

合同学術講演会
シンポジウム

講演要旨

期 日：昭和63年11月25日(金)、26日(土)

場 所：北海道大学百年記念会館
(札幌市北区北8西5北大構内)

日本農芸化学会北海道支部
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 Ⅱ 011-716-2111 内線2496・3352

昭和63年11月25日(金)

一般講演

(講演時間10分, 討論2分, ○印: 演者)

午 前 の 部

◎一般講演

(座長: 塩見徳夫)

- 9:00 (1) ミツバチ結合型 Trehalase の活性解離基の推定
(北大農化) ○中村 充, 木村淳夫, 千葉誠哉
- 9:12 (2) イエローデントコーン発芽種子の α -amylase II の精製と諸性質
(北大農化) ○豊嶋孝一, 木村淳夫, 松井博和, 千葉誠哉
- 9:24 (3) イエローデントコーン発芽種子の α -amylase II のサブサイト構造
(北大農化) ○豊嶋孝一, 木村淳夫, 松井博和, 千葉誠哉
(座長: 葛西隆則)
- 9:36 (4) Bifidobacterium のフラクトオリゴ糖分解酵素
(酪農大食品科学) ○小野寺秀一, 菊地政則, 塩見徳夫
- 9:48 (5) アズキ培養細胞中の脂質成分の分子種的特性
(帯畜大農化, *十勝農協連) ○小嶋道之, 鈴木裕志*, 大西正男, 伊藤精亮
- 10:00 (6) 植物資源の再利用 —野草, 菜草, 樹木等の種子および葉に分布する不飽和脂肪酸について
(帯畜大環境) ○中野益男, 荒木由紀子, 岩本 哲, 福島道広, 根岸 孝
(座長: 田原哲士)
- 10:12 (7) ナス科近縁野生種, Solanum torvum の抗菌物質
(北大農化) ○天羅順子, 長瀬 洋, 吉原照彦, 坂村貞雄
- 10:24 (8) チモシーがまの穂病病徴部からの抗菌物質 (第10報)
(北大農化, *草地試, **北農試) ○越野広雪, 奥野美智, 吉原照彦, 坂村貞雄, 島貫忠幸*, 佐藤 徹*, 但見明俊**
- 10:36 (9) 作物根圏における Pseudomonas 属菌の分布ならびにその産生する抗菌性物質について
(道立衛研, *道立中央農試) ○長谷川伸作, 児玉不二雄*
(座長: 中野益男)
- 10:48 (10) ルーピン芽生えのイソフラボン相とストレスによるその変動について
(北大農化) ○渋谷祐輔, 田原哲士, 水谷純也
- 11:00 (11) 7-O-Methyl-luteone の Botrytis cinerea による代謝産物について
(北大農化) ○田原哲士, 水谷純也
(座長: 及川英秋)
- 11:12 (12) ハマナス (Rosa rugosa Thunb.) 葉中のカロチノイドの動態について
(北大農化) ○岩谷紀子, 橋床泰之, 田原哲士, 水谷純也
- 11:24 (13) ハマナス (Rosa rugosa Thunb.) の抗菌性 Sesquiterpene, Rugosal A の予想前駆体, carota-1,4-dienaldehyde の検索, 単離および構造決定
(北大農化) ○橋床泰之, 田原哲士, 水谷純也

11:36 (14) 穏和な病状を示すマイコプラズマ (CP Strain) に感染した *Catharanthus roseus* 花芽組織の Virescence (緑色変化) 発現におけるジベレリンの影響 (北大農化, *Univ. of Alberta, Plant Science) ○橋床泰之, Chuji Hiruki*, 水谷純也 (座長: 吉原照彦)

11:48 (15) 牛ラクトフェリンの固定化ブルー色素との相互作用 (帯畜大酪農化学) ○島崎敬一

午 後 の 部

◎日本農芸化学会北海道支部会総会 (1:10~1:30)

◎一 般 講 演

(座長: 松井博和)

1:30 (16) *Streptomyces* sp. MA406A-1 株におけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素およびグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素について (北大農化) ○小山信行, 布施広光, 中村通伸, 八島重昂

1:42 (17) *Streptomyces* sp. MA406A-1 株のフォルマイシンBアミノトランスフェラーゼサブユニットの菌体外蓄積について (北大農化) 小山信行, 布施広光, ○八島重昂

1:54 (18) *Streptomyces* sp. MA406A-1 株からの核外遺伝子の検索 (北大農化, *現武田薬品醸生研) ○布施広光, 小山信行, 鬼沢隆一*, 八島重昂

(座長: 吉田 忠)

2:06 (19) 大腸菌低温耐性変異株の遺伝学的解析 (北大農化) ○八十川大輔, 海藤晃弘, 川本伸一

2:18 (20) *Kluyveromyces lactis* 産生キラー耐性変異株に関する遺伝学的解析 (北大農化, *旭川高専) 川本伸一, ○羽鳥英孝, 田辺千夏, 中村太郎*

(座長: 川本伸一)

2:30 (21) 甜菜生汁および廃糖蜜の *Aspergillus terreus* K26 によるイタコン酸酸酵における金属イオンおよび有機酸の影響 (帯畜大農化) ○中川允利, 上家一則, 石橋憲一, 広中和憲

2:42 (22) 新生有珠火山灰土における微生物相 (9) 火山灰中和の影響 (北大応菌) 吉田 忠

◎特 別 講 演 (3:00~)

植物遺伝工学と微生物

(北大農化) 大野哮司
(座長, 千葉誠哉)

醸造技術者とビールの味

(サッポロビール(株)) 越野昌平
(座長, 水谷純也)

◎懇 親 会 (6:00~), 共済サロン

(札幌市中央区北4西1, 共済ビル, 電話011-241-2661~4)

昭和63年11月26日 (土)

シンポジウム「若手研究者の現場から —— 次世代の生命科学 ——」

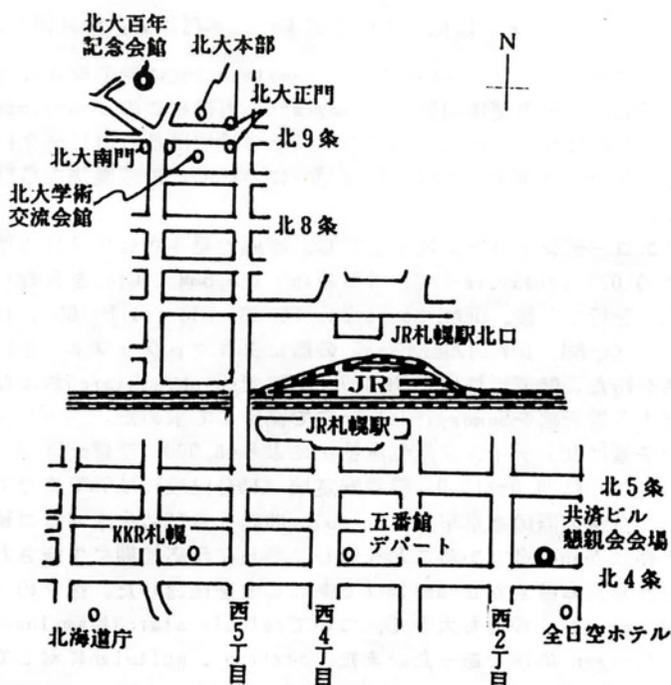
(午前の部)

- 10:00 開会の辞 日本農芸化学会北海道支部長 桐山修八
- 10:10 (S-1) セルフリー系を用いたジベレリンの生合成研究 (理研) 神谷勇治
(座長: 及川英秋)
- 11:00 (S-2) 酵素機能部位の特異的修飾 —— その新しい局面 (東北大農化) 小林幹彦
(座長: 木村淳夫)

(午後の部)

- 1:00 (S-3) 脳内神経活性ペプチドの個体発生 (阪大医) 塩坂貞夫
(座長: 原 博)
- 1:50 (S-4) 染色体の活性制御 (北大遺伝子実験施設) 高木信夫
(座長: 川本伸一)
- 2:40 (S-5) 高等動物におけるメチル化塩基性アミノ酸の代謝 —— ジメチルアルギニンの
新規代謝機構について (徳島大医) 小川 正
(座長: 葛西隆則)
- 3:30 閉会の辞 シンポジウム世話人一同

