

合同学術講演会

講演要旨

期 日：昭和62年7月11日(土)

場 所：北海道大学百年記念会館

日本農芸化学会北海道支部
日本土壤肥料学会北海道支部
北海道農芸化学協会

〒060 札幌市北区北9条西9丁目 北海道大学農学部
農芸化学科内 TEL 011-716-2111 内線2496・3352

学術講演会

◎一般講演 (9:30~12:00)

(講演時間12分, 討論3分, ○印: 演者)

- (座長, 及川英秋)
9:30 (1) フロログルシノールモノメチルエーテルの位置選択的アシル化反応
—— [2-¹⁴C] アシルフロログルシノールの合成 ——
(北大農化, *オーストラリア国大化) ○川端 潤, W.D.Crow*
- 9:45 (2) ホワイトルーピン (Lupinus albus L) の根に含まれる新規イソフラボノイド
について (北大農化) ○田原哲士, 折原 淳, 水谷純也
- (座長, 西村弘行)
10:00 (3) チモシーがまの穂病病徴部 (Choke) からの抗菌物質の構造 (第8報)
(北大農化, *草地試, **北農試) ○越野広雪, 塚田聡子,
吉原照彦, 坂村貞雄, 島貫忠幸*, 佐藤 徹**, 但見明俊**
- 10:15 (4) 逆相HPLCによる植物セレブロシドの分子種分析
(帯畜大農化, *兵庫女子短大) ○今井博之,
小嶋道之, 大西正男, 伊藤精亮, 藤野安彦*
- (座長, 塩見徳夫)
10:30 (5) 牛乳中のトリアシルグリセロール種のパターン解析, とくに初乳から常乳ま
での変化について (帯畜大農化, *兵庫女子短大) ○足立真理,
山口尚志, 大西正男, 伊藤精亮, 藤野安彦*
- 10:45 (6) 乳酸菌細胞壁多糖体の化学構造と抗コレステロール血漿作用について
(帯畜大畜産環境) ○中野益男, 渡辺隆之, 根岸 孝
- (座長, 川本伸一)
11:00 (7) Penicillium属菌のexo型イヌリナーゼの精製と性質
(酪農大食化) 安田 匡, ○小野寺修一, 塩見徳夫
- 11:15 (8) チーズホエーおよび初乳より得たラクトフェリンの高次構造の比較
(帯畜大酪農化学) ○島崎敬一, 吉本幸博
- (座長, 吉田 忠)
11:30 (9) 性成熟に伴うシロサケ血清の着色化現象
(北大水産) ○安藤清一, 羽田野六男
- 11:45 (10) 常温における余剰汚泥のメタン発酵
(工技院北開試) ○泉 和雄, 松山英俊

◎北海道農芸化学協会総会 (13:00~13:30)

◎特別講演 (13:30~15:30)

三員環アミノ酸の代謝 (エーシーシー・エムエーシーシーの間)

北海道大学農学部 本間 守
(座長, 中村太郎)

南米のジャングルとサバンナ

北海道大学農学部 佐久間敏雄
(座長, 田中 明)

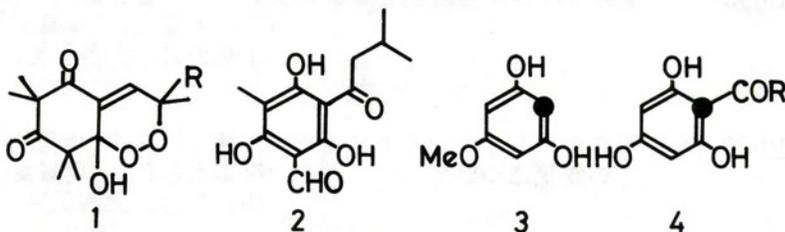
◎懇親会 (18:00)

共済サロン (中央区北4条西1丁目, 共済ビル)

1 フロログルシノールモノメチルエーテルの位置選択的アシル化反応
 — [2-¹⁴C]-アシルフロログルシノールの合成 —
 (北大農化, *オーストラリア国大化) ○川端 潤, W.D. Crow*

目的: ユーカリの一種 *Eucalyptus grandis* に含まれる植物生長阻害物質 G-inhibitors (1) 及び grandinol (2) は, ポリケチド経路からアシルフロログルシノールを経て生合成されると考えられるが, 演者はそれを確かめるためにラベル化合物の取り込み実験を計画し, 用いるラベル位置の固定されたアシルフロログルシノールを以下のように合成した。

