



日本農芸化学会中部支部第156回例会

ミニシンポジウム「生命現象と誘引物質」

および

一般ポスター発表

日時：平成21年10月3日（土）13:00～18:00

会場：名古屋大学 シンポジオン

13:00 開会の辞 支部長挨拶

ミニシンポジウム「生命現象と誘引物質」

13:10 「カイコの誘引と忌避の分子機構：半世紀前から続く研究の温故知新」
東原和成（東大院新領域）

13:55 「花の中でオスをおびき寄せる誘引物質ルアーの発見」
東山哲也（名大院生命理学・JST さきがけ）

14:40 休憩

15:00 一般ポスター発表

16:30 懇親会およびポスター賞表彰式

カイコの誘引と忌避の分子機構：半世紀前から続く研究の温故知新

東原和成（東大院・新領域）

カイコは、絹生産に欠かせないものであるとともに、日本人にとっても親しみ深い身近な昆虫のひとつである。養蚕産業にとっての重要性から、カイコの摂食行動についての研究は古くからなされてきた。20世紀の中頃には、カイコがなぜ桑を食べるのかということで、桑の葉から発する揮発性のカイコ誘引物質、カイコが好む味物質、カイコが食べ続けるための因子などの探索がなされた。我々は、日中共同プロジェクトでカイコゲノムの解読が終了したことをうけて、カイコが桑の葉の香りに引き寄せられるときに働く嗅覚受容体を同定することを目指した。着目したのは以下の点である。カイコは、桑の葉からでる単一の香りに引き寄せられているのか？それとも複数の香りの組み合わせを感じているのか？そして、これらの香りを単一の嗅覚受容体で認識しているのか？それとも複数の受容体の組み合わせを信号として感知しているのか？その結果、シスジャスモンという香りとは単一の嗅覚受容体 **BmOr56** が、カイコの桑の葉への誘引行動に関わっていることがわかったので紹介する。

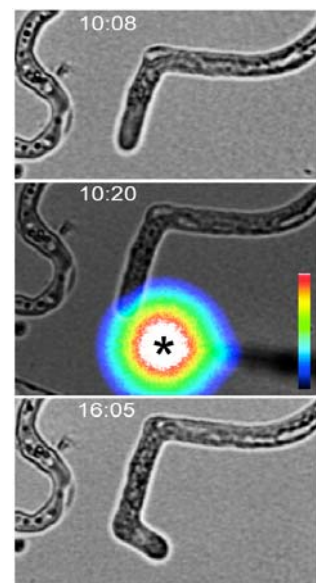
カイコの桑の葉への誘引行動はもう理解できていると信じられていたが、過去に報告されていた候補物質は、誘引活性も弱く、受容体レベルでも行動との相関は見出せなかった。シスジャスモンは非常に微量にしかでていないので、半世紀前のガスクロ分析技術では見出せなかったのであろう。近年の分析技術と分子生物学の進展に伴い、カイコの桑の葉への匂い誘引行動を、物質レベル、受容体レベル、そして脳神経レベルで理解するための第一歩を改めて踏み出すことができたといえる。温故知新である。そして、応用面として、カイコの生産向上にも役立つ可能性がある。実際、カイコは、シスジャスモンをふりかけた人工飼料に対して食いつきがいい。また、カイコだけでなく、作物生産にとって害虫となるような草食性の昆虫が、宿主植物のどんな匂いに誘引されるか、そしてその匂いを感知する受容体を明らかにすることができれば、その機能をブロックすることによって、害虫の行動制御、そして作物生産に役立たせることができると期待される。

参考文献：Tanaka *et al.* (2009) *Current Biol.* **19**, 881-890

花の中でオスをおびき寄せる誘引物質ルアーの発見
 東山哲也（名古屋大・院理・生命理学/JST・さきがけ）

複雑なめしべ組織の中で、なぜオスの花粉管が迷わずに卵細胞のある場所にたどり着けるのか。この「花粉管ガイダンス」については、140年も前から花粉管をおびき寄せる誘引物質が存在するのではないかと考えられ、探索されてきた。我々のグループでは、メスの胚嚢（雌性配偶体）が母体組織から突出するトレニアというユニークな植物を使って、卵細胞の隣にある「助細胞」が誘引物質を分泌することを世界に先駆けて示した（Higashiyama *et al.*, 1998, *Plant Cell*; 2001, *Science*）。助細胞による誘引は、花粉管ガイダンスの最終段階、距離にして200マイクロメートル前後で働く、極めて正確な誘引である。さらに我々は、この誘引物質が近縁種間でも異なることを示し、誘引物質は助細胞で生合成されるような、種固有の物質であると予想した（Higashiyama *et al.*, 2006, *Plant Physiology*）。

そこで、トレニアの助細胞を顕微鏡下で取り出して、どのような遺伝子が発現しているのかEST解析を進めた。その結果、助細胞だけで多く作られて細胞外に分泌されるディフェンシン類似のポリペプチドの存在と、その強い誘引活性を突き止めた（右図）。ディフェンシンは、システインに富むポリペプチドであり、生体防御に関わる。さらに、我々が独自に発明・実用化したレーザーマイクロインジェクターという装置を使い、モルフォリノアンチセンスオリゴを胚嚢に導入し、発現阻害を試みた。その結果、花粉管の誘引が抑えることが明らかとなった。これらの結果は、このタンパク質が真の花管誘引物質であることを示唆している。誘引物質は少なくとも2種類あり、我々はこのタンパク質を、花粉管をおびき寄せる性質から「ルアー」（LURE1, LURE2）と名付けた（Okuda *et al.*, 2009, *Nature*）。花粉管誘引物質が同定されたことによって、植物における受精のしくみの解明が大きく進展するだけでなく、今後、人為的に受精を制御することも可能になると期待される。このシンポジウムでは、ルアーの発見に至る経緯、発見のインパクト、今後の展開について概説したい。



P 01

分裂酵母の経時寿命延長因子 Ecl1 と相互作用する因子の解析

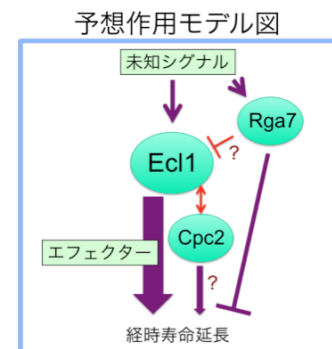
○東 剣虹, 大塚北斗, 古賀由梨枝, 内藤知佳子, 饗場浩文 (名大院生命農)

【目的】

当研究室では, 分裂酵母の経時寿命を延長させる新規遺伝子 *ecl1*⁺(*extender of chronological lifespan*) 及び *ecl1*⁺の相同因子として, 分裂酵母の *ecl2*⁺, *ecl3*⁺, 出芽酵母の *CEL1* (*S. cerevisiae ecl1*)の機能解析を行っている. これまでにこれらの高発現がそれぞれ分裂酵母, 出芽酵母の経時寿命を延ばすことを報告した. しかしながら, そのメカニズムについては依然として不明な点が多い. そこで本研究では, Ecl1 タンパク質と相互作用する因子を同定し, それらの機能を解析することで, 経時寿命延長機構の解明を目的とした.

【方法・結果】

酵母 Two-hybrid を用いて, Ecl1 タンパク質と相互作用する因子をスクリーニングし, 8つの因子を取得した. その中には, 酸化ストレスセンサーとして働く Tdh1, 栄養飢餓等に応答して胞子形成を誘導する Cpc2, 細胞の形態や隔壁の合成に関与する Rga7 など, 細胞の生存に関連する興味深い因子も含まれていた. 取得したすべての因子に関して, 欠損変異株の作製ならびにそれらの欠損株に Ecl1 を高発現させ, それらの経時寿命の解析を行った. その結果, 興味深い表現型が得られた2つの因子, Cpc2 と Rga7 に焦点を当て, これらを基に Ecl1 の経時寿命制御における作用モデルを報告する.



P 02

分裂酵母経時寿命を延長させる新規遺伝子の解析

○大塚北斗¹, 東 剣虹¹, 三輪由紀子¹, 浜 祐子², 東田英毅², 饗場浩文¹
(¹名大院・生命農学, ²旭硝子株式会社)

【目的】

現在, 多くのモデル生物を用いた老化・寿命の研究が行われ, 寿命に関わる因子が, 広くモデル生物に共通して存在することが報告されつつある. これら研究は, 単に我々ヒトなどの最大・平均寿命を規定する因子を同定, 理解することに貢献してきたのみならず, マウス等の高等生物から得られた知見のように, 老化を抑制することが, 加齢に伴い発症率が上昇する病気の抑制に非常に有効であることが明らかとなり, ひいては, ヒトの健康長寿にも貢献しつつある. 我々はモデル生物として分裂酵母を用い, 細胞レベルでの経時寿命を規定する因子の解析を通して普遍的な老化・寿命研究へ貢献すべく研究を行っている. 近年, 我々は分裂酵母の経時寿命を高発現させることによって延長させる新規遺伝子, *ecl1*⁺, *2*⁺, *3*⁺ を発見した. しかし, この *ecl1*⁺, *2*⁺, *3*⁺ が具体的にどのような分裂酵母経時寿命を延長しているのかについては依然不明である. そこで今回は, この新規遺伝子 *ecl1*⁺, *2*⁺, *3*⁺ の作用機構を理解することを目的とした.

【方法・結果】

酵母の寿命には2つあり, 一つは分裂寿命と呼ばれ, 一つの細胞の分裂能で表される. これは高等生物の活発に分裂する細胞のモデルとされている. もう一方の経時寿命は, 分裂しない細胞集団の生存率・生存時間と定義され, これは高等生物の分化した細胞のモデルとされている. 近年, 我々は以前まで遺伝子の存在が確認されていなかった領域から, 3つの新規遺伝子 *ecl1*⁺, *2*⁺, *3*⁺ を発見した. これらのコードするタンパク質は既知のドメイン構造や機能の知られているタンパク質とは類似性を示していない. そのため, 現在においてもこれら *ecl1*⁺, *2*⁺, *3*⁺ の働きはわかっていない. 今回, *ecl1*⁺らにおける経時寿命延長機構に関する知見を得るため, *ecl1*⁺, *2*⁺, *3*⁺ を高発現株した時のマイクロアレイデータを取得した. これらの中から, 興味深い遺伝子に焦点を当てた解析結果について示す.

P 03

二枚貝発光タンパクの発光機構に関する研究

○田中瑛子¹, 久世雅樹², 西川俊夫¹ (¹名大院生命農, ²名大物質国際セ)

【目的】

発光二枚貝ヒカリカモメガイは発光タンパク pholasin (PL) を持ち、活性酸素種の存在下で青色に発光する。PL の発光基質デヒドロセレンテラジン (DCL) は、PL と結合してクロモフォアを形成する。クロモフォアは、さらに酸素と反応して励起状態のセレンテラミド型 (CLA) となり、発光する。その発光スペクトルは発光極大が 490 nm である。しかし、セレンテラジン系化合物を発光基質とする発光タンパクの発光極大は、一般に 460 nm である。これは、CLA のプロトン解離位置の違いによるものであると推測されている。そこで本研究では CLA の解離位置を明らかにすることを目的とした。また本研究を進めるにあたり、様々な DCL 誘導体が必要であるため DCL 誘導体の簡便な合成法についても検討した。

【方法・結果】

天然から抽出された PL の発光極大は 490 nm と報告されているが、PL に化学合成した DCL を加えた場合の発光スペクトルはこれまで測定されていなかった。そこで PL に化学合成した DCL を加え測定したところ、天然抽出 PL の報告値と同様に発光極大は 490 nm であった。次に、発光時に解離し得る DCL の 6 位の水酸基をメトキシ化した DCL 誘導体を用いて測定した結果、同じく発光極大は 490 nm であった。よって CLA の水酸基は解離せずに発光していることが明らかとなった。

DCL 合成法の一つにフェニルピルビン酸とセレンテラミンの縮合が報告されている。様々な DCL 誘導体を得るため、フェニルピルビン酸誘導体の合成法を検討した。その結果、グリシンと様々な置換様式のベンズアルデヒドを出発原料として、2 段階でフェニルピルビン酸誘導体の合成に成功した。これにより、様々な DCL 誘導体の簡便な合成が可能となった。

