

日本農芸化学会中四国支部
第5回講演会

講演要旨集

日時：2003年1月25日(土) 13時開会
場所：高知大学農学部

日本農芸化学会中四国支部

Information

支部評議員会は、12時から農学部1号棟2階大会議室で行います。

懇親会は、18時から高知第一ホテル

(JR高知駅前, Tel.088-883-1441)で行います。

次回予定

中四国支部 第6回講演会(シンポジウム)予定

日 時 2003年5月31日(土)

場 所 広島大学先端物質科学研究科

世話人 宮川 都吉

日本農芸化学会中四国支部

〒700-8530 岡山市津島中1-1-1

岡山大学農学部生物資源化学講座内

<http://www.agr.okayama-u.ac.jp/JSBBAchushi/>

2003年(平成15年)1月25日発行

特別講演，受賞講演および一般講演プログラム

特別講演（13:00～13:30）

「化学の目で覗く昆虫の寄主選択」 （座長：沢村正義）
堀池 道郎（高知大学農学部教授）

農芸化学奨励賞受賞講演（13:30～14:00）

「ゲノム情報に基づく枯草菌の逆遺伝学的研究」 （座長：味園春雄）
吉田 健一（福山大学生命工学部講師）

一般講演（14:00～17:12，発表10分，質問2分）

（座長：永田信治 高知大・農）

1．微生物による第4級アンモニウム化合物の分解（第1報）；NAD-依存性脱水素酵素生産菌の探索

村上寛幸，松野美智子，北本 豊， 森 信寛*
（鳥取大・農，*鳥取大院・連農）

2．微生物による第4級アンモニウム化合物の分解（第2報）；トリメチルアミノ-1-ブタノール脱水素酵素の精製と性質

森本幸子*，村上寛幸，北本 豊，森 信寛**
（*鳥取大院・農，鳥取大・農，**鳥取大院・連農）

3．*Penicillium chrysogenum* IFO4626から誘導したアルミニウム耐性変異菌で優位に発現する遺伝子の構造と機能解析

齋木祐志，杉本 学，河合富佐子
（岡山大・資生研）

4．ビタミンB₆代謝酵素ピリドキシンオキシダーゼの大量発現系の構築と精製法の改良

吉金 優，横地奈菜，大西浩平*，八木年晴
（高知大・農・生物資源，*高知大・遺伝子）

（座長：受田浩之 高知大・農）

5．ラックの主色素ラッカイン酸Aの抗酸化性（天然食用色素の抗酸化機構研究）

増田俊哉， 稲葉 譲，桐木平拓也，前川智美*，武田美雄，山口英昌*
（徳島大・総合科学，*大阪市大・生活科学）

6. ゴマ微量成分の物理化学的性質

大島久華, 山野善正*, 合谷祥一

(香川大・農, *おいしさの科学研)

7. ニューラルネットワークによるスポンジケーキの物性解析

川田眞基子, 山野善正*, 合谷祥一

(香川大・農, *おいしさの科学研)

8. 抗酸化剤によるリポソーム包埋高度不飽和脂肪酸の放射線分解抑制

大崎健一, 馬場直道*, 白石友紀*, 多田幹郎

(岡山大院・自然科学, *岡山大・農)

(座長: 芦内 誠 高知大・農)

9. でんぷん糖化酵素の放射線殺菌

松田かおり, 坂上和之*, 多田幹郎

(岡山大院・自然科学, *(株)三栄源 F F I)

10. タバコ培養細胞 (BY2) の耐塩化に伴う糖タンパク質糖鎖の構造変化

渡辺貴夫, 吉家猛雄, 前田 恵, 木村万里子*, 村田芳行, 木村吉伸

(岡山大・農・生物資源, *現くらしき作陽大・食文化)

11. 糖類アモルファスマトリクスの物理的安定性に及ぼす糖分子構造の影響

坂浦啓介, 福島厚志, 今村維克, 崎山高明, 中西一弘

(岡山大・工・生物機能工)

12. 微生物リパーゼのエステル交換能を応用したポリフェノールグルコシドの安定化と高機能化

中島伸佳, 比江森美樹, 木本眞順美, 辻 英明

(岡山県立大・保健福祉・栄養)

(座長: 八木年晴 高知大・農)

13. 双翅目昆虫特異的チャネル形成毒素タンパク質の機能解析

山際雅詩, 三輪大輔, 酒井 裕

(岡山大・工・生物)

