

平成 2 5 年度

公益社団法人 日本農芸化学会 北海道支部講演会

講演要旨

日時：平成 25 年 11 月 29 日（金），30 日（土）

会場：北海道大学農学部総合研究棟 W109

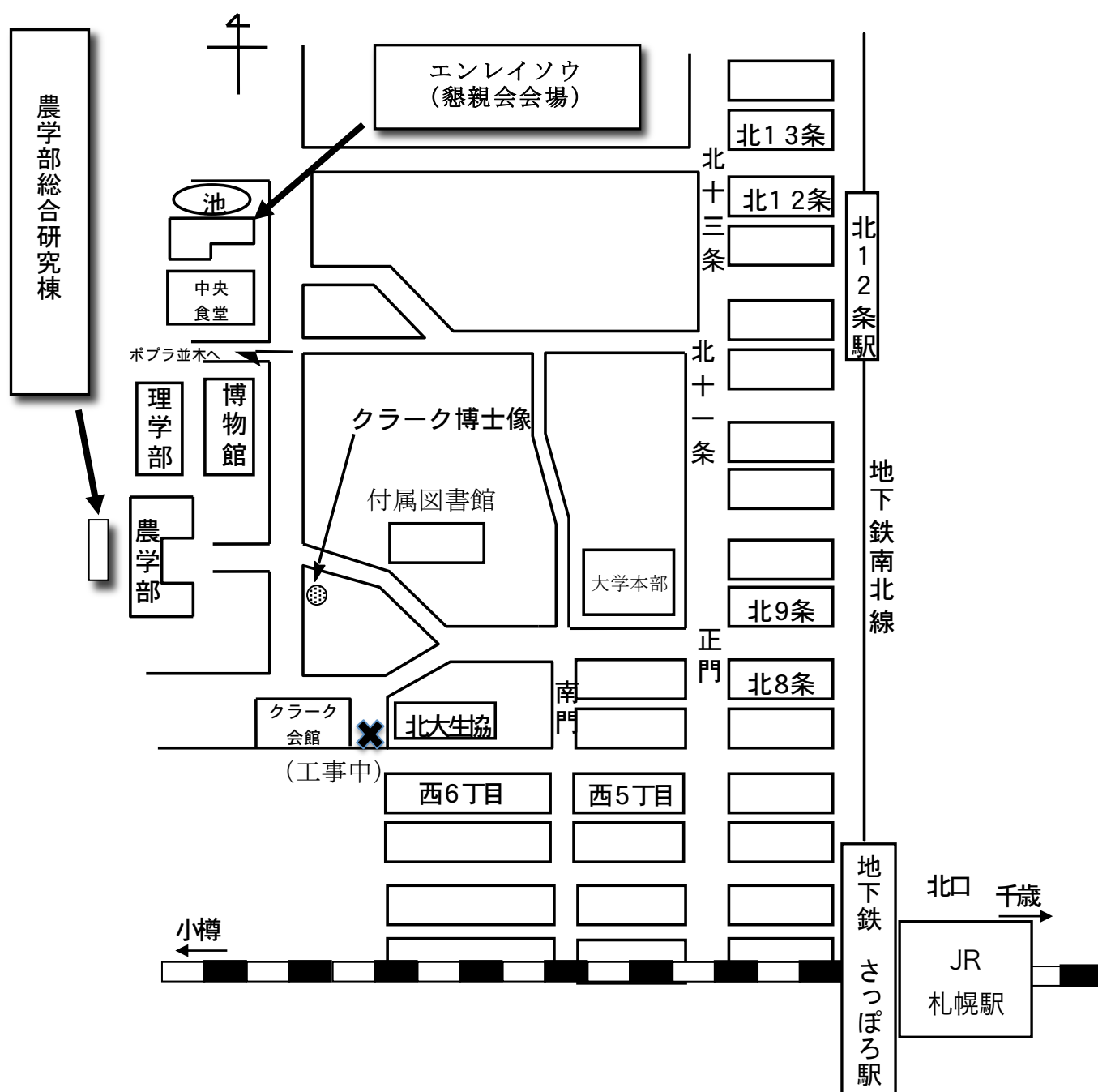
公益社団法人 日本農芸化学会 北海道支部

共催：公益社団法人 日本生物工学会 北日本支部

連絡先：北海道大学大学院農学研究院 和田 大（011-706-4185）

エンレイソウおよび北海道大学農学部総合研究棟へのアクセス

- ・JRもしくは地下鉄札幌駅到着後，JR札幌駅北口へお進み下さい。北海道大学農学部総合研究棟までは北口より，徒歩で約12分です。下記，位置図をご参照下さい。また，懇親会会場となります「エンレイソウ」は農学部より徒歩約10分です。農学部総合研究棟は農学部本館と2階の渡り廊下で接続しています。



平成 25 年度 公益社団法人日本農芸化学会北海道支部講演会

平成 25 年 11 月 29 日(金)～30 日(土)

於 北海道大学農学部総合研究棟1階 多目的室 W109 (札幌市)

11 月 29 日(金)

13:00 公益社団法人日本農芸化学会北海道支部 活動報告会
第 11 回公益社団法人 日本農芸化学会 北海道支部奨励賞・
学生会員奨励賞授賞式

13:30-14:30 特別講演 1 松井 博和 先生 (北海道大学名誉教授)
「遺伝子組換え技術の理解増進と青少年への普及啓発」
(平成 25 年度 文部科学大臣表彰科学技術賞(理解増進部門))
座長:原 博(北大院農)

14:45-16:15 一般講演 1 (1-6, 6 題)

16:15-16:30 休憩

16:30-17:30 一般講演 2 (7-10, 4 題)

18:00 懇親会(北海道大学ファカルティハウス「エンレイソウ」レストラン)

11 月 30 日(土)

9:30-10:30 受賞講演(講演時間:奨励賞 30 分, 学生奨励賞 20 分)

奨励賞 曾根 輝雄 氏(北海道大学大学院農学研究院 准教授)
「イネいもち病菌の病原性変異に関する分子遺伝学的研究」
座長:浅野 行蔵(北大院農)

学生会員奨励賞 Kyung-Mo Song 氏(北大院農学院)
「真菌類由来 α -グルコシダーゼの構造と機能に関する研究」
座長:木村 淳夫(北大院農)

学生会員奨励賞 岩谷 一史氏(北大院農学院)

「潰瘍性大腸炎の病態発症と進展に関する因子の研究」

(米国滞在中のため、受賞講演はありません)

10:40-11:20 特別講演 2 木村 淳夫先生(北海道大学大学院農学研究院 教授)

「糖質酵素の分子機構に関する研究」

(平成 25 年度 日本応用糖質科学会 学会賞)

座長:川端 潤(北大院農)

11:30-12:00 一般講演3(11-12, 2 題)

13:00-14:15 一般講演4(13-17, 5 題)

14:30-16:45 一般講演5(18-26, 9 題)

プレゼン用ファイルの受付:

11月29日(金)12:20より北海道大学農学部会場前にてプレゼン用ファイルを受け付けております。以下の時間までにお済ませになるようお願い致します。当日はWindows 7を使用致します。ご持参頂いたファイルを支部が用意いたしますノートパソコンにコピーをお願い致します。ここで、最終的な作動確認もお願い致します。

講演種別	プレゼンファイル受付締切時間
特別講演1	11月29日 12:50
一般講演1, 2	11月29日 14:30
授賞講演	11月30日 9:20
特別講演2	11月30日 10:30
一般講演3	11月30日 10:30
一般講演4	11月30日 12:30
一般講演5	11月30日 14:00

・一般講演について

一般講演の講演時間は討論、交代を含め15分です。標準講演時間は12分とします。

・懇親会について

11月29日(金)18時より、北海道大学ファカルティハウス「エンレイソウ」レストランにて行います。会費は一般会員:2,000円、学生会員:1,000円です。当日、講演会場受付、ならびに17:30より懇親会場にて受付致します。

平成25年度 公益社団法人日本農芸化学会北海道支部講演会
講演要旨目次

特別講演1

遺伝子組換え技術の理解増進と青少年への普及啓発

一文部科学大臣表彰科学技術賞(理解増進部門)を受賞して一

北海道大学名誉教授 松井 博和5

特別講演2

糖質酵素の分子機構に関する研究

(平成 25 年度 日本応用糖質学会学会賞 受賞課題)

北海道大学大学院農学研究院 木村 淳夫6

奨励賞, 学生会員奨励賞

奨励賞

イネいもち病菌の病原性変異に関する分子遺伝学的研究

北海道大学大学院農学研究院 曾根 輝雄7

学生会員奨励賞

Elucidation of structure-function relationship of fungal α -glucosidases

(真菌類由来 α -glucosidase の構造と機能に関する研究)

北海道大学大学院農学院 Song, Kyung-Mo9

潰瘍性大腸炎の病態発症と進展に関する因子の研究

北海道大学大学院農学院 岩谷 一史11

支部講演会 一般講演プログラム・要旨13

夏期シンポジウム ポスターセッションプログラム・要旨29

遺伝子組換え技術の理解増進と青少年への普及啓発

一文部科学大臣表彰科学技術賞(理解増進部門)を受賞して一

松井 博和

ブダペスト会議あるいはブダペスト宣言という言葉をごぞんじでしょうか。21世紀を前にして、1999年に国際連合教育科学文化機関(UNESCO)と国際科学会議(ICSU)の共催によりハンガリーの首都ブダペストで開催された世界科学会議あるいはその宣言のことです。様々な国際機関や各国団体の代表など、約2000人が集まりました。

ここで議論されたことの背景には次のことがあります。それまでの過去数十年において科学技術が著しく発展、その恩恵として私たち人間の生活は豊かになり、何よりも経済における大きな発展をもたらした。しかし、その一方で、地球温暖化などの環境問題という地球の未来に関わる大きな問題が生じたということです。そして、科学技術が生み出した負の側面をも解決する手段もやはり科学技術であり、そのためには科学界や産業界、政府、国民が同じ場に立つことが必要であることが認識され、次の4つが宣言されました。

1. 知識のための科学(進歩のための知識)
2. 平和のための科学
3. 開発のための科学
4. 社会における科学と社会のための科学

これを受けて、わが国では科学技術振興機構(JST)に社会技術研究開発センター(RISTEX)が創設され、また“科学技術基本計画”，とりわけ第3期のもの(2006～2010)では、「社会・国民に支持される科学技術」が特に強調され、①科学技術が及ぼす倫理的・法的・社会的課題への責任ある取組、②科学技術に関する説明責任と情報発信の強化、③科学技術に関する国民意識の醸成、④国民の科学技術への主体的な参加の促進が謳われました。

このような中で、全国初の北海道遺伝子組換え(GM)条例策定において、GM作物試験栽培の検討委員会の座長(2004年)、交雑等防止委員会の部会長(2005年)を務め、合意形成を得たこと、これらと並行して、遺伝子組換え作物を憂慮する人たちとの対話を重ねたこと、道庁が主催した地方自治体では初めてのコンセンサス会議を発議しサポートしたこと、さらにはJST-RISTEXの「21世紀科学技術リテラシー」の課題に「研究者の社会リテラシーと非専門家の科学リテラシーの向上」のプロジェクト代表として参加、同時に一般市民や道内の小中高校生への多数の講話や講演等の社会的活動が、今回の受賞につながりました。

2000年以降の北海道における食に関する諸問題からGM条例策定の経緯、双方向性コミュニケーションの重要性、遺伝子理解を得るための小中高生への講話講演内容等をこの機会に紹介させていただきます。東日本大震災における福島原発問題は、科学者や行政、政府に対する不信感をますます増幅させました。一般社会における科学技術のあり方を考える一助となれば幸いです。

糖質酵素の分子機構に関する研究

木村 淳夫

北海道大学大学院農学研究院

これまで約 35 年間にわたり糖質酵素の機能と構造の関係究明を目指し、研究を行ってきた。その対象は主にグリコシドヒドラーゼ・ファミリー(GHと略)13と31に属す α -グルコシダーゼである。最近では、デキストラナーゼなども対象に含め研究を行っている。以下に詳細を示す。

(1) GH31 酵素に関する研究:

植物 α -グルコシダーゼの生澱粉への吸着・分解: 植物や糸状菌の α -グルコシダーゼは GH31 に属する。基質認識における両酵素の大きな相違は、澱粉などの高分子基質に対する分解活性である。植物酵素は高分子基質に作用できるが、糸状菌酵素の作用は極めて微弱である。イネ種子 α -グルコシダーゼが澱粉粒(生澱粉)に吸着・分解することを初めて見出した。GH31 酵素は5ドメインを有するが、N 末ドメインのループ構造と C 末ドメインの芳香族アミノ酸が生澱粉吸着に貢献すると考えられた。植物酵素の C 末端ドメインを糸状菌酵素に移植することで、糸状菌酵素に生澱粉の吸着・分解能力を付与できた。種子の発芽過程における生澱粉分解は α -アミラーゼが鍵酵素とされていたが、 α -グルコシダーゼも単独で分解できることから重要な鍵酵素であることを提唱した。生理機能が不明であった植物 α -グルコシダーゼの分子多型に関しイネ酵素を用いて究明し、生澱粉分解に関与することを明らかにした。

細菌 α -1,3-グルコシダーゼの発見と解析: 細菌に初めて α -1,3-グルコシダーゼを見出した。 α -1,4 結合への作用が低く、 α -1,3 結合に高い特異性を示した。本酵素のグリコシターゼ転換に成功し、ニゲロシドを生産した。

(2) GH13 酵素に関する研究:

立体構造の解明: GH13 に属するデキストラン グルコシダーゼの立体構造を解明した。 α -1,6 グルコシド結合に作用を示す GH13 酵素において初めて基質-酵素複合体の立体構造の解明に成功し、本酵素が有する α -1,6 結合特異性や長鎖基質特異性を発揮させる構造因子を決定した。触媒ポケットの底に外部と繋がる「孔」を発見した。孔内部に3つの水分子が存在し、触媒水の供給に関与すると推定した。

ミツバチ酵素: 西洋ミツバチは、性質が異なる3つの α -グルコシダーゼ(HB1, HB2, HB3 と略)を有する。HB1 と HB2 は報告例の少ない単量体アロステリック酵素である。3酵素は異なる遺伝子にコードされるアイソザイムであった。局在部位の推定から生理機能が予想できた(HB1: 消化, HB2: 消化・血糖調整, HB3: 蜂蜜生成)。蜂蜜から単離した酵素は HB3 に該当した。東洋ミツバチにも HB1 と HB2 に相当する酵素が見出された。

(3) GH66 酵素に関する研究:

エンド型デキストラナーゼ: 細菌デキストラナーゼに関し、プロテアーゼ消化による多数のアイソフォーム形成が広く知られている。*Streptococcus mutans* の本酵素遺伝子が大腸菌で発現させると多くのアイソフォームが見られ、N 末と C 末領域で消化されていた。構築した N 末と C 末領域の削除体は、プロテアーゼ分解されない安定な酵素であり、産業利用に適すと判断された。さらに削除体が非削除体より極めて高い活性を示すことから、N 末と C 末領域での消化に関し「プロ酵素活性化」(例:トリプシノーゲン→トリプシン)を提唱した。本現象は、糖質酵素で初めて見出された機構である。結晶 X 線構造解析で立体構造を世界で初めて解明した。ケミカル・レスキュー反応で触媒残基の機能を決定した。

イネいもち病菌の病原性変異に関する分子遺伝学的研究

曾根 輝雄

北海道大学大学院農学研究院

いもち病は我々の主食作物であるイネにイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) が感染することによる最重要病害である。いもち病の防除は抗菌剤などの薬剤やいもち病抵抗性イネ品種の導入によって行われているが、これらの防除は常に薬剤耐性菌やイネの抵抗性を無力化する病原性突然変異株の出現のリスクを背負っている。我々は分子遺伝学的手法を用いていもち病菌の突然変異のメカニズムを解明しようと試みてきた。