P 04

キシヤヤスデの蛍光物質に関する研究

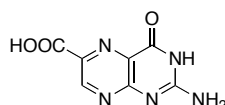
○柳 美帆¹, 田中瑛子², 谷 直紀², 久世雅樹³, 西川俊夫²
(¹名大農, ²名大院生命農, ³名大物質国際セ)

【目的】

キシヤヤスデは数年に一回大発生し、昨年も蓼科高原でその大発生が記録されている。高原の別荘地等で大発生することから害虫とされている。最近我々はキシヤヤスデ体表が強い蛍光を示すことを見いだした。本研究ではその蛍光物質の構造を決定することを目的とした。

【方法・結果】

体表に蛍光物質を含むヤスデとして他には北米発光ヤスデがあり、その蛍光物質はプテリン化合物である。キシヤヤスデ蛍光物質もプテリン系化合物であると予想されたので、体表より蛍光物質を抽出し質量分析により構造決定することにした。キシヤヤスデ体表をジクロロメタンで脱脂した後、メタノール中で粉碎・抽出した結果、青緑色蛍光を示す粗抽出物を得た。その粗抽出物を逆相オープンカラムクロマトグラフィーと HPLC により精製し、キシヤヤスデ体表と同じ蛍光を示す化合物を単離することに成功した。この化合物をイオントラップ型質量分析装置で標品サンプルと比較分析した結果、キシヤヤスデの蛍光物質はプテリン 6-カルボン酸 (下図) であることが明らかとなった。



プテリン-6-カルボン酸の構造

P 05

α -リポ酸と相互作用する蛋白質の検出法の構築と探索

○若林美由紀, 石井剛志, 伊藤創平, 中山 勉 (静岡県大・食品栄養)

【目的】

α -リポ酸 (LA) はジチオラン環を有する脂肪酸誘導体である。ミトコンドリア内の LA は酵素のリジン残基と自身のカルボキシ基とで結合してリポアミドを形成し、補酵素として機能する。また、抗酸化作用や抗炎症作用などの多様な生理機能を示し、医薬品や機能性食品として広く利用されている。摂取した LA は、腸管より吸収された後に、血中に移行し、血流に乗ることで標的臓器へ到達する。血中には、ヒト血清アルブミン (HSA) など物質の運搬に関与する蛋白質が存在するが、LA を運搬する蛋白質は明らかとなっていない。本研究では、LA と HSA との結合構造や結合様式を決定し、得られた知見をもとに LA と相互作用する蛋白質の探索プローブの開発を試みた。

【結果および考察】

脂肪酸存在下で LA と HSA との複合体を結晶化した。結晶化した複合体を X 線結晶構造解析に供し、LA 結合部位 (LA-1 および LA-2) を決定した。LA 結合部位は、疎水性が高いアミノ酸で構成されており、LA のジチオラン環との強い疎水性相互作用により結合することが明らかとなった。以上の知見をもとに、HSA との相互作用に関与しない LA のカルボキシ基をアミノカップリング法によりアガロースビーズのアミノ基と結合した LA 結合ビーズを作製した。LA 結合ビーズの有用性を確認するために、HSA をプルダウンした試料を酵素消化し、洗浄後にビーズに結合しているペプチドを質量分析により解析した。その結果、LA-1 を含むペプチド配列のみが特異的に検出された。本実験により、HSA と LA との相互作用に関する新たな知見を得るとともに、LA 結合蛋白質の探索プローブの開発に成功した。現在、LA 結合ビーズを用いて、血中や細胞内で LA と相互作用する蛋白質の探索を行っている。

P 06

アントシアニン類と蛋白質との反応性

○土井裕太, 石井剛志, 森 大気, 熊澤茂則, 中山 勉 (静岡県大・食品栄養)

【目的】

植物ポリフェノールは、化学構造の違いにより多様な生理作用を示す。近年、食品成分と蛋白質との相互作用が生理機能の発現に重要であることが明らかとなったが、植物ポリフェノールに関する知見は少ない。先行研究において、我々は緑茶ポリフェノールであるカテキン類が B 環の自動酸化を経て、蛋白質中のシステイン残基と共有結合することを見出した。本研究では、アントシアニン類の蛋白質及びペプチドに対する反応性を評価することで、植物ポリフェノールと蛋白質との相互作用に関する新たな知見を得ることを目的とした。

【方法】

各種アントシアニン類とグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) およびチオール含有ペプチドをリン酸緩衝液中 (pH 7.4) でインキュベートし、試料とした。レドックスサイクリング染色法と質量分析法 (MS) により、GAPDH およびチオール含有ペプチドに対するアントシアニン類の反応性を評価した。次に、高い反応性を有するアントシアニン類を用いて、濃度、時間および pH 依存性を同様の手法により評価した。さらに、結合部位や結合構造を MS により解析した。

【結果及び考察】

B 環に 3 つの水酸基を有するデルフィニジンは、水酸基を 2 つ有するシアニジンや 1 つ有するペラルゴニジンに比べ反応性が高く、B 環の水酸基が蛋白質との反応性に影響することが示唆された。デルフィニジンを用いた検討により、反応量は濃度や時間に依存して高まるが、pH には完全に依存しないことが明らかとなった。MS による解析の結果、アントシアニンと蛋白質との反応性は、カテキン類と異なり、B 環の自動酸化とは異なる因子が関与することが予想された。アントシアニン類の化学構造は pH により変化するため、蛋白質との反応性が複雑になったものと考えられる。蛋白質との反応性の違いは、アントシアニン類とカテキン類の示す生理作用の違いに寄与している可能性がある。

P 07

脂肪細胞が分泌する膜小胞は新たな細胞間伝達媒体としての可能性を持つ

○田中千絵¹, 小川瑠美子¹, 佐藤真広¹, 平野貴子¹, 秦 健敏¹, 長崎はるか¹, 中川 嘉²,
青木直人¹ (¹三重大院・生資, ²筑波大院・人間総合)

【目的】

我々は, アディポサイトカインに加え脂肪細胞がタンパク質やリン脂質に富む膜小胞 (ADM: adipocyte-derived microvesicle, 旧称アディポソーム) を盛んに分泌することを最近見出した (*Endocrinology*, **148**, 3850-3862, 2007). これまでに ADM が血管新生活性を示すことを見出したが (投稿中), 細胞間コミュニケーションツールとしてのさらなる可能性を探るために, 核酸成分の探索を試みた.

【方法・結果】

マウス 3T3-L1 脂肪細胞の培養上清を回収し, 超遠心分離 (100,000 x g, 2 h) により ADM を調製し, TRIzol 試薬を用いて核酸成分を抽出した. マイクロアレイ (アジレント社) 解析, RT-PCR は定法に従った. マクロファージのモデルとして J774 細胞を用いた. 分化誘導後 8-11 日目にかけて約 450 ng/1 x 10⁶ 細胞の RNA を含む ADM が分泌されることが判明した. マイクロアレイ解析の結果, 6,941 種の mRNA が含まれ, そのうち 1,473 種は細胞より ADM により多く含まれることも明らかとなった. アディポネクチン, レジスチン, PPAR γ など脂肪細胞特異的 mRNA の存在も RT-PCR により確認した. さらに ADM を介してマクロファージへと RNA が輸送され, ADM の分泌量はマクロファージとの共培養により上昇することも見出した. 以上の結果は, 脂肪細胞とマクロファージとの相互作用における ADM の関与と, 含有 RNA によるマクロファージの遺伝子発現制御の可能性を示唆している.

P 08

ゼブラフィッシュ Adiponectin Receptor の cDNA クローニングと発現解析

○渡辺康平¹, 田中千絵¹, 秦 健敏¹, 秋山真一¹, 田丸 浩¹, 島田康人², 西村訓弘², 田中利男²,
青木直人¹ (¹三重大院・生資, ²三重大院・医)

【目的】

当研究室では, ゼブラフィッシュを用いたメタボ研究の可能性を探るため, インスリン感受性亢進作用や抗動脈硬化作用を発揮するアディポネクチンに注目し, 2 種のゼブラフィッシュ Adiponectin (z-Adiponectin-1,-2) の cDNA クローニングに成功した. そこで本研究では, クローニングされた z-Adiponectin-1,-2 の生物学的機能を解析するために, その特異受容体 (AdipoR) の cDNA クローニングと発現解析を試みた.

【方法・結果】

ヒトおよびマウス AdipoR1,R2 の cDNA 配列を bait としてゼブラフィッシュデータベース (ZFIND) に対して BLAST search を行い, ゼブラフィッシュ相同遺伝子を同定した. 肝臓由来 cDNA プールより, ヒトおよびマウス AdipoR1 に対してそれぞれ 76%, 75% の相同性を示す z-AdipoR1 を, また, ヒトおよびマウス AdipoR2 に対していずれも 73% の相同性を示す z-AdipoR2 の cDNA クローニングに成功した. 翻訳産物の hydrophathy plot パターン比較より, z-AdipoR1,R2 はヒト, マウスと同様に 7 回膜貫通型の構造を有すると考えられた. RT-PCR による発現解析により, z-AdipoR1 は調べたほぼ全ての臓器で発現が確認されたが, z-AdipoR2 は腸や生殖器 (精巣, 卵巣) での発現が顕著であった. 哺乳動物細胞で発現させたところ z-AdipoR1,R2 とともに細胞質および細胞膜での発現が確認された.

DNA アレイによるエラグ酸の脂質代謝改善作用機構解析
○窪田静香, 齋藤裕樹, 後藤 剛, 長岡 利 (岐阜大・応生)

【目的】

アポリポタンパク質 B (apoB) を主要タンパク質にもつ低密度リポタンパク質 (LDL) とアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) を主要タンパク質にもつ高密度リポタンパク質 (HDL) は、動脈硬化症に対して正の相関、負の相関を持つことが明らかにされている。本研究では植物由来成分でイチゴに多く含まれるエラグ酸 (Ellagic acid : EA) を HepG2 細胞に添加し、apoB, apoA-I 分泌及び apoB 関連の脂質代謝関連遺伝子発現に対する影響を、DNA マイクロアレイなどを用いて検討することを目的とする。

【方法・結果】

HepG2 細胞に、EA を 10, 25 μ M で添加し、apoB 分泌量及び apoB mRNA, LDL レセプター (LDLR) mRNA, ミクロソームトリアシルグリセロール転移タンパク質 (MTP) mRNA を測定した。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより LDLR 遺伝子の転写活性を測定した。さらに、DNA マイクロアレイにより様々な遺伝子発現を測定した。その結果、10, 25 μ M の EA 添加により apoB 分泌量はコントロールと比較して有意な減少 (0.87 倍)、LDLR mRNA はコントロールと比較して有意な増加 (1.69 倍)、MTP mRNA はコントロールと比較して有意な減少 (0.78 倍) が観察された。また、DNA マイクロアレイにおいても、25 μ M の EA 添加により LDLR mRNA がコントロールと比較して有意に増加 (2.0 倍) し、MTP mRNA が有意に減少 (0.7 倍) した。さらに、ルシフェラーゼアッセイにおいては、コントロールと比較して LDLR 遺伝子の転写活性に顕著な変化は認められなかった。これらの結果より、EA による脂質代謝改善効果は、MTP mRNA を減少させることで小胞体からの脂質の輸送を減少させ、超低密度リポタンパク質 (VLDL) の合成を抑制することにより誘導されることが示唆された。さらに、LDLR 遺伝子転写活性を促進するのではなく、LDLR mRNA の安定化に寄与することにより脂質代謝改善作用を発揮することを明らかにした。

ラクトスタチンの媒介する新しいコレステロール分解調節系の解析
○世古聖士, 後藤 剛, 長岡 利 (岐阜大・応生)

【目的】

コレステロール 7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) は肝臓の胆汁酸合成系律速酵素であり、コレステロールの分解に関与している。本研究室の研究より、牛乳乳清 β -ラクトグロブリン由来のペプチドであるラクトスタチン (IIAEK) は、ヒト肝ガン由来株化細胞 HepG2 において、CYP7A1 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした¹⁾。そこで本実験では、ヒト CYP7A1 遺伝子プロモーター (-371~+24) 上の、胆汁酸応答領域 (BARE) I 相同領域、BARE II 領域、HNF-3 結合領域に注目し、遺伝子転写活性化に関与する応答領域の解明などを目的とする。

