

合同学術講演会

講 演 要 旨

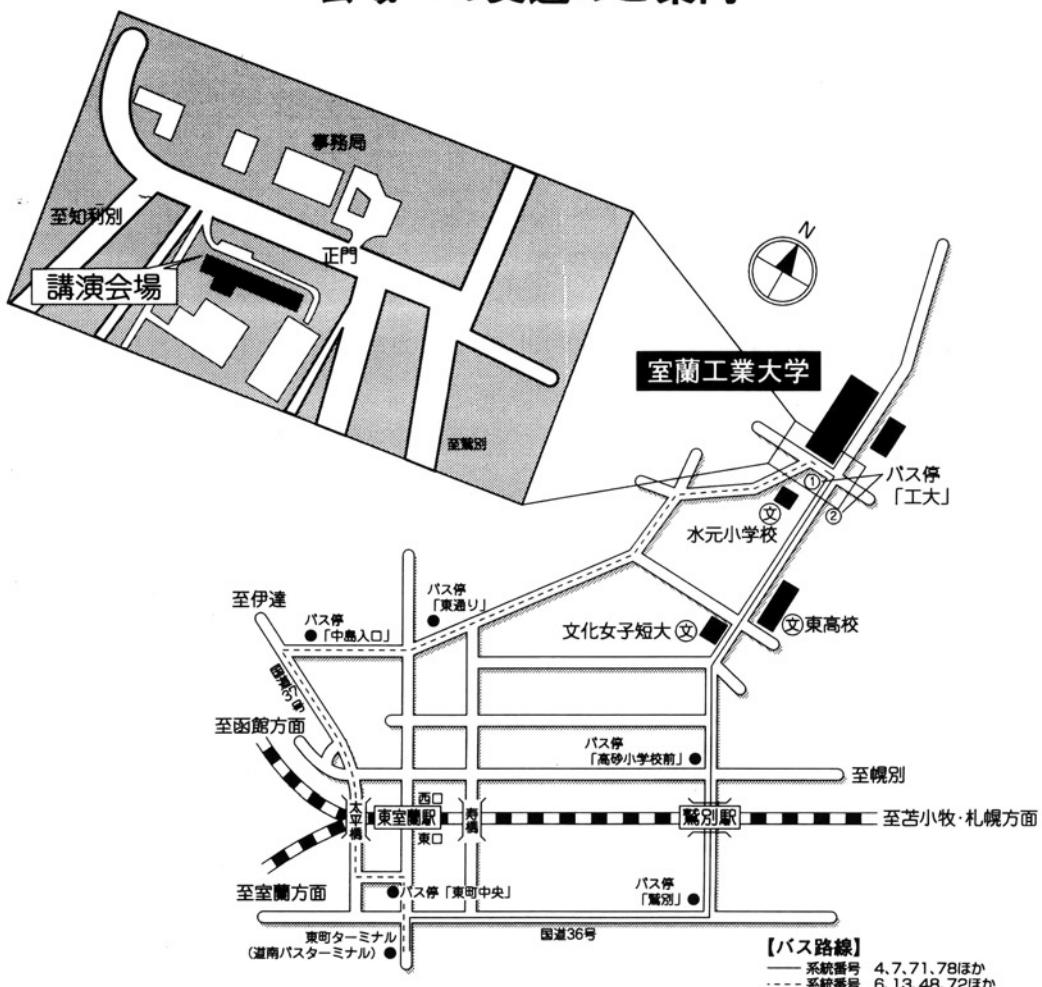
期 日：平成 12 年 11 月 4 日(土)

場 所：室蘭工業大学学内共同利用施設
(室蘭市水元町 27-1 Tel:0143-46-5741)

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
日本応用糖質科学会北海道支部
北 海 道 農 芸 化 学 協 会

〒 060-8589 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 : 011-706-2496/4140

会場への交通のご案内



*室蘭工業大学へは、JR東室蘭駅東口から徒歩7分の道南バス「東町ターミナル」からバスで15~20分。

道南バス時刻表 (東町ターミナル～鷺別～工大～仲通～東町ターミナル)

東町ターミナル発	7:39, 47*
	8:00, 10*, 13*, 15, 21*, 35, 48*, 59
	9:10*, 20, 30* 以降約10分おき (*鷺別先回り、他は仲通先回り) 他に、7:41, 8:04, 8:15, 8:17, 9:04 (高砂2丁目経由) もあり
工 大 発	15:01, 16*, 21, 36*, 42, 45*, 57*, 59
	16:03, 19*, 27, 42*, 47
	17:02*, 08, 23*, 29, 45*, 53
	18:08*, 13 (*乗り場②から鷺別経由、他は乗り場①から仲通経由) 他に、15:31, 16:32, 17:32 (工大②発東室蘭西口経由)

- ご利用になる時刻は念のため現地でお確かめ下さい。
- バスは循環コースで所要時間は鷺別経由約15分、仲通経由約20分。
- 工大前バス停(①, ②)は経由により場所が違います。
- タクシーご利用の際は、駅西口より所要約10分。

合同学術講演会プログラム

11月4日(土)

