シンポジウム及び合同学術講演会

講　演　要　旨

期　日：平成元年10月13日(金)，10月14日(土)

場　所：帯広畜産大学講義棟
（帯広市稲田町
電話0155-48-5111内線325，431）

日本農芸化学会北海道支部
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

89 10 13

平成元年10月13日(金)

シンポジウム
「微生物と植物の相互作用」

10:30　開会の辞　日本農芸化学会北海道支部長　千葉誠哉

10:40 (S-1)　根粒菌の感染機構と宿主植物の応答反応
(鹿児島大学理学部)○阿部美紀子，内海俊樹，東　四郎
(座長　佐藤哲也)

11:25 (S-2)　アグロバクテリウムによる植物の遺伝子操作
(筑波大学・生物科学)内宮博文
(座長　大野哮司)

12:10　休　憩

13:30 (S-3)　植物病原糸状菌の生成する宿主特異的毒素とその病理学的役割
(鳥取大学・農)尾谷　浩
(座長　美濃羊輔)

14:15 (S-4)　植物病害抵抗性の制御機構について
(岡山大学農学部)白石友紀
(座長　水谷純也)

15:00　総合討論　司会　佐藤哲也
閉会の辞

◎ **見学会及び懇親会**(17:00)(講演会場から連絡バスが出ます。出発予定　15:30)
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所
池田町営レストラン十勝

交通

札幌 → 帯広	札　幌	千歳空港	帯　広
おおぞら1号	804	835	1051
3	957	1026	1255
5	1115	1145	1415
7	1411	1441	1703
9	1639	1710	1918
11	1757	1827	2047
13	2003	2033	2256
まりも	2300	2338	335

帯広 → 札幌	帯　広	千歳空港	札　幌
おおぞら2号	727	945	1015
4	940	1206	1235
6	1050	1256	1325
8	1221	1441	1512
10	1523	1749	1821
12	1717	1944	2015
14	1903	2126	2155
まりも	120	605	650

帯広駅前 → 畜大
ＪＲバス(駅西側、改札口を出て左手)　2番乗場「畜大農場行」
十勝バス(駅前富士銀行の前)　系統番号76「畜大農場ゆき」
} 共に 350円 〔畜産大学前〕下車
タクシー(約15分)　約 1,500円

平成元年10月14日(土)

学　術　講　演　会

◎ **一般講演**(9:00〜12:12)　　(講演時間10分・討論2分, ○印:演者)

(座長　松井博和)

9:00 (1) 甜菜生汁および廃糖蜜模擬培地でのAspergillus terreus K26によるイタコン酸醗酵における金属イオンおよび有機酸の影響
(帯畜大農化) ○中川允利, 石橋憲一, 弘中和憲

9:12 (2) 新生有珠火山灰における微生物相(11) ── 嫌気性N固定菌について ──
(北大応菌) 吉田　忠

9:24 (3) 発芽コーン酵素による生でん粉の分解
(北海道立工業試験場, *食品総合研究所) ○宇野豊子, 小林昭一

9:36 (4) α-ガラクトシダーゼに関する研究 ── Rhizopus hangchowによるα-ガラクトシダーゼの生産とその性質
(帯畜大農化) ○高野一紀, 和田英昭, 佐藤哲也, 菅原四郎

(座長　増田宏志)

9:48 (5) Bifidobacterium adolescentis G1のフラクトオリゴ糖分解酵素(β-フラクトフラノシダーゼ)の精製と一般性質
(酪農大・食品科学) 小野寺秀一, ○村松　圭, 菊地政則、塩見徳夫

10:00 (6) Candida utilis β-Fructofuranosidase の縮合反応
(北大・農化) 中村　充, 佐藤恭子, ○木村淳夫, 千葉誠哉

10:12 (7) アモルファス乳糖の結晶化におよぼす牛乳塩類の影響
(北大酪農科学研究施設) ○斎藤善一, 佐藤憂美

(座長　菊池慎太郎)

10:24 (8) Kluyveromyces lactis 産生キラー毒素に対するSaccharomyces cerevisiae耐性変異株の遺伝学的解析
(北大・農化) ○川本伸一, 羽鳥英孝, 田辺千夏, 佐藤祥子, 大野哮司

10:36 (9) マメキモトリブシンインヒビター遺伝子の単離とその発現の解析
(北大・農・農化) ○土生芳樹, Surin Peyachoknagul, 大野哮司

10:48 (10) 大腸菌低温耐性遺伝子の遺伝生理学的解析
(北大・農化) ○海藤晃弘, 八十川大輔, 川本伸一, 大野哮司

11:00 (11) Strcptomyces lavendulae MA406 A-1株の多面的変異現象の解析
(北大・農化) ○布施広光, 中村通伸, 八島重昂, 大野哮司

(座長　中川允利)

11:12 (12) ホタテガイ(Patinopecten yessoensis)からのメタロチオネイン様蛋白質の分離とその性質
(室蘭工業大学・化工) ○岡村一永, 安居光國, 竹内隆男, 菊池慎太郎

11:24（13） 抗酸菌の脂肪酸合成酵素の固定化

（室蘭工業大学） ○菊池慎太郎
（オハイオ州大・バイオテクノロジー） P.E, Kolattukudy

11:36（14） 植物の低温耐性とスフィンゴ脂質との関連性について

（帯畜大農化） ○母坪研已，木下幹朗，小嶋道之，大西正男，伊藤精亮

（座長 大崎 満）

11:48（15） アズキの冷温障害

（北大低温研，*北農試） ○匂坂勝之助，*黒田治之，大和田琢二，松田祐介，奥田 徹

12:00（16） 馬鈴薯塊茎形成誘導物質

（北大農化，*農業生物） ○松浦英幸，吉原照彦，市原耿民，*幸田泰則，*喜久田嘉郎

◎ **日本農芸化学会北海道支部総会**（13:20〜13:40）

◎ **一般講演**（13:40〜14:40）

（座長 及川 英秋）

13:40（17） カラマツ（Larix leptolepis Gord）カルスの生成するリグナンについて

（帯畜大・畜） ○鍋田憲助，中原一哲，河合真吾，奥山寛，（北大・農） 笹谷宣志

13:52（18） 塩化銅ストレスにより誘導的に生成されるキショウブの抗菌性イソフラボノイドについて

（北大・農化） ○塙 藤徳，田原哲士，水谷純也

（座長 鍋田憲助）

14:04（19） 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（第2報）

（北大農化，*北農試） ○田渕浩康，市原耿民，*但見明俊

14:16（20） アルファルファの根から分泌される新規化合物の構造

（北大農化，*草地試） ○越野広雪，*正岡淑邦，市原耿民

14:28（21） チモシーがまの穂病菌（Epichloe typhina）によるフェノール化合物の代謝

（北大農化，*北農試） ○越野広雪，塚田聡子，吉原照彦，坂村貞雄，市原耿民
*島貫忠幸，*但見明俊，*佐藤 徹

◎ **特別講演**（14:45〜16:45）

熟成に伴う食肉の軟化とカルシウムイオン

北海道大学農学部 高橋興威
（座長 千葉誠哉）

機能性オリゴ糖類とその栄養特性

酪農学園大学食品科学科 塩見徳夫
（座長 菅原四郎）

S－1　根粒菌の感染機構と宿主植物の応答反応

（鹿児島大学理学部）阿部 美紀子°・内海 俊樹・東 四 郎

マメ科植物の根粒中で固定した空中窒素をアミノ酸に変換して植物体内へ転流するに至る過程は、宿主植物と根粒菌の遺伝子が相互に関係した反応系により成り立っている。

近年、植物の産生するﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ類が根粒菌の根粒形成遺伝子(nod genes)中のnodDの産物と結合しnodABCを発現誘導し、宿主植物の根毛の発育、変形や根粒原基の形成、また初期ﾉﾃﾞｭﾘﾝ蛋白の生産を促すことが明らかにされた(Long(1989))。しかし、菌側から植物細胞へ伝達された情報に対する植物側の応答のしくみについて、その遺伝子ﾚﾍﾞﾙでの解析はようやく始まったばかりである。

