シンポジウム
合同学術講演会

講　演　要　旨

期日：平成８年７月26日(金)・27日(土)

場所：東京農業大学オホーツクキャンパス

日本農芸化学会北海道支部
日本食品科学工学会北海道支部
日本土壌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
生物機能化学科内　TEL 011－706－2501・2493

初日. シンポジウム 懇親会

13:55 − 17:30　　18:00 − 20:00

2日目　9:30 − ①−③　A会場

10:18 ⑤ ⑥　C会場

10:42 ⑦−⑩−⑫　A会場

12:06 ⑬　B会場

総会　13:20 − 13:50　A会場

特別講演　14:00 − 16:00　C会場

バス 帰 16:20 ⟶ 16:52 湘南

行き・湘南 (12:25 → 12:55　会場
13:10 → 13:42

会場へのご案内

○東京農業大学オホーツクキャンパス（網走市八坂196，TEL 0152－48－2116）

○網走バス（東京農大線）が利用できます。網走駅～東京農大の運賃は片道360円です。

網走駅 → 東京農大		東京農大 → 網走駅	
8：20	8：50	8：15	8：45
8：50	9：20	9：00	9：30
9：35	10：05	9：25	9：55
10：00	10：30	10：10	10：40
10：45	11：15	10：40	11：10
11：15	11：45	11：20	11：50
11：55	12：25	11：50	12：20
12：25	12：55	12：30	13：00
13：10	13：42	13：00	13：30
14：05	14：35	13：55	14：27
14：35	15：05	14：40	15：10
15：15	15：45	15：10	15：40
15：45	16：15	15：50	16：20
16：25	16：55	16：20	16：52
17：00	17：30	17：00	17：30
17：35	18：05	17：40	18：10
18：15	18：45	18：10	18：40
18：50	19：20	18：50	19：20
		19：25	19：55

○タクシー利用の場合

網走市内～東京農大　料金　2,000～2,500円

空　港～東京農大　料金　5,000円

○シンポジウム会場：大講義室

○一般講演会場：A会場→8－201講義室

B会場→8－202講義室

C会場→8－204講義室

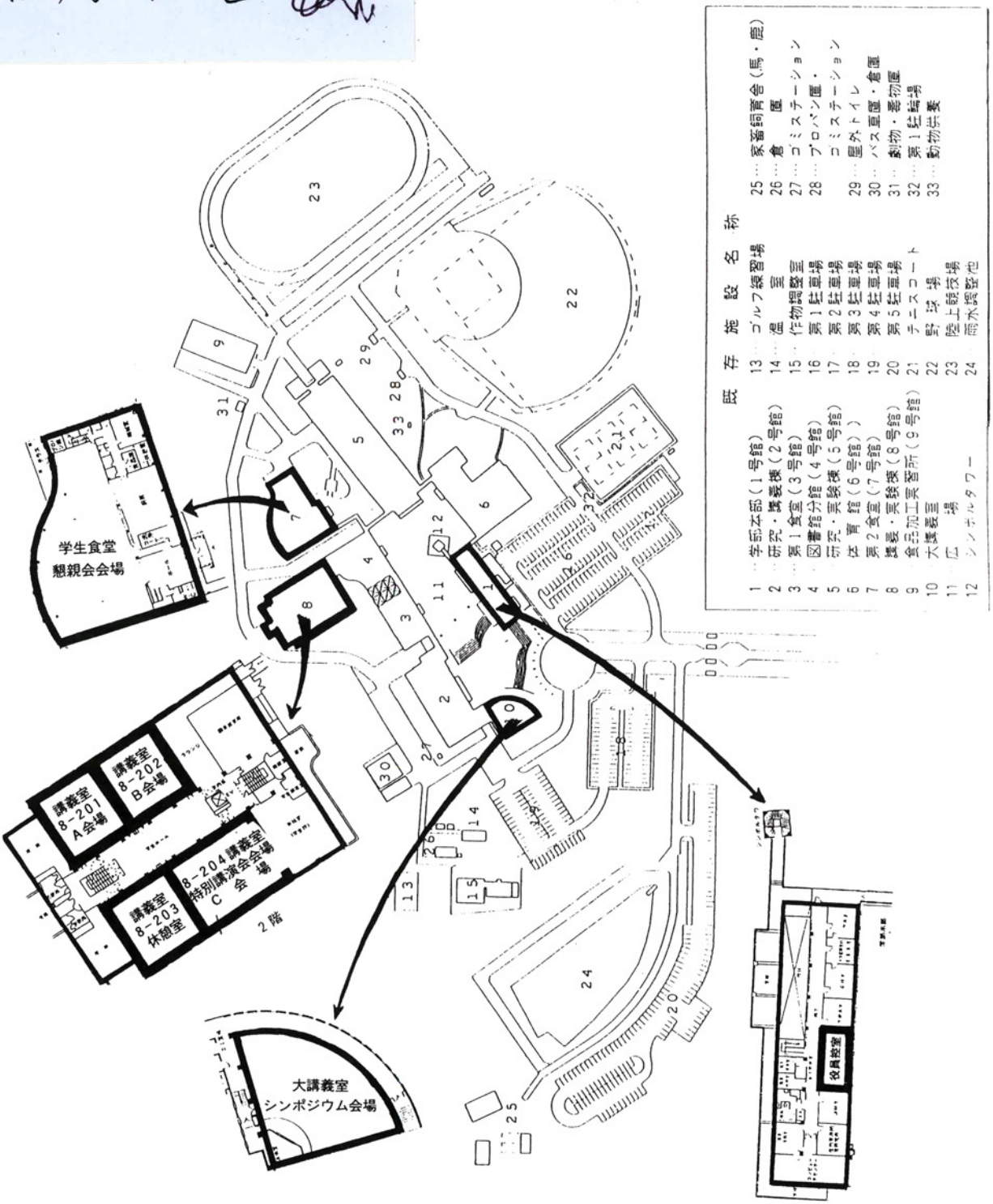
○特別講演会場：8－204講義室

○休　憩　室：8－203講義室

○懇親会会場：学生食堂

次頁の見取図を参照して下さい。

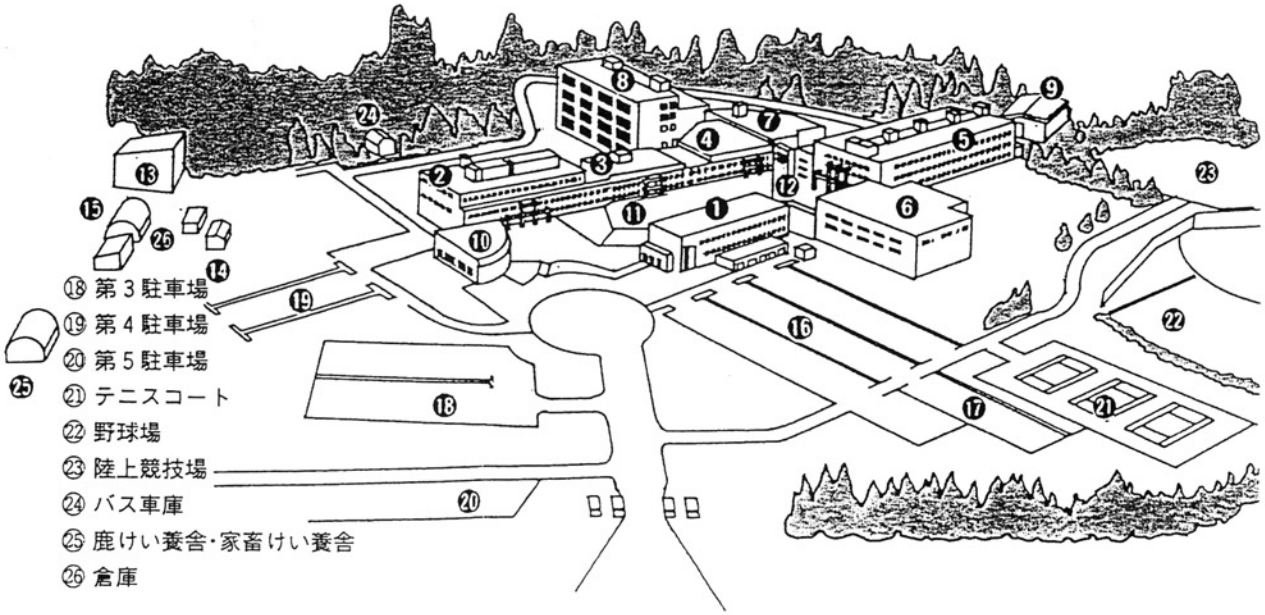
田原先生

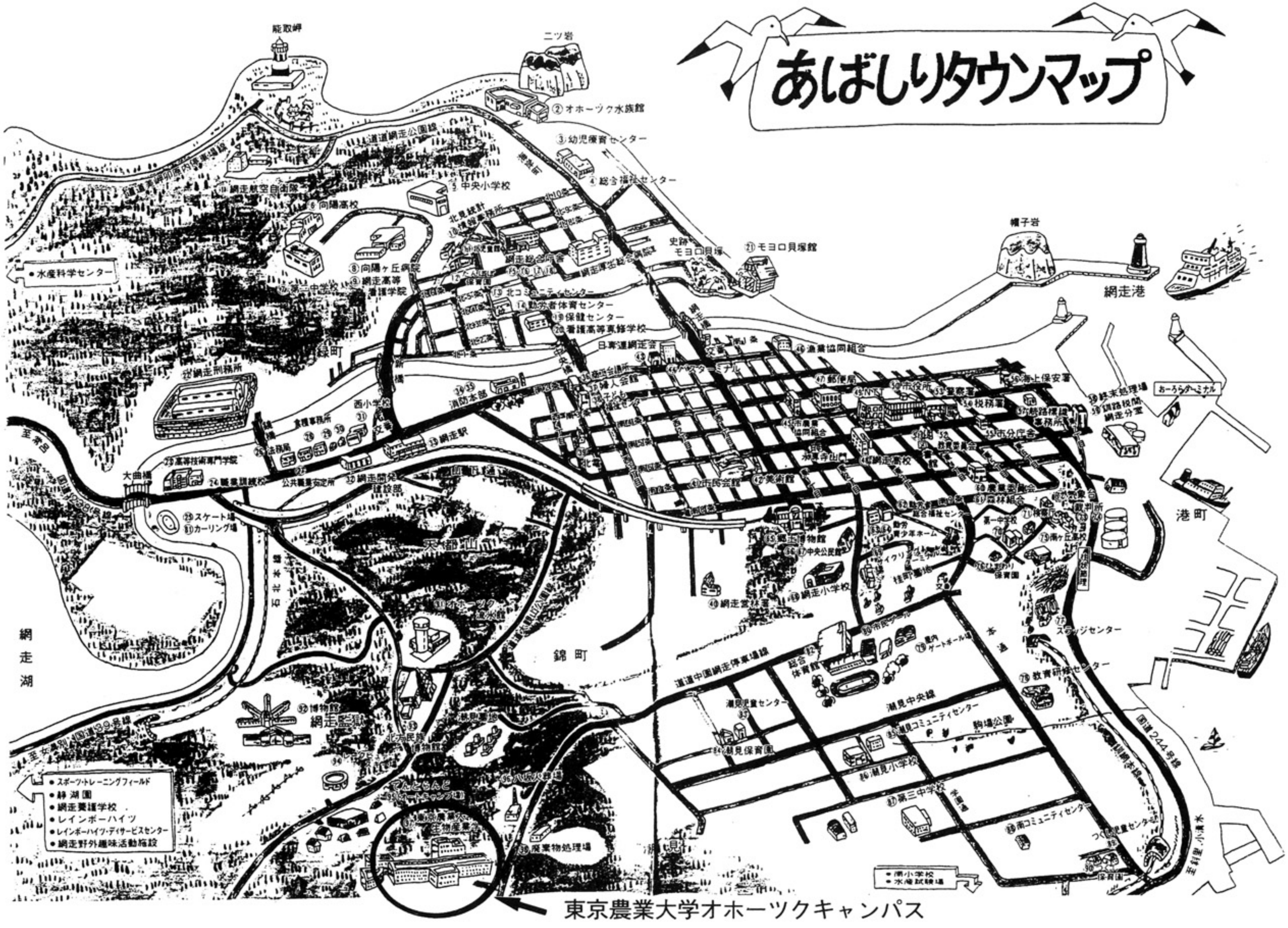

学生食堂
懇親会会場
講義室
8-201
A会場
講義室
8-202
B会場
講義室
8-203
休憩室
8-204講義室
特別講演会会場
C 会 場
2階
大講義室
シンポジウム会場
役員接室
既存施設名称
1…学部本部（1号館）
2…研究・講義棟（2号館）
3…第1食堂（3号館）
4…図書館分館（4号館）
5…研究・実験棟（5号館）
6…体育館（6号館）
7…第2食堂（7号館）
8…講義・実験棟（8号館）
9…食品加工実習所（9号館）
10…大講堂
11…庁舎
12…シンボルタワー
13…ゴルフ練習場
14…温室
15…作物調整室
16…第1駐車場
17…第2駐車場
18…第3駐車場
19…第4駐車場
20…第5駐車場
21…テニスコート
22…野球場
23…陸上競技場
24…雨水調整池
25…家畜飼育舎（馬・鹿）
26…倉庫
27…コミステーション
28…プロパン置・コミステーション
29…屋外トイレ
30…バス車庫・倉庫
31…動物・畜物置
32…第1駐車場
33…動物供養

会　場　見　取　図

東京農業大学オホーツクキャンパス見取図

① 1号館(学部本部)
② 2号館(研究・講義棟)
③ 3号館(第1食堂)
④ 4号館(図書館分館)
⑤ 5号館(研究・実験棟)
⑥ 6号館(体育館)
⑦ 7号館(第2食堂)
⑧ 8号館(講義・実験棟)
⑨ 9号館(食品加工実習所)
⑩ 大講義室
⑪ 広場
⑫ シンボルタワー
⑬ ゴルフ練習場
⑭ 温室
⑮ 植物資源学研究室
作物調整室
⑯ 第1駐車場
⑰ 第2駐車場





あばしりタウンマップ
能取岬
二ツ岩
②オホーツク水族館
③幼児療育センター
④総合福祉センター
⑤中央小学校
⑥向陽高校
⑧向陽ヶ丘病院
⑨網走高等看護学院
道道網走公園線
帽子岩
網走港
史跡 モヨロ貝塚
㉑モヨロ貝塚館
⑬北コミュニティセンター
⑭勤労者体育センター
⑮保健センター
⑯看護高等専修学校
日赤道網走舎
㉒網走刑務所
消防本部
西小学校
㉝網走駅
㉓高等技術専門学校
大曲橋
㉙スケート場
㉚カーリング場
天都山
石北本線
錦町
網走湖
網走監獄
㊷博物館
美術館
市民会館
㊻漁業協同組合
郵便局
市役所
警察署
税務署
海上保安署
おーろらターミナル
港町
市分庁舎
森林組合
第一中学校
網走小学校
スケジャセンター
教育研修センター
道道中園網走停車場線
総合体育館
潮見中央線
潮見児童センター
潮見コミュニティセンター
駒場公園
潮見保育園
潮見小学校
第三中学校
南コミュニティセンター
国道244号線
国道39号線
水産科学センター
● スポーツ・トレーニングフィールド
● 静湖園
● 網走養護学校
● レインボーハイツ
● レインボーハイツ・デイサービスセンター
● 網走野外趣味活動施設
● 南小学校
● 水産試験場
廃棄物処理場
東京農業大学オホーツクキャンパス

合同シンポジウム
平成８年７月26日㈮　大講義室

「作物生産・物質生産のバイオテクノロジー：北からの発信」

世話人（北海道大学）冨田房男・松井博和・横田　篤

13：55　開会の辞　　世話人　横田　篤

14：00（Ｓ－１）植物のストレス応答に関与するアセチルコリン

東京農業大学　桃木芳枝

（座長：田原哲士）

14：40（Ｓ－２）リン欠乏条件での作物のホスファターゼ

北海道大学　大崎　満

（座長：橋床泰之）

15：20（Ｓ－３）コケ培養細胞でテルペンを作る

帯広畜産大学　鍋田憲助

（座長：及川英秋）

16：00　休　憩

16：10（Ｓ－４）糖転移反応による新しい配糖体・糖質の合成

北海道糖業㈱　石川　弘

（座長：横田　篤）

16：50（Ｓ－５）微生物の多糖分解酵素によるイヌリン・レバンからのオリゴ糖生産

北海道大学　横田　篤

（座長：浅野行蔵）

17：30　閉会の辞　　日本農芸化学会理事　葛西隆則

懇 親 会

平成８年７月26日㈮（18：00～20：00）

東京農業大学オホーツクキャンパス学生食堂にて（１Ｐの会場見取図を参照して下さい）

会費：3,000円（学生会費1,500円）

当日お早目にお申込み下さい。

懇親会終了後に網走市内までのバスが出ます。

春季合同学術講演会プログラム
平成８年７月27日(土)