学会場、懇親会場とその近辺



(北大・農化) ○中村 充, 木村淳夫, 千葉誠哉

1. 目的 d,d-Trehalase は基質特異性が高く、d,d-trehalose のみを基質とする加水分解酵素である。筆者らは起源の異なるカルボヒドラーゼの活性解離基について検討してきた¹⁾。今回は、速度論的検討および化学修飾法により本酵素の解離基について推定した。
2. 方法 酵素は既報の方法²⁾に従い電気泳動的に単一に精製した。酵素活性は trehalose より遊離する glucose を酵素法を用いて測定し求めた。化学修飾は、カルボキシル基に特異的な水溶性 carbodiimide (WSC) [glycine ethyl ester 存在下・pH 4.8・25℃] およびイミダゾール基に特異的な diethyl pyrocarbonate (DEPC) [pH 6.0・25℃] を用いて行った。
3. 結果 速度パラメータの pH 依存性から pK 値 ($pK_{e1}=pK_{s1}=5.3$, $pK_{e2}=pK_{s2}=8.2$) を、また pK_{e1} , pK_{e2} の温度依存性から解離熱 ΔH ($\Delta H_1=1.83$, $\Delta H_2=9.13$ kcal/mol) を求めた。さらに低誘電率の溶媒 (20% ethanol, v/v) 中で pK_{e1} はアルカリ側へ +0.2 pH 単位移動し、 pK_{e2} は変化しなかった。以上の速度論的検討から本酵素の活性解離基は、酸性側がカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$)、アルカリ側がイミダゾール基 (Imidazole) あるいはアミノ基 ($-\text{NH}_3^+$) と考えられた。次に WSC および DEPC により化学修飾を行うと、いずれの場合も酵素活性の低下が認められたが、基質存在下ではこの低下が抑えられた。また両部分修飾酵素の trehalase に対する K_m 値は変化せず、 V_m 値のみが低下した。さらに DEPC 修飾酵素に対して hydroxylamine 処理を行うと、残存活性の高いものについては活性の部分的な回復が認められた。以上の結果から酸性側の解離基はカルボキシル基、アルカリ側はイミダゾール基であると推定した。また、アミノ基の化学修飾剤でも失活が起り、活性中心あるいはその近傍にアミノ基の存在が考えられるが、活性の発現の関与については、現在のところ不明である。 1) 千葉誠哉, 澁物科学, 35, 69, (1988)。 2) 中村ら, 農化, 62, 345, (1988)。

イエローデントコーン発芽種子の α -amylase II の精製と諸性質

(北大・農化) ○豊嶋孝一, 木村淳夫, 松井博和, 千葉誠哉

1. 目的 イエローデントコーン種子中の α -amylase 活性は発芽後 3 日目以降急激に増加する (暗所, 27℃)。他の植物起源の α -amylase と同様にこの α -amylase についても isozyme が存在し、DEAE-Sepharose CL-6B により、その活性は 3 つのピークに分離された。今回、これらのうち一活性画分 (α -amylase II) についてその精製法ならびに諸性質について報告する。
2. 方法 イエローデントコーン種子を 27℃、暗所で発芽させ 6 日目の種子を実験材料とした。磨砕後 0.02M imidazole-HCl 緩衝液 (pH 7.5, 5mM CaCl_2 を含む) を用いて抽出し、硫酸分画 (45%) を行った後、DEAE-Sepharose CL-6B、Bio-Gel P-100、TOYOPEARL HW-55、DEAE-Sepharose CL-6B、TOYOPEARL HW-55 の順にクロマトグラフィーを行い、電気泳動的に単一の標品を得た。酵素活性は、pH 4.7、37℃で soluble starch および β -limit dextrin より遊離する還元糖を Somogyi-Nelson 法で測定して求めた。
3. 結果 分子量は SDS-ディスク電気泳動法により 48,000、至適 pH は 4.7 付近、pH 安定域 (4℃, 20 時間処理) は 4.0~10.0、温度安定域 (15 分処理) は 65℃ までであった。また、soluble starch 分解の際の加水分解率-blue value 曲線ならびに生成オリゴ糖の経時変化は、本酵素の作用様式が endo 型であることを示し、さらに反応初期に生成される maltose が α 型である事実から、本酵素が α -amylase であることを確認した。種々の α -glucan に対する分解速度は、amylose が最も大きく、ついで soluble starch \approx amylopectin > β -limit dextrin \gg glycogen の順であった。また、dextran、pullulan に対してはほとんど作用しなかった。

(北大・農化) ○豊嶋孝一, 木村淳夫, 松井博和, 千葉誠哉

1. 目的 α -amylaseはそれぞれ特徴的なマルトオリゴ糖切断様式を示すが、これは各 α -amylaseのサブサイト構造に反映されている。本報告では、イエローデントコーン発芽種子の α -amylase IIのサブサイト構造について検討を行い、そのサブサイト数および親和力を明らかにした。

2. 方法 前報に従って本酵素を精製した。各マルトオリゴ糖($G_2 \sim G_7$, G_{10})に対する K_m , V_{max} はLineweaver-Burkプロットより求め、 k_0/K_m を算出した。maltose(G_2)に対する k_0/K_m は、 $s \ll K_m$ の条件下で $V_{max}/K_m \approx v/s$ の式を用いて算出した。各マルトオリゴ糖に対する切断部位およびその確率は、TLCならびにGLCにより求めた。各サブサイト親和力は新田らの方法¹⁾に従って算出した。

3. 結果 本酵素の各マルトオリゴ糖に対する k_0/K_m は、 $G_2 = 1.81 \times 10^{-1}$, $G_3 = 1.42 \times 10^0$, $G_4 = 3.40 \times 10^2$, $G_5 = 1.03 \times 10^3$, $G_6 = 1.69 \times 10^3$, $G_7 = 2.65 \times 10^3$, $G_{10} = 2.78 \times 10^5$ ($\text{sec}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)であった。また、各マルトオリゴ糖に対する主な切断箇所は、 $G-G \downarrow G^*$, $G-G \downarrow G-G^*$, $G-G-G \downarrow G-G^*$, $G-G-G-G \downarrow G-G^*$, $G-G-G-G-G \downarrow G-G^*$ (G^* : 還元末端 glucose)であると推定した。サブサイト数を7と仮定して各サブサイト親和力(A_i)を求めたところ、 $A_1 = 0.3$, $A_2 = 0.3$, $A_3 = 0.7$, $A_4 = 2.7$, $A_5 + A_6 = -2.8$, $A_7 = 2.0$ (kcal/mole)と算出され、触媒部位は5位と6位のサブサイトの間にあると推定した。

文献1) Y. Nitta, M. Mizushima, K. Hiromi and S. Ono, *J. Biochem.*, **69**, 567, (1971).

4

Bifidobacterium のフラクトオリゴ糖分解酵素

酪農大 食品科学 ○小野寺 秀一、菊池 政則、塩見 徳夫

目的 腸内フローラを構成する細菌群の中で Bifidobacteriumは有用菌として知られており、宿主に対して腸管感染防禦作用、免疫機能の増強、腸内腐敗の抑制などの生理作用があるのではないかと考えられている。この菌の増殖には糖質が必要で、有機酸やアミノ酸では代替できないことが明らかにされている。資化できる糖質の中で、他の菌にはあまり利用されず Bifidobacteriumに選択的に利用される糖として、ラクツロース、ラフィノース、イヌリン、フラクトオリゴ糖などが知られている。そこで我々は、これまで研究されていない酵素系に着目し、Bifidobacteriumの産生するフラクトオリゴ糖分解酵素について検討を行ったので報告する。

方法 供試菌は、本学応用微生物研究室保存株 B. longum A1, B. longum JCM 01217, B. adolescentis G1, B. adolescentis JCM 01275, B. bifidum JCM 01255, B. breve JCM 01192の6菌株とし、培地は、光岡のBL液体培地を改良して用いた。同培地で嫌氣的に前培養後、菌体懸濁液を1%の割合で加えて37℃で本培養を行った。遠心分離により菌体と培養液を分け、菌体を超音波破砕して得られた抽出液を菌体内粗酵素液とした。酵素活性の測定は、Somogyi-Nelson法およびGlucostat法で行った。

結果 フラクトオリゴ糖水解活性は、6菌株いずれも菌体内に認められ、炭素源としてフラクトオリゴ糖のみをBL培地に添加した場合に高い活性を示したが、グルコースとデンプンを炭素源とした培地では酵素活性は低かった。フラクトオリゴ糖0.5%とした時に、B. adolescentis G1株が最も高い酵素活性を示し、1-kestoseおよびフラクトオリゴ糖に非常によく作用した。スクロース、イヌリンにも作用したが、レバンには全く作用しなかった。1-kestoseの水解において、反応の至適pHは5~6と考えられ、反応の初期生成物はフラクトースのみで、グルコースはほとんど生成されなかった。

(帯畜大農化, *十勝農協連) ○小嶋道之, 鈴木裕志*, 大西正男,
伊藤精亮

目的: 演者らは, これまでにアズキの脂質成分の分子種的特性を部位別(種子, 葉, 根など)に明らかにするとともに, 登熟過程における種子脂質の変動を分析した。今回は, アズキから誘導した培養細胞中の脂質組成ならびに主要な脂質クラスの分子種組成を調査して, 脱分化に伴う脂質成分の変化を明らかにしようとした。

方法: B5液体培地で10日間生育させたアズキ培養細胞から, 常法により全脂質を抽出した。ケイ酸カラムクロマトグラフィーおよび分取用TLCにより8種の脂質クラスを分離精製した後, 構成成分の組成および糖鎖基の構造をGLCで調べた。また, 各脂質クラスの分子種組成は逆相HPLCで分析した。

結果: 胚乳由来の培養細胞の脂質含量は1.7%であった。脂質クラスの組成ならびにリン脂質の分子種組成は種子のそれらと類似していた。中性リン脂質(ホスファチジルコリンとホスファチジルイタノール)の主要な1,2-ジアシルグリセロール(DG)残基は, PL(16:0-18:2), PLn(16:0-18:3), LL(18:2-18:?)およびLLn(18:2-18:3)で, 酸性リン脂質であるホスファチジルイノシトールとホスファチジルグリセロール(PG)のそれはPLおよびPLnであった。トリアシルグリセロールでは, 種子と比べてLnLnLn種の割合が多く, 一方PLLnとPLLの割合が低かった。培養細胞のグリセロ糖脂質の1,2-DG残基の主要な分子種はLnLnとPLnで, 後者の割合は種子と比べて高かった。

