

平成20年度 第一回合同学術講演会

講演要旨

日時：平成20年8月8日（金）、9日（土）

会場：北海道大学 学術交流会館

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
日本生物工学会北日本支部
日本応用糖質科学会北海道支部
北海道農芸化学協会

連絡先：北海道大学大学院農学研究院、森 春英（011-706-2816）

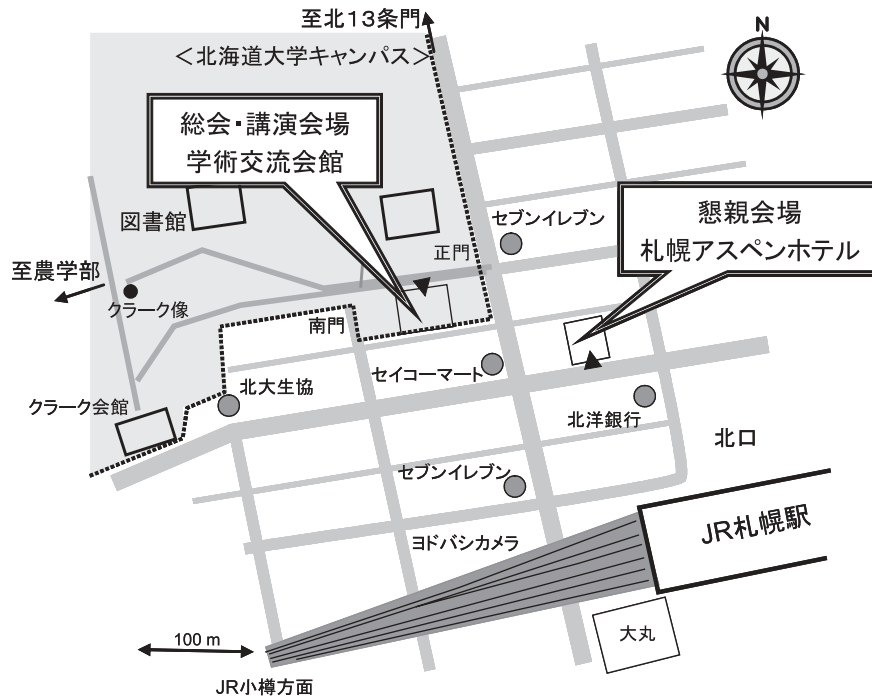
会場のご案内

北海道大学学術交流会館（総会・講演会会場）・札幌アспенホテル（懇親会場）

総会および講演会会場：北海道大学学術交流会館（北8条西5丁目）2階講堂
JR札幌駅北口より徒歩7分、北大正門を入りすぐ左手です。

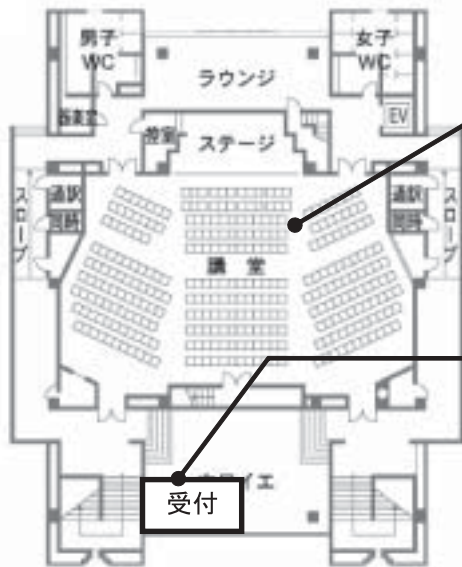
懇親会場：札幌アспенホテル（北8条西4丁目、電話011-700-2111）
講演会会場（学術交流会館）から徒歩5分ほどです。

下記、位置図をご参照下さい。



会場案内図（北大学術交流会館）

2F



学術交流会館 2階 講堂

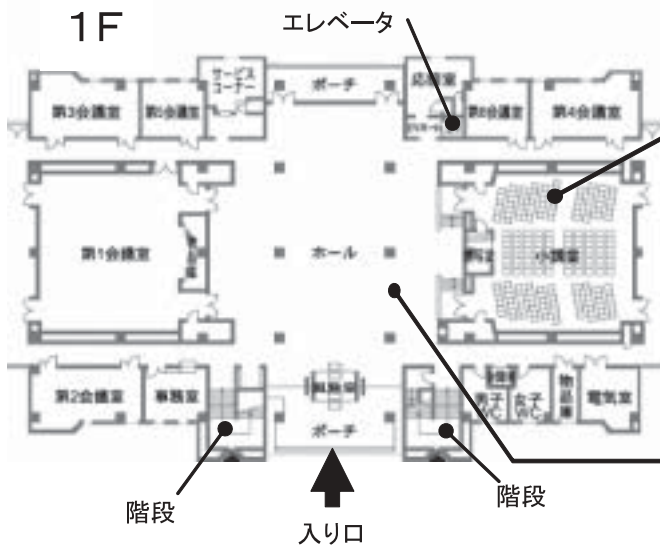
総会
受賞者講演
一般講演
特別講演

受付

パワーポイントファイル受付場所

一般講演第1日目(8月8日)の演者は当日午前中に、第2日(8月9日)の演者は可能な限り第1日目(8月8日)に、プレゼン用ファイルを受付のPCにコピーして下さい。

1F



1階 小講堂(他学会同時開催)

日本生化学会北海道支部会(8月8日)
日本動物学会北海道支部会(8月9日)

展示

他学会同時開催：日本生化学会北海道支部会（8月8日）、日本動物学会北海道支部会（8月9日）が小講堂（1階）において行われます。農芸化学会員は自由に入場できます（無料）。要旨頒布もあります（部数制限有り、有料）。各学会受付にお問い合わせ下さい。

平成20年度 第一回合同学術講演会日程

【8月8日(金)】 北海道大学学術交流会館 2階 講堂

- ・ 日本農芸化学会北海道支部総会 (9:30~10:00)
- ・ 第6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
- ・ 第6回日本農芸化学会北海道支部奨励賞、学生会員奨励賞受賞者講演
山田 美和(北大院工)(10:00~10:30) 座長: 田口 精一(北大院工)
「環境調和型バイオプラスチックの生合成調節研究」
*第6回日本農芸化学会北海道支部学生会員奨励賞受賞

- 瀬戸 義哉(北大院農)(10:30~11:00) 座長: 鍋田 憲助(北大院農)
「エンドファイト感染によるチモシーの誘導抵抗性に関する化学的研究」
*第6回日本農芸化学会北海道支部学生会員奨励賞受賞

- 栗原 秀幸(北大院水)(11:00~11:45) 座長: 川端 潤(北大院農)
「北海道産植物のポリフェノール類及び機能性物質に関する研究」
*第6回日本農芸化学会北海道支部奨励賞受賞

・ 一般講演 (13:00~16:24) (17題、各12分)

・ 磯貝彰日本農芸化学会会長 ご挨拶

・ 懇親会 (18:00~20:00)

場 所 : 札幌アспенホテル(札幌市北区北8条西4丁目、Tel 011-700-2111)

参加費 : 一般 4000円、学生 2000円

【8月9日(土)】 北海道大学学術交流会館 2階 講堂

- ・ 一般講演 (9:30~11:54、13:00~14:24) (19題、各12分)
- ・ 特別講演
宮下 和夫氏(北大院水産)(14:30~15:30) 座長: 大西 正男(帯畜大)
「マリノカロテノイドの構造と機能性」

西村 弘行氏(東海大生物理工)(15:30~16:30) 座長: 浅野 行蔵(北大院農)
「北方系作物の生体調節機能に関する研究」

一般講演プログラム

発表形式：液晶プロジェクターおよび支部が用意したパソコンで発表を行います。動作環境はWindows版PowerPoint Viewer 2007 (PowerPoint 97およびそれ以降のバージョンで作成されたプレゼンテーションの表示が可能)を用います。ただし、Mac版PowerPointで作成の場合は、Windows版での動作を確認しておいてください。なお、発表用ファイルはUSBメモリにて持参し、受付に用意してあるパソコンにコピーして最終的な動作確認を行って下さい（発表終了後にファイルは消去いたします）。一般講演第1日目（8月8日）の演者は当日午前中に、第2日（8月9日）の演者は可能な限り第1日目（8月8日）にコピーを済ませて下さい。また、OHPプロジェクターも用意しておりますので、受付に申し出てください。

講演時間：討論時間2～3分を含めてトータル12分間
座長の先生方は時間進行の厳守をお願い致します。

【8月8日（金）】

（座長：瀬戸 義哉）

- 13：00 (1) コデマリの高度酸化モノテルペン配糖体kodemariosideの絶対配置
川端 潤、吉田香織（北大院農）
- 13：12 (2) アカネスイセン（*Eleutherine americana*）根茎部中のマルターゼ阻害活性成分の探索
家山智大、Maria Gunawan-Puteri、川端 潤（北大院農）
- 13：24 (3) 海藻由来のリポキシゲナーゼ阻害活性物質
栗原秀幸、香川吉央、高橋是太郎（北大院水）
- 13：36 (4) 親鶏におけるリン脂質クラスの分布と化学的組成
柚木恵太¹、高林尚将¹、松山弘幸²、藤野武彦³、三明清隆⁴、小玉芳郎⁴、杉山雅昭⁴、大西正男¹
（¹帯畜大・食品科学、²エヌチキン、³レオロジー機能食品研究所、⁴丸大食品・中央研究所）
- 13：48 (5) 黄金色藻*Ochromonas danica*から得られるchlorosulfolipid類の構造解析
河原哲平、沖野龍文（北大院環境）

（座長：加藤 英介）

- 14：00 (6) 植物の傷害抵抗性獲得におけるジャスモン酸(JA)のシグナル伝達物質としての働き
佐藤千鶴、松浦英幸、鍋田憲助（北大院農）
- 14：12 (7) ツクシウロコゴケ(*Heteroscyphus planus*)培養細胞の粗酵素反応によるセスキテルペンの生成
山田陽介、秦理恵、Leily Tjandrawaskitasari、高橋公咲、鍋田憲助（北大院農）

- 14 : 24 (8) *Lasiodiplodia theobromae*由来の新規シクロヘキセノン化合物
北岡直樹、鍋田憲助、松浦英幸 (北大院農)
- 14 : 36 (9) Triflic acidを利用したFriedel-Crafts反応によるビスホモフェニルアラニンの効率的不斉合成の検討
村井勇太、橋本 誠 (帯畜大)
- 14 : 48 (10) Triflic acidを用いたフェノールのアシル化、Friedel-Crafts反応の制御、フェニルエステルのFries転位の検討
村重 諒¹、橋本 誠² (¹岩手大院農、²帯畜大・生資料)

(座長：崎浜 靖子)

- 15 : 00 (11) アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸合成システム
谷千春¹、村瀬正剛¹、名雪桂一郎²、久我ゆかり³、大友量⁴、大崎満¹、江沢辰広¹
(¹北大院農、²信大院農、³広大院総科、⁴畜草研)
- 15 : 12 (12) アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸の潜在的蓄積能とその対イオンとの関係
土方野分¹、村瀬正剛¹、谷千春¹、大友量²、大崎満¹、江沢辰広¹ (¹北大院農、²畜草研)
- 15 : 24 (13) *Corynebacterium glutamicum*のH⁺-ATPase欠損が呼吸関連酵素活性に与える影響
嘉藤由衣、和田 大、横田 篤 (北大院農)
- 15 : 36 (14) ヨシ根圏からのビスフェノールA分解菌の分離とその特性
佐藤雄介、遠山忠、張榕喆、菊池慎太郎 (室工大・工・応化)

(座長：濱田 茂樹)

- 15 : 48 (15) シロイヌナズナの低温ショックドメインタンパク質は花成を促進する
佐々木健太郎、金明姫、今井亮三 (農研機構・北農研)
- 16 : 00 (16) コムギ低温馴化過程のリン脂質変動を制御するリン脂質生合成酵素は小胞体とゴルジ体に共局在する
須藤慶太¹、榊剛²、今井亮三¹ (¹農研機構・北農研、²東海大・生物理工)
- 16 : 12 (17) コムギの低温馴化過程におけるアポプラストタンパク質のプロテオーム解析
増山 愛^{1, 2}、宇梶慎子¹、小浜孝士³、板部洋之³、榊 剛²、今井亮三¹
(¹農研機構・北農研、²東海大・生物理工、³昭和大・薬)

【8月9日(土)】

(座長：高橋 公咲)

- 9:30 (18) チコリー根抽出成分の血液がん細胞に対する細胞増殖抑制効果について
佐々木将人、木村卓郎、西村弘行(東海大院理工)
- 9:42 (19) ロシア極東産薬用植物抽出物の生体調節機能について
金野真也¹、佐々木将人¹、中村有里²、Valentina M. Peshekhodko³、西村弘行¹
(¹東海大院理工、²東海大生物工、³ロシア極東国立総合大環境科学)
- 9:54 (20) ジャガイモシストセンチュウの関与する甜菜の肥大化
木梨尚人、福井溪太、福澤晃夫(東海大生物理工)
- 10:06 (21) Dimethyl sulfoxideが赤カビ病菌(*Fusarium* sp.)のzearalenone生合成に及ぼす影響
小山知朗、福士幸治、橋床泰之(北大院農)
- 10:18 (22) 植物色素ベタレインの赤ビートからの単離・精製と活性窒素消去能
前田麻起子、崎浜靖子、福士幸治、橋床泰之(北大院農)

(座長：木下 幹朗)

