日本農芸化学会東北支部
日本農芸化学会北海道支部
日本生物工学会北日本支部
合同支部大会

講演要旨集

日時：平成１４年１０月２５日（金）～２６日（土）

場所：仙台市戦災復興記念館

編集・発行

日本農芸化学会東北支部

〒981-8555　仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

東北大学大学院農学研究科内

発行日：平成１４年１０月１５日

日本農芸化学会東北支部(第136回大会)
日本農芸化学会北海道支部
日本生物工学会北日本支部
合同支部大会

共催：東北地域バイオインダストリー振興会議(TOBIN)、北海道農芸化学協会

日時：平成14年10月25日(金)～26日(土)

会場：仙台市戦災復興記念館 （下記地図参照）

(〒980-0804　仙台市青葉区大町 2-12-1 Tel 022-263-6931)

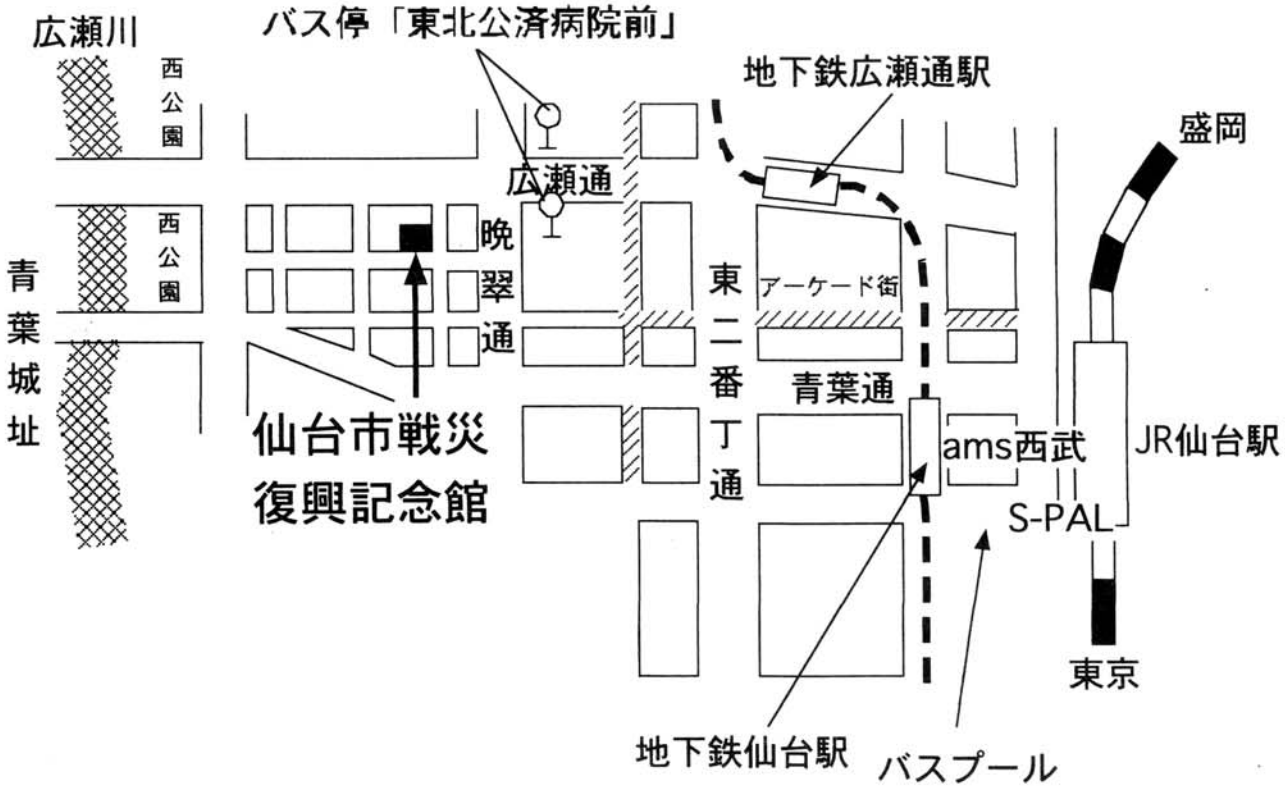
世話人：神尾好是 （日本農芸化学会東北支部長）

お問い合わせ先

・日本農芸化学会東北支部　〒981-8555　仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1
東北大学大学院農学研究科内　東北支部庶務幹事　冨田 敏夫
(Tel : 022-717-8781, Fax : 022-717-8780、tomita@biochem.tohoku.ac.jp)

・日本農芸化学会北海道支部　〒080-8555　帯広市稲田町
帯広畜産大学畜産生命科学科内　北海道支部庶務幹事　福島道広
(Tel : 0155-49-5557、Fax : 0155-49-5577、fukushim@obihiro.ac.jp)

・日本生物工学会北日本支部　〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉07
東北大学大学院工学研究科生物工学専攻内 北日本支部事務局庶務　中山　亨
(Tel : 022-217-7271、Fax : 022-217-7293、nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp)



・仙台駅からタクシーで５分
・地下鉄広瀬通駅から徒歩10分
・市バス「東北公済病院・戦災復興記念館前」下車、徒歩２分（仙台駅から料金１００円）
お車の場合、駐車場はございませんので、近隣の有料駐車場をご利用下さい。

スケジュール

●１０月２５日（金）

１４：００～１４：３０　農芸化学会東北支部総会（A会場）
農芸化学会北海道支部総会（B会場）
森 謙治 農芸化学会会長ごあいさつ

１４：４０～１６：１０　特別講演（各40分）
開会のあいさつ

＜座長：神尾 好是＞
(1) 冨田 房男 氏　（北海道大学大学院農学研究科）
「生理活性物質の探索とその利用」　（日本農芸化学会功績賞受賞記念講演）
(2) 佐藤 英明 氏　（東北大学大学院農学研究科）
「近未来の動物バイオテクノロジー」

１６：２０～１７：００　日本農芸化学会東北支部奨励賞記念講演（各15分）
＜座長：神尾 好是＞
(1) 橋本　勝 氏　（弘前大学農学生命科学部）
「エポキシドおよびアジリジンを応用した天然物の合成研究」
(2)豊増 知伸 氏　（山形大学農学部）
「イネ馬鹿苗病菌の*ent*-カウレン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析」

１７：３０～　懇親会（会場：仙台市戦災復興記念館レストラン、会費：２０００円）

●１０月２６日（土）

９：００～１３：４２　一般講演（発表１０分、質疑２分）

講演番号01	9:00 - 9:12	講演番号02	9:12 - 9:24
講演番号03	9:24 - 9:36	講演番号04	9:36 - 9:48
講演番号05	9:48 - 10:00	講演番号06	10:00 - 10:12
講演番号07	10:12 - 10:24	講演番号08	10:24 - 10:36
講演番号09	10:36 - 10:48	講演番号10	10:48 - 11:00

11:00 - 11:30　休憩（軽食をご用意しております）

講演番号11	11:30 - 11:42	講演番号12	11:42 - 11:54
講演番号13	11:54 - 12:06	講演番号14	12:06 - 12:18
講演番号15	12:18 - 12:30	講演番号16	12:30 - 12:42
講演番号17	12:42 - 12:54	講演番号18	12:54 - 13:06
講演番号19	13:06 - 13:18	講演番号20	13:18 - 13:30
講演番号21	13:30 - 13:42		

一般講演プログラム

◆ A会場

＜座長：得字圭彦＞

A-01）インゲンマメ Starch synthase IIの構造と発現特性
（北大院・農・応生科）○瀬野浦武志、磯野直人、桜井靖高、吉川基高、伊藤浩之、松井博和

A-02）Purification and characterization of two α-amylase isoforms from azuki bean *Viga angularis* Wild
（北大院・農・応生科）○San San Mar, Haruhide Mori, Atsuko Kimura, Seiya Chiba

A-03）成熟中のピーマン果実に存在するβ－ガラクトシダーゼに関する研究
（東北大院・農・応生科）○小笠原論、阿部敬悦、中島佑

A-04）サイネリア花弁のマロニル基転移酵素遺伝子の発現とキャラクタリゼーション
（東北大院・工・生工）○澤田真哉、鈴木宏和、中山亨、西野徳三

＜座長：中山　亨＞

A-05）植物の低温ショックドメインタンパク質
（農研機構・北海道農研）○今井亮三、Dale Karlson

A-06）ニンジン体細胞胚形成の初期階段に特異的に発現するallergen 様タンパク質の遺伝子の解析
（[1]岩手大院・連農、[2]食総研、[3]農生資研、[4]北大院・農、[5]帯畜大・生資科）
○佐野卓磨[1]、西本完[2]、保田浩[3]、木村淳夫[4]、大和田琢二[5]、増田宏志[5]

A-07）ニンジン表皮細胞の胚化過程におけるクロマチン関連遺伝子の動態
（[1]帯畜大・畜産科学、[2]北大院・地環科）○山本のぞみ[1]、森有希子[1,2]、菊池康次[1]、得字圭彦[1]

＜座長：阿部敬悦＞

A-08）環境保全型農業のための古代農業技術の化学的復元ー木炭埋設が栽培作物の収量および品質に与える影響
（[1]帯広畜大・生資科，[2]ズコーシャ総合科学研）○明石憲宗、中野益男

A-09）水田土壌から分離したプロピオン酸生産菌の同定
（弘前大学　農学生命科学部）○松岡拓磨　殿内暁夫　武田潔

A-10）Mg^{2+}によるホウレンソウ芽生え根面にバイオフィルムを形成する*Sphingomonas yanoikuyae* の生育促進効果
（北大院・農）Henny Hoo, ○橋床泰之、Md. Tfazzal Islam、田原哲士

A-11）*Brochothrix* 属細菌の冷蔵肉における抗リステリア活性とそのバクテリオシン産生能の遺伝解析
（東北大院・農・応生科）米山裕、宮地良昭、安藤太助、勝亦瞭一

A-12）植物病原菌 *Erwinia carotovora* Er のバクテリオシン遺伝子の構造解析
（東北大院・農・応生科）○新美喜子、廣田衛彦、金子淳、Nguyen H. Anh、神尾好是

＜座長：米山　裕＞

A-13）*Bacillus* 属由来PHA synthaseの比較
（北大院・工・分子化学）○佐藤康治、田島健次、源法雅、棟方正信

A-14）*Streptococcus mutans* 由来dextran glucosidaseの大腸菌での生産と組換え酵素の性質
（北大院・農・応生科）左分利亘、森英、木村淳夫

A-15) 連鎖球菌の酸素感受性変異株より分離された酸素耐性復帰株の耐性復帰機構について
（東北大院・農・応生科）○荒神直子、山本裕司、神尾好是

A-16) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 株における H^+-ATPase の酸性誘導機構
（北大院・農・[1]微生物資源生態学、[2]応用菌学、＊現北農研センター）
○藤井理恵[1]、曽根輝雄[2]、斉藤勝一＊、冨田房男[2]、横田　篤[1]

A-17) *Pseudomonas dacunhae* アスパラギン酸：アラニン交換輸送体遺伝子（*aspT*)のクローニングと発現
（東北大院・農・応生科）○八木恭子、阿部敬悦、山形洋平、中島佑

＜座長：冨田敏夫＞

A-18) 糸状菌によるポテトグリコアルカロイドの分解
（農研機構・北海道農研）○斉藤勝一、高田明子、森元幸、小田有二

A-19) 小麦ふすま中に含まれる糸状菌のタンパク質分解酵素誘導物質の探索と同定
（東北大院・農・応生科）○山形洋平、嶋影逸、阿部敬悦、中島佑

A-20) シイタケのメラニン生成とラッカーゼ
（岩手生物工学研究センター）○永井勝、河田真樹、小川真智子、佐藤利次

A-21) *Stereum purpureum* 由来エンドポリガラクシロナーゼ Ⅳの一次構造および Ⅰ との比較
（弘前大・農生命・生体情報）○坂雅典、清水哲哉、宮入一夫、奥野智旦

◆ B会場

＜座長：宮澤陽夫＞

B-01) 地上設置型雪室を使用した食品素材低温貯蔵の有効性
（弘前大農学生命[1]、山形県中山間地農業研究部[2]、JA美咽[3]）
○中村信吾[1]、五十嵐愛美[1]、藤田直也[1]、長田恭一[1]、阿部清[2]、西川賢[3]、森良明[3]

B-02) ホヤのもつ食品学的機能の探索
（岩手県立大学・盛岡短期大学部・生活科学科）○川崎雅志

B-03) Acid Hydrolysis of Peptides and Proteins in Mirocapillary tubes for the Reovery of Tryptophan
（東北大院・生命科学）Abayomi P.Adehibi, Dong-Hao Jin, Tomohisa Ogawa, Koji Muramoto

B-04) カゼインの高次構造はカゼインホスホペプチドの生成に影響を与える
（岩手大院農・応用生物）○菅原和郎、佐藤鈴子、小野伴忠

＜座長：村本光二＞

B-05) 水田転換畑で生育した大豆のフィチン酸含量
（岩手大院・農、[1]東北農業研究センター）○石黒貴寛、塚本知玄、島田信二[1]、小野伴忠

B-06) ウシラクトフェリンに対する *Trypanosoma bruei rhodesience* の結合タンパク質の検出
（北大院農・酪農科学、[1]帯畜大・原虫研）
○阿部雪絵、田仲哲也、井上昇[1]、玄学南[1]、長澤秀行[1]、五十嵐郁男[1]、玖村朗人、島崎敬一

B-07) ブルーチーズ中に見出されたデキストラナーゼの分離・精製とその性質
（北大院・農・酪農科学）○王裕量、仲田哲也、玖村朗人、島崎敬一

B-08) 牛乳由来のオステオポンチンの性質
（北大院・農）○玖村朗人、三浦敦史、佐藤恵理子、田仲哲也、島崎敬一

＜座長：小野伴忠＞

B-09）乳ホエーたん白質の脂質代謝調節および抗酸化機能
（弘前大農学生命）渋谷丞、川上裕生、柴田千博、鶴ヶ崎和華子、○長田恭一、中村信吾

B-10）性別ならびに年齢の異なるラットの生体内抗酸化機能に与える大豆イソフラボン類の摂取効果
（弘前大・農学生命・応生工）○川上裕生、清澤朋子、長田恭一、中村信吾

B-11）CCl_4 投与による酸化ストレス負荷に対するりんごポリフェノールの摂取効果
（[1]弘前大・農学生命，[2]ニッカウェスキー弘前工場）
○柴田千博[1]、青木健太郎[1]、船山誠[1]、長田恭一[1]、中村信吾[1]、神田智正[2]

B-12）食品ポリフェノールのアミンオキシダーゼ様活性に関する研究
（東北大院・農・応生科）○重光智子、赤川貢、須山亨三

＜座長：長田恭一＞

B-13）肝臓の糖代謝調節に関わる因子への酸化ストレスの影響
（岩手大・農・生命）○近江沙織、伊藤芳明、長澤孝志、西澤直行

B-14）モロッコ産アルガン油脂の化学的特徴
（帯広畜大・生資科）○中野益男、堺直子、福島道広

B-15）赤ワイン製造のアルコール発酵過程における脂肪酸成分の変動
（帯畜大・生資科、[1]池田町ブドウ・ブドウ酒研）
○柚木恵太、Renagul Musa、安井美裕[1]、中林司[1]、木下幹朗、大西正男

B-16）スフィンゴ脂質の食品機能性について
（帯広畜大・生資科[1]、日本製粉・中研[2]、国立健康・栄養研[3]、農研機構・北農研[4]、東北大院・農[5]）
○木下幹朗[1]、間和彦[1,2]、小野治三郎[2]、菅原達也[3]、小田有二[4]、櫛泰典[1]、宮澤陽夫[5]、大西正男[1]

＜座長：西澤直行＞

B-17）高血糖で生じる糖化ホスファチジルエタノールアミンの分布と新規生理活性
（東北大院・農・応生科）○玉正浩、山田美紗、仲川清隆、宮澤陽夫

B-18）共役トリエン脂肪酸による癌抑制機構
（[1]東北大院・農・応生科、[2]椙山女学園大・人間栄養、[3]国立がんセンター、[4]備前化成）
○都築毅[1]、得山佳子[1]、田中寿美[1]、神戸朋子[1]、宮澤陽夫[1]、五十嵐美樹[2]、武籐泰敏[2]、津田洋幸[3]、羽田尚彦[4]、井上良計[4]

B-19）C型肝炎における脂肪質過酸化と肝発癌：トランスジェニックマウスを用いた解析
（[1]東北大院・農・応生科、[2]東大院・医・内科学）○仲川清隆[1]、森屋恭爾[2]、小池和彦[2]、宮澤陽夫[1]

B-20）LIMドメインを有するマウス Limid1 遺伝子の構造と発現の解析
（[1]東北大院・農・応生科、[2]現ロッテ・中央研、[3]坂大・微研）
○日出間志寿[1]、松田崇[2]、野島博[3]　西宗義武[3]　西森克彦[1]

◆ C会場

＜座長：豊増知伸＞

C-01）サキシトキシン、テトロドトキシンとPSTBPとの結合に関する研究
（[1]東北大院・農・応生科、[2]日本食品分析センター）○山田俊一[1]、山下まり[1]、宮澤陽夫[1]、安元健[2]

C-02）網膜色素上皮細胞中の異常代謝物質に対する科学的研究
（[1]弘前大農生科、[2]コロンビア大学眼科、[3]コロンビア大学化学科）
青木宏太[1]、橋本勝[1]、Janet R. Sparrow[2]、中西香爾[3]、奥野智旦[1]

C-03）ナラ類集団枯損に関与するナラ萎凋病菌の生産する植物毒素について
（[1]山形大農・生物資源、[2]森林総研東北）○杉山長洋[1]、窪野高徳[2]、佐々武史[1]

C-04）ギンリョウソウ（*Monotropastrum Globosum*）の成分に関する研究
（山形大・農）○坂部文孝、小野寺健一、村山哲也、風間広、小林優子、池田道正

＜座長：山下まり＞

C-05）ハスカップ及びその加工品の抗酸化活性
（[1]道東海大・生物工、[2]株式会社ホリ）○小栗牧人[1]、西村弘行[1]、堀均[2]

C-06）ヤーコンの抗酸化活性および加工による変動について
（道東海大・生物工）○畠山尚人、木村卓郎、西村弘行

C-07）ネギ属含硫化合物のヒトLDL酸化抑制効果（第３報）
（[1]北東海大院、[2]東北大院・農）○舘下光太郎[1]、西村弘行[1]、樋口央紀[2]

C-08）海浜植物ハマエンドウ由来のラジカル捕食活性物質の構造
（[1]北大院地球環境・[2]道東海大生物工）○西田純[1]、鈴木稔[1]、西村弘行[2]

＜座長：橋本　勝＞

C-09）フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(12)　－プロトカテキュ酸メチルの２位付加体の構造－
（北大院農・応生化、[1]現藤女大・人間科）○齋藤静夏、川端潤、葛西隆則[1]

C-10）フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(13)
－2,3,4-トリヒドロキシ安息香酸のメタノール中での酸化反応－
（北大院農・応生化、[1]現藤女大・人間科）○児玉明香、川端潤、葛西隆則[1]

C-11）3',4'-C-ジエチニルヌクレオシドの合成研究
（東北大院・生命科学）○中村歩、大類洋

C-12）リパーゼを用いた天然型lavandulol の調製
（東北大院・農・応生科）○滝川真弥、清田洋正、桑原重文

＜座長：清田洋正＞

C-13）Phloroglucinol 配糖体の合成研究
（北大院・農・応生科）○福士幸治、田原哲士

C-14）Kojibiose phosphorylase による Glucosylraffinose の合成とNMR 解析
（酪農大院・食品科学[1]、北大院・農[2]、林原生化研[3]）
高橋夏子[1]、○岡田秀紀[1]、福士江里[2]、小野寺秀一[1]、西本友之[3]、川端　潤[2]、塩見徳夫[1]

C-15）環内に硫黄原子を有するチオマルトトリオース誘導体の合成
（[1]弘前大農生科、[2]岩連大）○森井康晴[1]、松田寛子[2]、大原啓一郎[1]、橋本勝[1,2]、宮入一夫[1,2]、奥野智旦[1,2]

C-16）オリゴチオ糖の合成における保護基の検討
（[1]弘前大農生科、[2]岩連大）○松田寛子[2]、森井康晴[1]、橋本勝[1,2]、奥野智旦[1,2]

特別講演

特別講演１　(日本農芸化学会功績賞受賞記念講演)

生理活性物質の探索とその利用

北海道大学大学院農学研究科　応用菌学　教授　　冨　田　房　男

新規な抗生物質のような化合物或いは新規な酵素の探索源としての微生物の特徴は、その多様性の大きさにある。加えて現在我々が純粋分離し、培養できるものはその数％であるといわれており、まだまだ未開拓の分野であるといえる。一方、例えば抗生物質などは多くの研究者によって数千の化合物が見つけられていて、新規な物質を見つけるのには様々の工夫が必要である。その一つにターゲット指向(target-oriented)スクリーニングと新規微生物を主な探索源とすることの組み合わせが考えられる。ターゲット指向スクリーニングとは、特定の生物反応をターゲットとした特異的識別アッセイ系を構築し、目的とする物質の発見率を向上させることである。これと新規微生物を主な探索源として組み合わせたもので、これまでに数多くの新規骨格物質や新規酵素を発見してきた。

DFA III
DGGE

ターゲット指向(target-oriented)スクリーニング

a) 抗腫瘍性物質の探索

抗腫瘍性物質の多くが核酸及びその生合成系に作用するものが多く知られていたので、枯草菌の核酸合成系の変異株と野生株とに対する抗菌力の差を指標にすることで簡便な予備探索法を開発し、様々の新規抗腫瘍性物質を多数見出すことが出来た。いずれも新規骨格をもつもので合成化学による修飾によって選択毒性の低下を試みた結果、数種のものは現在、臨床試験を行っている。

b) プロテインカイネース-Cをターゲットとする探索

プロテインカイネース-Cは、癌化に関与する重要なシグナルの発信源であることが知られているので、これをターゲットとするアッセイ系の開発と新規微生物を主な探索源とすることを組み合わせることで、プロテインカイネース-Cの阻害剤であるスタウロスポリンを再発見した。スタウロスポリンは、既知物質であったがこのような作用のあることは初めての発見であり，この分野の研究を大きく推進させた。その結果、我が国からの学術発表の中で引用率が極めて高いものとしての評価を受けている。また、よりプロテインカイネース-Cに特異的な阻害剤(UCN-01)も発見され、抗ガン物質として注目をあつめている。

c) リポ多糖、キチン生合成をターゲットとする阻害剤の探索

リポ多糖は、様々の薬剤の透過を阻害してグラム陰性菌の生残力を増すように働いている。そこでリポ多糖の特徴的な成分である 2-keto-3-deoxyoctonic acid (KDO)合成阻害物質のスクリーニング系を構築し、新規物質 CV-1 を発見した。CV-1 は、グラム陽性にのみに作用する副作用の少ないマクロライド系抗生物質をグラム陰性菌にも作用させる抗菌活性促進作用を示した。また、キチンは、真菌類に特徴的な化合物である。これらに特異的に作用する物質を探索するためにキチン生産低下変異株と野生株との活性の差を利用する系を構築し、効率よくキチン合成の特異的阻害剤を発見した。

2） 未利用多糖を原料とするオリゴ糖生産酵素の探索

北海道の地域性を考慮した研究として、イヌリンからのオリゴ糖の微生物による生産と利用についての研究も行った。最近のスクロース消費の現象を考え、テンサイに代わる作物としてチコリーを考えた。チコリーの蓄積多糖はイヌリンであり、これを原料として安価なオリゴ糖の生産が可能な酵素を探索し、difructose anhydride III（DFAIII）のみを生産する酵素を発見した。また、スクロースから合成したレバンから difructose anhydride IV（DFAIV）のみを生産する酵素を発見し，その大量生産に成功した。

これらは、現在地域結集型研究「食と健康」に発展し、このプロジェクトの中で DFAIII 及び DFAIV の新たな微生物による安価な大量生産方法を開発するとともにその有用性を検討した。その結果、日本人において不足がちなミネラルであるカルシウムの吸収を腸管内のタイトジャンクションを通して著しく促進することがはじめて見出された。これらはいわゆる難消化性オリゴ糖で、スクロースの約半分の甘味をもつ新たなる機能性食材を提供するものであり、近く製品化も見込まれている。

特別講演２

近未来の動物バイオテクノロジー

佐藤英明　（東北大学大学院農学研究科）

クローン羊が広く話題になっている。乳腺上皮細胞を除核卵子と融合し、体細胞クローンを誕生させ、さらに体細胞クローンにより遺伝子を改変した羊を生み出したことは、動物バイオテクノロジーの進展の中でも最もインパクトのある出来事である。羊につづいて、牛、豚、山羊などでも体細胞クローンが誕生したが、このようなクローン家畜は、人工授精、誘起排卵、胚移植、体外受精と同じく優れた家畜の増産という畜産学的な動機にもとづいて産み出されたものである。そして、このような到達点を踏まえ、新たな動物バイオテクノロジーが構想されている。演者らの研究を含め現在の開発動向を紹介したい。

１）受精可能卵子の大量生産

精液の凍結保存と人工授精により優良雄の配偶子の利用がなされ、家畜の改良が進展してきた。一方、誘起排卵、体外受精、胚移植の進展により優良雌の卵子の高度利用が現実の課題となっている。家畜では、卵巣で生み出され、潜在的に利用可能な卵子は１０～２０万個であるが、１００～２００個ほどしか排卵に至らない。すなわち家畜の卵巣には「少数の卵子を選抜して排卵させ、大多数のものを死滅へと誘導する機構」が存在する。このようなメカニズムの解明が同一個体からの大量の卵子生産を可能にする。卵子の生産はゴナドトロピンなどのホルモンによって制御されているが、演者らはホルモンの通り道である卵巣血管網を増やすことによってホルモン作用を効果的にする方法を考案し、誘起排卵技術を改変しようとしている。一方、核移植によるクローン作出においても卵子が必要である。しかし、卵子にはミトコンドリアＤＮＡがあることから、遺伝的に安定したクローンを作出するには同一個体からの卵子を使うことが望ましい。受精可能卵子の大量生産はクローンをよりクローンにすることにおいても重要である。

