

平成20年度 第二回合同学術講演会

北海道農芸化学協会特別会員御芳名

アサヒビール株式会社北海道工場	福山醸造株式会社
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所	ベル食品株式会社
岩田醸造株式会社	北海三共株式会社
関販テクノ株式会社	北海製罐株式会社
キリンビール株式会社千歳工場	有限会社北海道バイオ技術研究所
サッポロビール株式会社北海道工場	財団法人北海道農業企業化研究所
札幌酒精工業株式会社	北海道立十勝圏地域食品加工技術センター
春雪さぶーる株式会社	北海道糖業株式会社技術研究所
高砂香料工業株式会社札幌出張所	北海道和光純薬株式会社
ニッカウヰスキー株式会社北海道工場	雪印乳業株式会社札幌研究所
日本化学飼料株式会社	よつ葉乳業株式会社中央研究所
日本新薬株式会社千歳クリエートパーク	株式会社和科盛商会
日本甜菜製糖株式会社（技術部製造課）	

講演要旨

日時：平成20年11月8日（土） 9日（日）

会場：とかちプラザ（帯広市）

日本農芸化学会北海道支部
日本栄養・食糧学会北海道支部
日本土壌肥料学会北海道支部
日本生物工学会北日本支部
日本応用糖質科学会北海道支部
北海道農芸化学協会

連絡先：帯広畜産大学生物資源生産学部門、橋本 誠（0155-49-5542）
北海道大学大学院農学研究院、石塚 敏（011-706-2811）

平成20年度 第二回合同学術講演会日程（於 とかちプラザ）

【11月8日（土）】

13：00～17：10 シンポジウム「機能性食品と健康科学」（二階；視聴覚室）

18：00～20：00 懇親会（帯広ワシントンホテル内、ワシントンホール）

【11月9日（日）】

9：00～12：00 一般講演（A・B会場）

12：30～13：00 日本栄養・食糧学会北海道支部総会（A会場）

13：00～14：48 一般講演（A・B会場）

15：00～16：00 特別講演（二階；視聴覚室）

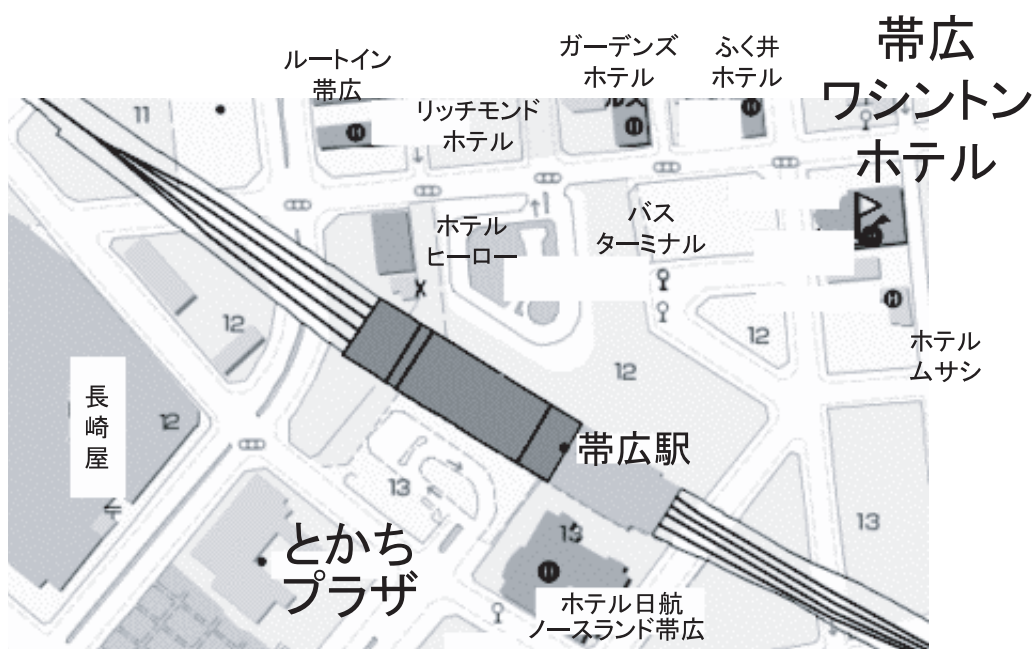
とかちプラザ内 会場ご案内

シンポジウム、特別講演 二階；視聴覚室

一般講演 A会場 四階；402号室、B会場 三階；304号室

受付（懇親会、協会、発表ファイル）四階；403号室

休憩室、クローク 四階；401号室



・シンポジウム、懇親会および特別講演プログラム

【11月8日(土)】

・シンポジウム「機能性食品と健康科学」(二階;視聴覚室)

開会の辞 塩見 徳夫(日本栄養・食糧学会北海道支部支部長 酪農学園大学)

(13:00~13:10)

コーディネーター挨拶 福島 道広(帯広畜産大学)(13:10~13:15)

第1部 帯広市市民大学講座

S-1 低利用食品素材の畜産食品への応用

島田 謙一郎(帯広畜産大学)(13:15~13:55)

休 憩(13:55~14:05)

S-2 未利用資源から機能性食品の開発

岡田 博(コスモ食品代表取締役社長)(14:05~14:45)

第2部

S-3 ワカメ脂質を抱合したホタテ由来リン脂質マイクロカプセルの抗肥満効果

岡田 朋子(北海道大学大学院水産)(15:00~15:40)

S-4 難消化性糖類による腸内細菌叢の制御を介したアレルギー疾患予防の試み

園山 慶(北海道大学大学院農学研究院)(15:40~16:20)

S-5 植物エキス発酵飲料中の新規フルクトピラノシド型オリゴ糖類

岡田 秀紀(大高酵素株式会社)(16:20~17:00)

閉会の辞 島崎 敬一(日本農芸化学会北海道支部支部長 北海道大学大学院農学研究院)

(17:00~17:10)

・懇親会:(18:00~20:00)

場所:帯広ワシントンホテル内2階ワシントンホール

(JR帯広駅より徒歩2分、Tel:0155-23-5111)

参加費:一般4000円、学生2000円

【11月9日(日)】

・特別講演(二階;視聴覚室)

島崎 敬一(北海道大学大学院農学研究院)(15:00~16:00)

「牛乳中の感染防御タンパク質 - ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリン - 」

座長:鍋田 憲助(北海道大学大学院農学研究院)

【11月9日(日)】

・一般講演プログラム

講演様式：Power Point (OHP対応可)、パワーポイントファイルはWindows XPをOSとした、Power Point version 2003で作動することを確認しておいて下さい。初日11月8日(土)の午後に受付(四階;403号室)にて、各自持参したファイルを支部が用意するノートパソコンにコピーして下さい。ここで、最終的な作動確認を行うことができます。

講演時間：討論時間2～3分を含めてトータル12分間

A会場(四階;402号室)

(座長：渡邊 治)

- 9：00 (A-1) エミュー卵の加工特性と卵白タンパク質組成
武内 純子、渡部 俊弘、永島 俊夫(東京農大 生物産業学部)
- 9：12 (A-2) 初乳および常乳ホエイのプロテオーム比較解析
福田 健二¹、仙田 晶嗣¹、石井 利明²、浦島 匡¹ (¹帯畜大畜産衛、²帯畜大獣医)
- 9：24 (A-3) 初乳に存在するOdorant-binding proteinの発見
仙田 晶嗣¹、福田 健二¹、寺林 隆志²、森田 稔³、石井 利明⁴、浦島 匡¹
(¹帯畜大畜産衛生、²北里大理、³東光薬品、⁴帯畜大獣医)
- 9：36 (A-4) High potency anti-oxidative peptides identified by enzymatic hydrolysis of whey protein isolate. Seema Kafley¹, Woan-Sub Kim², Haruto Kumura¹ and Kei-ichi Shimazaki¹ (¹Hokkaido Univ., ²Hangyon National Univ.)

(座長：木下 幹朗)

- 9：48 (A-5) ダツタンソバの抗酸化活性物質について
大森 千恵子、西村 弘行(東海大院理工)
- 10：00 (A-6) ネギ属植物中の男性ホルモン誘導含硫アミノ酸の定量について
鈴木 勇二、西村 弘行(東海大院理工)
- 10：12 (A-7) 赤チコリー抽出物の抗酸化活性およびU937細胞に対する増殖抑制活性について
木村 卓郎¹、佐藤 敦²、西村 弘行¹ (¹東海大院理工、²東海大生物理工)
- 10：24 (A-8) ヒドロキシ桂皮酸およびヒドロキシ安息香酸誘導体がヒト骨髄性白血病由来株U937の増殖に及ぼす効果(2)
佐藤 敦¹、村井 陽徳¹、木村 卓郎² (¹東海大生物理工、²東海大院理工)

(座長：橋本 直人)

- 10：36 (A-9) 消化管免疫系細胞の細胞傷害性に及ぼすきのこ熱水抽出物の影響
岡 浩輔¹、李 載星¹、渡邊 治²、原 博¹、石塚 敏¹
(¹北大院農、²北海道立食品加工研究センター)

10 : 48 (A-10) 消化管内分泌細胞株GLUTagにおける、トウモロコシペプチドによる消化管ホルモン
Glucagon-like peptide-1分泌機構
川村 侑輝¹、比良 徹²、原 博² (¹北大・農、²北大院農)

11 : 00 (A-11) コリン型Plasmalogenリンパ吸収の特徴
山下 舞亜¹、西向 めぐみ²、山崎 裕也³、根津 亨³、前場 良太⁴、原 博²
(¹北大農、²北大院農、³(株)ADEKA、⁴帝京大医)

11 : 12 (A-12) 野生エゾヒグマの腸管における免疫グロブリン A(IgA)産生細胞の組織分布
園山 慶¹、武村 直紀²、比良 徹¹、釣賀 一二三³、間野 勉³
(¹北大院農、²北大院生命、³道環科研)

(座長 : 比良 徹)

13 : 00 (A-13) フェノール性含窒素色素betacyaninの吸収動態の解明
奥村 純子¹、稲澤 幸恵¹、菊地 裕人²、有塚 勉²、福島 道広³、知地 英征¹
(¹藤女子大院、²日甜総研、³帯畜大)

13 : 12 (A-14) ビートファイバー入り湯種生地パン投与によるラットの脂質代謝への影響
金澤 聖月¹、飯島 勢津子¹、中村 有美¹、島田 謙一郎¹、関川 三男¹、山内 宏昭²、
橋本 直人²、杉山 雅則³、田中 裕子³、福島 道広¹
(¹帯畜大・畜産学科、²北海道農業研究セ・芽室拠点、³ (株)満寿屋商店)

13 : 24 (A-15) キノコ由来酸性糖脂質によるマウスT細胞活性化ならびにNK1.1 / TCR-double
positive細胞の増殖誘導効果
野崎 浩文¹、糸乗前²、杉田 陸海²、中村 公英³、大庭 潔⁴、鈴木 明身⁵、櫛 泰典¹
(¹帯畜大畜産、²滋賀大教育、³帯畜大保健センター、⁴十勝食工センター、⁵東海大未来
センター)

13 : 36 (A-16) 長期のイノシン投与が自然発症型糖尿病ラットの耐糖性に及ぼす効果
岡本 勝也¹、堀内 一隆¹、鈴木 寿子¹、小野寺 秀一^{1,2}、塩見 徳夫²
(¹酪農大食品科学、²酪農大院食品栄養科学)

(座長 : 藤村 朱喜)

13 : 48 (A-17) *Rhizopus delemar*の生産するスクロース加水分解酵素の精製およびその諸性質
森 優子¹、渡辺 剛志²、小田 有二² (帯畜大・¹分子生命、²食品科学)

14 : 00 (A-18) アカパンカビ*Neurospora intermedia*によるセルラーゼの生産
富田 康資¹、小田 有二² (帯畜大・¹分子生命、²食品科学)

14 : 12 (A-19) エゾヤマザクラのサクランボから分離したパン用酵母*Saccharomyces cerevisiae*の諸性質
三雲 大¹、山内 宏昭³、小田 有二² (帯畜大・¹分子生命・²食品科学、³北海道農研)

14 : 24 (A-20) フレックス酵母*Kluyveromyces marxianus* KD-15によるテンサイ糖蜜・チーズホエー混
合原料からのバイオエタノール生産
仲村 憲治¹、小田 有二² (帯畜大・¹生物資源、²食品科学)

- 14 : 36 (A-21) バレイショ加工副産物を原料としたエタノール発酵条件の検討
山田 順^{1,3}、四宮 紀之⁴、大庭 潔⁴、関川 三男¹、小田 有二²
(帯畜大・¹畜産衛生・²食品科学、³カルビーポテト、⁴十勝食加技セ)

B 会場 (三階 ; 304号室)

(座長 : 清水 弘樹)

- 9 : 00 (B-1) 糸状菌 *Lasiodiplodia theobromae* における安定同位体標識化合物を用いた lasiodiplodin 類の生合成機構の解明
香島 貴純、高橋 公咲、鍋田 憲助 (北大院農)
- 9 : 12 (B-2) Octylglucoside をグルコース供与体として用いる TA グルコシルトランスフェラーゼ
瀬戸 義哉、松浦 英幸、鍋田 憲助 (北大院農)
- 9 : 24 (B-3) Huisgen 環化反応を利用したコレステロール吸収阻害活性検定法の確立
鳥巢 哲生、加藤 英介、川端 潤 (北大院農)

(座長 : 加藤 英介)

- 9 : 36 (B-4) ペプチド固相合成に特化させたマイクロ波利用合成装置の開発とその利用研究
清水 弘樹¹、長島 生¹、松下 隆彦¹、西村 紳一郎¹、為野 強士²、秋元 正寿²
(¹産総研北海道セ、²東京理化器械)
- 9 : 48 (B-5) 6-Tuliposide B の不斉合成研究
大本 笑子、重富 顕吾、生方 信 (北大院農)
- 10 : 00 (B-6) Synthesis of benzophenone glucosides from *Phaleria macrocarpa*
Phebe Hendra, Yukiharu Fukushi, Yasuyuki Hashidoko
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)
- 10 : 12 (B-7) 甜菜に含まれるオリゴ糖の構造解析
高田 祐輔¹、福士 江里¹、菊地 裕人²、有塚 勉²、福士 幸治¹、橋床 泰之¹
(¹北大院農、²日甜総研)

(座長 : 瀬戸 義哉)

- 10 : 24 (B-8) Triflic acid (TfOH) を用いたカルボン酸誘導体の Friedel-Crafts 反応の検討
村重 諒¹、橋本 誠² (¹岩手大院農、²帯畜大)
- 10 : 36 (B-9) Triflic acid を用いた Friedel-Crafts ベンゾイル化反応による光反応性基導入アミノ酸の効率的合成
遠山 直紀、橋本 誠 (帯畜大・生資料)
- 10 : 48 (B-10) 光アフィニティーラベルを目指したジアジリン含有有機白金誘導体の合成
古川 慶太郎、橋本 誠 (帯畜大・生資料)
- 11 : 00 (B-11) 単量体 Avidin 固相上での光アフィニティーラベルの検討
笹川 斐子、橋本 誠 (帯畜大・生資料)

(座長：得字 圭彦)

