

ポスターセッションプログラム

場所： マリンサイエンス創成研究棟 オープンスペース

時間： 14:30-

1. 紅藻ダルス由来フィコビリタンパク質の構造と健康性機能
(北大院水) ○宮部好克, 古田智絵, 岸村栄毅, 安井 肇, 佐伯宏樹
2. DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおける食餌性スフィンゴ脂質の効果
(¹岩手大院・連農, ²帯広畜大・食品, ³丸大食品・中研, ⁴日本製粉・中研) ○荒井克仁^{1,2}, 木下幹朗², 三明清隆³, 間 和彦⁴, 大西正男²
3. 脱脂鶏皮乾燥粉末含有食品の経口摂取による肌機能改善効果
(¹丸大食品・中研, ²岩手連大・連農, ³帯広畜大・食品) ○川村純^{1,2}, 三明清隆¹, 琴浦聡¹, 奥山孝子¹, 府中英孝¹, 杉山雅昭¹, 大西正男^{2,3}
4. Paspalinine の全合成
(産総研・北海道センター¹, 東北大院農²) ○榎本賢^{1,2}, 森田暁², 桑原重文²
5. 廃グリセリンからトリアシルグリセロールの生産に適用可能な酵母の探索
(¹(独)農研機構・北海道農研, ²帯畜大・食品科学) ○高桑直也¹, 長濱晋也², 松村浩武², 木下幹朗², 大西正男²
6. ベタレイン色素の活性窒素消去機構におけるイミン構造の役割とベタラミン酸の反応性
(北大院農) ○大井辰哉, 前田麻起子, 崎浜靖子, 橋本 誠, 橋床泰之
7. 有機ゲルマニウム Ge-132 経口摂取による抗酸化能亢進機構— α -トコフェロールの役割
(¹浅井ゲルマニウム研, ²帯畜大・食品科学) ○中村宜司¹, 齋藤三季¹, 得字圭彦²
8. アミノ酸スクシンイミド活性エステルを用いた Friedel-Crafts アシル化反応
(北大院農) ○池本 悠, 橋床泰之, 橋本 誠
9. Chemo-enzymatic synthesis of 1'-modified sucrose derivatives
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University) ○Lei Wang, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto
10. 光反応性ジアジリン誘導体をアシルドナーとしたフリーデル・クラフツ反応の検討
(北大院農) ○村井勇太, 橋床泰之, 橋本 誠
11. 光反応基 diazirine 含有新規光反応性 aspartame の合成
(北大院農) ○櫻井宗矩, 橋床泰之, 橋本誠
12. 糖鎖加水分解酵素反応・糖転移酵素反応におけるマイクロ波照射の影響
(産総研生物プロセス¹, ナノシステム²) ○長島生¹, 作田智美¹, 杉山順一², 清水弘樹¹
13. 2-アミノレゾルシノールをリガンドとしたラット小腸 α -グルコシダーゼ群のアフィニティー精製
(北大院農) ○辻裕貴, 加藤英介, 川端潤

14. ラットの病態生理に及ぼすコール酸長期負荷の影響
(北大院農) ○吉次玲香、菊地慧大、藤井暢之、原博、石塚敏
15. クロレラ由来ネオキサンチンの抗肥満および血糖値改善効果
(北大院水) ○加茂川 寛之、阿部 真幸、細川 雅史、宮下 和夫
16. 氷楔単離細菌の休眠誘導と休眠細胞の特徴
(¹北大院農, ²産総研・生物プロセス) ○不野健太郎¹, Indun Dewi Puspita¹, 北川航^{1,2}, 田中みち子¹, 鎌形洋一^{1,2}
17. *Magnaporthe oryzae* の非病原性タンパク質 AVR-Pia の多量体化に必要な領域の探索
(北大院農) ○樋口裕也、佐藤佑樹、曾根輝雄
18. イネいもち病菌の DNA 損傷シグナルトランスデューサー p53BP1 の解析
(北大院農) ○田鹿 結、阿部 歩、曾根輝雄
19. 植物内生菌由来酵素を利用したアルカリ前処理稲わらの効率的糖化
(北大院農) ○伊藤由美、工藤綾子、岩井崇郎、田中みち子、阿部歩、曾根輝雄、浅野行蔵
20. ニューージーランド産水産物に存在するフラン脂肪酸の構造と組成
○山科 翔、板橋 豊(北大院水)、加藤陽二(兵庫県大)、丸山和佳子(国立長寿医療研究セ)、矢沢一良(海洋大)、A. MacKenzie, M. Vyssotski, S. Tallon, O. Catchpole(Industrial Research Ltd., NZ)
21. *Paenibacillus*. sp 由来の新奇のサイリウムシードガム分解酵素
(北大院水産) ○沖田伸一、井上晶、尾島孝男
22. *Flavobacterium* sp. UMI-01 株由来の新奇アルギン酸リアーゼ
(北大院水) ○高殿晃平、村田安興、M.M.Rahman(北大院水)、田島健次(北大院工)、井上 晶、尾島孝男(北大院水)

1

紅藻ダルス由来フィコビリタンパク質の構造と健康性機能

○宮部好克, 古田智絵, 岸村栄毅, 安井 肇, 佐伯宏樹 (北大院水)

【目的】ダルス (*Palmaria palmata*) は寒帯性海域に分布する紅藻類であり、マコンブやガゴメコンブなど有用海藻の養殖を妨げるため除去されている。そこで、ダルスに豊富に含有されるフィコビリタンパク質に着目し、その健康性機能としてアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害作用を検討した。さらに、ダルス・フィコビリタンパク質の一次構造を決定し、ACE 阻害作用を示すペプチドの由来タンパク質について考察した。

【方法】ダルスは北海道函館市で採集した。乾燥粉末から蒸留水でタンパク質を抽出後、サーモリシンで加水分解してペプチドを調製した。ACE 活性は Lieberman らの方法に準じて測定した。ペプチドのアミノ酸配列はプロテインシーケンサおよび MALDI-TOF/MS により分析し、タンパク質の一次構造は cDNA クローニングにより決定した。

