

学会創立90周年記念
日本農芸化学会2014年度中四国支部大会
(第40回講演会)

日本動物細胞工学会
第33回動物細胞工学シンポジウム

講 演 要 旨 集

日時：2014年9月26日（金），27日（土）

場所：徳島大学常三島キャンパス

日本農芸化学会中四国支部

日本農芸化学会2014年度中四国支部大会 第33回動物細胞工学シンポジウム 日程

第1日目：9月26日（金）

会場：徳島大学常三島キャンパス 総合科学部 2号館 2階 常三島けやきホール

11:30～12:50 日本農芸化学会中四国支部支部幹事打合せ

13:00～13:30 日本農芸化学会中四国支部 支部功労賞，奨励賞ならびに技術賞授与式

13:30～14:10 2014年度日本農芸化学会技術賞受賞講演

協和発酵バイオ（株）「ジペプチド発酵技術の開発と工業化」

東洋紡（株）「超好熱菌由来の新規DNAポリメラーゼの発見とその産業利用」

14:10～14:30 第2回（2014年）日本農芸化学会中四国支部技術賞受賞講演

中原達雄（丸善製薬（株）），川野隆史（（株）ますやみそ）

「無塩みそ風調味料の製造方法について」

14:30～15:10 2014年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

岩崎 崇（鳥取大・農）

「カプトムシディフェンシン由来改変ペプチドの応用研究」

川上賀代子（就実大・薬）

「茶ポリフェノールの吸収と生理機能に関する研究」

15:20～17:50 シンポジウム 「食と健康」

磯田博子（筑波大・北アフリカ研究セ）

「地中海食薬資源の機能性解析と有効利用」

片倉喜範（九州大院・農）

「アンチエイジング食品の探索とその機能性の分子メカニズム」

寺尾純二（徳島大院・HBS 研究部）

「ポリフェノールの生体利用性と高機能化戦略」

特別講演

清水 誠（東京農大・応用生物）

「機能性食品と腸管機能」

※13:00～15:00 日本動物細胞工学会 幹事会

会 場：徳島大学 常三島キャンパス 工学部機械棟8階

19:00～21:00 懇親会

会 場：阿波観光ホテル 当日参加費：一般 8,000円, 学生 6,000円

第2日目：9月27日（土）

会 場：徳島大学常三島キャンパス 共通教育5号館

9:00～11:48 一般講演

12:00～13:00 日本農芸化学会中四国支部 支部参与会

一般講演 会場一覧表

会場		講演番号	分類
A	201	A1-A13	有機化学・天然物, その他
B	301	B1-B14	微生物・遺伝子
C	302, 303	C1-C13	酵素・タンパク質, 植物・環境
D	401	D1-D14	動物・食品

一般講演 座長一覧表

会場	講演番号	座長
A (201 講義室)	1 ~ 4	仁戸田照彦 (岡山大院・環境生命)
	5 ~ 7	清田洋正 (岡山大院・環境生命)
	8 ~ 10	川浪康弘 (香川大・農)
	11 ~ 13	西脇 寿 (愛媛大・農)
B (301 講義室)	1 ~ 4	上野 勝 (広島大院・先端物質)
	5 ~ 8	上村一雄 (岡山大院・環境生命)
	9 ~ 12	麻田恭彦 (香川大・農)
	13 ~ 14	森田 洋 (北九大・国際環境)
C (302, 303 講義室)	1 ~ 4	櫻谷英治 (徳島大院・STS)
	5 ~ 7	前田 恵 (岡山大院・環境生命)
	8 ~ 10	兼目裕充 (徳島文理大・薬)
	11 ~ 13	林 直宏 (大塚化学(株))
D (401 講義室)	1 ~ 3	田中 保 (徳島大院・HBS)
	4 ~ 7	向井理恵 (徳島大院・HBS)
	8 ~ 10	渡邊文雄 (鳥取大院・連合農)
	11 ~ 14	岸田太郎 (愛媛大・農)

注)

1. 液晶プロジェクタを用います。操作は各発表者でお願いします。
2. 発表時間9分, 質疑応答2分, 交代1分 厳守で進行をお願いします。

支部大会・シンポジウム会場図

徳島大学常三島キャンパス総合科学部

(〒770-0814 徳島市南常三島町 1-1)

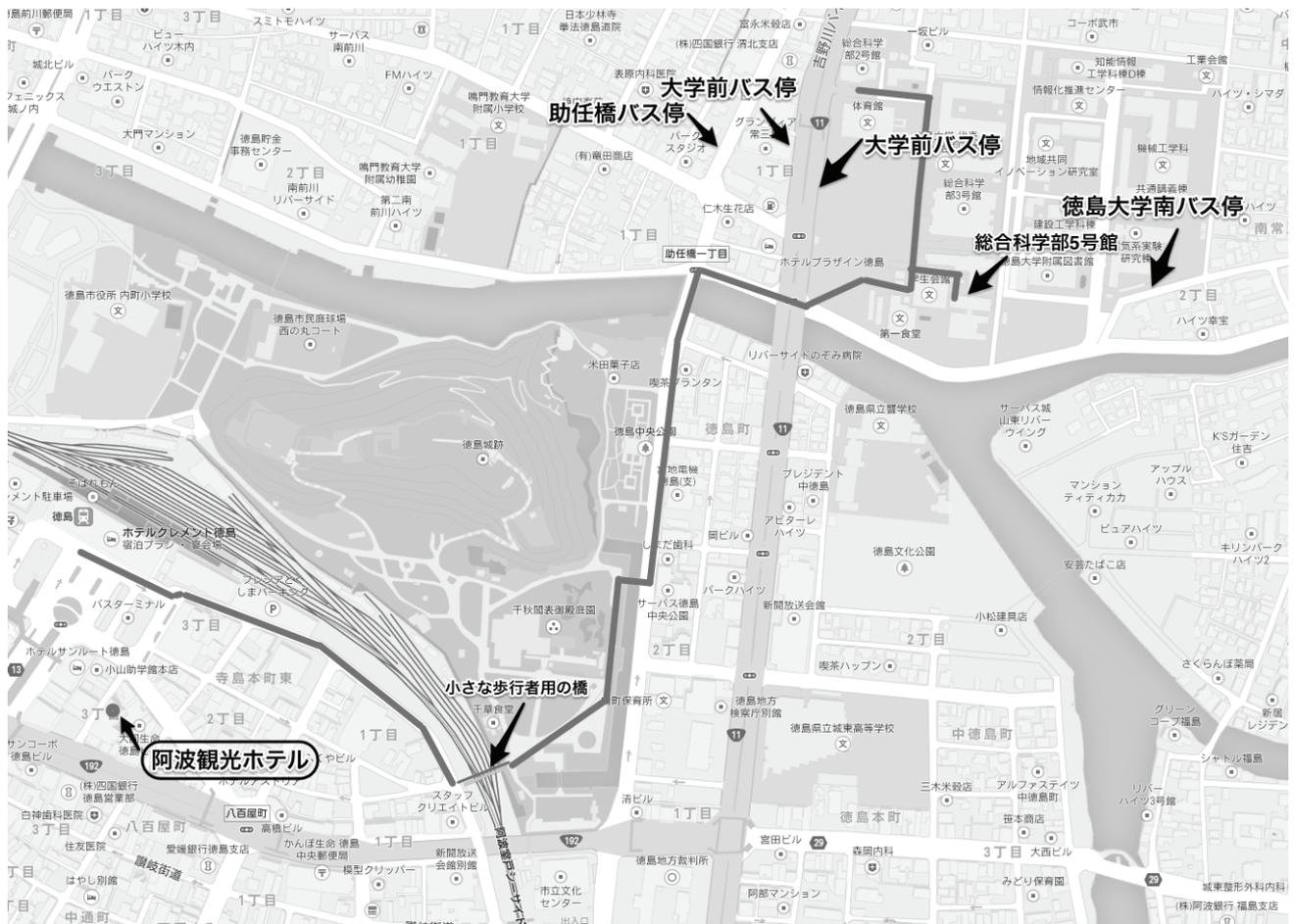
受付	1日目	2号館	2階	けやきホール前東側 (地域連携実習室前)
	2日目	5号館	2階	学生自習スペース前
表彰式, 受賞講演,	シンポジウム会場	2号館	2階	常三島けやきホール
一般講演	A会場	5号館	2階	201 講義室
	B会場	5号館	3階	301 講義室
	C会場	5号館	3階	302, 303 講義室
	D会場	5号館	4階	401 講義室
幹事会会場		2号館	1階	多目的室 2
支部参与会会場		第1食堂		
休憩室	2日目	5号館	2階	学生自習スペース



徳島駅からのアクセス

- ・ 徒歩の場合 20-30分 (1.7km)
- ・ バス利用の場合 15分

徳島駅前より徳島市営バス「島田石橋」行、「商業高校前」行 他に乗車し、「助任橋」又は「徳島大学前」又は「徳島大学南」下車



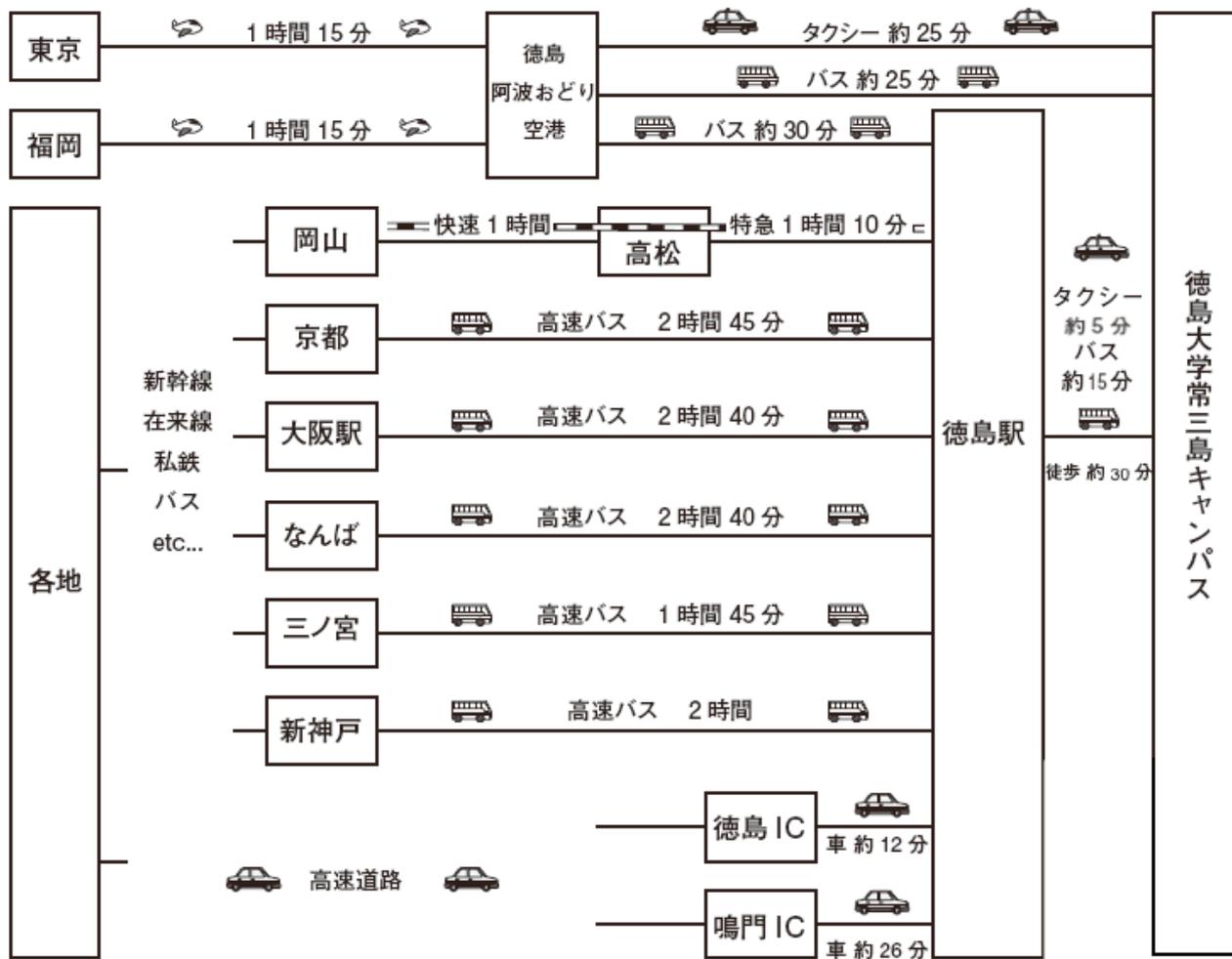
徳島市営バス

のりば	系統番号	路線名	行先	大学最寄りのバス停
5	31	中央循環線	(左回り)	助任橋
	6	島田石橋線	島田石橋	
	5	商業高校線	商業高校前	徳島大学南
6	32	東部循環線	(右回り)	助任橋
	3	中央市場線	中央市場	
7	なし	川内循環線	(左回り)	

徳島バス

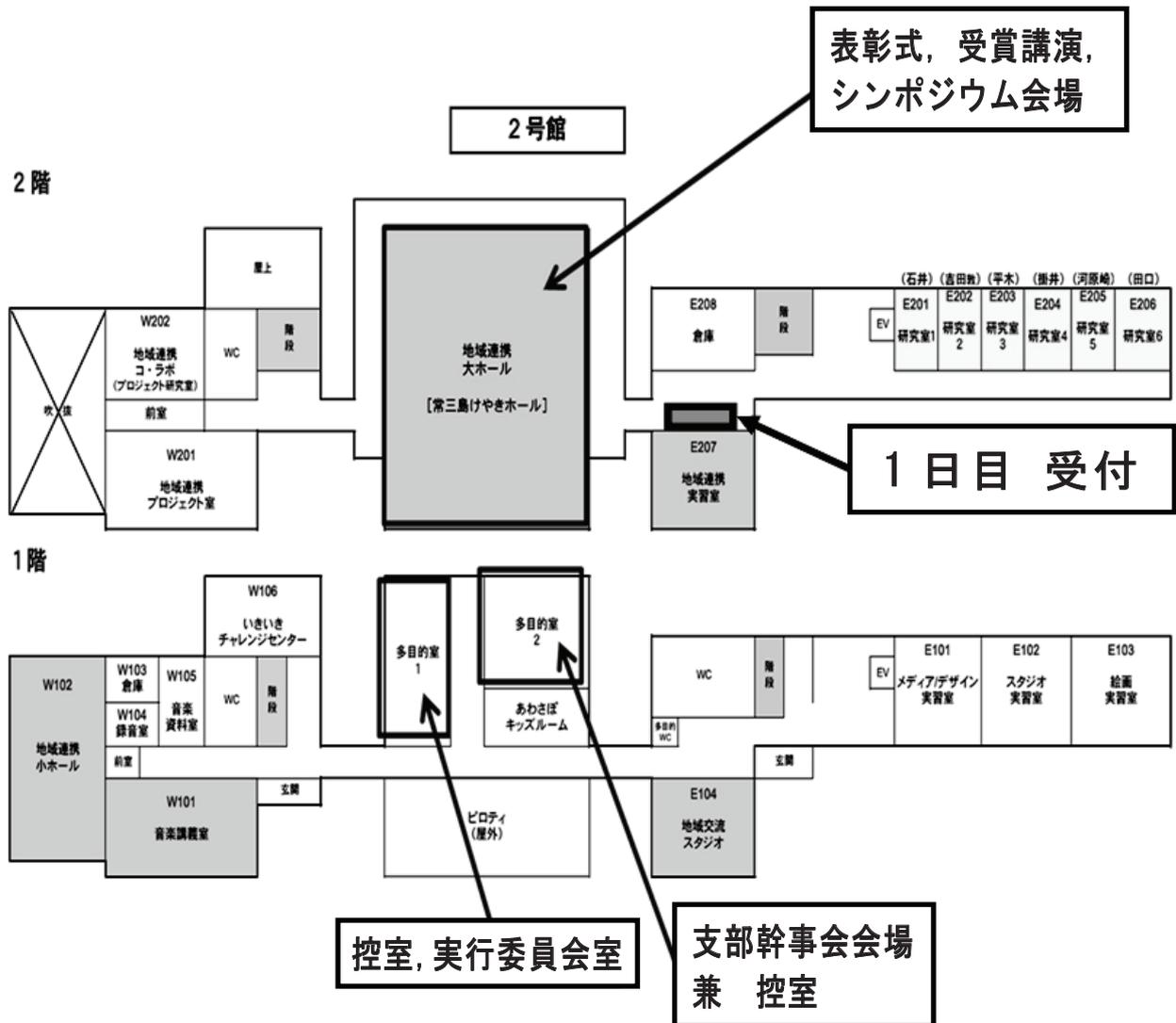
のりば	系統番号	路線名	行先	大学最寄りのバス停
1	13・15・16	鳴門線	バイパス経由子鳴門橋、 鳴門教育大、ウチノ海	大学前 (国道)
	21・23・24		四国大学前經由岡崎、子鳴門橋	大学前 (助任橋)
	27		鳴門公園	
3	28	かじや原線	住吉經由かじや原	





総合科学部 2号館 1, 2階

9月26日(金)



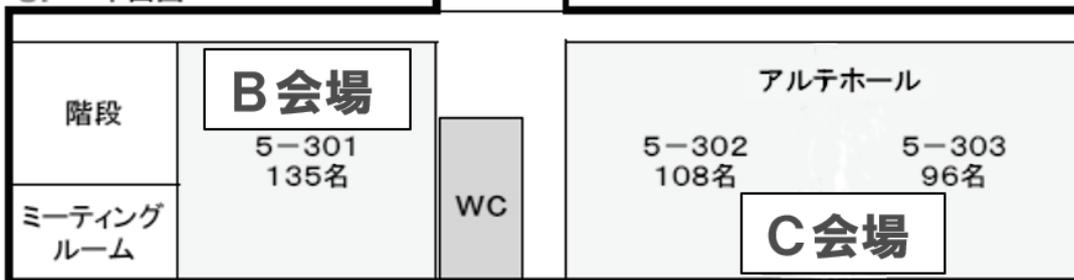
総合科学部 共通教育5号館 2～4階

9月27日(土)

4F 平面図



3F 平面図



2F 平面図



懇親会会場図

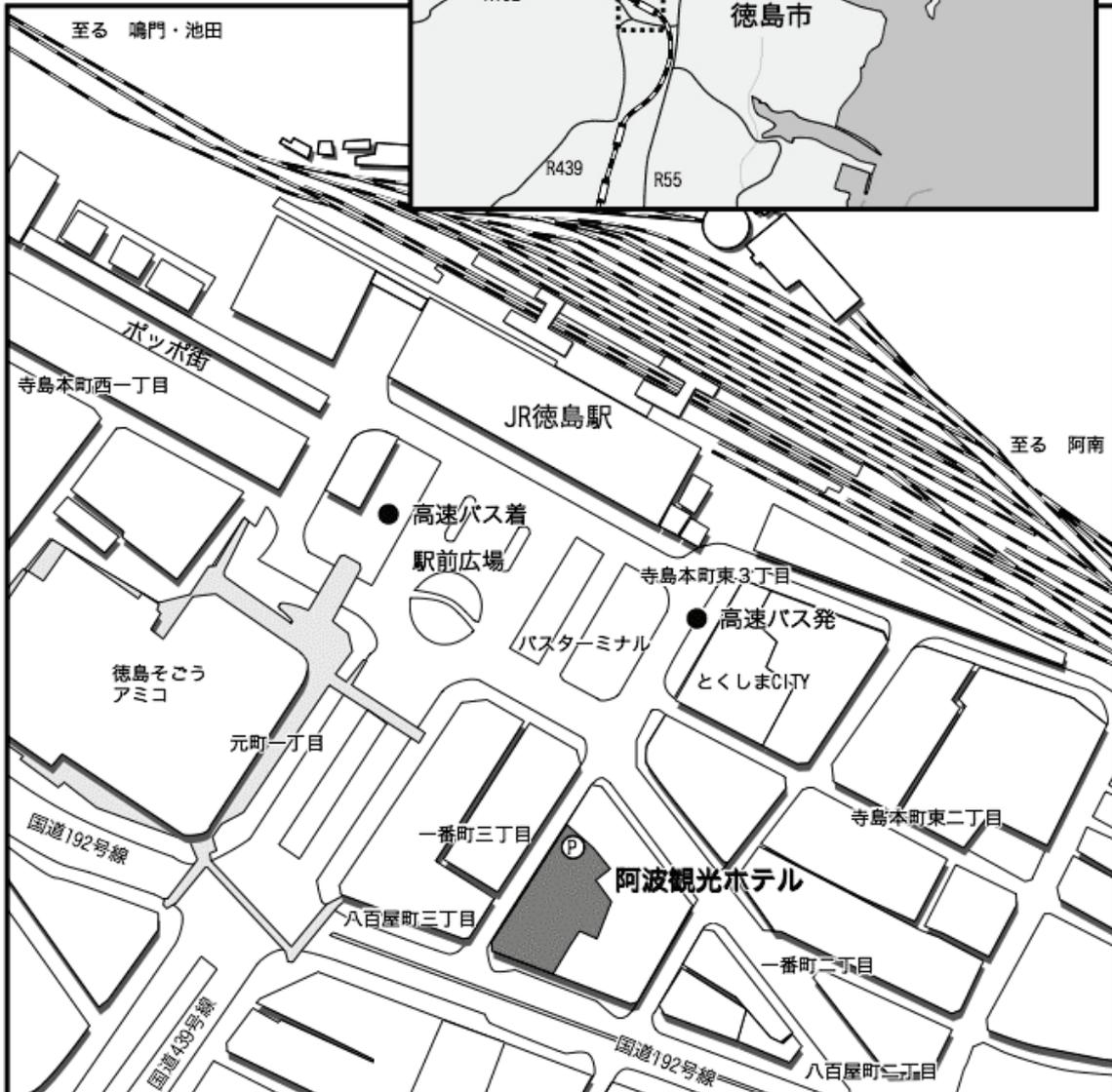
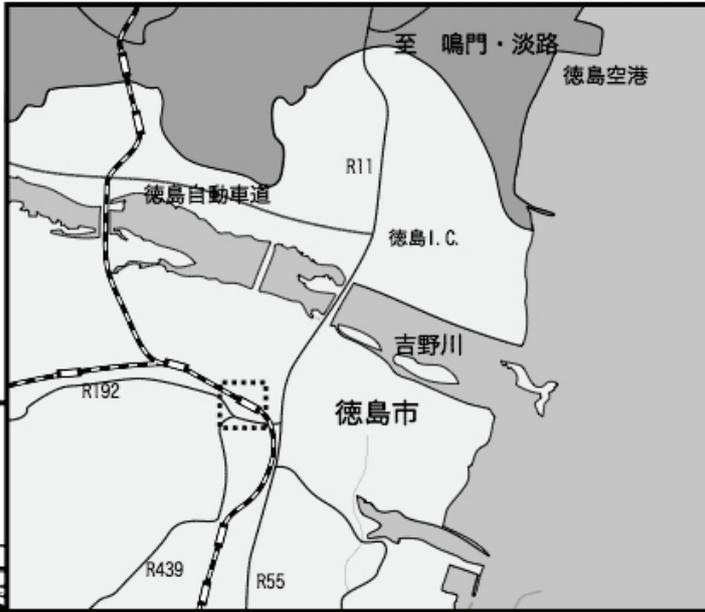


