

応用生物科学科



Department of
Applied Biological Science

応用生物科学科の歩み

応用生物科学科長 小巻利章

平成元年 4 月に生物工学科に継ぐ生命工学系の 2 番目の学科として「食品工学科」が誕生した。教育の目標として、生物資源中の食品素材や生理活性物質に関する基礎的研究と、これら素材を食品に加工・保存する生産技術などの応用研究の両面を、密接な連携のもとに行い、食品産業界に役たつ技術者・研究者を養成する事を目的とした。第 1 期生は定員 80 名であったが、入学者は 96 名であった。平成 10 年 4 月に第 3 番目の学科として「海洋生物工学科」が創設された。これを機にして平成 11 年度から「応用生物科学科」に改称し、「生命工学部」の新設にそなえた。平成 13 年度卒業生までが食品工学科生で、その総数は、835 名（内女性 211 名）修士 32 名である。

現在の学科構成は、4 分野 7 研究室から構成されている。生命物質化学分野（蛋白質研）、分子食品機能分野（脂質研、糖質研）、分子生体機能分野（代謝制御研）、生物機能開発分野（応用微生物研）および分子機能変換分野（応用酵素研、生物化学工学研）である。

学科の定員は平成 6 年 4 月に、福山平成大学の設立時に 70 名に減少した。

創立当時から、実学教育を主眼において、工場のパイロットプラントを意識した実習室を設けて、ボイラー、ジャーファメンター、澱粉の瞬間高温加熱液化法が実施できる酵素反応装置、濾過機、真空薄膜遠心式濃縮機、噴霧乾燥機、凍結乾燥装置、イオン交換装置、レトルト式加圧加熱装置、噴霧流動式造粒装置などを整備し、学生達に酵素糖化水飴や、粉末水飴の製造実験なども取り入れており、工業的生産の実習を架して、企業入社後に早く現場に慣れるような配慮をしている。

卒業生にとっては、この実習は良い経験で

あったと思うようで好評を得ている。

就職は毎年大体全員が決まり、大部分が食品産業に採用されて、研究・開発、製造及び品質管理部門に勤務している。特に HACCP 実施に参加しているものも多い。

人間にとって、食は、最も基本的なことがある。食物には各種の機能が在る。食品の持つ栄養素が、短期、長期にわたって生体に及ぼす影響であり栄養機能と呼ばれる。第 2 には感覚機能がある。食品の有する組織、成分に対して味覚、臭覚、視覚、触覚が応答する機能の事である。更に生体調節機能が第 3 番目に在る。生体防御、体調のリズム、老化抑制、疾患の防止、疾患の回復などの機能が、食品中の成分で発揮されているであろう。21 世紀の科学の目標の 1 つは、病気にならない身体作りであると思う。分子生物学の発展は、生物学の社会に遺伝学を始めいろんな新しい考えをもたらしてくれたと思う、これらの基礎的研究の成果を十二分に活用して、人類の福祉に貢献できるように、食品素材の生産、食品加工、食生活、更に地球環境整備の中に、組み立てて利用する方法を生み出して行く科学が「応用生物科学」の役目であると考えている。

バイオサイエンスに興味を覚える学生が多く集まり、夢多い未来をみつめて、ともに勉強して行きたいものである。

われわれの教員スタッフはかなり専門分野の異なる人の集団で、お互いがその専門知識を活用して研究の教育に常に工夫を凝らしているのである。この姿は若い世代の学生諸君にも広く受け入れられると信じている。

応用酵素工学研究室

職	氏 名	学 位
教授	小巻 利章 (Toshiaki Komaki)	農学博士
講師	倉掛 昌裕 (Masahiro Kurakake)	工学博士

はじめに

応用酵素工学研究室は、小巻が長瀬産業(株)を定年退職後1989年4月に着任し、食品工学科として創立された1989年当初に開設された。平成3年4月に倉掛が着任した。小巻が1951年以来企業で続けてきた酵素の産業的利用と澱粉利用・食品加工の高度化を主要研究にしてきた。

研究の概要

1. 酵素の産業的利用に関する研究

—特に加水分解酵素に関して—

1951年以来取り組んだ研究は、枯草菌由来の酵素、特に α -アミラーゼ、プロテアーゼについて、酵素学的諸性質の解明と、その利用の開発であった。特にデンプンの高度利用を目標に、まず高濃度澱粉乳液の完全液化方法の確立であった(1956年)。その成果として開発された澱粉の瞬間高温加熱液化法は、今日の酵素法による各種糖質生産の基礎技術となった。続いてグルコース製造目的のグルコアミラーゼの生産と利用開発であった(1959年)。その後のプロテアーゼ、グルコースオキシダーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼおよびグルコースイソメラーゼの開発、同固定化酵素による連続異性化反応を用いたブドウ糖果糖液糖の製造技術の開発普及であった(1972年)。

1990年以降は、本学で分離した細菌 *Enterococcus caseloflavus* および *Aspergillus awamori* K4株が生産する β -マンナナーゼおよび β -マンノシダーゼについて、および

Bacillus cereus の生産するキトサナーゼについて研究した。K4株 β -マンナナーゼはガラクトマンナンから2~4糖類のヘテロオリゴ糖を、キトサナーゼはキトサンから2~5糖類のオリゴ糖を生成した。

2. 酵素法によるリグノセルロースを始め農産加工廃棄物の有効利用

(A) 酵素反応のための前処理法

木材、草本類などリグノセルロース中のセルロースに対するセルラーゼの親和性を高めるには主にリグニンを除去する前処理法が必要となる。上部臨界温度(UCT; upper critical temperature)を有する水-有機溶媒2成分系溶剤(水-シクロヘキサノール系等)中の加熱処理では均一相の形成がリグニンの分解・抽出を促進させた。また、処理後遠心分離によりリグニンおよびヘミセルロースからの疎水性分解物は上層の有機相へ分離・除去された。木材のブナおよびアカマツをUCT-溶剤前処理することで95および92%のリグニンが除去され、酵素反応性は高められ、特にリグニン含量の多いアカマツなどの針葉樹に有効的であることがわかった。この溶剤の高いリグニン除去能は加熱処理で生じるリグニン分解物間の再結合反応を抑制する性質によるものであることが明らかとなった。

農産加工廃棄物のバガス(さとうきびの搾り粕)やコーンハスク(トウモロコシ種皮)や雑草類の前処理法としてアンモニア水添加加熱処理を行った。加熱時に気化するアンモニアによりリグニンを変性させるものでいわゆるアルカリ処理である。処理後アンモニアは真空乾燥で除去でき、容易に酵素反応に用いることができた。いずれもセルロースに対する酵素親和性は向上したが、アラビノキシランを主成分とするハスクからはこの処理によりアラビノキシランの抽出が容易に行なえることがわかった。

(B) セルラーゼの酵素反応機構の解析および速度式の導出

セルラーゼによる結晶性セルロースの加水分解反応における、急激な反応速度の減少は吸着酵素の比活性の減少で、エンドグルカナーゼおよびエキソグルカナーゼ間の相乗作用の欠落によるものであることがわかった。セルラーゼのセルロース加水分解の経験的速度式 $-dV/dX = kV$ のパラメータ k 値は吸着酵素量に依存することより、これが時間に対する指数関数となる速度式を提案し、実験データへの適用性を確認した。

3. 糖転移酵素によるオリゴ糖の合成

Aspergillus oryzae β -フラクトフラノシダーゼのシュクロースに対する加水分解活性の最適 pH が 5 であるのに対しフルクトシル基転移活性の最適 pH は 8 と異なった。pH 5 でのフルクトース転移率は反応初期にて pH 8 と同程度の高い値となったが、反応進行に伴い生成した 1-kestose および nistose が加水分解され、糖転移率が減少することが認められ、pH を 8 付近に制御することで 80% 程度の高い転移生成率が得られることがわかった。現在、フルクトオリゴ糖の生産には *A.niger* 起源の酵素が用いられているが pH を制御することで *A.oryzae* 起源の酵素も用いることが可能であることがわかった。

Aspergillus awamori K4 起源の β -キシロシダーゼの最適 pH は 4 で、最適温度は 70℃ 近辺であり、分子量は 117,000 と見積もられた。当該酵素はキシロシル基転移性を有し、糖類に対し広い受容体特異性を示した。特にソルビトールおよびマンニトールの糖アルコールへ転移し、主として 6-O- β -xylosyl sorbitol および 1(6)-O- β -xylosyl mannitol を生成した。また 2 糖類に対してはトレハロースへの転移性が高く、その生成転移糖はトレハロースの一方のグルコシル基 6 位炭素に

キシロシル基が結合した (6 or 6')-O- β -xylosyl trehalose と両方に結合した 6,6'-O- β -di-xylosyl trehalose であった。これら合成オリゴ糖の性質および生産条件について現在も研究中である。

4. 澱粉関連新素材の開発

澱粉粒を湿度 100% にてオートクレーブ中で加熱することで難糊化性の湿熱処理澱粉に変化する。湿熱処理コーンスターチの α -アミラーゼ吸着性は 30% エタノールを加えることで 2~5 倍増加した。これは澱粉消化性が減少し、その非消化部の酵素吸着能が非常に高いためであった。この吸着特性をラングミュアの等温式を用い解析したところ、生コーンスターチと比べ湿熱処理物では約 10 倍大きな吸着表面積を有することがわかった。

コーンスターチを水-エタノール混合液中で 120℃ 加熱処理したところ、水組成 40 から 60% の処理でその膨潤度および溶解度は減少した。水中での膨潤における ΔH および ΔS は 20-40% 処理で大きく減少し、またグルコアミラーゼに対する α -アミラーゼ反応比は 30% 処理で最大となり、30% 以上の水分組成の処理にて澱粉分子鎖間の再配列が起こることが明かとなった。またこの水分近辺での処理が湿熱処理と同程度の澱粉物性への効果をもたらすことがわかった。

おわりに

平成 14 年 3 月現在の卒業生は 100 名、修士は 3 名である。その多くは食品の製造・研究分野で活躍している。研究室では比較的自主性を重んじ、研究を通じて社会性を養うための人間教育にも力を注いできた。研究に関しては、応用や実用面を重視したため、広く浅い内容になりがちである。今後は遺伝子工学的手法や大学内の機器を大いに利用して、学術的であり実用的な研究活動を行いたい。

応用酵素工学研究室関連主要研究業績

1、酵素の産業的利用に関する研究—特に加水分解酵素に関して—

- 小巻利章, 澱粉の酵素糖化に関する研究 第1報 酵素糖化水飴中の混濁物質の成因について, 澱粉工業学会誌, 4(1), 9-12(1956).
- 小巻利章, 澱粉の酵素糖化に関する研究, 第2報 いわゆる高温液化の最適条件, 澱粉工業学会誌, 6(3), 91-94(1959).
- 小巻利章, シュガーハンドブック, 浜口栄次郎他, 961, 朝倉書店, III. ブドウ糖製造法 B-1-a 液化酵素, 475-483(1964).
- T. Komaki: Part 6. Preparation and properties of insoluble starch particle remaining in saccharified liquid of starch after treatment with bacterial α -amylase and glucoamylase. *Agri. Biol. Chem.*, **32**, 123-129 (1968).
- T. Komaki: Part 7. On the content of insoluble starch in some type of starch and increase of those materials by treatment under several conditions. *Agri. Biol. Chem.*, **32**, 314-319 (1968).
- T. Komaki: Occurrence of insoluble starch particles in enzymatically saccharified starch solution. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, **17**, 131-138 (1969).
- 小巻利章, 澱粉科学ハンドブック, 二國二郎他, 632, 朝倉書店, 22-3 異性化糖の製造, 482-489(1977).
- 小巻利章, 乳製品に対する固定化酵素の利用と効率, 調理科学, 13(3), 175-180 (1980).
- 小巻利章, でん粉糖化工業における酵素の利用, 日本食品工業学会, 30, 181-189(1983).
- 小巻利章, 微生物工業の流れ, 有馬啓他, 260, 講談社, 8. 酵素生産, 117-132(1983).
- 小巻利章, 食品工業と酵素, 一島栄治, 314, 朝倉書店, 2. 糖質関連酵素と食品加工, 36-72(1983).
- 小巻利章, 麹学, 村上英也, 515, 日本醸造協会, IX-7. 酵素剤, 459-473(1986).
- 小巻利章, 洗剤用酵素の研究開発の現状と課題, フレグナンス・ジャーナル, No.91, 74-77(1988).
- W. Basuki, M. Iizuka, K. Furuich, T. Komaki, N. Minamiura, T. Yamamoto: Comparison of enzymatic isomerization of glucose produced by Porcine Serum α -glucosidase and *Rhizopus* glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3341-3342(1989).
- 小巻利章, 酵素の産業的利用の現状と期待, 科学と工業, 64(6), 265-271(1990).
- 小巻利章, 細菌プロテアーゼの利用とその問題点, 日農化, 65(1), 68-70(1991).
- Y. Oda, K. Tonomura, and T. Komaki: Purification and properties of extracellular β -mannanase produced *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed *Konjac*. *J. Ferment. & Bioeng.*, **76**, 14-18(1993).
- Y. Oda, K. Tonomura, and T. Komaki: Production of β -mannanase and β -mannosidase by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayed *Konjac*. *Food Microbiology*, **10**, 353-358 (1993).
- 小巻利章, 酵素の産業的利用を志して 45 年とこれから, *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, No.169, 83-8(1996).
- T. Komaki: Review of future amylase and related enzymes. *International Congress on Glycoscience & Glycotechnology*, Kobe, 2010-2014(1997).
- 小巻利章, 酵素応用の知識, 334, 幸書房 (第4版) (2000).
- M. Kurakake, S. Yo-u, K. Nakagawa, M. Sugihara, and T. Komaki: Properties of chitosanase from *Bacillus cereus* S1. *Curr. Microbiol.*, **40**, 6-9 (2000).
- M. Kurakake, and T. Komaki: Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Curr. Microbiol.*, **42**, 377-380 (2001).

2. 酵素法によるリグノセルロースを始め農産加工廃棄物の有効利用

(A) 酵素反応のための前処理法

- M. Kurakake, H. Ooshima, and Y. Harano: Pretreatment of bagasse by UCT-solvent for the enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **27**, 111-121 (1991).
- H. Ooshima, M. Kurakake, J. Kato, and Y. Harano: Pretreatment of wood by UCT-solvent for the enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **37**, 165-176 (1992).
- M. Kurakake, H. Ooshima, J. Kato, and Y. Harano: Pretreatment of bagasse by nonionic surfactant for the enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technol.*, **49**, 247-251 (1994).
- M. Kurakake, W. Kisaka, K. Ouchi, and T. Komaki: Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of Corn husk, Bagasse and Switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90**, 251-259 (2001).

(B) セルラーゼの酵素反応機構の解析および速度式の導出

- H. Ooshima, M. Kurakake, J. Kato, and Y. Harano: Enzymatic activity of cellulase adsorbed on cellulose and its change during hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **31**, 253-266 (1991).
- M. Kurakake, T. Shirasawa, H. Ooshima, A. O. Converse, and J. Kato: An extension of the Harano-Ooshima rate expression for enzymatic hydrolysis of cellulose to account for changes in the amount of adsorbed cellulase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **50**, 231-241 (1995).

3. 糖転移酵素によるオリゴ糖の合成

- M. Dombou, H. Yamamoto, H. Nakajima, K. Tomita, and T. Komaki: Utilization of 4-galactosyl-lactose by intestinal Bacteria. *Denpun Kagaku*, **38**, 365-367(1991).
- M. Kurakake, T. Onoue, and T. Komaki: Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 236-239 (1996).
- M. Kurakake, S. Osada, and T. Komaki: Transxylosylation of β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2010-2014(1997).

4. 澱粉関連新素材の開発

- I. Maruta, Y. Kurahashi, R. Takano, K. Hayashi, Z. Yoshino, T. Komaki, and S. Hara: Reduced-pressure heat-moisture treatment; A new method for heat-moisture treatment of starch. *Starch/Starke*, **46**(5), 177-181(1994).
- M. Kurakake, Y. Tchibana, K. Masaki, and T. Komaki: Adsorption of alpha-amylase on heat-moisture treated starch. *J. Cereal Sci.*, **23**, 163-168 (1996).
- M. Kurakake, M. Ueki, S. Hashimoto, and T. Komaki: Adsorption of alpha-amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin. *Carbohydr. Polym.*, **34**, 55-59 (1997).
- M. Kurakake, M. Noguchi, K. Fujioka, and T. Komaki: Effects on maize starch properties of heat-treatment with water-ethanol mixtures. *J. Cereal Sci.*, **25**, 253-260 (1997).