【結果】本研究で調製したダルスのペプチドは高い ACE 阻害活性を示し、その阻害活性はさらなるペプシンおよびトリプシン消化により低下しなかった。本ダルス・ペプチドから主要な ACE 阻害ペプチド LDY, LRY, VYRT, FEQDWS が同定された。一方、ダルス・タンパク質の主要成分はフィコエリスリン (PE) であり、次いでフィコシアニン (PC) が多く、いずれも α 鎖および β 鎖サブユニットを有した。一次構造解析の結果、PE α 鎖および β 鎖はそれぞれ 164 および 177 アミノ酸残基、PC α 鎖および β 鎖はそれぞれ 162 および 172 アミノ酸残基により構成された。そして、ACE 阻害ペプチドとして同定された LDY の配列が PE および PC α 鎖、VYRT の配列が PE α 鎖、LRY の配列が PE および PC β 鎖の一次構造中にそれぞれ認められた。

2

DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおける食餌性スフィンゴ脂質の効果

(¹岩手大院・連農, ²帯広畜大・食品, ³丸大食品・中研, ⁴日本製粉・中研)

○荒井克仁^{1,2}, 木下幹朗², 三明清隆³, 間 和彦⁴, 大西正男²

研究背景) スフィンゴ脂質は様々な生理機能を持ち、機能性食品素材として利用されている。近年罹患者数が急増している炎症性腸疾患に対する食餌性スフィンゴ脂質の効果については、これまでスフィンゴミエリン (SM) についての報告があり、植物由来のグルコシルセラミド (GlcCer) については検討されていない。また、SM の効果に関しても炎症改善と悪化の双方の結果が報告されている。そこで本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデルマウスに対して SM および GlcCer を経口投与して、その効果の検証および作用機序の解析を行った。

実験方法) Balb/c マウス (♀) を用い、試験飼料は AIN-76 を基本飼料として、0.1% の SM または GlcCer を添加した。試験飼料および DSS を 2% 濃度で溶解した飲水を投与して 14 日間飼育し大腸炎を誘導した。炎症抑制効果の評価は、飼育期間中の炎症性指標 (体重変動、便潜血ならびに体毛などの外見状態) および屠殺後の腸の状態と好中球浸潤の指標であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) の Western blot 解析により行った。

結果および考察) DSS 投与 3 日目まではいずれの群においても体重の増加が認められたが、4 日目以降では各群ともに体重は減少した。しかしながら、両スフィンゴ脂質投与群ではコントロール群と比較して 6 日目まで体重の減少が有意に抑制されていた。大腸組織における MPO はコントロール群と比較し、SM および GlcCer 投与の両群ともに有意な減少が認められた。今回の研究から、両スフィンゴ脂質は構成スフィンゴイド塩基の構成が異なるが、いずれも経口投与することにより炎症初期状態において炎症緩和作用、あるいは炎症の予防効果があることが考えられる。

3

脱脂鶏皮乾燥粉末含有食品の経口摂取による肌機能改善効果

(¹丸大食品・中研, ²岩手連大・連農, ³帯広畜大・食品)

○川村純^{1,2}, 三明清隆¹, 琴浦聡¹, 奥山孝子¹, 府中英孝¹, 杉山雅昭¹, 大西正男^{2,3}

研究背景) 演者らは、畜産資源として利用度の低い廃鶏の皮部にスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴリエリン(SM)が高含有されていることを見出し、食品素材として有効利用する研究を行ってきた。近年、植物由来スフィンゴ脂質の経口摂取によって皮膚のバリア機能が改善されることが報告されているが、動物由来のスフィンゴ脂質を用いた知見は少ない。そこで、効率的に脱脂した鶏皮を乾燥させた粉末(脱脂鶏皮乾燥粉末)を用いてヒト経口摂取試験を実施し、皮膚への影響を調査することで、SM含有素材としての有効性を評価した。

試験方法) 本試験では肌の乾燥を自覚している31歳から48歳までの健康な女性のうち、頬の皮膚水分量が50以下かつ前腕の水分量が35以下である38名を最終的な被験者とした。試験デザインは二重盲験並行群間試験とし、被験者を脱脂鶏皮乾燥粉末摂取群(DCS群, SMとして2mg/日摂取)とプラセボ群に割付けた。摂取4, 8, 12週間後に皮膚水分量, 皮膚弾力性, 経皮水分蒸散量の測定を実施した。また、主観的評価として肌状態に関するアンケートを行った。

結果・考察) 全被験者を対象として解析したところ、両群において皮膚水分量および水分蒸散量は改善しているが、群間差は認められなかった。皮膚弾力性の指標はDCS群において改善が認められた。頬の皮膚水分量35未満の被験者層では、DCS群において有意な皮膚水分量の増加が認められ、アンケートにおいても摂取前と比較して有意な改善が見られた。本試験の結果から、脱脂鶏皮乾燥粉末の経口摂取は肌の乾燥が重度な人の皮膚保湿性を改善させる可能性が示唆された。

4

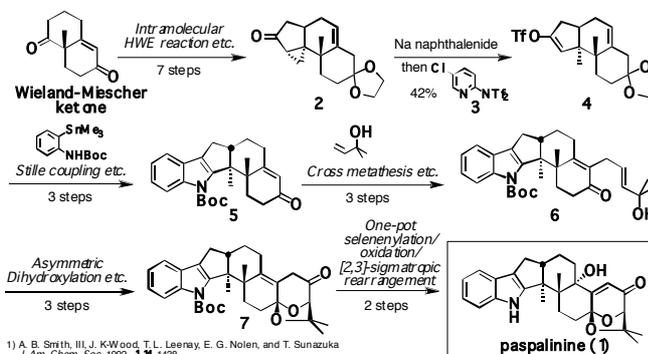
Paspalinineの全合成

(産総研・北海道センター¹、東北大院農²)

○榎本賢^{1,2}, 森田暁², 桑原重文²

研究背景) Paspalinine(1)は家畜麦角中毒の原因菌である*Claviceps paspali*より単離・構造決定された痙攣作用を示すインドールジテルペンである。我々はインドールジテルペン類の魅力的な活性と構造に関心を抱き、従来法¹⁾より効率的な合成法の確立を目指して合成研究に取り組んだ結果、今回新たな合成戦略により1の全合成を達成したので報告する。