14. *Bacillus thuringiensis*が産生するクリスタルタンパク質の白血病ガン細胞に対する細胞損傷能の解析
平尾太一，山際雅詩，赤尾哲之*，水城英一*，大庭道夫**，酒井 裕
(岡山大・工・生物，*福岡県工技セ，**九州大院・農)
15. マツノザイセンチュウ抽出物による細胞性免疫増強作用について
高松太郎，細田 俊，神崎 浩*，田井章博，山本 格
(岡山大・薬，*岡山大・農)
16. 新規親油性安定型アスコルビン酸誘導体(6-Acyl-AA-2G)の抗原特異的抗体産生及びIL-2産生に対する作用
松村拓大，田井章博，山本 格
(岡山大・薬)

特 別 講 演

講 演 要 旨

特別講演 化学の目で覗く昆虫の寄主選択 - ミナミキイロアザミウマの例 -

高知大学農学部 堀池 道郎

ミナミキイロアザミウマ (*Thrips palmi*) は総翅目アザミウマ亜目に属する体長 1 mm 程度の外来種であるが、イネから各種野菜類や花など多種類の農作物に被害をもたらす重要な農業害虫の一つである。特に、ウリ科のキュウリ、スイカ、メロンやナス科のナスやピーマンに大きな被害をもたらす。このミナミキイロアザミウマは繁殖力が大きく、その上、非休眠性で、冬は加温ハウス中で生活し年中絶えることがなく、しかも多くの薬剤に対して抵抗性を有している。このミナミキイロアザミウマに対する総合防除の確立に貢献するため、ミナミキイロアザミウマに対し抵抗性を有する植物を探索し、ミナミキイロアザミウマの寄主選択機構を化学的・生物学的手法により解明することを試みた。講演ではミナミキイロアザミウマの寄主選択について化学の目で覗いた 2 つの事例を紹介する。

トマトと -トマチン

ミナミキイロアザミウマはナスやピーマンなどナス科の植物を加害するが、同じナス科のトマトを加害しない。予備的な実験や観察から寄主選択が植物体に含まれる物質（活性物質）に起因すると考え、活性成分を追跡した。各種分離手段と生物検定を組み合わせ、活性物質を精製し、NMRを中心とした機器分析により、その化合物が -トマチンと言うグリコアルカロイドであることを突き止めた。

トマトがミナミキイロアザミウマの被害を受けないのは、ミナミキイロアザミウマの嫌う物質（摂食阻害物質）つまり -トマチンを作り、ミナミキイロアザミウマの攻撃を防ぐ防御物質の役割を持たせていることによることを明らかにした。

ユキヤナギと -メチレン- -ブチロラクトン

ミナミキイロアザミウマの攻撃を受けない植物はトマトやイチゴの他にもいくつかあるが、その中で劇的に殺虫活性を示すものにユキヤナギがある。

ユキヤナギはバラ科の植物で春先に白い花を付ける低木性の木で、ヤナギに雪をかぶせた感じがすることから古くから庭木として植えられ、また生け花等にも利用されています。このユキヤナギの葉に摂食阻害物質ではなくミナミキイロアザミウマを殺す成分が含まれていることを明らかにした。この成分は揮発性で、葉を傷つけると蒸気として発散し、この蒸気に触れたミナミキイロアザミウマは短時間内に死亡することから、ユキヤナギが持っているミナミキイロアザミウマに対する化学的防御物質であると考えた。その構造が -メチレン- -ブチロラクトンであることを突き止めた。

ユキヤナギの生葉を与えた場合と抽出物を与えた場合の死滅に至る経過の相違から、植物体中での存在形態はグルコースの 6 位と結合した 6-Tuliposide であることがわかり、物理的な刺激によって結合が切れると同時にラクトン化して -メチレン- -ブチロラクトンが生成し、殺虫活性を示すことを明らかにした。

受 賞 講 演

講 演 要 旨

受賞講演 ゲノム情報に基づく枯草菌の逆遺伝学的研究

福山大学生命工学部 吉田 健一

枯草菌は酵素や有用物質等の生産に用いられ、そのためもあって基礎的な分子遺伝解析が最も進んでいる微生物の一つである。実用上の重要性を背景に、枯草菌の遺伝子解析を一層推進するため、日欧米韓46研究グループの国際協力研究により枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定された。その結果、4100あまりの遺伝子より成る枯草菌のゲノム構成が明らかとなったが、半数の遺伝子は依然機能不明であった。この事実は、研究蓄積の豊富な枯草菌でさえ具体的機能がわかっている遺伝子が予想以上に少ないこと、さらにこれまで分子遺伝解析に用いられてきた戦略の能力的な限界を示唆した。