【方法・結果】

CYP7A1 遺伝子プロモーターに Luciferase 遺伝子を連結させたプラスミドを HepG2 に導入し、ラクトスタチン (1 mM) を添加した。その後、細胞を回収して Luciferase Assay 法により転写活性を測定した。また、ラクトスタチンを添加した細胞からトータル RNA を回収して、DNA マイクロアレイで脂質代謝関連遺伝子発現の変化を測定した。その結果、BARE I 相同領域の欠損では、野生型同様にラクトスタチン添加で転写活性が有意に上昇したのに対し、BARE II 領域を欠損させた場合に有意な変化は見られなかった。一方 HNF-3 結合領域に関しては、その欠損で転写活性は有意に上昇した。また、DNA マイクロアレイにおいては、CYP7A1 の mRNA レベルの上昇に伴い、HNF3 α や、MAPK シグナル伝達系、カルシウムシグナル伝達系遺伝子の mRNA が変化した。ラクトスタチンの媒介するコレステロール分解調節には、HNF-4 と HNF-3 が重要な役割を演じていることを明らかにした。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 697-702 (2007)

P 11

ペプチドアレイを活用した大豆タンパク質由来の新しい胆汁酸結合ペプチドの網羅解析

○高橋千奈¹, 山下祐加¹, 森川健正¹, 加賀千晶², 大河内美奈², 加藤竜司²,
本多裕之², 後藤 剛¹, 長岡 利¹ (¹岐阜大応生, ²名大工)

【目的】

大豆タンパク質のコレステロール代謝改善作用に寄与する胆汁酸結合ペプチドは、ソイスタチン (VAWWMY) 以外は不明である。そこで、本研究では、百～数千種類のペプチドを同時にアッセイ可能なペプチドアレイの技術を活用して、大豆の主要タンパク質である、 β -コングリシニンの配列中から、コレステロール代謝改善作用に寄与する新規胆汁酸結合ペプチドの網羅解析を行うことを目的とする。

【方法・結果】

β -コングリシニンのアミノ酸配列を網羅したペプチドアレイを作成し、タウロコール酸とハイブリダイゼーションを行った。抗コール酸抗体、蛍光標識した抗体と順次反応させ、アレイスポットの蛍光強度を測定し、評価した。その結果、VAWWMY よりも強力な蛍光強度を示したペプチドを数個発見した。そして、強力な蛍光強度を示したペプチドを化学合成し、*in vitro* で従来法 (試験管内で放射性胆汁酸との結合能を測定) により、胆汁酸結合能を評価した結果、従来法でも胆汁酸結合能を示した。試験管内で放射性コレステロールを含むミセル溶液に発見した胆汁酸結合ペプチドを添加して、コレステロールミセル溶解性に与える影響を評価した結果、カゼインペプチドと比較してより強いコレステロールミセル溶解性の阻害作用を発揮するペプチドが存在した。さらに、発見した胆汁酸結合ペプチドを加えた放射性コレステロールを含むミセル溶液を Caco-2 細胞に添加した実験では、Caco-2 細胞でのコレステロール吸収を抑制することも発見した。

P 12

シロイヌナズナ新規カルシウム結合タンパク質 AtPCaP2 は PtdInsPs と CaM/Ca²⁺ と相互作用し根毛伸長に關与する

○加藤真理子¹, 長崎菜穂子¹, 井出悠葵¹, 前島正義¹ (名大院・生命農¹)

【目的】

カルシウム高結合性タンパク質を検索する過程で新規分子を見出し、細胞膜結合性を考慮し、Plasma membrane associated Cation-binding Protein 2 (PCaP2) と名づけた。このタンパク質は既存の分子と構造上の類似性がない。PCaP2 は膜貫通ドメインをもたないが、N 末端の Gly 残基に付加したミリストイル基により細胞膜に安定に結合している。本研究では、PCaP2 の生化学的な特徴、発現細胞特異性、機能改変分子を発現した植物の表現型を解析し、生理機能を明らかにすることを目的にしている。

【方法・結果】

リコンビナント PCaP2 を作製し生化学的特性について検討した。その結果 PCaP2 は ⁴⁵Ca²⁺ との結合、また情報伝達に關わる PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ との明瞭な結合性、さらには CaM/Ca²⁺ 複合体との相互作用が示された。また PtdInsPs と PCaP2 の結合は、CaM/Ca²⁺ 共存下において顕著に低下することも明らかとなった。つづいて PCaP2 遺伝子の発現の細胞特異性をプロモーター^{PCaP2}-GUS を用いて詳細に解析したところ、PCaP2 は根毛や花粉管といった先端成長する細胞に特異的であることが明らかとなった。PCaP2 の根毛特異的な発現に關連し、PCaP2 過剰発現植物体の根毛の成長解析も行ったところ、根毛の成長に關わる可能性が示唆された。情報伝達に關わる PtdInsPs, CaM/Ca²⁺ との相互作用を含めた PCaP2 の生理機能モデルを提案したい。

「みどりの香り」投与によるラット脳内神経伝達物質及び記憶学習への影響

○加古大也¹, 福本修一^{1,2}, 小林葉子^{1,3}, 横越英彦¹(¹静岡県大院・生活健康科学・グローバル COE, ²(株)ポッカ, ³桐生大・医療保健)

【目的】

野菜や果物などに含まれるみどりの香りは神経伝達物質ドーパミンの放出を促進することを、ラット脳切片や神経様細胞を用いた *in vitro* の研究から見出している。しかし、香り成分を経口摂取したときの生体への影響についての報告はない。本大会では、香り成分をラットへ投与した後の(1)脳内神経伝達物質及び(2)放出量の変化、(3)ラットにおける記憶学習改善効果について検討した。

【方法】

実験動物は Wistar 系雄ラット(250-300 g)を用いた。(1)ラットへみどりの香りである *n*-hexanal を投与し、一定時間後に断頭により屠殺して脳を取り出し、脳内神経伝達物質量の経時変化を測定した。(2)ラット脳マイクロダイアリシス法を用いて、*n*-hexanal 投与後のドーパミン放出量の変動を測定した。(3)ラットへ 3 日間みどりの香り(*n*-hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol)を投与した後に、ステップスルー型学習装置を用いて記憶学習試験を行った。学習行動の記憶定着を阻害させるスコポラミンを用いて記憶障害モデルラットを作成し、香り投与により記憶保持能力が改善されるか検討した。

【結果・考察】

(1)*n*-hexanal 投与により脳内モノアミン濃度は特異的な時間変動を示した。(2)*n*-hexanal を投与することにより徐々にドーパミン放出量は増加し、投与後 2-3 時間でピークとなった。(3)みどりの香りを投与することによりスコポラミンを用いた記憶障害モデルラットの記憶学習能の亢進が見られた。

以上より、みどりの香り投与が脳内の神経伝達に影響し、記憶学習に効果のあることが示唆された。

フラボノール類の水酸基はヒト血清アルブミンとの親和性に重要である

○中務真結, 植草義徳, 石井剛志, 中山 勉 (静岡県大・食品栄養)

【目的】

フラボノール類は、抗酸化作用や抗炎症作用をはじめとする多様な生理機能を有している。生理活性強度はフラボノール類の化学構造の違いにより異なるが、その要因の一つとして生体成分に対する親和性の強弱が挙げられる。摂取したフラボノール類の一部は、血中でヒト血清アルブミン(HSA)に結合することが報告されており、疎水性相互作用により HSA の分子内に存在する脂溶性ポケットと結合すると考えられている。しかし、その相互作用の詳細は明らかになっていない。本研究では、フラボノール類の化学構造(水酸基の数・位置)及び疎水性の違いが HSA との親和性を与える影響を評価し、化学構造と親和性との関連性について検討した。

【結果・考察】

各種フラボノール類を HSA カラムまたは ODS カラムを備えた HPLC に供し、HSA との親和性および疎水性を示す定数(K_{HSA} 及び K_{ODS})を算出した。まず、フラボノール類の B 環水酸基に着目して分析を行った結果、 K_{HSA} は B 環に水酸基を 2 つ有する quercetin, 1 つ有する kaempferol 及び有さない galangin の順に高い値を示し、 K_{ODS} と逆の結果であった。次に、A 環 5 位の水酸基に着目して分析を行った結果、水酸基を有する quercetin は有さない fisetin より高い K_{HSA} 及び K_{ODS} を示した。フラボノール類の K_{HSA} は B 環の水酸基の数が多いほどが高くなることから、HSA との親和性は脂溶性ポケットを介する疎水性相互作用だけでなく、水素結合やイオン結合等もこの親和性に寄与することが示唆された。一方、A 環 5 位の水酸基は、C 環 4 位のカルボニル酸素との水素結合により六員環を形成して疎水性を高めていることが考えられ、これにより HSA との親和性が高まったと推測される。

ナツメグ (*Myristica fragrans*) 中の細胞増殖抑制物質
 ○工藤絵美, 今井邦雄, 勝崎裕隆 (三重大院生資)

【目的】

香辛料やハーブは、抗菌・防腐作用、薬理作用などの活性を有すると報告されており、様々な生物機能物質が単離、構造決定されている。また、中には昆虫による摂食は受けないが、ヒトの食品となるものもあり、非常に興味深い天然資源であると思われる。そこで今回は香辛料の細胞増殖抑制活性に着目して、その増殖抑制物質の特定と作用機構解明を目的とした。

【方法・結果】

7種の市販香辛料1gのエタノール抽出物を、ショウジョウバエ胚細胞(S2細胞)へ添加する活性測定を行い、細胞増殖抑制活性のあるものを目視により探索した。その結果ナツメグとペパーミントに顕著な活性があった。そこでまずナツメグの精製を行うことにした。ナツメグのエタノール抽出物を逆相 ODS カートリッジにより段階的に溶出した。各溶出画分について活性測定を行い、活性のあった溶出画分を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製した。その後、各分取画分について活性測定を行い、その中でも顕著な活性がある分取画分について核磁気共鳴装置(NMR)による構造解析を試みた。しかし構造決定に至ることはできなかつたため、大量抽出を行うことにした。大量抽出物を XAD-2 オープンカラムにより段階的に溶出し、上記と同様の精製を行った。その分取画分について活性画分を決定し、その保持時間および NMR スペクトルの比較により上記と同じ活性成分を得た。その中の一つが NMR, 質量分析により、 α -[1-[2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]ethyl] 4-hydroxy-3-methoxy-benzenemethanol であると同定した。また、この物質は 20 μ M で 45%の細胞増殖抑制活性をもつことがトリパンブルー排除法による活性測定で明らかになった。さらに、大量抽出後に得られた他の活性画分の一つについて、NMR および質量分析を行ったところ、上記の構造の水酸基がアセチル化されたものであると推定した。

D-アミノ酸オキシダーゼを用いた D-アミノ酸微量定量法の開発
 ○鬼頭幸彦, 加藤志郎, 邊見 久, 吉村 徹 (名大院生命農)

【目的】

近年、ほ乳類を含む高等動物にも様々な D-アミノ酸が存在し、多様な生理作用を有することが明らかとなってきた。D-アミノ酸の動態は臨床的にも注目されており、D-アミノ酸の正確かつ簡便な定量法が望まれている。現在、D-アミノ酸は蛍光ジアステレオマーに誘導体化された後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分離定量されているが、この場合 L-アミノ酸も D-アミノ酸と同様のシグナルを与えるため、標品によっては測定が困難である。本研究では D-アミノ酸オキシダーゼを用いた D-アミノ酸の微量酵素定量法を確立するとともに、この方法により食品サンプル中の D-アミノ酸定量を行った。

【方法・結果】

D-アミノ酸を *Schizosaccharomyces pombe* 由来の D-アミノ酸オキシダーゼ(SpDAO)を用いて α -ケト酸とした後、1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン(DMB)によって蛍光標識された誘導体とし、HPLC を用いて分離定量した。まず標品中の D-アミノ酸を SpDAO によって α -ケト酸へと変換した後、凍結乾燥により溶媒を除去した。得られた α -ケト酸を酸性条件下で DMB と反応させた。この反応生成物を HPLC へ供して得られたシグナルのほとんどは、D-アミノ酸に由来するものであった。この方法により、8種類の D-アミノ酸(D-Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Asn, Gln, Glu)が約 1~10 μ M の範囲で定量可能であった。また本法によってヨーグルト中の D-アミノ酸の定量を行ったところ、従来法による分析結果とよい一致をみた。

