

日本農芸化学会中四国支部創立10周年記念
日本農芸化学会中四国支部第35回講演会(例会)
日本農芸化学会中四国支部第22回市民フォーラム

会場: 高知大学農学部

日時: 2013年1月26日(土)

11:00～12:00 支部幹事会 (農学部1号館2階小会議室)

12:00～12:50 参与会 (農学部1号2階大会議室)

13:00～14:05

第22回市民フォーラム

「資源としての高知の植物の魅力」(農学部 5-1 教室)

13:00～13:30

「高知の植物資源戦略と農工医連携」

渡邊高志 (高知工科大学地域連携機構・連携研究センター
補完薬用資源学研究室・室長)

13:35～14:05

「高知の食材で健康未来！」

受田浩之 (高知大学国際・地域連携センター長)

14:15～16:45

第35回講演会(例会)

14:15～14:45

特別講演 (農学部 5-1 教室)

「ビタミン B₆ 酵素の基礎と応用研究」

八木年晴 (高知大学農学部)

14:45～15:05

日本農芸化学会中四国支部技術賞受賞講演 (農学部 5-1 教室)

「機能性食品素材「糖転移ヘスペリジン」の開発

-脂質代謝異常を是正する次世代老化予防食品の創製-

三鼓仁史、山田未佳、荒井紀恵、西浩一 ((株)林原応用研究部)

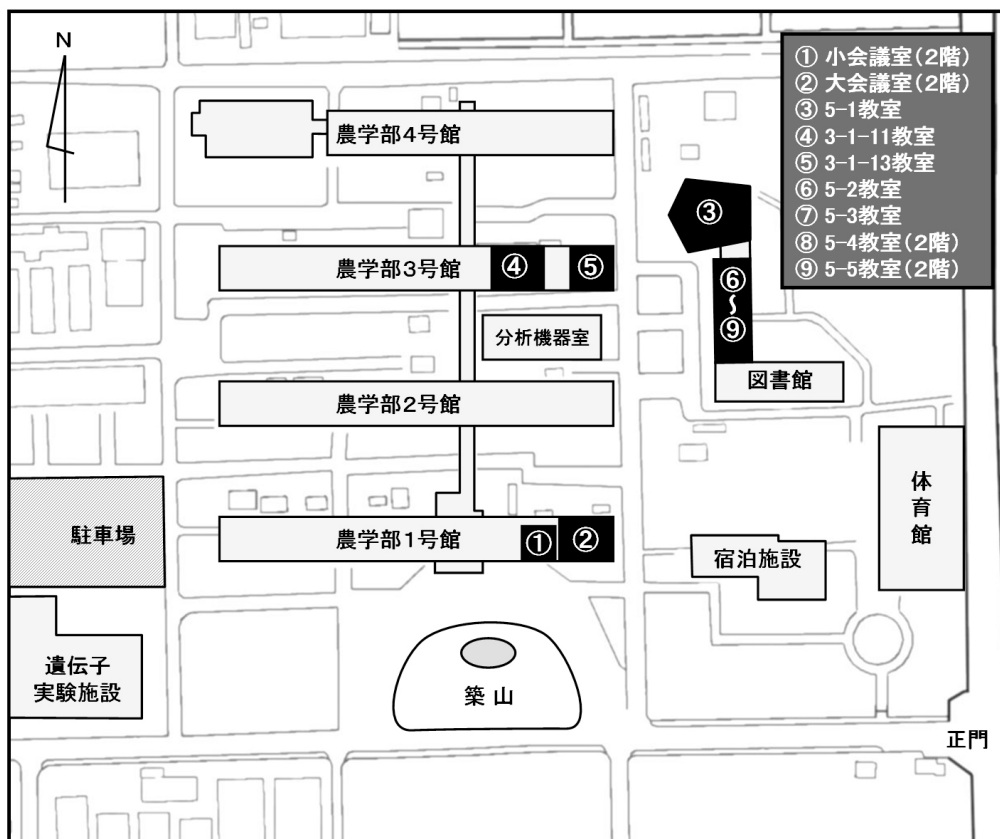
15:15～16:45

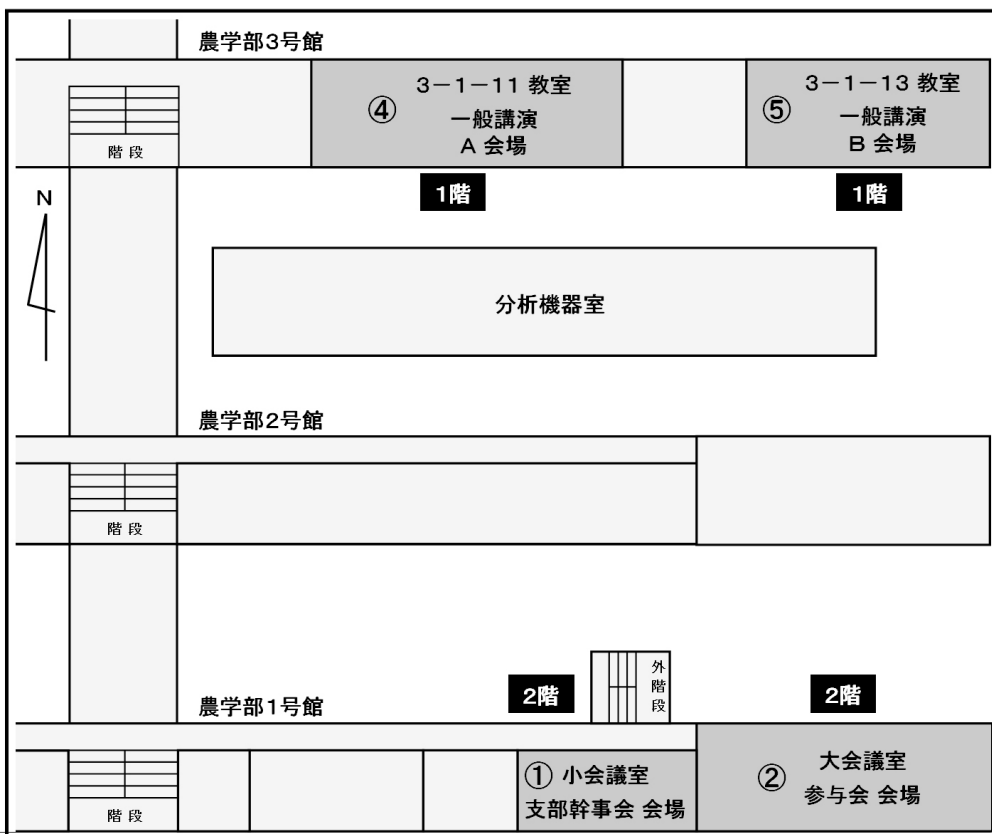
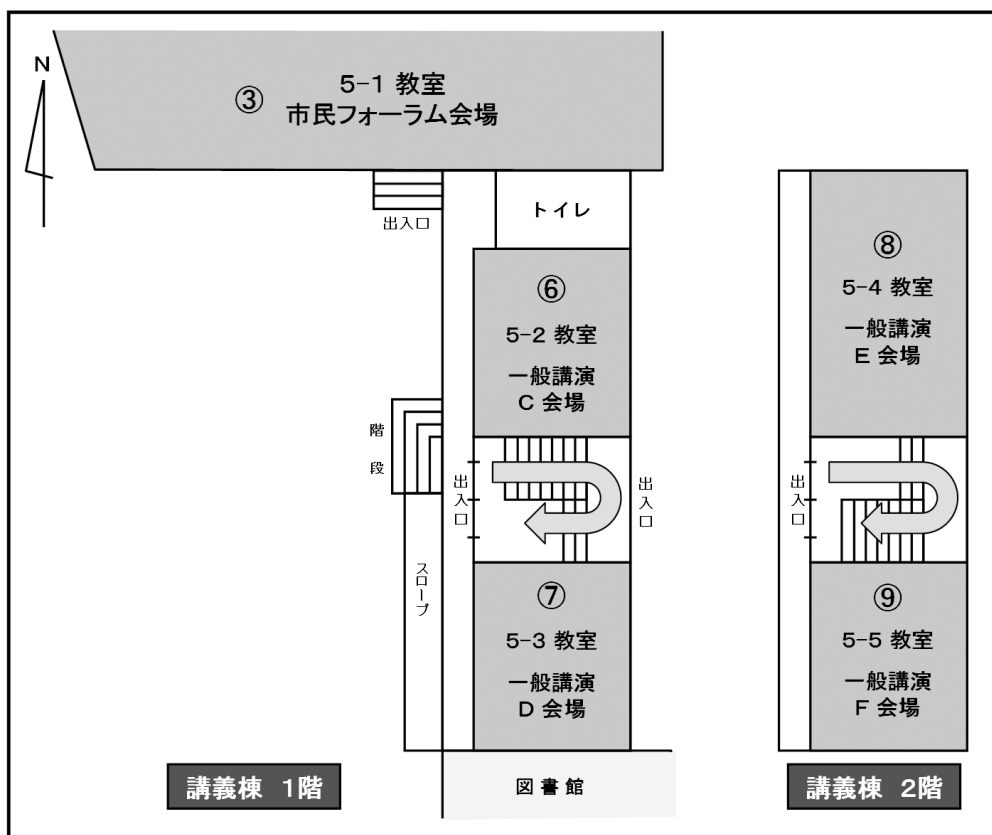
一般講演 (農学部 3-1-11、3-1-13、5-2、5-3、5-4、5-5 教室)

18:00～20:00

懇親会 (土佐御苑)

会場案内図





プログラム

2013年1月26日(土)

11:00～12:00 支部幹事会 (農学部1号館2階小会議室)

12:00～12:50 参与会 (農学部1号2階大会議室)

13:00～14:05

第22回市民フォーラム

「資源としての高知の植物の魅力」(農学部 5-1 教室)

座長:金 哲史 (高知大学)

13:00～13:30

「高知の植物資源戦略と農工医連携」

渡邊高志 (高知工科大学地域連携機構・連携研究センター
補完薬用資源学研究室・室長)

13:35～14:05

「高知の食材で健康未来！」

受田浩之 (高知大学国際・地域連携センター長)

14:15～16:45

第35回講演会(例会)

14:15～14:45

特別講演 (農学部 5-1 教室)

座長:永田信治 (高知大学)

「ビタミン B₆ 酵素の基礎と応用研究」

八木年晴 (高知大学農学部)

14:45～15:05

日本農芸化学会中四国支部技術賞受賞講演 (農学部 5-1 教室)

座長:永田信治 (高知大学)

「機能性食品素材「糖転移ヘスペリジン」の開発

–脂質代謝異常を是正する次世代老化予防食品の創製–

三鼓仁史、山田未佳、荒井紀恵、西浩一 ((株)林原応用研究部)

15:15～16:45

一般講演 (農学部 3-1-11、3-1-13、5-2、5-3、5-4、5-5 教室)

18:00～20:00

懇親会 (土佐御苑)

(講演会終了後、農学部から懇親会会場まで無料バスを片道運行致します。)

一般講演 一覧表

会場		
A	有機・天然物 新技術・新素材 糖鎖工学	A-1～A-4 A-5 A-6～A-7
B	食品 酵素・タンパク質	B-1～B-5 B-6
C	酵素・タンパク質	C-1～C-7
D	酵素・タンパク質	D-1～D-7
E	酵素・タンパク質 植物	E-1～E-3 E-4～E-7
F	微生物（代謝・分離） 微生物（遺伝子・機能解析）	F-1～F-6 F-7

一般講演 座長一覧表

会場			
A	A-1～A-5 A-6～A-7	手林慎一 芦内誠	（高知大） （高知大）
B	B-1～B-3 B-4～B-6	柏木丈弘 横井川久己男	（高知大） （徳島大）
C	C-1～C-2 C-3～C-7	大西浩平 加藤伸一郎	（高知大） （高知大）
D	D-1～D-3 D-4～D-7	渡邊彰 村松久司	（香川大） （高知大）
E	E-1～E-3 E-4～E-7	吉金優 曳地康史	（高知大） （高知大）
F	F-1～F-3 F-4～F-7	池上裕倫 大西浩平	（ソフィ） （高知大）

