

日本農芸化学会中四国支部
第22回講演会(2008年度支部大会)

講演要旨集

日時：2008年9月12日（金），13日（土）

場所：鳥取大学農学部・共通教育棟

日本農芸化学会中四国支部

日本農芸化学会中四国支部第 22 回講演会 大会日程

9 月 12 日(金)鳥取大学農学部 大講義室

13:30

● 2008 年度日本農芸化学会功績賞記念講演

「微生物による合成高分子の分解・代謝に関する生化学的・分子生物学的研究」

河合富佐子(京都工繊大) 座長 和泉好計 (鳥取大)

14:00

● 支部功労賞授与式

● 支部奨励賞授与式

14:10

● 2008 年度日本農芸化学会支部奨励賞受賞講演

1 「フードポリフェノールの機能性応答バイオマーカーの探究」

伊東秀之(岡山大) 座長 稲垣賢二 (岡山大)

2 「新規酵素 L-ラムノースイソメラーゼを用いた希少糖の生産に関する基盤的研究」

高田悟郎(香川大) 座長 森 信寛 (鳥取大)

● シンポジウム:『植物と微生物の関わり』 座長 山崎良平(鳥取大)

15:00

1 「菌従属栄養植物の菌根共生」

岩瀬剛二(鳥取大)

15:30

2 「菌根菌-植物共生系における相互認識シグナルの解明」

秋山康紀(大阪府大)

16:00

3 「植物病原糸状菌における二次代謝産物生合成と病原性発現の分子機構」

児玉基一郎(鳥取大)

16:30

4 「植物における病原細菌認識と植物免疫誘導の分子機構」

蔡 晃植(長浜バイオ大)

●懇親会 (18:00～20:00 、ホテルモナーク鳥取)

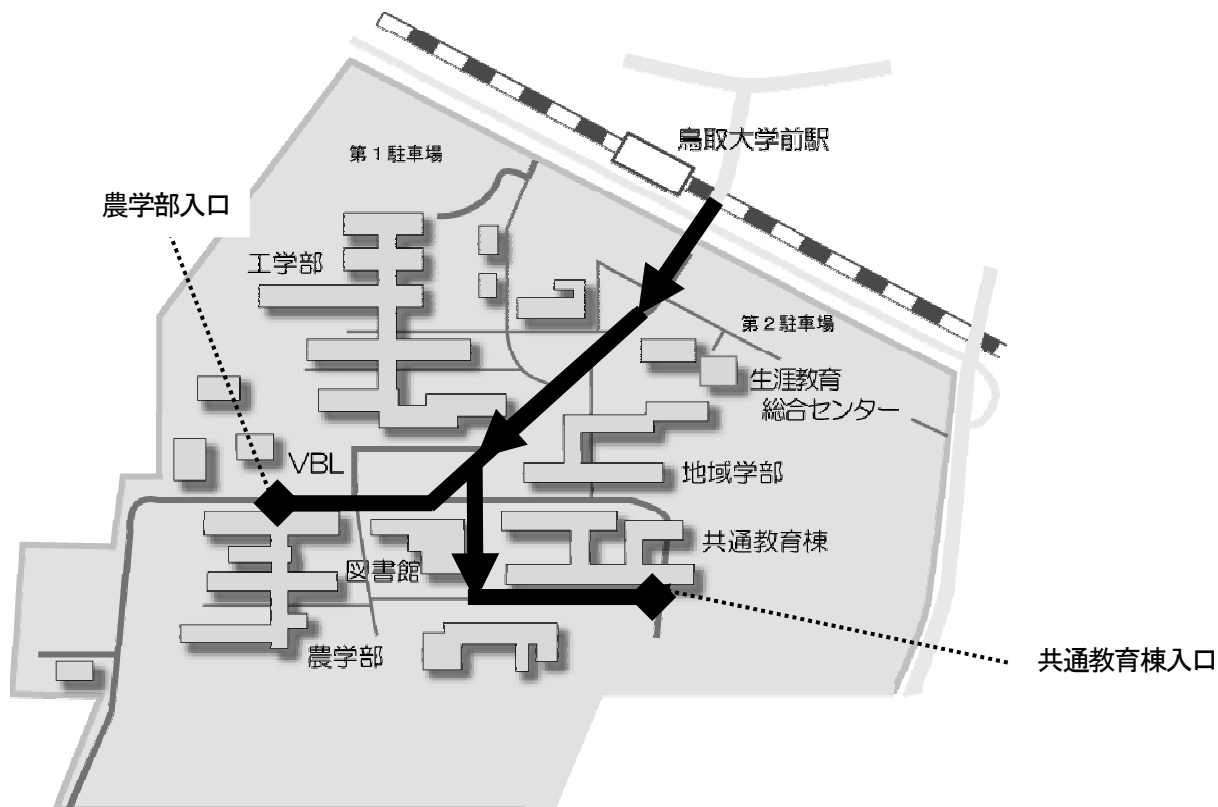
ホテル会場行きのバス(無料)は 17:30 に農学部前から出発します。

9 月 13 日(土)

●一般講演(10:00～ 、鳥取大学 共通教育棟)

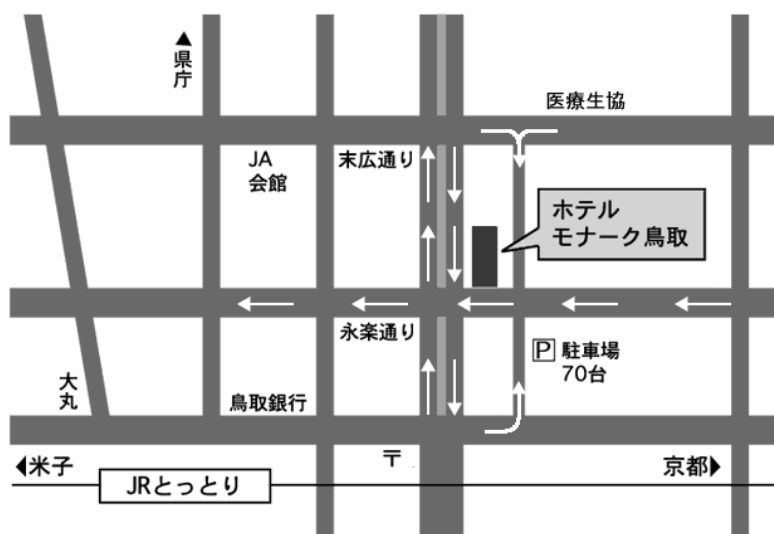
会場のご案内

日本農芸化学会功績賞・支部奨励賞受賞講演、シンポジウム（12日、13:30～）：農学部大講義室
 一般講演（13日、10:00～）：共通教育棟 2階 C21、D21、3階 C31、4階 D42
 評議員会議（13日、12:00～）：共通教育棟 3階 D31

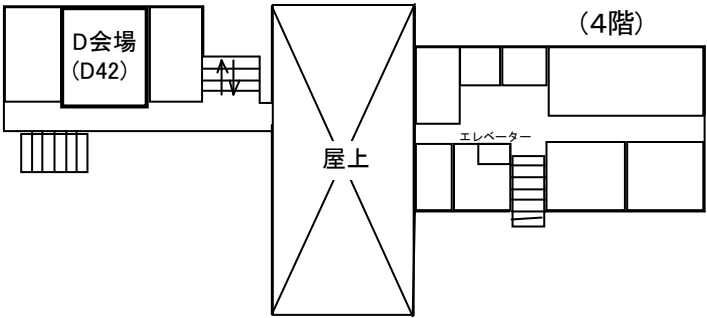
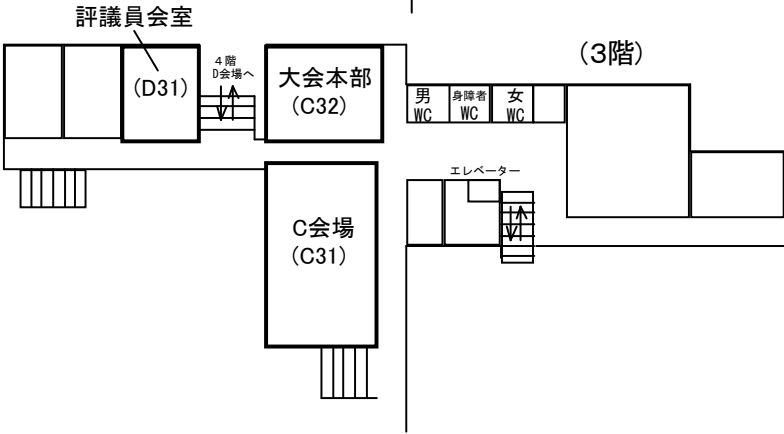
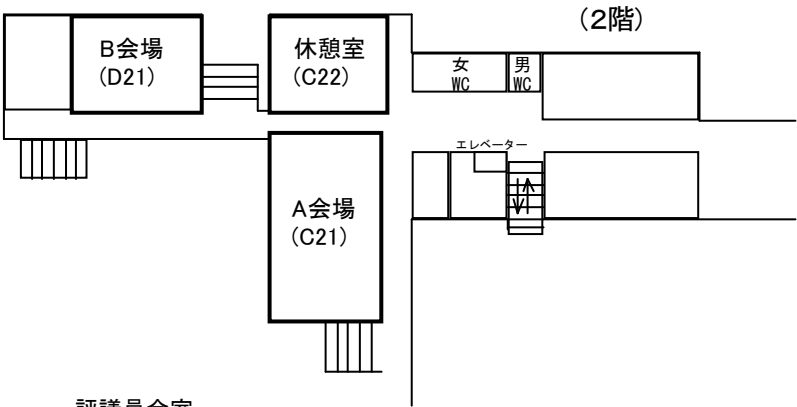
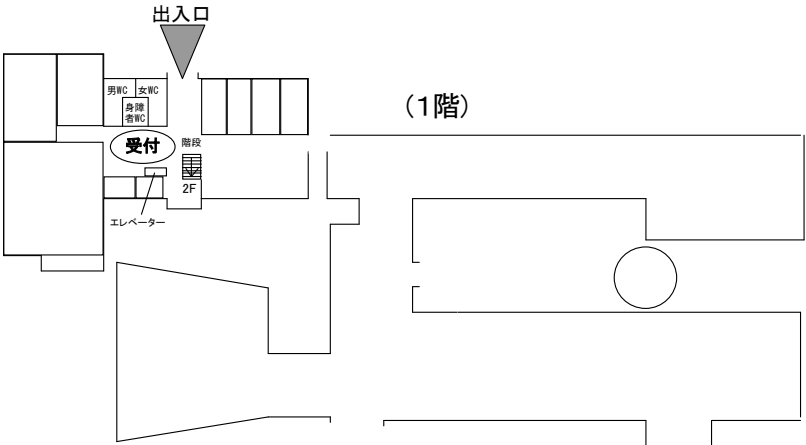


懇親会（12日、18:00～）：ホテルモナーク

ホテル会場行きのバスは17:30に農学部前（上記地図「農学部入口付近」）より出発します。



共通教育棟



一般講演プログラム（発表 9 分、質疑 3 分）

【A 会場：C21 室】

座長：高田悟郎（香川大希少糖研）

10：00

- A-1 (-)-モリノール B の 1"-9"部位が抗かび活性に与える影響
○升田健太¹、山内 聡¹、秋山浩一²、丸山雅史¹、菅原卓也¹、岸田太郎¹
(¹愛媛大農、²愛媛大学総合科学研究支援セ)

10：12

- A-2 ブタン型リグナンの立体構造と抗微生物活性との関係
○川口裕也¹、升田健太¹、山内 聡¹、秋山浩一²、丸山雅史¹、菅原卓也¹、岸田太郎¹
(¹愛媛大農、²愛媛大学総合科学研究支援セ)

10：24

- A-3 リグナン類、マタイレジノール、セコイソラリシレジノールがハマチ血合い肉褐変に与える影響
○山内 聡、菅原卓也、岸田太郎、山本 徹
(愛媛大農)

10：36

- A-4 レタス腐敗病菌 (*Pseudomonas cichorii*) が産出する植物毒素
○石田雅子、手林慎一、木場章範、曳地康史、金 哲史
(高知大農)

10：48

- A-5 シナピン酸の抗酸化反応機構研究 シナピン酸メチルと脂質過酸化化物とのカップリング化合物の構造
○秋山 純¹、武田美雄¹、前川智美²、曾根良昭²、増田俊哉¹
(¹徳島大総合、²大阪市大院生科)

座長：古本敏夫（香川大農）

11:00

- A-6 ヤマモモ葉由来の酸化制御物質研究 リポキシゲナーゼ阻害活性を有するガロイル化フラボノール配糖体
○染矢立志、武田美雄、増田俊哉
(徳島大総合)

11:12

- A-7 リン酸架橋デンプンの脂質代謝に及ぼす架橋度の影響
○大川佑治、岸田太郎、海老原 清
(愛媛大院農)

11:24

- A-8 シクロデキストリンによる 10-Undecyn-1-ol 包接特性と紋羽菌への効果
○Neoh Tze Loon、Tanimoto Takahiro、Ikefuji Shuichi、Yoshii Hidefumi、Furuta Takeshi
(鳥取大工)

11:36

- A-9 天然色素で染色したシルク、セルロースおよびキトサンの各パウダーに認められる機能
○藤岡 登¹、蜂谷和三²、石原達也¹、安藤 理¹、福田恵温^{1, 2}
(林原生化研¹ 医薬研、²粧薬研)

11:48

- A-10 Fourier self-deconvolution による糖類アモルファスマトリクスに包括されたタンパク質
および高分子のコンフォメーション解析
○今村維克、大山健一、横山 徹、野村真世、今中洋行、中西一弘
(岡山大院自然)

座長：作野えみ（鳥取大農）

13:12

- A-11 ゴマ毛状根に含まれるキノン類の生合成関連化合物
○神代敦史、古本敏夫
(香川大農)

13:24

- A-12 シコクビエに含まれるセジロウンカ摂食阻害物質
○Kabir Md. Alamgir、手林慎一、金 哲史
(高知大農)

13:36

- A-13 生理活性を示すイソプレニル化環状ジペプチド類のMS/MS 分析
○原田幸枝¹、臼木博一²、畑中唯史²、仁戸田照彦¹、神崎 浩¹
(¹岡山大院自然科学、²岡山生物研)

13:48

- A-14 リン酸捕獲試薬、Phos-tag[®]を用いたスフィンゴシン 1-リン酸の質量分析法による分析
○高木晴子¹、瓜倉真衣¹、盛重純一¹、平野 薫¹、里内 清¹、田中 保²、小池 透³
(¹福山大生命工、²徳島大院 HBS、³広島大院医歯薬)

14:00

- A-15 北部タイ腹菌類キノコ *Astraeus hygrometricus* (Per) Morgan 缶詰の揮発性化合物組成
○Pattana Kakumyan, 松井健二
(山口大院医)

座長：松井健二（山口大院医）

14:12

- A-16 クランベリーポリフェノールの尿中代謝物の大腸菌バイオフィーム形成抑制効果
○佐々木典子¹、大西令子¹、伊東秀之¹、狩山玲子²、光畑律子²、和田耕一郎²、
公文裕巳²、波多野 力¹
(岡山大院医歯薬¹ 天然医薬品開発学、²泌尿器病態学)

14:24

- A-17 ジャスモン酸メチルは孔辺細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介して気孔閉口を
誘導する
○宗正晋太郎¹、中村宜督¹、下石靖昭¹、森 泉²、村田芳行¹
(¹岡山大院自然科学、²岡山大資生研)

14:36

- A-18 昆虫培養細胞 **Sf9** に対するピリダリルの細胞毒性発現機構の解明
○杉岡大介¹、松野 煒¹、内海俊彦²、尾添嘉久¹
(¹ 島根大生資、² 山口大院医)

14:48

- A-19 ジカルボニル化合物に由来する酸化ストレス源
○小林隆幸、安田孝之、石川孝博、澤 嘉弘、柴田 均
(島根大生資)

15:00

- A-20 中国黄土高原産樹木苗木における S-ABA 散布処理が GB 蓄積に及ぼす影響
○東条昌彦¹、山本牧子²、杜 盛²、有馬二郎³、森 信寛³、山本福壽³、山中典和¹
(¹ 鳥取大乾地研、² 中国水土保持研究所、³ 鳥取大農)

15:12

- A-21 イネ科植物エンドファイトの生産する斑点米カメムシ類忌避物質
○作野えみ、澤 佑治、久木元堯斗、中島廣光
(鳥取大農)

【B 会場 : D21 室】

座長 : 有馬二郎 (鳥取大農)

10 : 00

- B-1 NMDA 型グルタミン酸受容体に対するジペプチドの効果
○立溝博也、黒下主悠、山田康枝
(近畿大工)

10 : 12

- B-2 ウサギ肝のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムの脂肪酸の酸化における役割
○宮尾夕子、岡崎早恵、山本 寛
(福山大生命工)

10 : 24

- B-3 大腸菌由来 L-アスパラギン酸オキシダーゼ (LAO) の安定性
○川上矩加¹、加藤さおり¹、芦田裕之²、石川孝博¹、柴田 均¹、澤 嘉弘¹
(¹ 島根大生資、² 島根大総科研)

10 : 36

- B-4 超好熱細菌 *Thermotoga maritima* 由来ピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼの性質
○林 順司¹、酒瀬川信一²、櫻庭春彦³、大島敏久⁴
(¹ 徳島大院生命テクノサイエンス、² 旭化成ファーマ、³ 香川大農、⁴ 九州大院微生物遺伝子工)

10 : 48

- B-5 ユーグレナにおける L-ガラクトノ-1,4-ラクトン脱水素酵素の機能解析
○西川 仁¹、草園智美¹、澤 嘉弘¹、柴田 均¹、薮田行哲²、丸田隆典³、重岡 成³、石川孝博¹
(¹ 島根大生資、² 鳥取大農、³ 近畿大院農バイオ)

座長：大城 隆（鳥取大工）

11:00

- B-6 パエニバチラス属由来 α -ガラクトシダーゼの性質と糖転移作用
○山本朗子、大倉隆則、西本友之、茶園博人、福田恵温
(林原生化研)

11:12

- B-7 β -アミラーゼを微量にしか含まないイネの多型の α -グルコシダーゼに関する研究
○山崎良樹、中島 進、今野晴義
(岡山大資生研)

11:24

- B-8 微生物反応および酵素反応による新規 1 デオキシ希少糖の生産
○原口智志、吉原明秀、プシュパキラン グラッパリ、ディベンダ ラオ、森本兼司、
高田悟郎、何森 健
(香川大希少糖研)

11:36

- B-9 大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素における Asp466 と Lys493 の役割
Golam Mustafa¹、石川宜位²、右田たい子¹、小林一雄³、田川精一³、○山田 守^{1,2}
(¹山口大院医、²山口大農、³大阪大産研)

11:48

- B-10 細胞表層提示糖鎖修飾酵素の検索
○熊内 悠、岡本賢治、築瀬英司
(鳥取大院生応工)

12:00

- B-11 アフリカツメガエル の 2 種のチモシン β_4 様タンパク質の生理機能
○山本 覚、竹中 諒、宮尾夕子
(福山大生命工)

座長：山本朗子（林原生化研）

13:12

- B-12 細胞損傷タンパク質 MM29kD の活性決定領域
○吉村 彰、松井亮祐、阪本佳樹、中野加奈子、松村祐介、小塚昌弘、千 菊夫¹
武部 聡² 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)

13:24

- B-13 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた Rab タンパク質のプレニル化の検出
○太田伊宣¹、守屋康子¹、鈴木 崇²、内海俊彦¹
(¹山口大院医、²島津製作所 バイオ・臨床ビジネスユニット)

13:36

- B-14 バキュロウイルス感染に伴い昆虫細胞で発現するパルミトイル化タンパク質の解析
○村田賢祐¹、柿原圭介¹、守屋康子¹、小林 淳²、内海俊彦¹
(¹山口大院医、²山口大農)

13:48

B-15 フユイチゴ抽出液の細胞死誘導活性

○渡部純也¹、早瀬伸樹¹、牛尾一利¹、山中理央²、中村 薫³
(¹新居浜高専生化、²姫路独協大薬、³京大化研)

座長：渡辺文雄（鳥取大農）

14:00

B-16 タンパクフリーローヤルゼリー

○三宅正樹、藤井光清、谷口美文、岩城完三、福田恵温
(林原生化研 医薬研)

14:12

B-17 鳴門金時(*Ipomoea batatas* L.)茎葉部の食品機能性

松浦(三木)宏美¹、○金丸 芳¹、山本澄人²、岩田深也²
(¹徳島大総合科学、²徳島県工業技術セ)

14:24

B-18 キャベツの消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモン・リゾホスファチジン酸による消化管組織修復

○田中 保¹、堀内 剛²、近藤宏樹²、松岡 恵²、盛重純一²、平野 薫²、里内 清²、徳村 彰¹、小池 透³
(¹徳島大院 HBS、²福山大生命工、³広島大院医歯薬)

14:36

B-19 スギ花粉アレルゲンの糖修飾によるエピトープ部位のマスキングと腸管吸収の最適化

○青木理恵子、齊藤 章、池田周平、SHAHA Ranajit Kumar、阿座上弘行、加藤昭夫
(山口大農)

座長：三宅正樹（林原生化研）

14:48

B-20 Dimethyl Sulfide によるヒト白血病細胞のアポトーシス誘導

○Zhang Gongliang、Wu Haitao、下石靖昭、中村宜督、村田芳行
(岡山大院自然科学)

15:00

B-21 サクラネチンによる脂肪細胞の分化及びグルコース取り込みの促進

○齋藤 武、阿部大吾、関谷敬三
(農研機構・近畿中国四国農業研究セ)

15:12

B-22 エピガロカテキンガラートはベンジルイソチオシアネートによる細胞死を増強する

○横山智子、Wu Haitao、下石靖明、村田芳行、中村宜督
(岡山大院自然科学)

15:24

B-23 ルテオリンはベンジルイソチオシアネートの抗がん作用を増感する

○堺 梨江子、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)

【C 会場 : C31 室】

座長 : 仲宗根 薫 (近畿大工)

10 : 00

- C-1 *Klebsiella* 由来 cyanide hydrolase 遺伝子の解析
○猿渡寛子、井上寿樹、岡本賢治、築瀬英司
(鳥取大院生応工)

10 : 12

- C-2 好熱菌由来ビオチン合成系酵素の遺伝子探索と特性解明について
○窪田高秋、中村昌義、河金雅志、和泉好計
(鳥取大工)

10 : 24

- C-3 微生物による第4級アンモニウム化合物の分解(第6報) : 4-*N*-トリメチルアミノ-
ブチルアルデヒド脱水素酵素遺伝子の解析
○赤井尚樹¹、Hassan Maizom²、一柳 剛³、森 信寛³
(¹鳥取大院農、²鳥取大院連農、³鳥取大農)

10 : 36

- C-4 シロイヌナズナの気孔形成関連遺伝子 *TMM* および *SDD1* の発現制御領域の解析
○赤坂裕也¹、川向 誠²、中川 強¹
(¹島根大総科セ、²島根大生資)

10 : 48

- C-5 *A.ferrooxidans* D3-2 株由来亜硫酸酸化酵素系の *c* 型 cytochrome *c* 及び *aa₃* 型 cytochrome *c*
oxidase からの再構築
○杉尾 剛¹、Taher M. Taha¹、早崎琢也²、赤穂亜実²、竹内文章³
(¹岡山大院自然科学、²岡山大農、³岡山大環境管理セ)

座長 : 伊東秀之 (岡山大医歯薬)

11:00

- C-6 環境試料由来新規アルドラーゼ遺伝子の探索
○佐藤杏子¹、櫻庭春彦²、大島敏久³
(¹徳島大院生命テクノサイエンス、²香川大農応用生物科学、³九州大院微生物
遺伝子工学)

11:12

- C-7 16S rDNA データベースを用いる T-RFLP フローラ解析法の確立
○中路沙織¹、末友寿実¹、芦田裕之²、石川孝博¹、柴田 均¹、澤 嘉弘¹
(¹島根大生資、²島根大総科研)

11:24

- C-8 元素硫黄で増殖した *A.ferrooxidans* ATCC 23270 株由来鉄酸化酵素系のラスティシアニン、*c* 型
cytochrome *c* 及び *aa₃* 型 cytochrome *c* oxidase からの再構築
○Taher M. Taha¹、Fumiaki Takeuchi²、Tsuyoshi Sugio¹
(¹岡山大院自然科学、²岡山大環境管理セ)

11:36

- C-9 リサイクルベクターシステムによる植物形質転換用多重遺伝子コンストラクトの構築
○中尾彰秀¹、中村真也¹、川向 誠²、河津 哲³、木村哲哉⁴、中川 強¹、
(¹島根大総科セ、²島根大生資、³森林資源研・王子製紙、⁴三重大院生資)

11:48

- C-10 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編による高病原化
○仲行あゆみ、斉藤悠希、加藤昭夫、阿座上弘行
(山口大農)