まず最初に、日本産イネいもち病菌のDNAフィンガープリント解析を行った。日本では、イネいもち病菌はその宿主範囲によって「病原性レース」に分類されている。抵抗性遺伝子の異なるイネにそれぞれ感染実験を行い、その感染可能な抵抗性遺伝子の組合せが同じものが、同じ病原性レースということになる。異なる病原性レースを持ついもち病菌がそれぞれ異なる遺伝的バックグラウンドを持つのであれば、突然変異が起きているのではなく、病原レースの異なった集団が抵抗性品種の異なる品種に対応して感染していることになる。DNAフィンガープリント解析の結果、日本のいもち病菌はほぼ同じ遺伝的バックグラウンドを持つ一方で、核型に多型性があった。また、染色体長の変異が頻発することも見つけた。以上のことにより、イネいもち病菌は染色体再編成などの突然変異を蓄積した結果多様な病原性に分化したことを明らかにした(Sone et al., 1997a; 1997b)。

イネの抵抗性を無力化する病原性突然変異の原因遺伝子は、宿主特異性に関わるAVR(非病原性)遺伝子である。AVR遺伝子を持ついもち病菌株は、AVR遺伝子と対応するR(抵抗性)遺伝子をもつイネに感染できない、gene-for-gene関係が成り立つ。AVR遺伝子の突然変異様式を解明するためには、AVR遺伝子をクローニング・解析する必要があるが、AVR遺伝子のコードするタンパク質に関する情報が少なく、逆遺伝学的なアプローチでは不可能であり、遺伝学的にポジショナルクローニングを行うことが一般的であった。我々は日本産のイネいもち病菌からAVR遺伝子をクローニングするために、日本産菌株であるIna168と外国産菌株との交配に成功したが、染色体地図の作成には至らなかった(Fukiya et al., 2001)。その後、病原性突然変異株を使用した「mutant-aided cloning」法を開発し、Ina168株が持つAVR遺伝子、AVR-*Pia*のクローニングに日本産イネいもち病菌から初めて成功した(Miki et al., 2009)。AVR-*Pia*遺伝子は全長255bpで、85アミノ酸からなるタンパク質で、そのN末端の19アミノ酸は分泌シグナルとして機能することが予想された。

AVR-*Pia*はIna168の最も大きな染色体上に3コピー存在し、自然突然変異株Ina168m95-1ではその全てのコピーが欠失していることがわかった。AVR-*Pia*の周囲には*Occan* (Kito et al., 2003)などのトランスポゾン様反復配列が多数存在する。Ina168とIna168m95-1のAVR-*Pia*遺伝子の周辺配列を比較解析したところ、Ina168m95-1における3コピーのAVR-*Pia*遺伝子の欠失はその周囲に存在するトランスポゾン*Occan*間の相同組換えによって起こることを明らかにした(Sone et al., 2013)。

DNAの相同組換えは、DNAの二本鎖切断の修復時に起こる。相同組換えがイネいもち病菌の突然変異機構の一つならば、いもち病菌はDNAの二本鎖切断をいつ起こしているのだろうか。二本鎖切断を受けたDNAには原核生物のRecAに当たるRAD51タンパク質が凝集するため、蛍光標識をつけることで細胞中の二本鎖切断を可視化できる。我々は、いもち病菌のRAD51ホモログ、Rhm51タ

ンパクとEGFPとの融合タンパク質を作成し、いもち病菌体内のDNA二本鎖切断の定量に成功した。その結果、イネいもち病菌はその生活環を通してDNA二本鎖切断を被っていることが明らかとなった(Ndindeng et al., 2010)。さらにDNA組換えに関与する遺伝子 *Rhm52, 54* を単離し、これらの転写が酸化ストレスにより活性化することを明らかにしている(Elegado et al., 2006)。

いもち病菌における突然変異のその他の原因としてトランスポゾンなどの転移因子の挿入がある。我々は、SINE様因子(後にレトロトランスポゾンの一部であることが判明した)MGSR1 (Sone et al., 1993), DNAトランスポゾン *Occan* (Kito et al., 2003), レトロトランスポゾン *Inago1, Inago2* (Sanchez et al., 2011)を発見した。これらはゲノム中に50~100コピー存在し、これらは相同組換えの起点ともなり得る。

以上、これまでの研究で、イネいもち病菌が非常にダイナミックにその遺伝子を変化させていることがわかってきた。イネいもち病菌はゲノム中に多数の反復配列を散在させ、感染中に生じたDNAの二本鎖切断を修復する際に、反復配列間で相同組換えを起こしその遺伝子のバリエーションを増大させているらしい。イネいもち病菌は子のう菌であり、アカパンカビや出芽酵母と同じく有性生殖が可能であるが、圃場分離株ではその能力がほとんど失われている。それらは遺伝子のバリエーションを生み出す有性生殖を放棄して、上記の様な突然変異機構を発達させてきたのかも知れない。今後はこれら突然変異機構のいもち病菌における進化的な意義の解析などに加え、突然変異を抑制する技術の開発なども行っていく所存である。

本研究を始めるきっかけを与えて下さり、さらに多くのご指導を賜りました北海道大学名誉教授 富田房男先生、いつも温かく見守っていただき、本研究を発展させるチャンスを下さいました同教授 浅野行蔵先生、横田 篤先生、同准教授 和田 大先生に深く御礼申し上げます。さらに、本研究を共に進めて下さった 阿部 歩博士、吹谷 智先生(北海道大学)、鬼頭英樹博士(現東北農研)、三木慎介博士(現セントラル硝子)、尾瀬農之先生(北海道大学薬学研究院)、寺内良平博士(岩手生物工学研究センター)に深く感謝いたします。本研究は共にいもち病菌の研究に携わってくれた多くの学生諸君のたゆまぬ努力が無ければ不可能でした。またいつも難解な(?)ゼミや月報会におつきあいいただいている応用菌学、微生物新機能開発学研究室のメンバーにもここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- Elegado, E. et al., 2006. *J. Gen. Plant Pathol.* **72**, 16–19.
Fukiya, S. et al., 2002. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1464–1473.
Kito, H. et al., 2003. *Curr. Genet.* **42**, 322–331.
Miki, S. et al., 2009. *Mol. Plant. Pathol.* **10**, 361–374.
Ndindeng, S.A. et al., 2010. *J. Gen. Plant Pathol.* **76**, 377–381.
Sanchez, E. et al., 2011. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**, 239–242.
Sone, T. et al., 1997a. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 81–86.
Sone, T. et al., 1997b. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **63**, 155–163.
Sone, T. et al., 1993. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1228–1230.
Sone, T. et al., 2013. *FEMS Microbiol Lett.* **339**, 102–109.

Elucidation of structure–function relationship of fungal α -glucosidases

(真菌類由来 α -glucosidase の構造と機能に関する研究)

Song, Kyung–Mo

北海道大学大学院農学院

α -Glucosidase from *Podospira anserina* (PAG) and α -glucosidase from *Schwanniomyces occidentalis* (SOG) belong to Glycoside Hydrolase family 31 (GH 31). PAG revealed high regioselectivity for α -1,3- and α -1,4-glucosidic linkages in hydrolysis as well as transglycosylation, while SOG preferred α -1,4-glucosidic linkage in hydrolysis and generated α -1,4- and α -1,6-glucosidic linkages in transglycosylation. The mutational study elucidates the structural elements important for the recognition of α -1,6-glucosidic linkage and α -1,3-glucosidic linkage.

1. Purification and characterization of α -1,3-specific α -glucosidase from *Podospira anserina*

A filamentous fungus *P. anserina* was cultivated in liquid medium containing soluble starch as a carbon source. The culture supernatant contained high amount of glucose and glucobioses. The most abundant glucobiose was nigerose, which have α -1,3-glucosidic linkage. The nigerose concentration in culture supernatant increased along with α -glucosidase activity. The α -glucosidase was purified from culture supernatant of *P. anserina*. α -Glucosidase from *P. anserina* (PAG) was composed of two subunits and their N-terminal sequences were identical to internal sequences start from 19th and 499th amino acid residues of B2B450 in UniProtKB, which belongs to glycoside hydrolase family 31 (GH 31). The recombinant PAG including C-terminal His-tag was produced by *Pichia pastoris* expression system. Native and recombinant PAG revealed almost same properties. Both enzymes produced glucose and glucobioses from soluble starch. The kinetic study of recombinant PAG was performed with various substrates. PAG showed high substrate specificity for α -1,3- and α -1,4-glucosidic linkages. Among maltooligosaccharides (G2-G7), maltotriose (G3) was the best substrate. In addition, PAG revealed strong transglycosylation activity. When maltose and maltotriose was used as substrate, the transglycosylation ratio reached 98% and 94% at 10 mM each substrate.

2. The role of aromatic residue on $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1 for regioselectivity of GH 31 α -glucosidases

α -Glucosidase from *Schwanniomyces occidentalis* (SOG), belonging to GH31, displays α -1,4-specificity in hydrolysis and α -1,4- and α -1,6-specificity in transglycosylation. The residues of substrate binding site are highly conserved in GH31 α -glucosidases. However, a corresponding residue to Trp324 of SOG varies in GH31 enzymes, which have Trp or Tyr. PAG also have Tyr in this position. Therefore, Trp324 of SOG was substituted to Tyr (W324Y). The k_{cat}/K_m values of W324Y for maltose, kojibiose, nigerose, and isomaltose were 4, 13, 42, and 140 times lower than those for wild type enzyme, respectively. In transglycosylation, W324Y generated α -1,4- and α -1,2-glucosidic linkages and lost the ability of the formation of α -1,6-glucosidic linkage. That is, Trp324 is also critical for the recognition of α -1,6-glucosidic linkage in transglycosylation as well as hydrolysis. In addition, a

considerable amount of novel product was produced by W324Y. Mass spectrometry and NMR determined its structure as 2,4-di-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose. The maximum production yield of 2,4-di-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose was calculated as 16, 19, and 16% under 50, 100, and 200 mM of substrate concentration, respectively.

3. Elucidation of structural factors important for α -1,3-specificity of fungal α -glucosidases

SOG and PAG have different regioselectivity though their high similarity in amino acid sequence (35%). In order to alter SOG as an α -1,3-specific enzyme, SOG variants were produced by site-directed mutagenesis based on the primary structures of SOG and PAG and three dimensional structure of human maltase which belongs to GH31. The mutations were introduced into the residues on $\beta \rightarrow \alpha$ loop 1, $\beta \rightarrow \alpha$ loop 8, and N-loop. The kinetic parameters and transglycosylation reactions of mutants were investigated. Among the mutants, only a quadruple mutant displayed increase of α -1,3-specificity. The relative k_{cat}/K_m values of for maltose, nigerose, kojibiose, and isomaltose were 100, 31, 17, and 0.1%, respectively (wild type: 100, 3.4, 7.9, and 7.3%). In transglycosylation, the mutant produced a large amount of nigerose and a new product which was also detected from the reaction mixture of PAG. Consequently, the residues on N-loop, loop 1, and loop 8 are important for the α -1,3-specificity.

潰瘍性大腸炎の病態発症と進展に関する因子の研究

岩谷 一史

北海道大学大学院農学院

特定疾患に認定されている炎症性腸疾患（IBD）の潰瘍性大腸炎とクローン病は再燃と緩解を繰り返す発症原因不明の慢性腸疾患である。IBD と大腸がんリスクの関係性が指摘されており、IBD 症状の低減や予防は将来的な大腸がんリスクの減少につながると期待される。この発症機構を解明するために、数多くの実験動物モデルを用いて様々な病態発症に関連する因子の解析が行われている。比較的よく用いられる大腸炎の実験系として、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）を用いる方法が挙げられるが、この発症機構ですら解明されていないのが現状である。DSS 誘導性大腸炎の発症・悪化の機構解明を通して、潰瘍性大腸炎の発症及び進展に関する因子の一端を明らかにするとともに、食品を介した予防・治療の可能性を見出すために、大腸炎発症に関わる食餌因子について検証した。

(1) ラット系統間比較によるデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸炎感受性関連因子の解析

消化管の管腔内には食品成分以外にも腸内細菌の構成成分やその代謝産物等多様な物質が共存しており、これらが粘膜上皮層を超えて体内へ侵入することは炎症の引き金となることが推察される。本研究では、近交系ラットである WKAH および DA 系統に DSS 誘導性大腸炎を発症させるとその症状が系統間で著しく異なり、とくに DA 系統では極めて重篤な症状となる事を見出した。そこで、分離大腸粘膜組織を用い、管腔側から上皮細胞層を介した物質透過性について、蛍光物質をマーカーとして物質透過性を解析したところ、大腸粘膜組織の物質透過性が DA 系統では相対的に高いことを見出した。さらに、大腸粘膜でのバリア形成に関与するタイトジャンクションタンパク質の発現構成を検討したところ、クローデニン-4 発現とその局在が系統間で大きく異なることが明らかとなった。これらのことから、タイトジャンクションタンパク質構成の差異が消化管バリア機能を変動させ、結果として腸炎症状の程度に影響すると考えられた。

(2) 消化管ホルモン不活化酵素ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) が DSS 誘導性大腸炎症状に及ぼす影響の解析

腸炎症状の抑制に関わる消化管ホルモンがあることが知られているが、これらの消化管ホルモンを特異的に分解する酵素として DPPIV が知られている。実験的大腸炎における DPPIV の役割を明らかにするために、DPPIV 欠損ラットにおける DSS 誘導性大腸炎の症状を野生型のラットと比較した。その結果、DSS の投与濃度が比較的高い場合には、その腸炎病態の発症初期に DPPIV 欠損ラットでの症状の改善が見られたものの、症状の進行に伴い腸炎症状の差異は消失した。一方、DSS 投与濃度を減少させた場合には、試験期間全体にわたり DPPIV 欠損ラットにおいて腸炎症状の軽減が観察された。これらのことから、腸炎病態期の発症初期あるいは軽度の炎症誘導時には、DPPIV 活性の抑制が症状緩和に有効であることが示された。

(3) 軽度亜鉛欠乏下における DSS 腸炎の病態解析

環境的要因である食習慣，特に亜鉛摂取が潰瘍性大腸炎に及ぼす影響を検討した．亜鉛添加量を制限した食餌誘導性の軽度亜鉛欠乏モデルラットでは重度の亜鉛欠乏で観察されるような摂食量の低下や成長遅延などが見られない一方，血中亜鉛レベルは通常の 1/3 程度まで減少することを確認した．この軽度亜鉛欠乏状態で DSS を投与した場合には大腸炎症状が有意に悪化することを見出した．通常，動物細胞の培養系に用いられる培地成分として亜鉛は考慮されていない．したがって，通常の血清中亜鉛濃度と同程度となるように亜鉛を添加した培地で分離腸間膜免疫系細胞を培養したところ，炎症性サイトカインの一つである TNF α 及びその受容体である TNFR1 の発現がいずれも有意に増加することを見出した．TNFR1 は炎症の収束に関与することから，亜鉛が炎症症状の収束に寄与することが推察された．これらの結果は，亜鉛摂取不足により生じる血中亜鉛濃度の低下が免疫反応を攪乱し，結果として腸炎発症および悪化に関わる危険性を示唆している．