マメ科植物と根粒菌の共生の第一ｽﾃｯﾌﾟは、根圏で根粒菌が特異的宿主根毛に付着するという、宿主の認識である。植物側のﾚｸﾁﾝと、菌側のﾚｸﾁﾝﾚｾﾌﾟﾀｰの結合により宿主が決定されるとするﾚｸﾁﾝ説(Bohlool and Schmidt(1974)他)である。Diaz等(1989)はｴﾝﾄﾞｳのﾚｸﾁﾝ遺伝子(psl)をｸﾛｰﾊﾞに導入して得た形質転換ｸﾛｰﾊﾞにｴﾝﾄﾞｳ菌が根粒を形成することを確認した。しかし、ﾚｸﾁﾝを介した菌の根毛への付着は必ずしも種特異性または感染性の有無に左右されず、むしろ付着した菌が根毛の変形を引き起こすか否かが感染の決定要因であるとする説もある(Bhuvaneswari and Bauer(1978))。

感染する菌を接種した根は、まず根毛が強いｶｰﾘﾝｸﾞ・分岐等の変形を起こす。次に、変形した根毛に閉塞された菌が根毛細胞内に侵入する(Higashi & Abe(1980))。次に感染糸(IT)が形成され、末端部で菌は根粒細胞内へ放出される。ここで菌はﾍﾟﾘﾊﾞｸﾃﾛｲﾄﾞﾒﾝﾌﾞﾗﾝ(PBM)により囲まれ、ﾊﾞｸﾃﾛｲﾄﾞに分化する。ITもPBMも、植物側の菌感染に対する防御機構として合成されたもののようで、PBMはｺﾞﾙｼﾞ体に由来する膜成分、ITは細胞壁に近い構造であると考えられている。ﾄﾘｾﾗｰｾﾞ処理したﾚﾝｹﾞｿｳの根粒は、根粒内部の細胞壁は完全に溶解し、根粒外殻と網の目のようなITのみが残存していることから、ITは化学的にかなり強固な構造物であると考えられる(Higashi等(1986))。根粒形成のごく初期に生産される初期ﾉﾃﾞｭﾘﾝ蛋白は、根粒およびIT形成、ITから植物細胞への菌の放出など、共生の初期に関与していると報告されている。しかも、最も早く出現するものはﾋﾄﾞﾛｷｼﾌﾟﾛﾘﾝに富むﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞで細胞壁組成との関連性が示唆されている(Gloudemans等(1988))。

“宿主の根が根粒に分化する最初の細胞分裂はいつか？”従来は、感染した菌が、ITから宿主の皮層細胞に放出された後に始まると考えられてきた。しかしDjordjevic等(1987)は、植物側のｼｸﾞﾅﾙ(ﾌﾗﾎﾞﾉｲﾄﾞ類)によりnod genesが活性化するとすぐ細胞分裂ｼｸﾞﾅﾙが植物側に伝達される、すなわち植物の細胞分裂は菌が細胞中へ放出されるより前に開始し根粒原基が形成されるﾓﾃﾞﾙを報告した。我々の研究室では熱帯性ﾏﾒ科植物のCentrosema pubescensにおいて、感染初期に、感染細胞を含む分裂zoneとは別に、感染細胞を含まない根の維管束部に近いpericycleに細胞分裂と、tracheary elementが出現しており、この部分は将来根粒の維管束へと分化することが予想された。

マメ科植物と根粒菌の共生において、過剰の根粒形成は抑制される。これは植物側に感染防御機構が働く為といわれている。Gresshoff等(1988)は、ﾀﾞｲｽﾞ種子をｴﾁﾙﾒﾀﾝｽﾙﾌｫﾈｰﾄ(EMS)処理して得た根粒形成変異株(nts)を用い、植物側の調節機構の分子的解明を試みている。最近、我々はｸﾛｰﾊﾞやｲﾝｹﾞﾝの胚軸より誘導した不定根への根粒形成能が正常根に比べ数倍に増加する事実を得た。これは植物側の菌感染に対する調節の発現ﾚﾍﾞﾙが不定根と正常根とでは異なることによると思われる。この系を用いることは根粒形成における植物側の反応・調節の機構を分子ﾚﾍﾞﾙで解析する好材料となると考えている。

S－2　アグロバクテリウムによる植物の遺伝子操作

内宮博文（筑波大学・生物科学）

土壌菌の一種であるアグロバクテリウム（Agrobacterium tumefaciens）は，植物に感染すると“クラウンゴール”と呼ばれる腫瘍組織を形成する。この現象は，アグロバクテリウム細胞中のTiプラスミドと呼ばれる巨大プラスミドによって誘導される。すなわち，菌が植物に感染すると，Tiプラスミドの一部である“T-領域”が植物細胞内のゲノム中に組み込まれる。このためには、T-領域の左右両側の約25bpから成る相同の境界配列が必要である。また，Tiプラスミド上には，植物細胞への感染に必要な一群の遺伝子（Vir-領域と呼ばれる）があり，これらの遺伝子はT-領域が植物ゲノムへ導入されるうえで重要である。T-領域上には，成長ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンの合成に関与する酵素（それぞれ，インドールアセトアミドハイドロレース，イソペンテニルトランスフェラーゼ）の遺伝子があり，これらの発現により植物細胞は腫瘍を形成（カルス化）する。

一方，完全な植物の分化を伴う形質転換体を得るために，いくつかの特徴あるベクターが考案されている。それらのベクターは，以下の３種類に大別される。一つは，①TiプラスミドのT-領域の一部を持つベクターを利用したものでノパリン型Tiプラスミドの右側の境界配列を保持している。また②T-DNAの遺伝子部位を除去したdisarm型のTiプラスミドも知られている。このベクターは，T-領域の左右の境界配列，Vir-領域を保持しており，植物ゲノムの組み込み様式は野生株のものと変わらない。さらに，③バイナリー型のベクターがあり，Vir-領域を持つプラスミドと，T-領域の境界配列を持つ広宿主型中間ベクターをアグロバクテリウム中に共存させる。中間ベクターには大腸菌とアグロバクテリウムの両方で働く複製開始点があるので，大腸菌内で外来遺伝子を中間ベクターにクローン化しアグロバクテリウムへ移すことができる。

野生型のTiプラスミドを持つアグロバクテリウムにより形質転換を行う場合，植物に傷をつけ，菌を感染させる。次に，形成された腫瘍組織を植物体から分離して培養するのが一般的である。しかし，腫瘍形成能のない改変型Tiプラスミドでは，以下の方法が用いられる。

先ず①共存培養法が上げられる。この方法は，宿主植物から酵素処理によって細胞壁のないプロトプラストを単離する。培養開始後２，３日目に菌を加えて感染させる。次に，抗生物質を用いて除菌および形質転換体を選抜する。１，２か月後に細胞塊を分化培地に移し，植物体を再生させる。さらに，②リーフディスク法がある。この方法は，植物葉を次亜塩素酸溶液などによって滅菌し，葉の切片にアグロバクテリウムを感染させる。その後の除菌および形質転換体の選抜には抗生物質を用いる。

本報告では，このようなTiプラスミドベクターを用いた外来遺伝子の導入と解析例について触れる。

S－3

植物病原糸状菌の生成する宿主特異的毒素とその病理学的役割

（鳥取大学・農）尾谷　浩

植物病原糸状菌の生成する宿主特異的毒素(HST)は、病原菌の感染成立可否の直接的決定因子であり、HST研究は、菌と宿主の相互認識機構の解析に有益な情報を提供する。これまでHSTについてはHSTが示す生理活性の機構に興味が集中し、病理学的な観点からの研究はほとんどなされていない。そこで、我々の研究グループは、ここ数年、感染場面でのHSTの役割に焦点をあてて研究を行ってきたので、断片的ではあるがこれまでに得られた結果の概略を述べ話題提供としたい。

HST生成菌は、Alternariaおよび Helminthosporium属菌を中心に14例知られているが、これらのHSTは、宿主に対する作用から大きく３つのグループに類別できる。すなわち、AK毒素(ナシ黒斑病菌)やHV毒素(エンバクvictoria blight病菌)など７種のHSTは宿主原形質膜(PM)に、ACR毒素(カンキツbrown spot病菌rough lemon系統)やHmT毒素(トウモロコシごま葉枯病菌)など５種のHSTは宿主ミトコンドリア(Mt)に、また、AM毒素(リンゴ斑点落葉病菌)は宿主PMと葉緑体(Chl)の２ケ所に作用点を持つと考えられている。このようにHSTの作用点はHSTの種類によって明らかに異なっているが、いずれのHSTとも感染場面では、宿主植物への病原菌受容化という共通した作用を示す。そこで、作用点の異なる３つのHST(AK、ACRおよびAM毒素)について毒素作用と菌受容化との関係を調べた。AK毒素では、毒素のPM作用を阻害すると菌の感染は抑制されたが、PM機能障害後の細胞致死過程を阻害しても感染は成立した。一方、ACR毒素では、毒素のMt作用後にPM機能障害が誘起されたが、このPM機能障害を阻害すると菌の感染は抑制された。また、AM毒素でも、毒素のChl作用は菌の感染にはまったく影響をあたえず、PM機能障害の阻害が菌の感染を抑制した。なお、テヌアゾン酸やフェニル酢酸などの非特異的毒素は、菌の感染を誘発しなかった。以上の結果は、HSTによる菌受容化には宿主細胞の致死は必要でなく、毒素による宿主のPM機能障害が重要であることを示している。