- 10:30 (23) 異なる品種の米を摂取したマウスの腸管粘膜バリア及び免疫応答の比較
小笠原達¹、後藤悠¹、吉田知世¹、藤原麗子¹、柳原哲司²、徳永善也³、園山慶⁴
(¹北大院生命科学、²道立上川農試、³千野米穀店、⁴北大院農)
- 10:42 (24) フラクトオリゴ糖摂取がマウスの経口免疫寛容誘導に及ぼす影響
吉田知世¹、武村直紀¹、藤原麗子¹、園山慶²(北大院生命¹、北大院農²)
- 10:54 (25) デキストリンデキストラナーゼの一次構造決定および組換え酵素の解析
貞廣樹里¹、佐分利亘¹、森春英¹、奥山正幸¹、岡田巖太郎²、木村淳夫¹
(¹北大院農、²静岡大教)
- 11:06 (26) 新規酵素isomaltotriose 6- α -glucosyltransferase(IGT)の機能解析
鐘ヶ江倫世、Young-Min Kim、本同宏成、奥山正幸、森春英、木村淳夫(北大院農)

(座長：西向 めぐみ)

- 11:18 (27) 大腸菌EntD遺伝子の長鎖多価不飽和脂肪酸合成への関与
杉原慎二¹、南広大²、奥山英登志^{1,2}(¹北大院地球環境、²北大理)
- 11:30 (28) ラビリンチュラ類微生物を用いたDHAリン脂質の生産
中野渡瞳、奥山英登志(北大院地球環境)

11 : 42 (29) 活性汚泥から得られた真菌の糖脂質および水浄化能力の比較
柘植純一¹、平塚宙子²、上宮悠²、野崎浩文²、櫛泰典² (¹岩大院連農、²帯畜大畜産科学)

11 : 54-13 : 00 休憩 (昼食)

(座長 : 吹谷 智)

13 : 00 (30) 糞便微生物の定量と母娘間の*Bifidobacterium*属の類似度比較
小田美也子¹、新津佐知子¹、飯田佳奈¹、齋藤康雄²、楠木伊津美¹、池田隆幸¹
(¹藤女子大・食物栄養、²グリコ乳業・中央研)

13 : 12 (31) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Corynebacterium glutamicum*
C.R.Leong¹, S.J.Jo¹, K.Kitagawa¹, Q.Wang², K.Matsumoto¹, C.T.Nomura², T.Ooi¹, and S.Taguchi¹ (¹Hokkaido Univ. Grad. Sch. Engin, ²SUNY-ESF, USA)

13 : 24 (32) 自然界から分離した*Saccharomyces*属酵母の製パン適性
田嶋可奈子¹、田村雅彦²、山内宏昭³、小田有二¹
(¹帯畜大・食品科学、²日本甜菜製糖、³北海道農研)

13 : 36 (33) 酵母*Saccharomyces paradoxus*の製パン用菌株としての諸性質
三雲大¹、山内宏昭²、小田有二¹ (¹帯畜大・食品科学、²北海道農研)

(座長 : 奥山 正幸)

13 : 48 (34) *Rhizopus oryzae*においてスクロースの加水分解に関与する酵素の諸性質
渡辺剛志、小田有二 (帯畜大・食品科学)

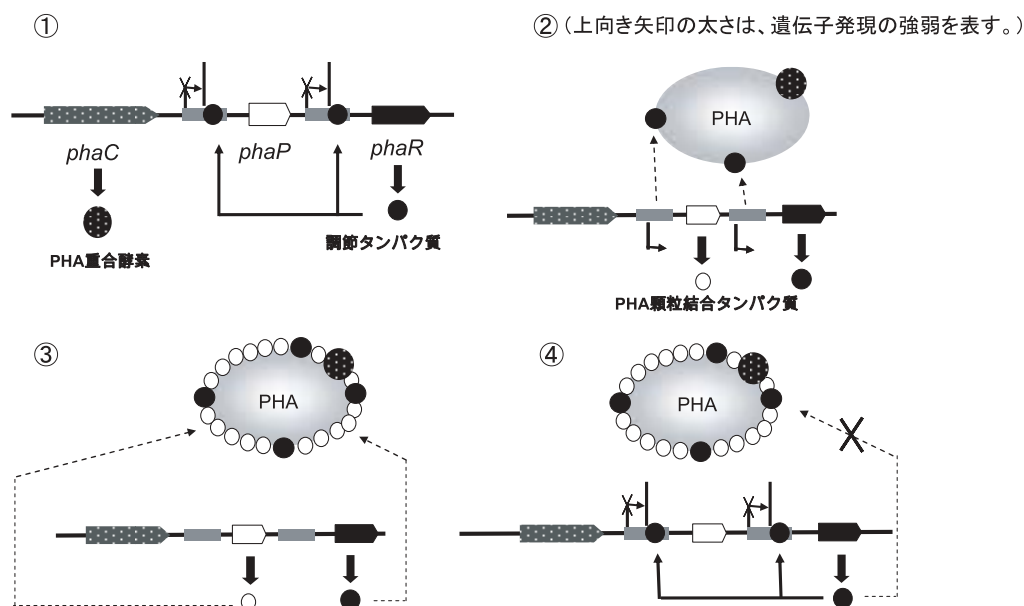
14 : 00 (35) *Pseudomonas* sp. T62由来のL-threo-3-hydroxyaspartate dehydrataseの機能解析と分子モデリング
村上知子、横田 篤、和田 大 (北大院農)

14 : 12 (36) 新規なラクトペルオキシダーゼシステムの開発
石堂拓也¹、金 完燮²、玖村朗人¹、島崎敬一¹ (¹北大院農、²韓京大)

第6回日本農芸化学会北海道支部学生会員奨励賞受賞講演要旨
環境調和型バイオプラスチックの生合成調節研究

山田 美和 (北大院工)

糖や植物油などの再生可能バイオマスから合成されるバイオプラスチックは、使用後は環境中の微生物によって水と二酸化炭素まで分解されることから、自然の炭素循環サイクルに組み込まれ、二酸化炭素の発生を抑制できる環境調和型の新素材として注目を集めている。バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、エネルギーの貯蔵物質として微生物が合成する脂肪族ポリエステルであり、石油系汎用樹脂の代替材料として期待されている。PHAの合成と調節の分子メカニズム解明は、PHAの効率的合成法の開発や望む物性発現に対応する新規PHAの創製に貢献する。



<図 微生物細胞内での PHA 生合成調節モデル>

図のように、PHAの細胞内合成は、高度に調節されていることが明らかになりつつある(1)。調節の鍵となるPhaRは、PHA顆粒表面に強固に結合するPhaPとPhaR自身の遺伝子発現を負に調節するリプレッサーである(図)。PHA顆粒が合成されてくると、PhaRはPHAに結合するとともにプロモーターから解離して、遺伝子発現の抑制が解除される(図)。すると、多数のPhaPがPHA顆粒に結合し、PHA顆粒の表面を覆う(図)。最後にPHA表面での結合サイトを失ったPhaRは、再びDNAに結合し、*phaP*, *phaR* 遺伝子の発現を抑制する(図)。つまり、PhaRのユニーク性は、ターゲットDNAとPHAの両分子に結合することに集約される。そこで、本研究では、PhaRの両分子に対する結合様式をインビトロで調べることで、上記の細胞内におけるPHA生合成調節を分子レベルで理解することを目指した(1, 2)。最後に、DNA結合能低下変異体PhaRを用い、インビトロの結果がインビボでも反映されることを、PHA顆粒の形成様式として電子顕微鏡観察から示した(3)。以上、本研究は、PhaRによるPHA生合成調節の詳細な理解をもたらし、PHA発酵生産システムの実用化への知見を提供した。

(1.Yamashita K.*et al.*, *Biomacromolecules*,8,2449-2454,2006., 2.Yamada M.*et al.*, *J. Bacteriol.*, 189,1118-1127,2007.,3.Yamada M.*et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71,1572-1576,2007.)

第6回日本農芸化学会北海道支部学生会員奨励賞受賞講演要旨
エンドファイト感染によるチモシーの誘導抵抗性に関する化学的研究
北海道大学大学院農学院 瀬戸 義哉

【背景】

チモシーは寒冷地で広く生育する牧草の一種であるが、チモシーに感染する重要な病害の一つに糸状菌 *Cladosporium phlei* の感染によって引き起こされる斑点病が挙げられる。斑点病防除を目的とし抵抗性品種をスクリーニングした結果、興味深いことに抵抗性を示した品種はエンドファイトであるがまの穂病菌 (*Epichloe typhina*) に感染していることが分かった。そこでこの誘導抵抗性を化学的な見地から解明することを目的に研究を行った。

【結果】

胞子発芽阻害物質の探索

従来の研究により *E. typhina* に感染したチモシーに *C. phlei* 胞子懸濁液を散布するとその発芽に異常が見られること、*E. typhina* が *C. phlei* 胞子発芽阻害物質を生産することが見出されている。そこで *E. typhina* 代謝産物が誘導抵抗性に関与している可能性が考えられたため胞子発芽阻害物質の探索を試みた。その結果、阻害物質の単離・構造決定に成功し、本化合物を epichlicin と命名した (Fig. 1)。Epichlicin は β -アミノ酸を含む環状オクタペプチドであるが、立体配置決定のため β -アミノ酸の両エナンチオマーを合成した。合成品及び市販のアミノ酸を標品として用い、改良 Marfey 法により epichlicin の全立体配置を決定した。Epichlicin は約 30 nM で *C. phlei* の胞子発芽を完全に阻害した¹⁾。

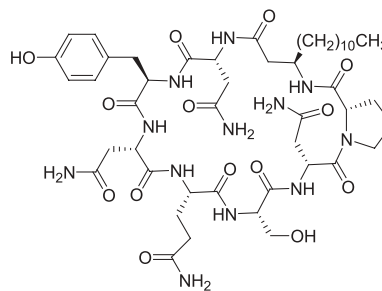


Fig. 1. Epichlicin の構造

Phleichrome 生産誘導物質の探索

E. typhina 培養濾液から *C. phlei* に対して抗菌活性を有する化合物を探索する目的でバイオオートグラフィーを行ったところ、プレート上に赤色を有するスポットが検出された。種々機器分析の結果、このスポットは *C. phlei* の生産する植物毒素である phleichrome と同定された。そこで *E. typhina* 培養濾液から *C. phlei* に phleichrome 生産を誘導する化合物が存在することが示唆されたため本化合物の分離を試みた。その結果二種のジケトピペラジンを単離・構造決定した (Fig. 2)²⁾。

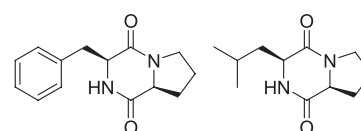


Fig. 2. ジケトピペラジンの構造

【まとめ】

今回単離した Epichlicin は誘導抵抗性に直接関与している可能性が考えられるため今後更なる検討が必要である。また、ジケトピペラジンが phleichrome 生産を誘導するという現象は抵抗性とは直接関わりが無いと思われるが、ジケトピペラジンがグラム陰性のバクテリアに置いてクオルモンとして働くことが報告されているため非常に興味深い。今回得られた結果は、エンドファイト感染による誘導抵抗性の解明のみならず、病原菌、エンドファイト、宿主間での低分子化合物を介したクロストークを理解する上でも重要な知見となると考えられる。

¹⁾Seto Y et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007. ²⁾Seto Y et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005.

第6回日本農芸化学会北海道支部奨励賞受賞講演要旨

北海道産植物のポリフェノール類及び機能性物質に関する研究

(北大院水) 栗原 秀幸

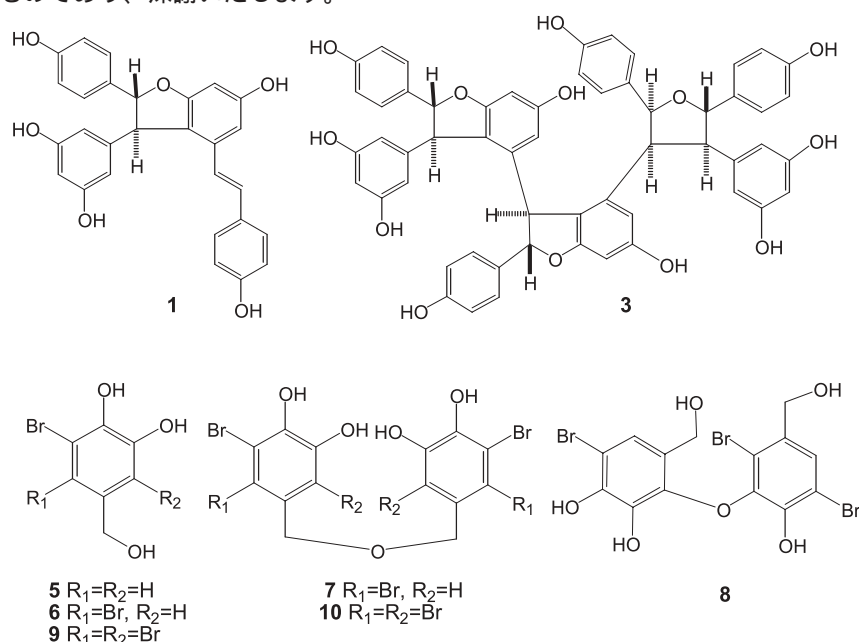
はじめに 北海道には植物資源が豊富にある。中でも海浜砂浜域で生息する植物や海岸に近いところで生育する海藻を対象にして、機能性物質を探索したところ、多くのフェノール性化合物を得ることができた。本研究では、それらの構造に関する化学的な研究を中心に行ってきた。