座長：中川 強 (島根大総科セ)

13:12

- C-11 トマトにおけるアスコルビン酸合成遺伝子ガラクトuron酸レダクターゼの遺伝子発現
○坂本真吾¹、村野亜沙子²、藤川愉吉¹、江坂宗春¹
(¹広島大院生物圏科学、²広島大生物生産)

13:24

- C-12 菌体内外物質の放出・蓄積能に及ぼす脂質合成酵素遺伝子群導入の影響
○北山了孝¹、渡辺昌規¹、福田 央²
(¹広大院大院物質工、²酒類総合研究所)

13:36

- C-13 精子形成期ラット精巣に発現する ras 抑制遺伝子の機能
○山野好章¹、浅野 淳¹、神尾高志¹、大山建司²
(¹鳥取大農、²山梨大院医工総)

13:48

- C-14 イネにおけるキシラナーゼインヒビターの発現と機能解析
○宮田佳栄、篤永隆昌、藤川愉吉、江坂宗春
(広島大院生物圏)

14:00

- C-15 ユーグレナ APX の cDNA 単離と酵素学的性質の検討
○田島奈緒子¹、澤 嘉弘¹、柴田 均¹、重岡 成²、石川孝博¹
(¹島根大生資、²近畿大院農バイオ)

座長：藪田行哲 (鳥取大農)

14:12

- C-16 Glutamyl tRNA synthetase affect cell growth and sexual differentiation of *Schizosaccharomyces pombe*
○Swapan Kumar Paul, M. Muniruzzaman Goldar, Miyo Yakura, Makoto Kawamukai
(島根大生資)

14:24

- C-17 イネにおけるプロリン生合成・代謝系遺伝子, P5CS と ProDH, の機能解析
○高橋裕昭、植地洋子、藤川愉吉、江坂宗春
(広島大院生物圏科学)

14:36

- C-18 枯草菌におけるフラボノイド応答性 *yetL-yetM* 遺伝子系の制御機構の解析
○檀上佑介、花野有貴、広岡和丈、藤田泰太郎
(福山大生命工)

14:48

- C-19 出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導
○松崎浩明、菊池正悦、柳本敏彰、秦野琢之
(福山大生命工)

15:00

- C-20 高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* のゲノム解析
○仲宗根 薫¹、関根光雄²、藤田信之²
(¹近畿大工、²製品評価技術基盤機構)

【D会場：D42室】

座長：仁戸田照彦（岡山大院自然科学）

10:00

- D-1 ゴマ毛状根培養による塩素含有アントラキノン anthracesamone C の生産
○星隈 新、古本敏夫
(香川大農)

10:12

- D-2 植物毒 radicinin の生合成 -第2報-
○鈴木大進¹、松永祥吾¹、作野えみ¹、田村純一²、中島廣光¹
(¹鳥取大農、²鳥取大地域)

10:24

- D-3 魚ウロコからのコラーゲンペプチドの新規製造方法（過酸化水素添加法）
○大城 隆¹、中山 哉²、宇賀田祐美¹、高橋祐介³、野口 誠³、和泉好計¹
(¹鳥取大工、²カンダ技工、³鳥取県産業技術セ)

10:36

- D-4 魚類由来コンドロイチン硫酸の組成分析
田村純一¹、川野愛美¹、田中晴奈¹、藤田裕之¹、○松下健也¹、今津綾夏¹、
堤下奈緒¹、有馬和也¹、石原幸雄²、中山 清³
(¹鳥取大地域、²鳥取県水産試験場、³カンダ技工)

10:48

- D-5 2種ホスホリラーゼを用いたトレハロースからのコージビオースの調製
○八木政裕、山本拓生、黒瀬真弓、日野恵子、西本友之、茶園博人、福田恵温
(林原生化研)

座長：田村純一（鳥取大地域）

11:00

- D-6 昆虫 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ特異的阻害剤生産放線菌によるキチナーゼ阻害剤の生産
○市川美里、仁戸田照彦、神崎 浩
(岡山大院自然科学)

11:12

- D-7 ポリヒドロキシジヒドロピラノン骨格を有するボロノリドの合成研究
○都田智子、渡部 薫、山内 聡
(愛媛大農)

11:24

- D-8 非天然型グリセロリン脂質過酸化物の合成と応用
○清水るみ子^{1,2}、永井 藍¹、富永浩子¹、木村郁美¹、泉 実¹、中島修平¹、
馬場直道¹
(¹岡山大院自然、²神戸学院大薬)

11:36

- D-9 新規オルソジアミノベンゼン誘導体の合成とセレン定量への応用
○中川太郎¹、鈴木悠人¹、中村宜督¹、下石靖昭¹、村田芳行¹
(岡山大院自然科学)

11:48

- D-10 LOS/LPS のコア糖鎖合成に向けた KDO 誘導体の合成
○田頭亮哉、一柳 剛、山崎良平
(鳥取大農)

12:00

- D-11 リポオリゴ糖のオリゴ糖鎖合成研究：分岐オリゴ糖鎖の構築
○豊田清薫、前田紗弥香、一柳 剛、山崎良平
(鳥取大農)

座長：森 信寛（鳥取大農）

13:12

- D-12 肉食性昆虫から単離した細菌類の殺虫活性
○西脇 寿¹、松田一彦²
(¹愛媛大農、²近畿大農)

13:24

- D-13 農業廃棄物の燃料用アルコール発酵への利用
○高橋 永¹、山崎浩司²、松元信也¹
(¹高知工大工、²高知県農業技術セ)

13:36

- D-14 微生物に対する不溶性物質の作用とその応用（4）天然培地の種類と醗酵特性の関係
○中西貴洋、宮地 諒、松元信也
(高知工大工)

13:48

- D-15 *Zymobacter palmae* の増殖・醗酵特性に及ぼす諸因子の影響
○江口美奈子、白石 昇、宮地 諒、松元信也
(高知工大工)

14:00

- D-16 食品ポリフェノールによる歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム抑制効果
○松永哲郎、中原 彩、加藤昭夫、阿座上弘行
(山口大農)

14:12

- D-17 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー 2 の精製と解析
○久本達格、小野光香、赤壁善彦、加藤昭夫、阿座上弘行
(山口大農)

座長：茶圓博人（林原生化研）

14:24

- D-18 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の走性
○薬師寿治^{1、2}、窪田真也³、保坂 毅⁴、千 菊夫³、松下一信²
(¹ 山口大院医、² 山口大農、³ 信州大農、⁴ 信州大国際若手)

14:36

- D-19 微生物による第4級アンモニウム化合物の分解(第7報)：3-N-トリメチルアミノプロパノール分解微生物のスクリーニング
○Isam Ali Mohamed Ahmed¹、作野えみ²、一柳 剛²、有馬二郎²、森 信寛²
(¹ 鳥取大院連農、² 鳥取大農)

14:48

- D-20 大腸菌における異種蛋白質のクリスタル化と高発現 ―画期的な効率的蛋白質調製法―
○酒井 裕、柏野陽子、松島賢治、内田素晶、早川 徹
(岡山大院自然科学)

15:00

- D-21 通性メチロトロフ細菌 *Acidomonas methanolica* MB58 のメタノール生育に及ぼす酢酸の影響
○三井亮司、片山寛子、大館昌史、田中三男
(岡山理大理)

15:12

- D-22 A coenzyme Q binding protein in fission yeast
○Tiezhong CUI, Makoto KAWAMUKAI
(島根大生資)

15:24

- D-23 細菌によるポリビニルアルコールの分解
○井神智裕、嶋尾正行
(鳥取大院生応工)

受 賞 講 演

講 演 要 旨

微生物による合成高分子の分解・代謝に関する生化学的・分子生物学的研究

河合富佐子^{1,2}

(¹ 岡山大資生研, ² 現在 京都工繊大バイオベースマテリアル研究センター)

1. 合成高分子の生分解評価と生分解特性

演者は水溶性/液状高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を代表とするポリエーテル、ポリアクリル酸(PA)、ポリビニルアルコール(PVA)、PEG を含むコポリマーなどの、また、ポリエチレン(PE)、変性ポリエチレンテレフタレート(PET)などのプラスチックの資化/分解菌を分離した。特に PEG 資化菌の *Sphingopyxis terrae* 及び *S. macroglabrida* は新種として type culture に認定された。これらの合成高分子の代謝経路を確立あるいは推定した結果、合成高分子の分解は菌体外酵素による加水分解型分解(endogenous: 分子鎖の at random な切断)と細胞内酵素による酸化型分解(exogenous: 分子末端からユニットずつ解重合)に大別され、前者にはポリエステルが、後者にはポリエーテルや炭素骨格を有する PA、PVA、PE が該当した。また、PEG 6000 以上の分子及び PEG・フタル酸コポリマーは共生菌でのみ分解されることを見出し、それらの共生機構を解明した。PE に関しては、分子量約 3,000 以下は資化可能であることを明らかにし、この知見を下に、高分子の光崩壊促進剤による低分子化と低分子化 PE の微生物分解を利用した環境分解性緩効性肥料カプセルが現在市販されている。

2. 合成高分子の分解代謝に関する生化学的/分子生物学的解明

演者は PEG の代謝に関わる PEG 脱水素酵素(PEGDH)が GMC family の flavoprotein であることを明らかにし、本酵素は現在 GMC family の PEGDH subgroup として認知されている。また、PEG-アルデヒド脱水素酵素(PEGALDH)は、NADP を内蔵する nicotinoprotein であり、アルデヒド脱水素酵素の最初の報告例である。また、PPG 脱水素酵素は typeI の quinoprotein alcohol dehydrogenase、PVA 脱水素酵素(PVADH)は typeII の quinoprotein alcohol dehydrogenase であることを明らかにするなど、本研究によって新規な酵素の存在を示すことができた。

酸化型分解高分子は細菌外膜を透過して、ペリプラズムに取り込まれて分解代謝される。PE、PPG 等は脂溶性で細胞膜と親和性があり、非特異的に取り込まれる可能性が高い。しかし、PEG、PVA 等の水溶性高分子は、他の取り込み機構を必要とする。PEG は分解オペロン中の TonB-dependent receptor が取り込みに関与することをほぼ結論づけた。PVA 分解オペロン周辺にはこのような遺伝子は存在しないが、PVA 存在下に出現する細胞表層の dent 構造が取り込みに関与していることを示した。これは合成高分子では最初の取込み構造の発見であった。

PEG 分解オペロンは transposases に挟まれて、メガプラスミドに存在する。オペロンや PEGDH 遺伝子が他の Sphingomonads その他で広く保存されているので、オペロンの伝播が推測される。また、オペロンは AraC-type regulator と GalR-type regulator で 2 重制御され、PEG により間接的にオペロンが誘導発現されることを解明した。他方、PVA 分解オペロンもメガプラスミドに存在し、構成的に発現されるものの、PVA により活性化された。本菌は当初、*Pseudomonas* 属と同定されていたが、*Sphingopyxis* 属細菌と再同定した。Sphingomonads は合成基質に対する多様な分解活性を有し、一般に数個のメガプラスミドを保有することが知られている。本研究によって、Sphingomonads の多様な分解能力の一環にポリマー分解能が加えられた。

その他、高融点ポリエステル(変性 PET)の耐熱性分解菌を堆肥より分離し、この菌による繊維製品の堆肥型分解システムを企業との共同研究で進めている。本研究は、エコプロダクツの普及とリサイクルへの波及効果が高く、耐熱性酵素の開発や堆肥の微生物解析という観点からも貢献できるものと期待している。

3. 合成高分子分解の数学解析

高分子は平均分子量で示されるように分子種が単一でなく、代謝産物の解析が困難である。オリゴマーをモデル化合物として利用できる場合以外は、代謝酵素の種類と活性及び分子量変化のパターン(endogenous か exogenous か)などから代謝経路を推定する他はない。このような場合に数学的手法で分解プロセスを追跡し、推定代謝経路を検証できないかと考えて、数学者との共同研究をスタートさせた。その結果、endogenous と exogenous な分解のそれぞれ複数例で実測値と数学モデルに基づく数値シミュレーションが一致したので、広く生分解計測に利用できることを示した。

本研究では、合成高分子の分解に関わる多くの微生物資源を見出し、それらの生分解性や代謝経路を検証するとともに、新規酵素や共生機構の解明を通じて微生物学・生化学に新しい知見を加えることができた。分解遺伝子研究を含めて Sphingomonads 研究にいささか貢献できたと自負している。また、ささやかながら実用化の芽を見出したことも農芸化学者としてはうれしく思っている。高分子化合物の分解プロセスの解明に数学的手法を導入したことは、広く微生物/酵素プロセスへの活用に繋がると考える。「継続は力なり」ということを改めて実感し、多くの共同研究者・関係者に深謝する。

日本農芸化学会支部奨励賞受賞講演
講演要旨

近年の分離分析技術の飛躍的な進歩により、食品に含まれる多種多様なポリフェノールの化学構造が解明され、それに伴って、フードポリフェノールの多彩な機能性も明らかになってきている。しかしながら、機能性フードポリフェノールは、実際に生体内においてどのような挙動を示し、どのような物質となって機能を発揮しているのか、即ち機能性に応答したフードポリフェノールのバイオマーカーについての知見は、あまり明らかにされていないのが現状である。そこで、私は、我々の生活に身近なフードポリフェノールの生体内代謝プロファイルを考慮した機能性開拓に着目し、フードポリフェノールの機能性応答バイオマーカーの探索研究を行っている。

(1) クランベリーポリフェノールのヒト尿中代謝物の同定とその代謝物の大腸菌性バイオフィーム形成抑制作用

クランベリージュース飲用後のヒト尿中代謝物を検索し、59種の代謝物を同定し、LC-MS/MS法により、44種の尿中代謝物の一斉定量分析を行い、各代謝物の尿中排泄率を算出した。また、クランベリーは欧米で尿路感染症の民間療法として用いられている。そこで尿路感染症の予防・治療に対するクランベリーの寄与の観点から、大腸菌性バイオフィーム形成に影響を及ぼすクランベリー成分および尿中代謝物の探索を行った。*in vitro*スクリーニングの結果、ジュースには含まれず、尿中に代謝物として排泄されるオルトクマル酸などの低分子フェノール類が、比較的強いバイオフィーム形成抑制作用を有することを見出した。

(2) コーヒーポリフェノールの脳神経賦活作用

アルツハイマー病など認知症の予防を指向した天然素材の開発の一環として、脳において記憶や学習に関して重要な役割を果たす海馬の初代培養神経細胞を用いて、各種天然素材の神経突起伸展作用の検討を行った。その結果、コーヒーの主ポリフェノール成分であるクロロゲン酸や、その生体内代謝物であるメタクマル酸の他、カテキンやエピカテキンなどが、神経突起伸展活性を有することを明らかにした。また、それらの活性の強さは、大脳半球神経細胞の突起伸展活性を有することが報告されているホーノキオールとほぼ同等であった。

(3) エラジタンニンの生体内代謝物の構造について

多くの薬用植物、各種茶剤やベリー類に含まれるエラジタンニンは、抗酸化活性を起因とする多彩な生理活性を有することが知られているが、エラジタンニンの生体内挙動に関する知見はほとんど知られていない。そこで、エラジタンニンの代表的分子内アシル基を有するゲラニニンについて、生体内代謝物の探索を行った。ラットにゲラニニンを経口投与後、採取した尿中から代謝物の分離、精製を行い、7種の代謝物を単離し、各種スペクトル解析の結果から、それらの構造を明らかにした。さらに主要代謝物の一つが投与したエラジタンニンと同等の抗酸化活性を有することも見出した。

以上の研究結果から、フードポリフェノールのなかには、代謝物として、生体内で機能性を発揮するものも存在することが示唆された。即ち、これらの結果は生体内代謝の知見も考慮に入れた活性評価の重要性を示すもので、今後、各種フードポリフェノールの代謝プロファイルの解明も含めて、さらに広範なフードポリフェノールの機能性本体、即ちバイオマーカーの探索研究を進めて行きたい。

単糖は、一般に化学式 $C_nH_{2n}O_n$ で表される有機化合物であり、多くの異性体が存在するのが特徴である。ヘキソースは、D-グルコースをはじめとする 16 種類のアルドース、D-フルクトースをはじめとする 8 種類のケトースの合計 24 種類存在し、ペントースではそれぞれ 8 種類、4 種類の合計 12 種類、テトロースではそれぞれ 4 種類、2 種類の合計 6 種類存在する。この 42 種類のうち普遍的に存在する単糖は 7 種類あるが、遊離の状態で多く存在する単糖は D-グルコースと D-フルクトースの 2 種類だけである。ほとんどの L-型の単糖を含む 35 種類は、天然にはほとんど存在しないので希少糖と呼ばれる。希少糖の中でも、D-プシコースは抗生物質プシコフラニンの配糖体、ズイナ科植物には遊離の状態で存在し、L-ソルボースはアスコルビン酸の前駆体として存在する。また、単糖の誘導体である糖アルコールには、キシリトールやエリスリトール、D-ソルビトールのような天然物質を含む 17 種類が含まれる。すべての単糖と糖アルコールは、異性化酵素および酸化還元酵素を組み合わせた酵素反応で生産が可能であり、その生産地図がイズモリングにまとめられている。希少糖にはさまざまな生理活性があり、機能的食品や医薬品、農薬などの分野での応用が考えられている。たとえば、D-プシコースには動脈硬化防止作用やインスリン分泌の促進作用、D-アロースには臓器虚血保護作用や癌細胞増殖抑制作用などの生理活性が報告されている。本研究は、微生物および酵素反応を用いた希少糖の生産に関する研究の中で、新規酵素 L-ラムノースイソメラーゼが、D-アロースなど多くの希少糖生産に応用できることを明らかにした。

1. *P. stutzeri* 由来の新規酵素 L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子クローニングおよび組換え酵素生産

L-ラムノースイソメラーゼ(6-デオキシ L-マンノース)は、L-ラムノースと L-ラムニュロースとの間の可逆的異性化反応を触媒する、古くからよく知られている酵素であり、大腸菌や枯草菌では遺伝子クローニングや X 線結晶構造解析も行われている。基質特異性が高く、L-ラムノースと L-マンノース以外の糖には反応しない。われわれが香川大学の土壌から分離した *Pseudomonas stutzeri* の生産する L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノースに対して最も触媒効率の高い酵素であり、上記の反応のほか触媒効率は低い D-アロースと D-プシコースとの間の可逆的異性化反応も触媒し、希少糖生産に適した酵素である事がわかった。基質特異性など酵素の機能解析を行うために、L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて組換え酵素を大量に生産させた。*P. stutzeri* 由来の L-ラムノースイソメラーゼのアミノ酸配列は、既知の L-ラムノースイソメラーゼおよび D-キシロースイソメラーゼと比較すると、活性中心のアミノ酸残基の保存性はあるものの、両酵素のアミノ酸配列との相同性は非常に低く、新規の酵素である事がわかった。

2. 組換え L-ラムノースイソメラーゼの機能解析と希少糖 D-アロースの大量生産への応用

組換え L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノース、L-マンノースのほか L-リキソース、D-リボース、D-アロースに高い触媒効率を示し、さらに高濃度の酵素を反応に用いることで、ほとんどのテトロース、ペントース、ヘキソースのアルドース-ケトース間の異性化反応を触媒できるきわめて基質特異性の広い酵素である事がわかった。このように広い基質特異性を示す酵素には *Streptomyces rubiginosus* 由来の D-キシロースイソメラーゼが報告されており、本酵素は L-ラムノースイソメラーゼと D-キシロースイソメラーゼ、両方の機能を有することがわかった。そこで、本酵素の X 線結晶構造解析を行い、大腸菌由来の酵素と比較することで、基質特異性の違いを基質結合部位の構造の違いから検討した。大腸菌由来酵素の 326 番目のフェニルアラニンが、本酵素の 329 番目のセリン残基に代わったことにより、基質を受け入れるスペースがでる幅広い基質に対応できるのではないかと推測した。

本酵素とすべてのケトースの第 3 位をエピ化できる D-タガトース 3-エピメラーゼを組み合わせることで安価な D-フルクトースからさまざまな希少糖の生産が可能になった。特に、L-ラムノースと比較して 1000 分の 1 の触媒効率ではあるが、D-プシコースから D-アロースを生産できる初めての酵素であり、生理活性希少糖である D-アロースのバイオリアクタを用いた大量生産が可能となった。現在は、さらに触媒効率が高く温度安定性の高い *Bacillus pallidus* 由来の L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子をクローニングしその組換え酵素を用いて希少糖生産の研究を進めている。

3. 謝 辞

本研究は、主に香川大学研究推進機構希少糖研究センターで行われたものであり、この場を借りてスタッフの先生方ならびに共同研究者の先生方に厚く御礼申し上げます。また、日本農芸化学会中四国支部長の和泉好計先生ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

シ ン ポ ジ ウ ム

「植物と微生物の関わり」

講 演 要 旨

菌従属栄養植物の菌根共生

1

岩瀬 剛二
(鳥取大農)

菌従属栄養植物とは、生育に必要な炭素源の全部または一部を自らの光合成ではなく、根に共生する菌類に依存した生活を送っている植物のグループのことである。一方、クロロフィルを欠いた植物は無葉緑植物と呼ばれ、それらは生態学的には寄生植物または腐生植物とされてきた。腐生植物とは、土壤中の有機物を分解し低分子の炭素源として吸収して生活していると考えられる植物を指すが、実際にはそのような能力を持つ植物は知られていない。腐生植物と見なされてきた植物のほぼ全てが、根に共生する菌類(共生菌、または菌根菌と呼ぶ)に炭素源の供給を依存しており、「菌従属栄養植物(Myco-heterotroph)」であることがわかってきている。緑葉を持つ植物でも部分的菌従属栄養(Myxotrophy)を示す種類が知られている。

一部を除く陸上植物のほぼすべてが、根に菌類を共生させており、その共生構造を菌根と呼んでいる。また、菌根をつくっている菌類を菌根菌と呼ぶ。菌根は形態的な違いから大きく7つのグループに分けられている。マツ科、ブナ科、カバノキ科などの主として樹木のみに見られる外生菌根、ツツジ科のツツジ属などに見られるエーコイド菌根、ツツジ科のイチヤクソウなどに見られるアーブトイド菌根、ツツジ科のギンリョウソウなどに見られるモントロポイド菌根、ラン科植物に見られるラン菌根、マツ属とカラマツ属の苗畑のみで報告されている内外生菌根、そして樹木草本を問わず最も普遍的に見られるアーバスキュラー菌根である。アーバスキュラー菌根を除く6種類の菌根は、担子菌または子囊菌によって形成されるが、アーバスキュラー菌根はグロムス菌によって形成される。

無葉緑の絶対的菌従属栄養植物は、世界中に87属400種以上が記載されており、双子葉植物のツツジ科、ヒメハギ科、リンドウ科、単子葉植物のサクラソウ科、ホンゴウソウ科、ヒナノシヤクジョウ科、ラン科などに見られるが、その多くがラン科植物で全体の4割以上を占める。双子葉植物で研究が進んでいるのはツツジ科の内、シヤクジョウソウ亜科のギンリョウソウの仲間、単子葉植物ではホンゴウソウ科、ヒナノシヤクジョウ科、そしてラン科である。ホンゴウソウ科ヒナノシヤクジョウ科ではアーバスキュラー菌根が形成し、ギンリョウソウの仲間ではモントロポイド菌根、ラン科ではラン菌根が形成する。

アーバスキュラー菌根を形成するグロムス菌類は腐生的能力を持たないため、他の緑葉を持つ植物に共生し、緑葉を持つ植物の光合成産物の一部が菌根菌の菌糸を通して菌従属栄養植物に供給されていることが示唆されている。また、ギンリョウソウの仲間やラン科植物でも無葉緑植物の菌根菌の多くは、樹木に外生菌根を形成することが知られている菌類であり、この場合も樹木の光合成産物の一部が菌根菌の菌糸を通して菌従属栄養植物に供給されている。無葉緑のラン科植物の場合は、木材腐朽性の菌が共生している場合も、日本のランを中心に報告されており、この場合は、周辺に存在する落葉や倒木などの有機物の分解物がランに供給されている。

キンラン(*Cephalanthera falcata*)は緑葉を持つランであるが、掘り取って鉢植えなどにするとやがて枯れてしまうことが知られていた。菌根菌を調べてみると、コナラ等の広葉樹に共生するベニタケ科やイボタケ科の菌が共生していることが明らかになり、樹木との3者共生系によって生育している部分的菌従属栄養性の植物であることが明らかになった(Yamato and Iwase, 2008)。

タシロラン(*Epipogium roseum*)は無葉緑ランで、東南アジアから日本にかけて分布が知られており、近年社寺林の林床によく見られるようになった種である。根を持たず、ストロンのような匍匐性のあるいは球状の地下茎を持ち、6-7月頃に花茎を伸ばし花を咲かせる植物である。菌根菌はヒトヨタケ属あるいはイタチタケ属の木材腐朽性の菌であり(Yamato et al., 2005)、培養条件下で共生関係を構築することで開花させることにも成功した(Yagame et al., 2008)。ヒトヨタケ属やイタチタケ属の担子菌がラン科植物の菌根菌となっていることを明らかにした初めての例であり、この結果は、タシロランの保全のためには、周辺にある落葉や倒木を取り除かずに放置することが重要であることを示している。

