

日本農芸化学会
2007 年度 中四国・西日本支部合同大会

中四国支部 第 19 回講演会
西日本支部 第 272 回講演会

講演要旨集

日時:2007 年9月 14 日(金), 15 日(土)

場所:山口大学大学会館・農学部

日本農芸化学会中四国支部・西日本支部

大会日程

第1日目 9月14日(金) 会場：大学会館

1. 2007年度 日本農芸化学会功績賞受賞講演(13:30~14:30)

「枯草菌代謝ネットワークのカタボライト制御の分子機作」

藤田泰太郎 (福山大・生命工)

2. シンポジウム 「ゲノムからの旅立ち」 (14:30~17:30)

(1) 「ゲノム解析による有用遺伝子探索」 東 慶直 (山口大院・医学系研究科)

(2) 「ゲノムの機能解析とアレイ」 久原 哲 (九州大院・農学研究院)

(3) 「シュミレーションによる生命パスウェイのシステムの挙動の理解」

松野浩嗣 (山口大院・理工学研究科)

(4) 「環境での微生物ゲノム情報発現」 津田雅孝 (東北大院・生命科学研究科)

(5) 「ゲノム工学と高機能宿主細胞創製」

森 英郎 (協和発酵・バイオフィロンティア研)

3. 懇親会 ホテル かめ福 (18:30~20:30)

第2日目 9月15日(土)

1. 一般講演(午前の部)(9:00~12:00) 農学部・大学会館

2. 評議員会 (12:00~13:00) 中四国支部(農学部3階A会場3番教室)

西日本支部(農学部4階C会場7番教室)

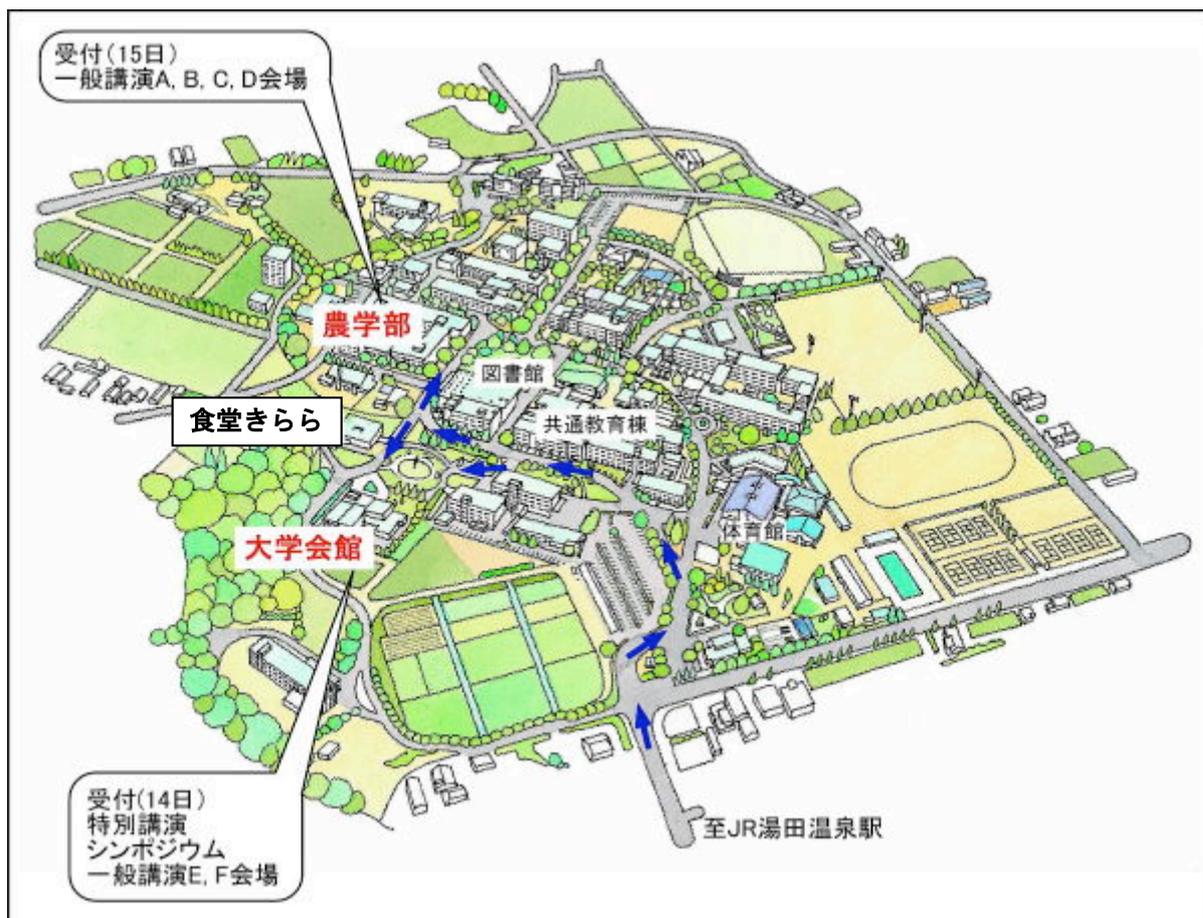
3. 一般講演(午後の部)(13:00~16:12) 農学部・大学会館

会場へのアクセス



- 新幹線新山口駅、JR 山陽本線新山口駅から JR 山口線「湯田温泉駅」下車。
湯田温泉駅入口バス停から JR バス山口大学行「山口大学」下車。
- 新山口駅前(在来線口)から防長バス「県庁前行(八方原・平川・山口大学・西京橋・日赤経由)」に乗り「山口大学前」下車。
- 新山口駅前(在来線口)から防長バス「井開田行」、「県庁前行(市民会館・西京橋・日赤前経由)」、「スポーツの森行(湯田温泉経由)」に乗り「湯田温泉」下車。防長バス「新山口駅行(山口大・南本町経由、リハビリ・八方原経由)」、「リハビリ病院行」に乗り換え「山口大学前」下車。
- 新山口駅前(新幹線口)から JR バス「東萩行(特急)」に乗り「湯田温泉通」下車。JR バス「山口大学行」に乗り換え「山口大学」下車。
- 徒歩の場合、湯田温泉バス停から約 35 分、JR 湯田温泉駅から約 25 分。

山口大学吉田キャンパス内案内図



参加者の方へのご案内とお願い

1、参加証（名札）

ご氏名、ご所属を記入の上、会場内では見やすい場所にご着用ください。

2、懇親会

9月14日（金）18時30分より、湯田温泉 ホテルかめ福にて行います。奮ってご参加ください。シンポジウム終了後、会場より無料送迎バスを2台手配しておりますのでご利用ください。

3、食堂のご案内

両日とも、農学部と大学会館の間の「学生食堂きらら」が営業しております。ご利用ください。

4、喫煙について

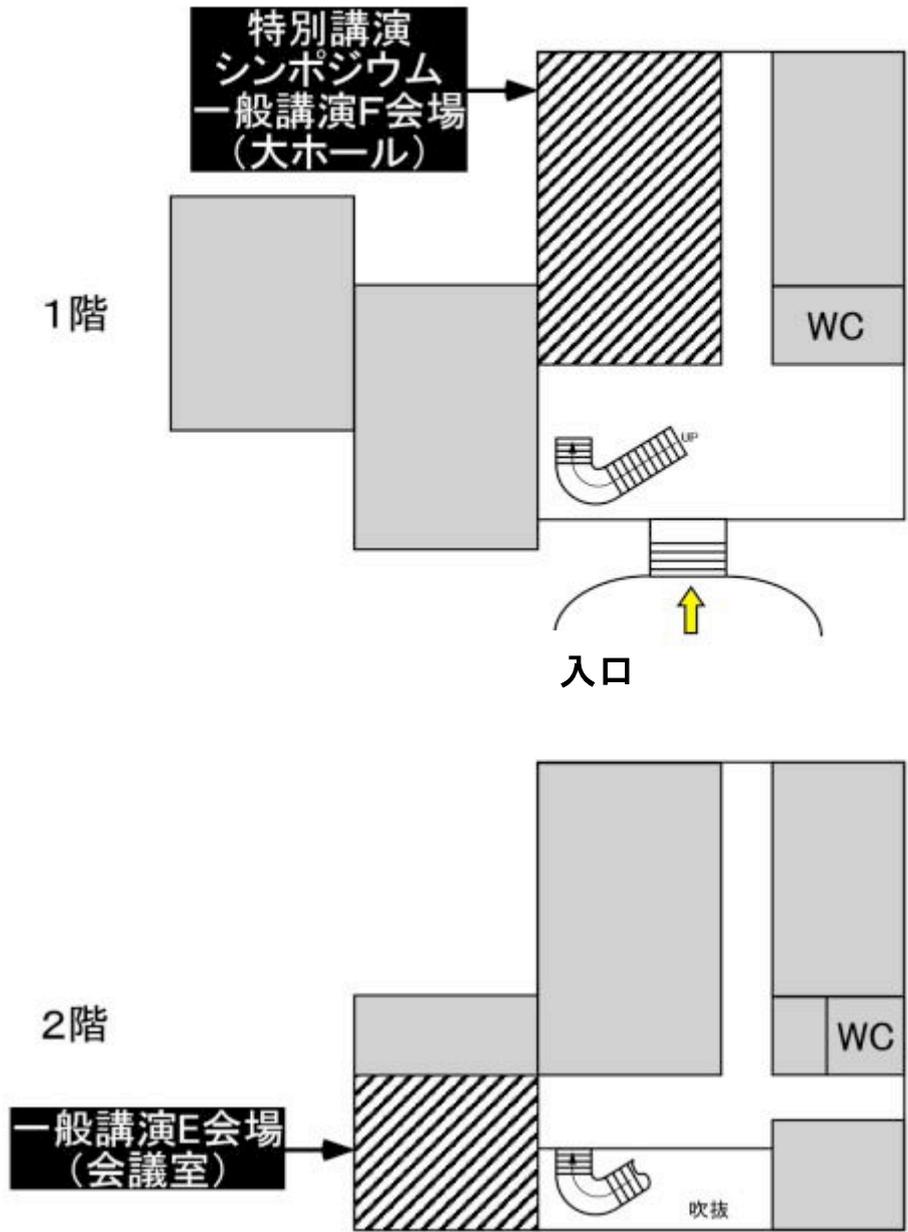
建物内は禁煙です。また、灰皿が設置されている場所以外での喫煙はご遠慮ください。

5、携帯電話について

講演の妨げとなりますので、会場内では電源を切るかマナーモードに設定してください。また、会場近くの廊下での通話もご遠慮ください。

会場案内図①

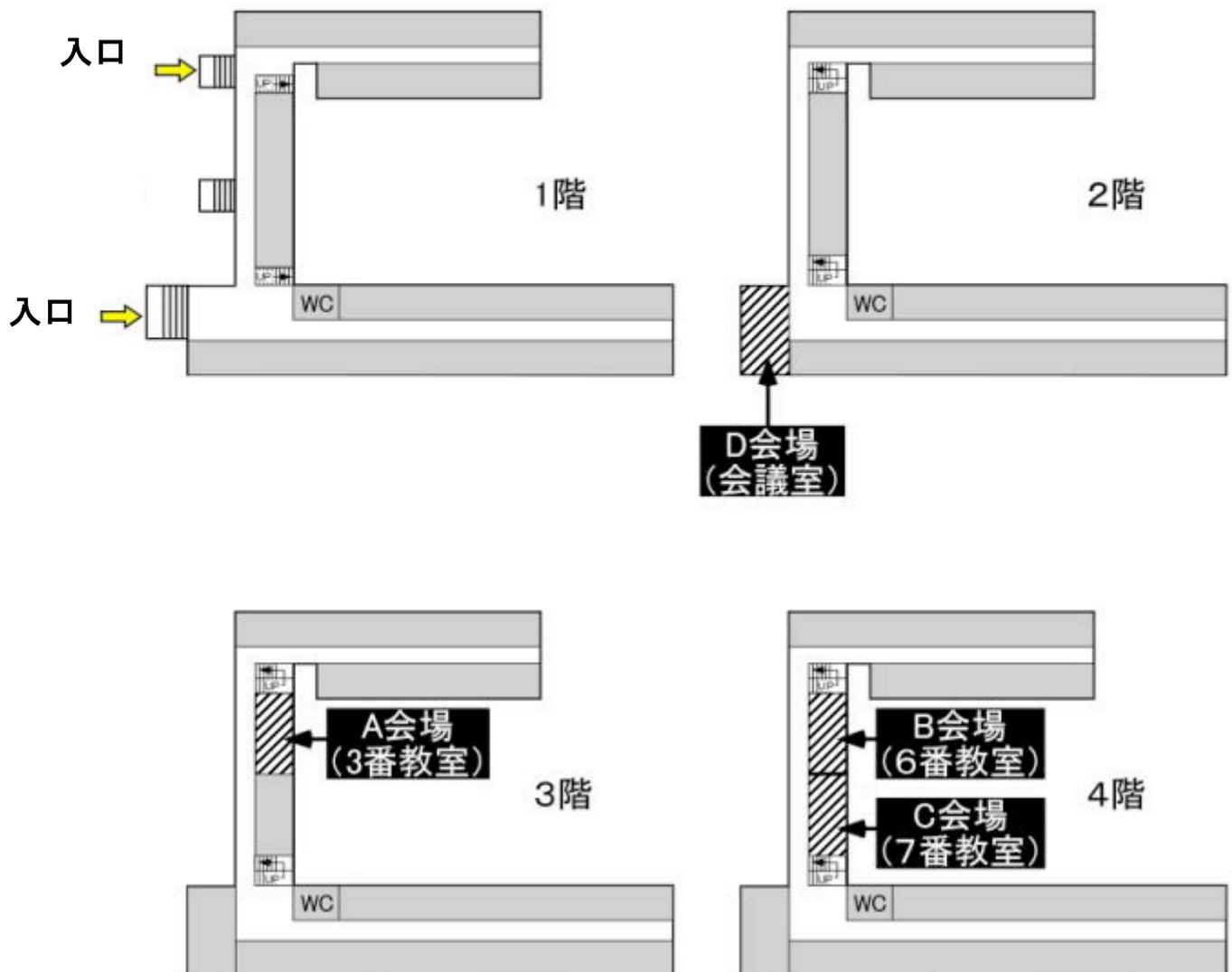
大学会館 特別講演, シンポジウム
一般講演 E, F 会場



会場案内図②

農学部棟 A, B, C, D 会場

注：E, F会場は大学会館です。



第1日目 プログラム

受賞講演

13:30～14:30

座長 宮川都吉(広島大院・先端物質科学研究科)

2007年度 日本農芸化学会功績賞

「枯草菌代謝ネットワークのカタボライト制御の分子機作」

藤田泰太郎 (福山大・生命工)

シンポジウム 「ゲノムからの旅立ち」

14:30～17:30

座長

東 慶直(山口大院・医学系研究科)
山田 守(山口大院・医学系研究科),

「ゲノム解析による有用遺伝子探索」

東 慶直(山口大院・医学系研究科)

「ゲノムの機能解析とアレイ」

久原 哲(九州大院・農学研究院)

「シミュレーションによる生命パスウェイのシステムの挙動の理解」

松野浩嗣(山口大院・理工学研究科)

「環境での微生物ゲノム情報発現」

津田雅孝(東北大院・生命科学研究科)

「ゲノム工学と高機能宿主細胞創製」

森 英郎(協和発酵・バイオフィロンティア研)

第2日目 一般講演プログラム

A会場(有機・天然物分野)

午前の部

- 9:00 A-1 3-(Alkyloxybenzyl)thio-4-(3-chlorophenyl)-4H-1,2,4-triazole の白化活性
○原田奈央子, 山田直隆, 桑野榮一(九大院・生資環)
- 9:12 A-2 Lunularic Acid 誘導体の合成と発芽阻害活性(2)
○多田加代子, 西牟田武, 渡邊雄太, 山田直隆, 市来弥生¹, 吉川博道¹, 桑野榮一
(九大院・生資環, ¹福工大院・生物有機)
- 9:24 A-3 PKABA を誘導する ABA 類縁体について
○立石大土, 市来弥生, 山田直隆¹, 田村廣人², 吉川博道
(福工大・院・生物有機, ¹九大院・生資環, ²名城大・院・環境微生物)
- 9:36 A-4 ゴマ毛状根培養によるアントラキノン化合物および推定生合成中間体の生産
○古本敏夫, 小原朋子, 久保哲也(香川大農・応用生物)
- 9:48 A-5 7'-オキシ3置換テトラヒドロフラン型リグナンである(-)-及び(+)-マグノロンの合成
○仲渡知史, 山内聡(愛媛大・農)
- 10:00 A-6 セスキネオリグナンであるモリノール A、B の立体構造と抗菌活性との関係
○多胡良介, 山内聡, 丸山雅史, 秋山浩一¹, 菅原卓也, 岸田太郎, 木場洋二
(愛媛大・農, ¹愛媛大・総科支セ)
- 10:12 A-7 ベンジル位の構造が異なるリグナン類の構造と抗酸化活性との関係
○山内聡, 菅原卓也, 染矢 立志¹, 増田俊哉¹, 丸山雅史, 秋山浩一², 岸田太郎
(愛媛大・農, ¹徳島大・総合科学, ²愛媛大・総科支セ)
- 10:24 A-8 Radical scavenging activity and anti-tumor promoting activity of Japanese olive extracts
○Pak-uthai Surutwadee, Nobumasa Arai¹, Tamura Hirotochi
(Graduate School, Fac. of Agriculture, Kagawa Uni., ¹Shodoshima Olive Park)
- 10:36 A-9 牡丹花卉抽出物の抗酸化活性
○田畑光正(島根産技セ)
- 10:48 A-10 リン脂質過酸化物の構造変化に対する質量分析の応用
○井村 恵¹, 植田容未¹, 小林教代¹, 佐藤瑞穂¹, 細川美穂¹, 松原純子¹, 草場康一郎¹, 玖村直紀¹, 小田圭一^{1,2}, 泉実¹, 中島修平¹, 馬場直道¹(¹岡大院・自然科学, ²池田糖化)
- 11:00 A-11 レプリノイル基をタグとして利用した新規アフィニティー分離とその糖鎖合成への応用
○松原純子, 岡本 律, 平岡尚子, 佐藤瑞穂, 馬場直道, 泉実, 深瀬浩一¹
(岡大院・自然科学, ¹阪大院・理)
- 11:12 A-12 ローヤルゼリー糖タンパク質に結合する腫瘍関連抗原含有 N-グリカンの構造特性
牛嶋孝之, 永井裕美, 木村万里子¹, 沖原清司², 橋本健², 杉本廣之², 山田英生²,
○木村吉伸(岡山大院・自然, ¹くらしき作陽大学, ²山田養蜂場)

午後の部

- 13:24 A-13 レモングラス由来のチロシナーゼ活性阻害物質—単離と同一—
○増田俊哉, 小川奈津子, 尾高由佳, 武田美雄, 仲本勝男¹, 國永秀樹¹
(徳島大・総合・生物環境資源, ¹仲善)
- 13:36 A-14 ゲットウ根茎の酵素的酸化劣化抑制機能と含有機能性物質の解明研究
○染矢立志, 尾高由佳, 武田美雄, 増田俊哉(徳島大・総合・生物環境資源)

- 13:48 A-15 昆虫 β -*N*-acetylglucosaminidase 特異的阻害剤 HU-1 の構成異常糖の合成と阻害活性評価
仁戸田照彦, 〇市川美里, 白木博一, 神崎 浩 (岡山大院自然科学)
- 14:00 A-16 *Pochonia* 属糸状菌が生産する新規 β -*N*-acetylglucosaminidase 阻害剤の阻害活性評価
仁戸田照彦, 〇豊岡実穂, 白木博一, 土屋有紀¹, 奥田 徹¹, 神崎 浩 (岡山大院自然科学, ¹玉川大学術研)
- 14:12 A-17 乾燥シイタケに含まれる抗菌物質
〇福島弘子, 作野えみ, 時本景亮¹, 中島廣光 (鳥取大農・生資環, ¹日本きのこセンター・菌茸研)
- 14:24 A-18 ステビア熱水抽出発酵液の抗真菌活性
〇切通章子, 古藤康太郎, 野瀬毅, 岡本啓湖(福農高・専攻科・微生物工学)
- 14:36 A-19 ソテツ有毒配糖体の定量と分解酵素
〇八木史郎, 永野国寛, 南 雄二 (鹿児島大・農・生資化)
- 14:48 A-20 香辛料による大腸菌 O157 の弱毒化
〇横井川久己男 (徳島大・総合科学)
- 15:00 A-21 ラット平滑筋細胞株 A7r5 に対する epigallocatechin-3-gallate の細胞増殖促進作用
〇長友俊介¹, 藤村由紀¹, 梅田大介¹, 山田耕路¹, 立花宏文^{1,2} (¹九大院農院・生機科, ²九大 BAC)
- 15:12 A-22 イネに含まれるセジロウンカ・ヒメトビウンカの probing 行動刺激物質
〇奥 康史, 松本 幸, Francis Adjei-Afrie, 手林慎一, 金 哲史(高知大・農・生資)
- 15:24 A-23 Secoisolariciresinol の生理活性評価に関する研究
〇富永詩央里, 菅原卓也, 近藤愛, 岸田太郎, 丸山雅史, 秋山浩一¹, 山内 聡 (愛媛大・農, ¹愛媛大・総科支セ)
- 15:36 A-24 昆虫の性フェロモン分泌におけるチラミン、ストレスの関与
〇平島明法, 永楽智彦, 茂田陽子, 木水めぐみ, 山路英臣, 吉澤貴樹, 桑野栄一, 江藤守総 (九大院・農)
- 15:48 A-25 アズレン誘導体による GABAA 受容体応答の昂進
〇山本万貴江, 行地一洋, 村藤俊宏, 青島均 (山口大院・医)
- 16:00 A-26 Studies on the docking of structurally diverse noncompetitive antagonists into the channel pores of GABA receptor homology models
〇Mohammad Sayed Alam, Yoshihisa Ozoe (Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

B 会場(動物・植物分野)

午前の部

- 9:00 B-1 ヒメアカタテハの蛹体色調節に関わる内分泌調節因子の抽出とその性質
米谷美和子¹, 山本和昭¹, 辻村由紀¹, 北沢千里², 〇山中 明^{1,3}
(¹山口大・理, ²山口大・教育, ³山口大院・医学系)
- 9:12 B-2 カイコ変態期におけるシステインプロテアーゼの役割
〇上野由宣, 岡田太郎¹, 山本幸治, 伴野豊, 藤井博, 麻生陽一
(九大院農, ¹フェニックスバイオ)
- 9:24 B-3 *Bombyx mori* 新規グルタチオン転移酵素の同定ならびに機能解析
〇山本幸治, 長岡純治¹, 麻生陽一 (九大院農, ¹京工繊大)
- 9:36 B-4 線虫 (*C. elegans*) に見出されたホスホリパーゼ A1
〇炭山隆雄, 平野薫, 田中保, 里内清, 松崎浩明¹, 秦野琢之¹
(¹福山大・生命工, 応生科, ¹生物工)
- 9:48 B-5 オニオコゼ仔魚の活性酸素産生とその生物学的意義
〇門村和志, 成瀬早矢加¹, 山口健一¹, 小田達也¹ (長崎水試, ¹長崎大・水)
- 10:00 B-6 ベンジルイソチオシアネートが誘導する細胞死における PI3K シグナル経路の役割
〇横部新太郎, 下石靖昭, 村田芳行, 中村宜督 (岡大院・自然科学)
- 10:12 B-7 セリン合成酵素 Phgdh KO マウス脊髄発達異常のマイクロアレイ解析
〇川上 由里子¹, 梁 延訓¹, 吉田 一之², 東 徳洋², 平林 義雄³, 古屋 茂樹^{1,3}
(¹九州大・バイオアーキテクチャーセンター生物機能デザイン, ²宇都宮大・農・生物生産, ³理化学研 BSI)
- 10:24 B-8 植物の紫外線防御における光回復の意義と紫外線誘発突然変異
〇佐藤良平, 安田愛, 吉原亮平¹, 滝本晃一²
(山口大院・農, ¹原子力開発機構, ²山口大・農)
- 10:36 B-9 光化学スモッグ注意報発令時のオゾンによるタバコ植物葉での可視障害の誘導
〇衛藤晋平, 平松拓也, 陽川憲, 河野智謙 (北九州市立大院 国際環境工学)
- 10:48 B-10 イネのプロリン生合成・代謝と耐塩性
〇植地洋子, 高橋裕昭, 江坂宗春 (広大院・生物圏科学)
- 11:00 B-11 植物の Dof タンパク質 AOBP と bHLH-ZIP タンパク質の相互作用と機能
〇水本俊行, 吉村尚子¹, 山崎奈奈, 江坂宗春
(¹広島大・生物生産, 広島大院・生物圏科学)
- 11:12 B-12 *Chlorella vulgaris* C-27 株の耐凍性獲得に及ぼすルメラリン酸の効果
〇渡邊雄太, 町田豪, 杉田未来, 山田直隆, 本城賢一, 桑野栄一 (九大院・生資環)
- 11:24 B-13 クロレラ葉緑体局在型 G6PDH アイソザイムの低温下における発現挙動と機能解析
〇大橋直人, 町田豪, 本城賢一¹, 飯尾雅嘉¹, 宮本敬久¹ (九大院・生資環, ¹九大院・農)
- 11:36 B-14 Defense mechanisms of proline and glycinebetaine in NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle in tobacco BY-2 suspension cells
〇Md. Anamul Hoque, Mst. Nasrin Akhter Banu, Eiji Okuma, Katsumi Amako¹, Yoshimasa Nakamura, Yasuaki Shimoishi, Yoshiyuki Murata (Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, ¹Kobe Gakuin University)
- 11:48 B-15 Protective roles of proline and glycinebetaine in cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 suspension cells against salt stress
〇Mst. Nasrin Akhter Banu, Md. Anamul Hoque, Megumi Watanabe-Sugimoto¹, Md. Sarwar Jahan, Yoshimasa Nakamura, Yasuaki Shimoishi, Yoshiyuki Murata (Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, ¹Department of Agriculture, Okayama University)

午後の部

- 13:00 B-16 シロイヌナズナにおけるアブシジン酸、ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口シグナル伝達経路 —プロテインホスファターゼ 2A の役割—
○齋藤直毅, 中村宜督, 下石靖昭, 村田芳行 (岡大院・自然科学)
- 13:12 B-17 孔辺細胞におけるカルシウムシグナリング
○宗正晋太郎, 中村宜督, 下石靖昭, 村田芳行 (岡大院・自然科学)
- 13:24 B-18 シロイヌナズナ気孔形成遺伝子の発現制御領域の解析
○赤坂裕也, 片山諭¹, 川向誠¹, 中川強(島根大総科センター,¹島根大生物資源)
- 13:36 B-19 植物カタラーゼのペルオキシソームへの輸送機構の解明
○西谷敬子¹, 大島良美¹, 神垣あかね^{1,2}, 真野昌二², 林誠², 西村幹夫², 江坂宗春¹
(¹広島大学院・生物圏科学,²基礎生物学研究所)
- 13:48 B-20 Functional analysis of aldolactonase on the ascorbate biosynthesis pathway in *Euglena*
○Yongshun Gao, Hitoshi Nishikawa, Yukinori Yabuta¹, Takanori Maruta², Yoshihiro Sawa, Hitoshi Shibata, Shigeru Shigeoka², Takahiro Ishikawa
(Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., ¹Sch. Agr., Biol. Environ. Sci., Fac., Tottori Univ., ²Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)
- 14:00 B-21 Is lipoxygenase or cytochrome P450 involved in 1-octen-3-ol formation in Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*)?
Kakumyan Pattana, 松井健二(山口大院・医学系)
- 14:12 B-22 タバコホスホリパーゼ A2 の機能解析
○山口麻里子, 藤川律子, 藤川愉吉, 飯島憲章, 江坂宗春 (広島大学院・生物圏科学)
- 14:24 B-23 サツマイモ葉由来ポリフェノール類のアルドースレダクターゼ阻害
○吉元誠, 倉田理恵, 山川理, 矢原正治¹ (九沖・農研, ¹熊大院・薬)
- 14:36 B-24 Purification and characterization of milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds
○Isam Ali Mohamed Ahmed Ali, Isao Morishima¹, Nobuhiro Mori²
(鳥取大院・農, ¹鳥取大・農, ²鳥取大院・連農)
- 14:48 B-25 Production, purification, and characterization of laccase from an edible mushroom, *Grifola frondosa*
○Thitinard Nitheranont, Akira Watanabe, Yasuhiko Asada (Fac. of Agri, Kagawa Univ.)
- 15:00 B-26 ラット血中の副腎皮質刺激ホルモン測定による香り成分の抗ストレス効果の検討
○重森芳枝, 折原佑輔, 丹信介¹, 青島均 (山口大院・医, ¹山口大・教育)
- 15:12 B-27 バングラデシュ産ハーブのラット腹腔内滲出細胞からのヒスタミン放出抑制効果
○辻山偉代, Sheikh Julfikar Hossain, Sanzida Mubassara, 高杉美佳子¹, 青島均
(山口大院・医, ¹九州産業大・工)
- 15:24 B-28 Beneficial activities of some Bangladeshi fruits
○Sheikh Julfikar Hossain, Hitoshi Aoshima (山口大院・医)
- 15:36 B-29 Beneficial activities of some Bangladeshi plants
○Sanzida Mubassara, Ryuo Iga, Sheikh Julfikar Hossain, Firoj Ahmed¹, Mikako Takasugi², Hitoshi Aoshima
(山口大院・医, ¹クルナ大学・薬, ²九州産業大)

C 会場(食品分野)

午前の部

- 9:00 C-1 製造・貯蔵中における水産練り製品(焼ちくわ)中の4-ヒドロキシヘキサナール含量の変動
○境 正, 山口 徹¹ (宮崎大農,¹山口商店)
- 9:12 C-2 ビールの新たな麦汁煮沸プロセスの評価
○岡 賀根雄, 松下 真也¹, 松元 信也², 築瀬 英司³
(サントリー株式会社,¹九州サントリーテクノプロダクツ株式会社,²高知工科大・物質・環境,³鳥取大・工・生物応用工)
- 9:24 C-3 抗酸化剤応答配列を標的としたレポーターアッセイによる食品機能性評価
○内田飛香¹, 榊原陽一^{1,2}, 児玉浩子¹, 赤松絵奈¹, 永濱清子¹, 岩田喬子¹, ハリシュ クマー
ル¹, 山崎正夫^{1,2}, 江藤 望^{1,2}, 西山和夫², 水光正仁^{1,2}
(¹宮崎県産業支援財団, ²宮崎大農・応生科)
- 9:36 C-4 蒸し煮マサバにおけるターメリックの抗酸化効果
○笠原賀代子, 松尾聡美 (ノートルダム清心女大・人間生活)
- 9:48 C-5 鳴門金時の食品機能性
○金丸芳, 三木宏美, 井田貴子, 山本澄人¹, 岩田深也¹, 有井俊介², 仲野孝弘²
(徳島大・総合科学・生命科学,¹徳島県工業技術センター,²(株)鳴門のいも屋)
- 10:00 C-6 黒ショウガ中のアントシアニン色素
○寺原典彦, 紺谷靖英, 松永勝政¹, 松井利郎²
(南九大健康・食健,¹オフィスK(株), ²九大院生資環・生機科)
- 10:12 C-7 ニンニク(*Allium sativum*)の匂いおよび褐変化に関わる酵素の発現
○高見知子, 近本公人¹, 江坂宗春 (広大院・生物圏科学,¹(株)ワールド物産)
- 10:24 C-8 黒糖に含まれる抗酸化成分の分離とヒト赤血球変形能低下抑制作用
○陳 晟敏, 佐藤亜弥, 藤野武彦, 船津軍喜 (レオロジー機能食研)
- 10:36 C-9 緑茶中の過酸化水素生成の魚醤油による抑制
○大島慎也, 青島 均 (山口大院・医)
- 10:48 C-10 微生物に対するショウガの作用とその応用
(4) ザイモモナス細菌の醗酵特性に及ぼすショウガの作用
○上田明代, 合田智晶, 下村高史, 大房 明, 池内慧士郎, 松元信也
(高知工科大・物質・環境)
- 11:00 C-11 微生物に対するショウガの作用とその応用
(5) ショウガの作用機構に関する基礎的検討
○合田智晶, 池内慧士郎, 富家功雄, 上田明代, 松元信也 (高知工科大・物質・環境)
- 11:12 C-12 二次元電気泳動による海産多糖類の機能性評価
○白杉一郎^{1,2}, 榊原陽一^{1,3}, 松下佳代¹, 山崎正夫^{1,3}, 西山和夫¹, 松井隆史², 水光正仁^{1,3}
(¹宮崎大・農・応生科, ²小倉屋昆布(株), ³宮崎県産業支援財団)

午後の部

- 13:36 C-13 カルボニル化タンパク質を標的としたプロテオーム解析による食品機能性評価の可能性
○原島 舞¹, 岩田喬子², 榊原陽一^{1,2}, 松下佳代¹, 中原幸太¹, 山崎正夫^{1,2}, 西山和夫¹,
水光正仁^{1,2}(¹宮崎大・農・応生科, ²宮崎県産業支援財団)

- 13:48 C-14 抗パーキンソン病効果を有する機能性食品及び機能水に関する研究
 ○阿比留 貴徳¹, 照屋 輝一郎^{1,2,3}, 中野 あゆみ¹, 佐藤 昭民², 高橋 英理子¹,
 濱崎武記³, 中道 昇⁴, 樺山 繁⁴, 大坪 一道⁴, 森澤 紳勝⁴, 江藤博⁵, 片倉 喜範^{1,2,3},
 白畑 實隆^{1,2,3} (¹九大院生資環・遺資工, ²九大院シス生・生命工, ³九大院農院・遺資工,
⁴日本トリム, ⁵第一産業)
- 14:00 C-15 酵素消化低分子フコイダン抽出物によるガン細胞のアポトーシス感受性の増強
 ○中野あゆみ¹, 上野真史¹, 仁保彰友², 山下万貴子², 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・遺資工, ²九大院シス生・生命工, ³九大院農院・遺資工, ⁴第一産業)
- 14:12 C-16 卵巣摘出ラットに対するハイアミロースコーンスターチの脂質代謝への影
 Xiong Liu, 小川 博¹, 岸田太郎, 海老原 清 (愛媛大・農, ¹帝塚山学院大・人間科学)
- 14:24 C-17 黒糖の LDL 酸化抑制作用に関する検討
 ○荻貴之, 前田剛希(沖縄県工技センター)
- 14:36 C-18 ラットにおける卵黄摂取による低タンパク質食誘導性脂肪肝の予防
 ○撰和男, 川村紗也佳, 佐藤匡央, 今泉勝己(九大院・農・栄養化学)
- 14:48 C-19 ニワトリ卵白リゾチーム-糖複合体の機能性
 ○岩見健吾, 早川 茂, 小川雅廣 (香川大・農)
- 15:00 C-20 ケール抽出物の免疫調節活性に関する研究
 ○近藤愛, 越智賢二¹, 高岡照海¹, 菅原卓也 (愛媛大・農, ¹遠赤青汁(株))
- 15:12 C-21 マウスにおけるスギ花粉アレルギー多糖複合体の腸管吸収と経口免疫寛容の誘導
 ○齊藤 章, 加藤 昭夫, 臼井将勝¹ (山口大・農・生物機能, ¹水産大・食品科学)
- 15:24 C-22 Cry j1 の可溶性凝集体による抗原性の低減化
 ○青木理恵子, 齊藤章, 原田哲仁, 臼井将勝¹, 加藤昭夫
 (山口大・生物機能, ¹水産大・食品科学)

D 会場(酵素・タンパク質分野)

午前の部

- 9:00 D-1 Ski2p 様 RNA ヘリカーゼ活性発現の構造基盤
○張小冬¹, 中島崇^{1,2}, 角田佳充^{1,2}, 木村誠^{1,2} (1九大院・システム生命, 2九大院・農)
- 9:12 D-2 澱粉枝作り酵素の X 線結晶構造解析
Vu Thi Nhuan¹, ○嶋田 宏章², 角田 佳充^{1,2}, 木村 誠^{1,2}
(¹九大院・農, ²九大院・システム生命)
- 9:24 D-3 大腸菌トキシノーアンチトキシン(YafQ-DinJ)の作用機構に関する研究
○高木久徳¹, 松尾尚紀¹, 菊竹智恵², 山本紘³, 内海利男³, 木村誠^{1,2}
(¹九大院・農, ²九大院・システム生命, ³新潟大・自然科学)
- 9:36 D-4 キトサナーゼの部分 N-アセチルキトヘキサオースに対する作用
○平野勝紹, Sitthinan Arayaveerasid, 渡辺真通, 関 清彦, 光富 勝 (佐賀大農・生機科)
- 9:48 D-5 プロテイン膜を用いた MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリント法の検討
○松岡篤史, 荒木朋洋 (九州東海大・農・バイオ)
- 10:00 D-6 化学修飾ペプチドを用いた MALDI 型質量分析によるデノボシークエンス
○荒木朋洋, 古川貴絵, 榊原光一 (九州東海大・農・バイオ)
- 10:12 D-7 アルコール存在下でのニトリ卵白リゾチーム(HEL)の転移反応産物の解析
○重高佳和, 河村俊介, 荒木朋洋, 鳥潟隆雄 (九州東海大・院・農)
- 10:24 D-8 *Anammox* 菌の cytochrome c552 の精製と性質
○河瀬達志, 島村宗孝, 西山孝, 古川憲治¹, 藤井隆夫
(崇城大・応生命, ¹熊大院・自然科学)
- 10:36 D-9 シトクロム c の構造・安定性と酸化還元機能の関係
○武田拓, 園山貴文, 三本木至宏 (広大院・生物圏)
- 10:48 D-10 好熱性細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* のチオ硫酸酸化活性
○佐野涼子, 園山貴文, 山中 優, 三本木至宏 (広大院生物圏)
- 11:00 D-11 Structural and functional characterizations of acetate kinases from *E. coli* and psychrotrophic *Shewanella* species
○Md. Abul Kashem Tang, 岩崎翔平, 田上潤, 本島浩之, 渡邊啓一 (佐賀大・農・生化学)
- 11:12 D-12 低温細菌由来コラーゲン分解酵素の精製と性質
○松本善行, 小川雅廣, 早川 茂 (香川大・農)
- 11:24 D-13 魚醬から分離した *Bacillus licheniformis* の産生するプロテアーゼの特性
○高原宏明, 豊川洋一, Alissara Reungsang¹, 安田正昭
(琉球大・生物資源, ¹Khon Kaen Univ., Thailand)
- 11:36 D-14 リステリア属細菌の *agr* 様遺伝子群にコードされる環状ペプチドの構造決定
○朱雀奈津子¹, 西口賢三¹, 善藤威史¹, 中山二郎¹, 園元謙二^{1,2}
(¹九大院・農, ²九大・バイオアーク)
- 11:48 D-15 ランチビオティック生合成・分泌に関与する ABC トランスポーターの機能解析
○西江麻美¹, 塩屋幸樹¹, 永尾潤一², 中山二郎¹, 園元謙二^{1,3}
(¹九大院・農, ²京大院・農, ³九大・バイオアーク)

午後の部

- 13:00 D-16 ランチビオティック吸着型耐性タンパク質 NukH の吸着特異性の解析
○柳原沙恵¹, 奥田賢一¹, 中山二郎¹, 園元謙二^{1,2} (¹九大院・農, ²九大・バイオアーク)

- 13:12 D-17 好熱菌リポ酸アセチルトランスフェラーゼのサブユニット構造変化
○重岡佑一, 山本幸治, 伴野豊, 麻生陽一(九大院農・遺資工)
- 13:24 D-18 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質プレニル化反応の解析
○石橋直人, 八舟宏典, 守屋康子, 鈴木崇¹, 内海俊彦
(山口大院・医・応用分子生命,¹島津製作所・ライフ研)
- 13:36 D-19 溶血性レクチン CEL-III の部位特異的変異体を用いた自己会合性解析
久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, ○畠山智充 (長崎大・工・応化)
- 13:48 D-20 X線小角散乱法を用いた溶血性レクチン CEL-III の孔形成機構の解明
○郷田秀一郎, 貞方仁, 久松啓伍, 畠山智充 (長崎大・工・応化)
- 14:00 D-21 進化分子工学によって育種したピフェニル資化菌の PCB の分解特性
○野中和彦, 藤原秀彦², 後藤正利¹, 古川謙介²
(九大院・生資環,¹九大院農,²別府大バイオ)
- 14:12 D-22 Catalytic conversion of malate dehydrogenase to aspartate dehydrogenase
○Yinxia Li, Takahiro Ishikawa, Hitoshi Shibata, Yoshihiro Sawa
(Fac. Life and Environ. Sci., Dept. Life Sci. and Biotechnol., Shimane Univ.)
- 14:24 D-23 ヒト肺由来チオレドキシシン還元酵素のCXC型酵素
○奥山祐子, 田村 隆, 稲垣賢二 (岡山大院・自然科学)
- 14:36 D-24 1アミノ酸残基挿入によるキノプロテイン・グルコース脱水素酵素の基質特異性改変
○外山博英, 重谷恒平¹, 足立収生¹, 松下一信¹(琉球大農,¹山口大農)
- 14:48 D-25 環境遺伝子資源を利用した *Taq*DNA ポリメラーゼの蛋白質工学的改変
○鍋 健吾, 松川 博昭, 山上 健, 石野 良純 (九大院・農)
- 15:00 D-26 アーキアの Hef 蛋白質に関する研究〜*Aeropyrum pernix* 由来の Hef スクレアーゼの解析を中心に〜
○跡部 朋美, 吉用 武弘, 古川 信広, 藤兼亮輔, 石野 良純 (九大院・農)
- 15:12 D-27 鶏卵白アルブミンの構造安定性と加熱凝集に及ぼす SH 基の影響
○田中美穂, 中嵩志, 石丸隆行, 松富直利 (山口大・農・生物機能)
- 15:24 D-28 鶏卵白アルブミンの熱安定化(S化)機構の解明
○石丸隆行, 伊藤一成¹, 松富直利 (山口大・農・生物機能,¹山口大院・医・生体情報)
- 15:36 D-29 遺伝子工学的手法による安定化ニワトリリゾチーム変異体の *Pichia* での発現分泌
○脇田幸弘, 原田哲仁, 阿座上弘行, 加藤昭夫 (山口大・農・生物機能)
- 15:48 D-30 ヘリックス安定化・不安定化ニワトリリゾチームのアミロイド線維形成
○原田哲仁, 阿座上弘行, 加藤昭夫 (山口大・農・生物機能)

