

平成25年度公益社団法人日本農芸化学会北海道支部夏期シンポジウム
「北の作物をはぐくむ」

日時：平成25年8月10日（土）13：30～17：10

会場：旭川市国際会議場 大会議室（旭川市神楽3条7丁目）

スケジュール：

13時30分～13時35分 開会挨拶（シンポジウム世話人 帯広畜産大学 福島道広）

13時35分～14時05分 信州大学 中村 浩蔵 先生（座長：帯広畜産大学 木下幹朗）
優れた降圧作用を有するソバ植物体乳酸発酵物「発酵キョウバク」

14時05分～14時35分 北海道立総合研究機構 池谷 聡 先生（座長：帯広畜産大学 福田健二）
澱粉原料用馬鈴しょの品種改良について

14時35分～15時05分 北海道立総合研究機構 佐藤 毅 先生（座長：帯広畜産大学 福島道広）
北の大地での水稲品種開発 「きらら397」から「ゆめぴりか」へ

15時05分～16時05分 ポスターセッション（同会議室にて）

16時05分～16時35分 新潟大学 大坪 研一 先生（座長：帯広畜産大学 得字圭彦）
赤タマネギの添加による稲の発芽促進

16時35分～17時05分 近畿大学 重岡 成 先生（座長：帯広畜産大学 小田有二）
畑でつくるサプリメント

17時05分～17時10分 閉会挨拶

（日本農芸化学会北海道支部支部長 北海道大学 原 博）

後援：北海道新聞社

18時00分～20時00分 懇親会

懇親会会場：大雪地ビール館（旭川市宮下通り11丁目1604番地の1）

TEL 0166-25-0400

優れた降圧作用を有するソバ植物体乳酸発酵物「発酵キョウバク」

信州大学農学部 中村浩蔵

「健康長寿社会」は、世界で最も高齢化が進行した我が国における最重要課題の一つであり、実現のためには疾病予防が重要である。我が国最大の疾患は、心臓病、脳卒中、高血圧症を含む循環器系疾患であり、病气診察・治療費の20%超を占めている。循環器系疾患予防のためには、危険因子である「高血圧予防」が必要である。平成22年度の高血圧症有病者は、30歳以上人口の52.3%、4,730万人であり、医療費削減のためにも高血圧予防は喫緊の課題といえる。これまでに、減塩に代表される様々な高血圧予防の取り組みが行われてきたが、高血圧予防の実現には至っていない。むしろ、高齢者の増加に伴い国民の平均血圧は上昇しており、より効果的な高血圧予防策が必要とされている。

本講演で紹介する「発酵キョウバク」は、ソバの茎葉をすんき漬の製法で加工した食品である。古来から、アジア-北欧にかけて広く栽培され食されてきたソバは、日本が独自に発達させた食文化と豊富な機能性成分によって世界的に注目を浴びている。ソバは実だけでなく茎や葉も食され、日本ではソバ栽培における間引き菜・ソバ菜として、中国ではソバ茎葉が蕎麦秸（キョウバクカク）と呼ばれる漢方として古くから利用されてきた。また、「すんき漬」は、長野県木曾地方で塩を使わない独特の製法で造られる乳酸発酵食品であり、減塩漬物として全国に知られている。すなわち、発酵キョウバクは、長い食経験のあるソバ茎葉を伝統的な漬物の製法で加工した「ソバの漬物」である。

高血圧症の約9割を占める本態性高血圧のモデル動物を用いた試験で、発酵キョウバクの優れた降圧作用が明らかになった。まず、発酵キョウバクは、他の食品素材に比べて圧倒的に少ない量で降圧効果と血圧上昇抑制効果を発揮する。そして、高血圧の状態にだけ作用して血圧を低下させるが、正常血圧状態では血圧に影響を与えない「高血圧選択性」という特徴を有しており、過剰な血圧低下の副作用が無い安全で効果的な高血圧予防を可能にできると考えられる。この作用は、血圧を上昇させる物質を造り出す酵素・ACE（アンジオテンシンI変換酵素）を阻害し、かつ、血管に直接働きかけて引き起される。現在、発酵キョウバクから7種類の降圧ペプチドを単離しており、その降圧メカニズムが、主に、組織ACE阻害であることを明らかにした。これらの降圧ペプチドの *in vitro*（試験管内試験）でのACE阻害活性は必ずしも高くないが、生体組織との親和性が高いため生体内でACEを効果的に阻害できると考えられる。

現在、発酵キョウバクの高血圧選択的な降圧メカニズム解明に取り組むと共に、発酵キョウバクを用いた安全性の高い高血圧予防食品の研究に取り組んでいる。発酵キョウバクは、ソバを原料としているためソバアレルギーが懸念されるが、これまでに製造した全ての発酵キョウバクはアレルギーテスト陰性であった。現在、実用化のための工業スケールでの製造法を検討中である。

