

2 0 1 0 年度
日本農芸化学会中四国支部大会
(第 2 8 回講演会)

講 演 要 旨 集

日時：2 0 1 0 年 9 月 2 4 日 (金) , 2 5 (土)

場所：香川大学農学部

日本農芸化学会中四国支部

2010 年度 日本農芸化学会中四国支部大会 日 程

第1日目：9月24日（金）

会 場：香川大学農学部

- ◇ 役員会 11:30 ～ 12:50
- ◇ 支部功労賞ならびに支部奨励賞授与式 13:00 ～ 13:15
- ◇ 2010年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演 13:15 ～ 14:15
- ◇ 第7回（2010年）農芸化学研究企画賞概要発表 14:15 ～ 14:30
- ◇ シンポジウム 14:45 ～ 16:45

- ◆ 懇親会 18:30 ～ 20:30

会 場：ロイヤルパークホテル高松ロイヤルホール

参加費：一般 7,000円、学生 3,000円

第2日目：9月25日（土）

会 場：香川大学農学部

- ◇ 一般講演
 - 午前の部 10:00 ～
 - 午後の部 13:00 ～
- ◇ 評議員会 12:00 ～ 12:50

香川大学農学部へのアクセス

■ JR高松駅から農学部へのアクセス：

琴平電鉄 長尾線 下り 「高松築港」→「農学部前」（約25分）下車 徒歩2-3分

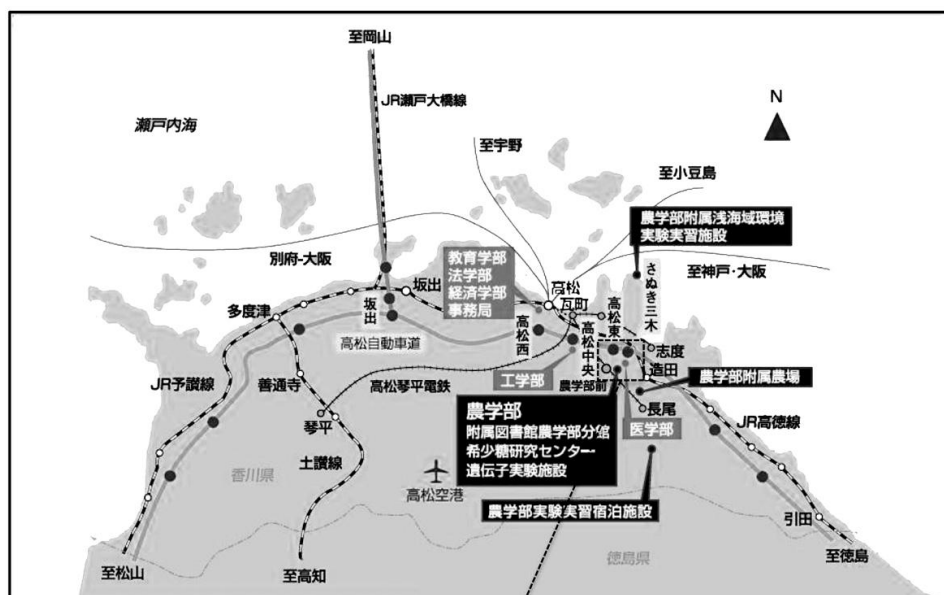
■ 高速道路から農学部へのアクセス（東方面より）：

さぬき三木IC（高松道）から車で約10分 （西方面より）高松東IC（高松道）から車で約5分

■ 高松空港から農学部へのアクセス：

高松空港からJR高松駅までは高松空港リムジンバス（約45分）をご利用ください。

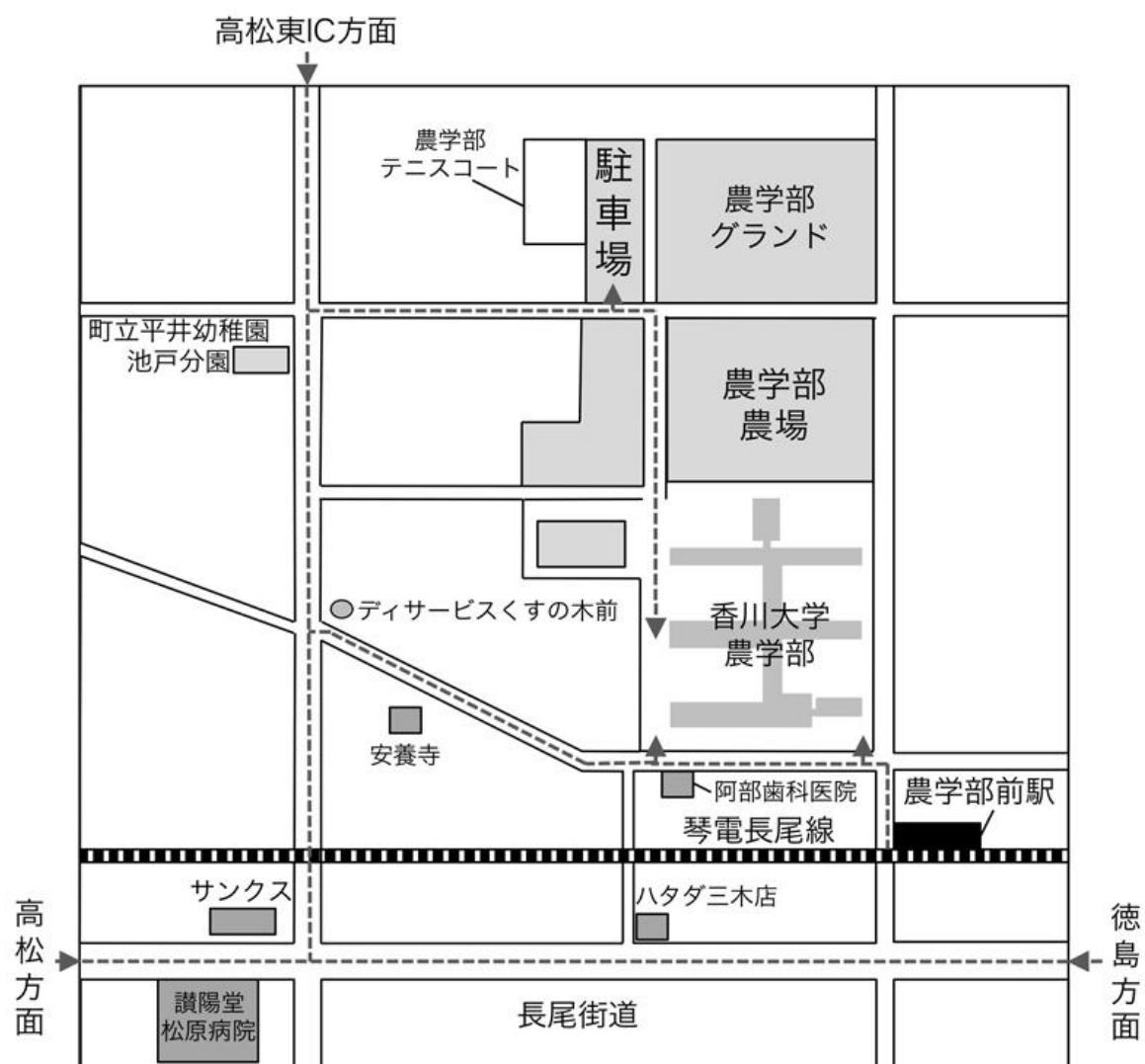
JR高松駅から農学部までは上記の「JR高松駅から農学部へのアクセス」を参照してください。



駐 車 場 案 内

お車で来られる方は、当日は、農学部正門を開けておきますので、下図の順路を参考に、指定の駐車場に駐車して下さい。講義棟前の“外来”と記された駐車場に駐車して頂いても構いませんが、数に限りがあります。“番号”が記された駐車場は、職員の駐車場ですので、特に第一日目は、ここへの駐車はご遠慮下さい。

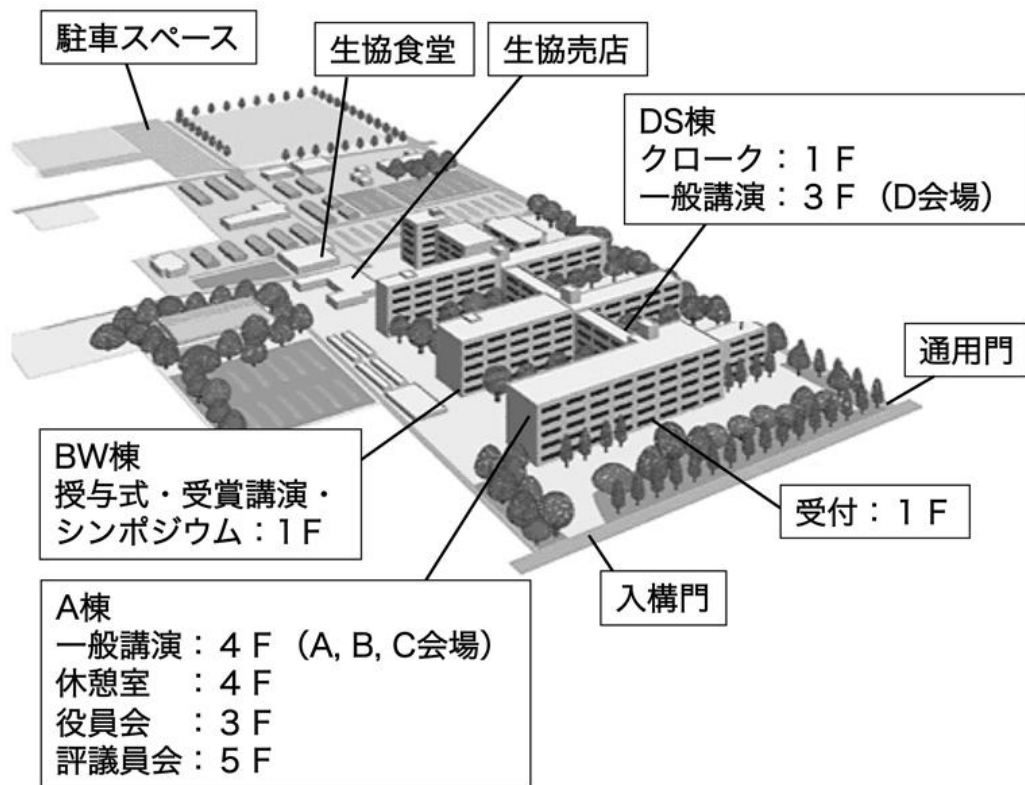
また、農学部周辺の道路は大変狭くなっていますので、ご注意下さい。



会場案内図

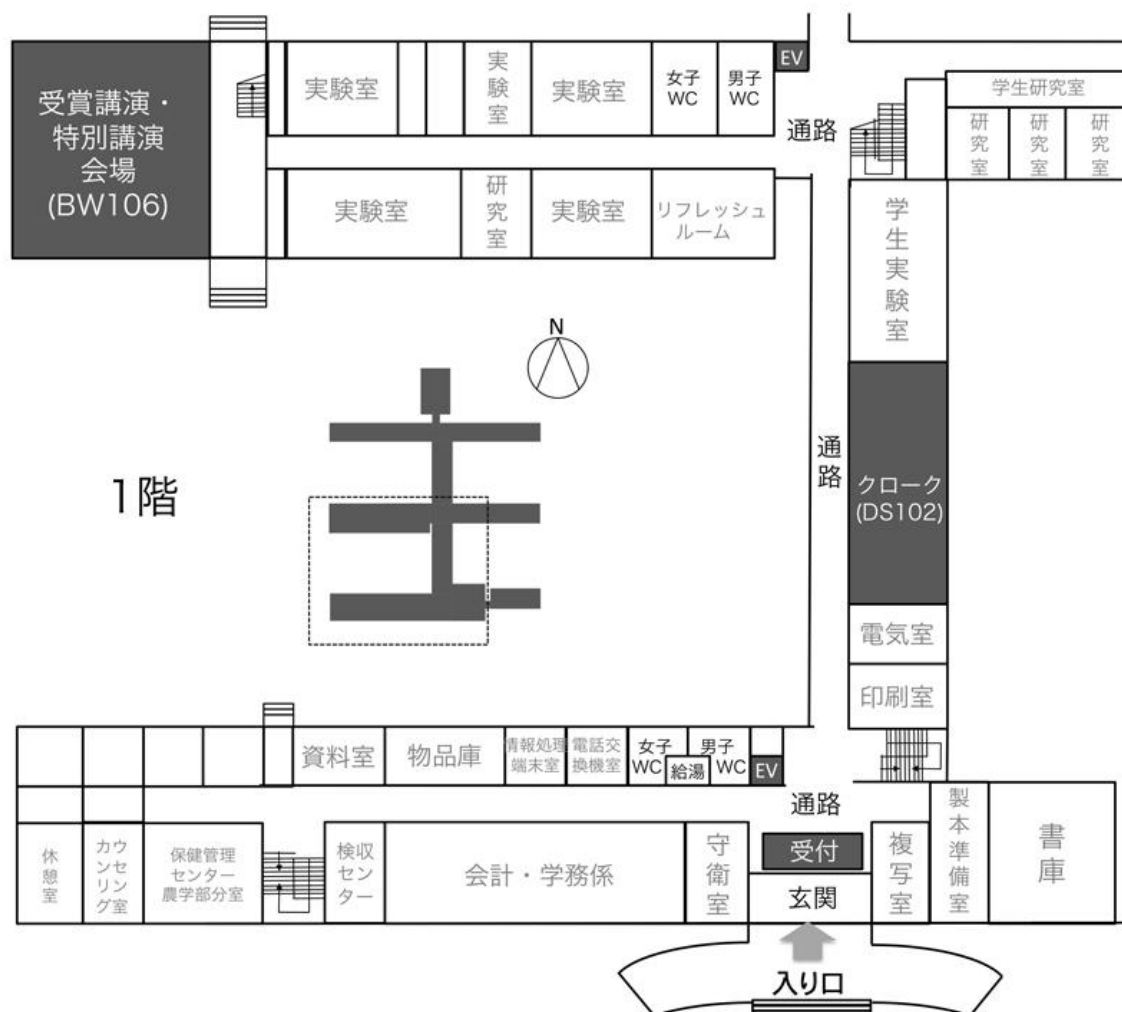
支部大会会場

(香川大学農学部：香川県木田郡三木町池戸 2 3 9 3)

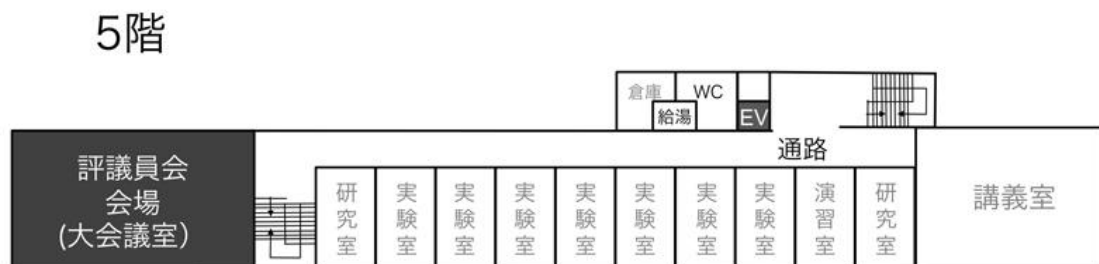
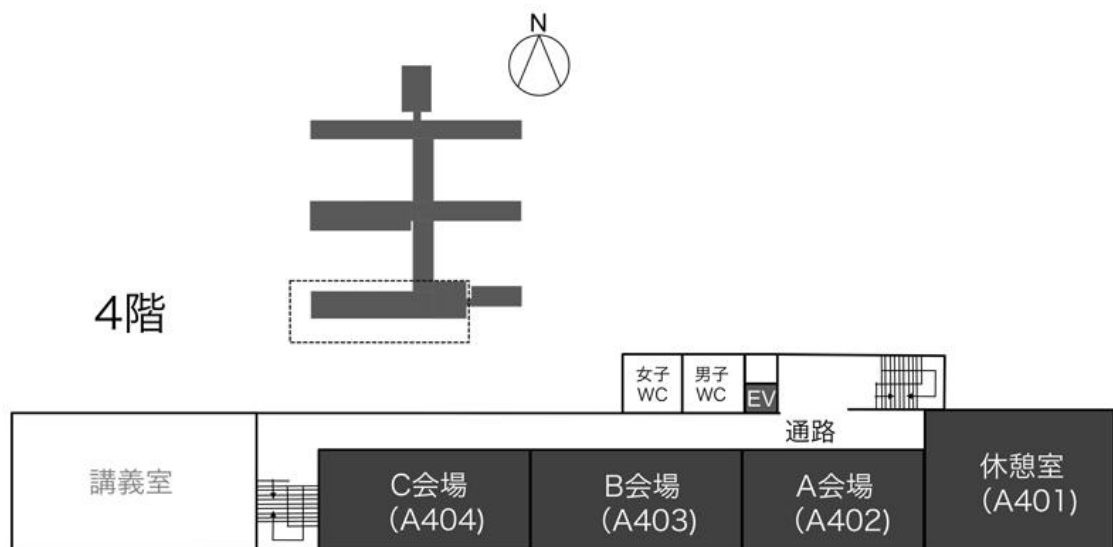
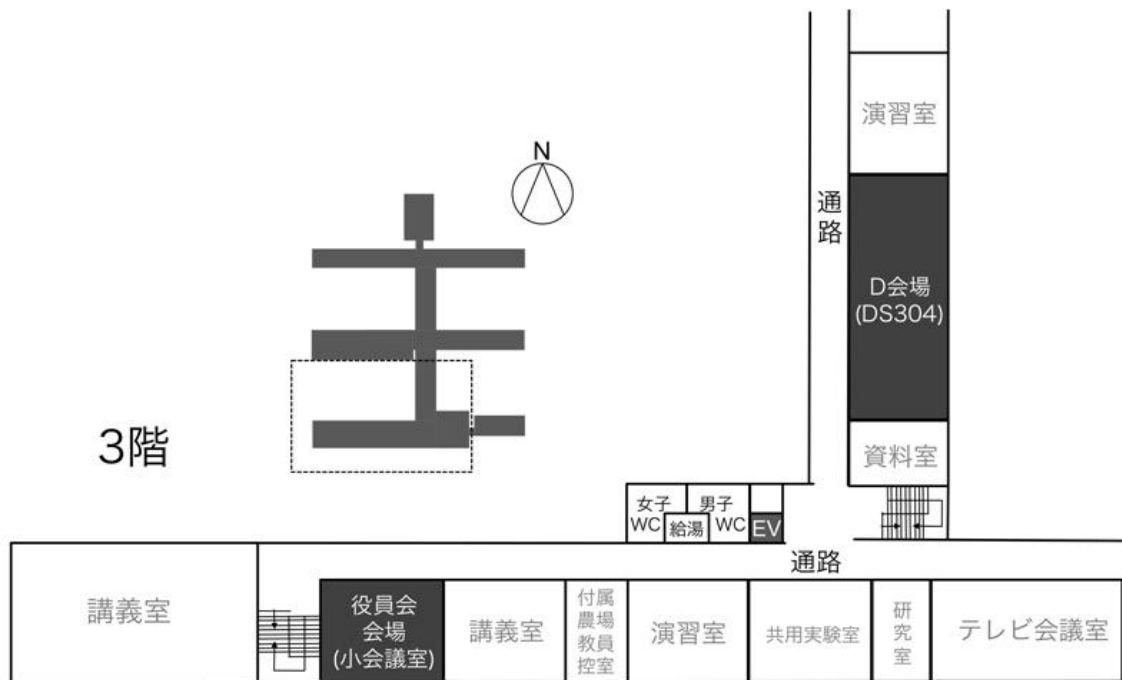


受付	農学部	正面玄関	
授与式・受賞講演・シンポジウム	会場	BW 棟 1 階	BW106
一般講演	会場	A 会場	A 棟 4 階
		B 会場	A 棟 4 階
		C 会場	A 棟 4 階
		D 会場	DS 棟 3 階
			DS304
役員会	会場	A 棟 3 階	小会議室
評議員会	会場	A 棟 5 階	大会議室
休憩室		A 棟 4 階	A401
クローク		DS 棟 1 階	DS102

香川大学農学部講義棟 1 階



香川大学農学部講義棟 3, 4, 5 階



懇 親 会 会 場 案 内

懇親会会場：ロイヤルパークホテル高松ロイヤルホール

(〒760-0052 香川県高松市瓦町 1-3-11, Tel: 087-823-2222)

参加費：一般 7,000 円、学生 3,000 円

シンポジウム終了後、農学部玄関前から懇親会会場まで無料バスを片道運行致します。

無料運行バスをご利用されない参加者の方へ

■ 農学部から懇親会会場へのアクセス：

- ・ 琴平電鉄 上り 「農学部前」→「瓦町」 (22分) 下車 徒歩約5分
- ・ 車で約30分

■ JR高松駅から懇親会会場へのアクセス：

琴平電鉄 下り 「高松築港」→「瓦町」 (4分) 下車 徒歩約5分

■ 高松空港から懇親会会場へのアクセス：

高松空港からJR高松駅までは高松空港リムジンバス (約45分) をご利用ください。

JR高松駅から懇親会会場までは上記の「JR高松駅から懇親会会場へのアクセス」を参照してください。



ホテル周辺地図

プログラム

第1日目 9月24日 (金)

11:30 - 12:50 役員会 (小会議室)

13:00 - 13:15 支部功労賞ならびに支部奨励賞授与式 (BW106講義室)

13:15 - 14:15 2010年度農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演 (BW106講義室)

座長：中島修平 (岡山大学大学院自然科学研究科)

L-01「カルシウム情報伝達系解明のための分子プローブの合成とその応用」

泉 実 (岡山大学大学院自然科学研究科)

座長：横田一成 (島根大学生物資源科学部)

L-02「生活習慣病に関わる動物脂質代謝関連酵素の分子細胞学的研究」

西村浩二 (島根大学総合科学研究支援センター)

座長：三本木至宏 (広島大学大学院生物圏科学研究科)

L-03「無機物と微生物の相互関係に関する研究」

若井 暁 (広島大学大学院生物圏科学研究科)

14:15 - 14:30 研究企画賞概要発表 (BW106講義室)

座長：稲垣賢二 (岡山大学大学院自然科学研究科)

L-04「品種の異なるオオムギに共生するメタノール資化性菌の網羅的ライブラリ
作製と宿主生育促進効果の解析」

谷 明生 (岡山大学資源植物科学研究所)

14:45 - 16:45 シンポジウム「微生物・酵素 - 産業利用の新展開」 (BW106講義室)

座長：櫻庭春彦 (香川大学農学部)

S-01「超好熱菌のフラビン含有アミノ酸脱水素酵素の機能開発」

大島敏久 (九州大学大学院農学研究院)

S-02「酵母での酵素高発現に向けて」

赤田倫治 (山口大学大学院医学系研究科)

座長：麻田恭彦（香川大学農学部）

S-03 「ポリ- γ -グルタミン酸の生合成、生分解、並びに新用途開発」

芦内 誠 （高知大学大学院総合人間自然科学研究科）

S-04 「真核細胞型D-セリンデヒドラターゼ：酵素学的特性とD-セリン酵素定量法への応用」

吉村 徹 （名古屋大学大学院生命農学研究科）

18:30 - 20:30 懇親会 （会場：ロイヤルパークホテル高松ロイヤルホール）

（シンポジウム終了後、農学部玄関前から懇親会会場まで無料バスを片道運行致します。）

第2日目 9月25日（土）

10:00 - 一般講演 午前の部 （A402, A403, A404講義室, DS304講義室）

12:00 - 12:50 評議員会（大会議室）

13:00 - 一般講演 午後の部 （A402, A403, A404講義室, DS304講義室）

一般講演一覧表

会場	午 前	午 後
A	食 品 A-01～07	酵素・タンパク質 A-08～23
B	植 物 B-01～07	微生物（代謝・分離） B-08～26
C	有機・天然物 C-01～08	有機・天然物 C-09～14 ----- 食 品 C-15～21
D	微生物（遺伝子・機能解析） D-01～08	動 物 D-09～13 ----- 微生物（遺伝子・機能解析） D-14～23

一般講演 座長一覧表

会場	午 前	午 後
A	01-04 川村 理（香川大・農） 05-07 吉井英文（香川大・農）	08-11 森本兼司（香川大・希少糖研セ） 12-15 吉原明秀（香川大・希少糖研セ） 16-19 里村武範（米子高専・物質工） 20-23 田村 隆（岡山大院・自然科学）
B	01-04 石川孝博（島根大・生資科） 05-07 多田安臣（香川大・総合生命研セ）	08-11 高田悟郎（香川大・希少糖研セ） 12-15 横井川久己男（徳島大・総合科学） 16-19 田中直孝（香川大・農） 20-23 村松久司（高知大・農） 24-26 渡邊 彰（香川大・農）
C	01-04 古本敏夫（香川大・農） 05-08 川浪康弘（香川大・農）	09-11 鈴木利貞（香川大・農） 12-14 片山健至（香川大・農） 15-17 小川雅廣（香川大・農） 18-21 合谷祥一（香川大・農）
D	01-04 岡崎勝一郎（香川大・農） 05-08 田淵光昭（香川大・農）	09-13 末吉紀行（香川大・農） 14-18 芦内 誠（高知大院） 19-23 木村義雄（香川大・農）

一般講演プログラム

A 会場午前

【食 品】

10:00～

- A-01 食品タンパク質・ペプチドによるオリーブ葉エキスの苦味低減化
○小川雅廣¹、早川茂¹、藤田夕佳¹、柴崎博行²、松井幸一³、植松勝太郎³
(¹香川大農・応生科、²香川県・産技セ、³株ヤマヒサ)

10:12～

- A-02 オリーブポメスに含まれる抗アレルギー活性成分の探索
○佐藤彰彦、田村啓敏（香川大院・農）

10:24～

- A-03 Anti-tumour promoting activity of Chemical Components from Ginger
○Trisonthi Piyapat, Tamura Hirotoshi
(Faculty of Agriculture, Kagawa University)

10:36～

- A-04 Modulating effects of food antioxidants on phloxine B-induced photocytotoxicity
○Hang Qi, Hiroshi Takano, Qian Wu, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama University)

10:48～

- A-05 A marked suppression in colon tumorigenesis by dietary vitamin B6 can be explained by higher susceptibility of intestinal PLP level to dietary vitamin B6
○Sofya Suidasari, Kabo Masisi, Noriyuki Yanaka, Norihisa Kato
(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

11:00～

- A-06 カクテルイムノアフィニティーカラム-HPLC 法を用いた牛乳及び鶏卵中のアフラトキシン類同時分析法の検討
○川村 理、木山 生（香川大農・応生科）

11:12～

- A-07 エビアレルゲンの抗原構造は多糖修飾ではマスクされない
○臼井将勝、田中真澄、西村美祝、花岡研一（水大校・食品科学）

A 会場午後

【酵素・タンパク質】

13:00～

- A-08 ミヤコグサに発現するプロテインキナーゼ PKL01 の酵素学的性質
○片山将一、末吉紀行、野村美加、田島茂行、亀下勇
(香川大・農・応用生物科学)