- 11 : 12 (B-12) コムギ低温馴化によって発現が誘導されるリン脂質合成酵素CTP : phosphoethanolamine
citidyltransferaseはゴルジ体に局在する
須藤 慶太¹、榊 剛²、今井 亮三¹ (¹農研機構・北海道農研、²東海大・生物理工)
- 11 : 24 (B-13) イネ葯特異的発現遺伝子の探索 (低温耐性イネ作出に向けて)
加藤 英樹¹、今井 亮三¹ (¹北農研センター)
- 11 : 36 (B-14) システイン側鎖化学修飾による抗菌ペプチドThanatinの構造機能相関：疎水結合力と
抗菌活性の関係
折笠 善丈¹、一戸 健太¹、橋本 茂樹²、田口 精一¹ (¹北大院工、²東理大・基礎工)
- 11 : 48 (B-15) 抗菌ペプチドApidaecin高活性変異体の*Escherichia coli*細胞内導入効率の評価
一戸 健太¹、折笠 善丈¹、橋本 茂樹²、田口 精一¹ (¹北大院工、²東理大・基礎工)

(座長：福田 健二)

- 13 : 00 (B-16) *Geobacillus stearothermophilus* 由来アゾ還元酵素AzrGにおける熱安定性の解析
向井 祐一、相沢 智康¹、松本 謙一郎、田口 精一、大井 俊彦
(北大院工、¹北大院理)
- 13 : 12 (B-17) 酵母低温発現系によるヒト由来不溶化タンパク質の発現と分子シャペロンの効果
○笠巻 貴大^{1,2}、佐原 健彦²、扇谷 悟^{1,2} (¹北大院・理、²産総研・ゲノムファクトリー)
- 13 : 24 (B-18) メチロトロフ酵母のメタノール代謝におけるシトクロムcの発現挙動
木下 博貴¹、藤村 朱喜¹、松藤 淑美¹、宮地 竜郎¹、中川 智行²、中川 純一¹
(¹東農大生物産業・食科、²岐阜大・応生科)
- 13 : 36 (B-19) ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼを高発現したメチロトロフ酵母のメタノール生
育能への影響 小澤 正太郎¹、藤村 朱喜¹、松藤 淑美¹、宮地 竜郎¹、由里本 博也²、
阪井 康能²、中川 智行³、中川 純一¹
(¹東農大生物産業・食科、²京大院農・応用生命、³岐阜大・応用生物)

(座長：中村 正)

- 13 : 48 (B-20) 酵母におけるセレブロシド合成酵素遺伝子破壊の影響
菊地 絢子¹、得字 圭彦¹、浅沼 高寛¹、矢島 祐輝¹、柚木 恵太¹、斎藤 勝一²、
田村雅彦³、大西 正男¹ (¹帯畜大・食品化学、²農研機構・北海道農研、³日甜)
- 14 : 00 (B-21) 海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素とシアル酸含有LPS構造
平塚 宙子¹、塩谷 一紗¹、上宮 悠¹、山本 岳²、梶原 ひとみ²、櫛 泰典¹
(¹帯畜大畜産、²日本たばこ・植物イノベーションセンター)
- 14 : 12 (B-22) ピフィズス菌の細胞膜のラクトフェリン結合性タンパク質の探索
田島 恵梨香、玖村 朗人、島崎 敬一 (北大院農)
- 14 : 24 (B-23) ラクトフェリンと相互作用するタンパク質の探索
北條 晶子、玖村 朗人、島崎 敬一 (北大院農)

S-1

低利用食品素材の畜産食品への応用

島田 謙一郎（帯広畜産大学）

【目的】十勝では馬鈴薯やビートの生産が盛んです。北海道農業研究センターにより幾つかのアントシアニンを多く含んだ有色ポテトが育種改良されて市場に出ています。また、甜菜糖の残渣物から生産されているビートファイバーという食物繊維もあります。畜産食品の中でもマヨネーズやソーセージなどは脂質を多く含んでおり健康に対するイメージが良くありません。大手メーカーでは少しでも健康に配慮した製品として、様々な特定保健用食品を開発して販売しています。そこで、これまでマヨネーズやソーセージに殆ど利用されてこなかった食品素材を応用した際に加工特性や栄養特性に及ぼす影響を検討しました。

【方法】脂質酸化抑制効果の実験ではアントシアニン色素は市販の紫サツマイモ色素、赤キャベツ色素、紫トウモロコシ色素を用い、有色ポテトフレークはシャドークイーンをドラムドライ法で調製して、アントシアニン色素量を測定して用いた。マヨネーズの配合はコーン油80%、卵8%、醸造酢10%、食塩1%及び砂糖1%とし、色素入りのマヨネーズは製造直前に醸造酢へ色素を溶解した製造した。モデルソーセージは豚挽肉（赤身85%）に対して食塩2%、ラード20%、氷20%を混合して製造し、燻煙せずに加熱殺菌だけ行い製造した。いずれも保存は脂質酸化を短期間で検討するため37℃で貯蔵し、脂質の酸化の程度は、マヨネーズはPOVにより測定し、ソーセージはTBA法により測定した。保水性向上効果の実験では、食物繊維としてセルロース、イヌリン、ビートファイバーを用いた。これらをソーセージ製造時に混合し、充填後に燻煙および加熱殺菌して製造した。保水性は、加圧ろ紙法によるドリップ損失量および水分量から計算により求めた。

【結果】マヨネーズにおける色素の脂質酸化抑制効果は1%サツマイモ色素添加区、0.1%BHT添加区、無添加区で経日的変化を調べると、貯蔵20日目以降は、色素及びBHT添加区が無添加区に比べて脂質の酸化を抑制し、サツマイモ色素がBHTと同等の効果を示すことが分かった。次に、色素の添加濃度を変えて調べると、1%以上の添加で脂質の酸化を抑制した。また、この効果を、赤キャベツ、紫トウモロコシ色素（1%添加）と比較すると、サツマイモ色素が最もマヨネーズの脂質酸化を抑制する傾向を示した。モデルソーセージでは、紫サツマイモ色素は濃度依存的に脂質の酸化を抑制し、0.2%添加により0.1% BHTと同等程度に酸化を抑制した。有色ポテトフレークを50%添加したモデルソーセージで最も脂質の酸化が抑制された。2%添加の酸化抑制効果は50%添加の8割程度に相当した。この2%添加は0.2%紫サツマイモ色素とアントシアニン量で同等である。そこで、2%添加ソーセージおよび添加しないソーセージの官能検査を行うと、色調以外の項目では有意な差は認められなかった。以上の結果から、アントシアニン色素はマヨネーズやソーセージ中において貯蔵中に脂質の酸化を抑制する効果が認められ、実際の製品への応用が期待できることが示唆された。

S-2

未利用資源から機能性食品の開発

岡田 博（コスモ食品株式会社 代表取締役社長）

北海道は農林水産資源が豊富であることから、これを原料にした一次産品食品加工工場が各地に点在しています。弊社ではその工場における生産活動に伴って排出される蛋白質を有効活用しており、これら可食性蛋白質の“未利用資源”を原料に調味料や機能性食品を開発し、資源の最大活用と循環型社会への貢献を目指しています。

基本技術としては、蛋白質の酸加水分解と酵素分解、そして乳酸菌発酵ですが、特に機能性食品素材として製造販売しております、北海道産の馬鈴薯の蛋白質を酵素分解したポテトペプチド（商品名：ポテ味）と、製餡工場の煮汁からポリフェノールを抽出した、抗酸化性を持つ「あずきの素」についてその製法と特長について説明致します。

まず、ポテトペプチドに関してですが、原料は澱粉工場で澱粉をとった後の蛋白質であり、これを酵素分解して精製した物であります。この製造方法については、平成14年に、十勝食品加工技術センター様と弊社で開発しました。その際には、アンジオテンシン変換酵素阻害活性、すなわち血圧上昇抑制作用という生理活性を有する機能性食品としての特許を取得しました。その後、平成17年から19年までの3カ年で、文部科学省所管の「都市エリア産学官連携促進事業」として帯広畜産大学様をはじめとする、産・学・官の連携により、健康機能性の検証が行なわれ、肝機能改善効果や生活習慣病の予防改善食品としての機能が動物実験で証明されたことから、新たな特許も申請し商品化したものであります。用途としましては、機能性食品素材として、飲料やサプリメント、さらに品質改良剤として、パンの発酵促進やビスケット、スナック、焼き菓子、漬物、ソース、味噌など、調味料としては、レトルト加工品やスープ、スナック菓子や小麦粉製品などであります。

次に、製餡工場の煮汁を利用した高ポリフェノールのあずきエキス（商品名：あずきの素）についてですが、これも産・学・官の連携から生まれた商品であります。原料であるあずきの煮汁から、不溶性物質である澱粉や蛋白質、多糖類などを酵素反応により分解除去した後、濃縮し、精製後、粉末化しております。この製品の特長は、粉末化の直前に特定の処理を行なうことにより鮮やかな小豆色になったことから、同系色の色素であるタマリンドより力価が高いことが確認されたので、天然色素としての用途が広がったことでもあります。用途としては、赤飯、乳製品、冷菓、飲料、練り製品、ゼリー、飴、スナック類、菓子パンなどであり、すでにこれを用いた赤飯が市販されております。また、カテキングリコシドというポリフェノールが16%含まれていることから、退色防止効果があることも研究過程で検証されましたので、酸化防止剤としての利用、さらに健康機能性についても着目しております。

以上のように、天然の素材を用いた、安全で安心な製品作りに今後もこだわり、環境負荷の軽減と地域の発展に貢献できるよう、全社挙げて取り組んでいるところであります。

S-3

ワカメ脂質を抱合したホタテ由来リン脂質マイクロカプセルの抗肥満効果

岡田 朋子 (北大院水産)

【目的】本研究ではホタテ加工廃棄物から抽出したリン脂質を膜材として、フコキサンチンを含有するワカメ由来の脂溶性成分を内包する事で、抗肥満訴求型マイクロカプセルを調整し、新食品素材としての機能促進効果を評価することを目的とした。

【方法】肥満病態マウス (KK - A^y マウス) を用い、AIN-93G組成に基づき飼料を調製し、¹⁾コントロール群 (13.5%大豆油コントロール食+水)、²⁾ワカメ脂質水分散液群 (コントロール食+0.2%ワカメ脂質混合飲料)、³⁾リン脂質水分散液群 (コントロール食+0.3%リン脂質混合飲料)、⁴⁾ワカメ脂質+リン脂質飲料群 (コントロール食及び²⁾と³⁾を混合したマイクロカプセル飲料)、⁵⁾ワカメ脂質食餌群 (12.5%大豆油コントロール食+1%ワカメ脂質+水)、⁶⁾リン脂質食餌群 (12.5%大豆油コントロール食+1%リン脂質+水)、⁷⁾ワカメ脂質+リン脂質食餌群 (11.5%大豆油コントロール食+ワカメ脂質1%+リン脂質1%+水) の全7群を設け、4週間の投与飼育を行った。解剖後、白色脂肪重量、褐色脂肪重量、血漿中の各脂質含量等について検討した。また、精巣周囲WAT及び腸間膜WAT中のUCP1の発現をWestern Blotting法を用いて測定し、同じく精巣周囲WAT及び腸間膜WAT中のUCP1 mRNAの発現をRT-PCRを用いて測定した。

【結果】コントロールと比較して、ワカメ脂質水分散液投与群とワカメ脂質+リン脂質マイクロカプセル群で、有意な体重増加抑制効果が認められた。血漿成分分析結果からは、ワカメ脂質水分散液投与群で総コレステロール値がコントロールと比較して有意に高い値を示したが、マイクロカプセル群では差は見られず、LDLコレステロール、中性脂肪レベルに関してもマイクロカプセル群とコントロールとは、差は見られなかった。一方、総白色脂肪重量については、マイクロカプセル投与群で有意に減少し、精巣周囲WATのUCP1及びUCP1 mRNA発現においてもコントロールと比較して有意に高い値を示した。これらの結果からフコキサンチン含有ワカメ脂質を包含した、ホタテ由来リン脂質から調製したマイクロカプセルには抗肥満効果がある事が示唆された。

S-4

難消化性糖類による腸内細菌叢の制御を介したアレルギー疾患予防の試み

園山 慶（北大院農）

腸内細菌叢と免疫系の発達ならびにアレルギー発症との関連についての知見が蓄積されるのにとともに、*Lactobacilli*や*Bifidobacteria*を投与することによるアレルギー予防・改善の試みが行われるようになった。これらはもともと腸内に常在する菌群であり、難消化性糖類はこれらの増殖を促進するので、難消化性糖類にもアレルギーの予防・改善効果が期待できるはずである。しかしながら、難消化性糖類の臨床試験はこれまでほとんど行われていない。我が国ではラフィノース（RAF）ならびにメリビオースの投与がAD患者の皮膚炎症状を改善したことが報告されている。またイタリアにおいてAD発症のリスクをもつ乳児を対象に二重盲検比較対照試験が行われ、ガラクトオリゴ糖（GOS）とフラクトオリゴ糖（FOS）の混合物投与がADの発症率を有意に低下させたことが示された。

私達は、卵白アルブミン（OVA）を抗原としたアレルギー性喘息をBrown Norwayラットに惹起し、RAFの混餌投与が気道炎症を抑制することを示した。同様な効果は、 α -結合GOSでも観察された。また、BALB/cマウスにジニトロフルオロベンゼンを塗布して接触過敏症を惹起するモデルでは、FOSの混餌投与が耳介の肥厚を有意に抑制した。このマウスの糞便よりDNAを抽出し、細菌の16S rDNA断片をPCRで増幅して変性剤濃度勾配電気泳動法（DGGE）により分析したところ、FOSが腸内細菌叢の構成を修飾することが示唆され、とりわけ定量PCRにより推定した*bifidobacteria*菌数と耳介の肥厚に負の相関が認められた。つまり、FOSによる接触過敏症の抑制には*bifidobacteria*が関与することが示唆された。

腸内細菌はとりわけ発育初期の免疫系に影響を及ぼすと考えられるので、発育初期の腸内細菌叢を修飾することにより成育後のアレルギー発症に影響を受けるかもしれない。私達は、FOS添加飼料で妊娠・授乳期のマウスを飼育することにより、離乳前の仔マウスの腸内細菌叢の構成を修飾できることを観察したので、これを発育後にADを自然発症するNC/Ngaマウスに適用した。その結果、母マウスへのFOS投与によって仔マウスの発育後のADを抑制できること、発育後にFOSを摂取してADを抑制することはより難しいことが示唆された。

以上のように、難消化性オリゴ糖がアレルギーの発症を抑制することが動物モデルを用いて示されており、今後はこれらのモデルを用いて作用機序の解明に向けて努力することが必要である。

ところで、北海道産米の一品種であるゆきひかりを米アレルギー患者が摂取することによりAD症状が改善することが報告されているが、その機序は解明されていない。私達はこの効果に腸内細菌叢が関係しているのではないかと考えて検討している。まず、BALB/cマウスに異なる品種の米を摂取させたとき、摂取した品種が腸内細菌叢の構成を修飾することをPCR-DGGEおよび16S rDNAクローンライブラリの解析により示した。また、OVAを抗原としたアレルギー性下痢症マウスにおいてはゆきひかり摂取群で他品種群と比して下痢の発症頻度が低い傾向にあった。更に、経口投与したOVAに対する抗体産生がゆきひかり摂取群において他品種群よりも低かった。これらの結果は、ゆきひかりに含まれる難消化性糖類が腸内細菌叢を修飾する結果、アレルギーを抑制する可能性を示唆している。

カンジダ菌（*Candida albicans*）はヒトの粘膜面に常在する日和見感染真菌である。私達は、消化管粘膜における本菌の定着がアレルギー発症の危険因子および増悪因子となる可能性を、動物実験により示してきた。このことは言い換えれば、*C. albicans*はアレルギー予防・改善のための標的のひとつとなりうるということが出来る。常在細菌が*C. albicans*の定着・増殖の制御に大きな役割を果たしているため、難消化性糖類により*C. albicans*を除菌できる可能性があり、実際に私達の*C. albicans*定着マウスにおいてFOSが結腸における*C. albicans*の定着を阻害することを観察している。したがって、難消化性糖類が消化管における*C. albicans*定着・増殖の制御を介してアレルギーの予防・改善に寄与するケースもあるかもしれない。