澱粉原料用馬鈴しょの品種改良について

道総研 北見農業試験場 研究部 地域技術グループ 池谷 聡

1. **澱粉原料用馬鈴しょについて**：馬鈴しょは北海道全体で約5万5千ha栽培され、約200万t生産されているが、澱粉原料用は栽培面積で約3分の1、生産量で4割以上を占める。特にオホーツク東部や十勝東部・南部等では澱粉原料用の比率が高く、畑作経営の基幹作物の一つとなっている。
2. **澱粉について**：国内の澱粉の需要量は約280万トンで、そのうち3分の2の約190万トンは、糖化製品の原料用途である。その他の用途は多岐に渡り、食品用、工業用、化工澱粉用がそれぞれおよそ10%程度を占める。澱粉の種類では、コーンスターチが最も多く使用され、全体の8割以上を占める。特に糖化製品用途、工業用途では、ほとんどをコーンスターチが占める。一方、馬鈴しょ澱粉の需要量はおよそ20万トン程度と、全体の約7%を占めるにすぎないが、特有の優れた性質により、特に食品用途ではシェアが約4割と高い。このような馬鈴しょ澱粉特有の性質を活かした用途を固有用途と呼んでいる。
3. **澱粉原料用の育種目標**：固有用途は、澱粉原料用馬鈴しょを安定的に生産していく上で非常に重要である。しかし主力品種が、固有用途に向く「紅丸」（昭和13年優良品種認定）から、澱粉品質の異なる「コナフブキ」（昭和56年優良品種認定）に置き換わり、実需の要望に十分応えられなくなったこともあって、固有用途は一時大きく減退した。一方、「紅丸」から「コナフブキ」に交替した原因は、「コナフブキ」の多収性にあった。これらのことから、「紅丸」並の澱粉品質と多収性を兼ね備える品種の育成が急務となってきた。
また、道内馬鈴しょ安定生産上の重大な問題であるジャガイモシストセンチュウの対策として抵抗性品種の導入が有効であるが、「紅丸」および「コナフブキ」はジャガイモシストセンチュウ抵抗性を持っていない。そのため、澱粉品質と収量性に加えて抵抗性導入も重要な目標と成ってきた。
4. **澱粉品質について**：固有用途適性としては、澱粉中のリン含量と老化性（離水率）が重要とされている。リン含量が高い澱粉は糊化の最高粘度とブレークダウンが大きくなる傾向にあるが、固有用途では加工中の大幅な粘度変化を嫌うことが多いことから、リン含量の比較的低いものが好まれる。また、離水率は低温貯蔵下で澱粉ゲルがどの程度老化するかを表す指標である。澱粉を用いた各種の冷蔵食品においては、老化しにくく離水率の低いものが好まれる。
「コナフブキ」の澱粉は、リン含量および離水率が「紅丸」より高く、このことから固有用途適性が劣っていると考えられている。
5. **育種方法について**：育種目標を達成するに当たって、当初、最も重要と考えられるリン含量、離水率、および収量性の主要な要素である澱粉価の間の関係性を調査した。その結果これら3つの関係性は低く、独立した形質と考えられた。そのため、これらを併せ持つものを効率的に選ぶために早期世代から澱粉品質による選抜を行うこととした。このような選抜等を行うことで、約10年間で収量性を維持しつつ、リン含量と離水率を「紅丸」の水準まで低下させていくことが出来た。
6. **「コナユキ」**：前項の選抜の結果「コナユキ」が育成された（平成22年優良品種認定）。「コナユキ」の澱粉はリン含量・離水率が「紅丸」並で、収量性も「コナフブキ」並に高く、ジャガイモシストセンチュウ抵抗性も持つ。以上のように「コナユキ」は当初の目標を満たすことができた。
7. **今後の澱粉原料用の品種改良**：以上のように当初の目標を満たす品種を育成することができたが、今後は、澱粉品質面ではタピオカなどの輸入澱粉に対抗していくことが出来るように、さらに品質を向上させていくことが必要であろう。また収量面では、近年の気候変動でも安定生産が可能になるような、「コナフブキ」「コナユキ」より多収の品種が望まれる。現在、「コナユキ」より収量性を向上させた「北育20号」が育成中である。

北の大地での水稲品種開発 「きらら397」から「ゆめぴりか」へ

(地独) 北海道立総合研究機構上川農業試験場 佐藤 毅

北海道は新潟県と1、2位を争う米の収穫量を誇るが、「コシヒカリ」のような全国ブランド米はなかった。そこで北海道の水稲育種では、指定試験および1980年に開始された「優良米の早期開発試験」以来、5期33年間の継続的に実施されてきたプロジェクトなどにより、27の優良品種を育成した。ここでは、その中の主要品種について育種の背景を概説する。

