

## ポスターセッションプログラム

2011年8月6日(土) 15:10~, とかちプラザ 3F 304 会議室にて

1. Zinc deficiency exacerbates experimental colitis *in vivo* and induces dysregulation of cytokine production *in vitro*  
○Erwin SUWENDI, Hitoshi IWAYA, Jae-Sung LEE, Hiroshi HARA, Satoshi ISHIZUKA (Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)
2. 病傷害応答における OsJAR1 および OsJAR2 の機能  
(北大院農, 北農研<sup>1</sup>) ○鈴木絵里香、和久田真司、佐分利亘、松浦英幸、鍋田憲助、今井亮三<sup>1</sup>、松井博和
3. 類似構造をもつ化合物をモデルとした betalain 色素の活性窒素消去機構の検討  
(北大院農) ○大井辰哉、前田麻起子、崎浜靖子、橋本 誠、橋床泰之
4. 十勝産生ナガイモの成分および不ケン化物のヒト結腸がん細胞の増殖に及ぼす影響について ( <sup>1</sup>帯広大谷短期大学生生活科学科、<sup>2</sup>岩手大学大学院連合農学研究科、<sup>3</sup>帯広畜産大学食品科学研究部門) 山崎民子<sup>\*1,2</sup>, 荒井克仁<sup>2,3</sup>, 得字圭彦<sup>2,3</sup>, 木下幹朗<sup>2,3</sup>, 大西正男<sup>2,3</sup>
5. GH 31  $\alpha$ -glucosidase における基質の鎖長認識機構の解明  
(北大院農) ○田上貴祥, 奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫
6.  $\alpha$ -Amylase inhibitors from an Indonesian medicinal plant, *Phyllanthus urinaria*  
Maria GUNAWAN-PUTERI, Eisuke KATO, Jun KAWABATA  
(Div. Appl. Biosci. Grad. Sch. Agric. Hokkaido Univ.)
7.  $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害部位同定に向けた 2-aminoresorcinol のプローブ化研究  
(北大院農) ○及川健一、加藤英介、川端潤
8. ながいもネットおよび付着茎葉の分解菌の探索とその利用  
○柴田浩之<sup>1</sup>、鈴木裕志<sup>1</sup>、梶孝幸<sup>1</sup>、大和田琢二<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>十勝農協連・農産化学研究所、<sup>2</sup>帯畜大・食品科学)
9. *Murraya paniculata* からの testosterone 5 $\alpha$ -reductase 阻害物質の単離  
(北大院農) ○伊秩誠志、加藤英介、川端潤
10. イネのシュート伸長を制御する ABC トランスポーター *RCN1* の低温応答性  
○古川薫<sup>1</sup>、松田修一<sup>1</sup>、小森のぞみ<sup>1</sup>、得字圭彦<sup>1</sup>、高牟礼逸朗<sup>2</sup>、加藤清明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>帯畜産大学 <sup>2</sup>北海道大学大学院農学研究院)
11. イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明  
(北大院農・応生科) ○竹内紗央里, 三木慎介, 大塚圭輔, 曾根輝雄
12. 乳酸菌発酵風味液の防カビ効果について  
(日本甜菜製糖株式会社) ○仲田弘明、長谷川秀樹、今井奈津夫、田村雅彦
13. *Lactobacillus gasser* JCM1131<sup>T</sup> の胆汁酸適応におけるリポテイコ酸の役割  
(<sup>1</sup>北大院・農、<sup>2</sup>東農大・応生科、<sup>3</sup>産総研・生物プロセス、<sup>4</sup>札医大・医・微生物)  
白石 宗<sup>1</sup>、富田 理<sup>2</sup>、田中 尚人<sup>2</sup>、吹谷 智<sup>1</sup>、森田 直樹<sup>3</sup>、横田 伸一<sup>4</sup>、岡田 早苗<sup>2</sup>、横田 篤<sup>1</sup>
14. ジアジリン化インドールを母核とした Post functional 誘導体合成  
(北大院農) ○村井勇太、橋床泰之、橋本 誠

15. Triflic acid を用いた Friedel-Crafts 反応による光反応性 Phe、Tyr 誘導体の効率的合成  
(北大院農) ○武藤靖幸、橋床泰之、橋本 誠
16. ハロゲン化スクロース誘導体の合成とその性質  
(<sup>1</sup>帯畜大院、<sup>2</sup>北大院農) ○武藤美帆<sup>1</sup>、折笠善丈<sup>1</sup>、小田有二<sup>1</sup>、橋床泰之<sup>2</sup>、橋本誠<sup>2</sup>
17. 効率的 click 反応の為の銅触媒検討  
(北大院農) ○小笠原 唯、橋床 泰之、橋本 誠
18. Tautomycetin の全合成研究(4)  
(北大院農) ○今村龍太郎、重富顕吾、佐藤文彦、生方 信
19. キノコ菌糸体からのオートファジー誘導剤探索  
(北大院農) ○新藤 千波耶、三橋 進也、宮本 敏澄、生方 信
20. イネ ABC タンパク質 G サブファミリーのストレスおよび植物ホルモン応答性  
(<sup>1</sup>. 帯広畜産大、<sup>2</sup>. 北大院農) ○松田修一<sup>1</sup>、小森のぞみ<sup>1</sup>、古川薫<sup>1</sup>、船引厚志<sup>1</sup>、  
得字圭彦<sup>1</sup>、高牟礼逸朗<sup>2</sup>、加藤清明<sup>1</sup>
21. Reduction of proteolysis during production of recombinant *Podospora anserina*  
 $\alpha$ -glucosidase  
(Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ.) ○ Kyung-Mo Song, Kazuyuki Kobayashi, Masayuki  
Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura
22. ミコフェノール酸 6' 位誘導体化による新規 HDAC 阻害剤開発の検討  
(北大院農) ○春原 和宏、重富 顕吾、三橋 進也、生方 信
23. ウシラクトフェリンが骨の血管新生因子の発現誘導に及ぼす影響  
○中島恵一<sup>1</sup>、中村正斗<sup>1</sup>、伊藤文彰<sup>1</sup>、河村あさみ<sup>1</sup>、石崎 明<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>農研機構・北海道農業研究センター、<sup>2</sup>岩手医科大学・歯学部)
24. Oleanolic acid and ursolic acid in dried fruits.  
(Iwate Univ.<sup>1</sup>, Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.<sup>2</sup>)  
○Zhang Feng<sup>1,2</sup>, Masao Ohnishi<sup>1</sup>, Mikio Kinoshita<sup>1</sup>, Yoshihiko Tokuji<sup>1</sup>
25. NADH dehydrogenase II 過剰発現による大腸菌呼吸鎖欠損株の糖代謝改善  
(北大院農・応生科) ○紀平知枝、林 由香里、吹谷 智、和田 大、横田 篤
26. Isolation of Biologically Active Compound from *Perenniporia fraxinea*  
(Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)  
○Mutiarra L. Sidharta, Shinya Mitsuhashi, Kengo Shigetomi, Makoto Ubukata
27. Expression profile of bovine colostrum odorant-binding protein during early  
lactation  
T. Japaridze, A. Senda, T. Suzuki, K. Kida, M. Yanagida, Y. Kushi<sup>1</sup>, T. Urashima,  
and K. Fukuda (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>1</sup>Nihon  
University )
28. Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus fermentum* TDS030603  
using Modified Chemically Defined Medium  
Tala Shi, Natsumi Inoue, Kenji Fukuda, and Tadasu Urashima (Obihiro University of  
Agriculture and Veterinary Medicine)

# 1

Zinc deficiency exacerbates experimental colitis *in vivo* and induces dysregulation of cytokine production *in vitro*

○Erwin SUWENDI, Hitoshi IWAYA, Jae-Sung LEE, Hiroshi HARA, Satoshi ISHIZUKA  
(Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

**Background** Zinc deficiency has been observed in patients suffering from inflammatory bowel disease (IBD), although the precise contribution of zinc to IBD has not been determined to date. We set out to investigate the role of zinc status in the pathogenesis of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis.

