

合同学術講演会

講演要旨

期日：平成元年7月8日(土)

場所：北海道大学百年記念会館
(札幌市北区北8西5北大構内)

日本農芸化学会北海道支部
日本土壤肥料学会北海道支部
北海道農芸化学協会

〒060 札幌市北区北9条西9丁目 北海道大学農学部
農芸化学科内 〒011-716-2111 内線2497・2508

学術講演会

◎一般講演(9:00 ~ 12:00)

(講演時間12分, 討論3分, ○印: 演者)

(座長 川端 潤)

9:00 (1) 連作小麦の根面優占糸状菌 *sterile dark* の代謝産物(第1報)

(北大農化, *原子力環境センター) ○越野広雪,
吉原照彦, 市原耿民, 成田保三郎*

9:15 (2) オーチャードグラス条葉枯(すじはがれ)病菌の生産する植物毒素の単離と構造研究

(北大農化, *北農試) ○田渕浩康,
平井孝昌, 市原耿民, 坂村貞雄, 但見明俊*

(座長 及川英秋)

9:30 (3) ハマナス(*Rosa rugosa*)葉に含まれるビサボレン型セスキテルペノイド
(北大農化) ○橋床泰之, 岩谷紀子, 田原哲士, 水谷純也

9:45 (4) 北海道産植物の化学成分(1)

エンレイソウ(*Trillium smallii* Maxim.)の抗菌成分について
(北大農化) ○川端 潤, 吉田 敦, 水谷純也

10:00 (5) アズキ培養細胞の低温処理による脂質組成の変化

(帶畜大農化, *十勝農協連) 小嶋道之
○山田 智, 鈴木裕志*, 大西正男, 伊藤精亮

(座長 佐藤哲也)

10:15 (6) exo および endo 型イヌリナーゼによる生成物のアノマー型

(酪農大食科) ○塩見徳夫, 小野寺秀一

10:30 (7) Mucor javanicus の Cysteine-conjugate β -lyase

(北大農化) ○下村尚哉, 笠原賢明,
本間 守, 千葉誠哉, 田原哲士, 水谷純也

(座長 塩見徳夫)

10:45 (8) γ 線照射による牛乳リパーゼ活性の変化におよぼす乳清成分の影響

(北大酪農科学研究所) 斎藤善一

11:00 (9) 秋播小麦の低温及びパラコート処理に対する酵素活性と基質濃度の変化
について (北大低温研) ○奥田 徹, 匂坂勝之助

(座長 横田 篤)

11:15 (10) 霜害を誘発する冰核活性細菌 Pseudomonas fluorescens の分離

(帯広畜大環境) ○中野益男, 清水克則, 福島道広, 根岸 孝

11:30 (11) 蛍光基質を使用したDNAハイブリダイゼーションによる Acinetobacter
属菌の再同定 (北海道立衛研) 長谷川伸作

11:45 (12) ELISA 法による根粒菌の識別・同定

(帯畜大農化, *セロテック) ○佐藤哲也,
野原康徳, *菅原四郎

◎北海道農芸化学協会総会 (13:00 ~ 13:30)

◎特別講演 (13:30 ~ 15:30)

不良土壤条件に対する作物の耐性とその機構

北海道大学農学部 但野利秋

(座長 佐久間敏雄)

水産発酵食品の菌相規制要因

北海道大学水産学部 信濃晴雄

(座長 千葉誠哉)

◎懇親会 (18:00)

共済サロン (中央区北4条西1丁目 共済ビル)

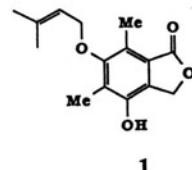
連作小麦の根面優占糸状菌sterile darkの代謝産物(第1報)

(北大農化、原子力環境センター)

越野広雪、吉原照彦、市原耿民、成田保三郎

1. 目的 糸状菌sterile darkは、連作小麦の根より高頻度で分離される糸状菌で、通常の培地上で胞子の形成がみられず菌学的には未同定の菌である。Sterile darkの分離される土壤では、小麦立枯病(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)の発生がみられず、sterile darkが小麦立枯病の発病を抑制している可能性が考えられる。また、sterile darkを拮抗微生物として小麦立枯病に対する生物防除に利用できる可能性が考えられる。我々は、sterile darkが代謝する小麦立枯病菌(以下Ggtと略す)に対する抗菌物質を明らかにすることを目的に本研究を行った。