一般講演プログラム（発表 10 分、質疑応答 2 分）

A 会場（農学部 3-1-11 教室）

「有機・天然物」

15:15

- A-1 軟骨魚類に含有されるコンドロイチン硫酸量と硫酸化パターン
○問田椋介、有馬和也、藤田裕之、入江有美、木戸口望美、君野大介、後藤尚也、高田博哉、田村純一
(鳥取大地域・地域環境)

15:27

- A-2 糸状菌 *Paecilomyces* sp. F30 株が生産する β -*N*-acetylglucosaminidase 阻害物質
○戎義子¹、土田彩²、奥田徹³、神崎浩²、仁戸田照彦²
(¹岡山大院・自然科学、²岡山大院・環境生命、³玉川大学術研究所)

15:39

- A-3 *Vernonia hindii* に含まれる昆虫忌避活性物質の探索
○千川貴大¹、泉実²、中島修平²
(¹岡山大院・自然科学、²岡山大院・環境生命)

15:51

- A-4 天然抗線虫活性物質の探索
○神谷彩絵¹、泉実²、中島修平²
(¹岡山大院・自然科学、²岡山大院・環境生命)

「新技術・新素材」

16:03

- A-5 バイオゲル新素材“ドーパミルポリ- γ -グルタミン酸”の環境調和合成とその反応メカニズム
○岡秒歩、大矢遥那、山本健人、芦内誠
(高知大・農)

「糖鎖工学」

16:15

- A-6 ローヤルゼリーからの TF 抗原含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成
前田恵¹、○田中達也²、木村吉伸¹
(¹岡大・院・環境生命、²岡大・農・農化)

16:27

- A-7 植物抗原性 *N*-グリカン含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成
前田恵¹、○竹田直人²、木村吉伸¹
(¹岡大・院・環境生命、²岡大・農)

B 会場（農学部 3-1-13教室）

「食品」

15:15

- B-1 4-ピリドキシン酸転換 HPLC 法によるヒト赤血球・血漿中のピリドキサール・ピリドキサール 5'-リン酸定量条件の検討と乳中 4-ピリドキシン酸定量法
○水関梨江、八木年晴
(高知大農)

15:27

- B-2 大豆発酵食品中の全ビタミン B₆ 化合物含有量
○大下浩子、水関梨江、八木年晴
(高知大農)

15:39

- B-3 腸内細菌に対する香酸柑橘類の影響
○中島明日香、横井川久己男
(徳大院・総合科学)

15:51

- B-4 四国の民間健康茶の機能—ラジカル消去, α -グルコシダーゼ阻害, キサンチンオキシダーゼ阻害活性の評価
○増田晃子¹、井内智子²、高橋千鶴²、増田俊哉²
(¹四国大・生、²徳島大院・総)

16:03

- B-5 マウス繊維芽細胞におけるビタミン E の膜マイクロドメインへの局在性
○野間絢子、中村俊之、板東紀子、寺尾純二
(徳島大院 HBS 研究部)

「酵素・タンパク質」

16:15

- B-6 オボアルブミン類似タンパク質の精製と加熱による変性
○平田光里、早川茂、小川雅廣
(香川大学 農学部)

C会場（農学部 5-2教室）

「酵素・タンパク質」

15:15

- C-1 *Burkholderia* sp. HME13 由来新奇チオールウロカニン酸代謝酵素遺伝子の同定
○栗田周哉¹、宮奥晴菜¹、松尾英典¹、松井祐士¹、加藤伸一郎^{2, 3}、村松久司^{1, 2}、
永田信治^{1, 2}
(¹高知大・農、²高知大・生命環境、³高知大・総研セ)

15:27

- C-2 植物エンドグリコシダーゼのキトオリゴ糖に対する糖転移活性と部位特異的変異
導入法による加水分解活性の昂進化
○千葉燃¹、前田恵^{1, 2}、木村吉伸^{1, 2}
(¹岡山大・院・自然、²岡山大・院・環境生命)

15:39

- C-3 植物複合型N-グリカンの代謝に関わるイネ α -L-Fucosidaseの精製、基質特異性
解析及び遺伝子同定
○藤重誠¹、前田恵^{1, 2}、小野奈津子¹、木村吉伸^{1, 2}
(¹岡大・院・自然科学、²岡大・院・環境生命)

15:51

- C-4 植物N-グリカン代謝に関与する β -キシロシダーゼの精製と性質検討
前田恵^{1, 3}、○秋山剛²、RAHMAN MD ZIAUR¹、藤重誠³、木村吉伸^{1, 3}
(¹岡大・院・環境生命、²岡山大・農、³岡大・院・自然科学)

16:03

- C-5 Endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) ノックダウン植物の構築とENGase発
現抑制が及ぼす影響
○横内大輔¹、中村浩介²、吉田美穂²、伊藤博孝²、前田恵¹、木村吉伸¹
(¹岡大・院・自然、²カゴメ総研)

16:15

- C-6 未利用海藻に発現する糖タンパク質の糖鎖構造解析と新規レクチンの探索
吉家猛雄¹、○永見匡資²、前田恵¹、木村万里子³、内田基晴⁴、木村吉伸¹
(¹岡大・院・自然科学、²岡大・農、³くらしき作陽・食文化、⁴水産総研セ)

16:27

- C-7 カラギーナン分解酵素の探索と機能解析
○高橋亮¹、大西浩平²
(¹高知大農・遺、²高知大総研セ・遺)

D 会場（農学部 5-3 教室）

「酵素・タンパク質」

15:15

- D-1 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の安定化機構について
○政成美沙¹、若井暁¹、加藤千明²、栗原達夫³、為我井秀行⁴、三本木至宏¹
(¹広島大・生物圏、²海洋機構、³京都大・化研、⁴日本大・文理)

15:27

- D-2 好熱菌および常温菌由来シトクロム *c'* の熱安定性の比較研究
○藤井創太郎、井上寛基、政成美沙、若井暁、三本木至宏
(広大院 生物圏)

15:39

- D-3 進化工学による *Pseudomonas putida* NBRC 100650 由来 *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の耐熱化
○松井祐士¹、山川匠¹、村松久司^{1, 2}、永田信治^{1, 2}
(¹高知大・農、²高知大・生命環境)

15:51

- D-4 海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リシン ϵ -オキシダーゼの精製、性質検討及び結晶化
○赤地周作¹、松井大亮^{2, 3}、岡崎誠司^{2, 3}、浅野泰久^{2, 3}、田村 隆¹、稲垣賢二^{1, 3}
(¹岡山大院・環境生命、²富山県大工・生工研セ、³JST, ERATO)

16:03

- D-5 Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*
○Mugo Andrew Njagi¹、小林淳²、山崎太嗣¹、三上文三²、大西浩平³、吉金優¹、八木年晴¹
(¹高知大農、²京大院農、³高知大遺伝子実験施設)

16:15

- D-6 ピリドキシン 4-オキシダーゼの活性中心残基とその変異
○渡邊江里子¹、Mugo Andrew Njagi¹、藤本芽衣¹、山崎太嗣¹、三上文三²、大西浩平³、吉金優¹、八木年晴¹
(¹高知大農、²京大院農、³高知大遺伝子実)

16:27

- D-7 放線菌由来 cyclo(Leu-Phe) oxidase の凝集性と可溶化の試み
○相澤ゆかり¹、仁戸田照彦²、神崎浩²
(¹岡山大院・自然科学、²岡山大院・環境生命)

E 会場（農学部 5-4 教室）

「酵素・タンパク質」

15:15

- E-1 マラリア原虫ミトコンドリアキャリアータンパク質の機能解析
○藤本竜治¹、野澤彰²、戸澤譲²
(¹愛媛大院・理工、²愛媛大・無細胞セ)

15:27

- E-2 無細胞翻訳系によるチトクロム P450 アッセイ系の構築
○篠原涼¹、野澤彰²、戸澤譲²
(愛媛大院理工、²愛媛大無細胞セ)

15:39

- E-3 等電点電気泳動を利用した Cyclin-dependent kinase-like 5 の新規基質探索
○片山将一、関口茉莉、千賀由佳子、末吉紀行、亀下勇
(香川大農・応生科)

「植物」

15:51

- E-4 セレンストレス下のタバコ培養細胞へのプロリンの影響
○松島大貴、宗正晋太郎、中村宜督、村田芳行
(岡山大院・環境生命科学)

16:03

- E-5 気孔開口阻害におけるアブシシン酸受容機構
○銀叶¹、足立優司¹、叶文秀¹、林真紀²、中村宜督¹、木下俊則²、森泉³、村田芳行¹
(¹岡大院・自然、²名大院・理学、³岡大・植物研)

16:15

- E-6 酵母エリクター誘導気孔閉口における Ca^{2+} 依存性タンパク質キナーゼ 6 の役割
○叶文秀¹、宗正晋太郎¹、中村宜督¹、森泉²、村田芳行¹
(¹岡大院自然、²岡大植物研)

16:27

- E-7 トマト新品種作出に有用な分子マーカーの探索
○平岡幸浩¹、吉金優²、岡村好倫²、古谷拓郎¹、沢村譲二¹、井上孝志¹、樋口慶郎²、沢村正義²
(¹井上石灰工業(株)、²高知大・土佐 FBC)

F 会場（農学部 5-5教室）

「微生物（代謝・分離）」

15:15

- F-1 純粋培養した野生酵母をスターターに用いた発酵種による製パンとその評価
○金子美幸¹、柳裕子¹、藤本ゆかり¹、近藤菜月¹、坂本奈穂¹、茂野光正²、高橋了子³、田所良康⁴、堅田裕子⁵、荒川義人⁶、佐々木ゆり⁷、村松久司^{1,8}、永田信治^{1,8}
(¹高知大・農、²ペロリ、³源水エコファーム、⁴さんかく広場、⁵遠藤青汁、⁶天使大学、⁷フードサイエンスファクトリ、⁸高知大・生命環境)

15:27

- F-2 植物性バイオマス由来の乳酸菌の探索と乳酸飲料への応用
○坂本奈穂¹、平尾智美¹、柳裕子¹、穴井直博²、木村有希¹、森奈津美¹、野尻修佑¹、松川和嗣^{1,3,4}、田辺憲一⁵、山本彰宏⁶、吉村敦⁷、加藤麗奈⁸、上東治彦⁸、村松久司^{1,4}、永田信治^{1,4}
(¹高知大農、²アミール動物病院、³高知大 FS、⁴高知大生命環境、⁵エコロジー四万十、⁶無手無冠、⁷県畜産試、⁸県工技セ)

15:39

- F-3 腸内環境由来の乳酸菌の探索と乳酸発酵餌料への応用
○柳裕子¹、坂本奈穂¹、穴井直博²、木村有希¹、森奈津美¹、野尻修佑¹、松川和嗣^{1,3,4}、田辺憲一⁵、加藤麗奈⁶、村松久司^{1,4}、永田信治^{1,4}
(¹高知大農、²アミール動物病院、³高知大 FS、⁴高知大生命環境、⁵エコロジー四万十、⁶県工技セ)

15:51

- F-4 黒酵母 *Aureobasidium pullulans* による機能性 β -1,3-1,6-グルカンの生産と粉末化
○池上裕倫^{1,2}、中谷麻衣^{1,2}、長瀧充¹、高本美佐¹、尾仲隆¹、村松久司^{2,3}、永田信治^{2,3}
(¹ソフィ、²高知大・農、³高知大・生命環境)

16:03

- F-5 *Paracoccus denitrificans* NBRC 13301 の分子育種による新規代謝系の構築と生育への影響
○高橋誠治、田中三男、三井亮司
(岡山理大・理)

16:15

- F-6 植物由来 *Methylobacterium* 属細菌のメタノールによる生育に及ぼすレアアースエLEMENTの添加効果
○山浦瑞穂¹、日比野歩美²、桑原朋代¹、中川智行²、田中三男¹、三井亮司¹
(¹岡山理大・理、²岐阜大・応生科)

「微生物（遺伝子・機能解析）」

16:27

- F-7** マンガン酸化系を構成する2種の細菌の分離と同定
○周藤慎也¹、小野博史¹、田村隆¹、高田潤²、稲垣賢二¹
(¹岡山大学院・環境生命、²岡山大学院・自然科学)