難消化性糖類は、限られた菌種を投与するプロバイオティクスに比べ、よりグローバルに腸内細菌叢を修飾できるが、難消化性糖類によるアレルギーの予防・改善に関連するこれまでの研究は極めて限られている。今後、精密なヒト介入試験や作用機構解明がなされることが望まれる。

S-5

植物エキス発酵飲料中の新規フルクトピラノシド型オリゴ糖類

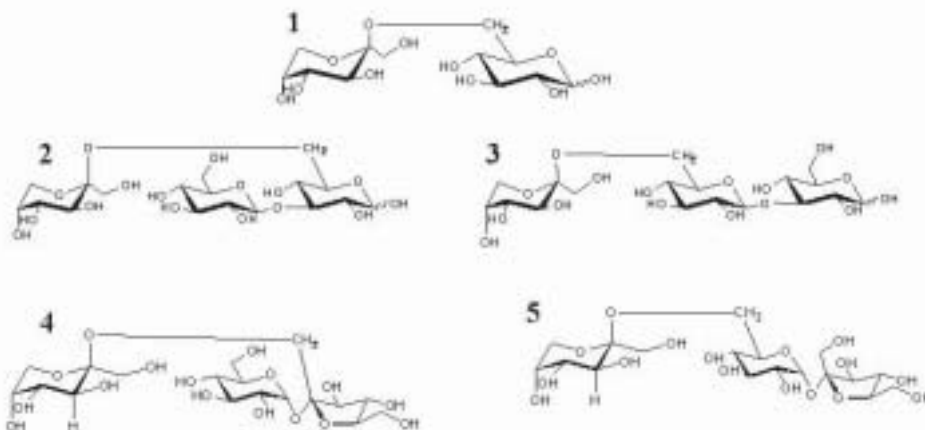
岡田秀紀（大高酵素株式会社）

【目的】植物エキス発酵飲料（以下FPE）は数十種類の野菜、果物を原料とし、sucroseの浸透圧を利用してエキスを抽出し約半年間、酵母および乳酸菌によって自然発酵させた褐色、粘ちよう性の飲料である。発酵中にsucroseはほとんどglucose、fructoseに分解される。この飲料の投与によりラットの寿命延長効果が示唆されており、アルコール性胃粘膜障害抑制効果を有する¹⁾ことを報告している。FPE中に含まれるglucose、fructose以外の糖質の検索は、60%近い糖濃度の飲料であるため困難であったが、高感度に検出する方法を用いることにより微量に含まれるオリゴ糖類の検出が可能となり、その結果、数種の新規オリゴ糖が見出され、そのうちのいくつかはピラノシドタイプのfructose残基を有していた。また、希少な糖類もいくつか見出された。本シンポジウムでは、FPEからのオリゴ糖の単離と構造決定を行った結果について報告する。

【方法】FPEから活性炭クロマトグラフィーや、Amide-80カラム、ODS-80TsカラムおよびODS-100Vカラムを用いたHPLCにより十数種の糖類を単離した。これら糖質について酸加水分解による構成糖分析、MALDI-TOF-MS分析、完全メチル化メタノリゼートのGCおよびGC/MS分析、COSY、HSQC、HSQC-TOCSY、HMBC等の2次元NMR分析等により構造解析を行った。また、発酵熟成前の植物抽出液についても調査し、得られた糖類が発酵熟成により生成されるか確認を行った。

【結果】FPEから単離した糖質を構造解析した結果、5種類のピラノシドタイプのfructose残基を有する新規糖質を見だし、それぞれO-β-D-fructopyranosyl-(2→6)-D-glucopyranose(1)²⁾、O-β-D-fructopyranosyl-(2→6)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-D-glucopyranose(2)、O-β-D-fructopyranosyl-(2→6)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)]-D-glucopyranose(3)³⁾、O-β-D-fructopyranosyl-(2→1)-O-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-β-D-glucopyranoside(4)、O-β-D-fructopyranosyl-(2→6)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranoside(5)と決定した。また、この他にも新規糖質である1^F-β-D-glucopyranosylsucrose、1^F-β-D-galactopyranosylsucrose⁴⁾や、O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-D-glucopyranose、O-β-D-fructofuranosyl-(2→6)-D-glucopyranose、laminaribiose、sophorose、gentiobiose、raffinose、panose、maltose、maltotriose等が含まれていることを確認した。これらの糖質のほとんどは、発酵熟成中に生成された。また、糖1については若干の機能性についても調査した⁵⁾。

1) 岡田ら, 日本栄養・食糧学会誌 58 209-215 (2005). 2) Okada et al., Carbohydr. Res., 341 925-929 (2006). 3) Kawazoe et al., Carbohydr. Res., 343 549-554 (2008). 4) Kawazoe et al., Open Glycosci. 1 25-30 (2008). 5) Okada et al., J. Appl. Glycosci., 55 179-182 (2008).



特別講演

牛乳中の感染防御タンパク質 - ラクトペルオキシダーゼとラクトフェリン -

島崎 敬一 (北大院農)

牛乳タンパク質についての研究は非常に古くから行われていた。たとえば、牛乳から酸によってカゼインを分離したとの報告があるのが1830年で、カゼインを除いた残りのホエイに含まれるホエイタンパク質の報告は1885年にみられる。1930年代になってからは -ラクトアルブミンと -ラクトグロブリンが結晶化法で分離されている。これらホエイタンパク質は栄養としての他に、多様な生物学的機能を示し、特に免疫グロブリン(IgG, IgM, sIgA)、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、および母乳中のリゾチームなどは感染防御機能を発揮する。これらの中でラクトペルオキシダーゼとラクトフェリンについて、これまで行ってきた研究成果および最近の研究動向について述べる。

牛乳中にペルオキシダーゼ活性が見出されたのは1881年であり、唾液や涙に見られるペルオキシダーゼ同様に抗菌活性を示すヘムタンパク質である。分子量は約8万で、ラクトペルオキシダーゼと呼ばれ、ラクトペルオキシダーゼに結合しているヘムは活性部位を構成しているだけでなく、分子の安定性にも大きく寄与している。「ラクトペルオキシダーゼシステム」は、過酸化水素(H_2O_2)とチオシアン酸イオン(SCN⁻)共存下で示す抗菌系を指し、グルコース - グルコースオキシダーゼ系によって抗菌反応に必要な H_2O_2 を得る方法が、生乳の冷蔵輸送が完備していない地域で利用されている。もともと生乳に存在する乳糖はグルコースとガラクトースから構成される二糖のため、乳糖 - -ガラクトシダーゼ系を初期反応に用いることを考案し、抗菌作用の発現にも成功した。また、組換えウシラクトペルオキシダーゼのN-末端アミノ酸配列は¹⁰¹Aspから始まるが、牛乳から分離した複数の標品を調べたところ、異なる長さのラクトペルオキシダーゼ分子が存在することを見出している。なお、長らく未解明であったラクトペルオキシダーゼのX線結晶構造が、2007年によりやく報告され、今後の研究に大きく役立つものと期待される。

ラクトフェリンは、牛乳に含まれる赤色タンパク質として1939年に報告された。ペルオキシダーゼ活性の発見に遅れること半世紀以上である。ラクトトランスフェリンとも呼ばれ、分子量が約8万の金属イオン結合性の糖タンパク質で、トランスフェリンファミリーに属するタンパク質である。ラクトフェリンについては、静菌作用の他に殺菌・抗ウイルス・細胞増殖調節・抗炎症・免疫調節・抗酸化・ピフィズス菌増殖促進など、多くの活性が1970~1980年代にはすでに報告されていた。非常に多機能であることが、研究対象の一つとして選択した理由である。間もなくアミノ酸全配列・塩基配列の決定および結晶構造の解明があった。その後も抗がん作用などさらに多くの機能が見出されており、これらの機能が健康・医療と密接に関連することから、農・食品系よりも医学関連の研究発表の割合が現在は多くなっている。これまでに、ラクトフェリンの担う部位を突き止めるために、N-およびC-ロープの分離を行い、硫酸化多糖であるヘパリン結合部位の決定を行った。また、乳房炎原因菌や乳酸菌・ピフィズス菌の生育に対する効果の評価なども行っている。さらに、ラクトフェリンのさまざまな機能を説明するため3つのモデルを提案した。十徳ナイフモデル、ピリヤードモデル、キャリアモデルである。

これら牛乳中の微量活性成分については、健康補助食品を始め多様な形態での活用が進展している。しかし、貴重な食料資源の一つである牛乳やホエイは、各成分の特性を生かしながら、かつ成分全てを利用することが重要と考える。

A-1 エミュー卵の加工特性と卵白タンパク質組成

(東京農大 生物産業学部) 武内 純子、渡部 俊弘、永島 俊夫

研究背景) オーストラリア原産の走鳥類であるエミュー (*Dromaius novaehollandiae*)はおとなしい性質や飼育の容易さなどから、新しい家畜として期待が高まっている。肉や脂質だけでなく、卵もその利用価値が高いと考えられているが、卵の一般成分や加工特性等について基礎的な情報が得られていないのが現状である。そこで、本研究ではエミュー卵の加工特性と卵白を構成するタンパク質について、鶏卵と比較して解析した。

方法・結果および考察) 北海道網走産のエミュー卵を実験に用いた。卵黄、卵白および全卵のそれぞれについてホモジナイズド液を調製し、一般成分分析を行った結果、エミューの卵黄は鶏卵の卵黄に比べて脂質が少なく、水分をやや多く含むことが分かった。卵白の組成には両者の間に顕著な差が見られなかったが、卵黄体積が大きいことから、エミュー全卵としては脂質にやや富む結果となった。次に加熱変性試験として、主に澱粉の粘性試験に用いられる迅速粘度測定機 (R.V.A.) を利用し卵黄もしくは全卵の粘度を調べた結果、これらの加熱変性試験にR.V.A.が応用できることが示唆され、全卵の加熱変性温度に大きな違いがあることが分かった。卵黄の加熱変性温度は鶏卵とほぼ同じであったことから、卵白を構成するタンパク質に違いがあると考え、エミュー卵白タンパク質の分画を行った。その結果、粗抽出液中のタンパク質が示すSDS-PAGEのパターンが鶏卵の場合と大きく異なること、オボアルブミンに相当するタンパク質が鶏卵と同じ大きさに検出されないことが示された。

A-2 初乳および常乳ホエイのプロテオーム比較解析

(¹帯畜大畜産衛、²帯畜大獣医) 福田 健二¹、仙田 晶嗣¹、石井 利明²、浦島 匡¹

【背景】 分娩後5日以内に搾乳された乳を初乳と呼び、牛乳 (常乳) と区別している。乳等省令に基づき、初乳が食品として市場に流通することは制限されており、酪農家で仔牛に給餌する以外は自家消費されている。初乳を未利用資源として捉え、含有する有益な未利用タンパク質資源の探索を目的とした。

【材料および方法】 本学フィールド科学センターで飼育されている健康な乳牛 (Holstein-Friesian) 5頭から初乳を経時的に採取した。得られた乳試料を遠心分離により脱脂し、酸沈殿によりカゼインを除去した。さらにゲルろ過による脱塩を行なったものをホエイ試料として二次元電気泳動に供した。二次元電気泳動後、各試料について得られたゲルのスポットパターンを比較した。次に、タンパク質スポットの切り出しを行ない、定法に従い脱銀処理、ゲル内トリプシン消化、およびペプチド断片の回収を行なった。質量分析はBRUKER AutoflexIIを用いた。得られたマスリストをもとにMass Toleranceが100 ppmの条件でMascot検索を行なった。また、一部MS/MS検索を行なった。

【結果と考察】 ホエイタンパク質のスポットパターンは経時的に変化し、初回搾乳後48時間以降ほぼ同様のパターンを示すことが明らかとなった。また、スポットパターンに大きな個体間差は見られなかった。検出可能なスポット数は約100個であり、そのうち、初乳において発現量が豊富な6種のタンパク質を同定した。初乳にVitamin D-Binding Proteinが豊富に含まれることから、分娩後初期におけるビタミンDの効率的な供給が新生仔牛の成長に重要であることが示唆された。

本研究は生研センターによる生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業「初乳成分の高度利用技術の開発」として行なわれた。

A-3

初乳に存在するOdorant-binding proteinの発見

(¹帯畜大畜産衛生、²北里大理、³東光薬品、⁴帯畜大獣医)

仙田 晶嗣¹、福田 健二¹、寺林 隆志²、森田 稔³、石井 利明⁴、浦島 匡¹

【背景】初乳に含まれる未利用資源の探索を目的として、特にタンパク質成分に注目し様々な分離・検出法を試みた。その結果、初乳のクロロホルム/メタノール抽出画分にOdorant-binding protein (OBP) が含まれていることを明らかにしたので報告する。

【材料および方法】ウシ (Holstein-Friesian) の初乳をクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 処理し、水・メタノール層を回収した。凍結乾燥後Bio-Gel P2Iによるゲルろ過、TLCおよびQ-Sepharose FFを用いた陰イオン交換により粗精製した。粗精製画分をSDS-PAGEに供し、タンパク質バンドの切り出し、ゲル内トリプシン消化およびペプチドの抽出を行なった。質量分析器としてBRUKER AutoflexIIを用い、得られた質量情報をもとにMascot検索によりタンパク質を同定した。

【結果と考察】粗精製画分をSDS-PAGEに供したところ、分子量20 kDa付近に主要なバンドが認められた。同バンドを切り出し、ペプチドマスフィンガープリンティングを行なったところHypothetical protein LOC517854 (similar to odorant-binding protein) と同定された。ウシの乳中に同タンパク質が見出されたのは、本研究が初めてである。OBPは疎水性低分子リガンドの結合・運搬に関与することが報告されており、同タンパク質もフェロモン等の結合・運搬に関与することが示唆された。

本研究は生研センターによる生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業「初乳成分の高度利用技術の開発」の一環として行なわれた。

A-4

High potency anti-oxidative peptides identified by enzymatic hydrolysis of whey protein isolate.

(¹Hokkaido Univ., ²Hangyong National Univ.)

Seema Kafley¹, Woan-Sub Kim², Haruto Kumura¹ and Kei-ichi Shimazaki¹

Purpose: Whey is a by-product of the cheese industry, but is a source of biological and functional valuable proteins, extending its importance for utilization in pharmaceutical, infant food and beverages. Also, the peptides obtained by hydrolysis of whey protein acts as bioactive components. In the present study, we have identified the amino acid sequence of Whey Protein Isolate (WPI) responsible for its anti oxidative property.

Materials and Methods: Whey protein isolate with or without preheating at 90 /5 min, were hydrolysed for 24 hours at 37 with varied concentration (protein: enzyme of 500:1 and 1000:1) of two enzymes, pepsin at pH 2 and trypsin at pH 7.5. SDS electrophoresis was done in tris-tricine buffer system. The HPLC pattern of all the samples (hydrolysed and unhydrolysed, heat treated and unheated, filtrate and supernatant through 5 kDa filter) was checked using C-18 column. Among all, the antioxidant activity was higher with trypsin hydrolysis in both (heated and unheated) WPI. The selected samples were separated by RP-HPLC and fractions collected were concentrated by vacuum centrifuge concentrator. UV Spectrophotometer and microplate reader were used for concentration determination. The samples were measured for anti oxidant activity by chemiluminescent as well as DPPH method. The MALDI TOF mass spectrophotometry showed the molecular weight of highest anti oxidation possessing peptides. Edman degradation method determined the amino acid sequence of the peptide.

