

日本農芸化学会東北支部 第 148 回大会

プログラム・講演要旨集
(2013)

日時：平成 25 年 10 月 26 日（土）

会場：岩手大学農学部

日本農芸化学会東北支部

〒981-8555

仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

東北大学大学院農学研究科内

日本農芸化学会東北支部

第 148 回大会

日時：平成 25 年 10 月 26 日（土）

会場：岩手大学農学部

世話人：磯部 公安

10:00～11:48 一般演題

[A 会場（2 番講義室）、B 会場（7 番講義室）、C 会場（ぼらんホール）]

12:00～12:50 支部参与会

第一会議室

12:50～13:10 支部活動報告会

C 会場（ぼらんホール）

13:10～13:20 支部奨励賞授賞式

C 会場（ぼらんホール）

13:20～14:00 支部奨励賞受賞記念講演

C 会場（ぼらんホール）

座長 西森 克彦（支部長）

「昆虫と植物の防御に関わる化学因子の化学生態学」

（秋田県立大・生物資源科学） 野下 浩二

「クロイツカイメンおよびホタテ貝による下痢性貝毒の蓄積機構」

（東北大院・農） 此木 敬一

14:10～14:50 特別講演 1

C 会場（ぼらんホール）

座長 磯部 公安（世話人）

「酵素・活性・分子 ―未知の酵素を表舞台に引っ張り出す―」

（富山県立大学） 浅野 泰久

15:00～17:00 一般演題

[A 会場（2 番講義室）、B 会場（7 番講義室）、C 会場（ぼらんホール）]

17:10～18:00 特別講演 2

C 会場（ぼらんホール）

座長 宮澤 陽夫（元支部長）

「腸管の炎症と食品因子によるその制御」

（日本農芸化学会会長） 清水 誠

18:00～19:30 懇親会（農学部生協食堂）

交通案内

盛岡駅⇒会場（岩手大学農学部）

[徒歩]

盛岡駅北口から徒歩約 25 分

[バス]

バス利用（盛岡駅前バスターミナル 11 番のりば）

・岩手県交通バス 307 系統 駅上田線「松園バスターミナル行き」

311 系統 駅桜台団地線「桜台団地行き」

「岩手大学前」下車（210 円）

[タクシー]

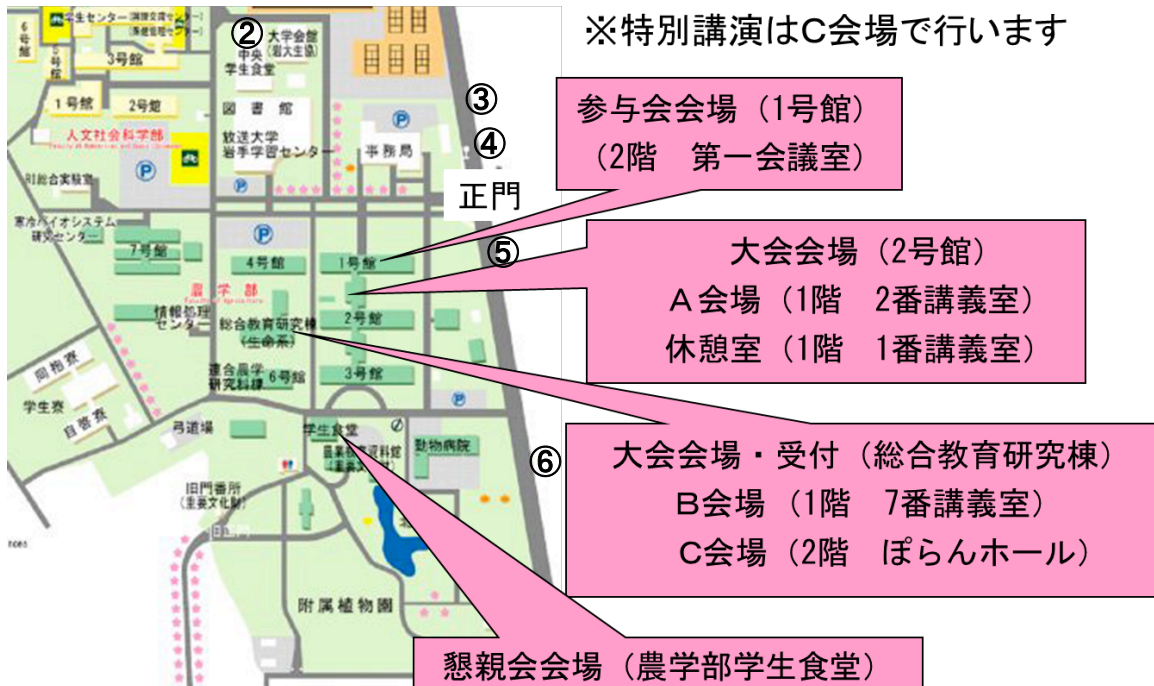
盛岡駅から約 2km 約 10 分



会場案内

工学部

①



- ① ローソン
- ② 生協中央食堂
- ③ ローソン
- ④ とらさん (ラーメン)
- ⑤ セブンイレブン
- ⑥ 明月館 (焼肉・冷麺)

一般講演

タイムテーブル

A会場

座長 橋本 勝 (弘前大)

A01 10:00-10:12 細胞毒性を有する酸化型不飽和脂肪酸ラクトン topsentolide C₂ の合成研究
○十和田諒、倉科友輔、桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)

A02 10:12-10:24 Nigriganoside 類の絶対立体配置決定にむけた合成研究
○倉科友輔、十和田諒、桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)

A03 10:24-10:36 抗生物質 enacyloxin 類の合成研究
○清田洋正、五十嵐渉、古川博之、齋藤亜紀、星川浩章、山田てい子
桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)

座長 今野博行 (山形大)

A04 10:36-10:48 norleptosphol C の全合成研究
○村井嘉晃、高橋萌子、坂元君年、橋本勝 (弘前大・農学生命)

A05 10:48-11:00 *Trichoderma* sp. 1212-03 の生産する新規物質の構造決定
○廣瀬あかね¹、殿内暁夫¹、根平達夫²、橋本勝¹ (1 弘前大・農学生命、
2 広島大・総合科学)

A06 11:00-11:12 旧 Fengycin 構造の合成研究
○六車美沙、本間美保、橋本勝 (弘前大・農生)

座長 野下浩二 (秋田県立大)

A07 11:12-11:24 CAF-603 関連物質の絶対配置、及び抗菌活性¹⁾
○橋本勝¹、安村良子¹、殿内暁夫¹、根平達夫²、(1 弘前大・農学生命、
2 広島大・総合科学)

A08 11:24-11:36 spiroleptosphol 類の全合成研究
○高橋萌子、村井嘉晃、橋本勝、坂本君年 (弘前大・農生)

A09 11:36-11:48 抗 HIV 活性を有する Homophymine A の合成研究：構成する異常アミノ
酸の合成
○東海林由憲、米田翔、武田祥、菊池真理、今野博行 (山形大院理工・
バイオ化学)

— 昼食・支部参加会、授賞式・記念講演等 —

座長 清田洋正 (東北大)

A10 15:00-15:12 カリペルチン B の合成研究：ジメチルピログルタミン酸 4 種のジアステ
レオマーの合成とその立体化学について
菊池真理、○今野博行 (山形大院理工・バイオ化学)

A11 15:12-15:24 システインプロテアーゼ阻害剤の創製研究
○齊藤洋太、菊池真理、高沼大樹、若林雅貴、今野博行（山形大院理工・バイオ化学）

A12 15:24-15:36 麻痺性貝毒の生合成中間体の探索
○吉岡廉平¹、土屋成輝¹、長由扶子¹、此木敬一¹、大島泰克²、山下まり¹（東北大院・農¹、生命科学²）

座長 坂本君年（弘前大）

A13 15:36-15:48 Na_v安定発現系の構築と TTX 関連化合物の結合性評価
○千葉雪絵¹、長由扶子¹、安立昌篤²、榊原良²、所聖太²、今津拓也²、磯部稔³、西川俊夫²、山下まり¹、此木敬一¹（¹東北大院・農、²名大院・生命農、³台湾国立清華大）

A14 15:48-16:00 抗フコキサンチンポリクローナル抗体の作製
○上野 美紗、野村 駿、此木 敬一、長 由扶子、山下 まり（東北大院農）

A15 16:00-16:12 ヒナタイノコズチ葉から放出される炭素数6の揮発性有機化合物の同定
○田母神繁、野下浩二、阿部誠（秋田県立大学・生物資源科学部）

座長 此木敬一（東北大）

A16 16:12-16:24 ナラ枯れの倒木より単離した糸状菌 TT-10 株が生産するナラ菌生育阻害活性物質について
○高野智也、小関卓也、小山浩正、塩野義人（山形大・農）

A17 16:24-16:36 植物内生糸状菌由来の抗がん物質 allantopyrone A の標的分子の探索
○上杉祥太¹、山下哲郎¹、塩野義人²、近藤恭光³、長田裕之³、木村賢一¹（¹岩手大院・連合農、²山形大・農、³理研・長田抗生物質）

A18 16:36-16:48 イネ葉身に存在するファン型ケイ酸体中の有機物の探索
○大澤章良、吉澤結子、岡野桂樹、尾崎紀昭（秋田県立大・生物資源）

A19 16:48-17:00 電気インピーダンス法を利用した塩の浸透挙動測定
○名古屋志、築館亜由美、秋山美展、石川匡子（秋田県立大学大学院、生物資源研究科）

B 会場

座長 長澤 孝志 (岩手大)

- B01 10:00-10:12 血漿過酸化リン脂質の異性体解析による生体酸化ストレスの評価
○加藤俊治¹, 仲川清隆¹, 浅井明², 及川真一², 宮澤陽夫^{1,3} (¹ 東北大院・農・機能分子解析, ² 日医大・内分泌代謝, ³ 東北大未来科学技術共同研究センター)
- B02 10:12-10:24 メタボリックシンドロームと生体脂質過酸化：乳児期マウスを用いた解析
○伊藤隼哉¹, 加藤俊治¹, 木村ふみ子¹, 仲川清隆¹, 宮澤陽夫^{1,2}
(¹ 東北大院・農・機能分子解析学, ² 東北大学未来科学技術共同研究センター)
- B03 10:24-10:36 ルテオリン (パプリカ葉フラボノイド) の分析条件検討と体内吸収動態評価
○近藤桃子¹, 庄子真樹², 仲川清隆¹, 津志田藤二郎³, 宮澤陽夫¹
(1. 東北大院農機能分子解析学 2. 宮城県産業技術総合センター 3. 宮城大学 食産業学部)

座長 伊藤芳明 (岩手大)

- B04 10:36-10:48 イネ品種日本晴を用いた新規ビタミンE合成酵素の解明
○阿部 伎¹, 木村映一², 吉田泰二², 木村俊之³, 村田和優⁴, 仲川清隆¹, 宮澤陽夫^{1,5} (¹ 東北大院農・機能分子解析学, ² 東北農研セ, ³ 中央農研セ, ⁴ 富山農総技セ, ⁵ 東北大未来科学技術共同研究セ)
- B05 10:48-11:00 過酸化リン脂質 (PCOOH) の細胞内代謝と還元酵素との関係性
○鈴木 優里¹・加藤 俊治¹・仲川 清隆¹・宮澤陽夫^{1,2}
(¹ 東北大院農・機能分子解析学, ² 東北大未来科学技術共同研究センター)
- B06 11:00-11:12 ラットおよび細胞を用いたトコトリエノールの抗肥満機能の解析
○林真貴子¹, Gregor Carpentero Burdeos¹, 木村ふみ子¹, 仲川清隆¹, 宮澤陽夫^{1,2} (¹ 東北大農・機能分子解析学・² 東北大未来科学技術共同研究センター)

座長 都築 毅 (東北大)

- B07 11:12-11:24 クルクミングルクロン酸抱合体の生理活性とクルクミンナノ粒子作製
○張替 敬裕¹, 宮澤大樹¹, 庄司 求¹, 仲川 清隆¹, 藤井 智幸², 宮澤 陽夫^{1,3} (¹ 東北大農・機能分子解析学, ² 東北大農・テラヘルツ, ³ 東北大未来科学技術共同研究センター)

B08 11:24-11:36 ゼラチンの酵素架橋を利用した粉末魚油の開発
○半澤康彦¹、青木茂太¹、阿久津光紹²、松本俊介²、仲川清隆¹、
宮澤陽夫^{1,3} (¹東北大・農・機能分子解析、²青葉化成(株)、³東北大・
未来科学技術共同研究センター)

B09 11:36-11:48 MS/MS によるアラキドン酸型 PCOOH 位置異性体の定量分析
○水落俊介¹、加藤俊治¹、仲川清隆¹、宮澤陽夫^{1,2} (¹東北大院農・機
能分子解析学、²東北大未来科学技術共同研究センター)

— 昼食・支部参与会、授賞式・記念講演等 —

座長 仲川清隆 (東北大)

B10 15:00-15:12 ジペプチドの苦味感受性の個人差をもたらす苦味レセプターの一塩基
多型
○齋藤弘貴、沼倉悠紀子、磯野邦夫、安達良太、入部マイ子、
後藤知子、白川仁、駒井三千夫 (東北大学大学院農学研究科・栄養
学分野)

B11 15:12-15:24 妊娠期における亜鉛欠乏が成熟後のラットの糖代謝に及ぼす影響
○西村 沙奈恵、後藤 知子、白川 仁、駒井 三千夫(東北大・院農・栄養)

B12 15:24-15:36 低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギー
および脂質代謝に与える影響 -C57BL/6J マウス 第2報-
一井洋和、井上奈穂、○池田郁男 (東北大院・農・食品化学)

座長 西向めぐみ (岩手大)

B13 15:36-15:48 長期的な日本食摂取がマウスの健康維持に与える影響
○本間太郎¹、治部祐里²、川上祐生²、都築 毅¹、仲川清隆¹、
宮澤陽夫¹ (¹東北大・院・農、²岡山県大・保福・栄養)

B14 15:48-16:00 日本食が授乳期の母親を介して子供の健康に与える影響
○畠山雄有¹、北野泰奈¹、本間太郎¹、治部祐里²、川上祐生²、
都築毅¹ (¹東北大院・農、²岡山県大・保福)

B15 16:00-16:12 食品レクチンが腸管輸送機能に及ぼす影響
○根本諒、山本進太郎、富山舞、永沼孝子、小川智久、村本光二
(東北大院生命科)

座長 白川 仁 (東北大)

B16 16:12-16:24 バオバブ果実繊維抽出物の AGE 生成に及ぼす影響
○大友陽夫¹、伊藤芳明¹、相澤恭²、長澤孝志¹ (¹岩手大学・院農・応
用生物化学、東洋精糖株式会社研究開発部)

- B17 16:24-16:36 Entech7200-GC×GC-TOF-MS を用いた三陸産ワカメの香気物質探索
○加藤恭子、小枝まどか、中野晴日、小野久弥、宮崎雅雄、山下哲郎（岩手大）
- B18 16:36-16:48 におい識別装置 FF-2020 による三陸産ワカメのにおい分析と評価
○小枝まどか、加藤恭子、小野久弥、宮崎雅雄、山下哲郎（岩手大学）
- B19 16:48-17:00 米麴を利用したグルテンフリー米粉パンの膨らみ向上のメカニズム
○濱田茂樹^{1,2}、鈴木啓太郎²、鈴木保宏²（弘前大・農生¹、（独）農研機構・作物研²）

C 会場

座長 伊藤菊一 (岩手大)

- C01 10:00-10:12 ショ糖による翻訳抑制を受ける bZIP 型転写因子遺伝子の改変による高ショ糖植物の分子育種
○田中俊、タロール・スニールクマール、朱旭君、
トーマス・ベルベリッヒ¹、草野友延 (東北大・院生命、¹Biodiversity and Climate Research Center)
- C02 10:12-10:24 シロイヌナズナのエコタイプ間に見られる重金属感受性の違いとヒ酸反応性決定遺伝子マッピングの試み
○木幡光、井上雅貴、國廣俊太、松田大樹、藤井伸治、
ショハブ・ユセフィアン¹、高橋秀幸、草野友延(東北大・院・生命、¹秋田県立大・生物資源)
- C03 10:24-10:36 ポリアミン酸化酵素 5 の機能欠損がシロイヌナズナの生育へ及ぼす影響
○金東煜、村山千尋、新津勝¹、トーマス・ベルベリッヒ²、草野友延
(東北大・院生命、¹城西大・薬、²Biodiversity and Climate Research Center)

座長 大谷典正 (山形大)

- C04 10:36-10:48 *Bacillus circulans* KA-304 由来 α -1,3-グルカナーゼの基質結合ドメイン
○矢野 成和¹, Suyotha Wasana², 立木 隆², 若山 守² (¹山形大院・バイオ化工,²立命館大院・生命・生工)
- C05 10:48-11:00 *Aspergillus oryzae* 由来 GH78 ファミリーの α -L-ラムノシダーゼについて
○室岡和宏、塩野義人、小関卓也 (山形大学・農学部)
- C06 11:00-11:12 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼの基質特異性の解析
○水野聖之、塩野義人、小関卓也 (山形大学・農学部)

座長 米山 裕 (東北大)

- C07 11:12-11:24 プラスミド伝達性クラス C β -ラクタマーゼ MOX-1 の X 線結晶解析
○小栗拓馬 (山形大・理)、古山雄光 (山大・理工学研究科)、
石井良一 (東邦大・医)、井深章子 (山形大・理)
- C08 11:24-11:36 亜鉛要求型メタロ- β -ラクタマーゼ IMP-18 の結晶構造解析
○古山雄光¹, 石井良和², 大谷典正³, 井深章子³
(¹山形大院理工,²東邦大医,³山形大理)

- C09 11:36-11:48 *Rhodobacter capsulatus* と *Rhodospirillum rubrum* 間でのキメラ型コハク酸 - ユビキノン還元酵素の作製
福士実咲¹、柴谷恵太¹、Hendri Aldrat²、北潔²、Fevzi Daldal³、
○坂元君年¹ (¹弘大・農生・分子生命、²東大院・医・生物医化学、³Dept. of Biol., Univ. Pennsylvania)

— 昼食・支部参与会、授賞式・記念講演等 —

座長 宮崎雅雄 (岩手大)

- C10 15:00-15:12 マウス歯牙形成における LGR4 の機能解析
○山上友希子、大山一徳、毛利泰彰、西森克彦 (東北大学農学研究科分子生物学分野)
- C11 15:12-15:24 乳腺上皮細胞における Lgr4 の機能解析
○霜田貴宏、大山一徳、毛利泰彰、西森克彦 (東北大学大学院 農学研究科応用生命科学専攻 分子生物学分野)
- C12 15:24-15:36 大腸菌プロテアーゼ BepA は外膜タンパク質の組立と分解を促進する
○成田新一郎¹、舛井千草²、鈴木健裕³、堂前直³、秋山芳展²
(¹盛岡大・栄養科学、²京大・ウイルス研、³理研・グローバル研究クラスター)

座長 矢野成和 (山形大)

- C13 15:36-15:48 バイオマスを原料とした *cis, cis*-ムコン酸のバイオ合成効率化に向けた *protocatechuate decarboxylase* 反応の強化
○園木和典、諸岡深雪 (弘前大・農学生命)
- C14 15:48-16:00 大腸菌は D-アラニン飢餓ストレスにより積極的に死滅する
○梅宮真知、佐藤一樹、大内寿一、堀初弘、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕 (東北大学院農学研究科・動物微生物学分野)
- C15 16:00-16:12 大腸菌の新規アラニン排出輸送体 *AlaE* の活性評価系の構築及び活性評価
○金 世怜、堀 初弘、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大・院・農)

座長 草野友延 (東北大)

