

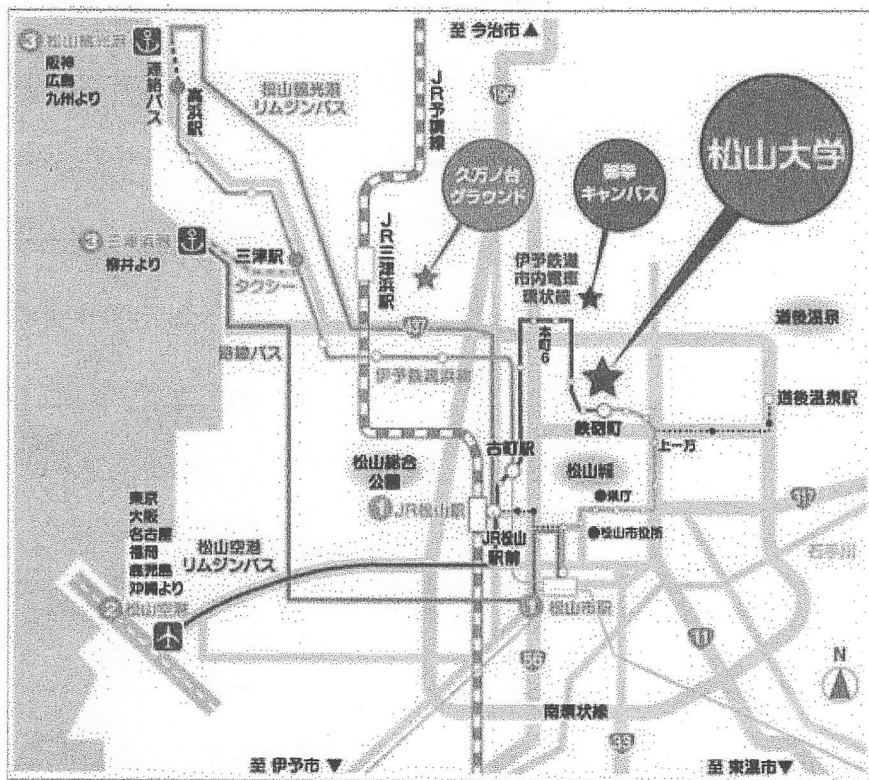
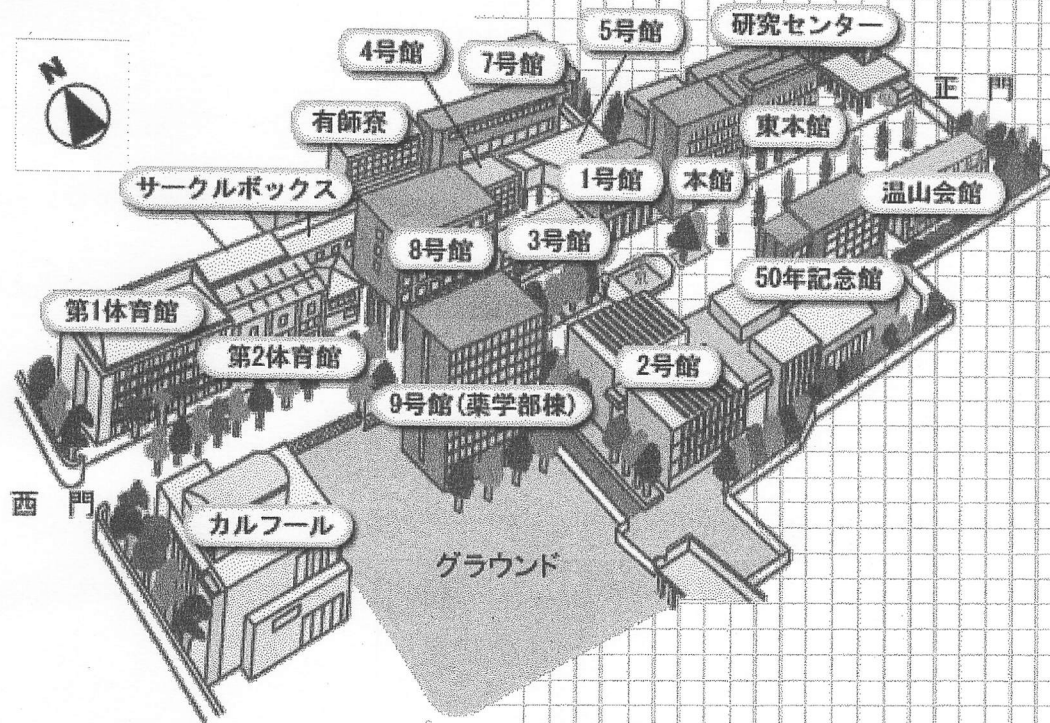
第2回 日本生物物理学会
中国四国支部大会
講演予稿集

2010年 5月8日、9日

於 松山大学薬学部



キャンパスマップの見たい箇所をクリックしてください。



日本生物物理学会 中国四国支部総会

挨拶：桐野豊支部長

議題：

- (1) 「生物物理」誌の地区編集委員の選出方法と原稿収集について
- (2) 支部名簿の管理について
- (3) 来年度の支部大会の開催場所について

報告：

- (1) 第47回徳島年会会計報告
- (2) 2009年度支部会計報告（下記参照）
- (3) 50周年記念事業についての紹介
- (4) 来年度の第49回年会についての紹介

その他、話題提供：

- (1) 学会の会計状況や法人化について

日本生物物理学会 中国四国支部

2009年度（2009年1月1日から12月31日） 会計報告

収入	支出
繰越額 ￥112,146	支出 ￥0
支部費 ￥60,000 (2009年9月7日入金)	繰越額 ￥172,146
合計 ￥172,146	合計 ￥172,146

2009年度は徳島市で第47回年会を開催したため、支部としての独自の活動は行わなかった。

日本生物物理学会50周年記念事業（改定案）

（1）50周年記念式典 日にちと場所

平成22年12月2日（木）13時-17時

日本科学未来館（東京都江東区青海2-3-6）

全体の司会進行：豊島陽子（東京大学）、伊藤悦朗（徳島文理大学）

（2）第1部 式典の部 13時-14時

会長挨拶 片岡幹雄

文部科学省研究振興局長 これから依頼

JST 理事長 北澤宏一（依頼済み）

日本学術会議 会長 金澤一郎（依頼中）

IUPAB 会長 永山國昭

ABA 会長 Benjamin Peng

あと1名なら、JSPS関係者もしくは分子生物学会会長

歴代会長は舞台上に座席を用意。来賓は途中退席者がいるので、舞台上に席を作らない。

休憩15分（舞台の設営）

（3）第2部 講演会「観て分かる生物物理」 14時15分-15時15分

2名の講演（30分×2人で1時間予定）

座長：次期会長

(I) 柳田敏雄（大阪大学）「実験の立場から（もちろん仮題です）」

(II) 美宅成樹（名古屋大学）「理論の立場から（もちろん仮題です）」

内容は現在の生物物理のトップランナーとして、当該領域全体の説明が期待される。

休憩15分（舞台の設営）

（4）第3部 パネルディスカッション 「生物物理、今後の50年」 15時30分-17時

司会：神取秀樹（名古屋工業大学）（専門：光生物学）

パネリスト（50音順，5名予定）：

(I) 岩槻壮市（高エネルギー加速器研究機構）（専門：構造生物学）

(II) 高橋淑子（奈良先端科学技術大学院大学）（専門：細胞生物学・発生生物学）

(III) 原田慶恵（京都大学）（専門：イメージング）

(IV) 望月敦史 (理化学研究所) (分野: 理論)

(V) 安田賢二 (東京医科歯科大学) (分野: 細胞ネットワーク)

まずは、司会者とパネリストが自己紹介および現在の研究紹介を、一人5分程度で、6名で都合30分くらい行う。

次に、それぞれの分野で次の50年の課題になりそうなことと生物物理への期待を話していただく。これも一人5分程度で、6名で都合30分くらい。

最後に全体討論として、分子レベルから細胞レベルや脳・個体レベルなどの階層性の問題、さらには実験から理論への質問など、それから今後の生物物理の役割などについて、都合30分程度議論していただく。

