

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658066

研究課題名（和文）：プラズマローゲン含有口腔内細菌を駆使した認知症予防戦略

研究課題名（英文）：Prevention of Alzheimer disease by oral bacteria having plasmalogen phospholipid

研究代表者：

神尾 好是（KAMIO YOSHIYUKI）

東北大学・大学院生命科学研究科・客員研究員

研究者番号：00109175

研究成果の概要（和文）：

ヒト認知症防御リン脂質プラズマローゲン(Plasmalogens; 以降PIs)が本研究代表者らによりヒト口腔内細菌*Selenomonas sputigena*に発見された。我々は、アルツハイマー型認知症(AD)患者脳内でPIsが減少するという知見から、ADの発症に関わるアミロイドβタンパク質(Aβ)を生産する膜酵素γ-セクレターゼ(γS)の活性に、膜のリン脂質組成にPIsの存在が関与を検討した。酵母のミクロソーム膜面分を利用したγSの*in vitro*アッセイ系を駆使してPIsとγS活性との関係を以下のことを明らかにした。(1)フォスファチジルコリン(PC)はAβ活性を高める。(2)PCとPL型フォスファチジルエタノールアミン(EPIs)の混合脂質での再構成実験から、PEの割合が高くなるとγS活性が極めて強く抑制される。以上のことから、我々は、AD患者脳内でγSが存在する膜系のEPIsの割合が減少したことでγS活性が亢進し、Aβの産生および蓄積が促進された可能性があるかと結論した。以上の発見は世界で初めてである。

研究成果の概要（英文）：We found plasmalogen phospholipids (PIs), which are known to prevent Alzheimer disease (AD), in a human oral bacteria, *Selenomonas sputigena*. It has been known that PIs decrease in brain of AD patient. γ-Secretase (γS) is known to cleave amyloid precursor protein to produce amyloid β peptides (Aβ) that is deposited in the brain of Alzheimer disease. Here we examined a relationship between phospholipid composition and production of γ-secretase in human brain, by *in vitro* assay system using *Saccharomyces cerevisiae*, which was established by Futai et al. The followings are evident, (1) Aβ-production is enhanced by the addition of phosphatidyl choline (PC), and (2) addition of phosphatidyl ethanolamine PIs (EPIs) to *in vitro* assay system prevented γS activity. Thus we concluded that the reduction of EPIs in the phospholipid fraction in human brain enhances the γS activity and causes Aβ-production and/or accumulation in AD patient. This is a first report in the world.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：プラズマローゲン，認知症予防、口腔内細菌， γ セクレターゼ， β アミロイド

1. 研究開始当初の背景：

プラズマローゲン (Pls) は哺乳動物の脳、心筋細胞をはじめ、動物や一部の嫌気性細菌に存在するが、その生合成経路や生理機能は不明な部分が多い。Pls は細胞膜構成リン脂質のひとつであることから、細胞膜酵素に対して何らかの役割を担っていると考えた。本研究代表者らはアルツハイマー型認知症 (AD) 患者脳内で Pls が減少するという知見から、AD の発症に関わるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) を生産する膜酵素 γ -セクレターゼの活性に、膜のリン脂質組成および Pls の存在が関与すると予想した。これを明らかにできれば、AD の発症機構の一端を明らかにできる。

2. 研究の目的

Pls の新たな生理機能の解明を目的として、 γ -セクレターゼをモデルとして Pls を含む膜リン脂質の組成が本酵素に与える影響を解析した。今回、 γ -セクレターゼおよび基質を酵母マイクロソームで発現させ、脂質で再構成した無細胞アッセイ系を導入し膜脂質組成の影響を評価した (Yagishita *et al.*, 2008)。その結果、生体膜におけるプラズマローゲン型リン脂質の存在が、膜酵素の活性に影響することを見いだした。さらに、細菌由来の Pls も同様の現象を起こすことを見だし、細胞膜における Pls の存在意義について考察した。

3. 研究の方法：

(1) γ -セクレターゼ複合体および基質を共発現する酵母の作製： γ -セクレターゼアッセイに用いる酵母マイクロソームは、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) PJ-69-4A Δ PEP4 株 (遺伝子型：*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4D*, *gal180D*, *GAL2-ADE2*, *LYS2::-* *GAL1-HIS3*, *met2::GAL7-lacZ*, *pep4::kanMX*) を形質転換して得られた、 γ -セクレターゼ複合体 (Presenilin, Nicastrin, Aph-1, Pen-2) と基質 C55 または C99 を共発現する株を用いて調製した (Futai *et al.*, 2009)。酵母の形質転換は、酢酸リチウム法によって行った。

