

おかやまバイオアクティブ研究会会報

第24号

バイオアクティブ

Okayama Bioactive Reseach Society

- | | | | |
|------|-----------------|--------|----|
| 第37回 | おかやまバイオアクティブ研究会 | シンポジウム | 抄録 |
| 第38回 | おかやまバイオアクティブ研究会 | シンポジウム | 抄録 |
| 第39回 | おかやまバイオアクティブ研究会 | シンポジウム | 案内 |



岡山県立大学

平成23年(2011年) 6月10日発行

目次

巻頭言・・・・・・・・・・・・・・・・おかやまバイオアクティブ研究会 会長 辻 英明 (1)

第 37 回おかやまバイオアクティブ研究会シンポジウム

【植物および食品に含まれる生理活性物質とその利用】

(平成 22 年 6 月 11 日) プログラム・・・・・・・・・・・・・・・・(2)

【抄録】

天然物を基にしたリポキシゲナーゼ阻害物質の開発

・・・・・・・・・・・・・・・・カリフォルニア大学バークレー校 久保 伊佐夫 (3)

植物および食品に含まれる神経栄養因子様物質の生物化学的研究

・・・・・・・・・・・・・・・・徳島文理大学 福山 愛保 (9)

糸状菌が植物成分を材料に生産する新たな生理活性物質：グリコシダーゼ阻害剤 prochonicine の例

・・・・・・・・・・・・・・・・岡山大学大学院自然科学研究科 仁戸田 照彦 (13)

生理活性物質の高機能化を主目的とした酵素的変換：安定で高機能な植物色素の酵素的創製

・・・・・・・・・・・・・・・・岡山理科大学大学院 石原 浩二 (15)

学生プレゼンテーション（研究室・研究紹介）

小麦依存性運動誘発アナフィラキシーに関する研究

・・・・・・・・・・・・・・・・川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 健康化学専攻 (17)

パリエル板細胞による IgA 産生誘導活性を有する天然物の探索

・・・・・・岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 創薬生命科学専攻 生体機能性天然物化学 (19)

潰瘍性大腸炎患者の脂肪酸組成および QOL についての検討

・・・・・・・・・・・・・・・・中国学園大学大学院 現代生活学研究科 臨床栄養研究室 (21)

飲料中の天然着色料の安定性に及ぼす香料の影響

・・・・・・・・・・・・・・・・中国学園大学 人間栄養学科 食品化学研究グループ (23)

食品中に含まれるニコチアナミンの定量法の開発

・・・・・・・・・・・・・・・・岡山理科大学 理学部 臨床生命科学科 臨床生化学研究室 (25)

シンポジウム風景・・・・・・・・・・・・・・・・(27)

第 38 回おかやまバイオアクティブ研究会シンポジウム【薬食同源：健康を鍵とする薬と食のつながり】

(平成 22 年 10 月 15 日) プログラム・・・・・・・・・・・・・・・・(28)

【抄録】

ニワトリ卵黄由来抗体 (IgY) の消化管感染症の予防・治療への応用

・・・・・・・・・・・・・・・・岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小熊 恵二 (29)

目次（つづき）

機能性素材への応用をめざした放線菌由来酵素の開発

.....岡山県農林水産総合センター・生物科学研究所 畑中 唯史 (32)

ローヤルゼリー（RJ）の生物作用とタンパクフリー RJ の開発

.....(株)林原生物化学研究所・研究センター 牛尾 慎平 (35)

タンニンおよび関連ポリフェノール研究の現段階

.....岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 波多野 力 (36)

学生プレゼンテーション（研究室・研究紹介）

L6 筋管細胞におけるエネルギー代謝に及ぼす酢酸の影響

.....岡山県立大学大学院 保健福祉学研究科 栄養学 (39)

既存添加物抽出原材料への放射線照射：殺菌効果，検知及び抽出効率

.....中国学園大学大学院 現代生活学研究科 人間栄養学科専攻 食品化学研究グループ (41)

ヤマブドウ果汁に含有される抗炎症成分の部分精製

.....岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科（薬学系） 分子毒性薬科学 (43)

セレン耐性 *Arabidopsis thaliana* 変異体の解析

.....岡山大学大学院 自然科学研究科（農学系） 生物情報化学研究室 (45)

シンポジウム風景 (47)

Bioactive Okayama 2010 (48)

第1回研究室訪問写真 (68)

平成23年度 おかやまバイオアクティブ研究会 シンポジウム 予告 (69)

おかやまバイオアクティブ研究会 会則 (70)

おかやまバイオアクティブ研究会 役員名簿 (72)

入会申込書 (74)

編集後記 (77)

【巻頭言】

おかやまバイオアクティブ研究会
会長 辻 英明

わが国は、20 年前にバブルがはじけ不況時代に突入しましたが、一昨年のリーマンショックにより、景気はさらに低迷し不況を抜け出せないでいます。さらに今年 3 月 11 日には、東北地方に大地震が発生し、それに伴って史上最大級の津波が東北地方の太平洋岸を襲い、壊滅的な打撃を受けました。その上、福島第一原子力発電所がこの地震および津波により制御不能になり、東日本の人々の生活基盤が完全に破壊し、いつ終わるとも分らない不安が募っております。第二次世界大戦後、わが国は高度成長期を経て米国に次ぐ経済力を獲得してきましたが、現在は上述のように長期の不況時代に突入し、未だに不況から抜け出せないでおります。この不況および東日本大震災のショックから脱出するには、「成長が人々の幸せを招く」とするこれまでの画一的な経済成長主義を捨て、多様性に富んだ幸福観を尊重して「量的な成長」から「質的な成長」への変革が強く求められています。よほどのことがない限りこのような価値観を革新することは不可能であるようであります。

今回の大震災により、わが国の人々は、価値観の変革、生命観、人生観、経済活動のあり方、原子力発電を中心としたエネルギー政策などについての根本的な変革を、有無を言わず求められています。このような状況下での岡山県下のバイオ産業を支援するために、おかやまバイオアクティブ研究会はますます重要な役割を果たさなければなりません。

今年度、本研究会は岡山大学および岡山理科大学において 2 回のシンポジウムを開催するとともに、新しい二つの試みを実施しました。一つは、国際会議 Bioactive Okayama 2010 を岡山県立大学と共催で岡山県立大学において開催したことです。この会議には、中国・韓国・バングラデッシュ・タイ・インドから 28 名、岡山大学・岡山県立大学等県下の大学から 120 名が参加し、盛会裏に終わりました。この会議の開催は、本研究会に所属している教員・学生の教育・研究および国際的な視野の醸成に極めて効果的でありましたが、企業からの参加者は多くありませんでした。このような会議は、企業にとっても東アジア全体の産業とつながりを形成する契機となるという点で重要であり、今後は、より企業が参加しやすい環境をつくる必要があります。もう一つの試みは、岡山大学神崎教授・中村准教授の研究室を岡山県下の企業に見学開放したことであります。シンポジウムや学生発表会だけでは、大学を広く知ってもらうのは十分ではないということから、研究室の開放を行ったわけであり、次年度からもこの研究室開放を実施していきたいと思えます。