(4) 腸炎症状緩和を目的とした新規糖質の機能性評価

難消化性糖類は，主に下部消化管での生理作用が知られているが，その種類により異なる生理作用をもつ．そこで，新規に合成された鎖長の異なる α -1,6-グルコシド型糖鎖を持つ直鎖イソマルト糖が DSS 誘導性大腸炎の発症に及ぼす作用を検討した．その結果，直鎖イソマルト糖の重合度がその発症遅延に関与することが示され，その作用機序として大腸内での有機酸発酵とそれにより誘導される消化管ホルモン分泌を介する可能性が推察された．これらのことから，イソマルト糖の重合度が大腸内発酵や消化管ホルモン分泌に影響し得ること，また大腸炎予防のために効果的な難消化性糖を設計するためには，構成糖の重合度が重要であることが示唆された．

これらの研究から，内因性因子としては消化管バリア機能の向上に関わるタイトジャンクション関連タンパク質や DPPIV の制御，外因性因子としては食事を介した血中亜鉛濃度や大腸内発酵の制御により，大腸炎の発症及び増悪のリスクを低下させる可能性が示された．

一般講演プログラム 1 演題 15 分, 発表 12 分・討論 3 分 (演者交代含む)

11/29(金)

一般講演1

(座長:曾根輝雄)

14:45(1) *Corynebacterium glutamicum* のリンゴ酸-キノン酸化還元酵素は中枢代謝におけるストレス応答時の制御点として機能する

(北大院農) ○萩原 拓也, 澤田 和典, 和田 大, 横田 篤

15:00(2) 異種遺伝子発現への応用を目的としたビフィズス菌のプロモーターの評価

(北大院農) ○玉井 早紀, 阪中 幹祥, 平山 洋佑, 吹谷 智, 横田 篤

15:15(3) 腸内特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築

(北大院農) ○平等 清夏, 河口 礼佳, 阪中 幹祥, 平山 洋佑, 吹谷 智, 横田 篤

(座長:和田 大)

15:30(4) *Gluconobacter oxydans* が産生する 2 つのデキストラン合成酵素の同一性に関する解析

(北大院農) ○貞廣 樹里, 森 春英, 佐分利 亘, 奥山 正幸, 木村 淳夫

15:45(5) エルゴチオネインは *Streptomyces coelicolor* を酸化ストレスから守る

(北大院総化) ○中嶋 駿介, 佐藤 康治, 築島 謙太郎, 松井 智未, 大利 徹

16:00(6) 出芽酵母の MFS トランスポーターの機能解析

(¹室蘭工大, ²愛媛大・農) ○小山 弘幸¹, 島津 昌光¹, 関藤 孝之², 柿沼 喜己²

16:15-16:30 休憩

一般講演2

(座長:加藤英介)

16:30(7) バイオマスとしての花き類の利用

(室工大院工) ○舩澤 千尋, 佐藤 大輔, 安居 光國

16:45(8) ハマナスの芳香成分について

(東京農大生物産業・食香) ○熊谷 順, 妙田 貴生, 中澤 洋三, 相根 義昌, 藤森 嶺, 西澤 信, 戸枝 一喜

17:00(9) ハマナス花卉由来加水分解性タンニンによるアレルギー抑制効果

(北見工大¹, 九州産業大²) ○笹山 志穂¹, 高谷 祐介¹, 山田 茉未¹, 戸田 一也¹, 高橋 良輔¹, 山岸 喬¹, 高杉 美佳子², 新井 博文¹

17:15(10) 海藻由来 α -グルコシダーゼ阻害活性物質に関する研究

(北大院水) ○三浦 葉奈子, 栗原 秀幸, 高橋 是太郎

11/30(土)

一般講演3

(座長:重富顕吾)

11:30(11) Cloning and characterization of allene oxide cyclase, SmAOC, in *Selaginella moellendorffii*
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University) ○Putri Pratiwi, Tomohiro Takahashi,
Hideyuki Matsuura, Kosaku Takahashi

11:45(12) ヒメツリガネゴケにおける12-オキソファイトジエン酸還元酵素の機能解析
(北大院農) ○高橋 知寛, 松浦 英幸, 高橋 公咲

一般講演4

(座長:佐分利 亘)

13:00(13) 組換えシイタケによるラッカーゼの発現とウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*) からのラッカーゼ遺伝子の単離
(北見工大・バイオ環境化学) ○佐々木 優太, 鈴木 夕湖, 猪俣 希, 内藤 真良, 菅原 大希,
鈴木 直之, 佐藤 利次

13:15(14) 無施肥水田での *Oryza longistaminata* x *O. sativa* 交雑後代系統イネ生育とイネ根圏機能性微生物
群集遷移との関連性
(¹北大院農, ²岡大資源植物研) ○白 啓鈴¹, 前川 雅彦², 橋床 泰之¹

(座長:奥山正幸)

13:30(15) シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ様タンパク質の生化学的機能解析
(¹北大院農, ²北農研) ○谷口 沙希¹, 佐分利 亘¹, 松浦 英幸¹, 今井 亮三², 松井 博和¹,
森 春英¹

13:45(16) イネ胚乳 ADP-グルコースピロホスホリラーゼの酵素化学的諸性質
(北大院農) ○石塚 佐都子, 和久田 真司, 佐分利 亘, 今井 亮三, 森 春英

14:00(17) ペプチド系抗生物質フェガノマイシンの生合成に関与する新規ペプチドライゲース
(¹北大院工, ²福井県大生資, ³感染研) ○野池 基義¹, 雄谷 洸一¹, 佐々木 郁雄¹,
丸山 千登勢², 石川 淳³, 佐藤 康治¹, 濱野 吉十², 伊藤 肇¹, 大利 徹¹

14:15-14:30 休憩

一般講演5

(座長:吹谷 智)

14:30(18) インドールジテルペン生合成に関与するプレニル転移酵素 PaxC/D, AtmD の機能解析
(北大院工¹, 北大院理², 茨城大院農³) ○劉 成偉¹, 野池 基義¹, 南 篤志², 田上 紘一²,
戸嶋 浩明³, 及川 英秋², 大利 徹¹

14:45(19) *Cellvibrio vulgaris* NCIMB 8633 のマンナン代謝オペロンの機能解析
(北大院・農) ○田中佑果, 佐分利 亘, 森 春英

15:00(20) *Gluconobacter oxydans* 由来 dextran dextrinase の直鎖イソマルトメガロ糖の合成に関わる領域
(北大院農) ○熊谷 祐也, Weeranuch Lang, 貞廣 樹里, 奥山 正幸, 森 春英, 木村 淳夫

(座長:高橋公咲)

15:15(21) アミノ酸スクシンイミドエステルを用いた Friedel-Crafts アシル化反応
(北大院農) ○池本 悠, 橋床 泰之, 橋本 誠

15:30(22) 4-Hydroxybutanoate 鎖を応用した光延反応アシロキシドナーの開発検討
(北大院農) ○佐井 勇介, 重富 顕吾, 生方 信

15:45(23) 抗菌活性物質 aurachin 類およびそのアナログ化合物の合成研究
(産総研生物プロセス) ○榎本 賢, 北川 航, 安武 義晃, 清水 弘樹

(座長:清水英寿)

16:00(24) クローブ抽出物からのテストステロン 5α -リダクターゼ阻害物質の探索
(¹北大農, ²北大院農) ○上西 雄大¹, 加藤 英介², 川端 潤²

16:15(25) フィチン酸およびミオイノシトール摂取が高脂肪食摂取ラットの腸内細菌叢と血清サイトカインに及ぼす影響
(¹藤女子大人間生活, ²生活栄養学研究所) ○岡崎 由佳子¹, 片山 徹之²

16:30(26) ヒドロキシアミンの糖取り込み促進作用とその作用機構解析
(¹北大農, ²北大院農) ○木村 太郎², 加藤 英介^{1,2}, 町川 司², 木村 駿介², 片山 紳司¹, 川端 潤^{1,2}

1

Corynebacterium glutamicum のリンゴ酸-キノン酸化還元酵素は中枢代謝におけるストレス応答時の制御点として機能する

(北大院農) ○萩原 拓也, 澤田 和典, 和田 大, 横田 篤

背景) *Corynebacterium glutamicum* は工業的アミノ酸発酵生産に広く用いられており, 産業上重要な微生物である。当研究室では本菌のピルビン酸キナーゼ(PYK) 欠失変異が中枢代謝に与える影響を解析してきた。PYK 欠失株をグルタミン酸生産条件であるビオチン制限条件下で培養したところ, ホスホエノールピルビン酸の過剰な蓄積を避けるためにアナプレロティック経路の酵素活性が変化し, グルタミン酸生産量が野生株よりも 30%増加した¹⁾。本研究では, 生育により適した条件であるビオチン十分グルタミン酸非生産条件において, PYK 欠失変異が中枢代謝に与える影響を解析した。

方法・結果及び考察) *C. glutamicum* ATCC 13032 株の PYK 欠失株をビオチン十分条件下で培養を行った。PYK 欠失株では菌体形成量の増大および呼吸活性の低下が観察された。酵素活性測定の結果, リンゴ酸からオキサロ酢酸(OAA)への酸化と共役して電子を呼吸鎖へ伝達する, リンゴ酸-キノン酸化還元酵素(MQO)の活性低下が観察された。これは, アナプレロティック経路の酵素活性変化によって OAA 供給量が増加し, 過剰な OAA 生成を防止するため MQO の活性が低下したと推測された。一方で, ビオチン制限条件下では, MQO 活性に変化が見られなかった。これは, 過剰な OAA がグルタミン酸として系外に排出されたことで OAA ストレスが除去されるためと推測された。

(1) Sawada, K., et. al., (2010) *Metabolic Engineering*, 12, 401-407

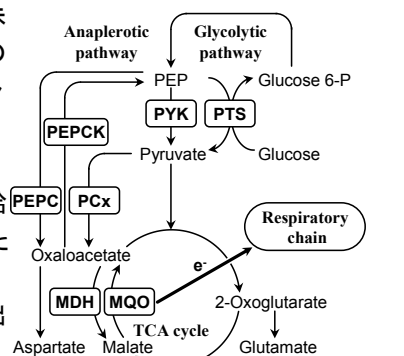


図. *C. glutamicum* の中枢代謝経路

2

異種遺伝子発現への応用を目的としたビフィズス菌のプロモーターの評価

(北大院農) ○玉井 早紀, 阪中 幹祥, 平山 洋佑, 吹谷 智, 横田 篤

【背景と目的】ビフィズス菌はヒトの健康に有用な腸内細菌であり, 安全性が高いことから, 異種遺伝子発現による医療への応用が期待されている。しかし, 異種遺伝子発現に使用されているビフィズス菌のプロモーターの種類は限られている。そこで本研究では, 異種遺伝子発現への応用を目的として, ビフィズス菌のレポーターアッセイ系を構築し, ビフィズス菌由来のプロモーターの活性を評価した。

【方法】α-ガラクトシダーゼ (α-Gal) をコードする *aga* の上流に, 以下の遺伝子プロモーターを連結した計 7 種類のベクターを作製した: (1)恒常発現型と考えられる解糖系の遺伝子 (*xfp*, キシルロース 5-リン酸/フルクトース 6-リン酸ホスホケトラーゼ; *gap*, グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素), (2)糖質により発現誘導されると考えられる糖質資化系の遺伝子 (*scrP*, スクロース加リン酸分解酵素; *cscBA*, スクロースパーミアーゼ・β-フラクトフラノシダーゼ; *fruEKFG*, フルクトース/キシロース ABC 輸送体)。これらのベクターを *Bifidobacterium longum* 105-A の *aga* 欠失株に導入し, プロモーター活性評価用の株を構築した。これらの 7 株を MRS 培地中の糖源を変化させた条件下で培養した。菌体破碎後の遠心上清を粗酵素とし, α-Gal の比活性を測定することで, プロモーターの活性を評価した。

【結果と考察】1%グルコース添加区では, (1)の 3 株に高い α-Gal 活性が見られた。一方, 同区での (2)の 4 株における α-Gal 活性は低かったが, 糖源を変えることで, 一部の株で α-Gal 活性が上昇した。特に, *fruEKFG* のプロモーターを導入した株は, 1%グルコース添加区での結果と比較して, 4%キシロース添加区で約 100 倍の α-Gal 活性を示した。このプロモーターは, 誘導型プロモーターとして使用できると考えられる。以上の結果から, これらのプロモーターと培地条件の組み合わせにより, 目的に応じた異種遺伝子の発現の調節が可能であると考えられる。

3

腸内特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築

(北大院農) ○平等 清夏, 河口 礼佳, 阪中 幹祥, 平山 洋佑, 吹谷 智, 横田 篤

【背景と目的】ビフィズス菌の健康有効効果の基盤となるビフィズス菌 - 宿主間の相互作用には, 宿主腸管内で特異的に発現するビフィズス菌遺伝子が関与していると考えられる. 本研究では, 部位特異的組換え酵素 Cre の発現の有無を指標として, 腸内特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索することを目的とした. Cre の発現は, Cre の標的配列である *loxP* に挟まれた薬剤耐性遺伝子が, Cre の作用でビフィズス菌染色体上から除去されることで確認できる.

【方法と結果】まず, *loxP* により挟まれたスペクチノマイシン耐性遺伝子(Sp^R)の断片(*loxP*- Sp^R -*loxP*)を持つベクターを *Bifidobacterium longum* 105-A に導入し, 染色体上に *loxP*- Sp^R -*loxP* が挿入された株を二重相同組換え法により取得した.

次に, Cre 発現ベクターの構築を行った. 実際の探索系では, プロモーターを欠損した Cre 遺伝子上流に *B. longum* 105-A のランダムなゲノム DNA 断片を挿入したライブラリーを作成し, 腸内特異的に発現する遺伝子のプロモーターを同定する. この系では, プロモーターを欠損した Cre 遺伝子を持つベクターを *loxP*- Sp^R -*loxP* 挿入株に導入しても, Cre が発現せず, Sp^R が除去されないことが前提条件として必要である. そこで, Cre の発現量を低下させるために, プロモーターを欠損した Cre 遺伝子のリボソーム結合部位とその隣接の配列を改変した 3 種類のベクターを作製した. これらを *loxP*- Sp^R -*loxP* 挿入株にそれぞれ導入したところ, 2 種類のベクターにおいて Cre の発現を大幅に抑えることに成功した. しかし, Cre の発現を完全に抑えることはできなかった. この原因は, Cre 遺伝子上流領域からの転写であると考えられた. この転写を阻止するために, 現在, Cre 遺伝子上流に転写ターミネーターを挿入することを試みている.

4

Gluconobacter oxydans が産生する 2 つのデキストラン合成酵素の同一性に関する解析

(北大院農) ○貞廣 樹里, 森 春英, 佐分利 亘, 奥山 正幸, 木村 淳夫

【研究背景】酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* ATCC 11894 は系引きビールの原因菌であり, 細胞外でマルトオリゴ糖から多糖デキストランを生成する. この反応を触媒する酵素としてデキストランデキシトナーゼ (DDase) は古くから研究されてきた. 培養液から精製される細胞外酵素と, 細胞のブタノール抽出液由来の細胞画分酵素がそれぞれ調製され, 異なる酵素とされてきた. 我々は, このうち, 細胞外 DDase について遺伝子単離や組換え酵素による機能解析を実施してきた. これにより細胞外 DDase は, 既報と異なり細胞画分酵素と類似した反応様式を示し, また一次配列上には一般的な N 末端分泌シグナルを持たないことが明らかになった. そこで, 本研究では両酵素が同一遺伝子産物であるか再検討を行った.