生物化学工学研究室

職 氏 名 学 位
教授 山本 英二 工学博士
(Hideji Yamamoto)

はじめに

当研究室は、平成2年4月大阪市立大学を退官された原納淑郎教授により反応工学研究室として開設された。平成3年4月に堺化学工業(株)から山本英二が助教授として着任、平成14年4月教授となる。原納淑郎教授は平成9年12月4日に食品工学科長の任期半ばに御逝去された。

研究の概要

食品・医薬品などの生体関連物質の晶析操作を用いた分離と機能性の創成を大きなテーマとしている。

1. 結晶の均一核化および成長の非等温解析

次節の研究とともに現在の研究の基礎となっている。無機塩の水溶液中の静止系、不純物のない状態における、一定冷却速度での均一化核化現象を、DSCを用いて測定し、核化速度の非等温解析を行った。また、溶液の熱履歴による核化挙動の相違を、溶液中の分子集合体(エンブリオ)のもつエントロピーの相違で説明した。

2. 水溶液からの二次核化と成長の速度論的研究

晶析時の電気伝導度と吸光度の経時変化から結晶の核化と成長を測定する装置を考案し、K-Alum や各種アミノ酸の結晶化と成長の速度論的解析を行った。二次核化を引き起こすための結晶の大きさは数十から百 μm の大きさが必要であること、核化速度はその大きさ以上の粒子の個数の二乗に比例することなどを明らかにした。

3. 機能性酸化鉄の合成

山本の企業における研究で、 α 酸化鉄を $\text{Fe}(\text{OH})_3$ を経由して水熱反応させる場合の核化と、成長抑制剤による晶癖制御を行った。

パイロットプラント、製造プロセスまで関与して発展させた。晶析による機能性材料の調製を工業的に発展させるという意味で、他の研究の指針となる研究である。

4. 食品・医薬品関連化学物質の結晶多形の制御に関する研究

化学式が同じで結晶構造の異なる結晶多形を制御することは、食品の呈味性、医薬品の生体活性(bio-availability)を決定するために非常に重要である。この多形結晶を選択的に析出させたり、結晶の保存時の多形転移を防ぐための研究を医薬品のシメチジン、インドメタシンを対象として行った。

インドメタシンの場合、 γ 形から β 形への固相転移速度は共存する溶媒(EDC)の含有量が60%で最大値をもつこと、また、Avrami-Erofeevの2次元式に従うことなどを明らかにした。

5. 固形油脂の固液分散制御

食用固形油脂製品(例マーガリン)は固液の分散系であるので、固相の粒径を制御することはその物性の制御に繋がる。テンパリング前の油脂製品中の固体粒子は、微小粒子の凝集体であり、温度を上昇させるとある温度範囲で急激に粒子径が小さくなることなどをSEMによる構造観察から明らかにした。

6. 塩化ナトリウム結晶の工業晶析装置・操作開発に関する研究

(財)ソルトサイエンス財団の助成を受けた3つの大学の共同プロジェクト研究である。

塩化ナトリウムについて結晶化現象を工業晶析理論に基づいて整理し、この理論との対応において工業晶析装置の基礎研究を行い、新しい晶析技術の開発法を提案した。

工業晶析装置として汎用されている逆円錐型晶析器における塩化ナトリウム結晶の成長速度を速度論的に検討し、25~85℃の広い温度範囲では、表面集積過程と物質移動過程を組み合わせた総括成長速度を考慮する必要があることを明らかにした。

7. 溶液構造と結晶化機構との関連の研究

結晶化に対する溶液構造の影響に関する研究である。

分子性結晶（クエン酸、尿素）とイオン性結晶（硫酸カリウム、塩化ナトリウム）の内部構造ならびに、一例としてクエン酸水溶液の構造特にクラスターの存在状態とその挙動を SEM 観察によって追跡した。その結果、結晶の内部は均一な溶質単分子の充填構造でなく、数 10nm の結晶粒を含む不均一構造であること、また、過飽和領域のみならず、未飽和のクエン酸水溶液中にも、クラスターやその集合体が観察されること、がわかった。

8. カテキン類とシクロデキストリンの包接結晶化に関する研究

シクロデキストリンにより分子認識される物質を選択的に包接結晶化分離する研究である。

天然食品添加物として注目されている緑茶ポリフェノールの一成分であるカテキン(CA)は β -シクロデキストリン(β -CD)と溶液中で 1:1 の複合体を形成し、両者の複合体結晶が析出することがわかった。

また、カテキン(CA)とエピカテキン(EC)は C3 位の OH がエカトリアルかアクシャルについているかで立体異性である。 β -シクロデキストリン(β -CD)はそのわずかの差を認識し、CA とはしっかりと、EC とは内部での自由度を持ってゆるく包接していることを NMR を用いて明らかにした。

9. 圧力晶析による機能性物質の調製

圧力 400MPa まで加圧できる高圧晶析器（高圧顕微鏡観察装置、高圧晶析分離試験装置）を用いて結晶化に及ぼす圧力の影響を研究している。(1) 医薬品の中間体の光学分割をエタノール溶媒系で行った。常圧から 300MPa に加圧にすることで光学異性体を分離できる組成範囲が 12%広がることがわかった。(2) 酵素サーモライシンの結晶化では、加圧 49MPa, 5min の短時間加圧による核化と

常圧による成長を組み合わせてすることで、酵素を変性させずに結晶化を促進できることを明らかにした。

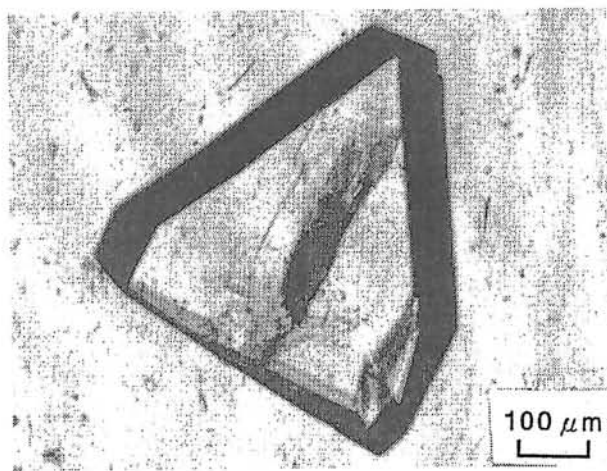
10. 光学異性体物質の変旋光転移結晶化

グルコース単位の C-1 位に関する立体異性体の β -アノマーから α -アノマーへの転移結晶化に関する速度論的な研究である。マルトース β 形一水和物から α 形無水物への転移結晶化を 130℃、静止系および攪拌系で検討した。転移効率は攪拌系で、結晶性の α 形種晶の量が多いほど高くなり、 α 形含量が 80% まで達することがわかった。

おわりに

平成 14 年 3 月現在の卒業生は 100 名、修士は 8 名である。上記の成果は、彼等の自主的で積極的な研究姿勢に負うところが大きい。その経験を活かして研究室を巣立った人たちの学士の一部と修士は企業の研究職として活躍している。

現在、圧力晶析については、まだまだ研究が少なく、未知の可能性を秘めている。また、カテキン類の包接結晶化はお茶からの抽出も含めた分離プロセスとして完成させたいと考えている。さらには、生体内の結晶化、環境の浄化に役立つ晶析技術や、生物反応を含めたプロセスも検討したい。



カテキンと β -シクロデキストリンの包接結晶の顕微鏡写真

生物化学工学研究室関連主要研究業績

1. 結晶の均一核化および成長の非等温解析

- H. Harano, H. Yamamoto, and T. Miura: Non-isothermal analysis of nucleation of KBrO_3 by differential scanning calorimetry. *J. Chem. Eng. Japan*, **14**, 439-444 (1981).
- H. Harano, T. Nakata and H. Yamamoto: Effect of thermal history of solution on homogeneous nucleation. *Industrial Crystallization '81*, North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1982, pp. 3-9.

2. 水溶液からの二次核化と成長の速度論的研究

- H. Yamamoto, and Y. Harano: Formation and growth of nuclei by secondary nucleation in agitated solution of K-alum. *J. Chem. Eng. Japan*, **13**, 313-318 (1980).
- H. Yamamoto, H. Hasegawa, and Y. Harano: Effect of L-aspartic acid on formation and growth of L-glutamic acid nuclei by secondary nucleation in agitated solution., *J. Chem. Eng. Japan*, **14**, 59-64 (1981).
- Y. Harano, and H. Yamamoto: Impurity effect of some amino acids on formation and growth of L-glutamic acid nuclei by secondary nucleation in agitated solution. *Industrial Crystallization '81*, North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1982, pp. 137-145.
- 山本英二, 竹田康之, 原納淑郎: L-グルタミン酸 2 次核の発生と成長に及ぼす不純物の影響. *化学工学論文集*, **8**, 423-429 (1982).
- H. Yamamoto, S. Sudo, and Y. Harano: Automatic measurement of crystallization in batch crystallizer. *Industrial Crystallization '87*, Elsevier, Amsterdam, 1989, pp. 403-406.
- 須藤省吾, 山本英二, 矢野元威, 原納淑郎: 攪拌型回分式晶析槽における L-アスパラギン酸とフマル酸の二次核化と成長. *化学工学論文集*, **15**, 1120-1125 (1989).
- 山本英二: 回分晶析操作-結晶粒度分布の制御に着目して. *最近の化学工学* **43**, 晶析 (化学工学会編), 化学工業社, 1991, pp. 140-147.
- Y. Harano, H. Yamamoto, and S. Sudo: Fundamental studies on industrial crystallization for functional materials. *International Symposium on Industrial Crystallization, An Overview of the Present Status and Expectations for the 21st Century*. The Society of Chemical Engineers Japan, Tokyo, 1998, pp. 172-181.

3. 機能性酸化鉄の合成

- 松本清治, 小巢忠史, 深井清, 山本英二: 針状酸化第二鉄の製造方法. 特許出願公告, 昭 60-42174 (1985).
- H. Yamamoto, K. Fukai, T. Koga, and S. Matsumoto: Preparation of acicular $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ by hydrothermal reaction and its characteristics as an intermediate of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. *Proceedings of "International Symposium on Preparation of Functional Materials and Industrial Crystallization '89 Osaka"*, The Society of Chemical Engineers Japan, Osaka, 1989, pp. 173-177.
- 松本清治, 小巢忠史, 深井清, 山本英二: 強磁性鉄粉末の製造方法. 特許出願公告. 平成 1-45725 (1989).

4. 食品・医薬品関連化学物質の結晶多形の制御に関する研究

- S. Sudo, K. Sato, and Y. Harano: Solubilities and crystallization behavior of cimetidine; polymorphic forms A and B. *J. Chem. Eng. Japan*, **24**, 237-242 (1991).
- S. Sudo, K. Sato and Y. Harano: Growth and solvent-mediated phase transition of cimetidine; Polymorphic forms A and B. *J. Chem. Eng. Japan*, **24**, 628-632 (1991).
- 山本英二, 小林幸雄, 原納淑郎: インドメタシンの γ 形から β 形への固相内転移に及ぼす溶媒の影響. *化学工学シンポジウムシリーズ* **49**, 21 世紀に架ける晶析技術 (化学工学会「晶析技術」特別研究会編), 化学工学会, 東京, 1995, pp. 84-89.
- 山本英二, 原納淑郎: 結晶多形と分離操作. *分離技術*, **25**, 381-386 (1995).

山本英二: 医薬・食品関連材料の晶析現象と機能性 日本結晶成長学会誌, 23, 50-57 (1996).

5. 固形油脂の固液分散制御

広川典夫, 原納淑郎: 塑性固液分散系のキャラクタリゼーション. 化学工学論文集, 17, 54-59 (1991).

広川典夫, 原納淑郎: 固形油脂製品のテンパリング機構. 油化学, 40, 648-651 (1991).

6. 塩化ナトリウム結晶の工業晶析装置・操作開発に関する研究

Y. Harano, S. Sudo, Y. Tanaka, Y. Matsumoto, and H. Yamamoto: Rates of growth and dissolution of sodium chloride in its aqueous solution in a cone type crystallizer. Seventh Symposium on Salt, Vol. II, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 183-189.

H. Yamamoto, R. Kume, and Y. Harano: Effect of suspension density on growth rate of sodium chloride in a cone type crystallizer. The Third Korea-Japan Symposium on Separation Technology, The Korea Institute of Chemical Engineers, Seoul, 1993, pp. 715-718.

7. 溶液構造と結晶化機構との関連の研究

上田正博, 広川典夫, 大垣一成, 守時正人, 原納淑郎: 結晶のミクロ構造とその不均一性. 化学工学, 56, 674-675 (1992).

M. Ueda, N. Hirokawa, Y. Harano, M. Moritoki, and K. Ohgaki: Change in microstructure of an aqueous citric acid solution under crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 156, 261-266 (1995).

G. Sazaki, H. Ooshima, J. Kato, Y. Harano, and N. Hirokawa: Mechanism of crystallization of enzyme protein thermolysin. *Journal of Crystal Growth*, 130, 357-367 (1993).

8. カテキン類とシクロデキストリンの包接結晶化に関する研究

細野哲矢, 宮本さおり, 小林幸雄, 山本英二, 原納淑郎: カテキンの β -シクロデキストリンによる包接複合体の形成. 化学工学シンポジウムシリーズ 47, 食品工学4 (化学工学会「食品工学」特別研究会編), 化学工学会, 東京, 1995, pp. 120-125.

H. Yamamoto and Y. Harano: Formation of clathrate compound between catechin and β -cyclodextrin. The Fourth Japan-Korea Symposium on Separation Technology, The Society of Process Engineers Japan, Tokyo, 1996, pp. 825-828.

T. Ishizu, K. Kintsu, and H. Yamamoto: NMR study of the solution structures of the inclusion complexes of β -Cyclodextrin with (+)-catechin and (-)-epicatechin. *J. Phys. Chem. B*, 103, 8992-8997 (1999).

9. 圧力晶析による機能性物質の調製

H. Yamamoto, Y. Takemura, K. Ogawa, T. Ueda, Y. Harano, K. Kagara and M. Moritoki: Optical resolution of homopiecolic acid benzyl ester by high pressure crystallization. Proceedings of International Symposium on Industrial Crystallization, ISIC98, Chemical Industry Press, Beijing, 1998, pp. 171-175.

H. Yamamoto, T. Oka, K. Seto, Y. Harano and H. Ooshima: High pressure crystallization of enzyme thermolysin from aqueous solution. The Fifth International Symposium on Separation Technology between Korea and Japan, The Korea Institute of Chemical Engineers, Seoul, 1999, pp. 401-404.

10. 光学異性体物質の変旋光転移結晶化

松村光高, 高橋幸治, 寺岡邦顕, 山本英二, 原納淑郎: マルトース β 形一水和物から α 形無水物への転移結晶化. 化学工学シンポジウムシリーズ 59, 食品工学5 (化学工学会「食品工学」特別研究会編), 化学工学会, 東京, 1997, pp. 97-102.