２）雌雄の産み分けと遺伝子診断

性染色体の特異的ＤＮＡの同定が可能となり、それを基盤に信頼性ある雌雄の産み分け技術が誕生しているが、このような研究はさらに大きな目標に向かって進もうとしている。すなわち、胚の段階での優良個体の選抜である。疾病や乳肉の生産性に係わる遺伝子が明らかにされつつある。胚の細胞の遺伝子を解析し、例えば病気にかかり難いものや乳肉の生産性の高いものを選抜し、その後、胚移植により子どもをつくることが可能である。このような胚の遺伝子診断は優良な親から確実に優良な子孫をつくる技術として間もなく家畜生産に

取り入れられるようになるだろう。ヒトでは胚の遺伝子診断は許されない。また、許されたとしても伴性遺伝にともなう疾病の診断などきわめて限られたものになるだろう。このようなことから、胚の遺伝子診断は、家畜でのみ許され、そして家畜生産に大きな影響をもつ技術となるだろう。

3）遺伝子改変ブタの作出と医療への応用

家畜の領域で開発された体外受精、顕微授精などの技術はヒトの不妊治療を支えているが、体細胞クローンと遺伝子改変技術がドッキングすることにより、移植医療にも大きな影響を与えることになるだろう。ブタを対象として研究が進められているが、異種抗原をもたないブタの作出が現実のものとなろうとしている。このようなブタが開発されれば、ヒト型臓器生産ブタの供給のみならず、ヒトのＥＳ細胞とブタ胚の混合によるヒト臓器をもつブタの作出に道を拓くこととなるだろう。

4）生殖細胞系列の「連続培養」技術

雌雄の性をもつ動物では受精により次の世代が誕生する。すなわち、精子と卵子の合体により胚をつくり、さらに始原生殖細胞をつくる。始原生殖細胞は生殖原基（あとで精巣や卵巣になる）へ移動し、減数分裂に入り、精子、卵子をつくる。精子と卵子は受精し、次世代をつくる。このような流れを生殖細胞系列というが、このような流れは現在のところ、体の中でしか維持することができない。しかし、体外受精、初期胚や始原生殖細胞の培養法は確立され、精子や卵子の体外形成も部分的には成功しており、生殖細胞系列を体外で維持する条件は整いつつある。このような技術が開発されれば、家畜の後代検定（子孫の能力を調べること）にも使えるし、数世代後の子どもへの薬剤や環境因子などの影響を調べたりすることもできる。このようなことから「生殖細胞系列の完全連続培養」技術の開発は重要なものとなるだろう。

5）ゲノムサイエンスの中の動物バイオテクノロジー

相同組換えにより、ある遺伝子を置換（破壊）した細胞を除核未受精卵に移植し、発生させ、そのような胚を器官形成のほぼ完了する時期まで体外で培養する（全胚培養）ことができれば、遺伝子の器官形成における役割を直接観察できる。また、演者らは *in vivo* ミクロイメージングシステム（Magnetic resonance imaging，ＭＲＩ）によりマウス胎仔の観察に成功しているが、この方法をさらに発展させることにより、培養胚（胎仔）の内部構造を、非破壊的にかつ連続的に観察することが可能である。高等動物の遺伝子の全構造を解明しようとするゲノムサイエンスが動き出しているが、研究の焦点は、マウスなどの動物を用いた遺伝子の機能解析へと進むようになっている。このような遺伝子の器官形成に及ぼす影響の解析に、遺伝子相同組換え、除核未受精卵への核移植、体外発生、全胚培養、ＭＲＩの組み合わせは強力な方法となる。

受賞講演

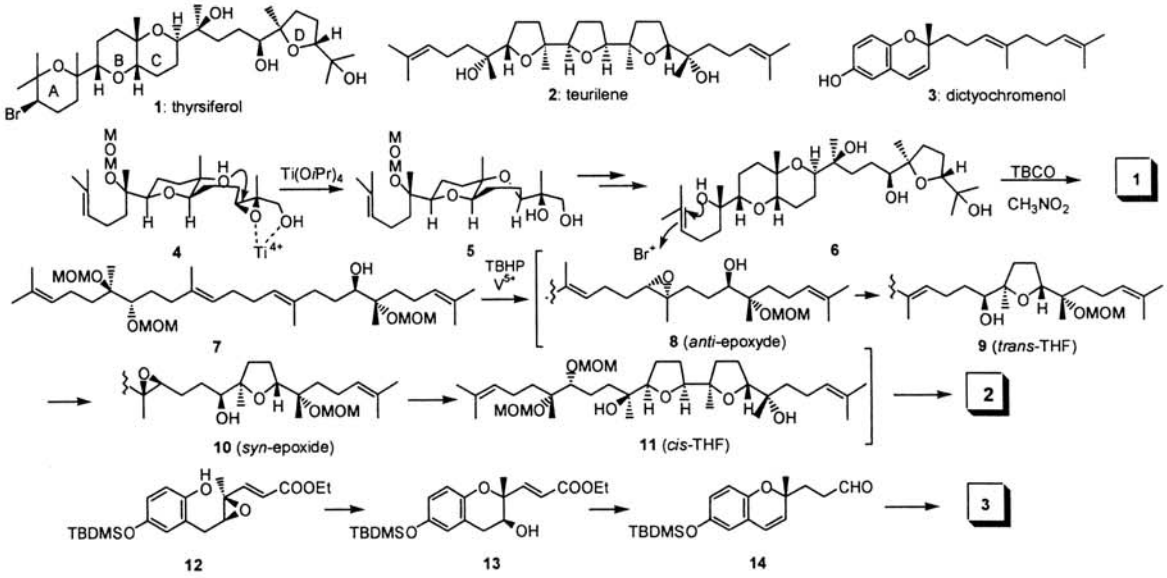
日本農芸化学会東北支部奨励賞受賞講演

エポキシドおよびアジリジンを応用した天然物の合成研究

橋　本　勝　（弘前大学農学生命科学部）

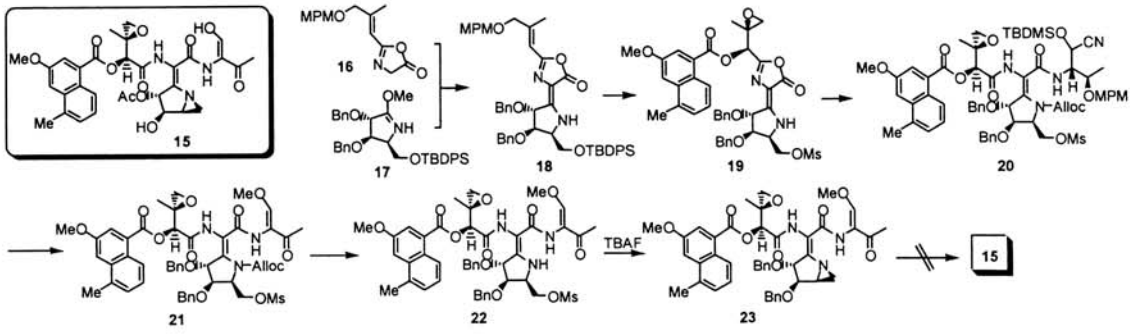
1．海産性ポリエーテル合成研究

紅藻から単離された強い細胞毒性を示すチルシフェロール(**1**)およびテウリレン(**2**)の最初の全合成をエポキシド→エーテル環の形成を基本戦略に行った。**1** の構造的特長であるひずんだボート型を持つ BC 環の構築には 2,3-エポキシアルコール **4** の $Ti(O^iPr)_4$ を用いた反応が有効であることを明らかにした。A 環の構築は **6** の 6-エンド形によるブロモエーテル化反応により達成した。また、**1** の合成研究でビスアリルアルコールの Sharpless 型酸化反応の選択性が置換様式により変化することを見出した。これを利用して **2** の生合成類似経路による全合成を達成した。さらに、褐藻シワヤハズから単離されたウニに対して強い節食阻害を示す **3** をエポキシフェノール **12** の環化を鍵段階として合成し、不明であったその絶対配置を明らかにした。



2．カルチノフィリンの合成研究

強い細胞毒性を示すカルチノフィリン **15** は 1954 年に単離されて以来、数回の構造の訂正が繰り返されてきた。**15** を全合成し、構造を確定するとともに関連化合物から新たな制癌化合物を開発する目的で本研究を行った。分子中央部の特徴的なデヒドロペプチド部分の構築には下に示したルートを開発した。アジリジン環の構築は TBAF を塩基に用いた場合他の官能基を損なうことなく達成できることが判明した。**23** から **15** への変換は行うことができなかったがカルチノフィリンは **15** の構造を有することを明らかにすることができた。またいくつかの強い細胞毒性化合物を見出すことに成功した。



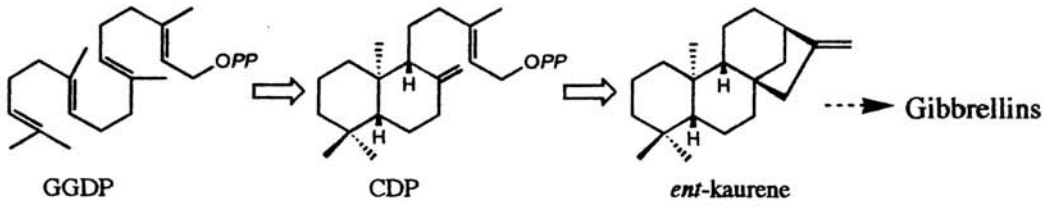
ご指導をいただきました、北大名誉教授松本毅教授、北大名誉教授白濱晴久教授、相模中央化学研究所寺島孜郎所長、コロンビア大学化学科中西香爾教授、弘前大学奥野智旦教授、弘前大学宮入一夫教授に深く感謝いたします。

日本農芸化学会東北支部奨励賞受賞講演

イネ馬鹿苗病菌の *ent*-カウレン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析

山形大学農学部　豊増知伸

植物ホルモンの一つジベレリンは、四環性のジテルペンであり、はじめは糸状菌のイネ馬鹿苗病菌（*Gibberella fujikuroi*）が生産するイネ徒長物質として単離されたことはよく知られている。そのような経緯から、このイネ馬鹿苗病菌を材料として、ジベレリンの生合成研究は古くから活発に行われてきた。その中でも生合成中間体炭化水素の *ent*-カウレンを合成する酵素に関する生化学的研究は数多く行われていたが、酵素（遺伝子）の単離には至っていなかった。我々の研究グループにより、別のジベレリン生産糸状菌 *Phaeosphaeria* sp. L487 から *ent*-カウレン合成酵素遺伝子（*PfCPS/KS*）がクローニングされ、糸状菌由来ジテルペン環化酵素遺伝子の単離としては世界で初めての成功例となった。そこで、その情報を利用して、イネ馬鹿苗病菌からも縮重プライマーを用いた RT-PCR と RACE 法により 952 個のアミノ酸をコードする *ent*-カウレン合成酵素遺伝子（*GfCPS/KS*）のクローニングに成功した。次に、この遺伝子を大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて機能解析を行った。*Ent*-カウレンは、ゲラニルゲラニル二リン酸（GGDP）からコパリル二リン酸（CDP）を経て生合成され、植物ではこの２段階は別々の２種の酵素により触媒されることがわかっていたが、本研究の結果、GfCPS/KS は PfCPS/KS と同様にその２段階の反応を１つのペプチドで触媒することが明らかになった。



GGDP　　CDP　　*ent*-kaurene

以上、本研究によって長年試みられてきたイネ馬鹿苗病菌の *ent*-カウレン合成酵素遺伝子の単離がようやく成功したことになる。

この研究を引き金として、現在、我々の研究グループはアフィジコリン等の糸状菌ジテルペン生合成酵素（環化酵素、酸化酵素など）遺伝子を遺伝子クラスターとして単離することや、イネのフィトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子のクローニングを行っている。さらに、この *GfCPS/KS* 遺伝子を植物の *ent*-カウレン生合成が欠損した突然変異体へ組み込む実験も行っており、それらの途中経過についてもあわせて講演する予定である。

本研究を行うにあたり大変お世話になりました佐々武史先生、三橋渉先生（山形大学農学部）、川出洋先生（東京農工大学農学部）、山形大学農学部の学生諸氏に心より感謝致します。また、この研究を発展させるにあたりご協力下さった神谷勇治博士（理化学研究所植物科学研究センター）、及川英秋先生（北海道大学農学部）をはじめとする多くの共同研究者の方々にも御礼申し上げます。最後に、本奨励賞に推薦いただきました五十嵐喜治先生（山形大学農学部）ならびに諸先生方に厚く御礼申し上げます。

一般講演

A-01

インゲンマメ Starch synthase II の構造と発現特性

○瀬野浦武志、磯野直人、櫻井靖高、吉川基世、伊藤浩之、
松井博和
（北大院農・応生科）

【目的】Strach synthase (SS) は，デンプンを構成するグルコースポリマーの伸長反応を触媒する重要な酵素であり，植物には複数の酵素特性の異なる SS が存在することが知られている。したがって，これらのアイソザイムの機能や発現特性を知ることは，デンプン合成機構を解明する上で必須である。我々はこれまでにインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) に存在する 3 種の SS アイソザイム (PvGBSSI、PvSSI および PvSSIIb) の構造および組換え酵素の性質を解析してきた。本研究では、登熟種子から新規 SSII アイソザイム (PvSSIIa) をコードする cDNA (pvss2a) を単離し，構造を決定した。また，2 種の SSII アイソザイム (PvSSIIa および PvSSIIb) の局在性および発現特性の比較を行った。

【方法・結果】RT-PCR 法によりインゲンマメ登熟種子から pvss2a cDNA を単離し一次構造を決定した。RNA ゲルブロット解析を行った結果，pvss2a mRNA は登熟中期から後期の種子に顕著に蓄積し、葉にも存在することが明らかとなった。一方、pvss2b mRNA は葉において発現しているものの，種子での蓄積は非常に微量なものであった。また PvSSIIa の大腸菌発現系を構築し組換え酵素を得た。それぞれの組換え酵素を抗原としてポリクローナル抗体を作成し，イムノブロット解析を行った。その結果，PvSSIIa は可溶性画分およびデンプン粒画分に存在することが明らかとなった。また，PvSSIIb はデンプン粒画分にのみシグナルが検出された。以上のように，2 種の SSII アイソザイムの局在性および発現特性は異なっており，それぞれのアイソザイムはデンプン合成において異なる役割を果たすことが示唆された。

A-02

Purification and characterization of two α-amylase isoforms from azuki bean *Vigna angularis* Willd.

Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University

○San San Mar, Haruhide Mori, Atsuo Kimura, and Seiya Chiba

During germination of plant seed, α-amylase is *de novo* synthesized and involved in starch degradation together with other glucan hydrolysing enzymes. While multiple isozymes of α-amylase are present in cereals, dicotyledonous plants have a few isozymes or just one enzyme [1]. We investigated α-amylase from azuki bean, in which two isoforms showing different affinity toward β-cyclodextrin were found.

Seven cultivars of azuki bean were germinated at 30 °C in darkness, and the highest activity was obtained in cotyledons of Hokuto Dinagon after 8 days imbibition. α-Amylase was extracted and purified by precipitation with ammonium sulfate between the concentration of 40 and 70 % saturation, followed by β-cyclodextrin Sepharose 6B column chromatography. In the step, two α-amylase isoforms, 1 and 2, were separately fractionated before and after starting elution by β-cyclodextrin, respectively, indicating that isoform 1 has lower affinity toward β-cyclodextrin. From the cotyledons of 300 g, 7.4 and 10 mg of isoforms 1 and 2 were purified through these two steps.

The purified enzymes were proven to be homogeneous in native PAGE as well as SDS-PAGE. The molecular weights were estimated to be 47 and 44 kDa for isoforms 1 and 2 (SDS-PAGE). The both showed pI 5.2 by IEF. The isoforms 1 and 2 had optimal pH of 5.3 and 5.2, stability at pH 4.6–10.4 and pH 3.9–11.9, respectively. The both isoforms showed the highest activity at 70 °C, and stability up to 70 °C. There was no significant difference in kinetic parameters for amylose (average degree of polymerization 17): k_{cat} of 55.5 s^{-1}, K_m of 0.096 mg mL^{-1} (isoform 2). Fifteen residues analyzed from N-termini of the isoforms were identical to each other and those of bean α-amylases reported previously [2–4]. MALDI-TOF mass spectra of tryptic peptides were almost the same, but a few signals were distinct from each other.

The results described above imply that the isoforms are the same gene product undergoing some different modification, which causes the different affinity toward β-cyclodextrin.

[1] Wegrzyn, T., *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1313–1322 (2000). [2] Koizuka, N., *et al.*, *Plant Physiol.*, **94,** 1488–1491 (1990). [3] Yamauchi, D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **18,** 4250 (1990). [4] Mori, H., *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, **45,** 261–267 (1998).

A-03

成熟中のピーマン果実に存在するβ-ガラクトシダーゼに関する研究

（東北大院・農・応生科）○小笠原　諭、阿部敬悦、中島　佑

【目的】

植物は、根の伸長、葉の展開、開花、果実の肥大や成熟など実に目まぐるしく変化している。植物組織中には細胞壁多糖をはじめ多くの糖類が存在し、成長における変化とともにその構成糖も変化している。糖質加水分解酵素であるグリコシダーゼには、糖鎖のプロセッシングや配糖体のグリコシドを切断しアグリコン部分の香気成分の遊離、病原菌などの侵入を防御するなどの働きを持つものが知られている。植物組織の中でも特に糖含量の多い果実には、まだ機能の未知なグリコシダーゼが存在する可能性が高い。

今回、ピーマン（*Capsicum annuum*）を研究材料に用いた。ピーマン果実は成熟するにつれて緑色から赤色に変化し、それに伴って果実の軟化や香気成分、甘味が変化する。これらの変化の一因としてグリコシダーゼの作用が考えられる。予備実験として、果実成熟におけるグリコシダーゼ活性の変化を経時的に調べたところ、β-ガラクトシダーゼ活性だけが果実の成熟に伴い上昇することが明らかになった。β-ガラクトシダーゼの作用により成熟中の果実に何らかの変化を与えていると考えられる。そこで、β-ガラクトシダーゼの精製とクローニングを行い諸性質を調べることにより、ピーマンの成熟におけるβ-ガラクトシダーゼの機能を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

緑色と成熟して赤色になったピーマン果実それぞれから粗酵素液を抽出し、イオン交換、疎水、ゲルろ過の各種カラムクロマトグラフィーよりβ-ガラクトシダーゼの精製を行った。緑色からは4種類、赤色からは3種類のβ-ガラクトシダーゼ活性を有する画分を得た。このうち最もβ-ガラクトシダーゼ活性の高かった赤色のピーマンのβ-ガラクトシダーゼ活性画分RB1のN末端アミノ酸配列を決定した。

ピーマン果実からβ-ガラクトシダーゼのPCRクローニングを試みた。ピーマンと相同性の高いトマト（*Lycopeersicon essculentum*）果実由来の7つのβ-ガラクトシダーゼファミリーの配列からPCRプライマーを設計した。ピーマン果実由来cDNAライブラリーに対してPCRを行ったところ、トマト果実のβ-ガラクトシダーゼファミリーの1つであるTBG4と相同性の高い増幅断片が得られた。この断片をPBG1と命名し、現在、このPBG1をプローブとしてcDNAライブラリーから完全長のβ-ガラクトシダーゼのスクリーニングを試みている。

精製で得られたβ-ガラクトシダーゼRB1のN末端アミノ酸配列、PCRにより得られたPBG1のアミノ酸配列ともにトマト果実のβ-ガラクトシダーゼTBG4と相同性が高いことから、PBG1はβ-ガラクトシダーゼRB1をコードしていることが示唆された。

PBG1遺伝子の発現時期、発現部位を調べるためピーマンの各部位からtotal RNAを調製し、PBG1をプローブとしてノーザンブロットによる転写解析を行った。その結果、PBG1は果実の成熟に特異的に発現していることが明らかとなった。

次に、果実内のβ-ガラクトシダーゼの基質となる物質の探索を試みた。まず、緑色と成熟して赤色になったピーマン果実をそれぞれ破砕して水溶性画分と残渣にわけた。さらに残渣から細胞壁多糖を抽出する操作を行った。現在、それぞれの画分について酸加水分解を行い、TSK Gel Amide-80カラムを用いてHPLCによる構成糖の比較・解析を行っている。

A-04

サイネリア花弁のマロニル基転移酵素遺伝子の発現とキャラクタリゼーション

（東北大院・工・生工）
○澤田真哉・鈴木宏和・中山亨・西野徳三

【緒言】サイネリア花弁の青色を担うアントシアニン（cinerarin, 図１）は４つの糖と４つのアシル基を含む複雑な構造をしており，その生合成経路についての知見はほとんど得られていない．本研究では，近年サイネリア花弁からクローニングされた機能未知の遺伝子 (*ScAT48*) が，アントシアニン-アシル基転移酵素（AAT）に特徴的な３つの保存配列をもつタンパク質をコードしていることに注目し，その異種発現産物を用いてその遺伝子の機能を推定した．

【実験】公開されている *ScAT48* 塩基配列をもとに *ScAT48* に特異的なプライマーを設計し，常法に従い，1386 bp からなる完全長の *ScAT48* cDNA を得た．得られた cDNA をもとに大腸菌における ScAT48 発現系を構築した．本発現系の発現産物を各種クロマトグラフィーを用いてほぼ均一に精製し，得られた酵素標品を用いて ScAT48 組み換え体の諸性質を調べた．

【結果】HPLC および機器分析の結果から，ScAT48 組み換え体は anthocyanidin 3-*O*-glucoside と malonyl-CoA を基質にした場合，効率よく anthocyanidin 3-*O*-6"-*O*-malonylglucoside を生成していることが確認された（図２）．その際の速度論パラメータ，pH 依存性，及び各化学物質の阻害効果を表に示す．これらについては既に特定されている他の AAT のものとよく一致していたのに対し，その基質特異性は他の AAT とは大きく異なり anthocyanidin 3-*O*-glucoside および malonyl-CoA に限定されていた．以上のことから *ScAT48* は malonyl-CoA: anthocyanidin 3-*O*-glucoside-6"-*O*-malonyltransferase をコードするものと推定した．本酵素の反応産物は cinerarin の一部に等しいことから，本酵素は cinerarin の生合成に関わる酵素の一つであると考えられる．

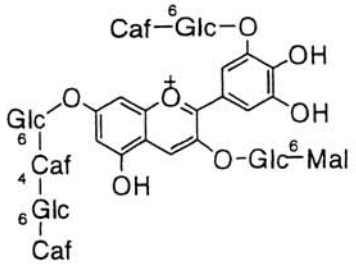


図１ Cinerarin の構造

Mal : malonyl
Glc : β-D-glucocyl

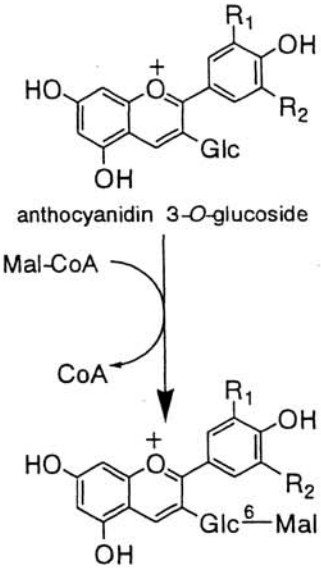


図２ ScAT48 が触媒する反応

R_1, R_2 : H or OH

表 ScAT48 の諸性質

反応至適 pH	7.5
k_{cat}	8.8±0.5 s^{-1}
K_m (Mal-CoA)	60.5±4.8 μM
K_m (Pg3G)	11.3±2.0 μM
0.1 mM Cu^{2+} 1)	0%
0.1 mM Hg^{2+} 1)	0%

1) 金属イオン存在下での相対活性

A-05

植物の低温ショックドメインタンパク質

農研機構・北海道農研センター　○今井亮三，Dale Karlson

低温は多様の生物種においてその生育及び生存を制限する．低温致死の選択圧により，低温適応の分子機構は生物の多様な存在形態の中においても保存性の高い進化を遂げていると考えられる．しかしながら，これまでの研究では，熱ショック応答のような原核生物から高等動植物まで広い範囲に渡って保存される適応応答は知られていない．細菌の低温応答は詳細に研究が進められており，低温ショックタンパク質と呼ばれる一群のタンパク質の蓄積等が明らかにされている．大腸菌では主要低温ショックタンパク質 CspA は低温ショックを受けた細胞中で可溶性タンパク質の 10%にも達する．CspA は２つの RNA 結合モチーフ (RNP1, RNP2)を介して１本鎖 RNA 及び１本鎖 DNA に結合するが，２本鎖 DNA には結合しない．CspA は低温下で mRNA 上に形成される２次構造の形成を抑制し，低温下での翻訳の効率化及び転写終結抑制に働くと考えられている．一方，高等植物の低温適応としては，一定期間の低温遭遇により高度の低温耐性が獲得される低温馴化の現象が古くから知られている．特にコムギなどの越冬作物においては低温馴化により越冬に必要な形態変化と生理変化が誘導されると考えられている．

我々はコムギの低温馴化の分子機構の解明を目指した研究の過程で，コムギ cDNA ライブラリーのマクロアレイを使った発現解析から，新規な低温応答性遺伝子 *WCSP1* を単離した[1]．WCSP1 タンパク質はN末端側に大腸菌 CspA と 43%相同な cold shock domain (CSD)を持ち，C 末端側には Gly-rich (GR)ドメイン中に及３個の Cys-X_2-Cys-X_4-His-X_4-Cys (CCHC)ジンクフィンガー(ZF)ドメインを持っていた．*WCSP1* の発現は１４日間の低温馴化過程でクラウン組織，幼苗期の茎葉及び根組織に蓄積するが，乾燥，高塩ストレス及び ABA 処理においては発現誘導されなった．GST::WCSP1 融合タンパク質を精製し，ゲルシフト解析により核酸結合特性を調べたところ，GST::WCSP1 は１本鎖と２本鎖 DNA の両者に結合した．３個 の ZF を欠失させた変異体(TGA132)を用いると，２本鎖 DNA への結合能のみが消失したことから，ZF 配列が WCSP1 の２本鎖 DNA への結合に不可欠であることが分かった．次に，リボホモポリマー・アガロースビーズを用いて RNA 結合能を検討したところ，polyG, polyU に対して強い結合能を持つことが分かった．このように WCSP1 は大腸菌 CspA と構造，発現，機能において共通点をもつことから，生体内でも類似の機能を持つと考えられた．WCSP1 の配列を用いてタンパク質データベースを検索したところ，WCSP1 相同遺伝子として，Gly-rich タンパク質として単離された *Nicotiana sylvestris* NsGRP2, Arabidopsis AtGRP2, AtGRP2b がヒットした．Arabidopsis ゲノム配列中には更に２つのホモログ (At2g17870, At4g36024)があり，４つの遺伝子からなる小ファミリーを形成していることが明らかとなった．EST データベースを利用したホモロジー検索では，WCSP1 と同様の CSD, GR, ZF ドメインを持つタンパク質が植物由来の 34 個の EST で見いだされ，本タンパク質は植物界において広範に分布していることが分かった．また，単子葉植物の EST には CSD のみから成り，細菌 Csp とほぼ同様の構造を持つもの(Type II)が存在することも明らかとなった．これは，真核生物で最初の例であることからも注目すべきである．植物の CSD タンパク質の低温適応における機能解明は細菌と高等植物との間で保存される低温適応機構の解明につながると考えられる．

1) Karlson, D. , Nakaminami, K., Toyomasu, T., Imai, R. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35248-56.