13:12～

- A-09 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来 Cytochrome *c'* のアミノ酸配列と相同性
○井上寛基、若井暁、三本木至宏 (広大院・生物圏)

13:24～

- A-10 Molecular characterization and molecular modeling of plant α -mannosidase
○Md.Anowar. Hossain¹, Ryohei Nakano¹, Kosuke Nakamura^{1,2},
Yoshinobu Kimura¹ (¹岡山大学大学院自然科学研究科、²カゴメ (株))

13:36～

- A-11 *Bacillus* sp. 由来 α -L-Rhamnosidase の希少糖に対する作用に関する研究
○河原愛子¹、宮西伸光²、田中直孝¹、泉 実³、竹川 薫⁴
(¹香川大・農・応用生物、²東洋大・生命科学・食環境科学、³岡山大・院・自然科学研究科、⁴九州大・院・農)

13:48～

- A-12 ランダム変異導入による *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の改変
○松井祐士、山川 匠、村松久司、永田信治 (高知大・農)

14:00～

- A-13 ヒト由来セレノシステイン β リアーゼの遺伝子クローニングと発現、機能解析
○佐藤久美、田村隆、稲垣賢二 (岡山大院・自然科学)

14:12～

- A-14 L-グルタミン酸酸化酵素の基質特異性の改変
○内海友宏¹、田村 隆¹、日下部 均²、稲垣賢二¹
(¹岡山大院・自然科学、²(株)エンザイムセンサ)

14:24～

- A-15 *Anabaena* 由来 DyP 型ペルオキシダーゼの触媒作用 Trp 残基とメディエータ反応機構
○上池貴晃, Henry J.O. Ogola, 石川孝博, 澤嘉弘 (島根大・生命工)

14:36～

A-16 微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解(第 9 報) : ホモコリン分解酵素系の検討

イサム アリ¹、塚本悦子²、一柳 剛²、有馬二郎²、○森 信寛²

(¹鳥取大連農、²鳥取大農・生資環)

14:48～

A-17 好熱菌 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ATCC43494 株由来コージビオースホスホリラーゼの大腸菌での発現および精製と諸性質

○佐藤千晶¹、伊澤精祐¹、山本拓生¹、阿賀創²、西本友之¹、福田恵温¹

(¹林原生化研、²林原)

15:00～

A-18 土壌から単離した *Penicillium* sp. が生産する新規糖アルコール酸化酵素

○徳野友香¹、仲西一未¹、渡邊彰¹、森本兼司²、何森健²、麻田恭彦¹

(¹香川大・農・応用生物科学、²香川大・希少糖研セ)

15:12～

A-19 異性化酵素を用いた 6-デオキシ-L-アロース、6-デオキシ-L-アルトロースの生産法の確立

○松本麻里子^{1,2}、吉原明秀²、ラオディベンダー²、森本兼司²、高田悟朗²、

何森健³ (¹香川大農・応生科、²香川大・希少糖研セ、³希少糖生産技研)

15:24～

A-20 アスコルビン酸の 6 位水酸基を特異的に β -グルコシル化する *Aspergillus niger* 由来酵素(第 2 報) - 糖転移活性の詳細検討 -

○早川有美、仁戸田照彦、神崎浩 (岡山大院・自然科学)

15:36～

A-21 色素依存性脱水素酵素の網羅的な機能検索

○里村武範¹、櫻庭春彦²、大島敏久³

(¹米子高専・物質工、²香川大農・応生科、³九大院・農・遺伝子資源工)

15:48～

A-22 超好熱菌由来 UDP-galactose 4-epimerase の性質と構造

○河合智之¹、米田一成²、大島敏久³、櫻庭春彦¹

(¹香川大・農、²東海大・農、³九大院・農)

16:00～

A-23 超好熱菌由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の機能および構造解析

○原佑介¹、里村武範²、米田一成³、大島敏久⁴、櫻庭春彦¹

(¹香川大・農、²米子高専・物質工、³東海大・農、⁴九大院・農)

B 会場午前

【植 物】

10:00～

- B-01 セレン耐性 *Arabidopsis thaliana* 変異体の解析
○大野美佐緒¹、裏地美杉¹、中村宜督¹、森泉²、村田芳行¹
(¹岡山大院自然, ²岡山大植物研)

10:12～

- B-02 Roles of catalases in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells
○Rayhanur Jannat¹, Misugi Uraji¹, Miho Morofuji¹, Mohammad Anowar Hossain¹,
Mohammad Muzahidul Islam¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori²,
Yoshiyuki Murata¹ (¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

10:24～

- B-03 Involvement of intracellular glutathione in methyl jasmonate signaling in
Arabidopsis guard cells
○Nasima Akter¹, Muhammad Abdus Sobahan¹, Mohammad Anowar Hossain¹,
Misugi Uraji¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori², Yoshiyuki Murata¹
(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

10:36～

- B-04 Involvement of peroxidases in chitosan-induced stomatal closure in *Arabidopsis*
○Md. Atiqur Rahman Khokon¹, Misugi Uraji¹, Shintaro Munemasa¹, Eiji Okuma¹,
Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori², Yoshiyuki Murata¹
(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

10:48～

- B-05 植物用新規ベクターシステムによる 2 遺伝子同時クローニング
○中尾彰秀¹、中村真也¹、戒能智宏²、川向誠²、木村哲哉³、中川強¹
(¹島根大・総科センター・遺伝子、²島根大・生物資源科学・生命工、³三重大院・生物
資源・資源循環)

11:00～

- B-06 ユーグレナチオレドキシシペルオキシダーゼの機能解析
○玉木 峻、西川 仁、柴田 均、澤 嘉弘、石川孝博 (島根大生資料・生命工)

11:12～

- B-07 ヒメツリガネゴケにおけるアスコルビン酸生合成経路の同定と機能解析
西川 仁、原井健司、柴田 均、澤 嘉弘、○石川孝博 (島根大生資料・生命工)

B 会場午後

【微生物（代謝・分離）】

13:00～

B-08 耐熱性 *Zymomonas mobilis* の高温育種と育種株の生理学的解析

○中島康之¹、入江陽¹、Kannikar Charoensuk¹、村田正之¹、高坂智之²、
山田守^{1,2}（¹山口大・院医・応用分子、²山口大・農・生機）

13:12～

B-09 耐熱性 *Zymomonas mobilis* による L-乳酸発酵

○嘉松初¹、入江陽¹、村田正之¹、中島康之¹、高坂智之²、山田守^{1,2}
（¹山口大・院医・応用分子、²山口大・農・生機）

13:24～

B-10 納豆菌の生理活性物質産生におけるキシロオリゴ糖の影響について

○丸山雅史、津田さおり、木場洋次郎（愛媛大農・応生化）

13:36～

B-11 大腸菌 0157 の調理器具素材に対する付着性の抑制

○横井川久己男¹、麻野亜耶佳¹、石本麻衣子¹、武政二郎^{1,2}、達牧子^{1,3}
（¹徳島大総合科学、²辻調理師専門学校、³神戸女短大）

13:48～

B-12 *Clostridium* 属細菌の共培養によるセルロースからのブタノール生産の試み

○西垣直哉¹、兵頭一星¹、大西浩平²（¹高知大農・農、²高知大総研セ）

14:00～

B-13 キャッサバ澱粉残渣を原料とする無蒸煮法によるアルコール発酵

○松元信也、柿木裕一、高橋 永（高知工科大 物質・環境）

14:12～

B-14 機能性 β -1, 3-1, 6-グルカンの特異的に分解する微生物の分離と評価

○松岡靖子¹、清野由佳¹、和田いくみ¹、宮脇香織^{1,2}、中谷麻衣^{1,2}、村松久司¹、
永田信治¹（¹高知大・農、²ソフィ）

14:24～

B-15 β -1, 3-1, 6-グルカンを生産する黒酵母 *Aureobasidium pullulans* の細胞形態につ
いて

○宮脇香織^{1,2}、山本純史¹、松尾知佳¹、村松久司¹、永田信治¹
（¹高知大・農、²ソフィ）

14:36～

B-16 様々な動物の腸内環境を利用した有用酵母の探索

○木村有希¹、穴井直博²、須藤千賀¹、井上寿子¹、村松久司¹、永田信治¹
（¹高知大・農、²高知アニマルサイエンス、²木村どうぶつ病院）

14:48～

B-17 食餌利用を目指した植物性バイオマス由来の乳酸菌の分離

○井上寿子¹、穴井直博²、木村有希¹、徳井あすみ¹、松尾知佳¹、村松久司¹、
永田信治¹（¹高知大・農、²高知アニマルサイエンス、²木村どうぶつ病院）

15:00～

B-18 海洋細菌による prodigiosin の生産と殺藻性

○白川哲夫、有賀 修、榎本恵一（高知工大・環境理工）

15:12～

B-19 銅のバイオリッチング活性の高い鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* D3-2 株は亜硫酸耐性である

○小野田桂子¹、竹内文章²、杉尾 剛³
（¹岡大農、²岡大環境管理セ、³岡大院自然）

15:24～

B-20 鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の外膜における *aa₃* 型 cytochrome *c* oxidase の存在

○狩野典香¹、竹内文章²、杉尾 剛³（¹岡大農、²岡大環境管理セ、³岡大院自然）

15:36～

B-21 新規な鉄酸化細菌による酸性鉱山廃水の生成

○王 揚¹、金尾忠芳²、上村一雄¹
（¹岡山大院・自然科学、²岡山大・自然科学研究支援センター）

15:48～

B-22 6-デオキシ-D-プシコース及び 6-デオキシ-D-アロースの新規生産法の確立

○加藤明広¹、吉原明秀²、森本兼司²、高田悟郎²、何森健³
（¹香川大農・希少糖研セ、²香川大希少糖研セ、³希少糖生産技術研究所）

16:00～

B-23 希少糖 D-アロースを含む新規二糖の生産

○竹地紀昭¹、森本兼司²、吉原明秀²、高田悟郎²、何森健³
（¹香川大農・希少糖研セ、²香川大希少糖研セ、³希少糖生産技術研究所）

16:12～

B-24 ニゲロース分解酵素を生産する微生物の検索と諸性質の検討

高田悟郎²、賀来仁美¹、○沖村美由紀¹、吉原明秀²、森本兼司²
（¹香川大・農、²希少糖研セ）

16:24～

B-25 *Mesorhizobium loti* ケトース 3-エピメラゼ誘導発現条件の検討

○上地敬子^{1,2}、吉原明秀²、森本兼司²、高田悟郎²、何森健³
（¹香川大・農、²希少糖研セ、³希少糖生産技研）

16:36～

B-26 *Enterobacter aerogenes* 由来キシリトールデヒドロゲナーゼの諸性質の検討

○古田睦¹、吉原明秀²、森本兼司²、高田悟郎²、何森健³

(¹香川大・農、²希少糖研セ、³希少糖生産技術研究所)

C 会場午前

【有機・天然物】

10:00～

C-01 D-アロース脂肪酸エステル of 植物成長抑制活性

○江川佳穂、上田真理子、小田愛、川浪康弘 (香川大農)

10:12～

C-02 リパーゼを用いた D-アロース不飽和脂肪酸エステル of 合成とその植物成長調節作用

○内藤まどか、江川佳穂、川浪康弘 (香川大農)

10:24～

C-03 D-アロース中鎖脂肪酸エステル of 血管新生阻害活性

○吉村麻衣¹、川浪康弘¹、塚本郁子²、小西良士²

(¹香川大農、²香川大医)

10:36～

C-04 コージビオース of アルカリ異性化-異性化物 of 単離と構造解析-

○小出修也、八木政裕、渡邊 光、西本友之、福田恵温 (林原生化研)

10:48～

C-05 陽イオン交換樹脂を用いた Pictet-Spengler 反応

○城戸健史、村上美祐、中島修平、泉 実 (岡山大院・自科)

11:00～

C-06 TMSCI を用いたフィッシャーグリコシド化 of β 選択性

○堀内正子、武内野乃子、中島修平、泉 実 (岡山大院・自科)

11:12～

C-07 アントラセサモン類 of 新規生合成関連化合物 of 探索

星隈 新、○古本敏夫 (香川大農・応生科)

11:24～

C-08 ゴマ of セサミノール of 生合成経路 of 解明

○川原夏美¹、鈴木利貞¹、藤原利彦¹、片山健至¹、田代亨²、並木満夫³

(¹香川大農、²千葉大園芸、³名古屋大名誉教授)

C 会場午後

【有機・天然物】

13:00～

- C-09 安定型アスコルビン酸誘導体 AA-2G のプロテアーゼによるモノアシル化(第2報)
○岩岡裕二¹、森佑¹、伊東秀之²、田井章博¹
(¹県立広島大・生命環境、²岡山大院・医歯薬)

13:12～

- C-10 モノアシル化アスコルビン酸誘導体 6-*O*-dodecanoyl-2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid の分子内アシル基転位および酵素的加水分解
○森佑¹、漆原将也¹、伊東秀之²、川崎大輔²、山本格²、田井章博¹
(¹県立広島大・生命環境、²岡山大・薬)

13:24～

- C-11 バニリン構造類似体の抗酸化作用評価
○澤野健史¹、伊東秀之²、田井章博¹
(¹県立広島大・生命環境、²岡山大院・医歯薬)

13:36～

- C-12 茶からの新規プロアントシアニジンの同定と NMR によるペプチドとの分子間相互作用解析
○勅使河原 功、横井信敏、佐藤正資(香川大農・応生科)

13:48～

- C-13 ペルオキシ結合を有する特異なセサモール酸化ダイマーの構造[抗酸化フェノール物質の酸化生成物の構造と機能 IV]
○新開愛美、藤本彩、中村光裕、増田俊哉(徳島大院総合)

14:00～

- C-14 高速液体クロマトグラフィーによるヒアルロン酸と海洋細菌多糖ウミノグリカンの糖鎖解析と化粧品分析への応用
○生田寛子¹、奥谷康一²、岡崎勝一郎¹(¹香川大農・応生科、²シーバイオン)

【食 品】

14:12～

- C-15 ポリグリセリン脂肪酸エステルを用いた液晶乳化法によるナノエマルションの調製
○宮ノ下道隆、池田新矢、合谷祥一(香川大農・応生科)

14:24～

- C-16 非イオン活性剤の曇点およびエマルションの相転移温度に対する糖の影響
○大久保覚史、池田新矢、合谷祥一(香川大農・応生科)

14:36～

C-17 求肥の物性に対する D-プシコースの影響

○合谷祥一、古田智暖、池田新矢（香川大農・応生科）

14:48～

C-18 食用藍藻 *Nostochopsis* sp. からのフィコシアニンの精製と性質

○橋本恵利¹、山口裕司²、竹中裕行²、藪田行哲¹、渡辺文雄¹

（¹鳥取大院・農、²マイクロアルジェコーポレーション(MAC)）

15:00～

C-19 キャベツ葉中に見出されたフィトセラミド1-リン酸

○田中 保¹、盛重純一²、喜田孝史¹、安藤千恵¹、木下正文¹、葛西彩香¹、
大本真弓¹、瓜倉真衣³、里内 清³、徳村 彰¹

（¹徳島大・院 HBS(薬学系)、²福山大・GSRC、³福山大・生命栄養）

15:12～

C-20 希少糖 D-プシコースを添加した魚肉練り製品の物性及び機能性

○井上雅貴¹、小川雅廣²、早川茂²（¹香川大院・農研科、²香川大農・応生科）

15:24～

C-21 芋や栗の加工後の規格外品を利用した焼酎醸造法の検討

○村上潤¹、市田英雄¹、加藤麗奈²、上東治彦²、村松久司¹、永田信治¹
（¹高知大・農、²高知県工技セ）

D 会場午前

【微生物（遺伝子・機能解析）】

10:00～

D-01 異担子菌酵母 *Rhodospiridium toruloides* の形質転換系の確立

○川勝早智、岡田典子、渡邊彰、麻田恭彦（香川大・農・応用生物科学）

10:12～

D-02 エノキタケの子実体形成過程において発現するラッカーゼの解析

○山本亮輔¹、渡邊 彰¹、馬替由美²、麻田恭彦¹（¹香川大学・農、²森林総研）

10:24～

D-03 担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成過程で活性が増大するホスファターゼ

○金子啓祐、馬場裕美、渡邊彰、麻田恭彦、末吉紀行、亀下勇
（香川大農・応生科）

10:36～

D-04 担子菌ウシグソヒトヨタケにおける MAPKK kinase アダプターSte50 ホモログ
(Cc.Ubc2) とその下流 MAP kinase カスケードの子実体発生への関わり

○中沢威人、近藤浩文、中堀清、鎌田堯（岡山大学・自然科学研究科）

10:48～

D-05 寒天分解遺伝子の大腸菌へのクローニング

○小田 達¹、有賀 修¹、井上貴由、久保 元（¹高知工大・環境理工）

11:00～

D-06 枯草菌の転写開始点の塩基種に支配される緊縮制御と孢子形成

○東條 繁郎、広岡 和丈、藤田 泰太郎（福山大 生命工）

11:12～

D-07 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編が病原性に及ぼす影響

○山崎遼平、斉藤悠希、松永哲郎、加藤昭夫、阿座上弘行

（山口大・農・生物機能）

11:24～

D-08 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させた鶏卵白リゾチームの構造安定性とカルネキシンとの相互作用との相関

○興梠祐樹、鶴永雄太、Kazi Mostafizur、加藤昭夫、阿座上弘行

（山口大・農・生物機能）

D 会場午後

【動 物】

13:00～

D-09 哺乳類の精子形成に関与する遺伝子の発現解析

○山野好章¹、大山建司²（¹鳥取大農・獣医、²山梨大医・臨床看護）

13:12～

D-10 ビタミンB₁₂アルキルアミン誘導体を用いたビタミンB₁₂欠乏線虫 *C. elegans* の調製法の検討

○大塚賢二、西谷南、安井麻里子、美藤友博、藪田行哲、一柳剛、河野強、渡辺文雄（鳥取大院・農）

13:24～

D-11 線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫休眠を制御する新経路の探索

大道由香里¹、合田憲司¹、松永洋平²、岩崎 崇^{1,2}、○河野 強^{1,2}

（¹鳥取大農・生物資源科学、²鳥取大院・連合農学）

13:36～

D-12 ビートファイバーの摂取エネルギー低下効果と肥満傾向性の関係

○小原祐香、森裕貴、藤田悠祐、水重貴文、岸田太郎、海老原清

（愛媛大院農・生資）

13:48～

- D-13 クルクミンの細胞毒性 - ラット胸腺細胞の自発的アポトーシスに対する影響 -
○幸泉和樹（徳島大・院・総合科学教育部）

【微生物（遺伝子・機能解析）】

14:00～

- D-14 *Gluconobacter* 属酢酸菌のべん毛運動の誘導
○薬師寿治¹、窪田真也²、藤井雅子¹、保坂毅²、千菊夫²、松下一信¹
（¹山口大学、²信州大学）

14:12～

- D-15 深海由来 *Shewanella* 属細菌のべん毛フック形成遺伝子 *fliK* の比較構造解析
○仲宗根薫¹、山野由美子¹、Fengping Wang²、Xiang Xiao²、加藤千明³
（¹近畿大・工・生化工、²上海交通大学、³海洋研究開発機構）

14:24～

- D-16 枯草菌におけるフラボノイドに応答した転写制御機構と標的遺伝子群の生理的機能
○広岡和丈、藤田泰太郎（福山大・生命工・生物工）

14:36～

- D-17 分裂酵母のコエンザイムQ生合成と硫黄代謝系との関連性
○古田奈々¹、志岐拓哉¹、林 和弘¹、戒能智宏¹、中川 強²、川向 誠¹
（¹島根大生資科、²島根大・総科支援センター）

14:48～

- D-18 Triacylglycerolを分泌する酵母変異株の解析
○池本ひとみ、松崎浩明、秦野琢之（福山大学・生命工学部・生物工学科）

15:00～

- D-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
○宮本昭弘、柳本敏彰、秦野琢之、松崎浩明
（福山大学・生命工学部・生物工学科）

15:12～

- D-20 戦国醤菌 *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang* の膜局在性短鎖ポリグルタミン酸：発見と分子解析
○芦内 誠^{1,2}、亀井 亨¹、山城大典²、蓑内 裕¹（¹高知大院、²愛媛連大）

15:24～

- D-21 戦国醤菌 *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang* の染色体上に存在する染色体外DNA維持遺伝子：発見と生化学的解析
○山城大典¹、芦内 誠^{1,2}（¹愛媛連大、²高知大院）

15:36～

D-22 巨大菌 *Bacillus megaterium* WH320 由来ポリ- γ -グルタミン酸合成オペロンのファンクショナルクローニング

○蓑内 裕¹、山城大典²、芦内 誠^{1,2} (¹高知大院、²愛媛連大)

15:48～

D-23 分裂酵母のゴルジ層板に関与するタンパク質の解析

○船木大伍¹、松沢智彦²、工藤麻友美¹、竹川薫²、田中直孝¹
(¹香川大農、²九大院農)

支部奨励賞受賞講演・
農芸化学研究企画賞概要発表

講演要旨

カルシウム (Ca) は骨格の構成要素としてだけでなく、ホルモン分泌や神経伝達物質の放出、筋収縮、受精、発生など様々な生理機能の調整において重要な役割を担っている。カルシウムイオンは細胞内液には殆ど存在せず、細胞外からのカルシウムイオンの流入や、細胞内の小胞体に蓄えられたカルシウムイオンの放出は、様々なシグナルとしての生理的機能がある。

生体内でカルシウムイオンの放出を誘導するセカンドメッセンジャーとしてイノシトール三リン酸 (Inositol triphosphate, IP_3) やサイクリック ADP リボース (cyclic Adenosine diphosphate ribose, cADPR) が知られているが、NAADP (Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) が IP_3 と同じくセカンドメッセンジャーとして働いていることが近年分かった。Lee らは、NAADP が IP_3 とは異なる機構でカルシウムイオン放出を誘導していることを発見した。さらに植物や動物においても NAADP がカルシウムイオン放出を誘導していることが明らかになった。また、NAADP はリソソームにおけるカルシウムイオン放出を誘導していることも明らかになった。しかしながら、そのメカニズムや機能などまだ解明されていない点が多い。

本研究では、コンピューターによる分子設計で推定した NAADP の 3 次元構造と類似した立体構造を持つ化合物群をライブラリーから検索し、それらをスクリーニングすることで NAADP のアンタゴニストである Ned-19 を発見した。ここで、Ned-19 は分子内に 2 ヶ所の不斉中心を持つため、実際には 4 種の異性体が存在する。市販の Ned-19 はジアステレオマー混合物であったため、この Ned-19 の 4 種類の異性体を作りわけ、それらの活性と作用機構の詳細を調べることにした。

Pictet-Spengler 反応を鍵反応として合成した Ned-19 の立体異性体を用いて、ウニ卵におけるカルシウムイオン放出誘導の検討を行なった。この結果と立体的な相同性から、その生理活性は L-トリプトファンを基質として合成したトランス体の Ned-19 が最も強い NAADP アンタゴニスト活性を有することがわかった⁽¹⁾。また、Ned-19 のメチルエステル体や Ned-20 (Ned-19 のオルト位にあるフッ素がパラ位についた化合物) を用いたアッセイにより、NAADP 受容体には 2 つの結合部位があることが示唆された⁽²⁾。NAADP 受容体や NAADP の機能について更なる知見を得るために、Ned-19 構造の一部を改変した誘導体を合成し、その活性を現在評価中である。

1) E. Naylor, et al., *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 220-226 (2009)

2) D. Rosen, et al., *J. Biol. Chem.*, **284**, 34930-34934 (2009)

脂肪組織を構成する脂肪細胞は前駆脂肪細胞から分化し、過剰なエネルギーの貯蔵や貯蔵脂肪の分解を行うことにより、通常生体内のエネルギーバランスを巧みに調節している。一方、肥満は脂肪細胞の数と大きさが過剰に増大することによる脂肪組織の過形成であり、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、ガンといった重大な疾患の危険因子であることが近年明らかになってきている。

演者は哺乳動物のアラキドン酸シクロオキシゲナーゼ（COX）経路と肥満に起因する生活習慣病との関連性の解明や生活習慣病予防を目指して、主としてマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を実験材料に用いて、これまで脂肪細胞のライフサイクルに対するアラキドン酸 COX 経路の作用機序を解析してきた。COX には構成的に発現する COX-1 と誘導型の COX-2 の二種類のアイソフォームが存在する。また COX 代謝産物の一つである 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -プロタグランジン（PG） J_2 は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 PPAR γ のリガンドであることも知られている。COX アイソフォーム特異的な阻害剤を用いた研究から、COX が脂肪細胞分化に対して促進的に作用することを報告した。また脂肪細胞分化において PG J_2 誘導体はオートクライン的に脂肪滴の蓄積に促進的に作用した。しかし COX-1 と COX-2 をそれぞれ安定的に過剰発現する形質転換 3T3-L1 細胞を用いた研究では、それぞれの COX アイソフォームが脂肪細胞の分化能を抑制するという逆の結果も得られた。一般的に COX 経路の代謝産物は多種知られ、その作用機序も多様で相反するものもあるため、今後は COX 経路の下流の代謝経路に焦点を当て、個々の代謝産物が脂肪細胞のライフサイクルにおける作用機序を解析する必要がある。また食品由来の共役リノレン酸類や腫瘍壊死因子 TNF- α が 3T3-L1 前駆脂肪細胞に対してアポトーシスを誘導することを報告した。さらに COX 阻害剤は TNF- α によるアポトーシスを促進し、COX 経路活性化剤や COX 代謝産物である PGE $_2$ や PGF $_{2\alpha}$ は抑制的に作用することを見いだした。一方、脂肪細胞は TNF- α によるアポトーシスに対して耐性を有した。アラキドン酸の非酵素的産物である 8-イソプロスタニン（8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ）は酸化ストレスマーカーとして知られている。演者は抗 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ モノクローナル抗体の単離に成功し、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ の酵素免疫測定法を確立し、酸化ストレスの簡便な評価系を構築した。これらの結果から、食品由来因子や PG 類による脂肪細胞の質や量の調節の様子が明らかになってきた。

本研究は、島根大学生物資源科学部生命工学科および総合科学研究支援センター遺伝子機能解析分野で行われました。本研究を行うにあたりご指導を賜っている島根大学教授横田一成先生に御礼を申し上げます。その他多くの共同研究者の方々にもこの場を借りて御礼を申し上げます。