ムウラン属(*Lechanorchis* spp.)は日本に10種程度分布することが知られている無葉緑ランの仲間である。これまで得られた結果では、菌根菌はチチタケ属を中心としたベニタケ科の菌であることが明らかになっており(未発表)、樹木との3者共生系の存在が示唆されるものである。

講演では、上記のような当研究室で得られた成果を中心に、様々な菌従属栄養植物の菌根共生の実態とその生態学的意義について紹介する予定である。

“菌根”とは菌類と植物根との共生形態であり、菌根を形成する菌類を菌根菌と呼ぶ。我々が研究対象としてきた菌根菌は、根の細胞内部に菌糸を侵入させる内生菌根菌の一種であるアーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) である。AM 菌は根の皮層細胞内で樹枝状体と呼ばれる栄養交換器官を形成する。樹枝状体は英語で *arbuscule* といい、その形容詞形は *arbuscular* である。すなわち、アーバスキュラー菌根菌というのは“樹枝状体を形成する菌根菌”という意味である。AM 菌と植物との共生は 80%以上もの陸上植物に見られるため“地球上で最も普遍的な共生系”と呼ばれる。AM 菌は宿主植物にリン酸やミネラルを供給する有用微生物であり、植物に生育促進や耐病性・環境ストレス耐性の向上など様々な有益な作用をもたらす。分子系統解析や化石記録から AM 菌の起源は約 4 億 6 千万年前と考えられている。これは陸上植物の起源と同時期であることから、無機栄養素が乏しい陸上で植物が生存していくのに AM 菌が重要な役割を果たしてきたと考えられている。

AM 菌は絶対共生菌であり、菌単独ではほとんど生育せず、次世代の胞子も形成しない。このため、実験生物としては取り扱いが極めて難しく、AM 菌と植物とがどのようにして互いの存在を認識し、共生確立に至るのか、その分子機構はあまり分かっていない。とりわけ、この分野に化学者がほとんど参入していないこともあり、AM 菌と植物との間で取り交わされる共生シグナル物質などの共生制御物質はほとんど全く不明であった。我々は 12 年に亘って、天然物化学的手法を用いて AM 共生における共生シグナル物質の解明を目標に研究を行ってきた。その結果、植物から AM 菌に向かって発せられるシグナル物質 (branching factor, BF) の解明に世界に先駆けて成功し、さらに AM 菌から植物に向けて発せられるシグナル物質 (Myc factor, MF) に迫りつつある。

AM 菌の菌糸は宿主の根の近傍に達すると激しく分岐する。この菌糸分岐は非宿主であるアブラナ科やアカザ科などの植物では見られないことから、AM 菌の宿主認識反応と見なされている。BF はこの菌糸分岐を誘導する物質であり、その単離が試みられてきた。しかし、根から極微量しか分泌されず、化学的にも不安定であるため、単離に成功した例はなかった。2005 年、我々はマメ科モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根分泌物から世界で初めて BF の単離に成功し、これを 5-deoxystrigol と同定した。本物質はストリゴラクトンと総称される根寄生雑草の種子発芽刺激物質として単離されていた化合物であった。ストライガやオロバンキなどの根寄生雑草は他の植物の根に寄生して養水分を奪う難防除性の強害雑草であり、世界中で農作物に甚大な被害を与えている。寄生を受けてしまうのにもかかわらず、なぜ植物が根からストリゴラクトンを分泌するのか、ながらく謎であった。本成果により、ストリゴラクトンは本来、AM 菌に対する共生シグナルとして根から発せられ、根寄生雑草はこれを傍受することにより寄主となる植物の所在を突き止めているということが分かってきた。

AM 菌が絶対共生菌であるという実験的制約の大きさから、MF が実在するという実験的証拠は長らく得られなかった。しかし、マメ科モデル植物を用いた研究により、菌根共生と根粒共生との間で共生初期のシグナル伝達系に共通過程が存在することや、根粒菌や根粒菌の生産する共生シグナル物質である Nod ファクターによって誘導される共生初期応答遺伝子のいくつかが AM 菌の感染初期にも誘導されることが明らかになり、MF が存在するという可能性が徐々に高まってきた。2003 年に AM 菌が根の近傍で菌糸分岐を起こすときに、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) の共生初期応答遺伝子の一つである *MtENOD11* の発現を誘導する物質を菌糸から分泌することが報告され、MF が実在することがついに確認された。*MtENOD11* の発現は菌糸分岐を起こしている菌糸の近くでのみ見られることから、MF の生産・分泌は BF、すなわちストリゴラクトンにより誘導されると考えられている。我々も AM 菌の胞子中にミヤコグサの共生初期応答遺伝子の一つである *LjCbp1* のプロモーターを活性化させる物質が含まれていることを見出し、現在精製を行なっている。MF 同定はフランスやイギリスなど海外のグループとの国際的な競争の中で行われており、近い将来に MF が解明されることが確実視されている。

植物病原糸状菌における二次代謝産物生合成と病原性発現の分子機構

3

○児玉基一朗, 赤木靖典, 赤松 創, 尾谷 浩
(鳥取大農)

地球上には 10 万種、あるいはそれ以上の糸状菌種が存在し、その生息可能場所も様々である。その一方で、特定の糸状菌が生物学的に大きなコストをかけて植物寄生能力を進化させてきた要因は、宿主植物というニッチを占有することの利点にある。病原糸状菌の感染様式は、栄養関係の確立に生細胞との相互作用を必要とする活物寄生菌 (biotroph) から、植物細胞を激しく加害し死に至らしめる殺生菌 (necrotroph) まで多岐にわたる。このような植物病原糸状菌における病原性関連因子としては、植物侵入時の感染構造体をはじめ、菌が生産、分泌する二次代謝産物である毒素、各種分解・解毒酵素類などが挙げられる。従来、病原性発現に関わる各種要因の病理学的意義を正確に検証することは困難であった。しかし、近年、遺伝子ターゲティング技術など候補遺伝子の機能解析法が多くの糸状菌で可能となり、個々の候補因子の病理学的役割を還元的に実証することが容易になってきている。さらに、遺伝子タギング法などにより、機能未知の病原性関連遺伝子を発掘することも可能となっている。このようなケーススタディを積み重ねることにより、植物病原糸状菌における特異性決定機構の統一理論が構築されるのか、あるいはその多様性が浮き彫りになるのか、研究の発展が期待されている。

ここでは、植物病原菌の病原性発現に関わる因子のうち、宿主特異的毒素 (host-specific toxin, HST) に焦点を当てる。特に、本因子を糸状菌の二次代謝産物の一つとしてとらえ、生合成の分子機構と多様性、また生合成系の進化について議論する。多彩な化学構造と生物活性を有する二次代謝産物を、病原糸状菌が宿主植物に対する寄生戦略の一環として採用することは、極めて妥当である。糸状菌由来の植物毒素、とりわけ宿主植物に対してのみ作用する HST はその代表的事例である。これら毒素の多くが、糸状菌の二次代謝産物として代表的なポリケチドおよび非リボソーム型ペプチド (環状ペプチド) 様構造を有することは注目に値する。

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*Alternaria alternata* tomato pathotype) が生産する AAL 毒素はポリケチド化合物であり、*Fusarium* 属病原菌が生産するマイコキシンのフモニシンに化学構造および生物活性が類似している。AAL 毒素生合成には、少なくとも 10 以上のクラスター形成した遺伝子 (*ALT* クラスター) が関与していることが明らかとなっている。*ALT* クラスターは茎枯病菌のみに存在し、ポリケチド合成酵素 (PKS)、ABC トランスポーター、LAG 蛋白質、P450 等をコードする遺伝子が含まれる。遺伝子ターゲティングの結果より、クラスター中のいくつかの遺伝子は、毒素生合成と同時に病原性発現に直接関与することが確認された。一方、リンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype) の AM 毒素は、環状ペプチド様構造を有する。AM 毒素生合成を支配する環状ペプチド生合成酵素 (CPS) 遺伝子 (*AMT*) は、13.1 kb の ORF を持ち、イントロンは存在しない。また、AM 毒素を構成する 4 個のアミノ酸および有機酸にそれぞれ対応するアミノ酸活性化ドメインが認められた。*AMT* ターゲティングの結果より、本菌においても“毒素生合成遺伝子＝病原性遺伝子”であることが証明された。

PFGE による染色体解析の結果、*Alternaria* 属菌は 0.6~6.5 Mb の範囲に菌株によって異なるが約 10 本の染色体を持ち、総ゲノムサイズが約 30 Mb であることが明らかとなった。また、HST を生産する各種病原型菌は、それぞれサイズは異なるものの、非病原性 *A. alternata* 菌株には見出されない小型染色体を保有していた。さらに、各病原型において、HST 生合成遺伝子 (*Tox*) クラスターはそれぞれの菌株の保有する付加的で余分な小型染色体に座乗していた。これらの染色体を人為的に欠損させた場合、毒素生産能および病原性は失われるが、菌の成長などには影響が全く認められない。以上の結果は、これら小型染色体が conditionally dispensable (CD) 染色体であり、HST 生産菌における“病原性染色体”と呼ぶにふさわしいことを示唆する。世界各国で分離された茎枯病菌 (AAL 毒素生産菌) は、全て同サイズの CD 染色体を保有していた。さらに、*ALT1* を含む CD 染色体上の遺伝子と、その他の染色体に座乗する遺伝子それぞれにおける分子系統解析の結果、各分離菌株において、CD 染色体の由来が他のゲノム領域と異なる可能性が示唆された。また、細胞融合により作出した茎枯病菌と斑点落葉病菌間のハイブリッド株は、AAL および AM 毒素を生産するとともに両宿主植物に対して病原性を示した。これらハイブリッド株では、両親株由来の CD 染色体が安定して保持されていた。これら一連の研究成果を踏まえ、HST 依存植物病原菌の病原性の進化と多様性形成過程に、*Tox* クラスター、さらには CD 染色体の水平移動 (伝播) が関与しているとの作業仮説を提示した。

糸状菌における *Tox* クラスターを含む二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの構造を眺めると、その合目的性には目を見張る。このような遺伝子クラスターの由来、起源は何処にあるのか？そしてクラスターの集団内での拡散と保持のメカニズムは何であろうか？このような二次代謝産物生合成系および菌の病原性の進化に関する疑問に答えるためには、系統ゲノミクスに立脚した異なる生物間における gene flow に関する包括的な理解が必要である。

植物は自然界において多くの植物病原菌と接触の機会を有するが、ほとんどの場合、植物が病原菌を認識し、植物独自の免疫反応を誘導することなどにより感染は成立しない。*Acidovorax avenae*は単子葉植物を宿主とし、葉の褐変や茎の屈曲等を引き起こす植物病原細菌である。この菌の菌株間における宿主特異性は非常に厳密であり、一つの菌株が感染できる植物種はほぼ一種に限定される。これまでに我々は、イネに対して非病原性の N1141 菌株と病原性の K1 菌株をそれぞれイネに接種すると、N1141 菌株を接種したイネでは過敏細胞死や活性酸素の発生、抵抗性遺伝子の発現などの一連の植物免疫反応が誘導されるが、病原性の K1 菌株を接種したイネではこのような免疫反応が全く誘導されないことを明らかにした。さらに我々は、このようなイネの免疫反応の誘導に関与する特異的認識物質としてこの菌の鞭毛を構築するフラジェリンを同定した。両菌株から精製したフラジェリンをイネに処理すると、イネに対し非病原性の N1141 菌株由来のフラジェリンでは様々な免疫反応を誘導するが、病原性の K1 フラジェリンではこのような免疫反応を誘導しなかった。両菌株のフラジェリンは共に 492 アミノ酸残基で構成されており、14 アミノ酸残基の配列置換が存在している。そこで、大腸菌を用いて両菌株の発現フラジェリンを作製しイネに処理したところ、非病原性 N1141 菌株のフラジェリンだけでなく、病原性 K1 菌株のフラジェリンも免疫反応を誘導することが明らかになった。このことは、両フラジェリン間に存在する認識特異性にはアミノ酸配列の違いではなく、翻訳後修飾に関与する可能性を示している。実際、両フラジェリンには分子量約 1,000-2,000 程度の糖鎖が付加していることが糖鎖分析と質量分析計を用いた実験で明らかになっている。そこで次に、フラジェリン糖鎖付加酵素遺伝子を同定し、この遺伝子の欠損株を作製したところ、両欠損株におけるフラジェリンの測定分子量は推定分子量と一致した。さらに、両欠損株から糖鎖欠損フラジェリンを精製し、イネの免疫反応誘導の有無を調べたところ、非病原性のフラジェリンだけでなく病原性のフラジェリンも免疫反応を誘導することが明らかとなった。以上のことは、イネによる *A. avenae* フラジェリンの認識特異性はフラジェリンの糖鎖修飾に由来することを示している。

次に、イネに存在するフラジェリンの受容体に関する解析を行った。シロイヌナズナでは、フラジェリンの N 末端部分の共通配列を基に合成された flg22 という 22 アミノ酸からなる合成ペプチドが免疫反応を誘導することが明らかになっており、この flg22 の受容体として受容体型キナーゼである FLS2 が同定されている。これまでの我々の研究で、flg22 はイネに対してほとんど免疫反応を誘導することが出来ないことが示されており、フラジェリンの様々な部位を用いた実験からイネにおいてはフラジェリンの C 末端部分を認識して免疫反応を誘導していることも明らかになっている。そこでまず、FLS2がイネにおけるフラジェリンの認識にも関与するかどうかを明らかにするため、イネの *FLS2* 遺伝子のオルソログである *OsFLS2* の RNAi 発現抑制体をイネで作製した。この発現抑制体に *A. avenae* 非病原性菌株由来のフラジェリンを処理したところ、野生株と同様にフラジェリンを認識し免疫反応を誘導することが示された。また、*OsFLS2* をシロイヌナズナの *fls2* 欠損株に恒常的に発現させたところ、flg22 に対する感受性が回復し、*OsFLS2* はシロイヌナズナ FLS2 の機能を相補できることが明らかになった。そこで次に、*OsFLS2* を過剰発現したイネを作製し、flg22 や病原性、非病原性のフラジェリンに対する感受性を調べたところ、非病原性フラジェリンだけでなく、flg22 や病原性フラジェリンもイネの免疫反応を誘導した。以上の結果は、イネは flg22 の受容体である *OsFLS2* を潜在的に有しているものの、細胞における低存在量などにより本来の機能を示さないこと、イネにおいて認められるフラジェリンによる免疫反応誘導は flg22 とは異なる部位の認識に由来し、この認識には *OsFLS2* とは異なる受容体に関与することを示している。シロイヌナズナにおいて *FLS2* の発現は flg22 処理によって上昇することが示されているので、次に、マイクロアレイを用いたイネの受容体遺伝子の同定を試みた。22K オリゴマイクロアレイ解析によって、フラジェリン認識によって発現誘導される 172 個の遺伝子を同定した。これら遺伝子を詳細に解析したところ、植物の受容体型キナーゼをコードする 22 個の遺伝子が含まれていることが明らかとなった。そこで、この 22 個の受容体型キナーゼ遺伝子の欠損株を用いて解析したところ、*STR1* と名付けた受容体型キナーゼ遺伝子のイネ欠損株において、フラジェリン感受性が失われていた。この *STR1* 遺伝子を発現させたシロイヌナズナは *A. avenae* 非病原性菌株由来のフラジェリンに対する感受性を獲得したことから、この遺伝子がイネで主に機能するフラジェリンの受容体をコードしている可能性が高いと考えている。本シンポジウムでは、このようなイネにおけるフラジェリンの認識機構に中心をおきながら、植物の免疫反応の一つである過敏細胞死の誘導機構についても最新の情報を交えて概説したい。

一 般 講 演

講 演 要 旨

(-)モリノール B の 1''-9''部位が抗かび活性に与える影響

A-1 ○升田健太¹、山内 聡¹、秋山浩一²、丸山雅史¹、菅原卓也¹、岸田太郎¹

(¹愛媛大農、²愛媛大総合科学研究支援センター)

目的) モリノール A, B はジアステレオマーの関係にあり、中国の薬草から単離、同定されたテトラヒドロピランセスキネオリグナンである。植物によって(+)体と(-)体との混合物として生合成されることが知られている。モリノール A, B のすべての立体異性体を合成し抗かび活性を調べたところ、(-)-モリノール B が *Alternaria altanata* に対して最も高い抗かび活性を示す事が分かった。この事は、(-)-モリノール B のすべての立体が高い活性発現に重要である事を意味している。今回は、(-)-モリノール B の 3,4-dimethoxycinnamyl 部位 (1''-9''部位) が活性に与える影響を調べた。

方法・結果) (-)-モリノール B の誘導体は既報の方法に従って合成し、シンナミル基のフェニル部位は Heck 反応によって構築した。得られた誘導体の *Alternaria altanata* に対する抗かび活性試験の結果、(-)-モリノール B の 3''および 4''位のメキシ基は活性発現に必要でない事が分かった。しかし、シンナミル基のフェニル基は活性発現のために重要である事が示された。また、シンナミル基の2重結合を単結合に還元した化合物も(-)-モリノール B と同レベルの活性を示した。

ブタン型リグナンの立体構造と抗微生物活性との関係

A-2 ○川口裕也¹、升田健太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

(¹愛媛大農、²愛媛大総合科学研究支援センター)

目的) ブタン型リグナンであるセコイソラリシレジノール(SECO)、ジヒドログアイアレチ酸(DGA)、DGA の2つのベンジル位がケトンに酸化されたジオキソジヒドログアイアレチ酸(ODGA)の立体構造と抗微生物活性との関係を明らかにすることを目的として実験を行った。天然には(-)体及び *meso*-体の DGA が存在し *meso*-体に抗かび、抗菌活性が報告されているが、(+)体の単離及び活性は知られていない。また、ベンジル位がケトンまで酸化された DGA 関連化合物の単離の報告はあるが活性はこれまで未知である。

結果) 植物体内でエナンチオマー混合物として生合成されている可能性があるため、本研究においては光学的に純粋な化合物を合成し活性試験を行った。(+)、(-)、*meso*-DGA はグラム陽性菌に対して抗菌活性を示し、ベンジル酸化体である ODGA のすべての立体異性体の活性よりも高かった。また、みかん類黒斑病菌に対して DGA, ODGA のすべての立体異性体が抗かび活性を示し、*meso*-体の活性が光学活性体よりも強かった。9, 9'-ジオール体である SECO はどの立体異性体も抗菌活性を示さず、また、抗かび活性も DGA, ODGA よりも弱かった。ブタン型リグナンの立体構造と抗微生物活性との関係が明らかになった。

リグナン類、マタイレジノール、セコイソラリシレジノールがハマチ血合い肉褐変に与える影響

A-3

○山内 聡^{1,2}、菅原卓也^{1,2}、岸田太郎^{1,2}、山本 徹¹

(¹愛媛大農、²愛媛大南予水産研究センター)

目的) ハマチ血合い褐変はミオグロビンの酸化によって容易に起こり、ハマチの値段の下落、輸出の伸び悩み等の問題の原因となっているが、これまでに有効な対策はない。一方我々の研究で酸化されていないベンジル位を有するリグナン類が高い抗酸化活性を有することが分かった。そこで今回、野菜類に広く含まれ酸化されていないベンジル位を有するマタイレジノール、セコイソラリシレジノールのハマチ血合い肉褐変に与える影響を調べた。

方法・結果) (-)及び(+)-マタイレジノール、(-)及び(+)-セコイソラリシレジノールを50%エタノール溶液に溶解した後、ハマチ血合い肉に塗布し、色の経時変化をX 値、R 値の測定を行うことによって調べた。その結果、(-)-マタイレジノールの2%、1%、0.5%溶液を塗布した切り身において12時間後まで褐変がほぼ押さえられた。その後、36時間後まですべての濃度でコントロールに比べて褐変の進行が遅いことを確認した。(+)マタイレジノール、(-)及び(+)-セコイソラリシレジノールにも褐変遅延効果が認められたが、(-)-マタイレジノールよりも効果が弱かった。(-)-マタイレジノールはY 値の減少も抑制する事が示された。

レタス腐敗病菌 (*Pseudomonas cichorii*) が産出する植物毒素

A-4

○石田雅子、手林慎一、木場章範、曳地康史、金 哲史

(高知大農)

Pseudomonas cichorii (以下 Pc) が引き起こすレタス腐敗病は、レタス細胞の自己細胞死が原因であり、そこ過程に Pc の産出する植物毒素が関与していると考えられている。しかしながら、未だその実態も含め、分子構造は明らかとなっていない。このことから、本研究はこの毒素の単離・構造解析を試みた。

Pc を 25℃で数日間培養した後のグルコース・硝酸含有 PCSM 培地から菌体を除去した後、培養濾液をレタス葉に陰圧接種したところ、細胞死誘導活性が認められた。活性成分はヘキサンの抽出され、シリカゲルカラムによる分画では、50% メタノール/酢酸エチル画分とメタノール画分に溶出した。最も高い活性が認められたメタノール画分を ODS カラムにより再度分画したところ、80%メタノール画分及び 100%メタノール画分が活性を示し、特に 100%メタノール画分が高かった。更にこの画分を HPLC にて分画を試みたところ、活性を示すピークが認められた。現在、この画分に含まれる成分の構造を解析中である。

シナピン酸の抗酸化反応機構研究

A-5

シナピン酸メチルと脂質過酸化物とのカップリング化合物の構造

○秋山 純¹, 武田美雄¹, 前川智美², 曾根良昭², 増田俊哉¹

(¹徳島大・総合・生物環境資源, ²大阪市大院・生活)

【目的】アブラナや落花生に多く含まれるフェノール酸で、抗酸化性の強い、シナピン酸に着目し、その抗酸化反応機構を安定抗酸化反応生成物の化学構造から解明することを目的とする。

【方法・結果】フェノール酸は、生体成分のラジカル種を捕捉し、ラジカルを消去することで抗酸化性を示す。その際、抗酸化性物質はラジカル種となるが、続くラジカル終結反応により安定生成物となる。本研究では、リノール酸エチルを酸化基質に用い、酸化反応をラジカル開始剤において促進する実験系において、シナピン酸メチルの抗酸化能測定および抗酸化反応生成物の特定を行った。結果、主に生成した物質は、NMR 等により構造解析を行ったところ、シナピン酸メチルと脂質過酸化物とのカップリング化合物であることがわかった。一方で、他のフェノール酸で認められた二量体¹⁾は、生成量が少ないか、不安定であるため、今回は特定できなかった。

1) Masuda *et al. Food Sci. Technol. Res.* **12**(3), 173 (2006).

ヤマモモ葉由来の酸化制御物質研究

A-6

リポキシゲナーゼ阻害活性を有するガロイル化フラボノール配糖体

○染矢立志, 武田美雄, 増田俊哉

(徳島大・総合・生物環境資源)

【目的】ヤマモモの葉部は実部と比べるとその利用性は低い。そこでヤマモモ葉部より新たな機能を見出し有効利用につなげることを目的に、酸化制御に関わる機能¹⁾について検討した。今回はリポキシゲナーゼの阻害活性についての検討を行ったところ、葉部抽出物に強い活性を認めたので、その物質的エビデンスとして活性寄与化合物を明らかにすることにした。

【方法・結果】徳島で採集したヤマモモ葉部のメ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、阻害率を求めたところ、強力な活性を認めた。そこで、活性に寄与する物質の特定を目的とし、溶媒分画によって得た酢酸エチル可溶部について、各種クロマトによる精製を繰り返し行った。最終的に HPLC 上の主要ピークを分取し、活性測定を行ったところ、ガロイル化ミリセチン配糖体を有したフラクションに活性があることがわかった。

1) Masuda *et al. J. Agric. Food Chem.* **56**, 597 (2008)

リン酸架橋デンプンの脂質代謝に及ぼす架橋度の影響

A-7

○大川佑治, 岸田太郎, 海老原 清

(愛媛大農)

【目的】レジスタントスターチ (Resistant Starch: RS) は食物繊維と同様の生理効果を持つことが報告されている。RS は 4 つのタイプがあり、タイプ 2 および 3 は脂質代謝に影響を与えることが知られている。一方、タイプ 4 の脂質代謝に関する研究はほとんど行われていない。そこでタイプ 4 のリン酸架橋デンプン (Distarch Phosphate: DP) を用い、架橋度と脂質代謝の関連について検討した。

【方法・結果】実験①架橋度弱 (DP-L)、中 (DP-M)、強 (DP-H) を 5% 添加した飼料で 4 週間ラットを飼育した。血清総コレステロール濃度、糞中胆汁酸排泄量、盲腸内容物の短鎖脂肪酸含量と pH に有意差はなく、架橋の影響はなかった。肝臓総コレステロール量は架橋度が上がるにしたがって有意に増加した。実験②ラットを 15 時間絶食させ、尾静脈より採血し、絶食時血中グルコース濃度を測定したのち、タピオカデンプン、DP-L、-M、-H の各 10% 懸濁溶液をラットに胃管で投与し、投与後 15, 30, 60, 90, 120 分に血中グルコース濃度を測定した。投与後の血中グルコース濃度は全群で、30 分でピークとなり、投与 120 分後に絶食時にまで減少し、各測定時の血中グルコース濃度は群間で有意差はなく、Total IAUC も有意差はなかった。

Inclusion complex of 10-undecyn-1-ol with cyclodextrin derivatives and its antifungal activity against *Rosellinia necatrix*

A-8

○Neoh Tze Loon, Tanimoto Takahiro, Ikefuji Shuichi, Yoshii Hidefumi, Furuta Takeshi
(Faculty of Engineering, Tottori University)

The inclusion complexation of 10-undecyn-1-ol with cyclodextrin (CD) derivatives, namely, randomly methylated β -CD (RM- β -CD) and hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD), was studied in terms of solubility improvement, apparent stability constant, and the inclusion ratios of the resultant inclusion complexes on an ultimate purpose of producing complex powders with antifungal activity. The aqueous solubility of 10-undecyn-1-ol was greatly improved by inclusion complexation. The effects of the complex powders towards *Rosellinia necatrix* were examined. The inclusion complexes were prepared in solution and lyophilization was performed obtain the inclusion complexes in powder form. The maximum inclusion ratios of 10-undecyn-1-ol/CD complexes were 1.85:1 and 0.65:1 for RM- β -CD and HP- β -CD respectively. The antifungal activity of these complex powders was compared to that of 10-undecyn-1-ol concentrate. The inclusion complexes of 10-undecyn-1-ol with RM- β -CD and HP- β -CD were found more effective in preventing growth of *Rosellinia necatrix* than the 10-undecyn-1-ol concentrate alone.

