

合同学術講演会及びシンポジウム

講 演 要 旨

期 日：昭和55年7月21日(日)～7月22日(火)

場 所：北海道大学農学部

日本農芸化学会北海道支部
日本土壤肥料学会北海道支部
北海道農芸化学協会

7月21日(月)

9：30～12：00	一般講演
13：30～14：30	北海道農芸化学協会総会及び 日本農芸化学会北海道支部臨時総会
14：30～16：30	特別講演
18：00～20：00	懇親会

7月22日(火)

9：00～12：30	シンポジウム
------------	--------

- 懇親会は共済サロンで行ないますが、その他の行事は全て北海道大学農学部農芸化学科第2講義室で行ないます。

学術講演会

昭和55年7月21日(月) 9:30~16:30

於: 北海道大学農学部農芸化学科第2講義室

●一般講演 (9:30~12:15)

(講演時間13分、討論2分、印講演者)

座長: 千葉誠哉

- 9:30~9:45 (1) *Pseudomonas putida* のチオ硫酸同化機構 (北大・農化)^o 中村太郎, 江口良友
9:45~10:00 (2) 植物ミクロゾームのNADPH代謝 (北大・低温研) 勾坂勝之助
10:00~10:15 (3) 甜菜種子中のサッカラーゼの部分精製と性質について (帯畜大・農化)^o 増田宏志, 長居健次, 菅原四郎

座長: 山田次良

- 10:15~10:30 (4) 北海道内養護施設収容児の栄養状態に関する統計分析—1960年から1976年までの年次推移— (北大・農・家政) 山東せつ子
10:30~10:45 (5) 稲および小麦中のスフィンゴシンについて (帯畜大・農化)^o 大西正男, 伊藤精亮, 藤野安彦
10:45~11:00 (6) 小豆の脂質成分、とくにステロール脂質について (帯畜大・農化)^o 西山栄徳, 大西正男, 藤野安彦

座長: 市原耿民

- 11:00~11:15 (7) セスキテルペン炭化水素δ-Cadineneの全合成 (北大・農化) 西村弘行, 角康一郎, 高畠哲彦, 濑尾明, 水谷純也
11:15~11:30 (8) チャラン科植物成分に関する研究(第2報)ヒトリシズカの成分glechomanolidの絶対構造 (北大・農化)^o 川端潤, 田原哲士, 水谷純也

座長: 田原哲士

- 11:30~11:45 (9) 河川底泥中の多核芳香族炭化水素とその分解について (帯畜大・畜産環境)^o 中野益男, 小林進介, 山谷裕子, 根岸孝
11:45~12:00 (10) 飼料用油脂抗酸化剤—エトキシキンシナジストとして第4アンモニウム化合物の使用 (北大・水産) 高木徹
12:00~12:15 (11) 低温下で活性の高い脱窒菌の探索(第1報) (工技院北開試)^o 松山英俊, 石崎紘三

●特別講演 (14:30~16:30)

1. 植物性スフィンゴ脂質、とくにフィトグリコリピドに関する最近の知見

帯広畜産大学 伊藤精亮
(座長: 藤野安彦)

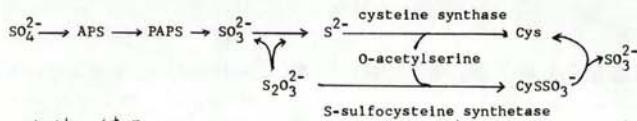
2. 北海道における牧草の周年栄養生理的研究と肥培管理技術

北海道立天北農試 坂本宣崇
(座長: 岡島秀夫)

1. Pseudomonas putida のチオ硫酸同化機構

(北大農化) ○中村太郎, 江口良友

1. 目的 硫酸の異化的還元を行なう微生物やクロレラなどによつて、 $S_2O_3^{2-}$ は自然界に供給される可能性はある。 $S_2O_3^{2-}$ は細菌や酵母では硫酸同化経路上の一員とは考えられてはいないが、このものは還元的 K^-S^2- と SO_3^{2-} とに開裂してから利用される。P. putida のシステイン要求株を作成すると、 S^2- は單一硫黄源として生育できないが、 $S_2O_3^{2-}$ は利用できる変異株が数多く得られる。このことは S^2- を経ない $S_2O_3^{2-}$ の直接的同化経路が機能していることを示唆する。主にこの菌について調べた $S_2O_3^{2-}$ とO-アセチルセリンヒドロアセチルセリンヒドロシスティンを生成するシステインシンターゼについても併せて報告する。



2. 方法・結果 P. putida PpG1 株の細胞を音波処理してえた粗抽出液中には Proteus vulgaris, Salmonella typhimurium や酵母などに見らる様な SO_3^{2-} 還元活性は検出されない。部分精製したS-スルホシステインシンターゼ標品にはシステインシンターゼ活性が混在するが、ピリドキサールリん酸が何等かの関与をしている。 $S_2O_3^{2-}$ に対する K_m は 2.2 mM で、基質阻害 (K_i^S : 31.8 mM) がみられる。O-アセチル-L-セリンに対する K_m は 16.9 mM である。そのほかO-ホスホ-DL-セリンにも親和性を示す。S. typhimurium や Escherichia coli にも弱いながらS-スルホシステインシンターゼ活性が見出される。

2. 植物ミクロゾームのNADPH代謝

(北大低温研) 勾坂 勝之助

目的. ポプラの枝における NADPH 生成能は越冬期間中に高まりを示す。NADPH の酸化と連結している反応系は材部、皮層部とともに NADPH に特異的なグリオキシリ酸還元酵素などが越冬中に作動している。一方、細胞オルガネラにおける NADPH 代謝も越冬中に進行していると思われる。これについては 1) NADPH 依存の H_2O_2 生成と 2) lipid peroxidation が主な問題と思われる。本報ではポプラのミクロゾームにおける H_2O_2 生成系について述べる。