β-cryptoxanthin 抽出法の開発

○増田慶彦, 石井剛志, 中山 勉 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)

【目的】

温州みかんに含まれるカロテノイドの一種である β-cryptoxanthin は、様々な生理活性を有することが報告されている。一方、温州みかんの果皮は工場などで廃棄されており、β-cryptoxanthin の供給源として有効利用が期待されている。本研究では、亜臨界水がもつ強い加水分解能と、優れた有機物溶解能に着目し、温州みかん果皮を亜臨界処理することによる β-cryptoxanthin の新規抽出法を開発を目的とする。

【方法・結果】

はじめに、温州みかん果皮に *tert*-butylmethylether/ethanol (2 : 1) の混合溶媒と海砂を加え、すり潰すことにより抽出される量を、温州みかん果皮に含まれる β-cryptoxanthin の全量とした。次に、温州みかん果皮を用いて亜臨界処理の検討を行った。β-cryptoxanthin は、水による亜臨界処理では抽出されなかったが、エタノールを混合することで抽出された。抽出量はエタノール濃度に依存して増加した。そこで、温州みかん果皮と温州みかん果皮を乾燥させたチンピを用いて 99.5%エタノールによる亜臨界処理を行い、β-cryptoxanthin の最適抽出条件を検討した。その結果、最適抽出条件における温度を 100°C、時間を 10 分、圧力を 6 MPa に決定した。最適抽出条件を用いて亜臨界処理を行なったところ、温州みかん果皮に含まれる β-cryptoxanthin の約 80%が抽出された。さらに、亜臨界処理による β-cryptoxanthin の抽出効果を、従来の溶媒を用いた抽出法と比較した。常温常圧下における溶媒抽出 (30 分) に比べ、亜臨界処理による β-cryptoxanthin の抽出量は多く、亜臨界処理を行うことで β-cryptoxanthin を短時間で抽出できることが明らかになった。これらの結果より、温州みかん果皮の亜臨界処理は β-cryptoxanthin の大量生産を可能にする有用な方法であることが示唆された。

ガラクトース転移酵素導入トランスジェニックニワトリによる
蛋白質医薬品の N 型糖鎖の改善○水谷昭文, 小島康裕, 笹本貴子, 元野 誠, 小島 純, 稲吉勇仁,
西島謙一, 三宅克英, 飯島信司 (名大院工)

【目的】

トランスジェニックニワトリの利用により、その高い蛋白質生産性や、成熟期間の短さ、飼育コストの低さから、優れた蛋白質医薬品生産の動物工場システムを確立することが可能である。当研究室ではこれまでに一本鎖抗体、エリスロポエチン、TNFR-Fc 等を発現するトランスジェニックニワトリを作成し、これら蛋白質の鶏卵中への生産に成功している。しかしながら、卵白に蓄積されるこれらの蛋白質は不完全な N 型糖鎖 (ガラクトース, シアル酸の欠損) を有し、これにより、医薬品として使用する際の血中半減期や生理活性の低下等が危惧されている。本研究では、卵白中に生産される蛋白質医薬品の N 型糖鎖修飾の改善を目的とし、ニワトリガラクトース転移酵素 (GalT1) の発現解析、及び GalT1 トランスジェニックニワトリの作成を行った。

【方法・結果】

野生型ニワトリの各臓器での GalT 遺伝子発現の比較を行ったところ、卵白蛋白質の生産の場である輸卵管膨大部では、GalT1 の遺伝子発現は非常に低く、また有為な酵素活性も示さなかった。従って卵白蛋白質の N 型糖鎖不備は GalT1 発現が見られない為であると考えられた。そこで、一本鎖抗体を生産するトランスジェニックニワトリにレトロウイルス法を用いて GalT1 遺伝子を導入し、糖鎖修飾が改善されるかを検討した。種々の解析の結果、GalT1 導入ニワトリの卵白には、ニワトリ由来の卵白蛋白質に加え、外来の一本鎖抗体の N 型糖鎖にも有為にガラクトースの附加が確認された。現在、生産された一本鎖抗体の機能解析を進めている。本研究結果は、糖転移酵素遺伝子導入が、トランスジェニックニワトリの生産する蛋白質医薬品の改善に有効な手段であることを示している。

(本研究は生研センター・新技術新分野創出の為の基礎研究推進事業の支援を受けて行った.)

たまり醤油粕に含まれる ACE 阻害ペプチドの高血圧自然発症ラットの血圧に対する影響

○藤原稔弘¹, 勝崎裕隆¹, 今井邦雄¹, 松永正好², 西尾昌洋¹, 梅川逸人¹(¹三重大院生物資源, ²サンジルス醸造 (株))

【目的】

大豆を主原料とするたまり醤油には、一般に消費されている濃い口醤油に比べて比較的大きなペプチドが豊富に含まれていることが知られており、機能性が期待される。一方、醤油製造時の副産物である醤油粕の多くは、産業廃棄物として焼却・埋没処理されており、新たな有効利用方法が望まれている。最近我々は、たまり醤油粕が高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧を低下させることを報告し、たまり醤油粕抽出物のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害画分から 4 つのペプチドを同定した。今回、これらのペプチドの ACE 阻害活性および *in vivo* における作用を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

既報に従い、たまり醤油粕を脱イオン水に対する透析、NaOH による抽出、両性イオン交換樹脂ダイアイオン AMP01 およびトヨパール HW-50 によるクロマトグラフィーに供することにより、SHR に対する降圧作用と *in vitro* の ACE 阻害活性を併せ持つ FII 画分を調製した。次に、FII を Cosmosil 5C₁₈-AR による逆相 HPLC を繰り返し行うことにより分画し、LVG, VTSY, FSAT, FETR の 4 つのペプチドを得た。これら 4 つのペプチドについて、ACE 阻害活性の測定および SHR の血圧に対する影響を検討したところ、FETR と LVG は強い ACE 阻害活性を示すとともに、有意な血圧降下作用を有していた。以上のことから、FETR と LVG は ACE を阻害することにより、血圧降下を引き起こすことが示唆された。

CAM 法を用いた血管新生抑制活性の評価

○岡村直樹¹, 太田敏郎¹, 宇都義浩², 中田栄司², 堀 均², 熊澤茂則¹¹静岡県立大学大学院生活健康科学研究科, ²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

【目的】

血管新生とは、既存の血管から新たに血管網が形成される現象である。胎生期や創傷治癒過程などの生理的血管新生と、固形腫瘍、糖尿病性網膜症や関節リウマチなどの病的血管新生に分類される。このように、血管新生は様々な疾病に関与していることが明らかとなっている。本研究では安価で、操作が簡便であり、短期間で結果の得られる *in vivo* 試験として、CAM (Chorioallantoic Membrane)法 (鶏胚漿尿膜法)を確立し、この方法により、*in vivo* におけるフラボノイド類の血管新生抑制活性を評価した。

【方法・結果】

CAM 法とは、受精鶏卵の CAM 上に試料を添加し、血管新生抑制活性を評価する方法である。具体的には、試料添加後 3 日目における血管新生抑制を観察し、活性の強さを目視により 5 段階で評価した。その評価をもとに、血管新生抑制率を算出することで定量化を行った。今回、*in vitro* 試験により血管新生抑制活性がすでに確認されている 4 種のフラボノイド、Galangin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin について、この CAM 法を用いて *in vivo* 活性を評価した。これらの化合物は、フラボノールに分類され、B 環の OH 基の数がそれぞれ 0, 1, 2, 3 個である以外は共通の構造を持っている。CAM 法による評価では、各試料間において、OH 基の数の違いによる活性の変化はあまり見られなかったが、各試料いずれにおいても、濃度依存的な血管新生抑制活性が観察された。これらのフラボノイドの評価結果から、*in vitro* 試験およびマウスを用いた *in vivo* 試験の代替法として CAM 法が有用であることが示唆された。

P 21

卵巣摘出ラットにおけるゲニステインの抗うつ様活性に関する研究

○陰山亜矢¹, 榊原啓之^{1,2}, 下位香代子^{1,2}, 横越英彦¹

(¹ 静岡県立大学 生活健康科学研究科, ² 静岡県立大学 環境科学研究所)

【目的】

女性が罹患するうつ病の発症リスクは、男性の約 2 倍高く、そのピークは更年期に存在することが報告されている。近年、病気を治療するのではなく、予防し心身ともに健康を維持するという予防医学の考え方が普及しており、それに伴って食品成分の摂取による生活習慣病の予防や改善に大きな関心が集まっている。うつ病等の精神疾患を対象とした予防医学的研究は発展途上の分野であるが、日本人女性の平均寿命は世界で最も高く、いかに更年期のうつ症状を予防できるかは心身共に健全な更年期を過ごす為に重要な課題である。そこで本研究では食品成分によるうつ病の予防改善を目的とし、大豆イソフラボンの一種であるゲニステインの抗うつ様活性を更年期モデルである卵巣摘出ラットを用いて検討した。

【方法・結果】

卵巣摘出ラットにゲニステイン (0.1, 1, 10, 100 mg/kg) を 1 日 (短期) および 14 日間 (長期) 経口投与し、その後、代表的な抗うつ剤のスクリーニング手法である Porsolt の強制水泳試験 (Forced Swimming Test: FST) に供した。具体的には、逃避不可能な水を張った円柱の中にラットを入れると次第に泳ぐことをあきらめ無動化するが、この無動時間の短縮を指標としてゲニステインの抗うつ様活性を評価した。その結果、ゲニステイン短期投与群では対照群と比較して無動時間の短縮は確認できなかったが、ゲニステイン (10 mg/kg) の長期投与により FST による無動時間が短縮した。また、ゲニステイン 10 mg/kg の長期投与群の海馬中で、ドーパミン代謝、セロトニン代謝の変化が確認された。以上の結果より、卵巣摘出ラットにおいてゲニステインの長期投与に抗うつ様活性があり、その作用メカニズムの一つは脳内神経伝達物質の変化による可能性が示唆された。

P 22

緑茶成分テアニンによるラットの記憶・学習能に及ぼす影響

○坂本和洋¹, 乾直人¹, 源川博久¹, 武田厚司², 横越英彦¹

(¹ 静岡県立大学 生活健康科学研究科, ² 静岡県立大学 薬学研究科)

【目的】

日本人の平均寿命は、戦後の食生活の改善などによって飛躍的に伸び、いまや世界有数の長寿国となった。しかし、高齢化は生活習慣病などの発症率を高め、これに起因して認知症などの患者が増加している。こうした背景から、日常生活を自立して元気に過ごせる期間、すなわち健康寿命の延伸が求められている。特に認知症などによる記憶・学習能の低下は、健康的な生活を送る上で障害となる。したがって記憶・学習能の維持は健康寿命の延伸に寄与すると考えられる。そこで本研究では、中枢神経系についての研究が行われている緑茶成分テアニンを用いて、ラットの記憶・学習能に及ぼす影響を検討した。本研究では、行動試験および神経栄養因子について検討した。

【方法・結果】

動物実験として Wistar 系雄ラットを用い、コントロール群とテアニン群に分けた。テアニンは、脳の成長過程である出生直後から摂取させた。離乳前ラットには、テアニン水を摂水した母ラットの母乳からテアニンを摂取させ、離乳後は直接テアニン水を摂水させた。行動試験を検討するラットには 0.3% (w/w) テアニン水、神経栄養因子を検討するラットには 0.25%, 0.5%, 1% (w/w) テアニン水を摂水させた。記憶・学習能を判定する行動試験として、4 週齢ラットで passive avoidance test (恐怖に関わる記憶・学習能の評価系)、5 週齢ラットで novel object test (物体認知に関わる記憶・学習能の評価系) を行なった。また、ELISA 法により、1 週齢ラット海馬で、神経栄養因子の一つである BDNF 量を測定した。その結果、passive avoidance test における記憶・学習能の指標は、テアニン群がコントロール群と比較して有意に増加した。さらに novel object test における記憶・学習能の指標も、テアニン群がコントロール群と比較して有意に増加した。また海馬 BDNF 量は、テアニン群がコントロール群と比較して有意に増加した。本研究結果から、テアニンはラットにおいて幾つかの記憶・学習能を向上させる作用があると考えられた。また、テアニン摂取が海馬 BDNF 量を増加させたことから、テアニンによる作用の一部は、BDNF 合成を介した経路に関与していると考えられる。