方法・結果及び考察) Wieland-Miescherケトンより7工程の変換で得られるケトン2をナトリウムナフタレニドで還元した後に、生じたエノラートを3で捕捉することによりone potでエノールトリプレート4を得た。続くStilleカップリングを含む3工程の変換によりインドール部位を構築して5へと導き、クロスメタセシス等により増炭して6を合成した。さらに不斉ジヒドロキシ化等により分子内アセタール構造を構築して7を合成した。7から1への変換は合成上最大の難関であったが、セレノキッドを利用した2,3-シグマトロピー転位により立体的に込んだ核間位へ立体選択的にヒドロキシ基を導入することに成功した。最後にBoc基の除去を行い、1の新規全合成を達成した。



5

廃グリセリンからトリアシルグリセロールの生産に適用可能な酵母の探索

(¹(独)農研機構・北海道農研、²帯畜大・食品科学) ○高桑直也¹、長濱晋也²、松村浩武²、木下幹朗²、大西正男²

目的 酵母の一部の菌種は、培地中のグリセリンを資化して菌体内で油脂(トリアシルグリセロール, TG)を生産する。本研究では、廃食油からのバイオディーゼル(脂肪酸メチルエステル)製造工程で副生する廃グリセリンの有効利用を図る一環として、廃グリセリンから TG を効率的に生産する酵母の分離を試みた。

方法 北海道および福井県内で採取した植物やチーズ等食品を YPD 液体培地に接種し、30°Cで培養した。24 時間後にその一部を同寒天培地に塗布して数日静置し、出現した酵母コロニーを任意で釣菌した。分離株の菌種は Internal Transcribed Spacer 領域の塩基配列解析により同定した。培養試験は廃グリセリン 1%(w/v)、酵母エキス 1%(w/v)からなる培地で検討し、既報の油脂高生産株 *Rhodotorula glutinis* を対照株に用いた。菌体内 TG はメタノール性 KOH で抽出し、得られた脂肪酸メチルエステルから TLC-デンシトメトリー法により TG 含量を推定した。TG の構成脂肪酸の組成はガスクロマトグラフで解析した。

結果及び考察 296 点の試料から 2,062 株の酵母を分離した。これらを廃グリセリン培地で培養したところ、旺盛に増殖可能な酵母は 10 株だった。これらの中で *Pseudozyma* 属酵母は TG 含量が最も高く(40%)、対照株と比べて 2 倍以上の生産性を有していた。また、同酵母の TG から調製した脂肪酸メチルエステルの組成は、バイオディーゼル規格の項目(ヨウ素価およびセタン価)に適合していたことから、バイオディーゼル燃料用途に利用可能であることが示唆された。

6

ベタレイン色素の活性窒素消去機構におけるイミン構造の役割とベタラミン酸の反応性

○ 大井辰哉、前田麻起子、崎浜靖子、橋本 誠、橋床泰之(北大院農)

研究背景 中心子目の多くの植物で生成される水溶性含窒素色素ベタレインは、赤紫系のベタシアニンと黄系のベタキサンチンに分類され、植物色素のうちでも特に高い抗酸化能を持つ。ベタレインはアントシアニンと同様、タンパク質の酸化やニトロ化などの細胞障害を引き起こす活性酸素種や活性窒素種を消去する機能を持つが、アントシアニンと比べ、ベタレインとその誘導体では、活性窒素種の消去機構はほとんど理解されていない。そのために、ベタレインと類似構造を持つ比較的安定な化合物をモデル化合物として、最も反応性の高い活性窒素種であるペルオキシナイトライト(ONOO⁻)と反応させ、その反応性、主要な生成物の化学構造、ならびにそれらの生成率を求めた。これらの反応生成物の構造から、ベタレインの活性窒素消去反応機構の推定を試みた。

方法・結果及び考察 赤ビートから単離精製したベタレインのアルカリ処理より得たベタラミン酸からプロリン-、グリシン-ベタキサンチン類を調製し、また共役イミンモデル化合物としてレチナール-プロリンシッフ塩基誘導体、レチナール-グリシンシッフ塩基誘導体の調製を試みた。各化合物をリン酸緩衝液(pH 7.4)中で ONOO⁻ と反応させ、得られた生成物を液液分配と各種クロマトグラフィーにより精製した。得た反応生成物について ¹H-NMR、LC-MS、GC-MS 分析を行い、それらの構造を推定し、ベタレインの分子構造と活性窒素種消去能の関連性について考察した。各種ベタレインにおいて、活性窒素種消去能は大きく変化しないという結果より、ベタレインに含まれるベタラミン酸部分の共役イミン構造が活性窒素種消去能に強い影響を与えることが示唆された。また、レチナール-プロリンシッフ塩基誘導体では ONOO⁻ との反応によって多様な分解物が生じた。これも共役イミン構造の重要性を示唆した。

7

有機ゲルマニウム Ge-132 経口摂取による抗酸化能亢進機構— α -トコフェロールの役割
(¹浅井ゲルマニウム研、²帯畜大・食品科学) ○中村宜司¹、齋藤三季¹、得字圭彦²

【研究背景】Ge-132は安全性確認されている唯一の水溶性有機ゲルマニウムであり、免疫賦活作用をはじめ様々な生理活性が報告されている。私達はこれまでに Ge-132 の経口摂取による胆汁色素ビリルビンを介した抗酸化作用の誘導や、肝臓におけるプロトポルフィリン合成の促進作用を明らかにしてきた。本研究では、マウスの Ge-132 経口摂取時におけるビリルビン以外の抗酸化因子として α -トコフェロールについて検討するとともに、Ge-132 短期間摂取時の肝臓の応答を網羅的遺伝子発現解析により検討した。

【方法】雄性 ICR マウスに精製飼料あるいは精製飼料に 0.05%Ge-132 を混合した餌を自由摂取によって与え、Ge-132 を 0, 1 および 4 日間摂取させた。その後、マウスの血中トコフェロール濃度と TBARS を測定した。また、Ge-132 摂取 0 および 1 日の肝臓の Total RNA を抽出し、定量 PCR 法による胆汁排泄に関連遺伝子群の発現解析、および DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