**Methods** Rats were randomly assigned into two dietary groups and fed zinc adequate diet (ZA, 30 mg Zn/kg diet) as a control or zinc deficient diet (ZD, 5 mg Zn/kg diet) for 28 d. To induce colitis, all rats consumed 2% DSS dissolved in deionized water for 7 d after a 21 d adaptation to the ZA or ZD diets.

**Results** Serum zinc concentrations were significantly lower in rats fed the ZD diet than those in rats fed the ZA diet on d 14 prior to induction of colitis. DSS treatment considerably reduced serum zinc in both groups. The rats fed the ZD diet showed exacerbated colitis as assessed by clinical outcomes including body weight, DAI score, colon length, and histology. *In vitro* study corroborated these results, showing that large amounts of TNF  $\alpha$  were produced by rat mesenteric leukocytes in response to stimulants (either lipopolysaccharide or DSS) under ZD medium (less than 10  $\mu$  mol/L). Interestingly, such increase in TNF  $\alpha$  production was not found under ZA medium (35  $\mu$  mol/L). The ZD condition is considered to induce dysregulation of cytokine productions through promotion of TNF  $\alpha$  signaling.

**Conclusion** Our findings provide evidence that disrupted immune function due to the zinc deficiency exacerbates the inflammatory response in experimental colitis. More attention should be given to zinc levels in culture medium in order to maintain cellular function.

# 2

病傷害応答における OsJAR1 および OsJAR2 の機能

(北大院農, 北農研<sup>1</sup>)○鈴木絵里香、和久田真司、佐分利亘、松浦英幸、鍋田憲助、今井亮三<sup>1</sup>、松井博和

## 【背景と目的】

ジャスモン酸(JA)はストレス応答や生長に関わる植物ホルモンであり、イソロイシンの接合体である JA-Ile が活性型として機能する。シロイヌナズナでは、JA-Ile 合成酵素として JAR1 タンパク質が同定されているが、イネゲノムに見出される 3 つの JAR1 ホモログ (*OsJAR1*~*OsJAR3*) の機能は不明である。本研究では、イネの JA-Ile 合成酵素を同定し、その生理機能を解明することを目的とした。

## 【結果と考察】

ゲノム情報を基に、RT-PCR を行い、*OsJAR1* および *OsJAR2* cDNA を単離した。*OsJAR3* は、種々の組織を用いても転写物が不検出あるいはイントロン含有型であったため、通常条件では機能発現していないと考えられた。*OsJAR1*, *OsJAR2* をそれぞれ発現させた大腸菌は JA から JA-Ile への変換活性を示し、共に JA-Ile 合成酵素であると判明した。傷害を与えたイネにおける JA と JA-Ile 内生量は傷害 1 時間後に共に最大となった。この時 *OsJAR1* と *OsJAR2* の発現量は傷害 1 時間後と 30 分後にそれぞれ最大となった。いもち病菌を感染させたイネでは、JA と JA-Ile の内生量は感染 24~72 時間後にかけて増加した。*OsJAR1* は感染 24~72 時間後にかけて発現が誘導されたが、*OsJAR2* の発現は誘導されなかった。イネにおいては JA-Ile 合成酵素は少なくとも 2 つの遺伝子によりコードされ、それらは病傷害ストレスに対して異なる応答を示すことが明らかになった。

### 3

類似構造をもつ化合物をモデルとした betalain 色素の活性窒素消去機構の検討

○ 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)** 野菜を日常的に食べる人は病気になりにくいと言われており、これには野菜に含まれるフラボノイドやカロテノイドといった植物色素の抗酸化能が寄与していると言われており、植物色素のうち、水溶性含窒素色素であるベタレインは高い抗酸化能を持っており、細胞内で発生する活性酸素種や活性窒素種といったラジカル分子を消去できると考えられている。活性窒素はタンパク質のニトロ化など細胞障害を引き起こすことから近年注目されているが、活性酸素種と比べると、その反応機構については知見が少ない。カロテノイドやアントシアニンで活性窒素種の消去能と消去機構について説明されているが、ベタレインについての報告はない。ベタレインは不安定で、反応生成物の単離が難しいため、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<sup>-</sup>)との反応性を検討した。さらに得られた主要な反応生成物の構造を解析し、ベタレインの活性窒素消去能とその反応機構を明らかにしようと試みた。

**方法・結果及び考察)** 基質となる各化合物 0.5 mmol は、リン酸緩衝液(pH 7.4)中で 2.0 mmol もしくは 4.0 mmol の ONOO<sup>-</sup> と反応させた。得られた生成混合物から反応生成物を液液分配、カラムクロマトグラフィーで精製し、<sup>1</sup>H-NMR、MS 分析によって構造を決定した。これらの化学構造から、活性窒素種の消去はラジカル消去に伴う化合物のニトロ化が重要な要因であり、反応性の高いモデル化合物は分子内でのラジカル転移が活発に起こっていることが示唆された。これらの結果を踏まえ、ベタレインの分子構造と抗酸化活性の相関について考察した。ベタレインと ONOO<sup>-</sup> の反応機構の解明は、植物細胞内でのベタレインが果たしている機能性を理解する一助となりうる。

### 4

十勝産生ナガイモの成分および不ケン化物のヒト結腸がん細胞の増殖に及ぼす影響について

(<sup>1</sup> 帯広大谷短期大学生生活科学科、<sup>2</sup> 岩手大学大学院連合農学研究科、

<sup>3</sup> 帯広畜産大学食品科学研究部門) 山崎民子\*<sup>1,2</sup>、荒井克仁<sup>2,3</sup>、得字圭彦<sup>2,3</sup>、木下幹朗<sup>2,3</sup>、大西正男<sup>2,3</sup>

**研究背景)** 十勝の農産物であるナガイモは、近頃、アジア等にも輸出されているが、十勝産ナガイモの成分についての報告は少ない。また、ナガイモの機能性を検討するため、ナガイモ風乾物の不ケン化物を調製してヒト結腸がん細胞に及ぼす影響についても検討したので併せて報告する。

**方法・結果及び考察)** ナガイモ(*Dioscorea opposita* Thunb.) 可食部 100g 中、水分は常圧加熱乾燥法で 84.9g、蛋白質はケルダール法で 1.2g、脂質は酸分解法で 0.1g 以下、灰分は直接灰化法で 0.7g、炭水化物は計算式により 13.2g であった。これら一般成分値は、灰分以外十勝産メークインジャガイモより少なく、エネルギー量も 57kcal で他のイモ類より少ない。無機質のカリウム、銅は原子吸光度法で 310mg、0.06mg。リン、鉄、カルシウム、マグネシウム、亜鉛は ICP-AES 発光分析法で 24.8mg、0.24mg、6.7mg、13.7mg、0.19mg であり、カルシウムのみ十勝産メークインジャガイモより多い。総アスコルビン酸は高速液体クロマトグラフ法で 7mg であり、標準値よりやや多い。食物繊維は、酵素一重量法(プロスキー変法)で 0.9g であり、十勝産メークインジャガイモより少ない。糖類のブドウ糖、果糖、ショ糖は高速液体クロマトグラフ法で 0.47g、0.68g、0.25g で、十勝産和稔じよよりブドウ糖、果糖は多い。また、ナガイモ凍結乾燥物から不ケン化物を調製し、ヒト結腸がん由来細胞株 Caco-2 細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。培養液 1ml 当たり不ケン化物 100 μg を添加して培養すると、24 時間、48 時間後のいずれにおいても不ケン化物非添加の場合と比べて有意にがん細胞数が減少した。また、培養 48 時間後の不ケン化物の濃度依存性では、500 μg/ml 以上の濃度では Caco-2 細胞はほとんど検出されなかった。この細胞増殖抑制作用は、ジオスゲニンではなく、主としてシステロールに起因するものであった。