微生物機能開発研究室

職 氏 名 学 位
教授 山田 靖宙 農学博士
(Yasuhiro Yamada)
講師 山田 隆志 農学博士
(Takashi Yamada)

はじめに

当研究室は、平成 2 年 4 月大阪府立大学を退官された外村健一教授（農学博士）によって開設された。外村教授は平成 12 年 3 月退職され、平成 12 年 4 月、大阪大学工学部を退官した山田靖宙が着任した。尚、研究室助教授であった小田有二氏は平成 12 年 4 月より農水省常広研究所に転職した。伊藤美幸は本学大学院修士課程（代謝生理研究室）を平成 11 年卒修了後当学科に勤務していたが、平成 14 年 3 月退職した。山田隆志は平成 10 年 3 月神戸大学大学院博士課程修了後 2 年半カルフォルニア大学デービス校でポスドクとして留学の後、平成 13 年 4 月より当研究室に着任した。

研究の概要

外村教授、小田助教授は主として微生物を利用した環境浄化、パン酵母の改良、乳酸菌によるサイレージの研究を進めていた。

山田靖宙は東京大学農学部にて 5 年間助手として在職、大阪大学工学部には助教授として 15 年、教授として 15 年在職し、その間、天然物有機化学、有機合成、微生物化学、微生物分子生物学領域での研究歴がある。本学就任前は生理活性物質の合成、微生物の生産する二次代謝物質の構造決定、テルペンの微生物変換^{a)}、リパーゼの有機合成へ利用、大環状ラクトン生産能を有する微生物リパーゼの開発、分離精製、その遺伝子のクローニング、活性発現機構^{b)}、微生物生理活性二次代謝物の生合成、放線菌抗生物質生産誘導因子の構造、生合成^{c)}、レセプター、抗生物質生産の制御機構等を主として研究していた。特

に阪大在職後期 1.5 年間は、抗生物質生産放線菌に存在する、抗生物質生産を極微量で制御、誘導する微生物ホルモンを精製、構造決定し、その生合成経路を明らかにした。この微生物ホルモンは低分子でブチロラクトン環を含むユニークな構造をもち、*Streptomyces* 属放線菌に広く分布していることを証明した。また、世界で初めてそのレセプタータンパク質を精製、その遺伝子をクローニングした。本レセプターは DNA に結合するリプレッサータンパク質であり、微生物ホルモンと連携して、抗生物質の生産制御機構の上流部分を支配している事が判明した。微生物ホルモンが関与する、二次代謝物質制御システムはその応用面のみならず、微生物生態学的にも重要であり、その分子生物学的な研究は大阪大学で進行中である^{d)}。

山田隆志は神戸大学大学院においては植物の酸化酵素 P450 に関する研究で学位を取得、その後前記カルフォルニア大学デービス校に於いてはマウス肝臓のエポキシド加水分解酵素の反応機構をタンパク質工学的手法を用いて研究している。植物 P450 は多種存在し、植物ホルモン生合成を始めとする多くの重要な生理学的役割を担っている^{e)}。

伊藤美幸は本学の代謝生理学研究室に於いて哺乳類脂肪酸 ω -水酸化酵素の研究で修士号を取得、本研究室では小田助教授と生デンプン加水分解能を有する乳酸菌のアミラーゼ遺伝子の構造、および蔗糖加水分解酵素の精製研究を行ってきた。本研究の目的はイモデンプン製造廃棄物の家畜飼料化し有効利用することである^{f)}。

以上の研究経歴を背景として平成 12 年 4 月に発足した当研究室のテーマは現在下記の通りである。

1. 馬尿酸資化性微生物の探索

馬尿酸はトルエン等の有機溶媒に被爆したヒトあるいは、草食動物の尿中に排泄される簡単な低分子化合物である。構造は N-

benzoyl glycine で分子中に炭素源、窒素源を含有し、太古から自然界に存在していたと考えられる。従って、馬尿酸資化性微生物も数多く存在し、benzoyl amide 基の加水分解、酸化分解、電子吸引性の carbonyl 基を有するベンゼン環の開裂反応に関わる新規酵素群の解明、芳香属化合物代謝を伴う環境浄化に有用な微生物群の分離、有機合成に役立つ微生物変換反応の開発に役立つと考えた。この着想に基づき自然界より馬尿酸を炭素窒素源として細菌、放線菌、酵母、糸状菌を含む微生物を分離してきた。現在馬尿酸分解に関わる新規反応、フラボノイドその他の複素環化合物酸化反応に於いて興味ある知見が得られつつある。

2. イタコン酸及びそのエステル資化性微生物の検索

イタコン酸は糸状菌により多量に生産される α, β -不飽和カルボン酸基を含む二塩基性有機酸である。イタコン酸及びそのジエステルを炭素源として自然界よりその資化性微生物を分離し、カルボキシル基に隣接する二重結合の加水を伴う微生物変換反応、 α, β -不飽和エステル加水分解能が顕著なりパーゼ、エステラーゼを開発する事を目的としている。分離した細菌群より新規エステル加水分解酵素によると考えられる反応が見出されている。

3. 新規クエン酸誘導体生産能を有する微生物の検索

クエン酸は TCA サイクルの鍵化合物であり、その誘導体には抗菌、抗肥満を含む様々な生理活性が期待される。クエン酸を炭素源として自然界より細菌、放線菌、糸状菌、酵母を分離し、その生産物を HPLC で分析、同定してスクリーニングを進めている。酸化を伴う微生物変換反応を主として追求している。

4. 微生物が多量に生産する物質の誘導体合成による新規用途開発

微生物、特に糸状菌はコウジ酸、イタコン

酸等の二次代謝物質を多量に生産し、これらの物質は比較的安価に入手できる。これらの物質を原料とし、合成化学的手法で誘導体化して新規機能、生理活性を有する物質群を創造して新規用途を開発する研究に着手している。

5. ファインケミカル工業製品から微生物信号伝達物質を合成する

グルタミン酸等の合成原料である cyanopropionaldehyde は低分子物質ながら、反応性の高いアルデヒド基とシアノ基を持ち、様々な有用物質合成原料として有望である。cyanopropionaldehyde に formaldehyde をアルドール反応させ、新規合成アミノ酸、あるいはブチロラクトン環を有する放線菌信号物質の簡易合成法を開発する。

おわりに

微生物機能開発研究室は平成 12 年～13 年に新たなスタッフで再出発したといえる。研究テーマのほとんどは新規なものであり、担当者の過去の研究歴にある手法は大いに活用し、利用していく方針であるが、個々の過去のテーマは切り離し、新しい視点から現在のテーマを設定している。従って、開拓的な仕事がほとんどで、現在も菌株のスクリーニング、新たな研究手法の導入等、教員、学生諸君ともに新規な現象を求めて苦闘している最中である。報文にするデータはいまだしの状態であるが、着実に新しい芽はそだちつつあると信じている。平成 13 年には大学院生が 2 名入学し、平成 14 年にはさらに 2 名入学する。それぞれのテーマが学生と共に成長し、新規機能を持つ微生物、新しい酵素反応の発見、新規生理活性物質の発見と化学的創造に育っていくことを祈りつつ研究に励んでいる。

微生物機能開発研究室関連主要研究業績

a. テルペンの微生物変換に関する研究

- N. Ikeguchi, T. Nihira, A. Kishimoto and Y. Yamada: Oxidative pathway from squalene to geranylacetone in *Arthrobacter* sp. strain Y-11, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(2), 381-385 (1988).
- M. Takeuchi, T. Sakane, T. Nihira, Y. Yamada and K. Imai: *Corynebacterium terpenotabidum* so nov., a bacterium capable of degrading squalene, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 223-229 (1999).

b. 大環状ラクトン合成能を有するリパーゼに関する研究

- A. Makita, T. Nihira and Y. Yamada: Lipase catalyzed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvents, *Tetrahedron Letters*, **28** (7), 805-808 (1987).
- F. Ihara, Y. Kageyama, M. Hirata, T. Nihira and Y. Yamada: Purification, Characterization and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species, *J. Biol. Chem.*, **266**(27), 18135-18140 (1991).
- F. Ihara, I. Okamoto, K. Akao, T. Nihira and Y. Yamada, Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas* sp. strain 109, *J. Bacteriol.*, **177**(5), 1254-1258 (1995).
- J. Tanaka, T. Nihira and Y. Yamada: Glutathione as an essential factor for chaperon-mediated activation of lactonizing lipase from *Pseudomonas* sp. 109, *J. Biochem.*, **127**, 597-601 (2000).

c. 微生物生産物の構造, 合成

- D. Rodphaya, T. Nihira, S. Sakuda, and Y. Yamada: Biosynthesis of the macrolide antibiotic patulolides by *Penicillium urticae* S11R59: Identification of the origin of carbon atoms by ¹³C NMR spectroscopy, *J. Antibiotics*, **41**(11), 1649-1658 (1988).
- S. Sakuda, Z.-Y. Zhou and Y. Yamada: Structure of a novel disulfide of 2-(N-acetylcysteinyl)amido-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl-myoinositol produced by *Streptomyces* sp., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(7), 1347-1348 (1994).
- S. Sakuda, U. Guce-Bigol, M. Itoh, T. Nishimura and Y. Yamada: Linearmycin A, a novel linear polyene antibiotic, *Tetrahedron Letters*, **36**(16), 2777-2780 (1995).

d. 放線菌ホルモンに関する研究

- Y. Yamada, K. Sugamura, K. Kondo, Y. Yanagimoto and H. Okada: The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*, *J. Antibiotics*, **40**(4), 496-504 (1987).
- K. Kondo, Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira and Y. Yamada: New virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*, *J. Antibiotics*, **42**(12), 1873-1876 (1989).
- K. Sato, T. Nihira, S. Sakuda, M. Yanagimoto and Y. Yamada: Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5, *J. Ferment. Bioeng.*, **68**(3), 170-173 (1989).
- H. S. Kim, H. Tada, T. Nihira and Y. Yamada: Purification and characterization of virginiae butanolide C-binding protein, a possible pleiotropic signal-transducer in *Streptomyces virginiae*, *J. Antibiotics*, **43**(6), 692-706 (1990).
- S. Sakuda and Y. Yamada: Stereochemistry of butyrolactone autoregulators from *Streptomyces*, *Tetrahedron Letters*, **32**(15), 1817-1820 (1991).
- S. Sakuda, A. Higashi, S. Tanaka, T. Nihira and Y. Yamada: Biosynthesis of virginiae butanolide A, a butyrolactone autoregulator from *Streptomyces*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **114**(2), 663-668 (1992).
- S. Okamoto, K. Nakamura, T. Nihira and Y. Yamada: Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*, *J. Biol. Chem.*, **270**(20), 12319-12326 (1995).
- Y. Yamada, T. Nihira and S. Sakuda: Butyrolactone Autoregulators, inducers of virginiamycin in *Streptomyces virginiae*: their structures, biosynthesis, receptor proteins, and induction of virginiamycin biosynthesis, *Biotechnology of Antibiotics*, W. R.

Strohl, ed. 63-79 Marcel Dekker, Inc., New York (1997).

- Y. Yamada and T. Nihira: Microbial hormones and microbial chemical ecology, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, ed. D.H.R. Barton, Koji Nakanishi and Otto Meth-Cohn, Pergamon, **8**, 377-413 (1999).
- S. Sakuda and Y. Yamada: Biosynthesis of butyrolactone and cyclopentanoid skeletons formed by aldol condensation, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, ed. D. H. R. Barton, Koji Nakanishi, and Otto Meth-Cohn, Pergamon, **1**, 139-158 (1999).
- Y. Yamada : Autoregulatory factors and regulation of antibiotic production in *Streptomyces*, *Microbial Signalling Communication*, ed. R. England, G. Hoffis, N. Bainton and D. McL. Roberts, Cambridge University Press, 177-196 (1999).
- R. Kawachi, T. Akashi, Y. Kamitani, A. Sy, U. Wangchaisoonthorn, T. Nihira and Y. Yamada: Identification of an AfsA homologue (BarX) from *Streptomyces virginiae* as a pleiotropic regulator controlling autoregulator biosynthesis, virginiamycin biosynthesis and virginiamycin M1 resistance, *Mol. Microbiol.*, **36**(2), 302-313 (2000).
- H. Nakano, C-H. Lee, T. Nihira and Y. Yamada: A null mutant of *Streptomyces virginiae* *barA* gene encoding a butyrolactone autoregulator receptor and its phenotypic and transcriptional analysis, *J. Biosci. Bioeng.*, **90** (2), 204-207, (2000).
- R. Kawachi, U. Wangchaisoonthorn, T. Nihira, and Y. Yamada: Identification by gene analysis of a regulator , VmsR that controls virginiamycin biosynthesis in *Streptomyces virginiae*, *J. Bacteriol.*, **182-2**, 6259-6263 (2000).
- N. Shikura, T. Nihira, and Y. Yamada: Identification of a plausible biosynthetic enzyme for the IM-2 type autoregulator in *Streptomyces antibioticus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1475**, 329-336 (2000).
- E. Takano, T. Nihira, Y. Hara, Jo J. Jones, C. J. L. Gershtater, Y. Yamada and M. Bibb: Purification and structural determination of SCB1, a butyrolactone that elicits antibiotic production of *Streptomyces coelicolor* A3(2): *J. Biol. Chem.*, **275-15**, 11010-11016 (2000).
- S. Kitani, M. Bibb, T. Nihira, and Y. Yamada.: The conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **10-4**, 535- 538 (2000).
- W. Namwat, C-H. Lee, H. Kinoshita, Y. Yamada and T. Nihira: Identification of the *varR* gene as a transcriptional regulator virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*, *J. Bacteriol.*, 2025-2031 (2001).
- S. Kitani, Y. Yamada and T. Nihira:, Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5, *J. Bacteriol.*, 4357-4363 (2001)
- E. Takano, R. Chakraborty, T. Nihira, Y. Yamada and M. J. Bibb: A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Mol. Biol.*, **41**(5), 1015-1028 (2001).

e. エポキシド加水分解酵素及び植物 P450 に関する研究

- T. Yamada, C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson and B. D. Hammock: Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase, *J. Biol. Chem.*, **275**, 23082-23088 (2000).
- T. Yamada, Y. Kambara, H. Imaishi and H. Ohkawa: Molecular cloning of novel cytochrome P450 species induced by chemical treatments in cultured tobacco cells, *Pest;ic. Biochem. Physiol.*, **68**, 11-25 (2000).

f. 蔗糖資化性新規乳酸菌に関する研究

- Y. Oda and Miyuki Ito: Characterization of a mutant from *Lactobacillus amylovorus* JMC 1126(T) with improved utilization of sucrose, *Curr. Microbiol.*, **41**, 392-395 (2000).

糖質研究室

職	氏 名	学 位
助教授	井ノ内 直良	学術博士
	(Naoyoshi Inouchi)	
助 手	前田 祐里	工 学 士
	(Yuri Maeda)	

はじめに

当研究室は、平成元年4月不破英次教授(理学博士)と井ノ内直良講師により糖質研究室として開設された。平成元年10月には朝岡正子助手(学術博士)が着任し、平成5年9月に同助手が退職された。平成10年3月に不破英次教授が定年退官された。(平成11年度特認教授、平成12年度非常勤)平成11年8月より前田祐里助手が生命物質化学分野から糖質研究室に移られた。

研究の概要

主として植物の主要貯蔵多糖である澱粉の構造と物理的特性について、コメ、トウモロコシを中心に、さらにその他の多くの植物起源の異なる澱粉を用いて以下に示すような実験方法を用いて研究を進めている。

I. 澱粉の構造特性研究法

①ヨウ素・澱粉複合体吸収曲線による澱粉のヨウ素親和性の測定②酵素・クロマト法(中圧ゲル濾過法・HPLC法の2種類の方法)による澱粉中のアミロース含量とアミロペクチンの側鎖長分布の測定③パルスドアンペロメロリー検出器を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによるアミロペクチンの短鎖領域の側鎖長分布の精密測定④中圧ゲル濾過法による澱粉分子全体の鎖長分布の測定⑤澱粉分子から精製したアミロペクチンの分子量分布の測定⑥HPLCに示差屈折計と低角レーザー光散乱光度計を組合わせた検出器を用いたアミロペクチン側鎖の分子量測定

II. 澱粉の物理的特性研究法

①示差走査熱量分析法(DSC)による澱粉の糊化温度と糊化熱量の測定②ラピッド・ビス

コ・アナライザー(RVA)による澱粉の粘度特性値の測定③澱粉の膨潤力と溶解度の測定④X線回折計による結晶図形の測定⑤BAP法(β -アミラーゼ-プルラナーゼ法)を用いた澱粉の糊化度・老化度の測定⑥生澱粉分解酵素による澱粉粒の分解率の測定⑦走査型電子顕微鏡(SEM)による澱粉粒観察

以上のような実験方法によって明らかにした研究成果についてその詳細を以下に示す。

1. 遺伝的背景の明らかなトウモロコシ胚乳澱粉に関する研究

米国インディアナ州立パデュー大学のD.V. Glover教授との共同研究により、澱粉の性質を改変する劣性遺伝子をもつ遺伝的背景の明らかな single, double, および triple ミュータントトウモロコシ、およびその生育段階の異なるトウモロコシの胚乳澱粉の性質を明らかにすることにより、それぞれの劣性遺伝子および生育段階が胚乳澱粉の性質に及ぼす影響を調べている。その結果、waxy(wx)遺伝子は澱粉をモチ性に関することは他のどの劣性遺伝子よりも優位であり、amylose-extender(ae),dull(du),sugary1(su1), sugary2(su2)の各劣性遺伝子は澱粉のアミロース含量を増加させ、アミロペクチンの鎖長分布をそれぞれ特異的に変化させ、澱粉のヨウ素親和性、糊化・老化特性、粘度特性、結晶性、酵素消化性などの性質に大きな影響を及ぼすこと、su1 トウモロコシ穀粒中には水溶性多糖であるフィトグリコーゲンが存在すること、生育が進むにつれて澱粉のアミロース含量が増加することなどを明らかにした。

2. 形質米胚乳澱粉に関する研究

平成元年に農林水産省が米の需要拡大を目標に開始した新しい形質をもった米の開発計画[通称、新形質米(スーパーライス)計画]の一部を担当し、その胚乳澱粉の構造と物理的特性について(株)サタケの協力を得ながら研究を進めている。その結果、低アミロース米は粘りが強く食味が良く老化しにくいこ

