

日本農芸化学会中部支部第153回例会

受賞講演

シンポジウム

「無酸素下で働く微生物 - 嫌気性菌の世界
～環境と健康の視点から～」

ならびに

一般講演

講演要旨集

日時：平成20年11月1日（土）

会場：名古屋大学 シンポジオン

（名古屋市千種区不老町）

日本農芸化学会中部支部事務局

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院生命農学研究科内

日本農芸化学会中部支部第153回例会

日時：平成20年11月1日(土) 13:00より

会場：名古屋大学 シンポジオン(名古屋市千種区不老町)

参加費：無料

プログラム

13:00 開会のあいさつならびに支部功労者表彰式
中部支部長 前島正義(名古屋大学)

13:20-13:50 日本農芸化学会賞 受賞講演
「新しい酵素機能の開拓と産業利用に関する研究」
浅野泰久(富山県立大学)

14:00-16:00 シンポジウム 「無酸素下で働く微生物 - 嫌気性菌の
世界 ~ 環境と健康の視点から ~」

14:00 『嫌気性微生物生態系とメタン生成』上木厚子(山形大学)

14:40 『ヒトの疾病と嫌気性菌』渡邊邦友(岐阜大学)

15:20 『嫌気性条件での芳香族塩素化合物の微生物分解』

片山新太(名古屋大学)

16:10-17:10 一般講演(ポスターセッション)

17:10-19:00 懇親会、奨励賞表彰式

名古屋大学シンポジオン増設ホワイエ

会場への交通：地下鉄東山線「本山」駅下車 名城線乗り換え「名古屋大学」駅下車

問合せ先：464-8601 名古屋市千種区不老町

中部支部庶務幹事 浅川 晋（名古屋大学大学院生命農学研究科）

(Tel: 052-789-5509, Fax. 052-789-4136)

E-mail: asakawa@agr.nagoya-u.ac.jp



日本農芸化学会賞受賞講演

講演要旨

新しい酵素機能の開拓と産業利用に関する研究

富山県立大学・工学部・生物工学科 浅野 泰久

我々は、微生物や植物由来の新しい酵素を見出し、進化分子工学の手法により巧みに改変して、従来記録されていない新しい反応および用途を開発した。それらは化学工業および医療に有効に利用されている。

1. 先天性代謝異常症早期診断用アミノ酸脱水素酵素の開発

フェニルアラニン脱水素酵素を細菌に見だし、初めて酵素化学的諸性質を明らかにした (EC 1.4.1.20) *Bacillus badius* 由来の本酵素を先天性代謝異常症であるフェニルケトン尿症の診断に適用した。本診断法は、1994 年より現在まで、新生児の先天性代謝異常のマススクリーニング試験の一環として利用されている。わが国の新生児の約 30% (500 万人以上) がこの方法により診断され、70 名以上のフェニルケトン尿症新生児を検出した(図 1)。

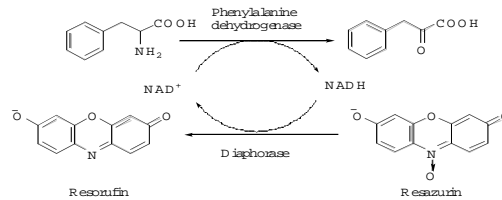


図 1. フェニルアラニン脱水素酵素およびジアフォラーゼを用いる L-フェニルアラニンの蛍光定量法

自然界には存在が確認されていないメチオニン脱水素酵素を *B. sphaericus* 由来の PheDH の合理的 5 点部位特異的変異により創製し、L-メチオニンの定量に適用した。メチオニン脱水素酵素を分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ (BCAT) とともに用いる血中メチオニンの定量により、新生児の先天性代謝異常症であるホモシスチン尿症の診断が可能である。

2. 微生物および植物のニトリル代謝酵素群とそれらの有用物質生産への利用

微生物および植物のニトリル代謝酵素群の生理学的側面、存在意義および有効利用について検討した。

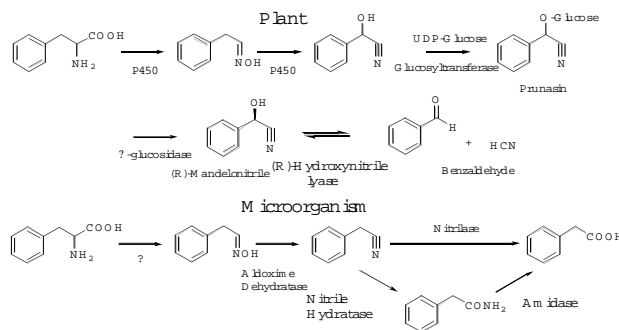


図 2. 植物と微生物の「アルドキシム-ニトリル経路」の比較

すなわち *Bacillus* sp.等にアルドキシムからニトリルを与える新酵素「アルドキシム脱水酵素」を見出し、世界初のニトリルの酵素的合成に利用した。さらに、アルドキシム脱水酵素とニトリル分解酵素との相関関係を検討し、「アルドキシム - ニトリル経路」を明らかにした(図 2)。従来、報告が皆無であった D-アミノ酸アミド加水分解酵素群を発見し、構造や酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、それらを用いるアミノ酸アミド類のダイミク的な光学分割を初めて実現した(図 3)。

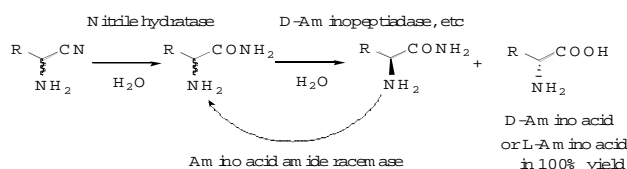


図 3 . アミノニトリルあるいはアミノ酸アミドを基質とするダイナミックな光学分割反応

わが国ではほとんど研究例が無かった、植物由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) について研究し、工業用宿主として実用性が高い大腸菌で *Manihot esculenta* 由来の HNL を可溶性に発現させ、医薬等原料であるキラル中間体であるシアノヒドリンの工業的製造法の開発を推進させた。

3 . ピロリン酸を用いるイノシンの酵素的リン酸化反応

安全、安価な化合物であるピロリン酸をリン酸供与体とする酵素的リン酸化法の開発をめざして研究を開始し、*Morganella morganii* 等の腸内細菌群に存在する酸性ホスファターゼの触媒により、イノシンの 5' 位を選択的にリン酸化する反応を見出した。進化分子工学を用いる本酵素の改変により収率を劇的に向上させた (図 4)。

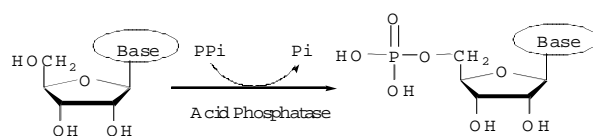


図 4 . ピロリン酸を用いるイノシンの酵素的リン酸化反応

富山県立大学での共同研究をもとに、味の素(株)によって非組換え型実用菌が構築され、リン酸化酵素を用いる核酸系うま味調味料 (イノシン酸およびグアニル酸) の生産技術が 2003 年に工業化された。本法は、危険な試薬である塩化ホスホリルによるリン酸化反応を、酵素による安全な反応に置換えた画期的なグリーンプロセスである。現在、6,600 トン/年以上のスケールで生産されている。

シンポジウム

「無酸素下で働く微生物 - 嫌気性菌の世界 ~ 環境と健康の視点から ~」

講演要旨

S-1

嫌気性微生物生態系とメタン生成

上木厚子（山形大学農学部生物資源学科）

1. はじめに

地球上には、湛水土壌や湿地、水圏の底泥、さらには動物の消化管内などに代表される無酸素環境が広く分布しており、ここでは多様な嫌気性微生物が活発な生命活動を営むことにより、地球上の物質循環や人類の生活の維持にとって不可欠の役割を果たしている。無酸素環境で増殖できる生物は、真核生物のうちの少数のグループ（単細胞性の菌類や原生動物）を除いて、基本的に原核生物（細菌および古細菌）である。嫌気性微生物のエネルギー獲得の方式は、独立栄養性である酸素非発生型光合成を除くと、発酵と嫌気呼吸に大別でき、無酸素環境下における微生物反応は、基本的にこの発酵と嫌気呼吸による有機物の酸化分解に依存して進行する。なお近年、嫌気性の化学合成無機（独立）栄養性の新規微生物に関わる報告が相次いでおり、無酸素環境下に棲息する微生物のエネルギー代謝の型は非常に多岐に渡っていることが改めて認識されつつある。本講演では、嫌気性微生物生態系の構成や機能について、近年得られている知見を紹介しつつ、その概略を述べる。

2. 無酸素環境下における有機物の分解とメタン生成

発酵性細菌は、基質となる有機物を最終発酵産物に変換する過程で、基本的に基質レベルのリン酸化によりATPを生成するが、一般に生成物として、酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸、コハク酸などの有機酸やアルコール、さらに H_2 などを排出する。利用できる基質の範囲、生成物の種類とその比率などは種によってそれぞれ異なる。糖発酵性の種はもとより、特にアミノ酸発酵性の種は、基質として利用できるアミノ酸の種類と生成物において非常に多様である。一方、嫌気呼吸性の微生物は、有機物（特に発酵性細菌などによって生成された短鎖脂肪酸など）や H_2 を電子供与体とし、最終電子受容体として、 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} などを利用してこれらを異化的に還元することにより、有機物の分解と物質循環に寄与している。 SO_4^{2-} 濃度が高い海洋環境では硫酸還元が卓越していると考えられているが、有機物の嫌氣的分解の最末端段階では一般的に、発酵性および嫌気呼吸性の微生物によって生成された、主として酢酸および $H_2 + CO_2$ をメタン生成古細菌が利用することによりメタンを生成する。このため、有機物を含む無酸素環境からは通常メタンが放出される。

3. 嫌気性化学合成無機栄養微生物と物質循環

好気性の化学合成無機栄養微生物であるイオウ酸化細菌、アンモニアあるいは亜硝酸酸化細菌などの存在はこれまでよく知られてきていたが、これに対し近年、様々なタイプの嫌気性化学合成無機（独立）栄養性の微生物の存在が明らかになってきた。これらの微生物として、 S^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 S^0 などの還元型イオウ化合物、あるいは H_2 を電子供与体として利用し、電子受容体として主に NO_3^- を利用することによりエネルギーを得る、主として *Epsilonproteobacteria*綱や *Aquificales*目といった系統に所属する新規細菌が、深海底熱水孔や石油汚染地下水などといった環境から分離されてきている。さらに近年特に注目され、その存在が確証されつつあるものに嫌気性アンモニア酸化（anaerobic ammonium oxidation: Anammox）細菌がある。Anammox細菌は独立栄養的に、 NH_4^+ を酸化すると同時に NO_2^- を還元して N_2 を生成（脱窒）する。この反応を担う微生物はまだ純粋分離されていないものの、集積培養などの多くの証拠により、*Planctomycetes*門に属す単系統のグループがこの反応を

担っているものとみられている。Anammox細菌の脱窒に対する寄与はかなり大きいと推定され、地球上における窒素循環に関わる従来の認識を大きく変えつつある。

4．大気中メタン濃度の増加と嫌氣的メタン酸化

大気中メタンは、温室効果への寄与率がCO₂に次いで大きい温室効果ガスである。産業革命以前の大気中濃度（715 ppb）に比べ、現在はその約1.5倍程度（1774 ppb）にまで増加しており、環境問題の上から注目されてきた。大気中へのメタン放出源としては、メタン生成古細菌によって生成されたメタンを起源とする生物的メタン放出と、化石燃料やバイオマスの燃焼などによる非生物的メタン放出とに大別でき、生物学的かつ人為的メタン放出源として、水田土壌や反芻動物などが重要視されてきた。1990年代初め頃までは、大気中メタン濃度は直線的な増加傾向を一貫して示してきていたが、1990年代後半以降の濃度増加は停滞し、近年その濃度はほぼ一定で推移している。しかし、地球温暖化抑制の観点からは依然として、地球規模での大気中へのメタン放出量の抑制が大きな課題である。なお、メタンは、基本的には酸素存在下での好氣的なメタン酸化細菌による酸化か、または化学的酸化によりCO₂に戻ると考えられてきた。しかし近年、メタンの生物的嫌氣的酸化（anaerobic oxidation of methane: AOM）の存在に関わる多くの証拠が報告されている。AOMを担う微生物はまだ分離されていないが、メタンを酸化する古細菌とH₂を利用する硫酸還元細菌の共生によるものという見方が一般的であり、このAOMが、特に海洋におけるメタン酸化にかなり寄与しているものと推定されている。なお、硝酸還元性微生物が関与するAOMの例も報告されている。