阿波観光ホテル FEEI BEGINNING

〒770-0833
徳島県徳島市一番町3-15-3
TEL (088) 622-5161 (代)
FAX (088) 622-2857

交通のご案内

- ※飛行機
大阪⇒徳島・・・30分
東京⇒徳島・・・1時間10分
- ※船
大阪⇒徳島(高速船)・・・2時間
大阪⇒徳島(フェリー)3時間20分
神戸⇒徳島(フェリー)3時間20分
- ※JR
岡山⇒徳島・・・2時間20分
- ※お車
神戸⇒淡路⇒徳島・2時間30分



講 演 会

プ ロ グ ラ ム

日本農芸化学会2014年度中四国支部大会

第33回動物細胞工学シンポジウム

第1日目：9月26日（金） 受賞講演・シンポジウム
（総合科学部2号館2階 常三島けやきホール）

◇日本農芸化学会中四国支部 支部功労賞，奨励賞ならびに技術賞授与式
13:00 ～ 13:30

◇ 2014年度日本農芸化学会技術賞受賞講演

13:30 ～ 13:50 座長 山田 守（山口大院・医）

「ジペプチド発酵技術の開発と工業化」

田畑和彦（協和発酵バイオ(株)・

バイオプロセス開発セ)

13:50 ～ 14:10 座長 稲垣賢二（岡山大院・環境生命）

「超好熱菌由来の新規 DNA ポリメラーゼの発見とその産業利用」

北林雅夫（東洋紡（株）・バイオケミカル事業部）

◇ 第2回(2014年)日本農芸化学会中四国支部技術賞受賞講演

14:10 ～ 14:30 座長 江坂宗春（広島大院・生物圏）

「無塩みそ風調味料の製造方法について」

中原達雄（丸善製薬（株））・川野隆史（(株)ますやみそ）

◇ 2014年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

14:30 ～ 14:50 座長 大城 隆（鳥取大院・工）

「カプトムシディフェンシン由来改変ペプチドの応用研究」

岩崎 崇（鳥取大・農）

14:50 ~ 15:10 座長 神崎 浩（岡山大院・環境生命）
「茶ポリフェノールの吸収と生理機能に関する研究」
川上賀代子（就実大・薬）

◇ 共催シンポジウム 「食と健康」

15:20 ~ 15:50 座長 橋爪秀一（日本動物細胞工学会・会長）
「地中海食薬資源の機能性解析と有効利用」
磯田博子（筑波大・北アフリカ研究セ）

15:50 ~ 16:20 座長 永尾雅哉（京都大院・生命科学）
「アンチエイジング食品の探索とその機能性の分子メカニズム」
片倉喜範（九州大院・農）

16:20 ~ 16:50 座長 大政健史（徳島大院・STS 研究部）
「ポリフェノールの生体利用性と高機能化戦略」
寺尾純二（徳島大院・HBS 研究部）

特別講演

16:50 ~ 17:35 座長 稲垣賢二（岡山大院・環境生命）
「機能性食品と腸管機能」
清水 誠（東京農大・応用生物）

第2日目：9月27日（土） 一般講演（共通教育5号館 A～D会場）

一般講演プログラム

A会場（201講義室）「有機化学・天然物，その他」

- A-1 09:00 PCTK3 はアクチン動態を制御する
○松田真弥，宮本賢治，小松弘明，辻 明彦，湯浅恵造
（徳島大院・STS 研究部）
- A-2 09:12 誘電泳動技術を利用した希少細胞の分離選抜技術とその応用
○横山拓也^{1,2}，脇坂嘉一¹，高野雅代¹，糸井隆行¹，圓城寺隆治¹，
大政健史²
（¹（株）AFIテクノロジー，²徳島大院・STS 研究部）
- A-3 09:24 Savinin 類縁体の合成およびそれらの細胞毒性評価
○物部勇馬，西脇 寿，藤原敏美，菅原卓也，山内 聡，首藤義博
（愛媛大・農）
- A-4 09:36 イミダゾリジン環の5位に置換基を有するイミダクロプリド類縁体の
三次元定量的構造活性相関解析
○長岡ひかる，西脇 寿，赤松美紀¹，山内 聡，首藤義博
（愛媛大・農，¹京都大院・農）
- A-5 09:48 D-アロース-2-ナフチル酢酸エステル合成と植物生長調節活性
○佐野真奈美，広瀬花穂，川浪康弘
（香川大・農）
- A-6 10:00 D-アロース誘導体の合成とその植物生長調節作用
○安藤 光，Md. Tazul Islam Chowdhury，川浪康弘
（香川大・農）
- A-7 10:12 ペントース誘導体の合成と MOLT-4F 白血病細胞に対する増殖阻害活性
○高倉千尋，小橋克哉，柳田 亮，川浪康弘
（香川大・農）

- A-8 10:24 The synthesis of 4,5-disubstituted-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid (Kdo) derivatives
○Ruiqin Yi, Tsuyoshi Ichiyanagi
(Fac. of Agric., Tottori Univ.)
- A-9 10:36 分子内グリコシル化反応を利用する Kdo2 糖の合成研究
○田坂瑞葵¹, 一柳 剛
(鳥取大院・農,¹鳥取大・農)
- A-10 10:48 中国産ハーブより単離された抗腫瘍物質マオエクリスタルVの合成研究
○清田洋正, 小竹正晃¹, 佐藤恵里子¹, 佐々木郁香¹, 浅尾洋樹¹, 島崎泰治¹, 山田てい子¹, 桑原重文¹
(岡山大院・環境生命,¹東北大院・農)
- A-11 11:00 はぶ草 (*Senna occidentalis* L.) 種子の香気成分と生理活性について
○元矢倫子, 元矢知志¹, 岡田芳治, 野村正人
(近畿大院・シス工,¹島根大院・医)
- A-12 11:12 4種の抗酸化試験による oleuropein aglycon のパン酵母還元生成物およびその関連化合物の評価
高津綾香, ○古賀まり子, 三宅剛史¹, 徐 恵美², 菊地敬一², 仁戸田照彦, 神崎 浩
(岡山大院・環境生命,¹岡山県工技セ,²日本オリーブ (株))
- A-13 11:24 β -*N*-Acetylglucosaminidase 阻害物質生産糸状菌が生産する昆虫成長制御物質
○高辻笑理, 奥田 徹¹, 神崎 浩, 仁戸田照彦
(岡山大院・環境生命,¹東京大・理)

B 会場（301 講義室）「微生物・遺伝子」

- B-1 09:00 Screening and characterization of ulvan-degrading bacteria
○何 川，高橋 亮，大西浩平
(高知大・農)
- B-2 09:12 酸性鉱山廃水処理に有用な微生物の探索
○山本康次郎，Sultana Sharmin¹，金尾忠芳¹，上村一雄¹
(岡山大・農，¹岡山大院・環境生命)
- B-3 09:24 非生物素材に付着した大腸菌 O157 の次亜塩素酸ナトリウム耐性
後藤月江^{1,2}，達 牧子³，○横井川久己男¹
(¹徳島大院・総合科学，²四国大・短大部，³神戸女短大)
- B-4 09:36 T-RFLP 法による 18S-rDNA フラグメント解析の最適化
○曾我夏実，芦田裕之¹，丸田隆典，石川孝博，澤 嘉弘
(島根大・生物資源，¹島根大・総科研支援セ)
- B-5 09:48 分裂酵母のテロメア短小化に関与する因子の解析
○南部智子，上野 勝
(広島大院・先端物質)
- B-6 10:00 分裂酵母のテロメア・rDNA における組み換え・複製中間体がスピンドル
ルチェックポイントを活性化する機構の解析
○中野明美，上野 勝
(広島大院・先端物質)
- B-7 10:12 分裂酵母ロンボイドプロテアーゼの推定切断モチーフを有する
PA-リングフィンガータンパク質の機能解析
○出島健司，東 玲那，田淵光昭，田中直孝
(香川大・農)
- B-8 10:24 酵母発現系を用いた植物病原菌エフェクター RSc0608 の機能解析
○忻 詩博，加本佳大，東構真城，藤原祥子，田中直孝，田淵光昭
(香川大・農)

- B-9 10:36 パン生地改良剤としての脂肪酸塩の効果
○森永賀亮, 森田 洋¹
(北九大院・国際環境工,¹北九大・国際環境工)
- B-10 10:48 米麴を用いたそやし水製造における微生物の遷移と特徴
○伊藤一成, 相澤ゆかり, 辻麻衣子¹, 三宅剛史
(岡山県工技セ,¹(株)辻本店)
- B-11 11:00 脂肪酸塩の果実汚染原因カビに対する抗カビ効果
○境 志穂, 恵良真理子, 川原貴佳¹, 完山陽秀¹, 森田 洋²
(北九大院・国際環境工,¹シャボン玉石けん(株),²北九大・国際環境工)
- B-12 11:12 牛乳液体培地を用いた糸状菌の酵素生産性
○三貝咲紀, 宮崎千佳¹, 二宮純子, 森田 洋¹
(北九大院・国際環境工,¹北九大・国際環境工)
- B-13 11:24 希少糖が担子菌キノコにおよぼす生理的影響
○川手 亮, 渡邊 彰, 何森 健¹, 麻田恭彦
(香川大・農,¹香川大・希少糖セ)
- B-14 11:36 さらなる耐熱化への薬剤耐性スクリーニングの活用
○吉田咲紀, 白丸優貴¹, 村田正之, 高坂智之¹, 山田 守
(山口大院・医,¹山口大・農)

C会場（302, 303 講義室）「酵素・タンパク質, 植物・環境」

- C-1 09:00 ルイス a 抗原に作用する植物 α -フコシダーゼの精製と諸性質
前田 恵, ○板野紗月¹, 木村吉伸
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・農)
- C-2 09:12 沈水植物オオカナダモに存在する遊離 N-グリカンの特徴
前田 恵, ○江原菜津紀¹, 木村吉伸
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・農)
- C-3 09:24 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来ホモセリンデヒドロゲナーゼ
の構造解析
○井上翔太, 米田一成¹, 大島敏久², 櫻庭春彦
(香川大・農,¹東海大・農,²大阪工大・工)
- C-4 09:36 超好熱アーキア *Aeropyrum pernix* 由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼの結晶
構造解析
○津島悠斗, 林 順次, 米田一成¹, 大島敏久², 櫻庭春彦
(香川大・農,¹東海大・農,²大阪工大・工)
- C-5 09:48 徳島県産ラッパウニの叉棘レクチンの生理活性について
○江戸 梢, 酒井仁美¹, 中川秀幸¹, 西堀尚良, 西尾幸郎
(四国大短・食物栄養,¹徳島大院・環境共生)
- C-6 10:00 L-アスパラギン酸オキシターゼ-キノリン酸合成酵素複合体解析
○木村あすみ, 芦田裕之¹, 丸田隆典, 石川孝博, 澤 嘉弘
(島根大・生物資源,¹島根大・総研セ)
- C-7 10:12 大腸菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼへのアフィニティタグ付加の検討
○井本知志, 三島朱加, 稲垣賢二, 田村 隆
(岡山大院・環境生命)
- C-8 10:24 大腸菌発現系に及ぼす異種遺伝子 5'末端配列の影響
○安保紘高, 原 啓文¹, 山副敦司², 土金恵子², 細山 哲²,
今村維克, 今中洋行
(岡山大院・自然科学,¹マレーシア工科大,²NITE-NBRC)

- C-9 10:36 シグナルペプチドに生じる *N*-ミリスチル化の解析
○南風原樹, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦
(山口大院・医)
- C-10 10:48 Click chemistry を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 代謝標識法による脂質修飾
タンパク質の検出
○林田真梨子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦
(山口大院・医)
- C-11 11:00 細胞周期制御タンパク質 CDCA3 は *N*-ミリスチル化されている
○矢野愛美, 大塚基顕, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦
(山口大院・医)
- C-12 11:12 スズシロソウの重金属応答に関わる遺伝子群の特徴
○加藤伸一郎, 原 夏希¹, 梅川美紗¹, 浜田朋江¹, 相川良雄²,
岩崎貢三¹
(高知大・総合研究セ, ¹高知大・農, ²三菱マテリアル)
- C-13 11:24 立体障害を導入した前駆体蛋白質を用いた葉緑体への蛋白質輸送
○秋田 充, Manoj Pohare, 三好貴子
(愛媛大・農)

D 会場（401 講義室）「動物・食品」

- D-1 09:00 Association of GSTP1 and ABCC4 polymorphisms with response and toxicity of cyclophosphamide-based chemotherapy on Bangladeshi breast cancer patients
○Mohammad Safiqul Islam, Md. Siddiquil Islam, Ferdous Khan¹, Pinky Karim Syeda K. Fatema¹, Abul Hasnat², Kazushige Yokota¹
(Dept. Pharm., Noakhali Sci. Technol. Univ., Bangladesh; ¹Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.; ²Dept. Clin. Pharm. Pharmacol. Univ. Dhaka, Bangladesh)
- D-2 09:12 Biosynthesis of prostacyclin and its action are up-regulated during the maturation phase of adipocytes
○Ferdous Khan, Mohammad Sharifur Rahman, Pinky Karim Syeda K. Fatema, Mohammad Safiqul Islam, Kohji Nishimura¹, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono², Kazushige Yokota
(Dept. Life Sci. Biotechnol., ¹Center Int. Res. Sci., Shimane Univ., and ²Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)
- D-3 09:24 11-Deoxy-11-methylene-prostaglandin (PG) D₂ exerts pro-adipogenic effect on cultured adipocytes during the maturation phase through cellular mechanism different from that of natural PGD₂
○Pinky Karim Syeda K. Fatema, Mohammad Safiqul Islam, Ferdous Khan, Kohji Nishimura¹, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono², Kazushige Yokota
(Dept. Life Sci. Biotechnol., ¹Center Int. Res. Sci., Shimane Univ., and ²Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)
- D-4 09:36 裸子植物に含まれるポリメチレン中断型不飽和脂肪酸の動物細胞における必須脂肪酸への変換
○魚住幸加, 森戸克弥, 大隅 隆¹, 徳村 彰², 田中 保
(徳島大院・薬, ¹兵庫県大院・生命理学, ²安田女子大・薬)
- D-5 09:48 大豆由来リゾホスファチジン酸の歯周病抑制効果
○橋村 慧, 松田璃沙, 稲垣裕司¹, 松井寛和, 横田美帆, 田中 保, 木戸淳一¹, 永田俊彦¹, 徳村 彰²
(徳島大院・薬, ¹徳島大院・歯, ²安田女子大・薬)
- D-6 10:00 高脂肪食負荷マウスの血漿脂質レベルに及ぼす紫黒米摂取の影響
○中川咲良, 永易あゆ子¹, 近藤（比江森）美樹
(徳島文理大・人間生活, ¹岡山県大・保健福祉)

- D-7 10:12 高脂肪食摂取におけるリグナン Secoisolarisiresinol の脂質代謝への影響
—動物種，投与方法の違い—
○福田真子，松木 翠，西脇 寿，山内 聡，岸田太郎
(愛媛大・農)
- D-8 10:24 運動無負荷・非制限で飼育したラットでは魚肉タンパク質摂取による筋
重量増加に IGF-1 は関与しない
○澤井真梨子，原 由真，魚住圭佑，安井万智，速水耕介¹，
横井香里¹，水重貴文，岸田太郎
(愛媛大・農，¹日水・生機研)
- D-9 10:36 ポリフェノール-システインによるメトミオグロビンのオキシ化
○三浦ゆかり，本田沙理，増田俊哉
(徳島大院・総合)
- D-10 10:48 希少糖 D-プシコースを処理した線虫におけるミトコンドリア局在型
SOD の発現量
○山口大貴，佐藤正資
(香川大・農)
- D-11 11:00 ビタミン B₁₂ 強化植物性乳酸発酵食品 (ザワークラウト) の開発
○北村有子，美藤友博¹，藤井久美子²，藪田行哲¹，会見忠則¹，
渡邊文雄¹
(鳥取大院・農，¹鳥取大院・連合農，²鳥取大・農)
- D-12 11:12 トリュフ及び松露に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の特性
○滕 飛，竹中重雄¹，藪田行哲，霜村典宏²，渡邊文雄
(鳥取大院・連合農，¹大阪府大院・生命環境，²鳥取大・農・菌類きのこ
遺資セ)
- D-13 11:24 栄養補助食品のクロレラ錠剤に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の精密分析
○浅井悠亮，美藤友博¹，多湖一憲，藪田行哲¹，竹中重雄²，
溝口 享³，渡邊文雄¹
(鳥取大院・農，¹鳥取大院・連合農，²大阪府大院・生命環境，³サン・
クロレラ)

D-14 11:36 塩素系殺菌剤がビタミン B₁₂ に及ぼす影響
○上田 央, 馬場泰弘, 藪田行哲, 渡邊文雄
(鳥取大院・農)

受 賞 講 演

講 演 要 旨

ジペプチド発酵技術の開発と工業化

田畑和彦（協和発酵バイオ（株）・バイオプロセス開発セ）

二つのアミノ酸が結合したジペプチドは、構成するアミノ酸と同等の栄養生理機能を持つだけでなく、溶解性や安定性などで構成アミノ酸より優れた物性を示したり、ジペプチドの構造に起因した生理機能を発現するものもあり、その潜在機能の発掘や、多様な機能を持つ新素材として用途開発が進められている。しかしながら一般的にジペプチドの経済的な工業製法はなく、安価に供給できないことがその進展の大きな障害となっていた。従来ジペプチドはアミノ酸を原料に保護基の導入、ペプチド結合形成、保護基の脱離を経る化学合成法（または化学酵素合成法）で生産されており、その技術の改良と最適化の結果、ジペプチド誘導体である人工甘味料アスパルテームは唯一の例外として商業生産されている。しかしながら技術の汎用性が乏しいため、その他のジペプチドについてこの製法では経済的に製造することは難しい。理想的なジペプチド製法は、二種の無保護のアミノ酸を直接意図する一定の順序で酵素的に結合させることである。そこで発酵法を目標としたジペプチドの抜本的な製法革新を最終目標として、この新規活性酵素の探索から取り掛かることにした。

新規酵素探索の定石として活性（目的産物の生成）を指標とするスクリーニングを思い浮かべるが、対象産物のジペプチドは容易に生分解されるために、予めゲノム情報より候補遺伝子を絞り込み、該当遺伝子の組換え型精製酵素を用いることで細胞由来分解活性を排除し、高感度に活性を評価する手法を採用した。それを実現すべく候補遺伝子の選抜方法については、目的酵素がデータベース中に潜在するという前提で、その構造的特徴の仮説を複数設定することで実施した結果、最有力候補として枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来の *ywfE* が見出された。本遺伝子の大腸菌で発現した組換え酵素は遊離アミノ酸から ATP 依存的にジペプチドを合成する目的の活性が確認され、新たに L-アミノ酸 α -リガーゼ：L-amino acid α -ligase (Lal) と命名した¹⁾。

続いて新たに発見した Lal の酵素活性を最大に活かせる方法としてジペプチドの直接発酵プロセスの構築に取り組んだ。アミノ酸発酵によれば微生物は増殖しながらアミノ酸を合成できることから、Lal の活性を組み合わせによりジペプチドが安価な原料（グルコースやアンモニア）から微生物の増殖・代謝を通じて直接発酵生産できるものと想像できる。そしてそれを実現すべく多面的な分子育種の組合せ^{2), 3), 4)}により工業生産スケールにおいても目的産物を効率的に純度高く発酵生産できる生産菌および培養技術と、従来のアミノ酸発酵における単離精製・結晶化の技術踏襲の組合せにより、特別な操作・装置を用いることなく低コストで高収率な商業生産を国内工場（山口事業所）にて実施している。今回の対象新製品は溶解度と溶液状態における安定性に大きな課題があるグルタミン（Gln）とチロシン（Tyr）について物性改善できるジペプチドのアラニルグルタミン（AlaGln）およびアラニルチロシン（AlaTyr）である。これらにより要望の強くあった Gln および Tyr 成分含有液体製品化を可能にすることができる（医療用の輸液、飲料、細胞培養用培地用途等）。従来技術との製品価格に対するメリットでは、既存の化学合成法に比べて製造コストは 1/10 程度になっていると推定され、より使いやすい価格での供給が可能となり、新たな用途での需要喚起が期待される。

1) K. Tabata, H. Ikeda & S. Hashimoto : *J. Bacteriol.*, **187**, 5195-5202 (2005).

2) K. Tabata & S. Hashimoto : *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6378-6385 (2007).