以上のように、本研究会は、絶えず自己反省に努め、県下のバイオ産業の発展に資するよう活動を行っております。会員の皆様には今後も本研究会の活動にご支援を賜りますようお願い申し上げます。

平成 23 年 3 月

おかやまバイオアクティブ研究会 第 37 回シンポジウム
日時：平成 22 年 6 月 11 日（金） 13 時 10 分～17 時 40 分
場所：岡山理科大学 25 号館 8 階・理大ホール

【植物および食品に含まれる生理活性物質とその利用】

【基調講演】 13：10～14：05

「天然物を基にしたリポキシゲナーゼ阻害物質の開発」

カリフォルニア大学 久保 伊佐夫 氏

【講演 1】 14：10～14：45

「植物および食品に含まれる神経栄養因子様物質の生物化学的研究」

徳島文理大学 福山 愛保 氏

学生プレゼン セッション 14：50～15：15

学生ポスターディスカッション・コーヒーブレイク 15：20～16：20

【講演 2】 16：25～17：00

「糸状菌が植物成分を材料に生産する新たな生理活性物質：

グリコシダーゼ阻害剤 prochonicine の例」

岡山大学大学院自然科学研究科 仁戸田 照彦 氏

【講演 3】 17：05～17：40

「生理活性物質の高機能化を主目的とした酵素的変換：

安定で高機能な植物色素の酵素的創製」

岡山理科大学大学院 石原 浩二 氏

事務局：（財）岡山県産業振興財団

おかやまバイオアクティブ研究会会長 辻 英明（岡山県立大学保健福祉学部）

第 37 回シンポジウム実行委員長 益岡 典芳（岡山理科大学大学院理学研究科）

【基調講演】

天然物を基にしたリポキシゲナーゼ阻害物質の開発

カリフォルニア大学 バークレー校 久保 伊佐夫

LIPOXYGENASE INHIBITORY ACTIVITY OF 6-PENTADECANYLSALICYLIC ACID Without Prooxidant Effect

Isao Kubo

*Department of Environmental Science, Policy and Management,
University of California, Berkeley, California 94720-3114, USA*

ABSTRACT

6-Pentadecanysalicylic acid, referred to as anacardic acid ($C_{15:0}$), was found to inhibit the linoleic acid peroxidation competitively catalyzed by soybean lipoxygenase-1 (EC 1.13.11.12, Type 1) with an IC_{50} of 14.3 μM (4.88 $\mu g/mL$). This inhibition is a reversible reaction without pro-oxidant effects. The inhibition kinetics analyzed by Dixon plots indicates that anacardic acid ($C_{15:0}$) is a competitive inhibitor and the inhibition constant, K_i , was established as 6.4 μM . The hydrophilic head (salicylic acid) portion first chelates the iron in the active site and then the hydrophobic tail portion begins reversibly interacting with the C-terminal domain where the iron is located. The inhibition of anacardic acid ($C_{15:0}$) can be explained by a combination of iron ion-chelation and hydrophobic interaction abilities because of its specific structural feature.

INTRODUCTION

Lipoxygenases (EC 1.13.11.12) are non-heme iron-containing enzymes that catalyze the site-specific oxygenation of polyunsaturated fatty acids to produce hydroperoxides. Lipoxygenases are suggested to be involved in the early event of atherosclerosis by inducing plasma low-density lipoprotein (LDL) oxidation.¹⁾ On the other hand, lipid peroxidation is known to be one of the major factors causing deterioration of foods during their processing and storage, since it leads to the development of unpleasant rancid or off flavors as well as

potentially toxic end products.²⁾ Hence, lipoxygenase inhibitors should have broad applications.³⁾ However, safety is a primary and paramount consideration for food.

In recent years the cashew *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) apple has increased in value, especially in the countries where it is grown, such as Brazil. There is no doubt that the nut (true fruit) is the most important product of the cashew tree. However, this tree also yields the pear-shaped "apple" (pseudo fruit) to which the nut is attached. A number of processes have now been developed for converting the cashew apple into various products such as juice, jam, syrup, chutney, and beverage. Cashew apple juice is, in fact, one of the most popular juices in Brazil today. Anacardic acids, 6[8'(Z),11'(Z),14'-pentadecatrienyl]salicylic acid ($C_{15:3}$) (1), 6[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienyl]salicylic acid ($C_{15:2}$) (2), and 6[8'(Z)-pentadeca-enyl]salicylic acid ($C_{15:1}$) (3), were previously characterized from the cashew apple and are referred to for simplicity as anacardic acid ($C_{15:3}$), anacardic acid ($C_{15:2}$) and anacardic acid ($C_{15:1}$) respectively. In a preliminary assay, these anacardic acids were found to inhibit the linoleic acid peroxidation catalyzed by soybean lipoxygenase-1 (EC 1.13.11.12, Type 1). Salicylic acid did not inhibit the lipoxygenase-catalyzed oxidation of linoleic acid, indicating that the tail portion is vital for this specific activity. Lipoxygenase inhibitors from a regularly imbibed beverage such as cashew apple juice may superior compared to non-natural ones. However,

anacardic acids (1 and 2) were found to act as substrates at lower concentrations, because both possess a (1*Z*,4*Z*)-pentadiene system in their pentadeca(en)yl side chain. Lipoxygenases catalyze the dioxygenation of (1*Z*,4*Z*)-pentadiene moiety of polyenoic fatty acids to the 1-hydroperoxy-(2*E*,4*Z*)-pentadiene product. Because of their free radical nature, anacardic acid hydroperoxides can be quite active by themselves. This prompted us to examine their effective utilization.

RESULTS AND DISCUSSION

Cashew nut shell liquid (CNSL) is available in greater tonnage, but it is neglected in commercial terms and there is thus considerable potential for its further exploitation. CNSL is traditionally obtained about 30-35% from the shell as a byproduct during the process of removing the cashew kernel from the nut and contains approximately 70% anacardic acids. Thus, anacardic acids (1-3) can be obtained in large quantities from the CNSL.⁴⁾ In our continuing efforts concerning utilization of CNSL as starting material for preparation of useful compounds, diverse biological activities of anacardic acids such as antibacterial, antioxidant and antitumor activities have been reported. It is for these reasons that anacardic acids were recently suggested to be utilized in functional food formulations.⁵⁾ Lipid peroxidation is known to be one of the major factors causing deterioration of foods during their processing and storage, and anacardic acids (1-3) are described to inhibit the peroxidation of linoleic acid catalyzed by soybean lipoxygenase-1.⁶⁾ During their lipoxygenase kinetic study, we became aware that anacardic acid (C_{15:3}) (1) and anacardic acid (C_{15:2}) (2) were oxidized as substrates at lower concentrations (Figure 2), because both possess a (1*Z*,4*Z*)-pentadiene system in their C₁₅-alkenyl side chain, although both exhibited inhibitory activity at higher

