

日本農芸化学会
2005 年度 関西・中四国・西日本支部合同大会

講 演 要 旨 集

2005 年 9 月 30 日（金），10 月 1 日（土）

於 大阪大学コンベンションセンター

日本農芸化学会 関西支部・中四国支部・西日本支部

シンポジウムプログラム

未来農学 Agro-X プロジェクト (1日目午後 A会場)

13:30-13:40	SA1	はじめに	小林昭雄 (大阪大学大学院工学研究科)
13:40-14:20	SA2	クリエイティブな農芸化学を考える	吉田茂男 (大阪大学大学院工学研究科, 理化学研究所)
14:20-15:00	SA3	食品由来ペプチドを出発点とする新しいペプチド機能科学の展開	吉川正明 (京都大学大学院農学研究科)
15:00-15:10		- 休息 -	
15:10-15:50	SA4	食の感性と健康 - 塩の香りを求めて-	下田満哉・今泉勝己 (九州大学大学院農学研究院)
15:50-16:30	SA5	日本のバイオサイエンスの原点 清酒醸造を科学する	秦洋二 (月桂冠総合研究所)
16:30-17:00		フリーディスカッション・未来農学	小林昭雄 (大阪大学大学院工学研究科)
		オーガナイザー:	小林昭雄 (大阪大学大学院工学研究科) 吉田茂男 (大阪大学大学院工学研究科, 理化学研究所)
		座長:	SA1 小林昭雄 (大阪大学大学院工学研究科) SA2 吉田茂男 (大阪大学大学院工学研究科, 理化学研究所) SA3 吉川正明 (京都大学大学院農学研究科) SA4 今泉勝己 (九州大学大学院農学研究院)

情報科学技術 (IT) が拓く先端バイオテクノロジーの未来 (1日目午後 C会場)

13:30-14:10	SC1	ニュートリゲノミクスによる食と健康の科学	木曾良信 (サントリー健康科学研究所)
14:10-14:50	SC2	生体分子シミュレーションとグリッドコンピューティング - タンパク質・基質複合体の反応機構解明に向けて -	高田俊和 (NEC 基礎・環境研究所)
14:50-15:30	SC3	バイオインフォマティクスデータをもとにした分子育種に向けて	古澤 力 (大阪大学大学院情報科学研究科)
15:30-15:40		- 休息 -	
15:40-16:20	SC4	細胞の完全理解に向けて; 大腸菌を用いたシステムバイオロジー	森 浩禎 (奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス, 慶應義塾大学・先端生命科学研究科)
16:20-17:00	SC5	DNA マイクロアレイデータに対するバイオインフォマティクス	花井泰三 (九州大学大学院システム生命科学府)
		オーガナイザー:	大竹久夫, 塩谷捨明 (大阪大学大学院工学研究科) 清水 浩 (大阪大学大学院情報科学研究科)
		座長:	SC1, 4, 5 清水 浩 (大阪大学大学院情報科学研究科) SC2, 3 大竹久夫 (大阪大学大学院工学研究科)

生かせ，微生物のポテンシャル（1日目午後 D会場）

13:30-13:35		はじめに	原島 俊（大阪大学大学院工学研究科）
13:35-14:10	SD1	微生物の多様性と利用	今中忠行（京都大学大学院工学研究科）
14:10-14:45	SD2	バイオリファイナリー産業の早期実現へ向けて	湯川英明（RITE）
14:45-15:20	SD3	超好熱アーキアの構造ゲノミクスとその利用	大島敏久（徳島大学工学部）
15:20-15:30		- 休息 -	
15:30-16:05	SD4	多彩な微生物細胞表面ディスプレイシステムの開発と展開	近藤昭彦（神戸大学工学部）
16:05-16:40	SD5	脱ハロゲン呼吸細菌のポテンシャルと遺伝生化学	古川謙介（九州大学大学院農学研究科）
16:40-17:15	SD6	From Genes to geocycles: Bacterial resistances to toxic heavy metals	Simon Silver（イリノイ州立大学）
17:15-17:20		おわりに	稲垣賢二（岡山大学大学院自然科学研究科）

オーガナイザー： 原島 俊（大阪大学大学院工学研究科）
 稲垣賢二（岡山大学大学院自然科学研究科）
 座長： SD1, 2 園元謙二（九州大学大学院農学研究科）
 SD3, 4 稲垣賢二（岡山大学大学院自然科学研究科）
 SD5, 6 原島 俊（大阪大学大学院工学研究科）

一般講演プログラム

1日目 (9月30日)

A会場 (食品)

- 9:12 1A02 脂肪細胞機能を調節する農作物成分
○関谷敬三, 齋藤武, 阿部大吾 (近畿中国四国農業研究センター)
- 9:24 1A03 フェルラ酸類の抗酸化機構研究Ⅰ. フェルラ酸メチルの抗酸化過程で生じる抗酸化反応終結物質について
○山田和毅¹, 前川智美², 武田美雄¹, 山口英昌², 増田俊哉¹ (¹徳島大・総科, ²大阪市大院・生科)
- 9:36 1A04 酸素の界面物質移動に及ぼす界面活性剤の影響
○森本真仁, 島元啓, 安達修二 (京大院農・食生科)
- 9:48 1A05 亜臨界水を用いたナノエマルジョンの連続調製
○片木聖子, 木村幸敬, 安達修二 (京大院農・食生科)
- 10:00 1A06 加圧カーボネーション下における加水分解反応
○丸目高也, 井倉則之, 下田満哉 (九大院生資環・生機科)
- 10:12 1A07 栗皮に含まれるポリフェノールによる血糖上昇抑制作用
○片岡久¹, 川崎健司¹, 白水智子¹, 都築久仁¹, 範本文哲² (¹カネボウフーズ(株) 食品研究所, ²カネボウ(株) 評価・分析センター)
- 10:24 1A08 未熟果パパイアの血圧低下作用に関する研究
○鎌田靖弘¹, 豊川哲也¹, 真栄平房子² (¹沖縄県工技セ, ²琉大医・生体代謝)
- 10:36 1A09 アルギン酸オリゴマーのサイトカイン放出誘導作用
倉智麻木¹, ○小田達也¹, 中島琢自¹, 山口健一¹ (¹長崎大・水・海洋生物化)
- 10:48 1A10 リポ酸によるアポトーシス誘導とその作用機構解明
○山崎正夫¹, 山根理学¹, 西本健太郎¹, 榊原陽一¹, 水光正仁¹, 池田正浩², 伊藤勝昭², 西山和夫¹ (¹宮崎大・農・応用生物科学, ²宮崎大・農・獣医)
- 11:00 1A11 マクロファージ様細胞株 RAW264.7 の LPS 誘導性 NO 産生に及ぼす大豆イソフラボンの影響
○中谷真子, 立花宏文, 山田耕路 (九大院農・生機科)
- 11:12 1A12 酵素消化フコイダン抽出物の抗腫瘍効果
○白水謙次¹, 小林倫子², 上野真史¹, 長田和浩³, 照屋輝一郎^{1,2,3}, 片倉喜範^{1,2,3}, 江藤博⁴, 白畑寛隆^{1,2,3} (¹九大院生資環, ²九大院シス生, ³九大院農院, ⁴第一産業)
- 11:24 1A13 ヒジキのガン細胞増殖抑制
○杉本真由美, 中川秀幸, 林弘三, 小山保夫, 増田俊哉, 金丸芳 (徳島大総科)
- 11:36 1A14 カズノコ抽出物中の免疫調節因子に関する研究
○菅原卓也¹, 白石隆介², 土居幹治² (¹愛媛大・農, ²マルトモ)
- 11:48 1A15 伊予絋カブ抽出物の免疫調節機能に関する研究
○越智ゆかり¹, 新田修敏², 菅原卓也¹ (¹愛媛大・農, ²漬新)

B会場 (酵素)

- 9:00 1B01 蛍光分光法を用いるサーモライシン (TLN) の活性化機構の解析
○加茂昌之, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 9:12 1B02 サーモライシンに対するアフィニティーリガンドとしての Gly-D-Phe, Gly-L-Leu, D-Phe の評価
○草野正雪, 保川清, 中村孝司¹, 井上國世 (京大院農・食生科, ¹東ソー)
- 9:24 1B03 Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1)の活性化機構の検討
○三宅由夏, 都築巧, 伏木亨, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 9:36 1B04 Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1)プロドメインの生物学的意義の解明: urokinase-type plasminogen activator (uPA) の活性化における役割
○兒島憲二, 都築巧, 伏木亨, 井上國世 (京大院農・食生科)

- 9:48 1B05 サーマライシン分子表面への変異導入による酵素活性への効果
○辰巳智香, 保川清, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 10:00 1B06 Co^{2+} によるサーモライシン (TLN) の阻害メカニズムの解析
○橋田泰彦, 保川清, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 10:12 1B07 Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular Proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133
○E. Setyorini, S. Takenaka, S. Murakami, and K. Aoki (神戸大・自然科学)
- 10:24 1B08 Ca^{2+} 非依存性を持つハブ膵臓トリプシノーゲンの一次構造
○渡辺則子, 岩切泰貴, 有馬一成, 米澤弘夫 (鹿大院理工・生命化学)
- 10:36 1B09 小麦由来 α -アミラーゼ阻害剤 0.19AI による PPA の阻害に対する NaCl の効果
○李承在, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 10:48 1B10 β -グルコシルアミジン吸着体による β -グルコシダーゼ精製法の確立
○藤原冬樹, 水谷正治, 平竹潤, 坂田完三 (京大化研)
- 11:00 1B11 *Aspergillus fumigatus* が誘導的に生産するキトサナーゼの精製及び性質
○廣瀬圭翼, 関清彦, 光富勝 (佐賀大・応生科)
- 11:12 1B12 糖転移活性を有する植物クラスVキチナーゼの大腸菌による発現
○林比呂子, 平良東紀, 深溝慶¹, 石原昌信 (琉大農・生資科, ¹近畿大・農)
- 11:24 1B13 抗結核剤候補化合物 γ -D-グルタミル-L-トリプトファンの酵素合成
○加藤健二¹, 鈴木秀之¹, 熊谷英彦² (¹京大院生命・統合生命, ²石川県大・生資工研)
- 11:36 1B14 ラン藻 GPX 様タンパク質の発現による植物の光・酸素毒耐性能の向上
○山本貴史¹, 吉村和也², 武田徹¹, Ahmed Gaber³, 中野長久³, 重岡成¹ (¹近畿大・農・バイオ, ²奈良先端大・バイオ, ³大阪府大・農・応生化)
- 11:48 1B15 Purification and amino acid sequence of green turtle (*Chelonia mydas*) ribonuclease
○Katekae S., Torikata T., Araki T. (Kyushu Tokai Univ, Sch of Agric)

C会場 (微生物)

- 9:12 1C02 高い形質転換能を示す酵母の分子育種
○内海孝昭, 河井重幸, 河野恵美, Tuan Anh Pham, 村田幸作 (京大院・農)
- 9:24 1C03 酵母の形質転換とエンドサイトーシスにおける Pan1p の機能
○河野恵美, 河井重幸, 内海孝昭, Tuan Anh Pham, 村田幸作 (京大院・農)
- 9:36 1C04 Analysis of transformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* by a visualization of DNA
○Tuan Anh Pham, Shigeyuki Kawai, Emi Kono, Takaaki Utsumi, and Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)
- 9:48 1C05 耐熱性細菌胞子の圧力発芽に関する研究
○村上綾, 井倉則之, 下田満哉 (九大院農・生資環)
- 10:00 1C06 *Eikenella corrodens* のクオラムセンシングの歯周病原性への関与
○阿座上弘行, 寺村泉, 松永哲郎, 加藤昭夫 (山口大・農・生物機能)
- 10:12 1C07 大腸菌における *Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼの発現と分泌
○山川大輔, 田中秀典, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)
- 10:24 1C08 麹菌によりエタノール耐性が増強した焼酎酵母の遺伝子発現の網羅的解析
○田中秀典, 田中淳也, 太田一良 (宮崎大・農・応生科)
- 10:36 1C09 耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* GrpE の構造および機能
○東千華¹, 杉本真也¹, 中山二郎¹, 園元謙二^{1,2} (¹九大院農・生機科, ²バイオアーキテクチャーセンター)
- 10:48 1C10 Durancin TW49M, a novel bacteriocin from *Enterococcus durans* QU 49
○Chih-Bo HU¹, Takeshi ZENDO¹, Kohei HIMENO¹, Jiro NAKAYAMA¹, Kenji SONOMOTO^{1,2} (¹Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., ²Bio-Architecture, Kyushu Univ.)
- 11:00 1C11 *Bacillus subtilis* IM-94 株由来のバクテリオシンの諸性質
○丸山雅史, 藤井朱美, 木場洋次郎 (愛媛大農・応生化)
- 11:12 1C12 ゲラニルゲラニオール誘導体のストレス依存性抗真菌作用
○中林健¹, 臼杵克之介², 藤田憲一¹, 谷口誠¹, 田中俊雄¹ (¹阪市大院理・生物地球系, ²阪市大院理・物質分子系)

- 11:24 1C13 *Salmonella* Enteritidis の熱ストレス損傷および回復機構の解明
○桐木円香¹, 内藤公貴¹, 本城賢一², 飯尾雅嘉², 宮本敬久² (¹九大・院・生資環, ²九大・院・農)
- 11:36 1C14 食中毒菌の農作物への付着機構の解明と付着防止法の開発
○下八重雅明¹, 下津智志², 本城賢一³, 飯尾雅嘉³, 宮本敬久³ (¹九大・院・生資環, ²九大・農, ³九大・院・農)
- 11:48 1C15 微酸性次亜塩素酸水の殺菌効果と生食用野菜の微生物制御への利用
○元松藍¹, 芳住あさこ², 本城賢一³, 飯尾雅嘉³, 宮本敬久³ (¹九大・院・生資環, ²九大・農, ³九大・院・農)

D会場（微生物）

- 9:12 1D02 Proteome analysis of the adaptation process of yeast to high ethanol concentration
○Dinh Thai Nho¹, 永久圭介¹, 平沢敬², 片倉啓雄², 古澤力¹, 塩谷捨明², 清水浩¹
(¹阪大院情報・バイオ情報, ²阪大院工・生命先端工)
- 9:24 1D03 コリネ型細菌における *odhA* 遺伝子発現調節株の代謝フラックス解析
○佐藤由康¹, 永久圭介¹, 平沢敬², 古澤力¹, 清水浩¹ (¹阪大院情報・バイオ情報, 阪大院工・生命先端)
- 9:36 1D04 *Burkholderia* sp.KU-15 株による 2-ニトロ安息香酸の分解
○世羅俊成, 岩木宏明, 長谷川喜衛 (関大・工・生工)
- 9:48 1D05 *Burkholderia* sp.KU-46 株による 2,4-ジニトロフェノールの分解
○阿部和也, 岩木宏明, 長谷川喜衛 (関大・工・生工)
- 10:00 1D06 水俣湾由来水銀耐性退化株の *mer* 遺伝子の多様性
○和才昌史¹, 藤原秀彦¹, 古川謙介¹, 中村邦彦² (¹九大院・生資環, ²国立水俣病総合研究センター)
- 10:12 1D07 細菌「超チャネル」の分子移植によるダイオキシン高分解菌の創成
○麻生祐司, 宮本裕希子, 橋本渉, 村田幸作 (京大院農・生物機能)
- 10:24 1D08 担子菌類の子実体形成過程におけるキチン合成酵素遺伝子の発現
○西原幹広, 渡邊彰, 麻田恭彦 (香川大農・生命機能)
- 10:36 1D09 新菌株 *Trichoderma* sp.由来の β -1,3-glucanase による機能性低分子 β -1,3-グルカンオリゴ糖の生成
○三島啓助¹, 守谷健吉¹, 小川喜八郎² (¹マスコ, ²南九大・食品健)
- 10:48 1D10 糸状菌の多糖類分解酵素
○永吉恵美, 和久田智子, 矢野めぐむ, 瀧井幸男 (武庫川女子大学)
- 11:00 1D11 *Agrobacterium tumefaciens* C58 株のアルギン酸オリゴ糖代謝
○落合秋人, 三宅統, 橋本渉, 村田幸作 (京大院・農)
- 11:12 1D12 全体構造の異なるアルギン酸リアーゼにおける触媒機構の類似性
○山崎正幸¹, 小倉康平², 橋本渉², 村田幸作², 三上文三¹ (¹京大院・農・農, ²京大院・農・食生科)
- 11:24 1D13 Cyclo(Leu-Phe)酸化酵素が触媒する cyclo(Asp(OMe)-Asp(OMe))の脱水素反応
神崎浩, ○平田里枝, 柳澤恵広, 仁戸田照彦 (岡山大院自然)
- 11:36 1D14 放線菌由来のメチオニン脱炭酸酵素 ～活性測定法の確立と精製～
○内富久美子, 田村隆, 左右田健次¹, 稲垣賢二 (岡大院自科・バイオサイエンス, ¹京大名誉教授)
- 11:48 1D15 *Clostridium perfringens* 毒素産生遺伝子検出法の検討
○篠崎温子¹, 白井篤義¹, 市石卓¹, 井上方晴², 橋本彬子², 神野英毅¹ (¹日大院生産工・工化, ²日大生産工・応化)

E会場（動物）

- 9:00 1E01 グミ由来 C 型レクチン CEL-IV とメリビオースとの複合体の X 線結晶構造解析
○畠山智充¹, 保澤崇夫¹, 楠木正巳² (¹長崎大・工・応化, ²阪大・蛋白研)
- 9:12 1E02 イトマキヒトデ由来 C 型レクチンの大腸菌による大量発現とその性質
○田中淳一¹, 倉本政則¹, 沖野望², 伊東信², 畠山智充¹ (¹長崎大・工・応化, ²九大院・農・生物機能)

- 9:24 1E03 海藻由来レクチンの抗腫瘍効果およびその作用機構に関する研究
上野真史¹, ○福田勇騎¹, 福田祐介², 菅原卓也¹, 越智ゆかり¹, 秋山浩一³, 増田清造³,
川久保明宏⁴, 加藤敬一² (¹愛媛大・農, ²愛媛大・工, ³愛媛大・総合支援セ, ⁴ヤマキ)
- 9:36 1E04 異種生物由来ストレスタンパク質 70 の免疫細胞に対する結合特性解析
○西川慧, 谷史人, 北畠直文 (京大院農・食品生物)
- 9:48 1E05 マウスを用いた呼気ガス測定法による澱粉の消化性評価
○松本年弘, 北畠直文 (京大院農・食品生物)
- 10:00 1E06 ラットのコレステロールと脂肪酸代謝に及ぼす大豆親水性ペプチドの影響
實方綾子, 岩本和香子, ○佐藤匡央, 今泉勝己 (九大院農・生機科)
- 10:12 1E07 NKG ケフィアによる脂肪細胞におけるグルコース取り込み増強機構の解析
○伊東花織¹, 照屋輝一郎², 奥田聡子¹, 片倉喜範², 徳丸千之助³, 徳丸浩一郎³, 白畑實隆²
(¹九大院・生資環, ²九大院・農院, ³日本ケフィア (株))
- 10:24 1E08 細胞老化プログラムにおける TAK1 の寄与
○伊藤紋子¹, 片倉喜範², 藤木司², 白畑實隆² (¹九大院・生資環, ²九大院・農院)
- 10:36 1E09 Origin and evolution of *STAT*, *WNT* and the nuclear receptor superfamily, *NR*
○S. Abe, E. Sasaki, T. Kishida, K. Ebihara (Fac. Agriculture, Ehime Univ.)
- 10:48 1E10 Origin and role of intergenic splicing of *UbiE2* and *Hig1-4* in mouse
S. Abe, ○E. Sasaki, (Faculty of Agriculture, Ehime University)
- 11:00 1E11 染色体・動原体・ヘテロクロマチンを可視化したマウス C3H 細胞のライブイメージングと微小管
重合阻害剤 indanocine の有糸分裂への影響
○渡辺沙奈美, 杉本憲治 (大阪府大院・生命環境)
- 11:12 1E12 グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼと RanBPM によるアンドロゲン受容体転写制御
機構の解明
○泰永涼子, 原田直樹, 山地亮一, 乾 博, 中野長久 (大阪府大院・応生化)
- 11:24 1E13 BRL3 はアンドロゲン受容体の転写活性を抑制する
○吉元貴子, 中尾元幸, 山地亮一, 乾 博, 中野長久 (大阪府大院・応生化)
- 11:36 1E14 エリ蚕中腸で発現する 2 種のペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)遺伝子
○橋本和彦, 山野好章, 森嶋伊佐夫 (鳥取大農)
- 11:48 1E15 Adiponectin 発現制御遺伝子の網羅的解析
○田島亜佳里, 立花宏文, 山田耕路 (九大院農院 生機科)

F 会場 (新技術、分析法)

- 9:12 1F02 リパーゼを用いた無溶媒系エステル化の平衡解析
○小林敬¹, 永尾寿浩¹, 渡辺嘉¹, 寺井忠正², 島田裕司¹ (¹阪市工研, ²大工大院)
- 9:24 1F03 アントシアニン系色素の安定性に関する分子計算
○小原蓉子¹, 藤本佳則², 森義裕¹, 山本健², 小川浩一², 直島好伸¹ (¹岡山理大総合情報,
²日本食品化工)
- 9:36 1F04 分子計算により酵素リパーゼのエナント選択性の発現機構を探る
○森義裕, 直島好伸 (岡山理大総合情報)
- 9:48 1F05 二次元電気泳動のためのダイナミックスポット法の開発
○柏原 仁¹, 岸本通雅², 奥村弘一³, 下野善弘⁴, 大政健史¹, 大竹久夫¹ (¹阪大院・工・生命
先端, ²京工織・工芸・物質工, ³ホリバ・バイオテクノロジー, ⁴堀場製作所)
- 10:00 1F06 低コストでできる蛍光ディフュージョン二次元電気泳動技術の確立
○榎原陽一¹, 松下佳代¹, 森永浩通², 甲斐孝憲², 水光正仁¹ (¹宮崎大・農・応生科, ²雲海
酒造)
- 10:12 1F07 グライコミックス的手法を用いた PmtA の標的タンパク質の同定と機能解析
○堀隆太, 岡拓二, 後藤正利, 古川謙介 (九大院生資環)
- 10:24 1F08 脂質アルデヒドを標的としたリビドーム解析
○竹田清夏, 河合慶親, 寺尾純二 (徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学)
- 10:36 1F09 モノリス型シリカカラムを用いたクロマトグラフィーによるポリプレノール類の分離
○馬場健史^{1,3}, 福岡英一郎¹, 水口博義², 中澤慶久³, 小林昭雄¹ (¹阪大院工・応生, ²京都モ
ノテック, ³日立造船)

- 10:48 1F10 順相クロマトグラフィーでのウロン酸の挙動
○垣田浩孝¹, 上嶋洋¹, 井上國世² (¹産総研, ²京大院農・食生科)
- 11:00 1F11 C-reactive protein (CRP) 定量の高感度化と臨床的意義の研究
○伊藤逸雄¹, 神野英毅², 福田梓³, 関口敏史³ (¹日大院・生産工・応化, ²日大生産工, ³日大生産工学部)

G会場 (有機化学、天然物化学)

- 9:24 1G03 オーロン類のハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性
○福本浩美¹, 萩原愛², 濃添都紀², 森本正則², 駒井功一郎² (¹近畿大院農・応生化, ²近畿大農・応生化)
- 9:36 1G04 6-メチル-3-ピリジルエーテル誘導体 (UD-5) の幼虫成育に及ぼす影響
○藤田雄大¹, 桑野栄一¹, 塩月孝博² (¹九大院・農, ²農生資研)
- 9:48 1G05 新規抗幼若ホルモン活性物質の合成探索
○白橋浩光, 芦邊希代, 山下春菜, 山田直隆, 桑野栄一 (九大院農)
- 10:00 1G06 昆虫の抑制性神経受容体に対する EBOB の多様な作用
○石田知春, 伊原誠, 松田一彦 (近大院・農・応生化)
- 10:12 1G07 ムキタケ (*Panellus serotinus*) の病原菌 *Trichoderma* に対する抵抗性機構
○作野えみ, 谷央子, 脇川宏太, 蒲原邦行¹, 時本景亮², 中島廣光 (鳥取大農, ¹佐賀県立林試, ²菌茸研)
- 10:24 1G08 タンニンの生体内挙動に関する研究 (第2報)
○井口歩¹, 伊東秀之¹, 吉田隆志², 波多野力¹ (¹岡山大院医歯薬, ²松山大)
- 10:36 1G09 *Penicillium brasilianum* Batista JV-379 株の生産する brasiliamide 類の生合成経路について
○大久保薫, 藤田智之, 林英雄 (大阪府大院・生命機能)
- 10:48 1G10 ゴマ種子の抗酸化性リグナンであるセサミノールの生合成
○片山健至, 小堀里恵, 鈴木利貞, 並木満夫¹, 田代亨² (香川大農, ¹おいしさの科学研究所, ²千葉大園芸)
- 11:00 1G11 ヤエヤマサソリの毒液に含まれるペプチド成分の分析
○宮下正弘, 大槻純子, 花井陽介, 中川好秋, 宮川恒 (京大院農・応用生命)
- 11:12 1G12 植物病原菌 *Botrytis cinerea* の生産する新規抗菌物質
○谷央子, 越野広雪¹, 作野えみ, 中島廣光 (鳥取大農, ¹理研)
- 11:24 1G13 ヒスチジinkinase の選択的 protein-protein interaction 阻害剤の開発
○平瀬創太, 平徳久, 古田英司, 伊東潤二, 岡本忠, 内海龍太郎, 北山隆 (近大院農・バイオ)
- 11:36 1G14 新規 cinnamic acid 4-hydroxylase 阻害剤の探索
○三枝秀之, 洪淳星, 山田直隆, 桑野栄一 (九大院・生資環)
- 11:48 1G15 ステビオール化合物群の DNA ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ阻害活性とその応用
○水品善之^{1,2}, 栗山磯子¹, 吉田弘美^{1,2} (¹神戸学院大・栄養, ²神戸学院大・ライフサイエンス産学連携センター)

一般講演2日目 (10月1日)

A会場 (食品)

- 9:00 2A01 酵母でのアミロイド型シスタチン発現系を用いたアミロイド抑制成分の検索
○近澤咲子, 原田哲仁, 阿座上弘行, 加藤昭夫 (山口大・農・生物機能)
- 9:12 2A02 甘味タンパク質ソーマチン I の *Pichia pastoris* による分泌発現
○井出信幸, 榎田哲哉, 北畠直文 (京大院農・食品生物)
- 9:24 2A03 高知県の優良酵母の特性を利用した製パン
○相模遥香¹, 茂野光正², 渋江稔³, 上東治彦⁴, 加藤麗奈⁴, 加藤伸一郎⁵, 永田信治¹
(¹高知大農生資, ²ペロリ, ³小田象製粉, ⁴県工技セ, ⁵高知大遺伝子)
- 9:36 2A04 Application of Globin-Sugar Conjugates to Bakery Products
○Aree INNUN, Yuanxia SUN, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA. (Agr. Kagawa Univ.)
- 9:48 2A05 Functional Properties of BSA (Bovine Serum Albumin) Glycated with Rare Sugars
○Melin CHUAMANOCHAN, Yuanxia SUN, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA
(Agr. Kagawa Univ.)
- 10:00 2A06 タンニン酸の渋味発現における唾液タンパク質の役割
村上裕子, ○北畠直文 (京大院農・食品生物)
- 10:12 2A07 大豆タンパク質の渋味に関する研究
○塚副成, 北畠直文 (京大院農・食品生物)
- 10:24 2A08 大豆タンパク質のプロテアーゼ加水分解に伴う断片の凝集反応と熱処理の関係
○中野幹生, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 10:36 2A09 大豆タンパク質由来の新規オピオイドペプチドに関する研究
○安居居俊, 大日向耕作, 吉川正明 (京大院農・食生科)
- 10:48 2A10 Phenolics isolated from black and pigmented brown rices, their antioxidant and enzyme inhibitory activities
Robert Yawadio, Shinji Tanimori, ○Naofumi Morita (Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture University)
- 11:00 2A11 ラクトパーオキシダーゼ (LPO) システムの抗菌性機能の解析
○宮内和則, 小川雅廣, 早川茂 (香川大農・食化)
- 11:12 2A12 希少糖を結合したβ-ラクトグロブリンの抗酸化作用
○中川順子, 孫媛霞, 小川雅廣, 早川茂, 何森健 (香川大農・食化)
- 11:24 2A13 タマネギ外皮抽出物のアンジオテンシン変換酵素活性に及ぼす影響
○瀬部和美, 宇野香代子, 白山由香, 進藤直文 (西九州大・健康栄養)
- 11:36 2A14 ボイルしたブタおよび牛肉中の脂質過酸化由来アルデヒド、4-ヒドロキシノネナールの生成に及ぼす NaCl 添加の影響
○境正, 清水佑季子, 河原聡 (宮崎大学農学部応用生物科学科)
- 11:48 2A15 海藻多糖類の食品への利用に関する研究
○坂田美保, 恵良聖子, 浅川牧夫 (熊本大, 教育)
- 12:00 2A16 耐塩性γ-グルタミルトランスペプチダーゼの醤油醸造への応用
○木嶋恭子, 南博道, 鈴木秀之 (京大院生命・統合生命科)
- 12:12 2A17 バナナ追熟に対するエチレン作用阻害剤1-MCPの抑制効果
○エレナ・トメ・バキデン, 菅沼俊彦, 北原兼文, 橋永文男 (鹿児島連大院・鹿児島大農)
- 12:24 2A18 ローゼルおよびケナフ種子の一般化学成分
○古賀民穂, 宮田奈美子, 石井利直, 太田英明 (中村学園大学)
- 12:36 2A19 日本固有種ラン藻・スイゼンジノリの成分と機能性
○梶田聖孝, 小野政輝, 増岡智加子, 伊東保之, 小林弘昌, 井越敬司, 岡本智伸 (九州東海大・農)
- 12:48 2A20 フラボノイド類とアリール炭化水素受容体との相互作用について
○向井理恵¹, 福田伊津子², 西海信², 川瀬雅也³, 吉田健一¹, 芦田均^{1,2} (¹神大院・自然・生機化, ²神大院・自然・生命科, ³阪大・院薬)

B会場（酵素）

- 9:00 2B01 Anammox 菌のヒドラジン酸化酵素の一次構造
○島村宗孝¹, 豊本健志¹, 古川憲治², 藤井隆夫¹ (¹ 崇城大・院・応生命, ² 熊本大・工・環境システム工)
- 9:12 2B02 好熱菌リポ酸アセチルトランスフェラーゼの解離・凝集
○重岡佑一, 手柴智史, 坂野大介, 藤井博, 石野良純, 麻生陽一 (九大院農)
- 9:24 2B03 アミド加水分解活性向上を目指したリパーゼの進化分子工学 -基質結合部位への saturation mutagenesis-
○長谷川惇子, 中川祐一, 平竹潤, 坂田完三 (京大化研)
- 9:36 2B04 フルオロ酢酸デハロゲナーゼによる加水分解的脱フッ素反応に必須なアミノ酸残基の同定
○実森啓二¹, 近江理恵¹, 栗原達夫¹, 宮原郁子², 広津建², 江崎信芳¹ (¹ 京大化研, ² 大阪市大・院・理)
- 9:48 2B05 チオレドキシン還元酵素のC末端へのセリン残基導入効果の検討
桑原光彦, ○田村 隆, 稲垣賢二 (岡大院自科・バイオサイエンス)
- 10:00 2B06 古細菌由来リボヌクレアーゼ P RNA 触媒部位の構造と機能に関する研究
○寺田敦, 渡邊円俊, 木村誠 (九大院・生資環)
- 10:12 2B07 グース型リゾチームにおける Glu73 の構造と機能への役割
○大野公嗣, 河村俊介, 千々岩有紀, 大隈真理, 鳥潟隆雄 (九東大・農)
- 10:24 2B08 リゾチームの触媒基 Asp52 と周辺残基間の水素結合ネットワークに関する研究
○榎田祐治¹, 河村俊介¹, 深溝慶², 千々岩有紀¹, 荒木朋洋¹, 鳥潟隆雄¹ (¹ 九東大・農, ² 近大・農)
- 10:36 2B09 鶏卵白アルブミンの糖鎖の役割
○伊藤一成, 瀬利亜紀子, 松富直利 (山口大農・生物機能)
- 10:48 2B10 リゾチームのヘリックスN末端及び疎水性パッキングの強化による安定化
○原田哲仁, 阿座上弘行, 加藤昭夫 (山口大・生物機能)
- 11:00 2B11 *Pseudomonas syringae* の2種のフェニルセリン脱水素酵素
○上島左久子¹, 中島賢則², 山本浩明², 加藤伸一郎³, 永田信治¹ (¹ 高知大農生資, ² ダイセル化学, ³ 高知大遺伝子実)
- 11:12 2B12 *Pseudomonas syringae* のD-フェニルセリン脱水素酵素の精製と結晶化
○山本陽介¹, 上島左久子¹, 中島賢則², 山本浩明², 加藤伸一郎³, 永田信治¹ (¹ 高知大農生資, ² ダイセル化学, ³ 高知大遺伝子実)
- 11:24 2B13 *Alcaligenes denitrificans* のリジン脱水素酵素の精製と結晶化
○前田早也香¹, 加藤伸一郎², 永田信治¹ (¹ 高知大農・生資, ² 高知大遺伝子実)
- 11:36 2B14 マウス由来硫酸転移酵素 SULT3A1 のX線結晶構造解析
○稲田加奈子¹, 寺本岳大¹, 榊原陽一², 水光正仁², 木村誠¹, 角田佳充¹ (九大院・生物機能¹, 宮大・農・応用生物²)
- 11:48 2B15 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来ペプチドグリカン合成酵素 Mur E のX線結晶構造解析
○松崎富士郎, 木村誠, 角田佳充 (九大院農・生物機能)
- 12:00 2B16 リジル tRNA 合成酵素のL-リジンヒドロキサメートより生じたリジルアデニレート様複合体のX線結晶構造解析
○櫻間晴子¹, 滝田禎亮¹, 三上文三², 伊藤貴文², 井上國世¹ (¹ 京大院農・食生科, ² 京大院農・農学)
- 12:12 2B17 リジル tRNA 合成酵素の基質 L-リジンの側鎖認識部位への変異導入によるアミノ酸基質に対する特異性の改変
○阿波君枝, 滝田禎亮, 櫻間晴子, 井上國世 (京大院農・食生科)
- 12:24 2B18 リジル tRNA 合成酵素のクロスサブユニット間相互作用の変異導入解析
○猿渡由寛, 滝田禎亮, 井上國世 (京大院農・食生科)

C会場（微生物）

- 9:12 2C02 増殖に必要な転写因子 YycF を標的とした新規抗菌剤の開発
○後藤恭宏¹, 古田英司¹, 建部大輔¹, 深溝慶¹, 山本兼由¹, 三沢典彦², 内海龍太郎¹
(¹近畿大院・農・バイオ, ²海洋バイオ研)
- 9:24 2C03 二成分制御系 ArcA/ArcB による DNA 修復遺伝子 *uvrA* の発現制御
○山本聡, 小笠原寛, 寺本潤, 山本兼由, 内海龍太郎 (近畿大院・農・バイオ)
- 9:36 2C04 枯草菌イノシトール分解系に関与する *iolG* と *iolI* の新規機能
○森永哲郎¹, 山口将憲², 池内摩耶¹, 木根原匡希¹, 芦田均¹, 藤田泰太郎³, 吉田健一¹
(¹神大院・自然, ²北興化学・開発研, ³福山大・生命工学)
- 9:48 2C05 枯草菌における緊縮応答による分岐鎖アミノ酸生合成オペロンの発現制御
○広岡和丈, 里村武範, 森崎薫, 藤田泰太郎 (福山大生命工・生物工)
- 10:00 2C06 DNA 修復に関する Hef 蛋白質の保存性とその機能
○石野良純 (九大・院農)
- 10:12 2C07 温泉地区土壌から得られたファミリーA型 DNA ポリメラーゼ遺伝子の多様性
○山上健¹, 鬼塚尚子¹, 田島秀二², 河原林裕³, 石野良純¹ (九大院・農・遺資工¹, プレシジョン・システム・サイエンス², 産総研・生物機工³)
- 10:24 2C08 好冷細菌 *Pseudoalteromonas* sp. AS-11 由来酢酸キナーゼ遺伝子のクローニング
○田上潤, 本島浩之, 渡邊啓一 (佐賀大・農・応生科)
- 10:36 2C09 大腸菌-バチルス-酵母シャトルベクターの構築と組換えタンパク質の分泌発現
○久堀剛資¹, 生田淳也¹, 飯笹英一^{1,2}, 本島浩之¹, 永野幸生², 渡邊啓一¹ (¹佐賀大・農・応生科, ²佐賀大・総分セ)
- 10:48 2C10 高効率遺伝子組換え法の開発
○飯笹英一^{1,2}, 永野幸生² (¹佐賀大農・応生科, ²佐賀大・総分セ)
- 11:00 2C11 酵母の GABA 合成と GAD1 遺伝子の発現系の構築
○黒沼良江, 福山晶子, 町田くみ子, 新森温子, 新田陽子, 植野洋志 (奈良女大・食物)
- 11:12 2C12 耐熱性セルラーゼを分泌生産する耐熱性酵母の構築
○洪ジョン, 玉置尚徳¹, 熊谷英彦 (石川農短大 農資研, ¹京大院 生命)
- 11:24 2C13 大腸菌の新規 γ -グルタミル- γ -アミノ酪酸加水分解酵素とその発現調節
○栗原新¹, 熊谷英彦², 鈴木秀之¹ (¹京大院生命・統生科, ²石川県大・生資工研)
- 11:36 2C14 *tpl* プロモーターを利用した大腸菌内での組み換えタンパク質発現系の構築
○小柳喬¹, 片山高嶺², 平尾愛¹, 鈴木秀之¹, 熊谷英彦² (¹京大院生命・統合生命, ²石川県大・生資工研)
- 11:48 2C15 *Clostridium aurantibutyricum* M6 株における新規ソルベント生成遺伝子の構造解析
○牧野宏俊, 中山俊一, 吉野貞蔵, 古川謙介 (九大院・生資環)

D会場（微生物）

- 9:00 2D01 分裂酵母のガラクトースの取り込みを介したガラクトース鎖修飾機構の解析
○抜木弥生, 竹川薫, 田中直孝 (香大院農・生命機能)
- 9:12 2D02 分裂酵母の PI4-キナーゼをコードする *Pik1* タンパク質の機能解析
○細見昭, 田中直孝, 竹川薫 (香川大農・生命機能)
- 9:24 2D03 PX-associated ドメインを持つ分裂酵母タンパク質の機能解析
○川西裕也, 竹内秀俊, 細見昭, 田中直孝, 竹川薫 (香川大農・生命機能)
- 9:36 2D04 分裂酵母のオートファジーに関与する遺伝子の解析
○梶原史朗, 田中直孝, 竹川薫 (香川大農・生命機能)
- 9:48 2D05 分裂酵母の液胞局在酵素の成熟化に関与するプロテアーゼの同定
○楠陽子, 岩城知子, 田中直孝, 竹川薫 (香川大農・生命機能)
- 10:00 2D06 出芽酵母由来のヘキサプレニルニリン酸合成酵素の特性
○Zhang Mei, 羅 軍, 荻山友貴, 田中克典, 松田英幸, 川向誠 (島根大・生資)
- 10:12 2D07 酵母におけるヤマイモキチナーゼ E 遺伝子の分泌大量発現系の開発
○木村将士, 野黒美俊介, 田中克典, 中川強¹, 川向誠, 古賀大三², 松田英幸 (島根大生資科・生命工, ¹島根大・総科研支援センター, ²山口大・応生化)

- 10:24 2D08 根粒菌 *Mesorhizobium loti* における ピリトキサル 4-デヒドロカナーゼ の生理機能
○横地奈菜, 吉金優, 八木年晴(高知大・農)
- 10:36 2D09 *Rhodococcus erythropolis* MAK154 株由来アミノアルコール脱水素酵素遺伝子の解析と有用物質生産への応用
○浦野信行, 石毛たける, 福井聡子, 片岡道彦, 北伸二¹, 坂本恵司¹, 清水昌 (京大院農・応用生命,¹ 第一ファインケミカル)
- 10:48 2D10 Cry45Aa 組み換え体の大腸菌封入体からの新規調製法とその精製
○奥村史朗¹, 斎藤浩之¹, 片山秀樹¹, 日下芳友¹, 水城英一¹, 井上國世² (¹福岡県工技セ,² 京大院農・食生科)
- 11:00 2D11 *Streptomyces* sp. REN-21 由来有機溶媒耐性チロシナーゼの触媒特性と大腸菌での大量発現系の構築
○伊東昌章¹, 井上國世² (¹レンゴー・中研,² 京大院農・食生科)
- 11:12 2D12 Cre-loxP システムを用いた分裂酵母遺伝子削除株の取得とその解析
○稲井孝典¹, 岩城知子^{1,2}, 田中直孝¹, 浜祐子², 竹川薫¹ (¹香川大農・生命機能,² 旭硝子中研)
- 11:24 2D13 カイコ消化液による *Bacillus thuringiensis* 殺虫性毒素タンパク質の活性化機序
○飯倉直哉, 白坂信和, 加藤富民雄, 神田康三 (佐賀大・農)
- 11:36 2D14 混合組換え型クローンをを用いた枯草菌 LP 形質転換機構の解析
再東幸子, 田口久貴, ○赤松隆 (崇城大学・生物生命)

E会場 (植物)

- 9:00 2E01 トウモロコシにおける傷害誘導性ペルオキシターゼに関する研究
○野崎匡文¹, 松川哲也¹, 石原亨², 岩村徹¹ (¹近畿大生物理工・生物工,² 京大院農・応生科)
- 9:12 2E02 高温ストレスにより植物体内で発生するマロンジアルデヒドが与える生化学的・分子生物学的影響
○山内靖雄, 脇内成昭, 杉本幸裕 (神戸大学農学部)
- 9:24 2E03 トリプトファン高生産型形質転換シロイヌナズナにおける IAA の定量
○長井徹^{1,4}, 甲斐建次^{1,4}, 宮澤春奈^{1,4}, 松田史生⁴, 矢部尚登^{2,4}, 若狭暁^{3,4}, 宮川恒^{1,4} (¹京大院農,² 東大院理,³ 東農大,⁴ 科技構 CREST)
- 9:36 2E04 ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 グルカナーゼの生理機能解析
○黒瀧秀樹, 田茂井政宏, 深溝慶(近畿大・農・バイオ)
- 9:48 2E05 HPAEC-PAD 法による fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase の反応解析
○田茂井政宏¹, 前田千紘¹, 吉原綾子¹, 川端康之², 重岡成¹, 深溝慶¹ (¹近畿大・農・バイオ,² 大阪樟蔭女大・食栄)
- 10:00 2E06 イネユビキチン様タンパク質 RURM1 の機能特性の解析および精製
○李鐘源¹, 谷坂隆俊², 築山拓司², 奥本裕², 中崎鉄也², 井上國世¹ (¹京大院農・食生科,² 京大院農・農学)
- 10:12 2E07 レーザー 1細胞サンプリングによるエンバクファイトアレキシンの分析
梶山慎一郎¹, ○和泉自泰¹, 石原亨², 福岡英一郎¹, 小林昭雄¹ (¹阪大院工・応生工,² 京大院農・応生科)
- 10:24 2E08 シロイヌナズナにおけるアブシジン酸誘導気孔閉口とジャスモン酸メチル誘導気孔閉口
○宗正晋太郎, 中村宜督, 下石靖昭, 村田芳行(岡山大院自科・生物資源)
- 10:36 2E09 イネキチナーゼ遺伝子のいもち病特異的発現を制御する転写調節因子の同定
○築山拓司¹, 井上國世², 奥本裕¹, 寺地徹³, 田中千尋¹, 中崎鉄也¹, 谷坂隆俊¹ (¹京大院農・農学,² 京大院農・食生科,³ 京産大・工)
- 10:48 2E10 シロイヌナズナキチナーゼアイソザイムの発現解析
○中野早智子, 西田彩, 中村美紀子, 田茂井政宏, 深溝慶 (近畿大・農・バイオ)
- 11:00 2E11 クロレラ由来葉緑体局在型グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (ch-G6PDH) の cDNA クローニングおよび大腸菌での発現
○町田豪¹, 大橋直人², 三村綾乃¹, 本城賢一³, 宮本敬久³, 飯尾雅嘉³ (¹九大・院・生資環,² 九大・農,³ 九大・院・農)
- 11:12 2E12 *Eucalyptus globulus* のモノテルペン合成酵素について
○矢野伸一¹, 佐々木佳菜子², 矢崎一史² (¹産総研中国セ,² 京大生存圏研)