3) M. Hayashi & K. Tabata : *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3033-3039 (2013).

4) M. Hayashi, K. Tabata, M. Yagasaki & Y. Yonetani : *FEMS Microbiol. Lett.* **304**, 12-19 (2010).

超好熱菌由来の新規 DNA ポリメラーゼの発見とその産業利用

北林雅夫（東洋紡（株）・バイオケミカル事業部）

特定のDNA断片だけを増幅するPCR法は、遺伝子の研究分野のみならず、診断分野などでも広く産業利用されている。このPCR法の酵素として用いられるのが耐熱性DNAポリメラーゼである。

*Thermus aquaticus*由来の耐熱性DNAポリメラーゼ（*Taq* DNAポリメラーゼ）の利用によりPCR法の簡便化、自動化への道が開かれ、幅広く応用可能な手法として発展したが、この酵素はDNAの合成速度は速いが、3'-5'エキソヌクレアーゼ（プルーフリーディング）活性を持たないため、DNA合成時の正確性が低いという欠点があった。そこで、更に高温（90℃以上）で生育する超好熱菌が探索され、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を持つ*Pyrococcus furiosus*由来の酵素（*Pfu* DNAポリメラーゼ）が開発された。この酵素は*Taq* DNAポリメラーゼと比較して、耐熱性と正確性は高いが伸長能力が低く、PCR増幅効率が低いという欠点があった。超好熱菌の中で、耐熱性と合成速度と正確性の全てが優れるDNAポリメラーゼの開発が待望されていた。

Thermococcus kodakarensis KOD1 株は鹿児島県小宝島の硫気坑から分離された超好熱始原菌であり、その生理特性は既報の *P. furiosus* と類似していた。しかし、本菌からクローニングされた KOD DNA ポリメラーゼは、*Pfu* DNA ポリメラーゼとアミノ酸レベルにおいて高い相同性（約 80%）を有するものの、その酵素特性は大きく異なっていた。そのプロセッシビティー（DNAポリメラーゼが基質 DNA に結合してから離れるまでに合成できるヌクレオチドの数）は、既報の耐熱性 DNA ポリメラーゼの中で最高水準であった。この特長を明らかにするため、X 線結晶構造解析が行なわれ、立体構造が明らかにされている。DNA ポリメラーゼには Palm 領域と Fingers 領域と呼ばれる領域があり、基質となる dNTP の取り込みに関与している。KOD DNA ポリメラーゼの Fingers 領域にはリジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸が Palm 側に向かって数多く並んでおり、これが効率的な dNTP の取り込みに関与していることが示唆されている。

KOD DNA ポリメラーゼは、米国で開発された *Taq* DNA ポリメラーゼ、*Pfu* DNA ポリメラーゼとは異なる純然たるメイド・イン・ジャパンの酵素である。*Taq* DNA ポリメラーゼと比較して、耐熱性が約 7 倍、合成速度が約 2.5 倍、正確性が約 50 倍と優れた酵素特性を有する、これまでに類の無い酵素であった。しかし、その高い DNA 伸長能力や強すぎる 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のため、PCR に使用するには制御が難しく、使いづらいという欠点があった。われわれは、KOD DNA ポリメラーゼを使い易い PCR 酵素とするため様々な工夫を行った。

その結果、「KOD DNA ポリメラーゼ」をベースに、最近、用途別に 2 種類の PCR 用酵素を開発した。1 つは KOD DNA ポリメラーゼの高い正確性を更に向上して、PCR の成功率を上げた「KOD-Plus-Neo」（正確性は *Taq* DNA ポリメラーゼの約 80 倍）である。もう 1 つが、KOD DNA ポリメラーゼの安定性、伸長能力を最大源に活かして、マウステールや植物葉などから DNA を精製することなく、直接 PCR に持込むことを可能にした「KOD FX Neo」（正確性は *Taq* DNA ポリメラーゼの約 20 倍）である。両酵素ともヒトゲノムから 20 kb 以上の目的産物を増幅することが可能である。

更に、2013 年には、これまでのリアルタイム PCR 用酵素の常識を覆し、難配列、ロングターゲット、クルードサンプルで高効率リアルタイム PCR を可能にした「KOD SYBR[®] qPCR Mix」を開発した。また、KOD DNA ポリメラーゼは研究用途のみならず、遺伝子診断でも優れている（東洋紡（株）全自動遺伝子解析装置 GeneCube[®]の反応試薬として販売）。その優れた伸長速度を活かし、素早く正確な判定が必要な診断の用途でも大いに活躍することが期待されている。

われわれは多くの研究者が望む製品の開発を心がけ、これまで数多くの KOD 関連製品群を開発している。これからも「KOD DNA ポリメラーゼ」が PCR 酵素の 1 つの理想形と信じて、更なる応用研究を進めている。

第2回（2014年）日本農芸化学会中四国支部技術賞受賞講演

無塩みそ風調味料の製造方法について

○中原達雄（丸善製薬（株））、川野隆史（（株）ますやみそ）

近年、塩分の過剰摂取は生活習慣病の発症リスクの一因とされる高血圧などを引き起こす要因の一つであると言われている。

日本の食生活に欠かせない調味料としてみそがあるが、みそはみそ汁、みそ漬け、みそ煮込みなど多種の食され方をされている。

しかし、みその製造においては食塩を加えることで雑菌などの増殖を抑制し、発酵、熟成から製品化までの保存性に重要な役割を果たすが、近年における避塩の風潮によって、低塩・減塩とされるみそが多く開発されている。これまでもみそ中の食塩の代替としてエタノールを添加した無塩みそ風調味料やフリーズドライにした無塩みそ風調味料を製造する方法が知られていたが、そのままの形態で無塩みそ風調味料を製造することは困難でありました。

そこで今回我々は食塩を使わずにみそを製造することに成功した。

1. 今回、無塩みそ風調味料を製造するに至った要因として、圧力酵素分解装置を使用したことにある。この装置は100 MPaまでの圧力を増幅することのできる装置である。一般的に「高圧処理」と言われる場合は、数百～数千 MPaの圧力を指すことが多いが、本圧力酵素分解装置は「高圧処理」と言われる範疇より少し低い圧力で処理できる装置である。

2. 本無塩みそ風調味料の製造は、市販の大豆を一晩水で浸漬させた後、蒸し器で大豆を蒸し、蒸した大豆を放冷後、麴と混合させ、粉砕機で粉砕する。本来の「みそ」は熟成期間が長い為、麴を粉砕しなくてもよいが、本圧力酵素分解装置を使用し、短期間で無塩みそ風調味料を製造する為、大豆と麴の接触比率を上げるためにも粉砕しておくことが好ましいと考えた。その後、圧力酵素分解装置にかけることにより、無塩みそ風調味料が完成する。

なお、本製造で使用した圧力酵素分解装置は装置の名称が圧力酵素分解装置であるが、本無塩みそ風調味料には麴由来以外の酵素は使用していない。

3. 本無塩みそ風調味料の成分分析を行った。その結果、無塩みそ風調味料は、食塩を使用していないため、ナトリウムがほとんど検出されなかった。たんぱく質、脂質、炭水化物、水分、食物繊維に関しては無塩みそ風調味料とその他のみそでは、分量に大きな差はなかった。

このことから、無塩みそ風調味料と通常のみそは、食塩（ナトリウム）量の違いだけで、その他の成分については変わりがないことが示唆された。

今後、様々な課題は残っているが、無塩みそ風調味料は調味料としてのみ使用するのではなく、食品素材として、例えば、パン、ケーキ、クッキーなどに配合して新しい食品を作り出すことが可能になってくるとも考えられる。また、これまで食塩が含まれることからみそは化粧品原料として使用されていなかった。これは化粧品処方中の製剤が食塩の影響を受けることがある為である。このように食塩の影響で味噌を使用できなかった様々な分野への応用も期待できる。

*JAS法で「みそ」とは、「大豆、麴、食塩」を使用したものを示すが、本技術では食塩を使用していないため、「無塩みそ風調味料」としています。

2014 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

カブトムシディフェンシン由来改変ペプチドの応用研究

岩崎 崇（鳥取大・農）

【背景】 申請者はこれまでに『昆虫機能の医療・産業応用』を目指し、カブトムシ抗菌性ペプチド『ディフェンシン』由来の4種類の改変ペプチド（RLYLRLRIGRR-NH₂, RLRLRIGRR-NH₂, ALYLAIARRR-NH₂, RLLLRLRIGRR-NH₂）を用いたペプチド創薬研究を行ってきた。その中で、改変ペプチドの持つ『正電荷』に着目し、以下の生理活性を見出した。

【抗菌活性】 正電荷を帯びた改変ペプチドは、負電荷を帯びた MRSA や緑膿菌といった薬剤耐性細菌の細胞膜を破壊し、既存の抗生物質よりも強い抗菌活性を示すことを見出した。さらに、改変ペプチドを長期間使用した場合においても、耐性細菌は出現しないことを明らかにした（*J. Insect Biotechnol. Sericology*, **76**: 25-29.）。

【抗腫瘍活性】 『哺乳類の腫瘍細胞は、負電荷を帯びた酸性リン脂質・フォスファチジルセリン（PS）を細胞表面に多量に表出している』という知見に着目し、改変ペプチドの抗腫瘍活性を調べた。その結果、改変ペプチドは正常細胞に細胞毒性を示さない一方で、腫瘍細胞（特に骨髄腫細胞）に対して選択的な細胞毒性を示すことを見出した。また、この抗腫瘍活性は、細胞膜を直接破壊するものであり、腫瘍細胞膜表面の PS 密度に依存的であることを明らかにした（*Peptides*, **30**: 660-668.）。

【ミトコンドリア破壊活性】 『ミトコンドリアは好気性細菌由来の負電荷を帯びた外膜を持つ』という知見に着目し、改変ペプチドがミトコンドリアを破壊することを見出した。細胞膜透過ペプチドを利用して細胞内へ導入した改変ペプチドは、細胞内のミトコンドリアの外膜を破壊し、アポトーシスを誘導することで高い細胞毒性を示すことを明らかにした（*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**: 683-687.）。この結果から、改変ペプチドと薬物輸送技術を併用することで、特定の標的細胞を効率的に制御できる可能性が示唆された。

【薬物輸送技術との併用】 上記の知見を応用するべく、腫瘍細胞特異的な分子（integrin $\alpha V \beta 3$ ）を標的とする細胞膜透過ペプチド（cyclic RGD ペプチド）と、改変ペプチドをコンジュゲートすることで、cyclic RGD-改変ペプチドを合成した。この cyclic RGD-改変ペプチドは、integrin $\alpha V \beta 3$ を発現している細胞に対して選択的に取り込まれ、ミトコンドリアの崩壊に起因したアポトーシスを誘導することが明らかになった（*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**: 2044-2048.）。このように、薬物輸送技術と改変ペプチドを組み合わせることで、細胞選択的なミトコンドリア破壊のコントロールに成功した。

【総括】 以上の研究から、カブトムシディフェンシン由来改変ペプチドは、『抗菌活性』『抗腫瘍活性』『ミトコンドリア破壊活性』といった多様な生理活性を有することを見出した。また、一見異なるように思えるこれらの生理活性は、正電荷を帯びた改変ペプチドが持つ『負電荷を帯びた生体膜破壊活性』という共通の作用機序により説明できることも明らかにした。種々の生理活性を有する改変ペプチドは、抗菌剤や抗がん剤の新規リード化合物として応用可能であることが示された。

茶ポリフェノールの吸収と生理機能に関する研究

川上賀代子（就実大・薬）

健康志向が高まる中で、手軽に摂取できる機能性食品としてお茶が注目されている。例えば、緑茶カテキンの生理作用が明らかにされ、緑茶カテキンの積極的な摂取が浸透しつつある。しかし、緑茶カテキン（エピガロカテキンガレート；EGCg）の体内への移行量は低く、生理作用を最大限発揮させるためには、効率よく体内に吸収させることが必要である。本研究では、緑茶カテキンの生理作用を効果的に享受する目的で、血中の EGCg 濃度に影響を与える食品成分の検索を行った。

さらに、緑茶成分を研究する中で、従来から飲用されてきた柿葉茶に関する含有成分や生理作用の研究が少ないことに着目した。その過程で、柿葉の熱水抽出物に α -アミラーゼ阻害活性があり、その活性成分が水溶性のプロアントシアニジン（フラバン-3-オールのポリマー）であることを見出した。しかし、柿葉のプロアントシアニジンは複雑な構造特性をもつため、詳細な化学構造は明らかになっていない。また、柿葉にはフラボノール配糖体とその 2"-ガロイル体が含まれているとの報告があるが、その生理作用やガロイル基の有無による活性変化などの詳細な研究は行われていない。そこで、柿葉ポリフェノール成分の構造とその機能性を明らかにしようとした。

ヒトに EGCg とカフェインを摂取させると、その比率によって遊離型 EGCg の血中移行量が増減することを明らかにした。機構解析のため、ヒト血中の EGCg 代謝物（グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体）量を定量した結果、EGCg とカフェインを摂取したときに血中の代謝物量は低下しており、カフェインが EGCg の抱合化を抑制することが示唆された。

柿葉に含まれる水溶性ポリフェノールに α -アミラーゼ阻害活性があることを明らかにした。水溶性ポリフェノールは生育過程において 6 月に最も含有量が高く、主要な化合物は EGCg を構成ユニットとして含有する特徴的なプロアントシアニジンであることがわかった。また、柿葉プロアントシアニジンは、高血圧自然発症ラットに対して血圧降下作用を示すことを明らかにした。その作用機序として NO を介した内皮依存の血管弛緩反応であることが示唆された。

柿葉から 4 種類のフラボノール配糖体とその 2"-ガロイル体を各種酵素を用いて効率的に分離し、DNA 損傷チェックポイントに着目して柿葉フラボノール配糖体の抗がん剤の増感作用を調べた。ATM (Ataxia Telangiectasia) はチェックポイントにおける細胞内情報伝達で中心的な役割を果たしており、下流の分子群のリン酸化を介して細胞周期を厳密に制御していることから、ガン治療の効率化を図る上で ATM の活性制御は重要なターゲットであると考えられている。柿葉フラボノール配糖体はチェックポイント分子とその上流の ATM のリン酸化を抑制し、特に 2"-ガロイル体が ATM 依存のチェックポイントシグナルを破綻させることにより、抗ガン剤の増感作用を示すことを明らかにした。

以上の結果から、カテキンは渋味を呈するため、過剰量のカテキンは飲食品の風味を損なう恐れがあるが、本研究で得られた最適カフェイン/EGCg 比を用いることで、カテキンを効率よく体内に吸収できる新規高機能茶の開発につながると期待できる。また、柿葉茶はガロイル基に富むプロアントシアニジンやガロイルフラボノールを含有しており、その生理作用として、血糖値上昇抑制作用、血圧上昇抑制作用、抗ガン剤増感作用を明らかにし、その作用機序の一端を解明した。今後、本知見を活かした新たな機能性食品の開発が期待できる。

シ
ン
ポ
ジ
ウ
ム
「食と健康」

講
演
要
旨

地中海食薬資源の機能性解析と有効利用

磯田博子（筑波大・北アフリカ研究セ）

地中海からサハラ砂漠にかけての地域は、世界植物区系において全北植物界と旧熱帯植物界の植物が共存する地域であり、また地中海からサハラ砂漠までの距離が短く乾燥傾度が高いことから、多様な生育環境に順応した植物種が存在するフィールドである。また、この地域には伝統文化と近代化の調和に基づく食薬文化があり、疫学的に欧米に比べて生活習慣病の発症率が低いことが知られている。筑波大学北アフリカ研究センターは、チュニジア・モロッコ・フランスの高等教育省傘下の大学・研究機関と生物多様性条約に則った包括協定を締結し、北アフリカ・地中海圏の 900 種の植物・菌類の種情報・伝承薬効情報・生息環境情報・機能性成分情報をデータベース化し、250 種の植物乾燥体・エキス・活性画分を保有している国内唯一の機関である。これまで、アルツハイマー症やパーキンソン病、糖尿病や肥満、アレルギー、メラニン産生などの疾患モデルとしてのバイオアッセイにより、いくつかの高い抗酸化性を有する機能性成分を見出し、プロテオミクス・メタボロミクス・マイクロアレイなど網羅的な解析により、酸化ストレスに関連するバイオマーカーの検出や細胞内情報伝達系を明らかにした。

地中海圏におけるオリーブ成分によるがん抑制等の機能性については、多くのヒト有効性が報告されている。我々は、オリーブ成分によるヒト骨髄性白血病細胞 K562 の分化誘導作用について解析している。オリーブ由来 Apigenin-7-glucoside は濃度、時間依存的に K562 細胞の増殖を抑制したが、細胞周期において G2/M 期における細胞の割合が増加したことから増殖抑制はアポトーシス誘導によるものではないことが判明した。また、細胞分化誘導活性については血球分化マーカー（CD 抗原）の発現量増加により確認した。細胞周期調節因子であり、近年造血細胞や赤血球の分化誘導への関連が報告された Chk1, Chk2 のリン酸化が Apigenin-7-glucoside による血球分化誘導に必須であることを見出すとともに、プロテオーム・マイクロアレイ解析を行い、血球機能性関連およびシグナル伝達系関連因子を確認した。(Eur. J. Nutr; 2013, 52, 25, Mol. Nutr. Food Res, 2011, 55, 93)。

神経変性疾患は様々な原因により脳内の様々な部位で神経細胞が徐々に死滅してしまうために生じる疾患の総称である。代表的な神経変性疾患としてアルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）が挙げられ、これら疾患ごとに障害を受けやすい神経細胞の種類が決まっており、AD では記憶を担当する神経細胞、PD ではドーパミン神経細胞の障害が原因で起こることが知られている。興味深いことに AD 及び PD は原因毒素及び症状は異なるが、発症メカニズムには共通性があり、どちらの疾患も酸化ストレスが原因となり発症する。リラックス効果を有する伝承薬効植物を対象として AD 及び PD に有用であると考えられる酸化ストレス抑制効果に着目し神経変性疾患に有用な活性成分の探索及びその作用メカニズムの解明を行った。(Behavioural Brain Res. 2013, 238, 86)。

また、皮膚や毛髪に含まれるメラニン色素は紫外線を吸収する機能を持つ。メラノサイトにおいて合成されたメラニンはメラノソームと呼ばれる粒子に蓄積し、周辺のケラチノサイトへと移行し皮膚に沈着する。民間伝承的に皮膚薬用植物として用いられてきた地中海アロマ植物を探索源とし、メラニン産生抑制物質として 2 種の新規化合物を見出し、マイクロアレイ解析によりその関連する遺伝子を明らかにした (J Dermatol Sci, 2012, 67, 26, J. Nat. Prod. 2009, 72, 938)。

乾燥地の様々な環境ストレスに対抗するユニークな生理活性物質には、特に、酸化ストレスが原因の一つとされる疾患の予防改善効果を有することが期待される。

シンポジウム講演

アンチエイジング食品の探索とその機能性の分子メカニズム

片倉喜範（九州大院・農）

最近になり、老化・寿命制御の分子基盤に関する研究報告が数多くなされるとともに、特に、カロリー制限効果を規定する細胞内分子・シグナルに関する研究の進展にはめざましいものがある。これまでに当研究室では、カロリー制限効果を規定する下流ターゲットとしての長寿遺伝子、サーチュインに注目し、サーチュインファミリーのプロモーター活性を EGFP 蛍光強度で追跡することのできる系を、様々なヒト由来細胞（腸管細胞、肝細胞、皮膚角化細胞、筋肉細胞）において構築し、各種食品成分のサーチュイン増強効果を検証してきている。各種同定されたサーチュイン増強食品の中から、腸管細胞において SIRT1 発現を増強することが明らかとなった乳酸菌 T2102 株について、その機能性とその機能性発現のメカニズムについて紹介する。SIRT1 増強乳酸菌 T2102 株は、多くの大腸がんの原因分子となっている β -カテニンを、SIRT1 依存的に脱アセチル化し、それとともに不活性化・分解を誘導することで、大腸ガン細胞の増殖を強く抑制することを明らかにした。またさらに最近、細胞寿命を規定するテロメラーゼの腸管における発現を、 β -カテニンが調節・制御していることが報告されたが、T2102 は β -カテニンの消失とともにそのテロメラーゼ発現も顕著に抑制することが明らかとなった。以上の結果から、T2102 株は SIRT1 増強を通じて、 β -カテニンさらにはテロメラーゼ依存的に大腸がん細胞を抑制することが明らかとなった。今後は、T2102 株以外のサーチュイン増強食品の機能性についても評価していきたいと考えている。

シンポジウム講演

ポリフェノールの生体利用性と高機能化戦略

寺尾純二（徳島大院・HBS 研究部）

Diphenylpropane 構造を共通骨格とするフラボノイドは植物性食品の主要なポリフェノール類であり、日常の食事から摂取する基本的な食品機能成分である。1936年 Scent-Györgyi らが柑橘フラボノイドのビタミンP説を提唱して以来、フラボノイドの生理活性に関する膨大な研究成果が報告されているが、健康維持や疾病予防に関わる機能がヒトで実証された例は非常に少ない。これは、各種ビタミンに比べてヒトでの生体利用性が著しく低いのが一つの理由である。すなわち、Scent-Györgyi らの説とは異なり、フラボノイドはビタミンではなく生体異物であるため、生体にほとんど吸収されないか、吸収されても第II相酵素により素早く不活性代謝物に変換されて体外に排出される。この不活性代謝物が生体内で機能を発現するメカニズムとして、われわれは標的部位における脱抱合を介した不活性代謝物の選択的活性化をすでに提唱した^{1, 2)}。一方、生体利用性の低いフラボノイドを食品機能因子としてヒトの健康増進や疾病予防に応用するためには、生体利用性を高めて高機能化する戦略が必要である。以下に述べる戦略が現在実施あるいは検討されており、ここで紹介したい。

1. 育種技術により植物性食品中のフラボノイド含量を高める。農研機構・北海道農業研究センターは従来種よりもケルセチン含量が1.5-2倍高いタマネギ品種の育成に成功し、「クエルゴールド」の名称で普及を始めている³⁾。本品種を用いた産官学横断型研究プロジェクトも開始された⁴⁾。

2. フラボノイドの物理的修飾あるいは化学的修飾によりその腸管吸収効率を高める。物理的修飾としてのヘスペリチンのサブナノ粒子化、化学的修飾としてのケルセチン配糖体のオリゴ糖付加（水溶性の付与）が、これらフラボノイドの腸管吸収効率を増加させることにより、生体利用性の向上に働くことをわれわれは明らかにした^{5, 6)}。

3. フラボノイドの化学的修飾により体内滞留性を向上させる。一般に経口摂取フラボノイドの血中半減期は数時間であり、体内にはほとんど滞留しないと考えられている。しかし、ナリングエンをプレニル化すると体内滞留量が増加して機能発現が促進することをわれわれはみいだした⁷⁾。プレニル化はフラボノイドの生体吸収の挙動を変化させ、体内滞留性を向上させる⁸⁾。したがって、プレニル化はフラボノイドの高機能化の有力な手段になりうる。

4. 他の食品との「食べ合わせ」によりフラボノイドの腸管吸収率を高める。油脂の同時摂取はフラボノイドの吸収を高める可能性がある⁹⁾。豆腐の同時摂取はタマネギケルセチンの抱合体代謝に影響することを、われわれはみとめた¹⁰⁾。しかし油脂以外の栄養素・食品成分がフラボノイド腸管吸収に与える影響は明らかではないため、今後の検討課題である。

1)Kawai et al. *J.Biol. Chem.* 2008;283:9424-9434, 2)Terao et al. *Food Func.* 2011;2:11-17, 3) 室ら, *北海道農研研報* 2010;192:25-32,

4) http://www.naro.affrc.go.jp/project/f_foodpro/subject/a7.html

5)Takumi et al. *Food Func.* 2012;3:389-398, 6)Murota et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010;501:91-97,

7)Mukai et al. *PLoS ONE* 2012;7:e45048, 8)Mukai et al. *J. Nutr.* 2013;143:1558-1564, 9)Murota et al.