それでは、何故PM機能障害が菌の受容化へと導くのであろうか。感染場面でのHSTの役割についてナシ黒斑病菌を例に紹介してみたい。黒斑病菌は、胞子発芽とともにAK毒素を生成し放出する。このような胞子発芽時の毒素生成は、HST生成菌に共通した性質であり、後述するように菌受容化に極めて重要な意味をもっている。胞子発芽液中には、AK毒素以外に宿主抵抗反応の誘導物質(Inducer)も放出される。Inducerは、マンノースを主成分とする分子量約40,000の多糖で、Inducerをナシ葉に処理すると、処理後４～６時間で宿主非特異的に抵抗反応が誘導される。一方、ナシ葉に予め熱処理(55℃温湯中に３秒間浸漬)や蛋白質合成阻害剤処理を行うと、菌は病原性有無に関係なく、感受性、抵抗性ナシ葉ともに感染可能となったが、これらのナシ葉では、Inducer処理による抵抗反応は発現しなかった。また、AK毒素とInducerを同時にナシ葉に処理すると、感受性ナシ葉では抵抗反応の発現はみられず、菌の感染が誘発された。このように胞子発芽時のAK毒素の役割は、宿主抵抗反応の発現停止にあり、抵抗反応が停止した状態下で菌は宿主組織内に侵入し感染が成立するものと思われる。

以上の結果からHST生成菌の感染機構を要約すると、(1)病原菌発芽胞子からのHST生成と放出、(2)宿主細胞のその選択的認識、(3)PM機能障害による宿主抵抗反応の始動停止、(4)菌受容体制化の完成という一連の図式が想定される。今後、HSTの宿主認識から菌受容化までの機構を分子レベルで解析することが重要な課題である。

S－4　植物病害抵抗性の制御機構について

白石友紀　（岡山大学農学部）

植物は無数の病原体の攻撃に常にさらされている。しかしながら、自然界ではむしろ発病枯死に至る例の方が珍しい。モノカルチャーの条件下においても十数万種といわれる糸状菌のなかで、例えばイネを攻撃して大被害を与えるものは縮熱病菌 Pyricuralia oryzae をはじめ10種もない。換言すれば、植物は大多数の病原体に対して抵抗性を備えており病気に罹らないのが通常の姿であると考えられる。／植物の病害抵抗性は、細胞壁の物理的な強さや先在的抗菌性物質の存在など既に備わった静的抵抗性と病原菌の攻撃により誘導される動的抵抗性に分類されるが、heat shock や代謝阻害剤などで後者の作動を抑制すると本来感染できない菌も感染できるようになることからその主力は後者にあるものと考えられている。この抵抗性の担い手として、lignin, callose, hydroxyproline rich glycoprotein, papilla などの物理的障壁や、phytoalexins, lipids, superoxides, PR-proteins, infection inhibitor などの化学的障壁が生成される。著者らがエンドウを用いて行った実験によれば、phytoalexin(PA) である pisatin と infection inhibitor (感染阻害因子)が抵抗性に関与していることが示唆された。これらの生成・蓄積は、エンドウに病原性を示さない菌のみならず病原菌の分生胞子(通常、植物への伝搬・感染を担っている)発芽液中の高分子多糖 elicitor (誘発物質)によっても誘導される。／エンドウ褐紋病菌(M. pinodes)の elicitor で無傷のエンドウ組織を処理して一定時間置いた後、同じ場所に同菌の分生胞子を接種するとそれらの感染は著しく阻害された。エンドウ上に1時間置かれたelicitor 溶液中には未同定の感染阻害因子の生成が認められた。褐紋病菌に本因子を添加してエンドウ組織へ接種すると侵入が顕著に阻害され、感染できない。一方、加傷したエンドウ組織を同 elicitorで処理すると6－9時間で pisatin 蓄積が、3時間以内に pisatin 生合成の律速酵素の一つである phenylalanine ammonia-lyase(PAL)の活性増加が、また処理組織より抽出した RNAの Northern blot hybridization分析の結果、elicitor処理後1時間以内に PALや chalcone synthase(CHS)遺伝子の転写の増高が認められた。elicitor処理後の初期情報伝達には protein kinaseが関与している様であった。以上の様に、病原菌といえども発芽・感染の過程において宿主の抵抗性を誘発する物質を分泌している。／しかし、褐紋病菌の胞子発芽液（高分子及び低分子物質の混合液）をエンドウ組織に与えた場合には以上のような抵抗性は発現しない。また興味深いことに、本来感染できない菌も褐紋病菌の発芽液を混合するとエンドウに感染できた。本菌の発芽液には宿主に毒性を示す代謝産物は見いだせなかったので、低分子画分（MW. <2x10⁴）から①感染誘導②pisatin の生産抑制を指標に検索した結果、ペプチドを含む2成分（F5, F2）にこれらの活性が認められた。私共はこのような因子を〈suppressor〉と呼んでいる。部分精製物とelicitorを混合してエンドウを処理し、pisatin 生合成系にたいする効果を調べた結果、蓄積は6時間、PAL活性の増加は3時間、PAL・CHS遺伝子の転写は3時間遅れることが判った。elicitor処理された無傷組織に誘導される感染阻害因子の生産も顕著に抑制された。本因子の情報伝達系への作用については未詳であるが、エンドウ原形質膜 ATPaseの活性を顕著に阻害した。このような結果から、病原菌は、宿主の homeostasisや基礎的なエネルギー生産に関わる系を阻害する代謝産物を感染初期に分泌し、宿主の抵抗反応の発現を抑制して感染に成功するのではないかと思われる。褐紋病菌の suppressor(F5) の作用特異性は褐紋病菌の宿主範囲と一致しており本菌のエンドウへの感染成立に必須の因子であることが示唆された。

1　甜菜生汁および廃糖蜜模擬培地でのAspergillus terreus K 26によるイタコン酸醗酵における金属イオンおよび有機酸の影響

（帯畜大農化）○中川允利・石橋憲一・弘中和憲

1．目的　演者らは、甜菜生汁および廃糖蜜のイタコン酸醗酵への原料化に関する検討を行ってきた。原料中に含まれる有機酸、過剰な金属イオンおよび窒素が醗酵を阻害し、その程度は揮発性有機酸において顕著であった。今回は、模擬培地中での有機酸および金属イオンなどが培養の経過に伴い如何に変化し醗酵成績に影響を及ぼすかを明らかにした。

2．方法　甜菜生汁および廃糖蜜の原料分析値より糖および窒素源の一部以外無機成分より成るシックジュース、HAおよびHB糖蜜（以下それぞれTJ、HAおよびHBと省略）基本培地を調製し　それぞれの基本培地に原料に由来する不揮発酸および揮発酸を添加して模擬培地を調製した。培養は、麦芽寒天培地に着生した胞子を白金耳で糖濃度10％に調製した培地120mlに接種し、35℃、120rpmの往復振盪機で行った。なお、コントロールとしてグルコース模擬培地（G培地と省略）を用いた。

3．結果　TJ、HAおよびHB基本培地における醗酵成績（1A蓄積速度、対消費糖1A収率）は、TJおよびHAはG培地と同程度であったが、HBでは低下が認められた。菌体中の各金属イオン濃度は、いずれの培地を使用しても、培養初期に高く、後期に低く、漏出も認められた。HB培地ではG培地に比し、Kが50倍、Na80倍およびZn14倍と多量に存在したが、初期の菌体中のそれぞれの金属イオン濃度はG培地使用の場合に比較し2～3倍程度であった。副性する有機酸には、イタ酒石酸の他にクエン酸、リンゴ酸などが認められ、後期に多少減少した。

TJ、HAおよびHB模擬培地における醗酵成績は、TJでは揮発酸および不揮発酸資化のための誘導期の延長などによる低下が認められ、HAでは殆どG培地に匹敵し、HBでは菌の生育が認められなかった。これらの結果は、天然培地の結果に合致していた。