concentrations. If anacardic acids (1, 2) represent as (LH) are oxidized as substrates to the corresponding conjugated hydroperoxides (LOO·),⁷⁾ these in turn would create the potential regeneration pathway viz., (LOO· + LH → LOOH + L·), which could be followed by (L· + O₂ → LOO·). Due to their free radical nature, anacardic acid hydroperoxides can be quite active by themselves, and thus the lipoxygenase products mediate many biological processes. It appears thus that lipoxygenases catalyze the oxygenation of polyenoic compounds containing a (1*Z*,4*Z*)-pentadiene system such as anacardic acids (1, 2) into their 1-hydroperoxy-(2*E*,4*Z*)-pentadiene products. As long as the (1*Z*,4*Z*)-pentadiene system is present in the molecules, this system preferentially interacts with the active site in the enzyme regardless their hydrophilic portions. This may explain the observation that, as days goes by, cashew apple juice starts to produce a rancid odor. Anacardic acids (1, 2) are present in the cashew apple that is widely consumed for many years not only as fresh fruit but also as various processed products, especially as juice. In addition, the (1*Z*,4*Z*)-pentadiene system is known to exist in many natural products. For example, 5-alk(en)ylresorcinols, commonly known as cardols, are characterized in many edible plants such as pistachio, *Pistacia vera*, macadamia, *Macademia ternifolia*, and mango, *Mangifera indica*.⁸⁾ More specifically, both 5[8(*Z*),11(*Z*),14-pentadecatrienyl]resorcinol (10) and 5[8(*Z*),11(*Z*)-pentadecadienyl]resorcinol (11) as well as alk(en)ylphenols; 3[8(*Z*),11(*Z*),14-pentadecatrienyl]phenol (12) and 3[8(*Z*),11(*Z*)-pentadecadienyl]phenol (13), known as cardanols (12 and 13 respectively), artifacts of the corresponding anacardic acids by heating treatment, isolated from the CNSL,⁹⁾ were all oxidized as substrates at lower concentrations. It appears that lipoxygenase can first recognize the (1*Z*,4*Z*)-pentadiene system regardless of other part of the molecules. Since safety is a

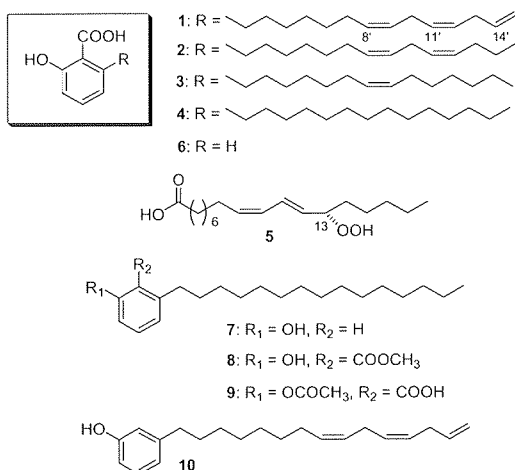


Figure 1. Chemical structures of anacardic acids and related compounds.

primary and paramount consideration for food, their safety may need to be examined. Hence, the (1Z,4Z)-pentadiene should be avoided in the hydrophobic tail portion. To address this problem, the fraction of the CNSL containing anacardic acids (1–3) was hydrogenated over 5% Pd-C to yield the stable saturated anacardic acid (C_{15:0}) (4). Anacardic acid (C_{15:1}) can be purified from CNSL by HPLC,^{4,5} but it may not be practical for commercial terms. On the other hand, anacardic acid (C_{15:0}) was previously described to inhibit the linoleic acid peroxidation catalyzed by soybean lipoxygenase-1, although only the IC₅₀ value was reported.¹⁰ The synthesized anacardic acid (C_{15:0}) was tested for its lipoxygenase inhibitory activity using soybean lipoxygenase-1. Anacardic acid (C_{15:0}) is stable, colorless, inexpensive and biodegradable.

In the current experiment, linoleic acid was used as a substrate. Soybean lipoxygenase-1 (EC 1.13.11.12, Type 1) is known to catalyze the dioxygenation of (1Z, 4Z)-diene moiety of linoleic acid to the 1-hydroperoxy-(2E,4Z)-pentadiene product. In plants, the primary dioxygenation product is 13 (*S*)-hydroperoxy-9Z, 11E-octadeca-dienoic acid (13-HPD) (5).² Hence, the enzyme activity was

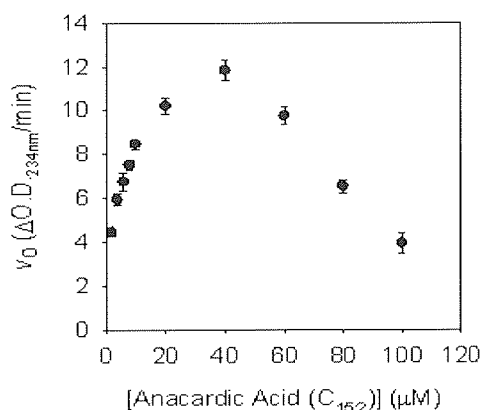


Figure 2. Concentration dependence of the initial rate of the oxidation of anacardic acid (C_{15:2}) at 25 °C, 0.1 M borate buffer, pH 9.0.

monitored by measuring a UV absorption at 234 nm associated with the 1-hydroperoxy-(2E,4Z)-conjugated double bonds newly formed in the product but not the substrate. The data were obtained at pH 9 because soybean lipoxygenase-1 was reported to have its optimum at pH 9.0.¹¹ The inhibition kinetics as analyzed by Dixon plots demonstrated that anacardic acid (C_{15:0}) is a competitive inhibitor. The equilibrium constant for inhibitor binding, $K_i = 6.4 \mu\text{M}$ was obtained from the $-[I]$ value at the intersection of the three lines. The inhibition was shown again to be a slow and reversible process in which the substrate was not oxidized. It thus appears that the double bond in the side chain is not essential in eliciting the specific activity but is most certainly associated with increasing it.