(5) パーティー 100名くらいの参加者を予定

以上。

第2回 日本生物物理学会 中国四国支部例会 プログラム

講演時間 12分 討論 3分

5月8日

12:55

開会のあいさつ (加茂直樹)

13:00~14:00

座長 加茂直樹

- 1 多剤輸送担体 EmrE と基質との pH 依存的相互作用変化の熱力学的特性
○下野和実^{1,2}, 染谷友美², 白水美香子², 横山茂之^{2,3}, 宮内正二¹
(¹ 松山大・薬、² 理研生命分子システム、³ 東大・院理・生化)
- 2 異なる反応中心タンパク質で構成される *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 II 複合体のエネルギー論的比較
○杉浦美羽¹, Fabrice Rappaport², 加藤祐樹³, Alain Boussac⁴
(¹ 愛媛大・無細胞研究センター、² IBPC、³ 東大・生産研、⁴ CEA Saclay)
- 3 光化学系 II 複合体における Psb30 サブユニットの役割
○原田紗代¹, Alain Boussac², 林秀則^{1,3}, 杉浦美羽^{1,3}
(¹ 愛媛大院・理工、² iBiTec-S、CEA Saclay、³ 愛媛大・無細胞研究センター)
- 4 光化学系 II 反応中心タンパク質が異なる *Thermosynechococcus elongatus* の光合成機能の比較
○大上 翔悟¹, 林 秀則^{1,2}, 杉浦 美羽^{1,2}
(¹ 愛媛大院・理工、² 愛媛大・無細胞研究センター)

休憩

14:10~15:10

座長 宮内正二

- 5 飽和・不飽和リン脂質二分子膜の体積挙動観測
筒井 舞子¹, 後藤 優樹², 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)
- 6 ジヘキサデ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¹, 泉川 拓也², 後藤 優樹¹, 松木 均¹
(¹ 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部、² 徳島大学大学院先端技術科学教育部)
- 7 ジパルミトイルホスファチジルグリセロール二分子膜の高圧相挙動
田中佐江子¹, 後藤 優樹², 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)
- 8 タンパク質と麻酔薬の相互作用に関する研究
○鎌倉法子, 東山紫布, 秦 隆志, 長山和史, 岡林南洋 (高知工業高等専門学校 物質工学科)
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)

休憩

15:20~16:20

座長 杉浦美羽

- 9 カチオン性ポリペプチド-ヒドロキシアパタイトナノ粒子複合体と脂質二分子膜との相互作用
○植野 哲、斎藤 博幸 徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系)
- 10 寒冷暴露したラットの褐色脂肪組織に発現する FABP アイソフォームの定量的解析
○山本篤司^{1,2}、山本武範¹、渡邊政博^{1,2}、篠原康雄^{1,2}
(¹徳島大・ゲノム、²徳島大・薬)
- 11 Ca²⁺によって酵母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、山田安希子²、吉村勇哉^{1,3}、合田俊一^{1,3}、川島聡^{1,3}、寺田弘⁴、篠原康雄^{1,3}
(¹徳島大・ゲノム、²徳島大・歯、³徳島大・薬、⁴東京理大・薬)
- 12 卵管環境再現を目標とした受精卵培養システムとその効果
○松浦宏治¹、黒田ユカ¹、李井春²、舟橋弘晃²、成瀬恵治³
(岡山大学 ¹異分野融合先端研究コア ²自然科学総合研究科 ³医歯薬学総合研究科)

休憩

16:30~17:30

座長 篠原康雄

- 13 線虫トロポニンCの2つのカルシウム結合部位のアミノ酸置換による機能解析
○香川弘昭、高谷智秀 (岡山大学自然科学研究科理学部生物学科)
- 14 アメーバ様細胞の理論モデル
西村信一郎 広島大学大学院理学系研究科数理分子生命理学専攻
- 15 サリドマイド由来誘導体の抗インフルエンザ活性
○畠山 大¹、岩井佑磨¹、高橋 仁²、本島和典³、石川 稔³、杉田和幸³、橋本祐一³、原田勇一²、板村繁之²、小田切孝人²、田代真人²、清 悦久⁴、山口健太郎⁴、葛原 隆¹ (¹徳島文理大・薬、²国立感染研・インフルエンザウイルス研究センター、³東京大・分生研、⁴徳島文理大・香川薬)
- 16 インフルエンザウイルスの行動解析
○堺立也 (川崎医大・微生物学)

休憩

17:40~18:25

座長 香川弘昭

- 17 異種生物種由来酵素の反応場の相違からみたヘムオキシゲナーゼ反応におけるヘム分解の微調整
○右田たい子、徳田真人、原口明子 (山口大農)
- 18 環境負荷によるバクテリオファージの変異挙動

○ 森 奨平、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、戸部廣康（高知工業高等専門学校 物質工学科）

井上隆信（豊橋技術科学大学）、藤田正憲（高知工業高等専門学校）

19 クロマチンリモデリングタンパク質のリン酸化による構造機能制御機構の解明

○橋本愛美、松井理恵子、上脇準一、楯慎一（広島大・院理・数理分子）

18:25~18:45

支部総会

19:00~20:30

懇親会（松山大学カルフル1F 松山大学生協食堂）

5月9日

9:00~10:00

座長 右田たい子

20 新規カドミウム耐性菌に関する研究

○ 山中亨一、鈴江裕二（高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻）

秦 隆志、戸部廣康（高知工業高等専門学校 物質工学科）

21 微細気泡による排水処理の高効率化に関する研究

○ 田辺一平、細川雄太（高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻）

秦 隆志、森長久豊、長山和史、土居俊房、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）

吉田正伸、西内悠祐（高知工業高等専門学校 電気情報工学科）

大成博文（徳山工業高等専門学校 土木建築工学科）

22 軟体動物中枢神経系における一酸化窒素合成酵素の発現解析

○定本久世、伊藤悦朗（徳島文理大学香川薬学部）

23 ヒスタミンH1受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節神経回路の研究

○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、

上山敬司⁵（¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部、²生理学研究所行動・代謝分子解析センター、³大阪大学大学院生命機能研究科、⁴福島県立医科大学、⁵和歌山県立医科大学）

休憩

10:10~11:10

座長 奈良敏文

24 瞬目反射条件付けに対する小脳破壊の効果—ウサギとマウスの差異

○桐野 豊^{1,2}、金子礼奈²、川原茂敬^{2,3}

(¹徳島文理大学香川薬学部、²東京大学薬学部、³富山大学工学部)

25 ミツバチの8のダンスによるコロニーの利得：マルコフモデルによる解析

岡田龍一、○伊藤悦朗（徳島文理大学 香川薬学部）

26 NMRを用いたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の動的構造解析

○和田侑士、村上千穂、古川貴章、堀内裕司、大前英司、月向邦彦、楯 真一
(広島大・院理・数理分子)

27 べん毛フックの長さ制御タンパク質 FliK の構造解析

○水野 志乃、楯 真一、相沢 慎一（県立広島大学院・広島大学）

休憩

11:20~12:20

座長 伊藤悦朗

28 べん毛フラジェリンの異種間における互換性

○稲葉 敏、橋本愛美、相沢慎一（県立広島大学）

29 アザイド存在下における、光駆動性クロライドポンプのイオン輸送

○宮内正二¹、関頭照²、下野和実¹、菊川峰志²、出村誠²、加茂直樹¹
(¹松山大学・薬、²北海道大学・院理)

30 *Halobacterium salinarum*に存在する光センサータンパク質センサーロードプシン II の光化学反応サイクル

○田母神淳^{1,2,3}、菊川峰志²、池田陽一³、竹村朱加³、出村誠²、加茂直樹^{1,2,3}
(¹松山大・薬、²北大・生命科学院、³北大院・薬)