- C16 16:12-16:24 大腸菌のアラニン分泌に及ぼすアミノトランスフェラーゼ過剰発現の影響
○勝部 哲、佐藤一樹、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕
(東北大学院農学研究科・動物微生物学分野)
- C17 16:24-16:36 チチタケ由来 *cis*-prenyltransferase のクローニングと機能解析
○家田偉史¹、中村武志²、大谷典正² (¹山形大学大学院・理工学研究科、²山形大学・理学部)

- C18 16:36-16:48 3-desmethyl アリル性基質によるウンデカプレニルニリン酸合成酵素の阻害
○門崎雅史¹、佐藤華奈¹、中村武志²、大谷典正² (¹山形大学大学院理工学研究科、²山形大学理学部)
- C19 16:48-17:00 ヨーグルト乳酸菌の発酵と共生関係における NADH オキシダーゼの役割
○山本裕司、山下瑞穂、岡本ほさな、川嶋紘子¹⁾、堀内啓史¹⁾、福井宗徳¹⁾、佐々木泰子²⁾、向井孝夫(北里大・獣医、(株) 明治・食品開発研¹⁾、明治大・農²⁾)

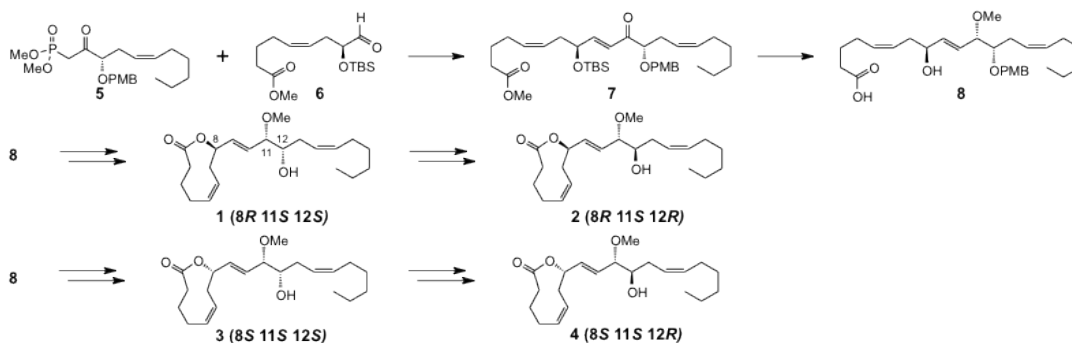
一般講演

A 会場

A01 細胞毒性を有する酸化型不飽和脂肪酸ラクトン topsentolide C₂の合成研究

○十和田諒、倉科友輔、桑原重文
(東北大院農・生物産業創成)

[目的] topsentolide C₂は2006年にJungらにより海綿 *Topsentia* sp. より単離された、9員環ラク톤を有する不飽和脂肪酸であり、そのC-8、11位の絶対立体配置は未決定である¹⁾。本研究では、4種のジアステレオマーの合成によりその絶対立体配置を決定することを目的とした。
[方法・結果]phosphonate **5**とaldehyde **6**とのHWE反応により**7**とし、数工程の変換を経て共通中間体**8**を得た。**8**を光延法、山口法でラクトン化した後に脱保護することにより**1**、**3**を合成し、それぞれのC-12位の水酸基を光延反転することにより**2**、**4**を得た。得られた4つのジアステレオマーのNMRデータから、天然物は**8R**、**11S**、**12S**体(**1**)であると決定した。



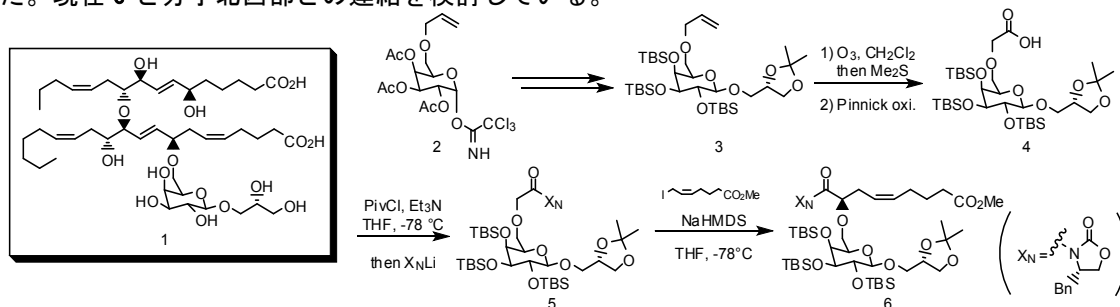
1)H. Jung *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 567-571.

A02 Nigricanoside 類の絶対立体配置決定にむけた合成研究

○倉科友輔、十和田諒、桑原重文 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】 Nigricanoside 類は緑藻よりジメチルエステル形で単離された化合物であり、ヒト乳がん細胞 MCF-7 に対し極めて強力な抗有糸分裂活性を有する¹⁾。我々は Nigricanoside A の絶対立体配置を**1**であると推定し、合成的手法を用いて立体配置の決定を行う。

【方法・結果】 既知のイミデート**2**よりグリコシル化および保護基の変換を経て**3**を得た。**3**のアリル基に対して酸化的開裂を行うことでグリコール酸誘導体**4**とした後、オキサゾリジノン**5**へと導いた。**5**に対して不斉アルキル化を行い、生じたジアステレオマーを分離し**6**を得た。現在**6**と分子西北部との連結を検討している。



1) Williams, D.E. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 5822-5823.

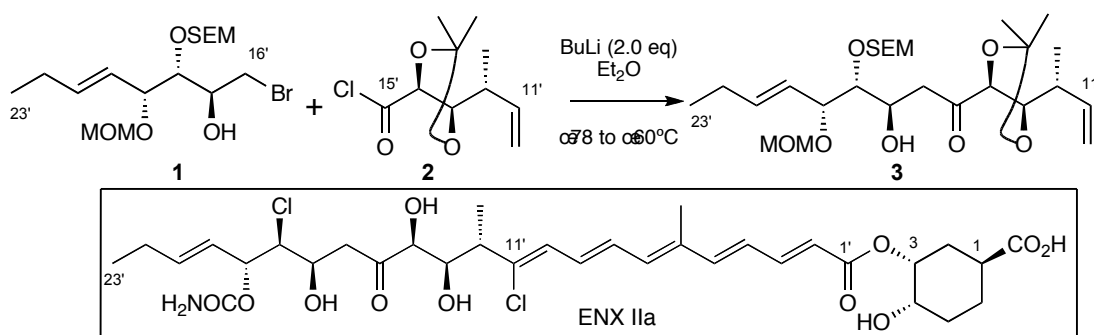
A03

抗生物質 enacyloxin 類の合成研究

○清田洋正、五十嵐渉、古川博之、齋藤亜紀、星川浩章、山田てい子
桑原重文（東北大院農・生物産業創成）

【目的】 Enacyloxin (ENX) 類は、赤パンカビの培養上清で培養した *Fraterulia* sp. W-315 株の生産するポリエン系抗生物質であり [1]、当研究室で全立体構造を決定した [2]。抗グラム陽性・陰性細菌活性を示し、その作用機構はリボソーム elongation factor-Tu に作用するタンパク質合成阻害によることが知られている [3]。ENX の創薬への展開を目指して合成研究を行っている。

【経過】 ブロモヒドリン 1 [4] から発生させたジアニオンと酸クロリド 2 とのカップリングにより、ENX の C11'-C23' 部位に相当するケトン 3 の合成に成功した。



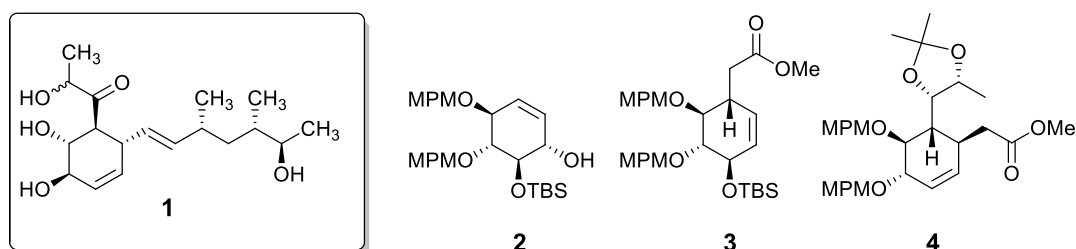
[1] T. Watanabe *et al.*, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1141. [2] H. Furukawa *et al.*, *Chem. Biodivers.* **2007**, *7*, 1601. [3] A.M. Zuurmond *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 627. [4] W. Igarashi *et al.*, *Heterocycl. Commun.* **2011**, *17*, 7.

A04

norleptoshol C の全合成研究

○村井嘉晃、高橋萌子、坂元君年、橋本勝（弘前大・農学生命）

当研究室で *Leptosphaeria doliolum* から単離した norleptoshol C (1) は、2-hydroxypropanone 部分の立体化学が未決定である。合成によりこれを決定すべく、また類縁体を提供すべく合成研究を行っている。D-グルコースから誘導した 2 に、Johnson-Claisen 転位を行い、立体選択的に C2 ユニットのを導入し 3 とした。次に、立体選択的に官能基を整え、アセトニドとして保護した後、シリル基を除去、二度目の転位反応をほぼ同一条件で行うことにより、側鎖部の手掛かりを立体選択的に導入した。4 より側鎖部をオレフィン化で導入などにより *ent*-norleptoshol C (*ent*-1) の合成を目指している。



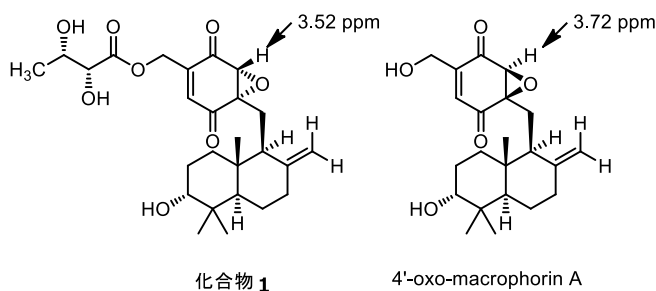
A05

Trichoderma sp. 1212-03 の生産する新規物質の構造決定

○廣瀬あかね¹、殿内暁夫¹、根平達夫²、橋本勝¹

(1 弘前大・農学生命、2 広島大・総合科学)

我々は、白神山地微生物から新規生理活性化合物の探索研究を行っている。弘前大学白神自然観察園の土壌から単離した *Trichoderma* sp. 1212-03 に強い抗菌活性を見出し、その培養液から化合物 **1** を見出した。これらの分子式は ESITOFMS の精密質量からそれぞれ $C_{26}H_{36}O_8$ と決定した。平面及び相対構造は NMR スペクトルの解析により、4'-oxomacrophorin A¹ のデカリン部分にアキシアル水酸基を有する且つ、エポキシベンゾキノンのジアステレオマーと決定した。ジヒドロブタン酸部分のジヒドロキシ部はトレオ配置であり末端メチル基の ¹³C NMR の化学シフト (19.5 ppm) から、その絶対配置は対応するジベンゾアートの ECD スペクトルから決定した。大会では他の類縁体を含めて報告する。



1) Ishibashi, M.; Sassa, T. *J. Nat. Prod.* 2001, **64**, 1234.

A06

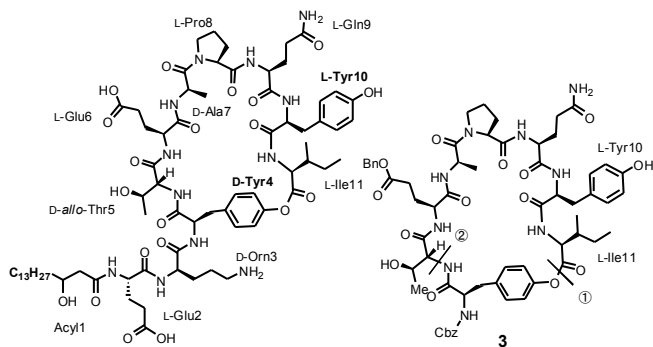
旧 Fengycin 構造の合成研究

○六車美沙、本間美保、橋本勝 (弘前大・農生)

強い抗菌活性のある Fengycin と Plipastatin はそれぞれ別物質と考えられてきたが、最近、我々は、これらは同一物質であり、plipastatin の構造に収斂されると報告した¹。本結果を最終的に確認することを目的に、旧 Fengycin 構造 (2) の合成を計画した。

Ile11 の C 側に、Tyr10 を①のエステル結合させた後、②のアミド結合で環化させることにより、3 の合成に成功した。しかし、このルートでは、①の結合を形成する際、Ile11 がエピメリ化してしまうことが判明した。

本大会では、この問題の解決に向けた新ルート開発、3 への環化反応について報告する。



plipastatin = fengycin (1): L-Tyr4-D-Tyr10 isomer
old fengycin (2): D-Tyr4-L-Tyr10 isomer

1) Honma, Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 3793 (2012).

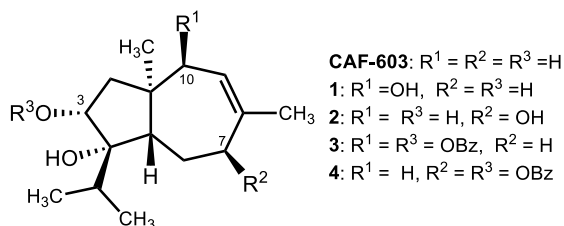
A07

CAF-603 関連物質の絶対配置、及び抗菌活性¹⁾

○橋本勝¹、安村良子¹、殿内暁夫¹、根平達夫²、

(1 弘前大・農学生命、2 広島大・総合科学)

我々は、弘前大学白神自然観察園の土壌から単離した *Trichoderma crassum* から CAF-603 新規誘導体 **1, 2** を見出し、その相対構造を昨年の本支部大会で発表した。これら化合物の絶対配置について励起子キラリティー法を応用して決定した。遠隔ジオールを考慮して UV 吸収の大きい 2-ナフトイル基を発色団に採用した。ジクロロメタン中、**1, 2** に対し DMAP/TMEDA 存在下 2-naphthoylchloride を作用させたところ、**3, 4** がそれぞれ選択的に得られた。これらの CD スペクトルを解析、さらに理論計算によりそれらを再現することによりそれぞれ(3*R*,10*S*), (3*R*,7*S*)-配置と決定した。また、旋光度比較や生合成考察などにより、既知の CAF-603 はすべて同じキラリティーであり、植物由来の多くのダウカン誘導体とは鏡像の関係にあることを明らかにした。単離化合物の抗菌活性などについても言及する。



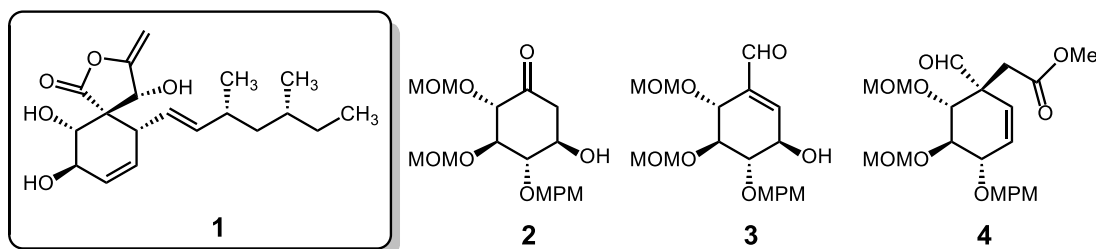
1) R. Yasumura, et al, *Tetrahedron in press*.

A08

spiroleptsphol 類の全合成研究

○高橋萌子、村井嘉晃、橋本勝、坂本君年（弘前大・農生）

ヨモギ茎由来の子囊菌 *Leptosphaeria doliolun* から当研究室で単離・構造決定した spiroleptsphol (**1**)及び、その類縁体の全合成を目指して研究を展開している。これまでに開発した方法では *ent*-体しか得られないことから、天然物と同じ絶対配置で合成すべくルートを再検討した。これまで同様、D-gulcopyranoside を出発物質として、保護基の位置などを変更することにより、**1** のシクロヘキセン部と同じ絶対配置を持つ **2** へ変換することに成功した。1,3-dithiane により C1 ユニットを導入後、加水分解してアルデヒド **3** としたのち、Claisen 転位により立体選択的に 4 級炭素を構築、**4** を得ることにすることに成功した。これらの詳細及び、その後の展開について報告する。

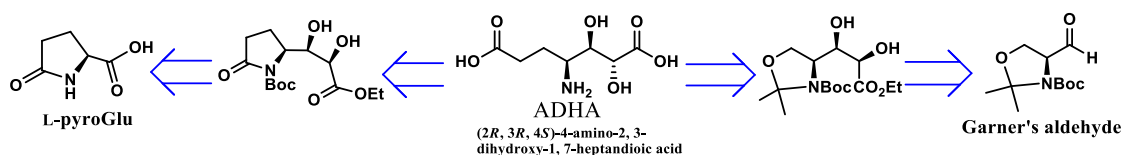


A09

抗 HIV 活性を有する Homophymine A の合成研究：構成する異常アミノ酸の合成
 ○東海林由憲、米田翔、武田祥、菊池真理、今野博行
 (山形大院理工・バイオ化学)

【目的】 Homophymine A は 2008 年に単離、構造決定された環状デプシペプチドである。本天然物は 11 のアミノ酸残基などで構成され、抗 HIV 活性 ($IC_{50}=75$ nM) を有する。我々は Homophymine A の全合成と構造活性相関へ向け、構成する異常アミノ酸 (2*R*, 3*R*, 4*S*)-4-amino-2, 3-dihydroxy-1, 7-heptandioic acid (ADHA) の合成研究を行った。

【結果と考察】 ADHA を合成するにあたり 2 つのルートを設定した。L-Ser から既知の方法で導いた Garner's aldehyde ならびに L-pyroGlu を Peter らの方法¹⁾により得られる L-pyroGlutaminol を出発原料とした。これらはともに Z 選択的な HWE 反応による増炭、つづいて四酸化オスミウムによるジアステレオ選択的なジヒドロキシル化などを用いて合成を進めた。その結果、低収率ながら ADHA の保護体を得ることができた。現在は立体化学の検討を行っている。



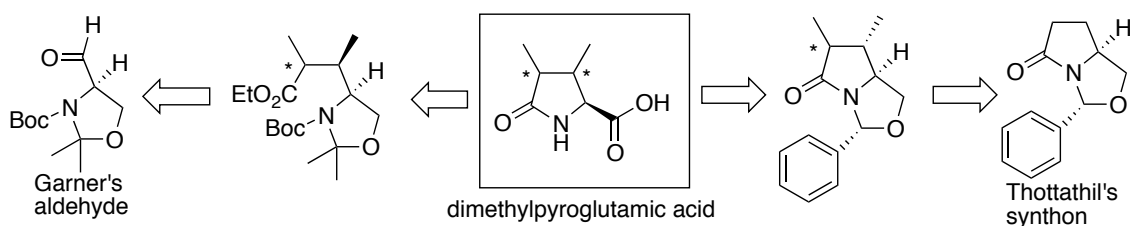
1) Peter Wipf *et al.*, *Org. Lett.* 2011, 10, 2634.