◎一般講演 (9:00~12:00) : 室蘭工業大学学内共同利用施設(S棟)S301会議室
(プログラムは別掲)

○日本農芸化学会北海道支部総会 (13:00~13:20) : 同上

◎特別講演 (13:30~15:10) : 同上

(座長:千葉誠哉)

13:30 「オオムギ α -アミラーゼのタンパク質工学による基質認識の調節」 (北大院農) 森 春英

(座長:板橋 豊)

14:20 「キラル HPLC によるトリアシルグリセロールの立体特異分析」 (北大院水産科) 安藤靖浩

◎懇親会 (15:30~17:30) : 室蘭工大大学会館特別食堂

会費: 一般 3000 円、学生 1500 円

(参加希望者は、当日講演会場でお申し込みください)

一般講演プログラム（講演時間10分、討論2分、○印：講演者）

(座長：得字圭彦)

- 9:00 (1) 好熱菌と常温菌から得た融合微生物のゲノム構造
(室蘭工大・応化)[○]山口太一、角谷政尚、安居光國
- 9:12 (2) 醋酸菌(*Acetobacter* sp. NCI1193 株)の脂質代謝関連酵素遺伝子のクローニング
(¹帯広畜大・生資科、²岩手大院・連農、³ミツカン中研)[○]山根衣佳¹、高桑直也²、山内奈緒¹、後藤英嗣²、木下幹朗¹、大西正男¹、塚本義則³
- 9:24 (3) 酵母 *Saccharomyces kluyveri* の種内分岐
(北農試)小田有二

(座長：小栗 秀)

- 9:36 (4) 南カリマンタン硫酸酸性化地域の水田で生育したイネ根面につく非共生性窒素固定細菌の定性的評価
(北大院農・応生科)[○]多田元比古、橋床泰之、田原哲士
- 9:48 (5) ニンジン体細胞胚形成の最も初期段階に発現する遺伝子の検索
(¹帯広畜大・生資科、²岩手大寒冷バイオシステム研)[○]伊藤崇博¹、保田 浩²、得字圭彦¹、大和田琢二¹、増田宏志¹
- 10:00 (6) サイトカイニンとジベレリンによるニンジン体細胞の胚化の制御
(帯広畜大・生資科)[○]得字圭彦、栗山京子、大和田琢二、増田宏志

(座長：森 春英)

- 10:12 (7) トマトレクチンの発現と局在性～種子形成との関係
(東農大生産)小栗 秀
- 10:24 (8) トマト種子 2S アルブミン(Lec2SA)の構造と性質
(東農大生産)[○]鴨志田真弓、桃木芳枝、小栗 秀
- 10:36 (9) 未ハゼ粒の発生と米粒水分および熟度の関係－北海道産もち米の品質特性解析と品質向上技術(1)－
(道中央農試)[○]中森朋子、柳原哲司、加藤 淳

(座長：福島道広)

- 10:48 (10) Jurkat 細胞のラクトフェリンレセプターに関する研究
(¹北大農・酪科、²韓国建陽大医)[○]森田浩史¹、劉 永春²、金 完燮¹、田仲哲也¹、玖村朗人¹、島崎敬一¹
- 11:00 (11) イノシン、アデノシン、シトシン混合物がラット血中グルコースおよびインスリンレスポンスにおよぼす影響
(酪農大院・食科)[○]内山由貴、福森保則、山森 昭、小野寺秀一、塩見徳夫
- 11:12 (12) LC/MS によるリン脂質分子種の精密分析
(北大院水産科)[○]生田朋久、板橋 豊

(座長：栗原秀幸)

- 11:24 (13) ヤーコン中のトレハラーゼ阻害活性物質について
(道東海大生工)西村弘行、[○]松澤貴詩、佐藤 敦
- 11:36 (14) チコリー茎葉部中の抗菌活性物質の検索およびその季節変動について
(道東海大生工)西村弘行、[○]永井良周、佐藤 敦
- 11:48 (15) キバナハウチワマメ幼植物における構成フラボノイドとその変動について
(¹CREST、²北大院農・応生科)[○]片桐康史¹、橋床泰之^{1,2}、田原哲士^{1,2}

1

好熱菌と常温菌から得た融合微生物のゲノム構造
 (室蘭工業大学・応用化学科・生物工学講座)
 ○山口 太一、角谷 政尚、安居 光國

【目的】好熱菌の耐熱性はタンパク質については特異なアミノ酸配列によるもの、DNAについてはG C含量の高さが個々の要素についての研究が積極的になされている。一方で、古くよりポリジン、Caイオンの保護効果といった外的要因も提唱され、個々の要素だけでは熱耐性が不完全であり保護因子の存在が示唆された。本研究はこのような耐熱保護機構を検索するものである。

【方法】ここで用いる中度好熱菌はバチルス属に分類され、そのバチルス属の代表である常温性枯草菌の全ゲノム解析は既に完了している。このデーターを利用することにより好熱性微生物の耐熱性の機構を解明できることが期待できる。このため好熱菌と常温菌をプロトプラスト融合し、この耐熱性を有している融合微生物のゲノム構造を解析した。ゲノムサイズはCHEF法で求めた。枯草菌のマップに従った遺伝子の存在確認はPCR法によった。カタラーゼ活性はザイモグラフィー法により確認した。