一般講演　（講演時間10分，討論２分，○印：講演者）

Ａ会場（８－２０１講義室）

（座長：橋床泰之）

9：30 (1)　ツクシウロコゴケ培養細胞からの大環状ビスビベンジル化合物の構造決定

（[1]帯広畜大・生資化，[2]シオノギ油日研）

○穂積玲子[1]，大久保進一[1]，加藤研治[2]，鍋田憲助[1]

9：42 (2)　オオクラマゴケモドキ（*Porella grandiloba Lindb.*）からの *pinguisane* 型セスキテルペンの構造

（帯広畜大・生資化）田崎弘之，○石川典子，五月女浩，鍋田憲助

（座長：福士幸治）

9：54 (3)　*Cistella japonica* の生産する生理活性物質の検索

（北大・農）○出浦　愛，佐藤博二，市原耿民

10：06 (4)　ジャスモン酸関連化合物の合成と生物活性

（北大・農）○奈良真二，荒巻久晃，戸嶋浩明，幸田泰則，市原耿民

（座長：田崎弘之）

10：18 (5)　糸状菌における異常芳香環形成反応に関する研究（第４報）

（北大・農）○渡辺賢二，及川英秋，八木健司，本間　守，市原耿民

10：30 (6)　糸状菌における異常芳香環形成反応に関する研究（第５報）

（北大・農）及川英秋，○八木健司，渡辺賢二，本間　守，市原耿民

（座長：川崎　潤）

10：42 (7)　セイタカアワダチソウ（*Solidago altissima*）地下部に含まれるホウレンソウ根腐病菌（*Aphanomyces cochlioides*）を指標菌とした抗菌活性物質の検索・単離

（北大・農）○水谷正憲，田原哲士

10：54 (8)　パキラ根の主要抗菌性物質について

（北大・農）○芝谷真理子，橋床泰之，田原哲士

（座長：戸嶋浩明）

11：06 (9)　軸性キラル化合物を用いるカルボン酸の絶対配置決定法 －BNDO法－ について

（北大・農）○福士幸治，重松勝一郎，水谷純也，田原哲士

11：18 (10)　軸性キラル試薬とα，β-不飽和カルボン酸とのエステルの立体構造について

（北大・農）福士幸治，○重松勝一郎，田原哲士

（座長：及川英秋）

11：30 (11)　小麦抗原性ペプチドエピトープのNMR解析

（北大・農，*学芸大・教育）○福士江里，田辺創一*，渡辺道子*，川端　潤

11：42 (12)　生薬成分中のα-グルコシダーゼ阻害物質

（北大・農）○西岡徹夫，川端　潤，仁木良哉

11：54 (13)　ナツメグ中の唾液アミラーゼ阻害成分

（北大・農）○川端　潤，森　夏子，仁木良哉

B会場（8−202講義室）

（座長：大庭　潔）

9：30 (1)　小豆の平衡含水率と蒸発潜熱

（東京農大）○田中親紀，田川彰男，村松良樹，林　弘通，北村　豊

9：42 (2)　各種ヤマイモの粘性物質の精製ならびに構成成分について

（東京農大）○津久井学，永島俊夫，佐藤広顕，小嶋秩夫，谷村和八郎

（座長：田川彰男）

10：06 (3)　魚皮コラーゲンの食品素材化に関する試験

（北海道食加研）○清水英樹，長島浩二，清水條資

10：18 (4)　ブナサケを利用したカツオ節様加工食品の開発（第2報）

（十勝食品技術センター）○阿部　茂，大庭　潔

（座長：福島道広）

10：30 (5)　赤タマネギ加工におけるペクチナーゼの応用

（オホーツク食品技術センター）○中野敦博，柿本雅史

10：42 (6)　包装条件の違いによる茹でうどんの保存性について

（オホーツク食品技術センター）○柿本雅史，中野敦博

（座長：柿本雅史）

10：54 (7)　ラット回腸におけるアポリポタンパクA-IV mRNAレベルに対する胆膵液の影響

（北大・農）○藤原麗子，園山　慶，青山頼孝

11：06 (8)　貝化石投与によるラットの血清生化学成分とミネラル吸収への影響

（[1]岩手連大院，[2]帯広畜大・生資化）○三浦健人[1]，中野益男[2]

（座長：佐藤広顕）

11：18 (9)　生菌製剤を用いた環境保全型養殖の試み－とくに養殖タイの脂質への影響について

（帯広畜大・生資化，[1]岩手連大院，[2]アース技研）

○斎藤秀俊，福島道広，中野益男，遠藤　威[1,2]，長田正宏[2]

11：30 (10)　網走市周辺に生息するエゾシカの脂肪酸組成の特性

（東京農大）○笠井孝正，横濱道成，井上勝弘，石島芳郎

11：42 (11)　ミトコンドリアDNA解析による日本在来イノシシとブタの遺伝的変異

（[1]帯広畜大・生資化，[2]岩手連大院，[3]帯広蓄大・獣医，[4]農水省畜試，[5]奈良文研，[6]歴博）

○渡部琢磨[1]，奥村直彦[2]，石黒直隆[3]，中野益男[1]，小松正憲[4]，松井　章[5]，佐原　真[6]

（座長：信濃卓郎）

11：54 (12)　ニンジンの再生植物体からの不定胚形成の初期過程について

（帯広畜大・生資化，）○保田　浩，増田宏志

12：06 (13)　不定胚形成を促進する物質の存在について

（帯広畜大・生資化）○佐藤　豪，保田　浩，増田宏志

C会場（8－204講義室）

（座長：森　春英）

9：30 (1)　ハマナスから単離した糸状菌によるキシランからのキシロビオースの生産

（北大・農）○竹林美穂，田中みち子，横田　篤，冨田房男

9：42 (2)　ダイフラクトースアンハイドライドIIIの製造

（日甜㈱，*北大・農）井上政尚，○菊地裕人，

*横田　篤，*冨田房男，佐山晃司

9：54 (3)　ＤＦＡIIIの特性，特にラットおよびヒト腸内フローラに及ぼす影響

（日甜㈱，*㈱浅井ゲルマニウム研究所，**北大・農）

○名倉泰三，*中村宜司，岸田太郎，**横田　篤，**冨田房男，佐山晃司

（座長：渡部俊弘）

10：06 (4)　キノリンの微生物分解

（北大・農）○吉竹宣宏，山本千勢子，横田　篤，冨田房男

10：18 (5)　葉面着生細菌 *Klebsiella oxytoca* の基質誘導性4－ヒドロキシケイヒ酸脱炭酸酵素（4－HCAD）の性質と精製の試み

（北大・農）○橋床泰之，田原哲士

（座長：横田　篤）

10：30 (6)　過酸化物分解活性を有する *Sporolactobacillus inulinus* の NADH oxidase

（東京農大，*昭和女子大）

○西山由隆，新村洋一，高尾幸子，宮地竜郎，渡部俊弘，小崎道雄*，鈴木英雄

10：42 (7)　ボツリヌスC型菌，Stockholm株の産生するプロジェニター毒素の構造

（東京農大）○渡部俊弘，大山　徹*，○相根義昌，井上勝弘，*北海道衛研

10：54 (8)　新開発ハイドロキシアパタイトのクロマトグラフィー担体への応用

（北海道食加研，[1]道工試）

○富永一哉，浅野行蔵，吉川修司，赤沢敏之[1]，勝世敬一[1]

（座長：富永一哉）

11：06 (9)　十勝産ブドウ果汁およびワイン中のリスベラトロール含量ならびに発酵過程における変動

（帯畜大・生資化）○柚木恵太，後藤大史，小嶋道之，大西正男，伊藤精亮

（池田町ブドウ酒研）○安井美裕，中林　司，内藤彰彦，川口政憲

11：18 (10)　インドネシアの伝統的発酵乳ダディヒの製法・利用法と性質について

（帯広畜大・生資化・岩大・院*）○有賀秀子，Yusdar ZAKARIA*

11：30 (11)　Kefir微生物のD－，L－乳酸同化と生産

（文教短大）吉田　忠，○豊島琴恵

（座長：須藤　学）

11：42 (12)　乳酸菌乾燥粉末スターターの開発（乳製品用乳酸菌の流動層乾燥）

（北海道食加研）○田村吉史，吉川修司，川上　誠，浅野行蔵，富永一哉

11：54 (13)　乳酸菌乾燥粉末スターターの開発（味噌用乳酸菌の乾燥化）

（北海道食加研）○吉川修司，田村吉史，川上　誠，浅野行蔵，富永一哉

12：06 (14)　乾燥酵母を用いた清酒醸造

（北海道食加研）○浅野行蔵，富永一哉，吉川修司

北海道農芸化学協会総会

（13：20～13：50） A会場（8－201講義室）

特別講演

（14：00～16：00） C会場（8－204講義室）

1．合成化学を機軸とした生理活性天然物研究と新展開

北海道大学農学部　市原耿民

（座長：葛西隆則）

2．鶏卵の生理活性物質とその利用

太陽化学㈱総研　　金　武祚

（座長：清水條資）

S－1

植物のストレス応答に関与するアセチルコリン

（東京農業大学生物産業学部）桃木芳枝

モモノキ

アセチルコリン(ＡＣｈ)は，動物の神経細胞と神経細胞の間隙に存在し，膜のイオンチャンネルの開閉を司り，情報や刺激を伝達する物質として知られる．植物と動物のＡＣｈレベルを制御するアセチルコリンエステラーゼ(ＡＣｈＥ)の存在および行動は，ほとんど同じであると言われる．植物における刺激やストレスへの応答は，原形質連絡糸で細胞から細胞へ刺激を伝達する系，すなわちＡＣｈ-受容体-ＡＣｈ分解酵素(ＡＣｈＥ)が存在すると考えられる．もし，この系においてＡＣｈが作用するとすれば，細胞と細胞の間に，ＡＣｈＥが存在すると想定される．以下の実験は，桃木(Plant Physiol.1992)の植物におけるＡＣｈ作用の仮説に基づいて行ったものである．

１．熱ストレスにおける葉の萎凋現象とＡＣｈ： マメ科牧草サイラトロに熱ストレスを与えると，ＡＣｈ分解酵素(ＡＣｈＥ)の活性が葉の萎凋現象と共に，とくに，第１および第２葉枕で著しく変化する．また，熱ストレス後，第１葉枕を含む三出複葉を外生的にＡＣｈ(0.1 μM)に浸漬すると３分以内に萎凋から回復し，ＡＣｈとK^{+}(10 μM)またはCa^{2+}(1 mM)に浸漬すると１分以内に回復する．しかし，このような迅速な葉の回復は，ＡＣｈＥの阻害剤であるネオスチグミン(30 μM)を加えた場合には認められない．これらのことから，サイラトロの葉枕が主にＡＣｈの作用部位であり，葉枕の運動細胞におけるイオンの流入・流出にＡＣｈの関与することが示唆される．さらに，ササゲ，キュウリ，ダイコンなどの作物品種間で葉の萎凋現象とＡＣｈＥ活性変化の強弱の差異が認められた．

２．熱ストレスとカルシウムの遊離： ＡＣｈ-受容体-ＡＣｈＥの系において，Ca^{2+}が主要な細胞内のメッセンジャーとしての役目を担っている．暗発芽させたトウモロコシ芽生えの各器官の横断切片をKoelleの方法によって組織化学的にＡＣｈＥ活性部位を検出すると，節の部位に最も顕著なＡＣｈＥ活性が認められる．つぎに，節の横断切片をカルシウムグリーンでラベルして共焦点走査型レーザー顕微鏡で検鏡と，熱ストレスを与えた切片では，ＡＣｈＥ活性が認められた内皮細胞および内皮細胞を囲む皮層細胞全体にCa^{2+}の分布範囲が拡大し，高いCa^{2+}分布量が認められる．

３．重力屈性における不均等な生長とＡＣｈ： トウモロコシ芽生えに重力ストレスを与えると，節部から４ｍｍ以下の中胚軸の部位で最も顕著な屈性現象が認められ，ＩＡＡ(インドール－３－酢酸)が不均等に分布することは知られる．重力ストレス後のＡＣｈＥ活性の分布も，ＩＡＡと同様に屈曲側のみに不均等分布すること，化学的定量(ＤＴＮＢ法)，組織化学的およびトウモロコシ芽生えの種子に注射したC^{14}-ＡＣｈの放射性活性が中胚軸で不均等分布することを認め，ＡＣｈが選択的イオンチャネルの開閉に関与することを裏付けた．同様に，重力ストレス後の屈性現象およびＡＣｈＥ活性の不均等分布も，ネオスチグミンにより阻害された．

４．今後の研究方向： ＡＣｈが選択的チャネル開閉を司ることによって，ストレス下の植物の水・イオン類・ホルモン類などの輸送を調節し，環境変化への適応の一端を担っていると考えられる．また，ＡＣｈＥ活性が熱ストレスに強い熱帯地域からの導入作物で高いことから，植物が環境変化のなかで獲得してきた耐性要因であるとも考えられる．さらに，塩生植物のイオンの器官間輸送に関与することが示唆され，現在，分子生物学的レベルでＡＣｈ作用とストレス耐性植物の関係を究明中である．

― メモ ―

比較生化学的見地から神経系の起源はどのへんに求められると考えるか？

1) acetyl choline の植物内の分布. 普遍的と考えられるかどうか.

2) 植物の acetyl choline esterase の基質特異性は明らかになっているか

3) 有機リン剤などによる薬害が植物で知られているか.

↳ AChE の阻害が植物に何をもたらすか

4) AChE の局在性.
→ 活発な現出 ?

ACh の局在性
→ 活発な現出 ?

葉枕における膨圧 … イオンの出入りを伴なう
↓
イオンチャンネルの関与.
↙
動物の場合との analogie.

生合成 ⟹ 蓄積 ⟹ 放出 ⟹ 受容
シグナル物質.
刺激　　分解酵素 ⇓
作用発現

放出抑制. ボツリヌス毒素.
放出促進. BHC
受容体をカバー. カルタップ
受容体と相互作用 ニコチン

分解阻害 … 有機リン剤. カーバメート剤.

S－2

リン欠乏条件下での作物のホスファターゼ

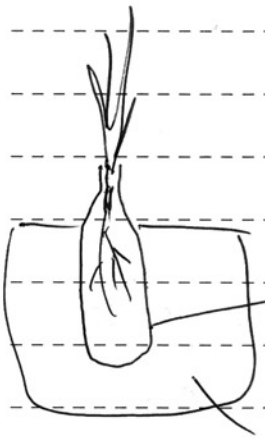
（北海道大学農学部・生物機能化学科）大崎　満

リン酸質肥料の原料であるリン鉱石資源は次第に枯渇しつつある。一方、土壌中のリンの3～6割は有機体リンにより占められており、このリン資源を有効利用し、限られたリン資源を循環利用する方策を探る必要がある。また、地球上には低リン土壌が広く分布しており、作物の低リン耐性を強化する必要がある。リンの有効利用と低リン耐性は１）低リン土壌からのリン吸収能、２）植物体中でのリン利用効率、３）低リン含有率耐性より成り立っている。低リン土壌からのリン吸収機構として、さらに1）各種有機酸や酸性ホスファターゼ(APase)の分泌、2）Pi transpoterの機能、3）VA菌根菌の機能等が重要である。今回は酸性ホスファターゼの根からの分泌機構について詳しく述べる。

各種作物を低リン条件下で水耕栽培したところ、分泌性酸性ホスファターゼ(S-APase)活性がもっとも高かったのは、ルーピンで、ついでトマト、ダイコン、キャベツで、アズキ、イネ、コムギでもっとも低かった。そこで、低リン条件下でルーピン（*Lupinas Albus* L. cv. Kievskij Mutant)の根より分泌される酸性ホスファターゼについて解析した。この酵素を精製したところ、等電点は4.7、最適pHは4.3であり、分子量がSDS-PAGEで72,000、ゲル濾過で140,000であったことから、この酵素はホモの二量体と考えられた。*p*-ニトロフェニルリン酸を基質としたときのKmは2.7×10^{-2} mMで、 Vmaxは 200 $\mu M\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$であった。本酵素のポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットしたところ地上部では本酵素が発現しておらず、根で特異的に合成されることが明らかとなった。本酵素は根の全ての部位から分泌されるが、特に側根で活性が高かった。蛍光抗体法で分泌部位を確認したところ表皮細胞に局在していたが、皮層の細胞膜においてもその存在が確認された。アミノ酸シークエンサーでN末端のアミノ酸配列を解析したところ、ダイズ培養細胞で報告されているS-APaseと相同性が高かった。cDNAライブラリーよりS-APase遺伝子をクローニングし、塩基配列の相同性の検索を行ったところ、*Phaseorus vulgaris*、 *Arabidopsis thaliana* のAPaseと特に相同性が高く、*Aspergillus Ficuum*、*A. nigaer*のAPaseとも相同性が認められた。

ついで、低リン培地からのリン吸収におけるPi transpoterやVA菌根菌の機能について述べる。Kai et al.はリン酸トランスポーターと高い相同性を持つPIT1遺伝子をニチニチソウ（*Catharanthus roseus* ）より単離し解析した。PIT1のcDNAの塩基配列は*Saccharomyces cerevisiae* (PHO84)、 *Neurospora crassa* (PHO-5)、 *Glomus versiforme* (GvPT)のリン酸トランスポーターとそれぞれ31％、30％、34％の相同性が認められた。*Glomus versiforme* はVA菌根菌であり、GvPT遺伝子と相同性の高い植物PIT1遺伝子も低リン培地からのリン吸収に重要な機能を持っていると考えられる。ノーザンハイブリダイゼーションによると、PIT1遺伝子はニチニチソウの根、茎、幼植物で発現していたが、葉では発現していなかった。