【方法・結果】*G. oxydans* ATCC 11894 の培養を既報 (細胞画分酵素調製用の培養法) に従って行い, 経時的にサンプリングして培養上清および細胞ブタノール抽出液を調製した. SDS-PAGE 解析の結果, 培養初期には細胞外酵素のみ見られ, 菌増殖がプラトーに達すると細胞画分酵素の顕著な蓄積が認められた. 両酵素とも試料中の主要タンパク質として確認され, SDS-PAGE および native-PAGE 解析において同じ移動度を示した. ゲルから切り出した両タンパク質試料をトリプシン消化後, MALDI-TOF MS 解析を行った. DDase はトリプシンでは比較的切れづらいが, 予想される質量 500-4000 Da のペプチド質量のうち, 約半数の質量が両酵素で同じように検出された. 以上から, 両酵素は同一遺伝子産物であると判断された. 細胞画分酵素は細胞表面にあることが示唆されており, 両酵素の局在性がどのような機構によるものか興味が持たれる.

5

エルゴチオネインは *Streptomyces coelicolor* を酸化ストレスから守る
(北大院総化) ○中嶋 駿介, 佐藤 康治, 築島 謙太郎, 松井 智未, 大利 徹

研究背景 微生物における新規代謝経路の発見は、新規物質生産法の開発や抗生物質の新規ターゲットとして役立つ。新規代謝経路の発見を目的に *S. coelicolor* ゲノム上の機能未知遺伝子クラスターの機能解析を行った。本株はグルタチオンを生産しないが、ゲノム上にはグルタチオン生合成に関わる g-glutamylcysteine (g-GC) ligase のオルソログ (SCO0910) が存在する。そこで本酵素の機能解明を目的に、クラスターを成す SCO0910-0913 遺伝子の解析を試みた。

方法・結果及び考察 SCO0910 の組換え酵素を用いて *in vitro* にて解析を行った結果、予想通り g-GC ligase 活性を検出できた。しかし、生成物である g-GC と組換え SCO0911, SCO0912, SCO0913 を反応させたが特異的な生成物は認められなかった。

しかしその当時、*Mycobacterium smegmatis* のエルゴチオネイン (ERG) 生合成遺伝子を同定した報告がなされた。比較検討により SCO0910-0913 遺伝子は ERG 生合成遺伝子のオルソログであると推定されたので、SCO0910 遺伝子の破壊を行った結果、ERG 生産能が消失したことから本クラスターが ERG 生合成に関与することを確認した。

放線菌や *Mycobacterium* 属細菌は、抗酸化物質としてグルタチオンではなく ERG とマイコチオール (MSH) を用いることが報告されている。そこで、*S. coelicolor* ではどちらがより重要であるか調べるため、MSH 欠損株も構築し各種酸化剤や抗生物質に対する感受性の差異を調べた。その結果 ERG 欠損株は多くの薬剤に感受性となり、特に過酸化水素において顕著であった。以上の結果から、*S. coelicolor* において抗酸化物質として ERG が重要であると示唆された。

6

出芽酵母の MFS トランスポーターの機能解析
(¹ 室蘭工大, ² 愛媛大・農) ○小山 弘幸¹, 島津 昌光¹, 関藤 孝之², 柿沼 喜己²

研究背景 我々のグループが明らかにした出芽酵母の塩基性アミノ酸輸送に関与するトランスポーターファミリー VBA (Vba1p ~ Vba5p) の相同性検索を行うと、MFS トランスポーターに属する Azr1p, Sge1p が近傍に見出される。Azr1p, Sge1p は Vba5p と同様に細胞膜に局在し、Azr1p はアゾール系化合物や Crystal Violet (CV) を、Sge1p は Benzopyrene をそれぞれ細胞外へ輸送すると報告されている。一方、VBA 系トランスポーターと類似する Azr1p, Sge1p が塩基性アミノ酸の輸送にも関与する可能性が考えられる。また、Azr1p と系統樹上で近傍に、未同定の MFS トランスポーター YJR124C が存在する。本研究では Azr1p, Sge1p, YJR124C がアミノ酸や薬剤輸送に関与するかどうか検討した。

方法 親株 BY4741 株と Azr1p 欠損株 (*azr1Δ*), Sge1p 欠損株 (*sge1Δ*) のアミノ酸輸送活性を、遠心法により比較した。各種酵母株の細胞懸濁液にアミノ酸を添加し、所定時間毎に遠心により細胞を沈渣した。分取した上清画分のアミノ酸含量をニンヒドリン法により測定し、各株におけるアミノ酸取り込み量を算出した。薬剤に対する *azr1Δ*, *sge1Δ* および *yjr124cΔ* の感受性については、各株の細胞増殖に対する種々の薬剤の影響をスポット法により調べた。

結果及び考察 野生株と Azr1p 欠損株, Sge1p 欠損株のアミノ酸輸送活性を調べたところ、His や Lys の取り込みに差異は見られなかった。一方、Sge1p 欠損株における Arg の取り込みでは野生株と比較して 2 割程度の減少が見られた。この結果から、Sge1p は Arg に対する輸送活性を有する可能性が示唆された。また、スポット法より Sge1p 欠損株の増殖が CV に阻害を受けたことから、Sge1p が CV を細胞外に排出する機能を有する可能性が示唆された。同じく、Miconazole が YJR124C 破壊株の増殖を特徴的に阻害したことから、YJR124C は Miconazole を液胞内に取り込む機能を有すると考えられた。

7

バイオマスとしての花き類の利用

(室工大院工) ○舩澤 千尋, 佐藤 大輔, 安居 光國

【研究背景】 近年, 環境問題を背景にバイオマス研究の重要度が増している. バイオマスとして食料と競合しない多種多様な植物が研究されており, 国内では稲わらが挙げられる. 本研究では稲わら同様, 花き産業の廃棄物である花の茎を材料とした. 花の茎は食料と競合しない植物であるが, これまでバイオマスとして注目されてこなかった. 国内生産量の 1~3 位を占める菊, カーネーション, そしてバラに物理的・生物学的前処理を行い, 稲わらと比較することでバイオマスとしての有用性を検証した. これらの研究により花の茎が稲わらより高濃度の還元糖保持や分解されやすい細胞壁の可能性など優れた特徴を持つことがわかった.

【方法】 試料は洗浄し, 2cm にカット後, (1)物理破碎処理①(Waring blender で脱イオン水と共に 3 分間破碎)後, ろ過した. さらに, 乾燥(105°C, 24 時間)させ, (2)ミルで 3 分間の物理破碎処理②を行った. 物理破碎処理を比較するため, (3)物理破碎①せず, 直接ミル②で微細化を行った.

【結果】 稲わらおよび花の茎の各試料は物理的破碎によって段階的に茎部に含有する還元糖が溶出され, 菊とカーネーションの茎からは稲わら同様の 500-600mg/DW[g]糖収率が見られた. しかしながら, バラから糖の溶出は少なかった. 2 回の破碎処理によって菊は 650 mg/DW[g]と稲わらよりも高濃度の糖を溶出した. 菊・カーネーションの細胞壁は稲わらよりも豊富な難分解性物質リグニンを保持しているため, 破碎なしでは還元糖の溶出は少なかったが, 破碎によって細胞壁の一部が破壊され, 内部の糖が溶出した可能性が考えられた. よって, 菊とカーネーションは稲わらと同等のバイオマスであることが示唆された. さらに, 菊は国内生産量が最も多く, 通年利用されているので新たなバイオマスとしての可能性を持つといえる.

8

ハマナスの芳香成分について

(東京農大生物産業・食香) ○熊谷 順, 妙田 貴生, 中澤 洋三, 相根 義昌, 藤森 嶺,
西澤 信, 戸枝 一喜

研究背景) ハマナス(*Rosa rugosa*) は, 日本原産のバラであり Japanese rose と呼ばれている. バラ類の芳香成分に関する研究報告は多くあるが, ハマナスについての報告は少ない. 本研究ではハマナスの開花に伴う芳香成分の推移ならびに, それら, 芳香成分の配糖体の推移について検討した. また, これまでの研究において, われわれは 2 種類の β -glucosidase 遺伝子の存在を見出した. そこで, これら遺伝子を大腸菌を宿主とした発現系で過剰発現させることを検討した.

方法・結果及び考察) ハマナス花冠を蕾から満開まで 6 段階に分けて採取し, 液体窒素に浸漬後-80°C で保存した. 実験時に花弁を分離し酵素活性の測定をした. 芳香成分の捕集には Dynamic-Head Space 法を用い, ハマナス生花より放出される芳香成分を Tenax-TA に吸着させて, GC-MS で分析をした. β -glucosidase 活性は, ハマナス花弁より調製した粗酵素に, 基質として *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside を用いて測定した. Dynamic-Head Space 法を用いた芳香成分の経時変動の結果より, 主要成分は phenylethyl alcohol, citronellol, geraniol, nerol, eugenol であった. 芳香成分は昼前後の満開時に最大となった後急激に低下した. その後夜中まで緩やかに減少した. これらの結果より, 開花段階によって放散量に変化することが明らかとなった. ハマナスの 2 種類の β -glucosidase 遺伝子のうち, ひとつが大腸菌を用いた発現系で可溶性発現し, β -glucosidase 活性を有していた. 現在, もう一方の β -glucosidase 遺伝子の活性型発現を検討中である.

9

ハマナス花弁由来加水分解性タンニンによるアレルギー抑制効果

(北見工大¹, 九州産業大²) ○笹山 志穂¹, 高谷 祐介¹, 山田 茉未¹, 戸田 一也¹, 高橋 良輔¹, 山岸 喬¹, 高杉 美佳子², 新井 博文¹

【研究背景】 ハマナス(*Rosa rugosa*)は北海道の海岸に多く自生しており, 花弁は主に茶や化粧品の原料などとして用いられている。本研究では, I 型アレルギーを引き起こすマスト細胞からのケミカルメディエーター(ヒスタミンおよびロイコトリエン)放出に対するハマナス花弁抽出物および花弁由来加水分解性タンニンの効果を *in vitro* で調べた。また, 作用機序についても検討した。

【方法】 北見産ハマナス花弁の水および 50%エタノール抽出物を調製した。ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 にハマナス抽出物または加水分解性タンニン(テリマグランジン I)を添加し, カルシウムイオノフォア(A23187)または IgE-抗原刺激により細胞から放出されるヒスタミンを HPLC/蛍光検出で定量した。また, マウス骨髓由来マスト細胞株(PB-3c)を同様に A23187 によって刺激し, 放出されるロイコトリエン(LT)B₄を HPLC/UV 検出で定量した。さらに, ウエスタンブロッティングにより細胞内シグナル伝達物質のリン酸化を解析した。

【結果及び考察】 ハマナス花弁抽出物はポリフェノールを多く含み, その主成分は加水分解性タンニンであるテリマグランジン I であった。ハマナス花弁抽出物およびテリマグランジン I は, A23187 および IgE-抗原刺激による RBL-2H3 細胞からのヒスタミン放出を濃度依存的に抑制した。また, テリマグランジン I は LTB₄ 放出を抑制した。さらにテリマグランジン I は, 細胞内シグナル伝達物質である Syk, Lyn, ERK, JNK のリン酸化を抑制した。以上の結果から, ハマナス花弁に含まれるテリマグランジン I は, シグナル伝達を抑制することによって抗アレルギー作用を発揮する可能性が示唆された。

10

海藻由来 α -グルコシダーゼ阻害活性物質に関する研究

(北大院水) ○三浦 葉奈子, 栗原 秀幸, 高橋 是太郎

【研究背景】 α -グルコシダーゼ は, α -グルコシド配糖体を加水分解する酵素である。微生物由来 α -グルコシダーゼの阻害剤は抗微生物活性, ウイルス由来 α -グルコシダーゼの阻害剤は HIV などに対する抗ウイルス活性を有する事が分かっている。また, 哺乳類では小腸由来 α -グルコシダーゼの阻害剤が血糖値上昇抑制効果を有しており, 糖尿病の治療薬に用いられている。本研究室では, 海洋生物由来の α -グルコシダーゼ阻害活性物質を探索する過程で, 紅藻や褐藻からはブロモフェノール類やフロロタンニン類の化合物を単離してきた。そこで本研究では, 2012 年に北海道沿岸で採取した緑藻からの α -グルコシダーゼ阻害活性物質の探索を行った。

【方法・結果及び考察】 2012 年 4 月に函館市で採取した緑藻ウスヒトエグサのメタノール抽出物を試料として, α -グルコシダーゼ阻害活性物質の精製を進めた。抽出物の溶媒分画後に最も高い阻害活性を示した *n*-ブタノール可溶画分に含まれる阻害活性物質の単離を試みた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し, クロロホルム-メタノールで溶出したところ, Fr.1, 3, 4 が高い阻害活性を示した。最も高い阻害活性を示した Fr.3 および 4 に含まれる阻害物質は, 機器分析の結果リゾホスファチジルコリン(LPC)と予想された。Fr.1 に含まれる阻害活性物質の精製・単離を進めたところ, 脂質であると推定され, 現在詳細な構造を検討中である。

[Background] *Selaginella moellendorffii*, a lycophyte, is the first non-seed vascular plant which its genome has been successfully sequenced. This lycophyte represents as a resource for further analysis in the early evolution of developmental and metabolic processes, such as jasmonic acid (JA), in vascular plant. In octadecanoid pathway, allene oxide cyclase (AOC) is a key enzyme to catalyze the cyclization of an unstable allene oxide to produce 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), a biosynthetic precursor of JA. In this study, we investigate the presence of AOC in *S. moellendorffii* and its characteristics in comparison to higher plants.

[Results] The AOC gene was cloned from *S. moellendorffii*. The ORF sequence of *SmAOC* consists of 738 bp which encodes a protein of 245 amino acids with a molecular mass of 26 kDa. The result suggests that *SmAOC* is located in the chloroplast and is actively involved in octadecanoid pathway to produce OPDA, which is similar to those in the higher plants. Under wounding treatment conditions, *SmAOC* was up-regulated and the amount was started to accumulate after 2 hours of treatment. Moreover, the qualitative of JA-related compound analysis after wound-induced treatment was monitored by UPLC/MS-MS. The result showed that OPDA, OPC-8 and JA were dramatically increased in wounded-*S. moellendorffii*. Furthermore, characterization analysis of another putative key homologous genes involved in octadecanoid pathway in this lycophyte will be important to elucidate the evolution of JA during the time of evolution.