A10

カリペルチン B の合成研究：ジメチルピログルタミン酸 4 種のジアステレオマーの合成とその立体化学について
 菊池真理、○今野博行 (山形大院理工・バイオ化学)

【目的】 ジメチルピログルタミン酸は海綿 *Callipelta* sp. から単離、構造決定されたカリペルチン B を構成する異常アミノ酸の一つである。我々はカリペルチン B に関する研究を行う過程でジメチルピログルタミン酸の 2 つのメチル基が細胞毒性の発現に大きな影響を及ぼしていることを見出した。そこでカリペルチン B の立体化学の決定と構造活性相関への展開を見据えジメチルピログルタミン酸 4 種のジアステレオマーの合成と細胞毒性試験を行うことにした。

【結果と考察】 4 種のジアステレオマーを合成するにあたり 2 つのルートを設定した。まず 3*R*, 4*R* 体ならびに 3*R*, 4*S* 体については Garner's アルデヒドを用いる Hanessian の方法により合成を進めた。ジアステレオ選択的な接触水素化、 α 位のメチル化さらに、すべての保護基を除去することでヒドロキシラクタムが得られた。4 位メチル基は容易に異性化することがわかった。その後 TEMPO 酸化により 2 種の異性体を得た。一方で、3*S*, 4*R* 体ならびに 3*S*, 4*S* 体を得るためピログルタミン酸から導かれるキラルシントンを原料に用いた。ジアステレオ選択的な 1, 4-付加、 α 位のメチル化、TFA 処理等を行うことで 2 種の異性体を得た。得られた 4 種の異性体について立体化学の比較ならびに細胞毒性試験を行った。



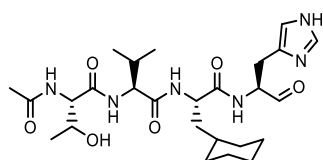
A11

システインプロテアーゼ阻害剤の創製研究

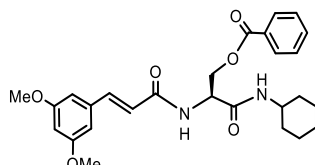
○齊藤洋太、菊池真理、高沼大樹、若林雅貴、今野博行
(山形大院理工・バイオ化学)

【目的】システインプロテアーゼはシステインを活性中心に持つタンパク質分解酵素であり、消化、生命維持を司るもののみならず、ウイルスの増殖や種々の疾患に関わる酵素にも存在する。我々は SARS, アルツハイマー病に関与する SARS-3CL^{pro} ならびに Cathepsin B の低分子阻害剤創製を目指し研究を行ってきた。その結果、テトラペプチドアルデヒド(1)が SARS-3CL^{pro} を強力に阻害することを見出している。そこで今回、1 の構造を基にした低分子阻害剤の設計、合成および構造活性相関を行った。さらに細胞毒性を評価した。

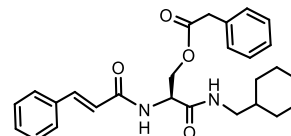
【結果と考察】まず 1 から活性発現に有効な部位を抽出し、テンプレートである L-, D-serine に修飾した低分子誘導体を多数合成した。次に R188I mutant SARS-3CL^{pro}、Cathepsin B に対して阻害能評価を行った。その結果、誘導体(2)が R188I mutant SARS-3CL^{pro} に対して IC₅₀= 70 μM、誘導体(3)が Cathepsin B に対して IC₅₀= 170 μM という結果を示した。これらは強い細胞毒性を示さなかった。



1 ; IC₅₀ = 98 nM



2



3

A12

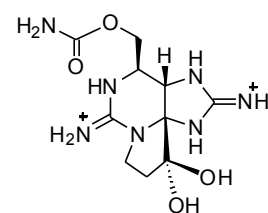
麻痺性貝毒の生合成中間体の探索

○吉岡廉平¹、土屋成輝¹、長由扶子¹、此木敬一¹、大島泰克²、山下まり¹
(東北大院・農¹, 生命科学²)

【背景・目的】麻痺性貝毒は saxitoxin(STX)¹⁾骨格を有する化合物の一群で、電位依存性 Na⁺チャンネルを特異的に阻害する。近年、麻痺性貝毒を生産する淡水産藍藻や海産渦鞭毛藻のゲノム中に、STX 生合成遺伝子が発見され、予想生合成経路が示された²⁻⁴⁾。しかし、化学的な証明は不十分であり、当研究室の土屋らは初期中間体を数種合成し、存在を証明した⁵⁾。本研究では、予想生合成中間体を有毒淡水産藍藻より探索し、生合成経路の解明に役立てることを目的とした。

【方法】有毒淡水産藍藻 *Anabaena circinalis* TA04 株を培養し、培養液を抽出後、各種 HPLC に供し、LC/MS(MRM) および HR-LC-MS/MS で予想生合成中間体を探索し、精製した。

【結果】予想生合成中間体 E' と同じ分子式の化合物は、2 成分存在することが示された。また、予想された中間体ではないが、中間体あるいはその代謝物と思われる成分が見つかった。現在、NMR で構造の証明するために、それらの成分の精製をさらに続けている。



saxitoxin (STX)

Ref.) 1) Llewellyn, L. *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* **23**, 200-222 (2006). 2) Kellmann, R. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4044-4053 (2008). 3) Mihali, T. K. *et al.*, *PLoS One* **6**, e14657 (2011). 4) Stüken, A. *et al.*, *PLoS One* **6**, e20096 (2011). 5) Tsuchiya, S. *et al.*, The proceedings of 54th symposium on the chemistry of natural products. 459-464 (2012).

A13 Na_v安定発現系の構築と TTX 関連化合物の結合性評価

○千葉雪絵¹、長由扶子¹、安立昌篤²、榊原良²、所聖太²、今津拓也²、磯部稔³、西川俊夫²、山下まり¹、此木敬一¹(¹東北大院・農、²名大院・生命農、³台湾国立清華大)

【目的】テトロドトキシン(Tetrodotoxin, TTX)は脳、筋肉、神経などに発現する電位依存性ナトリウムチャネル(Na_v)に対する強力な阻害剤である。Na_v1型にはNa_v1.1-Na_v1.9までの9つのサブタイプが存在するが、TTXはNa_v1.1-1.4, Na_v1.6-1.7に感受性を示し、Na_v1.5, Na_v1.8-1.9に対して非感受性である。このようにTTXはサブタイプ選択性の高い化合物とは言えず、よりサブタイプ選択性の高い、あるいは特定のサブタイプのみを選択性を示すTTX類縁体が求められている。本研究では、単離された、もしくは化学合成により調達されたTTX関連化合物とその類縁体の各種Na_vに対する結合性を調べることを目的とする。

【方法】(1)pCDM8ベクターに挿入したヒト型Na_v1.2(hNa_v1.2)、Na_v1.4(hNa_v1.4)、Na_v1.5(hNa_v1.5)を用いて、Hek293T細胞を形質転換した。抗生物質G418の存在下、各Na_vを発現する細胞のみを選択的に培養し、安定発現細胞の構築を試みた。(2)ホールセル記録法によりNa⁺電流を記録し、TTX関連化合物のIC₅₀値を求めた。

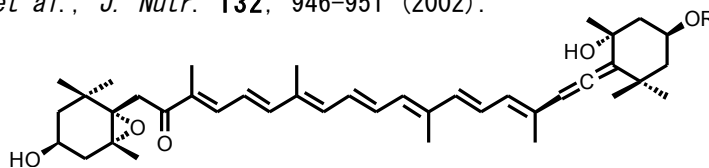
【結果と考察】(1)hNa_v1.4を安定発現するHEK293T細胞の構築に成功したが、hNa_v1.2およびhNa_v1.5を安定発現する細胞の構築には至らなかった。これはG418に対して抵抗性を獲得した細胞が増殖し、擬陽性を示すためと考えられた。(2)(1)で調製したhNa_v1.4を安定発現するHEK293T細胞を用いてホールセル記録を行い、TTXおよびTTX関連化合物のIC₅₀値を決定した。現在、再実験により精度を高めることを試みている。

A14 抗フコキサンチンポリクローナル抗体の作製

○上野美紗、野村駿、此木敬一、長由扶子、山下まり(東北大院・農)

【目的】フコキサンチン(1)は、褐藻や珪藻類の光合成に必要なカロテノイドであり、抗酸化活性、抗癌作用などをもつ生理活性物質である¹⁾。1は経口摂取後、大部分が消化管内でリパーゼなどによって脱アセチル化され、より活性の強いフコキサンチノール(2)に変換され吸収されることが報告されている²⁾。本研究では、1や2の生体内での作用機構や細胞内の局在解明などへの応用を期待し、抗フコキサンチンポリクローナル抗体を作製し、その評価を行うことを目的とした。

【方法・結果】1をヘミスクシニル化してフコキサンチン-KLH-conjugateを作製した。これを抗原としてウサギを免疫し、抗フコキサンチンポリクローナル抗体を作製した。作製した抗体に対し、1、2を含む4種のカロテノイドとの反応性を評価した。競合ELISA法により、抗フコキサンチンポリクローナル抗体の1に対する特異的親和性が確認できた。一方、2に対する親和性は、1に比べて低かった。類似の方法を用いて作製した、抗フコキサンチノールポリクローナル抗体についても報告する。Ref.) 1) Nicolantonio, D. *et al.*, *Mar. Drugs* 10, 604-616 (2012). 2) Sugawara, T. *et al.*, *J. Nutr.* 132, 946-951 (2002).



A15 ヒナタイノコズチ葉から放出される炭素数6の揮発性有機化合物の同定

○田母神繁、野下浩二、阿部誠（秋田県立大学・生物資源科学部）

【目的】植物は食害やメチルジャスモン酸処理によって様々な種類の揮発性有機化合物 (VOCs) を放出する。VOCs としては、テルペンや炭素数6のアルデヒド、アルコール、エステルなど、いわゆる緑の香り (GLVs) が知られている。ヒナタイノコズチは GLVs に加え、VOCs としては珍しい、ヘキセン酸のメチルエステルも放出することが分かっている。そこで、ヒナタイノコズチが放出する VOCs を精査し、興味ある類縁化合物を見出すことを目的とした。

【方法】密閉できるガラス容器にヒナタイノコズチの茎葉部を入れ、メチルジャスモン酸を空中伝搬によって吸収させた。明所で24時間インキュベートした後、ヘッドスペースに放出された VOCs を固相抽出し、GC-MS によって分析した。GLVs が検出されやすい、比較的早い時間帯を精査し、既にヒナタイノコズチから同定した VOCs の類縁化合物を探索した。

【結果】すでに見出している (E)-2-ヘキセン酸メチルより早い保持時間に、ピーク強度は弱いものの、3個の類縁化合物を見出した。一方、一般的な GLVs である (Z)-3-ヘキセニルアセテートと (E)-2-ヘキセニルアセテートの間に、2個の構造類似のアセテートを見出した。

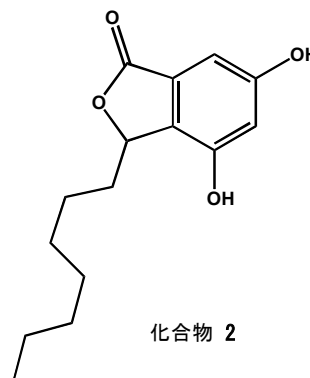
得られたマススペクトラムの解析と合成標品との比較から、これら5個のVOCsを同定した。同定した化合物は、炭素鎖の二重結合の位置や立体化学が異なる構造類似体、あるいは飽和の炭素鎖を持った類縁化合物であった。同定したVOCsの生合成はきわめてシステムティックであると考えられ、ヒナタイノコズチ葉においてどのように生合成されるのか現在検討中である。

A16 ナラ枯れの倒木より単離した糸状菌 TT-10 株が生産するナラ菌生育阻害活性物質について

○高野智也、小関卓也、小山浩正、塩野義人（山形大・農）

【目的】ナラ枯れは、カシノナガキクイムシとナラ菌 (*Raffaelea quercivora*) により誘導される樹木萎凋病である。ナラ枯れの被害が拡大すると、森林の水源かん養機能が失われ、土砂災害などの公益機能の低下を引き起こす。そのため、ナラ枯れの被害を最小限にとどめる方策が検討されている。我々のグループでは、これまで、ナラ菌に対する生育阻害物質を天然物に求めて探索してきた。本研究では、ナラ枯れ罹病木から、ナラ菌に対する抗菌活性作用を有する微生物をスクリーニングし、それらの生産する生育阻害物質を単離することを目的とした。

【方法および結果】ナラ枯れ罹病木より糸状菌 29 株を分離し、それぞれの培養物について、ナラ菌に対する生育阻害活性試験を行った。その結果、TT-10 株に阻害活性が見られたため、本菌の生産する活性物質を明らかにすることとした。そこで、本菌株の大量培養物について、活性試験と TLC 上での挙動を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物 1~5 を単離した。構造解析の結果、1, 3, 4, 5 は既知のインテグラシン A、サイトスポロン A, R、サイトカラシン類であった。一方、化合物 2 は、分子内に γ -ラクトンを有するサイトスポロン E の誘導体であった。また、活性試験の結果、サイトカラシン類がナラ菌に対する生育阻害抗菌活性を示した。



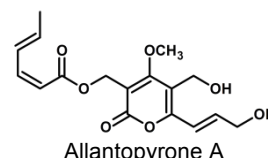
A17

植物内生糸状菌由来の抗がん物質 allantopyrone A の標的分子の探索

○上杉祥太¹、山下哲郎¹、塩野義人²、近藤恭光³、長田裕之³、木村賢一¹

(¹岩手大院・連合農、²山形大・農、³理研・長田抗生物質)

【目的】Allantopyrone A は、植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 株より単離した新規化合物である¹⁾。ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対して細胞毒性 (IC₅₀=0.32 μM) を示しアポトーシスを誘導することが示唆されているが、標的分子は未解明である。そこで本研究では、allantopyrone A の細胞内標的分子を探索した。



【方法・結果】UV 照射により allantopyrone A を固定化した光親和型ビーズを用いて、HL60 細胞の全細胞抽出液に対してアフィニティークロマトグラフィーを行い、結合タンパク質を検出した。遊離薬剤による競合実験に基づき、30 kDa と 33 kDa のバンドを LC-MS/MS により解析した結果、ミトコンドリア内膜に主に局在してアポトーシスにも関わる prohibitin-1、prohibitin-2 をそれぞれ同定した。これらのタンパク質は SDS 化の際の変性によりビーズから解離したため、非共有結合性の相互作用であると考えられた。一方、allantopyrone A は親電子性の α, β -不飽和カルボニル構造を有し、求核性の SH 基などと共有結合する可能性がある。実際、allantopyrone A の細胞毒性は、SH 基を含む抗酸化剤 *N*-acetyl-L-cysteine や還元剤 dithiothreitol との併用によって顕著に低下した。細胞死を誘導する条件で allantopyrone A は ROS 産生を惹起せず、SH 基を持たない抗酸化剤 (vitamin E、allopurinol) では細胞毒性は抑制されなかった。これらのことから、標的分子の SH 基への求核付加による共有結合が活性に大きく関与することが示唆された。そこで、リンカー一部分に切断可能なジスルフィド結合を導入したビーズを利用し、allantopyrone A と共有結合を形成するタンパク質の探索を進めている。1) Y. Shiono *et al.*, *J. Antibiot.*, **63**, 251-253 (2010)

A18

イネ葉身に存在するファン型ケイ酸体中の有機物の探索

○大澤章良、吉澤結子、岡野桂樹、尾崎紀昭

(秋田県立大・生物資源)

【目的】イネ科植物の葉身には、ケイ酸体が形成されているが、それは生体防御や成長促進のため利用されると考えられている。イネにおいては少なくとも 4 種類の形状のケイ酸体が確認されており、そのうちファン型ケイ酸体のみが葉身内部に形成される。生物が作るケイ酸体は、ケイ藻や海綿動物でよく研究されており、その形成には有機物が関わっていることが知られているが、高等植物での報告例は少ない。本研究では、イネのファン型ケイ酸体の単離を試み、イネのケイ酸体形成に関与する有機物が存在するかどうかを調べた。

【方法】乾燥させたイネ葉身を細かく破碎し、ナイロンメッシュを用いて濾過を行い、時計皿を用いてファン型ケイ酸体を収集した。収集したケイ酸体を硫酸やクロロホルムで表面を洗浄後、フッ化水素 (HF) 溶液を用いて溶解し、HF 可溶性成分を透析、濃縮後 SDS-PAGE を行った。これとは別に、表面を洗浄せず HF 処理したものと比較した。

【結果と考察】孔径 258 μm のナイロンメッシュと時計皿を用いて収集することにより、ファン型ケイ酸体を単離することができた。HF によるファン型ケイ酸体の溶解後に、膜状の不溶物が見られたが、予め硫酸で処理をしたものからは確認されなかった。HF 可溶性成分を SDS-PAGE に供したところ 2 種類のバンドが検出され、このうち一つは、ケイ藻の長鎖ポリアミンと類似した位置に検出された。これらのバンドはケイ酸体の表面に存在する有機物除去後も検出されたため、有機物がケイ酸体内部に存在することが強く示唆された。

A19 電気インピーダンス法を利用した塩の浸透挙動測定

○名古屋志、築館亜由美、秋山美展、石川匡子
(秋田県立大学大学院、生物資源研究科)

【目的】我々は、食品表面上で塩が溶解する様子を非破壊かつリアルタイムでモニタリング可能なシステムの開発に取り組み、電気インピーダンス法により塩の溶解速度を測定することに成功した。しかし、実際の食品の調理過程では、塩による脱水、収縮を伴うことから、現行システムでは長時間加工時における塩の浸透挙動測定が不可能であった。そこで、本研究では測定に用いる電極を改良し、塩の浸透挙動計測について検討を行った。

【方法】試料には寒天ゲルをガラスセルに流し固めたテストピースを作製した。インピーダンス測定には LCR メータを用いた。電極は食品内部に差し込み可能なステンレス製の棒電極を作製し、絶縁スプレーで被膜することで、一部分のみがゲルに直接接触できるように加工した。寒天表面に塩を一様に振りかけ、インピーダンス値を測定し、数値が一定になった時間での塩化物イオン濃度を測定した。

【結果】新規の電極を用い、浸透挙動について電気インピーダンスによりゲル内部への塩の浸透挙動について検討した結果、電極の接触部位が寒天ゲル上部から下部に移行することに比例して、インピーダンス値が平衡に達するまでの時間が長くなった。また、振りかける塩の量を増加させると、インピーダンス値が平衡に達する時間が長くなった。硝酸銀を添加した寒天ゲルに食塩を振りかけて浸透挙動を観察したところ、インピーダンス値の変化と同様の挙動を示した。同時に平衡時間におけるゲル中の塩化物イオン濃度を測定した結果、平衡に達する時間と塩化物イオン濃度は相関が高かった。以上より、本システムにより塩の浸透挙動を非破壊かつリアルタイムでモニタリングの可能性が示唆された。

一般講演

B 会場

B01

血漿過酸化リン脂質の異性体解析による生体酸化ストレスの評価

○加藤俊治¹, 仲川清隆¹, 浅井明², 及川眞一², 宮澤陽夫^{1,3} (1 東北大院・農・機能分子解析, 2 日医大・内分泌代謝, 3 東北大未来科学技術共同研究センター)

【背景・目的】生体膜のホスファチジルコリンは酸化ストレスにより酸化一次生成物であるホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) を生じる。当研究室では生体酸化ストレスを評価するため、PCOOH を高感度かつ選択的に分析できる化学発光検出 HPLC を開発し、高脂血症では PCOOH が高値で、PCOOH が単球の血管内皮細胞接着を促進する生理活性物質であることを見出した。生体内の PCOOH は-OOH 基の位置によって様々な異性体が存在し、異性体ごとに生理活性が異なる可能性が示されている。近年ではタンデム質量分析 (MS/MS) が PCOOH 定量に用いられている。我々はこれまで MS/MS を用いた PCOOH 精密定量法を確立するため、高純度 PCOOH 標品の調製法や PCOOH 抽出法、MS/MS 条件を検討してきた。本研究ではこれらの点を考慮し、新たに PCOOH 異性体分析が可能な MS/MS 法を確立し、ヒト血中 PCOOH 解析に応用した。

【方法・結果】ダイズ lipoxygenase を用い、*sn*-2 に 13-hydroperoxy-octadecadienoic acid を有する高純度 PCOOH (16:0/18:2-13-OOH PC) を調製した。標品の MS/MS 分析では親イオンに Na 付加体を用い、特徴的ニュートラルロスを得た。精密質量解析により、このニュートラルロスは-OOH 基の位置情報を反映し、PCOOH 異性体分析へ応用できることがわかった。本法は生体内脂質酸化物のうち、酵素酸化物とラジカル酸化物を定量的に明らかにできる利点があると考えられる。本法の応用で、より詳細な生体内脂質酸化の評価が可能になることが期待される。現在、動脈硬化症、健常人の血中 PCOOH 解析を進めて、新知見を得つつある。