5．未利用バイオマスからのメタン（バイオガス）の回収

上述したように有機物を含む嫌氣性微生物生態系では、最終的には一般に可燃性ガスであるメタンが生成されるため、このメタンを回収することにより、化石エネルギーに替わるエネルギーを得ることができる。下水汚泥、各種廃水、生ゴミなどの廃棄物系バイオマスを嫌氣的に処理し、廃棄物の減量化を図りながらメタンを回収し、これをガス発電および熱回収などによりエネルギー源として利用する様々なシステムが、世界的に稼働している。ヨーロッパでは特に、メタン発酵リアクターの利用と共に、有機性廃棄物の埋め立て地（landfill）からのメタンの回収が進んでいる。

6．環境試料から分離した発酵性嫌氣性細菌について

演者らは現在、水田土壌やメタン発酵槽、海洋底泥などの様々な試料から分離した嫌氣性細菌株について、その生理学的特徴や系統分類学的位置づけを検討している。本講演ではこのうち、ほとんどの種が主にヒトの糞便や口腔、さらに反芻動物の第一胃などの哺乳動物関連試料から由来し、環境試料からの種の記載例がほとんどなかった嫌氣性グラム陰性桿菌である*Bacteroidetes*門関連菌株の特徴について述べ、環境中に分布する発酵性細菌の栄養要求性や多様性について考察する。

研究テーマ：嫌氣性微生物の生態と系統

略歴：山形大学農学部農芸化学科助手、助教授を経て1998年より生物資源学科教授

連絡先：997-8555 鶴岡市若葉町1 - 2 3 山形大学農学部生物資源学科生物資源利用化学講座

E-mail: uatsuko@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

S-2

ヒトの疾病と嫌気性菌

渡邊邦友（岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野）

嫌気性菌の存在をはじめて記したのは L. Pasteur である。1861 年に乳酸発酵の研究の過程で初めて嫌気性菌の存在に気付いた彼は、この菌が増殖している培地の中に空気を送り込むと 1 ~ 2 時間以内にすべて死滅すると記載した。このように空気に接触すると死滅する嫌気性菌、酸素に依存する生物であるヒトの病気とは一見無関係に思えるが、実はヒトの病気（感染症や中毒）と予想以上に深く関係している。

ヒトの病気と関連する細菌は、それが体外？ 体内？どこから発したか？により、外因性と内因性と区別して呼ばれる。例えば、破傷風菌、ボツリヌス菌、ガス壊疽菌群などのクロストリジウムは代表的な外因性嫌気性菌のグループに分類される。それらは環境中に芽胞として存在し、外傷あるいは術後のように皮膚粘膜に損傷を受けた場合に直接、あるいは保存中に食品中で増殖してその食品とともに体内に侵入して病気（外因性感染や中毒）を起こすことができる。それらが原因となる病気には強力な外毒素(神経毒)が発症に重要な役割を演じているものがある。次に、バクテロイデス、プレボテラ、フゾバクテリウム、ファインゴルディアなどは内因性嫌気性菌のグループに分類される。それらはヒトの粘膜上に生息し、体内の通常無菌の領域（体腔、組織、臓器、血液）に偶発的に侵入し、病気（内因性感染）を起こす。外傷、手術などがきっかけとなることが多いが、粘膜あるいは粘膜近隣の炎症、癌などからも侵入する。後者では、宿主は免疫不全の状態にあり、発症しやすい。発症すると重症化しやすく、致死率も高くなる。内因性感染は、複数菌による感染で通性菌との混合感染ある場合がほとんどである。抗菌薬使用による細菌の抗菌薬耐性化と正常細菌叢の構造変化（Dysbiosis）の惹起の観点から、抗菌薬の使用をどうすべきか議論されるところが多い感染症の一つでもある。

正常細菌叢の構造変化が発症に重要な役割を演じると考えられる病気がある。今日病院内で問題となっているクロストリジウム ディフィシルによる抗生物質関連下痢症、腸炎は、感染症の治療予防に用いた抗菌薬による腸内細菌叢の構造変化が原因となっておこる副現象である。また、慢性歯周炎や細菌性膣症などもまだ十分明らかにされていない原因による口腔、膣内細菌叢の構造変化によって起こる代表的な疾患と考えた方がいいかもしれない。

さて、前世紀に臨床細菌検査室で広く展開されてきた培養依存型の検査法に適した病原菌の分類法、すなわち嫌気、微好気、好気培養法の培養結果とグラム染色所見から見るプラクティカルともいえる分類法に、医療従事者は親しんできた。しかし、培養非依存型の分子生物学的手法の応用が、この領域で進んでいる。その結果、正常細菌叢や病的細菌叢の多様性が明らかになるとともに例えば、これまで病原菌はいないと考えられてきた古細菌に病原菌がいる？とか、培養できない嫌気性菌らしい細菌群がある病巣に優勢に存在する？とか、環境中によく見られる硫酸還元細菌が医学的にも重要である？とかいった情報も得られている。医療従事者はこれらの新しい情報に対応していかなければならない。

このシンポジウムでは、系統分類から見た医学的に重要な嫌気性菌の種類、嫌気性菌の病原因子、嫌気性菌感染症と嫌気性菌症の種類と特徴、嫌気性菌感染症と嫌気性菌症の治療などについて、最近の知見を加えて紹介したいと考えている。

研究テーマ：無芽胞嫌気性菌に関する臨床細菌学的研究

略歴：昭和 47 年岐阜大学医学部卒、昭和 51 年岐阜大学大学院医学研究科、昭和 51 年岐阜大学助手(医学部微生物学講座)昭和 57 年～昭和 58 年 文部省在外研究員(タフツ大学,米国)、昭和 62 年岐阜大学助教授(医学部附属嫌気性菌実験施設)、平成 5 年同教授(医学部附属嫌気性菌実験施設)、平成 15 年～同教授(岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野)

連絡先：〒501-1194 岐阜市柳戸 1-1 岐阜大学医学部棟 7 階 岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野 TEL:058-230-6555

嫌気性条件での芳香族塩素化合物の微生物分解

片山新太、楊素銀、吉田奈央子、柴田敦司、馬場大輔（名古屋大学エコトピア科学研究所）

1. はじめに

有害化学物質による高濃度汚染が発覚した場合は、そのヒト健康リスクから、迅速な浄化のために、熱エネルギーや化学反応を利用した物理化学的処理技術が用いられている。しかし、処理後にしばしば残る低濃度汚染に対しては、物理化学的処理技術では費用対効果が悪く、適した方法が無いのが現状である。その様な汚染に対して、微生物を用いた浄化技術が省エネルギー浄化技術として期待され、開発が進められている。これまでに、油汚染土壌の好気性微生物分解技術や有機塩素系溶媒の嫌氣的脱塩素技術が実用化されている。最近では、元々自然界の持つ浄化能力を利用した低濃度地下水汚染の浄化（自然減衰）や、ダイオキシン類等の難分解性有機化学物質の拡散防止を主眼とした微生物浄化技術が注目されている。

芳香族塩素化合物は、代表的な難分解性有機化合物であり、その完全分解には還元的脱塩素反応と芳香環の酸化分解反応が必要とされる。芳香環の酸化分解反応は、置換塩素が多くなると阻害されることから、まず還元的脱塩素反応による脱塩素によって水素と置換して、酸化分解反応を可能としないといけない。これまで、完全分解のためには、嫌気性菌による還元的脱塩素反応と、好気性菌による芳香環酸化反応が必要とされてきたが、汚染したサイトを嫌気性から好気性にかえることが難しく実用化には至っていなかった。しかし、近年になって、嫌気性条件下でも芳香環の酸化分解反応が見いだされた。嫌氣的条件下での完全分解を行うことができれば、実用化へ大きく近づくことができるものと期待される。そこで、嫌気性条件下での芳香族塩素化合物の完全分解を目的とし、嫌気性脱塩素微生物群と嫌気性酸化分解菌の組み合わせ技術に関する研究を行った。

2. ペンタクロロフェノールの嫌氣的脱塩素微生物群

ペンタクロロフェノールの嫌氣的脱塩素を行う微生物群を、水田土壌に乳酸を添加した培養系を用いて集積した。集積した嫌気性微生物群は、ペンタクロロフェノールを2,3,4,5-テトラクロロフェノール、3,4,5-トリクロロフェノール、3,5-ジクロロフェノール、3-クロロフェノールを経由してフェノールまで完全に脱塩素し、中間代謝産物の蓄積は見られなかった。脱塩素活性は、電子供与体として乳酸、ピルビン酸、水素を用いた場合に高まり、酢酸では変化しなかった。また、硝酸イオンや硫酸イオンは活性を拮抗的に阻害したが、鉄(III)は影響しなかった。代謝阻害剤や抗生物質を用いた試験から、脱塩素活性は、*Firmicutes*門に属する微生物群によることが示唆された。またPCR-DGGEおよび呼吸鎖キノン解析から、この微生物群が*Firmicutes*門、特に*Clostridium*属細菌で優占することが示唆された。

3. フェノールの嫌氣的酸化分解菌群

フェノールの嫌氣的酸化分解を行う微生物群を硫酸還元条件および鉄還元条件で集積した。集積微生物群は、フェノールの酸化に必要な硫酸還元または鉄還元を化学量論的に行い、二酸化炭素まで完全分解していることが示唆された。微生物群集の呼吸鎖キノンおよびPCR-DGGE解析を行ったところ、硫酸還元条件および鉄還元条件ともに、*Deltaproteobacteria* 綱の細菌群が優占していた。両方の集積微生物群とも、フェノール以外に *p*-クレゾールを分解したが、4-クロロフェノール、3-クロロフェノール、ナフタレン、ピフェニルは分解でき

なかった。

4．嫌氣的脱塩素微生物群と嫌氣的酸化分解菌群の組み合わせ技術

脱塩素微生物群と酸化分解微生物群を組み合わせ、嫌気条件下でのペンタクロロフェノールの完全分解を試みた。電子供与体と電子受容体を加えた条件下で両微生物群を混ぜ合わせたところ、ペンタクロロフェノールの脱塩素は阻害されず、両微生物群を働かせることに成功した。¹⁴C 標識化合物を用いて、ペンタクロロフェノールが二酸化炭素およびメタンへ変換されていることを明らかにした。硫酸還元条件下では、脱塩素に必要な乳酸が共存する硫酸イオンの還元消費のために乳酸の効率が低いこと、および脱塩素と酸化分解を合わせた全体の分解速度は、乳酸に比べ硫酸イオンの割合が高い方が、高まることが明らかとなった。また、脱塩素が終わった後に酸化分解微生物群と硫酸を加えることによって、乳酸の効率を高めることができた。

5．まとめと課題

ペンタクロロフェノールの嫌氣的完全分解を行うことに、還元的脱塩素微生物群と嫌氣的酸化分解菌群の組み合わせによって成功した。今後は、より難分解性の化合物であるポリ塩化ビフェニルやダイオキシンを対象として嫌氣的微生物群の組み合わせ技術を展開することを予定している。既に、*Firmicutes* 門の細菌が優占するポリ塩化ビフェニルの脱塩素微生物群の集積に成功し、多様なポリ塩化ビフェニル同族体を含むカネクロール 300 とカネクロール 400 の混合物の脱塩素を可能にしている。この脱塩素活性は、238 ng-total-PCBs/ml-culture/day あり、世界で他に 2 例しかない既知の嫌気性微生物群集と比べても遜色ない高活性であった。今後は、ビフェニルをはじめとした多環芳香族化合物の嫌氣的酸化分解微生物群の集積によって、脱塩素微生物群と嫌氣的酸化分解微生物群の組み合わせ技術の適用を可能としたい。

参考文献

- Yoshida et al. Science of the Total Environment, 381, 233-242 (2007)
Yang et al. Proc. International Symp. EcoTopia Sci. (2007)
Yang et al. Biotech. Bioeng. In printing (2008)
Baba et al, J. Biosci. Bioeng. 104(1), 62-68 (2007)

片山新太 (かたやまあらた)

研究テーマ：好気・嫌気微生物群のデザイン化による環境浄化、生物系廃棄物リサイクルにおける有害化学物質の運命、各種環境浄化技術の評価指標

略歴：

昭和61年 東京工業大学大学院総合理工学研究科化学環境工学専攻修了，同年 名古屋大学農学部助手，昭和63年 米国カリフォルニア大学デービス校博士研究員，平成5年 名古屋大学農学部助教授，平成12年 同難処理人工物研究センター教授，平成18年 同エコトピア科学研究所教授 工学博士

連絡先：464-8603名古屋市千種区不老町F3-4(670) 名古屋大学エコトピア科学研究所
a-katayama@esi.nagoya-u.ac.jp

一般講演 要旨

P1

Development of biosensor based on cellobiose dehydrogenase from *Irpex lacteus* for detection of cellobiose

Sai Soe Than, Kouichi NOZAKI, Masahiro MIZUNO, Takahisa KANDA, Yoshihiko AMANO (Shinshu University, Faculty of Engineering)

[Introduction] The most commonly used method for measuring reducing sugars is the colorimetric method which is a time consuming, laborious and detect all reducing sugars. The biosensor in this study could replace colorimetric assay for determining cellobiose (G2) which is the reducing sugar, substrate for cellobiose dehydrogenase (CDH) enzyme and main products by exo-type cellulases. The biosensor for detection of cellobiose will become useful in the future.

