

日本農芸化学会創立80周年記念

**日本農芸化学会中四国支部
第11回講演会**

特別講演『21世紀バイオサイエンス研究の展望』

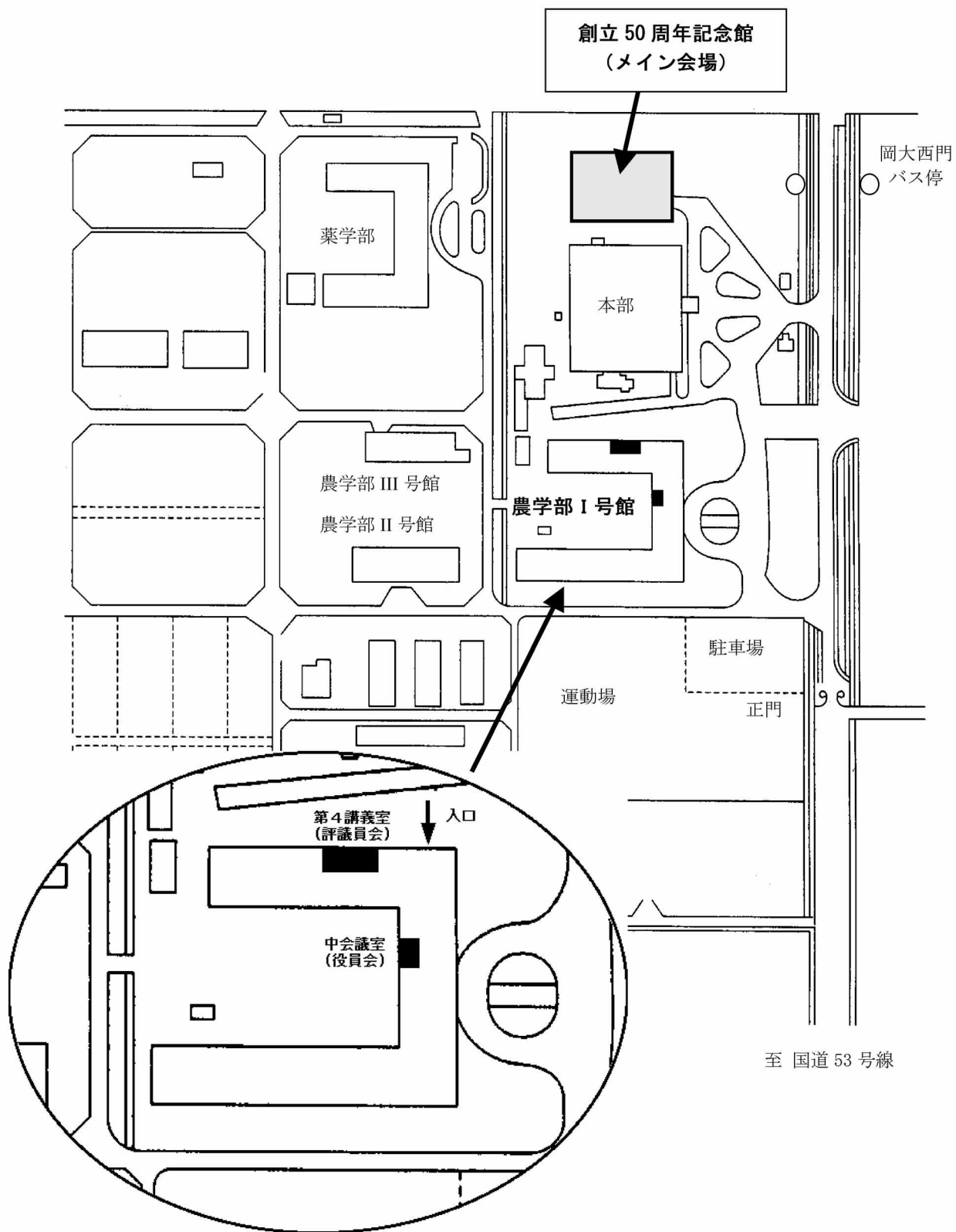
講 演 要 旨 集

日時：2005年1月22日(土)

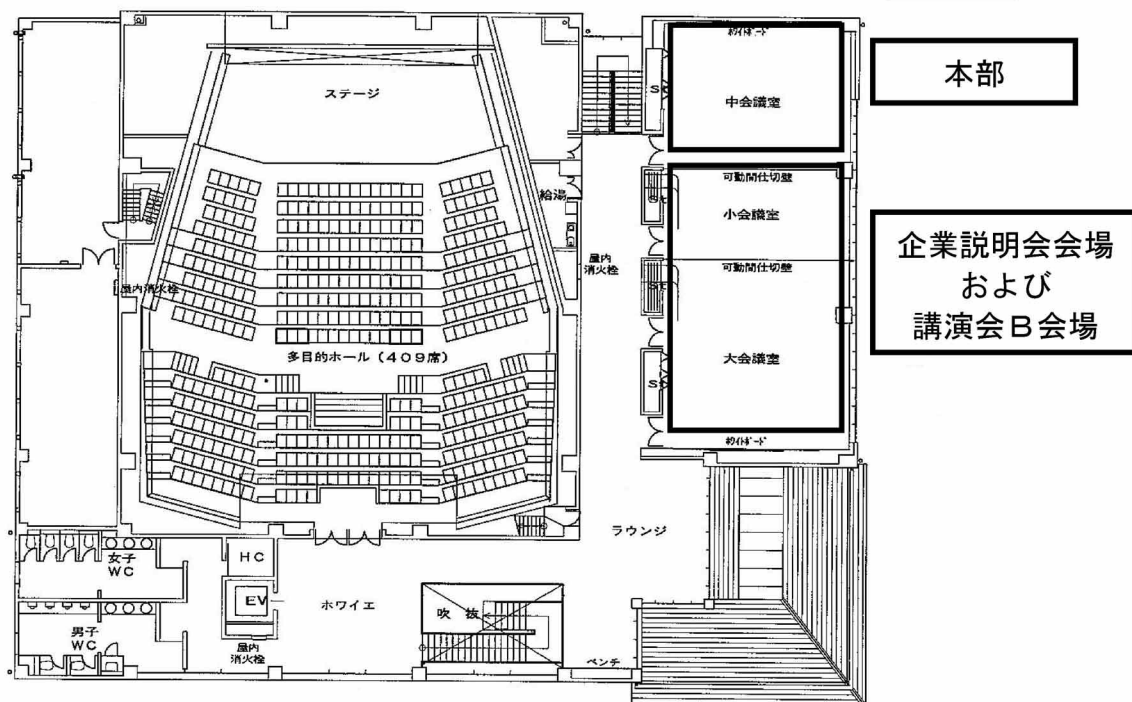
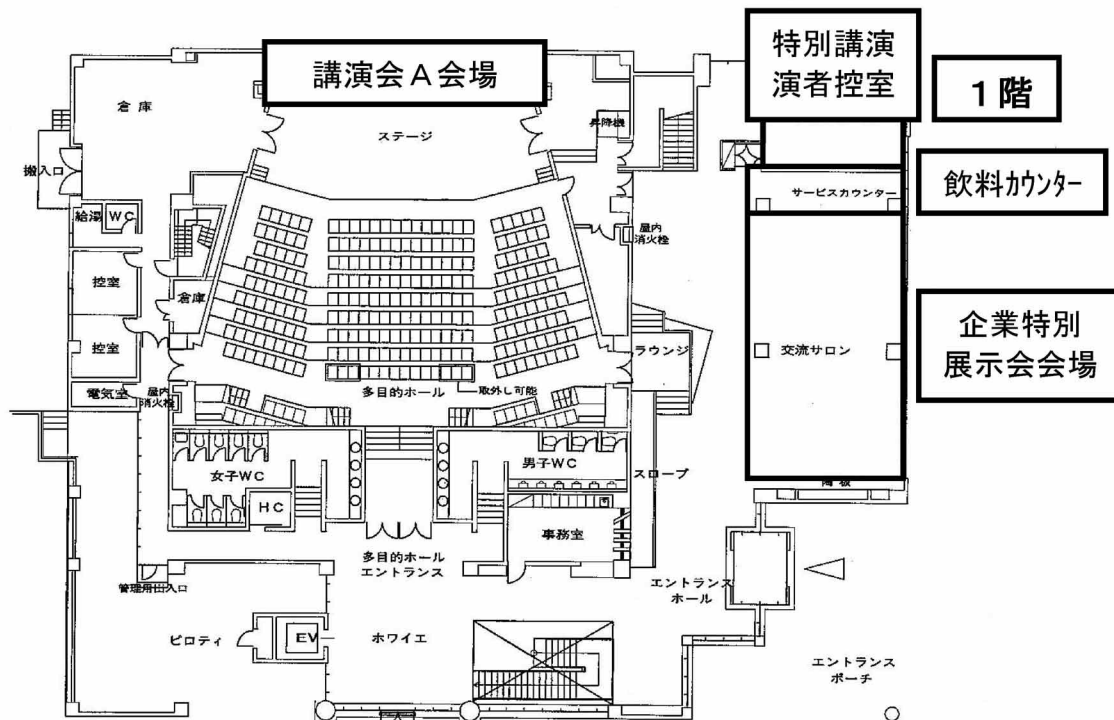
場所：岡山大学創立50周年記念館

