of flagellum stay on a circle in the pitch-diameter ($P-\pi D$) plot, indicating that they all belong to one family. Previously, we showed that the flagellar family of a marine bacterium *Idiomarina loihiensis* (Family II) differed from the conventional flagellar family of *Salmonella typhimurium* (Family I). The pitch and diameter of Family II flagella are half those of Family I flagella. We have suggested that Family I encompasses peritrichous flagella while Family II forms a polar flagellum. In this study, we have surveyed the polymorphs of flagella from 18 other species and categorized their family types. Previous observations were confirmed; Family I form peritrichous flagella while Family II form polar flagella. Furthermore, we found that lateral flagella had helical parameters much smaller than those of the other two Families and thus belong to a new family (Family III).

高粘度条件下における根粒菌種 *Bradyrhizobium japonicum* の運動様式

○門馬和也、神戸正臣、相沢慎一 (県立広島大学)

根粒菌種 *Bradyrhizobium japonicum* はマメ科の植物に共生し、窒素固定をおこなう菌である。*B. japonicum* は、極べん毛、側べん毛の2種類のべん毛システムをもつ。極べん毛は液体中を泳ぐのに使われており、側べん毛は半固形表面上で泳ぐのに使われると考えられている。この2つのべん毛システムの違いを調べるため、高分子 Ficoll の添加により溶液の粘度を変化させ、菌体の運動を暗視野顕微鏡で観察した。極べん毛のみもつ変異株 (BJDΔ283) は液体培地中で 30.3 $\mu\text{m/s}$ の速度でスムーズに泳ぎ、粘度が増すにつれて速度は下がっていった。その泳ぎ方に粘性の違いによる変化は見られなかった。一方、野生株の液体培地中での速度は 30.4 $\mu\text{m/s}$ であることから、野生株は側べん毛の影響を受けることなく、極べん毛により推進力を得ていると考えられる。これに対し側べん毛のみもつ変異株 (BJDΔ293) は液体培地中で方向の定まらない、不均一な泳ぎ方をしていた。その遊泳速度は 11.0 $\mu\text{m/s}$ であり、BJDΔ283 と比較すると約 1/3 の速さであった。しかし、この変異体は粘度が増すにつれて遊泳速度が上がっていき、15%(w/v)Ficoll のときには最大で 18.1 $\mu\text{m/s}$ にまで上がった。また、初めの不均一な泳ぎ方は、スムーズな泳ぎ方に変わった。さらに、液体培地中では観察できなかった側べん毛も 15%(w/v)Ficoll 溶液中で観察することができた。そのべん毛のピッチを測定した結果、精製した側べん毛では 0.59 μm であったのに対し、菌体上で観察されたべん毛では 1.42 μm と約 2 倍強の大きさになっていた。*B. japonicum* の側べん毛は低粘度条件下では遊泳のためのトルクを発生できないが、高粘度条件下ではべん毛の多型変換によりピッチを大きくすることで泳ぐことが可能になったと考えられる。

新規カドミウム耐性菌に関する研究

○溝渕翔子, 細川雄太 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 小林洋和, 鈴江裕二, 秦 隆志, 戸部廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科)

カドミウムは金属や合金として広く使用される一方、人体に有害な物質でもある。高濃度のカドミウムに汚染された土壌・水域からの農産物の摂取は、人体に深刻な影響を及ぼす。そのため、カドミウム及びカドミウム含有物の処理には十分な取り扱いが求められるとともに、すでにカドミウムに汚染された土壌・水域の浄化・修復が急務となっている。近年、その浄化手法としてバイオレメディエーションが提案されているが、カドミウム中で生存可能な生物が限られているため、実施可能な環境や規模が限定されており、解決のためには新規耐性微生物の発見やその耐性遺伝子の特定が必要である。

本研究では、マグロ漁船の船槽から分離された新規海洋微生物がカドミウムに対し耐性能を有することから、カドミウム汚染環境のバイオレメディエーションへの利用を目指し、この微生物の微生物学的な特性及び耐性遺伝子の調査をおこなった。