(1) 海浜のスゲ属植物のオリゴスチルベン類 海浜砂浜に生育するカヤツリグサ科スゲ属植物には、レスベラトロール(3,5,4'-トリヒドロキシスチルベン)の二量体 - ビニフェリン(1)、三量体ミヤベノールC(2)、四量体ミヤベノールA(3)、コウボウフェノールA(3)及びB(4)が存在している。これらの化合物は、2,3-ジアリール-2,3-ジヒドロベンゾフラン骨格が特徴的であり、1を用いてそれらの立体化学を検討した。アリール基の置換やジヒドロフラン環から単純にNMRスペクトルの結合定数から決定することができないため、脱水素化反応-触媒による接触水素添加-ルイス酸による異性化反応を組み合わせて、相対立体配置をtransであることを決定した。2~4の相対配置はphase sensitive NOESY, ROESY、分子模型等により検討した。

(2) 海藻フジマツモ科紅藻のプロモフェノール類 酵母 - グルコシダーゼに対する阻害活性を指標にして、フジマツモ科海藻に含まれる阻害活性物質を探索したところ、モロイトグサから5、ハケサキノコギリヒバから6~8、及びイソムラサキから9、10のプロモフェノール類が得られた。それぞれの海藻から得られたプロモフェノール類は、それぞれモノ-、ジ-、トリプロモベンゼン骨格を持つのが特徴であった。このうち、8は*p*-ジプロモ構造を持つ新規な化合物であった。-グルコシダーゼに対する阻害活性を検討したところ、置換するBr原子の数では、置換数の最も多いトリプロモベンゼン骨格のものほど阻害が強く、さらに、対称二量体である7及び10は他より強い阻害活性を示した。

(3) その他のフェノール類等 湖沼に生息するヒツジグサから抗菌性物質として加水分解性タンニンであるゲラニイン、褐藻からは、-グルコシダーゼ阻害活性物質として、海藻タンニンであるフロロタンニンが得られた。また、海藻からは、グリセロ糖脂質のスルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)やそのものアシル体も -グルコシダーゼ阻害活性物質として同定した。

謝辞 本研究は北大農・農薬化学講座(現生態化学研究室)及び北大水・食品化学第1講座(現資源利用学研究室)で行われてきた研究であり、多くの先生のご指導や諸先輩、同輩、学生のご助力で行ってきたものであり、深謝いたします。



特別講演

マリノカロテノイドの構造と機能性

北海道大学大学院水産科学研究院 宮下和夫

カロテノイドは自然界に存在する一般的な色素で、700種類以上が知られている。カロテノイドの最も一般的な栄養機能性はプロビタミンA活性であり、50種ほどのカロテノイドが体内で吸収されてビタミンAとなる。ヒトの血中に検出される主なカロテノイドとしては、 β -カロテン、リコペン、 α -カロテン、ルテイン、ゼアキサンチン、 γ -クリプトキサンチンなどが知られているが、各カロテノイドの生体中での含量は、摂取する食物によって大きく異なり、欧米人の血中には β -カロテン、リコペン、 α -カロテンが多く見られるが、ルテインやゼアキサンチンは少ないという報告もある。一方、海洋生物には陸上動植物には見られないカロテノイドが多数報告されている。例えば、褐藻のみに含まれるカロテノイドとしてフコキサンチンがある。褐藻中の脂質含量は種類や生育時期及び生育地域などによっても異なるが、最大7%（乾燥重量あたり）、多くは1-3%程度である。フコキサンチン含量も種類などによって大きく異なるが、脂質あたり約10%程度(多いもので30%)含まれており、褐藻類におけるフコキサンチンの含量は、他の陸上植物中のカロテノイドのそれに比べて非常に高いといえる。フコキサンチンは生物生産量が最も多いカロテノイドの一つであり、癌細胞に対するアポトーシス誘導能や抗酸化活性など、カロテノイドに一般的な機能性がこれまでに知られていた。ところが、最近の我々の研究により、フコキサンチンは、肥満モデル動物の内臓脂肪（白色脂肪）中に脱共役タンパク質（UCP1）を発現させ、これにより脂肪を分解して体熱として発散させる活性のあることが明らかになった。また、フコキサンチン投与により、糖尿病病態マウスの血糖値が正常レベルまで低下することもわかった。UCP1は、本来、褐色脂肪組織(BAT)に特異的に存在し、脂肪を分解し熱を産出するが、白色脂肪組織(WAT)中にはUCP1は発現しないと考えられていた。したがって、フコキサンチンのこうした機能は、効果的な抗肥満活性を示す新たな食品素材として注目されている。

ところで、フコキサンチンは生体内吸収時にフコキサンチノールに変換される。したがって、生体内でのフコキサンチンの活性本体はフコキサンチノールなどの代謝物と考えられる。実際、フコキサンチノールもモデル動物での脂肪蓄積を、内臓脂肪中のUCP1の発現を介して抑制した。また、両カロテノイド共に、3T3-L1脂肪細胞の分化におけるグリセロ-3-リン酸デヒドロゲナーゼの活性と脂肪の蓄積をコントロールに比べて有意に抑制した。さらに、フコキサンチノール及びフコキサンチノールは3T3-L1の核内受容体PPAR γ の発現を減少させた。PPAR γ は脂肪細胞の分化に關与する重要な生体因子であり、フコキサンチンやフコキサンチノールの3T3-L1細胞での脂肪蓄積抑制作用はPPAR γ の制御と密接に關係していた。また、果物や野菜中に含まれる各種カロテノイドの活性についても調べたところ、フコキサンチン、フコキサンチノール以外にネオキサンチンも、3T3-L1細胞での脂肪蓄積抑制作用を示すことが明らかになった。ただし、その他のカロテノイド(β -カロテン、ケト基含有カロテノイド、エポキシ基含有カロテノイド、水酸基含有カロテノイド、水酸基とケト基含有カロテノイド、水酸基とエポキシ基含有カロテノイドなど)には抑制効果が認められなかった。脂肪蓄積抑制効果のあったフコキサンチン、フコキサンチノールおよびネオキサンチンと効果が認められなかったカロテノイドの構造を比較することにより、抗肥満効果を有するキサントフィルには、水酸基を有するアレノ構造が必須であることが明らかになった。したがって、この構造が、フコキサンチンなどの抗肥満作用の活性部位と推測できた。アレノカロテノイドと非アレノカロテノイド共に抗酸化活性は示すが、3T3-L1細胞に対しては、このように明確に異なった作用を示す。また、ごく最近、我々は、ホヤなどに含まれるアセチレンカロテノイドが強い抗炎症作用を示す一方で、その他の活性は非常に低いことを見出している。こうした各カロテノイドの特徴的な機能性については、カロテノイドの立体構造の違いと生体分子との親和性といった観点からの解明が今後期待できよう。

特別講演

北方系作物の生体調節機能に関する研究

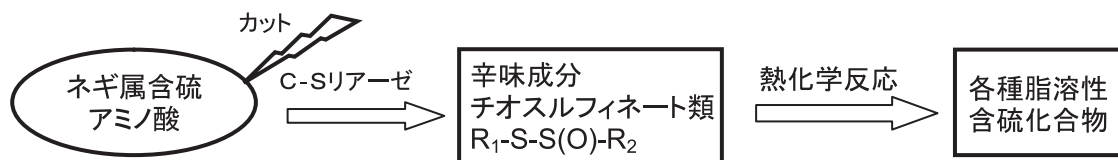
東海大学生物理工 西村 弘行

近年の急激な高齢化や生活習慣の変化によって、がん、虚血性心疾患および脳血管疾患、糖尿病、認知症などの生活習慣病の発症がクローズアップされている。その為、国民医療費が増大し、国民生活への負担が余儀なくされている。

演者はこれまで、北方系食用植物の生体調節機能の解明と調理・加工法を確立する目的で本研究を行った。以下、道産作物ごとに事例を紹介する。

1. 道産ネギ属作物

ユリ科ネギ属植物であるタマネギ、ニンニク、ギョウジャニンニク、ニラなどは古くから国内外で民間療法として活用されていた。共通した主要成分は多量に含まれる含硫化合物で、調理・加工によって以下の反応で様々な成分に変化する。



この反応が速やかに進行すれば、トリスルフィド類、セパエン類、ビニルジチン類、アホエン類が生成し、ヒトLDL酸化抑制活性¹⁾、血小板凝集抑制活性ならびに記憶障害改善効果²⁾が期待される。しかしながら調理・加工条件によって成分や生理機能が大きく変化する。演者は、ネギ属を用いた料理が、古くから強精作用を持つという疫学的情報から、タマネギやニンニクなどを摂取することにより血中テストステロンを増加させ、性的機能老化改善につながると考え、誘導活性物質を追究した。その結果、活性の高い物質はネギ属中のS-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxidesであることを明らかにした。そこで調理・加工法を検証した結果、従来ではなく、ネギ属食材をカットする前に、熱処理をして酵素C-Sリアーゼを失活させる必要があると考えた。³⁾

2. 寒冷地キク科作物チコリーとヤーコン

これまで、本学夕張バイオ試験農場で北欧原産のチコリーならびに南米アンデス高地原産のヤーコンの栽培と生体調節機能に関する研究を行った。チコリーは5月下旬～6月上旬に播種し、10月下旬に塊根を引き抜き、緑葉を除去後、プラスチック製のバットを用いて塊根から二次的に成長する軟白葉を生産した。この食用の軟白野菜の抗動脈硬化活性を明らかにする目的で、抗酸化活性物質の単離・同定を行った。その結果、caffeic acidはじめdicaffeoylquinic acidを同定した。さらに、ヒト骨髄性白血病由来株細胞に対する細胞増殖抑制効果を調べた所、セスキテルペン類の8-deoxylactucinその他を単離・同定した。

一方ヤーコンの塊根部には多量のフラクトオリゴ糖およびクロロゲン酸を含むことが知られているが、その茎葉部には抗酸化活性物質として3,4- および3,5-dicaffeoylquinic acidsその他を含むことを明らかにした。この成分が血糖上昇抑制効果を持つことも臨床的に明らかにされている。ヤーコンの葉は焙煎茶として実用に供されているが、抗酸化活性を消失せずに焙煎する技術を明らかにした。

3. 道産小果実ハスカップとアロニア

道内で特徴的な小果実ハスカップおよびアロニアの抗酸化活性成分として各種ポリフェノールを明らかにし、ヒト介入検証で動脈硬化予防の食材として適していることを確立した。

(引用文献)

- 1) Higuchi, O., Tateshita, K. and Nishimura, H., J. Agric. Food Chem., 51, 7208-7214 (2003).
- 2) Nishimura, H. et al., BioFactors 26, 135-146 (2006).
- 3) 西村弘行、水島豊「テストステロン増加剤、ネギ属植物処理物、およびこれらを含む食品添加物」特開2007-210918.

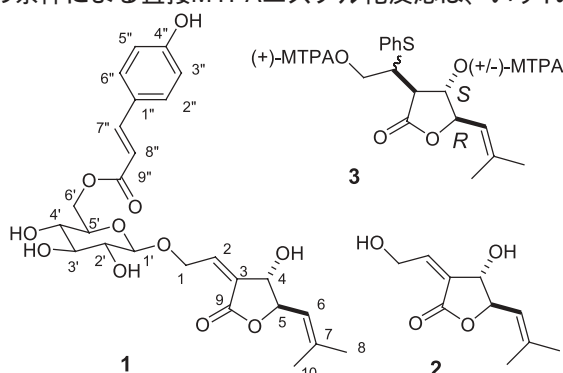
1 コデマリの高度酸化モノテルペン配糖体kodemariosideの絶対配置

(北大院農) 川端 潤、吉田香織

目的: 演者らは、ラット小腸マルターゼ阻害物質の探索研究の過程で、バラ科の灌木コデマリの花および葉から活性成分としてフラボノールアシル配糖体を単離した。¹⁾ 一方、その際に阻害活性は低いものの興味深い高度酸化構造をもつ新規モノテルペンアシル配糖体kodemarioside類を単離し、その相対配置を含めた構造を報告した。²⁾ 今回はそのアグリコン部の絶対配置について検討した。

方法および結果: kodemarioside A (1)をタンナーゼ処理するとアシル基とともにグリコシド結合が開裂して一段階で2が得られた。アグリコン2の種々の条件による直接MTPAエステル化反応は、いずれも脱離生成物を与えたのみであった。そこで2のエキソ二重結合をチオフェノールで保護したチオエーテル体の一級アルコールのみを(+)-MTPAエステルとした後、残る二級アルコールをNMR測定管内で(+)-および(-)-MTPAエステル化して反応物を*in situ* NMR分析し、両ジアステレオマー(3)のスペクトルを得た。その値より、1の絶対配置を(4*S*, 5*R*)体と決定した。

1) K. Yoshida *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4367 (2008). 2) 吉田ら、第49回TEAC要旨集, 2005, p. 323.