ビタミン B₆ 酵素の基礎と応用研究

八木年晴 (高知大農)

ビタミン B₆ 酵素という言葉は、一般的には、B₆ 依存性酵素を意味して使われることが多い。しかし、この講演では B₆ 依存性酵素群だけではなく、B₆ の相互転換、吸収、排出にかかわる酵素群、B₆ 生合成酵素群、ならびに B₆ 分解酵素群を含めたものとする。この講演では、これらの 4 種類の酵素群に関する研究でこれから解明されなくてはならない課題を紹介したい。講演を聞いていただいた方々、特に若い研究者や学生さんがこれらの課題に果敢に挑戦しようという気持ちになっていただくことを切に願っている。B₆ 依存性酵素はリガゼを除く 5 種類の酵素群に見られ、184 種類の反応を触媒し、2167 種類の酵素の一次構造が明らかにされている。アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)を中心にして立体構造と触媒機能の相関に関しての知見が得られている。しかしながら、B₆ 依存性アミノ基転移酵素の中には、全反応と半反応において反応特異性と基質特異性が異なるものが存在し、このメカニズムが不明である。また、AspAT は微生物、動物、植物に存在しており、微生物の酵素に比べ、動物や植物の酵素は基質特異性が非常に高くなっている。活性中心の微細構造の違いが原因であると思われるが、はっきりとした説明はできていない。

B₆ の吸収と排泄にかかわる酵素(タンパク質)群の研究は遅れており、構造が決定されたものは出芽酵母由来のものしかない。分裂酵母やその他の酵母、また、動物には B₆ 輸送系が存在しているが構造は明らかとなっていない。また、酵母細胞にピリドキシン (PN) の排出系が存在すること、ピリドキサール (PL) レダクターゼが PL の排出に関与していることを明らかにしたが、動物での排出系は不明である。母乳中には PL が特異的に排出されるようであり、このメカニズムの解明が必要である。細胞内での B₆ 依存性酵素間での B₆ (PLP) の分配は、B₆ の効率的利用を可能とするものであり、その機構の解明が必要であるが、従来の技術では実験が困難であるため、ほとんど手つかずの状態である。

B₆ のデノボ生合成経路は 2 種類ある。PLP がジヒドロキシアセトンリン酸、リブロース-5-リン酸、L-グルタミンから直接合成されるのは経路 I である。現在、PLP は化学合成された PN から合成されている。バイオテクノロジーにより、経路 I の酵素群の発現量を増大させた微生物を用いて PLP を生産することは有益である。

Snell 研究室で、*Pseudomonas* MA-1 に見いだされた B₆ 分解経路 I が根粒菌に存在すること、経路に含まれる酵素群(9 種類)の遺伝子がクロモソームでクラスターとなっていることを見出した。9 種類の酵素を全て大量発現させ、酵素学的性質を明らかにし、4 種類の酵素の結晶構造を明らかにしたが、根粒菌での本経路の生理機能は不明である。構造情報に基づき、基質特異性を改変した酵素を作成し、それを大量発現した菌体を持ちいて、抗糖尿病合併症作用のあるピリドキサミン (PM) の製造を可能にした。また、3 種類の酵素を組み合わせ、B₆ の分別定量法を考案した。食品分析に用いることのできる初の方法である。各種分析の結果、ヒトにおける B₆ 代謝経路は再解析されるべきであることがわかった。

機能性食品素材「糖転移ヘスペリジン」の開発
ー脂質代謝異常を是正する次世代老化予防食品の創製ー

株式会社 林原 ¹応用研究部、²生産技術部
○三鼓仁志¹、山田未佳¹、新井紀恵¹、西 浩一²

ヘスペリジンは柑橘類の果皮に多く含まれるフラボノイドの一種であり、ビタミンPとも呼ばれ、毛細血管を強化し、血管透過性の増大を抑制することが良く知られている。他にも、抗酸化作用、血圧降下作用、抗アレルギー作用などの多彩な生理活性を持つことが報告されており、ヘスペリジンは多機能性食品成分として注目を集めている。しかしながら、このフラボノイドは水溶性が極めて低く、その利用範囲は限られていた。

そこで、当社では、微生物由来の転移酵素シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを用いてヘスペリジンにグルコースを1分子付加し、高水溶性化した「糖転移ヘスペリジン」を開発した。糖転移ヘスペリジンは、小腸 α -グルコシダーゼによってヘスペリジンに加水分解され、その生理活性を発揮することが明らかとなった。この特性を踏まえ、我々は、糖転移ヘスペリジンのヒトにおける有効性検証試験を実施した。その結果、糖転移ヘスペリジンは、血清中性脂肪(TG)の高い被験者に対して効果を発揮し、血清TG値を正常レベルにまで改善する作用を持つことが明らかとなった。また、高TG血症を誘発させたニワトリを用いた試験を実施し、糖転移ヘスペリジン投与が動脈硬化の発症を顕著に抑制することも併せて確認した。本作用は、VLDL代謝異常の是正に起因し、small dense LDLの生成抑制に寄与することが示唆された。さらに本作用は、肝臓からの過剰なVLDL分泌の低下によってもたらされるものと推測された。

この作用機序を明らかにするため、高脂肪食負荷ラットに糖転移ヘスペリジンを経口投与し、種々の脂質代謝パラメーターに与える影響を解析した。その結果、血清TGおよびコレステロール(VLDL + LDL)は高脂肪食負荷によって上昇し、これらの上昇は糖転移ヘスペリジン投与で有意に抑制された。肝臓脂質については、TGとコレステロールエステル(CE)が投与によって有意に減少した。肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現解析では、投与によってfatty acid synthaseのmRNA発現量が有意に低値を示し、かつ、carnitin palmitoyltransferase I、IIのmRNA発現量が有意に高値を示した。以上より、糖転移ヘスペリジンは、肝臓のTGとCEを低減させて過剰なVLDLの合成・分泌を抑制し、血清TGの低下に寄与することが示唆された。また、本作用には、脂肪酸合成系の抑制と脂肪酸 β -酸化系の亢進が関与すると推測された。

これらの知見に基づき、糖転移ヘスペリジンは、TG低減効果を発揮する特定保健用食品(トクホ)の関与成分として消費者庁の許可を取得し、2012年7月に大手製薬および飲料メーカーから3品目のトクホ製品が上市された。これらの製品は、作用機序が新しく、健康食品分野で好評を博している。今後もさらなる研究開発を継続し、人々の健康維持に貢献できるよう努めていきたいと考えている。

本賞の成果は、株式会社林原の多くの共同研究者、関連部署の皆様の尽力に負うところが多かったことを付記し、ご協力頂いた皆様にこの場を借りて感謝申し上げます。また、本賞にご推薦頂きました先生方に厚く御礼申し上げます。

軟骨魚類に含有されるコンドロイチン硫酸量と硫酸化パターン

A-1 ○問田 椋介、有馬和也、藤田裕之、入江有美、木戸口望美、君野大介、
後藤尚也、高田博哉、田村純一 （鳥取大地域・地域環境）

【目的】 コンドロイチン硫酸は、関節痛の改善や角膜表皮の保護に有効な物質として知られており、健康補助食品などにも利用されている。しかし、現在コンドロイチン硫酸の資源として利用される生物は、保護動物であったり感染症が危惧されるものが多く、資源として不安定である。そこで本研究では、これらに代替しうる生物としてエイに注目し、コンドロイチン硫酸の構造および含有量を明らかにし、資源としての利用を検討する。

【方法・結果】 今回はアカエイをはじめとする小型のエイ 3 種を分析対象とすることとした。比較としてアオザメをはじめとする大型のサメ 4 種についても、エイと同様の手順で分析した。これらの生物をいくつかの部位に分け脱脂、乾燥し、酵素によってタンパク質を分解した。その後エタノールで沈殿分離し、沈殿物を DEAE セルロースカラムとゲルろ過で精製した。得られた精製糖鎖を、コンドロイチナーゼ ABC を用いて二糖単位に分解し、HPLC により二糖の硫酸化パターンを解析し、コンドロイチン硫酸の含有量を算出した。

糸状菌 *Paecilomyces* sp. F30 株が生産する β -N-acetylglucosaminidase 阻害物

A-2 質 ○戒義子¹、土田彩²、奥田徹³、神崎浩²、仁戸田照彦²
(¹岡山大院・自然科学, ²岡山大院・環境生命, ³玉川大学術研究所)

【目的】我々は、キチン分解酵素の 1 つである β -N-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) 阻害物質の探索を行い、糸状菌 4 菌株を選抜した。このうち、糸状菌 *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA87 株が強力な GlcNAcase 阻害物質 *pochonicine* とその類縁体を生産することを明らかにした¹⁾。今回、TAMA87 株の次に生産性が高いと考えられた糸状菌 *Paecilomyces* sp. F30 株を用いて活性化合物の精製・単離を試みた。

【方法・結果】*Paecilomyces* sp. F30 株の固体培養により得られた培養物の MeOH 抽出液を出発物として溶媒分画・各種カラムクロマトグラフィー・陽イオン交換 HPLC により活性化合物の精製・単離を行った。その精製過程における部分精製物を用いた GC-MS 分析から活性化合物が *pochonicine* であることが示唆された。さらに単離した化合物の HPLC 分析を行った結果、得られたピークの保持時間からも本化合物が *pochonicine* であることが支持された。その一方で TAMA87 株において 3 種類以上の生産が確認されている *pochonicine* 類縁体はほとんど検出されなかった。このことから、TAMA87 株と F30 株はどちらも *pochonicine* を生産しながらも、その類縁体生産は異なることが示された。

¹⁾H. Usuki, T. Nitoda, H. Kanzaki, *et al.* *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 7248-7253 (2009)

Vernonia hindii に含まれる昆虫忌避活性物質の探索

A-3 ○千川貴大¹, 泉実², 中島修平² (¹岡山大学院・自然科学,²岡山大学院・環境生命)

【目的】現在、貯穀害虫による食害対策として、リン化アルミニウムなどによる燻蒸処理が行われている。しかし、「食の安全性」や「環境保全」の観点からこれらの薬剤を用いない新たな防除方法の開発が望まれている。その一つとして、忌避活性物質を用いた防除は安全性が高く、有効な方法であると考えられる。本研究では、新たな防除方法の開発のために、代表的な貯穀害虫であるコクヌストモドキを用いて、その忌避活性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】コクヌストモドキの忌避活性物質に関しては、これまでにいくつか報告例が挙げられているものの、実際の防除法に応用できるほどの有効な物質は見出されていない。そこで、新たな試験方法によるスクリーニングを行うため、「四方向嗅覚計」を開発した。まず、炭化水素類について調べた結果、n-tetradecane と n-heptadecane に忌避活性を確認した。一方、植物抽出物のスクリーニングを行った結果、キク科植物である *Vernonia hindii* の Hexane 抽出物が活性を示した。現在、シリカゲルクロマトグラフィーなどを用いて分画・精製し、含まれる忌避活性成分について検討している。

天然抗線虫活性物質の探索

A-4 ○神谷彩絵¹, 泉実², 中島修平² (¹岡山大学院・自然科学,²岡山大学院・環境生命)

【目的】松が急激に枯損する「松枯れ」はマツノザイセンチュウが主な要因となって引き起こされる。防除策として、媒介昆虫マツノマダラカミキリの殺虫剤空中散布が行われており、また線虫に対しては、樹幹注入剤などが用いられている。しかしこのような薬剤は周辺環境への配慮が必要であり、また薬剤耐性を持つ個体の出現も危惧される。このような背景から、より効果的で安全かつ安価な防除対策が求められている。本研究では抗線虫薬剤開発のために、植物由来の活性成分の探索を行った。

【方法・結果】生物試験(綿球試験法)の結果、熱帯植物 *Brucea sumatrana* の乾燥果実のメタノール抽出物に抗線虫活性が認められたため、この抽出物を水可溶部と酢酸エチル可溶部に分画したところ、両可溶部とも活性を示した。このうち酢酸エチル可溶部を順相及び逆相シリカゲルクロマトグラフィーなどを用いて精製し、抗線虫活性を示す画分を得た。現在、この画分より活性成分の単離を行い、各種機器分析による構造解明を試みている。

バイオゲル新素材“ドーパミルポリ- γ -グルタミン酸”の環境調和合成とその A-5 反応メカニズム

○岡 秒歩, 大矢遥那, 山本健人, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】接着は我々の身の回りで常に起こっている現象であり、事実、産業的に利用されている場面も少なくない。我々は、貝類の水中接着器官がカテコール基に富むタンパク質で構成されていることに着目し、該分子構造を納豆等の粘着性高分子として知られるポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) に導入したバイオゲル新素材“ドーパミルPGA”を開発した。最近、自己修復性超吸水ゲルとしての特性まで示された¹⁾。今回、環境調和の指向に適う新合成法を確立した。その反応メカニズムについても興味深い示唆を得たので報告する。

【方法・結果】本合成法は先に開発したPGAイオンコンプレックス (PGAIC)¹⁾を初発物質として用いるところに特徴がある。実際、PGAICのアルコール溶液とドーパミンをはじめとする修飾物質のアルコール溶液を単純混和するだけで目的に達することを明らかにした。ドーパミン構造類縁体を代替物質として用いた合成実験を実施したところ、本PGA修飾反応にアミノ基の存在は必須、芳香環も重要であること、水酸基が存在することでゲル性能が高まることが示唆された。以上より、ドーパミンはこれら構造的要件の全てを満たしているため、PGAの高性能ゲル化には特に有効であるとの結論に達した。

1) M. Ashiuchi *et al.*, The 9th SPSJ International Polymer Conference 2012 (Kobe, Japan), Preprint 14C13, pp. 148.

