春季合同学術講演会

講　演　要　旨

日時：平成15年7月29日（火）

会場：北海道大学百年記念会館

日本農芸化学会北海道支部

日本土壌肥料学会北海道支部

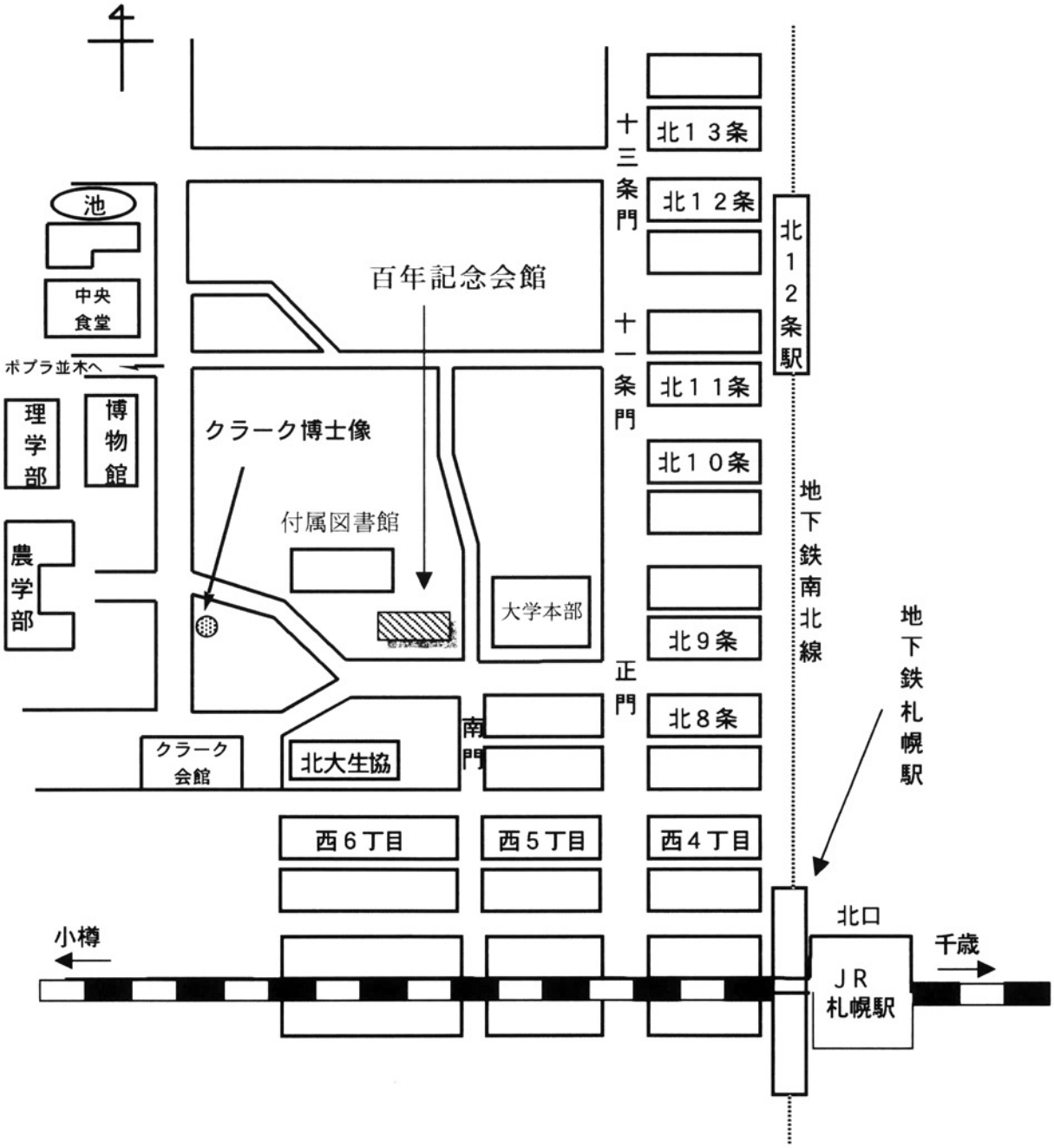
日本食品科学工学会北海道支部

日本応用糖質科学会北海道支部

北海道農芸化学協会

北海道大学百年記念会館までの交通アクセス

・札幌駅到着後、西改札口を出て、北口へお進み下さい。北海道大学百年記念会館までは北口より、徒歩、約 10 分です。下記、位置図をご参照下さい。また、懇親会会場となります「きゃら亭」は同会館内にございます。



春季合同学術講演会

1) 日時：平成 15 年 7 月 29 日（火）

2) 会場：北海道大学百年記念会館

3) 一般講演（9：00～,プログラムは別掲）

講演様式：OHP（シートの交換係はおりません。）

講演時間：討論を含め 15 分

4) 日本農芸化学会北海道支部総会（15:30～）

第 1 回日本農芸化学会北海道支部奨励賞・学生会員奨励賞授与式

5) 特別講演

16：00　座長：伊藤浩之（北大院農）

α-Glucosidase 変異酵素が触媒するα -Glycosynthase 反応　奥山正幸
（2003 年度日本農芸化学会論文賞）　（北大院農学研究科）

16：20　座長：山口淳一（北大院農）

北海道における衛星データを利用した良食味米の生産支援　安積大治
（道立中央農試・岩見沢）

16：50　座長：川端潤（北大院農）

有機化学と生態学・境界農学をつなぐ植物着生微生物の機能性解明　橋床泰之
（2003 年度日本農芸化学会奨励賞）　（北大院農学研究科）

6) 懇親会：北海道大学百年記念会館内きゃら亭（17:30～）

春季学術講演会プログラム

タイムテーブル

・一般講演　9：00-11：45、13：00-15：30
・日本農芸化学会北海道支部総会　15：30-16：00
・特別講演　16：00-17：20
・懇親会　18：00-

場所）懇親会以外は百年記念会館大会議室にて行ないます。
懇親会は百年記念会館内、きゃら亭で行ないます。

一般講演プログラム（講演時間：12 分、討論：3 分、○印：講演者）

座長：福士幸治

9：00 (1) 重水素ラベルセオブロキシドの合成とセオブロキシド定量法の確立
（北大院農・応生科）○太田希岐、上野陽司、松浦英幸、吉原照彦

9：15 (2) 大徳寺納豆および浜納豆のラット小腸スクラーゼ阻害成分
（北大院農・応生科） ○林部和人、高木大介、川端　潤

9：30 (3) オレガノ(*Origanum vulgare*)からの DPPH Radical Scavenging 化合物の単離
（北大院農・応生、ノーステック財団[1]、藤女大院・人間生活[2]、
（社）植物情報物質研究センター[3]）○松浦英幸、 知地英征[2]、
浅川智香子[1,3]、天野みどり[1]、吉原照彦、水谷純也[3]

9：45 (4) ヤーコン葉中の抗酸化活性物質および加熱処理による成分変化に関する研究
（道東海大・生物工[1]、（株）北海道バイオインダストリー[2]）畠山尚人[1]、木村卓郎[1,2]、斉藤昭彦[2]、西村弘行[1,2]

座長：松浦英幸

10：00 (5) チコリーの抗酸化活性物質およびそれらの植物器官内分布について（第 3 報）
（道東海大・生物工[1]、（株）北海道バイオインダストリー[2]）木村卓郎[1,2]、渡部和哉[1]、佐藤敦[1]、西村弘行[1,2]

10：15 (6) フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構（16）
－プロトカテキュ酸類縁カテコール誘導体のラジカル消去反応－
（北大院農・応生科） ○齊藤静夏、川端　潤

10：30 (7) フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構（17）
－各種コーヒー酸エステル類のラジカル消去活性－
（北大院農・応生科） ○吉岡育之、川端　潤

10：45　(8)　超遠隔異種核相関ＮＭＲ法の開発と応用(4)
-----X-filtered DEPT long-range C-C relay 法
（北大院農・応生科）○福士　江里、川端　潤

座長：橋床泰之

11：00　(9)　イネ根でリン酸応答に関わるタンパク質の経時的な発現データベースの構築
（北大院農、北大創成研究[1]、JSPS 研究員[2]）○福田 琢哉，大崎 満，信濃 卓郎[1]，和崎 淳[2]

11：15　(10)　低リン条件下でのルーピンクラスター根からの酸性フォスファターゼ分泌能の解析
（北大農[1]，JSPS 研究員[2]，北大創成研究[3]）○山村卓也[1]、和崎　淳[2]、信濃卓郎[3]、大崎　満[1]

11：30　(11)　熱帯イネ new plant type 系統の根の特徴と乾物生産性
（北大院農[1]、ＮＡＲＯ[2]、ＪＩＲＣＡＳ[3]、ＩＲＲＩ[4]，北大創成研究[5]）○鮫島啓彰[1]、近藤始彦[2]、伊藤治[3]、野副卓人[4]、信濃卓郎[5]、大崎満[1]

座長：渡部賢二

13：00　(12)　アスパガス由来フルクタン合成酵素遺伝子の単離
（酪農大院・食品科学[1]、北農研[2]）○上野啓司[1]、小野寺秀一[1]、川上顕[2]、吉田みどり[2]、塩見徳夫[1]

13：15　(13)　Effect of temperature on soluble invertase activity and glucose, fructose and sucrose of onion bulbs (*Allium cepa*) in store.
（酪農大院・食品科学、北農研）Benkeblia, N., Onodera, S., Yoshihira, T., Kosaka, S., and Shiomi, N.