天然色素で染色したシルク、セルロースおよびキトサンの各パウダーに認められる機能

A-9

○藤岡 登¹, 蜂谷和三², 石原達也¹, 安藤 理¹, 福田恵温^{1,2}

((株) 林原生物化学研究所 研究センター ¹医薬研究部門, ²粧薬研究部門)

古来より、種々天然色素が安全性の高い染色料として食品や衣類をはじめ広く使用され、とりわけ、ベニバナは女性の口紅にも使用されてきた。我々は、化粧品用途で開発するために、天然色素としてベニバナ赤色素、クチナシ黄色素またはシコン色素を用いて、天然の基材であるセルロースパウダー、シルクパウダーまたはキトサンパウダーを染色した。その結果、赤色、黄色および黒色の色材としての使用が可能なたパウダーが得られた。基材に染着したメリットとして、溶液中で不安定だった色素が、基材のパウダーに染着することにより退色に対する安定性が向上した。更に、ベニバナ色素染着パウダーでは、蛍光が認められた。また、化粧品原料への分散性も良好であった。次に、用いた天然色素は生薬としての効果も知られているので、基材に染着した色材の状態では生物活性を検討した。クチナシ黄色素で染色したシルクパウダーやシコン色素で染色したキトサンパウダーは、UVB 照射や光増感剤存在下での UVA 照射による角化細胞の傷害を防御した。更に、ラジカルによるリノール酸の酸化も抑制し、アンチエイジング効果が期待される天然色材であると考えられた。

Fourier self-deconvolution による糖類アモルファスマトリクスに包括された

タンパク質および高分子のコンフォメーション解析

A-10

○今村維克, 大山健一, 横山 徹, 野村真世, 今中洋行, 中西一弘

(岡山大院自然)

糖類アモルファスマトリクスによる不安定物質の安定化作用の高度化を目的として、糖アモルファスに包括されたタンパク質および高分子物質の高次構造と温度との関係を調べた。Fourier transform infrared spectroscopy (TS-FTIR)を用いて様々な温度における糖-タンパク質（高分子）複合試料の IR スペクトルを測定し、Fourier self-deconvolution 分析により、タンパク質（高分子）の二次構造を解析した。糖としては二糖のトレハロース、マルトースとデキストラン(MW 6,000)を用いた。タンパク質としてはbovine serum albumin (BSA)などの5種類のものを用い、高分子としてはpolyvinylpyrrolidone (PVP, MW 360,000)を取り上げた。糖-タンパク質（高分子）複合試料は真空乾燥等で絶乾することにより作成した。その結果、今回用いたいずれのタンパク質・高分子についても、ガラス転移温度(Tg)以上になると主要な二次構造成分が急激に減少することがわかった。さらに糖の種類による違いを比較したところ、極めて高い Tg を有するデキストランのアモルファスマトリクスでは、Tg 以下でもタンパク質の構造変化が顕著に生じることが分かった。

ゴマ毛状根に含まれるキノン類の生合成関連化合物

A-11

○神代敦史, 古本敏夫

(香川大農)

[目的] 現在ゴマ由来のアントラキノン類として、MPAQ、(E)-MPDEAQ および数種の anthrasesamone 類がゴマ根および毛状根から確認されている。本研究では、さらなるアントラキノン生合成関連化合物の単離、構造決定を目的に、ゴマ毛状根からの検索を行った。

[方法・結果] Gamborg's B5 液体培地中で 28°C、暗所、60 rpm で4週間回転振とう培養した毛状根について、自然ろ過して得られた毛状根およびろ紙を凍結乾燥した後 MeOH 抽出し、抽出物を水と CH₂Cl₂ で分配することで CH₂Cl₂ 可溶性画分を得た。これをシリカゲル、Sephadex LH-20 および逆相カラムにより精製し、さらに HPLC 分取により compound 2 (4.5 mg) を得た。さらに各種機器分析から既知物質である (E)-MPDEAQ の幾何異性体で、2-[(Z)-4-methylpenta-1,3-dienyl]anthraquinone ((Z)-MPDEAQ) と決定した。また、この化合物は光によって容易に変化し、その変化物は (E)-MPDEAQ であることが確認された。このことから、(Z)-MPDEAQ は光により異性化し、(E)-MPDEAQ となることが示唆され、植物体内では今回確認された (Z)-MPDEAQ が真の生合成代謝産物であることが強く示唆された。

Antifeedants of finger millet, *Eleusine coracana* against whitebacked planthopper,

A-12

Sogatella furcifera

○Kabir Md. Alamgir, Shin-ichi Tebayashi, Chul-Sa Kim

(Faculty of Agriculture, Kochi University)

Whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*) is the well known as serious sucking insects of rice plant through out the world specially the Asian countries. Though it is also known that they can attack several germanous plants, they can not attack finger millet (*Eleusine coracana*). As this resistance of finger millet against this insect species is based on antifeeding activity, we tried to isolate and identify those antifeedant(s). The methanol extract of finger millet stems and leaves after defatting with hexane showed a high antifeeding activity. The acidic and basic fractions obtained from separation by ion exchange resins did not show the feeding inhibitory activity but the combined fractions showed significantly activity. L-Phenylalanine, 1-methylnicotinamide, adenosine, adenine and 4-aminobutanamide were isolated and identified from the active basic fraction. Of those compounds, 1-methylnicotinamide and 4-aminobutanamide were the most active against *S. furcifera* when they were combined with acidic fraction.

生理活性を示すイソプレニル環状ジペプチド類の MS/MS 分析

A-13

○原田幸枝¹, 臼木博一², 畑中唯史², 仁戸田照彦¹, 神崎 浩¹

(¹岡山大学院自然科学, ²岡山生物研)

【目的】脱水素型環状ジペプチド類(Δ CDPs)は、様々な生理活性を示す。我々は糸状菌が生産し、イソプレニル化されたデヒドロヒスチジン残基を有す phenylahistin, aurantiamine から脱水素体を調製し、これら4種の化合物と他の Δ CDPsの構造活性相関研究により、dehydrophenylahistin(Δ PLH)が抗腫瘍剤のリード化合物として有望であること、活性発現にイソプレニル基と両アミノ酸残基の二重結合の存在が重要であることを明らかにしてきた^{1,2)}。今回、これらのさらなる構造的特徴解析のため ESI-MS/MS 分析を行った。

【方法と結果】4種の化合物全てにおいて、デヒドロヒスチジン残基に結合しているイソプレニル基の脱離を示すと考えられるフラグメントイオン $[M+H-68]^+$ と、イソプレニル基に由来すると考えられるフラグメントイオン m/z 69 が検出された。さらに、イソプレニル化アミノ酸残基に由来すると考えられるフラグメントイオン m/z 176 が検出されたことから、ESI-MS/MS 分析の応用により、各種試料中に含まれるイソプレニル化 CDPs の効率的な探索および予備的構造解析が可能となることが期待される。

¹⁾Kanzaki *et al.*, *J. Antibiot.*, **55**, 1042-1047(2002). ²⁾ 平田ら、日本農芸化学会 2007 年度大会要旨集 p42

リン酸捕獲試薬、Phos-tag®を用いたスフィンゴシン 1-リン酸の質量分析計による分析

A-14

○高木晴子¹, 瓜倉真衣¹, 盛重純一¹, 平野 薫¹, 里内 清¹, 田中 保^{1, 2}, 小池 透³

(¹福山大生命工, ²徳島大院 HBS, ³広島大院医歯薬)

【目的】スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、特異的 S1P 受容体を介して様々な生理活性を示すリン酸モノエステル型のリゾリン脂質メディエーターである。生体内での S1P 量は微量であるため、その分析には簡便かつ高感度に測定する方法が求められる。今回我々は、リン酸捕獲試薬、Phos-tag®を用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) による S1P の定量法を開発した。

【方法】生体試料に内部標準物質 (C17 S1P) を添加した後に S1P を 1-ブタノールで抽出し、薄層クロマトグラフィーで精製した。これを ⁶⁸Zn-Phos-tag と混和し、マトリックスに 2',4',6'-trihydroxyacetophenone を用いてターゲットプレート上で結晶化させた。分析は正イオンモードで行った。【結果および考察】C17 S1P に対する C18 S1P の検量線を作成したところ、傾きが 1.02 となる良好な直線が得られた。また、微量のケイ酸を混和して結晶を作製すると S1P の検出感度が向上し、検出限界は 0.8 pmol on plate となった。本法を用いてマウスの血漿および血清からの S1P を定量した結果、既報と同程度の値が得られた。

Characterization of volatile compounds in canned Puff Ball mushroom,
Astraeus hygrometricus (Pers.) Morgan, widely consumed in northern Thailand

A-15

○Pattana Kakumyan, 松井健二
(山口大院医学系 (農学系))

Volatile compounds in canned Puff Ball mushroom, *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan, were extracted by close loop stripping system and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This mushroom is widely found and consumed in North and Northeast of Thailand because it's unique flavor. In Japan we know that it was consumed in the south of Kyushu. Their profiles of volatiles and key odorants were compared with those of canned straw mushroom, *Volvariella volvacea* Sing. Total amount of volatiles of Puff Ball mushroom was significantly higher than that of straw mushroom. C₈ compounds, 1-octen-3-ol (mushroom like), 3-octanol (mushroom like), 1-octanol (citrus) and 3-octanone (mushroom like), exhibiting the fungal odor note, were much more abundant in Puff Ball mushroom than in straw mushroom. In contrast, fatty and fruity odor description such as 2, 4-decadienal (fatty) and 2-pentyl-furan (floral, fruity) were higher in straw mushroom than in Puff Ball mushroom. Interestingly, 2-cyclohexane-1-one, 3-methyl-2-cyclohexen-1-one and 3, 5-dimethyl-2-cyclohexen-1-one were identified only in Puff Ball mushroom. These compounds had not been reported before with other mushrooms.

クランベリーポリフェノール尿中代謝物の大腸菌性バイオフィルム形成抑制効果

A-16

○ 佐々木典子¹, 大西令子¹, 伊東秀之¹, 狩山玲子², 光畑律子², 和田耕一郎²,
公文裕巳², 波多野 力¹
(岡山大院医歯薬¹天然医薬品開発学, ²泌尿器病態学)

多様なポリフェノールを含有するクランベリーは、古くから欧米で尿路感染症の民間療法として用いられてきた。演者らは先に、クランベリージュース飲用のヒトにおける尿中代謝物の同定およびその尿中排泄率について報告してきた。今回、尿路感染症の予防・治療に対するクランベリーの寄与の観点から、バイオフィルム形成に影響を及ぼすクランベリー成分および尿中代謝物の探索を目的として研究に着手した。

大腸菌性バイオフィルム形成抑制作用について peg 付マイクロプレートを用いて検討を行った結果、尿中代謝物のなかでも、*o*-Coumaric acid, *p*-Coumaric acid, Vanillic acid, Ferulic acid, および Homovanillic acid に、比較的強いバイオフィルム形成抑制効果が認められた。また、これらの化合物を2種類ずつ組み合わせてアッセイを行った結果、それぞれ単独でアッセイを行ったときと比べて、より強いバイオフィルム形成抑制効果を示したことから、尿中代謝物は、相加的又は相乗的にバイオフィルム形成を抑制している可能性が示唆された。

ジャスモン酸メチルは孔辺細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介して気孔閉口を誘導する

A-17

○宗正晋太郎¹，中村宜督¹，下石靖昭¹，森 泉²、村田芳行¹

(¹岡大院・自然科学，²岡大・資生研)

【目的】植物の葉の表皮に存在する気孔は、蒸散による水分放出や光合成に使用する二酸化炭素の吸収を調節する重要な器官である。近年の研究から、病原菌の感染や傷害に対する防御応答を制御する植物ホルモンであるジャスモン酸メチル(MeJA)が、多くの植物種において気孔閉口を誘導する働きを持つことが明らかとなってきた。しかし、MeJA の気孔閉口誘導シグナル伝達機構の詳細は現在不明である。本研究では、多くの生物において非常に重要な情報伝達因子として機能しているカルシウムイオンに着目して、MeJA の気孔閉口誘導シグナル伝達機構の解明を試みた。

【結果】カルシウム指示蛍光タンパク質であるイエローカメレオンを発現したシロイヌナズナを用いて実験を行った結果、MeJA は孔辺細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を誘導することがわかった。また、逆遺伝学的解析によって細胞内カルシウムセンサーであるカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素が、MeJA が気孔閉口を誘導する際に必要であることが明らかとなった。以上の結果から、MeJA の気孔閉口誘導シグナル伝達経路において孔辺細胞内のカルシウムイオンが情報伝達因子として機能していることが示唆された。

昆虫培養細胞 Sf9 に対するピリダリルの細胞毒性発現機構の解明

A-18

○杉岡大介¹，松野 燐²，内海俊彦³，尾添嘉久¹

(¹島根大・生資・生命工、²同・生物、³山口大院・医・応用分子生命)

【目的】ピリダリルは、最近開発された殺虫剤であり、従来の殺虫剤とは異なる作用機構を有すると考えられているが、その作用機構は不明である。本研究では、昆虫培養細胞 Sf9 を用い、ピリダリルの作用機構を解明することを目的とした。

【方法と結果】1 μ M のピリダリル処理により細胞の増殖は停止し、その作用は可逆的であった。細胞の生死をトリパンブルー染色で調べると、細胞は生存しており、またヘキスト染色の結果、アポトーシスを誘導していないことが分かった。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析により、ピリダリル処理した細胞は G2/M 期で停止していることが分かった。電子顕微鏡による観察では、ピリダリル処理時に細胞内にオートファゴソーム様小胞が見られ、それがモノダンシルカダベリンで染色されたことから、オートファジーが誘導されていることが示唆された。しかし、オートファジーの誘導と関連があるライソゾームあるいはオートライソゾームの活動をアクリジンオレンジで検出したところ、ピリダリル処理した細胞ではこれらの活動の衰退が推察された。

ジカルボニル化合物に由来する酸化ストレス源

A-19

○小林隆幸, 安田孝之, 石川孝博, 澤 嘉弘, 柴田 均
(島根大・生物資源・生命工)

メチルグリオキサール (MG) や 3-デオキシグルコソール (3-DG) は、生体内において解糖系やメイラード反応の過程で生成されるジカルボニル化合物であり、糖尿病患者の血中ではこれらの濃度が健常者と比較して上昇している。ジカルボニル化合物は反応性が高く、タンパク質の重合や各種遺伝子の発現を誘発することから、その存在は“カルボニルストレス”と呼ばれている。MG をアルカリ条件下でアラニンと反応させると、生成物の MG 骨格がラジカル化すると報告がある。これを踏まえ、今回 MG に加えて 3-DG、フェニルグリオキサールという 3 種のジカルボニル化合物をアミノ酸と反応させ、スピントラップ剤 DBNBS を使用して中性条件下でのラジカル生成を測定した。これより、発生するラジカル種はジカルボニル化合物ではなく、反応させたアミノ酸に依存するという結果を得た。今回、このアミノ酸に依存する炭素中心ラジカルによる生体内タンパク質の重合化など、このラジカルが持つ酸化ストレス源としての特性について報告する。

中国黄土高原産樹木苗木における S-ABA 散布処理が GB 蓄積に及ぼす影響

A-20

○東条昌彦¹, 山本牧子², 杜 盛², 有馬二朗³, 森 信寛³, 山本福壽³, 山中典和¹
(¹鳥取大乾燥地研, ²中国水土保持研究所, ³鳥取大農)

苗木への天然型アブシジン酸(S-ABA)散布処理が、浸透調節物質として機能すると考えられているグリシンベタイン (GB) の蓄積に及ぼす影響を調べた。実験には中国黄土高原原産のリョウトウナラ (*Quercus liaotungensis*)、紫丁香 (*Syringa oblata*)、側柏 (*Platycladus orientalis*) と、北アメリカ原産のニセアカシア (*Robinia pseudoacacia*) の 3 年生苗木を使用した。栽培は鳥取大学乾燥地研究センター内の大型ガラス室内で行い、毎日十分な水を与える灌水処理と、pF 3 の乾燥ストレスを与える乾燥処理の 2 処理を設けた。ABA 処理には S-ABA を含む複合肥料ミヨビ (バル企画) を用い、処理濃度を 0、0.005、0.05、0.5mM に設定した。ABA 溶液は 1 週間に 1 度、夜明け前に葉面裏側に十分に散布した。散布は、2007 年 5 月から 10 月まで行った。実験終了後、葉を刈り取り、80℃で 48 時間乾燥させた後、粉碎し粉末状にした。その後、水を加え熱抽出し、フェナシルエステル化反応させたものを試料とした。GB 分析にはキャピラリー電気泳動装置 CAPI-3300 (大塚電子株式会社) を使用した。結果として、GB 含有量は樹種間で比較すると、ニセアカシアで多くみられた。また、乾燥ストレスがかかると GB 含有量が増加する傾向がみられた。ABA 処理濃度と GB 蓄積の間には明瞭な関係は認められなかった。

イネ科植物エンドファイトの生産する斑点米カメムシ類忌避物質

A-21

○作野えみ, 澤 佑治, 久木元堯斗, 中島廣光
(鳥取大農)

【目的】近年, 斑点米カメムシ類による斑点米の発生が急増している. 斑点米が収穫米に混入していると見た目, 食味ともに悪くなり, 米の商品価値が著しく低下する. このことから斑点米カメムシ類は稲作における重要害虫とされている. このカメムシによる被害を防ぐ方法の一つとして, 忌避剤の利用が考えられる. そこで本研究では, イネ科植物のエンドファイト代謝産物中に斑点米カメムシ忌避物質を求めた.

【方法と結果】鳥取大学周辺のイネ科植物よりエンドファイトを分離した. このエンドファイトを培養し, 代謝産物を得た. 得られた代謝産物について, 斑点米カメムシ類の一種であるマルシラホシカメムシを用いた忌避活性試験を行い, Hs-259 菌を選抜した. 本菌を麦芽培地で培養し, 培養ろ液を酢酸エチルで抽出した. この抽出物をマルシラホシカメムシ忌避活性を指標に各種クロマトグラフィーにより精製し, 化合物1を得た. 各種機器分析の結果から化合物1を 3-(4-methylfuran-3-yl)propan-1-ol と決定した. 化合物1は 0.5 mg で完全にカメムシを忌避した. また, 0.1 mg でも強い忌避活性を示し, その忌避活性はポジティブコントロールとして用いたナフタレンより強かった.

NMDA 型グルタミン酸受容体に対するジペプチドの効果

B-1

○立溝博也, 黒下主悠, 山田康枝
(近畿大工)

〔背景・目的〕NMDA型グルタミン酸受容体は記憶や学習に重要な役割を果たしており、グリシンとグルタミン酸が結合することで開くイオンチャンネルである。NMDA受容体の過剰な反応が脳梗塞や脳卒中の際の神経細胞死の原因の一つにもなっており、この受容体に作用する物質の研究が望まれている。本研究では、4種類のジペプチドについてNR1/NR2A およびNR1/NR2BサブタイプNMDA受容体への作動活性と阻害活性を測定し、これらのジペプチドのNMDA受容体への効果を検討した。

〔方法・結果〕NMDA 受容体の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、膜電位を -70 mV に固定し、二電極膜電位固定法により活性を測定した。その結果、4つのジペプチドで程度の違いはあるが、作動活性が見られた。阻害活性を測定したところ、アスパルチルグルタメイトにのみ阻害活性がみられた。以上の結果よりジペプチドには NMDA 型グルタミン酸受容体の活性に効果を及ぼすものがあることが明らかになった。

ウサギ肝のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムの脂肪酸 ω 酸化における役割

B-2

○宮尾夕子, 岡崎早恵, 山本 寛

(福山大 生命工)

【目的】 脂肪酸 ω 酸化経路は、脂肪酸のカルボキシル基と反対側の ω 位をカルボキシル基にまで酸化する経路である。これまでに、著者らは脂肪酸の ω 酸化に関与するウサギ肝の脂肪酸 ω 水酸化酵素(CYP4A)、およびアルデヒド脱水素酵素について詳細に報告し、その基質特異性などについて報告してきた。今回、 ω 酸化経路で働くアルコール脱水素酵素を特定することを目的として、ウサギ肝に分布する種々のアルコール脱水素酵素について、それらの基質特異性を中心に検討したので報告する。

【方法と結果】 ウサギ肝mRNAを鋳型として、デジェネレートプライマーを用いたRT-PCR法により4種類のアルコール脱水素酵素をコードするcDNAをクローニングし、大腸菌発現系を用いて発現させた。今回検討したアルコール脱水素酵素の4種類のアイソザイムの中で、Class Iの ω ヒドロキシ脂肪酸に対する K_m 値が低く(12-hydroxy lauric acidに対する K_m 値は $32.3 \mu M$)、Class Iが脂肪酸 ω 酸化経路で重要なはたらきをしている可能性が示唆された。また、Class IIおよびClass IIIの基質特異性は、それぞれベンジルアルコール、及びホルムアルデヒドに対して低い K_m 値を示すことが明らかとなった。

大腸菌由来L-アスパラギン酸オキシダーゼ(LAO)の安定性

B-3

○川上矩加¹, 加藤さおり¹, 芦田裕之², 石川孝博¹, 柴田 均¹, 澤 嘉弘¹

(¹ 島大・生資・生命工, ² 島大・総科研・遺伝子)

大腸菌由来 L-アスパラギン酸オキシダーゼ (LAO) は、生体内で NAD 生合成経路の初発反応として L-アスパラギン酸 (L-Asp) からイミノアスパラギン酸の生成を触媒する酵素である。LAO は、基質特異性が高く、L-Asp に対する親和性も高いことから、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) との共役反応による高感度の L-Asp 定量系として用いることが可能であり、バイオセンサーとしての利用も期待できる。

しかしながら、LAO が光に対して不安定であり、光照射により急激に活性を失う点や、精製中にプロテアーゼによる分解を受けて不可逆的に不活性化することが判明した。

そこで、各種クロマトグラフィーにより精製した大腸菌由来 LAO を用いて、種々の条件で安定化を検討した。最終的に EDTA の添加により LAO の分解がほぼ完全に阻害されたことから、LAO の分解はメタルプロテアーゼによるものであると示唆された。また、断片化 LAO の N 末端シーケンスを決定することで、切断点を決定し、この近傍のアミノ酸を置換することで、分解を受けにくい安定化 LAO の作成・解析を行った。

超好熱細菌 *Thermotoga maritima* 由来ピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼの性質

○林 順司¹, 酒瀬川信一², 櫻庭春彦³, 大島敏久⁴

B-4

(¹徳島大院・生命テクノサイエンス, ²旭化成ファーマ株式会社, ³香川大農・応用生物科学, ⁴九州大院・微生物遺伝子工学)

ピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼ (PPDK) はピルビン酸、ATP、リン酸からホスホエノールピルビン酸、AMP、ピロリン酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。本酵素は AMP から ATP を生成することができるため、ルシフェラーゼと共役させることで ATP サイクリング系を構築し、微生物量の指標として微量の ATP を測定する検査法に応用されている。しかし常温生物由来の酵素は不安定であるため安定性の高い酵素の開発が求められている。一般に超好熱菌由来の酵素は安定性に優れているため、超好熱菌に PPDK が存在すればその有用性が期待できる。ゲノム情報から超好熱細菌 *Thermotoga maritima* に PPDK のホモログを見出した。推定される ORF を PCR で増幅後、pET-15b に組み込み、大腸菌株 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL における発現系の構築を行った。その結果、ORF 産物が PPDK 活性を示し、高度耐熱性 PPDK をコードしていることが確認できた。酵素は熱処理 (90℃、10 分)、Chelating Sepharose FF、SuperdexTM200 を用いて精製した。本発表では *T. maritima* 由来 PPDK の酵素化学的性質について報告する。

ユーグレナにおける L-ガラクトノ-1,4-ラクトン脱水素酵素の機能解析

B-5 ○西川 仁¹, 草園智美¹, 澤 嘉弘¹, 柴田 均¹, 薮田行哲², 丸田隆典³, 重岡 成³,

石川孝博¹ (¹島根大・生物資源, ²鳥取大・農, ³近畿大院・農)

光合成真核藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis* Z) のアスコルビン酸は、ガラクトツロン酸経路により合成され、L-ガラクトノ-1,4-ラクトン (L-GalL) 脱水素酵素 (L-GalLDH) はこの経路の最終段階を触媒している。ユーグレナは、ミトコンドリアと細胞質に L-GalLDH アイソザイムが存在するが、これらの遺伝子レベルでの詳細は明らかではない。今回、ユーグレナから L-GalLDH をコードする cDNA を単離し、その機能解析を行った。ユーグレナ EST データベースより高等植物 L-GalLDH と高い相同性を持つ配列を見だし、完全長 cDNA クローンを単離した。得られたクローンは 593 アミノ酸残基 (推定分子量 58, 103) をコードし、植物 L-GalLDH と約 43%、動物 L-グルノ-1, 4-ラクトン酸化酵素 (GLO) および酵母 D-アラビノ-1, 4-ラクトン酸化酵素 (ALO) と約 30%の相同性を示した。N 末端領域には、41 残基からなる推定ミトコンドリアシグナル配列が存在していた。また、動物 GLO および酵母 ALO のフラビン共有結合に関与する N 末端近傍の保存領域中の His 残基は、植物 L-GalLDH 同様 Leu に置換されていた。現在、組換え体酵素を作成し、酵素学的性質の検討を進めている。

Paenibacillus 属由来 α -ガラクトシダーゼの性質と糖転移作用

B-6

○山本朗子, 大倉隆則, 西本友之, 茶園博人, 福田恵温

(林原生化研)

我々は有用かつ付加価値の高い糖質および配糖体の調製を可能にする新規な糖質関連酵素を得ることを目的に土壌菌株からスクリーニングを行ってきた。その過程で見出された *Paenibacillus* 属由来の α -ガラクトシダーゼの酵素的性質と糖転移作用について報告する。本酵素は培養上清に存在し、各種クロマトグラフィーによって、ほぼ単一にまで精製した。本酵素の分子量は約 50 k、等電点は、pI 4.4 であった。反応最適 pH は約6、pH 約 5-9.5 の範囲で安定であった。また、反応最適温度は 50°C であり、カルシウムイオン非存在下で 40°C まで、存在下で 45°C まで安定であった。金属イオンの影響を調べたところ、Cu・Hg で完全に失活、Fe・Al・Pb でもかなり活性の抑制が認められた。EDTA による影響は認められなかった。基質特異性を調べたところ、パラニトロフェニル α -ガラクトシドの加水分解活性は、メリビオースより86倍高かった。受容体特異性の調査および本酵素を用いた縮合反応によるガラクトビオースの調製も行ったので、その結果も併せて報告する。

β -アミラーゼを微量にしか含まないイネの多型の α -グルコシダーゼに関する研究

B-7

○山崎良樹、中島 進、今野晴義

(岡山大・資生研)

【目的】 イネ種子(*Oryza sativa* L., var. *Hinohikari*)が発芽するとき、 β -アミラーゼ活性は非常に弱くしか検出されなくて、 α -グルコシダーゼ活性が多量に検出される。今回は、この α -グルコシダーゼについて報告する。

【方法】 イネ種子を5%食塩含有の50 mM酢酸緩衝液(pH 5.3)中に浸漬して、ホモゲナイザー(Nissei Excel Auto-Homogenizer)で破碎し、その抽出液を粗酵素(A液)とした。また、30°Cで8日間発芽させた発芽イネ種子からも同様にして粗酵素(B液)を得た。

【結果】 A液についてIEF(pH 3.5-10)を行うと、3種の α -グルコシダーゼ(A-1, A-2, A-3)が得られたが、A-1, A-3が主要酵素であった。A-1とA-3は。類似の性質を示したが、可溶性澱粉に対するKm値(A-1, 6.7 mg/ml; A-3, 2.2 mg/ml)は異なっていた。一方、B液についてIEF(pH 3.5-10)を行うと、1種の α -グルコシダーゼ(B-1)のみが得られた。A-3とB-1のpIは同じであった。そこで、発芽に関わっていると考えられるA-3を単離し、その諸性質を調べた。

微生物反応および酵素反応による新規 1 デオキシ希少糖の生産

B-8 ○原口智志, 吉原秀明, Pushupakiran Gullapalli, Devender Rao, 森本兼司, 高田悟郎, 何森 健

(香川大 希少糖研究センター)

天然に存在する 6 デオキシ糖 L-フコース(6-デオキシ-L-ガラクトース)から新たなデオキシ希少糖を合成するため、これをまずニッケル触媒を用いた水素添加法にて還元し 6-デオキシ-L-ガラクトールを得た。これを *Enterobacter agglomerans* 221e 株の持つ酸化酵素を用いて微生物酸化し 1-デオキシ-D-タガトースを得た。生成物の比旋光度および ^{13}C -NMR の化学シフトを調べ構造決定した。その結果、生成物の比旋光度は+13.0 で、ケミカルシフトは 1-デオキシ-D-タガトースと一致した。続いてこの 1-デオキシ-D-タガトースを *Pseudomonas cichorii* ST24 株由来の D-タガトース 3-エピメラーゼを用いてエピ化反応を行うと基質と生成物が 3:1 の割合で平衡に達し、平衡に達した反応液を脱塩、脱色した後に基質と生成物とをカルシウム型にしたイオン交換カラムを用いて分離した。先と同様に分析したところ、生成物の比旋光度は+43.7 で、ケミカルシフトは 1-デオキシ-D-ソルボースと一致したことが確認された。次に水素添加により 1-デオキシ-D-ソルボースを還元し、2 種類のデオキシポリオールを得た。現在これらの構造を確認中である。

大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素における Asp466 と Lys493 の役割

B-9 Golam Mustafa¹, 石川宜位², 右田たい子¹, 小林一雄³, 田川精一³, ○山田 守^{1, 2}

(¹ 山口大農, ² 山口大院医, ³ 大阪大産研)

[目的] 大腸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH) は、呼吸鎖初発酵素の機能解析にとって良いモデルとなる。mGDH は、補酵素 PQQ に加えて、結合キノン (Q) とバルク Q の結合部位をもつ。K493 や D466 は、PQQ のオルトキノンの近くにあつて触媒反応に関与する。結合 Q は、PQQ から 11-13 Å の位置にあることが示唆されている(1)。これらのことから、両アミノ酸は結合 Q の近くに存在する可能性が考えられる。本研究では、K493 や D466 と結合 Q との相互作用の有無を検討した。[方法・結果] D354, D466, K493 のいくつかの変異 mGDH を精製して用いた。D466N, D466E, K493A は、二次構造的にはほとんど違いは見られなかったが、Q 結合量が大幅に減少していた。パルスラジオリシス解析の結果、K493R は、より安定な Q セミキノン中性ラジカルを形成し、PQQ への電子移動低下を示した。D354N と D466N は、セミキノンアニオンラジカルを形成した。また、EPR 解析の結果、K493 変異や D466 変異は、結合 Q スペクトルに明らかな影響を及ぼした。以上の結果、K493 や D466 は、PQQ だけでなく結合 Q に近接し、直接あるいは間接的に相互作用していると予測される。(1) *Biochemistry* 44:13567, 2005

細胞表層提示糖鎖修飾酵素の検索

B-10

○熊内 悠, 岡本賢治, 築瀬英司

(鳥取大院・生応工)

細胞表層にはタンパク質や脂質に結合した糖鎖構造が提示され、その糖鎖の多くが分子間の相互作用あるいは細胞間相互認識などに深く関与している。胃粘膜表層に提示されるスルファチドやルイスb糖タンパク質は、難治疾患の一つである胃ガン誘発の原因とされる *Helicobacter pylori* が付着する標的分子として報告されている。これまでに、*H. pylori* 接着阻害作用をもつ酵素製剤開発を目的として、ルイスb糖タンパク質糖鎖切断酵素や糖脂質糖鎖切断酵素を生産する微生物を自然界より分離してきた。今回は、Lewis 型糖鎖末端L-fucose 残基を特異的に切断するフコシダーゼを生産する微生物を検索し、その酵素化学的性質を解析した。

PGM(Porcine Gastric Mucin)を炭素源として生育する細菌を自然界に検索した。次に、分離した PGM 資化性菌を対象として、PGMを基質として fucose を遊離する活性を指標としてフコシダーゼ生産菌(No.5641 株)を選択した。5641 株は生育とともにフコシダーゼを細胞外に分泌し、その培養液上清には 2'-fucosyllactose に特異的な α -L-フコシダーゼ活性が認められた。

アフリカツメガエル の 2 種のチモシン β_4 様タンパク質の生理機能

B-11

○山本 寛, 竹中 諒, 宮尾夕子

(福山大 生命工)

【目的】 EST 解析では、さまざまな機能未知タンパク質や既知タンパク質のホモログが見出されているが、これらの機能を確定するためには、発現タンパク質の機能を直接確認する必要がある。著者らはアフリカツメガエル (*X. laevis*) 未受精卵の EST 解析において、マウスの Thymosin β_4 と相同性を有する2種のクローン(Clone #862 および Clone #913)を単離している。Thymosin β_4 は分子量約 5 kDa.の比較的小さなポリペプチドで、細胞内では G-Actin の貯蔵に働く一方で、ホルモンとしても作用することが知られている。本研究では、これら2種の cDNA がコードするタンパク質の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】Clone #862 および Clone #913 cDNA を大腸菌発現系を用いて GST 融合タンパク質として発現させ、GSTrap FF カラムを用いたアフィニティクロマトにより精製した。発現タンパク質の G-Actin との相互作用は、HPLC 及び Biacore システムにより検討した。その結果、Clone #862、および Clone #913 発現タンパク質は G-Actin との結合活性を有する Thymosin β_4 であることが確認された。また、Clone #862 および Clone #913 の遺伝子構造を解析したので、これらの結果についても報告する。

細胞損傷タンパク質MM29kDの活性決定領域

B-12

○吉村 彰, 松井亮祐, 阪本佳樹, 中野加奈子, 松村祐介, 小塚昌弘,

千 菊夫¹, 武部 聡², 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)

MM29kD は *Bacillus thuringiensis* MM50G2 株が産生するクリスタル由来のタンパク質で、ヒト白血病ガン細胞 (Jurkat 細胞) に細胞損傷活性を示す。MM29kD (V²⁹-A²⁸¹) はクリスタルタンパク質をプロテアーゼ処理によって生じる活性化ペプチドを基にデザインされたものであるが、それが適切な活性化ペプチドである保障はない。本研究では MM29kD の N 末端側及び C 末端側を適宜伸張・欠失させた様々な変異体を構築、Jurkat 細胞に対する細胞損傷活性を調査することで、MM29kD の活性決定領域を特定しようと試みた。具体的には MM29kD 遺伝子を含むベクター、pBS-MM29kD WT を鋳型とした PCR により、異なる N 末端側及び C 末端側境界を持つ変異体を構築した。作製した MM29kD 変異体は GST 融合タンパク質として発現させ、Jurkat 細胞に投与し、生存率は MTT アッセイにより評価した。ここでは最大活性を示す MM29kD 活性決定領域の N 末端側及び C 末端側境界を示すと共にプロテアーゼによる活性化の意義についても議論する。

昆虫由来無細胞タンパク質合成系を用いた Rab タンパク質のプレニル化の検出

B-13

○太田伊宣¹、守屋康子¹、鈴木 崇²、内海俊彦¹

(¹ 山口大院・医・応用分子生命, ² 島津製作所 バイオ・臨床ビジネスユニット)

[目的] タンパク質プレニル化は主要な脂質修飾の一つであり、極めて重要な生理的機能を担っているが、簡便な検出法が知られておらずその解析は他の修飾と比較して遅れている。これまでの研究から、タンパク質プレニル化のうち、ファルネシル化及び GGTase I によるゲラニルゲラニル化 (GG 化) が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で効率よく検出できることを示した。本研究ではこの手法が GGTase II による GG 化の検出においても有効であるか否かについて検討した。[方法・結果] C 末端 CXC モチーフをもち、GGTase II の基質として知られる Rab7A の N 末端に Flag tag を付加した cDNA 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] C 末端 CAAX モチーフを介するプレニル化とは異なり、Rab7A のプレニル化は C 末端 CXC モチーフのみでは生じず、Rab7A の全長で検出された。[2] Rab7A への [³H]メバロン酸の取り込みはファルネシル化阻害剤 (FTI-277) 及び、GGTase I 阻害剤 (GGTI-298) による阻害を受けないことから、GGTase II による GG 化であることが示された。以上より、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 GGTase II による GG 化の検出にも有効であることが示された。

バキュロウイルス感染に伴い昆虫細胞で発現するパルミトイル化タンパク質の解析

B-14

○村田賢祐¹, 柿原圭介¹, 守屋康子¹, 小林 淳², 内海俊彦¹

(¹ 山口大院・医・応用分子生命, ² 山口大・農・生物資源)

[目的] バキュロウイルス発現系は、目的タンパク質を大量発現する手法として広く用いられている。最近、バキュロウイルスゲノム中の ORF である *odv-e18* が、バキュロウイルスのライフサイクルに必須な 30 番目の core gene として同定された。我々は、これまでにカイコバキュロウイルス(BmNPV)感染に伴いカイコ培養細胞 BmN4 で ODV-E18 タンパク質が多量に発現し、³H-パルミチン酸により特異的に修飾されることを明らかにした。ODV-E18 はそのアミノ酸配列から一回膜貫通型タンパク質であると推定されたことから、本研究では ODV-E18 の膜局在について検討を行った。

[方法・結果] C 末端に EGFP を融合した、疎水領域に関する一連の変異体を作製して COS-1 細胞に遺伝子導入し、蛍光顕微鏡観察及び細胞分画により解析した結果、ODV-E18 の疎水領域が膜局在に必須であることが示された。また N 末端近傍に N-グリコシル化部位を導入した変異体を作製し、無細胞タンパク質合成系を用いた *in vitro* 膜通過系で解析した結果、ODV-E18 は小胞体膜上におけるタンパク質合成にともない、N 末端を小胞体腔に、C 末端を細胞質に向けた I 型膜タンパク質として小胞体膜上に局在化することが明らかになった。

フユイチゴ抽出液による細胞死誘導

B-15

○渡部純也¹, 早瀬伸樹¹, 牛尾一利¹, 山中理央², 中村 薫³

(¹ 新居浜高専生化, ² 姫路独協大薬, ³ 京大化研)

【目的】我々の研究室では、先般、クサイチゴ *Rubus hirsutus* の葉からのエタノール-水系抽出液中に、ヒト口腔がん細胞 KB に対して細胞死誘導作用を示す物質を数種類見だし、そのうち 1 つをフィトールであると同定した。今回はクサイチゴと同じバラ科キイチゴ属であり、同様の細胞死誘導作用が認められたフユイチゴ *Rubus buergeri* に含まれる有効成分を精製し、クサイチゴ中の有効成分と比較した。【方法】細胞死誘導成分の抽出: フユイチゴの葉を 70% エタノール中、室温・暗所に 10 日間静置後、これを減圧ろ過し、ろ液をフユイチゴ抽出液とした。有効成分の単離・同定: 各種クロマトグラフィーにより精製して構造解析をおこなった。細胞死誘導能検定法: 検定にはヒト口腔がん細胞 KB TKG4010 を用いた。分画後調製した試料液を培地に対して 1% 添加し、その後、顕微鏡下で形態学的変化を観察した。【結果】フユイチゴ中に含まれる有効成分は少なくとも 2 つあり、そのうち疎水性が高いものについてはクサイチゴに含まれる有効成分同様、フィトールであると判明した。より疎水性の低い活性成分はクサイチゴの場合と異なり顕著な活性を示さず、精製とともに失活する傾向があった。

タンパクフリーローヤルゼリー

B-16

○三宅正樹, 藤井光清, 谷口美文, 岩城完三, 福田恵温
(株) 林原生物化学研究所 研究センター 医薬研究部門

ミツバチの産生するローヤルゼリー(以下RJ)は滋養強壮のためのサプリメントとして古くより利用されてきた。我々は以前よりRJについて検討を行い, その低分子画分には, さまざまな生物作用があることを明らかにしている。ところでRJを摂取した場合, 稀にはあるもののアレルギー症状が出る場合があり, そのアレルゲンがRJに含まれる Major Royal Jelly Protein 1 (MRJP1)を始めとするタンパク質であることが報告されている。そこで我々はタンパク質を除去したRJの調製を試みた。いくつかの調製方法を試みた結果, プロテアーゼによる消化ではRJタンパク質は分解できるものの, PCA およびIgE抗体価の測定から, 抗原性を完全には除去できない可能性が示唆された。そこで別の方法として限外濾過膜によりタンパク質の除去を行なったところ, さまざまな生物作用を示す10ヒドロキシデセン酸を損なうことなく高分子タンパクを除去したRJを調製することが可能であった。このタンパクフリーRJの調製方法を、生物活性と併せて紹介する。

鳴門金時(*Ipomoea batatas* L.)茎葉部の食品機能性

B-17

松浦(三木)宏美¹, ○金丸 芳¹, 山本澄人², 岩田深也²
(¹徳島大・総合科学・生命科学, ²徳島県工業技術センター)

【目的】昨年度本支部会で、鳴門金時の各部位や加熱処理したものについて、食品としての各種の機能性を示した。中でも茎葉部に最も効果があり、また茎より葉に効果があることを示した。そこで今回、再度、鳴門金時の茎葉部を茎・葉柄・葉部に分けて、機能性を検討した。さらに、収穫後の枯れた茎葉部についても検討した。【方法】鳴門金時の茎葉部を茎・葉柄・葉に分けて、凍結乾燥・粉碎し、MeOH で抽出した。抽出物は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、食中毒菌(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】葉部が最も機能活性を示した。100µg/ml でガン細胞3種の増殖を、1、2.5mg/ml で *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* の増殖を強く抑制した。500µg/ml で *Lactobacillus acidophilus* の増殖をわずかに促進した。50µg/ml で細胞内の H₂O₂ 量を抑制し、20µg/ml で DPPH ラジカルを 100%消去し、抗酸化性を示した。一方、収穫後の茎葉部は、ガン細胞の増殖をより強く抑制し、茎部の方が最も効果が強く、逆に食中毒菌の増殖抑制に対しては効果が減弱した。

キャベツの消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモン・リゾホスファチジン酸 による消化管組織修復

B-18 ○田中 保^{1,2}, 堀内 剛¹, 近藤宏樹¹, 松岡 恵¹, 盛重純一¹, 平野 薫¹, 里内 清¹,
徳村 彰², 小池 透³

(¹福山大生命工, ²徳島大院HBS, ³広島大院医歯薬)

リゾホスファチジン酸(LPA)は細胞増殖因子様のメディエーター脂質であり、皮膚や消化管の創傷治癒を促進すると考えられている。我々は食品に含まれる LPA を調べた。その結果、最も高い LPA 含量を示した食品はキャベツ 22 nmol/g(湿重量)であった。煮沸したキャベツにはその 1/20 しか LPA が含まれないことから、キャベツを擦る潰す際に活性化したホスホリパーゼ D と内因性基質から LPA が作られると推定された。咀嚼したキャベツにも、約 20nmol/g の LPA が含まれていた。さらに、咀嚼キャベツには約 200 nmol/g のホスファチジン酸(PA)が存在し、この PA は腭液酵素のホスホリパーゼ A₂ により LPA へと変換されたことより、消化管ではさらに多くの LPA が供給されると推定された。キャベツ脂質は Swiss 3T3 繊維芽細胞の増殖を促進し、HGC-27 胃上皮様細胞の運動性を促進させた。この効果は LPA 受容体アンタゴニストで阻害された。LPA はムチンの分泌を促進する作用があることも判明し、キャベツの摂取は消化管傷害の治癒を促進する可能性が考えられた。

スギ花粉アレルゲンの糖修飾によるエピトープ部位のマスキングと腸管吸収の最適化

B-19 ○青木理恵子, 齊藤 章, 池田 周平, 阿座上弘行, 加藤 昭夫
(山口大農)

[目的] 本研究者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 複合体が効率良く腸管内腔へ吸収され免疫寛容を誘導することを報告してきた。今回は、ガラクトマンナン(GM)および種々の糖を用いてエピトープ部位のマスキング効果および腸管吸収の確認を行った。

[方法] 種々の糖類を乾燥加熱下でのメイラード反応により結合させた Cry j 1-糖複合体の抗原部位のマスキング効果を花粉症患者血清を用いた ELISA により調べた。また、ビオチニル化した Cry j 1-糖複合体をマウスに経口投与し、腸管組織切片を FITC-ストレプトアビジンで処理し、蛍光顕微鏡による免疫組織学的分析により腸管吸収を検討した。

[結果] アレルゲン Cry j 1 に種々の糖類をメイラード反応により結合し、マスキング効果を確認したところ、ガラクトマンナンによる修飾が最も効率良く抗原性を低下した。さらに、腸管吸収においてはガラクトマンナンのみでなく、マンノースにおいても観察され、樹状細胞のマンノースを選択的に認識するレクチンにより、腸管免疫細胞内に貪食されることが示された。

Effects of Dimethyl Sulfides on Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells, Jurkat Cells and
HL-60 Cells

B-20

○Zhang Gongliang, Wu Haitao, 下石靖昭, 中村宜督, 村田芳行
(岡大院・自然科学)

Organosulfur compounds have been established to possess anticancer effects. To provide a better understanding of the biological function of dimethyl sulfides, dimethyl monosulfide (Me_2S), dimethyl disulfide (Me_2S_2), dimethyl trisulfide (Me_2S_3) and dimethyl tetrasulfide (Me_2S_4) were used as experimental materials to investigate their effects on apoptosis induction of human leukemia cells, Jurkat cells and HL-60 cells. Treatment with 20 μM dimethyl sulfides for 24 h decreased cell viability of both cells. The cell viability-reduction effect of these sulfides was in the following order; $\text{Me}_2\text{S}_4 \approx \text{Me}_2\text{S}_3 > \text{Me}_2\text{S}_2 \approx \text{Me}_2\text{S}$ for Jurkat cells and $\text{Me}_2\text{S}_4 > \text{Me}_2\text{S}_3 > \text{Me}_2\text{S}_2 \approx \text{Me}_2\text{S}$ for HL-60 cells. Me_2S_3 and Me_2S_4 significantly induced DNA fragmentation and caspase-3 activation. Addition of GSH or NAC completely suppressed the sulfides-induced apoptosis. Our results indicate that dimethyl sulfides with larger number of sulfur atoms more strongly induce apoptosis of both human leukemia cells *via* ROS production and caspase-3 activation.