【結果】まず完全長のゲノムを分離したところゲノムサイズが好熱菌、枯草菌が3.3Mb, 4.7Mbに対し好熱性融合株のものは2.9Mbと小さく示され、高温生育に必要な機構は比較的軽量であることが示唆された。細胞内タンパク質を比較すると融合株のものは好熱菌のそれと類似しておりメジャーなタンパクは好熱菌遺伝子の産物と考えられた。つぎに、それに組み込まれた2つの微生物を起源とする遺伝子の存在様式をPCR法により解明した。その結果、枯草菌rpsL, amyE, katAに対するプライマーを設計したところ、融合株ゲノムを鉄型として増幅された。これは枯草菌遺伝子が融合株中に存在し、これが連続した配置とするとその遺伝子が含まれるサイズは1Mbあり、好熱菌と枯草菌ゲノムの両者がメガベースサイズで組み替えられたものであることが示された。その結果耐熱性生育に必要な機構は1.9Mb内に存在すると示唆された。

2

酢酸菌 (*Acetobacter* sp. NCI1193株) の脂質代謝関連酵素遺伝子のクローニング
 ○ 山根衣佳、高桑直也¹、山内奈緒、後藤英嗣¹、木下幹朗、大西正男、塙本義則²
 (帯畜大・生資科、¹岩手大院・連農、²ミツカングループ本社・中研)

演者らは酢酸菌における高濃度の酢酸やエタノールに対する耐性機構と膜脂質との関連性を検討しており、先に酢酸菌による培地中への酢酸蓄積過程において菌体中の Ceramide(Cer) と Phosphatidylcoline(PC) が増加することを見出した。本研究では、酢酸產生能との関連性が推測される種々の脂質の代謝に関わる遺伝子を単離し、標的遺伝子の破壊および過剰発現による酢酸產生能に及ぼす影響を解析しようとした。また、供試菌株の種レベルを同定する一環として、酢酸產生に関わる Alcohol dehydrogenase(ADH) および Aldehyde dehydrogenase(ALDH) 遺伝子のクローニングを試みた。Cer の生合成に関わる遺伝子としては Fatty acid hydroxylase(FAH) 遺伝子を、PC 生合成に関わる遺伝子としては Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase(PEMT) 遺伝子ならびに β -Keto-acyl-ACP synthase II(KAS II) を標的遺伝子とした。酢酸菌ゲノムDNAライブラリーからのスクリーニング用プローブの作製として、それぞれ既報の細菌由来のアミノ酸配列の情報を基に設計した縮重プライマーを用いて内部配列のPCRクローニングを行った。得られた増幅産物の推定アミノ酸配列は既報のアミノ酸配列と高い相同意を示し、とくに *Acetobacter aceti*(*A. aceti*)由来のPEMTとは97%の相同意を示した。同様に ADH および ALDH 遺伝子の内部配列の PCR クローニングを行った結果、*A. aceti*由来の ADH の推定アミノ酸配列と 94%の相同意を示す増幅産物が得られたことにより、供試菌株は *A. aceti* と近縁であることが示唆された。

3

酵母 *Saccharomyces kuyveri* の種内分岐

(農水省北海道農試) 小田有二

【目的】*Saccharomyces kuyveri* は、染色体 DNA の分離パターンから均一な種と考えられている。そこで、5 株(IFO 1685^T, IFO 1811, IFO 1892, IFO 10847, IFO 10848)の rRNA スペーサー領域およびメリビオース発酵性(*MEL*)遺伝子の塩基配列を比較することにより、菌株間の差異について調べた。

【方法および結果】 ITS1、5.8S rRNA および ITS2 を含む全 ITS 領域は、プライマー-pITS1 と pITS4 で増幅した。¹⁾全長は 597bp で、その中の 158bp の 5.8S rRNA は 5 株で同一であった。IFO 1811 と IFO 10848 の配列は完全に一致していたが、その他と違っていた。これら 2 株と異なる塩基は、IFO 1685 において ITS1 の 178 の T が C に、ITS2 の 198 位で C が T、IFO 1892 において ITS1 の G が A に、IFO 10847 で T が C に置換されていた。ITS1 のほうが ITS2 よりも置換されている塩基数が多いのは、ITS2 よりも ITS1 のほうが変異しやすいというこれまでの知見²⁾と一致していた。以上のように、*S. kuyveri* の 5 株における ITS 領域の違いはわずかであり、すべて transversion ではなく transition であったものの、菌株内のバラツキはあるものと推定した。これらの差異をさらに詳しく調べるために、*MEL* 遺伝子について調べることにした。*Saccharomyces cerevisiae* の *MEL1* 遺伝子を標的としたプライマー³⁾で PCR 反応を行うと、*MEL1* 遺伝子の 88.8% に相当する 1247bp の断片が増幅された。この断片をプローブとすると、1500–1600bp の染色体 DNA にハイブリダイズした。塩基配列をもとに近隣接合法にて系統樹を描くと、5 株の間に明確な種内分岐が見られた。