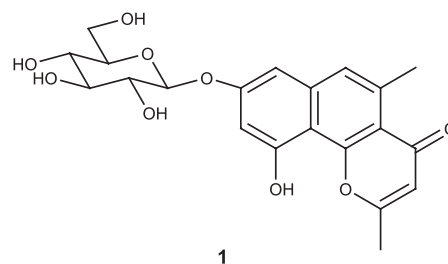
2 アカネスイセン (*Eleutherine americana*) 根茎部中のマルターゼ阻害活性成分の探索

(北大院農) 家山智大、Maria Gunawan-Puteri、川端 潤

目的: 小腸マルターゼ阻害物質はその食後高血糖の抑制効果によって糖尿病、肥満などの予防や治療に貢献できると考えられ、種々の天然素材から活性物質の探索が行われている。インドネシア産植物のスクリーニング実験の結果、¹⁾ 薬用植物アカネスイセン根茎部抽出物に高いマルターゼ阻害活性が認められたため、活性成分の単離同定を試みた。

方法および結果: インドネシア産植物58種の50%メタノール抽出液について、ラット小腸 - グルコシダーゼ粗酵素を用い、マルトースを基質としたときの加水分解活性をマルターゼ活性として、阻害活性試験を行った。その結果、供試植物中25種が高い阻害活性を示した。その中からアカネスイセン (*Eleutherine americana*、アヤメ科)根茎部の50%メタノール抽出物をDiaion HP-20カラムクロマトグラフィーに供し、メタノール溶出画分を水と酢酸エチルで溶媒分配した後、水可溶画分を逆相ODSカラムクロマトグラフィー (50%メタノール)、同HPLC (10-30%アセトニトリル) により順次精製し、活性成分として新規ナフトピロン配糖体eleutherinol 8-O-glucoside (1)を単離し、各種機器分析により構造を決定した。また別の画分より既知のナフトレン配糖体eleuthoside Bを単離した。

1) Gunawan-Puteri and Kawabata, 日本農芸化学会2008年度大会要旨集 p.127.



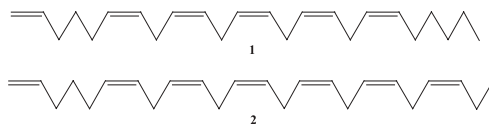
3 海藻由来のリポキシゲナーゼ阻害活性物質

(北大院水) 栗原秀幸、香川吉央、高橋是太郎

背景と目的) リポキシゲナーゼは不飽和脂肪酸にヒドロペルオキシ基を導入する酵素で、アラキドン酸カスケードの最初の反応に関与している。このカスケードにより生成するロイコトリエン類は炎症・アレルギー・動脈硬化など様々な病態に関与している。演者らは海藻成分の酵素阻害活性成分を探索する過程で、リポキシゲナーゼ阻害活性の強い抽出物を得た。

方法) リポキシゲナーゼ反応は以下の条件で行った。基質にリノール酸を用いて、酵素は市販の大豆リポキシゲナーゼを用いた。25℃で5分間酵素反応を行ない、生成ヒドロペルオキシド量を3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンと3-ジメチルアミノ安息香酸存在下で、インダミン色素へと誘導して、598 nmの吸光度を測定した。北海道沿岸で12種類の海藻を採集して、メタノール抽出物の酵素阻害活性をスクリーニングして、阻害物質の単離同定を行った。

結果) 褐藻のフシスジモク由来の阻害活性物質は不飽和脂肪酸のメチルエステル混合物であった。紅藻のフジマツモからは2種類の透明油状の阻害活性物質1及び2を得た。機器分析等で構造を検討したところ、末端メチレンを有するポリエンと決定できた。これらの IC_{50} 値は40 μ M及び5 μ Mであり、供試した既知阻害活性物質であるノルジヒドログアイアレチン酸の400 μ Mと比較して低い値になった。



4 親鶏におけるリン脂質クラスの分布と化学的組成

4

(¹帯畜大・食品科学、²エヌチキン、³レオロジー機能食品研究所、⁴丸大食品・中央研究所)
柚木恵太¹、高林尚将¹、松山弘幸²、藤野武彦³、三明清隆⁴、小玉芳郎⁴、杉山雅昭⁴、大西正男¹

【緒言】 プラズマローゲンは、sn-1位のビニルエーテル基により抗酸化性を有する脂質であり、とくに心筋や脳神経系に多く存在している。演者らは、これまで、十分に活用されていなかった畜産資源である親鶏（卵を生まなくなった採卵鶏）を動物性リン脂質の供給源として利用する目的で脂質成分の分析を進めてきた。先に、鶏表皮にはスフィンゴミエリンと高度不飽和脂肪酸含有エタノールアミンプラズマローゲンが著量存在することを報告しているが¹⁾、今回は親鶏の各種器官に含まれるリン脂質の種類と化学的組成を比較分析した。

【方法と結果】 鶏各器官からFolch法により全脂質を抽出し、ケイ酸カラムクロマトグラフィーによって複合脂質画分を調製した。複合脂質画分の構成は主に、HPLC-ELSDで分離・分析した。条件：カラム，LiChrospher 100 Diol (250 × 4 mm, 5 μ m)；移動相，A液：ヘキサン/2-プロパノール/酢酸 (82:17:1, v/v) + 0.08% トリエチルアミン，B液：2-プロパノール/水/酢酸 (85:14:1, v/v) + 0.08% トリエチルアミン。また、酵素処理により分離濃縮されたプラズマローゲンをメタノリシスして脂肪酸メチルエステルとジメチルアセタールを調製し、GC-MSで分析した。

【結果】 親鶏心臓にはエタノールアミンプラズマローゲン (EP) とコリンプラズマローゲン (CP) が等量含まれていた。肝臓にはEPのみが、砂肝にはEPがCPの約2倍含まれていた。プラズマローゲンの構成脂肪酸は、肝臓では22:6(n-3)が、精巣では22:4(n-6)が著量検出され、プラズマローゲンの組成は組織特異的に異なっていた。

1) Yunoki, K., et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85: 427-433 (2008).

5 黄金色藻 *Ochromonas danica* から得られる chlorosulfolipid 類の構造解析

(北大院環境) 河原哲平、沖野龍文

【研究背景】

黄金色藻 (Chrysophyceae) *Ochromonas danica* は、不等毛植物門 (Heterokontophyta) に属する単細胞遊泳性の植物性鞭毛虫であり、1960年代から chlorosulfolipid (CSL) を有することが知られていた。しかし、高極性で粘性の高い CSL は単離が困難であり、不斉炭素を多く含むこれらの構造解析は不十分であった。また、黄金色藻 *Poterioochromonas malhamensis* 由来の CSL は、抗微生物活性やプロテインチロシンキナーゼ阻害活性を示し、アドレア海産イガイ由来の CSL は細胞毒性を有する。これらの背景から、増殖が比較的速く、大量に CSL を産生する *O. danica* の CSL の化学構造と生理活性を明らかにすることは、医薬品への応用にも期待がもてる。

【方法および結果】

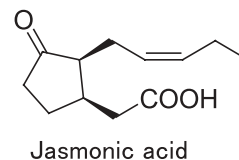
O. danica を、O培地、25℃で1週間培養し(430 L)、連続遠心分離して得られた藻体(乾燥重量 115 g)を、メタノールおよび酢酸エチルで抽出後、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノールで溶媒分画した。ブラインシュリンプに強い毒性を示したブタノール画分を、シリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーにより分画し、さらに C₃₀ カラムを用いた逆相 HPLC に供することで、主要成分である 2,2,11,13,15,16-hexachloro-*n*-docosane 1,14-disulfate と、2種の新規 CSL を得た。これらの平面構造を MS/MS や各種 NMR スペクトルにより決定し、HETLOC および IMPEACH スペクトルを用いて JBCA 法により相対立体構造を決定した。これらの CSL は、いずれもブラインシュリンプ毒性試験で強い活性を示した。

6 植物の傷害抵抗性獲得におけるジャスモン酸(JA)のシグナル伝達物質としての働き

(北大院農) 佐藤千鶴、松浦英幸、鍋田憲助

研究背景) 植物が昆虫の食害といった物理的傷害を受けると、JAが傷害に即応的に生合成され様々な防御反応を引き起こす。これらの反応には、昆虫の消化酵素を阻害するプロテイナーゼインヒビター (PINs) の発現や、昆虫の天敵を誘引する揮発性物質および仲間に緊急を知らせる揮発性物質の発散などが挙げられる。またこれらの防御反応は傷害を負っていない葉でも観察され、傷害のシグナルが非傷害葉へと伝達しているものと考えられる。このシグナル伝達物質は、以前はシステミンというペプチドホルモンであると考えられていたが、JA生合成および応答変異体を用いた接木実験によってその働きは否定されている。現在はJAもしくはその類縁体がシグナル伝達物質であると言われていたが、その移動形態は特定されていない。よって本研究では、JAの移動形態の特定を目的とした。

方法・結果及び考察) 傷害応答時において非傷害葉のJA類の内生量を経時的に測定した。植物体はタバコ (*Nicotiana xanthi*) を使い、ピンセットで葉を圧迫することで傷害を施した。傷害から30分、1, 2, 3, 6および24時間後の非傷害葉のJA類を分析したところ、傷害から30分後にはJAが検出され、2時間後に内生量が最大となった。また2時間までに他のJA類の増加が見られなかったことから、JAそれ自身が非傷害葉へと移動していることが示唆された。そこで重水素標識したJAを傷害葉へ塗布し、傷害から1, 2時間後の非傷害葉を分析したところ、いずれも重水素標識されたJAが検出された。これらのことから、傷害応答時においてJAがシグナル伝達物質として非傷害葉へと移動していることが考えられる。



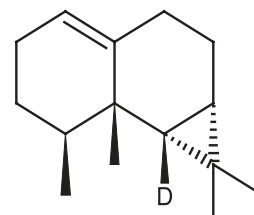
Jasmonic acid

7 ツクシウロコゴケ(*Heteroscyphus planus*)培養細胞の粗酵素反応によるセスキテルペンの生成

(北大院農) 山田陽介、秦理恵、Lely Tjandrawaskitasari、高橋公咲、鍋田憲助

研究目的) ツクシウロコゴケ(*Heteroscyphus planus*)懸濁培養細胞は細胞内に油体が存在するため、テルペンやポリフェノールを多く蓄積する。ツクシウロコゴケが生産するテルペンは維管束植物が生産するテルペンの光学異性体であることが多く、炭素骨格形成や官能基での不斉の導入における酵素反応の立体選択性に興味を持たれる。今までにツクシウロコゴケ培養細胞におけるセスキテルペン、(+)-epicubenol、(+)-cubenene¹⁾及び(-)-cadinene²⁾合成酵素について報告した。今回、ツクシウロコゴケ培養細胞の無細胞抽出液中に(-)-calarene合成活性を認めたので報告する。

方法・結果) セスキテルペン前駆体である重水素標識farnesyl diphosphate([1,1-²H₂]-FPP)を合成し、ツクシウロコゴケ培養細胞の無細胞抽出液を用いて酵素反応を行った。反応生成物をGC-MS分析に供したところ、保持時間12.6分にcalareneと推定される化合物を検出した。この化合物は培養細胞中にも存在したので各種HPLCにより分取し、¹H-NMR、¹³C-NMR分析および旋光度より(-)-calareneと同定した。マススペクトルより[²H₂]-FPPから生成した(-)-calareneには重水素が1個保持されていることが確認できた。



推定される²H(-)-calarene

1) Nabeta, K., et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2065-2070 (1997)

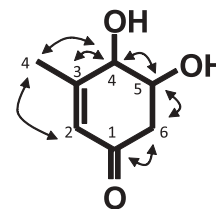
2) Nabeta, K., et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1935-1939 (1995)

8 *Lasiodiplodia theobromae*由来の新規シクロヘキセノン化合物

(北大院農) 北岡直樹、鍋田憲助、松浦英幸

研究背景) 糸状菌、*Lasiodiplodia theobromae*は様々な興味ある生理活性物質を生合成する。本菌は植物ホルモンであるジャスモン酸を生合成することで有名である。また当研究室において、本菌培養液中より葉面散布によってジベレリン生合成阻害、アサガオ花芽誘導促進効果、バレイショ塊茎増収効果、内生ジャスモン酸含有量上昇効果を示すセオプロキシドが単離された。本報告では本菌培養液中よりセオプロキシド類縁体であるシクロヘキセノン骨格をもつ新規化合物を単離し、その構造決定を行ったので報告する。

方法・結果及び考察) *Lasiodiplodia theobromae*を2週間培養した培養液36Lを濃縮した後、酢酸エチルで抽出し、フラッシュカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル、5%メタノール/クロロホルム)、HPLC(0-5%メタノール/水)に供して分画、精製を行った。その結果、化合物1を39mg単離し各種機器分析に供した。各種NMR測定結果から、その構造を新規シクロヘキセノン化合物である4,5-dihydroxy-3-methyl-cyclohex-2-enoneであると決定した。現在、水酸基の絶対配置の決定および生物活性試験を行っている。



1

←→ important correlation in HMBC

9 Triflic acidを利用したFriedel-Crafts反応によるビスホモフェニルアラニンの効率的な不斉合成の検討

(帯畜大) 村井勇太、橋本 誠

研究背景) フェニルアラニン(Phe)の側鎖メチレン部に関する構造活性相関はリガンドならびに生体高分子中の立体的要因を知る上でも重要であり、簡便で高収率かつ立体選択的合成が求められている。光学活性グルタミン酸を用い、その不斉を保持したままFriedel-Crafts反応を利用して、2個増炭したビスホモフェニルアラニン(bhPhe)誘導体骨格合成が有用と考えられるが、従来法ではグルタミン酸誘導体の有機溶媒への溶解度に問題があるため、過剰の芳香族化合物を溶媒としルイス酸存在下、加熱還流条件が必要であった。そのため、貴重な芳香族化合物へ応用することが難しく、Friedel-Crafts反応による増炭反応はほとんど利用されてこなかった。そこでブレンステッド酸であるtriflic acid(TfOH)の α -アミノ酸溶解能に着目し、溶媒兼触媒として用いることでグルタミン酸誘導体との等量・室温・短時間におけるFriedel-Crafts反応によるbhPheの不斉合成を検討した。

方法・結果) 文献に従いL-/D-グルタミン酸から光学活性N-TFA-Glu(Cl)-COOMeを調製し¹⁾、当量の芳香族化合物とTfOH中で反応させた。その結果0 ~ rt条件下で1時間以内に効率よくFriedel-Crafts反応を進行させることが可能となりbhPhe誘導体骨格の合成に成功した。続いてH₂/Pd/Cによるベンジルカルボニル位の還元、6N HCl、80 °CでTFA基、メチルエステルを脱保護²⁾することで、L-/D-bhPhe・HClをとともに高収率で合成することに成功した。合成した化合物はキラルHPLC分析により、ee 99%であった。

¹⁾W. Friedrich, G. Rolf, *Chem. Ber.*, 90 634-638 (1957). ²⁾K. L. Kirk, *J. Org. Chem.*, 45 2015-2016 (1980).