## 5

GH 31  $\alpha$ -glucosidase における基質の鎖長認識機構の解明  
(北大院農) ○田上貴祥, 奥山正幸, 森 春英, 木村淳夫

**【背景】**Glycoside hydrolase (GH) family 31 に属する $\alpha$ -glucosidase は、40%ほどのアミノ酸配列類似性を示すにも関わらず、基質の鎖長に対して多様な特異性を示す。テンサイ $\alpha$ -glucosidase (SBG) は可溶性デンプンなどの長鎖基質に対して高い特異性を示す。一方、*Aspergillus niger*  $\alpha$ -glucosidase (ANG) は、マルトトリオースなどの短鎖基質に対して高い特異性を示す。これらの酵素において鎖長特異性を決定する構造因子を見いだしたので報告する。

**【結果と考察】**一次構造比較から、活性ポケットの一部を形成するループ(N-loop)のアミノ酸配列が多様であることを見いだした。SBG は N-loop 上に芳香族アミノ酸 Phe236 を有している。Phe236 を Ala または Ser に置換した変異酵素では、マルトースに対する速度パラメーターは野生型酵素と同等であったのに対し、マルトトリオース以上長鎖の基質に対する  $k_{cat}/K_m$  値は 15-30% に減少した。サブサイト親和力を比較すると、両変異酵素ではサブサイト+2 および+3 の親和力が低下していた。

一方、ANG では、SBG の Phe236 に対応するアミノ酸残基が Thr228 である。野生型酵素がマルトトリオースに対して最も高い  $k_{cat}/K_m$  値を示すのに対し、Thr228 を Phe に置換した変異酵素はマルトテトラオースに対して最も高い値を示した。サブサイト親和力を比較すると、T228F 変異酵素ではサブサイト+2 および+3 の親和力が上昇していた。

以上の結果は、GH 31  $\alpha$ -glucosidase において、N-loop の Phe 残基がサブサイト+2 および+3 の形成により鎖長特異性を決定する重要な構造因子の一つであることを示している。

## 6

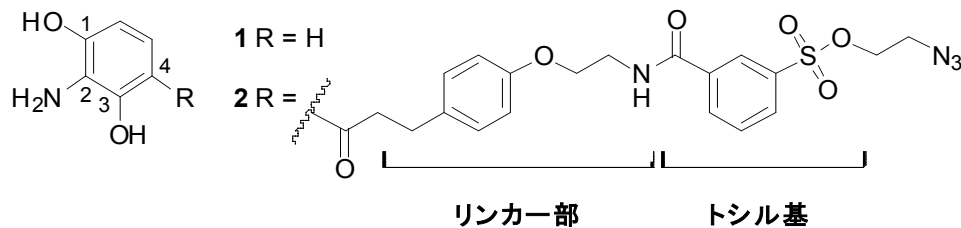
$\alpha$ -Amylase inhibitors from an Indonesian medicinal plant, *Phyllanthus urinaria*  
Maria GUNAWAN-PUTERI, Eisuke KATO, Jun KAWABATA  
(Div. Appl. Biosci. Grad. Sch. Agric. Hokkaido Univ.)

Background) One of the hyperglycemic remedies is by suppressing carbohydrate digestion due to utilization of  $\alpha$ -amylase inhibitors. This research is aimed to reveal potencies of Indonesian medicinal herbs for natural sourced diabetic treatment based on its inhibitory activity to  $\alpha$ -amylase.

Methods & Results) Determination of prospecting herbs done by in vitro assays to evaluate their inhibitory activities against starch azure hydrolysis by porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA) resulted in the finding that leaf extracts of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae) had the potent inhibitory activity. Aqueous methanol extracts of *P. urinaria* leaves were partitioned between EtOAc and water. The active EtOAc phase was chromatographed on silica gel using  $\text{CHCl}_3$ -MeOH gradient eluent. Further purification by RP-HPLC (20 - 60% MeOH in water) resulted in the isolation of gallic acid and two ellagitannins which are corilagin and macatannin B. Another isolation process with silica gel TLC developed two times (hexane : chloroform : formic acid = 10 : 1 : 0.1 and then 20 : 1 : 0.1) give mixture of fatty acid esters which are methyl palmitate, methyl oleate, and methyl stearate.

**研究背景)**  $\alpha$ -グルコシダーゼは小腸刷子縁膜に存在する糖質加水分解酵素である。 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤は糖の吸収を穏やかにして食後血糖値の上昇を抑えることから、糖尿病の予防・治療に有効である。当研究室では、2-aminoresorcinol (1) がラット小腸 $\alpha$ -グルコシダーゼ(スクラーゼ及びマルターゼ)を強力に阻害することを見出した。1 は糖と構造的に大きく異なり、またスクラーゼを不拮抗的に阻害することから、基質と競合する他の阻害剤とは異なった部位に作用していると考えられる。そこで、本研究では1の阻害部位を明らかとするため、分子プローブを合成することとした。これまでの構造活性相関研究で、1のベンゼン環4位に導入したアシル基が活性に影響しなかったことから、アシル修飾型プローブ(2)を設計した。

**方法・結果)** 1のベンゼン環4位に導入したアセチル基と置換ベンズアルデヒドをアルドール縮合させてリンカー部とした。さらに、ラベル導入のためのトシル基をリンカー末端のアミノ基に結合させた。現在、最後の2-azidoethanolの導入、及び脱保護について条件検討を進めている。



**研究背景)** ながいもは十勝の主要作物の一つである。栽培後は茎葉付きネットが大量に排出されるが、茎葉は「一般廃棄物」、ネットは「産業廃棄物」と廃棄区分が異なり、茎葉が付着した状態では市町村の焼却処分場へ持ち込めないため、茎葉が分解してネットから脱落するまでの約2年間、保管・管理しなければならない。本研究では、茎葉が付着したながいもネットの保管・管理期間を短縮し処理経費と管理労力を軽減するために、茎葉、並びにながいもネットを分解する微生物の探索を目的とした。