¹⁾Y. Oda et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 1102–1106 (1997)

²⁾Y. Oda et al. *Yeast*, 13, 1243–1250 (1997)

³⁾Y. Oda and M. Fukunaga, *Yeast*, 15, 1797–1801 (1999)

4

南カリマンタン硫酸酸性化地域の水田で生育したイネ根面につく非共生性窒素固定細菌の定性的評価

(北大院農) ○多田元比古、橋床泰之、田原哲士

研究背景) インドネシア、南カリマンタンの低湿地地帯に広がる硫酸酸性化土壌は、雨季の湛水域においてさえ水相の pH 値が 3.0 近くまで低下する強酸性土壌である。このような酸性土壌は、栄養供給の面からみると極めて貧弱な土壌であるとされている。しかしながら、このような酸性土壌に生育できる耐性植物があり、また、現地のイネにも、窒素、リンおよび石灰を経済的な問題から施さないにも拘わらず、施与区以上の収量を上げているものがある。従つて、これら植物の生産性には、当該植物の根圏に棲む非共生性窒素固定微生物が大きく寄与しているのではないかと考えている。そこで、新たに開発した半ゲル培地法による窒素固定能の簡易定性評価を試み、これら耐性植物の根圏に棲み着いている多様な非共生性窒素固定微生物の存在を明らかにしてきた。今回、南カリマンタンの稻作地帯において 8 月下旬に現地調査を得た、施肥条件や生育状態の異なるイネのサンプルについて根面微生物の定性評価を行い、幾つかの知見を得たので報告する。

結果及び考察) 半ゲルで固めたアゾトバクター用無窒素培地に現地で採取した根面洗浄液を接種し、静置培養によって出現するコロニーの形状、密度、上面からの深さによる判定を試みた。モヤ状のものに対して、粒状集団状のものやディスク状のものはその機能が極めて特徴的であると考えられた。イネの根面における非共生性窒素固定微生物は、新たに伸びた白色の根よりも還元的に生成した硫化水素によるとと思われる黒色化した根に、より高い菌体密度とより低窒素分圧で窒素固定が可能な集団が認められた。また、施肥をしていない水田のうち、分けつ数や収量が極めて高かったイネ (Siam Pandak) の主根から得られた複数のサンプルでは、4 ~ 5 層のディスクを形成するものが出現し、根面における酸素分圧に対する適応性の高い集団が共存していることが示唆された。これは、根圏における効率的な窒素固定に重要な要素である可能性がある。

5

ニンジン体細胞胚形成の最も初期段階に発現する遺伝子の検索

(¹帯畜大・生資科、²岩手大・寒冷バイオシステム研究センター)

○伊藤崇博¹、保田浩²、得字圭彦¹、大和田琢二¹、増田宏志¹

【目的】 私達は従来の体細胞胚形成系ではほとんど研究できなかった体細胞が分裂して胚形成能を持つ細胞塊が形成される胚形成の最も初期段階を研究できる系を確立して種々の研究を行ってきた。この胚形成系は迅速かつ初期段階の細胞塊を高収量で調製できることから、この段階に特異的に発現する遺伝子の検索の研究を可能にした。今回は、この初期段階に高く発現する二つの遺伝子を単離し、それらの全長の塩基配列を決定したので報告する。

【方法】 体細胞胚形成試験は再生植物体を用いて行った。全長の塩基配列は cDNA 断片から RACE 法で決定した。ノーザンプロットの解析は再生植物体、培養 5 日目の細胞塊（最も初期のもの）、培養 9 日目の細胞塊（後期のもの）、球状胚、魚雷型胚、懸濁培養細胞からそれぞれ total RNA を抽出して行った。

【結果】 ノーザンプロットの結果、胚形成の過程で体細胞から細胞塊を形成する最も初期段階に高く発現する二つの遺伝子を単離した。即ち、その一つは No.43 で ORF の全長を含む 884bp の塩基配列を決定した。この遺伝子はノーザンプロットの結果、培養 5 日目の細胞塊に最も高く発現し、球状胚、魚雷型胚、再生植物体および懸濁培養細胞ではほとんど検出されなかった。またこの No.43 は花柱や果実に蓄積されていると報告されている thaumatin 様タンパク質と高い相同意識があった。他の一つは ORF の全長を含む 1439bp の塩基配列を決定した結果、大麦の珠心での発現が報告されているアスパラギン酸プロテアーゼである nucellin と高い相同意識があり、活性中心のアミノ酸配列も保存されていることから nucellin 様タンパク質と名付けた。また、この遺伝子のノーザンプロットの結果は、培養 5 日目の細胞塊で高く発現しており、球状胚、魚雷型胚および再生植物体での発現は僅かであり、懸濁培養細胞にも高い発現が見られた。