13：30　(14)　*Rhizopus oryzae* NBRC 4707 の生産するペクチン分解酵素の精製およびその性質
（農研機構・北海道農研）○川村泰代、斉藤勝一、小田有二

座長：奥山正幸

13：45　(15)　*Escherichia coli* 由来ホスファチジルグリセロールの立体異性体組成に及ぼす培養環境の影響
（北大院・水産科学）　○藤島裕典、蒲野淑子、板橋 豊

14：00　(16)　メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* におけるホルムアルデヒドデヒド脱水素酵素の発現制御
（東農大・生物産業・食科）○中川智行、小多聡子、小池啓介、伊藤尚志、築井未佳、藤村朱喜、宮地竜郎、冨塚登

14：15　(17)　ニンジン体細胞胚形成時における細胞周期制御物質について
（岩手大院・連農[1]、帯畜大・畜産科[2]、農生資研[3]）○佐野卓磨[1]、大津恵美子[2]、今成佳恵[2]、保田浩[3]、大和田琢二[2]、増田宏志[2]

座長：崎浜靖子

14：30　(18)　*Euglena gracilis* SMZ（株）における cytochrome P450 分子種ならびに tributyltin-chloride および ethanol の代謝機構に関する研究
（北大院・水産科学, *滋賀県立大・人間文化）○千葉利郎、太田万里*、板橋豊、渡邊益美、鈴木鐵也

14：45　(19)　ポテトパルプ中に含まれる超長鎖脂肪酸とオクタコサノール
（帯畜大・畜産科・分子制御、農研機構・北農研*）○Renagul Musa, 柚木恵太、小田有二*、大西正男、岡本明治

15：00　(20)　煮沸と切断処理が野菜のグルコシノレート含量に及ぼす影響
（北海道農業研究センター）石井現相

15：15　(21)　食物繊維及びオリゴ糖摂取による腸上皮間リンパ球局在の比較検討
（北大院農・応生科）○今西　俊輔、田中　誠仁、石塚　敏、原　博

特別講演プログラム

1］16：00　座長：伊藤浩之（北大院農）

α-Glucosidase 変異酵素が触媒するα-Glycosynthase 反応　奥山正幸
（2003 年度日本農芸化学会論文賞）　（北大院農学研究科）

2］16：20　座長：山口淳一（北大院農）

北海道における衛星データを利用した良食味米の生産支援　安積大治
（道立中央農試・岩見沢）

3］16：50　座長：川端潤（北大院農）

有機化学と生態学・境界農学をつなぐ植物着生微生物の機能性解明　橋床泰之
（2003 年度日本農芸化学会奨励賞）　（北大院農学研究科）

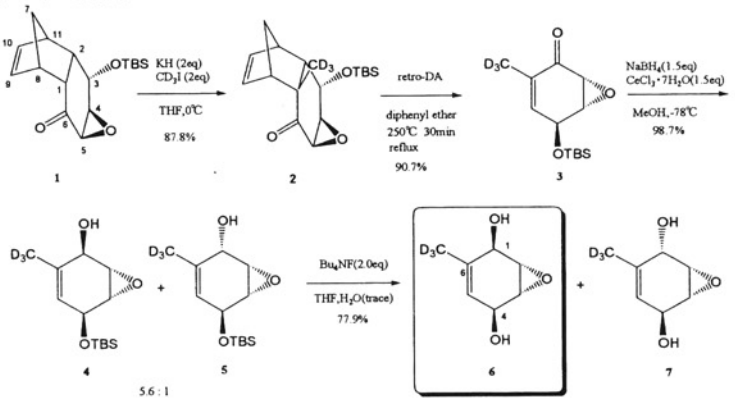
一　般　講　演　要　旨

1　重水素ラベルセオブロキシドの合成とセオブロキシド定量法の確立

（北大院農・応生科）　○太田希岐、上野陽司、松浦英幸、吉原照彦

[目的]　セオブロキシドは、熱帯亜熱帯に幅広く分布する植物病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* の培養液から、バレイショ塊茎誘導活性を示す化合物として当研究室の中森ら[1]によって単離され、その構造が決定された。その後の研究により、セオブロキシドは、1. 花芽誘導が認められない長日条件でアサガオの花芽形成の誘導[2]、2. バレイショ、アサガオの内生ジャスモン酸生成量の増加、3. リポキシゲナーゼ活性の上昇などの様々な活性が見出された。今回、新たなセオブロキシド生産菌や高生産菌の検索、至適培養条件の検討のために内部標準を用いた定量法の確立を目的とした。

[方法及び結果]　3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-4,5-epoxy-tricyclo[6.2.1.0]undeca-9-en-6-one（1）[3]を出発物質として用いた。1 を CD_3I でメチル化し、2 を retro-Diels-Alder 反応を行った。3 は $NaBH_4$ を用いて還元した後、脱保護を行うことで目的の 6 位に CD_3 を導入した内部標準 6 を合成した。この内部標準を各種のサンプルに加え、EtOAc で抽出後、種々の固相抽出を行い、N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamide (BSA)を用いて水酸基をトリメチルシリル(TMS)誘導化を行った。その後、この誘導物質を GC-MS にて定量を行った。その結果、内部標準の誘導体と生合成由来の誘導体の親イオンピークが観測された。これによりセオブロキシド生産量をすばやく確実に知ることができるようになった。



1)　Nakamori, K.; Matsuura, H. ; Yoshihara, T.; Ichihara,; Koda, Y. ,*Phytochemistry*, 35, 835 (1994)

2)　Yoshihara, T.; Ohmori, F.; Nakamori K.; Amamura, M.; Tsutsumi, T.; Ichihara, A.; Matsuura, H., *J. Plant Growth Regul.*, 19, 457 (2000)

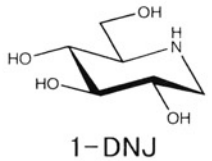
3)　Kamikubo, T.; Ogasawara, K. ,*Tetrahedron Lett.* ,36, 1685 (1995)

2　大徳寺納豆および浜納豆のラット小腸スクラーゼ阻害成分

（北大院農・応生科）○林部　和人、高木　大介、川端　潤

【目的】 食品中のラット小腸スクラーゼ阻害成分を探索したところ、中国の伝統発酵大豆食品トウチの水抽出物から強い阻害活性物質として知られるイミノ糖 1-デオキシノジリマイシン（1-DNJ）を見出した。[1]今回は日本で製造されているトウチ類縁発酵大豆食品である塩納豆のうち、大徳寺納豆および浜納豆から活性物質の探索を行った。

【方法および結果】 市販の大徳寺納豆および浜納豆の 50%メタノール抽出物にはトウチ抽出物同様高いラット小腸スクラーゼ阻害活性がみられた。大徳寺納豆 50%メタノール抽出物を水—1-ブタノールで溶媒分配した結果、阻害活性は水可溶部に認められた。この水可溶部を陽イオン交換クロマトグラフィー（Dowex50W×8）に供したところ、活性成分は 0.6%アンモニア水溶出区に溶出された。この画分を陰イオン交換クロマトグラフィー（Dowex1×8、水溶出）、陽イオン交換クロマトグラフィー（Dowex50WX8、0.6%アンモニア水溶出）で順次分画し、ゲル濾過クロマトグラフィー（ToyopearlHW-40C、水溶出）で最終精製した結果、トウチの活性成分と同じ 1-DNJ を単離した。含量は大徳寺納豆 100 g 中 2.9 mg であった。浜納豆についても同様の分画精製を行った結果、含量は大徳寺納豆よりも低いものの、やはり 1-DNJ が活性成分として含まれていることがわかった。



1-DNJ

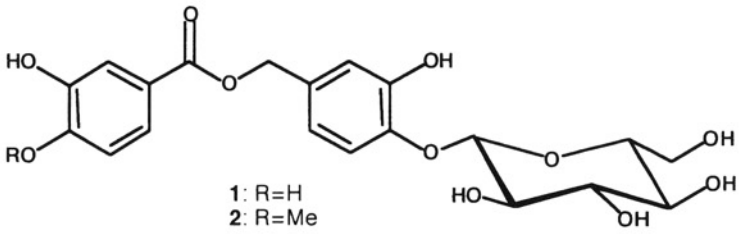
1)；高木ら、日本農芸化学会 2003 年度大会、東京、要旨集 p.210.

3　オレガノ(*Origanum vulgare*)からのDPPH Radical Scavenging化合物の単離

（北大院農・応生、ノーステック財団[1]、藤女大院・人間生活[2]、（社）植物情報物質研究センター[3]）
○松浦英幸、知地英征[2]、浅川智香子[1,3]、天野みどり[1]、吉原照彦、水谷純也[3]

目的）近年の研究により生体内で過剰に発生する活性酸素種が生活習慣病の発症に関与していることが示唆されてきた。生活習慣病を予防する上で活性酸素消去能の強い食材を日常的に摂取し、これらの疾病の発症を予防することは理想的である。そこで食経験のある抗酸化活性の強い植物の検索とその活性物質の単離構造決定を目的とした。

結果）ハーブとして知られている10種類の植物のDPPH ラジカル消去能を検討した。オレガノ(*Origanum vulgare*)、ヒソップ (*Hyssopus officinalis*)、ヤロー (*Achillea millefolium*)に強い消去能活性が確認された。オレガノ乾燥葉 (100 g) の70% aq. MeOH抽出液を、DPPH ラジカル消去能を指標に精製を行った。この結果、ラジカル消去物質として4'-*O*-β-D-glucopyranosyl-3',4'-dihydroxybenzyl protocatechuate (1) と 4'-*O*-β-D-glucopyranosyl-3',4'-dihydroxybenzyl 4-*O*-methylprotocatechuate (2) をそれぞれ270 mg、120 mg単離した。構造決定はIR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FAB-MS, HMQC, HMBC, NOEなどの機器分析データを元に決定した。DPPH ラジカル消去能を抗酸化物質として知られているルチン、ケルセチン、ローズマリン酸と比較した。1はケルセチン、ローズマリン酸とほぼ同様の活性を示し、2は1に比べ1/8程度の活性であった。1の含量をHPLCを用いて検討したところ3.8 mg/ 1g, dry leavesの高含量であることが解った[1]。



1: R=H
2: R=Me

[1] Matsuura, H., *et.al.*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press (2003).