― メ モ ―



無機栄養 P(+), P(−) 根から菌糸の分泌を抑える

(P(−)) で acid phosphatase の分泌

土壌中では phytin 含量が大きい phytase も重要

Pi-translocator (菌糸)

mycorrhiza の中に吸収に重要

植物(ニチニチソウ)にも見られる 30%の相同性

acid phosphatase の分布は植物で広い

一分泌の方で特異性がある

S－3

コケ培養細胞でテルペンを作る

（帯広畜産大学・生物資源化学科）　鍋田憲助

コケ植物は、イソプレン則に従わないirregularな構造や、維管束植物のそれとは逆の絶対構造を有するテルペノイド化合物あるいは高度に酸素化された化合物を多く生成し、生合成的観点から興味が持たれる。コケ植物から誘導される培養細胞は、通常、良く発達した葉緑体と油体を含み、母植物と、量的にも質的にも変わらないテルペノイド化合物を蓄積する。また、培養細胞への^{2}Hあるいは^{13}C標識したメバロン酸(MVA)の投与実験によって、維管束植物の全草や組織を用いた実験と異なり、セスキテルペンは高度に同位体で標識される（最高30 atom% excess)こと、葉緑体内でゲラニルゲラニルピロりん酸(GGPP)から生合成される化合物のうち、ジテルペンは、標識率は低いが（約1.0 atom% excess)、クロロフィルのフィチル側鎖やカロチノイドは高レベルで標識されることが確認された。本講演では、ツクシウロコゴケ(*Heteroscyphus planus*)ならびにトサカゴケ(*Lophocolea heterophylla*)の培養細胞を用いたセスキテルペン生合成とGGPPから派生する化合物の代謝、セスキテルペン環化酵素について紹介する。

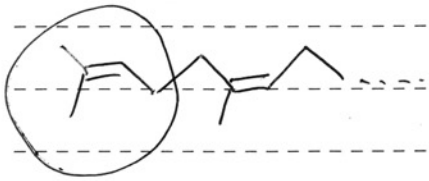
(1) ツクシウロコゴケ培養細胞にセスキテルペン(1*S*)-7-methoxy- 1,2- dihydrocadalene (MDC) の生合成－*H. planus*の培養細胞は、cadalene系列のセスキテルペンを生成するが、この液体培養細胞に2,2-$^{2}H_{2}$-, 4,4-$^{2}H_{2}$-, 5,5-$^{2}H_{2}$- および6,6,6-$^{2}H_{3}$- MVAを投与し、生成物をGC-MS分析と^{2}H 及び^{13}C NMR分析した結果、HCとMDCの生成過程での1,2-並びに1,3-水素転移、及び、芳香環の水酸化の際にNIHシフトを伴わないことが示された。

(2)ツクシウロコゴケ及びトサカゴケ培養細胞でのGGPP代謝－ツクシウロコゴケ培養細胞は、種々のクレロダン型ジテルペン酸やγ-ラクトンを生成するが、最主要成分である、heteroscyphic acid A(HAA)に酢酸（2-^{13}C-）と MVA（2-^{13}C-及び4,5-$^{13}C_{2}$-）を取り込ませたところ、それぞれ、HAAは1.36 と0.9 atom% excessで^{13}C標識された。興味深いことに、HAAのFPP由来の部位のみ(scheme 2)が標識され、末端のIPP部位は標識されなかった。この結果は、維管束植物の茎葉部での、MVAのモノテルペンやセスキテルペンIPP部位への選択的取り込みと対照的であり、全く新しい知見であった。同様の非等価な標識は、ツクシウロコゴケ及びトサカゴケ培養細胞中のクロロフィルa のフィチル部分の生合成(10 atom% excess)やカロチノイド生合成においても観察されたことから、葉緑体内でのGGPP代謝系から派生する化合物は、全て、同じ標識パターンを持つと推定される。この標識パターンは、葉緑体内に取り込まれたFPPと葉緑体内で合成されたIPPからGGPPの一部が合成されると解釈すれば合理的に説明できる。

(3)ツクシウロコゴケ培養細胞からの無細胞抽出液を用いたcadinane型セスキテルペンノ合成の生成－培養細胞からの無細胞抽出液を用いて、4種の1,1-$^{2}H_{2}$-FPP幾何異性体、並びに、6-^{2}H-2*E*,6*E*-FPPから(+)-cubenene, (+)-epicubenolおよび(-)-γ-cadineneへの環化反応を試みた。その結果、2*E*, 6*E*-FPP のみが(+)-cubeneneと (+)-epicubenolに転換すること、2*Z*, 6*E*-FPPからは(-)-γ-cadineneが選択的に生成すること、環化過程で1,2- 及び1,3-水素転移すること、金属イオンの要求性、SH阻害剤に対する挙動などが証明された。

― メ モ ―

揮発性物質（24hr当り）
　針葉樹：3-5 kg/ha
　広葉樹：2 kg/ha　　蒸散



このunit　入りにくい　pool が大きいから

$C_{15} + C_5$　　フリーカプラスト
＝この部分　生合成によって供給される
とり込みのある　C15中間体と

$C_5 - C_5 - C_5 - \boxed{C_5}$
ラベルが入らない

$C_{15} + \boxed{C_5 + C_5} + C_{15}$

C40部分中間の C_{10} には
入りにくい
細胞内の合成場所の
ちがい．途中で移動する
?

S－4

糖転移反応による新しい配糖体の合成

○石川　弘[1]，鈴木　弘[1]，柴田知彦[1]，北畑寿美雄[2]，生原ちず子[3]，
大谷和弘[3]，田中　治[3]
([1]北海道糖業(株)，[2]大阪市立工業研究所，[3]広島大学(薬))

カウレン系ジテルペンのステビオール配糖体ルブソシド(R)、ステビオシド(S)、レバウディオシド-A(RA)等は高甘味度であるが、甘味質において苦味、残味等の欠点も併せ持つ。既にシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ(CGTase)を用い、RまたはSにグリコシル基をα-1,4 結合で転移させる研究が行われている。そしてこの反応における多数の生成物のうち、RおよびSの13位グルコースにのみ、グルコシル基が一ないし二分子転移結合した物質が、甘味質、甘味強度において最も優れていることが明らかにされている。われわれは以上の活性構造化学的知見に基ずき、これらのステビオール配糖体の甘味質改善を行うべく、β－ガラクトシダーゼとCGTaseを用いた糖転移反応を利用して、グリコシル基をRの13位グルコースにのみ、選択的に結合させる方法を考えた。さらにβ－フラクトフラノシダーゼを用いてフラクトシル基をSに高転移率で結合させることにより、これまでの甘味料にはない、優れた甘味質を持った高甘味度甘味料を実用化レベルで合成することに成功した。

CGTase はグリコシル基をグルコースの4位炭素の水酸基にα結合で転移するが、グルコースのC4位エピマーであるガラクトースには転移しない。そこでR及びSの19位グルコースの4位にα-またはβ-ガラクトシダーゼでガラクトシル基を転移結合させ、19位グルコースのC4位水酸基をガラクトースでブロックし、続いてCGTase 反応を行うと、グリコシル基は13位グルコースの4位に、選択的に転移すると考えられる。そこで各種αまたはβ－ガラクトシダーゼを用いてガラクトシル・ステビオール配糖体を合成し、その構造を調べた。α－ガラクトシダーゼにおいては Mortierella vinacea の酵素では、ガラクトシル基が13位グルコースに優先的に 1,6 結合で転移した生成物が得られた。13位グルコースにガラクトース2分子が転移した生成物も認められた。Absidia reflexa の酵素では、主として19位グルコースと13位グルコースの両方に 1,6 結合でガラクトシル基を転移した。Escherichia coli またはコーヒー豆由来の酵素では、前二者の酵素に比べて転移率は低かったが、13位、19位いずれのグルコースにも 1,6 結合で転移した。β-ガラクトシダーゼでは Bacillus circulansの酵素では、13位および19位グルコースへの 1,4結合によるガラクトシル基転移生成物と19位グルコースへの 1,6 結合による転移生成物をほぼ同量生成した。Escherichia coli の酵素では、主として19位に 1,6 結合で転移した。これに対して、Aspergillus oryzae およびPenicillium multicolor の酵素では、いずれも前二者の酵素剤と比べて転移率も低く、かつ 1,6 結合による転移生成物が主であった。Kluyveromyces lactis 由来の酵素では転移しなかった。β－ガラクトシダーゼによる転移反応において、19位グルコースへの β-1,4 結合転移生成物の多い転移反応初期の反応液を得、続いてこれを受容体としてCGTase転移反応を行い、13位グルコースにグリコシル基を選択的に転移結合させた後、再度β－ガラクトシダーゼによりガラクトシル基を加水分解、除去して、目的のRの13位グルコースにのみグリコシル基が転移した、良質甘味質の甘味物質を選択的に合成することが出来た。

フラクトシダーゼによる転移反応では、Candida、Baker's Yeast、Penicillium の各起源の酵素では、フラクトシル基はそれぞれの配糖体には転移しなかった。しかし Arthrobacter sp. K-1 または Microbacterium sp. H-1 酵素では、受容体の9割に達する高い転移率でS、Rの19位に 2,6 結合でフラクトシル基を転移した。

フラクトシル・ステビオシド、フラクトシル・ルブソシドの甘味強度は、いずれも元のS、Rと比較してあまり変わらなかった。しかし甘味質は大きく改善された。特にフラクトシル・ステビオシドの甘味質は著しく穏やかになり、苦み、残味、まろやかさ、全ての点において天然のステビオール配糖体の中では最も甘味質がよいとされているRAよりも優れ、高甘味度甘味料の中では最も甘味質がよいとされているアスパルテームに匹敵するほどであった。

― メ モ ―

Diaion HP-20

糖部と配糖体を分別

Steviaside　C6 unitをつなぐ

Rebausioside 等.　酵素的

(Rosaceae　{ 甘味 の relative sweetness

S－5

微生物の多糖分解酵素によるイヌリン・レバンからのオリゴ糖生産

（北海道大学農学部・生物機能化学科）横田　篤

オリゴ糖は機能性食品の重要な素材である。また近年、エリシター活性や植物の生長制御活性を示すオリゴ糖が見い出され、農業用資材としてのオリゴ糖の用途も期待されている。しかし、実際に利用されているオリゴ糖は少ない。そのおもな理由は、オリゴ糖の安価な大量調製法が確立されていないことにある。また、一般的に酵素によるオリゴ糖生成反応では、複数の分子種のオリゴ糖が生成され、高純度のオリゴ糖を得ることが容易ではない。そこで我々は、食糧資源と競合しないイヌリンやレバンなどの未利用天然多糖から、微生物の分解酵素を用いて特定のオリゴ糖を生産する研究を進めている。以下に述べるように、我々はいくつかの優れたオリゴ糖生成酵素生産菌を分離した。今後はこれらのオリゴ糖の実用化をめざして、大量調製法の確立や、機能性の評価などを行う予定である。

（1）イヌリンからのオリゴ糖生産：イヌリンはβ2→1結合をもつポリフラクタンで、チコリなどに多量に含まれる貯蔵多糖である。我々は、イヌリンを還元末端から二糖単位で分解し、環状二糖であるダイフラクトースアンハイドライドⅢ(DFAⅢ, di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride)を与えるイヌラーゼⅡ(EC 2.4.1.93)を生産する細菌、*Arthrobacter* sp. H65-7株を自然界から分離した。本菌のイヌラーゼⅡ活性は、従来報告された株にくらべて格段に高く、培養上清を粗酵素液としてイヌリンと数時間反応させるだけで、理論収率のほぼ100%に相当する約200g/lものDFAⅢを生産できる。精製イヌラーゼⅡの性質を検討した結果、本酵素は反応至適温度が高く、pH、温度、種々の金属イオンに対する安定性に優れていた。これらの性質は粗製のイヌリンを原料にする工業生産に好適である。イヌラーゼⅡ遺伝子をクローニングして塩基配列を決定した。本遺伝子はシグナルペプチドを含む437個のアミノ酸をコードしていた。塩基配列から推定されるアミノ酸配列の比較により、本酵素は、加水分解酵素であるイヌリナーゼ(EC 3.2.1.7)と遺伝的に異質の酵素であることが明らかになり、その反応機構に興味がもたれる。また、本菌はDFAⅢを分解してイヌロビオースを生成する酵素をもち、これを利用したイヌロビオースの大量生産も可能と考えられる。

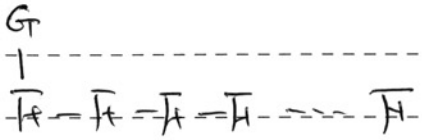
さらに我々は、イヌロトリオース生成型の新規イヌリン分解酵素を生産する放線菌、*Streptomyces rochei* E87株を分離し、本酵素を精製して諸性質を明らかにした。培養上清を粗酵素液として用いると、イヌリンに対して70%以上の重量収率で、高純度のイヌロトリオースが生産可能であった。これはイヌロトリオースの大量生産の初めての報告である。

（2）レバンからのオリゴ糖生産：レバンはフラクトースがβ2→6結合したイネ科植物の茎や葉に含まれる貯蔵多糖で、微生物によってもショ糖から生産できる。微生物由来のレバンは一般に分岐が多く、これが酵素分解の妨げになるが、我々は分岐のほとんどないレバンを生産する菌株を入手した。このレバンを用いて、自然界からレバンオリゴ糖生成酵素生産菌を探索した結果、放線菌*Streptomyces exfoliatus* F3-2が、レバンビオース生成型のレバン分解酵素を生産することを見いだした。本菌の培養上清を粗酵素として用いると、50g/lのレバンから42g/lのレバンビオースを生産することができた。これはレバンオリゴ糖の大量生産の初めての報告である。本酵素を精製し、酵素化学的諸性質を検討した結果、本酵素は2,6-β-D-フルクタン 6-レバンビオハイドロラーゼ (EC 3.2.1.64)であると考えられた。

レバンからの環状二糖であるDFAⅣ(di-D-fructofuranose 2,6':6,2' dianhydride)生成酵素生産菌として、我々は*Arthrobacter nicotinovorans* GS-9株を分離した。本菌の培養上清をレバンに作用させると、約75%の高い重量収率でDFAⅣが生成された。

— メ モ —

Inulin



A－(1)

ツクシウロコゴケ培養細胞からの大環状ビスビベンジル化合物の構造決定

（[1]帯畜大・生資化,[2]シオノギ油日研）・○穂積　玲子[1]、大久保　進一[1]、加藤　研治[2]、鍋田　憲助[1]

1．目的　大環状ビスビベンジル化合物は、ゼニゴケ亜目、スジゴケ亜目、ウロコゴケ亜目（Jungermanniidae）に広く分布するコケ特有の物質であり、抗菌活性、5-リポキシゲナーゼやカルモジュリン阻害活性があり注目されている。今回ウロコゴケ亜目 に属するツクシウロコゴケ（*Heteroscyphus planus*）から2種の大環状ビスビベンジル化合物（I 及びII）を分離したので報告する。

2．方法　ツクシウロコゴケの葉状配偶体(381 g) 液体培養細胞(600 g)のメタノール抽出液を併せた画分から各種クロマトグラフィーによりビスビベンジル化合物 I (5.2 mg) 及び II(3.2 mg) を分離した。3．結果　化合物 1 は、分子式 $C_{28}H_{22}O_4$(HRMS,M^+ m/z: 422,1542)であり、アセチル化によりトリアセテートを与えた。I及びそのアセテートの^{1}H及び^{13}C 1D-NMR、^{1}H-^{1}H COSY、^{1}H ホモデカップリング、^{1}H-^{13}C COSY、DEPT、NOESY、差NOE、HMBCの各NMR分析により、トサハネゴケ[1]から分離されたビスビベンジル化合物isoplagiochinAと同定した。化合物II {分子式 $C_{28}H_{22}O_4$(HRMS,M^+ m/z:422,1485)} は^{1}H及び^{13}C 1D-NMR、^{1}H-^{1}H COSY、^{1}H ホモデカップリング、^{1}H-^{13}C COSY、DEPT分析により、構造式に示した4個の芳香環の置換様式を決定し、 NOESY及び差NOEで観察したNOE（破線）及びHMBC相関（実線）から最終的に構造を図のように決定した。

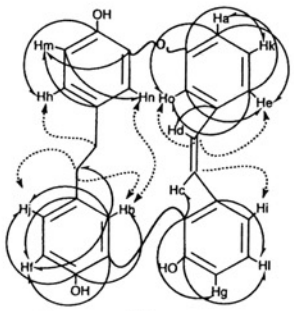


Fig. 1　bisbibenzyl II

1)T.Hashimoto *et. al. Tetrahedron.lett.*,35,911(1994)

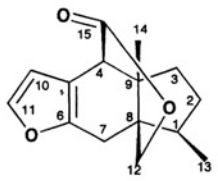
A－(2)

オオクラマゴケモドキ（*Porella grandiloba* Lindb.）からのpinguisane型セスキテルペンの構造

田崎弘之、○石川典子、五月女浩、鍋田憲助（帯畜大・生物資源化学科）

＜目的＞　苔類から単離されたテルペン化合物の多くは、特異的な骨格を有するものや、高等植物で単離されたものの鏡像異性体である。我々はこれらの化合物のうち、pinguisane型セスキテルペンの構造と生合成に関する興味から、今までミドリゼニゴケに含まれるpinguisone及びその誘導体について研究を行ってきた[1)2)]。今回、同じく pinguisane型セスキテルペン、 norpinguisone methyl ester の単離報告があるオオクラマゴケモドキ（*Porella grandiloba* Lindb.）[3)]について、含まれるテルペン化合物の詳細な再検討を行った。本報では*P.grandiloba*から単離された4種の新規セスキテルペンと、6種の既知のテルペン化合物について報告する。

＜方法及び結果＞　野外採集した *P. grandiloba* の植物体（74.6 g）をEt_2O抽出した。Et_2O抽出(1.43 g)をSephadexLH-20カラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2-MeOH 1:1)で3画分に分画した。さらにFr.2をVLCとHPLC（SiO_2, *n*-hexane-EtOAc, pentane-Et_2O）で分画し、新規pinguisane型セスキテルペン1 (3.8mg), 2 (4.2mg), 3 (5.0mg), 4 (2.7mg) を、既知のbryopterin B, norpinguisone methyl ester, caespitenone, secoswartzianin A, perrottetianal A, Bと共に得た。1は無色油状で、EI-HR-MSより分子式が$C_{15}H_{18}O_3$であることが示され、各種NMR分析により構造を図のように決定し、grandilobalide Aと命名した。1) *Biosci.Biotech. Biochem.*, 59, 158(1995). 2) *Phytochemistry*, 42, 465 (1996). 3) *Phytochemistry*, 19, 603 (1980).