【結果及び考察】0.05%Ge-132 含有餌の自由摂取により、摂取 4 日目の血中 α -トコフェロール濃度は有意に増加した(40%)。また、肝臓において抗酸化作用に関わるいくつかの遺伝子の発現量が増加し、 α -トコフェロール運搬タンパクをコードする *Ttpa* の発現も増加していた。加えて、Ge-132 の摂取によって変動する遺伝子群を Gene Ontology をもとにクラスタリングしたところ、免疫応答を始めとする過去の研究で報告された DNA 修復作用と関連する遺伝子群に発現変動が見られた。*Ttpa* は小腸より吸収された α -トコフェロールを選択的に肝臓より分泌させるため、この発現量の増加が血中の α -トコフェロール濃度の上昇を与えたと考えられる。Ge-132 の経口摂取は、短期間で肝臓に作用し、抗酸化物質ビリルビンの誘導を生じるとともに、 α -トコフェロールの肝臓からの運搬を高めて、その相乗効果によって生体の抗酸化能を亢進することが示唆された。

8

アミノ酸スクシンイミド活性エステルを用いた Friedel-Crafts アシル化反応
(北大院農) ○池本 悠、橋床泰之、橋本 誠

研究背景 活性エステル法はアミド結合形成時によく利用される手法である。中でもスクシンイミドエステルは、安定性に優れ脱離基としての性能を兼ね備えるだけでなく、単離も可能である。本研究ではスクシンイミドエステルのこれらの性質に着目し、これが Friedel-Crafts アシル化反応(F-C 反応)に対し反応性と安定性のバランスのとれた優秀なアシルドナーとなることを期待した。 α -アミノ酸をカルボン酸原料とした場合、 α -位ラセミ化の問題を考慮しなくてはならないため、分子内に立体中心を 2 つ持つイソロイシンを用いて種々反応条件の検討を行った。 α -位の立体が反転してジアステレオマーが生じた場合、イソロイシンでは ¹H-NMR の測定結果により異性化の確認が可能である。

方法・結果及び考察 イソロイシン異性体(L, D, L-*allo*, D-*allo*)のアミノ基を TFA 基で保護^[1]した後、WSCD・HCl を用い、スクシンイミド活性エステルを得た。得られた活性エステルに対し AlCl₃ を加え、ベンゼン溶媒中で 70-80°C の熱をかけて F-C 反応を行い、収率 70-85% で目的の生成物を得た。90°C まで加熱した場合には反応中に分解が起こり、目的の生成物は得られなかった。また、 α -位の立体が異なる L 体と D-*allo* 体について、原料イソロイシンから F-C 反応生成物までを ¹H-NMR 比較した結果、 α 水素並びに側鎖のケミカルシフトが異なることが各段階で観察され、この二者の区別が常に可能であった。この知見をもとに、ラセミ化が懸念されていた α -位の立体は、F-C 反応前後で保持されていることが確認された。今後はこの手法で他の α -アミノ酸に関しても、活性エステル経由での立体保持型 F-C 反応を予定している。

[1] *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4882-4892

9

Chemo-enzymatic synthesis of 1'-modified sucrose derivatives (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Lei Wang, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto

研究背景) Sweetness is one of the basic tastes that human beings can differentiate. Sucrose, a common sweetener, is widely applied in many fields. Not all the sucrose derivatives can be recognized as sweetener, but 1-kestose, sucrose linked a fructose at 1'-position, shows sweetness, which indicates that 1'-position of sucrose will be acceptable for substitutions. Up to now, novel synthesis of 1'-phenoxy derivatives of sucrose had been established. For example, trifluoromethyldiaziriny moiety as the photoaffinity labeling photophore is a useful method to search for the interactions of low molecular bioactive compounds with biomolecules. In this work, we synthesized some 1'-modified sucrose derivatives so as to investigate their structure-activity relationships.

方法・結果及び考察) To obtain heptaacetyl-1'-OH-sucrose, octaacetylsucrose was enzymatic hydrolyzed by incubation at 37 °C for 24 h with alcalase[®] 2.4 L. Through purification several times, we separated heptaacetyl-1'-OH-sucrose from its diastereoisomers. Heptaacetyl-1'-OH-sucrose was treated with Tf₂O to give 1'-sulfonate sucrose, which was then subjected to chlorination with lithium chloride at room temperature to obtain the 1'-chlorinated sucrose in 67.8% yield. At the same time, heptaacetyl-1'-OH-sucrose was also treated with *p*-(trifluoromethyl)benzylbromide (2 eq) and catalyzed by silver oxide in dichloromethane at 60 °C for 96 h to prepare heptaacetyl-1'-trifluoromethylbenzyl sucrose in 50% yield and the condition optimization is being proceeded. These derivatizations can be used to prepare new probes for sweetener receptors.

10

光反応性ジアジリン誘導体をアシルドナーとしたフリーデル・クラフツ反応の検討 (北大院農) ○村井勇太、橋床泰之、橋本 誠

研究背景) これまでの研究でフェニルジアジリンをアシルアクセプターとする F-C アシル化反応条件を種々検討し、フェニルジアジリンの酸性条件での安定性を鑑み、触媒に triflic acid(TfOH)を利用することで効率良く反応を進行させることに成功した。また TfOH の酸性度及び溶解性に着目し、従来 F-C 反応の応用が困難であったアミノ酸骨格にも、TfOH を触媒兼溶媒として利用することで F-C アシル化反応を進行可能とし、光反応性側鎖増炭芳香族アミノ酸を効率良く合成するルートを開拓した。¹⁾ さらにこの知見を生かし、フェニルアラニン(Phe)に光反応性基の一つベンゾフェノン骨格を1段階で効率良く導入する方法を検討した。

方法・結果及び考察) アミノ基をトリフルオロアセチル、カルボキシル基をメチルエステル保護した光学活性 *N*-TFA-Phe-OMe を調製し、ベンゾイルクロライドをアシルドナーとした F-C ベンゾイル化反応を行ったところ、ラセミ化することなく目的とするベンゾイル化化合物を得ることに成功した。さらに活性エステル等の有用な前駆体となるフェニルジアジリンカルボン酸を酸クロライドに変換し、これをアシルドナーとして用いることでジアジリニル基及びベンゾフェノンを同時に構築できる Phe の立体選択的合成にも成功した。現在、この化合物に光照射を行い光反応性基の反応性の違いについて検討を行っている。

1) Murai Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2011**, 75, 352-354. Murashige R. *et al.*, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 641-649. Murashige R. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2009**, 73, 1377-1380. Murai Y. *et al.*, *Heterocycles*, **2009**, 79, 359-364.