日本農芸化学会中四国支部

岡山大学西南キャンパス地図



岡山大学創立 50 周年記念館平面図



日本農芸化学会創立80周年記念 日本農芸化学会中四国支部第11回講演会プログラム

【講演会】

13:05～14:25 特別講演『21世紀バイオサイエンス研究の展望』

開会の辞 稲垣賢二（岡山大院・自然科学）

「農芸化学分野におけるアミノ酸研究－これまでとこれから－」

熊谷英彦（農芸化学会会長，京大名誉教授）

座長：稲垣賢二（岡山大院・自然科学）

「間違いはなぜ起こるか－天然物有機化学の立場から－」

森 謙治（農芸化学会前会長，東大名誉教授）

座長：馬場直道（岡山大・農）

14:25～14:45 休憩（企業特別展示会の展示をご覧下さい）

14:45～15:05 2004年度農芸化学奨励賞受賞講演

「微生物のポリリン酸研究の新展開」

黒田章夫（広島大院・先端物質科学）

座長：宮川都吉（広島大院・先端物質科学）

15:10～17:20 一般講演（次ページに詳細プログラム）

【中四国支部維持会員企業特別展示会 & 企業・就職説明会】

11:00～16:30 展示会

10:00～13:00 企業・就職説明会

- | | | | | | |
|-----|-------|--------------|------|-------|-------------|
| (1) | 10:00 | 岡山県酒造組合連合会 | (7) | 11:35 | 備前化成(株) |
| (2) | 10:15 | (株)カワニシ | (8) | 11:50 | 池田糖化工業(株) |
| (3) | 10:30 | (株)ビーシーオー | (9) | 12:05 | 丸善製薬(株) |
| (4) | 10:45 | オハヨー乳業(株) | (10) | 12:20 | (株)アプロサイエンス |
| (5) | 11:00 | カバヤ食品(株) | (11) | 12:35 | 大塚化学(株) |
| (6) | 11:20 | (株)林原生物化学研究所 | | | |

【懇親会】

18:00～20:00 於 リーセントカルチャーホテル

一般講演終了後にホテル行きの無料シャトルバスがでますのでご利用下さい。

一般講演プログラム
A会場（多目的ホール）

座長 中島伸佳（岡山県大・共同研究機構）、杉本 学（岡山大・資生研）

- | | | |
|-----|-------|--|
| A-1 | 15:10 | アフィニティタグを用いた酵素のポリスチレンラテックスへの固定化と高機能化
○徳永安秀, 今石大輔, 今中洋行, 崎山高明, 今村維克, 中西一弘（岡山大・工） |
| A-2 | 15:20 | 土壌細菌由来耐熱性モノグリセリドリパーゼの特性解析と遺伝子の同定
○森 真基, 今中洋行, 崎山高明, 今村維克, 中西一弘（岡山大・工） |
| A-3 | 15:30 | 根粒菌, <i>Mesorhizobium loti</i> , 由来の4-ピリドキソラクトナーゼ
○舟見淳一, 吉金 優, 大西浩平*, 八木年晴（高知大・農, *同・遺伝子実） |
| A-4 | 15:40 | 根粒菌, <i>Mesorhizobium loti</i> , 由来のダイマー型ピリドキサル4-デヒドロゲナーゼ
○田所 実, 横地奈菜, 吉金 優, 大西浩平*, 八木年晴（高知大・農, *同・遺伝子実） |
| A-5 | 15:50 | Riプラスミド由来オパイン合成酵素遺伝子の発現特性の比較解析
○秦 一智, 猪口雅彦, 近藤弘清（岡山理大・理） |
| A-6 | 16:00 | 塩ストレス抵抗性オオムギで発現するACC酸化酵素遺伝子のクローニング
○藤谷典志, 岡田吉弘***, 伊藤一敏*, 武田和義, 今野晴義, 杉本 学（岡山大・資生研, *サッポロビール(株)・バイオリソース開発研, **現 九州沖縄農研） |
| | 16:10 | 休憩 |

座長 山崎良樹（岡山大・資生研）、今村維克（岡山大・工）

- | | | |
|------|-------|---|
| A-7 | 16:20 | 銅イオン存在下で生育するホンモンジゴケの澱粉分解酵素に関する研究
○山崎良樹, 今野晴義（岡山大・資生研） |
| A-8 | 16:30 | Gene expression and enzyme activity of apyrase during early stages of germination of peas (<i>Pisum sativum</i> L. var. Alaska) in the dark.
阿部俊之助, Motohito Yoneda, Mahmoud F.M. Moustafa, Eric Davies*（愛媛大・農, *Dep. Botany, Univ. North Carolina） |
| A-9 | 16:40 | <i>Clostridium</i> 属の腸内細菌由来食物繊維分解酵素を用いるオリゴ糖の連続生産
○中島伸佳, 松浦 康*, 辻 英明**（岡山県大・共同研究機構, *中国学園大・現代生活, **岡山県大・保健福祉） |
| A-10 | 16:50 | トルエン耐性細菌によるトルエンからのクレゾール生産
○Irvan Faizal, 黒田章夫, 滝口 昇, 大竹久夫*, 加藤純一（広島大院・先端物質, *阪大院・工） |
| A-11 | 17:00 | 組換え大腸菌を用いたケトンの不斉還元
○依馬 正, 矢ヶ崎秀雄, 沖田修康, 是永敏伸, 酒井貴志（岡山・工） |
| A-12 | 17:10 | 克蘭ベリージュース飲用後のヒト尿中代謝物の分析（第1報）
○大西令子, 伊東秀之, 笠島直樹*, 金田 幸*, 狩山玲子**, 公文裕巳**, 吉田隆志（岡山大・薬, *就実大・薬, **岡山大・医） |

B会場（小会議室&大会議室）

座長 木本眞順美（岡山県大・保健福祉）、川口 洋（くらしき作陽大・食文化）

- B-1 15:10 酵母*Pichia pastoris*で発現させた鶏オボアルブミンの構造特性
○伊藤一成，瀬利亜紀子，松富直利（山口大・農）
- B-2 15:20 酵母発現系による鶏卵白アルブミンのN型糖鎖欠損変異体の発現とその分子特性
伊藤一成，○瀬利亜紀子，平原伸悟，松富直利（山口大・農）
- B-3 15:30 ホスビチンの卵白タンパク質に対する凝集抑制機構
○吉賀陽子，松富直利（山口大・農）
- B-4 15:40 キトサンの油吸着能及び血清中性脂肪に与える影響について
○渡邊洋子，澤内裕美，岸田太郎，海老原清（愛媛大・農・栄養科学）
- B-5 15:50 卵巣摘出ラットにおける各種植物性タンパク質の脂質代謝の影響
○三輪智弘，岸田太郎，海老原清（愛媛大・農・生物資源）
- B-6 16:00 ダイオキシシン投与ラット精巣における発現遺伝子の解析
○山野好章，吉田恵美，大山建司*，太田正法**，利谷明繁***，島田順一***，森嶋伊佐夫
（鳥取大・農，*山梨大・医・臨床看護，**山梨大・医・小児，***ベンタナ・ジャパン(株)）
- 16:10 休憩

座長 金原和秀（岡山大・資生研）、谷 明生（岡山大・資生研）

- B-7 16:20 あくぬき処理トチノキ種子のサポニン成分の化学構造と血糖値上昇抑制作用
○木村英人*，渡邊あい**，地阪光生***，山本達之***，木村靖夫****，勝部拓矢*****，横田一成*（*鳥取大院・連合農，**寿製菓，***島根大・生物資源，****鳥取大・農，*****島根県産業技術セ）
- B-8 16:30 *Pseudomonas putida* OUS82の多環性芳香族化合物分解系オペロンの転写制御因子の解析
戸高哲也，守本明弘*，○滝澤 昇*（岡山理大院・工・応化，*岡山理大・工・応化）
- B-9 16:40 促進酸化処理法による揮発性有機ハロゲン化合物の分解
猶原 順，○前川 豊，久保千晶，高野勝也*，石戸弘晃*（岡山理大・技科研，*同和工営(株)環境事業部）
- B-10 16:50 Degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates by *Ensifer* sp. AS08
Xin LIU, 谷 明生, 河合富佐子（岡山大・資生研）
- B-11 17:00 微生物細胞集団の活性モニタリング手法の開発
下村有美，羽場洋介，志村 稔*，河合富佐子**，○金原和秀**（東工大院・人間環境，*鉄道総研，**岡山大・資生研）
- B-12 17:10 好酸性鉄酸化細菌の外膜タンパク質FopAの機能解析
○石川幸子，若井 暁*，金尾忠芳，杉尾 剛*，上村一雄（岡山大・農，*岡山大院・自然科学）