研究背景 オクタデカノイド経路はジャスモン酸の生合成経路であり, 12-オキソファイトジエン酸(OPDA)などのオキシリピンの生産に関与している。高等植物において, オクタデカノイド経路に関わる主要な酵素であるアレンオキシドシンターゼ(AOS), アレンオキシドシクラーゼ(AOC)および12-オキソファイトジエン酸還元酵素(OPR)が明らかにされている。また, OPRは, 非天然型のOPDAを還元するグループIと天然型のOPDAも還元できるグループIIに分類される。一方, 蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)においては, すでにAOSとAOCをコードする遺伝子がクローニングされ, それらの組換えタンパク質の酵素活性は高等植物と同様であることが示されている。しかし, OPRに関する研究報告はこれまでなされていない。そこで, ヒメツリガネゴケのOPR遺伝子をクローニングし, その機能を解析することを目的として研究を行った。

方法および結果 ヒメツリガネゴケのゲノムデータベースから, 7種類のOPR遺伝子(*PpOPR1*~*PpOPR7*)の存在が示唆された。系統解析の結果, *PpOPR3*, *PpOPR6*および*PpOPR7*がグループIIに分類されることが推測された。そこで, *PpOPR3*および*PpOPR6*をクローニングし, 組換えタンパク質をそれぞれ作製した。それらを用いて酵素活性を確認した結果, *PpOPR3*および*PpOPR6*は共にグループIIのOPR活性を持つことが確認された。さらに, 植物体内での機能も確認するため, *PpOPR3*と*PpOPR6*の過剰発現変異株をそれぞれ作製した。OPDAの内生量を測定した結果, 変異株のOPDA量が野生株よりも減少していることが確認された。また, OPDA添加培地において, 野生株よりも変異株の生育が阻害されることも確認された。

13

組換えシイタケによるラッカーゼの発現とウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*) からのラッカーゼ遺伝子の単離

(北見工大・バイオ環境化学) 佐々木 優太, 鈴木 夕湖, 猪俣 希, 内藤 真良, 菅原 大希, 鈴木 直之, 佐藤 利次

研究背景) 担子菌や植物は、環境汚染物質の無害化など産業上有用な酵素であるラッカーゼ(Lcc)を有している。当研究室では、シイタケ解糖系の *gpd* 遺伝子プロモータによるシイタケ外来遺伝子発現ベクター pChG を構築して、その有用性に関して解析してきた。一方、塗料として利用されるウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*) の樹液には、樹液の硬化に必要な Lcc が存在し、その至適 pH は担子菌由来 Lcc より中性に近いことが報告されている。したがって、環境汚染物質の無害化などには、担子菌類の Lcc よりもウルシ Lcc が適していると考えられる。しかし、ウルシ樹液は大量調製が困難であり、かつ、高価なため、塗料としての特殊な利用に限られている。本研究では、pChG ベクターによる外来遺伝子高発現系の確立を目的としたシイタケラッカーゼ遺伝子(*lcc1*)の高発現に関して、ウルシ Lcc のシイタケによる異種発現を目的としたウルシラッカーゼ遺伝子(*Rvlcc*)の単離について報告する。

方法・結果) *gpd* プロモータによるシイタケ *lcc1* 遺伝子発現ベクター-pChG-cL1s 導入シイタケの Lcc 発現を確認したところ、宿主株に比べ約2倍高い Lcc 活性と、培養後期での活性の維持が確認できた。また、RT-PCR により導入ベクターからの転写が確認できた。一方、網走うるしの会が維持している漆林内で採取したウルシの葉から、*Rvlcc* の単離を試みた。採取した漆の葉からトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。次に、既知の木本植物の *lcc* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列情報をもとに縮重プライマーをデザインし、PCR を行った。その結果、*Rvlcc* 断片と推定される 412bp の断片が得られた。現在、この情報や既知の漆 *lcc* 情報をもとに、*Rvlcc* 遺伝子配列の決定を行っている。

14

無施肥水田での *Oryza longistaminata* × *O. sativa* 交雑後代系統イネ生育とイネ根圏機能性微生物群集遷移との関連性

(¹ 北大院農, ² 岡大資源植物研) 〇白 啓鈴¹, 前川 雅彦², 橋床 泰之¹

研究背景) 本研究は、岡山大学植物資源科学研究所で 20 年以上無施肥管理し、10 年以上収穫物地上部の持ち出しを継続している実験水田でアフリカ原産の *Oryza longistaminata* と *O. sativa* subsp. *japonica* (しおか) を交雑させ世代を重ねた交雑後代系統イネについて、その栄養獲得能力と根圏微生物の関連の追跡を目的としている。このイネは、施肥水田で栽培したものと比較して遜色ないコメ収量が維持されることから、実験圃場微生物との栄養獲得共生を仮説に立て、本研究を開始した。

方法・結果及び考察) 実験水田でのイネ根圏微生物群集の菌相変化を追跡するため、*O. longistaminata* × *O. sativa* 交雑後代種について、対照とした農林 18 号と交雑後代系統イネの母系品種、台中 65 号とともに、それぞれ苗移植後 1 週間(7月上旬)、幼穂形成期(8月中旬)、ならびに登熟期(9月下旬)に土壌と根面細菌の採取を行った。イネ根は直ちに 1 mL TE buffer が入ったファルコンチューブ中、スパティールで潰し、その液中分散物をエッペンドルフチューブに集め、DNA 抽出キット Isoplant II で DNA 菌相解析を目的とした DNA 抽出を行った。また土壌 DNA は Isoil® で抽出した。

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)分析で得られた主要な DNA バンドの塩基配列を読み、それぞれの微生物群集の主要なものを同定した。施肥水田と無施肥水田では出穂期から根の微生物群集に大きな違いが認められ、この根周辺での微生物遷移に窒素固定細菌をはじめとした宿主植物の栄養獲得、交雑後代系統イネの栄養獲得に寄与する根面／根内微生物が、20 年無施肥水田での交雑後代系統イネの高い収穫量を維持できる原因の一部と推察される。微生物の同定と分離に現在取りかかっており、分離できた機能性候補細菌は交雑後代系統イネを用いた接種試験を行う予定である。

15

シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ様タンパク質の生化学的機能解析

(¹北大院農, ²北農研) ○谷口 沙希¹, 佐分利 亘¹, 松浦 英幸¹, 今井 亮三², 松井 博和¹, 森 春英¹

研究背景) β -グルコシダーゼ (BGLU) は各種 β -グルコシドの加水分解を触媒する酵素であり, β -フコシド, β -ガラクトシド等に作用するものもある. その多くは Glycoside Hydrolase family 1 に分類される. 本酵素間の基質特異性は多様であり, 植物では細胞壁の代謝, 防御物質や植物ホルモンの脱配糖化を担い, 様々な生理機能の調節に関与すると考えられている. しかし, 植物のゲノム中で BGLU 遺伝子は大きな遺伝子ファミリーを形成するが, その中で機能が解明されたものはごく一部である. そこで, 本研究では, シロイヌナズナの BGLU の中で, イネにおけるサリチル酸およびツベロン酸の配糖体 (SAG および TAG) 加水分解酵素のホモログ, BGLU12, BGLU13, BGLU15, BGLU16 および BGLU17 の機能解析を行った.

方法・結果及び考察) 各遺伝子の cDNA を pET32a に導入し, 大腸菌 Origami (DE3) を用いて N 末端にチオレドキシンタグおよび His タグを融合した組換えタンパク質を生産した. 可溶性タンパク質として生産された組換え BGLU13, BGLU15 および BGLU16 を電気泳動的に単一に精製した. 精製酵素の 1 mM p -ニトロフェニル β -グルコシド (p NPG) に対する比活性は, BGLU13 が 6.19 U/mg, BGLU15 が 8.06 U/mg であったのに対し, BGLU16 は 0.118 U/mg と低値を示した. BGLU13, BGLU15 および BGLU16 はいずれも SAG や TAG をほとんど加水分解せず, ソホロース, ラミナリビオース, セロビオース, p NPG, p NP フコシド, o NPG に加水分解活性を示した. これらの中ではラミナリビオースに対して最も高い k_{cat}/K_m 値を示した. 以上から BGLU13, BGLU15 および BGLU16 は SAG や TAG といった配糖体ではなく, 細胞壁に存在する β -1,3 グルカンの代謝に関与することが示唆された.

16

イネ胚乳 ADP-グルコースピロホスホリラーゼの酵素化学的諸性質

(北大院農) ○石塚 佐都子, 和久田 真司, 佐分利 亘, 今井 亮三, 森 春英

研究背景) ADP-グルコースピロホスホリラーゼ (AGPase; EC 2.7.7.27) は α -グルコース 1-リン酸と ATP を基質とし, デンプン合成における唯一のグルコース供与体 ADP-グルコース (ADPG) の生成を触媒する酵素である. 植物 AGPase は異なる 2 種のサブユニット 2 つずつから成るヘテロ四量体である. また 3-ホスホグリセリン酸 (3PGA) で活性化され, 無機リン酸 (Pi) で阻害を受けるアロステリック酵素である. しかし穀物胚乳 AGPase は由来する植物種によってアロステリック特性が異なる. オオムギやコムギ由来酵素はアロステリック因子に対する感受性をほぼ示さないのに対し, トウモロコシやイネ由来酵素の感受性は高い. しかしイネに関しては胚乳の抽出液を用いた実験しかされておらず詳細が不明であるため, 本研究ではイネ胚乳 AGPase の組換え酵素を用いて諸性質の解析を行った.

方法・結果及び考察) イネ胚乳 AGPase を構成する 2 種の遺伝子 (*OsApL3*, *OsApS2A*) のコドンで大腸菌での生産に最適化し, 大腸菌の AGPase 遺伝子欠損株でこれらの遺伝子を共発現させた. 2 段階のカラムクロマトグラフィーによりホモ四量体を除き, ヘテロ四量体を精製した. ADPG 分解活性に基づき検討した至適 pH は 7.5 であり, 至適温度は 40°C であった. 本酵素は pH 5.0–8.5, 30°C 以下で安定であった. 3PGA と Pi の影響を調べると, 最大速度の 1/2 を与える 3PGA 濃度 $A_{0.5}$ は 2.02 mM, Pi 非存在時の速度の 1/2 を与える Pi 濃度 $I_{0.5}$ は 0.16 mM であり, 本酵素はアロステリック因子に感受性を示す AGPase ($A_{0.5}$ が 0.2 mM 以下) より 3PGA に対する親和性が低いことが明らかになった. また 1 mM Pi 存在下の $A_{0.5}$ が 26.2 mM だったのに対して, $I_{0.5}$ は共存する 3PGA 濃度によらず 0.16 mM だった. このことから, 本酵素は 3PGA による活性化よりも Pi による阻害の影響をより強く受けていると考えられた.

17 ペプチド系抗生物質フェガノマイシンの生合成に関与する新規ペプチドライゲース (¹ 北大院・工, ² 福井県大・生資, ³ 感染研) ○野池 基義¹, 雄谷 洸一¹, 佐々木 郁雄¹, 丸山 千登勢², 石川 淳³, 佐藤 康治¹, 濱野 吉十², 伊藤 肇¹, 大利 徹¹

研究背景) ペプチド系抗生物質フェガノマイシン (PM) は非タンパク性のフェニルグリシン誘導体を含み, かつ C-末アミノ酸配列に多様性 (NVKDGP と NVKDR) がある. PM は非タンパク性のアミノ酸を含むことから, NRPS により生合成されると推定されるが, 一般に NRPS の A-ドメインの基質認識は厳密であり, C-末の多様性を説明できない. 本観点から PM の生合成に興味を持ち解析を行った.

方法・結果及び考察) PM 生産菌のドラフトゲノム解析を行い, 推定生合成遺伝子クラスターを見出した. 本クラスターには 7 つのアミノ酸を活性化できる巨大 NRPS は存在せず, 各々 A-, T-, C-ドメインを 1 つずつ有する 3 つの小さな NRPS が存在するのみであった. また, C-末の 2 種類の配列を含む 38 アミノ酸からなる ORF も存在した. 以上の結果から, NRPS の A-ドメインで活性化されたフェニルグリシン誘導体が T-ドメインへロードされた後, C-ドメインでリボソーム由来のペプチドと縮合すると予想した. しかし組換え酵素を用いたアデニレーション活性試験では特異的活性を検出できなかった. そこで NRPS 欠失株を構築した結果, PM 生産性を維持していたことから, 本 NRPS は PM の生合成に関与しないことが判明した. そこで, クラスター内にフェニルグリシン誘導体とペプチドを縮合させる酵素遺伝子を探索した. ペプチド系抗生物質の生合成では, 基質は ATP で活性化される場合が多いことから ATP 結合モチーフを持つ酵素を探索した結果, 機能未知の候補遺伝子を見出した. 組換え酵素を調製し, ATP 存在下でフェニルグリシン誘導体と NVKDGP および NVKDR を反応させた結果, 何れもペプチド結合した生成物が得られた. これまでペプチドを求核剤とするライゲースの報告は無く本酵素が初めての例である.

18 インドールジテルペン生合成に関与するプレニル転移酵素 PaxC/D, AtmD の機能解析 (北大院工¹, 北大院理², 茨城大院農³) ○劉 成偉¹, 野池 基義¹, 南 篤志², 田上 紘一², 戸嶋 浩明³, 及川 英秋², 大利 徹¹

研究背景) Paxilline は代表的なインドールジテルペンである. 最近我々は, *Aspergillus oryzae* を用いた異種発現により paxilline 生合成に必須な 6 つの遺伝子とそれら個々の機能を明らかにした(1). しかし, 初発反応を触媒し geranylgeranyl indole (GGI) を生成する PaxC の真の基質や, クラスターに存在し, プレニル転移酵素と相同性を有する paxD の機能など不明な点も多い. また *Aspergillus flavus* が生産する paxilline 類縁体である aflatrem の生合成遺伝子クラスターに存在し, プレニル転移酵素と相同性を有する atmD 遺伝子の機能も不明である. そこで, 組換え PaxC, PaxD および AtmD と種々のインドールジテルペン関連化合物を基質に用い詳細な解析を行った.

方法・結果及び考察) (1) PaxC は, indole-3-glycerol phosphate (IGP) と indole に GGDP を転移し, GGI の生成を触媒することが分かった. 両基質を用いて速度定数を求めた結果, IGP が真の基質であると推定された. さらに, PaxC は farnesyl diphosphate (FDP) を IGP および Indole に付加し farnesyl indole (FI) を生成する活性も有していた.

(2) PaxD, AtmD とともに Paxilline に DMAPP を転移する活性を有していたが, 導入されたプレニル基の数や位置が異なっていた. さらに両酵素は paxilline 生合成中間体である paspaline や FI も基質としたが, 導入されたプレニル基の数, 位置, regular/reverse 選択性が変わることが解った(2, 3).

References: (1) Tagami K et al. *J Am Chem Soc*, 135, 1260 (2013). (2) Liu C et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press (2013). doi: 10.1007/s00253-013-4834-9. (3) Liu C et al. *Appl Environ Microbiol*, in press (2013).

doi:10.1128/AEM.02496-13

19

Cellvibrio vulgaris NCIMB 8633 のマンナン代謝オペロンの機能解析

(北大院・農) ○田中 佑果, 佐分利 亘, 森 春英

研究背景) *C. vulgaris* NCIMB 8633 は, α -ガラクトシダーゼ (Aga27A), β -マンノシダーゼ (Man5A), マンノース異性化酵素 (EpiA), および機能未知タンパク質 (UnkA) をコードする遺伝子からなる遺伝子クラスターを持つ。EpiA は, 組換え酵素を用いてマンノースをグルコースに異性化する反応が確認されているが, *Ruminococcus albus* NE1 および *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 由来セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) とそれぞれ 33%および 39%の配列同一性を示す。また, UnkA は *R. albus* や *B. fragilis* 由来マンノシルグルコースホスホリラーゼ (MGP) とそれぞれ 56%および 66%の配列同一性を示す。これらより, EpiA と UnkA はそれぞれ, *R. albus* や *B. fragilis* に見られたようにマンノビオースの異性化と生成するマンノシルグルコース (MG) の加リン酸分解を触媒すると推測された。そこで, 本研究では EpiA と UnkA の組換え酵素を用いて, 酵素機能を解析した。

方法・結果及び考察) 大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて組換え EpiA と UnkA を各々生産し, 電気泳動的に単一になるまで精製した。EpiA は, 既報の CE と同様にセロビオース, ラクトース, およびマンノビオースに対して高い異性化活性を示した。活性が最も高かったマンノビオースに対する k_{cat}/K_m は, マンノースに対する値の 1000 倍高値であった。このことから, マンノースではなく, マンノビオースが EpiA の真の基質であると考えられた。また, UnkA は MGP 活性を示し, 逆反応では α -マンノース 1-リン酸を供与体, グルコースのみを受容体とした。これより, UnkA は MG に特異的な MGP であると判断された。以上のことから, *C. vulgaris* においても, *R. albus* や *B. fragilis* と同様に, マンノビオースを CE と MGP により異性化・加リン酸分解して代謝すると考えられた。