ローヤルゼリーからの TF 抗原含有糖ペプチドの多量調製法の確立と A-6 ネオグリコペプチドの合成

前田 恵¹, 〇田中 達也², 木村 吉伸¹(¹岡大・院・環境生命 ²岡大・農・農化)

【目的】我々は、ローヤルゼリー(RJ)糖タンパク質から腫瘍抗原 (TF-抗原、Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc)ユニットを非還元末端に持つ新規構造 N-グリカンを見出すとともに、TF-抗原ユニット生合成に関わる β 1-3GalT 遺伝子の同定及び酵母を用いた遺伝子発現系を確立している。本研究では、TF-抗原ユニットを利用した抗腫瘍抗体の作製や生理機能解析を目的として、TF 抗原含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成を試みた。

【方法・結果】RJ 凍結乾燥品を還元 CM 化後、アクチナーゼ E 処理を行った。次いで、ゲルろ過、Con A アフィニティクロマト、Shodex-NH2 樹脂によって糖ペプチドを精製した。精製糖ペプチドのアミノ酸配列は Asn 一残基のみであったが、糖鎖構造解析からは、TF-抗原を有する複合型糖鎖は存在するものの高い構造不均一性が確認された。そこで、Endo-H 処理によりハイマンノース型及びハイブリッド型糖鎖を完全に除去し、糖ペプチドの α -アミノ基を N-アセチル化後、TF-抗原あるいは Lacto-diNAc 構造を有する糖ペプチド (~100 mg) を調製した。次いで、調製糖ペプチドを WSCD によりポリリジン(PL)にカップリングさせ、ゲルろ過によりグリコシル化 PL を得たが、PL へのカップリング効率が低い (14%) ため、現在、効率的なカップリング反応条件を検討している。

A-7 植物抗原性 *N*-グリカン含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成

前田恵¹, ○竹田直人², 木村吉伸¹ (¹岡大・院・環境生命, ²岡大・農)

【目的】我々は、植物抗原性 *N*-グリカンの骨格構造 ($\text{Man}_3\text{Fuc}_1\text{Xyl}_1\text{GlcNAc}_2$, M3FX)が、スギ花粉症患者 Th2 細胞からの IL-4 産生を抑制することを見出し、抗原性糖鎖の薬剤利用への基礎研究を進めている。しかしながら、構造均一な植物抗原性糖鎖を有する糖ペプチドの多量調製は極めて困難であり、植物抗原性糖鎖の免疫活性の分子機構解明の障害となっている。本研究では、当研究室で開発した植物抗原性 *N*-グリカン含有糖ペプチドの調製法に改良を加えるとともに、免疫活性解析に向けたネオグリコペプチドの合成を試みた。

【方法・結果】銀杏種子貯蔵タンパク質を還元カルボキシメチル化後、アクチナーゼ E 消化により糖ペプチドを調製した。次いで、ゲルろ過を繰り返すことで糖ペプチドを部分精製した後、Shodex NH₂-P 樹脂を用いた親水性クロマト条件を検討することで均一構造の糖鎖を有する糖ペプチド精製 (~100 mg) に成功した。得られた糖ペプチドは、アミノ酸分析結果から Asn 残基のみを有する Asn-糖ペプチドであり、結合する糖鎖の 90%が M3FX 構造を有することが分かった。残りの糖鎖構造は、非還元末端に GlcNAc 残基を有する複合型糖鎖であったが、 β -GlcNAc α se 処理により、100% M3FX 構造を有する糖ペプチドへ変換できた。現在は精製糖ペプチドを用いてネオグリコペプチドの合成条件を検討している。

B-1 4-ピリドキシン酸転換 HPLC 法によるヒト赤血球・血漿中のピリドキサル・
ピリドキサル 5'-リン酸定量条件の検討と乳中 4-ピリドキシン酸定量法
○水関梨江、八木年晴（高知大農）

【目的】ヒトは一日に約 1.3 mg のピリドキシン（PN）を摂取し、肝臓でこれを補酵素型 B₆ であるピリドキサル 5'-リン酸（PLP）とピリドキサル（PL）に転換し、これらをプラズマと赤血球経由で筋肉その他の臓器に運搬しているとされる。当研究室で分析した結果、食品中には PN がわずかししか含まれないことが明らかとなり、この経路の再考が求められている。また、プラズマと赤血球中の PL と PLP、特に PL の濃度に関して確認が必要とされている。また、日本人母乳中の 4-ピリドキシン酸（4-PA）の濃度も報告されていない。今回、高感度な 4-ピリドキシン酸転換 HPLC 法によりこれらの濃度を明らかにした。

【方法・結果】食品に比べ、プラズマと赤血球中は比較的低濃度の PL と PLP を含み、かつ蛍光性夾雑物が多いため、分析試料の調製に高濃度の TCA を用いる必要があった。日本人男性のプラズマ中の PL は 52 ± 8 nM であり、PLP は 17 ± 5 であった。また、赤血球中の PL は 177 ± 3 であり、PLP は 53 ± 5 nM であった。つまり、プラズマ、赤血球共に PL の濃度が PLP の濃度の約 3 倍であることがわかった。牛乳と母乳中の 4-PA のイソクラティック HPLC による分析が可能となった。牛乳中には母乳の約 10 倍の 4-PA が含まれていた。日本人母乳中の 4-PA 濃度は米国人母乳中のそれと大きな差は認められなかった。

B-2 大豆発酵食品中の全ビタミン B₆ 化合物含有量
○大下浩子、水関梨江、八木年晴（高知大農）

【目的】現在食品成分表にはビタミン B₆ の含有量としてピリドキシン（PN）当量が表記されている。この値には B₆ 栄養効果が約半分程度しかないピリドキシン-β-グルコシド（PNG）が含まれていること、塩酸加水分解時における B₆ の分解ならびにリン酸型 B₆ の不十分な加水分解により正確に定量されていないこと等の問題がある。当研究室で開発した 4-ピリドキソラクトン（4-PLA）転換 HPLC 法は食品中全 B₆ 化合物を分別定量できるため、各種食品中の B₆ を分析している。これまでの結果から、魚肉の食品成分表の値は魚肉中の実際の B₆ 濃度の約 50% となっていることを明らかにした。今回、大豆発酵食品中の B₆ 含有量を測定した。【方法・結果】味噌は 1%（w/v）になるよう 0.1 M HCl に溶かし、TCA で除タンパクした後、中和し、4-PLA 転換のための酵素反応に供した。醤油は 1%（v/v）になるように 0.1 M HCl に溶かし、同様に処理した。八丁味噌、信州味噌、西京味噌（2 種）のなかで、PNG を含めても除いても B₆ 含有量が最も高いのは八丁味噌であった。いずれの味噌でも PNG の含有量が最も高く、ついでピリドキシン 5'-リン酸（PNP）と PN であった。抗糖尿病合併症機能のあるピリドキサミンとピリドキサミン 5'-リン酸の総量が最も高いのは、信州味噌であった。濃口醤油では PNG よりも PNP の含有量が高かった。

【目的】 スダチや柚子などの香酸柑橘類は、食品に風味やアクセントを与えると共に、健康を増進する様々な効果が知られている。一般に、香酸柑橘類は酸味が強いいため殺菌作用も期待されるが、レモンの精油でも殺菌効果が低く、加熱との併用が必要とされている(Espina et al., Food Cont., 22:896-902, 2011)。本研究では、腸内細菌に対する香酸柑橘類の影響を検討した。

【実験材料と方法】 食中毒細菌として遺伝的に異なる 3 株の *Escherichia coli* O157, 6 株の非病原性大腸菌, その他の腸内細菌の 5 株, 乳酸菌・ビフィズス菌として 3 株を使用した。腸内細菌は Luria-Vertani (LB) 培地, 乳酸菌は MRS 培地又は BCP 寒天培地, ビフィズス菌はビフィズス菌培地 (NBRC385) を用いて定常期まで培養した。香酸柑橘類としては、スダチ, 柚子, レモンを使用した。

【結果】 大腸菌 O157 に対しては、使用した香酸柑橘類の中でスダチ果汁が比較的高い殺菌作用を示した。本菌のペロ毒素の生産性もスダチ果汁により抑制される傾向がみられた。その他の細菌は、菌株によってスダチ果汁に対する感受性が異なった。香酸柑橘類の精油成分リモネンは腸内細菌に対する殺菌作用が低いと思われた。

四国の民間健康茶の機能—ラジカル消去, α -グルコシダーゼ阻害, キサンチンオキシダーゼ阻害活性の評価

【目的】 日本の地方には、古からの伝承に基づく民間食薬草があり、四国にも多くの食薬草が伝えられている。本研究では、地域食資源の有効利用の観点から、民間で栽培または採集され、実際に健康目的で販売されているいわゆる健康茶を入手し、生活習慣病とのかかわりがある 3 種の活性により評価することを目的とした。【方法・結果】 50 種類の健康茶を四国内で収集し、熱水抽出、凍結乾燥したものについて、DPPH ラジカル消去能, α -グルコシダーゼ阻害活性, キサンチンオキシダーゼ阻害活性を評価した。その結果、ラジカル消去能は、相生番茶（販売名で記載）が最も強い活性を示し、続いてヤマモモ, うらじろかし茶であった。 α -グルコシダーゼの阻害活性は、ヤマモモ, しらかし茶, 相生番茶, 柿の葉茶, うらじろかし茶, キンミズヒキに強力な活性が見られた。一方、ラット小腸顆粒を用いた阻害活性は、山桑の葉, くわ茶のみに見られた。キサンチンオキシダーゼ阻害活性は、シソ科の 3 種のお茶（せいそう茶, しそ茶, かきどうし茶）に強く見られたので、その成分を HPLC により比較したところ、3 種のデータは大変よく似ており、かつ主成分は同一であると考えられ、MS^E 分析結果から、ロスマリン酸と予想した。現在、ロスマリン酸の活性への寄与とそれ以外の含有活性物質について検討している。

B-5 マウス繊維芽細胞におけるビタミンEの膜マイクロドメインへの局在性 ○野間絢子、中村俊之、板東紀子、寺尾純二（徳島大院 HBS 研究部）

【目的】ラフトは生体膜上に存在し、皮膚の光老化に関与する膜マイクロドメインである。よって、ラフトに局在する抗酸化物質には効果的な光老化抑制作用が期待される。本研究は、皮膚真皮由来のマウス繊維芽細胞を用いてラフトへの α -トコトリエノール（ α -T3）の局在性を α -トコフェロール（ α -T）の場合と比較検討することを試みた。