2　新生有珠火山灰における微生物相（11）。
嫌気性N固定菌について。

北大応菌　吉田　忠

目的．1977年に爆発した有珠山の新火口付近で，保存状態の良い火山灰に自然着生する微生物相の変化を，噴火4年後から8年間にわたって調べた結果で，*Arthrobacter*，*Corynebacterium*などの一般細菌が堆積4年後以降に，糸状菌が6年後以降に着生するのにくらべて，嫌気性窒素（N）固定菌が，堆積4年後にすでに火山灰1g（乾重）当たり10^4のオーダーで存在しており，これが，無菌状態の火山灰に最も早くに着生し，増殖していると見られることから，火山灰有機化の先駆として重要な役割を演じていることが考えられたので，これらの分離、同定を試みた。

方法、結果．試験菌は，1986年5月の火山灰試料について，嫌気性N固定菌用培地を用いた集積培養の後，同菌用寒天培地を用いたN_2気流中での平板培養により純粋分離した7株で，主として土壌微生物実験法（土壌微生物研究会編，昭52），Bergey's Manual（1984，1974）を参考として同定試験を行った。その結果，これらは2群を含み，その1群は（5株），好気性とされながらO_2分圧の低いところでも生育し，元来，豆科植物に根粒を形成するgenus *Rhizobium* に属するものと考えられ，未だ根粒を形成するにいたってはいないが，諸性質から判断して*Rh. meliloti* に近いものと推測された。他a 1群（2株）は，放線菌で，基質菌糸が分断するだけのgenus *Nocardia* に属するものと判断された。

今後．さらに，これらのN-固定能，固定条件等につき検討の予定である。

3　発芽コーン酵素による生でん粉の分解

（北海道立工業試験場、＊食品総合研究所）○宇野豊子、小林昭一

1．はじめに　でん粉から異性化糖、アルコールを生産する場合、予め、でん粉をグルコースに分解する必要がある。天然に存在する生でん粉は酵素による分解率が低いため、工業的にはでん粉を加熱糊化し糖化している。この加熱糊化には、多量のエネルギーを必要とするため、生でん粉を効果的に分解する酵素の検策がなされている。

植物は発芽の際、固形のでん粉粒をグルコースなどの低分子可溶性物質に酵素分解して吸収利用している。この発芽とともに生成されてくる酵素を種子中より抽出分離し、でん粉に作用させてその効果を検討した。また、他起源の酵素を添加した場合の相乗効果についても検討した。

2．実験方法　発芽させたコーンの芽、根を取り除き磨砕し、ガーゼろ過、遠心分離して上澄み液を粗酵素液とした。硫安塩析、遠心分離して沈殿を0.1M-リン酸バッファーに溶解（pH6.0）、透析しながら、コロジオンバッグ濃縮した。濃縮液はG3000SWカラムの高速液体クロマトグラフィーにより、各ピーク別に分画分取した。

コーンスターチに抽出分離した酵素を添加し、pH5.0、40℃において、振とう反応させた。各時間毎に反応液の一部をとり、分解率、糖組成の分析を行った。

3．実験結果　1）コーンスターチ1g当り、65IUの発芽酵素を作用させて反応させた場合の分解率は24時間で約50%、50時間で約67%前後となった。

2）発芽酵素によるコーンスターチの分解により、最初にマルトースが出現し、次いで3糖以上のオリゴ糖も検出されるが、最終的には、ほとんどグルコースに分解された。

3）発芽酵素液にグルコアミラーゼ、α-アミラーゼをそれぞれ組み合わせて使用した場合、グルコアミラーゼについては、相乗効果が見られ、分解率が向上した。

4　α－ガラクトシダーゼに関する研究
Rhizopus hangchow によるα－ガラクトシダーゼの生産とその性質

（帯畜大農化）　○高野一紀、和田英昭、佐藤哲也、菅原四郎

1．目的　演者らは、これまで微生物の生産するα－ガラクトシダーゼ（α－G）の性質の比較検討を行なってきた。*Rhizopus hangchow* の生産するα－Gは、他の微生物のものとは異なり、メリビオースやラフィノースを分解しないものである。今回は、本菌によるα－Gの生産条件を検討し、その二、三の性質について調べた結果について報告する。

2．方法　使用菌株：*Rh. hangchow* AHU 6522。基本培地としてCzapek-Dox培地（窒素源：ペプトン1%）を使用した。30℃で振盪培養を行ない、得られた菌体を洗浄後ポリトロンで磨細し菌体内酵素を得た。酵素反応基質としては主として *p*NP－グリコシドを用いた。

3．結果　本菌株は、炭素源としてガラクトースを用いた場合α－Gの生産が最も高かった。ガラクトース濃度を高めた場合培地pHが低下し、それにともない生産量が低下した。培地をMES〔2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid〕を用いて緩衝化することにより、α－Gの生産量を約5倍に高めることができた。本菌株は他の菌株（*Aspergillus oryzae*、*Penicillium roqueforti*、*P. notatum* および *Monascus anka*）とは異なり、α－、β－グルコシダーゼ、β－ガラクトシダーゼおよびインベルターゼをほとんど生産しなかった。本酵素はメリビオースやラフィノースを基質とし得ず、またこれらに対する糖転移反応も認められなかった。特殊な基質特異性を有する本酵素の精製を行ない、諸性質を調べた。

5　Bifidobacterium adolescentis G1のフラクトオリゴ糖分解酵素（β-フラクトフラノシダーゼ）の精製と一般性質

（酪農大・食品科学）　小野寺秀一、○村松　圭、菊地政則、塩見徳夫

目的　すでに我々は、数種のBifidobacteriumが、フラクトオリゴ糖を炭素源とすることによりフラクトオリゴ糖分解活性を誘導することを報告した[1]。そして一部の株では、シヨ糖分解活性よりも高い1-ケストース分解活性が確認され、これまで知られているβ-フラクトフラノシターゼ、およびイヌリナーゼとは異なる基質特異性を持つ酵素の存在することが推定された。そこで、今回は、B.adolescentis G1のフラクトオリゴ糖分解酵素を菌体抽出液より精製したので報告する。

方法　フラクトオリゴ糖0.5%を炭素源とするBL液体培地を用いてB.adolescentis G1株を、嫌気条件下、37℃で72時間培養し、菌体を回収した。菌体を超音波破砕して得られた抽出液を粗酵素液として、DEAE-Sepharose CL-6B, Toyopearl HW-65F, Bio-Gel P-100の各カラムクロマトグラフィー操作および調製用電気泳動を行って本酵素を精製した。酵素反応は、pH6.1のリン酸緩衝液中37℃で、1-ケストースおよびショ糖を基質として行い、遊離するフラクトースをSomogyi-Nelson法および酵素法で測定して酵素活性を求めた。

結果　本酵素は電気泳動的に均一に精製され、分子量は、SDS-PAGE法により 74,000、ゲルろ過法により 86,000と算出された。等電点は、pH4.5付近であった。至適pHは、1-ケストースを基質としてpH6.1であった。安定pH域は、4℃,20時間処理でpH6.5～10.0であった。また10分間処理で45℃まで安定であった。本酵素は、1-ケストースおよびフラクトオリゴ糖に対してよく作用し、1-ケストースおよびショ糖に対するK■値は、それぞれ1.1■M,11■Mであった。また各基質(10■M)に対する相対活性は、1-ケストース(100)、ニストース(95.3)、1^F-フラクトシルニストース(73.9)、イヌリン(32.1)、ショ糖(13.4)、ラフィノース(0.2)であった。

1)小野寺ら，日農化北海道支部昭和63年度秋季学術講演会要旨集，p.5.

6　Candida utilis　β-Fructofuranosidase の縮合反応

（北大・農化）中村　充，佐藤恭子，○木村淳夫，千葉誠哉

1.目的　オリゴ糖の酵素的合成法として，a)多糖の加水分解，b)糖転移反応の他に，最近，縮合反応が利用されている[1]。　この反応は加水分解の逆反応と考えることができ，一般的に基質濃度(本酵素の場合はfructose)を高くして行われている。a)およびb)の方法と比較すると基質の調製が容易で安価と考えられるが，反応収率が低いことが指摘されている。　我々は既にglucoamylaseおよびα-glucosidaseの示す縮合反応を詳細に解析し，その反応機構について新たな知見を得た[2]。　今回，Candida utilis β-fructofuranosidaseの縮合反応について，オリゴ糖生成最適条件を検討し，フラクトオリゴ糖(inulobiose, levanbioseなど)の他にethyl β-fructofuranosideの生成を確認したので報告する。

2.方法および結果　酵素は市販品を使用した。　基質濃度，反応温度およびpHを変化させ，生成するオリゴ糖をHPLC (Shodex Ionopak S-801, 0.8×30cm)で分離定量した。　その結果，基質濃度70%，pH5.0，60℃の条件で最も効率よくオリゴ糖が生成されたが，その生成量は極めて低いことが認められた。　反応液中にethanolが存在すると(基質濃度25%)，新たな糖(EFと仮称)の生成が確認され，その糖の分離はHPLCを用いて行った。　EFは非還元糖であり，TLCにおいてfructoseよりRf値が大きいことが認められた。　酸加水分解およびβ-fructofuranosidase処理により，fructoseが生成した。　また，FD-MSより分子量を測定したところ，208であった。　以上の結果からEFをethyl β-fructofuranosideと推定した。　EFの生成条件において，縮合反応により生成される二糖類の量は極めて低いことから，EFはfructoseとethanolの縮合反応により生成されたものと考えられたが，生成したオリゴ糖から糖転移反応により生じていることも否定できない。

1)鰐坂 & 藤本，澱粉科学，36，113 (1989).　2)木村 & 千葉，農化，63，386 (1989).