2. 方法及び結果 Sterile darkとGgtを対峙培養し、拮抗作用がみられる培地を検索した結果、2%麦芽エキス・0.2%酵母エキス寒天培地上で、静菌的な拮抗作用がみられた。Sterile darkを上記の液体培地で22°C、暗所で50日間静置培養し、菌体(470 g)と培養液(5 l)に分け、菌体はアセトン抽出し、濃縮後酢酸エチルで抽出した。培養液は濃縮後酢酸エチルで抽出した。それぞれの収量は1.57 g及び141 mgであり、共にGgtに対して500 ppmで40%以上の菌叢生長阻害活性がみられた。Ggtに対する抗菌活性を指標に菌体抽出物を各種クロマトグラフィーで分画を繰り返し、活性成分の一つである新規化合物¹を1 mg単離した。各種スペクトルデータ及び、CH₂N₂処理して得られるメチルエーテル体を用いてNOE差スペクトルを測定することにより構造を図のように決定した。

¹

オーチャードグラス条葉枯(すじはがれ)病菌の生産する植物毒素の単離と構造研究

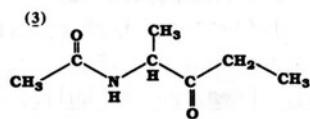
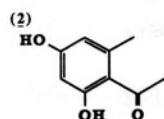
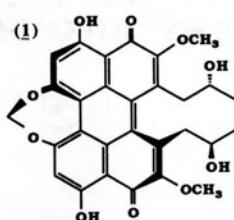
(北大農化、北農試) ○田淵浩康、平井孝昌、市原耿民、坂村貞雄、但見明俊*

1) 目的 オーチャードグラス条葉枯病菌(*Scolecothrichum graminis* Fuckel 582)の生産する植物毒素を単離し、その化学構造を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

2) 方法及び結果 *Scolecothrichum graminis* Fuckel 582をPS培地で、25°C、30日間暗所にて静置培養した。培養液の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、A~H区分に分画した。量的に多く、またレタス種子に対し、500 ppmで100%の生育阻害活性を示すA区分から数個の代謝産物を単離した。

化合物⁽¹⁾は濃赤色を呈し、HR-MS m/z 534.1535(C₂₉H₂₆O₁₀), IR ν_{max} cm⁻¹: 3480, 2950, 1720, 1520~1600, 1140~1420. [α]_D²⁵=+410.24° (c 0.41, CHCl₃), ¹H-NMR δ_{ppm}(CDCl₃) ppm: 13.25(2H,s), 7.02(2H,s), 5.73(2H,s), 4.23(6H,s), 3.70(2H,m), 3.51(2H,dd, J=3.6Hz, 13.3Hz), 2.87(2H,dd, J=8.2, 13.3Hz), 1.57(2H,br.s), 0.97(6H,d, J=6.2Hz)などのスペクトルデータを与えた。又⁽¹⁾は、ダイズ紫斑病菌から単離されているcercosporinやそのperylenequinone環のねじれの異性体である(-)-isocercosporinのスペクトルデータと比較することによって、(+)-isocercosporinであると決定した。同様な各種機器分析によって、⁽²⁾は

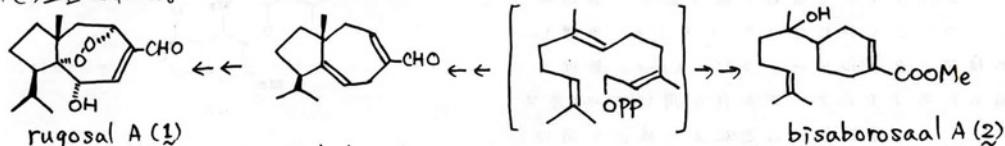
1-(2,4-dihydroxy-6-methylphenyl)-1-ethanone,