【方法・結果】マウス皮膚繊維芽細胞（NIH-3T3）に α -Tあるいは α -T3を添加し培養後、両者の細胞への取り込み量を測定した。密度勾配超遠心分離後、カベオリンをマーカーたんぱくとしてラフト画分と非ラフト画分に分画した。また、 α -Tあるいは α -T3を添加後24時間培養した細胞に methyl- β -cyclodextrin（M β CD）を処理し、ラフト破綻による各画分への α -T・ α -T3の蓄積量の変化を検討した。ラフトあるいは非ラフトモデルのリポソームを作製し、 α -T・ α -T3の蓄積量を測定した。 α -T3は α -Tに比べて多量に細胞に取り込まれることが確認され、M β CD処理によりラフトにおける α -T3の蓄積量が減少する傾向がみられた。また、 α -T3はラフトモデルリポソームに有意に多く蓄積したことから、 α -T3は一部ラフト画分に局在すると考えられた。

B-6 オボアルブミン類似タンパク質の精製と加熱による変性 平田光里○、早川茂、小川雅廣

ニワトリ卵白からイオン交換クロマトグラフィーにより塩基性画分において新たなタンパク質を単離精製できた。部分アミノ酸配列と TOF/MS による分子量検定の結果、オボアルブミン(OVA)類似タンパク質であると判断し、cBPL (Chicken Basic Protein Large)とした。cBPL は OVA と比較し等電点や糖鎖等の数など相違点も多く存在する。そこで、cBPL の構造的な特性を調べ、OVA との相違点の検討を行った。

【方法・結果】

cBPL の加熱変性による溶解性の変化、加熱による表面疎水性（蛍光強度）の変化、示差走査熱量計による変性温度、等電点電気泳動やアクリルアミドゲルによる cBPL の等電点について調べた。その結果、加熱変性 OVA では pH 調整により不溶化するが、加熱変性 cBPL では不溶化しない事が分かった。また、変性温度が 10℃ 近く cBPL の方が低いなど、OVA と変性の仕方が異なる事が分かった。cBPL はアミノ酸配列から見ると、弱酸性の等電点を持つタンパク質であるが、イオン交換クロマトグラフィーや塩基性の等電点電気泳動用ゲルを使用した際、正電荷を帯びた挙動を示す事が分かった。

Burkholderia sp. HME13 由来新奇チオールウロカニン酸代謝酵素遺伝子の同定
C-1 ○栗田周哉¹、宮奥晴菜¹、松尾英典¹、松井祐士¹、加藤伸一郎^{2,3}、村松久司^{1,2}、
永田信治^{1,2} (¹高知大・農、²高知大・生命環境、³高知大・総研)

【目的】エルゴチオネイン (ERT) はチオール基を持つヒスチジンペタインである。これまでに ERT 代謝経路の第 1 段階を触媒するエルゴチオナーゼ (ERT からチオールウロカニン酸への反応を触媒) が報告されたが、代謝経路の第 2 段階以降は不明である。最近、我々は ERT 代謝経路の第 2 段階の反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を同定したので報告する。【方法・結果】*Burkholderia* sp. HME13 のエルゴチオナーゼ遺伝子 (*erg*) の周辺遺伝子を解析したところ、*erg* の上流に *Pseudomonas putida* 由来ウロカナーゼのアミノ酸配列と 46.8% の相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子を見出した。この遺伝子を PCR で増幅し、pSE420U の *Hind*III-*Nde* I 部位に挿入して pSETU を構築した。pSETU で形質転換した *Escherichia coli* JM109 を 100 μ g/ml アンピシリンを含む LB 培地で 14 時間、37°C で振とう培養後、1mM IPTG を加えて、さらに 3 時間振とうして集菌した。集菌体を 20% グリセロールと 5% NaCl を含む 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、氷上で超音波破碎した。粗酵素液からトヨパール DEAE-650M カラム、トヨパールブチル-650M カラム、トヨパール AF-ブルー-HC-650M カラムで目的の酵素を精製した。精製酵素の基質特異性を調べたところ、チオールウロカニン酸に作用し、ウロカニン酸に作用しなかった。

植物エンドグリコシダーゼのキトオリゴ糖に対する糖転移活性と
C-2 部位特異的変異導入法による加水分解活性の昂進化。○千葉 燃¹、前
田 恵^{1,2}、木村 吉伸^{1,2} 1 岡山大・院・自然、2 岡山大・院・環境生命

【目的】ハイマンノース型糖鎖のキトビオース (GlcNAc β 1-4GlcNAc) 間を加水分解するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) は、細胞質におけるミスフォールドタンパク質の小胞体関連分解 (ERAD) において重要な機能を担っている。植物 ENGase は GH Family 85 に属していることから、加水分解活性と糖転移活性の両方を有する酵素であると考えられる。そこで、本研究では当研究室において大腸菌での発現系が確立しているイネ由来 ENGase (Endo-Os) を用いて、部位特異的変異導入による活性部位の同定とキトオリゴ糖鎖に対する糖転移活性の測定を行った。【方法・結果】部位特異的変異導入は、GH Family 85 間のホモロジー解析を基にプライマー設計し、数種の変異体を作成した。大腸菌 (BL21) で発現させ、Ni カラム及び GST カラムを用いて精製後、基質として蛍光標識糖鎖を用いて ENGase 活性を測定した。糖転移活性測定は、糖鎖供与体としてロイヤルゼリー由来のハイマンノース型糖ペプチドを、糖鎖受容体として種々キトオリゴ糖鎖 (GN3-GN6) を用いた。その結果、キトオリゴ糖鎖に対する糖転移活性が確認され、ユニークな糖転移機構の存在が示唆された。一方、分子モデリングから触媒部位近傍に存在すると推定されるチロシン残基の変異体 (Y225F) において加水分解活性の昂進が確認された。

植物複合型 *N*-グリカンの代謝に関わるイネ α -L-Fucosidase の精製,
C-3 基質特異性解析及び遺伝子同定 ○藤重誠¹、前田恵^{1,2}、
小野奈津子¹、木村吉伸^{1,21} 岡大・院・自然科学² 岡大・院・環境生命

【目的】糖タンパク質糖鎖の代謝は植物の分化・成長に重要な影響を及ぼすことが知られているが、植物複合型 *N*-グリカン (PCNG) に特異的に作用する植物 α -L-Fucosidase については、機能特性解析や遺伝子同定が進んでいない。そこで本研究では、イネ培養細胞を材料として用い、PCNG に特異的に作用する α -L-Fucosidase (OsFUC1) の精製を行った。

【方法・結果】OsFUC1 は陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせることで単一に精製された。SDS-PAGE から推測された分子量は約 58 kDa、至適 pH は 6.0、至適温度は 50 °C であった。エドマン分解法による、N 末端アミノ酸配列解析から 8 残基 (AAPTTPPL) を決定し OsFUC1 をコードしている遺伝子は Os04t0560400-01 と推定された。この酵素はルイス A ユニット中の α -1,4fucose 残基や還元末端側 GlcNAc に結合した α -1,3fucose 残基にも活性を示した。 α -1,3fucosidase 活性は Mannose 残基や Xylose 残基がトリミングされた GlcNAc(Fucose)GlcNAc 構造に対してのみ確認された。OsFuc1 は分泌型のルイス A 含有 PCNG だけでなく、液胞に存在するパウチマンノシド型 PCNG の代謝にも関与することが明らかとなった。

植物 *N*-グリカン代謝に関与する β -キシロシダーゼの精製と性質検討
C-4 前田恵^{1,3}、○秋山剛²、RAHMAN MD ZIAUR¹、藤重誠³、木村吉伸^{1,3}
(¹岡大・院・環境生命, ²岡山大・農, ³岡大・院・自然科学)

【目的】植物糖タンパク質には、 β 1-2 Xyl 残基と α 1-3 Fuc 残基が結合する植物複合型糖鎖が遍在する。これら植物に特異的な複合型糖鎖がほ乳類に対して抗原性を示すことは知られているが、植物生理に関わる生理機能に関しての知見はほとんど無い。我々は植物 *N*-グリカン代謝機構を明らかにする研究の一環として、既にトマト果実から β 1-2 Xylosidase を単一精製後、詳細な基質特異性を明らかにしているが、遺伝子構造の同定には至っていない。本研究では、貯蔵糖タンパク質がほぼ 100% 複合型糖鎖を有する銀杏種子に着目し、遺伝子構造同定及び遺伝子発現抑制植物の構築を目的として β 1-2Xyl'ase の精製を試みた。【方法・結果】銀杏種子の脱脂粉末からトリス緩衝液(pH 7.9)によりタンパク質を抽出後、各種クロマトを組み合わせることで、植物複合型 *N*-グリカンに作用する β -Xyl'ase Gb を精製した。酵素活性は、*p*NP- β -Xyl 及び蛍光標識糖鎖 Man1Fuc1Xyl1-PA (MFX) を基質に用いて定量した。得られた β -Xyl'ase Gb は、分子量 約 65 kDa (ゲルろ過)、酸性領域に至適 pH を有し、MFX から β 1-2 Xyl 残基を遊離させることなどから、トマト酵素(67 kDa) と遺伝子構造も同一である可能性が示唆された。

Yokouchi, D., Maeda, M., et al. *Glycoconjugate J.*, (2012) Doi:10.1007/s10719-012-9441-y

C-5 Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) ノックダウン植物の構築と
ENGase 発現抑制が及ぼす影響 ○横内大輔¹, 中村浩介²,
吉田美穂², 伊藤博孝², 前田恵¹, 木村吉伸¹ (¹岡大・院・自然,²カゴメ総研)

【目的】分化・成長中の植物組織には、機能不全タンパク質から ENGase や PNGase の作用により生成した遊離 *N*-グリカンが μ M 濃度で存在する。これらは植物の分化・成長に関わる新しいクラスのシグナル分子であると推定されているが、未だ確証は得られていない。本研究では、植物成長に関わる糖タンパク質糖鎖の代謝機構や遊離 *N*-グリカンの生理機能を明らかにするため、ENGase 発現を抑制した植物体を構築し、ENGase 活性抑制と遊離 *N*-グリカンの構造特性変化が植物成長や果実熟成に及ぼす影響を解析した。

【方法・結果】トマト ENGase 遺伝子情報を基に RNAi 法により遺伝子発現を抑制したトマトを構築した。果実、茎、葉の ENGase 活性を基質として蛍光標識糖鎖を用いて定量した。一方、ENGase KD 株で生成される遊離 *N*-グリカンは、2-アミノピリジンを用いて蛍光標識し、Con A アフィニティー及び RP-HPLC によりハイマンノース型糖鎖を精製した。糖鎖構造は、SF-HPLC によるマッピングと酵素消化法 (α -1,2-Manase, Endo-H) を併用して解析した。その結果、果実では酵素活性がほぼ消失し、還元末端にキトビオースユニットを持つ遊離 *N*-グリカン量の増加が確認された。ENGase KD 株の発芽・成長過程における際立った形態変化は観察されなかったが、果実裂果率の顕著な低下が確認された。

C-6 未利用海藻に発現する糖タンパク質の糖鎖構造解析と新規レクチンの探索
吉家 猛雄¹, ○永見 匡資², 前田 恵¹, 木村 万里子³, 内田 基晴⁴, 木村 吉伸¹
(¹岡大・院・自然科学,²岡大・農,³くらしき作陽・食文化,⁴水産総研セ)

【目的】植物糖タンパク質に結合する *N*-グリカンには、哺乳動物に対して強い抗原性を示すものがあり、その免疫活性の利用に興味を持たれている。本研究では、抗原性 *N*-グリカンの供給源の探索を目的として、未利用海藻中に発現する糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。次いで、腫瘍抗原糖鎖に対して特異性を有する新規海藻レクチンの探索を試みた。