Lipoxygenase is a non-heme iron-containing enzyme and lipoxygenase inhibitors are known to act mainly in two different ways: by a chelating the iron of the active site of enzyme¹² and/ or by reducing the ferric form of the enzyme to an inactive ferrous form.¹³ Taking altogether, anacardic acid (C_{15:0}) inhibits the linoleic acid peroxidation catalyzed by soybean lipoxygenase by chelating the iron of the

active site without pro-oxidant effects. In previous reports, anacardic acids were described to form complexes with both the divalent ferrous ion¹⁴⁾ and trivalent ferric ion,¹⁵⁾ and hence, anacardic acids can be expected to inhibit both E_{ox} and E_{red} forms of lipoxygenases as iron chelators. Salicylic acid (6) also form complexes with both ferrous and ferric ions but it did not inhibit the enzymatic linolenic acid peroxidation, indicating that the chelation ability alone is not enough to inhibit the activity of the enzyme. This can be indirectly supported by the observation that 3-pentadecanylephenol or cardanol ($C_{15:0}$) (7), an artifact of the corresponding anacardic acid ($C_{15:0}$) by heating treatment, did not show any inhibitory activity up to 200 μ M. In addition, neither methyl ester (8) nor acetate (9) of anacardic acid ($C_{15:0}$) noticeably inhibited this oxidation, indicating that not only the salicylic acid moiety but also an alk(en)yl side chain are an essential combination in eliciting the inhibitory activity. The hydrophilic head portion of anacardic acids first chelates the iron in the active site like a "hook" in attaching itself to hydrophilic portion of the molecule, and then the hydrophobic tail.¹⁶⁾ The molecular dimensions, together with the lipophilicity, have a critical impact on the ability of this class of chelator to inhibit lipoxygenase. The interaction of iron-chelating molecules with the iron center of lipoxygenase is known to be influenced by the lipid solubility.¹⁷⁾ It appears that hydrophilic ligands with a longer alkyl side chain length tend to be the more potent inhibitors. Incidentally, both anacardic acid ($C_{22:1}$) and anacardic acid ($C_{22:0}$) were previously reported to inhibit potato lipoxygenase.¹⁸⁾

However, 3-[8(*Z*),11(*Z*),14-pentadecatrienyl]phenol, referred to cardanol ($C_{15:3}$) (10), was oxidized as a substrate at lower concentrations.

Although anacardic acid ($C_{15:0}$) (4) was not

isolated from the cashew, it was previously isolated together with anacardic acid ($C_{15:1}$) (3) as prostaglandin synthetase inhibitors in large quantities from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata* (Anacardiaceae).¹⁹⁾ In the case of lipoxygenase inhibitory activity, anacardic acid ($C_{15:0}$) was found to show the inhibitory activity but slightly lesser extent to anacardic acid ($C_{15:1}$). Both anacardic acids (3 and 4) isolated from another African *Ozoroa* species, *O. insignis* were reported to be cytotoxic principles against six human cancer cell lines.²⁰⁾ Among these natural lipoxygenase inhibitors, anacardic acid ($C_{15:0}$) is a most stable lipoxygenase inhibitor without being oxidized.

CNSL oozes out from the shell during the processes of roasting. The heating process leads to decarboxylation of the anacardic acids to form cardanols and thus, cardanols are artifacts of the corresponding anacardic acids by heating treatment. Cardanols no longer inhibit the peroxidation of linoleic acid catalyzed by soybean lipoxygenase-1, indicating that the carboxyl group is an essential element in eliciting this specific activity. Since salicylic acid has little or no effects on these enzymes, the hydrophobic alkyl side chain in anacardic acids is also undoubtedly associated with the lipoxygenases inhibitory activity. It seems that lipoxygenases are common to possess a relatively nonspecific and hydrophobic domain. The hydrophobic pentadeca(en)yl side chain in anacardic acids likely interacts with this hydrophobic domain and disrupts enzymes' quaternary structure.²¹⁾ Since native proteins form a sort of intramolecular micelle, in which their nonpolar side chains are largely out of contact with the water based test solution. The hydrophobic C_{15} -alkyl side chain may act as an anchor in the low dielectric interior of proteins. This concept can be more broadly conceivable that the straight alkyl chain should allow for

conformational flexibility and interacts with many types of the hydrophobic domain in different enzymes. Anacardic acids' non-specificity of enzyme inhibition supports this assumption.

Anacardic acids in general act as antioxidants in a variety of ways, including inhibition of various pro-oxidant enzymes involved in the production of the reactive oxygen species and additionally chelate transition-metal ions, but do not quench reactive oxygen species.²²⁾ Thus, anacardic acids are preventive antioxidants. They may be advantageous to suppress the formation of free radicals and active oxygen species in the first line of defense. Metal chelation capacity of anacardic acids is their additional advantage since it reduces the concentration of the catalyzing transition-metal in lipid peroxidation. It is known that chelating agents, which form bonds with a metal, are effective as secondary antioxidants because they reduce the redox potential thereby stabilizing the oxidized form of the metal ion.²³⁾ In summary, anacardic acid (C_{15:0}) appears to combine both lipoxygenase inhibitory activity and metal chelation properties in one agent without itself being oxidized. It should have potential for use as an antioxidant additive in food. However, its biological significance in living systems is still largely unknown. Thus, it is not clear whether ingested anacardic acid (C_{15:0}) is absorbed into the system through the intestinal tract and delivered to the places where lipoxygenase inhibitors are needed.²⁴⁾ The relevance of the in vitro experiments in simplified systems to in vivo protection from oxidative damage should be carefully considered. Their further evaluation is needed to identify formulate a holistic and dynamic perspective.

REFERENCES

1. Cornicelli JA, Trivedi BK: 15-Lipoxygenase and its inhibition: a novel therapeutic target for vascular disease. *Curr Pharm Design* 1999;5:11-20.
2. Grechkin A: Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* 1998;37:317-352.
3. Richard-Forget F, Gauillard F, Hugues M, Jean-Marc T, Boivin P, Nicolas J: Inhibition of horse bean and germinated barley lipoxygenases by some phenolic compounds. *J Food Sci* 1995;60:1325-1329.
4. Kubo I, Komatsu S, Ochi M: Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. *J Agric Food Chem* 1986;34:970-973.
5. Trevisan MTS, Pfundstein B, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW: Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol* 2006;44:188-197.
6. Ha TJ, Kubo I: Lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids. *J Agric Food Chem* 2005;53:4350-4354.
7. Shobha SV, Ramadoss CS, Ravindranth B: Regiospecific hydroperoxidation of anacardic acid (15:2) by soybean lipoxygenase-1. *J Nat Prod* 1992;55:818-821.
8. Cojocaru M, Droby S, Glotter E, Goldman A, Gottlieb HE, Jacoby B, Prusky D: 5-(12-Heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry* 1986;25:1093-1095.
9. Tyman JHP: Non-isoprenoid long chain phenols. *Chem Soc Rev* 1979;8:499-537.
10. Shobha SV, Ramadoss CS, Ravindranth B: Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids, cardols, and cardanols. *J Nat Prod* 1994;57:1755-1757.
11. Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S: Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymology* 1981;71:441-457.
12. Mansuy D, Cucurou C, Biatry B, Battioni JP: Soybean lipoxygenase-catalyzed oxidations by linoleic acid hydroperoxide:

- different reducing substrates and dehydrogenation of phenidone and BW 755C. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:339-346.
13. Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter A: Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* 1987;26:7064-7072.
 14. Nagabhushana KS, Shobha SV, Ravindranath B: Selective ionophoric properties of anacardic acid. *J Nat Prod* 1995;58:807-810.
 15. Tsujimoto K, Hayashi A, Ha TJ, Kubo I: Mass spectrometric elucidation of anacardic acids and ferric ion chelation. *Z Naturforsch C J Biosci* 2007;62:710-716.
 16. Prigge ST, Boyington JC, Faig M, Doctor KS, Gaffney BJ, Amzel LM: Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* 1997;79:629-636.
 17. Abeyasinghe RD, Roberts PJ, Cooper CE, MacLean KH, Hider RC, Potter JB: The environment of the lipoxygenase iron binding site explored with novel hydroxypyridinone iron chelators. *J Biol Chem* 1996;271:7965-7972.
 18. Grazzini, R., Hesk, D., Heininger, E., Hildenbrandt, G., *et al*, Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;176:775-780.
 19. Kubo I, Kim M, Naya K, Komatsu S, Yamagiwa Y, Ohashi K, Sakamoto Y, Hirakawa S, Kamikawa T: Prostaglandin synthetase inhibitors from an African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. *Chem Lett* 1987;1101-1104.
 20. Rea AI, Schmidt JM, Setzer WN, Sibanda S, Taylor C, Gwebu ET: Cytotoxic activity of *Ozoroa insignis* from Zimbabwe. *Fitoterapia* 2003;74:732-735.
 21. Hasinoff BB, Davey JP: The inhibition of a membrane-bound enzyme as a model for anaesthetic action and drug toxicity. *Biochem J* 1989;258:101-107.
 22. Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Tsujimoto K: Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chem* 2006;99:555-562.
 23. Fraga CG, Oteiza PI: Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002;180:23-32.
 24. Kubo I, Ha TJ, Shimizu K. Lipoxygenase inhibitory activity of 6-pentadecanoylsalicylic acid without prooxidant effects. *Nat. Prod. Commun.* 2010;5:85-90.

[講師プロフィール]

Isao Kubo (くぼ いさお)
Natural Products Chemist, Professor of
Department of Environmental Science, Policy and
Management, University of California at Berkeley
since 1979.

学歴・職歴:

1969 年に大阪市立大学大学院理学研究を終了後、
University of Rochester と University of Oklahoma
の両大学で三年間をポストドクの資格で過ごし、母

校に戻り助手を拝命する。学振よりケニア国のナイ
ロビに設立された国際昆虫整理生態学センター
(ICIPE)へ派遣され、研究をコロンビア大学の中西
研で続ける。1979 年にカルフォルニア大学バークレ
ー校へ赴任し、現在に至る。

研究業績、専門分野:

He has published more than 380 papers. In recent
year, he focuses to gain new insights into
melanogenesis on a molecular basis.

【講演 1】

植物および食品に含まれる神経栄養因子様物質の生化学的研究

徳島文理大学薬学部 福山 愛保

わが国における人口の老齢化は急速なスピードで進んでおり、老人人口の増加にともなった認知症患者の急増は深刻な社会問題になりつつある。認知症中でもアルツハイマー病の治療、予防薬の研究は、その病因解明と共に重要な社会的ニーズである。現在、アルツハイマー病治療薬として使用されているのは、脳内の血液循環を改善する脳代謝改善薬と、痴呆の脳内で不足しがちのアセチルコリンの濃度を高める目的で開発されたアセチルコリンエステラーゼ阻害薬がある。しかし、これら薬物は、変性神経細胞の改善作用がないことから治療効果に限界がある、と考えられている。神経変性疾患に伴う神経細胞死の抑制や障害された神経細胞を修復させる薬物として、神経細胞自身の突起伸展能力の亢進や神経生存維持に必要な神経栄養因子 (NGF、BDNF、NT3、NT4/5 等) の利用が検討されているが、蛋白高分子であるがために脳血液関門を通過できないことから、臨床応用時の大きな障害となっている。もし、神経栄養因子類似作用を有する低分子物質が見いだされたなら、神経変性疾患で障害された神経細胞の修復が可能になる画期的な薬物とし

て開発できるはずである。

このような観点から、神経栄養因子様低分子天然物質の探索研究を続けている。本講演において、我々が見出した神経栄養因子天然物の化学および作用機構に関する研究成果を紹介したい。

1. 植物から見出した神経栄養因子様物質

天然物から神経栄養因子物質の探索研究には、NGF によって容易に分化誘導できる PC12 細胞が一般的に用いられ、NGF (Nerve Growth Factor) 類似作用 (NGF 様分化誘導物質)、NGF 分泌促進、NGF 効果増強作用の三つのうちのどれかの作様物質が多く見出されている。¹ しかし、PC12 細胞はラット副腎髄質由来のガン細胞で神経細胞ではなく、いまだこのアッセイ系から薬物開発に発展した例が見あたらない。我々は PC12 細胞に加えて、より *in vivo* に近いラット大脳皮質初代神経培養系を用いて神経栄養因子様 (神経突起伸展促進作用、神経細胞保護作用) 活性物質の探索を開始した。その結果、ホーノキ (*Magnolia obovata*)、サンゴジュ (*Viburnum awabuki*)、インドネシ

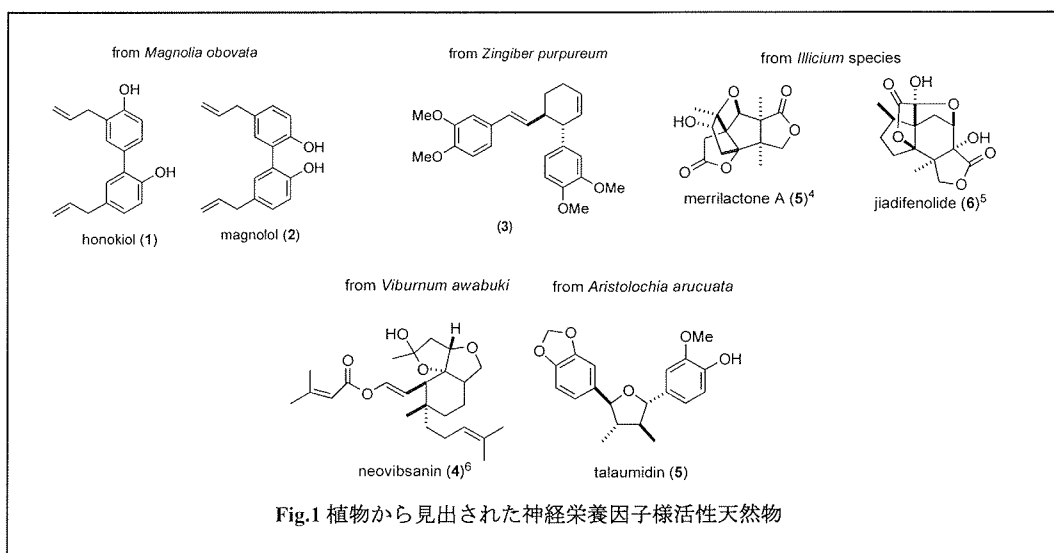


Fig.1 植物から見出された神経栄養因子様活性天然物

ア産ショウガ科食用植物 BANGLE (*Zingiber purpureum*)、シキミ (*Illicium*) 属植物、南米産 *Aristolochia arucuata* 等から様々な新規活性化化合物を見出した (Fig. 1)。これら化合物は、活性の興味だけでなくユニークな構造から多くの合成化学者に合成ターゲットとして取り上げられている。