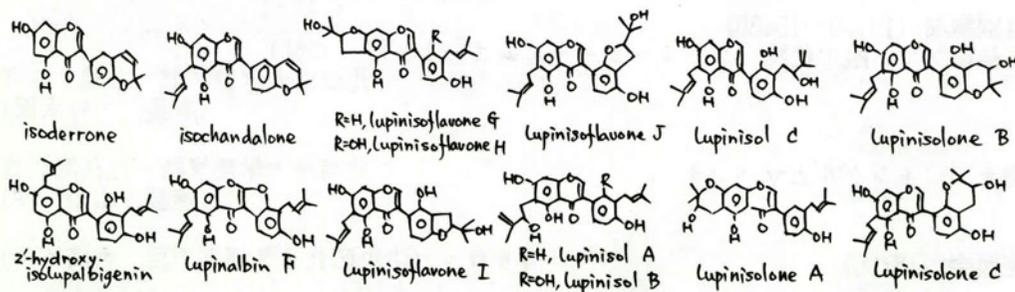
方法及び結果: [2-¹⁴C]-アシルフロログルシノール (4) を標的とし, 次のように合成を行った。まず, [2-¹⁴C]-マロン酸ナトリウムを遊離酸を経てマロニルクロリドに変換の後, 2-メトキシプロペンとカップリングさせて [4-¹⁴C]-1-O-メチルフロログルシノール (3) を得た。次に, 常法通りルイス酸触媒によるアシル化によってアシル基を導入するが, このときラベル炭素すなわちメトキシ基のパラ位に位置選択的にモノアシル化を行わせるために, コールドな化合物について種々の条件を検討した。その結果, エーテル/塩化メチレン中塩化チタン (IV) 触媒を用いることにより, パラアシル体が67%の収率で得られることを見出した。このとき, ハードなルイス酸ではパラ置換体の生成が優勢であり, 塩化スズ (IV), 塩化亜鉛 (II) のようなよりソフトなものではオルト体の生成比が増大する傾向がみられた。また, ニトリルを原料にした Hoesch 反応では高選択的にオルトアシル体が生成した。最後に, 三臭化ホウ素による脱メチル化で目的の4が得られた。



2 ホワイトルーピン (*Lupinus albus* L.) の根に含まれる新規イソフラボノイドについて
 (北大農化) ○田原 哲士, 折原 淳, 水谷 純也

目的: 我々はマメ科植物の抗菌性イソフラボノイド検索の一環として, ホワイトルーピンの根に含まれるイソフラボノイド類を精査している。既に主要なイソフラボノイドとして, genistein, 2'-hydroxygenistein (simple isoflavones), wightone, luteone, licoisoflavone A (monoprenylated isoflavones), lupalbigenin, 2'-hydroxylupalbigenin (6,3'-diprenylated isoflavones), parvisoflavone B, licoisoflavone B (pyranisoflavones), lupinisoflavones A-F (dihydrofurano-isoflavones) 及び Lupinalbins A-E (coumaronochromones) の存在を明らかにした。今回は, 更に少量成分の単離を行ない, 14種類の文献未記載イソフラボノイドを得, それらの構造を解析したので, その経過について報告する。

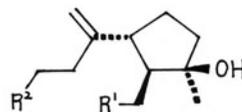
方法及び結果: ホワイトルーピン (cv. Kievskij Mutant) の根の 90% MeOH 抽出物の酢エーテル溶脱脂部をシリカゲル及びフロリシラカラムクロマトで分画, 注目した TLC 検出成分は最終的に preparative TLC で単離精製した。単離化合物は, MS, UV, ¹H-NMR 及び IR (一部) のスペクトル解析から及び Gibbs 試薬に対する呈色の速度と色調から, 以下のように構造を決定した。



3 チモシーがまの穂病徴部 (Choke) からの抗菌物質の構造研究 (第8報)
 (北大農化,*華地試,**北農試) ○越野広雪, 塚田聡子, 吉原照彦, 坂村貞雄
 島貫忠幸*, 佐藤 徹**, 但見明俊**