6

サイトカイニンとジベレリンによるニンジン体細胞の胚化の制御

○得字圭彦、栗山京子、大和田琢二、増田宏志（帯広畜産大学

生物資源科学）

植物細胞は動物細胞とは異なり、発生過程で多様に特殊化（分化）してしまった体細胞から植物個体を再生する能力を持っている。これを植物細胞の「分化全能性」といい、ニンジン体細胞胚形成はこの典型的な例として研究されてきた。しかし、体細胞が胚的な細胞に転換する機構についてわかっていることは少ない。我々はニンジン表皮細胞からカルスを経ずに直接胚形成が起こる実験系を用い、体細胞の胚化機構を研究している。今までに胚形成を誘導する植物ホルモンのオーキシンや種子成熟に関わるアブシジン酸についてニンジン不定胚形成に対する影響が報告されているが、サイトカイニンとジベレリン(GA)の影響に関する報告は少ない。また、体細胞が直接胚化する過程における植物ホルモンの働きについては報告されていない。今回は GA とサイトカイニンの体細胞の胚化における役割について調べたので報告する。

ニンジン再生植物体（不定胚を経て再生）を 2,4-D で処理し、その後様々な植物ホルモンや阻害剤の入った固体培地で静置培養し、表皮細胞からの胚形成を観察した。その結果、アンチサイトカイニンであるプリンリボシドは体細胞胚形成率を低くすることがわかった。また、この阻害はサイトカイニンであるゼアチソリボシドを加えることによって回復した。また、GA 合成の阻害剤であるウニコナゾール-P は心臓型胚から魚雷型胚へ発達するときの胚軸の伸長を著しく阻害し、さらに再生した胚の根の部分に二次胚を誘導した。

以上より、体細胞の胚化にはサイトカイニンが必要で、再生した胚が胚的な生長を終え、幼植物への発達過程に転換するためには GA 合成が必要であると考えられる。

トマトレクチンの発現と局在性～種子形成との関係

(東京農業大学生物産業学部) ○小栗 秀

目的) トマト果実レクチン (LEL) は、果実の子室組織 (種子周辺の液状部分) に局在するキチン結合性レクチンである。糖鎖工学のツールとして汎用されているが、植物体内の役割は不明である。LELの役割解明を目的に、これまで不明であった植物体内の分布や果実における発現時期など、LELの基本的な性質を明らかにした。また、LELの発現と種子形成との因果関係を単為結果 (無種子) 果実を用いて調べた。

方法) トマト (*Lycopersicon esculentum* var. *cherry*) は、温室で栽培し、受粉後 3 日間隔で子房を採取した。単為結果は、開花前の花薺の薬と花柱を除去した子房にオーキシン剤 (4-クロロフェノキシ酢酸) を散布して誘導した。レクチン活性は、ヒトA型赤血球の凝集を指標に測定した。

結果) ①トマト植物体では果実と葉に赤血球凝集活性が検出され、葉の比活性は果実の 1/140 であった。抗 LEL 抗体を用いたイムノプロット分析から葉には LEL (分子量 130 kD) が存在しないが、交叉反応性を示す 93 kD のタンパク質が見出され、果実と葉の異なるイソレクチンの存在が示唆された。②果実の赤血球凝集活性は受粉直後から検出され、12 日後から上昇が始まり 30 日後に一定に達した。イムノプロット分析から LEL のバンドは受粉後 15 日以後の果実に検出されたが、それ以前には検出されず、かわりに葉に見られた 93 kD タンパク質が受粉後 12 日目までの幼い果実に存在していた。③単為結果果実のレクチン活性は正常果実と等しかった。また、果実内の局在性も全く同一であった。以上の結果は LEL の発現は種子形成と独立した現象であり、オーキシンで誘導される子房の発達のみに依存することを示している。また、LEL は、受粉直後から存在するのではなく、果実が著しい成長を始める頃に一致して発現することがわかった。

アーティクル
著者名
成熟果の表面にも
糖鎖と結合する
存在する

8

トマト種子 2S アルブミン (Lec2SA) の構造と性質

(東京農業大学生物産業学部) ○鶴志田 真弓, 桃木 芳枝, 小栗 秀

目的) 2S アルブミンは、双子葉植物の種子タンパク質の一つであり、ラージ (約 8 kD) とスマール (約 4 kD) の二つのサブユニットがジスルフィド架橋したヘテロダイマーである。2S アルブミンは貯蔵タンパク質と考えられているが、トリプシンインヒビター活性や、抗菌活性を示すもの、アレルゲンとして同定されたものなどが含まれ、性質は多岐にわたる。我々は、トマト種子から新規な 2S アルブミン (Lec2SA) を精製し、一次構造を決定した。Lec2SA は精製の過程で分子量と電荷が異なる数種の成分に分離された。本報では、この不均一性の由来を解析した。また、Lec2SA は、抗トマト果実レクチン (LEL) 抗体と交叉反応性を示すことを発見したので、Lec2SA の性質をレクチンとの比較から調べた。

方法) Lec2SA はトマト (*L. esculentum* var. *cherry*) 種子 60 g から CM- 及び SP-トヨバールカラムクロマトグラフィーにより単離した。