A-06

ニンジン体細胞胚形成の初期段階に特異的に発現するallergen様タンパク質の遺伝子の解析

○佐野　卓磨[1]、西本　完[2]、保田　浩[3]、木村　淳夫[4]、大和田　琢二[5]、増田　宏志[5]（[1]岩手大院・連農、[2]食総研、[3]農生資研、[4]北大院・農、[5]帯畜大・生資科）

目的

我々はニンジンの体細胞から直接胚を形成する体細胞胚形成系を開発し、この系を用いて体細胞胚発生の最も初期段階に発現する遺伝子やタンパク質を検索することで胚形成のメカニズムの解明を試みている。今回の研究では、体細胞胚形成の初期段階に特異的に発現し、それ以降の段階には存在しないタンパク質を見出し、それらのタンパク質をコードする遺伝子の解析を行った。

結果

体細胞胚形成の初期段階、すなわち体細胞が分裂して細胞塊が形成される時期から球状胚の段階にかけて特異的に発現し、それ以降の心臓型胚、魚雷型胚および再生植物体には存在しない2つのタンパク質（P-19.5、P-18.6）を見出し、Western blottingで確認した。また、Western blottingでこれら2種のタンパク質以外に体細胞胚形成の全ての過程に発現するタンパク質（P-16）をも見出した。これら3種のタンパク質をコードする遺伝子の解析を行うために、タンパク質をそれぞれプロテアーゼで消化し、得られた数個のペプチド断片のアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列をもとに作成したプライマーを用いてcDNAから目的遺伝子を増幅・クローニングし、全塩基配列を決定した結果、3種の類似した遺伝子を単離した。そのうち、P-19.5タンパク質のプロテアーゼ消化で得られたペプチド断片が入っている*P-19.5*遺伝子では154個のアミノ酸からなる翻訳領域が認められた。相同性検索の結果、セロリやニンジンのmajor allergenなど、シラカンバの花粉allergen Bet v 1に代表されるPR-10（pathogenesis-related protein-10）ファミリーのタンパク質と高い相同性を示した。また、この遺伝子はNorthern blottingの結果、細胞塊や球状胚の段階で発現し、以後の胚や再生植物体ではほとんど発現しなかった。次に、体細胞胚形成の全過程に発現するP-16タンパク質のペプチド断片が入っている*P-16*遺伝子は、既に知られているニンジンの根に多く発現しているmajor allergenと同一の遺伝子であった。残りの遺伝子はP-18.6タンパク質をコードしているかどうかは現在不明である。

A-07

ニンジン表皮細胞の胚化過程におけるクロマチン関連遺伝子の動態

[1]帯畜大・畜産科学、[2]北大院・地環科
○山本のぞみ[1]、森有希子[1,2]、菊池康次[1]、得字圭彦[1]

植物細胞は一旦さまざまな組織や器官に分化した後でも個体を再生する能力(分化全能性)を持っており、ニンジン体細胞からの胚形成はその最も端的な例である。胚軸外植片をオーキシン（2,4-D）で24時間処理することによって容易に表皮細胞の胚化を誘導できる。近年、ニンジンおよびシロイヌナズナを用いた分子生物学的研究より、この過程に関わる遺伝子がいくつか単離され、体細胞が胚形成を行なう細胞へ変化する分子機構を説明する糸口が見つかってきた。しかし、それら体細胞胚形成に関わる複数の遺伝子群の発現全体を調節するさらに高次の制御機構については、ほとんどわかっていない。そこで、本研究では高次の遺伝子発現調節機構の候補としてクロマチン修飾に焦点を当て、クロマチン関連遺伝子をニンジンから単離し、体細胞の胚化における役割について明らかにする事を目的とした。

これまでに、クロマチンリモデリング因子SWI2/SNF2ファミリー（ATP依存的DNAヘリカーゼ）をコードする*SWICA1*遺伝子を単離し、2,4-Dによる胚化誘導処理12時間後に発現しはじめ、その後の脱分化的な細胞分裂時に増加し、胚の形態形成が始まると発現が低下することを報告した(13年度秋期北海道支部会)。今回は*SWICA1*mRNAの組織局在についてin situハイブリダイゼーションを行って調べた。その結果、胚形成が起こるような表皮細胞由来の細胞集団と細胞分裂がおこる内皮および内鞘に局在が見られ、これらの領域での脱分化的な細胞分裂への関与が考えられた。また、類似の遺伝子*SWICA2*を今回新たに単離し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った結果、*SWICA1*と同様の発現パターンを示した。このことから両遺伝子が同様な時期に同じような役割を協調的に果たしているのではないかと考えられる。また、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）およびDNAメチルトランスフェラーゼ（MET）の遺伝子を単離し、体細胞が胚化する過程での発現パターンを解析した。HATは2,4-Dによる胚化誘導処理12時間目から24時間目に一過的発現増加が見られた。METは胚化誘導処理後、培養24時間目から発現し、表皮細胞の活発な細胞分裂が起こる培養5日目まで発現するが、7日目以降は発現が減少した。以上の事から、体細胞の胚化に伴うヒストンのアセチル化および脱分化後の胚発生初期におけるDNAのメチル化といったクロマチン修飾が一連の過程に関与する可能性が予想された。

A-08

環境保全型農業のための古代農業技術の化学的復元－木炭埋設が栽培作物の収量および品質に与える影響

（[1]帯広畜大・生資科、[2]ズコーシャ総合科学研）
○明石憲宗[1,2]、中野益男[1]

1．目的

福井県勝山市三宝遺跡は、縄文中期・晩期（約 4000～3000 年前）のものである。この遺跡から東西南北に規則正しく 120cm×90cm の石組みの炉跡が発見された。また、その炉跡の上にある水田は、収量の高い美田として伝えられてきた。これは、炉跡の炭が農地の生産力に影響を及ぼしているためと考えられている。そこで、本研究では、古代の農業技術と近代技術の併用による環境保全型農業の確立を目的とし、木炭を埋設した試験圃場において、作物の収量や品質等の調査を実施し、木炭埋設が作物生育に及ぼす影響について検討した。

2．方法

試験圃場は、北海道内各地に 12 圃場設定し、6 年間、のべ 64 作物について調査を行った。試験圃場には、圃場を 20m メッシュに区切った交点に、直径 100cm、深さ 85cm の円柱状に木炭を埋設した。また、同一圃場内に木炭を埋設しない箇所を設け、対照区とした。調査項目は、作物の収量・一般成分分析、土壌の理化学性・微生物活性等である。

3．結果

作物の収量は、作付作物や気象などの要因によりばらつきが認められるものの、木炭埋設からの経過年数によって特徴的な傾向となった。すなわち、木炭埋設 1 年目には、収量は、対照区と比較して増加の傾向が認められなかったが、2～6 年目は平均 10%程度の増加傾向となった。また、デンプン原料用バレイショのデンプン含量の増加やテンサイ根中糖分の増加などの品質向上も認められた。一方、収穫物の成分分析では、木炭埋設区において、Zn、Cu、Mn などのミネラル微量要素含量の増加傾向が認められた。これらのことから、木炭の埋設は、農地の生産力増大や収穫物の品質向上に効果があると考えられた。また、これらの作物効果は、木炭埋設区における土壌物理性の改善や微生物活性の向上に起因するものと考えられる。

GTTTGATCCCT

A-09

水田土壌から分離したプロピオン酸生産菌の同定

○松岡拓磨　殿内暁夫　武田潔
弘前大学　農学生命科学部

［目的］水田土壌中の有機物は多種多様な微生物群によって分解される。分解過程の初期には酢酸やプロピオン酸、酪酸などの揮発性脂肪酸を生成する酸生成細菌が関与している。プロピオン酸生産菌は酸生成細菌であり、水田土壌中に多い菌数で存在しているという報告があるが詳しい研究はされていない。本研究では水田土壌のプロピオン酸生産菌を計数し分離を行い、菌学的特徴を明らかにした。

［方法］土壌は弘前大学農学生命科学部附属金木農場の標準区湛水水田土壌を使用した。VL 培地を用いたロールチューブ法によりプロピオン酸生産菌の計数と分離を行った。計数はロールチューブに形成されたコロニーを VL 液体培地に釣菌し、プロピオン酸を生産した菌株の数を計ることで行った。分離菌株の細胞形態観察には光学顕微鏡を用い、発酵生産物はガスクロマトグラフ（FID）で同定した。基質利用性、生化学的試験は常法に従った。分離菌株の 16S rRNA 遺伝子の増幅には真正細菌に特異的なプライマーを用いた。増幅された 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し既知の菌株の塩基配列と比較した。

［結果と考察］金木水田土壌のプロピオン酸生産菌数は 2.48×10^{6}cfu/g 乾土であり、KP-718 菌株と KP-6119 菌株の 2 菌株を分離した。両菌株は代謝産物として多量のプロピオン酸と酢酸を生成した。分離菌株の細胞は不定形桿状で大きさは 0.5-1.0×2-5μm であり、運動性はなく胞子は形成しなかった。両菌株共に偏性嫌気性でグラム陽性、カタラーゼ陽性、硝酸塩還元陽性であったが、インドール生成、ミルクの凝固、ゼラチンの消化は KP-6119 菌株のみが陽性であるという違いが見られた。ミルクの消化は両菌株共に陰性であった。両菌株はグルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、ラクトース、乳酸を資化したが、デンプン、ペクチンといった高分子物質やカザミノ酸は資化しなかった。アラビノース、マルトース、セロビオース、スクロースは KP-6119 菌株のみが資化した。これらの菌学的特徴から KP-718 菌株と KP-6119 菌株は *Propionibacterium* 属に分類される細菌であると推察された。16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析による同定を行うため真正細菌に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、約 500bp の塩基配列を解析し両菌株を比較した。KP-718 菌株と KP-6119 菌株の塩基配列の相同性は 98.3%であった。また KP-718 菌株は *Propionibacterium acnes* に対して 100.0%、KP-6119 菌株は 98.5%の相同性を示した。しかし、KP-718 菌株は好気的に生育しない、ゼラチンを消化しない、ラクトースを資化するという点で *Propionibacterium acnes* と異なった。また、KP-6119 菌株は *Propionibacterium acnes* が資化しないマルトース、ラクトース、セロビオース、スクロースと五炭糖のアラビノースを資化したことから *Propionibacterium* 属の異なる菌種であると考えられる。

A-10

Mg^{2+}によるホウレンソウ芽生え根面にバイオフィルムを形成する*Sphingomonas yanoikuyae*の生育促進効果

（北大院農）Henny Hoo、○橋床泰之、Md. Tfazzal Islam、田原哲士

研究背景）表面殺菌処理した種子から無菌的に育成したホウレンソウ芽生えの表面を走査電顕で観察すると、根や子葉表面に桿菌が着生しているのがしばしば観察される。これを分離し、16S rDNAの塩基配列から*Sphingomonas yanoikuyae*と同定するとともに、本分離菌株の性質と挙動を調べてきた。本分離株は、ブイヨン培地では他の腐生性細菌に比較して緩やかに生育し低密度のまま定常期に達するのに対し、ジャガイモ煮汁培地ではほとんど生育しなかった。これに対し、ホウレンソウ葉の煮汁（1 kg flesh leaves/2.5 L water) をそのまま培地に用いると、菌体の増殖期が1週間以上に渡って続き、また菌体は激しく凝集した。ホウレンソウ葉1 g相当の脱脂煮汁凍結乾燥品（20 mg）を100 mlのポテト-デキストロース培地に加えたところ、本分離菌株の生育が劇的に向上した。我々はこれらの観察事実から、ホウレンソウ葉には着生細菌である*S. yanoikuyae*の生育を促進する因子が存在するものと仮定し、その活性本体の同定ならびにその活性評価を試みた。

方法・結果及び考察）活性は、常にホウレンソウ葉1 g相当量を基準として検定した。ホウレンソウ葉の煮汁（1 kg flesh leaves/2.5 L water）を濾過後、析出する不溶物を遠心操作により除去し、上清を1／2容量のEtOAcにより脱脂した。活性は有機層には移行せず、全て水層に留まった（SLE)。次に水層をXAD-2カラムに通し、疎水基部分のあるものとないものに分画した。活性は水100％で溶出した部分に集中し、その収率はおよそ90%だった(SLE-A)。さらに、この水層をOH^-型DEAE-celluloseカラムに通したところ、通過液に活性が集中した（SLE-A-B+N、収率約50%）。これに対し、SLE-AあるいはSLE-A-B+NをH^+型CM-celluloseカラムにかけると、これらの通過液には全く活性がみられなかった。それぞれの収率は、SLE-Aのおよそ90%および40%であった。この時点で、活性本体が有機化合物か無機化合物かを調べることにした。18 mgのSLE-Aを耐熱ガラス製小試験管に入れ、バーナーで灰化し、これを全量、100 mlのポテト-デキストロース培地に加えたところ、活性は全量保持された。この結果から、活性本体は金属カチオンであると推定した。植物の水耕液として汎用されるHoagland No2液は、植物の組織に含まれる元素をほぼ全て含んでいる。そこで、Hoagland No2液をベースにしたポテト-デキストロース培地を用いて*S. yanoikuyae*の生育促進効果をみた。予想どおり、この水耕液ベースの培地に活性が認められたため、それぞれオリジナル濃度の組成塩類を単独でポテト-デキストロース培地に加え、それらの活性を比較したところ、唯一、$MgSO_4.7H_2O$を加えた培地でのみ、*S. yanoikuyae*の生育促進が認められた。逆に、Hoagland No2液から$MgSO_4.7H_2O$のみを除いたものをベースとした培地では、生育は全く認められなかった。Mg^{2+}の硫酸アニオン以外のアニオンとの組み合わせでも（$Mg(Cl)_2$＆$Mg(NO_3)_2$)、活性は同様に認められた。Mg^{2+}濃度と、その*S. yanoikuyae*の生育促進効果の相関を調べたところ、本細菌は培地中、0.12 mMで20mg SLE-A/100 mL培地とほぼ同等の生育効果を示し、0.06 mMでも明らかな生育促進効果を示した。ホウレンソウ葉水抽出液の凍結乾燥品（SLE）中のMg^{2+}量を原子吸光で測定すると、100 mg当たり1.0 mgのMg^{2+}が含まれており、SLEが示す最小活性濃度200mg／L時のMg^{2+}量は0.08 mMと算定された。従って、Mg^{2+}がホウレンソウ葉の*S. yanoikuyae*に対する生育促進因子と結論した。現在、Mg^{2+}が根面フロラではたす生態学的意義、およびバイオフィルム形成に重要な役割を果たすquorum sensingとMg^{2+}の関係を検討している。

A-11

Brochothrix 属細菌の冷蔵肉における抗リステリア活性とそのバクテリオシン産生能の遺伝解析

米山裕、宮地良昭、安藤太助、勝亦瞭一（東北大院・農）

【目的】近年、乳酸菌のバクテリオシンまたはその産生菌を抗菌スターターに用いる食品保蔵法が注目されている。食肉についても、特に汚染度と感染時の致命率が高いリステリア菌(*Listeria monocytogenes*)を標的とした検討が行われているが、増殖を完全に阻止した事例はない。演者らは先に冷蔵肉からほぼ普遍的に分離される非病原性・非腐敗性のグラム陽性低温増殖性細菌 *Brochothrix thermosphacta* 中に抗リステリア活性を示すバクテリオシン産生株 No.5 を見出した。そこで、さらに冷蔵肉中での No.5 株によるリステリア殺菌作用を調べるとともに、バクテリオシン産生形質について初歩的な遺伝解析を行うことにした。

【方法】*Brochothrix thermosphacta* No.5 (No.5 株)のバクテリオシン産生能は、*Listeria monocytogenes* IID580 (*Listeria*)を被検菌とした寒天重層法によって調べた。生肉中での No.5 株の *Listeria* に対する増殖抑制作用は、バッグに肉を入れさらに両菌株を接種し密封して 4℃に放置し、7 日毎に生菌数を測定することによって判定した。バクテリオシン非産生株の誘導は、No.5 株をアクリフラビン(5 μg/ml)処理後、寒天重層法にて *Listeria* に増殖阻止活性を失った株を選択することによって行った。

【結果と考察】低温(4℃)において抗 *Listeria* 活性を有する No.5 株の *Listeria* に対する増殖阻止活性を調べた結果、7 日後に生肉に接種した *Listeria* は完全に消失していた。次に No.5 株のバクテリオシン産生遺伝子の所在を明らかにするために、No.5 株をアクリフラビン処理することによってバクテリオシン非産生株を分離した。そして、No.5 株およびバクテリオシン非産生株よりプラスミドを分離しアガロースゲル電気泳動で解析をしたところ、No.5 株は大プラスミド(>10 kbp)と小プラスミド(約 4 kbp)を有しており、バクテリオシン非産生株は小プラスミドのみを有していた。また、この非産生株は本バクテリオシンに対し感受性になっていたことから、産生能とともに免疫能を支配する遺伝子（群）はこの大プラスミドにコードされていることが明らかとなった。

A-12

植物病原菌 *Erwinia carotovora* Er のバクテリオシン遺伝子の構造解析

○新美喜子、廣田衛彦、金子淳、Nguyen H. Anh. 神尾好是
（東北大院・農・応生科）

【目的】*Erwinia carotovora* はニンジンやハクサイなど多くの作物に感染して植物細胞壁のペクチン質を分解し、野菜軟腐病を引き起こす植物病原菌である。当研究室では、病原因子であるペクチン酸リアーゼ及びペクチンリアーゼの研究を行ってきた。このうちペクチンリアーゼはDNA合成阻害剤であるマイトマイシンC などの添加や紫外線照射により誘導されるが、当研究室ではペクチンリアーゼの誘導と同時にファージ尾部状の構造を有するバクテリオシンである carotovoricin Er (Ctv Er) が誘発されることを見い出した。

近年、*Erwinia* 属のバクテリオシンの抗菌活性を微生物農薬としての応用が試みられ、すでに一部実用化されている。Ctv Er は類縁の菌のみに殺菌活性を有することから微生物農薬としての利用が期待される。作用機構の探究、並びにより有効な微生物農薬としての実用化のためにはさらなる分子レベルでの研究が重要である。そのため Ctv Er の各構成タンパク質である収縮性の鞘 （sheath protein）、芯（core protein）、基板（baseplate)、そして繊維（tail fiber)の単離、精製を行う一方、全構造遺伝子の塩基配列の決定、並びに遺伝子構造の解析を行った。

【方法・結果】最初に決定された sheath protein の N-末端アミノ酸配列からプローブを設計し、*E. carotovora* Er のゲノム DNA のシャロミドライブラリーのスクリーニングを行った。得られたクローンの塩基配列を決定し、それを基点としたウォーキングにより Ctv Er の全構造遺伝子配列を含む 21 kbp の領域の遺伝子配列を決定した。精製した Ctv Er の各構成タンパク質の N-末端アミノ酸配列から、ORF5、ORF6、ORF10、ORF11、ORF14、ORF16 はそれぞれ 50 kDa (sheath)、20 kDa (core)、35 kDa、46 kDa、44 kDa (baseplate)、68 kDa (tail fiber)と同定した。推定アミノ酸配列の相同性検索の結果、Ctv Er の構成タンパク質群は *Salmonella* のゲノム上のプロファージの尾部領域の ORF 群と高い相同性を示し、また、P2 並びに類縁のファージの尾部を構成する成分とも相同性を示した。

Ctv Er の構造遺伝子領域の転写レベルの解析をノーザンブロット法、RT-PCR 法、プライマー伸長法により行った結果、転写単位が少なくとも４つに分断されていることがわかった。Ctv Er の転写単位の配置は *Salmonella* のプロファージと同様であったが、P2 ファージの尾部領域遺伝子群とは逆になっていた。

A-13

Bacillus 属由来 PHA synthase の比較

(北大院・工・分子化学)
○佐藤康治、田島健次、源法雅、棟方正信

【目　的】

Polyhydroxyalkanoate (PHA) は生分解性および熱可塑性を有することから生分解性材料としての応用が期待されている。PHA の合成は微生物の体内において行われ、モノマーである hydroxyalkanoyl coenzyme A が PHA synthase によって重合されてグラニュールとして蓄積される。

これまでに我々はガス田採掘土壌より培養温度 45°C においても PHA 合成能を有する *Bacillus* sp. INT005 株を単離し、さらに、その PHA 生合成遺伝子群をクローニングした。その解析の結果、本菌株の PHA synthase は $PhaR_{Bsp}$ (19 kDa)と $PhaC_{Bsp}$ (42 kDa)が結合して PHA synthase 活性を発揮することを明らかにした。

Basillus 属に属する PHA 合成細菌の遺伝子クローニングは、他に *Bacillus megaterium* について報告されているだけであるが、*Bacillus* sp. INT005 株とは異なる結果が報告されている。そこで、差異の確認および両菌株の PHA synthase の比較を行うことを本研究の目的とした。

【方法および結果】

これまでに我々は $PhaR_{Bsp}$ または His-tag $PhaC_{Bsp}$ を発現している *Esherichia coli* の粗抽出を混合した際に PHA synthase 活性が発現されることを報告した。しかしながら、*B. megaterium* においては活性の発現は確認されないと報告されている。そこで以前に行った方法と同様に $PhaR_{Bm}$ または His-tag $PhaC_{Bm}$ を発現している *E. coli* の粗抽出を調製し、それらを混合して活性試験を行った。その結果、*B. megaterium* においても活性の発現が確認された。

Bacillus sp. INT005 および *B. megaterium* において同様の結果が得られたことより、$PhaR_{Bsp}$ と $PhaC_{Bm}$、$PhaR_{Bm}$ と $PhaC_{Bsp}$ を組合せた場合でも活性を発現できるか検討した。その結果、それらの組合せでも活性を示すことが確認された。

A-14

Streptococcus mutans 由来 dextran glucosidase の大腸菌での生産と組換え酵素の性質

○佐分利 亘、森 春英、木村 淳夫（北大院農・応生科）

［目的］ Dextran glucosidase (DGase) はデキストランの非還元末端からグルコースを遊離するエキソ型酵素である。*S. mutans* の生産する本酵素の遺伝子はすでにクローニングされ一次構造が明らかにされている[1)]。その結果α-amylase ファミリーに属し、特に *Bacillus* 属由来の oligo-1,6-glucosidase (O16Gase) と 45%前後の高い相同性を持つ。本酵素はイソマルトースのようなイソマルトオリゴ糖からデキストランのような高分子基質まで作用できるのに対し、*Bacillus* 属の有する O16Gase は高分子基質には作用せず短鎖のイソマルトオリゴ糖を加水分解する。本研究ではこの基質特異性の違いを酵素の構造から明らかにすることを最終目的とし、まず *S. mutans* 由来 DGase を大腸菌で生産し、その性質を詳細に解析したので報告する。

［方法と結果］ DGase 遺伝子を *S. mutans* ATCC25175 よりコロニーPCR によって増幅した。これを pBluescript II SK にサブクローニングし塩基配列を確認した。その結果、1611 塩基中 10 塩基が既報のものと異なっており、536 残基中 3 残基のアミノ酸配列が異なっていた。

発現プラスミドとして pET23d を用い、大腸菌 BL21 (DE3) CodonPlus RIL で DGase 遺伝子を His-Tag 融合タンパク質として発現させた。1 mM IPTG による誘導後 10 時間で培養液 1 L あたり 3,780 U の発現量を得た。培養液 600 mL から菌体を回収し、その無細胞抽出液から組換え酵素をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。電気泳動的に単一な比活性 173 U/mg の精製標品を 5.22 mg 得た。

次に組換え酵素の諸性質を調べた。分子量は 62,000 (SDS-PAGE)、至適 pH は 5.5 であり、pH 安定性、温度安定性はそれぞれ 6.0－9.0、40 °C 以下であった。基質特異性についてはα-glucoside 結合を持つ種々のオリゴ糖に対する本酵素の反応速度を比較した。基質濃度はオリゴ糖ではそれぞれ 1 mM、高分子基質では 1 %に設定した。イソマルトオリゴ糖およびパノース (α-1,6-isomaltosyl-glucose) に対して高い加水分解力を示したが、マルトオリゴ糖、トレハロース、コージビオースおよびニゲロースにはほとんど水解力を示さなかった。デキストラン T2000 をイソマルトースの 16%の反応速度で加水分解した。イソマルトオリゴ糖、およびパノースについてはそれぞれ反応動力学的パラメータを明らかにした。k_{cat}/K_m はパノースに対して最も高く、続いて IG3、IG4、IG5、IG2、IG6、IG7 の順であった（IG はイソマルトオリゴ糖を示す、数字は基質の重合度）。

DGase は *Bacillus* 属由来の O16Gase と異なり、高分子基質に対しても作用できる酵素である。現在までに本酵素の基質特異性は詳細に解析されていなかったが、今回 DGase がα-1,6 結合に特異的に作用することが明らかになった。

1） Russell, R. R. B. *et. al.*, *J. Gen. Microbiol.*, 136, 803-810, (1990)

A-15

連鎖球菌の酸素感受性変異株より分離された酸素耐性復帰株の耐性復帰機構について

○荒神 直子、山本 裕司、神尾 好是
(東北大院農・応生科)