アズキ種子中に見出された新しいGal(β 1-6)Gal(β 1-3')型のジグリコシルジアシルグリセロールは, 培養細胞ではごく微量しか検出されなかった。セレブロシドの分子種組成は, 培養細胞と種子の間で類似性が認められたが, 4-ヒドロキシ-8-スフィンゲニン異性体(シスおよびトランス不飽和)含有型の量比は異なっていた。

G 植物資源の再利用—野草, 葉草, 樹木等の種子および葉に分布する不飽和脂肪酸について

(帯畜大環境) ○中野益男, 荒木由紀子, 岩本 哲, 福島道広, 根岸 孝

1. 目的 自然界には, 未だに利用されていない数多くの生理効果の高い資源が眠っている。とくに, 植物は精油類に代表される脂溶性物質から生理活性の高い物質が見つかり, バイオマスの面からも見直されている。近年, 不飽和脂肪酸が代謝作用やヒトの健康に対し著効のあることが明らかにされて以来, 多くの関心をもたれている。これまでに, パルミトオレイン酸等のモノエン酸およびエイコサペンタエン酸等の高度不飽和脂肪酸による脳卒中, 心臓病, 高血圧, 関節炎の予防効果については科学的に証明されている。一般には, これらの脂肪酸を魚および魚油から得ている。最近, 短鎖脂肪酸が腸の機能を調節し, 脳卒中の予防にも効果のあることが明らかになった。機能性食品として短鎖脂肪酸と高度不飽和脂肪酸をもつ食物を植物界に広く求めることは可能である。今回は, 栽培植物以外の未利用の野草, 葉草, 樹木等の種子および葉に分布する不飽和脂肪酸について調べた。

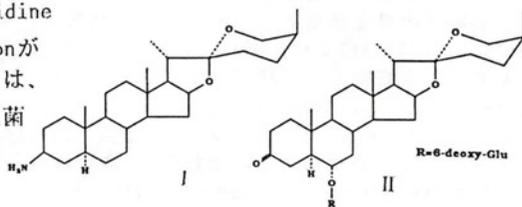
2. 方法 北海道産のシダ植物2種, 双子葉植物13種, 単子葉植物5種, 裸子植物10種, 被子植物18種, 南米産の葉草35種について調べた。種子および葉からクロロホルム-メタノール混液により全脂質を抽出。脂質クラスはカラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーにより分画した。脂肪酸は, ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー-質量分析計により同定・定量した。

3. 結果 植物脂質の構成脂肪酸は, リノール酸, オレイン酸, リノレイン酸およびパルミチン酸の順に多く, 栽培植物の一般的な脂肪酸パターンとよく類似していた。しかし, メマツヨイグサ等野草種子3種, エゾマツ・カエデ等樹木種子6種には, γ -リノレイン酸が3~23%と比較的高い割合で分布していた。南米産葉草には, 低級脂肪酸と γ -リノレイン酸の分布が高く, 葉用効果の高い葉草にこの傾向が見られた。

(北大農化) ○大羅順子 長瀬洋 吉原照彦 坂村貞雄

1. 目的 ナス科作物は、連作障害を回避する手段として、台木を用いた栽培を行なっている。演者らは、現在までに台木の病害抵抗性機作解明の目的でナス台木、耐病VF、トマト台木、耐病新交1号の抗菌物質の検索を行なってきた。今回は、ナス台木として有望な *S. torvum* の根よりステロイドアルカロイド及びステロイド配糖体を抗菌物質として単離したのでここで報告する。

2. 方法及び結果 *S. torvum* の根のエタノール抽出部をエーテル可溶部、酢酸エチル可溶部、水可溶部に分画した。半蒴萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*) と萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*) を用いた菌叢成長阻害試験では、酢酸エチル可溶部が強い抗菌活性を示した。その酢酸エチル可溶部を菌叢阻害試験や TLC bioautography を指標に各種クロマトグラフィに供し、抗菌物質としてステロイドアルカロイド I¹⁾ とステロイド配糖体 II²⁾ を単離した。I は、各種機器分析により jurubidine と同定した。II は、加水分解により aglycon が solagenine であると決定し、糖部については、6-deoxyglucose であると推定している。抗菌活性については、I、II とも E.O. を用いた TLC bioautography で活性を示した。



文献1) R. Radeglia et al Tetrahedron Letters vol.11, 903-906, (1977)

2) Ajit K. Chakravarty et al phytochem. 18, 902-903, (1979)

83

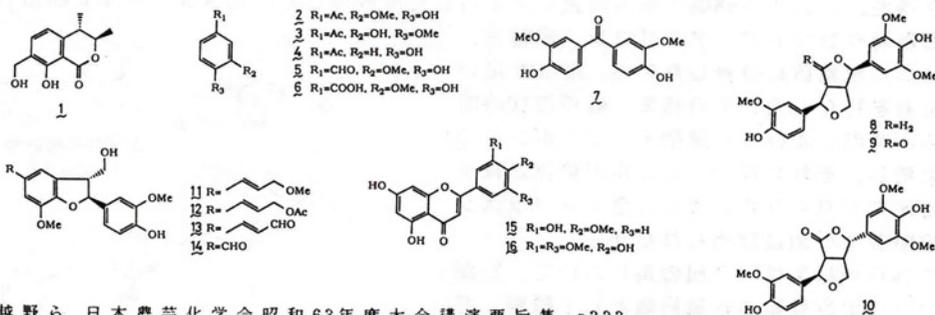
チモシーがまの穂病病徴部からの抗菌物質 (第10報)

(北大農化、草地試、北農試)

○越野広雪、奥野美智、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 (*Epichloe typhina*) に感染することにより、斑点病 (*Cladosporium phlei*) に対して誘導抵抗性を示す。抵抗性発現には抗菌物質が関与していると考え、病徴部の抗菌物質を中心とした成分研究を行い、既に数種の化合物について報告してきた¹⁾。今回は、新規抗菌物質 (1) を含む、16種のフェノール化合物の単離、構造決定について報告する。

2. 方法及び結果 がまの穂病病徴部の酢酸エチル可溶部 (43 g) を SiO₂ カラムで分画後、さらに Sephadex LH-20 カラム (MeOH) で分画し、フェノール化合物の画分を得た。さらに分画を繰り返して、化合物 (1)-(16) を単離した。化合物 (1)-(6) は *C. herbarum* 菌に対し抗菌性を示し、化合物 (1)-(16) は抗菌性を示さなかった。化合物 (7)-(10) の抗菌活性については検討中である。新規化合物 (1) の立体化学は、 δ 2.89 及び 4.50 ppm のメチンプロトン間のカップリング定数が 6.6 Hz であること及び、NOE 差スペクトルの結果より、二つのメチル基の相対配置を *trans* と決定した。



1) 越野ら 日本農芸化学会昭和63年度大会講演要旨集 p333

H. Koshino et al. *Phytochemistry* 27, 1333 (1988)

○長谷川伸作, 児玉不二雄* (北海道立衛研, *北海道立中央農試)

目的 作物の根圏に *Pseudomonas* 属菌を接種し, 糸状菌の侵入を防ぎ, 土壤伝染性病害の抑制を行う微生物防除の試みがなされている。しかし, 各種作物の根圏における本属菌の分布, 産生する抗菌性物質, 発病抑制機作等について, 体系的な研究はなされていない。今回, 作物根圏での本属菌の働きを明らかにすべく, 各種作物根圏から本属菌の検索ならびに産生する抗菌性物質の単離同定を行い, その分布状況を明らかにしたので報告する。

方法 抗菌活性を有する微生物は, メロン, キュウリ, トマト, ネギ, タマネギ, ユリ, インゲンおよびアズキの根部および根圏土壌から, *Fusarium*属菌などの病原菌を被検菌とし, 改良三層法^{1,2)}により検索した。*Pseudomonas* 属菌の検索には *Pseudomonas* agar, Nalidixic acid-cetrimide agar を用いた。分離菌株の *in vitro* 抗糸状菌活性は, 逆層法²⁾ならびに対峙培養法²⁾により測定し, 活性が認められたものについて, 抗菌性物質の単離・同定を行った³⁾。

結果 抗菌活性のある微生物は, ほとんどの土壌から検出され, その多くは放線菌で, 他は *Pseudomonas* などのグラム陰性桿菌が占めた。*Pseudomonas* 属菌はトマトを除く作物根圏土壌に認められたが, 根部または塊茎など作物体からの検出ではネギ, タマネギ, ユリに限られた。抗菌性物質を産生する *Pseudomonas* 属菌は, 根圏土壌において, メロンから1株/7試料; 順に1/5; 0/5; 3/5; 4/5; 4/5; 1/3および5/8(重複検出1試料)であり, 根部または塊茎ではネギで5/5(重複検出1試料); タマネギ, 2/5; ユリ, 3/5であった。菌種別では, *P. fluorescens*, 12株; *P. cepacia*, 9株; *P. aeruginosa*, 5株; *P. maltophilia*, 1株; *P. putida*, 1株, 未同定 *Pseudomonas*, 1株であった。*P. fluorescens* は広範に検出され, *P. cepacia* はネギ, タマネギの根部または塊茎で, それぞれ3株/5試料, 2/5の高い検出率であった。*P. fluorescens* からは pyrrolnitrin(1), pyoluteonin(2), hemipyocyanine(3), chlororaphin(4), phenazine-1-carboxylic acid(5)など; *P. cepacia* からは(1),(4); *P. aeruginosa* からは(3~5)などの産生が認められた。文献 1)今月の農業, 30(3), 22(1986), 2)北海道衛研報, 36, 16(1986), 3)J. of Pharmacobio-Dynamics 10, S-57(1987)