【方法・結果】15 種類の海藻及び海草を加熱処理、ペプシン消化した後、ゲル濾過、陽イオン交換クロマト、SF-HPLC 等により糖ペプチドを部分精製した。次いで、ヒドラジン分解、*N*-アセチル化、ピリジルアミノ化により蛍光標識糖鎖を調製し、糖鎖構造を酵素消化、ESI-MS、HPLC マッピング等によって解析した。その結果、全ての海藻において主要糖鎖は Man₅₋₉GlcNAc₂ 構造を持つ典型的なハイマンノース型糖鎖であり、陸生植物に顕著に発現されるフコース・キシロース含有の植物複合型糖鎖は検出されなかった。一方、海藻レクチンについては、緑藻 (ミル) のアセトン脱脂粉末からタンパク質を抽出後、疎水性クロマト、ゲル濾過等により 2 種類のレクチン (14kDa、40kDa) 精製に成功した。14kDa レクチンはヒト赤血球 (A 型、B 型、O 型) を凝集させる既報のものであったが、40kDa レクチンはニワトリ赤血球とヒト A 型赤血球を特異的に凝集させる新たなレクチンであると考えられた。

カラギーナン分解酵素の探索と機能解析

C-7

○高橋亮¹, 大西浩平² (¹高知大農・遺, ²高知大総研セ・遺)

【【目的】紅藻類が生産する「カラギーナン」は、食料と競合しないバイオ燃料の糖源として有望である。本研究ではカラギーナンを資化する *Bacillus* 属から単離したカラギーナン分解酵素遺伝子をクローニングし、その機能を解析することを目的とした。

【方法・結果】カラギーナンを資化する *Bacillus* 属の培養上清から、カラギーナン分解酵素 CglA を精製し、その N 末端アミノ酸配列を決定した。一方、本菌のドラフトゲノム配列を決定し、N 末端アミノ酸配列を用いた BLAST 解析により本酵素をコードする遺伝子 *cglA* を同定した。塩基配列より予想される CglA の分子量は 146 kDa であり、シグナル配列も有していた。CglA は Glycosyl hydrolase 42 family に属する β -ガラクトシダーゼと相同な領域を持つが、既知のカラギーナン分解酵素との顕著な相同性は見いだせなかった。*cglA* を pTrc99A にクローニングし、大腸菌 BL21 株における発現系を構築した。菌体内より CglA を精製し酵素活性測定を行った。カラギーナンは κ 、 ι 、 λ などいくつかの種類に分類されるが、CglA は少なくとも κ と λ の二種類のカラギーナンに対する分解活性を有していた。これまでに報告されている海洋性細菌由来のカラギーナン分解酵素はいずれも一種類のカラギーナンしか分解せず、本 CglA は複数の基質と反応する最初の例である。

Shewanella 属細菌由来シトクロム *c* の安定化機構について

D-1 ○政成美沙¹, 若井暁¹, 加藤千明², 栗原達夫³, 為我井秀行⁴, 三本木至宏¹
(¹ 広島大・生物圏, ² 海洋機構, ³ 京都大・化研, ⁴ 日本大・文理)

【目的】生物は生息する環境に適応した性質を持つ蛋白質を生産している。一般的に、低温環境に生息する微生物の蛋白質は安定性が低いことが知られている。しかし、低温環境の一つである深海に生息する *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の安定性が高いことを本研究のこれまでの実験で既に明らかにしている。本研究の目的は、深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の安定化機構を解明することである。

【方法・結果】本研究では、深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* の安定性を測定し、浅瀬の同属細菌由来相同蛋白質と比較した。その結果、深海シトクロム *c* は低温環境由来であるにも関わらず安定性が高かった。また、由来する細菌の生育圧力とシトクロム *c* の安定性の間に正の相関があった。このことから、深海微生物が生育圧力に適応した蛋白質を生産した結果、深海シトクロム *c* の熱安定性が高くなったと考えた。また、構造シミュレーションから深海シトクロム *c* に特徴的な 50 番目のアミノ酸がヘムと水素結合することで安定性に寄与している可能性を見出した。このアミノ酸に変異導入し、安定性を測定した結果、野生株よりも安定性が下がることを確認できた。今後は構造決定を行い、深海シトクロム *c* の 50 番目のアミノ酸が実際に水素結合を形成しているか確認する。

好熱菌および常温菌由来シトクロム *c'* の熱安定性の比較研究

D-2 ○藤井創太郎、井上寛基、政成美沙、若井暁、三本木至宏 (広大院 生物圏)

【目的】シトクロム *c'* は細菌から見出される蛋白質である。4 つのヘリックスが束になった筒状構造を持ち、CO や NO を特異的に結合する性質がある。本研究では、好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c'* (PHCP) の熱安定性を調べる。PHCP の比較対象として、常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c'* (AVCP) を用いる。

【方法・結果】PHCP と AVCP はアミノ酸配列が 55% 一致するが、それぞれの構造や安定性に違いが見られた。(1) ヘムがない状態 (アポ型) での CD スペクトル測定から、PHCP は AVCP よりも α -ヘリックス形成能が高いことを明らかにした。(2) 熱変性実験により、ホロ型 PHCP の変性中点 T_m は AVCP よりも 30°C 高い値を示し、PHCP は熱変性に伴う ΔH が非常に大きい特徴があった。AVCP のヘム周辺残基である Gly20 が、PHCP では Ala であることに着目し、AVCP の変異体 G20A を作製した。G20A の T_m は野生型より 9°C 上昇した。(3) Blue Native-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィーから複合体形成時の分子量を推定した。ホロ型 AVCP が 2 量体であるのに対して、ホロ型 PHCP は 3 量体を形成していた。PHCP の 3 量体形成が、熱変性時の高い ΔH として現れた結果であると考えている。

D-3 進化工学による *Pseudomonas putida* NBRC100650 由来 *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の耐熱化

○松井祐士¹, 山川匠¹, 村松久司^{1,2}, 永田信治^{1,2} (¹高知大・農, ²高知大・生命環境)

【目的】*Pseudomonas putida* NBRC100650 の *pp359I* 遺伝子にコードされている DpkA は *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を持ち、医・農薬品合成中間体に有用な *N*-メチル-L-アミノ酸の不斉合成に有効である。これまでに DpkA を用いた *N*-メチル-L-フェニルアラニンの合成が報告されているが、合成開始から約半日で DpkA がほぼ失活することが問題になっている。本研究では、ランダム変異と部位特異的変異による DpkA の耐熱性の改良を試みた。【方法・結果】*pp359I* 遺伝子を pET21a(+)に連結し、pDpkA を構築した。pDpkA を鋳型としてエラープローン PCR を行い、得られた PCR 産物を pUC18 に連結し、*Escherichia coli* JM109 を形質転換した。得られた形質転換体 2,447 コロニーから耐熱性の向上した 2 種の変異型酵素 (V117M、Q302R) を取得し、2 種の変異を合わせた V117M/Q302R も作製した。野生型酵素と 3 種の変異型酵素をそれぞれ Ni-NTA カラムを用いて精製し、45℃ で 30 分間加温した後の残存活性を比べると、V117M/Q302R (89%) > V117M (74%) > Q302R (35%) > 野生型酵素 (3%) となった。また、野生型酵素と変異型酵素では反応に対する温度と pH の影響、基質特異性に大きな違いは見られず、本研究で修得した変異型酵素を用いて *N*-メチル-L-アミノ酸の合成が可能であると考えられた。

D-4 海洋細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リシン ε-オキシダーゼの精製、性質検討及び結晶化○赤地周作¹, 松井大亮^{2,3}, 岡崎誠司^{2,3}, 浅野泰久^{2,3}, 田村隆¹, 稲垣賢二^{1,3} (¹岡山大院・環境生命, ²富山県大工・生工研セ, ³JST, ERATO)

【目的】L-リシン ε-オキシダーゼ(Lys-ε-OX)は L-Lys の ε 位の酸化的脱アミノ反応を触媒し、ε-ケト酸、H₂O₂、NH₃ へ変換する L-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)の 1 種である。LAO は医薬や抗菌剤としての利用が期待され、Lys-ε-OX の研究は基礎と応用両面から注目される。本研究は、海洋細菌 *M. mediterranea* 由来 Lys-ε-OX の構造と機能の解析を目的として行った。

【方法・結果】酵素活性は、H₂O₂ を定量する 4-アミノアンチピリン法を用いて測定した。*M. mediterranea* を培養後、培養液上清を脱塩水で 3 倍希釈した酵素液を DEAE-Toyopearl、Sephacryl S-300HR に供して精製を行い、電気泳動的に単一のバンドを得た。この精製酵素を用いて、種々の性質検討を行った。最適温度は 20℃、最適 pH は 6.0、L-Lys に対する *K_m* 値は 3.5 μM であった。熱安定性は、70℃ 30 分間処理で約 90%の残存活性を示した。NaCl、KCl の添加によって酵素活性が上昇し、EDTA、3-アミノプロピオニトリルにより活性が阻害された。基質特異性は L-Lys に対する活性を 100%として、Nα-アセチル-L-Lys で約 50%、ε-アミノカプロン酸で約 20%の相対活性が確認された。結晶化では、1.6 M 硫酸アンモニウム、10%(v/v) 1,4-ジオキサン、0.1 M MES (pH=6.5)の条件で 2.20Åの分解能を示す赤色結晶 (0.18×0.09×0.02 mm³)を得た。現在単波長異常散乱法(S-SAD 法)での位相決定を試みている。

Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*

- D-5 OMugo Andrew Njagi¹、小林 淳²、山崎太嗣¹、三上文三²、大西浩平³、吉金 優¹、八木年晴¹ (¹高知大農、²京大院農、³高知大遺伝子実験施設)

【Aims】Pyridoxine 4-oxidase (PNOX), an FAD-dependent enzyme in *Mesorhizobium loti* MAFF303099, is the first enzyme in the degradation pathway 1 for pyridoxine (vitamin B₆) and belongs to glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family. Here, we determined the tertiary structure of PNOX and PNOX-pyridoxamine (PM) complex. 【Methods・Results】PNOX with a His₆ tag was overexpressed in *E. coli* JM109 cells and purified with a Ni-NTA agarose column and a QA52 column. Crystallization was done by the sitting-drop vapour-diffusion method at 277 K. The structure was solved by the molecular replacement method. The structures of PNOX and PNOX-PM were determined at 2.2 Å and 2.1 Å resolution, respectively. The overall structure consisted of FAD-binding and substrate-binding domains. The FAD interacts with PNOX protein through a network of hydrogen bonds, which are mainly found in the ribose and pyrophosphate moieties of the FAD molecule. PNOX had an opening socket for access of substrates. In the active site, active site residues were located on the re-face of the isoalloxazine ring of FAD. A proline residue instead of a His or Asn in other GMC oxidoreductase family members was for the first time found in the active site. The binding mode of PM was also determined.