生理活性天然物は、その活性の作用機構が明らかにされ、さらに動物実験において有効性が証明されることで初めてその価値が証明されたことになる。本講演では天然物として多量に確保でき、かつ合成も容易な honokiol (1)、食用植物 BANGLE の活性成分 3 と talaumidin (5) の 化学的研究、神経栄養因子様作用の特徴と作用機構解析、および老化促進マウスに対する 1 の効果について得られた 最新の知見⁸ について紹介する。

2. Honokiol (1) および magnolol (2) の神経栄養因子活性と作用機構解析²

厚朴 (コウボク) は、しばしば漢方常用処方に配剤されている重要な構成生薬で、その起源植物として日本産がホオノキ (*Magnolia obovata*)、中国産はカラホウ (*Magnolia officinalis*) の幹および樹皮を乾燥したものが当てられている。漢方における厚朴の適応は、膨満感等を主徴とする消化器系疾患と不安神経症等を含めた広義の精神性疾患に大別される。我々は厚朴の主成分である honokiol (1) と magnolol (2) に神経栄養因子様活性を見出した。Honokiol は、0.1~10 μM でラット大脳皮質培養神経の突起伸展促進作用と 1~5 μM で神経保護作用が観測されるが、magnolol は同濃度では突起伸展促進作用がみとめられない。しかし、神経保護作用は 10 μM の高濃度でも毒性は示さず安定した神経保護作用を発現した。両化合物は多量に供給することから、活性発現機構、構造活性相関ならびに老化促進マウスの脳神経系に対する影響について詳細に検討できた。

Honokiol (1) と magnolol (2) の作用機構解明を始めるに当たり、まず、細胞の増殖・分化と生存維持に関与している細胞内シグナ

ル伝達蛋白 Erk1/2 と Akt の関与について薬理学的手法と生化学的手法で解析した。Honokiol (10 μM) によって促進されるラット大脳皮質培養神経の突起伸展は、MEK 阻害剤 PD98059 (1~10 μM) の培地添加により濃度依存的に抑制された。しかし、PI3K 阻害剤 LY294002 は honokiol の突起伸展活性に影響しなかった。一方、honokiol の神経保護作用は両阻害剤で有意に抑制された。この結果は honokiol の突起伸展活性は細胞内シグナル伝達系 MEK/ERK キナーゼの活性化に関与しているが、神経保護作用には MEK/ERK と PI3 キナーゼの両経路の活性化が重要である可能性を示唆した。次に、MEK/ERK キナーゼの Erk1/2 と PI3 キナーゼの Akt のリン酸化を western blot 法で解析した。Honokiol (10 μM) は、薬物処理 10 分後から Erk1/2 のリン酸化が確認でき、30~60 分後にリン酸化がピークに達した。一方、1 は Akt のリン酸化を 10 分後に増加させ、その後減少に転じる。Magnolol も同様に Erk1/2 のリン酸化の活性化が認められ、その作用は濃度依存的に増加した。また、MEK 阻害剤 PD98059 によって両化合物で亢進されたリン酸化は阻害され、PI3K 阻害剤 LY294002 添加により Akt のリン酸化亢進が阻害された。以上の結果より、両化合物 1、2 の神経栄養因子活性と突起伸展作用は Erk1/2 シグナル伝達系の活性化によって、一方、神経細胞保護作用は Erk1/2 および Akt の両シグナル伝達系の活性化によって発現していることが証明できた。次に、細胞内カルシウムイオンの恒常性に対する 1 と 2 の影響について検討した。連続培養液交換神経培養系と蛍光色素 Fluo-3 を用いた蛍光顕微鏡画像解析装置で、神経細胞内の Ca^{2+} 濃度変動を解析した。その結果、両化合物 1、2 は、ラット大脳皮質初代神経および人由来神経芽細胞 SH-SY5Y において、細胞内 Ca^{2+} 濃度を濃度依存的に増加させた。これらの細胞内 Ca^{2+} 動員作用は ホフォリパーゼ C 阻害剤 U73122 添加で完全に消失した。この結果は、1 と 2 により誘起される細胞内 Ca^{2+} 動員に PLC-IP3 シグナル伝達機構が関与していることを示唆している。以上、化合物 1、

2 は細胞膜上の Trk リセプターに作用するか、細胞内に入った後 Trk キナーゼの何処かに作用して MEK/ERK、IP3 および PI3 キナーゼの活性化に寄与するのか、あるいは直接 PI3 キナーゼを活性化して Erk1/2 と Akt のリン酸化が亢進されるかも知れない。いずれにしても化合物 1、2 の標的分子の解明が残された課題である。現在、蛍光および光アフィニティープローブの作製し、1 の標的分子の同定を試みている。

3. Talaumidin の神経栄養因子様活性³

Talaumidin (5) は最初 *Talauma hodgsonii* から見出されたジベンゾテトラフラン型リグナンで、生理活性に関する報告は皆無であった。我々は talaumidin が 30 μ M 以上で NGF 存在下 PC12 細胞の分化誘導と突起伸展を濃度依存的に増強するだけでなく (Fig. 2)、ラット大脳皮質培養神経の神経突起伸展促進作用 (Fig. 3) と神経細胞保護作用 (Fig. 3) 示す興味深い化合物である。さらに、5 はラット大脳海馬培養神経に対しても同様に神経突起伸展促進作用を有することから、神経変性疾患において重篤な問題となる神経細胞死の阻止および保護作用が期待された。Talaumidin はテトラヒドロフラン環上に連続した 4 個の不斉中心があることから、2 個のアリール基と 2 個のメチル基に関する立体化学と神経栄養因子活性とどのような相関性があるのか調べることにした。1 の絶対立体配置に関しては不明であることから、まず、(2*S*、3*S*、4*S*、5*S*)-talaumidin の不斉合成を検討しその合成に成功した。⁷その後可能な 8 個の立体異性体の内 7 種の合成にも成功したので、現在、活性と立体化学の関連を調べている。

参考文献

1. 大泉康, 山口徹, 斉藤真也, *医学のあゆみ* 207, 46-50 (2003).
2. Esumi, T.; Makado, G.; Zhai, H.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. *Bioorg. Med.*

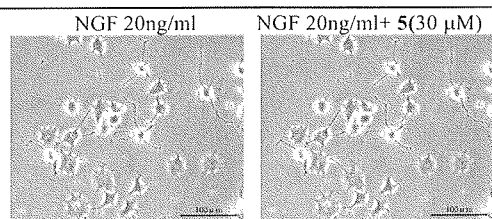


Fig. 2. Effect of talaumidin on PC12 cells in presence of NGF.

PC12 cells were cultured in DMEM/10HS+5% FBS for first day, then the culture medium was changed to DMEM/2%HS+1%FBS +NGF 20 ng/ml containing different concentration of talaumidin. After 48 h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and effects of talaumidin on cell morphology, percent of cell with neurites, neurite length were assayed.

