

各賞受賞者合同講演会

講 演 要 旨

期 日：平成11年12月2日(木)

場 所：北海道大学農学部N22講義室
(札幌市北区北9条西9丁目)

日本農芸化学会北海道支部
日本栄養・食糧学会北海道支部
北海道農芸化学会

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

北海道大学大学院農学研究科内

TEL : 011-706-2496/4140

平成 11 年度各賞受賞者合同講演会

司会：日本農芸化学会、日本栄養・食糧学会北海道支部長 葛西隆則

14:00 (1) 「消化管におけるアポリポタンパク質の発現調節に関する研究」
－平成 11 年度日本栄養・食糧学会奨励賞－ (北大院農) 園山 慶

14:40 (2) 「新規微弱発光系による活性酸素消去能に関する研究」
－平成 11 年度日本農芸化学会奨励賞－ (東北大院農) 吉城由美子

15:20～15:30 休憩

15:30 (3) 「組織培養によるコケ植物の二次代謝産物の生合成研究」
－平成 11 年度日本農芸化学会奨励賞－ (帯広畜大) 田崎弘之

16:10 (4) 「グリコシダーゼの分子機構に関する研究」
－平成 11 年度日本農芸化学会功績賞－ (北大院農) 千葉誠哉

なお、講演終了後同会場で日本栄養・食糧学会北海道支部総会が行なわれます。

講演者略歴

○ 園山 慶（北海道大学大学院農学研究科）

1986年 北海道大学農学部農芸化学科卒業
1988年 同大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了
1988年 ライオン株式会社生物科学研究所研究員
1991年 北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程入学
1992年 同農学部助手
1995年 博士(農学、北海道大学)
1999年 北海道大学大学院農学研究科助手、現在に至る

○ 吉城 由美子（東北大学大学院農学研究科）

1985年 宮城学院女子大学家政学科卒業
1985年 仙台白百合短期大学助手
1992年 東北大学農学部研究生
1993年 同農学部技術補佐員
1995年 農学博士(東北大学)
1998年 東北大学農学部文部技官、現在に至る

○ 田崎 弘之（帯広畜産大学畜产学部）

1982年 北海道大学農学部農芸化学科卒業
1984年 同大学院農学研究科修士課程修了
1984年 日本専売公社(現 JT)中央研究所、植物開発研究所
1990年 帯広畜産大学畜产学部助手
1993年 ドイツ、ザールラント大学留学
1996年 帯広畜産大学助教授、現在に至る

○ 千葉 誠哉（北海道大学大学院農学研究科）

1961年 北海道大学農学部農芸化学科卒業
1963年 同大学院農学研究科修士課程修了
1963年 北海道大学農学部助手
1974年 農学博士(北海道大学)
1975年 北海道大学農学部助教授
1979年 同教授(生物化学講座)
1992年 北海道大学農学部応用生命科学科教授(蛋白質機能工学講座)
1999年 同大学院農学研究科教授、現在に至る

(1)

消化管におけるアポリポタンパク質の発現調節に関する研究

(北海道大学大学院・農学研究科) 園山 慶

消化管腔内消化を受けた食餌脂質は小腸上皮細胞に吸収され、小腸上皮細胞内で再エステル化された後にリポタンパク質であるカイロマイクロ (CM) あるいは超低密度リポタンパク質 (VLDL) としてリンパ管に放出される。小腸上皮細胞で発現する主要なアポリポタンパク質はアポA-I、A-IV、及びB48であり、これらがCMやVLDLの主要構成タンパク質となる。こうしたアポリポタンパク質は血中脂質の輸送・代謝に中心的な役割を果たしているのに加えて、小腸から放出されるアポA-IVは中枢神経系を介した食欲及び消化管機能の調節に関与するため、アポリポタンパク質の発現様式を解析することは、脂質代謝異常の病態や食欲・消化管機能の調節に関する知識を広げる上で興味深い課題である。我々は、小腸におけるアポリポタンパク質（とりわけアポA-IV）の発現調節機構についてラットならびに培養細胞を用いて解析し、以下に示すような知見を得た。