サクラネチンによる脂肪細胞の分化及びグルコース取り込みの促進

B-21

○齋藤 武, 阿部大吾, 関谷敬三
(農研機構・近畿中国四国農業研究センター)

メタボリック症候群を予防、改善するためには脂肪細胞機能を正常に維持することが重要である。我々は以前より脂肪細胞の分化およびグルコースの取り込みといった脂肪細胞機能を調節する成分の評価を進めており、今回、フラバノン型のポリフェノールであるサクラネチンによる前駆脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪細胞分化及び脂肪細胞機能に及ぼす影響について検討した。

サクラネチンは分化誘導剤 (DEX、IBMX、Insulin) の存在下、あるいは非存在下でも脂肪細胞分化を濃度依存的に促進した。このとき、脂肪細胞機能に関わるアディポネクチン、脂肪酸結合タンパク質等の遺伝子発現も有意に増加していた。その作用メカニズムを検討したところ、サクラネチンは脂肪細胞分化に必須の核内受容体 $\text{PPAR}\gamma$ に対するリガンド活性は示さないものの、それ単独で $\text{PPAR}\gamma$ 遺伝子の発現を顕著に亢進すること、またその一因として、未分化の細胞において脂肪細胞分化を負に制御している転写因子の発現を減少させていることがわかった。さらにサクラネチンは、分化した脂肪細胞におけるグルコースの取り込みも促進したのであわせて報告する。

エピガロカテキンガレートはベンジルイソチオシアネートによる細胞死を増強する

B-22

○横山智子, Wu Haitao, 下石靖明, 村田芳行, 中村宜督

(岡山大院自然科学)

【目的】 緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCG)は、様々な培養細胞において、過酸化水素の生成や MAP キナーゼ経路の活性化を介したアポトーシス細胞死を誘導することが報告されている。一方、パパイヤ由来のベンジルイソチオシアネート(BITC)も、MAP キナーゼ依存的なアポトーシス誘導作用を示すことが知られている。しかし、これら 2 種の化合物の組合せが細胞死に対してどのように相互作用するかについては、不明な点が多い。そこで本研究は、組合せの細胞死に対する影響と MAP キナーゼの役割を明らかにすることを目的とした。【結果】 まず、ヒト T リンパ球 Jurkat 細胞における EGCG のアポトーシス誘導作用を検討した。その結果、カタラーゼや JNK/ERK 阻害剤により EGCG の作用が解除されたことから、本細胞における EGCG のアポトーシス誘導は過酸化水素の生成を介した、JNK/ERK 経路の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。次に、BITC と EGCG の組合せ処理の効果をウェスタンブロッティング法及びトリパンプルー法にて測定したところ、それぞれの単独処理で誘導される JNK/ERK のリン酸化、並びに細胞死を少なくとも相加的に増加させることがわかった。現在、組合せによる細胞死増強が JNK/ERK に依存しているか否かについて検討中である。

ルテオリンはベンジルイソチオシアネートの抗がん作用を増感する

B-23

○堺 梨江子, 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】 パパイヤ由来のベンジルイソチオシアネート(BITC)は、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、アポトーシス誘導の有効濃度範囲が狭いことから、我々は、食品成分との組み合わせによる効果の上昇と毒性の低下を目指した研究を行ってきた。本研究では、抗酸化・抗炎症作用などを示すフラボノイドであるルテオリンを用いて、BITC との組み合わせによる細胞死誘導効果を検討し、その作用機構について考察した。

【方法・結果】 ヒト大腸がん細胞(HT-29・HCT-116)にルテオリンを前処理した後、BITC を添加した培地で培養を行った。MTT 法やアガロース電気泳動法を用いて細胞死誘導活性を評価したところ、特に HCT-116 細胞において、ルテオリンは BITC によるアポトーシス細胞死を相乗的に促進することを観察した。次に、BITC による細胞死の感受性低下に関与する p21 の発現レベルを RT-PCR 法により評価した。その結果、ルテオリンが p21 発現レベルを有意に低下させることが明らかとなった。以上のことから、ルテオリンは BITC に対する耐性機構を抑制することで、BITC の抗がん効果を増進させていることが示唆された。

Klebsiella 由来 cyanide hydrolase 遺伝子の解析

C-1

○猿渡寛子, 井上寿樹, 岡本賢治, 築瀬英司

(鳥取大院・生応工)

シアン (CN^-) は青酸カリに代表されるように、生物に対しては猛毒性を示す物質である。しかし、微生物をはじめとする様々な生物においては生理活性物質としてのシアン化合物の生産が報告されている。本研究では、極めて反応性に富むC 1化合物としてのシアンを出発物質とするバイオコンバージョンを目的とし、これまでにシアン固定酵素、シアン加水酵素、シアン加水分解酵素、シアン酸化酵素の存在を報告している。今回は、土壌から分離したシアン資化性細菌 *Klebsiella pneumoniae* のゲノム DNA からクローン化した cyanide hydrolase 遺伝子の大腸菌内での高発現化と触媒アミノ酸残基を解析した。

K. pneumoniae からクローン化した cyanide hydrolase 遺伝子は 1,035 bp、344 アミノ酸残基からなり、分子量が 38,673 のタンパク質をコードしていた。既報の nitrilase 遺伝子との相同性解析の結果、cyanide hydrolase の触媒残基として Cys164 を見出した。そこで、本遺伝子の大腸菌内での高発現系を確立し、この系を利用して Cys164 アミノ酸置換酵素の特性を検討した。

好熱菌由来ビオチン生合成系酵素の遺伝子探索と特性解明について

C-2

○窪田高秋, 中村昌義, 河金雅志, 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おり、現在、医薬品、飼料等の添加物としても広く利用されている。我々はこれまで全く報告の無かった好熱菌のビオチン生合成酵素に着目し、ビオチン(中間体)合成活性を有する酵素の探索とそのライブラリ構築を行ってきた。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】 超好熱菌 *A. aeolicus* のゲノムに対して、常温菌由来のビオチン生合成系酵素の遺伝子配列を基に探索を行ったところ、DTB 合成酵素遺伝子 (*AqbioD*)など 5 つの遺伝子を見出した。これらの遺伝子をクローニングし、大腸菌内で組換え酵素としての発現を試みたところ、AqBioD の発現を確認でき、これが DTB 合成活性を示すこと、高い熱安定性(85°C、1時間の熱処理後も約 50%の活性を保持)を有していることを明らかにした。現在、本組換え酵素の諸性質解析と結晶化について詳細に検討している。

微生物による第4級アンモニウム化合物の分解(第6報):

4-N-トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素遺伝子の解析

C-3

○赤井尚樹¹, Hassan Maizom², 一柳 剛³, 森 信寛³

(¹鳥取大院農, ²鳥取大院連農, ³鳥取大農)

我々はこれまでに *Pseudomonas* sp. 13CM の生産する 4-N-トリメチルアミノブチルアルデヒド脱水素酵素(TMABA-DH)の諸性質を明らかにしてきた(1)。さらに最近、本菌から TMABA-DH 遺伝子をクローニングし、組換え酵素と親株由来酵素(13CM 酵素)の性質を比較した(2)。しかし、組換え酵素と 13CM 酵素は基質に対する K_m 値や N 末端アミノ酸配列などが異なり、これらは別々の酵素であることが示唆された。そこで今回、クローニングに成功した TMABA-DH 遺伝子の塩基配列決定を行った。

決定した塩基配列の中には、組換え酵素の N 末端アミノ酸配列を含む 476 アミノ酸がコードされた ORF が存在していた。しかしながら、13CM 酵素の N 末端アミノ酸配列をコードする ORF は見つからず、組換え酵素と 13CM 酵素は異なる酵素であることが判明した。また、相同性検索の結果、本酵素は *Pseudomonas putida* KT2440 の betaine-aldehyde dehydrogenase (putative)に対して 92%の相同性が確認された。

1) H. Maizom, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 155-162(2008) 2) 2008 年度本大会講演要旨集 p. 195.

シロイヌナズナの気孔形成関連遺伝子 TMM および SDD1 の発現制御領域の解析

C-4

○赤坂裕也¹, 川向 誠², 中川 強¹

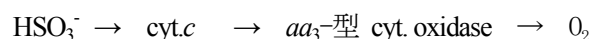
(¹島根大・総科センタ・遺伝子, ²島根大・生物資源科学)

気孔は2個の孔辺細胞で形成され、植物のガス交換における重要な役割を担っている。シロイヌナズナにおいて、気孔の分布や配置、孔辺細胞の形態に異常を示す変異体が単離され、気孔発達のメカニズムについて解析が進んでいる。それらのうち *TOO MANY MOUTHS (TMM)*、*STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1 (SDD1)* 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、そ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を持たれる。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遺伝子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、シス領域の同定を試みた。上記の遺伝子についてデリーションした promoter::GFP クローンを作製し、Dip 法によりシロイヌナズナへと導入、形質転換体について解析を行った。その結果、両遺伝子とも開始コドン上流 200bp のプロモーターコンストラクトまで発現が観察され、特に TMM はこの領域内でその発現パターンに変化を示した。両遺伝子とも数塩基レベルまでシス配列を限定し、データベース検索で既知の転写因子結合部位を調べたところ、該当する候補は見つからなかった。今回の結果から限定されたシス配列は新規のものであることが示唆される。

C-5 *A. ferrooxidans* D3-2 株由来亜硫酸酸化酵素系の *c* 型 cytochrome 及び *aa*₃ 型 cytochrome oxidase からの再構築

○杉尾 剛¹, Taher M. Taha¹, 早崎琢也², 赤穂亜実², 竹内文章³
(¹岡大・院・自然科学 ²岡大農 ³岡大・環境管理セ)

【目的】*A. ferrooxidans* D3-2 株は、チリ共和国銅鉱山より分離した銅溶出活性の高い菌株であり、他の鉄酸化細菌株と比較してより亜硫酸に耐性な亜硫酸酸化酵素を持つことを明らかにしている。今回、D3-2 株の亜硫酸酸化機構を明らかにすることを目的とした。【方法及び結果】亜硫酸酸化活性は亜硫酸の減少速度をパラローズアニリン法を用いて測定した。2価鉄及び元素硫黄で増殖した D3-2 株の亜硫酸酸化活性は 0.1 mM の NaCN で強く阻害されたことから亜硫酸酸化には、鉄酸化酵素の構成成分である *aa*₃-型 cytochrome oxidase が関与していることが示唆された。鉄生育 D3-2 株より *aa*₃-型 cyt. oxidase、rusticyanin (rus)、cytochrome c (cyt.c) を部分精製した。上記 3 成分の存在下でのみ鉄酸化活性が再構成された。亜硫酸酸化には *aa*₃-型 cyt. oxidase と cyt.c の存在が必要であったが rus は必要なかった。2 価鉄は rus、cyt.c、*aa*₃-型 cyt. oxidase のすべてを還元したが、亜硫酸は cyt.c と *aa*₃-型 cyt. oxidase を還元したが rus を還元しなかった。亜硫酸の酸化は、下記のように鉄酸化酵素系の成分である cyt.c 及び *aa*₃-型 cyt. oxidase を用いて行われていると推定した。



環境試料由来新規アルドラーゼ遺伝子の探索

C-6 ○佐藤杏子¹, 櫻庭春彦², 大島敏久³

(¹徳島大院・生命テクノサイエンス, ²香川大農・応用生物科学, ³九州大院・微生物遺伝子工学)

【目的】これまで研究対象とされてきた分離・培養可能な微生物は、環境中微生物全体の 1%未満に過ぎないと言われており、大量の遺伝子資源が未利用のまま残されていると考えられている。そこで、環境から直接取り出した DNA (eDNA) を利用することで、これらの遺伝子資源を利用する試みが近年進められており、これまでに産業上有用な酵素をコードする遺伝子が多数同定されている。本研究では、医薬品リード化合物となる糖類関連物質合成への応用が期待されている、2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) に着目し、高温環境より取得した eDNA より新規 DERA 遺伝子の獲得とその評価を目的とした。

【方法と結果】鹿児島湾若尊カルデラ土壌より取得した 10 種の eDNA を鋳型とし、DERA 遺伝子増幅用縮重プライマーを用いて PCR を行ったところ、1 つの eDNA より増幅が確認できた。縮重プライマーの設計上、獲得した 5 種類の新規配列は、DERA 遺伝子の中間部に当たる部分配列であるため、得られた部分配列と既知の DERA 遺伝子を融合させた「キメラ酵素」を作成し、その酵素活性を評価した。今後は、eDNA からの DERA 遺伝子全長取得を目指す予定である。

16S rDNA データベースを用いる T-RFLP フローラ解析法の確立

C-7

○中路沙織, 末友寿実, 石川瑞枝, 石川孝博, 柴田 均, 澤 嘉弘
(島大生資生命工)

フローラ解析法として 16S rDNA の多様性に着目した T-RFLP 法がある。T-RFLP 法は、迅速に多量のサンプルを処理できる優れた解析法であるが、GeneScan で用いる Size Standard とサンプル 16S rDNA に付加する蛍光色素種の相違により、フラグメント解析値にかなりの誤差が生じ、フローラ解析を困難にしている。今回、迅速かつ正確な環境微生物系統解析法を確立するために、T-RFLP 法の最適解析条件の検討と、16S rDNA データベースの構築を行ったので報告する。

フラグメント解析値の誤差を±1 bp 以内に収めることを目標とし、Size Standard の検出時間とフラグメントサイズの関係に着目して補正プログラムを作成した。種々検討の結果、誤差はフラグメントサイズに依存的であり、フラグメント長が短いものほど高い精度での補正が可能であることがわかった。

データベースは、16S rDNA 配列データを含む Nucleotide Core 情報を GenBank よりダウンロード、そこから 16S rDNA 配列データのみを抽出し、約 110,000 からなる制限酵素フラグメントデータベースを構築した。補正率とデータベースを用いて、ケニア発酵乳の T-RFLP 解析を行った。

Reconstitution of Iron Oxidation System from Sulfur-Grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 Cells

C-8

○Taher M. Taha¹, Fumiaki Takeuchi², Tsuyoshi Sugio¹

(¹ Division of Bioscience, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, ² Environmental Management Center, Okayama University)

A. ferrooxidans ATCC 23270 cells grown in sulfur medium without ferric iron for successive generations showed ferrous iron oxidizing activity comparable to that of the iron-grown cells. This activity is localized in plasma membranes and it was found to be dependent on protein and ferrous iron concentrations. The inhibitors of *aa*₃ type cytochrome *c* oxidase strongly inhibited this activity. Cytochrome *c*, *aa*₃ cytochrome oxidase and blue copper protein rusticyanin, the components of iron oxidation enzyme system, have been isolated in partially purified forms from sulfur-grown cells. The ferrous iron oxidation activities of these components separately or in combinations were tested. The presence of the three components was absolutely needed for the reconstruction of iron oxidation activity. The reconstruction of iron oxidation enzyme system from proteinous components of sulfur-grown cell strongly supports the proposal of the involvement of iron oxidation system in sulfur oxidation.

リサイクルベクターシステムによる植物形質転換用多重遺伝子コンストラクトの構築

C-9

○中尾彰秀¹, 中村真也¹, 川向 誠², 河津 哲³, 木村哲哉⁴, 中川 強¹,
(¹島根大・総科センタ・遺伝子, ²島根大・生物資源科学, ³森林資源研・王子製紙, ⁴三重大院・
生物資源)

我々はこれまでに Gateway クローニングを利用したバイナリベクター (pGWB) の開発を進めてきたが、LR クロナーゼを用いた組換え反応の正確さと効率の良さに着目し、LR 反応を繰り返して遺伝子を順次クローニングする方法の開発に取り組んだ。今回は *attL1-transgene-attR4-attR3-attL2* の構造を持つエントリークローンと *attL4-attR1-attR2-attL3* の変換用ベクターを構築し、これらを交互にデスティネーションベクターに組み込むことで、Gateway カセットのリサイクルを行うシステムを開発した。これらのステップを繰り返すことで、複数の *transgene* を単一の操作でクローニングすることが可能となった。本法を用いて7個の酵素サブユニット遺伝子を容易にバイナリベクターにクローニングすることができた。また4種のレポーター遺伝子を組み込んだバイナリベクターを作製し、タバコ培養細胞 BY-2 に導入して解析を行ったところ、全てのレポーターの発現を検出することができた。本法が植物への多重遺伝子導入用クローニングシステムとして有用であることが示された。

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編による高病原化

C-10

○仲行あゆみ、斉藤悠希、加藤昭夫、阿座上弘行
(山口大農)

Eikenella corrodens は歯周病原性細菌の一つで、その病原性には菌体表層の GalNAc 特異的レクチンが大きく関与している。近年、我々は臨床分離株の一つに約 8.7kb のプラスミド DNA を発見し、その解析を行った。その結果、プラスミド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し、レクチン活性やバイオフィーム形成能を著しく増加させることを明らかにした。

ゲノムの組換えが起こった株からタイプ 4 線毛遺伝子領域をクローニングしその塩基配列を解析したところ、タイプ 4 線毛の構造遺伝子 (*ecpA*) 内で組換えが起こり、新たな線毛遺伝子が出現していることがわかった。また、リコンビナーゼ遺伝子の導入の有無による本菌の口腔上皮細胞への付着や侵入能力の変化について調べた。導入により上皮細胞への付着活性の顕著な増加が見られた。一方、侵入については、導入株ではほとんど見られなくなった。したがって、本菌の上皮細胞への付着には菌体表層レクチンが寄与するが、侵入にはタイプ 4 線毛が寄与することが示唆された。これらの結果より、プラスミドによるゲノムの再編によって *E. corrodens* が高病原化する可能性が示唆された。

トマトにおけるアスコルビン酸生合成遺伝子ガラクトツロン酸レダクターゼの遺伝子発現

C-11

○坂本真吾¹, 村野亜沙子², 藤川愉吉¹, 江坂宗春¹

(¹ 広大院生物圏科学, ² 広島大生物生産,)

植物にとってビタミンC(アスコルビン酸)は植物の生育に必要な不可欠な物質であり、様々な生理条件に応じたアスコルビン酸生合成がおこなわれるが、詳細は不明である。本研究では、トマトにおけるアスコルビン酸生合成酵素ガラクトツロン酸レダクターゼについて解析をおこなった。

トマト EST Database (www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html/) から得たガラクトツロン酸レダクターゼ遺伝子の部分塩基配列を基に、Rapid Amplification of cDNA End 法により全鎖 cDNA をクローニングした。その結果、318 アミノ酸残基をコードする Aldo-keto-reductase ファミリーに属す酵素であることが明らかとなり、本酵素は NADP 依存性の還元酵素であることが示唆された。また、トマトの緑葉と黄化葉におけるアスコルビン酸量の測定とガラクトツロン酸レダクターゼ遺伝子の遺伝子発現の解析を行った。結果、アスコルビン酸量は緑葉で高いが、遺伝子発現については緑葉に比べて、黄化葉で顕著に発現していることが明らかとなった。本研究結果から、アスコルビン酸生合成経路酵素ガラクトツロン酸レダクターゼは、老化段階の進行と共に遺伝子発現が誘導される可能性が示唆された。

菌体内外物質の放出・蓄積能におよぼす脂質合成酵素遺伝子群導入の影響

C-12

○北山了孝¹, 渡辺昌規¹, 福田 央²

(¹ 広大院大院・物質工, ² (独) 酒類総合研究所)

現在、様々な微生物を用いた有用物質生産、環境からの有害物質回収等が試みられ、有用物質生産においては、低コスト且つ、効率的な菌体内有用物質の放出が求められている。また、環境中からの有害物質回収においては、一旦菌体内に取り込まれた有害物質を蓄積・保持する事が求められている。そこで本研究では、菌体内物質の放出・蓄積を促す為に、酵母由来である脂肪酸合成酵素遺伝子群(FAS 遺伝子群)を大腸菌に導入し、菌体内物質(β ガラクトシダーゼ、GFP)の放出・蓄積能に与える影響について検討を行った。

FAS 遺伝子群と GFP 遺伝子をコンピテントセルに導入後、任意濃度の IPTG を添加、培養液上清と菌体内の β ガラクトシダーゼ、GFP の放出・蓄積を SDS-PAGE 法により比較検討を行った。その結果、FAS 遺伝子群を導入した組換え体は、導入していない組換え体と比べ、培養液上清中の菌体内物質濃度に差が見受けられた。このことから、酵母由来の FAS 遺伝子群を導入する事により、菌体内物質の放出・蓄積を任意制御する可能性が示唆された。

精子形成期ラット精巣に発現する ras 抑制遺伝子の機能

C-13

○ 山野好章¹, 浅野 淳¹, 神尾高志¹, 大山建司²

(¹鳥取大農, ²山梨大院医工総)

【目的】精子形成に関わる遺伝子解析を目的としてディファレンシャルディスプレイ法 (DD法) を行った結果、7週齢ラット精巣で発現上昇する遺伝子の一つとして ras 抑制遺伝子のひとつ (*hrasls5*) を発見し、ダイオキシン (TCDD) 投与による遺伝子発現影響を検討した。

【材料と方法】乳幼児期 (3週齢) ならびに思春期 (7週齢) に相当するラット精巣由来のRNAを鋳型としてDD法を行い、7週齢で発現上昇する *hrasls5* (遺伝子登録番号 BC099084) をノーザン法と *in situ* ハイブリダイゼーションにより分析した。また生後から8週齢まで TCDD (300, 1000 ng/kg/w) を雄ラットに皮下投与し、9週齢精巣における *hrasls5* 遺伝子発現量を分析した。

【結果と考察】*hrasls5* の発現は精巣特異的であり、7週齢以降に発現が認められたこと、精細管内発現は精母細胞から円形精細胞に認められたことから本遺伝子産物が減数分裂期以降の過程に関与すると考えられる。また、TCDD 投与ラットではコントロール群と比べて本遺伝子の発現に有意な変化が認められず、TCDD が ras シグナリング系に影響を与えなかったと考えられる。

イネにおけるキシラナーゼインヒビターの発現と機能解析

C-14

○宮田佳栄, 篤永隆昌, 藤川愉吉, 江坂宗春

(広島大院・生物圏科学)

キシラナーゼインヒビターは単子葉植物に特有なタンパク質として興味を持たれている。これまでの研究からイネにおいて XIP タイプのキシラナーゼ (OsXIP) は傷害ストレス応答性遺伝子であることを明らかにしているが、その生理機能については未だ不明な点が多い。本研究ではイネにおける OsXIP の生理機能を明らかにすることを目的として OsXIP の発現と機能解析を行った。

最初に、OsXIP 遺伝子発現の組織特異性を検討したところ、イネの成熟種子に特異的に発現していることが明らかになった。また、傷害処理によりイネの根において遺伝子発現の誘導が認められ、さらに OsXIP タンパク質が細胞外に発現していることも確認した。また、大腸菌より調製した組換え OsXIP は *T. longibrachiatum* のキシラナーゼの活性を有意に阻害したが、イネ組織抽出液 (根、種子および成熟種子) に OsXIP を添加したところ、いずれも抽出液のキシラナーゼ活性の低下は認められなかった。本研究の結果より、イネの根において OsXIP は病原菌に対する防御機構に関与している可能性が示された。

ユーグレナ APX の cDNA 単離と酵素学的性質の検討

C-15

○田島奈緒子¹, 澤 嘉弘¹, 柴田 均¹, 重岡 成², 石川孝博¹

(¹島根大・生物資源・生命工, ²近畿大院・農・バイオ)

カタラーゼを持たないユーグレナ (*Euglena gracilis* Z) は、細胞質に局在するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が主要な過酸化水素代謝酵素として機能している。精製酵素の解析から、ユーグレナ APX は機知の高等植物細胞質型 APX の約 2 倍に相当する分子量約 58 kDa のモノマーであること、過酸化水素以外にアルキルヒドロペルオキシド還元活性を持つことを明らかにしてきた。今回、ユーグレナ APX の完全長 cDNA を単離し、ユーグレナ APX 遺伝子の構造解析および組換え体酵素による触媒機能について検討を行った。得られた cDNA の推定アミノ酸配列は、ほぼ中心部を境にして互いに 68.9% の相同性を持つ 2 つのドメインがタンデムに並んでおり、結果として既知 APX の 2 倍の分子量を持つことが示された。MOE による立体構造予測から、ユーグレナ APX は分子内二量体構造を形成していることが推測された。ゲノムサザンブロットおよび APX 遺伝子の部分配列解析により、2 つのドメインは同一遺伝子上に存在することが示された。組換え体酵素を用いた解析から、2 つのドメインは酵素学的にも相同な機能を有していること、また両ドメインによる分子内二量体構造の形成がアルキルヒドロペルオキシドの認識に関係していることが示唆された。

Glutamyl tRNA synthetase affect cell growth and sexual differentiation of *Schizosaccharomyces*

pombe

C-16

○Swapan Kumar Paul, M. Muniruzzaman Goldar, Miyo Yakura, Makoto Kawamukai

(Fac. of Life & Environ. Sci., Shimane Univ.)

The *moc1-moc4* genes have been screened out as the inducers of sexual differentiation that overcome the sterility caused by the elevated level of cAMP in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We have screened Moc1, Moc2, Moc3 and Moc4 interacting elements by yeast two hybrid system. A novel gene encoding glutamyl tRNA synthetase (GluRS) was isolated as a Moc3 interacting element by yeast two hybrid system. GluRS also interacted with Moc1 and Moc4 in a yeast two hybrid system. Disruption of the *GluRS* gene revealed that *GluRS* is an essential gene for cell growth of *S. pombe*. Interestingly, GluRS has an inhibitory effect on cell growth and viability when it was over expressed and GluRS induces the sexual differentiation of *S. pombe*. This observation lead us to test the effects of various amino acids on sexual differentiation and we found that glutamic acid, tryptophan and methionine had a positive effect on sexual differentiation in *S. pombe*.