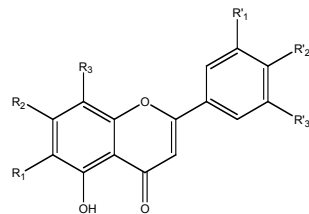
**方法・結果)** ネット分解菌は、茎葉が付着したながいもネット近傍の土壌から採取し、ポリエチレングリコール(PEG)などの長鎖炭化水素、或はポリエチレン(PE)ビーズ(LLDPE: linear low density polyethylene)を含む無機塩培地で一次選抜後、PEビーズの分解能で二次選抜した。また、茎葉分解菌は、ながいも茎中にセルロース含量が高いことからセルロースの分解能により選抜した。その結果、ネット分解菌は、一次選抜で選抜された60株について更にPEビーズの分解試験を行った結果、最大で2.6%程度の分解率が確認された。特にPEGを炭素源として選抜された菌株で高い分解率が見られた。分解率の高かった上位6菌株を用いてネットの分解試験を行った結果、分解率はいずれも1%未満であったが、相対的に分解率の高かったPEG5h株は、その改良とネット前処理等の組合せにより、より高い分解効果を期待できる可能性があると考えられた。一方、ながいも茎葉分解菌は、茎残渣からセルロース含有PDA培地を用いて6菌群を回収し、更に茎粉砕物に接種して継代培養する方法で、セルロース分解率の高い3菌群から7菌株を選抜した。これら7菌株のうちセルロース分解率の高かった上位4菌株で茎葉が付着したネットを処理した結果、最大で16.6%の分解が確認された。

## 9

### *Murraya paniculata* からの testosterone 5 $\alpha$ -reductase 阻害物質の単離 (北大院農) ○伊秩誠志、加藤英介、川端潤

**研究背景** 男性型脱毛症(Androgenetic Alopecia ; AGA)は思春期以降の男性に多く見られる男性ホルモンを原因とした脱毛症である。AGA は頭皮の組織で testosterone が 5 $\alpha$ -reductase により還元されることによって進行する。AGA の治療には 5 $\alpha$ -reductase を阻害することが効果的であり、実際に酵素阻害型の経口治療薬が使用されている。しかし、医薬品であるため処方箋が必要である。そこで本実験では、食品として容易に摂取できるように天然の植物から 5 $\alpha$ -reductase 阻害物質を探索することを目的とした。

**方法・結果及び考察** インドネシア産植物 *Murraya paniculata* 葉乾燥物 40 g を 50%メタノール 400 mL で 24 h 浸漬抽出を 3 回行い、50%メタノール抽出物 24 g を得た。この抽出物を水—ヘキサンで分液後、さらに水層を水—酢酸エチルで分液をした。酢酸エチル層に阻害活性が見られたので、これを各種カラムクロマトグラフィーで分画した。最終的に 6 つのフラボノイド化合物 1-6 を単離した。現在これらの化合物の阻害活性試験を行っている。



	R1	R2	R3	R'1	R'2	R'3
1	-OMe	-OMe	-OMe	-OH	-OMe	-OMe
2	-H	-OMe	-H	-OH	-OMe	-H
3	-H	-OMe	-H	-OH	-OMe	-OMe
4	-OMe	-OMe	-OMe	-H	-OMe	-OMe
5	-OMe	-OMe	-H	-OMe	-OMe	-OMe
6	-OMe	-OMe	-OMe	-OMe	-OMe	-OMe

## 10

### イネのシュート伸長を制御する ABC トランスポーター *RCN1* の低温応答性 ○古川薫<sup>1</sup>、松田修一<sup>1</sup>、小森のぞみ<sup>1</sup>、得字圭彦<sup>1</sup>、高牟礼逸朗<sup>2</sup>、加藤清明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>、帯広畜産大学<sup>2</sup>、北海道大学大学院農学研究院)

**【背景と目的】**イネ(*Oryza sativa* L.)の幼苗期におけるシュートの低温伸長性は、寒冷地での直播栽培において重要な形質の一つである。今回は、シュート伸長を制御する ABC トランスポーター遺伝子 *RCN1* (Yasuno ら 2009)の低温伸長性における機能を解明するために①*rcn1* におけるシュートの低温伸長性と②*RCN1* 遺伝子の発現の低温応答性を解析した。

**【材料と方法】**イネ品種「しおかり」と「しおかり」由来の *rcn1* 変異体を用いた。吸水開始後 3 日目から 17°C 処理し、16h 28°C 明条件/8h 24°C 暗条件(コントロール)に対するシュートの伸長量の抑制程度を低温伸長性として評価した。また、コントロール、17°C、6°C 処理の 3 処理区について、0、1、4、24 時間後のシュートから RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により、ユビキチン遺伝子の発現量に対する *RCN1* の相対的発現量を求めた。

**【結果と考察】**シュート伸長は、17°C 処理により「しおかり」で 2~7 割程度までに抑制された。*rcn1* では、「しおかり」よりシビアに抑制された。*RCN1* の発現量は、コントロール区での「しおかり」と *rcn1* の各タイムコースで変動は無く、また、常に *rcn1* で多くなった。このことから負のフィードバック制御が *RCN1* の mRNA 量を調節しているものと考えられた。17°C 処理では、「しおかり」では 1 時間後に減少し、4 時間後には増加し始め、24 時間後にはもとに戻った。負のフィードバック制御は 1 時間後に消失し、4 時間後には復帰し始め、24 時間後にはもとに戻った。6°C 処理では、発現と負のフィードバック制御ともに「しおかり」は 1 時間後から 24 時間後まで減少したままであった。以上より、*RCN1* が 17°C で一過的に発現が減少するものの、24 時間後には復帰し、シュートの低温伸長性に関わるものと考えられた。一方、6°C では少なくとも発現の減少が *RCN1* の機能を低下させているものと考えられた。

# 11

イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明

○竹内紗央里, 三木慎介, 大塚圭輔, 曾根輝雄

(北大院農・応生科)

**研究背景)** *AVR-Pia* はイネいもち病菌が持つ, イネ品種愛知旭の抵抗性遺伝子 *Pia* に対応する非病原性遺伝子である。Ina168 株の同一染色体上に 3 コピー保存されているが, 宿主特異性変異株 Ina168m95-1 株は全ての *AVR-Pia* 遺伝子を欠損している。本研究ではその変異機構を解析した。

**結果・考察)** Ina168 株由来の *AVR-Pia* 領域を含むコスミドクローンの塩基配列を基に, Ina168m95-1 株との違いを調べた。その結果, Ina168m95-1 株では, *AVR-Pia* に隣接する DNA 型トランスポゾン *Occan* の 5' 末端側近接領域において Ina168 株と 100% の相同性を保持していたが, 3 コピーの *AVR-Pia* を含む *Occan* の 3' 末端側近接領域を大きく欠損していることが分かった。続いて, Ina168m95-1 株の *Occan* 5' 末端側近接領域内において inverse PCR を行い, 3 コピーの *AVR-Pia* とともに欠損した領域の両端部分のクローニングに成功した。この領域の塩基配列を解析したところ, *Occan* 5' 末端側近接領域に続いて *Occan* 全長が存在し, その 3' 末端側近接領域に新規な配列が得られた。この *Occan* 3' 末端側新規配列は Ina168 株にも存在しており, この配列の 5' 側にもうひとつの *Occan* が存在することがわかった。以下, Ina168 株で *AVR-Pia* に隣接して存在した *Occan* を *Occan A*, 新規配列に隣接したものを *Occan B* とする。次に Ina168 株の *Occan B* の 5' 末端側近接領域を調べると, この領域は Ina168m95-1 株に存在しないことがわかった。また PFGE により, Ina168 株で *Occan A* の 5' 末端側近接領域、*Occan B* の 3' 末端側近接領域、*AVR-Pia* が同一染色体上にあること, Ina168m96-1 の *Occan* は *Occan A, B* の特徴を兼ね備えていることがわかった。以上より, 2 つの *Occan A, B* の相同組み換えにより, その間の 3 コピーの *AVR-Pia* が欠失したことが示唆された。