[Methods and Results] The biosensor was constructed with the enzyme-modified electrode as the working electrode, with an Ag/AgCl (0.1M KCl) electrode as the reference electrode and a platinum wire as the auxiliary electrode. The enzyme from *Irpex lacteus* was over expressed by *Aspergillus oryzae* and purified by HisTrap column. Its specific activity was 1.4 U/mg. Its characteristics such as stability and the response against G2 concentration were determined by CDH assay before CDH immobilization. CDH reaction method for the detection of G2 concentration is more precise than the colorimetric method. For enzyme-modified electrode preparation, 15 μ l of 2.6 μ g CDH was immobilized by simple chemophysical adsorption on the ϕ 5mm carbon graphite electrode. The potential voltage applied was 1 V. Ammonium acetate buffer of pH5 was selected as the working buffer solution. This CDH was able to be immobilized and used as biosensor for detection of cellobiose. To achieve better sensitivity, mediator will be used to enhance the electron transfer for further investigation.

P2

レニン-アンギオテンシノーゲン反応における触媒残基近傍の Ser および Thr 残基の役割 中根 千晶、吉岡 祐一郎、岩田 英之、中村 征夫、海老原 章郎、鈴木 文昭 1、 中川 寅(岐阜大・応用生物科学・応用生化学、1 岐阜大・応用生物科学・動物生化学)

【目的】 アスパルティックプロテアーゼは触媒残基として2つの Asp 残基を持ち、その pH 依存曲線は一般的に pH 4 付近に至適 pH を持つ典型的なベル型を示す。しかし、レニン反応の pH 曲線は肩があった曲線や双丘型の曲線を示し、レニン反応は酸性と塩基性に至適 pH を持つ 2 つの反応で構成されていると考えられる。Asp 側鎖の pKa が約 4 であることから、レニンの塩基性反応には Asp 以外の残基の関与が示唆される。本研究では、塩基性 pH でプロトン供与体となり得る水酸基ならびにグアニジル基を側鎖に持つ Ser、Thr および Arg の関与を調べた。

【方法・結果】 レニンの活性中心近傍に位置し、種間でよく保存されているヒトレニン Thr39、Ser41、Thr80、Arg82、Thr85、Thr227、Ser230、Ser233 を Ala へと改変した T39A、S41A、T80A、R82A、T85A、T227A、S230A、S233A 改変型ヒトレニンを作製し、組み換え型ヒツジアンギオテンシノーゲンを基質として pH 依存性を調べた。アスパラギン酸プロテアーゼ間で保存されている触媒モチーフの DTGS および DTG を改変した T39A、S41A、T227A は酵素活性を示さなかった。T80A は野生型と同じ pH5.5 と pH8.5 の 2 ピークを示したが、野生型に比べ、塩基性ピークが僅かに低かった。R82A は変化がなかった。T85A は pH7.5~8.5 に肩があった pH5.5 の 1 ピークを示し、野生型に比べ、塩基性ピークが顕著に低かった。S230A、S233A は pH7~7.5 に肩があった pH6.0~6.5 の 1 ピークを示した。これらの結果より、Ser230 と Ser233 は触媒 Asp 側鎖の pKa 値を上昇させていることが明らかとなった。また、N フラップに位置する Thr80 と Thr85 は塩基性 pH における触媒活性に寄与していることが示唆された。

P3

ハツカダイコンにおける α -アミラーゼ RsBAMY1 の分布に関する研究 高橋郁夫、原 正和、久保井徹（静岡大・農）

【目的】当研究室では、以前、ハツカダイコンの胚軸が肥大する際に発現が向上する遺伝子として、 α -アミラーゼ遺伝子 *RsBAMY1* を見出し、cDNA クローンを単離した。さらに、同じ植物体から α -アミラーゼを精製し、ESI-MS 情報により、本精製タンパク質が *RsBAMY1* の産物である可能性が高いことを明らかにした。本研究では、ハツカダイコンにおける *RsBAMY1* タンパク質の発現部位を特定することを目的に、 α -アミラーゼ活性と、*RsBAMY1* を特異的に認識する抗体反応を指標に、器官および組織レベルでの発現の分布を調査した。

【方法と結果】ハツカダイコン（品種コメット）を温室内で栽培し、成長ステージごとにサンプリングを行なって、 α -アミラーゼ活性と抗 *RsBAMY1* 抗体による *RsBAMY1* の発現を調査した。その結果、 α -アミラーゼ活性と *RsBAMY1* 発現は、共に肥大時の胚軸で上昇した。本活性と発現は、根では若干高まるものの、葉では低く抑えられていた。肥大胚軸における *RsBAMY1* 発現の組織分布を調査するため、抗 *RsBAMY1* 抗体を用いた tissue printing を行なった。その結果、肥大胚軸の横断図では、形成層が輪状に染色され、その内側の木部柔組織には、点状の染色斑が見られた。さらに、詳細な分布を観察するため、免疫組織染色を行ったところ、抗原は、形成層に非連続的に存在するダイコン肥大胚軸に特有な異形維管束と、木部柔組織に点在する維管束を形成する細胞の一部に局在することが判明した。ダイコンの肥大は、形成層の活発かつ連続的な発達によると考えられている。*RsBAMY1* が、主に形成層の異形維管束に局在することから、*RsBAMY1* は、ダイコンの肥大活性と何らかの関係があると推察される。現在、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質を用いて細胞内局在性の解析を進めている。

P4

シロイヌナズナにおける His 型金属結合ペプチド AtHIRP1 の調査 鹿島 大樹、久保井 徹、原 正和（静岡大・農）

【目的】メタロチオネインやファイトキレーチンなど、植物における金属ストレス関連ペプチドは、主に Cys の SH 基で金属と結合する。当研究室では、Cys をもたないミカンノデハイドリンが His 含有ドメインで金属と結合することを見出した。これは、植物の金属ストレス耐性に、His 型の金属結合ペプチドが関与している可能性を示唆している。そこで本研究では、シロイヌナズナにおいて、His 型金属結合ペプチドを探索し、機能解析を試みた。

【方法・結果】シロイヌナズナのゲノムデータベースから His を多く含む ORF を検索し、His 型金属結合ペプチドの候補遺伝子とした。転写産物の発現解析により、2 つの遺伝子を選び、そのうち的一方 (*AtHIRP1*) を研究対象にした。大腸菌で合成した recombinant タンパク質を用い金属結合特性を調査した結果、*AtHIRP1* は、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} と結合し、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} と結合しないことを確認した。また、*AtHIRP1* は Zn^{2+} に対し、二相性の結合様式（解離定数：0.6 mM, 128 mM）を持ち、1 mol 当たり最大 13 mol の Zn^{2+} と結合すると推定された。現在、植物ホルモンやストレスなどによる *AtHIRP1* 遺伝子の発現変動について調べている。

P5

Ex-vivo and in vitro analyses using BIOPEP system to indentify early molecular targets for ACE inhibitory activity from soybean protein

Athanasia Matemu and Soichiro Nakamura
(Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University)

Soybean protein is known as a rich source of bioactive peptides with potential benefits in physiological and nutritional aspects. Recently these peptides have received more attention because of its role in preventing and curing diseases such as hypertension and cancer. BIOPEP system (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/>) provides the bioactive peptides database which is useful in identification of potential peptides with different physiological activities e.g. antihypertensive from numerous food proteins. The objective of this study is to determine potential biological profile of bioactive peptides from 7S & 11S globulins and identify its early molecular targets for ACE inhibitory activity using ex-vivo analysis in protein data bank.

The BIOPEP system was used in ex-vivo analysis to predict peptides from soybean globulins proteolytic digests with ACE inhibitory activity. Soybeans globulins (7S & 11S) were digested with different proteolytic enzymes. The supernatants containing suite of peptides were purified using Sephadex G-25 and ACE inhibitory activity of the collected fractions was determined. The ODS 18C column was used to fractionate the peptides based on their charged properties. The active fractions were further subjected into amino acid sequence analysis to identify its amino acid. The most potent peptide from 7S globulin was identified as tripeptides with GPL sequence.

Keywords: Protein data bank; BIOPEP analysis; molecular targets; ACE inhibitory activity; soybean; 7S globulin; 11S globulin.

P6

そば殻由来ポリフェノール類の回収技術開発

横澤拓也、黒岩大輔¹、水野正浩、佐藤伸明、野崎功一、神田鷹久、天野良彦
(信州大・工、¹日穀製粉株式会社)

【緒言・目的】

長野県は全国でも有数のそばの産地である。このそばの実から製粉時に排出されるそば殻は有効な利用がなく、その大部分が農産廃棄物として処理されている。一方、そば殻には抗酸化作用などの高い生理活性をもつルチンなどのポリフェノール類が含まれており、有用資源として見直されるべき特性を有している。そこで、我々は高収率でポリフェノール類を得ることを目的として、高い反応活性場が期待される加圧熱水処理を用いて抽出を行い、既存のアルコール抽出と比較することで抽出法の評価を行った。

【方法・結果】

そば殻は粉碎し、120 μmのふるいを通したものをを用いた。加圧熱水抽出は耐圧硝子K.K社製のBatch型反応器(50 cc)を用い、100 ~ 200 °C、10 分間での処理を行った。その後、固液分離を行い、Folin-Ciocalteu 法により測定した抽出液の総ポリフェノール量を比較したところ、処理温度 100 °C、180 °C ではそれぞれ 531 mg/100 gDW、2885 mg/100 gDWであった。これより、処理温度が高いほど高収率でポリフェノールを抽出できることが分かり、処理温度 180 °C での総ポリフェノール量はメタノール抽出の約 2 倍の値を示した。また、熱水抽出液を HPLC により分析した結果、抽出液中にルチンやケルセチンは含まれていなかった。しかし、ケルセチンは水に難溶であり、熱水抽出後の残渣に析出している可能性が考えられた。そこで、残渣を少量のメタノールで洗浄し、再度ケルセチン量を定量したところ 3.41 mg/100 gDW (処理温度 200 °C) であり、メタノール抽出の約 3 倍のケルセチンが洗液中に含まれていることを確認した。また、DPPH ラジカル消去活性法により加圧熱水抽出液が抗酸化活性を有していることが示唆された。

P7

赤アズキ種皮の登熟に伴う色素変化に関する化学的研究 小西香織^a, 後藤美樹^b, 島田尚典^c, 吉田久美^a (名大院・情報科学^a, 名大院・人間情報^b, 北海道十勝農試^c)