- 11:24 2E13 シス型ゴム産生植物パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*)の EST 解析
○山東智紀, 福岡英一郎, 山下敦士¹, 服部正平¹, 小笠原直毅², Nadirman Haska³, Teuku Tajuddin³, 渡辺訓江⁴, 小林昭雄 (阪大院工・応生,¹北里大・北里生命研究所,²奈良先端大・情報・情報生命,³BPPT・Indonesia,⁴ブリヂストン)
- 11:36 2E14 トランス型ゴム産生植物トチュウ (*Eucommia ulmoides*) の EST 解析
○西河貴史, 福岡英一郎, 山下敦士¹, 服部正平¹, 小笠原直毅², 中澤慶久³, 馬場健史³, 小林昭雄 (阪大院工・応生,¹北里大・北里生命研究所,²奈良先端大・情報・情報生命,³日立造船)
- 11:48 2E15 Effect of deuterium oxide on Arabidopsis seed germination and gene expression profiles during imbibition
○Amin Md. Abdullahel, 岡澤敦司, 福岡英一郎, 小林昭雄 (阪大院工・応生工)
- 12:00 2E16 エンドウ (*Pisum sativum* L.) 発芽初期における APY1 の発現解析
○米田基人¹, Eric Davies², 横尾俊哉¹, 阿部俊之助¹ (¹愛媛大・農,²ノースカロライナ州大・植物)
- 12:12 2E17 シロイヌナズナの強光応答性 SR タンパク質ホモログの機能解析
○朝野未奈子¹, 木村彩子¹, 田部記章¹, 吉村和也², 重岡成¹ (¹近畿大・バイオ,²奈良先端大・バイオ)
- 12:24 2E18 レーザーアブレーションを用いた植物細胞への遺伝子導入— 葉緑体形質転換の試み —
○梶山慎一郎¹, Benesh Joseph¹, 井上文秀¹, 嶋村正樹², 福岡英一郎¹, 富澤健一², 小林昭雄¹ (¹阪大院工・応生工,²地球環境研(RITE))

F 会場 (糖鎖、環境科学)

- 9:24 2F03 ヌメリスギタケレクチン (PAL) は殺虫性レクチンファミリーに属している
○八木史郎, 長崎寛規 (鹿児島大・農・生資化)
- 9:36 2F04 魚類粘質物による流体抵抗の低減特性に関する研究
○藤原和人¹, 浅川牧夫², 廣江哲幸¹, 波多英寛¹ (¹熊大工,²熊大教)
- 9:48 2F05 パーフォリン糖鎖におけるシアル酸の存在形態
○藤本紀和¹, 久澄倫之介¹, Liu, Chau -Ching², 江藤望¹ (¹宮大農・応生科,²ピッツバーグ大医)
- 10:00 2F06 *Aspergillus nidulans* のガラクトース転移酵素の構造と機能
○井田寛子, 岡拓二, 後藤正利, 古川謙介 (九大院生資環)
- 10:12 2F07 線虫野生株及び α -Mannosidase 欠損株における遊離 N-結合型糖鎖の構造解析
○北村久美子¹, 加藤紀彦¹, 前田恵², 木村吉伸², 片山高嶺¹, 山本憲二¹ (¹京大生命・統合生命,²岡山大院自科・生物資源)
- 10:24 2F08 ビフィズス菌由来のエンドグリコシダーゼによるペプチドへの糖鎖の付加
○小澤隼人¹, 山口真範², 石田秀治^{3,4}, 片山高嶺^{1,4}, 山本憲二^{1,4}, 鈴木俊一⁵ (¹京大院生命・統合生命,²弘前大・医,³岐阜大・応生科,⁴JST・CREST,⁵味の素・アミノサイエンス研)
- 10:36 2F09 Lecithin/Cardiolipin 感作 Latex 試薬における Lecithin の影響
○小森谷友絵, 市石卓, 神野英毅 (日大・生産工)
- 10:48 2F10 ヘドロとマージを基材にしたシードベレットの調製と利用に関する研究
○小池晶琴¹, 本田知史¹, 岡本智伸¹, 原敏夫², 梶田聖孝¹ (¹九州東海大・農,²九大院・農)
- 11:00 2F11 酸性環境中の独立栄養細菌の遺伝的解析
○上村一雄, 岡林愛, 若井暁, 金尾忠芳, 杉尾剛 (岡山大院・自然科学)
- 11:12 2F12 PCE 脱塩素化酵素遺伝子の安定性に及ぼすクロロフォルムとトリクロロエテンの影響
○二神泰基, 山口威仁, 後藤正利, 古川謙介 (九大院, 生資環)
- 11:24 2F13 環境中での Triton X の好氣的分解について
○市来弥生¹, 田村廣人², 吉川博道¹ (¹福工大院工,²名城大農)
- 11:36 2F14 VOC 分解菌のスクリーニングと緒特性の解析
○上野紘史¹, 岡本賢治¹, 築瀬英司¹ (¹鳥取大工・生応工)
- 11:48 2F15 メチルエチルケトン分解菌を担持したバイオフィルター
○徳永大貴¹, 岡本賢治¹, 築瀬英司¹ (¹鳥取大工・生応工)

G会場（有機化学、天然物化学）

- 9:00 2G01 アンチマイシン A による ROS 産生とアポトーシスの関係
○小北真生（阪市大，院，理）
- 9:12 2G02 5-Deoxy-strigol の AM 菌の菌糸分岐誘導における構造活性相関
○秋山康紀^{1,2}，松崎謙一¹，林英雄¹（¹ 阪府大・院生命科学，²CREST）
- 9:24 2G03 ミトコンドリア複合体-I 阻害剤アセトゲニンの阻害機構研究：スパーサー部の機能
○安部真人，村井正俊，一丸直哉，吉田健彦，西岡孝明，三芳秀人（京大院農・応用生命）
- 9:36 2G04 新規アセトゲニン mimics (Δ lac - アセトゲニン) の合成と作用機構研究
○一丸直哉，村井正俊，安部真人，濱田剛，榎野早恵，真壁秀文¹，西岡孝明，三芳秀人（京大院農・応用生命，¹ 信大院農）
- 9:48 2G05 オクトパミン受容体とリガンドのドッキング構造
○平島明法¹，瀬下秀則²，Hongwei Huang²（¹ 九大農院，² アクセルリス）
- 10:00 2G06 Cytokine 生成抑制活性を有するセスキネオリグナン morinol B の立体構造研究
○山内聡¹，菅原卓也¹，秋山浩一²，丸山雅史¹，岸田太郎¹，岡崎百年¹，柏木丈弘¹（¹ 愛大農，² 愛大総科支セ）
- 10:12 2G07 3,4-dibenzyltetrahydrofuran 型リグナンのベンジル位における酸化の程度と抗酸化活性との関係
林良雅¹，○中島由貴¹，山内聡¹，切木平拓也²，増田俊哉²，山田和毅²（¹ 愛媛大・農，² 徳島大・総合科）
- 10:24 2G08 アラキドン酸代謝産物である LTB4 の C9-C20 部位の合成
○小泉有希，植田哲平，山内聡（愛媛大・農）
- 10:36 2G09 Equol の合成研究
○岡崎百年，森崎文栄，岸田太郎，首藤義博（愛媛大・農）
- 10:48 2G10 DNA 結合ピロールポリアミドの脂質誘導体の合成
○山本雅彦，朱長進¹，泉実，中島修平，馬場直道（岡山大・農，¹ 北京理工大）
- 11:00 2G11 3-Aminoflavones の合成
○武知厚吏¹，三宅秀芳²，滝川浩郷¹，佐々木満¹（¹ 神戸大院自然・生機化，² 神戸大農・生機化）
- 11:12 2G12 パラジウム触媒を利用したフラン化合物のワンポット合成
○谷森紳治，加藤義裕，切畑光統（阪府大院・生命環境）
- 11:24 2G13 ホウ素中性子捕捉療法に用いる BPA ポリアミドアミンデンドリマーの開発
○西堀大輔，浅野智之，切畑光統（阪府大院生命環境科・応生科）
- 11:36 2G14 ゼルンボンの二重共役系保持型位置選択的臭素化反応と応用
北山隆¹，○中平真起¹，高谷光²，河合靖³，岡本忠¹，K. Barry Sharpless⁴（近大院農¹，阪大院基礎工²，長浜バイオ³，The Scripps Research Institute⁴）
- 11:48 2G15 Sharpless 反応を利用したゼルンボンの不斉誘導化検討
○古谷篤¹，森山智千¹，高谷光²，河合靖³，岡本忠¹，北山隆¹（¹ 近大院農バイオ，² 阪大院基礎工，³ 長浜バイオ）
- 12:00 2G16 多様なゼルンボンの立体選択的酸化反応
○米倉裕史¹，森山智千¹，古谷篤¹，河合靖²，岡本忠¹，北山隆¹（¹ 近大院農バイオ，² 長浜バイオ）

一般講演座長一覧

1日目 (9月30日)

会場		A	B	C	D	E	F	G
No	開始時間	食品	酵素	微生物	微生物	動物	新技術・分析法	有機化学・天然物化学
1	9:00	白畑實隆 九大院 生資環	村上周一郎 神戸大農	太田一良 宮崎大農	山下光雄 阪大院工	片倉喜範 九大院農	古澤 力 阪大院情報	中川好秋 京大院農
2	9:12							
3	9:24							
4	9:36							
5	9:48							
6	10:00	山田耕路 九大院農	平良東紀 琉球大農	宮本敬久 九大院農	神崎 浩 岡大院自然	中野長久 大阪府大農	清水 浩 阪大院情報	桑野栄一 九大院農
7	10:12							
8	10:24							
9	10:36							
10	10:48							
11	11:00	小田達也 長崎大水	平竹潤 京大化研	木場洋次郎 愛媛大農	片岡道彦 京大院農	阿部俊之助 愛媛大農	岸本通雅 京都工織大 工芸	松田一彦 近大院農
12	11:12							
13	11:24							
14	11:36							
15	11:48							

2日目 (10月1日)

会場		A	B	C	D	E	F	G
No	開始時間	食品	酵素	微生物	微生物	植物	糖鎖・環境科学	有機化学・天然物化学
1	9:00	大日向耕作 京大院農	荒木朋洋 九東大農	植野洋志 奈良女大	保川 清 京大院農	尼子克己 神戸学院大	松富直利 山口大農	平島明法 九大院農
2	9:12							
3	9:24							
4	9:36							
5	9:48							
6	10:00	早川 茂 香川大農	加藤昭夫 山口大農	内海龍太郎 近畿大農	竹川 薫 香川大農	田茂井政宏 近畿大農	後藤正利 九大院農	三芳秀人 京大院農
7	10:12							
8	10:24							
9	10:36							
10	10:48							
11	11:00	北畠直文 京大院農	角田佳充 九大院農	藤田泰太郎 福山大 生命工	川向 誠 島根大生 物資源	山内靖雄 神戸大農	長谷川喜衛 関西大工	北山 隆 近畿大農
12	11:12							
13	11:24							
14	11:36							
15	11:48							
16	12:00	森田尚文 大府大院 生命環境	加藤伸一郎 高知大 遺伝子実験	藤田泰太郎 福山大 生命工	川向 誠 島根大生 物資源	武田 徹 近畿大農	長谷川喜衛 関西大工	谷森紳治 大阪府大 生命環境
17	12:12							
18	12:24							
19	12:36							
20	12:48							

SA1 未来農学 Agro-X プロジェクト

大阪大学大学院工学研究科 小林 昭雄, 吉田 茂男

【はじめに】

古くて新しい学問 「農芸化学」 化学と生物学が融合した新領域開拓への期待

近年、生命科学は、その基礎学問の発展と呼応して裾野が著しく広がり、かつて、農芸化学科で教育を受けてきたものにとっても、「農芸化学的発想法、農芸化学的研究展開の特徴とは何か」との質問への即答が実に難しいと思える状況にある。

今回、大阪大学キャンパス内で、農芸化学会が初めて開催されるに当たり、大会開催に主体的に協力を願った会員が所属する大阪大学工学研究科（工学部）の中で、生物の工学的展開を意識し、教育・研究を展開してきたものとして、両者の研究展開のアイデンティティについて思考することで、より特徴的な学会活動が助長されるのではないかとこの視点から、「未来農学 Agro-X プロジェクト」と銘打ったシンポジウムを企画してみた。また、シンポジウムのタイトル：Agro-X は、農学- related Science をイメージし、鈴木梅太郎博士の目指した、化学的基盤を重んじた研究展開が、未来農学を透視するのに通じるのかを論じる端緒となることを意図した。

今回、異分野の4名の先生に講演を賜り、出来る限り、ご自分の農芸化学感を交えて、21世紀に即した農芸化学的研究展開の持論を披露して頂きたいと思う。

全講演の後、30分程度時間を取り、会場の皆様に直接、ご意見を賜り、「農芸化学的未来農学」の展望に対して議論を深めてみたい。

一般会員、また、学生会員の皆さんの多くの参加を期待しています。

「農芸化学の父」の一人

明治7年（1874年）、鈴木梅太郎は静岡県に生まれた。

東京帝国大学農科大学農芸化学科を卒業し、スイス、ドイツで有機化学を学んだ後、同大学の教授となった。

当時、陸海軍の兵士に脚気（かっけ）に悩むものが多く、死亡する者も少なくない状態であった。彼は、精力的に原因究明に当たり、米糠(コメヌカ)中に脚気をなおす成分のあることを実験的に確認し、この有効成分が「アベリ酸」（ビタミンB1）であることを見出した。

1910年、これらの成果を発表すると共に、米糠中から有効成分の分離に成功し、特許権も得た。（特許第20785号）。そして、生涯、応用研究を強く意識し研究展開をはかった。

植物などの生物生産機能を利用する農業およびその関連産業にかかわる諸問題を研究するための分野として約80年前に発足した農芸化学は、20世紀後半に飛躍的な発展を遂げたバイオサイエンスおよびバイオテクノロジーの中核をなす学問といえる。また、農芸化学は生物学を化学（分子）的視点から解析することを基礎として、食糧・資源・環境・エネルギーなどといった人類の生存基盤を確保する為に役だつことを使命とするのである。

筆者は本年3月末まで理化学研究所において研究室を主宰していたが、そこでは農芸化学の大先達である鈴木梅太郎博士の偉業が濃厚に語り継がれていた。有名なオリザニン（ビタミンB1）の発見に始まり、高橋克己博士と展開したビタミンAなどの研究は、当時の国際水準を越えて最先端を切り開くものであった。彼らのすごさは、学問的レベルで卓越していたばかりでなく、研究成果をきちんと特許出願して権利化し、実際に大きなビジネスとして成功させたことである。「農業立国」を強く意識していた鈴木博士は、大切な食糧であるコメを確保する為には、コメ無しに日本酒を作り出すことが必要と考え、合成酒の研究にも力を注いだ。そして、このような研究の流れの中から、今日の協和発酵、理研ビタミン、科研製薬などに繋がる企業が生み出されたのである。

鈴木博士は、「ヴィタミンを産業の方面に應用することも澤山ある。余等はこの方面で役に立つことをやりたいと思つて居る。何の研究でもさうだが、かういふ研究は全く根氣が續かなくては駄目である。折角始めても、途中で止めては何にもならない。幸に私は理化学研究所と駒場に、多數の共同研究者を持つて居る。倦まずにやつたならば、今後も何か面白いことが出来るだらう。」と述べているが、この考え方は今の我々にとって非常に教訓的である。

最近数年間にゲノム科学の成果がもたらしたバイオサイエンス・バイオテクノロジーの革命的進展は、生物の種を越えて生命機構の分子レベルでの理解を可能としている。これに伴い、人間生活に必須のいろいろな物質を工業的に生産する画期的な方法も次々に創出されるはずである。こうした新しい基礎科学と応用技術の発展は、農芸化学の在り方に大きなインパクトを与え、より斬新な考え方で、より高度な技術を用いる研究の必要性が認識され始めた。しかし、一方で研究が先鋭化するとともに極端に狭い範囲の特殊な研究者間での競争に陥る傾向が見られる。このような場合の研究動機は大概において Science for science であり、公的研究資金に余裕があった1990年代には推奨されていたが、深刻な財政難に陥っている現状では応用を強く意識して Science for society を展開することが望まれている。

農芸化学における基礎と応用の研究バランスの取り方は、約百年前の鈴木時代から大きな命題であるが、大きな時代のうねりの変曲点を迎えている今日の時点で、筆者のプロジェクト研究経験等を検証しつつ、真にクリエイティブな農芸化学研究について想いをめぐらせてみたい。

食品タンパク質から生理活性ペプチドが生成することが見出された最初の例は、カゼインペプトンからの μ -オピオイドペプチド β -casomorphin の単離(Brantl,1979)まで遡る。爾来、我々は各種タンパク質の酵素消化物から数十種類の生理活性ペプチドを単離してきた。このようなペプチドは動物タンパク質のみならず、植物タンパク質からも派生し、経口投与で血圧降下およびコレステロール低下等、生活習慣病の予防に有効な作用を示す場合がある。植物由来のペプチドについては、存在理由を合目的論では説明できないことから、我々はこれらを広義のランダムライブラリーから得られた生理活性ペプチドと見なしている。

1. 記憶固定促進および抗不安作用を示す Rubisco 由来の δ -オピオイドペプチド

Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)は光合成の際、炭酸固定に関与する酵素であり、光合成能を持つすべての生物に存在することから、地球上で最も豊富に存在するタンパク質であると言われている。とりわけ、その large subunit は植物タンパク質としては例外的に理想的なアミノ酸組成を持つ点で、優れた食品タンパク質と言える。我々は Rubisco large subunit から δ -レセプター選択的なオピオイドペプチド YPLDLF が派生することを見出し、Rubiscolin と命名した。本ペプチドはマウスに経口投与した際に記憶固定促進作用および抗不安作用を示した。また、小麦グルテンから得た δ -オピオイドペプチドも同様な作用を示した。従来、 μ -および δ -オピオイドペプチドは記憶固定を阻害すると言われてきたが、植物タンパク由来の δ -オピオイドペプチドが逆の作用を示すのは興味深い。

一方、Rubisco からは、アンジオテンシン変換酵素阻害活性、動脈弛緩活性および抗酸化活性に基づいて血圧降下作用を示すペプチドが派生することも見出し出している。

2. β -ラクトグロブリンから派生する Neurotensin NT₂ アゴニストとしての β -Lactotensin

β -ラクトグロブリンのキモトリプシン消化物から回腸収縮ペプチドとして得られた β -Lactotensin (HIRL)は Neurotensin NT₂ レセプターのアゴニストとしては最初の天然リガンドであり、鎮痛、記憶固定促進、コレステロール低下および胆汁酸分泌促進作用を示した。

3. 免疫増強、抗脱毛および植物生長促進作用を示す大豆由来ペプチド Soymetide-4

好中球によるファゴサイトーシスを促進するペプチドとしてダイズ β -コングリシニンから得た Soymetide-4 (MITL)は fMLP レセプターを介して作用し、抗ガン剤 etoposide による脱毛を抑制した。本ペプチドは植物に対しても花粉管伸長促進等、種々の作用を示した。

4. 卵白アルブミン由来の動脈弛緩ペプチドの高機能化と遺伝子改変作物での生産

卵白アルブミンキモトリプシン消化物から動脈弛緩ペプチドとして得られた Ovokinin III (RADHPF) は一酸化窒素(NO)を介して作用し、自然発症高血圧ラット(SHR)に対しては 10 mg/kg の経口投与で血圧降下作用を示す。本ペプチドのアミノ酸残基を部分的に置換して得られた RPLKPW は、もとの 1/100 に相当する、0.1 mg/kg の経口投与で血圧降下作用を示した。本ペプチドを Novokinin と命名した。本ペプチドはアンジオテンシン AT₂ レセプターを介して作用し、意外にも、その下流では NO ではなく、プロスタグランジン E₂ が関与することが判明した。本ペプチドはまた、剃毛マウスに対して育毛促進作用を示した。この作用もプロスタグランジン E₂ を介するが、動脈弛緩及び血圧降下作用の場合の EP₃ レセプターとは異なり、毛胞では EP₄ レセプターが関与していることがわかった。本ペプチドをダイズ、コメ等の遺伝子改変作物において生産する試みが進行しており、上記機能の確認にも成功している。以上のように、タンパク質由来の生理活性ペプチドは生活習慣病予防のための食品素材としてのみならず、新しい情報伝達経路の解明や、経口投与で強力な作用を示す機能素材を設計するためのリード物質としても有効であることがわかった。

SA4 食の感性と健康 —塩の香りを求めて—

○下田満哉、今泉勝己（所属）九大院農・生物機能科学

五感の中でも化学感覚と呼ばれる味覚と嗅覚は、食べ物の「おいしさ」に決定的な影響を及ぼしている。食事時の味覚情報は、甘味、酸味、塩味、旨味、苦味毎に大脳皮質の味覚野へ送られる。同様に、臭球で発生した嗅覚情報は大脳皮質の嗅覚野へ送られ、そこで嗅覚に関する情報処理が行われる。次に、これらの感覚情報は大脳皮質の前頭葉連合野で統合され、食物の全体的な評価が行われる。連合野の情報はさらに扁桃体に送られるが、そこで過去の食体験と照合され、その結果として安心⇔警戒、快⇔不快等の感情が発生する。次いで、この情報は扁桃体から視床下部へ送られるが、そこでは安心・快感は摂食中枢を刺激する一方、警戒・不快感満腹中枢を刺激し摂食を抑制するように働く。これらの食情報は摂食行動のみならず神経系及びホルモンの各種経路を介して消化器官の活動も調節していると考えられる。このような食情報の伝播システムを考えると末端の感覚受容部位から中枢神経の途中までは感覚としての情報処理であるのに対して、感性は前頭葉連合野以降の経路で創造されと考えられる。要するに、感性とは感覚情報を先天的あるいは後天的に獲得された判断様式に沿って発現された情動と考えることができるであろう。

食事時の楽しい会話は、胃腸の働きを良くすると言われている。では、おいしさは胃腸の働きを活発にするだろうか。答えは、Yes。ラットに粉末飼料を蒸留水、塩酸キニーネ(10 mM)、サッカリン(100mM)の各水溶液で練り合わせた餌を与え、150 分後に胃内残留物を測定した結果、蒸留水で調製した餌に比べてサッカリン入りの餌の残留量は有意に少なく、逆に、苦いキニーネ入りの餌の残留量は有意に多いことが明示されている（山本隆ら）。なお、上記3種類の餌を直接胃内に投与した場合には残留量に違いは認められなかった。

塩味は陽イオンが味受容膜のイオンチャンネルを透過することにより発現する味覚とされているが、私たちが好ましく感じる味質は塩化ナトリウム（食塩）だけが呈する。動物は生来この塩味を好むが、食塩の過剰摂取は種々の循環器疾患を誘発する環境要因として重大な問題を呈している。WHO/国際高血圧学会では食塩摂取量として6g/日未満をガイドラインとしているが、わが国では男性は10g/日未満、女性は8g/日未満を目標としている。塩化ナトリウムの必要摂取量は明らかではないが、現代人は必要量以上の食塩を嗜好として摂っているということは間違いない事実である。

食塩は最も安価な調味料であるが健康維持には過剰な摂取は避けるべきである。演者は醤油の揮発性成分の中に塩味を強く連想させるニオイ成分(Volatile Salty Flavor; VSF)が存在することを以前から認めていた。現在、VSFがFlavor Enhancerとして極めてユニークな特性を有することに自信を深めている。2004年に「ユーザーを基盤とした技術・感性融合機構; User Science Institute, USI」が九州大学に全学的取り組みとして誕生したことを契機として、醤油中のVSFに関する研究を再スタートした次第である。現在得られている成果は、以下のとおりである。

- i) VSF水溶液は無味であるが、塩味および旨味に関して明瞭な相互作用が認められた。
- ii) 微量のVSF添加により、食塩水の塩味を約50%増強することができた。
- iii) グリシン(50mM)水溶液に微量のVSFを添加したところ、グリシンの甘味が低下し旨味が著しく増大した。
- iv) VSF画分を嗅がせたラットは、食塩水の摂取量が低下傾向にあった。

現在のところ上記のような効能が得られているが、今後ヒトの味覚に及ぼすVSFの影響を詳細に検討すると共に、動物実験により塩味に対する嗜好性の形成に及ぼすCSFの影響、嗜好性（感性情報）が消化器官の活性に及ぼす影響等を検証していく予定である。

【はじめに】

我々の祖先は、酵母と麹菌の2種類の微生物を巧みに操ることにより「清酒」という素晴らしい発酵産物を生み出した。しかし酵母と麹菌を単に使用するだけでは、清酒を造ることはできない。高濃度のアルコールを生成することができる清酒酵母や原料である米デンプンを強力に分解できる清酒麹菌など、清酒醸造に適した醸造微生物を発見・育種しなければならない。また製造方法においても、「酒母造り」や「三段仕込み」に見られるような清酒酵母を安全に拡大培養させる工夫や加水分解酵素を大量に分泌させることができる「米麹造り」など様々な培養ノウハウを組み入れることも必須要件である。すなわち清酒醸造とは、2000年の長きにわたり先人たちが試行錯誤で獲得した「秘訣」が結集したバイオテクノロジー技術の集大成と考えられる。

ここでは清酒醸造の「秘訣」を解明するためのアプローチの歴史を振り返るとともに、これら醗酵技術から生み出される新たな展開について紹介してみたい。

【バイオサイエンスの原点としての清酒醸造】

1895年に矢部博士は、清酒もろみから初めて酵母を単離し、それを純粋培養することに成功した。今では酵母がアルコールを生成することは周知であるが、我々がその事実を知ったのは高々100年あまり前のことである。その後は当時の微生物学を駆使して、清酒酵母の様々な活動が研究され、清酒醸造の各工程の意義が科学的に証明されることになる。まさしく清酒醸造は、当時最も魅力あるバイオサイエンスの研究テーマであったと考えられる。

【清酒醸造の近代化】

清酒醸造における微生物の役割が解明されると、その工程を理論的に再設計することが可能となった。まず従来の手作業による工程を機械化・自動化するために、連続蒸米機や自動製麹機などの設備が開発され、四季を通じて清酒が醸造できるシステムが完成した。これにより清酒醸造は、杜氏集団が冬季に集約的に作業するものから、年間雇用の社員が通年行う作業へと変化し、労務管理においても近代産業へ発展した。

また微生物育種技術の発達により吟醸酵母など様々な有用な酵母や麹菌を人為的に造成することが可能になっている。いよいよ人間が清酒醸造を管理できる時代となった。

【ポストゲノム情報を用いた新たな清酒醸造の展開】

最近になってこれらの醸造微生物（酵母・麹菌）の全ゲノム配列が決定され、ポストゲノム研究という観点から新たな「秘訣」も明らかとなってきた。例えば、麹菌の固体培養での遺伝子発現を解析した結果、グルコアミラーゼなど清酒醸造で有用な酵素は、米麹のような固体培養でのみ強力に発現する遺伝子が存在する。また、清酒もろみのマイクロアレイ解析からは、アルコールが20%近く生成される発酵後期において、通常のモデル培養では発現が認められない遺伝子の発現が多数認められる。すなわち清酒醸造の培養方法には、実験室で設定されるモデル培養で得られない「独特の形質」が秘められている。これらの形質の解明は、清酒醸造の「秘訣」を明らかにするだけでなく、新たな物質生産方法につながる魅力ある研究テーマである。既に我々は、醸造技術を応用した新規タンパク製造方法について開発を進めている。「清酒」は、研究対象としても確実に復権しつつあると考えている。

SC1 ニュートリゲノミクスによる食と健康の科学

○木曾良信（サントリー健康科学研）

健康食品の効能を科学的に証明することが求められている。しかし、健康食品は医薬品と比較してその作用が弱いのが一般的であり、通常用いられる薬理学的な手法ではなかなか成果が得られない。われわれはこれを克服すべく、近年、発展著しいニュートリゲノミクスの技術を導入して、ゴマ由来のセサミンおよび必須脂肪酸の一つであるアラキドン酸の効能研究を行ってきた。これまでの研究成果を紹介するとともに、食と健康の分野におけるニュートリゲノミクスの有用性について考えてみたい。

ゴマは古来より健康を増進する食品として広く親しまれてきた。近年その様々な生理活性が科学的に解明されつつある。中でもゴマに特徴的な成分であるリグナン類の持つ生理活性が注目を集めている。セサミンはこのゴマリグナンの一種であり、含量が最も高く、生理活性としてはこれまでに、コレステロール低下作用、抗高血圧作用、抗酸化作用、肝臓保護作用、アルコール代謝促進作用、肝臓癌予防作用、乳癌発生抑制作用、免疫賦活作用などが報告されている。われわれはこれらの効能のメカニズムを解明する目的で DNA マイクロアレイを用いた解析を行った。

ラットにセサミン 250 mg を懸濁させたオリーブ油 5 ml/kg あるいはオリーブ油 5 ml/kg を 3 日間投与し、肝臓の mRNA の発現変化を、DNA マイクロアレイを用いて比較した。その結果、セサミン投与によってラット肝臓の脂肪酸β酸化系酵素ならびに脂肪酸酸化系酵素の発現が増強した。逆に、脂肪酸合成系の酵素の発現はセサミン投与によって減少した。また、アルコール代謝系酵素では、アルコール脱水素酵素（ADH）やアルコール代謝特異的 CYP2E1 には影響を与えず、アルデヒド脱水素酵素（ALDH）の発現を 3 - 4 倍に上昇させた。ALDH mRNA 発現量の上昇は、リアルタイム PCR でも確認された。

セサミンのアルコール代謝促進作用はかなり以前から動物およびヒトを用いた試験で確認されていたが、DNA マイクロアレイを用いた解析により、その作用はアルデヒドの分解促進を介していることが示唆された。また、同時に脂肪酸β酸化系酵素ならびに脂肪酸酸化系酵素の発現が増強、脂肪酸合成系の酵素の発現が減少したことから、脂肪肝の予防にも有効である可能性が示唆された。

必須脂肪酸の一つであるアラキドン酸は高齢者の脳で減少し、それが脳機能の低下と密接な関係にあることが最近の研究から明らかになってきた。われわれは高齢のラットおよびヒトでアラキドン酸摂取による脳機能の変化を検討したところ、いずれも有意な改善効果が認められた。しかし、脳機能改善効果の認められたアラキドン酸摂取高齢ラットの脳を用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったが、対照ラットとの間に明らかな変化は認められなかった。おそらく、アラキドン酸は遺伝子発現を介さずに効果を発揮したものと推測される。

以上より、ニュートリゲノミクスは食品およびその成分の機能を網羅的に瞬時に解析できるメリットを有するが、すべての効能が解析できるわけではないことが明白になった。最近では、プロテオミクス、メタボロミクスさらにはリポミクスなど網羅的に解析する技術はますます進歩している。これらを総称してニュートリショナルシステムバイオロジーなる学問分野まで誕生している。これらを生かすも殺すも研究者しだいと考える。

生体分子シミュレーションとグリッドコンピューティング

SC2 -タンパク質・基質複合体の反応機構解明に向けて-

○高田俊和（N E C基礎・環境研究所）

人工酵素の開発や阻害剤の探索における研究プロセスの効率化を目的として、生体分子シミュレーションへの企業研究者の期待が、高まっている。その理由は、1) 酵素のどの部位のアミノ酸をどのように置換すべきか予測することは既存技術では大変難しく、試行錯誤的に改変しているのが現状である、2) 創薬におけるリード化合物の開発には、100万化合物を凌駕する物質の中から親和性の高い数個の物質を探索しなければならず、HTS技術を以ってしても探索困難になっている、3) その為、研究開発の期間及びコストがおおきな負担となっている、からである。

一方、PCクラスタの発展に見られるように、近年のコンピュータの性能向上と計算コストの低減には、目を見張るものがある。これは、従来困難と思われていた生体分子の高信頼計算が、現実的な計算コストで可能になってきたことを、意味している。

このような時代的な背景を受けて、米国や欧州では、生体分子シミュレーションに多くの研究リソースが配分され、活発なプログラム開発が行われている。国内では、大阪大学の進めているBioGridプロジェクト (<http://www.biogrid.jp/>) が、先行していると思われる。このプロジェクトでは、次世代のコンピュータ環境と期待されているGRIDに着目して、その環境で効率的な生体分子シミュレーションを行うためのアプリケーションプログラムやミドルウェアの開発を行っている。

原子・分子の物理的・化学的性質は、量子力学に基づきシュレーディンガーの方程式を解けば、原理的には得られる。その計算手法として、非経験的分子軌道法や密度汎関数法が整備されており、比較的小さな有機分子などでは実験結果と対比できる結果が多数報告されている。しかしながら、蛋白質のような巨大分子をまともに扱うのは、地球シミュレータのような最新のコンピュータを以ってしても、必要な計算時間の観点から不可能である。この問題を解決する手段として、QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics) 法が、最もプロミシングな生体分子の計算手法として、脚光を浴びている。その理由は、次の通りである。例えば、酵素反応においては、電子の関与が本質的なので、化学事象のおこる部位を分子軌道法などの量子力学的手法で扱い、それ以外の蛋白質の大部分を計算時間のかからない分子力場法（古典論）で近似的に表現する。これにより、酵素反応に対する計算精度を保持しつつ、計算時間の大幅な短縮が可能となるが、これらの空間の接合部で、両者のエネルギー表式（量子論と古典論）が不連続になるため、シミュレーション中に蛋白質の構造が異常をきたし、酵素反応を正しく再現できないという理論上の深刻な問題が指摘されている。この問題を解決する連続的なエネルギー表式を、前述のBioGridプロジェクトで世界に先駆けて考案した。この技術の適用により、酵素反応の正しいシミュレーションが可能となり、新規有用物質の生産に適した酵素の開発や既存酵素の反応効率の向上を、短期間に行えると期待している。

本講演では、GRIDが生体分子シミュレーションにどのような恩恵をもたらすか、また、QM/MM法を軸とした計算手法の発展により、どのようなことが生体分子シミュレーションとして実現可能なのか、その将来展望について紹介する。

バイオインフォマティクスデータをもとにした分子育種に向けて
SC3 ○ 古澤 力 (阪大院・情報、ERATO 複雑系生命プロジェクト)
 塩谷捨明 (阪大院・工)・清水 浩 (阪大院・情報)

実験技術の発展は、細胞内ダイナミクスについての詳細な情報を我々にもたらしている。それを受けて、これまでは経験的に行われていることが多かった有用微生物の育種について、その膨大な情報を活用することへの期待が高まっている。しかしながら、その情報量の増大が、育種の成功へと単純に結びついているとは言い難い。これは、詳細な情報が未だに不足しているというよりも、むしろその膨大な情報を扱う術を我々が持っていない為であると考えられる。我々は、酵母のストレス耐性菌株の育種を題材として、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析のデータからの有用遺伝子の抽出法の開発に取り組んできており、浸透圧や高エタノール濃度に耐性を示す細胞の構築に成功している。しかし、遺伝子発現と遺伝子操作の効果の関係を示す、より一般的な基盤構築が必要であると考えられる。

マイクロアレイ解析においては、菌株や環境の違う条件で遺伝子発現量を網羅的に測定することによって、その状態の差を理解しようとする。そのときしばしば仮定されることは、異なる条件の間で大きく発現量が変化したものが、その系において重要な遺伝子であるということである。例えば環境変化を与えた場合、大きく発現量を大きく上昇させた遺伝子はその環境変化に対して重要な働きを持つ可能性が高いと見なされ、それが遺伝子操作による育種の候補遺伝子となる。多くの場合、そのような候補遺伝子は多数 (例えば数十や数百個) になり、それら全てが遺伝子操作 (欠損や発現増強) によって有益な表現型変化をもたらすわけではないが、有益な変化をもたらす「当たり」の遺伝子の割合は高いと信じられている。しかし、その根拠は実のところ乏しい。もちろん、大きく上昇した遺伝子を適当に選んで遺伝子操作を加えた場合、細胞状態の有益な変化が起こる場合もある。しかし、それはランダムに遺伝子を選んでも起こりえることであり、マイクロアレイ解析の結果から選ばれた遺伝子群に、「当たり」の遺伝子が多く含まれていた証明にはならない。マイクロアレイ解析の結果から選ばれた遺伝子群が、真に「当たり」の遺伝子を高い確率で含むことを示すためには、少なくともランダムに選んだ遺伝子群との結果を比較する必要がある。

そこで我々は、遺伝子発現と遺伝子操作に対する応答の関係を調べるために、1 遺伝子破壊株のセットを用いた網羅的な増殖プロファイルの解析を行い、その結果とマイクロアレイ実験による発現プロファイルとの相関を調べることを試みている。具体的には、まず酵母の 1 遺伝子破壊株 (およそ 4000 株) の全てについて浸透圧ストレスを与えた場合の増殖曲線を測定し、親株と比較してストレスに耐性あるいは感受性になった株を全て羅列する。並行して、ストレスを与えた時の遺伝子発現の応答を、マイクロアレイによって網羅的に測定し、両者を比較することによって、どのような発現パターンを持つ遺伝子群に、ストレス耐性あるいは感受性になった遺伝子が集中しているかを検証する。このように表現型 (遺伝子発現ダイナミクス) と遺伝型 (遺伝子欠損による変化) の対応を調べ上げ、いわば「当たり」遺伝子がどこにあるかを全て知った後に、その遺伝子を抽出することが出来るアルゴリズムがどのように構築できるかを検証する。まずは遺伝子欠損の影響を網羅的に調べるが、同じように個々の遺伝子の発現増強株セットを用いた解析も可能であろう。もし、上述の仮定が正しければ、発現量が大きく変動した遺伝子に操作を加えると、そうでない遺伝子よりも大きな影響を細胞状態に与えるであろうし、あるいは遺伝子発現プロファイルと増殖プロファイルの相関を見出すことが出来なければ、我々はマイクロアレイの応答から単純に遺伝子選択を行うことは難しく、より詳細な遺伝子ネットワークの解析を必要とするであろう。我々は、こうしたアプローチによって、分子育種についての理論的基盤の構築を目指している。

(本研究は NEDO プロジェクトの一環として行われているものである。)

細胞の完全理解に向けて；大腸菌を用いたシステムバイオロジー

SC4 ○ 森 浩禎（奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科、慶應義塾大学・先端生命科学研究所）

私たちはこれまで細胞の全体像を明らかにすることを目的として、そのモデルとして大腸菌のゲノム配列決定、リソース構築、さらにリソース群を利用した網羅的な解析を進めてきた。何故今大腸菌なのか？ゲノム研究が進み、生命を司る要素、少なくとも遺伝子レベルでは、それらの機能が既知かどうかは別にして、そのほぼ全体を見渡すことが出来るようになってきた。今ようやく遺伝子と細胞活動の全体像とを結びつける研究が可能にな時代になった。この目的のために、1) 単純（単細胞）、2) 過去の研究蓄積、3) 研究方法論の充実、4) 研究材料の充実、が要求される。大腸菌は過去 50 年以上にわたる生化学、遺伝学及び分子生物学の蓄積が非常に多い、地球上もっとも研究蓄積の多い生物の一つである。そのため、各分野における研究方法論の充実も他に類を見ない。しかし、これまで予測全遺伝子のクローンや欠失株など、酵母および枯草菌と比較して整備が遅れていた。私たちは、まずこれら研究リソースの整備から始め、予測全遺伝子のクローン化(ASKA library)¹と欠失株作製(KEIO collection)²を行った。クローンは全ての予測遺伝子の開始コドンを除くアミノ酸コード領域を PCR で増幅したものを発現ベクターに組み込んだものであり、IPTG 誘導、N 末 His タグ融合の特徴を持つ。C 末は GFP 融合型と非融合型の 2 種類を用意した。これにより簡便に対象とする遺伝子産物の精製も可能になった。欠失株は開始コドン及び C 末 6 アミノ酸を残し、その間の領域を Km 耐性遺伝子と置き換えるものである。大腸菌はこれまで、酵母や枯草菌と比較して、相同性組み換えが非常に難しい生物と考えられて来たが、2000 年に Wanner らにより効率的な組み換えの方法が開発され、その方法を利用した³。

これらのリソースを利用し、網羅的な研究を進めている。

- 1) Transcriptome: クローンを利用し DNA microarray の開発を行い、欠失株における遺伝子発現の変動の解析。
- 2) Proteome: クローンの His タグを利用し、pull down アッセイによるタンパク質相互作用解析。
- 3) Metabolome: 解糖系、TCA 回路を中心として酵素の精製、酵素パラメーターの取得、抗体の作製と細胞内酵素量の定量。
- 4) Phenome: BIOLOG 社の phenotype microarray を利用した解析および GFP による細胞内タンパク質局在解析。

大腸菌ゲノムは非常に近縁の K-12 株の 2 種類が日本とアメリカにより独立に決定された。それらの比較から、ゲノム配列の見直しを行い、日米欧の研究者による遺伝子アノテーション会議を 2003 年の秋より進め、21 世紀のシステムバイオロジーを目指した準備を進めてきた。

世界の流れと、我々の研究進捗状況を紹介し、今後の方向を議論したい。

Reference

1. Kitagawa, M. et al. (in press).
2. Baba, T. (in preparation).
3. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6640-5 (2000).