メチロトローフ酵母 *Pichia methanolica* のペルオキシシン Pex14 の機能解析
 ○伊藤大祐¹, 伊藤尚志², 藤村朱喜², 小澤正太郎², 末永優人², 中川純一²,
 早川享志¹, 中川智行¹ (¹ 岐大・応生科, ² 東農大・食科)

【目的】

メチロトローフ酵母のメタノール代謝に特異的な酵素, アルコールオキシダーゼ (AOD) およびジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) はペルオキシソーム (Ps) 局在型タンパク質である。つまり, Ps タンパク質輸送機構は本酵母のメタノール代謝制御における重要なプロセスであると考えられる。我々は, 現在まで *P. methanolica* のメタノール代謝制御について AOD アイソザイムを中心に解析をすすめ, Ps 輸送シグナル 1 (PTS1) レセプター Pex5p が AOD アイソザイムの活性発現に必須であることを報告してきた。今回は, Pex5p と相互作用を持つペルオキシシン Pex14p について解析を行った。

【方法・結果】

他酵母由来 Pex14p のアミノ酸配列を基に, *PmPEX14* をクローニングした。PmPex14p は, 4 カ所の Pex14 保存領域, class II SH3-ligand の共通配列を保持していた。一方, 遺伝子情報を基に *Pmpex14* Δ株を作成し, その表現系について観察した。*Pmpex14* Δ株は Ps 誘導炭素源であるメタノールに対する生育能を完全に失っており, メタノール誘導性 Ps 酵素 AOD, DAS およびカタラーゼ (CTA) 活性の大部分は細胞質に局在した。さらに, PTS1 を付与した GFP-PTS1 は野生株では Ps に局在するものの, *Pmpex14* Δ株ではその局在は細胞質および液胞に局在していた。これらの結果は, PmPex14p が AOD アイソザイムをはじめとしたタンパク質の Ps 輸送に必須な因子であり, メタノール代謝制御において重要な役割を持つことを示している。

5-aza-2'-deoxycytidine により誘導される DNA 損傷応答機構
 ○中林裕貴, 杉村和人, 奥村克純 (三重大・院・生物圏生命・分子細胞生物学)

【目的】

DNA のメチル化は, DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT)ファミリーにより制御され, 遺伝子発現制御や染色体構造の安定化に重要である。DNMT1 は DNA 複製依存的にメチル化パターンを維持する維持メチル化酵素であり, DNMT1 の欠損は細胞のがん化や細胞死を導く。5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)は, DNA 複製時にゲノム中に取り込まれる一方, DNMT1 の触媒ドメインと不可逆的に共有結合することで, その酵素活性を阻害する DNA メチル化阻害剤である。当研究室により, 5-aza-dC は DNA 複製期 (S 期)特異的に DNA 損傷を誘導することがわかり, このことが 5-aza-dC の細胞毒性誘発の原因であることが示唆された。本研究では, 哺乳類細胞を用いて 5-aza-dC 処理により活性化する DNA 損傷応答機構を解析することを目的とした。

【方法・結果】

5-aza-dC が細胞増殖に与える影響を解析するため, 哺乳類細胞 (HeLa, VA-13, m5S)を 5-aza-dC で処理した。処理後 1~3 日後に増殖率は低下し, 生細胞数は減少した。フローサイトメーターにより細胞周期を解析した結果, 5-aza-dC 処理細胞は S 期並びに G₂ 期で停止することがわかった。DNA 損傷によるチェックポイント機構の活性化が知られている。そこで, 5-aza-dC 処理により DNA 損傷が誘導されているかを解析するために, DNA 二本鎖切断のマーカータンパク質であるリン酸化ヒストン H2AX (γ-H2AX)を免疫蛍光染色法により検出した。その結果, 5-aza-dC 濃度依存的に核内の γ-H2AX の量が増加することから, 5-aza-dC は DNA 二本鎖切断を誘導することがわかった。また, チックポイントキナーゼタンパク質である Chk1 の活性化を, リン酸化型 Chk1^{ser317}を指標に解析した。Western blotting の結果, 5-aza-dC 処理によりリン酸化 Chk1 の量が増加したことから, 5-aza-dC 処理により S/G2 チェックポイントが活性化していることがわかった。さらに, Chk1 を基質とするチェックポイント因子 ATR の阻害剤であるカフェインを 5-aza-dC と共処理すると細胞周期の停止は起こらず, 細胞増殖率の低下も幾分抑えられた。以上の結果から, 5-aza-dC 処理により活性化される DNA 損傷応答機構の一端が明らかとなった。

水田土壌中の糸状菌群集に及ぼす田畑輪換および畑転換の影響

○石川裕己¹, 西田瑞彦², 土屋一成², 増田欣也³, 原 嘉隆³, 中野恵子³, 木村真人¹,
浅川 晋¹(¹名古屋大学院生命農, ²東北農研, ³九州沖縄農研)

【目的】

これまでに国内3地域の有機物長期連用水田圃場を対象としてPCR-DGGE法により水田土壌中に生息する細菌菌群集, 糸状菌群集の解析が行われ, 有機物連用や地域, 季節の違いは菌群構造にあまり影響を及ぼさないことを示した(平松ら 2007, 石川ら 2008). 本研究では, 水田土壌中の糸状菌群集の特徴をさらに詳しく捉えるために, 水稻連作田とは異なった土壌管理を行っている『輪換田』および『転換畑』の糸状菌群集をDGGE法により解析する. これにより, 田畑輪換および畑転換が糸状菌の菌群構造に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする.

【方法・結果】

東北農研(以下, 大曲)内の輪換田と, 九州沖縄農研(以下, 筑後)内の転換畑から採取した作土層の土壌から抽出したDNAを用い, 糸状菌の18S rDNA断片をPCR増幅し, DGGEを行った. 得られたバンドパターンの統計解析により, 輪換田および転換畑の糸状菌群集の特徴を明らかにした. その結果, DGGEにおいて全てのサンプルに共通したバンドがいくつか見られ, 土壌管理によらず安定して生息している糸状菌の存在が明らかとなった. 一方, 水稻連作田ではみられない, 輪換田や転換畑に特有のバンドも観察された. また, 統計解析の結果, 輪換田(大曲)と転換畑(筑後)には, 水稻連作田とは異なった糸状菌群集が形成されていることが示唆された. 有機物連用や地域, 季節の違いは糸状菌の菌群構造にあまり影響を及ぼさなかったこと(石川ら 2008)と比較すると, 田畑輪換や畑転換といった, 水稻連作田とは異なる土壌管理は, 施肥管理よりも糸状菌群集に影響を与えやすいことが明らかとなった.

Asaia bogorensis 由来のUDP-グルコースピロフォスホオリラーゼに関する研究

○吉澤亮雄, 水野正浩, 野崎功一, 神田鷹久, 天野良彦 (信大・工)

【目的】

Asaia bogorensis は非常に微細なセルロースファイバーを生産するが, 酢酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* に比べて生産量は少ない. その原因の一つとして, セルロース合成の基質となるUDP-グルコースの供給の問題であることが考えられる. 本研究では, 菌体内でUDP-グルコースを合成する *A. bogorensis* のUDP-グルコースピロフォスホオリラーゼ(UDPGP)の機能解析を行い, UDP-グルコース生成とセルロース生産の関係を解明することを目的としている.

【方法・結果】

292アミノ酸からなる約32kDaのタンパク質である *A. bogorensis* のUDPGPを得るために, この酵素の遺伝子をpET21aベクターに挿入し, これを用いて大腸菌BL21(DE3)pLysSを形質転換した. 終濃度0.1mM IPTGにより誘導を行い37°Cで12時間培養した結果, 菌体破碎液の可溶性画分に32kDaの目的タンパク質が得られた. この粗酵素を用いてG1PからUDP-グルコースへの変換活性をNADP⁺がNADPHに還元する反応を用いて測定した結果, 182U/mlであった. また, 他起源由来のUDPGP同様にMg²⁺の濃度により活性が変化することも確認した. しかし, 粗酵素状態では半日で大半がプロテアーゼにより分解されてしまうため, 現在は金属プロテアーゼ阻害剤であるEDTAなどを加え精製を進めている.

Cellobiohydrolase I と cellobiose phosphorylase を用いた
セルロースからのグルコース 1 リン酸の生産に関する研究

○馬場健介, 水野正浩, 野崎功一, 佐藤伸明, 神田鷹久, 松澤恒友, 天野良彦 (信大・工)

【目的】

我々は、セルロース系バイオマスから機能性を有するオリゴ糖（グルコシルキシロース, GX）を酵素合成する研究を行ってきた。この際、セルロースを Cellobiohydrolase I (Ex1) によって分解しセロビオース (G2) を得る必要があるが、Ex1 が生成物である G2 によって阻害されてしまうという問題があった。そこで、本研究では G2 からグルコース 1 リン酸 (G1P) に加リン酸分解する cellobiose phosphorylase (CBPase) を Ex1 と同時に反応させることで、セルロースの効率的な分解と GX 生産に必要な中間産物である G1P への変換を試みた。

【方法・結果】

本研究で使用した酵素 Ex1 及び CBPase は、それぞれ遺伝子組換えを用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* により生産した。基質には微結晶性セルロースを用い、反応生成物は TLC によって確認した。Ex1 と CBPase の至適 pH はそれぞれ 5.0, 7.2 である。そこで pH 6.6 に調整した 10 mM リン酸カリウム緩衝液(PPB)を用い各々の酵素の反応性を比較したところ、両酵素とも pH 6.6 において作用することを確認した。10 mM PPB (pH 6.6)に微結晶性セルロースを 0.2 wt%になるように懸濁し Ex1 を添加、30℃で一定時間反応させた後、同一の反応系に CBPase を追添加して反応を継続させた。その結果、CBPase 添加前は Ex1 によるセルロースから G2 への変換が主体であり、CBPase 添加後は G2 から G1P への変換を確認することが出来た。今後は両酵素を用いた共役反応系の最適条件の検討を行っていく予定である。

D-プロリン脱水素酵素へのランダム変異導入による
機能改変及び変異体を用いた D-セリンセンサーの構築

○福田朱美¹, 桜庭春彦², 大島敏久³, 末信一郎¹ (¹福井大院工, ²香川大院農, ³九州大院農)

【目的】

真正細菌、哺乳類など近年いたるところで D-アミノ酸の存在が明らかになっている。また、ヒト脳髄液や腎不全患者の血清中でも D-セリンが存在することがわかっており、その検出は診断等において重要である。D-アミノ酸の測定は、一般的に煩雑な操作や検出に時間を要する HPLC により行われており、簡便な検出系は確立されていない。D-セリンの簡便な検出には D-アミノ酸を基質とする脱水素酵素を用いた電気化学的バイオセンシングシステムが考えられるが、一般に D-アミノ酸を基質とする脱水素酵素は基質特異性が低いという問題がある。そこで本研究では超好熱性アーキア *Pyrobaculum islandicum* 由来の D-プロリン脱水素酵素を取り上げ、エラープローン法による変異導入により同酵素の機能を改変することにより、D-セリンに対する高い基質特異性を目指した。

【方法・結果】

ランダム変異の導入法としては error-prone QuickChange 法を用いた。得られた増幅産物を精製し、形質転換をした。得られたコロニーの D-プロリン、D-セリンに対する脱水素酵素活性を比較検討することで、スクリーニングを行った。その結果、両基質に対する活性が向上した変異体が 14 株確認された。現在、さらに D-セリンに対する活性向上株取得を進めている。

シアル酸認識レクチン Siglec のマクロファージに対する抗炎症作用

○庄司 徹, 屠 文杰, 安藤宗稔, 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 やペプチドグリカンにより誘導されるマクロファージの炎症を抑制できることが我々の検討で明らかとなっている. 一方, インスリン非応答性(II型)糖尿病や心筋梗塞など, 薬では容易に治療できない生活習慣病は, 自覚しない程度の弱い慢性炎症が原因であるとの説が近年有力である. パルミチン酸やステアリン酸等の食餌由来飽和脂肪酸は TLR を介して弱い慢性炎症を引き起こすことが報告されており, 本研究ではこれら様々な炎症誘導物質によるマクロファージの活性化を Siglec が抑制するか検討した.