そこで演者は、ゲノム情報を起点として未知遺伝子の機能を探る逆遺伝学的な戦略へと発想転換した。まず、未知遺伝子の機能同定の鍵を得るため、未知遺伝子を一つづつ網羅的に破壊して表現型変化を追跡する組織的国際協力研究に参画、遺伝子破壊株とその表現型情報を国内外の研究者と共有して未知遺伝子が関わる生体機能を検索した。そして網羅的解析の結果にヒントを求めつつ、遺伝学的に未解明であった特定の生体機能についてゲノム情報に基づく推論と実証を進める逆遺伝学を展開した。本講演では、この戦略により手掛けてきた幾つかの研究対象のうち、イノシトール分解系について紹介する。枯草菌などの微生物以外の生物は、イノシトールを単一炭素源として利用することができない。つまり、枯草菌などの微生物のイノシトールの分解利用に関わる遺伝子群は他の生物種には見られない特殊なものであると考えられていたが、如何なる遺伝子群がこの分解系を担うのかは未解明であった。そこで、演者は枯草菌のゲノム情報を基に、この分解系に関わる遺伝子群を推定した。そして、それらの転写構造と発現制御機構を実証、さらに各々の遺伝子を生化学的に解析して分解酵素の5遺伝子と輸送系2遺伝子の機能同定に成功し、イノシトールの分解利用系を分子レベルでほぼ解明した。

一方、演者等は枯草菌のトランスクリプトーム変動を解析するDNAマイクロアレイ技術を確立した。アレイ解析を用いることで共通の発現変動を示す遺伝子群がゲノムワイドに抽出できるが、それらは機能的にも関連する可能性が高い。そこで、筆者はアレイ解析で発現変動を共にする遺伝子群から、より機能上の関連が強いと考えられる各々の転写調節因子が司るレギュロンの構成遺伝子を選抜する研究に取りかかった。本講演ではモデル研究として取り上げたTnrAレギュロンの解析を紹介する。TnrAは窒素源制限生育条件下のグローバル調節因子である。*tnrA*変異株とその親株のトランスクリプトームを比較し、顕著な発現変動を示した遺伝子を抽出、その中で生物情報学的に推定されるTnrA結合配列との相関が評価できるものを選出し、さらにゲル移動度シフト解析でTnrA結合が検出されたものをTnrAレギュロン構成遺伝子として選抜した。こうして選ばれた遺伝子は、窒素源制限生育条件に適応するためにTnrAによって制御されていることが示唆された。類似のアプローチにより、その他多数の機能未知転写制御因子のレギュロンも解析できると期待される。

一 般 講 演

講 演 要 旨

講演番号1 微生物による第4級アンモニウム化合物の分解(第1報); NAD-依存性脱水素酵素生産菌の探索

村上寛幸, 松野美智子, 北本 豊, ○森 信寛*
(鳥取大・農, *鳥取大院・連農)

【目的】当研究室では, コリンやカルニチンなどの第4級アンモニウム化合物分解酵素の構造と機能について研究を行っており, 今までに, 微生物由来の第4級アンモニウム化合物分解酵素として, コリン酸化酵素, ベタインアルデヒド脱水素酵素, L-およびD-カルニチン脱水素酵素を精製し, その諸性質を明らかにしてきた。また, ベタインアルデヒド脱水素酵素およびL-カルニチン脱水素酵素遺伝子をクローニングし, 塩基配列を決定している。本研究では, 新たな第4級アンモニウム化合物分解酵素を探索する目的で, コリンと構造が類似した3-トリメチルアミノ-1-プロパノール(TMAP), 4-トリメチルアミノ-1-ブタノール(TMAB)を取り上げ, TMAPおよびTMAB分解微生物の探索さらにNAD依存性TMAP脱水素酵素, NAD依存性TMAB脱水素酵素の探索を行った。

【方法および結果】TMAPあるいはTMABを炭素および窒素源とする培地を用いて, それぞれ368菌株, 525菌株分離した。次に, 生育度テスト, 無細胞抽出液中のNAD依存性脱水素酵素活性の測定, 安定性の検討などを行い最終的にそれぞれ1菌株(125a株, 13-CM株)を選定した。さらに, これらの菌株の培地条件, 培養条件を検討した。NAD依存性TMAP脱水素酵素は基質特異性の広いアルコール脱水素酵素であることが示唆された。

講演番号2 微生物による第4級アンモニウム化合物の分解(第2報); トリメチルアミノ-1-ブタノール脱水素酵素の精製と性質

○森本幸子*, 村上寛幸, 北本 豊, 森 信寛**
(*鳥取大院・農, 鳥取大・農, **鳥取大院・連農)

【目的】前報では第4級アンモニウム化合物である4-トリメチルアミノ-1-ブタノール(TMAB)脱水素酵素生産菌を探索し, 13-CM株の酵素生産条件を検討した。本報では, NAD依存性TMAB脱水素酵素を精製し, 諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法】酵素反応はグリシン緩衝液(pH 9.5)中で行い, 生成するNADHの340nmでの吸光度変化を経時的に測定して酵素活性を算出した。