7　アモルファス乳糖の結晶化におよぼす牛乳塩類の影響

（北大酪農科学研究施設）○斎藤善一，佐藤憂美

1. 目的　牛乳，脱脂乳，ホエーなどを噴霧乾燥すると，乳糖はα型とβ型を1：1.5の割合で含むアモルファス状態となる。吸湿により容易にα-乳糖水和物の結晶となる。β-乳糖の結晶化はむずかしく，特殊な条件下でのみ可能である。[1] 乳成分，特に塩類がβ-乳糖の結晶化ならびにα，β-乳糖の混合結晶の生成におよぼす影響を調査したので報告する。

2. 方法　市販の脱脂粉乳，ホエーパウダー（WP），および，噴霧乾燥又は凍結乾燥により調製したアモルファス乳糖（それぞれSDL，FDLと略記）を試料とした。40～100℃に加温したコンウエイ拡散分析用容器の内室に同温度の試料，外室に同温度の飽和食塩水を入れ密封して恒温器内で30～300分加温した。結晶化した乳糖の判定はX線回折（銅対陰極使用）によった。標品のX線回折図と文献値から，回折ピークの位置が $2\theta°$ = 12.4，16.4，19.6，20.0にあるものをα-乳糖結晶，$2\theta°$ = 10.5，19.1，20.9にあるものをβ-乳糖結晶，$2\theta°$ = 18.4，19.1，20.1，22.0にあるものをα-，β-乳糖の混合結晶とした。

3. 結果　室温で加湿すると，すべてが速やかにα-乳糖結晶となるが，SLDとFDLはさらにβ-乳糖結晶を生成し，高温では混合結晶も得られた。特にFDLは混合結晶となり易く，50℃以上60分で3結晶が混在した。牛乳の場合と同程度の濃度になるように $CaCl_2$，$MgCl_2$，NaCl，クエン酸塩，燐酸塩を加えて凍結乾燥すると混合結晶は得られなかった。$CaCl_2$ を添加した場合はβ-乳糖結晶も生じなかったので，WP中でCaはβ-乳糖の結晶化を阻害すると考えられる。40℃以上では，脱塩WPにβ-乳糖結晶が生じること，脱イオン水に対し透析したホエーに乳糖を加えて凍結乾燥したものはβ-乳糖とα-乳糖の結晶を作ること，脱イオン水をホエーに対し透析した後に凍結乾燥したものはβ-乳糖結晶も混合結晶も作らないことは，塩類による結晶化阻害を示した。

1) Z. Saito: Food Microstruc., 44, 333 (1985)

8　*Kluyveromyces lactis* 産生キラー毒素に対する *Saccharomyces cerevisiae* 耐性変異株の遺伝学的解析

北大　農化　○川本伸一，羽鳥英孝，田辺千夏，佐藤祥子，大野暢司

我々は，*K. lactis* 産生キラー毒素タンパク質の作用機作解明を目的として，感受性酵母 *S. cerevisiae* から耐性変異株を取得（17株）しその遺伝生理学的解析を進めている。

これまでにこれら変異株はその表現型から，1）プロトプラスト化するとキラー毒素感受性となるもの（Type Ⅰ），2）プロトプラスト化してもキラー毒素耐性を示すもの（Type Ⅱ），3）プロトプラスト再生欠損を示すもの（Type Ⅲ）の3つのタイプに分類されること，また耐性変異はすべて劣性であることが明らかとなった。特にType Ⅲに属する変異株（5株）はキラー毒素耐性と共にプロトプラスト再生能欠損という興味ある表現型を示す。

そこで両変異形質を指標とした相補性試験を行なった結果，Type Ⅲに属する変異株は3つの相補群A（3株），B（1株），およびC（1株）に分類されることが判明した。さらに酵母-大腸菌シャトルベクター $YCp50$ に構築された遺伝子ライブラリーを用いて上記相補群Bに属する耐性変異を相補する遺伝子のクローン化を試みた。スクリーニングに際しては，遺伝子ライブラリーの組換えプラスミドDNAを相補群Bに属する変異株TK13（*MATa ura3 leu2 top1 his4 skt-13*）にプロトプラスト法により形質転換し，再生してきた Ura^+ 形質転換体についてキラー毒素感受性を判定する方法を用いた。その結果，最終的に一つの形質転換体が保有する組換えプラスミド pSK13 がキラー毒素耐性並びにプロトプラスト再生欠損の両変異形質を同時に相補した。pSK13の挿入DNA断片長は約11 kb_p であった。

9　マメキモトリプシンインヒビター遺伝子の単離とその発現の解析

○土生芳樹、Surin Peyachoknagul、大野暉司（北大、農、農化）

目的　シカクマメキモトリプシンインヒビター（ＷＣＩ）の組織及び時期特異的発現の制御機構を解析するためにＷＣＩ遺伝子の解析を行った。

方法と結果　最も多量に存在するＷＣＩ－３のｃＤＮＡをプローブとしたサザン分析の結果からＷＣＩ遺伝子は遺伝子ファミリーを形成していることが推定された。これまでにＷＣＩ－３と相同性の高い３種の遺伝子を単離、解析し、そのうちの１種（wbg-2)をＷＣＩ遺伝子の一つと推定した。ＷＣＩ－３ｃＤＮＡ及び３種のゲノミッククローンを区別し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いたノザン分析の結果、wbg-2遺伝子は種子で、ＷＣＩ－３をコードする遺伝子は種子と塊根で発現していると推定された。ＷＣＩ－３に特異的なオリゴヌクレオチドを用いてサザン分析を行うと約５Ｋｂと約８ｋｂのＥｃｏＲＩ断片が検出され、どちらかがＷＣＩ－３遺伝子であると推定された。これはＥｃｏＲＩ完全分解したゲノムＤＮＡを電気泳動分画し、ＷＣＩ－３ｃＤＮＡの５’及び３’末端に特異的なオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼチェーン反応を行った結果、約４－６Ｋｂと約６－１５Ｋｂの画分でｃＤＮＡの大きさに相当するＤＮＡ断片が増幅されたことからも支持され、同時にＷＣＩ－３遺伝子はイントロンを持たないことが推定された。約４－６ＫｂのＥｃｏＲＩ断片からλgt11を用いて遺伝子ライブラリーを作製し、ＷＣＩ－３ｃＤＮＡをプローブとしてスクリーニングを行った結果、ＷＣＩ－３と極めて高い相同性を持ちこれまでの３種のものとは異なる新たなＷＣＩ遺伝子が得られた。

10　大腸菌低温耐性遺伝子の遺伝生理学的解析

（北大　農化）

○海藤晃弘　八十川大輔　川本伸一　大野暉司

当教室ではこれまで大腸菌 K-12 株の低温耐性変異形質を支配する遺伝子（crg 遺伝子）が大腸菌染色体上で trp 遺伝子から 0.3-0.5 分 lac 遺伝子側に存在する事を示した。

今回、crg 遺伝子領域以外は同一な遺伝的背景を有すると考えられる MET3 株（Csg）及び MET6 株（Crg）を用いて低温耐性形質以外に認められる形質について解析を行った。