# 12

乳酸菌発酵風味液の防カビ効果について

(日本甜菜製糖株式会社) ○仲田弘明, 長谷川秀樹, 今井奈津夫, 田村雅彦

**【目的】** 製パン用の乳酸菌発酵風味液(以下、風味液)は、パンに特徴的な風味を付与することのできる製パン資材であり、近年では風味の付与の他に、焼成されたパンにおける防カビ効果が求められている。そこで、高い防カビ効果を保持する風味液の作製を目指し検討を行った。

**【方法】** 北海道内の様々な分離源から分離された乳酸菌を対象に、防カビ物質を生産する菌株のスクリーニングを行った。スクリーニングによって取得された菌株の同定を行い、さらに食経験のある菌株を選抜した。本菌株を用い、糖蜜を炭素源として風味液を作製した。この風味液を用いて風味液添加パンを焼成し、防カビ試験を実施した。

**【結果】** 防カビ物質を生産する乳酸菌のスクリーニングを行ったところ、十勝地方のコーンサイレージより分離された菌株が選抜された。本菌株について、形態観察および 16S リボソーム RNA 遺伝子配列に基づく相同性検索により同定を行ったところ、*Lactobacillus buchneri* と同定され、食経験を有する菌種であった。本菌株により風味液を作製し、風味液パンを焼成して防カビ試験を実施したところ、高い防カビ効果が認められた。防カビ効果の要因として、本菌株が生産する「酢酸」が防カビ物質として機能していることが推測された。また、無添加パンと比較し、風味液添加パンは甘い香りがし、ほのかな酸味を呈していた。



# 13

*Lactobacillus gasseri* JCM1131<sup>T</sup> の胆汁酸適応におけるリポテイコ酸の役割

(<sup>1</sup> 北大院・農、<sup>2</sup> 東農大・応生科、<sup>3</sup> 産総研・生物プロセス、<sup>4</sup> 札医大・医・微生物)

白石 宗<sup>1</sup>、富田 理<sup>2</sup>、田中 尚人<sup>2</sup>、吹谷 智<sup>1</sup>、森田 直樹<sup>3</sup>、横田 伸一<sup>4</sup>、岡田 早苗<sup>2</sup>、横田 篤<sup>1</sup>

**研究背景**：腸管内に生息する *Lactobacillus gasseri* はプロバイオティクスとして実際に利用される乳酸菌であり、我々は *L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> の胆汁酸に対する適応現象を発見した。胆汁酸適応とは、胆汁酸の主な構成因子であるコール酸を非致死濃度 (4 mM) 含む培養液に、細胞を短時間 (30 分) 暴露させることで、致死濃度 (15 mM) のコール酸ストレスに対して耐性を獲得する現象である。我々は、この適応現象のメカニズムの解明を目指し、適応現象に細胞膜脂質が関与することを明らかにしている。そこで、本研究では細胞膜の構成因子であるリポテイコ酸 (LTA) に着目した。LTA は、一般的にグリセロールリン酸ユニットで構成される主鎖を持ち、細胞膜の脂肪酸に糖を介して結合する。また、表層電荷の要因にもなり、抗菌物質からの物理的防御機能を持つと報告されている。従って、本研究ではコール酸適応現象への LTA の関与と役割を明らかにすることを目的とする。

**方法・結果**：コール酸適応株と非適応株からブタノール抽出法により LTA を抽出後、疎水性クロマトグラフィーによって LTA 画分を得た。得られた両者の LTA 画分を NMR によって構造を推定し、GC によってアンカー脂肪酸の構成分析を行った。さらに、Native PAGE によってグリセロールリン酸主鎖の鎖長を、ヘキサデカン法によって表層極性を比較した。その結果 *L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> は、グリセロールリン酸とグリセロールの 2 位にアラニンを持つ 2-アラニルグリセロールリン酸ユニットの 2 種のユニットを LTA 分子中に持つことが明らかになった。しかし、適応によるユニット構造の変化や脂肪酸構成、主鎖の鎖長、表層極性に違いは確認されなかった。今後は、細胞当たりの LTA 量の変化や詳細な表層電荷を観察する。

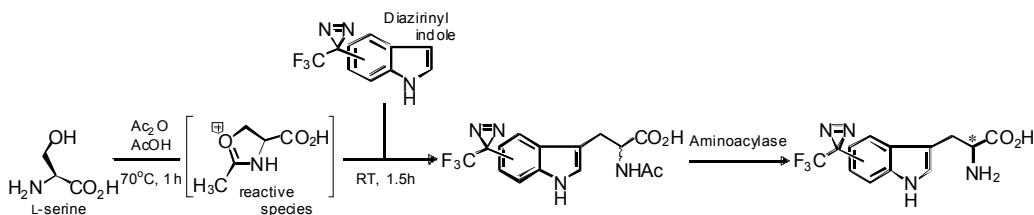
# 14

ジアジリン化インドールを母核とした Post functional 誘導体合成

(北大院農) ○村井勇太、橋床泰之、橋本 誠

**研究背景**) インドール環を含む化合物群は種々の生理活性を持つことが知られている。その生体内における作用機序解明に光アフィニティーラベル法を適用するため、母体骨格となるジアジリン化インドールを合成し、その Post functionality としてジアジリン化トリプトファン等の誘導体合成を検討した。

**方法・結果及び考察**) 5-又は6-Brインドールを原料として、母核であるジアジリン化インドールを合成した。<sup>1)</sup> これとセリンを酢酸・無水酢酸溶媒条件下でカップリング反応<sup>2)</sup>させることによるジアジニルトリプトファン骨格の構築と、その後の脱保護反応を検討した。文献に従いカップリング反応を 70°C で行なったが、ジアジニル骨格の分解が確認された。そこで、予めセリンを酢酸・無水酢酸と 70°C で反応し反応活性種を発生させ、それをジアジリン化インドールと室温でカップリングする方法によりジアジニル骨格に影響なくジアジリン化 *N*-Ac トリプトファン合成を行なうことに成功した。続いてこれを L-もしくは、D-アミノアシラーゼで処理し、光学活性ジアジリン化トリプトファンを得ることに成功した。また他の誘導体合成についても検討中である。 1) 2010 農化本大会 P.145 3ACa04 2) *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 7851



## 15

Triflic acidを用いた Friedel-Crafts 反応による光反応性 Phe、Tyr 誘導体の効率的合成  
(北大院農) ○武藤靖幸、橋床泰之、橋本 誠

**研究背景)** 光反応性基が導入されたアミノ酸誘導体は、アミノ酸やペプチドの構造活性相関を光アフィニティーラベル法により解析するための有用なラベル試薬であるが、アミノ酸の有機溶媒への難溶性等により、通常は光反応性基に対しアミノ酸骨格を導入する多段階合成が必要であった。今回 Friedel-Crafts (F-C) ベンゾイル化反応を用いて、フェニルアラニンやチロシンの芳香環上に光反応性基ベンゾフェノン骨格を1段階で効率的に導入する方法を検討した。

**方法・結果及び考察)** 塩化アルミニウム等のルイス酸を触媒とした通常の F-C 反応では、アミノ酸の有機溶媒への難溶性のため反応が不均一系となり適用できなかった。そこで超強酸の Triflic acid を触媒兼溶媒として用いることでアミノ酸の溶解度を上げ<sup>1)</sup>、ベンゾイルクロライド (BzCl) をアシルドナーとした F-C ベンゾイル化反応による<sup>2)</sup>ベンゾフェノン骨格の1段階での導入を試みた。N-アセチルフェニルアラニンメチルエステルを出発原料とした場合、BzCl 20 当量、室温、1 時間でベンゾフェノン骨格の構築が確認されたが、同時にアミノ酸部分がオキサゾール化した化合物が主生成物であった (収率 63%)。N-アセチルフェニルアラニンの場合は、BzCl 20 当量、80°C、1 時間で *p*-ベンゾイル体を収率 59%、*m*-ベンゾイル体を収率 20% で得ることに成功した。出発原料が無保護のフェニルアラニンの場合、室温で BzCl を 1 当量ずつ加えることで *p*-ベンゾイルフェニルアラニンを収率 28% で得た。無保護のチロシンでは BzCl 3 当量で、室温、3 時間で *O*-ベンゾイルチロシンが収率 68% で得られる一方、80°C、7 時間で目的の 3-*C*-ベンゾイルチロシンが収率 76% で得られた。