【結果】TMABを炭素および窒素源とした培地で18時間培養した13-CM株の無細胞抽出液から, 硫酸分画を行い, さらに陰イオン交換, 疎水, ゲルろ過の各クロマトグラフィーを行い, 本酵素を電気泳動的に単一にまで精製した。本酵素は分子量約45kDaのモノマー酵素であった。本酵素はTMAB(100%), 4-ジメチルアミノ-1-ブタノール(54%)に作用したが, その他の第4級アンモニウム化合物には作用しなかった。至適pHは9.0, 至適温度は50℃, 温度安定性は30℃まで安定であった。本酵素反応は Rb^+ , Hg^{2+} により強く阻害された。さらに, SH酵素阻害剤であるDTNBやIodoacetamideにより阻害された。

講演番号3 *Penicillium chrysogenum* IFO4626から誘導したアルミニウム耐性変異菌で優位に発現する遺伝子の構造と機能解析

齋木祐志, 杉本 学, 河合富佐子
(岡山大・資生研)

環境汚染による土壌の酸性化は土壌中の金属イオン濃度を上昇させ植物根圏に深刻な影響を及ぼす。土壌微生物は土壌中の物質循環に必須であり, 金属イオン毒性に耐性な土壌微生物の育成や作出は土壌改良や土壌活性を保ち, 植物の生産性向上をもたらすことが期待される。本研究では, 土壌微生物のアルミニウム耐性機構を明らかにすることを目的として, アルミニウム耐性菌で優位に発現している遺伝子のスクリーニングを行い, その構造と機能を明らかにした。

アルミニウム感受性保存菌*P. chrysogenum* IFO4626とUV照射処理で得たアルミニウム耐性変異菌から抽出したRNAを用いたサブトラクションハイブリダイゼーションによりアルミニウム耐性変異菌特異的cDNAライブラリーを構築した。ディファレンシャルスクリーニングにより候補遺伝子を選択した後, 候補遺伝子をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った結果, アルミニウム耐性変異菌で有意に発現している8種類の遺伝子を得た。これら遺伝子の全長cDNA塩基配列を明らかにした結果, 未知遺伝子の他, グルコアミラーゼ, エノラーゼ, システイン合成酵素, ADP/ATPトランスロカーゼと高い相同性を示した。これらの酵素活性を測定した結果, 耐性変異菌は感受性保存菌よりも高い値を示した。本研究は生研機構基礎研究推進事業の成果の一部である。

講演番号4 ビタミンB₆代謝酵素ピリドキシンオキシダーゼの大量発現系の構築と精製法の改良

吉金 優, 横地奈菜, 大西浩平*, 八木年晴
(高知大・農・生物資源, *高知大・遺伝子)

*Microbacterium luteolum*由来のピリドキシンオキシダーゼ (PNox) はFADを補酵素とし, ピリドキシンをピリドキサルへと酸化する反応を触媒する。本酵素の三次構造については未だ明らかとなっていない。今回, この構造を解明するため, 大量発現系の構築と結晶化を試みた。本酵素遺伝子を強力なT7プロモーターを有するpET21aベクターに連結後, 大腸菌*E. coli* BL21 (DE3) に導入し, 本酵素の発現系を構築した。発現タンパク質はほとんど不溶化していたため, P_{trc}プロモーターを有するpTrc99aベクターに連結後, *E. coli* JM109に導入した。しかし, 大部分が不活性な封入体を形成したままであった。そこで, この菌体にシャペロンGroESLを発現するpKY206ベクターを追加導入したところ, 可溶性活性酵素が大量に発現した。さらに低温培養 (23℃ 培養) により活性酵素は増大し, 本菌は, 粗抽出液レベルで*M. luteolum*に比べ約92倍 (4.59U/mg) の比活性を示した。この組換え酵素タンパク質はSDS-PAGEで分子量約53,000であり, *M. luteolum*由来の酵素とほぼ同じであった。本酵素は硫酸分画, イオン交換ならびに吸着クロマトグラフィーの3段階により精製された。本酵素を用いて結晶化条件の検討を行った。

講演番号5 ラックの主色素ラッカイン酸Aの抗酸化性（天然食用色素の抗酸化機構研究）

増田俊哉， 稲葉 譲， 桐木平拓也， 前川智美*， 武田美雄， 山口英昌*
（徳島大・総合科学，*大阪市大・生活科学）

【目的】実際食品に利用されている天然由来の色素の抗酸化性および抗酸化機構を解明する。今回は，リノール酸メチル-Tweenミセル系を用いた食用色素の抗酸化スクリーニングにおいて強力な活性が認められたラック色素の抗酸化性を明らかにする。