上記両株に於て SDS 及び Vancomycin に対する感受性に明確な差異のあることが見いだされ、これら薬剤感受性をマーカーとして P1kc ファージによる遺伝子マッピングを行った結果、両形質は共に crg 遺伝子の極めて近傍で同一の遺伝座位に支配されていることが示唆された。又、これらの薬剤に対する感受性の差が細胞表層の変化に由来するか否かを検討するため庶糖密度勾配遠心分離により細胞表層画分、細胞質画分のタンパク質をそれぞれ調製し SDS-PAGE により両株間の比較を行った。その結果、細胞表層画分に関しては明確な差異は認められないものの、細胞質画分に於て分子量約 60,000 のタンパク質が MET6株（Crg）に於て著量存在する事が認められた。これら薬剤感受性が膜タンパク質の欠損等による可能性は低いことが推定されるが、低温耐性形質とこの 60k のタンパク質の関連については現在検討中である。

１１　Streptomyces lavendulae MA406 A-1 株の多面的変異現象の解析

（北大 農化）
○布施広光　中村通伸　八島重昂　大野啓司

［目的］

Streptomyces lavendulae MA406 A-1 株をアクリジン系色素で処理する事より，フォルマイシン生産能、色素生産能、気菌糸形成能欠損変異株（多面的変異株）が高頻度で取得され、それらの形質間の連関性に関して検討を行ってきた。今回は、A-1 株の形質発現の不安定性及び変異形質の多様性を解析する目的で、プラスミドの検索及び染色体の再編成の可能性について検討を行ったので報告する。

［方法及び結果］

従来のアガロースゲル電気泳動によるDNAの分画法では A-1 株からプラスミドは検出できなかったが、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行ったところ、A-1 株には少なくとも２つの線状プラスミド（ca.700kbp,ca.80kbp）が存在することが示された。そこで多面的変異株をPFGEを用いて検討した結果、株によりプラスミドの保有パターンに差異が認められた。さらに、A-1 株とは異なる分子量の線状プラスミド(ca.300kbp,ca.100kbp,ca.70kbp)が存在する事も示された。そこで、変異株が保有するプラスミドの由来に関して検討を行う為、A-1 株のプラスミドをプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、1) A-1 株に存在する700kbpのプラスミドは変異株に存在する700kb,300kbpのプラスミドのバンドとハイブリダイズした 2) A-1 株に存在する80kbpのプラスミドは変異株に存在する100kbp,80kbp,70kbpのプラスミドのバンドとハイブリダイズした。又、A-1 株と変異株間に於てHindⅢ,DraⅠ切断パターンに差異が認められた為、プラスミドの染色体へのインテグレーションなどの染色体の再編成の可能性に関して現在サザンハイブリダイゼーションによる解析を行っている。

１２　ホタテガイ（Patinopecten yessoensis）からのメタロチオネイン様蛋白質の分離とその性質

○岡村一永、安居光國、竹内隆男、菊池慎太郎　（室蘭工業大学・化工）

目的：重金属に高い親和性を示すメタロチオネイン（ＭＴ）は、馬の腎臓より初めて単離されて以来、哺乳動物や微生物に広く存在することが確認されている。中でも海産性二枚貝が多量のＭＴを含有することは既に報告されているが、その生化学的諸性質についてはいまだ不明な点が多く残されている。我々は噴火湾に多産するホタテ貝（Patinopecten yessoensis）よりＭＴ様蛋白質を分離、その幾つかの生化学的諸性質について検討すると共に、生物工学的応用についても若干の試みを行ったのでその結果について報告する。

方法：ホタテ貝の肝臓をホモゲナイズした後、アセトン分画（45～80 %）した。次いでSephacryl S-200ゲル濾過をおこなった。金属（亜鉛）の定量は原子吸光法により行った。蛋白質の固定化はニトロセルロース膜（ＮＣＭ）を支持担体として行った。

結果と考察：アセトン飽和画分のゲル濾過の結果、分子量の異なる二つの亜鉛結合性蛋白質が認められたが、高分子量域に溶出された蛋白質のみを再ゲル濾過したところ、再び小分子量域に蛋白質ピークが出現したことから、低分子量蛋白質の会合の程度によって見かけ上複数の亜鉛結合性蛋白質が検出されたものであり、本質的にホタテ貝肝臓の亜鉛結合性蛋白質は一種類であると推定された。他方、この亜鉛結合性蛋白質は中性条件下において258 nmに吸収極大を有し、また280 nm付近に芳香族アミノ酸に起因する吸収を殆ど有さなかった。これらの結果はムラサキイガイ（Mytilus edulis）ＭＴの性質とよく一致するものであった。次いでこのＭＴ様蛋白質をＮＣＭ上に固定化し、ｐＨ制御による固定化ＭＴの亜鉛の吸着－遊離能について検討したところ、酸性側ｐＨで吸着金属が遊離し、中性領域で金属の再吸着が認められたことから、このＭＴ様蛋白質が金属の吸着に関して哺乳動物や微生物のＭＴと類似した性質を有することが示された。

13　抗酸菌の脂肪酸合成酵素の固定化

○菊池 慎太郎 （室蘭工業大学） P.E.Kolattukudy （オハイオ州大・バイオテクノロジー）

目的： Mycobacterium smegmatis や M.tuberculosis などの抗酸菌には三種類の脂肪酸合成酵素（系）の存在することが知られており、これらの酵素（系）が共同的に作用して抗酸菌に特徴的な多種多量の脂肪酸の供給を可能ならしめているものと推定されている。特に、ミコール酸をはじめとする極めて長鎖の脂肪酸は、その免疫増強作用や細胞性免疫の誘発などの特有の生理活性を有することから、生化学的にも、また医薬品生産の観点からも興味がもたれている。今回、我々は 上述の三種類の酵素（系）から、長鎖脂肪酸の de novo 合成に関与する酵素を M.smegmatis から分離してこれを固定化し、その脂肪酸合成について遊離酵素のそれと比較検討した。

方法： M.smegmatis 細胞質画分よりⅠ型脂肪酸合成酵素を精製した後、これを trimethylolpropane trimethacrylate (TMPTMA) 存在下において 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) を支持担体として低温放射線重合法により固定化した。酵素活性は、縮合単位の 2-^{14}C-malonyl-CoA の生成脂肪酸への取り込み量により測定した。

結果と考察： 固定化脂肪酸合成酵素は、遊離酵素と同様に acetyl-CoA をプライマーとし malonyl-CoA を縮合単位として炭素数 24 程度までの脂肪酸を de novo 合成した。反応の至適温度および pH に関して、固定化酵素と遊離酵素の間に差異は認められなかったが、前者は後者に比して低イオン強度条件下において著しく安定であった。また、acetyl-CoA および malonyl-CoA に対する固定化酵素の Km 値はいずれも遊離酵素のそれとほぼ同一であり、さらに固定化酵素においても遊離酵素と同様に通常の Lineweaver-Burk プロットが観察されることから、本固定化酵素系においては反応に際して Nernst 型の基質の diffusion-limitation はないものと推定された。

14　植物の低温耐性とスフィンゴ脂質との関連性について

（帯畜大農化）○母坪研巳，木下幹朗，小嶋道之
大西正男，伊藤精亮

1．目的　先に演者らは、細胞膜や液胞膜を構成しているｾﾚﾌﾞﾛｼﾄﾞ(CMH)の各分子種の相転移温度を明らかにして、CMHを構成するﾋﾄﾞﾛｷｼ酸の鎖長と相転移温度との間に関連性のあることを明らかにした[1]。また、耐冷性の高いｺﾑｷﾞやﾗｲﾑｷﾞなどの葉CMHには、n-9系列の不飽和ﾋﾄﾞﾛｷｼ酸含有分子種が存在し、その相転移温度は飽和ﾋﾄﾞﾛｷｼ酸含有分子種のそれに比べて低いことも明らかにした。今回は、CMHに不飽和酸を含有するｺﾑｷﾞおよびﾀﾞｲｺﾝ茎葉のCMHの前駆体であるｾﾗﾐﾄﾞ(CM)の構成分を比較調査して、構造的関連性を明らかにするとともに、低温感受性植物である西洋ｶﾎﾞﾁｬ子葉の低温ｼﾌﾄ時の脂質、特にCMHおよび主要ﾘﾝ脂質ｸﾗｽの組成変化を明らかにしようとした。

2．方法　常法に従ってCMおよびCMHを分離して、構成分の化学的組成をGLC等で分析した。また、25℃で生育させた西洋ｶﾎﾞﾁｬの子葉は、12℃で３日間低温処理した後に脂質を調製して、２次元TLCで各脂質ｸﾗｽに分別後に構成分および分子種組成を求めた。