【目的】

アズキ (*Vigna angularis*) の種皮色は赤、黒、斑など様々である。その中で、黒アズキからはデルフィニジン 3-グルコシドが報告されているが、赤アズキの種皮にはアントシアニンほとんど含まれておらず、色素の本体は不明である。赤アズキ種皮色素の解明を目的に、今回は登熟過程での色と成分の変化を分析したので報告する。

【結果および考察】

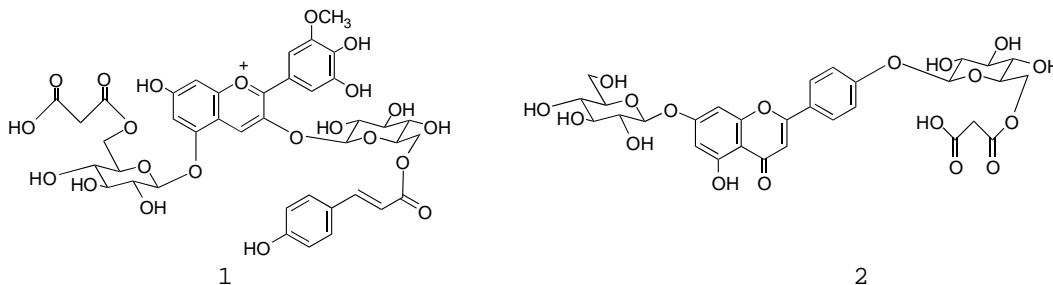
材料には北海道産の品種：エリモショウズおよびキタロマンを用いた。赤アズキの種皮は開花約一ヶ月後から徐々に着色する。最初は莢も種皮も緑色であるが、莢が黄色から褐色に変化するにつれて、種皮は赤くなる。そこで、莢の色により緑色、黄色、褐色の3段階に分け、それぞれ緑色、薄赤色および赤色の種皮に 3% TFA を含有する 50% アセトニトリル水溶液を加えて一晩抽出した。抽出画分を HPLC で分析を行ったところ、緑色から薄赤色の種皮の抽出液にはアントシアニン色素と見られるピークが数本検出された。しかし、登熟するにつれてそれらのピークが消失していくことが観察された。抽出画分はメタノールに不可溶な画分を取り除いた後、現在各種カラムクロマトグラフィーにより分離、精製を進めている。

P8

ネモフィラ青色花弁に含まれるメタロアントシアニンの構造と発色に関する化学的研究 山下佳子^a, 北原小容子^a, 森美穂子^b, 近藤忠雄^a, 吉田久美^a (名大院・情報科学^a, 名大院・人間情報^b)

【目的】青色の花弁発現に重要な役割を果たしているメタロアントシアニンは、6 分子ずつのアントシアニンとフラボン、2 原子の金属イオンから成り、構成成分を混合するだけで形成され、その際に厳密なキラル構造認識がなされる。これまでの探索研究により我々は、ネモフィラ (*Nemophila menziesii*) の青色発色が、メタロアントシアニンによることを明らかにした。本研究は、ネモフィラ花弁色素の組成を明らかにして青色発色機構を解明することを目的に行った。

【方法と結果】ネモフィラ花弁より、メタロアントシアニン構成色素 petunidin 3-*p*-coumaroylglucoside-5-malonylglucoside (1) 及び、フラボン apigenin 7-glucoside-4'-malonylglucoside (2) を単離した。これらと、花弁より検出された金属イオンを用いて、メタロアントシアニンの再構成実験を行い、その化学構造について機器分析による解析を進めている。



P9

バンレイシ科アセトゲニン aromin の合成研究 大麻 真由、真壁 秀文（信州大院農）

【目的】バンレイシ科アセトゲニン類は、熱帯・亜熱帯地方に生育するバンレイシ科植物が生産する化合物群であり、現在までに 400 種以上の関連化合物が単離・構造決定されている。その生物活性は抗腫瘍、抗マラリア、殺虫など多岐にわたる。これらの活性発現メカニズムの 1 つとして、ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (complex I) の阻害が報告されている。目的化合物である aromin は総炭素数 35 のアセトゲニンであり、非直結型 bis-THF 環をもち、さらに分子内にケト基をもつことが最大の特徴である。現在までに aromin の合成報告例はない。そこで合成戦略として aromin を左側部分と右側部分に分けて合成した後、菌頭クロスカップリング反応を用いて aromin の全合成を行い、合成経路を確立することを目的とした。

【方法と結果】Acrolain 及び laurylmagnesium bromide を出発物質として、Sharpless 不斉エポキシ化反応、Sharpless 不斉ジヒドロキシル化反応、ヒドロスズ化、ヨウ素化などの反応を経て 19 段階で左側部分の合成を完了した。現在は g-butyrolactone を出発物質として、不斉アリル化を鍵反応に用い右側部分の合成を行っている。今後、両者を菌頭クロスカップリング反応に供し aromin の全合成を達成する予定である。

P10

メチル化カテキン類縁体と resveratrol の合成 飯島 崇士、真壁 秀文（信州大院農）

【目的】メチル化カテキン類縁体であるメチル化カテキングレート、メチル化エピカテキングレートおよび resveratrol は自然界に幅広く存在するポリフェノールの一種で、抗酸化活性や動脈硬化抑制作用、抗腫瘍活性などの多様な生理活性を有していることが報告されている。これらの生理活性の発現機構の詳細な解明や新たな活性の探索、応用研究等には多量の試料が必要となるが、両化合物とも植物体から得られる量は微量である。本研究では、メチル化カテキン類縁体においてはその特徴となるエステル部分の構築に基質を等量用いた縮合反応を行い、効率的な合成経路の確立を図る。Resveratrol においては 0 価のパラジウム触媒による Heck 反応を鍵反応として効率的な合成法を確立することを目的とした。また、得られた試料を用いて新たな生理活性の探索を試みることにした。

【方法・結果】メチル化カテキン類縁体では、3, 4-dihydroxy-5-methoxybenzaldehyde を出発物質として調製したガロイル基と、カテキンまたはエピカテキン由来のアルコールを等量用い、縮合剤に DCC または EDCI を用いた縮合反応を経て、4 段階でメチル化カテキングレートおよびメチル化エピカテキングレートの効率的な合成経路の確立に成功した。Resveratrol においては 1, 3-dimethoxybenzene を出発物質とし、イリジウム触媒を用いた arene borylation による位置選択的なプロモ基の導入、0 価のパラジウム触媒による vinylanisole との Heck 反応を経て、3 段階で resveratrol の全合成を達成した。また、合成したメチル化カテキン類縁体を用いてマウス耳による炎症抑制活性試験を行ったので、その結果も併せて報告する。

P11

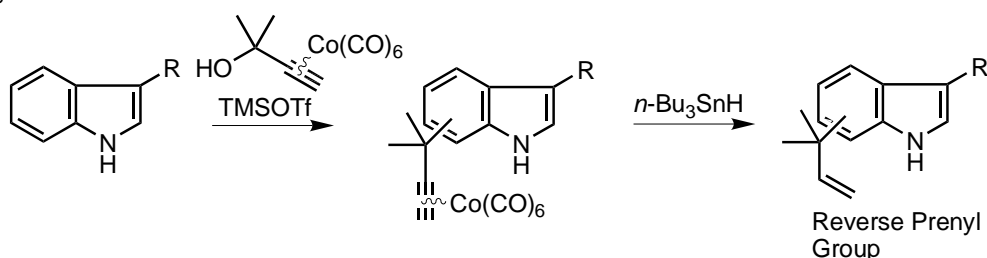
アセチレンコバルト錯体を活用した芳香族化合物の逆プレニル化

伊佐地央明¹、西川俊夫¹、磯部 稔²

(¹名大院生命農・応用分子生命科、²名大高等研究院)

[目的] 天然から逆プレニル基を持つ様々な芳香族化合物が発見されているが、芳香族化合物に対し逆プレニル基を化学合成により導入する方法は非常に限られている。本研究では、アセチレンコバルト錯体を利用することで、芳香族化合物に対し効率的に逆プレニル基を導入する新しい方法を開発することを目的とした。

[方法および結果] フェノールとインドール誘導体に対し、Lewis 酸存在下で 2-methyl-3-butyn-2-ol のアセチレンコバルト錯体を作用させると、Friedel-Crafts 型の反応が進行し芳香族にアセチレンコバルト錯体が導入された。得られた生成物を $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$ で還元することで、2段階で逆プレニル基を導入することに成功した。本反応の位置選択性と反応機構およびこの反応を活用した海産アルカロイド deformylflustrabromine の合成について発表する。



P12

化学合成発光素子によるトビイカ発光タンパク質 symplectin の生物有機化学的研究 中島陽介 (名大院生命農) 久世雅樹 (名大物質国際セ) 西川俊夫 (名大院生命農) 磯部 稔 (名大高等研究院)

【目的】 沖縄海域に生息するトビイカは発光タンパク symplectin を持ち、一価のカチオン (K^+) と分子状酸素の存在化、青色に発光を示す。 symplectin は活性中心であるシステイン残基が発光素子デヒドロセレンテラジン (DCZ) を共有結合で取り込み発色団を形成すると推定されている。そこで、我々は発光素子 DCZ 側からのアプローチにより発光メカニズムの動的解析、そして、活性中心であるシステイン残基の特定を目指してきた。その結果、発光素子 DCZ をモノフッ素化した mono-F-DCZs が F の電子吸引性のためシステインとの共有結合を強めることを見だし、 symplectin の酵素消化、続く LC-MS 分析により活性中心の推定に成功した。しかしながら、得られたイオンピーク強度が低かったため、MS/MS 解析による確実な証拠を得ることができなかった。そこで、より電子吸引性を強める新規発光素子の合成、活性評価に続き、活性中心の確実な特定を目的とした。

【方法と結果】 フッ素基、ニトロ基を導入した 4 種類の新規発光素子の化学合成を行い、活性評価を行った。その結果、フッ素の置換位置の異なる 2 種類の di-F-DCZ の内、2,4- diF-DCZ が天然型に匹敵する活性を示し、2,6- diF-DCZ が非常に低い活性を示すという興味深い結果が得られた。そこで、その違いを生み出す原因をチオール基との反応性・化学発光能力・conformation・発光後生成物等に着目し、考察してきた。その結果、いずれの発光素子も化学発光能力を有し、 symplectin と発色団を形成していると考えられた。しかしながら、システインへの反応性、conformation に違いが観察され、2,6- diF-DCZ は symplectin 内で発光を示さない形で消費されていることが示唆されてきた。

P13

二枚貝発光タンパク (pholasin) の有機基質に関する研究 田中瑛子 (名大農学)、久世雅樹 (名大物質国際セ)、西川俊夫 (名大院生命農)

【目的】発光二枚貝 (*Pholas dactylus*) より、120 年前に世界で初めてルシフェリン-ルシフェラーゼ反応が発見された。活性酸素で発光するルシフェリン (発光タンパク) は pholasin と命名され、すでに活性酸素検出キットとして市販されている。応用例は多いにもかかわらず、pholasin が利用する有機基質の構造は未だに不明である。本研究では、pholasin 生物発光で利用される有機基質の構造を決定することを目的とした。

【方法と結果】Pholasin はこれまでオワンクラゲやウミホタルで利用されるセレンテラジン系化合物では発光しないことが報告されている。また、pholasin には有機分子が共有結合しており、活性酸素により発光強度が増すことも報告されている。この現象が、トビイカ発光タンパク (symplectin) の生物発光と類似しているため、symplectin の有機基質であるデヒドロセレンテラジン (DCL) により pholasin が発光するのではないかと考えられた。

そこで、市販されている天然抽出 Pholasin[®] (Knight Scientific Ltd., Plymouth, UK) へ化学合成した DCL を加えた。その結果、天然 pholasin に比べて発光強度で 3 倍、そして 5 分間での総発光量で 4 倍発光量が増加することが明らかになった。DCL は pholasin 存在下でのみ発光することから、DCL は pholasin の有機基質として機能することが確認できた。DCL による pholasin 発光が pholasin 本来の発光機構とは異なる可能性もあることから、現在、天然 pholasin から DCL の単離を試みている。