ピリドキシン 4-オキシダーゼの活性中心残基とその変異

- D-6 O渡邊江里子¹、Mugo Andrew Njagi¹、藤本芽衣¹、山崎太嗣¹、三上文三²、大西浩平²、吉金 優¹、八木年晴¹ (¹高知大農、²京大院農、³高知大遺伝子実)

【目的】根粒菌のビタミン B₆ 分解経路の初発の反応を触媒するピリドキシン(PN) 4-オキシダーゼの三次構造を決定した。本酵素の基質特異性を改変すると、補酵素型 B₆ であるピリドキサル 5'-リン酸(PLP)を工業的に生産するために利用できる可能性が高い。そこで、本酵素の活性中心残基の機能を調べた。【方法・結果】活性中心残基を変異させた 5 種類の変異酵素(H460A, H462A, H460A/H462A, Q328K, Q328R)の遺伝子は KOD mutagenesis kit を用いて作製し、*E. coli* JM109 中でシャペロニンをコードする遺伝子と共発現させた。これらの変異酵素を精製または部分精製して活性を調べた。H460A と H462A 変異酵素は、各々、野生酵素の 0.5%と 1.2%の触媒効率(kcat/Km)しか示さなかった。Km に関して、これら酵素は、各々、4.5 倍と 5.7 倍高い値を示した。H460A/H462A 二重変異酵素は活性を全く示さなかった。これらの残基が PNOX の活性発現に必須であることがわかった。PN の構造類似体である PM の結合様式から PN にリン酸基が結合したピリドキシン 5'-リン酸(PNP)に対する親和性を上げるよう Q328K と Q328R の変異酵素を発現させ PNP に対する反応性を調べたところ野生酵素に比べ PNP に対する反応性は上がらなかった。これら 2 種の変異酵素の PN に対する反応性が低下したため、Q328 が触媒に必要であることがわかった。

放線菌由来 cyclo(Leu-Phe) oxidase の凝集性と可溶化の試み

D-7

○相澤ゆかり¹, 仁戸田照彦², 神崎浩²

(¹岡山大院・自然科学, ²岡山大院・環境生命)

【目的】我々は *Streptomyces albulus* KO23 株由来 cyclo(Leu-Phe)(以下 CFL) oxidase が CFL から albonoursin への脱水素反応を触媒し、様々な脱水素型環状ジペプチドの生産に利用可能であることを明らかにしてきた。本酵素は細胞質に存在しているが、精製が進むとタンパク質の疎水性の高さから凝集し巨大な構造体となることが実験結果から推測された。そこで精製過程における本酵素の凝集の確認及び界面活性剤による凝集の解消を試みた。

【方法・結果】無細胞抽出液およびその Phenyl Sepharose 分画後には超遠心分離操作による沈殿画分に活性が見られなかったが、さらに Q Sepharose 分画すると沈殿画分に凝集が見られたことから、本酵素は精製の進行に伴い凝集することがわかった。Q Sepharose 分画物に各種の界面活性剤を添加後 4°C、1h 処理したところ、低比活性画分では可溶性画分に活性が回収され凝集は解消したが、高比活性画分では一旦凝集してしまうと再び可溶化させることは困難であった。そこで Phenyl Sepharose 分画後の酵素を添加実験で効果の高かった CHAPS および *n*-octyl β -D-thioglucoside 存在下で Q Sepharose カラム精製に供した。*n*-octyl β -D-thioglucoside 存在下の精製で得られた活性画分は凝集が解消されていたため、この界面活性剤を用いた精製は本酵素の凝集解消に有効であることが示された。

マラリア原虫ミトコンドリアキャリアータンパク質の機能解析

E-1

○藤本竜治¹, 野澤彰², 戸澤譲² (¹愛媛大院・理工, ²愛媛大・無細胞セ)

【目的】ミトコンドリアキャリアー(MC)タンパク質は、ミトコンドリア内膜に存在し、多様な分子の輸送を担うトランスポーターである。MC は真核生物のトランスポーターでは最大のファミリーを形成しており、マラリア原虫ゲノムには 12 種の MC 候補遺伝子が存在する。本研究ではこれら MC 候補遺伝子由来の cDNA のクローニングを行い、それらによってコードされる MC タンパク質の輸送機能を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】これまでにマラリア原虫の cDNA ライブラリーから PCR により 6 種の MC 候補遺伝子由来の cDNA クローンを増幅することに成功し、無細胞発現用のプラスミドに組み込んだ。コムギ胚芽無細胞翻訳系によりこれらのタンパク質の合成を行い、6 種の MC 全てが合成可能であることを確認した。この中で今回はアミノ酸配列の相同性から ADP/ATP キャリアーと推測される PF10_0366 について輸送機能の解析を行った。その結果、PF10_0366 が ATP と ATP もしくは ADP の交換輸送活性を有することを明らかにした。今後は残りのタンパク質に関しても輸送機能の解析を進める予定である。

無細胞翻訳系によるチトクロム P450 アッセイ系の構築

E-2

○篠原涼¹, 野澤彰², 戸澤譲² (¹愛媛大院理工, ^{1,2}愛媛大無細胞セ)

【目的】チトクロム P450 (P450) は、各種生物に広く存在するモノオキシゲナーゼであり、異物代謝や二次代謝産物の合成に関与する医学的にも産業的にも重要なタンパク質である。真核生物は多様な P450 を有しているが、その多くの P450 の機能は未だに不明であり、機能解明が待たれている。P450 機能解析系の構築においては、P450 タンパク質調製系構築と電子供与体 NADPH の不安定性の克服が重要課題である。本研究では P450 機能解析系の確立を目的とし、無細胞翻訳系による P450 調製系と P450 還元酵素を利用した NADPH 再生系構築を試みた。

【方法・結果】シロイヌナズナの桂皮酸水酸化酵素 (C4H) を P450 のモデルタンパク質として用い、コムギ胚芽無細胞翻訳系の添加物の至適濃度条件の探索を進め、活性型タンパク質として合成できる系を構築した。続いて、酵母あるいは植物由来の NADPH 依存型 P450 還元酵素をその膜結合領域を切除するなど、P450 反応解析系へ添加する酵素を蛋白質工学的に改良することなどにより、C4H により触媒される桂皮酸からクマル酸への水酸化反応を増強することに成功した。今後は C4H 以外の P450 でもこのアッセイ系が利用できるかどうかを検討する予定である。

等電点電気泳動を利用した Cyclin-dependent kinase-like 5 の新規基質探索

E-3

○片山 将一、関口 菜里、千賀 由佳子、末吉 紀行、亀下 勇
(香川大農・応生科)

【目的】 Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) は、中枢神経に豊富に発現するプロテインキナーゼ (PK) であり、その欠損や変異により精神発達遅滞を伴う Rett 症候群様の病態を呈することが知られている。この CDKL5 の神経細胞における機能を知るためには、その標的となる内在性基質を明らかにすることが重要であるが、これまで CDKL5 により効果的にリン酸化される良好な基質は報告されていない。そこで本研究では等電点電気泳動を利用した新しい PK 基質探索法を用いて、CDKL5 の新規基質の探索と同定を試みた。

【方法・結果】 溶液中での等電点電気泳動法である MicroRotofor を用いてマウス脳抽出液を分離濃縮した後、各画分を用いて活性化型 CDKL5 によるリン酸化を行った。その結果、pI 4~5 の酸性タンパクが泳動される画分に CDKL5 により顕著にリン酸化される約 110 kDa のタンパク質が見出された。このタンパク質バンドをゲルから切り出し、LC-MS/MS により分析したところ、Amphiphysin 1 (Amph1)、MAP2 と DrebrinA が検出された。これら 3 種のタンパク質を精製し、CDKL5 によりリン酸化したところ、Amph1 だけが顕著にリン酸化された。これらの結果から、等電点泳動で分離した酸性画分に検出された CDKL5 の良好な基質タンパク質が Amph1 であることが判明した。

セレンストレス下のタバコ培養細胞へのプロリンの影響

E-4

○松島大貴、宗正晋太郎、中村宜督、村田芳行 (岡山大院・環境生命科学)

【目的】

植物では塩ストレス及びカドミウムストレス下で内生プロリンが蓄積する。プロリンは浸透圧の調節、酵素の保護及びフリーラジカルの除去を行うことが示唆されている。外因性プロリンは、塩ストレス及びカドミウムストレス下のタバコ培養において、成長抑制の緩和、抗酸化酵素活性の増加、過酸化物質蓄積の減少を誘起する。しかし、ストレス緩和におけるプロリンの役割は、十分に明らかにされていない。本研究では、セレンストレス下のタバコ培養細胞への外因性プロリンの影響を調査した。

セレンは土壤中で主にセレン酸として存在する。植物への高濃度のセレン酸の暴露はタンパク質へのセレンの誤った取り込みなどにより成長阻害を生じる。

【方法・結果】

セレンストレス下のタバコ培養細胞の成長、抗酸化酵素活性及び過酸化物質蓄積への外因性プロリンの影響を評価した。また、発表では、塩ストレス及びカドミウムストレス下のタバコ培養細胞への外因性プロリンの影響との比較を行い、ストレス下のタバコ培養細胞におけるプロリンの役割について議論する。

気孔開口阻害におけるアブシシン酸受容機構

E-5 ○銀叶¹, 足立優司¹, 叶文秀¹, 林真紀², 中村宜督¹, 木下俊則², 森泉³, 村田芳行¹ (¹岡大院・自然、²名大院・理学、³岡大・植物研)

【目的】アブシシン酸 (ABA) は、植物のストレス応答及び成長を調節する植物ホルモンである。ABA は、気孔の閉口を促進し、また、気孔の開口を阻害する。しかし、これらの運動は単純な逆向き過程ではないことが知られている。近年、PYR/PYL/RCAR 遺伝子群が ABA 受容体として同定された。PYR/PYL/RCAR の四重変異体である *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* において、ABA 誘導性気孔閉口が抑制されることが報告されているが、ABA の開口阻害効果への影響は詳細に調べられていない。本研究では、同四重変異体を用いて、開口阻害における PYR1, PYL1, PYL2 および PYL4 の役割について精査した。

【方法・結果】四重変異体では ABA 処理による気孔閉口が顕著に抑制され、ABA の感受性の低下が示唆された。一方、開口の阻害は野生株と変わらなかった。孔辺細胞 ABA シグナルにおけるセカンドメッセンジャーである活性酸素種と一酸化窒素の産生ならびに細胞質アルカリ化を測定したが、変異体ではこれらは誘導されなかった。気孔開口に重要な H⁺-ATPase のリン酸化と内向き K⁺チャンネル活性について調べた。野生株と同様に変異体においても ABA により H⁺-ATPase のリン酸化は阻害され、K⁺チャンネル活性は抑制されていた。

酵母エリシター誘導気孔閉口における Ca²⁺依存性タンパク質キナーゼ 6 の役

E-6 割 ○叶文秀¹, 宗正晋太郎¹, 中村宜督¹, 森泉², 村田芳行¹ (¹岡大院自然、²岡大植物研)

酵母エリシター (YEL) は、気孔閉口を誘導し、細胞質 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こす。また、植物細胞において、Ca²⁺依存性タンパク質キナーゼ (CPK) は Ca²⁺センサーとして機能している。CPK の一つである CPK6 は、アブシシン酸誘導ならびにジャスモン酸メチル誘導気孔閉口を正に調節する。しかし、CPK6 が YEL 誘導気孔閉口に関与するかどうかは未解明である。そこで、シロイヌナズナでの YEL 誘導気孔閉口における CPK6 の役割を調べた。CPK6 遺伝子の変異によって YEL 誘導気孔閉口が阻害された。*cpk6-2* 孔辺細胞原形質膜非選択性カチオンチャンネルの YEL による活性化が阻害され、YEL 誘導細胞質 Ca²⁺濃度の変動が減衰された。野生株では、YEL が孔辺細胞原形質膜 S 型アニオンチャンネルを活性化したが、*cpk6-2* では活性化しなかった。野生株において、YEL は孔辺細胞原形質膜内向き整流性 K⁺チャンネルを阻害したが、*cpk6-2* においては阻害しなかった。*cpk6-2* の変異は葉の組織と孔辺細胞での YEL 誘導活性酸素種の蓄積を阻害したが、葉の組織でのその活性酸素種の産生は阻害しなかった。以上の結果から、CPK6 が YEL 誘導気孔閉口に関与することが示された。

トマト新品種作出に有用な分子マーカーの探索

E-7 ○平岡幸浩¹, 吉金 優², 岡村好倫², 古谷拓郎¹, 沢村譲二¹, 井上孝志¹,
樋口慶郎², 沢村正義² (¹井上石灰工業㈱, ²高知大・土佐 FBC)

【目的】ミニトマト新品種‘スウィーティア’は、涙のような特異な果実形態を有する。そして、この形を活かした特徴的なミニトマト新品種の作出を目指している。しかしながら、これまで‘スウィーティア’果実の形態形成に関与する遺伝子群は未解明である。そこで、本研究では、‘スウィーティア’果実形態に関する分子マーカーの探索を目的とした。

【方法・結果】トマトの果実形態に係る遺伝子として、*ovate* と *sun* の 2 種類をマーカー候補として選抜した。*ovate* は塩基置換による *Ovate* タンパク質機能喪失、*sun* はレトロトランスポゾン挿入による *Sun* タンパク質の発現量増加により、ミニトマトの果実形態に影響を与えることが知られている。そこで、さまざまな形を有する 30 品種のミニトマト幼苗からゲノム DNA を調製し、PCR を用いて *ovate* と *sun* の変異の有無を調べた。その結果をもとに、30 品種を 7 グループに分類した。新品種‘スウィーティア’は、ゲノム DNA に *ovate* の塩基置換および *sun* のレトロトランスポゾンの挿入が認められ、その変異パターンは他 29 品種と完全に異なっていた。以上のことから、両分子マーカーは、今後、ミニトマトの新品種を作出する際に、幼苗段階での選抜への応用が期待される。