1990 年代に開発された多種類の mRNA を一度に測定する方法が DNA マイクロアレイ（以下 アレイと略）または DNA チップであり、アレイを使えば細胞が変化する状況を全体的に測定することが可能となる。ただし、微生物でさえ遺伝子は数千種類あるので、アレイデータから様々な結論を導くためには、統計的・情報工学的解析が必要となる。このような解析に関する研究分野が、バイオインフォマティクス（生物情報科学）であり、解析結果が医療・生物工学に大きなインパクトを与えると期待されている。アレイデータに対するバイオインフォマティクスは様々な存在するが、大きく分けて、Fold Change Analysis、クラスタリング、判別モデル、遺伝子ネットワーク解析、シミュレーションに分けられる。我々は過去 7 年間にわたり、医療・生物工学への応用を目指したバイオインフォマティクスに関して研究を行ってきた。紙面の都合上、ここでは、これらの研究のうち、マイクロアレイデータのクラスタリングを中心に論じる。

クラスタリング解析は、細胞や遺伝子に関する情報があまりない状況下で、遺伝子発現量のパターンがよく似ている細胞や、遺伝子同士をクラスターと呼ばれるグループにして分類する方法である。たとえば抗がん剤を加えたがん細胞を一定時間間隔でサンプリングし、発現遺伝子量の時系列変化を測定したアレイデータをクラスタリング解析する場合を考える。この場合、数千～数万種類の遺伝子発現データを数個～数十個の時系列変化がよく似た遺伝子のグループとして取り扱うことが可能となり、ある程度理解しやすくなることができる。また、機能既知の遺伝子と同じグループに分類された機能未知遺伝子は、機能既知遺伝子と同じ転写制御関係にある可能性があるか、機能そのものも類似である可能性があると考えられる。クラスタリング解析には、統計の分野で広く行われている階層的クラスタリング、k-means クラスタリングが一般的な方法として知られている。しかし、これらの方法はノイズに弱いと言われており、アレイデータには大きなノイズがあることから、解析の際、大きな問題となっている。そのため、我々は k-means クラスタリングにファジィ推論の考え方を導入した Fuzzy k-means クラスタリングと呼ばれる情報工学的手法をアレイデータ解析に応用した。まず、Fuzzy k-means クラスタリングのノイズに対する強さを調べるため、酵母孢子形成時の遺伝子発現時系列データに人工的なノイズを加え、ノイズを加えていないデータとのクラスタリング結果を比較して、その再現性を調べた。その結果、k-means クラスタリングより Fuzzy k-means クラスタリングのほうが、再現性が高く、ノイズに対してより強い解析法であることが確認できた。また、Fuzzy k-means クラスタリングでは、各遺伝子に帰属度と呼ばれる「どのクラスターにどの程度属しているかを示す指標」が与えられる。高い帰属度を有する遺伝子は、各クラスターの中心的な遺伝子と考えることができるため、帰属度の閾値を設定し、高い帰属度を有する遺伝子の抽出を行った。この結果、閾値の帰属度を上昇させるに従い、孢子形成に重要な働きを有すると考えられる遺伝子を抽出することができた。以上のことから、Fuzzy k-means クラスタリングは、k-means クラスタリングよりアレイデータのクラスタリングに適していると考えられた。

この他のマイクロアレイデータの解析法についても、発表をおこなう。

地球が 1 つの惑星として誕生したのは約 46 億年前、その地球上に原始生命体が出現したのは約 38 億年前であると言われている。最初の動植物が出現したのは約 5-6 億年前であることを考えると、地球歴史上の大半が微生物により占められており、まさに微生物は地球の先住民であるといえる。

今まで生活になじみのある微生物、或いは各分野の研究対象となってきた微生物のほとんどは 20-40℃、中性付近、豊富な栄養条件の下で活発に増殖するものであった。しかし最近になって、これらは地球上に存在する微生物のごく一部に過ぎないことがわかってきた。蛍光顕微鏡観察や PCR 法を利用することにより、研究室で培養可能な微生物は土壌中の全微生物の 1-10% 程度であることが判明した。また、火山付近などの高温土壌・熱水環境、深海などの高圧環境、北極や南極域などの低温環境にもその環境に見事に適応した極限環境微生物 (extremophile) が多数生息していることも近年明らかになった。現在 extremophile としては thermophile (高温)、psychrophile (低温)、acidophile (酸性)、alkaliphile (アルカリ性)、halophile (高塩濃度)、piezophile (高圧) の 6 種類が知られている。これらの極限環境微生物は従来の微生物に見られない特性を有し、基礎・応用両面で興味深い研究対象である。

ここでは超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 に焦点を当ててお話をしたい。本菌は以下の特徴・利点を有している。

- 1) 本菌は 60-100℃ で生育する絶対嫌気性の従属栄養始原菌である。生物系統樹の根本に比較的近いため進化の研究に適しているとともに、染色体が小さいという特徴がある。
- 2) ゲノム解析が終了しており、その大きさは 2,088,737 塩基対である。
- 3) ORF は最大に見積もって 2306 であり、約半分は機能推定可能であるが残りの半分は機能未知である。
- 4) 基本的代謝経路を推定することができる。
- 5) 本菌は高温でもコロニー形成させる事ができるので、微生物遺伝学の手法が適用できる。
- 6) DNA チップを利用して環境応答などの転写レベルでの解析ができる。
- 7) 連続培養により比増殖速度 (希釈率) が 0.8 hr^{-1} 以上であることを確認している。従って、世代時間は約 50 分となり、この種の微生物では非常に高い増殖能力を有している。
- 8) 2D ゲル電気泳動によるプロテオーム解析と各スポットの同定が可能である。
- 9) 生産されるタンパク質は耐熱性であるから、精製、結晶化などが容易である。従って酵素機能の生化学的解析が簡単に行える。
- 10) ターゲティングによる遺伝子破壊 (遺伝子交換) ができる系を開発した。現在、各遺伝子について破壊株を作り、そのライブラリーを作成中である。これにより各遺伝子産物の生理的役割を *in vivo* で検証することができる。
- 11) 遺伝子交換系を利用して、有用酵素の耐熱化を図る。
- 12) 代謝工学の手法により、物質生産能力を強化できる。
- 13) 以上の技術を総合して、各種代謝経路の確認や蛋白質の機能解明を進め、最終的に生命基本原理の解明につなげたいと考えている。

なお 2004 年 11 月末から 2005 年 3 月末までの間、第 46 次南極地域観測隊に参加し、現在各種試料から微生物の探索を試みている。この貴重な体験についても少し触れてみたい。

はじめに

地球環境に関わる新しい技術コンセプトとして「バイオリファイナリー」が注目されている。これは、再生可能資源バイオマスからの大規模な化学品・エネルギー生産を意味する米国生まれの新規造語であり、米国は石油ベースのオイルリファイナリーからの大転換実現を国家科学戦略としている。すなわち、バイオリファイナリー実現への key となる技術をバイオテクノロジーを基盤とする『ポスト・ゲノム』として位置付け、生み出されるバイオプロセスに関する技術革新は 21 世紀の産業革命とも言われている。

新規バイオプロセスへの挑戦

バイオリファイナリーの実現は、高効率バイオプロセス確立の成否に依存し、各国において激しい研究開発競争が予想される。われわれ RITE では、新規技術コンセプトに基づく高効率バイオプロセスを基礎的に確立した。高効率の key は、微生物細胞の生育を人為的に停止した状態で化合物を製造させることにある。これにより微生物細胞はあたかも化学反応における触媒のように用いることが可能となる。すなわち増殖する「場」が不要となり、反応器に高密度で「触媒（微生物細胞）」を充填し、連続反応様式にて化合物製造を行うことから、大幅な高効率化となり化学プロセスと同等の生産性も可能となる。

このプロセスの応用として我々は各種の化学品・エネルギー生産を産業界と共同で計画しており以下に具体例を紹介する。

*化学品製造への応用：コハク酸生産

RITE バイオプロセスによるコハク酸製造は原料としてバイオマス由来の糖類、副原料として CO_2 を用いる高効率連続生産方式である。バイオ触媒は反応装置に高密度に充填し、原料の糖類および CO_2 を連続的に供給しコハク酸を生成させる。生成コハク酸は連続的に抜き出して回収工程へ供給する。コハク酸の製造において炭素鎖の付与反応の原料として CO_2 を用いるが、バイオプロセスの直接の原料として CO_2 を用いることは初めての報告であり酵素化学的にも大変興味深い反応である。

*エネルギー製造への応用：水素生産

バイオプロセスによる水素生産は、常温常圧反応、燃料電池の触媒被毒となる CO が発生しないことなどから工業的な製法開発が期待され、各国において活発に研究が実施されている。しかしながら、現在までの研究成果は経済性を決定する生産性 STY (Space/Time/Yield) において、1 L 水素 /hr/L 反応容器程度であり、実用化へは程遠いレベルにあった。これに対し RITE バイオプロセスによる生産性 STY は、既存より 2 桁高い値を示した。燃料電池との組み合わせによる方式により、数万 kwh の発電システムへの応用を検討中である。

おわりに

RITE 新規バイオプロセスにより、再生可能資源バイオマスから化学品・エネルギーの経済性ある製造の可能性を見出した。ゲノム情報を基に特定物質生産に特化させた微生物細胞を用いる「Cell-factory」である。今後は民間企業との連携を強化し早期に実用化を図りたい。

SD3 超好熱アーキアの構造ゲノミクスとその利用

○大島敏久, 櫻庭春彦, 川上竜巳 (徳島大・工・生物工)

90℃以上の高温で生育可能な超好熱菌は、現存する最古の生物として、生物進化の観点から興味を持たれている。また、その酵素は一般に極めて耐熱性が高く、有機溶剤や種々の薬品処理などに対しても高い安定性を示すため、各種酵素の応用面における新たな開発を可能にすることが期待できる。また、近年、ゲノム解析が進み 10 種を超える超好熱アーキア的全塩基配列が既に決定され、膨大なゲノム情報が蓄積されている。我が国においても 4 種の超好熱アーキアのゲノム解析が完了しており、その情報を利用して遺伝子産物の立体構造と分子機能を網羅的に解析し、応用しようとする構造ゲノミクス（構造ゲノム科学）研究がプロテイン 3000 プロジェクトなどによって進められている。我々は、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii*（海洋性、嫌気性菌、1.74 Mbp）、*Aeropyrum pernix*（海洋性、好気性菌 1.67 Mbp）、*Sulfolobus tokodaii*（内陸性、好気・好酸性菌 2.70 Mbp）を主な対象として構造ゲノム科学研究を進め、それらの特徴的な生命現象の理解と得られた知見のバイオテクノロジーへの展開を図っている。ここでは、生化学的手法とゲノム情報解析を用いる *P. horikoshii* の補酵素 NAD(P)の生合成に関与する酵素の機能と構造研究、及び色素依存性アミノ酸脱水素酵素複合体の機能と構造、及び応用研究に関するこれまでの成果を概説する。

1. *P. horikoshii* の補酵素 NAD(P)の生合成系の構造ゲノム科学

ゲノム情報から、L-アスパラギン酸酸化酵素に相同性を示す遺伝子（PH0015）を見出し、その産物が酸化酵素活性だけでなく、フマル酸などを電子受容体とする脱水素酵素活性を有すること、また遺伝子構造から、NADP 生合成系の初発酵素であることを明らかにした。次に、NADP 生合成経路に関与する他の 5 種の酵素、キノリン酸合成酵素（遺伝子 PH0013）、キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（PH0011）、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ（PH0464、NMNAT）、NAD 合成酵素（PH0182）、NAD キナーゼ（PH1074）をゲノム情報を用いて全て同定し、特徴を明らかにした。特に、NMNAT が ATP だけでなく、高温条件下では ADP や AMP もアデニリル基供与体にするユニークな性質をもつこと、及び NAD キナーゼが ATP に加え、ポリリン酸を良好な供与体にする特徴を見出した。安定性の高いポリリン酸依存性 NAD キナーゼは NAD からの NADP 生産用酵素として有効性が高い。さらに、これまで全く機能解析が進んでいないキノリン酸合成酵素の立体構造解析に成功した。この構造に関する情報は本酵素の反応機構の解析に有用であるだけでなく、新規な抗菌剤の開発に寄与することが期待できる。

2. 色素依存性アミノ酸脱水素酵素の構造と機能、応用

人口色素 DCIP を電子受容体とする 2 種の L-プロリン脱水素酵素(L-PDH)を *Thermococcus profundus* と *P. horikoshii* に発見した。*T. profundus* の L-PDH は高い耐熱性と基質特異性を持ち、分子量 52、43、19、11kDa の 4 種類のサブユニットから構成された複合体構造（ $\alpha\beta\gamma\delta$ 型構造）をとること、 β が FAD を含む L-PDH、 α が FAD と [2Fe-2S] を有する NADH 脱水素酵素、 γ が [8Fe-8S] フェレドキシンであることを明らかにした。さらに、本酵素を素子とする DCIP-炭素電極からなる電極型 L-プロリン定量用酵素センサーを設計、構築し、新しい機能性電極型バイオセンサーを開発した。この酵素電極を利用して、肺炎を起こすレジオネラ菌を迅速検出する方法の開発にも成功した。一方、*P. horikoshii* からは、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型に加え、 $\alpha_4\beta_4$ 型構造をとり FAD, FMN, ATP, 鉄を補酵素として含有する新規 L-PDH を見出し、X 線結晶構造解析に成功した。その結果、本酵素が L-プロリンから FAD, FMN, 鉄を経る新規な電子伝達系を持つ複合体酵素であることを明らかにできた。

現在、我々は、超好熱アーキアの 200 種を超える種々の酵素、タンパク質を対象に、バイオテクノロジーへの積極的な応用展開を踏まえて、構造ゲノム科学研究を進めている。

SD4 多彩な微生物細胞表面ディスプレイシステムの開発と展開

○近藤昭彦 (神戸大・工)

近年、各種の細菌や酵母の細胞表面にタンパク質やペプチドをディスプレイする手法は飛躍的な進展を遂げている。基本的には、ディスプレイしたいタンパク質を適当な微生物細胞表面局在タンパク質との融合タンパク質として発現させればよい。我々は、酵母で、グルカン骨格に GPI アンカーで共有結合する α -アグルチニン等を利用した表面ディスプレイ系や、凝集タンパク質である Flo1 の細胞付着領域を利用したシステム等を開発し、多彩なタンパク質の表面ディスプレイに成功してきた。さらにグラム陰性菌（大腸菌）や、グラム陽性菌（乳酸菌やコリネ型細菌等）を用いた細胞表面ディスプレイ系の開発を行ってきた。いずれの細菌においても、*Bacillus* sp.由来のタンパク質 PgsA をアンカーに用いることで、分子量の大きなタンパク質までディスプレイすることに成功した。これらの細胞表面ディスプレイ技術は、経口ワクチン、バイオセンサー、各種バイオコンバージョン、バイオレメディエーション、創薬など広範囲な応用展開が可能である。特に細胞を触媒として利用する場合は、表面発現した酵素の反応と細胞自身の代謝反応をカップルさせることで、多段階の複雑な反応を行うことができる。また、細胞を培養するだけで、高次の機能を持った触媒が得られることから、極めて実用性の高い手法でもある。様々な微生物を使った細胞表面ディスプレイ系は、それぞれ特色を持つ。例えば酵母は真核生物のタンパク質、極めて大きなタンパク質、ヘテロオリゴマータンパク質など多彩なタンパク質の表面発現が可能であり、大腸菌では最もサイズの大きな（多様性に富む）表面ディスプレイライブラリーを創製できる。このように、多彩な細胞表面ディスプレイ系が開発されつつあることから、目的に応じて使い分けることが可能である。

細胞表面ディスプレイ系を用いて新たな機能性分子や薬のリード化合物を生み出す試みも進んでいる。すなわち、注目するタンパク質（ペプチド）の分子全体あるいは一部にランダムなアミノ酸配列を導入することによって多様化し(Diversity)、それらを細胞にディスプレイ(Display)したコンビナトリアルライブラリーを構築し、そこから目的の機能を持った分子を提示する細胞をハイスループットに選択する(Directed selection)試みである。この三つの”D”に象徴される新しい機能性分子の創出法は、コンビナトリアル・バイオエンジニアリングと呼ばれる。ここでは、酵母細胞表面ディスプレイ系を用いたアゴニスト（レセプター分子のシグナル伝達を引き起こし、薬のリード化合物となるペプチド）探索の試みについて紹介する。創薬現場における最大の標的レセプターは G-protein coupled receptor (GPCR)であり、GPCR のアゴニストの探索は重要な課題である。まず酵母内在性 GPCR（Ste2）の代わりに標的とするヒト GPCR を発現させ、酵母内でヒト GPCR に対するアゴニスト結合によってシグナル伝達を引き起こされるように酵母を改変する。ここで、シグナル伝達によって最終的に発現するタンパク質にレポーターとして緑色蛍光タンパク質（EGFP）等を融合しておけば、アゴニスト結合の検出が可能となる。この様なアゴニスト活性を検出可能な酵母の細胞表面にペプチドリガンドをディスプレイして固定すると、ペプチドがアゴニスト活性を持つ場合は、それを生産した細胞上の GPCR とのみ結合を起こし、GPCR からのシグナル伝達により菌体が蛍光を発することになる。したがって細胞ごとに全くランダムなペプチド配列を生産させる酵母コンビナトリアルライブラリー群を培養し、蛍光を発する細胞をハイスループット・スクリーニングすることで、一度に大量のペプチドライブラリーをアッセイし、アゴニスト活性を有するペプチド（リード化合物）を得ることが可能となる。

細胞表面ディスプレイは、細胞に新しい機能を付与する上で、またコンビナトリアル・バイオエンジニアリングにより機能性生体分子やリード化合物の創出から利用を目指す上で、極めて重要な基盤ツールの一つと言える。

SD5 脱ハロゲン呼吸細菌のポテンシャルと遺伝生化学

○古川謙介 (九大院・農・生機科)

脱ハロゲン呼吸は、有機塩素化合物を最終電子受容体とするエネルギー生産と共役した嫌氣的代謝系である。クロロエテン脱ハロゲン呼吸細菌は、*Desulfitobacterium*、*Dehalococcoides* を中心に十数株が分離されている。*Desulfitobacterium* 属細菌には、ハロゲン化芳香族化合物のみならず、クロロエテン、クロロアルカンを脱塩素化する様々な菌株が存在する。*Dehalococcoides ethenogenes* 195 株は、唯一 PCE をエテンへ完全に脱塩素化する。クロロエテン脱塩素化酵素は、その触媒機能の相違から 4 つに分類される。① テトラクロロエテン (PCE) をトリクロロエテン (TCE) へと脱塩素化する酵素(PceA)、② PCE を *cis*-1,2-ジクロロエテン (*cis*-DCE) へと脱塩素化する PCE デハロゲナーゼ (PceA)、③ TCE をエテンへと脱塩素化する酵素 (TceA)、④ *cis*-DCE 及びビニルクロライド (VC) をエテンへと脱塩素化する VC デハロゲナーゼ (VcrA) が代表的である。当研究室で分離した *Desulfitobacterium* sp. Y51 株は飽和濃度 (960 μ M) から 0.6 μ M の PCE を効率よく *cis*-DCE へと脱塩素化する。Y51 株の PceA は分子量 61 kDa で、前駆体タンパク質として生産される。成熟型 PceA は分子量 58 kDa のモノマーとして機能するが、酸素に極めて感受性が高く空気中での半減期は 330 分である。未成熟酵素の N 末端領域は、ペリプラズムへの輸送システムである Tat システム依存型蛋白質のシグナル配列 (RRXFXK) と電子伝達に関与する Fe-S クラスター結合ドメインをもつ。Y51 株の PceA の触媒活性には補因子としてコリノイドが必須であり、Co が脱塩素化反応の活性中心であると考えられる。これまでに報告された還元的デハロゲナーゼのほとんどは Y51 株の上記の性質を共通に持っている。

Desulfitobacterium sp. Y51 株からは *pceA* 遺伝子を含む遺伝子クラスターがクローン化された。*pceA* の下流には膜アンカータンパク質をコードする *pceB* が存在する。*pceAB* クラスターは共転写されており、その下流に膜結合型転写制御因子をコードする *pceC* と、トリガーファクターをコードする *pceT* がつづいている。*D. ethenogenes* 195 株では、*tceA* と *tceB* が同定されている。最近、*cis*-DCE および VC 脱塩素化細菌である *Dehalococcoides* sp. VS 株から *vcrABC* 遺伝子が同定された。*Desulfitobacterium dehalogenans* の *o*-クロロフェノール脱塩素化酵素遺伝子クラスターは *cprTKZEBACD* で構成される。この遺伝子クラスターでは脱塩素化酵素遺伝子 (*cprA*) の上流に膜アンカータンパク質遺伝子 (*cprB*) が存在する。最近、*cprK* 発現産物が、転写を正に調節することが示唆された。

Y51 株では *pceABCT* 遺伝子の両端に 2 つの相同な IS が存在する。Y51 株の *pceA* 遺伝子は PCE、TCE が存在する環境下では安定に保持されるが、非存在下では高頻度に欠失する。これは、2 つの相同な IS 間で相同組換えが生起し、*pce* 遺伝子を含む環状体が形成され欠失するためである。

脱ハロゲン呼吸細菌のゲノム解析は 195 株と Y51 株で行われた。また、*o*-クロロフェノール脱塩素化細菌 *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 株で進行中である。195 株は約 1.5 Mbp の環状ゲノムを有しており、1591 の CDS が推定されている。195 株には 17 もの還元的デハロゲナーゼと推定される遺伝子が存在する。Y51 株は約 5.7 Mbp、GC 含量 47.4 % の環状ゲノムを有しており、約 5000 の CDS が推定されている。

195 株および DCB-2 株のゲノムからは多くのデハロゲナーゼ遺伝子が見いだされている。これらの遺伝子の機能を明らかにすることは脱ハロゲン呼吸の起源と進化を考慮する上で極めて重要である。脱ハロゲン呼吸の研究は興味ある基礎的知見を提供するばかりでなく、有機塩素化合物のバイオレメディエーションにも応用でき、今後の進展が期待される。

Microbial activities often provide the basis for useful environmental and agricultural biotechnology, as well as frequently causing problems. Essentially all bacteria have genes for toxic metal ion resistances and these include those for Ag^+ , AsO_2^- , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , TeO_3^{2-} , Tl^+ and Zn^{2+} . Resistance to inorganic Hg^{2+} and to organomercurials such as CH_3Hg^+ and phenylmercury involve a series of metal-binding and membrane transport proteins as well as the enzymes mercuric reductase and organomercurial lyase. Hg is methylated and demethylated by microbial processes. The methylmercury of concern in human food is of microbial origin and microbial bioremediation and phytoremediation can clean polluted sites. Arsenic resistance and metabolizing systems occur in three forms, the widely-found *ars* operon that is present in most bacterial genomes and many plasmids, the more recently-recognized the *aso* genes for the periplasmic arsenite oxidase that serves as an initial electron donor in aerobic resistance to arsenite and the functionally-related *arr* genes for arsenate reductase that serves as a terminal electron acceptor in anaerobic respiration. The largest group of resistance systems function by energy-dependent efflux of toxic ions. Some of the efflux resistance systems are ATPases and others are chemiosmotic ion/proton exchangers. For example, Cd^{2+} - efflux pumps of bacteria are either inner membrane P-type ATPases or three polypeptide RND chemiosmotic complexes consisting of an inner membrane pump, a periplasmic- bridging protein and an outer membrane channel. Silver compounds are increasingly used in industrial, environmental and medical applications. A cluster of 9 silver-specific genes make proteins that bind extracellular Ag^+ or pump internalized Ag^+ out from the cells, using membrane potential or ATP hydrolysis for energy. The SilE periplasmic Ag^+ binding protein is an unusual small soluble protein that binds 5 Ag^+ cations with 10 histidine residues.

simon@uic.edu

Refs:

- S. Silver and L. T. Phung. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753-789.
- S. Silver and L T. Phung. 2005. A bacterial view of the Periodic Table: Genes and proteins for toxic inorganic. *J. Indust. Microbiol. Biotech.* 32, in press.

一般講演

講演要旨

1A02 脂肪細胞機能を調節する農作物成分

○関谷敬三、齋藤武、阿部大吾（近畿中国四国農業研究センター）

【目的】脂肪細胞分化を促進し小さな脂肪細胞を増やす作用のあるチアゾリジン誘導体が糖尿病薬として開発されている。そこで、私たちは農作物・食品の成分について脂肪細胞を小さくするような作用を検討したところいくつかの農作物成分が分化を促進することを見いだしたので報告する。

【方法・結果】前駆脂肪細胞として 3T3-L1 細胞を用い常法により培養した。密集状態に達したのち分化誘導した。また、同時にサンプルを添加した。分化の指標としてグリセロール-3-リン酸脱水素酵素(GPDH)活性と細胞内油滴(TG)を測定した。また、インスリン感受性を検討するためにグルコース取り込みを測定した。カンキツ、大豆、ショウガ、ナガイモなど抽出物が GPDH 活性及び細胞内 TG を増加させ脂肪細胞への分化を促進させた。活性成分はフラバノン、イソフラボン、ショウガフェニルプロパノイドなどであった。

1A03 フェルラ酸類の抗酸化機構研究Ⅰ．フェルラ酸メチルの抗酸化過程で生じる抗酸化反応終結物質について

○山田和毅¹，前川智美²，武田美雄¹，山口英昌²，増田俊哉¹
(¹徳島大・総科，²大阪市大院・生科)

【目的】フェルラ酸は特に穀物に多く含有され、その抗酸化性またはそれに由来する機能が注目されている。本研究では、フェルラ酸類の抗酸化機構を明らかにすることを目的にした。

【方法・結果】フェノール性物質は一般にラジカル種をトラップ消去することにより抗酸化性を示す。その際、抗酸化性物質はラジカルとなり、その終結反応により構造が変化した生成物を与える。そこで、酸化基質リノール酸エステルにフェルラ酸メチルを加え、抗酸化反応を行い、生成物を HPLC 分析した。結果、フェルラ酸メチルの減少に伴い、主に一つのピークが増大することを見出した。この抗酸化反応終結物質を構造決定したところ、ベンゾフラン構造を有するダイマーであることがわかった。その構造から推測したフェルラ酸メチルのラジカル消去の機構を報告する。また、脂質中での抗酸化機構についても報告予定である。

1A04 酸素の界面物質移動に及ぼす界面活性剤の影響

○森本真仁，島元啓，安達修二（京大院農・食生科）

【目的】O/W 型エマルションの油相の酸化には、酸素の界面物質移動が関与すると思われるが、定量的な評価はなされていない。そこで比較的測定が容易な、界面活性剤存在下での気液界面における酸素の物質移動係数を測定した。

【方法】試薬瓶中の脱気した水に界面活性剤を溶解させ、寒天で固定した。試薬瓶上部に空気を封入し、気相の酸素濃度の減少を酸素電極で経時的に測定することにより、気液界面での酸素流束を評価した。界面活性剤には Tween 20、 β -カゼイン、ドデシル硫酸ナトリウムおよびショ糖デカン酸エステルを用いた。

【結果】精製水を用いた場合には、気液界面に物質移動抵抗がないと考えるモデルで実測値をよく表現できた。界面活性剤を添加した場合には、臨界ミセル濃度(CMC)以下では精製水の場合と同様であった。CMC を越えると界面物質移動抵抗が無視できず、酸素の物質移動係数は 10^{-7} m/s のオーダーであった。

1A05 亜臨界水を用いたナノエマルジョンの連続調製

○片木聖子、木村幸敬、安達修二（京大院農・食生科）

【目的】脂肪酸は高温高压下で液体状態を保った亜臨界水に高濃度で溶解する。脂肪酸を溶解させた亜臨界水を常温常圧に戻すと過飽和の脂肪酸が油相となる。その際に親水性乳化剤を共存させると微細な O/W 型エマルジョンが調製できる。本研究では、流通式装置を用いた微細エマルジョンの連続調製の可能性を検討し、従来法と比較した。

【方法・結果】少量の非イオン性乳化剤 ML-750(0.01%(w/v))を加えてホモジナイズし、オクタン酸(1.47%(w/v))の O/W 型粗エマルジョンを調製した。油浴(220 または 230°C)中に浸したステンレス管(SUS-316)に、粗エマルジョンを通液した。油浴を通過した直後に ML-750 乳化剤溶液(0.05-1.0 %(w/v))を合流したのち降温して、油滴径の微細なエマルジョンを連続的に調製した。本方法ではオイルオフは観察されなかった。またホモジナイザーを用いた従来法と比較して、低濃度乳化剤溶液で油滴径が 100 nm 以下のエマルジョンを調製できた。

1A06 加圧カーボネーション下における加水分解反応

○丸目 高也、井倉 則之、下田 満哉（九大院生資環・生機科）

【目的】加圧カーボネーション（HPC）処理は、非加熱で酵素失活及び微生物の殺菌を可能とする。その効果を発揮するために必要な CO₂ 圧力は、酵素失活には数十 MPa を要するものの、微生物の殺菌は数 MPa である。著者らはこの有効圧力域の違いに着目し、HPC 処理技術によって微生物の生存と酵素反応を個別に制御することが可能であると考えた。本研究では、HPC 環境下で酵素反応を行うことによって無菌的な物質生産を試みた。

【方法・結果】HPC 環境下における微生物の生存について検討するため、酵母(*Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255) 及び大腸菌(*Escherichia coli* K12) を液体培地中に懸濁し、HPC 処理に供した。また、HPC 処理が酵素反応に及ぼす影響を検討するため、HPC 環境下で酵素分解反応を行った。供試酵素には酸性プロテアーゼ、 α -アミラーゼ等を用いた。本研究より、酵母及び大腸菌が生育できない条件下で、酵素活性は維持あるいは促進されることが示された。

1A07 栗皮に含まれるポリフェノールによる血糖上昇抑制作用

○片岡久¹、川崎健司¹、白水智子¹、都築久仁¹、範本文哲²（¹カネボウフーズ（株）食品研究所、²カネボウ（株）評価・分析センター）

【目的】栗の鬼皮や渋皮は中国本草では「栗殻」等と呼ばれ、古来より様々な用途に珍重されてきた。栗の皮にはポリフェノールが豊富に含まれている事が知られているが、今回栗皮から得られた抽出物に含まれるポリフェノールの分析を行い、更に血糖値上昇抑制作用等の生理機能性について検討した。

【方法・結果】栗の渋皮及び鬼皮から 55% (v/v) エタノールにより抽出を行い、濃縮、乾燥後、抽出物を得た。この抽出物を α -トルエンチオールにより分解し、分解物を精製後、NMR にて構造解析を行った。その結果、エピカテキン及びエピガロカテキンの 4 位の炭素に α -トルエンチオールが結合した化合物、及びカテキンが確認された。また KK-Ay マウスに対する抽出物投与試験では、50 mg/kg 以上の投与により 4 週目から有意に血糖値が低下した。

1A08 未熟果パパイヤの血圧低下作用に関する研究 ○鎌田靖弘¹, 豊川哲也¹, 真栄平房子² (¹沖縄県工技セ、²琉大医・生体代謝)

【目的】 パパイヤは、沖縄でパパヤーまたはマンジュウイという方言名で呼ばれており、果実としての熟果よりも、野菜としての未熟果の方が伝統食材として日常的に食されてきた。そこで本研究では、未熟果パパイヤの血圧低下作用を検討した。

【方法・結果】 パパイヤの未熟果及び熟果を乾燥粉末化し、各種抽出を行った。*in vitro*試験では、アンジオテンシン変換酵素（以下 ACE）阻害活性を測定し、*in vivo*試験では、自然発症高血圧ラット (SHR) に未熟果の乾燥粉末物を 8 週間摂取させ、2 週毎の収縮期血圧等を測定した。その結果、ACE 阻害活性はパパイヤの未熟果及び熟果共に有したが、活性の程度は未熟果の方が高かった。次に未熟果を摂取した動物試験では、パパイヤ摂取群の収縮期血圧が、摂取後 1 週目から低下傾向 ($p < 0.23$) を示し、摂取後 5 及び 6 週目で対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低下を示した。以上の結果より、未熟果パパイヤには血圧低下作用を有する事が分かった。また、飼育終了後の血漿中の総コレステロール濃度も有意な低下を示した。

1A09 アルギン酸オリゴマーのサイトカイン放出誘導作用 倉智麻木¹, ○小田達也¹, 中島琢自¹, 山口健一¹ (¹長崎大・水・海洋生物化)

【目的】 アルギン酸は褐藻類の細胞壁に含まれ、マンヌロン酸とグルロン酸の 2 種類のウロン酸から構成される酸性粘性多糖類である。高分子アルギン酸の様々な生理活性は知られているが、酵素分解等で低分子化したアルギン酸オリゴマーに関する研究例はあまり多くない。本研究では、アルギン酸オリゴマーの免疫系に対する作用を中心に解析した。

【方法・結果】 高分子アルギン酸或いはその加水分解により得た、ポリグルロン酸 (PG)、ポリマンヌロン酸 (PM) をアルギネートリアーゼ処理により種々のオリゴマーを調製した。得られたアルギン酸オリゴマーをヒト末血白血球或いは RAW264.7 (macrophage) 細胞に添加した結果、オリゴマーの構造及び濃度依存的に TNF- α 放出が誘導された。精製オリゴマーの内、7 量体マンヌロン酸 (M7) と 8 量体グルロン酸 (G8) オリゴマーに最も強い活性が認められた。高分子アルギン酸の酵素分解産物の混合物を ddY 系マウスに i.p. 投与した結果、投与 30～60 分で血中 TNF- α レベルの顕著な上昇が認められた。

1A10 リポ酸によるアポトーシス誘導とその作用機構解明 ○山崎正夫¹, 山根理学¹, 西本健太郎¹, 榊原陽一¹, 水光正仁¹, 池田正浩², 伊藤勝昭², 西山和夫¹ (¹宮崎大・農・応用生物科学、²宮崎大・農・獣医)

【目的】 ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞におけるリポ酸の細胞致死活性の有無を検討するとともに、その細胞死誘導機構を詳細に検討した。

【方法・結果】 HL-60 細胞をリポ酸存在下で培養し、細胞致死活性およびアポトーシス誘導能の評価を行った。その結果、リポ酸は HL-60 細胞にヌクレオソーム単位の DNA 断片化を伴う細胞死を誘導することが示された。その作用機構を検討したところ、本細胞死ではカスパーゼ 3 及び 9 の活性化が確認されたが、それより早い段階に apoptosis inducing factor の核局在化および DNA 断片化が認められた。また、リポ酸による細胞死はカルシウムキレーターで顕著に阻害された。以上の結果から、リポ酸は HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導し、その引き金にはカルシウムイオンを必須とするカスパーゼ非依存的経路が関与することが示唆された。

1A11 マクロファージ様細胞株 RAW264.7 の LPS 誘導性 NO 産生に及ぼす大豆イソフラボンの影響

○中谷真子, 立花宏文, 山田耕路 (九大院農・生機科)

【目的】一酸化窒素 (NO) はエンドトキシンショックや炎症性サイトカインによって誘導される生体防御に重要な生理活性物質の一つである。今回、マクロファージ様細胞株 RAW264.7 の NO 産生に及ぼす大豆イソフラボンの影響を検討した。また、大豆イソフラボンは estrogen receptor (ER) に結合することが知られているため ER 経路の関与についても検討を行った。

【方法・結果】RAW264.7 細胞を大豆イソフラボン (genistein、daidzein) および LPS 存在下で 24 時間培養後、培養上清中に産生された NO 量を Griess 法にて測定した。また、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現に及ぼす大豆イソフラボンの影響をウエスタンブロットにより検討した。その結果、大豆イソフラボンは濃度依存的に NO 産生および iNOS 発現を促進した。また、ER アンタゴニストによって大豆イソフラボンの iNOS 発現促進効果は抑制されたことから、大豆イソフラボンは ER 経路を介して NO 産生を調節することが示唆された。

酵素消化フコイダン抽出物の抗腫瘍効果

1A12

○白水謙次¹、小林倫子²、上野真史¹、長田和浩³、照屋輝一郎^{1,2,3}、片倉喜範^{1,2,3}、江藤博⁴、白畑實隆^{1,2,3}

(¹九大院生資環、²九大院シス生、³九大院農院、⁴第一産業)

【目的】近年、褐藻類（コンブ、ワカメ、モズクなど）が産生する多糖類フコイダンの抗腫瘍効果が注目されている。我々は酵素消化によって低分子化したフコイダン抽出物について、担ガンマウスにおける腫瘍増殖および延命、培養腫瘍細胞の増殖、足場非依存性増殖に及ぼす効果を検討したので報告する。

【方法・結果】アワビグリコシダーゼ処理により低分子化したフコイダン抽出物を Balb/c マウスに経口ゾンデで 2 週間前投与し、マウス大腸ガン細胞 Colon-26 を移植した。フコイダン投与群では腫瘍の増殖が有意に抑制され、延命効果が認められた。酵素消化フコイダン抽出物は培養腫瘍細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。また、腫瘍細胞の足場非依存性増殖を抑制したことから、悪性の腫瘍の性質をフコイダンが抑制することが示唆された。

1A13 ヒジキのガン細胞増殖抑制

○杉本真由美, 中川秀幸, 林弘三, 小山保夫, 増田俊哉, 金丸芳 (徳島大総科)

【目的】以前、徳島の海藻（緑藻 4 種と褐藻 6 種）に培養ガン細胞に対する増殖抑制を確認した。そこで今回、徳島鳴門産ヒジキについて培養ガン細胞に対する増殖抑制を検討し、その有効成分を明らかにした。

【方法・結果】ヒジキは、脱塩・風乾・粉碎し、抽出分画して用いた。ヒジキ抽出分画物を添加したガン細胞（K562, B16-F1, CACO-2）浮遊液（ 1×10^4 cells/ml）を 37°C、5%CO₂ 存在下で培養し、MTT 法で細胞増殖を測定して、増殖抑制を検討した。まず、ヒジキをメタノールで抽出したものに強い増殖抑制があったので、メタノール抽出物をヘキサン・酢酸エチル・ブタノール・水で順次抽出した。これらの中ではヘキサン抽出物の抑制が最も強かったので、さらにアセトン可溶部と非可溶部に分け、アセトン可溶部に強い抑制が見られた。そこで、シリカゲルカラムを用いて、ヘキサン：アセトン、及びアセトン：水で分画物を得た。その結果、クロロフィル a が K562, B16-F1 に対して強い抑制効果を示した。

1A14 カズノコ抽出物中の免疫調節因子に関する研究

○菅原卓也¹, 白石隆介², 土居幹治² (¹愛媛大・農, ²マルトモ)

【目的】カズノコを破碎して得られた抽出液中に含まれる物質の免疫調節活性をヒトハイブリドーマ細胞株、およびヒト末梢血リンパ球を用いて評価した。

【方法・結果】オランダ産カズノコを破碎し、超遠心により不溶物を除去した抽出液を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に対して透析した後、試験サンプルとした。この抽出液は、ヒトハイブリドーマ細胞株 HB4C5 細胞の IgM 産生を 5.6 倍促進した。この抽出液の抗体産生促進活性はトリプシン処理により消失したことから、活性因子はタンパク質であると推察された。そこで、カズノコ抽出液中のタンパク質をアセトン沈殿により回収し、10 mM リン酸緩衝液に溶解後、同緩衝液に対して透析したのちに活性を測定したところ、HB4C5 細胞の抗体産生を強く促進した。また、カズノコ抽出液はヒト末梢血リンパ球の IgM 産生を 2.3 倍、IgG 産生を 1.4 倍促進した。さらに、リンパ球のインターフェロン γ 産生を 15.7 倍、インターロイキン (IL) 5 の産生を約 90 倍促進した。しかし、IL-6 産生促進には無効であった。

1A15 伊予緋カブ抽出物の免疫調節機能に関する研究

○越智ゆかり¹, 新田修敏², 菅原卓也¹ (¹愛媛大・農, ²漬新)

【目的】愛媛県特産の農産物である伊予緋カブ抽出物の免疫調節機能を、ヒト培養細胞、およびヒトリンパ球を用いて評価した。

【方法・結果】伊予緋カブ可食部を凍結乾燥後、粉碎し、蒸留水を加え一晚攪拌後、10,000 $\times$ g、30 分間遠心し、得られた上清を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に対して透析したものを試験材料とした。活性の測定にはヒト型ハイブリドーマ細胞株 HB4C5 細胞とヒト末梢血リンパ球を用いた。培地中に産生された抗体量、およびサイトカイン量を酵素抗体法により定量した。まず、無血清培養下において伊予緋カブ抽出物の抗体産生促進活性を検討したところ、HB4C5 細胞の IgM 産生を濃度依存的に促進し、IgM 産生量はコントロールに対し 3.9 倍となった。その活性は 100°C の加熱処理後も保持された。また、ヒト末梢血リンパ球の IgM 産生は促進したが、IgG 産生促進には無効であった。またリンパ球のインターフェロン γ 、およびインターロイキン 5 産生をそれぞれ 3.0 倍、11.0 倍促進した。

1B01 蛍光分光法を用いるサーモライシン (TLN) の活性化機構の解析 ○加茂昌之、井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】我々は NaCl に代表される中性塩の添加による TLN の顕著な活性化について検討している。この活性化現象は塩による選択性があり、NaCl により最も活性化される。今回、蛍光分光法により、NaCl で誘起される微細な立体構造変化の解析を目的とした。

【方法・結果】pH 7.0, 25 °C、1 μ M TLN で NaCl 添加により内在性の Trp 残基の蛍光強度はわずかに 9.2 % 増大した。CsCl, KI, アクリルアミドによる消光実験を行ったが、いずれの消光剤でも Trp 残基は消光されなかった。疎水性蛍光プローブ ANS を TLN に結合させ、NaCl 添加による蛍光スペクトルの変化を解析した。その結果、NaCl 濃度依存的に最大蛍光波長は減少し、3.2 μ M ANS 存在下では 3.6 M NaCl 添加により 7.7 nm 最大蛍光波長が減少した。また、ANS は、中性 pH では TLN を阻害しなかった。これらの結果から、NaCl の添加により TLN の立体構造が微細に変化すること、ANS は TLN の活性部位には結合しないこと、ANS 結合部位の誘電率が 8.6 % 減少したことが明らかとなった。

1B02 サーモライシンに対するアフィニティーリガンドとしての Gly-D-Phe, Gly-L-Leu, D-Phe の評価 ○草野正雪、保川清、中村孝司¹、井上國世 (京大院農・食生科,¹東ソー)

【目的】Gly-D-Phe, Gly-L-Leu, D-Phe のサーモライシン (TLN) に対するアフィニティーリガンドとしての性能を評価した。【方法・結果】各リガンドを Toyopearl AF-Formyl-650M (東ソー) およびセファロース 4B (アマシャムファルマシア) に結合させた。TLN の樹脂への吸着の至適 pH は 5.5 であった。4 ml の樹脂をつめたアフィニティーカラムクロマトグラフィーの TLN の吸着率は、TLN のアプライ量が 2 mg のときはどのリガンドでも 100% であったが、20 mg に上げると Gly-D-Phe では 100% であったのに対し、他の 2 種では 20% に低下した。ラングミュアの吸着等温式より求められた TLN との結合定数は、Gly-D-Phe が結合した樹脂では $(3.3 \pm 0.8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であったが、他の 2 種では 10 倍低い値であった。一方、TLN の最大吸着量は樹脂 1 ml あたり 18-31 mg であり、樹脂間で差がなかった。以上の結果から、Gly-D-Phe が TLN のアフィニティーリガンドとして最も性能が高いことが示された。

1B03 Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1)の活性化機構の検討 ○三宅 由夏、都築 巧、伏木 亨、井上 國世 (京大院農・食生科)

【目的】Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1)は、細胞の移動や剥落、癌細胞の転移や浸潤に関与している膜結合型セリンプロテアーゼである(1)。本酵素の活性化には、内因性の阻害物質 hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 (HAI-1)の関与が示唆されているが、その詳細は未だ不明である。【方法・結果】2004 年度日本農芸化学会で、HAI-1 との共発現により MT-SP1 の活性化が起こること、活性型 MT-SP1 が培養上清のみから検出されることを報告した。本研究ではサル腎臓由来 COS-1 細胞を用いて、HAI-1 による MT-SP1 の活性化が培養上清と細胞のどちらで起こるのかを検討した。MT-SP1 は細胞表面もしくは細胞内で活性化されることが示唆された。次に、MT-SP1 を分泌型に改変した HAI-1 と共発現させたところ、活性型 MT-SP1 が検出された。このことから、HAI-1 が細胞膜上に存在することは MT-SP1 の活性化に必要ではないことが示された。(1) Tsuzuki et al. *Biochem. J.* **388**, 679-687 (2005)

Membrane-type serine protease 1 (MT-SP1)プロドメインの生物学的意義の解
1B04 明： urokinase-type plasminogen activator (uPA) の活性化における役割
○児島憲二, 都築巧, 伏木亨, 井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】MT-SP1 は高等動物の上皮細胞に発現する膜結合性セリンプロテアーゼである。MT-SP1 プロテアーゼドメインの N 末端側にはプロドメインが存在するが、その生物学的意義は不明である。本研究では uPA の活性化における MT-SP1 プロドメインの役割を検討した。【方法・結果】MT-SP1 のプロおよびプロテアーゼドメインから成る HL MT-SP1 (100 kDa) とプロテアーゼドメインのみから成る L MT-SP1 (40 kDa) を CHO-K1 細胞を用いて調製した。HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中で各リコンビナント MT-SP1 と一本鎖 uPA を 37°C で 7 分間インキュベートし、その後 uPA 活性測定用の合成基質 Glutaryl-Gly-Arg-MCA を加えて 20 分間インキュベートした。反応停止液を加え、370 nm の吸収を測定した。HL MT-SP1 の場合の基質分解量は L MT-SP1 の場合に比べ 1.5 倍であった。このことから MT-SP1 プロドメインが uPA などの高分子基質の認識に関わっている可能性が示唆された。

サーモライシン分子表面への変異導入による酵素活性への効果
1B05 ○辰巳智香, 保川清, 井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】サーモライシン (TLN) は、高濃度 (1-4M) の中性塩存在下で活性化することが知られており、分子表面の電荷が重要であることが示唆されている。今回、TLN の活性中心付近の表面にある Gln128 および Gln225 を改変した変異体を作成し、酵素活性への効果を検討した。【方法・結果】部位特異的変異導入法により変異型 TLN (Q128K、Q128E、Q128A、Q225K、Q225E、Q225A) を作成し、大腸菌 JM109 を宿主として発現させ、培養上清から精製した。それぞれについて酵素活性 (25°C、pH7.5) を測定したところ、Q225A についてのみ、野生型 TLN (WT) と比較して以下に示す差が認められた。①N-FA-Gly-Leu amide (FAGLA) の加水分解活性の pH プロファイルにおいて、アルカリ側の pK_a が 8.1 から 8.5 へとシフトした。②N-Z-Asp-Phe methyl ester の加水分解活性の k_{cat} は 1/4 に低下した。③FAGLA 加水分解活性における、4 M NaCl 存在下の活性化度 (塩非存在下の活性に対する 4 M NaCl 存在下の活性の比) は、WT では 14 倍であるのに対し、Q225A では 10 倍であった。

Co^{2+} によるサーモライシン (TLN) の阻害メカニズムの解析
1B06 ○橋田泰彦, 保川清, 井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】TLN は、活性に必須な 1 個の Zn^{2+} と、構造安定性に寄与する 4 個の Ca^{2+} を含む亜鉛プロテアーゼである。TLN に Co^{2+} を添加すると、2 mM 以下では活性中心の Zn^{2+} が Co^{2+} に置換されて活性が上昇するが、さらに Co^{2+} を添加すると活性は減少する。本研究では、2 mM 以上の Co^{2+} の添加による不活性化機構の解明を目的とした。【方法】1,10-phenanthroline を用いて TLN から Zn^{2+} を除去し、各種濃度の Co^{2+} と Ca^{2+} の存在下で活性を測定した。N-furylacryloyl-Gly-Leu amide (FAGLA) と N-furylacryloyl-Leu-Ala amide (FALAA) を基質とし、加水分解に伴う 345 nm の吸光度変化から反応速度を求めた。【結果】2005 年度農芸化学会大会で、 Ca^{2+} 非存在下では Co^{2+} による TLN の失活が顕著になると報告したが、残存する微量の Ca^{2+} の効果が無視できないことが明らかになったため、この点を改善した。①高濃度 (10 mM) Ca^{2+} では、 Co^{2+} は拮抗的に TLN を阻害した。②低濃度 (0.01 mM) Ca^{2+} では TLN は経時的に失活した。③この失活は一次反応的であり、その速度は Co^{2+} 濃度の上昇に伴って増大した。

1B07 Purification and Characterization of Two Novel Halotolerant Extracellular Proteases from *Bacillus subtilis* Strain FP-133

○E. Setyorini, S. Takenaka, S. Murakami, and K. Aoki (神戸大・自然科学)

【目的】 Halotolerant proteases, showing activity in the absence and presence of salt, are greatly needed in food industries. This study aimed to purify and characterize halotolerant proteases produced by the isolate *Bacillus subtilis* strain FP-133 and to evaluate the prospect of its utilization.

【方法・結果】 Strain FP-133, isolated from a fermented fish paste, was able to synthesize two novel halotolerant extracellular proteases (expro-I and expro-II) showing activity and stability at concentrations of 0-20% (w/v) NaCl. Each protease was purified to homogeneity and characterized. The purified expro-I was a non-alkaline serine protease with an optimum pH of 7.5 and preferred glycine and L-alanine as cleavage sites in peptides. The purified expro-II was a metalloprotease and activated by Fe^{2+} , which has never been reported as a bacterial protease activator.