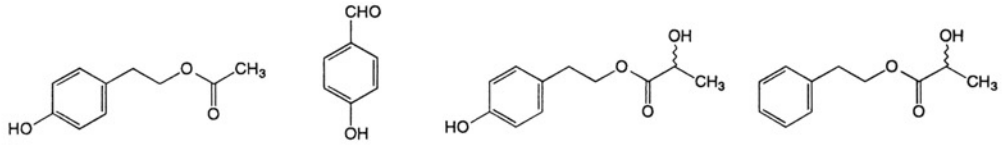
grandilobalide A (1)

A－(3)　*Cistella japonica* の生産する生理活性物質の検索

○出浦　愛、佐藤　博二、市原　耿民（北大農）

【目的】ヒノキ漏脂病菌として最近有力視される*C.japonica* の代謝産物からヒノキ鱗片葉脱離活性を指標として生理活性物質の検索を行い、新規物質を含む数種のフェノール性化合物を単離したので報告する。

【方法及び結果】3%グルコース添加バレイショ煎汁培地で 36日間、22℃で暗所静置培養した*C.japonica* 培養濾液の酢酸エチル抽出部から、ヒノキ鱗片葉脱離活性を指標としてシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取薄層クロマトグラフィーを行い、化合物１～４を単離した。各種NMR、MS、IRスペクトルから構造を *p*-hydroxyphenethyl acetate（１）、*p*-hydroxy benzaldehyde（２）、*p*-hydroxyphenethyl lactate（３）、phenethyl lactate（４）と決定し化合物３、４については合成して構造を確認した。１～４はすべてヒノキ鱗片葉脱離活性を示し、３と４は新規物質である。

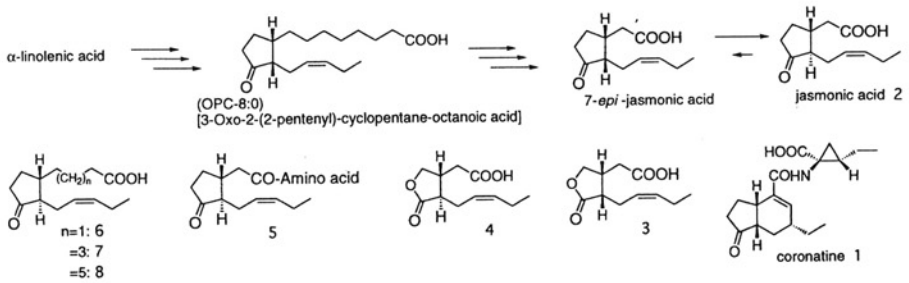


A－(4)　ジャスモン酸関連化合物の合成と生物活性

（北大・農）○奈良真二・荒巻久晃・戸嶋浩明・幸田泰則・市原耿民

目的）　最近、いくつかのバイオアッセイ系でコロナチン**(1)**がジャスモン酸**(2)**の 100～10000 倍の活性を示すことが明らかになった。コロナチン**(1)**とジャスモン酸**(2)**の構造の比較からジャスモン酸**(2)**の生合成前駆体である OPC 類、天然にも存在するアミノ酸が縮合したジャスモン酸**(5)**、等がジャスモン酸様の活性を持つことが予想される。今回、これらの生物活性の比較を目的としてジャスモン酸類縁体を各種合成し、活性試験を行った。

方法と結果）　合成したジャスモン酸関連化合物 **3**～**8** で馬鈴薯塊茎細胞肥大試験を行ったところ、シクロペンタノン環をラクトン環にして C_7位を固定したシス体 **3**、トランス体 **4**、はいずれも活性を示さなかった。アミノ酸が縮合したジャスモン酸**(5)**の中ではイソロイシンが最も強い活性を示したがジャスモン酸**(2)**より活性は弱かった。生合成前駆体類似の **6**、**7**、**8** ではジャスモン酸**(2)**と同程度の活性がみられた。さらに **6**、**7**、**8** について馬鈴薯塊茎誘導試験を行ったところ、この場合もジャスモン酸**(2)**と同程度の活性を示した。



A－(5)　糸状菌における異常芳香環形成反応に関する研究　（　第4報　）

（北大農）○渡辺賢二、及川英秋、八木健司、本間　守、市原耿民

【目的】　*Macrophoma commelinae* は、5-acetyl-4-methoxy-6-methyl-2-pyroneを4-acetyl-3-methoxy-5-methylbenzoic acid (macrophomic acid) に変換する[1)]。この反応は、ピロン環に炭素数 3 個の前駆体を付加する新規な反応を含む。我々はすでに、5-acetyl-4-methoxy-6-methyl-2-pyroneを基質として含む緩衝液で3時間処理した菌体から、無細胞抽出液を調製し、この中に基質からmacrophomic acidを生成する活性があることを示した。その活性は、pyruvateを加えることによって上昇したが、生菌の活性に比較して極めて低かったので、活性を上昇させる条件について検討した。

【方法】　無細胞抽出液は、生育が最大に達した菌体を1mMの基質を含む緩衝液で培養した後、調製した。macrophomic acidは、逆相カラムクロマトグラフィーで定量し、酵素活性は、生成物の量で示した。

【結果】　生菌を用いた実験で、アルゴン中では、基質からmacrophomic acid の生成は認められず、空気中で激しく振盪することが必要であった。無細胞抽出液による反応は、pyruvateを加えた場合においても生菌の約1/100と計算され、［1-^{14}C］pyruvateを用いた実験によって、生成物macrophomic acid に^{14}C が取り込まれないことが示された。次に、無細胞抽出液に基質とpyruvateを加え、空気中で激しく振盪することによって、活性が約65倍に上昇することを見出した。その活性は、pyruvateの代わりにPEPを加えることによって約75倍、さらにNAD^+を加えることによって約90倍になり、これは生菌の活性の約90%の値であった。また、pyruvateを用いたとき、アルゴン中では生成物は検出されなかった。

1) I. Sakurai *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2003 (1988).

A－(6)　糸状菌における異常芳香環形成反応に関する研究（ 第 5 報 ）

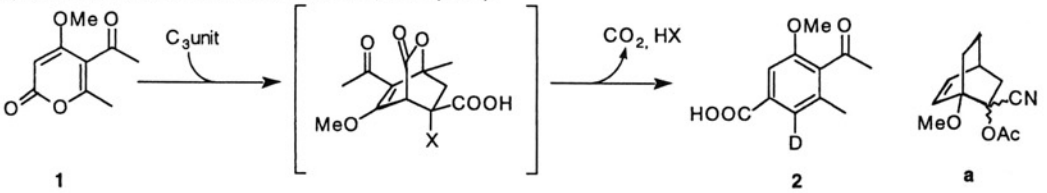
（北大農）及川英秋　○八木健司　渡辺賢二　本間守　市原耿民

（目的）　*Macrophoma commelinae* は、pyrone **1** と炭素数 3 個(C_3)の前駆体より、安息香酸誘導体 macrophomic acid **2** に変換することが知られている[1)]。我々は他に例がないこの代謝の生合成の過程に興味を持ち、**1** 以外に導入される C_3 前駆体と変換反応の機構を明らかにすることを目的とし研究を行った。

（方法と結果）　現在までに、各種同位体の取り込み実験から、C_3 前駆体は解糖系中間体であり、enolase 等に対する特異的な阻害剤により変換が阻害されることから PEP(Phosphoenolpyruvic acid)以降の化合物であることがわかっている。今回我々は、新たに(1*R*, 2*R*)-[1-^{2}H]-, (1*S*, 2*R*)-[1-^{2}H]-glycerol の合成法を確立し本菌に投与したところ、重水素は図の位置に入りその取り込み率はそれぞれ 34%、7.1%であった。このことは、PEP が C_3 前駆体であることを支持する。

また、pyrone **1** 1mM に対し化合物 **a** 5mM で、macrophomic acid 変換反応が 87%阻害された。このことは、この酵素反応が図に示した仮想中間体を経て Diels-Alder 型で進むことを示唆している。 現在、類縁体を種々合成し、その阻害について検討中である。

1) I. Sakurai et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2003 (1988).



A－(7)　セイタカアワダチソウ（*Solidago altissima*)地下部に含まれるホウレンソウ根腐病菌(*Aphanomyces cochlioides*)を指標菌とした抗菌活性物質の検索・単離

（北大・農）　○水谷　正憲，　田原　哲士

1．　目的：　ホウレンソウ根腐病菌(*Aphanomyces cochlioides*)は，特にホウレンソウを主な宿主とし，根部から侵入して根腐病を引き起こす病原菌である．この菌は，ホウレンソウ以外にもアカザ科の植物の多くに対して親和性を持っているが，キク科やタデ科植物には感染できないことが知られている．演者らは，こういった非宿主性植物が，根から何らかの対 *A. cochlioides* 防御物質を分泌していると考えている．本研究では，野生植物中に存在するであろう，本菌に対する抗菌活性物質の単離・精製を目的とした．49 種の植物の抽出液を用いて抗菌活性検定に供したところ，セイタカアワダチソウ（*Solidago altissima*，キク科)地下部に強い活性を見い出したため，本活性本体の単離・精製を試みた．

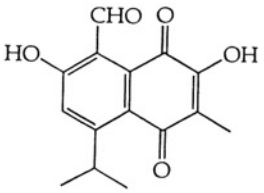
2．　方法および結果：　採集した植物体（600g）は，地下部と地上部に分け，それぞれをメタノールで抽出した．このメタノール層に水を少し加えてからメタノールを除去し，酢酸エチルと水層に分画した．各層から 25μg ずつ取り，抗菌活性検定（ペーパーディスク法）を行った．菌を植えてから３～４日後にディスクの周辺の阻止円の有無で判定した．その結果，セイタカアワダチソウ地下部の酢酸エチル転溶部に強い抗菌活性が見られた．この酢酸エチル可溶部を 50％メタノールに再溶解し，*n*-ヘキサンで分配したところ，*n*-ヘキサン層に抗菌活性が移行したので，この部分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび順相高速液体クロマトグラフィーに供し，活性成分の精製を行った．その結果，抗菌活性物質として，$C_{20}H_{26}O_3$のジテルペンアルデヒドと思われる化合物を 11.3mg 得た．この物質の活性下限値は，2.5μg/disc 以下であった．本化合物のさらに詳しい構造については現在解析中である．

A－(8)　パキラ根の主要抗菌性物質について

（北海道大学・農・生態化学）○芝谷真理子、橋床泰之、田原哲士

［**目的**］　演者の属する研究室では、主に北海道産野生植物について、それらが生産する抗菌性物質の検索、単離、構造解析を十数年来行ってきている。今回、植物の防御機構の解明の一環として、北海道産の植物にとどまらず、熱帯産植物の抗菌性化合物の検索を試みた。対象植物としては、観葉植物として入手が容易であるパキラ(*Pachira aquatica*、キワタ科)を用い、その地上部および地下部について抗菌性物質の検索を行った。

［**方法と結果**］　*Cladosporium herbarum*を用いたTLCバイオオートグラフィーによる予備実験では、パキラの根部に強い抗菌活性が認められた。そこで、パキラの根82ｇをEtOAcで抽出し、これをクロロホルム-メタノール系シリカゲルカラムで分画した。主要抗菌活性物質（pr１）は、２％メタノール／クロロホルムで溶出され、黄色針状の良好な結晶として析出した。これを、クロロホルム-*n*-ヘキサンにより再結し、約10mgを得た。pr1はEI-MSにより分子量274と推定され、また^{1}H-および^{13}C-NMRからnaphthoquinone骨格を持つセスキテルペンであることが判明した。文献検索の結果、すでにワタのつぼみから単離されていた物質、hemigossypolone(**1**)[1]と分光分析結果がほぼ一致した。化合物**1**は、1981年にその構造が訂正されているが[2]、演者らが得たpr1のHMBCおよびNOEのデータは、この訂正構造を支持するものであった。パキラの根部は非常に柔らかく、多量の糖類を蓄える貯蔵器官でもあるが、ここに極めて多量の1が内在性抗菌性成分として含まれている事実は、本植物の化学的防御機構の一端として興味深い。現在、EtOAc可溶部および水可溶部より1の関連化合物を検索中である。



hemigossypolone (**1**)

1) Seshadri, V. *et al*, *Indian J. Chem.* **11**, 825-826 (1973)
2) Akella V. B. Sankaram *et al*, *Phytochemistry*, **20**, 1877-1881 (1981)

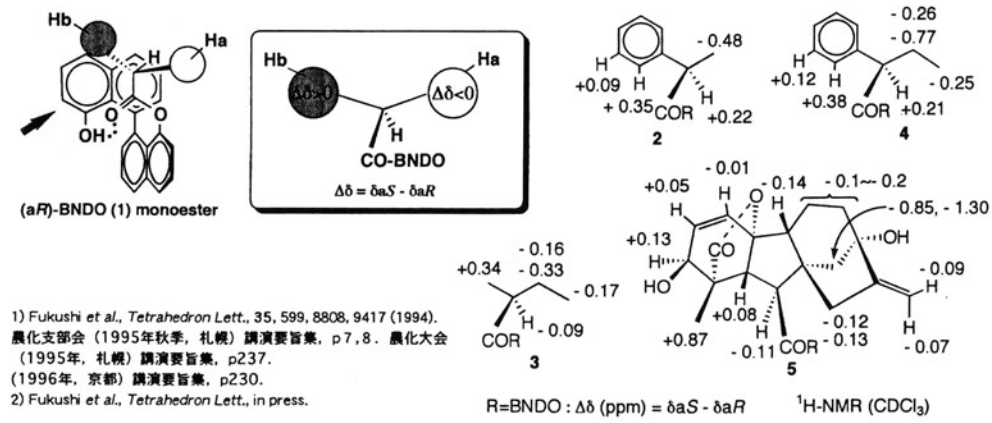
A－(9)

軸性キラル化合物を用いるカルボン酸の絶対配置決定法
－BNDO法について－

（北大農）°福士　幸治、重松勝一郎、水谷純也、田原哲士

1．目的　我々は既に軸性キラル化合物を用いるキラルアルコール、アミンおよびカルボン酸の絶対配置の決定法について報告した[1]。今回、新たに1,1'-binaphthalene-8,8'-diol (BNDO, 1)を用いるキラルカルボン酸の絶対配置の決定法[2]を確立したので報告する。

2．方法および結果　軸性キラル化合物１とキラルカルボン酸（２～５）とのジアステレオマーモノエステルは、シリカゲルTLC上で分離したスポットを与えた。NMR解析の結果、これらのエステルは溶液中で下図に示した立体配座をしていることが予想され、ジアステレオマーモノエステルの対応するプロトン間の化学シフト差を求めることにより元のカルボン酸の絶対配置が決定できることが判明した。



1) Fukushi *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 35, 599, 8808, 9417 (1994).
農化支部会（1995年秋季，札幌）講演要旨集，p7，8．農化大会（1995年，札幌）講演要旨集，p237.
（1996年，京都）講演要旨集，p230.
2) Fukushi *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, in press.