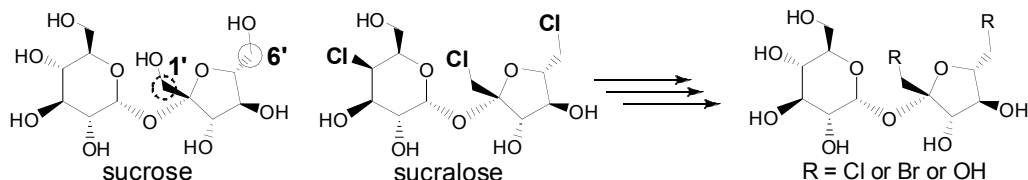
1) *Tetrahedron Lett.* 2008, **49**, 6566. 2) 2011 農化本大会 P. 178 3A05a10

## 16

ハロゲン化スクロース誘導体の合成とその性質  
(<sup>1</sup>帯畜大院、<sup>2</sup>北大院農) ○武藤美帆<sup>1</sup>、折笠善丈<sup>1</sup>、小田有二<sup>1</sup>、橋床泰之<sup>2</sup>、橋本誠<sup>2</sup>

**研究背景)** スクロースは、理想的な甘味を呈する砂糖の主要成分として知られているが、その甘味を発現する機構はほとんど知られていない。そこで、甘味受容体の解析に応用することを目的とし、スクロース誘導体の合成を検討した。スクラロースのようにハロゲンを含む糖は甘味の活性が強くなるため、スクロース 1', 6' 位に Cl または Br を導入する種々誘導体の合成を検討した。

**方法・結果及び考察)** スクロースを CX<sub>4</sub> (X=Cl, Br) と Ph<sub>3</sub>P で反応させ<sup>1)</sup>、1 級水酸基へのハロゲン導入を検討した。反応条件を詳細に検討した所、Br 化では文献通り 6-モノブromo体が主成分として得られたが、1'-モノブromoならびに 1',6'-ジブromo誘導体も得られることが明らかとなった。Cl の場合は 6'-モノクロロ、1',6'-ジクロロ体が得られた。これらハロゲン化スクロースのインペルターゼ加水分解活性を見たところ、6' 位にハロゲンが導入された化合物のみ加水分解されることがわかった。今後は加水分解後のハロフルクトース誘導体の代謝機構解明のため重水素誘導体の合成を検討する予定である。

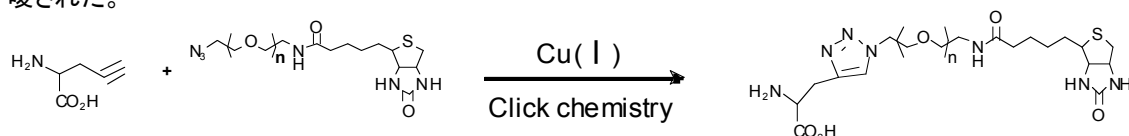


参考文献 <sup>1)</sup> M. M. Andrade, M. T. Barros, P. Rodrigues *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 3655-3668

## 17 効率的 click 反応の為の銅触媒検討 (北大院農) ○小笠原 唯、橋床 泰之、橋本 誠

**研究背景** click 反応は生体内に存在しない官能基であるアジドとアルキンが1価の銅触媒存在下で新規共有結合をつくることから、生体内に導入された exogenous な化合物の捕捉・標識ツールとして有用であることが示唆されている。しかし、この反応の効率性(収率)について網羅的に議論された研究はほとんどない。そこでアジド、アルキンを持つ基質をそれぞれいくつか用意し、click 反応での銅触媒の種類による反応性の違いを検討した。

**方法・結果及び考察** アジド側分子としては、ベンジルアジド、水溶性の高いエチレングリコール鎖の一方の末端にアジドを持ちもう一方の末端にタグとしての biotin を持つもの等を用いた。アルキン側分子としては propargylglycine、*N*-Boc propargylglycine 等を準備した。これらの試薬の組み合わせで反応条件検討を行っている。click 反応は触媒として反応系内に1価銅が存在する必要があるため、1) 直接1価銅を用いる方法、2) 反応系内にてアスコルビン酸ナトリウムを用いて2価銅を1価銅に還元する方法の2種類を比較検討した。1価銅の場合、反応条件によっては、反応後に発生する2価銅を還元剤(アスコルビン酸ナトリウム)で再生する必要があることが明らかとなった。また、基質と銅触媒、溶媒等の組み合わせによっては反応が進行しない場合があり、基質により条件を最適化する必要性が示唆された。



## 18 Tautomycetin の全合成研究(4) (北大院農) ○今村龍太郎、重富顕吾、佐藤文彦、生方 信

**研究背景** Tautomycetin(TC)は放線菌 *Streptomyces griseochromogenes* より単離・構造決定された化合物であり、抗真菌活性を有する抗生物質である。また、TC は1型のセリン/スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素に特異的な阻害剤であることが明らかにされており、細胞内シグナル伝達機構の解明や、抗がん剤などの薬剤としての利用が期待される。そのため TC の改良と構造-活性相関研究を目的として、本化合物の全合成を行うことにした。

**方法・結果** 逆合成解析により TC を C15、C16 間で大きく二つのセグメントに分割した。無水マレイン酸構造を含むセグメントをセグメントA、ジエノン骨格を含むセグメントをセグメントBとして両者をアルドール反応によりカップリングを行う。その反応予備実験と各セグメントの合成を行った。

まず、methyl tiglate を出発物質として Sharpless 不斉エポキシ化、Jung のアルデヒド合成法を用いてセグメントAのモデル基質を合成した。一方、セグメントBのモデル基質は Roche ester から Weinreb アミドを経由して3stepで合成した。これらのモデル基質を用い、天然型である *anti*-Felkin アルドール付加体を優先的に与える条件を検討することにした。結果、望んだ立体化学を持ったアルドール付加体の合成を優れた収率及び選択性で達成した。

つぎに各セグメントの合成を試み、acetylene dicarboxylic acid と  $\beta$ -propiolactone からセグメントAの基本骨格の合成を行った。C11-C15 フラグメントと C16-C18 フラグメントは上述のモデル基質と同様に methyl tiglate から合成した。

## ■研究背景■

細胞内タンパク質分解機構の一つであるオートファジーは、飢餓対応や細胞内環境維持のほか、ガンや神経疾患などに関わりのある重要な生理機能である。これまでに当研究室ではニカウウロコタケから Hirsutanol A を単離し、その絶対配置を決定した<sup>1)</sup>。最近、Hirsutanol A がオートファジーを誘導することが報告された<sup>2)</sup>。そこで他のキノコからもオートファジー誘導剤を見出すことができると考え、採取したキノコの培養菌糸体抽出物から、オートファジー誘導剤を探索することを目的とした。