1. 目的 チモシーはがまの穂病徴菌 (*Epichloë typhina*) に感染すると、斑点病 (*Cladosporium phlei*) に対して拮抗性を示す。我々は、この誘導拮抗性の発現機構を化学的に解明することを目的に、拮抗性に関与していると考えられる choke の抗菌物質の検索を行ってきた。すでにセスキテルペン chokol A~F¹⁾、酸化型脂肪酸類²⁾及びフェノール化合物などの抗菌物質について報告してきた。今回、新規 chokol 関連化合物(1)とそのメチルエステル(2)の単離、構造決定について報告する。

2. 方法及び結果 圃場より採取した choke (20 kg) を70%エタノールで浸漬し、 π -Hキサン、次に酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物43gをシリカゲルカラム、Sephadex LH-20カラムを用いて分画した後、ジアゾメタン処理し、逆相 HPLC で精製し化合物(1)をメチルエステル(2)として3mg単離した。一方、低極性画分から同様な分画により、化合物(2)を9mg単離した。化合物(2)はFI-MS m/z 243 (MH⁺) 及び EI-HR-MS m/z 224.1393 (M⁺-H₂O, calcd. for C₁₃H₂₂O₄) より分子式を C₁₃H₂₂O₄ と決定した。¹H NMR 及び ¹³C NMR などのスペクトルデータより、chokol A(3)の1位がヒドロキシメチルに、側鎖がカルボキシ基に酸化された化合物のメチルエステルと推定した。立体配置については現在検討中である。



(1) R¹=OH, R²=COOH

(2) R¹=OH, R²=COOMe

(3) R¹=H, R²=CH₂OH

1a) 越野ら, 日本農芸化学会昭和62年度大会講演要旨集 p.482

1b) Yoshihara, Togiya, Koshino, Sakamura et.al. *Tetrahedron Lett.* 26, 5551 (1985)

2) Koshino, Togiya, Yoshihara, Sakamura et.al. *Tetrahedron Lett.* 28, 73 (1987)

4 逆相 HPLC による植物セブレロシドの分子種分析

(帯畜大農化、兵庫女子短大*)

○今井博之、小嶋道之、大西正男、伊藤精亮、藤野安彦*

目的：植物セブレロシドには、多様なセラミド残基に基づく種特異のおよび器官特異的な分子種分布がみられる。最近、特定の植物セブレロシド種に発芽促進性などの生物活性が見出され、またセブレロシドと植物の耐冷性との関連が注目されてきているので、微量で詳細な分子種組成を解析する必要性が高まっている。そこで今回は各種のセブレロシドを用い、未修飾の状態これらの分子種の逆相 HPLC による分離定量法の検討を行った。

方法：HPLCは、LS410、ERC-ODS-1282などのカラムを用い、40°Cで分析した。溶離液にはメタノール-水(25:1)を使用して毎分1.1mlの流速とした。ピークの検出はUVおよびRI検出器で行なった。また主要ピークを分取してTLC、IR、NMRおよびMS分析するとともに、メタノリシスした後、構成成分の組成を調べた。

結果：稲セブレロシド(100 μ g)を逆相 HPLC に供すると、少なくとも24種のピークが検出された。UV(220nm)とRI検出によるピーク面積比にはほとんど差が認められなかった。植物セブレロシドの主要な構成スフィンゴイドである d18:1^{aa}、d18:1^{ac}、d18:2^{aa,aa}、d18:2^{aa,ac}、t18:1^{aa}および t18:1^{ac}を含有するセブレロシドの相対保持時間の対数と脂肪酸の炭素数との関係を求めたところ、いずれも直線的で平行線群を形成した。このことから、相対保持時間から各ピークの分子種を推定することが可能であった。しかし、ジヒドロキシ塩基含有型とそれより炭素数1つ少ない脂肪酸を有するトリヒドロキシ塩基含有型(d18:2-24h:0型と t18:1^{aa}-23h:0型など)の分子種群は、それぞれ保持容量が近似していた。したがって両群を正確に分離定量するには、あらかじめケイ酸TLCでジヒドロキシ塩基とトリヒドロキシ塩基含有型を分別する前処理が必要であった。

5 牛乳中のトリアシルグリセロール種のパターン解析、とくに初乳から常乳までの変化について (帯畜大農化、*兵庫女子短大) ○足立真理、山口尚志、大西正男、伊藤精亮、藤野安彦*