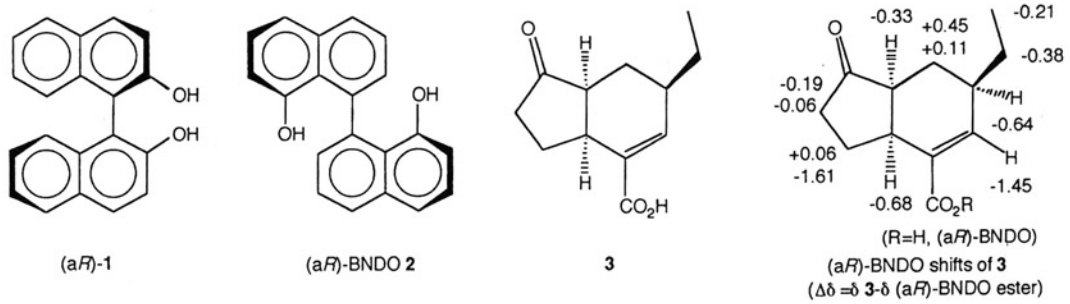
A－(10)

軸性キラル試薬とα,β-不飽和カルボン酸とのエステルの立体構造について

（北大農）福士　幸治，　○重松　勝一郎，　田原　哲士

1．目的：　軸性キラル化合物である 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol (1)および 1,1'-binaphthalene-8,8'-diol (BNDO, 2)と環状α,β-不飽和カルボン酸である coronafacic acid (3)とのジアステレオマーモノエステルを調製し，それらの分離条件および溶液中での立体構造について検討した．

2．方法および結果：　1 および2 とラセミの3 とのモノエステルを調製した．得られたジアステレオマーはそれぞれ高速液体クロマトグラフィー(HPLC)，薄層クロマトグラフィー(TLC)により分離できた．これらのエステルを ^{1}H NMR ($CDCl_3$) 解析した結果，カルボン酸部分のプロトンは，元のカルボン酸より高磁場シフトしていることから対面するナフタレン環の遮蔽領域に存在することが示唆された．現在1 および2 と他のα,β-不飽和カルボン酸とのエステルについても ^{1}H NMR を用い立体構造を解析中である．



謝辞：　Coronafacic acid と NMR データをご恵与いただいた北海道大学農学部生物有機化学教室・戸嶋浩明博士および奈良真二氏に感謝します．

A－(11)　小麦抗原性ペプチドエピトープのNMR解析

○福士江里，田辺創一*，渡辺道子*，川端　潤，
(北大農･生機化，*学芸大･教育)

【目的】小麦グルテンのエピトープはQQQPP配列を有し，そのモデルペプチドAcQQQPP(**1**)は小麦アレルギー患者血清のIgEに対し結合能を示す[1]．**1**の溶液中での構造を解析するため各種NMR測定を行った．

【方法および結果】合成した非ラベル**1**の約4mg/D_2O:H_2O=4:1およびDMSO-d_6溶液の30℃における^{1}H-,^{13}C-NMRスペクトルが類似していたので解析にはDMSO-d_6溶液を用いた．^{1}H-NMRスペクトルでは δ_H 1.6-2.2 ppmの範囲にQ_γ, Q_β, P_β, P_γのメチレンプロトンのシグナルが複雑に重なっていたため，まず分離のよい^{13}Cを手がかりにHSQC-TOCSY, HMBCにより解析した．$Q1_\alpha$Hと$Q2_\alpha$Hの帰属には，近接するQ_NHへの影響をさけるためデカップリング差より穏和な照射条件のSPT差を用いた．また，$Q2_N$Hと$Q3_N$H，および$Q1_\alpha$Hと$Q2_\alpha$Hの δ_H が近く一般のNOE相関法ではこの部分の相関を帰属できず，HMQC-ROESYでは十分な感度と分解能が得られなかった．そこで，改良法としてE-HSQC-ROESY法を作成し，メチン選択スペクトルにより$Q1_\alpha$/$Q2_N$, $Q2_\alpha$/$Q3_N$の相関を得た．以上によりQ_δ(C, NH_2)を除く全シグナルを帰属し主鎖のアミド結合をすべてトランスと決定した．

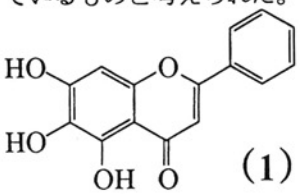
1) S. Tanabe *et.al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 290(1996).

A－(12)　生薬成分中のα-グルコシダーゼ阻害物質

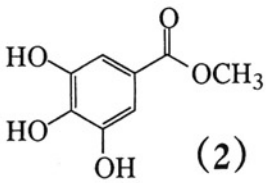
○西岡徹夫、川端潤、仁木良哉　（北大農・生機化）

【目的】食後高血糖抑制には糖質の消化吸収を遅延させることが有効と考えられる。演者らは、この観点から食品を中心にα-グルコシダーゼ阻害物質の探索を行っており、今回は市販の27種（山梔子、人参、茯苓、蒼朮、紅花、黄連、桂皮、大棗、乾地黄、玄参、半夏、黄芩生姜、柴胡、当帰、大黄、防已、杏仁、山査肉、桃仁、芍薬、牡丹皮、麻黄、黄耆、葛根、甘草、山薬）の生薬に関してスクリーニングを行い、強い阻害活性がみられた牡丹皮、大黄、黄芩から活性成分の単離同定を行った。

【方法および結果】上記３種の生薬メタノール抽出物の酢酸エチル可溶中・フェノール性画分にα-グルコシダーゼ（ラット小腸由来）阻害活性が認められたので、スクロースの加水分解により生成するグルコース量のグルコースオキシダーゼ（GOD）による定量を指標に分画（シリカゲルカラム、逆相HPLC）し、活性物質を単離した。MS, NMR等の分析により黄芩から単離した化合物の構造をbaicalein（**1**）、牡丹皮、大黄から単離した化合物の構造をmethyl gallate（**2**）と決定した。**1**のα-グルコシダーゼ（スクラーゼ）に対する50％阻害濃度（IC_{50}）は2.6×10^{-4}Mであった。しかし、グルコースの定量を非酵素的に行ったところ、**2**は阻害活性を示さなかったため、スクラーゼ反応を阻害しているのではなく、GOD法によるグルコース定量を妨げているものと考えられた。



(1)



(2)

A－(13)　ナツメグ中の唾液アミラーゼ阻害成分

○川端　潤、森　夏子、仁木良哉　（北大農・生機化）

【目的】デンプンの消化吸収には唾液および膵液中に分泌されるα-amylaseによる加水分解が重要な役割をはたしている。一方、糖質の過剰摂取による肥満や成人病の予防、あるいは糖尿病患者等の食後高血糖の抑制には、糖質の消化吸収の遅延が効果的である。この観点から、本研究では広く食品中より消化液中のα-amylase活性を阻害する成分を探索することを目的とした。

【方法および結果】starch azure（着色不溶性デンプン）の加水分解による青色色素の遊離の抑制を指標に、食品32種のメタノール抽出物について、ヒト唾液α-amylase阻害試験を行ったところ、ローレル、ハッカク、ナツメグの抽出物に強い阻害活性がみられた。このうちナツメグ（*Myristica fragrans* Houtt.、ニクズク科）の活性本体について、以下のように単離精製を行った。市販のナツメグ粉末（朝岡香辛料）の50%メタノール抽出物を、シリカゲルカラムクロマト（クロロホルム）、およびシリカゲル分取薄層クロマト（ヘキサン/クロロホルム(2:1)、ヘキサン/酢酸エチル(3:1)）を繰り返すことにより精製し、活性画分を得た。MS、NMRなど各種機器分析の結果、活性物質はミリスチン酸メチル（**1**、$CH_3(CH_2)_{12}CO_2CH_3$）を主成分とする混合物であり、GC-MSデータの標品との比較より、**1**とともに$C_{12:0}$、$C_{16:0}$、$C_{18:1}$、$C_{18:2}$の脂肪酸メチルエステルの存在が確認された。また同時に得られた遊離のミリスチン酸（**2**）も阻害活性を有することがわかった。含量は100gあたり**1**：161mg，**2**：251mg、阻害率は、2×10^{-4} mol/L濃度で市販のヒト唾液α-amylaseに対し、**1**：56%，**2**：63%、ブタ膵液α-amylaseに対し、**1**：74%，**2**：41%であった。また種々の鎖長の脂肪酸メチルエステルの活性を検討したところ、$C_{14:0}$を中心に鎖長が変化するにつれ活性が低下する傾向が見られた。

B－(1)

小豆の平衡含水率と蒸発潜熱

（東京農業大学食品科学科）

○田中　親紀，田川　彰男，村松　良樹，林　弘通，北村　豊

「目的」　平衡含水率は，乾燥や貯蔵問題を扱う上で最も重要な因子である．しかし，従来の方法では測定に長期間を要するため，高湿度条件下では試料に生物的，化学的変化が生じ測定に困難を伴う．本研究では，1.測定期間を大幅に短縮できる新しい方法の開発，2.小豆の平衡含水率を広い範囲で測定して精度良いデータを得ること，3.いくつかの平衡含水率式に当てはめ，その結果を利用して熱力学的手法により蒸発潜熱を計算することを目的とする．

「方法」　測定は30,40,50,60℃の4段階の温度条件に対し，5～85%の湿度範囲で行った．真空用デシケータ内の湿度を飽和塩溶液で制御し，送風ファンを設置する．温度の制御は定温乾燥器に入れて行う．平衡化の促進を図るために定期的に脱気し，その後大気圧に戻しデシケータ内の雰囲気を安定させる．この操作を平衡に達するまで繰り返す．測定結果は，代表的な平衡含水率式5種に非線形最小二乗法を適用して当てはめる．また蒸発潜熱は，一般に豆類に用いられるOthmer plotにおける一切の仮定を排して，熱力学の式であるClausius-Clapeyronの式から直接計算を行う．

「結果」　新測定法は再現性が極めて良く，測定期間を大幅に短縮できるため高湿度における測定も可能であった．その測定結果を平衡含水率式5種に当てはめたところ，最も適合性の高かったのは，Chen-Claytonの式：$rh=exp(-AT^{B}exp(-CT^{D}M))$であった．そのパラメータは$A$：$2.0889\times10^{14}$，$B$：-5.5017，$C$：0.739289，$D$：-0.246087，標準偏差：0.15152である．また，小豆の蒸発潜熱を熱力学の式であるClausius-Clapeyronの式から直接計算した．その結果，乾量基準含水率30%以上では水の蒸発潜熱とほぼ一致した．

B－(2)　各種ヤマイモの粘性物質の精製ならびに構成成分について

○津久井学、永島俊夫、佐藤広顕、小嶋秩夫、谷村和八郎
（東京農大・食品科学）

【目的】ヤマイモは冷凍保存や乾燥した場合、粘度の低下や食味の劣化など問題点が多い。そこで本研究では、良質な乾燥ヤマイモの調製を目的として、我が国で栽培されている3種類のヤマイモから粘質物を分離・精製し、種類の違いによる多糖画分の構造、アミノ酸組成の差異および粘度と構造との関係を比較検討した。

【方法】試料は、平成6年度に収穫された兵庫県産ツクネイモ、千葉県産イチョウイモおよび北海道東藻琴産ナガイモの生鮮品を用いた。粘度はオストワルド粘度計を用い、20℃で動粘度を測定した。次に、粘質物を佐藤らの方法に従い分離・精製し、得られた精製粘質物を酸加水分解後タンパク部分のアミノ酸組成をHPLCにて、多糖部分の構成糖をGLCにて測定した。さらに、先に得られた精製粘質物から多糖画分を分離後、箱守法に従いメチル化し、加水分解後、アセチル化してGLCおよびGLC-MSに供した。

【結果】(1)動粘度は、ツクネイモが最も高く、次いでイチョウイモ、ナガイモの順であった。精製粘質物の収量は、動粘度の高い順でツクネイモが最も多かった。(2)粘質物の主要構成アミノ酸は、グリシン、イソロイシン、ロイシンなどであった。しかし、その割合は種類により異なり動粘度との相関は特に認められなかった。(3)精製粘質物の糖組成は、いずれもマンノースを主要構成糖とし、ほかにガラクトース、グルコースが認められた。(4)多糖画分をメチル化し、GLCにより検出された3つのピークは、保持時間、マススペクトラおよび文献値より、それぞれ非還元末端に由来する2,3,4,6-tetra-O-methyl-mannitol、1→4結合を示す2,3,6-tri-O-methyl-mannitol、1→3結合の分岐を示す2,6-di-O-methyl-mannitolであることを確認した。1→4直鎖部分の単位鎖長は、ツクネイモが最も長く粘度と鎖長の長さには相関が認められた。

B－(3)　魚皮コラーゲンの食品素材化に関する試験

北海道立食品加工研究センター
○清水英樹・長島浩二・清水條資

＜目的＞北海道の主要水産物であるサケ・マスの加工工程から排出される魚皮の有効利用を目的とし、その主成分であるコラーゲンをゼラチンとして抽出し、その特性評価および食品素材としての応用について試験を行った。

＜方法＞凍結保存したマス皮を用い、以下のフローにより魚皮ゼラチンを調製し、市販牛ゼラチン（武田薬品工業）を比較対照として試験を行った。

原料を解凍・洗浄・細断－エタノール脱脂－水洗浄－抽出（70℃）－ろ過－活性炭処理－ろ過－乾燥（70℃）－粉砕

(1)溶液およびゲルの特性評価　JIS規格（K6503－1977）に基づき透過率・粘度・凝固点・融点・ゲル強度を測定した。また、ゲルの凍結解凍後の状態をSEMにより観察した。　(2)食品素材としての応用　1％ゼラチンを添加した絹ごし豆腐を試作し、凍結解凍後の離水量を測定してそれらの保水性を比較した。

＜結果＞(1)溶液およびゲルの特性評価　魚皮ゼラチンは牛ゼラチンと比較した場合、透過率・粘度はほとんど変わらないが、凝固点・融点・ゲル強度が低く、軟らかいが弾力性に富んだゲルを形成するという特徴を有していた。また、凍結解凍後のゲルをSEMにより観察した結果、魚皮ゼラチンゲルは牛ゼラチンゲルよりも空隙が小さくスポンジ状の構造を有しており、凍結解凍後のゲルの弾力性、保水性の違いに関与していると考えられた。

(2)食品素材としての利用　試作した絹ごし豆腐の凍結解凍後の離水量は、ゼラチン無添加に対し、牛ゼラチンの添加で約44％、魚皮ゼラチンの添加で約16％とゼラチンの添加で明かに減少し、魚皮ゼラチンの添加で特に顕著であった。従って、魚皮ゼラチンは、離水防止や保水性向上などの目的にその添加が有効な素材と考えられた。

B－(4)　ブナサケを利用したカツオ節様加工食品の開発（第２報）

（北海道立十勝圏地域食品加工技術センター）
○阿部　茂、大庭　潔

（目的）　サケは北海道の代表的な水産物であるが、近年の漁獲量の増加、輸入サケの増加に伴い価格が非常に低迷しており、加工による高付加価値化が望まれている。本研究ではサケのうま味調味料としての利用の検討を行い、カツオ節様加工食品の開発を行った。

前報ではカツオ節と同様の方法で試作を行ったが、製造過程でのエキス成分の流出が著しく、またカビ付けによるうま味成分の生成もほとんど行われなかったため、カツオ節と比較してうま味に乏しいものものとなった。そのため本実験ではうま味成分の増大を目的とし、加工工程の検討を行うと共に酵素によるうま味成分の生成について検討を行った。

（方法）　加工工程の検討では３枚におろしたブナサケを煮熟、蒸煮し、その抽出液をTNBS法にて可溶性加水分解物量を測定し、残存エキス量を測定した。また、生、煮熟後、蒸煮後にパパインを添加、作用させ可溶性加水分解物量を測定し酵素の添加時期について検討を行った。プロテアーゼ選択試験では、13種のプロテアーゼを用いて試験し、生成した可溶性加水分解物量、アミノ酸組成を測定し調味液製造に適した酵素の検討を行った。

（結果）　加工工程の検討では煮熟と比較して蒸煮による方法がエキス成分の流出が少なく、また酵素の添加時期においては生の状態で酵素作用を行ったものが最も可溶性加水分解物量の生成が多かった。これらのことから生の状態で酵素反応を行い、その後蒸煮を行う方法がエキスの生成が多く、かつ流出も少ないことが結論づけられた。プロテアーゼ選択試験では 13種中 4種のプロテアーゼがグルタミン生成量も多く、官能試験でも良い評価を得た。これらの結果をふまえ、実際にサケのカツオ節様加工食品の試作を行ったところ、従来の方法で試作したものと比較してグルタミン酸量、可溶性加水分解物量ともに2倍以上に増加し、うま味の強い調味液を得ることができた。

B－(5)　赤タマネギ加工におけるペクチナーゼの応用

（オホーツク圏地域食品加工技術センター）
○中野敦博　柿本雅史

【目的】赤タマネギを原料とした加工食品を製造するためには、その特徴である赤色色素（アントシアニン）をできるだけ損失させない加工工程を考えなくてはならない。アントシアニン色素は、熱、光および酸素等の影響で分解しやすい。そこで機械摩砕よりも穏和な処理であるペクチナーゼ処理を検討した。