## ■方法・結果及び考察■

キノコを採取後、菌糸体を分離培養し、DNA シークエンスにより種を推定した。培養菌糸体をアセトン抽出し濃縮除去後、酢酸エチルで分液抽出した。マウス NIH3T3 細胞に各菌糸体の抽出物を最終濃度 100 µg/ml で加え、2 時間処理した後回収し、ウェスタンブロット法によりオートファジーを検出した。本発表ではキノコ抽出物によるオートファジー活性を報告する。

- 1) Ryo Asai, et al. *Journal of Antibiotics*, in press
- 2) Fen Yang, et al. *Chinese Journal of Cancer*, 2010, vol.29, 655-660

## 背景・目的)

ABCG タンパク質のうちハーフサイズは、シロイヌナズナではクチンおよびアブシジン酸の輸送に関わり、乾燥などの環境ストレス耐性に関連するものと考えられている。イネではハーフサイズの OsABCG5 が、著しくシュート伸長の抑制された *rcn1* の原因遺伝子として報告されているが、その機能は未解明なままである。本研究では、イネのハーフサイズの ABCG 遺伝子の非生物学的ストレスおよび植物ホルモン応答性を解析し、*RCN1/OsABCG5* との関連性を検討した。

## 材料および方法)

イネの栽培品種「しおかり」の幼苗に非生物学的ストレスおよび根に植物ホルモンを処理し、3 時間後にシュートと根における ABCG タンパク質遺伝子の発現を半定量的あるいは定量的 RT-PCR により解析した。

## 結果・考察)

イネ (IRGSP/RAP build 4) とシロイヌナズナ (TAIR 8) のゲノム配列中に、それぞれ 30 種と 29 種のハーフサイズの ABCG タンパク質遺伝子を見出した。各ゲノム配列から見いだされた 59 遺伝子の全アミノ酸配列を用いて近隣結合 (NJ) 法で分子系統樹を作成した。その結果、ハーフサイズ ABCG タンパク質は 4 つのクラスのサブクレードに類別する事が出来た。クラス IV サブクレードはイントロンレス遺伝子が大半を占め、クラス IV に類別された 9 種のイネの ABCG 遺伝子のうち発現の確認された 7 種類の遺伝子の発現パターンが類似していたことから、機能的な関連性が示唆された。

## 21 Reduction of proteolysis during production of recombinant *Podospora anserina* $\alpha$ -glucosidase (Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ.) ○ Kyung-Mo Song, Kazuyuki Kobayashi, Masayuki Okuyama, Haruhide Mori, Atsuo Kimura

$\alpha$ -Glucosidase from *Podospora anserina* (PAG) has the high similarity to  $\alpha$ -1,3-glucosidase in amino acid sequence. To investigate the characteristics of PAG, its recombinant enzyme possessing hexa-histidine tag (His-tag) at C-terminal has been over-expressed in *Pichia pastoris* system. However, purification yield of recombinant PAG was unsatisfactory: only 10% of produced enzyme has properly bound to Ni-chelating resin. The results of SDS-PAGE, peptide mass fingerprinting and N-terminal sequencing indicated that a limited proteolysis occurred during cultivation. Degradation of C-terminal region including His-tag caused the low binding ability to Ni-chelating resin. The proteolysis was reduced by modification of cultivation conditions. Consequently, the amount of enzyme binding to resin was raised to 40% when the recombinant PAG was produced in 1% yeast extract, 2% casamino acid, 2% glucose at 30°C for 72 h. In addition, total produced activity increased threefold. The purified recombinant PAG displayed the high regioselectivity for  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,4 glucosidic linkages in both of hydrolysis and transglycosylation.

## 22 ミコフェノール酸 6'位誘導体化による新規 HDAC 阻害剤開発の検討 (北大院農) ○春原 和宏、重富 顕吾、三橋 進也、生方 信

(研究背景と目的) ミコフェノール酸(Mycophenolic acid, MPA)は*Penicillium* sp.から単離構造決定された生理活性物質である。MPAはイノシン酸脱水素酵素(IMPDH)を阻害することで免疫抑制剤として用いられている。また当研究室の研究によりMPAの6'位をヒドロキサム酸に誘導体化したミコフェノールヒドロキサム酸(MPHA)はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害することが判明した。しかしMPHAのHDAC阻害活性は代表的なHDAC阻害剤に比べ弱い。従って本研究では活性中心の亜鉛イオンとの親和性に着目し、HSAB則や他の亜鉛イオンを含む酵素阻害剤の構造を基に硫黄原子やピリジンを導入した亜鉛配位子官能基を持つミコフェノールチオール(MPT)、*N*-ピリジニルミコフェノールアミド(PMPA)およびMPHA誘導体のデザイン及び合成を行った。

(実験方法と結果) 各化合物を合成するに際して、最初にMPAの7位フェノール性水酸基をTBSで保護した後、6'位カルボキシル基の化学修飾を試みた。MPTの合成はまず6'位カルボキシル基をメチルエステルとしDIBAL、NaBH<sub>4</sub>を用いてアルコールまで還元した。得られたアルコールを光延反応によりチオ酢酸を付加させ、TBS、アセチル基を脱保護することでMPTの合成を達成した。PMPAは6'位を酸クロリドとした後、2-アミノピリジンを付加させ、TBSを脱保護することで合成をした。MPHA誘導体は6'位を無水酸として活性化した後TrONH<sub>2</sub>を付加させ、得られたアミドに対して*N*-メチル化および*N*-アセチル化を行った。次いでTBS、Trを脱保護することでMPHA誘導体を合成した。合成した6種のMPA誘導体を用いた細胞増殖抑制試験については現在検討中である。

## 23

ウシラクトフェリンが骨の血管新生因子の発現誘導に及ぼす影響

○中島恵一<sup>1</sup>、中村正斗<sup>1</sup>、伊藤文彰<sup>1</sup>、河村あさみ<sup>1</sup>、石崎 明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>農研機構・北海道農業研究センター、<sup>2</sup>岩手医科大学・歯学部)

【目的】乳中に含まれるラクトフェリンは抗菌作用、免疫調節作用などを有する多機能性タンパク質として注目されている。近年、ラクトフェリンは骨の成長を促進することが報告されているが、骨の成長に不可欠な血管新生に及ぼす影響については不明である。本研究では骨芽細胞においてラクトフェリンが血管新生因子である VEGF と FGF-2 の発現誘導に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。【方法】マウス初代培養骨芽細胞および MC3T3-E1 細胞をラクトフェリンで処理し、VEGF および FGF-2 の mRNA の発現変動をリアルタイム PCR 法により解析した。ラクトフェリン処理により培地中に遊離する VEGF を ELISA 法により定量した。FGF-2 タンパク質の発現変動をウエスタンブロッティング法により解析した。ラクトフェリンによるシグナル伝達について MAP キナーゼ経路の特異的阻害剤を用いて解析した。【結果】ラクトフェリン処理によりマウス初代培養骨芽細胞および MC3T3-E1 細胞の VEGF および FGF-2 の mRNA 発現が経時的および用量依存的に増加した。同様に FGF-2 タンパク質の発現および培地中に遊離する VEGF タンパク質量が増加した。ラクトフェリン処理により ERK1/2 がリン酸化され、さらに VEGF および FGF-2 の発現誘導は MEK 阻害剤より抑制された。【結論】ラクトフェリンは骨芽細胞において ERK1/2 を介し血管新生因子の合成を促進することが推察された。

## 24

Oleanolic acid and ursolic acid in dried fruits.