1) K. Nakagawa et al, JLR (2007); D. Ibusuki et al, JLR (2008); S. Kato et al, JLR (2013)

B02

メタボリックシンドロームと生体脂質過酸化：乳児期マウスを用いた解析

○伊藤隼哉¹, 加藤俊治¹, 木村ふみ子¹, 仲川清隆¹, 宮澤陽夫^{1, 2}
(1 東北大院・農・機能分子解析学, 2 東北大学未来科学技術共同研究センター)

【背景・目的】肥満は世界規模で蔓延しており、肥満と肥満により誘導されるメタボリックシンドロームの機構解明が待たれている。この進展に酸化ストレスの関与が示唆されているが、証明には生体内酸化ストレスを適切に評価する手法が必要である。当研究室では、酸化ストレスを鋭敏に評価できる過酸化リン脂質 (PCOOH) の LC-MS/MS 測定法を構築した。一方、妊娠・授乳期の母マウスに高脂肪食を与えると、仔マウスの肥満発症リスクが高まる。本研究では、この仔マウスを用い、肥満・メタボリックシンドロームの進行と酸化ストレスの関係解明を目指した。

【方法】試験には C57BL/6J マウスを用い、母マウスが妊娠期と授乳期のいずれも普通食を摂取する群と妊娠期と授乳期に高脂肪食を摂取する群に分けた。離乳時に仔マウスを屠殺し、生体内酸化ストレス指標として、血漿 PCOOH を LC-MS/MS で定量した。血液の脂質・糖質代謝パラメーターと肝臓の抗酸化関連分子の mRNA 発現量を測定した。

【結果】妊娠と授乳期の両期間に母マウスに高脂肪食を与えると、仔マウスは肥満を呈するとともに、血中インスリン濃度が増加した。LC-MS/MS により仔マウス血漿から PCOOH が検出され、出産後の若齢期から血中に過酸化物が含まれることが明らかとなった。母マウスの高脂肪食摂取は、肥満を呈した仔マウスの血漿 PCOOH 濃度に影響を与えなかった。抗酸化関連遺伝子の mRNA 発現量にも大差はなかった。したがって、肥満とメタボリックシンドローム発症メカニズムには、生体脂質過酸化の関与は少ないと予想され、むしろその後の病状の増悪化に酸化ストレスが関係することが示唆された。

B03 ルテオリン（パプリカ葉フラボノイド）の分析条件検討と体内吸収動態評価

○近藤桃子¹、庄子真樹²、仲川清隆¹、津志田藤二郎³、宮澤陽夫¹ 1. 東北大院農機能分子解析学 2. 宮城県産業技術総合センター 3. 宮城大学 食産業学部

【目的】 宮城県はパプリカの生産が盛んである。パプリカの葉には、フラボン類のルテオリンとその配糖体が多く含まれており、パプリカ葉ルテオリンの潜在的な生理作用の発見と活用に関心が寄せられている。そのために、食品成分として摂取したパプリカ葉ルテオリンがヒトの体内で、どのように消化吸收され代謝を受けて、血液や末梢の組織細胞にまで運ばれ、生理作用を示すのかについて理解が必要である。そこで本研究では、はじめにルテオリン（アグリコン）、ルテオリン配糖体、ヒト体内で生成が想定される代謝物の LC-MS/MS 分析法を検討し、次にラットにルテオリン（アグリコン）を与え血漿の LC-MS/MS 分析により、パプリカ葉ルテオリンの体内動態に関する基礎的知見を得ようとした。

【方法と結果】 トリフルオロ酢酸 (0.05%) とギ酸 (0.1%) を共に LC 移動相へ加えると、ルテオリン（アグリコン）、ルテオリン配糖体、ルテオリン代謝物は良好に分離し、MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) で高感度分析が可能であった。そこで、Fischer 雄性ラットにルテオリン（アグリコン、20mg/kg）を単回投与し、2 および 12 時間後に採血し、血漿を LC-MS/MS 分析した。投与 2 時間後の血漿からルテオリン代謝物が検出され、ルテオリンを摂取すると、その一部が速やかに消化管から吸収され体内で抱合化されると考えられた。今後はさらに解析を進めるとともに、パプリカ葉にはルテオリンのアグリコンよりも配糖体が多く含まれるため、配糖体の体内動態も明らかにし、生理作用発現との関係性を評価していきたいと考えている。

B04 イネ品種日本晴を用いた新規ビタミン E 合成酵素の解明

○阿部 伎¹、木村映一²、吉田泰二²、木村俊之³、村田和優⁴、仲川清隆¹、宮澤陽夫¹、⁵（¹東北大院農・機能分子解析学、²東北農研セ、³中央農研セ、⁴富山農総技セ、⁵東北大未来科学技術共同研究セ）

【目的】 米（特に糠部）には不飽和ビタミン E (VE) であるトコトリエノール (T3) が特徴的に含まれ T3 による抗血管新生や抗腫瘍、脂質代謝改善、皮膚保湿、抗アレルギー、テロメア抑制などの新たな機能性を我々は明らかにしてきている¹⁾。本研究では VE 生合成に関与する GGR が変異したカルスを作製し新規 VE 合成酵素の性質を明らかにし T3 高生産システムの実現を目指した。

【方法】 GGR1 (既知 GGR) 遺伝子内にトランスポゾンが転移したイネ品種日本晴の GGR1 変異カルスを作成し、VE 量を 4000QTRAP LC-MS/MS で定量した。次に GGR1 変異カルスについて、GGR2 (新規 GGR) を RNAi 処理した変異カルスを作成し、同様に VE を LC-MS/MS で定量した。

【結果・考察】 GGR1 の欠損に関わらず、VE は合成されていた。このことは GGR が複数存在し相補的に機能することを示唆した。また、GGR1 と GGR2 をともに欠損するカルスでは、Toc 量は顕著に減少した。これは GGR1 と GGR2 が共に Toc 生合成に必須であることを示した。今後は T3 を高純度・高生産させることを目指したいと考える。1) E. Eitsuka et al, BBRC (2006); K. Nakagawa et al, JN (2007); A. Shibata et al, Biochem Pharmacol (2008), JN (2008); T. Miyazawa et al, JNB (2009); T. Tsuduki et al, BBA (2013)

B05

過酸化リン脂質 (PCOOH) の細胞内代謝と還元酵素との関係性

○鈴木 優里¹・加藤 俊治¹・仲川 清隆¹・宮澤陽夫^{1, 2}

¹ 東北大院農・機能分子解析学、² 東北大未来科学技術共同研究センター

【目的】動脈硬化における酸化 LDL の形成では、LDL 表面のホスファチジルコリン (PC) の酸化で PC ヒドロペルオキシド (PCOOH) が生じ、PCOOH の病態生理学的作用が注目されている。PCOOH は単球の血管内皮細胞への接着を誘導し、動脈硬化巣形成に関与する¹⁾。ヒト肝癌細胞 (HepG2) では PCOOH が PCOH へ還元される可能性があり、PCOOH の生理作用か PCOH など代謝物によるのか不明である。本研究では、合成 PCOOH を HepG2 に処理し、取り込みと代謝を解析し、細胞障害と還元酵素の関係を明らかにしようとした。

【方法と結果】高純度 PCOOH 標品を調製し、培地に加え HepG2 を培養したところ、培地中の PCOOH の一部は HepG2 へ取り込まれ、そのほとんどが細胞内で PCOH へと還元され、細胞内に蓄積することを LC-MS/MS 分析で明らかにした。この現象は、ヒト大腸癌細胞とヒト単球細胞でも観察された。したがって、PCOOH の病態生理学的作用は、還元物 PCOH あるいは、細胞内に残存する PCOOH により引き起こされている可能性がある。還元機構について、本研究で用いた細胞には PCOOH 還元酵素として知られるリン脂質グルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) はほぼ発現しておらず、その基質 (グルタチオン) 量にも変化がないことから PHGPx 還元経路とは異なる経路の存在が新たに示唆された。

1) A. Asai et al, BBRC (2011); A. Asai et al, JLR (2009); D. Ibusuki et al, JLR (2008); Y. Tokita et al, J Atheroscl Thromb (2005); T. Nagashima et al, Diabetes Res Clin Pract (2002); M. Kinoshita et al, Clin Chem (2000); T. Miyazawa et al, Methods Enzymol (1994)

B06

ラットおよび細胞を用いたトコトリエノールの抗肥満機能の解析

○林真貴子¹、Gregor Carpennero Burdeos¹、木村ふみ子¹、仲川清隆¹、

宮澤陽夫^{1, 2} (¹東北大農・機能分子解析学・²東北大未来科学技術共同センター)

【目的】ビタミン E は脂溶性ビタミンの一種であり、米糠やパーム油に含まれる。トコフェロール (Toc)、トコトリエノール (T3) の 2 種、さらにクロマン環側鎖の違いから各 4 種 (α - δ) の異性体がある。本研究では、動物実験と細胞実験により脂質代謝への T3 の関与を検討した¹⁾。

【方法】6 週齢 F344 ラットに高脂肪食として大豆油を与えたもの、さらに T3 を加えたものを用い 3 週間飼育後、血漿と臓器を分析した (動物実験)。ヒト肝がん細胞 HepG2 細胞にオレイン酸添加後、細胞増殖能とトリグリセリド (TG) を定量し、脂質合成関連遺伝子を定量 RT-PCR と Western Blotting で分析、マウス線維芽細胞 3T3-L1 (脂肪細胞前駆細胞) は薬剤による分化誘導後 HepG2 と同様の分析と脂肪球特異的染色により脂肪蓄積程度を比較した (細胞実験)。

【結果】動物実験より、T3 はラットの血漿および肝臓において TG 量を減少させ、脂質生成の関連遺伝子を標的として作用し、脂質制御と炎症性標識遺伝子に影響していた。細胞実験では HepG2 を用いた実験より γ -T3 が 10-15 μ M の濃度で TG 蓄積を阻害する一方、これ以上の濃度では細胞毒性を示し、CPT1A、CYP3A4 の発現が上昇したが、FAS 遺伝子発現は抑制された。分化後の 3T3-L1 では γ 、 δ 体が TG 蓄積を阻害、染色により細胞の脂肪球減少が示され、脂質合成関連遺伝子群への関与も認められた。以上の結果より、T3 は脂質代謝関連疾患に対し機能性食品創成の可能性を秘めていると思われる。

1) T. Miyazawa et al, Trends Food Sci Technol (2011); G. C. Burdeos et al, Lipids (2013)

B07

クルクミングルクロン酸抱合体の生理活性とクルクミンナノ粒子作製

○張替 敬裕¹, 宮澤大樹¹, 庄司 求¹, 仲川 清隆¹, 藤井 智幸², 宮澤 陽夫^{1,3}

(¹ 東北大学・機能分子解析学, ² 東北大学・テラヘルツ, ³ 東北大学未来科学技術共同研究センター)

【目的】ウコンは黄色色素クルクミンを含む。クルクミンは抗酸化作用を示し、抗炎症、抗腫瘍、抗動脈硬化、抗血管新生、抗アルツハイマー病機能が報告されている。一方、消化吸収過程で代謝され、生体内では主にグルクロン酸抱合体 (CUR-G) として存在する¹⁾。本研究では、CUR-G の生理活性を評価し、クルクミンをナノ粒子化し、PLGA で包むことで徐放性を上昇させ、クルクミンの抱合体生成を防いで生物学的利用能を向上させようとした。

【方法】UDP-グルクロナシルトランスフェラーゼを用い、クルクミンをグルクロン酸と反応させ、固相抽出、分取 HPLC で、CUR-G を得た。CUR-G を HepG2 細胞に添加し、WST-1 試験を行った。HepG2 細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR に供した。クルクミンナノ粒子 (C-NP) は、クルクミン、PLGA を酢酸エチルに溶かし、PVA、Tween80 溶液に混ぜ、超音波で W/O エマルションとし、スクロースを加え凍結乾燥して作製した。

【結果と考察】WST-1 試験ではクルクミンが 25 μ M で HepG2 増殖抑制作用を示したのに対し、CUR-G は全く作用を示さなかった。HepG2 の遺伝子発現に対し、GSTT1 など一部の遺伝子で有意な変動が認められたが、多くの遺伝子は CUR-G の影響はなかった。これは CUR-G の HepG2 細胞内への移行量がクルクミンより少ないためと考えられた。C-NP は水によく分散し、その粒径は 200nm 未満と小さく均一であった。さらに Tween80 で粒子を覆うことで生体親和性が高くなり、血液脳関門を經由して直接、脳神経細胞に作用できる可能性があり、動物実験で評価する予定である。

1) A. Asai & T. Miyazawa, JN (2001); A. Asai & T. Miyazawa, Life Sci (2000)

B08

ゼラチンの酵素架橋を利用した粉末魚油の開発

○半澤康彦¹, 青木茂太¹, 阿久津光紹², 松本俊介², 仲川清隆¹, 宮澤陽夫^{1,3}

(¹ 東北大学・農・機能分子解析, ² 青葉化成(株), ³ 東北大学・未来科学技術共同研究センター)

【目的】機能性食品として DHA や EPA に富む魚油需要が高まっている。魚油を粉末化出来れば、食品展開が一層進むが、粉末魚油製造は未だ難しい。我々はトランスグルタミナーゼ (TG) 含有ゼラチンを用い、酵素反応による架橋構造に乳化魚油を包接して、粉末魚油調製を試みてきた¹⁾。作製した粉末魚油の酸化安定性は高く、新機能として徐放性により魚油の消化管吸収が穏やかになり、DHA 等の健康機能を持続的に享受できる可能性が示唆された。本研究では、魚油粉末化の最適条件を検討し、酸化安定性と徐放性を評価した。

【方法・結果】魚油に HLB (親水親油バランス) の異なる乳化剤を加え、O/W エマルションを作製した。乳化液に TG 含有ゼラチンを溶解し、酵素による架橋形成を十分促進させた。ゲルを凍結乾燥後、低温下で粉末化した。その結果、魚油にパーム油を少量加え、高 HLB と低 HLB の乳化剤の併用により粉末魚油調製に成功した。この粉末魚油の脂質含量は 73% と高く、DHA 量は 140mg/g に達した。調製粉末魚油を、示差走査熱量計とヘッドスペース GC による酸化安定性試験に供したところ、魚油粉末化により有意な酸化安定性向上が確認された。架橋構造にトラップされた油脂の徐放性を検証する溶出試験では、溶出油脂濃度が経時的に増加し徐放性が確認された。ヒト試験では粉末魚油摂取前から摂取 6 時間後まで採血し、血漿のトリグリセリドと脂肪酸の挙動を調べた。粉末魚油摂取による血漿トリグリセリド値の大きな上昇はなく、粉末魚油摂取後に血漿総脂質の DHA と EPA の濃度が経時的に有意に増加することを認めた。

1) C. Vichasilp et al, Food Chem (2012); C. Vichasilp et al, LWT-Food Sci Technol (2012)

B09

MS/MSによるアラキドン酸型 PCOOH 位置異性体の定量分析

○水落俊介¹、加藤俊治¹、仲川清隆¹、宮澤陽夫^{1,2} (¹東北大院農・機能分子解析学、²東北大未来科学技術共同研究センター)

【目的】多くの生体膜はホスファチジルコリン(PC)を含み、PCは活性酸素で酸化され酸化一次生成物ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)となる。当研究室では生体の酸化ストレスを評価すべく、PCOOHの精密定量法を確立し、PCOOHの細胞障害性や生理活性を明らかにしてきた。PCOOHには構成脂肪酸の違いや-OOH基の位置により多くの分子種・異性体が存在し、それぞれ生理活性が異なる可能性が最近示唆されている。この背景から、当研究室では構造情報を得られるタンデム質量分析(MS/MS)を用いて、PCOOHの分子種・異性体分析法の開発を検討してきている。中でもアラキドン酸を有する過酸化リン脂質は炎症亢進作用があるが、今まで血中の量を定量的に論じられてこなかった。本研究では、アラキドン酸型PCOOHに着目し、高純度PCOOH調製法を改良し、安定して標品取得ができるようにした。MS/MS条件を検討し、アラキドン酸型PCOOHの異性体ごとのMS/MS分析法を確立しつつ、血中のPCOOH解析に応用した。

【方法と結果】ダイズ lipoygenase を用いて *sn*-2に 15-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid を持つ高純度 PCOOH(18:0/20:4-15-OOH PC)を調製した。これまでの反応濃度条件では副生成物の蓄積など、PCOOH収率が不安定だった。そこで、溶媒、PC濃度、触媒濃度などを検討し、最適条件を見つけた。MS/MS条件では、PCOOHのNa付加体を親イオンとした解析により-OOH位置特異的なフラグメンテーションを取得し、安定して-OOH位置異性体特異的に定量を行えるようにした。現在その他のアラキドン酸型PCOOHの-OOH位置異性体のMS/MS条件の検討を進めており、生体内の脂質過酸化物の動態について明らかにしつつある。

B10

ジペプチドの苦味感受性の個人差をもたらす苦味レセプターの一塩基多型

○齋藤弘貴、沼倉悠紀子、磯野邦夫、安達良太、入部マイ子、後藤知子、白川仁、駒井三千夫(東北大学大学院農学研究科・栄養学分野)

【目的】ヒトにおける苦味は、舌の味蕾の味細胞に存在する苦味レセプター(TAS2R)によって受容される。本研究では、牛乳やチーズ、大豆製品の製造・加工過程や発酵課程で生じる苦味ジペプチドの苦味感受性の個人差とTAS2Rの一塩基多型(SNP)の関連性を明らかにすることを目的とした。【方法】味官能評価試験には、代表的な苦味物質でありTAS2R38のリガンドとして知られているPTC(phenylthiocarbamide)、PROP(6-n-propylthiouracil)に加えて、苦味を有するジペプチド3種を一点濃度で用いた。TAS2R遺伝子の解析は、被験者の口腔内粘膜細胞からDNA調製し、解析対象としたTAS2R遺伝子をPCRにより増幅して得られたPCR産物を用い、塩基配列を決定することによって行なった。【結果と考察】TAS2R1のあるSNPがAla-Trpの苦味感受性の個人差をもたらしている可能性が示唆された。被験者にあらかじめ答えていただいた味覚に関するアンケートの結果と味官能評価試験の結果を関連付けて考察した結果、グレープフルーツの苦味感受性とGly-Tyrの苦味感受性に相関が認められ、これらの苦味成分が同一のTAS2Rによって受容される可能性が示唆された。

B11 妊娠期における亜鉛欠乏が成熟後のラットの糖代謝に及ぼす影響 ○西村 沙奈恵、後藤 知子、白川 仁、駒井 三千夫(東北大・院農・栄養)

【目的】 亜鉛は多様な生理作用を有する必須微量元素であり、その必要量は妊娠期・授乳期に増加する。また、胎仔期や乳仔期の栄養状態が生活習慣病の発症に関係していることも明らかとなっており、胎仔期と乳仔期に亜鉛欠乏にしたラットを用いた実験では、糖負荷時の耐糖能異常が報告されている。そこで本研究では、妊娠期の母ラットに低亜鉛食を与えて育てた仔ラットを用いて、成熟後の仔ラットの糖代謝に及ぼす影響を解析した。

【方法】 SD系妊娠1日齢雌ラットに亜鉛添加食(亜鉛含量33.7 mg/kg diet)、または低亜鉛食(亜鉛含量8 mg/kg diet)を3週間給餌し、出産後の母ラットに離乳まで両群に亜鉛添加食を与えた。3週齢で離乳した雄仔ラットを、胎仔期に亜鉛添加食を給餌した群(SS群)と胎仔期に低亜鉛食を給餌した群(LS群)に分け、亜鉛添加食により14週齢まで飼育した。飼育9、11、14週目に経口糖負荷試験(OGTT)、飼育10、13週目にインスリン負荷試験(ITT)を行った。