【方法および結果】食品色素としてのラック色素はいくつかの色素を中心とした混合物であるので，まず主色素であるラッカイン酸A（LA）を精製し，その抗酸化性検討を行った。精製単離したLAは，ミセル系水溶性酸化促進剤条件においてラック色素同様，脂質に対する強力な抗酸化性が認められた。その一方で，LAは脂溶性酸化促進剤を用いたミセル系，またメタノールを溶媒とした均一系においてはほとんど活性を示さなかった。次に活性を示したミセル系において，抗酸化性の強度と系のpHとの関係を検討したところ，pH6.3付近での抗酸化性が最も強く認められた。また，LAの抗酸化反応による生成物の経時的HPLC分析では，反応進行に従って主に2種の生成物を観測できたが，それらの生成比はpHによって異なり，pH6.3では保持時間9分ピーク物質の方が多かった。興味あることにこの条件でのLA自体の減りは，抗酸化強度に比して少なく，この9分物質のLAの抗酸化機構上の重要性が示唆された。

講演番号6 ゴマ微量成分の物理化学的性質

大島久華，山野善正*，合谷祥一
（香川大・農，*おいしさの科学研）

【目的】近年の研究で生理化学的有用性が明らかになってきているセサミンと未利用資源であるオクタデカ二酸のさらなる利用を広げるために、物理化学的性質を検討した。

【方法】セサミン濃度0，0.5，1.0%のセサミンコーン油溶液を調製し，ガラス表面に対する油滴の広がり，水との界面張力，表面張力，粘度を測定した。セサミン，オクタデカ二酸を $0 \sim 2.60 \times 10^{-4} \text{g/cm}^2$ の表面密度で塗布したガラス板を調製し，試料塗布ガラス表面の水滴の接触角を測定し，150 °Cでの耐熱性，耐水性，温度依存性を調べた。対照としてステアリン酸亜鉛，エイコサ二酸，大豆レシチンについても測定した。また，試料を塗布したガラス板表面をSEMを用いて観察した。

【結果】コーン油のセサミン濃度が高くなるにつれ，ガラス表面に対する油滴の広がりが小さくなり，水との界面張力は低くなる傾向を示した。表面張力及び油の粘度はセサミン濃度による影響をほぼ受けなかった。ガラス表面のセサミン密度が高くなるにつれて水滴の接触角は大きくなり，一定の密度を越すとほぼ一定になった。また，この撥水性は，耐熱性，耐水性に優れ，融点以上に加熱することによって高い値を示した。オクタデカ二酸の撥水性はステアリン酸亜鉛と似た挙動を示し，表面密度が高くなるにつれ，高い値を示したが，加熱することによって著しく低下した。

講演番号7 ニューラルネットワークによるスポンジケーキの物性解析

川田眞基子，山野善正*，合谷祥一
(香川大・農，*おいしさの科学研)

【目的】洋菓子の中で、口当たりと風味の面で優れているとされるバタースポンジケーキの物性解析に対する人工ニューラルネットワークにおける適用を検討した。

【方法】鶏卵200 g，薄力粉100 g，ベーキングパウダー0.5 gを基本とし，無塩バター0，20，40，60，80，100，120 gで調整したバタースポンジケーキを貫入圧縮測定及びテクスチャー測定に供した。貫入測定値（破断応力，歪率，破断エネルギー）及びテクスチャー測定値（かたさ応力，凝集性，付着性，ガム性荷重，ガム性応力，A1エネルギー，A2エネルギー）を用いて，無塩バター含有量によりSPSS 9.0 for Windows（株）SPSS製）を用い，バタースポンジケーキを判別分析で分類した。さらに人工ニューラルネットワーク（以下NNとする。）Clementine6.5（株）SPSS製）を用いて，多層パーセプトロンネットワーク中の隠れ層や重みを変化させることによる分類を行い，判別分析と比較した。

【結果】バター含量の異なる2種類のスポンジケーキは，判別分析及びNNのどちらでもほぼ100%分類することができた。7種類のスポンジケーキの分類では，判別分析では約40%だが，NNにおいては50%以上分類でき，分類わけをする種類が多いとNNの方がより正しく行われることが分かった。分類わけにおける測定値の寄与度を調べたところ，NNの分類において重要なパラメーターは，貫入測定では破断変形及び破断応力値であり，テクスチャー測定では凝集性とA2エネルギーであった。また隠れ層が1層のNNよりも2層のNNの方が，わずかではあるが正しく分類することがわかった。

講演番号8 抗酸化剤によるリポソーム包埋高度不飽和脂肪酸の放射線分解抑制

大崎健一，馬場直道*，白石友紀*，多田幹郎
(岡山大院・自然科学，*岡山大・農)