31 ホヤ幼生の脳胞における視覚サイクル機能分子の局在

滝本紀子、日下部 岳広¹、○津田基之²

(兵庫県立大学生命理学研究科、¹甲南大学理工学部生物学科 ²徳島文理大学香川薬学部)

閉会のあいさつ（次期実行委員長）

多剤輸送担体 EmrE と基質との pH 依存的相互作用変化の熱力学的特性

○下野和実^{1,2}, 染谷友美², 白水美香子², 横山茂之^{2,3}, 宮内正二¹

1, 松山大・薬; 2, 理研生命分子システム; 3, 東大・院理・生化

kshimono@cc.matsuyama-u.ac.jp

【目的】EmrE は、大腸菌由来の SMR (small multidrug resistance) 型多剤輸送タンパク質であり、膜内外のプロトン濃度勾配をエネルギー源として多種多様な脂溶性カチオン分子を細胞外に排出する。膜貫通領域の唯一の酸性アミノ酸である Glu14 は、プロトン輸送と基質結合に最も重要な残基として知られている。本研究では、解離性アミノ酸の荷電状態が EmrE と基質との結合に及ぼす影響を検討するために、基質結合の pH 依存性を等温滴定型熱量計 (ITC) により解析した。

【方法】大腸菌抽出液を用いた無細胞合成系[1]を利用して EmrE を大量合成した。反応液を遠心分離後、膜画分を 1% ドデシルマルトシドで可溶化し、カラムクロマトグラフィーにより EmrE を精製した。精製試料を目的の pH の緩衝液に対して透析した試料を ITC 測定に用いた。基質としては、tetraphenyl phosphonium ion (TPP⁺) を用いた。【結果・考察】本法により無細胞合成した EmrE の合成量は、2.5 mg/mL 反応液であり、高収量で EmrE を合成できる系を確立した。さらに Blue-Native PAGE により、2 量体と 4 量体が主成分であることを確認した。ITC により 1 分子の TPP⁺ の結合に伴い 2 分子のプロトンが放出されることを観測した。pH の増加に伴い、結合親和性は増大し、またエントロピーの効果 (疎水性相互作用の増大、水分子の排除) が大きくなった。これらの結果は、酸性では、Open state に、アルカリ性では、Closed state に結合することを示唆している。

1, Shimono, K. et al. (2009) *Protein Sci.*, **18**, 2160-2171.

異なる反応中心タンパク質で構成される *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 II 複合体のエネルギー論的比較

○杉浦美羽¹, Fabrice Rappaport², 加藤祐樹³, Alain Boussac⁴

(¹愛媛大・無細胞研究センター、²IBPC、³東大・生産研、⁴CEA Saclay)

好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* のゲノムには光化学系 II の反応中心タンパク質である D1 をコードする遺伝子が 3 つ存在し⁽¹⁾、通常の培養条件では *psbA₁* が発現しているが(D1:1)、光ストレスを受けると *psbA₃* が発現する(D1:3)ことが知られている⁽²⁾。D1:1 と D1:3 の間では、360 アミノ酸のうち 21 アミノ酸が異なる。本研究では、これらのアミノ酸の違いが PSII の機能と構造にどのような影響を与えるのかを調べるために、*psbA₁* と *psbA₂* を破壊した組換え体を作製し、D1:1 で構成する PSII、および、D1:3 で構成する PSII を単離して、それらの性質を調べた。

D1:3-PSII の酸素発生活性は D1:1-PSII よりも高い酸素発生活性を示した。S₂Q_B⁻ および S₃Q_B⁻ 電荷再結合時の熱発光は D1:3-PSII の方が高温度に現れ、また、S₂Q_A⁻ 電荷再結合時には、D1:3-PSII では D1:1-PSII とは異なるバンドが現れた。Q_B の近傍には両者の間で異なるアミノ酸があり、このアミノ酸が近くの脂質と相互作用している可能性が考えられる。また、殆どの D1 では 130 番目のアミノ酸は Glu であり、Pheo_{D1} と水素結合していると考えられている。D1:3 は Glu であるが、D1:1 では Gln である。分光電気化学的測定により Pheo_{D1}/Pheo_{D1}⁻ の酸化還元電位を調べたところ、D1:1 では 17 mV 低いことが明らかになった⁽³⁾。

References:

- (1) Nakamuta, Y et al. (2002) *DNA Res.* **9**, 123-130
- (2) Kos, P. B. et al. (2008) *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* **1777**, 74-83.
- (3) Sugiura, M. et al. (2010) *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* in press

光化学系 II 複合体における Psb30 サブユニットの役割

○原田紗代¹, Alain Boussac², 林秀則^{1,3}, 杉浦美羽^{1,3}

(¹愛媛大院・理工, ²iBiTec-S, CEA Saclay, ³愛媛大・無細胞研究センター)

ラン藻や植物は光合成反応によって太陽光エネルギーを化学エネルギーに変換する。初発の反応は、葉緑体チラコイド膜に局在する 20 サブユニットタンパク質とコファクターで構成される光化学系 II (PSII) 超複合体が担う。Psb30 は 2007 年に好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* の単離 PSII 複合体から発見された膜を 1 回貫通する 5 kDa のサブユニットで^[1]、PSII 複合体の外側に位置すると考えられているが、その役割は不明である。そこで本研究では、*T. elongatus* の Psb30 欠損株 (Δ Psb30) を作製し、構造と機能の観点から野生株 (WT) と比較した。最も重要な光合成機能である水の酸化機能を調べるために、 Δ Psb30 および WT から精製した PSII の酸素発生活性を測定したところ、両者の間に大きな違いは認められず、Psb30 は直接水の酸化には関与しないことが分かった。両者の細胞に強光を照射すると、WT は 1 時間で水の酸化活性が 20%低下したのに対して、 Δ Psb30 は 30%低下した。更に、タンパク質合成阻害剤を添加すると、WT に比べて Δ Psb30 の酸素発生の失活速度および PSII 反応中心タンパク質の分解は速かった。EPR スペクトル測定により、光防御機構に働く Cyt b_{559} のポテンシャルは、WT では光照射によって HP 型になるが、 Δ Psb30 は LP 型のままであることが分かった。従って、Psb30 の欠失により Cyt b_{559} のポテンシャルが下がり、副次的電子移動が機能しなくなったために、強光照射下で PSII 複合体構造が不安定になったと考えられる。以上の結果より、Psb30 は PSII の機能には直接関わっていないが、複合体構造の保持、特に、機能的な Cyt b_{559} の構造保持に重要であることが明らかになった^[2]。

[1] Kashino, Y., Sugiura, M. *et al. Biochim. Biophys. Acta* (2007) 1767, 1269-1275

[2] Sugiura, M. *et al. Biochim. Biophys. Acta* (2010) *in press*

光化学系 II 反応中心タンパク質が異なる *Thermosynechococcus elongatus* の光合成機能の比較

○大上 翔悟¹, 林 秀則^{1,2}, 杉浦 美羽^{1,2} (¹愛媛大院・理工, ²愛媛大・無細胞研究センター)

ラン藻や植物は、光合成電子伝達によって光エネルギーを化学エネルギーに変換する。初発の反応は光化学系 II (PSII) が担っており、電子伝達に関わるほとんど全てのコファクターは反応中心タンパク質 D1 に配位している。そのため、D1 が損傷するとエネルギー変換ができず、光合成生物は、生命活動を維持できなくなる。好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* のゲノムには D1 をコードする遺伝子 *psbA* が 3 つあり、快適な条件では主に *psbA₁* が発現しているが、光ストレスによって *psbA₃* が誘導されることが分かってきた。PsbA1 と PsbA3 では 344 アミノ酸のうちの 21 アミノ酸が異なっており、D1 が PsbA1 である PSII と PsbA3 である PSII が同じ光合成機能を持つとは考えにくい。そこで、本研究では遺伝子組換えによって *psbA₂* および *psbA₃* を破壊して PsbA1-PSII のみを作る *T. elongatus* WT*1 株を構築し、PsbA3-PSII のみを作る WT*3 株、および、PsbA1-PSII と PsbA3-PSII の両方を作る WT 株を用いて、光合成機能を比較した。