E 会場(微生物(代謝・分離))

午前の部

- 9:00 E-1 2相式メタン発酵槽を用いる固形有機廃棄物処理
○藤森愛, 福間三喜, 岡本賢治, 築瀬英司 (鳥大・生応工)
- 9:12 E-2 改変 DVC 法による堆肥中の好熱性細菌の検出法
○塩塚皇太, 柳田裕紹, 金澤晋二郎, 酒井謙二(九大院・農・土壤微生物)
- 9:24 E-3 POPs 類を分解する新規な嫌気性微生物の分類学的推察
○渡邊克二, 後藤正利¹, 古川謙介^{1,2} (九沖農研, ¹九大院農, ²別府大バイオ学科)
- 9:36 E-4 サイレージ乳酸菌の機能開発～*Lactobacillus* 属乳酸菌の硝酸還元性の検討～
渡辺誠人, 岩井覚, 福田耕才, 野村善幸, 緒方靖哉, 大桃定洋¹, ○土居克実²
(崇城大・応微, ¹アサマ化成, ²九大院・遺資工)
- 9:48 E-5 ステビア粉末からの硝酸還元性高温菌分離・同定
○堤 義備, 岡本啓湖 (福農高・専攻科・微生物工学)
- 10:00 E-6 分子生物学的手法による有明海干潟泥の細菌相解析
○田代幸寛, 光武奈緒子¹, 小林元太, 加藤富民雄¹(佐大・有明プロ, ¹佐大・農)
- 10:12 E-7 有明海からのキシロース資化性乳酸菌の分離
○岡宏圭, 田代幸寛¹, 小林元太¹, 加藤富民雄, 林信行 (佐大・農, ¹佐大・有明プロ)
- 10:24 E-8 微生物に対する微粒子の作用とその応用(3) 微粒子物質の種類および菌株と醗酵特性の関係
○宮地 諒, 藤本敏幸, 西森大祐, 松元信也 (高知工科大・物質・環境)
- 10:36 E-9 硫黄培地に増殖した高度水銀耐性鉄細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 株の無機水銀及び有機水銀分解活性
○杉尾 剛, 中村壮作, 金尾忠芳, 竹内 文章¹
(岡山大・院・自然科学,¹保環セ・環境安全部門)
- 10:48 E-10 鉄酸化細菌及び硫酸酸化細菌を用いた児島湖浚渫土壌からの重金属の溶出
○櫻井あゆみ, 金尾忠芳, 竹内文章¹, 杉尾 剛
(岡山大・院・自然科学,¹保環セ・環境安全部門)
- 11:00 E-11 Existence of ferric iron reductase activity in the outer membrane of sulfur-grown *A. ferrooxidans* ATCC 23270
○Taher M. Taha, Tadayoshi Kanao, Fumiaki Takeuchi¹, Tsuyoshi Sugio (Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, ¹Health and Environment Center, Okayama University)
- 11:12 E-12 植物病原菌の分類と同定に対する MALDI-MS の応用可能性について
○荒巻 忍, 市来 弥生, 津野 和宣¹, 田村 廣人², 吉川 博道
(福工大・院・生物有機, ¹宮崎大学・農学部・食料生産, ²名城大・院・環境微生物)
- 11:24 E-13 Isolation of thermotolerant strains from *Saccharomyces cerevisiae*
○Walika Larblamool, Kohzo Kanda, Fumio Kato
(Dept. of Appl. Biochem. & Food Sci., Saga Univ.)
- 11:36 E-14 *Zymomonas mobilis* の耐熱性分離株の解析
○入江 陽¹, Kaewta Sootsuwan², 村田 正之¹, Noppon Lertwattanasakul², 山田 守^{1,2,3}
(¹山口大院・医・応用分子, ²鳥取大連院・生物資源, ³山口大・農・生物機能)
- 11:48 E-15 C75 を用いた酢酸イソアミル高生成酵母の育種
○谷本昌太, 蔵尾公紀, 藤井一嘉, 平賀良和¹ (広総技研食工技セ, ¹広大院理)

午後の部

- 13:00 E-16 分裂酵母のグリセロール代謝経路の解析
○松沢智彦, 田中直孝, 竹川 薫(香川大・農・応用生物)
- 13:12 E-17 ナリングエンを合成する酵母の開発とそれに適した酵母株の選抜
○井手一郎^{1,2}, 原田哲郎^{1,2}, 松本亮司¹, 永野幸生² (¹佐賀大・農, ²佐賀大・総分セ)
- 13:24 E-18 出芽酵母における *CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析
○柳本 敏彰, 神原 将希, 松崎 浩明, 秦野 琢之(福山大・生命工・生物工)
- 13:36 E-19 バイオエタノールの省エネルギー的高効率醗酵システムの開発(4)澱粉質原料の無蒸煮醗酵系における酵母の醗酵特性に及ぼす初発エタノール濃度の影響
○川村和幸, 曾我部 梢, 松元信也(高知工科大・物質・環境)
- 13:48 E-20 バイオエタノールの省エネルギー的高効率醗酵システムの開発(5)塩類を添加した澱粉質原料の無蒸煮醗酵系における酵母の醗酵特性に及ぼす醗酵温度の影響
○和田拓也, 山下佳朱美, 松元信也(高知工科大・物質・環境)
- 14:00 E-21 *Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸耐性に関与する膜タンパク質の解析
○藤井豊弘, 井上岳人, 吉原望, 外山博英, 足立収生, 松下一信(山口大農・生物機能)
- 14:12 E-22 酢酸菌による 5-ケート-D-グルコン酸の高効率生産法
○阿野嘉孝, 品川恵美子¹, 外山博英, 足立収生, 松下一信
(山口大農・生物機能, ¹宇部高専・物質工学)
- 14:24 E-23 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の AI-2 シグナルはバイオフィルム形成に関与する
○松永哲郎, 加藤昭夫, 勝本哲史¹, 野杵由一郎¹, 恵比須繁之¹, 阿座上弘行
(山口大・農・生物機能, ¹阪大院・菌・保存)
- 14:36 E-24 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサーの精製と解析
○久本達格, 赤壁善彦, 加藤昭夫, 阿座上弘行(山口大・農・生物機能)
- 14:48 E-25 食中毒細菌の付着阻害物質と阻害機構に関する研究
○下津智志, 川口 穰¹, 下八重雅明, 本城賢一², 宮本敬久²
(九大院生資環, ¹九大農, ²九大院農)
- 15:00 E-26 *L. monocytogenes* の分類と制御に関する研究
○藤原久美子, 原口敬寛¹, 樋脇 弘³, 本城賢一³, 宮本敬久³
(九大院生資環, ¹九大農, ²福岡市保環研, ³九大院農)
- 15:12 E-27 Cell morphology under sE activation and oxidative stress in *Escherichia coli*
○Rashed Noor¹, Hiroyuki Tachino², Masayuki Murata¹, Junko Makino², Mamoru Yamada^{1,2}
(¹Appl. Mol. Bio-Sci., Sch. of Med., Yamaguchi Univ., ²Dep. of Biol. Chem., Fac. Agr., Yamaguchi Univ.)
- 15:24 E-28 出芽酵母の Ca²⁺シグナル伝達におけるアポトーシス誘導因子 Stm1 の機能
○小丸山匡, 町田朋大, 水沼正樹, 宮川都吉(広島大学先端研)
- 15:36 E-29 酵母のタンパク質品質管理機構におけるカルネキシンの役割
○松尾亮平, 山下祐一郎, 上原正義, 加藤昭夫, 阿座上弘行(山口大・農・生物機能)
- 15:48 E-30 鶏卵白アルブミンの folding における糖鎖付加の役割
○伊藤一成, 石丸隆行¹, 岸本崇¹, 松富直利¹
(山口大院・医・生体情報, ¹山口大・農・生物機能)

F 会場(微生物(遺伝子・機能解析))

午前の部

- 9:00 F-1 トラフグ 80S リボソームタンパク質(RP)アイソフォーム遺伝子群の発現解析および分子系統解析
○山口健一, 小田健太, 小田達也(長崎大・水産)
- 9:12 F-2 線状ファージの感染による歯周病原性細菌のゲノム再編と病原性の発現
○仲行あゆみ, 加藤昭夫, 阿座上弘行(山口大・農・生物機能)
- 9:24 F-3 *Bacillus subtilis*168 の P 型トランスポーター *zosA* 遺伝子の機能解析
○田村 隆, 福原高裕, 小林和夫¹, 小笠原直毅¹, 稲垣賢二
(岡山大院・自然科学, ¹奈良先端大・バイオ)
- 9:36 F-4 *B. cereus* 嘔吐毒合成酵素遺伝子の発現に関する研究
○古澤麻帆, 林沙弥香, 本城賢一¹, 宮本敬久¹(九大院生資環, ¹九大院農)
- 9:48 F-5 *B. thuringiensis* テンペレートファージ KK-88 にコードされた RecA* の性状
○興梶佑基, 平石拓也, 副島胡子, 加藤富民雄, 神田康三(佐賀大・農)
- 10:00 F-6 好熱菌由来ビオチン合成系酵素に関する研究—好熱性 DTB 合成酵素の遺伝子クローニングと酵素活性検出—
○中村昌義, 窪田高秋, 和泉好計(鳥取大工・生応工)
- 10:12 F-7 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 の hydrogenase の転写、機能解析
○吉村 太郎, 中山 俊一, 吉野 貞蔵, 古川 謙介
(九州大院・生物資源環境科学・発酵化学)
- 10:24 F-8 *Bacillus thuringiensis* が産生する細胞損傷蛋白質変異体ライブラリーの解析
○小川和也, 中島穰太郎, 平尾彬奈, 川野 香, 木村まゆみ, 木庭 唯, 千 菊夫¹, 武部 聡², 山際雅詩, 早川 徹, 酒井 裕
(岡山大院・自然科学, ¹信州大・農, ²近畿大・生物理工)
- 10:36 F-9 分裂酵母の *IRE1* ホモログ遺伝子の機能解析
○中井慶輔, 小寺美千子, 田中直孝, 竹川 薫(香川大・農・応用生物)
- 10:48 F-10 分裂酵母の3つのユビキチンリガーゼ Pub1-3 の機能解析
○中瀬 舞, 細見昭, 田中直孝, 竹川 薫(香川大・農・応用生物)
- 11:00 F-11 分裂酵母のマルチベシキュラーボディ(MVB)形成に関するタンパク質の解析
○竹川 薫, 岩城知子(香川大・農・応用生物)
- 11:12 F-12 分裂酵母の有性生殖過程を昂進させる *sam* 変異株の解析
○當麻憲一, 吉本光平, 大渡康夫, 片山 諭, 川向 誠(島根大・生資科・生命工)
- 11:24 F-13 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の硫黄代謝酵素遺伝子の発現制御機構の解析
辻田瑞穂, ○長田 臨, モハメッド・マンシュル, 金尾忠芳, 上村一雄(岡山大院・自然)
- 11:36 F-14 脱ハロゲン呼吸細菌の脱塩素化酵素遺伝子群の機能解析
○森田靖之, 二神泰基, 後藤正利¹, 古川謙介²
(九州大・生資環, ¹九大院農, ²別府大食物栄養)
- 11:48 F-15 糸状菌 *Aspergillus japonicus* が生産する糖質加水分解ファミリー11 キシラーゼの精製と遺伝子クローニング
○脇山元気, 吉原浩司, 佐藤香織¹, 太田一良¹, 林 幸男
(宮崎大工・物質環境化, ¹宮崎大農・応生科)

午後の部

- 13:00 F-16 担子菌 *Coprinus Cinereus* の菌糸に発現する新規プロテインキナーゼの発現クローニングとその解析
○金子啓祐, 山田裕介, 杉山康憲, 末吉紀行, 渡辺彰, 麻田恭彦, 亀下勇
(香川大・農・応用生物)

- 13:12 F-17 超好熱アーケア *Sulfolobus tokodaii* のセリン生合成系の解明:ホスホセリンアミノ基転移酵素(PSAT)の機能解析
清水泰博, 米田一成, 土居克実, 櫻庭春彦¹, 大島敏久¹
(九大院農・遺資工, ¹徳大院・ソシオテクノサイエンス)
- 13:24 F-18 超好熱性アーケア *Pyrococcus furiosus* の DNA 複製開始、伸長過程で機能する GINS 複合体について
○吉用 武弘, 藤兼 亮輔, 川波 美幸, 松永 藤彦, 石野 良純(九大院・農)
- 13:36 F-19 超好熱性アーケア *Aeropyrum pernix* 由来 DNA リガーゼの構造と機能に関する研究
○上河内 徹, 清成 信一, 石野 良純(九大院・農)
- 13:48 F-20 超好熱性アーケア *Pyrococcus furiosus* における塩基除去修復系の酵素学研究
○内村 真伊子, 清成 信一, 石野 良純 (九大院・農)
- 14:00 F-21 高圧力に耐える深海微生物 RNA ポリメラーゼの性質
○仲宗根 薫(近畿大工)
- 14:12 F-22 高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* *rimB* 破壊株の取得とその遺伝学的解析
○前田 豊, 荒下 智行, 仲宗根 薫(近畿大工)
- 14:24 F-23 高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* RNA ポリメラーゼの Two-hybrid 法によるサブユニット間相互作用の解析
○松味 弘也, 下浦 洋祐, 仲宗根 薫(近畿大工)
- 14:36 F-24 *ssnA* 相補鎖上に一部重複する新規遺伝子の解析
○長光 博史¹, 村田 正之¹, 新田 剛², 山田 守^{1,3}
(¹ 山口大院・医・応用分子, ²徳島大・ゲノム機能研究センター, ³山口大・農・生物機能)
- 14:48 F-25 Auxotrophic mutant screening and genetic engineering of ethanol producing yeast *Kluyveromyces marxianus*.
○Sanom Nonklang, Kumi Nakamura, Ryouta Sakai, Hisashi Hoshida, and Rinji Akada
(Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med. Yamaguchi Univ.)
- 15:00 F-26 相同組換えを用いた酵母での組換え遺伝子構築法による糖化酵素遺伝子の発現
○堺 亮太, Kamonchai Cha-aim, 星田尚司, 赤田倫治(山口大院・医系・応分生)
- 15:12 F-27 The study on gene(s) responsible for thermotolerance in thermotolerant acetic acid bacteria
○Arpaporn Deeraksa, Somporn Moonmangmee¹, Hirohide Toyama, Osao Adachi, Kazunobu Matsushita (Fac. of Agric, Yamaguchi Univ., ¹Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand)
- 15:24 F-28 Analysis of bound quinone in membrane-bound glucose dehydrogenase of *Escherichia coli*
○Golam Mustafa¹, Yoshinori Ishikawa², Kazuo Kobayashi³, Catharina T. Migita^{1,2}, Seiichi Tagawa³, Mamoru Yamada^{1,2} (¹Appl. Mol. Bio-Sci., Sch. of Med., Yamaguchi Univ., ²Dep. of Biol. Chem., Fac. Agri., Yamaguchi Univ., ³ISIR Osaka Univ.,)
- 15:36 F-29 膜結合型グルコース脱水素酵素活性に対する膜電位の影響
○石川宜位¹, 高尾佳史², Golam Mustafa², 松下一信^{2,3}, 山田 守^{1,2,3}
(¹山口大院・医・応用分子, ²鳥取大連院・生物資源, ³山口大・農・生物機能)
- 15:48 F-30 大腸菌における DNA 損傷誘導性細胞死の解析
○中村慶子¹, 大島 拓², 小笠原直毅², 山田 守^{1,3}
(¹山口大院・医・応用分子, ²奈良先端大院・情報科学, ³山口大・農・生物機能)

受賞講演

講演要旨

受賞講演 枯草菌代謝ネットワークのカタボライト制御の分子機作

藤田泰太郎(福山大学生命工学部)

講演者は、過去 30 年以上の間、枯草菌のカタボライト制御研究中核した代謝制御研究を展開してきた。カタボライト抑制とは、外界に炭素源としてグルコースが存在する限りは、解糖系を働かせることにより他の炭素源の分解系の酵素合成を抑制するという制御系であるが、1995 年、枯草菌のカタボライト抑制がカタボライト制御蛋白質(catabolite control protein, CcpA)の関与する負の制御機構で説明できる事を明らかにした。1997 年、枯草菌の全塩基配列が決定され、ポストゲノムシーケンス時代に入った。演者らは、枯草菌の DNA マイクロアレイ解析技術を駆使した、転写制御ネットワーク研究を展開した結果、CcpA の関与するカタボライト制御を基軸とする代謝制御ネットワークを明らかにするに至った。

1970 年代初頭、大腸菌のラクトースオペロンのカタボライト抑制を対象に、カタボライト抑制機構は cAMP とその受容蛋白質である CRP による遺伝子発現の正の制御系と結論された。しかし、枯草菌等のグラム陽性菌の多くは cAMP をもたないこともあり、この正の制御系が多くの生物系に当てはめられるかどうか疑問視されていた。1970 年代後半、演者は枯草菌のカタボライト抑制には解糖系の中間産物であるフルクトース-ビスリン酸(FBP)が関与していることを明らかにした。その後、グルコン酸オペロンを対象にカタボライト抑制の分子機作の解明研究を開始し、1995 年、次のような枯草菌のカタボライト抑制の制御機作を明らかにした(*Mol. Microbiol.*, **17**, 953)。「培地中にグルコースが存在すると菌体内に取り込まれ解糖系にのり FBP の濃度を上昇させる。FBP は、HPr 蛋白質のセリン残基を特異的にリン酸化する ATP 依存性のプロテインキナーゼの賦活剤であり、FBP の濃度上昇により細胞内の P-Ser-HPr 蛋白質の濃度も上昇する。そして、転写制御因子である CcpA 蛋白質が P-Ser-HPr 蛋白質と複合体を形成しカタボライト応答配列(*cre*)に結合し、転写制御を引き起こす。」というものであった。その後、このカタボライト抑制機作が定説化され、大腸菌のカタボライト抑制を説明する正の制御系より、この負の制御系の方が、真核生物を含むカタボライト抑制機構により普遍的に適用しうると考えられている。

1997 年、枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定され、ポストゲノムシーケンス時代に入り、カタボライト抑制研究もゲノムレベルでの展開が可能となった。まず、CcpA と P-Ser-HP の複合体が認識して結合する *cre* 配列の詳細な解析を行い、そのコンセンサス配列を導き出した。このコンセンサス配列を利用したゲノムレベルでの解析で、140 個のカタボライト制御を受ける遺伝子を見い出した。また、イノシトールオペロンの *cre* 配列の研究により、*cre* 配列はそのコンセンサス配列の特徴より 2 種類に区別できる事を明らかにした。さらに、DNA マイクロアレイ解析とプロテオーム解析により、新規のカタボライト抑制を受ける遺伝子を多数同定した。この枯草菌のカタボライト抑制のゲノムレベルでの研究(*Nucleic Acids Res.*, **29**, 683)は、我国の細菌のトランスクリプトーム解析研究公表の先駆けともなった。さらに、CodY や TnrA のようなグローバルな代謝制御蛋白質の支配するレギュロンの解析により、CcpA と P-Ser-HPr の複合体による分岐鎖アミノ酸合成のカタボライト活性化を中核に据える基幹代謝制御を明らかにした(*Mol. Microbiol.*, **56**, 1560)。つまり CcpA と P-Ser-HPr の複合体によるカタボライト制御に基づく細胞総体としてバランスのとれた代謝制御ネットワークが作動しているという事が明確になった。

シンポジウム

「ゲノムからの旅立ち」

講 演 要 旨

S-1 ゲノム解析による有用遺伝子探索

東 慶直(山口大院・医・ゲノム機能分子)

DNA 配列の決定の歴史は、1977 年の Sanger らによる ϕ X174 ファージが持つ全 DNA 配列の決定に始まる。1990 年代の分子生物学技術とコンピュータ技術の急速な進歩を基盤として、ヒトや研究対象生物の全ゲノム DNA 配列情報の有する学術的意義と商業的価値がゲノム情報獲得の挑戦を推進し、1995 年の Venter らによるインフルエンザ菌の全ゲノム DNA 配列の解読から 2001 年のヒト全ゲノム DNA 配列の解読に至る。現在までに、微生物についてはヒトの病原微生物を中心に 460 を超える種株、動植物についてヒトやマウス、イネなど 15 種の全ゲノム情報が公開されている。今後は動植物の病原微生物、有用微生物、モデル微生物、比較ゲノム解析用微生物 2000 以上の種株について全ゲノム DNA 配列を決定する計画が公表されている。

我々のグループも日本学術振興会未来開拓推進事業の支援を受け肺炎クラミジア日本株とネコ・クラミジアの全ゲノム DNA 配列を解読し発表した。さらに、アルファプロテオバクテリアに属する日本紅斑熱病原菌リケッチャ・ジャポニカ1種と酢酸菌2種3株のゲノム DNA 配列解読を進めている。肺炎クラミジアは近年発見されたクラミジアだが成人の 60% が感染歴を持ち、動脈硬化や虚血性心疾患に関連することが明らかになってきている。的確な検査方法や治療方法そして感染や流行の予防方法の確立は必須が必須となっている。この肺炎クラミジアの解析として性行為感染症原因菌クラミジア・トラコマティスと人畜共通感染症原因菌であるネコ・クラミジアを用いた比較ゲノム解析を進めている。

クラミジアの全ゲノム DNA 配列情報は 1998 年に初めて公開されて以来これまでに 11 菌種株について決定された。クラミジアを肺炎クラミジア群、トラコマティス群、人畜共通感染症クラミジア群の 3 群に分けた場合、すべての群に共通な遺伝子は約 800 存在する。その中には、例えば外膜タンパク質遺伝子や封入体膜タンパク質遺伝子、真核生物型遺伝子、III 型分泌装置遺伝子など、クラミジアの持つ巧妙な感染機構の解明に重要で、医療工学的応用に発展可能な分子が存在すると考えられる。一方、それぞれの群に特異的な遺伝子が約 100 存在し、感染宿主(もしくは臓器)や疾患の特異性を決定する遺伝子が含まれると考えられる。その多くが機能未知であるが、肺炎クラミジアのみの遺伝子には多くの封入体膜タンパク質遺伝子が、トラコマティスではホスホリパーゼや接着因子遺伝子が同定される。

全ゲノム DNA 配列が決定されても残念ながら個別の遺伝子について新規な情報が付加されることは稀である。ゲノム情報の解読には DNA 配列情報と生物学的解析から得られる情報が必須である。我々のグループでは国内外の多くの研究者と連携して、ポストゲノム DNA 配列決定事業として肺炎クラミジアの検査試薬やクラミジアワクチンの開発を進めている。また、遺伝子保有の違いに着目した抗クラミジア薬やアポトーシス誘導遺伝子を用いた抗がん剤、動脈硬化抑制剤の基礎的研究を行い、ゲノム解析の可能性を示すため特許申請は行ってきた。さらにクラミジアと同様に細胞内寄生性であるリケッチャと、そのリケッチャと近縁であるが独立に増殖出来る酢酸菌の解析を通して、多くの有用遺伝子の発掘をすすめている。

S-2 ゲノムの機能解析とアレイ

久原 哲(九州大学大学院農学研究院)

ウェルシュ菌はグラム陽性の偏嫌気性有孢子細菌であり、人体に対しては、解糖系で生じるガスによるガス壊疽、タンパク分解酵素による筋壊死、毒素による食中毒を引き起こす。ウェルシュ菌は3,031,430塩基からなり、染色体の遺伝子2,660個、プラスミドの遺伝子63個を含むことが明らかにされている。

これまでに、遺伝子破壊あるいは培養条件の異なる106個のマイクロアレイ実験データを用いて、遺伝子の共発現性を基にオペロン構造、発現の制御等を検討することを目的として、すべての染色体遺伝子、プラスミド遺伝子、およびIGR(Inter genic region)について総当りのピアソンの相関係数を算出した。

まず、IGRや毒素関連遺伝子、転写制御の遺伝子、二成分制御系の遺伝子との共発現を調べるにあたって、ピアソンの相関係数(正の相関)についての閾値を決める必要がある。そのため、閾値となる相関係数の値を変化させ、ODB(オペロンデータベース)に対するオペロン予測の精度を求め、最も予測精度が高いときの相関係数の値(+0.7312[+3.2 σ])を共発現する遺伝子を調べるときの閾値と設定できた。

同様に、逆相関のある遺伝子を調べるにあたって、ピアソンの相関係数(負の相関)についての閾値を決める必要があり、そのため、閾値となる相関係数の値を変化させ、含まれるORFの数をそれぞれ求め、変化率が高いときの相関係数の値(-0.5699[-2.7 σ])を逆相関の遺伝子を調べるときの閾値と設定できた。

次に、相関係数が+0.7132以上および-0.5699以下のORFまたはIGRのペアを対象として、グルーピングを行った。方法としては、IGR、毒素関連遺伝子、転写制御の遺伝子、二成分制御系の遺伝子の各々を起点として、相関のリンクが1つ目までのORFまたはIGRを求め、同じものを含む場合は同一のグループとしてまとめた。その結果、ウェルシュ菌において病原遺伝子発現の調節機構として知られている、二成分制御系VirR/VirSの遺伝子と複数の毒素遺伝子が1つのグループの中に確認できた。

また、いくつかの転写制御遺伝子で、共発現している遺伝子群や逆相関関係のある遺伝子群を同定することができた。

S-3 シミュレーションによる生命パスウェイのシステムの挙動の理解

松野浩嗣(山口大学大学院理工学研究科)

設計図を基に部品を造り、これを組み合わせてシステムを完成させることは、工学的な製品製造のプロセスである。生物も、多くのタンパク質がそれぞれの役目をもつ部品として働き、連携して動作している巨大なシステムとみなすことができる。このタンパク質の設計図がコードされているのはDNA上の遺伝子であり、最近ではDNAの遺伝子以外の領域の非コードRNAの部分にも注目が集まっている。

システム生物学は、工学の分野で扱われてきたシステム設計と製造プロセスの方法を生物学に持ち込んで、生命の理解を図ろうとする新しいアプローチの学問である。このアプローチが注目されるようになった背景として、単細胞生物からヒトまで多くの種類の生物の遺伝子やタンパク質などの分子の研究によって、生物を構成する部品の所在とその性質の情報が多く蓄積されたことがある。すなわち、個々の部品の基本性質が明らかになってきたので、生物の中で部品がどのように連携して、高度なシステムとして働くのかを知りたいという機運が高まってきたのである。

機械などの人工物は、部品が揃い、設計図があれば何度でも再構成できる。部品の役割とシステムでの働きが最初から分かっているからである。しかし、生物は自然が創りあげたものであるから、これを構成する部品の役割の把握とシステムとして働きの理解には非常に大きな隔りがある。この隔りを埋めるために必要な技術がシミュレーションである。

シミュレーションを実行するためには、何らかの数理的方法で生物をモデル化し、コンピュータに入力する必要がある。このモデル化法としてよく用いられるのが微分方程式であり、微分方程式をベースとした生命シミュレーションツールは多く開発されている。しかし、微分方程式によるモデル化法は一般の生物学者にとっては敷居が高く、このようなツールの利用が広がっているとは言えない。

我々は、2000年からハイブリッドペトリネットを用いた生物システムのシミュレーション技術の開発に取り組んでおり、単細胞生物からヒトまで、また、遺伝子ネットワーク、シグナル伝達経路、代謝経路などの多くの種類のモデルを作り、シミュレーションを実行してきた。この手法では、微分方程式やプログラミング言語などの数理的表現を使うことなく、目的の生物システムをモデル化し、シミュレーションを実行することができる。今回の講演では、これまでに我々が構築してきた様々な生物システムを紹介しながら、ハイブリッドペトリネットによるモデル化とシミュレーションの方法について解説を行う。

S-4 環境での微生物ゲノム情報発現

津田 雅孝 (東北大・院生命科学)

様々な自然生態系から多種多様な生物現象を示す環境微生物株が数多く分離され、純粋培養したこれら微生物を実験室で検討することで、個々の生物機能の詳細な分子メカニズムが解明されてきた。その一方で、多様な環境要因の大規模な変動に曝される複合生物系の自然生態系で、研究対象としてきた環境微生物が実験室で純粋培養したときと同様の様式で生物機能を発揮しているのかという、シンプルだが重要な問題は手がつけられないでいた。一方、動植物病原細菌を扱う研究者は、感染モデル生物を「培養装置」とし、この装置内での菌の生存・増殖に必要な遺伝子や特異的に発現する遺伝子を探索・解析することで、病原細菌の未知であった生きざまを示し、病原性発揮に直接的並びに間接的に必要な遺伝子群の総合的理解を深めてきた。他方、環境細菌においては、土壌などの自然環境を「培養装置」と見立て、本環境で生存・増殖に必要な遺伝子や特異的に発現する遺伝子を探索・解析する研究がなかったが、自然環境での微生物の特定遺伝子やゲノム全体の発現を解析する手法がこの数年の間に急速に確立されてきた。本講演では、土壌環境で実際に機能している遺伝子の検索・解析について、我々の研究例を紹介する。

好気性 β -プロテオバクテリア *Burkholderia multivorans* は、かつては *Pseudomonas* 属に分類されていた細菌で、土壌や水圏・植物表面などの多様な自然環境に常在し、環境汚染物質も含めた極めて多様な有機化合物を *Pseudomonas* 以上に炭素・エネルギー源にできる。また、ゲノムが3本環状染色体から構成される点でも通常環境細菌とは大きく異なる特徴をもつ。我々は、*B. multivorans* ゲノムの全塩基配列を決定し、本菌が根圏土壌生態系で主要炭素源となる様々な芳香族化合物の分解酵素遺伝子群を数多くもつことを確認した。現在、芳香族化合物をはじめとする多様な炭素・エネルギー源化合物の分解・代謝を中心にしたゲノム微生物学的研究を実験室系で行っている。これと並行して、土壌で特異的に発現する本菌遺伝子群とこの環境での生存・増殖に必要な遺伝子群の網羅的取得を、各々 In Vivo Expression Technology (IVET) と Signature-Tagged Mutagenesis (STM) と呼ばれる遺伝学的手法で実施し、実験室系と土壌生態系でのゲノム情報発現の違いの提示、この違いを規定する環境要因特定化、そして、当該要因シグナルの各遺伝子への情報伝達機構の解明を目指している。

IVET は以下のようにしている。プロモーターを欠く *dapB-lacZ* カセット [*dapB* はリジンと細胞壁前駆体ジアミノピリン酸(DAP)の合成に必要な酵素遺伝子] 上流に *B. multivorans* ゲノム DNA 断片を挿入した組換えプラスミドを *B. multivorans* の *dapB* 欠失株ゲノムに相同組換えで組み込んだ誘導体株ライブラリーを土壌に接種し、90 日後にリジンと DAP、X-gal を含む最小寒天培地を用いて *B. multivorans* を回収した。白色であった回収株では土壌特異的に転写されるゲノム領域に組換えプラスミドが挿入されたと推定され、このような約 250 の土壌特異的発現遺伝子候補には、各種物質代謝系や物質透過系、細胞表層成分合成系に関わる遺伝子が 3/4 を占め、機能未知遺伝子が約 1/6 を占めた。物質代謝遺伝子には芳香族化合物分解に関わる遺伝子が 2 割を占め、このような植物由来化合物が接種土壌に多く存在すると推定された。また、細胞表層成分合成遺伝子の中には菌体外多糖合成酵素遺伝子があり、当該遺伝子機能は接種株の土壌での安定な定着・増殖に必要と推定している。上記の芳香族化合物分解や菌体外多糖合成に関わる遺伝子を含むいくつかの候補遺伝子については、実際に土壌での特異的転写を確認した。現在、これら遺伝子の破壊株の実験室系と土壌での挙動、そして、両環境での遺伝子発現制御の分子機構を検討している。

STM としては、トランスポゾン挿入変異株ライブラリーから、土壌での生存・増殖に必要な遺伝子に変異がある株を効率的に negative screening する手法を採用している。約 7,000 株から成るライブラリーを 200 弱ほどのプールにまとめ、各プールを土壌に接種、2 週間後に回収し、取得目的としている遺伝子に欠損がある 280 程の候補変異株を得た。この中には、アミノ酸合成系の突然変異株も存在し、遊離アミノ酸がほとんど存在しない土壌ではこれら変異株は増殖できないことを踏まえると、本 STM 系は、アミノ酸合成系遺伝子以外の目的遺伝子取得にも有効と判断している。現在は目的遺伝子取得過程だが、取得変異株には物質取り込み輸送系やストレス応答の変異株が存在した。土壌では菌にとって容易に利用可能な栄養分が少ないとともに様々な環境要因によるストレスが多く、取得変異株は土壌環境で生存・増殖できないと推定している。今後、このような推定も考慮しながら各取得株の詳細な解析を進める予定である。

- 1) 津田雅孝ら: 化学と生物, 45, 557 (2007)
- 2) 津田雅孝ら: 細胞工学別冊「ゲノムから読み解く生命システム」(印刷中)



基礎研究や産業上重要な微生物のゲノム配列が次々と明らかにされ、ゲノム配列が簡単に決定できるという意味では微生物はブラックボックスではなくなった。しかしながら最も解析が進んでいる大腸菌でさえ、そのゲノム上の遺伝子の約40%については未だに機能が明確に解明されていない。ゲノム長が1 Mbpを切るようなバクテリアのゲノムも幾つか決定されたが、それらとて10%~20%の遺伝子についてはその機能が知られていない。つまりゲノム配列が決まった微生物でも、機能的なシステムとしては未だブラックボックスのままなのである。機能既知遺伝子のみで構成されたゲノムを持つ微生物が存在すれば、この微生物は必要に応じた機能改変が合理的かつ迅速に行えることが期待でき、応用的には次世代型実用宿主細胞と呼べるものになるであろう。現在協和発酵はNEDOプロジェクト「高性能宿主細胞創製技術の開発」に参加し、大腸菌を出発材料として「機能既知遺伝子のみで構成されたゲノム」の作製を進めている。その中で、産業用途に不要な遺伝子を徹底的にゲノムから排除しゲノムを縮小化する研究、ならびに網羅的な遺伝子機能解析を進めている。

まず大腸菌の染色体の縮小化であるが、2段階の組換えを経て、ゲノム上にマーカーなどの外来配列を残さない形でターゲット領域を欠失させる方法を考案した。この手法を用いることで、原理的には無限回の遺伝子削除を繰り返すことが可能となった。次に欠失しても生育に問題のない領域を実験的に特定しつつ、それらの不要領域を多重に欠失させてMGF-01株(染色体全長3.6メガベース)を作製した。この株は野生株ゲノムの22%の領域を失っているにも関わらず、最少培地でも旺盛に生育する。最少培地を用いた試験管培養では、MGF-01株は野生株と同等の生育速度で生育しはじめ、野生株が生育を止めた後も増殖を続け、糖の総消費量は野生株より少ないにも関わらず、その最終生菌体数は野生株の1.5倍に達した。

染色体の縮小化と並行して、大腸菌の全遺伝子に関する網羅的な機能解析も進めている。奈良先端科学技術大学・森浩禎先生のグループが作製した網羅的な一遺伝子破壊株ライブラリーを利用して、遺伝子欠損により生じる表現型変化を定量的に測定し、各遺伝子の機能解析を進めている。生育、ATP合成能力、様々な化合物の資化特性変化などのデータを既に得ている。このような解析を行う過程で、幾つかの機能未知遺伝子については削除すると細胞機能が低下することを見いだした。そのような遺伝子群を重要機能未知遺伝子と位置づけており、順にその機能解析を進める予定である。

遺伝子機能のレベルでゲノムあるいは細胞の脱ブラックボックス化を達成することを課題として、次世代型実用宿主細胞作製を進めている。また収集した遺伝子機能情報を基にして、より合理的にMGF-01株の機能改良を進めたい。目標とする新型実用細胞のことを我々はデザインドゲノムファクトリー(Designed Genome Factory)と呼んでいる。

参考文献

1. Ito, M., and et al. (2005) *Metab. Eng.*, 7:318-327
2. Mizoguchi, H., and et al (2007) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 46:157-167

一 般 講 演
講 演 要 旨

A-1 3-(Alkyloxybenzyl)thio-4-(3-chlorophenyl)-4H-1,2,4-triazole の白化活性

○原田奈央子、山田直隆、桑野榮一(九大院・生資環)

【目的】我々は既に、4-(3-fluoro 及び chlorophenyl)-3-(4-trifluoromethylphenyl)thio-4H-1,2,4-triazole(1)及び(2)が植物に対し白化作用を示すこと、また化合物1がカロテノイド合成を抑制し白化を引き起こすことを報告している。今回、化合物1及び化合物2をリード化合物として、構造と活性を検討し、さらに高活性な白化剤の合成探索を行った。【方法と結果】1,2,4-triazole 化合物の合成は、3-chloro phenyl isothiocyanate と formic hydrazide より 4-(3-chloro phenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione を得、これにアルキルハライドを定法によりアルキル化し合成した。生物検定は、シャーレ法により化合物を処理したレタス種子を4日間生育させその幼葉の白化を観察し、白化活性を評価した。化合物2の triazole 環3位について(4-alkyloxy phenyl) thio 体の構造活性相関を検討したところ、alkyl が propargyl 基(化合物3)及び allyl 基である化合物が化合物2より高活性を示し、10 μ M で完全白化を引き起こした。alkyl 基が propyl 基などの飽和炭化水素の場合には、100 μ M でも完全白化は観察されず、活性には不飽和結合が必要であった。さらに、化合物3の benzyl thio 基のベンゼン環メタ位への塩素原子導入は白化活性を上昇させた。

A-2 Lunularic Acid 誘導体の合成と発芽阻害活性(2)

多田加代子¹、西牟田武¹、渡邊雄太¹、山田直隆¹、市来弥生²、吉川博道²、桑野榮一¹

(九大院・生資環¹、福工大院・生物有機²)

【目的】苔類などの下等植物において主に見出される Lunularic Acid (LA) は、高等植物に対し植物ホルモンである Abscisic Acid (ABA) と類似した生理活性を示すことがこれまでに報告されている。本研究では、ABA アゴニストの検索を目的とし、構造的に安定な LA をリード化合物として、その誘導体の合成と ABA 活性の評価を行った。【方法・結果】LA の合成は、*N,N*-Dimethyl-3-methoxybenzylamine を *n*-BuLi によりオルトリチウム化し、これにクロロ炭酸メチルを反応させ Methyl-6-chloromethyl-2-methoxy-benzoate(1)を得た。化合物(1)を PPh_3 塩とした後、*p*-Anisaldehyde との Wittig 反応、さらに接触水素還元、加水分解、脱メチル化することにより合成した。ABA 活性は、レタス種子発芽阻害活性及びオオムギ無胚種子での α -amylase 誘導阻害活性にて評価した。レタス種子発芽阻害の検定では、LA は 1mM においても活性を示さなかったが、LA の2つの水酸基をメキシ基に変換した化合物(2)は、活性を示した。今回合成した化合物中では 2-Methoxy-6-[2-(3-methoxyphenyl)ethenyl]benzoic acid (3)が最も高い阻害活性を示した。また、化合物(2)及び(3)は、オオムギ無胚種子において、発芽時に観測される α -amylase の発現を mRNA レベルで阻害していた。

A-3 PKABA を誘導する ABA 類縁体について

○立石 大士¹、市来 弥生¹、山田 直隆²、田村 廣人³、吉川 博道¹

1) 福工大・院・生物有機、2) 九大・院・生資環、3) 名城大・院・環境微生物

【目的】イネ科植物では種子の発芽時に胚でジベレリン(GA)が生合成される。この GA はアリューロン層に移動して α -amylase 等の加水分解酵素の合成を誘導する。一方植物の抗ストレスホルモンである ABA はリン酸化酵素である PKABA1 を誘導する。このキナーゼは、GAMYB のリプレッサーである SLN1 をリン酸化することで活性化し、 α -amylase mRNA 生合成性を抑制する。今回は、ABA 様活性を持つことが知られている *O*-アルキルオキシム類を用いて、これらが PKABA1 誘導に与える影響について検討した。【方法及び結果】オオムギ (*Hordeum vulgare* cv. *Ichibanboshi*) の無胚半切種子に、ジベレリンと供試化合物を同時に投与し、24時間 25°C でインキュベートした。Total RNA を抽出後、逆転写を行って得られた cDNA を用いて PKABA1 遺伝子と α -amylase mRNA 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、今回試験した *O*-アルキルオキシム類は、すべて 100 μ M の濃度で PKABA1 遺伝子を誘導すると同時に、 α -amylase 遺伝子の発現を抑制することが確認できた。これらのオキシム類の活性は ABA に比べ非常に低いものの、ABA と同じ作用メカニズムで働いていることを示している。

A-4 ゴマ毛状根培養によるアントラキノン化合物および推定生合成中間体の生産

○古本敏夫, 小原朋子, 久保哲也(香川大農・応用生物)