無機物は、微生物のエネルギー源として利用される他、補因子などとして酵素機能を制御している。すなわち、無機物と微生物やその酵素が相互に関係して生命活動が成立していると捉えることができる。演者は、これまで一貫して微生物を対象に研究を行っており、その内容は無機物と微生物（酵素）との相互関係についての研究として総括できる。本発表では、エネルギー源としての無機物と微生物の関係に焦点を当て、これまでの研究の一部を紹介する。

1. バイオリーチング：バイオリーチングとは、微生物の代謝を利用して鉱石から有用金属を溶出・回収する技術である。バイオリーチングが、ケミカルリーチングよりも回収効率で優れている理由の一つとして、微生物のイオウ酸化能力がある。しかしながら、バイオリーチングのモデル微生物とされる鉄・硫黄酸化細菌のイオウ酸化経路は、鉄酸化経路ほど理解が進んでいない。

演者は、生化学および分子生物学的な手法を用いて、sulfide:quinone oxidoreductase および cytochrome *bd*-type ubiquinol oxidase から成る新規硫黄酸化経路を提唱した。リーチング現場で発現・活躍しているイオウ酸化システムについては未だ不明である。このような微生物の無機物代謝能の解明並びにコントロールが、より効率的なリーチングシステムの開発に結び付くと演者は考えている。

2. バイオコロージョン：バイオコロージョン（微生物腐食）とは、微生物の直接的あるいは間接的な作用によって金属が腐食する現象である。石油関連施設等で発生がしばしば観察されるこの現象は、原油漏えい事故による甚大な経済的損失と環境汚染を引き起こす。微生物腐食に関しては、古くから硫酸塩還元細菌がその原因菌であると考えられてきたが、実際に激しい腐食を誘導する微生物の報告やそのメカニズムの解明はされてこなかった。

演者らは、激しい腐食を誘導する鉄腐食性メタン生成菌を国内三カ所の石油備蓄タンクから分離した。本菌は、金属鉄を二価鉄へと溶解させ、この時に生じた電子を用いてメタンを生成していた。比較ゲノム解析の結果、鉄腐食性菌に固有な遺伝子クラスターを発見し、新規腐食メカニズムを提案した。本菌は、固体である金属鉄から積極的に電子を引き抜いており、その酵素の機能ならびに起源は興味深い。

演者は、現在、高度好塩性菌の ATP 合成酵素の研究を行っている。本プロジェクトでは、無機物として高濃度の塩を取り扱っており、酵素機能との関係に注目している。これまで微生物のエネルギー代謝の研究を行ってきたが、現在のプロジェクトで ATP のエネルギー起源が未だ不明であることを知り愕然とした。サイエンスは、まだまだ未知の事象を沢山抱えている。今回の奨励賞受賞を機に、自分の独自の研究分野（無機物と微生物）を開拓し、農芸化学を含む科学の進歩に貢献できるよう尽力したい。

L-04 品種の異なるオオムギに共生するメタノール資化性菌の網羅的ライブラリ作製と宿主生育促進効果の解析

谷 明生（岡山大学資源植物科学研究所）

植物は成長に伴って細胞間隙に存在するペクチンを分解する必要があり、その過程でメタノールを放出している。地球規模ではその量は年間1億トンとされる。植物表面にはこのメタノールを栄養源として生育できるメタノール資化性菌が多く存在している。植物表面細菌のメタゲノム解析によりメタノール資化性菌である *Methylobacterium* 属細菌が優占化していることが分かっており、メタプロテオミクス解析により本属細菌が植物由来のメタノールを資化していることが分かっている。また、本属細菌はオーキシシン・サイトカイニンなど植物ホルモンの合成活性や、窒素固定、不溶性リン酸の可溶化能、シデロフォアの合成活性などがあり、これらの活性が本属細菌が持つ植物生育の促進作用に関わっているという報告が数多く存在する。

一方で、本属細菌のどの種がどの種の植物に多く存在するのかという特異性や、生育促進作用が起こる組み合わせなどは不明である。演者らは数多くの植物サンプルから本属細菌を網羅的に収集し、植物との相互作用の種特異性の解析と、生育促進作用の高い菌のスクリーニングを行っている。収集した膨大な数の菌をスクリーニングするのは非効率的である。そこで、演者らは質量分析器（MALDI-TOF/MS）を用いて菌体内のタンパク質の質量プロファイルを解析することにより、ライブラリの中から同種の菌を除き、ユニークな菌のみからなるライブラリを構築した。さらに本属細菌の基準株も同様に解析することにより、新種菌候補を非常に簡単に選抜できた。

上記では雑多な植物種から多様な本属細菌の種が分離された。では同じ種の植物の異なる品種、かつ同じ栽培条件では、それら植物に共存している本属細菌の多様性はどのようなものであろうか？またそれらの植物に対する効果はどのようなものであろうか？演者の属する研究所ではオオムギの世界的なコレクションがあり、多様な品種が揃っている。そこで、オオムギを対象として異なる品種から集めた本属細菌がどのような種に属するのかを、上記と同じく質量分析器を用いて解析した結果について報告する。

シンポジウム

『微生物・酵素—産業利用の新展開』

講 演 要 旨

生体エネルギーの生産、生体物質の生合成や分解代謝などに、様々な酸化還元酵素が関与している。酸化還元酵素は、アミノ酸、アルコール、糖、アミンなどの電子供与体と電子受容体間の電子移動を伴う可逆反応を触媒するが、酸素を電子受容体とする酸化酵素（オキシダーゼ）や酸素添加酵素（オキシゲナーゼ）、及び NAD (P)、FAD、FMN、PQQ、Cyt c などを電子受容体とする脱水素酵素や還元酵素に大別される。その中で、FAD や FMN などのフラビンを電子受容体とする一群の脱水素酵素が存在し、一般に生体膜に存在する電子伝達系の初発酵素として機能するものが知られている。代表的なものとして、コハク酸脱水素酵素などが古くから知られ、人工の酸化還元色素 2,6-ジクロロインドフェノール (DCIP) やフェリシアン化カリウムなどを電子受容体とするために、色素依存性脱水素酵素と呼ばれる。これらは色素をメディエータとして、基質の電子を電極へ導入できるので基質を電気化学的に測定するバイオセンサー用素子として利用できる。しかし、これらの酵素の多くは膜結合性であるために、機能解析には膜からの可溶化が必要となる。可溶化すると常温性生物由来の膜結合性酵素は総じて不安定になり、急速な活性低下をきたす場合が多く、精製も容易ではなく機能性素子としての応用は遅れている。また、これらの酵素は細胞膜にある電子伝達タンパク質などと複合体を形成するなど、多様で複雑な構造をとるために、機能解析や構造解析も NAD(P) 依存性の脱水素酵素と比較してかなり遅れているのが現状である。そこで、我々は、常温生物よりも高い安定性が期待できる超好熱菌のフラビン含有色素依存性アミノ酸脱水素酵素の機能開発を進め、新しい局面を展開した。まず、超好熱菌におけるスクリーニングから安定性の高い 2 種類の L-プロリン脱水素酵素 (PDH) を見出した。機能と構造解析から、嫌気性超好熱菌 *Thermococcus profundus* に $\alpha \beta \gamma \delta$ の 4 種のサブユニット（4 量体構造）からなる FAD と鉄硫黄を含む新規酵素複合体の機能解明に成功した。次に、嫌気性超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* に、 $\alpha_4 \beta_4$ 構造をとる PDH を発見し、機能解析から補酵素として FAD の他に FMN、Fe、ATP を有する全く新規な複合体酵素を見出し、X 線結晶構造解析にも成功した。また好気性超好熱菌 *Pyrobaculum caldifontis* にホモ 2 量体構造をとる FAD 含有の PDH を見出し、第 3 の新規 PDH であることを明らかにした。さらに、嫌気性超好熱菌 *Pyrobaculum isladicum* に膜結合性の D-プロリン脱水素酵素 (D-PDH) を発見し、膜結合性のアミノ酸脱水素酵素として、大腸菌での大量生産に初めて成功した。これらの新規 PDH を素子とする L-Pro や D-Pro 測定用電極型バイオセンサー、病原性レジオネラ菌の DNA の簡便・迅速測定用新規酵素センサーの開発に成功した。さらに、PDH を陰極用素子とするプロリン燃料酵素電池の開発にも成功し、超好熱菌の高度耐熱性のフラビン含有アミノ酸脱水素酵素の応用において新局面を開拓した。参考文献：1) 大島敏久, 川上竜巳、櫻庭春彦 (2009) フラビン含有アミノ酸脱水素酵素の機能開発、アミノ酸研究 3、29-38.

遺伝子工学の基本は、異種生物の遺伝子を宿主によって発現させることである。異種遺伝子高発現で有用タンパク質を無尽蔵に取得できるようになり、画期的な技術となった。バイオテクノロジーが華々しく展開した時代から、現在でも、遺伝子の高発現のためには目的遺伝子のプロモータを宿主の高発現プロモータに付け替えて高発現を達成しようと計画する。基本的な考え方は目新しくない。しかし、やってみると高発現できない遺伝子にしばしば遭遇する。これほど研究が進んでいるのに、この理由はいまだ答えられていないと思う。さらには、遺伝子発現の基本であるプロモータ、ORF、コドン、ターミネータや翻訳、翻訳後修飾、分泌経路など、改めて検証していくとわかっていないことが多い。本講演では、遺伝子工学的に有用酵素を高発現するための我々のアプローチを紹介する。

カビの α -アミラーゼ TAA を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で高発現させると大変うまくいく。しかし、枯草菌の α -アミラーゼ AmyL を発現させようとするとうまくいかない。この原因を解明するため、我々はゲノムワイド解析を行った。酵母では全遺伝子が破壊された株のセットが入手できる。非必須遺伝子破壊株は 4800 株ある。AmyL 遺伝子をこの 4800 株に導入し、発現量が増強した破壊株を探してみた。いくつかの遺伝子破壊株が取得できたのであるが、おもしろいことに糖鎖付加関連遺伝子が多い。破壊株での発現タンパクを調べてみると糖鎖の付加に異常が起こっていた。よく考えると枯草菌では糖鎖が付加されていないはずである。酵母では枯草菌 α -アミラーゼに不用な糖鎖が付加されてしまい、酵素活性の低減、または、酵素の不安定化が起こっていたのである。糖鎖付加配列をはずしてしまうと高発現できるようになった。

次に、プロモータを調べてみた。教科書にも載っているガラクトース誘導性プロモータ GAL10p はその構造がよくわかっていると思われる。しかし、本当に必要な配列はどこにあるかを尋ねたら、たぶん、エンハンサーと TATA box ぐらいを答えるではないだろうか。精密なディレーション解析で、GAL10p の最少必須領域を決定した。おもしろいことに、TATA 周辺、開始コドン周辺、TATA から開始コドンまでの距離など、未知要素が見いだされてきた。プロモータのことはまだまだわかっていないのではないかと感じる。

宿主の違いはどうなのかという問に関して、我々は新しい酵母 *Kluyveromyces marxianus* で答えようとしている。バイオエタノール酵母として研究していたが、この酵母の遺伝子発現が興味深い。*S. cerevisiae* のプロモータが *K. marxianus* で *S. cerevisiae* 以上に発現する。反対に、*S. cerevisiae* 宿主に *K. marxianus* プロモータを入れるとこれも高い発現を示す。*K. marxianus* のプロモータを *K. marxianus* で発現させると異常に高い。いや、それとも *S. cerevisiae* が異常に低い？

遺伝子工学的酵素高発現は、まだまだわかっていないことだらけである。すべてを暴き出して、どんな遺伝子でも最高の発現ができるしくみを作り出すつもりである。

ポリ- γ -グルタミン酸の生合成、生分解、並びに新用途開発
S-03 芦内 誠（高知大学大学院総合人間自然科学研究科）

納豆の糸の正体は御存じだろうか？その主たる成分が今回話題として取り上げるポリ- γ -グルタミン酸である。基本的にアミノ酸のグルタミン酸を唯一の構成単位とするため、広くポリペプチドに属するとされている。しかしながら、一万分子を超えるグルタミン酸が連なっていること、L 体ばかりか、D-グルタミン酸も構成単位になっていること、結合様式が一般的なポリペプチドやタンパク質ではなく、むしろ人工のナイロンと同質であること等、いわゆるポリペプチドの範疇に収まらないバイオポリマーであることが分かってきた。その合成メカニズムの解明は、今もなお、生化学の大きな興味の対象となっている。また、昨今の環境問題への関心の高まりを受け、今日の化成材料に代わるサステナブルなバイオベース材料の開発が激化している。なかでも、ポリ- γ -グルタミン酸はナイロンやアラミド等を代替しうるポリアミド系バイオ新素材の有力候補として注目されている。ただし、環境中、少なくとも生化学的に分解されることを明確にする必要がある。加えて、バイオベース材料に全般的な弱点とされる難成形性の問題をいかに克服するかについても大きな課題となっている。ここでは、最近の微生物工学的な知見を織りまぜながら、ポリ- γ -グルタミン酸の生合成及び分解に係る最新情報について詳解する。さらに、ポリ- γ -グルタミン酸のバイオプラスチック・繊維化技術と期待される新たな用途展開を中心に、ポリアミドベース新素材の産業化に係る最近の動向についても簡単に紹介する。

(1) ポリ- γ -グルタミン酸の生合成

ポリ- γ -グルタミン酸は、ポリ- ϵ -リジンやシアノファイシンとともに、リボソーム非依存的に合成されるバイオポリマーである。最近、4 つの構造遺伝子 (*pgsBCAE*) を含むオペロンが同定され、*pgsE* 遺伝子を除く各遺伝子の機能解析も進展した。*pgsE* 遺伝子はわずか 55 アミノ酸残基でなる小型タンパク質をコードしている。ごく最近、亜鉛存在下でポリ- γ -グルタミン酸の合成能を著しく高めるエンハンサー様の機能を発揮することが分かってきた。他の Pgs 成分とあわせ、PgsE 成分の新機能について詳解する。

(2) ポリ- γ -グルタミン酸の生分解

ポリ- γ -グルタミン酸を基礎に新素材を開発する場合、どのような生化学反応によって分解されるかを捉えておく必要がある。先に、ポリ- γ -グルタミン酸の生合成に係る *pgs* オペロンのすぐ下流にその分解に係る *pgdS* 遺伝子を見いだした。推定反応機構とともに、「ポリ- γ -グルタミン酸の光学純度を改善するための新加工法」への応用例も紹介する。

(3) ポリ- γ -グルタミン酸の用途開発

納豆にも含まれているポリ- γ -グルタミン酸には高い安全性が見込まれている。カルシウムの吸収促進等、食や健康に関わる産業との関わりが深い。高吸水ゲルや水質浄化剤等、環境応用も本格化しはじめた。他方、バイオポリアミドの構造特性を活かした素材開発が進展している。ここでは、ポリ- γ -グルタミン酸の産業材料化の現状と展望に触れる。

S-04 真核細胞型 D-セリンデヒドラターゼ：酵素学的特性と D-セリン酵素定量法への応用

吉村 徹（名古屋大学大学院生命農学研究科）

我々は *Saccharomyces cerevisiae* の機能未知遺伝子、*ygl196w* がピリドキサルリン酸 (PLP) に依存して D-Ser をピルビン酸とアンモニアへ分解する、D-セリンデヒドラターゼ(DsdSC) をコードすることを見出した。真核生物では初めての D-セリンデヒドラターゼである DsdSC は、やはり PLP 酵素である既報のバクテリア型酵素とは相同性をもたず、両酵素は収斂的に進化したと考えられる。DsdSC のホモログは一部の細菌から酵母、魚類、爬虫類、鳥類などの脊椎動物にまで分布するが、哺乳動物には存在しない。

さて、D-Ser は哺乳動物脳内で、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターのコアゴニストとして、記憶や学習などの脳の高次機能に重要な役割を果たしている。統合失調症やアルツハイマー病患者の脊髄液や血中では D-Ser 量や D-Ser の全 Ser に対する量比の有意な低下が報告される一方、過剰の D-Ser が NMDA レセプターの異常亢進を介して運動神経細胞死をもたらし、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を起こす可能性が指摘されている。このように体内の D-Ser 量の制御は哺乳動物にとっては重要な意味をもつ。鳥類では主要な D-Ser 分解系である D-セリンデヒドラターゼを持たない哺乳動物では、D-アミノ酸オキシダーゼがその役を担っているものと考えられている。

ところで、上記のように D-Ser 量の変動と疾病との関連が明らかになるにつれ、D-Ser の動態解析の重要性が認識されるようになった。現在、D-Ser を含む D-アミノ酸の分析のほとんどは、D-,L-アミノ酸を光学活性試薬によりジアステレオマーとし、非光学活性のカラムにより分離する HPLC 法によって行われている。この方法は微量アミノ酸の同時分析が可能である一方、分析時間が長く、分離条件の設定などに熟練を要する。そこで我々は DsdSC の高い基質特異性を利用した D-Ser の酵素定量法を構築した。例えば DsdSC によって D-Ser から生成したピルビン酸を、乳酸脱水素酵素共役下で NADH の減少量から定量する方法は、約 10 mM 程度の D-Ser の測定が可能であり、他の D-, L-アミノ酸や 40%程度までの血清成分が夾雑しても影響を受けない。同じく生成したピルビン酸をピルビン酸オキシダーゼと反応させ、生じた H₂O₂ をペルオキシダーゼと Amplex® Red により蛍光的に検出する方法では、1 mM までの D-Ser を定量可能である。なおこれらの方法は、遺伝子工学的にセリンに対する触媒能を上昇させた *Geobacillus stearothermophilus* 由来の変異型アラニンラセマーゼを共役させることで、D-, L-Ser の同時定量にも適用できる。我々は DsdSC を用いた酵素法により、ヒト尿中やウシ血清中の D-および D-, L-Ser 定量に成功しており、本法がまだ未知の部分が多い D-Ser 動態の解明に寄与できるものと期待している。なお、本研究は生研センターイノベーション創出事業「D-アミノ酸に着目した新規機能性食品の開発」の一環として行われている。

[参考文献] Ito T., et al. (2008) *Biochem. J.*, **409**, 399-406、Ito T., et al. (2007) *Anal. Biochem.*, **371**, 167-172、Naka T., et al (2010) *J. Mol. Cat. B in press*

一 般 講 演

講 演 要 旨

食品タンパク質・ペプチドによるオリーブ葉エキスの苦味低減化

A-01 ○小川雅廣¹、早川茂¹、藤田夕佳¹、柴崎博行²、松井幸一³、植松勝太郎³
(¹香川大農・応生科、²香川県・産技セ、³㈱ヤマヒサ)

【目的】オリーブ葉にはオレウロペインをはじめとするポリフェノール化合物（PPC）が高濃度で含まれている。オリーブ葉の PPC には高い抗酸化性などの機能があることから、PPC を多量に含むオリーブ葉エキス（OET）が国内外で市販されている。しかし、OET には PPC に起因する強い苦みがある。本研究では、OET の苦みを食品タンパク質由来ペプチドによって抑制できるか検討した。

【方法・結果】オリーブ葉を 25～40℃で 24 時間乾燥後、粉碎機でオリーブ葉粉末を作製した。5 g の葉粉末 に、30mg/mL の食品タンパク質（コラーゲン、ホエイ、大豆）由来ペプチド水溶液、市販のゴマペプチド入りウーロン茶、および純水（コントロール）をそれぞれ 100mL 加え攪拌しエキス抽出を行った。ろ過後のろ液を加熱殺菌したものを OET とした。OET の官能検査を行ったところ、4 種のペプチドを添加したエキスはいずれもコントロールのエキスより苦味が少なかった。なかでも、コラーゲンペプチドとホエイペプチドの苦味低減化効果が大きかった。オリーブ葉の PPC とタンパク質・ペプチドの結合数を調べたところ、1 分子のタンパク質・ペプチドには 1 ～18 分子の PPC が結合していることがわかった。

オリーブポメスに含まれる抗アレルギー活性成分の探索

A-02 ○佐藤彰彦、田村啓敏（香川大院・農）

【目的】I 型アレルギーは、体内の肥満細胞または好塩基球に抗体が感作し、そこに抗原が結合することで細胞中から生理活性物質が放出（脱顆粒）し、それらの生理活性物質によってアレルギー症状が現れる。また、オリーブにはヒドロキシチロソールなどの様々な機能性成分が含まれていることが数々の研究で明らかにされている。本研究では、オリーブのさらなる機能性として抗アレルギー活性について評価することを目的とした。

【方法・結果】本研究ではオリーブ果実中成分の抗アレルギー活性について、ラット由来肥満細胞 RBL-2H3 を用いた脱顆粒抑制活性試験によって評価した。その結果、オリーブ果実からオリーブオイルを搾り出した後の搾りかす（ポメス）のメタノール抽出液乾固物中に脱顆粒抑制活性を示す成分があることが分かった。次に、そのメタノール抽出液乾固物についてカラム分離を行い、分離した各フラクションについて脱顆粒抑制活性試験、HPLC 分析を行った。その結果、オリーブポメス中に含有されているヒドロキシチロソール、ルテオリン、バーバスコサイドが脱顆粒抑制活性に関与しているかもしれないということが分かった。また、ポメス中に含まれている未知成分も活性に関与しているかもしれないことが示唆された。

Anti-tumour promoting activity of chemical components from ginger

A-03

○Trisonthi Piyapat, Tamura Hirotooshi
(Faculty of Agriculture, Kagawa University)

【目的】 The objective of this study is to determine anti-tumor promoting activity of chemical components composed in ginger extract obtained by supercritical fluid extraction. Deformation of Raji cells induced by the presence of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) (40 ng/mL) and *n*-butyrate (10 μ M) is decided to be an indicator of tumor promoting activity. The result from this experiment may be able to suggest about potential of ginger, which is the widely used spice around the world, in tumor protection property.

【方法・結果】 Purification of ginger crude extract, obtained by supercritical fluid extraction, was done by column chromatography and preparative thin-layer chromatography. It was found that ginger extract fraction 5 possessed the most potent activity and after further purification, it was found that sub-fraction 5-3 had shown the best activity. Gingerol homologues, shogaol homologues, zingerone and dehydrozingerone were also determined the activity and it was found that shogaol homologues, especially 6-shogaol, intensively inhibited the deformation of Raji cells. Identification of the most effective ginger extract sub-fraction was done using mass spectrometry and it was found that the active chemical might be the mixture of *cis*-6-shogaol and *trans*-6-shogaol.

Modulating effects of food antioxidants on phloxine B-induced photocytotoxicity

A-04

○Hang Qi, Hiroshi Takano, Qian Wu, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama University)

We have previously demonstrated that phloxine B (PhB), an artificial food colorant, induced photocytotoxicity dependently on extracellular hydrogen peroxide production in human acute promyelotic leukemia HL-60 cells. In this study, to identify potential modifiers of PhB-induced photochemical reactions, we examined the effects of food antioxidants on PhB-induced photocytotoxicity. Higher concentrations of L-cysteine (1 mM), α -tocopherol and L-histidine significantly inhibited PhB-induced photocytotoxicity, DNA fragmentation and caspase-3 activation, whereas lower concentrations of L-cysteine (0.1 mM), ascorbic acid and L-methionine potentiated each apoptosis-related event in HL-60 cells. Consistently, 0.1 mM L-cysteine synergistically enhanced PhB-induced hydrogen peroxide production, while it was completely inhibited by the higher concentration (1 mM). These results suggested that free radical scavengers probably enhanced a Type-I radical-dependent reaction resulting in the enhanced formation of hydrogen peroxide. In summary, certain food chemicals could regulate PhB-induced oxidative events both negatively and positively in a concentration-dependent manner.

A-05 A marked suppression in colon tumorigenesis by dietary vitamin B6 can be explained by higher susceptibility of intestinal PLP level to dietary vitamin B6
○Sofya Suidasari, Kabo Masisi, Noriyuki Yanaka, Norihisa Kato (Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

We have reported the marked suppression in colon tumorigenesis by dietary vitamin B6 (B6) in azoxymethane-treated mice. Our results have been supported by a number of epidemiological studies. However, the results of the relationship between B6 status and the development of cancer in other organs including mammary gland, prostate, etc. were not consistent. Thus, the anti-tumor effect of dietary B6 appears to be specific in the colon. This study was conducted to examine the responses of the B6 (PLP) level in several tissues to dietary level of B6 (0 ~ 35 mg pyridoxine HCl/kg). Among the tissues examined, the elevation in PLP levels of small intestine, colon, lung, spleen and stomach to supplemental B6 appeared to be remarkable. The intermediately susceptible tissues to supplemental B6 were brain, kidney and liver. The PLP levels in heart and muscle were unaffected. In general, the PLP level in intestine appeared to be highly susceptible to the wide range of dietary level of B6, implying that the marked anti-colon tumor effect of dietary B6 is in part ascribed to higher sensitivity of colon B6 status to dietary B6.