とがわかった。このことから製菓原料、冷凍すしの原料米などへの利用が期待されている。逆に高アミロース米は粘りが弱く、ピラフ・パエリアなどに好適な米であること、高アミロース米胚乳澱粉は実際には真のアミロース含量は通常のウルチ米程度であり、アミロペクチンにアミロース様の非常に長い側鎖が存在していることが老化しやすい主な原因であること、インディカ米系統の品種米の中にはアルカリ崩壊遺伝子がコードする澱粉合成酵素を含むものがあり、その胚乳澱粉は比較的短鎖の割合が低く、トウモロコシに近いアミロペクチン構成をもっており、糊化温度が高く、老化しやすい性質をもっていること、シュガリー(*su1*)イネ(糖質米)の胚乳澱粉の性質は *su2* トウモロコシに、水溶性多糖が存在する性質は *su1* トウモロコシに近い性質をもつことなどを明らかにした。

3. 難消化性澱粉 (レジスタントスターチ) に関する研究

本来多くの澱粉粒は体内で消化しやすい栄養成分であるが、高アミローストウモロコシ澱粉は難消化性であり、湿熱処理などの物理的改変を行うことによりさらに消化性の低い澱粉粒が形成される。これらの難消化性澱粉は食物繊維的な栄養効果があり、今後その重要性は益々高まることが予想される。そこで高アミローストウモロコシ澱粉を用いていくつかの物理的処理澱粉を調製し、その酵素消化性、糊化特性、粘度特性、結晶性などの変化を明らかにした。現在、いくつかのレジスタントスターチの製造が工業化に成功し、市販されている。

4. 世界の米および日本の特性米の胚乳澱粉に関する研究

広島県立大学猪谷助教授との共同研究により、中国、フィリピン、タイなどをはじめとする世界の米(インディカ、温帯ジャポニカ、熱帯ジャポニカ) および日本の様々な特性をもつ米(紫黒米、赤米、香り米、神社米など)

の胚乳澱粉の性質を調べることにより、ジャポニカ米にはない様々な米の用途に適した性質をもつ有用品種を見つけ出す試みを始めた。

5. 植物起源の異なる澱粉に関する研究

すでによく知られている天然澱粉では十分な酵素消化性や糊化・老化といった利用特性が得られない場合が多い。しかしながら天然澱粉を物理的あるいは化学的に改質するには、多くの労力、時間、コストなどが必要である。そこで数多くの植物の天然澱粉の中で、あまり研究の進んでいない植物澱粉についてその性質を明らかにしていくことにより、様々な利用特性に近い性質をもった天然澱粉を見つけ出すことが期待される。またよく知られている澱粉には見られない特異な澱粉の分子構造と物理的特性との関係を明らかにすることにより、より幅広い澱粉の分子構造と物理的特性との関連性を見出すことができ、ひいては新しい特性をもつ澱粉創成の育種または物理的改変目標となる可能性があると考えられる。研究室では共同研究により、クワイ、カタクリ、ドングリ、クリ、タケノコ(近畿大)、アマランス(信州大、大阪市大)、カンナ、タピオカ(タイ、カセサート大)、西表島イモ(大阪市大)、アワ(龍谷大)などの澱粉の研究を行い、また市販の植物(マメ種子、球根、香辛料用植物など)からも澱粉を調製し、多くの興味深い結果を得ている。

おわりに

農水省(現農業技術研究機構)、厚生省との委託研究、飯島記念食品科学振興財団(山崎製パン)、明治製菓、江崎グリコ、味の素、日本水産、サタケとの助成研究を行ってきたが、今後も産官学の関係を密にして、広島県立大学、農業技術研究機構、近畿大学、信州大学、カセサート大学(タイ)の方々とコメ、トウモロコシ、アマランスなどの穀類を中心とする穀物科学に関する研究を研究室全員の力をあわせて行っていきたいと考えている。

糖質研究室関連主要研究業績

1. 遺伝的背景の明らかなトウモロコシ胚乳澱粉に関する研究

- N. Inouchi, D.V. Glover, T. Takaya and H. Fuwa : Development changes in fine structure of starches of several endosperm mutants of maize *Starch/Staerke*, **35**, 371-376 (1983).
- N. Inouchi, D.V. Glover, Y. Sugimoto and H. Fuwa : Developmental changes in starch properties of several endosperm mutants of maize, *Starch/Staerke*, **36**, 8-12 (1984).
- N. Inouchi, D.V. Glover and H. Fuwa : Properties of residual maize starches following acid hydrolysis, *Starch/Staerke*, **39**, 284-288 (1987).
- N. Inouchi, D.V. Glover and H. Fuwa : Chain length distribution of amylopectins of several single mutants and the normal counterpart, and sugary-1 phytylglycogen in maize (*Zea mays* L.), *Starch/Staerke*, **39**, 259-266 (1987).
- N. Inouchi, D.V. Glover, Y. Sugimoto and H. Fuwa: DSC characteristics of gelatinization of starches of single-, double-, and triple-mutants and their normal counterpart in the inbred Oh43 maize (*Zea mays* L.) background, *Starch/Staerke*, **43**, 468-472(1991).
- N. Inouchi, D.V. Glover, Y. Sugimoto and H. Fuwa : DSC characteristics of retrograded starches of single-, double-, and triple-mutants and their normal counterpart in the inbred Oh43 maize (*Zea mays* L.) background. *Starch/Staerke*, **43**, 473-477(1991).
- N. Inouchi, D.V. Glover, and H. Fuwa : Structure and physicochemical properties of endosperm starches of a waxy allelic series and their respective normal counterparts in the inbred Oh43 maize background, *Starch/Staerke*, **47**, 421-426(1995).
- 井ノ内直良、トウモロコシを中心とする穀類澱粉の構造と性質に関する研究 (平成 7 年度日本応用糖質科学会奨励賞受賞講演)、応用糖質科学誌、**43**、125-132(1996).
- 井ノ内直良、遺伝的背景の明らかなトウモロコシ胚乳澱粉の構造と性質、第 37 回澱粉研究懇談会資料集 p.23-31(1997).
- N. Inouchi, D.V. Glover, and H. Fuwa : 玉米胚乳淀粉的特性、'97 中国吉林省玉米深加工国際検討会論文集 p.523-530(1997)長春、中国.
- N. Inouchi, D.V. Glover and H. Fuwa : Characterization of maize endosperm starches and phytylglycogens, Abstracts of 1998 International Symposium on plant polymeric carbohydrates (California, U.S.A.)(1998-8).
- H. Fuwa, D.V. Glover, S. Fujita, Y. Sugimoto, N. Inouchi, M. Sugihara, S. Yoshioka, K. Yamada : Structural and physicochemical properties of endosperm starches possessing different alleles at the amylose-extender and waxy locus in maize (*Zea mays* L.), *Starch/Staerke*, **51**, 147-151(1999).

2. 米胚乳澱粉に関する研究

- 朝岡正子、奥野貞敏、井ノ内直良、杉本温美、不破英次、日本型ハイブリッドライス胚乳澱粉の特性、澱粉科学、**35**、57-59 (1988) .
- 不破英次、上田麻永、朝岡正子、井ノ内直良、杉本温美、アジア在来株イネ低アミロース胚乳澱粉の特性、澱粉科学、**38**、361-363 (1991) .
- 不破英次、山本美代子、辻江昌美、上田麻永、井ノ内直良、朝岡正子、小西洋太郎、蓮尾徹夫、庭山 孝 : 酒造用水稲胚乳澱粉の特性に及ぼすイネ生育温度の影響、澱粉科学、**38**、369-373 (1991) .
- H. Fuwa, K. Okuno, R. Asashiba, H. Kikuzaki, M. Asaoka, N. Inouchi and Y. Sugimoto : Characterization of high-amylose type endosperm starches of rice plants cultivated in Asia., *Starch/Staerke*, **44**, 203-205 (1992).
- M. Asaoka, K. Okuno, M. Yano and H. Fuwa : Effects of shrunken and other mutations on the properties of rice endosperm starch, *Starch/Staerke*, **45**, 383-387 (1993).
- 朝岡正子、高橋慶一、中平 健、井ノ内直良、不破英次 : 新形質米胚乳澱粉の構造特性—1990, 91 年産うるち米について—応用糖質科学、**41**、17-23 (1994) .
- 朝岡正子、中山朝雄、遠藤 潤、井ノ内直良、不破英次 : 新形質米胚乳澱粉の糊化特性—1990, 91 年産うるち米

について—応用糖質科学、41、25-33 (1994)。

不破英次、朝岡正子、新谷宏高、重松利典、大柴正之、井ノ内直良：新形質米胚乳澱粉の性質—巨大胚米、香り米、高アミロース米、日食工誌、41、413-418 (1994)。

井ノ内直良、不破英次：スーパーライス計画とDSC、Netsu Sokutei 21、158-161 (1994)。

井ノ内直良、池内南美、高美 正、朝岡正子、不破英次：米アミロースの簡易測定法、応用糖質科学、43、1-5 (1996)。

豊島英親、岡留博司、大坪研一、須藤 充、堀末 登、稲津 脩、成塚彰久、相崎万裕美、大川俊彦、井ノ内直良、不破英次、ラピッド・ビスコ・アナライザーによる米粉粘度特性の微量迅速測定方法に関する共同試験、日食工誌、44、579-584 (1997)。

N. Inouchi, M. Asaoka, K. Okuno and H. Fuwa : Characterization of amylose and amylopectin obtained from normal and mutant rice endosperms possessing recessive amylose-extender (*ae*), dull (*du*), shrunken (*shr*) or waxy (*wx*) genes, Abstracts of 1998 International Symposium on plant polymeric carbohydrates (California, U.S.A.) (1998-8).

N. Inouchi, H. Ando, M. Asaoka, K. Okuno and H. Fuwa : The effect of environmental temperature on distribution of unit chains of rice amylopectin, Starch/Staerke, 52, 8-12 (2000).

N. Inouchi, Y. Sugimoto and H. Fuwa : Effects of amylopectin unit chains on the starch pasting characteristics, Proceedings of the IX international starch convention in Cracow (Poland) (2000).

3. 米、トウモロコシ以外の澱粉に関する研究

S. Fujita, L. Donghui, Y. Sugimoto, N. Inouchi and H. Fuwa : Some properties of starch from foxtail millet (*Setaria italica* Beauv.) Agric. Biol. Chem., 53, 1163-1165 (1989).

杉本温美、山下安代、小野田宜世、阿部一博、奥田義二、井ノ内直良、不破英次：生育段階の異なる粟澱粉の性質について (その2)：澱粉科学、37、155-161 (1990)。

杉本温美、山下安代、井ノ内直良、藤森正宏、川村吉也、不破英次：カタクリ澱粉の二、三の性質について、澱粉科学、40、397-401 (1993)。

井ノ内直良、竹井恵美子、朝岡正子、河村吉則、坂本寧男、不破英次：アワ(*Setaria italica* Beauv.)胚乳澱粉の二、三の性質、澱粉科学、40、397-401 (1993)。

S. Fujita, Y. Sugimoto, Y. Yamashita, H. Fuwa : Physicochemical studies of starch from foxtail millet (*Setaria italica* Beauv.) Food Chem., 55, 209-213 (1996).

杉本温美、山下安代、村上恵美子、井ノ内直良、不破英次：タケノコ澱粉の二、三の性質について、応用糖質科学、43、179-186 (1996)。

N. Inouchi, K. Nishi, S. Tanaka, M. Asai, Y. Kawase, Y. Hata, Y. Konishi, S. Yue and H. Fuwa : Characterization of amaranth and quinoa starches, J. Appl. Glycosci., 46, 233-240 (1999).

4. 熱測定による脂質と抗生物質の相互作用に関する研究

P.P. Constantinides, N. Inouchi, T.R. Tritton, A.C. Sartorelli, and J.M. Sturtevant : A scanning calorimetric study of the interaction of anthracyclines with neutral and acidic phospholipids alone and in binary mixtures : J. Biol. Chem., 10196-10203 (1986).

P.P. Constantinides, L. Ghosaini, N. Inouchi, S. Kitamura, R. Seshadri, M. Israel, A.C. Sartorelli, and J.M. Sturtevant : Interaction of N-alkylanthracyclines with lipid bilayers : correlations between partition coefficients, lipid phase distributions and thermotropic behavior, Chemistry and Physics of Lipids, 51, 105-118 (1989).

井ノ内直良：脂質と抗生物質の相互作用、Netsu Sokutei 14、78-82 (1987)。

生命物質化学分野蛋白質研究室

職	氏 名	学 位
教授	廣瀬 順造 (Junzo Hirose)	薬学博士
助教授	岩本 博行 (Hiroyuki Iwamoto)	農学博士

はじめに

平成元年四月、福山大学工学部に食品工学科が創設され、廣海 啓太郎教授が京都大学・農学部食品工学科から、また岩本 博行助手が京都大学大学院農学研究科博士後期課程食品工学専攻を修了し赴任し、福山大学工学部・食品工学科・蛋白質研究室としてスタートした。平成二年十月、廣瀬 順造 助教授が名古屋市立大学薬学部から赴任した。平成六年四月 岩本が講師に昇格、平成八年三月廣海教授が退職し、平成九年四月 廣瀬が教授に昇格し、平成十二年四月岩本が助教授に昇格し今日に至っている。蛋白質研究室の伝統である反応速度論などの生物物理化学思想をバックグラウンドとし、酵素の触媒機構や蛋白質の機能を明らかにする事を目的としている。

研究の概要

1. 亜鉛イオンを結合した酵素に関する研究

種々のペプチダーゼには、活性部位に亜鉛イオンを含む亜鉛ペプチダーゼが多く存在する。亜鉛イオンは無色であるため、活性にどのように関与するかは長らく不明であった。しかし、亜鉛ペプチダーゼであるカルボキシペプチダーゼ A 中の亜鉛イオンを、コバルトイオンや銅イオンに置き換え、基質や阻害剤との相互作用を測定し、本酵素の反応機構が 1990 年代の始めまでにほぼ明らかにされた。研究業績に示した 1984-1988 年のカルボキシペプチダーゼ A に関する我々の研究はその一翼を担った。最近、松本歯科大学の深沢らとの共同研究より、セリンペプチダーゼと考えられていたジペプチジルペプチダーゼ III (DPP III) が、亜鉛ペプチダーゼであ

ることを証明し、また部位特異的変異酵素の作成と亜鉛含有量の測定の結果、亜鉛結合部位がアミノ酸配列 HEXXXH のモチーフ上である事を示した。亜鉛ペプチダーゼの大部分は一般に HEXXH という亜鉛結合モチーフを持つことが知られているが、我々が発見したモチーフは His 間にもう一残基のアミノ酸残基 (X) が余分に加わっている。この様に少し異なっているモチーフを持っているにもかかわらず、DPP III 中の亜鉛イオンは、銅イオンやコバルトイオンに置き換えても、その配位構造はカルボキシペプチダーゼ A のそれと類似していた。DPP III 中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換え、金属イオンが基質との結合に直接関与している事を、電子スピン共鳴法によりほぼ証明した。それゆえ HEXXXH のモチーフは新たな亜鉛ペプチダーゼのモチーフとなり、多くの新たな亜鉛ペプチダーゼがアミノ酸配列から見いだされると思われる。現在 DPP III 中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換え、迅速凍結法により基質と酵素の反応中間体の検出を電子スピン共鳴法により試みている。

2. 銅を結合した酵素および蛋白質に関する研究

a) マルチ銅酵素は可視部に強い吸収帯を示す事から、基質と酵素が結合した反応中間体をストップフローで捕らえる事が出来るのではないかと考え研究を行った。マルチ銅酵素は熊本工業大学の村尾教授が発見した *Acremonium* sp. HI-25 から得られたアスコルビン酸酸化酵素および寶酒造から市販されている *Trachyderma tsunodae* K-2593 から得られたビリルビン酸化酵素を使用した。まずアスコルビン酸酸化酵素及びビリルビン酸化酵素がマルチ銅酵素である事を証明し、種々の陰イオンとの相互作用をストップフローにより追跡し多くの知見を得たが、残念ながら初期の目的であった基質を結合した反応中間体を見いだすことは出来なかった。

b) 銅、亜鉛-スーパーオキシトディスムターゼ (SOD) 中の銅イオンは、基質である O_2^- と

反応する際に酸化還元される。この反応は拡散律速に近く、反応機構が良く判っていない。そこで電子供与体として $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ を選択し、その電子移動反応機構を明らかにしようとしている。