(Iwate Univ.<sup>1</sup>, Obihiro Univ. Agric. Vet. Med.<sup>2</sup>)

○Zhang Feng<sup>1,2</sup>, Masao Ohnishi<sup>1</sup>, Mikio Kinoshita<sup>1</sup>, Yoshihiko Tokuji<sup>1</sup>

**Background**) Oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) are natural triterpenoids that have properties of anti-tumor, lipid-lowering, anti-hepatitis and hepatoprotective. These terpenoids are known to exist on the surface of leaf and fruit of plants. Dried fruits are usually eaten without removing their pericarp. Thus, dried fruits may be good resources for oral intake of OA and UA naturally. However, little is known about OA and UA content in dried fruits until now. Therefore, here we study the OA and UA content in some dried fruits.

**Methods, Results & Discussion**) 17 kinds of dried fruits (raisin, blueberry, cranberry, etc.) were purchased from market. After extraction from these materials with ethanol and concentration, we analyzed them by TLC. Among these dried fruits, raisin, cherry, cranberry, blueberry, persimmon and apricots contain OA or UA. Because OA and UA are isomers and have similar property, TLC could not separate them. Thus, OA and UA in dried fruits were quantified using reversed phase HPLC. The conditions of HPLC were as follows: column, Wakosil-II 5C18 (4.6 × 250mm); solvent, acetonitrile/methanol/water/phosphoric acid (500:400:100:0.5); flow rate, 0.5mL/min; temperature, 20°C. Raisins contain higher level of OA than the other dried fruits, and green raisin is the highest (0.79mg/g) among the three kinds of raisin. Cranberry contains higher level of UA (0.66mg/g) while raisin doesn't contain UA; comprehensively, cranberry contains higher level of OA + UA (0.84mg/g). It demonstrates that cranberry is one of the good resources of these terpenoids.

## 25 NADH dehydrogenase II 過剰発現による大腸菌呼吸鎖欠損株の糖代謝改善 (北大院農・応生科)

○紀平知枝、林 由香里、吹谷 智、和田 大、横田 篤

【背景】当研究室では中枢代謝の増強による発酵生産の効率化を目指し、細胞内エネルギーレベルが糖代謝に与える影響を検討している。細胞内 ATP 生産の大部分を担う ATPase は呼吸鎖の形成するプロトン駆動力を駆動源とする。そこで呼吸鎖成分のうちプロトン駆動力形成能の高い NADH dehydrogenase I (NDH-1)あるいは cytochrome *bo*<sub>3</sub> oxidase の単独または両欠損による ATP 形成効率の低下が大腸菌の糖代謝に与える影響を調べたところ、プロトン駆動力形成効率が低い株ほど菌体あたりの糖消費速度が増大した。しかし、いずれの欠損株も最大生育量の低下やピルビン酸および酢酸の蓄積が見られた。また、これらが原因となりバッチ当たりの糖消費時間が野生株に比べて遅延した。これは菌体当たりの糖消費速度の増大に比べて呼吸活性の増加率が低いため NADH が過剰になり起こると推測された。そこで本研究では、プロトン駆動力形成能を持たない NADH dehydrogenase II (NDH-2)の過剰発現による NADH 再酸化能力の補強が呼吸鎖欠損株の糖代謝に与える影響を検証した。

【方法・結果】NDH-2 をコードする遺伝子 *ndh* を pBR322 にクローニングし、野生株および各呼吸鎖欠損株に導入した。各株をグルコース無機塩発酵培地を用いた DO-STAT 条件でバッチ培養を行った。その結果、各過剰発現株で呼吸活性が増大した。また野生株および単独欠損株は過剰発現により菌体当たりの糖消費速度が増大した。さらに NDH-1 欠損株および二重欠損株では過剰発現により最大生育量が野生株並みに回復し、バッチ当たりの糖消費時間が大幅に短縮した。さらにいずれの株でも過剰発現によりピルビン酸および酢酸の生成量の低下が見られた。これは解糖系フラックスと NADH の再酸化の不均衡が解消されたためと考えられる。

## 26 Isolation of Biologically Active Compound from *Perenniporia fraxinea*

(Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

○Mutiar L. Sidharta, Shinya Mitsuhashi, Kengo Shigetomi, Makoto Ubukata

**Background:** Search for compound which has toxicity effect against cancer cells from natural source has been an important element in pharmaceutical research. Previously conducted screening on several mushroom species from Siberia, Northern part of China, Hokkaido Island, and subalpine zone of Honshu Island showed that extract from *Perenniporia fraxinea* (Polyporaceae) has promising activity against mouse B16 melanoma cells. In this study, isolation of cytotoxic compound against human HeLa cells from *Perenniporia fraxinea* is conducted.

**Method and Result:** Cultured mycelia (443 g, wet wt) from *Perenniporia fraxinea* was extracted with 20x acetone (w/w) and further extracted with 1x CHCl<sub>3</sub> (pH 4.0) (v/v). Crude extract (2.086 g) was applied on silica gel column chromatography (2.5 cm i.d. x 17 cm) eluted with CHCl<sub>3</sub>/MeOH system. Active fraction (230.5 mg) was purified through silica gel column chromatography (1.0 cm i.d. x 23.3 cm) using CHCl<sub>3</sub>/1% MeOH. Purification using photodiode array HPLC (preparative column Mygthysil Si60, 250 x 10 mm, 3% MeOH in CHCl<sub>3</sub>, 4.0 ml/minute, UV detected at 240 nm) resulted in 28.3 mg of final sample. Structure elucidation and test of biological activity of the compound are in progress.

**27**

Expression profile of bovine colostrum odorant-binding protein during early lactation  
T. Japaridze, A. Senda, T. Suzuki, K. Kida, M. Yanagida, Y. Kushi<sup>1</sup>, T. Urashima, and K. Fukuda (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>1</sup>Nihon University )

Bovine colostrum odorant-binding protein (bcOBP) is a lipocalin, with a molecular mass of 19 kDa, recently identified in bovine colostrum, showing 52% sequence similarity to bovine nasal odorant-binding protein. Using Western blotting, we semi-quantified bcOBP's concentration and studied its exoexpression pattern in early lactation stages. Colostrum was collected from three healthy Friesian-Holstein cows at 0, 5, 15, 24, 38, 48, 120, and 240 h postpartum. Samples were electrophoresed by 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane, and visualized with HRP-conjugated goat anti-mouse IgM as secondary antibodies using ECL detection system. The bcOBP was constantly secreted at the concentration of 181 µg/L after birth and at least up to 10 d postpartum. Despite of low and constant secretion of bcOBP, the expression in bodily fluids suggests its possible biological roles in chemical communication.

**28**

Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 using Modified Chemically Defined Medium  
Tala Shi, Natsumi Inoue, Kenji Fukuda, and Tadasu Urashima (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

The aim of this study is to optimize the culture conditions of *Lb. fermentum* TDS030603 using chemically define medium (CDM) to enhance exopolysaccharide (EPS) production. After pre-cultivation in MRS for 24 h, cells were harvested by centrifugation, washed thoroughly with PBS, and then cultured on CDM under various conditions such as different medium components, pH, temperature, agitation, and aeration. After 48 h cultivation, the supernatant was collected by ice-cold ethanol precipitation. The precipitant was dialyzed, lyophilized, and collected as crude EPS. When the cultivation was done under the optimized conditions (5% glucose, 1% ammonium citrate, and anaerobic cultivation), the EPS yield has increased 2.8-fold higher than the non-optimized conditions. Currently, variation of mRNA transcripts of EPS related genes between optimized and non-optimized culture conditions are under investigation by RT-PCR.