1B08 Ca^{2+} 非依存性を持つハブ膵臓トリプシノーゲンの一次構造

○渡辺則子, 岩切泰貴, 有馬一成, 米澤弘夫 (鹿大院理工・生命化学)

【目的】 蛇類は獲物を咀嚼, 粉碎することなく丸飲みすることから, 非常に強いが, もしくは安定な消化酵素を持つと考えられる。日本の西南諸島に生息する毒蛇であるハブの膵臓より得られたトリプシンは Ca^{2+} 非感受性であることが分かった。その原因を明らかにするために, ハブトリプシノーゲンの一次構造解析を行った。

【方法・結果】 まず, ハブ膵臓の cDNA ライブラリーを作成し, ハブ膵臓トリプシノーゲンの構造を推定した。さらに, ゲノム DNA の解析を行ったところ, 5つのエキソンと4つのイントロンから構成されていた。 Ca^{2+} 結合部位において, 多くの脊椎動物のトリプシノーゲンでよく保存されているウシでの Glu75 が Ala に置換されていた。この Glu は Ca^{2+} との結合に関係しているとされていることから, ハブでは Ala に置換されることによって, Ca^{2+} との結合性を失うものと推定された。さらに, Ca^{2+} 結合部位に他種のトリプシノーゲンでは見られない Pro が存在しており, これが Ca^{2+} 結合部位を安定化させていることが推定された。

1B09 小麦由来 α -アミラーゼ阻害剤 0.19AI による PPA の阻害に対する NaCl の効果

○李承在、井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】 小麦には多種類のアミラーゼ阻害剤が含まれており, そのうちの 0.19AI はブタすい臓 α -アミラーゼ(PPA)を拮抗的に阻害する。また, PPA の活性は mM レベルの Cl イオンにより 10 倍程度上昇することが知られている。これらの事実に基づき, 本報告では, 0.19AI の阻害物質定数(K_i)に対する NaCl の添加効果を検討した。【方法・結果】 各塩濃度で 0.19AI と PPA を pH 6.9, 30°C で 30 分間インキュベートした後, *p*-nitrophenyl- α -D-maltoside を加え, 反応を開始した。反応生成物 *p*-nitrophenol の増加速度を 400 nm にて連続的に測定し, 反応速度を求め, K_i を算出した。検討した塩濃度は 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 mM である。0.19AI の PPA に対する K_i は 0 M NaCl では 100 ± 23 nM であるが, NaCl 濃度の増加につれて減少した。NaCl により酵素の活性化が最大となる 25 mM 付近での K_i は 36 ± 4 nM で最も小さい値を示した。しかし, 塩濃度を 25 mM 以上に増加させてもほとんど変化が認められなかった。

1B10 β -グルコシルアミジン吸着体による β -グルコシダーゼ精製法の確立 ○藤原冬樹、水谷正治、平竹潤、坂田完三（京大化研）

【目的】 我々は β -グルコシダーゼの強力な阻害剤である β -グルコシルアミジンをリガンドとするアフィニティークラムを開発し、これを用いた β -グルコシダーゼ精製法の確立と、酵素とリガンドの結合メカニズムの解明を目的として研究を行った。

【方法・結果】 チャ葉から部分精製した β -グルコシダーゼを用いて、アフィニティークラムによる精製法を検討した。 β -グルコシダーゼは pH 6.0 で吸着し、pH を 4.0 へ下げることによって pH 変化による溶出精製を行うことができた。一方 β -グルコシルアミジンは精製酵素に対して pH が高いほど阻害活性が強く ($K_i = 17$ nM, pH 6.0)、また pH を下げると阻害活性は低下した ($K_i = 623$ nM, pH 4.0)。阻害活性と酵素活性の pH 依存性から、酵素の酸-塩基触媒残基（グルタミン酸, $pK_a = 6\sim 7$ ）がより高い pH 条件下において負電荷を持つことでアミジノ基の正電荷と静電相互作用している可能性が示唆された。以上の結果、アフィニティークラムを用いた β -グルコシダーゼの精製に pH 変化が有効であることを示した。

1B11 *Aspergillus fumigatus* が誘導的に生産するキトサナーゼの精製及び性質 ○廣瀬圭翼、関 清彦、光富 勝（佐賀大・応生科）

【目的】 我々は *A. fumigatus* が生産するキチン質分解酵素の生物学的役割を明らかにするため、本菌の生産するキトサナーゼを精製し、その酵素化学的性質について検討している。これまでに、*A. fumigatus* が生産する主要なキトサナーゼである 25-kDa キトサナーゼが糖質分解酵素 family 75 に属することを明らかにした。本研究ではグルコサミンで誘導的に生産される 40-kDa キトサナーゼの精製を行い、その性質について検討した。

【方法・結果】 本菌をスクロース含有培地で 1 日間培養し、菌体を集め洗浄後、グルコサミン含有培地に移して培養した。経時的に活性染色を行った結果、25-kDa 以外に 40-kDa 以上の複数のキトサナーゼの生成が認められた。40-kDa キトサナーゼはグルコサミンにより誘導的に生産された。40-kDa キトサナーゼを精製し、その酵素化学的性質について検討した結果、本酵素はエンド型の作用様式でキトサンおよびモノアセチルキトヘキサオースを分解した。また、基質特異性および一般的な性質は 25-kDa キトサナーゼと類似していた。

1B12 糖転移活性を有する植物クラス V キチナーゼの大腸菌による発現 ○林比呂子、平良東紀、深溝慶¹、石原昌信（琉大農・生資科、¹近畿大・農）

我々は植物クラス V に属するソテツキチナーゼ-A (*Cycas revoluta* chitinase-A: Cr Chi-A) が糖転移反応を触媒する初の植物起源キチナーゼであることを明らかにした。本酵素の構造と機能を調べることを目的として、大腸菌における本酵素蛋白質の発現を試みた。部分アミノ酸配列情報をもとに RT-PCR 法によってクローニングされた Cr Chi-A 遺伝子の ORF のうち、N 末端の推定シグナル配列を除く 364 アミノ酸残基をコードする領域を pET-22b ベクターに連結し、大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した。IPTG 誘導後、菌体破碎液の不溶性画分に組換え蛋白質を検出した。組換え蛋白質と精製蛋白質のポリペプチド鎖の同一性を確認するため、両蛋白質のペプチドマッピング及びアミノ酸配列解析を行なった。その結果、精製蛋白質は組換え蛋白質よりも C 末端が 17 残基短いことがわかった。これらのことから Cr Chi-A 遺伝子は翻訳後、N 末端と C 末端が切断され成熟型となることが推察された。現在、成熟型 Cr Chi-A と同じポリペプチド鎖を有する蛋白質の発現を試みている。

抗結核剤候補化合物 γ -D-グルタミル-L-トリプトファンの酵素合成

1B13

○加藤健二¹, 鈴木秀之¹, 熊谷英彦²

(¹京大院生命・統合生命, ²石川県大・生資工研)

【目的】 γ -D-グルタミル-L-トリプトファンは免疫調節物質であり、通常の化学療法と組み合わせて使用すると結核の治療に有効であることが臨床試験により確認されている。一方、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)は γ -グルタミル化合物の加水分解反応とその γ -グルタミル基をアミノ酸やペプチドに転移する反応を触媒する酵素である。今回、GGT の転移反応を利用した γ -D-グルタミル-L-トリプトファンの酵素合成法を開発した。【方法・結果】 D-グルタミンを γ -グルタミル基供与体、L-トリプトファンを受容体として用い、大腸菌の GGT の転移反応による γ -D-グルタミル-L-トリプトファン酵素合成法の最適条件を求めた。反応温度 37°Cにおける最適条件は、D-グルタミン 50mM、L-トリプトファン 50mM、pH9-9.5、酵素濃度 0.2units/ml であり、5 時間反応後の生成物濃度は 33mM であった。生成物が γ -D-グルタミル-L-トリプトファンであることを、NMR と旋光度測定により確認した。

ラン藻 GPX 様タンパク質の発現による植物の光・酸素毒耐性能の向上

1B14

○山本貴史¹, 吉村和也², 武田徹¹, Ahmed Gaber³, 中野長久³, 重岡成¹

(¹近畿大・農・バイオ, ²奈良先端大・バイオ, ³大阪府大・農・応生化)

【目的】 ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) 様タンパク質 (GPX-1, GPX-2) は GSH を基質とせず、NADPH のみを電子供与体とし、膜脂質過酸化物の高度不飽和脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解する (Plant Physiol. 136, 2855-2861, 2004)。そこで本研究では、GPX-2 を葉緑体あるいは細胞質に導入した形質転換シロイヌナズナの種々のストレスによる光・酸素毒耐性能の評価を試みた。

【方法・結果】 GPX-2 を葉緑体あるいは細胞質で発現 (15.3~9.6 nmol/min/mg protein) する形質転換シロイヌナズナ (ApGPX2-11, 16 および AcGPX2-14, 15) は H₂O₂ (10 mM) 処理に対する耐性を示し、細胞内 NADPH/(NADP⁺ + NADPH)比率が減少していた。また両形質転換体は、低温(4 °C)、塩 (100 mM NaCl)または乾燥(2 週間) ストレス下において、野生株と比較して、過酸化脂質生成量が低く抑えられていた。

1B15

Purification and amino acid sequence of green turtle (*Chelonia mydas*) ribonuclease

○Katekaeu S., Torikata T., Araki T. (Kyushu Tokai Univ, Sch of Agric)

Green turtle (*Chelonia mydas*) ribonuclease was isolated from egg white. This enzyme has been purified to homogeneity, following a 2-step of CM-toyopearl cation exchange chromatography. There are two isolated peaks separated by RP-HPLC, which were contained the same molecular weight protein and ribonuclease activity. This indicated that this enzyme might be consisted with two isoforms. This enzyme showed high activity of ribonuclease on SDS-PAGE activity staining and found as a single 13-kDa band on a gel. This enzyme was composed of around 118 amino acid residues and showed the highest similarity of amino acid composition to snapping turtle (*Chelydra serpentina*) ribonuclease. The amino acid sequence was analyzed by protein sequencer and mass spectrometry of peptides cleaved by trypsin, cyanogen bromide, and chymotrypsin. The positions of insertions and deletions in the sequence compared to pancreatic ribonuclease are identical to those in the enzyme from snapping turtle.

1C02 高い形質転換能を示す酵母の分子育種

○内海孝昭、河井重幸、河野恵美、Tuan Anh Pham、村田幸作（京大院・農）

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *pde2*（高親和性 cAMP フォスホジエステラーゼ欠損株）、*spf1*（小胞体局在性 P-type ATPase 型 [基質不明]欠損株）、*pmr1*（ゴルジ体局在性 P-type ATPase 型 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ トランスポーター欠損株）は、高い形質転換能を示す（1）。本研究では、同欠損株を利用して、より形質転換能の高い酵母株の分子育種を試みた。また、*SPF1* の欠損がなぜ高い形質転換能を示すのかを明らかにすべく、*SPF1* の欠損との合成致死遺伝子の探索も行った。

【方法・結果】*PDE2*、*SPF1*、並びに *PMR1* の 2 重および 3 重変異株を作成し、それらの形質転換能を検討した。また、*SPF1* とエンドサイトーシスおよび形質転換関連遺伝子である *PANI* が合成致死性を示すことを明らかにした。尚、本研究は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

(1) Kawai, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317:100-107 (2004).

1C03 酵母の形質転換とエンドサイトーシスにおける Pan1p の機能

○河野恵美、河井重幸、内海孝昭、Tuan Anh Pham、村田幸作（京大院・農）

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換において、アクチンの重合化に関わる Arp2/3 複合体と同複合体の活性化因子 (Pan1p, Vrp1p, Las17p, Myo3/5p) が重要な役割を果たす（1）。これら形質転換因子は、同時にエンドサイトーシス因子でもある。特に、生育に必須のタンパク質である Pan1p は、他の多くのエンドサイトーシス因子と相互作用する。Pan1p の詳細な機能解析により、酵母の形質転換並びにエンドサイトーシスの分子基盤に関する知見が得られる。本研究では、形質転換並びにエンドサイトーシスにおける Pan1p の各領域の機能を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】Pan1p の各領域 (coiled coil 領域、 PIP_2 結合領域、Acidic 領域、proline-rich 領域など) を削除した変異 Pan1p を、*PANI* 温度感受性変異株と完全変異株に導入し、同領域の形質転換とエンドサイトーシスにおける機能を解析した。本研究は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

(1) Kawai, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317:100-107 (2004).

1C04 Analysis of transformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* by a visualization of DNA

○ Tuan Anh Pham, Shigeyuki Kawai, Emi Kono, Takaaki Utsumi, and Kousaku Murata (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【Objective】In transformation of *Saccharomyces cerevisiae* cells, DNA has been proposed to enter into cells via membrane-invagination (1). To elucidate further the transformation process, we attempted to visualize DNA using membrane-impermeable fluorescent reagent for DNA, YOYO-1.

【Methods and Results】Using the DNA complexed with YOYO-1 (YOYO-1/DNA), transformation process was successfully visualized. After incubation of cells with YOYO-1/DNA and PEG, the region around cell surface gave fluorescent light, indicating that DNA was bound around cell surface. Further incubation of the cells in medium, nucleus showed light. This work was partly supported by the PROBRAIN.

(1) Kawai, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317:100-107 (2004).

1C05 耐熱性細菌胞子の圧力発芽に関する研究 ○村上綾，井倉則之，下田満哉（九大院農・生資環）

【目的】 *Bacillus* 属に代表される胞子形成細菌が形成する胞子は物理的及び化学的に高い耐性を有し、殺菌が非常に困難なため、しばしば食中毒や食品の腐敗の原因となる。一方、胞子は発芽により耐性が低下することが知られており、胞子の発芽を促進させる因子として圧力、温度、発芽誘導物質の存在等があげられる。本研究では、これらの発芽促進因子を組み合わせることで、より効率的な殺菌条件を検討することを目的とした。

【方法・結果】 まず、3種の *Bacillus* 属細菌 (*B.subtilis*, *B.atrophaeus*, *B.cereus*) を様々な条件下で圧力処理 (20~60 °C、100~400 MPa) を行ったところ、いずれの菌株も全ての胞子を発芽させることはできなかった。続いて、これら3種の細菌胞子にそれぞれの発芽誘導物質を添加して圧力処理を行った。*B.subtilis* では全ての胞子が発芽したが、他2菌種に関しては未発芽胞子が確認された。以上のことから、発芽における圧力と発芽誘導物質の相乗効果が確認され、またその効果は菌種によって差があることが示唆された。

1C06 *Eikenella corrodens* のクオラムセンシングの歯周病原性への関与 ○阿座上弘行，寺村泉，松永哲郎，加藤昭夫（山口大・農・生物機能）

【目的】 *E. corrodens* は歯周病原性細菌の一つである。我々はその菌体表層に存在するレクチンが本菌の歯周病原性に大きく関与していることを報告してきた。最近、我々は本菌がこのレクチンを介してバイオフィームを形成することを明らかにした。多くの病原微生物において、バイオフィーム形成や毒素生産など病原因子の発現がクオラムセンシング (QS) により制御されている。本研究では、本菌の歯周病原性と QS との関係を調べた。

【方法・結果】 種々のオートインデューサー (AI) のセンサー株を用いて、本菌の培養上清にどのような AI が生産されているかを調べた。その結果、AI-1 の生産は見られなかったが、AI-2 の生産が見られた。そこで、AI-2 生産の鍵となる *luxS* 遺伝子をクローニングした。この *luxS* 遺伝子を大腸菌 DH5 α に導入したところ AI-2 の生産が見られ、本菌の *luxS* 遺伝子が functional であることが示された。さらに、*luxS* 遺伝子欠損株を作成したところ、欠損株ではバイオフィーム形成の増加が見られた。

1C07 大腸菌における *Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼの発現と分泌 ○山川 大輔、田中 秀典、太田 一良（宮崎大・農・応生科）

【目的】 不完全菌 *Aureobasidium pullulans* 由来の菌体外キシラナーゼは、アミノ酸 34 残基から成る分泌シグナル中に大腸菌のシグナルペプチダーゼ認識部位様の配列を含む。本報では、組換えタンパク質の効率的な分泌生産を目的として、本酵素遺伝子 *xynI* のコードする分泌シグナルを利用した大腸菌によるキシラナーゼの発現と分泌について検討した。

【方法・結果】 *xynI* の分泌シグナルを含まない成熟タンパク質コード領域を pUC18 に挿入し、この組換えプラスミドで大腸菌 JM109 を形質転換した。形質転換体を 37°C で LB 液体培地にて培養し、吸光度 (660 nm) 0.2 の時 IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加し *xynI* の発現を誘導した。さらに 4 時間培養を継続し菌体と培養液上清をそれぞれ回収した。菌体破碎液にはキシラナーゼ活性 (61 mU/ml) が検出されたが、培養上清中には検出されなかった。一方、分泌シグナルを含む *xynI* の ORF を導入した形質転換体を作製し、同様に培養した結果、菌体破碎液だけでなく培養上清中にもキシラナーゼ活性 (88 mU/ml) が検出された。

1C08 麹菌によりエタノール耐性が増強した焼酎酵母の遺伝子発現の網羅的解析 ○田中 秀典、田中 淳也、太田 一良（宮崎大・農・応生科）

【目的】我が国の酒類醸造法では麹菌体が酵母エタノール耐性を増強するため、生成エタノールが 20% (v/v)以上の高濃度に達する。本報では、高濃度エタノール発酵系において黒麹菌が焼酎酵母の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

【方法・結果】1%酵母エキス、2%ペプトン、20%ショ糖を含む培地 150 ml に凍結乾燥した黒麹菌 *Aspergillus niger* IFO 6341 株の菌体破碎粉末を 0.1 g 添加し、焼酎酵母 *Saccharomyces cerevisiae* No. 1200 株を 1×10^8 /ml となるように植菌した。30°C で適宜加糖しながら静置培養し、発酵が旺盛な時期（炭酸ガス発生量約 12 g）に集菌した。酵母菌体からホット・フェノール法により全 RNA を抽出し、この全 RNA を用いて GeneChip Yeast Genome 2.0 アレイ (Affymetrix 社)により遺伝子の発現プロファイルを取得した。得られたデータを GeneSpring (Silicon Genetics 社)を用いて解析した結果、*A. niger* を添加しなかったコントロールに比べてエルゴステロール生合成系の遺伝子群の発現が有意に上昇していた。

1C09 耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* GrpE の構造および機能 ○東千華¹、杉本真也¹、中山二郎¹、園元謙二^{1,2} (¹九大院農・生機科、²バイオアーキテクチャーセンター)

【目的】分子シャペロン DnaK の補因子である GrpE は、ヌクレオチド交換因子として機能し DnaK の ATP 依存的なシャペロン機能を活性化する。本研究では、耐塩性乳酸菌 *T. halophilus* GrpE (TGrpE) の構造およびその機能を詳細に解析することを目的とした。

【方法・結果】大腸菌内で発現させた組換え体 TGrpE は CD スペクトル解析の結果、coiled-coil 様二次構造に富むことが示唆され、高塩濃度条件下 (1 M KCl) でその構造は安定化された。次にゲル濾過クロマトグラフィーにより TGrpE のオリゴマー状態を解析したところ、塩濃度に関係なくタンパク質濃度依存的に多量体 (~10-mer) を形成することが示唆された。さらに、TGrpE は様々な塩濃度条件下 (0-1.5 M NaCl および KCl) で ATP 非依存的に 8 M 尿素変性 LDH の活性回復を促進した。これらのことより TGrpE は単独で ATP 非依存的にシャペロン様活性を示すことが明らかとなった。

1C10 Durancin TW49M, a novel bacteriocin from *Enterococcus durans* QU 49 ○Chih-Bo HU¹, Takeshi ZENDO¹, Kohei HIMENO¹, Jiro NAKAYAMA¹, Kenji SONOMOTO^{1,2} (¹Dept. Biosci. Biotech., Fac. Agr., ²Bio-Architecture, Kyushu Univ.)

Purpose: To find out LAB bacteriocins suitable for food industry as biopreservatives.

Method and result: Strain QU 49, exhibiting antibacterial activity against other bacteria including listeria, was isolated from carrot and identified as *Enterococcus durans*. The bacteriocin purified by 3-step method has a MW of 5227.8 Da determined by ESI-MS. Edman degradation analysis revealed the full length of amino acid sequence (54 amino acids) and degenerated primers were constructed to explore the encoding gene. The DNA sequence clarified that this bacteriocin was translated as a prebacteriocin of 72 amino acids and then processed to a mature bacteriocin. Only with 54% identity to enterocin B at the amino acid level (almost at N-terminus), this bacteriocin was regarded as a novel one and designated durancin TW49M.

1C11 *Bacillus subtilis* IM-94 株由来のバクテリオシンの諸性質

○丸山雅史, 藤井朱美, 木場洋次郎 (愛媛大農・応生化)

【目的】食品保存料の使用にあたっては、安全性の点から合成保存料よりも天然保存料に対して関心が高い傾向にある。そこで、発酵食品より抗菌物質生産菌のスクリーニングを試みた結果、枯草菌の一種である *B. subtilis* IM-94 を分離した。本菌が生産するバクテリオシン (IM-94) の生化学的性質について検討したので報告する。

【方法・結果】IM-94 の部分アミノ酸配列についてホモロジー検索した結果、subtilosin A と一致した。双方のバクテリオシンのプロテアーゼ消化物について逆相クロマトグラフィーによる溶出パターンから比較したところわずかな違いが認められた。IM-94 は *B. stearothermophilus*, *Listeria denitrificans* などグラム陽性菌に対して効果を示した。また、ヒト消化液中における安定性について検討したところ、人工胃液中では安定であったが、人工腸液中では完全に失活した。このことから、IM-94 を摂取した場合、腸内で分解され乳酸菌のような有益な腸内フローラには影響を及ぼさないことが推測された。

1C12 ゲラニルゲラニオール誘導体のストレス依存性抗真菌作用

○中林健¹, 臼杵克之介², 藤田憲一¹, 谷口誠¹, 田中俊雄¹
(¹ 阪市大院理・生物地球系, ² 阪市大院理・物質分子系)

【目的】病原性の真菌と言えども宿主体内では熱や酸化ストレスなど様々なストレスを受けており、感染や増殖にとってはストレスを回避する機構が必要とみなされる。本研究では、1-geranylgeranylpyridinium (GGPy) に見いだされたストレス依存性抗真菌作用について解析するとともに、その機構の一端を明らかにしようとした。

【方法・結果】GGPy は低・高浸透圧下に加えて熱ストレス下でも *S. cerevisiae* に対して強い殺菌作用を発揮した。GGPy の殺菌作用は、金属、アルカリ、エタノールなど様々なストレス要因の存在下でも認められた。また、GGPy は種々ストレス下で種々の酵母に対しても同様の致死作用をおよぼすことが判った。PLC 遺伝子欠損株は種々ストレス下では増殖できないが、GGPy の殺菌作用に対しては耐性であった。PLC の活性調節能を有する compound 48/80 にも GGPy と類似の浸透圧ストレス依存性殺菌作用が認められた。

1C13 *Salmonella* Enteritidis の熱ストレス損傷および回復機構の解明

○桐木円香¹, 内藤公貴¹, 本城賢一², 飯尾雅嘉², 宮本敬久²
(¹ 九大・院・生資環, ² 九大・院・農)

【目的】食品中の細菌は貯蔵および加工中の加熱、凍結、乾燥などにより損傷している。本研究では、迅速で確実な食中毒細菌検査法の確立を目的として、*Salmonella* Enteritidis (SE) の損傷および回復機構について検討した。

【方法・結果】非加熱、加熱直後、加熱後緩衝液中で 1 時間保温および液体培地中で回復 1 時間目の SE 菌体から total RNA を調製し、RT-PCR により加熱および酸化ストレス誘導遺伝子転写量を比較した結果、液体培地回復菌体では *clpX*, *katG*, *ahpC* など 10 種の遺伝子転写量が顕著に増加した。これら遺伝子の損傷回復時の役割解明のため、まず、カタラーゼをコードする *katG* の遺伝子破壊株を作製し、カタラーゼ活性、加熱損傷からの回復態度を調べた結果、野生株と同様の活性と回復を示した。そこで、*katG* と同様に過酸化水素スカベンジャーをコードする *ahpC*, *ahpF* 遺伝子破壊株を作製し、野生株との比較を行った。

食中毒菌の農作物への付着機構の解明と付着防止法の開発

1C14

○下八重雅明¹, 下津智志², 本城賢一³, 飯尾雅嘉³, 宮本敬久³

(¹ 九大・院・生資環, ² 九大・農, ³ 九大・院・農)

【目的】近年、生鮮野菜および果実の摂取に起因する食中毒が増加している。本研究では、農作物への食中毒細菌の付着機構解明と付着防止法開発のため、*Salmonella* Enteritidis (SE) の固体表面への付着に関係する遺伝子破壊株を作製し、その性質を調べた。

【方法・結果】まず植物表面への付着に関与すると考えられる SE のセルロース合成酵素をコードする *bacteria cellulose synthesis A* 遺伝子 (*bcsA*) の破壊株を作製した。pKOBEGA 導入 SE の相同組み換えにより得られた数個のカナマイシン耐性のコロニーについて PCR、ゲノミックサザン解析により調べた結果、一株の *bcsA* 破壊株が得られた。得られた遺伝子破壊株に緑色蛍光タンパク質発現ベクターを導入した SE (SE-EGFP: $\Delta bcsA$) を作製した。現在この破壊株と野生株について野菜表面への付着状態を蛍光顕微鏡観察により比較検討中である。

微酸性次亜塩素酸水の殺菌効果と生食用野菜の微生物制御への利用

1C15

○元松藍¹, 芳住あさこ², 本城賢一³, 飯尾雅嘉³, 宮本敬久³

(¹ 九大・院・生資環, ² 九大・農, ³ 九大・院・農)

【目的】平成 14 年に殺菌料として食品添加物に指定された微酸性次亜塩素酸水 (SAHW) は、低い有効塩素濃度で使用可能なことから、幅広い利用が期待されている。そこで、本研究では、SAHW の殺菌効果を調べ、生食用野菜の微生物制御への応用について検討した。

【方法・結果】SAHW 処理直後の生菌数測定結果から、最少発育阻止有効塩素濃度は *B. cereus* および *S. aureus* では 30 ppm、*S. Enteritidis* (SE)、*E. coli* O157 および K-12、*L. monocytogenes* では 5 ppm であった。SE に対する殺菌効果を NaClO、H₂O₂ と比較した結果、NaClO 同様処理直後に生菌数が低下し、速効性であった。次に、レタスの殺菌に応用するため、市販レタスのマイクロフローラを解析した結果、*Flavobacterium* 属、*Xanthomonas* 属、*Pseudomonas* 属細菌などが多かった。このレタスを有効塩素濃度 30 ppm で 5 分間処理しても生菌数はほとんど低下しなかったが、ある種の界面活性剤との併用により生菌数は低下した。

1D02

○ Dinh Thai Nho¹, 永久圭介¹, 平沢敬², 片倉啓雄², 古澤力¹, 塩谷捨明², 清水浩¹. (¹ 阪大院情報・バイオ情報, ² 阪大院工・生命先端工)

【目的】 Organism has an ability of adaptation to various environments surrounding it. Thus, the adaptation process of yeast to ethanol was analyzed by proteome to construct the ethanol tolerant yeast strain.

【方法・結果】 The adaptation process of cells was observed, which was repetitive fermentation of stepwise increasing ethanol. In the medium containing 10% ethanol, the adapted cells could grow faster than the non-adapted cells, with specific growth rates of 0.051 and 0.029 h⁻¹, respectively. At the proteome level, there were some protein spots altered when compared between adapted and non-adapted yeast samples. MALDI/TOF-MS was used for identification of proteins by peptide fingerprinting method. The functions of these proteins were discussed.

1D03

コリネ型細菌における *odhA* 遺伝子発現調節株の代謝フラックス解析

○ 佐藤由康¹, 永久圭介¹, 平沢敬², 古澤力¹, 清水浩¹
(¹ 阪大院情報・バイオ情報, 阪大院工・生命先端)

【目的】 *Corynebacterium glutamicum* がグルタミン酸を過剰に生産する際には、2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC)の酵素活性の低下を伴うことが報告されている。本研究では ODHC 活性に着目し、ODHC のサブユニットの1つをコードする *odhA* 遺伝子の発現調節株を構築し、TCA 回路とグルタミン酸生産経路の分岐点である α -ketoglutarate 周りの代謝フラックス解析から、ODHC 比活性がグルタミン酸生産に与える影響を観察することとした。

【方法・結果】 IPTG 添加により誘導発現可能なベクターを導入して、*odhA* 発現過剰株を構築した。*odhA* を過剰に発現した状態で、Tween 40 添加によるグルタミン酸生産を誘導したところ、ODHC 比活性が比較的高い値で維持されグルタミン酸生産量が半減した。現在、アンチセンス RNA を利用した *odhA* 発現抑制株の構築と合わせ、両発現調節株の代謝フラックスの変動から ODHC とグルタミン酸生産との関係を調べている。

1D04

Burkholderia sp.KU-15 株による 2-ニトロ安息香酸の分解

○ 世羅俊成, 岩木宏明, 長谷川喜衛 (関大・工・生工)

【目的】 ニトロ芳香族化合物は、農薬や染料などの合成に広く利用されており、環境汚染が懸念されている化合物のひとつである。本研究では、ニトロ安息香酸 (NBA) の微生物分解に着目し、土壌より分離した 2-NBA 分解菌の代謝経路の推定を行った。

【方法・結果】 2-NBA を唯一の炭素源・窒素源として集積培養を行い、2-NBA 分解能を有する KU-15 株を得た。この菌株の 16S rDNA 配列を用いて系統解析を行ったところ、*Burkholderia* sp.に近縁な細菌であることがわかった。KU-15 株による 2-NBA の分解経路を推定するため、分解産物の同定を行ったところ、2-NBA の分解にともないアンモニアが培地中に蓄積することが明らかになり、KU-15 株はニトロ基を還元する経路で 2-NBA を分解することが推定された。さらに、アントラニル酸、3-ヒドロキシアントラニル酸、カテコールの蓄積が観察された。

1D05 *Burkholderia* sp. KU-46 株による 2,4-ジニトロフェノールの分解 ○阿部和也, 岩木宏明, 長谷川喜衛 (関大・工・生工)

【目的】ニトロ芳香族化合物は染料や医薬品などの合成原料として使用されており、環境中から検出される。しかし、ニトロ芳香族化合物は微生物分解を受けがたいことから環境中への蓄積が懸念されている。本研究では、アンカップラーである 2,4-ジニトロフェノール (2,4-DNP) を唯一の窒素源として利用できる菌株を土壌より分離し、2,4-DNP 分解経路について検討した。

【方法・結果】2,4-DNP を唯一の窒素源として集積培養を行い、2,4-DNP 分解能を有する KU-46 株を得た。この菌株の 16S rDNA 配列を用いて系統解析を行ったところ、*Burkholderia* sp. に近縁な細菌であることがわかった。KU-46 株による 2,4-DNP の分解経路を推定するため、休止菌体による 2,4-DNP の反応生成物を HPLC と LC/MS を用いて同定した。その結果、4-ニトロフェノールが同定され、本菌株は、グラム陽性菌で報告されている経路とは異なる新規経路で 2,4-DNP を分解していることが示唆された。

1D06 水俣湾由来水銀耐性退化株の *mer* 遺伝子の多様性 ○和才昌史¹、藤原秀彦¹、古川謙介¹、中村邦彦² (¹九大院・生資環、²国立水俣病総合研究センター)

【目的】過去、高濃度の水銀に汚染された水俣湾では、水銀に対して高い耐性・分解能を有する細菌が選択的に生存していた。現在、環境の改善がなされた湾内には、水銀耐性能が退化した細菌が存在する可能性が推察される。本研究では、湾内より水銀耐性能退化株を分離し、水銀耐性の多様性について解析した。

【方法・結果】水俣湾より分離した水銀弱耐性菌について、サザンブロット解析により *merA* (mercury reductase)、*merB* (mercury lyase) の存在を確認した。無機水銀還元活性 (MerA) は X-ray film 法により、フェニル水銀分解活性 (MerB) は生成するベンゼンをガスクロマトグラフにより測定した。その結果、*mer* 遺伝子を有するにもかかわらず水銀に対して感受性を示す菌株を取得し、これらを水銀耐性能退化株とした。退化株の *mer* 遺伝子についてシーケンス解析を行い、既知の *mer* 遺伝子と比較することで *mer* 遺伝子の多様性について考察した。

1D07 細菌「超チャネル」の分子移植によるダイオキシン高分解菌の創成 ○麻生祐司, 宮本裕希子, 橋本渉, 村田幸作 (京大院農・生物機能)

【目的】*Sphingomonas* sp. A1 は細胞表層に形成する体腔と ABC トランスポーターからなる「超チャネル」を介して高分子物質であるアルギン酸を細胞内に取り込む。体腔はアルギン酸濃縮機能を持ち、その形成はアルギン酸の輸送・分解に関する遺伝子群の発現と関係している。本研究では、本遺伝子群をダイオキシン分解菌 *Sphingomonas wittichii* RW1 (RW1 株) に導入することで超チャネルを RW1 株へ分子移植し、ダイオキシン分解能の向上を試みた。

【方法・結果】本遺伝子群を導入した RW1 株 (RW1 (pBE11)) を作製後、アルギン酸と dibenzofuran を添加した無機培地で培養し、経時的に各添加物質を定量した。野生株は 10 mM dibenzofuran を完全分解するのに 3 日以上要したが、RW1 (pBE11) は僅か 2 日で分解した。ウェスタン解析および電子顕微鏡観察から、RW1 (pBE11) はアルギン酸非依存的に超チャネルを形成することが示唆された。本結果は超チャネルの分子移植が高度な微生物分子育種に寄与することを示す。尚、本研究は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

1D08 担子菌類の子実体形成過程におけるキチン合成酵素遺伝子の発現 ○西原幹広、渡邊彰、麻田恭彦（香川大農・生命機能）

【目的】キチンは担子菌類において細胞壁の主要な構成多糖である。本研究では、担子菌類の子実体形成機構を細胞壁の合成制御の面から明らかにするため、*Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ)を対象として、子実体形成過程におけるキチン含量の測定およびキチン合成酵素遺伝子の発現解析を行った。

【方法・結果】ヒラタケの生育段階別および部位別のキチン含量を測定した結果、各部位によってキチン含量が異なることが明らかとなり、子実体形成過程ではキチンの生合成が制御されていることが示唆された。菌類においてキチン合成酵素は複数のアイソザイムから構成され、生体内では各アイソザイムが協調して機能する。我々は、ヒラタケよりクラス II, III, IV キチン合成酵素遺伝子を取得し、これらの子実体形成期における発現量を比較した。その結果、生育段階、子実体の部位によって発現量が変動することが明らかとなり、各クラスのキチン合成酵素に特異的な生理的機能が存在することが示唆された。

1D09 新菌株 *Trichoderma* sp.由来の β -1,3-glucanase による機能性低分子 β -1,3-グルカンオリゴ糖の生成 ○三島啓助¹、守谷健吉¹、小川喜八郎² (¹マスコ、²南九大・食品健)

【目的】シイタケほだ木や子実体から分離した新菌株 *Trichoderma* sp.の生産する真菌類細胞壁溶解酵素系は、シイタケ子実体や酵母細胞壁を完全に溶解し、6~10 糖の機能性 β -1,3-グルカンオリゴ糖を生成する。本酵素の 2,3 の性質を調べたので報告する。

【方法・結果】本酵素を各種カラムクロマトグラフィーにより、分画・精製しエンド型の β -1,3-glucanase が得られた。精製酵素は SDS-PAGE により単一バンドを示し、分子量 30,000 と推定された。最適 pH は 5.0~5.5 で、3.0~5.5 まで安定であった。最適温度は 55~60℃ で、55℃まで安定であった。本酵素は酵母細胞壁、ラミナラン、パストラン、シイタケ粉末に作用して機能性の高い 6~10 糖の β -1,3-グルカンオリゴ糖を生成することが認められた。上記のオリゴ糖はマクロファージのレセプターと複合体を形成することが知られており、機能性を有する低分子 β -1,3-グルカンオリゴ糖の応用の可能性が示唆された。

1D10 糸状菌の多糖類分解酵素 ○永吉恵美、和久田智子、矢野めぐむ、瀧井幸男（武庫川女子大学）

【目的】本研究では、*A.oryzae* の glucoamylase に注目し、麹菌宿主・ベクター系における発現を試み、効率的な多糖類分解系の構築を検討した。

【方法・結果】*A.oryzae* の遺伝子情報を基に、麹菌宿主から glucoamylase 遺伝子 (*glaB*) を取得し、高発現ベクター pNAN8142 に連結後、窒素源選択性培地を用いて、プロトプラスト化した宿主を形質転換した。固体培養には α 化米、液体培養には DP 培地を用い、糖化力を測定した。形質転換体のうち、最も高い糖化力を示す pNANET3-6 は、固体培養において、宿主に対し約 4.2 倍の活性 (1380U/g・こうじ) を示したが液化力は宿主の 1/20 に低下していた。また、固体培養において、小麦フスマや大豆オカラを用いた場合、 α 化米を用いた場合よりも 2-3 倍の糖化力を示した。これは、安価なバイオマス資源の効率的な利用を示唆するものである。

1D11 *Agrobacterium tumefaciens* C58 株のアルギン酸オリゴ糖代謝 ○落合秋人, 三宅統, 橋本渉, 村田幸作 (京大院・農)

【目的】*Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、細胞表層に形成する孔（体腔）にアルギン酸を濃縮し、ABC トランスポーターにより直接細胞内に取り込み、資化する。これらアルギン酸の取り込みと資化に関わる一連の遺伝子はクラスターを形成しているが、*Agrobacterium tumefaciens* C58 株（以下 C58 株）のゲノム上にも、それぞれの遺伝子と高い相同性を示す遺伝子クラスターが存在する。今回、C58 株での本遺伝子クラスターの役割を検討する。

【方法・結果】C58 株を様々な培地で培養したところ、アルギン酸を含む最少培地での生育は認められなかった。しかしながら、アルギン酸オリゴ糖を含む最少培地では顕著な生育を示し、ウエスタンブロット解析によりいくつかのクラスター内遺伝子の発現が示された。また、菌体細胞抽出画分からクラスター内の遺伝子の 1 つである *Atu3025* を単離・同定した。C58 株の本遺伝子クラスターは、アルギン酸オリゴ糖の取り込みと資化に関わると推定された。なお、本研究は、生研センタープロジェクトの一環として行われた。

1D12 全体構造の異なるアルギン酸リアーゼにおける触媒機構の類似性 ○山崎正幸¹、小倉康平²、橋本渉²、村田幸作²、三上文三¹ (¹京大院・農・農、²京大院・農・食生科)

【目的】我々は、スフィンゴモナス属 A1 株由来の 2 種のエンド型リアーゼ、A1-III(38kDa) と A1-II'(25kDa) について、バイオフィルム分解製剤への応用をにらみ、アルギン酸分解機構を検討している。すでに、A1-III は α/α バレル構造をモチーフとし、ループ開閉が関与した反応機構を持つことを提唱した。今回はその A1-II' とのユニークな類似性を報告する。【方法・結果】A1-II' について 1.0 Å 分解能の構造解析、変異解析、基質結合シミュレーション実験を行った。A1-II' は β サンドイッチ構造をモチーフし、水素結合ネットワークにより安定化された活性中心と、それを覆うフレキシブルな 2 つのループを持っていた。全体構造の大きな違いと対照的に、A1-II' は活性中心の構造が A1-III と良く重なり、一つのアロニン残基を酸・塩基触媒とした両酵素に共通な触媒機構を持つことが示唆された。尚、本研究は生研センタープロジェクトの一環として行われた。

1D13 Cyclo(Leu-Phe)酸化酵素が触媒する cyclo(Asp(OMe)-Asp(OMe))の脱水素反応 神崎浩, ○平田里枝, 柳澤恵広, 仁戸田照彦 (岡山大院自然)

【目的】我々は放線菌由来の cyclo(Leu-Phe)酸化酵素が広い基質特異性を有することを見出し、その反応により抗腫瘍剤として有望な dehydrophenylhistin を含む数種の脱水素型環状ジペプチド(Δ CDP)を合成してきた。本酵素は特に芳香族アミノ酸に対して高い親和性を示すが、cyclo(Met-Met)といった芳香族アミノ酸を有さない CDP も基質とするという興味深い事実が明らかとなっている。そこで今回、芳香族アミノ酸を有さない他の CDP、特に酸性アミノ酸残基を有する CDP について反応の進行の確認とその脱水素体の単離を行った。

【方法・結果】酵素反応液を DAD-HPLC 分析した結果、cyclo(Asp-Asp)、CDD や Asp を含む数種の CDP については、脱水素反応の進行が確認されなかったが、CDD のメチルエステル体 CD(OMe)D(OMe)は脱水素体の生成が認められた。次に、その反応液から片側脱水素体と予測される化合物を精製し、各種機器分析により、C Δ D(OMe)D(OMe)と同定した。本化合物は、これまでに単離してきた片側脱水素体と同様、ウニ胚卵割阻害活性を示さなかった。

放線菌由来のメチオニン脱炭酸酵素 ～活性測定法の確立と精製～

1D14

○内富久美子, 田村隆, 左右田健次¹, 稲垣賢二
(岡大院自科・バイオサイエンス, ¹京大名誉教授)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp.590 中に発見された本酵素は、L-メチオニンの脱炭酸反応を触媒し、補酵素としてピリドキサル 5'-リン酸を持つビタミン B₆ 酵素である。本酵素を持つ生物は鞭毛藻やシダなど数種しか見つかっておらず、未だ遺伝子レベルでの解析は一例もないことから、その生理的機能にも興味をもたれる。そこで本酵素遺伝子のクローニングを行い、他の類縁酵素との比較を行うことを目的として、本酵素の活性測定法の改良および精製を行った。【方法・結果】活性測定は、従来產生する CO₂ をマノメーターで測定していたが今回、本酵素の反応産物 3-メチルチオプロピルアミンをアミノオキシダーゼにより酸化し、その際に生成する H₂O₂ 量を定量する方法を確立した。放線菌 *Streptomyces* sp.590 を振とう培養後、超音波破碎を行い、得られた無細胞抽出液を硫酸分画後、疎水、陰イオン、ハイドロキシアパタイト、ゲルろ過の各カラムクロマトグラフィーにより、酵素精製した。

Clostridium perfringens 毒素產生遺伝子検出法の検討

1D15

○篠崎温子¹, 白井篤義¹, 市石卓¹, 井上方晴², 橋本彬子², 神野英毅¹,
(¹日大院生産工・工化, ²日大生産工・応化)

【目的】偏性嫌気性菌 *Clostridium perfringens* は、動物の腸内や土壤中に広く分布している常在菌であり、嫌気条件における増殖が早い。臨床的には感染から腸炎発症まで、短時間で進行するという特徴を有する。しかし、本菌の毒素產生機序は未だ不明な点が多く、毒素タンパクによる検出法を含め、現在の迅速診断法には改善点が多く挙げられる。そこで、菌の有する毒素產生部位の遺伝子のみを増幅・検出することで、遺伝子レベルでの迅速かつ簡便な検出法の確立を目指し、鋭意異検討を行った。

【方法・結果】変法 GAM 寒天培地により純培養した菌体のコロニーをウサギ糞便に混入させヒト模擬糞便とし、フェノール・クロロホルム抽出法、アルコール抽出法等を用いて DNA を抽出した。そして、得られたサンプルを PCR 法、Real-Time PCR 法及び、LAMP 法により DNA を増幅・検出し、増幅法の差による検出感度の比較検討を行った。

1E01 **グミ由来 C 型レクチン CEL-IV とメリビオースとの複合体の X 線結晶構造解析** ○畠山智充¹, 保澤崇夫¹, 楠木正巳² (¹長崎大・工・応化, ²阪大, 蛋白研)

【目的】棘皮動物グミ (*Cucumaria echinata*) 体液中に存在する C 型レクチン CEL-IV は C 型糖認識ドメインが S-S 結合を介して 4 量体を形成しており, α -ガラクトシドに高い特異性を示す。しかしながら, 一般に Gal 認識に必要とされる糖結合部位の QPD 配列が, Man 特異的レクチンに多い EPN 配列となっている。そこで, CEL-IV とメリビオースとの複合体の X 線結晶構造解析を行い, その立体構造ならびに糖認識機構について検討した。

【方法・結果】CEL-IV/メリビオース複合体の結晶構造から, CEL-IV は Cys1, Cys41, Cys151 を介した鎖間 S-S 結合により 4 量体を形成していることがわかった。1 つのサブユニット中には 1 個の Ca^{2+} の存在が確認され, その Ca^{2+} にメリビオース中の Gal 残基の 3 位と 4 位の OH が配位結合していた。また, 糖結合部位近傍の Trp79 により糖の配向が CEL-I など他の C 型レクチンと大きく異なっており, このことが EPN 配列を有するにもかかわらず, Gal 特異性を示す要因となっているものと推察された。

1E02 **イトマキヒトデ由来 C 型レクチンの大腸菌による大量発現とその性質** 田中淳一¹, 倉本政則¹, 沖野 望², 伊東 信², 畠山智充¹ (¹長崎大・工・応化, ²九大院・農・生物機能)

【目的】イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) レクチン (ApL) は, C 型糖認識ドメイン及びそのオリゴマーからなり, GalNAc に高い結合特異性を示す。今回, ApL を大腸菌により大量発現し, その性質について検討を行った。

【方法・結果】ApL 遺伝子を pET-3a ベクターに組み込んだ後, 大腸菌により発現させた結果, ApL は封入体として得られた。そこで, 低濃度の尿素を含む緩衝液によりタンパク質を抽出後, アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過を用いて精製を行った。ゲルろ過により 1~8 量体の異なるサブユニット構成の ApL が得られたが, 会合数が大きいものほど赤血球凝集活性が高いことがわかった。また, 糖結合特異性については, GalNAc に最も高い特異性を示し, 天然型レクチンと同様の性質を示した。結晶化条件を検索したところ, pH 5.5, 4.2 M NaCl 存在下で, 蒸気拡散法を用いて単結晶が得られた。