結果) ① Lec2SA は SP-トヨバールカラムを用いて 4 種の成分に分離された。このうちの 2 つについて、各サブユニットのアミノ酸組成と配列、分子量を比較した。両者のスマールサブユニットのアミノ酸組成と N 末端配列は等しく、質量分析結果も同一であったことから、スマールサブユニットの構造は一致していると思われた。一方、ラージサブユニットのアミノ酸組成と質量分析結果から、両者は Val と Arg 残基数が異なることが示され、両者の違いはラージサブユニットのアミノ酸配列の違いに由来することが明らかになった。② Lec2SA のラージサブユニットは抗 LEL 抗体と交叉反応性を示したが、スマールサブユニットは交叉反応しなかった。ラージサブユニットは LEL と構造上の共通性を有すると思われる。しかしながら Lec2SA は赤血球凝集活性と糖タンパク質糖鎖への結合性を示さなかった。

未ハゼ粒の発生と米粒水分および熟度の関係

- 北海道産もち米の品質特性解析と品質向上技術（1）-

○中森朋子 柳原哲司 加藤 淳 （北海道立中央農業試験場）

【背景・目的】 「ハゼ（りょく化）」は、もち米特有の白濁化現象であり、流通上、米粒がハゼていることが「もち米」の必要条件とされている。しかし、年次・地域により未ハゼ粒が発生する場合があり、うるち米の混入と区別できないという理由から、返品やクレームの対象となる事例が報告されている。そのため生産現場では、未ハゼ粒発生の要因解明とその防止対策が強く求められている。そこで本研究では、未ハゼ粒の発生要因として、従来から指摘のある米粒水分との関係に加えて、米粒熟度との関係について検討した。

【方法】 米粒水分と未ハゼ粒割合の関係解析：平成11年産「はくちょうもち」を用いて、水分18%から13%までの乾燥過程における未ハゼ粒割合を経時的に測定した。水稻栽培試験：平成12年中央農試水田においてもち米の栽培を行った。窒素施用量を2段階に設定し、各処理とも収穫を5時期に分けサンプリングを行った。ヨウ素吸光度の測定：もち米粉に1N NaOHを加え懸濁し、オートクレーブにより糊化、溶解した後、pH調整を行い、I₂-KI溶液を加え、分光光度計により400~700 nmの吸光度を10 nm間隔で測定した。

【結果】 ①従来の報告¹⁾同様、水分の低下とともにハゼ粒は増加したが、もち米がハゼる境界水分とされている15.0%以下の米粒においても、未ハゼ粒が5%認められた。②①で得られた未ハゼ粒に対しヨウ素染色を行ったところ、うるち米とは異なる呈色反応を示し、うるち米の混入がないことを確認した。③窒素施用量の違いにより、未ハゼ粒割合に明らかな差異は認められなかった。一方、収穫時期によって未ハゼ粒割合が異なったことから、未ハゼ粒の発生には米粒の熟度が関与していると推測された。④未ハゼ粒のヨウ素吸光曲線は、ハゼ粒に比べて全波長領域で吸光度が高かった。このことから、ハゼ粒と未ハゼ粒ではデンプン含量あるいはデンプン粒の特性が異なることが示唆された。

1) 畠山俊彦・眞崎聰・加藤武光・山木虎雄 1993 秋田県農試研究時報 (33)

Jurkat細胞のラクトフェリンレセプターに関する研究

○森田浩史¹、劉永春²、金完燮¹、田仲哲也¹、玖村朗人¹、島崎敬一¹

(¹北大・農・酪農科学、²韓国・建陽大・医・微生物学)

<目的> ラクトフェリン（Lf）は乳汁から発見された鉄結合性の糖蛋白質であり、様々な体液や好中球顆粒にも含まれており、さらに多様な生物活性を持つことが知られている。一方、生体内における炎症反応では、細胞性免疫の主体となるT細胞が抗原に対して最も強烈な免疫反応を起こし、この細胞の異常な活性化は周辺組織の障害をもたらすため抗炎症にはT細胞の機能抑制も重要である。炎症の初期に好中球が浸潤し、好中球はLfを産生する細胞である事を考えると、好中球由來のLfがT細胞の機能抑制にそのレセプターを通じて働く可能性が高い。そこで本研究では、Lfと結合するT細胞上のレセプターを検索した。

<方法> ウシLf(BLf)は森永乳業(株)製、ウシトランスクフェリン(BTf)、オボトランスクフェリン(OTf)はSigma社製を用い、それぞれをBiotinで標識しリガンドとして用いた。ヒトTリンパ芽球の株化細胞であるJurkat細胞は常法により培養し、実験に供した。細胞の固定化はアセトンによる方法、細胞膜画分は凍結・融解操作後、CHAPSにて細胞膜中の可溶性画分を分離した。細胞へのBiotin化リガンドの結合はFITC標識Avidinを用いて蛍光顕微鏡で観察した。抽出した細胞膜蛋白質はSDS-PAGEの後にPVDF膜へ転写し、Biotin-Avidin反応によるFar-western法によりリガンドと結合する画分をECLにて検出した。さらに糖による結合阻害実験にはLactose,D(+)-mannose,α-Methyl-D-mannoside,N-Acetyl-D-galactosamine,N-Acetyl-D-glucosamineを用いた。