11

光反応基 diazirine 含有新規光反応性 aspartame の合成
(北大院農) ○櫻井宗矩、橋床泰之、橋本誠

背景・目的 生体高分子と生理活性化合物の機能解析において光アフィニティーラベルが有用である。この手法において、タンパク質への影響が少ない 350nm 付近の光照射でクロスリンクできるなどの利点から、diazirine が光反応基として適していると考えられる。本研究では、甘味受容体解明のための光反応性試薬として、新規 diazirinyl-Phe 誘導体およびその aspartame の誘導体化を検討した。

方法 以前の aspartame 構造-活性相関研究で、芳香環の *p*-位に OH 基、OMe 基を導入した場合、その順に甘味活性が下がっており、*p*-位に diazirine を導入したところ、同様に甘味活性が低下した。それに対し *o*-位に OMe 基の入った誘導体の甘味活性は従来の aspartame と変わらなかった。以上の結果から、本研究では aspartame の Phe 芳香環の *m*-位に diazirine、*o*-位に OMe 基をもった光反応性 aspartame の合成を検討した。

結果 4-OMe-acetophenone から oxime、tosyl oxime、diaziridine を経て、4-OMe-diazirine を大量、高収率で得ることに成功した。続いてホルミル化、還元、ブロモ化を経て 3-CH₂Br-4-OMe-diazirine の合成に成功した。この BnBr と Gly 誘導体とのカップリングを行い脱保護することで、光反応性 phenylalanine の合成に成功した。その際 cinchonidinium Br、ホスファゼン塩基 BTPP を用いた不斉合成も行ない、ee96%で L 体選択的な不斉合成に成功した。その後メチルエステル化し、N-Boc-L-アスパラギン酸 α -スクシンイミドエステルと 86%で縮合後、脱保護し、キラル HPLC で分取することで目的の新規光反応性 aspartame の合成に成功した。

12

糖鎖加水分解酵素反応・糖転移酵素反応におけるマイクロ波照射の影響
(産総研生物プロセス¹、ナノシステム²) ○長島生¹、作田智美¹、杉山順一²、清水弘樹¹

研究背景 糖鎖加水分解酵素は、セルロースやキチンなどの硬質糖鎖高分子体、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン、でんぷんやペクチンなどのゲル多糖を低分子化し、各種エネルギー源や他方面の利用展開を可能にする生体触媒のひとつである。また糖転移酵素は、多様性に富む糖鎖合成において、糖と糖を連結するグリコシル化反応を位置選択的かつ立体選択的に進行させる、糖鎖合成において重要な生体触媒である。本研究では、これらの糖鎖関連酵素について、マイクロ波照射の影響や効果について検討した。

方法 糖加水分解反応については、耐熱酵素研究所から市販されている至適温度が 60°C の Glycosidase HT1 の反応について検討した。2.45GHz のマイクロ波照射は、温度制御能力に長けているシングルモードマイクロ波照射装置 (MWS-1000、東京理器器械) を用い、5.8GHz マイクロ波照射は in house で製作した装置を用いた。糖転移酵素反応については、市販されている各種シアル酸転移酵素の他、比較的安定性の良いフコース転移酵素やグルコサミン転移酵素について、汎用の 2.45GHz マイクロ波を照射し、産物収率の経時変化により反応性を検証した。

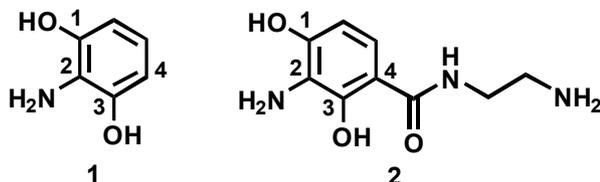
結果及び考察 糖転移酵素反応については、マイクロ波照射しても、これまでのところ顕著な効果は認められなかった。一方、糖加水分解酵素では、マイクロ波加熱によって反応至適温度が 60°C から 50°C に低下し、50°C における反応性が 2 倍に向上した。また、5.8GHz を照射すると、2.45GHz 利用の場合より反応性が低下した。これらを基に、本反応系におけるマイクロ波効果について考察する。

謝辞 Glycosidase HT1 をご寄与いただきました耐熱酵素研究所様に感謝いたします。

13 2-アミノレゾルシノールをリガンドとしたラット小腸 α -グルコシダーゼ群のアフィニティー精製 (北大院農) ○辻裕貴、加藤英介、川端潤

研究背景 哺乳動物起源の小腸 α -グルコシダーゼには、マルターゼ・グルコアミラーゼ(MG)、スクラーゼ・イソマルターゼ(SI)の2つのユニットが存在する。これら α -グルコシダーゼの阻害剤は、食後の血糖値上昇を抑制し糖尿病の治療薬として有用である。阻害剤の候補化合物を探索する場合、阻害活性はMG、SIの混合物を対象として算出する機会が多いため、阻害剤が主にどの酵素に作用しているか不明瞭な場合が多い。また、MG、SIの分離には手間がかかる。本研究ではこれらの酵素の効率的な精製法の開発を目的とした。

方法・結果 MG、SIの精製を2-アミノレゾルシノール(1)をリガンドとしたアフィニティーゲルにより行うこととした。1はマルターゼおよびスクラーゼを不拮抗的に阻害することが知られている。したがって、酵素の精製時に共存させる基質を変えることでMG、SIの精製が可能だと考えた。1のベンゼン環4位にアミド結合を介してアルキルアミンを導入した2を市販のゲルと結合しアフィニティーゲルを作成した。現在ラット小腸アセトンパウダーより調製した粗酵素をアフィニティーゲルと反応させMG、SIの精製を検討している。