1E03 **海藻由来レクチンの抗腫瘍効果およびその作用機構に関する研究** 上野真史¹, ○福田勇騎¹, 福田祐介², 菅原卓也¹, 越智ゆかり¹, 秋山浩一³, 増田清造³, 川久保明宏⁴, 加藤敬一² (¹愛媛大・農, ²愛媛大・工, ³愛媛大・総合支援セ, ⁴ヤマキ)

【目的】海藻トゲキリンサイ由来のレクチンである ESA (*Eucheuma serra* agglutinin) は, 細胞表面上のハイマンノース型糖鎖を特異的に認識し, 結合する。このレクチンのガン細胞に対する抗腫瘍効果, およびその作用機構を *in vitro* ならびに *in vivo* において検討した。

【方法・結果】ESA を 3 種のガン細胞株に作用させた結果, BALB/c マウス大腸ガン細胞株である Colon-26 細胞に対して特に顕著な細胞傷害活性を示した。次にこの細胞を標的細胞として, ESA による細胞死誘導経路を, カスパーゼ-3 活性, フローサイトメトリー解析, および DNA ラダー検出により解析した。その結果, ESA はアポトーシスによる細胞死を誘導することが示唆された。また, Colon-26 細胞を背部皮下に移植した担ガン BALB/c マウスに対して ESA 尾部静脈投与を行ったところ, その腫瘍体積の増加が著しく抑制された。

1E04 異種生物由来ストレスタンパク質 70 の免疫細胞に対する結合特性解析 ○西川慧、谷史人、北島直文（京大院農・食品生物）

【目的】これまで我々は、マウス細胞質 Hsp72 の C 末端領域を欠失させると B 細胞系 P388D1 細胞への結合能が低下することを見出してきた。今回、Hsp70 の C 末端領域の配列が多様性に富むことに着目し、異種生物由来 Hsp70 の各種免疫細胞に対する結合能を検討した。

【方法・結果】本実験では、マウス細胞質 Hsp72、ホウレンソウ Hsc70、乳酸菌 DnaK および大腸菌 DnaK を選択した。BL21 Star (DE3)株を用いてこれらのタンパク質を発現させたが、発現量の少なかったホウレンソウ Hsc70 については、大腸菌でのコドン使用頻度を改善した Rosetta 2 (DE3)株を用いることで収量を増大させた。P388D1 およびマウス腹腔マクロファージに対する各種 Hsp70 の結合能をフローサイトメトリーで解析したところ、P388D1 にはマウスとホウレンソウの Hsp70 が、腹腔マクロファージにはマウスと大腸菌の Hsp70 がそれぞれ結合した。本実験で得られた結果は、各々の免疫細胞が Hsp70 の C 末端領域の相違を認識しており、その認識機構は細胞種によっても異なることを示唆している。

1E05 マウスを用いた呼気ガス測定法による澱粉の消化性評価 ○松本年弘、北島直文（京大院農・食品生物）

【目的】食品中の難消化性成分が大腸に達すると、その一部は腸内細菌により資化される。その際、水素やメタンなどのガスが最終産物として産生され、血液を介して呼気中に排出される。呼気ガス測定法は呼気中の水素やメタンを測定することで、間接的に腸管内での発酵の様相を知る方法である。本研究では呼気ガス測定法によりマウスを用いて、食品成分とりわけ澱粉の難消化性、腸内発酵を評価する方法の確立を目的とした。

【方法・結果】クローズドコロニーマウス 2 種に難消化性成分である未糊化の馬鈴薯澱粉を投与し、一定時間毎の呼気分析を行った結果、個体差が比較的大きく、かつ同種内で 2 種類以上の経時変化のパターンが観察された。次に、同様の実験を近交系マウス 5 種で行ったところ、種間による経時変化の相違は大きかったが、同種内では一定の値が得られ、特に A/J, C3H/He マウスが良い結果を与えた。現在、本マウスを用いて、澱粉の腸内細菌叢に与える影響を検討している。

1E06 ラットのコレステロールと脂肪酸代謝に及ぼす大豆親水性ペプチドの影響 實方綾子、岩本和香子、○佐藤匡央、今泉勝己（九大院農・生機科）

【目的】分離大豆タンパク質（SPI）をプロテアーゼで加水分解することによって得られる大豆親水性ペプチド画分（SWP）が SPI と同様に血清コレステロール濃度低下作用および D6D 活性抑制作用をもつかどうかについて検討した。

【方法】SPI、および SWP さらに対象としてカゼインをタンパク質源として 20%のレベルで含む AIN-93GTM 基本飼料を 4 週齢 SD 系雄ラットに 2 週間給餌した。

【結果】摂食量、体重増加量、肝臓重量は群間で差異がなかった。血清のコレステロール濃度はカゼインと比較して、SWP と SPI 摂取によって低下した。SPI と SWP の摂取はカゼインと比較して肝臓ミクロソームリン脂質のリノール酸を増加させ、アラキドン酸を減少させた。アラキドン酸の低下は $\Delta 6$ -不飽和化酵素の発現抑制に基づく活性の低下に基づいていた。

【結論】SWP は SPI と脂質代謝に対して類似の影響を及ぼすことが示唆された。

1E07 NKG ケフィアによる脂肪細胞におけるグルコース取り込み増強機構の解析
○伊東花織¹、照屋輝一郎²、奥田聡子¹、片倉喜範²、徳丸千之助³、徳丸浩一郎³、白畑實隆² (¹九大院・生資環、²九大院・農院、³日本ケフィア (株))

【目的】2型糖尿病ではインスリン抵抗性を原因とした標的臓器におけるグルコース取り込み能の低下が起こる。本研究ではマウス由来の 3T3-L1 脂肪細胞における発酵乳 NKG ケフィア(ケフィア)のグルコース取り込み増強機構の解析を行った。

【方法・結果】ケフィア水溶性画分はインスリン刺激の有無に関わらず、脂肪細胞におけるグルコース取り込みを増強した。ケフィアが PI 3-キナーゼ経路に与える影響を調べた結果、PI 3-キナーゼ阻害剤 wortmannin はグルコース取り込み増強効果を完全に阻害しなかったためケフィア活性成分は複数の作用点を有することが示唆された。MAP キナーゼファミリータンパク質の各阻害剤を用いたグルコース取り込み検定によりケフィア活性成分の p38 経路、ERK 経路への関与が示唆され、p38、ERK の活性化が western blotting によって確認された。現在、ケフィア処理がグルコーストランスポーターに与える影響を検討中である。

1E08 細胞老化プログラムにおける TAK1 の寄与
○伊藤紋子¹、片倉喜範²、藤木 司²、白畑實隆²
(¹九大院・生資環、²九大院・農院)

【目的】本研究では、炎症性シグナル経路の下流キナーゼとして知られる TAK1 の細胞老化プログラムにおける寄与を明らかにすることを目的として、研究を行った。

【方法・結果】まず TAK1 の細胞老化誘導能を評価した。その結果、ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) に TAK1 を導入することで、細胞形態の扁平化、細胞増殖抑制及び老化マーカーである酸性 β -ガラクトシダーゼ活性の上昇が観察され、TAK1 は細胞老化誘導能を有することが明らかとなった。さらに、長期培養を行うことで、テロメアの短縮に伴う細胞老化が誘導された TIG-1 において、TAK1 が活性化されていることがウエスタンブロットにより明らかとなった。以上の結果より、TAK1 は、細胞老化プログラムの制御因子として中心的な役割を担っていることが明らかとなった。

1E09 Origin and evolution of *STAT*, *WNT* and the nuclear receptor superfamily, *NR*
○S. Abe, E. Sasaki, T. Kishida, K. Ebihara (Fac. Agriculture, Ehime Univ.)

Phylogeny of *NR* for lipid metabolism (*RXR*, *RAR*, *PPAR*), steroid hormone reception (*GR*, *MR*, *ESR*, *AR*), and other (*THR*, *VDR*, *TR2*, *TR4*), and *WNT* members were studied in lower and higher vertebrates. Analysis of their genomic organization showed considerable conservation of exon organization and a nearly universal exon linkage in *NR* was found. An *RXR* and *NR2F1* were identified in *Ciona intestinalis* with similar genomic structures, and *NR2F1* at 5q14 shared the same structure with human *PPARG* at 3p25, indicating the *NR2F1* is the direct source of *NR* and *NR2F1* was already created from *RXR* before evolution of *Ciona*. Ten *WNTs* in *Ciona* shared similar genomic structure to vertebrates, and analyses of flanking genes demonstrated evolutionary linkages of *NR*, *WNT*, and *STAT* to the human 3p14-26 and also to 1q21-42, 2q11-35, 5q12-35, 6p21-25, 12q11-13, 17q11-21 and 22q11-13 syntenies. Homodimer or heterodimer formation and their functional overlap might play a key role in the coordinated evolution and differentiation of *NR*, *WNT*, and *STAT* members.

1E10

Origin and role of intergenic splicing of *UbiE2* and *Hig1-4* in mouse

S. Abe, ○E. Sasaki, (Faculty of Agriculture, Ehime University)

Hig1 ファミリーは、ブリで最初に発見された *YGHL1* (D85880) と呼ばれた遺伝子のホモログで、植物から動物にいたる幅広い生物種において、ゲノム構造を高度に保存する。本研究では、マウス、ヒト、魚類およびホヤのゲノムを比較することによって、*Hig1* (9F4, 3p22.1), *Hig1-4* (15F1, 12q13) および *Clst11240* (11D, 17q21.31) が、ホヤから魚類に進化する過程で生じたパラログを起源とすること、およびマウスの腎臓では *Hig1-4* が隣接する *UbiE2* と遺伝子間スプライシングし融合遺伝子として発現することを明らかにした。一方、ヒト 12q13 では *UbiE2* と *HIG1-4* が *CIG* (cancer induce gene) をはさんで並んでおり、*UbiE2* と *HIG1-4* の融合した発現は困難であると考えられた。*Hig* ホモログの周辺領域には *STAT* や *WNT* および *NR* ファミリー (*RAR*, *PPAR*, *THR*, *VDR*) を含む Synteny が存在し、*Hig* ファミリーがこれらと協調進化した可能性が高い。マウス腎臓での遺伝子間スプライシングは、新しい遺伝子の生成と機能の獲得という遺伝子進化の観点からも興味深く、その機能解析を進めている。

1E11

染色体・動原体・ヘテロクロマチンを可視化したマウス C3H 細胞のライブイメージングと微小管重合阻害剤 indanocine の有糸分裂への影響

○渡辺 沙奈美、杉本 憲治 (大阪府大院・生命環境)

【目的】我々は染色体・動原体・ヘテロクロマチンの三つを可視化したマウス C3H 細胞を樹立し、微小管の重合阻害剤として知られている indanocine がこれらの細胞内構造の動態に与える影響についてリアルタイムで調べる事を目的とした。

【方法・結果】細胞に微小管重合阻害剤の一つである indanocine を添加し生きたまま蛍光顕微鏡下で観察を行った。10nM 添加した際には核膜が崩壊し染色体が散在した後、染色体が複数の極様構造を中心に集合して分裂を停止する様子が観察された。また、30nM 添加した際には核膜が崩壊し染色体が散在してその後散在した状態のまま分裂を停止している様子が観察された。このように indanocine は有糸分裂期の前期から前中期の染色体の中心体周辺への集合や赤道面への整列に影響を与え、その添加濃度によって異なる形態変化を示した。

1E12

グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼと RanBPM によるアンドロゲン受容体転写制御機構の解明

○泰永涼子、原田直樹、山地亮一、乾博、中野長久(大阪府大院・応生化)

【目的】近年、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) は解糖系酵素以外の多くの機能を持つタンパク質と認識されている。GAPDH はアンドロゲン受容体 (AR) と結合し、また前立腺癌細胞においては GAPDH の発現レベルが増加する。そこで本研究では GAPDH が AR の転写活性に及ぼす効果とその調節機構について検討した。

【方法・結果】アンドロゲン応答配列を組み込んだベクターを作製し、Luciferase reporter アッセイによって GAPDH が AR の転写活性を促進することを明らかにした。さらに、GAPDH による AR の転写活性化に関与するタンパク質を検索するために、GAPDH を bait とした酵母 Two-Hybrid アッセイを行った結果、AR の転写活性化因子である RanBPM を候補タンパク質として得た。*in vitro* 及び *in vivo* 解析によって、GAPDH が RanBPM と結合することを示し、さらに GAPDH が RanBPM と相乗的に AR の転写活性を高めることを明らかにした。

1E13 **BRI₃ はアンドロゲン受容体の転写活性を抑制する** ○吉元貴子, 中尾元幸, 山地亮一, 乾博, 中野長久(大阪府大院・応生化)

【目的】 BRI₃ は BRICHOS ドメインを持つ BRI ファミリー (BRI₁₋₃) メンバーである。BRI₃ は β -amyloid precursor protein (APP) の切断酵素の β -site APP-cleaving enzyme 1 と相互作用し、さらに BRI₃ と BRI₂ は APP と相互作用することが報告されている。本研究では BRI₃ の機能情報を得るために、BRI₃ の局在を検討し、BRI₃ と相互作用するタンパク質を検索した。

【方法・結果】 RT-PCR 実験より、BRI₃ が脳や精巣を含む様々な組織で発現していることが判明した。また組換え体 BRI₃ を COS-7 細胞で発現させたところ、細胞膜や核周囲で観察された。さらに酵母 Two-Hybrid システムを用いたスクリーニングにより、BRI₃ と相互作用する候補タンパク質として、AR の転写活性促進能を持つ RanBPM を得た。BRI₃ は AR コレギュレーターのコンセンサス配列 (LXXLL または FXXLF) に似た FXXLL 配列を持っているので、AR の転写活性に及ぼす BRI₃ の効果を検討したところ、BRI₃ がテストステロンによって活性化した AR の転写活性を抑制することが判明した。

1E14 **エリ蚕中腸で発現する 2 種のペプチドグリカン認識タンパク質(PGRP)遺伝子** ○橋本和彦, 山野好章, 森嶋伊佐夫 (鳥取大農)

【目的】 バクテリア細胞壁ペプチドグリカン (PGN) は、昆虫において、抗菌性タンパク質をはじめ様々な生体防御遺伝子の発現を誘導する。PGN 認識タンパク質 (PGRP) は、カイコ体液から最初に単離され、その後、種々の昆虫及び脊椎動物からその cDNA がクローニングされている。本研究では、今までに知られている鱗翅目昆虫型 PGRP とは異なる 2 種の PGRP cDNA をエリ蚕 (*Samia cynthia ricini*) 幼虫からクローニングし、ノーザンブロット法によりその発現を解析した。

【結果】 2 種の PGRP cDNA (1A および 1B) は、ショウジョウバエ PGRP-LB と高い相同性を示した。PGRP-1A は中腸において恒常的に高レベルで発現しており、PGN あるいはバクテリアの注射により脂肪体で低レベルの発現誘導が認められた。PGRP-1B は PGN の注射により中腸の他、脂肪体、血球で発現が誘導された。また、1A、1B ともに LB などの一部の PGRP に特異的なアミダーゼ活性部位を有していた。

1E15 **Adiponectin 発現制御遺伝子の網羅的解析** ○田島 亜佳里, 立花 宏文, 山田 耕路 (九大院農院 生機科)

【目的】 Adiponectin は脂肪細胞でのみ特異的に発現する生理活性タンパク質であり、その発現低下は糖尿病や動脈硬化を惹起するが、Adiponectin を補充することでその病状は改善する。これまでに Adiponectin の発現制御関連因子についての研究が行われてきたが、それらはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、Adiponectin の発現を制御する遺伝子の網羅的スクリーニングを試みた。

【方法・結果】 Adiponectin のプロモーター活性が上昇した細胞のみが生き残る薬剤選択系を構築し、その細胞にマウス胚由来の遺伝子断片ライブラリーを導入した。遺伝子断片を導入した細胞に薬剤添加後、薬剤耐性クローンを選択し、その細胞から導入遺伝子断片を回収し、その由来遺伝子を同定した。その結果、Adiponectin の発現を制御する可能性のある遺伝子として数種類の遺伝子を同定した。

1F02 リパーゼを用いた無溶媒系エステル化の平衡解析 ○小林敬¹, 永尾寿浩¹, 渡辺嘉¹, 寺井忠正², 島田裕司¹ (¹阪市工研, ²大工大院)

【目的】リパーゼを用いた無溶媒系でのエステル化は、簡便性、生産性の高さなどの利点を有しており、工業的にも有用な反応系である。本反応系において生産性を左右する要因の1つに反応平衡がある。しかし、系が反応成分を高濃度で含んでおり、理想溶液とは大きく異なるため、平衡解析は不十分であった。そこで、本研究では食品素材などへの応用が期待されるオレイン酸メントールエステルの酵素合成について、生産性と反応平衡の観点から検討し、平衡定数に与える反応液組成の影響を検証する。

【方法・結果】オレイン酸とメントールを種々のモル比で混合し、規定量の水の存在下、30℃で *Candida rugosa* 由来リパーゼを用いて、反応平衡に達するまで攪拌した。その結果、オレイン酸とメントールを等モルで混合したときに生産性が最高となった。また、平衡定数を算出した結果、平衡定数は反応液の油相の組成に依存し、メントールまたはオレイン酸過剰時には小さくなった。

1F03 アントシアニン系色素の安定性に関する分子計算 ○小原蓉子¹, 藤本佳則², 森 義裕¹, 山本 健², 小川浩一², 直島好伸¹ (¹岡山理大総合情報, ²日本食品化工)

【目的】アントシアニン系天然色素に対する立体配座解析計算を行い、その安定性の要因を探ると共に、オリゴ糖の添加によるアントシアニンの退色抑制について検討、解析する。

【方法・結果】赤キャベツや紫コーンなどに含まれるアントシアニン色素分子を構築した後、その構造を立体配座探索プログラム MacroModel により調整した。ついで、LowMode 法を組み入れたモンテカルロ計算を行い、最小立体エネルギー構造から 20kJ/mol 以内の立体配座 285 個を算出した。さらに、それら立体配座に対するクラスタ解析計算を繰り返し行い、最終的に 17 個の類似コンホメーション構造を得た。類似構造は何れも、色素分子中のシアニン骨格に有機酸の芳香環平面がほぼ平行に覆いかぶさるように配置(スタック構造)しており、そのことが色素の発現や安定性に寄与していると考えられる。目下、アントシアニン色素に対するニゲロオリゴ糖の退色抑制作用や関連する分子計算について検討中である。

1F04 分子計算により酵素リパーゼのエナンチオ選択性の発現機構を探る ○ 森 義裕、直島好伸 (岡山理大総合情報)

【目的】酵素リパーゼが様々な有機化合物に対して示すエナンチオ選択性の発現機構を解明するために、リパーゼと有機分子の相互作用を生命分子計算によって追跡する。

【方法・結果】これまで、我々が合成研究に用いてきた2種類の酵素リパーゼと芳香族や脂肪族エステル計10種類をコンピュータ上に構築し、適当な分子計算で構造を整えた。その後、リパーゼの活性中心付近に基質エステルの鏡像体を配置し、フレキシブルドッキング計算、続いて Mixed MCMM/LLMOD 法によるコンホメーション探索計算を行った。さらに、算出された酵素-基質複合体の中から、配座エネルギーがより低く、且つ活性中心セリンのアルコール酸素とエステル分子のカルボニル炭素との間の C-O 原子間距離がより短いものを選択し、その動きを 100ps の分子動力学計算により追跡した。その結果、何れの複合体においても、R-体の C-O 原子間距離の方が S-体よりも短いことが判明した。目下、フラグメント分子軌道法によるリパーゼ-基質エステル複合体の量子化学計算を鋭意検討中である。

二次元電気泳動のためのダイナミックスポット法の開発

1F05

○柏原 仁¹, 岸本通雅², 奥村弘一³, 下野善弘⁴, 大政健史¹,
大竹久夫¹ (¹阪大院・工・生命先端, ²京工織・工芸・物質工,
³ホリバ・バイオテクノロジー, ⁴堀場製作所)

【目的】二次元電気泳動(2-DE)法には再現性の問題、2-DE ゲル画像の解析に当たって、染色時間や人為的誤差が生じるなどの問題がある。そこで我々は、2-DE の新たな解析法「ダイナミックスポット法」を提唱した。この方法は画像データの時間変化を用いて解析するため、現像時間の違いによるゲル画像の変化や解析誤差を最小限に抑えられると期待できる。また、安定した画像撮影ができる装置(Smart Imager)と新たな画像解析ソフト(Cancer8)を内蔵した Smart Imager システムを共同開発し、ダイナミックスポット法の実験的評価を行った。

【方法・結果】*Escherichia coli* W3110 と京都大学付属病院より譲渡して頂いた肝臓正常細胞と癌細胞をサンプルとして 2-DE を行い、ゲルの染色には銀染色法を行った。どのサンプルでもダイナミックスポット法で検出できたスポット数は従来法より 40%以上増加した。

低コストでできる蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動技術の確立

1F06

○榊原陽一¹, 松下佳代¹, 森永浩通², 甲斐孝憲², 水光正仁¹
(¹宮崎大・農・応生科, ²雲海酒造)

【目的】タンパク質の網羅的解析であるプロテオーム解析において、二次元電気泳動はプロテオームを分離し、その全体像を把握するために有効な手法である。今回手軽にできる蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の条件検討を行ったのでここに報告する。

【方法・結果】タンパク質のラベルは、コハク酸イミド活性型の蛍光標識色素を使用し、タンパク質中のリジン残基のアミノ基をラベルした。一次元目等電点電気泳動は pH レンジ 3-10 の範囲の IPG ストリップを使用して行い、二次元目は SDS-PAGE を行った。二次元電気泳動後の蛍光イメージを取り込んだ後、解析ソフトで定量解析を行った。蛍光標識色素によるタンパク質のラベルは、変性条件下で行うことで再現性良く、均一にラベルすることができた。本方法は、二次元電気泳動イメージ解析ソフトを使用し、内部標準ゲルイメージで補正をすることで統計的に定量解析できることが示された。

1F07

グライコミクス的手法を用いた PmtA の標的タンパク質の同定と機能解析

○堀隆太, 岡拓二, 後藤正利, 古川謙介(九大院生資環)

【目的】本研究は、糸状菌 *Aspergillus nidulans* における O-結合型糖鎖の機能解明を目的とし、二次元電気泳動法により O-マンノース型糖鎖付加の初発酵素である protein O-mannosyltransferase A (PmtA)の標的タンパク質の探索を試みた。

【方法・結果】*A. nidulans* 野生株である FGSC26 株及び *A. nidulans pmtA* 遺伝子破壊株である P3 両株を MM 培地で 24 時間培養後、集菌した。菌体を破碎後、遠心分離法により細胞質画分、細胞壁画分、及びミクロソーム画分に分離し、それぞれの画分からタンパク質の抽出を行った。また、細胞壁画分から、O-結合を介して共有結合している細胞壁タンパク質を 30 mM NaOH により抽出した。FGSC26 株及び P3 株由来の各タンパク質の二次元電気泳動解析を行った。その結果、特に細胞壁タンパク質画分及びミクロソーム画分において両株間にタンパク質の泳動パターンに顕著な変化が見られた。これらのタンパク質は PmtA による制御を受けているものであると予想される。

脂質アルデヒドを標的としたリピドーム解析

1F08

○竹田清夏, 河合慶親, 寺尾純二
(徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学)

【目的】脂質過酸化で生じるアルデヒドはその高い反応性から生体傷害への関与が示唆されている。本研究では生体内の主要な多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸とドコサヘキサエン酸の酸化から生じるアルデヒドについて GC/MS にて一斉解析することを試みた。

【方法・結果】各脂肪酸メチルエステルについて調製したヒドロペルオキシドを Fe^{2+} 存在下、Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)中 37°Cで酸化分解した。アルデヒド基をペンタフルオロベンジル(PFB)化した後、その他の官能基はトリメチルシリル化により誘導体化を行い GC/MS にて分析した。一斉検出は PFB 化物に特異的な m/z 181 における選択イオン検出により行った。その結果、グリオキサールとマロンジアルデヒドは共通して検出され、アラキドン酸から n-6 系に特異的なヘキサナール等が、ドコサヘキサエン酸から n-3 系に特異的な 4-ヒドロキシ-2-ヘキセナール等が検出された。計 30 種類のアルデヒドの一斉検出が可能となった。

モノリス型シリカカラムを用いたクロマトグラフィーによるポリプレノール類の分離

1F09

○馬場健史^{1,3}, 福崎英一郎¹, 水口博義², 中澤慶久³, 小林昭雄¹
(¹阪大院工・応生, ²京都モノテック, ³日立造船)

【目的】カラム骨格と流路が一体となったモノリス型シリカカラムは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の新しい固定相として注目されている。また、これを溶融シリカキャピラリーに充填したカラムでは、分析精度の向上や溶媒消費量の低減などが期待される。本研究ではモノリス型シリカカラムを用いたHPLCによる各種ポリプレノール類の分離を試みた。

【方法・結果】100×4.6 mm I.D.のロッドカラムを用いた系では、高流速による分析時間の短縮およびカラムの連結による分離の向上について検討し、それぞれにおいてモノリス型カラムの有用性が示された。キャピラリーカラムを用いた系では、 α 末端が不飽和型のポリプレノールと飽和型のドリコールの分離に成功し、また、トチュウ葉由来ポリプレノール画分において、これまで未同定であったドリコール体の存在を明らかにした。

順相クロマトグラフィーでのウロン酸の挙動

1F10

○垣田浩孝¹, 上嶋洋¹, 井上國世² (¹産総研, ²京大院農・食生科)

【目的】ウロン酸はアルドースの第一級アルコール基の代わりにカルボキシル基が導入されたものでありアルデヒド基の性質と酸の性質を持つ。酸の性質を持つゆえに、ウロン酸は、順相クロマトグラフィー用カラムを用いる中性糖分析条件下での分離が困難である。ウロン酸の順相系での分析条件を確立するため、移動相の pH と移動相への塩類添加を検討した。

【方法・結果】順相クロマトグラフィー用カラムとして TSK Gel Amido-80 (A) と TSK Gel NH2-60 (B) を用いた。ウロン酸は市販品を移動相に溶解して用いた。アセトニトリル/水の移動相では、Aカラムでは、ウロン酸はイオン排除され素通り位置に溶出した。一方、Bカラムではウロン酸はゲルに吸着され溶出しなかった。移動相への塩の添加により、ウロン酸は分子量が等しい中性糖と同様の保持挙動を示すことが明らかになった。

1F11 C-reactive protein (CRP) 定量の高感度化と臨床的意義の研究

○伊藤逸雄¹，神野英毅²，福田梓³，関口敏史³

(¹日大院、生産工、応化、²日大生産工、³日大生産工学部)

【目的】急性期タンパク CRP 定量法は臨床検査法として用いられているが、さらに高感度化必要がある。CRP は正常血中でも微量に存在し、炎症性疾患や組織の変性・壊死が生じるとさらに CRP 血中濃度が上昇する特徴をもつ。本研究ではアミノ酸を用いてスペーサーとしたラテックス試薬を迅速かつ高感度に作製し、正常者、患者血清で比較検討した。

【方法・結果】カルボキシル基修飾ラテックスに WSC-NHS 法でアミノ酸スペーサーを結合させ、遠心分離して粒子を洗浄し、再度 WSC-NHS 法にて CRP 抗体を結合させた。ブロッキングには BSA を用い、Tris-HCl 緩衝溶液で洗浄し未反応活性エステルを加水分解した。最終的に 0.5%(w/v)抗 CRP 抗体化学結合ラテックス試薬を作製した。高感度に作製したラテックス試薬は LPIA200 を用いて 5ng/ml～100ng/ml まで測定でき、臨床検体（ヒト血清）の加齢黄斑変性症と肝疾患患者の CRP 量を測定し、それぞれの上昇値を臨床的に検討した。

オーロン類のハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性

1G03

○福本浩美¹、萩原愛²、濃添都紀²、森本正則²、駒井功一郎²
(¹近畿大院農・応生化、²近畿大農・応生化)

【目的】オーロンは植物の黄色色素として天然に存在し、種々の生理活性を持つフラボノイドである。本研究では、オーロンの新規な生理活性として昆虫摂食阻害活性を評価し、これらの構造活性相関を検討することを目的とした。

【方法・結果】各種フェノールを出発物質としてエーテル化を経由した分子内環化反応を行い、対応するクマラノン合成した。各種クマラノンは、種々の置換基を持つベンズアルデヒドとの縮合反応によりオーロン類を合成した。生理活性評価は、ハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性試験を実施した。置換基を持たないオーロンの昆虫摂食阻害活性は低く、B環にメトキシル基を導入したオーロン類に高活性が認められた。また、B環欠損体であるクマラノンについては、ベンゼン環へのメトキシル基よりもメチル基導入が高活性を示した。これらの傾向はフラボン類の場合と同様な傾向であった。

6-メチル-3-ピリジルエーテル誘導体(UD-5)の幼虫成育に及ぼす影響

1G04

○藤田雄大¹、桑野栄一¹、塩月孝博² (¹九大院・農、²農生資研)

【目的】高い早熟変態誘起活性を示す ethyl 4-[4-methyl-2-(6-methyl-3-pyridyloxy) pentyloxy]-benzoate (UD-5) がカイコ幼虫に対して、血液中の Ecdysone 分泌に影響を与えず、JH esterase (JHE) の分泌誘導を伴って抗 JH 活性(早熟変態誘起)を示すことを明らかにしたので、さらにその生物活性について検討した。

【方法・結果】カイコ及びハスモンヨトウの幼虫に対して供試化合物のアセトン溶液を局所施用し、4 齢期以前に誘導される早熟蛹化の有無、あるいは体色の変化を調べた。UD-5 はカイコ幼虫に対し、3 齢期に処理すると薬量依存的に 4 齢期における早熟変態を誘導した。また、2 齢期に処理しても、2 度脱皮して 4 齢期に変態を誘導した。4 齢期に処理すると、低薬量でのみ弱い早熟変態誘導活性が見られた。一方、UD-5 はハスモンヨトウ幼虫に対し早熟変態は誘導せず、JH アゴニストのメソプレン処理と同様、体色の淡色化を顕著に誘導した。UD-5 が昆虫種によっては、JH 活性も有することが示唆された。

新規抗幼若ホルモン活性物質の合成探索

1G05

○白橋浩光 芦邊希代 山下春菜 山田直隆 桑野栄一(九大院農)

【目的】抗幼若ホルモン活性を示す 4-[2-(6-methyl-3-pyridyloxy)butyloxy]benzoate(EMP)をリード化合物として構造改変を行い、より高い活性を有する化合物を創製することを目的とした。

【方法・結果】生物検定はカイコ 3 齢あるいは 4 齢幼虫に供試化合物のアセトン溶液を局所施用し、4 齢期に JH 欠乏により誘導される早熟蛹化により評価した。アルキル側鎖を長くした 2-(6-methyl-3-pyridyloxy)hexyloxy 体が強い活性を示したので、hexyl 部位を固定して種々の誘導体を合成した。その結果、6-methyl-3-pyridyl 部位を phenyl 基、3-pyridyl 基、6-methylphenyl 基、3-chlorophenyl 基に変換しても同程度の活性を示した。また、ベンゼン環上の置換基としては ethoxycarbonyl、methoxycarbonyl 基のみが活性を示し、propoxycarbonyl、butanoyl、nitro 基では活性を消失した。ethoxycarbonyl 基は経口による生物検定でも活性を示したが、carboxyl 基は活性を示さず、ester が活性本体である事が示唆された。

1G06 昆虫の抑制性神経受容体に対する EBOB の多様な作用 ○石田知春、伊原誠、松田一彦（近大院・農・応生化）

【目的】昆虫の神経には、抑制性受容体として GABA 受容体(GABAR)とグルタミン酸受容体(GluCl)が存在するが、 $[^3\text{H}]4'$ -ethynyl-4-*n*-propylbicycloorthobenzoate(EBOB)は GABAR に対して選択的に作用するプローブとして結合実験に使用されている。しかし我々は、EBOB が GABAR のみならず、GluCl に対しても阻害作用を示すことを見出した。今回、電気生理学的手法を用いて、GABAR と GluCl に対する EBOB の作用について詳しく調べたので報告する。

【方法・結果】ワモンゴキブリ培養神経細胞の GABAR および GluCl に対する EBOB の作用をホールセルパッチクランプ法により解析した。EBOB は静止状態および活性化状態の GABAR および GluCl に作用し、受容体の脱感作を促進するとともに、その応答の最大値を抑制した。GABAR および GluCl の応答に対する EBOB の抑制作用は、EBOB を高濃度で処理した場合にはひとつの定常状態に達したが、低濃度で処理した場合には 2 段階の定常状態に達した。このような作用が他の昆虫の抑制性受容体に対しても見られるのかどうか、現在検討中である。

1G07 ムキタケ(*Panellus serotinus*)の病原菌 *Trichoderma* に対する抵抗性機構 ○作野えみ、谷 央子、脇川宏太、蒲原邦行¹、時本景亮²、 中島廣光（鳥取大農、¹佐賀県立林試、²菌蕈研）

【目的】ムキタケ栽培において *Trichoderma* 属菌による菌床汚染の被害が問題になっている。これまでの研究からムキタケの菌株によっては *Trichoderma* 属菌に対して抵抗性を示すことが明らかになっている。本研究では 5 種のムキタケ菌株 (SPs-7, 11, 48, 61, 75)の抵抗性と諸性質を比較し、いくつかの異なる抵抗性機構を見出した。今回は SPs-48 について報告する。

【方法・結果】ムキタケ SPs-48 と *T. harzianum* を麦芽寒天培地で対峙培養した。菌体と培地をメタノールで抽出後、各種クロマトグラフィーを用いて精製し、*T. harzianum* に抗菌活性を示す化合物 1 を得た。各種機器分析を行い、化合物 1 を clavilactone A と同定した。5 種のムキタケ菌株を同時に対峙培養し、それぞれの clavilactone 生成量を調べた結果、SPs-48 以外では生産されていないことが明らかとなった。

1G08 タンニンの生体内挙動に関する研究（第 2 報） ○井口歩¹、伊東秀之¹、吉田隆志²、波多野力¹（¹岡山大院医歯薬、²松山大）

【目的】今までに種々の薬用植物から数多くの加水分解性タンニンの単離、構造解明が行われ、さらに抗酸化作用をはじめとする様々な生理活性について報告されてきている。しかし、加水分解性タンニンが実際に生体内でどのような挙動を示し、機能を発揮しているかは全く未解明である。そこで、ゲンノショウコの主タンニンである Geraniin のラット経口投与後の尿中代謝物の検索を行った。

【方法・結果】SD 系雄性ラットを 24 時間絶食後、Geraniin のアラビアゴム末懸濁液(50 mg/head)を経口投与し、48 時間後までの自然排泄尿を採取した。採取した尿サンプルは、酵素(β -glucuronidase, sulfatase)による脱抱合化を行った後、各種カラムクロマトおよび分取 HPLC により分離、精製を行い、既に報告（日本薬学会第 125 年会）した 3 種の代謝物に加え、新たに 1 種の代謝物を単離した。その構造は各種スペクトルデータに基づき、3,9-Dihydroxy-8-methoxy-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one と決定した。

1G09 *Penicillium brasilianum* Batista JV-379 株の生産する brasiliamide 類の生合成経路について

○大久保 薫, 藤田 智之, 林 英雄 (大阪府大院・生命機能)

【目的】*P. brasilianum* JV-379 株の生産する brasiliamide 類はカイコに対し痙攣活性を示し、天然物にはまれな構造を有する。そこで brasiliamide 類の生合成経路の探索を目的とし、予想される前駆体の取り込み実験を行った。

【方法・結果】Brasiliamide 類の前駆体はその構造から L-phenylalanine であると予想された。そこで [*phenyl*-¹³C]₁-L-phenylalanine (50 mg/L) を添加した YpSs 液体培地 (2.5 L) を用いて、JV-379 株を 2 週間静置培養した。得られた培養液を酢酸エチルにより抽出し、その抽出物から brasiliamide A (13 mg) を単離した。得られた brasiliamide A の ¹³C-NMR スペクトルから、予想された炭素原子に ¹³C の取り込みを確認することが出来た。今回の結果から、brasiliamide 類は L-phenylalanine の二量体を中間体として生合成されると強く示唆された。

1G10 ゴマ種子の抗酸化性リグナンであるセサミノールの生合成

○片山健至, 小堀里恵, 鈴木利貞, 並木満夫¹, 田代 亨²
(香川大農,¹おいしさの科学研究所,²千葉大園芸)

【目的】ゴマ種子には主要なセサミンとセサモリンに加えて、フェノール性であり抗酸化性のセサミノール、ピノレジノール並びにセサモリノール等のリグナン類が存在する。しかしながら、ゴマリグナン類の生合成には不明な点が多く、特にゴマに固有のセサミノールの生合成は全く研究されていない。本研究では、その解明を目的として、¹⁴C 標識した前駆体 L-フェニルアラニン (Phe) のゴマ (*Sesamum indicum*) 種子へのフィーディング実験を行った。

【方法・結果】L-[U-¹⁴C]Phe 溶液の投与方法を種々検討し、ポット栽培した植物体 2 品種 (三重大 1 号と Chinese 36) の未成熟さく果内に L-[U-¹⁴C]Phe 溶液 (10mM) を 20 μl 注入して 1 週間代謝させたところ、2 品種ともにその放射能が、種子中の遊離のセサミノールと 7-エピセサミノールに取込まれることを初めて見出した。後者への取込み率は、両品種とも前者の 8-9% であった。種子以外のさや中から、放射性の両リグナンは検出されなかった。

1G11 ヤエヤマサソリの毒液に含まれるペプチド成分の分析

○宮下正弘, 大槻純子, 花井陽介, 中川好秋, 宮川恒 (京大院農・応用生命)

【目的】サソリの毒液には多くのペプチド成分が含まれており、そのほとんどは神経系に作用する。日本では、八重山諸島などにヤエヤマサソリ (*Liocheles australasiae*) が生息しているが、その毒液の成分や生理活性についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、ヤエヤマサソリの毒液の化学的性状と生理活性を明らかにすることを目的として、毒液の昆虫に対する作用を調べるとともに LC/MS 分析を行い、毒素成分の単離を試みた。

【方法・結果】石垣島にて採取したヤエヤマサソリより毒液を採取し、昆虫 (コオロギ) に対する毒性を注射法により測定した。その結果、昆虫一個体あたり毒液 5 μg を投与すると顕著な麻痺活性が見られた。毒液を LC/MS 分析に供したところ、分子量 500~9000 のペプチド成分が多種含まれていることが明らかとなった。最も含量の多い成分 (分子量 7788) を HPLC により単離し、そのアミノ酸配列を決定した結果、このペプチドは 4 つのジスルフィド結合を有し、その配列に既知のサソリ毒素との相同性はみられなかった。

1G12 植物病原菌 *Botrytis cinerea* の生産する新規抗菌物質

○谷 央子、越野広雪¹、作野えみ、中島廣光（鳥取大農、¹理研）

【目的】糸状菌代謝産物中にイネいもち病菌のメラニン生合成阻害物質を検索する過程で、植物病原菌 *Botrytis cinerea* の培養濾液中に抗菌物質の存在を見いだした。活性物質を単離し、構造を明らかにするとともに抗菌活性を調べたので報告する。

【方法・結果】本菌を麦芽浸出培地上で 24°C、2 週間静置培養した。培養後、イネいもち病菌に対する抗菌活性を指標に培養濾液の抽出物を各種クロマトグラフィーを用いて精製し、無色針状結晶の化合物 **1** と油状の化合物 **2**、**3**、**4** を得た。NMR を中心とした各種機器分析を行った結果、化合物 **1** はピロン環、エーテル環及びエステル結合した脂肪酸からなる新規化合物であることがわかった。化合物 **2-4** は **1** の類縁体であった。イネいもち病菌に対する抗菌活性を調べた結果、化合物 **2** と **4** の MIC は 12.5 μmol であり、化合物 **1** と **3** の MIC は 100 μmol であることがわかった。

1G13 ヒスチジンキナーゼの選択的 protein-protein interaction 阻害剤の開発

○平瀬創太、平徳久、古田英司、伊東潤二、岡本忠、内海龍太郎、北山隆（近大院農・バイオ）

【目的】多剤耐性菌の増殖を抑制するため、従来の代謝系阻害型抗生物質と異なる、細菌情報伝達系(two-component system : TCS)阻害型の新規抗生物質の開発研究を行っている。本研究では、ヒスチジンキナーゼ(HK)の *In vivo* 二量体阻害評価を用い、新規な protein-protein interaction 阻害剤の探索を行った。

【方法・結果】2-アルキル置換イミダゾール誘導体を出発物質として、N 上に種々のアルキル鎖を導入した。その結果、1-Dodecyl-2-isopropylimidazole(I-8-15)が YycG(必須 HK)の二量体形成を阻害し、HK 自己リン酸化阻害と異なる作用機構で TCS を制御することをはじめて見いだした。また、YycG を有する多剤耐性菌にも選択的生育抑制効果を示すことも明らかとした。

1G14 新規 cinnamic acid 4-hydroxylase 阻害剤の探索

○三枝秀之 洪淳星 山田直隆 桑野栄一（九大院・生資環）

【目的】演者らは既に 2-(3-fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazoline-5-thione(YK62)が cinnamic acid 4-hydroxylase(CA4H)阻害活性($I_{50}=0.13 \mu\text{M}$)を示すことを報告している。今回、YK62 の CA4H 阻害様式の検討、*in vivo* における CA4H 阻害活性の検討を行った。

【方法・結果】*Populus kitakaminesis* 由来 CA4H を導入した酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)より発現させ、調製した粗酵素を用いて *in vitro* 酵素阻害検定を行い、Lineweaver-Burk Plot による阻害様式を検討したところ、YK62 の CA4H 阻害は混合型阻害であり、YK62 の 2 位ベンゼン環 *p* 位が水酸化された代謝物が観察された。YK62, cinnamic acid の基質との親和性を示す K_m 値はそれぞれ 8.0×10^{-7} 、 $1.5 \times 10^{-5} (\text{M}^{-1})$ であった。一方、ソバ(*Fagopyrum esculentum* Moench)幼鞘を用いて、anthocyanin 生合成に対する影響を検討したところ、YK62 は 100 μM で anthocyanin 生合成に影響しなかったが、処理後 72 時間後には cinnamic acid, salicylic acid を control に比べそれぞれ 5 倍、3 倍蓄積させた。

1G15 **ステビオール化合物群の DNA ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ阻害活性と
その応用** ○水品善之^{1,2}, 栗山磯子¹, 吉田弘美^{1,2}
(¹神戸学院大・栄養, ²神戸学院大・ライフサイエンス産学連携センター)

【目的】 ステビオシドは天然甘味料であり、天然にはステビオシドをはじめとする多種類のステビオール化合物が存在する。我々は植物から単離・精製、もしくは微生物を用いて変換したステビオール化合物群の DNA ポリメラーゼ(pol)、DNA トポイソメラーゼ(topo)、ヒト癌細胞増殖抑制活性、マウス耳を用いた抗炎症活性を測定した。

【方法】 酵素阻害活性は常法に従った。ヒト癌細胞増殖抑制活性は Molt-4 cell を用いて、MTT 法で測定した。抗炎症活性測定は起炎剤として TPA を用いて実施した。

【結果・考察】 12種類のステビオール化合物群のうち、isosteviol だけが pol を阻害して、最も強く topo II を阻害した¹⁾。また isosteviol が最も強くヒト癌細胞の増殖を抑制して、抗炎症活性も見られた¹⁾。ステビオール化合物の構造と活性の相関を考察する。

¹⁾ Y. Mizushina *et al.* (2005) *Life Sciences* in press.