<結果> SDS-PAGEおよびTOF-MSによってBiotin標識による分子量変化を確認したところ、BLf,BTf,OTfそれぞれ1分子当たりの結合Biotin分子数は約30であった。これらBiotin標識化BLf,BTf,OTfはいずれも固定した細胞と結合する事が観察された。さらに細胞溶解物の膜画分についてのFar-westernの結果から、35 kDa付近の二つのタンパク質バンドがBLf,BTf,OTfと結合性を有する事が示され、これらのタンパク質に対する親和性を持ったレセプターであることが示唆された。なお、ラクトフェリン糖鎖を構成している糖を用いた結合阻害実験により、Lfの糖鎖は細胞との結合に関与しない事も観察された。

イノシン、アデノシン、シトシン混合物がラット血中グルコースおよび
インスリンレスポンスにおよぼす影響

○内山由貴、福森保則、山森昭、小野寺秀一、塩見徳夫
(酪農大院・食品科学)

【目的】筆者らはこれまでにイノシン、アデノシン、シトシンがショ糖投与時の血糖上昇を抑制することを報告した^{1, 2)}。これらのヌクレオシドをショ糖に添加し利用する際、三者各々単独で添加投与するよりも混合物で投与する方が食品成分の構成比にちかくより好ましいと思われる。

本研究では、イノシン、アデノシン、シトシンの等量混合物をショ糖と共に投与した時の血糖上昇抑制について調べた。

【方法】SD系雄ラット(150g)を基本飼料で5日間飼育後、体重に差が生じないように組み分けし(一群6匹)、一夜絶食後20%ショ糖液、20%ショ糖+0.33%イノシン+0.33%アデノシン+0.33%シトシン液、20%ショ糖+1%イノシン液、20%ショ糖+1%アデノシン液および20%ショ糖+シトシン液を経口投与した。各々の投与群を、順にコントロール群S-NM群、S-I群、S-A群、S-C群とした。0、15、30、60、120、180分後断頭屠殺により採血し、血中グルコース量およびインスリン量を測定した。

【結果】各試料投与15分後の血糖量(mg/dl)およびインスリン量(μU/ml)はコントロール群: 307.28; 47.27、S-NM群: 229.5; 32.02、S-I群: 202.0; 27.27、S-A群: 225.6; 35.79、S-C群: 246.5; 31.95であり、各ヌクレオシド投与群の血糖量およびインスリン量はコントロール群と比較して有意に低かった。30分後の血糖およびインスリン量も同様の傾向を示した。三種のヌクレオシド類混合物の添加投与は各ヌクレオシドの単独投与とほぼ同様の血糖上昇抑制およびインスリン節約効果を示した。

1) Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 237-243 (2000)

2) J. Nutr., 130, 1946-1949 (2000)

L C / M S によるリン脂質分子種の精密分析

(北大院・水) ○生田朋久、板橋 豊

【目的】リン脂質の分子種を精密に分析し、その組成を正しく把握することは細胞膜の機能を研究する上で重要である。また、食品や医薬品としての利用を図る上でも必要である。本研究では、ホスファチジルコリン(PC)の分子種をHPLCとMSを用いて決定する精密分析法の確立を目的とした。

【方法】植物油(大豆、卵黄)と魚油(サンマ筋肉、ニシン筋肉、サバ筋肉、サケ卵)から分離したPCをホスホリパーゼCで加水分解し、生成したジアシルグリセロールを2-アンスリルウレタン(2-AU)およびニコチネートに変換した後、両誘導体を逆相HPLCおよびLC/MSで分析した。HPLCにはODSカラムを用い、アセトニトリルとイソプロパノールの混液を移動相とするイソクラティック溶離法で分析した。MSにはイオントラップ型装置を使用し、2-AUはESIでニコチネートはAPCIモードで測定した。

【結果】植物油および魚油PCの分子種は、両誘導体において明瞭に分離された。2-AUは、その蛍光検出限界(EX 265 nm / EM 432 nm)が1 fmolと極めて高感度で、少量成分を含めての分子種組成を明らかにできた。また、LC/ESI/MSでは[M+N_a]⁺の明瞭な分子イオンピークが得られたが、LC/ESI/MS/Msでは二つの脂肪酸の構造に関する情報は得られなかった。一方、ニコチネート誘導体はUV検出感度が低いものの、LC/APCI/MSでは、[M+H]⁺の明瞭な分子イオンピークが、LC/APCI/MS/MSでは[MH-RCO+1]⁺、[MH-RCOOH]⁺および[RCOO·CH₂·CH·CH₂O+H]⁺などの特徴的なフラグメントイオンが得られた。これらのフラグメントを利用することにより各PCの構成脂肪酸を容易に同定することができた。

西村 弘行、○松澤 貴詩、佐藤 敦（道東海大学・生物工）

【目的】トレハラーゼは昆虫が血糖として持つトレハロースを特異的に加水分解し、glucoseとする酵素であるが、ヒトなど哺乳動物では、消化酵素中にわずかに活性が確認されているだけである。またカビなどの真菌類においては強いトレハラーゼ活性が確認されており、実際にトレハラーゼ阻害を主要な作用機構とする抗真菌剤も検討されている。この実験では、近年生活習慣予防を持つ作物として注目され、病害虫抵抗性を持つヤーコンとその他植物について、より選択性の高い殺虫剤、抗真菌剤への応用を目的として、植物中のトレハラーゼ阻害活性物質の検索を行った。