10 Triflic acidを用いたフェノールのアシル化、Friedel-Crafts反応の制御、フェニルエステルのFries転位

(岩手大院農、²帯畜大・生資料) 村重 諒¹⁾、橋本 誠²⁾

有機合成における水酸基の保護として、アシル化が知られており、様々な方法が報告されている。中でもTriflic acid (TfOH)、及び金属triflateをプロモーターに用いた方法は、反応条件が低温、短時間と温和であり、また多様な化合物への応用が可能であるとされている¹⁻³⁾。一方で、TfOHはFriedel-Crafts (F-C)反応のプロモーターとなる⁴⁾ことも報告されていることから、TfOHを用いたフェノールの水酸基のアシル化、芳香環へのF-C反応という2つの反応の制御を検討した。同様にアシル化されたフェノールのBismuth triflateを用いたFries転位⁵⁾も報告されていることから、TfOHを用いたFries転位についても検討した。アシル化剤として塩化アセチル(AcCl)を用い、様々な濃度に調整したTfOH/CH₃CN溶媒中、フェノールと室温、30分反応を行い、¹H-NMRにより生成物の混合比を求めた。結果は、低濃度のときはアシル化が優先し、高濃度では、F-C反応が優先して進行した。両反応の最適化を行うと、アシル化はAcClを3等量用い、TfOH1%、室温、5分で収率99%、F-C反応は、AcClを等量用い、TfOH100%、室温、60分で収率99%で生成物を得た。このようにTfOH濃度により、アシル化、F-C反応の制御が可能であった。また、フェニルアセートのFries転位については、TfOH100%、室温、30分で収率99%で生成物を得ることに成功した。これらの応用として、様々な炭素鎖の脂肪酸クロライドを用いた場合でも、両反応の制御が可能であり、収率95%以上で生成物を得ることに成功した。

¹⁾*Adv. Synth. Catal.* 2004, 346, 1465-1470 ²⁾*J. Org. Chem.* 2001, 66, 8926-8934 ³⁾*Tetrahedron lett.* 2004, 45, 825-829 ⁴⁾*Tetrahedron* 2000, 56, 7199-7203 ⁵⁾*Synlett* 2004, 15, 2794-2796

アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸合成システム

(¹北大院農、²信大院農、³広大院総科、⁴畜草研)

谷千春¹、村瀬正剛¹、名雪桂一郎²、久我ゆかり³、大友量⁴、大崎満¹、江沢辰広¹

研究背景)アーバスキュラー菌根菌(AM菌)は、植物の根に感染すると同時に土壌中にも菌糸ネットワークを構築し、吸収したリン酸をポリリン酸に濃縮して植物に輸送する。研究の進んでいるグラム陰性細菌とは対照的に、真核生物におけるポリリン酸合成酵素(遺伝子)は、唯一、細胞性粘菌でATPを基質としてポリリン酸を合成するものが単離されている以外、まったく報告がない。また、AM菌細胞内におけるポリリン酸の局在についてもほとんど情報がない。本研究では、AM共生におけるリン酸輸送のメカニズムを明らかにするために、ポリリン酸の蓄積に関与するオルガネラの同定と、細胞分画によるポリリン酸合成活性の検出を試みた。

方法)菌糸だけを効率的に収穫するために、ポットに菌糸のみが通過できる37 μmナイロンメッシュバッグを挿入し、その内側に*Glomus* sp. HR1を接種したマリーゴールドを栽培した。播種6週後にメッシュバッグの外側から菌糸を収穫し、磨砕後、Percoll連続密度勾配遠心による分画を行った。各画分のポリリン酸は、PPK/ルシフェラーゼ法により定量した。ポリリン酸合成活性は、ATP存在下、30、30分間のインキュベーション後のポリリン酸の増減で評価した。また、急速凍結/凍結置換した菌糸をDAPI染色し、蛍光顕微鏡下でポリリン酸の局在を観察した。

結果)ポリリン酸は液胞様のオルガネラ中に観察された。ただし、細胞分画中に大部分のポリリン酸は可溶性画分に移行したことから、このオルガネラの単離には至らなかった。比重1.06-1.09 g mL⁻¹の画分にATP存在下でポリリン酸を合成する活性が検出された。この画分には細胞質が濃縮されており、膜画分はほとんど含まれていなかった。本合成活性は、H⁺-ATPase阻害剤およびH⁺脱共役剤で阻害されなかったことから、ATPを直接の基質としていると考えられた。

アーバスキュラー菌根菌におけるリン酸超集積：ポリリン酸の潜在的蓄積能とその対イオンとの関係

(¹北大院農、²畜草研)

土方野分¹、村瀬正剛¹、谷千春¹、大友量²、大崎満¹、江沢辰広¹

研究背景)アーバスキュラー菌根菌(AM菌)は植物の根に感染すると同時に土壌中にも菌糸ネットワークを構築し、土壌から吸収したリン酸を植物に供給する。土壌および根内の菌糸からは無機リン酸の直鎖重合体であるポリリン酸が検出されること、根内の菌糸ではポリリン酸が減少し、鎖長も短くなることなどから、ポリリン酸は菌糸内のリン輸送形態であると推定されているものの、本菌は純粋培養できない絶対生体栄養菌であることから、リン輸送メカニズムの詳細はわかっていない。そこで本研究では、リン酸輸送解析のモデル栽培系を確立し、リン酸化合物とその対イオンの動態を解析した。

結果及び考察)ポットに菌糸のみが通過できる37 μmナイロンメッシュバッグを挿入し、その内側に*Glomus* sp. HR1を接種したミヤコグサを栽培後、メッシュバッグの外側から菌糸を回収した。リン酸欠乏処理後の菌糸にリン酸を与えると、急速にポリリン酸を蓄積し、4時間後には全リンの64%にまで増加した後、9時間後には元のレベルに戻った。このときのポリリン酸蓄積速度は、活性汚泥から単離されたリン酸超集積細菌の蓄積速度とほぼ同等であった。全リンはポリリン酸と同調的に増加したが、オルトリン酸濃度は一定であった。一価および二価の無機カチオンも同調して増加したが、細胞内に多量に存在する有機カチオンであるアルギニンの濃度は変化しなかった。CaまたはMgを培養液から除くと、ポリリン酸の蓄積量が有意に低下した。これらの結果より、AM菌においてポリリン酸は最大のリンプールであり、吸収されたリン酸は直ちにポリリン酸に変換・蓄積されること、ポリリン酸は、速いリン酸取込プロセスと比較的遅いリン輸送を緩衝する役割を果たしていることが示唆された。また、リン酸の取込みとポリリン酸の蓄積には無機カチオン、特にMgとCaが対イオンとして重要な役割を果たしている可能性も示された。

13 *Corynebacterium glutamicum* の H⁺-ATPase 欠損が呼吸関連酵素活性に与える影響

(北大院農) 嘉藤由衣、和田 大、横田 篤

【研究背景】従来、発酵生産の効率化研究は、主に生成物に固有の生合成経路を取り扱ってきた。しかし、当研究室では糖代謝活性増大等の中枢代謝の活性化による生産性の向上を目指している。*C. glutamicum* F172-8株はアミノ酸生産菌である*C. glutamicum* ATCC14067株から取得されたH⁺-ATPase活性低下変異株であり、親株に比べ高い糖消費活性と呼吸活性を示す。本菌の可溶性画分のプロテオーム解析により、中枢代謝に関わるタンパク質発現を比較したところ、解糖系のpyruvate kinase、TCA回路のmalate:quinone oxidoreductase (MQO)及びmalate dehydrogenase (MDH)の発現上昇が検出された。今回は呼吸活性増大機構を明らかにするため、呼吸関連酵素の活性測定を行い、変異株での代謝変化の解析を行った。

【方法・結果】14067株、F172-8株を2Lジャーフェーマンターで培養し、得られた菌体から調製した細胞抽出液を呼吸関連酵素の活性測定に供した。プロテオームの結果に合致して、F172-8株でMQO及びMDH活性の上昇が認められた。また、可溶性NAD⁺-dependent lactate dehydrogenase (LdhA)、乳酸脱水素反応に伴いメナキノン還元する膜結合性L-lactate dehydrogenase (L-LDH)及びD-Lactate dehydrogenase (D-LDH)の活性上昇が確認された。しかし、大腸菌やミトコンドリアで呼吸鎖の入り口に位置しNADHの再酸化に働くNADH oxidase活性に差は見られなかった。これらの結果から、変異株ではMQO/MDHおよび、(L-LDH, D-LDH)/LdhAのカップリングによるNADHの再酸化系の活性増大というユニークな変化により、呼吸活性が増大し、中枢代謝の活性化が行われると考えられた。

14 ヨシ根圏からのビスフェノールA分解菌の分離とその特性

(室工大・工・応化) 佐藤雄介、遠山忠、張裕喆、菊池慎太郎

【はじめに】ウキクサやヨシなどの水生植物は、根圏に酸素、栄養素や生理活性物質などの分泌物を供給して微生物の代謝活性を高めることで化学物質の分解を促進していることが明らかとなってきた。また、その根分泌物には、フェノール性物質などが多く含まれており、これらと類似の構造をもつ汚染物質を分解する微生物を集積する効果も期待できる。本研究では、このようなこれまでの成果を踏まえ、内分泌攪乱活性を有し、水環境中から検出されているビスフェノールA (BPA) のヨシ根圏での生分解を確認するとともに、その分解菌を分離して特性を調べた。

【方法及び結果】水環境中の嫌気底質とヨシ根圏底質中のBPA分解菌数を比較したところ、根圏底質に多くのBPA分解菌が棲息していることが確認された。また、ヨシとその根圏底質からなるマイクロコスムにBPAを25 mg/kgとなるように添加して分解実験を行ったところ、42日間で89%のBPAが分解された。その根圏から *Novosphingobium* 属に属するBPA分解菌 (TYA-1株) を分離することに成功した。TYA-1株は1mMのBPAを24時間以内に速やかに分解し、4-ヒドロキシベンズアルデヒド、4-ヒドロキシ安息香酸と4-ヒドロキシアセトフェノンを介してBPAを代謝することが分かった。

15 シロイヌナズナの低温ショックドメインタンパク質は花成を促進する

(農研機構・北農研) 佐々木健太郎、金明姫、今井亮三

大腸菌の低温馴化においては、低温下で形成されるRNAの2次構造を解消するRNAシャペロンとして機能する低温ショックタンパク質 (CSPs) が必須である。我々は植物においてもCSPsと相同な低温ショックドメイン (cold shock domain ; CSD) をもつタンパク質が存在することを報告し、シロイヌナズナの4つのCSDタンパク質のうち、AtCSP3が耐凍性獲得に必要であることを明らかにしている。今回はAtCSP4についての機能解析の結果を報告する。ノーザン解析により低温応答性発現を検討したところ、AtCSP4の発現は48時間の低温処理(4℃)の間で徐々に増加した。組換えタンパク質を用いた解析から、AtCSP4は2本鎖核酸を解離させる活性を有していた。さらにAtCSP4は大腸菌*csp*変異株の低温感受性を相補できることを確認した。これらの結果からAtCSP4はRNAシャペロンとして機能すると考えられた。Promoter-GUS融合遺伝子の発現解析により、AtCSP4は葉の維管束や茎頂などで特異的に発現しており、細胞内におけるGFP融合タンパク質の局在は主に核小体であることが明らかになった。またAtCSP4過剰発現体では、野生株 (Col-0) と比較して長日条件下で花成が促進された。このことから、RNAシャペロンであるAtCSP4が花成誘導の正の制御因子として機能する可能性が示唆された。