4　ヤーコン葉中の抗酸化活性物質および加熱処理による成分変化に関する研究

（道東海大・生物工[1]、北海道バイオインダストリー[2]）○畠山尚人[1]、木村卓郎[1,2]、斎藤昭彦[2]、西村弘行[1,2]

【目的】医療費の増加に伴い治療医学から予防医学に関心が持たれている。近年、食習慣や運動不足、喫煙、飲酒、ストレス等が起因となり、体内に過剰な活性酸素が発生し、動脈硬化をはじめとする生活習慣病に大きく関わっていることが明らかにされてきた。我々は北方系食材であるヤーコンに注目し、抗酸化活性の検証を行った。さらにヤーコンの葉を焙煎することによって得られるヤーコン茶についての抗酸化活性および成分変化を検証した。

【試料と方法】非焙煎のヤーコン乾燥葉を温度制御機能付きホットプレートで温度と時間を変えて焙煎し、それぞれを熱水抽出した。熱水抽出物を酢酸エチルにより分配しHPLCに供した。抗酸化活性試験として、DPPHラジカル捕捉活性を用いて測定した。成分変化の検証にはHPLCを用い、既知の抗酸化活性物質であるカフェー酸を基準にし、これを指標として加熱処理による量的および質的変化の比較を行った。

【結果と考察】加熱時間5分、10分、15分では、140℃、180℃、260℃の加熱温度でDPPHラジカル捕捉活性に差は見られなかった。しかし 260℃ 30 分では活性の低下が見られた。HPLCによる分析の結果、加熱温度260℃においては5分加熱で既に、カフェー酸に相当するピークの存在を確認できず、加熱により消失した可能性が考えられる。しかし、加熱によるDPPHラジカル捕捉活性の変化とHPLCによるカフェー酸の変動の関係はパラレルと言えず、カフェー酸以外の抗酸化活性物質の寄与が示唆された。

5　チコリーの抗酸化活性物質およびそれらの植物器官内分布について（第３報）

（道東海大・生物工[1]、北海道バイオインダストリー[2]）○木村卓郎[1,2]、渡部和哉[1]、佐藤敦[1]、西村弘行[1,2]

【目的】チコリーはキク科の２年草であり、従来食用に供されてきた軟白葉は *C.intybus* 種の１年次肥大根を暗所で出葉させたものである。近年サラダ葉として *C.endivia* 種の緑葉も好まれるようになった。我々は先に、北海道東海大学試験圃場で育成・作出した軟白葉がマーケットで入手したものと較べ高い抗酸化活性をもつこと、また、*C.endivia* 緑葉に比して有為に高い活性をもつことを報告した（本学会平成１４年春期学術講演会・帯広）。今回、すでに軟白葉から単離・同定したカフェー酸、3,4- および 3,5-ジカフェオイルキナ酸を基準物質としてHPLC クロマトグラムの比較から両種間の差異を評価・検討したので報告する。

【材料と方法】チコリー新鮮葉エタノール抽出物を溶媒分画、次いで酸性度の差による分画で得た有機酸性物質画分を ODS カラムクロマトグラフィーにより活性物質の分離を行った。抗酸化活性は主としてDPPH ラジカル捕捉活性を指標に用い、また、ヒトLDL 酸化抑制効果についても比較した。

【結果と考察】*C.intybus* 軟白葉及び緑葉、花茎葉など器官別に有機酸性物質画分のHPLC クロマトグラムを比較したところ、カフェー酸及びその誘導体の存在比は軟白葉で特異的に高く、その増大は自然条件下の生活環とは独立の作出操作によることが示唆された。しかしながら、チコリー属２種間緑葉の比較ではそれら誘導体の存在比は *C.intybus* が *C.endivia* より高く、内在的種間差のあることも示唆された。

これらの物質がチコリーの抗酸化活性に寄与するところが大きいことがわかった。

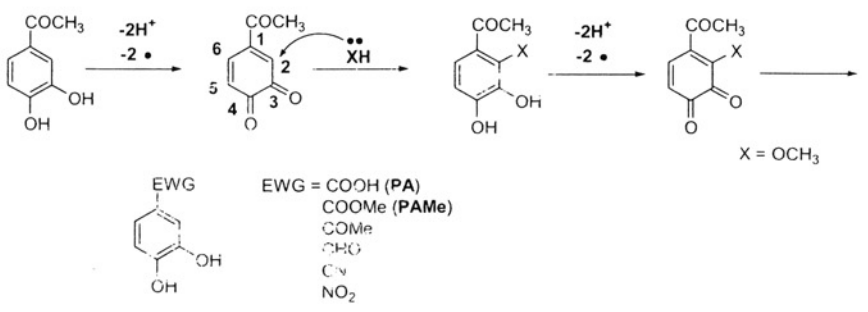
6　フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構 (16)

－プロトカテキュ酸類縁カテコール誘導体のラジカル消去反応－

（北大院農・応生科）　○齊藤静夏、川端　潤

【目的】 プロトカテキュ酸メチル（PAMe）は、非プロトン性溶媒中では DPPH ラジカル 2 当量を消去してキノン体へ酸化されるのに対し、プロトン性溶媒中では約 5 当量ものラジカルを消去する。PAMe と DPPH ラジカルのメタノール中の反応液から 2 位にメタノールが付加した生成物を単離同定したことを既に報告した。[1] 今回はプロトカテキュ酸（PA）と同様に電子求引性基をもつカテコール誘導体のラジカル消去活性について検討した。

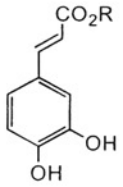
【方法および結果】 種々の PA 類縁体（3',4'-dihydroxyacetophenone、3,4-dihydroxybenzaldehyde、3,4-dihydroxybenzonitrile、1,2-dihydroxy-4-nitrobenzene など）のメタノール中での DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、いずれも PAMe と同程度の活性を示した。また、メタノール中での 3',4'-dihydroxyacetophenone と DPPH ラジカルの反応液を NMR 分析したところ、PAMe と同様に対応するキノン体およびアセタール体のシグナルとともに、2 位付加体と考えられるシグナルが観測された。このことから一般的に電子求引性基をもつ化合物では 2 位へ溶媒の付加反応が起こり、その結果カテコール構造が再生してラジカル消去当量が増大することが示唆された。現在、他の化合物についても NMR 等により検討中である。



1) 齊藤ら、農化 2003 年度大会、要旨集 p228.

7　フェノールカルボン酸類のラジカル消去機構(17)
－各種コーヒー酸エステル類のラジカル消去活性—
(北大院農・応生科)　○吉岡育之、川端　潤

【目的】プロトカテキュ酸(PA)およびそのエステルとDPPHラジカルとの反応の経時変化および溶媒依存性について検討した結果、エステルではプロトン性溶媒と非プロトン性溶媒中でのラジカル消去反応に大きな違いがあること、またプロトン性溶媒中の反応速度がPAとエステルで大きく異なり、エステルのアルキル鎖の違いがラジカル消去能に影響を与えることをすでに報告した。[1)]今回はPAと同様のカテコール型フェノールカルボン酸であるコーヒー酸(CA)のDPPHラジカル消去能が遊離酸とエステルではどのように異なるかについてPAと比較して検討した。
【方法および結果】コーヒー酸(CA)およびメチルエステル(CAMe)、エチルエステル(CAEt)、プロピルエステル(CAPr)、ブチルエステル(CABu)、イソプロピルエステル(CAiPr)、t-ブチルエステル(CAtBu)のラジカル消去能をメタノール及びアセトン中で比較した。ラジカル消去活性はDPPHラジカルの減少量を吸光度の経時変化で評価した。プロトン性溶媒(メタノール)中での30分後のラジカル消去当量は、CAtBu(5.8)＞CaiPr(5.4)＞CABu(3.8)＞CAPr(3.6)＞CAEt(3.1)≒CAMe(3.2)＞CA(2.4)の順になりエステルのアルキル基が大きくかつかさ高くなるほどラジカル消去当量が増加することがわかった。これはプロトカテキュ酸エステルで得られた結果と逆であった。また非プロトン性溶媒(アセトン)中ではすべてのエステル類はコーヒー酸と同様に反応30分で約2当量程度のラジカルしか消去しなかった。現在、さらに長鎖のエステルについても検討中である。

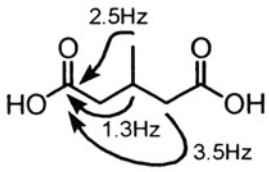


	R
CA	H
CAMe	CH_3
CAEt	CH_2CH_3
CAPr	$(CH_2)_2CH_3$
CABu	$(CH_2)_3CH_3$
CAiPr	$CH(CH_3)_2$
CAtBu	$C(CH_3)_3$

1) 岡元ら、農化北海道支部会、2001.11、B8.

8　**超遠隔異種核相関NMR法の開発と応用(4)**
-----X-filtered DEPT long-range C-C relay 法
(北大院農・応生科)　○福士　江里、川端　潤

【目的】 有機化合物の構造解析に広く使われる**HMBC**などの遠隔異種核相関法は通常**3**結合はなれた炭素(C)－水素(H)間のカップリング(J_{CH})を検出するもので、これ以上四級炭素やヘテロ原子が連続している分子の解析には限界がある。この限界を超えた**H-C-X-X-C**型の超遠隔異種核相関を得る一次元(1D)**BIRD DETP C-C relay** 法[1)]をすでに報告した. 本法では、$^{LR}J_{CH}$の磁化移動に由来する不要なセンターシグナルを**BIRD**パルスにより除去しているが、**BIRD**パルスの待ち時間の精密な最適化が必要で、最適条件をはずれるとスペクトルの質が低下する. この**BIRD**パルスの代わりに、最適化を必要としない**zz gradient-enhanced X-filter**の利用を試みた.
【方法および結果】 除去したい不要シグナルは目的シグナルを与えるアイソトポマーの**100**倍存在する**H-X-(X)-C**アイソトポマーに由来し、問題のプロトンが^{12}Cに直接結合していることから**BIRD**パルスで抑えることができる。**BIRD**パルスの代わりに^{12}Cに直接結合しているプロトンシグナルを磁場勾配パルスにより除く手法がいくつか知られているが、その中で**zz gradient-enhanced X-filter**[2)]を採用した。モデル化合物として**3**-メチルグルタル酸を用い両者を比較した。不要シグナルはスペクトル編集によってもある程度抑えられるため、**DEPT90°**をそのまま用いるメチンサブスペクトルと、これを編集に用いるメチレンサブスペクトルにおいてセンターシグナル除去が問題になった。**BIRD**パルスではセンターシグナルが残り、とくにJ_{CC}の小さな場合に相関を読み取れなくなることがあったが、**X-filter**の利用で効果的に除去された。また、後者は**BIRD**の待ち時間がないぶん、同じ測定時間で積算できる回数を多くとることもできた。**1)** 福士江里・川端潤、日本農芸化学会北海道支部合同学術講演会、**2001**年**7**月、札幌、要旨集 **p.8. 2) D. Uhrín *et. al.*, *J. Magn. Reson.*, 130, 155-161 (1998)**