管腔内因子と小腸アポA-IV：ラット小腸の近位一遠位軸ならびに陰窓一絨毛軸に沿ったアポA-IV遺伝子の発現パターンを解析した結果、アポA-IV mRNAの発現レベルは、近位小腸で高く、また絨毛に存在する分化した上皮細胞で高かった。近位一遠位軸に沿った発現の勾配について、近位小腸を広範囲に切除した後の残存回腸におけるアポA-IV遺伝子の応答を解析し、アポA-IV mRNAレベルが迅速かつ特異的・補償的に増加することを見出した。このような増加は絶食動物でも観察されたため、まずははじめにアポA-IV発現調節に関与すると考えられる管腔内因子として胆汁に注目し、種々の外科手術動物を用いて解析した結果、胆汁成分が小腸におけるアポA-IV発現を調節する管腔内因子のひとつであること、近位一遠位軸に沿った発現の勾配や近位小腸切除後の残存回腸におけるアポA-IVの適応的な発現增加の少なくとも一部は胆汁成分に依存することが示唆された。

体液性因子と小腸アポA-IV：小腸切除や食餌脂質により、消化管ホルモンであるペプチドYY (PYY) の遠位腸管からの放出が刺激されることが知られているので、小腸アポA-IV発現にPYYが関与すると予想した。ヒト結腸ガン由来細胞株Caco-2を小腸上皮細胞のモデルとして用い、PYYがアポA-IV遺伝子発現に及ぼす影響を解析した結果、PYYは時間及び用量依存的にアポA-IV mRNA レベルを増加させた。したがって、PYYが小腸におけるアポA-IV発現を調節する体液性因子のひとつであり、食餌脂質による小腸アポA-IV発現・分泌の増加や近位小腸切除後の残存回腸におけるアポA-IVの適応的な発現增加の少なくとも一部はPYYの分泌増加に依存することが示唆された。

神経性因子と小腸アポA-IV：管腔内の栄養素に応答する求心性神経が小腸に存在することが示唆されているので、アポA-IVの発現動態にも神経系が関与するか否かについて薬理ブロッカーを用いて解析した。無麻酔・非拘束条件下のラットに各種の薬理ブロッカーを注入し、小腸におけるアポA-IV遺伝子の発現について解析した結果、小腸におけるアポA-IV遺伝子の”基礎的な”発現の少なくとも一部はコリン作動性神経により支配されていることを示唆する知見を得た。

以上のことから、小腸におけるアポA-IV発現に関して、管腔内因子、体液性因子、及び神経性因子による複雑な調節機構が存在する可能性が示された。

更に、食物纖維の血漿コレステロール低下作用とアポリポタンパク質の発現動態との関連についても言及する。

新規微弱発光系による活性酸素消去能に関する研究

(東北大院・農学研究科) 吉城由美子

X (reactive oxygen species), Y (hydrogen donor), Z (mediator) 系微弱発光は大豆サポニンの生理活性解明を行った研究過程で発見した新規の発光現象である。大豆サポニンは過酸化水素、没食子酸存在下で微弱発光し、この微弱発光が 3 種存在下において生じることから、過酸化水素を X、没食子酸を Y、大豆サポニンを Z とし X、Y、Z 種のスクリーニングを行った。その後、フラボノイドに代表される天然ラジカル消去物質が過酸化水素、アセトアルデヒド存在下で同様の微弱発光現象を示すことを明らかにし、多数の化合物間で広く観察される現象である知見を得た。そこでこの微弱発光を当初、範疇分けした XYZ を用い XYZ 系微弱発光と命名した。現在まで Y 種としてフラボノイド、グリケーションエンドプロダクト、Z 種として大豆サポニンの他、アセトアルデヒド、メタロプロテインがそれらに相当することを明らかにしている。