方法. 1) 材料: 越冬中のポプラの枝を $-10^\circ C$ に保存して用いた。2) ミクロゾームは皮層部から調製した。3) 反応系: メチオナールからエチレンの生成する反応系を用いた。4) エチレンの定量: Chromosorb 102 によるガスクロマトグラフィーで行った。

結果. 1) ポプラのミクロゾームは NADPH 依存の H_2O_2 生成活性を示す。反応初期に lag がみられるがその後数時間継続する。2) 反応は EDTA-Fe⁺⁺ を必要とし、catalase で阻害される。3) 反応はまた superoxide dismutase あるいは Cyt C によって阻害される。4) KCN あるいはアントラキノン-SO₄ の存在で促進される。5) MgCl₂ の濃度によって活性がかわる。

3. 甜菜種子中のサッカラーゼの部分精製と性質について

(第百大・農化) 増田宏志, 長尾健次, 楠原田郎

従来より甜菜実生の細胞膜より外壁結合型サッカラーゼについて検討してきた。この実生のサッカラーゼが発芽過程中でどのような変化をするかを調べるためにまず種子中の酵素について検討する必要がある。そこで今回は種子中のサッカラーゼについて部分精製と性質について検討したので報告する。

吸水した甜菜種子をアレンダー式よりトロンで充分磨碎し、硝安塗析、セファデック又び100あるDEAEセルロースで部分精製を行った。ゲルロ過では分子量の異ニコット活性画分に分かれた。それそれの活性画分はDEAEセルロースでイオン交換クロマトグラフィーを行うと少くとも六つの活性画分に分かれた。それそれの酵素の性質を調べた。一方、種子の吸水でサッカラーゼおよび他のアリコシダーゼ-β-ガラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼ、ムクミノシターゼ、アミラーゼなどの活性が増加する。発芽過程中ではサッカラーゼ活性のみが急速に増加するが、他のアリコシダーゼ活性はあまりかえは減少する。また発芽を通じて種子中のものとは異なったサッカラーゼが出現することがゲルロ過又はイオン交換クロマトグラフィーの結果より明らかとなった。さらに実生のサッカラーゼは大きく分けて二種存在する。発芽初期にはサッカラーゼⅠの活性が高く、サッカラーゼⅡはほとんど存在しない。発芽が進行するに従いサッカラーゼⅠの活性は相対的に低下し、サッカラーゼⅡが出現(2<<3)。

4. 北海道内養護施設收容児の栄養状態に関する統計分析 - 1960年から1976年までの年次推移一 (北大農食栄家政) 山東せつ子

- 目的 北海道内養護施設收容児の実態と対策を考えるため1960, 1965, 1970, 1976年の4回の横断的調査結果について年次推移を検討した。
- 方法 既報の方法で得た身体計測値と食餌摂取量の年次結果をも検定で比較した。
- 結果 (1) 食品消費では、牛乳、卵、肉、果物が増加した一方、豆、穀類、いも、魚が減少し、食の欧風化が見られるようになった。(2) Energy, protein, iron, thiamine, niacin equivalent, ascorbic acidは概して充たされた。Riboflavinは1964年以来の牛乳給付で改善されたが、calcium, vitamine A, & Dは依然として不足する傾向が見られた。充足度平均値は1960-1970年で徐々に増加するが1976年低下の傾向を示した。(3) 蛋白摂取では動植物比の著しい増加が見られ(29-50%)、体重kg当たりの蛋白摂取は3.4g, 4/7は4.4~4.8であった。蛋白の質的変化を検討するには化學価の中で蛋白価が適切と考えられた。その制限アミノ酸である含硫アミノ酸, tryptophanのFAO scoreにおける顕著な増加は1965年の牛乳、1970年の卵、1976年の肉によるものであった。卵給付の効果を見ると卵価が適当であった。(4) 1960年低体位であった施設児は1965, 1970年と全国値に迫り追い越す群も見られた。その順序は胸囲、体重、座高及び身長であり、又年少群が年長群より、女子が男子より早く全国値に追いついた。併し1976年体位の明らかな劣りが見られ、形質中最も変動の激しいものは体重であった。(5) 以上の結果から体位と栄養摂取間の関係を考察すると、1960-1970年の施設児の胸囲、体重等幅育に寄与したものは同時期の一般児より豊富な熱量摂取であり、一方低身長、低座高に止むた一原因は熱量より多く蛋白摂取ではなかろうか。1976年の施設児に protein energy undernutrition の傾向が現れ、その対策が望まれる。

7. 植物および小麦中のスフィンゴシンについて

(帯畜大農化) ○大西正男, 伊藤精亮, 藤野安彦

目的: 演者らは、これまでに米糠中のスフィンゴ脂質(セラミド, モノ-, ジ-, トリ-およびテトラグリコシルセラミド)の化学構造を基本的に明らかにしてきた。今回は、稻茎葉、米胚乳および小麦種子からスフィンゴ脂質を分離して、構成スフィンゴシンの化学的組成を明らかにするとともに、各スフィンゴ脂質間の構造的関連を考察しようとした。

方法: クロロホルム-メタノール混液および水飽和ブタノールで抽出した全脂質を、常法に従ってケイ酸カラムクロマトグラフィー、弱アルカリ処理、分取ケイ酸薄層クロマトグラフィーなどに供し、各スフィンゴ脂質を分離精製した。次いで、酸あるいはアルカリで分解してスフィンゴシンを調製した。これを NaIO_4 酸化, NaBH_4 還元などに供して、生成物を主としてガスクロマトグラフィーで分析した。構成スフィンゴシンへ二重結合の位置と立体配置は、 OsO_4 酸化物の質量分析と赤外線吸収スペクトル分析から決定した。

