

う現象と一致している。一方、PGC1 α 過剰発現細胞ではグルタミン酸量は増加せず、アラニンが増加した。BCATによってBCAAから産生したアミノ基がピルビン酸に転移されアラニンができたためかもしれない。PGC1 α Tgマウスではアラニンは増加していない。これはPGC1 α Tgマウスでは解糖系の遺伝子発現が低下しているため、基質であるピルビン酸が少ないためであるかもしれない。また、動物では細胞と異なり、血流を通じて他の臓器に運搬されて利用されるためかもしれない。

3. 運動により誘導されるPGC1 α とBCAA代謝

持久的運動トレーニングは、骨格筋において筋線維タイプの変化、ミトコンドリア生合成、血管新生、他の適応的な変化を起し、げっ歯類とヒトの両方でインスリン感受

性そして代謝の能力を改善する。PGC1 α mRNAとタンパク質の発現は持久運動によく応答するので、PGC1 α の発現増加は骨格筋適応にとって役割を果たしているようである。運動はエネルギー消費を増加させ、結果としてアミノ酸の異化一般、特にBCAAの酸化を促進させる。これらの知見と一致して、持久運動はヒトとラットの骨格筋においてBCKDHの複合体を活性化し、BCAA分解を増加させることが報告されている。骨格筋におけるBCAA代謝の活性化は、PGC1 α を介したミトコンドリア機能の増加に関与する運動トレーニングの応答のひとつかもしれない。すなわち、考え合わせると、運動によって生じるBCAAの分解はPGC1 α の発現増加を介している可能性を示唆する。

超好熱アーキア由来酵素の活性化に対するシャペロンの影響の解明

長崎大学大学院工学研究科 郷田秀一郎

1. 序 論

好熱及び超好熱アーキア由来グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は大腸菌を宿主に用いて生産させると、ほとんど活性を示さない形で得られ、加熱することによって天然由来のものと同程度の活性を有するまでに活性化されることが幅広い種で報告されている¹⁾。種によっては活性化に伴って不活性な単量体が六量体を形成することや²⁾、不活性な六量体の四次構造のアレンジメントが変化することが報告されている³⁾。これら活性化に伴う酵素活性や立体構造変化に関する報告はされているが、ほとんど活性を示さない形で生産される原因については、まったくわかっていない。受領者は高温環境が活性に重要な役割を果たしていると考え、活性型酵素を変性剤によって変性させ、低温環境下でリフォールディングを行ったが、得られた酵素は活性型であり、低温環境でも活性型に折りたたまれた。また、大腸菌体内の還元的な環境が影響しているとも考え、大腸菌セルフリー生産系で生産を行ったが得られた酵素は不活性型であり、菌体内であれ、セルフリーであれ不活性型として生産された。これらのことから、タンパク質の立体構造形成で律速段階として知られているプロリンの異性化及び構造形成を助けるシャペロンの存在が不活性型としての生産に影響しているのではないかと考え、研究を行った。

2. 方 法

プロリンの異性化反応およびシャペロン活性、及び超好熱菌と大腸菌の種の違いを考え、用いるシャペロンには超好熱菌由来FK506 binding protein (FKBP)を用いた。FKBPは海洋研究開発機構、丸山先生から恵与されたものを用いた⁴⁾。シャペロン活性およびプロリン異性化活性に着目し、*Thermococcus* sp. KS-1由来(TcFKBP)および*Pyrococcus horikoshii*由来(PhFKBP)の2種の超好熱菌由来のFKBPを用いた。2種の違いはプロリン異性化活性の強さであり、TcFKBPは高いプロリン異性化活性を有している。大腸菌体内での生産中のFKBPの効果を調べるために、大腸菌体内でGDHとFKBPの共発現を行った。GDHには超好熱アーキア*Pyrobaculum islandicum*由来(Pis-GDH)のものを用いた。

3. 結果および考察

恵与されたFKBPをコードする遺伝子を含むプラスミドから、目的タンパク質をコードする部分をPCRによって増幅し、pACYC184ベクターに挿入した。Pis-GDHはpET-11aに挿入されているものを用いた。Pis-GDHの培養は、TcFKBP、PhFKBPおよびコントロールとしてそれらをクローニングしたpACYC184ベクターをPis-GDHと共発現して行った。得られたPis-GDHは、色素を吸着させた樹脂であるRed-sepharose、陰イオン交換カラムResource Qおよびゲルろ過クロマトグラフィーSuperdex200でSDS-PAGEで単一のバンドを示すまでに精製を行った。培養後の大腸菌の菌体湿重量および生産されたPis-GDHの総活性は、これら3条件で大きな違いは見られず、生育状態や生産量によって影響は受けていないものと