9 イネ根でリン酸応答に関わるタンパク質の経時的な発現データベースの構築

○福田 琢哉(北大院農), 大崎 満(北大院農), 信濃 卓郎(北大創成研究), 和崎 淳(北大院農, 学振)

低リン応答に関する遺伝子解析はそれぞれの遺伝子、タンパク質の両面から解析が進められているが、タンパク質レベルでの応答機構については、未だ不明な点が多い。また、難溶性無機リン酸化合物に富む土壌には有機酸分泌能の高いイネが、難溶性有機態リンが多い土壌にはホスファターゼの分泌能が高いイネが望まれるように、それぞれの土壌の特性に応じた機能の強化が必要である。しかしながら、このような形質が生育に応じて適切に発現するようにするためには、単一のタンパク質・遺伝子の解析のみでは不十分である。本研究では、低リン条件下で経時的に変動するタンパク質について、二次元電気泳動法により網羅的に解析し、そのタンパク質発現データベースを作成することで、有用遺伝子の単離・解析を行うことを目的として実施した。まず、イネの根から可溶性タンパク質を抽出、濃縮、再溶解および二次元電気泳動による最適な条件を検討した。その結果、ストリークの少ない発現データベースを得ることができ、PDQuest(Bio-Rad)によって定量解析した。タンパク質の解析にはMALDI-TOF-MS を用いた同定またはエドマン分解による N-末端アミノ酸シーケンスにより同定を行った。－P処理（３～５週間）おいては、＋P処理と比較し様々なタンパク質発現の抑制が見られたが、－P処理で発現が増加するタンパク質は発現が減少するタンパク質より少なかった。リン処理によってタンパク質発現量に差があると考えられるタンパク質を同定した結果、superoxide dismutase といった酸化的ストレスで発現誘導されることが知られているタンパク質は－P処理で増加し、細胞増殖に関わるとされる Human translationally controlled tumor protein (TCTP)類似のタンパク質などは－P処理で減少していた。

10 低リン条件下でのルーピンクラスター根からの酸性フォスファターゼ分泌能の解析

○山村卓也[1]・和崎　淳[2]・信濃卓郎[3]・大崎　満[1]
([1]北大農, [2]JSPS研究員, [3]北大創成研究)

【目的】 植物はリン欠乏条件下で根から酸性ホスファターゼ(APase)を分泌することにより植物が直接吸収できない有機態リンを分解し、吸収利用する。根から多量のAPaseを分泌することで知られるルーピンは、リン欠乏条件下においてクラスター根と呼ばれる密集した側根を形成する。そこで本研究ではルーピン根のAPase分泌におけるクラスター根の役割を明らかにするために以下の実験を行った。

【材料と方法】 温室でルーピンを水耕培養（+P、-P条件）により生育させた。リン処理開始後、11日、18日、25日目の+P条件、-P条件のクラスター根およびそれ以外の根の表面に局在するAPase活性を活性染色法により解析した。また、25日目のルーピン根におけるLASAP2（APaseの遺伝子）のmRNA発現量を、+P条件の根、-P条件のクラスター根およびそれ以外の根に分けてノーザンブロット解析法により調べた。

【結果と考察】 活性染色により、APaseは-P条件で生育させたルーピン根から全体的に多く分泌していることが分かった。-P条件の根では、特にクラスター根のまわりで活性が強くなっており、APaseがクラスター根から多量に分泌していることが示された。またノーザンブロット解析により、APase遺伝子LASAP2 mRNAの発現は-P条件のルーピン根で認められたが、その中でもクラスター根において最も強く発現しており、このことからもクラスター根でAPaseが多量に分泌していることが裏付けられた。以上の結果より、ルーピン根からのAPase分泌においてクラスター根が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。すなわち、ルーピンはリン欠乏条件でクラスター根から積極的にAPaseを分泌し、有機態リンを利用していることが示唆された。

11 熱帯イネnew plant type系統の根の特徴と乾物生産性

○鮫島啓彰[1]、近藤始彦[2]、伊藤治[3]、野副卓人[4]、信濃卓郎[5]、大崎満[1]
([1]北大院農、[2]NARO、[3]JIRCAS、[4]IRRI、[5]北大創成研究)

熱帯地域における水稲の多収を実現するために、国際稲研究所（IRRI）において、新しい草型（new plant type）をもつNPT系統が開発された。NPT系統が目標とする特徴のひとつにvigorous rootを持つことが挙げられている。しかし、NPT系統の根系が、従来の品種と比較して、どのような特徴を持つのかは明らかにされていない。本研究は、最も収量の高い従来品種のひとつであるIR72とNPT系統の根系について、形態的、生理的特徴を比較することを目的とする。根系の特徴と乾物生産性の関係についても考察する。

1997年および2000年の雨期にIRRIにおいて圃場試験を行った。3系統のNPTおよび対照品種IR72を供試した。各々4反復を設けた。N・P_2O_5・K_2Oを基肥としてそれぞれhaあたり150、60、60kg施肥した。両年で、全植物体の乾物重と窒素蓄積量、根乾物重、根長、根の窒素濃度および溢泌液量を定期的に測定した。1997年にはモノリス法により層別の根乾物重、根長を調査した。

IR72と比較して、NPT系統の根長は長く、根乾物重は大きかった。すなわち、NPT系統はIR72より大きい根系を持っていた。根長や根乾物重の品種間差は土壌表層（0－5cm）で明確に現れた。ところで、NPT系統とIR72の全植物体乾物重と窒素蓄積量に有意差はなかった。すなわち、NPT系統の大きい根系は、大きい乾物生産性と窒素吸収能を伴っていなかった。NPT系統の根乾物重あたりの窒素吸収速度および出液速度、また根の窒素濃度はIR72と比較して同程度か低い傾向があった。これらの結果から、NPT系統の根系の生理的活性が、IR72と比較して向上していない可能性が示された。これがNPT系統の乾物生産性が向上しない原因の1つであるかもしれない。

12 アスパラガス由来フルクタン合成酵素遺伝子の単離

(酪農大院・食品科学[1]、北農研[2])
○上野敬司[1]、小野寺秀一[1]、川上顕[2]、吉田みどり[2]、塩見徳夫[1]

【目的】アスパラガスは貯蔵炭水化物としてフルクタンを蓄積する。フルクタンは3種類のフルクタン合成酵素、sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST)、fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)、fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT)により合成されると考えられている。我々はこれまでに、6G-FFTのクローニングについて報告した[1)]。今回、アスパラガス6G-FFTと64%および61%のの相同性を示すポリペプチドをコードするcDNA（AoFT2、AoFT3）の単離と塩基配列の決定、推定されるアミノ酸配列から既知の植物由来フルクタン合成酵素との相同性について報告する。

【方法】アスパラガス根より調製した mRNA から二本鎖 cDNA を合成した。これを鋳型として degenerate primer を用いた PCR により、フルクタン合成酵素と高い相同性を持つ 2 種類の PCR 断片を得た。これらの断片をプローブとしてアスパラガス根より構築した cDNA ライブラリーからスクリーニングを行った。スクリーニングにより単離した cDNA の塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列から既知の植物由来フルクタン合成酵素の推定されるアミノ酸配列と比較した。

【結果】アスパラガス根cDNAライブラリーから2種類のcDNA、AoFT2、AoFT3を単離した。AoFT2の推定されるアミノ酸配列は624のアミノ酸からなるポリペプチドであり、アスパラガス6G-FFTと64%、同じユリ科植物のタマネギ6G-FFTと61%、タマネギ1-SSTと59%の相同性を示した。AoFT3の推定されるアミノ酸配列は628のアミノ酸からなるポリペプチドであり、アスパラガス6G-FFTと61%、タマネギ1-SSTと71%、タマネギ6G-FFTと60%の相同性を示した。AoFT2とAoFT3の推定されるアミノ酸配列の相同性は59%であった。今回単離したAoFT2、AoFT3は6G-FFTとは異なるフルクタン合成酵素をコードしていると考えられ、既知の植物由来フルクタン合成酵素との比較からAoFT2は1-FFTを、AoFT3は1-SSTをコードしていることが推定された。

1)上野ら、第51回日本応用糖質科学会講演要旨集 (2002)

13 **Effect of temperature on soluble invertase activity and glucose, fructose and sucrose status of onion bulbs (*Allium cepa*) in store**

○ Noureddine Benkeblia, Shuichi. Onodera, Taiki Yoshihira, Shinichi Kosaka and Norio Shiomi
Department of Food Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan.