A-06 カクテルイムノアフィニティーカラム-HPLC 法を用いた牛乳及び鶏卵中のアフラトキシン類同時分析法の検討
○川村 理, 木山 生 (香川大農・応生科)

【目的】アフラトキシン(AF)は、*A. flavus* などが産生する強発がん性のマイコトキシンで、AFB₁汚染飼料を摂取すると、体内でAFM₁に変換されて乳中や鶏卵に移行する。また、2009年にHarzallaは、ヨルダンの牛乳や鶏卵からAFM₁の10倍のAFB₁が検出されたと報告した。日本でもそのようなことがあれば、食品衛生学上大きな問題となる。そこで、牛乳と鶏卵中のAF類の汚染を明らかにするため、AF類の同時分析を目的とした、カクテルイムノアフィニティーカラム(IAC)-HPLC法を確立し、国内市販品の汚染調査を行った。

【方法・結果】まず、AFM₁に特異的な抗体AM.3抗体結合ゲルとAFB₁、B₂、G₁とG₂と反応するAF.2抗体結合ゲルを混合してカクテルIACを作製し、牛乳と鶏卵中のこれらの5種のAFsの同時分析条件を検討した。次に、確立した方法で、国内市販の牛乳131検体の汚染調査結果を行った。その結果、すべての検体からAFM₁は検出(平均濃度; 8.1±4.5 ppt, 最大25 ppt)されたが、AFB₁、B₂、G₁およびG₂はまったく検出されなかった。また、国内市販鶏卵42検体からは、5種のAFsはいずれも検出されなかった。これらの結果は、Harzallah (2009)の報告と異なるものであった。この理由は明確ではないが、少なくとも国内市販の牛乳中や鶏卵のAFB₁汚染はほとんどないと考えられた。

エビアレルゲンの抗原構造は多糖修飾ではマスクされない

A-07

○臼井将勝、田中真澄、西村美祝、花岡研一（水大校・食品科学）

【目的】 本研究ではアレルゲン蛋白質の抗原性がメイラード型多糖修飾法により低減化できることを明らかにしてきた。しかし、この多糖修飾法は、折りたたみ構造を持つ球状蛋白質において効果が示されているが、複雑な構造を持たない線状蛋白質においては、有効性が示されていない。そこで本研究では、エビの主要アレルゲンであるトロポミオシン（TM）をモデルとして、線状蛋白質の抗原性低減化に対する多糖修飾法の有効性について検討した。

【方法・結果】 TM は、破碎したクルマエビ可食部に 0.6 M KCl-10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて加熱抽出し、硫酸分画およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。円二色性分散計による二次構造解析では、精製された TM の立体構造は α -ヘリックス構造に酷似していることが示唆された。TM とガラクトマンナンを重量比で 1:8 となるように混合し、メイラード型多糖修飾を行った結果、SDS-PAGE にて多糖修飾による高分子化が確認された。しかし、マウス血清中の抗 TM IgE 抗体を用いた拮抗 ELISA では、多糖修飾による有意な抗原性の低減化は見られなかった。この結果より、線状蛋白質では、多糖による分子表面マスキング効率が球状蛋白質に比べて大幅に低下することが示唆された。

ミヤコグサに発現するプロテインキナーゼ PKL01 の酵素学的性質

A-08

○片山将一、末吉紀行、野村美加、田島茂行、亀下勇（香川大農・応生科）

【目的】 プロテインキナーゼ(PK)は細胞内シグナル伝達に関与する重要な酵素である。我々は、ミヤコグサ根粒 cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニングにより 15 種類の新規プロテインキナーゼを取得した。今回は、このうち PKL01 と命名した PK に焦点を絞って、大腸菌で発現させた組換え PKL01 の酵素学的性質を調べることにした。

【方法・結果】

PKL01 は、そのアミノ酸配列の特徴から Ndr キナーゼのミヤコグサホモログと考えられた。そこで、大腸菌で発現させた各種アミノ酸変異酵素を取得し、リン酸化活性や活性制御機構等の酵素学的性質を比較検討した。PKL01 は、自己リン酸化とともに、MBP やヒストンを良好な基質としてリン酸化した。また PKL01 の主要な自己リン酸化部位は Ser-317 であり、その部位のリン酸化が活性制御に重要な意味を持つことが明らかになった。

また、ノーザンブロット解析により、PKL01 は、ミヤコグサの葉、茎、根、根粒の各部位に広く分布することが示された。そこで、それぞれの組織から調製した抽出液をマイクロロトフォアで等電点分離し、各画分に含まれるタンパク質を PKL01 でリン酸化したところ、特に強い塩基性の内在性タンパク質を好んでリン酸化する PK であることが判明した。

A-09 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来 Cytochrome *c'* のアミノ酸配列と相同性
○井上寛基、若井暁、三本木至宏 (広大院・生物圏)

【背景・目的】 ヘムタンパク質は細菌から高等植物、動物まで普遍的に存在し、さまざまな生理機能に関わっている。今回、好熱性細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* から新たに未知ヘムタンパク質を発見した。そのアミノ酸配列から機能を推定するために、他種由来の相同タンパク質と比較した。

【結果・考察】 本菌のペリプラズム画分からヘムタンパク質を粗精製し、SDS-PAGE 後、未知ヘムタンパク質の N 末端アミノ酸 30 残基を決定した。N 末端配列とヘム結合領域の配列を利用して Inverse PCR を行い、タンパク質全長のアミノ酸配列を推定した。配列情報から、未知ヘムタンパク質は Cytochrome *c'* と判明した。本菌は β -プロテオバクテリアに分類されるが、相同タンパク質との比較では、 β -プロテオバクテリアよりも γ -プロテオバクテリアである *Azotobacter vinelandii* などの Cytochrome *c'* に高い相同性 (56-59%) を示した。これら Cytochrome *c'* はヘムを介して NO や CO 結合するため、バイオセンサーとして利用できる可能性がある。本タンパク質は好熱性細菌から発見された Cytochrome *c'* であることから、耐熱性という付加価値を期待できる。

A-10 Molecular characterization and molecular modeling of plant α -mannosidase
OMd.Anowar. Hossain¹, Ryohei Nakano¹, Kosuke Nakamura^{1,2}, and
Yoshinobu Kimura¹ (¹Grad. Sch. of Nat. Sci. Tech., Okayama Univ.,
²Kagome Co.)

It has been reported that the amount of free *N*-glycans and the glycoenzyme levels increase during fruit ripening, indicating that turnover of *N*-glycoprotein are deeply associated with the fruit ripening or softening. As a part of study to elucidate the physiological significance of *N*-glycan-turnover during fruit ripening, we have characterized an acidic α -mannosidase (α -Man'ase) from tomato fruits at molecular levels, and analyzed the 3D protein structure.

Based on the amino acid sequences of native tomato α -Man'ase, we cloned and expressed a cDNA from tomato fruits in *Pichia pastoris* and identified the α -Man'ase activity in the cell lysate. The α -Man'ase gene is a 10 kb spanned containing 30 exons and located at chromosome 6. The gene-encoded-protein is single polypeptide chain of 1028 amino acids containing the glycosyl hydrolase superfamily domain 38 with predicted molecular mass of 116 kDa. A molecular 3-D model shows that the catalytic domain and the putative catalytic amino acids have been conserved between acid plant enzyme and animal lysosomal α -Man'ase, indicating that catalytic mechanism of plant acidic α -Man'ase must be the same as that of animal one. (1) Md. A. Hossain *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 140 (2009). (2) Md. A. Hossain *et al. J. Biochem.*, in press (2010)

Bacillus sp.由来 α -L-Rhamnosidase の希少糖に対する作用に関する研究

A-11

○河原愛子¹、宮西伸光²、田中直孝¹、泉 実³、竹川 薫⁵

(¹香川大・農・応用生物、²東洋大・生命科学・食環境科学、
³岡山大・院・自然科学研究科、⁴九州大・院・農)

【目的】本研究では、希少糖を含有する新しいオリゴ糖、糖鎖、化合物を酵素合成し、希少糖含有化合物の新しい生理活性を見出すために、希少糖含有化合物に作用する新しいグリコシダーゼを検索することを目的とした。そこで、希少糖である L-Mannose (L-Man) にパラニトロフェニル基(pNP)を結合させて pNP- α -L-Man を化学合成し、L-Man を遊離する α -L-Mannosidase 活性が自然界に存在するか検索を行った。

【方法・結果】土壌微生物培養液や市販の酵素を調べた結果、*Bacillus* sp. 由来の α -L-Rhamnosidase が pNP- α -L-Man を分解することを見いだした。*Bacillus* sp. 由来の本酵素はバクテリアが生産する多糖であるジェランや植物配糖体から L-Rhamnose (L-Rha) を遊離する加水分解酵素である。本酵素の pNP- α -L-Man に対する分解速度は pNP- α -L-Rha と比較して非常に遅かった。L-Man の 6 位のデオキシ体が L-Rha であり、本研究で本酵素が α -L-Mannosidase 活性を示すことを初めて明らかにした。本酵素は X 線結晶構造解析が行われていることから、ランダム変異による機能改変をおこない、 α -L-Mannosidase 活性上昇変異体の簡便かつ高効率なスクリーニング系の構築を目指す。

ランダム変異導入による *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の改変

A-12

○松井祐士、山川 匠、村松久司、永田信治（高知大・農）

【目的】*Pseudomonas putida* 由来の *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素 (DpkA) は、医薬品の合成中間体として有用な *N*-アルキル-L-アミノ酸の不斉合成に利用できる。本酵素を用いて *N*-メチル-L-フェニルアラニンを高い光学純度で合成する方法がすでに報告されているが、合成反応を始めて約半日で DpkA がほぼ失活することが問題になっている。そこで本研究では、ランダム変異導入による DpkA の耐熱性の向上を目的として実験を行った。

【方法・結果】pET21a(+)に DpkA をコードする *pp3591* を連結して pDpkA を作製した。次に pDpkA を鋳型としてエラープローン PCR を行い、*pp3591* にランダム変異を導入した。得られた PCR 産物を連結した pUC18 を用いて *Escherichia coli* JM109 を形質転換し、1mM IPTG と 0.1mg/ml のアンピシリンを含む LB 培地で培養して粗酵素を調製した。耐熱性が向上した酵素を選抜するために、粗酵素液を 40、45、50℃で各々 30 分間処理し、その残存活性を野生型酵素と比較した。得られた 734 種の変異型酵素から、耐熱性が向上した耐熱型酵素を 1 種類選択した。その酵素遺伝子の塩基配列を解析した結果、Q302R の変異が導入されたことがわかった。耐熱型酵素のホモロジーモデリングによって、新たに形成された R302 と E176 の側鎖の相互作用が、耐熱性の向上に寄与していることが示唆された。

A-13

ヒト由来セレノシステイン β リアーゼの遺伝子クローニングと発現、機能解析

○佐藤久美, 田村隆, 稲垣賢二 (岡山大院・自然科学)

【目的】セレンは、抗酸化作用、免疫賦活作用、ホルモン代謝調節作用など多彩な生理活性を示す微量必須元素である。セレノシステイン β リアーゼ (SCL) はセレノシステインをセレンとアラニンに分解する酵素で、セレノシステインのリサイクル経路で機能することが知られている。哺乳類ではマウス、ブタの SCL の活性を確認した報告があるが、未だヒト由来の SCL では確認されていない。本研究ではヒト由来 SCL に着目し、クローニング、発現、活性の確認を目的として実験を行う。

【方法・結果】ヒト SCL 様タンパク質として PDB 登録 (3GZD 3GZC) されていた NCBI-Gene51540 の配列をもとにプライマーを設計し、ヒト肺由来 cDNA から PCR で増幅して、発現プラスミドを構築した。His タグ付きのタンパク質として Mag Extractor (TOYOBO) で精製を行った。基質として 10 mM L-Sec と L-Cys を用い、Ar 気流下で反応を行い、生成物であるアラニンを TLC で確認した。その結果 L-Sec を基質とした方はアラニンの生成を確認できたが、L-Cys は基質とならなかった。このことから、今回クローニングしたヒト肺由来 SCL は、セレノシステイン β リアーゼとしての活性を確認し、また L-Sec 特異的に反応することが明らかになった。

L-グルタミン酸酸化酵素の基質特異性の改変

A-14

○内海友宏¹, 田村 隆¹, 日下部 均², 稲垣賢二¹

(¹岡山大院・自然科学, ²(株)エンザイムセンサ)

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼは L-グルタミン酸(L-Glu)の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)の一種である。本酵素は L-Glu に対する基質特異性が非常に厳格なため、微量定量や酵素センサーに活用されている。最近我々は本酵素の X 線結晶構造を明らかにし、本酵素と蛇毒由来 LAO を比較して基質認識機構を予測した。その結果、本酵素特有のアミノ酸残基の配置を推測できたため、変異酵素の作製により基質認識機構の解析や基質特異性の改変を目指した。 【方法・結果】変異酵素の精製は、発現ベクター pGOx-mal1 を有する *E. coli* JM109 の無細胞抽出液を硫酸分画した後、アミロースカラム・ゲルろ過により精製した。活性測定は、酵素反応産物である α -ケトグルタル酸、 H_2O_2 の定量、または消費された酸素量から測定した。基質認識機構の予測結果から、他の LAO の活性部位と比べ本酵素は反応ポケットが L-Glu がはまり込む適度な大きさであることや、本酵素特有の塩基性アミノ酸が配置されていることが確認できた。これを元に作製した変異酵素は、いずれの酵素も L-Glu に対する活性が大幅に低下しており、重要残基であることが明らかとなった。興味深いことに R305X 変異酵素は塩基性アミノ酸である L-ヒスチジンを酸化的に分解しており、基質特異性の変化が確認できた。

A-15 *Anabaena* 由来 DyP 型ペルオキシダーゼの触媒作用 Trp 残基とメディエータ反応機構

○上池貴晃, Henry J. O. Ogola, 石川孝博, 澤嘉弘 (島根大・生命工)

【目的】我々は、ラン藻 *Anabaena* sp. PCC7120 より色素脱色型ペルオキシダーゼ(AnaPX)を見だし、酵素学的性質および表面に位置している Trp がラジカル化し脱色触媒作用をおこなう長距離電子移動 (LRET) 経路の存在を報告してきた。今回は、AnaPX のメディエータ反応機構と触媒作用 Trp 残基について解析を行ったので報告する。

【方法・結果】AnaPX は、大腸菌で発現後、各種クロマトグラフィーにより、均一までに精製した。AnaPX は、極低温 EPR スペクトル、常温 ESR スペクトル解析により、Trp ラジカルが発生していることが認められた。DyP とのホモロジーモデリングで作製した AnaPX の三次元構造解析より、AnaPX に含まれる 7 種の Trp を Phe に置換した変異酵素(W62F, W141F, W229F, W405F, W431F, W435F, W448F)を作製した。単変異酵素中で著しく活性の減少が確認された W229F、W405F 変異体および W229F/W405F 二重変異体について、NBS による Trp 修飾実験、ESR スペクトル解析を行った。また、天然メディエータとして知られている Syringaldehyde を用いて Rapid-scan Stopped flow 法によるメディエータ反応機構の解析を行った。

A-16 微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解(第 9 報)：ホモコリン分解酵素系の検討

イサム アリ¹, 塚本悦子², 一柳 剛²,
有馬二郎², 〇森 信寛² (¹鳥取大連農、²鳥取大農・生資環)

【目的】我々はこれまでに偶数個の炭素鎖を持つ第 4 級アンモニウム化合物〔コリン、トリメチルアミノブタノール (TMAB)〕の微生物分解について研究を行ってきたが、第 7 報では奇数個の炭素鎖を持つホモコリン (トリメチルアミノプロパノール; TMAP) 分解菌を分離し、その分解経路は TMAP→TMAP-aldehyde→β-アラニンベタイン (AB)→トリメチルアミン (TMA) であることを明らかにした。本研究では TMAP の分解酵素系を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ホモコリン分解菌 *Pseudomonas* sp. A9 の風乾菌体を用いてホモコリン分解を検討した。NAD 存在下で急激なホモコリン減少と AB 及び TMA の増加が見られ、NAD 依存性ホモコリン脱水素酵素及び NAD 依存性 TMAP-aldehyde 脱水素酵素の存在が示唆された。無細胞抽出液を用いてホモコリン脱水素酵素の特異性を調べた。ホモコリン以外に TMAB、ジメチルアミノブタノール、ジメチルアミノプロパノール、1-ブタノール、4-アミノ-1-ブタノールも酸化された。本酵素活性はホモコリンを培養基質としたときのみ生成し、コリンや TMAB では誘導されなかった。

FEMS Microbiological Letter, Vol. 296:219-225 (2009)

A-17 好熱菌 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ATCC43494 株由来コージビオース
ホスホリラーゼの大腸菌での発現および精製と諸性質 ○佐藤千晶¹, 伊澤
精祐¹, 山本拓生¹, 阿賀創², 西本友之¹, 福田恵温¹(¹林原生化研, ²林原)

【目的】 *Thermoanaerobacter brockii* ATCC 35047 株由来のコージビオースホスホリラーゼ (Tb-KP) は、Glc と β -G1P からコージビオースのみならず、重合度が 3 以上のコージオリゴ糖を生成する。また、逆反応としてコージオリゴ糖の加リン酸分解を行うことが知られている。しかし微生物起源の異なる KP 活性およびその性質に関する知見は少ない。そこで、Tb-KP とは性質の異なる KP を取得することを目的に、アミノ酸レベルで 55% の相同性を有する *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ATCC43494 株由来 KP (Cs-KP) の遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として得られた発現タンパク質の酵素的諸性質を調べた。

【方法・結果】 組換え酵素 Cs-KP を精製し、本酵素の諸性質を調べた結果、Tb-KP と比較して以下の点で異なっていた。①ゲル濾過分析において、Tb-KP が 500 kDa からなる 6 量体構造をとるのに対し、本酵素は 170 kDa からなる 2 量体であった。②加リン酸分解反応において、20℃ 高い 85℃ 以下で安定な酵素であった。③加リン酸分解活性において最良の基質であるコージビオースと比較し、コージトリオースやコージテトラオースに対する相対活性が高かった。④200 mM の β -G1P を供与体に、12.5~200 mM の Glc を受容体として本酵素を作用させると、若干鎖長の長いコージオリゴ糖が合成された。

土壌から単離した *Penicillium* sp. が生産する新規糖アルコール酸化酵素
A-18 ○徳野友香¹, 仲西一未¹, 渡邊彰¹, 森本兼司², 何森健², 麻田恭彦¹
(¹香川大・農・応用生物科学, ²香川大・希少糖研セ)

【目的】 我々は土壌から糖アルコール酸化酵素を生産する *Penicillium* sp. を単離した。本研究では、本酵素の生産条件ならびに諸性質について検討することを目的とした。

【方法・結果】 本酵素活性の測定は、D-マンニトールを基質として反応を行い、生成する過酸化水素をペルオキシダーゼ法により定量することによって行った。単離した *Penicillium* sp. は、小麦フスマ培地を用いた固体培養を行うと培地中に糖アルコール酸化酵素を分泌生産することが明らかとなった。また、小麦フスマ熱水抽出液などを用いた液体培養では本酵素の分泌生産は全く認められなかったことより、本酵素は固体培養において特異的に生産されることが示唆された。小麦フスマ培地抽出液より本酵素の部分精製標品 (収率 0.4%、精製倍率 11.6 倍) を得た。本酵素は分子量約 113kDa のモノマー酵素であることが示唆された。また、本酵素は各種糖アルコールに対して幅広い基質特異性を示し、最も良好な基質は D-アラビトール(100)であり、次いでエリスリトール(81)、D-マンニトール(79)、D-ソルビトール(37)の順に高い活性を示した。アルドースやケトースに対しては全く活性は認められなかった。また、基質として D-ソルビトールを用いた本酵素反応においては、希少糖であるグルコースが生成することが明らかとなった。

異性化酵素を用いた 6-デオキシ-L-アロース、6-デオキシ-L-アルトロースの生
A-19 産法の確立 ○松本麻里子^{1,2}, 吉原明秀², ラオディベンダー², 森本兼司²,
高田悟朗², 何森健³ (¹香川大農・応生科, ²香川大希少糖研セ, ³希少糖生産技研)

【目的】我々は、自然界に微量、もしくはほとんど存在しない希少糖の生産に関する研究を進めている。本研究では 6 位がメチル基になった全ての 6-デオキシ-ヘキソースの生産を目的として、各種異性化酵素を用いた L-ラムノース (6-デオキシ-L-マンノース) から 6-デオキシ-L-アロース、6-デオキシ-L-アルトロースの生産法の確立を目指した。

【方法・結果】キトパールに固定化した *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼと *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼを用いてバイオリアクターを構築し、L-ラムノースから異性化反応とエピ化反応により 6-デオキシ-L-プシコースを生産した。次に、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の L-リボースイソメラーゼ (L-RI) と *Enterobacter aerogenes* 由来の L-アラビノースイソメラーゼ (L-AI) をそれぞれキトパールに固定化し 6-デオキシ-L-プシコースを基質として、L-RI は 30℃、L-AI は 40℃でそれぞれ酵素反応を行った。HPLC 分析した結果、L-RI の反応では、基質濃度 1%において 96 時間で平衡に達し、基質の 62.5%が 6-デオキシ-L-アロースに転換された。L-AI の反応では、基質濃度 10%において 48 時間で平衡に達し、基質の 39.0%が 6-デオキシ-L-アルトロースに転換された。なお、両 6-デオキシアルドースの構造決定について、現在検討中である。

アスコルビン酸の 6 位水酸基を特異的に β -グルコシル化する *Aspergillus niger*
A-20 由来酵素 (第 2 報) —糖転移活性の詳細検討—

○早川有美, 仁戸田照彦, 神崎浩 (岡山大学院自然科学)

【目的】我々はアスコルビン酸 (AA) の 6 位水酸基のみを特異的に β -グルコシル化する酵素を *Aspergillus niger* 培養上清に見出した。このような位置選択性に注目し、本酵素の精製・諸性質検討を行った¹⁾。また 2 位と 6 位水酸基をグルコシル化することで知られている *Trichoderma* 由来酵素を含め、pNPG (*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) 分解活性を持つ他の酵素と比較を行うことで、本酵素の糖転移活性について詳細検討した。

【方法・結果】本酵素の pNPG 分解活性の至適 pH は 4.0 であるのに対し、糖転移活性の至適 pH は 2.0 付近であった。pNPG 分解活性をそろえ糖転移反応に供した結果、本酵素と *A. niger*、*A. oryzae* 由来の市販酵素剤は、高い糖転移活性と位置選択性を有していた。これらとは異なり、*Trichoderma* 由来酵素、アロマーゼ (*Penicillium multicolor*) は糖転移活性がそれらの約 15%、アーモンド由来酵素は約 0.5%であった。また、アロマーゼとアーモンド由来酵素は 6 位水酸基に特異的であり、*Trichoderma* 由来酵素は 6 位と同時に 2 位水酸基もグルコシル化した。このことから、高い糖転移活性を示し、かつ AA の 6 位水酸基に特異的であるという特徴は *Aspergillus* 属由来酵素に共通していることが示唆された。¹⁾ 早川・水津・仁戸田・神崎、日本農芸化学会中四国支部第 25 回講演会要旨集、p 141(2009)

色素依存性脱水素酵素の網羅的な機能検索

A-21

○里村武範¹、櫻庭春彦²、大島敏久³

(¹米子高専・物質工、²香川大農・応生科、³九大院・農・遺伝子資源工)

【目的】色素依存性脱水素酵素 (Dye-DH) は、各種生体成分から電子を取り出し、これを人工の酸化還元色素に渡す。この反応を利用すれば、人工色素をメディエーターとして、酵素反応と電極を直接結びつけることが可能となるため、物質の濃度を電気化学的信号として簡便に検出するバイオセンサー用素子や生体物質を起電力とするバイオ電池用素子として利用できる。しかしながら、従来から研究されてきた常温生物由来の酵素は総じて不安定であり、機能性素子としての応用例はほとんど無い。我々の研究グループでは超好熱菌から Dye-DH を見出し機能性素子として有用性が高いことを明らかにしてきた。しかしながら、現在までに超好熱菌由来 Dye-DH の報告例は少なく、応用利用へのボトルネックとなっている。そこで、本研究では新規反応を触媒する Dye-DH を見出すことを目的として研究を行った。

【方法・結果】ゲノム情報より Dye-DH 補酵素結合モチーフを持つ候補 ORF を抽出した。本 ORF を大腸菌により発現させ酵素活性を測定することにより基質の特定を行った。その結果、30 種の ORF より 4 種類の Dye-DH の機能同定に成功した。

超好熱菌由来 UDP-galactose 4-epimerase の性質と構造

A-22

○河合智之¹、米田一成²、大島敏久³、櫻庭春彦¹

(¹香川大・農、²東海大・農、³九大院・農)

UDP-galactose 4-epimerase (GalE) は、4 位のエピマーである UDP-glucose と UDP-galactose の相互変換を触媒する酵素で、ガラクトース代謝系に存在している。これまでに真核生物やバクテリア由来のガラクトース代謝系酵素については研究が進んでいるが、アーキアの関連酵素については報告が無い。超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* のゲノム情報を見ると、本菌には GalE のホモログ (ORF Pca1_0885) を初めとするガラクトース代謝系酵素の存在が推定されている。今回は、この Pca1_0885 遺伝子の *大腸菌* における発現系を構築し、熱処理 (80℃、10 分間) および各種クロマトグラフィーにより均一に精製した。得られた酵素は GalE 活性を示し、反応の最適 pH は 5.5、最適温度 80℃であった。また、90℃・10 分間の処理でも失活せず、幅広い領域の pH で高い安定性を示した。本酵素のサブユニット構造は、*大腸菌* GalE と同様ホモダイマーであった。また、本酵素の結晶化を行い、1.8 Å の分解能で X 線結晶構造解析に成功した。*大腸菌* GalE との比較により、耐熱性に関与する構造上の特徴について解析したので報告する。

超好熱菌由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の機能および構造解析

A-23

○原佑介¹、里村武範²、米田一成³、大島敏久⁴、櫻庭春彦¹

(¹香川大・農、²米子高専・物質工、³東海大・農、⁴九大院・農)

【目的】色素依存性脱水素酵素は、酵素機能電極用素子として医療、食品、環境用バイオセンサーなどへの応用が期待されている。しかし常温生物由来の酵素は安定性が低いため、高次構造や機能の解析はあまり進んでおらず、応用研究も遅れている。

これまでに我々は、安定性の高い酵素を生産する超好熱菌に着目し、数種の高度に安定な色素依存性脱水素酵素を見出している。今回、好気性超好熱アーキア *Aeropyrum pernix* において色素依存性 L-プロリン脱水素酵素をコードすると推定される遺伝子 Ape1267.1 を見出した。そこで、大腸菌を用いて本遺伝子を大量発現させ、産物の機能および構造解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】Ape1267.1 を pET15b ベクターへ挿入し、大腸菌 BL21(DE3)codon plus RIL を用いて大量発現を行った。発現産物は熱処理(80℃、10 分)とニッケルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより単一に精製することに成功した。本酵素は 80℃、10 分の熱処理で 94%の活性を保ち、高い熱安定性を有していた。

また、本酵素の立体構造を明らかにするため、酵素の結晶化を行った。その結果、良好な結晶を得ることに成功し、分解能 2.05 Å の回折データを得た。

セレン耐性 *Arabidopsis thaliana* 変異体の解析

B-01

○大野美佐緒¹, 裏地美杉¹, 中村宜督¹, 森泉², 村田芳行¹
(¹岡山大院自然, ²岡山大植物研)

【目的】セレン (Se) は、ヒトを含む動物にとって微量必須元素の 1 つである。しかし、その過剰摂取は中毒を引き起こす。その毒性のために環境中のセレン汚染が問題となっている。Se を除去する有効な方法の 1 つとして、Se 耐性植物を利用した Se 環境浄化が注目されている。この方法は環境に優しく、低コストで、広範囲にわたる Se 汚染土壌から Se を除去することが可能であると考えられている。さらに、植物は無機セレンを代謝して無毒なジメチルセレニド (Me_2Se) という気体に変換して放出することができる。本研究では Se 耐性シロイヌナズナ変異体における Se 耐性機構を解明し、更なる Se 耐性植物を作出することを目的にした。

【方法・結果】本研究では、硫酸輸送体 *SULTR1;2* ノックアウト変異体である *sultr1;2* とその野生株 *Ws* を用い、Se への耐性の評価、Se 蓄積能の評価、Se 代謝関連遺伝子の発現の調査を行った。その結果、*sultr1;2* は *Ws* よりも Se に対して耐性であることが示唆され、蓄積能において *sultr1;2* は *Ws* よりも有機 Se を蓄積する傾向が示された。遺伝子発現解析の結果より、 Me_2Se への代謝を触媒する酵素遺伝子の発現が高い傾向が見られた。

Roles of catalases in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells

B-02

ORayhanur Jannat¹, Misugi Uraji¹, Miho Morofuji¹, Mohammad Anowar Hossain¹, Mohammad Muzahidul Islam¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori², Yoshiyuki Murata¹ (¹Div. Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

Catalase (CAT) is one of major hydrogen peroxide (H_2O_2) scavengers that play an important role in controlling cellular H_2O_2 levels. Reactive oxygen species (ROS), especially H_2O_2 , is one of the important second messengers in abscisic acid (ABA) signaling in guard cells. We analyzed ABA-induced stomatal closure in *cat2*, *cat3-1* and *cat1 cat3* mutant plants. All mutations did not change stomatal aperture but reduced CAT activity and increased ascorbate peroxidase activity and accumulation of ROS and NO. ABA induced more stomatal closure in these mutants than in wild type along with ROS and NO production while ABA-induced cytosolic alkalization was similar in wild type and mutants. ABA-induced stomatal closure was more inhibited by pre-treatment with CAT (H_2O_2 scavenger) in wild type than in mutants, suggesting the involvement of endogenous H_2O_2 . In addition, ABA-induced stomatal closure was enhanced by pre-treatment with 3-aminotriazole (CAT inhibitor), indicating that CATs function during ABA-induced stomatal closure. Our results demonstrate that CATs are important to maintain endogenous H_2O_2 and transient change of ROS level in ABA signaling to lead stomatal closure.