3. 糖質分解酵素に関する研究

澱粉枝切り酵素は、アミロペクチンやグリコーゲンなどの α -1,6-グルコシド結合を特異的に加水分解する酵素である。これら酵素は、自然界では植物と微生物に分布し、基質特異性の違いやアミノ酸配列の相同性によりイソアミラーゼとプルラナーゼに2分される。本研究室では、微生物 *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼについて、基質や基質アナログとの相互作用を、反応速度論的、分光学的手法を用いて調べた。その結果、分岐した糖鎖の枝と幹に相当すると考えられる2つのサブサイト構造を明らかにした。また京都大学、SPring-8 と共同研究で、酵素とマルトオリゴ糖との複合体の、高分解能での立体構造解析を行い、酵素上で澱粉の分岐部分がどのように認識されるか、また酵素上に結合した分岐糖鎖の構造を初めて明らかにした。一方植物においては、澱粉枝切り酵素が澱粉の資化ばかりでなく、アミロペクチンの生合成時に、クラスター構造を整形する働きを持つことが明らかにされつつある。そこで秋田県立大学と共同で、イネ登熟種子胚乳中のプルラナーゼについて詳細に調べ、微生物酵素と比較研究を行っている。今後は、本酵素をはじめ、澱粉生合成に関与する酵素の立体構造を網羅的に解析し、澱粉生合成系の詳細を明らかにしたい。

4. 抗癌性白金錯体に反応するモノクローナル抗体に関する研究

廣瀬は薬学部に在籍しているおりに、現在第三世代の抗癌性白金錯体としてヨーロッパ・アメリカで使用され、また日本で臨床試験中のオキザリプラチン($\text{Pt}(\text{oxalato})1\text{R},2\text{R-cyclohexanediamine}$)の開発に関わった。そこでこの白金錯体が標的である DNA 上にどの様にまたどの程度結合するかを知る目的

で、生物工学科の山口教授との共同研究により、これと特異的に反応するモノクローナル抗体を作成した。現在これを使用して、癌細胞内の DNA 上に結合した白金錯体の量を定量し、白金錯体の抗癌性機構の解明に役立てようとしている。

5. 鉄結合蛋白質に関する研究

廣瀬はイタリアのフィレンツェ大学との共同研究として、細胞内へ鉄イオンを運び込むトランスフェリンについて研究を行った。帰国後福山大学に移り、トランスフェリン中の鉄イオンを銅イオンに置き換え、電子スピン共鳴法を用いる事で、多くの結果を得た。

6. 糖蛋白質糖鎖の構造解析およびその他に関する研究

自然界に存在するタンパク質の多くは糖や脂質などにより修飾されているが、近年糖蛋白質糖鎖の多彩な機能が明らかにされつつある。蛋白質に結合した糖鎖の構造解析には様々な分析手法が用いられるが、その中で核磁気共鳴(NMR)分析法は最も有力なものの1つである。本研究室では、平成元年度に400MHzの超伝導NMR装置が導入されたのを機に、本学の松浦教授、香川大学、大阪府立大学などと共同で、新規の構造を含む各種糖蛋白質糖鎖の構造を決定した。

おわりに

上記の研究は、大学院生や4年生の多大な協力によって達成されました。厚くお礼申し上げます。廣海先生は、教員や学生に、酵素と基質とで作る反応中間体である酵素・基質複合体がどのように変化して行くかを捉えたいと常々語られていた。我々の研究室では未だそれらの反応中間体の変化を捉えてはいない。今回 DPP III 中の亜鉛イオンを銅イオンに置き換えた Cu-DPP III で、基質と酵素が作る複合体の変化の姿を是非とも捉えてみたいと考えている。また基質類似体が結合した酵素のX線結晶解析と反応速度の結果を詳細に比較検討することにより、酵素の反応機構を明らかにすることに邁進している。

生命物質化学分野蛋白質研究室関連主要業績

1. 亜鉛イオンを結合した酵素に関する研究

- J. Hirose, M. Noji, Y. Kidani, and R.G. Wilkins: Interaction of zinc ions with arsanilazotyrosine-248 carboxypeptidase A. *Biochemistry*, **24**, 3495-3502 (1985).
- J. Hirose, S. Ando, and Y. Kidani: Excess zinc ions are competitive inhibitor for carboxypeptidase A. *Biochemistry*, **26**, 6561-6565 (1987).
- J. Hirose and Y. Kidani: Excess zinc ions induce the inhibition of carboxypeptidase A activity by the conformational change. *J. Coord. Chem.*, **18**, 165-168 (1988).
- K. Fukasawa, K.M. Fukasawa, M. Kanai, F. Shigeo, J. Hirose, and M. Harada: Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase. Molecular cloning and expression. *Biochem. J.*, **329**, 275-282 (1998).
- K.M. Fukasawa, M. Harada, J. Hirose, T. Izumi, T. Shimizu, and K. Fukasawa: Aminopeptidase B is structurally related to leukotriene-A4 hydrolase but not a bifunctional enzyme with epoxide hydrolase activity. *Biochem. J.*, **339**, 497-502 (1999).
- K. Fukasawa, K.M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, and M. Harada: The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme. *Biochemistry*, **38**, 8299-8303 (1999).
- J. Hirose, H. Iwamoto, I. Nagao, H. Sugao, F. Matsuura, K.M. Fukasawa, and K. Fukasawa, *et al.*: Characterization of the metal-substituted dipeptidyl peptidase III (Rat liver). *Biochemistry*, **40**, 11860-11865 (2001).

2. 銅を結合した酵素および蛋白質に関する研究

- K. Hiromi, Y. Yamaguchi, Y. Sugiura, H. Iwamoto, and J. Hirose: Bilirubin oxidase from *Trachyderma tsunodae* K-2539, a multi-copper enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1349-1350 (1992).
- J. Hirose, H. Kano, Y. Kidani, H. Iwamoto, and K. Hiromi: Zinc deficient bovine erythrocyte superoxide dismutase has low activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 506-508 (1992).
- I. Bertini, K. Hiromi, J. Hirose, M. Sola, and M.S. Viezzoli: Electron transfer between copper and zinc superoxide dismutase and hexacyanoferrate(II). *Inorg. Chem.*, **32**, 1106-1110 (1993).
- J. Hirose, T. Sakurai, K. Imamura, H. Watanabe, H. Iwamoto, K. Hiromi, H. Itoh, T. Shin, and S. Murao: Characterization of ascorbate oxidase from *Acremonium* sp. HI-25. *J. Biochem.*, **115**, 811-813 (1994).
- J. Hirose, K. Inoue, H. Sakuragi, M. Kikkawa, M. Minakami, T. Morikawa, H. Iwamoto, and K. Hiromi: Anions binding to bilirubin oxidase from *Trachyderma tsunodae* K-2593. *Inorg. Chim. Acta*, **273**, 204-212 (1998).
- J. Hirose, M. Minakami, K. Settu, K. Tsukahara, J. Ueda, and T. Ozawa: The reaction mechanism of electron transfer from Fe(II)(CN)_6^{4-} or W(IV)(CN)_8^{4-} to the cupric ions in human copper, zinc superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **383**, 246-255 (2000).

3. 糖質分解酵素に関する研究

- Y. Oda, H. Iwamoto, K. Hiromi, and K. Tonomura: Purification and characterization of α -glucosidase from *Torulaspora pretoriensis* YK-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(11), 1902-1905 (1993).
- H. Iwamoto, M. Ohmori, M. Ohno, J. Hirose, K. Hiromi, H. Fukada, K. Takahashi, H. Hashimoto, and S. Sakai: Interaction between pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* and cyclodextrins. *J. Biochem.*, **113**(1), 93-96 (1993).
- H. Iwamoto, M. Ohno, M. Ohmori, J. Hirose, A. Tanaka, S. Sakai, and K. Hiromi: Comparison of the binding of β -cyclodextrin and α - and γ -cyclodextrins with pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* as studied by equilibrium and kinetic fluorometry. *J. Biochem.*, **116**(6), 1264-1268 (1994).

4. 抗癌性白金錯体に反応するモノクローナル抗体に関する研究

- H. Yamada, T. Kato, J. Hirose, K. Inagaki, M. Noji, and Y. Kidani: Antibodies against (1R, 2R)-cyclohexanediamineplatinum (II)-DNA adduct recognize the conformation differences of isomeric analogues of cyclohexanediamine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 298-302 (1990).
- M. Harada, M. Sisido, J. Hirose, M. Nakanishi: Photoreversible antigen-antibody reactions. *FEBS Letters*, **286**, 6-8 (1991)
- M. Goto, J. Hirose, M. Noji, K. Lee, R. Saito, and Y. Kidani: The crystal structure and absolute configuration of antitumor platinum complex *trans*(OH)-Pt(OH)₂(malonato)(1R,2R-cyclohexanediamine). *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1022-1024 (1992).
- T. Yamashita, J. Hirose, M. Noji, R. Saito, H. Tomida, and Y. Kidani: Cytotoxicity of platinum(II) complexes containing 1R,2R-cyclohexanediamine as a ligand. *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1014-1018 (1993).
- J. Hirose, K. Inoue, E. Morimoto, H. Iwamoto, Y. Yamaguti, M. Kitase, K. Inagaki, and K. Hiromi: Characterization of monoclonal antibodies against (1R,2R)-cyclohexanediamine platinum(II)-DNA adduct. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1220-1222 (1996).

5. 鉄結合蛋白質に関する研究

- T. Kato, Y. Shirano, H. Iwamoto, and D. Shibata: Soybean lipoxygenase L-4, a Component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissues: Expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. *Plant Cell Physiol.*, **34**(7), 1063-1072 (1993).
- J. Hirose, H. Fujiwara, T. Magarifuti, Y. Iguti, H. Iwamoto, S. Kominam, and K. Hiromi: Copper binding selectivity of N- and C-sites in serum(human)- and ovo-transferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1296**, 103-111 (1996).
- L. Messori, G.D. Poggetto, R. Monnani, and J. Hirose : The pH dependent properties of metallothioneins: a comparative study. *Biometals*, **10**, 303-313 (1997).
- J. Hirose, I. Fujiwara, K. Iio, S. Masunari, M. Minakami, L. Messori, and K. Hiromi: The dependence of the copper dissociation rate constants from human(serum)- and ovo-transferrin on pH and the anion. *Inorganic Reaction Mechanism*, **1**, 121-128 (1999).

6. 糖蛋白質糖鎖の構造解析およびその他に関する研究

- S. Iwahara, T. Maeyama, T. Mishima, T. Jikibara, K. Takegawa, and H. Iwamoto: Studies on the uronic acid-containing glycoproteins of *Fusarium* sp. M7-1: IV. Isolation and identification of four novel oligosaccharide units derived from the acidic polysaccharide chain. *J. Biochem.*, **112**(3), 355-359 (1992)
- M. Ohta, S. Emi, H. Iwamoto, J. Hirose, K. Hiromi, H. Itoh, T. Shin, S. Murao, and F. Matsuura : Novel-β-D-Galactofuranose-containing high mannose type oligosacchrides in ascorbate oxidase from *Acremonium* sp. HI-25. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1123-1130 (1996).
- K. Takegawa, K. Fujita, J.-Q. Fan, M. Tabuchi, N. Tanaka, A. Kondo, H. Iwamoto, I. Kato, Y.C. Lee, and S. Iwahara: Enzymatic synthesis of a neoglycoconjugate by transglycosylation with *Arthrobacter* endo-β-N-acetylglucosaminidase: Substrate for colorimetric detection of endo-β-N-acetylglucosaminidase activity. *Anal. Biochem.*, **257**, 218-223 (1998).
- C. Vilcheze, H.R. Morbidoni, T.R. Weisbrod, H. Iwamoto, M. Kuo, J.C. Sacchetti, and W.R. Jacobs Jr: Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, **182**(14), 4059-4067 (2000).

分子食品機能分野脂質研究室

職	氏 名	学 位
教授	里内 清	農学博士 (Kiyoshi Satouchi)
講師	田中 保	博士 (薬学) (Tamotsu Tanaka)
助手	村上 薫	工学士 (Kaoru Murakami)

はじめに

分子食品機能分野脂質研究室は、工学部に食品工学科の設立された翌年の平成 2 年 10 月に里内が赴任し開設された。村上は平成 3 年 4 月、田中は平成 5 年 4 月にそれぞれ着任し現在に至っている。

分子食品機能分野脂質研究室では主に「リン脂質分子種の多様性とその機能」という題目のもと研究を行っている。

研究の概要

リン脂質は細胞膜の構成成分であり、動物では主にグリセロリン脂質の 1 位には飽和脂肪酸、2 位には不飽和脂肪酸が結合した分子種より構成される。ひとつの細胞膜で 100 種以上のリン脂質分子種が存在するが、それぞれの役割としては膜の流動性や透過性など物性に係わる分子種と、たとえば 1-ステアロイル-2-アラキドノイルホスファチジルイノシトール 4, 5 ビスリン酸のように細胞活性化時での情報伝達素子として細胞の機能や制御に係わる分子種とがある。

1. 1,2-ジポリエン不飽和脂肪酸結合型リン脂質—その生合成と機能—

血小板活性化因子(PAF)は刺激に対応して産生される生理活性を持ったリン脂質で、サブ nM という非常に微量で血小板凝集や血管透過性亢進といった活性を惹起する。平成 3 年までにわれわれは PAF について以下のことを明らかにしてきた。すなわち PAF サイクルといってその産生にはアラキドン酸が密

接に関連し、アラキドン酸と拮抗する ω -3 脂肪酸、 α -リノレン酸がその産生を抑えること(*J. Immunol.*, **147**, 1607-1613, 1991)、一方、下等動物には刺激の有無に関係なく恒常的に PAF が存在すること(*J. Lipid Res.*, **32**, 1795-1803, 1991)、また酵素的経路以外にリン脂質の過酸化反応によっても PAF が生成することである(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 466-473, 1991)。線形動物には寄生する種が多く、アレルギー反応に関係深いことより生物工学科、生化学研究室との共同研究で線虫での PAF 解析を行った。結果は PAF のメトキシ体をシャーレに加えても線虫は何ら影響を受けないこと、また下等動物では例外的に PAF を持たないことを明らかにした。しかし、遺伝子の解析から線虫には PAF の加水分解酵素が存在することが報告され、その基質は過酸化反応で生じる PAF 様リン脂質であろうと推察されている。また線虫が動物でありながら植物の脂肪酸不飽和化酵素を持つことを指摘し、この報告に基づいてワシントン州立大の Browse らによって ω -3 不飽和化酵素のクローニングがなされている。一方、魚には ω -3 脂肪酸が多く、それゆえ血球細胞よりの PAF 産生は抑えられていると想定し、魚の血球細胞の脂質分析を行った。その過程において、カツオ筋肉中に 2 位に主にドコサヘキサエン酸が結合したリゾホスファチジルコリンを見出し、この産生にホスホリパーゼ A₁ が関与することを明らかにした。さらにグリセロールの C-1、2 位ともドコサヘキサエン酸が結合したホスファチジルコリンが筋肉には多量に存在するが、ホスホリパーゼ A₁ によって生じた 2-アシルリゾホスファチジルコリン 2 分子よりこの分子種を合成するトランスアシラーゼをサイトゾル中に見出した。一方線虫においても PAF 分析の過程において C-1、2 位ともにエイコサペンタエン酸が結合したホスファチジルコリンを見だし、低温においてこの分子種が増加すること、ま

た線虫の場合はマイクロソームのアシルトランスフェラーゼが C-1 位にもエイコサペンタエン酸を導入することより合成されることを明らかにした。

線虫やカツオ筋肉で見出された C-1、2 位ともにエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸の ω -3 脂肪酸が結合したリン脂質は、その脂肪酸の構造から考えて分子的に極めてコンパクトであり、その機能は単に膜流動性ばかりでなく他に特別の機能があると注目されてきている。なおこれらの分子種分析において設立時および平成 7 年度の私学助成で購入された島津 QP-2000 ガスクロマトグラフ質量分析計およびパーセプティブ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計が多いに威力を発揮した。

2. ポリメチレン中断型脂肪酸によるホスファチジルイノシトールの分子種改変

細胞内情報伝達機構に中心的な役割を果たしているリン脂質、ホスファチジルイノシトールがアラキドン酸含有分子種で構成されていることに注目して研究を進めた。このリン脂質のアラキドン酸残基を代替する脂肪酸を広く天然素材に求め、ある種の針葉樹種子に含まれるポリメチレン中断型脂肪酸がアラキドン酸を代替することを見出した。このタイプの脂肪酸の単離、構造解析法を開発すると共に細胞内代謝経路を明らかとし、さらにその細胞機能に及ぼす影響について検討したところ、細胞増殖の抑制作用を有することが明らかとなり、ホスファチジルイノシトールを標的としたリン脂質分子種改変が細胞機能調節に有効な戦略となることを立証した。なおこれらの一連の業績によって田中は平成 12 年度の日本脂質栄養学会奨励賞を受賞した。

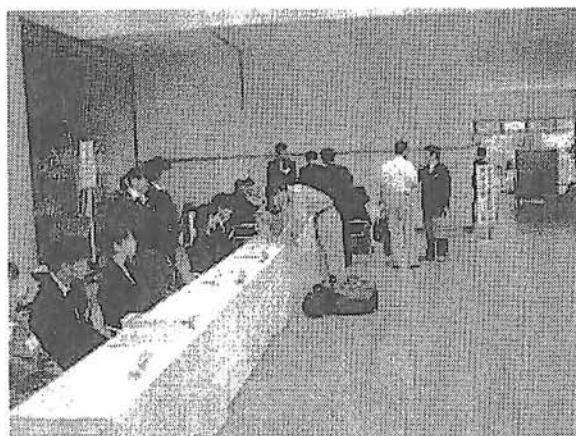
3. 植物よりのリパーゼ阻害物質の検索

食事として摂取した油脂は小腸で消化を受けなければ吸収されない。したがって腓リパ

ーゼの活性を抑える物質は抗肥満剤として機能することになる。現在までに知られているリパーゼ阻害物質に大豆種子中のタンパク質がある。このタンパク質は非常に強い表面活性作用を持ち、水-油界面に貫入し極めて少量でリパーゼ阻害を示す。最近、このリパーゼ阻害タンパク質が大豆リボキシゲナーゼであること明らかにした。さらに広く種々の植物や薬草の熱水抽出物についてリパーゼ阻害物質を検索していく中でお茶のカテキンガレート類がリパーゼを阻害することを見出している。なおこれらの研究の一部は卒業生の勤務する企業研究所との共同研究である。

おわりに

分子食品機能分野脂質研究室のこれまでの研究についてまとめたが、これらの成果があげられたのは卒業生諸君の日々の努力によるところが大きい。特に大学院卒業生、坂口昌充(1 期生)出羽信也(生物工学科 7 期生)服部俊憲(5 期生)生駒政和(6 期生)岡田江利子、瀧本龍昇(7 期生)児玉圭史(8 期生)の諸君にこれまでの活躍に対し謝意を表する。今後は博士課程後期 1 年盛重純一、博士課程前期 2 年高井誠道、同 1 年岩脇大ら大学院生や学部学生諸君らとともに、これまでの成果を受け継ぎ、さらに発展させていきたい。



4 年生、院生と共に運営した第 8 回日本脂質栄養学会(本学、大学会館にて)

分子食品機能分野脂質研究室関連主要研究業績

1. ジポリエン不飽和脂肪酸結合型リン脂質—その生合成と機能—

血小板活性化因子について.