細胞増殖速度を比較すると、PsbA3-PSII を持つ WT*3 は WT と同じであったのに対し、PsbA1-PSII を持つ WT*1 は特に誘導期が長く、WT*1 は光に対してより敏感であることが示唆された。強光照射によって光合成機能が低下することが知られているので、細胞に強光を照射して水の酸化活性を測定したところ、WT は 20%、WT*3 は 30%、WT*1 は 70%低下した。その後、通常光に戻すと、WT と WT*3 は 1 時間で活性が完全に回復したのに対して、WT*1 は回復に 20 時間かかった。更にタンパク質合成阻害剤を加えると、強光照射により、WT*1 の方が、WT*3 よりも速く活性が低下した。また、水の酸化活性を単離した PSII で測定すると、PsbA3-PSII は、PsbA1-PSII より 1.7 倍高かった。

以上の結果より、*T. elongatus* は、強光ストレスを受けた時に、PsbA1 より機能の高い PsbA3 を作ることによって、光合成機能の低下を抑えると同時に、機能を早く回復させて生命活動を維持していると考えられる。

飽和・不飽和リン脂質二分子膜の体積挙動観測

○ 筒井 舞子¹, 後藤 優樹², 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

近年、水溶液の熱膨張係数を測定する為の熱量計が開発された。この手法は一般的に圧力擾動熱量 (PPC) 測定と呼ばれ、試料溶液および参照溶液 (通常は溶媒) に対して 40 気圧 (約 0.4 MPa) 程度の等温圧力変化に伴う熱の出入りを測定し、いくつかの仮定に基づき、熱力学関係式を適用して、熱膨張係数を得るものである。本研究では、不飽和リン脂質であるジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) および、それと炭素数の等しい飽和リン脂質であるジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) を用い、それらの二分子膜中における体積挙動を PPC 測定により調べ、炭化水素鎖中の二重結合の存在が、体積挙動に及ぼす影響について検討した。

ジヘキサデ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¹, 泉川 拓也², 後藤 優樹¹, 松木 均¹

¹徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

²徳島大学大学院先端技術科学教育部

これまで、我々は鎖長の異なる一連のエステル結合型リン脂質の二分子膜相挙動に及ぼすコレステロールの影響について調べてきた。一方、エーテル結合型リン脂質もまたモデル膜研究でよく用いられるリン脂質の一つであり、大気圧下で指組みゲル ($L_{\beta}I$) 相と呼ばれる非二分子膜構造を形成することが知られている。本研究では、エーテル結合型リン脂質の一つであるジヘキサデシルホスファチジルコリン (DHPC) 二分子膜の相挙動に及ぼすコレステロールの影響について、示差走査熱量測定 (DSC) および蛍光スペクトル観測により作成された温度-コレステロール組成相図をもとに考察し、エステル結合型リン脂質の二分子膜相挙動に及ぼすコレステロール効果との相違について検討した。

ジパルミトイルホスファチジルグリセロール二分子膜の高圧相挙動

○ 田中佐江子¹, 後藤 優樹², 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

リン脂質二分子膜におけるこれまでの相転移研究はホスファチジルコリンのような中性リン脂質に集中してきた。一方、極性基に負電荷をもった酸性リン脂質も生体には多数存在し、ホスファチジルグリセロール (PG)はその一種である。PG が形成する二分子膜は、特定の陽イオン存在下、その二分子膜構造の安定性が著しく変化することが知られている。本研究では、炭素数 16 の飽和アシル鎖を有するジパルミトイル PG (DPPG) が形成する二分子膜の添加塩 (NaCl)濃度に依存した相転移を常圧および高圧下において高圧光透過法を用いて調査した。構築した温度-圧力相図に基づき高圧相挙動に及ぼす脂質極性基間相互作用の影響を考察した。

タンパク質と麻酔薬の相互作用に関する研究

○ 鎌倉法子, 東山紫布, 秦 隆志, 長山和史, 岡林南洋

(高知工業高等専門学校 物質工学科)

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ついては、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 (BSA) 等、種々のタンパク質に関して詳細な研究がおこなわれている。本研究では、麻酔薬のタンパク質: BSA 及びリゾチームへの結合挙動について麻酔薬選択性電極法を用いて調査した。また、pH 環境を変え、第三級アミンである麻酔薬の解離/非解離型構造の結合挙動についても比較検討する。

測定の結果、タンパク質に対する麻酔薬結合挙動は BSA では多段階の指数関数的増加を、リゾチームでは単一の指数関数的増加をそれぞれ示した。BSA への多段階的な結合挙動は、麻酔薬によって BSA に誘起される “molten globule” の関与が考えられる。

また、両タンパク質共に結合が始まる濃度 (ズレが確認される濃度) は、pH の上昇に伴い増加することが確認された。この現象を pH の変化による麻酔薬の解離型/非解離型構造の存在比から検討した結果、麻酔薬のタンパク質の結合挙動はまず一次的に解離型が結合し、タンパク質に何らかの構造変化を誘発。次いで、二次的に非解離型の結合が始まるという 2 段階の過程が考えられる。

カチオン性ポリペプチド - ヒドロキシアパタイトナノ粒子複合体と脂質二分子膜との相互作用

徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系)

○植野 哲、斎藤 博幸

[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、2種類のカチオン性ポリペプチド poly-L-arginine (poly(Arg)) poly-L-lysine (poly(Lys)) とヒドロキシアパタイトナノ粒子 (Hap) 複合体を調製し巨大リポソーム膜との相互作用を蛍光スペクトル測定、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 等を利用し検討を行ったのでこれを報告する。

[実験] HAp 粒子とカチオン性ポリペプチドの複合体は、HAp 懸濁液にカチオン性ポリペプチド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] ζ ポテンシャルの正方向へのシフト、FT-IR スペクトル上にポリペプチド由来の amido I バンドの出現により、2種類の複合体の形成を確認した。FT-IR スペクトルの結果より複合体中のポリペプチドのコンフォメーションが脂質膜との共存により変化することまた、CLSM 観察から両カチオン性ポリペプチド - Hap 複合体、が脂質二分子膜透過能を持つことが明らかとなった。

寒冷暴露したラットの褐色脂肪組織に発現する FABP アイソフォームの定量的解析

○山本篤司¹⁾²⁾、山本武範¹⁾、渡邊政博¹⁾²⁾、篠原康雄¹⁾²⁾

¹⁾ 徳島大・ゲノム、²⁾ 徳島大・薬

我々は、余剰のエネルギーを熱として発散する褐色脂肪組織(BAT)に着目し、この組織の機能発現に重要な遺伝子の探索を行ってきた。その結果、BATの熱産生機能が亢進する寒冷条件下において、3種脂肪酸結合タンパク質(FABP3)の転写レベルが顕著に上昇することを見出した。また、10種のFABPアイソフォームのうち、FABP3~5の3つのアイソフォームがBATにおいて発現していることを明らかにした。しかし、機能が亢進したBATにおけるFABPアイソフォームの量的関係は明らかでない。そこで本研究では寒冷暴露したラットのBATにおけるFABPアイソフォームの発現レベルを定量的に比較した。

室温及び寒冷条件下で飼育したラットそれぞれのBATから総RNAを単離し、既知量の合成RNAとともにNorthern blottingに供することにより、それぞれのFABPアイソフォームの発現レベルを測定した。その結果、室温飼育したラットのBATではFABP4が総FABPの93%を占めるのに対し、寒冷暴露したラットのBATではFABP3の転写レベルが顕著に上昇し、総FABPの30%を占めるようになることが分かった。また、寒冷暴露に伴ってFABP5の転写レベルも上昇したが、その総FABPに占める割合は極めて低かった。これらの結果は、Western blottingによるタンパク質レベルの結果ともよく一致していた。

Ca²⁺によって酵母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⁾、山田安希子²⁾、吉村勇哉¹⁾³⁾、合田俊一¹⁾³⁾、川島聡¹⁾³⁾、寺田弘⁴⁾、篠原康雄¹⁾³⁾