2A01 酵母でのアミロイド型シスタチン発現系を用いたアミロイド抑制成分の検索 ○近澤 咲子、原田 哲仁、阿座上 弘行、加藤 昭夫（山口大・農・生物機能）

【目的】本研究者は、以前に、酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いてアミロイド型ニワトリシスタチン（I66Q）を分泌させると、野生型シスタチンと異なり、モノマー・オリゴマー・凝集体の生成が分泌段階で生成することを明らかにしている。本実験では、この系を用いて、食品由来のアミロイド抑制成分の簡便な検索を行うことを目的とした。

【方法・結果】アミロイド型ニワトリシスタチン（I66Q）変異体 cDNA を、*Pichia pastoris* に形質導入を行った。得られた形質転換酵母にアミロイド抑制成分として期待されるカテキン、ミリセチンを培養液に加え、3日間メタノール誘導を行った後、培養上清の分泌パターンを評価した。その結果、カテキン、ミリセチンともに培養上清における凝集体、オリゴマー種の生成が減少していた。このことから、カテキン、ミリセチンは、アミロイド抑制成分として有効であると考えられる。また、抑制成分を入れることで、分泌パターンが異なることから、このアッセイ系は、アミロイド抑制成分の検索に有効である。

2A02 甘味タンパク質ソーマチン I の *Pichia pastoris* による分泌発現 ○井出信幸、榎田哲哉、北畠直文（京大院農・食品生物）

【目的】熱帯植物由来のソーマチンは強い甘味を呈し、少なくとも5種類のタンパク質多型（I,II,a,b,c）が存在するとされている。本研究では、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いてソーマチン I の高分泌発現系の確立を試みた。

【方法・結果】既知のソーマチン II 塩基配列をもとにプライマーを設計し PCR にて cDNA のクローニングを試みた結果、今までに同定されていないソーマチン遺伝子が得られた。この遺伝子を発現ベクター pPIC6 α に挿入し *Pichia pastoris* による分泌発現をジャーファーマンターを用いて行った。培養上清をウェスタン解析に供した結果、培養上清中に組換え型ソーマチンの分泌が確認された。陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した後、組換え型ソーマチンの N 末端アミノ酸配列を調べたところ N 末端にベクター由来の数残基が付加していた。この精製組換え型ソーマチンを用いてヒトによる官能検査を行ったところ、植物由来のソーマチン I と同等の甘味閾値を示した。

2A03 高知県の優良酵母の特性を利用した製パン ○相模遥香¹、茂野光正²、渋谷稔³、上東治彦⁴、加藤麗奈⁴、加藤伸一郎⁵、永田信治¹（¹高知大農生資、²ペロリ、³小田象製粉、⁴県工技セ、⁵高知大遺伝子）

【目的】パンや清酒の発酵に用いる *Saccharomyces cerevisiae* は、食品に特徴的な風味を与える役割を担っている。これまでに発酵力は強いがマルトース資化性が弱い、くろがねもち酵母とやぶつばき酵母を用いて、長時間発酵により特徴的な風味をもつパンを焼成した。今回はさらに強い発酵力を有する野生酵母を分離し、これらの野生酵母と高知県内の清酒醸造に用いられる高知酵母を製パンに利用することを試みた。【方法・結果】海洋試料や植物試料を用いて YM15 培地で野生酵母の単離を行なった。分離株を YM15 培地で培養し、清酒酵母より糖分解能が高い菌株を選択した。清酒小仕込み試験において清酒酵母に比べるとアルコール発酵力は劣っていたが、くちなし酵母とまてばしい酵母はマルトース資化性が強く、特徴的な香気性を示した。これらの野生酵母と、高知酵母とその変異株を用いて、直捏法や中種法、一次発酵時間を検討することにより、香り高い良質のパンが焼成された。

Application of Globin-Sugar Conjugates to Bakery Products
2A04 ○Aree INNUN, Yuanxia SUN, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA
(Agr. Kagawa Univ.)

【目的】 Colorless Hb (Globin; Gb) possesses various functional properties such as water holding capacity, solubility, foaming, gelling and emulsifying. In the study, Gb glyated with keto-hexose and aldo-hexose through Maillard reaction to improve its basic functional properties. The purpose of this study was to improve the qualities of dough and bread products by adding glyated Gb.

【方法・結果】 Rheological characteristics of dough determined by Farinograph showed that the addition of native Gb significantly increased water absorption. The addition of Gb glyated with keto-hexose pronouncedly improved dough qualities as shown in decrease of weakening and extended stability compared to native Gb. Specific volume of bread products fortified by glyated Gb was larger than that fortified by native Gb. Rheological properties by the creep measurements showed that the addition of glyated Gb provided softer and more elastic bread than native Gb.

Functional Properties of BSA (Bovine Serum Albumin) Glyated with Rare
2A05 Sugars ○Melin CHUAMANNOCHAN, Yuanxia SUN, Masahiro OGAWA,
Shigeru HAYAKAWA (Agr. Kagawa Univ.)

【目的】 Functional properties of protein can be improved by glyating protein with reducing carbohydrate compound through Maillard reaction. BSA was glyated with two rare sugars, D-Psicose and D-Allose, and their C-3 epimers, D-Fructose and D-Glucose. Some characteristics and functional properties of the samples were determined. 【方法・結果】 The mixture of BSA and 4 sugars in powder form was incubated at 50°C and 35% relative humidity for 48 hr. The degree of glyation, by OPA method and SDS-PAGE, of aldose-glyated samples were higher than ketose-glyated samples. Browning intensity, fluorescence intensity and free radical scavenging activity, using ABTS and DPPH, of rare sugars-glyated samples were higher than general sugars-glyated ones. Products from each stage of Maillard reaction were different depending on individual sugar. BSA glyated with sugars maintained high emulsifying activity and emulsion stability.

2A06 タンニン酸の渋味発現における唾液タンパク質の役割
村上裕子、○北畠直文 (京大院農・食品生物)

【目的】 タンニン酸は口腔内において収斂性の渋味を惹き起こす。このタンニン酸による渋味発現については不明な点が多い。本研究では、タンニン酸、唾液タンパク質の相互作用と口腔内における渋味発生との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 タンニン酸はシグマ社製を用い、ヒト耳下腺から分泌される唾液を採取して実験に供した。渋味閾値の測定はヒトによる官能検査法を用いた。耳下腺唾液にタンニン酸を添加すると、タンニン酸濃度上昇に伴い沈殿が生じた。SDS-PAGE の解析から唾液中の塩基性プロリンリッチプロテイン (bPRP) がタンニン酸濃度に依存して特異的に沈殿することが明らかになった。沈殿が生じるタンニン酸濃度はタンニン酸の渋味閾値と良い対応を示した。また、耳下腺唾液を、口腔外へ流出させる器具を装着した状態でタンニン酸溶液を口腔内に投与したところ、渋味を呈しなかった。このことから、タンニン酸の渋味発現には耳下腺唾液、とりわけ bPRP が重要な役割を果たしているものと結論した。

2A07 大豆タンパク質の渋味に関する研究

○塚副成, 北島直文 (京大院農・食品生物)

【目的】タンパク質は通常無味である。しかし、酸性 pH に調整した乳清タンパク質溶液は渋味を呈することが報告された(H. Sano et al., J. Dairy Sci., 88, 2312, 2005)。本研究では大豆タンパク質に着目し、渋味発現の確認およびその発現機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】脱脂大豆より抽出した大豆タンパク質、およびその主成分であるグリシニン、コングリシニンを単離した。それぞれについて pH 3.5 および pH 7.5 の条件でヒト官能試験を行ったところ、pH 3.5 のタンパク質溶液は渋味を呈することが明らかとなった。pH 4.5 における大豆タンパク質沈殿形成量と、渋味の関係を調べたところ、沈殿量の増加とともに渋味強度の増加が観察された。また、耳下腺唾液タンパク質を単離し、グリシニンおよびコングリシニンと酸性条件で混合した。混合物の上清と沈殿に関して SDS-PAGE 解析を行ったところ、耳下腺唾液タンパク質は沈殿画分にはほとんど観察されなかった。このことより唾液タンパク質は大豆タンパク質の沈殿形成、渋味発現には関与していないものと思われる。

2A08 大豆タンパク質のプロテアーゼ加水分解に伴う断片の凝集反応と熱処理の関係

○中野幹生, 井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】これまでに分離大豆タンパク質 (SPI) の subtilisin Carlsberg (E) による加水分解に伴うペプチド断片の凝集反応を解析してきた。今回は SPI、7S 画分、11S 画分に対する熱処理と、それらを E で加水分解した時に生じる断片の凝集反応との関係を検討した。

【方法・結果】脱脂大豆粉から分画した SPI、7S 画分、11S 画分を pH 8.0 のリン酸 Na 緩衝液に溶解した。SPI、7S 画分、11S 画分溶液 (各溶液濃度は 10 mg/ml) を 50-90°C で熱処理した。熱処理溶液を pH 8.0、37°C で E (1.0 μ M) により加水分解した。加水分解に伴う断片の凝集を OD₆₆₀ の濁度変化で追跡した。さらに、SDS-PAGE により E による大豆タンパク質の加水分解過程を調べた。非加熱溶液では断片の凝集に基づく濁度の上昇は観察されなかったが、60°C 以上で熱処理した溶液では観察された。また、加熱大豆タンパク質は非加熱大豆タンパク質より速やかに E によって分解された。熱処理することで E による大豆タンパク質の分解が促進され、生成する断片が変化し、断片の凝集が生じると考えられた。

2A09 大豆タンパク質由来の新規オピオイドペプチドに関する研究

○安居院俊, 大日向耕作, 吉川正明 (京大院農・食生科)

【目的】大豆 β -conglycinin β -subunit 中には人乳 β -casein 由来のオピオイドペプチド β -casomorphin-4 に相当する YPFV 配列が存在する。そこで、該当配列を有するペプチドを合成し、それらのオピオイド活性を評価すると共に、 β -conglycinin β からオピオイドペプチドが生成する条件を検討した。

【方法・結果】まず、 β -conglycinin β に含まれている YPFV、YPFVV および YPFVVNA を合成し、それらのオピオイド活性をモルモット回腸アッセイ系で測定したところ、IC₅₀ 値はそれぞれ、20 μ M、8 μ M および 3 μ M であった。次に、 β -conglycinin β の第 318~333 残基に相当するモデルペプチド VIPAAYPFVVNATSNL を合成し、elastase で消化したところ AYPFVV が生成した。さらに、leucine amino peptidase で消化したところ YPFVV が得られた (収率 36.5%)。YPFVV の生理作用については検討中である。

2A10 Phenolics isolated from black and pigmented brown rices, their antioxidant and enzyme inhibitory activities

Robert Yawadio, Shinji Tanimori, ○Naofumi Morita
(Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Prefecture University)

Two anthocyanins (cyanidin-3-O- β -glucoside and peonidin-3-O- β -glucoside) and two other phenolics (Ferulic acid and α -tocopherol) were isolated from black and pigmented brown rices (*Oryza sativa* L. *japonica*) as raw materials and their complete structures were determined by spectroscopic analyses. Anthocyanins extracted from black rice were cyanidin-3-O- β -glucoside (85.0%) and peonidin 3-O- β -D-glucoside (15.01%). Phenolics identified were ferulic acid (85.7%) and α -tocopherol (14.3%). The DPPH scavenging activity tested was the decreasing order of BHA, α -tocopherol, ferulic acid, cyanidin-3-glucoside, and peonidin-3-glucoside. In contrast, the aldose reductase inhibitory activity was in the following decreasing order: cyanidin-3-glucoside, quercetin, ferulic acid, peonidin-3-glucoside and tocopherol.

2A11 ラクトパーオキシダーゼ (LPO) システムの抗菌性機能の解析 ○宮内 和則、小川 雅廣、早川 茂 (香川大農・食化)

【目的】LPO とは、乳中に含まれるタンパク質で抗菌性を持つことが知られている。LPO システムの抗菌作用機構の一つとして、菌体の SH 酵素の失活による菌の死滅が考えられている。しかし、その作用機構は不明な点が多い。そこで、SH 酵素である Papain を用いて作用機構のモデル実験を行った。また、LPO システムを阻害する食品成分とその作用機構について検討した。

【方法・結果】LPO システムを作用させた Papain の活性を測定した。4 時間まで測定したところ、Papain は反応時間とともに失活していった。また、Papain の SH 基を測定した結果、活性と同様に SH 基も反応時間とともに減少していった。したがって、LPO システムの作用機構の一つとして、SH 酵素の失活が関与しているということが考えられた。さらに、食品成分による LPO システムへの影響を、Papain 活性測定により調べた。その結果、NaCl、BSA、スクロースを添加することにより、SH 酵素を失活させる LPO システムの働きが阻害された。

2A12 希少糖を結合した β -ラクトグロブリンの抗酸化作用 ○中川順子、孫媛霞、小川雅廣、早川茂、何森健 (香川大農・食化)

【目的】還元糖とタンパク質を混合して乾燥状態で加温すると、タンパク質のアミノ基と糖のカルボニル基の間でメイラード反応により複合体が形成される。この複合体は様々な機能特性を有している。本研究では、希少糖 D-アロース (All) と D-プシコース (Psi) を修飾した β -ラクトグロブリン (β -Lg) の抗酸化作用について調べた。

【方法・結果】 β -Lg は All、Psi 及び対照糖 D-グルコース (Glc)、D-フルクトース (Fru) とともに乾燥状態で 50°C、相対湿度 55% で 48 時間保温した。糖の反応度合を評価するため β -Lg の遊離アミノ基量を調べると、結合数は All と Glc で多く、Psi と Fru で少なかった。次に、All と Psi を混合した状態で β -Lg と反応させたところ、All だけでなく Psi も結合することが分かった。All、Psi を付加した β -Lg において、DPPH ラジカル消去作用はいずれも高い値を示し、優れた抗酸化活性を有することが明らかになった。これらの複合体は食品の酸化を抑える食品素材として利用できると考えられる。

2A13 タマネギ外皮抽出物のアンジオテンシン変換酵素活性に及ぼす影響

○瀬部和美, 宇野香代子, 白山由香, 進藤直文 (西九州大・健康栄養)

【目的】 タマネギ鱗茎部にはプロトカテキュ酸など、数種のポリフェノール化合物が存在し、これらが DPPH ラジカル消去能、血糖上昇抑制作用があることを確認した。また、ポリフェノール類には血圧上昇抑制作用があるとの報告がある。そこで今回は、タマネギ外皮抽出物がアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】 基質溶液 (Hip-His-Leu) に ACE、さらにタマネギ外皮水抽出液、またはプロトカテキュ酸を加え、37°C で 0~30 分間反応させた。この反応溶液を TLC 後、分解により生成した馬尿酸、または His-Leu のスポットを TLC デンシトメーターにて定量した。その結果、タマネギ外皮抽出液は明らかに ACE 活性を阻害することがわかった。また、タマネギ外皮に多く含まれるプロトカテキュ酸にも同様に ACE 活性の阻害がみられたことより、タマネギ外皮抽出液の血圧上昇抑制作用はプロトカテキュ酸の作用によるものと考えられた。

2A14 ボイルしたブタおよび牛肉中の脂質過酸化由来アルデヒド、4-ヒドロキシノネナールの生成に及ぼす NaCl 添加の影響

○境 正、清水佑季子、河原 聡 (宮崎大学農学部応用生物科学科)

【目的】 NaCl 添加が調理した畜肉中の脂質過酸化由来有毒アルデヒド、4-ヒドロキシノネナール (HNE) の生成に及ぼす影響を調べる目的で本研究を行った。

【方法・結果】 ブタおよび牛肉に 0、1 および 2% になるように NaCl を添加後、100°C の熱湯中でボイルした。試料を 0°C にて貯蔵し、経時的に HNE 含量の変動を測定した。脂質過酸化の指標としてマロンアルデヒド (MA) 含量も測定した。

貯蔵期間中、ブタ肉中の NaCl 添加区の HNE 含量は、対照区に比べ有意に低かった。牛肉中の HNE 含量は貯蔵 2 日目まで添加区と対照区では有意な差がなかったが、3 日目では NaCl 添加区の HNE 含量は対照区に比べ有意に低かった。この結果はボイルしていないブタおよび牛肉の結果とは逆であった。他方、MA 含量の変動結果は NaCl 添加がボイルしたブタおよび牛肉の脂質過酸化の進行を促進することを示していた。

2A15 海藻多糖類の食品への利用に関する研究

○坂田美保, 恵良聖子, 浅川牧夫 (熊本大, 教育)

【目的】 ある種の多糖類は特有な粘性、乳化性および保水性などを有しており、様々な分野で利用されている。本研究では、八代海・有明海で得た海藻多糖類を有効利用するため、海藻多糖類のレオロジー特性に着目し、食品への利用を比較検討した。

【方法・結果】 海藻粉末から熱水抽出し、上清にエタノールを加えて海藻多糖類を得た。①海藻多糖類粉末を 40°C/90%RH/24hr に放置後、更に 25°C/35%RH/24hr に放置し、重量の変化を保湿度として算出した。②海藻多糖類を乳化剤として 20%大豆油からなる O/W 乳化剤を調製し、乳化物の粒子径および乳化保持性を比較検討した。③E 型粘度計により粘性および Casson 式により降伏値を算出し、保水性および乳化性との関連性を検討した。これらの実験結果より、海藻多糖類は対照物より高い保湿度および乳化性が認められた。このことにより海藻多糖類は食品の加工適性を改善、増強および拡大するための添加物として期待できると考えられる。

2A16 耐塩性 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの醤油醸造への応用

○木嶋恭子、南博道、鈴木秀之（京大院生命・統合生命科）

【目的】醤油の主要な旨味成分はグルタミン酸 (Glu) であるが、醤油麴の産生するグルタミナーゼは耐塩性が低く醸造条件下では十分に作用していないと考えられる。一方、枯草菌 *Bacillus subtilis* の γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は耐塩性が高く、また D445A 変異体は γ -グルタミル基転移活性を有さず加水分解反応のみを触媒することを明らかにしてきた。これらの酵素を利用して Glu 含量のより多い醤油を得ることを目的とした。【方法・結果】醤油もろみ中に野生型・変異型両酵素をそれぞれ添加し、経時的に Glu 濃度を測定した。その結果、変異型 GGT を添加した醤油の Glu 濃度は酵素を添加しなかったものと同程度であったが、野生型 GGT を添加したものは 20 mM 程度 Glu 含量が増加し 95 mM 程度になった。官能試験を行ったところ、この程度の濃度の差は旨味の差として感知されがたく、50 mM の差があればより旨味が強いと認識されることが分かったことから、さらに酵素添加量を増やすなどすれば旨味の増した醤油となることが示唆された。

2A17 バナナ追熟に対するエチレン作用阻害剤 1-MCP の抑制効果

○エレナ・トメ・パキデン、菅沼俊彦、北原兼文、橋永文男
(鹿児島連大院・鹿児島大農)

【目的】エチレンによる果物の追熟防止剤として 1-MCP (1-メチルシクロプロペン) が米国企業により開発され、まもなく、国内でこの薬剤で処理したカキ、ナシ、リンゴの流通がなされようとしている。本実験ではエチレン処理後の品質劣化が早いバナナの追熟に対する効果を調べた。

【方法・結果】エチレン未処理の緑バナナに、100—500ppb の 1-MCP を 1 回ないし 3 回処理後、3 本ずつ 8 L の容器に 20°C で保存し、追熟課程を色段階 7 まで観測した。1-MCP 処理により呼吸量とエチレン生成のピークならびに色段階 5 までの期間が 10—17 日遅くなった。色段階 5 までの期間は 1 回処理より 3 回処理の方が長くなったが、処理濃度 100 ppb と 500ppb とでは殆ど差が認められなかった。色段階 5 で、軟化ならびにでん粉の消費とグルコース、スクロースの生成がほぼ同時に進行していることが分かった。

2A18 ローゼルおよびケナフ種子の一般化学成分

○古賀民穂、宮田奈美子、石井利直、太田英明（中村学園大学）

【目的】ローゼルおよびケナフはアオイ科ハイビスカス属の繊維作物で、東南・南アジアで栽培され、繊維のみでなく、ローゼルは萼や花弁はジュース、ローゼル酒等の食用に、ケナフは環境植物として注目され、紙類、綿と混紡で衣類、ボード類、建築材料などに広く利用開発がなされているが、種子についての利用は開発途中である。各々の種子の有効利用を目的に脂質を中心に一般化学成分を検討した。【方法・結果】ローゼル種子は輸入品を、ケナフ類は非木材普及協会およびケナフ協議会から購入した。種子からの脂質の抽出は C:M 法で行い。脂肪量、脂肪酸、ステロール、リン脂質組成を検討し、さらにトコフェロールおよびアミノ酸組成を調べた。ローゼル種子の脂肪量は平均 20.7g% でケナフ種子と同様に半乾性油であった。両種子の脂肪酸、ステロール、トコフェロール組成およびアミノ酸組成は類似しており、油脂原料として、またしばり粕は食用や動物の飼料として利用可能と考える。

日本固有種ラン藻・スイゼンジノリの成分と機能性

2A19

○梶田聖孝, 小野政輝, 増岡智加子, 伊東保之, 小林弘昌,
井越敬司, 岡本智伸 (九州東海大・農)

【目的】スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada) は、清澄な水域で増殖する日本固有の淡水産ラン藻である。江戸時代から高級郷土料理の素材として珍重されていたが、水圏の環境悪化により激減している。分布範囲が限定され、その生態や食素材としての成分分析、機能性等に関する報告は少ない。そこで、本種の生化学的知見に注目した研究を行った。

【方法・結果】本種を、屋内培養装置および休耕田を利用した屋外培養池で培養した。成分分析・同定は、HPLC, NMR 等により行った。色素成分として、フィコビリリン系色素 2 種、ゼアキサンチン等を同定した。他のラン藻にあまり含まれていない中鎖脂肪酸と思われるピークが認められた。構成単糖として、フコース等 6 種を同定した。さらに、凍結乾燥した本種のメタノール抽出エキ스는、BHA や α -トコフェロールよりも強い抗酸化能を示し、ヒアルロニダーゼ活性阻害試験でも緑茶メタノールエキスよりも約 3 倍強い活性を示した。

フラボノイド類とアリール炭化水素受容体との相互作用について

2A20

○向井理恵¹、福田伊津子²、西海 信²、川瀬雅也³、吉田健一¹、芦田 均^{1,2}
(¹神大院・自然・生機化、²神大院・自然・生命科、³阪大・院薬)

【目的】我々は、ダイオキシン毒性の初発段階を担うアリール炭化水素受容体 (AhR) の形質転換に対して、フラボノイド類がサブクラスの構造により異なった抑制効果を示すことを報告している。そこで本研究では、フラボノイド類の AhR に対する相互作用を検討した。

【方法と結果】フラボノイド類がアゴニストである 3-メチルコランズレンと AhR との特異的結合を阻害するか否かを検討したところ、ケンフェロール、ケルセチン、ガランジンは濃度依存的に阻害効果を示したが、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) は阻害しなかった。しかし、表面プラズモン共鳴測定法により評価したところ、EGCG は濃度依存的に AhR 複合体に結合した。これらのことから、フラボノールは AhR のリガンド結合部位に作用するが、カテキンは異なる部位あるいは AhR と複合体を形成する HSP90、XAP2、p23 に作用することが示唆された。

2B01

○島村宗孝、豊本健志¹、古川憲治²、藤井隆夫¹
(¹ 崇城大・院・応生命、² 熊本大・工・環境システム工)

【目的】嫌気性アンモニア酸化(Anammox)反応は、アンモニアと亜硝酸とが酸化還元し N_2 を生成する反応である。我々はすでに、Anammox 反応に関与するヒドラジン酸化酵素(HZO)の精製に成功した。本研究では HZO をコードする塩基配列を決定し、HZO の一次構造を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】Anammox 汚泥から精製した HZO をトリプシン消化し、部分分解ペプチドのアミノ酸配列を決定した。4 種類のアミノ酸配列を基に設計した縮重プライマーを用いた PCR、さらに inversePCR により HZO 遺伝子配列の取得を試みた。その結果、2,384 bp の塩基配列を決定することができた。決定した領域には 1704 bp の ORF があり、予想されるアミノ酸配列は既存の硝化菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素と相同性があった。しかしアミノ酸配列の一致度が 30%未満しかないことが分かった。

2B02

好熱菌リポ酸アセチルトランスフェラーゼの解離・凝集

○重岡佑一、手柴智史、坂野大介、藤井博、石野良純、麻生陽一（九大院農）

【目的】好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* のリポ酸アセチルトランスフェラーゼ (E2) は同一ポリペプチド 60 個の会合体である。本研究は、E2 の解離・凝集のメカニズムを解明することを目的としている。

【方法・結果】光散乱測定及び超遠心分析を行った。E2 は酸性条件及び中性条件における塩化カリウム (0.25M)、塩化ナトリウム (1.5M)、グアニジン塩酸塩 (0.25M) の添加によりサブユニットの解離を起こした。E2 の凝集はこの解離に引き続いて生じ、60 量体があるまま凝集するのではないと考えられた。ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼの添加は、酸性条件における凝集を抑制した。加えて、カイコ（家蚕）熱ショックタンパク質 sHSP20.8 は、酸性条件やグアニジン塩酸塩による凝集を抑制した。

2B03

アミド加水分解活性向上を目指したリパーゼの進化分子工学

-基質結合部位への saturation mutagenesis-

○長谷川惇子、中川祐一、平竹 潤、坂田完三（京大化研）

【目的】エステル加水分解酵素である *Pseudomonas aeruginosa* 由来リパーゼはセリンプロテアーゼと同様の活性中心構造をもつが、エステルより化学的に安定なアミドを加水分解できない。そこでリパーゼを改変し、アミド加水分解活性を向上させることを目的とした。

【方法・結果】アミド加水分解活性への影響が大きいと考えられる基質結合部位に対し集中的に変異を導入した。二世代にわたる error-prone PCR で得た変異体 (L252M, F207S, A213D) の Met252 に対して、saturation mutagenesis を行った。Met252 は、基質の結合部位を構成し、catalytic triad の His に隣接する残基である。Oleoyl 2-naphthylamide および 2-naphthylester を基質としてアミドおよびエステル加水分解活性を測定した結果、アミド加水分解活性が大きく向上した変異体が取得でき、そのアミノ酸配列を調べたところ、すべて Phe に置換されていた。他の部位に対する変異の結果についても合わせて報告する。

**フルオロ酢酸デハロゲナーゼによる加水分解的脱フッ素反応に必須な
2B04 アミノ酸残基の同定**
○実森啓二¹, 近江理恵¹, 栗原達夫¹, 宮原郁子², 広津建²,
江崎信芳¹ (¹京大化研, ²大阪市大・院・理)

【目的】フルオロ酢酸デハロゲナーゼは、種々のハロ酢酸の加水分解的脱ハロゲン反応を触媒するが、強固な C-F 結合をもつフルオロ酢酸を最良の基質とする。C-F 結合開裂機構の解明を目指し、本酵素の立体構造を決定し、活性部位アミノ酸残基に変異導入を行った。

【方法・結果】野生型酵素のフルオロ酢酸に対する K_m 、 V_{max} はそれぞれ 9.1 mM、61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。結晶構造解析によって活性部位近傍に存在することが示された Trp150 を Ala に改変すると、フルオロ酢酸に対する活性は完全に消失した。対照的に、クロロ酢酸に対する活性は残存した。野生型酵素のクロロ酢酸に対する K_m 、 V_{max} は、それぞれ 15 mM、2.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ で W150A の K_m 、 V_{max} は、それぞれ 24 mM、2.0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。脱フッ素反応における Trp150 の機能を、酵素の立体構造に基づいて推定した。

2B05 チオレドキシン還元酵素の C 末端へのセリン残基導入効果の検討
桑原光彦, ○田村 隆, 稲垣賢二 (岡大院自科・バイオサイエンス)

【目的】大腸菌で発現させるためにほ乳類チオレドキシン還元酵素(TrxR1)の SeCys498 残基を Cys 残基に置換すると、酵素活性は 0.1%以下に低下する。これはチオール基(pKa8~9)がセレノール基(pKa5~6)よりも解離性に乏しいためとされている。E.Arner らは不活性なラット Cys 型 TrxR の C 末端配列(-Gly-Cys-Cys-Gly-OH)に、もともと SeCys 残基を持たないキイロショウジョウバエ酵素の配列(-Ser-Cys-Cys-Ser-OH)を模して Ser 残基を導入すると野生型酵素と同等の活性を回復すると報告した。そこで我々は、ヒト肺由来 TrxR-X498C にセリン残基を導入してその効果を検討した。【方法・結果】ヒト肺由来 TrxR1-X498C 変異酵素遺伝子を発現ベクター pET32a にサブクローニングした。0.3mM IPTG 存在下で低温下、長時間(18°C, 22h)の誘導を行い、Trx 融合蛋白質を Ni-カラムで精製後、タグ切断を経て目的蛋白質を調製した。この発現系を用いて Gly を Ser に置換した GCCS 配列、SCCS 配列を持つ TrxR 変異酵素を調製したが、いずれの変異酵素にも活性回復が認められなかった。

2B06 古細菌由来リボヌクレアーゼ P RNA 触媒部位の構造と機能に関する研究
○寺田敦, 渡邊円俊, 木村誠 (九大院・生資環)

【目的】リボヌクレアーゼ P (RNase P) は、前駆体 tRNA の 5' リーダー配列のプロセシングに関与するエンドヌクレアーゼで、触媒活性を持つ RNA とタンパク質から構成されている。本研究では、超好熱古細菌 (*Pyrococcus horikoshii* OT3) RNase P RNA サブユニットの触媒活性への寄与を証明するとともに、その触媒活性に重要なヌクレオチドを同定した。

【方法・結果】まず、真正細菌での研究結果に基づいて、古細菌 RNase P RNA のヌクレオチド (A40, A41, U44) と近傍に位置するヌクレオチド (A37 ~ G39 および G42, U43) に関して、触媒活性への影響、活性に必須なマグネシウムイオン濃度との相関、速度論のパラメーターについて検討した。その結果、RNase P RNA の A40, A41, および U44 が重要で、古細菌も真正細菌 RNase P RNA と同様の触媒作用を示すことが示唆された。現在、RNase P RNA のヘリックス-ループ構造を順次欠損した変異体を作製し、その活性への影響を検討中である。

2B07 グース型リゾチームにおける Glu73 の構造と機能への役割 ○大野公嗣，河村俊介，千々岩有紀，大隈真理，鳥潟隆雄（九東大・農）

【目的】グース型リゾチームは細菌細胞壁多糖類を加水分解する溶菌酵素であるが，ニワトリ型リゾチームと比べて研究が遅れている．X線解析から本酵素の触媒基は Glu73 と推定されているが，実験的証明はなされていない．本研究ではダチョウ由来グース型リゾチーム（OEL）の Glu73 を置換した変異体（E73D,E73Q）を作製し，その役割を解析した．【方法・結果】2種の変異体の溶菌および(GlcNAc)₅に対する活性を調べた結果，E73D では若干の活性が認められたものの，E73Q では活性がほぼ消失した．しかしながら，各変異体の CD スペクトルとキチンカラムに対する基質親和性に変化は見られなかった．この結果より，Glu73 はプロトンドナーとして作用する OEL の触媒基であることが明らかとなった．さらに各変異体の熱安定性を解析した結果，E73Q と E73D の変性の中点温度（T_m）はそれぞれ 5℃と 7℃低下した．したがって，Glu73 はグース型リゾチームの触媒基としてだけでなく，構造安定性にも重要であることが明らかとなった．現在，E73A について検討中である．

2B08 リゾチームの触媒基 Asp52 と周辺残基間の水素結合ネットワークに関する研究 ○榎田祐治¹，河村俊介¹，深溝慶²，千々岩有紀¹，荒木朋洋¹，鳥潟隆雄¹ （¹九東大・農，²近大・農）

【目的】糖加水分解酵素であるニワトリ卵白リゾチームは，触媒残基として Glu35，Asp52 が明らかにされている．触媒作用において，Glu35 はプロトンドナーとして作用するが，Asp52 の役割は明らかではない．そこで Asp52 とその周辺の残基（Asn46,Asn59,Ser50）間の水素結合ネットワークに着目し，Asn46 を Ala，Gln，Asp に置換した変異体（N46A,N46Q,N46D）を作製した．変異体は溶菌活性，グライコールキチン，(GlcNAc)₅に対する活性が大きく低下した．本研究では，これらの活性の減少を明らかにするため，¹⁵N ラベル化変異体を用いて NMR スペクトルで検討した．【方法・結果】*Pichia pastoris* を宿主とし最少培地(FM22)を用いて ¹⁵N ラベル化変異体を作製した．得られた変異体は栄養培地より得た変異体と同じ活性，ペプチドマップ，CD スペクトルを示した．HSQC スペクトルを測定した結果，βシートおよび Asp52 主鎖のシグナルが動いていることを確認した．

2B09 鶏卵白アルブミンの糖鎖の役割 ○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 N 型糖鎖付加部位を 2 ヶ所(Asn-292, Asn-311)持っているが，292 位の Asn にのみ糖鎖が付加している．輸卵管中では，両方に糖鎖が付加した OVA が存在し，glycosidase により 292 位の糖鎖は切断されないが，311 位の Asn に付加した糖鎖のみが特異的に切断をうけ分泌される．野生型を酵母 *Pichia pastoris* で発現、分泌させた場合も必ず 292 位には糖鎖が付加していた．以上から 292 位の Asn への糖鎖が，OVA が成熟していく間に特別な役割を果たしているのではないかと考えられる．本研究では，酵母発現系を用いて OVA の糖鎖の役割について調査した．

【方法・結果】OVA 内の 2 ヶ所の糖鎖付加配列に変異をかけた N292Q, N311Q, N292/311Q を作成し，酵母 *P. pastoris* で発現、分泌させた．N311Q の分泌レベルは，野生型とそれほど変わらなかったが，N292Q では著しく低下し，N292/311Q では検出が出来ないほど低下した．これは 292 位の Asn に付加した糖鎖が OVA の成熟や分泌に重要であることを示す．

2B10 リゾチームのヘリックスN末端及び疎水性パッキングの強化による安定化

○原田 哲仁、阿座上 弘行、加藤 昭夫（山口大・生物機能）

【目的】タンパク質の安定化の手法として、ヘリックスの双極子モーメントを打ち消すこと、疎水性パッキングを強化することが挙げられる。本研究では、鶏卵白リゾチームをモデルタンパク質として、2つの安定化の手法の組み合わせにより、より高い構造安定性を付与させることを目的とした。

【方法・結果】鶏卵白リゾチームの23-35位の α -ヘリックスを安定化させたN27Dと、90-101位の α -ヘリックスを安定化させたN93D、疎水性パッキングを強化したS91Tを組み合わせたN27D/N93D、N27D/S91T変異体を作成し、酵母 *Pichia pastoris* で分泌させ、両変異体の構造安定性について、CDを用いて測定した。その結果、変性転移点が野生型に比べN27D/S91Tは2.7°C、N27D/N93Dは4.4°C上昇していた。N27D/S91Tは、CDスペクトラムから二次構造がやや壊れていた。このことから、リゾチームの安定化には、2つの α -ヘリックスを安定化させたN27D/N93D変異体のほうが有効であることが示された。

Pseudomonas syringae の2種のフェニルセリン脱水素酵素

2B11 ○上島左久子¹、中島賢則²、山本浩明²、加藤伸一郎³、永田信治¹ (¹高知大農生資、²ダイセル化学、³高知大遺伝子実)

【目的】*Pseudomonas syringae* のD-フェニルセリン脱水素酵素(PSDH)は、D-スレオ- β -フェニルセリンの水酸基の酸化反応を触媒するNADP⁺依存性酵素であり、スレオ- β -フェニルセリン存在下で誘導生成される。さらにPSDHをコードする遺伝子(*psdh*)は複数の遺伝子とオペロンを構成しており、*psdh*とは異なる脱水素酵素遺伝子の存在が示唆された。そこでこの遺伝子の大腸菌高発現株を構築し、遺伝子産物の酵素科学的諸性質を明らかにした。

【方法と結果】*psdh*周辺の塩基配列約9 kbをIPCR法によって明らかにした結果、*psdh*を含む4つの遺伝子がオペロンを形成していた。そのうち、短鎖アルコール脱水素酵素ファミリーと相同性の見られたORFを大腸菌でクローン化して高発現株を得て、遺伝子産物の精製を行った。その結果、この酵素はNAD⁺を補酵素として、基質に対する立体特異性が異なり、PSDHとは一次構造が異なるフェニルセリン脱水素酵素であることが明らかになった。

Pseudomonas syringae のD-フェニルセリン脱水素酵素の精製と結晶化

2B12 ○山本陽介¹、上島左久子¹、中島賢則²、山本浩明²、加藤伸一郎³、永田信治¹ (¹高知大農生資、²ダイセル化学、³高知大遺伝子実)

【目的】*Pseudomonas syringae* のD-フェニルセリン脱水素酵素(PSDH)遺伝子は4つの遺伝子からなるオペロンに含まれ、さらに同一オペロンには一次構造や基質特異性の異なる別のフェニルセリン脱水素酵素(PSDH2)遺伝子が存在する。そこで、立体構造を解析することにより基質認識部位や反応機構を明らかにし、2種類の酵素の違いを解明することを目的としてPSDHとPSDH2の結晶化を試みた。

【方法・結果】PSDH遺伝子を導入したプラスミドpUPSDHとPSDH2遺伝子を導入したプラスミドpSUPSDT3を持つ大腸菌組換え体を構築した。この菌体を培養後、超音波破碎し、得られた上清を粗酵素液とした。硫酸分画を経て、イオン交換カラム等を用いて精製条件を確立し精製酵素を得た。結晶化は、様々なタンパク質濃度の精製酵素と、様々な結晶化剤を用いてハンギング・ドロップ法によって行い、いくつかの条件で微結晶を得ることができた。

2B13 *Alcaligenes denitrificans* のリジン脱水素酵素の精製と結晶化

○前田早也香¹, 加藤伸一郎², 永田信治¹ (¹高知大農・生資, ²高知大遺伝子実)

【目的】リジン脱水素酵素は、L-リジンの末端アミノ基を酸化的に脱離する反応を触媒する酵素である。これまでに味園らは、*Agrobacterium tumefaciens* や *Alcaligenes denitrificans* の酵素の精製、酵素科学的性質、酵素遺伝子の単離と塩基配列を明らかにした。しかしながら、酵素の高次構造に関する知見は得られていない。本研究では、*A. denitrificans* の酵素遺伝子の大腸菌高発現株を構築し、酵素の精製と結晶化を試みた。

【方法・結果】*A. denitrificans* の酵素遺伝子をベクター pKK223-3 と、ベクター pET21a(+) に連結したプラスミドを持つ大腸菌組換え体をそれぞれ構築した。pET21a(+) の組換え株の粗酵素液は、元株の 100 倍の比活性を示した。この高発現株の粗酵素液を硫酸分画、DEAE-トヨパール及び Mono Q カラムクロマトグラフィーに供して、ゲル電気泳動的にほぼ均一な酵素標品が得られた。この酵素標品を用いて、ハンギングドロップ法により結晶化条件を検討した結果、小さな針状が得られる条件や大きな六角柱状が見られる条件を見出した。

2B14 マウス由来硫酸転移酵素 SULT3A1 の X 線結晶構造解析

○稲田加奈子¹, 寺本岳大¹, 榊原陽一², 水光正仁², 木村誠¹, 角田佳充¹
(¹九大院・生物機能¹, 宮大・農・応用生物²)

細胞質に存在する硫酸転移酵素は、ホルモン・神経伝達物質などの内因性物質や、薬物などの外来性異物に硫酸基を転移することで、その濃度調節、解毒代謝に関与していると考えられている。マウス由来硫酸転移酵素 SULT3A1 は、外来性異物である 2-ナフチルアミンやデシプラミンなどのアミンに対して、高い基質特異性をもつ。本研究の目的は、その酵素反応メカニズム及び基質特異性を決定している立体構造基盤を明らかにすることである。

X 線結晶構造解析を行うために、大腸菌による発現系の構築及び精製法を確立した。結晶化は、ナフチルアミン及び反応後生成物 PAP の存在下で行い、分解能 2.6 Å の X 線回折データを得た。位相は Se-Met 置換体を用いた MAD 法により決定し、モデル構築を進めている。

2B15 高度好熱菌 *Thermus Thermophilus* HB8 由来 ペプチドグリカン合成酵素 Mur E の X 線結晶構造解析

○松崎富士郎, 木村誠, 角田佳充 (九大院農・生物機能)

【目的】*Thermus thermophilus* 由来 Mur E は、ペプチドグリカン前駆体の UDP-N アセチルムラミン酸 L-Ala-D-Glu に ATP の加水分解によってオルニチンを付加するペプチドグリカン合成酵素と予想される。我々は本酵素の基質特異性及び熱耐性メカニズムを明らかにするために X 線結晶構造解析を行った。

【方法・結果】Mur E は大腸菌を用いて大量発現した。カラムクロマトグラフィーによって精製したサンプルを用いて ADP 共存下で柱状の結晶を得た。X 線回折実験を行い、分解能 1.6 Å のデータを収集した。格子定数は $a = 59.9 \text{ \AA}$, $b = 64.4 \text{ \AA}$, $c = 64.6 \text{ \AA}$, $\beta = 105.4^\circ$ 、空間群は $P2_1$ であった。Hg 及び Pt 誘導体による MIR 法で立体構造を決定した。Mur E は 3 つのドメインからなる構造をとっており、ドメイン 2 とドメイン 3 の間に ADP が結合していた。

リジル tRNA 合成酵素の L-リジンヒドロキサメートより生じたリジルアデニレート様複合体の X-線結晶構造解析
2B16 ○櫻間晴子¹, 滝田禎亮¹, 三上文三², 伊藤貴文², 井上國世¹
(¹京大院農・食生科, ²京大院農・農学)

【目的】*Bacillus stearothermophilus* 由来リジル tRNA 合成酵素は、L-リジンと ATP からリジルアデニレート中間体 (Lys~AMP) を形成し、L-リジンを tRNA^{Lys} に転移するアミノアシル化反応を触媒する。我々は、L-リジンヒドロキサメート (LXT) が ATP 存在下に本酵素を強く阻害し、これが Lys~AMP 様化合物 (LXTAMP) の生成によることを報告している (文献)。今回は、構造的知見を得るため、LXTAMP 複合体の X-線結晶構造解析を行った。【方法・結果】回析強度データは BL41XU (Spring8) で収集した。分解能 2.2 Å、R 因子 17% で決定した結果、monoclinic、空間群 $P2_1$ で非対称単位に 4 分子のサブユニットが存在し、その全てに LXTAMP が存在した。大腸菌 LysRS の Lys~AMP 複合体との比較により、Glu411 と Mg²⁺ 結合部位付近の構造に相違が観察された。(文献) Takita *et al.* *J. Biochem.* **121**, 244-250 (1997)

リジル tRNA 合成酵素の基質 L-リジンの側鎖認識部位への変異導入によるアミノ酸基質に対する特異性の改変
2B17 ○阿波君枝, 滝田禎亮, 櫻間晴子, 井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】*Bacillus stearothermophilus* 由来リジル tRNA 合成酵素は、L-リジン (Lys) を ATP で活性化し、tRNA^{Lys} に転移するアミノアシル化反応を触媒する。我々は、本酵素の Lys 活性化反応においては、まず Lys が結合し続いて ATP が結合すること、Lys 認識には α -カルボキシル基より 2 つのアミノ基が重要であることを報告している (文献)。今回は、反応の第 1 段階で基質 Lys の ε -アミノ基を認識する Glu418 への変異導入により、その Lys 結合および活性化における役割と、各変異体の L-リジンアナログに対する基質特異性を調べた。【方法・結果】変異体 (E418D、E418A、E418Q) について、Lys 依存的 ATP-PPi 交換反応活性を測定した。全ての変異体で、 $K_{m,Lys}$ が大きく上昇し k_{cat} が減少した。特に E418A では $K_{m,Lys}$ が 76,000 倍以上、 k_{cat} が 1/70 に減少した。E418Q では、基質特異性が逆転し、Lys より L-ノルロイシンの方が有利な基質となった。(文献) Takita *et al.* *J. Biochem.* **119**, 680-689 (1996)

リジル tRNA 合成酵素のクロスサブユニット間相互作用の変異導入解析
2B18 ○猿渡由寛, 滝田禎亮, 井上國世 (京大院農・食生科)

【目的】*Bacillus stearothermophilus* 由来リジル tRNA 合成酵素は二量体酵素で、サブユニットは触媒ドメイン (CAD) と tRNA アンチコドン結合ドメイン (AND) より構成され、CAD は他方のサブユニットの AND と相互作用している。我々は、CAD 単独の k_{cat} は大きく減少するが、AND 添加で活性が回復することを報告している (文献)。今回は、この活性回復と CAD-AND クロスサブユニット間相互作用 (CSI) の関係を、接触領域にある Met458 と Tyr456 への変異導入により調べた。【方法・結果】L-リジン依存的 ATP-PPi 交換反応において、CAD 変異体単独の k_{cat} 値は野生型酵素に比べ非常に小さな値のままであった。AND 添加で全ての変異体の活性は上昇したが、その濃度依存性と活性上昇率は変異体間で異なっていた。特に M458W では、CAD に比較して、AND との K_d 値が 28 倍も上昇したが、AND 過剰時の k_{cat} 値は 1/3 倍であった。これらから、CSI は比較的広範囲の相互作用により CAD の活性回復に寄与すると推定した。(文献) Takita and Inouye, *J. Biol. Chem.* **277**, 29275-29282 (2002)

増殖に必須な転写因子 YycF を標的とした新規抗菌剤の開発
2C02 ○後藤恭宏¹, 古田英司¹, 建部大輔¹, 深溝慶¹, 山本兼由¹, 三沢典彦²,
内海龍太郎¹ (¹近畿大院・農・バイオ, ²海洋バイオ研)

【目的】近年、既知の抗菌剤の標的である DNA 合成、タンパク質合成や細胞壁合成などの代謝地図における特定段階の阻害ではなく、情報伝達系を標的とした新規抗菌剤が注目されている。そこで、グラム陽性菌に広く保存され、増殖に必須な情報伝達系である二成分制御系 YycG/YycF のレスポンスレギュレーター YycF に対して、有効な情報伝達阻害剤の開発とその作用機構の解析を試みた。

【方法・結果】YycF は二量体化し標的遺伝子に結合することが知られている。古田らが最近開発したホモダイマリゼーション (HD) システムを用いて、YycF 二量体形成を選択的に阻害する薬剤をスクリーニングした結果、D897 が得られた。この D897 は、YycF に作用し YycF 標的遺伝子の発現を抑制することで、細胞分裂を抑制し増殖を阻害した。この結果から、YycF 標的の薬剤 D897 は、新しいタイプの抗菌剤として有望であることが示唆された。