A. Tokumura, T. Yotsumoto, T. Hoshikawa, T. Tanaka, and H. Tsukatani: Quantitative analysis of platelet-activating factor in rat brain. *Life Sci.*, **51**, 303-308 (1992).

里内 清: PAF研究の最近の進歩. 油化学, **41**, 745-749 (1992).

里内 清: 食用油脂による血小板活性化因子の産生制御. 食品の生体調節機能の解析 (千葉英雄編) 学会出版センター pp. 25-32 (1992).

K. Satouchi, K. Hirano, M. Sakaguchi, H. Takehara, and F. Matsuura: Phospholipids from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, **28**, 837-840 (1993).

T. Tanaka, H. Minamino, S. Unezaki, H. Tsukatani and A. Tokumura: Formation of platelet-activating factor-like phospholipids by Fe^{2+} /ascorbate/EDTA-induced lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1166**, 264-274 (1993).

里内 清: 土壌自活線虫 *C. elegans* の脂質組成と脂質性メディエーター. 農化誌, **67**, 982-983 (1993).

A. Tokumura, T. Tanaka, and H. Tsukatani: Characterization of PAF-like phospholipids formed by lipid peroxidation. *J. Lipid Mediat. Cell*, **10**, 179-181 (1994).

里内 清: 血小板活性化因子、分子生物学・免疫学キーワード辞典 (永田和宏、長野 敬、宮坂信之、宮坂昌之編) 医学書院, pp. 151 (1994).

T. Tanaka, M. Iimori, H. Tsukatani, and A. Tokumura: Platelet-aggregating effects of platelet-activating factor-like phospholipids formed by oxidation of phosphatidylcholines containing an *sn*-2 polyunsaturated fatty acyl group. *Biochim. Biophys. Acta*, **1210**, 202-208 (1994).

田中 保、里内 清、徳村 彰: PAF と高度不飽和脂肪酸、AA、EPA、DHA-高度不飽和脂肪酸 (鹿山 光編) 恒星社厚生閣, pp. 116-130 (1995).

T. Tanaka, A. Tokumura, and H. Tsukatani: Platelet-activating factor (PAF)-like phospholipids formed during peroxidation of phosphatidylcholines from different foodstuffs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1389-1393 (1995).

T. Sugiura, A. Yamashita, N. Kudo, T. Fukuda, T. Miyamoto, N. Cheng S. Kishimoto, K. Waku, T. Tanaka, H. Tsukatani, and A. Tokumura: Platelet-activating factor and its structural analogues in the earthworm *Eisenia foetida*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1258**, 19-26 (1995).

里内 清: 松の実油による脂質性メディエーターの産生制御. アサヒビール生活文化研究振興財団研究紀要, **9**, 31-36 (1996).

田中 保、里内 清: PAF、基礎生化学実験法 第5巻 脂質・糖質・複合糖質 (日本生化学会編) 東京化学同人, pp. 86-91 (2000).

ジポリエン不飽和脂肪酸結合型リン脂質について

K. Satouchi, M. Sakaguchi, M. Shirakawa, K. Hirano, and T. Tanaka: Lysophosphatidylcholine from white muscle of bonito *Euthynnus pelamis* (Linnaeus) - Involvement of phospholipase A_1 activity for its production -. *Biochim. Biophys. Acta*, **1214**, 303-308 (1994).

T. Tanaka, K. Ikita, T. Ashida, Y. Motoyama, Y. Yamaguchi, and K. Satouchi: Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, **31**, 1173-1178 (1996).

- K. Hirano, A. Tanaka, K. Yoshizumi, T. Tanaka, and K. Satouchi: Properties of phospholipase A₁/transacylase in the white muscle of bonito *Euthynnus pelamis* (Linnaeus). *J. Biochem.*, **122**, 1160-1166 (1997).
- K. Hirano, T. Ito, H. Morihara, T. Tanaka, and K. Satouchi: Lysophosphatidylcholine/transacylase in the production of dipolyunsaturated phosphatidylcholine in bonito muscle. *FEBS Lett.*, **437**, 193-196 (1998).
- T. Tanaka, S. Izuwa, K. Tanaka, D. Yamamoto, T. Takimoto, F. Matsuura, and K. Satouchi: Biosynthesis of 1,2-dieicosapentaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 189-194 (1999).
- K. Hirano, E. Okada, T. Tanaka, and K. Satouchi: Purification and regiospecificity of multiple enzyme activities of phospholipase A₁ from bonito muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **1483**, 325-333 (2000).

2. ポリメチレン中断型脂肪酸によるホスファチジルイノシトールの分子種改変

- T. Tanaka, K. Shibata, H. Hino, T. Murashita, M. Kayama, and K. Satouchi: Purification and gas chromatographic mass spectrometric characterization of non-methylene interrupted polyunsaturated fatty acid incorporated in rat liver. *J. Chromatogr.*, **700**, 1-8 (1997).
- T. Tanaka, T. Hattori, M. Kouchi, K. Hirano, and K. Satouchi: Methylene-interrupted double bond in polyunsaturated fatty acid is essential structure for metabolism by fatty acid elongation system of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1393**, 299-306 (1998).
- T. Tanaka, T. Hattori, M. Kouchi, K. Hirano, and K. Satouchi: Non-methylene interrupted polyenoic fatty acid: Structural characterization and metabolism by fatty acid chain elongation in rat liver: in *Essential Fatty Acids and Eicosanoids* (eds by R.A. Riemersma, R. Armstrong, R.W. Kelly & R. Wilson) AOCs Press, Champaign, IL pp. 229-233 (1998).
- T. Tanaka, T. Takimoto, J. Morishige, Y. Kikuta, T. Sugiura, and K. Satouchi: Non-methylene interrupted polyunsaturated fatty acids: Effective substitute of arachidonate of phosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 683-688 (1999).
- S. Nakane, T. Tanaka, K. Satouchi, Y. Kobayashi, K. Waku, and T. Sugiura: Occurrence of a novel cannabinimetic molecule 2-sciadonoylglycerol (2-eicosa-5', 11', 14'-trienoylglycerol) in the umbrella pine *Sciadopitys verticillata* seeds. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 758-761 (2000).

田中 保: ポリメチレン中断型不飽和脂肪酸 —細胞生物学的研究への有用性—, 脂質栄養学, **10**, 11-19 (2001).

- T. Tanaka, J. Morishige, T. Takimoto, Y. Takai, and K. Satouchi: Metabolic characterization of sciadonic acid (5c, 11c, 14c-eicosatrienoic acid) as an effective substitute for arachidonate of phosphatidylinositol. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4928-4939 (2001).

田中 保: リン脂質の機能と分子種の多様性 —グリセロ型活性脂質の疎水鎖に求められる構造—化学と生物, 印刷中.

3. 植物よりのリパーゼ阻害物質の検索

- K. Satouchi, K. Hirano, O. Fujino, M. Ikoma, T. Tanaka, and K. Kitamura: Lipxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1498-1503 (1998).

里内 清、田中 保、村上 薫: 黒大豆種子よりのリパーゼ阻害タンパク質に関する研究. 農林水産業特別試験研究費補助金による試験研究結果概要書, pp. 14-17 (2001).

代謝制御研究室

職 氏 名 学 位
講師 菊田 安至 (医学博士)
(Yasushi Kikuta)

はじめに

代謝制御研究室は、食品工学科が開設されて2年目の平成2年4月、大阪市立大学医学部を定年退官した楠瀬正道先生を教授に迎え開設された。同時に大阪市立大学大学院医学博士課程を修了したばかりの菊田安至が助手として着任した。また、平成2年4月から平成6年3月まで、山本 覚講師(現、生物工学科助教授)に教育・研究の両面において協力していただいた。楠瀬正道先生は平成11年3月に定年退職された。

代謝制御研究室は、教育面では生化学関係科目を担当し、研究面では脂肪酸、プロスタランジン(PG)、およびロイコトリエン B_4 (LT B_4)などの ω 水酸化反応を触媒するチトクロームP450に関する研究を中心に研究活動を行ってきた。

研究の概要

楠瀬正道先生は長年にわたり、脂肪酸 ω 水酸化酵素に関する研究を行い、その本態がチトクロームP450(P450)であることを明らかにしてきた。P450は種々の脂溶性物質に対してモノオキシゲナーゼ活性を示すヘムチオレートタンパク質の総称であり、P450遺伝子スーパーファミリーを形成している。その中でCYP4ファミリーは脂肪酸 ω 水酸化酵素のために設けられたファミリーである。現在では、CYP4はCYP4A~CYP4ABまでの24サブファミリーに分類され、P450遺伝子スーパーファミリーの中で最も大きなファミリーとなっている。しかし、150種を超えるCYP4サブファミリーの中で、その触媒機能が明らかにされているのは、われわれの研究グループによって明らかにされたCYP4A、CYP4B、およびCYP4Fサブファミリーに限られており、われわれはCYP4研究の中心的役割を果たしてきた。

1. 脂肪酸 ω 水酸化酵素に関する研究

代謝制御研究室が開設されるまでに、ウサギ腎から3種類の脂肪酸 ω 水酸化酵素(CYP4A5、CYP4A6、およびCYP4A7)、ウサギ肺からPG ω 水酸化酵素(CYP4A4)の精製とcDNAクローニングが成し遂げられ、CYP4ファミリーが確立されていた。これらに加えて、ラット、ヒトの腎からも脂肪酸 ω 水酸化酵素の精製に成功し、ヒト腎の脂肪酸 ω 水酸化酵素(CYP4A11)についてcDNAをクローニングし全一次構造を決定した。

CYP4Aに分類される ω 水酸化酵素は、一次構造上相互に80%程度の相同性を有するが、基質特異性を異にするため、その基質特異性を支配する構造と機能の関係について検討を行った。また、脂肪酸 ω 水酸化活性を有する薬物代謝型P450(CYP2C2、およびCYP2E1)について、アミノ酸変異を導入することにより、水酸化の位置特異性を支配するアミノ酸を特定した。

脂肪酸 ω 水酸化反応は生理的意義が十分に明らかにされていないため、強い関心を示す研究者は少なかったが、ペルオキシソーム増強剤による脂肪酸 ω 水酸化酵素の誘導とその核内レセプター(PPAR)の発見や20-HETEの生理活性が明らかにされて以来、熱い視線を注がれるようになってきた。脂肪酸 ω 水酸化酵素の研究は、脂肪酸 ω 酸化経路の確立という観点から本学生物工学科の山本助教授に引き継がれている。

2. ロイコトリエン B_4 ω 水酸化酵素に関する研究

LT B_4 は好中球で産生される強力な生理活性脂質で、炎症やアレルギーに重要な役割を果たしている。したがって、その不活性化機構の解明は極めて重要である。九州大学医学部の住本らはヒト好中球ミクロソームにLT B_4 ω 水酸化活性が存在し、LT B_4 の不活性化に関与することを示唆した。生化学的実験に十分量のヒト好中球を入手することは困難であるため、ヒト好中球cDNAライブラリーよりLT B_4 ω 水酸化酵素のcDNAクローニングを試みた。その結果、新しいP450(CYP4F3)のcDNAのクローニングに成功した。また、ヒト肝

のLTB₄ ω水酸化酵素 (CYP4F2) のcDNA クローニングにも成功した。これらcDNAの酵母内発現タンパク質は、精製後、再構成系において著明なLTB₄ ω水酸化活性を示した。このことから、CYP4Fサブファミリーの生理機能がLTB₄のω水酸化による不活性化であることを初めて明らかにした。さらに、ラット肝、およびマウス肝のLTB₄ ω水酸化酵素 (CYP4F1、およびCYP4F14) についてもcDNAを発現させLTB₄ ω水酸化活性を有することを明らかにしている。

ヒト好中球のCYP4F3はLTB₄に対する親和性が極めて高いこと、ヒト好中球ではその代謝産物(20-ヒドロキシLTB₄)が多量に産生されることなどから、好中球のLTB₄レベルの調節に働く酵素であると考えている。一方、CYP4F2はLTB₄に対する親和性が比較的低く、活性も低いことから、CYP4F3とは異なる生理機能を担っている推定している。また、LTB₄ ω水酸化酵素はリポキシンA₄や12-HETEなどのエイコサノイドのω水酸化活性を有することも明らかにしているが、その生理的意義については不明である。

一般的に、P450の多くは誘導酵素であることが知られているが、CYP4Fの誘導については解明されていない。CYP4F2、およびCYP4F3について、その遺伝子構造を明らかにし、発現制御領域をある程度特定したが、残念ながらその制御因子を同定するには至っていない。

肝および好中球のそれぞれのLTB₄ ω水酸化酵素の生理機能や誘導機構の解析には、マウスが実験材料として優れていると考えられるため、マウスのLTB₄ ω水酸化酵素に研究の軸を移しつつある。現在、テキサス大学医学部ヒューストン校のStrobel教授と共同研究でLTB₄ ω水酸化酵素遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製を試みている。この技術の導入によりLTB₄ ω水酸化酵素の生理機能の詳細な解明が期待される。

3. 小腸粘膜の薬物代謝型P450に関する研究

脂肪酸ω水酸化酵素の研究過程で、小腸粘膜ミクロソームに薬物代謝型P450の存在を見出

した。小腸粘膜は摂取した食物や経口投与された医薬に直接接触する組織であり、小腸における薬物代謝の研究は、食品の安全性確保や医薬開発の観点からも重要である。当研究室では、ウサギ小腸粘膜ミクロソームから精製された薬物代謝酵素P450ibのcDNAクローニングを行い、その全一次構造を明らかにした。P450ibは新しいP450として、CYP2J1と分類され、CYP2Jサブファミリーの先駆的存在となった。CYP2J1は小腸に特異的に発現しており、小腸粘膜の薬物代謝におけるCYP2J1の役割を検討している。

おわりに

菊田は平成13年10月から平成14年9月まで休職し、米国テキサス大学医学部ヒューストン校のStrobel教授のもとに留学中である。この期間、代謝制御研究室は閉鎖されるが、帰国後ただちに研究活動を再開する予定である。

CYP4Fサブファミリーの生理機能を最初に明らかにしたのは当研究室の報告であった。その後も、LTB₄ ω水酸化酵素の機能や遺伝子構造など多くの知見を見出してきた。LTB₄ ω水酸化酵素の系統的分類名であるCYP4Fの“F”は偶然採用されたものである。しかし、この“F”がFukuyama Universityを表す“F”と思われるように本研究を発展させていきたい。