F-1

純粋培養した野生酵母をスターターに用いた発酵種による製パンとその評価
○金子美幸¹、柳 裕子¹、藤本ゆかり¹、近藤菜月¹、坂本奈穂¹、茂野光正²、
高橋了子³、田所良康⁴、堅田裕子⁵、荒川義人⁶、佐々木ゆり⁷、村松久司^{1,8}、
永田信治^{1,8}（¹高知大・農、²ペロリ、³源水エコファーム、⁴さんかく広場、⁵
遠藤青汁、⁶天使大学、⁷フードサイエンスファクトリ、⁸高知大・生命環境）

【目的】市販の安価なパン酵母は生地膨張力も臭気も強くて、パンの素材や酵母の特徴を活かすことが難しい。天然酵母は植物素材を自然発酵して得る発酵種であり、生地に添加する量と素材を工夫して個性的なパンを作る。しかし、パンの風味を損なわずに発酵力を維持する発酵種の管理は難しい。我々は植物や動物の腸内環境から野生酵母を単離して、その発酵特性に基づく利用を試みてきた。パン酵母に比べて生地膨張力や保存性が優る野生酵母の培養菌体による製パンは、市販のパン酵母に勝る評価を受け、店頭で野生酵母を培養する方法も確立したが、培養に要するコストが障害になる。そこで本研究では、野生酵母の分離源を用いた発酵種による製パン法を検討した。【方法・結果】製パンに有効な発酵種の素材としてトマト、ヤーコン、青汁を選択した。各々を分離源として生地膨張力に優れた3種の野生酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、トマト CHI2305、ヤーコン YKR325、ケール MYK101 の培養菌体を 0.5-5g 添加した発酵種を用いて、味や食感の優れた製パンが可能であり、菌体を添加する製パンと比べて、酵母量を 10%以下に低減することができた。

F-2

植物性バイオマス由来の乳酸菌の探索と乳酸飲料への応用
○坂本奈穂¹、平尾智美¹、柳 裕子¹、穴井直博²、木村有希¹、森奈津美¹、野尻修佑¹、松川和嗣^{1,3,4}、田辺憲一⁵、山本彰宏⁶、吉村 敦⁷、加藤麗奈⁸、
上東治彦⁹、村松久司^{1,4}、永田信治^{1,4}（¹高知大農、²アミール動物病院、³高知大 FS、⁴高知大生命環境、⁵いこひー四万十、⁶無手無冠、⁷県畜産試、⁸県工技）

【目的】乳酸菌とその発酵物を含む植物餌料は、腐敗が抑制されるだけでなく、消化性や嗜好性が高まり、摂食した動物の腸内細菌叢に影響を与えて健康維持に役立つ。また、食品加工時に大量に生じる植物性廃棄物は、乳酸発酵によって餌料化することで有効に利用できる。本研究は、ブンタンやユズなどの柑橘系残渣や、栗などの焼酎粕に由来する乳酸菌の探索と、流通しないハネ物が多いが、乳酸菌の生育を顕著に促進するトマトやヤーコンに由来する乳酸菌の探索を行った。【方法・結果】ブンタンやユズなどの柑橘系搾汁残渣、果実やオリゴ糖などの栄養分に富むトマトやヤーコンの破砕物を 30℃の嫌気条件下で発酵させた試料から、MRS 寒天培地で生育する嫌気性細菌を分離し、それらの中からグラム陽性桿菌を選択し、糖資化性試験と 16S rDNA の塩基配列の解析によって同定を行った。さらに、人工胃酸胆汁酸耐性試験を行って、乳酸発酵と経口摂取に有益と思われる乳酸菌を選択した。一方、単離した乳酸菌の活用モデルとして、米麴糖化液の乳酸発酵に適した乳酸菌を選択し、糖度や酸度、乳酸菌生菌数を測定して乳酸飲料の評価を行った。

腸内環境由来の乳酸菌の探索と乳酸発酵餌料への応用

F-3

○柳 裕子¹、坂本奈穂¹、穴井直博²、木村有希¹、森奈津美¹、野尻修佑¹、松川和嗣^{1,3,4}、田辺憲一⁵、加藤麗奈⁶、村松久司^{1,4}、永田信治^{1,4}（¹高知大農、²アミール動物病院、³高知大 FS、⁴高知大生命環境、⁵コトギ-四万十、⁶県工技セ）

【目的】餌料の乳酸発酵は、その保存性や消化性、嗜好性を高めるが、同時に摂取する乳酸菌には、動物の腸内細菌叢を良好に維持して健康管理に寄与することが望まれる。家畜が摂取するサイレージでは、保存性と機能性を高める乳酸菌の活用が望まれ、犬や猫が摂取するペットフードでは、乳酸菌を添加して補う必要がある。本研究では、動物の腸内環境の乳酸菌の探索と、犬の腸内環境の乳酸菌に及ぼす餌料と日齢の影響を検討した。

【方法・結果】家庭で飼育する成人犬と、ペットショップで飼育する幼犬の新鮮便から、シクロヘキシミドを添加した MRS 培地で嫌気条件下に生育する細菌を単離し、量的解析と顕微鏡観察を行った。さらに、グルコースやグルコン酸存在下のガス産生試験、糖資化性試験、16S rDNA の塩基配列の解析によって同定し、胃酸胆汁酸耐性試験を行った。ペットフードで育つ成人犬の新鮮便に乳酸菌が検出されないことから、成人犬を利用した乳酸菌の経口投与試験が可能であることが示唆された。幼犬では日齢が若いほど乳酸菌が検出され、離乳期間が長いと乳酸菌が消滅する。離乳後、最後まで維持できる乳酸菌の有用性が期待できることから、離乳後のペットフードへの有用乳酸菌の添加効果が期待できる。

黒酵母 *Aureobasidium pullulans* による機能性 β -1,3-1,6-グルカンの生産と

F-4

粉末化 ○池上裕倫^{1,2}、中谷麻衣^{1,2}、長瀧 充¹、高本美佐¹、尾仲 隆¹、村松久司^{2,3}、永田信治^{2,3}（¹ソフィ、²高知大・農、³高知大・生命環境）

【目的】*Aureobasidium pullulans* が生産する水溶性の β -1,3-1,6-グルカン (SBG) は、その増粘性と安全性から、食品添加物に認可されている。SBG は、NK 細胞の活性化など多数の生理機能が確認されており、機能性食品への更なる利用が期待されている。本研究では、食品分野での汎用性を高めるために、液状の SBG の特徴を持つ粉末の製造を検討した。

【方法・結果】SBG に、デキストリン、糖類 S2、糖類 S4 の 3 種類の賦形剤を添加し、スプレードライ法にて粉末を作成した。粉末の β -1,3-1,6-グルカン含有量、含水値、色、水溶液の粘度を測定し、乾燥状態で保存した際の経時変化の度合により、安定性を評価した。 β -1,3-1,6-グルカン量は、基質特異性の高いグルカナーゼを用いた酵素法で測定した。溶解性は粘度の変化により評価した。その結果、デキストリンを使用した粉末が短期間で不溶化したのに対し、S2 および S4 を使用した場合、溶解性が長期間低下しなかった。また、S2 および S4 を用いた粉末を再溶解して得た水溶液の粘度および β -1,3-1,6-グルカン量は、SBG と同程度であった。より安定性の高かった S4 を用いた粉末については、28 日の反復投与試験およびマウスの脾臓細胞を用いた ⁵¹Cr 放出試験を行った。その結果、被験物質の影響と考えられる病変は確認されず、SBG と同程度の NK 細胞活性を確認できた。

F-5 *Paracoccus denitrificans* NBRC13301 の分子育種による新規代謝系の構築と生育への影響

○高橋誠治, 田中三男, 三井亮司 (岡山理大・理)

【目的】 *P. denitrificans* は嫌気条件下で脱窒を行う細菌として知られるが、好気条件ではメタノールやグリセロールなど多様な炭素源を利用して生育する。メチロトロフは一般にホルムアルデヒドを資化経路に取りこむのに対し、本菌株はカルビンサイクルによる二酸化炭素固定により行われる。しかし、メタノール培養下において、他の炭素源での培養に比べ生育が著しく遅い。そこで本研究ではメチロトロフ細菌の C_1 化合物資化経路を本菌株に導入し、生育改善のための新規代謝系を構築することを目的とした。

【方法・結果】 リブローズモノリン酸 (RuMP) 経路を用いてホルムアルデヒド (HCHO) を資化 *M. aminofaciens* 77a の鍵酵素であるヘキシュロース-6-リン酸シンターゼ (HPS) 及び 6-ホスホヘキシュロイソメラーゼ (PHI) 遺伝子を *P. denitrificans* に導入し、カルビンサイクルと RuMP 経路がリンクした代謝系を持つ育種株を作製した。育種株はメタノールへの生育が大きく改善した。そこで、育種株が ^{13}C -HCHO を資化していることを NMR で確認したところ、育種株においてのみ取り込みが確認できた。また、二酸化炭素固定に関わるリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ活性を測定した結果、育種株においても活性が維持されている事が明らかとなった。

F-6 植物由来 *Methylobacterium* 属細菌のメタノールによる生育に及ぼすレアアース元素の添加効果

○山浦瑞穂¹, 日比野歩美², 桑原朋代¹, 中川智行², 田中三男¹, 三井亮司¹

(1 岡山理大・理, 2 岐阜大・応生科)

【目的】 メタノールなどの C_1 化合物の供給源のひとつが植物であり、メタノール資化性菌と植物が深く関係していることが知られている。近年、イネ葉上微生物のメタプロテオーム解析が行われ、メチロトロフ細菌の Ca^{2+} 依存型のメタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) や、 La^{3+} 依存型 MDH であることがごく最近に明らかになった XoxF が葉上において高い頻度で検出されることが報告された。この La^{3+} などのレアアース元素は土壤中に広く存在し、植物葉上にも提示されていることが報告されている。そこで本研究では葉上より分離した *Methylobacterium* 属細菌を用い、 La^{3+} の添加による生育への影響を検討した。

【方法・結果】 メタノールを単一炭素源として植物葉上から分離した約 50 株を用いて XoxF の補欠分子となる La が生育に及ぼす影響を調べた。その結果、調べたほとんどの株で La^{3+} の添加により生育が良くなり、阻害を受ける菌株はなかった。しかし、影響の度合いに差が見られたことから、度合いに応じてグループに分類した。さらに 16SrRNA に基づく系統樹を *Methylobacterium* の Type strain も加えて作成した結果、 La^{3+} によく応答するグループに分類された菌株が系統樹上で新規なクラスターを形成することが明らかとなった。

マンガン酸化系を構成する2種の細菌の分離と同定

F-7

○周藤慎也¹, 小野博史¹, 田村 隆¹, 高田 潤², 稲垣賢二¹
(¹岡山大院・環境生命, ²岡山大院・自然科学)

【目的】マンガン酸化菌が産生するマンガン酸化物は、有害な微量金属イオンを吸着することから河川の浄化などに利用できると考えられ、バイオレメディエーションの面で注目されている。しかし、マンガン酸化活性を示す細菌に関する報告は少ない。本研究では、静岡県の河川から採取し、集積培養されたマンガン酸化活性を有する微生物群から、マンガン酸化系を構成する2種類の細菌を分離し同定した。

【方法・結果】集積培養の諸条件を検討した結果、炭素源としてグルコース、窒素源として硫酸を添加した培地を確立した。マンガンの酸化はグルコースの添加に強く依存することが示された。またマンガン酸化活性の最適温度は30℃であった。集積培養したマンガン酸化菌叢から、寒天平板培地への線引きを繰り返すことにより、マンガン酸化に関わる2種類の菌を単離した。片方のコロニーは白色で、もう一方は赤色のコロニーを形成する。黒色のマンガン酸化物は赤色のコロニーを形成する細菌において形成されたが、マンガン酸化には白色の細菌が分泌する未知の成分が必要であることが判明した。16S rRNA 系統解析をおこない、白色の細菌が *Ralstonia pikettii*, 赤色の細菌が *Micromonospora sp.*であると同定した。