16 コムギ低温馴化過程のリン脂質変動を制御するリン脂質生合成酵素は小胞体とゴルジ体に共局在する

(農研機構・北海道農研、²東海大・生物理工) 須藤慶太¹、榊 剛²、今井亮三¹

晩秋の低温を認識し、耐凍性を獲得する低温馴化には、生体膜の低温適応が必要であるが、その詳細な制御機構は不明である。生体膜を構成する主要リン脂質、Phosphatidylethanolamine (PE) 及び Phosphatidylcholine (PC) はパラレルな3段階の酵素反応によって生合成される。我々はコムギより、PE及びPC生合成の最終段階を司るAminoalcoholphosphotransferase (AAPT) 遺伝子 (*TaAAPT1*、*TaAAPT2*) を単離した。発現解析の結果、*TaAAPT1* は低温馴化により誘導されたが、*TaAAPT2* は低温に応答しなかった。出芽酵母のAAPT二重欠損株 (*ept1*、*cpt1*) を用いて、*TaAAPT1*、*TaAAPT2* の基質特異性を決定したところ、両酵素とも酵母由来酵素が示すような厳密な特異性はず、*TaAAPT1* は主にPEの生合成に、*TaAAPT2* は主にPCの生合成に関わることが明らかになった。また、酵母の二重欠損株は低温感受性を示したが、*TaAAPT1* または *TaAAPT2* の発現はこれを相補した。コムギの低温馴化時におけるリン脂質組成変化を調べたところ、PCに比べPEの増加が顕著であった。このことは、低温馴化過程における *TaAAPT* の発現パターンを矛盾無く説明できる。つまり、コムギの低温馴化時に増加するPE含量は、主にPEを生合成するタイプのAAPTを特異的に発現することにより調節されていることが判明した。さらにGFP融合タンパク質を用いて、コムギ細胞中での一過的発現による細胞内局在解析を行ったところ、*TaAAPT1*、2ともに、小胞体とゴルジ体の両方に局在することが示唆された。この結果から、高等植物においてPE/PCが最終的に生合成される場合は、主に小胞体とゴルジ体であることが明らかになった。

17

コムギの低温馴化過程におけるアポプラストタンパク質のプロテオーム解析

(¹農研機構・北農研,²東海大・生物理工,³昭和大・薬) 増山 愛^{1,2}, 宇梶慎子¹, 小浜孝士³, 板部洋之³, 榎 剛², 今井亮三¹)

コムギは低温馴化過程で雪腐病抵抗性を増大させるが、このときアポプラストには様々な抗菌活性を持ったタンパク質が誘導されると考えられている。本研究では、コムギの低温馴化組織よりアポプラスト画分を分離し、電気泳動的にアポプラストタンパク質の全体像を把握し、雪腐病菌に対して有効な抗菌タンパク質を発見すると共に、低温遭遇により誘導される病害抵抗性の分子機構を明らかにすることを目的とする。

1次元SDS-PAGE解析により低温馴化過程で誘導されるバンドを4本検出した。LC-MS/MS解析により、バンド1が3種の脂質輸送タンパク質(LTP)の混合物、バンド2はそれらとは異なるLTP、バンド3がwheatwin1、バンド4はPeroxidase, -1,3 glucanase, SGNH plant lipase, chitinaseの混合物であった。wheatwin 1,2について、遺伝子レベルで低温馴化による発現誘導を確認したが、組み換えタンパク質の精製は困難であり、抗菌活性の評価はできなかった。次に2次元電気泳動を用いてより詳細なプロテオーム解析を行った。低温馴化により顕著に蓄積するスポットを9個特定し、LC-MS/MS解析により、そのタンパク質を推定した。各スポットはそれぞれ、Taumatin-like protein, PR-1, wheatwin, Chitinase, Basic secretory proteinであることが判明した。これらの結果から、低温馴化によりアポプラストに分泌されるタンパク質は、そのほとんどがいわゆるPR(抗菌性)タンパク質であり、PRタンパク質の中でも特定なものが誘導されていると考えられる。

18

チコリー根抽出成分の血液がん細胞に対する細胞増殖抑制効果について

(東海大院理工)佐々木将人、木村卓郎、西村弘行

【研究背景】 チコリー(学名*C. intybus*. L)は軟白化した葉が食用として用いられている。これまで、当研究室では軟白葉より、ヒト骨髄性白血病由来株細胞U937に対して増殖抑制効果を示す8-deoxylactucinを単離、同定している。しかしながら、その根については大部分が廃棄処分されている現状にあり、チコリー根の生理機能を解明し、その付加価値を高めることが重要だと考える。そこで、新たな生理機能を解明する一環としてU937細胞に対する増殖抑制効果を調べ、活性物質の単離、同定を試みた。

【方法】 U937細胞を5%FBS-RPMI1640培地を使用し、5%CO₂、温度37℃、湿度96%の条件下で一定時間培養し、対数増殖期にある細胞を2.5×10⁵個/mlの細胞濃度になるように調整した。次に、調整した細胞にサンプルを添加し、添加しない細胞をコントロールとして24穴プレートで一定時間培養した。その後、血球計算盤で生存細胞の数を測定し、コントロールの細胞数とサンプル添加時の細胞数を比較して抑制効果を調べた。

【結果】 チコリー根エタノール粗抽出物で極性の差による分画と酸性度の差による分画を行い、最も抑制効果が高い酢酸エチル可溶のフェノール性画分を得た。このフェノール性画分をオープンカラムおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製し、Fr5-1からFr5-4の4つのフラクションを得た。その中で、最も高い抑制効果を示したFr5-2をHPLCで更に精製して活性物質を単離した。活性物質のスペクトルによる同定は現在検討中である。

19

ロシア極東産薬用植物抽出物の生体調節機能について

(¹東海大院理工、²東海大生物工、³ロシア極東国立総合大環境科学)

金野真也¹、佐々木将人¹、中村有里²、Valentina M.Peshekhodko³、西村弘行¹

【研究背景】沿海州を含むロシア極東地域に自生する薬用植物に関して、本学とロシア極東国立総合大学との間で共同研究を行っている。一部の植物について地域民間薬として利用されていることから、その抽出物の生体調節機能について調べたので報告する。

【方法・結果及び考察】ロシアで採集した9種類の薬用植物を乾燥させエタノールで抽出した。それらをin vitroでのACE阻害活性による血圧上昇抑制試験(A)、ヒト骨髄性白血病由来株細胞U937に対する細胞増殖抑制試験(B)、DPPHラジカル捕捉活性法および化学発光 脂質ペルオキシラジカル捕捉活性法による抗酸化活性試験(C)を用いて生理活性の評価を行った。その結果(A)では*Scutellaria baicalensis*の根部、(B)では*Saussurea pulchella*、(C)では*Hypericum ascyron*が比較的高い活性を示した。そこで我々は比較的高い抗酸化活性を示した*Hypericum ascyron*について活性物質の単離・同定を試みた。

Hypericum ascyron 700gをエタノールにて抽出し、得られた抽出物を各種有機溶媒と水によって分配した。そして、得られた各画分を抗酸化活性試験にて評価した。活性の高い画分をさらに酸性度の差によって分画を行い、抗酸化活性を比較した。活性が確認された有機酸性画分を、ODS-A(YMC製)を用いたオープンカラムに供し、得られた各画分を抗酸化活性試験にて評価した。得られた各画分の中で寄与率の高かったFr.1とFr.3を高速液体クロマトグラフィーに供し、活性物質の単離を行った。

20

ジャガイモシストセンチュウの関与する甜菜の肥大化

(東海大生物理工) 木梨尚人、福井深太、福澤晃夫

ジャガイモシストセンチュウ(*Globodera rostochiensis* : 以下PCN)は、ナス科植物に寄生する重要な農害虫である。倶知安町富士見のPCN発生甜菜圃場にジャガイモ及びトマトの植え込み、あるいはヤシ油脂肪酸ジエタノールアミド類を散布したところ甜菜の肥大化が見られた。

【材料・方法・結果及び考察】汚染圃場におけるPCN密度は乾土1gあたり100~250頭であった。散布した化合物は、酢酸ジエタノールアミド、デカン酸ジエタノールアミド、オクタデカン酸ジエタノールアミド及びヤシ油脂肪酸ジエタノールアミドを含む非イオン性洗剤等である。これらの化合物を昨年5月末に1回のみ約15cmに生長した甜菜の根元に散布した。散布量は1㎡あたり(甜菜7株)に9g、5.5g、1.8g、洗剤については30g、20g、10gを散布した。ジャガイモの根茎とトマト苗を甜菜株1つ置きに植え込み、一ヶ月後に除去した。アミド類の合成法は相当する脂肪酸からthionyl chlorideを用いて脂肪酸クロリドを合成し、pyridine存在下でalkanolamineと反応させアミド化し、加水分解して得た。

昨年10月18日に甜菜根部を収穫し、未処理区から10株を採取し一株あたりの平均重量を求めた結果1.35Kgであった。酢酸ジエタノールアミド施用区画において、散布量1.8gで今回最大株である2.85Kg(標準の2.11倍)デカン酸ジエタノールアミドは散布量9g散布で絞り汁の糖度が23.4%と糖度最高値であった。トマトの植え込みで最大株が1.96倍、ジャガイモの植え込みでは1.56倍に肥大化した。洗剤は散布量30gの平均が2.27Kgで標準の1.68倍であり、バラツキがなく平均的に大きくなった。PCNが存在しないと肥大化が起こらないことから、孵化する際に何らかの植物生長促進物質が分泌されていることが推測された。

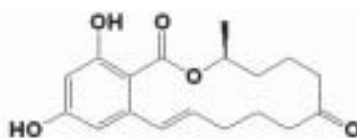
21

Dimethyl sulfoxideが赤カビ病菌(*Fusarium* sp.)のzearalenone生合成に及ぼす影響

小山知朗、福士幸治、橋床泰之 (北大院農)

研究背景) Zearalenone (ZEN) は主に赤カビ病菌 (*Fusarium* sp.) が産生するエストロゲン作用を持つマイコトキシンである。海外ではブタのZEN汚染飼料摂取による死亡例も報告されている。わが国ではZENの飼料への暫定的な基準値を1.0 ppmに設定している。しかし、赤カビ病菌のZEN生合成には未だ不明な点が多く、制御する因子の報告例も少ない。本研究では赤カビ病菌の生合成に影響を及ぼす化合物を探索することを目的とした。

方法・結果) 本研究では北海三共(株)から供与された*F. graminearum* JD02a株を用いて試験を行った。予備試験においてdimethyl sulfoxide (DMSO) 添加により、ZEN産生量が増加していることを確認した。DMSOがZEN生合成に与える影響を調べるため、Potato dextrose agar培地にDMSO [10, 50, 100, 200 mM; 100 mM = 0.7% (v/v)] を添加し試験を行った。培養後の培地抽出物のZEN及びエルゴステロール量をコントロールと比較した。その結果、菌の生育に影響を与えない濃度のDMSO添加培地においてZENの産生量が約350 ppmに達していることが明らかとなった。また、DMSO添加培地では菌叢が黄色を呈した。



zearalenone

22

植物色素ベタレインの赤ビートからの単離・精製と活性窒素消去能

(北大院農・応生科) 前田麻起子、崎浜靖子、福士幸治、橋床泰之

研究背景) 植物色素の一つであるベタレインには、赤～紫色を示すbetacyaninと黄色を示すbetaxanthinがあり、アカザ科やヒユ科など一部の植物にのみ分布が限られている。ベタレインは食品着色料として利用されており、抗酸化物質として応用面での研究が進められている。一方、植物細胞における抗酸化機能についてはほとんど報告例がなく未知の部分が多い。そこで本研究では、ベタレインの植物細胞における生理機能を明らかにすることを目的とし、動植物細胞における酸化傷害の原因物質として近年注目されている活性窒素消去能を検討した。

方法・結果及び考察) ベタレインを含む代表的な植物である赤ビート(*Beta vulgaris* L.)の根を凍結後圧搾し、得られたベタレイン色素液を逆相HPLCに供し、主要な2つのピーク(F1、F2)を分取した。F1は黄色、F2は赤色を呈しており、吸収スペクトル分析の結果、それぞれの吸収極大が474 nm、537 nmと、betaxanthin及びbetacyaninの特徴を示したことから、F1をBx-1、F2をBc-1とした。最も毒性が高い活性窒素種であるペルオキシナイトライト(ONOO⁻)とBx-1、Bc-1の反応性を調べたところ、Bx-1、Bc-1共にONOO⁻ 添加によって速やかに退色した。また、Bx-1、Bc-1共に反応後の吸収スペクトルに新たな吸収ピーク(350 nm)が見られたことから、ONOO⁻ との反応生成物が同じ、または同一共鳴系を有する可能性が示された。以上の結果は、赤ビートベタレインが活性窒素消去能を持つことを示している。

23

異なる品種の米を摂取したマウスの腸管粘膜バリア及び免疫応答の比較

小笠原達¹、後藤悠¹、吉田知世¹、藤原麗子¹、柳原哲司²、徳永善也³、園山慶⁴
 (¹北大院生命科学、²道立上川農試、³千野米穀店、⁴北大院農)

【背景・目的】北海道米の一品種である「ゆきひかり」を摂取することで、米アレルギー患者の皮膚炎症が改善されることが報告されているが¹⁾、その作用機序は解明されていない。我々はこれまでに、マウスに異なる品種(ゆきひかり、コシヒカリ、はくちょうもち、吟風)の米を摂取させることで、品種に特有の腸内細菌叢が形成され、コシヒカリ摂取群と比して、ゆきひかり摂取群では *Akkermansia muciniphila* の腸内細菌叢に占める割合が低いこと²⁾、ならびに卵白アルブミン(OVA)誘導アレルギー性下痢症マウスにおいて、ゆきひかり摂取群では他群と比して下痢の発症頻度が低い傾向にあることを示してきた³⁾。以上の結果より、ゆきひかりの摂取時には腸内のムチン分解菌である *A. muciniphila* が少ないために腸管でのアレルギータンパクの透過が少ないと推測した。本研究ではこのことを明らかにするために、マウスの腸管のタンパク透過性及び経口抗原に対する抗体産生を比較した。

【材料・方法】上記の4品種の米粉を主成分とする精製飼料をBALB/cマウスに自由摂取させ、OVA(0.1 mg)を週に5回投与した。OVAの投与開始前及び投与開始後1週おきに、血清中のOVA特異的抗体価をELISAにより測定した。11週間のOVA投与後、結腸反転サックを用いてタンパク透過性を評価した。