3．結果　ｺﾑｷﾞおよびﾀﾞｲｺﾝ茎葉より調製したCMの構成ﾋﾄﾞﾛｷｼ酸は、両者とも炭素数24,22および26が主要であり、CMHと同様にそれらのn-9位に二重結合(cis型)を有する不飽和ﾋﾄﾞﾛｷｼ酸を含むことが認められた。しかし、不飽和ﾋﾄﾞﾛｷｼ酸の含有割合はCMHのそれに比べて低く8-9%であった。また、構成ｽﾌｨﾝｺﾞｲﾄﾞは両者とも80%以上がﾄﾘﾋﾄﾞﾛｷｼ型であった。低温感受性植物である西洋ｶﾎﾞﾁｬ子葉を低温処理すると、ｸﾞﾘｾﾛﾘﾝ脂質の構成脂肪酸の不飽和度が若干増大したが、CMHの構成分は他の脂質ｸﾗｽと同様に未処理の場合と大きな違いは認められなかった。しかし、低温耐性植物であるﾀﾞｲｺﾝ茎葉より調製したCMHの構成ﾋﾄﾞﾛｷｼ酸の割合は、試料調製時期により少し変動することが認められ、環境要因によるCMH組成の変動が示唆された。

1) M.Ohnishi et al:Proceedings on ISF-JOCS world congress (1988), vol.1, p.930

１５　　アズキの冷温障害

（北大低温研、北農試*）○匂坂 勝之助、黒田 治之*、大和田 琢二、
松田 祐介、奥田 徹

目的：アズキは冷温感受性を示す作物の一つで、生育の初期に、度々異常寒波にみまわれる北海道では、この性質が原因で発芽後に枯死する被害が発生する。気象的な回避手段はないので、この問題を解決する方策として、アズキの性質を変えて冷温非感受性とすることが考えられる。アズキの冷温感受性の細胞学的性質の解析は進んでいない。本報では、どの栄養器官が冷温感受性を示すかについて調査した結果を中心に報告する。

方法：品種；早生大納言、エリモ小豆。実験材料；ポット栽培及びシャーレ内で育てた本葉展開前の苗。温度処理；4℃と0℃。障害からの回復条件；戸外の温度（約22℃）。組織の染色；toluidine blue, 4',6-diamidino-2-phenylimidazole (DAPI).

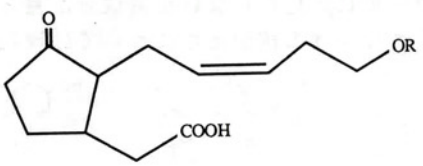
結果：1）冷温障害を受ける器官；ポット栽培の苗を4℃に保つと、根に障害があらわれた。シャーレ内では0℃で上胚軸にも障害が見られた。障害のあらわれる初期的症状として、根の表皮と根毛の両方に局部的に異常な形態的変化が出現した。ついで細胞の内容物の漏出が起こり（中期）、最終的に組織の崩壊が起こった。2）回復；平年気温の環境下に移すと、およそ1週間で萎縮した葉が正常の状態になり、成長を開始した。この時、既に根の再生が進んでいた。以上のことから、根の器官形成のためにこの器官で特異的に発現する一群の遺伝子産物が冷温感受性を示している可能性が高いと考えられる。異常気象下で、病原菌の侵入を防御する機能が低下して被害の発生する可能性もある。

１６　　ﾊﾞﾚｲｼｮ塊茎形成誘導物質

（北大農化、農業生物*）○松浦英幸、吉原照彦、市原耿民、幸田泰則*、喜久田嘉郎*

1.目的）ﾊﾞﾚｲｼｮ塊茎は、ｽﾄﾛﾝ(側枝)の伸長停止それに続くｽﾄﾛﾝ先端次頂部の肥大により形成される。塊茎形成は短日及び夜間の低温環境下において開始または促進される。この環境下、ﾊﾞﾚｲｼｮ葉内で塊茎形成誘導物質が形成され地下部へ移動し、塊茎形成を誘導するものと考えられている。演者らは既にこの塊茎形成誘導物質のひとつを単離し、その構造1を報告した[1]。今回は新たに、他の活性物質(2)を単離し、それが1のｱｸﾞﾘｺﾝである tuberonic acidであることを明らかにしたので報告する。

2.方法及び結果）生物検定法としてﾊﾞﾚｲｼｮ茎断片組織培養法[2]を用いた。短日条件下(札幌:7月下旬～8月上旬)圃場で育成したﾊﾞﾚｲｼｮ(品種:ｴﾆﾜ､ﾀﾞﾝｼｬｸ)葉80kgを収穫し、70%ｴﾀﾉｰﾙ溶液に浸漬後、常法に従い、n-ﾍｷｻﾝ､酢酸ｴﾁﾙ、水の各可溶部に振り分けた。水溶部を活性炭ｶﾗﾑｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰに供し、ｴﾀﾉｰﾙ溶出部を得た。このｴﾀﾉｰﾙ溶出部を濃縮後、酢酸ｴﾁﾙ、水の各可溶部に振り分けた。活性物質1は水可溶部より単離しているが酢酸ｴﾁﾙ可溶部も活性を有するので、今回、この酢酸ｴﾁﾙ可溶部を各種ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰに供し、精製を進め、活性物質(2)を5mg単離した。^{1}Ｈ－ＮＭＲ、^{13}Ｃ－ＮＭＲ、ＥＩ－ＭＳ ｽﾍﾟｸﾄﾙﾃﾞｰﾀから活性物質(2)をtuberonic acidと同定した。そのｽﾍﾟｸﾄﾙﾃﾞｰﾀは合成品の3-oxo-2-(5'-hydroxy-2'-cis-pentenyl)-cyclopentane-1-acetic acid(2)と、よい一致を示した。強い塊茎形成活性が10^{-5}M(2ppm)で認められた。



1 R=β-D-glucose
2 R=H:tuberonic acid

1)T.Yoshihara et al., Agric.Biol.Chem., 53, 2835(1989)
2)Y.Koda and Y.Okazawa, Plant & Cell Physiol., 29, 969(1988)

１７　カラマツ（*Larix leptolepis* Gord）カルスの生成するリグナンについて。

（帯畜大・畜）○鍋田憲助，中原一哲，河合真吾，奥山寛，（北大・農）笹谷宜志

目的　カラマツ（*Larix leptolepis* Gord）の実生から誘導されたカルスは、クロロフィルを多く含み、低級テルペンを生合成する能力がある。[1] しかしながら　培養を長期間行なうとカルスは褐変し、培養後期にフェノール物質が大量蓄積することが示唆された。そこでカラマツの木材や樹皮中に検出されたリグナン類[2]を指標に、褐変したカルス中のリグナンの分析を行った。

方法　褐変したカラマツカルスをブタノールで抽出した。抽出液を、酸性、中性、塩基性画分について更に、シリカゲルカラム、展開溶媒　ベンゼン；酢酸エチル，酢酸エチル－エタノール系で分画した。ベンゼン；酢酸エチル＝３：２，２：３，１：４，酢酸エチル，酢酸エチル：エタノール＝９８：２溶出画分について　HPLC 分析［ODSカラム，25cm×4.6mm (i.d.)，展開溶媒，メタノール：水＝２：３，1ml/分，検出 280 nm］し、クロマトグラム上の主たるピークを分取し、EI/MS分析（70 eV）した。

結果．カラマツ木材中に検出された主要リグナンのうち、ピノレジノールとHPLC保持容量、MSスペクトルの一致する成分［保持容量，23.1ml，MS：*m/z* 358 (M^+), 151 (100%)］をベンゼン；酢酸エチル＝２：３溶出画分に認めた。また 2,3－dihydro－2－(4-hydroxy－3－methoxylphenyl)－3－hydromethyl－5－(ω－hydroxypropyl)－7－methoxybenzofuranのMSの文献記載値と一致する成分［MS；*m/z* 360 (M^+), 342 (100%)］を酢酸エチル：エタノール＝９８：２溶出画分に検出した。その他、数種のリグナン様物質の存在を認めた。しかし、カラマツの主要リグナンである lariciresinol, isolariciresinol, secoisolariciresinol は認められなかった。

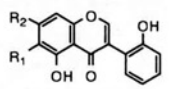
1) K. Nabeta et al. "Recent Advances in Flavor Science and Technology" G. Charalambous (ed). in press, 2) A. Sakakibara et al. *Holzforshung* 41, 1－11 (1987)