⁽³⁾は2-(N-acetyl-amino)-3-pentanoneと決定した。尚、⁽¹⁾,⁽²⁾,⁽³⁾の生理活性については、現在検討中である。

³ ハマナス (*Rosa rugosa*) 葉に含まれるビサボレン型セスキテルペノイド

(北大農化) ○橋本泰之、岩谷紀子、田原哲士、水谷純也

ハマナス (*Rosa rugosa*) 葉に含まれる抗菌性テルペノイド検索の結果、*rugosal A* (1)を中心とし、カロタン型セスキテルペナルデヒドあるいは、対応するカルボン酸が多い見出されている。^{1,2)} 更に、本植物中のセスキテルペノイドを精査したところ、ビサボレン型セスキテルペン *bisaborosaa* (2) およびその関連化合物を単離し、その平面構造を各種機器分析、化学変換等の手法を用いて決定することができた。カロタノイドはその生合成経路の初期段階でビサボレノイドと同じ *cis, trans-farnesyl pyrophosphate* を前駆体とすることが明らかであり、³⁾ 両者は同系列のセスキテルペノイドとして認識されている。高等植物からは、セリ科 (Umbelliferae)、キク科 (Compositae) 植物にカロタノイドが見出されているが、これらは共にビサボレノイド高含有植物を含んでおり、カロタノイドとビサボレノイドの生合成における関係を明示している。第三のカロタノイド源であるハマナス (Rosaceae) より前述のビサボレノイドが見出された事実は、ハマナスにおける *cis, trans-farnesyl pyrophosphate* 系の生合成経路の存在を示唆しており、両セスキテルペン *a regio-specific* な酸化様式も、お互いに近縁であることを裏付けるものと注目される。



1, 2) Hashidoko, Y. et al., *Phytochemistry* 28, 425 (1989); *ibid.*, 投稿中。

3) Devor, T.K. & Scott, A.I., *Handbook of Naturally Occurring Compounds*, Vol. II, Terpenes, Academic Press, 1972, p.57.

⁴ 北海道産植物の化学成分 (1)

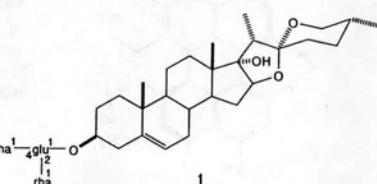
エンレイソウ (*Trillium smallii* Maxim.) の抗菌成分について

(北大農化) ○川端 潤、吉田 敦、水谷純也

目的：演者らは、北海道産植物の成分検索の一環として札幌近郊にみられる野生植物の成分の検索を行っているが、今回はエンレイソウ (*Trillium smallii* Maxim., ユリ科) の葉の水溶性画分からカビ及び酵母に抗菌作用を有する活性成分を単離同定したので報告する。方法及び結果：札幌市内の藻岩山及び三角山で採集したエンレイソウの葉のアセトン抽出物は、カビ (*Aspergillus niger*) と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に強い抗菌性を示したので、その活性本体を次のように分画精製した。エンレイソウ葉 1.3kg のアセトン抽出物を酢酸エチルと水で分配し、水相を 1-ブタノールで抽出、可溶部をシリカゲルカラム (CHCl₃/MeOH) に供した。CHCl₃/MeOH (2:1) 溶出区をシリカゲル PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O (20:10:2)) で精製し、活性本体をメタノール溶液から結晶化して、無色針状晶 1 (22mg, mp 250–252°C, [α]_D -131° (ピリジン))を得た。1 は FD-MS で (M+Na)⁺ 1053 を示し、TLC 上チモール試薬陽性、バニリン硫酸で赤色を呈すること、及び、¹³C-NMR でアノマー炭素が 4 本みられることから、ステロイドに四糖が結合した配糖体と考えられ、NMR で、さらに一個のアセタール炭素が存在し、二級メチルの数から 6-デオキシ糖を 3 個もつスピロスタノール型サポニンと推定した。文献検索により、1 は近縁のオオバナノエンレイソウから報告¹⁾ されている化合物と諸性質が一致したことにより、その構造を

pennogenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- β -D-glucopyranoside と決定した。

1) Nohara et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 842 (1975).



アズキ培養細胞の低温処理による脂質組成の変化

(蒂畜大農化, *十勝農協連)

小嶋道之, ○山田智, 鈴木裕志*, 大西正男, 伊藤精亮

目的: 先に演者らは、アズキ培養細胞の脂質を分析して、いずれの部位（葉、胚軸、根および胚乳）から誘導した培養細胞でも類似の脂質組成と分子種組成を有することを報告した¹⁾。今回は、植物の低温感受性と膜脂質との関連性を検討する一環として、胚乳および根由来のアズキ培養細胞を低温処理し、それに伴う脂質成分の変化を分子種レベルで明らかにしようとした。