P14

新規タンパク質標識プローブを用いた Tautomycin によるタンパク質脱リン酸酵素阻害機構の生物有機化学的研究 宮崎 敦史¹、Magne Olav Sydnnes¹、久世 雅樹²、磯部 稔^{3,4} ¹名大院生命農学、²名大物国センター、³名大高等研究院、⁴清華大学

【目的】Tautomycin (TTM) はタンパク質脱リン酸酵素 (PP1) を特異的に阻害することが発見されており、その活性発現機構に関する研究が進められている。タンパク質分子と阻害剤との分子間相互作用を詳細に調べるため、本研究では新規方法論としてタンパク質活性中心標識プローブを開発し、PP1 の TTM による阻害機構解明を目指すこととした。

【方法と結果】Cu,Zn-SOD タンパクを希薄 H₂O₂ 処理すると、Cu イオンの近傍 6 以内のアミノ酸残基を選択的に酸化修飾できる。TTM の近傍に配位子を使って Cu を導入できれば、PP1 の TTM 結合部位近傍のアミノ酸残基を部位特異的に酸化修飾できると考えられる。酵素消化したペプチド断片から、質量数が 16 増加したものを LC-MS で検出すれば、TTM と PP1 の結合部位を特定できる。これまでに、Cu 配位子である BPA (bispicolylamine) を TTM に有機化学的に導入した新規酸化修飾プローブ (TTM-BPA) を用いて PP1 の酸化修飾を行ったところ、いくつかの酸化ペプチド断片を発見している。これらの酸化ペプチド断片とマクロモデルによって予測される TTM と PP1 との結合部位を比較することで、詳細な結合部位の解析が可能になっている。本新手法は、光親和性標識によるタンパク質修飾に代わる新規タンパク質修飾法となり得る。

P15

フラレンによる脂質フリーラジカル捕捉反応の速度論的解析

門脇章夫、岩本悟志、山内 亮 (岐阜大院連農・生資料)

【目的】脂質過酸化反応は、脂質フリーラジカルが自触媒的に連鎖反応を引き起こすことで進行する。フラレンは、脂質フリーラジカルと反応して脂質過酸化反応を抑制するが¹⁾、その反応機構の詳細は不明である。そこで本研究では、ラジカル連鎖反応におけるフラレンの作用を反応速度論的解析から検討し、脂質過酸化反応に対するフラレン分子の役割を定量的に評価した。

【方法】リノール酸メチル (ML) とフラレン C₆₀ あるいは C₇₀ をトルエンに溶かし、ラジカル反応開始剤 (AMVN) を加えて 37 °C で過酸化させた。ML の初期過酸化生成物である ML ヒドロペルオキシド (MLOOH) の生成量と、フラレンの減少量は HPLC で測定し、動力学的パラメーターである連鎖成長反応速度 (R_p) と連鎖開始反応速度 (R_i) を算出した。

【結果】ML にフラレンを添加すると、MLOOH の生成が抑制され、 R_p は有意に低下した。また、 R_i から算出した自動酸化難易度および動力学的連鎖長も、フラレンの添加によって低下した。これらの値の低下は、フラレンが本反応系で連鎖切断型抗酸化剤として作用したことを示すものである。しかし、フラレンによる抗酸化作用は、 α -トコフェロールに比べて低いものであった。また、HPLC 分析では、反応の進行に伴いフラレンは消失し、反応生成物としてフラレンと ML 由来ラジカルとの付加体と思われるピークが出現した。以上の結果より、フラレンは連鎖開始反応で生成した脂質フリーラジカルを捕捉して連鎖停止反応へと導き、連鎖成長反応の進行を抑制することが明らかとなった。

1) Kadowaki, A., Iwamoto, S., Yamauchi, R.: *J. Clin. Biochem. Nutr.* **41S**, 163 (2007).

P16

UV-A induced peroxidation of phosphatidylcholine in unilamellar liposomes.

○Azzedine Mazari, Satoshi Iwamoto, and Ryo Yamauchi

(The United Graduate School of Agriculture Science, Gifu University)

Ultraviolet (UV) radiation has been shown to be a source of oxidative stress via generation of reactive oxygen species. However, the mechanism by which UV induce lipid peroxidation is not yet elucidated. We have studied UV-A induced lipid peroxidation in 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-sn-phosphatidylcholine (PLPC) liposomal systems. Unilamellar liposomes prepared from PLPC were exposed to UV-A light (2.2 mW/cm²). Progress of lipid peroxidation was monitored by detection of PLPC hydroperoxides (PLPCOOH) by reversed phase HPLC. The isomeric composition of hydroperoxy fatty acids, constituting PLPCOOH, was determined by GC-MS analysis.

The UV-A induced PLPC peroxidation could not be inhibited by any significant degree by mannitol ([•]OH scavenger), DABCO (¹O₂ quencher), or DTPA (metal chelator), while BHT and α -tocopherol caused total inhibition. The isomeric analysis of PLPCOOH by GC-MS revealed the predominance of 13- and 9-isomers instead of 10- and 12-isomers, suggesting that ¹O₂ was a minor factor in this peroxidation. To further elucidate the mechanism of UV-A induced lipid peroxidation, pre-existing PLPCOOH in the liposomes were reduced with triphenylphosphine, as a result, UV-A irradiation could no longer initiate lipid peroxidation. When extra PLPCOOH were introduced into the liposomes, this led to markedly enhanced UV-A induced peroxidation.

From these results, we concluded that UV-A induced lipid peroxidation was initiated through the decomposition of pre-existing traces amounts of hydroperoxides in the liposomal system.

P17

**オオバギ (*Macaranga tanarius* Muell. Arg.) に含まれる
プレニルフラボノイドの定量分析と抗酸化活性
百瀬昇、村瀬真代、熊澤茂則 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)
福本修一 (株式会社ポッカコーポレーション)**

【目的】これまでの当研究室における研究により、沖縄産プロポリスの起源植物として、トウダイグサ科の植物オオバギ (*Macaranga tanarius* Muell. Arg.) が同定されている。ミツバチはオオバギの果実表面の樹脂腺をプロポリスの原料に用い、その樹脂腺中には特異なプレニルフラボノイド化合物が含まれていることが明らかになっている。オオバギは雌雄が存在する植物であるが、雌雄差や、葉や花などの部位別による含有成分の違いについては不明である。本研究では、今後、オオバギを機能性植物素材として有効に利用するために、オオバギに含まれるプレニルフラボノイド化合物について詳細に定量分析することを目的とした。

【方法】沖縄で採取したオオバギの雌雄株を部位別に分別し、メタノールで抽出したものを分析用試料とした。この試料について、PDA-HPLC を用いてオオバギに含まれるプレニルフラボノイド化合物の定量分析を行った。定量の際の標準物質としては分析対象としたプレニルフラボノイド化合物と同様のフラバノン骨格を有する eriodictyol と naringenin を用いた。また、それぞれの植物部位の DPPH ラジカル捕捉活性も測定した。

【結果】オオバギに含まれるプレニルフラボノイド化合物は植物の各部位によって含有量が異なっていた。雌雄ともに、葉柄や茎、若葉などにはプレニルフラボノイド化合物はほとんど含まれていなかったが、葉や花、果実には多く含まれていた。果実に含まれるプレニルフラボノイド化合物は、表面の樹脂腺の部分に集中していた。また、植物のどの部位においても、強い DPPH ラジカル捕捉活性が認められた。

P18

**血清アルブミンはガロイル基を有するカテキン類の酸化安定性を向上させる
養田 香奈子¹、石井 剛志¹、河田 裕希子¹、鈴木 友紀子²、中山 勉¹
(静岡県立大・食品栄養¹、(株)アルバック・技術開発部²)**

【目的】エピガロカテキンガレート (EGCg) は様々な生理活性を有しているが、中性以上の pH では B 環構造が酸化され易く不安定である。我々は弱塩基性を示すヒト血清中で EGCg の安定性が高まることを見出し、その安定化にヒト血清アルブミン (HSA) との相互作用が関与することを明らかにしている。本研究では、カテキン類の化学構造の違いによる HSA との親和性の強さを比較し、HSA との相互作用がカテキン類の酸化安定性に与える影響を検討した。

【方法および結果】HSA を含む緩衝液中にエピガロカテキン (EGC) あるいは EGCg を加え、インキュベートした。EGC および EGCg の残存量を HPLC により測定した結果、EGCg は 1 時間後も安定に存在したが、EGC は不安定であった。次に、各種カテキン類と HSA との親和性を、HSA カラムを備えた HPLC および水晶共振子マイクロバランス法を用いて評価した。その結果、ガロイル基を有するカテキン類は有していないカテキン類と比較して HSA と高い親和性を示した。また、非エピカテキンおよびメチル化カテキンとの比較により、相互作用にはガロイル基だけでなく、B 環の水酸基も重要であることが示唆された。以上の結果より、(1) ガロイル基を有するカテキン類は HSA により酸化安定性が高まる、(2) ガロイル基を有するカテキン類は HSA と強く相互作用する、(3) カテキン類の B 環は HSA との相互作用に直接関与することが明らかとなり、HSA との相互作用がカテキン類の酸化安定性の向上に寄与することが示唆された。

P19

蛋白質システイン残基との共有結合反応に関与するカテキン類の酸化特性

森 大気¹、石井 剛志¹、赤川 貢²、中山 勉¹

¹静岡県大・食品栄養、²阪府大院・生命環境

【目的】 緑茶の主要成分であるカテキン類は様々な生理機能を有しているが、中性から弱アルカリ性の水溶液中では酸化され易く不安定である。我々は、これまでにカテキン類が酸化されキノン構造を形成した後に、蛋白質中のシステイン残基と求電子的に共有結合することを見出した¹⁾。本研究では、カテキン類の酸化安定性が蛋白質システイン残基との反応性に及ぼす影響を検討した。

【結果と考察】 水溶液中での酸化安定性を評価するために、カテキン類（エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガラート、エピガロカテキンガラート）をリン酸緩衝液（pH 6.2 ~ 8.2）中でインキュベートした。HPLC 分析により 1 時間後の残存量を測定したところ、どのカテキンも緩衝液の pH が高まるにつれ残存量が減少した。同条件において、システイン残基を含むペプチドあるいは蛋白質とカテキン類をインキュベートし、その反応性を検討した。質量分析により反応生成物の検出を行なった結果、生成物の量は緩衝液の pH が高まるにつれ増加した。また、弱酸性の pH ではカテキン類とペプチドあるいは蛋白質との反応生成物はほとんど観察されなかったが、ポリフェノールオキシダーゼの存在下ではその生成が確認された。以上の結果より、カテキン類と蛋白質システイン残基との反応性は、カテキン類の酸化安定性に強く影響されることが示唆された。

1) Mori T. & Ishii T. et al. *Free Radic. Biol. Med.* in press

P20

DNA アレイによるカテキンの脂質代謝改善作用機構解析

齋藤裕樹、金丸義敬、長岡 利（岐阜大学・応用生物科学部）

【目的】 アポリポタンパク質 B（apoB）は、低密度リポタンパク質（LDL）の主要なタンパク質であり、LDL レベルは apoB レベルに依存することから、apoB 遺伝子発現を調節する因子を探索し、その機構を解明することは、高コレステロール血症や動脈硬化症に対する新しい予防改善法の構築のために有効である。当研究室では、ヒト肝ガン由来株化細胞である HepG2 細胞において、赤ワインに含まれるレスベラトロールが apo A-I 分泌量を有意に増加させ、apoB 分泌量を有意に減少させることを報告した。そこで本研究では、動脈硬化症を引き起こす要因として考えられている LDL の主要タンパク質である apoB に注目し、茶に含まれるポリフェノールであるエピガロカテキンガラート（EGCG）の HepG2 細胞における apoB 分泌に対する影響を検討することを目的とした。また、脂質代謝には様々な遺伝子が関与しておりその作用機構は複雑であるため、EGCG の脂質代謝関連遺伝子発現に対する影響について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

【方法】 HepG2 細胞に、10 μM、25 μM EGCG を添加して 24 時間培養し、培地を回収し apoB 分泌量を測定した。また、細胞からトータル RNA を回収し、apoB、LDL 受容体（LDL-R）、ミクソソームトリアシルグリセロール転移タンパク質（MTP）などの脂質代謝関連遺伝子の発現を DNA マイクロアレイやリアルタイム定量 PCR 法により測定した。