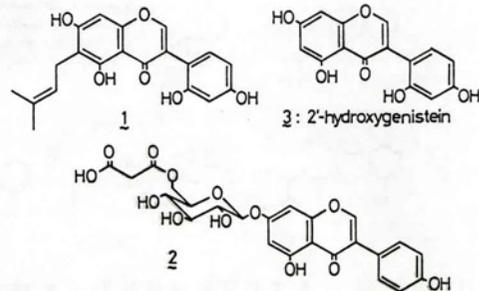
○北大農化) ○渋谷祐輔, 田原哲士, 水谷純也

1.目的 ルーピンは葉の表層に感染前抗菌物質として luteone(1) などの遊離型イソフラボンを持していると言われている¹⁾。しかし芽生えの段階では, genistein-7-O-(6"-malonyl)-glucoside(2), genistein-7-O-glucoside が主なイソフラボンであり, 他の配糖体類や遊離型イソフラボンは, TLCでわずかに検出される程度であった。一方, この芽生えに塩化銅ストレスを与えたところイソフラボン相が大きく変動し, 遊離型イソフラボンの誘導的生成が見られた。今回は, 塩化銅ストレスに伴うイソフラボン相の経時的変動を追跡した。

2.方法および結果 White lupinを脱イオン水で培養し, 吸水後5日めの芽生えから下胚軸を得た。これを3mM塩化銅水溶液に所定時間浸漬処理したのちメタノールで抽出した。

調製薄層クロマトで, アグリコン, 配糖体, マロニル配糖体に分画したのち, HPLCを用いて定量を行なった。その結果, 処理後10時間から24時間にかけて遊離型イソフラボン(1,3)が急増し, それに伴いマロニル配糖体が減少する傾向が見られた。また, 全イソフラボン量の顕著な増加は認められなかった。

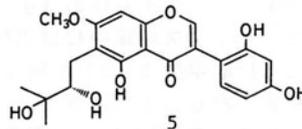
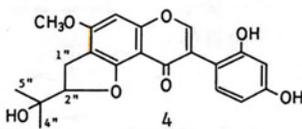
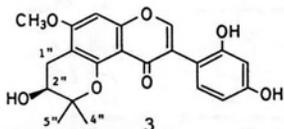
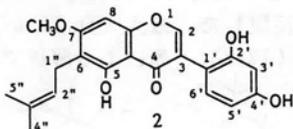
これらの結果は, 今回の系において, 2がイソフラボン骨格の貯蔵形態として機能していることを示唆すると思われる。

1) J.B.Harborne et al., *Phytochemistry*, 15, 1485 (1976)

(北大農化) 田原 哲士, 水谷 純也

1. 目的 抗菌性イソフラボン luteone (1) は *Botrytis cinerea* により環状エーテル誘導体 (dihydrofurano- 及び dihydropyrano-isoflavone) と側鎖部グリコール誘導体に代謝されることが明らかにされているが、環状エーテルは7位水酸基と側鎖の間に形成されたものであった。7位水酸基をメチルエーテルに変換した基質により、予想される代謝中間体即ち側鎖二重結合部のエポキシドを検出できるのではないかと期待し、本実験を試みた。

2. 方法及び結果 1 のジアゾメタンによるメチル化で 7-O-methyl-luteone (2) を得、4日間前培養した *B. cinerea* 培地に 5 mg/100 ml 濃度で添加、そのまま24時間振盪培養を続けた。培地に等量のアセトンを加えて濾別し、部分濃縮後代謝産物を酢エタで抽出中、フェノール性成分を濃縮後、Gibbs 試薬陽性成分を調製薄層クロマトによって単離精製した。代謝産物は三種類(3~5)得られたが、期待したエポキシドは含まれていなかった。5位水酸基はカルボニル基と水素結合しており、7位水酸基よりエポキシドとの反応性は低いが、7位に水酸基のない場合には、容易に5位水酸基とエポキシ化された側鎖から 3 や 5 の部分構造を形成するものであろう。代謝産物の立体化学についても述べる予定である。

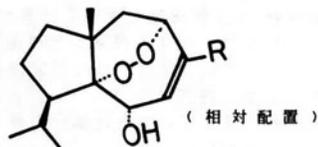


[北大農化] 岩谷 紀子, 橋床 泰之, 田原 哲士, 水谷 純也

[目的] 傷害ハマナス葉の水浸出液に見出された環状ハロキサイドセスキテルペン rugosal A (1) は強い抗菌活性を有し、ハマナスの防御物質として機能していると考えられる。1 は健全葉に含まれ、傷害部分より遊離してくると思われるが、その量には季節的変動があるように見受けられた。さらにハマナスの病虫害は夏よりも春先や秋口に目立つことに興味を感じ、定期的に採取したハマナス健全葉ならびに傷害葉からの浸出物中の 1 の定量を試みることにした。なお、1 のカルボン酸誘導体 rugosic acid A (2) の定量も行なった。

[方法] 供試ハマナス葉は5月半ばから9月初めにかけて石狩浜にて定期的に採取し、傷害を与えて水浸漬するものと、健全なままメタノール抽出するものと、2通りに処理した。浸出液及び抽出液成分は、それぞれ酢酸エチルに転溶し中性部と酸性部とに分けた。中性部の 1、酸性部の 2 は、それぞれ調製薄層クロマトにより単離し、UV吸収法で定量した。

[結果] 健全葉の定量では、1、2 共ハマナスの生育が活発な6月末から8月半ばにかけて急激に増加し、その後は減少するという全体的な傾向がみられた。傷害葉においてもほぼ同様の傾向がみられたが、季節の早い時期ほど傷害により遊離されてくる割合が大きかった。また、健全葉、傷害葉のいずれにおいても 2 は 1 よりも多量に検出され、1 に対する 2 の割合は季節が進むにつれて増大し、傷害葉でその傾向がより強かった。1、2 の関連化合物の消長についても述べる予定である。



R = -CHO rugosal A (1)

R = -COOH rugosic acid A (2)

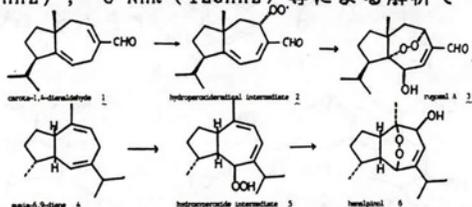
1) Y. Hashidoko, S. Tahara, and J. Mizutani, *Phytochemistry*, 27 (1988), in press.

ハマナス (*Rosa rugosa*) の抗菌性 Sesquiterpene, Rugosal A の予想前駆体、carota-1,4-dienaldehyde の検索、単離および構造決定。

(北大農化) ○橋床泰之、田原哲士、水谷純也

ハマナス (*Rosa rugosa*) は、特異的なエンドパーオキシド構造を有する carotanoid、rugosal A (1) を抗菌性因子として含有する。このエンドパーオキシドは、酸素分子の 1,3-ジエンへの付加により生成し天然有機化合物中に時おり見いだされるエンドパーオキシド群とは異なり、不飽和脂肪酸から生成するエンドパーオキシド環同様エキソパーオキシドラジカルを経て生成すると考えられる。一方糸川ら¹⁾は、ハナミョウガ (*Alpinia japonica*) より単離した、2 のエンドパーオキシドと相対的に同様な部分構造を有する hanalpinol (3) がエキソパーオキシドを経て生成することを化学的手法で示し、更に 3 の前駆体、guaia-6,9-diene (4) が *A. japonica* 中に存在することを G, C で確認している。Rugosal A が予想される生合成経路を経るならば、ハマナス葉中に前駆体 carota-1,4-dienaldehyde (1) が相当量含有されると考えられたので、この予想先駆体の検索を行なった。

ハマナス葉 (6月1日採集, 1020g) MeOH 抽出液の直接 n-hexane 転溶部を濃縮後シリカゲルカラムクロマトで分画し、低極性部に見いだされる蛍光クエンチング成分 (silica gel 60F₂₅₀ 上) を HPLC (n-hexane: CH₂Cl₂, n-hexane: EtOAc) により精製した。最大成分 RL-C は GC-MS で M⁺218 (C₁₅H₂₂O) を示し、¹H-NMR (500MHz), ¹³C-NMR (125MHz) 等による解析で 1 の構造が明らかにされた。本化合物は空气中で極めて不安定であり、容易に幾つかのパーオキシド試薬陽性の高極性化合物へ変化した。ハマナス組織中には本化合物を特異的に rugosal A 中間体 (2) へ酸化する lipoxidase 様酵素の存在が予想された。



参考文献 1) 糸川ら、香料テルペン及び精油化学討論会講演要旨集 pp.295-297 (1987)

穏和な病状を示すマイコプラズマ (CP Strain) に感染した *Catharanthus roseus* 花芽組織の Virescence (緑色変化) 発現におけるジベレリンの影響