最後に、これらの研究遂行にあたっては、学部学生・大学院生諸君の活躍によるところが大きい。特に大学院生諸君、金森浩樹、野島儀久、遠藤克哉、加藤美香子、山下嘉章、宮内抽美湖、伊藤美幸、柏木聡一郎、谷 和憲、時政英之、加州英昭の各氏に謝意を表する。また、共同研究でご指導いただいた、大阪市立大学医学部の楠瀬恵美先生、市原宏介先生、川島秀紀先生、東北大学理学部の藤井義明先生、十川和博先生、九州大学医学部の住本英樹先生、住友化学株式会社の大川秀郎先生(現、神戸大学・農)、本学応用生物科学科の里内 清先生、生物工学科の山本 覚先生に厚く感謝します。

代謝制御研究室関連主要研究業績

1. 脂肪酸 ω 水酸化酵素に関する研究

- S. Yamamoto, E. Kusunose, S. Matsubara, K. Ichihara, and M. Kusunose: Occurrence of cytochrome P-450 with prostaglandin ω -hydroxylase placental microsomes. *J. Biochem.*, 100, 175-181 (1986).
- M. Yoshimoto, E. Kusunose, S. Yamamoto, M. Maekawa, and M. Kusunose: Purification and characterization of two forms of cytochrome P-450 from rat kidney cortex microsomes. *Biochem. Internat.*, 13, 749-755 (1986).
- M. Matsubara, S. Yamamoto, K. Sogawa, N. Yokotani, Y. Fujii-Kuriyama, M. Haniu, John E. Shively, O. Gotoh, and M. Kusunose: Prostaglandin ω -hydroxylase (cytochrome P-450_{p-2}). *J. Biol. Chem.*, 262, 13366-13371 (1987).
- Y. Kikuta Y, E. Kusunose, S. Matsubara, Y. Funae, S. Imaoka, I. Kubota, and M. Kusunose: Purification and characterization of hepatic microsomal prostaglandin ω -hydroxylase cytochrome P-450 from pregnant rabbits. *J. Biochem.*, 106, 468-473 (1989).
- E. Kusunose, A. Sawamura, H. Kawashima, I. Kubota, and M. Kusunose: Isolation of a new form of cytochrome P-450 with prostaglandin A and fatty acid ω -hydroxylase activities from rabbit kidney cortex microsomes. *J. Biochem.*, 106, 194-196 (1989).
- Y. Kikuta Y, E. Kusunose, T. Okumoto, I. Kubota, and M. Kusunose: Purification and characterization of two forms of cytochrome P-450 with ω -hydroxylase activities toward prostaglandin A and fatty acids from rabbit liver microsomes. *J. Biochem.*, 107, 280-286 (1990).
- R. Yoshimura, E. Kusunose, N. Yokotani, S. Yamamoto, I. Kubota, and M. Kusunose: Purification and characterization of two forms of fatty acid ω -hydroxylase cytochrome P-450 from rabbit kidney cortex microsomes. *J. Biochem.*, 108, 544-548 (1990).
- N. Yokotani, E. Kusunose, K. Sogawa, H. Kawashima, M. Kinoshita, M. Kusunose, and Y. Fujii-Kuriyama: cDNA cloning and expression of the mRNA for cytochrome P-450_{kd} which shows a fatty acid ω -hydroxylating activity. *Eur. J. Biochem.*, 186, 531-536 (1991).
- H. Kawashima, E. Kusunose, I. Kubota, M. Maekawa, and M. Kusunose: Purification and NH₂-terminal amino acid sequences of human and rat kidney fatty acid ω -hydroxylases. *Biochem. Biophys. Acta*, 1123, 156-162 (1992).
- T. Fukuda, Y. Imai, M. Komori, M. Nakamura, E. Kusunose, K. Satouchi, and M. Kusunose: Replacement of Thr-303 from P450 2E1 with Serine modifies regioselectivity of its fatty acid hydroxylase activity. *J. Biochem.*, 113, 7-12 (1993).
- A. Sawamura, E. Kusunose, K. Satouchi, and M. Kusunose: Catalytic properties of rabbit kidney fatty acid ω -hydroxylase cytochrome P-450_{ka-2} (CYP4A7). *Biochim. Biophys. Acta*, 1168, 30-36 (1993).
- M. Kusunose: Fatty acid omega-oxidation and eicosanoid metabolism, Cytochrome P-450 (T. Omura, Y. Ishimura, and Y. Fujii-Kuriyama, eds.). Second edition, pp. 127-141, Kodansha (Tokyo) and VCH (Weinheim) (1993).
- T. Fukuda, Y. Imai, M. Komori, M. Nakamura, E. Kusunose, K. Satouchi, and M. Kusunose: Different mechanism of regio selection of fatty acid hydroxylation by laurate (ω -1)-hydroxylating P450s, P450_{2C2} and P450_{2E1}. *J. Biochem.*, 115, 338-344 (1994).
- H. Kawashima, E. Kusunose, Y. Kikuta, H. Kinoshita, S. Tanaka, S. Yamamoto, T. Kishimoto, and M. Kusunose: Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid ω -hydroxylase. *J. Biochem.*, 116, 74-80 (1994).
- Y. Kikuta, E. Kusunose, and M. Kusunose: Expression and induction of cytochrome P450s in rabbit parotid glands. *Biochem. Pharmacol.*, 62, 249-254 (2001).

2. ロイコトリエン B₄ ω -水酸化酵素に関する研究

- H. Sumimoto, E. Kusunose, Y. Gotoh, M. Kusunose, and S. Minakami: Leukotriene B₄ ω -hydroxylase in rat liver microsomes: Identification as a cytochrome P450 that catalyzes prostaglandin A₁ ω -hydroxylation, and participation of cytochrome b₅. *J.*

Biochem, 108, 215-221 (1990).

- H. Sumimoto, Y. Kikuta, E. Kusunose, M. Kusunose, and S. Minakami: Antibodies against rabbit ω -hydroxylases of prostaglandins and fatty acids cross-react with leukotriene B₄ ω -hydroxylase in human neutrophils (cytochrome P-450LTB₄). *Biochem Internat.*, 20, 381-387 (1990).
- Y. Kikuta, E. Kusunose, K. Endo, S. Yamamoto, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama, and M. Kusunose: A novel form of cytochrome P-450 family 4 in human polymorphonuclear leukocytes. cDNA cloning and expression of leukotriene B₄ ω -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 268, 9376-9380 (1993).
- Y. Kikuta, E. Kusunose, T. Kondo, S. Yamamoto, H. Kinoshita, and M. Kusunose: Cloning and expression of a novel form of leukotriene B₄ ω -hydroxylase from human liver. *FEBS Lett.*, 348, 70-74 (1994).
- Y. Kikuta, E. Kusunose, H. Sumimoto, Y. Mizukami, K. Takeshige, T. Sakaki, Y. Yabusaki, and M. Kusunose: Purification and characterization of recombinant human neutrophil leukotriene B₄ ω -hydroxylase (cytochrome P450 4F3). *Arch. Biochem. Biophys.*, 355, 201-205 (1998).
- Y. Kikuta, M. Kato, Y. Yamashita, Y. Miyauchi, K. Tanaka, N. Kamada, and M. Kusunose: Human leukotriene B₄ ω -hydroxylase (CYP4F3) gene: Molecular cloning and chromosomal localization. *Dev. Cell Biol.*, 17, 221-230 (1998).
- Y. Kikuta, Y. Miyauchi, E. Kusunose, and M. Kusunose: Expression and molecular cloning of human liver leukotriene B₄ ω -hydroxylase (CYP4F2) gene. *Dev. Cell Biol.*, 18, 723-730 (1999).
- Y. Kikuta, E. Kusunose, M. Ito, M. Kusunose: Purification and characterization of recombinant rat hepatic CYP4F1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 369, 193-196 (1999).
- Y. Kikuta, E. Kusunose, and M. Kusunose: Characterization of human liver leukotriene B₄ ω -hydroxylase P450 (CYP4F2). *J. Biochem.*, 127, 1047-1052 (2000).
- Y. Kikuta, H. Kashu, E. Kusunose, and M. Kusunose: Expression and catalytic activity of mouse leukotriene B₄ ω -hydroxylase, CYP4F14. *Arch. Biochem. Biophys.*, 383, 225-232 (2000).

3. 小腸の薬物代謝型 P450 に関する研究

- Y. Kikuta, K. Sogawa, M. Haniu, M. Kinoshita, E. Kusunose, Y. Nojima, S. Yamamoto, K. Ichihara, M. Kusunose, and Y. Fujii-Kuriyama: A novel species of cytochrome P-450 (P-450ib) specific for the small intestine of rabbits. cDNA cloning and its expression in COS cells. *J. Biol. Chem.*, 266, 17821-17825 (1991).
- Y. Shimizu, E. Kusunose, Y. Kikuta, T. Arakawa, K. Ichihara, and M. Kusunose: Purification and characterization of two new cytochrome P-450 related to CYP2C subfamily from rabbit small intestine microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1339, 268-276 (1997).
- K. Koike, E. Kusunose, Y. Nishikawa, K. Ichihara, S. Inagaki, H. Takagi, Y. Kikuta, and M. Kusunose: Purification and characterization of rabbit small intestinal cytochrome P450 belonging to CYP2J and CYP4A subfamilies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 643-647 (1997).

4. その他の研究

- H. He, S. Oka, Y. Yamamura, E. Kusunose, M. Kusunose, and I. Yano: Rapid serodiagnosis of human Mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6'-6-dimycolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 76, 201-204 (1991).
- Y. Oda, Y. Kikuta, B. S. Park, and K. Torimura: Comparison and characterization of *Lactobacillus amylovorus* strains for lactic acid fermentation of food by-products. *Food Microbiology*, 17, 341-347 (2000).

応用生物科学科 2001 年研究業績

A. 研究発表

1. 論文

- (1) Metabolic characterization of sciadonic acid (5*c*,11*c*,14*c*-eicosatrienoic acid) as substitute for arachidonate of phosphatidylinositol

T. Tanaka, J. Morishige, T. Takimoto, Y. Takai and K. Satouchi

Eur. J. Biochem., **268**, 4928-4939 (2001)

Sciadonic acid (SciA) (20:3 Δ -5,11,14) is an n-6 series trienoic acid that lacks the Δ 8 double bond of arachidonic acid (AA). In this study, we characterized the metabolic behavior of SciA in the process of acylation to phospholipid of HepG2 cells. One of the characteristics of fatty acid compositions of phospholipids in SciA-supplemented cells is a relatively higher proportion of SciA in phosphatidylinositol (PtdIns) than in phosphatidylethanolamine (PtdEtn), phosphatidylcholine (PtdCho) and phosphatidylserine (PtdSer). Similarly, the proportion of AA was higher in PtdIns in AA-supplemented cells. The extensive accumulation of SciA in PtdIns resulted in the enrichment of newly formed 1-stearoyl-2-sciadonoyl molecular species (38%) in PtdIns and caused the reduction in the level of pre-existing AA-containing molecular species. The kinetics of incorporation of SciA to PtdEtn, PtdSer and PtdIns of cells were similar to those of AA. These results suggest that SciA or SciA-containing glycerides are metabolized in a similar manner to AA or AA-containing glyceride in the biosynthesis of PtdIns in HepG2 cells. In this regard, SciA will become an interesting experimental tool to clarify the significance of AA-residue of PtdIns-origin bioactive lipids.

- (2) Expression and induction of cytochrome P450s in rabbit parotid glands

Kikuta Y, Kusunose E, and Kusunose M

Biochem. Pharmacol., **62**, 249-254 (2001)

Microsomes from parotid glands of untreated rabbits were found to contain 42.3 pmol of P450/mg protein and to catalyze the ω -hydroxylation of laurate. Administration of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) resulted in a 7-fold increase of laurate ω -hydroxylation. This enzyme activity was greatly inhibited by pretreatment with antibodies against

CYP4A5. Furthermore, parotid gland CYP4A5, CYP4A6, and CYP4A7 mRNAs were identified by RT-PCR. Moreover, the CYP4A enzymes were demonstrated immunohistochemically to be localized exclusively in the ducts of these glands. In addition to the CYP4A enzymes, immunoblot analysis revealed that CYP2B4 is constitutively present, and that CYP1A1 is induced in these glands by treatment with 3-methylcholanthrene. Taken together, we can conclude that the P450 isoforms expressed in rabbit kidney cortex and parotid glands are identical in composition.

(3) Identification of the *varR* gene as a transcriptional regulator of virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*

Wises Namwat, Chang-Kwon Lee, Hiroshi Kinoshita, Yasuhiro Yamada and Takuya Nihira

J. Bacteriol., 2025-2031 (2001)

A gene designated *varR* (for virginiae antibiotic resistance regulator) was identified in *Streptomyces virginiae* 89 bp downstream of a *varS* gene encoding a virginiamycin S (VS)-specific transporter. The deduced *varR* product showed high homology to repressors of the TetR family with a conserved helix-turn-helix DNA binding motif. Purified recombinant VarR protein was present as a dimer in vitro and showed clear DNA binding activity toward the *varS* promoter region. This binding was abolished by the presence of VS, suggesting that VarR regulates transcription of *varS* in a VS-dependent manner. Northern blot analysis revealed that *varR* was cotranscribed with upstream *varS* as a 2.4-kb transcript and that VS acted as an inducer of bicistronic transcription. Deletion analysis of the *varS* promoter region clarified two adjacent VarR binding sites in the *varS* promoter.

(4) Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5

Sigeru Kitani, Yasuhiro Yamada and Takuya Nihira

J. Bacteriol., 4357-4363 (2001)

IM-2{(2R,3R,1'R)-2-1'-hydroxybutyl-3-hydroxymethyl butyrolactone} is a butyrolactone autoregulator which, in *Streptomyces lavendulae* FRI-5, switches off the production of D-cycloserine but switches on the production of blue pigment and several nucleoside antibiotics. To clarify the in vivo function of an IM-2 specific receptor (FarA) in the IM-2

signaling cascade of *S. lavendulae* FRI-5, a *farA* deletion mutant was constructed by means of homologous recombination. On several solid media, no significant difference in morphology was observed between the wild-type strain and the *farA* mutant (strain K1049), which demonstrated that the IM-2-FarA system does not participate in the morphological control of *S. lavendulae* FRI-5. In liquid media, the *farA* mutant overproduced nucleoside antibiotics and produced blue pigment earlier than did the wild-type strain, suggesting that the FarA protein acts primarily as a negative regulator to the biosynthesis of these compounds in the absence of IM-2. However, contrary to the IM-2-dependent suppression of D-cycloserine production in the wild-type strain, overproduction of D-cycloserine was observed in the *farA* mutant, indicating for the first time that the presence of both IM-2 and intact FarA are necessary for the suppression of D-cycloserine production.

- (5) A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Eriko Takano, Rekha Chakraborty, Takuya Nihira, Yasuhiro Yamada and Mervyn J. Bibb

Mol. Microbiol., 41 (5), 1015-1028 (2001)

Many streptomycetes produce extracellular γ -butyrolactones. In several cases, these have been shown to act as signals for the onset of antibiotic production. Synthesis of these molecules appears to require a member of the AfsA family of proteins (AfsA is required for A-factor synthesis of the γ -butyrolactone A-factor and consequently for streptomycin production in *Streptomyces griseus*). An *afsA* homologue, *scbA*, was identified in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and was found to lie adjacent to a divergently transcribed gene, *scbR*, which encodes a γ -butyrolactone binding protein. Gel retardation assays and DNase I footprinting studies revealed DNA binding sites for ScbR at -4 to -33 nt with respect to the *scbA* transcriptional start site, and at -42 to -68 nt with respect to the *scbR* transcriptional start site. Addition of the γ -butyrolactone SCB1 of *S. coelicolor* resulted in loss of the DNA-binding ability of ScbR. A *scbA* mutant produced no γ -butyrolactones, yet overproduced two antibiotics, actinorhodin (Act) and undecylprodigiosin (Red), whereas a deletion mutant of *scbR* also failed to make γ -butyrolactone and showed delayed Red production. These phenotypes differ markedly from those expected from analogy with the *S. griseus* A-factor system. Furthermore, transcription of *scbR* increased, and that of *scbA* was abolished, in an *scbR* mutant, indicating that ScbR represses its own expression while activating that of *scbA*. In the *scbA* mutant, expression of both was

greatly reduced. Addition of SCB1 to the *scbA* mutant induced transcription of *scbR*, but did not restore *scbA* expression, indicating that the deficiency in *scbA* transcription in the *scbA* mutant is not solely due to the inability to produce SCB1, and that ScbA is a positive regulator in addition to being required for γ -butyrolactone production. Overall, these results indicate a complex mechanism for γ -butyrolactone mediated regulation of antibiotic synthesis in *S. coelicolor*.