Br. J. Nutr. 2013;109:2147-2153, 10)Nakamura et al. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58:310-317.

特別講演

機能性食品と腸管機能

清水 誠（東京農大・応用生物）

食品の機能性に関する系統的な研究は、ちょうど30年前の1984年にスタートした文部省（現文部科学省）の大型研究プロジェクトによって始まった。このプロジェクトは、その後、3期11年にわたって継続されることになったが、その中核を担ったのは日本農芸化学会の研究者たちであった。医学や薬学の研究者とも連携して、食品に多様な生体調節機能があることを示したこの研究プロジェクトは、「機能性食品」という、特定の健康増進機能を持つ新規な食品カテゴリーを創出し、それは日本のみならず、今や世界各国で研究・開発されるようになった。

一定の科学的証拠をもとに開発された機能性食品の代表が、厚生労働省（その後は消費者庁）の許可を得て販売される特定保健用食品（通称トクホ）である。現時点では1100品目を超える製品がトクホの許可を受けており、整腸、虫歯予防、骨強化、さらには血圧、血糖値、中性脂質・コレステロール値、肥満などのいわゆるメタボリック症候群の予防・改善機能と持つ食品群として広く利用されるに至っている。

さて、これらのトクホをその「作用の場」という視点から眺めてみると、8割近くが腸（消化管）で働くものであることに気付く。その内容は、①腸内細菌叢を改善するもの、②腸管における栄養素の吸収制御を行うものに大別されるのだが、いずれにせよ腸管が、「食による健康増進」を考えた時の標的器官として好適なものであることが推察される。腸管が、食品成分や腸内内容物に直接接触し、その影響を受けやすいことを考えればこれは当然とも言えよう。

腸管には、栄養素の「吸収機能」、有害異物に対する「バリア機能」、腸管内容物を認識し、その情報を体内に伝える「認識・応答機能」が備わっている。食品成分はこれらの機能に影響を及ぼすことにより、様々な疾病予防や体調調節に関わっていると考えられる。したがって、これまでのトクホで利用されている作用機構以外にも、食品による腸管を介した健康増進戦略としてはまだ多くのアプローチがあるに違いない。例えば、トランスポーターの制御による栄養素吸収の制御、転写因子を介した解毒代謝系の調節による腸管バリアの強化、腸管免疫系の機能を制御することによる感染予防やアレルギー予防などである。また、近年、腸管内に棲息する微生物が健康に大きな影響を持つことが次々に明らかになっている。よい腸内細菌叢を持つことは、腸管感染の予防はもとより、免疫系の機能改善、脂質代謝や糖代謝の改善、神経系の成長や維持など、全身にわたる健康増進に極めて重要な役割を果たしていると多くの研究者が考えるようになっている。これまで単に便秘や下痢の改善に役立つとされていた整腸食品が、実は腸内細菌叢を介してさらに幅広い機能を持ち得ることが期待されるのである。

機能性食品の研究・開発が急激に進んだ理由の一つとしては、1980年代になって動物細胞培養系が食品科学の世界にも広く普及したことが挙げられよう。日本動物細胞工学会は、食品の機能性評価系への動物細胞の利用に関し、この間多くの貢献をしてきた。腸管機能を制御する機能性食品の開発デザインやメカニズム解析を進める上でも、例えばCaco-2細胞をはじめとする腸管培養細胞株を用いた研究が多く、多くの情報や示唆を与えたことは疑いない。最近はいPS細胞のような高いポテンシャルを持つ細胞も登場しており、いずれはそれらを利用した機能性・安全性評価系が、機能性成分探索や新規機能性食品の開発に活かされていくことを期待したい。

〔参考文献〕 M. Shimizu, Interaction between food substances and the intestinal epithelium, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 232-241(2010); 清水 誠, 機能性食品と腸管, FFI ジャーナル, **218**, 311-318 (2013).

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 PCTK3 はアクチン動態を制御する
○松田真弥, 宮本賢治, 小松弘明, 辻 明彦, 湯浅恵造 (徳島大院・STS 研究部)

【目的】PCTAIRE kinase 3 は cyclin dependent kinase (CDK)ファミリーに属する Ser/Thr キナーゼであるが、他の CDK とは異なり、組織選択的な発現パターンを示すことから、細胞周期制御以外の機能を果たす特殊な CDK と考えられている。ごく最近、我々は PCTK3 の活性調節因子として cyclin A 及び PKA を同定し、その活性制御機構の解明に至った。しかしながら、PCTK3 の下流シグナル伝達機構や生理機能には依然として不明な点が多く残っている。そこで、本研究は、PCTK3 の生体内での機能を明らかにすることを目的とし、PCTK3 ノックダウンによる細胞機能への影響を調べるとともに、下流シグナル伝達機構の解明を試みた。【方法・結果】まず初めに、PCTK3 を標的とする siRNA を HEK293T 細胞に導入したところ、細胞の形態が変化し、細胞が伸展することを見出した。さらに、創傷治癒アッセイにより、PCTK3 ノックダウン細胞において、細胞遊走の促進が認められた。この結果を受け、蛍光標識した phalloidin を用いて F-アクチンを染色した結果、コントロール細胞と比較して PCTK3 ノックダウン細胞では細胞膜辺縁でのアクチンの凝集が観察された。アクチンの重合・脱重合には、コフィリンが関与していることから、コフィリンのリン酸化状態について調べた結果、PCTK3 ノックダウン細胞ではそのリン酸化が増加することが明らかとなった。それと共に、myosin light chain やコフィリンの上流因子である LIM-domain kinase のリン酸化も増加していたことから、PCTK3 は細胞骨格の制御に関わる RhoA/ROCK シグナルを介して、細胞形態や遊走の制御に関与している可能性が示唆された。

A-2 誘電泳動技術を利用した希少細胞の分離選抜技術とその応用
○横山拓也^{1,2}, 脇坂嘉一¹, 高野雅代¹, 糸井隆行¹, 圓城寺隆治¹, 大政健史²
(¹(株)AFI テクノロジー, ²徳島大院・STS 研究部)

動物細胞による抗体医薬品製造プロセスにおいて、優良細胞の選抜・分離は非常に重要な課題のひとつである。特に、細胞株構築段階で抗体高生産株を選択的に取得することができればスループットが向上し、開発・製造が飛躍的に進展すると考えられる。

しかし、従来の細胞選抜・分離手法は、蛍光標識を必要とするため指標としてしか使えない、精度が低い、処理量が少ない等々の問題があるため、ELISA 法などを繰り返すことで細胞の選抜を行うしかなく、結果としてひとつの製造プロセスに半年間～1年間を要している。細胞に標識を必要とせず（非侵襲である）、高精度かつ大量処理が可能な細胞の選抜分離技術が実現すれば、細胞全数の中から抗体高生産株を選抜・分離し、それらをそのまま抗体生産に使用することが可能となり、プロセスの大幅な短縮にも結び付く。

本研究グループは、誘電泳動の原理によって細胞や微生物を選択的に分離する技術の開発を行っている。誘電泳動による細胞分離は、細胞への標識を必要とせず非侵襲であること、高精度を実現する可能性があること、大量処理が可能であることなどの要件を備えており、抗体医薬品製造に多く用いられている CHO 細胞の抗体高生産株の選抜・分離に応用することを試みている。本技術は、様々な分野において求められる希少細胞の選抜・分離に応用することが可能である。

A-3 Savinin 類縁体の合成およびそれらの細胞毒性評価

○物部勇馬, 西脇 寿, 藤原敏美, 菅原卓也, 山内 聡, 首藤義博
(愛媛大・農)

【目的】 Savinin は α -benzylidene- β -benzyl- γ -butyrolactone 構造を有するリグナンであり, 北米ザリガニ(*Procambarus spiculifer*)に対する摂食阻害活性が報告されている。また, 細胞毒性を有することも期待されており, 白血病由来の HL-60 細胞に対する(-)-savinin の毒性評価が検討されているが, あまり強い作用は認められていなかった。しかし, 立体異性体を用いた詳細な研究はなされておらず, 本研究では種々の savinin 類縁体を立体選択的に合成し, 立体構造および置換基構造と細胞毒性の関係を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 Piperonal を出発原料に, 不斉補助基として(4*R*)-あるいは(4*S*)-benzyloxazolidinone を用いることで, 中間体である(+)-および(-)- β -benzyl- γ -butyrolactone を立体選択的に合成した。これらのラクトンを用い, 様々なアルデヒドを縮合させることで, 種々の savinin 類縁体を高い光学純度で得た。これら類縁体の HL-60 細胞あるいは Vero 細胞に対する毒性を WST-8 試験により評価した。その結果, savinin の HL-60 細胞に対する IC₅₀ は, 両鏡像異性体とともに 10 μ M 前後であり, 異性体間での有意な差は認められなかった。一方, Vero 細胞ではいずれの化合物も 30 μ M で有意な活性を示さず, savinin の両鏡像異性体ともに細胞種間の選択性を有することが認められた。

A-4 イミダゾリジン環の 5 位に置換基を有するイミダクロプリド類縁体の三次元定量的構造活性相関解析

○長岡ひかる, 西脇 寿, 赤松美紀¹, 山内 聡, 首藤義博
(愛媛大・農, ¹京都大院・農)

【目的】われわれはこれまでに, 神経作用性殺虫剤イミダクロプリドのイミダゾリジン環の 5 位に多様な置換基を導入した類縁体を合成し, それらの受容体親和性および殺虫活性を測定することで, 置換基導入が生物活性に与える影響を明らかにしてきた。本研究では, 殺虫活性と受容体親和性の相関関係および置換基の物理化学的性質が受容体との結合に与える影響を解明することを目的として, 生物活性間の相関関係を解析するとともに, 測定した受容体親和性をもとに Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 法を用いて定量的に構造活性相関を解析した。

【方法・結果】受容体親和性と殺虫活性の相関関係を解析した結果, 殺虫活性には受容体親和性だけでなく, 疎水性および置換基に含まれる硫黄や酸素といったヘテロ原子の数が関与していることが示され, ヘテロ原子を有する類縁体はイェバエ体内で代謝を受ける可能性が考えられた。さらに, CoMFA 法による解析の結果から, 化合物が高い受容体親和性を示すために必要な静電的相互作用領域および立体的許容領域が明らかとなり, 同部位には *n*-pentyl 程度の長さを持つ置換基の導入が可能なが示された。これらの結果から, ある程度の炭素数を有し, かつ, 代謝を受けにくい置換基をイミダゾリジン環エチレン部位へ導入することで, 高い生物活性を有する化合物のデザインが可能であることが示唆された。

A-5 D-アロース-2-ナフチル酢酸エステルの合成と植物生長調節活性
○佐野真奈美, 広瀬花穂, 川浪康弘 (香川大・農)

【目的】D-アロースなどの希少糖は、植物生長抑制作用、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その生理活性が向上することを報告している。今回、直鎖脂肪酸の代わりに、芳香族のナフタレン環を有する2-ナフチル酢酸をD-アロースの6位に導入したD-アロース-2-ナフチル酢酸エステルをリパーゼによる酵素反応で合成し、レタス及びイネに対する生長調節活性を検討した。

【方法・結果】D-アロースと2-ナフチル酢酸をアセトンに懸濁させ、脱水剤としてモレキュラシーブ4Aを加え、50°Cで8日間リパーゼ (*Candida antarctica* lipase) を用いてエステル化反応させ、C-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-2-ナフチル酢酸エステルの合成を行った。レタスに対する活性試験は、ペトリ皿に試料溶液、レタスの種10粒を入れ、25°Cの暗所で2日間育成後、胚軸と根の長さを測定した。また、イネに対する活性試験は、管瓶に試料溶液を入れ、発芽した種子7粒をまき、30°C明所で7日間育成後、第二葉鞘の長さを測定した。レタスに対する活性試験において、D-アロース-2-ナフチル酢酸エステルは100 µMの濃度で胚軸と根に対して約40%の生長抑制活性を示したが、逆に1 µMの低濃度で約120%の生長促進活性を示した。イネに対する活性試験においても、D-アロース-2-ナフチル酢酸エステルは100 µMの濃度で第二葉鞘に対して約70%の抑制活性を示す一方、10 µMの低濃度では約120%の生長促進活性を示した。

A-6 D-アロース誘導体の合成とその植物生長調節作用
○安藤 光, Md. Tazul Islam Chowdhury, 川浪康弘 (香川大・農)

【目的】希少糖の一種であるD-アロースは、植物生長抑制作用、活性酸素産生抑制作用、抗アレルギー作用、癌細胞増殖抑制作用などが報告されている。しかし、その活性は低い。当研究室では、親水性である希少糖に直鎖脂肪酸や芳香族などの疎水基を導入することで、生理活性が向上することを報告している。さらに、希少糖にアミドを導入することで生長促進活性傾向がみられたので、さらなる生長促進の向上を目指し、アミドから尿素誘導体へ、直鎖脂肪酸からベンゼン環へと変えた1,2,6-トリデオキシ-6-(2-ヒドロキシベンズイミダゾリル)-D-アロース(dAll-HBI)の合成を行い、レタスによる生理活性試験を行った。

【方法・結果】D-アロースを用いてアシル化およびブロモ化を行い、続けて、亜鉛による脱離反応後、収率51%で合成した。次に接触還元反応後、収率88%で合成した。次に加水分解反応後、収率66%で合成した。次にトシル化後、収率70%で合成した。最後に求核置換反応後、収率20%でdAll-HBIを合成した。各種の濃度に調整した試料溶液にレタスの種を10粒ずつ浸し、25°C暗所にて48時間育成させた。胚軸と根の長さを計測し、コントロールに対する生長率を検定した。生長試験の結果、胚軸に対して、10 µMで110%、根に対して、1 mMで107%の微かな生長促進活性が見られた。そこで、さらなる生長促進活性を明らかにするため、25°C明所にて96時間育成させた。その活性試験の結果、胚軸に対して、100 µMで115%、根に対して、136%の生長促進活性が見られた。

A-7 ペントース誘導体の合成と MOLT-4F 白血病細胞に対する増殖阻害活性
○高倉千尋, 小橋克哉, 柳田 亮, 川浪康弘 (香川大・農)

【目的】D-アロースは、D-グルコースの C-3 位エピマーである希少糖の一種であり、血管新生阻害活性、植物生長調節活性、がん細胞増殖阻害活性を示す。これまでの研究で、D-アロースの C-6 位アシル化誘導体が、D-アロースの数十倍白血病細胞増殖阻害活性を示すことが明らかになった。そこで本研究では、D-アロースのフラノース型構造に類似したペントースのアシル化誘導体を合成し、それらのがん細胞増殖阻害活性を調べた。

【方法・結果】各種のペントースにデカン酸ビニルあるいはドデカン酸ビニルを加え、C-5 位の水酸基をリパーゼにより位置選択的にアシル化し、ペントースのデカン酸エステルおよびドデカン酸エステルを合成した。ペントースには、D-リボース、2-デオキシ-D-リボース、D-アラビノース、L-アラビノースの 4 種類を用いた。10~300 μ M の濃度の各ペントースエステルをヒト白血病 MOLT-4F 細胞株を播種したマイクロプレートウェルに添加し、37°C、5%CO₂ 条件下で 48 時間インキュベーションした後、生細胞数を定量し、コントロール群に対する細胞増殖率を算出した。いずれのペントース誘導体においても、ドデカン酸エステルの方がデカン酸エステルよりがん細胞増殖阻害活性が高い傾向が見られた。また、D-リボースドデカン酸エステルの増殖阻害活性は D-アロースドデカン酸エステルとほぼ同程度で、2-デオキシ-D-リボースドデカン酸エステルの増殖阻害活性はそれらより高く、一方 D-アラビノースおよび L-アラビノースドデカン酸エステルの増殖阻害活性は低かった。

A-8 The synthesis of 4,5-disubstituted-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) derivatives
○Ruiqin Yi, Tsuyoshi Ichiyangi (Fac. of Agric., Tottori Univ.)

Lipopolysaccharides (LPSs) are produced by gram-negative bacteria on their outer membrane and play an important role in the mechanism of bacterial infection. LPS is composed of O-specific polysaccharide, a core oligosaccharide (core OS), and lipid A. The lipid A moiety causes the biological toxicity of LPS; however, the function of a core oligosaccharide of LPS is unclear. Recently, it has been reported that human antibody recognized a core OS of LPS derived from pathogenic strains, so core OS is a focused target for vaccine development. In our development of the core OS synthesis, we have reported a new Kdo intermediate preparing from D-mannose to synthesize the Kdo disaccharides [Kdo (α 2-4 or α 2-8)Kdo] in good yield¹.

In this report, the limitation of glycosylation reactions and syntheses of 4,5-branched Kdo trisaccharides using this Kdo disaccharide as an acceptor will be discussed.

¹ Ichiyangi, T. et. al. *Tetrahedron*, **2011**, 67, 5964-5971.

A-9 分子内グリコシル化反応を利用する Kdo2 糖の合成研究
○田坂瑞葵¹, 一柳 剛 (鳥取大院・農,¹鳥取大・農)

【目的】グラム陰性細菌は細胞外膜に複合糖脂質リポ多糖 (LPS) を産生する。これらは、多糖, コア糖鎖, Lipid A からなる。コア糖鎖と Lipid A との架橋部には α -2-4 結合を有する 2-3 分子の酸性糖 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) が存在する。我々は Kdo を含むコア糖鎖の合成を目指しており、これまでに Kdo 鍵中間体を開発し、いくつかの Kdo 糖鎖合成を達成している。しかし、Kdo の分子間グリコシル化では 3-デオキシ糖である理由から立体制御, 反応性の調節が困難なため選択性, 収率に改善の必要があった。本研究では、Kdo 供与体の 1 位カルボキシル基と Kdo 受容体の 5 位をエステル化し、続いて分子内縮合を行うことで上記問題が解決するのではないかと考え Kdo2 糖の合成を試みた。

【方法と結果】D-マンノースから鍵中間体である Kdo 中間体を合成した。この化合物のアノマー水酸基をパラジウム触媒と炭酸アリルエチルによりアリル化したのち 90% トリフルオロ酢酸水溶液で 4, 5 位のジオール体を得た。続いてトリエチルシリル化により 4 位を選択的に保護することで糖受容体とした。一方、アノマー水酸基を三フッ化ジメチルアミノ硫黄によりフッ素に変換し、ヨウ化リチウムまたはリチウムチオエトキシドによりメチルエステルの脱保護を行い、カルボキシル基を有する 2 種類の糖供与体を得た。続いて糖供与体と糖受容体のエステル化において、各種縮合剤を検討した結果 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物が最適であることがわかった。得られたエステル体を使用した分子内グリコシル化反応の結果と併せて報告する。

A-10 中国産ハーブより単離された抗腫瘍物質マオエクリスタル V の合成研究
○清田洋正, 小竹正晃¹, 佐藤恵里子¹, 佐々木郁香¹, 浅尾洋樹¹, 島崎泰治¹,
山田てい子¹, 桑原重文¹ (岡山大院・環境生命,¹東北大院・農)

【目的】Maoecrystal V (**1**) は、中国産ハーブの一種 *Isodon eriocalyx* より単離、構造決定された化合物で、類例の無い 6,7-seco-6-nor-15(8->9)-abeo-5,8-epoxy-ent-kaurane 骨格を有している [1]。HeLa 細胞に対して選択的に強い細胞毒性 ($IC_{50} = 20$ ng/ml) を示すことから、**1** は新規抗ガン剤のリードとして期待されている。既に全合成が報告されているが [2], 我々も異なるアプローチで高選択的な全合成を目的として研究を進めている。

【方法・結果】Cyclohex-2-en-1-one を出発原料とし、8 工程で三環性ジエノフィルを得、Danishefsky-Kitahara ジエンとの Diels-Alder 反応により四環性ケトラクトンを高収率かつ立体選択的に得た。さらに、ラクトン環を開環し、アセチリドによる増炭およびブロモエーテル環化反応を経て、四環性エーテルを合成することに成功した。現在、残る六員環ラクトン環の構築を、ラジカル反応、カルボニル化-ラクトン化、6-exo-環化反応により検討している。

[1] S. H. Li *et al.*, *Org. Lett.* 2004, **6**, 4327.