方法: B5液体培地(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 1mg/lとカイネチオン 0.1mg/l含有)で10日間(25°C)培養したアズキ胚乳および根由来の細胞を、3°Cで2日間保持した後、全脂質を抽出した。各脂質クラスに分別した後、構成成分(脂肪酸、ステロール、糖およびスフィンゴイドなど)の組成およびジアシルグリセロール(DG)残基とセラミド残基に基づく分子種組成をGLCと逆相HPLCで分析した。

結果: 胚乳および根由来のアズキ培養細胞を低温シフト(25°C → 3°C)した結果、いずれもリン脂質含量の減少がみられた。また、主要なリン脂質クラスであるPC、PEおよびPIでは不飽和度が4以上の分子種(LnLn、LLnおよび0Ln)の割合がわずかに増大した。グリセロ糖脂質(MGDGとDGDG)でも、リン脂質と同様に高度不飽和型のDG残基を有するタイプが微増した。遊離型、アシルエステル型、グリコシル型およびアシルグリコシル型ステロール脂質の構成ステロールの組成は、25°Cで培養した細胞のそれらと同様にスチグマステロールとシトステロールが主要成分であった。また、低温下で膜の相分離状態を引き起こす可能性が示唆されているセレブロシドの分子種組成では低温処理による大きな変化は認められなかつた。このように低温感受性植物の培養細胞では低温に対する脂質組成の応答は軽微であることが示された。

1) 小嶋ら: 日本農芸化学会1989年度大会要旨集, p.491

exo および endo型 イヌリナーゼによる生成物のアノマー型

(酪農大 食科) *塩見徳夫 小野寺秀一

1. 目的: Penicillium属菌の exo および endo 型のイヌリナーゼを精製し、その一般性質および重合度の異なるフラクトオリゴ糖に対する基質特異性を調べすでに報告した^{1,2)}。今回は両タイプのイヌリナーゼによりイヌリンから生成されるフラクトースあるいはフラクトースオリゴマーのアノマー型について¹³C-NMR法を用いて分析した。

2. 方法: exo-およびendo-イヌリナーゼは既報の如く Penicillium属菌の培養滤液から電気泳動的に均一に精製し、両酵素による生成物のアノマー分析は既報の方法³⁾により行った。exo-イヌリナーゼについては、基質として用いたイヌリンから遊離されるフラクトースの各¹³Cシグナルを経時的に測定し、endo-イヌリナーゼの場合にはイヌリンあるいはフラクトオリゴ糖(DP=9)から遊離されるオリゴマーの還元末端残基のアノマー炭素・シグナルを同様にして調べた。

3. 結果: exo-イヌリナーゼによりイヌリンから生成されるフラクトースは、反応5分後に β -D-fructofuranose に由来する6ヶのシグナル(C1; δ 63.50, C2; 102.31, C3; 76.22, C4; 75.26, C5; 81.49, C6; 63.19)が観察され、その後これらのシグナル強度が低下すると共に β -D-fructopyranose および弱小ではあるが α -D-fructofuranose 由来の各シグナルが生じたことから、 β 型であることが確かめられた。またendo-イヌリナーゼについても同様に調べたところ、イヌリンおよびフラクトオリゴ糖から遊離されるオリゴマーの還元末端残基は、反応5分後に β -D-fructofuranose 残基由来のC2シグナル(δ 101.61)が強く生じ、その後このシグナル強度が減少したことから、 β 型を保持していることが分かった。

1) 小野寺ら, 日農化誌 63, 371(1989) 2) S.Onodera and N.Shiomi, Agric.Biol.Chem., 52, 2569(1988) 3) N.Shiomi and S.Onodera, Agric.Biol.Chem., 52, 2347(1988)

Mucor javanicus の Cysteine-conjugate β -lyase(北大農化) ○下村 尚哉, 笠原賢明, 本間 守, 千葉 誠哉,
田原 哲士, 水谷 純也

(目的) Mucor javanicus はジクロロニトロベンゼン類を代謝し、生成物としてメチルチオ化体を与える⁽¹⁾。この代謝様式はグルタチオン抱合体形成に始まり、システイン抱合体が α , β 脱離反応によるC-S結合開裂を受け、生じたチオール体がメチル基転移を受けてメチルチオ化体を生成するものと考えられている。本研究では、このC-S結合開裂反応を触媒する酵素の精製方法を確立し、基質特異性等の性質を調べた。