1月22日支部例会タイムスケジュール

		50周年記念館		農学部	
		多目的ホール	会議室	交流サロン	中会議室 第4講義室
10:00	10:15		企業説明会1		
10:15	10:30		企業説明会2		
10:30	10:45		企業説明会3		
10:45	11:00		企業説明会4		
11:00	11:15		企業説明会5	展示会	役員会
11:15	11:20		休憩	↓	↓
11:20	11:35		企業説明会6	↓	↓
11:35	11:50		企業説明会7	↓	↓
11:50	12:05		企業説明会8	↓	(12時まで)
12:05	12:20		企業説明会9	↓	
12:20	12:35		企業説明会10	↓	評議員会
12:35	12:50		企業説明会11	↓	↓ (12時から)
				↓	↓ (12時50分まで)
13:00	13:40	特別講演1		↓	
13:40	14:20	特別講演2		↓	
		休憩		↓	
14:40	15:00	受賞講演		↓	
		休憩		↓	
15:10	15:20	一般講演A1	一般講演B1	↓	
15:20	15:30	一般講演A2	一般講演B2	↓	
15:30	15:40	一般講演A3	一般講演B3	↓	
15:40	15:50	一般講演A4	一般講演B4	↓	
15:50	16:00	一般講演A5	一般講演B5	↓	
16:00	16:10	一般講演A6	一般講演B6	↓	
16:10	16:20	休憩	休憩	↓	
16:20	16:30	一般講演A7	一般講演B7	展示会	
16:30	16:40	一般講演A8	一般講演B8		
16:40	16:50	一般講演A9	一般講演B9		
16:50	17:00	一般講演A10	一般講演B10		
17:00	17:10	一般講演A11	一般講演B11		
17:10	17:20	一般講演A12	一般講演B12		

懇親会場へシャトルバス運行

18:00	20:00	懇親会 (リーセントカルチャーホテル	3 F	ホワイトインシグニア)
20:00	22:00	2次会 (リーセントカルチャーホテル	6 F	メルカンティー)

維持会員企業特別展示会 参加予定企業リスト

天野エンザイム(株)
(株)アプロサイエンス
アルファー食品(株)
池田糖化工業(株)
大熊(株)
大塚化学(株)
岡山県酒造組合連合会
オハヨー乳業(株)
カバヤ食品(株)
(株)カワニシ
協和発酵工業(株)防府工場
キリンビール(株)岡山工場
久保田商事(株)広島出張所
サッポロワイン(株)岡山ワイナリー
(株)林原生物化学研究所
(株)ビー・シー・オー
備前化成(株)
広島和光(株)岡山営業所
マナック(株)
マルキン忠勇(株)
丸善製薬(株)
(株)山田養蜂場
(有)山本理化
両備バス(株)

計24社 五十音順 (2005年1月12日現在)

特別講演・受賞講演

講演要旨

特別講演

農芸化学分野におけるアミノ酸研究—これまでとこれから—

日本農芸化学会会長，石川県農業短期大学 熊谷 英彦

日本農芸化学会は、昨年7月1日をもって創立80周年を迎えました。1924年に創設されたわけですが、日本の大学に農芸化学科ができましたのは、その約30年前の1893年です。当初、農芸化学は農学の中の基礎的領域を担う学問と位置づけられていたようです。『パスツールの、「学問とその応用あるのみ」という有名な言葉が広く伝えられていますが、概してパスツールに限らず、このように基礎と応用をはっきり区別するのが、当時の世界一般の考え方だった訳であります。』しかしそれ以来、110年間にわたって『農芸化学では、専ら生命現象の秩序と制御機構を解析する基礎的学術研究を進めるとともに、生物がもつ機能を有効に利用し、人類の福祉に役立てる応用科学技術の開発に多大の努力と貢献を果たして参りました。』つまり農芸化学は基礎だけでなく同時に応用をも視野においた研究の進め方をしてきた、それを大きな特徴としてきた、といえると思います。我が国における、アミノ酸に関する研究と工業生産は、そのひとつの典型的な例と言えます。

農芸化学会初代会長の鈴木梅太郎先生は、ドイツでの留学を終えて帰国後、ビタミンだけではなく、タンパク質やアミノ酸に関し広く栄養学の立場から研究をされ、スレオニンや、シトルリン等のアミノ酸の発見をされました。1908年、池田菊苗先生は昆布のうまみ成分がグルタミン酸ナトリウムであることを発見し、その生産方法を特許化し、工業生産の道を開かれました。時が経ち、第二次世界大戦後の食糧難の時代に、タンパク質（アミノ酸）の重要性を認識した企業、協和発酵において、グルタミン酸の微生物による生産が発明され、1954年に実用化されました。その後のアミノ酸工業の発展は目覚ましいものがあり、タンパク質を構成するアミノ酸はもちろん、他の生理活性を有するアミノ酸が多く微生物で生産されています。現在のグルタミン酸ナトリウムの世界での生産高は、年100万トンを超え、東南アジアを初め世界各地の日本企業の工場で生産されています。これらの用途は広がる一方であり、食料、飼料、医薬、化粧品、化成品等多様であります。企業で主として行われる生産のための研究は、なかなかおもてに現れにくいものがありますが、遺伝子組み換え技術、ゲノム解析等を基にした、新しい成果も発表されつつあります。

農芸化学分野におけるアミノ酸研究の発展と研究成果、実用面での成果などを例に上げながら農芸化学とは何ぞやという問題を考えるとともに、農芸化学のこれからを若い研究者の方々に少しでも示唆できればと思います。

(『内は、「農芸化学の100年」より引用)

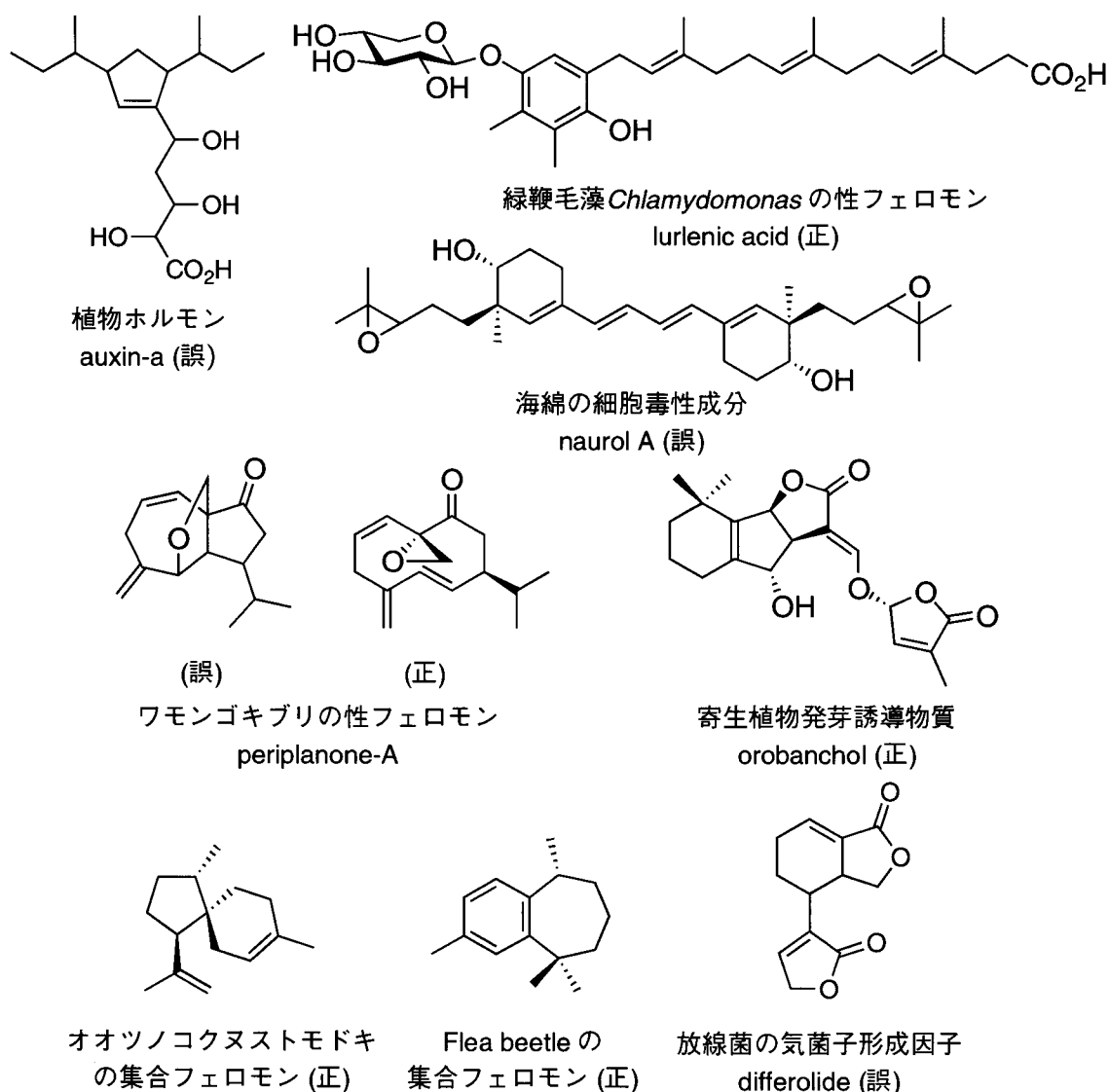
特別講演

間違いはなぜ起こるかー天然物有機化学の立場からー

日本農芸化学会前会長，東京大学名誉教授 森 謙治

日本農芸化学会創立の頃は，天然有機化合物の化学構造が盛んに研究され始めた時であった。第二次世界大戦後の機器分析法の発展は，研究を大いに加速した。多数の輝かしい構造研究の陰には，かなりの数の間違った構造の提案があった。間違いはなぜ起こったのか。今後の間違いを避けるためには，それを明らかにしなくてはならない。