A-5 ダットンソバの抗酸化活性物質について

(東海大院理工) 大森 千恵子、西村 弘行

【研究背景】近年、高齢社会による医療費の増大などの深刻な問題を抱える日本において、病気を未然に防ぐ予防医療が盛んに叫ばれている。その中でも、日本人の死因の約3分の2を占める生活習慣病に関するそれは大きな関心を持たれ、とりわけ『食生活』において『健康食材・健康食品』を取り入れることに多くの注目が集まっている。この現状下で、食が持つ機能性を探索する試みがなされている。

今回用いたダットンソバは中国原産のソバで、普通の日本ソバに比べ苦味を呈し、数十～百倍も含まれるルチンやケルセチンなどは抗酸化活性物質として知られ、降圧作用も確認されている。その他にもケルセチン配糖体であるケルシトリンや美白効果があるとされるシス・ウンベル酸等の報告がされているが、それ以外の研究報告は少ない。

【方法・結果】生活習慣病の基盤ともなる動脈硬化の一つであるアテローム性動脈硬化は、活性酸素種などにより酸化された低密度リポタンパク(LDL)が要因で発症し、この酸化を防ぐことがアテローム性動脈硬化の予防につながると考えられ、本研究では抗酸化活性を指標に実験を行った。今回は抗酸化活性検定法としてDPPHラジカル捕捉活性法と化学発光法を用いた。

無加工のダットンソバ(全粉)と焙煎加工されたダットンソバ(全粉)を各々約1ヶ月間エタノール抽出したものを濃縮・乾固させたのち極性の差により分画し、高い活性が確認された酢酸エチル画分を酸性度の差により分画した。この内、高い活性が確認された有機酸性画分とフェノール性画分を各々ODSオープンクロマトグラフィーに供し、高い活性を示したフラクションを更に高速液体クロマトグラフィーにて精製し、活性物質の単離・同定を試みた。

A-6 ネギ属植物中の男性ホルモン誘導含硫アミノ酸の定量について

(東海大院理工) 鈴木 勇二、西村 弘行

【目的】タマネギやニンニクなどネギ属植物に含まれる含硫化合物は様々な生理作用を持つことで知られているが、品種や加工法により、その含有量は大きく異なる。近年、ネギ属植物に含まれる含硫アミノ酸が男性ホルモンであるテストステロンを誘導する活性を持つことが明らかとなった¹⁾。これは、中・高年男性の性的機能老化改善効果やうつ病予防が期待できるため、ネギ属に含まれる含硫アミノ酸の定量を行ない、品種間での差異を調べたので報告する。

【方法】サンプルを電子レンジで加熱後に刻んだ物と、加熱せずに刻んだ物の2種を0.01Mの塩酸を含む80%メタノールに一週間浸漬し、得られた抽出物をHPLC(YMC Pack NH2)にて分析した。合成により得られた各種含硫アミノ酸を標品として用い作成した検量線からサンプル中の含有量を測定した。

【結果および考察】今回、7品種のタマネギと日本産および中国産ニンニク、ギョウジャニンニク、ラッキョウの合計11種のネギ属植物をサンプルとして用い、含硫アミノ酸であるS-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (R = methyl: MCSO, propyl: PCSO, allyl: ACSO)の定量を行なった。タマネギ品種中ではオホーツク222と北もみじ2000がPCSO、MCSO共に比較的高い含有量を示した。最も一般的に販売されている品種であるスーパー北もみじは、PCSOの含有量は平凡であるが、MCSOの含有量はタマネギ品種中では最も高かった。また、加熱処理せずに刻んだものは加熱処理したものに比べ、含硫アミノ酸の含有量が減少した。

1)西村、水島「テストステロン増加剤、およびネギ属植物処理物の製造方法」特許第4172488号(2008)

A-7

赤チコリー抽出物の抗酸化活性およびU937細胞に対する増殖抑制活性について

(¹東海大院理工、²東海大生物理工) 木村 卓郎¹、佐藤 敦²、西村 弘行¹

【目的】 食用に供するチコリーはキク科 *Cichorium intybus* L. の軟白葉 (Agronomical deviations) であり、特有の苦み成分であるセスキテルペン類をもつ。近年同系の変異種由来赤色チコリー軟白葉 (以下赤チコリー) が市販されるようになった。すでに我々は、チコリー軟白葉の活性物質としてカフェ酸誘導体とセスキテルペン (8-deoxylactucin) がヒト白血病由来株細胞U937の細胞増殖抑制活性を有すること、また赤チコリー赤色成分の両活性関与を報告した (2008年度農芸化学学会大会)。今回赤チコリーの活性物質の単離を試みたので報告する。

【材料と方法】 チコリー軟白葉は東海大夕張試験農場で作出し、赤チコリーは市販品を使用した。抗酸化活性はDPPHラジカル捕捉活性法を用い、細胞増殖抑制は一定時培養後の被検細胞数を無添加細胞数に対する百分比で調べた。赤チコリー酸性アセトニトリル抽出物をアンバーライトXAD-7次いでODS-HPLCで分画・精製を行った。

【結果と考察】 1.赤色を有するXAD-7 20% AcCN溶出画分の抗酸化活性 (IC_{50}) は12 μ g/ml、細胞増殖抑制活性は120 μ g/mlを示した。2.ODS-HPLCにより単離した物質はスペクトル解析の結果cyanidine-3-malonylglucosideであることを確認した。その抗酸化活性は16 μ g/mlであったがU937細胞に対する増殖抑制活性は投与重量300 μ gに於いて25%に留まり IC_{50} 値は得られていない。3.活性に寄与する物質の全体像について現在検討中である。

A-8

ヒドロキシ桂皮酸およびヒドロキシ安息香酸誘導体がヒト骨髄性白血病由来株U937の増殖に及ぼす効果(2)

(¹東海大生物理工、²東海大院理工) 佐藤 敦¹、村井 陽徳¹、木村 卓郎²

研究背景) プロポリスから単離されたカフェ酸フェネチルエステル (CAPE) は、抗炎症作用などを有する化合物であり、また、ヒト骨髄性白血病由来株U937など動物細胞に対して比較的低濃度でその増殖を抑制する。しかしながら、遊離のカフェ酸の細胞増殖抑制活性は、CAPEと比較して非常に弱い。昨年度、私たちは、カフェ酸メチルエステル~カフェ酸ペンチルエステルまでの5種のエステルおよびCAPEを用いて、50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) と分配係数 ($\log Pow$) の相関が、二次式によって近似される事を明らかにした。今回は、プロトカテキユ酸エステルおよび没食子酸エステルを用いて、アルコール部分の効果を、さらに検討した。

方法) 昨年度と同様に、カフェ酸、プロトカテキユ酸および没食子酸のメチル~デシルエステルを、酸触媒縮合反応により対応するアルコールから調製した。各エステルの細胞増殖抑制効果は、MTT法により、各エステル添加48時間後の細胞数を求め、50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) により評価した。

結果) MTT法により求めたカフェ酸メチル~カフェ酸ペンチルまでの5種のエステルの IC_{50} と $\log Pow$ の相関は、昨年度と同様に二次式により近似された。近似式より求められる IC_{50} の極小値を与える $\log Pow$ は、昨年度、血球計算盤による細胞計数の結果と同じ値を示した。さらに、MTT法により、プロトカテキユ酸エステル並びに没食子酸エステルの IC_{50} を評価したところ、いずれのエステルのおいても、分配係数 ($\log Pow$) 2~3の間で最も強い細胞増殖抑制活性を示した。このことからヒドロキシ桂皮酸およびヒドロキシ安息香酸エステルの細胞増殖抑制活性には、分配係数の最適値があることが明らかとなった。

A-9

消化管免疫系細胞の細胞傷害性に及ぼすきのこ熱水抽出物の影響

(¹北大院農、²北海道立食品加工研究センター)

岡 浩輔¹、李 載星¹、渡邊 治²、原 博¹、石塚 敏¹

研究背景)我々はこれまでに、ラットから小腸及び大腸における消化管粘膜固有層に存在する免疫系細胞(LPL)の分離法を確立した。この手法を用いて分離した消化管免疫系細胞の機能を評価する手段として細胞傷害性測定試験を行い、LPLは細胞傷害性を有するという結果を得ている。一方、きのこは抗腫瘍作用をはじめとする保健機能性が以前から知られており、健康増進作用を持つ食品として期待されている。そこで我々は、LPLの細胞傷害性に及ぼすきのこ抽出物の寄与を検討した。

方法)ラット小腸よりLPLを分離してこれをエフェクター細胞(E)とし、YAC-1細胞をターゲット細胞(T)としてRPMI1640培地内でE:T=50:1となるように調整、37℃で2時間共培養した。その際、培地中の種々のきのこ熱水抽出物濃度を0.1、1、10 mg/mlになるように調整した。その後、FACSにて細胞死を起こしたYAC-1細胞の頻度を測定した。また、同一培養条件でLPLを加えないサンプルを調製し、きのこ熱水抽出物がYAC-1の細胞死を直接的に誘導するかどうかを併せて検討した。

結果及び考察)小腸LPLをきのこ熱水抽出物含有培地で培養した結果、ブナシメジ、ナラタケ、ムキタケ、及びタモギタケで細胞傷害性の亢進を確認した。特にムキタケは他のきのこに比べて低濃度で影響を及ぼすことを見出した。一方でエノキタケ、ナメコ、マイタケでは、活性の変化は見られなかった。細胞傷害性亢進が見られたきのこ熱水抽出物のYAC-1細胞死に及ぼす直接的な作用はムキタケのみで見られたが、その程度はLPLを加えて誘導される細胞死と比較すると極めて小さいものであった。これらの結果から、消化管粘膜における免疫監視機構にきのこ熱水抽出物が寄与すること、またその作用の程度はきのこの種類により極めて多様であることが示された。

A-10

消化管内分泌細胞株GLUTagにおける、トウモロコシペプチドによる消化管ホルモンGlucagon-like peptide-1分泌機構

(¹北大・農、²北大院農) 川村 侑輝¹、比良 徹²、原 博²

【背景・目的】我々は、トウモロコシペプチド(ZeinH)が消化管ホルモンGlucagon-like peptide-1(GLP-1)の分泌を刺激することを、GLP-1産生消化管内分泌細胞株ならびにラットにおいて明らかにしてきた。本研究では、消化管内分泌細胞における、ZeinHによるGLP-1分泌機構を明らかにすることを目的とし、実験1では、ZeinHによるGLP-1分泌における細胞内情報伝達経路を解析し、実験2では、消化管内分泌細胞に認識されるZeinH中の活性ペプチドの同定を試みた。**【方法】**トウモロコシの難消化性たんぱく質Zeinをパブリン処理(55℃、60分)することでZeinHを調製した。マウス腸管由来のGLP-1産生細胞株GLUTagを用いて、ELISAによるGLP-1分泌の測定、ならびに細胞内情報伝達経路の解析を行った。実験1: 細胞内イオン測定装置(CAF-110)とCa²⁺感受性色素Fura-2 AMを用いて、GLUTag細胞をZeinHに暴露した際の細胞内Ca²⁺濃度を測定した。実験2: 水とアセトニトリルを移動相として、C18カラムによる逆相HPLCを用いて、ZeinHを分画、分取し、GLUTag細胞における各画分のGLP-1分泌活性を評価した。**【結果・考察】**実験1: GLUTag細胞をZeinHに暴露すると、濃度依存的な細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された。この結果より、ZeinHによるGLUTag細胞におけるGLP-1分泌において、細胞内Ca²⁺シグナルの関与が示唆された。実験2: 逆相HPLCを用いて分離したZeinHの各画分のうち、疎水性の高い画分がGLP-1分泌活性を有していた。これにより、ZeinH中の疎水性のペプチドがGLP-1分泌刺激の主な活性本体であると考えられた。

A-11

コリン型Plasmalogenリンパ吸収の特徴

(¹北大農、²北大院農、³(株)ADEKA、⁴帝京大医)

山下 舞亜¹、西向 めぐみ²、山崎 裕也³、根津 亨³、前場 良太⁴、原 博²

研究背景) Plasmalogen(Pls)はリン脂質のサブクラスの一つで、主なクラスとしてコリン型(PlsCho)とエタノールアミン型(PlsEth)がある。グリセロール骨格の1位のビニルエーテル結合により抗酸化能を有し、動脈硬化症予防やアルツハイマー病の発症との関係が示唆されている。しかし、その吸収や生理作用には不明な点が多く、これまでにPlsCho投与による吸収の報告はなされていない。本実験では高度に濃縮されたPlsChoとPlsEthをラットに投与し、クラス別にPls吸収を見ることを目的とした。

方法) 十二指腸と胸管に脂質投与用とリンパ液採取用カテーテルを留置したWistar-ST系雄ラット(10週齢)に、コリン型リン脂質(CP)(ウシ心臓由来PlsCho 50.6%含有)とエタノールアミン型リン脂質(EP)(ブタ脳由来PlsEth 52.5%含有)をそれぞれ10%エマルジョンの形で1.0ml経腸投与した。投与開始から8時間、経時的に胸管リンパ液を全量採取した。リンパ液からリン脂質を抽出後、LC-MS/MS法により、Plsの各分子種を定量した。その他の脂質定量には市販キットを用いた。

結果及び考察) リンパへの放出量は、PlsCho、PlsEth共にCP、EP投与後に顕著に増加したが、その吸収率はPlsChoの方が3倍以上高い値を示した。吸収パターンはPlsEthがピークの3時間目以降、減少したのに対し、PlsChoはピークの5時間目以降も殆ど減少しなかった。PlsCho、PlsEth共にsn-2位の脂肪酸にはアラキドン酸が多く組み込まれたが、PlsChoにはリノール酸も多く組み込まれた。以上、PlsChoの方がより吸収率が良いことが示され、またPlsはアラキドン酸の貯蔵体としての役割を持つが、これがリンパ吸収の際に形成されている可能性が示唆された。

A-12

野生エゾヒグマの腸管における免疫グロブリンA(IgA)産生細胞の組織分布

(¹北大院農、²北大院生命、³道環科研)

園山 慶¹、武村 直紀²、比良 徹¹、釣賀 一二三³、間野 勉³

【背景・目的】クマ類は6ヶ月以上の冬眠期間中に摂食・排泄をまったく行わないが、非冬眠動物と同様に腸内細菌との共生関係を構築していると考えられる。しかしながら冬眠期間中の腸内細菌叢ならびに宿主の腸管粘膜バリアおよび腸管粘膜免疫についてはまったく調べられていない。本研究ではそれらのことを明らかにする一環として腸管粘膜免疫の重要な構成要素であるIgA産生細胞のエゾヒグマ腸管における組織分布を解析した。**【材料・方法】**のぼりべつクマ牧場において飼育下のエゾヒグマの新鮮糞便を採取し、アフィニティクロマトグラフィによりIg鎖を分離した。このものを完全フロインドアジュバントを用いてBALB/cマウスに免疫し、抗血清を得た。有害鳥獣駆除により捕殺された野生エゾヒグマの腸管組織をホルマリン固定した後に凍結切片を作成し、H/E染色、PAS染色、および抗ヒグマIg鎖マウス血清を用いた蛍光免疫染色を施した。**【結果・考察】**エゾヒグマ糞便から分離した約62 kDaのタンパクのN末端アミノ酸配列は、EVQLVESGGDLVKPGGSLLLと推定され、イヌ、マウス、およびヒトIg H鎖V領域と高い相同性を示したので、このものをエゾヒグマIg鎖として抗血清を作成し、IgA⁺細胞の免疫組織染色を行った。H/E染色およびPAS染色の結果、遠位小腸に巨大なリンパ球の集簇であるパイエル板を認めた。これは胚中心をもつ多数のリンパ小節から成るとともに、粘液産生上皮細胞に乏しいドーム状構造を絨毛間に形成していた。IgA⁺細胞は遠位小腸および結腸の粘膜固有層に観察され、それらはIgA産生形質細胞と考えられた。またIgA⁺細胞はパイエル板リンパ小節内にも散在していたので、パイエル板内でB細胞におけるIgのクラススイッチが生じていると考えられた。以上の結果から、エゾヒグマのパイエル板は粘膜免疫の誘導組織として機能することが示唆された。