二成分制御系 ArcA/ArcB による DNA 修復遺伝子 *uvrA* の発現制御
2C03 ○山本聡、小笠原寛、寺本潤、山本兼由、内海龍太郎 (近畿大院・農・バイオ)

【目的】大腸菌を嫌氣的に培養した場合、ArcA/ArcB 二成分情報伝達機構(TCS)により制御される遺伝子群が知られている。最近、これらの遺伝子群とは別に DNA 修復関連遺伝子群が ArcA/ArcB TCS 制御下にあることが DNA マイクロアレイから示唆された。本研究では、DNA 修復遺伝子 *uvrA* に着目し ArcA/ArcB TCS による *uvrA* の発現制御機構を明らかにした。

【方法・結果】*uvrA* プロモータに *lacZ* を融合させた株(MYuvrA)を作製した。MYuvrA において ArcA を過剰発現させると、 β -galactosidase 活性は顕著に抑制された。さらに、実際の mRNA を定量解析するために、S1 nuclease assay を行った結果、*uvrA* の発現は ArcA/ArcBTCS により負に制御されることが示唆された。In Vitro transcription、DNase-I footprinting の結果、ArcA が *uvrA* プロモータに直接結合し負に制御していることだけでなく、*uvrA* に隣接している *ssb* の発現も負に制御していることが判明した。これらの結果は、*uvrA* 遺伝子が *lexA*, *recA* 遺伝子による SOS 応答と ArcA/ArcB TCS による二重の制御を受けていることを示唆する。

枯草菌イノシトール分解系に関与する *iolG* と *iolI* の新規機能
2C04 ○森永哲郎¹, 山口将憲², 池内摩耶¹, 木根原匡希¹, 芦田均¹, 藤田泰太郎³,
吉田健一¹ (¹神大院・自然, ²北興化学・開発研, ³福山大・生命工学)

【目的】枯草菌のゲノム情報に基づく逆遺伝学的研究の結果、イノシトール(*myo*-inositol:MI)分解系を担う遺伝子群 *iolABCDEFGHIJ* の同定に成功した。我々はすでに MI 分解系を応用し、MI を変換し 2 型糖尿病に効果が期待される D-*chiro*-inositol (DCI) が生産できることを見出した。本研究では MI/DCI 変換に関わる *IolG* と *IolI* の機能の同定を目指した。

【方法・結果】枯草菌の *iolG* と *iolI* について、それぞれ C 末端側にヒスチジントグを融合させ大腸菌内で生産し、ニッケルカラムにより精製した。精製した各タンパク質を用いて反応産物を HPLC で解析した結果、*IolG* (inositol dehydrogenase) は MI のみならず DCI とも反応することが明らかになった。*IolI* は inosose isomerase で 2-*keto*-*myo*-inositol と D-*chiro*-inosose を相互に異性化した。*IolG* と *IolI* の反応をカップルさせると試験管内でも MI/DCI 変換が可能であることが示された。

2C05 枯草菌における緊縮応答による分岐鎖アミノ酸生合成オペロンの発現制御 ○広岡和丈、里村武範、森崎薫、藤田泰太郎（福山大生命工・生物工）

【目的】微生物がもつ RelA は緊縮応答に関与し、GTP から ppGpp を合成することで ppGpp と GTP の濃度を調節し、標的遺伝子の発現を直接的、間接的に制御する。枯草菌では、分岐鎖アミノ酸生合成を司る *ilv-leu* オペロンもまた緊縮応答によって誘導され、また GTP 結合性調節因子である CodY にも制御されることが明らかとなった。そこで、RelA と CodY によるこのオペロンの制御機構の解析を目的に、*relA* と *codY* の変異株におけるオペロンの発現応答を調べた。【実験および結果】様々な長さの転写制御領域と *lacZ* を連結した構築を挿入した株を用いて緊縮応答を誘導させ、LacZ 活性を測定した結果、転写開始点を基準に-55 から+26 の領域が緊縮応答に必須であることがわかった。また、*relA* 変異株では緊縮応答は起こらず、一方 *codY* 変異株では発現が構成的となるが、これらの二重変異株では緊縮応答条件にすると逆に発現の抑制が観察された。DNA マイクロアレイ解析からもこれを支持する結果が得られた。以上より RelA による転写活性維持機構の存在が示唆された。

2C06 DNA 修復に関する Hef 蛋白質の保存性とその機能 ○石野良純（九大・院農）

【目的】Hef（Helicase-associated endonuclease for fork structured DNA）蛋白質は我々が超好熱性アーキア（古細菌）から単離同定した、DNA 構造特異的なヘリカーゼ／ヌクレアーゼ活性を有する多機能蛋白質である。我々はこの酵素が複製時のフォーク進行の停止修復に働くのではないかと考えており、その詳細を明らかにしたい。

【方法・結果】配列上の相同性がある蛋白質を検索すると、Hef 遺伝子のオルソログと考えられる遺伝子がヒトゲノム中に存在することがわかり、そのコードする蛋白質の機能解析が注目される。興味深いことに、今夏ヒト Hef が常染色体劣性癌感受性疾患であるファンコニ貧血 (FA) の原因遺伝子産物と相互作用し、癌抑制経路の中で機能していることを示す結果が報告され、今年の DNA 修復研究の中での一つの大きなトピックスとなった。ゲノム安定性維持のための Hef の重要性が認識されてきたことを、我々の Hef の機能解析の結果と共に紹介したい。

2C07 温泉地区土壌から得られたファミリーA型 DNA ポリメラーゼ遺伝子の多様性 ○山上 健¹、鬼塚尚子¹、田島秀二²、河原林裕³、石野良純¹（九大院・農・遺資工¹、プレジジョン・システム・サイエンス²、産総研・生物機工³）

【目的】温泉地区土壌メタゲノムにどのような DNA ポリメラーゼ遺伝子が存在するのかを調べるため、今回はファミリーA型 DNA ポリメラーゼ遺伝子の検索を行った。

【方法・結果】ファミリーA型 DNA ポリメラーゼに高度に保存されているアミノ酸配列のうち、活性部位近傍のアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計し、国内6カ所の温泉地から採取した土壌試料約200種を鋳型にそれぞれPCR反応を行った結果、40サンプルからポリメラーゼ遺伝子断片を得た。次に、それぞれのサンプルから得られた増幅断片をクローニングし、20クローンずつを塩基配列解析した。その配列をもとにアミノ酸を推定した結果、合計189個の異なったアミノ酸配列を得た。得られた配列をもとに系統樹を作成した結果、*Taq* ポリメラーゼと90-95%、75-80%および50-60%の同一性を示すものの3つの群に分類された。

2C08 好冷細菌 *Pseudoalteromonas* sp. AS-11 由来酢酸キナーゼ遺伝子のクローニング

○田上 潤、本島浩之、渡邊啓一（佐賀大・農・応生科）

【目的】好冷細菌由来の酵素は、常温細菌由来の相同酵素と比較して低温での活性が高い。これら酵素の低温適応機構を解明するには、構造と動きそして機能の関係を明らかにする必要がある。触媒反応時に構造変化の大きな酵素は研究材料として興味深い。本研究では、触媒反応時の構造変化が比較的大きなキナーゼ類の性質、構造を明らかにするために、南極産好冷細菌 *Pseudoalteromonas* sp. AS-11 由来酢酸キナーゼ遺伝子のクローニングを行った。【方法・結果】既知の酢酸キナーゼのアミノ酸配列をもとに、*Pseudoalteromonas* sp. AS-11 ゲノム DNA を鋳型として degenerated PCR を行った。得られた DNA 断片の塩基配列から推定したアミノ酸配列は、既知の酢酸キナーゼと高い相同性を示した。λファージを用いてゲノム DNA ライブラリーを作成し、上記の DNA 断片をプローブとしたプライクハイブリダイゼーションにより、酢酸キナーゼ遺伝子のスクリーニングを行った。現在、スクリーニングしたポジティブクローンの塩基配列解析をすすめている。

2C09 大腸菌-バチルス-酵母シャトルベクターの構築と組換えタンパク質の分泌発現

○久堀剛資¹、生田淳也¹、飯笹英一^{1,2}、本島浩之¹、永野幸生²、渡邊啓一¹（¹佐賀大・農・応生科、²佐賀大・総分セ）

【目的】組換えタンパク質生産が容易に行える分泌発現ベクターの開発を目的として、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞内相同組換え法による高効率且つ容易な DNA 断片の挿入が可能な大腸菌-バチルス-酵母シャトルベクターを構築した。

【方法・結果】*Bacillus megaterium* 用分泌発現ベクター pWHSIG に、酵母の複製起点 (2μ origin) と選択マーカー (URA3) を付加し、大腸菌-バチルス-酵母シャトルベクター pEBYSIG を構築した。pWHSIG 及び pEBYSIG のシグナル配列下流に、前者は制限酵素-DNA リガーゼ、後者は酵母相同組換えを用いてサチライシンをコードする DNA 断片を挿入した。*B. megaterium* 形質転換体を LB 培地中 37°C で培養し、濁度 1.0 で 0.5% キシロースによりサチライシンの発現を誘導した。pEBYSIG を用いた場合、酵母相同組換え法により容易に高効率で DNA 断片の挿入を行うことができ、その発現分泌量は pWHSIG とほぼ同等であった。

2C10 高効率遺伝子組換え法の開発

○飯笹英一^{1,2}、永野幸生²
（¹佐賀大農・応生科、²佐賀大・総分セ）

【目的】酵母相同組換え法によって、従来の制限酵素とリガーゼを用いた方法よりも容易に、効率よく DNA 断片をベクターにクローニングすることができる。しかし、多くのベクターには酵母複製開始点がないため、この方法は使えない。そこで、酵母相同組換えによって、これらの多くのベクターに DNA 断片をクローニングする新しい方法の開発を目指した。

【方法・結果】まず、アンピシリン耐性遺伝子と pBR322 (または、pUC) origin という多くのベクターにある共通の配列の間に酵母複製開始点と選択マーカーを持った pSU0 というプラスミドを構築した。酵母複製開始点を持たない pET32a(+)ベクターを PCR によりこのベクターと相同な配列を付加した GFP、RFP の DNA 断片および、pSU0 と一緒に酵母に形質転換するとこれらの相同な配列が組換わり、非常に高い効率で、GFP および RFP 遺伝子を pET32a(+)にクローニングすることに成功した。

酵母の GABA 合成と GAD1 遺伝子の発現系の構築

2C11

○黒沼良江, 福山晶子, 町田くみ子, 新森温子, 新田陽子, 植野洋志
(奈良女大・食物)

【目的】 高等動物で抑制性神経伝達物質として作用する γ -アミノ酪酸 (GABA) は血圧上昇抑制作用をもつことより, 健康食品の有効成分として注目されている. 食品に利用される酵母における GABA 合成機構を明らかにするとともに, 現在知られているパン酵母の GABA 合成酵素である GAD1 遺伝子産物を発現する系の構築を目的とした.

【方法・結果】 研究室の保存株を用いて GABA 産生量を定量的に測定することで, 高 GABA 発現株のスクリーニングを行った. 培地中と菌体内での GABA の蓄積に関して報告する. さらに, GABA 産生がみられたパン酵母より GAD1 遺伝子を PCR 法により増幅し, ショートベクターである pYES2 への組込み, GAD1 欠損株に形質転換を行った. 得られた組換え酵母を Galactose にて誘導 4 時間後の菌体中の GAD 活性は約 60 nmol/min/mg であった. 発現タンパク質の性質についても報告する.

耐熱性セルラーゼを分泌生産する耐熱性酵母の構築

2C12

○洪ジョン, 玉置尚徳¹, 熊谷英彦 (石川県大・生資工研, ¹京大院 生命)

【目的】 我々はこれまでに耐熱性の Endo- β -glucanase, Cellobiohydrolase 及び β -glucosidase の各遺伝子をクローニングした. 今回, この三つの耐熱性セルラーゼ遺伝子を耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* において発現させ, セルロースを分解できる酵母の構築を目指した. 【方法・結果】 *K. marxianus* の栄養要求性マーカーとして *URA3*, *LEU2* と *TRP1* 遺伝子のクローニング並びに遺伝子破壊株の構築を行った. 耐熱性セルラーゼ遺伝子 *eng1*, *cbh1*, *bg1* を高発現プロモーターの下流につなぎ, *URA3* や *TRP1* をもつ染色体挿入型ベクターを用いて *K. marxianus* に形質転換した. 得られた形質転換株を 42°C で培養したところ培地中に各酵素活性を検出することができた. 本株は, Carboxymethylcellulose(CMC)を単一炭素源として生育することができ, 0.2g/l のエタノール発酵を行うことが確認された.

大腸菌の新規 γ -グルタミル- γ -アミノ酪酸加水分解酵素とその発現調節

2C13

○栗原新¹, 熊谷英彦², 鈴木秀之¹ (¹京大院生命・統生科, ²石川県大・生資工研)

【目的】 ポリアミンは, 広範な生物に見出される生理活性物質であり, 生体内で核酸と結合し, 遺伝子の発現を調節するなど重要な役割を果たしている. このポリアミンの一種であるプトレッシンは, 大腸菌細胞内で数十 mM という高濃度で存在する重要な物質である. 近年大腸菌において筆者らが発見した γ -グルタミル中間体を経る新規プトレッシン代謝系の中の酵素のひとつである, γ -グルタミル- γ -アミノ酪酸加水分解酵素(PuuD)の生理的役割を解明するために酵素学的パラメータおよび発現調節の観点から実験を行った.

【方法・結果】 新規プトレッシン代謝系の関連遺伝子について遺伝子破壊株を作成し, 各遺伝子の欠失がもたらす PuuD 活性の発現への影響を解析した. また, PuuD 活性は代謝系の出発物質であるプトレッシンで誘導され, 代謝系の最終産物であるアンモニアとコハク酸で抑制された. さらに, PuuD 活性を失った株が PuuD の生理的な基質である γ -グルタミル- γ -アミノ酪酸を蓄積することを示した. また各代謝中間体に対する PuuD の k_{cat}/K_m 等を求めた.

tpl プロモーターを利用した大腸菌内での組み換えタンパク質発現系の構築
2C14 ○小柳喬¹, 片山高嶺², 平尾愛¹, 鈴木秀之¹, 熊谷英彦² (¹京大院生命・統合生命, ²石川県大・生資工研)

【目的】バクテリアのチロシンフェノールリアーゼ (*tpl*) 遺伝子は、TyrR タンパク質により正の転写調節を受ける。我々は *Erwinia herbicola* 由来 TyrR の様々な変異体を研究する過程において、著しく *tpl* 遺伝子の転写活性を上昇させる変異体を取得した。この強力な転写活性化能を利用し、大腸菌内において新たなタンパク質大量発現系を構築できると考え、以下の実験を行った。【方法・結果】*tpl* プロモーターの下流にマルチクローニングサイトを導入したクローニングベクターを作製した。*lac* レポーター遺伝子をこのクローニングサイトに導入し、変異型 TyrR を保持する大腸菌に導入してレポーター活性を評価したところ、この発現系は T7 システムより弱い、*tac* システムよりも強力な発現能を保持することが明らかとなった。また、レポータータンパク質が一部不溶性となった T7 システムに比べ、本発現系においては全て可溶体として発現させることに成功した。

Clostridium aurantibutyricum M6 株における新規ソルベント生成遺伝子の構造解析
2C15 ○牧野宏俊、中山俊一、吉野貞蔵、古川謙介 (九大院・生資環)

アセトン・ブタノールを生産する *Clostridium* 属細菌はバイオマスによる化学原材料発酵生産への利用が期待されている。菌株間におけるソルベントの生成比は多様であり、その育種改良には多種の遺伝子資源の蓄積と機能解析が必要である。今回新たにアセトン高産生株 M6 株を分離し、既知のブタノール高産生株である *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 株のソルベント生成遺伝子 *sol*-operon との構造比較を試みた。

新たに単離された M6 株は 16S rDNA 解析により *C. aurantibutyricum* と同定された。既知 *sol*-operon から得た 2 種の *bld* (butyraldehyde dehydrogenase)、*adc* (acetoacetate decarboxylase) を probe に用いたサザン解析の結果、低い相同性を示したことから新規な *sol*-operon を有する事が示唆された。そこで本菌における *sol*-operon のクローニングを行ったところ、M6 株は *ctfA* (CoA-transferase A subunit)、*ctfB*、*adc* から成る *sol*-operon を形成し、*bld* は *ctfA* の上流約 900 bp から逆位に存在しており、既知の菌株とは大きく異なった遺伝子構造を示した。

2D01 分裂酵母のガラクトースの取り込みを介したガラクトース鎖修飾機構の解析

○抜木 弥生, 竹川 薫, 田中 直孝 (香川大農・生命機能)

【目的】分裂酵母はガラクトース (Gal) を炭素源とした培地で生育不能なため、糖鎖中の Gal 鎖は UDP-グルコース (Glc) から生合成されると考えられている。本研究において自然突然変異によって Gal 培地上でも生育可能となることが確認された。そこで分裂酵母の細胞外からのガラクトースの取り込みと糖鎖修飾の関連について解析を行った。

【方法・結果】Gal 転移酵素の基質である UDP-Gal は UDP-Glc からエピメラーゼ活性により生合成される経路と Gal への UDP 転移により生合成される 2 通りの経路が存在する。エピメラーゼ遺伝子を欠失させた結果、UDP-Gal から UDP-Glc への変換を行うエピメラーゼ活性が見られず、さらに Gal 鎖が欠損した分裂酵母が単離された。本遺伝子破壊株を Gal 含有培地で生育させた結果、Gal 鎖修飾が回復することが分かった。さらに Gal への UDP 転移に関与する遺伝子を破壊した結果、Gal 鎖修飾の回復が不能なことから、分裂酵母は細胞外からガラクトースを取り込む機能が備わっていることが強く示唆された。

2D02 分裂酵母の PI4-キナーゼをコードする Pik1 タンパク質の機能解析

○細見 昭、田中直孝、竹川 薫 (香川大農・生命機能)

【目的】リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール (PI) は真核生物の細胞内小胞輸送やシグナル伝達機構などに関与している。分裂酵母におけるホスホイノシチド、特に PI(4)P の機能を明らかにするため PI-4 キナーゼ欠損株の解析を行った。

【方法・結果】出芽酵母において PI-4 キナーゼをコードする *PIK1* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を分裂酵母 *pik1* とした。分裂酵母 *pik1* 遺伝子の破壊株が取得できたことから、出芽酵母とは異なり生育に必須ではないことがわかった。PI 測定の結果、野生株と比較して分裂酵母 *pik1* 破壊株は PI(4)P の減少が見られた。さらに PI(4)P と特異的に結合するタンパク質ドメインと GFP との融合タンパク質の局在観察の結果、特にゴルジ体の PI(4)P が減少していることがわかった。分裂酵母 *pik1* 破壊株は栄養条件下では野生株と変化がないが、胞子形成に異常が見られた。以上の結果から Pik1 タンパクによりゴルジ体で合成される PI(4)P は、分裂酵母では飢餓条件下における胞子膜形成に重要であることがわかった。

2D03 PX-associated ドメインを持つ分裂酵母タンパク質の機能解析

○川西裕也, 竹内秀俊、細見 昭、田中直孝、竹川 薫 (香川大農・生命機能)

【目的】PX(phox homology)ドメインは酵母からヒトに至る真核生物のタンパク質に広く存在し、最近の研究から特異的にホスホイノシチドと結合することが明らかにされた。PX ドメインを持つタンパク質には PX-associated(PXA)と呼ばれるドメインを持つものもあるが、PXA ドメインの機能については全く明らかにされていない。分裂酵母の 1 遺伝子 (SPAC5D6.07c) がコードするタンパク質 (Pxa1p) は PX ドメインを持たないが PXA ドメインを持っている。そこで本遺伝子の破壊株を作成し、PXA ドメインの機能解析を行った。

【結果】分裂酵母の *pxa1* 遺伝子を破壊したところ、本遺伝子破壊株は生育には必須ではないが、野生株ではフラグメント化した液胞が *pxa1* 株では異常に肥大していることがわかった。本破壊株の液胞形態はホスファチジルイノシトール (PI)-3 キナーゼ欠損株や PI3,5-キナーゼ欠損株にも見られることから、Pxa1p が PI の代謝に関与していることが示唆された。しかしながら *pxa1* 株は液胞タンパク質輸送や胞子形成などには欠損は認められなかった。

2D04 分裂酵母のオートファジーに関与する遺伝子の解析

○梶原史朗, 田中直孝, 竹川 薫 (香川大農・生命機能)

【目的】出芽酵母は栄養飢餓条件にさらすと細胞は生き延びるために、自己の細胞質構成成分を液胞で分解して再利用する自食作用（オートファジー）が存在する。一方、分裂酵母も出芽酵母と同様に窒素飢餓条件下で胞子形成が起こるが、分裂酵母にもオートファジーが存在するかに関する報告は無い。そこで出芽酵母のオートファジー関連遺伝子と相同性の高い分裂酵母遺伝子を同定し、遺伝子破壊株を用いてオートファジーの解析を行った。

【結果】出芽酵母のオートファジーに必須な ATG 遺伝子と相同性の高い分裂酵母遺伝子の破壊株は窒素飢餓条件下で極めて低い胞子形成率を示した。またオートファジーのマーカーとして用いられる Atg8p は、窒素飢餓条件下で分裂酵母野生株ではオートファジーにより液胞内部へ輸送されることが観察されたが、ATG 破壊株では液胞内部へ輸送されずオートファジーが起きていないことが示唆された。以上の結果から分裂酵母でもオートファジーが飢餓条件下で起こり、胞子形成などに重要な役割を果たしていることを明らかにした。

2D05 分裂酵母の液胞局在酵素の成熟化に関与するプロテアーゼの同定

○楠 陽子, 岩城知子, 田中直孝, 竹川 薫 (香川大農・生命機能)

【目的】酵母の液胞局在タンパク質の多くは前駆体として合成され、液胞へ到達してからタンパク分解を受けて活性型となる。出芽酵母においては、プロテイナーゼ A (Pep4p) が液胞タンパク質の成熟(活性)化に必須であるが、分裂酵母には *PEP4* 遺伝子と相同性の高い遺伝子は存在しない。そこで分裂酵母ゲノムから各種プロテアーゼをコードする遺伝子を検索し、その破壊株を用いて液胞タンパク質の成熟化に重要なプロテアーゼの検索を行った。

【方法・結果】分裂酵母のプロテアーゼをコードする遺伝子の各破壊株の中から液胞局在カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の成熟化に異常の認められる株を選別した。解析の結果、分裂酵母 CPY はセリンプロテアーゼである *isp6* と *psp3* 遺伝子の二重破壊株で完全に成熟化が起こらなかった。さらに *isp6psp3* 二重破壊株は液胞局在膜タンパク質であるアルカリホスファターゼの C-末端のプロセッシングにも関与していることから、これら2つのプロテアーゼが直接、または間接的に液胞局在酵素の成熟化に寄与していることがわかった。

2D06 出芽酵母由来のヘキサプレニルニリン酸合成酵素の特性

○ZHANG MEI, 羅 軍, 荻山 友貴, 田中 克典, 松田 英幸, 川向 誠 (島根大・生資)

【目的】ユビキノン(UQ)は生物種によりそのイソプレノイド側鎖長が異なるが、イソプレノイド鎖長はポリプレニルニリン酸合成酵素が決定している。本研究では、出芽酵母のヘキサプレニルニリン酸合成酵素 (Coq1) の特性を調べることを目的とした。

【方法・結果】*COQ1* を大腸菌で発現させ、活性測定し UQ 抽出をしたところ、UQ-6 の合成が確認できたため、Coq1 は大腸菌内で単独でヘキサプレニルニリン酸合成酵素活性を持つ事が判った。また、Coq1 は大腸菌のオクタプレニルニリン酸合成酵素 IspB の代りに機能することが可能であった。Coq1 融合蛋白質を分裂酵母の UQ 非生産株である RS312($\Delta dlp1$) で発現させたところ、最少培地での相補性が見られ、不思議なことに UQ-6 ではなく、UQ-9 と UQ-10 が合成された。一方、Coq1 融合蛋白質を KS10($\Delta dps1$) で発現させた処、UQ 合成は回復できなかった。よって、分裂酵母内では、Coq1 と Dps1 はヘテロ複合体を形成してデカプレニルニリン酸合成酵素として機能すると考えられた。

酵母におけるヤマイモキチナーゼ E 遺伝子の分泌大量発現系の開発
2D07 ○木村将士、野黒美俊介、田中克典、中川強¹、川向誠、古賀大三²、松田英幸
(島根大生資科・生命工、¹島根大・総科研支援センター、²山口大・応生化)

山口大の古賀らの研究によって、ヤマイモ (*Dioscorea opposita* Thunb) に数種のキチナーゼアイソザイムが存在し、その中のキチナーゼ E 等が特に強い抗菌活性を保持していることが分かっている。我々はこの植物由来酵素 (ヤマイモキチナーゼ E) を化学農薬に替わる安全なバイオ農薬として利用することを目的とし、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* と分裂酵母 *S.pombe* での大量発現系の開発に取り組んできた。

現在、*Pichia pastoris* 発現系の開発が進んでおり、分泌生産によってキチナーゼ活性および推定される分子量のタンパク質発現が確認された。また、誘導性 AOX1promotor を含むマルチコピー型ベクター pPIC9K を用いて作製した多コピー導入形質転換株は、シングルコピーの株より高い発現を示し、さらに誘導時添加するメタノールの量を若干増やすことで約 80mg/L まで発現させることに成功した。

根粒菌 *Mesorhizobium loti* における ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ の生理機能
2D08 ○横地奈菜、吉金 優、八木年晴(高知大・農)

【目的】根粒菌 *Mesorhizobium loti* はビタミン B₆ (ピリドキシン(PN) あるいはピリドキミン (PM)) 代謝経路を有している。本代謝経路の 2 番目の反応を触媒するピリドキサル (PL) 4-デヒドロゲナーゼ (PLDH) は NAD⁺ を補酵素とし、PL を 4-ピリドキサクトン (4-PAL) へと酸化する反応を触媒する。今回、本酵素の生理機能を明らかにするため、本酵素の遺伝子破壊株を調製し、その性質を調べた。【方法・結果】ゲンタマイシン (Gm) 耐性遺伝子を内部に組み込んだ PLDH 遺伝子を pK18mobsacB に挿入し、破壊プラスミドを構築した。これを大腸菌 S17-1 株に形質転換し、コンジュゲーションにより *M. loti* に破壊プラスミドを導入した。相同組み換えによって生ずる PLDH 破壊株を Gm 抵抗性に基づいて選択した。得られた本酵素破壊株は PN あるいは PM を唯一の炭・窒素源とする合成培地では、本酵素破壊株は生育がみられなかった。また、破壊株は本酵素によって生産される 4-PAL の水解物 4-ピリドキシ酸を資化できた。以上の結果から、本酵素はビタミン B₆ の資化に必須の機能を果たしていることがわかった。

Rhodococcus erythropolis MAK154 株由来アミノアルコール脱水素酵素遺伝子の解析と有用物質生産への応用
2D09 ○浦野信行、石毛たける、福井聡子、片岡道彦、北伸二¹、坂本恵司¹、清水昌
(京大院農・応用生命、¹第一ファインケミカル)

【目的】*Rhodococcus erythropolis* MAK154 株由来アミノアルコール脱水素酵素 (AADH) は、*l*-1-phenyl-1-keto-2-methylaminopropane (*l*-MAK) を *d*-pseudoephedrine へと変換する酵素として当研究室において単離された酵素である。今回は、本酵素の遺伝子解析と *d*-pseudoephedrine の生産について検討したので報告する。【方法・結果】AADH は 1-amino-2-propanol により発現が誘導される誘導酵素である。*R. erythropolis* MAK154 株のゲノム上で *aadh* 遺伝子のすぐ下流に存在する *orfE* の破壊株は、誘導の有無に関わらず、誘導を行った野生株と同等の AADH 活性を示した。以上のことより *orfE* 遺伝子産物は *aadh* 遺伝子の発現を負に制御する転写調節タンパク質であることが示唆された。また、*Rhodococcus* 属用発現ベクターである pREIT19 を用いた本菌株による AADH の発現についても検討した。

Cry45Aa 組み換え体の大腸菌封入体からの新規調製法とその精製
2D10 ○奥村史朗¹, 斎藤浩之¹, 片山秀樹¹, 日下芳友¹, 水城英一¹, 井上國世²
(¹福岡県工技セ、²京大院農・食生科)

【目的】*Bacillus thuringiensis* A1470 株が産生する Cry45Aa は CACO-2、Sawano、MOLT-4 などのヒト培養ガン細胞に対して細胞破壊活性を示す。Cry45Aa 遺伝子を導入した大腸菌から得た封入体を *B. thuringiensis* 由来タンパク質を調製する際の定法に従い、炭酸ナトリウム緩衝液 (pH10.5) で可溶化後、proteinase K 処理により活性化すると 20 µg/mL 程度の低濃度溶液しか得られない。そこでより高濃度の溶液が得られる新規調製方法を検討した。

【方法・結果】組み換え体の大腸菌による Cry45Aa 封入体は 10mM 塩酸に対して従来法の約 26 倍という高い溶解度を示した。そこで、Cry45Aa 封入体を 10mM 塩酸で可溶化し、ペプシンで活性化したところ、CACO-2 細胞に対して従来法と同等の細胞傷害活性を示した。さらに、陽イオン交換カラムによる精製を行い、約 540 µg/mL の精製 Cry45Aa 溶液を調製し、その pH 安定性や温度耐性など諸性質について検討を行った。

Streptomyces sp. REN-21 由来有機溶媒耐性チロシナーゼの触媒特性と大腸菌
2D11 での大量発現系の構築
○伊東昌章¹, 井上國世² (¹レンゴー・中研, ²京大院農・食生科)

【目的】*Streptomyces* sp. REN-21 が生産する有機溶媒耐性チロシナーゼ (OSRT) は、親水性有機溶媒を含む溶液中で高い酵素活性を示すユニークな酵素である。本研究では、OSRT のチロシン含有ペプチドやタンパク質などのモノフェノール類に対する酸化特性を調べた。また、OSRT を工業的に利用するための前段階として、大腸菌での大量発現系の構築を試みた。

【方法・結果】OSRT は、Gly-L-Tyr を最も効率よく酸化した。一方、マッシュルームチロシナーゼ (MT) は、L-Tyr-Gly に対して高い活性を示した。OSRT は、MT と比べ、カゼイン、ヘモグロビンなどのタンパク質を相対的によく酸化した。これらのことから、OSRT のチロシン含有ペプチドやタンパク質に対する酸化特性は、MT のそれと異なっていることが明らかとなった。次に、OSRT 遺伝子オペロンをクローニングし、それらの遺伝子と pET20(+), *E. coli* BL21(DE3)pLysS を用いて 54mg/l の生産量の OSRT 大量発現系の構築に成功した。

Cre-loxP システムを用いた分裂酵母遺伝子削除株の取得とその解析
2D12 ○稲井孝典¹, 岩城知子^{1,2}, 田中直孝¹, 浜 祐子², 竹川 薫¹
(¹香川大農・生命機能、²旭硝子中研)

【目的】分裂酵母は 2002 年に全ゲノム塩基配列が決定された最も遺伝子数の少ないモデル真核生物である。しかしながら必須遺伝子の同定や染色体の改変などに関する報告は大変少ない。そこでゲノム情報から必須遺伝子を含まない領域を推定して実際に大規模遺伝子削除株を取得し、削除株の諸性質や異種タンパク質発現への影響について検討を行った。

【方法・結果】分裂酵母ゲノムデータベースから出芽酵母の必須遺伝子のホモロジー検索により推定した必須遺伝子をマッピングした結果を基に、遺伝子削除標的領域を決定した。*ura4⁺*をマーカー遺伝子として Cre-loxP システムなどを用いて大規模遺伝子削除株を取得した。本手法により削除株 6 株を取得できた。染色体削除可能領域の総計は第一染色体で 263 kb、第二染色体 80 kb、第三染色体で 36 kb、合計約 380 kb であり、134 個の分裂酵母遺伝子が生育に必須でないことを新たに明らかにすることができた。

2D13 カイコ消化液による *Bacillus thuringiensis* 殺虫性毒素タンパク質の活性化機序

○飯倉直哉 白坂信和 加藤富民雄 神田康三 (佐賀大・農)

【目的】 近年、*Bacillus thuringiensis* (Bt) 抵抗性害虫の出現が報告されはじめ、解明すべき重要な課題となってきた。そこで、本研究では、害虫の Bt 抵抗性獲得機構の解明を目的として、カイコをモデル昆虫にして、Bt の毒性発現の第一段階である消化液プロテアーゼによる結晶体毒素タンパク質（プロトキシン）の活性化機序の解析を試みた。

【方法・結果】 Bt 感受性カイコ（錦秋 X 鍾和）消化液を 65% 硫酸塩析した後、陰イオン交換クロマトグラフィーで、プロテアーゼ分画を分離した。この分画をゲルろ過することで、3 種の分画（G1、G2 および G3）が得られた。3 種の分画は単独ではプロトキシンを活性化しなかったが、それぞれを組み合わせると反応させたところ、G2 と G3 を組み合わせでのみ、プロトキシンの活性化が認められた。分析の結果、G3 分画はトリプシン様活性を示したが、G2 はプロテアーゼ活性のない糖タンパク質であった。以上のことから、プロトキシンの活性化には糖タンパク質の関与が要因となることが強く示唆された。

2D14 混合組換え型クローンを用いた枯草菌 LP 形質転換機構の解析

再東幸子, 田口久貴, ○赤松 隆 (崇城大学・生物生命)

【目的】 プロトプラスト溶菌液中の DNA による枯草菌の形質転換で、取り込まれた DNA が一本鎖 DNA か、あるいは二本鎖 DNA かを混合組換え型クローンを解析することにより調べる。

【方法・結果】 セクタークローンを含むコロニーが混合組換え型クローンから成り、相同的組換えがスプライス型を示すのであれば、取り込まれた DNA が二本鎖 DNA であると推定することができる。そこで、枯草菌 AYG2 (*cysA metC trpC leuB arg1 aroG*) のコンピテント細胞に枯草菌 AC820 (*rpsL hisH smcI*) からのプロトプラスト溶菌液を加え、Arg⁺形質転換体を解析した。Arg⁺形質転換体の約 2% はセクタークローンであった。Arg⁺形質転換体コロニーを単一コロニー分離して解析したところ、二種類の異なる細胞を得た。その細胞はヘテロクローンであり、その多くがスプライス型で組換わっていると解釈できた。すなわち、枯草菌コンピテント細胞内に取り込まれた DNA は二本鎖 DNA であることが強く示唆された。

トウモロコシにおける傷害誘導性ペルオキシターゼに関する研究

2E01

○野崎匡文¹, 松川哲也¹, 石原亨², 岩村俣¹

(¹近畿大生物理工・生物工, ²京大院農・応生科)

【目的】トウモロコシにおいて傷害によりヒドロキシ桂皮酸アミド化合物が一過的に蓄積されることが報告されている。ヒドロキシ桂皮酸アミド化合物の役割の一つとして細胞壁を強化することによる物理的防御が挙げられ、その重合に peroxidase が関与することがいくつかの植物で示されている。本研究ではトウモロコシにおいても同様の防御機構が存在するかどうか検討するために、傷害による peroxidase 活性の誘導について研究を行った。

【方法・結果】植物材料としてトウモロコシ第一葉の裏側表皮を除去し蒸留水に浮かべたものを傷害処理葉として用いた。傷害処理葉の葉組織を4つの画分に分画して peroxidase を抽出し、各画分における活性を経時的に測定した。その結果、細胞外画分においては傷害により顕著に peroxidase 活性が増加したが、細胞内画分においては傷害による誘導がほとんど見られなかった。

高温ストレスにより植物体内で発生するマロンジアルデヒドが与える生化学的・分子生物学的影響

2E02

○山内靖雄・脇内成昭・杉本幸裕（神戸大学農学部）

【目的】高温ストレスにより植物体内で発生する多価不飽和脂肪酸の過酸化生成物・マロンジアルデヒド（MDA）がタンパク質機能や遺伝子発現に与える影響を調べた。

【方法・結果】光照射下で高温ストレスを与えた植物体を用い、タンパク質に結合した MDA を特異的に認識するモノクロナル抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果、ストレスにともなうタンパク質の化学修飾が検出された。MDA は酵素活性を阻害することからタンパク質機能低下をもたらしていると考えられる。また高温ストレス下での熱ショックタンパク質（HSP）の遺伝子発現を RT-PCR により調べたところ、MDA 量の変化と関連した遺伝子発現の上昇が見られた。MDA は非ストレス下の植物の HSP 遺伝子を誘導することから、高温ストレスにより発生する MDA はタンパク質毒性を示すのみではなく、高温ストレス応答機構におけるシグナル分子として機能している可能性がある。

トリプトファン高生産型形質転換シロイヌナズナにおける IAA の定量

2E03

○長井徹^{1,4}, 甲斐建次^{1,4}, 宮澤春奈^{1,4}, 松田史生⁴, 矢部尚登^{2,4}, 若狭暁^{3,4}
宮川恒^{1,4}（¹京大院農, ²東大院理, ³東農大, ⁴科技構 CREST）

【目的】植物ホルモンオーキシンの一種であるインドール-3-酢酸（IAA）は、トリプトファン（Trp）を前駆体として生合成される。Trp 含量の変化が IAA の生合成や代謝にどのような影響を与えるかを調べるため、イネ由来の *OASA1D* 遺伝子を導入して Trp 含量を飛躍的に高めたシロイヌナズナ形質転換体における IAA 関連化合物を定量した。

【方法・結果】播種後2週間の植物体抽出液を C18 カートリッジによる固相抽出法で精製し、LC/MS/MS を用いて MRM 負イオンモードにより定量分析した。Trp 含量が数百倍に増加した形質転換シロイヌナズナでは、野生型に比べ遊離 IAA および貯蔵型 IAA アミノ酸抱合体含量が数倍増加していた。IAA の異化産物と考えられるアミノ酸抱合体の含量には変化はみられなかった。IAA 含量の増加にもかかわらず、形質転換体の形態に野生型との相違はみられなかった。

2E04 ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 グルカナ-ゼの生理機能解析

○黒瀧 秀樹、田茂井 政宏、深溝 慶(近畿大・農・バイオ)

【目的】ラン藻 *Synechocystis* PCC6803 には、family 9 に属する endo-1,4-β-グルカナ-ゼに類似したタンパク質 (SsGlc) をコードする遺伝子が存在する。本研究では、ラン藻細胞内における SsGlc の生理機能を明らかにすることを目的とし、S.6803 SsGlc 遺伝子破壊株 (SsΔGlc) を作成し、諸性質の検討を行った。

【方法・結果】SsΔGlc ではグルカナ-ゼ活性が見られないことを確認し、SsGlc の欠損が生育に及ぼす影響を検討した。連続光 ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) および明暗条件下 (明期:12 時間/暗期:12 時間) における SsΔGlc の生育速度は、野生株と有意な差は認められなかった。しかし、0.3 M NaCl ストレス条件下では SsΔGlc の生育速度は野生株に比べ遅く、0.45 M NaCl 条件下では生育が完全に阻害された。また、0.3 M ソルビトール存在下でも SsΔGlc の生育阻害が認められた。以上より、SsGlc はラン藻細胞内の浸透圧調節に関与することが示唆された。現在、SsGlc により生成される浸透圧調節物質の単離・解析を試みている。

2E05 HPAEC-PAD 法による fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase の反応解析

○田茂井政宏¹、前田千紘¹、吉原綾子¹、川端康之²、重岡 成¹、深溝 慶¹
(¹近畿大・農・バイオ、²大阪樟蔭女大・食栄)

【目的】ラン藻に広く分布する fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBPase) は、Fru 1,6-P₂ と Sed 1,7-P₂ の両方を加水分解する新規酵素であるが、詳細な反応機構は不明である。本研究では、FBP/SBPase がどちらの基質を選択的に分解し、どのような調節機能をもつのかを明らかにすることを目的として、HPAEC-PAD 法を用いた反応解析を試みた。

【方法・結果】Fru 1,6-P₂ と Sed 1,7-P₂ を様々なモル比で混合し、FBP/SBPase により反応させ、継時的に HPAEC-PAD 法で解析した。高濃度条件下では、両基質が共存する場合、単独基質の場合いずれも同速度で両基質が加水分解されており、基質のモル比を変化させても基質選択性に違いは見られなかった。一方、低濃度条件下でも基質選択性に違いは見られないが、両基質共存時の反応速度は、単独基質存在時に比べて約 1.2~2 倍に上昇した。

2E06 イネユビキチン様タンパク質 RURM1 の機能特性の解析および精製

李鐘源¹、谷坂隆俊²、築山拓司²、奥本裕²、中崎鉄也²、井上國世¹
(¹京大院農・食生科、²京大院農・農学)

【目的】イネ *Rurm1* (*Rice ubiquitin-related modifier-1*) 遺伝子の機能喪失は、粒形の細粒化や植物体の生育遅延のみならず、非自律性トランスポゾン *mPing* の転移に影響を与える可能性がある。本研究は、*Rurm1* の生物学的機能を明らかにするために、ウェスタンブロット法により RURM1 タンパク質の機能解析を行うと共に、RURM1 タンパク質の精製を試みた。

【方法・結果】抗 RURM1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、RURM1 のバンドに加えて、40kDa および 100kDa の明確なバンドが観察された。これらのバンドは RURM1 と標的タンパク質との結合体であり、したがってイネ生体内において RURM1 が他のタンパク質と結合して機能していると考えられた。また、GST 融合タンパク質発現系を用いて RURM1 タンパク質の精製を試みたところ、0.1mM IPTG、16℃、24 時間の培養条件下で、多量の可溶化 RURM1 タンパク質を得ることができた。

レーザー1 細胞サンプリングによるエンバクファイトアレキシンの分析 2E07 梶山慎一郎¹, ○和泉自泰¹, 石原亨², 福崎英一郎¹, 小林昭雄¹ (¹阪大院工・応生工, ²京大院農・応生科)

【目的】我々は ArF エキシマレーザーを用いて、植物細胞壁に穿孔し、細胞内容物のサンプリングを可能とする装置の開発に成功している。本装置は、紫外線を高効率で透過する中空ファイバーを用いたフレキシブル照射系を有しており、複雑な3次元的形状を有する組織細胞への適応が可能である。今回、本装置を用いてエンバクのファイトアレキシンである、avenanthramide A を1細胞レベルで分析することを試みたので報告する。

【方法・結果】エンバク葉の切断面をエリシター (penta-*N*-acetyl-chitopentaose) 水溶液にて処理した後、葉の表面及び断面方向に関して1細胞サンプリングを行った。得られた試料を、Nano Flow LC-ESI-MSにより分析した結果、avenanthramide A の1細胞あたりの量は~40 pgであった。特に、表皮細胞では、サンプリングした細胞によってその蓄積量に大きな違いが確認され、細胞によりエリシター刺激に対する応答に差があることが示唆された。

シロイヌナズナにおけるアブシジン酸誘導気孔閉口とジャスモン酸メチル誘導気孔閉口 2E08 ○宗正晋太郎、中村宜督、下石靖昭、村田芳行(岡山大院自科・生物資源)

【目的】現在、植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)が誘導する気孔閉口シグナル伝達経路が幅広く研究されている。ジャスモン酸メチル(MeJA)は ABA と同様に植物の防御応答に関与し、気孔閉口を誘導する。本研究では、ABA 誘導気孔閉口と MeJA 誘導気孔閉口におけるシグナル伝達の相違点を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】気孔閉口において重要なセカンドメッセンジャーである活性酸素種(ROS)、一酸化窒素(NO)が ABA、MeJA 処理によって孔辺細胞内で産生され、2つの処理区の間でそれらの量に有意な差が見られた。また孔辺細胞アニオンチャネル、カルシウムチャネルなどのイオンチャネルが ABA、MeJA によって同様に活性化した。さらに ABA、MeJA それぞれの非感受性変異体の解析を行うことによって ABA 誘導気孔閉口、MeJA 誘導気孔閉口の間でシグナル伝達のクロストークが示唆された。

イネキチナーゼ遺伝子のいもち病特異的発現を制御する転写調節因子の同定 2E09 ○築山拓司¹、井上國世²、奥本裕¹、寺地徹³、田中千尋¹、中崎鉄也¹、谷坂隆俊¹ (¹京大院農・農学、²京大院農・食生科、³京産大・工)

【目的】イネにおいては、12 の PR-3 キチナーゼ遺伝子座(*Cht1*-*Cht12*)が存在する。これらの中には、いもち病感染によって発現が誘導されるものの、サリチル酸やジャスモン酸では誘導されないキチナーゼが存在することが明らかになっている。本研究では、イネ PR-3 キチナーゼ遺伝子のいもち病感染特異的発現を制御する転写調節因子の単離・同定を試みた。

【方法・結果】イネ品種日本晴の 12 の PR-3 キチナーゼ遺伝子上流約 1.0kbp の配列を用いて、それぞれの遺伝子に存在する *cis* 配列を PLACE で検索した結果、*Cht10* を除くいもち病感染特異的に発現した全ての遺伝子は VP1 タンパク質を *trans* 因子とする RY-repeat を有していた。イネの VP1 タンパク質のホモログである *OsVP1* の配列を用いて、イネ EST データベースに対する tblastn 検索を行った結果、イネといもち病菌との相互作用で同定されている 5 つの *OsVP1* ホモログが得られた。

2E10 シロイヌナズナキチナーゼアイソザイムの発現解析 ○中野早智子、西田彩、中村美紀子、田茂井政宏、深溝慶（近畿大・農・バイオ）

【目的】高等植物にはキチナーゼアイソザイムが複数種存在していることから、それぞれが異なる生理機能を有すると考えられる。本研究では、植物キチナーゼの生理機能解明を目的として、種々の生育環境下におけるシロイヌナズナキチナーゼアイソザイム遺伝子 (*AtchiA*: クラス III, *AtchiB*: クラス I, *AtchiV*: クラス IV) の発現パターンを、詳細に解析した。

【方法・結果】通常条件下で栽培したシロイヌナズナの各器官より Total-RNA を抽出し、RT-PCR 法によって mRNA 発現量を比較した。その結果、*AtchiB*, *AtchiV* は全器官で恒常的に発現していたが、*AtchiA* は全く発現が認められなかった。そこで、ストレス条件下における発現量を Real-time PCR 法によって詳細に解析した。その結果、*AtchiA* は種々のストレスによって誘導され、特に乾燥処理（灌水なし、7 日間）および塩処理（200 mM NaCl, 24 hr）により高発現が認められた。また、*AtchiB*, *AtchiV* も種々のストレスによって誘導され、*AtchiB* は乾燥処理によって 26 倍に、*AtchiV* は塩処理によって 8 倍に発現量が増加していた。

2E11 クロレラ由来葉緑体局在型グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (ch-G6PDH) の cDNA クローニングおよび大腸菌での発現 ○町田豪¹、大橋直人²、三村綾乃¹、本城賢一³、宮本敬久³、飯尾雅嘉³ (¹九大・院・生資環, ²九大・農, ³九大・院・農)

【目的】*Chlorella vulgaris* C-27 株は、低温処理（ハードニング）により耐凍性を獲得する。その際、G6PDH の活性上昇が報告されており、細胞質、葉緑体局在の 2 種類のアイソザイムの存在が示唆されている。本研究では、このうち葉緑体局在型アイソザイムをコードする cDNA のクローニングを行い、耐凍性獲得への関与について明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】まず、PCR 法を用い、*ch-g6pdh* 遺伝子の cDNA をクローニングした。次に、成熟型 ch-G6PDH を大腸菌で過剰発現させ、活性測定ならびに部分精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析により目的タンパク質であることを確認した。現在、ハードニング中の *ch-g6pdh* 遺伝子の転写産物量、翻訳産物量および活性の変化について検討している。

2E12 *Eucalyptus globulus* のモノテルペン合成酵素について ○矢野伸一¹、佐々木佳菜子²、矢崎一史² (¹産総研中国セ、²京大生存圏研)

【目的】ユーカリはパルプ用等で植栽量が増加している樹種であるが、多量のイソプレン、モノテルペン等を大気中に放出するため環境面への影響が懸念されている。本研究はこれらの物質の合成に関わるユーカリ酵素遺伝子のクローニングと解析を目的とした。

【方法・結果】*Eucalyptus globulus* の緑葉から調製した cDNA ライブラリーから、*Populus alba* のイソプレン合成酵素遺伝子 DNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った結果 2 種の陽性クローンが得られたが、それらは DNA で 10 塩基、アミノ酸で 4 残基のみ異なっていた。これらの遺伝子による発現ベクターを構築して大腸菌でタンパク質を発現させ DMAPP または GPP を基質として反応させた生成物を定性した。その結果、2 種の遺伝子産物とも 1,8-シネオール合成活性を持つが、イソプレン合成活性は持たないことが明らかになった。しかしこれらの酵素のアミノ酸配列は、1,8-シネオール合成酵素を含む既知のモノテルペン合成酵素よりイソプレン合成酵素により高い相同性を持っていた。

シス型ゴム産生植物パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*)の EST 解析

2E13

○山東智紀, 福崎英一郎, 山下敦士¹, 服部正平¹, 小笠原直毅², Nadirman Haska³, Teuku Tajuddin³, 渡辺訓江⁴, 小林昭雄 (阪大院工・応生, ¹北里大・北里生命研究所, ²奈良先端大・情報・情報生命, ³BPPT・Indonesia, ⁴ブリヂストン)

【目的】パラゴムノキは、タイヤや医療用手袋などに代表されるゴム製品の主原料として欠かせない天然ゴム(natural rubber : シス-ポリイソプレン)をその乳液(latex)中に含有することが知られている。これまでにいくつかのタンパク質の天然ゴムの生合成への関与が示唆されているが、生合成メカニズムは未だに解明されていない。今回ポリイソプレン生合成関連遺伝子を得るために EST(expressed sequence tags)解析を行ったので報告する。

【方法・結果】ゴム産出部位である Latex と非産出部位である木部(Xylem)について cDNA Library を作製した。両者について各 2 万クローンをランダムに選び、ワンパスシークエンス解析を行った。得られた配列について clustering および annotation を行った結果、Latex cDNA Library 由来の配列において発現遺伝子に大きな偏りがあることが明らかになった。

トランス型ゴム産生植物トチュウ (*Eucommia ulmoides*) の EST 解析

2E14

○西河貴史, 福崎英一郎, 山下敦士¹, 服部正平¹, 小笠原直毅², 中澤慶久³, 馬場健史³, 小林昭雄 (阪大院工・応生, ¹北里大・北里生命研究所, ²奈良先端大・情報・情報生命, ³日立造船)

【目的】トチュウは葉や樹皮にテルペンの一種である長鎖 *trans*-ポリイソプレンを多量に蓄積し、次世代のバイオマス資源として注目されている。ポリイソプレン生合成関連遺伝子を取得するために EST (expressed sequence tags) 解析を行なったので報告する。

【方法および結果】ポリイソプレン高生産部位である師部 (樹皮) と低生産部位である木部について cDNA ライブラリを作製しシークエンス解析を行なった。師部、木部のライブラリについてそれぞれ 16567、16113 の精度の高い EST 配列が得られた。得られた配列についてグループ分けおよび注釈付けを行なった。これにより師部 cDNA ライブラリ由来の配列の割合が高く機能未知の配列を複数見いだした。また annotation の情報からテルペン生合成に関与している可能性のある配列が複数確認できている。

Effect of deuterium oxide on Arabidopsis seed germination and gene expression profiles during imbibition

2E15

○AMIN Md. Abdullahel, 岡澤敦司, 福崎英一郎 小林昭雄 (阪大院工・応生工)

【目的】Germination of Arabidopsis is extremely delayed in D₂O. In this study, the effect of D₂O on the expression pattern of genes during imbibition was analyzed. Additionally, new genes involved in seed germination were screened.