本講演では，間違いの原因を(1)実験データの捏造(2)単離・分析法の不備(3)生物検定法の不備の三つに分けて論ずる。また演者らの合成研究で，どのようにして間違いが明らかになったか，そして時には正しい構造に到達できたかを論ずる。とりあげる化合物のいくつかを，下に示す。



受賞講演

微生物のポリリン酸研究の新展開

広島大院・先端物質科学, 科学技術振興機構 黒田 章夫

ポリリン酸は数百のリン酸がアデノシン三リン酸（ATP）と同様の高エネルギーリン酸結合によって結合したリン酸バイオポリマーである。この物質は微生物から高等生物まで広く存在する。しかし10年ほど前までポリリン酸の研究はほとんど行われていなかった。生物に普遍的に存在する高分子でありながら、これほどまで未踏の研究対象物質は極めてまれであり、オリジナリティーを発揮するためには絶好の物質であろうと考えた。演者らはポリリン酸のみをリン酸化の基質とするグルコキナーゼを発見し、ポリリン酸が高度に蓄積された生命エネルギー物質であることを明らかにした。またスタンフォード大学のArthur Kornberg博士と共同で、大腸菌内でのポリリン酸蓄積機構やその生命機能を分子レベルで初めて明らかにした。ここではこれら基礎的な研究内容の他にもポリリン酸の応用展開研究についても簡単にお話したい。

①貴重リン資源リサイクル技術の開発 我々はポリリン酸蓄積機構を解明し、変異操作によりリン蓄積微生物を開発した。驚くべきことに、現在改良を進めている微生物の菌体内ポリリン酸量は全菌体重量の約30%に及ぶことがわかった。この微生物のリン含量はリン鉱石のものにやや劣るものの、もはやバイオリン鉱石（現大阪大学の大竹久夫先生が命名）と呼んでも良い。バイオリン鉱石生産技術を確立し、富栄養化防止の環境技術開発、貴重リン資源のリサイクル技術開発を行うことを考えている。この研究は科学技術振興機構 PREST, SORSTにより研究中である。

②超高感度ATP検出のバイオセンサーの開発 我々はポリリン酸を利用してATP増幅反応を初めて開発した。原理は最初にポリリン酸（polyP）とアデノシン一リン酸（AMP）とアデニル酸キナーゼ（ADK）、ポリリン酸キナーゼ（PPK）を混合しておく。その状態ではATPができないが、反応系に少量のATPを加えると、即座にアデニル酸キナーゼによって、一分子のATPと一分子のAMPから二分子のアデノシン二リン酸（ADP）が生じる。できたADPはポリリン酸とポリリン酸キナーゼによって、二分子のATPに変換される。この反応が繰り返されて、多量のATPが数分のうちに作られる。増幅したATPをルシフェラーゼ発光反応にさらすことにより、微生物一匹由来のATPを検出することに成功している。現在この技術を利用してバイオ関連研究における高感度な細菌検出技術を確立したいと考えている。本研究開発は現在広島県知的クラスターに採択され、研究開発中である。

③ポリリン酸を利用する人工酵素の研究 ポリリン酸は、リン酸が高エネルギーリン酸結合によって縮合したリン酸ポリマーであり、実際にATPなどのエネルギーを生み出す物質である。この物質は、リン酸を加熱すると生じる。また原始生命が生まれたとされる火山の熱水に検出される。これらのことから、最も原始的な生命エネルギーの形ではないかとも言われている。我々はこのポリリン酸をATPの代わりに直接エネルギーとして利用するグルコキナーゼを発見した。この酵素はATP型のグルコキナーゼの祖先と考えられており、生命エネルギーの進化の謎が隠されていると考えている。現在のATP型酵素をポリリン酸型に変えた人工酵素の開発を行っている。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 アフィニティータグを用いた酵素のポリスチレンラテックスへの固定化と高性能化

○徳永安秀, 今石大輔, 今中洋行, 崎山高明, 中西一弘
(岡山大・工生物機能工)

【目的】機能性たんぱく質の付着現象は、酵素の固定化、バイオセンサーやプロテインチップの作成など生物・生体工学の種々の応用分野でみられる普遍的な現象である¹⁾が、付着の相互作用や配向を制御することにより、効率や性能を改善することが可能である。本研究では、固体表面に対して高い親和性を示すペプチド配列をアフィニティータグとして酵素の末端に付加する方法²⁾に着目して、最適なタグのスクリーニングを行うとともに、タグを付加することによる酵素活性の改善に及ぼす影響を検討した。

【方法および結果】酵素としては、Glutathione-S-Transferase(GST)を、また固体表面としては、ポリスチレンラテックス粒子(PSL)を用いた。大腸菌の鞭毛部分・チオレドキシン中のペプチド部位(12アミノ酸残基)の組成をランダムに変化させることが可能な、ランダムペプチドライブラリーシステム(Invitrogen社製)を用いて、PSLに親和性を有するペプチドをスクリーニングした結果、25種類のペプチド配列を見出した。これらのペプチドをタグとしてGSTのC-末端に付加した変異酵素を調製したところ、その比活性は、野生型の酵素よりも低下したが、相対残存活性は著しく上昇した。

1) Nakanishi, K., et al., J. Biosci. Bioeng., Vol. 91, 233-244 (2001)

2) Sakiyama, T., et al., J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, 28, 207-214 (2004)

A-2 土壌細菌由来耐熱性モノグリセリドリパーゼの特性解析と遺伝子の同定

○森 真基, 今中洋行, 崎山高明, 今村維克, 中西一弘
(岡山大・工生物機能工)

【目的】リパーゼは各種多様な基質特異性や安定性を有していることから、基礎から応用に至るまで幅広く研究がなされている酵素の一つである。一方、食品、化粧品材料として有用な乳化剤であるモノグリセリド(MG)を酵素を用いて合成する場合、モノグリセリドリパーゼ(MGL)が用いられるが、その報告例は少ない。我々は既に土壌より単離した耐熱性MGLの特性解析について報告しているが¹⁾、本研究ではMGLをコードする遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】精製した酵素の諸性質を調べた結果、本酵素がモノグリセリド合成反応を触媒できることがわかった。解析したN末端アミノ酸配列および類縁種由来のリパーゼ遺伝子配列を参照してDNAプローブを設計し、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、全MGL遺伝子配列を含むDNA断片の取得に成功し、一次構造の決定に至った。耐熱性MGLをコードする遺伝子の全長は1830 bp (610 aa) からなり、アミノ酸配列解析の結果、N末端側から順にシグナルペプチド、リパーゼドメイン、オートトランスポータードメインの存在が示唆された。さらに16S rRNA遺伝子配列比較による系統解析を行ったところ、本菌は*Rhodanobacter*属の近縁種であることがわかった。

1) T. Sakiyama et al., J. Biosci. Bioeng., 191, 27 (2001)

A-3 根粒菌, *Mesorhizobium loti* 由来の4-ピリドキソラクトナーゼ

舟見淳一, 吉金 優, 大西浩平*, 八木年晴
(高知大・農・生物資源, *同・遺伝子実)

【目的】 Snell等の研究で明らかにされたビタミンB₆ (ピリドキシン, およびピリドキサミン) の分解代謝経路 I を根粒菌*Mesorhizobium loti*が有していることを本研究室で見いだした。本経路の3番目の反応を触媒する酵素4-ピリドキソラクトナーゼの一次構造の解明を目的とし, 本酵素をクローン化し, 組換え酵素の性質を明らかにした。

【結果】 ピリドキシン資化菌より精製した酵素のN末端配列と相同性の高い配列をコードする遺伝子を根粒菌*Mesorhizobium loti*中に見出した。そこで本遺伝子をクローン化し大腸菌で発現系を構築した。発現したタンパク質は4-ピリドキソラクトナーゼ活性を示し, 本遺伝子が4-ピリドキソラクトナーゼ遺伝子であることが分った。組換え酵素タンパク質は2段階のカラムクロマトグラフィーにより分子量58,500±500のダイマー酵素としてSDS-PAGE的に均一に精製できた。さらに本酵素はpH 7.5 (KPB), 60-70°Cで最大活性を示し, その反応は可逆性であり, 4-ピリドキソラクトン, 4-ピリドキシン酸に対するV_{max}, K_m値をそれぞれ算出した。本酵素の一次配列は相同検索により, クオラムセンシング機構に由来するアシルホモセリンラクトナーゼ群の配列と相同性を持ち, 亜鉛メタロハイドレーズの特徴を示す保存配列を有することが分った。