(2) 酵母の培養及び酵母の調製：SD-LWU

培地を用いて行った。前培養液は $OD_{600} = 1.0$ を超えるまで、約 24 時間培養した。本培養は、前培養液を本培養用培地 2 L に、培養開始時の $OD_{600} = 0.01$ となるように植菌し 16 ~ 18 時間振盪培養した。 OD_{600} が 1.0 ~ 1.5 に達した後、4 $^{\circ}C$ 、4,500 $\times g$ で 5 分遠心集菌した。

(3) γ -セクレターゼアッセイに使用する酵母マイクロソーム画分の調製：基本的なプロトコールは Futai らの方法 (Y. Futai *et al.*, 2009) に従い、適宜改良して行った。

(4) γ -セクレターゼアッセイ (再構成プロテオリポソーム法)：再構成プロテオリポソームを用いた $A\beta$ 産生反応は次のように行った。すなわち 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブに、タンパク質重量で 40 μg または 80 μg を含む酵母マイクロソーム画分に γ バッファーを加えて合計 12.5 μl とし、2% CHAPSO / γ バッファーを 12.5 μl 加えてボルテックスで混ぜ、氷中に置いた。その後、1% 脂質溶液または 1% CHAPSO / γ バッファーを計 20 μl 加え、ボルテックスで混和した。さらに γ バッファー 135 μl を添加してボルテックスし、CHAPSO 濃度を臨界ミセル濃度 (0.25%) 以下に希釈した。この状態で、添加した脂質によって再構成されたプロテオリポソームとなる。調製した反応 mixture (180 μl / 1.5 ml tube) は、以下のようにして 37 $^{\circ}C$ で 24 時間インキュベートし、添加した脂質組成で包埋された γ -セクレターゼと基質を反応させた。再構成プロテオリポソームは、まずブロックインキュベーターで 37 $^{\circ}C$ で 10 分間インキュベートした後、気相インキュベーターに移して 37 $^{\circ}C$ で 24 時間インキュベートした。また、調製後すぐに -80 $^{\circ}C$ のフリーザーに入れたものを未反応 (0 時間インキュベート) サンプルとし、次の作業まで 24 時間保存した。

24 時間インキュベート終了後、以下の操作で反応産物であるアミロイド β ペプチドを含むタンパク質画分を抽出した。なお、24 時間インキュベート終了に合わせて 0 時間サンプルも -80 $^{\circ}C$ フリーザーから取り出し、溶解した。これらプロテオリポソームのサンプルにクロロホルム：メタノール (2 : 1, v / v) を 0.5 ml 入れ、フタをしてすぐにボルテックスで激しく攪拌した。この時、チ

ューブ内の液全体が 2 層に分離することなく均一に白濁したことを確認した。これを室温で 30 分間放置した後、マイクロチューブ用遠心機で約 5 ~ 10 秒室温で遠心し、タンパク質を上層と下層の界面に凝縮させた。これにメタノール 0.9 ml を加え、フタをして 2 層に分離していた溶液が完全に 1 層となるまで手で穏やかに混和して、タンパク質を沈殿させた。これを 4 °C、18,000 × g で 25 分間遠心しペレットを得た。次にペレットにクロロホルム:メタノール:MilliQ 水 (1 : 2 : 0.8, v / v / v) を 0.5 ml 加えてボルテックスし、ペレットを洗浄した。これを 4 °C、18,000 × g で 25 分間遠心し、沈殿を回収した。ペレットに 2 × サンプルバッファー (2-メルカプトエタノール添加) を 20 μl 加え攪拌した。その後、100 °C で 10 分間ボイルした。ボルテックスで攪拌し、最後にもう一度軽く遠心して SDS-PAGE 用サンプルとした。

(5) アクリルアミドゲルを用いた

Tris-Tricine PAGE による全 Aβ の解析:

16.5 % ポリアクリルアミドゲルにより、SDS 化したサンプル (20 μg) アプライした。電気泳動終了後、ゲルをウエスタンブロッティングに供した。Aβ の検出は、抗 Aβ 抗体によるウエスタンブロッティングにより検出した。バンドの強度の定量化は、Multi Gauge Version 3.11 で行った。