【結果】 EGCG 添加により、コントロールと比較して apoB 分泌量は有意に減少した。LDL-R mRNA がコントロールと比較して有意に増加し、MTP mRNA に有意な変化は見られなかった。また、DNA マイクロアレイにおいても、LDL-R の mRNA レベルがコントロールと比較して有意に増加（2.1 倍）した。EGCG による脂質代謝改善効果には LDL-R の活性化が重要であることを明らかにした。

P21

遺伝性アミロイドーシス型シスタチンを用いたポリフェノール類の抗アミロイドーシス性 大脇貴薫，前田悠樹，近藤葉月，中村宗一郎（信大農）

【目的】超高齢化社会と高度医療化社会の到来によって、認知症に代表されるアミロイドーシスが大きな社会的問題になっている。正常なタンパク質がアミロイド線維に至る過程には未だ不明の部分が多く、ポリフェノール類に阻害効果があるという知見があっても作用メカニズムの解明には至っていない。本研究では安全でより効果的な抗アミロイドーシス薬剤の開発に資するため、代表的なアミロイド型タンパク質である遺伝性アミロイドーシス型シスタチン，L68Q を用いてポリフェノールの抗アミロイド効果を調べ、構造と機能の関係について考察したので報告する。

【方法と結果】ポリフェノールをフラボノイド類，フェノールカルボン酸類，フェノールアミン類，カテキン類，リグナン類の 5 系統に分類し，L68Q シスタチンのアミロイド形成に及ぼす影響を調べた。アミロイド線維の形成度合はチオフラビン T を用いた蛍光法と電子顕微鏡観察によって追跡した。チオフラビン T を用いてアミロイド線維を測定した結果，ポリフェノールの系統によって阻害効果に差があることが明らかになった。アミロイド形成には，アミロイドシード形成とアミロイド線維の伸長の 2 つの段階があると推定されている。本研究の結果，フェノールカルボン酸類（図 1）とフェノールアミン類が，フラボノイド類（図 2），カテキン類及びリグナン類のポリフェノールが有効であることが示唆された。これらの知見は今後より効果的な抗アミロイド薬剤の分子設計を行う上で重要なものと考えられる。

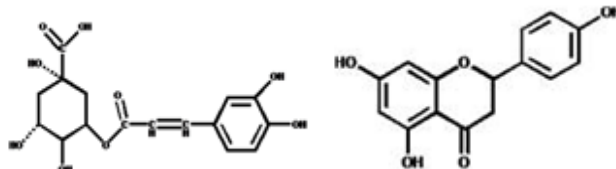


図 1 クロロゲン酸の構造 図 2 ナリンゲニンの構造

P22

飛騨・美濃伝統野菜の摂取効果について

吉川卓志¹，千田真里²，前澤重禮^{1,2,3}，中川智行^{1,2}，早川享志^{1,2}

¹ 岐阜大・農・生物資源利用学専攻，² 岐阜大・応用生物，³ ぎふクワン農業研究センター

【目的】十六ささがと飛騨紅かぶ葉部の抗酸化活性が強いことが *in vitro* において調べられている。本実験においては、これら野菜を摂取した場合の *in vivo* での抗酸化効果を調べるとともに、食物繊維成分摂取による大腸内環境改善効果を合わせて調べることを目的とした。

【方法】AIN-76 標準飼料 (C) を基準とし、脂質レベルは通常の 5% に加え 10% の 2 レベルを設け、十六ささが (S) あるいは飛騨紅かぶ葉部 (K) の凍結乾燥粉末を食物繊維レベルとして 5% 含む飼料を調製し (C5, C10, S5, S10, K5, K10)，これら飼料をラットに 3 週間投与した。飼育期間中に新鮮糞および尿を回収し、飼育最終日に血液、肝臓、盲腸、精巣周辺脂肪、腎臓周辺脂肪を摘出した。抗酸化評価のために TBARS や総グルタチオン量を測定するとともに、盲腸内容物は pH、短鎖脂肪酸量とフェノール化合物（フェノール，*p*-クレゾール）を、肝臓は活性酸素消去系の SOD 活性および過酸化脂質消去系の GSH-px 活性を、新鮮糞と尿はフェノール化合物の測定に供した。

【結果】10% 脂質添加により肝臓中の TBARS が有意に増加し、赤血球中の総グルタチオン量は野菜添加群で上昇した。SOD 活性に有意な差はなかったが、10% 脂質添加群では K10 群の GSH-Px 活性が有意に増加した。また、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量は、野菜粉末添加群で高くなり、特に酢酸の増加が顕著であったが、他の短鎖脂肪酸の増加は顕著ではなかった。一方、野菜の添加により盲腸内のフェノール量が増加し、糞中では S5 および S10 群で、尿中では S10 群で有意な増加がみられた。盲腸内の *p*-クレゾール量は S5 群および S10 群で減少した一方で、K5 および K10 群では有意に増加し、尿中では S10 群および K10 群で有意に増加した。以上より食物繊維効果としては、十六ささがが、*in vivo* 抗酸化特性は飛騨紅かぶ葉部が良好と判断した。

P23

飼料への桑葉粉末添加が大腸内環境に及ぼす影響

深谷有里¹，高井悟史²，堀田茂樹³，中川智行^{1,2}，早川享志^{1,2}

¹ 岐阜大・応用生物，² 岐阜大・農・生物資源利用学専攻，³ (有)レイク・ルイズ

【目的】桑葉については，糖質の消化・吸収を抑制し，血糖の上昇に対しては抑制的に働くことが調べられている。しかし，デンプンの分解に対しての情報は見られない。もしデンプンの分解に対しても抑制的に働くのであれば，大腸に達するデンプン成分（RS：レジスタントスターチ）を増加させる可能性がある。そこで，本研究においては，桑葉粉末の飼料への添加が，デンプンの消化管内動態に及ぼす影響と大腸内環境へ及ぼす影響について評価することを目的とした。

【方法】 -コーンスターチを含む対照飼料と，RS 源としてハイアミローススターチ（HAS）5% を含む HAS 飼料，また，それらにログワまたはヤマグワの凍結乾燥粉末各 2.5% を加えた合計 6 種類の飼料を Wistar 雄ラットに 21 日間与えた。飼育途中に 3 日間分の糞と新鮮糞を採取し，飼育終了後には麻酔下で盲腸を採取した。新鮮糞については短鎖脂肪酸（SCFA）を，回収糞については総デンプン量を求めた。また，盲腸については重量測定後，内容物の pH と SCFA を測定した。また，盲腸内容物と尿中のフェノール化合物についても測定した。

【結果】糞排泄量は，桑葉と HAS の添加により増加が見られ，総デンプン排泄量は対照飼料では桑葉粉末添加による上昇が見られた。SCFA のうち盲腸当たりの n-酪酸量は桑葉添加による増加が見られたが，HAS 添加による効果の方が高かった。新鮮糞における SCFA 含量は桑葉添加により有意に増加し HAS 飼料群に匹敵した。また，n-酪酸の増加も有意であった。一方，腐敗発酵産物であるフェノール化合物は，桑葉添加による若干の増加が見られたが，HAS の添加により増加が抑えられていた。したがって，本実験の結果から，桑葉の特性をより有効に発揮させるためには，桑葉の単独摂取よりも HAS との同時摂取が良い摂取法であると考えられた。

P24

たまり醤油粕から得られたアンジオテンシン 変換酵素阻害ペプチド

藤原稔弘，沖村幸司，吉田沙織，内山裕介，勝崎裕隆，今井邦雄，
松永正好*，梅川逸人（三重大院・生物資源，*サンジルス醸造株式会社）

【目的】醤油製造時の副産物である醤油粕は，主に家畜の飼料としてその一部が利用されているが，大半が産業廃棄物として莫大な経費をかけて処理業者により焼却・埋没処理されているのが現状であり，新たな有効利用方法が望まれている。一方，食品由来のアンジオテンシン 変換酵素（ACE）阻害ペプチドは，高血圧の予防効果から健康食品として期待されている。たまり醤油は一般の濃い口醤油とは製造方法が異なることから，未分解のペプチドが多く存在することが知られている。そこで，たまり醤油粕に含まれる ACE 阻害活性ペプチドの精製および構造解明を行った。

【方法】既報に従い，たまり醤油粕を 0.2N NaOH にて抽出し，Diaion AMP 01 による両性イオン交換クロマトグラフィーおよび Toyopearl HW-50 によるゲルろ過クロマトグラフィーを行い，ACE 阻害活性画分（F）を得た。さらにその F を数回の逆相 HPLC にて精製し，得られた精製画分について ACE 阻害活性測定を行った。阻害活性を有した画分を LC-MS によって分子量を測定し，シークエンサーにかけアミノ酸配列を調べた。

【結果】F から得られた精製画分のうち，3 つの画分に強い ACE 阻害活性が認められた。また LC-MS による分析から，それらの ACE 阻害画分から分子量 1000 以下の物質が確認され，シークエンスの結果，それらがペプチドであることが判明した。

P25

SHR でみられた発酵発芽ソバの優れた降圧作用

橋本 恭子、小山 正浩、中村 浩蔵（信州大院農、応生科）

【目的】ソバsprautを搾汁・乳酸発酵させることで得られる発酵発芽ソバは *in vivo* で降圧作用を示すが、この降圧作用は発酵過程を経て急激に上昇する。発酵発芽ソバの HPLC 分析の結果、発酵によって出現するピークが検出された。本研究では、このピークを分取し SHR に単回経口投与を行うことによりその降圧作用を評価すると共に、降圧作用に対する乳酸発酵の影響を考察した。

【方法と結果】発酵発芽ソバの発酵後出現ピークは、ODS カラムを用いた HPLC 分析における 215 nm の UV 吸収で検出した。検出されたピークを分取し、凍結乾燥したものを発酵後出現ピーク試料として 0.05mg/kg、0.01mg/kg の用量で SHR への単回経口投与を行い、0・3・6・9・24 時間後の心拍数・収縮期血圧・拡張期血圧をテイルカフ法により測定した。その結果 0.05mg/kg、0.01mg/kg 投与でコントロール群と比較し、有意な血圧・心拍数の低下が見られた。加えて、両投与群で投与 6 時間後に最大の血圧・心拍数の低下を示した。0.01mg/kg という非常に薄い濃度で血圧を低下させたことから、発酵後出現ピーク試料は SHR において非常に高い降圧作用を示すことが明らかとなった。また、発酵発芽ソバの発酵過程で出現するピークには高い降圧作用を有する化合物が含まれており、この化合物が発酵発芽ソバの降圧作用を担っている可能性が示唆された。発酵後出現ピークは乳酸発酵によって生じるものであるため、含まれている降圧成分は、ソバsprautの成分が乳酸菌の作用によって分解または化学変化を受けたものであると考察された。

P26

多糖鎖導入による蕎麦主要アレルゲン Fag e 1 の免疫応答の改善

○鈴木泰裕、石川えり、葛西雅博、中村宗一郎（信大農）

【目的】蕎麦は重篤なアレルギー症状を惹起することから特定原材料に指定されている食素材である。本研究では、蕎麦の主要アレルゲンである Fag e 1 及びそのペプシン分解物をメイラード反応によって多糖修飾し、抗原への多糖鎖導入が蕎麦アレルギー発症マウスの免疫応答に及ぼす影響について調べたので報告する。

【方法・結果】修飾多糖にはタマリンドガム由来のキシログルカン(XG)及び *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁由来のグルコマンナン(YGM)を用いた。Fag e 1 及びペプシン処理した Fag e 1 (pFag) と多糖との混合溶解-凍結乾燥粉末を 60℃, RH65% で 3-7 日間ドライヒーティングすることによって抗原分子表面上の遊離アミノ基と多糖の還元末端とを化学的に共有結合させた。Fag e 1 を抗原に用いて作成された蕎麦アレルギー発症マウスに pFag 及び XG 修飾 pFag を継続摂取させ、免疫応答の変化を追跡したところ、XG 修飾 pFag に関して特異的 IgE 産生の抑制が示された。これらのマウスの脾細胞には Th2 サイトカインである IL-4 の産生が低下していることが示された。一方、YGM 修飾 Fag e 1 を継続摂取させた蕎麦アレルギー発症マウスについては、IgE 産生量の測定に加えて、フローサイトメトリー法を用いて脾細胞に内在する Th1/Th2 バランスと Treg 産生量 (Fig.1) を測定した。その結果、多糖鎖を導入した pFag 及び Fag e 1 は蕎麦アレルギーの改善、すなわち経口免疫寛容食素材としての利用の可能性が示唆された。