表1 各シャペロンと共発現したPis-GDHの酵素活性

	比活性 (U/mg)	
	非加熱	加熱後
TcFKBP	1.86	3.48
PhFKBP	0.392	2.98
pACYC184	0.107	3.54

加熱は90℃で15分間

考えられた。精製後の酵素活性を表1に示した。これらの比活性は基質としてグルタミン酸を用い、補酵素NADがNADHになる際の340 nmの値の変化から生成量を見積もった。測定は50℃で行った。

これらの結果から、精製後のPis-GDHの加熱による活性化はTcFKBP, PhFKBP および pACYC184 では、それぞれ1.9倍、7.6倍、33倍となった。加熱後の比活性に大きな違いが見られないことから、FKBPを共発現させたものでは非加熱状態での比活性が比較的高くなっていることが明らかとなった。加熱後の活性を100%として非加熱状態の活性を表したものを図1に示す。これらのことから、FKBPを共発現することによって、大腸菌で生産された状態での活性が比較的高く、FKBPの中でもTcFKBPの方が高い活性を示した。このことから、大腸菌体内での超好熱アーキア由来グルタミン酸脱水素酵素活性にはシャペロンが影響しており、なかでもプロリン異性化酵素活性が大きく寄与していることが明らかとなった。

今後は、それぞれの共発現を行ったPis-GDHの構造に関する測定を行う予定である。

謝 辞

最後に本研究にご理解とご援助を下さいました財団法人

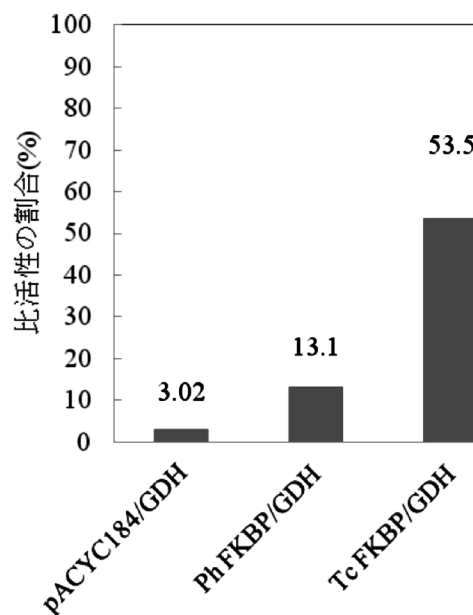


図1 加熱後の活性を100%とした時の非加熱状態時の比活性の割合

農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。また、ともに実験を行った共同研究者の方々にも厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 郷田秀一郎, 櫻庭春彦, 大島敏久 (2009) 大腸菌で生産される超好熱菌由来の不活性型グルタミン酸脱水素酵素の活性化機構, 生化学, **81**, 1049-1055.
- 2) J. DiRuggiero, & F. T. Robb (1995) *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 159-164.
- 3) S. Goda, M. Kojima, Y. Nishikawa, C. Kujo, R. Kawakami, S. Kuramitsu, H. Sakuraba, Y. Hiragi, & T. Ohshima (2005) *Biochemistry*, **44**, 15304-15313.
- 4) A. Ideno, & T. Maruyama (2002) *Gene*, **292**, 57-63.

イネいもち病菌に対するイネ由来新規生理活性物質の探索

東京理科大学理工学部応用生物科学科
嘱託助教 成川(奈良) 恵

研究背景・目的

イネの三大病害の一つであるイネいもち病は、イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって起こり、イネの苗代期から出穂後まで各期を通じて発生し、イネの成長やコメの収穫に甚大な被害を及ぼすことが知られている。これまでイネいもち病菌はイネの地上部に感染し病害を引き起こすと考えられてきたが、近年同菌がイネやムギ類の根に

感染する能力を持つことが明らかになった。ただし、自然条件下で同様の現象が起こっているのか、また起こっているならば好気性菌であるイネいもち病菌が土壌中でどのように植物体に到達するかは全く明らかになっていない。

また、感染成立後、イネ根中で成長しているイネいもち病菌の菌糸は、イネ地上部中で成長する菌糸と異なり、きれいな円柱状に成長しかつ分岐がほとんどみられないことが明らかとなっている。さらに、イネいもち病菌のイネ地上部への感染機構とイネ根への感染機構が異なることや、イネいもち病菌の感染時にイネにおいて発現する応答遺伝子群が地上部と根で異なること、イネ根中では宿主であるイネの細胞死を引き起こさないことなどから、イネいもち病菌はイネの各組織を判別する能力を有しており、宿主の