【方法・結果】

Siglec-9 を発現させたマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 を用い, 刺激後の培養上清中に存在する TNF- α 量を ELISA により測定した. dsRNA, CpG DNA などマクロファージ内で認識される TLR リガンドにより誘導される TNF- α 産生は Siglec により抑制されることが確認された. 一方, 抗炎症性サイトカイン IL-10 は Siglec により強く誘導された. また, 食餌性成分であるパルミチン酸によって産生される TNF- α は, Siglec 発現細胞において低いことが示された.

環境低負荷下型の繊維加工を目的としたリパーゼ変異体の創製

○倉田誠一¹, 田中 勉², 近藤昭彦², 黒田浩一³, 植田充美³, 末信一郎¹(¹ 福大院生応化, ² 神戸大院応化, ⁵ 京大院応用生命)

【目的】

環境低負荷型を目的としたセルラーゼとリパーゼを組み合わせた効率的な酵素によるトリアセチルセルロース (TAC) 繊維の分解を行うため, TAC の脱アセチル化の効率化について検討を行った. 本研究ではクモノスカビ属由来のリパーゼ (ROL) の活性・基質特異性に影響すると考えられている lid 部位にコンビナトリアル変異の導入を行い, ROL の持つ本来のエステラーゼ活性に TAC に対する脱アセチル化活性の付与された変異体の取得を目指した. また, 細胞表層工学を用いて ROL 変異体の酵母細胞表層提示を行うことにより, 目的の変異体のスクリーニングの迅速化を行った.

【方法・結果】

酵母細胞表層提示プラスミドである pWIFSPROROL の ROL 配列が持つ lid 部位の 6 アミノ酸残基に対してコンビナトリアル変異の導入を行うために, ライゲーション法及び Quik change[®]法の 2 種の方法を用いて ROL 変異体プラスミドを構築した. そして, この変異体プラスミドを用いて酵母 *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 の形質転換を行い ROL 変異体のコンビナトリアルライブラリーの構築を行った. 得られた 3,000 個のコロニーについて 96 穴プレートを用いて *p*-nitrophenyl acetate を基質とした一次スクリーニングを行い, その結果, 野生型 ROL より活性の高い株を取得した. 一次スクリーニングにより取得した株に対しアセチルセルロース (CA) を基質とした二次スクリーニング及び DNA シーケンシングによる変異導入の確認を行ったが, 変異導入の確認はできなかった. このことから, lid 部位は CA に対する脱アセチル化活性には影響しないことが考えられた. 今後, エラープローン変異導入等を行うことにより, CA 脱アセチル化活性変異体の取得を目指す.

エラープローン RCA 法に基づいた耐熱性 L-アスパラギン酸脱水素酵素の
中性付近における触媒活性の向上

○桶崎 陽友¹, 鄭 海濤², 米田 一成³, 櫻庭 春彦⁴, 大島 敏久⁵, 末 信一郎¹
(¹福井大院・工・生応化, ²天津工大・材料化工, ³東海大・農・バイオサイエンス,
⁴香川大・農・応生, ⁵九大院・農・遺資工)

【目的】

超好熱アーキア由来耐熱性 NAD-依存性 L-アスパラギン酸脱水素酵素(L-AspDH)は, 至適 pH 11.6 であり中性付近においてその酵素活性は 10%以下まで低下することが知られている. これまでに我々は本酵素を用いて L-Asp 定量のための電気化学的センサの構築を行ってきたが, 本酵素の至適 pH が塩基性サイドにあるためメディエーターを介した電流応答が充分得られなかった. そこで今回はセンサ反応機構の最適化によるセンサ機能の向上を目指して, 至適 pH を中性側へシフトさせるため本酵素遺伝子へ変異を導入した.

【方法及び結果】

ランダム変異導入法としてエラープローンローリングサークル増幅法を用いた. 鋳型として L-AspDH をコードした遺伝子 pEAF1838 を用いて, MnCl₂ を添加し DNA ポリメラーゼの複製精度を低下させた状態でローリングサークル増幅を行い, その増幅産物を用いて大腸菌を形質転換させることで, 遺伝子配列全体にランダム変異が導入された変異体ライブラリーを作製した. その後スクリーニングによって, 得られた 750 変異体のうち 43 変異体において酵素活性の向上および至適 pH の変化が確認された. 現在, さらなる高活性体の取得および変異体の解析を行っている.

**Electrochemical behavior of dye-linked L-proline dehydrogenase on glassy carbon electrode
modified by multi-walled carbon nanotubes**

○ Haitao Zheng^{1,3}, Leyi Lin^{2,3}, Yosuke Okezaki³ and Shin-ichiro Suye^{3,*}

(¹School of Environmental Science and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300160, P.R. China; ²College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, P.R. China; ³Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui 910-8507, Japan.)

【Purpose】

As an essential component, L-proline is important for proper functioning of joints and tendons. It not only implicates some disorders in human body, but also a practical subject in food and pharmaceutical industries. An electrochemical biosensor based on nanotube-modified electrode was constructed in this research.

【Experimental and results】

A glassy carbon electrode (GC) was modified by multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), and the cyclic voltammetric behaviors of the modified electrode were investigated. A redox pair of peaks was found clearly, which was owned to the oxygen-containing functional groups on the nanotube surface. Recombinant thermostable dye-linked L-proline dehydrogenase originally from hyperthermophilic archaeon (*Thermococcus profundus*) was further immobilized, and the modified electrode (GC/MWCNTs/L-proDH) exhibited electrocatalytic properties to L-proline compared to bare GC, GC/L-proDH and GC/MWCNTs electrode, which suggested that the presence of MWCNTs efficiently enhanced the electron transfer between the active center of L-proline dehydrogenase and the electrode surface.

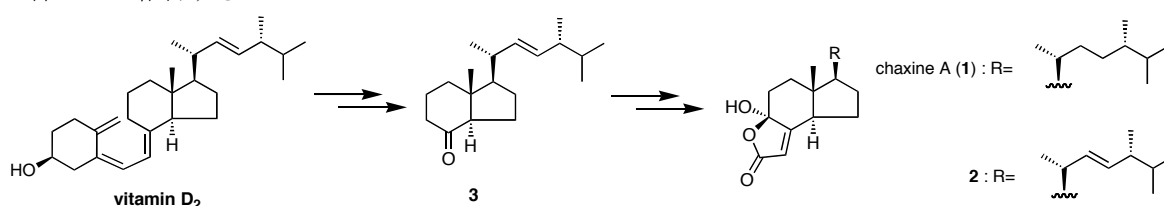
破骨細胞形成阻害物質チャキシンの合成研究
安立昌篤, Oト部直樹, 西川俊夫 (名大院生命農)

【目的】

チャキシシン A (1) および 2 は, 2006 年に河岸らによって茶樹茸 (*Agrocybe chaxingu*) から単離された三環性化合物である。これらは, 破骨細胞の形成を選択的に阻害する働きを持っているため, 骨粗鬆症薬のリード化合物として期待されている。チャキシシン A (1) の立体化学は, 絶対配置既知の化合物 2 との比較によって推定された。そこで, 本研究では化合物 2 の立体化学を明らかにするために, チャキシシンの合成研究を行なった。

【方法・結果】

まず, ビタミン D₂ を出発原料としてケトン 3 を合成した。その後, ヘテロ Diels-Alder 反応を含む 5 段階で化合物 2 の合成に成功した。また, 同様の方法でチャキシシン A (1) の合成も検討しているので合わせて報告する。



安定同位体標識化合物の生体内トレーサーとしての可能性
○小山正浩¹, 天野大輔¹, 中村浩蔵¹ (¹信州大院農)

【目的】

ポリフェノール的一种であるフェノール酸類は, 植物二次代謝物として普遍的に存在しており, 食品三次機能が期待されている。本研究では, 重水素または重炭素で標識した安定同位体標識フェノール酸類を合成し, それらの生体内挙動を調べることを目的とした。

【方法・結果】

ヒドロキシ安息香酸型フェノール酸のいくつかは, 重水中で加熱, 還流するだけで重水素標識体を得ることができた。重炭素標識体は, ¹³CO₂, [1-¹³C]酢酸エチルを原料として合成した。合成した安定同位体標識化合物はラットに単回経口投与し, LC/MS のシングルイオンレコーディングモード (SIR) で安定同位体標識化合物と未標識化合物とを独立して定量した。その結果, 安定同位体標識フェノール酸類と未標識化合物標識とは, ほぼ同様の挙動を示した。また, 血漿中では FA, ¹³C-FA, SA, ¹³C-SA が, 肝臓中, 腎臓中, 胃中では CA, ¹³C-CA, FA, ¹³C-FA, SA, ¹³C-SA が, サンプル投与 30 分後の各サンプル濃度と比較して投与 120 分後の濃度が有意に減少しているというデータが得られ, 腸中においては, いずれの化合物も投与 30 分後と投与 120 分後の濃度に有意差は見られなかった。この結果から, 安定同位体標識化合物は生体内トレーサーとして利用できると考えられた。

**Enhanced surface functionality of soy globulins
through attachment of carbohydrates and fatty acid chains**
○Athanasia O. Matemu, Shigeru Katayama, and Soichiro Nakamura
(Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University)

【Objectives】

Soy proteins have been widely used as a source of highly functional proteins in many formulated food products. For further industrial uses, it is desirable to improve their functional properties. Introduction of carbohydrates and fatty acid chains onto the protein molecular can alter its structure facilitating change in physic-chemical and functional properties. The aim of this study is to investigate the effects of glycosylation and lipophilization on the surface functionalities such as emulsion stability (ES), emulsifying ability index (EAI), and water or oil-binding capacities (WBC or OBC) of soy globulins.

【Methods and Results】

Glycinin (11S) or β -conglycinin (7S) were covalently conjugated with carbohydrates such as xyloglucan (XG), chitin and chitosan oligosaccharide, through naturally occurring Maillard-type glycosylation at controlled temperature 60°C, relative humidity 65% and pH 7.0 for 7 days, or acylated with N-hydroxysuccinimide esters of fatty acids (6C-18C). As the result, the XG or chitin oligo conjugates showed almost 3.0-4.5 times improvement in ES but no significant difference in EAI. The EAI of 7S and 11S was increased by acylation with increasing chain length of fatty acid. The OBC of 11S was significantly increased by glycosylation with chitosan oligo but the OBC of 7S and the WBC of 7S and 11S were not improved. In contrast, the WBC and OBC of soy globulins were improved upon acylation, except for the WBC of 11S. In conclusion, it is revealed that covalent attachment of carbohydrates and fatty acid chains to soy globulin, 7S and 11S, resulted in enhancement of the surface functional properties.