イネにおけるプロリン生成・代謝系遺伝子,P5CS と ProDH,の機能解析

C-17

○高橋裕昭, 植地洋子, 藤川愉吉, 江坂宗春
(広大院 生物圏科学研究科)

〔背景・目的〕 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。タバコやシロイヌナズナなどの双子葉植物において Pro は、グルタミン酸(Glu)とオルニチン(Orn)から合成されるが、ストレス時には Glu からの Pro 合成が主経路となり、 Δ ¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) が、また Pro 代謝系においては Proline dehydrogenase (ProDH) が律速酵素であると考えられている。本研究では単子葉モデル植物であるイネを用いて「Pro は適合溶質として機能し、耐塩性を獲得できるのか？」ということをテーマに研究を行った。

〔結果〕 塩ストレス(400 mM NaCl または 200 mM CaCl₂)+Pro 添加によって、ストレス耐性を付与する可能性が示唆された。また、P5CS 過剰発現株においては高 Pro 含有株の作出に成功したが、ProDH 発現抑制株については WT に比べ Pro 含量の低い株のみ作出された。さらに、一部の P5CS 過剰発現株において耐塩性が確認された。また、ProDH 発現抑制株において NaCl に対して高感受性である可能性が示唆された。

枯草菌におけるフラボノイド応答性 *yetL-yetM* 遺伝子系の制御機構の解析

C-18

○檀上佑介, 花野有貴, 広岡和丈, 藤田泰太郎
(福山大生命工・生物工)

【目的】DNA マイクロアレイ解析によってフラボノイドで誘導される遺伝子候補として *yetL-yetM* 遺伝子系が見いだされた。*yetL* は制御因子を、*yetM* はモノオキシゲナーゼをコードすると推定され、YetL がこれらの両遺伝子を抑制し、フラボノイド添加によって発現誘導されると予想され、これを検証した。

【方法と結果】DNase I フットプリント解析により *yetL*、*yetM* 遺伝子のそれぞれの上流域に YetL が結合する保存配列が見いだされた。また、ゲルシフト解析から YetL が *yetL* よりも *yetM* プロモータに対して高い親和性を示すことがわかった。種々のフラボノイドを添加してゲルシフト解析を行った結果、いくつかのフラボノイドで結合の解除が見られた。また、*lacZ* レポータ解析でもこれらの *in vitro* 解析の結果を支持する結果が得られた。

出芽酵母における染色体からのセントロメア配列の切り出しによる細胞死の誘導

C-19

○松崎浩明, 菊池正悦, 柳本敏彰, 秦野琢之

(福山大生命工)

遺伝子組換え生物が野外で拡散すると、環境へ及ぼす影響が危惧される。遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐために部位特異的組換えを利用して特定の条件下や時期に染色体からセントロメア配列を切り出し、細胞死を誘導することが有効であると考えられる。そこで、*Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として細胞死を誘導することを検討した。一倍体細胞で第 IV 番染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位配列(RS)を同じ方向に挿入した後、この細胞に *GALI* プロモーター制御下でレコンビナーゼ遺伝子 *R* が発現するプラスミドを導入し、ガラクトースによりセントロメア配列の切り出しが誘導される酵母を作製した。この細胞はグルコースプレートでは多数のコロニーが出現したが、ガラクトースプレートでは殆ど出現しなかった。さらに、ガラクトース液体培養での増殖はグルコース液体培養より遅く、生存率は低下した。したがって、セントロメア配列の切り出しによって細胞死を誘導できた。二倍体細胞でも相同染色体の両方からセントロメア配列を切り出すことで細胞死を誘導できた。現在、*ZIP1* プロモーターの制御下でレコンビナーゼを発現させ、胞子形成での細胞死を検討している。

高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* のゲノム解析

C-20

○仲宗根 薫¹, 関根光雄², 藤田信之²

(¹ 近畿大工, ² 製品評価技術基盤機構)

高度好塩性アーキア *Haloarcula japonica* TR-1株は、石川県の塩田から分離された、至適塩濃度が20%の微生物である。TR-1株は、本菌株全体をシステムティックに理解するためのゲノム情報解析の基盤整備は行われてきていない。そこで我々は、高度好塩性アーキアのゲノム情報に基づく様々なレベルでの研究の基盤形成、またゲノム資源としての潜在性を最大限に利用する目的で、*H. japonica*の全ゲノムを解析した。

H. japonica TR-1 株の染色体 DNA よりショットガンライブラリーを作成し、8x 程度の coverage でシーケンシング、約 4.2Mb のゲノム配列情報を得、アノテーションを行った。全ゲノムを解析の結果、5 つのレプリコン(3.0Mb, 613kb, 506kb, 95kb, 51kb), 約 4,057 の遺伝子の存在が示唆された。既にゲノム解析の終了している *H. marismortui* と TR-1 株とは同属であるばかりでなく、16SrDNA 解析からはお互いに非常に近縁であることが明らかであるものの、レプリコンの数(8 レプリコン)は異なり、また最大のレプリコンにおける必須遺伝子群に関してはオペロン構造の保存性が高いことが確認された。

ゴマ毛状根培養による塩素含有アントラキノン anthrasedione C の生産

D-1

○星隈 新, 古本敏夫

(香川大農)

【目的】 ゴマ根から塩素含有アントラキノン anthrasedione C (ASC) とその脱塩素体 anthrasedione B (ASB)、および各種アントラキノンが本研究室で確認されており、また毛状根による生産も確認されている。しかし ASC 生産量は微量である。そこで本研究では、毛状根の ASC と ASB 生産における塩化物イオン (Cl^-) の影響について検討した。

【方法・結果】 毛状根培養は、 Cl^- 欠乏 Gamborg's B5 培地に 0~300 mM の NaCl を添加した培地を調製後、その液体培地を用いて 25°C、暗所、回転振とう培養で4週間行った。得られた培養物を MeOH を用いて超音波抽出した後、HPLC により ASC と ASB 生産量について分析した。その結果、ASC 生産量は 0 mM の時は検出限界以下 ($<0.014 \mu\text{mol/l}$) だが、 Cl^- 濃度が高くなるほど生産量は顕著に増加し、100 mM の時に最大で $3.1 \mu\text{mol/l}$ を示した。300 mM になると生育が悪くなり、生産量も減少し $1.6 \mu\text{mol/l}$ となった。また ASB 生産量は 0 mM の時に $4.6 \mu\text{mol/l}$ 、100 mM の時に最大となり $9.6 \mu\text{mol/l}$ で、約2倍の増加となった。現在、他の Cl^- 源として KCl、 CaCl_2 を用いた時の ASC と ASB 生産量への影響について検討中である。

植物毒 radicinin の生合成

D-2

○鈴木大進¹, 松永祥吾¹, 作野えみ¹, 田村純一², 中島廣光¹

(¹鳥取大農, ²鳥取大地域)

【目的】 Radicinin は *Alternaria radicina* などの植物病原菌が生産する植物毒素である。本研究で用いた *Bipolaris coicis* H13-3 は radicinin とその類縁化合物を生産している。Radicinin の生合成前駆体は deoxyradicinin と考えられているが、いまだその証明はなされていない。そこでこのことを証明するために deoxyradicinin を合成し、本菌への投与実験を行った。また、細胞抽出液を用いて deoxyradicinin から radicinin への変換実験を行った。

【方法・結果】 出発物質として 4-methoxy-6-methyl-2H-pyran-2-one を用い、酸化反応、Wittig 反応、Friedel-Crafts アシル化反応、脱メチル化反応を行い deoxyradicinin を合成した。得られた deoxyradicinin をキラルカラムで分離して (+)-体と (-)-体を得た。それぞれを *Bipolaris coicis* H13-3 に投与したところ、いずれもコントロールに比べて radicinin 量が増加していることがわかった。また本菌から得られた粗酵素抽出液による deoxyradicinin から radicinin への変換も確認した。

魚ウロコからのコラーゲンペプチドの新規製造方法(過酸化水素添加法)

D-3

○大城 隆¹, 中山 哉², 宇賀田祐美¹, 高橋祐介³, 野口 誠³, 和泉好計¹

(¹鳥取大・工, ²カンダ技工, ³鳥取県産業技術センター)

＜目的＞コラーゲンの原料は主として家畜動物であったが、BSE 問題をきっかけに水産物へ原料の転換が起こっている。なかでも、魚ウロコは臭いの問題が少ないことから、魅力的な原料となっている。一方、ゲル化しない低分子のコラーゲンはコラーゲンペプチド(CP)と呼ばれ、高濃度溶液を調製することが可能なことから、機能性食品や化粧品素材としての需要が高まっている。従来、CP の製造は熱水抽出、酵素処理によって行われているが、褐変による着色が問題であった。今回、過酸化水素を用いた新規製造方法について検討を行った。

＜方法と結果＞テラピア由来で脱灰済みのウロコを原料とし、生成する CP の分子量は、Superdex Peptide を用いて算出した。脱灰ウロコを 95℃で熱処理すると分子量 70,000 の CP が抽出されるが、その際過酸化水素を 10% 添加すると抽出と低分子化が同時進行することが明らかになった。熱処理時間を長くすると対照系では CP の分子量の低下は認められないが、過酸化水素添加系では時間とともに分子量が小さくなり、褐変は認められなかった。添加する過酸化水素濃度、処理温度についての検討結果、さらにはプロテアーゼを添加した場合の結果についても報告する。(本研究は都市エリア産学官連携促進事業研究助成によって行われた。)

魚類由来コンドロイチン硫酸の組成分析

D-4

田村純一¹, 川野愛美¹, 田中晴奈¹, 藤田裕之¹, ○松下健也¹,

今津綾夏¹, 堤下奈緒¹, 有馬和也¹, 石原幸雄², 中山 清³

(¹鳥取大地域, ²鳥取県水産試験場, ³カンダ技工)

【目的】コンドロイチン硫酸は、近年医薬品やサプリメントとして注目されており、需要が増えつつある。現在市販されているものの多くはサメ由来であるが、サメは保護動物になりつつあり、安定した他の代替資源の探索が急がれている。実際に、エイやサケの軟骨を利用したコンドロイチン硫酸の製造が、一部地域で実用化されている。コンドロイチン硫酸は動物組織にほぼ普遍的に存在しているので、含有量の高い資源の探索と、硫酸基に起因する特異的な機能を見いだすことが課題となる。今回我々は、山陰沖で捕獲される数種類の魚介類についてコンドロイチン硫酸の単離精製を行い、その含有量と硫酸化パターンを解析した。

【方法と結果】山陰沖で捕獲される数種類の魚介類について、部位別に粉碎、脱脂、タンパク分解を行い、コンドロイチン硫酸の単離精製を行った。得られた精製糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC によって二糖単位に分解し、HPLC で不飽和二糖の組成分析を行なった。その結果、対象魚介類のいくつかの部位にコンドロイチン硫酸の存在が確認された。

2種ホスホリラーゼを用いたトレハロースからのコージビオースの調製

D-5

○八木政裕, 山本拓生, 黒瀬真弓, 日野恵子, 西本友之, 茶園博人, 福田恵温
(林原生化研)

【目的】コージビオースはグルコース2分子が α -1,2結合した還元性二糖で、麴汁、蜂蜜、澱粉部分分解物中に微量ながら存在するが、本糖質の物性や機能性についての知見はほとんどない。今回、安価なトレハロースを出発原料とし、2種類のホスホリラーゼを用いたコージビオースの調製を行った。

【方法および結果】《トレハロースから β -G1Pの調製》175 mMトレハロースを含む0.5 Mリン酸緩衝液pH 7.0の基質溶液200 Lにトレハロースホスホリラーゼを22 u/g-DS添加し、60°Cで72 h反応させた。反応液中の無機リン酸をリン酸マグネシウムアンモニウムとして除去した後、イオン交換樹脂を用いて β -G1Pを精製した。《コージビオースの調製》75 mM β -G1P および450 mM グルコースを含む50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)200 Lにコージビオースホスホリラーゼを10 u/g-G1P添加し、55°Cで48 h反応させた。反応液をろ過、脱塩後、分画して二糖画分を回収した。結晶化操作により、最終的に純度96%のコージビオース結晶1 kgを得た。諸物性調査結果についても、あわせて報告する。

昆虫 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ特異的阻害剤生産放線菌による

キチナーゼ阻害剤の生産

D-6

○市川美里, 仁戸田照彦, 神崎 浩
(岡山大院自然科学)

【目的】我々は、 β -N-acetyl-D-glucosaminidase(GlcNAcase)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 TMG-chitotriomycin 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た¹⁾。今回、本菌株が GlcNAcase 阻害剤である TMG-chitotriomycin と同時にキチナーゼ阻害剤を生産することを見だし、その培養生産条件の検討および予備的性状解析を行なったので報告する。【方法と結果】本菌株を TMG-chitotriomycin 生産培養条件で培養して得られた培養上清をハスモンヨトウ蛹キチナーゼ阻害試験に供した結果、キチナーゼ阻害活性がみられた。TMG-chitotriomycin にはキチナーゼ阻害活性がないことから、本化合物以外にキチナーゼ阻害剤の生産が示唆された。培養上清のキチナーゼ阻害活性は、培養6日目にピークに達した。また、培養上清の GlcNAcase 阻害活性は、培地中のキチン含量0.5%程度まで、キチン含量に依存して上昇するのに対し、キチナーゼ阻害活性はキチン含量2%程度まで上昇がみられた。予備的性状解析の結果、キチナーゼ阻害活性物質は熱安定性が高い低分子化合物であることが明らかとなった。¹⁾J. Am. Chem. Soc., **130**, 4146(2008)

ポリヒドロキシジヒドロピロン骨格を有するボロノリドの合成研究

D-7

○都田智子、渡部 薫、山内 聡

(愛媛大農)

目的) (+)-ボロノリドは、アフリカの薬草に含まれるポリヒドロキシジヒドロピロン骨格を有する化合物である。我々は、同様の骨格を有するゴニオジオールがグラム陰性菌である *Yersinia intermedia* に選択的に抗菌活性を示すことを見出している。今回は、ゴニオジオールよりも不斉炭素が一つ多いボロノリドに対する有機合成化学及び生物活性に対する興味から合成研究を行った。

方法・結果) 酵母還元により得られる methyl (1*R*,2*S*)-(2-hydroxycyclopentyl)acetate を出発化合物とし、*E*-3-[(1*R*,2*S*)-2-(triisopropylsilyloxy)cyclopent-1-yl]propenal を得た。このアルデヒドと *n*-ブチルリチウムとの反応、酸化、(*R*)-Me-CBS 還元によって8位に天然物の立体を有する水酸基を導入した。次に、この水酸基を MOM 基で保護した後、ADmix- β との反応を行い、天然の立体を有するグリコールを構築した。このグリコールのアセタール保護の後、脱シリル化、酸化によってケトンとした後、ラクトンを得るためのバイヤビリガー酸化の反応条件を検討している。一方、8位のエピマーからはバイヤビリガー酸化によって、天然ボロノリドの8位エピマーへの重要中間体であるラクトンが得られた。

非天然型グリセロリン脂質過酸化物の合成と応用

D-8

○清水るみ子^{1,2}、永井 藍¹、富永浩子¹、木村郁美¹、櫻井絵梨香¹、泉 実¹、中島修平¹、

馬場直道¹

(¹岡山大農, ²神戸学院大薬)

[背景・目的] 生体脂質は核酸や蛋白質と異なり、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、トリグリセリド類といった大きな群に分類され、その各群には共通構造を持つ分子が含まれる。例えばグリセロリン脂質にはホスファチジルコリン、ホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジルセリン等が含まれるが、それらに結合する脂肪酸は一種類ではない。そのため、生物現象と脂質の構造(変化)との関係を調べるには、上記の分子種を含む複雑な生体脂質混合物を HPLC 等でまず分離し、それぞれの画分の構造を明らかにする必要がある。本研究ではこのような問題を回避する方法について検討した。

[方法・結果] 本研究では分子構造が天然のリン脂質とは少し異なる不飽和脂肪酸結合非天然型グリセロリン脂質を合成した。これを様々な脂質を含む複雑な生体試料に添加して一定時間インキュベートした後再抽出し、タンデム型 ESI MS 質量分析法で分析する事によって添加した合成試料の構造変化のみを選択的に追跡できる事が明らかとなった。

新規オルソジアミノベンゼン誘導体の合成とセレン定量への応用

D-9

○中川太郎, 鈴木悠人, 中村宜督, 下石靖昭, 村田芳行

(岡大院・自然科学)

【目的】セレンは動物にとって微量必須元素であるが、ヒトにおいては1日あたりの摂取量が0.01 mgを下回ると欠乏症が、0.2 mgを上回ると過剰障害が発生する。したがって、正確な摂取量の制御が必要であり、高感度で簡便な定量法の確立が求められている。本研究では、新規オルソジアミノベンゼン誘導体を合成し、亜セレン酸との反応生成物の蛍光性を利用する簡便なセレン定量法の確立を目指した。

【結果】1,2-Diaminobenzeneを出発物質とし、それぞれ4段階の反応により新規蛍光試薬1,2-Diamino-3-bromo-6-(4'-hydroxy-phenyl)-benzene (DBB) と1,2-Diamino-3,6-di(4'-hydroxy-phenyl)-benzene (DDB) を合成した。この試薬を用いたセレン定量法の確立のために、亜セレン酸との反応条件、セレン化合物の抽出条件等の検討を行なった。

既存の定量試薬2,3-Diaminonaphthalene (DAN) ほどの検出感度は得られなかった。しかし、新規蛍光試薬DBBは亜セレン酸との反応性においてDANより優れていたことから、セレン定量における操作の簡便化、試薬回収率の向上が可能となった。

LOS/LPSのコア糖鎖合成に向けたKDO誘導体の合成

D-10

○田頭亮哉, 一柳 剛, 山崎良平

(鳥取大農)

【目的】グラム陰性細菌は細胞外膜に複合糖脂質であるリポオリゴ糖/リポ多糖(LOS/LPS)を産生する。LOS/LPSはオリゴ糖(OS)/多糖(PS)がKDO1~3分子を介してLipid Aに結合した構造を有する。これ迄に、我々はLOSのコア糖鎖の化学合成を押し進めてきている。本研究では、コア糖鎖とlipidAの架橋部の糖鎖構造構築に必要な、KDO誘導体の合成を目的とした。

【結果】D-mannoseから4段階で5,6-di-O-benzoyl-2,3-diisopropylidenemannofranoseへと誘導した(90%)。この化合物のC1位からWittig反応により2炭素伸長を行った(91%, E/Z=12/1)。次に得られた α,β -不飽和エステル体の幾何異性体を分離することなくオスミウム酸化したのち(92%)、脱水反応をへてピラノース環へと変換した(60%)。アノマー位をアセチル化し、最後にイソプロピリデン基を酸加水分解で除去することにより、4,5位に遊離水酸基を持つKDO誘導体を合成した。現在、酸加水分解の条件検索を行っており詳細を併せて報告する。

【結論】D-mannoseより、9段階でmethyl 2-O-acetyl-7,8-di-O-benzoyl-D-manno-octulosonate合成を達成した。

リポオリゴ糖のオリゴ糖鎖合成研究: 分岐オリゴ糖鎖の構築

D-11

○豊田清薫, 前田紗弥加, 一柳 剛, 山崎良平

(鳥取大農)

ナイセリア属等の病原性グラム陰性細菌は、その細胞外膜にオリゴ糖 (OS) と Lipid A が結合した複合糖脂質、リポオリゴ糖 (lipooligosaccharide, LOS) を産生する。この複合糖脂質のオリゴ糖鎖内には属特異的に保存された内部コア糖鎖が存在し、このコア糖鎖は、グラム陰性細菌に共通に発現するヘプトース二糖(Hep α 1-3Hep)に短いオリゴ糖鎖が結合した分岐構造をしている。

これまでに、我々は Hep の 2,3 位あるいは 3,4 位で分岐したオリゴ糖鎖とそのコンジュゲート合成を押し進めて来ている^{1,2}。本研究では、糖鎖コンジュゲートの効率的な合成を達成するために、分岐オリゴ糖鎖構築後スペーサーを導入するのではなく、スペーサー化した Hep(α 1-3)Hep を用いて分岐糖鎖の構築というアプローチを検証した。上記した Hep 二糖を受容体として用い、単糖、および二糖供与体とのグリコシル化反応により、3,4 分岐オリゴ糖鎖の合成を目指した。この合成研究の結果を報告する。

¹Eur. J. Org. Chem. 2004, 1202-1213., ²Eur. J. Org. Chem. 2004, 1214-1227.

肉食性昆虫から単離した細菌類の殺虫活性

D-12

○西脇 寿¹, 松田一彦²

(¹愛媛大農, ²近畿大農)

「目的」肉食性昆虫であるクロコウスバカゲロウ幼虫に捕食されているハスモンヨトウ幼虫の体表には、微生物の感染に起因すると考えられる黒変症状が認められる。この症状をヒントにして、クロコウスバカゲロウ幼虫の消化管内から数種類の昆虫病原性細菌を単離することができたので報告する。

「方法・結果」クロコウスバカゲロウ幼虫のそ嚢から SCD 培地を用いて細菌類を単離し、生化学試験などにより同定した。さらに、培養を介さずにそ嚢内細菌叢を調べるために、そ嚢内から抽出した 16S rRNA 遺伝子の配列を解析した。それらを比較したところ、単離培養することができた細菌類がそ嚢内細菌叢の多数を占めていることが判明した。次に、単離した各菌体を培養後、ハスモンヨトウ幼虫に注射投与して殺虫活性を評価した。その結果、*Bacillus cereus* や *B. sphaericus* をはじめとする数種の菌体に高い昆虫病原性が認められた。さらに、*B. cereus* や *B. sphaericus* については各菌体が生産しているタンパク質性の殺虫因子を同定し、それらの作用機構を解明した。

農業廃棄物の燃料用アルコール発酵への利用

D-13

○高橋 永¹, 山崎浩司², 松元信也¹

(¹高知工科大学工 物質・環境, ²高知県農業技術セ)

【目的】養液栽培されているミョウガの廃茎葉は土壌への鋤き込みができない、また球根栽培されているグロリオサの余剰球根は毒性のあるコルヒチンを含むため焼却処分しているなどの理由から、これら農業廃棄物の処分に苦慮している。そこで、これらの燃料用アルコール発酵への利用の可能性について基礎的検討を行なった。

【方法】合成培地及び天然培地に所定のミョウガ茎葉もしくはグロリオサ球根の搾汁液などを所定量添加し、酵母を用いて 28℃にて静置発酵させた。発酵中は経時的に炭酸ガス発生量を測定し、発酵終了後は生成アルコール濃度、酵母数などを測定した。

【結果】①合成培地及び天然培地にミョウガ茎葉及びグロリオサ球根のいずれの生搾汁液を添加しても、酵母の発酵は促進される傾向にあった。②各搾汁液を加熱処理(120℃、10 分)しても、それらの酵母発酵促進作用は維持されていた。③各搾汁液を添加した場合は、酵母数が増加する傾向にあった。④以上のことから、これら農業廃棄物は、基本的には、燃料用アルコール発酵に利用可能であると判断された。⑤グロリオサの球根に含まれるコルヒチンには酵母発酵促進作用は認められなかった。

微生物に対する不溶性物質の作用とその応用(4)天然培地の種類と醗酵特性の関係

D-14

○中西貴洋, 宮地 諒, 松元信也

(高知工科大学工 物質・環境)

【目的】我々は、これまでに、ハスク(麦芽穀皮)などの微細な不溶性物質を合成培地に添加して醗酵させると、醗酵が促進され、微量成分生成量も変化することを報告した¹⁾。ここでは、微細な不溶性物質を含む各種の天然培地を用いて、それらの醗酵特性を詳細に検討し、醗酵の効率化や製品品質の観点から考察を加えた。

【方法】固液分離法の組合わせなどによって微細な不溶性物質含有量を調整した各種天然培地をそのまま、もしくはそれらにハスクなどの不溶性物質を所定量添加して、酵母を用いて 28℃で静置醗酵させた。なお、微細な不溶性物質の含有量は 660nm の吸光度を指標とした。醗酵中は、経時的に炭酸ガス発生量を測定した。醗酵終了後は、生成アルコール濃度、酵母数、微量成分生成量などを分析した。

【結果】①天然培地に含まれる微細な不溶性物質の多少は、醗酵速度並びに生成される微量成分の量比に基づく製品品質に重大な影響を及ぼすことが知られた。②従って、培地の微細な不溶性物質の含有量に影響する固液分離条件は、生産効率と製品品質の両面を勘案して最適化する必要があると考えられた。

1) 宮地ら、農化中四国・西日本支部合同大会講演要旨集 p64(2007)

Zymobacter palmae の増殖・発酵特性に及ぼす諸因子の影響

D-15

○江口美奈子, 白石 昇, 宮地 諒, 松元 信也

(高知工科大学工 物質・環境)

【目的】アルコール発酵性細菌 *Zymobacter palmae* は、*Zymomonas mobilis* よりも糖の資化スペクトルが広いという特徴がある。本研究では、実用的視点から重要な増殖・発酵特性に関する基礎的検討を行なった。