[目的]ゴマの根は同一の炭素骨格(アントラキノン環+C₆側鎖)を有する, 含塩素化合物 anthrasesamone C を含む各種アントラキノン化合物を生産している。本研究では, ゴマ根におけるアントラキノン化合物の生合成経路を解明するため, ゴマ毛状根培養系の確立およびその毛状根によるアントラキノン化合物の生産について検討した。[方法・結果]無菌栽培したゴマ芽生えに *Agrobacterium rhizogenes* を直接感染させることにより, 毛状根を誘導した。除菌した後, 植物ホルモン無添加の 1/2MS 固体培地で継代することにより, 毛状根を選抜した。アントラキノン生産のため, 確立された毛状根クローンを Gamborg B5 液体培地で4週間, 振とう培養した後, 成分の抽出・精製を行った。単離した成分の NMR および MS 分析により, 2-(4-methylpent-3-enyl)anthraquinone および anthrasesamones A-C の4種のアントラキノン化合物のゴマ毛状根における生産を確認した。また, 同時に得られた未知成分について構造解析を行ったところ, アントラキノン環形成前の生合成中間体としてその存在が示唆されていた 2-geranyl-1,4-naphthoquinone であることが明らかとなった。

A-5 7'-オキシ 3 置換テトラヒドロフラン型リグナンである(-)-及び(+)-マグノロンの合成

○仲渡知史, 山内聡(愛媛大・農学部)

(目的)薬用植物から単離された(-)-マグノロンは, 7'-オキシ 3 置換テトラヒドロフラン型リグナン、(7*S*,8*R*,8'*S*)-9-hydroxy-3,4-methylenedioxy-3',4'-dimethoxy-7'-oxo-7,9'-epoxylignane である。このタイプのリグナン類の単離、合成研究は少なく、生物活性研究も進んでいない。また、近年、リグナン類が鏡像異性体混合物として生合成される例も明らかになっている。そこで、高い光学純度を有する(-)-及び(+)-マグノロンの合成を目的とした。方法・結果)エバンスのシン選択的の不斉アルドール縮合を利用して不斉構築を行い、(8*R*,8'*S*,7*R*/*S*)-3',4'-dimethoxy-7-methoxymethoxy-3,4-methylenedioxy-7'-oxo-9,9'-diyl dipivaloate へ導いた。さらに、THF 中で 6 M 塩酸で処理すると、7 位にベンジルカチオンが発生し、9'位の酸素がこのカルボカチオンを攻撃して7*S*体が選択的に生成し、マグノロンのピバロイルエステルが得られた。この時、9位及び7位の酸素がカルボニル基を攻撃する事によって生じるヘミアセタールの生成は観察されなかった。最後に加水分解によって(-)-マグノロンへ導いた。同様にして、(+)-マグノロンを合成し、キラルカラムを用いて光学純度を測定したところ、どちらも 99%ee 以上であった。

A-6 セスキネオリグナンであるモリノール A、B の立体構造と抗菌活性との関係

○多胡良介¹, 山内聡¹, 丸山雅史¹, 秋山浩一², 菅原卓也¹, 岸田太郎¹, 木場洋次郎¹

(¹愛媛大・農学部、²愛媛大・総科支セ)

(目的)(-)-モリノール A ((2*R*,3*R*,5*S*)-5-[(*S*)-(hydroxy)(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-(3,4-dimethoxycinnamyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)tetrahydropyran) 及び(+)-モリノール B ((2*S*,3*S*,5*S*)-5-[(*S*)-(hydroxy)(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-(3,4-dimethoxycinnamyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)tetrahydropyran) は植物によってエナンチオマー混合物として生合成される。そこで、モリノール A、B の 16個の立体異性体を合成し、抗菌活性を調べた。(方法・結果)2位の立体はグリニヤール反応によって得られる立体を分離することによって、3位の立体はエバンスの *S* 体または *R* 体の不斉補助基を用いたアリル化によって、5位とベンジル位の不斉は、エバンスのアンチまたはシン不斉アルドール縮合を用いる事によって、16個の立体異性体を作り分けた。まず、天然に存在する(-)-及び(+)-モリノール A 及び(-)-及び(+)-モリノール B の抗菌活性を調べた。その結果、(+)-モリノール A のみが *B. subtilis* に対して MIC 50 mM、*L. denitrificans* に対して MIC 25 mM の活性を示した。次に、非天然体の活性を調べた結果、モリノール B タイプである(2*S*,3*R*,5*R*)-5-[(*S*)]体が *B. subtilis* に対して MIC 25 mM、*L. denitrificans* に対して MIC 50 mM の活性を示した。

A-7 ベンジル位の構造が異なるリグナン類の構造と抗酸化活性との関係

○山内聡¹、松木潤子¹、菅原卓也¹、染矢立志²、増田俊哉²、岸田太郎¹、丸山雅史¹、
秋山浩一³(¹愛媛大・農学部、²徳島大・総合科学部、³愛媛大・総科支セ)

(目的)リグナン類は C6-C3 単位がさまざまなパターンで結合し、さらに基本骨格中に多くの酸化様式があるため、その構造には多様性がある。これまでの我々の研究から、ベンジル位の酸化の程度が増すと抗酸化活性が低下する事が明らかになった。今回は、2級の酸化されていないベンジル位を有する構造と、ベンジル位が酸化されて環に組み込まれた構造を有するよく知られたリグナン類を合成し、ベンジル位の構造と抗酸化活性との関係を明らかにする事を目的とした。(方法・結果)2つの酸化されていない2級ベンジル位を持つ2, 3-ジベンジルブタンジオール型、3, 4-ジベンジルテトラヒドロフラン型、1つの酸化されていない2級ベンジル位と1つの酸化され環に組み込まれているベンジル位を持つ2-アリアルール-4-ベンジルー3-ヒドロキシメチルテトラヒドロフラン型、2つのベンジル位が共に酸化されて環に組み込まれている2, 5-ジアリアルール-3, 4-ジメチルテトラヒドロフラン型及びフロフラン型リグナンを合成し、ラジカル消去活性、ヒドロパーオキシド生成抑制活性、スーパーオキシド消去活性を測定した。その結果、2つの酸化されていない2級ベンジル位を有するリグナンが高い活性を有する事が示された。

A-8 Radical scavenging activity and anti-tumor promoting activity of Japanese olive extracts

○Surutwadee Pak-uthai¹, Arai Nobumasa², and Hirotohi Tamura¹(¹Graduate School of Agriculture, Kagawa University, ²Shodoshima Olive Park)

The biological activities of olive waste water (OWW), pomace and leaves of three cultivars (Mission, Manzanillo and Lucca) from Shodoshima Island were characterized. In OWW samples, 20 % MeOH eluent from Amberlite XAD-7 column of Manzanillo var. contained the highest value of total phenolic content (355.10 mg/ml GE/g sample), radical scavenging activity (2.80 mM TE/g sample), and positive anti-tumor promoting activity. The major compound in this fraction was hydroxytyrosol which characterized by HPLC, NMR and MS. In case of pomace, 20 % MeOH eluent of Manzanillo var. contained the highest value of total phenolic content (296.09 mg/ml GE/g sample), and 60 % MeOH eluent of Lucca var. contained the highest radical scavenging activity (2.40 mM TE/g sample). One hundred percent MeOH eluent of Mission pomace showed positive anti-tumor promoting activity. The major compound in positive anti-tumor promoting activity was oleuropein-like compound which characterized by NMR. Dried leaves MeOH and hexane extracts contained higher total phenolic content and more active DPPH radical scavenging activity than fresh leaves. The results suggest that olive waste water, pomace and leaves may be utilized as a source of bioactive compounds and safe for human health.

A-9 牡丹花卉抽出物の抗酸化活性

○田畑光正(島根産技セ)

【目的】牡丹(*Paeonia suffruticosa*)はボタン科に属し、根の樹皮部分は牡丹皮として漢方薬の原料となっている。一方、花卉は島根県を代表する花であるが、機能性に関する報告はほとんどない。よって、牡丹花卉について、抗酸化活性を評価し、有効利用の可能性を検証することとした。

【方法】島根県大根島で採取された春牡丹花卉を試料として、含水エタノール抽出液を評価に供与した。抗酸化活性の検証として、DPPH ラジカル消去活性、次亜塩素酸ラジカルおよびヒドロキシルラジカルによる蛋白質変性抑制活性を評価した。

【結果】エタノール濃度を変化させて抽出した牡丹花卉抽出液について、DPPH ラジカル消去活性を評価した結果、0-100%全濃度域で消去活性を示したが、50-75%の抽出液で強い活性を確認した。一方、蛋白質変性抑制活性では、緑茶抗酸化物質である、EGCG と同様に濃度依存的に変性を抑制することを確認した。また、0-100%エタノール抽出液について Folin-Ciocalteu 法により総ポリフェノールを測定した結果、DPPH ラジカル消去活性と高い相関を確認した。このことから抗酸化活性に寄与する物質はポリフェノールと推定された。

A-10 リン脂質過酸化物の構造変化に対する質量分析の応用

○井村 恵¹, 植田容未¹, 小林教代¹, 佐藤瑞穂¹, 細川美穂¹, 松原純子¹, 草場康一郎¹, 玖村直紀¹,
小田圭一^{1,2}, 泉 実¹, 中島修平¹, 馬場直道¹(1.岡大院・自然科学, 2.池田糖化工業(株))

【目的】生体組織、食品に普遍的に存在するリン脂質には、グリセロール骨格の1位と2位に結合する脂肪酸の組み合わせ、及び極性基部位との組み合わせが多数生じるために、生体リン脂質の分子種は複雑である。脂質の網羅的解析という最近の手法により、これら複雑な混合物中の各分子種の効率的同定が可能になった。一方、そのような複雑な混合物中のある特定の分子が生体組織や食品中で起こす化学変化を追跡する事も重要である。本研究では、ホスファチジルコリン(PC)のコリン部分の構造が少し異なる化合物(N-Triethylethanolammonium bromide, N-TEAB)を合成し、これをホスファチジル基受容体として、Phospholipase D(PLD)触媒によるPCからN-TEABへの転移反応をESI MSで分析する方法を検討した。

【方法・結果】エーテルを含む酢酸緩衝液(pH 5.6)にN-TEAB, ホスファチジルコリン過酸化物(PC-OOH)およびPLDを溶解し、30°Cで4時間反応した。EDTAで酵素を失活させた後に過剰のクロロホルム/メタノール混合液(1:2)を加えてリン脂質成分のみを抽出し、この溶液をTandem ESI MSによるPrecursor ion scan modeで分析した。その結果、N-TEABはPLDの基質となり、PC-OOHから過酸化ホスファチジル基がN-TEABに転移する事を確認された。この方法を用いてPC-OOHの分解物がPLDの基質になるかどうかを現在検討している。

A-11 レプリノイル基をタグとして利用した新規アフィニティー分離とその糖鎖合成への適用

○松原純子¹, 岡本 律¹, 平岡尚子¹, 佐藤瑞穂¹, 中島修平¹, 馬場直道¹, 泉 実¹, 深瀬浩一¹
(1岡大院自然科学, 2阪大院理)

糖質化合物は、様々な生理活性物質の重要な構成成分として自然界に広く存在しており、細胞分化・神経機能・癌の転移・急性炎症・感染などに深く関与している。糖質化合物の生物機能の解明に化学合成は大きな役割を果たしてきたが、簡便な糖質化合物の合成法が確立されていないため、その分子レベルでの機能探求はペプチド・核酸など他の1次代謝物に比べ大きく遅れている。有機化合物を迅速に合成するには常に固相合成が有効であるわけではなく、いかに効率良く固相-液相を組み合わせて合成を行うかが重要である。本研究ではChemical Fishing法に着目し、ヒドラジンなどに代表されるアミノ基のレプリノイル基への高い求核性を利用したChemical Fishing法の検討を行った。その方法としては、(1)液相でグリコシル化反応を行った後に、レプリノイル基を有する目的化合物のみを特異的にアミノオキシ基を導入した固相に結合させる、(2)不要の試薬や副生成物を洗い流した後、目的物を固相から溶出させる、と言う方法である。アミノオキシ基を導入した固相担体とレプリノイルタグを導入した糖鎖を24時間反応した後、ろ過および洗浄により過剰な試薬や副生成物などを除去した。ついで固相担体から糖鎖を切り出し、選択的に目的糖鎖のみを得ることに成功した。

A-12 ローヤルゼリー糖タンパク質に結合する腫瘍関連抗原含有N-グリカンの構造特性

牛嶋孝之¹⁾, 永井裕美¹⁾, 木村万里子²⁾, 沖原清司³⁾, 橋本健³⁾, 杉本廣之³⁾, 山田英生³⁾,
○木村吉伸¹⁾ 1)岡山大院・自然科学, 2)くらしき作陽大学, 3)山田養蜂場

【目的】ローヤルゼリー(RJ)には、興味深い生理活性を持つ糖タンパク質(RJGP)が多く存在する。我々は、RJGPに腫瘍関連T-抗原を有する新規構造N-グリカンが存在することを発見し、既にその詳細な化学構造を報告している(1)。腫瘍抗原含有新規N-グリカンの構造特性と免疫活性を明らかにする研究の一環として、今回はT-抗原含有糖鎖の全貌を報告する。【方法】全RJGPを還元アルキル化後、アクチナーゼ処理を行った。得られた糖ペプチドからヒドラジン分解により糖鎖を遊離させた後、2-アミノピリジンにより蛍光標識糖鎖(PA-糖鎖)を調製した。それぞれの糖鎖を精製後、それらの化学構造を組成分析、メチル化分析、酵素消化法、ESI-MS分析、¹H-NMRにより決定した。【結果】T-抗原含有糖鎖には、ハイブリッド型構造(Gal1GalNAc1GlcNAc1Man5(4)GlcNAc2-Asn)とパイアンテナ複合型構造(Gal2(1)GalNAc2(1)GlcNAc2Man3GlcNAc2-Asn)の2種のサブグループが存在することが明らかになった。これまでに決定したRJGP糖鎖構造から、ミツバチ頭部器官における糖タンパク質生成には、これまで知られていないβ1-3GalTが機能していることが示唆された。更に、T-抗原含有N-グリカンが結合する糖ペプチドを精製後、アミノ酸配列を決定したところ、T-抗原含有タンパク質は、ミツバチ脳内タンパク質であることが明らかになった。(1) Kimura, Y., Ushijima, T., et al. *BBB* **70**, 2583-2587 (2006).

A-13 レモンガラス由来のチロシナーゼ活性阻害物質 —単離と同定—

○増田俊哉¹, 小川奈津子¹, 尾高由佳¹, 武田美雄¹, 仲本勝男², 國永秀樹²

(¹ 徳島大・総合・生物環境資源, ² 仲善)

【目的】未利用またはそれほど一般的でない(低利用)の植物から有効利用可能な資源を見出す目的で、沖縄にて食用薬用利用が期待されて採集栽培されていた植物36種の合計53部位から抽出物を調製、その酸化劣化防止に関わる機能を検証する。さらにその機能発現エビデンスとして、含有活性物質を明らかにする研究を行う。今回は、酸化劣化防止機能として、特にチロシナーゼ(ポリフェノールオキシダーゼ)の阻害活性を取り上げ、53部位のなかで強い活性を示した植物としてレモンガラスの地上部に検討を加えることにした。

【方法・結果】レモンガラスは、仲善薬草園にて採集した沖縄産食薬用植物(36種53部位)をエタノール抽出することで得られた抽出物のチロシナーゼ阻害活性を評価した際に、ナンテン(葉)、ツルグミ(枝)、サキシマスオウノキ(枝)、ゲットウ(根茎)とともに着目すべき活性を示したものである¹⁾。そこで、その活性に寄与する含有成分を明らかにするために、再度レモンガラスを入手・抽出し、活性を指標にしながら、溶媒分画、各種クロマト精製を行った結果、2種の活性物質を単離することができた。それらの化学構造を解析した結果、トランスとシスのゲラン酸であることがわかった。 1) Masuda et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem* in press.

A-14 ゲットウ根茎部の酵素的酸化劣化抑制機能と含有機能性物質の解明研究

○染矢立志、尾高由佳、武田美雄、増田俊哉(徳島大・総合・生物環境資源)

【目的】沖縄にて薬用や食用目的で利用されている植物29種の抽出物について酸化劣化防止機能、今回は特にリポキシゲナーゼ阻害活性を調べ、強い活性を有する植物を選別するとともに、その活性成分を特定する。

【方法・結果】沖縄にて採集した食薬用植物29種のエタノール抽出物について、リポキシゲナーゼによるリノール酸の酸化にて生じるリノール酸ペルオキシドを234nmの吸光度で経時的に測定し、これから阻害率を求めた。結果、ゲットウ根茎部、ツルグミ葉部、シマトウガラシ実部、ネコノヒゲ地上部、ロブスターユーカリ葉部の抽出物に特に強い活性を認めた。中でも最も強い活性を示したゲットウ根茎部について含有活性物質の特定を試みた。ゲットウ根茎部を再度入手し、メタノールで抽出した。その抽出物を各種溶媒により分画した。その中でブタノール可溶部、酢酸エチル可溶部の活性が特に強いことがわかった。より強い活性のあったブタノール可溶部をODSカラムで更に分画したところ、50%、60%、70%、80%メタノール溶出部に強い活性があった。このうち60%分画物についてリポキシゲナーゼ阻害活性に寄与すると思われるHPLC上のピークを分取した。ピーク構成物質の構造解析、活性についての検討結果を報告する。

A-15 昆虫β-N-acetyl-D-glucosaminidase 特異的阻害剤 HU-1 構成異常糖の合成と阻害活性評価

仁戸田 照彦, 〇市川 美里, 白木 博一, 神崎 浩(岡山大学院自然科学)

【目的】我々は、昆虫脱皮に必要なキチン分解酵素の1つであるβ-N-acetyl-D-glucosaminidase (GlcNAcase)の阻害剤の探索を行い、これまでに放線菌 *Streptomyces anulatus* NBRC13369株が生産する新規オリゴ糖 HU-1が昆虫および糸状菌のGlcNAcaseを特異的に阻害することを明らかにしてきた¹⁾。HU-1の阻害活性には、N,N,N-trimethylglucosaminium (GlcNMe₃)残基が大きく貢献している可能性が考えられたため、GlcNMe₃の合成と阻害活性評価を行った。

【方法と結果】硫酸ジメチルを用いて、D-glucosamineのアミノ基をメチル化することによりGlcNMe₃の合成を試みた。得られた反応液を溶媒分画、カラムクロマトグラフィーなどに供して精製し、各種機器分析により構造解析を行った結果、GlcNMe₃を50%のモル収率で得たことを確認した。同時に、本化合物のアノマー平衡は圧倒的にα体に偏っていることが明らかとなった。ハスモンヨトウ蛹GlcNAcase阻害試験の結果から、HU-1のGlcNAcase阻害活性にはGlcNMe₃残基とキトリオース残基、もしくはその部分構造との結合が必要であることが示唆された。¹⁾日本農薬学会第31回大会講演要旨集, p 81-82(2006)

A-16 *Pochonia* 属糸状菌が生産する新規 β -N-acetylglucosaminidase 阻害剤の阻害活性評価
仁戸田照彦, ○豊岡実穂, 臼木博一, 土屋有紀¹, 奥田 徹¹, 神崎 浩
(岡山大院自然科学, ¹玉川大学術研)

【目的】我々は、昆虫脱皮に必須なキチン分解酵素群のうち、 β -N-acetylglucosaminidase(GlcNAcase) 阻害剤の探索を行い、これまでに放線菌と糸状菌の活性株を見だし、放線菌 *Streptomyces anulatus* NBRC13369 株が生産する新規オリゴ糖 HU-1 が昆虫および糸状菌の GlcNAcase を特異的に阻害することを明らかにしてきた¹⁾。今回、糸状菌が生産する GlcNAcase 阻害剤の単離・構造解析を行い、様々な生物種由来の GlcNAcase に対する阻害活性評価を行った。【方法と結果】形態的、生理的特徴および塩基配列に基づく系統解析から *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* と同定した糸状菌のオオムギ固体培地培養物の MeOH 抽出液を出発材料として活性物質の精製を行い、溶媒分画、各種カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換 HPLC により活性物質を単離した。各種 NMR 分析および質量分析などから、本化合物は新規のピロリジジナルカロイドであることが明らかとなった。本化合物はハスモンヨトウ蛹由来の GlcNAcase に対し、既知の GlcNAcase 阻害剤ナグスタチンと同等の強力な阻害活性を有していた。さらに、本化合物は双翅目、鱗翅目、網翅目の昆虫由来酵素に対しても阻害活性を示した。¹⁾日本農薬学会第31回大会講演要旨集, p 81-82 (2006)

A-17 乾燥シイタケに含まれる抗菌物質

○福島弘子¹、作野えみ¹、時本景亮²、中島廣光¹
(¹鳥取大農・生資環、²日本きのこセンター・菌茸研)

【目的】シイタケ (*Lentinula edodes*) は日本で最も普及している栽培食用きのこである。特に、乾燥シイタケは乾かすことにより、生のシイタケとは違った味や香りが出ることでその価値は高い。水戻しの際、日本産の乾燥シイタケが、3日後にカビがはえるのに対して、中国産の乾燥シイタケでは 2 週間後でもカビがはえないという現象を認めた。本研究では中国産乾燥シイタケが抗菌性を示す原因の解明を目指した。

【方法・結果】トリコデルマ (*Trichoderma harzianum*) はシイタケの原木栽培において深刻な被害を与える。本菌に対する抗菌活性を指標に以下のように精製を進めた。中国産乾燥シイタケの成分を蒸留水で抽出し、溶媒分画し、抗菌活性を示した酢酸エチル可溶区を各種クロマトグラフィーを用いて精製し、化合物1を単離した。各種スペクトルデータにより、化合物1を 1-oxo-1,2,4-trithiolane(OTT)と同定した。OTT はトリコデルマに対し 100 mg/L から生育遅延を示し、1000 mg/L では完全に生育を阻害した。次に、日本産3種と中国産3種の乾燥シイタケに含まれる OTT の含量を HPLC で定量した。その結果、中国産では 1.8 ~ 3.3 mg/g と OTT 含量にばらつきがあること、中国産3種の含量は日本産の OTT 含量、0.8 ~ 0.9mg/g よりも多いことがわかった。

A-18 ステビア熱水抽出発酵液の抗真菌活性

○切通章子¹⁾、古藤康太郎¹⁾、野瀬毅¹⁾、岡本啓湖¹⁾(福岡高・専攻科)

【目的】*Stevia rebaudiana* Bertoni (ステビア) の乾燥茎を熱水抽出後、発酵させて得られたステビア熱水抽出発酵液の農場での施用効果として、真菌類に起因する紋羽病からの完全治癒が現場で確認されている。本研究ではステビア熱水抽出発酵液の真菌類に対する増殖遅延活性及びその活性因子について検討した。【方法・結果】実験1: *Aspergillus oryzae* (白色変異株) を indicator としプレート実験を行なった結果、ステビア熱水抽出発酵液培地(pH6.8 調整)には対照培地(可溶性デンプン培地)との比較で 24 時間の増殖遅延活性が得られた。実験2: 白紋羽病原菌である *Rosellinia necatrix* R-4 株を indicator としてプレート実験を行なった結果、ステビア熱水抽出発酵液培地(pH6.8 調整)には対照培地(potato dextrose 寒天培地)との比較で 9 日間の増殖遅延活性が得られた。実験3: 96well を用いて *A.oryzae* 増殖遅延活性物質の特性を調べた結果、121°C15 分のオートクレーブ滅菌で失活せず、また pH6.8 調整により増殖遅延効果は 12 倍に増大した (pH 無調整との比較)。実験4: ステビア熱水抽出発酵液由来 3 種乳酸菌の混合培養液の *A.oryzae* 増殖遅延活性を検討した結果、増殖遅延活性は見られなかったが、*A.oryzae* の糖化活性減少がヨー素デンプン反応により示唆された。

A-19 ソテツ有毒配糖体の定量と分解酵素

○八木史郎、永野国寛、南 雄二（鹿児島大農生資化）

アゾキシ配糖体(AZG)はメチルアゾキシメタノール(MAM)をアグリコンにもちこれまでソテツにのみ見いだされてきた特殊なもので、サイカシン(β-グルコシド)、マクロザミン(β-プリミベロシド)が主なものである。これまで多くのソテツの種子の AZG 含量が報告されているが、ソテツの葉の AZG 含量は報告されていない。正確には、酵素の働きを抑えることが必要であるが、分解物 MAM についてはこれまで考慮されていなかった。

10属32種のソテツの葉抽出液について、AZG 含量を HPLC で定量し、分解物である MAM 量も同時に定量した。またそれぞれのサイカシン、マクロザミンの分解活性も測定した。

32種のソテツの葉のうち18種には AZG も MAM も検出されなかった。特に *Encephalartos* 属のものでは限られた種か、非常に若い葉にのみ検出された。サイカシンは *Bowenia serrulata* には 2%以上、マクロザミンは *Stangeria eriopus* で 0.12%含まれた。サイカシンの分解活性は *S. eriopus* で高く、マクロザミンは *Macrozamia miquelli* で最も高い値を示したが、AZG の定量に影響を及ぼすものではなかった。過去には、GC、クロマトロープ酸法および TLC、GC の組み合わせによる定量が行われていたが、それらの問題点について考察する。Phytochemistry, 65, 3243(2004)

A-20 香辛料による大腸菌 O157 の弱毒化

○横井川久己男(徳島大・総合科学)

(目的)大腸菌 O157 による経口感染は数細胞でも成立すると言われ、この高い感染力は胃の酸性バリアーを容易に通過できる高い酸耐性と関連すると考えられる。また、本病原体が生産するペロ毒素は細胞のペリプラズム空間に蓄積するため、抗生物質の使用がペロ毒素の大量放出やペロ毒素遺伝子の活性化等を誘導し、病態を悪化させる事例が報告されている。しかし、ペロ毒素生産性を有効に抑制する物質に関する報告はほとんどない。本研究では、本病原体の生細胞数の低下、酸耐性の低下、並びにペロ毒素生産性の低下を目的として、多様な作用を有する香辛料の影響を検討した。(実験材料と方法)遺伝的に異なる数種の大腸菌 O157 を実験に使用した。酸耐性は本病原体細胞を LB 培地(pH 3.0) に懸濁し、30℃で1時間後の生存率から調べた。ペロ毒素(VT1とVT2)は、抗ペロ毒素抗体で感作したラテックス粒子を用いた逆受身ラテックス凝集反応により測定した。各種香辛料は粉碎後、70%エタノールで抽出し実験に使用した。(結果)大腸菌 O157 の生細胞数はナツメグに含まれるβ-ピペニンにより特異的に低下した。また、ペロ毒素生産性はオールスパイスに含まれるオイゲノールにより抑制された。各種香辛料精油成分の組合せ効果についても検討を行った。

A-21 ラット平滑筋細胞株 A7r5 に対する epigallocatechin-3-gallate の細胞増殖促進作用

○長友俊介¹、藤村由紀¹、梅田大介¹、山田耕路¹、立花宏文^{1,2}

(¹九大院農院・生機科, ²九大 BAC)

[目的] Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) は多彩な生理活性を有する緑茶の主要カテキンとして注目されている。これまでに我々は、EGCG が 67 kDa laminin receptor を介して細胞膜表面に結合するとともに、ミオシン軽鎖 (MRLC) のリン酸化レベルを低下させ、肺がん細胞株やメラノーマ細胞株の増殖を抑制することを報告してきた。そこで本研究では、ラット平滑筋細胞株の増殖および MRLC リン酸化に対する EGCG の影響、ならびにその細胞表面結合性について検討した。

[方法および結果] ラット平滑筋細胞株 A7r5 に EGCG を添加し、72 時間培養後、セルカウンターにて細胞数を計測した。その結果、EGCG は濃度依存的に A7r5 細胞の増殖を促進した。また、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて A7r5 の細胞膜表面に対する EGCG の結合活性を測定したところ、ほとんど結合性を示さなかった。さらに、EGCG は A7r5 における MRLC のリン酸化を促進する傾向を示した。以上の結果から、EGCG は細胞膜表面への結合性が低い細胞に対し、MRLC のリン酸化レベルを増強するとともに細胞増殖を促進する可能性が示された。

A-22 イネに含まれるセジロウンカ・ヒメトビウンカの Probing 行動刺激物質

○奥 康史, 松本 幸, Francis Adjei-Afrie, 手林慎一, 金 哲史 (高知大農 生資)

イネの重要害虫であるセジロウンカ(*Sogatella frucifera* Horvath)やヒメトビウンカ(*Laodelphax striatellus* Fallen)の摂食行動は口針挿入・吸汁部位探索(Probing)と吸汁(Sucking)の2過程からなる。両種ウンカの Probing 行動には数種のフラボノイド配糖体が関与しており、今までにセジロウンカの Probing 行動刺激物質として Isoscoparin 2''-O-(6'''-(E)-feruloyl)glucoside、Tricin 5-O-glucoside が同定され、ヒメトビウンカの Probing 行動刺激物質として前出と類似したフラボノイド配糖体6種が同定されている。しかしながら、その全容は未だ明らかとなっていないことから、本研究ではその解明を試みた。イネのメタノール抽出物を液-液分配分画し、逆相系カラムクロマト、HPLC で順次精製し目的の化合物を得た。これらを各種機器分析に供した結果、セジロウンカの Probing 行動刺激物質を Isoscoparin 2''-O-glucoside と同定した。同様にヒメトビウンカの Probing 行動刺激物質を Isoscoparin 2''-O-glucoside、Isoorientin 2''-O-(6'''-(E)-feruloyl)glucoside、Isoorientin 2''-O-(6'''-p-coumaroyl)glucoside であると同定した。以上より両種ウンカの全 Probing 行動刺激物質の構造を解明した。

A-23 Secoisolariciresinol の生理活性評価に関する研究

○富永詩央里¹、菅原卓也¹、近藤 愛¹、岸田太郎¹、丸山雅史¹、秋山浩一²、山内 聡¹

(1愛媛大・農、2愛媛大・総科支セ)

【目的】Secoisolariciresinol (SECO)とは亜麻仁(アマニ)に含まれるリグナンの一種でありエストロゲン様の作用を示すことが知られている。この SECO の構造異性体である(+)-SECO、(-)-SECO、meso-SECO を合成し、それぞれの生理活性に関する評価を様々な観点から検討した。

【方法】各 SECO 化合物について、ヒト乳ガン細胞株 MCF-7 細胞、および BALB/c マウス由来大腸ガン細胞株 Colon-26 細胞に対する細胞傷害活性、前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞のアディポネクチン産生に対する効果、およびヒトハイブリドーマ株に対する抗体産生促進活性について検討した。

【結果】ガン細胞に対する傷害性を検討したところ、メソ体に弱い細胞傷害活性が認められた。一方、(-)-SECO には低濃度において MCF-7 細胞に対する増殖促進効果が確認され、(-)-SECO のみがエストロゲン様活性を示すことが推察された。また、(-)-SECO は、3T3-L1 細胞のアディポネクチン発現を RNA レベル、およびタンパク質レベルで上方制御し、アディポネクチン産生を約 1.5 倍促進した。ヒトハイブリドーマ株 HB4C5 細胞の IgM 産生に対して(+)-SECO、(-)-SECO は産生促進効果を示したものの、メソ体には活性が認められなかった。

A-24 昆虫の性フェロモン分泌におけるチラミン、ストレスの関与

○平島明法、永楽智彦、茂田陽子、木水めぐみ、山路英臣、吉澤貴樹、桑野栄一、江藤守総
(九大院農)

目的) ノシメマダラメイガのメスにおいて、性フェロモン分泌抑制作用を示す化合物を見出したので(1)、蚕の性フェロモン分泌と生体アミンやストレスとの関連と、性フェロモン生合成における生体アミン受容体の関与を検討した(2)。

方法と結果) 交尾後、蚕メス食堂下神経節におけるチラミン(TA)濃度は、劇的に増加したが、オクトパミン(OA)やドーパミン(DA)の濃度は、交尾前後で変化しなかった。10 nmol の TA を注射すると、性フェロモン分泌は、コントロールの54%に抑制されたが、OA や DA の注射では、変化しなかったが、ストレスにより、食堂下神経節の OA や DA 濃度は増加した。TA の添加により、フェロモン腺摩砕調整液中の性フェロモン生合成は、著しく減少したが、OA や DA の添加では、変化しなかった。以上より、蚕の性フェロモン分泌の抑制において、TA が関与していることが明らかになった。(1) Pheromone production of female *Plodia interpunctella* was inhibited by tyramineric antagonists. *Chem. Biodiv.* 1(11), 1652-1667 (2004)

(2) Effect of tyramine and stress on sex-pheromone production in the pre- and post-mating silkworm moth, *Bombyx mori* *J. Insect Physiol.* in press.

A-25 アズレン誘導体による GABA_A 受容体応答の昂進

○山本万貴江、行地一洋、村藤俊宏、青島均（山口大院・医）

【目的】抑制性神経伝達を担う物質であるGABAはGABA受容体を介してその生理機能を発揮している。イオンチャンネル型のGABA_A受容体は活性化されると、抗不安・抗不眠作用を引き起こす。またGABA_A受容体は、アルコールやベンゾジアゼピンなどがによって応答が昂進される。これまでに芳香物質やポリフェノール類、水酸基をもつ有機化合物なども応答を左右することが明らかとなり、それらが気分や情緒に影響を与える可能性が示唆されてきた。アズレン類には古くから抗炎症・抗アレルギー作用などが認められている。ここで新たに合成された水酸基を有するアズレン誘導体5種をSampleとし、アズレン類が抗不安作用を持つ可能性を調べることとした。【方法・結果】GABA_A受容体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、ボルテージクランプ法により電気応答を測定した。結果、カルボキシル基を持つもの以外は受容体応答を昂進した。2-Hydroxyazulene と2,6-Dihydroxyazulene の比較から水酸基が少ない方がより昂進の傾向があり、Azulen-2-methanol と2-Hydroxyazulene の比較からアズレン環に直接水酸基を付加させるよりも、炭素を介して付加させた方がより応答を昂進させる可能性がある。

A-26 Studies on the docking of structurally diverse noncompetitive antagonists into the channel pores of GABA receptor homology models

○Mohammad Sayed Alam and Yoshihisa Ozoe (Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

The ionotropic γ -aminobutyric acid receptor (GABAR) is a pentameric ligand-gated ion channel and the major site of action of many structurally diverse insecticides acting as noncompetitive antagonists (NCAs). As the human $\beta 3$ GABAR subunit has a high homology to the insect GABAR subunit Rdl and is easily expressed in cell lines, the $\beta 3$ -homopentamer is useful as an experimental model of insect GABARs. Meanwhile, the heteropentamer composed of $\alpha 1$, $\beta 2$, and $\gamma 2$ subunits is the most abundant GABAR subtype in the mammalian brain, while the $\beta 3$ -homopentamer is not expressed in the brain. In the present study, three-dimensional models of the $\beta 3$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABARs were constructed by homology modeling using the 4Å cryo-electron microscopy structure of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor as a template in the MOE2006.08 (Molecular Operating Environment) program. Structurally diverse NCAs were automatically docked into the channel pore of the homology model of GABARs to identify their binding sites and orientations. Molecular docking studies suggested that the binding sites for structurally diverse NCAs are located in the channel-lining 2'-6' region of the second transmembrane domain of the $\beta 3$ and $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABARs. However, the molecules can apparently take a variety of orientations within the channel pore, depending on their structures. A good correlation was observed between the total binding energies and experimentally determined potencies of some NCAs, indicating the validity of the suggested mode of interaction.

B-1 ヒメアカタテハの蛹体色調節に関わる内分泌調節因子の抽出とその性質

米谷美和子¹、山本和昭¹、辻村由紀¹、北沢千里²、○山中 明^{1,3}

(1山口大・理、2山口大・教育、3山口大院・医学系)

【目的】ヒメアカタテハの蛹体色には、金や銀を基調とした黄土色型と暗褐色型が存在するが、本種の蛹体色の発現調節機構は不明である。本研究では、蛹の体色決定に関わる内分泌調節因子の抽出および性質について解析を行った。【方法】幼虫は、短日(8L-16D、16、20 および 32°C)ならびに長日(16L-8D、16、25 および 32°C)条件下で飼育した。内分泌調節因子の生物検定方法は、長日 32°C飼育個体の前蛹の胸腹部間を糸で結紮し、その結紮腹部に脳神経系粗抽出液を投与し、2 日後に幼虫表皮を除き、新たにできた蛹の表皮の体色を 5 段階に分け、因子の活性を数値化した。【結果】日長条件に関わらず、16°Cでは暗褐色型、32°Cでは黄土色型の蛹体色となった。次に、長日 32°C飼育個体の前蛹の胸腹部間を糸で結紮した時、前蛹初期の結紮腹部体色は黒褐色に、後期では白色となった。つまり、前蛹後期に、蛹体色の黒色化を抑制する因子が分泌され、黄土色型の蛹体色が発現していることが明らかとなった。そこで、3種の脳神経系粗抽出液を調製し、結紮腹部に各粗抽出液を投与したところ、2% NaCl 粗抽出液中に蛹の黒色化を抑制する強い活性が認められた。また、この活性は、腹部体色に対して濃度依存的な応答を示したので、ホルモンとして作用していることが示唆された。

B-2 カイコ変態期におけるシステインプロテアーゼの役割

○上野由宣¹ 岡田太郎² 山本幸治¹ 伴野豊¹ 藤井博¹ 麻生陽一¹

(¹九大院農 ²フェニックスバイオ)

我々は、完全変態昆虫カイコ *Bombyx mori* をモデルとし、システインプロテアーゼ(BCP)の変態期における役割を調べ、組織の崩壊と増殖の仕組みの解明を目指している。まず、BCP の組織分布を調べた結果、BCP は脂肪体内のタンパク質顆粒に存在することが明らかになった。完全変態昆虫は、体液にある貯蔵タンパク質をタンパク質顆粒に蓄積し、その分解産物を成虫組織の栄養にすると考えられている。このことから、BCP が貯蔵タンパク質分解に関与することが示唆された。分離したタンパク質顆粒を酸性化したところ、プロテアーゼが活性化し、貯蔵タンパク質が経時的に減少した。また、この貯蔵タンパク質の減少は抗 BCP 抗体によって抑制されることが分かった。次に、精製した貯蔵タンパク質と BCP を用いて貯蔵タンパク質の分解を調べた。その結果、貯蔵タンパク質は BCP によって分解された。その分解パターンは、タンパク質顆粒の酸性化時と同様であった。以上の結果から、カイコのシステインプロテアーゼは、顆粒中の貯蔵タンパク質分解を行ない、変態期の成虫組織形成の栄養面に関与すると考えられた。

B-3 *Bombyx mori* 新規グルタチオン転移酵素の同定ならびに機能解析

○山本幸治¹・長岡純治²・麻生陽一¹ (1.九大院農、2.京工繊大)

我々は昆虫の解毒酵素群について研究をすすめている。グルタチオン転移酵素(GST、EC 2.5.1.18)は代表的な解毒酵素の一つであり、生体外異物や脂質過酸化物質等の内因性の求核化合物に還元グルタチオン(GSH)を抱合し、体外への排出を促進する。本研究では鱗翅目昆虫のモデルであるカイコ(*Bombyx mori*)より GST(bmGST)を同定し、その機能の解析を行った。

カイコ5齢幼虫の脂肪組織よりtotal RNAを調製し、RT-PCRにより目的遺伝子のクローニングを行った。bmGSTは、257のアミノ酸残基より構成され、推定分子量は29,807であった。アミノ酸配列の相同性比較ならびに系統樹によりbmGSTは新規クラスに属することが分かった。その諸性質を調べるため、大腸菌Rosetta (DE3)株ならびに発現ベクターpET11bを用いて組換え体を作製した。組換えbmGSTは、50°C以下そしてpH4から11の範囲で安定であった。また脂質過酸化物質である4-ヒドロキシノネナールへのGSH抱合活性を有したことより、bmGSTは膜脂質の酸化的障害の修復に関与することが示唆された。

B-4 線虫 (*C. elegans*)に見出されたホスホリパーゼ A₁

○炭山隆雄¹⁾、平野 薫¹⁾、田中 保¹⁾、里内 清¹⁾、松崎浩明²⁾、秦野琢之²⁾
(福山大・生命工・¹⁾応用科、²⁾生物工)

【目的】動物のリン脂質は通常 1 位には飽和脂肪酸、2 位には不飽和脂肪酸が結合しているが、線虫 (*C. elegans*)には 1、2 位共に多価不飽和脂肪酸が結合した分子種が多量に存在する。我々は、本分子種の生合成系を検討する過程で、リン脂質の 1 位の脂肪酸を加水分解するホスホリパーゼ A₁を見出したので報告する。【方法】線虫をフレンチプレスにて破碎した後、100,000×g 上清画分を調製した。これを DEAE イオン交換カラムに供し、活性画分を得た。この画分を酵素源とし、種々のリン脂質を基質に活性測定を行い、生じたリゾリン脂質を定量した。【結果および考察】2 位のリノール酸残基を¹⁴Cで標識したホスファチジン酸(PA)を基質に用い位置特異性を検討した結果、見出されたホスホリパーゼ活性は 1 位を加水分解する A₁タイプであった。また、トリグリセリドを分解するリパーゼ活性は示さず、Ca²⁺非要求性であり、pH4.5 付近に最適 pH を持った。PA、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールを基質に用いたところ、PE や PA を比較的良い基質とした。現在、本酵素の生理的意義について検討している。

B-5 オニオコゼ仔魚の活性酸素産生とその生物学的意義

○門村和志(長崎水試)・成瀬早矢加・山口健一・小田達也(長崎大水)