結果、この新規海洋微生物はアンピシリン及びカドミウムに対し耐性能を、テトラサイクリンに対し弱い耐性能を有すること、また、プラスミド DNA を抽出した結果、いくつかの制限酵素において切断部位を有することが確認された。

微生物に与えるマイクロバブルの影響

○細川雄太, 田村仁人 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 秦 隆志, 長山和史, 岡林南洋, 戸部廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科), 武内秀樹 (高知工業高等専門学校 機械工学科)

環境問題として、水環境、例えば排水等の浄化は急務である。その排水処理として“活性汚泥処理”が挙げられるが、余剰汚泥削減や、リン・窒素除去、病原性微生物の殺菌、省エネルギー化などが求められている。ところで、この水環境に対し、自然な作用の中で改善可能な技術としてマイクロバブル (直径 50 μm 以下の微細気泡) が注目を集めている。このマイクロバブルは通常の気泡に比べ内包する気体の溶解能力が高いため、活性汚泥処理に重要な菌 (例えば、従属栄養生物や硝化細菌、リン蓄積生物など) の繁殖を助長することができる一方、マイクロバブルの圧壊によって高い酸化能力を有するフリーラジカルが生成することから、殺菌 (この場合は、病原性微生物が主なターゲット) への利用可能も考えられ、余剰汚泥の削減や病原性微生物の殺菌に対し効果が期待される。しかしながら、このようなマイクロバブルを用いた微生物の増殖と殺菌の統一的な制御に関する研究はおこなわれていない。本研究では、微生物、特に大腸菌に対するマイクロバブルの影響について調査をおこなった。

結果、大腸菌に対して、マイクロバブルは増殖促進よりも抑制作用の効果を示すことが確認された。

バクテリオファージを指標とする新たな水環境評価

○田村仁人, 溝渕翔子, 細川雄太 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻), 澤 秀和, 谷脇さやか, 秦 隆志, 岡林南洋, 戸部廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科), 藤田正憲 (高知工業高等専門学校)

河川や湖沼、海等の水域に対して、各種微量化学物質については規制強化がおこなわれているものの、生物汚染については感染性のバクテリアへの監視が大勢であり、近年、クリプトスポリジウムの集団感染が起こるなど生物汚染への対策は未だ充分とは言い難い。そのため、新たな水環境に対する汚染度合いの指標が早急に求められている。ところで、生態系における“Dark Matter”としてバクテリオファージが注目を集めている。計測技術の進歩により、環境水 1ml 中には平均 10^6 個ものバクテリオファージが存在することが判明した。このバクテリオファージは藍藻や細菌の数に大きく影響し、食物網における炭素や窒素の循環に大きな影響を与えることが確認され、生態学や環境学的に極めて重要な因子であることが判明した。また、バクテリオファージは外皮タンパク質と DNA のみという非常に単純な構造を有しているため、環境から鋭敏・迅速な影響を受けやすい。

そこで本研究では、新たな水環境評価手法としてのファージの有効性に関する調査研究として、本校に近接する物部川中におけるファージの分布調査とともに水質等との相関調査、及びファージ DNA の環境負荷による変異調査をおこない、ファージの挙動・遺伝的検討をおこなった。

呼吸基質非存在下でミトコンドリアに誘起される透過性遷移の解析

○山本武範¹⁾、吉村勇哉^{1,2)}、山崎尚志²⁾、山下菊治³⁾、片岡正俊⁴⁾、寺田 弘⁵⁾、篠原康雄^{1,2)}

(¹⁾ 徳島大疾患ゲノム、²⁾ 徳島大薬、³⁾ 徳島大歯、⁴⁾ 産総研、⁵⁾ 東京理大薬)