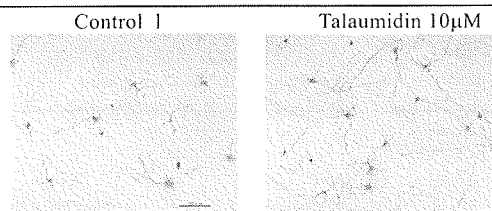


Fig. 3. Neurite outgrowth-promoting activity of talaumidin showed by anti-tau-immunochemical staining in primary cultured rat cortical neurons.

Neurons were first cultured in DMEM/10% FBS for 1 day at the density of 5000 cells/cm², then medium changed to serum-free DMEM/ 2% B27 supplements with or without talaumidin and basic FGF. After 3-day treatment of talaumidin, neurons were fixed and stained with anti-tau immunochemical method.

- Chem. Lett.* 14, 12621-2625 (2004). Zhai, H.; Nakade, K.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. *Eurp. J. Pharmco.* 474, 199-204 (2003).
- Zhai, H.; Nakade, K.; Oda, M.; Mitsumoto, Y.; Okagai, M.; Sakurai, J.; Fukuyama, Y. *Eurp. J. Pharmco.* 516, 112-117 (2003).
3. Zhai, H.; Nakatsukasa, M.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. *Planta Med.* 70, 598-602 (2004).
4. Huang, J.-M.; Yokoyama, R.; Fukuyama, Y. *Tetrahedron Lett.* 41, 32, 6111-6114 (2000).
5. Kubo, M.; Okada, C.; Huang, J.-M.; Harada, K.; Hioki, H.; Fukuyama, Y. *Org. Lett.* 22, 5190-5193 (2010).
6. Kubo, M.; Kishimoto, Y.; Harada, K.;

- Hioki, H.; Fukuyama, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 2566-2571 (2010).
7. Esumi, T.; Hojyuo, D.; Zhai, H.; Fukuyama, Y. *Tetrahedron Lett.* **47**, 3979-3983 (2006).
Fukuyama, Y. Harada, K.; Esumi, T.; Hojyo, D.; Kujime, Y.; Kubo, M.; Hioki, H. *Heterocycles* **76**, 551-597 (2008).
8. Matsui, N.; Fukuyama, Y.; Akagi, M. *Brain Research* **1305**, 108-117 (2009).

[講師プロフィール]

福山 愛保 (ふくやま よしやす)
徳島文理大学薬学部

学歴・職歴:

1970 年 大阪市立大学理学部化学科卒業
1975 年 大阪市立大学大学院理学研究科
博士課程修了
(久保田尚志教授) (理学博士)

1975 - 1978 年 米国オレゴン州立大学博士研究員
(J. D. White)

1978 - 1988 年 大塚製薬 (株) 天然物化学研究所
研究員

1988 年 徳島文理大学薬学部助教授

1995 年 徳島文理大学薬学部教授

受賞:

2006 年 徳島新聞賞科学賞 受賞

【講演 2】

糸状菌が植物成分を材料に生産する新たな生理活性物質：グリコシダーゼ阻害剤 pochonicine の例

岡山大学大学院自然科学研究科 仁戸田 照彦

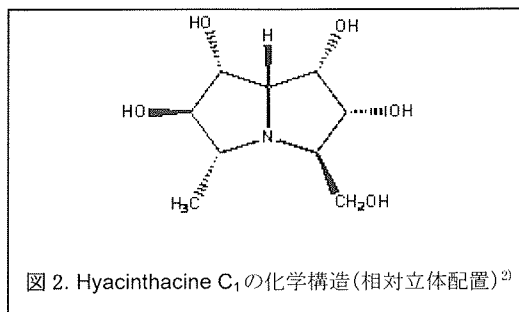
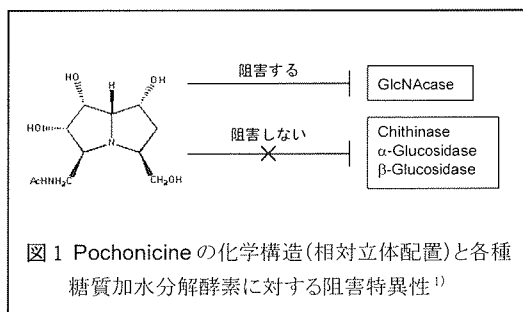
昆虫や糸状菌の生育に必須なキチン分解酵素群の 1 つである β -*N*-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) の阻害剤は、害虫防除剤や抗菌剤のリード化合物として期待されることから、我々は微生物代謝物を中心に GlcNAcase 阻害剤の探索を行ってきた。その過程において、糸状菌 *Pochonia suchlasporia* var. *suchlasporia* TAMA87 の培養物より、新規ピロリジジナルカロイド pochonicine を見いだした。本化合物は天然物由来の既知 GlcNAcase 阻害剤のなかで最強といわれる nagstatin と同等の強力な GlcNAcase 阻害活性を有していた。また、pochonicine は糖質加水分解酵素のなかでも GlcNAcase を特異的に阻害することが明らかとなった (図 1)¹⁾。Pochonicine は押し麦や玄そばなどの植物由来の基材を用いた固体培地において高生産されることから、植物成分が TAMA87 株により変換されて生成する化合物であることが示唆される。Pochonicine は高等植物から見いだされたグルコシダーゼ阻害剤 hyacinthacine 類²⁾と同様にポリヒドロキシピロリジジン類に属するが、このグループの既知化合物にはみられない *N*-アセ

チル基を有している。

このことが pochonicine の化学構造上の大きな特徴であり、本化合物が GlcNAcase 特異的阻害を示す要因と考えられる。さらに、TAMA87 株培養物の部分精製物をトリメチルシリル誘導体化し、GC-MS 分析に供した結果から、TAMA87 株は複数の pochonicine 類縁体を生産していることが確認された。GC-MS フラグメンテーションデータなどから、それらの類縁体は pochonicine とは水酸基の数が異なる構造を有すると考えられた。Pochonicine およびその類縁体の培養生産においては、それらの生産量だけでなく相対比も培養形態および培地成分に大きく影響されることが示唆された。

参考文献

- 1) Usuki, H.; Toyo-oka, M.; Kanzaki, H.; Okuda, T.; Nitoda, T. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 7248-7253.
- 2) Kato, A.; Adachi, I.; Miyauchi, M.; Ikeda, K.; Komae, T.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Wormald, M. R.; Fleet, G. W. J.; Asano, N. *Carbohydr. Res.*, **1999**, *316*, 95-103.