14 ラットの病態生理に及ぼすコール酸長期負荷の影響 (北大院農) ○吉次玲香、菊地慧大、藤井暢之、原博、石塚敏

【背景】 胆汁酸(BA)は肝臓で合成される両親媒性の物質で、脂質吸収に必須である。高脂肪食はBAの分泌を誘導する。腸肝循環から逃れた一部のBAは、腸内細菌叢の変換により二次胆汁酸(SBA)となる。SBAは細胞毒性を有しているために腸内細菌叢選択の大きな要因となり、肥満におけるSBA生成環境を促進すると考えられる。SBAには細胞培養系において腸管バリア機能を弱める、マクロファージの機能を抑制するという炎症に関連した報告がある。そこで本研究では、メタボリックシンドローム発症における胆汁酸の関与を理解するために、BA循環量の長期間にわたる増加が病態生理に及ぼす役割を検討した。

【方法】 WKAH雄性ラット3週齢に、基本飼料または0.05%のコール酸(CA)添加飼料を13週間与えた。経時的に尾採血を行い、肝傷害の指標として用いられる血中トランスアミナーゼ活性の変化を、更に粘膜バリア機能や免疫抑制に関与する血中アディポネクチンの変化を評価した。また、肝臓及び腸間膜リンパ節における炎症関連の遺伝子発現、腸間膜脂肪における免疫系細胞の表面抗原の発現について、PCRアレイを用いて網羅的に解析した。

【結論】 試験食摂取7週目以降でトランスアミナーゼ活性がCA飼料摂取群で有意に高値を示した。しかしPCRアレイ解析においては、腸間膜リンパ節において、抗原認識に関わるTLR及びそのシグナル因子の有意な発現亢進と、炎症抑制性サイトカインであるIL-10の発現低下が観察された。試験飼料摂取3週目以降にはCA群で有意なアディポネクチン濃度低下が維持された。CA摂取により増加した二次胆汁酸による肝細胞、脂肪細胞への作用と、腸管膜リンパ節における免疫応答の攪乱が推察された。

15

クロレラ由来ネオキサンチンの抗肥満および血糖値改善効果
(北大院水) ○加茂川 寛之、阿部 真幸、細川 雅史、宮下 和夫

研究背景 ネオキサンチンは、主に高等植物や緑藻類に含まれるカロテノイドであり、分子中にアレン結合やエポキシドを含んだ特徴的構造を有する。演者らは、これまでにアレン結合を有するフコキサンチンが抗肥満、抗糖尿病作用を有することを見出しており、それらに特徴的な構造と機能との関連性に興味をもたれる。そこで本研究では、ネオキサンチンをマウスに経口投与して抗肥満や抗糖尿病効果を調べることを目的とした。

方法・結果及び考察 ネオキサンチンはクロレラより分離した。また、フコキサンチンはワカメより分離した。それぞれのカロテノイドを、AIN93Gを基本組成とする飼料中の大豆油0.2%に置換して添加した。本研究では、2型糖尿病/肥満モデルマウスであるKK-A^yマウス(5週齢、雄)を使用し、28日間経口投与した後の脂肪組織および血糖値への影響を評価した。その結果、カロテノイド無添加のコントロール群と比較して、ネオキサンチン群およびフコキサンチン群では白色脂肪組織の重量増加が有意に抑制された。また、ネオキサンチン群では、フコキサンチン群に比べ効果は弱いものの血糖値の低下がみられたことから、糖尿病に対する予防・改善効果が示唆された。更に、ネオキサンチン群では、血清中におけるトリアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸濃度の低下がみられた。以上の結果より、アレン結合を有するネオキサンチンは、フコキサンチンと同様に内臓脂肪の蓄積抑制および血糖値改善作用を示すことが推察される。

16

氷楔単離細菌の休眠誘導と休眠細胞の特徴
(¹北大院農, ²産総研・生物プロセス) ○不野健太郎¹, Indun Dewi Puspita¹, 北川航^{1,2}, 田中みち子¹, 鎌形洋一^{1,2}

研究背景 永久凍土中の氷楔は、氷点下であり、栄養や酸素が制限されていて水分活性も低いため、微生物の成長や分裂には不都合な環境である。そこで、本環境下にいる細菌で胞子を作らないものは、休眠状態になることでエネルギー消費を抑え、生存してきたのではないかと仮説を立てた。氷楔単離株 *Tomitella biformata* AHU1821^Tでは、無機塩培地を用いた酸素制限条件下での長期培養が細胞を非分裂状態へと導き、さらに自身で産生する覚醒因子により非分裂細胞が再び分裂可能な状態に戻ることが示された。本研究の目的は他の氷楔単離株 *Arthrobacter* sp. AHU1770 と *Glaciibacter superstes* AHU1791^Tの2株について(1)酸素制限条件によって非分裂状態への誘導が可能かどうか確かめること、(2)新たな休眠誘導条件を見出すことにある。また、非分裂状態への誘導及び覚醒についての知見が蓄積されている *Escherichia coli* ATCC12435 を比較対象として用いた。

方法・結果及び考察 *Arthrobacter* sp., *G. superstes*, *E. coli* の3株について実験室での最適発育条件を決定し前培養を行なった。これを種々の培地に新たに植え継ぎし酸素制限条件、異なる温度条件(高温)での長期培養を行ない、経時的に Live/Dead 染色法と平板上でのコロニー形成による細胞数を比較し、非分裂状態の細胞数の変化を追った。無機塩培地を用いた酸素制限条件下の長期培養が上記3株の非分裂細胞を誘導したことから、株によって応答は異なるもののこの条件が氷楔内の他の細菌の休眠誘導にも有効であることが明らかになった。さらに *G. superstes* では高温条件により、劇的に非分裂細胞への誘導が促された。以上より、氷楔単離細菌はこれらの刺激のもとで非分裂状態となることが明らかになり、休眠が生存戦略の一つであることが示唆された。