(方法及び結果) 酵素活性はリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中で S -(2-クロロ-6-ニトロフェニル)-L-システインを基質として生成するピルビン酸を比色定量することによって測定した。菌体を冷アセトンで処理し、乾燥物から粗酵素液を抽出した後、DEAE-cellulose, Butyl-TOYOPEARL, Aminohexyl-Sepharose, Bio-Gel P-150, Mono Q の各カラムクロマトグラフィーを行った結果、本酵素は電気泳動的に均質に精製された(2060倍、収率7%)。活性の至適pHは7.6、酵素蛋白質としてのpH安定域は6.5~8.0であった。精製酵素溶液にピリドキサール5'-リン酸(PLP)を段階的に加えていくと、 10^{-4} Mまで活性の上昇が見られた。一方、PLP無添加では 10^{-4} M時に対して54%の活性を示し、430nmにShiff塩基を示すと考えられる吸収極大が存在した。本酵素は S -(2-クロロ-4-ニトロフェニル), S -(5-クロロ-2-ニトロフェニル), S -フェニルの各L-システイン抱合体に活性を示したが、 S -アルキル-L-システインには活性を示さなかつた。このことから本酵素はCysteine-conjugate β -lyase [EC 4.4.1. 13.]に属することが明らかとなつた。一方、 S -アルキル-L-システインスルホキシドに弱い活性を示した。

(1) Z.Hafsa, S.Tahara and J.Mizutani : J.Pesticide Sci., 9, 117 (1984).

γ線照射による牛乳リパーゼ活性の変化におよぼす乳清成分の影響
(北大酪農科学研究施設) 斎藤善一

1. 目的 牛乳の異常風味ランシッドの原因となるリパーゼの大部分はカゼインミセルに見られる。これは ^{60}Co γ線を照射すると、 $2 \times 10^4 R$ までは線量の増加により著しく活性が低下するが、それ以上($10 \sim 20 \times 10^4 R$)では残存活性がかえつて増加することを報告した⁽¹⁾。その原因について検討し、乳清成分特に水溶性ビタミン類の関与を認めたので報告する。

2. 方法 脱脂乳から超遠心法によりカゼインミセルを分離し、0.02M ワエン酸緩衝液(pH 6.1)に対し透析し、透明なカゼイン液を得た。これにL-アスコルビン酸、リボフラビン、または両者を加え、さらには $CaCl_2$ を加えて(0.05M)カゼインをミセル状に凝集させ白濁した状態にした。此等を試験管にとり、室温で1~2時間照射した。市販均質化乳を基質液とし、遊離脂肪酸の増加を測定し(フェノールレッド法)リパーゼ活性を比較した。

3. 結果 アスコルビン酸(0.2~0.5 mg/ml)やリボフラビン(3 mg/l)を加えたカゼイン液を照射しても、線量の増加に伴い活性が低下するだけであるが、さらには $CaCl_2$ を加えて照射すると、アスコルビン酸添加(0.2, 0.5 mg/ml)により $2 \times 10^4 R$ では対照の88%, 81%に活性が減少したが、 $11 \times 10^4 R$ では103%, 89%の活性を示した。リボフラビンを加えると、アスコルビン酸0.2 mg/mlの場合には $20 \times 10^4 R$ 、同0.4 mg/mlの場合には $37 \times 10^4 R$ までは対照よりもやや高い活性を示した。このような活性の変化は、カゼインミセルが溶解した透明な試料で見られないのと、カゼインがミセル状に凝集することにより、リパーゼと共に添加物もそこに結合濃縮され γ 線照射による変化がリパーゼ活性に複雑な影響を及ぼすようになると思われる。先に、カゼインミセルが示した特異的な失活も同様の現象と推定される。今後、乳清中に存在する他の微量成分の影響についても検討し結論を得たい。

1) Z. SAITO : Research in Food Science and Nutrition vol. 5, Boole Press Ltd., 1984, p273.

9 秋播小麦の低温及びパラコート処理に対する酵素活性と基質濃度の変化について
○奥田 徹、勾坂 勝之助（北大 低温研）

1. 目的：秋播小麦を低温処理すると、細胞の還元状態を維持する酵素系とこの酵素系に関与している基質濃度が高まつてくる。これは低温度によって化学反応が抑制され、酸化物の生成傾向が高まつた細胞を正常な還元状態に保つ調節機能と考えられる。植物をパラコートで処理すると細胞に酸化物が蓄積するので、低温ストレスと同様な酵素活性と基質濃度の変化が期待される。本報では低温ストレスとパラコートによる酸化物ストレスに対する植物の反応性を検討した結果について報告する。