ビタミン B₆ 欠乏時高ホモシステイン血症の葉酸による改善効果
○山本紘平¹, 中川智行^{1,2}, 伊佐保香³, 柘植治人⁴, 早川享志^{1,2}
(¹岐阜大連農,²岐阜大応生,³岐阜女子大家政,⁴中部大応生)

【目的】

ホモシステイン (Hcy) はメチオニンの中間代謝物であり、血中 Hcy 濃度が一定以上になると高 Hcy 血症と診断される。メチオニンは S-アデノシルメチオニン、S-アデノシルホモシステインを経て Hcy となり、ビタミン B₆ (B₆) を要求するイオウ転移経路か葉酸とビタミン B₁₂ を要求するメチオニンシンターゼ (MS) が関与する再メチル化経路により代謝される。医療現場では高 Hcy 血症の改善を目的に上記三つのビタミンが処方されるが、その中で葉酸の効果が最も高い。そこでこのメカニズムの詳細を検討するために、B₆ 欠乏により高 Hcy 血症へ誘導し、葉酸添加による改善について検討した。

【方法】

飼料 1 kg あたり葉酸 2 mg, メチオニン 9 g を含むコントロール飼料と B₆ 欠乏飼料, B₆ 欠乏飼料の葉酸量を 5, 10, 20 mg/kg と強化した 3 種の B₆ 欠乏葉酸添加飼料を調製し、4 週齢の Wistar 系雄ラットに 5 週間ペアフィーディングにより投与した。解剖後、血漿と肝臓の B₆ ビタミンと血漿 Hcy 濃度、肝臓 MS 活性を測定した。

【結果と考察】

B₆ 欠乏飼料により肝臓 MS 活性の減少と血漿 Hcy 濃度の顕著な増加が起こった。葉酸の同時添加により Hcy 増加の抑制と肝臓 MS 活性低下の回復が見られたが、葉酸添加レベルの違いによる差は見られなかった。しかし、血漿 Hcy レベルと肝臓 MS 活性に有意な逆相関関係が見られた。以上より、メチオニン負荷 B₆ 欠乏時の高 Hcy 血症は B₆ 欠乏によるイオウ転移経路への流量低下と MS 活性低下が原因であり、葉酸添加によって低下した MS 活性が回復したことで Hcy 代謝が亢進し、血漿 Hcy 濃度上昇が緩和されたと考えられた。

超臨界二酸化炭素を用いた卵黄からの脂質除去及び特異的抗体の精製

○中尾将昭¹, 横山英明², 佐藤伸明¹, 水野正浩¹, 野崎功一¹, 神田鷹久¹, 松澤恒友¹, 天野良彦¹
(¹信州大・工, ²(株)ゲン・コーポレーション)

【目的】

産卵鶏の場合, 血液中の特異的抗体は鶏卵中へと濃縮移行する. この性質を利用し, 人為的に選ばれた抗原(特定抗原)に対する特異的抗体を鶏卵卵黄中から得られる. しかし, 抗体の精製には脂質除去が必要とされる. 従来法ではヘキサンなどの有機溶剤によって不要な脂質分を除去しているが, 人体に無害な二酸化炭素を抽出溶媒として用いることによって, 受動免疫効果のある食品素材や医薬品への応用に向けて安全性の向上が期待される. 本研究では超臨界二酸化炭素抽出技術を用いる上で, 抗体活性を保ちながら最も効率の良い乾燥卵黄粉末からの脂質除去方法の確立を目的とする.

【方法・結果】

特定抗原に対する特異的抗体を含有した乾燥卵黄粉末(株式会社ゲン・コーポレーションより提供)を試料として, 超臨界抽出装置(耐圧硝子工業製 TSC-EX-016 型)を用いて超臨界二酸化炭素による脂質の除去を行った. 圧力は 20 MPa 一定, 温度は 50°C と 60°C, 時間は 3, 6, 9, 12, 15, 18 時間, CO₂ 送液ポンプ流速は 10 ml/min 一定, エントレーナポンプ流速を 0.5 ml/min という抽出条件の下で行った. その後, 抽出容器から回収したサンプルの残存脂質分をソックスレー抽出法(溶媒:ヘキサン)により定量した. その結果, 9 時間程度までは温度による脂質抽出効率への影響はそれほど大きくなかったが, 抽出時間が 12 時間以降は, 60°C で超臨界抽出を行った方が最終的な脂質除去率は良いということがわかった. 99.5% エタノールを添加した場合, 短時間で脂質除去が大きく進むことが確認された. 今後は抗体活性を確認しながら, 温度や圧力条件と添加物の使用量・種類, 充填剤の量や攪拌器などを検討していく予定である.

アオウキクサにおける配糖体型 KODA 代謝物の構造決定

○赤池 綾太¹, 村田 有明¹, 甲斐 建次², 横山 峰幸³, 渡辺 修治⁴
(¹静岡大農・応生化, ²阪府大院・生命環境, ³資生堂, ⁴静岡大創造科技学院)

【目的】

(12Z,15Z)-9-Hydroxy-10-oxooctadeca-12,15-dienoic acid (KODA) はアオウキクサ(*Lemna pausicostata*)より単離・同定された α -リノレン酸由来のオキシリピン化合物である. KODA とノルエピネフリンとの反応物はアオウキクサに対して強い花芽誘導活性を示すことが知られている. KODA の代謝物として, β -酸化により炭素鎖の短くなった K16 と K14, また α -ケトールが還元され vic-ジオールとなった D18, D16, D14 が明らかにされていた. さらに本研究室では配糖体化を受けた代謝物 **1**, **2**, **3** を同定した. 各種スペクトルより化合物 **1**, **2**, **3** は炭素 14 個からなる脂肪酸の配糖体であることが明らかであるが, その立体構造については未解明のままである. そこで本研究では化合物 **1**, **2**, **3** の構造決定を行った.

【方法・結果】

高分解能エレクトロスプレー質量分析の結果, 化合物 **1** は分子量 416 (HRESI-MS: m/z 439.1944 [M+Na]⁺) であり, 分子式が C₂₀H₃₂O₉ を有することが分かった. 化合物 **1** をアセチル化した後, NMR に供した結果, 糖部分はグルコースであることが明らかとなった. また分子式から化合物 **1** は KODA が β -酸化を受けて生成した K14 の配糖体であると推定された. さらに化合物 **1** の炭素鎖上 5 位の不斉炭素の立体を決定するために, [U-¹³C]-9R-KODA, [U-¹³C]-9S-KODA をそれぞれアオウキクサに投与し, 炭素鎖が ¹³C で標識された化合物 **1** を β -glucosidase 処理後キラルカラムを用いて分析したところ, [U-¹³C]-5R-K14 が検出された. その結果, KODA 代謝物である K14 は選択的に配糖体化されることが示唆された. 以上より化合物 **1** を(8Z,11Z)-5- β -glucopyranosyloxy-6-oxotetradeca-8,11-dienoic acid と決定した. 化合物 **2**, **3** についても構造解析をした結果, 化合物 **2** は化合物 **1** のカルボニル還元体, つまり D14 の配糖体であること, また化合物 **3** は化合物 **1** の 6'-O-malonate であると決定した.

アルツハイマー型認知症予防が期待されるポリフェノールの酵素的グリコシル化

○小川紘史, 山内雄貴, 片山 茂, 中村宗一郎 (信州大農)

【目的】カテキンやクルクミンなどのポリフェノール類はアルツハイマー型認知症予防効果を示し、アミロイド線維形成阻害効果を有することが報告されてきた。しかし、これらの多くは水に対して不溶性または溶解性が低く、食品・医薬品として応用する場合、汎用性に乏しいという欠点がある。そこで本研究では、酵素的合成法を用いたグリコシル化によりポリフェノールの水溶性化を試みる。とともに、アミロイド線維形成阻害効果におよぼす影響について検討した。さらに、天然ジンセノサイドの阻害効果を比較検討することで、糖鎖導入の有用性について考察した。

【方法と結果】1) ルチン、フェルラ酸およびルチナーゼを酢酸バッファー (pH 5.0) に懸濁させ、40℃で 24 時間攪拌し反応させた後、新規フェルラ酸-ルチノース配糖体を HPLC により分取した。アミロイド線維形成の過程は、アミロイド線維と特異的に反応し蛍光を発するチオフラビン T を用いて追跡した。その結果、フェルラ酸の溶解性はルチノース導入により水溶性化した。アミロイド線維形成阻害効果は変化しなかった。2) 不溶性のプロトパナキサジオールと水溶性のジンセノサイド Rc (Fig. 1) についてアミロイド線維形成阻害効果を比較したところ、両者とも高い活性を示した。以上の結果から、糖鎖導入によるポリフェノールの水溶性化は、アルツハイマー型認知症の予防治療薬の開発において有効な手法であることが示唆された。

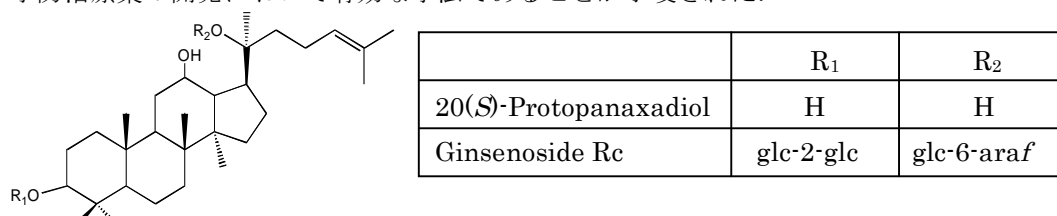


Fig. 1 : Chemical structure of 20(S)-protopanaxadiol and ginsenoside

そば主要アレルゲン Fag e 1 のリン酸化によるアレルゲン性の低減化

○葛西雅博, 片山 茂, 中村宗一郎 (信州大農)

【目的】そばアレルギー症状は重篤であり生命に関わるため、特に留意が必要なものとして我が国では特定原材料に指定されている。我々は、これまでにそば主要アレルゲンである 22 kDa のタンパク質 Fag e 1 に注目し、これを改変してアレルギー性を低減化させる手法の開発に取り組んできた。本研究では、リン酸塩以外の化学試薬を用いない安全な手法で Fag e 1 をリン酸化し、その抗原性の低減化効果を検討した。その結果、興味深い知見を得たので報告する。

【方法・結果】Fag e 1 および Fag e 1 のペプシン消化物 (図 1, 平均分子量 731, 以下 pFag e 1 と略す.) を 0.1M ピロリン酸溶液 (pH 4.0) に一旦溶解後、凍結乾燥によって得られた粉末を 85℃で 5 日間ドライヒーティングすることによってリン酸化を行った。5 名のそばアレルギー患者血清とリン酸化 Fag e 1 との反応性を ELISA 試験により調べたところ、抗原性にほとんど変化がないことが明らかにされた。一方 pFag e 1 においても大きな変化は見られなかったが、このペプチド画分をリン酸化したリン酸化 pFag e 1 においては、著しい抗原性の低下が示された。このことから Fag e 1 に対してはペプシン消化とリン酸化を組み合わせることによって、アレルギー性を低減化させることが示された。

NH₂ - GL - EQAF - CNL - KF - KQNVNRPS*RADVF - NPRAGRINT*VDS*NNL - PIL - EF - IQL - S*AQHVVV - YKNAIL - GPRWNL - NAHS*AL - YVT*RGEGRVQVVGDEGRS*VF - DDNVQRGQIL - VVPQGF - AVVL - KAGNEGL - EWVEL - KNDDNAIT*S*PIAGKT*S*VL - RAIPVEVL - ANS*YDIS*T*KEAF - RL - KNGRQEVEVF - RPF - QS*RDE - KERERF - S*IV - COOH

図 1 ペプシン処理後 Fag e 1 ペプチド画分, 残存するエピトープ部位 (下線部)

*は推定されるリン酸化箇所

遺伝性アミロイドーシス型シスタチンを用いた抗アミロイド作用を有する
リポフィル化フェノール化合物の分子設計
○前田悠樹, 近藤葉月, 片山 茂, 中村宗一郎 (信州大農)

【目的】

超高齢化社会と高度医療化社会の到来によってアルツハイマー病やプリオン病に代表されるアミロイドーシスが社会問題となっている。近年、カフェ酸やフェルラ酸等のフェノール酸類の抗アミロイドーシス性が注目されている。しかし、これらのフェノール酸は代謝され易く安定性に乏しいため、生体内での効果は不活化している可能性が高い。そこで本研究では、鎖長の異なる脂肪族アルコールを導入することによって、構造的に安定な抗アミロイド性フェノール化合物の分子デザインを試みた。

【方法と結果】

各種フェノール酸と鎖長の異なる脂肪族アルコールを *tert*-ブタノール中で *Candida antarctica* 由来リパーゼ (Novozym 435) 存在下で 60°C 1 週間インキュベーションした。精製は HPLC (カラム, Inertsil® ODS-3; 溶出条件, 2 mM H₂PO₄-methanol) で行った。合成効率は 3%~5% であった。得られた生成物のラッカーゼ, ヒト由来リパーゼ, 熱及び酸に対する安定性を調べた結果, リポフィル化の有効性が示された。代表的なアミロイド形成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 を用いて抗アミロイドーシス性を調べたところ, オクチルエステル (Fig. 1②) は, ブチルエステル (Fig. 1①) に対してより高い活性を有することが明らかとなった。本研究によって, 炭化水素鎖導入によって疎水性度を上昇させることはフェノール酸の抗アミロイド作用の改善だけでなく, 構造的に安定なドラッグデザインにおいて重要であることが示された。