Involvement of intracellular glutathione in methyl jasmonate signaling in
Arabidopsis guard cells

B-03 ONasima Akter¹, Muhammad Abdus Sobahan¹, Mohammad Anowar Hossain¹,
Misugi Uraji¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori², Yoshiyuki Murata¹
(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

Methyl jasmonate (MeJA) as well as abscisic acid (ABA) induce stomatal closure, which requires reactive oxygen species (ROS) production and elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in guard cells. Glutathione (GSH) regulates many bio-functions in plants, including stomatal movement. We investigated the effect of intracellular GSH on MeJA-induced stomatal closure using a GSH deficient mutant *chlorina1-1* (*ch1-1*) and on $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillation in Columbia plants expressing Yellow Cameleon 3.6. MeJA as well as ABA induced stomata closure accompanied with decreasing intracellular GSH. The *ch1-1* mutation decreased GSH in guard cells and narrowed stomatal aperture. MeJA induced ROS production in the mutants as well as wild-type plants and MeJA induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillations in wild-type guard cells regardless GSH monoethyl ester treatment to increase intracellular GSH. These results indicate that MeJA-induced stomatal closure is accompanied with decreasing GSH in guard cells and suggest that GSH modulates signal component(s) downstream of ROS production and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillation in MeJA signaling.

Involvement of peroxidases in chitosan-induced stomatal closure in

B-04 *Arabidopsis* OMd. Atiqur Rahman Khokon¹, Misugi Uraji¹,
Shintaro Munemasa¹, Eiji Okuma¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori²,
Yoshiyuki Murata¹ (¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

Chitosan is non-toxic and biodegradable compound from exoskeleton of crab, shrimp etc. It is known to stimulate plant growth and induces stomatal closure. Chitosan induced stomatal closure in wild type plants and *atrbohD atrbohF* mutants and induced reactive oxygen species (ROS) production in guard cells of wild type plants. The stomatal closure and ROS production were suppressed by catalase and peroxidase inhibitor (salicylhydroxamic acid: SHAM) but not by NADPH oxidase inhibitor (diphenylene iodonium chloride: DPI). Chitosan-elicited $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillations were inhibited by SHAM but not by *atrbohD atrbohF* mutation. These results indicate that chitosan induces ROS production mediated by SHAM-sensitive peroxidase in guard cells, resulting in stomatal closure via a Ca^{2+} -dependent pathway in *Arabidopsis*.

植物用新規ベクターシステムによる 2 遺伝子同時クローニング

B-05

○中尾彰秀¹、中村真也¹、戒能智宏²、川向誠²、木村哲哉³、中川強¹

(¹ 島根大・総科センター・遺伝子、² 島根大・生物資源科学、³ 三重大院・生物資源)

【目的】 現在、遺伝子機能の研究において 2 つの遺伝子の相互作用を細胞学的、生化学的に解明することが重要となっており、2 遺伝子を効率良く同時に発現させる実験系が望まれている。そこで我々はこれまでに構築を行ってきた Gateway クローニングを用いる植物形質転換用バイナリベクターを発展させ、任意のプロモーターと cDNA を 2 組同時にクローニングするベクターシステムの開発を進めた。

【方法・結果】 今までに 2 遺伝子同時クローニングシステムとして、35S プロモーターで発現を行う Dual Site Gateway バイナリベクターが作られていた。今回このシステムをベースに用い、attR4-promoter-attL1 エントリークローンを利用してプロモーター交換が可能なものへと改変を行った。現在特異的な att 配列として att1~6 の 6 種が知られており、これら 6 種の att 配列を用いることでベクター上の 2 か所でプロモーター:cDNA をクローニングできるバイナリベクターの開発を行い、Dual R4 Gateway バイナリベクターと名付けた。本システムにより 35S プロモーター、NOS プロモーターを用いて 2 レポーター発現クローンを作製した。これらクローンを導入した植物での発現実験の結果も合わせ報告する。

ユーグレナチオレドキシシペルオキシダーゼの機能解析

B-06

○玉木 峻、西川 仁、柴田 均、澤 嘉弘、石川孝博

(島根大生資科・生命工)

【目的】 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 H₂O₂ 代謝酵素として機能している。最近公開されたユーグレナ EST データベースより、ユーグレナにも APX 以外にチオレドキシシペルオキシダーゼ (TPX, ペルオキシレドキシシ) の存在が示唆されている。そこで本研究は、ユーグレナ TPX の cDNA を単離し、その生理機能を明らかにすることにした。

【方法・結果】 PCR によりユーグレナ TPX の完全長 cDNA を単離した。得られた TPX は、他の生物由来の 2-Cys タイプの TPX と約 60%程度の同一性を示した。Cys 残基を含め触媒作用に必須のアミノ酸残基はユーグレナ TPX でも全て保存されていた。また今回得られた TPX には、N 末側にトランジットペプチドが存在しないことから細胞質での局在が予測された。酵母チオレドキシシ(Trx)/Trx 還元酵素を用いた測定系により、組換え体 TPX は H₂O₂ およびアルキルヒドロペルオキシド還元活性を持つことが示された。Q-PCR により定常期のユーグレナ細胞における TPX 遺伝子発現レベルを調べたところ、TPX は APX 遺伝子発現レベルの約 20 倍高いことが示された。しかし、細胞レベルで TPX 活性は検出できないことから、やはり APX が主要な H₂O₂ 代謝酵素として機能していると考えられた。

ヒメツリガネゴケにおけるアスコルビン酸合成経路の同定と機能解析

B-07

西川 仁、原井健司、柴田 均、澤 嘉弘、○石川孝博

(島根大生資科・生命工)

【目的】アルドノラクトナーゼ(ALase)は、動物や緑藻ユーグレナのアスコルビン酸(AsA)生合成経路(ウロン酸経路)の構成酵素として、最終前駆体 L-アルドノラクトンの合成に機能している。陸上植物では一般に ALase 相同遺伝子は存在せず、AsA 生合成はウロン酸経路ではなく、D-マンノース/L-ガラクトース経路が機能している。最近我々は、データベース解析から、ヒメツリガネゴケに ALase 相同遺伝子が存在することを見出した。そこで、同植物の AsA 生合成経路を明らかにするため ALase の機能解析を行った。

【方法・結果】ヒメツリガネゴケからお互いに 52%の類似性を持った 2 つの ALase cDNA(PpALase-1, PpALase-2)をクローン化し、大腸菌で組換え体酵素を作製した。組換え体 PpALase-1 と PpALase-2 は、L-ガラクトン酸を基質とし、Km 値はそれぞれ 7.50 と 2.03 mM、触媒効率(kcat/Km)は、それぞれ 56.9 および 2.59 s⁻¹ mM⁻¹であった。生育 1 週目の原系体と 8 週目の茎葉体における AsA レベルを測定した結果、それぞれ 0.745 と 2.00 μmol g⁻¹FW であり、茎葉体は原系体の 2.7 倍に増加していた。このとき、PpALase-1 および PpALase-2 遺伝子の発現レベルを定量的 PCR で検討したところ、茎葉体の PpALase-1 は約 2 倍に発現上昇していたのに対し、PpALase-2 は約 15 倍と顕著な発現上昇が認められた。

耐熱性 *Zymomonas mobilis* の高温育種と育種株の生理学的解析

B-08

○中島康之¹、入江陽¹、Kannikar Charoensuk¹、村田正之¹、高坂智之²、
山田守^{1,2} (¹山口大・院医・応用分子、²山口大・農・生機)

【目的】*Zymomonas mobilis* は強力な Entner-Doudoroff 経路をもつエタノール発酵性細菌であり、嫌気性条件下で生育が良くエタノール生産性も高いがその至適温度は 30℃前後である。本研究では、高温高速発酵を目的として、*Z. mobilis* の耐熱性株の育種と育種による生理学的特徴の変化の検討を行った。

【方法・結果】

タイから分離された *Z. mobilis* を高温条件下で繰り返し培養し、より耐熱性をもつ株の育種を行った。タイ分離 *Z. mobilis* は標準的な *Z. mobilis* よりも耐熱性を有するが、育種によってより高い耐熱性が示された。育種による耐熱性の向上は繰り返し培養の回数が増えるほど高くなる傾向があり、高温で観察される細胞伸長が抑制されていた。逆に、培養回数が増えるほど酸に対する耐性は減少した。加えて、DNA チップ解析により高温条件下での親株と育種株の遺伝子発現量を比較した。

耐熱性 *Zymomonas mobilis* による L-乳酸発酵

B-09

○嘉松初¹、入江陽¹、村田正之¹、中島康之¹、高坂智之²、山田守^{1,2}

(¹ 山口大院医・応用分子, ² 山口大農・生機)

【目的】 *Zymomonas mobilis* は、その低い ATP 生産性を補うために、Entner-Doudroff 経路が非常に強力になっている。そのためこの菌は高い発酵生産性を有しており、エタノール発酵生産の場で利用されている。また、この菌はタイから耐熱株が単離されている。本研究では、これを利用して高温での L-乳酸生産を目的としている。

【方法・結果】 *Z. mobilis* は D-乳酸脱水素酵素をもつが、L-乳酸脱水素酵素 (L-Ldh) をもたない。そこで外来の遺伝子を導入し、*Z. mobilis* による L-乳酸生産経路の獲得を目指した。*Lactobacillus plantarum* 由来 L-Ldh 遺伝子を *Z. mobilis* で発現させるために、組換えプラスミドを構築した。これを *Z. mobilis* に導入したところ、導入株の乳酸生産量はコントロール株に比べて約 50 倍の増加を示した。現在、高温条件下における発酵についても検討している。

納豆菌の生理活性物質産生におけるキシロオリゴ糖の影響について

B-10

○丸山雅史、津田さおり、木場洋次郎 (愛媛大農・応生化)

【目的】 キシロオリゴ糖の新たな機能性の探索を目的とした。市販納豆から分離した一菌株をキシロオリゴ糖添加培地に接種して培養したところ、納豆の生理活性機能として有用な血栓溶解酵素と抗菌物質それぞれの活性の増加が確認された。そこで今回は三大納豆菌種を試験菌株として同様の傾向がみられるかどうか、それぞれの培養経過からキシロオリゴ糖の影響を検証した。

【方法・結果】 リン酸加水分解により調製したキシロオリゴ糖を 1%(w/v)になるようブイヨン培地に添加し、これに成瀬、高橋、宮城野の三菌種をもとに純粋分離して得たそれぞれの菌株を接種して培養を行った。経時的にサンプリングして活性を測定したところ、血栓溶解活性については、いずれも培養経過にともなって増加傾向を示し、特に成瀬菌では無添加に比べて約 5 倍に達した。一方、抗菌活性については、キシロオリゴ糖を添加することで新たに活性の発現が確認された。また、キシロオリゴ糖と物性や生理機能が類似したガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖それぞれを用いて同様の試験を行ったところ、血栓溶解酵素に関しては活性発現の遅延や低下がみられ、抗菌活性についてもキシロオリゴ糖とは異なる傾向がみられた。

大腸菌 0157 の調理器具素材に対する付着性の抑制

B-11

○横井川久己男¹、麻野亜耶佳¹、石本麻衣子¹、武政二郎^{1,2}、達牧子^{1,3}

(¹ 徳島大総合科学、² 辻調理師専門学校、³ 神戸女短大)

【目的】大腸菌 0157 は、胃の酸性バリアーを容易に通過できる高い酸耐性を有し、数細胞でも経口感染すると報告されている。本菌が混入した食材は直接の感染源となるだけでなく、調理器具を介して食品の二次汚染を引き起こすが、感染源となる食材は多様化しているため、食材毎に調理器具の殺菌や使い分けを行うことは困難である。本研究では、食品の二次汚染防止を最終的な目的として、各種調理器具素材に対する本菌の付着性を抑制する条件を検討した。【方法】菌株は大腸菌 0157sakai 株を使用した。調理器具素材は本菌が比較的高い付着性を示したガラスを主に使用した。100 細胞/ml の大腸菌 0157 細胞懸濁液を調製し、ガラスシャーレに 0.2ml/cm² の割合で流し入れた。室温で一定時間放置後、非吸着細胞数と吸着細胞数を平板培養法により測定した。【結果】クオラムセンシングにかかわるアシルホモセリンラクトン類は、アシル基の種類により付着性を変動させると考えられた。また、本菌の付着性は生育条件により変動し、低温で生育した本菌は低い付着性を示した。

Clostridium 属細菌の共培養によるセルロースからのブタノール生産の試み

B-12

○西垣直哉¹、兵頭一星¹、大西浩平² (¹ 高知大学農・農、² 高知大総研セ)

【目的】アセトン・ブタノール・エタノール発酵 (ABE 発酵) の歴史は古い、バイオブタノール生産に利用できることから近年再注目されている。本研究では、ABE 発酵を行う新規の微生物の探索を行ない、未利用バイオマスであるセルロースからのブタノール生産能について調べることを目的とした。

【方法・結果】高知県土佐町の水田と高知県浦ノ内湾の海底から土壌を採取し、セルロースパウダーを唯一の炭素源として含む培地で嫌氣的に集積培養を行った。カルボキシメチルセルロースを含む寒天培地でコロニーを形成させて細菌を単離し、グルコース及びセルロースの資化能と、それぞれで培養したときのブタノール生産の有無について調べた。

水田からは *Clostridium beijerinckii* に近縁な、21 種類のブタノール生産を行う細菌が分離されたが、いずれもセルロースを資化することができなかった。一方で、セルロースを炭素源として増殖する *Clostridium* 属細菌も複数種単離できたが、いずれもブタノールは生産していなかった。そこで、それぞれのタイプの *Clostridium* 属細菌を混合して培養したが、ブタノール生産は確認できなかった。現在、セルロース資化菌を培養した後、培養ろ液にブタノール生産菌を添加しブタノール生産が行われるか検討中である。

B-13

キャッサバ澱粉残渣を原料とする無蒸煮法によるアルコール発酵

○松元信也、柿木裕一、高橋 永（高知工科大工 物質・環境）

【目的】キャッサバの澱粉製造工程から排出される澱粉を含む固形廃棄物（澱粉残渣）を燃料用アルコールの原料として利用しようとの動きがあるが、その工業化にはエネルギー収支や生産効率などの点で問題があるとされている。そこで、本研究では、省エネルギー的仕込発酵法である無蒸煮法に注目して、仕込発酵条件と成績の關係に検討を加えた。

【方法】基本無蒸煮仕込発酵法：所定量の澱粉残渣粉砕物、水、グルコアミラーゼ剤及び酵母培養液を混合攪拌し、加熱することなくそのまま 28℃で静置発酵させた。発酵中は炭酸ガス発生量を測定し、発酵終了後は pH、総酸、アルコールなどを測定した。なお、実験目的に応じて、i) メタカリ ($K_2S_2O_5$) を添加、ii) 澱粉残渣懸濁液の pH を調整、iii) α アミラーゼを併用した。また、比較のために、低温蒸煮法（蒸煮条件: 80℃、10 分）と高温蒸煮法（蒸煮条件: 120℃、10 分）についても試験した。

【結果】基本無蒸煮仕込発酵法の場合の発酵歩合は約 81%にとどまったが、初発モロミの pH 調整や α アミラーゼを併用するなどの仕込発酵条件を最適化した改良無蒸煮法（NCS）の場合は、低温蒸煮法（LTC）及び高温蒸煮法（HTC）の場合と同等以上の約 88%の良好な発酵歩合が得られた。

機能性 β -1, 3-1, 6-グルカンの特異的に分解する微生物の分離と評価

B-14

○松岡靖子¹、清野由佳¹、和田いくみ¹、宮脇香織^{1,2}、中谷麻衣^{1,2}、
村松久司¹、永田信治¹（¹高知大・農、²ソフィ）

【目的】酵母や担子菌、藻類を形作り、黒酵母が菌体外で生産する β -1, 3-1, 6-グルカンは、凝集性、保水性、増粘性や免疫賦活化などの生理活性を有する多機能性多糖である。この多糖を分解する酵素は β -1, 3-グルカナーゼと β -1, 6-グルカナーゼであり、自然界に生息する様々な微生物に分布している。しかし、基質特異性が高くて、高分子多糖の複雑な立体構造に阻まれて、強い分解活性を示す酵素が少ない。本研究では、 β -1, 3-、 β -1, 6-グルカナーゼ活性を持つ微生物の探索法を検討し、単離した分解菌の分解活性を評価した。

【方法・結果】土壌試料を分離源として、パン酵母、リケナン、カードラン、パスツラン、黒酵母 β グルカンを添加した寒天培地で生育するコロニーから、ハロ形成やコンゴレッド染色法によって β グルカン分解活性を持つ菌を選択した。カードランやパスツラン、黒酵母 β グルカンの培地で顕著な分解活性を示した細菌 H1、放線菌 SY26、真菌 BRN、放線菌 IKM 等を分離した。H1 は β -1, 3-グルカナーゼ活性、SY26 と BRN は β -1, 3 と β -1, 6-グルカナーゼ活性を持ち、共に α グルカンの分解活性が弱い。反応様式や生成物は薄層クロマトで確認し、 β グルカン分解菌が持つグルカナーゼの種類や変化を調べた。特に黒酵母 β グルカン培地でハロを形成する微生物に、顕著な β グルカン分解活性が期待される。

B-15 β -1, 3-1, 6-グルカンを生産する黒酵母 *Aureobasidium pullulans* の細胞形態について ○宮脇香織^{1,2}、山本純史¹、松尾知佳¹、村松久司¹、永田信治¹
(¹高知大・農、²ソフィ)

【目的】黒酵母 *Aureobasidium pullulans* は、免疫賦活作用などの様々な機能性を示す β -1,3-1,6-グルカンを生産する。食品添加物として β グルカンが工業的に培養生産されているが、黒酵母は菌糸形と酵母形の二形成真菌であり、菌齢によって細胞形態を変化させる複雑な生活環を持つために、 β グルカンを安定に培養生産することが難しく、その詳細を明らかにした例もない。従って、 β グルカン生産に関わる細胞形態を明らかにすることが重要になる。本研究では、効率良い β グルカン生産を目的として、 β グルカン高生産性黒酵母の多糖生成能に与える環境条件と細胞形態の関連性について検討した。

【方法・結果】米糠培地もしくは半合成培地で液体培養を行い、栄養細胞である分生子や休眠性孢子である膨張細胞の割合と染色による多糖生産細胞を観察した。 β グルカン量は β -グルカナーゼを用いた定量法で測定した。両培地で β グルカンのみが生産され、増殖形態や分生子、膨張細胞、厚膜胞子の細胞形態にも変化はなかった。半合成培地で厚膜化が抑制され培養液の着色は見られない。培養初期の pH が 3.5 以下になると細胞が密集し β グルカン量が低下した。 β グルカン生産に影響する細胞は、細胞の大きさや細胞内小胞の数から膨張細胞であり、菌糸形も酵母形も共に膨張細胞が関与していることが示唆された。

様々な動物の腸内環境を利用した有用酵母の探索

B-16 ○木村有希¹、穴井直博²、須藤千賀¹、井上寿子¹、村松久司¹、永田信治¹
(¹高知大学農学部、²高知アニマルサイエンス、²木村どうぶつ病院)

【目的】様々な動物の腸内環境には、それぞれに有用なプロバイオティクス素材となる乳酸菌が生息する。動物の新鮮便を分離源として嫌気的で酸性条件下で培養を行うと、主な病原菌の増殖を抑えつつ、安全に乳酸菌を分離することができる。その上、同様の条件下で容易に酵母も分離することがわかった。そこで、様々な餌料で飼育されている動物から、発酵力の優れた酵母を分離し、その発酵特性に応じて利用できる酵母の評価を試みた。

【方法・結果】高知市内の動物園や水族館で飼育されている動物と野生動物を含め、22 種類の動物の新鮮便を用いて酵母を分離した。クロラムフェニコールを添加し pH5 に調整した栄養培地を用いて、嫌気条件下で酵母のみを生育させることができた。分離した酵母は、ブドウ糖、麦芽糖、ショ糖による発酵力試験や冷蔵保存試験を行い、優れた酵母について 18SrDNA 解析を行い *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。さらに小麦粉や米粉による生地膨張試験、清酒小仕込み試験、果汁や麦汁発酵試験を行い、その特性と実用性を評価した。特に、キリンとツキノワグマから分離した酵母は、発酵力、アルコール生成能、生地膨張力に優れて、高い冷蔵保存性を示す。醸造利用も可能な能力を持つが、製パンの官能試験の結果、個人の嗜好性で評価も異なるが、パン酵母よりも評価が高かった。

食餌利用を目指した植物性バイオマス由来の乳酸菌の分離

B-17 ○井上寿子¹, 穴井直博², 木村有希¹, 徳井あすみ¹, 松尾知佳¹, 村松久司¹,
永田信治¹ (¹高知大・農, ²高知アニマルサイエンス、²木村どうぶつ病院)

【目的】乳酸菌は発酵させた食餌料において、雑菌の繁殖を防いで保存性や嗜好性を高めたり、腸内微生物叢のバランスを保つことによって、整腸作用や免疫増進作用、抗アレルギー作用に寄与する。高知県では、ユズなどの果実を含む柑橘類や栗、蔬菜の加工時に生じる植物性廃棄物を、乳酸発酵することで新しい食餌料を開発したり、堆肥化して再利用することが望まれている。本研究では、様々な植物性バイオマスの発酵中に優勢種として見出される乳酸菌を分離し、動物の健康管理を目指した食餌料化への可能性を検討した。

【方法・結果】乳酸菌の分離源として、ユズの搾汁残渣や栗焼酎粕を含む様々な植物性素材を用いた。様々な条件の発酵物を 0.1mg/ℓ シクロヘキシミドを添加した MRS 寒天培地に塗布して、嫌気条件下で生育したコロニーを純化した後に、得られた菌株をグラム染色して顕微鏡観察を行った。また、グルコースもしくはグルコン酸を炭素源としたガス産生試験で発酵様式を確認し、マイクロプレートを用いた種々の糖類資化性試験と、16SrDNA の塩基配列を用いた簡易同定試験を行った。その結果、栗焼酎粕の *Lactobacillus fermentum*、*L. paracasei*、*L. brevis*、ユズ搾汁残渣の *L. casei*、*L. plantarum*、*L. pentosus* など様々な乳酸菌を分離し、胃酸胆汁耐性試験や植物性素材の発酵試験など、食餌利用の可能性を検討した。

海洋細菌による prodigiosin の生産と殺藻性

B-18 ○白川哲夫、有賀修、榎本恵一（高知工大・環境理工）

【目的】本研究では、赤潮による水産業への被害を抑制する事を目的として、海洋細菌が生産する色素の殺藻性を調べた。また、より効率的な色素生産を目的として、色素生産海洋細菌培地への粉粒体等の添加効果を調べた。

【方法・結果】色素生産菌 (*Pseudoalteromonas* sp.1020R) を、LB-SW 培地によって振盪培養した後、遠心分離により菌体を回収し、エタノールにより色素を抽出した。エタノールを蒸発させ、DMSO に溶かした色素を、赤潮プランクトン懸濁液に添加し、赤潮プランクトン正常細胞数を経時的に計数した。赤潮プランクトンとして *Heterosigma akashiwo* を用い、f/2 培地にて培養した。また、色素生産性に対するキチンやセルロース等の粉粒体の添加効果を LB-SW 培地にて調べた。

色素が、 $0.205 \mu\text{M}$ においても高い殺藻性を示し、色素添加後 2 時間で、およそ 50% の赤潮プランクトンが溶菌した。しかし、色素への光照射時間の増加により殺藻効果は低下し、16 時間の光照射により殺藻性は完全に消失した。また、色素生産培地へ粉粒体を添加する事により、色素生産量の増加がみられ、特にキチンが有用である事が分かった。

銅のバイオリッチング活性の高い鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* D3-2 株は亜硫酸 B-19 耐性である

○小野田桂子¹, 竹内文章², 杉尾 剛³ (¹岡大農,²岡大環セ,³岡大院自然)

【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鉄酸化細菌株である。最近、我々は *A. ferrooxidans* の aa_3 型 cytochrome c oxidase が本来の呼吸酵素活性とともに亜硫酸酸化酵素活性を併せ持っていることを明らかにした。鉄細菌が硫化鉱石と接触する際、代謝中間体として毒性の高い亜硫酸が生成する。今回、D3-2 株が高いバイオリッチング活性を持つ原因を明らかにするために、鉄細菌洗浄細胞に及ぼす亜硫酸の影響を検討した。

【方法・結果】 鉄酸化活性は 2 価鉄の減少速度を α -phenanthroline 法を用いて測定した。また、亜硫酸の定量にはパラローザニリン法を用いた。元素硫黄培地で増殖した D3-2 株、ATCC 23270 株、MON-1 株の洗浄細胞を pH 7.0 及び 3.0 で、異なる濃度の亜硫酸 (16.7 ~ 66.8 μ M) で 2 時間処理した後、鉄酸化活性を測定した。D3-2 株は亜硫酸処理後において最も高い鉄酸化酵素活性を保持していた。各種無機硫黄化合物 (S^0 、 SO_3^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 $S_4O_6^{2-}$ 、銅精鉱) のうち亜硫酸が最も高い細胞毒性を示し鉄酸化活性を減少させた。D3-2 株の cytochrome c oxidase は ATCC 23270 株や MON-1 株の cytochrome c oxidase に比較してより亜硫酸に耐性であった。

鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の外膜における aa_3 型 cytochrome c oxidase の存在 B-20

○狩野典香¹, 竹内文章², 杉尾 剛³ (¹岡大農,²岡大環セ,³岡大院自然)

【目的】 鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は 2 価鉄と還元型無機硫黄化合物の両方を酸化できるためにバイオリッチングの有用菌として知られている。我々は最近、硫黄酸化の際にも鉄酸化酵素の成分である aa_3 型 cytochrome c oxidase (aa_3) が機能していること、 aa_3 に対して調製した抗体が、洗浄細胞による鉄酸化活性のみでなく硫黄酸化活性をも強く阻害することを明らかにした。鉄酸化及び硫黄酸化が細胞内膜のみではなく細胞外膜でも行われていることを検討するために洗浄細胞を用いての還元型 mammalian cytochrome c の酸化を検討した。【方法・結果】 1%の元素硫黄培地で増殖した ATCC 23270 株及び MON-1 株の洗浄細胞は pH 5.7 で還元型 mammalian cytochrome c を酸化することができた。ATCC 23270 株より aa_3 及びチトクローム Cyc2 (外膜に局在し鉄酸化酵素系の一成分) を電気泳動的に単一に精製した。Cyc2 は 2 価鉄で素早く還元され、還元された Cyc2 は aa_3 によって酸化された。これらの結果は aa_3 が内膜のみでなく外膜にも存在し鉄酸化あるいは硫黄酸化に関与していることを示唆している。

新規な鉄酸化細菌による酸性鉱山廃水の生成

B-21

○王 揚¹、金尾忠芳²、上村一雄¹

(¹岡山大院・自然科学、²岡山大・自然科学研究支援センター)

【目的】 鉱山廃水中の微生物は、生物地球科学的観点あるいは微生物機能の利用の観点から興味ある対象であるが、その生態系に関する知見は少ない。本研究では、酸性環境中の微生物の有効利用を目指して、酸性鉱山水の微生物群落を 16S rDNA を指標に解析した。

【方法・結果】 岡山県柵原鉱山の地下水を一時貯留している場所で試料を採取した。採取した試料の pH は 4.7、水温は 23℃であった。酸性鉱山水から Soil DNA 抽出キット抽出法により DNA を回収し、それらを鋳型に用いて、DGGE 解析用プライマーで 16S rDNA を増幅した。DGGE 解析によって検出されたバンドから DNA を抽出し、PCR 増幅後、塩基配列を決定することによって細菌を同定した。鉱山廃水からは、独立栄養性の鉄酸化細菌である *Gallionella* や *Ferrovum* に属する細菌が検出された。さらに鉄を還元し、マグネタイトを形成する従属栄養細菌 *Geobacter* や *Magnetosprillum* に属する細菌、同じく鉄還元能を持つ好酸性の従属栄養細菌である *Acidocella* 属および *Acidiphilium* 属の細菌と古細菌のクローンが検出された。一方、酸性鉱山廃水にしばしば検出される、*Acidithiobacillus ferrooxidans* や *Leptospirillum* 属の鉄酸化細菌や *Acidithiobacillus thiooxidans* などの硫黄酸化細菌は検出されなかった。

6-デオキシ-D-プシコース及び 6-デオキシ-D-アロースの新規生産法の確立

B-22

○加藤明広¹、吉原明秀²、森本兼司²、高田悟郎²、何森健³

(¹香川大農、²香川大希少糖研セ、³希少糖生産技術研究所)

【目的】 当研究室では、微生物及びその酵素を用いて天然に微量にしか存在しない希少糖の生産を行っている。中でも、D-プシコース及び D-アロースは様々な生理機能を持つことがわかってきた。本研究では、更なる生理機能の発見や生理機能解明を目的に、構造の類似する 6-デオキシ-D-プシコース及び 6-デオキシ-D-アロースの生産法の確立を行った。

【方法・結果】 L-フコースを出発源にラネーニッケル触媒を用いた還元法により L-フシトールに転換した。その後、*Phyllobacterium myrsinacearum* Cyc-13s 株を用いた酸化反応で L-フシトールを 1-デオキシ-D-タガトースに 97%転換した。得られた 1-デオキシ-D-タガトースを上記方法で還元した結果、L-フシトールと 1-デオキシ-D-タリトールが 63 : 37 の比で得られた。分離した 1-デオキシ-D-タリトールを基質に *Klebsiella pneumoniae* 40bR 株を用いた酸化反応により 6-デオキシ-D-プシコースが 83%得られた。分離した 6-デオキシ-D-プシコースを基質として *Pseudomonas stutzeri* LL172 株、*Bacillus pallidus* Y25 株及び *Enterobacter aerogenes* IK7 株由来の L-ラムノースイソメラーゼを用いた酵素反応により、現在 6-デオキシ-D-アロースの最適反応条件及び諸性質の検討を行っている。

希少糖D-アロースを含む新規二糖の生産

B-23

○竹地紀昭¹、森本兼司²、吉原明秀²、高田悟郎²、何森健³

(¹香川大農・希少糖研セ、²香川大希少糖研セ、³希少糖生産技術研究所)

【目的】微生物の酸化反応およびラネーニッケル触媒による化学還元反応を組み合わせ、生理活性作用がある希少糖 D-アロースを含む新規二糖を生産するために、まず 3-ケト二糖類を生産する微生物の探索と、培養および反応条件の検討を行った。

【方法・結果】微生物の探索は、1.0% ラクチトールを含む無機塩液体培地を使用した。微生物が D-ガラクトースの炭素第 3 位をケト化し、3-ケトラクチトールを生産すれば、培養上清にそれが蓄積されると予想し、システインカルバゾール法によって分析した。その結果、高いラクチトール酸化能力を示した 2 種類の微生物、NT 1 1 と TKC 3 8 を得た。最適培養条件の検討を、TSB、ME、YE、MS の 4 種類の培地で行った。NT 1 1 と TKC 3 8 共に TSB 培地で最も生育したが、NT 1 1 では ME 培地で、TKC 3 8 では YE 培地で最も高い酸化活性を示した。洗浄菌体反応により D-グルコースを含む様々な二糖類から 3-ケト二糖類の生産性を検討した。両微生物ともに広い基質に対して反応性を示したが、トレハロースについては NT11 が 3-ケトトレハロースと少量の 3,3'-ジケトトレハロースを生産したのに対して、TKC38 は少量の 3-ケトトレハロースを生産しただけで、ほとんどは D-グルコースに分解されていた。

ニゲロース分解酵素を生産する微生物の検索と諸性質の検討

B-24

高田悟郎²、賀来仁美¹、○沖村美由紀¹、吉原明秀²、森本兼司²

(¹香川大・農、²希少糖研セ)

【目的】ニゲロースは、免疫機能の向上効果などがある価値の高い機能性糖質である。しかし、ニゲロースの生産方法は複雑で効率が悪い。そこで、本研究では、単糖や二糖からニゲロースを効率的に生産することができる微生物のスクリーニングを行い、分離した微生物の生産する酵素の諸性質を調べた。

【方法・結果】ニゲロースの分解活性に着目してスクリーニングを行った。培地にはニゲロオリゴ糖またはニゲロースを唯一の炭素源とする、無機塩培地を用いた。さまざまな場所から採取した土壌を液体培地に摂取し、30℃で培養を行った。培養上清の還元糖量をソモジネルソン法で測定しニゲロースの減少を調べた。その結果、スクリーニングによって土壌よりニゲロースのみを炭素源として生育する微生物を 10 株得ることができた。これらの中から 1 菌を選抜し、ニゲロース分解活性を調べた。その結果、ニゲロースの加水分解活性を持つ酵素を得ることができたので、酵素を精製し、酵素学的諸性質の検討を行った。

Mesorhizobium loti ケトース 3-エピメラーゼ誘導発現条件の検討

B-25

○上地敬子^{1,2}, 吉原明秀², 森本兼司², 高田悟郎², 何森健³

(¹香川大・農, ²希少糖研セ, ³希少糖生産技研)

【目的】ケトース 3-エピメラーゼはケトースの炭素第 3 位の水酸基をエピ化する酵素で、*Pseudomonas cichorii* の D-タガトース 3-エピメラーゼが当研究室により世界で初めて発見された。ミヤコグサに共生する根粒菌 *Mesorhizobium loti* は、ゲノム上に異なる 3 つのケトース 3-エピメラーゼ類似遺伝子をコードしていることが分かっており、そのうちのひとつの遺伝子の大腸菌へのクローニング、活性発現に成功しその諸性質を明らかにした。本酵素は希少糖生産における重要な鍵酵素のひとつであるが、*M. loti* 菌体内でどのような働きをしているのか明らかではない。本研究では *M. loti* 菌体内で本酵素の作用の有無を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】無機塩培地に各種炭素源を加えて *M. loti* を培養し、本酵素の誘導発現条件を検討した。用いた誘導炭素源間においてケトース 3-エピメラーゼ活性の大きな差は確認できなかったが、微量ながら本酵素が *M. loti* 菌体内で発現していることを確認した。

Enterobacter aerogenes 由来キシリトールデヒドロゲナーゼの諸性質の検討

B-26

○古田睦¹, 吉原明秀², 森本兼司², 高田悟郎², 何森健³

(¹香川大・農, ²希少糖研セ, ³希少糖生産技術研究所)

【目的】本研究室では、自然界に微量にしか存在しない希少糖を微生物や酵素を用いて生産している。キシリトールデヒドロゲナーゼは、キシリトールを酸化してキシロコースに変換する、希少糖生産に重要な酵素の一つである。*Enterobacter aerogenes* はこれまでの研究により、キシリトールデヒドロゲナーゼを生産する可能性を持つことがわかっている。本研究では、*E. aerogenes* 由来のキシリトールデヒドロゲナーゼを得る事を目的とした。

【方法・結果】本菌は通常の培養条件ではキシリトールデヒドロゲナーゼ活性をほとんど持たない。まず、キシリトールを炭素源とする培地を用いてコロニー分離を繰り返した。さらに、酵素活性の強いコロニーを選抜するために、キシリトールを炭素源とする無機塩培地をもちいて継代培養を繰り返したところ、酵素活性の強い菌を得ることが出来た。次に、キシリトールデヒドロゲナーゼを各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、酵素学的諸性質の検討を行った。

D-アロース脂肪酸エステル植物成長抑制活性

C-01

○江川佳穂、上田真理子、小田愛、川浪康弘（香川大・農）

【目的】リパーゼを用いてD-アロース 6 位の水酸基を位置選択的にアシル化したD-アロース脂肪酸エステルは、イネやレタスに対して高い成長抑制作用を持つ事を報告している。今回、D-アロース脂肪酸エステルのイネやレタスに対する作用機構を解明するために、D-アロース脂肪酸エステルの試料溶液にジベレリンA₃を投与し、イネやレタスの成長試験を行い、ジベレリンA₃による成長の回復が見られるかどうかを検討した。

【方法・結果】D-アロース脂肪酸エステルは、リパーゼを用いてD-アロースと脂肪酸ビニルを、THF中 45℃、48h 反応させて合成した。レタスは成長抑制が最も強いD-アロースデカン酸エステルにジベレリンA₃を同時投与し、2日間暗所で育成後、shoot と root の長さを測定し、超純水のコントロールに対する成長率で検定した。ジベレリンに投与により D-アロースデカン酸エステルの抑制が打ち消されて shoot の成長が回復し、一方 D-アロースの場合、成長は回復せず、作用機構が異なると考えられる。また、イネの D-アロースドデカン酸エステルにジベレリンA₃を同時投与した成長試験の結果、10 μM 以上のジベレリンA₃投与で成長が回復したが、1 μM のジベレリンA₃では回復しなかったため、一般の矮化剤と異なる作用機構により、成長を阻害しているのではないと考えられる。

リパーゼを用いた D-アロース不飽和脂肪酸エステルの合成と

C-02

その植物成長調節作用

○内藤まどか、江川佳穂、川浪康弘（香川大・農）

【目的】D-アロースなどの希少糖は、植物成長抑制作用、癌細胞増殖抑制作用、糖尿病予防作用、脂肪合成抑制作用などの生理活性を持つことが明らかにされている。さらに、親水性である希少糖に疎水性の直鎖脂肪酸を導入すると生理活性が向上する事を報告している。今回、リパーゼを用いた位置選択的エステル化反応を行い、cis の二重結合を有するD-アロース不飽和脂肪酸エステルの合成を行い、イネおよびレタスによる生理活性試験を行った。

【方法・結果】D-アロースとオレイン酸とリパーゼを用いて 45℃、48 時間で、6 位の水酸基が位置選択的にアシル化された D-アロースオレイン酸エステルの合成を行った。各種の濃度に調製した試料溶液にイネの種子を浸し、30℃の明所にて 7 日間育成させた。育成後、第二葉鞘の長さを測定し、超純水のコントロールに対する成長率で検定した。イネの成長試験の結果、D-アロースオレイン酸エステルは D-アロース及びオレイン酸に比べて成長抑制作用が強いことがわかった。一方、レタスの成長試験 (25℃、暗所、48 時間)では、D-アロースと異なり D-アロースオレイン酸エステルは 5mM でもほとんど成長抑制作用は見られなかった。このように単子葉植物に対する選択的な成長抑制活性が見られた。

C-03

D-アロース中鎖脂肪酸エステル の血管新生阻害活性

○吉村麻衣¹, 川浪康弘¹, 塚本郁子², 小西良士² (¹香川大農、²香川大医)

【目的】近年、がん細胞を標的とする従来の抗がん剤とは異なる、血管新生阻害に基づく兵糧攻め戦略による抗がん剤の開発が盛んである。D-アロースは、活性酸素産生抑制作用、癌細胞増殖抑制作用、植物成長抑制作用などの生理活性を持つことが明らかにされ、さらに疎水性の直鎖脂肪酸を導入することで、界面活性、膜透過性を持つようになり、生理活性の向上が期待できる。そこで、今回、ヒト血管内皮細胞を用いた D-アロース中鎖脂肪酸の血管新生阻害活性試験を行った。

【方法・結果】オクタン酸ビニルとリパーゼを用いて THF 中、45℃、48 時間の条件下で D-アロースの 6 位の水酸基が位置選択的にアシル化された D-アロースオクタン酸エステルの合成を行った。ヒト血管内皮細胞を繊維芽細胞と共培養した 24 ウエルプレートを用い、positive control VEGF-A 10ng/mL または各種の濃度に調製した被験物質を添加した培地で培養した (37℃、5%-CO₂)。3 日ごとに添加物とも培地交換を行い、10 日後に形成された管腔を染色して面積を測定した。D-アロースに濃度依存的な血管新生阻害が見られ、D-アロースオクタン酸エステルには D-アロースと比較し、さらに 4 倍強い血管新生阻害活性が見られた。一方、オクタン酸、グルコース及びグルコースオクタン酸エステルには、血管新生阻害活性はほとんど見られなかった。

コージビオースのアルカリ異性化—異性化物の単離と構造解析—

C-04

○小出修也, 八木政裕, 渡邊 光, 西本友之, 福田恵温 (林原生化研)

【目的】コージビオース (Glc (α1-2) Glc) は、酒や蜂蜜などに存在するグルコ二糖である。我々は酵素法によりコージビオースの大量製造に成功しており、その物性と機能性を明らかにしてきた (*J.Biosci.Bioeug.*, 92, 177-182 (2001))。今回、コージビオースのさらなる高度利用を目指し、1. アルカリ異性化における添加剤の影響検討、2. 異性化糖質の単離、3. 酵素消化および NMR による構造解析を行ったので報告する。

【方法・結果】1. マルトースの異性化反応においてマルチュロースの生成率を向上させることが報告されているアルミン酸およびホウ酸は、コージビオースの異性化糖調製に有用ではないと判断した。2. NaOH で pH11.5 に調整した 5%w/w コージビオース水溶液を 50℃で 24h 反応させた結果、異性化糖の生成率は 32.1%であった。イオン交換樹脂による脱塩後、固形分 360 mg を HPLC (カラム: Polyamine II, YMC) に供した結果、純度 95.4% の異性化糖を 120 mg 得た。3. 異性化糖は *Asp. niger* 由来 α-グルコシダーゼによりグルコースとマンノースに分解された。さらに、¹H および ¹³C-NMR 解析結果から本糖質をグルコースとマンノースが α-1,2 結合した二糖、Glc (α1-2) Man と同定した。本糖質の構造は、川村らの報告 (農化, 47, 4, 285-288 (1973)) を支持する結果であった。

陽イオン交換樹脂を用いた Pictet-Spengler 反応

C-05

○城戸健史、村上美祐、中島修平、泉 実（岡山大院・自科）

Pictet-Spengler 反応はアルカロイドの合成に用いられる反応のひとつであり、フェネチルアミンなどのアリアルエチルアミンと、アルデヒドやケトンを縮合させ閉環させる反応である。この反応は一般的に酸触媒を必要とするが、その高い反応性のため、副反応を起こすこともしばしばである。そのため、Pictet-Spengler 反応における、より温和でより効率的な酸触媒が必要である。

有機合成において、生成物の単離のプロセスを簡便にする方法のひとつに、ポリマー担持型合成がある。ポリマー担持型合成において、反応中間体は相互作用によりポリマーに保持される、そのため一般的な液相合成法と比較して後処理が簡単である。

本研究では、陽イオン交換樹脂 DOWEX50W-X4 の Pictet-Spengler 反応における酸触媒としての効果と、ポリマー担持剤としてのアミンの精製について検討した。その結果、陽イオン交換樹脂 DOWEX50W-X40 は酸触媒として反応を触媒するだけでなく、ポリマー担持剤としても作用し、生成物の単離を容易にすることが明らかとなった。

TMSCl を用いたフィッシャーグリコシド化の β 選択性

C-06

○堀内正子、武内野乃子、中島修平、泉 実（岡山大院・自然科学）

Fischer 法はアルコール中、酸を作用させて、一段階でグリコシドを形成する古典的方法である。すでに、アルコール中でトリメチルシリルクロリド (TMSCl) を酸として作用させる簡便な Fischer 法を見出している(1)。

これまでオクチルグリコシドは完全アセチル化された単糖にオクタノール中で三弗化ホウ素を作用させてグリコシル反応を行うことによって調整されてきた。しかし、この方法では隣接基関与のために β 体を得ることは可能であるが、効率良く、 α 体のオクチルグリコシドを得ることはできない。そこで、TMSCl を用いる方法を α -オクチルグリコシドの生成に適用したところ、 α 体ではなく β 体のみが生成した。そこで β 選択性について、詳細な検討を行った。

D-グルコースを TMSCl 存在下、1-オクタノールを反応溶媒として用い、室温で一週間攪拌した。反応の経過は TLC で観察した。トルエンを加えて共沸留去する操作を 3 回繰り返して、TMSCl を完全に留去した。その後、カラムクロマトグラフィーにより精製した。その結果、 α 体のみが得られるという予測に反し、 β 体のみが得られた。

(1) Izumi, M., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 211-214 (2002)

【目的】 アントラセサモン類は、ゴマ（*Sesamum indicum*）の根や種子から単離され、側鎖構造として 4-メチル-3-ペンテニル基を持つアントラキノンである。また、アントラセサモン類の推定生合成中間体として MPAQ [2-(4-methylpent-3-en-1-yl)anthraquinone] が単離されているが、側鎖構造として(E)-4-メチル-1,3-ペンタジエニル基を持つ MPDEAQ も知られている。これまでに演者らは、この化合物がシス体として生産され、光によってトランス体に異性化することを報告している。今回は、ジエン側鎖の生成に関するさらなる知見を得るため、新たなジエン側鎖を有するアントラセサモン類の単離を試みた。

【方法・結果】 ゴマ毛状根を B5 液体培地中、暗所で 4 週間振とう培養した。この後の全ての操作・測定等は、光異性化反応を防ぐために暗所または可能な限り低照度・短時間照明の条件下で行った。得られた毛状根をメタノールを用いて抽出した後、ジクロロメタンを用いて溶媒分画した。得られたジクロロメタン可溶性画分を各種クロマトグラフィーにより精製を行い、2 種の新規化合物を得た。各種 NMR スペクトル解析および上記アントラセサモン類等とのデータ比較の結果、これら化合物がアントラセサモン A および B のジエン類縁体であり、さらにシス体であることが明らかとなった。

【目的】 ゴマにはセサミンやセサモリンなどのリグナン類が豊富に存在し、これらのゴマリグナン類は様々な生理活性を持つことが知られている。セサミノールはその中でも特に強い抗酸化性を持つが、その生合成については不明である。本研究ではセサミノールの生合成経路の解明を目的とし、ゴマ種子のミクロソーム画分を用いた粗酵素反応実験、また生合成経路に関わるゴマリグナン類の単離・同定を行った。

【方法・結果】 基質としてのセサミン、セサモリン、ピノレジノールのそれぞれとゴマミクロソーム画分を、NADPH と MgCl_2 の存在下で 40°C で 30 分間インキュベートした。その結果、セサミンを基質とした反応液から、セサミノールと思われる生成物が見出された。コントロールとして用いた反応液ではセサミノールの生成は確認できなかった。この結果から、セサミンからセサミノールが、ミクロソーム画分のシトクロム P450 による水酸化によって生成したと推定した。また、ゴマリグナン類として、有機層画分からセサミン、セサモリン、ピノレジノール、セサモリノール、セサミノール、7-エピセサミノールおよびピペリトールを、水層画分からリグナン配糖体のセサミノールトリグルコシドおよびセサモリノールジグルコシドを単離・同定した。

安定型アスコルビン酸誘導体 AA-2G のプロテアーゼによるモノアシル化
C-09 (第2報) ○岩岡裕二¹, 森佑¹, 伊東秀之², 田井章博¹
(¹ 県立広島大・生命環境, ² 岡山大院・医歯薬)

【目的】アスコルビン酸 (AA) の2位の水酸基にグルコースが付加した安定型 AA 誘導体であるアスコルビン酸-2-グルコシド (AA-2G) は体内で代謝され、AA となりビタミン C 作用を示す。最近、我々は AA-2G の生物学的利用能の向上を目指し、AA-2G の AA 側6位の水酸基にプロテアーゼを用いてラウリル基を付加した親油性 AA 誘導体である 6-O-dodecanoyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (6-sDode-AA-2G) を 3% H₂O/DMF 中で合成した。しかし、この合成法の欠点として 6-sDode-AA-2G の収率の低さ、副産物の生成が挙げられた。本研究はこの溶媒系に新たな溶媒を混合することで 6-sDode-AA-2G の収率、アシル基の部位選択性を向上させることを目的とした。【方法・結果】今回、酵素として *Bacillus subtilis* 由来のプロテアーゼを、アシルドナーとしてラウリン酸ビニルを用いた。まず、DMF に混合する溶媒のスクリーニングを行い、1,4-Dioxane を選択した。次に水を含めた溶媒組成の検討を行った結果、1,4-Dioxane/DMF/H₂O (67: 30: 3) の組成で合成率が最も良好であった。この溶媒系を用いてプロテアーゼ量、アシルドナー量、反応時間の検討を行い、反応条件を最適化した。その最適化条件でスケールアップして合成を行ったところ、6-sDode-AA-2G の収率は以前の溶媒系の収率 20.4%から 38.1%にまで向上し、部位選択性も向上した。

モノアシル化アスコルビン酸誘導体 6-O-dodecanoyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid の分子内アシル基転位および酵素的加水分解
C-10 ○森佑¹, 漆原将也¹, 伊東秀之², 川崎大輔², 山本格², 田井章博¹
(¹ 県立広島大・生命環境, ² 岡山大・薬)

【目的】我々は安定型アスコルビン酸誘導体であるアスコルビン酸 2-グルコシド (AA-2G) の生物学的利用能の向上を目的として AA-2G のアスコルビン酸 (AA) 側の6位の水酸基にラウリル基を付加した 6-O-dodecanoyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (6-sDode-AA-2G) を合成している。今回、6-sDode-AA-2G の安定性試験および生体内酵素による代謝実験を行った。【方法・結果】安定性試験は pH 5~8 の水溶液中で行い、pH の値が高くなるに伴い安定性の低下が認められた。特に pH 7, 8 では3時間以内に約 10%の濃度が減少し、それに伴い分解物とは異なる新しい化合物が HPLC 分析より見られた。この化合物を分取し、各種機器分析により 6-sDode-AA-2G のラウリル基が AA 側の6位から5位に転位した 5-O-dodecanoyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (5-sDode-AA-2G) であることを明らかにした。さらにモルモットの臓器ホモジネートを用いて 6-sDode-AA-2G の代謝実験を行った結果、6-sDode-AA-2G から約 10%の 5-sDode-AA-2G が生成したが、両者とも AA-2G を経て AA に代謝されることが示唆された。このことから、6-sDode-AA-2G は転位も含め生体内の様々な条件下で AA 供給源としての利用が可能であると考えている。

バニリン構造類似体の抗酸化作用評価

C-11

○澤野健史¹、伊東秀之²、田井章博¹

(¹ 県立広島大・生命環境、² 岡山大院・医歯薬)

【目的】最近我々は、多角的な抗酸化作用評価を行い、バニリンの抗酸化作用を見出した。そこで今回バニリンの構造類似体の *in vitro* における抗酸化作用を評価した。

【方法・結果】タイプの異なる 3 種のモデルラジカル(DPPH ラジカル、ガルビノキシルラジカル、ABTS ラジカルカチオン)を用い、120 分の経時的なラジカル消去活性を評価した。また、生体条件に近い評価系として ORAC 法、酸化ストレス誘導性赤血球溶血阻害試験(OxHLIA 法)による抗酸化評価を行った。比較対象としてトロロックスを用いた。DPPH ラジカル、ガルビノキシルラジカルに対して、バニリン酸、バニリルアルコールは持続的に反応し、120 分後にトロロックスと同程度のラジカル消去活性を示した。ABTS ラジカルカチオンに対しては、全ての構造類似体がトロロックスと同等、またはそれ以上のラジカル消去活性を示した。また ORAC 法、OxHLIA 法では、全ての構造類似体がトロロックスよりも強い抗酸化作用を示した。特に OxHLIA 法では、モデルラジカルに対して強い消去活性を示すバニリン酸よりもバニリン酸エステル誘導体が強い抗酸化作用を示した。バニリン酸とバニリン酸エステル誘導体の赤血球膜表面への分配量の検討を行ったところ、OxHLIA 法での抗酸化活性と分配量に正の相関性があることが明らかになった。

茶からの新規プロアントシアニジンの同定と NMR によるペプチドとの

C-12 分子間相互作用解析

○勅使河原 功、横井信敏、佐藤正資(香川大農・応生科)