20

Gluconobacter oxydans 由来 dextran dextrinase の直鎖イソマルトメガロ糖の合成に関わる領域

(北大院農) ○熊谷 祐也, Weeranuch Lang, 貞廣 樹里, 奥山 正幸, 森 春英, 木村 淳夫

研究背景) 直鎖イソマルトメガロ糖 (L-IMO) は α -1,6-グルコシド結合から成る重合度が 10 から多糖までの糖質であり, フラボノイド配糖体のバイオアベイラビリティ亢進に寄与するデータが得られている。*Gluconobacter oxydans* 由来菌体外 dextran dextrinase (DDase) は, 糖転移活性によりマルトオリゴ糖から α -1,6-結合から成る多糖デキストランを合成するが, DDase の C 末端削除体 (Δ 382C) は野生型酵素 (WT) と比較して効率的に L-IMO を合成できることが明らかとなった。ここでは C 末端側に存在する L-IMO の生産に関わる領域について検討した。

方法・結果及び考察) DDase (WT および各 C 末端削除体) は大腸菌を宿主として生産し, Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。L-IMO はマルトヘキサオース/マルトヘプタオース (G6G7) を基質として DDase により作製し, 残存する α -1,4-結合はブタ膵臓由来 α -アミラーゼにより除去した。L-IMO はアルコール沈殿法にて調製し, その生成量はフェノール硫酸法により定量した。WT および Δ 382C で L-IMO を作製したところ, G6G7 に対してそれぞれ 21%および 41% (w/w) の割合であった。C 末端の削除した部分は 2 つの領域 (B および C) から成る。B および C 領域を大きく削った削除体それぞれ Δ 364C および Δ 255C では L-IMO をそれぞれ 43%および 22%の割合で生成した。このことから L-IMO の合成には DDase の C 末端側にある B 領域が寄与していると推測された。本研究は, 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行われた。

21 アミノ酸スクシンイミドエステルを用いた 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 スクシンイミド(Su)エステルは、優れた脱離基としての性能を持ちながら、安定性も有しており、単離が可能であることから、ペプチド固相合成に汎用されている。本研究では α -アミノ酸の不斉を利用した Friedel-Crafts アシル化反応(F-C 反応)による α -アミノケテンの合成に対し、Su エステルが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。

方法・結果及び考察 TFA 付きの Su エステルを合成した。ここに AlCl_3 を加え、ベンゼン溶媒中、70°C の条件下で F-C 反応を行った。反応中におけるラセミ化が懸念されることから、イソロイシンを用いて種々反応条件の検討を行った。イソロイシンは分子内に立体中心を 2 つ持ち、 α -位の立体が反転するとジアステレオマーが生じることから、 $^1\text{H-NMR}$ によるラセミ化の確認が可能になると考えられる。 α -位の立体異性体(L 体と D-*allo* 体, D 体と L-*allo* 体)同士では、 $^1\text{H-NMR}$ でケミカルシフトに明確な差が見られた。さらに F-C 反応後のスペクトルを比較した結果、 α -位の立体は保持されており、ラセミ化は起こらないことが明らかとなった。TFA-Phe-OSu とベンゼンとの F-C 反応においては、分子間反応と同時に側鎖ベンゼン環との分子内環化反応^[1]が確認され、生成物の収率はそれぞれ 27%, 52% だった。この生成比率は、反応温度および AlCl_3 等量の変化には影響されなかった。また、芳香族化合物の代わりに CH_2Cl_2 を溶媒として用いたところ、分子内環化反応のみを起こすことが可能となった。一方で芳香族化合物のアシルアクセプター性の検討では、アニソールを用いた場合には分子間反応のみが起こり、分子内環化反応が抑えられた。現在は、TFA-Tyr-OSu の F-C 反応について検討中である。

[1] Alan R. Katritzky, *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 4993-5000

22 4-Hydroxybutanoate 鎖を応用した光延反応アシロキシドナーの開発検討 (北大院農) ○佐井 勇介, 重富 顕吾, 生方 信

研究背景 Tuliposide は D-glucose に 4-hydroxymethylenebutanoate 鎖が接続した化合物として、チューリップの葯から抽出される主要な二次代謝産物である。当研究室に於いて tuliposide B の側鎖が中性溶液中で速やかにラクトン化する現象が確認された。我々はこの側鎖構造の脆弱性を応用して今までにない有機合成ツールの開発を検討することとした。その一つに、光延反応の酸成分が挙げられる。光延反応は 2 級水酸基の立体反転反応として有用な反応である一方、脱アシル化の際に塩基性条件が必要であるため、塩基性条件に弱い基質に対して反応の適用は難しいという欠点を持つ。ここで、脱アシル化の工程を中性条件で行うことができれば、その欠点を克服できる。本研究では中性条件で脱離する新しいアシロキシドナーの構造最適化を検討し、光延反応への応用を目指し研究を行った。

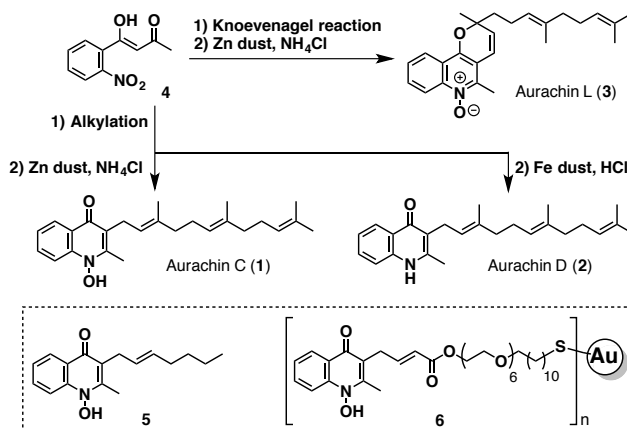
方法と結果 初めに tuliposide A 側鎖の 4-hydroxy-2-methylenebutanoate と tuliposide B 側鎖の 3,4-dihydroxy-2-methylenebutanoate を合成した。化合物を pH 5.0, 6.0, 7.0 バッファー中 30°C, 600 rpm で恒温振盪しながら経過時間毎に溶液を一部採取し、ラクトン化速度を分析・評価した。B 側鎖では中性条件下で速やかな環化が観測される一方、A 側鎖に顕著な環化は認められなかった。そこで、環化に関係する構造を詳しく調べるため 4-hydroxybutanoate 類縁体を合成し、同様に評価した。評価した候補から、今回 tuliposide B 側鎖を選び実用化への検討を行った。隣接する 2 つの水酸基を 2,2-propanediol により保護し、対応するカルボン酸へと変換した。合成した化合物をアシロキシドナーとして用い、入手が容易な光学活性をもつ第二級アルコールとの光延反応を試みた。

23

抗菌活性物質 aurachin 類およびそのアナログ化合物の合成研究
(産総研生物プロセス) ○榎本 賢, 北川 航, 安武 義晃, 清水 弘樹

研究背景) aurachin C (1), D (2) および L (3) は Höfle らにより単離・構造決定されたキノリンアルカロイドである。1 および 2 はキノロン部位がメナキノン等の電子伝達物質のミミックとして作用することで抗菌活性を示すと考えられていることから、キノロン部位を有するアナログ化合物でも抗菌活性を示すと予想された。そこで、1, 2 および 3 の全合成とともに、構造単純化と活性増強を目指してキノロン部位を有するアナログ化合物を合成して活性試験を行うことにした。

方法・結果及び考察) 既知物質 4 をアルキル化後に亜鉛粉末で還元することにより 1 を、鉄粉末で還元することにより 2 を全合成することに成功した。一方 3 は、Knoevenagel 反応と亜鉛粉末による還元で全合成を達成した。確立した合成経路を基に、側鎖を単純化した 1 のアナログ (5) を合成した。また、キノロン部位を金ナノ粒子上に担持しクラスター化することで活性が増強されることを期待して、6 を調製し抗菌活性試験を行ったので、その結果を会場にて報告する。

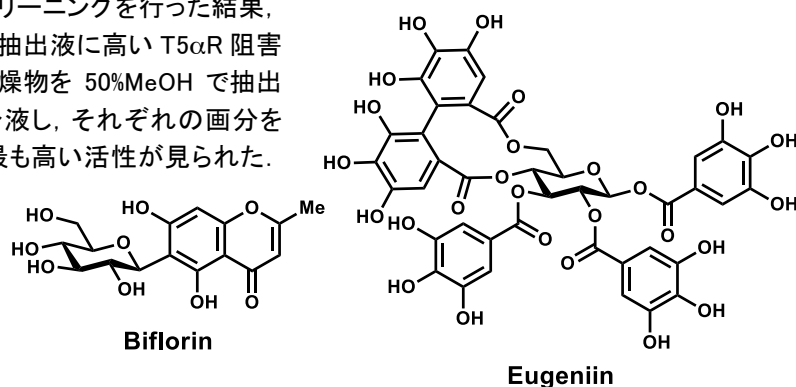


24

クローブ抽出物からのテストステロン 5 α -リダクターゼ阻害物質の探索
(¹北大農, ²北大院農) ○上西 雄大¹, 加藤 英介², 川端 潤²

研究背景) 男性型脱毛症 (Androgenetic Alopecia; AGA) の原因の一つにテストステロンがテストステロン 5 α -リダクターゼ (T5 α R) によって還元されて生成するジヒドロテストステロン (DHT) がある。頭皮で蓄積した DHT は皮脂線から皮脂の分泌の亢進, 毛乳頭から毛髪の成長を停止するシグナルを誘発する。従って T5 α R の阻害は、脱毛を遅らせ AGA の治療に効果的である。我々は、普段の食事から手軽に摂取できる天然の植物から T5 α R 阻害物質を探索することを目的として研究を行っている。

方法・結果) 各種植物抽出液のスクリーニングを行った結果、クローブ (*Syzygium aromaticum*) の抽出液に高い T5 α R 阻害活性を見出した。クローブのつぼみ乾燥物を 50%MeOH で抽出したものをヘキサン、酢酸エチルで分液し、それぞれの画分を阻害活性試験に供したところ水層に最も高い活性が見られた。続いて水層を各種力ラムクロマトグラフィーにより分離することで活性物質として eugeniin と biflorin の二つの単体化合物を単離した。



25 フィチン酸およびミオイノシトール摂取が高脂肪食摂取ラットの腸内細菌叢と血清サイトカインに及ぼす影響

(¹ 藤女子大人間生活, ² 生活栄養学研究所) ○岡崎 由佳子¹, 片山 徹之²

研究背景) フィチン酸はミオイノシトールの六リン酸化物で、穀類、豆類、油糧種子類等の主要植物性食品に1~3%含まれている。我々は、フィチン酸の摂取がラットの盲腸有機酸含量や Mucin(腸管バリア機能の指標)を増加させ、腸内環境を改善させる可能性を示してきた。一方、高脂肪食の摂取により腸内細菌叢の *Firmicutes/Bacteroidetes* 比および炎症性サイトカインが高まることが報告されており、大腸疾病との関連が指摘されている。本研究では、フィチン酸が高脂肪食摂取ラットの腸内細菌叢および炎症性サイトカインに及ぼす影響について、ミオイノシトールの影響と併せて検討を加えた。

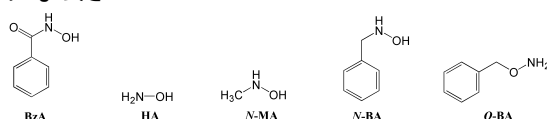
方法及び結果) 実験動物として4週齢のSD系雄ラットを用いた。高脂肪食(30%牛脂)を基本食とし、2.04%フィチン酸ナトリウムならびに等モルの0.4%ミオイノシトールを添加した飼料を与え、3週間飼育した。糞中の *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門は qPCR 法で、血清 IL-6 と TNF- α は ELISA 法を用いて分析した。また、糞中 β -Glucuronidase と β -Glucosidase 活性および血清 Ca, Zn 量を分光光度法により測定した。その結果、糞中 *Firmicutes* 門はフィチン酸添加食群で低下傾向を示し、*Bacteroidetes* 門はフィチン酸摂取により有意に増加した。*Firmicutes/Bacteroidetes* 比は、フィチン酸添加食群において有意に低下することが認められた。一方、ミオイノシトール添加食による腸内細菌叢への影響は認められなかった。血清 IL-6 はフィチン酸摂取により有意に低下し、TNF- α はフィチン酸およびミオイノシトール添加群において有意に低下した。糞中 β -Glucosidase 活性は、フィチン酸摂取により有意に増加した。体内 Ca と Zn 量のフィチン酸摂取による影響は、血清に関しては認められなかった。

26 ヒドロキシアミンの糖取り込み促進作用とその作用機構解析

(¹ 北大農, ² 北大院農) ○木村 太郎², 加藤 英介^{1,2}, 町川 司², 木村 駿介², 片山 紳司¹, 川端潤^{1,2}

背景・目的) 糖尿病は世界的に問題となっている疾病であり、患者数が年々増加している。骨格筋細胞は人の体において体内の50%を占める主要な細胞であり、食後の糖代謝に重要な役目を担っている。さらに、II型糖尿病患者において、骨格筋細胞の代謝が大きく低下することが報告されている。我々の知る限り、筋細胞の糖代謝を直接改善するように働く薬剤はインスリンとチアゾリジンジオンのみである。骨格筋細胞に対して糖取り込み促進作用を示す化合物を調べる過程で、我々はヒドロキシアミンが活性を示すことを見つけた。そこで、本研究ではヒドロキシアミンに関連する化合物の糖取り込み試験を行い、作用機構解析を行った。

方法・結果) マウス骨格筋由来の C2C12 細胞を分化させて各種試験を行った。ヒドロキシアミン関連化合物の糖取り込み促進作用を測定したところ、ベンゾヒドロキサム酸(BzA)、N-メチルヒドロキシアミン(N-MA)、N-ベンジルヒドロキシアミン(N-BA)、O-ベンジルヒドロキシアミン(O-BA)に顕著な活性は見られず、ヒドロキシアミン(HA)のみに強い活性が見られた。PI3K 阻害剤を用いた糖取り込み試験により、ヒドロキシアミンは PI3K シグナル経路に関わることがわかった。また、ウエスタンブロッティング解析の結果、PI3K の上流と下流の因子である IRS1 と Akt がヒドロキシアミンにより活性化されたことから、ヒドロキシアミンはインスリンシグナル経路を活性化することが明らかになった。



公益社団法人日本農芸化学会北海道支部 平成 25 年度夏期シンポジウム

(平成 25 年 8 月 1 0 日 旭川市国際会議場にて開催)