【結果】 離乳後の仔ラットにおいて、SS群に比べLS群では摂食量と体重の増加を示した。8週齢での血漿レプチン濃度はLS群で有意に低下していたことから、摂食量の上昇にレプチン濃度の低下が関与している可能性が示唆された。また、10週齢におけるITT、11週齢におけるOGTTの結果から、LS群においてインスリン感受性が上昇していることが観察された。一方、13週齢におけるITTと14週齢におけるOGTTではインスリン抵抗性の発症が示唆された。以上より、妊娠期の母ラットへの低亜鉛食給餌は、成熟直後の一時的なインスリン感受性の上昇を経たインスリン抵抗性の上昇を引き起こし、生活習慣病の発症に関与する可能性が考えられた。

B12 低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食がエネルギーおよび脂質代謝に与える影響 -C57BL/6Jマウス 第2報- 一井洋和、井上奈穂、○池田郁男(東北大院・農・食品化学)

【目的】 等カロリー条件下で、低脂肪高炭水化物食と高脂肪低炭水化物食のどちらが肥満を誘発するのかは明らかとなっていない。本実験では、AIN93G基準食を低脂肪高炭水化物食として、等カロリー条件の高脂肪低炭水化物食をC57BL/6Jマウスに供し、エネルギーおよび脂質代謝への短期的あるいは長期的な影響を調べた。食餌脂肪にはラードを用いた。

【方法】 試験には6週齢雄性C57BL/6Jマウスを用いた。試験食はAIN93Gに準じてラードを7%添加した低脂肪高炭水化物食(C群)および14%添加し、等カロリーとなるように炭水化物量を減らした高脂肪低炭水化物食(F群)とした。この試験食を4週間(Exp. 1)あるいは9週間(Exp. 2)マウスに与え、絶食せずに屠殺した。

【結果】 Exp. 1, 2ともに終体重、摂食量、内臓脂肪重量に群間で差はなかったが、Exp. 1では摂食効率がC群と比較してF群で高かった。Exp. 1ではF群で脂肪消費量が高く、炭水化物消費量は低かったが、総エネルギー消費量は群間で差はなかった。Exp. 2ではExp. 1と同様の傾向であったが、有意差はなかった。Exp. 1では肝臓トリアシルグリセロール濃度がF群で高かったが、Exp. 2では群間で差はなかった。Exp. 1では肝臓脂肪酸合成系酵素活性がF群で低かったが、Exp. 2では群間で差はなかった。Exp. 1, 2ともに肝臓β酸化系酵素活性は群間で差はなかった。

【考察】 内臓脂肪蓄積に食餌脂肪量の影響はなかった。高脂肪低炭水化物食により、短期的には肝臓トリアシルグリセロールの蓄積がみられたが、長期的には体内の脂質代謝が徐々に高脂肪量流入に適応する可能性が示唆された。

B13

長期的な日本食摂取がマウスの健康維持に与える影響

○本間太郎¹、治部祐里²、川上祐生²、都築 毅¹、仲川清隆¹、宮澤陽夫¹
(¹東北大・院・農、²岡山県大・保福・栄養)

【目的】日本人の平均寿命は着実に延び、長寿国として知られている。長寿の理由の一つとして日本人の食生活が注目され、日本食は健康食として世界中で研究されている。しかしこれらの研究は、単一もしくは数種の食品成分の短期的摂取による影響を検討しているものが主体であり、これらの成分が集まった「日本食」そのものの「長期的摂取」がどう影響するかは明らかではない。また日本食の内容は、食の欧米化とともにここ 40~50 年間で大きく変化し、加えて生活習慣病の罹患率が増加している。そのため、現在の日本食が本当に健康維持に有益か疑わしい。そこで本研究では、生活習慣病発症予防や老化遅延に効果的な日本食を明らかにするため、様々な年代の日本食の健康有益性をマウスを用いて検討した。

【方法】管理栄養士の指導の下、国民健康・栄養調査に基づき 2005 年、1990 年、1975 年、1960 年それぞれ 1 週間 21 食分の日本食の献立を再現し、調理したものを凍結乾燥・粉末化した。作製した各年代の日本食をそれぞれ通常飼育食 (CE-2; 日本クレア) に混合して 30%日本食含有飼料とし、正常マウスである ICR マウス (4 週齢、雄性) または老化促進モデルである senescence-accelerated mouse (SAM) P8 マウス (4 週齢、雄性) に 8 ヶ月間自由摂食させた。試験飼育終了後、屠殺し、各種分析に供した。

【結果】ICR マウス、SAMP8 マウスともに 1975 年の日本食含有飼料を摂取した群で白色脂肪組織への脂質蓄積量が少なかった。加えて、SAMP8 マウスでは肝臓への脂質蓄積が抑制され、老化による脂肪肝発症リスクが抑制されていることが示唆された。以上より、1975 年付近の日本食の成分に高い健康有益性が期待でき、老化遅延に効果的であることが示唆された。

B14

日本食が授乳期の母親を介して子供の健康に与える影響

○畠山雄有¹、北野泰奈¹、本間太郎¹、治部祐里²、川上祐生²、都築毅¹
(¹東北大院・農、²岡山県大・保福)

【目的】我々は以前に日本食まるごとを摂取したラットで、米国食と比べてカロリー制限様の遺伝子発現変化が起こることを明らかにした。カロリー制限食は健康維持に有益な食事として知られているが、妊娠授乳期の母親のカロリー制限は子供の将来の健康に悪い影響を与えることが知られている。そこで本研究では、日本食が母親の母乳を通して子供の健康にどのような影響を与えるかを検討した。さらに、日本食は時代と共に変化してきており、最近我々は、1960年から2005年の日本食まるごとをマウスに与えた研究で、日本食の健康への影響が年代によって異なることを明らかにしている。よって本試験では、様々な年代の日本食を使用した。

【方法】国民栄養調査に基づいて作製した 2005 年、1990 年、1975 年、1960 年の日本食を凍結乾燥・粉碎して粉末化日本食とした。各年代の粉末化日本食を通常飼育食 (粉末 CE-2) と 1:1 で混合したものと通常飼育食のみ (コントロール) を授乳期の母マウスに与えた。仔を 18 日齢で解剖し、各種分析に供した。加えて、上記と同様な方法で飼育し、離乳させ、その後仔を高脂肪食で飼育し、11 週齢で解剖し、各種分析に供した。

【結果】18 日齢において 1975 年群と 1960 年群の肝臓トリアシルグリセロール (TG) 量がコントロール群と比べて有意に高値となった。肝臓の組織学的観察を行ったところ、特に 1975 年群で肝細胞に脂肪が蓄積している様子が観察された。11 週齢において 1975 年群の肝臓 TG 量と肝細胞の脂肪蓄積量は他の群と比較して、依然として多かった。以上により、授乳期における 1975 年の日本食摂取は仔の肝臓の脂質蓄積を促進し、成長後も持続することから、脂肪肝の発症リスクが上昇すること示唆された。

B15

食品レクチンが腸管輸送機能に及ぼす影響

○根本諒、山本進太郎、富山舞、永沼孝子、小川智久、村本光二
(東北大院生命科)

【目的】レクチンは糖鎖を認識し、特異的に結合するタンパク質の総称であり、様々な食品に含まれている。演者らは、大豆などのレクチンがイソフラボン等の輸送を増加させていることを報告し、レクチンが腸管輸送機能に影響をおよぼすことを見出した。本研究では、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞単層膜における、輸送経路が既知の蛍光マーカーの透過量や経上皮電気抵抗 (TER) 値を測定することにより、多様なレクチンが腸管輸送におよぼす影響をさらに検討することを目的とした。

【方法】メンブレンフィルター上に Caco-2 細胞単層膜を調製し、レクチンと蛍光マーカーを管腔側に添加した。37°C で 2 時間インキュベートし、基底膜側の蛍光マーカー量を逆相分配系 HPLC を用いて測定した。また、インキュベートの前後での TER 値を測定した。

【結果】コムギ胚芽レクチン (WGA)、マッシュルームレクチン (ABA)、麴菌レクチン (AOL)、シロサケ卵レクチン (CSL3) はタイトジャンクション開閉状態の指標である TER 値を減少させ、傍細胞経路の指標であるルシファーイエロー (LY) の透過量を増加させた。他にも、モノカルボン酸トランスポーター介在経路の指標であるフルオレセイン (FL)、P 糖タンパク質介在流出経路の指標であるローダミン 123 (RH)、多剤耐性関連タンパク質介在流出経路の指標であるカルセイン (CA) の輸送において、種々のレクチンが影響をおよぼした。これらの結果からレクチンはそれぞれ異なる機構によって輸送経路に作用していることが示唆され、その作用は Caco-2 単層膜への個々のレクチン特異的な糖結合特性によると考えられる。

B16

バオバブ果実繊維抽出物の AGE 生成に及ぼす影響

○大友陽夫¹、伊藤芳明¹、相澤恭²、長澤孝志¹

(1 岩手大学・院農・応用生物化学、2 東洋精糖株式会社研究開発部)

【目的】糖尿病による高血糖下ではタンパク質と還元糖が非酵素的に反応し終末糖化生成物 (AGE) を形成する。生体内における AGE の蓄積は、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症などの糖尿病合併症の発症と関連がある。AGE の形成には活性酸素が密接に関わっており、抗酸化力を持つポリフェノールが AGE の形成を抑制する成分として注目されている。バオバブ (*Adansonia digitata*) はアフリカ大陸に分布する植物であり、果実に含まれる繊維に抗酸化活性を示す成分が含まれていることが報告されている。そこで本研究では、バオバブ繊維抽出物の抗酸化活性と抗糖尿病効果についての評価を行った。

【方法】バオバブ果実繊維の 80%メタノール抽出物を酢酸エチルと水で分画してそれぞれの画分の DPPH ラジカル消去活性、ORAC、SOD 様活性を測定した。また、牛血清アルブミン (BSA) -フルクトースの反応系における抗グリケーション活性を測定した。また、バオバブ果実繊維抽出物添加飼料を STZ 誘導 1 型糖尿病ラットに 4 週間与え、*in vivo*における抗糖尿病効果について検討した。

【結果と考察】バオバブ繊維抽出物は DPPH ラジカル消去活性、ORAC 法、SOD 様活性において高い抗酸化活性を示した。また、フルクトースによる BSA のグリケーションを抑制した。動物実験では、バオバブ果実繊維抽出物は糖尿病による腎臓 AGE、血漿中 ALT、AST の増加をわずかに抑制させる傾向を示したが、血糖値には影響を与えなかった。*in vitro*の実験で示された抗酸化活性および抗グリケーション活性に対して、*in vivo*における効果が小さかったことからバオバブ果実繊維抽出物は消化管における吸収率が低いということが考えられた。

B17 Entech7200-GC×GC-TOF-MS を用いた三陸産ワカメの香気物質探索 ○加藤恭子、小枝まどか、中野晴日、小野久弥、宮崎雅雄、山下哲郎（岩手大）

【目的】食品の香りは、非常に多種多様の揮発性物質が複雑に組み合わせられて構成されている。よって食品の香りを特徴付ける香気成分の探索で、揮発性物質の GC-MS 解析は第一の選択肢である。この解析では、香気成分の比率をできるだけ保ち、微量成分であっても確実に濃縮できる前処理法と高分解能の質量分析装置の組み合わせが望ましい。そこで本研究では、Entech7200 自動濃縮装置と包括的 GC×GC-TOF-MS をオンラインで接続した分析システムを構築し、三陸産ワカメから揮発する化合物の網羅的解析を試みた。

【方法】三陸産の原藻ワカメ、塩蔵ワカメ 10g を 1L 容器に密閉し、そのヘッドスペースガス 100ml を Entech7200 で濃縮後、GC×GC-TOF-MS (Pegasus4D、LECO) で解析した。

【結果】本分析システムで原藻ワカメと塩蔵ワカメからそれぞれ 2000 個以上、1000 個以上の化合物が検出された。ライブラリーサーチの結果、類似度 80%以上の化合物は、原藻ワカメ 888 個、塩蔵ワカメ 577 個であった。更に原藻ワカメと塩蔵ワカメについて多変量解析を行った結果、Fisher Ratio100 以上の化合物は 150 個以上同定された。食品から揮発する全ての化合物が香りに寄与するわけではなく、主成分でも香りに寄与しない化合物や、ごく微量でも香りに大きく寄与する化合物もある。よって、今後にはおい嗅ぎ GC など活用して三陸産ワカメに特徴的な香気成分を探索する予定である。

B18 におい識別装置 FF-2020 による三陸産ワカメのにおい分析と評価 ○小枝まどか、加藤恭子、小野久弥、宮崎雅雄、山下哲郎（岩手大学）

【目的】我々は、三陸産ワカメのにおい質が他産地ワカメと異なるか検証するためにワカメの香りを客観的に評価する方法の確立を目指している。通常においは主観的感覚として提起されるが、においの主観的感覚は個人差が大きい為、官能試験でワカメのにおいを客観的に評価することは難しい。においの分析では、試料中の揮発成分をガスクロマトグラフで分析する手法がよく用いられるが、揮発成分の定性・定量結果でにおいの質を説明することは不可能である。そこで本研究では、10 個の酸化半導体センサーを備えたにおい識別装置を用いて三陸産ワカメのにおいの質と強さを数値化して客観的に評価できるか検証した。

【方法】2 社から入手した三陸産ワカメ 2 種、中国産ワカメ 1 種、コーヒー豆 2 種、柑橘果実 2 種、生魚 2 種のヘッドスペースガスを 5L テドラーバックに回収してにおい識別装置 (FF-2020 S システム、島津製作所) で分析した。各試料の分析で 10 個のセンサー値が得られるので、分析結果は 10 次元上にベクトル表示し各試料の類似度を計算した。また主成分分析とクラスター解析も行った。

【結果】主成分分析によりワカメ、コーヒー、柑橘果実、生魚がにおい識別装置で大別できたので、酸化半導体センサーでワカメのにおいを識別できることが分かった。3 つのワカメの 2 ガス間の類似度の比較で、わかめのにおい質の産地や状態の違いも詳細に識別できる可能性が示唆された。またにおいの強さを表わす臭気指数相当値から同じワカメであっても、においの強さが有意に異なることが分かった。以上の結果、三陸産ワカメのにおいの質や強さを客観的に評価するために、酸化半導体センサーを備えたにおい識別装置は非常に有効であることが明らかとなった。

B19

米麴を利用したグルテンフリー米粉パンの膨らみ向上のメカニズム

○濱田茂樹^{1,2}、鈴木啓太郎²、鈴木保宏²

(弘前大・農生¹、(独)農研機構・作物研²)

【目的】グルテンフリー米粉パンの製法では、パンの膨みを向上させるために、一般的にはグアガムやヒドロキシプロピルメチルセルロースといった増粘多糖を用いる。しかし、コストや食味、安全性の観点からこれまでの添加剤に頼らない新たな方法が求められている。これまでに、米麴を用いた醗酵によって膨らみの良いグルテンフリー米粉パンを製造することに成功している。そこで本研究では、米麴による膨らみの原因を解明することを目的とした。

【方法】米粉パンの製法を以下に示す。白米粉と水で水分含量 55% の生地 400 g を調製し、市販の米麴 20 g を添加した後、ミキサーで攪拌、55℃に 12 時間静置することで米麴による前醗酵を行った。その生地に副材料を加え攪拌し、38℃でイースト醗酵させた後、150℃・30 分で焼成した。麴醗酵時間とともにパンの比容積および各種酵素活性を測定し、膨らみと酵素の因果関係を解析した。さらに、米麴由来の食品添加用酵素を用いて同様に製パン試験を行った。また酵素処理を行った生地について、生地粘性や米粉粒子の沈降性、顕微鏡観察による生地形態などを解析した。

【結果】米麴による前醗酵に最適な温度は、55℃前後であることがわかった。麴醗酵中の生地における酵素活性測定から、プロテアーゼ活性が醗酵時間の経過とともに上昇し、パンの比容積向上との間に正の相関を示した。さらに、米麴由来の食品添加用酵素製剤を用いた製パン試験からも、プロテアーゼが比容積向上に寄与することが示された。プロテアーゼ処理は、生地中の貯蔵タンパク質（特にグルテリン）を部分分解し、その変性タンパク質が凝集することで、生地の粘性や沈降性などの物理特性を変化させることが明らかとなった。

一般講演

C 会場

C01 ショ糖による翻訳抑制を受ける bZIP 型転写因子遺伝子の改変による高ショ糖植物の分子育種

○田中俊、タロール・スニールクマール、朱旭君、トーマス・ベルベリッヒ¹、
草野友延（東北大・院生命、¹Biodiversity and Climate Research Center）

【背景】シロイヌナズナ *AtbZIP11* 遺伝子では、ショ糖により bZIP タンパク質をコードする主 ORF の翻訳が抑制される現象 (Sucrose-induced repression of translation, SIRT と略称) が報告されている。この SIRT には *AtbZIP11* の進化的に保存された upstream ORF の存在が必要であることも示されていた。

【目的】SIRT を引き起こす bZIP 型転写因子遺伝子を改変することによる高ショ糖植物の分子育種の可能性を検討することを目的とした。

【結果】

(1) タバコの老化誘導性遺伝子として単離された *tbz17* 遺伝子由来の cDNA の 5' 非翻訳領域には進化的に保存された upstream ORF が存在している。このタバコ遺伝子は、*AtbZIP11* 遺伝子に極めて近縁の遺伝子であるが、*tbz17* 遺伝子においても SIRT が起こることを確認した。さらに SIRT の際に進化的に保存された upstream ORF が要求されることを確認した。

(2) *tbz17* 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (upstream ORF を含む) を除いた形を過剰発現する形質転換タバコ植物を作出した所、得られた植物ではいずれも野生株に比べて約 4 倍高いショ糖を含んでいた。

(3) 今回の結果を踏まえ、高ショ糖含有植物を作出する手法を論議する。

C02 シロイヌナズナのエコタイプ間に見られる重金属感受性の違いとヒ酸反応性決定遺伝子マッピングの試み

○木幡光、井上雅貴、國廣俊太、松田大樹、藤井伸治、ショハブ・ユセフィアン¹、
高橋秀幸、草野友延（東北大・院・生命、¹秋田県立大・生物資源）

【目的】カドミウム (Cd) および 5 価のヒ素 [As (V)] に対するシロイヌナズナの約 100 種類のエコタイプの感受性を明らかにすること、および As (V) 反応性決定遺伝子が座乗する染色体領域の特定を目的とした。

【方法】重金属の培地への添加により生じるシロイヌナズナの根の伸長阻害率を算出し、重金属感受性の指標とした。また、As (V) 耐性のエコタイプである Col-0 と、感受性のエコタイプである Pro-0 との交配後代を用いて、As (V) 耐性遺伝子の遺伝解析を行うとともに、座乗染色体領域を決定した。

【結果】(1) Cd および As (V) に対する感受性はエコタイプにより大きな違いがあることが分かった。そして Cd に対する感受性と As (V) に対する感受性には相関が認められなかった。

(2) As (V) 耐性の Col-0 と As (V) 感受性の Pro-0 とを交配し、得られた F₁ 株の As (V) 反応性を解析した結果、全ての F₁ が As (V) 耐性であった。さらに F₁ の自殖により得られた F₂ 株の As (V) 反応性は、As (V) 耐性 : As (V) 感受性 = 3 : 1 に分離したことから、Col-0 の As (V) 耐性は 1 遺伝子に支配される優性形質であると結論された。