結果: セレブロシド(モノグリコシルセラミド)の構成スフィンゴシンとして、いずれにも9種の塩基を見出した。そのうち主なものは、米胚乳ではスフィンガ-4,8-ジエニン、稻茎葉では4-オキシスフィンガ-8-エニン(デヒドロフィトスフィンゴシン)、小麦種子ではスフィンガ-8-エニンであった。8-不飽和の立体配置は、いずれもシス型が多かった。オリゴグリコシルセラミドの構成スフィンゴシンは、セレブロシドのそれと類似していた。しかし、遊離セラミドでは、すでに4-オキシスフィンガニン(フィトスフィンゴシン)が主要成分で、グリコシルセラミドとはかなりの相違が見られた。これは、特定のセラミド種への選択性的な糖転移あるいはサイコシン(グリコシルスフィンゴシン)へアシル化によるスフィンゴ糖脂質の合成系の存在を示唆しているものと思われる。

6. 小豆の脂質成分、とくにステロール脂質について

(帯畜大農化) ○西山栄徳、大西正男、藤野安彦

目的: われわれは、米を中心に、主として植物の油脂一般に関する研究を行なっている。今回はこの研究の一環として、これまでほとんど調べられていない小豆の脂質成分、とくにステロール脂質の構成成分を明らかにしようとした。

方法: 小豆からクロロホルム-メタノール混液および水飽和ブタノールで全脂質を抽出した。これをケイ酸カラムクロマトグラフィーに供して中性脂質、糖脂質およびリシン脂質に分画した。各画分の構成脂肪酸はガスクロマトグラフィーによって分析された。また、中性脂質および糖脂質からケイ酸カラムクロマトグラフィー、ケイ酸薄層クロマトグラフィー、アセチル化などによってステロール脂質を単離した。これらの純度を赤外線吸収分析およびケイ酸薄層クロマトグラフィーで確かめた後、構成成分の特性をガスクロマトグラフィー、質量分析などで決定した。

結果: 小豆の脂質含量は1.7%で、中性脂質、糖脂質およびリシン脂質の割合はおよそ1:0.7:3.6であった。主な構成脂肪酸はリノール酸、パルミチン酸およびリノレイン酸であった。

中性ステロール脂質として、アシルステロール、4,4-ジメチル-, 4-モノメチルおよび4-デメチルステロールが検出された。アシルステロールの構成脂肪酸は全脂質のそれと類似していた。極性ステロール脂質としては、既知のアシルステリルアリコシドとモノアリコシルステロールのほかに、オリゴ糖を有する3種の新型のステリル配糖体が認められた。このうち2種は米粒中のジ-およびトリグリコシルステロールと一致した。構成4-デメチルステロールは少なくとも7つで、シト-およびスチアマステロールが主要なものであった。構成糖は、ほとんどがグルコースであった。

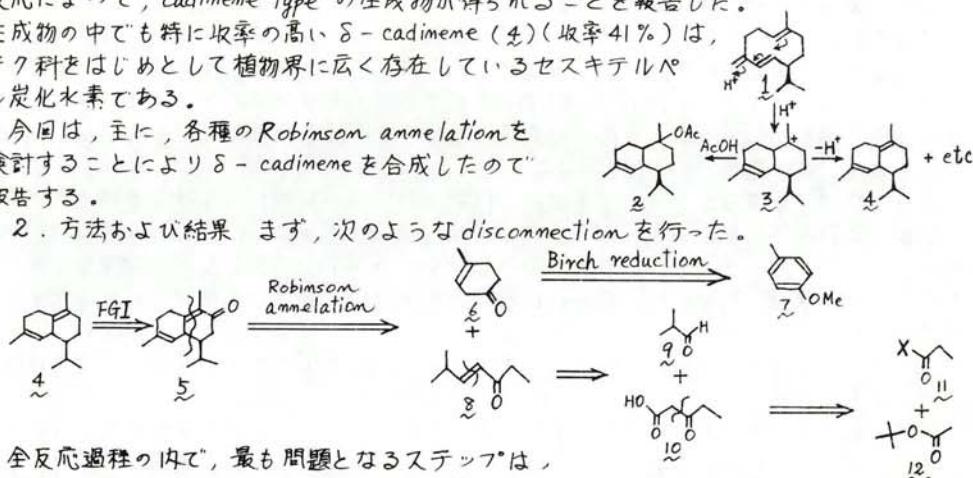
7. セスキテルペン炭化水素 δ -Cadinene の全合成

(北大農化) 西村弘行, ○角康一郎, 高畠哲彦, 濱尾 明, 水谷純也

1. 目的 先に、ワモンゴキブリ性フェロモン様物質 *germacrene D* (1) の酸触媒環化反応によって、*cadinene type* の生成物が得られることを報告した。¹⁾
生成物の中でも特に収率の高い δ -*cadinene* (4) (収率 41%) は、
キク科をはじめとして植物界に広く存在しているセスキテルペン炭化水素である。

今回は、主に、各種の *Robinson annelation* を検討することにより δ -*cadinene* を合成したので報告する。

2. 方法および結果 まず、次のような disconnectionを行った。



全反応過程の内で、最も問題となるステップは、
cyclohexenone (6) と α, β -不飽和ケトン (8) との *Robinson annelation* で、各種の塩基および反応条件を検討した結果、その enamine誘導体を使うのが最も適していた。

参考文献: 1) H. Nishimura, H. Hasegawa, A. Seo, H. Nakano and J. Mizutani,
Agric. Biol. Chem., 43, 2397 (1979).