(6) γ-セクレターゼアッセイに使用した脂質:市販品としてホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM)、ホスファチジルエタノールアミンプラズマローゲン (PEP1s)、ホスファチジルコリンプラズマローゲン (PCP1s) を使用した。それぞれの詳細は表 2-36 にまとめた。クロロホルムに溶解してあるものはそのまま、それ以外は指示された溶媒に溶解して、-20 °C で遮光保存した。

(7) γ-セクレターゼアッセイに用いる脂質サンプルの調製:γ-セクレターゼアッセイには、1 % CHAPSO を含む γ バッファーに脂質を濃度 10 mg/ml (1 %) となるように分散したものを使用した。

(8) アミロイド β (Aβ) スタンダードの調製:アミロイド β (Aβ) のスタンダードとして、Aβ40 [Amyloid β-Protein

(Human, 1-40)] (ペプチド研究所、4307-v)、Aβ42 [Amyloid β-Protein (Human, 1-42)] (ペプチド研究所、4349-v)、Aβ43 [Amyloid β-Protein (Human, 1-43)] (ペプチド研究所、4370-v) を使用した。スタンダードの調製法は、上記の合成 Aβ の入ったバイアル瓶に、DMSO (原液) を Aβ の濃度が 1 mg/ml となるように加えた。これに DMSO (原液) 998 μl と各種 1 mg/ml Aβ 溶液 2 μl をそれぞれ入れて十分に混和した (2 μg/ml = 2 ng / μl Aβ 溶液)。さらにこれを 2 × サンプルバッファー + 2-メルカプトエタノールを 200 μl 入れて十分に混和した。これを 95 °C で 10 分間煮沸した。Aβ 溶液は -20 °C で保存した。

(9) 大腸菌発現系による lyticase (粗酵素液) の調製:γ-セクレターゼアッセイに使用する酵母マイクロソームの調製には、大腸菌で発現させた lyticase を調製して使用した (Futai, J. Biol. Chem., 284, 13013-13022 (2009))。

(10) 浸透圧ショック法による lyticase (粗酵素液) の調製:lyticase 遺伝子を形質転換させた大腸菌を IPTG 誘導後、集菌した。次に、浸透圧ショックにより lyticase を含むペリプラズム画分を回収した。

(11) Lyticase の活性測定:Lycticase の活性測定に使用する酵母は、出芽酵母 PJ69-4A 株を使用した。酵母培養液 (OD₆₀₀ = 1.39) を 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブに 0.6 ml ずつ 6 本分注し、4 °C、18,000 × g で 3 分遠心集菌した [遠心機、MRX-150 (TOMY); 15,000 rpm]。上清を除き、これに 1 × assay buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、40 mM 2-メルカプトエタノール] (用時調製) を 1 ml、lyticase 液を 0、10、20、30、40、50 μl ずつ添加し、混和した。ウォーターバスで 30 °C で 30 分間インキュベート後、OD₆₀₀ を測定し、lyticase 添加量が 0 μl のサンプルの OD₆₀₀ の値を基準として、次式により、各サンプルの測定結果をもとに lyticase の unit を算出した。なお、1 unit はサンプルを 30 °C で 30 分インキュベートした後の OD₆₀₀ の値を 10 % 減少させる量と定義し、lyticase 液 1 ml あたりの unit を算出した。

unit = { 100 - (各サンプルの OD₆₀₀ 値 / lyticase 0 μl の OD₆₀₀ 値 × 100) } ÷ 10

4. 研究成果:

(1) 膜脂質による γ -セクレターゼアッセイ:

はじめに、生体膜に含まれる種々の膜脂質が、膜酵素 γ -セクレターゼのアミロイド β (以下、 $A\beta$ と呼ぶ) 産生活性にどのような影響を与えるのかを検討した。

実験は、Yagishita らの系 (Yagishita *et al.*, 2008) を用い、基質 C55 と γ -セクレターゼ複合体を共発現させた酵母マイクロソーム画分のリン脂質を、任意のリン脂質で置き換えた再構成プロテオリポソームを作製し、再構成された脂質環境におけるアミロイド β ペプチドの産生量をモニターすることで γ -セクレターゼ活性への影響を検証した。具体的には再構成プロテオリポソームを 37 °C で 24 時間反応させた後、有機溶媒で再構成プロテオリポソーム中の脂質を抽出・除去することで酵素反応を停止し、反応系からタンパク質画分を調製して、抗 $A\beta$ 抗体を用いたウエスタンブロットティングによって全 $A\beta$ 産生量を解析した。置換するリン脂質としては、ヒト細胞の主要な生体膜脂質であるホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM)、ミトコンドリアや原核生物の細胞膜を形成するホスファチジルグリセロール (PG)、およびプラズマローゲンとしてホスファチジルエタノールアミンプラズマローゲン (PEP1s)、ホスファチジルコリンプラズマローゲン (PCP1s) を用いた。これらを単独で、あるいは組み合わせるリポソーム形成に用いた。