Purpose) In this paper we report the activity of soluble invertase and, glucose, fructose and sucrose contents variation in onion bulbs (*Allium cepa*) during long-term storage at 10 and 20 °C.
Methods) Onions bulbs were stored at two set temperatures (10 and 20 °C). Soluble invertase was extracted according to the method of Van der Ende *et al.* (1998). A mixture of enzymatic extract (0.1 ml) in 50 mM sodium acetate buffer (0.1 ml) and sucrose solution (0.2 ml, 200 mM) was incubated at 30 °C for 2 h. The reaction was stopped by heating in a boiling bath for 5 min. The fructose content formed and sugars during storage were measured by high performance anion exchange chromatography (HPEAC).
Results) Invertase activity increased progressively after 8 weeks to 0.084 and 0.092, and sharply to 0.29 and 0.35 nkat g^{-1} fresh weight at 20 and 10 °C respectively and remained high during five weeks. Then, activity decreased abruptly to 0.039 and 0.041 nkat g^{-1}, and remained during the last eight weeks low and close to that observed initially. Glucose increased to 17.73 and 14.62 mg g^{-1} FW after four weeks at 20 and 10 °C respectively, then decreased sharply between week five and week seven to 4.13 and 4.91 mg g^{-1} FW respectively, and remained rather stable ranging from 9 and 10 mg g^{-1} FW in both temperatures. Fructose showed similar pattern and was 14.8 and 21.68 mg g^{-1} FW at 20 and 10 °C respectively. Between week ten and week 24, fructose ranged from 5 and 6 mg g^{-1} FW, and from 6 and 7 mg g^{-1} FW at 20 and 10 °C respectively. Sucrose increased to 19.63 and 14.43 mg g^{-1} FW at 20 and 10 °C respectively, decreased during three weeks and then sucrose increased randomly from 5.69 to 9.42 mg g^{-1} FW at 20 °C but remained in a steady state at 10 °C ranging 5.03 ± 0.78 mg g^{-1} FW. During the six last weeks, sucrose content was higher at 20 °C than at 10 °C. Fructose-Glucose ratio varied during the first eight weeks but remained in a steady level during the last sixteen weeks, while Glucose + Fructose / Sucrose ratio showed two distinguished states. its is concluded from the results of this investigation that invertase activity and sucrose catabolism were less influenced by temperature and seem to be more under the influence of the physiological state of the bulb.

.

Keywords: soluble invertase, glucose, fructose, sucrose, storage, onion

Van der Ende W, Moors S, van Hoenacker G van Laere A. (1998). Effect of osmolytes on the fructan pattern in feeder roots produced during forcing of chicory (*Cichorium intybus* L.). *J. Plant Physiol.* **153**, 290-298.

14 *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 の生産するペクチン分解酵素の精製およびその性質

（農研機構・北海道農研）
○河村泰代、斎藤勝一、小田有二

【目的】糸状菌 *Rhizopus oryzae* NBRC 4707 は、デンプン工場で副生するポテトパルプに増殖させると活発に乳酸発酵を行い[1)]、乳酸とエタノールの生成量はペクチン質の分解と密接に関係している[2)]。そこで、この菌株の生産するペクチン分解酵素を精製し、その性質を調べた。
【方法】ポテトデキストロース寒天培地上で、25℃、3日間培養し、発生する胞子を白金耳でかき取り、滅菌水に懸濁した。胞子数はトーマ血球計算盤で計測し、1ml 当たり 10^7 個になるようにした。この胞子懸濁液を滅菌したミカン皮 100g に接種し、4日間培養した。ポテトパルプを発酵させるときには、この胞子懸濁液 0.3ml を、120℃，15分間高圧滅菌しておいたポテトパルプ 30g に接種し、ビニル袋に入れて 25℃に7日間保温した。ポリガラクツロナーゼ活性は、2.0 mg ポリガラクツロン酸ナトリウムを含む 50 mM 酢酸緩衝液(pH4.5)0.2 ml に粗酵素液 0.05 ml を添加して反応後、生成する還元糖をネルソン試薬で定量することにより測定した。
【結果】糸状菌を増殖させたミカン皮から粗酵素液を抽出し、CM-トヨパールおよびヒドロキシルアパタイトの各クロマトグラフィーにて約 160 倍まで精製した。酵素反応の最適条件は、pH4.0～4.5、45～50℃で、リアーゼ活性は検出されなかった。本酵素は、ポリガラクツロン酸からモノマー、ダイマーおよびトリマーを生成したが、ペクチンに作用しなかったことから、メチル基が除去されたポリガラクツロン酸鎖をエンド型に分解すると推定した。ポテトパルプに精製酵素と糸状菌胞子を同時に添加して発酵させると、乳酸とエタノールの生成が促進された。

[1)]Oda *et al.* (2002): *Curr. Microbiol.*, **45**, 1-4.
[2)]Saito *et al.* (2003): *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* in press.

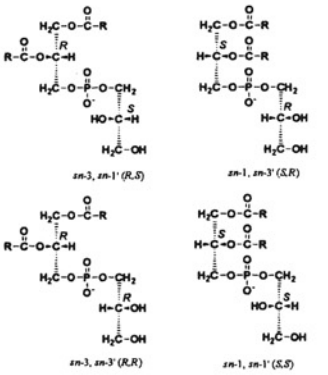
15 *Escherichia coli* 由来ホスファチジルグリセロールの立体異性体組成に及ぼす培養環境の影響

（北大院水）○藤島裕典・蒲野淑子・板橋　豊

【目的】 ホスファチジルグリセロール(PG)は広く細菌に分布し、菌体膜を構成する酸性リン脂質の一つである。PG は *E. coli* 総脂質中に約 20%存在し、PG の欠損は菌体の増殖及び致死性と深く関わっていると考えられている。PG には 4 つの立体異性体が存在するが (下図参照)、生物由来 PG の立体構造は従来 *sn*-3, *sn*-1'(*R,S* 配置)であると考えられてきた。しかし、我々はキラル HPLC 法を用いて数種の細菌 PG から *sn*-3, *sn*-3'(*R,R* 配置)を見いだした 。そこで、細菌中に存在する *R,R* 異性体の生理機能を明らかにするために、本研究では *E. coli* PG の立体異性体組成に及ぼす培養環境の影響について検討した。

【方法】 本実験には 6 株の *E. coli* を用い、B-1 液体培地中で培養温度(20, 30, 37, 45 及び 50℃)、培養時間(8, 16, 24, 72, 120 及び 168h)および培地 pH(5, 6, 7, 8, 及び 9)をそれぞれ変化させて 24 時間撹拌しながら暗所にてバッチ培養をした。培養後、遠心分離により回収した菌体から Bligh-Dyer 法により総脂質を抽出した。この総脂質からシリカゲル TLC を用いて PG を単離し、ビス(3,5-ジニトロフェニルウレタン)誘導体に変換したのち(*R*)-及び (*S*)-1-(1-ナフチル)エチルアミンを固定相とするキラル HPLC (YMC A-K03 及び L03 カラム 25cm x 4mm i.d.)で分析して PG の立体異性体組成を求めた。移動相にはヘキサン/ジクロロメタン/メタノール/TFA(60:20:20:0.2)を使用し、254nm でピーク成分を検出した。

【結果及び考察】 適用した何れの培養条件でも全ての株から *sn*-3, *sn*-3'(*R,R*)PG が検出された。立体異性体組成に及ぼす培養時間の影響を調べた結果、対数増殖期初期(8h)では全 PG 中での *sn*-3, *sn*-3'(*R,R*)含量が 3-4%だったが生育進行に伴い徐々に増加し、定常期後期(168h)では 10-13%に達した。培地 pH の影響を調べた結果、至適(pH7)では 4-5%だった *sn*-3, *sn*-3'(*R,R*)含量が酸性側(pH5)で 4-8%、塩基性側(pH8)で 6-7%にそれぞれ増加した。培養温度の影響については至適温度(37℃)で培養した株の *sn*-3, *sn*-3'(*R,R*)含量は 4-10%であったが、20℃では 1-3%に減少した。また、温度が上昇するに従って徐々に *sn*-3, *sn*-3'(*R,R*)は増加し、50℃においては 13-24%に達した。*E. coli* は増殖停止期や飢餓状態等の異常環境下では細胞が縮小し厚い細胞膜を持つこと、また、PG の脂肪酸組成を変えることによって温度変化に適応することが知られている。本研究の結果から、*E. coli* の形態変化や細胞構造の変化に *sn*-3, *sn*-3'(*R,R*)PG が影響を及ぼしていることが示唆される。また、PG の立体異性体組成を変えることでも膜の流動性を調節し、環境へ適応するものと推測される。



Structures of phosphatidylglycerol stereoisomers

16 メチロトローフ酵母*Pichia methanolica*におけるホルムアルデヒドデヒド脱水素酵素の発現制御

○中川智行、小多聡子、小池啓介、伊藤尚志、築井未佳、藤村朱喜、宮地竜郎、冨塚登
（東農大・生物産業・食科）

【目的】ホルムアルデヒド(FA)は非常に強い毒性を示すことから、生体内にはFAの毒性を回避する何らかの機構が存在する。一方、メチロトローフ酵母はメタノール代謝の中間体としてFAを生成することから、より厳密なFA制御機構を備えているものと考えている。今回、メチロトローフ酵母のFA代謝を考える上で、FA代謝の鍵酵素FA脱水素酵素(FLD)に着目し、*P. methanolica*における同酵素の一次構造の解析および発現制御について検討を行った。

【方法および結果】*P. methanolica*ゲノムDNA上にはFLDをコードする遺伝子は1コピーのみ存在したことから、本遺伝子を*FLD1*と名付けた。*FLD1*は225bpからなる一つのイントロンと380アミノ酸残基をコードするエキソンを持ち、その一次構造は他のメチロトローフ酵母由来FLDと非常に高い相同性を示した。さらにPmFld1pの発現制御について検討を行ったところ、PmFld1pはメタノール、FAによって強力に誘導される一方で、FAによる誘導はグルコースによって完全に抑制されなかった。さらにメタノール濃度の上昇に伴い、FAの発現量は増加した。これらのことはメチロトローフ酵母は生育環境下のメタノール濃度を認識し、それに合わせてFLD発現量を調節することで細胞の内のFAレベルを一定に保つ役割を担っているものと思われる。

17 ニンジン体細胞胚形成時における細胞周期制御因子について

○佐野卓磨[1]，大津恵美子[2]，今成佳恵[2]，保田浩[3]，大和田琢二[2]，増田宏志[2]（[1]岩手大院・連農，[2]帯畜大・畜産科，[3]農生資研）

近年、細胞周期制御因子に関する研究が進展し、動物と同様に植物においても、細胞分裂の方向性に重要な役割をもつ cyclin 依存性キナーゼ（CDK）および cyclin が多数得られている。細胞周期が動くためには、特定の CDK と cyclin が正しい組み合わせで結合する必要があり、それが分化の方向性の制御と密接に関わっていることが明らかになりつつある。