【方法】①分解試験：赤タマネギをブランチングせずに細切し、酢酸を用いてpHを調整後、酵素（ﾍﾟｸﾁﾈｯｸｽ ｳﾙﾄﾗSPL：ﾉﾎﾞﾉﾙﾃﾞｨｽｸﾊﾞｲｵｲﾝﾀﾞｽﾄﾘｰ）を添加し、200rpmで撹拌しながら酵素分解した。反応後22ﾒｯｼｭの篩を通過させたものを酵素処理ペーストとした。分解に対する温度、pH、酵素濃度、反応時間の影響を試験した。②特性試験：酵素処理ペーストの粒度分布を測定し、光学顕微鏡で観察した。室温で10,000lxの蛍光灯の下で保管した酵素処理ペーストと機械摩砕ペースト（摩砕機にて作製）の色素の減少傾向を評価した。アントシアニン量は、HPLCにて測定した。

【結果】分解率80％程度を目標とすると、赤タマネギを効果的に酵素分解する条件は、温度：35～60℃、pH：3.5～4.0、反応時間：60～120分、酵素濃度：0.13～0.3％であった。酵素処理ペーストの平均粒子径は231.4μmで、中間径は251.4μmであった。100～400μmの粒子で全体の体積の86.4％を示した。顕微鏡観察の結果も合わせると、単一細胞状態のものが多く懸濁していることが推定された。また酵素を失活させなければアントシアニン色素が減少することが示された。蛍光灯下で4日間の保管中に酵素処理ペーストは、機械摩砕ペーストよりも高い色素残存率を示した。しかし色素の退色は、抑制できなかった。

B－(6)　包装条件の違いによる茹でうどんの保存性について

（オホーツク圏地域食品加工技術センター）
○柿本雅史　中野敦博

【目的】圏域内では、地場農産品であるチホク小麦を原料とした茹でうどんの生産が行わている。近年は、大手企業を中心にＬＬ茹麺や冷凍茹麺といった長期保存性うどんの生産量が増加しているが、圏域内では酸味料等の食品添加物未使用の短期保存性うどんの生産が主流である。そこで本研究では、市販品の市場調査結果より試験条件を決定し、短期保存性うどんの包装条件の違いによる保存性について検討した。

【方法】保存試験条件を決定するため、平成７年冬期から秋期にかけ道内各地で生産された製品を小売店にて購入し直ちに製品温度を測定し、生菌数の測定も行った。供試するうどんは、酸味料等の食品添加物未使用のチホクうどんの生麺を茹でて約100gづつ包装した。包装フィルムは、ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ製（含気試験のみ）、ﾎﾟﾘﾌﾟﾛﾋﾟﾚﾝ製（対照）、ﾅｲﾛﾝ製、ｴﾁﾚﾝ-ﾋﾞﾆﾙｱﾙｺｰﾙ共重合体製（以下EVOH製と略）の４種類とした。包装条件は含気包装、真空包装、脱酸素剤封入包装の３種とし、試料の保存温度や初発菌数は市販製品の調査結果より決定した。尚、保存性の主要指標は生菌数の増加とし、試験区に応じカビ・酵母数、嫌気性細菌数、ｐＨの測定を行った。

【結果】市販品の平均品温は１１.４℃であり、市販品の生菌数は〈３００個/gである検体数が全体の６０％以上を占めていた。従って、保存試験の保存温度は１５℃、初発菌数は〈３００個/gとした。食衛法衛生規範の指導基準値である１０^{5}個/gを目安とした時、含気包装試験では、ｶﾞｽﾊﾞﾘｱ性の高いEVOH製袋を除く他の包装袋が10日目で１０^{5}個/g以上になり、特にﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝ製袋ではカビの発生が認められた。真空包装試験では対照であるﾎﾟﾘﾌﾟﾛﾋﾟﾚﾝ製袋ではカビの発生が認められたが、ﾅｲﾛﾝ、EVOH製袋では保存期間中に指導基準値には達しなかった。脱酸素剤封入包装試験では、４週間の保存期間中にﾅｲﾛﾝ製袋は１０^{4}個/g、EVOH製袋は１０^{2}個/gレベルより増加することはなく、著しい保存性が認められた。

B－(7)　ラット回腸におけるアポリポタンパク A-Ⅳ mRNA レベルに対する胆膵液の影響

○藤原麗子，園山慶，青山頼孝（北大・農・生機化）

【目的】我々はこれまでに小腸部分切除ラットにおいて残存回腸アポリポタンパク（apo)A-Ⅳ mRNA レベルが増加し，さらにその増加が胆汁迂回により阻止されることを示し，回腸 apoA-Ⅳ mRNA 発現に胆汁が関与することを示唆した[1)]。このことを更に確かめるために，小腸切除とは別に回腸に達する胆汁が増加する系を以下のように設け，解析した。

【方法】7週齢の Wistar 系雄ラットを３群（n=6）に分け，回盲弁より近位１０ cm の部分で切断後，端々吻合するのみの Transection(TR)群，Treitz 靭帯より遠位２ cm の部分から，回盲弁より近位１０ cm の部分までを切除して，残りの小腸を端々吻合する Resection(RE)群，及び Treitz 靭帯より遠位２ cm の部分を回盲弁より近位１０ cm の部分に端側吻合する Self-emptying loop(LO)群を作成し，術後２４ｈに麻酔下で開腹し，放血死させたのち末端回腸１０ cm 及び，Treitz 靭帯より遠位１０ cm の空腸を摘出した。次に８週齢の Wistar 系雄ラットを３群（n=6）に分け，一群を Sham 群，もう一群を Biliary diversion(BD)群として胆管にカテーテルを挿入し,他端を末端回腸１０ cm のところに挿入した。残りの一群は，Pancreatico biliary diversion(PBD)群として Vater 乳頭付近の膵管にカテーテルを挿入し，他端を末端回腸１０ cm の部分に挿入した。術後２４ｈに麻酔下で開腹し，腹大動脈より採血後，Treitz 靭帯より遠位１０ cm の空腸，カテーテル挿入部より遠位１０ cm の回腸を摘出した。Northern blotting により小腸粘膜 RNA を分析した。

【結果】回腸において TR 群と比べて LO 群及び RE 群で apoA-Ⅳ mRNA 量の有意な増加がみられた。またもう一方の実験では，Sham 群に比して，BD 群で回腸 apoA-Ⅳ mRNA の増加傾向がみられ，PBD 群では著しく増加した。

以上の結果より，回腸における apoA-Ⅳ mRNA 発現には胆汁成分が重要な役割を果たしており，その成分は恐らく膵外分泌酵素により管腔内消化を受けた後に吸収される胆汁脂質であると推測した。

1）Sonoyama　et al. (1996)　Proc.Soc.Exp.Biol.Med.　211:273-280

B－(8)　貝化石投与によるラットの血清生化学成分とミネラル吸収への影響

（[1]岩手連大院，[2]帯広畜大・生資化）○三浦健人[1]，中野益男[2]

1．目的　骨粗鬆症等の骨代謝疾患の予防や治療には、カルシウム、リン、マグネシウム等のミネラルや、その吸収を助ける因子を十分に摂取することが重要であることから、様々なミネラル製剤が開発されている。本研究では天然の未利用資源として数種のミネラルを含む貝化石を有効利用することを目的として、貝化石粉末、牛骨より得た天然ハイドロキシアパタイトおよび炭酸カルシウムをそれぞれラットに経口投与し、血清生化学成分およびミネラルの吸収への影響について比較検討した。
2．方法　F344系雄ラット4週令（55～65g）を1週間の予備飼育後、体重により炭酸カルシウム（Control）群、天然ハイドロキシアパタイト（HAP）群および貝化石（FPS）群の3群に分け、Caが0.5％になるよう調製した各試験飼料を4週間経口投与した。投与0、2、3および4週目に採血し、血清生化学成分の分析に供した。Ca、P、MgおよびFeの見かけの吸収率は、投与開始後、1週間ごとに2日間の糞を採取し、蛍光X線分析により糞中のそれぞれのミネラルの含有量を求めて算出した。試験最終日には大腿骨を摘出し、糞と同様の方法で大腿骨中のCa、P、MgおよびFe含有量を求めた。
3．結果　FPS群の血清カルシウム濃度は変化しなかったが、マグネシウムおよびリン濃度は低下した。骨代謝の指標となる酸性フォスファターゼおよびアルカリフォスファターゼ濃度は、FPS群、HAP群ともにControl群に比べて低かった。カルシウム、リンの見かけの吸収量と吸収率はともにFPS群の方がControl群に比べて高かったが、マグネシウムの吸収率はFPS群の方がControl群に比べて低かった。FPS群のミネラル吸収率は高いにもかかわらず、大腿骨中のミネラル含有量はControl群およびHAP群と差が見られなかった。

B－(9)　生菌製剤を用いた環境保全型養殖の試み－とくに養殖タイの脂質への影響について

（帯広畜大・生資化、[1]岩手連大院、[2]アース技研）
○斎藤秀俊、福島道広、中野益男、遠藤　威[1,2]、長田正宏[2]

1．目的　生菌製剤は抗生物質にかわる新しい製剤として注目されている[1)]。我々は生菌製剤を乳牛、肉牛、豚、鶏に給与することにより、家畜の腸内細菌の安定、生産性の向上、乳質、肉質、体質の改善と畜産環境の保全に有効に作用することを明らかにしてきた。この技術を養殖魚に応用し、環境保全型の新しい養殖を確立するために、養殖魚であるヒラメやハマチに生エサと薬剤にかわって、配合飼料と生菌製剤を給与し、養殖場の水質と底質、魚への影響、とくに魚肉の脂質に対する影響を調べてきた[2)]。今回は新しく高級養殖魚であるタイについて魚肉の脂質に対する影響を調べた。
2．方法　タイは愛媛県宇和島のイケスで養殖した。エサは市販の生エサと配合飼料（9：2）に混合したものを給与した。生菌製剤は *Bacillus*,*Lactobacillus*,*Streptococcus*,*Clostridium*,*Sacharomyces*,*Candida* を混合し米ぬかに吸着させたものをエサに0.3％混入して180日間給与した。養殖終了後、タイを解剖し、全筋、腹筋、背筋、肝臓の各部位に分けて試料を採取した。脂質はクロロホルム－メタノール系を用いたBligh-Deyer法で抽出した。脂質中の構成脂肪酸とコレステロールはガスクロマトグラフィーで分析された。
3．結果　脂質含量は生菌製剤を給与した養殖タイの腹筋と背筋では対照区と比較して、およそ50％増加した。各部位の構成脂肪酸に大きな変動はみられず、不飽和脂肪酸／飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸／飽和脂肪酸の比率にも大きな影響はみられなかった。全脂質中のコレステロール含量は腹筋でおよそ40％、背筋でもおよそ30％ほど減少していた。低コレステロールで脂の載ったタイが生産された。

1）M.Fukushima and M.Nakano:British J. Nutrition,*73*,701-710(1995)
2）中野益男ら：日本農芸化学会誌、講演要旨集、*70*,196(1996)

B－(10)　網走市周辺に生息するエゾシカの脂肪酸組成の特性

（東京農業大学生物産業学部）
○笠井孝正・横濱道成・井上勝弘・石島芳郎

『目的』 北海道東部におけるエゾシカの生息数は12～15万頭と推測されている。年々エゾシカの捕獲数は増える傾向にあり，1992年には約5万3千頭と報告されている。また，シカ肉や鹿茸の生産を目的とした養鹿事業が開始され，その動物資源としての認識が高まりつつある。一般に，エゾシカ肉は高タンパク，低脂肪と言われているが，その食品成分は化学的に明らかにされていない。食肉の脂質は肉の堅さや風味などの官能的性質に影響を与え，脂質の脂肪酸組成は食肉の酸化や貯蔵性に関係する。従って脂質の量や質が食肉の品質評価の際に重要な指標となる。シカの蓄積脂肪の脂肪酸組成はアカシカとニホンジカについて報告されているが，エゾシカについての報告例はない。著者らは野生エゾシカ肉の品質評価の一環として，可食部の脂質含有量の測定とその脂肪酸組成について検討した。

『実験材料および実験方法』 エゾシカは網走市周辺で1994年8月～11月の間に狩猟により捕獲した雄10頭，雌6頭から首肉，肩肉，モモ肉そして皮下脂肪をそれぞれ摘出して実験に供した。脂質の抽出はホルチ法を用いた。定法によりEtOH性KOHでケン化後，遊離脂肪酸を抽出し，MetcafeとSchmitzの方法に従いBF_3－MeOH溶液を用いて脂肪酸メチルエステルを得た。脂肪酸の分析は島津GC-14A(FID検出器）を用いてGLC法で行った。カラムはUnisole　3000　, Uniport C, 80/100メッシュ，Φ3.0mmx3mのグラスバックドカラム（ジーエルサイエンス），注入口と検出器温度は250℃，カラム温度は220℃の恒温，カリヤーガスは窒素40mℓ/min. で分析した。データは島津CR-5Aで処理した。各脂肪酸は脂肪酸標準試薬（ジーエルサイエンス）との保持時間の比較，炭素数と保持時間の対数値の直線関係から同定した。

『結果』 首肉,肩肉そしてモモ肉の全脂質含有量は2.23±0.22～4.57±0.46％であり，皮下脂肪は86.99±3.78％であった。雌雄間で有意差は認められなかった。エゾシカ各部位の主要な脂肪酸はパルミチン酸，パルミトレイン酸，ステアリン酸，オレイン酸そしてリノール酸であった。パルミチン酸，パルミトレイン酸そしてオレイン酸は雌のほうが若干高い値を示し，ステアリン酸とレノール酸は雄が高い傾向を示したが，各脂肪酸に関して性別の違いによる有意差は認められなかった。全不飽和脂肪酸含有量は49.86±4.23～52.48±5.74％であり，野生ニホンカモシカの分析値に近似していた。。皮下脂肪にはパルミトレイン酸が4.90±1.28％，リノール酸が3.57±0.26％含まれており，ほかの部位と比較して著しく低かった。これに対しステアリン酸は21.84±4.55％と非常に高い値を示した。ニホンジカのパルミチン酸濃度は39.1～51.3％と報告されているが，エゾシカでは23.92±3.78～31.89±1.46％を示しアカシカの値に近似していた。エゾシカの蓄積脂質の脂肪酸組成の特徴はニホンジカ，アカシカと比較し，リノール酸含有量が高いことであった。

B－(11)　ミトコンドリアDNA解析による日本在来イノシシとブタの遺伝的変異

（[1]帯広畜大・生資化，[2]岩手連大院，[3]帯広畜大・獣医，[4]農水省畜試，[5]奈良文研，[6]歴博）
○渡部琢磨[1]，奥村直彦[2]，石黒直隆[3]，中野益男[1]，小松正憲[4]，松井　章[5]，佐原　真[6]

1．目的　動物の遺伝資源の確保とその遺伝的特質の活用のためには、その動物種内の遺伝的多様性とその広がりの把握が必要である。そこで、重要な家畜種であるブタとその祖先種のイノシシとの近縁関係、さらに日本在来イノシシの各地方集団、琉球イノシシの地理的多様性を調べることを目的に、ミトコンドリアDNAの非コード領域[1)] ならびにチトクロームb遺伝子コード領域を解析した。

2．方法　在来イノシシは関東、中部、関西、九州の各地方で収集した48個体、琉球イノシシは西表、加計呂麻、奄美、沖縄本島より14個体、ブタについては各品種より2個体づつ選び、検索に供した。総DNAは肝臓組織、血液または筋肉組織より抽出し、PCR法にてミトコンドリアDNAの非コード領域、チトクロームb遺伝子コード領域を含む配列を増幅後、ダイレクトシーケンシングによりDNA塩基配列を決定した。

3．結果　ブタのミトコンドリアDNA非コード領域には10bp(CGTGCGTACA)を単位としたリピート数の変異によるヘテロプラズミーの存在が知られている。このリピート領域を除いた非コード領域の長さは約1035bpであり、全体で23の異なったハプロタイプが得られた。一方、チトクロームb遺伝子コード領域の長さは1140bpで、24の異なる塩基配列が得られた。非コード領域間の塩基置換数をもとに近隣結合法にて系統樹を作成したところ西洋ブタと、東洋ブタおよびイノシシは異なるクラスターに分かれた。これらのクラスターはブートストラップテストにより、確立100％で支持された。さらに、日本在来イノシシ、琉球イノシシ、東洋ブタはそれぞれ、ほぼ独立したクラスターを形成した。チトクロームb遺伝子コード領域を用いた解析においても同様の結果が得られた。

1）奥村直彦ら：日本分子生物学会年会,p245(1994)

B－(12)　ニンジンの再生植物体からの不定胚形成の初期過程について

（帯広畜産大学・生物資源化学）○保田　浩、増田　宏志

高等植物の不定胚形成において分化した細胞から細胞塊を経て不定胚が形成される初期段階に関する生化学的また分子生物学的研究はほとんど行われていない。その理由は分化している表皮細胞が分裂して不定胚を形成する最も初期段階の形態的変化に関する情報を得ることが困難なことと、不定胚形成の初期段階の試料を充分に得ることができないことなどの為である。私達は不定胚形成の出発材料として芽生えの胚軸切片を用いて新しいニンジンの不定胚形成系を開発した。しかし、不定胚形成の出発材料として再生した幼植物体を用いると芽生えの胚軸切片を用いた場合よりもより早い速度で高頻度かつ同調的に不定胚が形成されることを見いだした。そこで今回はこの再生した幼植物体から不定胚を形成する最も初期の段階である表皮細胞から細胞塊形成までの過程に注目して、その過程の形態的変化を光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡（SEM）で観察したので報告する。