本実験では、調製した酵母マイクロソームを通常タンパク質量で 40 μg 含む反応系に 100 μg のリン脂質を添加して再構成した。このリン脂質の量がマイクロソーム由来のリン脂質を完全に置き換えるか検証するため、今回調製したマイクロソーム画分におけるリン脂質を定量した。その結果、酵母マイクロソームのタンパク質 1 μg あたりのリン量は 0.0094 μg と算出された。酵母マイクロソーム膜の脂質組成を PC : PE = 7.3 とし、それぞれのリン脂質分子量として Avanti の鶏卵由来 PC (MW = 770.123)、PE (MW = 746.608) を使用して換算すると、リン 0.0094 μg にあたるリン脂質量は約 0.23 μg となる。従って実験系に用いるタンパク質 40 μg あたりで

は約 9.2 μg となり、再構成の反応系に加えるリン脂質 100 μg はその 10 倍にあたるため、十分に置き換えられると判断した。

酵母マイクロソームの脂質を PC のみで置き換えると γ -セクレターゼ活性が亢進することが知られている (Yagishita *et al.*, 2008)。そこで PC のみで置換して上昇した活性を基準とし、PC 以外のリン脂質を添加して γ -セクレターゼ活性への影響を調査した。その結果、 γ -セクレターゼ活性は PE 添加によって強く抑えられた。PC : PE の比を 10 : 0、9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5 と段階的に変化させたところ、アミロイド β ($A\beta$) 産生量は PC : PE = 7 : 3 までは減少し、PC : PE = 6 : 4 と 5 : 5 では検出されなかった。そこで、各リン脂質間の γ -セクレターゼ活性抑制効果を比較するにあたり、産生した $A\beta$ の定量が可能で、かつ抑制効果が確実に検出できる混合比として PC : 各リン脂質 = 80 : 20 の条件を採用した。

PC : PE、PC : PEP1s の全 $A\beta$ 産生量減少は大きく、それぞれ PC 24 h の 32.6 %、30.2 % であった。一方、PC : PG、PC : SM、PC : PCP1s を含む系では、PC 24 h と比較して全 $A\beta$ 産生量の有意な減少は見られなかった。以上の結果は、 γ -セクレターゼを包埋するリン脂質中の PE および PEP1s の存在が、強い γ -セクレターゼの $A\beta$ 産生活性抑制効果を持つことを示している。

一方、プラズマローゲン型脂質の影響は、PC : PCP1s は PC 24 とほぼ同じ全 $A\beta$ 産生量であったのに対し、PC : PEP1s の全 $A\beta$ 産生量は PC : PE の 92.6 % にあたり、わずかに低かった。

(2) PE と PEP1s の比の γ -セクレターゼ活性に対する影響:

ここまで PE および PEP1s が強い γ -セクレターゼの $A\beta$ 産生活性抑制効果を持つことを見いだした。その際、PEP1s は PE に比べて γ -セクレターゼ活性の抑制効果が高い傾向が見られた。今回使用した市販の牛脳由来 PEP1s 標品 (LFC、39-0200) は、PEP1s と PE の混合物であり、全体の 60 % が PEP1s、40 % が PE である。これより、エタノールアミン型リン脂質による γ -セクレターゼ活性の抑制は、酵素複合体が包埋されている膜脂質における PE と PEP1s の比によって変化すると予想した。そこで PC と PE または PEP1s の量比を変化させ、 γ -セクレターゼ