(6) Structure and some physico-chemical characteristics of tuber starch of three cultivars of Chinese arrowhead and their six F1 lines

Y.Sugimoto, Y.Sirai, M.Yamanaka, T.Tanimoto, N.Inouchi, Y.Konishi, and H.Fuwa,

J. Appl. Glycosci., **48**(2), 115-122(2001)

Starch granules were prepared from tubers of Chinese arrowhead (*Sagittaria trifolia* L. var. *edulis* (Sieb.) Ohwi), 3 cultivars : Aokuwai (Ao), Shirokuwai (Shi) and Suitakuwai (Sui), and their 6 F1 lines : Ao×Ao, Ao×Shi, Ao×Sui, Shi×Ao, Shi×Sui and Sui×Sui. The amylose content of the starches determined by amperometric iodotitrimetry were in a range of 28.2-29.9% and 26.6-31.3% by gel-permeation chromatography (GPC) of isoamylase-debranched starches. High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) of isoamylase-debranched starches showed the starches had unique amylopectin short chain length distributions of increased amounts of chains with DP 6 and 7, and decreased amounts of chains with DP 9 compared with waxy maize amylopectin. The X-ray diffractograms of the starches showed A type patterns. Among the 3 cultivars, the granular size and temperature of gelatinization by DSC of the starches were in the ascending order of Shi>Ao>Sui, and starch-granule digestibility by amylase and solubility and swelling power at 70°C of the starches were in the descending order of Shi<Ao<Sui. There were positive correlations between starch-granule digestibility by amylase and either solubility at 60°C and 70°C or swelling power at 60°C and 70°C of the starches, and negative correlations between starch-granule digestibilities by amylase and temperatures of gelatinization (*To* and *Tp*) by DSC of the starches.

(7) びわ種子澱粉の二、三の性質について

杉本温美、井ノ内直良、不破英次

J. Appl. Glycosci., **48**(4), 335-342(2001)

温室栽培のびわ種子 1 試料ならびに露地栽培のびわ種子 4 試料より澱粉を調製し、その性質について検討したところ、次のような結果が得られた。温室栽培のびわ種子澱粉は露地栽培のびわ種子澱粉よりも平均粒径（粒度分布の結果から得られた平均粒径は、温室栽培 12.6 μm 、露地栽培 9.5-10.7 μm ）がやや大きく、糊化温度（DSC より求めた糊化ピーク温度は温室栽培 57.2 $^{\circ}\text{C}$ 、露地栽培 62.4-64.1 $^{\circ}\text{C}$ ）が低く、アミロース含量（イソアミラーゼで枝切り後のゲル濾過分析より温室栽培 28.6%、露地栽培 22.4-26.9%）が高く、RVA による最高粘度やブレイクダウンが大きく、さらに X 線回折図（温室栽培 Cb 図形、露地栽培 C 図形）が異なるなど環境温度の影響を受けて露地栽培と種々異なる性質を示した。

(8) The Characterization of the Metal Substituted Dipeptidyl Peptidase III (Rat Liver)

J. Hirose, H. Iwamoto, I. Nagao, K. Enmyo, H. Sugao, N. Kanemitsu, K. Ikeda, M. Takeda, M. Inoue, T. Ikeda, F. Matsuura, K. M. Fukasawa, and K. Fukasawa
Biochemistry, **40**, 11860-11865 (2001)

Dipeptidyl peptidase (DPP III) (EC 3.4.14.4) which has a HELLGH-E (residue 450-455, 508) motif as the zinc binding site is classified as a zinc metallopeptidase. The zinc dissociation constants of the wild-type, Leu⁴⁵³-deleted, and E508D mutant of DPP III at pH 7.4 were $4.5(\pm 0.7) \times 10^{-13}$, $5.8(\pm 0.7) \times 10^{-12}$, and $3.2(\pm 0.9) \times 10^{-10}$ M, respectively. The recoveries of the enzyme activities by the addition of various metal ions to apo-DPP III were also measured, and Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cu^{2+} ions completely recovered the enzyme activity as did Zn^{2+} . The dissociation constants of Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cu^{2+} ions for apo-DPP III at pH 7.4 were $8.2(\pm 0.9) \times 10^{-13}$, $2.7(\pm 0.3) \times 10^{-12}$, and $1.1(\pm 0.1) \times 10^{-14}$ M, respectively. The shape of the absorption spectrum of Co^{2+} -DPP III was very similar to that of Co^{2+} -carboxypeptidase A or Co^{2+} -thermolysin, in which the Co^{2+} is bound to two histidyl nitrogens, a water molecule, and a glutamate residue. The absorption spectrum of Cu^{2+} -DPP III is also very similar to that of Cu^{2+} -thermolysin. The EPR spectrum and the EPR parameters of Cu^{2+} -DPP III were very similar to those of Cu^{2+} -thermolysin but slightly different from those of Cu^{2+} -carboxypeptidase A. The five lines of the superfine structure in the perpendicular region of the EPR spectrum in Cu^{2+} -DPP III suggest that two nitrogen atoms should coordinate to the cupric ion in Cu^{2+} -DPP III. All these data suggest that the donor-set and the coordination geometry of the metal ions in DPP III which has the HExxxH motif as the metal binding site are very similar to those of the metal ions in thermolysin which has the HExxH motif.

- (9) Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of Corn husk, Bagasse and Switchgrass.

Masahiro Kurakake, Wataru Kisaka, Kazuya Ouchi, and Toshiaki Komaki
Applied Biochemistry and Biotechnology, **90**, 251-259 (2001)

Bagasse, corn husk, and switchgrass were pretreated with ammonia water to enhance enzymatic hydrolysis. The sample (2 g) mixed with 1 - 6 mL ammonia water (25 - 28 % ammonia) and autoclaved at 120 °C for 20 min. After treatment, the product was vacuum-dried to remove ammonia gas. The dried solid could be used immediately in the enzymatic hydrolysis without washing. The enzymatic hydrolysis was effectively improved with more than 0.5 and 1 mL-ammonia water/g for corn husk and bagasse, respectively. In bagasse, glucose, xylose and xylobiose were the main products. The adsorption of CMCase and xylanase was related to the initial rate of enzymatic hydrolysis. In corn husks, arabinoxylan extracted by pretreatment was substantially unhydrolyzed because of the high ratio of arabinose to xylose (0.6). The carbohydrate yields from cellulose and hemicellulose were 72.9 and 82.4% in bagasse, and 86.2 and 91.9% in corn husk, respectively. The ammonia/water pretreatment also benefited switchgrass (*Miscanthus sinensis* and *Solidago altissima* L.) hydrolysis.

- (10) Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties.

Masahiro Kurakake, and Toshiaki Komaki
Current Microbiology, **42**, 377-380 (2001)

β -Mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 was produced by solid culture with coffee waste and wheat bran. The optimum composition for enzymatic hydrolysis was 40 % coffee waste - 60 % wheat bran. Two enzymes were partially purified. Optimum pH was about 5 for both enzymes and optimum temperature was around 80 °C for β -mannanase and 60 - 70 °C for β -mannosidase. These enzymes produced some oligosaccharides from glucomannan and galactomannan by their hydrolyzing and transferring activities. β -Mannanase hydrolyzed konjak and locust bean by 39.1 and 15.8 %, respectively. Oligosaccharides of various molecular size were released from glucomannan of konjak, but in the addition of cellulase, mannobiose was released selectively. In locust bean gum, tetra-, tri-, and disaccharides (mannobiose) were mainly released by K4 β -mannanase. Tetra- and trisaccharides were heterooligosaccharides consisting of galactose and mannose residues. K4

β -mannosidase had a transglycosylation action, transferring mannose residue to alcohols and sugars like fructose.

2. 報文

3. 口頭発表

- (1) シアドン酸 -ホスファチジルイノシトールのアラキドン酸含量を低下させる n-6 系列不飽和脂肪酸-

盛重純一、瀧本龍昇、高井誠道、田中 保、里内 清

第 42 回 日本生化学会中国・四国支部例会 (山口), プログラム・講演抄録, p.21 (2001-4)

- (2) カツオ筋肉に見出された 1,2-ジドコサヘキサエノイルホスファチジルコリンの生合成機構

村上 薫、岡田江利子、田中 保、里内 清

第 43 回 日本脂質生化学研究会・研究集会、2001 年度大会 (帯広), 脂質生化学研究, 43, p.29-32 (2001-6)

- (3) 茶カテキンによる腓リパーゼの活性阻害

井上弥子、加藤稚佳子、村上 薫、田中 保、里内 清、吉積一真*、辻 智子*

*ファンケル中央研究所

日本脂質栄養学会第 10 回大会 (富山), 脂質栄養学, 10, p.77 (2001-9)

- (4) 大豆種子リポキシゲナーゼ断片化物による腓リパーゼ活性阻害

児玉圭史、村上 薫、田中 保、里内 清

日本農芸化学会関西支部西日本支部中四国支部合同大会 (岡山), 農化誌, 75 (12), p.152 (2001-10)

- (5) ホスファチジルイノシトールの分子種改変に有効なシアドン酸の細胞内代謝

田中 保、盛重純一、高井誠道、里内 清

第 74 回 日本生化学会 (京都), 日本生化学大会発表抄録集, 73, p.835 (2001-10)

- (6) 1999 年産「次世代稲作」米胚乳澱粉の性質(1)－主として構造について－
中元誠亮、定岡義友、高崎優子、吉田智恵、城 洋考、岩附正英、前田祐里、井ノ内直良、不破英次
日本農芸化学会 2001 年度大会 (京都)、農化誌、75 (臨時増刊) p.32 (2001-3)
- (7) 1999 年産「次世代稲作」米胚乳澱粉の性質(2)－主として物性について－
内海好規、小山保則、伊藤陽介、堀端哲也、前田祐里、井ノ内直良、不破英次
日本農芸化学会 2001 年度大会 (京都)、農化誌、75 (臨時増刊) p.32 (2001-3)
- (8) 糖質米の胚乳澱粉と水溶性多糖の性質
堀端哲也、前田祐里、井ノ内直良、不破英次
日本農芸化学会 2001 年度大会 (京都)、農化誌、75 (臨時増刊) p.32 (2001-3)
- (9) Effects of side chains in amylopectin on gelatinization of rice starches
Naoyoshi Inouchi and Hidetsugu Fuwa
Abstracts of 11th World Congress of Food Science and Technology (Seoul, Korea) p.104 (2001-4)
- (10) RVA セットバック値の高い米胚乳澱粉の性質
堀端哲也、中元誠亮、内海好規、前田祐里、井ノ内直良、不破英次
第 50 回日本応用糖質科学会 2001 年度大会 (福山)、J. Appl. Glycoscience, 48 (4), p.397 (2001 - 9)
- (11) *Klebsiella pneumoniae* 由来プルラナーゼの活性中心構造
岩本博行、尹惠珍、Elif Sarikaya、勝矢良雄、目崎喜弘、三上文三、
日本農芸化学会大会 2001 年度大会 (京都) (2001-3)
- (12) アミラーゼの X 線結晶構造解析と蛋白質工学
三上文三、安達基泰、関根暁史、尹惠珍、Elif Sarikaya、平田章、内海成、勝矢良雄、岩本博行
日本農芸化学会 2001 年度大会 (京都)、農化誌、75 (臨時増刊)、p.510 (2001-4)
- (13) 金属置換したジペプチジルペプチダーゼ III (ラット肝) 中の金属の錯体化学的性質と活性に果たす役割
廣瀬順造、岩本博行、武田光徳、池田慶一、井上雅喜、池田智之、深沢勝彦、深

沢加与子

第11回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(岡山)、講演要旨集、p28-29
(2001-5)

- (14) 澱粉枝切り酵素上で、澱粉の分岐はどのように認識されるか

岩本博行、尹惠珍、Elif Sarikaya、勝矢良雄、目崎喜弘、三上文三

第1回日本蛋白質科学会年会(大阪)、講演要旨集 p.305 (2001-6)

- (15) 澱粉枝切り酵素の構造と機能ー反応速度論からアミロペクチン合成までー

岩本博行

食品酵素化学研究会(京都) (2001-9)

- (16) イネ胚乳由来プルラナーゼの反応速度論的性質および細菌由来プルラナーゼとの比較

岩本博行、新元芳彦、作田郁恵、久保亜希子、中村保典

第50回日本応用糖質科学会2001年度大会(福山)、応用糖質科学、48(4)p.425
(2001-9)

- (17) The characterization of the metal substituted dipeptidyl peptidase III.

Junzo Hirose, Hiroyuki Iwamoto, and Kayoko Fukazawa.

Abstract for the 10th International Conference on Bioinorganic Chemistry, J. Inorg. Chem., 86, p-264 (2001-8)

- (18) 新奇な金属結合部位を持つ酵素ジペプチジルペプチダーゼ III

深沢加与子、廣瀬順造、岩本博行

第74回日本生化学会(横浜)、日本生化学会大会発表抄録集、73、p.622
(2001-10)

- (19) Dipeptidyl Peptidase III の活性部位に存在する金属イオンの性質

廣瀬順造、岩本博行、武田光徳、池田慶一、井上雅喜、池田智之、深沢加与子

第74回日本生化学会(横浜)、日本生化学会大会発表抄録集、73、p.891
(2001-10)

- (20) *Aspergillus oryzae* KB 株 β -フラクトフラノシダーゼの固定化とそのフラクトオリゴ糖生産性

倉掛昌裕、真熊邦博、齋藤悦子、小巻利章

日本農芸化学会 2001 年度大会 (京都)、日本農芸化学会誌、75 (臨時増刊) p.20
(2001-3)

(2 1) 各種金属塩類添加焙焼による澱粉の物性と構造の変化

倉掛昌裕、西田剛、田中幸、榎京子、中里愛、小巻利章

日本応用糖質科学会平成 13 年度大会 (福山)、日本応用糖質科学誌、48 (4)
p.417 (2001-9)

(2 2) β -シクロデキストリンによるカテキン、エピカテキンの分子認識と包接結晶化

山本英二、住屋明宏、近都加奈子、石津 隆

化学工学会第 66 年会講演要旨集, T108 (2001-4)

(2 3) シクロデキストリンによるカテキン類の分子認識と包接結晶化

山本英二

第 10 回晶析技術特別研究会講演会 (2001-4)

B. 総説

(1) ポリメチレン中断型不飽和脂肪酸 -細胞生物学的研究への有用性-

田中 保

脂質栄養学, 第 10 巻 1 号, p. 11-19 (2001)

ある種の植物には二重結合と二重結合との間にメチレンを 2~4 個挟んだ、ポリメチレン中断型不飽和脂肪酸と呼ばれる不飽和脂肪酸が存在する。ポリメチレン中断型不飽和脂肪酸の代謝を調べたところ、シアドン酸が膜リン脂質、特にホスファチジルイノシトール(PI)によく取り込まれ、PI におけるアラキドン酸の代替脂肪酸として挙動することがわかった。本稿では筆者らの研究室で得られた知見を中心にポリメチレン中断型不飽和脂肪酸の代謝について述べる。

(2) 抗結核薬標的の構造

岩本博行

化学と生物, Vol. 39, No. 12, 815-817, (2001)

C. 著書

(1) いも類、種実類

井ノ内直良

栄養科学シリーズ NEXT 食品学各論、(編集)小西洋太郎、辻 英明、講談社(2001)

「いも類」(p.18-21)ではいも類の種類(ジャガイモ、サツマイモ、キャッサバ、ヤマノイモ、サトイモ、コンニャクイモ)、成分、利用と加工について解説した。

「種実類」(p.31-33)ではクリ、クルミ、ペカン、アーモンド、ギンナン、ゴマについて解説した。

(2) トランスフェリン

廣瀬 順造

血漿タンパク質 I (広川タンパク質化学 第5巻) 広川書店 pp. 82-86 (2001)

血漿トランスフェリンのタンパク質化学的性質について記述した。

(3) グルコースイソメラーゼの生産

小巻利章

発酵ハンドブック、バイオインダストリー協会、発酵と代謝研究会編、共立出版、pp.131-132 (2001)

D-キシロースを D-キシリロースに異性化する酵素は、グルコースをフルクトースに異性化することもできるため、グルコースイソメラーゼともよばれている。この酵素は菌体内酵素であり、酵素生産菌を培養して得られた菌体を収集してそのまま固定化するか、あるいは、菌体から酵素を抽出して固定化し、酵素糖化グルコース溶液の連続異性化によるブドウ糖果糖液糖の生産に用いられている。この酵素の歴史、用途、生産菌、発酵の実例、および固定化工程について解説した。

D. その他

(1) 新系統・育種素材の澱粉特性の微量精密評価技術の開発

井ノ内直良、不破英次

平成 12 年度農林水産省「画期的新品種の創出等による次世代稲作技術構築のための基盤的総合研究 推進評価会議資料 p.196-197 (2001)