本研究では、ニンジンの体細胞胚形成と細胞周期制御因子との関連性に着目し、まずニンジン体細胞胚形成における CDK 阻害剤の olomoucine と roscovitine、核の DNA 複製阻害剤の aphidicolin、微小管の形成阻害剤の nocodazole の影響を観察したところ、aphidicolin については細胞分裂が著しく阻害され、他の 3 つについても体細胞胚の生長の遅延および停止が見られたが、植物体にまで生長したものは形態的な変化が見られなかった。このことから、細胞分裂阻害剤と体細胞胚形成における細胞分裂停止との間に関連性があることが示されたので、体細胞胚形成時に発現する CDK および cyclin 遺伝子を網羅的に単離することを試みた。その結果 6 種の CDK（CDKA、B1、B2、C、D、E）および 7 種の cyclin（cyclinA1、A2、A3、B1、B2、D1、D2）をコードする遺伝子を単離し、部分塩基配列を決定した。体細胞胚形成段階においてノーザンブロット分析を行った結果、これらの CDK および cyclin がそれぞれ異なる発現パターンを示した。これは体細胞胚形成時に見られる細胞分裂の様式のドラスティックな変化と密接に関わっていると思われる。また、植物体を 2,4-D 処理し、2,4-D を含まない培地へ移す、つまり体細胞胚形成が始まる前後の段階についてもノーザンブロット分析を行ったが、やはり各 CDK および cyclin がやや異なる発現を示した。

18 *Euglena gracilis* SMZ 株における cytochrome P450 分子種ならびに tributyltin-chloride および ethanol の代謝機構に関する研究

○千葉利郎、太田万里*、板橋豊、渡邊益美、鈴木鐵也
（北海道大学大学院・水産科学研究科、*滋賀県立大学・人間文化学部）

[目的]現在、化学物質の毒性評価に培養細胞や実験動物をモデル生物として用いる方法が主流となっているが、それらの利用には多大な設備とコストを必要とする。そこで演者らは培養細胞や実験動物と比較して管理の容易な、真核単細胞鞭毛藻類 *Euglena gracilis* を体細胞の代替モデルとして内分泌撹乱物質の一つである有機スズ化合物 tributyltin-chloride (TBTCl)の毒性評価を行ってきた。これまでの研究により *E. gracilis* の野生株である Z 株において TBTCl の代謝を確認し、さらに代謝経路への cytochrome P450 (CYP) 2B1 の関与を示唆する結果を得た 1)。本研究は、Z 株と比較して動物細胞モデルにより近いと考えられる葉緑体欠損株 SMZ 株を用いて CYP 分子種の確認および TBTCl の代謝様式に関する知見を深めることを目的とした。

[方法と結果] *E. gracilis* SMZ 株を超音波処理により破砕し超遠心分離により microsome 画分を分取した後、Western blotting 法により、Z 株と同様に anti-rat CYP 2B1 と交差反応するバンドを確認した。また、代謝経路の確認を目的として SMZ 株に TBTCl を暴露し、diethylether による脂溶性画分抽出、グリニャール反応による誘導化を行い、GC-FPD で分析して有機スズ化合物の選択的な検出を行い代謝経路についての知見を得た。さらに、アルコール代謝に関わる CYP 2E1 についても交差反応物質を確認しており、近年 ethanol 代謝過程で発生する活性酸素種による肝細胞障害が問題となっていることを背景に、アルコール代謝経路を確認するモデル生物としての *E. gracilis* の利用についても検討した。

1) Ohta *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (1), 14- 21, 2001

19 ポテトパルプ中に含まれる超長鎖脂肪酸とオクタコサノール

○Renagul Musa、柚木恵太、木下幹朗，小田有二※，大西正男、岡本明治
（帯畜大・細胞分子制御、※農研機構・北農研）

目的 北海道ではデンプン製造の副産物として年間 10 万トンを超えるポテトパルプが発生する。これを乳酸生成糸状菌 *Rhizopus oryzae* により効率的に乳酸発酵することによって、家畜飼料および機能性食品素材として有効利用する試みがなされている。演者らは、脂質代謝改善効果や体力増強作用などを有する超長鎖脂肪酸とオクタコサノールが発酵ポテトパルプ中に存在することを認めた。本研究では、ポテトパルプの乳酸発酵における脂質成分の動態を精査するとともに両成分の存在形態などを明らかにしようとした。

方法 各試料からクロロホルム-メタノール混液および水飽和ブタノールによって全脂質を抽出した。脂肪酸分析は、メチルエステルとして GC-MS を用いて行った。また、高級アルコールは、不ケン化物から調製するとともに、脂肪酸メチルエステル画分をトリメチルシリルエーテル誘導体として分析した。

結果 発酵ポテトパルプ中には脂肪酸エチルエステル（4.3 nmol/脂質 mg）が見出され、また菌体由来のγ-リノレン酸（1.4 nmol/脂質 mg）も検出された。超長鎖脂肪酸としては C22 から C32 までの少なくとも 11 種の飽和タイプが認められ、その中で主なものは C28 と C30 であった。これらは中性脂質クラスに広範に分布し、その総量は 1.9 nmol/脂質 mg であった。一方、高級アルコールとしては C16 から C30 までの 13 種が検出され、そのうち主成分はオクタコサノール（0.8 nmol/脂質 mg）であった。オクタコサノールの分布を調べたところ、大部分はフェルラ酸エステルとして存在しており、ワックス画分には見出されなかった。また、超長鎖脂肪酸とオクタコサノールはともにバレイショ可食部には検出されずにバレイショ皮部のスベリンに由来していたことから、原料の皮成分がポテトパルプ中に移行して濃縮されていると判断された。

20 煮沸と切断処理が野菜のグルコシノレート含量に及ぼす影響

（北海道農業研究センター） 石井現相

【目　的】アブラナ科野菜にはグルコシノレート（以下 GSL）が含まれ、これは発ガン抑制機能を持つばかりでなく、収穫後の切断・加熱・漬け込みなど調理加工操作に伴い、分解や溶出して、その特有の香味を形成する。そこで、GSL 組成の収穫後処理による変動要因とその程度を明らかにする。

【材料と方法】キャベツ「金系 201」、ブロッコリー「violet queen」、ハクサイ「無双」と「CR 新黄」を 7 月播種、露地栽培して 10 月中旬に収穫。大根は市販品を用いた。GSL 分析は Ion-pair HPLC で行った。（1）GSL の沸騰水中への溶出と植物中残存に及ぼす添加水量の影響：大根は首部から約 1cm 角切片を、キャベツは葉脈からコルクボーラーで円切片を、ブロッコリーは約 300g から小花蕾を切り取って試料を作成した。予め蒸留水量を 3 段階（50,100,200mL）に変えて 500m L 容ナス型フラスコ中で沸騰させ、これに試料 50g を入れ、環流冷却器を付けて 30min 煮沸した。室温に放冷後、試料と煮汁を回収して、両画分を分析した。（2）低温貯蔵後の切断による GSL の変動：キャベツは新聞紙包装、ブロッコリーはプラスチック折り込み包装して約 4-5 ℃に大気下で 2 ヶ月間貯蔵した。キャベツは 1cm 角切片、ブロッコリーは小花蕾をそれぞれ、約 10g ずつ採り、100mL 容ナス型フラスコに入れて、切断後経時的に取り、GSL をメタノール抽出して測定した。

【結　果】白菜の主な GSL は Gluconapin ,Glucobrassicanapin,Gluconasturtiin で、全 GSL は中肋部＜葉部、外葉＜芯部内葉で高く、品種間差があった。大根の主な GSL は Glucoraphasatin、キャベツとブロッコリーで Glucobrassicin を検出した。GSL は煮沸水量が多いほど、煮汁への溶出割合が高かく、その程度は大根で小さく、ブロッコリーで大きかった。切断直後の Glucobrassicin の値を 100 とすると 77hr 後、キャベツ 33、ブロッコリー 46 となった。切断でキャベツ Sinigrin は速く分解、ブロッコリーの Glucoraphanin は比較的よく残存した。

21　食物繊維及びオリゴ糖摂取による腸上皮間リンパ球局在の比較検討

○今西 俊輔、田中 誠仁、石塚 敏、原 博　（北大院農・応生科）

【背景と目的】生理的条件下において腸管上皮クリプトに存在する腸上皮間リンパ球（IEL）は発酵性食物繊維摂取によりその存在頻度が増加することが以前の研究により分かっている。特にSBF摂取により盲腸クリプトにおいてCD8$^+$IEL存在頻度の増加が見られた。本研究では発酵性オリゴ糖摂取において同様の結果が得られるか否かを食物繊維の場合と比較検討した。

【方法】５週齢のWKAH/HkmSlc ♂ラットを１週間予備飼育し、その後difructose anhydride Ⅲ(DFA Ⅲ), fructooligosaccharides (FOS), raffinoseを30g/kg含む飼料で３週間飼育した。ラット屠殺後盲腸、結腸は組織切片を作成し免疫染色、盲腸内容物はHPLCで有機酸分析を行った。

【結果】食物繊維食ではSBF食, guar gum分解物食, 水溶性大豆繊維食において無繊維食に比べ盲腸CD8$^+$IELの有意な増加が確認されたが、オリゴ糖添加食では無繊維食またはアビセル添加食間にCD8$^+$IEL頻度の有意な差は見られなかった。また盲腸内容物の有機酸測定結果をみると、乳酸、酢酸、n-酪酸と盲腸CD8$^+$IELに正の相関が、コハク酸、iso-吉草酸と盲腸CD8$^+$IELに負の相関が見られた。このことにより盲腸CD8$^+$IEL誘引に発酵産物である短鎖脂肪酸が関与している可能性が考えられた。

特　別　講　演　要　旨

[特別講演]

α-Glucosidase 変異酵素が触媒するα-Glycosynthase 反応

奥山　正幸　（北大院・農）

The α-glucosidase mutant catalyses α-glycosynthase reaction

Masayuki OKUYAMA (Graduate school of agriculture, Hokkaido Univ.)