また膨大なスクリーニングテストの結果から、Y 種は水素供与体、プロトン供与体、電子供与体、抗酸化物質、Z 種は電子受容体、酸化促進物質としての特徴を有することがわかっている。多種多様の類似構造を持つフラボノイドを Y 種とし化学構造と微弱発光、活性酸素と微弱発光との関係を調べた結果、その微弱発光が Y 種の化学構造に影響され、その発光強度が従来報告されているフラボノイドの活性酸素消去能と一致する注目すべき結果を得ることができた。さらに XYZ 系微弱発光を詳細に検討した結果、微弱発光はそれら濃度に依存し、 $[P]=k[X][Y][Z]$ (k : photon constant) に従う 3 次反応生成エネルギーであるとの考えに至った。

様々な X、Y、Z 種の組み合わせによる微弱発光を多波長解析した結果は励起カルボニルによる発光を示し、その結果は 1270 nm (1 重項酸素に基づく) 発光が検出されないことからも裏付けることができる。その他、XYZ 系微弱発光に基づく実験系で Y、Z 種の組み合わせがスーパーオキシド消去、ヒドロキシリラジカル消去、抗酸化性などへ影響をおよぼし、活性酸素消去に対し、それぞれの Y、Z 種の組み合わせに特有な協奏効果を示すことを明らかにした。

多数の化合物間で観察できる XYZ 系微弱発光は Y、Z 種により特徴的な濃度依存性、活性酸素消去能を示し、その発光波長も Y、Z 種両種に依存する。また用いる 3 種の種類で発光強度が異なり、XYZ 系微弱発光が X、Y、Z 種に対し非常に特異性の高いものである。現在、XYZ 系微弱発光の特異性を応用し、X 種はナノモル、Y 種はミリモルレベルまで検出が可能である。

XYZ 系微弱発光にみられる注目すべき点は微弱発光強度と活性酸素消去に高い相関性が得られることにある。X、Y、Z 種の 3 種により放出される光エネルギーは反応性に富む (エネルギー的により高い状態) 活性酸素種の完全なる消去を意味するものである。従来の活性酸素消去測定法は抗酸化物質あるいはラジカル消去物質(Y)との反応における活性酸素の減少率に基づくものであるが、実際にはエネルギー移動 (Y-OOH、Y·の生成) がなされているに過ぎない。そのなかにあって微弱発光を通じ見いだした Z 種の存在意義は大きい。また 3 種存在下において生じる XYZ 系微弱発光は Y 種の検出を容易にするだけでなく、X、Z 種を容易に検出できる画期的方法でもある。食品、生体成分を用いた広範囲にわたる XYZ 系微弱発光の機構解明とその応用から生体防御、食生活、臨床検査に新しい領域が誕生するものと期待している。

本発表では XYZ 系微弱発光を見いだすに至った経路を踏まえながら、これまで明らかにした XYZ 系微弱発光機構における所見、食品、生体成分を試料とした XYZ 系微弱発光の応用について述べる。

組織培養によるコケ植物の二次代謝産物の生合成研究

帯広畜産大学畜産学部生物資源科学科 田崎弘之

コケ植物は、生合成的にも構造的にも特異な化合物を含有し、生物有機化学的に大変興味深い。例えば、テルペン化合物では、イソプレン則に従わないイレギュラーな骨格を有するもの、維管束植物で見いだされるものとは逆の絶対構造を持つものが数多く見いだされる。また、コケ植物の培養細胞や培養した葉状配偶体は、一般の維管束植物の培養細胞と異なり、母植物にはほぼ匹敵する量の二次代謝産物を蓄積し、構成成分もほとんど変わらないことから、植物組織培養による有用な二次代謝産物生産の有望な実験材料である。本研究では、組織培養技術を用いたコケ植物の二次代謝機構の解明が、植物の有用な二次代謝産物の生産技術を発展させるだけでなく、分類学上のコケ植物の位置づけや植物の二次代謝の多様性とその進化の過程を知る上でも重要となると考え、コケ植物の二次代謝産物の生合成について研究を行った。