¹⁾ 徳島大・ゲノム、²⁾ 徳島大・歯、³⁾ 徳島大・薬、⁴⁾ 東京理大・薬

哺乳類のミトコンドリアは、過剰量の Ca²⁺を取り込むと、内膜の物質透過性が著しく亢進する「透過性遷移」と呼ばれる現象を誘起し、透過性遷移に伴うミトコンドリアからのシトクロム c 放出はアポトーシス誘導の引き金となる。透過性遷移の分子機構の解明には、遺伝子改変酵母のミトコンドリアを用いた遺伝学的アプローチが有効であると考えられるが、酵母ミトコンドリアが哺乳類ミトコンドリアと同様に Ca²⁺によって透過性遷移を誘起するのかわ不明である。そこで本研究では酵母ミトコンドリアに対する Ca²⁺の作用を詳細に解析した。

酵母ミトコンドリアは、哺乳類ミトコンドリアとは異なり、Ca²⁺の取り込み活性を有していない。そこで、Ca 選択的イオノフォアを用いて、酵母から単離したミトコンドリアに Ca²⁺を取り込ませた。その結果、インキュベーションメディウム中に含まれる呼吸基質および無機リン酸の濃度を至適化した場合に、酵母ミトコンドリアに透過性遷移が誘起されることが示された。さらに、透過性遷移を誘起したミトコンドリアからのシトクロム c 放出も確認された。これらのことから、実験条件を至適化することによって、酵母ミトコンドリアにも哺乳類のミトコンドリアと同様に透過性遷移およびシトクロム c 放出を誘起させることが可能であることが示された。

卵管環境再現を目標とした受精卵培養システムとその効果

○松浦宏治¹⁾、黒田ユカ¹⁾、李井春²⁾、舟橋弘晃²⁾、成瀬恵治³⁾

岡山大学 ¹⁾ 異分野融合先端研究コア ²⁾ 自然科学総合研究科 ³⁾ 医歯薬学総合研究科

卵管の構造に基づいた考察から、胚の移送に伴う力学的刺激が受精卵の発育には欠かせないと考えており、受精卵を移動させながら体外培養するシステムを發展させている。これらのシステムでは培地が移動するために老廃物拡散速度も上昇する。この効果によって、胚発育を阻害する物質の取り込み量を下げることができるとも利点の一つである。Tilting Embryo Culture System (TECS) は傾斜動作と傾斜保持によって胚を移動させながら培養できる系である。この培養システムの利点は、従来の培養系をそのまま適用できるため臨床応用され易い。二細胞期からのマウス胚盤胞到達率は TECS 群で優位に上昇し、胚盤胞内細胞数も TECS 群で増加した。この傾向はブタ、ヒト胚培養についても認められた。しかし、TECS では力学的刺激が小さいため、より大きい刺激が負荷できるデバイスの完成を目指している。そのため、空圧によって蠕動模倣運動を起こせる PDMS (poly(dimethylsiloxane)) 薄膜を含むマイクロ流路系を構築した。PDMS 膜を下げた時に受精卵の変形が確認されたため圧縮刺激も負荷できる。シリンジを押す速度を変化させることによって、異なる MS を与えることが可能である。複数の MS を同時に負荷できる点において、従来の培養系と比較して卵管内の生理的環境により近づいたと言える。

線虫トロポニンCの2つのカルシウム結合部位のアミノ酸置換による機能解析

香川弘昭 O 高谷智秀 岡山大学自然科学研究科 (理学部生物学科)

線虫は自活性で筋肉は咽頭筋と体壁筋に2大別でき、ほ乳類の心筋と骨格筋に対応する。線虫のトロポニンCには2つの遺伝子が2つあり、それぞれの筋肉で発現しており、胚致死になる突然変異体の原因の1つは体壁筋のトロポニンC欠失であることを報告している。本研究はトロポニンCのカルシウム結合部位IVからC-末端までを逐次的に置換した変異トロポニンCのcDNAを作製して、*in vivo*と*in vitro*で機能解析した。大腸菌で生産した幾つかのトロポニンCのカルシウム結合能をSDSゲル電気泳動で、トロポニンI結合能は抗体を用いて調べた。EFハンドの形成に有用なアロマティックアミノ酸をグルタミン酸とプロリンに置換した時、*in vitro*では差はなかったが*in vivo*では差が出た。形質転換した線虫を使うことでタンパク質相互作用の詳細を示した例である。

Functional analysis *in vitro* and *in vivo* on the calcium binding of the troponin C in *Caenorhabditis elegans*,

Hiroaki Kagawa and Tomohide Takaya,

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

アメーバ様細胞の理論モデル

広島大学大学院理学系研究科数理分子生命理学専攻

西村信一郎

アメーバ様細胞とは、原生動物であるアメーバに類似した、動物やその他の真核生物の細胞を指し、細胞性粘菌からヒトの細胞に至るまで幅広い種で見られる。近年、細胞内のアクチンの重合を制御することによってアメーバ様細胞の遊走(運動)が引き起こされていることが明らかとなった。しかしながら、制御機構に関わると考えられる分子は多数発見されているにもかかわらず、その制御機構の全体像は未だ不明である。私は重合制御に関わる多数の分子を、1つの制御因子として捉えた理論モデルを提案する。この制御因子は、重合阻害因子で、細胞の収縮部で凝縮し、膨張部では逆に希釈されると仮定する。この性質のため、細胞の形状の対称性が少し破れると、細胞の自発的な運動が誘起される。さらに、細胞外シグナルに対する走化性を示すように理論モデルを拡張した結果、障害物などがあると、濃度勾配に逆らって運動し、障害物を避ける振る舞いがシミュレーションにおいて見られた。

サリドマイド由来誘導体の抗インフルエンザ活性

○畠山 大¹, 岩井佑磨¹, 高橋 仁², 本島和典³, 石川 稔³, 杉田和幸³, 橋本祐一³, 原田勇一², 板村繁之², 小田切孝人², 田代真人², 清 悦久⁴, 山口健太郎⁴, 葛原 隆¹ (¹徳島文理大・薬, ²国立感染症・インフルエンザウイルス研究センター, ³東京大・分生研, ⁴徳島文理大・香川薬)

A 型インフルエンザウイルスは、昨年ブタ由来の新型ウイルスがパンデミックを引き起こすなど、人類にとって大きな脅威である。現在、抗ウイルス薬としてタミフルなどのノイラミニダーゼ阻害薬が用いられているが、ノイラミニダーゼの遺伝子には変異が起きやすく、耐性ウイルスが頻繁に出現するため、ターゲットの異なる新しい抗ウイルス薬の開発が望まれている。そこで我々は、変異の少ないウイルスの RNA ポリメラーゼの活性を抑制する薬物の探索を始め、サリドマイドに着目した。サリドマイドは催奇形性ゆえに市場撤退した催眠剤であるが、アメリカではハンセン病の治療薬として市販され、近年エイズや癌に対する著効も注目されている。本研究ではサリドマイドの構造展開により 34 種類の誘導体を作成した。A 型インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、PA, PB1, PB2 の 3 種類のサブユニットが結合して RNA 合成能を発揮するが、34 種類の誘導体のうち、3 種類が PA サブユニットにおけるエンドヌクレアーゼ活性とウイルスの増殖を抑制し、他の 1 種類のアナログはブタ由来新型ウイルスの増殖を抑制した。これらの 4 種類の誘導体は全て共通してカテコール基を持っていた。また、ジメトキシフェニル基を持つアナログは、ウイルスの病原性の強度を決める RNA ポリメラーゼの PB2 サブユニットに結合し、PB2 活性を阻害することが示唆されたが、ウイルスの増殖は抑制できなかった。以上の結果より、PA サブユニットをターゲットとするサリドマイド由来誘導体は、新しい抗インフルエンザ薬としての可能性を持つことが示唆された。

インフルエンザウイルスの行動解析

○塚立也 (川崎医大・微生物学)

インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子表面の 2 種類のスパイク蛋白質、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼを使い細胞表面を二次元的に運動することができる。この運動は、ウイルスが細胞へ侵入する効率をあげている。さらに、運動のパターンはヒトを宿主とするウイルスとミズドリを宿主とするウイルスで異なっている。ヒトのインフルエンザウイルスはミズドリのウイルスがヒトへの感染性を獲得したもののだが、ミズドリのウイルスはヘマグルチニンとノイラミニダーゼの変異によりヒトウイルス様の運動様式を獲得することでヒトへの感染性を獲得するのではないだろうか。逆に自然界においてインフルエンザウイルスの宿主となっているミズドリやニワトリ、ブタなどのウイルスについて運動パターンを調べることで、どのような自然宿主内でウイルスがヒトへの感染性を獲得しているかが明らかにできるのではないだろうか。ところでこれまでウイルスの運動の観察は、蛍光標識したウイルス粒子を全反射顕微鏡により観察するという方法をとっていた。しかしこの方法は比較的大量のウイルスを要し、増殖の遅いウイルスには適用できない。さらに励起光によるウイルスの失活や褪色などの問題もあり簡便な方法とも言い難い。今回の報告では、比較的小量のウイルスを非標識で直接観察し運動パターンを解析する新しい方法を紹介する。あわせてこの方法でとらえたブタ由来新型ウイルスの運動についても報告する予定である。

異種生物種由来酵素の反応場の相違からみた
ヘムオキシゲナーゼ反応におけるヘム分解の微調整
○ 右田たい子・徳田真人・原口明子（山口大農）

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、補欠分子族ヘミンをビリベルディン、CO、および鉄イオンに分解する酵素である。遺伝子レベルでは、HO はバクテリアから高等動植物まで広範囲の生物種に保存されている。HO 反応では、ヘミン (Fe^{III}-protoporphyrin IX) は基質でありながら、還元状態で分子状酸素を活性化しながら、逐次的に自己酸素化分解を行う。酵素のヘミン結合部位 (ヘムポケット) では、鉄(II)-ヘムに結合した酸素分子をヒドロペルオキシヘムとして活性化するために、プロトンリレーの仕組みが働く。興味深いことに、このプロトンリレーに関与する残基は、高等植物 HO と哺乳動物や病原バクテリアの HO とでは異なっており、また同じ残基を利用していても、ヘムポケット内の分子環境を違えることで、活性の更なる微調整をしていることが明らかとなった。

先行した哺乳動物や病原バクテリア HO の研究では Asp が上記のプロトンリレーに必須であるとされているが、植物では、ヘムの遠位の比較的近くに His が位置し、数個の水分子を介して分極した水分子をヘム鉄上に配位させ、中間体のベルドヘムを鉄(III)の状態安定化していることが明らかとなった。一方哺乳動物 HO では、ベルドヘムは速やかに還元されて鉄(II)状態となる。このことは、植物が HO 反応を通して、ベルドヘムがさらに酸素化解裂して生成する鉄(III)-ビリベルディンを、光受容性色素の合成原料として用いていることと関係があるかもしれない。アミノ酸配列の相同性が高い哺乳動物 (ラット) 由来の HO1 と魚類 (トラフグ) の HO1 によるヘム分解反応の比較からは、電子供与タンパクであるシトクロム P450 還元酵素 (CPR) と電子受容体である HO との共役が、ラットよりもフグのほうがより効果的であることが見出された。このことは、水棲生物による環境適応の結果とも解釈される。

環境負荷によるバクテリオファージの変異挙動

- 森 奨平, 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, 戸部廣康 (高知工業高等専門学校 物質工学科)
井上隆信 (豊橋技術科学大学), 藤田正憲 (高知工業高等専門学校)

バクテリオファージ (ファージ) とは細菌に感染するウイルスの総称である。このファージは遺伝子と外皮タンパク質のみという非常にシンプルな構造のため、環境負荷による遺伝子変異を受けやすい特徴を持つ。ファージが微生物 (宿主) に感染すると溶菌あるいは溶原化が起こり、後者の溶原化ではファージ遺伝子が宿主の遺伝子に組み込まれることで遺伝子変異が起こる。このようにファージは生態系における遺伝子変異のトリガーとなる可能性が示唆され、環境における遺伝子変異の担い手として注目を集めている。本研究では環境負荷による環境水中のファージの存在量や遺伝子の変異挙動に関して調査をおこない、上記について検討した。

ファージ存在量の調査では、ファージ数と測定した各環境基準項目 (pH, DO, BOD 及び大腸菌群数) のうち大腸菌群数では正の相関が得られたものの、他の基準項目では明確な相関を得ることができなかった。また、ファージ数は生活排水に比べ農業排水の方が多く、排水の種類によりファージ存在量に相違を確認した。一方、ファージ遺伝子の変異調査では制限酵素による断片化の挙動に変異が確認された。

新規カドミウム耐性菌に関する研究

- 山中亨一, 鈴江裕二 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻)
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り、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 (Maguro-1 菌と命名) に対し、微生物学的調査をおこなったところ、この Maguro-1 菌がカドミウムに対し耐性能を有することが判明した。現在、この Maguro-1 菌による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、耐性遺伝子の調査をおこなっている。

微生物学的調査よりカドミウム以外の様々な重金属や抗生物質に対し耐性を有することを確認した。また、遺伝子調査として、この Maguro-1 菌からプラスミド DNA を抽出及び制限地図の作成、ヒートショック法による大腸菌へのプラスミド DNA の導入を試みた。

微細気泡による排水処理の高効率化に関する研究

- 田辺一平, 細川雄太 (高知工業高等専門学校 専攻科 物質工学専攻)
秦 隆志, 森長久豊, 長山和史, 土居俊房, 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)
吉田正伸, 西内悠祐 (高知工業高等専門学校 電気情報工学科)
大成博文 (徳山工業高等専門学校 土木建築工学科)

現在、下水処理法において主流となっているのは、全国1,000箇所以上の下水処理場で用いられている活性汚泥法と呼ばれるものである。活性汚泥法とは、自然界において日常的におこなわれている微生物による浄化作用を人工的に装置化し、排水処理をおこなうものである。その原理は汚水に対して活性汚泥 (微生物群を主成分とする浮遊性有機汚泥) を混合攪拌し、エアレーション (空気を吹き込む) によって活性汚泥に酸素を供給し、汚水中の有機物や栄養塩類等の汚濁物質を微生物により分解処理するものである。ここで、活性汚泥内の微生物の活性を高めることが出来れば、汚濁物質の分解効率は上昇し、装置の省エネルギー化が見込まれる、そこで本研究では、微生物の活性を助長させる微細気泡 (マイクロバブル) を用いたエアレーション手法の高効率化について検討した。

結果、エアレーション手法の相違による分解効率として、アンモニア態窒素及び亜硝酸性窒素等の窒素除去について微細気泡を用いた場合の方が高い分解能を示した。

軟体動物中枢神経系における一酸化窒素合成酵素の発現解析

徳島文理大学香川薬学部 ○定本久世, 伊藤悦朗

一酸化窒素 (NO) は気体状情報伝達物質としてさまざまな生体反応に関与し, 無脊椎動物の中枢神経系において機能しているとの報告も多い. 軟体動物ヨーロッパモノアラガイ *Lymnaea stagnalis* の中枢神経系では, 唾液腺運動ニューロンが NO を発生し, そしゃくりズムに影響することが分かっている.

一般的に, 脊椎動物の NO 合成酵素 (NOS) は神経型 (nNOS), 誘導型 (iNOS), 血管内皮型 (eNOS) の 3 種に分類される. 特に nNOS はタンパク質相互作用に働く PDZ (PSD-95/Discs large/Zonula-occludens-1) と呼ばれるドメインを持ち, PDZ を介して後シナプス部位に局在する. しかし, 無脊椎動物では PDZ を含む nNOS 遺伝子の単離例はなく, モノアラガイで既に同定されていた 2 種の NOS 遺伝子も PDZ を含まない短いものであった. 近年, 松尾らによって無脊椎動物では初めて PDZ ドメインを有する NOS 遺伝子がナメクジで同定された.