A-13

フェノール性含窒素色素betacyaninの吸収動態の解明

(¹藤女子大院、²日甜総研、³帯畜大)

奥村 純子¹、稲澤 幸恵¹、菊地 裕人²、有塚 勉²、福島 道広³、知地 英征¹

研究背景) 植物色素betalainは、anthocyaninとは全く異なる構造を持つフェノール性含窒素色素で熱、アルカリ、紫外線などに不安定である。しかし、betalainの摂取によって尿が赤くなるBeeturia現象が報告されており、その生体内動態や生理機能については未だ不明な点が多い。以前、赤ビートから精製した赤紫色のbetacyaninの尿中排泄物を分析した結果、配糖体のみが検出され、生体内では安定的に移動することが示唆された。そこで、本研究では、小腸結紮ループ実験 (*in situ*) を行いbetacyaninの吸収動態を検討した。

方法・結果及び考察) 7週齢のSD系雄性ラットに、麻酔下で小腸結紮ループを作成し、1%betacyanin溶液5mLを注入した。その後、5分毎20分まで、下大静脈、門脈から採血し、小腸内容物を採取した。HPLC-DAD、LC-MSを用いて血液および小腸内容物中のbetacyanin代謝産物の分析を行った。その結果、色素注入5分後から小腸内容物中の配糖体 (betanin、isobetanin) の量が急速に低下し、吸収速度が速いことが推定された。さらに、この配糖体以外に、少量のアグリコン (betanidin、isobetanidin) が10分後に最大に達し、その後減少した。このことから小腸内でbetacyaninの一部が酵素分解を受けていることが確認された。色素が急激に吸収されたので、下大静脈及び門脈から経時的に採血した結果、投与5、10分後の両血清中に配糖体のbetanin、isobetaninのみが検出されたが、アグリコンは検出されなかった。以上の結果から、生体内でbetacyaninの大部分は配糖体のまま吸収後、肝臓を通過してもその構造を維持しており、抗酸化性等の生理機能を発現しながら体内を循環し、一部は尿中に排泄されると考えられる。

A-14

ビートファイバー入り湯種生地パン投与によるラットの脂質代謝への影響

金澤 聖月¹、飯島 勢津子¹、中村 有美¹、島田 謙一郎¹、関川 三男¹、山内 宏昭²、橋本 直人²、杉山 雅則³、田中 裕子³、福島 道広¹ (¹帯畜大・畜産学科、²北海道農業研究セ・芽室拠点、³株満寿屋商店)

目的) ビートファイバーを食品素材として加工したパンの健康機能性を明らかにするため、小麦粉を90 でミキシング24時間冷蔵保存した湯種生地を用いて製造したパンを基準として、それにビートファイバーを添加したパンについてラットの脂質代謝に与える影響について検討した。

方法) AIN93G基準食群(CN)、湯種生地パン30%投与群(BR)、10%ビートファイバー入り湯種生地パン30%投与群 (BFBR) の3群を設け8週齢のF344系雄ラットにそれぞれ4週間経口投与し、解剖を行った。採血は毎週行い、各試料の脂質はGLCで、血清成分は酵素法により測定した。

結果および考察) 糞便排泄量はBFBR群が他の投与群より有意に増加し、盲腸重量ではBR群に対し有意に増加した。血清総コレステロール、HDL-コレステロール及び中性脂肪濃度はBR群及びBFBR群でCN群に比べ有意に減少した。VLDL+IDL+LDL-コレステロール濃度についてもCN群、BR群、BFBR群の順に有意に減少した。また、肝臓中のコレステロール濃度ではBR群がCN群に対し有意に増加した。盲腸内pHではBFBR群が他の投与群より有意に低下した。さらに盲腸内短鎖脂肪酸濃度でもBR群及びBFBR群でCN群に比べ有意に増加し、BFBR群は最も高い値を示した。糞便中への中性ステロール排泄量では、BR群及びBFBR群でCN群に比べ有意に増加した。さらに糞便中の総胆汁酸排泄量ではBFBR群で他の投与群に比べ有意に増加した。以上の結果より、10%ビートファイバー入り湯種生地パンは盲腸中の短鎖脂肪酸の増加により、糞便中への中性ステロール及び胆汁酸の排泄を促進させ、血清中のコレステロール及び中性脂肪を改善している可能性が示唆された。

A-15

キノコ由来酸性糖脂質によるマウスT細胞活性化ならびにNK1.1 / TCR-double positive細胞の増殖誘導効果

(¹帯畜大畜産、²滋賀大教育、³帯畜大保健センター、⁴十勝食工センター、⁵東海大未来センター) 野崎 浩文¹、糸乗前²、杉田 陸海²、中村 公英³、大庭 潔⁴、鈴木 明身⁵、櫛泰典¹

【背景】T細胞が分泌するIFN- γ やIL-4は、細菌や寄生虫感染、自己免疫疾患や腫瘍などへの抵抗性獲得のための免疫応答や免疫調節誘導に必須である。従って、上記サイトカインの分泌誘導能の有無やそれら分泌誘導においてアジュバント効果を発揮することは、食品機能性の1つとして重要であると考えられる。現在までにリンパ球ではNKT細胞のみが、糖脂質抗原認識による活性化を介して大量のTh1/Th2サイトカイン等を分泌し免疫ホメオスタシスに寄与していることが報告されている。しかしながら、これまで食品由来糖脂質によるNKT細胞活性化の報告はない。そこで本研究は、真菌に対するNKT細胞活性化が報告されていることから真菌類に属する食用キノコ(ブナシメジ; *Hypsizygus marmoreus*とエリンギ; *Pleurotus eryngii*)に着目し、それが有する酸性糖脂質(AGL)刺激によるIFN- γ /IL-4分泌への影響を*in vitro*条件下にて調査した。【結果及び考察】B6マウス脾臓ならびに胸腺より調製したT細胞画分をAGLで刺激すると、 α -GalCer(KRN7000)やiGb3と同様に、CD11c⁺細胞依存的にIFN- γ /IL-4分泌が亢進することをELISAにより確認すると同時に、これらAGL刺激により脾臓T細胞画分中のNK1.1 / TCR-DP細胞増殖が誘導されることをFACS解析により確認した。更にAGL+ α -GalCer混合試料でT細胞を刺激すると α -GalCer刺激能に影響し、脾臓T細胞では全体的にTh1応答が若干増強されたが、胸腺細胞では著しいIFN- γ の分泌抑制とIL-4の分泌亢進の誘導により極端なTh2応答を呈した。これらの結果から、生体内での食用キノコAGLのTh1/Th2サイトカインの分泌誘導もしくはアジュバント効果による免疫応答や免疫調節への関与の可能性が推察された。

A-16

長期のイノシン投与が自然発症型糖尿病ラットの耐糖性に及ぼす効果

(¹酪農大食品科学、²酪農大院食品栄養科学)

岡本 勝也¹、堀内 一隆¹、鈴木 寿子¹、小野寺 秀一^{1,2}、塩見 徳夫²

【目的】これまでにペントースおよびペントースを含む核酸関連物質はショ糖あるいは澱粉とともに経口投与すると血糖上昇を抑制することを報告¹⁻³⁾した。今回は核酸関連物質であるイノシンを自然発症型糖尿病ラットに長期投与した時の耐糖性に及ぼす効果を調べた。

【方法】体重60gの自然発症型糖尿病雄ラットをショ糖55.23%、カゼイン25%、セルロース10%、ミネラル類3.5%、ビタミン類1%、コーンオイル5%、コリン0.27%を含む基本飼料で1週間予備飼育後、1群7匹ずつ3群に分け、基本飼料、基本飼料に3%、5%イノシンを添加した飼料で635日間飼育した。

各試験試料で31、67、81、350、457、613日間飼育後、20%ショ糖(1.25ml/体重100g)溶液を、また72、95、178、450、593日間飼育後、20%グルコース(1.25ml/体重100g)溶液を経口投与した。それぞれ0、(15)、30、60、120、(180)分後に尾静脈採血し、血清グルコース量を測定した。

【結果】体重増加量については飼育450日までは5%イノシン食群で有意に低かったが、その後各群間で有意な差は認められなかった。

ショ糖投与テストによる耐糖性は、飼育初期(31、67日)では各群間でその差はなかったが、飼育後期(350、457、613日)で、コントロール食群に比べ3%および5%イノシン添加食群で明らかに改善された。

グルコース投与テストによる耐糖性についても、ショ糖投与テストの場合と同様に、飼育後期(450、593日)にイノシン投与による改善効果が認められた。

1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 237-243(2000). 2) *J. Nutr.*, 130, 1946-1949(2000). 3) *J. Appl. Glycosci.*, 48, 205-213(2001).

A-17 *Rhizopus delemar*の生産するスクロース加水分解酵素の精製およびその諸性質

(帯畜大・¹分子生命、²食品科学) 森 優子¹、渡辺 剛志²、小田 有二²

目的) *Rhizopus*属糸状菌は有機酸を生産する能力に優れており、*R. oryzae*はスクロースをグルコアミラーゼによって分解して乳酸を生成する。本研究では、スクロースからフマル酸を生成する*R. delemar*菌株を選抜し、その菌株の生産するスクロース加水分解酵素を精製するとともにその諸性質について調べた。

方法) *R. delemar*菌株は試験管(直径1.8cm)中のPDA寒天培地で増殖させ、この菌体をフマル酸発酵用培地(10%スクロース、0.2%(NH₄)₂SO₄、0.065%KH₂PO₄、0.025%MgSO₄・7H₂O、2.5%CaCO₃)100mlに移植し、30℃、振盪培養した(150rpm)。培養液の一部は有機酸およびエタノールはHPLCで定量し、残りは透析して粗酵素液として使用した。スクロース加水分解活性は、スクロースから生成する還元糖を定量することにより測定した。

結果) NBRC保存の*R. delemar* 21株からスクロースで生育可能な7株を選抜し、それらをフルクトオリゴ糖で培養すると、いずれも完全に分解して消費していた。このうちの1株 NBRC 4754の培養経過を追跡したところ、フマル酸およびスクロース加水分解活性は14日目まで日数に伴って増加した。そこで、培養上清から酵素を限外濾過、CMトヨパールおよびButylトヨパールのカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製した酵素をSDS-PAGEにかけると1本のバンドを示し、その分子量は64,000と推定された。本酵素の基質特異性は*R. oryzae*とは異なり、*Amylomyces rouxii* CBS438.76由来のインベルターゼに類似していた。

Watanabe and Oda (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.

A-18 アカパンカビ *Neurospora intermedia* によるセルラーゼの生産

(帯畜大・¹分子生命、²食品科学) 富田 康資¹、小田 有二²

目的) セルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産する際には、セルロースを発酵可能な糖にまで加水分解する糖化工程が必要である。本研究では、インドネシアの発酵食品オンチョムに使用されているアカパンカビ *Neurospora intermedia* 菌株からセルラーゼ活性の高い菌株を選抜し、最適培養条件を検討した。

方法) 使用した菌株は *Neurospora intermedia* FGSC2558, FGSC2559, FGSC2560, FGSC2561, FGSC2562, FGSC2613およびFGSC5097の7株であり、いずれもFungal Genetic Stock Centerより入手した。対照株としては *Trichoderma reesei* NBRC31329を使用した。これらの菌株は、直立させた試験管(直径1.8cm)中のPDA寒天培地上に増殖させ、生成する胞子を基本培地(1.0%結晶性セルロース、0.14%(NH₄)₂SO₄、0.2%KH₂PO₄、0.03%CaCl₂・2H₂O、0.03%MgSO₄・7H₂O、0.1%ペプトン、0.05%酵母エキス、0.1%Tween 80、0.1%微量元素溶液、50 mM 酒石酸緩衝液[pH4.0])に接種して30℃、振盪培養(150rpm)した。菌体を除去したる液は蒸留水に対して透析し、ろ紙分解(FPase)、カルボシメチルセルラーゼ(CMCase)およびβ-D-グルコシダーゼ(BGase)の各活性を測定した。

結果) すべての酵素活性がもっとも高い菌株として FGSC 2559を選抜した。この菌株のBGase活性は *T. reesei* よりも高かった。酵素活性は、基本培地+2.0%小麦フスマで7日間、30℃、振盪培養(150rpm)したときに最高になった。TLC分析により、*N. intermedia* FGSC 2559の酵素はセルロースをグルコースまで効率的に分解することが分かった。

A-19

エゾヤマザクラのサクランボから分離したパン用酵母 *Saccharomyces cerevisiae*の諸性質

(帯畜大・¹分子生命・²食品科学、³北海道農研) 三雲 大¹、山内 宏昭³、小田 有二²

目的)自然界から分離される*Saccharomyces*属酵母はマルトース発酵性が微弱であり、製パンに適さない菌株が多い。本研究では、エゾヤマザクラのサクランボから分離したパン製造に適用可能な酵母(特願2008-238360)の諸性質について調べた。

方法)十勝支庁管内に自生するエゾヤマザクラのサクランボを磨り潰して数日間発酵させた。これを小麦粉および水と混捏してパン生地を調製し、発酵後の一部からパン生地発酵力の高い菌株AK46を分離した。パン酵母の対照株としては*S. cerevisiae* NBRC2043, 2044, 2375, HP203, HP216およびHP467の6株を使用した。

方法)AK46株は出芽増殖を行い、酢酸寒天培地上で球形の子嚢胞子を形成する特徴を有しており、26S rDNAのD1/D2領域の塩基配列から*S. cerevisiae*と同定された。また、rDNAスペーサー領域の塩基配列はビール・ウイスキー・パン用酵母のタイプに分類された。インペルターゼをコードする遺伝子をプローブとしてパルスフィールドゲル電気泳動で分離した染色体DNAに対してサザン解析を行ったところ、AK46では第9番染色体にのみ、対照株ではさらに複数の染色体にハイブリダイズした。パン酵母菌株と比較して、AK46のインペルターゼおよび α -グルコシダーゼの両酵素活性は半分以下で、糖無添加および5%スクロース添加パン生地発酵力は80%程度であったが、30%スクロース添加パン生地発酵力は高水準であった。

A-20

フレックス酵母*Kluyveromyces marxianus* KD-15による テンサイ糖蜜・チーズホエー混合原料からのバイオエタノール生産

(帯畜大・¹生物資源、²食品科学) 仲村 憲治¹、小田 有二²

目的)フレックス酵母*Kluyveromyces marxianus* KD-15はカタボライトリプレッション非感受性の変異株であり、テンサイ糖蜜、チーズホエーおよびこれらを混合した原料中の糖をすべて消費してエタノールを生成する(特願2008-239928)。本研究では、KD-15の培養特性を三角フラスコ規模で調べ、バイオエタノール生産の適用性について検討した。

方法)2-デオキシグルコース耐性を付与してカタボライトリプレッション非感受性となった変異株*K. marxianus* KD-15、この親株NBRC 1963および通常のエタノール生産用酵母*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0224をそれぞれYPD培地(1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース)で振盪培養した。この培養液10mlの菌体(固形分として約60mg)を無菌的に遠心分離で回収し、その全量を発酵培地(20%糖、0.2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 100mlに接種し、通気を制限して振盪培養した。