先に我々は、連鎖球菌の一種である *Streptococcus mutans* の酸素耐性を担う因子として鉄結合蛋白である Dpr を見いだした。Dpr は鉄イオンが触媒する Fenton 反応 ($Fe^{2+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}+\cdot OH$) を妨げることで、*S. mutans* に酸素耐性を付与していると考えられる [1, 2]。*S. mutans* の *dpr* 欠損株は好気的条件下でコロニーを形成できないが、10^{-4} 程度の頻度で酸素耐性を復帰しコロニーを形成するものが現れる。この酸素耐性復帰株 (*dad* : Suppressors for defect of aerobic colony formation of *dpr* mutant) は、何らかの二次的な遺伝子変異により酸素耐性を復帰したと推定される。我々はこの酸素耐性復帰株の耐性復帰機構の解明を目的として、これまでに、*dpr* 欠損株より過酸化水素耐性の強い耐性復帰株 (*dad*1) と耐性の弱い耐性復帰株 (*dad*5) の 2 株を分離すると共に、その性状について報告している。今回、*dad*5 において、RNA polymerase の点変異により酸素耐性が復帰した可能性が示唆されたので、これを報告する。

RNA polymerase の変異は、バクテリアの形質を変化させる要因のひとつとして報告されている [3, 4]。これは RNA polymerase の構造変化が promotor 認識の特異性を変え、遺伝子の発現制御に影響を与えるためと考えられている。そこで、*dad*1、*dad*5 の酸素耐性復帰の原因として RNA polymerase の変異の可能性を検討した。RNA polymerase の変異は、polymerase に作用する抗生物質である rifampicin 耐性の変化をしばしば伴う。*dad*1、*dad*5 について嫌気条件下での rifampicin に対する MIC を調べたところ、野生株、*dpr* 欠損株及び *dad*1 は 0.025 μg/ml の MIC を示したが、*dad*5 では 0.050 μg/ml に上昇していた。この結果は *dad*5 の RNA polymerase に変異が生じていることを示唆する。一般に rifampicin 耐性株では RNA polymerase のβサブユニットをコードする *rpoB* に高頻度で変異が見られることから、*dad*5 の *rpoB* 遺伝子の塩基配列を決定し、親株である *dpr* 欠損株と比較した。その結果、*dad*5 において *rpoB* の ORF の 3374 番目の塩基 T が C に変わることにより、1125 残基目のフェニルアラニンがセリンに変わっていることが判明した。

現在、*rpoB* の変異が *dad*5 の酸素耐性復帰の原因であることを証明するため、点変異の配列を親株である *dpr* 欠損株のゲノム上に相同組み換えで導入し、得られた株の好気的条件下でのコロニー形成能、過酸化物及びスーパーオキシド発生体に対する耐性について調べている。また、*dad*5 における *rpoB* の変異が実際に菌体の総タンパク質の発現に影響を与えているか検討するため、二次元電気泳動によって解析を行っている。

参考文献

1).Yamamoto,Y.,M.Higuchi,LB.Pool,and Y.Kamio. J.Bacteriol.182.3740(2000)
2).Yamamoto,Y.,LB.Pool,RR.Hantgan,and Y.Kamio. J.Bacteriol.184.2931(2002)
3).Sonenshein,A.L.,and R,Losick. Nature,227,906(1970)
4).Deguchi,Y.,and T.Morishita. Biosci.Biotech.Biochem.,56,913(1992)

A-16

Lactococcus lactis subsp. *lactis* C2 株における H^+-ATPase の酸性誘導機構

○藤井理恵[1]、曽根輝雄[2]、斎藤勝一*、冨田房男[2]、横田　篤[1]
(北大院農・[1]微生物資源生態学、[2]応用菌学、*現北農研センター)

【目的】本研究室では有用な新機能を持つスターター乳酸菌の開発、及び乳酸菌における H^+-ATPase の機能解析を目的として、乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 株を用いて研究を行っている。これまでの研究により、H^+-ATPase 欠損株は pH 4.0 の酸性条件下では死滅すること[1]、*L. lactis* の H^+-ATPase は ATP 合成ではなく ATP を分解して細胞内プロトンを排出する方向に働き、細胞内 pH の維持に機能していること[2]などを明らかにした。また C2 の H^+-ATPase 活性は、中性条件(pH 7.0)に比べ酸性下(pH 4.5)において増大し、これは mRNA 量、タンパク量の増大を伴うものであることが示された[2]。このように H^+-ATPase は酸性条件下で *L. lactis* が生存するために必須の酵素であることが示されている。しかし酸性条件下での H^+-ATPase 活性の増大が、H^+-ATPase 遺伝子のプロモーター活性の上昇によるものなのか、mRNA の安定性向上によるものなのか、といった分子レベルでの誘導機構については明らかにされていない。そこで本研究では、β-galactosidase のレポーターアッセイにより、*L. lactis* の酸性条件における H^+-ATPase 遺伝子のプロモーター活性を調べることで、酸性誘導機構の解明を目指した。

【方法と結果】レポーターアッセイには H^+-ATPase(*atp*)オペロン上流遺伝子を得ることが必要である。そこでまず、プラスミドを用いたライブラリーを構築し、*atp* オペロン上流の遺伝子をクローニングして塩基配列を決定した。得られたクローンは *atp* オペロン上流のエステラーゼ遺伝子までを保持しており、発現調節機構の解析に十分な上流域が得られたと考えられた。続いて目的の遺伝子を、レポーターとしてβ-galactosidase 遺伝子(*lacZ*)を持つベクターpORI13 に挿入し、プロモーターアッセイ用プラスミド pPatp を構築した。

本プラスミドを保持する *L. lactis* MG1363 株由来の LL108 株を M17 培地で液体培養したところ、培地 pH は 4.7 まで低下したがβ-galactosidase 活性の上昇は認められず、酸性条件下で *atp* オペロンのプロモーター活性は上昇しないと考えられた。そこでより正確な評価を行うため、相同組み換えにより C2 株のゲノムに pPatp をシングルコピーで組み込み、目的の組み換え体を得た。現在この組み換え体を用いて、中性および酸性条件下でのプロモーター活性の変化を検討中である。

1) Yokota, A., et al. (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2004-2007
2) Amachi, S., et al. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1574-1580

A-17

Pseudomonas dacunhae アスパラギン酸:アラニン交換輸送体遺伝子
(*aspT*) のクローニングと発現

東北大学大学院農学研究科
○八木恭子、阿部敬悦、山形洋平、中島佑

[背景・目的]

ある種の細菌では、脱炭酸反応に共役してエネルギーを得ることが知られている。本系は一般に、基質と産物の1:1の細胞内外の交換輸送と、細胞内での脱炭酸反応の2反応系で構成されるプロトンポンプである。この反応によりプロトン勾配と膜電位が生じ、細胞膜の FO-F1ATPase と共役して ATP を生成する。

微生物を利用した物質生産 (発酵) には、酵素タンパク質などの1次代謝産物や抗生物質などの2次代謝産物の生産がある。発酵における目的物質生産の収量増大のためには、菌体内のエネルギー低下を改善する必要がある。現在までに知られている ATP 生成系には、基質レベルのリン酸化、光合成における光リン酸化、呼吸鎖における酸化的リン酸化がある。これらのエネルギー生成系とは異なり、この脱炭酸型プロトンポンプ系は、反応を構成する酵素数が少なく他の代謝の影響を殆ど受けずに自己触媒的に高速に反応が進むことから、種々の細胞に人工的に組み込み可能なエネルギー生成系として産業的に期待されている。

我々はそのような系のうち L-アスパラギン酸 (Asp) と L-アラニン (Ala) の変換によるエネルギー生成系を醤油乳酸菌である *Tetragenococcus halophila* D10 中に見出し、Asp-Ala 変換系 (L-アスパラギン酸β脱炭酸酵素 ; AspD、Asp : Ala 交換輸送体 ; AspT) をコードする operon (*aspD/T*) を初めて単離し、機能解析を行っている。

一方、我々の研究も含めて、アラニンの工業生産で知られる *Pseudomonas dacunhae* にも Asp-Ala 変換系が見出されている。アスパラギン酸β脱炭酸酵素 (AspD) はアラニン生産に使われている著名な酵素でありながら、その遺伝子は *T. halophila* と *P. dacunhae*、*Alcaligenes faecalis* のみしか知られていない。また、推定アミノ酸配列の検討から既知のアスパラギン酸α脱炭酸酵素とも全く異なる蛋白質構造であることが明らかとなった。

予備的検討から *T. halophila* の Asp-Ala 変換系よりも *P. dacunhae* の Asp-Ala 変換系の方が変換能が高いことが示唆されている。より変換能に優れる Asp-Ala 変換系は良質なエネルギー生成系として期待されることから、*P. dacunhae* と *T. halophila* の Asp-Ala 変換系の遺伝子ならびにタンパク質の構造・機能の比較解析は興味がもたれる。

[方法・結果]

AspT をコードする遺伝子としては、我々の単離した *T. halophila* の *aspT* のみが知られており、*P. dacunhae* の *aspT* は未だ単離されていない。AspD と AspT は Asp-Ala 変換の連続した反応系を構成する酵素であり、*T. halophila* の *aspD* と *aspT* は隣接して存在し operon を形成していたことから、*P. dacunhae* の *aspT* も *aspD* に隣接して存在する可能性が高いと考えられた。そこで、*P. dacunhae* の *aspT* のクローニングを、既にクローニングされている *P.dacunhae* の *aspD* をプローブとしてゲノムサザンブロッティング、コロニーハイブリダイゼーションにより試みた。その結果、*aspT* は *aspD* の上流に隣接して存在し、明らかとなった塩基配列より推定されるアミノ酸配列は、AspT が疎水性アミノ酸に富む多数の膜貫通領域を含む輸送体構造を有することを示唆した。また、*P.dacunhae* と *T.halophila* の *asp* operon の比較から、両 operon の遺伝子構成は異なっており、*T.halophila* ではプロモーター→ *aspD* → *aspT* の順であるが、*P.dacunhae* ではプロモーター→ *aspT* → *aspD* の順であった。

また、*P.dacunhae* の AspT を発現させた大腸菌の膜画分を調製し、AspT を膜画分より可溶化後、大腸菌の lipid を用いてプロテオリポソームに再構成した。プロテオリポソームを用いた輸送反応の解析より、AspT はアスパラギン酸自己交換能とアスパラギン酸ーアラニン交換能を有することが示された。

A-18

糸状菌によるポテトグリコアルカロイドの分解

(農研機構・北海道農研)
○斎藤勝一、高田明子、森元幸、小田有二

【目的】バレイショ加工工場で大量に発生する皮部などを安全かつ有効に利用することを目的として、芽部に発生したカビからポテトグリコアルカロイドを分解する糸状菌を分離し、その分解酵素の性質について調べた。

【方法】バレイショ芽部を裁断して 10g 秤量、これを 100ml 三角フラスコに入れて滅菌した培地に糸状菌の胞子を接種した。25℃、5 日間 静置培養後、2%酢酸でポテトグルコアルカロイドを抽出し、高速液体クロマトグラフで分析した。酵素活性は、α-チャコニンを含む反応液を30℃、30 分間放置後、沸騰水中で反応停止させ、高速液体クロマトグラフで分析した。

【結果】芽部に発生したカビから平板希釈法により純粋分離し、外観の異なる 3 株(HP339, HP340, HP341)の糸状菌を選抜した。形態学的性質から HP339 を *Cladosporium cladosporioides*、HP340 を *Penicillum* sp.と推定した。HP341 については、さらに DNA 解析により *Plectosphaerella cucumerina* と同定した。分離した 3 株の糸状菌株をそれぞれ裁断した芽に接種すると、増殖とともにα－チャコニン量のみ減少したが、α-ソラニン量はまったく変わらなかった。HP341 のα-チャコニン分解酵素を部分精製し、酵素反応生成物を分析したところ、α－チャコニンからβ_1-チャコニンが生成していた。このような性質から、本酵素をα-チャコニン中のラムノース(C_1-C_4)グルコース結合に特異的なα-ラムノシダーゼの一種と推定した。カビの発生した芽部から分離したその他の糸状菌もα-チャコニンをβ_1-チャコニンに分解しており、β_2-およびγ-チャコニンを生成するものはなかった。バレイショの芽部に増殖する糸状菌は、α-チャコニンをβ_1-チャコニンへと変換することによって毒性を軽減しているものと考えられる。

A-19

小麦ふすま中に含まれる糸状菌のタンパク質分解酵素誘導物質の探索と同定

○山形洋平，嶋影　逸，阿部敬悦，中島　佑
（東北大院・農・応生科）

【目的】

小麦ふすまは，糸状菌の各種酵素を高生産させる固相培地として，高峰譲吉以来，古くから用いられている．しかし，固相培養は液体培養に比べると，酵素生産には向いているというものの，培養条件の管理，制御が難しい．また，培養終了後の処理も液体培養に比べると容易ではない．そこで，液体培養で固相培養と同等の酵素生産が可能になれば，大量の酵素が容易に生産できることとなる．*Penicillium citrinum* は固相培養でサルミンを特異的に分解する penicillolysin を生産する．我々はこれまでに，このサルミン分解活性が小麦ふすまの熱水抽出物を基剤とした液体培養で特異的に生産されることを見いだした．そこで，この小麦ふすま抽出液に含まれるサルミン分解活性を誘導する物質を精製し，その構造を明らかにすることとした．

【方法及び結果】

小麦ふすま熱水抽出液を溶媒としてマルツ培地を作成した．これに *P. citrinum* ATCC9300 を植菌し，培養上清中のサルミン分解活性の経時的変化を観察した．その結果抽出液を用いた培地でのみ高い分解活性を示した．そこでこの活性を指標として小麦ふすま熱水抽出液から，アセトン沈殿，アルカリ抽出，陰イオン交換クロマトグラフィー，ゲル濾過クロマトグラフィーによって誘導物質の精製を行った．その結果誘導物質は，グリコーゲン様の分岐の多い低分子型α－グルカンであることが明らかになった．

A-20

シイタケのメラニン生成とラッカーゼ

○永井　勝、河田　真樹、小川　真智子、佐藤　利次
（岩手生物工学研究センター、微生物利用研究部）

【目的】シイタケ（*Lentinula edodes*）は子実体採取後、保存時においてヒダに褐変現象が生じ、商品価値が著しく減少することが知られている。この褐変はメラニンが生合成されることに起因すると考えられ、我々はこれまでにメラニン生合成に関与すると考えられるチロシナーゼ（Tyr）の活性が子実体保存後期に増加することを認めた。[1] 本研究では Tyr 同様、フェノールオキシダーゼの一種であるラッカーゼ（ Lcc）に着目し、シイタケ子実体のヒダ抽出物から Lcc を精製し、その諸性質を検討した。

【方法および結果】シイタケ子実体を湿度 80%、25℃で5 日間保存するとヒダに著しい褐変が認められた。ヒダ抽出物中の Tyr および Lcc 活性を測定したところ、褐変の程度と比例してどちらの酵素活性も上昇した。そこで、保存 3～5 日目のヒダ 40 g を集め凍結し、400 ml の 10 mM リン酸バッファー（pH 6.0）を用いてワーリングブレンダーで抽出したものを粗抽出液とした。50％飽和による硫安分画、疎水、陰イオン交換、ゲル濾過の各クロマトグラフィーにより収率 23.5%、精製倍率 1,200 倍で 604 μg の Lcc（Lcc 2）精製標品を得た。本酵素は分子量 58 kDa の単量体で糖鎖を有していた。ABTS を基質とした場合の至適 pH は 3.0、至適温度は 40°C であり、 pH 4.0-7.0、50°C まで安定であった。

我々はこれまでにシイタケの培養液中に分泌される Lcc（Lcc 1）の精製を行い、その諸性質を検討している。[2] そこで、両酵素の基質特異性を比較した。ABTS、グアヤコールに対しては酸化活性に大きな差は認められなかったが、ピロガロールに対する K_m 値は Lcc 1 で 0.417 mM、Lcc 2 で 24.6 mM であり、カテコールに対してはそれぞれ 22.4 mM (Lcc1)、1.72 mM (Lcc 2) であった。ドーパメラニン合成の初発物質である DOPA に対しては、Lcc 1 は殆ど酸化活性を示さなかったのに対して、Lcc 2 は活性を有しており、その K_m 値は 1.46 mM であった。この事から、Lcc 2 は Lcc 1 に比べてジフェノール類に対して強い酸化活性を示すものと考えられた。そこで、シイタケヒダ抽出物に両酵素を添加し、30°C で保温したところ、Lcc 2 添加区では抽出物の褐変化が起こった。また、先に精製した Tyr[3] との相乗作用について検討した所、Lcc 2 添加区では Tyr 単独で作用させた場合に比べて反応初期に褐変化が促進された。以上の結果より、Lcc 2 はシイタケ子実体におけるメラニン合成に強く関与しているものと推測された。

[1] Kanda et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** : 479-480 (1996)
[2] Nagai et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in Press (2002)
[3] Kanda et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** : 1273-1278 (1996)

A-21

Stereum purpureum 由来エンドポリガラクツロナーゼ IV の一次構造および I との比較

（弘前大・農生命・生体情報）
○坂雅典、清水哲哉、宮入一夫、奥野智旦

（目的）銀葉病菌(*Stereum purpureum*)の銀葉発現物質として本菌の培養ロ液から単離されたエンドポリガラクツロナーゼは等電点を異にする 4 種類が存在する。このうち主成分である等電点が最も高い endoPG I (pI8.5)については、cDNA のクローニングにより一次構造を、また、ESI-MS 分析から糖鎖結合部位と糖鎖構造、そしてジスルフィド結合部位を明らかにしてきた。その際、成熟 endoPG I タンパク質での C 末端 44 残基の欠失が明らかになり、他起源 endoPG との大きな相違が認められた。本研究では endoPG I と等電点的にもっとも離れており、酵素化学的性質においても安定性等で大きく異なる endoPG IV (pI4.9)について，cDNA クローニングによる一次構造の解明を試み， I と比較検討した。また、endoPG I については， ガラクツロン酸・酵素 複合体の X 線結晶解析[1)]から活性部位の構造が明らかになっていることから、この周辺構造についても一次構造での比較を行った。

（方法と結果）*S. purpureum* の培養ロ液から精製した endoPG IV をトリプシン消化し、分離したペプチドのアミノ酸配列情報を基にプライマーを設計し、degenerate-PCR, RACE を行った。得られた塩基配列から推定一次構造を決定した。その結果 endoPG IV は I よりアミノ酸が 36 残基少ない 343 残基からなっていたが、成熟 endoPG I で見られた C 末端の欠失は見られなかった。 成熟 endoPG I との比較では、これらの間のホモロジーは 70%であった。また、推定一次構造から計算される分子質量は 35,104 Da であり、ESI-MS で求めた native な endoPG IV b の 37,266 Da と糖鎖分を考慮するとほぼ一致した。endoPG I には Asn92, 161、279、302 の 4 箇所アスパラギン結合糖鎖結合部位が存在しているが、endoPG IV は、Asn161 と 279 の 2 箇所であった。endoPG I に比べ Lys、Arg の数が少なく、等電点の差を反映していた。これらの配列にはすべての endoPG に保存されている Asp153, 173, 174 が見られ、さらに endoPG I の活性部位の+1および-1 サブサイトを構成しているすべてのアミノ酸が認められた。この他にジスルフィドを形成するシステインもすべて保存されていた。また、endoPG I は 10 個の Pro を持つが、endoPG IV は Pro126 と 269 の 2 箇所のループ領域に位置する Pro が欠けており、熱安定性に影響しているものと考えられる。

1) Shimizu, T., *et al* : Biochemistry 41, 6651-6659 (2002)

B-01

地上設置型雪室を使用した食品素材低温貯蔵の有効性

弘前大学農学生命科学部[1]、山形県中山間地農業研究部[2]、JA美唄[3]
○中村信吾[1]、五十嵐愛美[1]、藤田直也[1]、長田恭一[1]、阿部清[2]、
西川賢[3]、森良明[3]

【目的】豪雪地域における雪氷の有効資源化、とくに、雪氷の融解に伴って生じる冷熱エネルギー源を利用した食品貯蔵システムの構築はこの5年間で進行しているが、食品素材成分に与える影響や利点は明らかではない。本研究では、形態の異なる雪室で食品素材あるいは加工品を貯蔵し、地上設置型雪室での食品素材貯蔵適性ならびに貯蔵後の試料成分変化の特徴を調べた。

【方法】大型電気冷蔵室と3種類の雪室（地下貯雪型（平賀町：みちのく雪室）、地上貯雪型（新庄市：もがみゆきっこ）、地上大形貯雪型（美唄市：雪蔵工房））に、2種類のりんご（フジ、王林）、ワイン、日本酒（生酒）、バターを貯蔵した。貯蔵したりんごは、硬度、水分、果汁pH、糖度を調べ、さらに、ビタミンC、ポリフェノール濃度およびポリフェノールオキシダーゼ活性変化を追跡した。ワインと日本酒は有機酸濃度、pH、アミノ酸度ならびに着色度を分析した。また、バターは脂質過酸化の進行を比較検討した。

【結果】フジの硬度は、電気冷蔵と比べて、雪蔵工房で貯蔵すると保持されやすく、王林はもがみゆきっこで貯蔵した場合に硬度が保持されやすかった。貯蔵りんごの水分変動に差はなく、フジの糖度は、電気冷蔵よりも雪蔵工房貯蔵で高く、もがみゆきっことみちのく雪室貯蔵では低くなった。王林は電気冷蔵と比べて全てのタイプの雪室貯蔵で低くなった。ビタミンC濃度は２種ともにもがみゆきっこ貯蔵で最も高くなった。ポリフェノール濃度は、貯蔵期間が長くなると低下していく傾向にあり、フジは雪室で保存すると、電気冷蔵よりも低下する速度が遅かった。2種のポリフェノールオキシダーゼ活性変動は、電気冷蔵と比べて雪室で貯蔵すると、その活性低下が遅くなる傾向にあった。バターの過酸化脂質生成速度はもがみゆきっこで保存した場合には他の雪室貯蔵よりも遅かった。日本酒の日本酒度は電気冷蔵よりも雪室貯蔵で低くなる傾向にあり、ｐＨはみちのく雪室貯蔵酒が他の貯蔵酒よりも高くなった。酸度はコルク栓酒は電気冷蔵よりも雪蔵工房およびみちのく雪室貯蔵酒が低くなり、金属栓酒は貯蔵初期にもがみゆきっことみちのく雪室貯蔵酒が低くなった。アミノ酸度は貯蔵期間が長くなると大きな差はなくなるが、貯蔵初期はコルク栓酒は電気冷蔵よりも雪室貯蔵酒が高い傾向にあり、金属栓酒は雪蔵工房およびみちのく雪室貯蔵酒が高くなる傾向にあった。

以上の結果から、雪室の中でも、もがみゆきっこのような年間を通して低温と高湿度を保つことができる施設は、電気冷蔵と比較して非常に優れた食品素材の保存特性を有しており、味覚あるいは視覚的な部分からも電気冷蔵よりも優れた部分があるものと予想された。本研究は文科省「地域先導研究」の援助によるものである。

B-02

ホヤのもつ食品学的機能の探索

○川崎 雅志（岩手県立大学・盛岡短期大学部・生活科学科）

【目的】岩手県沖をはじめとする三陸地域では、サケ・ワカメをはじめ様々な海産物が水揚げされているが、ホヤもその中の一つに数えることができる。現在、食用としてのホヤは主として嗜好品として利用されているところである。一方、近年の健康指向に伴い、食品の分野においては、栄養、嗜好といった従来の役割だけでなく、生体調節といった新たな役割をもった食品の開発が盛んに行われており、そうした機能性を重視した食品も数多く登場している。本研究ではホヤに注目し、これに有用な食品学的機能があるかどうかを探索することを目的として検討を行った。

【方法】3週齢のウイスター系オスラットを購入、固形飼料、ついで20%カゼインを含む標準食を与えて馴化飼育後、4群（7頭/群）に分けた。このうち3つの群にはホヤを凍結乾燥後粉砕して得た乾燥粉末を飼料に5、10、または20%添加したものを与えた。残りの1群には引き続き標準食を与え（対照群）、いずれの群もさらに3週間飼育を行った。飼育後、採血ならびに肝臓を摘出し実験に供した。血液から血清を得、脂質ならびにグルコース濃度を測定した。肝臓はホモジナイズ後脂質を抽出し、その含量を測定した。

【結果】血清総コレステロール、（超低密度リポたんぱく質＋低密度リポたんぱく質）コレステロール、トリグリセライド、りん脂質、遊離脂肪酸濃度がホヤ乾燥粉末を20%添加した飼料を与えた群において、対照群に比べて統計的に有意（$p<0.05$）に低下した。血清高密度リポたんぱく質コレステロール、グルコース濃度ならびにTBARS値に4群間で有意な差はみられなかった。肝臓コレステロール、トリグリセライド、りん脂質含量のいずれにも4群間で有意な差は認められなかった。以上の結果より、ホヤ乾燥粉末を摂取したラットにおいては血清中脂質濃度の低下といった脂質代謝に有用な影響をもたらすことが示唆された。今後さらに検討を重ね、具体的にホヤのどの部分がこうした脂質代謝に効果をもたらしているのかを明らかにしていきたいと考えている。

B-03

Acid Hydrolysis of Peptides and Proteins in Microcapillary tubes for the Recovery of Tryptophan.

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University.

Abayomi P. Adebiyi, Dong-Hao Jin, Tomohisa Ogawa, Koji Muramoto

Purpose: A method for the recovery of tryptophan in peptides and proteins by high-temperature and short-term acid hydrolysis in the presence of phenol was developed by Muramoto and Kamiya (1990). However, the method still requires an additional procedure such as laborious evacuation. It would be desirable to simplify the procedure by further improvement.

In this study, the acid hydrolysis procedure was simplified by employing microcapillary tubes without evacuation, and by optimizing the conditions. The method was evaluated by the amino acid analysis of model peptides and proteins.