2. 方法：実験材料：ホロシリ小麦

処理：パラコート、アミノトリアゾール、ベンレート、及び低温処理

測定項目：基質：糖リン酸

Ascorbate

Glutathione

酵素：G6PDH等 糖代謝系関連 4種類

GSHRD等 抗酸化関連 8種類

3. 結果：パラコート、アミノトリアゾール、及び低温処理では、処理後3-4日間でコントロールに対しG6PDHとGSHRDの活性が上昇するなど、基質濃度及び酵素活性に大きな変化が見られ、これらの酵素が抗酸化作用に大きく関与していることが考えられた。一方、ベンレート処理をしたものでは、コントロールに対して大きな変化が見られなかった。

10

霜害を誘発する冰核活性細菌 Pseudomonas fluorescens の分離

（帯広畜大環境） ○中野益男、清水克則、福島道広、根岸孝

1. 目的 初春、晩秋にかけて急に冷え込んだ夜の翌朝に霜害がみられる。これで、霜害は土壤および地形の違い、気象変化といった「物理的な要因」で起こると考えられてきた。ところが、同じ土壤、地形、気象、作物でありながら、霜害が起きたり起きなかったりする。この被害状況から、霜害は「物理的要因」だけでなく、「細菌」という生物的影響によって発生する」ことがわかつてきた。この霜害を誘発する細菌を「冰核活性細菌」と呼んでいる。冰核活性細菌は世界に広く分布し、これまでに P. syringae, E. herbicola, E. annas, P. fluorescens などの冰核細菌が見つけられている。今回は、十勝の畑作地帯の土壤、小麦の葉から冰核活性細菌を分離し、その冰核活性について調べた。

2. 方法 霜害に遇った小麦および周辺土壤から Tryptone Soya 培地、ケン酸培地で 27°C, 24-48時間培養して約1/100種のコロニーを分離し、それらの冰核活性を調べた。冰核活性は、超純水の入った試験管に細菌および培養液を添加し、凍上試験器に入れて試験管の冰結温度を測定して求めた。分離して冰核活性細菌の性質は、カナダで分離された P. fluorescens W-11, P. fluorescens W-31 と比較した。

3. 結果 小麦の葉から高い冰核活性を示す P. fluorescens NSK 17 と P. fluorescens NSK 25 を分離した。ところに、P. fluorescens NSK 25 は冰結温度 -2.1°C と W-11株および W-31株の -2.9°C よりも高い活性を示した。冰核活性は、菌体と培養液の両方に観察された。培養液のアルコール沈殿物の多糖体に冰核活性はみられないことから、冰核活性物質は菌体外分泌物のタンパク質が関与しているものと推定される。ケン酸液体培地、生石灰、マグネシウム、カリウムなどの無機塩存在下で冰核活性は抑制された。

(1) S. E. Lindow : Ann. Rev. Phytopathol. 21, 363 (1983).

蛍光基質を使用したDNAハイブリダイゼーションによるAcinetobacter
属菌の再同定

(北海道立衛研) 長谷川 伸作

(目的) Acinetobacter は人に尿路感染症、敗血症などを引き起こす日和見感染菌で、化学療法剤に多剤耐性を示し、菌交代現象を導き、治療を延長させている例が見られる。本菌は様々な性状を示すが、Berger's manual では、一括して A. calcoaceticus として記載されている。しかし、本属菌は、Bouvetらにより、DNA相同性に基づいて12菌種(genospecies)に分類され、6菌種には学名が与えられた。本属菌株の同定にはDNAハイブリダイゼーションを行う必要がてきた。今回、迅速簡便法として、蛍光法を使ったフォトビオチン標識DNAハイブリダイゼーションによるAcinetobacter の同定を行った。また、従来、行われてきたphenotypeによる分別との関連性を検討した。

(方法) DNAハイブリダイゼーションは、江崎らの方法に準じて行った。すなわち、マイクロプレートのwell中にAcinetobacterの基準株のDNAを固定し、これに臨床分離菌株のDNAをフォトビオチンで標識して加え、DNA-DNAハイブリダイゼーションを行った。反応は37°Cで5-7時間行った後、プレートを洗浄し、streptavidin-beta-D-galactosidaseをビオチン結合させた後、4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranosideを加え、蛍光を測定し、DNAの相同性を判定した。また、genospeciesと、先に行なったphenotypeによる分別とを比較検討した。