ミトコンドリアでは内膜を介したプロトンの電気化学勾配を駆動力としてATPを産生しているため、内膜はイオンや溶質をほとんど透過させない。しかし、ミトコンドリアに過剰なCa²⁺が取り込まれると、内膜の物質透過性が非選択的に亢進する透過性遷移 (permeability transition, PT) と呼ばれる現象が誘起される。PTを誘起したミトコンドリアからはシトクロムcが放出され、これがアポトーシス実行の引き金となることが明らかにされたが、PTの誘導およびシトクロムc放出のメカニズムは未だ不明である。これまで、PTの誘導には呼吸基質が必須であると考えられてきたが、これを裏付ける実験結果は報告はなされていない。そこで本研究では、呼吸基質がPTの誘導とシトクロムc放出に及ぼす影響について解析を行った。

呼吸基質が存在しない条件下でCa²⁺を添加したミトコンドリアを電子顕微鏡で観察したところ、PTを誘導したミトコンドリアに典型的な形態的特徴が認められた。また、PTの特異的阻害剤であるcyclosporin Aであらかじめ処理したミトコンドリアは、Ca²⁺を加えてもこのような形態を示さなかった。これらのことから、PTは呼吸基質の有無とは無関係に誘導されることが明らかになった。また、ミトコンドリアからのシトクロムc放出について解析を行ったところ、呼吸基質非存在下でPTを誘導したミトコンドリアからはシトクロムcは放出されなかった。このことは、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出が、呼吸基質の関与する未知の因子により制御されていることを示唆している。

ナメクジのにおい情報処理における GABA 神経伝達についての解析

○小林 卓、松尾亮太、伊藤悦朗 (徳島文理大学・香川薬学部・機能生物学講座)

チャコウラナメクジは嗅覚に優れており、特に嗅覚中枢とされる前脳葉を対象にした研究が進んでいる。前脳葉は形態的に発達した層構造をしており、その神経ネットワークで発生する律動的な活動とその周波数変化がにおいの情報をコードしているとされている。一方、このような律動的な活動を生成する神経ネットワークにはγ-アミノ酪酸 (GABA) が神経伝達物質として働くことがさまざまな種において知られている。これまでの免疫組織化学法を用いた研究、および電気生理学的・薬理学的手法を用いた研究により、ナメクジの中枢神経系にも GABA が存在すること、前脳葉の律動的活動の生成に GABA が関与することを示してきた。今回、前脳葉ニューロン群の同期的な振動活動である局所場電位の発生に関与する GABA の役割について、薬理学的および電気生理学的手法を用いて検証した。

生物物理学会と私一べん毛形成から筋肉遺伝子発現

香川弘昭 (岡山大学大学院自然科学研究科/理学部)

学会と言えば生物物理学会で過ごした者にとって、今回桐野先生が中国四国支部を立ち上げ、来年徳島で大会を主催されるのはすばらしいことです。これまでの40年間を振り返って今後の展開について話します。学会当初は「生物特有の物理学が有るか」などの議論が盛んで、如何に研究するかについての話が多く、発表が終わると座長が「結果は次の年ですね」で済んだ例を記憶している。複雑な系を研究するにあたって、素過程を見つけて法則性を導くのが研究の善し悪しを決めた。生物における構造形成も無機物の結晶化と同じで、分子集合の原理がどこまで複雑な構造形成まで成り立つかの疑問は、多くの場合新しいモノを見つけるのが答えにつながってきた。生化学的手法は大切であるが、より微量の物を単離するには遺伝学の助けが必要となった。ともあれ、*in vitro* から *in vivo* への研究として、「動かない細菌を動かす」ことができた。学位取得後10年を経て「線虫を使って生物の動きを解く」ことにした。動かなくなった線虫の突然変異の原因遺伝子の塩基配列決定から、筋肉蛋白質の構造、そして繊維形成モデルを考えた。アミノ酸置換と筋繊維の集合異常、個体の運動不良を関係づけることができた。5千アミノ酸から成るリアノジン受容体分子の分子解剖や、トロポニンC遺伝子欠損による胚発生致死の原因なども順次明らかにした。高等生物には多数の組織に似たような分子種が有るのをどの様に調節しているかなど、解らないことの方が多い。これまで解いたところでは、多数の遺伝子を何時何処で如何に発現させるかについては、単純な on/off が2重3重の足し算としてとして働いているようである。生物では多数の分子の組み合わせがあって解決不可能の様に思えるが案外簡単な過程の相互作用で解けそうである。複雑なゲノムの解かれている部分はほんの一部で解かれていない部分の方が多い。若い人たちが単純な疑問を恥ずかしげもなく問いかけることで発展してきた生物物理学が地方でも盛んになれば願っている。