Methods and Results: Standard amino acid solution (1nmol) was dried in microcapillary tubes (20 μ l or 100 μ l –volume). Hydrolysis of the sample in sealed tubes was carried out with 6 M HCl at 145℃/4 h or 110℃/24 h, and varying concentrations of β -mercaptoethanol and phenol. The hydrolysates were transferred into HPLC vials, dried under vacuum at 60℃ for 45 min, dissolved in 100 μ l of HPLC sample solution, and then subjected to amino acid analysis by a post-column HPLC system using o-phthaldialdehyde (OPA). The optimal hydrolysis condition was applied to the lysine endopeptidase digest of the lectin, CAM-BRA-2, of known amino acid sequence. The digest was separated by reversed-phase HPLC on a TSK ODS 120T column (5 μ m, 4.6 x 250 mm, Tosoh) at 40℃ and a flow rate of 1.0 ml/min, using a linear gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid.

Hydrolysis with 6 M HCl alone yielded no tryptophan recovery. Addition of 1% β -mercaptoethanol produced high tryptophan recovery (78±1%) at 110℃/24 h but very low (7±3%) at 145℃/4 h. Tryptophan recovery increased as phenol concentration increased. Moreover, further addition of 3% phenol to 1% β -mercaptoethanol produced good recovery (77±2%) even at higher temperature-shorter time hydrolysis condition; 145℃/4 h. The yield of tryptophan in 20 μ l microcapillary tube size was comparable to that of 100 μ l size, however, handling easiness and reliability of 20 μ l tube size were preferable for microanalysis. The present method could be successfully applied to the amino acid analysis of peptide fragments derived from CAM-BRA-2.

B-04

カゼインの高次構造はカゼインホスホペプチドの生成に影響を与える

○菅原和郎、佐藤鈴子、小野伴忠（岩手大院農・応用生物）

【目的】

牛乳中に含まれるカゼインは、カゼインミセルと呼ばれる高次構造をとっている。一方、カゼインは加工処理を行うことで、様々な食品素材として広く使用されている。この加工処理によってカゼインの高次構造は変化する。この高次構造の変化が、消化による機能性ペプチドの生成に影響を与える可能性がある。そこで本研究では、牛乳中のカゼインミセルに注目し、段階的にカゼインからミセルへと変化させた試料を調製し、高次構造の変化が CPP 生成にどのような影響を与えているか検討した。

【方法】

カゼイネートは、脱脂乳から pH4.6 で沈澱させたものを pH7.0 で溶解し、透析、凍結乾燥を行って調製した。カゼイネート溶液はカゼイネートを、MQ 水に溶解し、調製した。カゼインミセル分散液は、脱脂乳を超遠心分離して得たミセルを、上澄部の限外濾液に分散させ調製した。人工ミセル溶液は擬似乳清塩溶液（Simulated Milk Ultrafiltrate:SMUF）にカゼイネートを溶解させ、これを 5℃で 24 時間、室温で 12 時間、37℃で 24 時間透析後、生じたミセルを超遠心分離により沈澱させ、これを SMUF に分散し調製した。Ca 人工ミセル溶液は、カゼイネート溶液に終濃度 22.5mM となるように $CaCl_2$ を徐々に滴下し調製した。

各種カゼイン試料からの粗 CPP の調製はトリプシンによる加水分解で生じた可溶性ペプチドからカルシウム共存下、アルコール沈澱法によって粗 CPP を調製した。粗 CPP から RP-HPLC により分離した各ピークは MALDI-TOF-MS による質量分析とアミノ酸配列分析によりペプチドを同定した。

【結果】

高次構造の異なるカゼインのサンプルとして、カゼインミセル分散液、SMUF 人工ミセル溶液、Ca 人工ミセル溶液、カゼイネート溶液の 4 種を使用した。これら 4 種のカゼイン溶液にトリプシン加水分解を行い、粗 CPP を調製した。これを RP-HPLC により各ペプチドに分離し、ピーク面積から各 CPP の生成量を測定した。その結果β-カゼイン由来の CPP であるβ-CN-4P(f1-25)はカゼインの高次構造の変化に関わらず、生成量は一定であった。一方、αs1-カゼイン由来のαs1-CN-5P(f 59-79) の生成量は、カゼインミセル分散液で最も多く、次いで SMUF 人工ミセル溶液、Ca 人工ミセル溶液、カゼイネート溶液の順になった。

このことからαs1-カゼイン由来の CPP 生成量は、高次構造の変化により影響を受けることがわかった。また、その生成量は完全なカゼインミセルの形状を持つカゼインミセル分散液が最も多く、それにより近い構造をもつ順に SMUF 人工ミセル溶液、Ca 人工ミセル溶液、カゼイネート溶液と生成量が多くなっていたことから、カゼインの高次構造が牛乳中カゼインミセルに近いものほど、αs1-カゼイン由来の CPP の生成量が、多くなる傾向にあると考えられる。

B-05

水田転換畑で生育した大豆のフィチン酸含量

○石黒貴寛、塚本知玄、島田信二[1]、小野伴忠（岩手大院・農、[1]東北農業研究センター）

【目的】食料・農業・農村基本法の制定にともない、大豆は「本作作物」として位置づけらることになった。国産大豆は豆腐にした時の歩留まりや味の面で外国産大豆と比べ優れた品質を持っている。また遺伝子組み換え等に対する消費者の安全志向から、今後いっそうの生産振興が図られるものと考えられる。

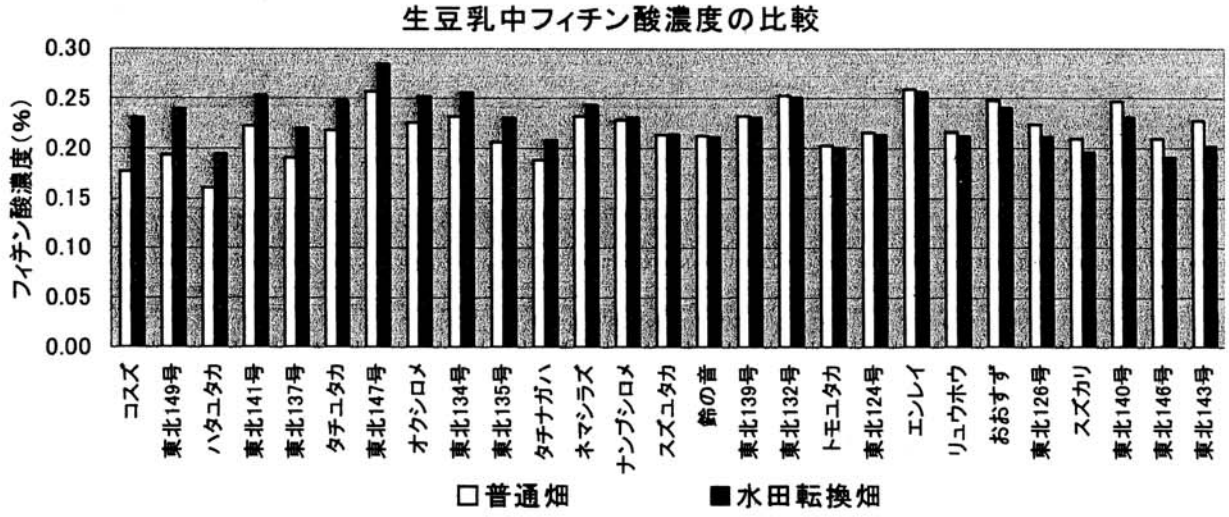
豆腐は、栽培条件の異なる大豆を用いて製造すると、同品種で同様の製造工程を経たものであっても、硬さなどの品質が異なることが知られている。この原因としては、栽培条件による大豆成分の変化が考えられる。本研究では、普通畑・水田転換畑それぞれで生育した同種の大豆について、豆腐の硬さに影響を与えることが知られているフィチン酸およびタンパク質の含量を調べ検討したので報告する。

【方法】　大豆は、豆腐用の品種登録されているもの１２種、育成途中の品種１３種、納豆用の品種２種の合計２７品種について、普通畑（秋田県上の台）と水田転換畑（秋田県大曲市）でそれぞれを育成し、２００１年に収穫したものを用いた。

生豆乳は大豆を浸漬後、大豆乾燥重の８倍量の水を加えて磨砕し、ろ過をして調製した。各大豆より調製した生豆乳のフィチン酸濃度(1)、タンパク質濃度(2)は赤外分光法を用いて定量した。

【結果】　それぞれの大豆から調製した豆乳のフィチン酸濃度を下図に示す。コスズ～ネマシラズの１２種の品種においては水田転換畑で生育した方が普通畑よりも有意にフィチン酸濃度が高かった。他の１５種については、有意差が見られなかった。このことから、栽培条件が大豆のフィチン酸含量に影響を与える可能性が示唆された。

タンパク質含量については、普通畑と水田変換畑の間の変動よりも品種間の変動の方が大きかった。このことから、この栽培条件の違いによるタンパク質含量への影響は少ないと考えられた。



（1）　石黒ら、　２００２年度　日本農芸化学大会要旨　p17

（2）　中里ら、　第１３３会　日本農芸化学会東北支部例会要旨　p24

B-06

ウシラクトフェリンに対する *Trypanosoma brucei rhodesience* の結合タンパク質の検出

○阿部雪絵、田仲哲也、井上昇[1]、玄学南[1]、長澤秀行[1]
五十嵐郁男[1]、玖村朗人、島崎敬一
（北大院農・酪農科学、[1]帯畜大・原虫研）

［目的］トランスフェリンファミリータンパク質であるラクトフェリン、トランスフェリン、オボトランスフェリンはそれぞれ哺乳類、鳥類などの生体内に分泌される分子量約 80 kDa の鉄結合性タンパク質である。特にラクトフェリンは乳汁や好中球に多く含まれており、抗菌作用、抗炎症作用、免疫賦活作用などの働きを示すことが知られている。一方トリパノソーマはヒトや家畜に感染して睡眠病を引き起こす細胞外寄生原虫である。この原虫はレセプターを介してトランスフェリンを利用し、増殖に必要な鉄を獲得している。ラクトフェリンはトランスフェリンとホモロジーが高く、かつ様々な微生物に対する作用が知られている。そこでトリパノソーマに対する反応性も期待し、トリパノソーマのラクトフェリンレセプター分子を検索するために、トリパノソーマ ブルーセイ ローデシエンス (*T.b.rhodesience*)のラクトフェリン結合タンパク質の検出を試みた。

［方法］溶解バッファーで処理した *T.b.rhodesience* の SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。次いでビオチンで標識したウシラクトフェリン、ウシトランスフェリン、オボトランスフェリンと結合させ、さらにペルオキシダーゼ標識したアビジンを用いた Far Western blot 法により、*T.b.rhodesience* のラクトフェリン結合タンパク質の同定を行った。またマイクロプレートを用いて結合量を測定することにより、*T.b.rhodesience* とラクトフェリンとの結合の特異性についても調べた。さらに比較として、細胞内寄生虫であるトキソプラズマ ゴンディ（*T.gondii*)についても同様の実験を行なった。

［結果および考察］共焦点レーザー顕微鏡によりビオチン標識ウシラクトフェリン、ウシトランスフェリン、オボトランスフェリンは *T.b.rhodesience* に結合する事が観察された。また、Far Western blot 法により検出されたラクトフェリン、トランスフェリン、オボトランスフェリンへの結合性タンパク質は、その分子量が 40 および 43 kDa と推定された。さらにラクトフェリンはトランスフェリン、オボトランスフェリンの *T.b.rhodesience* との結合を阻害するため、これらのトランスフェリンファミリータンパク質は同一のタンパク質により認識されていることが示唆された。一方、*T.gondii* において検出されたラクトフェリン結合タンパク質の分子量は約 42 kDa と推定された。

B-07

ブルーチーズ中に見出されたデキストラナーゼの分離・精製とその性質

北海道大学大学院・農学研究科・酪農科学研究室
○王裕量、田仲哲也、玖村朗人、島崎敬一

【目的】ブルーチーズから抽出した水溶性画分に Sephadex 及び可溶性 Dextran を分解する活性が見られ、デキストラナーゼの存在が示唆された。そこで、その酵素を分離・精製し、一次構造の解明を目指した。

【材料と方法】実験に用いたチーズはブルー・デ・コース(フランス産)である。チーズの水溶性画分からトヨパール HW55 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによって活性画分を分離した。さらに DEAE-トヨパール 650S を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。Native-電気泳動によってさらに精製し、かつ SDS-PAGE による純度検定を行った。これらの画分の活性測定には、肉眼で SephadexG-200 の分解程度をチェックする方法(Sephadex 分解法)および生成した還元糖を定量する方法(Somoyi-Nelson 法)を用いた。目的酵素の N 末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサー Model 491cLC(ABI 社)を用いて決定した。

【結果】酵素活性の最適 pH は 5.0~5.3 で、また Rotofor システム(Bio-Rad)による分離で本酵素の等電点は 4.9 前後と推定された。ブルーチーズ中のデキストラナーゼは架橋度の低い SephadexG-150、200 を分解するが、架橋度の高い SephadexG-15、25 などは分解しなかった。SDS-PAGE によって本酵素の分子量は 65KDa と推定された。Native-電気泳動で活性を示す画分を抽出し、PVDF 膜(ABI 社サンプル調製用カートリッジ)上へ濃縮・脱塩し、N 末端アミノ酸配列を求めたところ、15 残基まで決定され、ATPDEWRSRSIYFML であった。

B-08

牛乳由来のオステオポンチンの性質

○ 玖村朗人、三浦敦史、佐藤恵理子、
田仲哲也、島崎敬一（北大院・農）

オステオポンチン（OPN）は酸性リン酸化タンパク質で、骨代謝や免疫機能に関わる機能を有している。OPN は乳中にも見い出されることから乳腺や新生児にとって何らかの生理的な意義を持つものと思われるが、その詳細は不明である。そこで本研究では分娩後の乳汁中の OPN 含量の経時的な変化を観察すると共に牛乳から OPN を精製し、いくつかの性質を調べたので報告する。

実験方法

分娩直後から分娩後 5 日目まで採取した乳汁を試料とし、抗ヒト OPN ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、試料中の OPN 含量の推移を観察した。また常乳よりイオン交換クロマトグラフィーによって OPN を精製し、OPN の各種酵素に対する感受性を観察した。

結果

乳汁中の OPN 含量は分娩当日が最も多いことが確認された。そこで OPN のキモシンに対する感受性を調べるため、OPN を精製し、キモシンを作用させたが、OPN はキモシンによる分解を受けなかった。次に精製 OPN を種々のグリコシダーゼで作用させた結果、ウシ OPN は O-型結合糖鎖を持ち、その切断によって分子量が 5,000～8,000 減少することが明らかとなった。

B-09

乳ホエーたん白質の脂質代謝調節および抗酸化機能

弘前大学農学生命科学部
渋谷丞、川上祐生、柴田千博、鶴ヶ崎和華子、○長田恭一、
中村信吾

【目的】乳たん白質を構成するホエーたん白質はカゼインと異なる生理機能を有していることはよく知られている。しかし、その脂質代謝調節作用ならびに生体内抗酸化強化機能に関する明確な結論は得られていない。本研究では、カゼインを摂取させたラットを対照として、ホエーたん白質あるいはカゼインとホエーたん白質を1：1の比率で混合したたん白質を含む飼料をラットに与え、脂質代謝調節および抗酸化システムの変化を比較した。

【方法】4週齢SD系雄ラットに、カゼイン（C群）、ホエーたん白質（W群）あるいはカゼイン-ホエーたん白質混合物（1：1）（CW群）を各々20％含み、0.2％コレステロールを添加したAIN93純化食（10％サフラワー油添加）を摂食させた。44日間飼育した後に腹部動脈より採血死させ、各臓器を採取し、脂質代謝および抗酸化諸パラメータを測定した。

【結果】肝臓コレステロール生合成律速酵素活性はC群よりもW群は有為に低下した。血清と肝臓コレステロール濃度はホエーたん白質含有食摂取群が低くなり、両者ともにW群が最も低くなった。血清では認められなかったが、肝臓TG濃度はC群と比べてホエーたん白質含有食摂取群が低くなり、W群が最も低くなった。血清と肝臓コレステロール濃度はホエーたん白質含有食摂取群が低くなり、両者ともにW群が最も低くなった。肝臓リノール酸不飽和化律速酵素活性はC群と比べてW群は低くなる傾向にあった。その結果、組織りん脂質血清コレステリルエステルのリノール酸不飽和化指標はC群、CW群、W群の順に低くなった。また、動脈のプロスタサイクリン産生濃度も同じ傾向を示した。肝臓と血清のTBARS値は有意差はないが、3群の中でW群が最も低くなった。一方、W群の血清と肝臓のビタミンE濃度は、他の2群よりも高くなった。

【結論】以上の結果より、乳ホエーたん白質摂取による効果的な脂質代謝調節作用および抗酸化システムの強化が可能になるのではないかと推察された。このような機能の発現メカニズムを詳細に調べたいと考えている。

B-10

性別ならびに年齢の異なるラットの生体内抗酸化機能に与える大豆イソフラボン類の摂取効果

弘前大・農学生命・応生工
○川上 祐生，清澤朋子，長田恭一，中村信吾

【目的】大豆イソフラボン類は、抗発ガン作用など様々な生理機能を有することが明らかになっている。現在までに、大豆イソフラボン類が脂質代謝調節作用を発揮することを明らかにしてきた。最近、性別によってイソフラボン類の吸収および生体内での滞留時間が異なる可能性が指摘されている。イソフラボン類は、エストロゲン様作用を示すため、雌雄間での生理作用が異なるのではないかと予想される。本研究では、性別ならびに加齢による脂質代謝および抗酸化機能の変動に対する大豆イソフラボン類の摂取効果を比較検討した。

【方法】雌雄の 4 週齢および 8 ヶ月齢の SD 系ラットに、大豆イソフラボンアグリコンを 0.1%添加(対照は無添加)した AIN93 純化飼料を与え、24 日間飼育した。飼育終了後、腹部大動脈より採血死させ、脂質代謝および抗酸化システムの各パラメータを測定し、大豆イソフラボン類の摂取効果を比較した。

【結果】血清の GPT、GOT、LDH を測定したところ、イソフラボン摂取による肝臓障害は見られず、若齢 GOT 値は、イソフラボン摂取で低下する傾向を示した。抗酸化酵素群の活性を測定した結果、若齢群では、雌雄いずれも、肝臓の SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ活性は、イソフラボン摂取群の方が高い傾向にあった。さらに、肝臓のグルタチオンレダクターゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性も同様の傾向にあった。肝臓の過酸化脂質濃度(TBARS 値)は、若齢群の雄で、イソフラボンの摂取により低下する傾向を認めた。一方、老齢群の TBARS 値は、肝臓と血清の両者ともに、イソフラボンの摂取により低くなる傾向にあった。血清の HDL-Cholesterol/Total-Cholesterol 比を算出したところ、老齢群では明らかな差はなかったが、若齢群では、イソフラボンの摂取で高くなる傾向を認めた。

【結論】その他のパラメータについては現在分析中であるが、現在までの結果から、イソフラボンの摂取による抗酸化システムの強化は、代謝の未熟なラットで効果的であることが明らかであった。しかし、性別による効果の違いは、現在のところ明確ではない。

B-11

CCl_4投与による酸化ストレス負荷に対するりんごポリフェノールの摂取効果

○柴田千博[1)]，青木健太郎[1)]，船山誠[1)]，長田恭一[1)]，
中村信吾[1)]，神田智正[2)]
[1)]弘前大・農学生命，[2)]ニッカウヰスキー弘前工場

【目的】多くのポリフェノール類は種々の生理活性を有しており、中でも強い抗酸化機能により生活習慣病の予防効果を発揮する場合がある。りんご由来ポリフェノール(APP)も強い抗酸化機能を有しているが、酸化ストレスを負荷した場合の抗酸化効果は明らかではない。本研究では、CCl_4を添加し、かつ、APP を加えた飼料をラットに与えて酸化ストレスを負荷した場合の APP の摂取効果を検討した。

【方法】4 週齢 SD 系雄ラットに AIN93 純化食に無添加の食餌(NC 群)、CCl_4添加食(PC 群)、CCl_4とりんごポリフェノール低分子画分(APM)の添加食(APM 群)、CCl_4ととりんごポリフェノール高分子画分(ACT)の添加食(ACT 群)をそれぞれ 9 日間与えた。飼育終了後、腹部動脈より採血死させて各臓器を採取した。肝臓の GOT と GPT、肝臓から分離したサイトゾル、ミトコンドリアおよび赤血球の諸抗酸化酵素活性ならびに各組織の過酸化脂質濃度を測定した。

【結果】肝機能障害の指標となる GOT と GPT を測定した結果、GOT 値には差はなかったが、GPT 値は PC 群と比べて APM 群と ACT 群は低くなった。抗酸化酵素活性を測定した結果、肝臓のサイトゾル、ミトコンドリアおよび赤血球の SOD 活性は PC 群よりも APM と ACT 摂取群が高くなった。肝臓ミトコンドリアおよび赤血球のカタラーゼ活性は PC 群よりも APM 群と ACT 群の方が高くなった。肝臓サイトゾルの Glutathione-S-Transferase 活性は、PC 群よりも APP 摂取群が高く、とくに、ACT 群が最も高くなった。肝臓サイトゾルの Glutathione Reductase は、PC 群よりも有意に APM 群と ACT 群が高くなった。各組織の過酸化脂質濃度を測定した結果、腎臓 TBARS 値は PC 群よりも APM 群と ACT 群が有意に低くなった。肝臓 TBARS 値は、PC 群よりも APP 摂取群が高く、とくに、ACT 群が最も低くなった。脂肪組織 TBARS 値は PC 群よりも ACT 群が有意に低くなった。血清と赤血球 TBARS 値は PC 群よりも APM 群と ACT 群が有意に低くなった。

【結論】以上の結果より、CCl_4投与による酸化ストレス負荷に対して APP を摂取すると、肝機能障害が予防可能であり、さらには抗酸化諸酵素活性の消耗を抑えることで生体内脂質過酸化を抑える可能性が示唆された。

B-12

食品ポリフェノールのアミンオキシダーゼ様活性に関する研究

○重光 智子、赤川 貢、須山 享三　（東北大院農・応生科・生体物理化学）

【目的】

アミンオキシダーゼは、一級アミンを酸化的に脱アミノ化しアルデヒドへと変換する酵素である。我々は、ポリフェノールが遷移金属の触媒する自動酸化によってキノンへと酸化され、アミンオキシダーゼ様活性を発現することを明らかにしている[1)]。本研究は、ポリフェノール含有食品も同様の酸化的脱アミノ化反応を触媒するかどうかを明らかにすることを目的として実行した。今回、ポリフェノールを高濃度に含有する緑茶、紅茶、及びコーヒーをとりあげ、それぞれの抽出液をベンジルアミンと反応させ、反応産物であるベンズアルデヒドの生成を分析することによりアミンオキシダーゼ様活性を決定した。また、牛血清アルブミン(BSA)を基質としてタンパク質リジン残基に対するリジルオキシダーゼ様活性も調べた。

【方法】

① ベンジルアミンの酸化的脱アミノ化反応

10 mM ベンジルアミン、及び 0.5 mM $CuSO_4$ を含む 0.1 M リン酸緩衝液(pH7.4)に、緑茶、紅茶、及びコーヒーの抽出液(10 mg/ml)、または、0.5 mM ポリフェノール溶液をそれぞれ同量ずつ加えて 37℃でインキュベートし、酸化産物であるベンズアルデヒドの生成を逆相 HPLC によって分析した。また、この反応に与える pH、遷移金属イオン、及び金属キレート試薬である EDTA の影響も調べた。

② BSA リジン残基の酸化的脱アミノ化反応

20 mg/ml BSA、及び 0.5 mM $CuSO_4$ を含む 0.1 M リン酸緩衝液(pH7.4)に、緑茶、紅茶、及びコーヒーの抽出液(10 mg/ml)をそれぞれ同量ずつ添加し 37℃でインキュベートし、リジン残基の酸化物であるアルデヒド、アリシンの生成を分析した。アリシンの分析は、フェノールの存在下で BSA を酸加水分解し、ビスフェノール誘導体である ACPP へと誘導体化し逆相 HPLC を用いて行った。

【結果】

緑茶、紅茶、及びコーヒーの抽出液は、ベンジルアミンを酸化的に脱アミノ化しベンズアルデヒドを生じさせた。銅イオン存在下で 24 時間のインキュベートによって生成したベンズアルデヒドは、紅茶で 0.71 mM、緑茶で 0.54 mM、及びコーヒーで 0.37 mM であった。これら 3 種類の抽出液中に含まれる主要なポリフェノール成分もアミンオキシダーゼ様活性を示し、カテキン類で 0.15~0.29 mM、及びコーヒー酸で 0.65 mM のベンズアルデヒドを生じさせた。反応は、pH が高くなるに従い促進され、遷移金属イオンは、バナジウム、コバルト、銅イオンの順に促進効果があり、EDTA の添加により阻害された。また、全ての抽出液は、BSA のリジン残基を脱アミノ化しアリシンを生じさせたことから、そのリジルオキシダーゼ様活性が明らかとなった。

1) M. Akagawa and K. Suyama, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1953–1963 (2001).