１８　塩化銅ストレスにより誘導的に生成されるキショウブの抗菌性イソフラボノイドについて

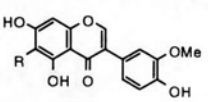
（北大　農化）　　○塙　藤徳、田原　哲士、水谷　純也

1．目的 植物は病原菌の感染刺激や重金属、紫外線などによるストレスを与えられると誘導的にストレス化合物を生成する。これらの化合物の中には抗菌活性を有するものもあり、ファイトアレキシンとして植物の病原菌に対する防御機構に寄与していると考えられている。我々は、アヤメ科の帰化植物であるキショウブ（*Iris pseudacorus*）に塩化第二銅によるストレスを与えるとコントロールには見られない抗菌性物質が生成されることを見いだした。これらの化合物の単離、構造決定を試みた。

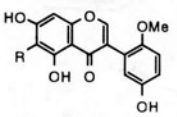
2．方法及び結果　キショウブ葉部に剣山による針穴を多数あけ、これを 3mM の塩化第二銅水溶液に浸漬した。24 時間後植物体をアセトンで 30 分間抽出し、粗抽出物を得た。抗菌活性は *Cladosporium herbarum* を検定菌とする TLC bioautography によって検出した。これらの成分はフェノール性物質の呈色試薬であるギプス試薬に対して陽性であった。活性本体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画、 PTLC 等により単離し、各種スペクトル分析により構造決定を行った。その結果、新規化合物を含む下記のイソフラボノイドを得た。またこの他にもコントロールには見られない抗菌成分が見られた。それらの成分の単離、構造決定、並びに単離した化合物の抗菌活性については現在検討中である。



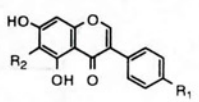
1a: R_1=OMe, R_2=OMe
1b: R_1=OMe, R_2=OH
1c: R_1=H, R_2=OH



2a: R=OMe
2b: R=OH



3a: R=OMe
3b: R=OH



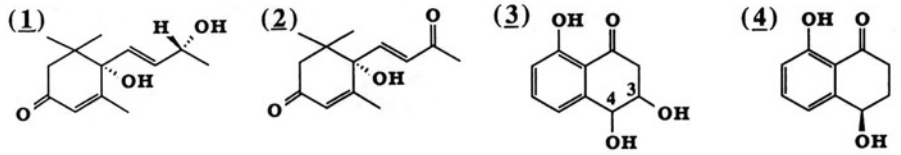
4a: R_1=OH, R_2=OMe
4b: R_1=OH, R_2=H
4c: R_1=OMe, R_2=H

19　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（第２報）

（北大農化、・北農試）　○田渕浩康、市原耿民、但見明俊・

１）目的　オーチャードグラス条葉枯病菌（Scolecotrichum 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て研究を行い、既に数種の化合物について報告してきた[1]。　今回はレタス種子生育阻害活性を示す区分から新たに4種の化合物を単離、同定したのでここに報告する。

２）方法及び結果　Scolecotrichum graminis Fuckel 582をPS培地で、25℃、30日間暗所にて静置培養した。培養濾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、又レタス種子に対し、強い生育阻害活性を示すA、B区分よりそれぞれ(2)と(4)、(1)と(3)の代謝産物を単離した。各種スペクトルデータと文献値との比較より(1)はvomifoliol、(2)は4-hydroxy-4-(3-oxo-1-butenyl)-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-oneであると同定した。(3)の相対配置は、glycol部位の3,4位のプロトンのカップリング定数(8.8Hz)より、2つのOH基がequatrial-equatrialの trans-3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxy-1(2H)-naphthalenone、(4)は既知化合物であるisoscleroneのスペクトルデータとの比較より(4R)-isosclerone であると決定した。尚、(3)の絶対配置はまた決定していない。また、(1),(2),(3),(4)の生理活性については現在検討中である。



1)田渕ら　日本農芸化学会平成元年度春季北海道支部会講演要旨集　P.3

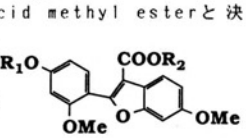
20　アルファルファの根から分泌される新規化合物の構造

（北大農化、・草地試）
°越野広雪、正岡淑邦・、市原耿民

目的　アルファルファの根分泌物が根のミネラル吸収に及ぼす影響を明らかにする目的で、アルファルファをFeを欠除した培養液で水耕法により栽培したところ、Fe欠乏症が現れるにしたがって、根由来の分泌物の量が増加する現象がみられた。根から分泌される成分の同定を行う過程において、分泌物の中に新規天然物を見いだしたので、その構造決定について報告する。

方法及び結果　アルファルファをFe欠除にて水耕栽培し、循環させる培養液より、アンバーライトXAD-4樹脂をもちいて根分泌物を吸着させ採取した。HPLCで分取後、TLCにより精製し、新規化合物1を約100μg単離した。化合物1の分子式はHR-MSより$C_{18}H_{16}O_6$と決定した。^{1}H-NMR (CD$_3$OD): δ 7.77(d,J=8.6),7.33(d,J=8.3),7.10(d,J=2.2),6.94(dd,J=8.6,2.2),6.52(d,J=2.2),6.48(dd,J=8.3,2.2),3.85,3.79,3.76(each 3H,s) より、三置換ベンゼン環が２個、メトキシ基が３個存在することが明かとなった。UV λmax(MeOH,nm): 320,228,207 より、2-aryl-3-benzofurancarboxylic acidの基本骨格を有することが示唆された。アセチル化、ジアゾメタンによるメチル化よりフェノール性水酸基の存在がわかった。1aと1bの^{1}H-NMRデータ、1のNOESY,Gibbs試薬(−)の結果より置換様式を決定した。1aより酸性条件(EtOH,pTsOH,室温)で脱アセチル化され1が得られること、さらに還流しても1は安定であることを確認した。さらに1は1N NaOH-MeOH(1:1)で加水分解され1cをあたえ、1cはジアゾメタンですばやくメチル化され1が得られることをTLCで確認し、メチルエステルの部分構造を有することを確認した。以上の結果より1の構造を2-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-6-methoxy-3-benzofurancarboxylic acid methyl esterと決定した。

化合物1はその炭素骨格より生合成的にアルファルファの成分として知られる4'-O-methylcumestrol よりラクトン環の開環及びメチル化により生成されていると推定できる。



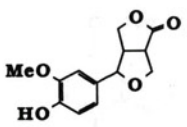
1 R_1=H,R_2=Me
1a R_1=Ac,R_2=Me
1b R_1=R_2=Me
1c R_1=R_2=H

21　チモシーがまの穂病菌(*Epichloe typhina*)によるフェノール化合物の代謝

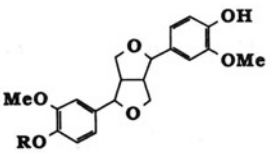
(北大農化、*北農試)°越野広雪、塚田聡子、吉原照彦、坂村貞雄、市原耿民
島貫忠幸*、但見明俊*、佐藤　徹*

目的　チモシーがまの穂病病徴部の抗菌物質を検索し、すでに種々の成分を単離し報告してきた。その中には、宿主植物起源と推定される多くのフェノール化合物が含まれるが、そのうちリグナン(1)は、pinoresinol(2)より酸化的に生成されていると考えられる。がまの穂病菌がそのような酸化を行うかどうか、さらにフェノール化合物をどの様に代謝するかを明らかにすることを目的に、リグナンとしてpinoresinol(2),フラボンとしてdiosmetin(3),フェニルプロパノイドとしてethyl ferulate(4)の代謝について検討した。

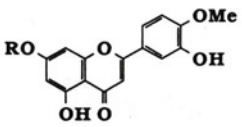
方法及び結果　*E. typhina* No.424 を22°C、暗所で30日間静置培養し、各化合物を添加しさらに2週間培養した。無添加の培養ろ液をコントロールとし、代謝産物を検索した。Pinoresinolからは化合物1とpinoresinolのα-ribofuranoside(5)が代謝産物として単離された。Diosmetinからは7-O-α-ribofuranoside(6)が、またethyl ferulateからはvanillyl alcohol(7)とvanillic acid(8)が代謝された。各化合物の構造はNMRなどのスペクトルデータにより決定した。化合物5の構造はアセチル化物のNOE差スペクトルを測定し立体化学を確認した。これらの代謝が、がまの穂病菌にとって解毒などの意味を持つのかどうかは今後検討する必要があるが、化合物5と6は新規化合物であり、興味深い代謝産物である。



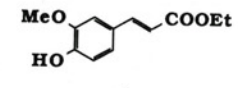
1



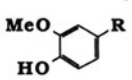
2 R=H
5 R=α-ribofuranosyl



3 R=H
6 R=α-ribofuranosyl



4



7 R=CH_2OH
8 R=COOH

合同懇親会

平成元年10月13日（金）　17：30～

於：池田町営レストラン十勝（ワイン城）
（TEL　01557-2-2467）

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