α-Glucosidase はα-グルコシド結合をもつ化合物を基質とし、その非還元末端からα-グルコースを遊離するアノマー型保持の加水分解酵素である。アノマー型保持酵素とは、触媒反応の過程において基質のアノマー型と同じアノマー型の生成物を遊離する酵素である。α-Glucosidase にはアミノ酸配列の違いから glucoside hydrolase family 4, 13, 31 に分類される 3 種類が知られている。Glucoside hydrolase family (GH family)とは糖質加水分解酵素をアミノ酸配列の相同性によって分類したもので現在約 90 ファミリーが存在する。本研究で我々が用いた *Schizosaccharomyces pombe* 由来の α-glucosidase は GH family 31 に属する。

まず我々は GH family 31 に属するα-glucosidase の加水分解活性に必須な 3 アミノ酸残基を決定した。そのうちの中間体形成に関係する触媒アミノ酸残基 Asp481 を Gly に置換した酵素 D481G はマルトース加水分解活性が野生型酵素の 0.002%に減少した。しかし通常の基質とは逆向きのアノマーをもつα-glucosyl fluoride を基質とすると *p*-nitrophenyl (pNP) α-glucoside と、α-結合を生成して *p*NP α-isomaltoside、pNP α-maltoside の合成を触媒できることがわかった（下図）[1]。酵素は加水分解反応を失っているので生成物は蓄積していく一方であり、pNP α-isomaltoside、pNP α-maltoside を高収率で合成できた。また pNP α-xyloside、pNP α-mannoside、または pNP α-glucoside を pNP α-glucoside の代わりに用いても、pNP 二糖類を合成できた。

この反応は Glycosynthase 反応と呼ばれ、α-glycosidase ではいくつかの酵素で報告がある [2]。しかし今回我々はα-glycosidase 変異酵素でもこの反応を触媒できることを初めて見つけた。

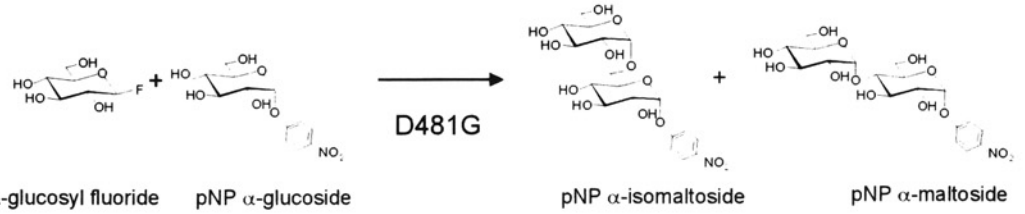


図　α-glycosynthase 反応

1) Okuyama M, Mori H, Watanabe K, Kimura A, Chiba S, *Biosci Biotechnol Biochem,* 2002, **66**, 928-933.

2) Jakeman, DL Withers SG, *Trends Glycosci Glyco*, 2002, **14**, 13-25.

[特別講演]

北海道における衛星データを利用した良食味米の生産支援

安積　大治 (北海道立中央農業試験場岩見沢試験地)

The Production Support of Good Eating Quality Rice Using the Satellite Remotesensing data in Hokkaido

Daiji Asaka (Iwamizawa,Hokkaido Prefectural Central Agricuitural Experiment Station)

1．はじめに

米の食味は色，つやなどの外観品質に加え，味，香り，粘りなどで構成され，官能検査や機器計測によってその良否が判定される．食味を左右する主要な要因は米粒のアミロース含有率と蛋白含有率であり，これらはいずれも食味と負の相関がある．アミロース含有率は主に品種や気象条件によって変動することから，栽培管理による制御の余地は少ないが，蛋白含有率は生育後期の窒素栄養状態の影響を強く受けるため，栽培管理による制御が可能である．蛋白含有率低下のためには，個々の圃場における蛋白含有率の実態を把握し，次年度以降の栽培管理に反映することが効果的であるが，これまで広域の蛋白含有率を圃場単位で把握するための効率的な手法は確立されていなかった．

米の蛋白含有率は，水稲成熟期の止葉（穂直下葉）のクロロフィル含量，葉身窒素濃度と高い正の相関がある．一方，水稲群落の単位土地面積当たりクロロフィル量や窒素吸収量の推定には，可視域・近赤外域の反射係数から算出される植生指標が有効とされている．したがって，水稲成熟期のリモートセンシングデータにより蛋白含有率の推定が可能と考えられる．そこで，良食味米生産を支援する情報の提供を目的とし，衛星データを用いて米の蛋白含有率の変動を地図化する手法を開発した．

2．方法

北海道の代表的な水田地帯である石狩川下流域低平地に位置するN町全域を対象地域とし，1998 年～2000 年について試験を行った．解析に使用した衛星データは，Landsat TM データおよび SPOT/HRV データである．

衛星観測は 2 時期におこなった．5 月下旬～6 月下旬（水稲移植直後～ 1 ヶ月後）の衛星データで観測当年の水田を判別し，8 月下旬～9 月下旬（水稲成熟期）の衛星データを蛋白含有率の推定に用いた．またあわせて，対象地域内の農家圃場で現地調査を行い，蛋白含有率を実測した．調査圃場の各バンド DN および正規化植生指数(NDVI:Normalized Difference Vegetation Index)を算出し，地上調査による米粒蛋白含有率との関係を検討した．

3．結果

表1　水稲成熟期の衛星データと米の蛋白含有率との相関

観測年月日	n	Band1 (緑)	Band2 (赤)	Band3 (近赤外)	NDVI
1998.9.19	24	-0.67***	-0.80***	0.47*	0.86***
1999.9. 5	32	-0.51**	-0.69***	0.52**	0.90***
2000.9. 4	34	-0.73***	-0.82***	0.65***	0.89***

*：5%有意水準，**：1%有意水準，***：0.1%有意水準

実測した蛋白含有率と水稲成熟期に取得された衛星データの各バンド DN ・ NDVI との相関を表 1 に示した．米粒蛋白含有率は，水稲成熟期のバンド 1（緑），バンド 2（赤）の DN と有意な負の相関が，またバンド 3（近赤外）の DN，NDVI と有意な正の相関が認められ，特に NDVI との間にはいずれの年次についても相関係数 0.86 以上・有意水準 0.1%以上の高い相関が認められた．

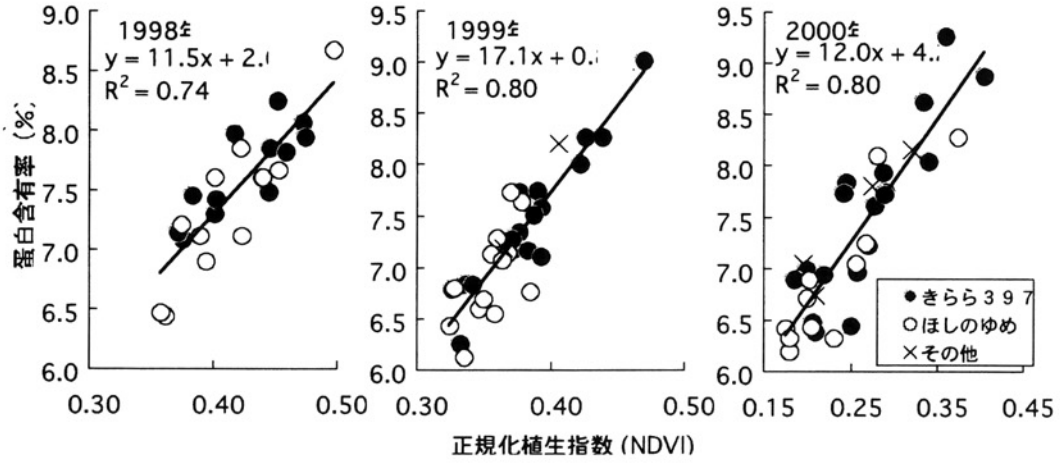
各年次について，水稲成熟期における NDVI と米粒蛋白含有率の関係を第 1 図に示した．各年次におけるプロットは，栽培品種を北海道の主要栽培品種である「きらら 397」「ほしのゆめ」，およびその他に 3 区分

して表示した．いずれの年次においても，「きらら 397」「ほしのゆめ」それぞれの，米粒蛋白含有率との直線回帰式に有意な差はなく，その他の品種についても大きくはずれることはないことから，全品種を込みにして共通の回帰式をあてはめることに大きな問題はないと考えられた．各年次における NDVI と米粒蛋白含有率の回帰式は次式のとおりである．

1998 年：Y=2.67+11.5×NDVI　　r=0.86　(1)
1999 年：Y=0.87+17.1×NDVI　　r=0.90　(2)
2000 年：Y=4.23+12.0×NDVI　　r=0.89　(3)
Y：蛋白含有率

NDVI と蛋白含有率の回帰式は年次によって異なっていた．これは，観測条件や衛星観測から成熟期までの日数が異なるためと考えられる．したがって，蛋白含有率推定のための回帰式は観測の都度作成する必要がある．しかし，NDVI が大きいほど蛋白含有率が高くなる傾向は同一であり，地域における蛋白含有率の相対的な序列を判定する場合には，NDVI の序列をそのままはてはめることが可能である．

得られた回帰式を対象地域全域に適用することにより，地域全体の蛋白レベルを地図化することができ，得られた地図から算出した蛋白変動は，実態調査の結果とよく合致した．したがって，衛星データによる蛋白含有率の推定手法は，広域かつ詳細な蛋白変動の把握に有効である．