本研究ではモノアラガイ中枢神経系において PDZ を含む nNOS 様遺伝子 (LymNOS3) を同定し, 発現様式について組織学的な解析を行った. まず *in situ* ハイブリダイゼーションにより mRNA 局在を観察した結果, LymNOS3 遺伝子発現は唾液腺ニューロンを含む特定のニューロン群に限られることがわかった. また, NADPH diaphorase 法により NOS 酵素活性分布を解析した. 多くの神経節では神経線維部位のみにシグナルが観察され, シナプス部位に局在するという nNOS の特徴とも一致する結果が得られた.

ヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節神経回路の研究

○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, 上山敬司⁵

(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, 和歌山県立医科大学⁵)

視床下部に摂食中枢および満腹中枢が存在することはよく知られている. 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と考えられる. そこで本研究では, H1 受容体発現ニューロンに注目し, イムノトキシン投与により, このニューロン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 が発現している). マウス脳における H1 受容体の分布を調べたところ, 視床下部の室傍核と腹内側核に非常に強く発現していた. また, この遺伝子改変マウスで IL-2R α の発現を調べたところ, 同様に室傍核と腹内側核に強く発現していた. そこでまず室傍核のニューロンをターゲットとし, その部位にイムノトキシンを微量注入することで, H1 受容体発現ニューロンが死滅することを確認した. 今後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している.

瞬目反射条件付けに対する小脳破壊の効果—ウサギとマウスの差異

○桐野 豊^{1,2}、金子礼奈²、川原茂敬^{2,3}

¹徳島文理大学香川薬学部、²東京大学薬学部、³富山大学工学部

ウサギの瞬目反射条件付けにおいては、条件付けした眼と同側の小脳が、記憶の獲得にも保持にも、必須であることが示されている。しかしながら、マウスにおいては未だ結論が得られていない。本研究において、我々は、C57BL/6マウスを用いて、遅延条件付けの前、あるいは、後に、小脳半球を吸引除去し、あるいは、一側の小脳深部核を電気消却して、それらの条件応答の獲得、あるいは、記憶保持への影響を調べた。

同側、反対側、あるいは両側の小脳深部核あるいは小脳半球を破壊・除去して3日後に遅延条件付けを行ったところ、いずれも条件応答の獲得は有意に障害された。しかしながら、手術の2週間後に遅延条件付けを行ったマウスでは、対象群と同様に条件応答の獲得を示した。これはウサギとは大きく異なる結果である。

十分に遅延条件付けトレーニングを行って学習させたマウスに対して、小脳半球を除去、あるいは、小脳深部核の破壊を行った。2週間の回復後に再び条件付けを行ったところ、記憶が大きく失われていた。しかしながら、再学習トレーニングが進むに連れて、いずれのマウスも条件応答の獲得を示した。

以上より、ウサギと異なって、マウスでは、反対側の小脳半球も学習に重要な役割を果たしていることが示された。また、マウスでは、小脳を全摘出して2週間後には正常な学習を行うことから、速やかに小脳に依存しない学習経路（代償的な経路）が形成されることが示唆された。

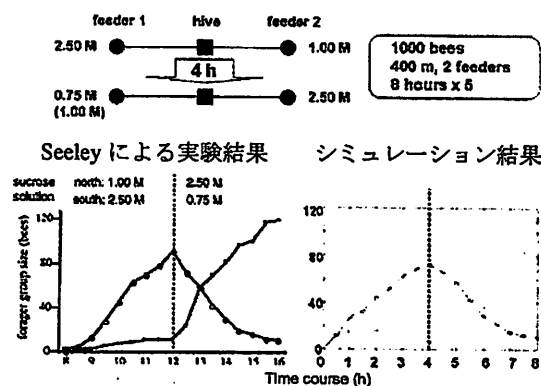
ミツバチの8のダンスによるコロニーの利得：マルコフモデルによる解析

岡田龍一、○伊藤悦朗（徳島文理大学 香川薬学部）

われわれは集団としての「知の機構」を明らかにすることを目標とし、社会性維持のための集団内での「情報の伝搬と共有」のメカニズムについて調べている。

例えば、ミツバチは訪れた花の位置（情報）を、8の字ダンスによって巣内の他のミツバチに伝える。われわれは、この8の字ダンスによるコロニーへの利得を、行動観察の結果を盛り込んだマルコフモデルによるコン

ピュータシミュレーションで調べた。結果、われわれのモデルはミツバチの採餌行動をよく表現できていること、ならびに8の字ダンスによる情報伝達は採餌の効率を上げていることがわかった。さらには、8の字ダンスによって伝えられる情報の誤差が、コロニーに対して適応性を与えていることも示された。



NMRを用いたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の動的構造解析

○和田侑士、村上千穂、古川貴章、堀内裕司、大前英司、月向邦彦、楯 真一
(広島大・院理・数理分子)

ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)のループ上に存在する Gly67 を Val に置換した変異体 G67V が、明らかな酵素反応の変調を示すことを私たちは示した。活性部位の立体構造には変化を与えない遠隔ループの変異が、どのように酵素機能変調を誘導するかは大変に興味深い。私たちは、この酵素機能変調がタンパク質構造に内在する運動性(構造揺らぎ)の変化に由来すると考えた。本研究では、NMR スピン緩和解析を用いて、ループ部変異によりどのように DHFR の内部運動性が変化するかを解析した。

^{15}N 標識した DHFR の各残基 ^{15}N 核スピン緩和解析から、G67V 変異体は $\mu\text{sec}\text{-msec}$ の時間域で野生体とは異なる内部運動性を持つことが明らかになった。G67V 変異体では、酵素活性に関与する FG ループを含む部位が、野生体とは異なる速さの運動性を持つことが分かった。また、同じ速度で運動する部位の分布も両者では異なることも分かった。このことから、活性部位から遠く離れた位置にある柔軟なループに変異を入れることで、立体構造を大きく変えず、タンパク質内部にある協調的内部運動を乱すことで酵素活性に摂動を与えることが明らかになった。

「べん毛フックの長さ制御タンパク質 FliK の構造解析」

○水野 志乃、楯 真一、相沢 慎一 (県立広島大学院・広島大学)

多くの運動性細菌はべん毛と呼ばれるらせん状のフィラメントをもち、それらが東になり回転することで推進力を得ている。べん毛構造は大きく分けて基部体、フック、フィラメントの3つの部位から構成されている。べん毛基部はモーターとして働き、フックは基部とフィラメントをつなぐユニバーサルジョイントとしての役割を担っている。フックは一定の長さに制御されており、最もべん毛構造の研究が進んでいる *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) のフックの長さは約 55nm に制御されている。フックの長さ制御因子として FliK が関与していることが知られているが、その制御機構の解明は未だ不十分である。

FliK は 405 アミノ酸残基からなる分子量 42 kDa の可溶性タンパク質であり、N 端領域と C 端領域の大きく分けて2つのドメインから成っている。FliK の N 端領域はプロリングリシンが豊富であるため、一般的に無構造でひも状に伸びきっているとされているが、バイオインフォマティクスの解析では小さいながら部分的立体構造をもつと予測できる。FliK の N 端領域はその無構造性のため結晶化が困難である。そこで、私たちは NMR 法によって FliK の構造解析を試みた。

アザイド存在下における、光駆動性クロライドポンプのイオン輸送

○宮内正二¹、関顕照²、下野和実¹、菊川峰志²、出村誠²、加茂直樹¹ (松山大学・薬、北海道大学・院理)

【目的】ハロロドプシン(HR)は、高度好塩菌の細胞膜に存在する高等動物の網膜に存在するロドプシンと同様レチナールを発色団とする色素タンパクの一つである。光エネルギーを吸収して、Cl⁻を含む様々なアニオン(Br⁻, I⁻, NO₃⁻, SCN⁻)を細胞外から細胞内へ輸送するアニオンポンプである。一方、弱酸であるN₃⁻存在下では、アニオンを細胞内に取り込むポンプからH⁺を排出するポンプへと変換することが言われている。本研究では、電気生理学的手法を用いてイオン輸送を測定し、N₃⁻によるアニオン輸送からH⁺輸送の変換機構の解明を行った。