B-13

肝臓の糖代謝調節に関わる因子への酸化ストレスの影響

岩手大・農・生命
○近江沙織、伊藤芳明、長澤孝志、西澤直行

【目的】肝臓は糖の利用や生成を通じて、血糖調節に大きな役割を果たしている。この過程に関わるglucokinase(GK)は解糖系の律速酵素、phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)は糖新生の律速酵素で、インスリンによりその発現が制御されており、糖尿病態と密接な関係がある。糖尿病では組織の酸化ストレスが亢進した状態になっており、更に酸化ストレスのインスリン抵抗性への関与が指摘されている。そこで本研究では、肝臓組織において酸化ストレスが糖代謝調節およびインスリン応答に及ぼす影響を明らかにする目的で、鉄ニトリロ三酢酸(FeNTA)を投与した急性酸化ストレスモデル動物を用いて、肝臓のGKとPEPCKの遺伝子発現やインスリンシグナル伝達に酸化ストレスが与える影響について検討した。

【方法】(1)20%カゼイン飼料を用いて、1日8時間(10：00－18：00)の食餌訓練を施したWistar系雄ラットに、解剖当日の給餌前40mM FeNTA溶液または生理食塩水を体重1kg当たり3.75ml腹腔内投与した。投与後3時間の摂食後、屠殺した。採取した血清より血糖値と血中インスリン濃度を、肝臓よりGKとPEPCKの遺伝子発現量を検討した。
(2)1週間20%カゼイン飼料で飼育した5週齢Wistar系雄ラットに、実験(1)と同様にFeNTA溶液を腹腔内投与し24時間絶食をさせた後、20%カゼイン飼料を摂取させた。摂食開始から3時間後に屠殺し、肝臓と血清を採取した。実験(1)と同様に血糖値と血中インスリン濃度、肝臓でのGKとPEPCKの遺伝子発現量、更に肝臓のインスリンレセプター及びIRS-1のチロシンリン酸化量を検討した。

【結果】(1)血糖値と血中インスリン濃度にFeNTA投与による影響は見られなかったが、GK遺伝子発現量はFeNTA投与で有意に減少した。このときPEPCK遺伝子発現量にはFeNTA投与による差は認められなかった。
(2)食餌の摂取により血糖値は上昇したが、FeNTA投与による影響は認められなかった。しかし血中インスリン濃度はFeNTA投与で有意な上昇が認められた。このとき肝臓GK遺伝子発現量はFeNTA投与で有意に減少したが、PEPCK遺伝子発現量には差が見られなかった。またIRS-1のチロシンリン酸化量は、FeNTA投与で減少する傾向を示した。

これらの結果より、FeNTA投与後短時間での酸化ストレス発生期の肝臓および、一定時間経過後の損傷を受けた肝臓組織においても、摂食時のGK遺伝子発現の上昇が抑制されていることが示された。更にその抑制の一部は、インスリンのシグナル伝達の障害を介して起きている可能性が考えられた。

B-14

モロッコ産アルガン油脂の化学的特徴

（帯広畜大・生資科）○中野益男，堺　直子，福島道広

１．目的

モロッコでは，生活習慣病，特に心臓疾患の発症が少ないと報告されている．その理由は，断食，豚肉や酒の飲食禁止などイスラム宗教上の制限もあるが，穀物・野菜・魚介類を多く摂取するモロッコの食生活に欠かせないアルガン油の効用が考えられる．アルガン油はモロッコ南西地域で生産されるアルガン樹ナッツ(*Argania apinosa*)から搾油される伝統的な油脂である．本研究はアルガン油脂の化学的特徴をイタリア，スペイン産のオリーブ油と比較・検討した．

２．方法

ナッツおよびオリーブから圧搾法により搾油した原油からクロロホルム-メタノール系を用いて全脂質を抽出した．全脂質は薄層クロマトグラフィーで各脂質クラスに分画した．脂肪酸とステロール組成はガスクロマトグラフィー-マスクロマトグラフィーで，トリアシルグリセロール(TG)の分子種は液体クロマトグラフィーで解析した．

３．結果

アルガン油はオリーブ油に比べて TG が多く分布していた．主要な脂肪酸はオレイン酸(18:1，約 45%)とリノール酸(18:2，約 46%)でほぼ同量含まれており，オリーブ油に比べてオレイン酸が少なく，リノール酸が高かった．不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸比は 2.21～2.34 でオリーブ油に比べ高かった．飽和脂肪酸/一価不飽和脂肪酸/多価不飽和脂肪酸比は 3:8.7:6.6 でオレイン酸とリノール酸の分布バランスに優れていることがわかった．TG の分子種は 17 種あり，主要な分子種は 18:1/18:1, 16:0/18:1 であった．主要なステロールはシトステロール(約 21%)，スピナステロール(約 22%)，ショッテノール(約 27%)，ステグマステロール(約 25%)であった．

B-15

赤ワイン製造のアルコール発酵過程における脂肪酸成分の変動

○柚木恵太、Renagul Musa、安井美裕[1]、中林　司[1]、木下幹朗、大西正男（帯畜大・生資科、[1]池田町ブドウ・ブドウ酒研）

【目的】先に演者らは、ブドウ果汁の脂肪酸分析値がブドウの品種特性や産地特性などを判定する指標に利用できる可能性を報告している※。また、赤ワインにはブドウ原料や発酵微生物に由来する脂肪酸成分が存在しており、それはワイン製造の初期段階で半減することも明らかにしている。今回は引き続いて、十勝産清見種のブドウを用いてアルコール発酵過程での脂質成分の変動を、特にワインフレーバーに関係する脂肪酸エチルエステルの生成に注目して調べた。

【方法】ブドウ果実圧搾物のアルコール発酵開始0日目、3日目および7日目にろ過して試料を調製した。なお、アルコール含量は発酵3日目では 1.4%、7日目では 10.0%であった。全脂質の抽出はクロロホルム-メタノール混液で行い、脂質クラスの組成はケイ酸 TLC と GC を併用して分析した。脂肪酸エチルエステルについてはそのまま GC-MS に供した。

【結果】全脂質量と総脂肪酸量は、発酵0日目ではそれぞれ 0.8mg/ml と 0.9μmol/ml、3日目では 0.4mg/ml と 0.5μmol/ml 、7日目では 0.4mg/ml と 0.7μmol/ml となり、アルコールが蓄積する前（3日目まで）に原料ブドウ由来の脂質成分が酵母によって資化されて大幅に減少することが判明した。果汁（発酵0日目）には著量のホスファチジン酸が検出されたことから、ブドウ果実中にはホスホリパーゼ D 活性が存在することが示唆された。発酵3日目の段階では、果汁中に見られたグリセロリン脂質クラス（ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンなど）の大部分は消失していた。このことは、酵母が増殖する過程で原料ブドウ由来の脂質成分の中でもリン脂質がまず優先的に分解されることを示すものである。また、発酵3日目から脂肪酸エチルエステルの生成が認められ、7日目では 0.05μmol/ml から 0.1μmol/ml まで増加した。脂肪酸エチルエステルの主な構成脂肪酸はリノール酸（33%）、パルミチン酸（29%）およびリノレン酸（10%）で、それらの量比はリン脂質群の構成脂肪酸を概ね反映するものであった。果汁では認められないカプリン酸などの中鎖脂肪酸のエチルエステル（6%）も検出されたが、それらの中鎖脂肪酸はアルコール発酵後から減少していくことから、酵母によって合成され、アルコール発酵後に速やかに代謝されるものと推測された。

一方、ブドウ果実由来のステロール脂質やスフィンゴ脂質はアルコール発酵の過程でほとんど分解されなかったが、発酵3日目からテルペノイド系と推測される成分が新たに検出された。また、トリアシルグリセロールに相当する成分が発酵7日目に増加したが、これはアルコールの蓄積によってブドウ果実から脂質成分が溶出されることによると推測された。

※丹治ら：日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集、p.29.

B-16

スフィンゴ脂質の食品機能性について

○木下幹朗[1]、間　和彦[1,2]、小野治三郎[2]、菅原達也[3]、
小田有二[4]、櫛　泰典[1]、　宮澤陽夫[5]、大西正男[1]
（帯広畜大・生資科[1]、日本製粉・中研[2]、国立健康・栄養研[3]、
農研機構・北農研[4]、東北大院・農[5]）

目的：スフィンゴ脂質には興味深い生理活性が見出されており、たとえば皮膚におけるバリアー機能や大腸ガン発症抑制能等が報告され、機能性脂質として注目されている。以前は、その供給源として動物（ウシ等）の脳・神経組織が使用されてきたが、ヒトへの機能性を考える上で原料の安全性が問題となる。そこで、食経験のある植物や真菌類のスフィンゴ脂質、特に量的に多いセレブロシド（グルコシルセラミド）が機能性素材として期待されている。これまでに演者らは、植物や真菌類のセレブロシドの構造特性と代謝関連遺伝子について研究を進めてきた。今回はスフィンゴ脂質の機能性を究明する一環として、セレブロシドからスフィンゴイド塩基およびセラミドを調製し、スフィンゴ脂質構成分の構造とアポトーシス誘導活性との関連についてヒト結腸ガン細胞株を用いて明らかにしようとした。

方法：各種の植物や真菌からセレブロシドを分離精製し、常法によってスフィンゴイド塩基、C2-セラミドおよびセラミドを調製した。アポトーシス誘導活性は、5X 10^4cell/cm^2 の Caco-2 細胞を２４時間 10%牛胎児血清添加 DMEM 培地で培養した後、血清未添加の DMEM 培地に切り替え、これに 0～50μM のスフィンゴ脂質誘導物を添加した。アポトーシスに陥った細胞は、細胞核を 0.05% 4',6-diamidino-2-phenyliodole（DAPI）で染色して蛍光顕微鏡下で計測された。

結果：10μMのスフィンゴイド塩基を添加すると、24 時間後においてトウモロコシ由来の 4-8-Sphingadienine（d18:$2^{4t,8t}$ と d18:$2^{4t,8c}$ の混合物）と 4-Hydroxy- 8-Sphingenine（t18:1^{8t} と t18:1^{8c} の混合物）では動物由来の *trans*-4-Sphingenine（d18:1^{4t}）や 4-Hydroxysphinganine（t18:0）と同様に 5～10%のアポトーシス細胞が認められ、これはコントロール群（2%以下）より有意に高かった。この生理活性は、時間および容量に依存した。セラミドの形態としては、C2-セラミドではアポトーシス誘導（20μM添加で10%の細胞死）が認められたが、ジヒドロキシ塩基と長鎖ヒドロキシ脂肪酸を有するタイプでは認められなかった。現在、真菌特有のスフィンゴイド塩基（9-methyl-*trans*-4,*trans*-8-Sphingadienine）についても検討中である。

B-17

高血糖で生じる糖化ホスファチジルエタノールアミンの分布と新規生理活性

○玉 正浩、山田美紗、仲川清隆、宮澤陽夫（東北大院・農・機能分子解析学）

【目的】 第一級アミノ基を有するホスファチジルエタノールアミン（PE）がグルコースと反応し、アマドリ型糖化リン脂質（Amadori-PE）を生じることを明らかにした[1-3]。「脂質糖化」の概念は全く新しい。このような糖化反応により生じる Amadori-PE の分布と生理活性は未だ不明である。本研究では、高純度の Amadori-PE を合成し、UV ラベル化試薬（3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride, MBTH）を用いた定量法を開発し、その生理活性として脂質過酸化惹起と血管新生への影響を明らかにしようとした。

【方法】 1,2-Di(cis-9-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine（dioleoyl PE）とグルコースをリン酸緩衝液中でインキュベートし、生じた Amadori-PE を phenylboronic acid でコートした固相抽出カートリッジで高純度の Amadori-PE 標品を得た。生体試料や食品から抽出した総脂質画分を、メタノール中で MBTH と反応させた。UV ラベルした Amadori-PE を LC-UV (318 nm)で検出し定量した。Amadori-PE の生理作用として脂質過酸化誘発能を調べた。Amadori-PE 標品をミセル状リノール酸に加え 37℃でインキュベートした。その後、脂質過酸化の進行を、thiobarbituric acid reactive substances（TBARS）法と ferrous oxidation in xylenol orange（FOX）法で評価した。活性酸素阻害剤を加えその効果を同様の方法で調べた。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells, HUVEC）の増殖・遊走・管腔形成に対する Amadori-PE の影響を調べた。

【結果及び考察】 生化学実験に十分に使用できる高純度（>95 % ）の Amadori-PE 標品の作製に成功し、生体試料や食品から 糖化脂質の検出にはじめて成功した。とくに高齢ラットの血漿で Amadori-PE が検出されたため、脂質糖化反応が老化に深く関わると考えられた。鉄存在下のミセル状リノール酸の 過酸化反応は、極微量の Amadori-PE（0.06-0.23 mol%）で顕著に誘発された。このミセル状リノール酸の過酸化反応は SOD、mannitol、catalase、EDTA によって抑制された。本結果より Amadori-PE は鉄と共存すると活性酸素を産生し膜脂質過酸化を著しく誘発促進することがわかった。
Amadori-PE は低濃度（<5 μM）で濃度依存的に血管新生を促進することも明らかになった。したがって、Amadori-PE は高血糖状態で生じ、生体膜脂質過酸化と血管新生を促進し、糖尿病性合併症の重要な原因分子であることが示唆された。

1) Lertsiri S., Shiraishi M. and Miyazawa T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 893-901 (1998)
2) Oak J.H., Nakagawa K. and Miyazawa T. *FEBS Lett.* **481**: 26-30 (2000)
3) Oak J.H., Nakagawa K. and Miyazawa T. *J. Lipid Res.* **43**: 523-529 (2002)

B-18

共役トリエン脂肪酸による癌抑制機構

○都築　毅、得山佳子、田中寿美、神戸朋子、宮澤陽夫（東北大院農）
五十嵐美樹、武藤泰敏（椙山女学園大・人間栄養）
津田洋幸（国立がんセンター）、羽田尚彦、井上良計（備前化成）

【目的】天然には、微量だが通常の二重結合ではなく共役化した二重結合をもつ共役脂肪酸が存在する。牛肉や乳製品には微量ながらリノール酸の幾何、位置異性体である共役リノール酸（共役ジエン型脂肪酸; 18:2; CLA）が含まれている。CLA の抗発癌作用と体脂肪抑制作用などについてはさかんに研究されているものの他の共役不飽和脂肪酸についてはほとんど研究されていない。

本研究では、共役トリエン型や共役テトラエン型の脂肪酸に CLA より強い生理作用を期待して、長鎖の共役脂肪酸を化学的に調製し、抗癌作用を明らかにし、そのメカニズムを解明しようとした。

【方法】α-リノレン酸 (18:3)、アラキドン酸 (20:4)、EPA (20:5)、DHA (22:6) を様々な条件でアルカリ処理して得た共役脂肪酸のヒト由来の癌細胞に対する作用を検討した。また正常細胞に対する作用も検討した。CEPA と CDHA について、大腸癌細胞 (DLD-1) と白血病細胞 (HL-60, Jurkat cell) を用いて、蛍光染色によるクロマチン凝集の観察、TUNEL 法を用いた断片化 DNA の *in situ* 検出、DNA 断片化率の定量、カスパーゼ阻害剤による細胞生存実験、過酸化脂質の測定を行った。また、癌細胞 (DLD-1) を移植したヌードマウスに CEPA を経口投し、*in vivo* での癌抑制作用を検討した。

【結果】殺癌細胞作用は CLA よりどの共役トリエン型脂肪酸も強い殺癌細胞作用を示した。また、共役 EPA(CEPA)と共役 DHA(CDHA)は正常細胞に殺細胞作用は示さなかった。顕微鏡で観察すると、CEPA あるいは CDHA を添加した培地で培養した DLD-1 は Control に比べて萎縮し細胞形態に大きな変化が見られた。TUNEL 法では DNA の断片化が確認された。また、カスパーゼ阻害剤により細胞の生存率は飛躍的に上昇した。共役脂肪酸添加により、細胞の過酸化脂質量は高値を示した。抗酸化剤により共役脂肪酸の殺細胞作用は有意に弱められた。癌細胞を移植したヌードマウスでは、CEPA 投与群に癌組織を退縮させ癌組織の脂質過酸化を強く促進することがわかった。

以上の結果から、正常細胞に影響を与えずに癌細胞にのみに選択的に殺癌細胞作用を示すのは CEPA と CDHA の共役トリエン型脂肪酸であることが明らかになった。そのメカニズムは膜脂質過酸化を介したアポトーシス誘導であることを明らかにした。

1. M. Igarashi& T. Miyazawa: *Cancer Lett.*, 148, 173-179 (2000).
2. M. Igarashi& T. Miyazawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 649-656 (2000).
3. M. Igarashi& T. Miyazawa: *Biochimica et Biophysica Acta,* 1530, 162-171(2001).

B-19

C型肝炎における肝脂質過酸化と肝発癌：トランスジェニックマウスを用いた解析

○仲川清隆[1], 森屋恭爾[2], 小池和彦[2], 宮澤陽夫[1]
([1]東北大院・農・機能分子解析学, [2]東大院・医・内科学)

【目的】 生活習慣病や老人病への膜脂質過酸化反応の関わりが明らかになりつつある。これまでに宮澤らは、生体膜を構成するリン脂質とくにホスファチジルコリンの初期過酸化生成物であるPCOOHに着目して、化学発光-高速液体クロマトグラフ（CL-HPLC）法とLC-ESI/MSを併用し、生体膜脂質の過酸化の実際を明らかにしてきた[1-3]。C型肝炎ウイルス（HCV）の感染による肝癌の発生機構については不明な点が多いが、酸化ストレス発生に関する明確な証明はなされていない。共同研究者の森屋らは、HCVのコア蛋白遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製に成功し肝発癌の発症機構を検討してきている。本研究では、コア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓PCOOH化と抗酸化酵素の発現を動物の加齢の影響をも考慮しつつ調べ、C型肝炎における肝発癌への膜脂質過酸化の実態を明確にしようとした[4]。

【方法】 若齢と老齢のHCVコア遺伝子をもつトランスジェニックマウスを作製し、肝臓のPCOOH量、カタラーゼ活性およびグルタチオン濃度を測定した。また、肝細胞のミトコンドリアの形態を電顕で観察し、ミトコンドリアDNAの傷害はPCR法で調べた。

【結果】 若齢（3～12ヶ月齢）のコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓にPCOOHの異常な蓄積は認められなかった。しかし、老齢トランスジェニックマウス（>16ヶ月齢）では、肝細胞癌の形成とともに肝臓PCOOH濃度が著しく増大し、カタラーゼの活性化、グルタチオンの減少、リポフスチン顆粒と種々の細胞小器官を含む二次的ライソゾームの出現、ミトコンドリアの二重膜構造の異常とDNA傷害が認められた。

【考察】 HCVのコア蛋白は、長期の脂肪肝ののちに肝細胞癌を引き起こす。本研究による知見は、C型肝炎における肝発癌の過程で、肝細胞内のオルガネラ膜リン脂質の激しい過酸化による遺伝子変異がとくに重要であることが示された。肝炎感染から肝細胞癌化に至る病変に対し肝の抗酸化処置の有効性を物語ると考えられた。

1) T. Miyazawa et al.: J. Lipid Res., 33, 1051 (1992)
2) T. Miyazawa et al.: Methods in Enzymol., 233, 324 (1994)
3) M. Kinoshita, S. Oikawa, T. Miyazawa et al.: Clin. Chem., 46, 822 (2000)
4) K. Moriya, K. Nakagawa, T. Miyazawa et al.: Cancer Res., 61, 4365 (2001)

B-20

LIMドメインを有するマウスLimd1遺伝子の構造と発現の解析

○日出間　志寿[1] 松田　崇[2] 野島　博[3] 西宗　義武[3] 西森克彦[1]
(1東北大院・農・分子生物、2現ロッテ・中央研、3阪大・微研)

生殖腺の機能と分化機構を解明するためのマウス精子細胞の形態形成期に特異的に発現している新規の遺伝子のスクリーニングの過程で得られたTISP5-S cDNA clone解析を行った。この結果、TISP5-S cDNAの推定132アミノ酸配列にはLIM domain motifが1つ存在し、新規の蛋白質であることが予想された。TISP5-S cDNAをprobeとしてマウスの各組織に対するNorthern blot解析を行ったところ、精巣特異的なsignalの他に複数の組織でこれより高分子のsignalが検出された。高分子転写物由来のcDNA clone（TISP5-L）を取得し塩基配列を決定したところ、TISP5-LはH.Kissらにより報告されたマウスLimd1と同一であり、TISP5-SはLimd1のC末端側をコードしている転写副産物であることが明らかとなった。

サザンブロット解析によりTISP5-S、Limd1は同一遺伝子由来であると推定されたので、genome構造を決定したところ、TISP5-Sに特異的なエキソンが存在することが明らかとなった。またLimd1はヒトホモログLIM D 1と高い構造的な相同性が認められた。精子形成期に特異的な遺伝子発現制御を受けることにより、異なる転写開始点よりアイソフォームが生じる例は多数報告されており、我々はTISP5-SとLimd1が同様の関係があることを予想している。

RT-PCRにより、Limd1の発現は時期、組織特異性がないのに対し、TISP5-Sは半数体精子細胞が現れ始める生後17日以降の精巣で特異的に発現する。Limd1、TISP5-SをCOS7細胞で発現させたところ、どちらも細胞内でタンパク質として翻訳され、細胞質に局在することが示された。またLimd1のノックアウトマウスを作製しLimd1、TISP5-Sの機能を解明することを計画しLimd1のノックアウトベクターを構築した。

C-01 サキシトキシン、テトロドトキシンとPSTBPとの結合に関する研究

○山田俊一[1]、山下まり[1]、宮澤陽夫[1]、安元健[2]
([1]東北大院・農・応生科,[2]日本食品分析センター)

【目的】サキシトキシン(saxitoxin, STX, Fig.1-1) とテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX, Fig.1-2)は麻痺性貝毒やフグ毒として知られているが、それ以外の生物にも広く分布する天然毒である。両毒は電位依存性 Na^+チャネルの同一部位に結合し、毒性を発する。我々は、ヒガンフグ (*Fugu pardalis*) 血漿中から STX、TTX と結合する糖タンパク質(Puffer fish STX, TTX Binding Protein: PSTBP)を見い出した[1)]。^{3}H-STX と PSTBP との K_d は 14.6 nM と決定できたが、^{3}H-TTX は入手不能のため TTX の PSTBP との結合特性は明らかではない。但し、^{3}H-STX と TTX、STX の競合結合試験で TTX の IC_{50} が STX の IC_{50} の 1400 倍であったので、もし TTX、STX が単純な競合的結合をするならば、TTX の結合性は STX に比べて著しく低いと考えられた。しかし、まだ STX、TTX の結合が単純な競合かどうかは不明であった。そこで本研究では、両毒の HPLC[2),3)]を用いて相互の競合的結合阻害を調べ、その様式について考察した[4)]。また、両毒の各種類縁体を用いて、PSTBP との結合に関する構造活性相関研究を行い、分子中で結合に関与する部分を推定して Na^+チャネルとの結合モデルと比較した。

【方法、結果】まず、STX 標品、TTX 標品及び精製 PSTBP を用いて相互の結合阻害実験を行った。すなわち、濃度一定の STX(0.47 μM)と PSTBP(0.30 μM)の 50 mM ammonium acetate (pH 7.4) 溶液に濃度可変の TTX を加えて、氷中 15 分放置後に限外濾過 (Millipore Ultrafree-MC, 30000NMWL) し、濾液を取り除いた。次に STX-PSTBP 複合体に 0.2 M AcOH を加えて解離させ、限外濾過後に濾液中の STX を定量した。その結果、TTX の IC_{50} は、81 ± 16 μM (n=2)であった。また、同様に濃度一定の TTX (1.6 μM)と PSTBP (1.2 μM)に濃度可変の STX を加えて同様の操作を行って求めた STX の IC_{50} は 0.35 ± 0.057 μM (n=2)であった。もし単純な競合結合であるならば、TTX の IC_{50} (81 μM)から予想される STX の IC_{50} は、0.0093 μM であるが、実際は 38 倍大きかった。この結果より、TTX、STX の PSTBP との結合が単純な競合モデルでは説明できないと考えられた。一方、構造活性相関研究は次のように行った。STX 群は、STX、neoSTX、dcSTX の混合物、GTX1、2、3、4、5 の混合物、dcGTX2、3 の混合物、C1、C2 の混合物 (各類縁体の濃度：0.26-1.1 μM)のそれぞれを、PSTBP 粗精製物 (2.6 μM)とインキュベートし、上記と同様の方法で結合した STX 群を HPLC で定量した。その結果、STX、dcSTX、GTX5 のみ結合活性が示された。このことから、STX の C-13 は結合に殆ど関与せず、N-1、C-11 が関与すると考えられ、STX の Na^+チャネル結合モデルと大きく異なった。

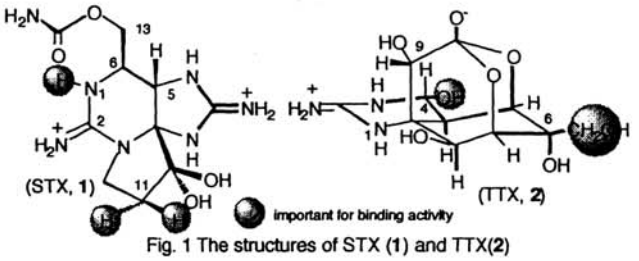


Fig. 1 The structures of STX (1) and TTX(2)

一方、TTX 群の結合試験は、29-42 pmol のほぼ単一の TTX、tetrodonic acid、4-*epi*TTX、 4,9-anhydroTTX、11-norTTX-6(*R,S*)-ol 混合物、6-*epi*TTX 及び、11-oxoTTX、TTX、6-*epi*TTX の 混合物を、それぞれヒガンフグ血漿 10 μl (予め結合していた TTX、STX を解離させ除去したもの)とインキュベートし、結合した TTX 群を HPLC で定量した。その結果、TTX、11-oxoTTX、6-*epi*TTX のみの結合が示された。よって、結合には 4-OH、C-11 が重要であると考えられ、この点においては TTX の Na^+チャネルとの結合モデルと類似していた。

STX 群標品をご提供下さった東北大学大学院生命科学研究科大島教授に心から感謝を申し上げます。

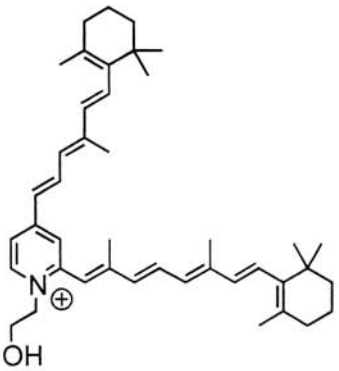
1) Yotsu-Yamashita, M., *et al. Eur. J. Biochem.*, **268**(22), 5937-5946 (2001). 2)Yasumoto, T., Michishita, T. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3077-3080 (1985). 3) Oshima, Y. *AOAC International*, **72**, 528-532 (1995). 4) Yotsu-Yamashita, M., *et al., Biosci. Biotech. Biochem. in press.*