1. 目的 乳脂肪の組成と性状については古くから分析されているが、主成分であるトリアシルグリセロール(TG)および微量の各リン脂質クラスの分子種組成はまだ調べられていない。今回はHPLC分析¹⁾を応用して牛乳中のTG分子種の組成を解析するとともに、乳質に影響を及ぼす諸要因、とくに泌乳期とTG種の組成変動との関連を検討しようとした。

2. 方法 本学付属農場のホルスタイン種から採取した無調整乳(常乳)および分娩直後から経時的に採取した初乳を供試材料とした。試料を凍結乾燥した後、常法により脂質を抽出し、ケイ酸カラムクロマトグラフィーでRf値の異なる2つのTG重画分を分離精製した。これを硝酸銀-ケイ酸TLCによりさらに分別し、GCで総炭素数分布を求めた。また逆相HPLCで分取した各分子種群についても、GCで総炭素数分布と構成脂肪酸を調べた。

3. 結果 牛乳TGを硝酸銀-ケイ酸TLCで分画した結果、飽和型が50%を占め、次いでモノ不飽和型が35%であった。常乳TGのHPLC分析では40以上のピークが検出され、クロマトパターンの解析から泌乳期間中のTG組成の変動を識別できることが判明した。常乳中の主要なTG種は、14:0-16:0-18:1(3.2%), 16:0-16:0-18:1(2.7%), 6:0-16:0-18:1(1.7%)などであった。

常乳および初乳TGには総炭素数としてC₂₄からC₅₄までの少なくとも30種が見出された。そのうち主なものは共通してC₃₆、C₃₈およびC₄₀で、これら3種が常に30%以上を占めていた。分娩後3日目までは、C₂₄からC₄₀のTG種が増したが、C₄₂からC₅₄のTG種の割合は経時的に減少した。7日目には再びC₃₆とC₃₈のTG種が増し、これにC₅₄を加えた3種の割合が全体の30%を越えてほぼ常乳のTG組成となった。

1) 佐々木、大西、間野、伊藤、藤野：日本農芸化学会61年度大会講演集、p.194(1986)。

6 乳酸菌細胞壁多糖体の化学構造と抗コレステロール血漿作用について

(帯畜大畜産環境) ○中野益男、渡辺隆之、根岸 考

1. 目的 腸内細菌は、宿主の各臓器の酵素や物質代謝の活性化、肝臓の解毒機能の向上、老化に伴う脂質の蓄積の抑制などに深く関係している。中でも乳酸菌は古くから関心が持たれ、これまでに腸内フローラの制御、乳酸の生成、ビタミンの合成、消化・吸収への役割について研究されてきた。しかし、乳酸菌の効果的作用機序について、細胞を構成する成分の分子レベルでは解明されていない。乳酸菌の細胞壁にはタイコ酸とよばれるポリオール、糖およびリン酸からなるヘテロ多糖体がある。このものは、細胞膜とリポドの結合したリポタイコ酸(LTA)の形で存在する。このLTAの存在形態と構造から、特異な生理機能が予測される。今回は、市販ヨーグルトの継代培養により特に粘性物質を生産する乳酸菌から分離されたLTAの化学構造と抗コレステロール血漿作用について報告する。

2. 方法 市販ヨーグルトから分離した乳酸菌から40%フェノールによりLTAを抽出し、Sephacrose 6B および Bio-Gel P-100 により精製した。LTAの構成成分であるリン、グリセリンおよび糖は比色法、グリセロ糖脂質はTLC、脂肪酸はGLCで分析された。糖鎖構造は完全メチル化後、GC-MSにより調べられた。LTAの抗コレステロール血漿作用はパーム油25%、コレステロール1%を添加して飼育したSD/Asmラットを用いて調べられた。

3. 結果 分離された乳酸菌は、グリセロ糖脂質(ジグリコシルジグリセリドおよびアシルジグリコシルジグリセリド)の化学的特徴から *Lactobacillus fermentum* sp. と推定された。LTAのリン:グリセロール:ガラクトース(p):グルコース(p):脂肪酸の構成比が1.00:0.96:1.20:0.40:0.02 であることから、グリセロリン酸と糖の結合を主鎖とする繰返し構造のユニットは18であった。高脂血症ラットを正常食にしてLTAを経口投与すると、12日後、血漿コレステロールは約50%低下したが、非投与群は約30%低下しにすぎなかった。