(北大農化、*Univ. of Alberta, Plant Science) ○橋床泰之、*Chuji Hiruki、水谷純也

目的) Virescence とはマイコプラズマ感染により起こる顕花植物の yellows disease (萎黄病) の特徴的な病状のひとつで、花芽組織の緑色化、葉状分化を指している。Virescence の要因として、各種植物ホルモンの virescent floral tissue 内でのインバランスが幾例¹⁻⁴⁾も報告されている。しかしながら、非感染個体に人為的に virescence を発現させたという例は無く、これら植物ホルモンのインバランスと virescence 発現との関係は不明な点が多い。Yellows disease 病原体であるマイコプラズマはその病状発現の差異から幾つかの strain が認められており、急激な virescence 及び植物全体の病的黄化伸長を引き起こす AY strain に対し、CP strain による感染症状は穏和で、植物体の黄化や病的伸長も起こりにくく、virescence のタイプも異なっている。したがって、CP strain には AY strain にある何かの virescence induction factor が欠けているか、あるいは減少していると考えられる。本研究では、健全植物と CP 感染植物を用いて virescence 誘導を試み、virescence 発現主因子を明らかにすることを目的とした。

方法および結果) 被験植物として選んだ *C. roseus* (ツルニチニチソウ) は、温室内で播種育成され顕花期を迎えた個体を用いた。分化初期の花芽 (in vivo, in vitro) あるいは植物体全体に高濃度の各種植物ホルモン (kinetin, NAA, GA₃) を与え、花芽の形成、開花におけるそれらの影響をみた。更に初期花芽の器官 (子房、柱頭、やく etc.) に対する機械的傷害による花弁形成の抑制と virescence 誘導との関連を考察した。一方、CP strain に感染した個体の病状に対するジベレリンの影響も併せて調べた。興味あることに、外来性ジベレリンが CP 感染 *C. roseus* に既往症状として記録されていた軽度の virescent floral tissue の下部花托を著しく伸長させることが認められた。更にこのジベレリン処理した CP 感染グループは、新たに生成する花芽の発現頻度がジベレリン未処理の CP 感染グループよりも高い傾向を示し、その病状は AY 感染個体のそれに類似性を示した。他方、ジベレリン処理した健全植物群は全く virescence 発現を示さず、花托の伸長もほとんど認められなかった。この観察によって次の 3 点が推論された。1) Virescence 発現に際して花托部分の機能変化が起こる。2) ジベレリンは単独では virescence 誘導に何ら影響を及ぼさないが、マイコプラズマ感染に因る別の virescence 発現因子が存在するときそれに協力的に働く。3) CP と AY の病状の差は、感染成立後に内在性ジベレリンの総活性量を高める能力の強弱による。

参考文献 1) McCoy, R. E., *The Mycoplasma Ill.*, pp.229-259 Academic Press (1979) 2) Prouhit, S. D. et al. *Indian J. Exp. Biol.*, 18(11), 1338-1340 (1980) 3) Davey, J. E., et al. *Physiol. Plant Pathol.*, 19, 193-200 (1981) 4) Golino, D. A., et al. *Phytopathology*, 78(3), 285-286 (1988)

15 牛ラクトフェリンの固定化ブルー色素との相互作用
(帯広畜大・酪農化学) 島崎敬一

目的 牛乳中に含まれているラクトフェリンは、固定化Cibacron Blue F3GAに対して強い吸着性を示した。そこで、どのような相互作用がその吸着性に関与しているのかを検討するため、様々な溶出条件においてその挙動を観察した。

方法 初乳から等電点沈澱法によってカゼインを除いて調製したホエーから、SP-トヨパール650(東ソーK.K.製)を用いてラクトフェリンとラクトペルオキシダーゼを主に含む吸着画分を得た。さらにこの画分からSP-トヨパールカラムにて再クロマトグラフィーを行い、ラクトフェリンを精製した。次いでAF-Blue トヨパール650ML(東ソーK.K.製)によるアフィニティークロマトグラフィーを行った。AF-Blue トヨパールカラムからの溶出条件を検討するために、0.05 M トリス-塩酸バッファー(pH8.0)にて平衡化した後、ラクトフェリン画分をカラムに添加し、次いで 3M 塩化カリウム、1M チオシアン酸カリウム溶液、0.05N 水酸化ナトリウム溶液、8M 尿素溶液、1% Triton X-100、75% エチレングリコール溶液での溶出を試みた。

結果 AF-Blue トヨパール650ML カラムからは3M 塩化カリウム、1M チオシアン酸カリウム、0.1N 水酸化ナトリウムにてラクトフェリンは溶出したが、8M 尿素、1% Triton X-100、75% エチレングリコール溶液では溶出しなかった。その結果から、ラクトフェリンと固定化ブルー色素との結合は、静電氣的相互作用が主体であろうと推定された。また遊離のCibacron Blue F3GAによってもラクトフェリンの溶出が観察された。

16 Streptomyces sp. MA406A-1株におけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素およびグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素について
北大農化 ○小山信行 布施広光 中村通伸 八島重昂

〔目的〕

アクリジン系色素処理により得られた Streptomyces sp. MA406A-1株由来の変異株はフォルマイシン生産能、色素生成能、気菌糸形成能、トランスケトラーゼ生合成能の一部あるいは全てを欠失しており、さらに従来菌体内酵素と考えられてきたグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素(6PGADH)およびその他の特異的蛋白質が菌体外に著量蓄積していることも示唆された。そこで、今回はフォルマイシン生合成系にも関与していると思われるG6PDH および6PGADHの菌体内外における諸性質について検討することを目的とした。

〔方法〕

親株および変異株は各種糖源・ポリペプトン・イーストエキストラクト液体培地を用い30℃で振盪培養を行った。粗抽出液は生育定常期初期の菌体を超音波破砕により調製した。

〔結果〕

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法におけるG6PDH および6PGADHの活性染色による結果から 1) A-1株および変異株の菌体内に分子量の異なる2種類のG6PDHが存在し、その一方のみが菌体外に蓄積していること、2) 6PGADHの分子量も菌体内外で異なっていることなどが示された。そこで、菌体内外のG6PDH および6PGADHの諸性質について比較検討をした結果を報告する。

- 17 Streptomyces sp. MA406A-1 株のフォルマイシンBアミノトランスフェラーゼサブユニットの菌体外蓄積について
北大農化 小山信行 布施広光 ○八島重昂

〔目的〕

Streptomyces sp. MA406A-1 株を親株として用い、アクリジン系色素処理により得られた変異株の大多数はフォルマイシンBアミノトランスフェラーゼ(FMBAT) 活性を欠失していた。本酵素は分子量約15,000のサブユニット(S-1) および約35,000のサブユニット(S-2) より成る約50,000の蛋白質であるが、変異株においてはS-1 のみを菌体外に著量蓄積していることが当研究室で認められた。そこで、今回はS-1 の菌体外蓄積条件および菌体内外のS-1 の特性について報告する。

〔方法〕

FMBAT, S-1 およびS-2 は通常の蛋白質精製法を使用しポリアクリルアミドゲル電気泳動法により単一バンドを示すまで精製した。また、これらの精製標品を用いて、ウサギ、マウスおよびラットを使用して抗血清を調製し実験に供した。

〔結果〕

- 1) 変異株におけるS-1 の菌体外蓄積は生育対数増殖期中期から後期においてのみ認められ生育誘導期および生育定常期においては認められなかった。
- 2) 変異株により菌体外に蓄積されたS-1 は親株菌体内のS-2 に対する親和性などについて親株S-1 と比較した場合差異が認められた。
- 3) 親株のS-1 と変異株により菌体外に蓄積されたS-1 は免疫反応(主に沈降反応)において差異が認められた。

- 18 Streptomyces sp. MA406 A-1株からの核外遺伝子の検索
(北大 農化, *現武田薬品醸生研)
○布施広光 小山信行 *兎沢隆一 八島重昂

〔目的〕

Streptomyces sp. MA406 A-1 株で、アクリジン系色素処理の結果よりフォルマイシン生産能、色素生産能、気菌糸形成能に核外遺伝子の関与が示唆された。今回、A-1 株より従来報告されている方法での検索結果を報告する。さらに、最近巨大DNA 分子を分離する方法としてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)が主に高等真核生物の染色体の構造と機能の解析を行う目的で開発された。そこで、原核生物である放線菌 A-1株のPFGEを用いた核外遺伝子の検討についても報告する。

〔方法〕

1. クリアードライゼート法及びアルカリ溶菌法でDNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動によりDNA を分画した。
2. 試験菌株のプロトプラストを低融点アガロース中で溶菌し、PFGE によりDNA を分画した。

〔結果〕

1. 分離・検出の可能な核外遺伝子を有する放線菌を試験菌株として、それらに有効な溶菌法を検索した。検索した方法を用いてA-1 株よりDNA を抽出し、核外遺伝子の検出を行ったところ、確認することは出来なかった。
2. A-1 株に約700 kbp 及び約100 kbp の核外遺伝子の存在がPFGEにより確認された。

当教室ではこれまでに大腸菌K-12株の低温耐性形質を支配する遺伝子(*crg* 遺伝子)が大腸菌染色体上で遺伝子から0.3 ~0.5 分*lac* 遺伝子側に存在する事を示した。今回 B. J. Bachmann博士より供与のあった*Escherichia coli* KY895株¹⁾及びS730株²⁾の*tdk*及び*hemA*マーカーを使用し、*crg* 遺伝子の詳細なマッピングを行った。

上記*tdk* 及び*hemA*マーカーを*E. coli* MET3株(*crg*⁺)にP1kcファージを用いたトランダクションにより導入し、MET33株、MET34株をそれぞれ作製した。これらMET33株及びMET34株と既に作製した*cysB*、*pyrF*変異株(*crg*⁺)、及びMET6株(*crg*-1)を用いてマッピングを行った結果、これら遺伝子マーカーは*hemA*-*tdk*、*crg*-*trpB*-*cysB*-*pyrF*の順序に並んでいる事が明らかになった。また*tdk*-*crg* マーカーの同時形質導入頻度は90%と極めて近接して存在する事が示され、これら遺伝子の位置関係は確定されなかった。

現在、*tdk* マーカーを選択標識とした*crg* 遺伝子のクローニングに関し、検討を行っている。

Reference:

- 1) Igarashi, K. *et al.* 1967 *Genetics* 57 : 643.
- 2) Guest, J. R. 1969 *Mol. Gen. Genet.* 105 : 285.