A-4 根粒菌*Mesorhizobium loti*由来のダイマー型ピリドキサール4-デヒドロゲナーゼ

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

ピリドキシン資化菌*Microbacterium luteolum*由来のピリドキサール4-デヒドロゲナーゼ (PLDH) はNAD⁺を補酵素とし, ピリドキサール (PL) を4-ピリドキソラクトン (4-PAL) へと酸化する反応を触媒する。このPLDHをコードする遺伝子配列を相同検索した結果, 根粒菌*Mesorhizobium loti*が41%の相同性を示す遺伝子を有することを見出した。この遺伝子が, PLDHをコードしているのかを調べるために, 本遺伝子のクローニングとその発現酵素の性質を調べた。本遺伝子をpET21aベクターに連結後, *E. coli* BL21 (DE3) に導入し, 本酵素の発現系を構築した。本組み換え体から得られた粗抽出液から本遺伝子によってコードされるタンパク質を精製したところ, このタンパク質はPLDH活性を示し, その比活性は15.4U/mgであった。また本酵素はL-フコース, D-アラビノースも良好な基質とした。本酵素はアルドーケトレダクターゼファミリーに属するダイマー型PLDHであると考えられる。*M. loti*はL-フコースを基質とするD-threo-アルドースレダクターゼを有していることを我々はすでに報告しているが, その酵素はPLに対する反応性は非常に低い酵素であった。今回, *M. loti*がピリドキシン資化菌と同じく, PLを基質にできるD-threo-アルドースレダクターゼも有することが分かった。

A-5 Riプラスミド由来オパイン合成酵素遺伝子の発現特性の比較解析

○秦 一智, 猪口雅彦, 近藤弘清
(岡山理大・理・生化)

【目的】 土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* は宿主双子葉植物に感染し、毛状根と呼ばれる腫瘍を誘発する。腫瘍組織中にはオパインと総称される非タンパク態アミノ酸が合成され、病原菌株により炭素・窒素源として資化される。*A. rhizogenes* は、この腫瘍形成とオパイン合成の遺伝情報がコードされているDNA断片 (T-DNA) を宿主ゲノムに組み込み形質転換する。このため、この現象は「遺伝的植民地化」と呼ばれる。オパインには多様な分子種が知られており、その種類で菌株が分類されるが、腫瘍で造られる共通した特徴がある。そこでオパイン類の生合成の制御について興味をもたれた。本研究ではオパイン類のうち立体構造異性体関係にある mikimopine と cucumopine について、その生合成の組織特異性と、オパイン合成酵素遺伝子の発現特性について調査をおこなった。

【方法】 *A. rhizogenes* 1724株 (mikimopine型) 及び2659株 (cucumopine型) によりタバコに誘導した毛状根から再形成植物体を作成し、葉、茎、根の器官毎のオパイン含有量を濾紙電気泳動法で比較した。一方、各オパイン合成酵素遺伝子のプロモーター断片にGUSレポーター遺伝子をつなげた融合遺伝子をタバコに導入し、GUS活性値測定と組織化学的染色よりプロモーターの発現特性を調査した。

【結果】 2種類のオパインとも腫瘍 (毛状根) と相同な器官である根に多く蓄積しており、合成酵素遺伝子プロモーターも同様に根で高い発現を示した。

A-6 塩ストレス抵抗性オオムギで発現するACC酸化酵素遺伝子のクローニング

○藤谷典志, 岡田吉弘^{*,**}, 伊藤一敏^{*}, 武田和義, 今野晴義, 杉本 学
(岡大資生研, ^{*}サッポロビール(株)バイオリソース開発研, ^{**}現 九州沖縄農研)

植物ホルモンであるエチレンは、種子発芽、形態形成、花芽形成、性分化、果実熟成など植物生育に重要な働きを担っているだけでなく、傷害、病原菌感染などのストレス応答反応に関与している。我々は塩ストレス抵抗性オオムギ根の特異的cDNAライブラリーを構築し、塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現している遺伝子をスクリーニングした結果、1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) をエチレンに変換するACC酸化酵素に相同性を示す遺伝子が高発現していることを明らかにした。本研究では、塩ストレス抵抗性オオムギで高発現するACC酸化酵素の構造と機能を明らかにする目的で、本遺伝子cDNAの全塩基配列を決定して一次構造を推定し、大腸菌中での発現をおこなった。

0.1M NaClに暴露した塩ストレス抵抗性オオムギOUK305根から構築したcDNAライブラリーを用いたRACE法を行い、アミノ酸残基数311をコードするORFを持つ全長1219bpのcDNA配列を決定した。本アミノ酸配列は植物由来ACC酸化酵素と33-49%の相同性を示し、活性中心であるヒスチジン残基が保存されていた。本ACC酸化酵素遺伝子のORF領域をpETベクターに導入し大腸菌で発現させ、分子量約36kDaの精製酵素を得た。本酵素は約2,500 nmolC₂H₂/min/mgのACC酸化酵素活性を示した。

A-7 銅イオン存在下で生育するホンモンジゴケの澱粉分解酵素に関する研究

○山崎良樹, 今野晴義
(岡山大・資生研)

【目的】ホンモンジゴケは銅に富んだ地域に生育する。その特異なホンモンジゴケの澱粉代謝系を明らかにする目的で、炭素源を含まない銅含有ムラシゲ-スクーグ基本塩固形培地にてホンモンジゴケの原系体を培養し、細胞内の澱粉分解酵素について検討した。

【方法】原系体は0.2mM CuSO₄含有ムラシゲ-スクーグ基本塩固形培地で、光照射下、22°C、2ヶ月間培養した。得られた細胞を100mMリン酸緩衝液(pH7)中でホモジナイズし、緩衝液可溶性画分(BS)と残渣に分離した。残渣はさらに3M LiClで処理し、塩可溶性画分(LS)を得た。

【結果】BSとLSは可溶性澱粉、アミロペクチン、アミロース、グリコーゲンをよく分解した。BSとLSをホスホリラーゼ活性測定条件下で反応し、アミロペクチンからの反応生成物をHPLCで測定すると、グルコースのみが同定され、グルコース-1-リン酸は検出されなかった。BSとLSの澱粉分解活性はβ-アミラーゼ阻害剤であるPCMBやα-アミラーゼインヒビターで阻害されず、またブタ膵臓や発芽黍種子由来のα-アミラーゼ活性に顕著な阻害を示す銅イオンでも阻害されなかった。以上の結果からホンモンジゴケの澱粉は加水分解経路で分解され、その経路は一般的に考えられているα-とβ-アミラーゼを中心とする系ではなく、α-グルコシダーゼが主要分解酵素となる代謝系で行なわれていると考えられた。そこで、α-グルコシダーゼを精製しさらに検討を進めている。

A-8 Gene expression and enzyme activity of apyrase during early stages of germination of peas (*Pisum sativum* L. var. Alaska) in the dark.

Shunnosuke Abe, ○Motohito Yoneda, Mahmoud F.M. Moustafa, *Eric Davies
(Ehime University, *Dept. Botany, NCSU)

We studied the expression of the 49 kDa apyrase gene (*apy1*) and the appearance of apyrase proteins (EC 3.6.1.5) during imbibition, germination and initial growth of pea (*Pisum sativum* L. var. Alaska) in the dark, using RT-PCR, 2D-PAGE, and Western blotting. The 49 kDa apyrase was absent in the 10-hour imbibed embryos, but began to appear after 16 hours germination and increased with germination time. By 62 hours, there were five isotypes present at pI 5.8, 6.0, 6.3, 6.6 and 6.8, with those at pI 6.0, 6.3, and 6.6 being most abundant and the one at pI 6.3 predominating, while the most acidic and basic isotypes were only present in significant amounts in 62-hour germinated seedlings. Stems contained all five isotypes and had more pI 6.0, 6.3 and 6.6 isotype than the plumules, while the roots contained very low amounts of all isotypes. Partial amino acid sequencing showed that all isotypes were identical with *apy1*. Apyrase activity was absent in imbibed embryos, but increased sharply during germination and reached a maximum after 62 hours. RT-PCR of RNA isolated at various stages of germination showed that the *apy1* transcript was at very low levels initially but began to rise by 35 hours, implying that expression of *apy1* gene was controlled primarily at the level of transcription.

A-9 *Clostridium*属の腸内細菌由来食物繊維分解酵素を用いるオリゴ糖の連続生産

○中島伸佳, 松浦 康*, 辻 英明**

(岡山県大・共同研究機構, *中国学園大・現代生活学部, **岡山県大・保健福祉学部)

【目的】 *Clostridium*属のヒト嫌気性腸内細菌は腸管内でヒトが摂取した食物繊維を分解し、その構成糖を原料に有機酸発酵を行い、エネルギーを産生して共生的に生息している。すなわち、生成した有機酸の一部はヒトのエネルギー源として利用されている。本研究ではオリゴ糖の生物的生産を主目的に、本菌を固定化した「菌体リアクター」を構築し、食物繊維からオリゴ糖を連続的に生産する方法を開発した。

【方法と結果】 誘導型酵素である難消化性多糖類分解酵素（マンナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ラミナリナーゼなど）を菌体外に分泌する本菌を「発泡セルロース」に固定化した「固定化菌体リアクター」を構築し、多糖類を含む培養液を連続的にリアクター内に供給することにより各種のオリゴ糖を培地中に生産させた。その結果、500mlの培養液の計4回の供給による回分反応(各10h)において、9gのペクチン酸から約4gの4,5-不飽和ジガラクトロン酸を、また、コンニャクグルコマンナンやラミナリンからも対応するオリゴ糖を30～40%の変換率で培地中に蓄積させることができた。