ポスターセッション要旨

1. Studies on Antitrypanosomal Activity of Myanmar Medicinal Plants
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Khine Swe Nyunt, Ahmed Elkhateeb, Yusuke Tosa, Kensuke Nabeta, Ken Katakura, Hideyuki Matsuura
2. マレーシア泥炭土壌から分離した真菌の化学ストレス応答二次代謝産物の検索
(北大農, 院農) ○横田 基, Sharon Y.L Lau, Wang Mengcen, 橋床 泰之
3. Isolation and investigation of active N₂O emitters from boreal sphagnum moss peat
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Yanxia Nie, Yasuyuki Hashidoko
4. Distinct metabolites for photoreactive L-phenylalanine derivatives in *Klebsiella* sp. CK6 isolated from rhizosphere of a wild dipterocarp sapling
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Lei Wang, Wataru Hisano, Yuta Murai, Yasuko Sakihama, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto
5. ウシ鼻粘膜由来 odorant-binding protein のクローニングとリガンド結合特性の解析
(帯畜大院畜産衛生) ○福田 健二, 鈴木 匠, 浦島 匡
6. Growth promoting compound produced by *Sphingomonas* sp. (GF9) for vigorous growth of *Catellibacterium nectarophilum* strain AST4^T
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, Shinya Mitsuhashi, Kengo Shigetomi, Yoichi Kamagata and Makoto Ubukata
7. イネの ABC トランスポーター RCN1/OsABCG5 の点突然変異体は塩耐性が低下する
(¹帯広畜産大, ²北大院農) ○長澤 秀高¹, 松田 修一¹, 山城 信広¹, 高野 翔¹, 渡部 敏裕²・谷 昌幸¹・得字 圭彦¹・高牟礼 逸朗²・加藤 清明¹
8. イネの SNF2 ファミリータンパク質の機能解析
(¹帯広畜産大, ²北大院農) ○北沢 英之¹, 高野 翔¹, 松田 修一¹, 得字 圭彦¹, 高牟礼 逸朗², 加藤 清明¹
9. シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ様タンパク質の生化学的機能解析
(¹北大院農, ²北農研) ○谷口 沙希¹, 佐分利 亘¹, 松浦 英幸¹, 今井 亮三², 松井 博和¹, 森 春英¹
10. Evaluation of isolation and culture procedure for sodium periodate-induced peritoneal elicited cells as a model system of functional analysis in primary macrophages
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Ga-Hyun Joe, Midori Andoh, Hidehisa Shimizu, Hiroshi Hara, Satoshi Ishizuka
11. 組換えコリネ型細菌によるポリ乳酸様ポリマー生産の増強
(北大院工) ○飛谷 康太, 笹森 哲弥, 松本 謙一郎, 田口 精一
12. 抗菌スペクトルを改変した抗菌ペプチド「アピデシン」特殊変異体の創成とその抗菌活性
(北大院工, ¹東理大基礎工) ○山崎 蔵亨, 岩村 雄太, 松本 謙一郎, 橋本 茂樹¹, 大井 俊彦, 田口 精一

13. コリネ菌の細胞表層提示技術を用いたデンプンからの乳酸様ポリマーの生産
(¹北大工, ²CREST-JST, ³神戸大・工大院) ○門屋 亨介 ^{1,2}, Yuyang Song¹, 飛谷 康太¹, 松本 謙一郎¹, 田中 勉³, 近藤 昭彦³, 田口 精一^{1,2}
14. *Abrus precatorius* に含まれる α -アミラーゼ阻害物質の探索
(北大院農) ○米本 龍太, Maria D.P.T Gunawan-Puteri, 加藤 英介, 川端 潤
15. *Cis*-(+)-12-オキソファイトジエン酸(OPDA)の立体選択的合成法の開発
(北大院農) ○梶原 章志, 阿部 達也, 橋本 貴裕, 松浦 英幸, 高橋 公咲

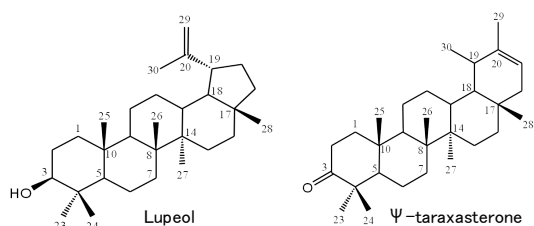
1

Studies on Antitrypanosomal Activity of Myanmar Medicinal Plants

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) OKhine Swe Nyunt, Ahmed ELKHATEEB, Yusuke TOSA, Kensuke NABETA, Ken KATAKURA, Hideyuki MATSUURA

研究背景) *Trypanosoma evansi* is an animal-pathogenic flagellated parasite and extensively distributed geographically, having a wide range of mammalian hosts and causing the trypanosomiasis condition known as surra. Natural products are important sources of chemotherapeutic agents in antitrypanosomal drug development. Aim of this study is to find trypanocidal compounds from Myanmar Medicinal plants according to the bio-activity guided fractionation using culture of *T. evansi*.

方法・結果及び考察) *Phyllanthus simplex* (Family-Euphorbiaceae) is locally used in the treatment of jaundice, liver disease, fever, dysentery and fresh leaves are used to cure itching in children. EtOH extract of *P. simplex* showed the activity against *T. evansi* with $IC_{50} = 96.1 \mu\text{g/mL}$. In this study lupeol (1, 5.5 mg) and Ψ -taraxasterone (2, 1.1 mg) were isolated as antitrypanocidal compounds from the EtOAc and *n*-Hexane fractions derived from *P. simplex* (427.5 g). The compounds were tested *in vitro* for their antitrypanosomal activity. The IC_{50} value of antitrypanocidal effect of lupeol (1) and (2) exhibited $99.8 \mu\text{g/mL}$ and $115.7 \mu\text{g/mL}$, respectively.



Considering the potentially fatal-side effects of trypanocidal drugs, it seems that the two isolated compounds are promising new candidates for the treatment of *T. evansi* infection.

2

マレーシア泥炭土壌から分離した真菌の化学ストレス応答二次代謝産物の検索

(北大農, 院農) ○横田 基, Sharon Y.L Lau, Wang Mengcen, 橋床 泰之

研究背景) 本研究室では、イネ苗立枯細菌病菌が産生する毒素トロポロンに耐性を示す微生物の検索に、トロポロンよりも安価に入手できるカテコールを化学ストレス剤として用いたスクリーニング系で、20mM カテコールに耐性を示す *Trichoderma virens* PS1-7 株が 0.5~2.0mM カテコールに対して濃度依存的にカロタン型セスキテルペンを培地中に蓄積することを見出している。¹⁾ このような真菌の化学ストレス応答性二次代謝産物誘導生成の生態化学的意味合いを明らかにするため、*Trichoderma* を含めた腐生性真菌をポリフェノールリッチな土壌であるマレーシア熱帯泥炭土壌から分離し、それぞれの化学ストレス誘導性二次代謝産物の産生能力の検証とその化合物同定を試みた。

方法・結果及び考察) 2012 年 12 月にマレーシア サラワク州 シブ市近郊のオイルパームプランテーション (6 年生) の泥炭土壌表土および朽木より、カテコール耐性を指標として真菌計 20 株を分離し、それらをカテコール 0.5mM 添加 200ml PD で 35°C・10 日間振盪培養した。培養液の EtOAc 転溶部について TLC 上でカテコール無添加区と比較し、カテコールストレスで生成する代謝産物の有無を調べた結果、5 つの菌株において化学ストレス誘導性代謝産物の生成が認められた。これらを同定するために 10 倍スケール培養により代謝産物を調製し、カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。これに並行して菌株同定を試みた。そのうちの一株は *Trichoderma* 属真菌と同定し、その代謝産物は NMR および FD-MS 解析によりアシルグリセロール誘導体であると推定した。現在、構成アシル基の解析を試みると共に、これらの化合物が軽微な化学ストレスで菌体外へ放出される意味を調べている。

1) Wang M., Hashimoto M., and Hashidoko Y., *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (6), 1906-1914.

3

Isolation and investigation of active N₂O emitters from boreal sphagnum moss peat
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Yanxia Nie, Yasuyuki Hashidoko

Background) Boreal sphagnum moss peat is a carbon pool, and often an active source of greenhouse gas, particularly emission of CH₄ and N₂O. The objective of our study is to search for major N₂O emitters from boreal sphagnum moss and its secondary metabolites affecting N₂O production.

Methods) For N₂O emission assay, 1 mM NH₄NO₃ was added as the substrate for N₂O production to Winogradsky's mineral solution gelled with 3 g L⁻¹ gellan gum (10 ml, pH 5.0) in gas-chromatographic vials. An aliquot (100 ml) of the boreal peat soil suspension (mg soil ml⁻¹ MilliQ water) or plant tissues of sphagnum moss (10 mg f.w.) were inoculated to the medium. After incubation at 15° C for 7 days, N₂O gas in each headspace was monitored using an ECD-gas-chromatography. Cultured media that produced significant amounts of N₂O were spread on PDA plate to search for N₂O emitable microorganisms.

Results and discussion) Three strains of bacteria (*Burkholderia* sp. PO-0402-34, *B. phenazinium* BPH-12, *B. sordidicola* BJC15-B21) were identified as active N₂O emitters. Among them, *B. sordidicola* BJC15-B21 isolated from the culture inoculated with sphagnum moss (*Sphagnum fuscum*) showed the most active N₂O emission. All the N₂O emitters produced N₂O more actively from NH₄NO₃ than KNO₃ or NH₄Cl. Addition of sucrose dose-dependently enhanced N₂O production of *B. sordidicola* BJC15-B21, although it did not show any exponential increases unlike N₂O emitters from tropical peat soil. N₂O production also increased along with the temperature increment in a range from 4° C to 30° C, while addition of sphagnum moss insolubles accelerated N₂O production dose-dependently.

4

Distinct metabolites for photoreactive L-phenylalanine derivatives in *Klebsiella* sp. CK6 isolated from rhizosphere of a wild dipterocarp sapling
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Lei Wang, Wataru Hisano, Yuta Murai, Yasuko Sakihama, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto

研究背景) Photoaffinity labeling (PAL) has emerged as a useful method to study the interaction between ligands and biomolecules. Aryl azide, benzophenone and trifluoromethyldiazirine, three major photophores, were well studied for their chemical properties, while no reports focus on the metabolic investigation. Rhizobacterium, *Klebsiella* sp. CK6, is able to grow in a low-nitrogen environment with L-tryptophan and generates indol-3-acetic acid (IAA), tryptophol (TOL) and indole-3-lactic acid (ILA), but the metabolic properties for phenylalanine were not investigated. In this study, photoreactive phenylalanine derivatives inoculated in this bacterium was examined for their metabolic properties.

方法・結果及び考察) L-Phenylalanine and its photoreactive derivatives were added to *Klebsiella* sp. CK6 and incubated at 28 °C for one week in the nitrogen-limiting condition. Removal of the moss by centrifugation, the pH of resulting supernatant was adjusted to 2.5 by 1N HCl. After extraction with EtOAc, dried over MgSO₄ and concentration, resulting crude extracts were subjected to silica gel column chromatography to purify the metabolites. For L-phenylalanine, phenyllactic acid (PLA) and phenylacetic acid (PAA) were the major metabolites, while PAA derivative was the sole metabolite from 4-azide-L-phenylalanine. For 4-benzoyl-L-phenylalanine, both PAA and phenylethanol (PE) derivative were obtained. As for 4-[(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]- and 4-nitro-L-phenylalanines, the metabolites are corresponding PLA derivatives. In conclusion, electron -donating and -withdrawing properties at 4-position affect the metabolism of aromatic α-amino acids to give different metabolites.

5

ウシ鼻粘膜由来 odorant-binding protein のクローニングとリガンド結合特性の解析
(帯畜大院畜産衛生) ○福田 健二, 鈴木 匠, 浦島 匡

研究背景) ウシ鼻粘膜には匂い物質を結合するタンパク質 odorant-binding protein (bOBP) が豊富に存在し、余剰の匂い物質を除去すると考えられている。一方、乳をはじめとするウシ体液中には bOBP と相同性を示す bcOBP が微量存在するが、そのリガンド結合特性や生理機能は明らかとなっていない。本研究の目的は、bcOBP の対照となる bOBP をクローニングし、組換え体 bOBP のリガンド結合特性を明らかにすることである。

方法・結果及び考察) bOBP のアミノ酸配列を基にプライマーを作製し、overlapping PCR 法により cDNA を合成した。発現ベクターに pET28a を用い、N 末端に His₆-tag を導入したコンストラクトを作製した。大腸菌 *E. coli* BL21 Star(DE3)pLysS を宿主とし、1 mM IPTG 添加により 37°C で一晚発現誘導を行なった。Ni²⁺-sepharose カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよび Toyopearl HW-55F カラムを用いたゲルろ過により、菌体破碎液から組換え体 bOBP を電気泳動的に単一に精製した。培養液 1 L から 12 mg の組換え体 bOBP を得た。蛍光基質 1-aminoanthracene (1-AMA) および組換え体 bOBP の蛍光スペクトルにおいて、蛍光基質の取り込みに伴って生じる特徴的なブルーシフトおよび蛍光強度の増減を観察した。従って、組換え体 bOBP がリガンド結合能を有することを確認した。また、1-AMA に対する解離定数 (K_d) は $0.12 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ($n=3$) と見積もられた。1-AMA を蛍光プローブとして用いた競合的結合阻害実験により、組換え体 bOBP は脂肪酸、テルペン類、シクロペンタン誘導体、アルデヒド類、芳香族化合物、複素環式化合物などに対し幅広い結合性を示すことを確認した。

6

Growth promoting compound produced by *Sphingomonas* sp. (GF9) for vigorous growth of *Catellibacterium nectarophilum* strain AST4^T

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.) ○Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, Shinya Mitsuhashi, Kengo Shigetomi, Yoichi Kamagata and Makoto Ubukata

Background: *Catellibacterium nectarophilum*, designated AST4^T, is a gram negative, ovoid to rod-shaped and white to beige colour uncultured bacterium. This bacterium did not show significant growth on nutrient broth (NPB), but growth was clearly stimulated by addition of supernatant from *Sphingomonas* sp. (GF9). We have tried to identify these unknown growth factor(s) which promote the growth of AST4^T in artificial cultures.

Methods: After harvesting 66 liter of GF9 jar fermentor culture, the broth was centrifuged and filtered to make supernatants. Supernatants were extracted using 1:3 ratio with n-Butanol (3 times). The aqueous phase was evaporated and the resulting samples were extracted using MeOH. The MeOH soluble phase was evaporated and subjected to HP20, LH20, SPE and finally HPLC for further purification. After collection of active fraction through HPLC, the active fraction was subjected to NMR, MS for structure elucidation.

Results and discussion: The HPLC fraction added in NPB media showed strong growth-promoting activities for AST4^T, similar to the results with the culture supernatants. The bioassay results showed that the active HPLC fraction contained growth promoting compound which promotes the growth of AST4^T. The active fraction amounts are very small and showed growth activities at concentrations less than 10 ng/ml.