第 1 図　水稲成熟期の衛星データから算出した正規化植生指数(NDVI)と蛋白含有率の関係

4．利用場面

衛星データで米の蛋白含有率を推定することによって，対象地域内の蛋白含有率の変動をメッシュ情報として知ることができ，変動傾向の把握と同時に，局所的に蛋白の高い圃場や低い圃場を特定することができる．蛋白含有率の地理的な変動パターンを既往の土壌図やメッシュ気象データなどと照合することにより，変動の原因を推定することが可能となる．蛋白の高い圃場に対しては次年度以降の栽培管理の改善を指導するなど，地域の品質の向上・均質化に向けた対策を効率的に実施できる．また先に述べたように，蛋白含有率の序列の判定については，NDVI の序列がそのまま利用できることから，観測のタイミングによっては収穫前に地域内の蛋白変動を相対区分した地図を現場に配布し，蛋白含有率の異なる圃場を分けて集荷するなど，収穫作業の参考情報とすることができる．

2002 年度には北海道内において水田面積の約 7 割にあたる約 85,000ha で衛星観測が実施され，米の蛋白含有率の地図が作製された．利用されたセンサは SPOT/HRV が主体であるが，地上分解能 4m の IKONOS も利用されており，1 筆圃場内の蛋白含有率変動まで把握可能な地図が作製されている．

北海道における本手法の適用は，以下に示す条件が有利に働いていると考えられ，本州など他地域での適用にあたっては，地域の栽培形態に応じた検討が必要であろう．

・圃場の区画が大きく，栽培品種数が少ない
・栽培様式・生育期間が限定されている
・生育後期に窒素追肥が行われない

5．おわりに

衛星データは，現時点ではデータ入手の確実性や定期性に問題はあるものの，地上調査のみでは入手困難な情報を入手するのに有効な手段である．これまでは生産現場への情報伝達に適当な手段が少なく，解析結果を実利用者に迅速に提供し利活用することが難しかったが，近年北海道内で導入の進む農業 GIS は，衛星情報を利用するための受け皿として有効である．

[特別講演]

有機化学と生態学・境界農学をつなぐ植物着生微生物の機能性解明

橋床泰之（北海道大学大学院農学研究科）

Functional Studies of Epiphytic Bacteria to Link Organic Chemistry and Ecology/Interdiscipline Agronomy

Yasuyuki Hashidoko (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

葉面や根面といった植物組織表面は、生産者である植物とそこに棲息する微生物間の環境応答の“場”である。この“場”における二次代謝産物を介した双方の情報伝達に注目し、幾つかの植物の組織表面に着生する細菌類の挙動、機能および宿主の側からみた生態化学的意義を明らかにしてきた。その研究のきっかけとなったのは、ハマナス葉面に存在する腺毛の分泌物から、新規のビサボラン型およびカロタン型セスキテルペンを発見したことである。これらのうち、主要成分の一つである carota-1,4-dienaldehyde は、空気酸化により、強い抗真菌活性をもつエンドパーオキシドに速やかに変換され、また、この過酸化型セスキテルペンは隣翅目植食昆虫の摂食忌避効果を示した。この研究を通して、葉面や根面には種に特徴的な成分が多量に蓄積し、これらが生態学的に重要な役割を果たしていることを認識した。

植物が含有するフェノール性成分の違いによって、そこに着生する微生物群集の代謝能が大きく異なることを見いだした。クロロゲン酸に富むキク科植物 *Polymnia sonchifolia* の被傷害葉から主要な葉面細菌として分離した *Klebsiella oxytoca* の場合、基質誘導性 4-hydroxycinnamate decarboxylase（4-HCD）発現能を有し、4-ヒドロキシケイヒ酸類を基質として 4-hydroxystyrene 類を遊離した。この脱炭酸生成物は、糸状菌や他の病原性グラム陰性細菌に対して強い毒性を発揮した。また、4-HCD 遺伝子を組み込んだ大腸菌株が 4-ヒドロキシケイヒ酸類存在下で *Cladosporium herbarum* 菌糸との競争に完全にうち勝ったことから、葉面着生細菌の 4-HCD 発現は被傷害葉面のミクロフロラを制御しうることを示していた。また、*K. oxytoca* JCM 1665 株を被検細菌とし、本酵素の最も受容性の高い基質である 4-hydroxycinnamic acid の非基質性アナログ類に 4-HCD 誘導活性を検索し、強力な 4-HCD 誘導剤として 6-hydroxy-2-naphthoic acid を見出した。

一方、ハマナス葉には大量の加水分解性タンニンが含まれており、ハマナス葉面から分離した *Rahnella aquatilis* は、非常に強い基質誘導性 gallate decarboxylase (GD) 発現能を有した。その脱炭酸生成物は、4-HCD による生成物と同じく、基質には認められない強い抗真菌活性を示した。この分離菌株は、1 mM gallic acid を誘導剤とした場合には gallic acid に対してのみ強い脱炭酸活性を示すが、同濃度の protocatechuic acid を誘導剤にすると、gallic acid と protocatechuic acid に対し、等しく脱炭酸活性を獲得する誘導特異性を示した。ハマナス葉面着生細菌としては、*R. aquatilis* の他に、*Pantoea agglomerans*、*Klebsiella terrigena*、*Erwinia rhapotici* の γ-Proteobacteria 類が得られ、これらの分離菌株は oxidase 活性、catalase 活性、sorbitol 代謝能など、特定の生理的性質が極めて良く一致したことから、ハマ

ナス葉面という特殊環境下でこれらの生理的性質が収斂したと推測している。

根面や葉面の機能性着生細菌の検索用培地として、一般に広く用いられているアガロースに代わり、植物組織培養用ゲル担体に用いられるジェランガムをマトリックスとした半ゲル無窒素培地を開発した。細菌由来のポリサッカライドであるジェランガムは、その高い透明性と均一なゲル特性から、細菌の溶存酸素に対する態度や化学物質に対する挙動（運動性、凝集性など）の判定を容易にする。この培地を用い、酸性硫酸塩土壌などの貧栄養土壌に生育できる植物の根面フロラの挙動解析を試みた。強酸性土壌条件下で生育できるインドネシア、南カリマンタン在来イネや *Melastoma* 属植物、あるいは *Shorea* 属植物の苗木根面から、根面 pH を中性に保ち宿主の生育をほう助する数種類の *Sphingomonas* 属および *Burkholderia* 属細菌を分離同定した。現地試験において、*Sphingomonas rosa* など多くの分離菌株が、貧栄養条件下で宿主の生育を昂進した。*Sphingomonas* 属細菌については、これとは別にシンジュガヤの茎内部に *Herbaspirillum* 属細菌と共存する種を見いだし、これらの共存によって細菌の運動性が増し、また窒素固定効率が上昇することが分かった。*Sphingomonas* 属細菌に関するこれらの成果は、高度負荷土壌における低投入持続型農業への微生物資材としての応用が期待されており、その研究が進行中である。また、ホウレンソウ芽生えから、根表面に均一に分散・付着する根面細菌として *Sphingomonas yanoikuyae* を分離同定した。ホウレンソウに含まれる *S. yanoikuyae* 生育促進因子を地上部熱水抽出物中に検索し、これがマグネシウムイオン（Mg^{2+}）であることを突き止めた。*S. yanoikuyae* 生育に対する用量反応試験で、Mg^{2+}は終濃度 0.10 mM で十分な効果を示した。

テンサイそう根病激発土壌のテンサイ根面から分離された *Xanthomonas* sp. SB-K88 株は、宿主根圏で効率よくテトラミン酸型マクロライド抗生物質 xanthobaccin A を産生する。そこで、本細菌がテンサイ根面で抗生物質生産効率を高める理由を探るため、無菌芽生えに SB-K88 株を接種し、4 週間後にその根面を走査電顕で観察した。その結果、本菌に特徴的なコロニー形成と菌体自体を多糖の膜で覆う、バイオフィルム状の構造体形成が認められた。テンサイ根からは、SB-K88 株のバイオフィルム形成を誘導する化学シグナルの存在が示唆された。また、キワタ科パキラ（*Pachira aquatica*）根幹外皮には、ナフトキノン型抗菌性セスキテルペン、isohemigossypolone が大量に蓄積し、これが化学的防御因子として機能していた。機械的傷害によりこの化学物質バリヤが破れ、芯腐れを引き起こす *Pseudomonas* 属細菌が内皮に侵入すると、内皮では isohemigossypolone の蓄積が急激に起こった。この細菌は本化合物のアルデヒド基をアルコールに還元し、これを無毒化したが、植物は抗菌性の強い脱ホルミル体を蓄積し、これに対抗していた。これらは、植物表面に蓄積する二次代謝産物をめぐる武装競走と理解された。

これら一連の研究は北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生態化学研究室において展開され、「二次代謝産物を介した高等植物と着生微生物の相互作用研究」として 2003 年度日本農芸化学奨励賞の対象となったものである。終始激励を頂いた同生態化学研究室教授田原哲士先生をはじめとする研究室の諸先生方、研究を分担して頂いた卒業生ならびに在学生諸氏、さらにはご助言とご鞭撻を頂きました多くの諸先生方に深謝致します。

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

アサヒビール株式会社北海道工場
ベル食品株式会社
恵庭リサーチ・ビジネスパーク株式会社
福山醸造株式会社
富良野市ぶどう果樹研究所
合同酒精株式会社
有限会社北海道バイオ技術研究所
北海道日産化学株式会社
北海道立十勝圏地域食品加工技術センター
北海道糖業株式会社技術研究所
北海道和光純薬株式会社
北海三共株式会社
北海製罐株式会社
株式会社北開水工コンサルタント
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所
岩田醸造株式会社
関東化学販売株式会社
キリンビール株式会社千歳工場
小柳商事株式会社
日本化学飼料株式会社
日本新薬株式会社千歳クリエートパーク
日本甜菜製糖株式会社（技術部製造課）
ニッカウヰスキー株式会社北海道工場
サッポロビール株式会社北海道工場
札幌酒精工業株式会社
高砂香料工業株式会社札幌出張所
十勝農業協同組合連合会農産化学研究所
株式会社和科盛商会
よつ葉乳業株式会社リサーチセンター
雪印乳業株式会社札幌研究所
株式会社ズコーシャ