【結果・考察】OVA特異的IgG抗体価はOVAの投与開始2週後から9週後まで上昇を続け、ゆきひかり摂取群において他群よりも低く推移した。また結腸におけるタンパク透過性もゆきひかり摂取群において低値を示した。これらの結果は、ゆきひかり摂取時には経口抗原の腸管透過が少ないことにより、その抗原に対する抗体産生が抑制されることを示唆する。1) 柳原 北海道中央農試報告 2002、2) 小笠原ら 日本栄養・食糧学会 2008、3) 小笠原ら 日本農芸化学会 2007

24

フラクトオリゴ糖摂取がマウスの経口免疫寛容誘導に及ぼす影響

(北大院生命¹、北大院農²) 吉田知世¹ 武村直紀¹ 藤原麗子¹ 園山慶²

【背景・目的】発育初期の腸内細菌叢が発育後の免疫応答に影響を及ぼすことが示唆されている。我々は、妊娠・授乳期の母マウスに難消化性オリゴ糖であるフラクトオリゴ糖(FOS)を摂取させることにより、発育初期の仔マウスの腸内細菌叢を制御できることを報告した¹⁾。またこのことを、発育後にアトピー性皮膚炎を自然発症するNC/Ngaマウスに適用し、発育初期の腸内細菌叢が発育後の皮膚炎発症に影響を及ぼすことを示した²⁾。更に我々は、発育初期の腸内細菌叢が発育後の経口免疫寛容誘導に及ぼす影響を明らかにしようとしている。今回はその一環として、発育したマウスにおいてFOS摂取による腸内細菌叢の変化が経口免疫寛容誘導に影響を与えるか評価した結果を報告する。

【材料・方法】雌性BALB/cマウスに精製飼料(FOS(-))またはこれにFOSを5%添加した飼料(FOS(+))を3週間自由摂取させた後、卵白アルブミン(OVA、20 mg/頭)あるいは溶媒(生理食塩水)を4日間連続して経口投与した。その後、OVAで皮下免疫し(1 mg/頭)、OVA特異的血清抗体価および脾細胞増殖速度(*in vitro*におけるBrdU取り込み)の測定を行った。更に盲腸内容物からDNAを抽出し、16SリボソームRNA塩基配列に基づくPCR-DGGE法により、腸内細菌叢の類似性を解析した。

【結果・考察】血清抗体価および脾細胞増殖応答はFOS(-)群およびFOS(+群)ともに免疫前にOVAを経口投与することにより有意に抑制されたが、FOS(-)群に比してFOS(+群)で抑制が大きい傾向にあった。FOS(-)群およびFOS(+群)でDGGEバンドパターンが異なったので、成マウスにおいてFOS摂取による腸内細菌叢の変化が経口免疫寛容誘導に影響するかもしれない。

1) Fujiwara et al. 2008 Br. J. Nutr. 2) 藤原ら 2007 農化大会

デキストリンデキストラナーゼの一次構造決定および組換え酵素の解析

(¹北大院農, ²静岡大教)

貞廣 樹里¹, 佐分利 亘¹, 森 春英¹, 奥山 正幸¹, 岡田 巖太郎², 木村 淳夫¹

研究目的) デキストリンデキストラナーゼ (DDase) は, マルトオリゴ糖からデキストランを合成する酵素であり, マルトオリゴ糖の非還元末端からグルコシル基を受容体へ連続的に α -1,6転移する。デキストランは現在, 産業的にデキストランスクラーゼによりスクロースから合成される。これに対し, DDaseは, ほぼ全てのマルトオリゴ糖をデキストランに変換できるため, 高収率および低コスト化の実現が期待される。我々は, *Gluconobacter oxydans* 菌体外DDase遺伝子を取得し, DDaseの一次構造を初めて明らかにした。大腸菌での生産系を確立し, 組換え酵素を用いてDDaseの解析を行った。

方法・結果及び考察) *G. oxydans* より全長3855bpからなるDDase遺伝子を単離し, 塩基配列を決定した。本酵素のアミノ酸配列は1284残基からなり, 二次構造予測により3ドメインを有すると予測された。N末端およびC末端ドメインは α -ストランドを, 両ドメインに挟まれた中央ドメインは β -ヘリックスを豊富に含む構造だった。大腸菌を宿主として, Hisタグを付加したDDaseを生産した。調製した無細胞抽出液からアフィニティークロマトグラフィーにより精製酵素を得た。オリゴ糖から生成されるデキストランの定量に基づく従来の反応速度測定法と比較し, より精密な初速度を初期生成物の定量により求めた。N末端およびC末端から欠失させた変異酵素の触媒活性の有無から, N末端ドメインおよび中央ドメインからなる構造が活性に必須であることが明らかになった。

新規酵素 isomaltooligosaccharide 6- α -glucosyltransferase (I6GT)の機能解析

(北大院農)

鐘ヶ江 倫世, Young-Min Kim, 本同 宏成, 奥山 正幸, 森 春英, 木村 淳夫

研究背景) 我々はこれまでに *Bacillus* sp.より新規酵素I6GTを見出し, 酵素化学的諸性質および一次構造を明らかにした。本酵素は, イソマルトオリゴ糖(IMO)の非還元末端グルコシル基を受容体 (IMO) へ連続的に α -1,6転移し様々な重合度のIMOを生成する。推定アミノ酸配列は, *Streptococcus mutans* 由来dextran glucosidase(DGase)と高い相同性を示す。DGaseはデキストランやIMOなどの非還元末端 α -1,6グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素である。本研究では, I6GTとDGaseの性質の違いを明らかにすることを目的とし, 本酵素を大腸菌で生産し, その性質を解析したので報告する。

方法・結果及び考察) PCRにより目的遺伝子全長を含むDNA断片を取得した。推定アミノ酸配列は, GH family 13酵素に必須なアミノ酸残基を保有し, 特にDGaseと高い相同性(68%)を示した。従って, 本酵素は転移反応を触媒するにもかかわらず, 加水分解酵素であるDGaseによく似た立体構造を有すると予想される。I6GT遺伝子が大腸菌で発現させ, 電気泳動的に単一の精製酵素を得た。次に組換え酵素の諸性質を調べた。至適pHは7.8であり, pH安定性, 温度安定性はそれぞれ6.3-10.4, 40℃以下であった。I6GTはDGaseと同様に α -1,6グルコシド結合を持つ基質(IMOなど)に対して高い特異性を示したが, DGaseは主に加水分解反応を触媒するのに対し, I6GTはglucose単位で連続的に α -1,6転移する反応を触媒した。また, 両酵素とも *p*-nitrophenyl α -D-glucoside(*p* NPG)に高い活性を示す。2mM *p* NPGから *p*-nitrophenolとglucoseの遊離速度より糖転移率を求めると, I6GTでは95%以上であるのに対し, DGaseでは65%であった。以上の結果からI6GTはDGaseと異なり, IMOや *p* NPGに対し転移反応を触媒し, 重合度の高いIMOを生成する酵素であることが明らかになった。

27 大腸菌EntD遺伝子の長鎖多価不飽和脂肪酸合成への関与

(¹北大院地球環境、²北大理) 杉原慎二¹、南広大²、奥山英登志^{1,2}

研究背景) 細菌において長鎖多価不飽和脂肪酸 (以下LCPUFA) は *pfaA,B,C,D,E* からなる *pfa* 遺伝子により合成される。*pfaE* は Sfp 型の phosphopantetheinyl transferase (PPTase) をコードする遺伝子である。Sfp 型 PPTase はそのドメイン構造から LCPUFA 合成に関わるグループ と大腸菌の enterobactin 合成に関わる *entD* に代表されるグループ (EntD タイプ) に分けられる。昨年11月の本会でエイコサペンタエン酸 (EPA) 合成細菌 *Photobacterium profundum* SS9 の EntD タイプ PPTase 遺伝子をクローニングし、この遺伝子が PUFA 合成に関わることを初めて報告した。本研究では大腸菌の *entD* 自身が LCPUFA 合成に関わるか否かを検討した。

方法・結果及び考察) *entD* として大腸菌 K-12 株の Aska クローンライブラリー (Strain No. JW5058; 国立遺伝学研究所) を利用した。*entD* がクローニングされているベクター (pCA24n::*entD*) と *Shewanella pneumatophori* SCRC2738 由来の *pfa* 遺伝子のうち *pfaE* だけを欠くクローンである pEPA 1,2,3 (相模中央化学研究所) を大腸菌 DH5 で共発現した。20、48 時間培養後、得られた細胞を直接メタノリシした。脂肪酸メチルエステルを GC/MS に供したところ、EPA が検出されたことから *entD* の LCPUFA 合成への関与が確認された。EPA の含量は全脂肪酸の約 1.5% であったが、この EPA レベルは *S. pneumatophori* SCRC2738 や *Moritella marina* MP-1 の *pfaE* を pEPA 1,2,3 と共発現させた場合の 12% に比べて著しく低かった。これは PfaA タンパク質中に存在するアシルキヤリアータンパク質部位に対する EntD と PfaE の基質特異性が大きく異なることによると考えられる。

28 ラビリンチュラ類微生物を用いた DHA リン脂質の生産

(北大院地球環境) 中野渡瞳、奥山英登志

背景と目的) ドコサヘキサエン酸 (DHA) はその多様な生理作用から栄養素として必須であり、サプリメントなどとしても広く利用されている。この場合、DHA は脂肪体 (DHA 脂肪) のものが摂取されるのが普通である。最近、DHA の分子形態による特異的生理機能が注目されているが、DHA を含有するリン脂質 (DHA リン脂質) の抗疲労作用と持久力増強作用¹ はその一例である。従来、DHA は DHA 脂肪も DHA リン脂質も魚油を原料としている。しかし、海洋汚染の影響など問題点も多いことから、新たな供給源が求められている。本研究では、アメリカなどでは既に DHA 脂肪の供給源として実用化されている DHA 蓄積性の微生物を用いた DHA リン脂質の製造法について検討した。

方法・結果及び考察) DHA 蓄積性ラビリンチュラ類微生物である 12B 株をブドウ糖を含む F 培地 (1% ペプトン、1% 酵母エキス、8% ブドウ糖、50% 海水) で 30、3 日間培養した。このときの細胞収量は乾燥重量で 23 mg/ml であった。乾燥菌体当りの脂質量は 43%、全脂質中の脂肪、リン脂質の割合はそれぞれ 67%、13% であった。この細胞の一部をブドウ糖を欠く Z 培地 (1% ペプトン、1% 酵母エキス、50% 海水) に移して 2 日間培養すると、細胞収量は 3 mg/ml から 8 mg/ml に増加した。乾燥菌体当りの脂質量は 9%、全脂質中の脂肪、リン脂質の割合はそれぞれ 5%、67% であった。培養液当りのリン脂質含量は 5 mg/ml から 15 mg/ml へと増加した。以上の結果は 12B 株においてはブドウ糖飢餓条件下で脂肪のリン脂質への変換が起きていることを示唆している。全脂質に由来する脂肪酸中の DHA 含量は、F 培地、Z 培地で培養後の細胞でそれぞれ 44.7%、57% であった。

¹特開 2007 - 161703 抗疲労化合物および持久力増強作用化合物及びそれらを含む含有する飲食品 (発明人: 古家 加夫留、長澤 伸一郎; 出願人: 旭化成株式会社)

29

活性汚泥から得られた真菌の糖脂質および水浄化能力の比較

(¹岩手大学大学院連合農学研究科, ²帯広畜産大学畜産科学科) 柘植純一¹, 平塚宙子², 上宮悠², 野崎浩文², 柳泰典²

研究背景・目的) 活性汚泥中では細菌, 真菌, 原生動物, 後生動物が共存しており, 環境の変化に対する適応力が高く, 流入水の温度が低下する寒冷期においても処理水の質は良好に維持される。我々はこれまでに活性汚泥から分離した真菌の糖脂質を比較した結果, 活性汚泥で寒冷期に増加する傾向にある糖脂質パターンと接合菌類の *Mucor* sp. の中性糖脂質パターンが類似性を有することを報告した¹⁾。今回は分離した真菌から得られたセレプロシド類(CMH)の化学構造およびこれらの真菌の水浄化力に関する新たな知見について報告する。

方法・結果及び考察) 2007年1月および5月に活性汚泥から分離・同定された5属の真菌から定法に従いCHCl₃-MeOH混液により脂質を抽出した。得られた総脂質の中性スフィンゴ糖脂質画分からCMHIに相当する糖脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーにより単離し, MALDI-TOF/MSおよびGC/MSによりそれらの構造解析を行った。その結果CMHIはいずれもGlcCerであり, これらの主なスフィンゴイド塩基は9-Me d18:2, 2-ヒドロキシ脂肪酸はh16:0, h18:0, h18:1で構成されていた。分離された真菌の10 におけるBOD除去力を比較したところ, 1月に分離された真菌では除去率70%前後で良好であったが, 5月にのみ分離された真菌では除去率20%で極端に低かった。またクロラムフェニコールを100 µg/ml含む合成下水中で8日間培養した活性汚泥を用いた同様の試験でも70%以上のBOD除去率が得られたことから, 低温条件下では活性汚泥中の寒冷期に優占種となる真菌類が水浄化に大きく貢献している可能性が強く示唆された。