7 Penicillium属菌のexo型イヌリナーゼの精製と性質

(酪農大 食化)

安田 匡, ○小野寺 秀一, 塩見 徳夫

目的 演者らはすでに、イヌロオリゴ糖調製を目的としてPenicillium属菌よりendo型イヌリナーゼを精製し、その一般的性質、1-ケストース系列の各種オリゴ糖に対する基質特異性およびイヌリンの水解により生じるオリゴ糖の経時的变化について報告した¹⁾。今回は、培養液中に認められたexo型イヌリナーゼについて、その性質を比較検討するために本酵素の精製を行ったので、その精製方法と若干の性質について報告する。

方法 イヌリンおよびマルトースを炭素源とする培地を用いて本菌を培養し、培養液を粗酵素液として、DEAE-Sepharose CL-6B, Toyopearl HW-65, Bio-Gel P-150 を用いた各カラムクロマトグラフィーにより本酵素を精製した。活性は、イヌリンおよびショ糖を基質として、遊離した還元糖をSomogyi-Nelson法で測定して求めた。

結果 本酵素は電気泳動的に均一に精製され、糖タンパクであることがわかった。分子量はSDS-PAGE法により87,000と算出された。至適pHは、5.2付近、安定域pHはイヌリン水解に対して3.5~6.5、ショ糖水解については3.5~7.0であった。また温度に対しては10分間処理でいずれの基質に対しても50℃まで安定であった。イヌリンの水解では反応初期より単糖(フラクトース)のみが生成し、最終的に100%分解されたことから本酵素はexo型のイヌリナーゼであることがわかった。またイヌリン水解に対するKm値は0.079mM、ショ糖水解に対しては17mMであった。最大速度の相対値は、イヌリンを100として、ショ糖で40であった。

1) 塩見ら、昭和62年度日農化大会 講演要旨集 p.654

8 チーズホエーおよび初乳より得たラクトフェリンの高次構造の比較

(帯広畜産大学・酪農化学) ○島崎 敬一、吉本 幸博

目的: 牛乳成分の分別利用法の一つとして、チーズホエーより食品以外に活用出来るタンパク質を分離して、応用への道を拓く事を目的とし、対象としてラクトフェリンを選択した。チーズホエーは加熱処理を受けているため、生乳や初乳から得たnativeなラクトフェリンと、構造あるいはその活性発現においてなんらかの違いが有るかもしれない。そのため今回はそれらラクトフェリンの構造の若干の比較を行なった。

方法: チーズホエーおよび初乳ホエーから、SP-トヨパール650に吸着させて分離し、粗ラクトフェリン画分を得た。SP-トヨパールは0.005Mリン酸バッファー(pH6.0)で平衡化して用いた。粗ラクトフェリン画分は、さらにクロマトグラフィーで精製した。TSK-GEL G3000SWを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって純度の検定および分子量の推定を行なった。溶出液は0.05M酢酸バッファー(pH5.0、含0.1MNa₂SO₄)を用い、流速は1.0ml/minとし、吸光度280nmでのクロマトパターンを記録した。二次構造の推定のため、JASCO J-500を用いて円偏光二色性(CD)を測定した。また、抗ラクトフェリン血清(ウサギ)を用いた免疫拡散法で抗原性を調べた。

結果: 精製されたラクトフェリンについては、その原料が初乳あるいはチーズホエーにかかわらず、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて同じ位置に溶出した。また、ラクトフェリンの遠紫外部におけるCDスペクトルは、216nm付近に肩、209nmに負のピーク、200~201nmにcrossover point、193~195nmに正のピークを示した。チーズホエーより得たラクトフェリンについても、全く同じCDスペクトルを示し、両者に差は無かった。抗ラクトフェリン血清(ウサギ)に対する反応では、初乳より得たラクトフェリンと同様に、チーズホエーより得たラクトフェリンでも沈降反応を示した。

○安藤清一・羽田野六男(北大水産)

目的 サケ・マス類は索餌回遊期に北洋域でアスタキサンチンを主として含むプランクトンを摂取し、カロテノイドを積極的に筋肉へ蓄積する。産卵期になり、母川沿岸へ回遊し始める頃になると、生殖腺は著しく発達し、筋肉中のカロテノイドは失われ、卵巣は色鮮やかなオレンジ色を呈し、また体表には黄色や赤色からなる種々の模様、すなわち婚姻色が現われる。筋肉カロテノイドの卵巣および体表への移行に伴い、産卵期のサケの血清は鮮やかな色調を呈する。本研究では、この血清の着色化現象について検討した。