8. チャラン科植物成分に関する研究(第2報)

ヒトリシズカの成分 glechomanolid の絶対構造

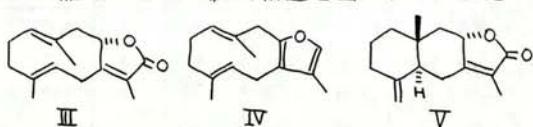
(北大農化) ○川端潤, 田原哲士, 水谷純也

1. 目的 チャラン科植物成分研究の一環として、演者らは既にヒトリシズカ (*Chloranthus japonicus*) から 2 種のセスキテルペナクトン、shizukanolide (I), dehydro-shizukanolide (II) を単離し、報告した。¹⁾ 今回、同植物からさらに 2 種のセスキテルペン、glechomanolid (III), isofuranodiene (IV) を単離し、特に III についてその絶対構造を決定したので報告する。

2. 方法及び結果 ヒトリシズカ地上部のエーテル可溶中性部をフロリジルカラムで分画し、30~50% エーテル / ペンタン画分を精製してよりやや極性の高い部分より無色板状晶 III (mp 110~112°, $[d]_D^{20} +150^{\circ}$ ($c=0.1, CHCl_3$)) を単離した。III は M^+ m/e 232, 1416 ($C_{15}H_{20}O_2$) を示し、各種スペクトルの結果から構造を図のように推定した。これは STAHL & DATTA が“カキドオシ(シソ科)から単離した glechomanolid と同一であり、物理化学的諸性質は文献値と一致した。glechomanolid の 2 個の二重結合の幾何異性及びラクトンの根元の立体化学についてはこれまで知見が得られていないため、以下のように決定した。III を DIBAH 還元したところ、対応するフラン体 (IV, mp 65~65.5°) を得た。IV は RÜCKER らによってフトモモ科植物から単離された isofuranodiene (E,E-体) と各種スペクトルデータが一致した。さらに IV はヒトリシズカ根のエーテル可溶部の低極性画分からも単離された。また、III を $SOCl_2$ 处理して閉環成績体 (V) (mp 121.5~122.5°, $[d]_D^{20} +277^{\circ}$ ($c=0.13, CHCl_3$)) を得た。V は HIKINO らによって立体化学が確立されており α -tracylenolide II と一致した。以上の結果から III の絶対構造を図のように決定した。

1) 川端ら、昭和 54 年度農化大会 3P-20.

J. KAWABATA et al., *Agric. Biol. Chem.*, 43, 885 (1979).



9. 河川底泥中の多核芳香族炭化水素とその分解について

(帯広畜大畜産環境) * 中野益男, 小林進介, 山谷裕子, 根岸 孝

1. 目的 環境汚染物質の1つである多核芳香族炭化水素はベンゼン環の縮合環数3-5までの低分子量多核芳香族炭化水素とそれ以上の高分子量多核芳香族炭化水素に区別される。前者は比較的水に溶け易いために河川水中では拡散していくが、後者は難水溶性のため底泥中に残留すると考えられる。しかし底泥中での多核芳香族炭化水素の動態についてはよく知られていない。今回われわれは、都市を貫流する河川の底泥中の多核芳香族炭化水素の分布特性を明らかにするとともに、代表的な高分子量多核芳香族炭化水素のベンゾ(a)ピレンの底泥中の代謝について検討した。

2. 方法 底泥は帯広市内を流れる帯広川で採取した。この試料から多核芳香族炭化水素をベンゼン等にはクロロホルム-メタノール(1:2, 2:1)で抽出し、アルカリ処理後、ケイ酸およびセファデックス LH-20 のカラムクロマトグラフィー、およびケイ酸薄層クロマトグラフィーで単離、精製した。得られた多核芳香族炭化水素はガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析計で分析された。ベンゾ(a)ピレンを添加して底泥は57°Cでインキュベートされ、前述の方法と同様にして多核芳香族炭化水素を分析した。

3. 結果 底泥中の多核芳香族炭化水素として、フェナントレンヒアントラセン、フルオランテン、ピレン、クリシンおよびベンゾ(a)ピレンなどが検出された。底泥中の高分子量多核芳香族炭化水素の含量は河川水中のそれと比較して高かった。底泥に添加されたベンゾ(a)ピレンは4週間でその約40%が分解された。分解産物の一部はベンゾ(a)ピレンキノンとして検出された。これは、ベンゾ(a)ピレンが底泥中の微生物によって分解されたためと推測した。

10. 飼料用油脂抗酸化剤-エトキシキンシナジストとして第4アンモニアム化合物の使用

(北大水産) * 高木 徹

(目的) さきに高密度不飽和油のための抗酸化剤としてエトキシキンにシナジストとしてコリンなど第4アンモニアム化合物を加えると著しく効力が増すことを報告した。(油化学28, 548 (1974)) 今回は各種第4アンモニアム化合物をシナジストとしての効力、エトキシキン、シナジスト濃度と効力の関連およびエトキシキンニトロキシドの抗酸化作用について明らかにする研究を行った。

(実験法) 抗酸化剤としての効力は97.8%におけるAOMテストおよび60°Cにおけるオーブンテストを用いて添加物を加えた場合の過酸化物価の上昇があげられる程度により求めた。

(結果) $\text{Bz}(\text{Me})_3\text{NCl}$ は効力零人、 $\text{Bz}(\text{Me})_3\text{NCl}, \text{CH}_3(\text{CH}_2)_n(\text{Me})_3\text{NCl}, \text{CH}_2(\text{CH}_2)_5(\text{Me})_3\text{NBr}, \text{Bz}(\text{Et})_3\text{NCl}$ はシナジストとして効力があった。一方、コリン誘導体ではコリンがもっとも効力がありクエン酸コリンはやや効力位く、塩化コリン、クエン酸ニ水素コリンは全く効力がなかった。ステアラ油を確体に用いた場合には無添加油はAOM法で3.6時間で過酸化物価が100になるが、エトキシキン-コリンを添加した場合には通常のように酸化が防止された。コリン添加量を増加させると、エトキシキンが0.01%のよう少量でも顕著な過酸化物価が示された。エトキシキンはニトロキシドに変化して抗酸化性を示すことが知られているが、ニトロキシドを合成して添加した場合にはコリンなど第4アンモニアム化合物は顕著な抗酸化力を有し、シナジストとしての作用を示した。