[2] J. Gong *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 16745; J. Y. Cha *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 14964; F. Peng *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18860; P. Lu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 14552.

A-11 はぶ草 (*Senna occidentalis* L.) 種子の香気成分と生理活性について
○元矢倫子, 元矢知志¹, 岡田芳治, 野村正人
(近畿大院・シス工, ¹島根大院・医)

【目的】近年、漢方医学と西洋医学の長所を互いに取り入れようという東西医学結合の流れが広まりつつある。この流れを受け、漢方やその原料となる生薬、さらには世界各地で伝統的に効果を持つとされる植物などの成分分析や、その効能を科学的に実証するための研究が盛んに行なわれている。そこで本研究では、健康茶の一つであるはぶ草 (*Senna occidentalis* L.) の種子について抽出を行ない、香気成分の検索と生理活性について検討した。

【方法・結果】岐阜県産はぶ草(葉取用)種子を粉碎し、メタノールに2週間浸漬して、メタノール抽出部を得た。これに対して、SPME法によるGC-MS分析を行ない、2-アセチルピリジン(25.77%)として確認した。次に、メタノール抽出部を、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノールの順に溶媒分画を行なった。その後、各分画部に対してDPPHラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験を行なった結果、水層部およびブタノール分画部に高い値を確認した。そこで、TLCを用いて水層部をFr.1~5、ブタノール分画部をFr.1~4に細分画を行ない、各分画部に対して両酸化試験を行なった結果、水層部ではFr.4に、ブタノール分画部ではFr.1~4の全てにおいて高い値を確認した。

一方、はぶ草種子を80°Cの熱水で抽出し凍結乾燥後、上記操作と同様に順次溶媒分画し、各分画部の酸化試験を行ない、抽出方法の違いによる酸化試験の結果を比較した。

A-12 4種の酸化試験によるoleuropein aglyconのパン酵母還元生成物およびその関連化合物の評価
高津綾香, ○古賀まり子, 三宅剛史¹, 徐 恵美², 菊地敬一², 仁戸田照彦,
神崎 浩(岡山大院・環境生命, ¹岡山県工技セ, ²日本オリーブ(株))

【目的】当研究室では、オリーブ葉EtOH抽出物EtOAc可溶画分をパン酵母により変換反応させた際、oleuropein aglyconのアルデヒド型(化合物A)からその還元型(化合物B)が得られることを見出した。化合物Bを含めたoleuropein関連化合物は酸化活性に寄与するカテコール構造を有することから、DPPH法とORAC法という原理が異なる2種の測定法によって酸化活性評価を行った。その結果、それらの化合物はDPPH法ではアスコルビン酸ナトリウム(AANa)と同程度、ORAC法ではビタミンE誘導体Troloxの7~9倍高い活性を示した。酸化活性は測定法の違いにより異なる活性の程度を示すことが報告されており複数の測定法にて評価を行うことが必要とされている。そこで、本研究ではさらにHORAC法とESR法によりoleuropein関連化合物の活性評価を行った。【方法・結果】測定法として、ORAC法と同様に、ラジカルにより分解される蛍光プローブの強度の減少を測定するHORAC法と、ラジカルをスピンドクトへ変換し電子スピン共鳴を測定するESR法を用いた。HORAC法ではORAC法と異なるラジカル種であるOHラジカルに対する活性を、ESR法ではO₂⁻, OH, C₂H₅ラジカルに対する活性を測定した。その結果、oleuropein関連化合物はAANaやTroloxと異なり、今回行った測定法全てにおいて高い活性を示し、DPPH法やORAC法においても高い活性を示したことから今後酸化剤としての応用が期待できる。またHORAC法とESR法にてoleuropein関連化合物が同じOHラジカルに対して異なる活性強度を示したことから、酸化活性評価において複数の測定法を用いることが重要であると実証された。

A-13 β -N-Acetylglucosaminidase 阻害物質生産糸状菌が生産する昆虫成長制御物質
○高辻笑理, 奥田 徹¹, 神崎 浩, 仁戸田照彦
(岡山大院・環境生命,¹東京大・理)

【目的】当研究室ではスクリーニングにより β -N-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) 阻害物質生産糸状菌として *Paecilomyces* sp. F13 株, *Paecilomyces* sp. F2281 株, *Paecilomyces* sp. F30 株, *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA87 株 (F40 株) を選抜した。本研究ではこれら 4 菌株が昆虫成長に影響するか検討した。

【方法・結果】キンバエの終齢幼虫と GlcNAcase 阻害物質生産糸状菌の培養物を同一シャーレ内に入れ、羽化するまでの成長過程を観察した。その結果、4 菌株のうち F30 株と F40 株の押し麦固体培養物と寒天培養物において殺虫活性が確認され、さらに押し麦固体培養物では幼虫期間を延長させる活性も確認された。これら 2 菌株の培養物をオートクレーブ処理すると、押し麦固体培養物では活性はほとんど確認できなかったが、寒天培養物では低下したものの活性が明瞭に確認できた。また、2 菌株の両培養物の MeOH 抽出物をろ紙あるいは寒天に保持させた試験では活性が確認できなかったことから、両培養物の MeOH 抽出物の活性は乾燥・加熱などの操作により失われることが考えられた。そこでこれらの操作による失活を防ぐため、試料をアルギン酸カルシウムゲルに保持させて試験した。その結果、2 菌株ともに、押し麦固体培養物の MeOH 抽出物は明瞭な活性を、寒天培養物の MeOH 抽出物はわずかな活性を示したため、押し麦固体培養物の活性は MeOH に回収されるが寒天培養物の活性は回収されにくいことがわかった。以上のことから、F30 株と F40 株の押し麦固体培養物と寒天培養物の活性に微生物代謝産物が関与することがわかり、さらに両培養物における活性物質が異なる可能性が示唆された。

B-1 Screening and characterization of ulvan-degrading bacteria
○何 川, 高橋 亮, 大西浩平 (高知大・農)

Ulvan is a complex sulfated polysaccharide in the cell walls of green algae belonging to the genus *Ulva*. The objective of this study is to discover ulvan-degrading bacteria, which can contribute to potential use of ulvan oligomers or monomers. Ulvan-degrading bacteria were screened on agar plates with purified ulvan as a sole carbon source in artificial seawater and visualized with cetylpyridinium chloride (CPC). Bacteria samples were collected from feces of the molluscs living on the surface of green algae, *Ulva ohnoi*. Ulvan-degrading enzymes were monitored from culture supernatants of screened bacteria by using ulvan gel and CPC. Finally, one strain KUL42 was isolated as an ulvan-degrading bacterium. KUL42 was classified as *Alteromonas* sp. by 16S rRNA gene sequence. The crude enzymes were purified by ammonium sulfate precipitation from the supernatant of bacterial culture grown with ulvan, followed by anion exchange and hydrophobic interaction chromatographies. With CPC method, two proteins with molecular masses of 45k and 60k Daltons were indicated to have activities. N-terminal amino acid sequences of these proteins were determined. Corresponding genes for these proteins were blast-searched using draft genome sequence of KUL42. As a result, the 45kD- and 60kD-proteins were identified as sulfatase and β -xylosidase, respectively. Sulfatase is an enzyme to remove sulfate group from substrates. The 60kD-protein is classified into glycoside hydrolase family 43.

B-2 酸性鉱山廃水処理に有用な微生物の探索
○山本康次郎, Sultana Sharmin¹, 金尾忠芳¹, 上村一雄¹
(岡山大・農, ¹岡山大院・環境生命)

【目的】黄鉄鉱に起因する酸性鉱山廃水は、 Fe^{2+} や重金属イオンを含んでおり、これらを除去するために pH 2 付近で生育する *Acidithiobacillus ferrooxidans* によって、 Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化した後、 CaCO_3 で中和処理されている。廃水処理は硫化鉄石が存在する限り続くため、処理コストの低減化が望まれている。そのために、pH 4 付近で生育する鉄酸化細菌を用いた処理システムの構築を目的に細菌の単離、培養を試みた。【方法】岡山県柵原鉱山周辺で鉱山廃水を採取した。試料から DNA を抽出し、PCR 増幅した 16S rRNA 遺伝子の DGGE 解析によって微生物を分析した。種々の培地を用いて生育に有効となる培養条件を検討した。培養液中の細菌は、特異的な PCR プライマーを用いて分析した。電気培養法を用いて、低鉄濃度条件での集積培養を試みた。【結果】DGGE 解析によって、鉄酸化細菌である *Ferrovum myxofaciens* と 95% の相同性を持つ細菌を検出した。UMEÅ 培地, 9K 培地, FS 培地, APPW 培地を用いて、鉄濃度を調節しながら集積培養を行なった。その結果、*Ferrovum* の培養には、中程度 pH, 低鉄濃度 (10 mM 以下), 培養温度 20°C 前後の条件で長期間培養することが有効であると考えられた。しかし、培養液中には *A. ferrooxidans* や *Gallionella* といった他の細菌も生育していた。*A. ferrooxidans* ATCC23270 株を電気培養すると、鉄濃度 10 mM では生育しなかったため、*Ferrovum* が優勢に生育した培養液を用いて、10 mM 鉄存在下で電気培養を行ない、*Ferrovum* の集積を試みた。顕著な菌数の増加は観察されていないが、集積培養液中には、*Ferrovum* と *A. ferrooxidans* の両方の存在が検出された。

B-3 非生物素材に付着した大腸菌 O157 の次亜塩素酸ナトリウム耐性
後藤月江^{1,2}, 達 牧子³, O横井川久己男¹
(¹徳島大院・総合科学, ²四国大・短大部, ³神戸女短大)

【目的】腸管出血性大腸菌 O157 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、調理器具表面のわずかな汚染でさえ感染源となり、調理器具を介して食品の二次汚染を引き起こす可能性がある。食品工場のステンレス、プラスチック、ゴム等の表面に付着した本菌は、長期にわたり生存すると報告されている。しかし、調理器具素材と食品との接触は短時間であり、単細胞の状態に付着した菌の生存性や殺菌剤耐性に興味もたれるが、その挙動は未だ十分に解明されていない。本研究では非生物素材表面に付着した本菌の生存性と次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性について検討した。【材料と方法】菌株は大腸菌 O157sakai 株を使用した。非生物素材としては、ステンレス、チタン、アルミニウム、ガラス、プラスチック類を使用した。これらの素材表面に細胞懸濁液を 25°C で 30 分間接触させ、生理食塩水で洗浄後、生理食塩水または 1/10 濃度の LB 培地を加えて、継時的に次亜塩素酸ナトリウム耐性を調べた。

【結果及び考察】浮遊細胞に対しては 0.01 ppm の次亜塩素酸ナトリウムにより 25°C、5 分間の処理で 99% 以上の殺菌効果が見られたが、非生物素材表面に付着した大腸菌 O157 は、初期付着の段階でも、同条件での処理により高い生存率となり、付着細胞は遊離細胞よりも高い次亜塩素酸ナトリウム耐性を示すと考えられた。また、付着後の時間の経過と共に次亜塩素酸ナトリウム耐性は増大した。水道水に含まれる次亜塩素酸ナトリウムでは、本菌の付着細胞を殺菌することは困難と考えられた。

B-4 T-RFLP 法による 18S-rDNA フラグメント解析の最適化
O曾我夏実, 芦田裕之¹, 丸田隆典, 石川孝博, 澤 嘉弘
(島根大・生物資源, ¹島根大・総科研支援セ)

【目的】T-RFLP 法は、微生物の SSU (16S-rDNA, 18S-rDNA) の塩基配列の違いを利用して微生物群集の多様性を簡便に把握することができる方法である。T-RFLP 法では一般的に 4 塩基認識制限断片の位置から微生物種を比較する T-RF プロフィール分析が行われているが、精度よく断片サイズを決定できれば、属レベルでの微生物種の特定が可能である。当研究室では、これまでに 16S-rDNA を対象とした T-RFLP 解析を行ってきたが、今回は真菌を対象とする 18S-rDNA の T-RFLP 法の最適解析条件の検討を行い、畑土壌の解析を行い、クローン化ライブラリー解析と比較を行ったので報告する。

【方法・結果】T-RFLP 解析には 18S-rDNA 遺伝子の V4-5 領域と V7-8 領域を標的とする 2 つのプライマーセットを用いた。トマト畑土壌は、植物から 30 cm 離れた 10 箇所、サトイモ畑土壌、ダイコン畑土壌は、植物から 5 cm 離れた深さ 10 cm の 3 箇所から採取し、ISOIL for Beads Beating を用いて DNA 抽出を行なった。フラグメント解析値の誤差を ±1 塩基以内に収めるため、当研究室で作製した 4 色蛍光標準フラグメントを基に補正式を作成した。V4-5 領域、V7-8 をそれぞれ制限酵素処理後混合し、GeneMapper 解析を行った。制限酵素は、16S-rDNA 解析において良好に補正することが可能であった Msp I, Hha I, Xsp I を用いた。これら最適条件で、T-RFLP 解析を行い、真菌属レベルで同定することが可能であるかを検討した。また畑土壌サンプルの V4-7(F-565-R-1631) を PCR 増幅後、クローン化ライブラリー法で解析し、T-RFLP 解析結果と比較・参照した。

B-5 分裂酵母のテロメア短小化に関与する因子の解析 ○南部智子, 上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】 分裂酵母の一本鎖 DNA 結合タンパク質である Pot1 が破壊されると、テロメアは急激に消失し、染色体間で末端融合が起こり、染色体が環状化した細胞だけが生き残ることができる。このテロメアの短小化には複数の因子が関与していることが分かっているが、短小化の機構は明らかにはなっていない。そこで本研究では、Pot1 が機能を失った時のテロメアの初期の変化と、その短小化に関与する因子の解析を目的とした。

【方法・結果】 薬剤投与で Pot1 の機能をオフにできる株を作成し、テロメアの短小化に関与すると考えられる因子が *pot1* 破壊株でどのように機能するかを調べた。その結果ヌクレアーゼである Exo1 とヘリケースである Rqh1 がテロメアの短小化に関与していることが明らかになった。また、Exo1 と Rqh1 のどちらも機能がしない条件下でもテロメアの削り込みが行われていたことから、短小化に関与する異なる因子の存在が示唆された。

B-6 分裂酵母のテロメア・rDNA における組み換え・複製中間体がスピンドルチェックポイントを活性化する機構の解析 ○中野明美, 上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】

Pot1 は一本鎖テロメアに結合し、テロメア末端を分解や DNA 修復活性から保護する。当研究室では、Pot1 破壊株と Rqh1 のヘリケース活性を失活させた *rqh1-hd* 株とを組み合わせた *pot1Δrqh1-hd* 株において、テロメアが DNA 組換えによって維持されること、M 期アレスト頻度が高いこと、スピンドルチェックポイント (SAC) が活性化することを発見している。しかし、この株における SAC 活性化の機構はわかっていない。そこで、本研究では *pot1Δrqh1-hd* 株における SAC 活性化機構の解明を目的とした。

【方法・結果】

SAC が活性化された *pot1Δrqh1-hd* 株におけるタンパク質の挙動を観察するために、蛍光顕微鏡を用いたライブ観察をおこなった。SAC が活性化された *pot1Δrqh1-hd* 株では、キネトコアと微小管の結合が異常なときにキネトコアに局在する Mad2 や Bub1 のフォーサイがコントロール株に比べて長く観測された。このことから、テロメアで組み換え中間体が蓄積された *pot1Δrqh1-hd* 株の SAC 活性化の原因として、キネトコアと微小管の結合異常が示唆された。また、テロメア以外の染色体上に組み換え中間体が蓄積した場合も SAC が活性化するかどうかを調べたところ、rDNA 領域にできる複製中間体の蓄積によっても SAC が活性化することを発見した。

B-7 分裂酵母ロンボイドプロテアーゼの推定切断モチーフを有する PA-リングフィンガータンパク質の機能解析
○出島健司, 東 玲那, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】当研究室では分裂酵母に存在するゴルジ体局在のロンボイドプロテアーゼ Rob1, Rob2 (Rhomboid) の解析を進めている。Rob1, Rob2 に認識される推定切断モチーフを有する膜タンパク質をデータベース (PomBase) から検索した結果, 推定膜貫通領域が 2 つ存在し, C 末端側の推定膜貫通領域に有する SPAC57A7.09 を見出した。SPAC57A7.09 の中間領域には機能についてほとんど知見がない PA ドメイン (Protease Association Domain) が存在しており, C 末端側にはリングフィンガードメインが存在していることから, ドメイン構造の頭文字より *pzr1*⁺ と名付けた。真核生物において, このように PA ドメインとリングフィンガードメインの両方を保存するタンパク質は近年報告されたばかりで, 機能についてはほとんど分かっていない。そこで, Rob1, Rob2 の推定基質としての Pzr1 の可能性を検証すると共に, PA-リングフィンガータンパク質としての機能を解析することを目的とした。

【方法・結果】Pzr1 が Rob1, Rob2 に切断される基質であるか確認するために, 野生株, *rob1*Δ 株, *rob2*Δ 株に Pzr1-GFP を発現させ, ウェスタンブロッティング法で分子量の確認を行った。その結果, 野生株と *rob2*Δ 株では GFP 単体のバンド (約 27 kDa) が検出されたが, *rob1*Δ 株では検出されなかった。このことから Rob1 が Pzr1 の切断に何らかの形で関係していることが示唆された。また, 野生株に Pzr1-GFP を形質転換して局在観察を行ったところ, ほとんどが液胞内で確認されたことから, 通常 Pzr1 は細胞内で速やかに分解されていることが示唆された。

B-8 酵母発現系を用いた植物病原菌エフェクター RSc0608 の機能解析
○忻 詩博, 加本佳大, 東構真城, 藤原祥子, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)

【目的】多くの植物病原菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に直接注入し, 様々な生理機能を攪乱することで感染を成立させる。エフェクターは病原菌の感染成立に大きく貢献しているが, その多くは分子機能が未だに解明されていない。エフェクターの分子機能解明は病原菌の感染戦略を理解する上で重要であることから, 本研究では酵母発現系を用いて機能未知な青枯病菌エフェクター RSc0608 の機能解析を行うことを目的としている。

【方法・結果】我々は, RSc0608 を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に過剰発現させると増殖阻害を引き起こすことを見出し, さらに GFP を指標にその細胞内局在を観察したところ, RSc0608 は酵母の娘細胞膜に特異的に極性輸送されることが明らかになった。そこで, RSc0608 の N, C 末端アミノ酸における各種欠損体を用いて, その酵母増殖阻害活性と膜局在に関わるアミノ酸配列について解析した。その結果, 膜局在と増殖阻害活性ドメインは異なることが示唆されたが, RSc0608 の N 末端には酵母内分子と相互作用して, 増殖阻害活性と膜局在の両方を可能にする重要な領域が存在することが予測された。次に, 娘細胞への極性輸送における膜脂質であるホスファチジルセリン (PS) 及びホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PI4, 5P₂) の依存性について解析を行った。しかし, どちらの脂質にも依存しないことが明らかになった。現在, 酵母遺伝学的スクリーニングによる RSc0608 と相互作用する酵母の膜分子の同定を試みている。

B-9 パン生地改良剤としての脂肪酸塩の効果

○森永賀亮, 森田 洋¹ (北九大院・国際環境工, ¹北九大・国際環境工)

【目的】パンの生地改良剤として乳化剤, 酸化剤, 酵素剤が使用されている。特に乳化剤(界面活性剤)に関しては, グリセリン脂肪酸エステルやショ糖脂肪酸エステルなどがある。これらはパン生地に加えることで, 柔らかく容積の大きなパンになり, パンの老化を防止などの効果を発揮するといわれている。本研究では, 新たなパン生地改良剤として脂肪酸塩に着目した。脂肪酸塩は陰イオン界面活性剤であり, 細菌に対する抗菌効果を有することが報告されている。そこで, 脂肪酸塩をパン生地に添加することによる, パン生地改良剤の効果の検証を目的に実験を行った。

【方法・結果】使用した脂肪酸塩のサンプルには, ラウリン酸カリウム塩 (C12K), ミリスチン酸カリウム塩 (C14K), リノール酸カリウム塩 (C18:2K) を使用し, それぞれを 350 mM, pH 10.5 に調整した。パン生地調製は, 小麦粉(日清製粉(株)) 100 g, 砂糖 5 g, 食塩 1.7 g, ドライイースト(日清製粉(株)) 1.7 g, 水 68 mL, 各種脂肪酸塩を添加して手で 500 回捏ねた。調製したパン生地について, 日本イースト工業会のパン用酵母試験法に基づき, 生地膨張力試験を行った。その結果, C12K では小麦粉重量に対して 10%添加で生地膨張力の増大を認めることができたが, C18:2K では 10%添加でも顕著な増大は認めることができなかった。しかし, C14K では 5%, 10%添加でコントロールの生地膨張に対してそれぞれ 10%, 17%の増大が認められた。

B-10 米麴を用いたそやし水製造における微生物の遷移と特徴

○伊藤一成, 相澤ゆかり, 辻麻衣子¹, 三宅剛史
(岡山県工技セ, ¹(株)辻本店)

【目的】現在普及している速醸もとや生もと系酒母の原型とされる菩提もとは, 自然集積する微生物を利用した方法で, 生米に少量の飯米を加え数日かけて乳酸発酵酸性水(そやし水)を製造し, 生米を蒸して掛米として利用するとともに, このそやし水をそのまま用いて水麴を調製し酒母を育成する一連の工程をいう。開放形で自然集積する微生物に頼る菩提もとは, 安定的に制御することの難しさから大正時代に姿を消したが近年, 奈良県の公設試で菩提もとの製造メカニズムが解析され, 優良乳酸菌の添加により, 微生物管理の安定化を図り再現復活に成功している。一方同時期に岡山県内の蔵元において, 独自に生米を用いず米麴からそやし水を製造し, 加熱殺菌後仕込み水とし, もとを製造する方法が確立されていた。我々はこのそやし水製造について, 製造過程での成分変化や微生物の菌叢変化を調査した。