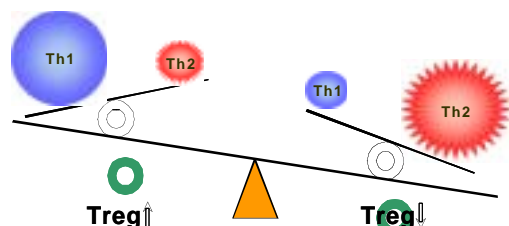


Fig.1 Proposed hypothesis of combination between regulatory T cell (Treg) and Th1/Th2 balance

P27

シアル酸レクチン Siglec によるマクロファージの IL-10 産生促進機構 屠文杰、安藤宗稔、 庄司徹、山居郁子、西島謙一、飯島信司 (名古屋大学工学研究科)

[目的] 高等細胞の表面は糖鎖に覆われており、分化や活性化など細胞の状態を反映して大きく変化することが知られている。シアル酸は、糖鎖末端に存在し、その負電荷により細胞機能の調節に関わる重要な分子である。哺乳類の持つシアル酸結合レクチン Siglec は主に免疫細胞表面に発現しており、LPS などの炎症誘導物質によるマクロファージの炎症活性を抑制できることが我々の検討で明らかとなっている。Siglec-9 の発現により強く誘導される抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生調節機構を解析した。

[方法及び結果] Siglec-9 及びその細胞内モチーフの一つまたは二つをチロシンからフェニルアラニンへの置換により破壊した Siglec-9YF を発現させたマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 を樹立した。培養上清を ELISA により測定したところ、IL-10 の産生には細胞内に 2 つ存在するチロシンモチーフのうち ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)が必要であることが示された。IL-10 の産生誘導は mRNA レベルでも観察されたことから、マウス IL-10 プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、その転写活性を測定した。その結果、転写開始点近傍500bp 内に Siglec に応答して IL-10 を産生させる領域が存在することが明らかとなった。現在、さらに詳細な解析を行っている。

P28

みどりの香りの直接刺激が神経伝達物質放出に与える影響 加古大也(1)、小林葉子(1,2)、横越英彦(1) 1)静岡県大院・生活健康科学・グローバル COE、2)桐生大・医療保健

[目的]みどりの香りとは、炭素鎖 6 のアルコール・アルデヒド類のことを言い、植物中に広く存在することが知られている。香気成分摂取後は血流に乗り、脳などの臓器へと運ばれるといわれる。そこで、みどりの香り成分による脳神経伝達物質放出に与える影響について、培養細胞、ラット脳切片、ラット生体を用い、多角的に検討した。

[方法] ラット副腎褐色細胞腫 (PC12) 細胞を 24 穴プレートに培養した。香気成分を溶解させた Krebs Buffer で浸漬させ、浸漬液中に放出されるドーパミン(DA)量を HPLC-ECD 法で測定した。Wistar ラットを用いて脳切片を作成し、同様に浸漬、および液を灌流させることで引き起こされる DA 量の変化を測定した。microdialysis 法を用い、ラット頭部に埋め込んだ透析プローブを介して脳内へ香気成分を灌流させ、香気成分刺激により引き起こされる DA 放出量の変化を測定した。

[結果・考察]PC12 細胞、ラット脳切片、ラット生体において、みどりの香り成分の刺激により、放出の程度は異なるが、DA 放出量の有意な増加が見られた。また、ラット脳を用いた実験において、炭素鎖 9 のアルデヒドである *n*-nonanal では *n*-hexanal ほどの効果は見られなかった。このことから、ドーパミン放出効果はみどりの香りで特に作用が高いことが考えられる。以上より、香気成分であるみどりの香りが細胞レベルから生体レベルまで、ドーパミン放出に影響を与えることが確認された。現在、生体における作用について検討中である。

P29

複製・転写依存的なクロマチンの核マトリックスへの結合

下京未来、齋藤辰朗、田口寛、奥村克純（三重大・院・生物圏生命）

複製・転写といった様々な核内イベントは、核マトリックスと呼ばれるネットワーク構造を足場にして行われる。核マトリックスとは、細胞を界面活性剤・ヌクレアーゼで処理した後に残る、タンパク質・DNA・RNA の複合体である。核マトリックス上におけるファクトリー形成が、各イベントに非常に重要な意味をもつ。細胞周期 S 期における DNA の複製は、複製開始点を起点として開始される。ヒトなどの高等真核生物は、ゲノム上に多数の複製開始点をもち、これにより効率的な DNA 複製を可能にしている。しかしながら、高等真核生物において複製開始点として同定されている領域は未だ少ない。共通する配列もなく、複製開始点選択には一次配列だけではなく、ヒストン修飾や転写、核内配置などの様々な因子が複雑に作用しているのではないかと考えられている。我々はこれまで、複製・転写活性と核マトリックスとの関係について研究してきた。本研究では、複製・転写依存的な核マトリックス結合に加え、この二つのイベントの関係性を明らかにすることを目的とした。まず、各種ヒト培養細胞由来の新生鎖 DNA をリアルタイム PCR 解析し、*LAMIN B2*, *β-GLOBIN*, *C-MYC*, *HSP70* の複製開始点を確認した。さらに、G1 期に同調した HeLa 細胞を用いて複製開始点の核マトリックス結合について解析した。その結果、S 期までに複製開始点の核マトリックス結合量が増加することが分かった。転写・転写と複製の関係に関しては、*HSP70* をモデルに解析した。本領域内には一つの複製開始点が存在し、熱ストレス処理により転写活性を誘導できる。HeLa 細胞における *HSP70* の転写量を G1 期各時間で RT-PCR 解析したところ、G1 期中期で転写量の減少がみられた。この結果と、核マトリックス結合量の変化から、このタイミングでの複製開始点の核マトリックス結合の重要性が示唆された。そこで、G1 期中の HeLa 細胞に熱ストレスを与え、転写を誘導した。その際の、*HSP70* における核マトリックス結合量の変化と、本領域の複製開始への影響について今回報告する。

P30

DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC による染色体不安定化

伊藤克 杉村和人 田口寛 奥村克純（三重大・院・生物圏生命）

DNA のメチル化は哺乳類ゲノムを生理的に修飾する唯一の機構であり、遺伝子の転写抑制およびヘテロクロマチン形成を介してゲノム機能を幅広く調節している。DNA メチル化異常は発がん、老化といったプロセスへと個体を導くことが知られている。5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) はシトシンアナログであり、DNA メチル化酵素 (Dnmts) と共有結合し Dnmts を不活化し、DNA 脱メチル化を引き起こす。その薬剤特性から 5-aza-dC はエピジェネティクスの研究に広く用いられている。更には、がん治療への利用も期待されている。しかしながら、その重要性に反し、5-aza-dC の作用機構について完全な理解は得られていない。本研究は、5-aza-dC による Dnmts の阻害に付随して起こる種々の核内イベントを捉えることを目的とし、マウスセントロメア領域を主な対象として解析を行った。マウスセントロメア領域はセントロメアヘテロクロマチンとセントロメア周辺ヘテロクロマチンからなり、DNA メチル化レベルが高く、クロマチンが高度に凝縮した転写不活性な領域である。マウスセントロメアヘテロクロマチン及びセントロメア周辺ヘテロクロマチンは、それぞれ minor satellite repeat (MiSat)、major satellite repeat (MaSat) と呼ばれる反復配列から構成されている。当研究室はこれまでに、5-aza-dC 処理によりセントロメア領域のヒストン修飾が、ヘテロクロマチン特異的なものから、ユークロマチン特異的なものへと変換することを示している。今回の解析では、5-aza-dC はセントロメア領域のクロマチン凝集度を低下させ、同領域の転写を爆発的に活性化されることを明らかにした。また DRB (RNA Pol II 阻害剤) 処理により、これら転写産物は減少したことから、セントロメア領域の転写は RNA Pol II 依存的であることが示された。ゲノムワイドな現象として 5-aza-dC 処理細胞において、複製依存的な γ -H2AX の蓄積、微小核および染色体ブリッジの増加を確認した。これらの結果から、5-aza-dC はセントロメア領域の正常なエピジェネティクスの破綻を導き、染色体全体を不安定化させることが示された。

P31

酵母の経時寿命を制御する新規遺伝子群の解析 東 剣虹、大塚 北斗、小川 祐樹、三田 知花、饗場 浩文 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

現在、出芽酵母、線虫、ショウジョウバエなどのモデル生物を用いた研究が、老化遺伝学において大きな役割を果たしている。最近、分裂酵母 *S.pombe* でも種をこえて保存された老化制御因子とその効果が一部証明された。酵母の寿命は分裂寿命と経時寿命があり、経時寿命は増殖定常期における生存率を経時的に測定することで解析できる。

我々は、*S.pombe* において高発現すると経時寿命を延ばす新規遺伝子 *ecl1⁺* を見いだした(昨年度本例会発表)。今回は、*ecl1⁺* と類似する *S.pombe* の *ecl2⁺*、*ecl3⁺* 遺伝子および、出芽酵母 *S.cerevisiae* の YGR146C 遺伝子の発見と解析結果に関して発表する。

これら遺伝子についてそれぞれ高発現株を作製し、経時寿命測定を行った結果、高発現株はベクターコントロール(VC)と比べ大きく経時寿命を延ばすことが分かった。また興味深いことに *S.pombe* の *ecl1⁺* は *S.cerevisiae* においても高発現することによって経時寿命延長効果が見られた。

次に、そのメカニズムを解明するにあたり、これらの遺伝子の高発現株に加え、欠損株を作製し、過酸化水素(HP)耐性及び欠損株の経時寿命測定を行った。その結果 *S.pombe* においては *ecl1⁺*、*ecl2⁺*、*ecl3⁺* のそれぞれの高発現株は VC と比べ、HP に耐性を持つことが分かった。また *S.cerevisiae* においても YGR146C の高発現株は VC と比べ、同じように HP に耐性を持つことが分かった。また *S.pombe* においては *ecl1⁺*、*ecl2⁺*、*ecl3⁺* の三重欠損株、*S.cerevisiae* では YGR146C 欠損株は野生株と比べ、経時寿命が短くなることも分かった。

上記結果はこれら遺伝子の機能が種を超えて保存されていることを示唆するものである。

P32

Clostridium propionicum のプロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子の 大腸菌における発現

中村仁美、粟冠真紀子、木村哲哉、粟冠和郎 (三重大院生資)

C. propionicum は中間体としてアクリリル CoA を持つアクリル酸経路によってプロピオン酸発酵を行うことが知られている。乳酸からプロピオン酸までのアクリル酸経路には 3 つの酵素が関与しており、この関連酵素のうちプロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子については塩基配列が報告されていたが、残り 2 つの塩基配列は報告されていない。そこで本研究では、プロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子の周辺領域をクローン化し、塩基配列決定を行った。また、*C. propionicum* の粗酵素液から得られたプロピオニル CoA トランスフェラーゼの酵素特性については報告されていたが、組換えプロピオニル CoA トランスフェラーゼについては報告されていなかった。そこで、組換えプロピオニル CoA トランスフェラーゼを精製し酵素特性を調べた。

プロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子上流域には、ラクチル CoA デヒドラターゼの -サブユニット、-サブユニット及びアクチベーターをコードすると予想される遺伝子が近接して並んでおり、これら 4 つの遺伝子が遺伝子クラスターを形成し 1 つの mRNA として転写されると予想された。しかし、アクリリル CoA リダクターゼ遺伝子はこの遺伝子クラスターの上流域、下流域には確認されなかった。また、組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、精製した。得られた組換えプロピオニル CoA トランスフェラーゼの活性は、反応液中の乳酸減少量で確認した。この酵素の最適 pH、最適温度、基質特異性、酸による活性への影響を調べた。その結果、最適 pH は pH6.0、最適温度は 35 であった。また、基質としてプロピオニル CoA 以外にもアセチル CoA とブチリル CoA に対して活性を示した。そしてプロピオン酸と酪酸によって活性が阻害されることが確認された。

***Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 の新規キシラナーゼ Xyn10B の解析**
須藤麻耶、栗冠真紀子、木村哲哉、Khanok Ratanakhanokchai¹、栗冠和郎
(三重大院生資、¹King Mongkut's Univ.)