球状胚、心臓胚および魚雷胚を2,4-Dで処理し、次いで2,4-Dのない培地で培養しても不定胚は形成されないが、それ以降のより発達した再生した幼植物体の段階で初めて不定胚が形成される。再生した幼植物体の表皮細胞の形態をSEMで観察し、各段階の不定胚の表皮細胞と比較した。その表皮細胞が単細胞やシート状の形で培地に遊離され、それらが分裂して細胞塊を経て球状胚が形成される。この過程を光学顕微鏡での連続写真で観察した。これは2,4-Dが存在しない条件下で単細胞から不定胚が形成される様子を連続的に観察した最初の報告である。また、表皮細胞から細胞塊に移行する変化をSEMで詳細に観察した。

B－(13)　不定胚形成を促進する物質の存在について

（帯広畜産大学・生物資源化学）○佐藤豪、保田浩、　増田宏志

高等植物の不定胚形成を促進するものとして種々の物質が明らかにされている。今回、私達はそれらとは異なると思われる不定胚形成促進物質がニンジン不定胚形成の初期段階に存在することを見い出したので報告する。

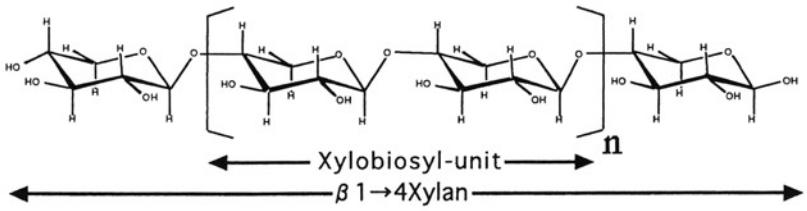
ニンジン再生植物体を不定胚形成の材料とし、2,4-Dで24時間処理した後、2,4-Dのない培地に移して培養すると、3～4日目頃から再生植物体から単細胞や表皮がシート状に遊離し、これらの表皮細胞が分裂して細胞塊を形成し、不定胚が形成される。この3～4日目の分裂していない表皮細胞を新しい2,4-Dのない培地に移して培養するとほとんど細胞塊は形成されないが、再生植物体を培養していた2,4-Dのない培地から再生植物体や遊離した細胞を取り除いた後の培地(conditioning培地：CM）で培養すると細胞塊が形成された。このことからCM培地中に表皮細胞の分裂を促進させる物質の存在が示唆された。そこで2,4-Dで処理していない再生植物体をCM培地中で培養したところ不定胚が形成された。しかし、このCM培地中に再生植物体に付着していた2,4-Dが存在する可能性があると考えられたので、2,4-Dで処理した再生植物体を培地で繰り返し充分に洗浄したが促進活性は失われなかった。また、繰り返し洗浄した各洗浄液にも同程度の促進活性があった。このことから、MS培地中に含まれる*myo*-inositolの代謝産物が促進物質であると推定して実験を進めた。*myo*-inositol溶液に2,4-Dで処理した植物体を入れ24時間インキュベートし、この反応物の一部を培地に加え2,4-D処理していない再生植物体を培養したところ不定胚が形成された。この反応物をペーパークロマトグラフィーに供すると*myo*-inositolの他に2個のスポットが観察された。これらのスポットは2,4-D処理していない再生植物体ではわずかしかないことが確認された。このことから、2,4-Dは*myo*-inositolを代謝する酵素を誘導する働きをしているのかもしれないことが推測された。

C－(1)　ハマナスから単離した糸状菌によるキシランからのキシロビオースの生産

（北大・農・応用菌学）　○竹林　美穂、田中　みち子、横田　篤、冨田　房男

【目的】未利用多糖資源であるキシランの有効利用を目的として、キシロオリゴ糖生成酵素生産菌株の探索を行った。植物を菌株の分離源とし、そのエンドファイトを分離してそれらのキシロオリゴ糖生産性を検索した。この過程で機能性オリゴ糖の一つであるキシロビオース(4-*O*-β-D-Xylopyranosyl-D-xylose)を主生産物として生産する菌株を得たので、その菌学的特徴、キシロビオースの生産条件の検討を行った。

【方法および結果】ハマナスの葉柄の表面を７０％エタノールで殺菌し、corn meal-malt extract培地で生育してきた微生物を単離後、キシランを単一炭素源とした液体培地で培養を行った。培養上清を粗酵素液として最終濃度1％としたキシランと37℃で反応させた。生成物のTLCとHPLC分析の結果、ハマナスから単離されたⅢ-7A株がキシロビオースと思われる物質を主生産物として最も効率的に生産していた。Ⅲ-7A株は、糸状菌であるが、検討した種々の培地では胞子を作らないためまだ同定できていない。Ⅲ-7A株の粗酵素反応液から活性炭カラムクロマトグラフィーにより精製された物質は、質量分析の結果、分子量が282であった。また、^{13}C-n.m.r.のケミカルシフトが標品のキシロビオースのものと一致したことから、この物質はキシロビオースであると同定された。現在、キシロビオースを生産するための培養条件および反応条件の検討を行っている。

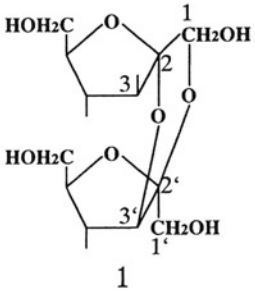


C－(2)　ダイフラクトースアンハイドライドⅢの製造

井上政尚、○菊地裕人、*横田篤、*冨田房男、佐山晃司
（日本甜菜製糖(株)、*北大農）

（目的）　ダイフラクトースアンハイドライドⅢ(DFA Ⅲ, 1)は、2個のフルクトースの還元末端が互いに他のフルクトースの還元末端以外の水酸基に結合した環状二糖である。最近になってイヌリンからDFA Ⅲを合成する酵素(イヌラーゼⅡ)が発見されているが、実際に高純度のDFA Ⅲを大量生産した例はほとんどないために、その性質については不明なところが多い。Yokotaらはイヌリンから DFA Ⅲを効率的に生産するイヌラーゼⅡを発見しており、また日本甜菜製糖(株)では以前よりイヌリンを根茎に多く含むチコリーを試験栽培している。そこで、我々はチコリーからイヌリンを抽出し、その抽出液にイヌラーゼⅡを作用させて高純度のDFA Ⅲを大量に製造することを試みた。

（方法および結果）　日本甜菜製糖(株)清川農場にて栽培したチコリー(品種:Dageraad) 約1.8トンを収穫した。チコリー中のイヌリン含量は18.6g/100gであった。そのチコリーを裁断してコセットにし、70℃の温水で1時間抽出した。その抽出液を減圧濃縮した後ライミング・カーボネーションにより精製して炭酸飽汁液を得た。装置上の問題もあってイヌリン回収率は良くなく、46％であった。その炭酸飽汁液 100L(イヌリン 約15kgを含有)をpH5.6に調整した後、*Arthrobacter* sp. H65-7株を培養して得た粗イヌラーゼⅡ(57units/ml) 1.9Lを加え、58℃で24時間加熱攪拌した。DFA Ⅲ 9.8kgが生成した。反応終了後、イースト発酵およびイオン交換樹脂を用いた脱塩により反応液中のDFA Ⅲ以外の糖および塩を除去した。その後結晶化、再結晶化を行って、純度 99.7％のDFA Ⅲ結晶 2.7kgを得た。



1)A. Yokota *et al.*, *J. Ferment. Bioeng*, 72(4), 258-261(1991).

C－(3)　ＤＦＡⅢの特性、特にラットおよびヒト腸内フローラに及ぼす影響

○名倉泰三、*中村宜司、岸田太郎、**横田篤、**冨田房男、佐山晃司
（日本甜菜製糖（株）　*（株）浅井ゲルマニウム研究所　**北大農）

（目的）我々はチコリーより抽出されたイヌリンからＤＦＡⅢ結晶を大量に製造することに成功した。今まで実際に高純度のＤＦＡⅢを大量生産した例はほとんどないために、その性質については不明なところが多い。そこで我々はＤＦＡⅢの特性について検討した。

（方法と結果）ＤＦＡⅢの甘味度は砂糖の52％であり、低吸湿性で、酸および熱に対して極めて高い安定性を示した。

ＤＦＡⅢはラットの小腸粘膜酵素で分解されず、ラット小腸反転腸管サック法で吸収されなかったことから、難消化性のオリゴ糖であることが示唆された。

そこで *in vitro* での *Bifidobacterium* による資化性を調べたところ、供試した5菌種5株はいずれもＤＦＡⅢの資化性を示さなかった。またヒト糞便を用いた糞便培養では、ラフィノースは速やかに発酵し、*Bifidobacterium* を増加させたのに対して、ＤＦＡⅢでは培養6時間まではほとんど発酵せず、24時間以降で *Enterobacteriaceae* の増加が認められた。発酵により生成する有機酸組成はラフィノースより *n*-酪酸が少なく、プロピオン酸が多い傾向であった。増加した *Enterobacteriaceae* を分離同定したところ、いずれも *Klebsiella* 属の菌（特に *K.pneumoniae*）にＤＦＡⅢの資化性が認められた。

ラットに5％ラフィノース添加飼料と2％ＤＦＡⅢ添加飼料を与えた結果では、両群ともコントロール群に対して、盲腸内容 pH の有意な低下と盲腸内容重と有機酸量の有意な増加が認められ、ＤＦＡⅢが腸内細菌に利用されていることが明らかとなった。有機酸組成において両群間に顕著な差はなかった。一方盲腸内フローラにおいては、ラフィノース群では、*Bifidobacterium* の増加が特徴であったが、ＤＦＡⅢ群では、レシチナーゼ陰性 *Clostridium* の増加が特徴であった。この *Clostridium* はグラム陽性短桿菌であること以外分かっていない。

健康成人7名にラフィノースとＤＦＡⅢをそれぞれ1日5gずつ2週間投与した結果では、ラフィノース投与で *Bifidobacterium* の菌数と占有率の有意な増加が認められたが、ＤＦＡⅢでは有意なフローラの変化は認められなかった。

以上の結果から、ＤＦＡⅢは難消化性であったが、難消化性オリゴ糖に一般的によく認められるビフィズス菌増殖作用はなく、ラフィノースとは明らかに腸内フローラによる利用性が異なったが、成人に1日5g投与した試験では、腸内フローラの変動は認められなかった。

C－(4)　キノリンの微生物分解

（北大・農・応用菌学）　○吉竹宣宏　山本千勢子　横田篤　冨田房男

【目的】　化石燃料中の窒素化合物の除去は、環境保全の観点から重要な課題の一つである。我々はこれまでにキノリンを窒素化合物のモデルとし、これを微好気条件下で資化できる微生物を2株取得した。これらの株は、同定試験の結果、*Comamonas testosteroni*（以下TKV3-2-1）、*Arthrobacter oxydans*（以下T59-47-1）であった[1]。今回は、生育の速いTKV3-2-1の洗浄菌体を用いたキノリン分解反応の最適化を行った。また、T59-47-1のキノリン代謝に関する酵素の諸性質について検討した。

【方法及び結果】　TKV3-2-1の培養は、既報の培地に酵母エキスを添加した液体培地で行った。菌体を回収後、pH7.2のリン酸カリウム緩衝液で洗浄したものを洗浄菌体とした。これを適当な濃度に希釈後、キノリンを添加し、デンシトメーターでキノリン、2-OHキノリンを定量した。その結果、試験したいずれの菌体濃度でも、分解に要する時間は生育させながらの反応に比べて著しく速かった。しかし、菌体濃度が高すぎると、反応速度がやや低下した。さらに、この菌懸濁液にn－パラフィンを添加して同様の実験を行った結果、n-パラフィン存在下でも水溶液中と同様のキノリン分解活性を示した。

T59-47-1株をフレンチプレス処理して得た無細胞抽出液によるキノリンの分解反応を行った。その結果、キノリン→2-OHキノリンの反応にはメチレンブルーなどの電子受容体が、その後の分解にはNADHが必要であることが示された。現在、キノリン→2-OHキノリンの反応を触媒するquinoline-2-oxidoreductaseの諸性質を検討している。

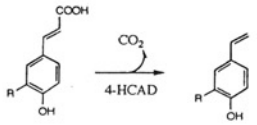
1）山本千勢子　我部政晴　小原寿幸　横田篤　冨田房男　1995年度日本農化大会要旨集，69，p.371 (1995)

C－(5)　葉面着生細菌*Klebsiella oxytoca*の基質誘導性4-ヒドロキシケイヒ酸脱炭酸酵素（4-HCAD）の性質と精製の試み

（北大農学部）○橋床泰之、田原哲士

目的）　演者らは、植物由来の4-ヒドロキシケイヒ酸誘導体を脱炭酸する能力を有する葉面着生細菌*Klebsiella oxytoca*を、*Polymnia sonchifolia*（キク科）から分離している。本菌は基質存在下、誘導的にこの脱炭酸酵素（4- hydroxycinnamic acid decarboxylase, 4-HCAD）の生産を開始する[1]。4-HCADは植物中に普遍的な4-OHケイヒ酸類を脱炭酸し、抗カビ性の強い4-OHスチレン誘導体を生成する反応を触媒するため、4-HCAD生産着生菌の生態化学的な役割に興味がもたれる。しかしながら4-HCADを含むケイヒ酸脱炭酸酵素群は、氷温下でも不安定なこともあり、その精製がなされた例はない。そこで、基質誘導をかけた*K. oxytoca* JCM 1665株菌体から4-HCADの抽出精製を試み、その酵素化学的性質を調べることにした。

方法および結果）　菌体タンパクの*K. oxytoca*菌体からの抽出は、リン酸ナトリウム緩衝液中（50 mM, pH 7.0）、超音波ホモジナイザーによって行い、遠心分離で不溶物を除いた溶液を硫安飽和とし、可溶化タンパクを沈殿回収した。この粗タンパクを緩衝液に再溶解し、不溶物を除いた後にSephadex G-100カラムでゲル濾過に供した。分子量10万前後の画分に4-HCAD活性がみられた。次にこれを50mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化したDEAE Sepharose A-50でイオン交換クロマトを行い、0.5 M NaClで溶出される酸性タンパク画分に4-HCAD活性を認めた。各精製段階で得られた活性フラクションの4-HCAD活性は、基質としたフェルラ酸から一定時間後に生成した3-メトキシ-4-ヒドロキシスチレンをGC分析することにより定量した。また、タンパク量はCoomassie Blue G 250を用いた色素結合法により定量した。陰イオン交換クロマトで得られた活性画分のタンパク量当たり4-HCAD活性比は、硫安沈殿によって得た粗タンパクに比べおよそ28倍に高められていた。本酵素は、4-位の水酸基をもつケイヒ酸類のみ脱炭酸し、3-(パラヒドロキシフェニル)プロピオン酸やチロシンには活性を示さなかった。また、有機溶媒（*n*-hexaneやEtOH等）が混入した溶液中ではその活性が著しく減少した。4-HCADの分子量およびその他の諸性質については現在解析中である。



1) Y. Hashidoko *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** (2), 215-219 (1993).