No	1	2	3	4	5	6	7	8
エトキシキン濃度	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01
コリン 濃度	0.05	0.1	0.3	0.05	0.1	0.3	0.3	1.0
T ₅₀	79.5	125	312	11	46	280	123	601
T ₁₀₀	92	146	319	15	56	301	134	625

(T_{50}, T_{100} ; 過酸化物価が50, 100になるまでの時間。)

11. 低温下で活性の高い脱窒菌の探索 (第一報)

(工技院北開試) ○松山英俊, 石崎林三

1. 目的 従来、脱窒菌は温度に影響を受けてやすく、低温下での生物的脱窒は困難である。そこで、低温で脱窒能の高い細菌を土壤から分離し、その菌の脱窒能に対する環境因子の影響、及び、同定を目的とした。

2. 方法 北農試清田水田の土壤から、硝酸を窒素源とした液体培養を行い、得られた菌株のおおのについて、 5°C において Hadjipetrou, L. P.¹⁾ の培地を用いて、脱窒能を検討した。脱窒能の測定は、ガス発生量を測定する方法、及び、液中の $\text{NO}_3^- - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ を測定する方法を用いた。分離株の同定法として、グラム染色を Hucker の変法、鞭毛染色を戸田法により行った。又、色素の生成は *Pseudomonas* H agar を用いて検討した。

3. 結果 ①得られた数株のうちの一つが、低温において高い脱窒能を示した。この菌株は、*Pseudomonas* H agar を培養すると色素生成する事、グラム陰性、O-万テストで Oxidative, 鞭毛である事などから、*Pseudomonas* 属と同定した。②本菌の脱窒能は、C/N 比が 3.5 付近で最適で、炭素源としては酢酸、クエン酸等の時に良く、メタノールは良くなかった。又、低温になると程、重硝酸が蓄積する事が観察された。③本菌の生育最適温度は 25°C 附近で、生育最適 pH は pH 8.0 附近であった。酢酸を炭素源とし、C/N 比を 3.5, pH 7.7 の培地で、本菌は 5°C において $0.014 \sim 0.021 \text{ mg NO}_3^- - \text{N} / \text{mg cell} / \text{hr}$ の脱窒速度を示した。

¹⁾ Hadjipetrou, L. P., and A. H. Stouthamer : J. Gen. Microbiol. 28, 29-34 ('65)

————— シンポジウム ———
『微生物の機能開発と高度利用』

昭和55年7月22日(火) 9:00~12:30

於：北海道大学農学部農芸化学科 第2講義室

9:00~9:10 開会の辞 世話人 高尾彰一

9:10~10:10 1. 有用微生物への遺伝子操作の適用

東京大学農学部 魚住武司
(座長：吉田忠)

10:10~11:10 2. 未利用資源特にガス状基質の微生物による有効利用

東京大学農学部 児玉徹
(座長：高尾彰一)

11:10~12:10 3. セルロース資源の酵素糖化とアルコール醸酵

宮崎大学農学部 外山信男
(座長：江口良友)

12:10~12:25 総合討論

12:25~12:30 閉会の辞 北海道支部長 江口良友

1. 有用微生物への遺伝子操作の適用

魚住 武司

近年、大腸菌を中心にして遺伝子操作技術が急速に進歩し、これをを利用して有用微生物に全く新しい物質の生産能を賦与したり、有用物質の生産能を飛躍的に増大させることが可能となってきた。遺伝子操作の基本は、微生物の菌体内で自己増殖能をもつプラスミッドあるいはファージをベクターとして、そのDNAに任意のDNAを試験管内で連結して菌体内にとり込ませ、ベクターの複製能を利用して目的とする遺伝子を複製し増殖して、目的の遺伝子産物を生産せることである。DNAの連結のためには、制限酵素とりがーゼ、あるいはterminal transferaseが用いられる。受容菌としては、異種DNAを特異的に分解する制限酵素を欠損した変異株が用いられる。異種DNAは菌体内で自然に活性を発現する場合もあるが、必要な場合には、受容菌に適した転写開始点(プロモーター)、翻訳開始配列(SD sequence)、蛋白の分泌のためのシグナルペプチドの付与などが行われる。

1. 大腸菌。大腸菌では遺伝子操作技術が最も進んでおり、ほとんどの任意のDNAの活性を発現させることができる。Staphylococcusのペニシリン抵抗性、クロラムフェニコール抵抗性(Cmr)遺伝子、酵母の leu^+ , trp^+ , his^+ , arg^+ などのアミノ酸合成系の遺伝子、枯草菌の leu^+ 遺伝子などは、特別な工夫なしに大腸菌内で活性を発現する。しかし放線菌の遺伝子が大腸菌内で発現した例はない。インシュリン、全長ホルモンの遺伝子などには、大腸菌のlactoseオペロンのプロモーター、 β -lactamaseのプロモーターなどを付加することによって活性を発現させ、これでホルモンを生産せることができる。インターフェロン遺伝子のクローニングと大腸菌での生産、肝炎Bウイルス遺伝子のクローニングと表面抗体の生産も行われる様になった。