結果)KD-15およびNBRC1963を糖濃度20%の糖蜜、ホエーおよび等量混合した発酵培地で培養した。
- ガラクトシダーゼに関して、KD-15の活性はホエーおよび混合培地で、NBRC1963の活性はホエー培地で高かった。KD-15のインペルターゼ活性は、糖蜜、混合、ホエー培地の順に高かったが、NBRC1963ではその逆であった。KD-15について糖濃度の影響を調べたところ、いずれの培地においても15~20%でエタノール変換率は最高となり、25%以上では急減した。糖濃度20%の糖蜜培地に固形分として約300mgの菌体を接種すると、エタノール量が最高に達するまでの時間はKD-15が72時間、NBRC1963が36時間、NBRC 0224は24時間となった。KD-15では接種量を約900mgまで増加させても効果は少なかったが、糖濃度を15%にすると発酵時間は短縮化されて24時間でほぼ完了した。

A-21

バレイショ加工副産物を原料としたエタノール発酵条件の検討

(帯畜大・¹畜産衛生・²食品科学、³カルビーポテト、⁴十勝食加技セ)

山田 順^{1,3}、四宮 紀之⁴、大庭 潔⁴、関川 三男¹、小田 有二²

目的) バレイショ加工工場では残渣をはじめとする様々な副産物が発生しており、その処理にかかる費用も少なくない。本研究では、これらの副産物をバイオエタノール原料として有効活用するため、糖化および発酵条件の検討を行った。

方法) 原料は、バレイショ加工工場で発生する皮部(いわゆるピールロス)とマッシュロス(ポテトフレーク生産時に出来るロス)の単独並びに組み合わせを使用した。また、酵素は市販の α -アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、グルコアミラーゼを使用した。エタノール発酵は糖化後の原料に市販圧搾パン酵母を添加し、ゆっくりと攪拌して行った。エタノールはHPLCで定量し、糖はTLCで分析した。

結果及び考察) α -アミラーゼ単独の場合、ピールロス並びにピールロスとマッシュロスの複合物ともにエタノール理論生成量の56%、62%程度であったが、 α -アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼの複合酵素で処理した場合136%、80%と高い値を示した。また、 α -アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ処理したピールロス単独、ピールロスとマッシュロスの複合物のエタノール生成量はそれぞれ1.79g/100mL、4.24g/100mLであった。操作性については、 α -アミラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼの複合酵素処理において液化程度が高くエタノール発酵工程処理を円滑に進め、エタノール回収率も高くなった。今後、エタノール発酵後の残渣が飼料として有効であるかを確認し、バレイショ加工副産物を多段階の利用を考えたい。

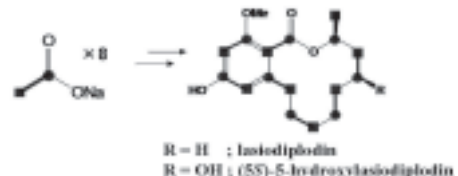
B-1

糸状菌 *Lasiodiplotia theobromae* における安定同位体標識化合物を用いた *lasiodiplotin* 類の生合成機構の解明

(北大院農) 香島 貴純、高橋 公咲、鍋田 憲助

研究背景) 糸状菌 *Lasiodiplotia theobromae* は、植物ホルモンのジャスモン酸や多様な生理活性を持つ theobroxide など、ポリケチド起源の化合物を生合成することで知られている^{1,2)}。それらの中でも、植物生育阻害活性や抗白血病活性が報告されているマクロライド化合物 *lasiodiplotin* 類は、その生合成に関する知見はこれまでに得られていない。本報告では、¹³Cラベル化酢酸ナトリウムを用いて、*lasiodiplotin* および (5S)-5-hydroxylasiodiplotin が、8つの酢酸ユニットからなるオクタケチド化合物であることを¹³C NMR およびINADEQUATE分析によって確認したので報告する。

方法・結果及び考察) *Lasiodiplotia theobromae* IFO 31059株を、1% PD培地で27 暗所において静置培養した。培養7日後に3種類の¹³Cラベル化酢酸ナトリウム ([1-¹³C], [2-¹³C], [¹³C₂]) を、培地内の濃度が10 mMとなるように添加し、さらに10日間培養を行った。培養ろ液を酢酸エチル、菌体をアセトンで抽出した。得られた抽出物を濃縮後、2回のPTLCに供して *lasiodiplotin* と (5S)-5-hydroxylasiodiplotin を単離した。¹³C NMR、INADEQUATEスペクトルより、*lasiodiplotin* (標識率3.4~6.0%) および (5S)-5-hydroxylasiodiplotin (標識率3.5~6.0%) は、8つの酢酸ユニットから生合成されるオクタケチド化合物であることが確認された。



1) Li, P., et al. *phytochemistry*, 65, 819-823 (2007).

2) Takei, R., et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 2069-2073 (2008).

B-2 Octylglucosideをグルコース供与体として用いるTAグルコシルトランスフェラーゼ

(北大院農) 瀬戸 義哉、松浦 英幸、鍋田 憲助

【背景】ツベロン酸 (TA, 12-ヒドロキシジャスモン酸)、及びツベロン酸グルコシド (TAG) はバレイシヨの塊茎形成誘導物質として単離された化合物である。これらの化合物はジャスモン酸 (JA) から代謝されて生合成され、植物体内での転流が確認されているが詳細な機能については不明である。我々はTAGの機能解明を目的にTAグルコシルトランスフェラーゼに着目して研究を行ってきた。その結果、UDP-glucoseをグルコース供与体として用いるTAグルコシルトランスフェラーゼを同定し既に報告している。本酵素はサリチル酸グルコシルトランスフェラーゼと相同性が高く、実際にサリチル酸 (SA) に対しても高い活性を示す基質特異性の低い酵素であった。我々はさらにUDP-glucose以外の化合物をグルコース供与体として用いる酵素を探索した結果、オクチルグルコシドを用いる酵素の存在を見出したので報告する。

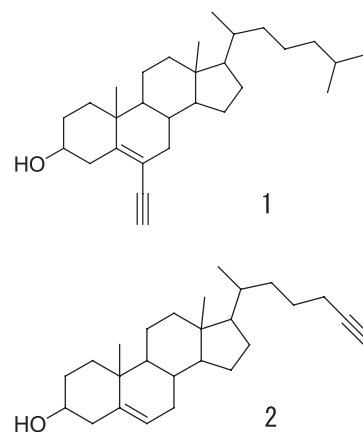
【結果】イネ培養細胞から粗酵素を調整し、基質としてTA及びSA、グルコース供与体として、UDP-glucose、TDP-glucose、octylglucoside、glucose-1-phosphateを用いて酵素反応を行った。反応産物をLC-MS/MSにて分析したところ、UDP-glucose、TDP-glucose、及びoctylglucosideを用いた際にTAGの生産が確認され、octylglucosideを用いた際にのみSAGが全く検出されなかった。このことからoctylglucosideをグルコース供与体として用いる基質特異性の高いTAグルコシルトランスフェラーゼが存在することが示唆された。そこで各種カラムクロマトグラフィーにて本酵素の精製を試みた。現在SDS-PAGEにてほぼ単一のバンド (CBB染色) となるまで精製を進めている。Octylglucosideを供与体として用いるグルコシルトランスフェラーゼは現在まで動物に置いて1つ報告があるのみであり、植物界に置いては極めて新規性の高い酵素であると考えられ、精製後は酵素学的な解析のみならず遺伝子の同定、変異体の作成等を行い本酵素の詳細な働きを解明していきたいと考えている。

B-3 Huisgen環化反応を利用したコレステロール吸収阻害活性検定法の確立

(北大院農) 鳥巢 哲生、加藤 英介、川端 潤

目的) コレステロールの小腸粘膜からの吸収阻害を培養細胞を用いたモデル系で測定する際には、細胞内で合成されたコレステロールと区別して、細胞外から吸収されたコレステロールのみを選択的に定量する必要がある。そのため放射活性標識コレステロールを用いる方法が一般的であるが、放射活性分子の取り扱い等の制約が難点である。そこで本研究では、Huisgen環化反応を利用したより簡便な代替法を確立することを目的とした。

方法および結果) コレステロール骨格にエチニル基を導入した化合物1および2を合成した。1は、コレステロールを6-ケトコレスタノールに変換した後、Grignard反応によってエチニル基を導入後脱水することにより、6段階29%で合成した。また、2はヒオデオキシコール酸をトシル化後選択的脱離反応によってホモアリルアルコール体とし、側鎖を還元、トシル化してTMS化アセチレンとカップリングさせることにより、8段階21%で合成した。これらのエチニル誘導体は3-アジド-7-ヒドロキシクマリノールと反応させることで蛍光による定量が可能である。現在、ミセル溶液を用いた*in vitro*コレステロールミセル排出試験によって本実験系の有効性を確認している。



B-4

ペプチド固相合成に特化させたマイクロ波利用合成装置の開発とその利用研究

(¹産総研北海道セ、²東京理化工機)

清水 弘樹¹、長島 生¹、松下 隆彦¹、西村 紳一郎¹、為野 強士²、秋元 正寿²

研究背景) 化学合成の効率加熱手段として1986年以来、マイクロ波は盛んに利用されている。発表者らはマイクロ波の加熱効果でない効果の研究をすすめており[1]、これまでに糖鎖合成[2]や糖ペプチド合成[3]における研究成果を報告した。マイクロ波利用合成装置は、そのシェアの70%占めているアメリカのCEM社をはじめ国内外のメーカーから多数販売されているが、固相ペプチド合成に特化させた装置はほとんどない。そこで我々はこの装置を開発し、長いペプチド、あるいは短いタンパク質のアミノ酸順次導入法によるリニアな化学合成研究をすすめた。

方法・結果及び考察) シングルモードのマイクロ波照射を利用して、固相反応に特化したマイクロ波利用合成装置を製作した。そして本装置を利用して、マルチペプチド全自動合成装置APEX 396にてデモ合成されるAcyl Carrier Protein (ACP)の65-74残基部10残基ペプチド、既報告した糖鎖認識機能を有する3種類の15残基ペプチド[3]、りんご銀葉病菌由来エンドポリガラクトツロナーゼのペプチド欠損部の30残基、さらには大腸菌O15由来のベロ毒素における糖鎖認識タンパク部の69残基VTBの全長合成を進めた。

[1] 高分子論文集, 64, 883-896 (2007).

[2] Biosci. Biotech. Biochem., 69, 1054-1057 (2005); Tetrahedron Lett., 46, 4701-4705 (2005); Tetrahedron, 64, 10091-10096 (2008).

[3] Org. Lett., 7, 877-880 (2005); J. Org. Chem., 71, 3051-3063 (2006).

[4] Carbohydr. Res., Special Issue; Glycomimetics, 342, 1895-1903 (2007).

B-5

6-Tuliposide Bの不斉合成研究

(北大院農) 大本 笑子、重富 顕吾、生方 信

【緒言】 チューリップの薬に特異的に含まれる6-tuliposide B (Fig. 1) は、種々の細菌類に対して抗菌活性を示すことが報告されている¹⁾。当研究室では本化合物の全合成を達成しており²⁾、ジアステレオマーの分割にはキラルHPLCを用いている。現在、tuliposide類のチューリップにおける生合成経路と生理学的役割の解明、および抗菌活性の作用機構の解明に向けて研究が行われており、本化合物の多様なアナログが必要とされている。これらの背景より、効率よくアナログを調製するために、S型の立体配置をもつ天然型6-tuliposide Bの不斉全合成法を確立することを、本研究の目的とした。**【実験】** 全合成法では、糖アクリレートとアルデヒドとのBaylis-Hillman(BH)反応によりtuliposide骨格を形成したが、本研究では不斉BH反応を用いるために、アクリレートとアルデヒドのカップリングの後、エステル交換によりtuliposide骨格の形成を目指すこととした。HFIPA-⁻ICD法³⁾とsultam法⁴⁾の2種の不斉BH反応について検討した。**【結果】** HFIPA-⁻ICD法では、R = TBSのとき、収率16%、60% eeで、目的物が得られた。R = PMBのとき目的物が得られなかったため、現在、温度条件を検討中である。sultam法では、R = TBSのとき収率7%、97% ee、R = PMBのとき収率20%、98% eeで目的物が得られた。今後は、さらに不斉BH反応の検討を重ね、最適な条件を決定した後、糖とのカップリングを行う予定である。

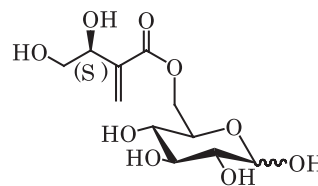


Fig. 1 6-tuliposide B

1) J. Japan. Soc. Hort. Sci., 74, 469-475, 2005

2) Tetrahedron: Asymmetry, 19, 1444-1449, 2008

3) J. Am. Chem. Soc., 121, 10129-10220, 1999

4) J. Am. Chem. Soc., 119, 4317-4318, 1997

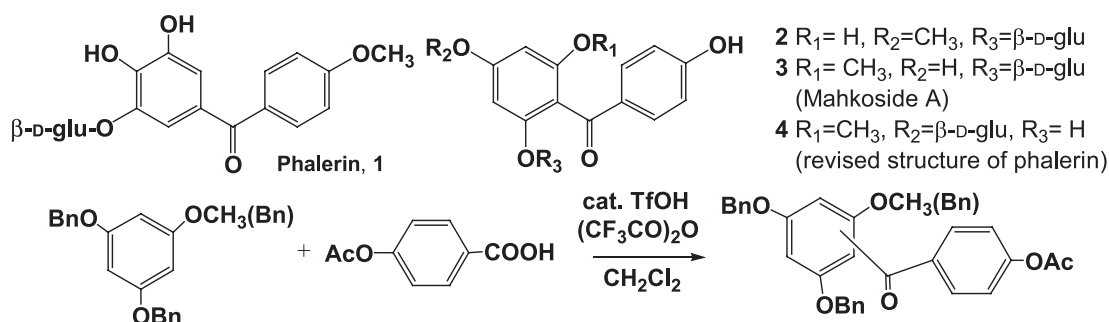
B-6

Synthesis of benzophenone glucosides from *Phaleria macrocarpa*

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Phebe Hendra, Yukiharu Fukushi, Yasuyuki Hashidoko

Three benzophenone glucosides; phalerin (1), 2, and mahkoside A (3), have been isolated from *Phaleria macrocarpa*. As these compounds have been reported to show anticytotoxic activities against myeloma cell line, antitumor activities toward murine leukemia P-388 cells,^{1,2,3)} we tried to synthesize these compounds. We synthesized phalerin (1) first. By comparison of the NMR data of reported and synthesized ones, we estimated that the real structure of phalerin should be 4. Now we are preparing compounds 2-4 by using below reaction condition.