【方法】*Zymobacter palmae* NBRC102412 株を用いて次の実験を行なった。i) 増殖特性は、合成培地で通気条件及び糖濃度を变化させて、28℃で試験した。培養中は、経時的に菌数と湿菌体重量を測定した。ii) 発酵特性は、合成培地及び天然培地を用いて、仕込濃度、発酵温度、SO₂濃度、不溶性物質添加量、初発菌数などを变化させて試験した。発酵中は、経時的に炭酸ガス発生量を測定し、発酵後は、アルコール濃度などを分析した。

【結果】①通気培養すると静置に比べて、増殖速度及び菌体収量が向上した。特に、糖濃度の高い場合、その差が著しかった。②コーンを原料とする無蒸煮並行複式発酵系の場合、発酵速度及び生成アルコール濃度は酵母などより劣った。③単式発酵系(合成培地)の場合、培地に竹炭などの微細な不溶性物質を添加し、かつ初発菌数を増大させると、酵母などに匹敵する成績の得られる可能性が示された。④最適発酵温度領域は、30～34℃であった。⑤SO₂濃度 150ppm までは増殖・醗酵した。⑥微量成分生成量は酵母より顕著に少なかった。

食品ポリフェノールによる歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム抑制効果

D-16

○松永哲郎, 中原 彩, 加藤昭夫, 阿座上弘行

(山口大農)

Eikenella corrodens は歯周病原性細菌の一つであり、菌体表層に局在する GalNAc 特異的レクチンが本菌の病原性に大きく関与することが示されてきた。最近、本菌が GalNAc 依存的にバイオフィルムを形成すること、タイプ2のクオラムセンシングが本菌のバイオフィルム形成に関与することを明らかにしてきた。本研究では、カテキン類やフラボノイド類などのポリフェノールが本菌のバイオフィルム形成に及ぼす影響を調べた。

カテキンとエピガロカテキンガレート (EGCg) を 1 mM ずつ添加し本菌のバイオフィルム形成を調べたところ、EGCgの添加により 25%以下まで抑制された。添加量を変えて抑制効果を調べたところ、0.1mM 以上の EGCg の添加により効果的にバイオフィルム形成の抑制が見られた。さらに、EGCg 添加による増殖への影響を調べたが、これらの濃度では阻害効果は見られなかった。また、同様にフラボンやケルセチンのようなフラボノイドの添加においても同様のバイオフィルム抑制効果が見られた。したがって、これらのポリフェノール類は本菌の増殖に影響を与えずにバイオフィルム形成を阻害することが示唆された。

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー2の精製と解析

D-17

○久本達格、小野光香、赤壁善彦、加藤昭夫、阿座上弘行

(山口大農)

*Eikenella corrodens*は歯周病原性細菌の一つである。最近、我々は、本菌が対数増殖期後期にオートインデューサー2 (AI-2) を生産し、AI-2生産に必須な*luxS*遺伝子の欠損株ではバイオフィーム形成能に影響を及ぼすことを明らかにした。そこで、*E. corrodens*においてAI-2を介したクオラムセンシングがバイオフィーム形成を含めた病原性にどのように関与するのかを調べることにした。

対数増殖期後期の培養上清を酢酸エチル抽出し、C18カラムクロマトおよびシリカゲル薄層クロマトにより分画した。各画分を*Vibrio harveyi* BB170をセンサー株としてAI-2アッセイを行い、AI-2活性を含む画分が得られた。この画分をガスクロマトにより解析したところ、ほぼ単一の成分であることがわかった。この成分を*E. corrodens*の野生株および*luxS*遺伝子欠損株に添加後培養を行い、バイオフィーム形成に及ぼす影響を調べた。その結果、野生株では添加による影響はほとんど見られなかったが、*luxS*欠損株ではAI-2活性を有する成分の添加によりバイオフィーム形成量が増加した。以上の結果から、*E. corrodens*のバイオフィーム形成がAI-2を介したクオラムセンシングにより制御されることが示唆された。

酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の走性

D-18

○薬師寿治^{1, 2}、窪田真也³、保坂 毅⁴、千 菊夫³、松下一信²

(¹山口大院医、²山口大農、³信州大農、⁴信州大国際若手)

酢酸菌は、エタノールを酢酸に酸化する。この反応は不完全酸化とも呼ばれ、酢酸菌の1つの特徴である。エタノールの酸化は本菌の呼吸鎖につながっているため、この過程によってプロトン駆動力という形のエネルギーを生産する。細菌の走性を担うべん毛モーターは、プロトン駆動力をエネルギー源とし、毎秒数百回転もの高速で回転する運動器官である。プロトン流はモーター回転あたり百個とも見積もられており、強力なエネルギー消費システムであると考えられる。本研究では、酸化発酵とべん毛運動との間に何らかのつながりを考え、ゲノムが解読された酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* 621H 株の走性を調べた。

G. oxydans は、軟寒天上で同心円状に広がるべん毛による走性に加えて、Trail と名付けた小径のようなものをつくりながら広がった。遊泳能は、グルコース・エタノール培地、あるいはグルコース・グリセロール・エタノール培地で培養した際に高かった。エタノールのような酸化基質の存在下において速い遊泳速度を示し、酸化基質のない条件では遅かった。液滴の表面、あるいは空気と界面において良好な遊泳を示したが、液滴の中央や深度の深い領域では遊泳は著しく低下した。

Microbial degradation of quaternary ammonium compounds (No.7):

Screening of 3-*N*-trimethylaminopropanol degrading microorganism

D-19

○Isam Ali Mohamed Ahmed¹, 作野えみ², 一柳 剛², 有馬二朗², 森 信寛²

(¹鳥取大院連農, ²鳥取大農)

Quaternary ammonium compounds are widely distributed in the biosphere having several biological functions, such as adaptation of the organisms toward environmental stresses and transporting chemical groups in a number of metabolic processes among others. This study was carried out to investigate the degradation of trimethylaminopropanol in microorganisms. We isolated several bacteria growing with trimethylaminopropanol as the sole source of carbon and nitrogen. Based on morphological and 16S rDNA analysis, these strains were identified as *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, and *Arthrobacter sp.* Analysis of the metabolites by TLC, capillary electrophoresis, FAB-MS, and GC-MS, showed trimethylamine (TMA) as major metabolite beside β -alaninebetaine and trimethylaminopropionaldehyde. Therefore, the possible degradation pathway of trimethylaminopropanol in the isolated strains is through consequence oxidation of alcohol group (OH) to aldehyde (CHO) and acid (COOH), respectively, and thereafter cleavage of C-N bonds providing trimethylamine and alkyl chain.

大腸菌における異種蛋白質のクリスタル化と高発現 ——画期的な効率的蛋白質調製法——

D-20

○酒井 裕、柏野陽子、松島賢治、内田素晶、早川 徹

(岡山大・院・自然科学)

Cry4Aa は土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* が産生する双翅目昆虫特異的な殺虫蛋白質である。Cry4Aa は芽胞形成期に大量生産され、蛋白質クリスタル（不溶性凝集体）として細胞内に蓄積するが、感受性昆虫の中腸内のアルカリ性条件下で容易に可溶化し、プロセッシングを経て活性型となる。

Cry4Aa のクリスタル化には、その C 末端側半長領域が必須であると考えられてきた。本研究ではクリスタル化能を有するポリペプチドを探索／同定するとともに、これをタグとして用いて異種蛋白質の大腸菌におけるクリスタル化／高発現が可能であることを発見した。すなわち、Cry4Aa の C 末端側半長領域に由来するポリペプチド (I⁶⁹⁶~P⁸⁵¹) をグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)あるいは細胞損傷蛋白質 MM29kD に連結して作製した融合蛋白質は大腸菌細胞内でクリスタル化／高発現により大量蓄積する。このクリスタルはアルカリ性条件下(pH11 付近)で容易に可溶化し、天然型と同レベルの生物活性を有する蛋白質を回収できる。これは新規な効率的蛋白質調製法として画期的なものであり、これまで大腸菌を宿主とした高発現が困難であった蛋白質を容易に且つ活性を保持しつつ大量発現させることを可能にした。

通性メチロトロフ細菌 *Acidomonas methanolica* MB58 のメタノール生育に及ぼす酢酸の影響

D-21

○三井亮司¹, 片山寛子¹, 大館昌史¹, 田中三男¹

(¹岡山理大理・生化)

【目的】グラム陰性の通性メチロトロフ細菌である *A. methanolica* MB58 は、メタノール以外にグルコースやグリセロールを炭素源として生育する。また、エタノール存在下では酢酸を培養液中に蓄積する。本研究ではメタノールからの物質生産系を構築するため、メタノール代謝と酢酸発酵の関連を明らかにすることを目的とした。

【方法および結果】 MB58 株はメタノールを炭素源とした場合でもエタノールを添加しておくで酢酸生産は認められるものの、生育は完全に阻害された。また、酢酸を直接培養液中に加えても同様の効果が見られた。そこで酢酸が C₁ 代謝に与える影響について調べるため、本菌株における C₁ 資化経路であるリブローズモノリン酸経路の鍵酵素、3-ヘキシュロース-6-リン酸シンターゼと3-ヘキシュロース-6-リン酸イソメラーゼを含む遺伝子断片を取得した。オペロン構造をとる両遺伝子のプロモーター領域にレポーターとして *xyIE* を下流に連結して炭素源による誘導を確認した。その結果、このプロモーターは主にホルムアルデヒドに誘導されるが、酢酸が存在することで発現が阻害されることが明らかになった。このことから、遺伝子レベルで C₁ 代謝と酢酸発酵を切替していることが示唆された。

A coenzyme Q binding protein in fission yeast

D-22

○Tiezhong CUI, Makoto KAWAMUKAI

(Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

To date, most of the genes required for biosynthesis of coenzyme Q have been identified. However, the regulatory mechanism of coenzyme Q is still elusive. In this study, we characterized a coenzyme Q binding protein, SpCoq10, in fission yeast *S. pombe*. The *Spcoq10* null mutant showed most typical characteristics of coenzyme Q deficient mutants (although a lower degree) of fission yeast, such as requirement of an antioxidant for proper growth on minimal medium, increased sensitivity to H₂O₂, high amounts of H₂S production and defective respiration, except that it produced nearly normal contents of Q10. To elucidate the role of SpCoq10, we biochemically analyzed SpCoq10 expressed in *Escherichia coli* and Q8 was detected from the purified proteins. Further more, two hydrophobic amino acid residues, leucine63 and tryptophan104, were identified to be involved in binding of Q and required for functions of SpCoq10. Thus, this study may contribute to identification of some diseases derived from dysfunction of coenzyme Q considering the functional conservation of SpCoq10 with its human counterpart.

細菌によるポリビニルアルコールの分解

D-23

○井神智裕, 嶋尾正行

(鳥取大学大学院 生物応用工学)

【目的】水溶性合成高分子であるポリビニルアルコール(PVA)は、PVA 分解菌と分解菌の必須の増殖因子であるピロロキノリンキノン(PQQ)を供給する細菌の共生系によって分解資化される。また、酵素反応的には、PVA は、PQQ を補酵素とする PVA デヒドロゲナーゼ(PVADH, EC1.1.99.23)による β -ジケトンの生成とそれに続く酸化PVA 加水分解酵素による反応によって分子鎖が切断される。一方、PVADH 以外に PVA 酸化酵素として PVA オキシダーゼ(PVAOX)の存在も知られている。本研究では、*Pseudomonas* sp. VM15C 株に比べて比較的強い PVAOX 活性を示す、PVA 分解菌 *Pseudomonas* sp. VT1B 株の PVA 分解系について検討した。

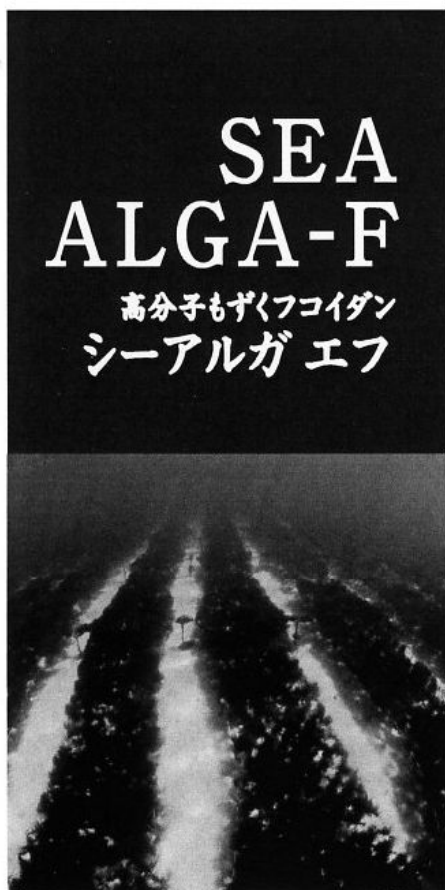
【方法・結果】PVA を唯一の炭素源とする培地で、30℃で VT1B を培養すると、5 日間で PVA を完全に分解した。また、その PVA 増殖には、PQQ が必須であった。VT1B 株は、VM15C 株と同様に PVAOX 活性に加えて PVADH 活性を示した。一方、分解菌 VT1B 株の 16S rRNA 遺伝子の解析を行った結果、VT1B 株は VM15C 株とともに、*Sphingomonas* 細菌ではないことが示された。

日本農芸化学会中四国支部 維持会員

(株) アプロサイエンス
天野エンザイム (株)
アルファー食品 (株)
(株) 井ゲタ竹内
池田糖化工業 (株)
(株) 猪原商会
(株) えひめ飲料
(株) 大愛
(株) 大熊
大塚化学 (株)
大塚器械 (株)
岡山県酒造組合連合会
社団法人岡山県農業開発研究所
小田象製粉株式会社
(株) オハヨー乳業
片山化学工業 (株) 岡山営業所
カバヤ食品 (株)
機能性食品開発研究所
杏林予防医学研究所
協和発酵工業 (株) 防府工場
キリンビール (株) 岡山工場
近畿日本ツーリスト (株)
久保田商事 (株)
高知酒造 (株)
(株) サカタ
(株) 佐竹製作所
(株) 四国総合研究所
四国乳業 (株) 研究所
(株) シマヤ
新青山 (株)
神協産業 (株)
(株) 酔心山根本店
諏訪酒造 (株)
正晃 (株)
仙味エキス (株)
(株) ソフィー
大興産業 (株)
大山乳業農業協同組合
大山ハム (株)
大洋香料 (株)
高木酒造 (株)
高塚ライフサイエンス (株)
(有) タグチ
中国ケミー (株)
中国醤油醸造協同組合

(株) 千代田テクノル
帝國製菓 (株)
鳥取科学器械 (株)
(有) 友田大洋堂
日本オリーブ (株)
(株) 日本総合科学
白牡丹酒造 (株)
(株) 林原生物化学研究所
(株) ビー・シー・オー
備前化成
ひまわり乳業 (株)
(株) 氷温研究所
広島和光 (株)
(株) ヒロセイ
富士産業 (株)
(株) 扶桑理化
プロテノバ株式会社
ペロリ
松田バイオサイエンスラボ
マナック (株)
マルキン忠勇 (株)
丸善製菓 (株)
(有) 丸浅苑
マルトモ (株)
三島食品 (株)
(株) 宮田薬品
(株) 無手無冠
ヤスハラケミカル (株)
(株) やまだ屋
(株) 山田養蜂場
山本薬品 (株)
両備バス (株)
ルナ物産 (株)
湧永製菓 (株)
(五十音順)

原料は、沖縄もずくだけ。



沖縄もずくから抽出した無添加のフコイダンです。ずっともずくに携わってきたから、もずくの持つ不思議な力に出会うことができました。健康な生活を実感していただきたいから…。
高分子もずくフコイダン
シーアルガ エフ。

■ご注文・お問合せは…

 **0120-834-629**

■ホームページでご確認ください。

<http://www.fucoidan1.jp/>

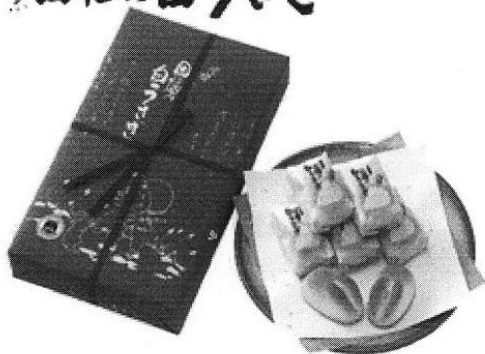


海産物のきむらやグループ

キムラファンクショナルフーズ 株式会社

〒684-0072 鳥取県境港市 3307 番地

名菓 元祖 白うさぎ



あなたの大切な人へ

福を呼び、縁を結ぶ お菓子

名菓 元祖 白うさぎ

第19回全国菓子大博覧会
名誉総裁賞受賞
第25回全国菓子大博覧会
橘花栄光賞受賞

喜びを創り喜びを提供する

寿製菓株式会社

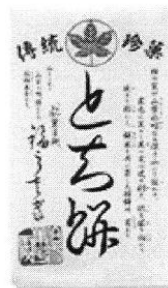
〒683-0845

鳥取県米子市旗ヶ崎2028 TEL 0859-22-7456

URL <http://www.okashinet.co.jp/>



伝統珍菓
とち餅



伝統珍菓 とち餅

第22回全国菓子大博覧会
名誉総裁賞受賞
第25回全国菓子大博覧会
茶道家元賞受賞

お菓子の **壽城**

鳥取県米子市淀江町佐陀1605-1

Tel 0859-39-4111 Fax 0859-39-4119

営業時間 8:00~17:00 年中無休

シロハヨナゴシ
ダイヤル 0120-46-4754

農家シリーズ 田中農場

田中農場【純米酒】



720ml



1800ml

「田中農場」の原料米は鳥取県田中農場産の山田錦のみを使用しています。田中農場の特徴は、完熟堆肥を近所の牧場と協力して作り、適正な量を使用する、一切化学肥料を使用しない土作りを基本とする農法を実践していることです。平成18年7月、第55回全国農業コンクール全国大会（農林水産省後援）に於いては、種芸部門で名誉賞を受賞しました。ほどよい酸味、後口のなめらかさ、長い余韻は、この酒ならではの熟成の味わいです。ぬる燗から上燗がおすすめです。

● この地でしか生まれない酒がある

諏訪泉

鳥取砂丘を育んだ千代川の源流の町・智頭町。百年余りの時を越えて流れ下る森に育まれた伏流水を、井戸から汲み上げ、無ろ過で酒造りに使用。まさに森のめぐみです。



1800ml



1800ml

「天のない酒造り」
尾瀬あきら氏の人気漫画「夏子の酒」最終回に登場するこの言葉は、前杜氏で現在相談役を務める広島杜氏・鳴川 喜三氏が、座右の銘としていたものです。大吟醸酒「鵬」で諏訪酒造の名を名蔵蔵として世に知らしめたには、やはり名杜氏であったこと、平成8年には国の卓越技能者に贈られる「現代の名工」を受賞した。「天のない酒造り」とは、酒造りには天（最高）がないこと、言い換えると終わりが無いことを示し、日々努力であるという言葉です。

天のない酒造り



夏瀬あきら

諏訪酒造株式会社
鳥取県八頭郡智頭町大字智頭451
電話 0858(75)0618 FAX 0858(75)3082
ホームページ <http://www.suwaizumi.com>

あなたへ贈る「白の一滴、心の一滴」
—酪農家の心を食卓へ—



代表理事組合長 幅 田 信一郎
常 務 理 事 小 濱 讓
常 務 理 事 平 野 浩

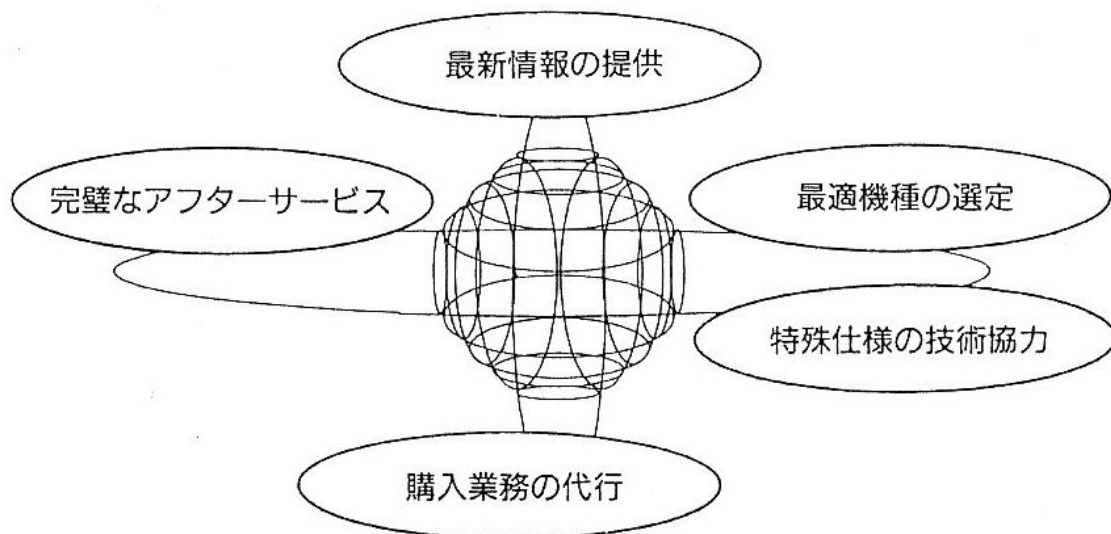


大山乳業農業協同組合

〒689-2393 鳥取県東伯郡琴浦町大字保 37-1

TEL:0858-52-2211 FAX:0858-53-1501

<http://www.dainyu.or.jp>



先端技術と共に躍進する



鳥取科学器械株式会社

本 社 鳥取市商栄町251番地13

TEL(0857)23-2851 FAX(0857)23-2853

倉吉営業所 倉吉市駄経寺町2丁目5番地

TEL(0858)22-1763 FAX(0858)22-9503

SCIENCE

科学への扉はここにあります

和光純薬工業株式会社 代理店
(試薬、特殊薬品)

株式会社日立ハイテクノロジーズ 特約店
(日立理化学機器)

試薬・各実験器具・分析装置販売

ISO14001認証取得

鳥取サイエンス株式会社

鳥取市吉方温泉3丁目110番地

TEL0857-23-5651 FAX0857-23-5652

E-mail science@apionet.or.jp

ニーズに対応する研究室の総合ディストリビューター

有限会社 友田大洋堂

営 業 品 目

バイオ・遺伝子・分子生物関連製品
理化学機器・試薬・硝子器具
クリーンルーム・研究設備など

本 社

〒690-0047 島根県松江市嫁島町 13-34

TEL 0852-24-3456 FAX 0852-24-3461

E-Mail tomoda-matsue@tomoda-taiyoudo.co.jp

鳥取営業所

〒680-0862 鳥取県鳥取市雲山 147-4

TEL 0852-24-3456 FAX 0852-24-3461

E-Mail tomoda-matsue@tomoda-taiyoudo.co.jp

日本農芸化学会 2008 年度中四国支部大会実行委員会

実行委員長：河野 強

実行委員：岡本賢治（会場受付責任者）

田村純一（プログラム編集責任者）

一柳 剛（要旨受付責任者）

山崎良平（会計責任者）

山野好章（会場責任者）

吉井英文（広報担当責任者）

渡辺文雄（懇親会責任者）

有馬二郎

大城 隆

北 実

作野えみ

田中 浄

古田 武

森 信寛

藪田行哲

連絡先：〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101

鳥取大学農学部 河野 強

Tel: 0857-31-6764, E-mail:kawano@muses.tottori-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）：築瀬英司, 森 信寛

幹事（会計）：渡辺文雄

〒680-8552 鳥取市湖山町南 4-101

鳥取大学大学院工学研究科内

Tel: 0857-31-5275（庶務）、Fax: 0857-31-0881（庶務）

支部からのお知らせ

○日本農芸化学会中四国支部第23回講演会（例会）

開催日：2009年1月24日（土）

場 所：高知大学物部キャンパス

世話人：八木年晴（高知大学農学部）

Tel & Fax: 088-864-5191, E-mail: yagito@kochi-u.ac.jp

○日本農芸化学会中四国支部第24回講演会（例会）

開催日：2009年5月23日（土）

場 所：くにびきメッセ

世話人：横田一成（島根大学生物資源科学部）

Tel & Fax: 0852-32-6576, E-mail: yokotaka@life.shimane-u.ac.jp

○日本農芸化学会中四国支部第25回講演会（3支部合同大会・西日本・中四国支部・ 関西支部）

開催日：2009年10月30日（金）、31日（土）

場 所：琉球大学

実行委員長：安田正昭（琉球大学）

○第11回市民フォーラム

開催日：2008年12月6日（土）

場 所：徳島大学蔵本キャンパス

世話人：寺尾純二（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

Tel: 0886-33-7087, E-mail: terao@nutr.med.tokushima-u.ac.jp

詳しくは支部ホームページを御覧下さい.

中四国支部 <http://jsbba-cs.jp>

日本農芸化学会中四国支部

〒680-8552 鳥取市湖山町南4-101

鳥取大学大学院工学研究科内

2008年（平成20年）9月12日発行