【方法・結果】岡山県内の蔵元で実際に製造されたそやし水をサンプルとした。製造期間ごとの各種成分分析と微生物数を計測し, 生酸菌の菌叢変化と性質を調べた他, 遺伝子同定を行った。またそやし水の製造に与える米麴量の影響を調べた。その結果, 菩提もとのそやし工程とよく似ており, 乳酸菌に必要最小限の糖を供給し先行増殖させ, 速やかに酸性環境にして細菌を減少させていた。そして, *Lc. lactis* から *Leu. citreum* へ主要菌叢の遷移が起こり, 後半の乳酸生成を *Leu. citreum* が担うことでさらなる乳酸の蓄積を可能にしていた。米麴を用いたそやし水の製造技術は, 米麴に存在する乳酸菌種の確認や仕込み配合に注意が必要であるが, 一般的に広く適応可能な有用技術になり得ることが考えられた。

B-11 脂肪酸塩の果実汚染原因カビに対する抗カビ効果

○境 志穂, 恵良真理子, 川原貴佳¹, 完山陽秀¹, 森田 洋²

(北九大院・国際環境工,¹シャボン玉石けん(株),²北九大・国際環境工)

【目的】石けんの主成分である脂肪酸塩の微生物制御は、細菌類についてはいくつか報告されているが、カビに対する知見は少ない。カビはかんきつ類などの食品に繁殖し、劣化や腐敗を引き起こす。*Penicillium* 属菌は主に食品分野で問題となっているカビであり、本研究では脂肪酸塩の *Penicillium* 属菌に対する抗カビ効果について検討を行った。

【実験方法】検定菌には、*Penicillium pinophilum* NBRC 6345 株を選定した。脂肪酸塩は酪酸カリウム (C4K)、カプロン酸カリウム (C6K)、カプリル酸カリウム (C8K)、カプリン酸カリウム (C10K)、ラウリン酸カリウム (C12K)、ミリスチン酸カリウム (C14K)、オレイン酸カリウム (C18:1K)、リノール酸カリウム (C18:2K)、リノレン酸カリウム (C18:3K) を用いた。

【実験結果】抗カビ試験の結果、C10K が *P. pinophilum* に対して 10 分の接触で 4 オーダーの抗カビ効果を発揮し、9 種類の脂肪酸塩のうち最も高い抗カビ効果を発揮することが明らかとなった。また、*P. pinophilum* に対して C10K の MIC 値は 175 mM という結果であった。この値は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) と比較して低い値であり、さらに、既存の防かび剤オルトフェニルフェノールナトリウム (OPP-Na) の MIC 値 87.5 mM と比較してほぼ変わらない値であったため、C10K の抗カビ効果の高さが確認された。これらのことから、C10K の食品分野における利用可能性が広がった。

B-12 牛乳液体培地を用いた糸状菌の酵素生産性

○三貝咲紀, 宮崎千佳¹, 二宮純子, 森田 洋¹

(北九大院・国際環境工,¹北九大・国際環境工)

【目的】焼酎製造に使用される白麹菌 *Aspergillus kawachii* は、 α -アミラーゼと耐酸性 α -アミラーゼ (A α -A)、クエン酸を生産するという特徴を持つ。一般的に焼酎製造に用いられる固体培養法では、酵素生産性が高い反面、麹の温度や湿度などの制御が難しく職人技に頼っているのが現状である。一方、液体培養は、固体培養法の問題点を補うことができるが、酵素生産性が低いという欠点がある。本研究では牛乳を液体培養の培養基質として用いることにより、A α -A 生産性が増強することについて既に明らかとしている。そこで本研究では、A α -A 生産の増強因子を明らかにすることにより、半合成液体培地による A α -A 生産法の構築と液体麹を用いた焼酎醸造に関する研究を行った。

【方法】菌株に *Aspergillus kawachii* NBRC 4308 を選定した。この菌株の孢子懸濁液を基本液体培地である糊化米粉を炭素源とした改変 SLS 液体培地に接種し、30°C, 200 rpm で 3 日間振とう培養を行った。

【結果】牛乳に含まれる炭素源、窒素源、ミネラル類についての A α -A 生産を検討した。その結果、カゼイン、ラクトース、塩化カルシウムについては、高い A α -A 活性は得られなかった。しかし、K₂HPO₄ を 1.0 g/L 添加した場合で 690 U/g-substrate の高い酵素活性が認められた。カリウムに対しては高い活性を得ることが出来なかったが、その他リン酸塩についても検討したところ 400 U/g-substrate 前後の高い活性を認めることが出来た。以上のことより、リン酸塩が酵素活性向上因子であることが明らかとなり、本液体麹を使用した焼酎製造への応用が示唆された。

B-13 希少糖が担子菌キノコにおよぼす生理的影響
○川手 亮, 渡邊 彰, 何森 健¹, 麻田恭彦
(香川大・農, ¹香川大・希少糖セ)

【目的】希少糖は自然界に存在しない,あるいは,極微量にしか存在しない単糖とその誘導体と定義されている。近年,希少糖の一種であるD-プシコースとD-アロースの大量生産系が確立された事から,これらの希少糖の有用生理作用が明らかとなってきた。しかし,希少糖が担子菌キノコにおよぼす生理的影響については全く研究が行われていない。そこで本研究では,希少糖が担子菌キノコにおよぼす生理的影響に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】(1) 資化性:各種担子菌キノコを液体培地(0.1%酵母エキス+3%各種単糖類)に接種し,28℃暗所で静置培養を行った後に,乾燥菌糸体重量を測定した。その結果,担子菌キノコの希少糖資化能力は低いことが判明した。

(2) 子実体形成:各種希少糖を含む単糖類を添加した菌床培地(オガ粉に米ぬかなどの栄養物を添加した培地)を用いてエノキタケとヒラタケの栽培を行った。その結果,本研究で用いた全ての希少糖を添加した培地において両キノコの正常な成熟子実体が形成された。さらに菌糸体内に希少糖が取り込まれていることが明らかとなった。得られた子実体の生理活性(抗酸化活性など)については現在解析中である。

(3) 糖転換反応:PDB培地で培養した各種担子菌キノコの菌糸体を用いて担子菌キノコの糖転換反応について解析を行った。その結果,担子菌キノコは全般的にケトースのC2位を還元してポリオールに糖転換する能力が高いことが示唆された。

B-14 さらなる耐熱化への薬剤耐性スクリーニングの活用
○吉田咲紀, 白丸優貴¹, 村田正之, 高坂智之¹, 山田 守
(山口大院・医, ¹山口大・農)

【目的】耐熱性微生物を用いた高温発酵は,冷却コストの削減や発酵操作の簡素化などにより安価なエタノール生産を可能にすると期待されている。*Zymomonas mobilis*は,通性嫌気性グラム陰性のエタノール発酵性細菌で,エントナー・ドウドロフ経路により一般的にエタノール発酵に用いられる酵母よりも速いエタノール生産能をもっている。当研究室では高温側の生育限界温度が38℃の*Z. mobilis* TISTR548株を親株とする,生育限界温度40℃の高温適応変異株である*Z. mobilis* 200M株が単離されている。高温での継代培養による生育限界温度の改変は限界であると考えられたことから,本研究では抗生物質を用いて高温適応株の生育限界温度の改変を試みた。

【方法・結果】*Z. mobilis* 200M株を定常期まで培養し,終濃度が5 µg/mlのリファンピシンと100 µg/mlのストレプトマイシンを含むYPD寒天培地で培養することで薬剤耐性株を240株取得した。それらを用いて3段階のスクリーニングを行い,41℃での液体培養によるスクリーニングで最終的に1株の耐熱化株を獲得した。どのような形質変化により耐熱化株が耐熱性を獲得できたかを明らかにするため,耐熱化株の呼吸活性を*Z. mobilis* 200M株や*Z. mobilis* TISTR548株の呼吸活性と比較した。その結果,耐熱性の強い株ほど呼吸活性が抑えられていることが明らかとなった。それ以外の表現型(細胞伸長,過酸化水素耐性など)についての解析結果も紹介する。

C-1 ルイス a 抗原に作用する植物 α -フコシダーゼの精製と諸性質
前田 恵, ○板野紗月¹, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命, ¹岡山大・農)

【目的】植物糖タンパク質は α 1,3 フコース残基と β 1,2 キシロース残基を結合したコア構造 (M3FX) を有する植物複合型 *N*-グリカンを発現している。この *N*-グリカンは, M3FX の非還元末端がルイス a 抗原 (Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-) や *N*-アセチルグルコサミンで修飾される場合もある。植物複合型 *N*-グリカンは抗原性糖鎖として知られているものの, 植物細胞における生理機能は解明されていない。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, 貯蔵糖タンパク質のほぼ 100% が植物複合型 *N*-グリカンであ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 α 1,3Fuc'ase Gb の精製を試みた。【方法・結果】銀杏種子 (2.8 kg) をアセトン脱脂し, 脱脂粉末 (1.3 kg) を 0.2 M NaCl を含んだ 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) で懸濁し粗酵素液を抽出した。粗酵素液から各種クロマトグラフィ (DEAE 陰イオン交換, 疎水クロマト, ゲルろ過, QA 陰イオン交換, SP 陽イオン交換, ヒドロキシアパタイト) により α -フコシダーゼの精製を行った。 α 1,3Fuc'ase Gb の活性測定は基質としてルイス a 抗原を有する PA 化糖鎖 (G2F2GN2M3FX) を用い, SF-HPLC により生成物を検出した。ゲルろ過クロマトグラフィと SDS-PAGE の結果, 精製 α 1,3Fuc'ase Gb の分子量は 140 kDa であり, 複数のサブユニットから構成されていることが明らかとなった。これまでに精製したイネ α 1,3Fuc'ase は分子量 58 kDa のモノマーであり, α 1,3Fuc'ase Gb と異なる分子種であると考えられた。

C-2 沈水植物オオカナダモに存在する遊離 *N*-グリカンの特徴
前田 恵, ○江原菜津紀¹, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命, ¹岡山大・農)

【目的】成長・分化中の植物組織には μ M 濃度の遊離 *N*-グリカン (FNGs) が遍在するが, その生理的機能はいまだ解明されていない。我々は FNGs の生理機能解明の一環として, イネ培養細胞が産生する FNGs の網羅的な構造解析を行った。その結果, 還元末端に GlcNAc を 1 残基有する “GN1 型” の複合型 FNGs を発見した。植物複合型 *N*-グリカンに作用するエンドグリコシダーゼは見出されていないことから, 「細胞質で精製した FNGs が小胞体内へと輸送され, さらにゴルジ装置でプロセッシングを受けたのち細胞外へと分泌される」という仮説を立てた。この仮説を立証するために, 分化した植物体中における植物複合型 GN1-FNGs の遍在を確認する目的で複合型 *N*-グリカンが顕著に発現されているオオカナダモを用いて, FNGs の構造解析を実施した。【方法・結果】オオカナダモをホモジナイズ後, 透析・イオン交換法・ゲルろ過を組み合わせて FNGs を精製した。次いで, FNGs を蛍光標識 (PA 化) した後, Con A アフィニティーカラムに供した。Con A 非吸着画分について α -Fuc'ase, β -Gal'ase, β -GlcNAc'ase 消化及び質量分析により構造解析を行った。その結果, 植物複合型 GN1-FNGs を分化した植物体から初めて見出すことに成功した。この結果は, 分化した植物においても FNGs が小胞体, ゴルジ装置を経てプロセッシングを受けるという仮説を支持すると考えられる。

C-3 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来ホモセリンデヒドロゲナーゼの構造解析

○井上翔太, 米田一成¹, 大島敏久², 櫻庭春彦
(香川大・農,¹東海大・農,²大阪工大・工)

【目的】ホモセリンデヒドロゲナーゼ (HSDH) はトレオニン/リジン生合成経路中でアスパラギン酸セミアルデヒドからトレオニン, メチオニン, イソロイシンの前駆体であるホモセリンを生成する酵素である。HSDH はヒトには存在しないため, 抗菌剤開発のターゲットとして注目されている。これまで常温微生物由来の本経路については詳細な研究がなされているが, 超好熱アーキアにおける本経路関連酵素についての研究は少なく, HSDH に関する報告はない。今回, 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来 HSDH の結晶構造解析に成功したので報告する。

【方法・結果】20 % MPD, 100 mM リン酸カリウム (pH 6.2) 溶液を母液として, シッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶を作成した。高エネルギー加速器研究機構の NW12 で測定を行い, 分解能 2.3 Å の回折データを得た。構造解析の結果, 結晶作成時に補酵素を添加していないにも関わらず, 得られた構造中に NADP(H) が結合していることが判明した。補酵素特異性を調べたところ, 興味深いことに本酵素は, NADP に対して反応性を示さず, 逆に NADP によって強力に阻害を受けることが分かった ($K_i = 11.5$ nM)。構造中では NADP(H) のアデニンリボース C2 リン酸基は, R40, K57 の側鎖と相互作用していた。そこでこれらのアミノ酸残基をアラニンに変異させた酵素を作製したところ, NADP を補酵素とした活性が確認された。従って, 野生型 *P. horikoshii* 由来 HSDH が, NADP を補酵素として利用出来ないのは, NADP のリン酸基を酵素が強固に保持しているためと考えられる。

C-4 超好熱アーキア *Aeropyrum pernix* 由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼの結晶構造解析

○津島悠斗, 林 順次, 米田一成¹, 大島敏久², 櫻庭春彦
(香川大・農,¹東海大・農,²大阪工大・工)

【目的】色素依存性 D-乳酸脱水素酵素 (Dye-DLDH) は, FAD を補酵素とし, ジクロロインドフェノールやフェリシアン化カリウムなどの人工色素を電子受容体として D-乳酸の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は人工色素を介して D-乳酸と電極との間で電子授受が可能であるため, D-乳酸を簡単に測定できるバイオセンサー用素子としての利用が期待される。しかし, 常温菌由来の酵素は総じて不安定であるため応用開発や機能・構造解析は進んでいない。我々は超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* に安定性の高い Dye-DLDH を見出し, その酵素化学的性質を明らかにした。構造解析のため本酵素の結晶化を試みたが現在まで良好な結晶は得られていない。そこで, 本研究では *S. tokodaii* DLDH と高い相同性を示す *Aeropyrum pernix* 由来のホモログ (ORF APE_0487) の精製法の確立, 諸性質の解明及び X 線結晶構造解析を行った。【方法・結果】発現ベクター pET-15b/APE_0487 を用いて, 大腸菌 Rosetta-gamiTM 2 (DE3) の形質転換を行いタンパク質を発現させた。超音波破碎, 遠心分離により得られた粗酵素液を, 熱処理 (80°C, 10 min), アフィニティークロマトグラフィー, ゲルろ過クロマトグラフィーの 3 段階で精製し, SDS-PAGE レベルで単一に精製した。精製した酵素を用いて結晶化条件の検討を行った結果, ハンギングドロップ蒸気拡散法により良好な立方体状の単結晶が得られた。さらにチメロサルを用いた Hg 誘導体を作製し, MAD 法により 1.9 Å の分解能で構造解析に成功した。DALI サーバによる解析の結果, 最も類似した構造を持つのは *Rhodospirillum rubrum* 由来 Putative dehydrogenase (3PM9) であることが判明した。

C-5 徳島県産ラップウニの叉棘レクチンの生理活性について
○江戸 梢, 酒井仁美¹, 中川秀幸¹, 西堀尚良, 西尾幸郎
(四国大短・食物栄養,¹徳島大院・環境共生)

ウニ類は有用な水産資源の一つであり、ムラサキウニやバフンウニ、アカウニ等がよく知られている。一方、有毒種のウニとしては、ガンガゼやラップウニ等が挙げられる。これらの棘に刺されると、痛みや腫れが生じる。ラップウニの体表叉棘は大型、中型及び小型の3タイプに分類される。今回、徳島県産ラップウニの大型叉棘に由来する新規レクチンの精製を試み、生理活性について検討した。徳島県南沿岸で採集したラップウニより大型叉棘を採取し、叉棘標品を調製した。大型叉棘標品からのレクチンの精製は、Superdex 200 カラム及び Phenyl Sepharose CL-4B カラムの組み合わせにより行った。精製レクチン画分は、還元下及び非還元下の SDS-PAGE で共に 32 kDa の位置に単一のタンパク質バンドを呈した。32 kDa タンパク質は D-ガラクトース結合性レクチンの SUL-I の N 末端部分アミノ酸配列と類似しており、SUL-IA と命名した。SUL-IA はマウス脾細胞由来の T 細胞において低濃度よりマイトジェン活性を示した。SUL-IA によるマイトジェン活性は D-ガラクトースにより効果的に阻害された。SUL-IA は T 細胞に対して高濃度側で 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) に関連する IFN- γ を産生したが、2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) に関連する IL-4 を産生しなかった。この結果より、SUL-IA はマウス脾細胞由来の T 細胞を刺激し、Th1 に分化誘導することが示唆された。

C-6 L-アスパラギン酸オキシターゼ-キノリン酸合成酵素複合体解析
○木村あすみ, 芦田裕之¹, 丸田隆典, 石川孝博, 澤 嘉弘
(島根大・生物資源,¹島根大・総研セ)

【目的】NAD 生合成経路の初発酵素 (NadB) として、多くの原核生物では L-アスパラギン酸オキシターゼ (LAO) あるいはアスパラギン酸デヒドロゲナーゼ (AspDH) が働くことが知られている。反応生成物は、共にイミノアスパラギン酸 (ImAsp) であるが、この生成物は非常に不安定で水分子と接触すると半減期 144 秒でオキサロ酢酸とアンモニアへ加水分解される。そのため、NadB と 2 番目に働くキノリン酸シンターゼ (QS, NadA) は複合体を形成することで ImAsp を分子間トンネル経路により QS の活性中心まで輸送しジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) との縮合反応によってキノリン酸を生成すると予想されている。これまで LAO, AspDH, QS の X 線構造解析や生化学的解析はいくつか報告されているが、複合体での解析はまったく行われていない。今回は、LAO:QS 複合体の形成を確認するために、各種クロマトグラフィーによる解析を行ったので報告する。

【方法・結果】*Pyrococcus horikoshii* 由来の LAO, QS 遺伝子を挿入した pET Duet を構築し、両遺伝子が、共に十分発現が確認できる条件を決定し、熱処理によるタンパク質精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーや DEAE-クロマトグラフィーによる 4 次構造解析で複合体形成の確認を行ったが、LAO:QS 複合体の形成は確認できていない。現在、複合体形成に必要と思われる因子についても検索を行っている。また、QS の Fe-S ホロ化条件の検討や LAO, QS のカイネティクスパラメータの決定も行っている。

C-7 大腸菌由来 [NiFe] ヒドロゲナーゼへのアフィニティタグ付加の検討
○井本知志, 三島朱加, 稲垣賢二, 田村 隆 (岡山大院・環境生命)

【目的】水素酸化反応を触媒する酵素「ヒドロゲナーゼ (H₂ase)」は、水素燃料電池における水素酸化触媒 (白金) の代替物として注目されている。しかし、多くの H₂ase はわずかな酸素によって失活してしまうことが分かっている。大腸菌 MC4100 株が有するヒドロゲナーゼ (HyaAB) は 2 種類のサブユニットから成るヘテロ二量体で、好気条件から嫌気条件に環境が切り替わったときに発現する酸素耐性型 [NiFe]H₂ase として研究が進められている。本研究では、HyaAB 精製におけるアフィニティタグとその挿入位置の検討を行うことによって、活性型 HyaAB の簡易精製法を確立することを目的とした。

【方法・結果】アフィニティタグ導入型 HyaAB の発現のため、HyaA (小サブユニット) C 末端側に His タグを挿入するよう設計した *hyaAB*(SC-His6) 遺伝子を、pUC19 ヘクローニングした。更に HyaB (大サブユニット) N 末端側に StrepTagII を挿入するよう設計した *hyaAB* (LN-STII) 遺伝子を、pUC19 ヘクローニングした。それぞれの構築したプラスミドを大腸菌 MC4100 Δ *hyaAB* 株に形質転換し、培養、菌体破砕、それぞれのアフィニティカラムによる HyaAB 精製を行った。それらを Native-PAGE 後、活性染色により精製度を確認した。その結果、HyaAB(SC-His6)は精製されていたが、通過画分においても存在が確認されたのに対し、HyaAB (LN-STII) は通過画分にほとんど残らず、精製することが出来た。

C-8 大腸菌発現系に及ぼす異種遺伝子 5'末端配列の影響
○安保紘高, 原 啓文¹, 山副敦司², 土金恵子², 細山 哲², 今村維克,
今中洋行 (岡山大院・自然科学, ¹マレーシア工科大, ²NITE-NBRC)

[目的]

大腸菌は増殖速度が速く、多様な遺伝子ツールの利用が可能で、取扱いも簡便なことから、組換えタンパク質の発現用宿主として最も汎用されている。しかし異種タンパク質を発現させる際、遺伝子のコドン使用頻度やポリペプチド鎖の折り畳み特性が異なることから、発現量低下や凝集体形成などの問題がしばしば生じる。そこで本研究では、ポリペプチド鎖合成の初発段階に着目し、遺伝子の 5' 末端配列が組換えタンパク質発現に及ぼす影響について調べた。

[方法・結果]