(3) F₂ 株を用いた SSLP マーカーおよび CAPS マーカーを用いた解析により、As (V) 反応性決定遺伝子が座乗している 2 番染色体の領域を決定した。

C03

ポリアミン酸化酵素5の機能欠損がシロイヌナズナの生育へ及ぼす影響

○金東煜、村山千尋、新津勝¹、トーマス・ベルベリッヒ²、草野友延
(東北大・院生命、¹城西大・薬、²Biodiversity and Climate Research Center)

【目的】演者らはシロイヌナズナに存在する5種のポリアミン酸化酵素遺伝子につき、解析を行ってきた。大腸菌で調製した組換え AtPA05 酵素は、テトラアミンであるスペルミンとサーモスペルミンをトリアミンであるスペルミジンへ逆変換することを2013年の年会で報告した。今回、シロイヌナズナでのポリアミン酸化酵素5の役割をさらに明らかにすることを目的とした。

【方法】ポリアミン酸化酵素5 (*AtPA05*) 遺伝子につき、T-DNA 挿入による loss-of-function 変異体を用いて、シロイヌナズナの生育への影響を調べた。

【結果】*pao5-1*、*pao5-2*の2つの loss-of-function 変異体のポリアミン含量を調べた所、プトレシン、スペルミジン、スペルミンの含量は親株と同程度であったが、サーモスペルミン含量が約2倍となっていた。上述の組換え AtPA05 酵素の基質特異性の結果を加味すると、AtPA05 はシロイヌナズナ植物体においてサーモスペルミン酸化酵素として機能することが強く示唆された。幼植物の生育において、野生株と *pao5-1*、*pao5-2* との間には差が見られなかったが、培地に低濃度のサーモスペルミンを加えると変異体の著しい生育阻害が見られた。また、この生育阻害は他のポリアミンではより高濃度の添加によっても観察されなかった。さらに、*pao5-2* に野生株由来の *AtPA05* 遺伝子を導入した植物では、サーモスペルミン含有培地での生育阻害が見られなくなることを確認した。上記の結果をもとに、ポリアミン酸化酵素5のシロイヌナズナでの役割を考察する。

C04

Bacillus circulans KA-304 由来 α -1,3-グルカナーゼの基質結合ドメイン

○矢野 成和¹、Suyotha Wasana²、立木 隆²、若山 守² (¹山形大院・バイオ化工、²立命館大院・生命・生工)

【目的】 α -1,3-グルカナーゼは、細菌が生成するグリコシダーゼファミリー87型 (GH 87型) と、真菌が生成する GH 71 型に大別される。我々は、*Bacillus circulans* KA-304 が GH 87 型 α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA) を生成すること、Agl-KA が *B. circulans* KA-304 由来の GH 19 型キチナーゼと共同して *Schizophyllum commune* 菌糸よりプロトプラストを生成することを明らかにした。Agl-KA は、N-末端から、Discoidin ドメイン I (DS1)、Carbohydrate binding Module 6 型ドメイン (CB6)、Discoidin ドメイン II (DS2)、機能未知ドメイン (UCD)、触媒ドメインから構成されており、DS1、CB6、DS2 が、 α -1,3-グルカンの結合に関わるドメインであることも明らかにした。本報では、Agl-KA の DS1、CB6、DS2 ドメインが α -1,3-グルカン分解に与える影響を調べた。

【方法と結果】Agl-KA の DS1、CB6、DS2 ドメインを欠失させた変異酵素 Agl-KA Δ DS1、Agl-KA Δ CB6、Agl-KA Δ DS2 を調製した。欠失変異酵素の α -1,3-グルカン分解活性を調べた結果、Agl-KA と比べて、すべての変異酵素の分解活性がわずかに低下した。さらに、プロトプラスト生成活性を比較したところ、反応 10 時間後の Agl-KA のプロトプラスト生成数は 2.2×10^6 cells/ml、Agl-KA Δ DS1 と Agl-KA Δ DS2 はおよそ 1.4×10^6 cells/ml であったが、Agl-KA Δ CB6 の場合は 0.4×10^6 cells/ml と著しく低下した。

C05

Aspergillus oryzae 由来 GH78 ファミリーの α -L-ラムノシダーゼについて

○室岡和宏、塩野義人、小関卓也（山形大学・農学部）

【目的】 α -L-ラムノシダーゼはナリンギンやルチン等、フラボノイド配糖体の末端に存在する α -L-ラムノースを加水分解する酵素であり、グレープフルーツジュースなど、柑橘類の苦味を低減させる目的で工業的に利用されている。柑橘類の加工として重要な役割を持っているラムノシダーゼをコードする遺伝子は *Aspergillus oryzae* にも複数保有することが考えられるが、これまで特徴付けまでに至っていない。今回は *A. oryzae* ラムノシダーゼ遺伝子の探索について報告する。

【方法】 *A. oryzae* RIB40 由来 GH78 ファミリーのラムノシダーゼ様遺伝子 (*AorhaB*、*AorhaC*) を *Pichia pastoris* を用いて発現させた。*AorhaB* については典型的なシグナル配列が見られなかったため遺伝子全長をベクター (pPICZB) に挿入、*AorhaC* は典型的なシグナル配列が存在しているためシグナル配列を除いてベクター (pPICZ α A) に挿入した。ラムノシダーゼ活性は合成基質である p-ニトロフェニル- α -L-ラムノピラノシドを用いて分光光学的方法より測定を行った。

【結果】 酵母由来シグナル配列を用いた *AoRhaC* については、培養液に最大 0.030[U/ml] という活性を示した。*AoRhaC* は他のラムノシダーゼとは相同性の低いタンパク質であったが、ラムノシダーゼ活性が確認されたため、この遺伝子はラムノシダーゼ遺伝子であるということを示唆している。*AoRhaB* についても、同様に培養液から 0.0024[U/ml] と *AoRhaC* ほど高くはないが、ラムノシダーゼ活性を示した。典型的なシグナル配列が見られなかったにも関わらず、培養液中にラムノシダーゼ活性が見られたことから典型的ではないが、シグナル配列が含まれており、酵母においても機能しているということが示唆された。

C06

Aspergillus oryzae 由来タンナーゼの基質特異性の解析

○水野聖之、塩野義人、小関卓也（山形大学・農学部）

【目的】 タンナーゼはタンニンなどに存在する没食子酸のエステル結合（デブシド結合）を加水分解する酵素で、ワインや茶飲料の製造の際に清澄工程に利用されている。これら食品加工で利用されるタンナーゼはこれまで *Aspergillus oryzae* 由来の酵素が多く使用されてきているが特徴付けされている糸状菌タンナーゼはごくわずかである。今回、*A. oryzae* タンナーゼのネイティブとリコンビナント酵素の酵素化学的性質の違いについて報告する。

【方法】 *A. oryzae* 由来のタンナーゼは市販のタンナーゼ製剤から精製するとともに、*A. oryzae* RIB40 由来のタンナーゼ遺伝子 (*AotanaA*) を *Pichia pastoris* を用いて発現させた。タンナーゼ活性は合成基質として没食子酸メチル、没食子酸エチル、没食子酸プロピルを、天然基質として(-)-カテキンガレート、(-)-エピカテキンガレートおよび(-)-エピガロカテキンガレートを用いて分光光学的方法により測定した。

【結果】 SDS-PAGE からリコンビナント *AoTanA* の分子量は 45kDa-70kDa の幅広いバンドを示した。また、エンドグリコシダーゼ H 処理後では、*AoTanA* は 30kDa と 34kDa の二つのバンドを示した。ネイティブの精製酵素でも SDS-PAGE は二つのバンドを示し、リコンビナント酵素と同様に特異的なプロセッシングが示唆された。タンナーゼ基質に対する比活性はネイティブでリコンビナント酵素よりもわずかに高い傾向が見られた。また、合成基質よりも天然基質に対して高い触媒効率を示し、中でも(-)-エピカテキンガレートに対して最も高かった。*A. oryzae* タンナーゼの基質特異性は、基質構造の違いにより触媒効率に影響が現れたことから、ポリフェノールの化学構造も関係していることが示唆された。

C07 プラスミド伝達性クラスCβ-ラクタマーゼ MOX-1 のX線結晶解析

○小栗拓馬（山形大・理）、古山雄光（山大・理工学研究科）

石井良一（東邦大・医）、井深章子（山形大・理）

【目的】β-ラクタマーゼ遺伝子を持った耐性菌の存在が臨床の場で問題となっている。β-ラクタマーゼはペニシリンに代表される抗生物質β-ラクタム剤を分解する酵素であり、クラスA, B, C, Dの4グループに分類される。MOX-1はクラスCで、モキサラクタムを含むセファロsporin系β-ラクタム剤を加水分解する。本研究では、β-ラクタマーゼ MOX-1 活性部位の構造の解明・立体構造と基質特異性の解明を目的とした MOX-1 のX線結晶解析を行った。

【方法】大腸菌 BL21 (DE3) で発現した MOX-1 を Ni-NTA アフィニティクロマトグラフィーによって精製し、ハンギングドロップ法による結晶化を行った。得られた結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構で回折データを収集した。

【結果と考察】結晶は分解能 1.5Åまで回折し、非対称単位に MOX-1 が1分子あった。N末端、Asn213 及び Pro214、Glu303 から Ser306 までのループの立体構造は定まらなかった。MOX-1 では基質認識部位が *E. coli* AmpC よりも広く開いており、これがモキサラクタムの加水分解に必要であることが示唆された。

C08 亜鉛要求型メタロβ-ラクタマーゼ IMP-18 の結晶構造解析

○古山雄光¹、石井良和²、大谷典正³、井深章子³

(¹山形大院理工、²東邦大医、³山形大理)

【目的】β-ラクタマーゼは臨床で多用されるβ-ラクタム系抗生物質を加水分解する酵素である。細菌は主としてβ-ラクタマーゼを生産することでβ-ラクタム系抗生物質に対する耐性を獲得する。中でも亜鉛要求型メタロβ-ラクタマーゼは第三世代セフェムやカルバペネム系薬剤を含むほぼすべてのβ-ラクタム剤を分解する。また臨床で使用できる阻害剤はまだ存在しないため、特に危険視されている。本研究では亜鉛要求型メタロβ-ラクタマーゼ IMP-18 の結晶構造解析を行った。

【方法と結果】IMP-18は大腸菌 BL21 (DE3) を宿主として発現させた。培養後の培地を分取し、80% 硫酸分画によりタンパク質沈殿を回収した。PD-10 による脱塩後、TOYOPEARL CM-650S を用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよび Superdex 75 10/300 GL を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行ったところ、結晶化温度 10 °C でクエン酸バッファー (pH 5.2)、3 %v/v グリセロール、20 %w/v ポリエチレングリコール 4000 を含むリザーバー溶液を用いた際に X 線結晶構造解析に適した結晶が得られた。高エネルギー加速器研究機構 BL-5A にて回折実験を行い分解能 2.6 Å のデータが得られた。現在は更なる高分解能データを得るために精製・結晶化条件の検討および阻害剤との共結晶を用いた構造解析の検討を進めている。

C09

Rhodobacter capsulatus と *Rhodospirillum rubrum* 間でのキメラ型コハク酸-ユビキノ還元酵素の作製

福士実咲¹、柴谷恵太¹、Hendri Aldrat²、北潔²、Fevzi Dalal³、○坂元君年¹
(¹弘大・農生・分子生命、²東大院・医・生物医化学、
³Dept. of Biol., Univ. Pennsylvania)

【目的】細菌の細胞膜やミトコンドリア内膜で機能する呼吸鎖電子伝達系は一連の酵素複合体の反応により、生物のエネルギー転換反応を担う。その一つ、コハク酸-ユビキノ還元酵素 (Succinate-Quinone Reductase, SQR) は呼吸鎖電子伝達系と TCA 回路を繋ぐ重要な酵素複合体であり、細菌、真核生物を通して結晶構造解析がなされた例が比較的多い一方で、アミノ酸変異体の解析は技術的な問題から大腸菌と出芽酵母に集中している。膜酵素である SQR の親水性サブユニットは生物種間でのアミノ酸配列の一致率は高いが、膜貫通サブユニットにおける一致率は極めて低い。その為、類似性の低い部位に関しては大腸菌や出芽酵母において変異体解析を基に機能が提唱されたアミノ酸残基が他の生物において他のアミノ酸に置換されている例も少なくない。SQR の基質の一つは脂溶性のキノンであり、その結合部位周辺の解析に大腸菌や出芽酵母をモデルとして一般論を導くことには限界がある。そこで我々はより広範囲な生物での情報を得るシステムを作るために紅色光合成細菌 *R. capsulatus* を発現宿主とした異種生物 SQR の発現系開発に着手した。

【結果】内在性の SQR を欠損した *R. capsulatus* を発現宿主として *R. rubrum* の SQR を機能的に発現することが可能であった。さらに親水性部位は *R. rubrum*、膜貫通サブユニットは *R. capsulatus* 由来の遺伝子を持つ変異体から酵素活性を持つキメラ酵素の発現が確認できた。この異種発現系で得られた組換え *R. rubrum* SQR、キメラ SQR について幾つかの阻害剤に対する感受性を調べた。

C10

マウス歯牙形成における LGR4 の機能解析

○山上友希子、大山一徳、毛利泰彰、西森克彦
東北大学農学研究科 分子生物学分野

食物を摂る入口の臓器である「歯」は、栄養を効率よく摂取する「噛む」機能を担っている。このように「歯」は、食を支える最初の重要な器官の一つである。ヒトを含む哺乳類の歯の形成は、胎児期から始まり、歯胚と呼ばれる組織において、上皮細胞・間葉細胞間の複雑なシグナル伝達によって細胞分化が制御されている。本研究では上皮組織の細胞分化を制御する新規受容体遺伝子 LGR4 の、歯胚形成における機能解析を行った。

本研究では始めに LGR4 の遺伝子領域に蛍光タンパク質 EGFP を組み込んだレポーターマウスを用い、歯胚の発生時期における LGR4 の発現パターンを解析した。その結果 LGR4 が胎児期 14.5 日 (E14.5) より歯胚上皮細胞の Bud 構造で発現している事を見出した。次に *Lgr4*^{-/-} マウスを用いて E14.5、出生直後における歯胚組織の形態観察を行ったところ、第二臼歯歯胚から形成される第三臼歯原基の形成不全が観察された。*Lgr4*^{-/-} マウスは出生後に致死を引き起こすため、成獣齢まで生存可能な *Lgr4*^{KO} マウスを用いて上皮組織特異的に *Lgr4* を欠損させ、成獣齢マウス (11 週齢) の歯牙形態観察を行った。その結果、25% のマウスで第三臼歯の欠損が認められ、また残りのマウスについても第三臼歯の矮小化が認められた。この結果は、*Lgr4* が連続的な臼歯発生を特異的に制御する事で第三臼歯の発生に必須の機能を有する事を証明した世界で初めての結果である。

C11

乳腺上皮細胞における Lgr4 の機能解析

○霜田貴宏、大山一徳、毛利泰彰、西森克彦

東北大学大学院 農学研究科応用生命科学専攻 分子生物学分野

【目的】Lgrs(leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptors)ファミリーに属する Lgr4 は様々な組織の発生に関係する受容体タンパク質である。リガンドの不明なオーファンレセプターであったが、近年液性タンパク質 R-spondin と結合することで Wnt シグナルを亢進する機能を有することが明らかとなった。本研究では乳腺組織における Lgr4 の機能について解析を行った。

【結果と考察】乳腺組織における Lgr4 の発現パターンを解析したところ、二層構造からなる乳腺管腔上皮細胞のうち基底膜側の筋上皮細胞特異的に発現していることを見出した。Lgr4 null マウスは致死性を示すことから、我々は上皮組織特異的な Lgr4 コンディショナル KO マウスを作製し解析を行った。このマウスは乳腺管腔構造の伸長遅延、ブランチング数の低下、乳腺房の発達不全を示したことから、Lgr4 が乳腺組織の正常な発達に必要であることを強く示唆していると考えている。さらに乳腺管腔上皮細胞の細胞分離マーカーである CD24, CD49f を用い Lgr4 欠損マウスの乳腺細胞について FACS 解析を行ったところ、興味深いことに内腔上皮細胞画分が加齢に伴い減少していた。更に詳細に乳腺管腔上皮細胞の機能制御・分化調節等において R-spondin/Lgr4 系が担う役割を明らかとする為、上記細胞の 3 次元培養を行ったところ、Wnt3a 存在下において R-spondin1 が細胞塊形成およびブランチング形成を促進することを見出した。

C12

大腸菌プロテアーゼ BepA は外膜タンパク質の組立と分解を促進する

○成田新一郎¹、舛井千草²、鈴木健裕³、堂前直³、秋山芳展²

(¹盛岡大・栄養科学、²京大・ウイルス研、³理研・グローバル研究クラスタ)

【背景】グラム陰性細菌の生存にとって外膜の機能が保たれていることは重要であり、細菌は表層ストレス応答機構を備えて外的環境の変化に対応している。 σ^E 経路は最も重要な表層ストレス応答機構の一つである。 σ^E レギュロンのメンバーである *bepA* (*yfgC*) 遺伝子は、プロテアーゼをコードすると推定されている。*bepA* 欠失株が薬剤感受性を示すことから、BepA は外膜の生合成あるいは品質管理に働いていると考えられているが、詳細な機能は不明であった。

【結果と考察】*bepA* 欠失株の薬剤感受性を指標にマルチコピーサプレッサーを選択したところ、LptE の過剰発現によって *bepA* 欠失株の薬剤感受性が抑制されることがわかった。LptE はリポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質 LptD の生合成に関与することが知られている。LptD は 2 組の連続した Cys 間にジスルフィド結合を持つ前駆体(LptD^C)の状態を外膜にターゲットされ、LptE との相互作用が引き金となってジスルフィド結合の組換えを行い成熟体(LptD^{NC})となる。*bepA* 欠失株では LptD^C から LptD^{NC} への変換の遅延が見られたことから、BepA は LptD のジスルフィド結合の組換えを伴うフォールディングを促進すると考えられる。また、LptE を枯渇させると LptD^C が蓄積するが、これらは BepA によって分解された。架橋実験およびプルダウンアッセイの結果、BepA は外膜タンパク質の生合成に関与する BAM 複合体と相互作用することがわかった。以上の結果から BepA は BAM 複合体の近傍で外膜タンパク質のアセンブリを促進する一方、フォールディングが阻害された際はそれらを取り除く働きをするシャペロン/プロテアーゼであると考えられる。

C13

バイオマスを原料とした *cis, cis*-ムコン酸のバイオ合成効率化に向けた protocatechuate decarboxylase 反応の強化
○園木和典、諸岡深雪（弘前大・農学生命）

【目的】 *cis, cis*-ムコン酸 (ccMA) は、ポリエステルやポリアミド等の樹脂原料として幅広く利用可能な化合物である。また非常に汎用性の高い樹脂原料であるテレフタル酸への変換も報告されている基幹化学品である。バイオマスを原料とした ccMA のバイオ合成法はこれまでも検討されてきたが、代謝中間体である Protocatechuate (PA) の脱炭酸反応 (PA decarboxylase (PDC) 反応) がボトルネックであり、現在までにその解決には至っていない。

本研究ではバイオマスを原料とした ccMA 生産のボトルネックである PDC 反応の強化方法を検討した。

【結果】 *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* A170-10 株由来の PDC をコードする遺伝子 *aroY* を生産させた組換え大腸菌は、培養液に添加した PA の 40% 程度しか脱炭酸できなかったが、phenolic acid decarboxylase subunit と相同性を有するタンパク質と AroY を共発現させた組換え大腸菌は、2 倍以上の PA 変換率を示した。

本研究の一部は JST 復興促進プログラム (A-STEP)、弘前大学若手研究者支援事業の支援を受けて実施した。

C14

大腸菌は D-アラニン飢餓ストレスにより積極的に死滅する
○梅宮真知、佐藤一樹、大内寿一、堀初弘、安藤太助、磯貝恵美子、米山裕
(東北大学院農学研究科・動物微生物学分野)