2. 枯草菌。枯草菌は大腸菌に比べて遺伝的によく研究されており、またアミラーゼ、プロテアーゼなど菌体外酵素の生産能も高いので、遺伝子操作の対象として有望であると考えられる。また枯草菌はヒトの腸管内に定着しないので、ホルモンなどの薬効物質の生産菌を造成した場合にも、その安全性は極めて高いであろう。枯草菌には固有のプラスミッドがいくつも存在するが、これらは選択マーカーを持たないcryptic plasmidであるので、一部の例外を除いては、ベクターとして用いられない。StaphylococcusのCmr, Tcr (テトラサイクリン抵抗性), Km^r (カナマイシン抵抗性)などのプラスミッドが、そのまま枯草菌内で複製し抵抗性を発現するので、枯草菌のベクターとして用いられている。大腸菌の遺伝子は枯草菌の中では形質を発現しない。また、動物の遺伝子の形質発現を可能にするためのプロモーターなどもまだ知られていないので、今後の開発が必要である。

3. 放線菌。放線菌の抗生素生産性の遺伝子をプラスミッド上で増殖して生産性を向上させること、また類似の2種以上の抗生素の生合成系の遺伝子を同一菌体内で組み合せて新しい抗生素を生産することなどが、可能な目標として考えられている。最近、Bibbらは、放線菌のプラスミッドにメチルエノマイシン抵抗性遺伝子をin vitroで連結することに成功し、放線菌のhost-vector系を作成した。今後の進歩が期待される。

4. 酵母。酵母に固有のプラスミッド(2μ DNA)がベクターとして用いられる。また酵母の染色体上の複製開始点(ars遺伝子)を持ったDNA断片が自己増殖能を持つべクターとなる。これらのベクターと大腸菌のベクターを組み合せて、両者の間を行き来できるshuttle vectorが作られ、これを用いて酵母の leu^+ , trp^+ , arg^+ , his^+ などの遺伝子がclone化されている。また、大腸菌のプラスミッドのCmr遺伝子が酵母内で発現することも報告されている。Single Cell Proteinとして酵母に不足しているXオニンな

などを特に多量に含む人工ペアクトの化合合或遺伝子を酵母に与えることにより、SCPの栄養価を改善することができるであろう。

5. 硝素固定菌。豆科植物の根粒菌 (*Rhizobium*) にはプラスミットが存在し、根粒形成能あるいは窒素固定能とプラスミットとの関連が示唆されていたが、最近、エンドウ菌 (*Rh. leguminosarum*) のプラスミット上に窒素固定遺伝子 (*nif*) の少しことも一部分が乗っている事が証明された。*nif* 遺伝子の増幅による強力な根粒菌の造成、*Agrobacterium* との hybrid 形成により豆科植物以外に窒素固定能をはさむことなども考えられる。

(おわりに) 遺伝子操作は、今や、普通の遺伝学的技術の一つになった感がある。これからの有用微生物において遺伝子操作の応用による育種が可能であろう。また、DNAの化合合体によって全く新しい遺伝子を人工合成できることで、将来は、新しい設計による人工酵素、人工ペアクトを醸酵生産できる様になると考えられる。

2. 未利用資源特にガス状基質の微生物による有効利用

児玉 徹

1. はじめに

微生物工業において基質として大量に利用される未利用資源は、現状では化学成分として極めて限られており、実質的にはデンプン質および糖質（アドン糖、蔗糖）以外は未利用資源といふべきであろう。中でも多量に存在し、微生物によく比較的利用され易いものはセルロース性質資源であろう。また本邦中にセルロースに次いで多く含まれるカリゴニン化合物も微生物による資源性に難免はかかるが、資源的には豊富である。一方、化石燃料に由来するカーボナインや石油化学会製品も価格高騰により魅力は薄れながらもなお利用の可能性は残されている。しかししながら、これらはセロース性質資源と同様と考えられるので別として、他の石油化学会製品の一一部を除いて新たに発酵原料として利用されるとは考え難い状態にある。

このような状況下で発酵原料としての条件である低価格、大量の安定供給、微生物による利用され易さを兼ね備えて物質を探してみると、まずメタノール、エタノールなど低級アルコール類、植物油脂などがあげられるよう。アルコール類については、固体蛋白質はジカルボン酸生産などにおける多くの研究がなされ、あり、発酵原料としての供給能力も十分と考えられるので今後利用の傾向が強まることが期待される。植物油脂は最近の生産量増加に伴ない、新たな発酵原料として着目されるところ。

以上の諸原料に比較すると、微生物による資源化され易いおよび基質としての技術の易さの要であるために従来注目を浴びなかつてもうにガス状物質があつた。資源としては液体状基質源として多量に存在する二酸化炭素およびメタンに着目し、それらの発酵原料としての可能性を検討していくが、その結果を含めた内外の動向を紹介するとともに、非炭素基質では

あるが窒素ガスの利用(生物的窒素固定)についても言及したい。

2. 二酸化炭素の基質としての利用

現在の膨大な量の化石燃料の消費は大気中の二酸化炭素濃度を著しく高めている。二酸化炭素を唯一炭素源として利用するいわゆる独立栄養微生物が地球上の物質循環、環境維持に果して役割は小さくなっている。このようて微生物を積極的に利用しようとする試みは少しだ。化石燃料が枯渇に瀕するにはまだ時間がかかるとしても実験的には残されたであろう二酸化炭素を发酵原料として考えることは、植物と比較した時の微生物の有機化能力が大ききからか必要ないとであろう。利用可能な独立栄養微生物としては光合成菌と化学合成菌があるが、演者らはエネルギー供給、生育速度の面から後者に属する水素細菌が最も有望と考え研究を進めてきた。