【目的】最近の研究で演者らはオニオコゼの胚および仔魚が正常な発育過程においても極めて高いレベルの活性酸素(ROS)を産生することを見出した。このステージの仔魚は特異的免疫機構が備わっていないことから仔魚のROS産生は興味深い。これらの現象が他の海産魚類にも共通する性質であるか明らかにするため解析を行った。

【方法と結果】6種類の海産魚類仔魚について特異的プロンプ(L012)を用いたROSの化学発光解析を行った。魚種によりその程度は大きく異なるものの、いずれもROSを産生し、中でもオニオコゼを含むカサゴ目魚類が極めて高いレベルのROSを産生することが示唆された。いずれの化学発光もSODにより阻害され、これらが主としてスーパーオキシドであることが示された。ペニシリンやストレプトマイシンなどの抗生物質で1-2日間処理後、仔魚のROS産生レベルは減少した。高感度光量子顕微鏡観察により比較的高いレベルのROSが仔魚の頭部領域において産生されていた。これらの結果はROS産生が海産魚類に共通する特性であり、仔魚はその発育過程でおそらく生体防御の目的でROS産生していることを示唆している。

B-6 ベンジルイソチオシアネートが誘導する細胞死における PI3K シグナル経路の役割

○横部新太郎、下石靖昭、村田芳行、中村宜督(岡山大院・自然科学)

【目的】ベンジルイソチオシアネート(BITC)はパパイヤ種子などに含まれている食品由来の化合物であり、アポトーシス細胞死を誘導することで抗がん作用を発揮することが報告されている。一方で、これまでの報告や我々の実験結果は、BITC が、アポトーシスの抑制に関与する Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) シグナルに影響を与えることを示唆しているが、詳細は明らかになっていない。そこで本研究は、BITC が誘導する細胞死における PI3K シグナルの役割をさらに解明することを目的とした。

【方法・結果】がん細胞(HeLa、HT-29)に PI3K 阻害剤の LY294002 を前処理した後、BITC を添加した培地で培養を行った。フローサイトメリー解析の結果、PI3K の阻害は BITC が誘導するアポトーシスを増加させることがわかった。また、Hoechst 染色を行い同様の効果を観察した。さらに、PI3K の下流に位置する分子である Akt のリン酸化レベルを Western blot 法により評価した。その結果、BITC が Akt のリン酸化を亢進すること、つまり PI3K を活性化することが示唆された。以上のことから、BITC は PI3K を活性化し、下流の標的分子を介して、アポトーシスを抑制することで、自らの効果を減衰させていることが予想された。

B-7 セリン合成酵素 Phgdh KO マウス脊髄発達異常のマイクロアレイ解析

○川上 由里子¹、梁 廷訓¹、吉田 一之²、東 徳洋¹、平林 義雄³、古屋 茂樹^{1,3}

(¹九州大学バイオアーキテクチャーセンター、²宇都宮大学農学部、³理化学研究所 BSI)

[目的]我々は非必須アミノ酸である L-セリンが培養神経細胞の生存を促進する液性因子であり、その分子機序としてセリン合成酵素 Phgdh の神経上皮/放射状グリア/アストロサイト系譜に局限した発現を見いだした。さらに Phgdh ノックアウト(KO) マウスを作製し、グリア細胞系譜特異的な内在性セリン合成が脳の形態形成と胚発生の維持に不可欠であることを実証した。本研究ではセリン欠乏が、中枢神経系に及ぼす影響のより詳細な分子機序を明らかにすることを目的に、Phgdh KO マウス胚脊髄のトランスクリプトーム解析を行い、発現が変化する遺伝子の同定を行った。[方法]Phgdh KO マウス脊髄から全 RNA を調製し、マイクロアレイ実験に供した。マイクロアレイチップとして Illumina 社 Mouse-6 Expression BeadChip を用いた。[結果]KO マウスと同腹の野生型胚の脊髄から調製した RNA サンプルについて、倍率変化ならびに統計学的なフィルタリングにより、KO マウスで有意な発現変化を示す 90 遺伝子を同定した。72 遺伝子に発現上昇、18 遺伝子に発現低下が認められた。発現上昇している遺伝子の 4 割が細胞周期に関与していた。組織観察からも、KO 胚脊髄の脳室帯背側に増殖性細胞核特異抗原(PCNA)陽性細胞が野生型より多く分布し、個々のシグナルも増強されていた。これらの結果より、セリン欠乏は脊髄神経上皮幹細胞に細胞周期異常を導き、神経細胞分化を阻害している可能性が強く示唆された。

B-8 植物の紫外線防御における光回復の意義と紫外線誘発突然変異

○佐藤良平¹、安田 愛¹、吉原亮平²、滝本晃一³

(¹山口大院農、²原子力研究開発機構、³山口大農)

紫外線(UV)は DNA 上にピリミジン 2 量体を生成し、致死や変異誘発の原因となり、生育を抑制する。植物には光回復と暗回復が修復系として知られ、前者は可視光線を利用するもので、太陽光下で生育している植物にとっては有効な修復系と考えられる。我々は高等植物において、シクロブタン型ピリミジン 2 量体(CPD)光回復が高等植物の紫外線防御と変異誘発に与える効果を調べた。

シロイヌナズナにホウレンソウ CPD 光回復遺伝子を導入してコピー数を増やしたホモ系統の UV-B(主波長 306nm)感受性を調べたところ、野性型に比べて生育抑制の軽減がみられた。一方、CPD 光回復遺伝子を RNAi によりサイレンシングしたシロイヌナズナは著しい UV-B 感受性を示した。CPD 光回復は高等植物の UV 耐性に重要な役割を果たしている。

ピリミジン 2 量体は突然変異の原因となる。変異標的遺伝子導入シロイヌナズナを用いた。サイレンシング体の変異頻度は野性型の約 2 倍であり、GC→AT 塩基置換やフレームシフトが多い傾向がみられた。他生物の UV 誘発変異ではあまりみられない AT→TA や GC→CG 塩基置換が野性型で検出された。植物に特有なのかもしれない。

B-9 光化学スモッグ注意報発令時のオゾンによるタバコ植物葉での可視障害の誘導

○衛藤晋平、平松拓也、陽川憲、河野智謙(北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科)

平成 19 年 5 月 27 日、北九州市全域で光化学スモッグ注意報が発令された。これに合わせ同日午後 0 時 30 分から北九州市立大学の屋上においてオゾン感受性の異なる 2 系統のタバコ植物体(各 10 鉢)を用いてオゾンが植物に与える影響を観測した。48 時間外気に曝し、回収した感受性植物では 10 個体全てに可視障害が表れた。最も若い 2 枚の十分に展開した本葉を対象に解析を行ったところ、白い斑点が葉 1 枚平均で 40 個出現した。しかし、耐性植物や屋内に放置した両系統の葉には変化がなかった。また、発芽間もない両系統の芽生えを同日午後 6 時 30 分から 42 時間屋上に放置すると、感受性植物の芽生え 10 個体には特徴的な障害が出たが、耐性植物の芽生え 10 個体にはほとんど影響はなかった。本大学近隣の 2 ヶ所の観測所では 5 月 27 日午前 11 時から正午にかけて光化学オキシダント濃度が注意報基準の 0.12ppm を上回っていた。最近、全国的に頻発した光化学スモッグの原因が、大陸由来の大気汚染物質によるものとするシミュレーション等の報告があるが、今回の北九州市での光化学スモッグ発生が同様の原因によるものとするならば、国外からの要因による光化学オキシダントの植物への影響に関する初の報告であると考えられる。

B-10 イネのプロリン生合成・代謝と耐塩性

○植地洋子・高橋裕昭・江坂宗春(広大院 生物圏科学研究科)

プロリン(Pro)は植物では塩・乾燥などのオスモティックストレス下において細胞内に大量に蓄積し、浸透圧調節を行う適合溶質として機能している。Pro はグルタミン酸(Glu)から中間体である Δ 1-pyrroline-5-carboxylate(P5C)を経て合成されており、P5C synthetase(P5CS)、P5C reductase(P5CR)という酵素が触媒している。一方代謝経路では、Pro から Glu へと分解される際に、proline dehydrogenase (ProDH)、P5C dehydrogenase(P5CDH)という酵素が触媒している。また Glu からの合成系以外に、オルニチン(Orn)から Ornithine- δ -aminotransferase(δ -OAT)という酵素が触媒し、P5C を経て Pro が合成される経路も存在している。

イネの水耕栽培時に、水耕液に NaCl を添加しストレス下におくと、葉で Pro 含量が増加した。KCl、CaCl₂、Mannitolを添加した場合、NaClと同様に葉でPro 含量が増加した。Pro の増加時に、Pro 合成および代謝酵素遺伝子群の発現解析を行ったが、根、葉ともに Pro 含量の増加を調節するための鍵となる酵素を特定することはできなかった。

B-11 植物の Dof タンパク質 AOBP と bHLH-ZIP タンパク質の相互作用と機能

○水本俊行、吉村尚子¹、山崎奈奈、江坂宗春

(¹広島大・生物生産学部、広島大院・生物圏科学研究科)

AOBP (Ascorbate Oxidase gene Binding Protein)は、カボチャのアスコルビン酸酸化酵素(AAO)遺伝子の 5' 上流域に結合するタンパク質であり、Dof(DNA-binding with one finger)ドメインという DNA 結合ドメインを有する植物特異的な転写因子であると考えられている。これまでにモデル植物であるタバコの AOBP ホモログ、NtAOBP を用いた解析から、NtAOBP と相互作用する NtbHLH-ZIP(basic helix-loop-helix leucine Zipper)転写因子タンパク質が単離されている。Dof タンパク質や植物の bHLH-ZIP 型タンパク質の遺伝子発現調節機構は不明な点が多く、その解明に興味を持たれる。そこで本研究では、酵母 two-hybrid 法を用いてモデル植物であるタバコやシロイヌナズナの AOBP 様タンパク質と bHLH-ZIP 型タンパク質の相互作用の解析を試みた。その結果、NtbHLH-ZIP は NtAOBP との結合にはほぼ全鎖が必要であるとともに、シロイヌナズナ AtDof3.3 と相互作用できることが分かった。現在、同様の手法でシロイヌナズナの AOBP 様タンパク質と bHLH-ZIP 型タンパク質の相互作用を解析中である。また、Luciferase reporter assay system を用いてシロイヌナズナの AOBP 様タンパク質及び bHLH-ZIP 型タンパク質の転写制御能も解析中である。

B-12 *Chlorella vulgaris* C-27 株の耐凍性獲得に及ぼすルヌラリン酸の効果

○渡邊雄太、町田豪、杉田未来、山田直隆、本城賢一、桑野栄一(九大院・生資環)

【目的】ある種の植物は、非凍結の低温に一定時間曝されると、糖・脂質および蛋白質の代謝を変化させ、耐凍性を獲得することが報告されている。本研究では、3°Cの低温処理により耐凍性を獲得し、凍結融解後も生存可能なクロレラ(*C. vulgaris* C-27 株)を用い、種々のストレス耐性を誘導することが知られているABAの代替物質、ルヌラリン酸(LA)が耐凍性獲得能に与える影響を検討した。

【方法・結果】耐凍性獲得能の高いL2細胞主体の培養液に、LAを添加し、低温処理(24時間)した。-20°Cで凍結保存(20時間)後、25°C・連続明期下で振とう培養し、クロレラ細胞数を計測した。3°Cの低温処理は、十分な耐凍性を付与し、解凍後48時間で20倍以上に増殖した。この3°Cの低温処理で、10 μ M以上のLAを処理すると、増殖率は低下した。しかし、耐凍性獲得が不十分な10°Cの低温処理では、50 μ MのLA施用で、クロレラは72時間後に未処理の8倍増殖した。このとき、凍結防御に関与するとされるLEA(Late Embryogenesis Abundant)蛋白質をコードした*hiC6*(hardening-induced *Chlorella* 6)遺伝子の発現が、LA処理で抑制されることからLAによる耐凍性誘導はLEA蛋白質とは別のメカニズムであることが示唆された。

B-13 クロレラ葉緑体局在型 G6PDH アイソザイムの低温下における発現挙動と機能解析

○大橋直人¹, 町田豪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)

Chlorella vulgaris C-27は低温処理により耐凍性を獲得する。これまでの研究により、クロレラの低温処理中にグルコース6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)の活性上昇が認められている。さらに、細胞質(CvcG6PDH)および葉緑体局在型(CvchG6PDH)の2種類のアイソザイムの精製、cDNAのクローニング、ならびにCvcG6PDHの低温下での発現挙動について解析が行われている。そこで、本研究では、CvchG6PDHの低温下における発現挙動および耐凍性獲得への関与について検討した。

まず、精製したG6PDHアイソザイムのN末端アミノ酸配列と*Cvchg6pdh*の推定アミノ酸配列を基に、成熟型タンパク質コード領域(*mCvchg6pdh*)を決定し、大腸菌で発現させた。発現タンパク質はDTT感受性であったことから、本cDNAは葉緑体局在型をコードすると推定された。次に、クロレラから全RNAを調製し、ノーザンブロット分析を行った結果、低温での転写量増加が認められた。現在、抗CvchG6PDH抗体を用いて低温処理中の翻訳量変化を調べ、活性変化との関係について調べている。

B-14 Defense mechanisms of proline and glycinebetaine in NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle in tobacco BY-2 suspension cells

○Md. Anamul Hoque, Mst. Nasrin Akhter Banu, Eiji Okuma, Katsumi Amako*, Yoshimasa Nakamura, Yasuaki Shimoishi, Yoshiyuki Murata (Okayama University, *Kobe Gakuin University)

Up-regulation of antioxidant system provides protection against NaCl-induced oxidative damage in plants. Components of ascorbate-glutathione (ASC-GSH) cycle in tobacco BY-2 cells were investigated to assess the antioxidant protection offered by proline and betaine against salt stress. Salt stress reduced contents of ASC and GSH as well as activities of ASC-GSH cycle enzymes. Exogenous proline as well as betaine increased the activities of ASC-GSH cycle enzymes except monodehydroascorbate reductase under salt stress. Levels of ASC and GSH in BY-2 cells under salt stress were lower in the presence of proline or betaine than in the absence of proline or betaine whereas there was no difference in redox status. Proline proved more effective than betaine in maintaining the activity of ASC-GSH cycle enzymes under salt stress. Neither proline nor betaine had any direct protective effect on NaCl-induced ASC-GSH cycle enzymes. This study, together with our earlier findings (Hoque et al., 2007), suggests that proline offered greater protection against salt stress than betaine because proline was more effective in increasing enzyme activities involved in antioxidant defense system.

B-15 Protective roles of proline and glycinebetaine in cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 suspension cells against salt stress

○Mst. Nasrin Akhter Banu, Md. Anamul Hoque, Megumi Watanabe-Sugimoto, Md. Sarwar Jahan, Yoshimasa Nakamura, Yasuaki Shimoishi, Yoshiyuki Murata (Okayama University)

Salt stress causes oxidative damage and cell death in plants. Plants accumulate proline and glycinebetaine (betaine) to mitigate detrimental effects of salt stress. We investigated the protective effects of proline and betaine on cell death in NaCl-unadapted tobacco BY-2 cells subjected to salt stress. Salt stress increased reactive oxygen species (ROS) generation, lipid peroxidation, nuclear deformation and degradation, chromatin condensation, apoptosis-like cell death and ATP contents. Neither proline nor betaine affected apoptosis-like cell death and G₁ phase population, and increased ATP contents in the 200 mM NaCl-stressed cells but both of them effectively decreased ROS generation and lipid peroxidation, and suppressed nuclear deformation and chromatin condensation induced by severe salt stress. Evans blue staining experiment showed that salt stress caused a significant increase in cell death whereas both proline and betaine significantly decreased 200 mM NaCl-induced cell death. It is concluded that both proline and betaine protect tobacco BY-2 cells against NaCl-induced cell death, and this protection is correlated with decreased level of ROS generation and lipid peroxidation.

B-16 シロイヌナズナにおけるアブシジン酸、ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口シグナル伝達経路—プロテインホスファターゼ 2A の役割—

○齋藤直毅 中村宜督 下石靖昭 村田芳行(岡山大学大学院自然科学研究科)

植物は乾燥ストレスにさらされると、アブシジン酸(ABA)産生が誘導される。ABA は孔辺細胞内で、活性酸素種(ROS)の産生、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇などを引き起こし、気孔閉口を誘導する。Kwak ら(2002)によって、Ser/Thr タンパク質脱リン酸化酵素(PP2A)の調節 A サブユニットの RCN1 が ABA 誘導気孔閉口シグナル伝達のポジティブレギュレーターとして、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇より上流で機能することが示された。一方、ABA と同様に気孔閉口を誘導することが知られているジャスモン酸メチル(MJ)は、ABA 誘導気孔閉口シグナル伝達経路の ROS 産生より上流でクロストークすることが報告された。そこで、本研究では ABA、MJ 誘導気孔閉口シグナル伝達における RCN1 の役割をさらに解明することを目的とし、シロイヌナズナの RCN1 遺伝子ノックアウト変異体である *rcn1* 変異体を用いて実験を行った。*rcn1* 変異体は、以前の報告通り気孔閉口に関して ABA に非感受性を示した。また、MJ にも非感受性を示すことが分かった。さらに、*rcn1* 変異体は ABA、MJ によって孔辺細胞内で ROS を産生しないことが分かった。以上より、RCN1 は ABA、MJ 誘導気孔閉口シグナル伝達経路において ROS 産生より上流で機能することが示唆された。

B-17 孔辺細胞におけるカルシウムシグナリング

○宗正晋太郎、中村宜督、下石靖昭、村田芳行(岡大院・自然科学)

多くの生物においてカルシウムは非常に重要な情報伝達因子であり、生物の様々なシグナル経路が細胞質中のカルシウムイオン濃度の変化に依存している。植物に関しては、気孔開閉制御や根の成長、花粉管の伸長、光感知などにおけるカルシウムの役割が幅広く研究されている。しかし、植物におけるカルシウムシグナリング機構は動物のそれに比べて多くが未解明のままである。本研究では、気孔開閉制御におけるカルシウムの役割について着目し、植物におけるカルシウムシグナリングを解明することを試みた。細胞質中のカルシウムイオン濃度の動的変化を観察するため、カルシウムセンサータンパク質であるイエローカメレオンを孔辺細胞に発現したシロイヌナズナを用いて実験を行った。また、植物に固有のカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 CDPK とカルシウムチャネルである TPC1 に着目し、その遺伝子を破壊した植物体を用いて孔辺細胞のカルシウムシグナリングにおけるそれらの役割について調査した。

B-18 シロイヌナズナ気孔形成関連遺伝子の発現制御領域の解析

○赤坂裕也¹、片山諭²、川向誠²、中川強¹(¹島根大・総科センター、²島根大・生物資源)

気孔は植物のガス交換における重要な働きをしている。気孔は 2 個の孔辺細胞から成り、シロイヌナズナにおいて気孔の分布や配置、孔辺細胞の形態に関する変異体が単離され、解析が進められている。それらのうち *TOO MANY MOUTHS (TMM)*、*STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1 (SDD1)*、*MC79* 遺伝子はいずれも孔辺細胞系譜(メリステモイド-孔辺母細胞-孔辺細胞)で発現するものの発現タイミングは異なっており、これらの発現制御機構に興味もたれる。そこで本研究では、孔辺細胞の発達ステージにおいてこれらの発現調節がどのようになされているのか調べるために、特異的発現に関わるシス領域の同定を試みた。上記の遺伝子についてプロモーター領域のデリーションを行い、プロモーター::GFP の手法を用いて解析を行った。葉の蛍光顕微鏡観察の結果、*TMM* では開始コドン上流 150bp のコンストラクトに到るまでメリステモイドにおける発現が観察され、*SDD1* では開始コドン上流 200bp に到るまで孔辺母細胞における発現が観察され、*MC79* では開始コドン上流 200bp に到るまでメリステモイドから孔辺母細胞にかけて発現が観察された。これらの領域内にシス配列が存在することが予想される。また、シス配列特異的に作用するトランス因子の特定を試みた。

B-19 植物カタラーゼのペルオキシソームへの輸送機構の解明

○西谷敦子¹、大島良美¹、神垣あかね^{1,2}、真野昌二²、林誠²、西村幹夫²、江坂宗春¹
(¹広島大学大学院生物圏科学研究科、²基礎生物学研究所)

カタラーゼは、ペルオキシソーム内に大量に蓄積する酵素であるが、ペルオキシソームへの輸送シグナルは、未だ同定されていない。カボチャカタラーゼCat1ではPTS1(Peroxisome Targeting Signal 1)様の配列QKLが内部PTS1として機能することが示唆されている。また、タバコ培養細胞において、PTS1型タンパク質のレセプターであるPex5pの発現を抑制すると、典型的なPTS1は輸送されないが、Cat1は輸送されることが示され、カタラーゼのペルオキシソームへの輸送は、Pex5pが関与しないユニークな機構で輸送されることが示唆されている。そこで本研究ではPex5pと、Pex5pのレセプターであるPex14pに着目し、Cat1のペルオキシソームへの輸送機構について解析した。Pex14pがカタラーゼ輸送に関わるかどうかを調べるため、タバコ培養細胞において、RNAi法によりPex14p発現抑制株を作製し、カタラーゼの輸送を解析したところ、カタラーゼのペルオキシソームへの輸送がみられた。したがって、Pex14pはカタラーゼ輸送に関与しないことが示唆された。カタラーゼはPex14pを含む上流の過程において、他のペルオキシソームタンパク質と異なるユニークな輸送経路を持つと考えられる。一方、アラビドプシスカタラーゼのQKLが、内部PTS1として機能するかについて、酵母two-hybrid systemを用いて解析している。

B-20 Functional analysis of aldonolactonase on the ascorbate biosynthesis pathway in *Euglena*

○Yongshun Gao¹, Hitoshi Nishikawa¹, Yukinori Yabuta², Takanori Maruta³, Yoshihiro Sawa¹, Hitoshi Shibata¹, Shigeru Shigeoka³, Takahiro Ishikawa¹(¹Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., ²Sch. Agr., Biol. Environ. Sci., Fac. Agri., Tottori Univ., ³Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

Recent genetic and biochemical evidences indicate that Mannose/Galactose pathway is a major route for ascorbate biosynthesis in plants, although several possible pathways have been proposed *via* uronic acids as their intermediates. Photosynthesis green alga, *Euglena*, contains high concentrations of ascorbate and the biosynthesis pathway proceeds *via* the conversion of UDP-D-glucuronic acid to UDP- D-galacturonic acid, with successive production of D-galacturonate (D-GalUA) and reduction to L-galactonic acid (L-GalA). L-Galactono-1,4-lactone (L-GalL) is the final precursor for the ascorbate production. The fact indicates that the *Euglena* has developed an analogue pathway to D-GalUA pathway unclear in plant. To understand the ascorbate biosynthesis pathway in *Euglena* in detail, we have characterized aldonolactonase (ALase) catalyzing L-GalA to L-GalL. ALase were purified to homogeneity from *Euglena* cells. The purified ALase had activity toward various aldonolactones including L-GalL and L-gulonono-1,4-lactone with a requirement for Zn²⁺ as a cofactor. A *Euglena* EST clone annotating in public database as a putative rat ALase was found and the corresponding full-length cDNA was cloned by RACE method. The deduced amino acid sequence of the cDNA showed 37.1% identity with that of rat ALase. The cDNA was expressed in *E. coli*, and the purified recombinant protein exhibited ALase activity with the same properties as those of native *Euglena* ALase. The enzyme catalyzed the reverse reaction with L-GalA and L-gulonate with the apparent *K_m* values 1.55 ± 0.3 mM and 4.55 ± 0.23 mM, respectively. We will also discuss the physiological function of *Euglena* ALase by a transient suppression of the gene expression.

B-21 Is lipoxygenase or cytochrome P450 involved in 1-octen-3-ol formation in Shiitake (*Lentinula edodes*)?

○Kakumyan Pattana, Kenji Matsui (Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, and Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University)

Mushrooms have their characteristic odor. The main odorants are 8-carbon volatiles, particularly 1-octen-3-ol derived from oxygenation and subsequent cleavage of a polyunsaturated fatty acid, linoleic acid. However, at this moment little is known about the mechanisms of the synthesis, or the properties of enzymes involved in the formation of 1-octen-3-ol. Cytochrome P450 in soybean has been reported to be capable of forming 1-octen-3-ol from linoleic acid; while in moss a lipoxygenase has been reported to be a possible enzyme. In this study, we checked the effect of a lipoxygenase inhibitor, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), and a cytochrome P450 inhibitor, piperonyl butoxide on 1-octen-3-ol production from linoleic acid in crude enzyme solution obtained from Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). The result showed that NDGA little affected on 1-octen-3-ol formation. In contrast, the formation of 1-octen-3-ol was inhibited significantly by piperonyl butoxide. In order to confirm involvement of cytochrome P450 in 1-octen-3-ol formation, the effect of NADPH on enzyme activity found in the membrane fraction was investigated. It was found that NADPH significantly increased 1-octen-3-ol formation. From these results, it could be assumed that cytochrome P450 is involved in 1-octen-3-ol production, and lipoxygenase is not involved in 1-octen-3-ol formation.

B-22 タバコホスホリパーゼ A₂ の機能解析

○山口麻里子、藤川律子、藤川愉吉、飯島憲章、江坂宗春
(広島大学大学院生物圏科学研究科)

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)はグリセリン脂質の sn-2 位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質と脂肪酸を産生する酵素である。動物 PLA₂ は、一次構造や細胞内局在などの違いにより分類されている。なかでも、分泌型 PLA₂ (sPLA₂)は低分子量の細胞外酵素で、その酵素活性の発現に Ca²⁺を必要とする。さらに、sPLA₂の一次構造内に存在する Ca²⁺結合領域や触媒領域は、様々な動物 sPLA₂間で高く保存されている。

一方、植物についても、いくつかの sPLA₂ の遺伝子が存在し、実際にその発現が確認されるようになってきた。しかし、植物 sPLA₂ の詳細な生理機能は不明である。本研究では、植物 sPLA₂ の機能解明を目的とし、モデル植物であるタバコ(*Nicotiana tabacum*)の sPLA₂に着目し、その酵素化学的性状と細胞内局在の解析を進めている。

部位特異的変異体を用いた酵素性状の解析結果から、植物 sPLA₂でも、動物 sPLA₂と類似した触媒ドメインが存在し、酵素活性の発現に寄与していると考えられた。また、タバコ sPLA₂のアミノ酸配列の解析結果から、N末端側に分泌型のシグナル配列の存在が予想され、レポーター遺伝子として、緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いて、sPLA₂の細胞内局在性の解析を行っているところである。

B-23 サツマイモ葉由来ポリフェノール類のアルドースレダクターゼ阻害活性

○吉元 誠、倉田理恵、山川理、矢原正治*(九州沖縄農研、*熊本大学院薬)

【目的】糖尿病合併症は糖尿病性網膜症や神経障害など重篤な症状を示す。糖尿病合併症のキー酵素はアルドースレダクターゼであり、エパレルスタット等この酵素の阻害剤が治療薬として利用されている。サツマイモ葉由来ポリフェノール類のアルドースレダクターゼに対する影響を調べた。

【方法及び結果】3,4-, 4,5-, 3,5-ジカフェオイルキナ酸および 3,4,5-トリカフェオイルキナ酸はサツマイモ葉から精製された。クロロゲン酸、カフェ酸、キナ酸は市販の試薬を供試した。アルドースレダクターゼはヒト組換え体酵素を用いた。キナ酸およびカフェ酸は酵素に対し、阻害活性を示さなかった。クロロゲン酸は阻害作用を示したことから、阻害作用にはキナ酸とカフェ酸の結合が必要であることが推察された。ジカフェオイルキナ酸類はクロロゲン酸の4~5倍強い活性を示した。3,4,5-トリカフェオイルキナ酸は3,4-および3,5-ジカフェオイルキナ酸より、さらに3倍以上強い阻害活性を示した。これは合併症治療薬であるエパレルスタットと同程度の阻害活性であった。阻害活性の強さには、キナ酸に結合しているカフェオイル基の数と結合位置が関係していることが示唆された。以上の結果から、3,4,5-トリカフェオイルキナ酸は糖尿病合併症の治療薬として利用できる可能性がある。

B-24 Purification and characterization of milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds

○Isam Ali Mohamed Ahmed¹⁾, Isao Morishima²⁾, Nobuhiro Mori³⁾

1)鳥取大院・農, 2)鳥取大・農, 3)鳥取大院・連農

Daily farmers in some parts of the Sudan use the fruits and seeds of *Solanum dubium* to make a type of white soft cheese from goat's and sheep's milk. This research was carried out to purify and characterize a milk-clotting enzyme from *S. dubium* seeds and to investigate the efficiency of the purified enzyme as a rennet substitute in cheese making. A novel milk-clotting enzyme was purified to 6.7 folds and 35% recovery from *S. dubium* seeds by combination of (NH₄)₂SO₄ fractionation, cation exchange and gel filtration chromatographies. The molecular mass of the purified enzyme is 66kDa as estimated by gel filtration and SDS-PAGE. The enzyme is a chymotrypsin-like serine protease with pI value of 9.3, acts optimally at pH 1.0 and stable over a wide range of pH (4.0-11.0). The purified enzyme is also thermostable protease with stability up to 60°C for 1 h and acts optimally at 70°C for 30 min. Furthermore, the enzyme is highly stable under different denaturants (3.0% SDS, 7.0 M urea and 3.0 M GuHCl) and organic solvents (50% acetonitrile and 50% methanol) for 1 h. The enzyme exhibited broad specificity toward bovine whole, α-, β- and κ-caseins.

B-25 Production, purification, and characterization of laccase from an edible mushroom, *Grifola frondosa*.

○Thitinard Nitheranont, Akira Watanabe, Yasuhiko Asada (Fac. of Agriculture, Kagawa Univ.)

[Introduction] Laccase (EC 1.10.3.2), which is known as one of lignin degrading enzymes, catalyzes the oxidation of a wide range of substrates, including mono-, di- and polyphenols, aminophenols, methoxyphenols, polyamines, aryl diamines, and lignins. The laccase is expected to apply to various aspects, such as paper pulping and bleaching, textile dye bleaching, bioremediation, and effluent detoxification. In this study, we purified and characterized one of the laccase isozymes from *Grifola frondosa* (maitake). [Methods and results] Generally, laccases of various fungi are known to be inducible. Therefore, we attempted to increase the amount of the enzyme production by supplementation of suitable inducers into the basic culture medium (potato dextrose broth). The result indicated that the highest enzyme activity was obtained with the culture supplemented with the combination of 0.15% yeast extract, 0.0002% copper sulfate, and 0.006% 2,5-xylydine. A major laccase isoform was purified using five chromatographic steps. The purified laccase revealed as a monomeric protein with a molecular mass of 66 kDa. This enzyme was stable from pH 7 to pH 10 at 30°C for 24 hours. The optimum pH of enzyme activity was 4.0 and 3.0 for guaiacol and 2,6-dimethoxyphenol (DMP) as substrates, respectively. For 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), the highest activity was observed at the lowest pH tested (pH 2.5). The laccase activity was strongly inhibited by chloride ion, although the inhibition was completely reversible.

B-26 ラット血中の副腎皮質刺激ホルモン測定による香気成分の抗ストレス効果の検討

○重森芳枝¹、折原祐輔¹、丹信介²、青島均¹

(¹ 山口大学院・医学系研究科、² 山口大学・教育学部)

視床下部-下垂体前葉-副腎皮質(HPA)系のストレス反応は受動的ストレス反応と呼ばれ、様々なストレス性疾患に関与している。GABA_A受容体は主要な抑制性の神経伝達を担い、抗不安薬ベンゾジアゼピンはGABA_A受容体に作用し、ストレス反応を引き起こすノルアドレナリン神経系を抑制する。GABA_A受容体においてボルテジクランプ法による測定を行った結果、安らぎ効果があるとされる芳香成分や、樽で熟成するウイスキーの芳香成分でも同様に作用することが分かっている。今回はラットを使い、呼吸を介してその香気成分を与え、与えた物質が抗ストレス作用を示すかを、HPA系の応答を指標に調べた。具体的には、ラットに拘束ストレスを与え、血液中の副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)量をIRMA法で測定し、ウイスキーや芳香成分を、呼吸を通して与えた時の効果を測定した。

今回、5種の香気成分と1種の精油についての効果を調べた。その結果、Terpinen-4-olと1-Octen-3-olの2種が有意に拘束ストレスによるACTH濃度の上昇を抑え、ストレス軽減効果を示した。残りの4種も、有意な差ではないが、いずれもACTH濃度上昇を抑える傾向が見られ、ストレス軽減効果を示す傾向が認められた。

B-27 バングラデシュ産ハーブのラット腹腔内滲出細胞からのヒスタミン放出抑制効果

○辻山偉代¹、Sheikh Julfikar Hossain¹、Sanzida Mubassara¹、高杉美佳子²、青島均¹

(¹ 山口大院・医、² 九州産業大・工)

アレルギーは、その発生機序の違いからI型~V型に分けられる。中でも花粉症に代表されるI型アレルギーは、IgE抗体への抗原の結合がヒスタミン放出を促し、それが各器官に作用することで起こる反応である。くしゃみ等の軽度なものからアナフィラキシーショック等の重篤なものまでであるため、発生機序や根本治療法の解明が急務となっている。バングラデシュやインド原産の植物には古来より薬として用いられたものがある。その効果・効能は多岐に渡るため、これらの植物が抗アレルギーに何らかの効果が期待できるのではないかと考えた。また近年、植物では色素や苦味成分であるポリフェノール類の抗アレルギー効果が報告されている。中でもカテキン類、イソフラボン、NGCが効果的とされる。最近ではメチル化カテキンの抗アレルギー効果が注目を浴びている。

本研究ではまず、全23サンプルの総ポリフェノール量測定から抗酸化活性を検討し、強い活性が見られたサンプルを用いて、ラット腹腔内滲出細胞からのヒスタミン放出抑制効果を調べた。結果、Terminalia arjunaで多量のポリフェノール含有が認められ、抗酸化活性・ヒスタミン放出抑制ともに有意な効果があった。

B-28 Beneficial activities of some Bangladeshi fruits

○Sheikh Julfikar Hossain, Hitoshi Aoshima (山口大院・医)

To identify beneficial activities of some fruits of Bangladesh, ethanol extracts of eleven fruits were studied in terms of the total dietary phenolic contents, anti-oxidative, anti- α -amylase, anti- α -glucosidase and anti-lipoxygenase activities. *D. indica*, *P. acidus*, *P. emblica*, *S. dulcis*, and *S. cumini* exhibited strong potent DPPH radical scavenging activity and also showed promising reducing powers. *A. marmelos*, *A. heterophyllus*, *D. indica*, *L. acidissima*, *M. zapota*, *P. acidus*, *S. dulcis*, and *Z. mauritiana* var. *deshi* and *narikeli* significantly inhibited the α -amylase (bacterial origin) activity and α -glucosidase (yeast origin) activity. Some of these extract, also inhibited the α -amylase, and α -glucosidase activities originated from rat small intestines. The results showed that only *S. cumini* prominently inhibited lipoxygenase activity. These fruits are beneficial to physiological health, and could be used in food or pharmaceutical industries to prepare dietary supplements, functional foods or food preservatives.

B-29 Beneficial activities of some Bangladeshi plants

○Sanzida Mubassara¹, Ryuo Iga¹, Sheikh Julfikar Hossain¹, Firoj Ahmed², Mikako Takasugi³, Hitoshi Aoshima¹ (¹山口大院・医、²クルナ大学・薬、³九州産業大・工)

Total phenolic contents, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities, and reducing powers of ethanol extracts of six plant species (*Avicenia officinalis*, *Deris uliginosa*, *Hibiscus tiliacicus*, *Manilkara zapota*, *Sonneratia caseolaris*, *Swetenia mahagoni*) in Bangladesh were measured to examine their beneficial activities. The IC₅₀ was determined by the absorbance which denotes the concentration of sample required to scavenge 50% of the DPPH free radicals. Due to their phenolic content and antioxidant activities, we examined some of these plant extracts to see whether they consist of antiallergic component, i.e., inhibitor of histamine release from rat peritoneal exudates cells. Our results suggest that there is a correlation between the content of phenolic compounds and DPPH radical-scavenging activity, suggesting that the radical scavenging activity of the extract is due mainly to its content of phenolic compounds. Therefore, these plants could be used for pharmaceuticals and cosmetics industries for the welfare of human being.