A-10 トルエン耐性細菌によるトルエンからのクレゾール生産

○Irvan Faizal, 黒田章夫, 滝口 昇, 大竹久夫*, 加藤純一

(広島大院先端物質・分子生命, *阪大院工・応生工)

【目的】 発酵生産を中心としたバイオプロダクション技術は、親水性の有用物質の生産で大きな成功を収めてきた。もし、この技術を疎水性物質の生産にも適用できるならば、さらなる発展が望める。そこで、我々は未だバイオプロダクション技術が確立していない疎水性物質の酸化反応プロセスの基盤技術の開発を目指し研究を進めている。本発表では有機溶媒耐性のトルエン資化細菌を用いた芳香族炭化水素モノオキシゲネーション系の開発について報告する。

【方法・結果】 活性汚泥より分離した有機溶媒耐性トルエン資化細菌 *Pseudomonas putida* T-67株を研究対象とした。T-67株はトルエンジオキシゲナーゼ経路を有する。トルエンジオキシゲナーゼ経路の最初の間体トルエンcis-グリコール (TG) は化学的に不安定であり容易に脱水しクレゾールに変換する。そこでTGをさらに代謝するTGデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊し、TGで代謝が停まる変異株を作成した。この変異株は炭素源としてオクタノールを重層した二相系でトルエンからo-クレゾールを蓄積した。興味あることにm-およびp-クレゾールは検出されなかった。親株は同じ条件でo-クレゾールを蓄積しなかった。現在、o-クレゾールの蓄積に及ぼす培養条件の影響について検討している。

A-11 組換え大腸菌を用いたケトンの不斉還元

○依馬 正, 矢ヶ崎秀雄, 沖田修康, 是永敏伸, 酒井貴志
(岡山大・工・物質応用化)

高い立体選択性と幅広い基質特異性を同時に示す酵素が存在する。これまで我々は、不斉合成に有用な汎用生体触媒に注目し、その機構解明と機能開拓を中心に研究を展開してきた。

以前にパン酵母から単離精製されたカルボニル還元酵素SCRは、 α -クロロケトン、 α -アセトキシケトン、 α -及び β -及び γ -ケトエステル、 β -ジケトン等の幅広い基質に対して還元活性を示し、20種類のケトンのうち13種類に対して98% ee以上の光学純度のアルコールを与えた。今回、このSCR遺伝子のクローニングと大量発現系の構築を行い、それを用いて不斉還元反応を行ったので報告する。

補酵素NADPHを再生するために、*Bacillus megaterium*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子を同一プラスミド内にタンデムに組み込み、両遺伝子の共発現系を構築した。基質とグルコースを休止菌体に加えるだけでも還元反応が進行したが、 NADP^+ を基質に対して0.4mol%添加すると反応が速くなった。現時点で16種類のケトンを効率よく高エナンチオ選択的に不斉還元できている。パン酵母から精製されたSCRを用いて得られた結果とほぼ同レベルの光学純度が、組換え大腸菌全細胞を用いた反応で達成された。

A-12 クランベリージュース飲用後のヒト尿中代謝物の分析 (第1報)

○大西令子, 伊東秀之, 笠島直樹*, 金田 幸*, 狩山玲子**, 公文裕巳**, 吉田隆志
(岡山大・薬, *就実大・薬, **岡山大・医)

【目的】多種多様のポリフェノールを多く含むことが知られているクランベリーは、古くから欧米で尿路感染症の民間療法として用いられてきた。本研究ではクランベリー飲用後に排泄される尿中代謝物から尿路感染症の予防、治療に寄与する活性代謝物の探索を目的として、ヒトにおけるクランベリージュース飲用後の尿中ポリフェノール代謝物の分析を行った。

【方法・結果】ボランティア11人に対してクランベリーUR100 (キッコーマン) 200mL飲用後24時間までの尿を採取した。採尿サンプルは酵素 (glucuronidase, sulfatase) による脱抱合化を行い、Bond Elut C18による固相抽出、フィルター後、分析サンプルとした。クランベリー中に含まれるポリフェノール成分に加えて、予想される代謝物も含め35種のポリフェノールを対象にHPLC-ESI-MS-MS法により分析を行った。その結果、Protocatechuic acid, m-Hydroxyphenylacetic acid, p-Coumaric acidやVanillic acidなどの低分子フェノール類に顕著な尿中排泄が認められ、その他フラボノイド類などがほとんどの尿サンプルにおいて検出された。

B-1 酵母*Pichia pastoris*で発現させた鶏オボアルブミンの構造特性

○伊藤一成，瀬利亜紀子，松富直利
(山口大・農，生物機能)

【目的】鶏オボアルブミン（OVA）は卵白中の主要タンパク質であり，優れた食品機能性を持つことから多くの食品加工素材として利用されている。このOVAの構造と機能特性を解明するため，変異を自由にかけることが出来る利点から遺伝子工学的手法により発現させた。

【方法】高発現系システムを持つとして知られるメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*でglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseのプロモーターを使用して発現させ，まずはそのOVAの特性を主に翻訳後修飾の観点から解析した。

【結果】今回の酵母発現系において2成分の発現が確認され，翻訳後修飾としてリン酸化とN末のアセチル化は起こっていなかったが，糖鎖付加は起こっていた。2成分の違いは，モノグリコシル型とジグリコシル型であり，非グリコシル型は存在しなかった。構造は卵白由来のものとはほぼ同じであったのに対し，熱安定性は2成分とも約2.5℃低下していた。

B-2 酵母発現系を用いた鶏卵白アルブミンのN型糖鎖欠損変異体の発現とその分子特性

伊藤一成，○瀬利亜紀子，松富直利
(山口大・農・生物機能)

【目的】鶏卵白アルブミン（OVA）は二箇所のN型糖鎖付加部位（N292，N311）を持つが，N292部位のみの糖鎖付加型として分泌される。我々は糖鎖付加と蛋白質フォールディングおよび品質管理との関係を調べることを目的として，*Pichia*発現系を用いてOVAの発現，分泌およびその特性を調べた。

【方法，結果】野生型，N292Q型，およびN311Q型を構築し，*Pichia*発現ベクター（pGAPZαA）に挿入後，*Pichia* X-33株へ形質導入し，発現分泌を試みた。野生型では2つのOVA成分（一糖鎖付加型と二糖鎖付加型）が分泌され，それらはいずれもリン酸化やN末端Glyへのアセチル化は検出されなかった。N292Q型は1つのOVA成分が分泌され，その分泌量は野生型と比較して減少しており，Man₁₀GlcNAc₂の糖鎖が付加していた。N311Q型では2つのOVA成分が確認され，1つは野生型の一糖鎖付加型と同等の成分（Man₉GlcNAc₂）であった。もう1つはPSQにより，N末端に4残基のアミノ酸が付加していることが確認され，Man₁₄GlcNAc₂の糖鎖が付加していた。

B-3 ホスピチンの卵白タンパク質に対する凝集抑制機構

○吉賀陽子, 松富直利
(山口大・農・生物機能)

【目的】ホスピチンは卵黄に含まれる高度にリン酸化された糖タンパク質であり、217残基のうち約60%がホスホセリンである。また、熱に対して非常に安定である。本研究室において、少量のホスピチン添加が卵白加熱ゲルを改質し、透明化することを発見したので、この改質機構を明らかにするため、ホスピチンの卵白タンパク質溶液に対する加熱凝集抑制について検討した。

【方法】加熱ゲルは、12%の卵白溶液にホスピチンを添加し、80℃、30分の加熱にて調製し、そのゲル特性（透明度、ゲル強度、保水性）を卵白ゲルと比較した。各卵白タンパク質溶液（オボトランスフェリン、オボアルブミン-リゾチーム）とホスピチンとの加熱相互作用は、濁度（500nmの吸光）、電気泳動、HPLC、CDスペクトルによって精査した。

【結果】卵白ゲルは、少量のホスピチン添加によって透明になったが、過剰に添加すると逆に白濁した。また、ゲル強度と保水性もホスピチン添加によって増加した。さらに、ホスピチンは各卵白タンパク質溶液の熱凝集を抑制することがわかった。この抑制能は塩や脱リン酸化によって低下したことから、ホスホセリン残基が凝集抑制に関与することが示唆された。また、ホスピチンのオボトランスフェリンに対する凝集抑制は、オボトランスフェリンの熱安定化に起因すると考えられた。

B-4 キトサンの油吸着能及び血清中性脂肪に与える影響について

○渡邊洋子, 澤内裕美, 岸田太郎, 海老原清
(愛媛大・農・栄養科学)

【目的】肥満が生活習慣病に及ぼす影響は大きく、食の欧米化による高脂肪・低繊維の食傾向は肥満の一要因である。脂肪の腸管吸収に影響を及ぼすキトサンには、肥満の増加を予防する効果が期待できる。今回はキトサンと血清中性脂肪との関連について注目し、実験を行った。