1) 「きらら397」の開発

これまでの北海道品種は、府県品種に比べ食味が劣っていた。これを改善するため、主として、デンプン成分の一つであるアミロース含有率の低減を重視した選抜を行ってきた結果、「粘り」が改善され、食味が大きく向上した。また、タンパク質含有率も食味に大きく影響するため、同様に低い系統を選抜した。その結果、遺伝資源として「コシヒカリ」の後代を活用して1988年に育成された「きらら397」は、それ以前の北海道品種にはない良食味性を備え、精力的な販売戦略もあって、北海道で初めての良食味米として全国区のブランド米になった。同品種は、収量の安定性にも優れており、現在まで長期間にわたり全道で広く作付けされている。

2) 「きらら397」以降の品種開発

「きらら397」の欠点である耐冷性を向上させ、さらに良食味化を図り、「ほしのゆめ」(1996)、「ななつぼし」(2001)等の品種育成が続き、北海道米に対する流通・実需関係者や消費者の食味評価はさらに高まった。タンパク質含有率については、アミロース含有率ほど顕著な改善は得られていないが、「国宝ローズ」の後代を遺伝資源に利用した「ななつぼし」や「ふっくりんこ」(2003)ではタンパク質含有率もやや低下した。

3) 「ゆめぴりか」の開発

「おぼろづき」(2005)の親である「北海287号」を遺伝資源に利用して、アミロース含有率を大幅に低下させた「ゆめぴりか」が2008年に育成された。「つや」、「粘り」および「柔らかさ」に優れており、食味のポテンシャルとしては「コシヒカリ」に並ぶと評価されている。「ゆめぴりか」は、これまで積み上げてきた育成材料を受け継ぎ、総勢16人の育種家が係わって育成した、いわばこれまでの北海道水稲育種の集大成のような品種である。

4) 極良食味育種戦略と今後の展開

アミロース含有率については、「粘り」や「柔らかさ」を考慮した場合、これ以上の低下は望ましくなく、「ななつぼし」と「おぼろづき」の中間の値を確保しつつ、産地や年次による変動が少ない品種の開発が重要である。現在、「国宝ローズ」由来の後代系統(現地試験供試系統「上育463号」等)の活用が考えられている。タンパク質含有率については、「ゆきさやか」の後代系統等を遺伝資源に利用して、安定的な低下が試みられている。さらに、「外観」や「つや」、冷めてもおいしく感じる「米飯老化性」を改良するために、これら特性を育種現場で効率よく測定する方法の開発が必要である。また、いわゆる「味」や「香り」などに関する特性も機器分析できるように基礎的な研究を続けていく必要がある。この他にも、「きらら397」に置き換わる業務用米の開発、収量性、北海道の永遠のテーマである耐冷性、および「食の安心・安全」の根幹となる耐病性など、さらに向上させなければならない特性が残されている。水稲品種開発に終わりはなく、次世代の品種を求めて研究を推進しなければならない。

赤タマネギの添加による稲の発芽促進

新潟大学農学部 大坪研一

1. 発芽玄米の特徴と問題点

稲の胚芽を水に浸漬しておくこと、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）の作用によってγ-アミノ酪酸(GABA)が増加することが報告され、発芽玄米の利用が拡大した。ミネラル、ビタミン、食物繊維、GABA などが多い上に、軟化して呈味成分が増加し、一般の精白米とブレンドして通常の炊飯器で炊飯できることからその利用が広がった。問題点としては、発芽時に微生物が増殖しやすいので、出荷前に殺菌工程が必要なこと、市販品の価格が高いことなどが挙げられる。

2. 赤タマネギの添加による発芽の促進と微生物増殖の抑制

演者らは、タマネギの抗菌性に着目し、発芽時に添加することで微生物の増殖抑制を試みた結果、赤タマネギの場合に効果が顕著であることを見出した。しかも、赤タマネギの添加によって、発芽率の低い原料米の発芽率が向上し、その発芽促進効果は、米に限定されず、麦、大豆、小豆などにも適用されることが明らかになった。

3. 超硬質米の発芽玄米への利用例

演者らは、米の利用拡大を目的として、九州大学で育成された「超硬質米」（アミロペクチン長鎖の多い突然変異米）の特性解明と用途開発に関する共同研究を行ってきた。「超硬質米」は、米飯がきわめて硬くて粘りが少ないので、米飯には不適であるが、難消化性デンプンを多く含むので、食後血糖上昇を抑制する機能性米粉の原料として有望である。演者らは、「超硬質米」を赤タマネギ添加発芽玄米とすることで、その利用拡大を試みた。

4. プロテオーム解析の試み

赤タマネギの発芽促進効果については、ウニコナゾールPの添加によってその効果が減少することから、ジベレリンを介することが推察されるが、演者らは、新潟大学の三ツ井教授と共同で、プロテオーム解析による機構解明に取り組んでいる。赤タマネギの添加によって、インドール酢酸合成関連酵素が増加することが認められ、今後の発芽促進機構の解明が期待されている。

1) S. Nakamura and K. Ohtsubo: Biosci. Biotechnol. Biochem., 75(3), 572-574, 2011.