水素細菌の生育と菌体生産

水素細菌の中で従来よく研究されてきたものは生育速度の面で優れて Alcaligenes eutrophus があり、これを用いて Schlegel ら、Repasko らは生理学的、微生物学的などに培養条件などに関する多くの報告を出している。一方演者らはガス状基質を使用する際の高温培養の有利性に着目し、50°C 以上に生育適温をもつ菌のスクリーニングを行って、うちには Pseudomonas hydrogenothermophila と命名された菌を分離し、その生育特性、菌体生産性、菌体成分などについて検討して二酸化炭素から蛋白生産の可能性を示した。

水素細菌の代謝生産物

水素細菌が autotrophic growth 時にアミノ酸などの有機物を培養液中に分泌することは以前から知られておりが、その量は生産物と呼ぶにはあまりにも微量であった。演者らは代謝産物の生成を目的として、前述の P. hydrogenothermophila のアノログ耐性異株によリトリプロトラン蓄積の可能性を示したほか、中温性水素細菌 Pseudomonas hydrogenovora が窒素源欠乏などの培養条件下で著量の多糖を菌体外に生成することを見出した。この多糖は四種類の中性糖を組成成分として生理活性を有するなど興味深い性質をもち、二酸化炭素を基質とする代謝産物の生成に新しい可能性を示したおりと考えている。最近 Vollbrecht らは A. eutrophus の異株を用いて、特に酸素供給制限下で多種類の代謝産物が生成することを報告した。代謝産物としては TCA サイクルの各種有機酸、低級アルコールなどばかり著量の 3-hydroxybutanoate を認めていた。従来水素細菌、多くは菌体内に多量の poly-3-hydroxybutanoic acid を蓄積するところが知られておりが、このポリマーを生成しない異株を誘導するによりそれを 1 マーク著量菌体外に分泌されたことは興味深い。

3. メタンの基質としての利用

メタンは天然ガスの主成分として埋蔵量は石油よりも多いといふが、これらは最近以農産廢棄物、海藻等を原料とするリサイクル可能なバイオガスとしても生産が試みられており、近い将来のエネルギー源として注目され、大量の安定供給が期待される資源である。メタンを唯一炭素源、エネルギー源として利用できる微生物は現在のところ細菌に限られているが、菌体蛋白生産には従来メタン資化細菌 (Methylococcus capsulatus など) と阻害的中间代謝物資化菌 (Hypomicrobium sp. など) の混合培養系が用いられてきた。そのため、菌体生産ではある程度の生産性が示されてはいるものの、代謝産物の生成には困難が予想された。演者らはメタンを基質とした場合にも高温培養の有利性に着目して高温メタン資化菌の純粋分離に成功した。この菌は純粹培養においても高い増殖速度を示すとともに構成成分の

特異な酸性多糖を大量生成した。これはメタンと基質とした菌体外生産物として初めて得られた物質であり、菌体蛋白以外の物質生産の可能性を示したものといえよう。

4. 金素ガスの基質としての利用

アンモニアは肥料その他の原料として経済上重要な物質であるが、現在工業的には大部分が Haber-Bosch 法によってつくられる。この代りに生物的固定を利用する二とはいろいろな意味で利害があるが、近年、生物的金素固定の生化学における急速な進歩により微生物による固定の応用が現実性を帯びてきつつある。そこで多少趣は異なり、また今後の技術開発の必要があるが、ガス状基質の利用の一環として考えていこう。

金素固定を行なう微生物には多くの種が知られており、实用の可能性が考えられるものは通性嫌気性の Klebsiella pneumoniae と好気性の Azotobacter vinelandii に属する。アンモニアによりニトロゲナーゼ合成抑制をうけた変異株がある。これらは従属栄養性のためアンモニア生成のためにエネルギー源として安価な炭素源が必要となるが、有機性廃棄物を利用すればメタンガス、水素ガスなどの生成と組合わせることによって、より効率的な発酵方式ができることが期待される。

3. セルロース資源の酵素糖化ヒアルコール醸酵

外山 信男

Trichoderma viride は土壤中にきわめてありわたったカビであり、多数の微生物学者たちの眼前に常に出現したはずなのに、演者が研究するまでは顧みられなかった菌である。しかし今日では Trichoderma のセルラーゼは、天然セルロースの分解に必要なセルラーゼ成分をすべて備えた、人類が初めて手にしたセルラーゼとまでいわれ、世界的に研究されるようになり、セルロース資源の糖化、アルコール醸酵が実用化されるに至った。

Trichodermaこそ今回のシンポジウム課題“微生物の機能開発と高度利用”にふさわしいカビといえよう。なお Trichoderma セルラーゼ製剤は Rhizopus プロトペクチナーゼ製剤と協同して各種の植物組織からプロトプラストを形成させるので、現在植物アロトプラスト融合による新植物の育種に世界各地で大いに貢献している。さらに Trichoderma の真菌類細胞壁溶解酵素は β -1,3-グルカナーゼとキチナーゼから成るが、この酵素もカビ、酵母、キノコのプロトプラスト形成に有効で、その融合による新微生物の育種に役立ちそうである。この酵素を生産する Trichoderma は、いろいろな植物病原菌の生育を阻止し今まで確認された唯一の生物防除用カビとして良く知られている。なお本菌はキチナーゼとプロテアーゼから成る甲殻分解酵素も生産し昆虫の遺体、エビの甲殻などを良好に利用できる能力も有することを発見した。したがって Trichoderma は土壤中で、広範囲の物質を食べ物として利用できるという恵まれた生活力を持っていることがわかった。

今回の講演では、特にセルロース資源の糖化と醸酵における Trichoderma セルラーゼの利用について述べる。

1. 目的 石油資源の将来の枯渇が予想されるので、再生可能なセルロース資源を酵素糖化し、その糖液を用いて燃料用酒精を生産することが、先進国、発展途上国を問わず世界