【目的】 大腸菌は 2 つのアラニン (Ala) ラセマーゼ (Alr、DadX) を有している。これらの酵素を欠損した二重変異株 MB2795 ($\Delta alr \Delta dadX$) は D-Ala 要求性を示し、D-Ala を含まない L 液体培地で培養すると急激な細胞死を来す。この細胞死の原因を探る目的で本研究を行った。

【方法】 D-Ala 添加 L 培地で前培養した MB2795 を、D-Ala を含まない L 培地あるいは最少培地に約 10^8 cells/ml 接種し、37°C にて振盪培養を行い経時的に残存生菌数を D-Ala 添加 L 平板にて計測した。また、浸透圧の影響を調べるために 2% NaCl あるいは 10% sucrose を両培地に添加し同様に残存生菌数を評価した。さらに、D-Ala 飢餓後に起こる細胞死の原因の一端を探るため、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコールの細胞死に与える影響を評価した。

【結果】 D-Ala を含まない液体培地に MB2795 を接種し培養開始 6-9 時間後において、L 培地では生菌数が約 10^{-4} に、最少培地では約 10^{-2} に低下した。D-Ala 欠乏による細胞壁合成阻害に起因する浸透圧溶菌の影響を調べるために、各培地に 2% NaCl と 10% sucrose を添加し、残存生菌数を計測した結果、最少培地では細胞死の抑制が認められたが、L 培地では抑制効果が認められなかった。次に D-Ala を含まない各培地にクロラムフェニコールを添加したところ、いずれの培地でも濃度依存的に細胞死が抑制された。以上のことより、D-Ala 飢餓ストレスによる細胞死には、遺伝情報の発現が関与すると考えられる。

C15

大腸菌の新規アラニン排出輸送体 AlaE の活性評価系の構築及び活性評価
○金 世怜, 堀 初弘, 安藤 太助, 磯貝 恵美子, 米山 裕 (東北大・院・農)

【目的】本研究室ではアラニン排出能を欠損した大腸菌変異株の分離に成功し、新規遺伝子 *ygaW* が大腸菌のアラニン排出輸送体をコードすることを初めて明らかにし *alaE* と命名した。本研究において我々は放射性標識した [³H]L-Ala を用いた AlaE の排出輸送活性評価系を構築し、これを用いた AlaE のアラニン排出輸送活性を評価することにした。

【方法】L-Ala および D-Ala 要求株 MLA301(親株)、AlaE 欠損株 ($\Delta alaE$)、クローン化した *alaE* 遺伝子を導入した形質転換体 ($\Delta alaE/pAlaE$) の Intact cell および inside-out membrane vesicles (ISO vesicles) を製作して各条件での [³H]L-Ala の細胞内あるいは ISO vesicles 内への取り込みを測定し AlaE の輸送活性を評価した。

【結果と考察】細胞内の蓄積量を調べた結果、AlaE が欠損した $\Delta alaE$ 細胞には L-Ala の排出能力の低下によって細胞内のアラニン蓄積量が親株及び *alaE* 遺伝子導入株より高かった。ISO membrane vesicles を利用してさらに AlaE の L-Ala 排出活性の詳細を評価した結果 $\Delta alaE/pAlaE$ 株の ISO vesicle が $\Delta alaE$ 株の ISO vesicle に比べて高いレベルの L-Ala を vesicle 内に蓄積した。また、この L-Ala の蓄積は AlaE 依存的に増加し、エネルギー源である NADH を添加すると取り込み量はさらに高くなった。この ISO vesicles を用いた AlaE の排出活性測定系は vesicle 外の L-Ala の濃度が高い。そこで、この L-Ala の化学ポテンシャルを除去するため、L-Ala をローディングした ISO vesicle を調整し内部と外部のアラニン濃度を等しくした条件のもとに実験した結果、L-Ala が AlaE によってエネルギー依存的に能動的に輸送されることが明らかとなった。

C16

大腸菌のアラニン分泌に及ぼすアミノトランスフェラーゼ過剰発現の影響
○勝部 哲, 佐藤一樹, 安藤太助, 磯貝恵美子, 米山 裕
(東北大学院農学研究科・動物微生物学分野)

【目的】大腸菌のアラニン (Ala) 合成経路を解明する過程で、我々は 3 つの主要な Ala 合成酵素 (YfbQ, YfdZ, AvtA) に加えセリン合成に関与する *serC* 遺伝子が Ala 要求株の最少培地での生育を相補することを見出した。また、大腸菌野生株は通常 Ala を分泌しないが、D-Ala 分解に関与する DadA を欠損した宿主にこれらの Ala 合成酵素遺伝子を導入すると、*serC* 形質転換体は主要な Ala 合成酵素遺伝子をもつ形質転換体より多くの Ala を分泌することを偶然見出した。そこで本研究では、Ala 要求性を相補することが最近報告されたアミノトランスフェラーゼ (SerC, AstC, ArgD, TyrB, PuvE, GabT, YgiG, AspC) の Ala 分泌に及ぼす影響を評価することにした。

【方法】各アミノトランスフェラーゼ遺伝子を持つ IPTG 誘導性発現プラスミド (ASKA) を DadA 欠損株に形質転換し最少培地にて対数後期まで培養した後、集菌、洗浄し最少培地に懸濁した。IPTG (1 mM) 添加後 37°C にて 1 時間振盪培養し、上清中に分泌された Ala を HPLC にて測定した。

【結果】Ala 要求性を相補する上記 8 つの ASKA プラスミドを導入した形質転換体は、主要な Ala 合成酵素遺伝子導入株と比較して Ala 分泌量が低いものもあったが、多くは同等以上の Ala 分泌量を示した。また、その中でも *puuE* 導入株の細胞外 Ala 量が最も高かった。

C17

チチタケ由来 *cis*-prenyltransferase のクローニングと機能解析

○家田偉史¹, 中村武志², 大谷典正²

(¹山形大学大学院・理工学研究科, ²山形大学・理学部)

【目的】天然ゴムは合成ゴムに比べ弾性や耐摩耗性に優れたタイヤ等ゴム工業製品に不可欠な天然材料であり、石油資源に頼らないエコ材料として注目を集めている。しかし、生体内でどの様にしてゴムが生合成されるかは不明な点が多い。そこでゴム合成機構解明のための新たな知見を得ることを目的とし、天然ゴム重合酵素である *cis*-prenyltransferase (CPT) の遺伝子クローニングおよび酵素機能解析を行った。

【方法】新鮮な天然のチチタケから total RNA を抽出し、cDNA ライブラリを作成した。Degenerate および RAGE PCR 法によってチチタケ由来 CPT (*Lv*CPT) の全長配列を決定した。pGold I (TaKaRa) に導入した *Lv*CPT を大腸菌で発現させてアフィニティーカラムで精製した後、放射線ラベルした基質モノマーの取り込み活性を測定した。また、*Lv*CPT を YEp352 (ATCC) へ挿入して温度感受性 CPT 欠損酵母 (SNH23-7D) に形質転換させ、23°C または 35°C で培養したときの生育差を観察した。

【結果と考察】全長 786 bp の *Lv*CPT をクローニングし、既存の CPT と高い相同性があることを確認した。これまでの報告と同様に *in vitro* での酵素活性は確認できなかった。一方、*Lv*CPT は 35°C において SNH23-7D 株の生育を補完できたため、*in vivo* で活性を持つことが示唆された。また、*Lv*CPT の触媒機構に関わる補因子が存在する可能性について検討している。

C18

3-desmethyl アリル性基質によるウンデカプレニルニリン酸合成酵素の阻害

○門崎雅史¹, 佐藤華奈¹, 中村武志², 大谷典正²

(¹山形大学大学院理工学研究科, ²山形大学理学部)

【目的】ウンデカプレニルニリン酸合成酵素 (UPS) はファルネシルニリン酸 (FPP) へのイソペンテニルニリン酸 (IPP) の *cis* 型連続縮合を触媒し、ウンデカプレニルニリン酸 (UPP) を生成する。UPP は細菌の細胞壁生合成に必須であるため、UPS 阻害効果の探索は新たな抗菌機能の発見に寄与することが期待される。これまでに、3 位のメチル基を欠失した人工基質である 3-desmethyl FPP が *trans* 型プレニルトランスフェラーゼを阻害することが報告されている。本研究では、アリル性基質の 3 位メチル基が *cis* 型プレニルトランスフェラーゼに及ぼす影響を検討した。

【材料及び方法】4 種の 3-desmethyl アリル性基質をアナログ基質として合成した (図 1)。BL21 (DE3) にて *Micrococcus luteus* B-P26 由来 UPS を大量発現させ、精製した。精製酵素、天然および人工基質、そして放射線ラベルした IPP を用いて反応速度論解析を行った。それらの取り込み様式を、ドッキングシミュレーション GOLD で解析した。

【結果及び考察】各アナログ基質は、反応速度論的解析において競合阻害もしくは混合阻害を示した。ドッキングシミュレーションにおいて FPP と同様の位置に結合することがわかった。特に desMe-E-GGPP は強力な競合阻害を示し、FPP よりも高い GOLD スコアを示した。desMe-E-GGPP はより優先的に反応部位に結合することで触媒反応を阻害していることが示唆された。

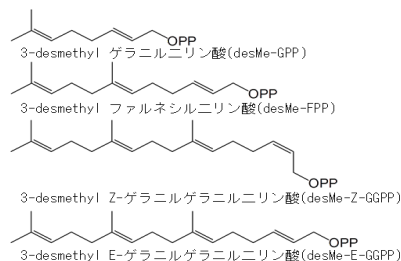


図 1. 各アナログ基質

C19

ヨーグルト乳酸菌の発酵と共生関係における NADH オキシダーゼの役割

○山本裕司, 山下瑞穂, 岡本ほさな, 川嶋紘子¹⁾, 堀内啓史¹⁾, 福井宗徳¹⁾,
佐々木泰子²⁾, 向井孝夫(北里大・獣医, (株) 明治・食品開発研¹⁾, 明治大・農²⁾)

【目的】ヨーグルトの製造に用いられる *Lactobacillus bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* は共生関係にあることが知られ、混合培養では発酵が亢進される。両菌の主要な共生因子であるギ酸は、*S. thermophilus* のピルビン酸ギ酸リアーゼ (Pfl) によって合成され、*L. bulgaricus* に供給されると推定される。Pfl は一般に酸素感受性の酵素であるため、酸素を除去する何らかの酵素が活性化に関与すると推測される。本研究では、*S. thermophilus* の酸素消費酵素として NADH オキシダーゼ (Nox) に注目し、欠損株を作製し乳中での生育を解析した。また、ギ酸の生成酵素と推定される Pfl についても欠損株を作製し併せて解析を行った。

【方法】実験には *L. bulgaricus* 2038 株、*S. thermophilus* 1131 株、*pfl* 欠損株、及び *nox* 欠損株を用いた。*S. thermophilus* の単独培養にはカゼインペプチド添加スキムミルク培地を、2038 株との共培養にはスキムミルク培地を用い、培地の pH の低下を発酵の指標とした。

【結果と考察】*S. thermophilus* の単独培養では、*nox*、*pfl* 欠損株の発酵は大きく遅延した。培養開始 6 時間では *pfl* 欠損株だけでなく *nox* 欠損株でもギ酸の蓄積は認められず、両株による発酵はギ酸の添加で復帰したことから、ギ酸が乳中での *S. thermophilus* の生育に寄与し、Nox が Pfl の活性化に必要と考えられた。また、アデニンの添加によって単独及び共培養時の *nox*、*pfl* 欠損株の発酵が回復したことから、ギ酸は主に *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* のプリン合成経路で使用されると推測された。

支部奨励賞

受賞講演要旨

(C 会場 (ぽらんホール))

昆虫と植物の防御に関わる化学因子の化学生態学

秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科 野下 浩二

はじめに

昆虫や植物は、外敵から身を守るために様々な防御戦略を発達させてきた。そのひとつに有毒な防御物質の生産などを基盤とした化学防御がある。その解明は、生態系での昆虫や植物の巧妙な生存戦略を知るばかりか、人類に有益な生物資源や化学因子の探索という点から非常に興味深い研究課題である。私は、これまで昆虫や植物の防御について以下の3つの課題を中心に研究を進めてきた。

1. 昆虫と植物の共進化における植物二次代謝産物の多様化

植物は、昆虫食害を回避するため、様々な二次代謝産物を生産する。一方、植食性の昆虫は、植物の防御網を突破しようとする。いったん防御物質が機能しなくなると、植物は新しい防御物質を作り、再び昆虫に対抗する。このように昆虫と植物が相互に影響し合い進化する過程は共進化と呼ばれるが、共進化の理論を証明する事例は少ない。

我々は、*Bursera* 属植物とその植食者である *Blepharida* 属ハムシを材料に、分子系統解析と化学分析を組み合わせ、*Bursera* 属の種の多様化が進むにしたがい、テルペンを中心とした葉に含まれる二次代謝産物の種類も増える方向に進むことを実証した^[1]。*Blepharida* 属ハムシが、化学成分の似た *Bursera* 種を好むことから、二次代謝産物の種類を多様化させることは、ハムシからの食害を回避する理にかなった防御戦略と言える。

2. 昆虫食害が誘導する植物のアミノ酸由来ニトリル化合物の生合成と機能

植物は、昆虫食害に対して、先の *Bursera* 属のように二次代謝産物をあらかじめ蓄積するなど直接的な防御機構を備えることに加え、天敵を誘引する揮発成分を生産するなど昆虫食害により特異的に誘導される防御能を持つ。

私は、農地周辺のいわゆる雑草やただの草の類に、意外と多くの害虫や天敵が見られることに着目し、未利用な生物相から有用生物資源の発掘を目指し、昆虫に食害された植物が放出する揮発成分と昆虫の関係を調べている。その過程で、植物成分として珍しいニトリル化合物、すなわち、マメコガネの食害を受けたオオイタドリ（タデ科植物）葉からフェニルアラニン由来のフェニルアセトニトリルを^[2,3]、ハムシに食害されたアレチマツヨイグサ（アカバナ科植物）葉からロイシン由来のイソバレロニトリルを同定した。これらニトリルの生成は、機械的に傷つけた植物葉からは確認できないが、植物ホルモンのジャスモン酸メチル (MeJA) で誘導されることから、昆虫由来のエリシターにより誘導されることが示唆される。また、アミノ酸由来の二次代謝産物の生合成において、前駆体のアミノ酸がどのように供給されるかこれまでほとんど議論されていなかったが、オオイタドリ葉中には、通常は余剰のアミノ酸が存在せず、フェニルアラニン生合成もまたマメコガネ食害や MeJA で誘導されることを明らかにした (図 1)^[3]。

一方、ハムシに食害されたアレチマツヨイグサ上には、ハムシを捕食する肉食性のルリクチブトカメムシがよく見られる。本カメムシは、食害葉やイソバレロニトリルに強い選好性を示した。ルリクチブトカメムシは、ハムシ以外にもモンシロチョウなど農業害虫である鱗翅目幼虫を捕食することから、新たな天敵昆虫として有望である。

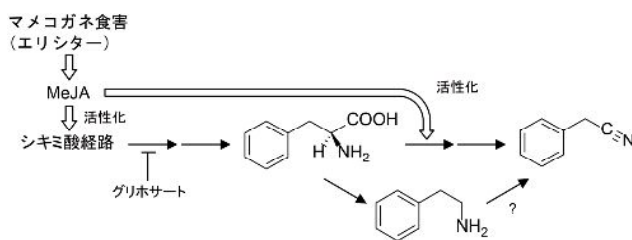


図 1. マメコガネ食害によりオオイタドリ葉中で起こるフェニルアセトニトリル生合成

3. カメムシ類の化学防御—そのおいと毒性—

カメムシが外敵に襲われると、(E)-2-hexenal や 4-oxo-(E)-2-hexenal (4-OHE) など不飽和アルデヒド類を含む臭気を放出すること (図 2) は広く知られているが、意外にも、どの臭気成分がどのように防御物質として機能するか実証例はほとんどなかった。我々は、カマキリを捕食者のモデルに、(E)-2-hexenal や (E)-2-octenal がにおいとして強い忌避活性を示す一方で、4-OHE など忌避活性を示さない成分もあることを明らかにした^[4]。一方、忌避活性のない 4-OHE が、摂食毒性^[5]や (E)-2-hexenal に比べ、非常に強い抗菌活性を持つことを報告している^[6]。α,β-不飽和アルデヒドの抗菌活性の強弱は、求核性化合物との反応性の違いにより説明できる。さらに、4-OHE が様々な昆虫の歩行や飛翔といった運動機能を不可逆的に阻害するユニークな殺虫活性を持つことを新たに見出した。4-OHE の作用が生体内チオール量を減少させることや、飛翔に必要なエネルギーを生産するプロリン代謝系の阻害であること (図 3) を明らかにしている。4-OHE は、アルツハイマー病の患者の脳に見られる過酸化脂質分解物と構造が類似する。防御物質としての 4-OHE の標的分子やカメムシが持つ 4-OHE に対する自家中毒回避機構を明らかにすることで、人類の健康に寄与する研究にも繋がると考える。

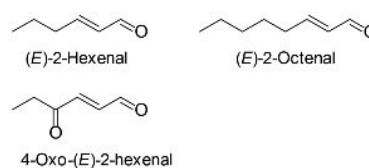


図 2. 代表的なカメムシ臭気成分

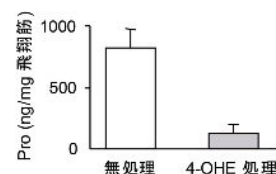


図 3. トンボ飛翔筋中のプロリン量

謝辞

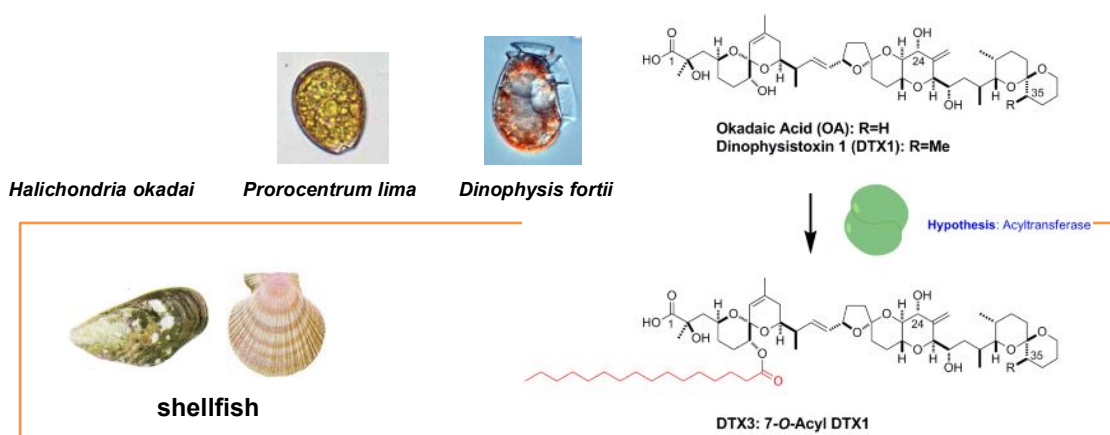
本奨励賞の受賞にあたり、日本農芸化学会東北支部支部長・西森克彦教授はじめ選考委員の先生方ならびに本賞にご推薦いただきました秋田県立大学生物資源科学部・田母神繁教授に厚く御礼申し上げます。また、留学時代に進化生態学的アプローチをご指導いただき、現在も共同研究を続けているアリゾナ大学の Judith X. Becerra 博士に深謝いたします。研究の手ほどきや研究に打ち込む姿勢などを通して、研究者としての基礎となる指針を与えてくださった学生時代の恩師である京都大学大学院農学研究科 (旧農薬研究施設) の桑原保正教授 (現 ERATO 浅野プロジェクト京都分室グループリーダー)、西田律夫教授、森直樹准教授に深く感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、田母神教授はじめ数多くのご助言やご指導をいただいた諸先生方ならびに共に研究を行った秋田県立大学の卒業生・在校生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Becerra JX, Noge K, and Venable DL, *PANS*, **106**, 18062–18066 (2009)
- [2] Noge K *et al.* *Molecules*, **16**, 6481–6488 (2011)
- [3] Noge K and Tamogami S, *FEBS Lett.*, **587**, 1811–1817 (2013)
- [4] Noge K *et al.*, *J. Chem. Ecol.*, **38**, 1050–1056 (2012)
- [5] Prudic KL, Noge K, and Becerra, *J. Chem. Ecol.*, **34**, 734–741 (2008)
- [6] Noge K *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1975–1978 (2012);