1) 柘植ら, 2008年度農化大会講演要旨集p207。

30

糞便微生物の定量と母娘間の *Bifidobacterium* 属の類似度比較

小田 美也子¹, 新津 佐知子¹, 飯田 佳奈¹, 齋藤 康雄², 楠木 伊津美¹, 池田 隆幸¹ (¹藤女子大・食物栄養, ²グリコ乳業・中央研)

研究背景) ヒト腸内フローラ構成微生物の1種である *Bifidobacterium* 属は, 一般的にヒトの健康維持に重要な役割をもつとされており, 生後まもなく母親から享受されると考えられている。実際に, 母と乳児の *Bifidobacterium* 属は類似しているとの報告がある。しかし, 乳児から成人になるにつれて腸内菌叢は変化すると言われている。そこで, 本研究では, 健康な母親と成人の娘の糞便微生物とさらに *Bifidobacterium* 属の比率における母娘間類似度を調査した。

方法) 健康な14組の成人母娘(母:平均年齢50歳, 娘:平均年齢21歳)から抗生物質等を禁止のうえ, 糞便を提供してもらった。併せて食事記録法により食事調査を3週間行い, 各栄養素の摂取状況, エネルギーの算出を行った。糞便微生物叢の定量は生菌数にて計測し, *Bifidobacterium* 属の測定は種特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRで定量した。定量結果はクラスター分析により類似度を算出した。

結果及び考察) 母娘各14人の食事について, エネルギー, 各種栄養素摂取は個人差があり, ばらつきがみられた。糞便微生物9種の定量では14組中6組の母娘で有意な類似がみられた ($p < 0.01$)。 *Bifidobacterium* 属8種の比率では14組中9組の母娘に有意な類似がみられた ($p < 0.01$)。興味深いことに, 糞便微生物および *Bifidobacterium* 属において強く類似していない母娘でも, その保持する種は類似している傾向がみられた。これらのことから, 成人となっても母娘間で *Bifidobacterium* 属の強い類似が見られる結果となり, *Bifidobacterium* 属は出産等で母から娘へ享受され, 成人になってもその比率が比較的安定して保持されている可能性が示唆された。

31

Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Corynebacterium glutamicum*

(¹Hokkaido Univ. Grad. Sch. Engin, ²SUNY-ESF, USA) C. R. Leong¹, S.J. Jo¹, K. Kitagawa¹, Q. Wang², K. Matsumoto¹, C. T. Nomura², T. Ooi¹, and S.Taguchi¹

Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], a typical biopolyester that has been studied extensively from its production to properties. In our previous study, we established the P(3HB) production system in a Gram positive bacteria, *Corynebacterium glutamicum*, which is well-known as an amino acid producer. This would provide the solution to the problem of contamination caused by the outer membrane lipopolysaccharide (LPS) endotoxins in the PHAs isolated from Gram-negative organisms. In the present study, we attempted to produce P(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] in *C. glutamicum*. By introducing 3HV as the secondary monomer unit, P(3HB-co-3HV) become more flexible and easier to mold compare to P(3HB) due to the reduced crystallinity. Therefore, this would enable the commercial application of P(3HB-co-3HV) in a wider range. The gene operon encodes monomer-supplying enzymes, β -ketothiolases (PhaA and BktB), acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) as well as PHA synthase (PhaC) was introduced into the *C. glutamicum*. P(3HB-co-3HV) with 3HV fraction of 7-28 mol% was produced in the recombinant *C. glutamicum* by feeding propionate as a precursor. We also investigated *de novo* synthesis of P(3HB-co-3HV) from single carbon source.

32

自然界から分離した*Saccharomyces*属酵母の製パン適性

(¹帯畜大・食品科学、²日本甜菜製糖、³北海道農研)

田嶋可奈子¹、田村雅彦²、山内宏昭³、小田有二¹

目的)十勝支庁管内で採取した果実、花などから分離した*Saccharomyces*属酵母の製パン適性について調べた。

方法)使用した菌株は、*S. paradoxus* AK42、43、45、49、*S. cerevisiae* AK46の5株および対照の市販パン酵母分離株(NBY)である。これらの菌株は、YPS培地(2.0% Yeast extract, 4.0% Peptone, 0.2% KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄・7H₂O, 3.0% NaCl, 0.05% アデカノール LG-294, 2.0% スクロース)で30℃、24時間振盪培養した。この菌体を遠心分離で回収し、蒸留水で2回洗浄してから吸収板の上に広げて湿菌体(固形分33%)とした。必要に応じて対照として市販イーストを使用した。

結果)ストレート法で製パン試験を実施したところ、焼成したパンの比容積はAK42で4.72、AK43で4.98、AK45で4.99、AK46で4.91、AK49で5.02、NBYで5.59、市販イーストで5.23であった。5株とも市販イーストとNBYよりも比容積がやや劣るものの、ある程度のパンをつくることのできた。中種法による製パン試験を実施する前に、糖を添加しない中種生地からのガス発生速度の変化を追跡した。NBYのような製パン用酵母は高マルトース発酵性を備えており、測定開始後60分以降に小麦粉中のデンプンからアミラーゼの作用で生成するマルトースを発酵してガスを発生する。同様の性質が見られたのはAK46だけであった。そこで、AK46を使用して中種法による製パン試験を実施した。比容積は、AK46で5.71、AK43で5.0以下、NBYで5.55、市販イーストで5.57であった。AK46は、NBYと市販イーストと比較してつくったパンは甘みやしっとり感がやや少ないが、パン用酵母として十分に適用可能と考えられた

33

酵母*Saccharomyces paradoxus*の製パン用菌株としての諸性質

(¹帯畜大・食品科学、²北海道農研) 三雲大¹、山内宏昭²、小田有二¹

目的)パン製造に適用可能な新規酵母を開発するため、各種の*Saccharomyces paradoxus* 菌株の製パン性と関係する諸性質について調べた。

方法)使用した*S. paradoxus* 菌株は、自然界から分離した5株およびNBRC保有の17株で、市販パン酵母由来の*S. cerevisiae* 4株を対照株とした。マルトース発酵性はダーラム管中のガス蓄積で判定した。各菌株はYPS培地で30℃、24時間振盪培養し、遠心分離で回収・洗浄した菌体は各種の実験に使用した。マルトース液体発酵力は液体培地の重量減少として、パン生地発酵力は、小麦粉10gに対して0,5,30%のスクロースを含むパン生地からのガス発生量として計測した。 - グルコシダーゼおよびインベルターゼ活性の測定には菌体懸濁液を使用した。

方法)*S. paradoxus* 菌株の中でマルトース発酵性を備えていたのはNBRC保有の5株だけであったが、市販パン酵母菌株が1日で陽性となるのに対して4日以上必要であった。また、*S. paradoxus* 菌株はマルトース液体発酵力もいずれも微弱であり、 - グルコシダーゼ活性もわずかに検出できる程度であった。自然界から分離した菌株の5%スクロース含有パン生地の発酵力はNBRC保存株よりも高かったが、市販パン酵母菌株には及ばなかった。*S. paradoxus* 菌株の糖無添加および30%スクロース含有パン生地の発酵力は市販パン酵母菌株よりも低かった。インベルターゼに関して*S. paradoxus* 菌株は市販パン酵母菌株よりも有意に高く、このような性質が30%スクロース含有パン生地発酵力の低い原因になっていると予想された。

34

Rhizopus oryzae においてスクロースの加水分解に関与する酵素の諸性質

(帯畜大・食品科学) 渡辺剛志、小田有二

目的)糸状菌*Rhizopus oryzae*は乏しい栄養源でも旺盛に増殖することが可能で、グルコースばかりでなくデンプンを糖化して純度の高いL- 乳酸を生成するが、スクロースの発酵性が低いとされている。本研究では、スクロースからの乳酸生成に優れた*R. oryzae* 菌株から、スクロースの加水分解に関与する酵素を精製するとともにその性質について調べた。

方法)*R. oryzae* NBRC 4785を試験管(直径1.8cm)中のPDA寒天培地で増殖させ、この菌体を乳酸発酵用培地(10%スクロース0.2%(NH₄)₂SO₄、0.065%KH₂PO₄、0.025%MgSO₄・7H₂O、2.5%CaCO₃)100mlに移植し、30℃、振盪培養した。PCRは*amy*遺伝子をもとに設計したプライマーで行った。

結果)培養に伴う乳酸の生成を追跡したところ、8日目まで日数に伴って増加したが、スクロース分解活性は4~6日目に最高に達してから急減し、8日目には検出限界以下になった。そこで、6日目の培養上清からスクロース加水分解酵素を限外ろ過、CMトヨパールおよびButylトヨパールのカラムクロマトグラフィーによって精製した。この酵素はスクロースとマルトースを完全に分解し、フルクトオリゴ糖および可溶性デンプンからグルコースを生成したが、ラフィノースには作用しなかった。SDS-PAGEによる分子量は59,000で、エンドグリコシダーゼH処理によって46,900にまで減少した。N末端アミノ酸配列はSKPATFPTであり、*R. oryzae*がもつ二つのグルコアミラーゼのうち的一方AmyBと一致した。ゲノムDNAから*amyB*遺伝子を標的としたプライマーでPCRを行い、増幅した断片の塩基配列を調べたところ、上記のアミノ酸配列をコードするORFの存在を確認することができた。

35

Pseudomonas sp.T62由来のL-threo-3-hydroxyaspartate dehydrataseの機能解析と分子モデリング

(北大院農) 村上知子、横田 篤、和田 大

【研究背景】L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase (L-THA DH) (EC 4.3.1.16) は、L-threo-3-hydroxyaspartate (L-THA) からアンモニアを脱離させてオキサロ酢酸を生成する反応を触媒する。L-THAは非タンパク性アミノ酸であり、2個の不斉炭素を持つため4個の構造異性体を持つ。この化合物は抗菌ペプチド中に存在することが知られているが代謝する酵素に関する詳細な生化学的諸性質はほとんど報告されていない。そこで、本研究では、*Pseudomonas* sp. T62 由来のL-THA DHをコードしている遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現系を構築して諸性質を解明した。また、類似酵素の立体構造を元に分子モデリングを行った。

【方法・結果】本酵素のアミノ酸配列を解析した結果、セリン/スレオニンデヒドラターゼファミリーに属しており、*S. cerevisiae*のセリンラセマーゼホモログ、ラットやヒトのセリンラセマーゼなどと相同性を示した。本酵素を大腸菌で発現させて組換え酵素を取得し、生化学的諸性質を解明した。本酵素はL-THAのみを基質とする基質特異性の高い酵素であり、副反応は持たなかった。酵素の活性はAMPによって上昇し、D-セリン等によって阻害された。本酵素の補酵素結合部位は53位のリジンであった。また、本酵素と65%のアミノ酸配列の相同性を持つ*S. pombe*のセリンラセマーゼの結晶構造解析が行われている。この立体構造を元に本酵素のモデリングを行ったところ、RMSD=0.07であり、全体的な構造は類似していた。本酵素は93アミノ酸残基から構成される小ドメインと216アミノ酸残基から構成される大ドメインから構成されており、ドメイン間に補酵素であるPLPが結合していると予想された。

36

新規なラクトペルオキシダーゼシステムの開発

(北大院農、²韓京大) 石堂拓也¹、金 完燮²、玖村朗人¹、島崎敬一¹

研究背景) ミルクにはさまざまな抗菌性タンパクが含まれている。ラクトペルオキシダーゼもその一つで、ラクトペルオキシダーゼシステムとして知られている。このシステムには基質として過酸化水素とSCN⁻が必要であり、最終的に生成するOSCN⁻が抗菌性物質である。冷蔵運搬システムの完備していない地域で実際に生乳の保存に用いる場合には、グルコースオキシダーゼとグルコースを加えて過酸化水素を産生させている。グルコースは乳糖から -ガラクトシダーゼを用いて生成することができるため、乳糖を初代基質としたラクトペルオキシダーゼシステムの方法の確立を目指した。

方法・結果及び考察) 乳糖溶液に*Kluyveromyces lactis*由来 -ガラクトシダーゼ、*Aspergillus niger*由来グルコースオキシダーゼおよびKSCNを加えたラクトペルオキシダーゼシステム溶液を作成した。これを菌培養液に添加して、菌の生育状態をマイクロプレート法によって観察した。また、ラクトペルオキシダーゼの活性測定にはABTS法を、抗菌性の指標としてOSCN⁻の濃度を測定した。対象とした菌は*E. coli* JCM1649、*P. fluorescens* DSMZ50090、*P. syringae* DSM5175であり、LB培地を用いて30℃で培養し、620 nmでの吸光度を経時的にマイクロプレートリーダーで測定した。その結果、程度の差はあるがこれら3種の菌のいずれにも生育抑制の効果が見られた。また、OSCN⁻の生成も確認され、本システムの有効性が確認された。

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

アサヒビール株式会社北海道工場	福山醸造株式会社
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所	ベル食品株式会社
岩田醸造株式会社	北海三共株式会社
関販テクノ株式会社	北海製罐株式会社
キリンビール株式会社千歳工場	有限会社北海道バイオ技術研究所
サッポロビール株式会社北海道工場	財団法人北海道農業企業化研究所
札幌酒精工業株式会社	北海道立十勝圏地域食品加工技術センター
春雪さぶーる株式会社	北海道糖業株式会社技術研究所
高砂香料工業株式会社札幌出張所	北海道和光純薬株式会社
ニッカウヰスキー株式会社北海道工場	雪印乳業株式会社札幌研究所
日本化学飼料株式会社	よつ葉乳業株式会社中央研究所
日本新薬株式会社千歳クリエートパーク	株式会社和科盛商会
日本甜菜製糖株式会社技術部	