Kluyveromyces lactis 産生キラー毒素耐性変異株に関する遺伝学的解析

(北大農化, *加川高専)

川本伸一 ○羽鳥英孝 田辺千夏 中村太郎*

1. 目的 *K. lactis* IF01267株が培地中に分泌するキラー毒素は作用スペクトルその他の点で他の酵母の産生するキラー毒素と異なり、その作用機作に興味を持たれる。当教室では、本キラー毒素の作用機作の解明を目的として感受性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AH22株からキラー毒素耐性変異株を独立に17株分離した。これら変異株はいずれも野生型に対して劣性であること、また表現型から次の3つのグループに分けられることが明らかとなった。すなわち、細胞をアロトプラスト化した場合に、毒素に対する耐性を消失する株 (Type I)、耐性を維持している株 (Type II)、及びアロトプラスト再生能を欠損した株 (Type III)である。今回、これら変異株の相補性試験による遺伝学的解析を行った。
2. 方法及び結果 得られた変異株は全て親株AH22 (*MAT α* , *leu2*, *his4*, *can1*, *p^o*)と同様に α 接合型のため、感受性の *S. cerevisiae* DBY746 (*MAT α* , *leu2*, *his3*, *trp1*, *ura3*)と交雑し、孢子形成させたのち α 接合型の一倍体耐性株を取得した。これら α 接合型の一倍体耐性株と元の α 型の耐性株との接合により得た二倍体細胞のキラー毒素に対する感受性から、耐性を示すものは同じ相補群に、感受性を示すものは異なった相補群に属するものと判定した。現在までのところ、17株の耐性株は少なくとも5つの相補群に分けられることが判明し、目下表現型との関連性について検討中である。

甜菜生汁および蔗糖蜜の *Aspergillus terreus* K26 によるイタコン酸発酵における金属イオンおよび有機酸の影響
(帯畜大農化) ○ 中川 允利 · 上家 一則 · 石橋 憲一 · 広中和 憲

1. 目的 先に演者らは、甜菜生汁および蔗糖蜜のカチオン交換、エーテル抽出、カチオン交換・エーテル抽出および電気透析処理のイタコン酸発酵成績(速度・収率)について報告した。今回は正常なイタコン酸発酵が行われるために、許容される金属イオンおよび有機酸の濃度について検討した。
 2. 方法 原料の生汁および蔗糖蜜は、日本甜菜製糖(株)より恵与されたシックジュース、HAおよびHB蔗糖蜜(以下それぞれTJ、HAおよびHBと省略)である。培養は麦芽寒天培地に着生した胞子を白金耳で糖濃度10%に調整した培地に接種し、35℃、140rpmの往復振盪機で4日間行った。培地の最低栄養源量はグルコース模擬培地(G培地と省略)を基準にした。各糖質原料および処理液の栄養源でG培地以下のものは補添された。
 3. 結果 金属イオン・有機酸・窒素量をG培地よりHBレベルまで変化させた発酵試験の分散分析の結果、有機酸の阻害効果が最も顕著にあらわれHBレベルで菌の生育が認められず、TJレベルでは1%有意水準で酸蓄積速度および酸収率に影響があらわれた。金属イオン・窒素については共に5%水準でGに比べTJおよびHBで同速度および収率にマイナスの効果があらわれた。
- 有機酸のうち揮発酸では蟻酸・酢酸で阻害が強く認められ、不揮発酸ではピロリドンカルボン酸(PCA)が菌体の増殖に影響を及ぼすことがわかった。一方、TJのG培地での5倍希釈およびTJのカチオン交換・エーテル抽出処理液およびHBのG培地での50倍希釈および同上処理液で正常な発酵成績が達成された。これらの処理液のうち、金属イオンでG培地のレベル以上含有されていたイオンはKで最大3倍、Naで2.5倍、および有機酸のうちでは蟻酸で最大110ppm、酢酸は170ppm、PCAは1000ppmであった。

22 新生有珠火山灰土における微生物相(9)
火山灰中和の影響
北大応菌 吉田 忠

1. 目的 1977年の有珠山爆発を機に、堆積4年後(1981年)から、新生火山灰に自然着生する微生物相を調べてきたが、堆積10年後(1987年)までに、一般細菌が *Arthrobacter*, *Corynebacterium* を中心として 10^4 /g乾重程度に安定し、*Penicillium* などの糸状菌が 10^2 、嫌気性N固定菌、S-酸化細菌がそれぞれ 10^2 , 10^4 レベルで安定したほか、後期には細菌が *Bacillus* や *Streptomyces*, 糸状菌が *Trichoderma* が急激に増加し、さらに、*Mucor*, *Aspergillus* など一般土壌に普遍的な糸状菌が現われるなど、次第に複雑化することを明らかにするとともに、空中落下菌のほとんどが定着できずに有機栄養源となることを推測した(昭63年4月、日農化大会)。今回は、微生物の主体がほぼ安定した1986年に、pH4台を示す火口付近の火山灰を中和し、微生物相に対する影響を観察した。
2. 方法 千葉、新毛(1977)の方法により計算量のCaCO₃を50×50×10cm³の火山灰に混じた中和区(N)と無処理区(I)について微生物相の変化を比較した。
3. 結果 火山灰中和直後に6.59であったNのpHは、2ヶ月以降もIにくらべて高い5台で経過しながら酸性化の傾向を示し、中和2年後には4.81とIの4.73を僅かに上回る値となった。微生物相中の優占種である細菌 *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, 糸状菌 *P. janthinellum*, *P. simplicissimum*, およびS-酸化細菌などはIとほぼ同様の変動を示して中和の影響を受けなかったが、細菌 *Bacillus* および *Streptomyces* をはじめ、*Trichoderma* その他の糸状菌類や好気性N固定菌、さらにSO₄²⁻還元菌、好気性・嫌気性セルロース分解菌など、多くの種類が強く抑制されることが判り、その反面、*P. funiculosum* が一時的に増加し、細菌 *Flavobacterium* や糸状菌 *Botrytis* などの新たな菌群が定着できるようになり、この程度の中和によっても微生物相に大きく影響することが明らかとなった。

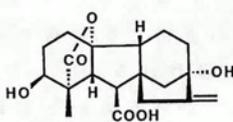
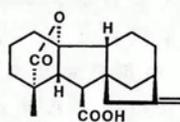
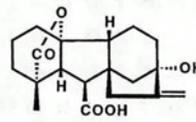
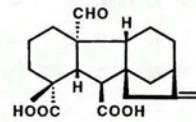
ジベレリン(GA)の生合成研究は初めカビ(*Gibberella fujikuroi*)や無傷植物を用いた取り込み実験により進められ生合成経路に関してかなりの情報が得られたが、この方法では基質が生体内に取り込まれなかったり、生理的濃度を越える高濃度の基質を用いると異常反応が起こるなど問題点があった。そこでこれらの問題を解決するために植物のセルフリー系(無細胞系)によるGA生合成研究に着手した。セルフリー系の確立により従来不明であった植物中のGA生合成経路の重要な段階を解明することができ、GAの活性化及び不活性化機構を酵素レベルで研究することができた。ついでGAの活性化を触媒する 3β 水酸化酵素の精製を進め、本酵素が植物では珍しい α ケトグルタル酸要求型の酵素添加酵素であることを示した。現在GA生合成酵素の化学構造の解析を進めているが、これらが明らかとなれば遺伝子レベルでのGA生合成研究が可能となる。

1. C_{20} -GAから C_{19} -GAへの変換

GAの生合成経路で未解決の問題は C_{20} -GAから C_{19} -GAへの変換過程である。エンドウの未熟種子から調製したセルフリー系を用いた研究により、 GA_{12} は GA_{15} 、 GA_{24} を経由して GA_9 に変換されるがC-20がカルボン酸である GA_{25} は GA_9 に変換されないことを明らかにした。これらの反応を触媒する酵素はGA以外に α ケトグルタル酸をもう一つの基質として要求する酵素添加酵素で、酵素一分子中の一原子はGAの酸化に用いられ他の一原子は α ケトグルタル酸の酸化に用いられる。C-20を ^{14}C で標識した GA_{12} を用いた変換実験からC-20は炭酸ガスの形で脱離し、C-19を ^{18}O で標識した GA_{15} を用いた実験から C_{19} -GA中の γ ラク톤の酸素はいずれもC-19のカルボン酸に由来することを示した。