C-1 製造・貯蔵中における水産練り製品(焼ちくわ)中の 4-ヒドロキシヘキセナール含量の変動

○境 正(宮崎大農), 山口 徹(山口商店)

【目的】水産練り製品中の 4-ヒドロキシヘキセナール(HHE)の生成機構を解明するために、焼ちくわの加工・貯蔵中の HHE 含量の変動を測定した。なお、脂質過酸化の指標としてマロンアルデヒド(MA)含量の変動も測定した。

【方法】スケソウダラすり身、卵白、水およびデンプンを加えたちくわ用すり身(すり身)をガスにより、すわり加熱 5 分、焼き加熱 5 分計 10 分間加熱した。その後冷蔵貯蔵(0°C)し、HHE およびマロンアルデヒド(MA)含量を経時的に測定した。実験は 2 回行った。

【結果および考察】一回目および二回目の試験共に、すり身には HHE はほとんど検出されず、加熱処理により有意に増加した。一回目の試験では冷蔵貯蔵一日後、すべての試料において HHE は検出されなかった。二回目の試験においては HHE 含量は貯蔵 2 日目まで増加し、4 日目に減少した。MA 含量は、両試験共に加熱処理により増加する傾向を示した。また、貯蔵 4 日目まで増加し、脂質過酸化が進行する傾向を示した。

C-2 ビールの新たな麦汁煮沸プロセスの評価

○岡 賀根雄、松下 真也¹、松元 信也²、築瀬 英司³(サントリー株式会社、¹九州サントリーテクノプロダクト株式会社、²高知工科大・物質・環境、³鳥取大・工・生物応用工)

【目的】ビール製造において、麦汁煮沸工程は品質と密接に関係しているとともに、最も多量のエネルギーを消費するプロセスである。そこで、我々は香味品質を維持向上しつつ省エネルギー化を達成する一手段として、工場新設を機にエネルギー効率の高い新規な麦汁煮沸プロセスを設計・導入した。ここでは、新プロセスの評価を中心に報告する。【新麦汁煮沸プロセスの特徴】新プロセスの特徴は以下の3点である。①多数の小径加熱管による内部加熱。②イジェクターを用いた廃蒸気の再圧縮と蓄熱温水タンクによる廃熱回収。③減圧蒸発器の採用による不良香り成分の除去。【結果】i)新設計の内部加熱機で、狙い通りの蒸発強度が得られた。ii)廃蒸気からの熱収支は、設計値より良好であった。iii)煮沸前昇温と低温蒸気使用により、麦汁伝熱面での局所的過剰熱負荷が抑制され、焦げによる伝熱効率低下が緩やかで、洗浄間隔が延長した。iv)減圧蒸発器の採用により、煮沸時間短縮の結果残存する不良香り成分を効率的に除去でき、泡タンクの保護とビール香味安定性の向上を実現できた。v)本プロセスでは廃蒸気の一部を内部加熱機の熱媒として使用するため、蒸気側の汚れによる熱効率の低下が予想されたが、2500 仕込は特別な洗浄をしなくとも稼動が可能であった。

C-3 抗酸化剤応答配列を標的としたレポーターアッセイによる食品機能性評価

○内田 飛香¹、柚原 陽一^{1,2}、児玉 浩子¹、赤松 絵奈¹、永濱 清子¹、岩田 喬子¹、ハリシク マール¹、山崎 正夫^{1,2}、江藤 望^{1,2}、西山 和夫²、水光 正仁^{1,2}

(1:宮崎県産業支援財団、2:宮崎大農・応生科)

【目的】老化や様々な疾病を予防するために、食品や食品成分の持つ抗酸化作用が注目されている。そこで、本研究では食品の細胞に対する抗酸化酵素誘導活性を評価するために、抗酸化剤応答配列(ARE)を導入したレポーターアッセイ系を確立し、ルシフェラーゼアッセイによる評価を行った。

【方法】pGL4neo にNQO1 遺伝子の ARE を導入してレポータープラスミドを作製し、肝がん細胞 HepG2 に導入、安定発現細胞株を樹立した。細胞を 96 ウェルプレートにて 24 時間培養後、ダイズその他の宮崎県産農産物の抽出物、フラボン類等の食品成分を培地中に添加し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果および考察】ARE を活性化することが報告されているゲニステイン、ケルセチンなどの食品成分において、ルシフェラーゼ活性の発現が確認された。さらに、これらの成分を含有するダイズやタマネギ等の食品の抽出物を用いてアッセイを行ったところ、同様にルシフェラーゼ活性の発現が確認された。これらより、本アッセイにより食品や食品成分の細胞応答を介した抗酸化ストレス活性を評価できることが判明した。本研究は、JST の支援による宮崎県地域結集型共同研究事業およびシーズ発掘試験により推進された。

C-4 蒸し煮マサバにおけるターメリックの抗酸化効果

○笠原賀代子、松尾聡美(ノートルダム清心女大・人間生活)

【目的】マイワシやマサバなどの多脂性赤身魚は加熱時に脂質酸化臭を発生するため、調理・加工においては、脂質酸化を抑制して嗜好性を高めることが必要となる。そこで、脂質酸化の二次生成物であるプロパナールを指標として、蒸し煮マサバにおけるターメリックの抗酸化効果を追求した。

【方法】ターメリックを添加した蒸し煮マサバのヘッドスペース・ベーパー(H.S.V.)を調製してGC-MS分析し、検出・同定されたプロパナールの面積を無添加の場合と比較して抗酸化効果を判定した。また、この抗酸化効果がターメリックに含まれる主要色素成分であるクルクミンによるものであるかどうかを標準品のクルクミンを添加して検討すると共に、 α -トコフェロールと比較して、クルクミンの抗酸化効果の程度についても判定した。

【結果】ターメリックを添加したものでは無添加と比べて、プロパナール面積が著しく小さいことが判明し、加熱時の抗酸化が認められた。さらにターメリックに含まれると思われる量のクルクミンの添加によってもプロパナールはかなり減少したため、ターメリックの抗酸化効果はクルクミンによるところが大きいと判断された。また、クルクミンの効果は α -トコフェロールと同程度であることも明らかとなった。

C-5 鳴門金時の食品機能性

○金丸芳¹、三木宏美¹、井田貴子¹、山本澄人²、岩田深也²、有井俊介³、仲野孝弘³

(¹徳島大・総合科学・生命科学、²徳島県工業技術センター、³株鳴門のいも屋)

【目的】鳴門金時の加工廃棄物の減量化と有効利用を目標に、食品機能性を活用した技術で、鳴門金時廃棄物を原料とする高付加価値な加工食品を開発中である。そのため、鳴門金時の食品機能性を明らかにする必要がある。今回、鳴門金時の各部位を加熱処理したものについて、各種の機能性を検討した。

【方法】鳴門金時の生芋・蒸芋・焼芋の身と皮、および茎と葉、計7種を凍結乾燥し、MeOH抽出物を得た。Dimethyl Sulfoxide(DMSO)に溶解して、機能活性を検討した。検討した機能活性は、ガン細胞(3種)増殖抑制、細菌(4種)増殖抑制、乳酸菌(3種)増殖促進、抗酸化活性(DPPHラジカル消去活性、細胞内H₂O₂上昇抑制)である。

【結果】葉に顕著な効果が見られた。ガン細胞K562, B16-F1, CACO-2の増殖を各々100, 500, 50 μ g/mlで阻止し、*Salmonella thphimurium*の増殖を5mg/mlで阻止し、*Lactobacillus casei*の増殖を1mg/mlで促進した。DPPHラジカルを50 μ g/mlで消去し、細胞内H₂O₂上昇を100 μ g/mlで阻止した。また、茎と芋にも効果があり、芋では身より皮(生芋・焼芋)に効果がみられた。皮(生芋・焼芋)と茎は500 μ g/mlでK562とCACO-2の増殖抑制と、50 μ g/mlでDPPHラジカル消去がみられた。また葉の場合より、増殖抑制される細菌や増殖促進される乳酸菌もあった。よって、鳴門金時廃棄物を原料とした加工食品に機能性付与(高付加価値化)が可能と考える。

C-6 黒ショウガ中のアントシアニン色素の構造

○寺原典彦、紺谷 靖英、松永勝政¹、松井利郎²

(南九大健康・食健、¹オフィスK(株)、²九大院生資環・生機科)

【目的】黒ショウガ(*Kaempferia parviflora*)は熱帯アジア原産のショウガ科の植物で、その根茎に黒紫色色素を含み、ラオスやタイでは白ショウガ同様に、古くから香辛料や生薬として用いられている。今回はラオス産黒ショウガの根茎乾燥品に含まれる色素について構造決定を試みた。

【方法及び結果】黒ショウガ乾燥粉末をアセトン(疎水性画分)、次いで10%酢酸で抽出した。10%酢酸抽出液をXAD-2000カラムに吸着させ、1%酢酸-メタノールによる段階的溶出法を行なった。その主要色素画分を繰り返し分取ODS-HPLC精製により、主要色素BG1-3を単離した。比較的収量の多い単離色素BG2,3につき、UV-VIS, ESITOF/MS, 各種2次元NMR(DQF-COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC)などの機器分析法により構造決定を行った。その結果、BG2は、Peonidin 3-rutinoside (Pn3Rut)、BG3はMalvidin 3-rutinoside (Mv3Rut)と決定された。他の色素画分BG1、およびアセトン画分の成分については現在検討中である。

C-7 ニンニク(*Allium sativum*)の匂い及び褐変化に関わる酵素の発現

○高見知子¹ 近本公人² 江坂宗春¹(¹ 広大院 生物圏科学研究科 ²株式会社ワールド物産)

ニンニクは特有の匂いを持つ食素材でありながら、殺菌効果・血圧低下など様々な薬効を持ち、最も古い生薬の1つと考えられてきた。ニンニク業者ではこの特有の匂いを消すために無臭化処理を行っている。しかし、この無臭化等の処理や貯蔵の過程でニンニクの褐変化が問題となっている。そこで本研究は、様々な貯蔵条件におけるニンニクの匂いと褐変化に関わる酵素の発現について調べ、ニンニクの匂いを抑え、褐変化を最小限に抑える新規な貯蔵方法を確立することを目的とする。匂いを誘起する酵素アリイナーゼ(alliinase)は、細胞が破壊されると、ニンニク特異のアミノ酸であるアリインと反応し、匂い成分であるアリシンを産生させ、ニンニク特有の匂いを発生させる。また高等植物に含まれる代表的な酵素であるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)は、リンゴやジャガイモなどの褐変(Enzymatic browning)の原因となる酵素としてよく知られており、クロロゲン酸やカテキンなどのポリフェノール化合物をキノン体へと酸化させる二核銅タンパク質である。本研究では、まずニンニクの alliinase の cDNA クローニングを行った。そして、ノーザンブロットによる発現解析を行った。ニンニクの PPO についても、その cDNA クローニングを行った。さらに、様々な貯蔵条件下でのニンニクの PPO 活性を測定した。低・高温条件下で貯蔵することで PPO 活性が増加した。またニンニクに傷害を与えることで PPO 活性は増加した。ニンニクの PPO の基質特異性について調べた。当初基質として用いていた 4-methyl catechol は PPO の最適な基質ではなかった。今回検討した 5 種類の基質の中では pyrogallol が最も高い活性を示した。

C-8 黒糖に含まれる抗酸化成分の分離とヒト赤血球変形能低下抑制作用

○陳 晟敏、佐藤 亜弥、藤野 武彦、船津 軍喜(レオロジー機能食研)

目的: 黒糖に含まれる抗酸化成分の構造と生理作用を明らかにすることを目的とし、その分離とヒト赤血球変形能に対する作用を調べた。

材料・方法: 沖縄産と鹿児島産の 10 種類の黒糖を用い、酢酸抽出後、1%酢酸溶液中での Bio-Gel P-10 カラムクロマトグラフィーと HPLC によって成分の分離を行った。抗酸化活性はリノール酸酸化に対する抗酸化活性と DPPH ラジカル捕捉活性で表し、ヒト赤血球変形能は nickel mesh filtrate 法で測定した。

結果: 酢酸抽出量と抗酸化活性は黒糖の種類によって異なることが分かった。酢酸抽出物についてゲルクロマトグラフィーを行った結果、フェノール酸を含む抗酸化成分は砂糖の後、広い範囲にわたって溶出され、引き続きフラボノイド配糖体が溶出され、吸着されたフラボノイドは 50%エタノールによって溶出された。1%酢酸溶出フラボノイド画分と 50%エタノール溶出フラボノイド画分についてヒト赤血球変形能に対する影響を調べた結果、いずれも APPH による赤血球変形能の低下を抑制することが分かった。さらに、黒糖に含まれるフラボノイド成分を HPLC で調べた結果、成分の種類は同一であったが、含量は黒糖の種類によって異なることが分かった。

C-9 緑茶中の過酸化水素生成の魚醤油による抑制

○大島慎也、青島均(山口大学・医)

<序論>ポリフェノールには、抗酸化作用があり、動脈硬化、脳梗塞、心筋梗塞や癌を予防するといわれている。ポリフェノールには有用な作用がある反面、過酸化水素を発生するという報告もある。実際、ペットボトルのカテキン強化緑茶は、開封後、時間とともに H_2O_2 含有量が増加し、細胞毒性を示す濃度に達する。そこで、FOX assay により H_2O_2 含有量を測定し、大豆醤油や魚醤油の H_2O_2 の生成を抑制する効果及び H_2O_2 を分解する効果を検討した。

<結果・考察>緑茶を 24h、25°C に保つと緑茶中の H_2O_2 濃度が 0.44 mM になるのに対し、大豆醤油を緑茶に添加しておくとも 0.05 mM に抑えられた。80°C、1 h 加熱しても活性は衰えず H_2O_2 生成を抑制した。このことより、カタラーゼでなく高温にも強い、安定した物質が存在することが考えられた。魚醤油を緑茶に添加し 25°C、24 h 保つと、種類ごとに活性に差はあるがすべての魚醤油に H_2O_2 生成抑制効果があった。しかし、80°C、1 h 加熱すると少し活性が落ち、2 h 加熱すると活性が全くなかった。また、 NaN_3 を添加すると活性は低下した。また、60°C、1 h でまったく活性が落ちなかったことから、魚醤油には耐熱性カタラーゼが存在して H_2O_2 を分解する可能性が示唆された。

C-10 微生物に対するショウガの作用とその応用(4) ザイモモナス細菌の醗酵特性に及ぼすショウガの作用

○上田明代、合田智晶、下村高史、大房 明、池内慧士郎、松元信也(高知工科大 物質・環境)

【目的】我々はこれまでの研究で、ショウガは酵母の増殖・醗酵を抑制する作用と促進する作用の両作用を有する可能性のあることを報告した¹⁾。ここでは、醗酵速度が酵母より速いことから、特にバイオエタノール生産用として注目されているアルコール醗酵性細菌のザイモモナス菌に対してショウガがどのような作用特性を示すか検討した。

【方法】オレンジ果汁醗酵系もしくはコーングリッツを原料とする無蒸煮醗酵系に所定量のショウガとザイモモナス菌培養液を加えて、28°Cで静置醗酵させた。なお、オレンジ果汁については、必要に応じてpH調整や加熱処理を実施した。醗酵モロミは経時的に重量を測定し、減量を炭酸ガス発生量とした。醗酵終了時点で、pH、総酸、アルコール、菌数などを分析した。

【結果】①ザイモモナス醗酵系にショウガを添加して醗酵させると、主原料の種類、ショウガ添加量ならびに菌株などによって醗酵特性に対するショウガの影響度は異なるが、ショウガはザイモモナス細菌の醗酵を促進することが示された。②ショウガを添加した場合、ザイモモナス菌の菌数は増加することが知られた。

1) 池内ら、農化中四国支部講演会要旨集 p37(2006)

C-11 微生物に対するショウガの作用とその応用(5) ショウガの作用機構に関する基礎的検討

○合田智晶、池内慧士郎、富家功雄、上田 明代、松元信也(高知工科大 物質・環境)

【目的】我々は、これまでに、ショウガは酵母やザイモモナス細菌の増殖・醗酵を促進する作用を有することを明らかにした¹⁾。しかし、ショウガの増殖・醗酵促進作用のメカニズムについては今のところ明らかではない。そこで、微生物に対するショウガの作用機構を明らかにすべく基礎的検討をおこなった。

【方法】各種醗酵系に所定量のショウガと酵母培養液を添加し、28°Cで静置醗酵させた。なお、6-ジンゲロール(ショウガ起源、和光純薬(株)製)の所定量を加えた醗酵試験も実施した。醗酵中は経時的に炭酸ガス発生量、pH、総酸、アルコール、菌数、ジンゲロール濃度を測定した。

【結果】①ショウガの主要な生理活性成分の一つである6-ジンゲロールは酵母の増殖・醗酵を促進した。②しかし、ショウガと試薬ジンゲロールを添加した場合の増殖・醗酵促進度を比較すると、前者はジンゲロール濃度が低かったにもかかわらず、後者より顕著な増殖・醗酵促進作用を示した。③これらのことから、微生物の増殖・醗酵促進作用の発現には6-ジンゲロール以外のショウガの成分も重要な役割を演じている可能性があると考えられた。1) 池内ら、農化中四国支部講演会要旨集 p37(2006)ほか

C-12 二次元電気泳動による海産多糖類の機能性評価

○白杉一郎^{1,2}、榊原陽一^{1,3}、松下佳代¹、山崎正夫^{1,3}、西山和夫¹、松井隆史²、水光正仁^{1,3}

(¹宮崎大・農・応生科、²小倉屋昆布食品(株)、³宮崎県産業支援財団)

【目的】昆布をはじめとした海藻類に含まれる多糖類の多くは生理作用を持ち、その機能性が注目されている。海産多糖類の機能性としては、高血圧の抑制作用、コレステロールの低減、抗腫瘍活性などの報告がある。食品の機能性、タンパク質の発現の変化を網羅的に評価できる有効な手法としてプロテオーム解析が注目されている。そこで本研究では、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に種々の海産多糖類を作用させ、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析を行い、海産多糖類の作用メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】海産多糖類としては、フコイダンやアルギニン酸などを用いた。HepG2細胞を1 mg/ml海産多糖類存在下で24時間培養後、細胞を回収し、細胞抽出物を調製しタンパク質試料とした。二次元電気泳動の蛍光イメージは、解析ソフト Progenesis を用いて内部標準法で解析した。発現量が変化したタンパク質はMALDI-TOF/MSを用いたペプチドマスフィンガープリント法により同定した。

【結果】海産多糖類の影響で、発現量が2倍以上変化したタンパク質が検出され、それを同定した。今後、これらのタンパク質と機能性との関係を明らかにし、作用メカニズムの解明およびバイオマーカーとしての可能性を評価・検討する。

C-13 カルボニル化タンパク質を標的としたプロテオーム解析による食品機能性評価の可能性

○原島舞¹、岩田喬子²、榊原陽一^{1,2}、松下佳代¹、山崎正夫^{1,2}、西山和夫¹、水光正仁^{1,2}
(¹宮崎大・農・応生科、²宮崎県産業支援財団)

【目的】酸化ストレスが多くの生活習慣病や加齢に伴って増える疾患の発症と深く関与することが知られている。このことから、近年、抗酸化食品が注目されており、食品の抗酸化作用の評価のため、タンパク質の酸化傷害の解析法の確立が要望されている。タンパク質の酸化傷害の一つとして、構成アミノ酸のリジンやアルギニンのカルボニル化が知られており、本研究では、このカルボニル化タンパク質を標的とした蛍光標識ディフュージョン二次元電気泳動法を確立し、食品機能性成分の抗酸化作用の評価を行うことを目的とした。

【方法】試料は、ラット肝臓及びヒト肝ガン由来細胞である HepG2 細胞のタンパク質を用いた。カルボニル化タンパク質を特異的に標識する Hydrazide タイプの蛍光色素を使用して、プレラベル化した後、二次元電気泳動を行った。得られたゲルイメージはソフトウェア Progenesis を用い解析した。発現量が変化したタンパク質は MALDI-TOF/MS を用いたペプチドマスフィンガープリント法により同定した。

【結果および考察】本方法は、定量性良くカルボニル化タンパク質を検出できることが示された。このことから、プロテオーム解析により食品の抗酸化作用が評価できる可能性が示された。

C-14 抗パーキンソン病効果を有する機能性食品及び機能水に関する研究

○阿比留貴徳¹、照屋輝一郎^{1,2,3}、中野あゆみ¹、佐藤昭民²、高橋英理子¹、濱崎武記³、中道 昇⁴、
樺山 繁⁴、大坪一道⁴、森澤紳勝⁴、江藤 博⁵、片倉喜範^{1,2,3}、白畑實隆^{1,2,3}
(¹九大院生資環・遺資工、²九大院シス生・生命工、³九大院農院・遺資工、⁴日本トリム、⁵第一産業)

【目的】我々は酵素消化低分子化フコイダンや電解還元水による細胞内活性酸素消去活性および抗糖尿病・抗腫瘍・神経細胞保護効果などの様々な効果を報告してきた。本研究ではこの中でも神経細胞保護効果に着目し、近年の高齢化社会の進行に伴い患者数の増加が懸念されているパーキンソン病に対する上記の食品成分および機能水による予防・治療効果の検討を行った。

【方法および結果】ドーパミンニューロンモデルとして広く用いられているヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞にプロテアソームストレスを付与し、パーキンソン病の特徴である細胞内異常タンパク質蓄積状態を誘導した。この細胞を用いて細胞内異常タンパク質蓄積やプロテアソーム活性等への食品成分および機能水の影響を検討したところ、異常タンパク質の蓄積の緩和効果が認められ、この効果はプロテアソーム活性賦活によることが示唆された。また C57BL/6 雄性マウスに 30 日間電解還元水を飲用させた後、MPTP 投与を行いパーキンソン病症状を誘導し検討を行った結果、電解還元水飲用区マウスの脳内過酸化脂質量の有意な低下が確認された。

C-15 酵素消化低分子フコイダン抽出物によるガン細胞のアポトーシス感受性の増強

○中野あゆみ¹、上野真史¹、仁保彰友²、山下万貴子²、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・遺資工、²九大院シス生・生命工、³九大院農院・遺資工、⁴第一産業)

【目的】ガン細胞表面の糖鎖発現はガンの悪性化に伴い変化することが知られている。モズクにはフコースを主成分とする粘質多糖類であるフコイダンが多く含まれている。本研究では当研究室で抗腫瘍効果が明らかにされている酵素消化低分子フコイダン抽出物を用いて、ガン細胞表面の糖鎖の変化とアポトーシス感受性に与える影響を検討した。

【方法】糖鎖発現プロファイリングは FITC 標識レクチンを用いて、酵素消化低分子フコイダン抽出物処理による細胞の糖鎖発現変化をフローサイトメトリーにより検討した。またフローサイトメトリーを用いた sub-G1 解析を行うことにより、アポトーシス感受性への効果を検討した。

【結果】ガン細胞に酵素消化低分子フコイダン抽出物処理を行った結果、用いた 8 種類のレクチンのうち Con A と結合する糖鎖の発現が上昇した。また、酵素消化低分子フコイダン抽出物処理により、ガン細胞での Con A 刺激によるアポトーシスの上昇が観察された。正常細胞ではアポトーシス誘導効果が確認されなかったことから、このアポトーシス感受性増強効果がガン細胞特異的であることが示唆された。

C-16 卵巣摘出ラットに対するハイアミロースコーンスターチの脂質代謝への影響

○Xiong Liu¹、小川 博²、岸田 太郎¹、海老原 清¹

(¹ 愛媛大学・農学部、² 帝塚山学院大学・人間科学部)

目的:本実験ではエストロゲン欠乏時の脂質代謝に及ぼすハイアミロースコーンスターチ(HACS)の影響、すなわち、HACS中のレジスタントスターチ(RS)の影響について検討する。

方法:実験には卵巣摘出ラット(OVX-ラット)を用い、実験飼料を3-4週間与えた後に、血液、肝臓の各脂質成分の濃度を調べるとともに、肝臓の脂質代謝に関係する酵素なども mRNA レベルを測定した。実験1: HACS 含量(0-30%)の異なる飼料を与えた。実験2:アミロース含量の異なるトウモロコシデンプン(0-85%)を30%含む飼料を与えた。実験3:盲腸を摘出した、またはしていない OVX-ラットに HACS を 30%含む飼料を与えた。

結果:HACS の血漿コレステロール(P-Chol)濃度は、飼料中の脂質源がコーン油の場合には低下し、脂質源が大豆油の場合には低下しなかったが、RS 摂取量に依存的であった。盲腸を摘出して HACS に P-Chol 濃度低下作用は認められ、HACS の P-Chol 濃度低下作用には短鎖脂肪酸の関与は認められなかった。HACS の P-Chol 濃度低下作用は、肝臓からの VLDL 分泌の低下および糞中への胆汁酸の排泄増加に依っていた。

C-17 黒糖の LDL 酸化抑制作用に関する検討

○荻貴之、前田剛希(沖縄県工業技術センター)

【目的】カテキンやアントシアニン等のポリフェノールは、動脈硬化発症要因の一つである LDL の酸化を抑制する。沖縄の伝統食品である黒糖も抗酸化能を有するフェノール性物質が豊富に含まれており、カテキン等と同様の作用が期待される。しかしながら、黒糖の LDL に対する影響は明らかにされていない。

そこで本研究では、ヒト LDL の酸化に対する黒糖の影響を *in vitro* の評価系で調べるとともに、寄与成分を特定した。

【方法】試料は、黒糖から合成吸着樹脂 HP20 を用いて MeOH 溶出した非ショ糖画分を用いた。黒糖非ショ糖画分のポリフェノール含量は Folin-Ciocalteu 法で測定した。LDL 酸化抑制作用は、ヒト LDL と試料の混合液に酸化開始剤 V70 を添加、37°C で反応させ、1 時間後の 234nm の吸光度を比較して検討した。さらに、LDL 酸化抑制作用の寄与成分を各種カラムクロマトグラフィ等の手法で分離精製した。

【結果】黒糖非ショ糖画分は、用量依存的に LDL の酸化抑制作用を示した。最も強い活性を示したのはポリフェノール含量が多い 40%MeOH 溶出画分であった。黒糖 40%MeOH 溶出画分から LDL 酸化抑制成分として、3 種のフラボノイド配糖体を単離した。

C-18 ラットにおける卵黄摂取による低タンパク質食誘導性脂肪肝の予防

○撰和男、川村紗也佳、佐藤匡央、今泉勝己(九大院、農、栄養化学)

【目的】脂肪肝はアルコール過剰摂取、糖および脂質過剰摂取、タンパク質摂取不足などによって誘導される。一方、我々は先の研究において、卵黄摂取群では対照群(C 群)と比べ肝臓トリアシルグリセロール(TG)量が有意に減少することを示した。この結果から卵黄が脂肪肝抑制的に作用する可能性が示唆された。そこで卵黄摂取により低タンパク質食で誘導される脂肪肝の予防の可能性を追求した。**【方法】**4 週齢 SD 系雄ラットを C 群、低タンパク質飼料群(LP 群)、LP とタンパク質、脂質含量が等しくなる様に卵黄を添加した群(EY 群)、または卵黄油を添加した群(EYO 群)で 2 週間飼育を行った。5 時間絶食後屠殺し、肝臓および血清脂質、肝臓で脂肪酸代謝に関与する酵素の活性を測定した。**【結果】**肝臓 TG 濃度は LP 群で C 群と比べ有意に増加したが、EY 群でその増加は抑制された。EYO 群ではその抑制効果は弱かった。脂肪酸同化系酵素は LP 群と比べて EY 群、EYO 群では有意に低下した。血清 TG 濃度は LP 群、EYO 群で C 群と比べ有意に減少したが、EY 群でこの減少はみられなかった。**【結論】**低タンパク質食により誘導された脂肪肝は卵黄摂取により予防され、それは血中への脂質分泌の増加および、肝臓での脂肪酸同化の減少によるものと考えられた。

C-19 ニワトリ卵白リゾチーム-糖複合体の機能性

○岩見健吾、早川 茂、小川雅廣(香川大学農学部)

リゾチーム(Lz)は卵白タンパク質の3~4%を占める塩基性タンパク質で細菌の細胞壁を加水分解する溶菌活性を有しているため、食品の日持向上剤として利用されている。メーラード反応はタンパク質と還元糖の間で起こる非酵素的褐変反応であり、反応が進むに連れてタンパク質の疎水性が増大し、食品の加工や保存に影響を及ぼす。本研究では、Lzにメーラード反応により6種のD-アルドヘキソースと8種のD、L-ケトヘキソースを結合させ、諸性質への影響を調べた。Lz溶液にモル数で7倍量の糖を加えて凍結乾燥後、50℃、相対湿度55%で48時間保温してリジン残基に糖を結合させた。Lz1分子あたりの結合数はアルドース、ケトースでそれぞれ2~4分子と1分子であった。分子構造変化により溶菌活性が8~20と33~51%失活した。マンノースを除く糖の結合によりLzの溶解度は低下し、特にケトース結合では顕著であった。疎水性が増大した事によりLzの乳化特性は著しく向上し、特に溶解度の低いLz-ケトース複合体は優れたエマルジョンを形成した。5mMジチオスレイトールを含む5%Lz-糖複合体を80℃で20分加熱して形成したゲルの破断応力はネイティブのものより低く、糖の結合によりゲルが弱くなったが、マンノース-糖複合体に関してはネイティブと遜色の無い強さのゲルが得られた。糖の結合により抗体結合部位の露出が増えたために、Lzに対する抗体の反応性がわずかに増大した。

C-20 ケール抽出物の免疫調節活性に関する研究

○近藤 愛¹、越智賢二²、高岡照海²、菅原卓也¹(¹愛媛大・農、²遠赤青汁(株))

【目的】ケール(*Brassica oleracea* var. *acephala* DC)はアブラナ科の植物で、多くの種々の栄養成分がバランスよく含まれているのが特徴であり、様々な生理効果が報告されている。本研究では、ケール抽出物の免疫調節機能に関して、ヒト型ハイブリドーマ細胞、及びヒト末梢血リンパ球を用いて評価した。

【方法】ケール乾燥葉の粉末を10 mMリン酸緩衝液(NaPB)にて抽出し、これを粗抽出液として試験試料とした。免疫調節活性の測定にはヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞、及びヒト末梢血リンパ球を用い、無血清条件下において培地中に産生された抗体量を酵素抗体法により定量することで活性を評価した。

【結果】ケール抽出物のHB4C5細胞のIgM産生に及ぼす影響を検討した結果、IgM産生を濃度依存的に促進した。また、ヒト末梢血リンパ球に対してもIgM産生促進効果を示した。さらに、限外ろ過により粗抽出液を分画して活性を評価したところ、分子量50,000以上の画分に抗体産生促進活性が認められた。また、トリプシン処理により活性が消失したことから、活性物質は分子量50,000以上のタンパク質である可能性が示唆された。

C-21 マウスにおけるスギ花粉アレルゲン-多糖複合体の腸管吸収と経口免疫寛容の誘導

○齊藤 章¹、加藤 昭夫¹、臼井 将勝²(¹山口大・農、生物機能、²水産大学校・食品科学)

本研究ではスギ花粉アレルゲン(Cry j 1)のエピトープ部位をガラクトマンナン(GM)により被覆したCry j 1-GM複合体が経口免疫寛容剤として利用できることを報告してきた。すなわち、この複合体をマウスに経口投与するとアレルゲンに対するIgE産生が著しく抑制され、スギ花粉アレルギー症状が緩和されることを明らかにしている。今回はこの経口免疫寛容誘導の機構を調べるため、マウスの腸管内腔へのCry j 1とCry j 1-GM複合体の吸収を、蛍光顕微鏡を用いた免疫組織学的分析により比較した。Cry j 1とCry j 1-GM複合体はビオチン化した後、マウスに経口投与した。ビオチン化Cry j 1の経口投与後、マウスの腸管組織切片をFITC-ストレプトアビジンで処理した。蛍光免疫染色した腸管切片の顕微鏡観察の結果、腸管免疫細胞である、マクロファージおよび樹状細胞と共局在することが明らかに示された。この傾向はCry j 1-GM複合体投与で顕著に認められたが、Cry j 1単独投与ではほとんど認められなかった。この観察から、Cry j 1-GM複合体が効率よく腸管に吸収され、腸管内細胞マクロファージおよび樹上細胞により貪食され、抑制性のT細胞を活性化し、免疫寛容が誘導される可能性が示された。

C-22 Cry j 1 の可溶性凝集体による抗原性の低減化

○青木理恵子¹, 齋藤章¹, 原田哲二¹, 臼井将勝², 加藤昭夫¹ (¹山口大生物機能 ²水産大食品化学)

【目的】本研究室ではこれまでにガラクトマンナン(GM)と Cry j 1 を乾燥加熱下でのメイラード反応により作成した Cry j 1-GM 複合体は花粉症患者血清中の IgE 抗体との反応性が著しく低減化することを報告してきた。今回は Cry j 1 の抗原性が加熱により消失するかどうかを解明することにより、スギ花粉症の治療戦略の情報を得ることを目的とした。【方法】Cry j 1 はスギ花粉から作成した。Cry j 1 を酢酸緩衝液(pH 5)中で凝集体を生じないような条件で加熱変性した。変性曲線は 222nm における CD 値の変化から作成した。加熱変性させた Cry j 1 をグアニジン塩酸で処理したときの CD 値、抗原性を測定した。【結果】Cry j 1 は温度の上昇と共に 222nm の CD 値の減少が観察され、 β 構造含量の増加が示された。この結果は分子間でのクロス β 構造の可能性が示された。また、HPLC による解析から高分子成分の増加が観察され、可溶性凝集体形成が確認された。さらに、Dot blot による解析から、加熱により形成された Cry j 1 の可溶性凝集体は抗原性が著しく抑制された。グアニジン塩酸処理した凝集体で抗原性が回復したことから、可溶性凝集体は分子表面の β 構造によるタンパク質分子間の結合により引き起こされ、分子間相互作用により抗原性が低減化することが明らかとなった。

D-1 Ski2p 様 RNA へリカーゼ活性発現の構造基盤

○張 小冬¹、中島 崇^{1,2}、角田 佳充^{1,2}、木村 誠^{1,2}(¹九大院・システム生命、²九大院・農)

酵母RNAへリカーゼ様タンパク質Ski2pは、タンパク質Ski3p およびSki8p とSKI複合体(Ski2p-Ski3p-Ski8p)を形成し、エキソゾームとともに異常 mRNA の分解に関わっているが、その酵素活性機構は不明である。本研究では、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 の Ski2p ホモログ(Ph1280p)を同定し、その ATPase 活性と結晶構造を解析した。

まず、Ph1280p を大腸菌内で大量発現、精製し、その ATPase 活性を測定した。その結果、Ph1280p は DNA および RNA 依存性 ATPase 活性を持つことが分かった。次に、Ph1280p の結晶を調製し、SPring-8 にて回折実験を行った。その結果、3.5 Å 分解能での回折強度データを収集し、セレンによる単波長異常分散法により位相を決定した。Ph1280p は4つのサブドメインから構成され、N 末端側の2つのサブドメイン(N1 と N2)はともに RecA 様構造を形成し、DEAD ボックスを持つ他の DNA へリカーゼのへリカーゼドメインとよく類似していた。一方、2つの C 末端サブドメイン(C1 と C2)は多くの α -ヘリックスからなり、それぞれ DNA/RNA 結合タンパク質や DNA へリカーゼに見出されている WH-フォールドと HhH-フォールドを形成していた。

D-2 澱粉枝作り酵素の X 線結晶構造解析

Vu Thi Nhuan¹、○嶋田 宏章²、角田 佳充^{1,2}、木村 誠^{1,2}

(¹九大院・農、²九大院・システム生命)

【目的】澱粉のアミロペクチン合成に関わる枝作り酵素(BE)は、 α 1,4-ポリグルカン直鎖に α 1,6-グルカン分枝を導入することで、アミロペクチンの微細構造の形成に重要な役割を果たしているが、その触媒機構や基質結合機構については不明である。本研究では、イネ澱粉枝作り酵素(BEI)の触媒活性機構を解明することを目的に、その X 線結晶構造解析を試みた。

【方法・結果】イネ由来 BE I を大腸菌発現ベクター pET-22b と宿主大腸菌 BL21 (DE3)を用いて大量発現させ、各種クロマトグラフィーを順次行うことにより、組換え酵素を精製した。組換え酵素 BE I の酵素活性をアミロペクチンを基質として評価したところ、イネ由来 BE I と同等の活性を保持していた。次に組換え BE I (10 mg/ml) の結晶化をハンギングドロップ蒸気拡散法で行い、SPring-8 にて X 線回折実験を行ったところ、3.0 Å 分解能の回折データを得た。その結果、結晶の格子定数は $a = 44.62 \text{ \AA}$, $b = 78.84 \text{ \AA}$, $c = 210.30 \text{ \AA}$ および $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ で、空間群は $P2_12_12_1$ であった。また、非対称単位中に 1 分子の BE I が存在していることが分かった。現在、大腸菌グリコーゲン枝作り酵素の構造をサーチモデルとして分子置換法による位相決定を試みている。

D-3 大腸菌トキシシン-アンチトキシシン(YafQ-DinJ)の作用機構に関する研究

○高木久徳¹、松尾尚紀¹、菊竹智恵²、山本紘³、内海利男³、木村誠^{1,2}

(¹九大院農、²九大院システム生命、³新潟大・自然科学)

真正細菌は環境ストレス条件下でタンパク質合成を抑制する調節因子・トキシシン-アンチトキシシンを有している。既に、大腸菌に存在する4種の調節因子のタンパク質合成抑制機構について研究されているが、5番目の調節因子と推定されている YafQ-DinJ に関する知見は得られていない。本研究では、YafQ-DinJ の作用機構を解明するために、YafQ のタンパク質合成への影響について検討した。

まず、YafQ および YafQ-DinJ の大腸菌内での発現系(pET-22b)を構築し、IPTGにより発現を誘導したところ、YafQ-DinJ は大量発現されていたが、YafQ の発現を誘導した菌体では細胞増殖が著しく抑えられていた。この結果より、YafQ は他のトキシシンと同様に細胞増殖を抑制し、DinJ の存在下でその活性が阻害されることが分かった。次に、大量発現した YafQ-DinJ を Ni カラムにより精製後、8 M 尿素処理、陽イオン交換(S-セファロース)クロマトグラフィーにより YafQ を精製し、大腸菌無細胞系(³⁵[S]-Methionine)を用いてタンパク質合成活性への影響を測定した。その結果、YafQ はタンパク質合成を顕著に阻害していることが分かった。現在、YafQ のリボソーム結合活性および mRNA 切断活性について検討している。

D-4 キトサナーゼの部分 N-アセチルキトヘキサオースに対する作用

○平野勝紹, Sitthinan Arayaveerasid, 渡辺真通, 関 清彦, 光富 勝(佐賀大農・生機科)

現在、キトサナーゼは、グルコサミン(GlcN)および N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を構成糖とする部分 N-アセチルキトサンの切斷特異性により3種のサブクラスに分類されている。サブクラス I キトサナーゼは、キトサン分子中の GlcN-GlcN 間および GlcNAc-GlcN 間を、サブクラス II は、GlcN-GlcN 間のみを、サブクラス III は、GlcN-GlcN 間および GlcN-GlcNAc 間を特異的に切斷する。キトサナーゼの切斷特異性は、部分 N-アセチルキトサンの酵素分解生成物を NMR, MS およびエキソグリコシダーゼ分解を用いて分析することにより調べられている。

我々は、(GlcN)₂-GlcNAc-(GlcN)₂-GlcNAc の構造をもつジアセチルキトヘキサオース(DACO)の酵素的調製法を確立した。そこで本研究では、DACOを用いた簡便なサブクラス分類法について検討した。DACOに各サブクラスのキトサナーゼを作用させ、分解生成物を TLC で分析した。その結果、DACOの分解生成物と各サブクラスの切斷特異性はよく一致し、本方法により容易にサブクラスを特定することができた。さらに、GlcNAc-GlcNAc 間以外のすべての結合を切斷する新規な切斷特異性を有するキトサナーゼが見いだされ、キトサナーゼは切斷特異性により4つのサブクラスに分類されることが明らかとなった。

D-5 プロテティング膜を用いた MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリント法の検討

○松岡篤史, 荒木朋洋(九州東海大・農・バイオ)

【目的】プロテオーム解析において、オンメンブレン消化によるタンパク質の断片化は、消化効率を改善することができれば、有用な消化法になりうると考えられる。そこで消化効率の向上を目的としてオンメンブレン消化における種々の条件を比較し、MALDI-TOF-MS によるペプチドマスフィンガープリント法(PMF 法)の検討を試みた。

【方法及び結果】試料はニワトリ卵白リゾチーム及びヒト血清アルブミンを用い、SDS 電気泳動で分離後、プロテティング膜に転写後、トリプシン(0.02 μg/μl)でオンメンブレン消化を行った。消化物は抽出後、MALDI-TOF-MS による PMF 法を行った。まず、消化緩衝液を検討した結果、トリス塩酸緩衝液を用いた消化法が PMF 解析値を向上させることがわかった。次に、支持体としてニトロセルロース膜と PVDF 膜の比較を行った結果、PVDF 膜を用いた消化がノイズシグナルの数から PMF 法に適していることがわかった。また、消化溶液中の有機溶媒濃度の検討を行った結果、15%のアセトニトリル濃度が最も消化効率が高いことが明らかとなった。

D-6 化学修飾ペプチドを用いた MALDI 型質量分析によるデノボシーケンス

○荒木朋洋, 古川貴絵, 榊原光一(九州東海大・農・バイオ)

【目的】質量分析計によるデノボシーケンス法は、ゲノム未知生物種のプロテオーム解析において微量で配列情報が得られる有効な方法である。しかし、MALDI 型質量分析計は高感度で操作が簡便であるが、デノボシーケンス法に適していない。そこで MALDI での配列分析法を改善するため、ペプチド分子に電荷を導入する各種化学修飾を検討した。

【方法】試料は HSA を用い、SDS 電気泳動で分離後、トリプシン(0.01 μg/μl)でインゲル消化した。ペプチドの化学修飾は、リジン残基の側鎖アミノ基をグアニジン化後、N 末端アミノ基のスルホン化を行った。スルホン化反応には、クロロスルホンアセチル塩化物(CSAC)、2-スルホ安息香酸環状無水物(SBAn)および 4-スルホフェニルイソチオンアン酸塩(SPITC)の3種を用い、デノボシーケンスを行った。

【結果】CSAC によるスルホン化では、y イオンの強度が高まったがノイズシグナルが検出され、SBAn では、y イオンの強度が低くデノボシーケンス法を改善できなかった。一方 SPITC では全てのペプチドで C 末端から N 末端まで完全にデノボシーケンスできた。このことから、SPITC でのスルホン化は MALDI-TOF-MS でのアミノ酸配列分析に有効なことが明らかとなった。

D-7 アルコール存在下でのニワトリ卵白リゾチーム(HEL)の転移反応産物の解析

○重高佳和, 河村俊介, 荒木朋洋, 鳥潟隆雄(九州東海大・院・農)

【目的】HEL は糖加水分解反応だけではなく、高能率な糖転移反応を触媒する。この転移反応は、グリコシド開裂後、切断された基質断片に加水分解に関わる水分子に換わって糖のアクセプターが結合することによって進行すると考えられるが、その詳細な触媒反応機構は明らかではない。

本研究では、N-アセチルグルコサミンの5量体(GlcNAc)₅を基質として用い、エタノール存在下で反応を行い、エタノールが転移して生じた転移反応産物[(GlcNAc)_n-Ethanol]の分離・同定を行った。

【方法及び結果】酵素反応の条件は0.01 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)中、酵素濃度約 1.0×10^{-4} M、基質濃度約 1.0×10^{-3} M にエタノールを25%、50%になるように加えて、30 °C及び50 °Cで反応した。反応生成物を、TSK-GEL G-Oligo-PW 及び TSK-GEL Amide-80 で分離した結果、(GlcNAc)₁₋₅とは溶出位置が異なったエタノールへの転移反応生成物と思われる反応生成物が検出された。それらを質量分析で分子量測定した結果、各々1~5量体の[(GlcNAc)_n-Ethanol]のNa付加イオンの理論値と一致し、エタノールが転移反応のアクセプターとなることが明らかとなった。[(GlcNAc)_n-Ethanol]はHELの糖転移反応の解析に有効であると考えられる。

D-8 Anammox 菌の cytochrome c₅₅₂ の精製と性質

○河瀬達志¹、島村宗孝¹、西山孝¹、古川憲治²、藤井隆夫¹

(¹崇城大・応生命、²熊大院・自然科学)

【目的】嫌気性アンモニア酸化反応(anammox)はアンモニアと亜硝酸から窒素を生成する新規な脱窒反応である。この反応の機構について仮説が提出され、世界的に研究が進められているが、未だ明確になっていない部分が多い。我々はヒドラジン酸化酵素(HZO)の精製し、その一次構造を決定した。今回、anammox 菌 KSU-1株を優占種とする汚泥からHZOの電子伝達とanammoxに重要と思われるcytochrome c₅₅₂の精製を試みた。

【結果】集積したanammox活性を持つ汚泥を超音波で破碎し、調製した無細胞抽出液を各種カラムクロマトグラフィーに供し、Cyt cを精製した。その結果、ヘムの比含量を約10倍まで高めることができた。精製したCyt cの還元型スペクトルには552 nmにα吸収帯ピークが観察された。本タンパク質のゲル濾過から求めた分子量は25,000であり、別のanammox菌の*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*由来として報告のあるCyt c₅₅₂の分子量10,000とはかなり異なっていた。精製したcytochrome c₅₅₂のその他の性質についても報告する。

D-9 シトクロムcの構造・安定性と酸化還元機能の関係

○武田拓, 園山貴文, 三本木至宏(広大院生物圏)

【背景と目的】シトクロムcは、ヘム鉄の酸化・還元によって電子を伝達する。*Pseudomonas aeruginosa*(生育温度:37°C)、*Hydrogenophilus thermoluteolus*(同52°C)、*Hydrogenobacter thermophilus*(同72°C)由来のシトクロムc(それぞれ、PA, PH, HTと略記)は、構造が類似している。しかし、それぞれの酸化型の安定性は、HTが最も高く、PH, PAと続く。今回、これらのシトクロムcが持つ①酸化還元機能と②安定性の関係について報告する。

【方法と結果】①酸化還元電位の測定:それぞれのシトクロムc溶液と電極との電子授受を直接測定することで、酸化還元電位の値を求め、それを機能の指標とした。測定の結果、電位の値は、PAが最も大きく、酸化型の安定性と負の相関があった。②還元型の安定性:それぞれのシトクロムcを編制剂(0~6M)存在下でジチオナイトにより還元し、円二色性スペクトルを測定することで、安定性の指標とした。いずれも酸化型よりも還元型の方が高い安定性を示した。さらに、それぞれの還元型の安定性の差は、酸化型ほど大きくなかった。すなわち、用いた3つのシトクロムcでは、酸化型の安定性が還元型よりも大きく異なっていることが、酸化還元電位の差の原因とであると考察した。

D-10 好熱性細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* のチオ硫酸酸化活性

○佐野涼子, 園山貴文, 山中優, 三本木至宏(広大院生物圏)

【背景と目的】微生物による無機硫黄化合物の酸化還元は、グローバルな硫黄循環の主要な反応のひとつである。最適生育温度が 52°C である *Hydrogenophilus thermoluteolus* (グラム陰性のベータプロテオバクテリア) は、水素ガスの他に無機硫黄化合物のひとつであるチオ硫酸も酸化する。本菌のチオ硫酸酸化能は、硫黄化合物酸化酵素群(Sox)に依存している。Sox は、常温菌 *Paracoccus pantotrophus* で研究が進んでいるが、好熱性細菌由来のものは報告がない。今回、本菌の抽出液によるチオ硫酸酸化活性について検討した。

【方法と結果】まず、本菌を水素ガス存在下で培養し、菌体を 20mM チオ硫酸に数時間さらした。次に、チオ硫酸処理した菌体からリゾチームによってペリプラズム画分を抽出し、Sox 粗抽出液とした。Sox 粗抽出液によるチオ硫酸の酸化活性は、人工的な電子受容体として用いたウマ心筋由来のシクロクロムcの還元度合いを指標に測定した。以上の実験から、本菌由来の Sox 粗抽出液のチオ硫酸酸化活性は 50°C が最適であることが分かった。さらに Sox 粗抽出液を一時的に 70°C 以上の高温さらすと、活性が上昇した。これらの結果から、本菌の Sox は、本菌が生育する高温環境に適応したものであると考察することができた。

D-11 Structural and functional characterizations of acetate kinases from *E. coli* and psychrotrophic *Shewanella* species

○Md. Abul Kashem Tang, 岩崎翔平, 田上潤, 本島浩之, 渡邊啓一(佐賀大・農・生化学)

Acetate kinase (AK) catalyzes the reversible phosphoryl transfer from ATP to acetate. To gain insights into cold-adaptation, the structural and functional properties were compared between two AKs from psychrotrophic *Shewanella* sp. AS-11 (SAK) and mesophilic *E. coli* (EAK). SAK was characterized by a shift of the optimum activity towards low temperatures and by a lower thermal stability compared with EAK. In the acetyl phosphate and ADP-forming direction, the specific activity of SAK was higher than that of EAK at temperatures lower than 15°C, but lower at higher temperatures. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of SAK was 12-fold higher than that of EAK at 10°C. The activation enthalpy and entropy in both reaction directions catalyzed by SAK were lower than those by EAK, respectively. The modeled structure of SAK shows the reduced numbers of salt bridges and cation- π interactions compared with EAK. These results indicate that SAK is cold-adapted with a more flexible structure.