生合成研究の対象となる化合物を探索するために、野外採集したコケからのセスキテルペンおよびジテルペンの単離を行い、コケ植物に含まれる新規骨格を有する化合物の構造を明らかにした。すなわち、野外採集したアキウロコゴケから*ent*-ラブダン型、*seco*-クレロダン型、クレロダン型のジテルペンおよび、イソプレン則に従わない新しい骨格を持つ jamesoniellide C を単離しその構造を明らかにした。また、オオクラマゴケモドキからは、grandilobalide A, B, C をはじめとする新規ピングイサン型セスキテルペンを単離した。その他のコケについても含まれるテルペン化合物の単離を行った。

ついで、実験室内でこれらのコケが扱えるように、無菌培養系を確立させた。アキウロコゴケの無菌培養は、表面殺菌した茎葉配偶体から誘導した。培養した植物体から、野外採集したアキウロコゴケからも単離されたジテルペンとともに、*seco*-クレロダン型ジテルペンjamesoniellide D-J をはじめとする多数の新規ジテルペンを単離した。また、植物体のメタノール抽出画分より、jamesopyrone をはじめ 4 つのリグナン誘導体を単離した。ミドリゼニゴケも同様な方法で無菌培養を誘導し、既知の pinguisone とともに、5 つのピングイサン型セスキテルペンを単離した。その他、イチョウウキゴケ、トサカゴケ、ツツソロイゴケの無菌培養を行い、含まれるテルペンについて調べた。

イソプレン則に従わないイレギュラーな骨格を有する、pinguisone に代表されるピングイサン型セスキテルペンの生合成では、ファルネシリピロリン酸 (FPP) から pinguisone の炭素骨格を形成するには、少なくとも 1 度の FPP 主鎖の切断と 2 回のメチル基の転移が起らないと炭素骨格は構築できない。この生合成に興味を抱き、安定同位体標識した生合成前駆体を無菌培養したミドリゼニゴケに投与することによって、ピングイサン型セスキテルペンの生合成経路の解明を試みた。最初に、培養したミドリゼニゴケへ [2-¹³C]-酢酸を投与し、ピングイサン型セスキテルペンへの取り込みを調べた。ついで、[6,6,6-²H₃]-メバロン酸の投与では、²H-NMR 分析により、ピングイサン骨格の 12、13、15 位のメチル基がメバロン酸の 6 位に由来することが明らかになった。さらに、[2,2-²H₂]、[4-²H₂]、[4-¹³C]、[4,5-¹³C₂] メバロン酸をそれぞれ投与し、ピングイサン型セスキテルペンの生合成経路を明らかにした。

コケ植物のリグナン 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,7-dihydroxy-1,2-dihydro-2,3-naphthalenedicarboxylic acid (DDDN) と jamesopyrone のコケ植物における分布について調べたところ、これらはコケ植物に広く分布していた。いくつかのコケについて、DDDN の光学分割を行ったところ、種によって片方の鏡像異性体が過剰に存在していた。そこで、コケ植物におけるリグナン生合成について調べるため、無菌培養した植物体への [8-²H]-コーヒー酸の投与実験を行った。その結果、コーヒー酸から、アキウロコゴケでは (+)-DDDN と jamesopyrone が、ミドリゼニゴケとトサカゴケでは (-)-DDDN が合成されることが明らかになった。

グリコシダーゼの分子機構に関する研究

(北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻) 千葉 誠哉

糖質の分解や合成に関与する酵素は、基礎的研究としてのみならず応用的研究の対象としても今日に至るまで多くの研究者に興味がもたれてきた。また、産業的に利用されている酵素も少なくない。演者らは、長年に亘り種々の糖質加水分解酵素の研究を行ってきたが、これまでの研究について主として α -グルコシダーゼに焦点を絞って述べることにしたい。

1. α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの基質特異性：各種の起源から精製した α -グルコシダーゼの基質特異性に関する反応速度論的パラメーターに基づいて、 α -グルコシダーゼを三つのグループに分類するのが適切であることを提案して広く受け入れられた。が、最近の研究の進展により蛋白質としての一次構造上からは二つのグループに分類するのが適切と考えられた。