C-02

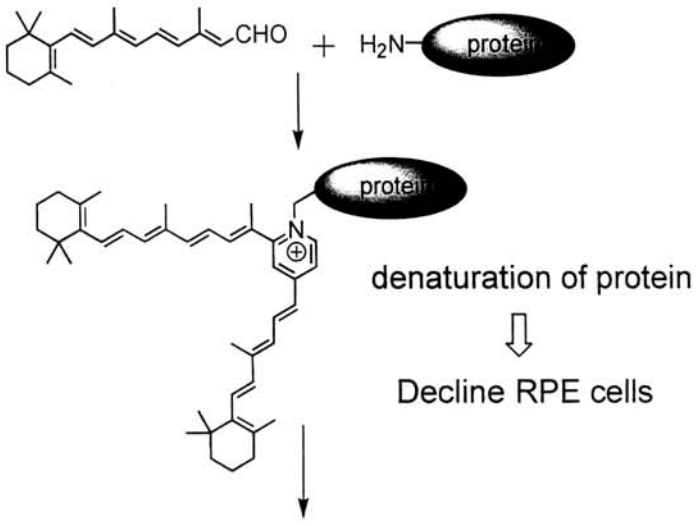
網膜色素上皮細胞中の異常代謝物質に対する化学的研究

青木宏太[1)]、橋本勝[1)]、Janet R. Sparrow[2)]、中西香爾[3)]、奥野智旦[1)]
弘前大農生科[1)]、コロンビア大学眼科[2)]、コロンビア大学化学科[3)]

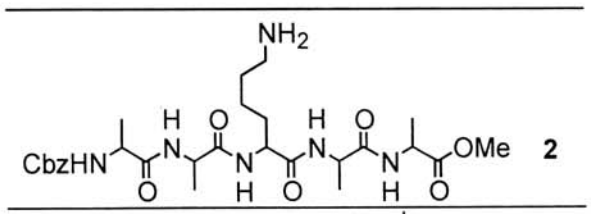
加齢性黄斑変性症(Age-related Macular Degeneration: AMD)は、視野の中心がぼやけてしまう病気であり、文献値によって値は異なるが欧米では 10-30%もしくはそれ以上の老人が症状を持っている。最近では日本人にも増えつつある目の疾病であるが、現在、治療法は存在していない。1988 年に G.E.Eldred らによって老人の網膜から単離され、Nakanishi らによってその構造が決定された蛍光物質 A2E(**1**)は、現在 AMD との関連性についてその研究が展開されている。**1** は 2 分子のレチナールとエタノールアミンとが反応により形成されると考えられているが、エタノールアミンではなくタンパク質のアミン部分と反応が起きた場合も A2-protein といった蛍光色素がタンパク上で形成、即ちタンパク質の変性をもたらし、網膜色素上皮（RPE）細胞を害すると想定できる。

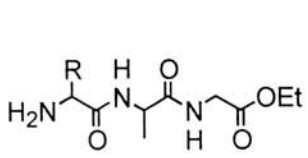


A2E (**1**)



我々はレチナールがアミノ酸やペプチドのアミン部分でも反応し同様な蛍光物質を形成するか検討した。まずタンパク質のリシン残基がそのような反応をするかを調べるため、ペプチド **2** を調製し DMSO 中で酢酸存在下レチナールを作用させたところ A2-ペプチドと考えられる蛍光色素が得られた。このものの構造は ^{1}H-NMR で確認した。次にタンパク質の N 末端での反応を想定して、またペプチド **3**、**4** を合成し同様の反応を行ったところ、N 末端が Gly である **3** の場合は蛍光色素を生成するが、Val（**4**）や Phe（**5**）の場合低収率でしか得る事ができなかった。競争実験では **3** は **4** に比べ約 3 倍速く蛍光色素を形成した。また、**3**、**4** は速やかに酸化されエポキシドを与えることが判明した。以上の知見を基にロドプシンの外側を中心としたペプチド（310Asn-322Cys）を用いて A2-ペプチドの調製を検討中である。





R = H : **3**

R = ^{i}Pro : **4**

R = Bn : **5**

C-03

ナラ類集団枯損に関与するナラ萎凋病菌の生産する植物毒素について

Rafaelea quericivora ○杉山長洋[1]、窪野高徳[2]、佐々武史[1]
([1]山形大農・生物資源、[2]森林総合研究所東北支所)

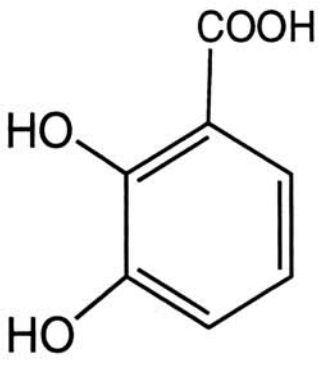
【目的】

現在、日本海側の地域において猛威を振るっているナラ類集団枯損は、カシノナガキクイムシによって伝搬される、アンブロシア菌類 *Raffaelea sp.*によって引き起こされる萎凋病害であると考えられている。本菌の樹体内辺材部における伸展域が黒褐色に変色し、萎凋枯死に深く関与することが示唆されている。

そこで、この病原菌（通称；ナラ菌）のNA9810菌株を人工培養し、本菌のナラの萎凋枯死に関与すると思われる植物毒素について探索する。

【方法及び結果】

本菌株をグルコース-イーストエキスの液体培地で3日間振蕩培養した。この培養菌体を病原性が検討された米ぬか-ふすまの固体培地に植種し、約3週間静地培養した。得られた菌体と培地の混合物をアセトン抽出し、アセトン抽出液の残査水溶液をpH9.0に調整した後、酢酸エチルで抽出して塩基性区抽出物（BN区）を得た。抽出後の残査水溶液を再度pH3.0に調製した後、酢酸エチルで抽出して酸性区抽出物（A区）を得た。それぞれの抽出物で野崎交配春蒔き一号白菜種子を用いたアッセイを行った結果、A区で根に対する褐変を伴う成育阻害が見られた。そこでA区抽出物を展開溶媒100:1 クロロホルム/エタノール(0.3%酢酸)のフラッシュクロマトにより分離し、同様なアッセイを行った。その結果、白菜芽生えの根の部分にナラの萎凋枯死と同様な黒変を示すフラクションがあった。このフラクションについて展開溶媒3:2 ヘキサン/酢酸エチル(0.3%酢酸)のフラッシュクロマトによりさらに詳しく分離した結果、根に対する黒変活性を示す物質をほぼ単一で得ることができた。各種NMRスペクトルの解析等から、今回単離した化合物は2,3-ジヒドロキシ安息香酸と同定した。また、本化合物及び類似化合物の合成標品を用いて行った同様なアッセイでは、2,3-ジヒドロキシ安息香酸のみに幼根の黒変が認められた。本菌は他にも発芽阻害物質などを生産しているが、それらは今後の研究課題である。



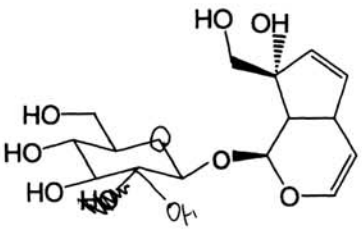
C-04

ギンリョウソウ（*Monotropastrum Globosum*）の成分に関する研究

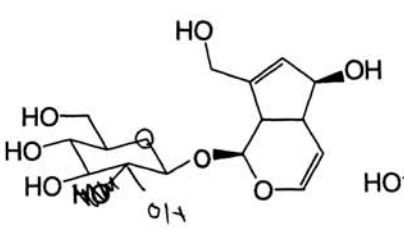
○坂部文孝、小野寺健一、村山哲也、
風間宏、小林優子、池田道正（山形大・農）

【目的】ギンリョウソウはイチヤクソウ科ギンリョウソウ属に属し、山地の林内の薄暗く湿り気のある腐植土に生える多年草で、葉緑素を全く持たない腐生菌根植物である。北海道から九州、沖縄、千島南部、朝鮮半島、台湾、サハリンなどに分布する。草丈は8～20cmで、根は交錯して多数分枝し、塊状に集合してもろい。茎は単一で直立し、通常白色で乾燥すると黒変する。葉は鱗状で互生し、長さは7～20mm、花期は6～8月で茎頂に筒状鐘形花を下垂して単生する。また、根を含む全草は漢方薬（水晶蘭）として使用されており、主に強壮、強精、鎮咳などの効果があると報告されている。本研究では、植物体が傷ついた時などに出現する紫色の色素の溶出と植物体より抽出した成分のうち、強い成長阻害活性の認められた画分に含まれる原因物質の検索を研究目的とした。

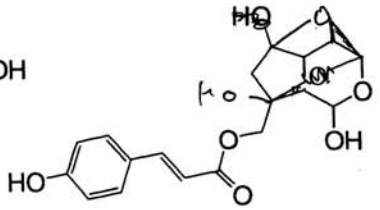
【方法および結果】山形県朝日村より採取したギンリョウソウ地上部を凍結乾燥した後、メタノールに浸漬し得られたメタノール抽出物をDIAION-HP20カラムクロマトグラフィーに付し、水溶出画分、メタノール溶出画分、クロロホルム溶出画分に分画した。各画分において生物活性を調べたところ、メタノール画分において強い成長阻害活性が認められたことからこの画分からの化合物の単離を試みた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODSカラムクロマトグラフィーにより、3種類の化合物を得た。3種の化合物のうち2種は、各種NMRスペクトル、質量分析の結果から、既知のイリドイド配糖体であるerantemoside (**1**)とaucubin (**2**)とそれぞれ同定した。一方、化合物**3**のNMRスペクトルからはイリドイド特有の3位の二重結合が消失していた。また，化合物**3**のアセチル化物の分子量（*m/z* 474）から，環状構造が一つ増えた構造が示唆され，HMBC等のデータから3位と8位がエーテル結合した図のような特異な構造を持つものと推定した。化合物**3**の立体構造の詳細については現在検討中である.



erantemoside (1)



aucubin (2)



(3)

C-05

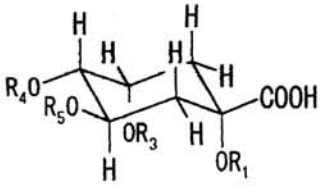
ハスカップ及びその加工品の抗酸化活性

（[1]道東海大・生物工、[2]株式会社 ホリ）○小栗牧人[1]、西村弘行[1]、堀 均[2]

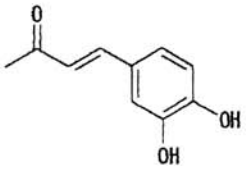
【目的】ハスカップは、和名クロミノウグイスカグラ(*Lonicera caerulea L.*)と称し、寒冷地に特徴的な小果樹である。その果実は昔から「不老長寿の妙薬」と呼ばれていることから、演者らはその抗酸化活性物質の解明を行った。また、ハスカップの加工飲料製品の一つ「ドラキュラの葡萄」((株)ホリ製）についても抗酸化活性の比較を行った。

【方法】実験材料としては北海道美唄市で栽培されたハスカップ果実及びハスカップ濃縮ジュース製品「ドラキュラの葡萄」((株)ホリ製）を用いた。常法に従って酢酸エチル、n-ブタノール、水、の順番に抽出・分配し、抗酸化活性を比較しながらPHの差による分離とHPLC(YMC-Pack ODS 250×20 mmI.D.)による分取を行い、得られたフラクションをNMR及びMSにより構造解析した。抗酸化活性検定は、in vitroアッセイ系として、DPPHラジカル捕捉試験で調べた。

【結果及び考察】極性の差及びpHの差による分画の結果、酢酸エチル抽出物有機酸性物質画分にラジカル捕捉活性が確認された。これまでに知られているハスカップ中の抗酸化活性物質であるアントシアニン類を含む水溶性画分よりもその値は高く、アントシアニン類以上の抗酸化能を持つ物質の存在が示唆された。HPLCにより単離したその成分中の物質を、各種スペクトル解析により、protocatechuic acid(3,4-Dihydroxybenzenic acid)、5-caffeoylquinic acid、1,5-dicaffeoylquinic acidと同定した。さらに、ハスカップ果汁のヒト介入検定により血漿中の過酸化リン脂質の低下が認められていることから、ハスカップ果実が生活習慣病予防食材として期待される。

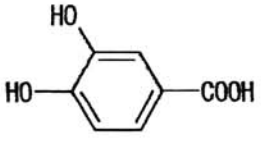


CA:



R1=R3=R4=H, R5=CA : 5-Caffeoylquinic acid

R1=R5=CA, R3=R4=H : 1,5-Dicaffeoylquinic acid



Protocatechuic acid
(3,4-Dihydroxybenzenic acid)

図 ハスカップ果実および加工ジュース中の抗酸化活性物質

C-06

ヤーコンの抗酸化活性および加工による変動について

(道東海大・生物工)○畠山　尚人、木村　卓郎、西村　弘行

【目的】ヤーコンは南米アンデスが原産のキク科の根菜類で、現地の人たちは、昔から塊根は果物として生食していた。現在、塊根部は、整腸作用に関与するフラクトオリゴ糖を多量に含むことで知られている。また、ヤーコンは病虫害抵抗性を持っていることから無農薬栽培が、一般に行われている。植物防御の観点からすでに、ヤーコンの葉や、塊根部から抗菌活性物質と殺虫活性物質が単離・同定されている。

一方、ヤーコンは生活習慣病の予防効果を持つことで知られ、特に動脈硬化予防に関与する抗酸化活性物質として、葉からカフェー酸や、クロロゲン酸などのポリフェノールが同定されている。しかし可食部である塊根部中の抗酸化活性物質については明らかにされていなかった。そこで、ヤーコンの器官別の抗酸化活性を調べ、さらに近年、ヤーコン葉を焙煎したお茶が多量に販売されていることから、焙煎加工による抗酸化活性の変動について調べたので報告する。

【方法】ヤーコンの栽培は北海道東海大学夕張バイオ試験農場およびキャンパス内圃場で行い、収穫期の植物地上部および根部の各器官を実験に供した。ヤーコン乾燥葉(非焙煎葉)および焙煎葉は㈱北海道バイオインダストリーより提供していただいた。生材料は、常法に従い有機溶媒抽出あるいは更に ODS カラム分画を行い DPPH ラジカル捕捉活性を指標に、その抗酸化活性物質を調べた。茶葉は、熱水抽出(90℃ 1 時間)物を同様に調べ、更に HPLC によりカフェー酸およびその誘導体について定量比較を行った。

【結果および考察】(1)ヤーコンの器官別抗酸化活性は根部に比し葉部に高い活性が認められたが、貯蔵根(可食部)、側根に比し地下茎不定芽球(いわゆる種子芋)が著しく高い活性を示した。葉部についても普通葉、脇葉に比し頂葉(暖地では頂花を分化させる)に高い活性が見られる。成長段階と活性物質の関連に興味が持たれる。(2)ヤーコン乾燥葉の熱水粗抽出液の抗酸化活性は非焙煎葉と焙煎葉との間に大きな活性の差は認められなかった。非焙煎葉抽出物の HPLC 分析によりカフェー酸、クロロゲン酸を同定したが、焙煎葉の HPLC クロマトグラム上にそれらを検出していない。

現在、焙煎条件の違いと抗酸化活性物質変動の関連性の有無を検討中である。

C-07

ネギ属含硫化合物のヒトLDL酸化抑制効果(第3報)

(1北東海大院、2東北大院・農)

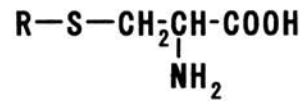
○舘下　孝太郎1、西村　弘行1、樋口　央紀2

[目的] 21世紀高齢化社会に伴って補完・代替医療の関心が国民の間に高まっている。特に国民医療費が増大する中、治療医学から予防医学の重要性が増している。このような状況下で、道産機能性食材およびその加工品の生体調節機能とその機能性に関与する活性物質を解明することは重要である。演者らはこれまでにタマネギ、ギョウジャニンニク等ネギ属成分の血小板凝集阻害活性について報告してきた[1)]が、今回は、ネギ属中の各種含硫化合物を合成し、それらのヒトLDL酸化抑制効果をin vitroで検証し、構造と活性との関係を考察したので報告する。

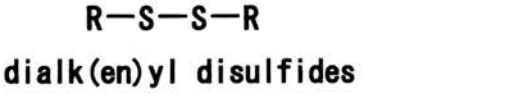
[方法] ネギ属含硫化合物として、S-alk(en)yl-L-cysteines(R=CH_3,$CH_3CH_2CH_2$,CH_2=$CHCH_2$)およびそれらのsulfoxides、dialk(en)yl disulfidesおよびtrisulfides[R=CH_3,CH_3CH_2,$CH_3CH_2CH_2$,$(CH_3)_2CH$,$CH_3CH_2CH_2CH_2$,CH_2=$CHCH_2$)、vinylditiinsの合成を行った。

調製した含硫化合物の抗酸化活性は常法に従って、銅イオンによるLDL変性の制御効果を指標に調べた。すなわち、ヒトLDLを含硫化合物と酸化促進インデューサーである硫酸銅と共にインキュベート(37℃)し、ロダン鉄法によってLDL酸化抑制効果を調べた。

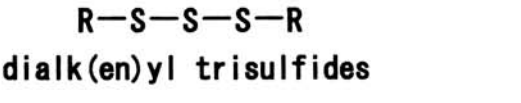
[結果および考察] 含硫アミノ酸ではsulfoxideアミノ酸がsulfideアミノ酸より抗酸化活性が高く、中でもS-metyl-L-cysteines sulfoxideの活性が高かった。この結果は活性酸素との反応性の高さに由来するものと考えられる。また、タマネギ由来の揮発性trisulfideはヒトLDL酸化抑制効果が高く、含硫アミノ酸や揮発性disulfideよりも高い活性を示した。



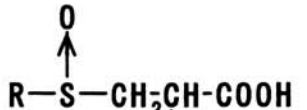
S-alk(en)yl- L-cysteines



dialk(en)yl disulfides



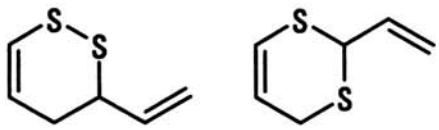
dialk(en)yl trisulfides



S-alk(en)yl- L-cysteine sulfoxides

R=CH_3, $CH_3CH_2CH_2$, CH_2=$CHCH_2$

R=CH_3, CH_3CH_2, $CH_3CH_2CH_2$, $(CH_3)_2CH$, $CH_3CH_2CH_2CH_2$, CH_2=$CHCH_2$



vinyldithiins

C-08

海浜植物ハマエンドウ由来のラジカル捕捉活性物質の構造

(1北大院地球環境・2道東海大生物工)
○西田　純[1]・鈴木　稔[1]・西村　弘行[2]

【目的】酸化ストレスによって生じる活性酸素などのフリーラジカルは、生体障害の原因の一つで、ガンや動脈硬化などの生活習慣病を引き起こすと考えられている。従って、この酸化ストレスを防ぐことができれば、これらの病気を予防できる可能性がある。

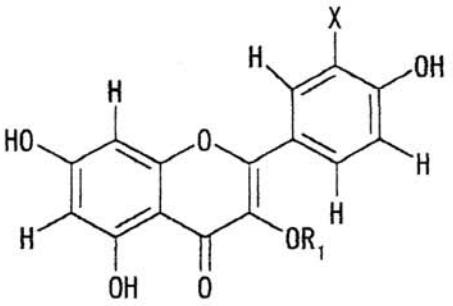
海浜植物は、海岸特有の厳しい立地条件（養分･水分の欠乏、潮風、強風、強烈な紫外線など）の下で生育している。北海道石狩浜でも、ハマボウフウ（セリ科)、ハマエンドウ（マメ科)、ハマハタザオ（アブラナ科)、ハマムギ（イネ科）などの多年草が群落を形成している。これらの海浜植物は自らを護るために酸化ストレスに対する防御機構を備えていることが示唆される。私たちは、ハマエンドウ（*Lathyrus maritimus* Bigel）からラジカル捕捉活性を指標として分離を行い、数種の化合物を単離し構造解析を行ったのでその結果について報告する。

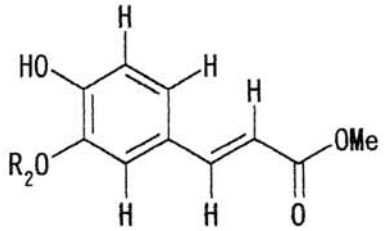
【方法】ラジカル捕捉活性試験法については、試料/エタノール溶液（1mg/ml）を100μl とり、これに Tris/HCl 緩衝溶液（50Mm、pH=7.4）400μl と DPPH (DPPH=1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) /エタノール溶液（300μM）500μl を加えて 20 分間室温、暗所で放置後、分光光度計で 517nm での吸光度の減少を測定した。

【結果】石狩浜より採取されたハマエンドウより、6 種の化合物（Maritin A～F）を単離した。各化合物の構造は、1D および 2DNMR、MS スペクトルデータを詳細に解析し、さらに既知化合物のデータと比較することによって、1-6 式と決定した。

Maritin A は同じマメ科のエンジュのつぼみに多量に含まれている Rutin と同定した。

また、7 種の化合物（1～7）のラジカル捕捉活性試験の結果についても報告する。





1:Maritin A, R_1=Glcose-Rhamnose, X=OH (Rutin)
2:Maritin B, R_1=Glcose-Rhamnose, X=H
3:Maritin C, R_1=hexose, X=H
4:Maritin D, R_1=H, X=H (kaempferol)
7:Quercetin, R_1=H, X=OH

5:Maritin E, R_2=OH
6:Maritin F, R_2=Me

C-09

フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構（12）
－プロトカテキュ酸メチルの 2 位付加体の構造－

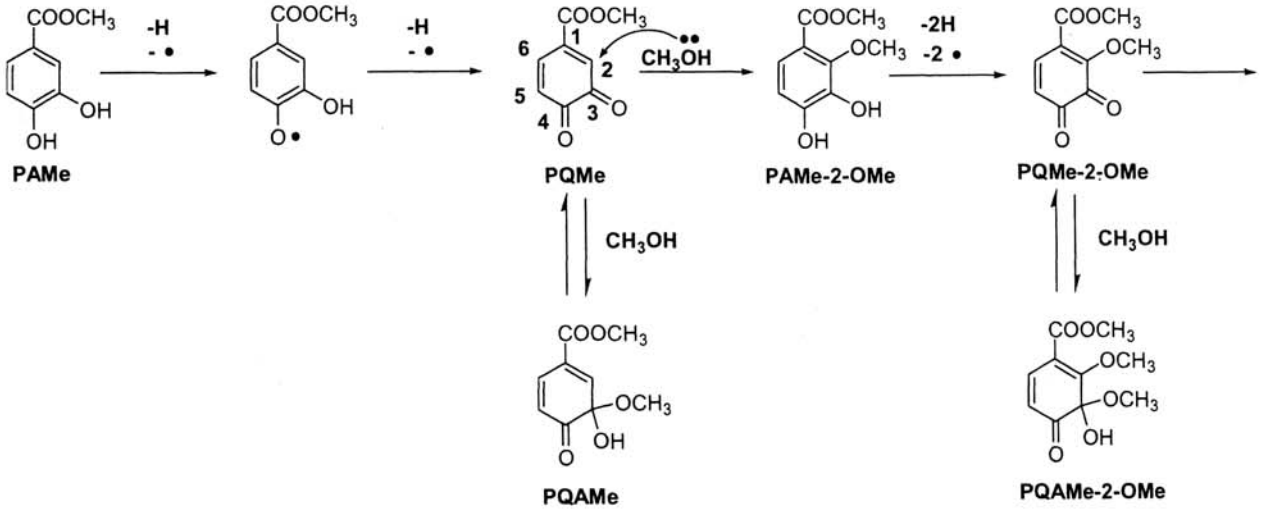
（北大院農・応生科、*現藤女大・人間科）　○齊藤静夏、川端　潤、葛西隆則*

【目的】プロトカテキュ酸メチル（PAMe）は、アセトニトリルなどの非プロトン性溶媒中で DPPH ラジカルと反応すると 2 当量のラジカルを消去してキノン体に酸化されるのに対し、メタノールなどのプロトン性溶媒中では、さらに多く約 5 当量のラジカルを消去する。この反応メカニズムの違いについて検討した結果、メタノール中ではキノン体およびそのアセタール体 [1]に変換された後、キノン体に対する溶媒分子の付加が起きている可能性が示唆された。そこで今回は反応溶液中から付加体の探索を行った。

【方法および結果】 メタノール中での PAMe と DPPH ラジカルの反応液を NMR で分析すると、既に報告したキノン体（PQMe）とアセタール体（PQAMe）のシグナルの他に、δ 5.83 にも 5 位プロトンと思われるダブレットのシグナルが観測される。このシグナルは溶媒であるメタノールが 2 位に付加した生成物のものであると予想した。そこで PAMe の 2 位メタノール付加体（PAMe-2-OMe）を合成し、アセトニトリル中、オルト過ヨウ素酸で酸化したところ、生成したキノン体（PQMe-2-OMe）の 5 位プロトンは δ 6.20 に観測された。また PAMe-2-OMe をメタノール中、同様に酸化したところ、5 位プロトンと考えられるダブレットのシグナルがキノン体の δ 6.19 の他に δ 5.83 にも観測され、これは PAMe の未知酸化生成物の化学シフトと一致した。PQMe/PQAMe の比較でキノン体の 5 位プロトンの化学シフトは 3 位アセタール化によって高磁場シフトすることから δ 5.83 はアセタール体（PQAMe-2-OMe）のシグナルであると推定された。

次に、種々の求核試薬の 2 位への付加反応性について検討した。求核試薬として *N*-(carbobenzyloxy)cysteine benzyl ester（SH）を調製し、アセトニトリル中、プロトカテキュ酸（PA）をオルト過ヨウ素酸で酸化して生成したキノン体（PQ）と反応させると SH の 2 位付加物が生成した。

1) 齊藤ら、農化道支部会、2002.8、帯広、B-7.