【目的】ポリフェノールには、分子間相互作用により生体高分子(タンパク質、核酸など)と結合する性質がある。最近、この性質がポリフェノールに様々な生物活性を付与しているとの報告がなされている。そこで、本研究では茶ポリフェノールとモデルペプチドとの分子間相互作用の様式を、核磁気共鳴吸収(NMR)法によって明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】相互作用解析には、ポリフェノールとして、茶生葉から単離した新規 A type プロアントシアニジン(1)を、モデルペプチドとしてブラジキニン(BDK)を用いた。化合物 1 と BDK の濃度比を変えて混合し、¹H-NMR スペクトルを測定した。いくつかの BDK アミドプロトンシグナルに、ポリフェノール濃度依存性のシフトが認められた。このことから、両者が相互作用し、複合体を形成していることが示唆された。次に、化合物 1 と BDK をモル比 1:1 で混合し、ROESY スペクトルを測定した。その結果、化合物 1 と BDK のプロトン間に複数の ROE 相関が観測された。これらの結果から、両分子の相互作用様式を推定した。

ペルオキシ結合を有する特異なセサモール酸化ダイマーの構造

C-13 [抗酸化フェノール物質の酸化生成物の構造と機能 IV]

○新開愛美, 藤本彩, 中村光裕, 増田俊哉 (徳島大院総合)

【目的】ポリフェノールなどの植物フェノールには強い抗酸化性があり、その性質ゆえにとても酸化されやすい。従って、抗酸化フェノールを高濃度に含有する機能性食品などには酸化物が蓄積する可能性があるが多くの酸化物の機能は不明である。我々は、ゴマ由来の抗酸化フェノールであるセサモールの酸化物に細胞毒性を認め、その細胞毒性物質の構造について報告してきた¹⁾。今回、セサモールのダイマー型酸化物のうちペルオキシ結合を有する物質の構造決定を計画した。【方法・結果】セサモールをエタノール中鉄触媒酸素酸化によって得られた酸化物を SiO₂ カラムにより分画して細胞毒性を評価し、最も活性の高かった分画 IV から、ダイマー型酸化物の単離構造決定を行っていった。しかしながらペルオキシ結合を有する物質の構造は、通常の 2DNMR のみでは決定することができなかった。そこで、今回新たに導入した ESI-QTOF-MS による MS/MS のフラグメンテーション解析によりペルオキシ結合の位置を予想し、接触還元によりペルオキシ結合を切断することによりその構造を確認した。その結果、本ダイマーはセサモール由来の構造のメチレンジオキシ基と環の二炭素が欠落し、その部分にペルオキシ結合を有する構造であると判明した。

1) 新開ら, 日本農芸化学会 2010 年度大会要旨集 P.149

C-14 高速液体クロマトグラフィーによるヒアルロン酸と海洋細菌多糖ウミノグリカンの糖鎖解析と化粧品分析への応用

○生田寛子¹、奥谷康一²、岡崎勝一郎¹ (¹香川大農・応生科、²シーバイオン)

【目的】高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるグリコサミノグリカン多糖(2,000kDa)の部分加水分解物糖鎖の微量解析技術を確認するとともに化粧品分析への応用を行う。

【方法・結果】2種類の多糖(10 mg)を 2M トリフルオロ酢酸存在下で部分加水分解(100℃で 6 hr)を行い蒸発・乾固後 1 ml の蒸留水に溶解した。多糖部分加水分解液あるいは標準糖液 0.01 ml にアミノベンジルエチルエステル(ABEE)標識試薬(生化学工業)0.04 ml を添加し反応(80℃で 1 hr)させた。ABEE 標識糖鎖は、XBridge(Waters)逆相カラムを用いた HPLC で分離し、蛍光(360 nm)で検出した。保湿性に加えてメラニン合成を抑制して美白作用を持つ海洋細菌(*Pseudomonas* sp. WAK-1 株)多糖ウミノグリカンでは3つのピークが検出された。2番目のピークはコンドロシン(グルクロン酸とガラクトサミンがβ-1,3結合した二糖)であり、3番目のピークはガラクトサミンであった。保湿性多糖として化粧品に多用されるヒアルロン酸では2つのピークが検出された。1番目のピークはグルクロン酸とグルコサミンがβ-1,3結合した二糖と考えられ、2番目のピークはグルコサミンであった。試作美容液からエタノール沈殿させた多糖糖鎖の HPLC 分析では、ウミノグリカン多糖由来のピーク3つとヒアルロン酸由来のピーク2つが検出され、定量も可能であった。

C-15 ポリグリセリン脂肪酸エステルを用いた液晶乳化法によるナノエマルションの調製

○宮ノ下道隆、池田新矢、合谷祥一（香川大農・応生科）

【目的】 ナノエマルションとは分散した液滴の粒径が 20nm から 500nm のエマルションであり、クリーミング等に対して安定で透明性が高いという特色を有している。ナノエマルションは高圧ホモジナイザーや高速ミキサーを用いて調製できるが、高エネルギーを必要とする。一方、省エネルギーなプロペラミキサーを用いた液晶乳化法でもナノエマルションの調製は可能である。今回は、ポリグリセリン脂肪酸エステル/水/食用油系の相図と調製されたエマルションの粒径の関係から、この系における液晶乳化法について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 乳化剤はデカグリセリンモノカプリン酸エステル(10G-MC)およびデカグリセリンモノラウリン酸エステル(10C-ML)を、油は食用油を用いた。液晶の状態は、偏光顕微鏡および小角X線回折によって調べた。水と乳化剤の混合系に油を滴下しながら攪拌し、エマルションを調製した。相図と粒径の関係から、以下の3条件が本系におけるナノエマルションの調製に重要であることが分かった。1：多量の液晶が形成される比率で水/乳化剤混合系を調製する。2：これに油を滴下しながら添加する。3：常に液晶の存在する範囲内で乳化する。また、小角X線回折より液晶はラメラ構造であることが分かった。

C-16 非イオン活性剤の曇点およびエマルションの相転移温度に対する糖の影響

○大久保覚史、池田新矢、合谷祥一（香川大農・応生科）

【目的】 非イオン性界面活性剤の重要な性質である曇点は阪井・片山の研究により、糖を添加することで降下する傾向がある。一方、界面化学的乳化法の一つである転相温度乳化法の転相温度は曇点とよく似た傾向を示す。そこで、本研究では転相温度乳化法に用いられる乳化剤の曇点に対する糖の影響およびこの乳化剤を用いたエマルションの転相温度に対する糖の影響を調べ、低温でのナノエマルションの調製を試みた。

【方法・結果】 曇点測定では界面活性剤水溶液を一定速度で昇温して濁度を測定し、濁度が急上昇する温度を測定した。転相温度乳化ではスクリー管ビンに試料を量りとり、種々の温度で20分静置し手動で攪拌した後冷水で急速に室温まで冷却した。得られたエマルションの平均粒径は、レーザー回折式粒度分布測定装置を用いて測定した。転相温度は電気伝導率の変化により求めた。

糖濃度が増加するほど曇点は降下した。最も微細な粒径が得られる温度帯は電気伝導率の変化より求めた転相温度とほぼ一致した。糖の添加により転相温度が5℃前後低温側へ移行し、得られたエマルションの平均粒径も小さくなった。現在は食品などに幅広く応用できるような組成における転相温度乳化法についても検討している。

求肥の物性に対する D-プシコースの影響

C-17

○合谷祥一、古田智暖、池田新矢（香川大農・応生科）

【目的】 D-プシコース (D-Psi) は低カロリーであり、さらにインシュリン分泌作用や動脈硬化防止作用などの機能性を有している。求肥は白玉粉、水、糖などを練り上げた餅菓子で、大福餅の皮や練り切りなど主に和菓子の原料として利用されている。本研究では、求肥の物性に対する D-Psi の影響を破断測定および DSC を用いて調べた。

【方法・結果】 求肥は白玉粉、水、糖（スクロース: Suc、トレハロース: Tre、プシコース: D-Psi）を混合し、電子レンジで加熱して調製した。求肥の破断試験はクリープメーター（山電: RE-33005）を用いて、デンプンの糊化に対する糖の影響は示差走査熱量計（Micro-DSC: SETARAM 社製）を用い、25-95℃の範囲で昇温速度 1.2℃/分の条件で調べた。

各糖単独添加の場合、破断荷重は Suc、Tre、D-Psi の順に小さくなり、D-Psi は Suc と比べ、時間経過による破断荷重の増加を抑えた。Suc または Tre の一部を D-Psi で置換した場合、重量の 25% を置換しただけで破断荷重が大きく低下した。これらの結果から D-Psi は少量でも求肥のやわらかさを長持ちさせ、デンプンの老化抑制効果が高いと考えられた。

DSC 測定では、糖不添加、D-Psi、Tre、Suc の順に糊化温度が上昇し、糊化エンタルピーは D-Psi、Tre、Suc、糖不添加の順に増大した。

食用藍藻 *Nostochopsis* sp. からのフィコシアニンの精製と性質

C-18

○橋本恵利¹、山口裕司²、竹中裕行²、藪田行哲¹、渡辺文雄¹
（¹鳥取大院・農、²マイクロアルジェコーポレーション (MAC)）

【目的】 藍藻の *Nostochopsis* sp. は、タイで“ロン”と呼ばれ食用とされているが、詳細な栄養成分や機能性に関する報告はない。そこで本研究では、*Nostochopsis* sp. の有効活用を目的として各種機能性成分を検討している。今回は、*Nostochopsis* sp. の抽出液が青色を呈したため、色素タンパク質のフィコシアニンが多量に含有されていると推定されたことから、本色素タンパク質の精製を試みた。

【方法・結果】 フィコシアニンは、*Nostochopsis* sp. を凍結融解を繰り返して抽出し抽出液中のフィコシアニン含量を測定したところ、菌体乾燥重量あたり 3.2% (w/w) のフィコシアニンが含まれていた。フィコシアニンの精製は、菌体抽出液を硫酸塩析 (20%-50%) 後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより行った。精製標品は電気泳動的に均一であり、SDS-PAGE により、フィコシアニン特有の α 、 β のサブユニット構造を有していた。また、紫外線下で赤色の蛍光を発することや可視吸収スペクトルもフィコシアニンと一致した。*Nostochopsis* sp. の精製フィコシアニンを用いて抗酸化活性を評価したところ、藍藻スピリリナ由来のフィコシアニンと同等の抗酸化活性を有していた。

キャベツ葉中に見出されたフィトセラミド-1-リン酸

C-19

○田中保¹、盛重純一²、喜田孝史¹、安藤千恵¹、木下正文¹、
葛西彩香¹、大本真弓¹、瓜倉真衣³、里内清³、徳村彰¹
(¹徳島大・院 HBS(薬学系)、²福山大・GSRC、³福山大・生命栄養)

【目的】創傷治癒因子・リゾホスファチジン酸(LPA)を含む食物について調べる過程で、TLC 上、LPA とよく似た挙動をとる未知リン脂質をキャベツ脂質中に認めた。本研究ではこのリン脂質の構造解析を行い、その生合成ルートについて検討を加えた。

【方法・結果】キャベツ脂質の二次元 TLC において、酸性リン脂質様の挙動をとる未知リン脂質を認めた。このリン脂質は弱アルカリに耐性であった。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化/質量分析より、リン酸モノエステルと特異的に結合する試薬の Phos-tagTM と複合体を形成することが判明し、このリン脂質がリン酸モノエステル含有スフィンゴリン脂質と推定できた。さらに、このリン脂質の脱アシル体はフィトスフィンゴシン-1-リン酸(PC1P)であること、このリン脂質が C16:0、C22:0、C24:0 および C24:1 の 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸を有することも判明した。以上より、キャベツ葉に見出された未知リン脂質は先の α -ヒドロキシ脂肪酸を有するフィトセラミド-1-リン酸(PC1P)と決定できた。この PC1P はキャベツ葉のホモジネートにホスホリパーゼ D を作用させると生じることから、前駆リン脂質はスフィンゴリン糖脂質であると推定された。

希少糖 D-プシコースを添加した魚肉練り製品の物性及び機能性

C-20

○井上雅貴¹、小川雅廣²、早川茂² (¹香川大院・農研科、²香川大農・応生科)

【目的】希少糖 D-プシコース (Psi) はノンカロリーの単糖であり、卵を原料とした加工食品に添加することにより保水性や抗酸化活性などが向上する。魚肉練り製品の主原料であるすり身には、保存中のタンパク質の変性を防ぐために糖類が添加されている。そこで本研究では、すり身に添加する糖類に Psi を使用してカマボコを作製し、Psi がカマボコの物性及び機能性に及ぼす効果について調べることを目的とした。【方法・結果】魚肉 (マダイ、サワラ、マダラ) を水晒しした後、ミンチにし、5%の各種糖 {スクロース (Suc)、トレハロース (Tre)、D-ソルビトール (Sor)、Psi} と 0.2%のリン酸塩を添加しすり身とした。すり身に 3%の食塩を混ぜてケーシングに充填し、約 90℃で 30 分間加熱してカマボコゲルを調製した。各種カマボコゲルについて、ゲル強度、保水性、抗酸化活性の測定を行なった。Psi 添加カマボコは、4 種の糖の中で最も高いゲル強度を示した。一方、ゲルの離水率は、Psi 添加のものが最も低い値を示したことから、Psi 添加カマボコが最も保水性が高いとわかった。また、カマボコの抗酸化活性は、Psi 添加のものが他の糖を添加したものに比べ高い数値を示し、Psi 添加により高い抗酸化活性が得られるとわかった。Psi はすり身の物性改善、抗酸化性において既存の糖と同等以上の機能を持つことがわかった。

芋や栗の加工後の規格外品を利用した焼酎醸造法の検討

C-21

○村上潤¹、市田英雄¹、加藤麗奈²、上東治彦²、村松久司¹、永田信治¹

(¹高知大・農、²高知県工技セ)

【目的】高知県で生産し加工されているサツマイモや栗は、焼酎以外にも芋けんぴや菓子製造に利用されているが、その製造過程で多くの規格外品や不要部位が破棄されている。そこで本研究では①芋けんぴ製造でサツマイモの油揚げ後や砂糖を添加した後に出る規格外品を利用した芋けんぴ焼酎、②菓子製造の過程で出る栗の不要部位を利用した栗焼酎、など地場産品を活用した焼酎の醸造法について、特に原料とその処理条件を比較検討した。

【方法・結果】焼酎の製造方法は、一次モロミで仕込水に白麹、乾燥酵母 S-2 を入れて 25℃で 5 日間発酵させ、二次モロミで仕込水と原料を加えて 25℃で 7 日間発酵させた後に蒸留することで行った。①芋けんぴ焼酎は、麹量、芋けんぴの添加形態、蒸留方法について最適な条件を検討した。その結果、無蒸煮の芋けんぴを用いて、麹歩合 54%、モロミは遠心分離せずに減圧蒸留した芋焼酎が、他の方法で製造した芋焼酎よりも豊富な香気成分を持ち、官能試験で最も良い評価を受けた。②栗焼酎は、栗のペースト採取後の残渣とその後に排出される焦げの部分を用いて仕込み、ペースト化した皮を含まない栗を用いた仕込みと比較した。その結果、残渣や焦げの部分を用いた焼酎は、皮を含まない栗を用いた焼酎に比べ香気成分が減少したが、官能試験では味が濃厚で優れているという評価を受けた。

異担子菌酵母 *Rhodosporidium toruloides* の形質転換系の確立

D-01

○川勝早智, 岡田典子, 渡邊彰, 麻田恭彦 (香川大・農・応用生物科学)

【目的】異担子菌酵母 *Rhodosporidium toruloides* は一倍体期では酵母状単細胞で、また、二核体期では糸状多細胞の形態で生育する。本研究では、この二形性の分子メカニズムを解明するために、まず本菌を対象とする形質転換系を確立することを目的とした。

【方法・結果】真菌類において、コハク酸脱水素酵素 Ip サブユニットに1アミノ酸置換 (His to Leu) が起こると、真菌剤であるカルボキシシンに耐性となることが報告されている。そこで、カルボキシシン耐性をマーカーとする形質転換ベクターの構築を目的として、まず本菌がカルボキシシン感受性であることを確認した。次いで本菌の同酵素遺伝子 (*rsi*、5'非コード領域 1068bp と 3'非コード領域 437bp を含む) を単離して、234 番目の His 残基を Leu 残基に置換するように1塩基置換を施した変異遺伝子 (*rsiH234L*) を作成した。*rsi* 遺伝子は、6カ所のイントロンを含む 1433bp の ORF を持ち、263 アミノ酸残基をコードすることが明らかとなった。作成した *rsiH234L* を pT7Blue2 ベクターに挿入したものを形質転換ベクターとして以下の実験に供した。*R. toruloides* への遺伝子導入方法として、プロトプラスト-PEG 法とエレクトロポレーション法を試みたところ、カルボキシシン耐性となった形質転換株を複数株取得することができた。詳細な形質転換効率について、現在検討中である。

エノキタケの子実体形成過程において発現するラッカーゼの解析

D-02

○山本亮輔¹、渡邊 彰¹、馬替由美²、麻田恭彦¹ (¹香川大・農、²森林総研)

【目的】我々はこれまで、エノキタケの子実体形成には、同菌が培地中に生産するラッカーゼが深く関与することを示唆してきた。本研究では、エノキタケの正常な子実体を形成する株 (正常株) と新たに単離された子実体を形成しない変異株を用いて、子実体形成過程において発現するラッカーゼの解析を行うとともに、エノキタケにおける子実体形成誘起条件である低温処理との関係について検討した。【方法・結果】エノキタケの子実体形成は、木粉と米ぬかを成分とする木粉固体培地を用いて行った。まず、子実体形成過程における正常株と変異株の培地抽出液を用いてラッカーゼ活性の推移を測定したところ、正常株と変異株はともにラッカーゼ活性を示すものの、変異株では正常株において見られる低温処理後のラッカーゼ活性の上昇は観察されなかった。次に、エノキタケは複数のラッカーゼアイソザイムを生産することから、native-PAGE・活性染色法を用いて子実体形成過程でのラッカーゼアイソザイムの発現解析を行った。その結果、正常株において発現している特定のラッカーゼアイソザイムが、変異株においては発現していないことが確認された。また、このラッカーゼアイソザイムは 15℃以下での低温処理によって顕著に誘導されることがわかった。

担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成過程で活性が増大する

D-03 ホスファターゼ

○金子啓祐、馬場裕美、

渡邊彰、麻田恭彦、末吉紀行、亀下勇（香川大農・応生科）

【目的】

真核生物には多様な脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）が存在するが、これまで担子菌の生活環におけるホスファターゼ活性が網羅的に調べられたことはない。今回我々は、担子菌の各成長段階で発現するホスファターゼについて調べた。

【方法・結果】

これまでに当研究室では、蛍光基質である 4-methylumbelliferyl phosphate を用いた電気泳動ゲル内でのホスファターゼ活性の検出法を考案した。本手法により担子菌 *Coprinopsis cinerea* の各成長段階の抽出液を解析したところ、活性が増減する複数のホスファターゼが検出された。本研究では子実体形成に伴い顕著に活性が増大するホスファターゼに着目し、以降の解析を進めた。目的のホスファターゼを MicroRotofor により溶液中で等電点分離したところ、酸性フラクションに分画された。また、そのホスファターゼ活性は酸性条件で高く、塩基性条件で抑制された。これらのことから、担子菌の子実体形成に伴い活性が増大するホスファターゼは酸性ホスファターゼであることが推測された。

担子菌ウシグソヒトヨタケにおける MAPKK kinase アダプター Ste50 ホモログ

D-04 (Cc.Ubc2) とその下流 MAP kinase カスケードの子実体発生への関わり

○中沢威人、近藤浩文、中堀清、鎌田堯（岡山大学・自然科学研究科）

担子菌キノコのモデル生物であるウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) において子実体（キノコ）が発生しない変異体の原因遺伝子を多数同定した。本発表では、出芽酵母や黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) において交配や植物病原性に関与する MAP kinase カスケードの MAPKK kinase (Ste11) のアダプタータンパク質 Ste50(Ubc2) のホモログが変異していた Bam28 株に関して報告する。表現型解析の結果、Bam28 株は交配型決定因子下流に位置する二核菌糸の形成と維持に関する過程（二核化のための核移動・クランプの形態形成）が影響を受けていることが明らかとなった。一方ゲノム情報から、真正担子菌キノコでは Ste11 に大幅な変異がおこっており、Cc.Ubc2 とその下流 MAP kinase カスケードの機能が *S.cerevisiae* や *U.maydis* とは異なっている可能性が考えられた。実際 Bam28 株では、出芽酵母や *U.maydis* で報告されている Ste50 下流の MAP kinase (Fus3, Ubc3/Kpp2) に相当するか、または非常に近いと考えられる MAP kinase のリン酸化が阻止されていた。しかし、それは野生株において交配型決定因子非依存的にリン酸化されていた。これらの結果から、Cc.Ubc2 は二核菌糸の形成と維持に関係する MAP kinase のリン酸化調節に関わっているが、それは交配型決定因子による支配を受けていないことが示唆された。

寒天分解遺伝子の大腸菌へのクローニング

D-05

○小田 達¹、有賀 修¹、井上貴由、久保 元（¹高知工大・環境理工）

【目的】本研究では、寒天分解菌からの寒天分解遺伝子の大腸菌へのクローニングを試みた。遺伝子の解析を行うとともに、生成オリゴ糖を調べた。

【方法・結果】寒天分解菌(*Cellvibrio* sp.)の染色体 DNA を制限酵素でランダムに切断し、pUC19 に結合し、*E.coli* DH 5 α を形質転換した。20mM リン酸緩衝液に添加した、20g/l のアガロースを組み換え大腸菌の粗酵素液で分解した。オリゴ糖の分析には HPLC 及び TLC を用いた。

得られた組換え大腸菌の塩基配列を調べたところ、2種類の異なる寒天分解遺伝子であることが分かった。大腸菌の粗酵素液でアガロースを分解したところ、2糖および4糖、4糖および6糖を主生産物とする混合物であることが分かった。また、NMR 及び MASS を使って調べたところ、得られたオリゴ糖がネオアガロオリゴ糖であり、2種類の遺伝子は β -アガラゼ遺伝子であることが分かった。

枯草菌の転写開始点の塩基種に支配される緊縮制御と孢子形成

D-06

○東條 繁郎、広岡 和丈、藤田 泰太郎（福山大 生命工）

枯草菌の緊縮制御機構には、窒素代謝制御因子 CodY に依存性の制御系と転写開始点の塩基種に支配される制御系の2種があり、後者の制御系について解析した結果、転写開始点近傍（+1+2 : +1 転写開始点）の塩基種に A が有り G が無ければ活性化、A が無く G が有れば不活性化する法則が有ることが分かった。

さらに、緊縮制御を受ける遺伝子と受けない遺伝子の違いについて緊縮制御条件で行なった DNA マイクロアレイ解析の結果と現在までに報告されているシグマ A 依存の転写開始点近傍の塩基種との比較によりこの法則の検証を行なった。その結果、強い緊縮制御を受ける遺伝子は法則に従っていたが、弱い緊縮制御を受ける遺伝子では法則に従っていない遺伝子があった。後者は、他の制御因子の関与が原因だと思われる。

また、以前から緊縮制御（GTP 濃度の低下）による孢子形成の誘導は知られていたが、その詳細については分かっていなかった。DNA マイクロアレイ解析で緊縮制御により活性化を受けると示唆された孢子形成初期のリン酸リレー系 *kinA* の発現解析により *kinA* が緊縮制御により活性化する事が確認され、これまではっきりと分かっていなかった *kinA* の発現誘導条件がヌクレオチド濃度の変化であることが推測された。

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編が病原性に及ぼす影響

D-07

○山崎遼平、斉藤悠希、松永哲郎、加藤昭夫、阿座上弘行（山口大農）

【目的】歯周病原性細菌 *E. corrodens* はその菌体表層に N アセチルガラクトサミンに特異的なレクチン様の付着因子を有し、これが本菌の歯周病原性に関与する。最近、プラスミド上にコードされたリコンビナーゼによって本菌のゲノム再編が起こり、その結果、線毛の消失、レクチン活性の増加、バイオフィーム形成能の増加などが見られた。そこで、ゲノム再編による本菌の上皮細胞への付着能および侵入能への影響を調べた。また、感染時における炎症性サイトカインや接着分子の発現に及ぼす影響も調べた。

【方法・結果】本菌を KB 細胞および Ca9-22 細胞に感染後、付着細菌数、侵入細菌数を調べた。また、感染後の上皮細胞の IL-6 および ICAM-1 の発現量を RT-PCR により調べた。その結果、ゲノム再編により本菌の上皮細胞への付着能が増加したが、侵入能は減少した。侵入能の低下は線毛の消失によるものと推察されたので、線毛が自然に消失した相変異株では侵入能の変化は見られなかった。したがって、ゲノム再編によって線毛以外の侵入因子に変化が起こることが示唆された。また、ゲノム再編した株を感染させた上皮細胞では IL-8 の誘導発現の低下が見られた。しかし、接着分子 ICAM-1 の誘導発現は上昇していた。現在、感染と炎症に及ぼすゲノム再編の影響について、調査中である。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させた鶏卵白リゾチームの構造安定性とカルネキシンとの相互作用との相関

D-08

○興柁祐樹、鶴永雄太、Kazi Mostafizur, 加藤昭夫、阿座上弘行（山口大農）

【目的】カルネキシンはタンパク質の品質管理機構で重要な役割を果たすが、出芽酵母のホモログ Cne1p が高等真核生物と同様に機能しているかは疑問視されてきた。そこで、モデル基質として糖鎖付加型鶏卵白リゾチーム (Lz) を発現させ、出芽酵母における Cne1p の役割を調べた。

【方法・結果】構造不安定化した糖鎖付加 Lz は野生酵母でほとんど分泌しなかったが、 Δ CNE1 酵母では分泌量が顕著に増加した。また、蛍光免疫染色により細胞内局在を調べたところ、野生酵母では不安定型 Lz はほとんど見られなかったが、 Δ CNE1 酵母では強く蛍光シグナルが観察された。また、 Δ CNE1 酵母では Lz の細胞内局在が顕著に変化していた。次に、これらの基質を Cne1p-FLAG と Δ CNE1 株で共発現させ、FLAG 抗体による共免疫沈降を行った。その結果、不安定型 Lz のみ Cne1p との相互作用が観察された。このことから、不安定型リゾチームが Cne1p との相互作用により小胞体に長く滞在していることが示唆された。これらの結果から、出芽酵母のタンパク質品質管理機構においてもカルネキシンホモログ Cne1p が重要な働きをすることが示唆された。

哺乳類の精子形成に関与する遺伝子の発現解析

D-09

○山野好章¹、大山建司² (¹鳥取大農・獣医, ²山梨大医・臨床看護)

【目的】精子形成過程において数多くの遺伝子が秩序だてて発現する。本研究では、精子形成期ラット精巣に発現する遺伝子をスクリーニングし、機能別分類を行っている。今回はCT (Cancer/Testis) 抗原の一つである結腸ガン抗原遺伝子(*Sdcccag8*)に注目した。本遺伝子は結腸ガンにおいて発現するが精子形成期精巣で発現する意義は不明である。そこで本遺伝子の生理機能を推察することを目的として、精巣内発現を解明した。