【目的】食品照射は非加熱的衛生化の有効な手段として国際的に実用化が進んでいる。しかし，照射によって肉類や魚介類は含有脂肪酸の分解による食味変化や異臭発生を起し，このことが実用化の上で問題になっている。そこで，本実験ではドコサヘキサエン酸エチルエステル（DHA-Et）の放射線分解に対するフラボノイド類の抑制効果を評価し，分解抑制作用機序について知見を得ることを目的とした。

【方法】DHA-Et含有リポソームを調製し，5種のフラボノイドを溶液中に添加した。¹³⁷Csを線源とする線照射後，DHA-Et残存量をHPLCを用いて測定した。フラボノイドのDPPHラジカル消去活性は，フラボノイド添加後のDPPHの520nmの吸光度の減衰から評価した。

【結果】フラボノイド1分子あたりのDPPHラジカル消去数の多い順は，ケンフェロール<ルチン<ルテオリン<ケルセチン<フィセチンであった。一方，DHA-Etの線による分解に対する抑制作用の強い順序は，ルチン<ケンフェロール<ケルセチン<ルテオリン<フィセチンであった。これらのデータは，疎水性の高い構造を持つものが脂肪酸酸化抑制において有効であることを示唆している。アスコルビン酸を用いたDHA-Etの分解抑制作用評価の結果からも，疎水性環境下にある脂肪酸の分解抑制のためには抗酸化剤がより疎水性の高い構造を持つことが必要であることが示唆された。

講演番号9 でんぷん糖化酵素の放射線殺菌

松田かおり，坂上和之*，多田幹郎
(岡山大院・自然科学，*(株)三栄源FFI)

【目的】加工食品の製造には様々な酵素が使用されている。これらの酵素は日本食品衛生法では既存添加物名簿に登録されている。これら酵素の一般規格の微生物限度では細菌数は1gにつき5万個以下と定められている。また酵素は容易に変性することから，穏やかな条件下で調製されるため微生物の混入が避けがたく，その除去も困難である。このため，その安全性と非加熱殺菌法としての有用性が認知され，国際的に実用化が進みつつある放射線殺菌法に期待が寄せられている。本研究では，製菓，製パン等に使用されているでんぷん糖化酵素の殺菌への放射線照射の適用の可能性を検討した。

【方法】 α -amylase， β -amylase，glucoamylaseの3種の酵素を対象とし， ^{60}Co を線源として1，2，3，5 kGyの線量を照射し，それぞれの酵素の活性に及ぼす影響を調べた。酵素活性の測定は，合成基質(*p*-nitrophenyl誘導体)を用いて分光学的方法で行なった。

【結果】殺菌法として一般的に用いられる線量範囲では α -amylase， β -amylaseについては線量の増大に伴ってVmaxが僅かに増大する傾向が見られ，glucoamylaseでは変化が見られなかった。これらの結果から，でんぷん糖化酵素の殺菌に放射線照射が適用できることを示唆している。

講演番号10 タバコ培養細胞(BY2)の耐塩化に伴う糖タンパク質糖鎖の構造変化

渡辺貴夫，吉家猛雄，前田 恵，木村万里子*，村田芳行，木村吉伸
(岡山大・農・生物資源化学，*現 くらしき作陽大・食文化)

【目的】動物細胞の分化・脱分化に伴い，糖タンパク質糖鎖が顕著な構造変化を起こすことが知られている。特に，ガン化に伴う糖鎖構造変化は臨床面からも重要な意味を持つ。一方，植物細胞の分化あるいは環境変化に伴う糖鎖構造変化に関する知見は殆どない。植物細胞の生理状態変化に関わる糖タンパク質糖鎖の構造変化と糖鎖機能解明研究の一環として，今回はタバコ培養細胞の耐塩化に伴う糖タンパク質糖鎖の構造変化について解析した。

【方法・結果】タバコ培養細胞(BY2株)及び200mM NaClを含むLS培地にて耐塩化誘導した細胞から細胞質画分と細胞壁を調製後，それぞれの画分をプロナーゼ処理し糖ペプチドを得た。ヒドラジン分解，N-アセチル化，ピリジルアミノ(PA-)化により蛍光標識糖鎖を調製し，それらの構造を糖鎖2次元マップ，ESI-MS，エキソグリコシダーゼ消化により解析した[1]。その結果，野生株の細胞質糖タンパク質には複合型構造(75%)とハイマンノース型構造(25%)の2種糖鎖構造が発現されているが，細胞壁には複合型構造のみが発現されていることが明らかになった。このことは，糖鎖構造の発現が部位特異的であることを示唆している。耐塩化細胞の細胞質及び細胞壁糖タンパク質糖鎖についても合わせて報告する。[1] Misaki, R., *et al. Glycobiology*, 13, in press.