2. 3β 水酸化酵素の精製

トウモロコシ、エンドウ、イネの遺伝的矮性種を用いた実験から、GAの生合成において 3β 水酸化反応がGAの活性発現で重要な役割を持つことが示された。そこで、インゲン(*Phaseolus vulgaris* cv. Masterpiece)未熟種子から 3β 水酸化酵素の精製を試みた。粗酵素抽出液を15%MeOH処理、Butyl-Toyopearl疎水クロマト、DEAE-Toyopearlイオン交換クロマト、HPLCゲル濾過クロマトを用いて精製し、 3β 水酸化酵素の比活性を粗酵素液に対して313倍に上げることができた。 3β 水酸化酵素は C_{20} -GAから C_{19} -GAへの変換酵素と同様に α ケトグルタル酸、 Fe^{2+} 、アスコルビン酸を要求する酵素添加酵素で、精製した酵素はBSAとカタラーゼによって安定化される。酵素は極めて不安定で失活しやすいが、緩衝液に30%グリセロール、0.2M蔗糖、2mM DTTを添加することにより安定化することができた。酵素の基質特異性の解析からインゲン未熟種子中のGA生合成経路を明らかにできた。 3β 水酸化酵素は3位の水酸化ばかりでなく、2,3不飽和結合化、2,3エポキシ化も触媒すると思われる。

GA₁GA₉GA₂₀GA₂₄

1. はじめに……化学修飾や親和標識を用いて酵素の触媒反応におけるアミノ酸残基の役割を演繹する方法は古くから反応解析の重要な手法とされている。近年の遺伝子工学の発展に伴って、糖質関連酵素の場合にも、その一次構造が次々と明らかにされている。ホスホリラーゼは動、植物、微生物に広く分布しているが、大量に結晶が得られるウサギ骨格筋の酵素の一次構造が決定されたのはその発見から約40年後の1977年であった。その後ジャガイモの酵素でも1984年に一次構造が提出された。筋酵素の一次構造決定から10年の間に、DNAの塩基配列から酵母、肝臓、脳の酵素のアミノ酸配列が明らかにされた。最近ではX線結晶解析とコンピューターグラフィックスの組み合わせにより、活性中心内での立体構造の変化と活性の相関の視覚化も試みられている。

2. タカアミラーゼAの特異的修飾…… α -アミラーゼの代表とも言えるタカアミラーゼA (TAA) に関しては一次構造の決定、三次構造の解析ともに国内の研究グループの手で明らかにされた。TAAではX線結晶解析のデータからサブサイトに結合する α -1,4-グルカン周辺の構造も読み取ることができる。この様な状況の中で、化学修飾、親和標識法による研究は被修飾残基の酵素分子内での存在位置の特定が以前よりはるかに容易になり、また、三次構造に基づいて修飾すべきアミノ酸残基を選択することも可能になってきた。TAAの活性中心にはサブサイトS'₂位のグルコースのC-3のOH基と水素結合をつくるLys残基の存在が認められている。オルトフタルアルデヒド(OPA)はNH₂基とSH基を架橋する形で連結し、蛍光性のイソインドール環を生成する。OPAはTAA活性を拮抗的に障害し、pHおよびOPA濃度に依存して酵素を不可逆的に失活させることから、OPAがサブサイト内のLys残基を修飾する可能性について検討した。OPAはTAAと等モルの反応を呈し、基質の存在により失活が抑えられた。さらに、修飾されたTAAではアミラーゼ活性がほぼ完全に消失したにも拘らず、マルトシダーゼ活性は約50%近く残存していた。これらの事実から、酵素とOPAの結合反応は活性中心内で起こっており、OPAの修飾部位が活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. ホスホリラーゼの特異的修飾……筋肉ホスホリラーゼはピリドキサルリン酸を補酵素とし、他にいくつかのアロステリックな活性調節部位を有している。そこで、シクロデキストリンのジアルデヒド誘導体(dial-CD)を調製してホスホリラーゼの親和標識を試みた。糖のアルデヒド基とアミノ基との反応はメイラード反応として著名な大変興味深い反応である。Dial-CDはホスホリラーゼに対して拮抗阻害剤として作用し、経時的に不可逆的な失活をもたらした。筋肉ホスホリラーゼbではマルトヘプタオースがグリコーゲン貯蔵部位に優先的に結合することが知られており、1)部分修飾酵素が活性を保持している、2)修飾酵素ではグリコーゲンに対する解離定数、 K_m 値の変化が大きい、3)基質のグルコース1-リン酸はグリコーゲンに比べて失活の保護効果が殆ど見られない等の理由から、dial-CDは活性中心ではなくグリコーゲン貯蔵部位に結合しているものと考えられる。調節機構を持たないジャガイモのホスホリラーゼに対しても dial-CDは強い修飾能を示した。この酵素はCDでも強く障害され、活性中心近傍にCD結合部位の存在が推定されていることから、dial-CDはこの部位に結合すると思われる。

4. むすび……酵素分子の特異的修飾の研究の中で私共が目指している方向と問題点を紹介した。最近の研究はアプローチの方法が多極化しており、各分野のエキスパートとの共同研究の成否が研究の迅速な展開のカギになっているようである。

神経系の化学伝達機構を担う物質としてアセチルコリンやカテコールアミンおよび伝達物質としてのアミノ酸（グルタミン酸、GABA等）はよく知られている。これら伝達物質と同定された物質群にたいし、脳神経系には数多くの神経活性ペプチドと呼ばれる一群がある。これらはいずれも数個から数十個までの小さなペプチド鎖であり脳内で神経細胞に適用すると興奮性あるいは抑制性の神経活性を有するので神経活性ペプチド（神経伝達物質と呼べるほどには確立していない）と呼ばれる。

これらのペプチドはそれらが発見されてきた経過からいくつかのサブグループに分けるのが一般的である。例えばバゾプレッシン、オキシトシンのような神経分泌ホルモン、ソマトスタチン、LH-RHを代表とする下垂体ホルモン、サブスタンス-Pのように血管作用および唾液分泌を指標として抽出されたもの、CCK、VIPのような消化管ホルモンとして、エンドルフィン、エンケファリン等痛覚抑制を指標として得られたモルヒネ様物質などの種類があり、すべてをあわせると50種類におよぶ数が確認されている。しかし各物質の機能は必ずしも上述したものだけでないことが次第に明らかとなってきたため、現在ではそれらの機能を類推するためにどのような経過で発見されたかということとはあまり問題とはされなくなってきた。神経活性ペプチドはその抗体が作製されると比較的容易にそれらの分布を知ることができる。その結果、これらペプチドは脳内にきわめて幅広く存在し、それらの機能は考えられた以上に複雑であろうと推定される。従来より私どもの研究室では免疫組織化学法、In situ ハイブリダイゼーション法を用いてこれらペプチドの組織学的検索を行ってきた。今回はその内、個体発生に関する研究をお示しする。

さて、神経系はその個体内の情報伝達および処理と各種機能の制御に中心的な役割を有する器官であり、とりわけニューロンに局在する活性物質の発達は極めて重要であると考えられる。このような神経活性物質はとくに成熟動物で豊富になると想像されたが、実際に免疫組織化学法によって検討してみると、色々な発達パターンを示した。とくに私どもが興味をもったものは、ある一部のペプチドが胎生期から周生期には豊富に認められるものの成熟期にはほとんど認められなくなるという一見奇妙な発達パターンであった。とくに下位脳幹部のソマトスタチン、帯状回、海馬傍回のニューロテンシン、腹側被蓋核のCCKといったペプチドがこれに相当する。

下位脳幹部のソマトスタチン——従来ソマトスタチンは視床下部を中心とする前脳部のみ分布すると考えられていたが、免疫組織化学法により下位脳幹部にも本ペプチドが豊富に分布することを明らかにした。さらにこれの個体発生を検討すると下位脳幹部のソマトスタチンは前脳のものとはやや異なり幼弱期に一過性にのみ出現する神経ペプチドであることが明らかとなった。これはとくに聴覚系のリレー神経核である蝸牛神経核のソマトスタチンニューロンにおいて顕著であった。このことをさらに明確にするためIn situ ハイブリダイゼーション法によってプレプロソマトスタチンmRNAの個体発生を検討した。その結果、下位脳幹部のソマトスタチンは類似蛋白質への交差反応性等ではなく真のソマトスタチンであり、成熟ラット下位脳幹部における本ペプチドの減少はやはりmRNAにおいても再現された。この一過性出現の生理的意義について現在検討している。

帯状回、海馬傍回のニューロテンシン——やはり、免疫組織化学法およびIn situ ハイブリダイゼーション法によりその個体発生的変遷を調べた。これも先程のソマトスタチンと同様に幼弱期には極めて豊富に観察される。またこの細胞群の神経回路については既に明らかにした。幼弱期のニューロテンシンニューロンの神経突起の伸張および標的組織への投射について現在検討している。

遺伝子を単位とした発現調節は組み換えDNA技術の進歩により解明の手がかりを得たが、対象がより高次の現象になると解析は急激に困難となる。ヒトを含む哺乳動物に特有なX染色体不活性化とゲノムの imprinting も後者の範疇に入るものであろう。