クロイツカイメンおよびホタテ貝による下痢性貝毒の蓄積機構
此木敬一（東北大院農）

研究概要：下痢性貝毒は世界各地で養殖業を脅かす動物性の自然毒である。主要原因毒であるオカダ酸 (Okadaic acid, OA) およびディノフィシストキシン 1 (Dinophysistoxin 1, DTX1) は、それぞれ渦鞭毛藻 *Dinophysis* 属、*Prorocentrum* 属により生産され、これら渦鞭毛藻が大量発生した海域で二枚貝の中腸腺に蓄積される。興味深いことに毒化した二枚貝の中腸腺には、OA および DTX1 の脂肪酸縮合体 (7-O-アシル体) が含まれている。ディノフィシストキシン 3 (Dinophysistoxin 3, DTX3) と命名されたこの脂肪酸縮合体は渦鞭毛藻からは検出されず、OA や DTX1 を取り込んだ二枚貝中で進行する生体反応の生成物と考えられている。しかし、その反応機構および生理的意義は不明である。



OA は元々、軟体動物のクロイツカイメン *Halichondria okadai* から単離された化合物である。その後、タンパク質脱リン酸化酵素 Protein Phosphatases 1 (PP1) および 2A (PP2A) に対する特異的阻害剤であること、発癌プロモーション活性を示すことが判明した。2007 年、我々はクロイツカイメンより PP1 および PP2A とは異なる立体構造を有する OA 結合タンパク質 okadaic acid binding protein 2 (OABP2) を単離した⁽¹⁾。OABP2 は OABP2.1-2.3 からなる相同性タンパク質の混合物であり、OA に対して高結合性を示すこと以外の生理機能は不明であった。

本研究ではクロイツカイメンおよびホタテ貝による下痢性貝毒の蓄積機構について知見を得ることを目的とし、以下で概要を述べる研究を行った。

1. 「OA-OABP2」間の構造活性相間と新規下痢性貝毒定量法の開発^(2,3)

クロイツカイメンより調製した OABP2.1 および OABP2.3 の cDNA を pET21a ベクターに挿入し、BL21 (DE3) 細胞中で発現誘導を行った結果、リコンビナント OABP2.1 (recOABP2.1)、OABP2.3 を得ることに成功した。[24-³H]OA を用いた結合実験より、各々 1.30 ± 0.56 nM、1.54 ± 0.35 nM の解離定数をもつことがわかった。両者は相同性 66% を示すタンパク質であり、共通配列上に OA 結合部位が含まれていると考えられた。また、競争的結合阻害実験により recOABP2.1 に対する DTX1、7-O-palmitoyl DTX1 (DTX3) の結合性を明らかにした。さらに、recOABP2.1 に対する各種 OA 類縁体の結合性を調べ、得られた実験結果に基づいて recOABP2.1 に高結合性を示す蛍光標識 OA の合成に成功した。下痢性貝毒を定量する公定法はマウスに対する急性毒性試験法であるが、動物愛護の観点から代替法の開発が望まれている。我々は、主要な下痢性貝毒が結合性を示した recOABP2.1 と蛍光性官能基を備えた OA 誘導体が新規下痢性貝毒定量法における鍵化合物になりうると考えており、その開発を進める予定である。

2. クロイソカイメン中の OABP2 の役割⁽⁴⁾

OABP2 はクロイソカイメンから単離されたが、無数の共生生物が棲息する同生物においてその生産者は不明であった。文献記載の方法に従い、細かく裁断したクロイソカイメンを EDTA で処理し、クロイソカイメン細胞や共生生物を解離させた。この混合物を抗生物質存在下で維持し、クロイソカイメン細胞の凝集塊をつくらせた。この凝集塊から遺伝子を抽出し配列解析を行った結果、クロイソカイメンの 18S rDNA および OABP2.1 遺伝子の存在を確認した。この結果より、OABP2 がクロイソカイメン自身のタンパク質であると結論された。

我々は、もし OABP2 が OA の解毒に関与するとすれば、OABP2 が OA を貯蔵する他の生物にも含まれていると考えた。この仮説を証明するため、recOABP2.1 に対するポリクローナル抗体を作製し、毒化したホタテ貝、ムラサキガイ、ホヤの各臓器抽出物に対してウェスタンブロッティングを行った。しかし、OABP2.1 の検出には至らなかった。従って、二枚貝は別の機構により解毒を行っていると考えられた。

3. ホタテ貝で進行する OA のアシル化機構⁽⁴⁾

DTX3 は OA や DTX1 の標的分子である PP1 や PP2A には結合せず、いわば毒性が軽減された誘導体である。我々は、二枚貝にとって解毒機構とも考えられる OA や DTX1 の脂肪酸縮合反応を精査することにした。まず、新鮮なホタテ貝の各臓器を切り分けた後、その抽出液と OA を混合し、LC-MS/MS により DTX3 の生成を追跡した。その結果、palmitoyl coenzyme A 存在下、7-*l*-palmitoyl OA (DTX3) の生成を確認した。これはホタテ貝抽出物を用いて初めて観測された脂肪酸縮合反応である。この反応は中腸腺の抽出液を用いた時のみ進行し、他臓器の抽出液を用いた場合には進行しなかった。本反応は温度や pH に依存して進行したため、酵素反応であることが示唆された。本酵素の単離を目指して検討を行った結果、本酵素が膜タンパク質であることが判明し、現在、戦略を練り直している段階である。

ホタテ貝の中腸腺の抽出物を用いた OA の脂肪酸縮合反応は、マガキやシジミの中腸腺を用いた場合にも進行した。シジミは汽水域に棲息する二枚貝であり、未だ毒化事例がない。従って、本反応は二枚貝に普遍的に存在する分子機構により制御されていると考えられた。ただ、観測された変換率は最大数パーセントであり、毒化したホタテ貝に含まれる脂肪酸縮合体の含有量を鑑みると、極めて低効率である。今後はこの変換反応の効率向上をはかり、本酵素を単離し、二枚貝による下痢性貝毒の蓄積機構を解明したいと考えている。

謝辞: 本研究を推進する機会を与えて下さり、また本賞への推薦をして下さった東北大学大学院農学研究科・山下まり教授、また、ご指導やご支援を頂いた共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献: 1) Sugiyama *et al.*, *Biochemistry* **2007**, *46*, 11410. 2) Konoki *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7607. 3) Konoki *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *in press*. 4) Konoki *et al.*, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 300.

支部若手奨励賞

受賞講演要旨

(講演は若手シンポジウムで行われました)

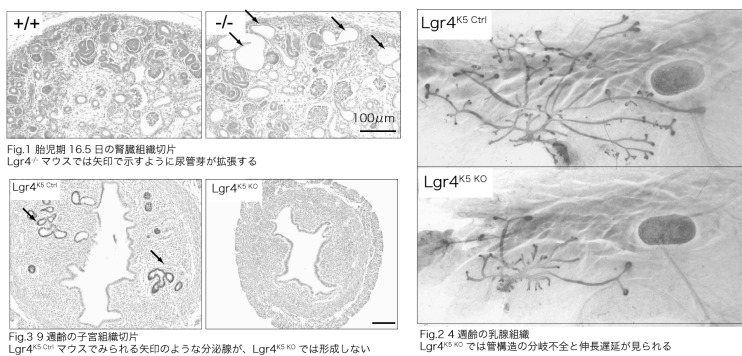
上皮細胞の分化と管腔組織形成における LGR4 の機能解析

東北大学農学研究科 大山 一徳

上皮細胞から形成される管腔構造は、肺や消化管、腎臓、腺組織などの臓器器官の基盤構造であり、管腔組織の形成や維持機構を解明することは生命科学研究の重要な課題である。本研究では、管腔組織の形成と維持に於ける細胞分化と形態・機能制御メカニズムの一端を明らかにするために、新規膜受容体 Lgr4 に注目し解析を行った。

Lgr4^{-/-}マウスは新生児致死だが、この時腎機能の低下を示したことから、まず胎児期腎臓発生期に遡り解析を行い、LGR4 が尿管芽の細胞を未分化な状態に保ち、正常な腎臓の集合管発達に寄与することを明らかにした¹⁾。加えて、Lgr4^{-/-}マウスでは腎臓間葉細胞が細胞死を起こし、正常なネフロン構造が形成されない事を明らかにした²⁾。これにより、LGR4が腎臓発生において、集合管やネフロン構造といった管腔構造の形成に必須であることを明らかにした。

次に Lgr4 を上皮組織特異的に欠損した Lgr4^{K5 KO} を作成し、生後に発達する上皮管腔組織での LGR4 機能の解析を行った。代表的な上皮管腔組織の一つである乳腺での LGR4 の役割について、乳腺の発達と乳汁産生のための組織分化に LGR4 が寄与していることを見出した³⁾。加えて、子宮上皮に存在する微細管腔構造である子宮分泌腺の発達を制御し、雌の正常な生殖能(受精卵の着床)に必須の役割を担うことを明らかにした⁴⁾。



References

1) Y Mohri, K Oyama, A Akamatsu, S Kato, K Nishimori (2011) *Dev. Dyn.* **240**(6): 1626-1634

2) Y Mohri, K Oyama, M Sone, A Akamatsu, K Nishimori (2012) *B. B. B.* **76**(5):888-891.

3) K Oyama, Y Mohri, M Sone, A Nawa, K Nishimori (2011) *Sex. Dev.* **5**(4): 205-212.

4) M Sone, K Oyama, Y Mohri, R Hayashi, H Clevers, and K Nishimori (2013) *The FASEB J.* [in press]

謝辞

本賞の受賞に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜りました西森克彦先生、原田昌彦先生、日出間志寿先生、毛利泰彰博士に厚く御礼申し上げますと共に、実験を共にした曾根瑞季さんをはじめとする分子生物学分野の皆様にご心より感謝申し上げます。

特別講演 1

(C 会場 (ぽらんホール))

酵素・活性・分子 一未知の酵素を表舞台に引っ張り出す一

○ 浅野泰久（富山県立大学・生物工学研究センター、JST ERATO）

【目的】酵素は、生物が環境から取り込んだ物質を化学的に変化させ利用するため、触媒として使われるタンパク質である。それらを産業利用するメリットは次の通りである。(1) 特定の化合物のみに選択的に反応する。(2) 10^8 倍以上もの反応加速性がある。(3) 副生成物の排出を抑制できる。(4) 温和な条件で反応し、エネルギーを節減できる。(5) 多段階の反応を短絡できる。また、生成物の精製工程を簡略化できる。平成24年度から開始されたERATO浅野酵素活性分子プロジェクトでは、第1に微生物、植物、動物由来の新しい酵素分子種を探索・開発し、各種有用物質を合成するための基礎的課題を研究している。第2に、種々の新しいアミノ酸代謝酵素により、血液中のアミノ酸などの定量技術を開発し、健康診断に用いる研究、その他を行っている。

【結果と考察】平成24年度から現在までのERATOプロジェクトの主な成果を以下に列挙する。植物および細菌由来のニトリル生成に関わる複数の酵素遺伝子を大腸菌に導入し、フェニルアラニンからフェニルアセトニトリルを生産する方法の開発に成功した。遺伝子解析用プログラムINTMSAlignを開発し、酵素スクリーニング等に利用した。アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイナミックな光学分割により、光学活性なアミノ酸の合成に成功した。D-アミノ酸オキシダーゼから変異によりアミノオキシダーゼを創成し、デラセミ化反応により光学活性アミンの合成に成功した。

一方、定量用酵素の開発の成果は以下の通りである。*Marinomonas mediterranea*が生産するL-リシン α -酸化酵素は、L-リシンの定量に用いることができる。本酵素の立体構造を解明し、補酵素としてシステイントリプトフィルキノン(GTQ)を用いる酸化酵素であることを明らかにした。微生物由来のトリプトファン脱水素酵素の安定性を向上させ、L-トリプトファン定量法を開発した。*Pseudomonas* sp. BYC41-1よりL-アルギニンオキシダーゼ活性を見出し、ヒト血漿サンプル中のL-アルギニン定量に用いた。L-トリプトファン定量法として、ビスインドール抗生物質 staurosporine および violacein の生合成系に着目し、L-トリプトファンオキシダーゼの取得に成功した。両酵素とも、ヒト血漿サンプルにおいて高い定量性を示したことから、生体試料中のL-アミノ酸定量に有用な酵素である。

岩手大学礪部公安先生との共同研究により、*Pseudomonas* sp. AIU813由来L-リシン酸化酵素を得、さらに東京大学伏信進矢先生との共同研究により立体構造を解明した。本酵素は、L-リシン2-モノオキシゲナーゼと高い相同性を示し、オキシダーゼ活性と共にモノオキシゲナーゼ活性を有する二機能性の酵素であることが明らかとなった。Cys254をイソロイシンに置換した変異型酵素(C254I)のオキシダーゼ活性は5倍上昇し、モノオキシゲナーゼ活性が著しく減少した。オキシダーゼ活性の上昇した本変異型酵素は、野生型酵素よりもL-リシンに対して高い基質特異性を示し、血漿中のL-リシン定量に有用な酵素であることが明らかとなった。

今後の展望（10～15年後に達成が期待される事）：

- (1) 「動的光学分割法」や「酵素的結晶転換法」によって、有用物質が工業的に生産される。
- (2) 有用ニトリル化合物が発酵法によって生産される。
- (3) 動物が新しい酵素やタンパク質源となり、バイオテクノロジーの主役の一つとなる。
- (4) 酵素による高選択的アミノ酸分析法が確立され、臨床応用される。酵素による「アミノインデックス」などの分析により健康診断が可能になる。
- (5) 大腸菌を宿主として、種々の異種タンパク質の発現が可能となる。

特別講演 2

(C 会場 (ぽらんホール))

腸管の炎症と食品因子によるその制御

清水 誠（東京大学大学院農学生命科学研究科）

1. 腸管の炎症

腸管内には様々な微生物、環境異物、食品成分とその消化物・代謝物が存在する。したがって腸管の内表面を覆う上皮細胞層は常にこれらの外来物質の刺激を受けているということができる。そのような刺激は、腸管上皮における免疫担当細胞の活性化や炎症性サイトカインの分泌を亢進し、その結果、腸管上皮は常にある種の炎症状態を引き起こしているということになる(1)。このような炎症は、病原微生物等の侵入に対する防御反応でもあり、軽度の炎症は「制御された炎症 (controlled inflammation) と捉えることができる。しかし、この状態が過度に進むと病的な炎症となり、様々な不都合が生じる。その典型的なものが、クローン病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) のような炎症性腸疾患 (IBD: Inflammatory bowel disease) である。IBDは難病であり、その治療・予防法の確立が望まれている。

2. 腸の炎症モデルとアミノ酸による炎症の抑制

我々はヒト腸管上皮細胞と免疫細胞を共培養すると上皮細胞が傷害を受けること、その原因が免疫細胞の出す炎症性サイトカインであることを見出した(2, 3)。そこで、これを炎症性腸疾患の単純化したモデル系と考え、これを用いて腸の炎症反応を抑制する食品成分の探索を行った。その結果、アミノ酸の一種であるタウリンやヒスチジンに腸管の炎症反応を抑制する作用があることを見出した(4-6)。この作用は、炎症のマスターレギュレーターである NF κ B の活性化抑制と、それによる上皮細胞のケモカイン分泌の抑制によるものであることが示唆されたが、*in vitro* 系で見出されたこのような抗炎症作用は、炎症モデルマウスを用いた *in vivo* 実験でも観察することができた(7)。

3. ポリフェノール類による炎症の抑制

ポリフェノール類にも様々な炎症抑制作用が報告されている。我々はコーヒーや果実に含まれるフェノールカルボン酸であるクロロゲン酸にも同様の抗炎症作用があることを *in vitro*、*in vivo* の両実験系で見出した(8)。クロロゲン酸の作用機構としては NF κ B 経路の上流に位置する PKD のリン酸化抑制などが推測されている。

ポリフェノール類の中でも特にフラボノイド類は、AhR や PXR のような細胞内の転写因子を介して腸管上皮細胞の解毒代謝系（薬物代謝系）を活性化することが知られている(9)。近年の研究から、AhR や PXR の活性化は解毒代謝系の活性化のみならず、炎症系 (NF κ B 経路) の抑制をも誘導することが明らかになった。また、AhR の活性化は、制御性 T 細胞など炎症抑制的な T 細胞への分化を誘導するなど(10)、食品成分は多様なメカニズムで腸管での炎症を抑えている可能性がある。腸の健康は全身の健康と密接につながっており、食による腸の炎症制御に関するさらなる研究の進展が期待される。

〈参考文献〉

1. Shimizu, M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(2): 232-241(2010)
2. Satsu, H., Ishimoto, Y., Nakano, T., Mochizuki, T., Iwanaga, T. and Shimizu, M. Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha. *Exp. Cell Res.*, 312(19) : 3909-3919 (2006)
3. Ishimoto, Y., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M. IEX-1 suppressed apoptotic damage in human intestinal epithelial Caco-2 cells induced by coculturing with macrophage-like THP-1 cells. *Biosci. Rep.*, 31(5) : 345-351 (2011)
4. 清水 誠、腸管上皮の炎症抑制作用を持つアミノ酸・ペプチド、*Functional Food*、3(2): 95-99 (2009)
5. Son, D.O., Satsu, H. and Shimizu, M. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF- α -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.*, 579(21) : 4671-4677 (2005)
6. Son, D.O., Satsu, H., Kiso, Y., Totsuka, M. and Shimizu, M. Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through posttranscriptional regulation. *Cytokine*, 42(2) : 265-276 (2008)
7. Zhao, Z., Satsu, H., Fujisawa, M., Hori, M., Ishimoto, Y., Totsuka, M., Nambu, A., Kakuta, S., Ozaki, H. and Shimizu, M. Attenuation by dietary taurine of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice and of THP-1-induced damage to intestinal Caco-2 cell monolayers. *Amino Acids*, 35(1) : 217-224 (2008)
8. Zhao, Z., Shin, H.S., Satsu, H., Totsuka, M. and Shimizu, M. 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF- α -induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 56(10) : 3863-3868 (2008)
9. Satsu, H., Hiura, Y., Mochizuki, K., Hamada, M. and Shimizu, M. Activation of the Pregnane X Receptor and Induction of MDR1 by Dietary Phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 56(13) : 5366-5373 (2008)
10. Wang, H-K., Yeh, C-H., Iwamoto, T., Satsu, H., Shimizu, M. and Totsuka, M. Dietary flavonoid naringenin induces regulatory T cells via an aryl hydrocarbon receptor mediated pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 60(9) : 2171-2178 (2012)

協賛企業

- イーエヌ大塚製薬株式会社
- 合同酒精株式会社
- 東北化学薬品株式会社
- 岩手県酒造組合

日本農芸化学会東北支部
第 148 回大会 プログラム・要旨集

2013 年 10 月 26 日 発行

発行者：日本農芸化学会東北支部

〒981-8555

宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

東北大学大学院農学研究科内

印刷・製本 東北大学生生活協同組合

キャンパスサポートセンター