C-10

フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(13)

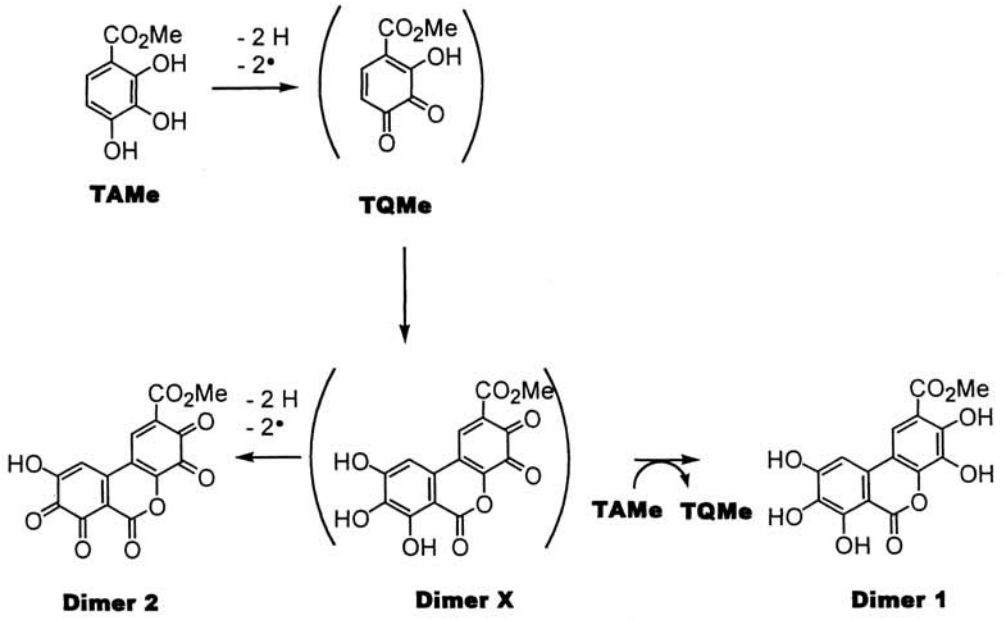
—2,3,4-トリヒドロキシ安息香酸のメタノール中での酸化反応—

（北大院農・応生化、*現藤女大・人間科）○児玉明香、川端 潤、葛西隆則*

【目的】2,3,4-トリヒドロキシ安息香酸メチル(TAMe)の DPPH ラジカル消去活性はメタノール中で 4.9 当量、アセトニトリル中で 3.8 当量である。ピロガロール型フェノールカルボン酸類のラジカル消去反応機構解明の一環として、この TAMe を種々の酸化剤により酸化させた結果、アセトニトリル中でのオルトクロラニルとの反応においてキノン体(TQMe)を経て新規二量体ラクトン(Dimer 1)が生成したことをすでに報告した。[1] 今回はプロトン性溶媒であるメタノール中での TAMe のオルトクロラニルによる酸化反応をNMRおよびHPLCにより追跡し、アセトニトリル中での反応機構との比較を行った。

【方法および結果】メタノール中、TAMe をオルトクロラニル1当量もしくは2当量で酸化させ HPLC 分析に供すると、アセトニトリル中での場合と同様出発物質以外に Dimer 1 のピーク、およびアセトニトリル中では検出されない未知のピークも検出された。同様の反応を NMR により経時的に観察すると、Dimer 1 のシグナルはほとんど検出されず、Dimer 1 に対応するビスキノン体と思われる Dimer 2 が反応直後に生成し、経時的に増加していくことがわかった。このことから、アセトニトリル中では酸化反応が穏やかに進行するため、反応液内に存在している TAMe によって生成二量体 Dimer X の還元がおこり、それに対してメタノール中ではアセトニトリル中よりも反応が速く TAMe が消費されてしまうために過剰の酸化剤によりDimer 2への酸化がおきていると推測された。メタノール中の反応液ではアセトニトリル中と共通な生成物のほかに、メタノール中のみに特徴的な生成物のピークも複数見られた。メタノール中での反応生成物の NMR パターンはアセトニトリル中のそれよりも単純であり、現在他の未知ピークの構造について検討中である。

[1]児玉ら、農化道支部会、2002.8、要旨集 B-8



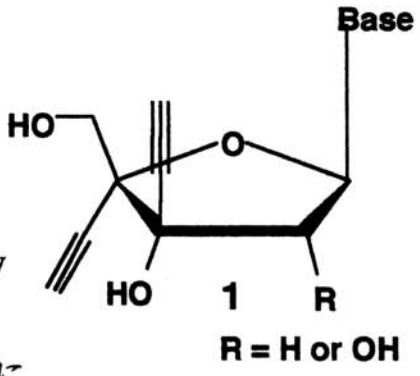
C-11

3’，4’－*C*－ジエチニルヌクレオシドの合成研究

○中村歩　，大類洋（東北大生命）

（目的）

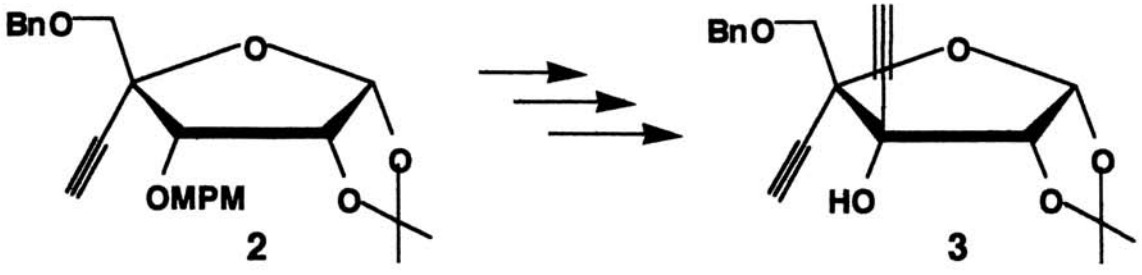
生理活性を有する修飾ヌクレオシドの多くは糖部を修飾したものであるが，4’位を修飾したものは化学変換の手がかりが少なく，その合成の困難さから報告例は多くない。しかしそれらの中には優れた生理活性を有するものが多く，当研究室で以前合成された，4’－*C*－エチニルヌクレオシドは強い抗 HIV 活性に加え，*in vivo* において優れた抗白血病活性を有していた。また3’位を修飾したヌクレオシドの中には，抗生物質として古くから知られているコルジセピンや，代表的な抗 HIV 薬である AZT などがあり，近年では3’位にエチニル基を導入した 3’－*C*－エチニルヌクレオシドが優れた抗腫瘍活性を示したという報告例もある。



本研究では，新規の糖部修飾ヌクレオシドとして，それぞれ優れた生理活性を有する 4’－*C*－エチニルヌクレオシドと 3’－*C*－エチニルヌクレオシドの両方の構造を併せ持つ，3’，4’－*C*－ジエチニルヌクレオシド **1** を設計し，その合成と生物活性の検討を行うことを目的とする。

(方法及び結果)

安価で入手の容易な D－グルコースを出発原料として，11 行程で化合物 **2** を合成し，3 位の MPM 基を DDQ で選択的に脱保護し，3 位の水酸基を Swern 酸化でケトンとした後，Grignard 反応でエチニル基を導入してカギ中間体である化合物 **3** を合成した。現在種々の塩基との縮合方法を検討中である。



C-12

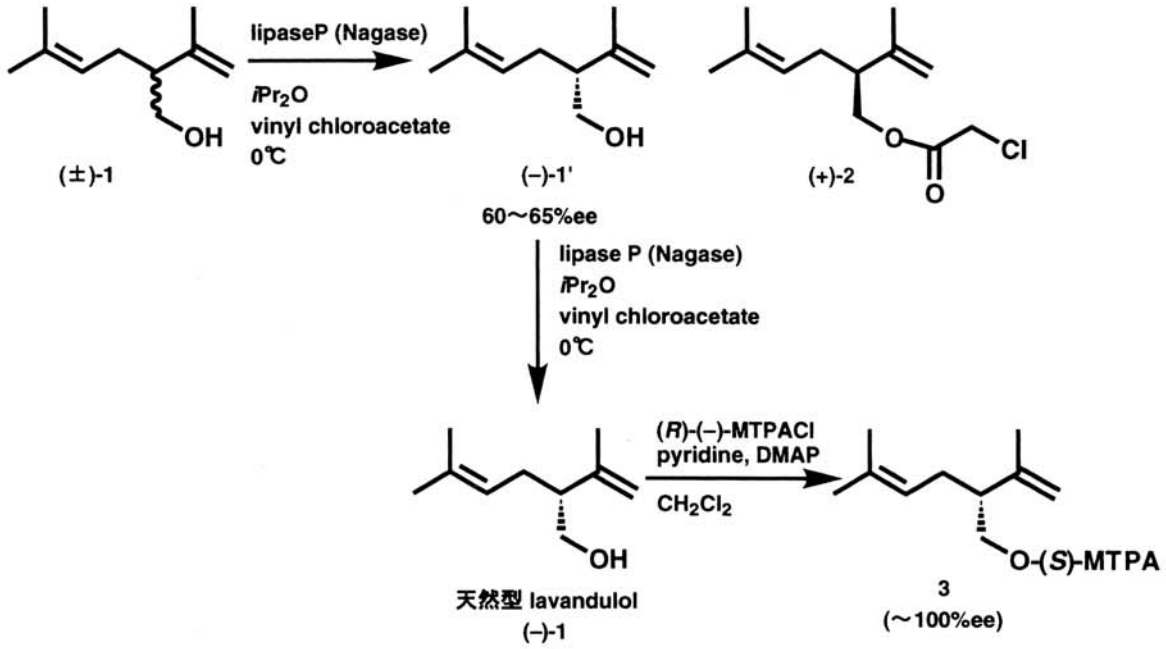
リパーゼを用いた天然型 lavandulol の調製

東北大院・農・応生科
○滝川真弥、清田洋正、桑原重文

Lavandulol (**1**) はフレンチラベンダーの香気成分として 1942 年に Shinz、Seidel によって単離[1] された。現在安価なラセミ体が工業的に合成されている。しかし、両鏡像体の香気活性の差異については分かっていない。そこで、本研究ではリパーゼを用いて光学分割の検討を行い、香気を調べることを目的とした。

＜リパーゼを用いた不斉アシル化＞

(±)-Lavandulol を lipase P(Nagase)を用いてアシル化反応に供し、光学活性なエステル(**2**)とアルコール(**1'**)(60～65%ee)を得た。(–)-**1'**の purity を向上させるため、更に同様の条件でアシル化反応を行い、純粋な(–)-**1** を得た。このことは(*s*)-MTPA エステルに誘導し、^{19}F-NMR スペクトルにより～100%ee と決定した。



1) H. Schinz & C. G. Seidel, *Helvetica Chimica Acta*, **1942**, *25*, 1572

C-13

Phloroglucinol配糖体の合成研究

○福士　幸治、田原　哲士（北大院農・応生科）

【目的】マメ科 *Tadehagi triquetrum* に含まれる phloroglucinol 配糖体、3,5-dihydroxyphenyl β-D-glucopyranoside (6) および 3,5-dihydroxyphenyl 6-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl-β-D-glucopyranoside (10) を合成する。

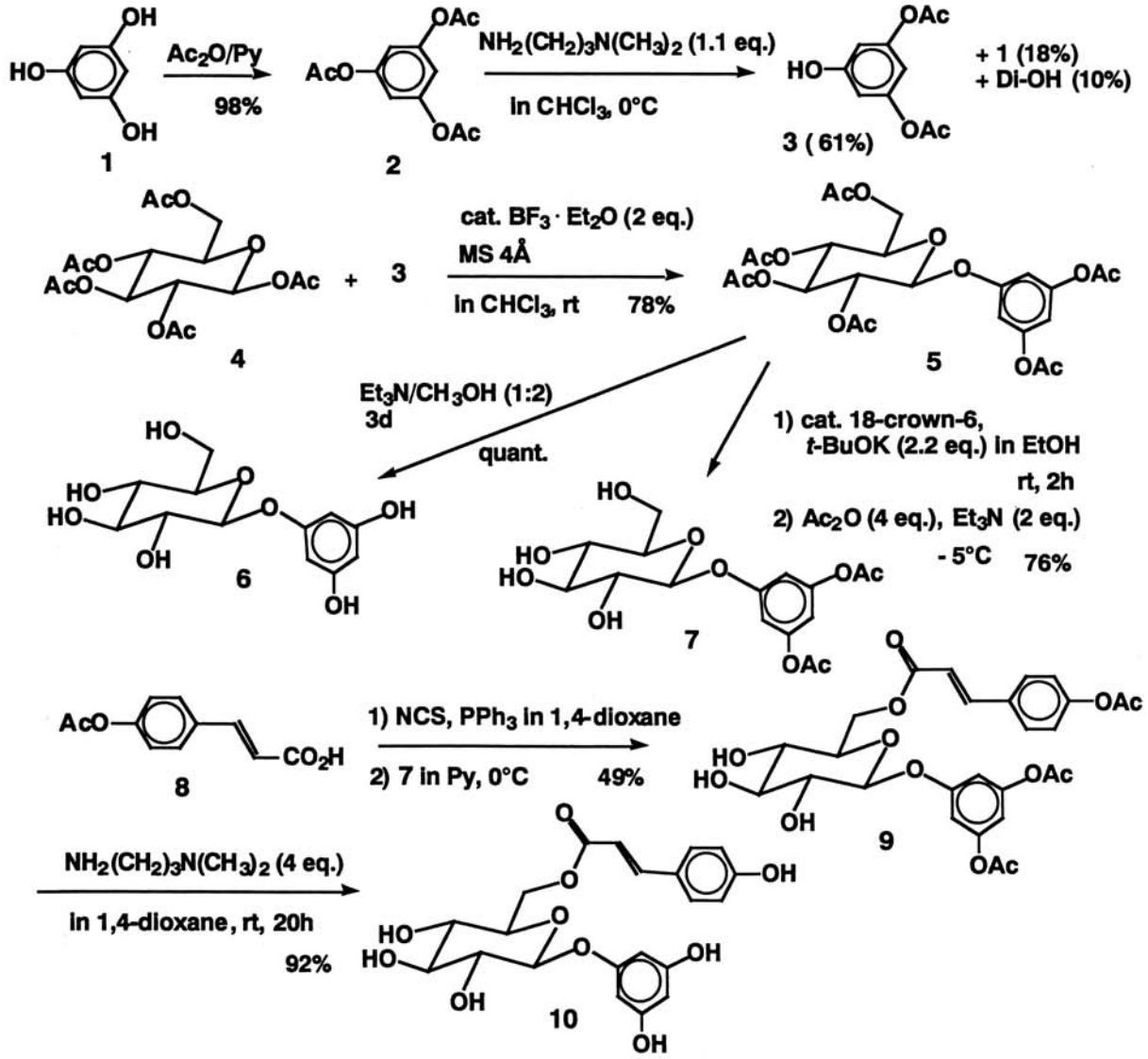
【方法と結果】以下のスキームで合成した。このスキームの特徴は、次のとおりである。

1）保護基としてアセチル基のみを用いた。

2）選択的脱アセチル化反応に *N*,*N*-dimethyl-1,3-propanediamine を用いた。

3）配糖体中のフェノール性水酸基を選択的にアセチル化するためエタノール中で反応した。

4）選択的アシル化のため、カルボン酸を *N*-chlorosuccinimide/ triphenylphosphine を用いかさ高い活性中間体に誘導した。



C-14

Kojibiose phosphorylaseによるGlucosylraffinoseの合成とNMR解析

高橋夏子[1]、○岡田秀紀[1]、福士江里[2]、小野寺秀一[1]、
西本友之[3]、川端　潤[2]、塩見徳夫[1]
（酪農大院・食品科学[1]、北大院・農[2]、林原生化研[3]）

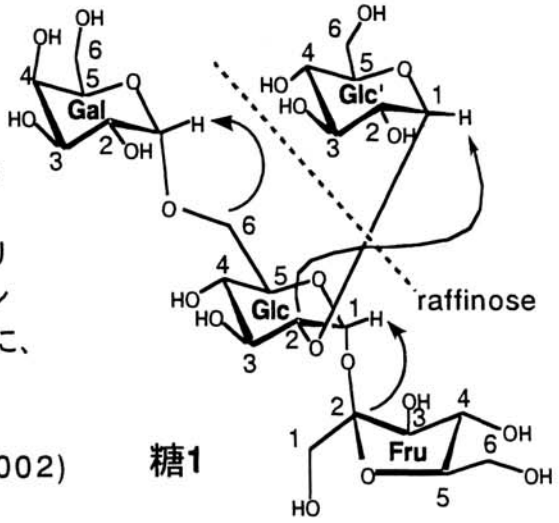
【目的】我々はすでに1[F]-β-D-fructosyltransferaseあるいはkojibiose phosphorylaseを用い、mono-およびdi-fructosyllactosucrose[1)]あるいは2(2-α-D-glucosyl)$_n$isokestose(n=1,2,3)、2(2-α-D-glucosyl)$_n$nystose(n=1,2)[2)]を合成した。

今回はkojibiose phosphorylaseの合成反応を利用し、β-D-glucopyranose 1-phosphate (β-G1P)をglucose供与体とし、raffinoseを受容体として新しいオリゴ糖の創製を試みた。

【方法】*Thermoanaerobacter brockii* 由来遺伝子を大腸菌で発現させた組換えkojibiose phosphorylaseを用いた。1.0% β-G1P、2.0% raffinose、0.1M 酢酸緩衝液を混合し50℃で48時間温浴後、100℃で5分間加熱し反応を止めた。さらにinvertaseを添加し、37℃で1時間処理して残存するraffinoseを分解した。酵素反応液について、エタノールのステップワイズグラジエント溶出による活性炭クロマトグラフィー及び調製用HPLC(ODSカラム,20mm×25cm)を行ない糖**1** を単離した。

【結果】糖**1** は非還元性でTOF-MS分析により689の$[M+Na]^+$イオンピークを与えた。糖**1** の完全メチル誘導体メタノリゼートのGLC分析では、methyl 1,3,4,6-tetra-*o*-methyl-D-fructoside、methyl 2,3,4,6-tetra-*o*-methyl-D-glucoside、およびmethyl 2,3,4,6-tetra-*o*-methyl-D-galactosideが検出された。しかし、glucose (Glc')が転移したと推定されるglucose残基(Glc)のメチル誘導体のピークについては同定が困難であったため、さらに糖**1** についてNMRによる解析を行った。3個のアノメリックプロトンおよびカーボンからCOSY、HSQC、HSQC-TOCSY、により各残基のシグナルを帰属し、それぞれをJ(H3,H4)値からGlcまたはGlc'およびgalactose(Gal)と決定し、fructose(Fru)はHMBCも併せて帰属した。

各残基は図示したHMBC相関によりつながりを明らかにした。以上により糖**1** のプロトンおよびカーボンシグナルを帰属するとともに、構造を2[G]-α-D-glucopyranosylraffinoseであると決定した。



糖**1**

1) Magn. Reson. Chem., 40, 541-544 (2002)
2) Carbohydr. Res., 投稿中 (2002)

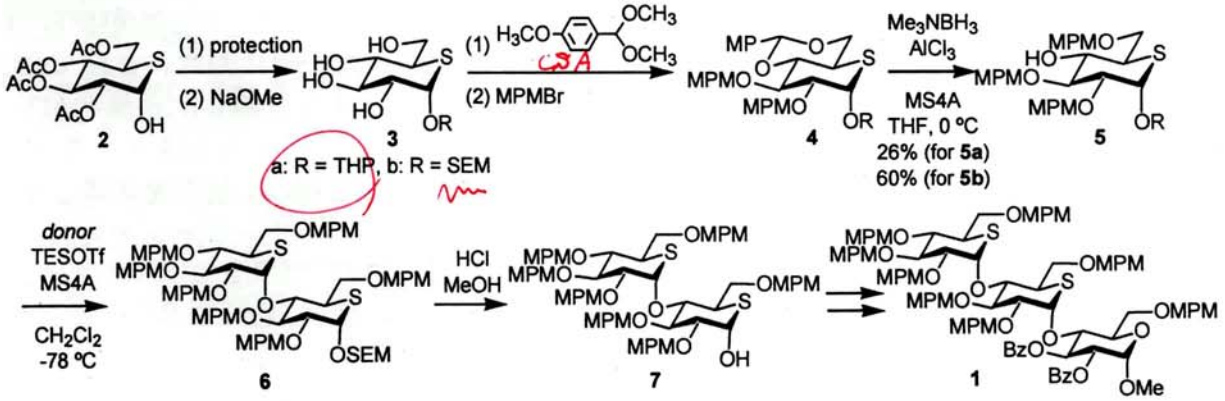
C-15

環内に硫黄原子を有するチオマルトトリオース誘導体の合成

○森井康晴[1]・松田寛子[2]・大原啓一郎[1]・橋本勝[1,2]・宮入一夫[1,2]・奥野智旦[1,2]

([1]弘前大農生科、[2]岩手連大)

ピラノース環内酸素原子を硫黄原子で置換した誘導体は、優れたエンド型グリコシダーゼ阻害剤になると期待できる。なぜなら、(i) 硫黄は酸素と静電気的性質が類似しており、(ii) チオアセタールは酸加水分解に比較的安定である、からである。また、オリゴ糖に展開していく場合、チオピラノースとすることによって、(iii) オリゴマー化に伴う構造の変化を環構造が吸収し、天然基質との構造の違いが最小になると期待できる。以上のコンセンプトに基づき、環内に硫黄原子を有するオリゴチオサッカリドの合成研究を展開中である。これまでに、チオイソマルトテトラオース誘導体の合成を行っている。今回、チオマルトトリオース誘導体 (**1**) の合成を行ったので報告する。



すでに、4 位遊離の 1,2,3,6-テトラアセチル-5-チオグルコピラノースを報告している[1]。しかし、これまでの実験から効率的なグリコシル化および脱保護を行うためには、グリコシルドナーの 2 位は MPM エーテルであることがふさわしいと予想した[2]。そこで、既知の **2**[3] の 1 位水酸基を MOM、THP、あるいは SEM 基で保護した。MOM 基は後の段階で除去が困難であることが判明した。1 位を THP または SEM 基で保護した **3a**、**3b** の 4,6-位をパラメトキシベンジリデンアセタールとして保護し **4a**、**4b** とした。次の MPM 化は、MPMBr[4] を用いることにより速やかに進行した。**4a** の 4,6-位のパラメトキシベンジリデンアセタールの選択的還元において、THP 基の切断も進行してしまうことが判明した。一方、**4b** は、この反応条件下で SEM 基を損なうことなく還元反応が可能であり、**5b** を与えた。さらにこれまでの知見を応用して、ジサッカリド **6** に導いた。次に、塩酸を用いて選択的に **6** の SEM 基を除去して **7** とし、さらにグリコシル化を行って **1** を得た。

参考文献

1) 松田、大原、橋本、宮入、奥野、**2001**、日本農芸化学会 2001 年度大会要旨、p.248.

2) 松田、大原、藤田、橋本、宮入、奥野、**2002**、日本農芸化学会 2002 年度大会要旨、p.219.

3) Izumi M.; Suhara Y.; Ichikawa Y., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 481.

4) PBr_3, MPMOH/Et_2O によって調製した。

C-16

オリゴチオ糖の合成における保護基の検討

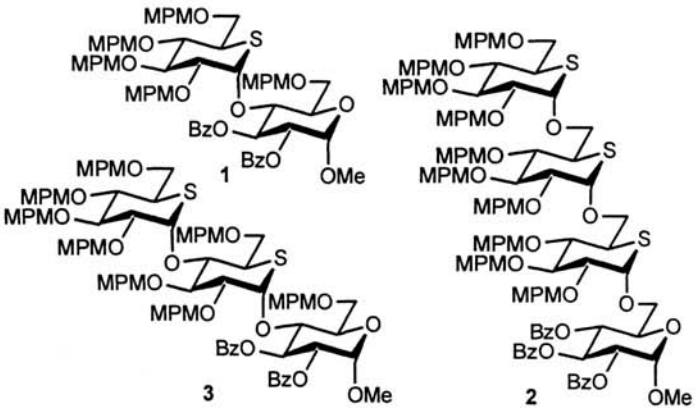
○松田寛子[2]・森井康晴[1]・橋本勝[1,2]・奥野智旦[1,2]

([1]弘前大農生科、[2]岩手連大)

前講演で述べたように我々はオリゴチオ糖の合成を展開中である。しかし、チオ糖に含まれるスルフィドは、(1) 酸化されやすいこと、(2) 触媒毒になること、また、(3) 安定性を考慮すると1位をチオアセタールとすることができないこと、ということが考えられるため、使用できる保護基は制限される。我々は、オリゴチオ糖合成研究に有用な保護基の応用を検討した。

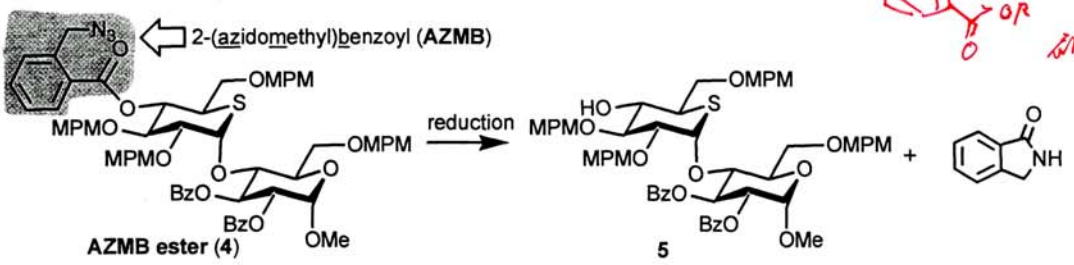
効率的な MPM 基除去法の開発

予備実験として、Bz、MPM 基を有するジサッカリド **1** を用いて脱保護を種々検討した。**1** の DDQ 処理による MPM 基の酸化を行ったところ、反応により生成したヒドロキノン体と脱保護体とのシリカゲルカラムでの分離が非常に困難であった。一方、塩基処理によってエステルを除去後、DDQ による MPM 基の脱保護を行ったところ、生成物は極めて高極性となることから精製が容易になり、望む無保護体を得ることができた（二工程、77%）。本法は、**2**、**3** の脱保護にも応用可能であった。



オリゴチオ糖の合成に有用な保護基の応用[1,2]

下に示した 2-(azidomethyl)benzoyl（AZMB）基の応用を検討した。このエステル保護基は、アジド基の還元により分子内アミド化反応が進行し、他のエステルと区別して除去可能である。我々はフタリドを出発物質とした調製法を新たに開発した（四工程、74%）[1]。これをマルトース誘導体 **4** に応用したところ、他の保護基に影響を与えることなく AZMB 基は容易に脱保護可能であることが判った（→**5**）。



以上の MPM 基および AZMB 基とを併用することにより、分岐型のオリゴチオ糖の合成も可能となると考えている。

参考文献

1) Matsuda, H.; Hashimoto, M.; Okuno, T., *Syn. Commun.*, **2002**, *32 (21)*, 3347-3355.

2) Wada, T.; Ohkubo, A.; Mochizuki, A.; Sekine, M., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 1069-1072.