すべての糖質水解酵素によるグリコシド結合の切断反応は、基質のもつアノマー型が生成物に保存されるか、または生成物のアノマー型が反転するかのいずれかである。 α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼは見掛け上は、共にglucoseのみを生成する酵素としては区別できないが、 α -glucoseを生成する α -グルコシダーゼと β -glucoseを生成するグルコアミラーゼとはアノマー型の違いによって明確に区別される。また、両酵素の基質特異性の相違は、活性部位におけるサブサイト親和力の差によって合理的に説明できた。

2. 糖転移反応による新規オリゴ糖の合成：通常、糖質水解酵素は、反応系に適當な受容体が存在すると基質のグリコシル残基を受容体に転移させて糖転移生成物を生成するが、糖質水解酵素ではアノマー保持型酵素のみが糖転移反応を触媒する。そのような糖転移反応を応用して、15種におよぶ新規二、三糖類を合成した。

3. グリコシダーゼの反応機構：糖質水解酵素の触媒反応は、二つのカルボン酸による一般酸・塩基触媒反応と考えられている。多くの α -グルコシダーゼについて、その活性解離基を速度論的に検討した結果、 $-COO^-$ および $-COOH$ と推定された。 α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの反応機構を速度論的に解析するため、酵素合成した [$1,1'$ - 2H] isomaltoseを基質として、 α -第二次動力学的同位体効果を測定した。その結果、両酵素の水解反応機構は、求核置換反応機構よりもオキソカーベニウムイオン中間体機構に基づいて進行すると推定された。

4. α -グルコシダーゼの一次構造と新規糖鎖および分子進化：演者らによって各種の起源から α -グルコシダーゼの一次構造が解析してきたが、特に、*Aspergillus niger*からの結晶酵素は（分子量、約125,000）、二つのサブユニットP1（227アミノ酸）とP2（719アミノ酸）からなり、約25%の糖を含む糖蛋白質である。その全一次構造は、Edman法と遺伝子の双方から解析された最大級の蛋白質の一つである。遺伝子のクローニングによる解析結果は、本酵素がP1、P2の順に連続して遺伝子上にコードされており、一本鎖のポリペプチドの前駆体として翻訳・生合成された後、限定的プロテアーゼ分離を受け成熟酵素となる。その触媒活性部位はP2に存在し、触媒活性に直接関与している解離基 $-COO^-$ (Asp224) を化学修飾により決定した。他方の解離基 $-COOH$ (Asp394) は、他起源 α -グルコシダーゼのアミノ酸置換に基づいた結果から推定した。

N-結合型糖鎖としてガラクトフラノース構造を含む三種の新規糖鎖、*O*-結合型糖鎖として二種の新規糖鎖の構造を決定した。

α -グルコシダーゼは、一次構造上から二つのファミリーIとIIに分類するのが妥当であると考えられた。ファミリーIは α -アミラーゼの一次構造上に高度に保存されている四つの領域（I～IV）を保存しているが、ファミリーIIでは大部分の酵素がその四領域のうちII領域のみを保存している。ファミリーIとIIの間には一次構造上の相同性は極めて低く、これら二つのファミリーが異なる祖先蛋白質から進化してきたと推定された。

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

(ABC順)

アサヒビール株式会社北海道工場
旭油脂株式会社
ベル食品株式会社
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
株式会社和科盛商会
株式会社ズコーシャ

関東化学販売株式会社
麒麟麦酒株式会社千歳工場
小柳商事株式会社
日本化学飼料株式会社
日本清酒株式会社
日本新葉株式会社千歳クリエートパーク
日本甜菜製糖株式会社
ニッカウヰスキー株式会社北海道工場
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
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リサーチセンター
雪印乳業株式会社札幌研究所
雪印食品株式会社
有限会社北海道バイオ技術研究所