P. curdlanolyticus B-6 は孢子を形成するグラム陽性の通性嫌気性菌である。本菌は細胞外にキシラナーゼを主体とするセルロソーム様複合体を形成するが、複合体形成機構については明らかでない。本研究は本菌よりキシラナーゼ遺伝子を単離し、翻訳産物の構造と機能を解析することを目的とする。

P. curdlanolyticus B-6 のゲノムライブラリーからオートスペルトキシランに対して活性のあるクローンを選択し、このクローンから新規のキシラナーゼ遺伝子 *xyn10B* をクローニングした。*xyn10B* は 1050bp の ORF から成り、350 アミノ酸をコードしていると推定された。相同性検索の結果、本酵素のアミノ酸配列は *Geobacillus thermodenitrificans* の細胞内キシラナーゼ(糖質分解酵素ファミリー10)と 63%の相同性を示し、触媒ドメインのみから成ると予想された。また、SignalP によりシグナルペプチドは存在しないと予想された。この予想を確かめるため本酵素全長(rXyn10B)と N 末端領域領域を除いた rXyn10B Δ N を構築し、N 末端領域の機能を調べた結果、この領域は本酵素の活性に必須である可能性が示された。続いて本酵素全長を大腸菌で発現させ、His-Tag を用いて精製し、その性質を調べた。本酵素の至適温度は 35 °C、至適 pH は 7.5 であった。また、本酵素は 0~40 °C、pH 7.0~11.0 において安定であった。本酵素のオートスペルトキシランに対する K_m 値、 V_{max} 値は各々 1.85mg/ml、3.70 μ mol/min/mg であった。薄層クロマトグラフィー解析から、本酵素はキシロオリゴ糖(キシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペンタオース、キシロヘキサオース)とオートスペルトキシラン、バーチウッドキシランをほぼ二糖と単糖に分解することが示された。これらの結果から、本酵素は細胞内酵素の可能性が高く、酵素複合体の構成成分ではないことが示唆された。

平成20年度日本農芸化学会中部支部維持会員芳名

アサヒビール(株)名古屋工場	太陽化学(株)
旭松食品(株)食品研究所	大和製缶(株)総合研究所清水研究室
アステラス製薬(株)CSR部	竹本油脂(株)情報調査室
アピ(株)長良川リサーチセンター	竹屋(株)研究所
天野エンザイム(株)岐阜研究所	東海物産(株)食品研究所
イチビキ(株)研究開発部	東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所
伊藤園中央研究所	(株)豊田中央研究所
伊藤製油(株)	中日本氷糖(株)
伊藤忠製糖(株)	名古屋製酪(株)
オリザ油化(株)	(株)ニッシ名古屋工場
科研製薬(株)生産技術研究所	(株)ニッポンジーン
加藤化学(株)	日本食品化工(株)研究所
カネハツ食品(株)技術部	フジ日本精糖(株)
(株)岐阜セラック製造所	フジパン(株)
キリンビール(株)名古屋工場	物産フードサイエンス(株)名古屋工場
金印(株)	(株)ポッカコーポレーション
サンエイ糖化(株)	三井農林(株)食品総合研究所
サンジルシ醸造(株)	ミツカングループ本社(株)
(株)サンピシ	(株)宮崎本店
(株)三和化学研究所三重研究所	名糖産業(株)
(株)J-オイルミルズファイン研究所	盛田(株)小鈴谷工場
敷島スターチ(株)技術開発グループ	焼津水産化学工業(株)
敷島製パン(株)研究部	ヤマモリ(株)
新日本化学工業(株)	養命酒製造(株)中央研究所

以上48社(50音順)

日本農芸化学会中部支部 平成20年度役員等名簿

(平成20年6月20日現在 敬称略)

支部長・理事

前島正義 名古屋大学大学院生命農学

副支部長

小林哲夫 名古屋大学大学院生命農学

三島 敏 アピ(株)

庶務幹事

西川俊夫 名古屋大学大学院生命農学

浅川 晋 名古屋大学大学院生命農学

会計幹事

金丸京子 名古屋大学大学院生命農学

監事

梅田幸一 天野エンザイム(株)

坂神洋次 名古屋大学大学院生命農学

奥村克純 三重大学理事

小鹿 一 名古屋大学大学院生命農学
(本部理事)

大西邦夫 元竹屋(株) 研究所

奥野 啓 (株)宮崎本店

小俣達男 名古屋大学大学院生命農学

小原章裕 名城大学農学部

(JABEE 対応委員会)

加賀孝之 (株)ミツカングループ本社

(本部評議員)

片桐孝夫 (株)ポッカコーポレーション

(本部評議員)

片山正人 産業技術総合研究所中部センター

金本 仁 加藤化学(株) 技術部

河岸洋和 静岡大学創造科学技術大学院

川上清文 東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所

菊池 洋 豊橋技術科学大学

熊澤茂則 静岡県立大学食品栄養科学部

(連絡評議員)

小林哲夫 名古屋大学大学院生命農学

(本部評議員、広報委員会)

酒井 坦 静岡県立大学食品栄養科学部

坂神洋次 名古屋大学大学院生命農学

(本部評議員、役員選考委員会)

榊 利之 富山県立大学(本部評議員)

粟冠和郎 三重大学大学院生物資源

(連絡評議員)

佐野佳之 名糖産業(株)食品開発部

佐藤俊郎 (株)J-オイルミルズ

レカ. ラジャ. ジュネジャ

太陽化学(株) 総合研究所

評議員 (50音順)

飯島信司 名古屋大学大学院工学

池田篤治 福井県立大学(本部評議員)

池田正人 信州大学農学部(連絡評議員)

石田秀治 岐阜大学応用生物科学部

磯部 稔 名古屋大学高等研究院(本部監事)

市原茂幸 名城大学農学部(本部評議員)

伊藤秀夫 金城学院大学短期大学部

今井邦雄 三重大学大学院生物資源

岩瀬一洋 竹本油脂(株)

梅川逸人 三重大学大学院生物資源

梅田幸一 天野エンザイム(株)

裏地達哉 日研化成(株) 研究開発部

衛藤英男 静岡大学創造科学技術大学院

榎本俊樹 石川県立大学(連絡評議員)

大澤俊彦 名古屋大学大学院生命農学

(授賞選考委員会)

朱 政治	太陽化学(株) 総合研究所 (本部評議員)	朴 龍洙	静岡大学創造科学技術大学院 (役員選考委員会)
白井孝子	敷島製パン(株) 研究部	服部束穂	名古屋大学 生物機能開発利用研究センター
杉山雅彦	フジパン(株) 本社生産部	早川享志	岐阜大学応用生物科学部
鈴木隆元	石川県立大学	原 正和	静岡大学創造科学技術大学院
鈴木文昭	岐阜大学応用生物科学部 (本部評議員)	久松 眞	三重大大学院生物資源
関口順一	信州大学繊維学部	廣田 満	信州大学農学部 (本部評議員)
千 菊夫	信州大学農学部 (本部評議員)	深田 理	ヤマモリ(株)
高見澤一裕	岐阜大学応用生物科学部 (本部評議員)	藤田智之	信州大学農学部
田口 寛	三重大大学院生物資源 (本部評議員)	本多裕之	名古屋大学大学院工学
竹内俊彦	キリンビール(株)名古屋工場	真壁秀文	信州大学農学部
竹内祥郎	カネハツ食品(株)生産本部技術部	前島正義	名古屋大学大学院生命農学 (本部理事)
竹尾忠一	伊藤園(株) 中央研究所	牧 正敏	名古屋大学大学院生命農学 (学術活動強化委員会)
田中晶善	三重大大学院生物資源	又平芳春	焼津水産化学工業(株)
玉置真司	敷島スターチ(株)技術開発グループ	松岡 信	名古屋大学 生物機能開発利用研究センター
田村廣人	名城大学農学部 (連絡評議員)	松田 幹	名古屋大学大学院生命農学 (本部評議員、産学官学術交流委員会)
千葉善根	愛知淑徳大学現代社会学部	三島 敏	アピ(株) (本部評議員)
土井梅幸	サンエイ糖化(株) 研究開発部	水野 猛	名古屋大学大学院生命農学 (授賞選考委員会)
徳山真治	静岡大学農学部 (連絡評議員)	村沢久司	旭松食品(株)
戸倉政雄	アサヒビール(株) 名古屋工場	森 仁志	名古屋大学院生命農学
長岡 利	岐阜大学応用生物科学部 (連絡評議員)	森上 敦	名城大学農学部 (連絡評議員)
中川 寅	岐阜大学応用生物科学部	森田達哉	静岡大学創造科学技術大学院
中野秀雄	名古屋大学院生命農学 (本部評議員)	森山龍一	中部大学応用生物学部
中村研三	名古屋大学院生命農学	山内 亮	岐阜大学応用生物科学部
中谷善博	イチビキ(株) 技術開発センター	山岸政昭	静岡県沼津工業技術センター
中村宗一郎	信州大学農学部	山口庄太郎	天野エンザイム (本部評議員)
中山俊裕	(株)岐阜セラック製造所技術部	山下富美男	科研製薬(株) 生産技術研究所
南条文雄	三井農林(株)食品総合研究所	山下道雄	アステラス製薬(株) CSR 部
西川俊夫	名古屋大学大学院生命農学		
根岸晴夫	中部大学応用生物学部		

山田幸生 (株)豊田中央研究所
山本幹男 日本食品化工(株) 研究所
山本卓夫 新日本化学工業(株)
吉村 徹 名古屋大学院生命農学
米田祐康 (株)ニッポンジーン

支部功労者

(昭和63年度)

芦田 淳、石沢修一、川野義男、金兵忠雄、近藤圭二、佐藤 泰、沢井輝男、清水純夫、鳥井秀一、二改未喜、柳田友道

(平成元年度)

飯島清治、瓜谷郁三、友枝幹夫、奈良省三、八木國夫、若林和正

(平成2年度)

金子安之、上林 明、後藤富士雄、高野悦子

(平成4年度)

谷田沢道彦

(平成5年度)

赤木盛郎、安藤 裕、並木満夫、南川紀敏

(平成6年度)

松嶋欽一、高木富蔵

(平成7年度)

小山吉人、入江利夫、永田幸雄、村松敬一郎

(平成8年度)

小山 宏、山下 勝

(平成9年度)

青木博夫、井口正信、上野良光、小川美江子、熊澤善三郎、小林 巖、山本幸男

(平成10年度)

小野崎博通、清水祥一、高木嘉昌、並木和子

(平成11年度)

旭 正

(平成12年度)

赤沢 堯、嶋林幸英、清水康夫、竹尾忠一、吉田 昭

(平成13年度)

石川正人、今関英雅、鷓高重三、嶋田協、堀津浩章、丸茂晋吾、吉田弘一

(平成14年度)

伊奈和夫、川岸舜朗、中村良、山田雄三

(平成15年度)

伊藤昌雄、竹内徳男

(平成17年度)

苅谷泰弘

(平成18年度)

竹内 久直、山田 哲也、柴田 久夫、建石 耕一

中部支部顧問：

旭 正 (元支部長)

石沢修一 (終身会員)

鷓高重三 (元支部長)

瓜谷郁三 (終身会員)

大羽和子 中部大学(前名古屋女子大学学長)

川岸舜朗 (元支部長)

塚越規弘 放送大学愛知学習センター

(元支部長)

鳥井秀一 (終身会員)

中村 良 (元支部長)

並木満夫 (元支部長)

奈良省三 (終身会員)

丸茂晋吾 (元支部長)

村松敬一郎 (終身会員)

柳田友道 (終身会員)

吉田 昭 (元支部長)