D-12 低温細菌由来コラーゲン分解酵素の精製と性質

○松本善行, 小川雅廣, 早川茂(香川大学農学部)

難分解性タンパク質コラーゲンを分解する酵素を低温環境で生育する菌からスクリーニングし、低温でコラーゲン分解活性を持つ菌 C35 を、寒冷地の土壌から単離した。そこで本研究は、C35 由来コラーゲン分解酵素を精製し、その性質を調べることを目的とした。

C35 を 4°C で 84 時間培養し、培養液上清を、硫安分画、HiTrap Butyl-S FF、TSKgel® Super SW3000 に供して、C35 由来コラーゲン分解酵素精製した。酵素の性質は、MOCAc-PLGL(Dnp)AR を基質として調べた。

C35 由来コラーゲン分解酵素の SDS-PAGE の結果、分子量は約 70kDa であった。この酵素の最適温度は 30°C で、4°C での活性は最適温度の 7.3% であった。さらに、30°C までは安定であり、60°C で完全に失活した。最適 pH は 7 であり、中性プロテアーゼであった。さらに EDTA、EGTA、1,10 フェナントロリンによって阻害されたことから、金属プロテアーゼであると推察された。 K_{cat} / K_m 値は、11412 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) であった。

D-13 魚醤から分離した *Bacillus licheniformis* の産生するプロテアーゼの特性

○高原宏明¹、豊川洋一¹、Alissara Reungsang²、安田正昭¹

(¹琉球大学・生物資源、²Khon Kaen Univ., Thailand)

【目的】魚醤は、東南アジアにおいて日本の醤油と同様に日常的に使われている調味料で、黄褐色～暗褐色の液体で、タイの Nam pla(ナンプレー)、ベトナムの Nước mắm (ニョクマム)、日本では、しょつたるなどが知られている。魚醤中には様々な微生物が存在し、プロテアーゼ産生菌についても報告されているが、詳細な報告は少ない。われわれは、これまでにタイの魚醤醗酵液より耐熱性細菌を分離し、分離菌株の産生するプロテアーゼの精製法を確立した。今回は、精製酵素の酵素化学的諸性質について報告する。

【方法と結果】ナンプレー発酵工程より単離した *Bacillus licheniformis* RKK-04 を供試菌株として用いた。酵素活性の測定はカゼインを基質として Folin 法により行なった。本酵素の精製は、培養濾液を粗酵素液として用い、各種クロマトグラフィーを組み合わせて行なった。精製酵素は電気泳動法で均一であることを確認した。本酵素活性に及ぼす NaCl 濃度の影響を調べた結果、25%においても比較的高い酵素活性を示した。本酵素タンパク質の N 末端アミノ酸はアラニンであった。基質特異性や阻害剤並びに N 末端付近のアミノ酸配列などの実験結果から、本酵素は Subtilisin 様セリンプロテアーゼであると考えられた。

D-14 リステリア属細菌の agr 様遺伝子群にコードされる環状ペプチドの構造決定

○朱雀 奈津子¹、西口 賢三¹、善藤 威史¹、中山 二郎¹、園元 謙二^{1,2}

(¹九大院・農、²九大・バイオアーク)

【目的】グラム陽性細菌のクォラムセンシングで有名なブドウ球菌の agr 制御系では、そのオートインデューサーは環状ペプチドであることが見出されている。近年全ゲノム配列の解析により、リステリア属細菌のゲノム上にもこの agr 遺伝子群に相同性を示す lsr 遺伝子群が存在することが明らかとなった。本研究では、*Listeria innocua* の lsr 遺伝子群にコードされる環状ペプチドの発現及び構造解析を行った。

【方法・結果】初めに、環状ペプチド生合成酵素 LsrB とペプチド前駆体 LsrD の遺伝子セットを *Lactococcus lactis* の発現プラスミドにクローニングした。本組換え体の培養液上清を LC/MS に供したところ、分子量 698 の分子が検出された (LsrD698)。構造解析の結果、LsrD698 は ACFMFV の 6 アミノ酸残基で、N 末端から 2 番目の Cys 側鎖のチオール基と C 末端のカルボキシル基とがチオエステル結合した環状ペプチドであることが明らかとなった。続いて *L. innocua* ATCC 33090^T を培養し、LsrD698 の検出を試みたところ、対数増殖期初期以降に LsrD698 の検出を確認することができた。また同時に、LsrD698 の N 末端にさらに Lys が結合していると予測される分子量 826 の分子も検出された (LsrD826)。現在、この分子の構造解析を行っている。

D-15 ランチビオティック生合成・分泌に関与する ABC トランスポーターの機能解析

○西江麻美¹、塩屋幸樹¹、永尾潤一²、中山二郎¹、園元謙二^{1,3}

(¹九大院・農、²京大院・農、³九大・バイオアーク)

【目的】ランチビオティック nukacin ISK-1 は、リボソーム上でリーダー領域を含むプレペプチド NukA として合成された後、異常アミノ酸形成酵素 NukM により異常アミノ酸が導入され、プロペプチド (リーダー領域をもつ非活性型ペプチド) となる。さらに ABC トランスポーター NukT によるリーダー領域の切断および菌体外輸送により抗菌活性を示す活性型となる。本研究では、*in vitro* における NukT のプロセッシングおよび輸送機能の解析を目的とした。

【方法・結果】*Staphylococcus carnosus* TM300 で NukT を発現後、フレンチプレスを用いた菌体破碎により反転膜小胞を調製し、これを粗酵素液とした。基質には大腸菌で *nukA* と *nukM* を共発現させて得られるプロペプチド、修飾 His-NukA を用いた (1)。NukT 反転膜小胞と修飾 His-NukA を ATP 存在下で反応した結果、NukT 反転膜小胞内に抗菌活性が確認された。また、この反転膜小胞破碎液を MALDI-TOF/MS 解析に供した結果、nukacin ISK-1 の生産が確認された。以上のことより、NukT による修飾 His-NukA のリーダー領域の切断が明らかとなり、活性型 nukacin ISK-1 の輸送が示唆された。(1) Nagao, J. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 507 (2005)

D-16 ランチビオティック吸着型耐性タンパク質 NukH の吸着特異性の解析

○柳原沙恵¹、奥田賢一¹、中山二郎¹、園元謙二^{1,2}(¹九大院・農、²九大・バイオアーク)

【目的】抗菌性ペプチドの一種である、ランチビオティック nukacin ISK-1 は、N 末端の Tail 領域と C 末端側の Ring 領域からなり、その Ring 領域には 3 つのランチオニン環と 1 分子の不飽和アミノ酸を有している。Nukacin ISK-1 の生産菌は、ABCトランスポーターである NukFEG と nukacin ISK-1 に対して吸着作用を示す膜タンパク質 NukH (1) によって構成される自己耐性機構を保持している。本研究では、様々な nukacin ISK-1 改変体を用いて NukH の吸着特異性の解析を行った。【方法・結果】最初に、N 末端の 3 つのリジン残基を欠損させた nukacin₄₋₂₇ と Tail 領域を欠損させ Ring 領域のみの nukacin₇₋₂₇ を用いて、NukH に対する吸着速度の解析を行った。その結果、nukacin ISK-1 が NukH に対して急速に吸着したことから、N 末端のリジン残基が NukH への効果的な吸着に関与することが示唆された。次に、nukacin₄₋₂₇、nukacin₇₋₂₇、異常アミノ酸部分に変異を導入した nukacin₄₋₂₇ 改変体を用いて NukH に対する吸着特異性を解析した。その結果、NukH の吸着には N 末端の Tail 領域は重要ではないこと、そしてランチオニン環によって保持された正しい Ring 領域が重要であることが示唆された。(1) Okuda *et al. FEMS Microbiol. Lett.*, **250**, 19 (2005)

D-17 好熱菌リポ酸アセチルトランスフェラーゼのサブユニット構造変化

○重岡佑一、山本幸治、伴野豊、麻生陽一(九大院農)

これまで、タンパク質の変性や凝集について、多くの研究がなされたが、ポリペプチド会合体についての知見は限られている。我々は、60 量体であるリポ酸アセチルトランスフェラーゼ(LT)をモデルとして、主として環境変化に対する応答から、その構造特性を明らかにしようとしている。本研究では、高 pH において KCl によって誘導される LT のサブユニット構造変化について報告する。

pH9.1 において、KCl の濃度増加とともに、光散乱強度が低下した。KCl 存在下において超遠心分析を行った結果では、31S から 25S へと沈降係数の低下が見られた。そこで KCl 存在下においてゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、分子サイズの減少が確認された。

次に、KCl を除去してからゲルろ過クロマトグラフィーを行った結果、pH 9.1 の場合と同様の分子サイズへの増加が見られた。この結果から、分子サイズの減少は大部分が可逆的な反応であるが、部分的に不可逆な分子種が生じたことが推測された。

D-18 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質プレニル化反応の解析

○¹石橋直人,¹八舟宏典,¹守屋康子,²鈴木崇,¹内海俊彦

(¹山口大院・医・応用分子生命、²島津製作所・ライフサイエンス研)

【目的】ゲノム解読後の課題としてタンパク質の機能解析に注目が集まるなか、タンパク質翻訳後修飾解析の重要性が高まっている。無細胞タンパク質合成系は cDNA を出発物質としタンパク質を試験管内で強制的に発現させる手法であり、多くのタンパク質翻訳後修飾が検出できる事が知られている。本研究では、主要なタンパク質脂質修飾の一つであるプレニル化について、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた代謝標識による検出を試みた。

【方法・結果】モデルタンパク質の C-末端にプレニル化を指令する CAAX モチーフを融合した一連の融合タンパク質のセットを作製し、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系における [³H]メバロン酸標識によりプレニル化を検討し、以下の結果を得た。[1]ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化の特異的阻害剤を用いる事で、簡便に短時間で修飾プレニル基の同定が可能であった。[2]プレニル化を指令する CAAX モチーフ中の X のアミノ酸要求性は、従来報告されているアミノ酸要求性と一致した。これらの結果から、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系における代謝標識は、特定の遺伝子産物に生じるプレニル化を簡便に短時間で検出する手法として優れている事が示された。

D-19 溶血性レクチン CEL-III の部位特異的変異体を用いた自己会合性解析

久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, ○畠山智充(長崎大・工・応化)

CEL-III は海産無脊椎動物 *C. echinata* に含まれる Ca^{2+} 依存性 Gal/GalNAc 特異的レクチンであり、溶血活性や培養細胞に対する強い毒性を示す。このような作用は、CEL-III の3つのドメインのうち、ドメイン1, 2が標的細胞膜表面の糖鎖に結合した後に、ドメイン3が細胞膜内で会合し、イオン透過性ポアを形成することによると考えられる。今回、ドメイン3へ部位特異的変異を導入することによって、その会合性と溶血活性への影響を検討した。

ドメイン3にはVal残基が交互に現れるValクラスターを含む2本の α ヘリックスが含まれる。このうち、1番目、2番目、及び両方のValクラスターをAlaに置換した変異体(F3VA, R3VA, 6VA)の溶血活性を野生型(WT)と比較したところ、F3VAはWTよりわずかに活性が高く、R3VAは約10倍の活性を示したが、6VAは活性が非常に低かった。一方、これらはいずれも不安定であり、溶液中でも自己会合する傾向が見られた。GST融合タンパク質を用いた実験などから、CEL-IIIのドメイン3のValクラスターはオリゴマー化における分子間相互作用に重要であるが、Alaへの置換によって、むしろドメイン間の相互作用が低下し、それに伴って溶血活性が上昇することが明らかになった。

D-20 X線小角散乱法を用いた溶血性レクチン CEL-III の孔形成機構の解明

○郷田秀一郎 貞方仁 久松啓伍 畠山智充(長崎大・工・応化)

海産無脊椎動物グミ(*Cucumaria echinata*)由来レクチン CEL-III は、分子量 47.5 k、 Ca^{2+} 依存性、galactose/N-acetylgalactosamine (GalNAc) 特異的であり、赤血球表面の糖鎖を認識・結合・多量体化することによって孔を形成し溶血活性を示す。すでに単量体での立体構造はX線結晶構造解析により明らかとしているが、会合体の構造・及びその形成機構は不明であり、その解明のためにX線小角散乱測定(SAXS)を行った。

グミ抽出液より天然の CEL-III 単量体・多量体を精製し、得られた単量体から人工的条件下(アルカリ性・高塩濃度・カルシウム・糖存在下)で多量体下を行った(人工多量体)。人工多量体は SDS-PAGE では 270 k 付近(6量体)にバンドを示すものの、SAXS で測定を行うと、その分子量は約 1000 k(25量体)とより高分子量な会合体として存在していた。そこで、界面活性剤存在下で測定を行ったところ、6量体に解離していた。他の溶血活性を示すタンパク質である α -ヘモリジンは7量体を形成して活性を示すことが知られている。これらの結果は、人工多量体は界面活性剤に対する耐性を持った溶血活性を示す最小のユニットである6量体が会合し、更なる多量体を形成していることを示唆していた。

D-21 進化学によって育種したビフェニル資化菌の分解特性

○野中中和彦、藤原秀彦²、後藤正利¹、古川謙介²(九大院生資環、九大院農¹、別府大バイオ³)

【背景・目的】*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株は、ビフェニル代謝(*bph*)遺伝子群がコードする一連の酵素により、ポリ塩化ビフェニル(PCB)を分解する。その中でも、ビフェニル環への初発酸素添加酵素の大サブユニット BphA1 は、本酵素の芳香族化合物に対する基質特異性を支配している。先に、KF707 株と *Burkholderia xenovorans* LB400 株の *bphA1* 遺伝子間で、諸種のキメラ *bphA1*(進化 *bphA1*)が構築された。本研究では、親株 KF707 株の染色体上 *bphA1* を進化 *bphA1* に置換した菌株を育種し、その分解特性を評価することを目的とした。

【方法・結果】本実験では、親株の *bphA1* よりも優れた分解特性を示した進化 *bphA1* を用いた。まず、KF707 株の *bphA1* を、相同組換えによりテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet^R*)へと置換した KF707-*tet* 株を取得した。同様に、KF707-*tet* 株の *tet^R* を6種類の進化 *bphA1* で置換した double-crossover (DC) 株を取得した。進化 *bphA1* を保有する各 DC 株は、諸種アルキルベンゼンに対して野生株と異なる資化性を示した。中でも、DC-1072 株は KF707 株が資化できないトルエンやエチルベンゼンを単一炭素源とする最少培地で速やかに生育した。

D-22 Catalytic Conversion of Malate Dehydrogenase to Aspartate Dehydrogenase

○Yinxia Li, Takahiro Ishikawa, Hitoshi Shibata, and Yoshihiro Sawa

(Department of Life Science and Biotechnology, Shimane University)

Recently aspartate dehydrogenases (AspDH) have been found in a thermophilic bacterium and an archaea. Since these thermophilic AspDHs show optimum reaction temperature over 90° C and almost no activity below 30° C, they are not suitable for industrial use, L-aspartate production and quantitative analysis. We have predicted that the alanine dehydrogenase (AlaDH) has evolved divergently from the lactate dehydrogenase (LDH). It might be possible to evolve a mesophilic aspartate dehydrogenase (AspDH) from a mesophilic malate dehydrogenase (MDH) by using evolutionary molecular engineering. We already reported that *E. coli* MDH (EcMDH) showed slightly L-aspartate deamination activity. Here we report the comparative biochemical analysis between EcMDH and archeal AspDH (AfAspDH), and new EcMDH mutants which were designed to have a higher AspDH activity. The recombinant EcMDH, EcMDH mutants and AfAspDH were purified to homogeneity. The k_{cat} value for L-Asp oxidative deamination at 37–50° C of EcMDH was higher than that of AfAspDH. K_m value for oxaloacetate (OAA) of AsAspDH changed depending on coexistent ammonium concentrations. We designed various EcMDH loop mutants (A80P, P83V, G84V, D86G, R87G, S222G, V213F, V214F, E215D, E215R) to have a higher AspDH activity. Although mutants E215D and E215R showed higher k_{cat} values for L-Asp deamination, unfortunately they showed no reductive amination activity for OAA. The effect of various compounds on mutant E215D and E215R were also determined for L-malate and L-aspartate oxidation reaction, and it was found that glyoxylate, 2-oxoglutarate and higher concentration of sodium chloride significantly inhibited L-malate and L-aspartate oxidation activity.

D-23 ヒト肺由来チオレドキシシン還元酵素のCXC型酵素

○奥山祐子, 田村 隆, 稲垣賢二(岡山大院・自然科学)

(目的)チオレドキシシン還元酵素(TrxR1)はヒト肺がん細胞で高発現する事が知られている。この高発現と細胞のがん化の関係性を調べる為、細胞レベルでの機能解明が待たれている。本酵素はセレンシステイン残基(SeCys498)を持つセレン酵素なので、組換え型酵素としての発現が困難である。SeCysをCysに置換したCys型酵素は野生型酵素の0.1%以下の活性(<50 mU/mg)である。本研究はCys型酵素の活性回復を目的とする。(結果)ラット肝TrxR1の研究から、SeCys498と隣のCys497での-Se-S-架橋形成が触媒機構に必須と提唱されている。硫黄の原子半径はセレンよりも小さい為、Cys型酵素の低活性はCys残基間の架橋形成が不利になる事に起因すると考えられる。そこでCys497-Cys498間に1アミノ酸を挿入する分子設計を行った。MOPAC計算の結果、Pro、Valなどの挿入が活性向上につながると予測された。pET32a発現ベクター上で変異導入を行い、目的酵素を発現・精製した。プロリン挿入型変異(CPC)は155.2 mU/mg、バリン型(CVC)は112.5 mU/mgの活性を示したので、1アミノ酸挿入による活性回復が可能である事が示唆された。

D-24 1アミノ酸残基挿入によるキノプロテイン・グルコース脱水素酵素の基質特異性改変

○外山博英¹、重谷恒平²、足立収生²、松下一信¹(¹琉球大農、²山口大農)

キノプロテイン・グルコース脱水素酵素(glucose dehydrogenase : GDH)は、ピロロキノリンキノン(PQQ)を補欠分子族とし、グルコースをグルコラクトンへと酸化する反応を触媒する。可溶型(soluble GDH : sGDH)と膜結合型(membrane-bound GDH : mGDH)の2種類の酵素が知られており、現在sGDHが血糖値測定バイオセンサーに応用されている。しかし、この酵素はマルトースに対する反応性がグルコースと同程度であるので、マルトースに対する反応性を低下させて、グルコースに対する特異性を向上させることが求められている。近年、本酵素のグルコースを結合した状態での立体構造が、X線結晶構造解析によって解明された。そこで、その立体構造を基にして、グルコース結合領域近傍にアミノ酸残基を挿入することで、マルトースに対する親和性を低下させることを試みた。PCR法による部位特異的変異で、特定部位にアミノ酸を1残基挿入するように、sGDH構造遺伝子中にランダムな3塩基を挿入した。得られた変異体のライブラリーの中から、マルトース酸化活性が野生株と比較して低く、グルコース酸化活性が維持されているものを、寒天培地上に生育した菌体を直接利用した活性染色法を用いて選抜した。選抜した変異体は、アミノ酸残基の挿入は確認されたものの、粗酵素抽出液の酵素活性を測定してみると、マルトース酸化活性がグルコース酸化活性に比べて減少していることはなく、選抜方法に問題があることが明らかとなった。そこで、寒天培地上の選抜をせずに、ライブラリーの一つ一つを培養し菌体抽出液を調製し酵素活性を測定して、グルコースとマルトースの反応性について、野生株と比較した。最も優れた変異体として、野生株と比べてグルコースに対する選択性が約1.4倍上昇したものが得られた。指定した領域へのアミノ酸残基の挿入は、本酵素の基質特異性の改良に寄与しうると考えられた。

D-25 環境遺伝子資源を利用した Taq DNA ポリメラーゼの蛋白質工学的改変

○鍋 健吾, 松川 博昭, 山上 健, 石野 良純(九大院・農)

99%の微生物は環境中に広く生育しているが培養できず、ほとんど全ての微生物は未だ未解析である事が明らかになってきている。そこで我々は、微生物の培養過程を経ずに、環境中の遺伝子断片を直接用いる事で既存の酵素の機能改変を目指している。Taq DNA ポリメラーゼはDNAの伸長性・増幅効率に優れている事からPCR法などで頻用され、遺伝子工学技術において特に重要な酵素である。この特徴を強化した酵素を創製する事ができれば遺伝子工学技術に大きく貢献できる。我々は、沖縄県近海海底の計19箇所の土壌から環境DNAを溶出した後、鋳型とし、Family A型DNAポリメラーゼに高度に保存され、活性部位を含むアミノ酸配列を元に作製した縮重プライマーを用いてPCR法を行った。増幅された遺伝子断片のクローニング、塩基配列の決定、アミノ酸配列への変換の結果、251種類の異なるDNAポリメラーゼ遺伝子断片が得られ、それらが全て新規配列である事を確認した。これらの遺伝子断片をTaq DNAポリメラーゼ遺伝子中の相当する領域と置換してchimera DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した。そして配列解析の結果から、有用酵素となる可能性が高いものを選び活性測定を行った。これらの結果を元に、アミノ配列の違いと活性の強さの関係を考察する。

D-26 アーキアの Hef 蛋白質に関する研究～*Aeropyrum pernix* 由来の Hef スクレアーゼの解析を中心に～

○跡部朋美, 吉用武弘, 古川信広, 藤兼亮輔, 石野良純(九大院・農)

我々は、*Pyrococcus furiosus* を用いたアーキアの修復機構の研究から新規のスクレアーゼを同定し、Hef (Helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA)と命名した。Hefは、DEAHヘリカーゼファミリーとXPFスクレアーゼスーパーファミリーのそれぞれ配列上の相同性を持った2つのドメインから形成されている。生化学的性質解析の結果、Hefタンパク質は、N末端領域のヘリカーゼ活性とC末端領域のスクレアーゼ活性を協調的に用いることで、停止した複製フォークの再開に関わる修復過程で重要な役割を果たすことが予想されている。

ユリアーキオタのHefのドメイン構造はユカリアのXPFポリペプチドと一致する。一方、クレナーキオタのXPFホモログにはN末端側のヘリカーゼドメインが存在しない。またスクレアーゼドメインの後に続くHhH2ドメインのC末端側にPCNA結合部位が存在すると考えられている。

我々は*Aeropyrum pernix*由来のHefホモログを探索し、クレナーキオタ型のドメイン構造からなるタンパク質を単離した。本発表ではこのタンパク質のスクレアーゼ活性の性質とPCNAとの相互作用による性質の変化を中心に述べる。

D-27 鶏卵白アルブミンの構造安定性や加熱凝集に及ぼすSH基の影響

○田中美穂, 中嵩志, 石丸隆行, 松富直利(山口大学・農・生物機能)

【目的】鶏卵白アルブミン(OVA)は卵白の主要タンパク質で、泡立ち性や加熱ゲル化等、卵白の優れた機能性発現の中心である。OVAは4つのSH基と1対のS-S結合を有しており、界面/加熱変性で、容易に酸化やSH-SS交換反応を起こす。これらの反応が泡立ち、乳化、ゲル化に重要であると考え、今回4つのSH基のCys残基をAla残基に置換したC11A, C30A, C367A, C382Aを構築し、構造安定性や加熱凝集性からSH基の役割を調べた。

【結果・考察】CD、Trp蛍光、ANS結合性により、変異体の2次、3次構造を調べたところ、Wildと比較して変化がないことが分かった。しかし、 α -ヘリックスの減少量から変性転移点を調べたところ、C11Aのみ約4°C減少していた。したがって、Cys11がOVAの構造安定性に関与していることが示唆された。

次に、分子間のSH基酸化反応を見るため、凝集体形成温度を測定した。C11AとC382Aの両変異体の凝集体形成温度は、Wildと比較して上昇した。これはCys11や382は分子表面に近い位置にあることから、露出しやすく、分子間相互作用しやすいと思われた。

D-28 鶏卵白アルブミンの熱安定化(S化)機構の解明

○石丸隆行¹,伊藤一成²,松富直利¹(¹山口大・農・生物機能,²山口大院・医・生体情報)

【目的】鶏卵白アルブミン(OVA)は有精卵では孵化のとき、無精卵では貯蔵中に熱安定化(S化)することが知られている。このS化は、アルカリ処理で再現できるが、そのメカニズムはわかっていない。最近、その結晶解析により、Ser 164,236, 320のL型からD型への転換が報告された。そこで、Ser残基のS化への寄与を検証することとした。

【結果・考察】アルカリ処理によりWild-typeでは9°Cの熱安定化を示したのに対し、Ser 164及び320をAlaに置換した変異体(S164A, S320A)では、約4.5度しか熱安定化しなかった。この2箇所を置換したS164/320Aは、アルカリ処理で熱安定化しなかった。一方、Arg 142をGluに置換したR142EでもS164Aと同様、約4.5度熱安定化した。このことから、Ser164とArg142がアルカリ処理により、強い相互作用を形成し、熱安定化を引き起こすことが示唆された。またSer320と相互作用を形成すると考えたLys 46をAlaに置換したK46Aは、アルカリ処理でWildと同程度の熱安定化した。このことより、Ser 320は別の部位と相互作用を形成し、熱安定化を引き起こしていることが示唆された。

D-29 遺伝子工学的手法による安定化ニワトリリゾチーム変異体の *Pichia* での発現分泌

○脇田幸弘、原田哲仁、阿座上弘行、加藤昭夫(山口大・農・生物機能)

目的:本研究室では立体構造や酵素作用機構がよく知られている卵白リゾチームをモデルタンパク質として、その構造を安定化する変異体の作成を行ってきた。これまでに、卵白リゾチームを用いて、 α -helixのN末端への負電荷のアミノ酸の導入(N27D)や、疎水性パッキングを強化する変異の導入(S91T)による耐熱化に成功している。今回はさらに熱安定性の向上を目的として、これらの変異を組み合わせた変異体リゾチームを作成し、酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現分泌させた。

結果:ヘリックスの安定化(N27D,N93D)と分子内パッキングの強化(S91T)を組み合わせた安定化変異の熱安定性が著しく向上することが明らかになった。すなわち野生型リゾチームに比べ、N27D/S91T変異体は3°C、N93D/S91T変異体は4°Cの熱安定化が示され、2本の α -helixと分子内疎水性パッキングを強化した変異体(N27D/N93D/S91T)は変性転移点がさらに上昇することが示された。また、 α -helix安定化変異体及び、疎水性パッキング強化変異体において分泌量の増加が示された。さらに、これらの変異体の酵素活性は野生型と比べ、同じ活性が保たれ、これらの手法が構造安定化及び、分泌量の増加に有効であることが示された。

D-30 ヘリックス安定化・不安定化ニワトリリゾチームのアミロイド線維形成

○原田哲仁、阿座上弘行、加藤昭夫(山口大・農・生物機能)

【目的】ヒトに致死的な病気をもたらす原因となるリゾチームのアミロイド線維形成は、アミロイド型リゾチームの α -ヘリックスが β -シートへと転移することで分子間のクロス β 構造により起こることが提唱されているが、直接的な証明はなされていない。本研究は、野生型リゾチームの α -ヘリックス安定化・不安定化させた変異体リゾチームを用いて、アミロイド線維形成の速度の違いから、リゾチームのアミロイド線維形成機構の解明を行うことを目的とした。

【方法・結果】野生型リゾチームcDNA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 -ヘリックスを不安定化させたN93D変異体及び、それぞれの α -ヘリックス不安定変異体K33D, K97Dを作成した。これら変異体を、酵母 *Pichia pastoris* で分泌させ、精製後、高温・酸性条件下でインキュベートを行い、アミロイド線維形成の有無を評価した。これらの結果から、 α -ヘリックス安定化変異体においてアミロイド線維形成の遅れが確認できた。一方で、 α -ヘリックス不安定化変異体では、アミロイド線維形成が早く起こっていた。このことから、アミロイド型リゾチームのアミロイド線維形成は、 α -ヘリックスが β -シートへと転移することで起こることが示唆された。

E-1 2相式メタン発酵槽を用いる固形有機廃棄物処理

○藤森愛、福岡三喜、岡本賢治、築瀬英司(鳥大・生応工)

【目的】本研究では、複雑な成分から成る固形有機廃棄物の嫌気処理を目的とし、嫌気分解に関する菌群の能力を最大限に発揮させるために処理槽を2相式(第1槽:可溶化・酸生成槽、第2槽:メタン生成槽)として嫌気発酵の最適条件を検討した。

【方法と結果】先ず、モデル生ゴミを用い、第1槽の処理温度を中温(37°C)と高温(55°C)に設定し、酸生成槽とメタン生成槽のVFAと生成ガスの挙動を観察した。55°Cの酸生成槽では、生成されるVFAは主に酢酸(VFAの約35%)・n-酪酸(約45%)であり、37°Cではプロピオン酸(約15%)の生成が認められ、第1槽の処理温度はプロピオン酸が少なく、VFA濃度も高い55°Cを選択した。次に、55°Cのメタン生成槽では、50ml-酸生成槽排出液から2Lのバイオガスが発生し、その理論収率は60%であった。また、生成ガスの組成は $\text{CH}_4:\text{CO}_2=6:4$ から $7:3$ で、この比率は投入する酸生成槽排出液量を変化させても安定していた。次に、メタン発酵に関するmethyltransferaseやmethylreductaseの補因子とされる金属イオンの添加効果を検討した結果、 Ni^{2+} と Co^{2+} の添加によりVFA消費速度の増加とともに、メタンガス生成速度と生成ガス量も若干の増加が認められた。

E-2 改変DVC法による堆肥中の好熱性細菌の検出

○塩塚皇太・柳田裕紹・金澤晋二郎・酒井謙二(九大院・農・土壤微生物学)

高温堆肥中で生育する好熱性細菌を顕微鏡下で直接計数する目的で、Kogureら(1979)のdirect viable count(DVC)法を改変し、high temperature-DVC(HT-DVC)法を確立した。まず、熱安定性を有する細胞分裂阻害剤としてピペミド酸とノルフロキサシンを選抜し、高温堆肥化法で作られた貝殻堆肥を試料として、阻害剤濃度、酵母エキスの有無、加温静置時間を検討した。その結果、試料の100倍希釈液に各阻害剤をそれぞれ $50\mu\text{g mL}^{-1}$ (最終濃度)、酵母エキスを $200\mu\text{g mL}^{-1}$ (最終濃度)となるように加え、60°Cで24時間加温静置すると、風乾堆肥1gあたり $(6.10\pm 0.20)\times 10^9$ の伸長肥大した好熱性細菌細胞が検出された。これは平板培養法で検出された数の5,000倍以上であり、従来の菌数計測から漏れていた培養できない好熱菌が検出・計数されたと考えられた。さらに同堆肥化法で作られた下水汚泥堆肥を試料とし、混合液の加温静置温度を80°Cに高めてHT-DVC法を行なったところ、最大で風乾堆肥1gあたり $(2.62\pm 0.35)\times 10^8$ の好熱性細菌細胞が検出された。この結果から、HT-DVC法は平板培養法での計数が困難な80°Cで増殖する高度好熱性細菌の検出にも適用できることが明らかになった。

E-3 POPs類を分解する新規な嫌気性微生物の分類学的推察

○渡邊克二、後藤正利¹、古川謙介^{1,2}(九沖農研¹・九大院農²・別府大バイオ学科)

【目的】これまでに国内や米国のPCB汚染土壌等から分離してきた、種々の難分解性有機塩素系化合物(POPs)を分解する嫌気性微生物は、高度耐熱性で結晶性コロニーを形成する等新規な微生物群である可能性が示唆される。本菌からの染色体DNAの抽出は困難で、リボゾーム塩基配列構造による分類学的位置付けの特定が遅れているため、栄養要求性から分類学的位置付けを推定した。【方法および結果】様々な電子受容体と電子供与体を加えた無機塩培地に分離株(17株)を接種し、11日~12日間嫌気培養後の増殖変化を OD_{600} により測定した。炭酸塩を電子受容体として固定した場合、すべてが電子供与体としてアセトンやエタノールを最もよく利用し、15株がメタノールも利用でき、9株が水素を利用できた。蟻酸(5株)、プロピオン酸(5株)、酢酸(1株)、グルコース(1株)、コハク酸(1株)、乳酸(1株)も利用できたが、増殖速度は遅かった。水素とエタノールを電子供与体として固定した場合、すべてが電子受容体として炭酸塩を最もよく利用した。10株はアセトンも利用できたが増殖速度は遅く、硫酸、チオ硫酸、硝酸は利用できなかった。よって本微生物群が炭酸塩呼吸を行う微生物群であり、多様な電子供与体が利用可能なことから細かな分類の必要性が示唆された。

E-4 サイレージ乳酸菌の機能開発 ～*Lactobacillus* 属乳酸菌の硝酸還元性の検討～

渡辺誠人¹、岩井寛¹、福田耕才¹、野村善幸¹、緒方靖哉¹、大桃定洋²、○土居克実³

(¹ 崇城大・応微、² アサマ化成、³ 九大院・遺資工)

【目的】近年、飼料作物への硝酸態窒素の蓄積による反芻家畜の急性・慢性疾病の発症、さらには家畜糞尿中に蓄積された硝酸態窒素の河川・湖沼への流入による環境汚染が問題となっている。本研究は、サイレージ発酵過程において、飼料作物中の硝酸態窒素を低減化させる乳酸菌スターターの開発を目的としている。今回は、硝酸還元機能を有する *Lactobacillus* 属菌株の検出および応用に向けた基礎的研究を行った。【方法および結果】九州・沖縄地方のサイレージよりの分離乳酸菌株 *Lactobacillus rhamnosus* NGR10110、*Lactobacillus plantarum* NGR10101 および *Lactobacillus casei* JCM1134、*Lactobacillus fermentum* JCM1137 について硝酸還元能を検したところ、*L. rhamnosus* NGR10110 と *L. casei* JCM1134 が約10%の硝酸還元能を有することが示された。また、*L. rhamnosus* NGR10110 は培地中の窒素含量を減少させることで約40%まで硝酸還元能が向上することが判った。次いで、液体培養とパウチ法を用いた乳酸菌株の混合培養によって生産されるサイレージの品質を評価した。上記の結果を基に硝酸還元能を有する *L. rhamnosus* NGR10110 と高温条件下でも増殖と乳酸生産の良好な *L. plantarum* NGR10101 との混合培養では、*L. plantarum* NGR10101 が培養初期から菌体増殖と乳酸生産が良好なのに対し、*L. rhamnosus* NGR10110 の菌体増殖と乳酸生成量は培養後期に上昇した。また、両菌株数の比率を変化させても乳酸生産量に有意な差は認められなかった。上記の結果より、両菌株は混合比 1:1 の培養で、長期間に渡って菌体生育と乳酸生成が持続し、また、硝酸還元性も示すことから、高温多湿環境下でのサイレージ発酵に好適であると判断した。現在、硝酸還元能の増強条件の検討や増強株の作出等について検討している。

E-5 ステビア粉末からの硝酸還元性高温菌の分離・同定

○堤義備¹・岡本啓湖¹ (¹ 福岡高・専攻科)

【目的】ステビア粉末を施用した小松菜等の硝酸態窒素減少が確認されていることから、本研究ではステビア粉末からの硝酸還元性を有する高温菌探索を目的とした。【方法・結果】実験 1:ステビア粉末より 0.5%肉エキス加トリプトイオン寒天培地を用いて 55°C・48 時間培養で、2 菌株の高温菌を純粋分離した。これらの高温菌の 16S rDNA 部分塩基配列解析により同定した結果、各々基準株 *Bacillus pumilus* ATCC7061 と 100%の相同性、*Bacillus licheniformis* DMS13 と 99.6%の相同性を示した。実験 2:両菌を 0.1%KNO₃ 含有ペプトン水培地で培養後、α-ナフチルアミンによる亜硝酸定性反応を行った結果、*Bacillus licheniformis* のみ陽性を示した。更に *Bacillus licheniformis* の生成亜硝酸定量を HACH:DR/4000 を用いて行なった結果、培養1日 (300±11.5 mg/L) に最大亜硝酸生成能を示し、培養 2 日 (260±5.77 mg/L) 以降減少することが判明した。更に培養1日の生成アンモニア態窒素濃度 (230±1.04 mg/L) は培養日数に伴い増加した。実験 3:0.5%肉エキス加トリプトイオン液体培地を用いた生育温度試験 (30,45,55,65°C) では各温度で 5 日間培養した結果、*Bacillus licheniformis* の至適温度は 55°C であったが、30°C での生育も確認された。

E-6 分子生物学的手法による有明海干潟泥の細菌相解析

○田代幸寛¹・光武奈緒子²・小林元太¹・加藤富民雄² (¹ 佐大有明プロ・² 佐大農)

【目的】室の海と呼ばれる有明海では古くから漁業や養殖業が活発に行われている。しかし、近年では漁獲量の減少やノリの色落ちによる被害などが報告されており、生態系の変化が危惧されている。本研究では、有明海における生態系変化に関する知見を得ることを目的とし、分子生物学的手法を用いて有明海干潟に生息する細菌相を解析した。

【方法・結果】平成 18 年 4 月から平成 19 年 3 月までに、佐賀県内有明海の 4 地点の干潟から泥を毎月採取し、試料として用いた。それらの試料から常法に従って DNA を抽出し、16S rDNA クローンライブラリーを構築し、試料毎に約 20 クローンずつシーケンス解析を行った。その結果、いずれの地点においても、9 割程度がこれまでに分離されている細菌と相同性を示さず、未分離で未知の細菌が優勢であることが明らかとなった。さらに、いずれの地点においても *Desulfobulbus* 属細菌や *Thiobacillus* 属細菌をはじめとする硫黄酸化細菌や硫黄還元細菌と相同性を示すクローンが得られた。よって、有明海干潟中における硫黄サイクルに関してこれらの細菌の寄与が示唆された。現在、全細菌と硫黄還元細菌をターゲットとした DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法による網羅的な定性解析を検討中である。

E-7 有明海からのキシロース資化性乳酸菌の分離

○岡宏圭¹・田代幸寛²・小林元太²・加藤富民雄¹・林信行¹(¹佐大農・²佐大有明プロ)

【目的】近年、地球環境問題や化石資源枯渇化の問題から植物バイオマスの微生物による有用物質生産が検討されている。ヘミセルロースを加圧熱水処理することによって得られるキシロースやキシロオリゴ糖を発酵原料として利用できる微生物を用いることにより、ヘミセルロース資源の有効利用が期待される。本研究では、有明海よりキシロース資化性乳酸菌を分離し、その同定および培養諸特性について検討を行った。

【方法・結果】有明海底泥よりキシロース資化性乳酸菌を100株以上分離し、さらにキシロオリゴ糖資化能および乳酸生産能より乳酸桿菌 n1.2.1 株を選択した。さらに、16S rDNA 解析によって *Lactobacillus brevis* と同定した。キシロース含有 MRS 培地を用いて、本菌株の培養至適条件を pH 6.5 および温度 30 °C と決定し、同 MRS 培地にて回分培養を行ったところ、乳酸生産性は 1.0 g/L/h とこれまでに *Lactobacillus brevis* にて報告された値よりも高かった。本菌株は市販オリゴ糖を原料として乳酸発酵を行うことも可能であり、現在、もみ殻を加圧熱水処理して得られる糖化物からの乳酸生産について検討中である。

E-8 微生物に対する微粒子の作用とその応用(3) 微粒子物質の種類および菌株と醗酵特性の関係

○宮地 諒、藤本敏幸、西森大祐、松元信也(高知工科大 物質・環境)

【目的】醗酵飲食品やバイオエタノールなどの醗酵プロセスの効率化、ならびに醗酵飲食品の品質の多様化策などに応用展開することを意図して、微生物の醗酵特性に対する微粒子物質の作用に関する研究を行っている。ここでは、合成系を中心とした微粒子物質の種類と醗酵特性の関係、ならびに微粒子物質存在下における醗酵特性と使用菌株の関係について検討した結果を報告する。

【方法】醗酵試験は、合成培地に所定量の微粒子物質と微生物培養液を加え、28°C で静置醗酵させた。醗酵中は経時的に重量を測定し、減量を炭酸ガス発生量とした。醗酵終了時点では、pH、総酸、アルコール、菌数などを分析するとともにヘッドスペース GC 法で香气成分を分析した。

【結果】①合成ゼオライトは、粒度によって程度は異なるものの、酵母の醗酵を促進させた。②イオン交換樹脂、ゲルろ過材も酵母に対する醗酵促進作用を有していたが、その程度は種類や粒度などによって大きく異なった。③酵母、ザイモナス菌のいずれの場合も、菌株間で程度の差はあるものの、微粒子物質添加によって醗酵は促進された。しかし、微粒子物質添加の香气成分生成への影響は、酵母とザイモナス菌で異なる傾向を示した。

E-9 硫黄培地に増殖した高度水銀耐性鉄細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 株の無機水銀及び有機水銀分解活性

○杉尾 剛¹、中村壮作¹、金尾忠芳¹、竹内 文章²(¹岡山大・院・自然科学、²保環セ・環境安全部門)

【目的及び方法】二価鉄培地に増殖した高度水銀耐性鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* MON-1 株は、無機及び有機水銀に耐性であり、既に明らかにされている水銀還元酵素に加えて、二価鉄依存性の水銀還元酵素活性(鉄酸化酵素の成分である cytochrome *c* oxidase が関与する)を持っていることを明らかにしてきた。今回、硫黄培地に増殖させた MON-1 株の洗浄細胞、及び無細胞抽出液を用い、無機水銀に対する水銀還元活性を還元気化原子吸光法で、有機水銀に対する分解活性を ECD-GC 法で測定し、二価鉄培地生育 MON-1 株の結果と比較検討した。【結果】MON-1 株は、10 μM の Hg²⁺ を含む硫黄培地に増殖が可能で Hg²⁺ に強い耐性を示したが、鉄培地で増殖が観察された 20 μM の Hg²⁺ を含む硫黄培地では増殖が見られなかった。一方、硫黄生育菌は、鉄生育菌とほぼ同程度の水銀気化活性を有し、(1)この活性が二価鉄の添加で活性化されること、(2)硫黄生育菌も鉄酸化活性を持っていること、(3)細胞膜の可溶性抽出液中に aa₃ 型の cytochrome *c* oxidase の存在が確認されることにより、硫黄生育菌も鉄生育菌同様に鉄依存性の水銀気化システムを持っていることが明らかになった。フェニル酢酸水銀分解活性に対して、硫黄生育菌は鉄生育菌とほぼ同程度の分解活性を示したが、メチル塩化水銀に対しては硫黄生育菌の方が 1.3 倍高い分解活性を示した。

E-10 鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌を用いた児島湖浚渫土壌からの重金属の溶出

○櫻井あゆみ¹, 金尾忠芳¹, 竹内文章², 杉尾 剛¹

(¹岡山大学・院・自然科学、²保環セ・環境安全部門)

【目的】岡山県児島湖では、農林水産省の事業として、児島湖の水質改善を目的として堆積した湖底土の浚渫が行われた。本研究では、児島湖底土の有効利用を目的として鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 及び硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* を積極的に浚渫土壌中に添加し、微生物的に土壌中の有害重金属を可溶化除去する可能性を検討した。また、本湖底土から単離した鉄酸化細菌の生理学的特性の解明も試みた。【方法・結果】児島湖浚渫土壌(25 g)に水と鉄酸化細菌、栄養塩類、1%元素硫黄を添加し(全容 100 ml, pH 5)、坂口フラスコで 22 日間振とう攪拌し、2 日おきに上清中の pH、重金属濃度(Fe, Zn, Cu, Pb)を測定した。土壌中への菌の添加と S⁰ の添加により土壌からの重金属の抽出が顕著に促進された。有用菌株の選抜と溶出条件の最適化を行なった結果、鉄酸化細菌及び硫黄酸化細菌の種類によって pH の低下や重金属溶出速度は異なったが、添加菌体量による重金属の溶出量の違いは見られなかった。硫酸生成による pH の低下は 22 日目でストップし(約 pH 1.5)、これ以降、重金属の溶出量は一定の値を示した。また、湖底土より単離した鉄酸化細菌 OKS-1 株は 16SrRNA の塩基配列解析により *A.ferrooxidans* と考えられたが、鉄及び硫黄酸化活性は標準株より弱く、膜の可溶化画分にチトクローム *c* がより大量に含まれるという特徴を持っていた。

E-11 Existence of Ferric Iron Reductase activity in the Outer Membrane of Sulfur-Grown *ferrooxidans* ATCC 23270

○Taher M. Taha,¹ Tadayoshi Kanao,¹ Fumiaki Takeuchi,² and Tsuyoshi Sugio¹

(¹Grad. School of Nat. Sci. and Technol., Okayama Univ., ²Health and Environ. Center, Okayama Univ.)