C－(6)　過酸化物分解活性を有する *Sporolactobacillus inulinus* の NADH oxidase

○西山由隆、新村洋一、高尾幸子、宮地竜郎、渡部俊弘、小崎道雄*、鈴木英雄
（東農大・食品科学、*昭和女子大・生活機構）

【目的】 *Amphibacillus xylanus* は、過酸化物分解酵素であるカタラーゼとペルオキシダーゼを欠如するが、好気条件下で良好に生育する。同菌のNADH oxidaseは、Alkyl hydroperoxide reductase の C22 component(AhpC) 存在下で過酸化物分解酵素系として機能することが見い出されている[1]。先に我々は、カタラーゼとペルオキシダーゼを欠如する *Sporolactobacillus inulinus* に*A.xylanus*のNADH oxidaseに類似するNADH oxidaseを見い出した[2]。今回、*S.inulinus* NADH oxidase の AhpC 存在下における過酸化物分解について検討を行った。

【方法と結果】 *S.inulinus* 好気培養菌体を Butyl TOYOPEARL、 DEAE Sephacel、 Blue Sepharose CL-6B、 TOYOPEARL HW60 により電気泳動的に単一に精製した。 NADH oxidase は、酸素から過酸化水素を生成するが、*A.xylanus*のAhpC存在下で過酸化水素のみならずt-butyl hydroperoxide も分解した。 *S.inulinus* の全菌体タンパクに対して、 *A.xylanus* 由来の抗 AhpC 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、 22kDa のバンドが観察された。このバンドは、*S.inulinus*中のAhpCと推定され、好気培養により顕著に誘発された。同様に *A.xylanus* 由来の抗 NADH oxidase 抗体を用いたところ、 *S.inulinus* の NADH oxidase に相当するバンドが観察された。このバンドも、好気培養により顕著に誘発された。以上から NADH oxidase が AhpC と協同して、 *S.inulinus* 菌体中の過酸化物分解に関与することが推定された。現在 *S.inulinus* における AhpC の精製を検討している。

1)Y.Niimura *et al.* (1995) *J.Biol.Chem.* 270, 25645-25650
2) 西山ら、 1996 年度　日本農芸化学大会講演要旨集　p.304

C－(7)　ボツリヌスC型菌、Stockholm 株の産生するプロジェニター毒素の構造

（東農大生化）渡部俊弘　大山 徹*　○相根義昌　井上勝弘　　*北海道衛研

ボツリヌス神経毒素（NT）は、ボツリヌス菌によって産生される M.W.約 150K のタンパク質である。本毒素は、ヒト或いは動物に対して強い毒性を示し、ボツリヌス毒素の本体と考えられてきた。しかし、ボツリヌス菌を培養したとき、その培養液中に出現する毒素タンパク質の M.W.は、900、500 或いは 300K の高分子タンパク質で NT は、単独では存在しない。

我々は、すでに、A 及び D 型菌の産生する高分子タンパク質（progenitor toxin；PT）の構造について報告してきた。今回は、C 型菌の産生する PT の構造について報告する。

C 型菌、Stockholm 株の培養液中の PT を硫安塩析、SP-Toyopearl 650S カラムによってクロマトグラフィーを行うことによって、500 および 300K の PT を精製した。得られた PT を Laemmli の方法に従って SDS-PAGE を行うと、前者は 9 つ、後者は 5 つのバンドを与えた。これらのバンドを PVDF 膜へブロッティングし、その N 末端アミノ酸配列を分析した。

その結果、500K の PT は、150K の NT、130K の NTNHA、及び 3 つの HAs から成り、300K の PT は、NT 及び nick の入った 130K の NTNHA から成る複合タンパク質であることが明らかになった。また、500KPT の構成成分、NT 及び HA-70 の 2 つの subcomponents は、その分子内に 1 つの nick が生じていることが認められた。また、300KPT の NTNHA は、N 末端から 140 番目の Thr と、141 番目の Ser の間のペプチド結合に nick が生じていた。これらの結果は、A 及び D 型 PT の研究によって得られた結果とよく一致していた。ボツリヌス C 型菌による PT の形成は、まず、500K の PT が生成した後、その構成タンパク質の中、NTNHA の分子内に nick が生ずると、500K を構成する 3 つの構成成分の中、HAs の総てが欠落し、300KPT が生ずることが推察された。

C－(8)　新開発ハイドロキシアパタイトのクロマトグラフィー担体への応用

（北海道立食品加工研究センター，[1]北海道立工業試験場）
○富永一哉，浅野行蔵，吉川修司，赤沢敏之[1]，勝世敬一[1]

1. 研究の目的

従来**ハイドロキシアパタイト**（HAp）は**クロマトグラフィー担体**として、タンパクや核酸などの分離・精製に用いられてきた。しかし、物理的な強度が弱い点が欠点であった。演者らが開発したハイブリッド HAp（HyHAp）は、HAp を**シリカ**（SiO_2）と混合して、この欠点を改善したクロマトグラフィー**担体**である。本報では、HyHAp の**タンパクの分離**に関する特性を調べた。

2. 試験研究の方法

スプレー・ドライで乾燥後、球状に成形した HyHAp（HAp（50%）＋SiO_2（50%）、ϕ 20～50 μ m）を充填したカラム（ϕ 10mm×200mm、15.7ml）を用いた。分離試験の標品は、牛血清アルブミン（BSA、pI 4.7）と Poly-L-Glu（pI 3.2）、卵白 Lysozyme（pI 10.5）と Poly-L-Lys（pI 9.7）を用いた。標品の溶出は、リン酸カリウム（pH 7.0）緩衝液を用い、直線的濃度勾配（0～500mM）で行った。HyHAp の**粒度分布**はコールター・メータで、表面付近の**原子組成**は X-線微少分析装置により測定した。

3. 実験結果

Lysozyme、Poly-L-Lys、BSA、Poly-L-Glu が、この順番に溶出した。等電点と溶出の最大ピーク番号には負の相関があり、HyHAp は**陰イオン交換樹脂**の性質を示した。この結果は、陰イオン交換樹脂と陽イオン交換樹脂の両性質を合わせ持つとされる HAp 担体におけるタンパクの溶出挙動と異なった。 HyHAp 粒子の表面組成は、粒子によって様々であった。SiO_2 が多く含まれている粒子の他に、リン酸カルシウムが多い粒子も観察された。この**不均一性**が、HyHAp の特異な性質の原因であると推測した。

C－(9)　十勝産ブドウ果汁およびワイン中のリスベラトロール含量ならびに発酵過程における変動

（帯畜大・生資化）○柚木恵太、後藤大史、小鳩道之、大西正男、伊藤精亮
（池田町ブドウ酒研）安井美裕、中林　司、内藤彰彦、川口政憲

ブドウに含まれるポリフェノール化合物はワインの品質に関与するとともに、抗酸化能、血小板凝集抑制能などの生理作用を有することが知られている。一般に食餌性フラボノイドの摂取増加に伴って冠状動脈疾患の危険率が低下することが疫学的に示されているが、ワインの飲酒も冠状動脈疾患の発生率を減少させるうえで有効であると言われている。本研究では、ワイン中の心臓病予防因子のひとつと考えられるリスベラトロール（3,5,4'-trihydroxystilbene）の含量について池田町で栽培されているブドウ品種間の違いならびにワインの製造段階での変動を明らかにしようとした。

95年産の9種の赤ワイン用および3種の白ワイン用ブドウ品種を用い、その果汁ならびに製成酒を酢酸エチルで抽出した。これを順相および逆相ＨＰＬＣに供してリスベラトロールとそのシス異性体を分離定量した。また、清見種について発酵14日目までの醪中のリスベラトロール量の経時的変化を総フェノール量と併せて分析した。

ブドウ果汁中のリスベラトロール（トランスとシス体）量は0.04～0.44mg/lで、品種により大きく異なっていた。白ワイン品種の製成酒ではリスベラトロール量にはほとんど変化がなかったが、赤ワイン品種では発酵過程での果皮との接触によりリスベラトロール量が製成酒において著増（0.59～3.17mg/l）した。リスベラトロールは発酵3日目からアルコール濃度の上昇とともに果皮から抽出され、発酵7日目でほぼ平衡に達することが判明した。マロラクチック発酵後（アルコール発酵終了6カ月後）の試料について分析したところ、多くの品種においてリスベラトロール量の増加（20％以上）が観察された。これは、果皮から移行したバイシード（stilbene glucoside）がリスベラトロールに加水分解されることを示すものと推定された。

C－(10)　インドネシアの伝統的発酵乳ダディヒの製法・利用法と性質について

○ 有賀　秀子・Yusdar ZAKARIA*
帯広畜産大学生物資源化学科・岩手大学大学院生物資源科学専攻*

（目的）1995年9月、スマトラ島西部のパダン近郊で伝統的発酵乳のダディヒの製造法と利用法を調査し、さらに試料を採取して、その物性、微生物叢などについて検討した。

（方法）ダディヒはブキチンギ市の農村地帯で伝統的方法にしたがって製造するのを見学した。調理法については、３種類について試食した。試料は製造３日目の製品をブキチンギ市のバザールで入手し、直ちに研究室に持ち帰り分析に供した。物性についてはＢ型回転粘度計を用い、35℃と40℃で測定した。製品からの菌の分離はMRS,M17及び0.1％脱脂粉乳添加標準寒天培地を用い、分離菌株の同定は常法に従い実施した。

（結果）ダディヒは水牛乳を原料とし、新鮮乳を新しく整えた竹筒に漉し入れ、バナナ等の葉でふたをして植物の繊維の紐で結わえ、室内の涼しい所に静置して自然発酵させた。２日目にやや弱いカードが形成されるが、さらに一夜経過するとしっかりしたカード形成が観察され、この時点で市場に出された。調理法としては、パームシュガーを添加して氷とともにホイップしたSirup dadih、果実と氷を組み合わせてシロップをかけたDadih buah及び、炊いた餅米をつぶし乾燥したものを湯で湿潤させ、ダディヒをかけパームシュガーで甘みをつけたEmping dadihなどを試食することができた。このように甘みを主体として他と組み合わせているが、熱帯地方の栄養供給源として嗜好的性に富む食べ方が工夫されていると思われた。

ダディヒの物性は、ずり速度が大になると見かけ粘度の急激な低下が観察され、両者の間には負の直線関係が認められ、かなり密な構造を持つ非ニュートン流体と判断された。

総生菌数は10^9程度で、最優勢種はEnterococcus faeciumの38％であり、Leuconostoc mesenteroides及びLactobacillus rhamnossusの３種で85％を占めていた。

C－(11)　Kefir微生物のD－，L－乳酸同化と生産

北海道文教短期大学
吉田　忠　○豊島琴恵

発酵乳Kefirの種（タネ）となるKefir粒については多くの研究があり、主に乳酸球菌、乳酸桿菌および酵母によって構成されていることが判っているが、その菌種は多様で、とくに酵母は乳糖発酵性、非発酵性を含めて9種が認められ、Kefir発酵の中心的役割をなすものと推測されている。我々が入手した株は、Kefir粒によって発酵したKefir飲用部分から分離した乳糖発酵酵母*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*の既知2種のほか、これまでKefirから分離例のない乳糖非分解性乳酸桿菌*Lactobacillus fructivorans*が得られ、これら3種の密接な関連によって発酵が進められることを見てきた。この場合、酵母は発酵12時間位までに乳糖を消費してアルコールを発酵、酸発酵桿菌をの生育を促し、発酵初期、3者によるアルコールを遊離生成し低下を招くとともに、糖消費後はこれらの酸が再利用され可能性を示唆して来た。今回は、とくに、3者の利用性を、D－，L－両型の挙動から観察し、発酵乳酸各の菌の役割をさらに明らかにしようとし、D－，L－乳酸単一のC－源とした3菌株の代謝過程を、ベーリンガー・マンハイム社製F－キットを用いたD－，L－乳酸の消長によって検討した。

その結果、乳酸桿菌、球菌、酵母のいずれもが、培養6～12時間までにてD－，およびL－乳酸の何れをも資化して増殖し、これに伴ってD－乳酸の増加があり、発酵後半にはD－，L－乳酸の蓄積に移るが、とくに嫌気条件では、球菌、桿菌によるL－乳酸生成蓄積を顕著に行うことがわかり、Kefir発酵では、加えた牛乳の乳糖が酵母によって発酵12時間までに急速に分解され、桿菌に単糖を供給するとともに、増殖とエタノールに発酵、なら3者による急激な乳酸、酢酸生成があって環境整備を行い、乳糖消費後は、これらの酸が桿菌、球菌に再利用され、後半、嫌気条件下で主としてL－乳酸蓄積に至ることが明らかとなった。

C－(12)　乳酸菌乾燥粉末スターターの開発（味噌用乳酸菌の乾燥化）

北海道立食品加工研究センター
○吉川修司・田村吉史・川上誠・浅野行蔵・富永一哉

１．研究の目的

乳酸菌スターターはヨーグルトなど発酵乳製品で使用されるのみで、他の乳酸発酵食品にはほとんど利用されていない。現在供給されているスターターは、凍結乾燥法により製造されるため価格が高い。したがって、取扱いと管理が容易で安価なスターターを開発すれば、乳製品以外でも潜在需要は高いと思われる。

本研究は食品に好適な乳酸菌を生きたまま乾燥させる方法の確立、発酵食品の製造工程の安定化と高品質化を目的として行った。

２．研究の方法

試験に用いた菌株は*Tetragenococcus halophila*、*Lactobacillus plantarum* および *Leuconostoc mesenteroides* の３株である。

流動層乾燥法を用いたのが本報の特徴で、食品製造用に低コストで乾燥が可能である。乳酸菌を液体培養後に集菌し、糖などの保護材溶液と混合して吹き付け液を調製した。温風で舞い上げた粉体（基材）に吹き付け液を噴霧し乾燥した。

３．結果

種々の乾燥条件を検討した。保護材として加える糖の種類や濃度および基材の種類によって、生残率が左右された。*T. halophila*の場合は、保護材にはシュークロース、基材にはスキムミルクが有効であった。吹き付け液の送液速度などを検討した結果、生残率はほぼ100%を達成でき、２週間保存（４℃）も可能であった。

他の株についても検討した。*L. plantarum* の場合、乾燥後の生残率は約100%で、１カ月保存（４℃）が可能であった。生残率は基材の種類と保護材の種類や濃度の影響を大きく受けた。*L. mesenteroides* の場合、生残率は約90%で２週間保存が可能であった。

C－(13)　乳酸菌乾燥粉末スターターの開発（乳製品用乳酸菌の流動層乾燥）

北海道立食品加工研究センター
○田村吉史・吉川修司・川上誠・浅野行蔵・富永一哉

【目的】　ヨーグルトやチーズなどの発酵乳製品は、スターターとして乳酸菌が添加されている。スターター用乳酸菌の多くは凍結乾燥菌体である。凍結乾燥品はやや高価で菌種も乏しい。スターターは、マザー、バルクと増殖させて製品作りに使用する。マザースターターの管理は重要であり、管理には設備と熟練した技術を必要とする。小規模メーカーは、取り扱いや管理が容易で保管に場所をとらない、低価格なスターターを望んでいる。そこで本研究では、主に発酵乳製品製造に用いられる乳酸菌の流動層乾燥法による乾燥化を試みた。

【方法】　供試乳酸菌は、乳業技術協会より入手した *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H-61の３菌株を用いた。培養後、遠心分離により集菌し、スキムミルクを基材として流動層乾燥法により乾燥した。乾燥保護剤としてシュクロース濃度の影響、保存性そして復水温度の影響、酸度の上昇などについて検討した。

【結果】　*S. salivarius* subsp. *thermophilus*は、乾燥後も高い生残性を示し保護剤濃度が高くなっても生残性は変化しなかった。４℃で３カ月間保存しても著しい菌数低下はなく、ここでも保護剤濃度による違いは見られなかった。 *L. lactis* subsp. *lactis* は、乾燥後も高い生残性を示し保護剤濃度が高くなっても生残性は変化しなかった。保存しても著しい菌数低下はなかったが、菌数の低下に対し保護剤濃度の効果が見られた。*L. lactis* subsp. *cremoris*は、保護剤なしでも高い生残性を示し、保護剤の濃度を濃くすると、さらに高い生残率を示した。保存中も高い生菌数が維持された。供試菌はいずれも復水温度（０℃～４０℃）の生菌数への影響は小さかった。

C－(14)　乾燥酵母を用いた清酒醸造

（北海道立食品加工研究センター）
○浅野行蔵、富永一哉、吉川修司

【目的】

従来の酒母育成は、保存酵母の増殖から初添まで2週間以上を要する。乾燥酵母を使用すれば、酒母が不要になり製造期間が短縮され、省力化とコストダウンにつながる。本研究では、清酒酵母を好気的に培養し、乾燥酵母を調製した。清酒を醸造し乾燥酵母の性能を調べた。特に、アミノ酸度と酸度の増加および醸造後半の切れに注目した。

【実験方法】

日本醸造協会701号および901号酵母を用いた。いずれも泡なし酵母でタンクあたりの仕込量を多くできる。酵母の培養は、廃糖蜜を糖源としてジャーファーメンターで好気的行った。酵母を遠心分離器で集め、水洗し、プレスし、通風乾燥した。生菌数は、メチレンブルー染色法で測定した。清酒メーカー6社で総米3tレベルの試験醸造を行った。エタノール、日本酒度などは、国税庁所定分析法に従い、ピルビン酸濃度は、酵素キット(ベーリンガーマンハイム)で測定した。

【結果】

乾燥酵母の使用方法として、注意すべき最大の点は、復水過程にあった。乾燥酵母を40℃付近のお湯に入れて復水すると生菌率は最も高かった。しかし、0℃の水では、ほとんどが死滅した。

異なった6つの清酒メーカで試醸したのは、それぞれ異なった米の種類、精米歩合、用水、管理方法において、乾燥酵母の性能を比較するためであった。いずれのメーカにおいてもモロミ経過は順調で、後半になっても発酵は衰えることなく、切れの良い、すがすがしい香りの清酒ができあがった。

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

アサヒビール株式会社北海道工場
旭油脂株式会社
恵庭リサーチビジネスパーク株式会社
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
北海道日産化学株式会社
北海道立十勝圏地域食品加工技術センター
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
北海製罐株式会社食品研究所
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所
岩田醸造株式会社
株式会社北開水工コンサルタント
株式会社ズコーシャ
株式会社和科盛商会
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
日本新薬株式会社千歳クリエートパーク
日本甜菜製糖株式会社総合研究所
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
十勝農業共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
有限会社北海道バイオ技術研究所

日本食品科学工学会特別会員御芳名

旭油脂株式会社
士幌町農業協同組合
東海物産株式会社北海道研究所

北交…0152-43-4141
鉄道……43-3939

農大バス停横ポスト前