【方法】〔実験1：人工消化における油吸着実験〕実験には脱アセチル化度及び粘度の異なる15種類のキトサンを用いた。胃液モデル溶液（0.16N塩酸）にキトサンを混濁後、コーン油を加え再度混濁した。小腸上部消化液モデル溶液（10%水酸化ナトリウム）で中和してからろ過して、残渣の油重量をキトサンによる油吸着量とした。〔実験2：コーン油摂取後の血清TG濃度応答試験〕5週齢雄Wistar/STラットを1週間予備飼育後、3群（n=8）に分けた。24時間絶食した後、それぞれコントロール飼料（C）、15%コーン油飼料（CO）、15%コーン油＋キトサン5%飼料（CH）を再給餌した後、経時的に尾静脈採血し、血清TG濃度を測定した。応答曲線から曲線下面積（AUC）を算出し油吸収の指標とした。

【結果】〔実験1〕キトサンは油をよく吸着し、油吸着量はサンプルにより異なったが、脱アセチル化度、粘度と油吸着量の関連性は見られなかった。TS1-chitosanの油吸着量が比較的安定して多かった。各キトサンにおいて中和の際に緩衝能が認められた。〔実験2〕キトサン源としてTS1-chitosanを用いた。コーン油摂取後60分目の血清TG濃度はCO群に比べCH群で有意に低かった。AUCは有意差はないがCH群のほうに低下する傾向が見られた。現在、キトサンの脂質代謝に及ぼす影響と抗肥満作用について検討中である。

B-5 卵巣摘出ラットにおける各種植物性タンパク質の脂質代謝の影響

○三輪智弘, 岸田太郎, 海老原清
(愛媛大・農・生物資源)

【目的】動物性タンパク質であるカゼインは大豆タンパク質と比較して血清コレステロール濃度を低下させることが知られている。しかし、これまでの動物性、植物性タンパク質の実験において卵巣摘出手術（OVX）を施したラットを使用した例は少ない。OVXを施したラットはインタクトと比較して血清コレステロール濃度が上昇しやすく、閉経後女性モデルとして実験に適している。そこで、OVXラットにカゼイン、米、大豆、じゃがいも、小麦のタンパク質を与え、それらの脂質代謝への影響を比較する。

【方法】Wistar系6ヶ月齢雌ラット30匹にOVXを施し、十分に回復飼育をした後、カゼインをタンパク質源とする飼料または米、大豆、じゃがいも、小麦のタンパク質をタンパク質源とする飼料（タンパク質含量20%）を与え、4週間飼育した。飼育終了直前の3日間採糞し、飼育最終日に断頭採血後、肝臓を摘出した。血清、肝臓コレステロール濃度、糞中の胆汁酸量と胆汁酸分画および小腸の胆汁酸量と胆汁酸分画を測定した。

【結果】血清コレステロール濃度はカゼイン群と比較して大豆、じゃがいも群で有意に低下し、肝臓コレステロール濃度は米、大豆、じゃがいも群で有意に低下した。糞中胆汁酸排泄は米群で有意に上昇し、じゃがいも群でさらに有意に上昇していた。小麦群では血清コレステロール濃度、肝臓コレステロール濃度、糞中胆汁酸排泄に有意な違いは見られなかった。

B-6 ダイオキシシン投与ラット精巣における発現遺伝子の解析

○山野好章, 吉田恵美, 大山建司*, 太田正法**, 利谷明繁***, 島田順一***, 森嶋伊佐夫
(鳥取大・農・応生、*山梨大・医・臨床看護、**山梨大・医・小児、***ベンタナ・ジャパン(株))

【目的】近年、ダイオキシシンをはじめ、さまざまな内分泌攪乱物質により哺乳類の生殖系が影響を受けることが報告されている。しかし分子レベルでその影響を検討した研究は少ない。本研究では動物にダイオキシシンを投与することにより精子形成に関連する遺伝子の発現変動を検討し、将来的にはこれらの遺伝子を作用機構未知の生殖系有害物質をスクリーニングするための分析系マーカーとして利用することをめざしている。

【方法】ラット精子形成関連遺伝子はディファレンシャルスクリーニング法により取得し、その遺伝子情報を解析した。また、遺伝子発現部位は*in situ*ハイブリダイゼーションにより決定した。動物へのダイオキシシン投与は生後直後から各週300ng/kgあるいは1,000ng/kgで9回投与した。9週齢で組織を摘出した。組織での遺伝子発現分析はノーザンブロッティングによった。

【結果】精子形成期に精巣で発現する遺伝子の一つ、SRF-2について詳細検討した。本遺伝子は7週齢以降、精巣特異的に発現した。発現箇所は精母細胞と推定された。また、発現タンパク質の推定アミノ酸配列内にRabGAP/TBCドメインが存在したことから、このタンパク質は精子形成過程に重要な役割を持つことが推定された。ダイオキシシン投与ラットでは肝臓で薬物代謝酵素CYP1A1の発現が上昇し、精巣でSRF-2の遺伝子発現が有意に減少した。

B-7 あくぬき処理トチノキ種子のサポニン成分の化学構造と血糖値上昇抑制作用

○木村英人***, 渡邊あい**, 地阪光生****, 山本達之****, 木村靖夫****, 勝部拓矢****, 横田一成****
(*鳥取大・院連農, **寿製菓(株), ***島根大・生資科, ****鳥取大・農, *****島根産技セ)

トチノキ (*Aesculus turbinata*) の種子, いわゆるトチノミは, 日本各地で, 枳餅や枳の実だんごなどの食品原料として使用されている。トチノミは, エスシンと呼ばれるトリテルペノイド配糖体のサポニン類を含有しているため苦味が強い。このため, 食品として利用するためには, アルカリ性の木灰液に浸漬するあく抜きが必要である。最近の研究により, エスシンは, 抗炎症作用の他, アルコールやグルコースの吸収阻害のような複数の生物活性を示すことが報告されているが, 食品として利用されているサポニン成分の化学構造や生物活性は不明である。今回, あく抜き処理の食用トチノミ中に, エスシンに由来する4つの変換物質を見いだした。そして, HPLC分析, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, さらに, エレクトロスプレーイオン化質量分析により, 4種類のエスシン類の化学構造を解析した。その結果, それらは, 4種類のエスシン類のC22位のアセチル基が脱離した物質として同定された。これらの生物活性を評価するため, 生後6週齢の雄のICRマウスに, 4種類の脱アセチル化エスシンを含む画分を投与して, 経口耐糖試験を行ったところ, 無投与群に比べて血糖値上昇の有意な抑制が認められた。

B-8 *Pseudomonas putida* OUS82の多環性芳香族化合物分解系オペロンの転写制御因子の解析

戸高哲也, 守本明弘*, ○滝澤 昇*
(岡山理大院・工・応化, *岡山理大・工・応化)

【目的】ナフタレンとフェナントレンを分解する*Pseudomonas putida* OUS82株の多環性芳香族化合物分解系オペロン (*pah* オペロン) は, *P.aeruginosa* の異化代謝抑制因子であるCrcタンパク質と高い相同性を示すAccタンパク質により負の制御を受けている。*acc* 遺伝子欠損株 (OUSK株) は, コハク酸による異化代謝抑制は解除されるが, グルコースによる異化代謝抑制は解除されない。本研究では, Accタンパク質による*pah* オペロンの負の制御とグルコースによる抑制のメカニズム解析のために, Accタンパク質の精製と, グルコースによる抑制が解除された変異株の作製を行った。

【方法・結果】Accタンパク質を精製するために, His₍₆₎::Acc融合タンパク質を発現させた。このHis₍₆₎::Acc融合タンパク質を, アフィニティー精製した。精製したHis₍₆₎::Acc融合タンパク質を用いたゲルシフトアッセイにより, Accタンパク質は*pah* オペロンのプロモーター領域に結合しないことが明らかとなった。一方, *Tn5* 挿入により, 培地中にグルコースが存在していても*pah* オペロンが発現し, 初発のジオキシゲナーゼの作用により, インドールをインジゴへ変換する変異株を12株獲得した。それらの中で, 視覚的に早く青色を呈した3株の高密度菌体懸濁液を調製し, インジゴの生成量を測定した。そのうち, インジゴの生成量が一番多かった変異株から*Tn5* 挿入領域をクローン化し, 解析を試みている。

B-9 促進酸化処理法による揮発性有機ハロゲン化合物の分解

猶原 順, ○前川 豊, 久保千晶, 高野勝也*, 石戸弘晃*
(岡山理大技科研, *(株)同和工営)

【目的】地下水・土壌汚染を引き起こしているトリクロロエチレン等の揮発性有機ハロゲン化合物を促進酸化処理法により分解した。

【方法】促進酸化処理法として, 電気分解処理装置 (株)GES で電解質溶液を電気分解した活性酸素種 (次亜塩素酸, オゾン, ヒドロキシルラジカル等) を含む溶液 (以下, 電解水) と過酸化水素により 7 種類の揮発性有機ハロゲン化合物 (Chloroform, 1, 1, 1-Trichloroethane, Trichloroethylene, Dibromochloromethane, Tetrachloroethylene, Bromodichloromethane, Bromoform) を分解した。揮発性有機ハロゲン化合物の分析は, GC-ECD (GC-14A (株)島津製作所) を用いた。試料溶液と電解水の混合割合 (試料溶液: 電解水=99.5:0.5, 99:1, 95:5, 90:10) を変え, 分解能力を比較した。また, 試料溶液に電解水と過酸化水素を添加し, 最適過酸化水素添加量を調べた。

【結果】揮発性有機ハロゲン化合物は, 電解水24時間処理でほぼ分解できた。最適分解条件は, 混合割合が試料溶液: 電解水=95:5で, 過酸化水素を250mg/lになるように添加したときであった。

B-10 Degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates by *Ensifer* sp. AS08 Authors

○Xin LIU, Akio TANI and Fusako KAWAI
(Bioresources, Okayama Univ)

Purpose: Nonylphenol mono- and diethoxylates (NP1EO and NP2EO) are known as possible endocrine-disrupting compounds. We intended to isolate microorganisms that can assimilate these compounds, and studied the mechanism of degradation.