講演番号11 糖類アモルファスマトリクスの物理的安定性に及ぼす糖分子構造の影響

坂浦啓介，福島厚志，今村維克，崎山高明，中西一弘
(岡山大・工・生物機能工)

【目的と方法】糖類アモルファスマトリクスは食品・医薬品分野において機能性成分の粉末化・包括担体として広く用いられているが，その物理的安定性は糖の種類によって大きく異なる．本研究では糖の分子構造がアモルファスマトリクスのガラス転移および水分収着特性に及ぼす影響について検討した．糖としてglucose, maltose, maltotriose ~ -heptaposeおよびグリコシド結合部位が異なる4種類の二糖を用いた．ガラス転移温度(Tg)は示差走査熱量計で測定した．Tg前後における糖分子の振動状態の変化をFTIRにより解析した．

【結果】グルコピラノースの重合度が高くなるにつれてTg，水分収着量とも上昇した．また，同じ二糖でもグリコシド結合部位によってTg，水分収着量とも異なることが分かった．FTIR分析の結果，糖アモルファスのOH伸縮振動の吸収波数は温度とともに直線的に上昇し，Tg近傍でその上昇勾配が不連続に増加した．これより糖アモルファスのガラス転移は糖分子間水素結合がある程度消失することにより分子運動が顕著に増加する現象と考えることができる．そこで，OH吸収波数の温度に対する上昇勾配とTgにおけるOH吸収波数からそれぞれ糖分子間水素結合の強度およびガラス転移が生じるときの糖分子間水素結合の形成度を評価し，糖分子構造によるガラス転移および水分収着特性の変化機構について検討した．

講演番号12 微生物リパーゼのエステル交換能を応用したポリフェノールグルコシドの安定化と高機能化

中島伸佳，比江森美樹，木本眞順美，辻 英明
(岡山県立大・保健福祉・栄養)

花卉の美しさや果汁の色調の鮮やかさを担う天然植物色素(フラボノイド系，及び，アントシアニン系色素)は，一般的には光や熱に不安定であるが，その一部は細胞内で，芳香族酸によりアシル化された配糖体(グルコシド)として安定に存在すると考えられている．

本研究では，食品添加物や食品機能素材として安定で高機能な植物色素類を分子設計することを主目的に，微生物リパーゼの位置特異的なエステル交換反応により，アシル基供与体に芳香族酸ビニルを用いて，各種のアシル化植物色素(アシル化ポリフェノールグルコシド)を酵素的に創造した．

さらに，それらの耐光性，耐熱性，ラジカル消去能などを比較検討し，安定化機構獲得のメカニズムを解明した．

また，ムラサキイモ培養細胞由来の酵素反応系を用いて，Coenzyme AとATPの存在下，芳香族酸とフラボノイドグルコシドからアシル化植物色素を酵素的に合成する方法も確立した．

講演番号13 双翅目昆虫特異的チャンネル形成毒素タンパク質の機能解析

山際雅詩，三輪大輔，酒井 裕
(岡山大・工・生物)

【目的】*Bacillus thuringiensis*が産生するCryタンパク質は標的昆虫の中腸上皮細胞膜にチャンネルを形成することが知られている。主に鱗翅目昆虫特異的Cryタンパク質では，タンパク質を構成する3つのドメインのうち，ドメインIがチャンネル形成に関与していることが示唆されており，ドメインIを構成する7つのヘリックスのうち4と5ヘリックスが重要な働きをしていることが示唆されている。そこで，本研究では双翅目昆虫特異的Cryタンパク質の殺虫活性発現におけるドメインIの機能解析を目的とした。

【方法と結果】双翅目昆虫特異的毒素タンパク質Cry4AのドメインI領域における欠失変異及び点変異タンパク質を構築して，それぞれをGST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)との融合タンパク質として大腸菌内にて発現させ，精製を行った。続いて精製タンパク質のアカイエカ幼虫に対する殺虫活性を検討した。その結果，Cry1ファミリーでチャンネル形成に重要であるとされる4ヘリックスを欠失させたCry4Aタンパク質は野生型Cry4Aとほぼ同等の殺虫活性を保持していた。よって，Cry1ファミリーとは異なり，Cry4Aのアカイエカ幼虫に対する殺虫活性の決定には4ヘリックスは不可欠の要素ではないことが示唆された。

講演番号14 *Bacillus thuringiensis*が産生するクリスタル蛋白質の白血病ガン細胞に対する細胞損傷能の解析

平尾太一，山際雅詩，赤尾哲之*，水城英一*，大庭道夫**，酒井 裕
(岡山大・工・生物，*福岡県工技セ，**九州大院・農)