7

イネの ABC トランスポーター RCN1/OsABCG5 の点突然変異体は塩耐性が低下する

(1. 帯広畜産大, 2 北大院農) ○長澤 秀高¹, 松田 修一¹, 山城 信広¹, 高野 翔¹,
渡部 敏裕²・谷 昌幸¹・得字 圭彦¹・高牟礼 逸朗²・加藤 清明¹

研究背景) ABC (ATP - binding cassette) トランスポーターファミリーは、物質輸送の駆動力として、アデノシン三リン酸 (ATP) を用いるタイプのトランスポーターで、植物ではヒトをはじめとする動物と比較して 2 倍以上の 120 前後の分子種が知られている。イネ (*Oryza sativa* L.) の 121 分子種は、8 サブファミリーに類別され、その中で最も多くの分子種から構成されるハーフサイズの G サブファミリーの機能は未解明である。我々は、G サブファミリーの OsABCG5 の点突然変異体をマップベースクロニング法で特定し、*reduced culm number1* (*rcn1*) 変異体として報告した (Yasuno et al., 2009)。*rcn1* 変異体では、分げつ伸長だけでなく、根や開花を含め、植物体の発達の多くの段階に影響を及ぼす (Yasuno et al., 2009; Ariyaratna et al., 2011; Ureshi et al., 2012)。一方で、*RCN1/OsABCG5* は、アブシジン酸 (ABA) に発現誘導されることから (Matsuda et al., 2012)、*rcn1* 変異体では ABA シグナリングを介したストレス耐性獲得の経路の機能低下も予測されている。

結果及び考察) 今回は、ABA シグナリングの関わる塩ストレス応答に着目して、まず、水田条件で栽培した野生型と *rcn1* 変異体のシュート中の Na⁺ と K⁺ 濃度を特徴付け、引き続き、環境制御下での液体培養による塩ストレス処理と K⁺ 欠乏処理による Na⁺ と K⁺ のホメオスタシスへの影響を検討し、最後に、塩ストレス耐性への影響を検討した。本研究により、*RCN1/OsABCG5* がイネの Na⁺/K⁺ のホメオスタシスの制御を介した塩ストレス耐性に欠かせない ABC トランスポーターであることが示された。

8

イネの SNF2 ファミリータンパク質の機能解析

(1. 帯広畜産大, 2 北大院農) ○北沢 英之¹, 高野 翔¹, 松田 修一¹, 得字 圭彦¹, 高牟礼 逸朗², 加藤 清明¹

研究背景) SNF2 ファミリータンパク質は、ATP 依存性のクロマチンリモデリング因子として、研究の先行している酵母あるいは動物において転写、複製、相同組換え、DNA 修復、およびエピジェネティックな制御に関わることが知られている。植物では、シロイヌナズナの突然変異体を用いた生理機能の解明が進んでいるものの、多くは未解明なままである。単子葉植物のイネについては、最近になって、遺伝子発現の組織特異性や非生物的ストレス応答性が特徴付けられはじめたところである (Flaus et al., 2006; Hu et al., 2013)。

方法・結果及び考察) 本研究では、イネの SNF2 ファミリータンパク質の機能解明に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。まず、Flaus ら (2006) の報告した酵母 25 種とシロイヌナズナ 45 種およびイネの 41 種のアミノ酸配列を用いて分子系統解析を行った。これら 111 種のアミノ酸配列について、SNF2 ファミリーを特徴付ける 2 種の DEXDc と HELICc ドメインの有無を Web CD-Search Tool を用いて解析した。続いて、両ドメインをもつことが示された酵母の 17 種、シロイヌナズナの 45 種、イネの 34 種について、MEGA5 を用いてマルチプルアライメントを行い、分子系統樹を作成した。その結果、イネの SNF2 ファミリータンパクは 6 グループに類別され、シロイヌナズナでも機能解明の進んでいない Rad5/16 グループに 7 種の分子種が類別された。さらにこれらは、Ris1 サブファミリー 3 種と Rad サブファミリー 3 種となった。このうち Ris1 サブファミリーの分子種に着目し、非生物的ストレスならびに植物ホルモン処理への遺伝子の発現応答性を解析した。当日は、これまでの経過を報告する。

9

シロイヌナズナ β -グルコシダーゼ様タンパク質の生化学的機能解析

(¹ 北大院農, ² 北農研) ○谷口 沙希¹, 佐分利 亘¹, 松浦 英幸¹, 今井 亮三², 松井 博和¹, 森 春英¹

研究背景) β -グルコシダーゼ(BGLU)は, 各種 β -グルコシド, β -フコシド, β -ガラクトシド等の加水分解を主に触媒する酵素であり, その多くは Glycoside Hydrolase family 1 (GH1)に分類される. 本酵素は多様な基質特異性があり, 植物では細胞壁の代謝, 防御物質や植物ホルモンの脱配糖化といった様々な生理機能の調節に関与すると考えられている. ゲノム配列が解明された結果, 植物は多数の BGLU 様遺伝子を有することが明らかとなり, 機能の帰属が必要である. 本研究ではシロイヌナズナに存在する 47 の BGLU 様遺伝子のうち, 病傷害ストレスへの関与が予想される BGLU の生化学的機能解析を行った.

方法・結果及び考察) 分子系統学的解析により, BGLU12, 13, 15, 16 および 17 が病傷害ストレスに関与すると予想された. 各遺伝子の cDNA を発現プラスミドに導入し, 大腸菌 BL21(DE3) origami を用いて組換えタンパク質を生産した. BGLU17 は生産されなかったが, BGLU12, 13, 15 および 16 は可溶性タンパク質として生産された. 組換え BGLU12 および BGLU16 を生産させた大腸菌の無細胞抽出液には *p*-ニトロフェニル- β -グルコシド(*p*NPG) 分解活性が見られなかったが, BGLU13 および BGLU15 では分解活性が検出された. 組換え BGLU13 および BGLU15 を電気泳動的に単一に精製し, 1 mM 各種配糖体およびオリゴ糖に対する反応速度を測定した. BGLU13 および BGLU15 はソホロース, ラミナリビオース, セロビオース, *p*NPG, *p*NP-フコシド, *o*NPG に加水分解活性を示し, これらの中ではラミナリビオースに対して最も高い k_{cat}/K_m 値を示した. このことから, BGLU13 および BGLU15 は細胞壁に存在する β -1,3 グルカンの代謝に関与することが示唆された.

10

Evaluation of isolation and culture procedure for sodium periodate-induced peritoneal elicited cells as a model system of functional analysis in primary macrophages

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

○Ga-Hyun Joe, Midori Andoh, Hidehisa Shimizu, Hiroshi Hara, Satoshi Ishizuka

Background: Macrophages play important roles in disease development such as inflammatory bowel disease, diabetes, as well as cancer. Also, some food ingredients are reported to modulate macrophage functions by using cell lines derived from monocytes. However, established cell lines frequently show unusual features far from physiological responses. The aim of this study is to develop a reasonable experimental system to mimic physiological functions in macrophages by using primary immune cells.

Methods: Chemically induced peritoneal-elicited cells (PECs) are widely used as a model of primary macrophages. In this experiment, NaIO_4 was used to induce PECs in rats. We investigated recovery and cellular composition as well as the responses in the isolated PECs and determined a reasonable way to investigate the responses according to the cytokine productions after stimulation with lipopolysaccharide (LPS). We used ELISA for cytokine productions, real-time RTqPCR for mRNA expressions, and flow cytometry for cellular composition to evaluate the responses of the PECs.

Results and discussion: Treatment with NaIO_4 raised the number of PECs as compared to untreated as expected. Almost all the NaIO_4 -induced PECs was expressed CD163 molecule. We determined to choose adherent cells in PECs and a serum starvation step was necessary to evaluate cytokine production in response to stimulants. The NaIO_4 -induced PECs has a high potential to produce $\text{TNF-}\alpha$ in response to LPS. A time-course study revealed that $\text{TNF}\alpha$ expression was the highest at 3 h after the stimulation. The system can be suitable for evaluation of cellular events in primary macrophages.

11

組換えコリネ型細菌によるポリ乳酸様ポリマー生産の増強

(北大院工) ○飛谷 康太, 笹森 哲弥, 松本 謙一郎, 田口 精一

研究背景 最も実用化が進んでいるバイオマス由来プラスチックであるポリ乳酸(PLA)は、乳酸発酵と重金属触媒による化学重合を組み合わせた複合プロセスで生産されている。我々はこれまでに、微生物のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素の改変により乳酸重合酵素(LPE)を人工創出し、乳酸の発酵と重合が一体化した単一バイオプロセスで、より安全な乳酸ポリマー生産系を確立した。さらに今回、汎用モデル菌である大腸菌からアミノ酸生産菌として工業的に実績があるコリネ型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)へとプラットフォームを拡大した。その結果、大腸菌では不可能だった高分率の乳酸ユニット(99.3mol%)を含む PLA 様ポリマーを合成することに成功した。しかし、ポリマーの生産量は、大腸菌に比べて低いという問題があった。そこで本研究では、組換えコリネ型細菌による PLA 様ポリマー生産量の増強を目的として、培養条件の検討を行った。

方法・結果及び考察 ポリマーの生合成に必要な遺伝子群をコリネ型細菌に導入し、得られた組換え株をジャーファーマンターによる精密制御培養して、ポリマーを生合成した。本研究では、モノマーとなる乳酸の合成量と、ポリマーの合成量の関係に着目した。培養液への通気速度を変化させ、それに伴う乳酸の合成量、およびポリマーの合成量の変化を調査した。その結果、当初の予測通り、乳酸の合成は通気速度を小さくすることで促進された。しかしながら、ポリマーの合成はむしろ通気速度を大きくした条件、すなわち乳酸合成が減少している条件で促進された。よって、コリネ型細菌を用いた乳酸ポリマー生産系では、乳酸合成が律速ではなく、好気条件下でポリマー合成を促進する他の因子の存在が示唆された。

12

抗菌スペクトルを改変した抗菌ペプチド「アピデシン」特殊変異体の創成と

その抗菌活性

(北大院工, ¹東理大基礎工) ○山崎 蔵亨, 岩村 雄太, 松本 謙一郎, 橋本 茂樹¹, 大井 俊彦, 田口 精一

研究背景 「抗菌ペプチド」は生物が持つ自然免疫を担う分子の一種であり、既存の抗菌剤である抗生物質に比べて人体や環境に対する負荷が少ないという特徴があるため、次世代の抗菌物質として注目されている。本研究において研究対象としている「アピデシン」はミツバチ由来の抗菌ペプチドであり、大腸菌をはじめとするグラム陰性菌に対して静菌的に作用するが、グラム陽性菌に対しては抗菌活性を示さない。アピデシンは標的となる細菌の細胞膜を破壊することなく細胞内に導入され、細胞内の作用標的と相互作用し、細菌の生育を阻害すると考えられている。アピデシンはGNNRPVYIPQPRPPHRLという18のアミノ酸残基から構成され、N末端の1~3残基および6~8残基(下線部)は、抗菌活性を示すのに必須ではない領域(可変領域)である。これまでの研究で、可変領域の一部であるN末端3残基に変異を導入することで、大腸菌に対して約10倍の抗菌活性を有するアピデシン変異体(RVR変異体)を取得することに成功した。本研究では、6~8残基のアミノ酸に変異を導入して、さらなる高活性変異体の取得や抗菌スペクトルの改変を試みた。

方法・結果 アピデシンのN末端7残基目のチロシンを他のアミノ酸に置換したアピデシン変異体を10種作製し、グラム陰性菌・グラム陽性菌の双方の菌に対する抗菌活性を最小発育阻止濃度(MIC)の測定により評価した。その結果、グラム陰性菌に対して約4倍高活性化した変異体を取得することに成功した。また、システインに置換した変異体は、グラム陰性菌に対する抗菌活性を失い、新たにグラム陽性菌に対して抗菌活性を取得した。これにより、これまでとは異なる抗菌スペクトルを示す特殊なアピデシン変異体の取得に成功した。

13

コリネ菌の細胞表面提示技術を用いたデンプンからの乳酸様ポリマーの生産

(北大工¹, CREST-JST², 神戸大・工大院³) ○門屋 亨介^{1,2}, Yuyang Song¹, 飛谷 康太¹, 松本 謙一郎¹, 田中 勉³, 近藤 昭彦³, 田口 精一^{1,2}

研究背景) 近年我々は、酵素進化工学により創成した乳酸重合酵素を用いて、乳酸発酵と重合を一体化した、乳酸ポリマーの微生物生産系を構築した。宿主としては、大腸菌に加え、安全性とバイオマス資化性に優れた *Corynebacterium glutamicum* (コリネ菌) を用いた系を開発しており、とくにコリネ菌のプラットフォームを用いると、99% 以上の乳酸分率を有するポリ乳酸様ポリマーの合成が可能である。本研究では、コリネ菌にデンプンの資化能を付与することにより、現在商業生産で用いられているデンプンからポリ乳酸を合成するプロセスを、単一の細胞内に集積することを目的とした。既往の研究において、我々は α -アミラーゼを細胞表面に提示したコリネ菌株を用いることにより、デンプンを炭素源として、ポリ-3-ヒドロキシブタン酸の合成が可能であることを示していた。そこで、本表面提示株に、乳酸重合酵素、およびモノマーとなるラクチル CoA を合成するための乳酸脱水素酵素、CoA 転移酵素をコードする遺伝子を導入した組換え株を作成した。

まず、デンプンの α -アミラーゼ分解物であるマルトースを炭素源としたポリマーの合成を検討した。モノマー供給系酵素、乳酸重合酵素遺伝子を組み込んだ提示株を、マルトースを炭素源とする培地で培養し、得られた菌体を GC/MS 分析に供したところ、期待通りポリ乳酸様ポリマーの合成が確認できた。続いて、デンプンを直接添加しポリ乳酸様ポリマーの合成を確認した結果、グルコース使用時と同様にポリマーの合成を確認することができたことから、デンプンからポリ乳酸様ポリマーをワンステップ合成するプロセスの創製に初めて成功した。

14

Abrus precatorius に含まれる α -アミラーゼ阻害物質の探索

(北大院農) ○米本 龍太, Maria D.P.T Gunawan-Puteri, 加藤 英介, 川端 潤

研究背景) α -アミラーゼは摂取したデンプンをマルトースなどのオリゴ糖に加水分解する酵素である。 α -アミラーゼによって分解されたオリゴ糖は小腸粘膜上の α -グルコシダーゼによって単糖に分解されてから吸収され、血液中に運ばれる。アミラーゼやグルコシダーゼの働きを阻害することは、デンプンからのグルコース生成量を低下させることに繋がり、結果的に食後高血糖状態の改善が可能となるため肥満や糖尿病の予防、治療に効果的である。そこで本研究では、新たな α -アミラーゼ阻害剤を探索することを目的として、インドネシアで採集した植物のスクリーニングを行いアミラーゼ阻害物質の探索をした。

方法・結果及び考察) インドネシアで採集した植物の 50%メタノール抽出物において、 α -アミラーゼ阻害活性試験を行った結果、*Abrus precatorius* 抽出物のクロロホルム可溶部に高い阻害活性が見られた。活性成分を明らかにするため、この植物抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画したところ、高極性画分と低極性画分に高い α -アミラーゼ阻害活性が見られた。高極性画分からは活性成分として luteolin を単離したが、 α -アミラーゼ阻害活性は低く、含有量が多いため阻害活性を示していることが考えられた。一方で、低極性画分からは微量成分として2つのトリテルペン、lupenone と 24-Methylenecycloartenone を単離した。現在、これら2つの化合物の α -アミラーゼ阻害活性を調べている。

【背景】12-オキソファイトジエン酸(OPDA)は、傷害応答などに関与している植物ホルモンであるジャスモン酸(JA)の生合成前駆体である。近年、OPDA は JA と異なる独自のシグナル伝達経路を介しシグナルを伝達していることが明らかになりつつある。これまで、OPDA は、アマ種子(*Linum usitatissimum*)から調整されるアセトンパウダーの抽出液に α -リノレン酸を添加することで酵素的に調整されてきた。しかし、本抽出液には、OPDA 生合成に重要な立体選択的な5員環ケトン形成に必須な AOC 活性が認められないため、得られた OPDA はラセミ体であり収率も低いものであった。今回我々は、この合成法にヒメツリガネゴケ由来の PpAOC2 を添加し、OPDA を立体選択的かつ高収率で得られる合成法の開発を試みた。

【方法・結果及び考察】緩衝液に α -リノレン酸と Tween20 を添加し、激しく攪拌することでエマルジョン化させた。その後、エマルジョンが消えるまで 2 M NaOH を添加することで基質であるリノレン酸ナトリウム塩を調整した。リノレン酸ナトリウム塩、アセトンパウダー抽出液及び組換え PpAOC2 を混合し、酸素雰囲気下、25°C で 3 時間反応させた。反応終了後、キラル GC-MS を用いて反応の立体選択性を検討した。その結果、組換え PpAOC2 を添加した場合、95%ee で天然体である *cis*-(+)-OPDA が合成されていることが判明した。また、UPLC-MS/MS により反応生成物である OPDA の収量を求めたところ、PpAOC2 濃度が 500 $\mu\text{g/mL}$ の時に収率(49%)が最大となり、従来の方法と比べ収率が約 7 倍上昇していた。以上の結果より、アマ種子のアセトンパウダーの抽出液に PpAOC2 を添加することで、OPDA 合成の立体選択性及び反応収率が向上することが明らかとなった。

平成 25 年度公益社団法人日本農芸化学会北海道支部講演会要旨集

平成 25 年 11 月 27 日 印刷

平成 25 年 11 月 27 日 発行

発行者 公益社団法人日本農芸化学会北海道支部

編集者 和田 大

〒060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

北海道大学大学院農学研究院