1. Hakim *et al.*, *Bull. Soc. Nat., Prod., Chem.*, 4, 67-70 (2004) (Indonesian), 2. Zhang *et al.*, *J. Asian Natur. Prod. Res.*, 8 (1-2) 119-123 (2006), 3. Hartati *et al.*, *Majalah Farmasi Indonesia*, 16 (1) 51-57 (2005)

B-7

甜菜に含まれるオリゴ糖の構造解析

(¹北大院農、²日甜総研)

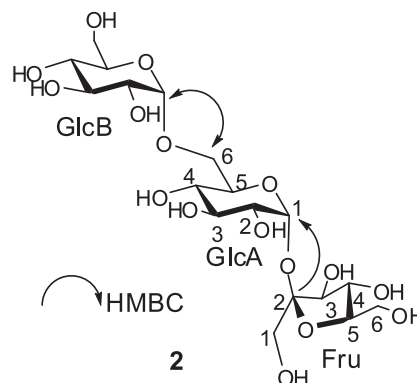
高田 祐輔¹、福士 江里¹、菊地 裕人²、有塚 勉²、福士 幸治¹、橋床 泰之¹

【目的】 甜菜のオリゴ糖画分に含まれる微量成分1, 2の構造を明らかにするため、化学反応およびMS, NMR解析を行った。

【方法・結果】 1, 2はFAB-MSおよび¹H-, ¹³C-NMRスペクトルからそれぞれ4糖および3糖と推定された。1はstachyoseとNMRスペクトルが一致した。

2は各種二次元NMRにより解析を行った。HSQC, HSQC-TOCSYおよび¹H-¹H COSYにより2は2つの -グルコピラノース(GlcA, GlcB) と1分子の -フルクトフラノースユニット (Fru) から成っていると推定し、それぞれのユニットのNMRシグナルを帰属した。HMBCにより、GlcA1 2Fru結合とGlcB1 6GlcA結合が明らかとなり、2の構造を -glucopyranosyl-(1 6)- -glucopyranosyl-(1 2)- -fructofuranoside (theandrose) と決定した。

構造確認のため、2, sucrose, raffinoseのそれぞれを完全メチル化後加水分解し、ついで還元、アセチル化して得た部分メチル化アルジトールアセテート混合物をGC-MS分析し比較した。2からは末端のグルコースとフルクトースに由来するもののほか、1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylsorbitol が生じ、推定構造を支持した。



B-8 Triflic acid (TfOH)を用いたカルボン酸誘導体のFriedel-Crafts反応の検討

(¹岩手大院農、²帯畜大) 村重 諒¹、橋本 誠²

我々はTriflic acid(TfOH)を触媒兼溶媒として用いることで、アミノ酸側鎖酸クロライドを利用した効率的なFriedel-Crafts(F-C)反応を確立した¹⁾。近年TfOHは、アシルハライドと混合酸無水物を形成し、ルイス酸非存在下でもF-C反応が進行するとの報告や^{2,3)}、アシルドナーとしてカルボン酸や、エステルでもF-C反応が進行するとの報告もあり^{4,5)}、TfOHの有用性が見出されている。そこで本研究では、アシルドナーのスクリーニングを目的として、直鎖デカン酸誘導体をアシルドナー、ベンゼンをアシルアクセプターとし、TfOH溶媒中で反応させ生成物の収率を比較した。さらにジカルボン酸誘導体を用いることで、2回のF-C反応により分子内環化反応の可能性について検討した。

酸クロライドや酸無水物は、等量のベンゼンと室温、1時間で反応し、カルボン酸も高温条件化する事により反応の進行が確認された。これらのことを利用して、 α -酸クロライド-エステルのジカルボン酸誘導体とベンゼンを反応させた後、導入したカルボニル基の還元、エステルの加水分解した化合物に対する分子内F-C反応について検討した。反応条件は、カルボキシル基をPCl₅によって酸クロライドとし、1)有機溶媒中AlCl₃、2)触媒兼溶媒としてTfOHさらに3)カルボン酸のまま触媒兼溶媒としてTfOH中での反応について検討した。結果は、酸クロライドにおいてAlCl₃と比べTfOHは短時間で反応が進行し、カルボン酸のままでも、長時間を要するが反応を進行させることに成功した。

¹⁾Tetrahedron Lett., in press ²⁾Angew. Chem. Int. Ed., 1972, 11, 299-300

³⁾J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1972, 24, 1345-1346 ⁴⁾Tetrahedron, 2006, 62, 9201-9209

⁵⁾Tetrahedron, 2000, 56, 7199-720

B-9 Triflic acidを用いたFriedel-Craftsベンゾイル化反応による光反応性基導入アミノ酸の効率的合成

(帯畜大・生資料) 遠山 直紀、橋本 誠

研究背景) 光アフィニティーラベル法は生体高分子の基質となる生理活性ペプチドなどにアリルアジド、ベンゾフェノン、アリルジアジリン等の光反応性基を導入した光反応性アミノ酸誘導体を導入することで標的となる生体高分子と生理活性ペプチド間にクロスリンクを形成し、解析を行なうことにより基質結合部位のアミノ酸配列や有用な生体高分子の同定を可能とする生体高分子機能解析法のひとつである。これまで、光反応性ペプチドは光反応性基を有したアミノ酸誘導体を作成し、その後のペプチド固層合成により多段階で合成されてきた。本研究では、生理活性ペプチド中の芳香環に対しFriedel-Craftsベンゾイル化反応(FC反応)を行い1段階で光反応性基の1つであるベンゾフェノンを導入することを目的に、まずアミノ酸に対する効率的合成を目指し研究を行なった。

方法・結果及び考察) 芳香環アミノ酸であるPheの α -アミノ基、カルボキシル基の各種保護基を検討しながら、ベンゾイル化を行なった。効率的な反応促進のため、強酸性のTriflic acid(TfOH)を触媒兼溶媒として用いることで有機溶媒に難溶なアミノ酸の溶解度を上げ、常温の温和な条件下での反応を検討した。エチルエステル保護基は反応途中で加水分解することが確認されたため、カルボキシル基を無保護、アミノ基をアセチル保護し検討を進めたところ、常温で α -炭素の立体を保持したままPhe芳香環への p -選択的なベンゾイル化が進行し、1段階でアミノ酸の芳香環にベンゾフェノン骨格を構築することが可能であると確認された。この結果からリガンド中の芳香環に対するFC反応を行うことにより、1段階で効率的に光反応性ペプチドを合成できる可能性が示唆された。

B-10 光アフィニティラベルを目指したジアジリン含有有機白金誘導体の合成

(帯畜大・生資料) 古川 慶太郎、橋本 誠

研究背景) 光アフィニティラベルは光反応性のリガンド誘導体を用い、標的の生体高分子にタグを導入し、機能解析を行なう方法である。タグとしては主にピオチンタグが用いられストレプトアビジンとの強い結合は化学発光による高感度検出とラベル化合物の特異的単離に有用である¹⁾が、近年の分子生物学的手法の進歩に鑑み、有機白金化合物の特性に注目し新規の光反応性プローブの合成を立案した。有機白金化合物は核酸塩基と相互作用することが知られているが、この親和性を光アフィニティラベル後のラベル化合物単離のためのタグとして利用することで分子生物学的手法に基づいた生体機能解析が行なえると期待される。そのため、本研究では有用な光反応性基であるジアジリン骨格を導入した有機白金化合物の合成を試みた。

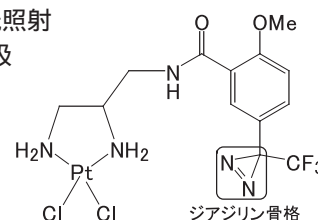
方法・結果及び考察) 目的化合物は文献に従い²⁾、*tert*-Butyl *N*-(2, 3-dihydroxypropyl) carbamateを出発原料とした多段階反応を経てPt骨格を持つ(1-Aminomethyl-1, 2-ethylenediamine) dichloro platinum ()を合成し、別に合成済みのジアジリン活性エステル³⁾をカップリングするこ

とで合成した。合成物の構造は¹H, ¹³C, ¹⁹F, ¹⁹⁵Pt NMRより確認し、加えて光照射後の¹⁹F NMRシグナルのシフトやUV測定での特徴的な350nm付近の波長吸収の減少から効率良く光分解することも認められた。

参考文献) 1) *ChemBioChem*, 2, 52 (2001)

2) *Synthesis*, 8.1113 (1998), *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5, 655 (2000)

3) *Carbohydr. Res.*, 331, 119 (2001)



B-11 単量体Avidin固相上での光アフィニティラベルの検討

(帯畜大・生資料) 笹川 斐子、橋本 誠

研究背景) 光アフィニティラベルは生体高分子の機能解析において期待される手法の一つである。¹⁾ この手法は、光反応性基を導入した基質と標的生体高分子で、基質複合体を形成させた後、光照射することで蛋白質と基質の接合点において共有結合を形成させることができ、これを解析することで機能性部位の探索が可能となる。形成後の解析には、Avidin-Biotin系を使った手法が有用²⁾だが、液相における光照射では単量体Avidinカラムを用いた単離が難しかった。そこで本研究では、固相単量体AvidinカラムにBiotin化基質を先に吸着させ光照射を行なうことで、上記の欠点を克服し、さらにストイキオメトリーを保った蛋白質-基質複合体による効率的な光アフィニティラベルを検討した。

方法・結果) 標的蛋白質であるD-アミノ酸酸化酵素(DAAO)に対し、基質として光反応性ジアジリン化安息香酸にBiotinを導入した化合物³⁾を用いた。まず、合成基質が固相単量体Avidinへ吸着でき、光照射によって固相上でも光反応性基を分解できることを確認した。さらに、合成基質を吸着させた固相へDAAOを供しアフィニティクロマトグラフィにより吸着後光照射することで、目的とするDAAOへBiotinを導入することに成功した。この導入はD-Phe又はD-Asp存在下で拮抗阻害がかかり、光反応性基質がDAAOの活性部位に結合していることが示唆された。また、液相で光ラベルしたものと固相で光ラベルしたものを再び固相単量体Avidinカラムに供したところ、固相のみが固相単量体Avidinに吸着した。現在、固相単量体Avidinを使用して得られたラベル蛋白質を用いて、回収率等を検討中である。

参考文献 1) *Eur. J. Org. Chem.*, 2513 (2008)

2) *Chem. Record*, 5, 385 (2005)

3) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 2481 (2000)

B-12

コムギ低温馴化によって発現が誘導されるリン脂質合成酵素CTP: phosphoethanolamine citidyltransferaseはゴルジ体に局在する

(¹農研機構・北海道農研、²東海大・生物理工) 須藤 慶太¹、榊 剛²、今井 亮三¹

晩秋の低温を認識し、耐凍性を獲得する低温馴化には、生体膜の低温適応が必要であるが、その詳細な制御機構は不明である。高等植物の生体膜を構成する主要リン脂質であるPhosphatidylethanolamine (PE)は3段階の酵素反応によって生合成される。前回、PE生合成の最終段階を司るTaAAPT1が小胞体及びゴルジ体に局在し、低温下のPE量の変動を制御していることを報告した。今回我々は、コムギより単離したPE合成の第2段階を司るCTP: phosphoethanolamine citidyltransferase (ECT) 遺伝子(WECT1)について報告する。発現解析の結果、低温馴化により、WECT1遺伝子の発現は誘導されることが示された。従って、WECT1はTaAAPT1と同様に低温下のPE生合成に重要な役割を持つと考えられた。次に、大腸菌を用いて組換えWECT1を作製し、酵素活性を測定したところ、組み換えタンパク質はECT活性を示し、その機能性が証明された。WECT1の細胞内局在性を調べるために、WECT1とGFPとの融合遺伝子を作製し、コムギ幼葉鞘細胞及び、タマネギ表皮細胞に一過的に導入したところ、WECT1は両細胞で、顆粒状のシグナルを示した。またこの細胞内局在性はWECT1のN末端42アミノ酸によって決定されていた。顆粒状シグナルは、その形状及び、小胞体膜近傍に存在することから、ゴルジ体由来である可能性が考えられた。そこで、ゴルジ体のマーカータンパク質 (St-mRFP) を用いて、共発現観察を行ったところ、GFP、RFPシグナルの共局在性が確認された。従って、WECT1はゴルジ体に局在すると結論された。TaAAPT1は小胞体とゴルジ体に局在することから、WECT1の酵素反応産物である、CDP-ethanolamineはTaAAPT1の基質としてゴルジ体において最も効率よく受け渡されると考えられる。従って、コムギにおけるPE生合成の主要な場はゴルジ体であると推察される。

B-13

イネ薬特異的発現遺伝子の探索(低温耐性イネ作出に向けて)

(¹北農研センター) 加藤 英樹¹、今井 亮三¹

研究背景) イネの冷害は主に遅延型冷害と障害型冷害に大別され、私たちはこれまで障害型冷害に着目し研究を行ってきた。障害型冷害は、穂ばらみ期に比較的温和な低温に長時間曝されることにより起こる。この現象は低温に曝されてタペト細胞が機能不全を起こし、雄性配偶子の正常な発達を阻害した結果、機能する花粉数が減少することで起こると考えられている。しかし、この現象における分子生物学的側面からの研究は少なく、私たちはマイクロアレイ法による低温下における薬内の遺伝子の動態を調査し、以前の本学会で発表した。本研究では、低温化においても正常な花粉形成を可能にする遺伝子を薬特異的に発現させることによって、低温耐性をもつイネの作出が可能であるとの仮説のもと、マイクロアレイ法によって薬特異的発現遺伝子を探索した。

方法・結果及び考察) 穂ばらみ期のイネの薬及び葉を採取し、これらからRNAを調製し、アジレント社製22Kマイクロアレイチップを使用して各遺伝子の発現量を比較した。この結果、薬においてのみ高いシグナルを示す遺伝子を薬特異的発現遺伝子の候補として幾つか選び出し、これらについてRT-PCRを行ないマイクロアレイの結果と照合した。薬にのみ発現が見られる遺伝子を最終的に選び出し、これらのプロモーター領域(約2kbp)をPCRにより増幅し、GUSレポーター遺伝子との融合遺伝子を作成した。アグロバクテリウム法によって、これらの遺伝子を導入した形質転換体植物を作成し、種子、幼苗、幼穂等をGUS染色した。この結果、ACE (Mandelonitrile lyase), CER1 (Sterol desaturase), MADSボックス, PGT (Polygalacturonase) 遺伝子のプロモーターが遺伝子の薬特異的発現に有用であることが示された。

B-14 システイン側鎖化学修飾による抗菌ペプチドThanatinの構造機能相関：疎水結合力と抗菌活性の関係

(¹北大院工、²東理大・基礎工) 折笠 善丈¹、一戸 健太¹、橋本 茂樹²、田口 精一¹

研究背景) Thanatinは、21アミノ酸残基からなる抗菌ペプチドであり、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、および一部の糸状菌に作用する広い抗菌スペクトルを有している。これまで、その分子内で形成されるヘアピン構造が抗菌活性発現の主要な構造要因であり、11、18番目のシステイン間に形成されるジスルフィド結合が本構造形成に必須であると考えられていた。しかしながら、最近両システイン残基を疎水性の高いtertial butyl(tBu)基で修飾したThanatinを合成したところ、グラム陽性菌である*Micrococcus luteus*に対し抗菌活性が4倍増強される現象を見出した¹⁾。今回われわれは、グラム陽性菌に対する作用メカニズム解明に迫るために、システイン側鎖が様々な疎水性基で修飾されたThanatin誘導体を合成し、その疎水結合力と抗菌活性の関係を系統的に調べた。

方法・結果及び考察) 異なる疎水性基で化学修飾されたシステイン誘導体3種類を網羅的に組み合わせ、疎水結合力の異なるThanatin化学修飾体を9種類合成した。合成したペプチドの分子量はMALDI-TOF Massにより確認した。次に、これらをグラム陰性菌の*Escherichia coli*とグラム陽性菌の*M. luteus*を対象に最小生育阻害濃度検定より抗菌活性を評価した。その結果、*E. coli*は化学修飾体の抗菌活性は野生型よりも低下したが、逆に*M. luteus*に対しては全ての化学修飾体が野生型よりも抗菌活性が上昇しており、疎水結合力と抗菌活性の間にある程度正の相関があることが示された。これらの結果から、Thanatinのグラム陽性菌に対する抗菌作用はグラム陰性菌と異なっていることが示唆され、化学修飾されたシステイン間の疎水相互作用が抗菌活性向上に寄与することが確認された。

参考文献) ¹⁾ T. Imamura *et al.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369: 609-15