イネいもち病はいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* によって引き起こされる。イネがいもち病菌に感染してしまうと収量が大幅に減ってしまうため、イネにとって深刻な病害である。この病害は農薬や抵抗性品種によって制御されており、イネの抵抗性の分子機構を明らかにすることはイネいもち病を制御する新たな方法を見出すために重要であると言える。イネいもち病菌は特定の品種には感染することが出来ない宿主特異性を持っている。この宿主特異性には、病原菌の AVR 遺伝子と宿主の R 遺伝子が関係しており、対応した遺伝子の組み合わせでのみ抵抗性反応が起こる。抵抗性反応は、AVR 遺伝子を持つ病原菌がイネ細胞侵入時に AVR タンパク質を細胞内に分泌し、これをイネの R タンパク質が認識して起こすものである。しかしながら、この分子機構はまだまだよく分かっていない。AVR 遺伝子の 1 つである AVR-Pia はいもち病菌の非病原性遺伝子で 255 塩基から成り、N 末端の 19 アミノ酸がシグナルペプチドだと推測され、遺伝子産物である AVR-Pia タンパク質は既知のタンパク質と相同性がない。これまでに、AVR-Pia と Pia は直接的な相互作用はしない一方、シグナルペプチドを除いた AVR-Pia 同士で相互作用することが分かっている。このことから、AVR-Pia がイネ細胞内に分泌された後に多量体化していると推測している。本研究では、AVR-Pia 同士の相互作用に必要な領域を明らかにするために、Inverse PCR によって N 末端から順に 10 アミノ酸ずつ欠損させた 6 種類の AVR-Pia 変異体を作成し、タンパク質間相互作用を確認できる Yeast two-hybrid assay によって相互作用の有無を試験した。その結果、3 つの変異体においてタンパク質間相互作用の低下が確認され、この 3 つの領域が AVR-Pia 同士の相互作用に重要であると考えられた。

研究背景 いもち病はいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) がイネに感染して起きるイネの最重要病害である。イネいもち病菌の感染は、分生子から発芽管を伸ばして付着器という特殊な細胞を作り、植物細胞に侵入することによって始まる。分生子内で有糸分裂した核の 1 つが付着器へ移動して分生子内の核が消失することで、成熟した付着器が完成する。この付着器形成と成熟には細胞周期が密接に関係していることが分かっている。本研究では細胞周期の S-G2 間のチェックポイントに關与する遺伝子 *p53BP1* のいもち病菌における役割を調べることを目的とした。

方法・結果及び考察 *p53BP1* 欠損株を作成し表現型の解析を行った。欠損株は生育と分生子形成率には影響がなかったが、付着器形成に異常が見られた。野生株では接種後約 12 時間後に 1 つめの付着器が形成され成熟するのに対し、欠損株では 6 時間後には 1 つめの付着器が形成され、さらに続いて 1 つの分生子に対して 2~4 個の付着器が形成された。分生子と付着器内の核の動きを可視化するため、histon:GFP 融合遺伝子を導入した株を作成し観察した結果、付着器形成後にも分生子内の核が残っていること、2 つめ以降の付着器にも核が存在することが分かった。複数の付着器を形成する過程と核の動きを明らかにするため、接種後 24 時間の経時観察を行い、各段階の分生子と付着器の形態とその割合を観察した。その結果、1 つめの付着器を形成した後、複数の付着器を形成する場合、有糸分裂を複数回行なっていることがわかった。以上のことから、*p53BP1* は付着器形成の制御に必要であることが示唆された。

19

植物内生菌由来酵素を利用したアルカリ前処理稲わらの効率的糖化

(北大院農) ○伊藤由美, 工藤綾子, 岩井崇郎, 田中みち子, 阿部歩, 曾根輝雄, 浅野行蔵

【背景】地球温暖化の進行に伴い、石油代替素材として植物原料由来のエタノールが注目されている。本研究では、稲わらを効率的に糖化する酵素の探索源として植物に侵入、生息する菌に着目した。市販酵素の活性を高める糖化酵素の探索および利用によるエタノール生産コスト削減を目指している。

【方法】200 株の植物内生菌を対象として稲わら高分解能株のスクリーニングを行った。植物内生菌由来細胞外酵素と市販酵素を混合し、40°Cの振とう条件下でアルカリ処理済稲わらを分解した後、遠心によって得た反応上清中のグルコースおよびキシロース濃度を測定した。18SrRNA 配列および ITS 配列の解読、BLAST 検索により選抜株の同定を行った。粗酵素のヘミセルラーゼ活性を測定し、TLC、HPLC により反応液中の生産物を分析した。さらに液体培養および小麦ふすま、米ぬかをを用いた固相培養による酵素大量生産系の確立を模索した。

【結果】固相培養、液体培養いずれにおいても選抜株の産生した酵素は、市販酵素のキシロース生産能を高めることが確認された。中でもふすま培養がより活性が高かった。硫酸沈殿により濃縮された粗酵素は市販酵素の活性を高め、稲わらキシランを約 90%糖化することが出来た。以上より、本酵素の使用による市販酵素使用量削減への可能性が示された。酵素活性測定の結果、選抜株はアセチルエステラーゼ活性を呈した。しかしその活性は市販酵素と同程度であり、市販酵素の活性を高める反応機構解明が今後の課題となった。塩基配列解読や形態観察の結果、選抜株は *Fusarium* sp.と同定された。稲わら分解反応液中の生産物を分析した結果、オリゴ糖の存在は僅かであり、グルコースやキシロース等の発酵可能な単糖まで分解されていることが明らかになった。

20

ニュージーランド産水産物に存在するフラン脂肪酸の構造と組成

○山科 翔, 板橋 豊(北大院水), 加藤陽二(兵庫県大), 丸山和佳子(国立長寿医療研究セ), 矢沢一良(海洋大), A. MacKenzie, M. Vyssotski, S. Tallon, O. Catchpole(Industrial Research Ltd., NZ)

【目的】NZ産ミドリイガイ(*Perna canaliculus*)は抗炎症作用、胃の保護など様々な生理活性を示すことで知られ、古くから先住民マオリ族に食されてきたが、活性物質については良く分かっていない。最近、ミドリイガイの超臨界流体抽出物にオリブ油を 60%添加したサプリメント(Lyprinol)から数種のフラン脂肪酸(F 酸)が検出され、また、合成した F 酸に抗炎症活性のあることが明らかにされた(Wakimoto ら, 2011)。しかしながら、ミドリイガイ抽出物そのものの分析はなされていない。本研究では、NZ産のミドリイガイとウニ(*Evechinus chloroticus*)及びこれらの類縁種である函館産のムラサキイガイとキタムラサキウニから F 酸の検出を試みた。Fig. 1 に、水産物に存在する代表的な F 酸(F6)の構造を示す。