【方法】*Natronomonas pharaonis*におけるハロロドプシン(pHR)のORFを組み込み込んだplasmid (pGH19/pHR)を用いてpHRのcRNAを合成した。輸送活性の測定はLEDにより530±18 nmの光を照射し、pHRを介したイオン輸送に伴った光誘起電流を2電極電位固定法により測定した。一方、光励起後のpHRタンパクからのH⁺の取り込み、放出はSnO₂透明電極を用いて測定した。

【結果及び考察】pHR発現卵母細胞では、光照射によりN₃⁻依存的な外向きの電流が発生した。この電流値は光強度及びN₃⁻濃度依存的に増加した。一方、SnO₂電極を用いて測定したH⁺の出入りは、観察されたが、そのpH依存性は実際の電流から求めたイオン輸送のpH依存性と相関しなかった。これより、電気生理から求められたイオン輸送は、H⁺以外のイオンであることが推察された。また、N₃⁻の他、NO₂⁻など酸性アニオンも同様の結果となった。pHRは、様々なアニオンを認識し輸送することから、N₃⁻やNO₂⁻を直接輸送することが推察された。これより、N₃⁻は、pHRをH⁺ポンプへの変換を行っているのではなく、むしろ、直接N₃⁻を認識し輸送していることが示唆された。

*Halobacterium salinarum*に存在する光センサータンパク質センサーロドプシンIIの光化学反応サイクル

○田母神淳^{1,2,3}、菊川峰志²、池田陽一³、竹村朱加³、出村誠²、加茂直樹^{1,2,3}

(¹松山大・薬、²北大・生命科学院、³北大院・薬)

古細菌である高度好塩菌 *H. salinarum* の細胞膜には、細菌の負の走光性に関わる光受容タンパク質センサーロドプシンII (HsSRII または、フォボロドプシン (pR)) が存在する。HsSRII は、生菌中における発現量の低さやタンパク質の安定性の低さなどの問題から、その分子メカニズムについて詳細な研究は進んでいない。今回、我々は HsSRII の大腸菌でのタンパク質発現および精製タンパク質の脂質への再構成により、測定に十分な量の試料調製と幅広い pH、温度条件下での HsSRII の安定性維持に成功した。また、様々な条件下における HsSRII の光化学反応機構について詳細な知見を得ることができたため、その成果について報告する。

HsSRII をはじめとする古細菌型ロドプシンは、全トランス型レチナールを発色団として有し、光照射により、レチナールの光異性化をトリガーとする光化学反応サイクル(フォトサイクル)を示すことで、それぞれの機能を発現することが知られている。従って、フォトサイクルを明らかにすることは、そのタンパク質の機能メカニズムを理解する上で重要である。今回、我々は、フラッシュ・フォトリシス法を用い、幅広い pH、温度条件下における測定から、HsSRII の常温でのフォトサイクルスキームを明らかにした。本発表では、それらの結果をもとに HsSRII の機能メカニズムについて議論したい。

ホヤ幼生の脳胞における視覚サイクル機能分子の局在

滝本紀子、日下部 岳広*、○津田基之**

兵庫県立大学生命理学研究科、*甲南大学理工学部生物学科

**徳島文理大学香川薬学部

視覚は網膜の視物質ロドプシンが光を受容して、視細胞内の情報伝達系が駆動して成立する。ロドプシンの発色団 11-シス型レチナールは光受容により全トランス型に異性化後、オプシンタンパク質とレチナールに分解する。従って、視覚を維持するためには全トランス型レチナールを 11-シス型レチナールに再異性化してロドプシンを再生する仕組みが存在しこれを視覚サイクルという。本研究で視覚サイクルにおける、レチナールの再異性化の分子メカニズムを明らかにする目的でヒトのモデル動物としてその最も原始型である脊索動物ホヤを用いる。ホヤではヒトの光異性化酵素の RGR のホモログ遺伝子 *Ci-opsin3*、暗異性化酵素 RPE65、BCO のホモログ *Ci-RPE65*、*Ci-BCO* があり、抗体を用いてそれらの脳胞における局在を明らかにし、視覚サイクルにおける機能を考察する。

クロマチンリモデリングタンパク質のリン酸化による構造機能制御機構の解明

○橋本 愛美、松井 理恵子、上脇 隼一、楯 真一（広島大・院理・数理分子）

クロマチンリモデリング因子である FACT は、SPT16 と SSRP1 のヘテロ 2 量体で構成されるタンパク質複合体である。FACT は、ヒストン H2A/H2B 2 量体を脱離させることでヌクレオソーム構造を変化させ、ヌクレオソームに巻き取られた DNA に対して RNA ポリメラーゼ II による転写を促進する。SSRP1 は DNA 結合ドメインである HMG-Box を介してヌクレオソームと結合する。SSRP1 HMG-Box の N 端側には単独では特定の立体構造を保持しない 2 つの天然変性領域 (intrinsically disordered region)、acidic ID (AID) と basic ID (BID) をもつ。AID は細胞内でリン酸化を受けることで、BID-HMG 部に対する分子内相互作用が強くなり、HMG を介した FACT の DNA に対する相互作用を自己阻害する機構があることを私たちは明らかにしてきている。

本研究では、AID リン酸化により AID と BID-HMG の相互作用がどのように変化し、それがどのような機構で FACT の DNA 結合能制御につながるか、NMR による相互作用解析により明らかにした。その結果、AID リン酸化前後で AID の BID-HMG に対する結合部位には変化がない一方で、AID がリン酸化されることで AID 上の HMG 結合部位が増えることが分かった。このことは、リン酸化により AID 上の HMG 結合部位が増えることで AID の HMG との複合体形成率を上げ、HMG を介した DNA との結合能を低下させる自己阻害機構があることを示す。

べん毛フラジェリンの異種間における互換性

○稲葉 敏、橋本愛美、相沢慎一（県立広島大学）

バクテリアの運動器官「べん毛」は、1 種類の構成タンパク質フラジェリン (FliC) がらせん状に重合した管状繊維 (フィラメント) である。菌体内から分泌されたフラジェリンはフィラメントの内部を通り、先端でキャップタンパク質 (FliD) の助けにより既存のフィラメントの先端に積み重ねられていく。FliD がないと FliC はモノマーとして培地に放出される。

フィラメントはらせんの大きさなどにより 3 つのグループ (Family I ; 周毛性, Family II ; 側毛性, Family III ; 極毛性) に分類することができるが、この Family を分類するための特徴的な配列はいまだ解明されていない。そこで、今回フィラメント形成を維持するためにどの程度 FliC と FliD の組み合わせ重要かを調べるため、Family I と Family II の異種間のバクテリアの FliC/FliD をそれぞれ交換する実験を行った。サルモネラ菌 (*Salty*; Family I) と大腸菌 (*E. coli*; Family I)・緑膿菌 (*Pseae*; Family II) 間で FliC/FliD を交換した。FliC 交換の結果、*Salty* Δ *fliC* 株に *E. coli* *fliC* を導入した株では短いフィラメントが形成されたが、*Pseae* *fliC* を導入した株ではフィラメントが形成されなかった。一方 FliD を交換した結果、*Salty* Δ *fliD* 株に *E. coli* *fliD*・*Pseae* *fliD* をそれぞれ導入した株では、*Salty* FliC の短いフィラメントが形成された。

以上の結果をまとめると、同種間の *fliC* 交換では、泳げるほど安定した構造ではなかったがフィラメントは構築された。一方、異種間の *fliC* 交換ではフィラメントは構築されなかった。また *fliD* 交換では Family によらず短いフィラメントが構築された。このことから、フィラメント構築および Family 決定には FliC が重要であり、FliD は補助的な役割しかしていない事が確認された。