活性抑制効果を詳細に解析した。まず、 γ -セクレターゼ複合体と基質として C55 およびより本来の APP の β セクレターゼ分解物に近い C99 を共発現する酵母ミクロソーム画分を用い、再構成するリン脂質の PC : PE あるいは PEP1s の比率を 90 : 10 から 70 : 30 まで変化させ、 $A\beta$ 産生に対する影響を検討した。いずれの APP 基質を用いた場合も PC に PEP1s 標品を添加したリン脂質で再構成した場合、PEP1s 標品の添加量が増加するに従い、 $A\beta$ 産生量は低下した。一方、PE を添加した場合、 $A\beta$ 産生は減少するが PEP1s に比べ高い添加量が必要であった。例えば、PC : PE = 80 : 20 の系では C55、C99 のいずれの場合にも PC 24 h に比べ有意な全 $A\beta$ 産生量の減少は見られなかったのに対し、PC : PEP1s = 80 : 20 の系では、C55、C99 とも、PC 24h および PC : PE = 80 : 20 に比べ、全 $A\beta$ 産生量は有意に減少した。これは、同じ割合で PE 型リン脂質を含む PC との混合リン脂質で再構成した場合、PE 型リン脂質に PEP1s を含む場合に、より強い γ -セクレターゼ活性抑制効果があることを示している。

(3) PE 型リン脂質における PEP1s 含量の γ -セクレターゼ活性抑制に対する影響 :

前述の通り、PEP1s を含む場合に、より強い γ -セクレターゼ活性抑制効果があることを明らかにしたが、次に PC : エタノールアミン型リン脂質の比を 80 : 20 とし、エタノールアミン型リン脂質の中の PE と PEP1s の比を変化させ、 γ -セクレターゼ活性抑制効果を検討した。ここでは、基質 C55 を用い、卵由来の PE およびウシ脳由来の PEP1s 標品を用いて PC : PE : PEP1s = 80 : 20 : 0、80 : 12 : 8、80 : 8 : 12 となるように混合したリン脂質で再構成したプロテオリポソームでの $A\beta$ 産生量の変化を検討した。その結果、エタノールアミン型リン脂質を加えた場合、PC 24 h に比べ、いずれも $A\beta$ 産生は有意に減少した。さらに、PEP1s を含む方が高抑制効果を示すことは、これまでの結果を支持するものである。さらに PC : PE : PEP1s = 80 : 12 : 8 の場合に対して PC : PE : PEP1s = 80 : 8 : 12 で全 $A\beta$ 産生量が約 66 % に有意に減少していることは注目すべき点である。

(4) $A\beta$ 分子種の解析 :

これまでの結果から、エタノールアミン型

リン脂質、特に PEP1s は γ -セクレターゼによる $A\beta$ 産生を有意に抑制することを見いだした。先に $A\beta$ には複数の分子種があると述べたが、PE および PEP1s による抑制が特定の分子種の産生を抑えている可能性がある。そこで 8 M 尿素を含むポリアクリルアミドゲルを用いて、Tris-Tricine SDS-PAGE を行い、産生された $A\beta$ 40、42、43 の 3 つの分子種の分離を試みた。基質は C 55 を用い、2.3.2 と同様に PC と PE あるいは PEP1s の量比を変化させて再構成したプロテオリポソームで産生した $A\beta$ 分子種を解析した。この条件では、 $A\beta$ は分子量と逆転して泳動され、泳動の先端に近いところに基質 C55 が、それから上に向かって $A\beta$ 43、42、40 の順で検出される。 $A\beta$ 40 は PE / PEP1s の増加に伴いバンド強度は明らかに低下した。基質 C55 と $A\beta$ 43、42 の位置が近く、C55 のバンドのテーリングがあるために $A\beta$ 43、42 の定量は困難であったが、これら分子種のバンド強度の減少する傾向が見られた。すなわち、PEP1s の含量が増えると、特定の $A\beta$ 分子種のみが優先的に減少することはなく、全 $A\beta$ が減少すると結論した。

(5) *Selenomonas* 由来 PEP1s を含むリン脂質画分による γ -セクレターゼアッセイ :