(結果) 臨床分離Acinetobacter 78菌株は、Genospecies-1(A.calcoaceticus)、8株(Phenotype I:O/F ブドウ糖酸化、β-溶血-)；G-2(A.baumannii)、36株(PI)；G-3、4株(PI)；G-4(A.haemolyticus)、1株(PII:酸化、+)および4株(PIII:非分解、+)；G-5(A.junii)、3株(PIV:非分解、-)；G-6、1株(PII)；G-7(A.johnsonii)、3株(PIV)；G-8(A.lwoffii)、1株(PI)および5株(PIV)；G-9、1株(PI)および2株(PIV)；G-10、2株(PI)；Ungrouped strain、5株(PI)，1株(PIII)および1株(PIV)に分別された。Bouvetらの分別結果と同様の傾向が示されたが、G-1が多く認められる点で異なった。Genospeciesとphenotypeとには、いくつかの規則的な関連が認められた。

ELISA法による根粒菌の識別・同定

(帝畜大農化、*(株)セロテック) ○佐藤哲也、野原康徳、菅原四郎

目的 演者らはこれまで各種免疫学的手法により根粒菌の識別・同定を行なってきた。これらのうち蛍光免疫組織化学的方法(FIHC)により根粒の細胞レベルの観察も可能となつた¹⁾。この方法は非常に鮮明な組織の写真を得ることができるが、試薬や染色プレラートの保存性および定量性に欠ける。そこで今回は定量性に優れているELISA法の適用を試みた。

方法 ダイズ根粒菌OUG 115、117およびS-32を使用した。前報¹⁾に述べた方法により得た菌株特異性抗体(S-Abs)を用いた。常法によりこれらS-AbsからIgGを調製し、MartenssonとGustafssonの方法に従いβ-galactosidase(G)あるいはhorse-radish peroxidase(P)で標識した(それぞれGS-AbおよびPS-Ab)。GS-Abの場合p-nitrophenyl β-galactoside(PNPG)を、PS-Abの場合3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)/H₂O₂あるいはdiaminobenzidine(DAB)/H₂O₂を入れた反応混液中で反応させた。

結果 いずれの菌株の場合もPNPGを基質としたGS-Ab反応系により10⁶-3×10⁷ cells/mlの範囲で定量性が確認された。これらの反応は特異的であり、OUG 115および117の混合懸濁液を用いた場合においてもそれぞれの菌株を定量し得た。前報で混合感染の認められた根粒およびPS-Absを用いた酵素標識免疫組織化学的方法(ELIHC)の適用を試みた。AECを用いる反応系においてそれぞれの感染部位は赤色に染色され、感染菌株を特定することが出来た。またDABを用いることにより褐色に染色されたことからこれらの反応系を用いることによりpaired stainingが可能となることが判明した。ELIHC法はFIHC法に比べ鮮明度に劣るもの、プレラートの保存性が良く、取扱いも容易であるという特徴を有している。

1) T. Sato, J. Kato and S. Sugawara, Soil Sci. Plant Nutr., 34, 247 (1988).

合 同 懇 親 会

平成元年7月8日(土) 18:00~20:00

於: 共済サロン(札幌市中央区北4西1 共済ビル
TEL 011-241-2661~4)

会 費: 3,000円 (学生会員1,500円)

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

(ABC順)

旭油脂株式会社	キッコーマン株式会社千歳工場
ベル食品株式会社	麒麟麦酒株式会社千歳工場
福山醸造株式会社	日本化学飼料株式会社
富良野市ぶどう果樹研究所	日本清酒株式会社
合同酒精株式会社	日本新薬株式会社札幌工場
北海道朝日麦酒株式会社	日本甜菜製糖株式会社技術部
北海道日産化学株式会社	ニッカウヰスキー株式会社
北海道糖業株式会社	サッポロビール株式会社札幌工場
北海道和光純薬株式会社	札幌酒精工業株式会社
北海三共株式会社	サントリー株式会社千歳工場
株式会社北海道測量団工社	宝酒造株式会社札幌工場
北海製罐株式会社罐詰研究所	高砂香料工業株式会社札幌出張所
株式会社北開水工コンサルタント	東洋科学産業株式会社札幌営業所
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所	十勝農業協同組合連合会農産化学研究所
岩田醸造株式会社	よつ葉乳業株式会社
関東化学販売株式会社	雪印乳業株式会社
有限会社和科盛商会	雪印食品株式会社