【方法】超臨界 CO₂抽出または CHCl₃/MeOH 抽出法で得た各試料の総脂質を単純脂質と複合脂質に分画し、それぞれから塩基性触媒を用いて脂肪酸メチルエステル(FAME)を調製した。各画分の FAME から、尿素付加法と銀イオン固相抽出法を用いて F 酸を濃縮し、GC/MS で構造を解析した。

【結果】ミドリイガイの単純脂質のフラン脂肪酸濃縮画分から、既に報告のある F2, F3, F4, F5, F6 に加え、新たに F1, F2', F5', F6', F8 の F 酸を見出した。総 F 酸量は総脂肪酸中 0.16%であった。NZ産ウニの単純脂質画分から同様の一連の F 酸が検出された。F 酸の中で、ミドリイガイでは F6 が、ウニでは F4 が最多成分であった。一方、ムラサキイガイとキタムラサキウニからは F 酸は検出されなかった。これらの結果から、NZ産試料に存在する F 酸は餌または共生するバクテリア由来である可能性が推測された。

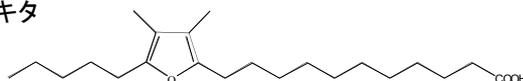


Fig. 1 Structure of a furan fatty acid (F6).

21

Paenibacillus. sp 由来の新奇のサイリウムシードガム分解酵素

(北大院水産) ○沖田伸一、井上晶、尾島孝男

研究背景: サイリウムシードガム(PSG)は、植物種皮に含まれるアラビノキシラン様の粘質多糖で、食物繊維様の機能とともに様々な生理活性を示す。PSG はすでにいくつかの特保食品に添加されているが、その高粘性や不透明性が利用範囲を狭めている。PSG の用途拡大には、生理活性を失わない程度に酵素分解し、減粘・清澄化することが期待されるが、現在その用途に適した市販酵素は見当たらない。このような状況下で当研究室では、函館沿岸土壌から PSG を唯一炭素源として生育する *Paenibacillus*.属の細菌(PSY-1 株)を分離した。本研究では PSY-1 株のもつ PSG 分解酵素の基本性状を解析した。

方法・結果及び考察: PSY-1 株を、1%PSG を含む最少培地で培養することにより、その上清中に PSG 分解酵素(粗酵素)を得た。この粗酵素を、硫酸分画、TOYOPEARL-Phenyl 650M、TOYOPEARL-DEAE 650M、および Superdex 200 10/300GL カラムクロマトグラフィーに順次供することにより SDS-PAGE で約 140 kDa と見積もられる酵素成分を得ることができた。本酵素は、PSG だけでなく 4-ニトロフェノール α -(L)-アラビノフラノシドをよく分解したことから、アラビドフラノシダーゼ様の酵素と考えられた。本酵素(以後 Afdase1 と呼ぶ)の至適温度、至適 pH、至適 NaCl 濃度は、それぞれ 45°C、6.5、0.15 M であり、30 分間のインキュベーションにより残存活性が 50%となる温度は 57°Cであった。Afdase1 は PSG から、アラビノースとキシロースを遊離しながらその粘度を穏やかに低下させたことから、PSG のペントース側鎖を脱離することによりこれを減粘すると考えられた。部分アミノ酸配列の分析により、Afdase1 は glycoside hydrolase family 43 に属すると推定された。

22

Flavobacterium sp. UMI-01 株由来の新奇アルギン酸リアーゼ

○高殿晃平、村田安興、M.M.Rahman(北大院水)、田島健次(北大院工)、井上 晶、尾島孝男(北大院水)

研究背景: 褐藻スギモクの腐敗物から、アルギン酸を唯一の炭素源として生育する *Flavobacterium* sp. UMI-01 株を単離した。本研究では、本菌のアルギン酸資化能に関わると考えられる主要なアルギン酸リアーゼの一つ(FIAly-1)を単離し、その基本性状と全アミノ酸配列を解析した。

方法: UMI-01 は 1%アルギン酸ナトリウムを含む最小培地で培養し、粗酵素は遠心分離で回収した菌体から超音波破碎により抽出した。FIAly-1 は粗酵素から硫酸分画と数種のカラムクロマトグラフィーにより精製した。アルギン酸リアーゼ活性は、アルギン酸分解物の示す 235 nm の吸光度測定により算出し、活性 1 U は 1 分間に吸光値を 0.01 上昇させる酵素量と定義した。FIAly-1 の遺伝子断片は、UMI-01 のゲノム DNA から、FIAly-1 の部分アミノ酸配列と多糖リアーゼファミリー 7 (PL-7) 酵素の保存配列に基づき作成した縮重プライマーを用いた PCR により増幅した。

結果及び考察: ①FIAly-1 は SDS-PAGE で約 30kDa と見積もられ、30°C、pH 7.0 におけるアルギン酸ナトリウムに対する比活性は 23,500 U/mg で、主に不飽和の 3 糖および 4 糖を生じた。至適温度、至適 pH、および至適 NaCl 濃度はそれぞれ 54°C、8.0、0.1-0.2 M であり、20 分間の加熱により活性が半減する温度は 47°Cであった。活性は 100 mM の Na^+ や NH_4^+ により 1.4-1.6 倍に増大したが、DTT などの還元剤の影響を受けなかった。また、通常条件では G-block を分解しないが、NaCl 非存在下 30°C、pH 7.0 では分解した。②UMI-01 ゲノム DNA から PCR により FIAly-1 の全長 288 残基のアミノ酸をコードする 867 bp の遺伝子断片が増幅された。このアミノ酸配列は、PL-7 に属すアルギン酸リアーゼと 51-55%の同一性を示したが、同一のものは見られなかった。このことから、FIAly-1 は新奇の PL-7 アルギン酸リアーゼであると結論された。