これまでの牛脳由来 PEP1s 標品および卵由来の PE を用いた解析から、PE / PEP1s によって γ -セクレターゼ活性が抑制されることを明らかにしてきた。これらはいずれも真核生物由来の炭素数偶数の尾部を持つ。一方、*S. ruminantium* の内膜のリン脂質組成は PE を主成分とし、PEP1s を豊富に含む。さらに、P1s 含量 (A / P 比) および尾部の炭素数が培養条件によって異なるという特徴がある。そこで PEP1s の分離源を問わず γ -セクレターゼの活性の抑制効果があるのかを、*S. ruminantium* 由来の内膜リン脂質画分を用いて検討した。本菌体由来のリン脂質画分を用いて、PC : *S. ruminantium* 由来リン脂質画分の混合比を段階的に変えた脂質で再構成したプロテオリポソームを用いた結果 PC : *S. ruminantium* 由来リン脂質画分 (70 : 30) の系において、PC 24 h と比較して有意に全 $A\beta$ 量が減少した。さらに、より P1s 含量の多い (A/P 比が高い) TYL+Bio 培養の内膜リン脂質画分で、全 $A\beta$ 量がより減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- (1) Kojima S., J. Kaneko, N. Abe, Y. Takatsuka and Y. Kamio. Cadaverine covalently linked to the peptidoglycan serves as the correct constituent for the anchoring mechanism between the outer membrane and peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*. J. Bacteriol. 193:2347-2350 (2011). (doi:10.1128/JB.00022-11)
- (2) Kojima S. and Y. Kamio. Molecular basis for the maintenance of envelope integrity in *Selenomonas ruminantium*: Cadaverine biosynthesis and covalent modification into the peptidoglycan play a major role. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 58:153-160 (2012) (査読有) (doi なし)
- (3) 児島征司、神尾好是、偏性嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* の表層膜安定化機構—細胞壁結合型カダベリンの分子機能並びにその合成・制御系—, ビタミン, 86:1-12. 2012. (査読有) (doi なし)
- (4) Tomita, N, K. Abe, Y. Kamio, and M. Ohta. Cluster-forming property correlated with hemolytic activity by staphylococcal γ -hemolysin transmembrane pores. FEBS Letter. 585, 2452-2456 (2011). (doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.041).
- (5) Yamashita, K, Y. Kawai, Y. Tanaka, M. Hirano, J. Kaneko, N. Tomita, M. Ohta, Y. Kamio, M. Yao, and I. Tanaka. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ -hemolysin reveals the β -barrel pore formation mechanism by two components. Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 108, 17314-17319 (2011). (doi: 10.1073/pnas.1110402108).
- (6) Tanaka Y, N. Hirano, J. Kaneko, Y. Kamio, M. Yao, and I. Tanaka, 2-Methyl-2,4-pentanediol induces spontaneous assembly of staphylococcal α -hemolysin into heptameric pore structure, Protein Science, 20, 448-456 (2011). (doi. 10.1002/pro.579)
- (7) N. Tomita, K. Abe, J. Kaneko, Y. Kamio, and M. Ohta, Probabilistic study on subunit mismatch arrangement in staphylococcal γ -hemolysin heteroheptameric transmembrane pore, J. Biomechanical Science and Engineering, 6, 286-298 (2011).

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Kojima S., J. Kaneko, N. Abe, Y. Takatsuka and Y. Kamio. Peptidoglycan-linked cadaverine serves as the essential constituent for the anchoring mechanism between the outer membrane and peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*. FEMS 2011 Conference, Geneva, Switzerland, June 2011.
- (2) 児島征司、高塚由美子、阿部直樹、金子淳、神尾好是, *Selenomonas ruminantium* におけるペプチドグリカン (PG) 結合型カダベリンを介した外膜—PG 間接着機構の解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会、京都、2011 年 3 月.
- (3) 児島征司、高塚由美子、阿部直樹、金子淳、神尾好是, *Selenomonas ruminantium* におけるペプチドグリカン (PG) 結合型カダベリンを介した外膜—PG 間接着機構の解析, 日本ポリアミン学会第二回年会、宇都宮、2011 年 1 月.
- (4) Y. Kamio Degradation of a *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase by ClpXP proteolysis system which requires bacterial antizyme, P22. Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012 (招待講演) 2012 年 06 月 04 日 Tohoku Gakuinn University, Sendai, Japan
- (5) Y. Kamio Molecular basis for the maintenance of cell envelope integrity in *Selenomonas ruminantium* which possesses cadaverine as an essential constituent of the peptidoglycan and regulation of the biosynthesis of cadaverine., 第4回ポリアミン学会 (特別講演) (招待講演) 2013 年 01 月 24 日 ホテル松島大観荘、仙台
- (6) 神尾好是, 細菌細胞壁結合ポリアミンの膜安定化機構と合成制御 (シンポジウム) 日本農芸化学会 (招待講演) 2013 年 03 月 24 日~ 2013 年 03 月 28 日 東北大学川内北キャンパス、仙台

6. 研究組織:

(1) 研究代表者:

神尾 好是
東北大学・生命科学研究科・客員研究員
研究者番号: 00109175

(2) 研究分担者:

金子 淳
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 30221188