The activity of ferric iron (Fe³⁺) reduction with tetrathionate as an electron donor was newly found in intact cells and cell debris obtained after sonication of sulfur-grown *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cells. The activity was also found in the supernatant obtained by direct extraction of intact cells with 1M Na₂SO₄ and 2% 1-O-n-Octyl-β-D-glucopyranoside in 0.1M β-alanine-SO₄²⁻ buffer (pH 3.5) for 1h. These results suggest that Fe³⁺ reductase activity is localized in the outer membrane of this strain. The Fe³⁺ reductase was partially purified using Sephadex G-100 and Phenyl TOYOPEARL-650M column chromatography. The level of Fe³⁺ reduction activity was dependent on the concentrations of protein, tetrathionate and ferric ion. Sodium cyanide didn't inhibit the activity at 2 mM. The optimum pH of this reaction was 3.5. It is suggested that this enzyme plays a crucial role in sulfur oxidation by *A. ferrooxidans*.

E-12 植物病原菌の分類と同定に対する MALDI-MS の応用可能性について

○荒巻 忍¹⁾、市来 弥生¹⁾、津野 和宣²⁾、田村 廣人³⁾、吉川 博道¹⁾

1)福工大・院・生物有機、2)宮崎大学・農学部・食糧生産、3)名城大・院・環境微生物

【目的】微生物の同定は、生理学的性質、形態、塩基配列などを基礎に行なわれるが、多くの時間と労力が必要である。近年、MALDI-MS を微生物の同定に利用する研究が進められている。本研究では、植物病原菌を対象に菌体抽出液の MALDI-MS スペクトルパターンによる迅速同定の有効性を検討した。

【方法および結果】MALDI-MS スペクトルは培養条件、培養時間、Matrix 剤に大きく影響される。我々はこれらの条件を検討し、YMPDA 培地を用い 30 °C、16 時間、培養した菌体を用いることとした。Matrix 剤としてシナピン酸を選択した。この条件下に、イネ白葉枯病菌である *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* の 17 株を対象に MALDI-MS スペクトルを測定した。T7174 株のマススペクトルから、相対強度の高い順から 30 ピークを選択し、そのピークが他の菌においても存在するかどうかを検討した。この結果より、同じ biotype 内であっても同一ピーク存在率は 0 % から 90 % と株間で大きな差があることが明らかとなった。従って、スペクトルのデータベースを充実することにより、株レベルでの同定の可能性があると考えられる。また、これらの 17 株中、16 株に 7143 Da と 7442 Da の特徴的なピークが出現した。

E-13 Isolation of thermotolerant strains from *Saccharomyces cerevisiae*

○ Walika Larblamool, Kohzo Kanda and Fumio Kato (Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University)

Thermotolerant yeasts are expected to use in industrial ethanol production to reduce cooling costs during fermentation process. To obtain the thermotolerant yeasts, commercial brewing yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* K-7 and *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, were taken to isolate mutants by specific selective techniques using EMS and NTG. Mutants were screened for the ability to grow at higher temperatures by culture on agar plates and incubated at elevated temperature at interval of 1°C. The isolation program resulted in four thermotolerant mutants from *S. cerevisiae* K-7 and two thermotolerant mutants from *S. cerevisiae* Hansen capable of growth on plate cultures up to 42°C and 43°C, respectively. The growth and ethanol production were studied at temperature ranges 30–45°C. All mutants grew up to 43°C and could tolerate temperature at 45°C in liquid culture. DM1313 showed the best ability to grow and tolerate the high temperature. The ethanol production from 100 g/l glucose was 37.5 g/l, 12.5 g/l and 10.0 g/l at 40°C, 42°C and 43°C, respectively. In batch condition, MC4301 is the highest ethanol producing strain by produce ethanol 84.7 g/l, 51.0 g/l, 31.5 g/l and 16.0 g/l at 30°C, 37°C, 42°C and 45°C, respectively, from 150 g/l glucose. Growth and ethanol production were decreasing at higher temperature. However, mutants were superior to their parent strain. The results presented the good potential in using these thermotolerant yeasts in industrial ethanol production in tropical countries as well as during hot season in non-tropical countries.

E-14 *Zymomonas mobilis* の耐熱性分離株の解析

○入江 陽¹、Kaewta Sootsuwan²、村田正之¹、Noppon Lertwattanasakul²、山田 守^{1,2,3}
(¹ 山口大院・医・応用分子、² 鳥取大連院・生物資源、³ 山口大・農・生物機能)

【目的】*Zymomonas mobilis* はグルコース、フルクトース、スクロースからアルコールを生産する。この微生物は EMP や TCA 経路が不完全であり、ED 経路を用いて糖を代謝し、エタノール生産性に優れている。このことからバイオエタノール生産を担う微生物として期待されている。本研究では、タイで分離された *Z. mobilis* の中から耐熱性の高い株を選択し、エタノール生産性の高い既存株 ZM4 と比較した。

【方法・結果】タイ分離株 4 株と ZM4 株を 30~40 度で培養し、生育とエタノール生産性を比較した。その結果、ZM4 株が高温で生育が悪くなるのに対して、2 株は 39 度でも良く生育し、30 度での ZM4 株よりもエタノール生産性が高いことが示された。そのうちの 1 株と既存株について、エタノール生産に直接関わる酵素(ピルビン酸デカルボキシラーゼ、アルコール脱水素酵素(AdhA と AdhB)) 遺伝子の構造や発現の比較および Adh 酵素活性比較を行った。その結果、いずれの遺伝子も 5' 側非コード領域を含めて保存性が高く、転写レベルの違いはほとんど見られなかった。一方、Adh 活性は両株で明らかな違いが見られた。

E-15 C75 を用いた酢酸イソアミル高生成酵母の育種

○谷本昌太¹、蔵尾公紀¹、藤井一嘉¹、平賀良和²(¹ 広総技研食工技セ、² 広大院理)

【目的】バナナ様の香りの酢酸イソアミルおよびリンゴ様の香りのカプロン酸エチルは、清酒の品質に重要な香気成分である。3-Carboxy-4-octyl-2-methylenebutyrolactone (C75) は、ラットに対する新規な脂肪酸合成酵素阻害剤であり、摂食抑制によりマウスにおける体重増加を抑制する。一方、脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンに耐性を示す清酒酵母の中から、高い確率でカプロン酸エチル高生成株の選抜が可能である。そこで、C75 耐性を示す清酒酵母の取得を試みたところ、カプロン酸エチルではなく、酢酸イソアミルを高生成する株が選抜されたので報告する。

【方法と結果】C75 は Kuhajda et al. の方法¹⁾により合成した。協会 601 および 901 号を EMS により変異処理し、150ppm の C75 を含む YNB 寒天培地に塗布し、生育した変異株を耐性株として分離した。麴・麹汁培地による発酵試験の結果、耐性株の酢酸イソアミルは、親株と比べて高かった。酢酸イソアミルが高く、発酵力が比較的良好な株について、総米 200g の清酒小仕込み試験を行った結果、耐性株の発酵力は良好で協会 901 号の変異株(901-11)で酢酸イソアミルを親株の 1.4 倍生成した。また、耐性株と親株のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性および C75 以外の薬剤耐性を親株と比較した。1) Kuhajda et al. PNAS 2000, 3450–3454.

E-16 分裂酵母のグリセロール代謝経路の解析

○松沢智彦、田中直孝、竹川 薫(香川大・農・応用生物)

グリセロールは炭素源として、また浸透圧ストレスなどの各種ストレスに対する適合溶質として生物に利用されている。分裂酵母は、グリセロールのみを培地の炭素源とした場合に極めて生育が遅いことが知られているが、その理由は不明である。そこで本研究では分裂酵母のグリセロール代謝機構について解析を行った。分裂酵母細胞内ではグリセロールは脱水素酵素によりジヒドロキシアセトン(DHA)となる。DHAはDHAキナーゼ(Dak1p, Dak2p)によりDHAリン酸(DHAP)となり、さらにグリセルアルデヒド3リン酸となって解糖系に入り、出芽酵母とは異なる代謝経路を持つと考えられている。分裂酵母のグリセロール脱水素酵素を検索したところ、相同性の高いSPAC13F5.03を見出し、本遺伝子および*dak1*, *dak2*遺伝子破壊及び過剰発現によりグリセロール代謝にどのような影響があるか調べた。SPAC13F5.03遺伝子は破壊すると全くグリセロールを資化できないこと、さらに本遺伝子の発現がグルコース抑制を受けていることなどがわかり、SPAC13F5.03遺伝子がグリセロール代謝の律速段階の1つであると考えられた。また*dak1*と*dak2*遺伝子は単独破壊株の表現型は異なっているが、二重破壊株でグリセロールを資化できなくなることから重複した機能を持つことがわかった。

E-17 ナリングニンを合成する酵母の開発とそれに適した酵母株の選抜

○井手一郎^{1,2}、原田哲郎^{1,2}、松本亮司¹、永野幸生²(¹佐賀大・農、²佐賀大・総分セ)

[目的]我々は、一つのベクターで5つの遺伝子を発現させるための酵母ベクターを開発し、植物フラボノイドであるナリングニンの合成を目指した。また、植物でフラボノイドはグルコシルトランスフェラーゼにより糖鎖修飾を受け、酵母でも同様な現象が起こる。しかし、これでは、酵母培養液中に分泌されず、収量が低下する原因になる。そこで、酵母ゲノム中の植物二次代謝産物の糖鎖修飾に関与する酵素を特定する事で、ナリングニンの合成に適したノックアウト酵母株を選抜した。[方法・結果]まず、酵母相同組換え法を用いてナリングニンの合成に必要な5つの植物遺伝子を持つ酵母ベクターを構築した。酵母株の選抜のために、酵母ゲノム中に存在するグルコシルトランスフェラーゼをコードしている遺伝子を調べた。その結果、8つの遺伝子が存在し、これらの中でATG26遺伝子のみが植物での糖鎖修飾に関与するグルコシルトランスフェラーゼと相同性があった。このATG26遺伝子ノックアウト酵母、及び、この親株を用いてナリングニンの合成の比較を行った。2種の酵母株の培養液中からの収量を比較したところ、ノックアウト酵母を用いた方がナリングニンの収量が大幅に増加することが分かった。

E-18 出芽酵母における *CEN5-HIS3* 間の部位特異的組換えの効率上昇変異株の解析

○柳本 敏彰、神原 将希、松崎 浩明、秦野 琢之(福山大・生命工・生物工)

真核生物の細胞核内には、染色体 DNA が非常にコンパクトに収納されている。我々は、染色体の核内収納メカニズムを、*CEN5-HIS3* 間の組換え効率が上昇した HCH6 変異株を用いて解明しようとしている。既に、HCH6 変異株は、セントロメアの核内配置が異常であることが示唆された。また、この変異株は温度感受性で、高温で cell integrity に異常を示した。この時、細胞は増殖を停止して丸く肥大し、アクチンやキチンの局在が消失し、細胞極性が失われた。核内配置と cell integrity の異常が同時に起こることから核内配置と細胞内配置の間にクロストークが存在する可能性が示唆された。まず、HCH6 株の変異の原因遺伝子を解明するため cell integrity 経路で働く遺伝子の破壊株の温度感受性を調べた結果、*mpk1Δ* 株、*ssd1Δ* 株、および *bck1Δ* 株の3株が温度感受性を示した。これら3株のうち、*ssd1Δ* 株のみが HCH6 変異株と交雑しても温度感受性を回復しなかった。さらに、HCH6 変異株へ *SSD1* を導入することで温度感受性が回復した。これらの結果から、*SSD1* が HCH6 株の変異に大きく関与している可能性が示唆された。さらに、組換え効率は *SSD1* 導入株では低下し、*ssd1* 破壊株では上昇したことから、*SSD1* が染色体の核内配置にも関与していることが示唆された。

E-19 バイオエタノールの省エネルギー的高効率醱酵システムの開発(4) 澱粉質原料の無蒸煮醱酵系における酵母の醱酵特性に及ぼす初発エタノール濃度の影響

○川村和幸、曾我部 梢、松元信也(高知工科大 物質・環境)

【目的】我々はこれまで、ザイモナス菌はコーングリッツを原料とする無蒸煮醱酵系でも酵母に比べて醱酵速度が速いことを明らかにするとともに、ザイモナス菌と酵母を混合醱酵させればより効率的にエタノールを製造できる可能性のあることを示した¹⁾。ここでは、ザイモナス菌を第1槽、第2槽に酵母を用いる2槽式連続醱酵システムに関する基礎研究の一環として、第2槽に流入するモロミのエタノール濃度が酵母の醱酵特性に及ぼす影響について検討した。【方法】無蒸煮並行複式醱酵系に所定量のエタノールと酵母培養液を加えて所定の温度で静置醱酵させた。醱酵モロミは経時的に重量を測定し、減量を炭酸ガス発生量とした。醱酵終了時点で、pH、総酸、エタノールなどを分析した。【結果】①糖のストレスを殆んど受けない無蒸煮並行複式醱酵系で、初発エタノール濃度を7.5%に設定し、38℃という高温で醱酵させると、30℃醱酵の場合に比べ醱酵は顕著に阻害された。②従って、2種類の微生物を使用する本2槽式連続醱酵システムの設計に際しては、第2槽に流入するモロミのエタノール濃度と第2槽の醱酵温度の両面を考慮したシステム条件の最適化が必須である。1)川村ら、農化中四国支部講演会要旨集 p67,68(2006)

E-20 バイオエタノールの省エネルギー的高効率醱酵システムの開発(5) 塩類を添加した澱粉質原料の無蒸煮醱酵系における酵母の醱酵特性に及ぼす醱酵温度の影響

○和田拓也、山下佳朱美、松元信也(高知工科大 物質・環境)

【目的】生澱粉を糖化醱酵させる無蒸煮醱酵法のバイオエタノール製造への採用は省エネルギー化という観点から重要な意義がある。我々は、その無蒸煮醱酵系に塩類を添加して28℃で醱酵させると、醱酵速度が向上することを明らかにした¹⁾。一方、醱酵工程での省エネルギー化策としては高温醱酵があるが、塩類の添加は高温下での酵母の醱酵特性に影響を及ぼす可能性がある。そこで、塩類を添加した無蒸煮醱酵系での酵母の醱酵特性に及ぼす醱酵温度の影響を調べた。【方法】無蒸煮醱酵系に所定量の海洋深層水(DSW)および酵母培養液を加えて、所定の温度で静置醱酵させた。醱酵中は経時的に炭酸ガス発生量を測定した。醱酵終了時点では、pH、総酸、アルコールなどを分析した。【結果】①DSW添加量5,10%のいずれの場合も、試験した28~38℃の温度領域では、醱酵速度は向上した。②醱酵96時間後の成績は28~32℃ではDSW添加5%の場合が最高で、34~38℃ではコントロールが最も良かった。③高温下でDSW添加系の成績が低下したのは、温度と塩のストレスに加えて生成アルコールによって酵母が弱化したためであると考えられた。1)和田ら、農化中四国支部講演会要旨集 p68(2006)

E-21 *Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸耐性に関与する膜タンパク質の解析

○藤井豊弘、井上岳人、吉原望、外山博英、松下一信(山口大農・生物機能)

Acetobacter 属酢酸菌はエタノールを酢酸に酸化する能力に加え、生産した酢酸に対する強い耐性能を有するため食酢の生産に利用されている。*Acetobacter* sp. IFO3283 は酢酸発酵培養条件下で、エタノールを酢酸に酸化するエタノール酸化期、一定期間生育を止める耐性期、生産された酢酸を酸化する過酸化期という複雑な生育ステージを示す。各生育ステージから採取した本菌の膜タンパク質をSDS-PAGEによって比較を行った結果、各生育ステージで発現量の異なるバンドが確認された。さらに、異なるエタノール濃度で酢酸発酵を行った結果からも酢酸濃度が上昇するにつれてエタノール酸化期で発現量の増加するバンドを確認することができた。しかし、膜タンパク質は数が多く解析が困難である。そこで、これらの膜タンパク質を複数の可溶化剤を用いて連続的に可溶化し、SDS-PAGEによる比較を行うことで、対応するタンパク・バンドを特定できる方法確立した。この方法により酢酸生成条件下で発現量が増加した酢酸耐性に関与していると考えられるタンパク質を特定し、現在そのアミノ酸配列を解析している。

E-22 酢酸菌による 5-ケト-D-グルコン酸の高効率生産法

○阿野嘉孝¹、品川恵美子²、外山博英¹、足立収生¹、松下一信¹
(¹山口大農・生物機能、²宇部高専・物質工学)

<目的>5-ケト-D-グルコン酸(5KGA)はキレート剤、食品添加物、バイオポリマーなど多岐にわたる応用が期待される有用中間体である。しかしながらその産業的安定供給が難しく、いずれも実用化されていない。それは2-ケト-D-グルコン酸(2KGA)生成反応が5KGA生成と競合していることが要因に挙げられる。近年、酢酸菌のゲノム情報に基づいた2KGA生成反応阻害による5KGA生産の向上が多数報告されているが、発酵中の生育障害など二次的な障害も観察されている。そこで、本研究では酢酸菌を用いた5KGA生産の高効率生産条件を検討した。<方法と結果> *Gluconobacter* 属酢酸菌の中から、5KGAならびに2KGAの生産性を比較したところ、菌株によって大きな違いがあることが分かった。その中より5KGAを高生産でき、且つ蓄積できる株を選抜し本研究に用いた。5KGAはグルコース(Glc)からグルコン酸(GA)を介して生産されるが、選抜菌株はGlc-GA混合培地では高生産が可能であったが、Glc単独培地では大きくその生産量が低下した。そのため、5KGAならびに2KGA生産に関わる酵素群の酵素学的性質や休止菌体反応による生産性の違いを比較したところ、培養過程の培地pHがその生産性に大きく影響することが明らかとなった。5KGA生産過程の培地pHを厳密に制御することによって、約50%の変換率を90%近くにまで向上させることができた。

E-23 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の AI-2 シグナルはバイオフィーム形成に関与する

○松永哲郎¹、加藤昭夫¹、勝本哲史²、野村由一郎²、恵比須繁之²、阿座上弘行¹
(¹山口大・農・生物機能、²阪大院・歯・保存)

Eikenella corrodens は歯周病原性細菌の一つであるが、近年アテローム硬化症や心内膜炎、髄膜炎など全身疾患の病原菌としても問題となっている。最近、我々は本菌が単一で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、クオラムセンシングにより病原性がコントロールされることが報告されている。そこで、本菌にクオラムセンシングが存在するか、またバイオフィーム形成と関わりがあるかを調べた。

Vibrio harveyi をセンサー株としたアッセイにより、*E. corrodens* 培地上清から AI-2 が検出された。AI-2 生産のキー酵素をコードする *luxS* 遺伝子をクローニングし、*luxS* 遺伝子の欠損株を作成した。バイオフィーム形成量を静置系のアッセイで調べたところ、欠損株ではバイオフィーム形成が約 1.3 倍増加した。一方、フローセルを用いて作らせたバイオフィームを観察したところ、欠損株ではバイオフィーム内の死菌の割合が高くなっていた。また、走査電顕による観察では、欠損株のバイオフィームは親株に比べて構造が疎になっていた。これらの結果から、AI-2 を介したクオラムセンシングが本菌のバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

E-24 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサーの精製と解析

○久本達格、赤壁善彦、加藤昭夫、阿座上弘行(山口大・農・生物機能)

Eikenella corrodens は歯周病原性細菌の一つで、菌体表層レクチンがその歯周病原性に関わっている。最近、我々は本菌が単一でバイオフィームを形成し、その形成にオートインデューサー2(AI-2)を介したクオラムセンシング(QS)が関与することを示した。本研究では、QSと歯周病原性との関係を明らかにするために、培養上清から AI-2 を精製し、その機能を解析することにした。

Vibrio harveyi をセンサー株としたアッセイにより、*E. corrodens* 培養上清から AI-2 が検出された。AI-2 の生産は対数増殖期中期から後期に見られ、定常期に入ると急速に AI-2 量が低下した。培養上清から酢酸エチルにて抽出した画分を、逆相クロマトおよび薄相クロマトによってほぼ単一に AI-2 が精製できた。*V. harveyi* を発光させる画分が得られたので、これを *E. corrodens* の培養液に添加し、バイオフィーム形成への影響を調べた。その結果、*luxS* 欠損株に AI-2 を添加したところ、バイオフィーム形成の増加が見られた。したがって、*E. corrodens* のバイオフィーム形成が LuxS を介した QS によって制御されることが示唆された。

E-25 食中毒細菌の付着阻害物質と阻害機構に関する研究

○下津智志¹、川口穰²、下八重御明¹、本城賢一³、宮崎敏³(九大院生資環¹、九大農²、九大院農³)

生食用野菜・果実による食中毒の発生が懸念されている。細菌が野菜表面に付着し、バイオフィルムを形成すると殺菌および除菌は困難となる。

食中毒細菌の除菌法または再付着防止法開発のため、本研究は、付着阻害物質のスクリーニングおよびその阻害機構の解明を目的に行った。

サルモネラ食中毒の原因菌として分離頻度の高い *Salmonella enteritidis* (SE) を用いて、まず、SE のマイクロプレートへの最適付着条件について検討した。その結果、SE は低濃度の蛋白分解物存在下において最も良く付着した。

次に、種々の安全性の高い食品添加物の中から SE の付着阻害物質のスクリーニングを試みた。その結果、プロタミンやアナトー色素、脂肪酸エステル類などが SE のマイクロプレートへの付着を強く阻害した。脂肪酸エステルでは、脂肪酸の炭素数が増大するにつれて、付着阻害効果も増大した。

そこで、付着阻害機構解明のため、付着阻害物質の SE に対する抗菌力を調べたところ、プロタミンを除き、付着阻害効果と抗菌力の相関は認められなかった。

E-26 *L. monocytogenes* の分類と制御に関する研究

○藤原久美子¹、原口敬寛²、樋脇 弘³、本城賢一⁴、宮本敬久⁴

(九大院生資環¹、九大農²、福岡市保環研³、九大院農⁴)

Listeria monocytogenes (LM) は食品を介して人に感染する。現在、LM の分類は血清型および PFGE パターンにより行われているが、感染源の特定や感染経路の解明のためには、より詳細かつ簡易迅速な分類法が必要である。また、全ての LM で病原性が高いわけではないが、現在用いられている検出法は全ての LM が検出対象となっており、食品の有効利用のためには病原性の高い株のみを検出できる方法の開発が望まれている。本研究では、本菌の病原遺伝子の遺伝子型による分類を行い、臨床株と同様に病原性の高いと思われる菌株を特異的に検出できる塩基置換検出法の開発を試みた。我が国および韓国の食品・環境および野生動物から分離された LM 161 株および我が国の臨床由来株 31 株について本菌の病原遺伝子の一部である *hlyA*, *plcA*, *inlA* および *clpC* 遺伝子の内部塩基配列を決定し、塩基置換に基づく分類を行った。その結果、*hlyA* で 12 群、*plcA* で 30 群、*inlA* で 28 群、*clpC* で 17 群に分類された。次に、臨床株に特異的な一塩基置換部位を同定し、サイクリングプローブ法を用いた Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 分析による検出を試みた。これにより、臨床 1/2a 株は *hlyA* 遺伝子内の 1 ヶ所の一塩基置換部位、臨床 1/2b 株および 4b 株は *clpC* 内の 2 ヶ所の一塩基置換部位を検出するサイクリングプローブ法により検出可能であった。

E-27 Cell morphology under sE activation and oxidative stress in *Escherichia coli*

○Rashed Noor¹, Hiroyuki Tachino², Masayuki Murata¹, Junko Makino², Mamoru Yamada^{1, 2}(¹Appl. Mol. Bio-Sci., Grad. Sch. of Med., Yamaguchi Univ., ²Dep. of Biol. Chem., Fac. Agri., Yamaguchi Univ.)

In *Escherichia coli*, accumulation of unfolded extracytoplasmic proteins due to heat shock or other stresses triggers the elevation of the active sE (encoded by *rpoE*) level, in which RseA and RseB, encoded by the *rpoE-rseABC* operon, are involved in addition to DegS and YaeL proteases. The active sE expresses the sE-regulon and directs the lysis of living but non-culturable cells accumulated in early stationary phase. Our previous studies revealed that such damaged cells have been significantly lysed in an *rseA*-mutant strain with increased expression of *rpoE*. Here, we performed the time-course study of the cell morphology using the transient expression system of *rpoE* under the oxidative stress. Cell morphological analysis under fluorescence microscope revealed that about half of the cells became filamentous 1.5 h after *rpoE* was induced in early stationary phase. Electron micrograph of the same strain showed the lysis 24 h after *rpoE* induction. In separate experiments, lysis in the liquid culture was enhanced in the *katE* (encoding catalase) background, and further enhancement of the lysis in the strain was observed in the presence of hydrogen peroxide. These results were similar to those with the *rpoS* mutant, suggesting that the enhancement of lysis by the *rpoS* mutation is due to the reduced expression of *katE*.

E-28 出芽酵母の Ca^{2+} シグナル伝達におけるアポトーシス誘導因子 Stm1 の機能

○小丸山匡政、町田朋大、水沼正樹、宮川都吉(広島大学先端研)

(目的)出芽酵母 *Zds1* は、*CLN2*(G1 サイクリン)および *SWE1*(細胞周期エンジン阻害因子)の転写レベルの抑制因子である。*zds1* 破壊株は Ca^{2+} 感受性で、 Ca^{2+} 依存的異常形態および G2 期遅延を伴う。これは培地 Ca^{2+} により細胞内 Ca^{2+} が上昇、 Ca^{2+} シグナル伝達経路の活性化による。 Ca^{2+} シグナル伝達経路による細胞増殖制御の詳細および生理的意義を明らかにする目的で、*zds1* 破壊株の Ca^{2+} 感受性を抑圧する多コピーサブレッサーを取得した。このスクリーニングでアポトーシス誘導因子 *STM1* が取得されたことに注目し、 Ca^{2+} シグナル伝達系における *STM1* 機能の解析を行った。

(結果) DNA 結合タンパク質 Stm1 は、テロメア DNA 結合タンパク質 Cdc13 と結合し、テロメア構造維持機能を有する。Stm1 は他にもリボソームと相互作用を持ち、アポトーシス誘導能を有することが知られる。*STM1* 高発現により、*zds1* 破壊株が示す Ca^{2+} 感受性および形態異常が抑圧されることが確認されたことから、Cln2 たんぱく質レベルを Western 解析により調べた結果、表現型の抑圧は *STM1* 高発現により Cln2 分解が促進されるためであることが明らかになった。さらに、テロメアサイレンサー *SIR3* と *STM1* の遺伝学的関係の解析から、*SIR3* が *STM1* を負に制御するモデルが示された。

E-29 酵母のタンパク質品質管理機構におけるカルネキシンの役割

○松尾亮平、山下祐一郎、上原正義、加藤昭夫、阿座上弘行(山口大・農・生物機能)

生物には、正しく構造形成したタンパク質だけを小胞体から分泌経路へと導き、不良タンパク質を細胞から除去する品質管理機構が備わっている。この機構の中で、まだ構造形成していないタンパク質を小胞体に留め、他の分子シャペロンと協同して構造形成を促進するのがカルネキシンである。しかし、出芽酵母においてカルネキシンホモログ Cne1p が機能的であるかどうかは疑問視されていた。我々は、不安定型糖タンパク質の CNE1 欠損酵母での発現が野生株に比べて多いことを明らかにし、酵母においても哺乳類と同様の品質管理機構が行われていることを提唱してきた本研究では、酵母の Cne1p の品質管理機構における役割を調べた。

c-myc タグをつけたリゾチームを酵母で発現させたところ、不安定型のリゾチームはほとんど発現しなかったが、CNE1 欠損酵母では発現が増加した。このことより、タグなしの場合と同様に品質管理機構による分解が示唆された。そこで、その細胞内の局在を蛍光標識抗 c-myc 抗体を用いて調べたところ、野生型酵母では小胞体からゴルジ体の輸送経路に局在が観察されたが、CNE1 欠損酵母では局在が変化していた。次に、Flag タグを付加させたカルネキシンを共発現させ、共免疫沈降によりカルネキシンとリゾチームの相互作用を調べた。その結果、不安定型リゾチームとカルネキシンの相互作用が観察された。これらの結果から、酵母のタンパク質品質管理機構において Cne1p が重要な働きをすることが示唆された。

E-30 鶏卵白アルブミンの folding における糖鎖付加の役割

○伊藤一成¹、石丸隆行²、岸本崇²、松富直利²

(¹山口大院・医・生体情報、²山口大・農・生物機能)

[目的] 糖鎖付加部位を 2 ヶ所(Asn-292, Asn-311)持つ鶏卵白アルブミン(OVA)は、卵白中ではモノグリコシル型(Asn-292)としてのみ存在している。本研究では酵母発現系を用いて、糖鎖の役割を解明する事を目的とした。

[結果・考察] Asn-292 に糖鎖を持たない変異体 N292Q, N292/311Q の分泌量が激減した。しかし、その変異体は細胞内では野生型と同程度発現していた。この分泌量の低下は、N292Q, N292/311Q の構造が野生型に比べ異なっていたこと、構造不安定変異体が分泌されないことから、細胞内で正確な folding が出来ないため、分泌に先立って分解されていることが示唆された。糖タンパク質の folding に関与する分子シャペロンであるカルネキシンを欠損した酵母で変異体の分泌を試みたところ、野生型の分泌量は N292Q や N292/311Q と同程度にまで低下した。カルネキシン欠損株においても細胞内での発現は変わらなかった。これらの結果から、OVA の Asn-292 への糖鎖付加は、合成後の folding に重要な役割を果たしていると考えられた。

F-1 トラフグ 80S リボソームタンパク質(RP)アイソフォーム遺伝子群の発現解析および分子系統解析

○山口健一、小田健太、小田達也(長崎大・水産)

【目的】我々は、トラフグ骨格筋80Sリボソームの大サブユニットから組織普遍的RP(L3)のアイソフォームである骨格筋特異的RP(L3L)を最近見出した。本研究では、脊椎動物に共通したRPアイソフォーム遺伝子の種類および発現特異性を調べるため、脊椎動物で最小のゲノムサイズをもつトラフグをモデルとして、RPアイソフォームの機能遺伝子の探索と各種組織における発現解析、並びに分子系統解析を行った。【方法】ラット肝RPをクエリー配列としたBLAST検索により、トラフグのゲノムデータベース(JGI ver4.0)およびESTデータベースから、RPアイソフォーム遺伝子を探索した。RPアイソフォーム遺伝子の各種組織における転写発現はRT-PCR法により解析した。分子系統解析は、CLUSTALXおよびPAUP4.0を用いた近隣結合法により行った。【結果】トラフグには、L3L遺伝子以外にも少なくとも6つのRPアイソフォーム遺伝子(S17L, S27L-1, S27L-2, L5L, L7L, およびL22L)が存在し、これらは組織普遍的に発現するRPパラログ遺伝子と比較して、骨格筋、皮膚、および脳での発現レベルが高いことが明らかとなった。L7LとL22Lのオースログ遺伝子は、L3Lと同様に、ヒトを含めた他の脊椎動物にも広く存在することから、これらRPアイソフォーム遺伝子群は、脊椎動物の特定の組織における翻訳において重要な機能を提供するものと考えられる。

F-2 線状ファージの感染による歯周病原性細菌のゲノム再編と病原性の発現

○仲行あゆみ、加藤昭夫、阿座上弘行(山口大・農・生物機能)

Eikenella corrodens は歯周炎患者の病変ポケットから頻繁に分離され、無菌ラットへの単一感染でも重度の歯周疾患を惹起することが確認されている歯周病原性細菌の一つである。我々は本菌の菌体表層に N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)に特異的なレクチン様の付着因子が存在することを明らかにし、これが本菌の歯周病原性に大きく関与することを示してきた。

最近、我々は臨床分離株の一つに約8.7kbの線状ファージを発見し、その存在とレクチン活性の相関を示した。ファージ上にコードされたリコンビナーゼがゲノム上のタイプ4線毛遺伝子領域に組換えを起こすことによって、本菌の GalNAc 特異的レクチン活性を増加させることを示した。また、このリコンビナーゼの作用によって菌体表層の線毛構造が消失し、コロニー形状の変化が見られた。さらに、この組換えによってバイオフィーム形成量や増殖速度の増加、溶血活性の増加なども見られた。これらの結果から、1073 株はファージ感染によりゲノムの組換えが部位特異的に起こり、病原性を増し、口腔内でより定着しやすくなるようになったのではないかと推察した。

F-3 *Bacillus subtilis* 168 の P 型トランスポーター *zosA* 遺伝子の機能解析

○田村 隆, 福原高裕, 小林和夫*, 小笠原直毅*, 稲垣賢二

(岡山大院 自然科学, *奈良先端大院・バイオ)

【目的】乳酸菌 *Enterococcus hirae* の銅イオン代謝オペロン *copYZAB* は微生物の銅代謝モデルとされてきたが、ゲノムが解読された微生物の銅代謝オペロンは *copYAZ* オペロンを持ち、銅の吸収に関わる遺伝子が見つからない。本研究では *B. subtilis* 168 を用いて銅取込遺伝子の同定を検討した。【方法・結果】銅キレート剤 DL-ペニシラミンを 0.3-0.5% 添加した最少培地で *B. subtilis* 168 は銅欠乏ストレスに高感受性を示した。この条件で DNA マイクロアレイ解析とノックアウト株のスクリーニングした結果、銅欠乏ストレスに応答する遺伝子 *zosA* を同定した。遺伝学解析とバイオインフォマティクスから *zosA* は亜鉛の取込みに関わる P 型トランスポーターと報告されていた¹⁾。しかし *ZosA* 欠損株はペニシラミンなしの培地でも銅欠乏ストレスに顕著な生育遅延を示したが、亜鉛欠乏培地では生育阻害を示さなかった。*ZosA* は亜鉛ではなく銅の取込に関わると思われる。

1) A. Gaballa, et al, Mol Microbiol 45, 997-1005 (2002)

F-4 *B. cereus* 嘔吐毒合成酵素遺伝子の発現に関する研究

○古澤麻帆1, 林沙弥香1, 本城賢一2, 宮本敬久2(九大院生資環1, 九大院農2)

B. cereus が産生する嘔吐毒(セレウリド)は、その構造や機能から、非リボソーム性ペプチド合成酵素 (NRPS) によって合成されると推定されたため、この点に注目し、これまでにセレウリド合成酵素と推定される構造遺伝子を含む合計約 18 kb の塩基配列を決定した。本研究では、この推定セレウリド合成酵素遺伝子の発現機構の解明、およびセレウリド合成酵素の同定を目的とした。

RT-PCR による遺伝子転写量の比較から、セレウリド合成酵素遺伝子転写量の違いにより、セレウリド産生性が異なると考えられた。そこで、推定セレウリド合成酵素遺伝子より上流域のクローニングを行い、転写制御に関わる因子を同定している。また、転写開始部位の推定を SMARTTM cDNA Library Construction Kit を用いて試みている。さらに、セレウリド合成酵素タンパクを同定するため、SDS-PAGE 分析により分析した結果、セレウリド産生株にのみ特異的な2種の高分子量タンパク質を見出した。これがセレウリド合成酵素である可能性があるため、この高分子量タンパク質の V8 プロテアーゼ処理断片の内部アミノ酸配列の決定によりセレウリド合成酵素の同定を試みている。

F-5 *B.thuringiensis* テンペレートファージ KK-88 にコードされた RecA*の性状

○興祐祐基, 平石拓也, 副島郎子, 加藤富民雄, 神田康三(佐賀大・農)

B.thuringiensis 溶原化ファージ KK-88 ではこれまでのゲノム解析において、ファージゲノムの染色体組込み部位近傍には組込み酵素をコードすると考察される ORF1 の存在が明らかにされている。さらに ORF1 にコードされるタンパク質はその塩基配列に基づいた推定アミノ酸配列から、*B.subtilis* の *recE4* 由来である RecA 類似体(RecA*)と高い相同性を持つことが確認された。そこで本研究では、ファージゲノム上の *recA** を単離・発現させ、その酵素活性について検討した。