的重要課題となつてゐる。わが国でも今年から國家計画の1つとして強力に進められることになった。同時に国産 *Trichoderma* セルラーゼ製剤の活性を世界最強を誇るまでに発展し、しかも18年間の量産の歴史を有している。演者の研究室では多年にわたり各種セルロース資源の化学的脱リグニン法、糖化、酵素条件について研究してきたが、その概要を述べる。

2. 方法 菅翻法および液内培養法で生産された国産 *Trichoderma* セルラーゼ製剤を使用した。総合セルラーゼ活性として沪紙崩壊度測定法を用いているが、沪紙崩壊所要時間で示すと8分間(3,750 units/mg)の製剤を使用した。セルロース資源としては、稻わら、新聞紙、段ボール紙、広葉樹および針葉樹の鋸屑などを使用し、特に発展途上国に適するように省エネルギー的であり、極力簡単な設備でできる方法で化学的に脱リグニンした後糖化した。さらに燃料酒精を作るために酵素条件を検討して常温糖化酵素法を採用了。この糖化酵素液よりセルラーゼ製剤を回収再利用するために膜分離法やタンニン酸・ポリエチレン glycol 法を試みた。なお *Trichoderma* のセルラーゼの作用操作を明らかにするために分画、精製を行なつた。

3. 結果 セルロース資源の最高基質濃度は25%であり、この場合セルラーゼ製剤濃度2.5%，pH 5.0，45°Cで3～5日間糖化すると15～20%糖液が得られた。糖液中グルコース2に対しキロース1が通常含まれる。この糖液は砂糖キビや砂糖大根の絞り汁に相当する。糖生成量と糖化率から見た最適基質濃度は10%で、セルラーゼ製剤濃度1.0%，48時間糖化で8～10%の糖液が得られる。糖化酵素の研究には、脱リグニンした稻わらと同じ糖化性を持つロールティッシュペーパーを使用した。基質濃度20～25%の場合に4～5%の酒精醪が得られるようになった。又常温で糖化と酵素を同時に行なわせる方法がすぐれていた。これらの糖化液または酵素液からセルラーゼ製剤を比較的容易に回収再利用することが可能である。セルロース資源の内稻わらは、それ自身固体培養基として *Trichoderma* セルラーゼの生産に競同様にすぐれており、化学的脱リグニンが簡単であり、脱リグニンした稻わらは容易に糖化されるのでアジアの発展途上国における最良の資源といえよう。なお *Trichoderma* のセルラーゼ・コンプレックスは Avicelase, CMCase並びにセロビアーゼの3成分から成り、これらを分画精製して作用操作を調べたところ前2者はランダム型に作用することを確認したが、エキソ型に働く成分は見られなかった。

最近の主要文献

- 1) Toyama, N. and Ogawa, K. : Saccharification of Agricultural Cellulosic Wastes with *Trichoderma viride* Cellulase, Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, Aulanko, Finland 12-14 March (1975) 375p.
- 2) Toyama, N. and Ogawa, K. : Cellulase Production of *Trichoderma viride* in Solid and Submerged culture Methods, 305p
Toyama, N. and Ogawa, K. : Sugar Production from Rice straw by Saccharification with *Trichoderma viride* Cellulase, 373p, Proceedings of Bioconversion Symposium, Feb 21-23 (1977) Editor T.K. Ghose, Indian Institute of Technology, Hauz Khas, New Delhi-110029, India.

北海道農芸化学協会総会及び 日本農芸化学会北海道支部臨時総会

昭和55年7月21日（月） 13:30～14:30

於：北海道大学農学部農芸化学科第2講義室

合 同 懇 親 会

昭和55年7月21日（月） 18:00～20:00

於：共済サロン

（札幌市中央区北4条西1丁目共済ビル TEL 231-2111）

会 費 3,000円（学生 1,500円）

講演会のお知らせ

下記の講演会開催を予定しておりますので、多数御参集下さい。

演 題 Utilization of Solar Energy

演 者 Melvin Calvin教授 (California大学)

日 時 昭和55年10月16日（木）

場 所 北海道大学工学部講堂

（財団法人 杉野目記念会、日本薬学会北海道支部、日本化学会北海道支部、
日本農芸化学会北海道支部その他 共催）

録音テープ貸出しのお知らせ

北海道支部は今年度より、当支部内における外国人学者等による関連学術
講演のうち、録音したテープを希望者に貸出すこととなりました。

ご希望の方は当支部までお申し込み下さい。

現在保存中の録音テープは下記の通りです。

1. "The chemistry of lignin biodegradation"

Dr. T. K. Kirk (May 2, 1980)

2. "The biosynthesis of cellulose"

Dr. J. R. Colvin (May 2, 1980)

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

(ABC順)

旭油脂株式会社
福山醸造株式会社
富良野市ぶどう果樹研究所
古谷製菓株式会社
合同酒精株式会社
北海道朝日麦酒株式会社
北海道日産化学株式会社
北海道農協乳業株式会社
北海道理化器械株式会社
北海道糖業株式会社
北海道和光純薬株式会社
北海三共株式会社
北海製罐株式会社 罐詰研究所
北開水工測量社(有限会社)
ホクレン開発研究部
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
麒麟麦酒株式会社 千歳工場
日本化学飼料株式会社
日本清酒株式会社
日本新薬株式会社 札幌工場
日本甜菜製糖株式会社 技術部
ニッカウヰスキー株式会社
相模ハム株式会社 北海道事業部
サッポロビール株式会社 札幌工場
札幌酒精工業株式会社
サントリー株式会社 千歳工場
宝酒造株式会社 札幌工場
高砂香料工業株式会社 札幌出張所
東洋科学産業株式会社 札幌営業所
雪印乳業株式会社
雪印食品株式会社