2) 大坪研一・中村澄子：発芽種子およびその製造方法，公開特許公報 2011-024472.

日本人の健康と長寿への意識の高まりがめざましい。高血圧、糖尿病など生活習慣病が蔓延ともいえる広がりを見せるなか、健康診断の検査データに基づいて、「メタボリックシンドローム（代謝症候群）予防」の考え方が普及し、食生活を見直す傾向が強まっている。一方、グローバルな視点から、我々は急激な人口増加（2050年で約93億人）、食糧（栄養）不足などのシリアスな問題にも直面している。FAOの推定によれば、現在1億2400万人の子供がビタミンA(VA)欠乏症であり、毎年50万人が失明し、100万人が欠乏症に関連する病気で死亡している。このような状況において、適切なカロリー摂取に加えて、ビタミンや他の栄養素を、日常の食生活の中で手軽にバランスよく補給するための解決策の一つとして、遺伝子組換え技術を用いてビタミンや医薬品などを多く含む穀物、野菜、果実や種子を作出する試みがある。

上述のVA欠乏症の子供たちをレスキューするために、スイスおよびドイツの研究グループによってゴールデンライス（プロVA： β -カロテン強化イネ）の開発が行われた。また、ビタミンE（ α -トコフェロール）を多く含む種子、レタス、ビタミンC含量を強化した植物、 β -カロテン、ビタミンC、葉酸を同時に強化したトウモロコシなどの作出も進められている。

一方、遺伝子組換え技術で医薬品などを植物で作る試みもなされている。これまで大腸菌や酵母などを用いて作られているが、生体に有害なエンドトキシンや培地成分など医薬品としての安全性をクリアすることや生産効率の向上が課題となっており、現状として得られる医薬品は非常に高価なものとなっている。これらの問題を解消するために、植物を使った医薬品生産が進められている。ヒトチオレドキシシン、 α インターフェロン、インスリン、ヒト内因子（ビタミンB₁₂）、リゾチーム、分泌抗体ワクチンなどの様々な疾患に対する医薬品、ワクチン、ホルモンなどが生産され、いくつかは既に臨床検査まで進んでいる。

このように、遺伝子組換え技術で作出した穀物、野菜、種子を用いて、たとえばサラダ（レタスなど）、ドレッシング（油）などを普段の食事から、さらには植物から抽出して、ビタミンや医薬品などを補給する（サプリメントとして利用する）ことが可能となる。最近、世界レベルで植物工場の普及拡大などを積極的に支援推進している状況にある。これを利用することにより、組換え植物の生産効率および均一性の向上、さらに生産コストの低下につなげることも可能となる。近い将来、動物・微生物による物質生産と比較して安全性にメリットがある高付加価値な遺伝子組換え植物（作物）を食して病気を治し、健康を維持するということが夢ではない。

ポスターセッション

注意事項

- 時間: 15:05 - 16:05
- 掲示開始は 13:30 からポスターセッション開始時までをお願いします。
- セッションが終了したら、できるだけ速やかに撤去願います。
- コアタイム等は設けません。適宜対応をお願い致します

プログラム

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
(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

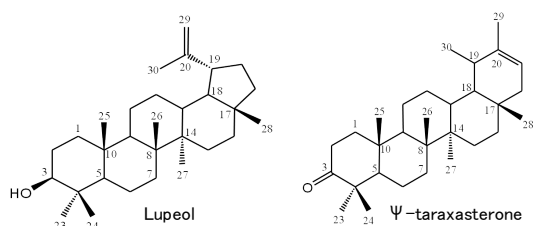
1

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 antitrypanosomal 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 antitrypanosomal 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 で一晩発現誘導を行った。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 nectariphilum* strain AST4^T

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

Background: *Catellibacterium nectariphilum*, 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ーニング法で特定し、*reduced culm number1* (*rcn1*) 変異体として報告した(Yasuno et al., 2009)。*rcn1* 変異体では、分けつ伸長だけでなく、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、水田条件下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質は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、1mM 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, NaIO₄ 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 NaIO₄ raised the number of PECs as compared to untreated as expected. Almost all the NaIO₄-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 NaIO₄-induced PECs has a high potential to produce TNF- α in response to LPS. A time-course study revealed that TNF α 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メ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GNNRPVYIPQPRPPHPRL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。

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

[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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。