【方法・結果】7週齢ラット精巣由来のRNAを鋳型としてcDNAクローニングを行った。この遺伝子情報はNM_177929で登録されている。ノーザンおよびウェスタン分析の結果、その発現は精巣特異的であり、正常結腸を含めて他の組織での発現を認めなかった。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、精母細胞で発現を認めた。immunohistochemistryの結果からは精母細胞に加えて円形精細胞でも発現を認めた。以上の結果より、*Sdcccag8* 遺伝子産物は精巣特異的に、精母細胞から精細胞に分化する際の減数分裂期に重要な機能を果たしていることが推察される。*Sdcccag8* 遺伝子産物にはcoiled-coil構造の存在が明らかになっており、結腸ガンと精細胞共通の遺伝子発現制御に関与していることが推定される。今後、本遺伝子産物が関与する発現制御機構を解明することが重要となる。

ビタミンB₁₂アルキルアミン誘導体を用いたビタミンB₁₂欠乏線虫

D-10

C.elegans の調製法の検討

○大塚賢二、西谷南、安井麻里子、

美藤友博、薮田行哲、一柳剛、河野強、渡辺文雄(鳥取大院・農)

【目的】現在ビタミンB₁₂(B₁₂)欠乏症発症メカニズム解明のためにB₁₂欠乏動物が用いられているが、その調製には多大な労力・時間・コストが必要である。そこでB₁₂特異的阻害剤を開発しB₁₂欠乏動物の簡便な調製法を確立することを目的とし、ヒトのモデル生物である線虫*C.elegans*を用い既存のB₁₂阻害剤であるB₁₂[c-lactam]とB₁₂アルキルアミン誘導体の比較検討を行った。

【方法・結果】M9培地を用いて培養した大腸菌*E.coli*をB₁₂制限食餌とした。B₁₂(100μg/l)を添加した培地上で生育させた線虫をコントロール線虫とし、このコントロール線虫をB₁₂アルキルアミン誘導体(100μg/l)およびB₁₂[c-lactam]を添加した培地にて生育させ、B₁₂依存酵素活性等に及ぼす影響を検討した。B₁₂アルキルアミン誘導体を添加した培地で生育させた線虫ではB₁₂依存性酵素メチルマロニルCoAムターゼ活性の顕著な低下が見られたが、B₁₂[c-lactam]では全く阻害されなかった。B₁₂欠乏線虫の調製時にはB₁₂制限食餌で5世代継代(15日間)飼育することが必要であったが、B₁₂アルキルアミン誘導体を用いれば1世代目(3日)で欠乏状態を示したことから、短期間にB₁₂欠乏動物を調製することができる可能性が示唆された。現在、その他B₁₂関連バイオマーカーの測定を行っている。

線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫休眠を制御する新経路の探索

D-11

大道由香里¹, 合田憲司¹, 松永洋平², 岩崎 崇^{1,2}, 〇河野 強^{1,2}

(¹鳥取大農・生物資源科学, ²鳥取大院・連合農学)

【目的】線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫休眠は、環境因子を認識する cGMP シグナル、それに続くインスリン様シグナル・TGF- β シグナル、両シグナルを統合するステロイドホルモンシグナルによって制御されと考えられている。ゲノムプロジェクトの結果から、インスリン受容体タンパクは1種のみ存在するが、インスリン様分子は40種存在することが示唆されている。本研究では、インスリン様分子の新たな受容体を同定ならびにその幼虫休眠制御機構を解析することを目的とした。

【方法・結果】哺乳動物の IGF-II 受容体（膜1回貫通型 GPCR）の相同遺伝子を WormBase で検索したところ、K03A1.2 を見出した。この遺伝子の機能を抑制 (RNAi knockdown)・破壊 (TMP/UV 法)したところ、休眠誘導条件下（休眠誘導フェロモンを添加）で対照区より幼虫休眠率が上昇した。次に、幼虫休眠を制御する既知のシグナルとのクロストークを検証するために、個々のシグナルの鍵遺伝子の機能抑制を行い、休眠率上昇が維持されるかどうかを検討した。その結果、K03A1.2 からのシグナルは、既知のインスリン様シグナルならびに TGF- β シグナルとは独立してステロイドホルモンシグナルへ統合する可能性が示された。

ビートファイバーの摂取エネルギー低下効果と肥満傾向性の関係

D-12

〇小原祐香、森裕貴、藤田悠祐、水重貴文、岸田太郎、海老原清

(愛媛大院農・生資)

【目的】我々は、ビートファイバー (BF) が摂取エネルギーを低下させ体脂肪蓄積を抑制することを見出しこの機構を検討している。この BF の摂取エネルギー低下効果は、高脂肪食摂取による体重増加が著しい（肥満傾向性）ラットにおいて顕著に見られる傾向にあり、食餌性肥満 (DIO) の傾向が高いほど摂取エネルギーの低下に対して BF が効果的であることが示唆された。これまでに使用した AIN-93G 準拠高脂肪飼料（20%脂質、10%スクロース；AIN-93 飼料）と市販の DIO 飼料を参考にした高脂肪飼料（25%脂質、22%スクロース；DIO 飼料）を用いて、BF の摂取エネルギー低下効果と肥満傾向性との関連について比較検討した。【方法・結果】実験Ⅰ：5週齢雄 SD 系ラットを搬入後、上記の AIN-93 および DIO 飼料、それぞれの無繊維 (NF) 飼料で1週間環境に馴化させた。それぞれの飼料群を NF および BF 群に分け42日間飼育した。DIO 飼料の方が AIN-93 飼料に比較して、BF の摂取エネルギー低下効果が顕著だった。実験Ⅱ：DIO 飼料群の NF および BF 群に分け33日間飼育した。NF、BF 群それぞれ重度、中度、軽度 DIO に分け解析した。重度、中度 DIO において、BF の摂取エネルギー低下効果が顕著だった。以上より、DIO 傾向性ラットにおいて、BF の摂取エネルギー低下効果が顕著に見られることが明らかとなった。

クルクミンの細胞毒性 –ラット胸腺細胞の自発的アポトーシスに対する影響–
D-13 ○幸泉和樹（徳島大・院・総合科学教育部）

【目的】 サプリメントや代替医薬品としての利用が考えられているクルクミンの細胞毒性を検討する目的で、ラット胸腺細胞に対する作用を調べた。

【方法・結果】 細胞標本：Wistar 種ラットから摘出した胸腺から機械的に胸腺細胞を単離し、細胞浮遊液 (RPMI1640 培地) を調製した。実験方法：蛍光プローブ (propidium iodide、annexin V-FITC) を用いてフローサイトメーター（日本分光 CytoAce-150）により細胞の各種パラメータを測定した。実験結果：クルクミン 10 μ M の濃度で 24 時間培養した場合、細胞致死率は $9.7 \pm 1.3\%$ （平均±標準偏差）から $13.4 \pm 0.9\%$ に増加した。サイズが萎縮した細胞の比率は $38.7 \pm 0.9\%$ から $62.7 \pm 2.0\%$ に増加した。また、phosphatidylserine を細胞膜表面に露出した細胞 (annexin V 陽性細胞) の比率も $28.2 \pm 1.1\%$ から $46.4 \pm 1.2\%$ に増加した。細胞萎縮や phosphatidylserine 露出は apoptosis 初期指標であり、クルクミンは胸腺細胞の apoptosis を促進すると考えられた。しかし、Hypodiploid DNA を有する細胞 (DNA 断裂細胞) の比率は $32.7 \pm 1.0\%$ から $13.6 \pm 2.6\%$ に減少した。これらの結果から、クルクミンは 10 μ M の濃度では proapoptotic と antiapoptotic の両方の作用を示す可能性が考えられた。

Gluconobacter 属酢酸菌のべん毛運動の誘導
D-14 ○薬師寿治¹，窪田真也²，藤井雅子¹，保坂毅²，千菊夫²，松下一信¹
（¹ 山口大学，² 信州大学）

【目的】 酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* は、エタノール、グリセロール、ソルビトールを、それぞれ酢酸、ジヒドロキシアセトン、ソルボースに酸化する。この反応は不完全酸化とも呼ばれ、酢酸菌の大きな特徴の一つである。この酸化は本菌の呼吸鎖につながっているため、この過程によってエネルギー（プロトン駆動力）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り、エネルギー消費システムであると考えられる。私たちは、*G. oxydans* 621H 株がべん毛を用いて運動することを見いだしたが、本菌株におけるべん毛運動の役割に関してはほとんど知見を得ていない。ここでは、べん毛運動の誘導条件を調べた。

【結果と考察】 *G. oxydans* の遊泳能は、エタノールを含む培地、あるいはグリセロールまたはソルビトール濃度の高い培地で培養した際に高かった。1%ソルビトール培地の場合、エタノール非存在下では遊泳しなかったが、1%エタノールを添加すると約 8 割の細胞が遊泳した。低濃度の酢酸でもべん毛運動を誘導したので、エタノールの酸化発酵産物である酢酸が、べん毛運動の誘導に関わる可能性がある。べん毛繊維タンパク質の発現をウェスタンブロットで調べたところ、べん毛運動の誘導時期と重なっていた。

深海由来 *Shewanella* 属細菌のべん毛フック形成遺伝子 *fliK* の比較構造解析

D-15

○仲宗根薫¹、山野由美子¹、Fengping Wang²、Xiang Xiao²、加藤千明³

(¹ 近畿大・工・生化工、² 上海交通大学、³ 海洋研究開発機構)

【目的】*Shewanella* 属細菌は幅広い環境から分離され、様々な表現型を有する微生物である。我々は、深海微生物 *Shewanella violacea* DSS12 株(DSS12)、深海由来で近縁の *S. piezotolerans* WP3 株(WP3)との比較ゲノム解析を行っている。比較遺伝子(産物)のとして、べん毛に着目しその関連遺伝子群の構造解析を行い、本研究では、べん毛フックのサイズ(長さ)を一定にするのに重要な FliK(*fliK*)に着目し、その構造解析を行った。

【方法・結果】FliK(*fliK*)の構造解析の結果、DSS12 では、576aa (1731nt)、分子量 62kDa、アミノ酸組成は、疎水性 43.58%、中性 30.73%、親水性 25.69%、pI=4.45 であった。細菌は、固有のフックサイズ(平均 55nm)を有し、ほとんどの細菌において *fliK* 遺伝子は 1 コピーのみコードされ、サイズ一定性と遺伝子コピー数の一致が観察される。ところが WP3 では本遺伝子はゲノム上に 2 コピー(FliK1、FliK2)見いだされ、FliK1(*fliK1*)は、522aa(1569nt)、分子量 565kDa、アミノ酸組成は、疎水性 43.68%、中性 31.42%、親水性 24.90%、pI=4.35、一方 FliK2(*fliK2*)は、359aa(1080nt)、分子量 38kDa、アミノ酸組成は、疎水性 48.48%、中性 11932.96%、親水性 18.56%、pI=4.95 であった。WP3 は 2 種のべん毛が観察され、それら関連性は明らかではなく現在詳細な解析を進めている。

枯草菌におけるフラボノイドに応答した転写制御機構と標的遺伝子群の生理的機能

D-16

○広岡和文、藤田泰太郎(福山大・生命工・生物工)

【目的】土壌細菌である枯草菌が根圏周辺に存在するフラボノイドに応答して遺伝子発現制御を行い、その環境に如何にして適応するかを知るために、フラボノイド応答性転写制御因子とその標的遺伝子群についての解析を行っている。今回 DNA マイクロアレイ解析の結果を検証することで、鉄イオン取り込み系を司る Fur 転写制御因子のレギュロンメンバーの発現がフラボノイドに応答して誘導されることが示唆されたので、Fur のフラボノイド応答特異性について検証した。【方法・結果】Fur レギュロンの 1 つであるシデロフォア合成に関わる *dhb* オペロンの制御領域に対応する DNA プローブを調製し、これと Fur 組換えタンパク質と混合してゲルシフト解析を行った。十分なバンドシフトが観察される濃度の Fur 存在下で種々のフラボノイドを濃度を変化させて系に添加し、同様の実験を行い、フラボノイドの DNA 結合解除能について調べたところ、クメストロール、カテキン、フィセチン等で結合解除がみられた。DNA プローブに用いたのと同じ領域を *lacZ* 遺伝子に連結した構築を組み込んだ枯草菌株を用いてレポーターアッセイを行ったところ、*in vitro* 系では結合解除効果があったクメストロールおよびカテキンでプロモーター活性の上昇はみられなかったが、フィセチン添加によっては明確な活性上昇が観察された。

分裂酵母のコエンザイム Q 生合成と硫黄代謝系との関連性

D-17

○古田奈々¹, 志岐拓哉¹, 林和弘¹, 戒能智宏¹, 中川強², 川向誠¹

(¹ 島根大生資科・生命工、² 島根大・総科支援センター)

コエンザイム Q (CoQ) は呼吸鎖の必須因子であるが、硫黄代謝にも関与する。分裂酵母では Sulfide (S^{2-}) は Sulfide:quinone oxidoreductase により代謝されるが、CoQ 非生産株ではこの反応が進まず高濃度の硫化水素が発生する。一方、 S^{2-} は Cysteine (Cys) 合成酵素 (Cys1a)、Homocysteine 合成酵素 (Met17) の反応に必要である。CoQ 非生産株では最少培地での生育遅延や多量の硫化水素の発生がみられるが、Cys 添加によりこれらの表現型は抑制される。本研究では、Cys による CoQ 非生産株の表現型抑制の解明を目的とした。Cys 添加の有無による CoQ 非生産株の硫黄代謝遺伝子の発現量を比較したところ、Cys 未添加では *met17* の発現量が顕著に上昇し、Cys 添加ではこの発現量上昇が抑制された。*cys1a* は Cys 添加の有無では発現に変化はみられなかったが、Cys1a が触媒する Cys 合成の基質となる O-acetylserine の添加で最少培地での生育遅延が回復し、CoQ 非生産株でのプラスミドによる *cys1a* の発現では、硫化水素発生量が減少した。以上のことから、CoQ 非生産株で過剰に蓄積した S^{2-} は、*met17* の発現量を上昇させることで代謝しようとしているが、Cys 合成による S^{2-} 代謝も CoQ 非生産株の表現型の抑制に影響しており、Cys 合成経路の寄与も示唆される。

Triacylglycerol を分泌する酵母変異株の解析

D-18

○池本ひとみ、松崎浩明、秦野琢之 (福山大・生命工・生物工)

【目的】我々は、油脂を細胞外へ分泌する微生物の育種を目指している。これまでに *Trichosporon* 属酵母由来の L-12 変異株 (細胞膜を介した細胞内外への triacylglycerol : TG 膜輸送機構を持つ) および *Saccharomyces cerevisiae* 由来の STG1 変異株 (TG を菌体外に漏出) を取得し、これら変異株の TG 輸送機構の解析を行ってきた。

【方法・結果】L-12 変異株の菌体外タンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、3 種類の TG 結合タンパク質が存在することが示された。そのうち 2 種の N 末端アミノ酸配列を明らかにした。現在、遺伝子クローニングを目指している。一方、STG1 株の変異遺伝子を特定するため、*S. cerevisiae* の非必須遺伝子ノックアウトコレクション (YKO、約 4800 株) を用いたスクリーニングを行い、得られた TG 分泌形質を示す候補株について STG1 株との交配試験を行った。その結果、SPC72 が TG 分泌抑制に関与していることが示唆された¹⁾。また、*spc72* は油滴形成に異常を生じることが明らかとなった。

1) 池本ら、日本農芸化学会 2010 年度大会要旨集 p. 221

D-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

○宮本昭弘, 柳本敏彰, 秦野琢之, 松崎浩明 (福山大・生命工・生物工)

【目的】 遺伝子組換え生物の野外での拡散を防ぐため遺伝子組換え生物に条件致死性質や不稔性質を付与することが効果的である。これらの性質の付与は、特定の条件下で染色体からセントロメア配列を切り出して細胞死を誘導することで可能と考えられる。そこで、我々は酵母 *S. cerevisiae* をモデル生物として部位特異的組換えを利用して染色体からセントロメア配列を切り出して細胞死を誘導することを検討した。

【方法・結果】 染色体のセントロメア配列の両側に組換え部位を挿入し、さらにレコンビナーゼ発現プラスミドを導入した株を作製した。レコンビナーゼ遺伝子は、*GAL1* プロモーターの制御下にあり、ガラクトース培地で培養してセントロメア配列を切り出した。まず、一倍体細胞において第IV番染色体からセントロメア配列を切り出すことによって細胞死を誘導できた(プレート培養での生存率: 約 4×10^{-5})。さらに、二倍体細胞で第IV番相同染色体の両方から切り出すことで細胞死を誘導できた。しかし、この生存率は一倍体細胞よりも約 10 倍高かった。そこで、第IV番相同染色体と第V番相同染色体の全てから切り出した結果、生存率は一倍体細胞と同程度に低下した。二倍体細胞で多数の染色体からセントロメア配列を切り出すことで細胞死の効率を向上できた。

D-20 戦国醤菌 *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang* の膜局在性短鎖ポリグルタミン酸：発見と分子解析

○芦内 誠^{1,2}、亀井 亨¹、山城大典²、蓑内 裕¹ (¹高知大院、²愛媛連大)

【目的】 ポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) の生産は枯草菌に近い納豆菌で有名だが、一方で D-グルタミン酸が豊富に含まれていることや細胞表層ではなく培地中に大量に放出されること等、生理的役割や生合成機構に関して不明な部分も少なくない。今回、納豆菌のみならず枯草菌にも PGA と思われる物質が存在し、それは菌体外ではなく膜中に局在する等、その生理に関する新たな知見を得たので報告する。【方法・結果】 枯草菌類の細胞表層は古くから酸性ポリマーに富むことが知られていたが、PGA については好アルカリ細菌のごく一部に存在が報告されているのみであった。しかも納豆菌 PGA とは異なり、これらには D-グルタミン酸が一切含まれていない。納豆菌等の膜局在成分を調査した結果、PGA と思われる酸性成分を発見した。その D-グルタミン酸含有率は最大でも 30%と低かった。鎖長も短くグルタミン酸にして 100 分子程度であった。短鎖 PGA 生産は富栄養培地下でも認められた。亜鉛イオンが短鎖 PGA の膜局在性に重要であることも分かった。遺伝子破壊実験や試験管内ポリマー合成実験の結果から、短鎖 PGA は長鎖 PGA (一万を超えるグルタミン酸分子で構成される高分子物質) の生合成に対し、何らかの補助的作用 (おそらくプライマー様機能等) を発揮するものと示唆された。

D-21 戦国醬菌 *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang* の染色体上に存在する染色体外 DNA 維持遺伝子：発見と生化学的解析

○山城大典¹、芦内 誠^{1,2} (¹愛媛連大、²高知大院)

【目的】微生物の遺伝子を直接改変し有用形質を付与する分子育種法では、多コピー性の染色体外遺伝因子（プラスミド等）がベクターとして主に用いられる。ただし、使用可能な自律複製型ベクターが宿主内で不安定であるため、抗生物質を投入し選択圧を負荷する必要がある。これら薬剤の多用に伴う生態系破壊や生産物の使用制限等が社会問題としてクローズアップされている。そのため、微生物工学分野では物質生産効率の向上とヒトや環境への安全性確保の双方を満たす技術革新が求められている。我々は戦国醬菌の染色体上に存在する *edmS* 遺伝子に extra-chromosomal DNA maintenance と呼ばれる新機能を見いだした。本遺伝子を利用し、抗生物質なしで多コピー性ベクターの超安定化に成功した。この機能は *edmS* 遺伝子にコードされる EdmS タンパク質に依存することが分かったので報告する。【方法・結果】疎水性解析は EdmS が膜タンパク質であることを示した。事実、EdmS は膜に局在していた。次に、*edmS* 遺伝子に変異修飾（フレームシフト変異、N 末端伸長、N 側ドメインの欠失、C 末端伸長、C 側ドメインの欠失等）を加えた。これらをベクター安定性試験に供し、いずれも本機能の著しい低下、或いは完全に消失することを確認した。以上より、EdmS タンパク質は新奇な DNA 維持因子であることが示唆された。

D-22 巨大菌 *Bacillus megaterium* WH320 由来ポリ- γ -グルタミン酸合成オペロンのファンクショナルクローニング

○蓑内 裕¹、山城大典²、芦内 誠^{1,2} (¹高知大院、²愛媛連大)

【目的】巨大菌は高塩環境下で巨大な PGA 分子を生産する。我々は、その興味深い生産特性を調査するため、PGA 合成遺伝子クラスターの同定及び配列解析に取り組んできた。今回、微生物 PGA 生産に係る有益な情報を得られたので報告する。【方法・結果】納豆菌、表皮ブドウ球菌等のグラム陽性菌類、*Fusobacterium* のような陰性菌類、極限環境微生物等、PGA 生産菌は微生物界に広く存在している。真正細菌では 3 つの特徴的な遺伝子群 B-C-A が種を超えて保存されている。4 番目の E 遺伝子は陽性菌独特でありグラム陰性菌には存在しない。分子進化解析を行った結果、巨大菌の遺伝子群は近縁の納豆菌よりもむしろ炭疽菌に近かった。実際、納豆菌は菌体外に PGA を放出する *pgs* タイプ、一方、炭疽菌は PGA を細胞表層に固定し莢膜成分とする *cap* タイプとされている。巨大菌は *cap* タイプであった。*pgs* タイプとは異なり、*cap* タイプでは表層固定化酵素をコードする *capD* 遺伝子が存在するが、巨大菌にはさらに CapD のイソ酵素 CapF をコードする新規遺伝子まで発見された。以上より、巨大菌に見いだされた遺伝子群は先にはないものであることが判明した。具体的には、*capB-capC-capA-capD-capE-capF* からなるこれまでに最長の領域と最多の構造遺伝子を含むクラスター構造であった。

分裂酵母のゴルジ層板に関与するタンパク質の解析

D-23

○船木大伍¹, 松沢智彦², 工藤麻友美¹, 竹川薫², 田中直孝¹

(¹香川大農, ²九大院農)

【目的】ゴルジ体は真核細胞にみられる細胞小器官の一つで，膜構造がほぼ一定の間隔をおいて重なっており，選別輸送や糖鎖修飾の機能を維持していると考えられている．ゴルジ体の層板間にはゴルジマトリックスタンパク質が存在し，ゴルジ体の構造の保持や，輸送機能に重要な役割を担っていることが知られている．分裂酵母のゴルジ体を精製し MALDI-TOF/MS により当研究室で取得された機能未知の coiled-coil タンパク質の【Gmp1 (SPCC569.01) 及び Gmp2 (SPCC569.03)】が同定され，機能解析を行った．

【方法・結果】Gmp1・Gmp2 はいずれも膜貫通領域およびシグナルペプチドがなく，ゴルジ表在性タンパク質に見られる GRAB や GRIP 領域が存在しないことがわかった．ゴルジ体局在に重要な領域を決定するために Gmp1 及び Gmp2 の coiled-coil 領域を削除し，coiled-coil 領域を削除した Gmp1, Gmp2 の局在観察を行った．その結果，coiled-coil 領域を削除すると細胞質中に拡散するため coiled-coil 領域がゴルジ体局在に重要であることが示唆された．また Gmp1 - Gmp2 の相互作用を Yeast Two-hybrid 法を用いて調べた結果，Gmp2 - Gmp2 間でのみ相互作用が見られた．

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	大興産業 (株)
天野エンザイム (株)	大山乳業農業協同組合
アルファー食品 (株)	大山ハム (株)
(株) 井ゲタ竹内	大洋香料 (株)
池田糖化工業 (株)	高塚ライフサイエンス (株)
(株) 猪原商会	(有) タグチ
(株) 大熊	中国ケミー (株)
大塚化学 (株)	帝國製菓 (株)
大塚器械 (株)	鳥取科学器械 (株)
岡山県酒造組合	(有) 友田大洋堂
社団法人岡山県農業開発研究所	日本オリーブ (株)
オハヨー乳業 (株)	(株) 日本総合科学
(株) 海産物のきむらや	白牡丹酒造 (株)
片山化学工業 (株) 岡山営業所	(株) 林原生物化学研究所
カバヤ食品 (株)	備前化成 (株)
機能性食品開発研究所	ひまわり乳業 (株)
杏林予防医学研究所	(株) 氷温研究所
協和発酵バイオ (株)	広島和光 (株) 岡山営業所
キリンビール (株) 岡山工場	(株) 扶桑理化
近畿日本ツーリスト (株)	プロテノバ (株)
久保田商事 (株)	ペロリ
高知酒造 (株)	(有) 丸浅苑
寿製菓 (株)	マルキン忠勇 (株)
(株) サカタ	丸善製菓 (株)
(株) 四国総合研究所	マルトモ (株)
四国乳業 (株)	三島食品 (株)
(株) シマヤ	(株) 宮田薬品
新青山 (株)	(株) 無手無冠
神協産業 (株)	ヤスハラケミカル (株)
(株) 酔心山根本店	(株) やまだ屋
諏訪酒造 (株)	山本薬品 (株)
正晃 (株)	両備ホールディングス (株) 事業開発部
仙味エキス (株)	ルナ物産 (株)
(株) ソフィ	湧永製菓 (株)
(株) 大愛	(五十音順)

2010 年度日本農芸化学会中四国支部大会実行委員会

実行委員長	麻田恭彦
総務・会計	櫻庭春彦、田淵光昭
要旨集	木村義雄、小川雅廣
会場	田村啓敏、吉井英文、佐藤正資、古本敏夫、 高田悟郎、一柳孝司、池田新也
揭示物	森本兼司、吉原明秀
懇親会	渡邊 彰、末吉紀行
広報・HP	田中直孝

連絡先：〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

香川大学農学部応用生物科学科
麻田恭彦

Tel 087-891-3112

e-mail asaday@ag.kagawa-u.ac.jp

支部からのお知らせ

○ 日本農芸化学会中四国支部第29回講演会（例会）

開催日：2011年1月22日（土）

場 所：徳島大学薬学部

世話人：徳村 彰（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）

Tel：088-633-7248, Fax：088-633-9572

E-mail：tokumura@ph.tokushima-u.ac.jp

○ 日本農芸化学会中四国支部創立10周年記念第30回講演会（例会）

開催日：2011年5月21日（土）

場 所：岡山大学一般教育棟

世話人：酒井 裕（岡山大学大学院自然科学研究科）

Tel & Fax：086-251-8203

E-mail：sakahrsh@biotech.okayama-u.ac.jp

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒761-0795

香川県木田郡三木町池戸2393

香川大学農学部内

<http://jsbba-cs.jp>

2010年（平成22年）9月24日発行