B-15 抗菌ペプチドApidaecin高活性変異体の*Escherichia coli*細胞内導入効率の評価

(¹北大院工、²東理大・基礎工) 一戸 健太¹、折笠 善丈¹、橋本 茂樹²、田口 精一¹

研究背景) ミツバチ由来の抗菌ペプチドApidaecinは、グラム陰性菌に対し静菌的な作用を示す。Apidaecinは、細菌の細胞膜透過後、細胞内の標的分子の機能を阻害することによって抗菌活性を発揮するといわれているが、作用メカニズムはまだ十分解明されていない¹⁾。われわれは、これまで*E. coli* JM109にApidaecinを発現させることによる生育阻害を指標とした*in vivo*アッセイシステム²⁾によって、ApidaecinのN末端3残基に変異をもつ高活性変異体を取得している。本研究では、Apidaecin野生型と高活性変異体の*E. coli*の細胞膜透過性に注目し、蛍光試薬で標識化したペプチドを用いて、これらペプチドの細胞内導入効率を比較検討した。

方法・結果及び考察) 野生型と2種の高活性変異体のN末端をカルボキシフルオレセインで標識化することにより蛍光標識体を作製した。最小生育阻害濃度検定により、これら蛍光標識体が抗菌活性を維持していることを確認した後、*E. coli* JM109に作用させ共焦点レーザー顕微鏡により観察した。いずれの蛍光標識体も細胞内に蛍光が観察され、細胞内への導入が確認された。次にフローサイトメーターにより蛍光標識体の*E. coli* JM109への細胞内導入量を測定したところ、高活性変異体2種はどちらも野生型より細胞内導入量が増加していることが観察された。以上のことから、変異体の高活性化の原因のひとつとして、*E. coli*への細胞膜透過性が高まり、より細胞内に入り易くなった事が考えられた。

参考文献) ¹⁾ M. Castle *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 32555-32564

²⁾ S. Taguchi *et al.* (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3566-3572

B-16

Geobacillus stearothermophilus 由来アゾ還元酵素AzrGにおける熱安定性の解析

向井 祐一、相沢 智康¹、松本 謙一郎、田口 精一、大井 俊彦
(北大院工、¹北大院理)

背景と目的) 中等度好熱性細菌である *G. stearothermophilus* ATCC12980株由来のアゾ還元酵素AzrGは、常温菌である *Bacillus* sp. B29株由来の3種類のアゾ還元酵素(AzrA¹、B、C)と同様に、分子量23 kDaのサブユニットを持つホモダイマー構造を持つことを明らかにした²。これらの中でAzrGは、熱安定性が最も高く68℃、1時間の熱処理でも酵素活性は完全に維持される。他の3種の常温菌由来酵素は40℃～55℃までは維持される。本研究では、この熱安定性に着目し、CDスペクトル測定することによりAzrGの構造変化について解析した。

方法と結果) AzrGは、組換え大腸菌により高発現させた粗酵素から精製しCD測定に使用した。変性温度(T_m)は、1℃/minで昇温した際のAzrGのα-ヘリックスの崩壊に基づく222 nmのスペクトル変化から73℃と算出され、酵素活性における失活温度とよく一致した。AzrG分子の構造変化をCDスペクトル変化により解析した。60℃ではα-ヘリックスはほぼ変化しないが、それ以上に加熱するとAzrGの構造の崩壊が始まることが観察された。我々が解析したAzrAの立体構造情報³から、AzrGの立体構造をモデリングした。両者の比較から、AzrGはサブユニットコア内に芳香族アミノ酸残基数が多く存在していたことから、AzrAと比較して分子内の疎水性相互作用が強いために熱安定性が高いと考えられた。

参考文献) ¹T. Ooi *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75,377-386,2007.、²2007日本農芸化学会大会講演要旨集P205、³2008年日本生物工学会大会講演要旨集P154、

B-17

酵母低温発現系によるヒト由来不溶化タンパク質の発現と分子シャペロンの効果

○笠巻 貴大^{1,2}、佐原 健彦²、扇谷 悟^{1,2}(¹北大院・理、²産総研・ゲノムファクトリー)

[研究背景]

標的分子の詳細な解析や工業化などにおいて、タンパク質の大量生産法の開発は重要な課題である。これまで、産業技術総合研究所(産総研)で開発された酵母低温発現系を用いることにより、多くのヒト由来タンパク質生産に寄与することができた。しかし、なお、可溶化・高発現できないタンパク質種も多い。そこで本研究では、外来タンパク質の可溶性生産を補助する因子として分子シャペロンを採用し、酵母低温発現系の改善を行った。

[方法・結果及び考察]

サンプルとしては、酵母低温発現系においてもなお、可溶性発現できなかったタンパク質を用いた。最初に、酵母低温発現系を用いて、主な酵母由来の分子シャペロンとヒト由来不溶化タンパク質との共発現を行った。酵母細胞破砕液上清における目的タンパク質量を比較した結果、特にSsb1という分子シャペロンに改善の効果が認められた。一方、ヒト由来の分子シャペロンとの共発現では、大きな効果は見られなかった。本研究では、酵母由来の分子シャペロンSsb1と共発現させることにより、可溶性画分の収量が増加できることを明らかとした。また、ヒト由来の分子シャペロンよりも酵母由来の分子シャペロンに改善効果が大きかったことから、分子シャペロンの適切な選択が重要であることがわかった。

B-18

メチロトロフ酵母のメタノール代謝におけるシトクロムcの発現挙動

木下 博貴¹、藤村 朱喜¹、松藤 淑美¹、宮地 竜郎¹、中川 智行²、中川 純一¹
(¹東農大生物産業・食科、²岐阜大・応生科)

【目的】メチロトロフ酵母におけるメタノール代謝は初段階酵素アルコールオキシダーゼ(AOD)の酵素反応と呼吸鎖の二カ所で酸素を必要とする。我々は、メタノール代謝では両者間の酸素利用バランスの制御が特に重要であると考え、現在までAODの発現が呼吸鎖活性により制御されていることを示してきた。一方、Bhatnagarらはシトクロムc(Cyt c)はAODプロモーターの転写活性化領域UASへの結合能を持つことを報告している。¹⁾

このような背景から、メチロトロフ酵母ではCyt cがAODの発現制御において重要な役割を持つ可能性があるものと考えられる。そこで本研究ではメチロトロフ酵母*Pichia methanolica*のCyt cの発現応答を解析し、メタノール代謝制御におけるCyt cの役割について考察する。

【方法および結果】*P. methanolica*におけるメタノール生育時のCyt c発現解析を行ったところ、CYC1の転写量はメタノール濃度上昇とともに増加した。また、メタノール濃度を一定にした場合、酸素濃度の低下とともに転写量も低下していた。メタノール代謝に必須である電子伝達系の働きを阻害するアジ化ナトリウムで処理した場合はCYC1の転写量は急激に低下した。しかし、グルコース生育の場合では、グルコース濃度変化によるCYC1転写量の変化は見られなかった。これらの結果から、*P. methanolica*は生育環境下のメタノールおよび酸素濃度に応じてCYC1発現レベルを制御し、これを通して何らかの方法でメタノール代謝を巧妙に制御していることが推測される。

¹⁾Bhatnagar A *et al.* 2004.

B-19

ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼを高発現したメチロトロフ酵母のメタノール生育能への影響

小澤 正太郎¹、藤村 朱喜¹、松藤 淑美¹、宮地 竜郎¹、由里本 博也²、阪井 康能²、中川 智行³、中川 純一¹
(¹東農大生物産業・食科、²京大院農・応用生命、³岐阜大・応用生物)

【目的】メチロトロフ酵母のメタノール代謝では、代謝初段階酵素アルコールオキシダーゼ(AOD)の酸化反応により、細胞毒性の高いホルムアルデヒド(FA)が産生される。そのためメタノール生育には、FAの毒性を回避するための細胞内FA量の制御系が必須であると考えられる。このFA制御系に関わる因子として、メタノール代謝の酸化経路の鍵酵素であるホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ(FLD)の働きは非常に重要である。そこでメチロトロフ酵母にてFLD高発現株を作成し、メタノール生育能への影響を調べた。

【方法および結果】メチロトロフ酵母*Candida boidinii*を宿主として強力なメタノール誘導性を有するジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子プロモーター支配下で*Pichia methanolica*由来FLD1の大量発現を試み、*PmFLD1*高発現株を4株獲得した。これらの高発現株のFLD活性は野生株に比べ10倍程度の高活性を示した。そこでFLD高発現株と野生株のメタノールに対する生育能について比較解析した。その結果、高発現株のメタノール生育は野生株に対し遅延がみられたが、FA耐性能自体は野生株よりも向上していることが明らかになった。

B-20

酵母におけるセレブロシド合成酵素遺伝子破壊の影響

(¹帯畜大・食品化学、²農研機構・北海道農研、³日甜) 菊地 絢子¹、得字 圭彦¹、浅沼高寛¹、矢島 祐輝¹、柚木 恵太¹、斎藤 勝一²、田村 雅彦³、大西 正男¹

目的：真核生物の代表的なスフィンゴ脂質であるセレブロシド(モノグリコシルセラミド)は *Saccharomyces cerevisiae* とその近縁酵母には分布していないが、セレブロシド含有酵母では特異な 9-methyl-4-trans, 8-trans-sphingadienin(9-メチル塩基)が主要なセレブロシド構成成分として共通して検出される。一方、植物界に普遍的に分布する 8-cis タイプのスフィンゴイド塩基は真菌や動物中には見出されていない。先に演者らは、9-メチル塩基含有型セレブロシドの膜流動性に及ぼす影響や低温ストレス条件下での組成変動について解析するとともに、GCS遺伝子破壊株ではアルカリ耐性が低下することを報告した。また、*Kluyveromyces lactis* のセレブロシド合成酵素(GCS)遺伝子破壊株では親株(NBRC1267)と比べて、遊離セラミド量の増加、ならびに構成トリヒドロキシ塩基とヒドロキシ脂肪酸の長鎖化抑制が観察されている。今回は、GCS遺伝子破壊が細胞形態や脂質代謝に及ぼす影響などを明らかにしようとした。

方法と結果：*K. lactis* のGCS破壊株では、親株と比べて増殖速度が低下して細胞が巨大化しており、疑似菌糸が観察された。DNAマイクロアレイ解析を行うと、C24以上の脂肪酸合成に係わる超長鎖化酵素遺伝子およびC16酸からのC18酸への合成に関与する遺伝子の発現量が減少していた。このことから、イノシトールリン酸含有の酸性スフィンゴ脂質のセラミド残基における短鎖長はC18ヒドロキシ脂肪酸と9-メチル塩基からなるセラミド残基を有するセレブロシドの合成不能に伴う膜構造の異常を相補するための代謝変動と推測される。また、細胞分裂関連遺伝子(サイクリンなど)の発現量も減少しており、この発現変動と遊離セラミドあるいはスフィンゴイド塩基の蓄積との関連性が示唆された。

B-21

海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素とシアル酸含有LPS構造

(¹帯畜大畜産、²日本たばこ・植物イノベーションセンター)

平塚 宙子¹、塩谷 一紗¹、上宮 悠¹、山本 岳²、梶原 ひとみ²、榎 泰典¹

研究背景)細胞表面の複合糖質の詳細な構造とそれに伴う機能解明はポストゲノム研究の中で、最も重要な課題の一つである。その目的達成には多種類の複合糖鎖が必要であり、様々な生理機能解析に活用できる。我々は海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素(STs)をクローン化した組み換え酵素を用いることにより、有用なガングリオシド合成系を既に確立している¹⁾。ここでは、材料として用いた海洋性細菌の表面のLPSの構造について検討を行なった。

方法、結果及び考察)既にSTsの組み換え酵素が得られている4種の菌体をMarine broth培地を用いて、培養後、菌体を回収し、その菌体からWestphalの方法に準じて、LPSを抽出、精製を行ない、その後各種の機器分析に供した。GC及びGC/MSによる組成分析とTOF/MS分析から、単一種ではない、複数のLPSの構造を有することが明らかになった。現在詳細な構造解析の検討を行なっている。シアル酸含有LPSの詳細な構造解析は、類縁菌の *C. jejuni* がギランバレー症候群の原因菌である可能性が高いことを考慮すると、自然界の中で、主として脊椎動物に存在するシアル酸の生物学的機能性を知る上で今後、増々重要になると考えられる。

1)第50回脂質生化学会講演集(2008)

B-22 ビフィズス菌の細胞膜のラクトフェリン結合性タンパク質の検索

(北大院農) 田島 恵梨香、玖村 朗人、島崎 敬一

研究背景) ミルク中に多く含まれる糖タンパク質であるラクトフェリンは、近年ヒトの健康への寄与が多く報告されている。これまでに、ラクトフェリンは腸内有用菌の1種であるビフィズス菌の増殖促進効果があること、ビフィズス菌表面にラクトフェリンが結合する部位があることがわかっている。本研究では、ビフィズス菌細胞膜上のラクトフェリン結合性タンパク質を精製し、そのアミノ酸配列を決定することを目的とし、ラクトフェリンのプレバイオティクスの作用の一端を解明することを目指している。

方法及び結果) 3種のビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* ATCC 15708、*B. longum* BB536および *B. breve* S46の各菌体を、細胞質画分および細胞膜画分に分離した。菌体成分の分離は超音波破碎法などにより行った。細胞膜画分サンプルのSDS-PAGEおよびファーウエスタンブロット法により、*B. breve* S46の細胞膜画分にラクトフェリン結合性タンパク質が存在していることを確かめた。そこで、この *B. breve* S46の細胞膜画分サンプルを、担体としてTSKgel Tressyl-5PWを用いて作製したラクトフェリン固定化カラムによるアフィニティークロマトグラフィーに供した。SDS-PAGEを行い、吸着した成分中に、ラクトフェリン結合性タンパク質のバンドを確認することができた。本菌株はラクトフェリンによる増殖促進効果を高く受ける株であることから、細胞膜上のラクトフェリン結合性タンパク質の存在が、ラクトフェリンによる増殖促進効果に何らかの影響を与えている可能性が示された。

B-23 ラクトフェリンと相互作用するタンパク質の探索

(北大院農) 北條 晶子、玖村 朗人、島崎 敬一

研究背景] ラクトフェリンは鉄・銅などの金属イオンや核酸、多糖類など多様な物質と結合することが知られており、その結合物質は生物学的に何らかの機能を持った物質であることが多い。しかし、これらの物質がラクトフェリンと結合し、生体内でどのような機能を発揮しているかについてはあまり解明されていない。ラクトフェリンが他の物質と結合、相互作用することを考えると、ラクトフェリンはそれ自体とは全く異なる構造あるいは機能を持った物質と結合し、キャリアーとして働き、さらに結合した物質の機能が表に出るという複雑な働きを生体内で発揮していると考えられる。本研究では生体内での機能発現機構の解明するために、牛唾液を対象としてラクトフェリン結合物質の探索を目的とした。

方法及び結果] 牛ラクトフェリン (bLf) を固定化したカラムを使用してアフィニティークロマトグラフィーを行い、牛唾液からbLfと相互作用するタンパク質を精製した。さらに、ビオチン化bLfとストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを用いてファーウエスタンを行ったところ、バンドがいくつか確認できた。その中の一つの約30 kDaのタンパク質のN末端アミノ酸配列分析を行ったところ、Bovine salivary protein (BSP)30と高いホモロジーを示した。さらに、エンドグリコシダーゼHで糖鎖を切断したbLfとbLfのCローブをリガンドとしてイムノブロットングを行ったところ、糖鎖を切断したbLfとも反応性を示し、Cローブとは反応しなかった。