発現タンパク質のモデルとしてコドン使用頻度が大腸菌と大きく異なる放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来 ϵ -リジンアシラーゼ (Sm-ELA) を用いた。Sm-ela の 5' 末端配列中のレアコドンの 1 つを同義コドンに置換した配列 (計 3 種類) およびコドン改変は行わず 5' 末端にタグ配列を連結した配列それぞれ調製した。これらに配列最適化遺伝子を加え、発現量の比較評価を行った。その結果、レアコドン置換配列は野生型配列と比べ、タンパク質発現量に差はほとんど見られなかったが、レアコドンの置換および mRNA 二次構造形成自由エネルギーに依存的な活性の向上が見られた。また、タグ連結配列では発現量が顕著に向上し、可溶化率も配列最適化遺伝子に比べて有意に高かった。これらの検討結果より、開始コドン直下流の翻訳過程がタンパク質の高発現に重要であることが強く示唆された。

C-9 シグナルペプチドに生じる N-ミリスチル化の解析
○南風原樹, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 (山口大院・医)

【目的】 N-ミリスチル化は細胞情報伝達や疾患に関連するタンパク質に生ずる脂質修飾反応であり、主に細胞質タンパク質に起きる修飾である。N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定をめざした我々の研究から、分泌タンパク質の N 末端に存在するシグナルペプチドに N-ミリスチル化が生ずる場合があることが示された。本研究では分泌タンパク質 Wnt10a に生ずる N-ミリスチル化について解析した。

【方法・結果】無細胞タンパク質合成系における代謝標識により N-ミリスチル化の有無を検討した結果、Wnt10a は効率良く N-ミリスチル化された。遺伝子導入した COS-1 細胞におけるタンパク質発現と N-ミリスチル化を検討したところ、培養上清中にはタンパク質は検出されなかったが、細胞溶解液中に 2 本のタンパク質バンドが検出され、このうち低分子量のバンドに N-ミリスチル化が認められた。2 本のタンパク質バンドの違いを、Glycopeptidase F 処理や N-グリコシル化部位欠失変異体、シグナルペプチド欠失変異体を用いて検討した結果、高分子量のバンドは、小胞体内腔への移行に伴ってシグナルペプチドが切断され、N-グリコシル化されたタンパク質バンドであり、低分子量のバンドはシグナルペプチドの切断が生じず、N-グリコシル化も生じていない N-ミリスチル化されたタンパク質であることが明らかになった。これらの結果から、Wnt10a は細胞でのタンパク質発現に伴い、小胞体内腔へと移行しシグナルペプチドが切断され、N-グリコシル化される分子種と、細胞質に留まり N 末端が N-ミリスチル化される 2 種類の分子種を生ずることが示された。

C-10 Click chemistry を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 代謝標識法による脂質修飾タンパク質の検出
○林田真梨子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 (山口大院・医)

【目的】タンパク質脂質修飾の一つであるタンパク質アシル化には、主に N-ミリスチル化とパルミトイル化がある。タンパク質アシル化の検出には RI 標識基質による代謝標識法が用いられてきたが、検出感度、露光時間の長さ、RI の使用に伴う制限など課題があった。近年、RI を用いない代謝標識法が開発されており、その一つに Click chemistry を用いた方法がある。本研究では、*in vitro* (無細胞タンパク質合成系) 及び *in vivo* (遺伝子導入細胞) において代謝標識を行い、Click chemistry を用いたタンパク質アシル化の検出を試みた。

【方法・結果】*in vitro* および *in vivo* において、標識基質としてアルキニルミリスチン酸またはアルキニルパルミチン酸を用いて代謝標識を行い、Click chemistry により蛍光色素を付加後、SDS-PAGE へ供与し、ゲル内蛍光検出によりタンパク質アシル化の同定を試みた。*in vitro* 及び *in vivo* において、N-ミリスチル化は N-ミリスチル化モチーフである N 末端 Gly 残基に依存して効率よく検出できた。一方、パルミトイル化は、*in vitro* では反応系内にパルミトイル転移酵素が存在しないため起こらなかったが、*in vivo* では RI 標識基質による従来法では一般に 1 週間から数か月もの長い露光時間を要したのに対し、本検出法では SDS-PAGE 直後に感度よく検出された。また、パルミトイル化部位である Cys を Ser に置換した変異体ではシグナルは完全に消失することが確認できた。以上、Click chemistry を用いた *in vitro* および *in vivo* 代謝標識法によりタンパク質アシル化が迅速かつ高感度で検出できることが示された。

C-11 細胞周期制御タンパク質 CDCA3 は N-ミリスチル化されている
○矢野愛美, 大塚基顕, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 (山口大院・医)

【目的】タンパク質 N-ミリスチル化は、翻訳と共役して飽和脂肪酸であるミリスチン酸がタンパク質の N 末端にアミド結合を介して結合するタンパク質脂質修飾であり、細胞情報伝達において重要な機能を担っている。本研究では我々のこれまでの網羅的な解析によりヒトタンパク質データベースから見出された新規 N-ミリスチル化タンパク質 CDCA3 について解析を行った。

【方法・結果】Swiss-Prot に収集された、アイソフォームを含む約 43,000 個のヒトタンパク質配列の中から、N-ミリスチル化予測プログラム及びデータベース検索により新規 N-ミリスチル化タンパク質候補を選択した。これらのうち、疾患との関連が示唆されるタンパク質を探索したところ、前立腺がんや口腔がんの増殖を促進すると報告がなされている細胞周期制御タンパク質である CDCA3 が見出された。そこで全長 cDNA と、その N-ミリスチル化モチーフを変異させた G2A 変異体を用いて、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系と遺伝子導入細胞において³H]ミリスチン酸の取り込みを検討したところ、CDCA3 は N-ミリスチル化シグナル依存的に効率よく N-ミリスチル化されることが示された。次に、CDCA3 の C 末端に EGFP を融合したタンパク質を作製し蛍光観察により細胞内局在を検討した結果、CDCA3-EGFP は主に小胞体に局在したのに対して、G2A 変異体は細胞質に局在することが示され、N-ミリスチル化が CDCA3 の細胞内局在に大きく影響することが示された。CDCA3 の生理活性における N-ミリスチル化の役割については今後の検討課題である。

C-12 スズシロソウの重金属応答に関わる遺伝子群の特徴
○加藤伸一郎, 原 夏希¹, 梅川美紗¹, 浜田朋江¹, 相川良雄², 岩崎貢三¹
(高知大・総合研究セ,¹高知大・農,²三菱マテリアル)

【目的】スズシロソウ (*Arabidopsis flagellata*) は、亜鉛、カドミウムなどの重金属を超集積することが知られている。本研究では、亜鉛、カドミウムに対する地上部の初期応答の分子機構を明らかにするため、重金属処理後に発現量が増加する遺伝子を cDNA サブトラクション法で調製し解析を行った。

【方法】スズシロソウを亜鉛 10 μM の基本培養液で 18 週間前栽培を行った後、培養液に終濃度 1 mM の ZnSO₄ または CdSO₄ を添加し経時的に葉を採取した。試料から総 RNA をそれぞれ精製した後、オリゴ dT プライマーを用いて cDNA を調製した。そのうち重金属処理直前と処理 24 時間後の試料を使用してサブトラクションを実施し、発現差のある cDNA を pCR4-TOPO ベクターに挿入しライブラリを作成した。このライブラリの塩基配列を解析するとともに、各遺伝子の発現量変動を定量 PCR により解析した。

【結果・考察】重金属処理により発現量の増加が示唆される遺伝子について BLAST により相同性の探索および機能推定を行ったところ、亜鉛、カドミウムのいずれの処理においても *A. thaliana* の VSP1 や LOX2 などの相同遺伝子が検出された。またカドミウム処理区においては jacalin lectin (JL) family protein や *A. halleri* の plant defensin (PDF1.3) など、また、亜鉛処理区では zinc finger family protein などの遺伝子が検出された。これらのうち亜鉛処理区の VSP1 とカドミウム処理区の PDF1.3 は、48 時間後の発現量がそれぞれ約 65 倍、75 倍と顕著に増加していたことから、これらの遺伝子が亜鉛・カドミウムに対する初期応答に大きく関わっている可能性が示された。

C-13 立体障害を導入した前駆体蛋白質を用いた葉緑体への蛋白質輸送
○秋田 充, Manoj Pohare, 三好貴子 (愛媛大・農)

葉緑体蛋白質の大部分は核ゲノムにコードされ、そのうちの大多数の蛋白質は、葉緑体移行シグナルを N 末端に有する前駆体としてサイトゾルで翻訳後、葉緑体を囲む外・内包膜に存在する蛋白質輸送装置 (トランスロコン) を利用して葉緑体内に輸送される。これまでに蛋白質の輸送の初期段階に形成される初期膜透過中間体を解析することで、多くの知見が得られてきた。しかし、葉緑体への蛋白質輸送をさらに理解するためには、初期膜透過中間体形成以降、輸送が完了するまでの前駆体蛋白質とトランスロコンとの係わりを解明する必要がある。前駆体蛋白質が輸送途上でトランスロコン内部に滞留した膜透過中間体を人為的に形成させ、中間体を解析することでこの目的が達成できると考えた。そこで、トランスロコンの目詰まりを引き起こす立体障害を導入した前駆体蛋白質を検討することとした。前駆体蛋白質を目詰まりさせることで膜透過中間体を形成させ、さらに中間体を解析するためには、成熟体部分がフォールドした前駆体蛋白質を大量に必要とする。現在、われわれは大腸菌で成熟体部分がフォールドした組換え前駆体蛋白質の獲得を試みている。本支部大会においては、このような取り組みと実際に獲得した組換え前駆体蛋白質を用いて行った *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験の結果について報告する。

- D – 1 Association of GSTP1 and ABCC4 polymorphisms with response and toxicity of cyclophosphamide-based chemotherapy on Bangladeshi breast cancer patients
O Mohammod Safiqul Islam, Md. Siddiqui Islam, Ferdous Khan¹, Pinky Karim Syeda K. Fatema¹, Abul Hasnat², Kazushige Yokota¹(Dept. Pharm., Noakhali Sci. Technol. Univ., Bangladesh; ¹Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.; ²Dept. Clin. Pharm. Pharmacol. Univ. Dhaka, Bangladesh)

Cyclophosphamide (CPA) used in breast cancer along with epirubicin and 5-fluorouracil is transported by ABCC transporters and detoxified by glutathione S-transferases (GST). The activities of these enzymes and transporters may vary due to the presence of genetic polymorphisms. The effects of GSTP1rs1695 and ABCC4rs9561778 polymorphisms on the response and toxicities of CPA-based chemotherapy were evaluated on Bangladeshi breast cancer patients. Total 256 patients with invasive breast cancers were recruited of which 117 patients received neoadjuvant chemotherapy to examine the response as well as toxicities and another 139 patients received adjuvant chemotherapy to evaluate only the toxicities. Genetic polymorphisms were detected by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Patients carrying AG, GG and AG plus GG genotypes of GSTP1rs1695 were more likely to have good response whereas no association of ABCC4rs9561778 was found with the chemotherapy response. Patients carrying GT and GT plus TT genotypes of ABCC4rs9561778 were found to be associated with anemia, neutropenia, leukopenia and gastrointestinal toxicities when compared with GG genotype whereas no association was found with thrombocytopenia. GSTP1rs1695 was not associated with any type of toxicities investigated.

- D – 2 Biosynthesis of prostacyclin and its action are up-regulated during the maturation phase of adipocytes
O Ferdous Khan, Mohammad Sharifur Rahman, Pinky Karim Syeda K. Fatema, Mohammad Safiqul Islam, Kohji Nishimura¹, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono², Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., ¹Center Int. Res. Sci., Shimane Univ., ²Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Prostacyclin alternatively termed prostaglandin (PG)_{I₂} is an unstable metabolite synthesized by the arachidonate cyclooxygenase pathway and rapidly hydrolyzed to 6-keto-PGF_{1 α} , a stable inactive product. Earlier studies have reported that prostacyclin analogues are capable of stimulating adipose differentiation under certain culture conditions. However, biosynthesis of prostacyclin has not been determined comprehensively at different life stages of cultured adipocytes. In this study, we monitored the endogenous synthesis of prostacyclin in cultured 3T3-L1 cells by the quantification of 6-keto-PGF_{1 α} by its specific immunological assay. The cultured adipocytes after 4-6 days of the maturation phase were found to have the highest capability to synthesize endogenous prostacyclin, which was accompanied by enhanced gene expression of PGI synthase and the IP receptor for prostacyclin. Selective IP agonists effectively rescued the accumulation of fats inhibited in the presence of aspirin, a general cyclooxygenase inhibitor. On the other hand, specific antagonists for the IP receptors appreciably blocked the storage of fats during the maturation phase. Taken together, our results indicate that biosynthesis of prostacyclin and its action are closely linked with up-regulated adipogenesis during the maturation phase of adipocytes.

D-3 11-Deoxy-11-methylene-prostaglandin (PG) D₂ exerts pro-adipogenic effect on cultured adipocytes during the maturation phase through cellular mechanism different from that of natural PGD₂

○Pinky Karim Syeda K. Fatema, Mohammad Safiqul Islam, Ferdous Khan, Kohji Nishimura¹, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, Fumiaki Shono², Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., ¹Center Int. Res. Sci., Shimane Univ., ²Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Prostaglandin (PG) D₂ and its dehydration products, PG of J₂ series, are known to serve as pro-adipogenic factors in adipocyte differentiation. Here, we studied the effect of 11-deoxy-11-methylene-PGD₂ (11dm-PGD₂), a chemically stable, isosteric analogue of PGD₂, on the accumulation of fats during the maturation phase of cultured adipocytes and compared its efficacy with that of parent PGD₂. The dose-dependent analysis of those effects revealed that 11dm-PGD₂ was more potent than PGD₂ in rescuing the storage of fats attenuated in the presence of indomethacin. Gene expression analysis confirmed the constitutive expression of two types of cell-surface receptors for PGD₂ including the DP1 receptor and DP2/CRTH2 receptor. Selective agonists for either of the DP1 receptor and the CRTH2 receptor were able to enhance adipogenesis suppressed in the presence of indomethacin to a similar extent. On the other hand, a selective antagonist for the DP1 receptor more preferentially blocked the pro-adipogenic effect of PGD₂ than that of 11dm-PGD₂ while a selective antagonist for the CRTH2 receptor was more inhibitory for the action of 11dm-PGD₂ as compared with PGD₂. These findings indicate that 11dm-PGD₂ stimulates adipogenesis through cellular mechanism different from that of natural PGD₂.

D-4 裸子植物に含まれるポリメチレン中断型不飽和脂肪酸の動物細胞における必須脂肪酸への変換

○魚住幸加, 森戸克弥, 大隅 隆¹, 徳村 彰², 田中 保
(徳島大院・薬, ¹兵庫県大院・生命理学, ²安田女子大・薬)

【目的】 マツやコノテガシワ等の裸子植物には二重結合と二重結合との間にメチレンを複数個挟んだポリメチレン中断型脂肪酸 (PMI-PUFA) が存在する。シアドン酸 (20:3, Δ-5, 11, 14), ジュニペロン酸 (20:4, Δ-5, 11, 14, 17) は代表的 PMI-PUFA で, 食事として摂取することもあるが, その代謝についてはよくわかっていない。以前, 我々は動物細胞にはこれら C20PMI-PUFA をリノール酸や α-リノレン酸に変換する代謝経路が備わっていることを報告した。今回, 我々は種々の PMI-PUFA について細胞種別に代謝効率を比較した。【方法・結果】 培地に脂肪酸を添加して 24 時間培養することにより, 細胞に脂肪酸を取り込ませた。全細胞脂質の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより測定した。シアドン酸, エイコサジエン酸 (20:2, Δ-11, 14) 及びジュニペロン酸をチャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 (野生株) に添加すると, それぞれリノール酸, リノール酸及び α-リノレン酸含量が増加した。これらの変化はペルオキシソーム欠損 CHO 細胞では観察されなかった。また, この代謝変換はヒト肝及び胃由来の細胞株 (HepG2 及び MKN74) においても観察された。興味深いことに, MKN74 細胞では効率良く代謝変換が起こり, 例えばシアドン酸添加の場合, 約 50% がリノール酸へ代謝された。一方, ピノレン酸添加ではどの細胞においてもその鎖長短縮物の増加は観察されなかった。以上の結果より, ヒト及びげっ歯類細胞では C18PUFA ではなく, C20PMI-PUFA 及びエイコサジエン酸がペルオキシソームを介して効率的に必須脂肪酸に変換されていることが分かった。

D-5 大豆由来リゾホスファチジン酸の歯周病抑制効果

○橋村 慧, 松田璃沙, 稲垣裕司¹, 松井寛和, 横田美帆, 田中 保,
木戸淳一¹, 永田俊彦¹, 徳村 彰²
(徳島大院・薬,¹徳島大院・歯,²安田女子大・薬)

【目的】歯周病は歯槽骨の吸収を伴う病態であり、罹患率が非常に高く、歯が失われる最大の原因といわれている。歯槽骨の形成には骨芽細胞と破骨細胞が関与していることが知られており、これらの細胞の働きに脂質メディエーターの1つであるリゾホスファチジン酸(LPA)が関わっていることが報告されている。そこで、本研究では健常者および歯周病患者の歯肉溝浸出液中のLPAを測定するとともに、歯周病モデルラットを用いて大豆LPAの歯周病に対する効果を検討した。

【方法・結果】健常者および歯周病患者から同意を得た後にPerio paperを用いて歯肉溝浸出液を回収した(約1 μ L)。このpaperから10 mM トリス塩酸緩衝液で歯肉溝浸出液を溶出し、Bligh&Dyer法により脂質を抽出した。得られた脂質をLC-MS/MSを用いて測定した結果、健常者と比べて歯周病患者の歯肉溝浸出液に含まれるLPAは有意に減少していることが分かった。また、歯周病モデルラットを調製し、LPA(大豆由来またはリノレオイルを含有)の口腔内粘膜局所への18日間1日1回連続投与を行った後、マイクロCTを用いた歯槽骨の画像解析を行ったところ、LPA投与は歯槽骨の骨吸収を有意に抑制し、歯周病の進行を抑制することがわかった。以上の結果から、歯肉溝浸出液などの粘膜局所でのLPA濃度の減少は、歯を支えている骨リモデリングのバランスを骨吸収に傾かせ、歯周病を悪化させる要因となる可能性が考えられる。

D-6 高脂肪食負荷マウスの血漿脂質レベルに及ぼす紫黒米摂取の影響

○中川咲良, 永易あゆ子¹, 近藤(比江森)美樹
(徳島文理大・人間生活,¹岡山県大・保健福祉)

【目的】紫黒米は、古代有色米であり、糊粉層に多様な機能を示すアントシアニン色素を豊富に含んでいる。アントシアニンは熱に不安定な化合物であるが、加熱後の生体における効果に関する情報は少ない。本研究では、高脂肪食負荷マウスの脂質代謝に及ぼす紫黒米摂取の効果を明らかにするとともに、加熱処理の影響について検討した。

【方法・結果】紫黒米として朝紫、さらに比較対照としてヒメノモチの玄米を搗精し、糠と胚乳を得た。次いで、紫黒米の胚乳を共通で使用し、炊飯した胚乳に各米糠を添加した試料、または胚乳に各米糠を添加後に炊飯した試料を凍結乾燥して粉碎し、各々を20%配合した高脂肪食(HFD)を調製した。C57BL/6Jマウス(5週齢, 雄性)を、①普通食, ②HFD, ③未加熱の紫黒米糠配合HFD, ④加熱の紫黒米糠配合HFD, ⑤未加熱の玄米糠配合HFD, ⑥加熱の玄米糠配合HFD, ⑦糠無配合HFDからなる7群に分け、11週間自由摂取させた。一晚絶食後、解剖して採血し、ワコーの生化学検査キットを用いて、血漿中のTG, 総コレステロール, HDL-コレステロール, 遊離コレステロール, NEFA濃度を測定した。普通食に対してHFD群ではHDL-コレステロール濃度が有意に低下したが、未加熱及び加熱の紫黒米糠配合群ではその低下が抑制された。これらの結果から、紫黒米は高脂肪食負荷マウスにおける脂質代謝異常を改善する作用を有することが示された。一方、糠の加熱処理の影響は認められなかった。

**D-7 高脂肪食摂取におけるリグナン Secoisolarisiresinol の脂質代謝への影響
—動物種, 投与方法の違い—
○福田真子, 松木 翠, 西脇 寿, 山内 聡, 岸田太郎 (愛媛大・農)**

【目的】リグナンは抗酸化作用, 脂質代謝改善作用およびエストロゲン様作用等を示すことが知られており, Secoisolarisiresinol(SECO)はその一種である。7週齢 C57BL/6 雄マウスに SECO の配糖体である Secoisolariciresinol diglucoside(SDG)を 1.0%添加した DIO 飼料を与え 4 週間飼育した結果, 副腎丸周囲脂肪・腎周囲脂肪・血中中性脂肪濃度・血中コレステロール濃度の有意な減少が報告されている。本実験では, 動物種・投与量・投与方法を変えた場合でも同様に SECO による脂質代謝改善効果がみられるか検討することを目的とした。高脂肪食を与えたラットとマウスに SECO を経口または混餌投与し, 脂質パラメータへの影響を調べた。【方法】6 週齢 SD 系雄ラットに DIO 飼料を与え, 胃ゾンデによる経口投与ではポリエチレングリコール 400(PEG400):生理食塩水=50:50 に, 舌下投与では 50%エタノールに, それぞれ SECO 6 mg/kgBW となるよう溶かしたものを 1 日 1 回投与し, 4 週間飼育した。混餌投与では AIN93G に基づくコントロール飼料および SECO を 6 mg/kgBW となるように添加した DIO 飼料を与えた。また, 7 週齢 C57BL/6NJcl 雄マウスに DIO 固形飼料を与え, 胃ゾンデ・舌下投与いずれも 50%エタノールに SECO 6 mg/kgBW となるよう溶かしたものを 1 日 1 回投与し, 4 週間飼育した。【結果】ラットでは, どの投与方法でも脂質パラメータに影響は見られなかった。マウスでは, むしろ舌下投与で腸間膜脂肪の有意な増加, 腎周囲脂肪の増加傾向が見られたが, 胃ゾンデ投与では同様の結果は得られなかった。マウスの肝臓, 血中脂質については検討中である。