Method: We screened microorganisms by enrichment cultivation with nonylphenol polyethoxylates as a sole carbon source. We investigated the optimal condition for the degradation by the isolates. HPLC system was used to monitor the degradation. Because authentic NP1EO and NP2EO were not commercially available, we purified them from the polyethoxylates mixture using silica gel chromatography. 16S rDNA sequence was performed to identify the bacteria in addition to the traditional method.

Result: Two kinds of bacteria strain AS08 (*Ensifer* sp.) and AS90 (*Pseudomonas putida*) that could degrade NP1EO and NP2EO were found. The best degradation was achieved when the culture contained 0.5% yeast extract and 0.04% substrate. Strain AS08 could remove more than 90% NP1EO and NP2EO without accumulating any metabolite, while strain AS90 accumulated appreciable amount of metabolite. HPLC analyses revealed that the degradation started from ethoxy chain of the substrates.

B-11 微生物細胞集団の活性モニタリング手法の開発

下村有美, 羽場洋介, 志村 稔*, 河合富佐子**, ○金原和秀**
(東工大院・人間環境, *鉄道総研, **岡大・資生研)

【目的】微生物を用いて汚染土壌の浄化する場合, 高い分解活性を維持するには, 個々の分解微生物の生理活性を把握することが重要である。そこで, 本研究は, 汚染現場での分解菌の生存状態や生理活性を, 迅速に測定できるモニタリング手法の確立を目的に行った。

【方法】微生物細胞集団の検出は, 細胞を種々の蛍光色素で染色しLaser Scanning Cytometryを用いて行った。土壌試料は緩衝液に懸濁し, メンブランフィルター上に一層の土壌層ができるように減圧濾過で捕集して作製した。微生物細胞は, 蛍光タンパク質 (GFP) を発現させたE. coliを用い, 土壌粒子との蛍光特性の比較, および土壌粒子とGFP発現菌の混合試料を測定した。また, ポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解菌Comamonas testosteroni TK102株を用いて, その分解活性の検出を目的として, PCBの基本骨格であるビフェニルの代謝産物の蛍光を測定した。

【結果】細胞の蛍光を選択的に検出する条件設定を検討した結果, 土壌粒子とGFP発現菌の混合試料を測定した場合, 約80%の細胞が検出され, GFPを発現したE. coliの土壌中での検出が可能となった。また, ビフェニルの代謝産物が緑色蛍光を発することが分かり, 細胞の特異的な検出が可能であることが示唆された。なお, 本研究の一部はNEDOより委託を受けて, 実施したものである。

B-12 好酸性鉄酸化細菌の外膜タンパク質FopAの機能解析

○石川幸子, 若井 暁*, 金尾忠芳, 杉尾 剛*, 上村一雄
(岡山大・農, *岡山大院・自然科学)

*Acidithiobacillus ferrooxidans*は, pH 2 ~ 3 の酸性環境下で生息する化学合成独立栄養細菌であり, その外膜はpH 2 付近の極めて酸性の環境にさらされている。本研究では, 本菌が酸性環境に適応して生息できる仕組みを解明するために, 外膜の主要な構成タンパク質の構造と機能を解析することを目的とした。

可溶化温度を変化させて外膜タンパク質を抽出すると, 熱処理によって変化する分子量40と30kDaのタンパク質がSDS-PAGEによって検出された。N-末端アミノ酸配列を決定し, *A. ferrooxidans*の遺伝子データベースを検索した結果, 40kDaのタンパク質 (Fop40) は, 既報の3量体を形成するポーリンと一致した。一方, 30kDaのタンパク質 (FopA) のN-末端は, C-末端にOmpAモチーフを持つ, 分子量約20kDaのタンパク質をコードする遺伝子と一致した。大腸菌で発現させた遺伝子産物は, FopA抗体と反応した。本菌の外膜のウェスタン解析では, 30kDaと24kDaのタンパク質と反応した。また, FopAは, ペプチドグリカン結合タンパク質として検出され, 熱処理をしていない外膜タンパク質を用いてウェスタン解析を行うと高分子量の多数のタンパク質と結合していることから, 本菌の細胞構造維持に重要な役割を演じていることが推測された。

維持会員リスト

(株)アプロサイエンス
アルファー食品(株)
池田糖化工業(株)
(株)大愛
大塚化学(株)
大塚製薬(株)分子医科学研究所
社団法人 岡山県農業開発研究所
片山化学工業(株)岡山営業所
(株)カワニシ
杏林予防医学研究所
キリンビール(株)岡山工場

久保田商事(株)広島出張所
酒井酒造(株)
佐竹製作所 穀物研究所
山陰建設工業(株)バイオ事業部
四国乳業(株)研究所
神協産業(株)
住友製薬(株)愛媛バイオ工場
正晃(株)
大興産業(株)
大山ハム(株)
高木酒造(株)
(有)タグチ
中国醤油醸造協同組合
帝國製薬(株)
土佐鶴酒造(株)
(有)友田大洋堂
日本オリーブ(株)
日本食研(株)
白牡丹酒造(株)
(株)ビー・シー・オー
ひまわり乳業(株)
広島ガス(株)
(株)ヒロセイ
(株)扶桑理化
(株)マグノール
マルキン忠勇(株)
マルトモ(株)
(株)無手無冠
(株)やまだ屋
山本薬品(株)
両備バス(株)
湧永製薬(株)広島事業所

天野エンザイム(株)岐阜研究所
(株)井ゲタ竹内
(株)えひめ飲料
大熊(株)
大塚器械(株)
岡山県酒造組合連合会
オハヨー乳業(株)
カバヤ食品(株)
機能性食品開発研究所
協和発酵工業(株)防府工場
近畿日本ツーリスト(株)
広島イベント・コンベンション支社
高知酒造(株)
(株)サカタ
サッポロワイン(株)岡山ワイナリー
(株)四国総合研究所
(株)シマヤ
(株)酔心山根本店
諏訪酒造(株)
仙味エキス(株)
大山乳業農業協同組合
大洋香料(株)
高塚薬品(株)
中国ケミー(株)
(株)千代田テクノル
東和科学(株)
鳥取科学器械(株)
日東酵素(株)
(株)日本総合科学
(株)バイオバンク
(株)林原生物化学研究所
備前化成(株)
(株)氷温研究所
広島和光(株)
富士産業(株)
ホシザキ電機(株)中央研究所
マナック(株)
丸善製薬(株)
三島食品(株)研究所
ヤスハラケミカル(株)
(株)山田養蜂場
(有)山本理化
ルナ物産(株)

2004年12月14日現在 85社（五十音順）

WAKO PUBLISHING

和光同塵 【わこうどうじん】

①仏が、人々を救うために、姿を変えてこの世に現れること
②知徳の優れた人が、知徳を隠して俗世間に関わること



出版を身近な物に

和光出版有限公司

〒700-0942 岡山県岡山市豊成3-1-27
TEL.086-902-2440 FAX.086-262-5096
e-mail wako@net-s.ne.jp

SHOWA
昭和印刷株式会社

真心【まごころ】 sincerity
いつわりのないところ。誠のこころ。

印刷に真心をつくす

昭和印刷株式会社

SHOWA PRINTING CO.,LTD.
〒700-0942 岡山市豊成3-1-27
TEL:086-264-6110 FAX:086-262-5096

実行委員会

実行委員長：稲垣賢二（岡山大学大学院自然科学研究科）

実行委員：神崎 浩（総務），木村吉伸（会計），泉 実，金尾忠芳，
上村一雄，酒井 裕，下石靖昭，多田幹郎，田村 隆，
中島修平，仁戸田照彦，馬場直道，村田芳行

連絡先：事務局

〒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

TEL: 086-251-8297（総務） FAX: 086-251-8388

支部からのお知らせ

詳しくは支部ホームページ (<http://home.hiroshima-u.ac.jp/jsbbacs/>) をご覧ください

○ 日本農芸化学会中四国支部若手研究者交流シンポジウム・懇親会

2005年5月20日(金)

世話人 松井健二

Tel (083) 933-5850, FAX (083) 933-5849

E-mail: matsui@yamaguchi-u.ac.jp

○ 日本農芸化学会中四国支部 第12回講演会(例会)および評議員会

2005年5月21日(土) 山口大学 農学部

演題申込締切 2005年4月13日(水)

講演要旨締切 2005年4月27日(水)

懇親会申込締切 2005年4月27日(水)

世話人 松下一信

Tel (083) 933-5858, FAX (083) 933-5859

E-mail: kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

日本農芸化学会中四国支部

〒739-8530 東広島市鏡山1-3-1

広島大学大学院先端物質科学研究科内

TEL (082) 424-7757, FAX (082) 424-7047

2005年(平成17年) 1月22日発行