【目的】これまで我々は*B. thuringiensis* A1519株が産生するクリスタル蛋白質に白血病ガン細胞に対して細胞損傷能を示すものがあることを見出し，その活性型分子種が29kDaの新規蛋白質であることを報告した。そこで本研究では，同様に白血病ガン細胞に対して細胞損傷能を示す新規*B. thuringiensis*菌A2316株が産生するクリスタル蛋白質の解析を行うことを目的とした。

【方法と結果】新規*B. thuringiensis*菌A2316株のクリスタル蛋白質はプロテイナーゼKにより活性化され，白血病ガン細胞MOLT-4に対して細胞損傷能を示した。クリスタル蛋白質を投与したMOLT-4細胞の形態変化を観察すると，細胞の膨張と核の凝縮がみられたが，細胞膜は破壊されていなかったことから，細胞膜を破壊して細胞死を誘導する*B. thuringiensis*由来クリスタル蛋白質とは異なる作用機構であることが示唆された。活性型分子種を同定するため，プロテイナーゼKにより活性化したクリスタル蛋白質をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し，細胞損傷能を測定した結果，29kDaのポリペプチドが活性型分子であることが強く示唆された。この29kDa断片のN末端アミノ酸配列を決定したところ，A1519株の29kDa断片のN末端アミノ酸配列と同一であったが，既知のクリスタル蛋白質とはまったく相同性がみられず，新規蛋白質であることが示唆された。

講演番号15 マツノザイセンチュウ抽出物による細胞性免疫増強作用について

高松太郎，細田 俊，神崎 浩*，田井章博，山本 格
(岡山大・薬，*岡山大・農)

生体には恒常性を維持するために、「体液性免疫」と「細胞性免疫」という互いに制御し合う二種類の防御機構が存在することが知られている。ところで、アレルギー患者においては前者の特徴であるIgEの血中濃度が上昇しているにもかかわらず、後者の特徴であるNK細胞障害活性が高く、がんになりにくいという疫学的調査がある。一方、最近当研究室では植物寄生虫であるマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* : 以降*B. xylophilus*と表記) 粗抽出物にポリクローナルIgE産生誘導作用を見出している。そこで今回、我々は*B. xylophilus*粗抽出物のNK細胞障害活性に与える影響について、C57BL/6マウスの脾細胞を用いた*in vitro*の実験系で検討を行った。その結果、*B. xylophilus*粗抽出物がNK細胞障害活性を増強させること、またその作用は即時的であり、「細胞性免疫」を増強するサイトカイン(IL-2)に非依存的事であることを認めた。また、粗抽出物によるNK細胞の細胞障害機構について、RT-PCR法を用いて調べた結果Granzyme B及びFas ligandのmRNA発現が亢進していることを見出した。この反応においてIgEの産生が関与しているか否かについては現在検討中である。今後、抽出物からの有効成分の精製を行い、細胞性免疫増強作用を活かした、がんワクチンの開発に関する基礎研究を行う予定である。

講演番号16 新規親油性安定型アスコルビン酸誘導体(6-Acyl-AA-2G)の抗原特異的抗体産生及びIL-2産生に対する作用

松村拓大，田井章博，山本 格
(岡山大・薬)

先に我々は、当研究室において開発した安定型アスコルビン酸誘導体(AA-2G)が*in vitro*抗原特異的抗体産生の増強作用を示すことを明らかにしている。種々の酸化的条件下で安定なAA-2Gは生体の α -glucosidaseによりグルコース分子を遊離し、活性型ビタミンC(アスコルビン酸, AA)となって吸収され、作用を発揮することも明らかとなっている。最近、我々はAA-2GのAA側6位の水酸基に種々の脂肪酸を導入した親油性アスコルビン酸誘導体6-Acyl-AA-2Gを開発した。これらの化合物は皮膚組織への浸透性、腸管からの吸収性がAA-2Gと比較して上昇していることを確認している。今回我々は抗原(OVA)特異的免疫応答におけるIL-2, IL-4, OVA特異的抗体産生に対する作用を比較検討した。その結果、6-Acyl-AA-2GはAA-2Gと比較して低濃度でIL-2, OVA特異的抗体産生を誘導していた。また、IL-4産生も上昇傾向にあった。また、6-Acyl-AA-2GのIL-2産生及びOVA特異的抗体産生増強作用は α -glucosidase阻害剤であるcastanospermine存在下、AA-2Gと同様に抑制されることを見出した。これらの知見は、6-Acyl-AA-2Gの細胞への取り込みはAA-2Gより優れており、またAA-2Gと同様に作用本体がAAであることを示唆している。

日本農芸化学会中四国支部 第5回講演会

世話人代表：味園春雄

連絡先：高知大学 農学部 生物資源科学科

TEL：088-864-5187 FAX：088-864-5200

Email：hmisono@cc.kochi-u.ac.jp