ヒスタミン H₁ 受容体発現ニューロンを脳部位特異的に破壊する遺伝子改変マウスの作製

○堀尾 修平¹、三宝 誠²、平林 敬浩³、八木 健³、小林 和人⁴、福井 裕行¹

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部¹、生理学研究所行動・代謝分子解析センター²、大阪大学大学院生命機能研究科³、福島県立医科大学⁴)

視床下部に摂食中枢および満腹中枢が存在することは、かなり古くから知られていた。しかしこの説は視床下部の神経核を破壊するという荒っぽい実験から得られたものであった。最近、摂食抑制物質であるレプチンが発見されたのを契機にこの摂食調節機構が見直され、現在はより正確な摂食調節の神経回路が描きなおされている段階である。本研究では、特定のタイプのニューロンのみを特異的に破壊するという非常に選択性にすぐれた手法を用いることで、摂食行動の調節の神経回路を明らかにすることをめざしている。

ヒスタミンH₁受容体拮抗薬が食欲増進をおこすこと、H₁受容体欠損マウスは肥満になることなどからH₁受容体が摂食行動の調節に関与することが指摘されている。また摂食行動の調節に中心的な役割をはたす視床下部の数種の神経核において、H₁受容体の発現が示されている。そこで本研究では、H₁受容体発現ニューロンに注目し、イムノトキシンの脳内局所投与により、H₁受容体発現細胞を特異的に死滅させる遺伝子改変マウスを作製した。このマウスでは、H₁受容体の代わりにイムノトキシン感受性であるヒトIL-2R α が発現し、同時にEGFPも発現するようにしてあるため、H₁受容体発現細胞の存在部位を容易に検出できる。実際に視床下部の弓状核、室傍核、腹内側核等でその存在を確認した。そこでこれらの部位に微小カニューレを用いてイムノトキシンを微量注入し、H₁受容体発現ニューロンを死滅させ、マウスの摂食行動への影響を調べることにより、当該ニューロンの摂食行動調節における役割を明らかにすることをめざす。

野生型マウスの加齢による聴性脳幹反応の変化

○北村美一郎、桐野 豊 (徳島文理・香川薬・生物物理)

我々は以前より、老化や神経変性疾患における瞬目反射連合学習障害を調べているが、この学習では音刺激を条件刺激として用いるため、聴力の減退の有無を調べることは重要である。そこで、我々は野生型マウス (C57BL/6J) の老化に伴う聴力変化を詳しく調べるため、音刺激に対する聴性脳幹反応 (auditory brainstem response : ABR) の経時的変化を長期 (9~90 週令) に渡って調べた。また、老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mouse : SAM) の1つである SAMP-8 についても、ABR (閾値、周波数特性) を調べた。種々の週令の野生型マウスの ABR 測定により、加齢に伴って聴力が低下 (閾値が上昇) することが示された。ごく低周波数 (1 kHz) の音刺激を用いた場合、9~50 週令ではほとんど閾値に差はなかったが、60 週令以上では閾値が上昇していた。比較的高周波数 (click, 10 kHz) の場合でも、同様に加齢に伴って徐々に閾値が上昇することがわかった。また、老化促進モデル SAMP8 (10 週令) の ABR 応答は、野生型マウス (9 週令) との間に有意な差は見られなかった。これまでの我々の結果では、2ヶ月令 (≒10 週令) の SAMP8 は瞬目反射学習ができないことがわかっているが、この学習障害は決して聴力の低下によって条件刺激 (CS) である音が聞こえていないわけではなく、老化に伴う脳機能の障害に依存するものと考えられる。