【方法・結果】Real time RT-PCR analyses showed that expression of most of key genes in gibberellins, brassinosteroids and methionine biosynthesis, abscisic acid catabolism is suppressed as well as delayed in D₂O during imbibition before germination. The expression level of *GPA1*, *AGB1* and *GCR1* which can recognize signals regulating germination is also suppressed or delayed in D₂O. Differential display followed by cloning, sequencing and finally real time RT-PCR data indicate that genes for *Zat10* and glutaredoxin family protein are suppressed in D₂O at early stage of imbibition.

エンドウ (*Pisum sativum* L.) 発芽初期における APY1 の発現解析
2E16 ○米田基人¹, Eric Davies², 横尾俊哉¹, 阿部俊之助¹ (¹愛媛大・農, ²ノース
カロライナ州大・植物)

apyrase は NTP だけでなく NDP も加水分解する基質特異性が低い酵素で、Apy1 と Apy2 がある。アラスカエンドウ黄化芽生え第一節間の細胞骨格画分には APY1 の産物 (apyrasel) が多量に存在しており、細胞内で多局在性を示す。そこで、芽生えの成長と分化における apyrase の役割を明らかにするため、発芽初期における APY1 の発現をウェスタンブロッティング、RT-PCR および免疫組織化学により解析した。APY1 は浸水中はごくわずかに発現し、播種後 16 時間から発現量が組織全体で急激に増大し、根茎葉の器官形成が終わる 62 時間で最大量に達した。また、Apy2 の発現もわずかながら検出された。吸水時から発現が高まる細胞骨格タンパク質遺伝子 (ACT、TUB) と APY1 の発現を比較すると、APY1 は発芽直後から転写が始まり器官形成初期に転写が活発となる発芽後誘導遺伝子であり、芽生えの器官形成時期に重要な役割を果たしていることが示唆された。

シロイヌナズナの強光応答性 SR タンパク質ホモログの機能解析
2E17 ○朝野 未奈子¹ 木村 彩子¹ 田部 記章¹ 吉村 和也² 重岡 成¹
(¹近畿大・バイオ, ²奈良先端大・バイオ)

【目的】セリン／アルギニンリッチ (SR) タンパク質は、選択的スプライシングの制御系において重要な機能を有する。これまでに我々は、高等植物シロイヌナズナに存在する複数の SR タンパク質が種々の環境ストレスに応答することを明らかにした。そこで本研究では、強光応答を示した SR タンパク質 (SR30 および SR41a) の選択的スプライシング制御機構の解析および標的遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】タバコ培養細胞 BY-2 を用いた GFP/SR41a 融合タンパク質の一過性発現解析の結果から、SR41a は核に局在していることが示された。次に、SR30 および SR41a を過剰発現もしくは欠失させたシロイヌナズナ形質転換株およびノックアウト変異株を作出した。現在、これらの形質転換体を用いて、SR30 および SR41a が選択的スプライシング効率を制御する標的遺伝子の同定とこれら形質転換体の酸化ストレス耐性能を検討している。

レーザーアブレーションを用いた植物細胞への遺伝子導入
2E18 — 葉緑体形質転換の試み —
○梶山慎一郎¹, Benesh Joseph¹, 井上文秀¹, 嶋村正樹², 福崎英一郎¹
富澤健一², 小林昭雄¹ (¹阪大院工・応生工, ²地球環境研(RITE))

【目的】我々は、紫外線パルスレーザーを利用した新しい植物形質転換法について報告してきた。今回、さらに本方法の適用範囲を広げる目的で、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xhanti) の葉表皮細胞への導入について検討すると共に、葉緑体の形質転換を試みたので報告する。

【方法・結果】遺伝子 (sGFP) をコーティングした金粒子 (直径 0.6 または 1 μm) をタバコ葉の細胞表面に置床し、これにレーザーを照射し導入を行った。その後 25°C、遮光下に一昼夜置き、蛍光顕微鏡にて GFP を一過性発現している細胞の確認を行った。その結果、処理細胞の約 1 % に一過性発現が見られた。次に葉緑体形質転換用のベクター (pLD200GFP) を用いて同様の実験を行ったところ、特に気孔細胞において ~ 3 % の良好な形質転換効率を得られた。

2F03 ヌメリスギタケレクチン (PAL) は殺虫性レクチンファミリーに属している。 ○八木史郎、長崎寛規 (鹿児島大・農・生資化)

【目的】菌類レクチンは、動植物レクチンとは異なった糖結合特異性やファミリーのものが報告されていて、いまだに不明の部分が多い。栽培キノコであるヌメリスギタケ (*Pholiota adiposa*) に、強い血球凝集活性を見出し、そのレクチンを精製し、性質の決定を試みた。

【方法・結果】凍結乾燥子実体を磨砕抽出後、CM-セルロファイン、トーヨーパール HW55F で2つの標品を得た。これらは分子量 66K、33K と推定されたが、SDS-PAGE では全く同一の二本のバンド (17.7K、16.2K) を 1:1 で与えた。そのため、組み合わせは分らないが、4量体、2量体と推定された。二つの標品の血球凝集活性の糖阻害は同じで、単糖、2糖は全く阻害せず、ウシ顎下腺ムチンのみが強く阻害した。N-末端分析の結果、いずれもブロックされていた。両サブユニットのリジルエンドペプチダーゼ処理後の SDS-PAGE は、ほぼ同じパターンであった。またペプチド配列も同じく対応していた。いくつかのペプチド断片の部分配列は、PAL が殺虫性レクチン (AOL など) に相同であることを示した。

2F04 魚類粘質物による流体抵抗の低減特性に関する研究 ○藤原和人¹、浅川牧夫²、廣江哲幸¹、波多英寛¹ (¹熊大工、²熊大教)

【目的】魚類の粘質物の物理特性はその生活環境・形態に密接に関係していると考えられる。運動性能の違う魚類においては、粘質物の流体特性にも差があることが予想される。表面における流体抵抗の低減効果を調べ、粘質物の物理的性質とどのように関係するかを調べる。

【方法・結果】

まず、ウナギとアユの粘質物から抽出した SA-を精製して得られた SA-糖タンパクの膜を有効に固体表面にコーティングする方法を見つけ、流路として 0.3mm の間隔を設けたガラス板に塗布する。流路に一定の圧力を加え水を通し、流量を計測することによって抵抗低減効果を調べる。実験の結果、シラネート剤を用いると安定した膜が形成され、流体抵抗も低減された。低減率はアユの方がウナギより高く、運動性から予想された結果が得られた。またこれは SA-糖タンパクの糖度に関係していることがわかった。

2F05 パーフォリン糖鎖におけるシアル酸の存在形態 ○藤本紀和¹、久澄倫之介¹、Liu, Chau -Ching²、江藤望¹ (¹宮大農・応生科、²ピッツバーグ大医)

【目的】パーフォリンは、キラーT細胞から放出される細胞傷害性顆粒タンパク質であり、標的細胞膜へ結合・侵入し、互いに重合する事で孔を構築し、標的細胞を破壊する。我々はパーフォリン糖鎖のシアル酸が活性発揮に重要である事を報告してきた。しかしながら、パーフォリンのシアル酸含量は一般的な糖タンパク質に比べ多い事から、本発表では、シアル酸の存在形態を検討した。

【方法・結果】シアル酸の存在位置を検討するために、パーフォリンに PNGase F 処理を行ったところ、羊赤血球 (SRBC) に対する溶血活性は、糖鎖の除去に伴い減少し、また、SRBC への結合量も減少した。この事より、パーフォリンの活性発揮に重要なシアル酸の大部分はムチン型ではなく、N 結合型糖鎖上に存在する事が示唆された。

2F06 *Aspergillus nidulans* のガラクトース転移酵素の構造と機能

○井田 寛子、岡 拓二、後藤 正利、古川 謙介(九大院生資環)

【目的】 *Aspergillus* 属糸状菌の糖タンパク質は主にマンノースが付加しているが、中にはガラクトースを構成糖とするものも存在する。本研究ではガラクトース付加に関する知見が得られていない *Aspergillus nidulans* のガラクトース転移酵素(Gct)に注目し、同定と機能解析を試みている。

【方法・結果】 *A. nidulans* の A26 株から全タンパク質を抽出し、植物由来の GSL-IB4 を用いたレクチンブロット解析を行った。ガラクトースを付加した複数のタンパク質が検出されたことから、*A. nidulans* における Gct の存在を確認した。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の Gct を指標として *A. nidulans* のゲノムデータベースから 2 つの ORF を見出し、それぞれを *gctA*、*gctB* と名づけた。その構造から *gctA*、*gctB* ともに II 型膜結合タンパク質であることが示唆された。A26 株から全 RNA を抽出し、*gctA*、*gctB* の転写量を測定した。*gctA* は構成的に発現していた。また、*gctA*、*gctB* ともに発現量が少ないことが確認された。

2F07 線虫野生株及び α -Mannosidase 欠損株における遊離 N-結合型糖鎖の構造解析

○北村久美子¹、加藤紀彦¹、前田恵²、木村吉伸²、片山高嶺¹、山本憲二¹
(¹京大生命・統合生命、²岡山大院自科・生物資源)

【目的】動物細胞内には有意な量の遊離N-結合型糖鎖が見出されている。しかし、その代謝経路や生理的意義の詳細は明らかにされていない。そこで遊離糖鎖の生理機能を解明するために、サイトゾルに存在する α -Mannosidase の遺伝子を欠損した線虫 *C. elegans* と野生株の線虫の遊離糖鎖を比較し、その代謝経路についての考察を試みた。【方法及び結果】線虫 *C. elegans* を破碎後、透析外液から遊離糖鎖を調製し、2-アミノピリジンで蛍光標識後、様々なカラムを用いて精製した。PA糖鎖の構造はHPLCによる標準糖鎖との溶出位置の比較や、ESI-MS、酵素消化により解析した。その結果、野生株はMan9-5GlcNAc1のハイマンノース型糖鎖を有し、Man5:Man6:Man7:Man8:Man9=12:9:9:6:1の比率で発現していた。一方 α -Mannosidase欠損株ではMan5:Man6:Man7:Man8:Man9=12:10:1:0.4:0.1の比率で発現し、さらに野生株では見られなかったGlcNAc1Man5GlcNAc1の構造が見出された。

2F08 ビフィズス菌由来のエンドグリコシダーゼによるペプチドへの糖鎖の付加

○小澤隼人¹、山口真範²、石田秀治^{3,4}、片山高嶺^{1,4}、山本憲二^{1,4}、鈴木俊一⁵
(¹京大院生命・統合生命、²弘前大・医、³岐阜大・応生科、⁴JST・CREST、⁵味の素・アミノサイエンス研)

【目的】 *Bifidobacterium longum* 由来の endo- α -N-acetylgalactosaminidase は糖タンパクからムチン型糖鎖のコア 1 構造(Gal β 1-3GalNAc)を特異的に加水分解して遊離する活性とともにヒドロキシル基を含む物質にその二糖を転移する糖転移活性を有する。本研究ではこの糖転移活性を利用してペプチドに糖を付加し、糖ペプチドを酵素合成することを試みた。

【方法・結果】 pNP-Gal β 1-3GalNAc を糖供与体とし、endo- α -N-acetylgalactosaminidase の糖転移活性を利用して、生理活性ペプチド(ペプチド-T など)の Ser/Thr 残基へ Gal β 1-3GalNAc 二糖の転移を試みた。反応液について、HPLC で分析し、糖転移生成物と予想された画分を分取して質量分析した結果、推定した糖ペプチドの分子量であることを確認した。また、ペプチドの他にも様々な糖やアルコールへ二糖が転移することも確認した。

2F09 Lecithin/Cardiolipin 感作 Latex 試薬における Lecithin の影響 ○小森谷友絵、市石卓、神野英毅（日大・生産工）

【目的】Cardiolipin 抗体は、梅毒やマラリア、AIDS などの多くの感染症患者で検出される他、動・静脈血栓や習慣性流産などの臨床症状を有する自己免疫疾患例においても血清中に出現することが明らかとなっている。本研究では、ラテックス凝集反応を用いて Cardiolipin 抗体の測定を試みた。本発表では、補助脂質 Lecithin の組成・構造から Latex 試薬への反応性への影響を検討したので報告する。

【方法・結果】脂質抗原溶液（Lecithin、Cardiolipin）と Latex 粒子を混合し、エバポレーターを用いて減圧乾燥を行った。乾燥後、0.2%の BSA 溶液で再懸濁し、30 分の攪拌と 15sec の超音波処理を行った。リン酸緩衝液で 2 回洗浄し、最後に超音波処理をすることにより Latex 試薬を作製した。作製した Latex 試薬は RPR 標準溶液（極東製薬）を用いて凝集反応速度を測定した。その結果、単一の組成をもつ Lecithin と比較し、複合 Lecithin を用いた方が、更に飽和 Lecithin より不飽和 Lecithin の方が反応性が高くなることがわかった。

2F10 ヘドロとマージを基材にしたシードペレットの調製と利用に関する研究 ○小池晶琴¹ 本田知史¹ 岡本智伸¹ 原敏夫² 梶田聖孝¹ （¹九州東海大・農、²九大院・農）

【目的】水圏は汚濁化や富栄養化が進行し、ダムや湖沼ではヘドロが堆積している。また、沖縄のマージ土壌流亡も、海洋汚染（赤土汚染）などの要因となっている。そこで、これらを未利用資源として活用するために、シードペレットの基材に用いた。さらに日々進行する砂漠化に対し、乾燥や日較差に強い種子を検討し、ヘドロ及びマージを基材にしてシードペレットを調製し、その利用価値について基礎的研究を行った。

【方法・結果】ヘドロ及びマージを風乾試料とし、それに一定量の種子と γ -PGA を加え、蒸留水を入れて調整し、室温で一週間風乾させた（この時、どのペレットも発芽していない）。風乾後、室温にて種類別に分けたシャーレ内で、一週間かけて発芽試験を行った。その結果、全てのシャーレ内で発芽は見られたものの、種子の種類や、基材の種類、 γ -PGA の有無などによって、発芽の状況に差が見られた。

2F11 酸性環境中の独立栄養細菌の遺伝的解析 ○上村一雄，岡林愛，若井暁，金尾忠芳，杉尾剛（岡山大院・自然科学）

【目的】岡山県柵原鉱山の酸性鉱山廃水は、鉄酸化細菌による微生物処理後、中和されて放流されている。本研究は、この処理システム内で鉄酸化に関与している優勢な微生物を明らかにし、システムの維持管理のための微生物学的知見を得ることを目的としている。

【方法・結果】処理される鉱山廃水中の微生物相については、鉱山廃水から抽出した DNA を鋳型に用いて 16S rDNA を、一方、処理システム内の微生物相については、RubisCO 遺伝子を、それぞれ PCR クローニングし、遺伝子配列を決定することによって、分類、同定を行った。鉱山廃水中には *Verrucomicrobia* に属する細菌が優勢な微生物として検出された。一方、処理槽内の RubisCO の *cbbL* 遺伝子（55 クローン）は、RFLP 解析により 7 グループに分類され、最も優勢はグループ(40 クローン)の配列は、既知の *Acidithiobacillus ferrooxidans* Fe-1 株と 98.5%の相同性を示したが、*A. ferrooxidans* ATCC23270 株とは 91%の相同性しか示さず、特殊な鉄酸化細菌が処理槽内で優勢となっていることが明らかとなった。

2F12 PCE 脱塩素化酵素遺伝子の安定性に及ぼすクロロフォルムとトリクロロエテンの影響 ○二神泰基、山口威仁、後藤正利、古川謙介（九大院、生資環）

【目的】*Desulfitobacterium* sp. Y51 株は、PCE 脱塩素化酵素 (PceA) によりテトラクロロエテン (PCE) を *cis*-1,2-ジクロロエテンへと脱塩素化する。先の研究で、SD 株 (*pceA* のプロモーターを欠失) と LD 株 (*pceA* を欠失) が分離された。本研究では、Y51 株の *pce* 遺伝子の安定性に及ぼすクロロフォルム (CF) とトリクロロエテン (TCE) の影響を調べた。

【方法・結果】Y51 株を CF (1 μ M) 添加培養すると LD 株が高頻度 (80%+) に出現した。この原因は、Y51 野生株では CF (1 μ M) 添加培養により生育が阻害されるのに対して、LD 株は (SD 株も) 阻害されないためであった。CF による生育阻害は、SD 株と LD 株で発現しない、あるいは機能が失われているタンパク質 (PceA, PceB, PceC, PceT) のいずれかが CF と相互作用することにより生起すると考えられた。また、CF (1 μ M) 添加培養でも、TCE (1mM) を添加すると、野生株から SD 株と LD 株は出現しなかった。したがって、TCE は CF による親株の生育阻害を解除する作用があると考えられた。

2F13 環境中での Triton X の好氣的分解について ○市来弥生¹、田村廣人²、吉川博道¹ (¹ 福工大院工, ² 名城大農)

【目的】非イオン性界面活性剤 Alkylphenol polyethoxylate (APPEO) は工業用洗剤や農薬補助剤として大量に使用されている。APPEO は農耕地中の微生物によりエストロゲン類似の作用を持つ Alkylphenol diethoxylate (AP2EO) に分解されることが明らかになっているが、河川や海水中に存在する Alkylphenol (AP) への分解プロセスは依然として不明のままである。本研究では、環境中において、AP を生産する好氣的分解プロセス存在の可能性を検討した。

【方法・結果】日本各地より採取した土壌を用いて、Triton X を単一炭素源とする無機塩培地で集積培養を行った。培養液の酢酸エチル抽出物を HPLC および GCMS で分析した。その結果、(1) Triton X のエチレンオキシド鎖の末端の酸化のみ行う土壌、(2) エチレンオキシド鎖の短鎖化に伴い、OPnEO とともに末端が酸化された OPnEC を蓄積する土壌、(3) OPnEO のみを蓄積する土壌の存在を見出した。また、好氣的条件下で Triton X を OPnEC まで分解する土壌を見出した。

2F14 VOC 分解菌のスクリーニングと緒特性の解析 ○上野紘史¹、岡本賢治¹、築瀬英司¹ (¹ 鳥取大工・生応工)

【目的】大気環境保全の観点から、揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compound、以下 VOC と略す) の除去技術の確立が急務とされている。我々は、低ランニングコストかつ環境低負荷型の VOC 除去システムの開発を目的とし、自然界から単離した VOC 分解菌を利用したバイオフィルターに関する研究を進めている。今回、トルエンやベンゼンに対して有効な分解能を示す菌のスクリーニングを行い、その特性について検討を行った。

【方法・結果】土壌から、トルエンおよびベンゼン存在下で生育可能な菌株をスクリーニングし、その中で生育と分解が最も安定していた2種類の細菌を単離した。形態学および生理学的性質ならびに 16S rDNA 解析の結果から、それぞれ *Pseudomonas* sp. ならびに *Rhodococcus* sp. と同定した。双方の菌ともに、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼンに対して有効な分解能を示し、これら各 VOC が混在した場合でも完全に分解した。また、両菌の DNA について調べたところ、Toluene dioxygenase をコードする遺伝子の存在を確認した。

2F15

メチルエチルケトン分解菌を担持したバイオフィルター

○徳永大貴¹，岡本賢治¹，築瀬英司¹（¹鳥取大工・生応工）

【目的】メチルエチルケトン（MEK）は、塗料、接着剤、電子基盤の洗浄液などの溶媒に使用されている。MEK は特異臭を放つことから、蒸気により目、皮膚、呼吸器などに激しい刺激を与える有害物質である。我々は、揮発性有機化合物（Volatile Organic Compound、以下 VOC と略す）として問題視されている MEK に着目し、VOC 除去システム確立の一環として、今回、自然界から有効な分解菌のスクリーニングを試みた。

【方法・結果】各地から採取した土壌サンプルから、MEK 存在下で生育可能な菌株をスクリーニングし、その中で生育と分解が最も安定していた細菌数株を単離した。さらに、その中からベンゼン、トルエンならびにエチルベンゼン等の VOC に対しても分解能を示す M14 株を選抜した。本菌を形態学および生理学的性質ならびに 16S rDNA 解析の結果から、*Rhodococcus* sp.と同定した。M14 株を使用したバイオフィルターを構築し、MEK の処理を検討したところ、有効な除去効果を確認した。

2G01 アンチマイシン A による ROS 産生とアポトーシスの関係

○小北真生（阪市大、院、理）

アンチマイシン A (AA) は、ミトコンドリア内膜上の複合体IIIで電子伝達系を阻害する。その結果、AA は活性酸素種 (ROS) の産生を伴う細胞毒性を示す。AA はヒト白血病細胞 HL-60 に対してはアポトーシス様の細胞死を誘導するが、その誘導メカニズムは典型的なアポトーシスのものとは異なっていることがわかった。今回はその相違点について報告する。AA 処理した細胞は、予想通り ROS を産生した。産生した ROS はアスコルビン酸の添加により顕著に抑制された。しかしながら、ROS の抑制は細胞死を防ぐことはできなかった。また、AA 処理した細胞では、典型的なアポトーシスの際に見られる核の断片化が誘発されたにもかかわらず、DNA のヌクレオソーム単位での分解がみられず、caspase 3 および 7 の活性化や、cytochrome c の細胞質への流出も認められなかった。以上の結果から AA による細胞死はミトコンドリアにおける ROS の産生とは関係がなく、ROS に依存した既知のアポトーシスのカスケードとは異なった経路で進行することがわかった。

2G02 5-Deoxy-strigol の AM 菌の菌糸分岐誘導における構造活性相関

○秋山康紀^{1,2}, 松崎謙一¹, 林英雄¹ (¹阪府大・院生命科学, ²CREST)

【目的】宿主植物の根近傍での顕著な菌糸分岐はアーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) の宿主認識反応である。最近、我々はミヤコグサの根分泌物からこの菌糸分岐誘導物質としてストリゴラクトンである 5-deoxy-strigol を単離した。今回、5-deoxy-strigol とその 2'-エピマーの計 4 つのエナンチオマーを用いて、本物質の菌糸分岐誘導における構造活性相関について調べたので報告する。

【方法・結果】光学分割はキラルカラム (Chiralpak AR-H, 20% i-PrOH- n-hexane) を用いて行った。AM 菌 *Gigaspora margarita* の発芽胞子を用いたアッセイにおいて、天然型 5-deoxy-strigol (2'(R)) は 3 pg/disc まで活性を示した。一方、そのエナンチオマーはほとんど全く活性を示さなかった。2'-エピマーのうち、2'(R)体は天然型とほぼ同等の活性を示した。2'(S)体も活性を示したが、約 30 倍(100 pg/disc) 活性は弱かった。以上の結果から、メチルブテノライド環の 2'位の立体化学が活性発現に大きく影響することが明らかになった。

2G03 ミトコンドリア複合体-I 阻害剤アセトゲニンの阻害機構研究：スパーサー部の機能

○安部真人, 村井正俊, 一丸直哉, 吉田健彦, 西岡孝明, 三芳秀人 (京大院農・応用生命)

【目的】アセトゲニン類は抗腫瘍活性、殺虫活性など幅広く強力な生物活性を有するが、このような活性がミトコンドリア複合体-I の強力な阻害に起因することがわかってきた。これまでに、THF 環部と γ -ラクトン環部がアルキルスパーサーによって直接的に連結されていないと全く活性を発揮しないことがわかり、スパーサー部の重要性が明らかになった。今回は、スパーサー部の役割をさらに詳しく解明することを目的とした。

【方法・結果】スパーサー部の長さを種々改変した結果、最適な長さは炭素数 13 個であった。スパーサーを 13 個よりも長くすることによる失活の程度は、短くするよりも顕著であった。スパーサー部に位置特異的に多重結合を導入しその柔軟性を低下させたが、どの位置においても阻害活性に大きな影響は認められなかった。以上のことから、スパーサー部には厳格な意味でのレセプターがないものと結論した。

新規アセトゲニン mimics (Δ lac - アセトゲニン) の合成と作用機構研究
2G04 ○一丸直哉, 村井正俊, 安部真人, 濱田剛, 槇野早恵, 真壁秀文¹,
 西岡孝明, 三芳秀人 (京大院農・応用生命, ¹信大院農)

【目的】天然アセトゲニン類の中で, γ -ラクトン環を共通構造として持つタイプが圧倒的に多いことが知られている。演者らは新規な作用特性を期待して, γ -ラクトン環を持たないアセトゲニン mimics (Δ lac - アセトゲニン) を合成し, ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I における作用機構研究を行った。

【方法・結果】いくつかの Δ lac - アセトゲニンは, 強力な天然アセトゲニン並の阻害活性を示したが, Δ lac - アセトゲニン類の構造活性相関プロファイルは, 天然アセトゲニン類と全く異なるものであった。複合体-I からの活性酸素発生に対する効果など詳細な作用機構研究の結果, 本化合物群が天然アセトゲニン類はもちろん, 既知の複合体-I 阻害剤とは作用性を異にする全く新規な阻害剤であることがわかった。

オクトパミン受容体とリガンドのドッキング構造
2G05 ○平島明法¹, 瀬下秀則², Hongwei Huang² (¹九大農院, ²アクセルリス)

【目的】オクトパミン受容体(OAR)活性中心とアゴニスト 2-(2,6-diethylimino)imidazolidine やオクトパミン(OA)とのドッキング構造を検討した。その結果より pharmacophore モデルの構築を試み、データベース検索から高活性リガンドを設計する。

【方法・結果】アクセルリス社の Discovery Studio Modeling 1.1/Structure Based Design (SBD) 1.2 を用い、ワモンゴキブリ OAR のアミノ酸配列(GenBank ID: AY333178)より、ホモロジー検索/3次構造の構築を行った。OAR のアミノ酸配列に、牛のロドプシン A 鎖(PDB ID: 1U19)が高い相同性を示したので、OAR モデル構造の鋳型として用いた。OA の NH_2 , $p\text{-OH}$ と OAR の ASP105, SER213 カルボニル酸素が水素結合し、OA のベンゼン環と OAR の PHE507 ベンゼン環に $\pi\text{-}\pi$ 結合が認められた。

Cytokine 生成抑制活性を有するセスキネオリグナン morinol B の立体構造研究
2G06 ○山内聡¹, 菅原卓也¹, 秋山浩一², 丸山雅史¹, 岸田太郎¹,
 岡崎百年¹, 柏木丈弘¹ (¹愛大農, ²愛大総科支セ)

【目的】morinol B (Tetrahedron, 55, 14571, 1999) は、薬草由来のテトラヒドロピランセスキリグナンであり、植物から得られた化合物の試験によって cytokine 生成抑制活性が報告されている。しかし、植物体内でラセミ体として生合成され、また、不斉 2 級ベンジル水酸基が存在する 7'位とそれに隣接する不斉 8'位との立体関係が不明であることから、立体異性体を合成する事によって天然物の立体構造を明らかにする事にした。

【方法・結果】今回は、7'と 8'位とがスレオ体の関係にある立体構造を得る事にした。7'と 8'位の立体は、エバンスの *anti* アルドール縮合によって構築し、8 位の立体もエバンスの不斉補助基を用いたアリル化によって選択的に得た。7 位は、グリニヤール反応により導入したが、選択的には得られなかった。テトラヒドロピラン環は、 $\text{S}_\text{N}2$ 分子内エーテル化によって得た。合成の結果、morinol B の 7'と 8'位とはスレオ体の関係にある事が分かった。

2G07 3,4-dibenzyltetrahydrofuran 型リグナンのベンジル位における酸化の程度と抗酸化活性との関係

林良雅¹、○中島由貴¹、山内聡¹、切木平拓也²、増田俊哉²、山田和毅² (¹愛媛大・農、²徳島大・総合科)

【目的】リグナン類の母構造と抗酸化活性との関係解明のための研究を行っている。本研究では、ベンジル位における酸化の程度が異なる 3,4-bis(4-hydroxy-3-methoxybenzyl) tetrahydrofuran 型リグナンを合成した後、ethyl linoleate hydroperoxide 生成抑制活性、及びラジカル消去活性の測定を行う事により、ベンジル位における酸化の程度と抗酸化活性との関係を調べる事にした。

【方法・結果】L-グルタミン酸から合成したリグナン類の活性を調べた結果、ベンジル位の酸化の程度が増すほど、抗酸化活性が低下する事が示された。また、ジアステレオマー間での活性の違いは、ethyl linoleate hydroperoxide 生成抑制活性では見られなかったが、ラジカル消去活性においては観察された。

2G08 アラキドン酸代謝産物である LTB₄ の C₉-C₂₀ 部位の合成

○小泉有希、植田哲平、山内聡 (愛媛大・農)

【目的】炎症作用に関与するアラキドン酸代謝産物である LTB₄ は、C₅ 位と C₁₂ 位に二級水酸基を持つ不斉炭素を有する。本合成研究では、LTB₄ の C₈ 位と C₉ 位のトランス二重結合間で切断し、C₁-C₈ 部位は酵母還元生成物である (1S,5S)-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-one (**1**) から、C₉-C₂₀ 部位は同様に酵母還元生成物である methyl (1R,2S)-(2-hydroxycyclohexyl)acetate (**2**) から合成する事にした。今回は、酵母還元生成物 **2** の 1 位の不斉を C₉-C₂₀ 部位の 12 位の不斉へ導く合成法について報告する。

【方法・結果】酵母還元生成物 **2** のシクロヘキサン環上の水酸基を保護した後、α 位の水酸化、保護を行った。エステル還元、生じた一級水酸基の保護、シクロヘキサン環上の水酸基の脱保護、酸化を行った後、立体保持である Baeyer-Villiger 酸化を行った。ヘミアセタールへの還元、BuPh₃PBr との Wittig 反応、接触還元、保護の後、酸化開裂、Ph₃P=CHCHO との反応を行い、さらに、還元、ハロゲン化の後、ホスホネートへ導いた。

2G09 Equol の合成研究

○岡崎百年、森崎文栄、岸田太郎、首藤義博 (愛媛大・農)

【目的】ダイズイソフラボンの一種である daidzein や formononetin の腸内代謝物である equol の合成、およびその両鏡像体の調製法の構築を目的とする。

【方法・結果】4-Hydroxyphenylacetic acid と 2,4-dihydroxybenzaldehyde とのアルドール縮合体を還元し、得られたジオールのベンジル位のみを位置選択的に加水素分解を行い、これを分子内閉環反応をすることで(±)-equol を合成した。

また 4-Hydroxyphenylacetic acid に対して Evans の不斉誘導因子を導入した不斉アルドール反応を行うことで S-(-)-equol と R-(+)-equol をそれぞれ 96%ee と 97%ee の光学純度で合成した。

2G10 DNA 結合ピロールポリアミドの脂質誘導体の合成

○山本雅彦, 朱長進¹, 泉実, 中島修平, 馬場直道 (岡山大・農,¹ 北京理工大)

【目的】DNA 結合ピロールポリアミドは、二本鎖 DNA の副溝に結合し転写因子の結合を阻害することが知られていて、特定遺伝子の発現を選択的にコントロールできる薬剤として期待されている。本研究では、トリ *N*-メチルピロールにスペーサーを介し各種脂質を導入する事で、新たな生理活性を持たせることを目的とした。

【方法・結果】*N*-methylpyrrole を出発物質とし、ピロール骨格へのトリクロロアセチル基の導入、ニトロ化、トリクロロアセチル基のメトキシカーボニル基への変換、ニトロ基のアミノ基への還元、アミド結合の形成、メチルエステルの加水分解によって得られたカルボンカルボン酸にスペーサーを介して、ステアリン酸、リノール酸、リゾホスファチジルコリンなどの脂質を導入し、目的の脂質誘導体を合成した。その構造を NMR,ESI-MS/MS で確認した。また、リゾホスファチジルコリン誘導体は豚脾臓由来ホスホリパーゼ A₂ を作用させるとピロール部分とリン脂質の間のエステル結合が切断される事を確認した。

3-Aminoflavones の合成

2G11

○武知厚史¹, 三宅秀芳², 滝川浩郷¹, 佐々木満¹
(¹ 神戸大院自然・生機化, ² 神戸大農・生機化)

【目的】Keampferol, quercetin 等のフラボノイドをラットの小腸粘膜細胞とインキュベートすると、3 位の水酸基が特異的にアミノ基に置換したアミノ体へと代謝されることが報告されている。本研究では、この現象をモデルとし、3-hydroxyflavones から 3-aminoflavones を効率的に化学合成する方法を開発し、得られたアミノ体の生物活性を評価する。

【方法・結果】我々はすでに、flavonol の 3 位の水酸基をトシルあるいはメシル化したのち、アンモニアや第一級アミンと反応させると、高収率で対応するアミノ体が合成できることを見出している。これを複数の水酸基をベンゼン環上にもつ 3-hydroxyflavones へと応用する方法を現在検討している。今回、rutin から効率的に 3-aminoluteolin を合成することに成功したので、報告する。

2G12 パラジウム触媒を利用したフラン化合物のワンポット合成

○谷森紳治, 加藤義裕, 切畑光統 (阪府大院・生命環境)

【目的】フラン化合物は、医薬品、農薬、香料ならびに天然物合成の中間体などとして有用である。本研究では、温和な条件下、触媒的にフラン化合物をワンポットで合成する簡便な方法の開発を行なうことを目的とした。

【方法・結果】まず、(Z)-2-ブテニレンジメチルジカルボナートに、3-オキソ-3-フェニルプロパン酸メチルをパラジウム触媒の存在下 THF 中室温で反応を行ったところ、2-フェニル-5-ビニル-4,5-ジヒドロフラン-3-カルボン酸メチルエステルが 52% の収率で得られた。また、2-アミノフェノールとシス-2,5-ジアセトキシ-2,5-ジヒドロフランを同様な条件下反応させたところ、三環性フラン誘導体である 9,9a-ジヒドロ-3aH-1,4-ジオキサ-アザシクロペンタ[b]ナフタレンが生成した。ジメドンとシス-1,4-ジアセトキシシクロヘキセンの反応では、3,3-ジメチル-3,4,5a,8,9,9a-ヘキサヒドロ-2H-ジベンゾフラン-1-オンが 67% の収率で得られた。反応機構の考察や、他の誘導体の合成も行なった。

2G13 ホウ素中性子捕捉療法に用いるBPAポリアミドアミンデンドリマーの開発 ○西堀大輔、浅野智之、切畑光統（阪府大院生命環境科・応生科）

【目的】ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）は、現在注目されているガンの新規治療法の一つであり、この治療法には、腫瘍細胞に選択的に集積するホウ素化合物（ホウ素キャリアー）の存在が不可欠である。本研究では腫瘍組織の毛細血管壁の間隙（50～100 nm）と正常細胞の血管壁の間隙（～20 nm）との差を利用した薬剤標的化に注目し、ナノスケールの新規なホウ素キャリアーの開発を目指して研究を展開した。

【方法・結果】母核となるデンドリマーには、末端に化学修飾の容易なアミノ基を持ち、ナノスケール分子への巨大化が容易なポリアミドアミンデンドリマー（PAMAM dendrimer）を選択した。このデンドリマーに現在BNCTで実用化されている *p*-boronophenylalanine（BPA）を 12.3 分子、もしくは 25.2 分子アミド結合させた、BPA-PAMAM デンドリマー（G2・G3）をそれぞれ合成した。これらの *in vitro* でのBNCT殺細胞効果を検討し、BPA-PAMAM デンドリマーが有効なホウ素キャリアーになり得ることを明らかにした。

2G14 ゼルンボンの二重共役系保持型位置選択的臭素化反応と応用 北山隆¹、○中平真起¹、高谷光²、河合靖³、岡本忠¹、K. Barry Sharpless⁴ (近大院農¹、阪大院基礎工²、長浜バイオ³、The Scripps Research Institute⁴)

【目的】ハナショウガから得られるゼルンボンは抗 HIV 活性、Hela ガン細胞成育阻剤、抗炎症作用など数多くの興味深い生理作用を有する。ゼルンボンの二重共役カルボニル基は、多様な反応性を示す中心的役割を担っているが、多様な生理活性発現にも必須であることが予測される。そこで、ゼルンボンをリード化合物とする新たな機能性、あるいは生理活性の発現・向上を目的として二重共役系を維持した新規誘導体合成を行った。

【方法・結果】反応活性種の導入を種々検討した結果、CH₃CN/H₂O 混合溶媒中、ゼルンボンと NBS の短時間反応によって、位置選択的臭素化が進行し、クリーンな精製過程を経てエキソオレフィン型モノプロモ体が定量的に得られ、計算化学でもその反応性を証明した。これは反応活性基を二重共役系以外に導入した初めての成功例で、続く求核剤との反応によって種々の官能基の導入が可能となった。

2G15 Sharpless 反応を利用したゼルンボンの不斉誘導体化検討 ○古谷篤¹、森山智千¹、高谷光²、河合靖³、岡本忠¹、北山隆¹ (¹近大院農バイオ、²阪大院基礎工、³長浜バイオ)

【目的】ゼルンボンは2つの共役二重結合と1つの孤立二重結合を有するため、特徴的な反応性を持ち、様々な誘導体合成が可能な物質である。その中でも環状多点不斉誘導体の構築によって、新たな不斉源としての活用が期待できるため、その包括的合成の確立を目標としている。

【方法・結果】これまでに、ゼルンボンの還元によって定量的に得られるゼルンボールの不斉 Sharpless 酸化反応によって、2つのオレフィンでエポキシ化が進行したオールエリスロ5点不斉ゼルンボン誘導体を得られた。この反応性は特徴的で、1段階目の酸化反応では完全な位置選択性を示すものの、全く不斉認識のないジアステレオマーが生成し、2段階目の反応でエネルギー差が生じ、不斉場が形成されることが明らかとなった。本発表では計算結果についても報告する。

多様なゼルンボンの立体選択的酸化反応
2G16 ○米倉裕史¹, 森山智千¹, 古谷篤¹, 河合靖², 岡本忠¹, 北山隆¹
(¹ 近大院農バイオ, ² 長浜バイオ)

【目的】二重結合の多様性はいうまでもないが、11 員環ゼルンボンの二重共役カルボニル基は、極めて多様な反応性を示す中心的役割を担っている。特にゼルンボンの酸化反応性の解明は、様々な酸化型新規骨格形成に大きく寄与する。これまでに、その剛直な構造が位置および立体選択的の反応を強く規制することが分かったため、実用性のある有用物質合成が可能となりつつある。本研究では 3 つの二重結合上における酸化反応の位置および立体選択性について検討した。

【方法・結果】ゼルンボンを MCPBA により酸化反応を行うと、6,7 位にのみ位置選択的にエポキシ化する。これを次亜塩素酸ナトリウムで処理後、NaBH₄ で還元すると、全ての二重結合がジアステレオ選択的にエポキシ化されたトリエポキシゼルンボール (1RS,2SR,3SR,6SR,7SR,10SR,11SR) が得られた。他の酸化反応についても報告する。

謝辞

関西・中四国・西日本支部合同大会の開催に際しまして、ソフトドリンクのご提供を賜りました、以下３社に対しまして厚く御礼申し上げます。

ご提供を賜った企業名

(株) 紀文食品

ダイドードリンコ株式会社

小林製薬株式会社