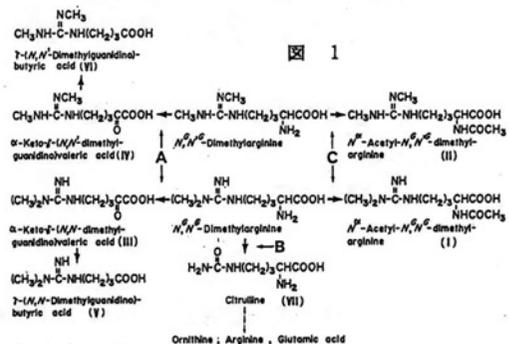
哺乳動物の性決定機構はXX-XY型である。Y染色体は小型で雄性決定と妊性に関する遺伝子のみが知られており、一方のX染色体はゲノムの約5%で、常染色体同様、多数の遺伝子を担っている。X染色体不活性化は雌雄間のX染色体量の違いを是正する手段であると考えられている。雌体細胞では一本のX染色体が凝縮して、その遺伝子のほとんどが発現不能な状態にある。生殖細胞でも不活性化は起きるが、卵母細胞で再び活性状態に戻る。不活性化は発生初期に起き、2本のXのいずれが不活性になるかは各細胞で無作意的に決まるとされているが、これは胚体部だけについて正しい。分娩時に不要となる胎盤など胚体外部では不活性Xは父由来である。X染色体は 1.5×10^8 塩基対、長さが約5cmのDNAよりなる。この巨大分子の全体が或る条件下で一様に不活性になり、再び活性化することは、通常の遺伝子単位での遺伝情報発現に比較すると、実に目ざましい現象と言えよう。不活性化はX染色体上の単一座位 (inactivation center; IC) によって支配され、しかも細胞分化と関連している証拠がある。しかし、(1) ICがいかなるシグナルにตอบสนองして不活性化の開始にいたるか、(2) 不活性化がどのように染色体の全体に及ぶのか、(3) 不活性化状態が体細胞ではいかにして安定に保たれるか、(4) 減数分裂期の卵母細胞での活性化シグナルはなにか、など重要な点は全く不明である。分子生物学の進歩にもかかわらず、研究が予測ほど進展しない主要な原因のひとつは活性状態の客観的な指標が見いだされていないことにありそうである。

父由来のX染色体が胚体外部で不活性化する現象は配偶子形成過程での imprinting によると考えられてきた。Imprintingとは相同染色体が互いに違った振舞いをするように予め押される刻印である。Imprintingが関与すると思われる面白い現象がこの数年間マウスで次々に明らかにされてきた。動物の中で単為生殖の例が知られていないのは哺乳類のみである。その原因を追求するための前核移植実験で、雄性前核のみを持つ androgenetic 卵、雌性前核のみの gynogenetic 卵を作成したところいずれも胚発生を全うせず妊娠途中で失われた。Androgenetic 胚では胚膜の発育は良いが、胚体は貧弱、逆に、gynogenetic 胚では胚体の発育は良いが胚膜の発育は悪い。従って、精子由来のゲノムは胚膜の、卵由来のゲノムは胚体の発生に適した形に修飾されており、正常の胚発生には両者の共存が必須であることが明らかにされた。

マウスに維持されている相互転座、centric fusion type の転座を利用すると、特定の相同染色体あるいはその一部を片親由来にすることが出来る。このようなマウス受精卵のあるものは正常に発育するが、あるものは表現型に異常を生じたり、発生途上で死亡したりする。特に興味深いのは異常個体で同一染色体が父由来であるものと、母由来であるものが正反対の表現型を示したことである。これは卵形成、精子形成過程での imprinting の存在を更に確かなものにした観察といえよう。Imprintingの機構については transgene を利用したアプローチがある。Transgeneが父を経由した時と、母を経由した時とではDNAのメチル化に明確な差が出ることもあり、それは成体でも変わることなく維持されている。DNAのメチル化は今後も研究を続ける価値がありそうである。

タンパク質の多くは、その生合成の過程で何らかの post-translational modification を受けた後、その機能を発揮することが知られているが、その一例としてタンパク質中の塩基性アミノ酸残基のメチル化がある。今回取り上げた2種のジメチルアルギニンの位置異性体、 N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (DMA) 及び N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (DM'A) については、DMA が主として non-histon nuclear protein に見いだされるのにたいして DM'A が神経系の myelin basic protein に見いだされることが報告されている。これらのタンパク質のメチル化及びその分解に伴って体液中に遊離されるメチル化塩基性アミノ酸類の生理的機能や、その後の代謝的運命については N^T -methylhistidine や N^E -trimethyl-L-lysine 等の一部について知られているにすぎない。高等動物においては、これらの化合物は代謝（分解、再利用）を受けずに尿中に排泄されるとする既成概念が存在し、十分な解析が為されないまま、生体内の特定のタンパク質の turn-over rate を知る指標物質として利用しようとする試みもある。しかしながら、演者らは、天然 B-6拮抗体のラットにおけるアミノ酸代謝に及ぼす影響を検討中に、尿中に排泄されるジメチルアルギニン類の新規代謝産物の存在を見いだしたのを契機として、ラットにおいてこれらのアミノ酸の代謝系が活発に機能していることを立証した。¹⁾ これらの事実から、上記の既成概念に疑問を提起すると同時に、少なくともラットにおいては DMA, DM'A を指標物質として用いることは不相当であることを示した。ラットを用いた酵素レベルでの詳細な解析により図1に示す代謝機構を解明した。これによれば、DMA 及び DM'A は主として両アミノ酸に共通する経路 (A) と DMA に特異的な経路 (B) によって代謝される。又、一部は経路 (C) により N^G -アセチル化を受けて尿中に排泄される。経路 (A) に関与する酵素は腎臓及び肝臓に局在し、DMA, DM'A, N^G -monomethyl-L-arginine (MMA) 等 guanidino 基のメチル化された L-arginine と pyruvate 間の transamination を触媒する。又、高等動物には報告のない L-ornithine の α -アミノ基の転移をも触媒する特異な aminotransferase であることを明かにしたが、その後の研究において本酵素は既知の AGT-II (EC 2.6.1.44) と同一であることを示した。この事実は AGT-II に新しく見いだされた性質である。一方、(B) に関与する酵素は DMA から加水分解によって dimethylamine を遊離し、L-citrulline を生成する N^G, N^G -dimethylarginine dimethylaminohydrolase と呼ぶべき新規な酵素である。²⁾ 本酵素は DMA 及び MMA のみを基質とし、種々の臓器に広く分布することから、体液中に遊離した DMA の速やかな分解に機能していると考えられる。本酵素の発見は、その機能に対する興味に加えて、反応生成物の一つである dimethylamine について、従来未明であったその生体内における生成起源に関しての一つの解答を与えるものである。ここに明かにされた事実は、現在未明の領域にあるタンパク質のメチル化やメチル化塩基性アミノ酸の生理的機能を理解するうえに多くの情報を提供するものと考えている。本シンポジウムでは、上記ジメチルアルギニン代謝の研究において得られた成果を中心に述べる。

1) T. Ogawa et al. A.B.B. 252, 526 (1987)
 2) T. Ogawa et al. B.B.R.C. 184, 671 (1987)



日本農芸化学会主催
第13回ABCシンポジウム

『ペプチド栄養』

主催：日本農芸化学会（北海道農芸化学協会共催）

オーガナイザー：桐山 修八（北海道大学農学部）

荒井 綜一（東京大学農学部）

日時：1989年1月28日（土），9時30分より

場所：北海道大学学術交流会館

（060 札幌市北区北8西5，北海道大学構内）

〔交通〕JR「札幌駅」北口から，徒歩5分

☎：011-716-2111，内線2141

— 入場無料 —

〈プログラム〉

(9:30)

1. 開会の辞 日本農芸化学会会長 養田 泰治

(9:45~12:00)

2. ペプチドの腸管吸収の生理学 静岡県立大学 星 猛

3. タンパク質の消化過程で生じるペプチドの栄養効果 共立女子大学 内藤 博

4. 酵素修飾タンパク質の栄養効果 東京大学農学部 荒井 綜一

(13:00~15:15)

5. オリゴメチオニンの栄養特性と飼料タンパク質 北海道大学農学部 桐山 修八

6. 低フェニルアラニンペプチドの特性およびPKU患者における臨床成績
日本大学医学部 北川 照男

7. オゾノリシスによる芳香族アミノ酸除去タンパク質の製造とその栄養評価
北海道大学農学部 葛西 隆則

(15:00~17:00)

8. スモールペプチドをタンパク質源とするエレメンタルダイエットの臨床応用
千葉大学医学部 真島 吉也

9. 血管内投与ペプチドの代謝 大阪大学医学部 黒沢 和平

(17:00)

10. 閉会の辞 北海道大学農学部 桐山 修八

終了後，懇親会を行いますので多数ご出席下さい。

参加申込み先および問い合わせ先：060 札幌市北区北9西9

北海道大学農学部農芸化学科食品栄養学教室

☎011-716-2111，内線2496および3352

合同懇親会

昭和63年11月25日(金) 午後6時より、

於：共済サロン(札幌市中央区北4西1 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
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
キッコーマン株式会社千歳工場
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