RecA 活性の検討は本酵素が持つ一本鎖 DNA 交換活性の *in vitro* 実験で行った。一本鎖 DNA 交換反応は ϕ x174 の線状 dsDNA と相補的な環状 ssDNA を基質として使用し、ATP 存在下で RecA* と反応させた後、開環 dsDNA の形成をアガロースゲル電気泳動で検索した。その結果、KK-88 由来の RecA* は対照とした大腸菌由来の RecA と同様の DNA 交換活性を示すことが認められた。

修復酵素であり、ファージ誘発に関与する RecA がファージゲノムの染色体組込みに関与しているという報告はこれまでに無い。そこで、今回の研究結果から、ファージ KK-88 は RecA の相同組換えを利用した新規溶原化様式を持つことを強く示唆した。

F-6 好熱菌由来ビオチン生合成系酵素に関する研究 -好熱性 DTB 合成酵素のクローニングと酵素活性検出-

○中村昌義, 窪田高秋, 和泉好計 (鳥取大工・生応工)

【目的】ビオチンはグルタミン酸発酵の生産制御因子としてよく知られているが、生体内では各種カルボキシラーゼの補酵素として、微生物だけでなく高等生物にとっても必須の生体内物質であり、現在、医薬品・化粧品・飼料添加物として広く利用されている。我々は今まで全く報告の無い好熱菌のビオチン生合成酵素に着目し、高温でのビオチン生産に適用できる好熱性ビオチン生合成酵素の探索を行っている。今回、ビオチン生合成経路において、ビオチン前駆体であるデチオビオチン (DTB) の合成反応 ($7,8\text{-ジアミノペラルゴン酸} + \text{CO}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{DTB} + \text{ADP} + \text{Pi}$) を触媒する酵素 (BioD) について好熱菌ゲノムからの遺伝子探索と組換え酵素の特性評価を行ったので報告する。【方法と結果】ゲノムデータベースからビオチン生合成酵素遺伝子を有する好熱菌を探索した。それらのゲノムから *bioD* と推定される遺伝子を PCR 法で増幅し、大腸菌内で組換え酵素として発現を試みた。その結果、超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 BioD の可溶性画分中への発現を確認したため、これを精製して諸性質を明らかにした。その結果、反応至適温度は 90°C でこれまで報告のあった BioD と比較して最も高い値を示した。また、 50°C で 2 時間の熱処理後もほぼ 100% の活性を保持していた。

F-7 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ヒドロゲナーゼの転写及び機能解析

○吉村 太郎、中山 俊一、吉野 貞蔵、古川 謙介(九大院生資環・生機科)

【目的】アセトン・ブタノール菌の代謝においてはカーボンフローと共にエレクトロンフロー制御も重要である。*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ではこれまでに水素取込型ヒドロゲナーゼ (*hupCBA*) のクローニング及び機能解析がなされ、本ヒドロゲナーゼの抑制がエレクトロンフロー制御、ひいてはソルベント生産に影響を及ぼすことが示された。今回、さらに全ゲノム配列より N1-4 が有する全ての推定ヒドロゲナーゼを抽出し、その転写発現及びアンチセンス RNA 法を用いた機能解析を試みた。

【結果】N1-4 全ゲノム配列からヒドロゲナーゼを検索した結果、本菌は既知の *hupCBA* 遺伝子の他に5つの推定 Fe-only hydrogenase と1つの推定 Ni-Fe hydrogenase を有していることが明らかとなった。これらの遺伝子においてノーザンブロット解析を行った結果、全ての遺伝子の転写発現が確認され、その発現時期により初期型、後期型、構成型の三種類に分類した。これら三種類のヒドロゲナーゼの生理的な機能を解析するため、アンチセンス RNA 法による遺伝子発現抑制を試みた。現在これらの形質転換体を取得し、その機能を解析中である。

F-8 *Bacillus thuringiensis* が産生する細胞損傷タンパク質変異体ライブラリーの解析

○小川和也、中島穰太郎、平尾彬奈、川野香、木村まゆみ、木庭唯、千菊夫¹、武部聡²、山際雅詩、早川徹、酒井裕 (岡山大学院・自然科学研究科、¹信州大・農、²近畿大・生物理工)

Bacillus thuringiensis が産生する殺虫蛋白質は微生物農薬として世界中で利用されている。一方最近では、殺虫活性を示さず、ヒトの癌細胞に対して強い細胞損傷活性を示すタンパク質(parasporin)を産生する *B. thuringiensis* 菌株も報告されている。*B. thuringiensis* MM50G2 株はその一つであり、この菌株に由来する MM29kD はヒト白血病ガン細胞(Jurkat 細胞)に強い細胞損傷活性を示す。

本研究では MM29kD の機能構造を明らかにするため、MM29kD のランダム変異体ライブラリーを構築した。N 末端側半長に変異を含む 73 クローンと、C 末端側半長に変異を含む 78 クローンが得られ、これらを解析した。その結果、活性上昇変異株が C 末端側ライブラリーから 10 クローン、N 末端側ライブラリーから 1 クローン発見された。これらは多重変異を含んでいたため、単一変異のみを含む変異体を構築、解析した。その結果、特に T179S、F180Y、F180L、K203R、Y220H を含む変異体で活性の上昇が検出された。このことから MM29kD の T¹⁷⁹~Y²²⁰ 領域には活性に重要な機能構造が存在すると考えている。

F-9 分裂酵母の *IRE1* ホモログ遺伝子の機能解析

○中井慶輔、小寺美千子、田中直孝、竹川 薫(香川大・農・応用生物)

新たに翻訳された新生分泌タンパク質は粗面小胞体(ER)内で立体構造形成及び糖鎖付加の修飾を受け、ゴルジ体へと運ばれる。その際、異常なタンパク質がER内に蓄積するとUPRと呼ばれるストレス応答機構が活性化される。UPRは分子シャペロンの転写が上昇し、異常なタンパク質が正しい高次構造を形成するように働く。正しい高次構造を形成できないと判断された異常タンパク質はERADと呼ばれる機構によりERから細胞質へ輸送されて分解される。出芽酵母ではERストレスを感知するセンサーの機能を持っているのがIre1と呼ばれるタンパク質で、ERストレスを感知すると*HAC1*転写因子のmRNAをスプライスすることでUPR標的遺伝子の転写が活性化される。分裂酵母ゲノムを検索したところ出芽酵母*IRE1* 遺伝子と相同性の高い遺伝子(*pkk4*; SPAC167.01)が存在することがわかった。そこで本遺伝子の破壊株の諸性質を解析して、本遺伝子産物が分裂酵母のERストレスセンサーの機能を持っているか調べた。*pkk4*破壊株はツニカマイシンやDTTなどのERストレスを誘導する試薬に感受性を示した。さらに分裂酵母において異種分泌タンパク質を発現させたところ、*pkk4*破壊株は野生株よりも強い生育阻害が起こった。これらの結果から分裂酵母*pkk4*遺伝子もUPR-ERAD経路に関与していることが示唆された。

F-10 分裂酵母の3つのユビキチンリガーゼ Pub1-3 の機能解析

○中瀬 舞、細見 昭、田中直孝、竹川 薫(香川大・農・応用生物)

真核細胞においてユビキチン-プロテアソーム系は細胞周期や転写調節を始めとする様々なプロセスに関与している。HECT型ユビキチンリガーゼである出芽酵母のRsp5pは標的タンパク質にユビキチンを付加することでトランスポーターのエンドサイトーシスや転写制御などの多様な役割を果たしている。一方、分裂酵母にはRsp5pと相同性の高いタンパクが3つ存在する(Pub1-3p)。これまでにPub1pはCdc25pをユビキチン化することでG2/M期の移行を制御することが報告されているが、その標的タンパク質などの詳細な解析は行われていない。そこで今回、3つのユビキチンリガーゼの役割や基質を明らかとするために解析を行った。出芽酵母のアミノ酸トランスポーターGap1pは細胞外にアミノ酸が豊富に存在する場合はユビキチン化されてエンドソームへ輸送されるが、飢餓条件下ではユビキチン化を受けずに細胞膜へ輸送されることが知られている。分裂酵母におけるGap1pのホモログタンパク質の局在を観察すると出芽酵母と同じような挙動を示すことがわかった。さらに*pub1*破壊株では栄養が豊富に存在する場合でもGap1pホモログタンパク質は細胞膜上に局在していた。このことより、分裂酵母Pub1pはGap1pホモログタンパク質のゴルジ体でのユビキチン化を行っていることが示唆された。

F-11 分裂酵母のマルチベシキュラーボディ(MVB)形成に関与するタンパク質の解析

○竹川 薫、岩城知子(香川大・農・応用生物)

細胞膜に局在するレセプタータンパク質は、細胞外シグナルを伝えた後にエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、最終的に液胞により分解される。その際、エンドソームにおいて膜の陥入が起こり、レセプターは液胞内部へと輸送される。このメカニズムはマルチベシキュラーボディ(MVB)経路と呼ばれる。出芽酵母の解析からMVB形成にはクラスE Vpsと呼ばれる一群のタンパク質が関与することが明らかになった。一方、分裂酵母ゲノムには出芽酵母クラスE VPS遺伝子と相同性の高い遺伝子が存在するが、これらのホモログ遺伝子の機能については不明であった。そこで我々は分裂酵母のクラスE VPSホモログ遺伝子破壊株を取得し、CPYの液胞への輸送を調べたところ、一部のCPYが細胞外にミスポートしていた。MVBのマーカータンパク質として出芽酵母のカルボキシペプチダーゼS (CPS)にユビキチンとGFPを連結した融合タンパク質(Ub-GFP-CPS)を作成し、野生株に導入したところ、この膜タンパク質は液胞内に局在していた。一方、クラスE vps破壊株でUb-GFP-CPSを発現させたところ、エンドソームと考えられる場所で蓄積して液胞へと輸送されなかった。以上の結果から分裂酵母にもMVB経路が存在し、クラスE vps遺伝子がMVB経路に必須な役割を果たしていることがわかった。

F-12 分裂酵母の有性生殖過程を早進させる *sam* 変異株の解析

○當麻憲一、吉本光平、大渡康夫、片山 諭、川向 誠(島根大・生資科・生命工)

分裂酵母は、栄養源が豊富な条件下では体細胞分裂により増殖するが、栄養飢餓の条件下では異性間で接合を行い、減数分裂、孢子形成といった有性生殖過程へと移行していく。本研究室では、野生株の分裂酵母に変異処理をすることにより、培地の栄養条件とは無関係に有性生殖過程へと移行する *sam* (*sporulation abnormal mutants*: *sam1-9*)変異株9株を単離している。この *sam* 変異株のうち *sam3*、*sam9*は優性変異であり、残り7株が劣性変異である。これまでに *sam* 変異株を解析する過程で、*msa1*、*msa2*を有性生殖の負の調節因子として、*sla1*、*zds1*を正の調節因子として単離し、その機能を報告している。しかし、*sam* 変異の原因遺伝子そのものについては未だ明らかになっていなかった。最近、ほとんどの *sam* 変異体がKCl感受性を示すことを見いだしたので、それを指標として *sam1* 変異体のKCl感受性を回復させる遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、14-3-3をコードする *rad25*を取得した。もう一つの14-3-3をコードする *rad24*の破壊株は *sam* 型の表現型を示すが、*rad25*破壊株は示さないことから *rad25*はサプレッサーとしての働きをもつのではないかと考えた。

F-13 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の硫黄代謝酵素遺伝子の発現制御機構の解析

辻田瑞穂, ○長田 臨, モハメッド・マンシュル, 金尾忠芳, 上村一雄 (岡山大院・自然)

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二価鉄および還元型無機硫黄化合物を唯一のエネルギー源として増殖する化学合成独立栄養細菌である。硫黄酸化経路についてはまだ不明な点が多いが、Ubiquinol oxidase, Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR), Tetrathionate hydrolase (TTH)の関与を明らかにしている。これらの酵素は、硫黄化合物を基質として増殖した際に誘導される。そこで、本研究では、*sqr* 遺伝子の発現を制御している因子の解析を試みた。*A. ferrooxidans* ATCC23270 株のゲノムデータベースを用いて SQR をコードする遺伝子(*sqr*)の上流と下流の遺伝子を解析した結果、*sqr* のすぐ上流に転写制御因子と推定されるタンパク質をコードしている遺伝子 (*TRsqr*)が検出された。この遺伝子の発現を RT-PCR で解析した結果、SQR の発現と同様に硫黄及びテトラチオン酸生育細胞では強く発現していたが、鉄生育細胞ではその発現が弱かった。従って、この制御因子様タンパク質が *sqr* の発現を制御していることが示唆されたため、発現タンパク質による解析を試みたが、大腸菌でこのタンパク質を発現させることができなかった。そこで、*sqr* 上流のプロモーター領域に結合するタンパク質の検出を試みた。解析にはビオチン標識したプロモーター領域 DNA を磁気ビーズに固定化したものを用いた。鉄および硫黄生育細胞の細胞抽出液について検討した結果、TRSQR の分子量(19 kDa)とは異なるタンパク質が検出された。

F-14 脱ハロゲン呼吸細菌の脱塩素化酵素遺伝子群の機能解析

○森田靖之、二神泰基、後藤正利¹、古川謙介²(九大院生資環、九大院農¹、別府大・食物栄養²)

【目的】脱ハロゲン呼吸はハロゲン化合物を最終電子受容体とする嫌気呼吸であり、その過程でハロゲン化合物は脱塩素化酵素(PceA)により脱塩素化される。テトラクロロエチレン(PCE)脱塩素化細菌 *Desulfitobacterium hafniense* Y51 株の PceA をコードする *pceA* 遺伝子の下流には、脱ハロゲン呼吸細菌間で高く保存されている *pceB*、*pceC* および *pceT* 遺伝子が存在する。しかし、それら遺伝子の機能は不明である。本研究では、これらの脱塩素化酵素遺伝子群の機能解明を目的とした。

【方法・結果】ノーザン解析および RT-PCR の結果、*pceA*、*pceB* 及び *pceC* 遺伝子は共転写されること、*pceT* 遺伝子はモノストロニックに転写されることを明らかにした。以上より、これらの遺伝子群が Y51 において機能していることが示された。次に、脱ハロゲン呼吸細菌では遺伝子組換え系が確立していないため、大腸菌を宿主として *pceA*、*pceB*、*pceC* 及び *pceT* の発現を試みた。その結果、PceA は封入体を形成し、可溶化後のリフォーリング PceA は脱塩素化活性を示さなかった。また、*pceB* と *pceC* の発現はともに大腸菌の生育を強く抑制したため、タンパク質を取得できなかった。一方、PceT は、一部可溶性画分にも回収され、組換え体 PceT を精製した。

F-15 糸状菌 *Aspergillus japonicus* が生産する糖質加水分解酵素ファミリー11 キシラナーゼの精製と遺伝子クローニング

○脇山元気、吉原浩司、佐藤香織¹、太田一良¹、林 幸男 (宮崎大工・物質環境化、¹宮崎大農・応生科)

【目的】農産廃棄物に含まれるキシランは、未利用バイオマス資源として、その有効利用が期待されている。糸状菌 *Aspergillus japonicus* MU-2 株は、キシランの主鎖を加水分解するキシラナーゼ (EC 3.2.1.8) を菌体外に産生する。本報では、本酵素を精製し、コードする遺伝子をクローニングした。

【方法および結果】カラス麦製キシランを炭素源として *A. japonicus* を培養し、培養上清から、硫酸塩析、各種クロマトグラフィーを用いてキシラナーゼを電気泳動的に単一に精製した。SDS-PAGE により、精製酵素の分子量は 25.1 kDa であった。精製酵素の N 末端および V8 プロテアーゼ消化ペプチド断片のアミノ酸配列を決定した結果、それらの配列は糸状菌由来の糖質加水分解酵素ファミリー11 (GH-11)のキシラナーゼと高い相同性を示した。内部アミノ酸配列および GH-11 のコンセンサス配列を基にして縮重プライマーを設計し、染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。DIG 標識した約 200 bp の増幅断片をプローブとして、サザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、本酵素をコードする遺伝子は、*A. japonicus* の染色体上に 1 コピー存在する事が示唆された。染色体 DNA からクローニングした 4.5 kbp の *Xba* I 断片を用いて、本酵素の完全長 ORF と周辺の塩基配列を決定した。

F-16 担子菌 *Coprinus cinereus* の菌糸に発現する新規プロテインキナーゼの発現クローニングとその解析

○金子 啓祐、山田 裕介、末吉 紀行、渡辺 彰、麻田 恭彦、亀下 勇(香川大・農・応用生物)
プロテインキナーゼ(PK)はタンパク質をリン酸化することで様々な生命現象を制御する重要な酵素であるが、担子菌キノコにおけるリン酸化を介した情報伝達経路の研究はあまり進んでいない。そこでまず、PK を網羅的に検出する抗体(Multi-PK 抗体)を用いたウエスタンブロッティング(WB)により、担子菌ウシグソヒトヨタケ(*Coprinus cinereus*)から PK の検出を試みた。菌糸から子実体までの各ステージの抽出液を用いて解析したところ、菌糸において顕著に発現が見られ、子実体の成熟に伴って減少した。次に、Multi-PK 抗体を用いた発現クローニングと RACE 法により、菌糸の cDNA ライブラリーから PK に特徴的な 12 ヶ所のサブドメイン配列を含む CoPK032 long (623 アミノ酸)と、そのスプライシングバリエーションと考えられる CoPK032 short (605 アミノ酸)を取得した。CoPK032 long は分裂酵母の Srk1 とアミノ酸レベルで 47%の相同性を示した。また、大腸菌で発現させた CoPK032 long は PK 活性を有していたが、CoPK032 short にはほとんど活性がなかった。CoPK032 long/short に特異的なポリクローナル抗体を用いた WB において、これらの PK は菌糸および子実体初期のみ発現していたので、*C. cinereus* の菌糸ステージで何らかの役割を担っていることが示唆された。

F-17 超好熱アーケア *Sulfolobus tokodaii* のセリン生合成系の解明:ホスホセリンアミノ基転移酵素(PSAT)の機能解析

○清水泰博, 米田 成, 土居克実, 櫻庭 彦, 大崎 久¹(九大院農・遺資工, ²徳大院・ソシオテクノサイエンス)

我々はゲノム情報と酵素機能解析から、超好熱アーケアに特異的な物質代謝系解明を行っている。本研究では *S. tokodaii* における D-3-ホスホグリセリン酸からの L-セリン生合成系に関与する 3 種の酵素の機能解析を進めてきた。既に、*S. tokodaii* のゲノム情報からセリン合成経路の初発酵素である D-3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素の遺伝子ホモログ(ST1218)を見出し、その遺伝子産物の機能を明らかにした。今回は、セリン生合成経路の第二段階の反応であるホスホヒドロキシピルビン酸からホスホセリンの合成に関与するホスホセリンアミノ基転移酵素(PSAT)の機能解析を試みた。まず *S. tokodaii* に PSAT 遺伝子ホモログを探索したが、見出せなかった。一方、大腸菌 PSAT はクラス 5 に分類されるアミノ基転移酵素であり、*S. tokodaii* にそれと同じクラスに分類されるアミノ基転移酵素をコードする ST1217 遺伝子を見出した。さらに、この遺伝子は初発酵素をコードする ST1218 遺伝子と遺伝子クラスターを形成することが判明した。これは、ST1217 遺伝子が PSAT をコードすることを示唆しているため、この遺伝子産物の解析を行った。その結果、大腸菌での遺伝子産物は PSAT 活性を示し、90°C でも熱変性しない高い耐熱性を示した。これらの結果から、ST1218 がコードする PSAT が *S. tokodaii* のセリン生合成系の第2段階の反応に機能することが判明した。

F-18 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* の DNA 複製開始、伸長過程で機能する GINS 複合体について

○吉用武弘、藤兼亮輔、川波美幸、松永藤彦、石野良純(九大院・農)

真核生物の DNA 複製開始過程で働く因子として同定された GINS 複合体は、複製フォークの場においても MCM 複合体、Cdc45 と共に二本鎖解離に働いていると提唱されている。詳細なゲノム解析の結果、アーキアにおいても GINS のホモログが存在することが提唱され、GINS 複合体の祖先的な分子ではないかと示唆されている(Makarova, et al. 2005)

我々がモデル生物としている超好熱性アーキア *P. furiosus* には二つの GINS ホモログ候補が存在し、アミノ酸配列上の類似性よりそれぞれ GINS51、GINS23 と名づけた。これらをコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌での組換えタンパク質発現系に供して、タンパク質を生産し高純度の GINS 複合体(PfuGINS)を調製した。PfuGINS は GINS51、GINS23 が 2:2 で安定な複合体を形成した。さらに PfuGINS は GINS23 を介して PfuMCM と結合し得ること、そして *in vitro* において PfuMCM のヘリカーゼ活性および ATPase 活性を促進することがわかった。さらにクロマチン免疫沈降の結果、PfuGINS は対数増殖期の *Pyrococcus* 細胞において複製起点(oriC)領域に特異的に局在するが、その局在性は定常期には見られないことが明らかとなった。

以上のことから *P. furiosus* における PfuGINS 複合体の機能について議論する。

F-19 超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来 DNA リガーゼの構造と機能に関する研究
○上河内 徹、清成 信一、石野 良純(九大院・農)

DNA リガーゼは DNA 複製、修復過程において DNA 鎖上に生じたニックをリン酸ジエステル結合で連結する活性を有する重要な酵素である。これまでの研究より、DNA リガーゼは PCNA (proliferation cell nuclear antigen) と相互作用して自身の DNA 鎖連結活性を上昇させることが知られている。本研究で用いた *Aeropyrum pernix* 由来 DNA リガーゼ(以下 ApeLig)は熱安定性に富み、コファクターとして ATP の他に ADP を用いることができる唯一の DNA リガーゼとして大変興味深い蛋白質である。私達は超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* 由来 DNA リガーゼ(以下 PfuLig)に関する研究結果を基に、ApeLig と PCNA の相互作用部位の同定を試みた。また、アミノ酸配列を比較すると、ApeLig は他種のアーキア由来 DNA リガーゼに比べて N 末端が 17 残基長い。この特徴が ApeLig の熱安定性に関与するかもしれないと考えられたので、私達は N 末端を 17 残基欠損させた変異体 ApeLig を作成し、その熱安定性を wild type と比較した。更にこれらの機能的な特徴を構造面から考察するために、私達は ApeLig の結晶化を試みた。現在、X 線構造解析に向けて良質の結晶の作成に取り組んでいる。

F-20 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* における塩基除去修復系の酵素学研究
○内村真伊子、清成信一、石野良純(九大院・農)

生物は紫外線や自らのエネルギー代謝系から生じる活性酸素種などの外的、内的要因によって絶えず様々な種類の DNA 損傷を受けている。ヌクレオチドの塩基部分がアルキル化や酸化などの化学修飾を受けることによって生じる損傷塩基は塩基除去修復系によって取り除かれる。好熱性細菌や好熱性アーキアが生育する高温環境下では常温性の生物に比べてシトシンの脱アミノ化によるウラシルの生成(C→U)が高頻度に生じることが知られているが、好熱菌が有するウラシル塩基除去酵素(uracil DNA glycosylase, UDG)は、常温生物のものとは異なるアミノ酸配列により、別のファミリーとして分類分けされている。

我々は *Pyrococcus furiosus* におけるウラシル除去修復機構の詳細を解明しようと考え、UDG (PfuUDG) の構造と機能を理解するために、遺伝子クローニングおよび大腸菌を用いた発現、精製を行った。興味深いことに PfuUDG は DNA ポリメラーゼの連続移動性を補助する因子として知られる PCNA (proliferating cell nuclear antigen) と相互作用することによってその酵素機能が活性化されることが判明した。また各種の変異体解析から PfuUDG の PCNA 結合部位の同定に成功した。今後は UDG から始まるウラシル塩基の除去とその後の修復過程に関わる酵素群が PCNA と共役して働いているのかということを中心に解析していきたいと考えている。

F-21 高圧力に耐える深海微生物 RNA ポリメラーゼの性質
○仲宗根 薫(近畿大・工、生化工)

深海由来好冷好圧細菌 *Shewanella violacea* DSS12 株は、8°C、300 気圧に生育至適を有する、低温・高圧の深海環境に適応したグラム陰性細菌である。大気圧下に適応している多くの微生物にとって高圧条件は、ストレス条件としてその増殖には負の方向へ働きかける一方、深海環境に適応した好圧性細菌には、高圧環境はむしろ好ましい状態であり、大気圧条件下こそ深海微生物にとってストレス環境であることが、これまでの増殖条件等のデータから推察されている。本研究では、深海微生物 RNA ポリメラーゼに着目し、その耐圧性を、転写活性及びサブユニット解離を指標として、大腸菌との比較解析を行った。

精製された両者の RNA ポリメラーゼを、100MPa、30 分間の高圧処理を行ったところ、大腸菌 RNA ポリメラーゼは、大気圧下と比較し 60%(40%の低下)の転写活性を示した。一方深海微生物 RNA ポリメラーゼは大気圧下と比較しても転写活性の変化は見られなかった。この解析結果は、深海微生物 RNA ポリメラーゼが深海環境に適応していることを明確に示すものであり、続いて高圧2次元電気泳動法を用いて、両菌株の RNA ポリメラーゼのサブユニット解離を観察した。

F-22 高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* *rrnB* 破壊株の取得とその遺伝学的解析

○前田 豊、荒下 智行、仲宗根 薫(近畿大・工、生化工)

塩田から分離され、三角形の特異な形態を有する *Haloarcula japonica* TR-1 株は、至適塩濃度 20% の高度好塩古細菌である。系統分類解析を目的とした 16S rDNA の解析において、*H. japonica* にはお互いに配列の異なる 16S rDNA (A 及び B) が存在し、それら相同性の差は 5% (通常の差異は 1% 未満) と大きな違いを示した。これは、少なくともヘテロなリボソームの存在 (リボソーム多様性の概念) を示唆すると同時に、「一種の細胞に一種のリボソーム」という概念から対立する考えであることを示している。そこで、染色体上の *rrn* オペロンを破壊し、解析を行な逆遺伝学的アプローチにより本菌株 *rrnB* オペロン破壊株の作成を試みた。

まずはじめに本菌株遺伝子ライブラリーのスクリーニングによる *rrn* オペロン及びその周辺領域の構造解析を行った。その構造情報に基づき、*rrnB* オペロンの上流及び下流域の一部を SOE-PCR により連結させた後、シヤトルベクター pWL102 に組み込むことにより、ダブルクロスオーバーで相同組換えが可能な遺伝子破壊用ベクター pDRB を構築した。これを *H. japonica* に導入し、*rrnB* 破壊株を得た。現在、遺伝子破壊株の生理学的特徴を得るための実験を行っており、その実験経過も併せて報告したい。

F-23 高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* RNA ポリメラーゼの Two-hybrid 法によるサブユニット間相互作用の解析

松味 弘也、下浦 洋祐、仲宗根 薫(近畿大・工、生化工)

高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株は生育至適塩濃度が 20% の *Haloarcula* 属に分類される古細菌である。一般的に好塩性微生物の持つ遺伝子は高濃度の塩環境下で制御される遺伝子群の存在が示唆されているものの、その詳細な研究例は少ない状況にある。こうした背景から好塩性微生物の遺伝子発現機構の解明、また耐塩性・好塩性酵素の生産を目指し、RNA ポリメラーゼサブユニット遺伝子のクローニングを開始した。これまでに本菌株の RNA ポリメラーゼは 10 種以上のサブユニットから構成されていることが明らかとなっており、現在までにいくつかの RNA ポリメラーゼサブユニット遺伝子の構造解析及び大腸菌における高発現を行った。またそれらの試験管内再構成のための情報とすべく、Two-hybrid 法を用いてサブユニット-サブユニット相互作用解析を行った。

サブユニット遺伝子の大腸菌における高発現においては pCold ベクターを用い、精製には His-tag 精製法を用いた。RNA ポリメラーゼサブユニット間相互作用の解析においては、BacterioMatch II Two-hybrid system を用い、Bait 及び Target プラスミドを構築した。これらのプラスミドを用い、His-欠損最少培地における相互作用解析を行った結果、いくつかのサブユニット間における相互作用が確認されたので報告する。

F-24 *ssnA* 相補鎖上に一部重複する新規遺伝子の解析

○長光 博史¹、村田 正之¹、新田 剛²、山田 守^{1,3} (山口大院・医・応用分子¹、徳島大・ゲノム機能研究センター²、山口大・農・生物機能³)

「目的」大腸菌プロモーターライブラリー解析から見出された *ssnA* は、増殖定常期において発現が増加し、その過剰発現により生育阻害が見られることが報告されている(1)。また、*ssnA* 破壊株が定常期初期に野生株よりも非常に多くの小コロニーを形成することや *ssnA* の発現が σ^S によって負に制御されることから、定常期初期の細胞死に関与する可能性が考えられる。*ssnA* 発現調節の解析の際、*ssnA* の一部と重なって逆方向に遺伝子が存在することが示唆された。今回、この遺伝子の解析について報告する。

「方法・結果」*ssnA* のコード領域の 5' 側一部と 5' 非コード領域を含む MluI 断片と *lac* とのオペロン融合体を作製したところ、両向きの組換え体ともにプロモーター活性をもつことが示された。そこで、プライマー伸長法を用いて逆方向の遺伝子の転写開始点を決定し、プロモーター部位を推定した。その結果、本遺伝子の転写開始点は、*ssnA* 転写開始点からおおよそ 100 塩基対下流にあり、両遺伝子は約 100 塩基対の重複領域をもつことを示唆した。本遺伝子にはコード領域がないことから、遺伝子転写産物は sRNA として *ssnA* mRNA と相互作用していることが予測される。

1. Yamada et al., *J. Bacteriol.*, 181:1838-1846 (1999)

F-25 Auxotrophic mutant screening and genetic engineering of ethanol producing yeast *Kluyveromyces marxianus*.

○Sanom Nonklang, Kumi Nakamura, Ryouta Sakai, Hisashi Hoshida, and Rinji Akada
(Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Med. Yamaguchi Univ.)

Kluyveromyces marxianus grows and produces ethanol at high temperatures. Application of *K. marxianus* for bioethanol production would give a considerable advantage over a conventional yeast *Saccharomyces cerevisiae* for saving cooling cost. To develop *K. marxianus* suitable for bioethanol production or other applications, genetic methods are required. However, gene manipulation methods in *K. marxianus* have not been widely reported. Therefore we constructed the gene manipulation system in *K. marxianus*. Auxotrophic mutants were isolated by UV mutagenesis and conventional replica-plating screening method. The *ura3* auxotrophic mutant was selected on 5-Fluoroorotic acid (FOA) containing plate. Auxotrophic mutants requiring Adenine, Histidine, Lysine, Leucine, Tryptophan, Methionine, Arginine, Serine, Threonine, Isoleucine/Valine and Threonine/Methionine were isolated. To identify some mutated genes, complementation with *S. cerevisiae* genes was carried out. DNA fragments of *S. cerevisiae* genes required for nutrient biosynthesis were amplified by PCR and then transformed into their chromosomes. Based on this method we are determining complementation genes for auxotrophic mutants.

F-26 相同組換えを用いた酵母での組換え遺伝子構築法による糖化酵素遺伝子の発現

○堺亮太, Kamonchai Chaaim, 星田尚司, 赤田倫治(山口大院・医系・応分生)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、デンブレンやセルロースといったバイオマス資源から直接エタノールを生産することはできず、まずこれらのバイオマス資源を糖化しなければならない。そこで、酵母に種々の糖化酵素遺伝子を導入し、これらのバイオマス資源からの直接的かつ効率的なエタノール発酵が可能な *S. cerevisiae* の育種を行っている。本研究では、有用酵素を発現させるために、相同組換えを利用する方法を試みた。糖化酵素の ORF とターミネータ・マーカーは PCR 法により一つの融合断片にした後、あらかじめ酵母染色体上の特定の領域 *ura3D0* 領域にプロモータ配列を組込んだ株に、相同組換えを利用して同領域に融合断片を組込んだ。育種過程で得られた株の染色体は種々の遺伝子構築するための PCR 用テンプレートに用いることができる上、構築用ホストとしても用いることができる。導入した糖化酵素のうち、菌糸状酵母 *Saccharomycopsis fibuligera* 由来の α -アミラーゼ *ALP1*、グルコアミラーゼ *GLU1*、そして麴カビ *Aspergillus oryzae* 由来の α -アミラーゼ *TAA* を発現させることに成功した。

F-27 The study on gene(s) responsible for thermotolerance in thermotolerant acetic acid bacteria

○Arpaporn Deeraksa¹, Somporn Moonmangmee², Hirohide Toyama¹, Osao Adachi¹, Kazunobu Matsushita¹ (Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., ²Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand)

Acetobacter strains are acetic acid bacteria, which grow most actively at ca. 30 °C, while the upper temperature limit is 37 °C for most mesophilic strains. Growth properties at high temperature vary from strain to strain, suggesting that tolerance to high temperature may result from a complex genetic background. Thermotolerant *Acetobacter* strains have been isolated from tropical habitats in flowers and fruits of Thailand; these strains are able to grow at temperatures up to 42 °C. The underlying thermotolerance mechanism (i.e., the ability to grow at sublethal high temperatures) has not yet been identified. In this study, the thermosensitive mutants of a thermotolerant *A. tropicalis* SKU1100 were generated using transposon mutagenesis. Two mutants, designated 1-21 and 3-45, which grew poorly at high temperatures (42 °C), as compared with the wild type, were selected and transposon flanking regions were sequenced. The sequence of the *Tn10* flanking region of the 1-21 mutant revealed an open reading frame (ORF) showing a homology to genes encoding a hypothetical protein (48% identity). The downstream sequence of this hypothetical gene is under investigation. In the 3-45 mutant, *Tn10* was located on an ORF encoded with 859 amino acids and exhibits high homology to Na⁺/H⁺ antiporter (77% identity). Plasmid harboring Na⁺/H⁺ antiporter gene could restore growth behavior at high temperature in the 3-45 mutant. Thus Na⁺/H⁺ antiporter gene is suggested to be involved directly or indirectly in thermotolerance in thermotolerant *Acetobacter* strain.

F-28 Analysis of bound quinone in membrane-bound glucose dehydrogenase of *Escherichia coli*

○Golam Mustafa¹, Yoshinori Ishikawa², Kazuo Kobayashi³, Catharina T. Migita¹, Seiichi Tagawa³, Mamoru Yamada^{1,2} (1Dep. of Biol. Chem., Fac. Agri., Yamaguchi Univ., 2Appl. Mol. Bio-Sci., Grad. Sch. of Med., Yamaguchi Univ., 3SIR Osaka Univ.,)

Pyroloquinoline quinone (PQQ) containing membrane-bound glucose dehydrogenase (mGDH) catalyzes the direct oxidation of glucose to gluconate in periplasm and feeds electrons to ubiquinol oxidase via ubiquinone in the respiratory chain of *E. coli*. mGDH possesses two ubiquinone binding sites, QI for bound UQ8 and QII for bulk ubiquinone. Several amino acids including Lys-493, Asp-466 and Asp-354 interact with PQQ in mGDH and bound UQ8 is closely located to PQQ, which has been indicated by pulse-radiolysis analyses. Here, we analyzed the effect of the substitution of these amino acid residues on the content and behavior of radical formation of bound UQ8, and these behaviors were compared with those of purified mGDH from cells lacking UQ8, menaquinone (MQ8) or both of UQ8 and MQ8. Pulse-radiolysis analyses revealed that purified D466N and D466E mGDHs were found to contain almost no bound UQ8. K493R and D354N having an equimolar amount of bound UQ8 showed a stable neutral and anion semiquinone radicals, respectively. EPR analyses showed that the signals for bound ubisemiquinone and menasemiquinone radicals were observed at around 3300 gauss. The signals for both radicals were increased upon oxidation by ferricyanide and the extent of the signal for the menasemiquinone radical was much larger than that of the ubisemiquinone radical in mGDH. These results indicate that the *E. coli* mGDH can accommodate either UQ8 or MQ8 as a bound quinone and both reduced and semiquinone states occur inside it.

F-29 膜結合型グルコース脱水素酵素活性に対する膜電位の影響

○石川宜位¹、高尾佳史²、Golam Mustafa³、松下一信^{2,3}、山田 守^{1,2,3}

(¹山口大院・医・応用分子、²山口大・農・生物機能、³鳥取大連院・生物資源)

[目的] 大腸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH) は、ペリプラズムにおいてグルコースをグルコン酸へ酸化し、電子をユビキノンそしてオキシダーゼへと伝達し膜電位を形成する。しかし、mGDH 単独では膜電位形成能力をもたない。mGDH は、単一タンパクで結合キノン含有することから呼吸鎖初発酵素の良いモデルとなると考えられる。mGDH は N 末端側に 5 個の膜貫通配列からなる疎水領域をもつ。5 回膜を貫通していることから、C 末端側の触媒部位を膜上に固定する機能以外に何らかの作用をもつのではないかと予想される。本研究では、膜電位の酵素活性に対する影響について検討した。

[方法・結果] 精製した mGDH と大腸菌から精製した脂質を用いてプロテオリポソームを作製した。このプロテオリポソームを用いて、膜電位を与えた場合と与えない場合の mGDH 活性を比較した。その結果、膜電位を与えると酵素活性が減少し、グルコースに対する Km 値を高めた。また、別の実験から、N 末端側疎水領域と C 末端側触媒部位との間で S-S 結合が形成されることが示唆された。以上の結果に基づいて、膜電位の酵素活性に対する影響について、N 末端側の役割を含めて考察する。

F-30 大腸菌における DNA 損傷誘導性細胞死の解析

○中村慶子¹、大島 拓²、小笠原直毅²、山田 守^{1,3}

(¹山口大院・医・応用分子、²奈良先端大院・情報科学、³山口大・農・生物機能)

[目的] プログラム細胞死(PCD)は異常な細胞を積極的に除去する機構であり、生物の恒常性維持のために重要である。大腸菌では、ストレスにより生じる傷害細胞の除去機構として、 σ^E (RNA ポリメラーゼサブユニットである σ 因子の一つ)依存性の溶菌機構などが存在する。大腸菌が DNA 損傷を受けた時にも傷害細胞が生じるため、何らかの除去機構が存在すると考えられる。本研究では、大腸菌の DNA 損傷により起こる PCD について検討した。[方法・結果] 大腸菌野生株と *lon* (*SulA* 分解プロテアーゼ遺伝子) 破壊株で、DNA 傷害剤処理による DNA 損傷を与えた時と *sulA* (DNA 傷害修復中、細胞分裂を抑制する蛋白質をコード)を高発現させた時の濁度(OD)、コロニー形成能(CFU)、培地中の蛋白蓄積量を観察し、溶菌の有無を調べた。DNA 傷害剤処理により、OD、CFU ともに減少し、培地中の蛋白量は時間経過に伴い上昇した。また、*sulA* 高発現株においても OD、CFU の減少、また溶菌が観察されたことから、DNA 損傷により、*sulA* が DNA 傷害に伴う溶菌に関与していると示唆された。しかし、*sulA* 破壊株においても DNA 損傷により強い溶菌が観察されたため、*sulA* 依存性の溶菌以外の溶菌経路が存在することが考えられる。

日本農芸化学会 2007 年度中四国・西日本支部合同大会実行委員会

実行委員長：松下一信

実行委員：松富直利（プログラム担当責任者）、滝本晃一（会計担当責任者）、
山田 守（シンポジウム担当責任者）、内海俊彦（会場担当責任者）、
松井健二（懇親会担当責任者）、真野純一（広報担当責任者）、青島 均、
赤田倫治、東 慶直、赤壁善彦、阿座上弘行、星田尚司、藤井克彦

連絡先：〒753-8515 山口市吉田 1677-1

山口大学農学部 松下一信

Tel: 083-933-5858、E-mail: kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

日本農芸化学会中四国支部

支部長：和泉 好計

副支部長：早川 茂

幹事（庶務）：森 信寛、築瀬 英司

幹事（会計）：渡辺 文雄

〒680-8553 鳥取市湖山町南 4 丁目 101 番地

鳥取大学農学部内

TEL : 0857-31-5443（庶務）、FAX : 0857-31-5347（庶務）

日本農芸化学会西日本支部

支部長：桑野 榮一

副支部長：久原 哲

幹事：平島 明法、山田 直隆、松井 利郎

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門内

Tel:092-642-2856（平島明法）Fax:092-642-2858

支部からのお知らせ

中四国支部

○日本農芸化学会中四国支部第 20 回講演会（例会）

開催日：2008 年 1 月 26 日（土）

場 所：徳島大学

世話人：横井川久己男（徳島大学総合科学部）

Tel & Fax：088-656-7267, E-mail：yokoigaw@ias.tokushima-u.ac.jp

○日本農芸化学会中四国支部第 21 回講演会（例会）

開催日：2008 年 5 月 24 日（土）

場 所：岡山理科大学

世話人：滝澤 昇（岡山理科大学工学部）

Tel & Fax：086-256-9552, E-mail：takizawan@dac.ous.ac.jp

○日本農芸化学会中四国支部第 10 回市民フォーラム

開催日：2007 年 9 月 22 日（土）

場 所：高知市文化プラザかるぽーと 小ホール

世話人：沢村正義（高知大学農学部）

Tel：088-864-5184, Fax：088-864-5200, E-mail：sawamura@kochi-u.ac.jp

西日本支部

○日本農芸化学会西日本支部総会および第 273 回講演会

開催日：2008 年 1 月 26 日（土）

場 所：九州大学農学部

○日本農芸化学会西日本支部第 274 回講演会

開催日：平成 20 年 5 月 23 日（金）

場 所：サントリー(株)九州熊本工場

詳しくは支部ホームページを御覧下さい。

中四国支部 <http://web-mcb.agr.ehime-u.ac.jp/jsbbacs/index.html>

西日本支部 <http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/jsbba-west/>

日本農芸化学会中四国支部

〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101

鳥取大学農学部内

2007 年（平成 19 年）9 月 14 日発行