**D-8 運動無負荷・非制限で飼育したラットでは魚肉タンパク質摂取による筋重量増加に IGF-1 は関与しない
○澤井真梨子, 原 由真, 魚住圭佑, 安井万智, 速水耕介¹, 横井香里¹,
水重貴文, 岸田太郎 (愛媛大・農, ¹日水・生機研)**

【目的】魚油の機能性については近年も数多くの報告がなされているが, 魚の可食部の大半を占めるタンパク質についてはあまり検討されていない。我々は加工食品として広く利用されているスケトウダラ魚肉タンパク質 (APP) に着目し, 機能性について検討している。これまでの研究で, 運動無負荷・非制限で飼育したラットに APP を含む飼料を摂取させたところ, カゼイン摂取と比較して骨格筋であるひふく筋が摂取 2 日で有意に増加した。また, 後肢ギプス固定による筋萎縮ラットにおいて, APP 摂取は骨格筋重量回復をもたらし, タンパク質合成を促進する IGF-1 (インスリン様成長因子 1) の発現をヒラメ筋で有意に増加させた。本研究では, ひふく筋における筋形成に関する遺伝子発現の測定, 肝臓での IGF-1 遺伝子発現の測定, 血中の IGF-1 濃度の測定を行い, APP 摂取による筋重量増加の機構を検討した。

【方法・結果】5 週齢の SD 雄ラットにタンパク質源がカゼインまたは APP の飼料を与え, 7 日間飼育した。その後, 骨格筋・肝臓を採取し, 重量を測定後, 遺伝子発現を測定した。また血清を採取し血中 IGF-1 濃度を測定した。カゼイン摂取と比較して, APP 摂取によりひふく筋重量が有意に増加した。ひふく筋では, APP 摂取によりタンパク質分解促進因子である MuRF1 と筋肥大抑制因子である Myostatin の発現が減少した。また mTOR を介してタンパク質合成を促進する IGF-1 の発現は変化しなかった。肝臓での IGF-1 の発現と血中の IGF-1 濃度も変化しなかった。

D-9 ポリフェノール-システインによるメトミオグロビンのオキシ化
○三浦ゆかり, 本田沙理, 増田俊哉 (徳島大院・総合)

【目的】ポリフェノールには、現在、様々な機能が期待され、その研究も広範囲に行われている。ところで、食肉の新鮮色は、色素タンパク質ミオグロビンのミオグロビン上の2価鉄イオンに分子状酸素が配位し、鮮赤色のオキシミオグロビンとなることで呈色している。しかし、このオキシミオグロビンはそれほど安定ではなく、鉄が3価となったメトミオグロビンになり、食肉は褐変化する。従って、オキシミオグロビンの生成、維持による食肉の色を保つことは重要とされる。ところで、抗酸化ポリフェノールには強い還元性があるとされる。本研究では、ポリフェノールの還元力に着目し、ポリフェノールが、メト型のキレート鉄を還元して、オキシミオグロビン化、及びその維持が可能かを検討した。

【方法及び結果】抗酸化性を有するポリフェノール類をメトミオグロビン溶液に添加して、その吸光スペクトルを経時的に測定し、オキシミオグロビンへの変換能を評価した。その結果、多くのポリフェノールにおいて、メトミオグロビンをオキシミオグロビンに効率的に変換することはできなかった。そこで、システインを共存させ、再度ポリフェノールのメトミオグロビンへの効果を検討した。その結果、ポリフェノールのみではメトミオグロビンのオキシ化をできなかった物質の中に、高い効率のオキシミオグロビン化作用を示す物質を見いだした。これらのポリフェノールが、システイン存在下で、どのようにメトミオグロビンをオキシ化できるのか、ポリフェノールの反応による構造変化に基づいて解析を行った結果と併せて報告する。

D-10 希少糖 D-プシコースを処理した線虫におけるミトコンドリア局在型 SOD の発現量
○山口大貴, 佐藤正資 (香川大・農)

【目的】演者らは、D-フルクトースの C-3 エピマーである希少糖 D-プシコースが、線虫 *Caenorhabditis elegans* の寿命を延長することを報告している。さらに数多くある単糖異性体のなかから、寿命延長・抗老化物質のスクリーニングを行っているが、線虫寿命試験は約1カ月の期間がかかり、結果のばらつきも大きい。そこで、より簡便な線虫老化評価法の開発が必要であると考えた。

予備試験において、加齢に伴ってミトコンドリア局在型スーパーオキシドデスムターゼ遺伝子 *sod-3* の発現量が増加していることを見いだした。この *sod-3* 遺伝子発現量を線虫の加齢・老化のバイオマーカーに使えないかと考え、D-プシコースを処理した線虫を用いて、加齢に伴う *sod-3* 遺伝子発現量の変化をレポーターアッセイ(GFP)により調査した。

【方法・結果】実験には、SOD-3::GFP 融合遺伝子を導入した変異体 CF1553 (muIs84) を用いた。この変異体を同調培養し、成熟成虫を得た。得られた成虫を D-プシコースを含む液体培地に移し、20°Cで静置培養を行った。ここから毎日あるいは隔日で10~20個体を取り出し、蛍光顕微鏡写真を撮影した。得られた画像はImageJを用いて輝度を定量し、*sod-3* 発現量とした。D-プシコース処理をした線虫の *sod-3* 遺伝子発現量は無処理線虫と同様、加齢に伴って増加していた。現在、繰り返し実験を行い、D-プシコース処理によって、*sod-3* 発現量が増加するのか減少するのかを確認している。

D-11 ビタミン B₁₂ 強化植物性乳酸発酵食品（ザワークラウト）の開発
○北村有子, 美藤友博¹, 藤井久美子², 薮田行哲¹, 会見忠則¹, 渡邊文雄¹
(鳥取大院・農,¹鳥取大院・連合農,²鳥取大・農)

【目的】ビタミン B₁₂ (B₁₂) は微生物によって生合成され、食物連鎖により高等動物の体内に吸収・蓄積される。高等植物は B₁₂ 依存性酵素や代謝系を持たないため、植物性食品に B₁₂ は含まれず、厳格な菜食主義者等で動物性食品の摂取不足の人において B₁₂ 欠乏症の発症が危惧される。そこで本研究では、菜食主義者が多いヨーロッパ諸国で一般的に食されている乳酸発酵食品ザワークラウト（キャベツの漬物）に着目し、B₁₂ 生産乳酸菌を用いて B₁₂ 強化ザワークラウトの作製を検討した。

【方法・結果】B₁₂ 生産乳酸菌の中からキャベツの搾り汁を用いて、ザワークラウトに適した菌の選別を行った。ザワークラウトの調製法としてキャベツ可食部に食塩を添加後、キャベツ重量の 0.1%、0.2% 及び 0.5% (w/w) の乳酸菌を添加し、25°C で 3 日間発酵させた。コントロールのザワークラウトは同様の条件で自然発酵させ調製した。乳酸菌及びザワークラウトの B₁₂ 定量は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法で測定した。B₁₂ 化合物の同定は *E. coli* 215 を用いたバイオオートグラム法で評価した。B₁₂ 生産乳酸菌の中で鳥取大学農学部附属フィールドサイエンスセンターで単離された MII-12 株 (62.2±14.5 ng/g 湿重量) が最も B₁₂ 含量が高く、シユード B₁₂ は含まれず、真の B₁₂ に由来することが明らかとなった。MII-12 株を 0.5% 添加して作製したザワークラウトの B₁₂ 含量は 0.3 µg/100g 湿重量であり、コントロールの約 3 倍の B₁₂ 含量を示した。以上の結果より、本 B₁₂ 生産乳酸菌を添加することで、B₁₂ 強化食品の作製が可能であることが示唆された。

D-12 トリュフ及び松露に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の特性
○滕 飛, 竹中重雄¹, 薮田行哲, 霜村典宏², 渡邊文雄
(鳥取大院・連合農,¹大阪府大院・生命環境,²鳥取大・農・菌類きのこ遺資セ)

【目的】トリュフは別名西洋松露とも言われ、大きく分けて「黒トリュフ」と「白トリュフ」の 2 種類がある。トリュフは世界三大珍味のひとつで、高級食材になっているキノコである。これまでの我々の研究では、食用キノコの一部に少量のビタミン B₁₂(B₁₂)が含まれていることが明らかになった。また、その中には非天然型 B₁₂ である B₁₂[c-lactone]が検出された。そこで、今回は松露及び西洋松露（トリュフ）の B₁₂ 含有量と B₁₂ 化合物を同定した。

【方法・結果】黒トリュフと白トリュフは市販品（缶詰，冷凍，生）を用いた。松露は鳥取大学菌類遺伝資源センターで人工栽培したものを用いた。各サンプルから B₁₂ の抽出・定量は、五訂増補日本食品標準成分表で採用される *L.delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で測定した。トリュフの B₁₂ 含量は、6.0～18.7 µg/100 g 程度であり、松露 (7.0 µg/100 g) に比べて高い値であった。また、抽出液を用いて *E. coli* 215 による TLC バイオオートグラムと LC/ESI-MS/MS で詳細に分析を行った結果、すべてのトリュフ及び松露において B₁₂ のみが検出された。

D-13 栄養補助食品のクロレラ錠剤に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の精密分析
○浅井悠亮, 美藤友博¹, 多湖一憲, 藪田行哲¹, 竹中重雄², 溝口 享³,
渡邊文雄¹ (鳥取大院・農,¹ 鳥取大院・連合農,² 大阪府大院・生命環境,³ サン・
クロレラ)

【目的】真核生物である藻類の一部にはビタミン B₁₂(B₁₂)が含まれていることが報告されており, これらの藻類は菜食主義者にとって B₁₂ の良い供給源になりうると考えられる。しかし, これまでの研究から B₁₂ が多量に含むとされる食用藍藻のスピルリナにはヒトにおいて生理的に不活性なシュード B₁₂ が多量に含まれていることが明らかになった。本研究では同じ栄養補助食品として利用されている緑藻類クロレラの市販錠剤に含まれる B₁₂ 化合物の特性を検討した。

【方法】市販のクロレラ錠剤から B₁₂ の抽出・定量は五訂増補日本食品標準成分表で採用されている *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 を用いた微生物学的定量法で測定した。B₁₂ 化合物は *E. coli* 215 を用いたバイオオートグラム法と LC/ESI-MS/MS で同定した。また, クロレラ中の未同定のコリノイド様化合物は HPLC を用いて精製し, 機器分析により同定することを検討した。

【結果】市販のクロレラ錠剤 19 種類のうち 15 種類から B₁₂ が検出された。バイオオートグラムと LC/ESI-MS/MS の結果から, クロレラから検出されたのは真の B₁₂ であることが明らかとなった。B₁₂ 含量を測定したところ, 15 種類のクロレラの内 8 種類は 192~415 µg/100 g と非常に高い B₁₂ 含量を示した。また, B₁₂ が検出された 15 種類のクロレラの内 4 種類から未同定のコリノイド様化合物が検出され, 現在, この未同定物質について詳細に分析している。

D-14 塩素系殺菌剤がビタミン B₁₂ に及ぼす影響
○上田 央, 馬場泰弘, 藪田行哲, 渡邊文雄 (鳥取大院・農)

【目的】ビタミン B₁₂ (B₁₂) は主に動物性食品に多く含まれる。当研究室において椎茸など一部のキノコには生理活性を示さない B₁₂[c-lactone]が含まれていることが明らかとなった。B₁₂[c-lactone]は B₁₂ とクロラミン T (有機塩素系殺菌剤) との反応によって生成することが報告されている。そこで本研究ではクロラミン T と同様の殺菌能を持つ塩素系殺菌剤である微酸性電解水を用いて B₁₂ に及ぼす影響を検討した。

【方法・結果】本研究では有効塩素濃度を 10, 30 ppm に調製した微酸性電解水を用いた。これらと B₁₂ (終濃度 10 µM) を混合し, 反応直後から 180 分間経時的に紫外可視吸光スペクトルの変化を測定した。また反応産物を得るために反応液を Sep-Pak C18 カラムと HPLC を用いて精製した。

有効塩素濃度 10 ppm の微酸性電解水と B₁₂ を混合させ, 反応開始 20 分後の紫外可視吸光スペクトルを測定したところ, B₁₂ に特異的な極大吸収波長 361 nm が 364 nm 付近へ, また 520-550 nm の吸収帯が 550-585 nm 付近へシフトしていた。さらに HPLC 分析の結果, 反応開始 60 分後には 2 つの反応生成物を確認した。また有効塩素濃度 30 ppm の微酸性電解水と B₁₂ の反応では, 前者の場合よりも短時間で同様の現象が確認され, さらに時間が経過すると 2 つの反応産物は分解されて検出することができなくなった。したがって B₁₂ は食品添加物指定を受けている低濃度の微酸性電解水と反応して主に 2 つの中間体を経て分解に至ると推定される。

賛助企業

- ・天野エンザイム(株) 岐阜研究所
- ・アルファー食品(株)
- ・アルファバイオ(株)
- ・(株)井ゲタ竹内
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・OATアグリオ(株)
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・岡山県酒造組合
- ・社団法人岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・(株)海産物のきむらや
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・機能性食品開発研究所
- ・杏林予防学研究所
- ・協和発酵バイオ(株)
山口事業所生産技術研究所
- ・キリンビール(株) 岡山工場
- ・近畿日本ツーリスト中国四国岡山支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・高知酒造(株)
- ・寿製菓(株)
- ・(株)サンキ精機
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)酔心山根本店
- ・諏訪酒造(株)
- ・正晃(株) 山口営業所
- ・仙味エキス(株)
- ・(株)ソフィ
- ・(株)大愛
- ・大興産業(株)
- ・大山乳業農業協同組合
- ・大山ハム(株)
- ・大洋香料(株)
- ・高塚ライフサイエンス(株)
- ・(有)タグチ
- ・中国ケミー(株)
- ・帝國製薬(株)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・(株)日本総合科学
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・盛田(株)小豆島工場
- ・丸善製薬(株)
- ・マルトモ(株)
- ・三島食品(株)
- ・(株)宮田薬品
- ・(株)無手無冠
- ・ヤスハラケミカル(株)
- ・ヤマキ(株)
- ・(株)やまだ屋
- ・山本薬品(株)
- ・(有)藍布屋
- ・ルナ物産(株)
- ・湧水製薬(株) 中央研究所 (五十音順)

2014年5月3日現在 69社

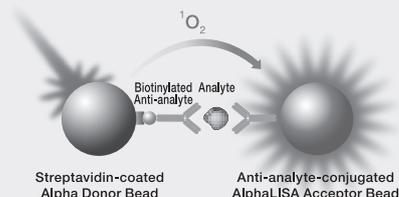
機能性食品の科学的エビデンス & 食品の抗酸化能測定

HUMAN HEALTH

ENVIRONMENTAL HEALTH

食品の新たな機能性表示制度に基づく機能性の科学的エビデンス取得に
混ぜるだけ ELISA AlphaLISA

AlphaLISA 原理



	ELISA	AlphaLISA
洗浄	必要	不要
アッセイステップ	> 5ステップ	3~4ステップ
サンプルボリューム	多	少 (5 µL以下)
プレートフォーマット	96-well	96, 384, 1536-well
自動化・スループット	★	★★★
感度	★★★	★★★★
ダイナミックレンジ	2 logs	2.5-5 logs

AlphaLISA は、ドナーとアクセプターの2種類のビーズを使用したテクノロジーです。溶液中で各ビーズに結合した分子が相互作用し、2つのビーズが近接した状態で励起光を照射すると、ドナービーズが一重項酸素を産生、近接したアクセプタービーズがこれを受け取り発光します。

AlphaLISA イムノアッセイキット

細胞培養液、血清サンプル中の目的分子を検出するキットです。さまざまな研究分野に対し、多数のキットを提供しています。

* 検出には Alpha 測定機能が搭載された専用装置 (EnSpire または EnVision) が必要です。

循環器疾患	代謝系疾患	アルツハイマー	がん関連	免疫・炎症関連
a-2 macroglobulin	Adiponectin	Aβ 1-15 / 16	AFP	b-NGF
Cardiac Troponin 1	Adiponectin (mouse)	Aβ 1-40	CA125	PSA
D-dimer	Albumin	Aβ 1-40 (high specificity)	Caspase-3 (active)	TFF3
EPO	C-peptide (mouse / rat)	Aβ 1-40 (mouse, rat)	CXCL11 / I-TAC	TIMP1
ICAM-1	FGF21	Aβ 1-42	EGF-R	TNFα
Myeloperoxidase	GH	Aβ 1-42 (high specificity)	EPO	CRP
Myoglobin	GLP-1	Aβ 1-42 (mouse, rat)	EPO-R	CXCL1 / GRO-α
NT-proBNP	IGF1	Aβ 1-x	ERBB2 / HER2	CXCL9 / MIG
PAI-1	IGF2	Aβ oligomers	HGFR / c-MET	CXCL10 / IP-10
PCSK9	Insulin	sAPPα (c-term sp)	IFN-β	IL12 (p70)
Plasminogen	Leptin	sAPPβ	MMP1	GM-CSF
Renin	Leptin (mouse)	sAPPβ (high sensitive)	MMP2	IFN-α
tPA	Prolactin	Tau	MMP3	IFN-γ
Transferin	glucagon		MMP9	IL1α
			MMP9 (mouse)	IL1β
				IL2
				IL3
				IL4
				IL5
				IL6
				IL7
				IL8
				IL10
				IL11
				IL15 (mouse)
				IL17A (mouse, rat)
				TNFα (mouse)
				CCL2 / MCP1 (mouse, rat)
				CCL5 / RANTES (mouse)
				GM-CSF (mouse)
				IFN-γ (mouse)
				IL1β (mouse)
				IL1β (rat)
				IL2 (mouse)
				IL6 (mouse)
				IL7 (mouse)
				IL10 (mouse)
				IL15 (mouse)
				IL17A (mouse, rat)
				TNFα (mouse)

食品の抗酸化力を ORAC (AOU-P) 法で測定しませんか？

ストレスや紫外線、喫煙などにより生体内で過剰産生される活性酸素から、抗酸化物質が身体を守り、発がん・老化・生活習慣病などを抑制する効果があることはよく知られています。各種の抗酸化物質を持つ抗酸化力の評価方法の一つとして、ORAC (AOU-P) 法が注目されています。

ARVO™ X シリーズ

- ORAC (AOU-P) 法の測定に求められる傾向測定 (上方・下方)・繰返し測定・温度制御機能などを備えた多機能プレートリーダー
- データ解析ソフトウェア WorkOut 2.5 は測定の実行から解析までの自動化が可能



EnSpire™ マルチモードモデル

- 卓越した温度制御機構や四重モノクロメーターにより、蛍光測定 (上方・下方) など、ORAC (AOU-P) 法の測定に求められる各種機能を持ち、柔軟なシステム構成が可能な多機能プレートリーダー



パーキンエルマーは、ORAC (AOU-P) 法測定にお使いいただける
プレートリーダーをご提案しています。

株式会社 パーキンエルマー ジャパン
ライフサイエンス事業部

本製品のお問い合わせ

本 社 〒240-0005 横浜市保土ヶ谷区神戸町134
横浜ビジネスパーク テクニカルセンター 4F TEL.(045)339-5862
大阪支社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町5-3 TEL.(06)6386-1771
東京営業所 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町1-7-17 CTKビル 5F TEL.(03)3866-2647
九州営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-12-6 花村ビル 2F TEL.(092)474-2311

www.perkinelmer.co.jp


PerkinElmer®
For the Better

2014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 大政健史 (徳島大院・STS研究部)

実行副委員長 田中 保 (徳島大院・HBS研究部)

総務・会計・広報

○向井理恵 (徳島大院・HBS研究部), 湯浅恵造 (徳島大院・STS研究部)

要旨集・プログラム

○近藤美樹 (徳島文理大), 間世田英明 (徳島大院・STS研究部),

兼目裕充 (徳島文理大), 櫻谷英治 (徳島大院・STS研究部)

会 場

○金丸 芳 (徳島大院・SAS研究部), 中村光裕 (徳島大院・SAS研究部),

中川秀幸 (徳島大院・SAS研究部), 林 直宏 (大塚化学(株)),

岡崎貴世 (四国大), 新居佳孝 (徳島県立工業技術セ)

懇親会

○増田俊哉 (徳島大院・SAS研究部), 横井川久己男 (徳島大院・SAS研究部),

寺尾純二 (徳島大院・HBS研究部), 川上竜巳 (徳島大院・SAS研究部),

酒井 徹 (徳島大院・HBS研究部)

2014年度日本農芸化学会中四国支部大会
(第40回講演会)

実行委員長：大政 健史

連絡先：徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

T E L : 088-656-7408

E-mail : nouka-tokushima@tokushima-u.ac.jp

支部からのお知らせ

1. 学会創立90周年記念第41回講演会（支部例会）
 - 開催日：2015年1月24日（土）
 - 場 所：水産大学校
 - 内 容：受賞講演，一般講演
 - 講演申込締切：2014年12月22日（月）
 - 講演要旨締切：2015年1月5日（月）
 - 世話人：原田和樹（水産大学校）
2. 学会創立90周年記念第24回市民フォーラム
 - 開催日：2014年11月8日（土）
 - 場 所：愛媛大学
 - 内 容：招待講演
 - 世話人：菅原卓也（愛媛大学農学部）
3. 学会創立90周年記念第18回若手研究者シンポジウム
 - 開催日：2014年9月20日（土）
 - 場 所：愛媛大学農学部
 - 内 容：招待講演
 - 世話人：渡辺誠也（愛媛大学農学部）

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1
岡山大学大学院環境生命科学研究科
農生命科学専攻生物機能化学講座内
支部ホームページ：<http://jsbba-cs.jp>
E-mail：nouka_chushi@okayama-u.ac.jp