【方法】採取した植物を直ちに細断し、メタノール抽出した場合と剣山で植物体に傷を付けた後、一晩蒸留水に浸し、細断後メタノール抽出した場合の両者で行った。それぞれ濃縮後、酢酸エチル画分、n-ブタノール画分、水画分に分画し、その中で活性の高い、ヤーコン塊根部の酢酸エチル抽出画分を、pHの差によって、有機酸性画分、フェノール性画分、塩基性画分、中性画分に分け、活性のあったフェノール性画分を、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画しトレハラーゼ阻害活性を測定した。

【結果及び考察】ヤーコン塊根、酢酸エチル画分、有機酸性画分、フェノール性画分に非常に高い活性が確認された、フェノール性画分を、シリカゲルクロマトグラフィーによって分画した結果、複数のフラクションで活性が確認された。現在この物質の単離、同定を行っている。また他の高等植物抽出物のトレハラーゼ阻害活性および抗菌活性について比較を行った。

西村弘行、○永井良周、佐藤 敦（道東海大・生物工）

【目的】北欧原産のチコリー(*Cichorium intybus L.*)は、高級野菜として知られていたが、近年ファミリーレストランなどで一般に普及されるようになってきた。チコリーは古くから病害虫に対し、抵抗性を持っていることが知られおり、一般に無農薬で栽培されている。このことからチコリーには、何らかの防御機構を持つと考えられる。これまでの研究によって塊根部には、セスキテルペン系の抗菌活性物質が発見されているが、茎葉部についての報告はない¹⁾。そこで演者らは茎葉部中の抗菌活性物質の検索および季節変動における抗菌活性の強さの変動についての研究を行った。今回は、植物病原菌、食中毒菌などのカビ類および細菌類を用いた抗菌活性を指標にし、活性物質の分離・精製を行った。また、チコリー茎葉部を異なる時期に採取し抗菌活性物質の季節変動を調べた。

【方法および結果】採取したチコリーを細かく切り、100%アセトンで1ヶ月間抽出し、粗抽出物を得た。これを酸性度の違いにより分画をおこない、有機酸性物質・フェノール性物質・塩基性物質・中性物質に分画した。各画分をペーパーディスク法、TLC 寒天平板法などを用いた抗菌活性試験を行った結果、フェノール性物質に強い活性が認められ、特に黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)に対し強い活性を示した。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて分画を進め、抗菌活性物質を精製し、各種のスペクトル解析を行ったが、化学構造については現在検討中である。また、時期ごとに採取したチコリー茎葉部エーテル抽出物の単位重量あたりの抗菌活性比較した結果、葉が十分に生育した時期(9月29日採取)のものが最も高い活性を示すことがわかった。

1) H. Nishimura et al. J. Chem. Ecology, in press (2000)

○片桐康史¹⁾, 橋床泰之^{1,2)}, 田原哲士^{1,2)} (1; 科技団CREST, 2; 北大院農)

【背景と目的】ハウチワマメ属の植物は、プレニル化イソフラボンを抗菌性成分として生成する。プレニル化イソフラボンの中でも強い抗菌性を有するluteoneはキバナハウチワマメ (*Lupinus luteus*) より初めて単離・同定されたが、この植物からはプレニル化フラバノンなど、イソフラボノイド以外のフラボノイド成分も単離・同定されている。このため、フラボノイド成分のほとんどをイソフラボノイドが占めるシロバナハウチワマメ (*L. albus*) とキバナハウチワマメとの異同を追究することは、フラボノイド化合物の骨格部分および抗菌性イソフラボンの代謝制御機構の解明の上で重要であると思われる。今回は、キバナハウチワマメの幼植物におけるフラボノイド相を調査するとともに、外的ストレスやジャスモン酸メチルを与えたときのその変動を検討した。

【方法と結果】吸水後、播種15日目までのキバナハウチワマメ幼植物の各部位をMeOHで抽出した。それらをC₁₈カラムに供して5% MeCNで洗浄後、86% MeCNで溶出された成分を粗フェノール性画分としてHPLC分析に供した。シロバナハウチワマメ幼植物ではいずれの部位においても主要なピーク成分は genistein 7-O-glucoside (*t_R* = 12.6 min) およびそのマロニル化物であったが、キバナハウチワマメの根ではより早い保持時間 (*t_R* = 11.3) を示すピークが、上胚軸ではやや遅い保持時間 (*t_R* = 13.4) を示すピークがそれぞれ最大ピークであった。スペクトル分析および加水分解処理により、前者はイソフラボンC-配糖体、後者はフラボンO-配糖体と予想された。子葉ではこれら両方のピークが明瞭に検出されたが、吸水前の種子に含まれるフラボノイド成分はごく微量であった。また、子葉を切片として外部からジャスモン酸メチルを与えたところ、イソフラボン配糖体、特にgenistein 7-O-glucoside の重量当たりの含量が著く増加したが、保持時間13.4分のピーク成分の量的な変動は認められなかった。

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
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