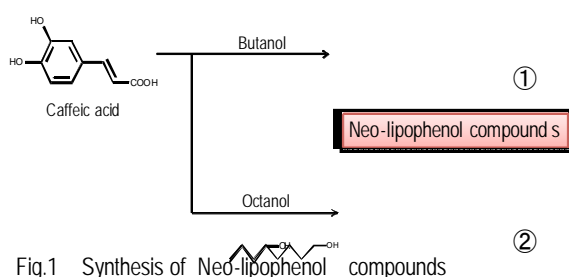


Fig.1 Synthesis of Neo-lipophenol compounds

腸上皮細胞による抗原タンパク質の取り込みと輸送
○秋山友香, 松原 毅, 灘野大太, 松田 幹 (名大院生命農・応用分子生命科)

【目的】

食物タンパク質の一部は未分解のまま取り込まれ, 免疫系を刺激し, 食物アレルギーを誘発したり免疫寛容を誘導すると考えられている。しかし, その機構については明らかにされていない。卵アレルギーの原因タンパク質であるオボアルブミン (OVA), オボムコイド (OM) およびリゾチム (LY) を用いて, タンパク質の構造と, 腸上皮細胞への取り込み, および細胞内輸送との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

多孔性膜上でヒト腸上皮様細胞 Caco-2 を培養して腸上皮様細胞層を構築した。この *in vitro* モデル実験系を用いて, 3 種のタンパク質 (OVA, OM, LY) を同時に培地に添加し, 上皮様細胞層を横切る輸送を, 高感度定量分析系により定量的に解析した。その結果, 頂端側から基底側方向への輸送がその逆向き輸送より顕著に優勢であることが, また OVA および LY の移行量は OM の約 2 倍であることが明らかとなり, 腸上皮細胞層移行量はタンパク質によって異なることが示唆された。このような移行量の差異は, リソソームプロテアーゼであるカテプシン B, C による *in vitro* 消化耐性とは必ずしも対応しなかった。さらに, これらのタンパク質を上皮様細胞層頂端側へ添加してから 5 時間後, 細胞層の蛍光免疫染色を行い, 細胞内に取り込まれたタンパク質を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果, OVA や OM に比べ, LY が細胞内に強く検出され, タンパク質による細胞内局在の違いが観察された。以上の結果から, これらのタンパク質は飲作用により同時に細胞内に取り込まれたと推定され, タンパク質の種類によって, 細胞内分布と細胞層を横切る輸送量が異なることが示唆された。

ノロウイルスの生物濃縮に関わるアサリ中腸腺糖タンパク質の探索

○北川 大地¹, 浅野 有香¹, 村上 耕介¹,
岡 智一郎², 片山 和彦², 灘野 大太¹, 松田 幹¹
(¹名大院生命農・応用分子生命科, ²国立感染研ウイルス第二)

【目的】

ウイルス感染性胃腸炎の主な原因病原体であるノロウイルスは、アサリ等の二枚貝類が海水を濾過摂食する際に、海水中にわずかに存在するウイルスが消化器官である中腸腺に蓄積、濃縮される事（生物濃縮）が知られている。しかし、これに関与するウイルス結合分子は同定されていない。本研究ではノロウイルスの生物濃縮に関与するウイルス結合分子の探索と同定を目的とした。

【方法と結果】

ヒト組織血液型糖鎖との結合が示唆されているノロウイルス Ueno-7k 株の外殻タンパク質を昆虫細胞で発現させて調製した virus-like particle (VLPs)を用いて、アサリ中腸腺における VLPs 結合分子を特異抗体とレクチンによる組織染色およびウェスタンブロット法により探索した。アサリの中腸腺を摘出し、固定した後、凍結切片を作製し、組織内の糖鎖分布をレクチンおよび抗体染色して、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、GlcNAc 特異的 WGA レクチン結合糖鎖が二次導管に局在する事、GalNAc 特異的 RCA I レクチン結合糖鎖が胃の粘膜上皮および二次導管に局在する事、さらにヒト H 型血液型糖鎖特異抗体と結合する糖鎖が一次導管に局在する事が明らかとなった。次に、アサリ中腸腺組織を超音波破碎した後、超遠心分離法により細胞膜画分を調製した。これを電気泳動の後 PVDF 膜へ転写し、VLPs と反応させた後、VLPs が結合した分子を免疫染色により検出した。その結果、分子量30-40Kに複数の VLPs が結合する分子が存在し、それらの一部は WGA および RCA1 レクチン陽性のバンドと一致する事が明らかになった。

日本農芸化学会中部支部 平成 21 年度役員等名簿

(平成 21 年 10 月 3 日現在 敬称略)

支部長・理事

小副 哲夫 名古屋大学大学院生命農学
 副支部長
 牧 正敏 名古屋大学大学院生命農学
 山口庄太郎 天野エンザイム(株)
 庶務幹事
 浅川 晋 名古屋大学大学院生命農学
 松林 嘉克 名古屋大学大学院生命農学
 会計幹事
 柴田 貴広 名古屋大学大学院生命農学
 監事
 山上 圭吾 (株)ミツカングループ本社
 前島 正義 名古屋大学大学院生命農学

評議員 (50 音順)

赤池 嘉彦 (株)サンピン 素材開発課
 浅野 泰久 富山県立大学生物工学研究セ
 (本部評議員, 役員選考委員会)
 飯島 信司 名古屋大学大学院工学
 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 洋祐 (株)J-オイルミルズ
 今井 邦雄 三重大学大学院生物資源
 (本部評議員)
 岩崎 行玄 福井県立大学生物資源学部
 (本部評議員)
 氏田 稔 名城大学農学部
 碓氷 泰市 静岡大学農学部
 (本部評議員)
 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 物産フードサイエンス(株)
 榎本 俊樹 石川県立大学生物資源環境学部
 遠藤 克秋 竹本油脂(株)
 大澤 俊彦 名古屋大学大学院生命農学
 大塚 正盛 サンエイ糖化(株)研究開発部
 奥村 克純 三重大学大学院生物資源
 小倉 光雄 東海大学海洋研究所
 小鹿 一 名古屋大学大学院生命農学
 (本部理事)
 岡戸 信夫 新日本化学工業(株)
 奥野 信二 (株)宮崎本店
 尾仲 宏康 富山県立大学工学部
 片桐 孝夫 (株)ポッカコーポレーション
 片山 新太 名古屋大学エコトピア科学研究所
 片山 正人 産業技術総合研究所中部センター
 加藤 康夫 富山県立大学工学部
 加藤 文雄 愛知県産業技術研究所
 食品工業技術センター
 加藤化学(株)技術部
 金本 仁 焼津水産化学工業(株)
 川口 光朗 東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所
 川上 文清 豊橋技術科学大学
 菊池 洋 名古屋大学大学院生命農学
 北島 健 福井県立大学生物資源学部
 木元 久 静岡県立大学食品栄養科学部
 熊澤 茂則 (連絡評議員)
 倉根隆一郎 中部大学応用生物学部
 黒川 洋一 福井県立大学生物資源学部
 (連絡評議員)
 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, 授賞選考委員会,
 役員選考委員会)
 栗冠 和郎 三重大学大学院生物資源
 (英文誌編集委員会)
 佐野 元昭 金沢工大ゲノム生物工学研究所
 佐野 佳之 名糖産業(株)食品開発部
 下位 香代子 静岡県立大学環境科学研究所
 下村 吉治 名古屋大学大学院生命農学
 (英文誌編集委員会)
 レカ. ラジュ. ジュネジャ 太陽化学(株) 総合研究所

朱 政治 太陽化学(株) 総合研究所
 (連絡評議員, 本部評議員)
 杉山 公男 静岡大学農学部
 杉山 雅彦 フジパン(株) 本社生産部
 鈴木 隆元 石川県立大学生物資源環境学部
 鈴木 文昭 岐阜大学応用生物科学部
 (本部評議員)
 関口 順一 信州大学大学院総合工学系
 千 菊夫 信州大学農学部
 竹内 俊彦 キリンビール(株)名古屋工場
 竹尾 忠一 伊藤園(株) 中央研究所
 田中 晶善 三重大学大学院生物資源
 田原 康孝 静岡大学農学部
 玉置 真司 敷島スターチ(株) 技術開発部
 田村 廣人 名城大学農学部
 轟 泰司 静岡大学農学部
 (連絡評議員)
 戸倉 政雄 アサヒビール(株) 名古屋工場
 長岡 利 岐阜大学応用生物科学部
 (連絡評議員, 本部評議員,
 英文誌編集委員会)
 中川 寅 岐阜大学応用生物科学部
 中野 秀雄 名古屋大学大学院生命農学
 (本部評議員)
 中村 洵 イチビキ(株) 技術開発センター
 中村宗一郎 信州大学農学部
 中山 俊裕 (株)岐阜セラック製造所技術部
 南条 文雄 三井農林(株) 食品総合研究所
 (本部評議員)
 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
 芳賀 聖一 名城大学農学部
 橋本 正治 富山県立大学工学部
 早川 享志 岐阜大学応用生物科学部
 (本部評議員)
 原 脩 名城大学薬学部
 久松 眞 三重大学大学院生物資源
 日野 資弘 アステラス製薬(株) 生物工学研
 平井 浩文 静岡大学農学部
 廣田 満 信州大学農学部
 (本部評議員)
 深田 理 ヤマモリ(株)
 藤田 智之 信州大学大学院農学
 二又 克之 科研製薬(株) 生産技術研究所
 星野 一宏 富山大学大学院理工学研究部
 堀尾 文彦 名古屋大学大学院生命農学
 (英文誌編集委員会)
 本多 裕之 名古屋大学大学院工学
 前島 正義 名古屋大学大学院生命農学
 (本部評議員)
 真壁 秀文 信州大学大学院農学
 間瀬 民生 相山女学園大学生生活科学部
 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)
 三島 敏 アピ(株)
 (本部評議員)
 水野 猛 名古屋大学大学院生命農学
 村澤 久司 旭松食品(株)
 森上 敦 名城大学農学部
 (連絡評議員)
 森山 龍一 中部大学応用生物学部
 山内 亮 岐阜大学応用生物科学部
 山上 圭吾 (株)ミツカングループ本社
 山田 康弘 カネハツ食品(株) 技術部
 山本 幹男 日本食品化工(株) 研究所
 吉村 徹 名古屋大学大学院生命農学
 (広報委員会)
 米田 祐康 (株)ニッポンジーン
 渡辺 達夫 静岡県立大学食品栄養科学部
 (英文誌編集委員会)
 渡邊 修治 静岡大学創造科学技術大学院

日本農芸化学会中部支部 維持会員企業御芳名（五十音順）

アサヒビール（株）名古屋工場	大和製罐（株）清水研究所
旭松食品（株）食品研究所	竹本油脂（株）情報調査室
アステラス製薬（株）CSR部	東海物産（株）食品研究所
アピ（株）長良川リサーチセンター	東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所
天野エンザイム（株）岐阜研究所	中日本氷糖（株）
イチビキ（株）研究開発部	名古屋製酪（株）
（株）伊藤園中央研究所	物産フードサイエンス（株）
伊藤忠製糖（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	フジ日本製糖（株）
（株）岐阜セラック製造所	フジパン（株）本社生産部
キリンビール（株）名古屋工場	（株）ポッカコーポレーション
金印（株）	三井農林（株）食品総合研究所
サンエイ糖化（株）	（株）ミツカングループ本社
サンジルシ醸造（株）	（株）宮崎本店
（株）サンビシ	名糖産業（株）
（株）三和化学研究所三重研究所	盛田（株）小鈴谷工場
（株）J-オイルミルズ	焼津水産化学工業（株）
敷島スターチ（株）	ヤマモリ（株）
新日本化学工業（株）	養命酒製造（株）中央研究所
太陽化学（株）研究所	