方法 各回遊ステージのシロサケ *Oncorhynchus keta* 雌雄の筋肉、血清、卵巣、表皮を実験に供した。カロテノイドはアセトンで抽出し、Sumipax OA-2000を用いるHPLCによって分析した。血清中のビリルビンレベルはMichaëllson法に基づいて測定した。血清リポタンパク質を密度勾配超速心分析法によって分離し、各画分中のカロテノイドおよびビリルビンレベルも測定した。

結果 血清のカロテノイドレベルは、性成熟に伴って雌雄のサケで増大し、主として高密度リポタンパク質画分(HDL)に存在した。HDLによって輸送されるカロテノイドは、大部分が(3S,3S)-アスタキサンチンであったが、放精直前および放精後の雄サケ血清では黄色系カロテノイドのゼアキサンチンも相当量含まれていた。血清ビリルビンレベルは雄においてのみ、性成熟に伴って増大した。ビリルビンもカロテノイド同様、HDLに存在した。従って、性成熟に伴ってサケ血清は、雌ではアスタキサンチン由来のオレンジ色を、また雄ではゼアキサンチンや胆汁色素であるビリルビンによってオレンジ色に黄色が強く混じった色調を呈していた。HDLは、アスタキサンチンの他にゼアキサンチン、さらにはビリルビンをも運ぶ多機能リポタンパク質であると思われた。

10 常温における余剰汚泥のメタン発酵

(工技院、北開試) ○泉 和雄、松山英俊

1. 目的 秋～冬にかけての最盛期には、水産加工廃水処理施設から1日1～2トン(乾物量)の余剰汚泥が出ており、その処理に苦慮している。そこで、我々は、この余剰汚泥を処理、利用することを目的として、メタン発酵を行っている。メタン発酵は、一般に、中温または高温で行われているが、北海道の冷涼な気候を考慮し、従来より低温である20～25℃における発酵について検討することとした。

2. 方法 メタン発酵装置は、30ℓ及び10ℓの上向流式固定床方式であり、接触材としてホッキ貝(ウバ貝、*Spisula sachalinensis*)の貝殻を用いた。投入余剰汚泥をTS(Total solids)4%に調整し、発酵温度を20℃及び、25℃、35℃で半連続試験を行った。発酵温度20℃においては、投入汚泥のTSを4%のほか、3%、6%でも行った。20℃、25℃の発酵槽には、種汚泥として、道内より採取した工糞を用い、35℃には実際に使用されている種汚泥を(株)西原環境衛生研究所より入手し用いた。発酵前後における、TS、VS(Volatile solids)、VFA(Volatile fatty acids)、pH、COD_{Cr}の変化、及び生成ガス量、ガス組成を測定し、負荷量を変化させたときの温度の影響を検討した。

3. 結果 発酵槽1ℓ当たりの1日のVS負荷量が1.1～1.2g以下で、TS4%の汚泥を投入したとき、メタン収率は、20℃では投入VS1gあたり約200mlであり、25℃では約230ml、35℃では約310mlであった。VS除去率は、20℃では、25℃、35℃と比較してやや低く、またVFAの蓄積が見られた。発酵温度20℃で、TS3%と6%に調整した汚泥を投入したときは、TS4%とほぼ同じメタン収率であった。生成ガス中のメタン濃度は、いずれも、64～70%であった。現在、各温度で負荷量をさらにあげたとき、メタン収率をどこまで維持できるか検討中である。

合同懇親会

昭和62年7月11日(土) 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 011-241-2661~4)

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
ベル食品株式会社
福山醸造株式会社
富良野市ぶどう果樹研究所
合同酒精株式会社
北海道朝日麦酒株式会社
北海道日産化学株式会社
よつ葉乳業株式会社
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
株式会社北海測量図工社
北海製罐株式会社罐詰研究所
株式会社北開水工コンサルタント
ホクレン農業総合研究所
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
ニッカウキスキー株式会社
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
十勝農業協同組合連合会農産化学研究所
雪印乳業株式会社
雪印食品株式会社