運動記憶形成における小脳顆粒細胞シナプス機能の解明

○岸本泰司^{1,2}、和田教男³、桐野 豊¹、狩野方伸²、中西重忠³

(¹徳島文理大・香川薬・生物物理、²阪大・医・細胞神経科学、³大阪バイオサイエンス研)

運動学習である瞬目反射条件付けは、小脳を必要とする学習であることが広く認知されているが、小脳内の各神経回路が記憶の素過程にどのように働いているかは未だ詳らかではない。今回我々は、小脳皮質において平行繊維を構成する小脳顆粒細胞に着目し、そのネットワークの運動学習における役割を検討した。1) まず、顆粒細胞に強く発現する種々の受容体分子 (NR2A/2C, Gabra6, CB1R) をノックアウトしたマウスの記憶を解析し、その小脳学習における役割を調べた。2) さらに、Tet-ON system を適応し、可逆的にかつ特異的に顆粒細胞からプルキンエ細胞への神経伝達物質放出を抑制することのできる RNB (reversible neurotransmission blocking) マウスの *in vivo* 解析を行った。DOX を含んだ餌を与えて Tet system を働かせながら条件付けを行ったところ、このマウスでは条件反射の獲得が著明に障害された。しかしながら、条件付け終了後、通常の餌を与えて神経伝達物質放出を正常に戻してやると、野生型と同程度の条件反射の表出を速やかに観察できた。この結果は、小脳皮質における顆粒細胞からプルキンエ細胞間への

神経伝達が瞬目反射条件付けの記憶の表出には必須ではあるが、潜在的な蓄積(saving)には必ずしも必要ではないことを示すものであり、瞬目反射条件付けの基礎を成す小脳メカニズムに新たな洞察を生むものとなった。

基調講演

細胞力覚の分子生物物理学：膜、チャネル、細胞骨格の関係

曾我部正博

(名古屋大院・医・細胞生物物理学、ICORP/SORST・細胞力覚・JST、生理研・分子生理)

最近メカノバイオロジーという言葉をよく耳にする。機械刺激で生じる様々な生命現象を包括する新しい学問分野である。機械刺激の感覚をはじめ細胞の形態形成や運動、重力感知、あるいは心血管系の生理/病理など広範な現象に関わっており、基礎生物学のみならず、循環器学、宇宙医学や理学療法などの応用科学とも密接に関連する裾野の広い分野である。メカノバイオロジーの根本課題の一つは細胞が機械刺激を感知する仕組みであり、我々はこれを“細胞力覚”と名付けた。細胞力覚の最前線は、力覚センサー分子の同定とその仕組みの解明にある。ここ10年間に、力覚センサーとしての機械受容 (mechanosensitive, MS) チャネルの地位が確立され、分子生物学やバイオイメージングの飛躍的發展と相まって、研究が急速に展開している。

細菌から人に至るあらゆる細胞に、様々なMSチャネルが発現している。代表的な遺伝子も同定されつつあるが、蛋白質の高次構造が判明しているのは細菌に発現する2種類のMSチャネルのみである。それらは細菌を雨水などの低浸透圧ショックによる破壊死から守っており、生命誕生の鍵を握る分子でもある。細菌MSチャネルは純粋に膜張力で活性化され、現在膜内張力の変化とチャネルタンパク質の構造変化の関係が原子レベルで解析されている。高等動物でもいくつかのMSチャネル遺伝子が同定されているが、注目されるのは、 Ca^{2+} 透過性のMSチャネルである。様々なMSCaチャネルが多くの細胞に発現しており、機械刺激を細胞内 Ca^{2+} 濃度に変換して種々の生理・病理反応を引き起こすからである。興味深いことに、これらのMSチャネルの活性化にはアクチン細胞骨格が関与しており、感度向上や力方向の感知機能に寄与しているらしい。一方、もう少し緩やかな反応に対応する受容体型や細胞骨格と関連した力覚センサーの存在も分かってきた。本講演では、いくつかの力覚センサーを取り上げて、その活性化機構と細胞機能における役割について論じたい。