[講師プロフィール]

仁戸田 照彦 (にとだ てるひこ)		バイオサイエンス室研究員
岡山大学 大学院自然科学研究科 (農学部) 准教授	平成8年1月	岡山大学農学部 助手
	平成9年4月	岡山大学機器分析センター 助手
	平成15年4月	岡山大学自然生命科学研究支援センター分析計測部門助手
学歴・職歴:		
(学歴)		
平成2年3月 岡山大学農学部総合農業科学科卒業	平成16年4月	岡山大学大学院自然科学研究科
平成2年4月 岡山大学大学院農学研究科修士課程入学		助手 (この間, 平成17年2月22日～平成18年2月21日米国カリフォルニア大学バークレイ校岡山大学海外教育研究員)
平成4年3月 岡山大学大学院農学研究科修士課程卒業		
平成15年9月 岡山大学博士 (農学) 学位取得	平成18年10月	岡山大学大学院自然科学研究科 (農学部) 准教授 (現在に至る)
(職歴)		
平成4年4月 太陽化学株式会社 基礎研究所		

【講演 3】

生理活性物質の高機能化を目的とした酵素的変換： 安定で高機能な植物色素の酵素的創製

岡山理科大学大学院理学研究科 石原 浩二

花の色の多彩さ、美しさを担う植物色素群において、その中心的な存在はフラボノイド系色素である。天然の植物色素はフェノール性のフラボノイドを基本骨格とした配糖体（グルコシド）構造を有している。さらに、植物色素は糖の特定の水酸基が *p*-クマール酸やフェルラ酸などの各種芳香族酸によるエステル化を受けており、この化学的な修飾が色素の安定化に関与していると考えられている。これらの植物色素は、保湿性、酸化防止、色調安定化、および口臭予防効果等があることから、食品添加剤、化粧品など、我々の身近な所で実に数多く利用されている。特に近年、これら植物色素の抗酸化機能、ラジカル消去能、脱臭作用、抗菌作用、抗ウイルス作用や免疫力向上効果が、食品や薬理領域においても注目されている天然物の一つである。

ところが、現在、植物色素は植物からの単離に依存し、化学的な合成はほとんど行われていない。植物体からの単離だけでは、多様化した現代社会において、今後その需要が増大すると考えられるこれら植物色素を安定に供給することは非常に困難であり、簡便で効率的な植物色素合成法の確立が必要とされている。さらに大きな問題として、現在、食品添加物など市販

されている植物色素の大半が芳香族酸エステル化されていないために不安定であり、そのために長期保存が不可能であることなど、その用途に制限があるのが現状である。それゆえに、植物色素合成の中でも、特に、植物色素の糖の特定の水酸基への芳香族酸エステル化は、安定な色素合成における時代的急務とされ、効率的で簡便な植物色素への位置選択的なエステル（アシル）化法の早急な確立が望まれていた。

講演者らの研究グループ（岡山県立大学保健福祉学部 中島伸佳研究室、岡山大学資源生物科学研究所 杉本 学研究室）は、これまでに、酵素的グルコシル化やエステル化を利用して、天然由来の多種多様なフェノール性生理活性物質の機能改変を目指した新機能分子創製に関する研究を行ってきた。本シンポジウムでは、植物色素の安定化と高機能化を主目的として、フラボノールグルコシド（イソケルシトリン）の糖の6位の水酸基に対しての位置特異的な芳香族酸によるエステル（アシル）化、および、アシル化イソケルシトリンの耐熱性や耐光性など、アシル基のフラボノイドグルコシド安定化への寄与に関する考察について紹介したい。

[講師プロフィール]

石 原 浩 二 (いしはら こうじ)
岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

学歴・職歴：

1990 年 4 月 大阪大学大学院理学研究科博士前期課程入学
1992 年 3 月 同修了 修士(理学) 取得
1992 年 4 月 岡山大学大学院自然科学研究科博士後期課程入学
1995 年 3 月 同修了 博士(工学) 取得
1995 年 4 月 京都教育大学教育学部理学科文部科学教官助手
2003 年 5 月 平成 15 年度文部科学省内地研究員
2004 年 4 月 岡山理科大学理学部臨床生命科学科講師
2007 年 4 月 岡山大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻講師

専門分野：

酵素化学, 応用微生物学, 生体触媒化学, バイオインフォマティクス

受賞：

2005 年 5 月 日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞
2007 年 1 月 岡山リサーチパーク研究・展示発表会奨励賞受賞

学会活動：

日本化学会, 日本農芸化学会, 日本生物工学会, 日本植物細胞分子生物学会, バイオインダストリー協会, マリンバイオテクノロジー学会, 極限環境微生物学会, 酵素工学研究会など

第4回学生プレゼンテーション（研究室・研究内容紹介）

4-1 小麦依存性運動誘発アナフィラキシーに関する研究

○田中 守（博士後期3年生）¹、中山祐紀子²、樋渡友美²、長野隆男^{1,2}

川崎医療福祉大学医療技術学研究科¹健康科学専攻、²臨床栄養学専攻

【目的】

小麦は三大アレルゲンの1つであり、食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA）の発症頻度が最も高い原因食品としても知られている。小麦が原因で発症するFDEIAを小麦依存性運動誘発アナフィラキシー（WDEIA）という。WDEIA患者の血清中IgEと小麦タンパク質の反応性を調べた研究から、WDEIAの主要アレルゲンはグリアジン成分の1つである ω -5グリアジンであると報告されている。しかしながら、なぜ ω -5グリアジンがWDEIAの主要アレルゲンとなるのかは明らかではない。そこで、マウスを使用してWDEIAのモデルを作製し、 ω -5グリアジンがWDEIAに与える影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】

グリアジン画分は、薄力粉（フラワー、日清製粉）から70%エタノールに可溶な画分として得た。感作マウスは、調製したグリアジン画分とAl(OH)₃のアジュバンドをマウス（B10.Aマウス）の腹腔内に投与して作製した。感作成立の判定は、血清中グリアジン特異IgE値を指標とし、IgE値はELISA法により求めた。感作マウスの胃内に10mgのグリアジン画分及び ω -5グリアジンをそれぞれ投与し、運動負荷（傾斜20%、速度15m/分、時間30分）の後、直腸温と回転ケージを用いた15時間の自発運動量を測定した。なお、直腸温と自発運動量はアナフィラキシーの指標として用いた。感作マウスの血清中 ω -5グリアジン特異IgE値は、ELISA法により求めた。感作マウス血清中IgEとグリアジン画分及び ω -5グリアジンの反応性はウエスタンブロッティング法を用いて評価した。

【結果及び考察】

感作マウスの作製では、グリアジン画分で感作したB10.Aマウスの血清中グリアジン特異IgE値は、コントロール群と比較して有意に高値を示した。このことからグリアジンによる感作が成立したものと判断した。アナフィラキシー評価の実験では、直腸温と自発運動量はコントロール群と比較してグリアジン群、 ω -5グリアジン群ともに有意な低下が観察されWDEIAを惹起した。ELISA法では、グリアジン特異IgEの74%が ω -5グリアジン特異IgEと反応した。ウエスタンブロッティング法では、感作マウス血清中IgEの大部分が ω -5グリアジンと反応した。以上の結果から、 ω -5グリアジンはマウスの実験系でもWDEIAの主要アレルゲンであることが示され、特にIgEを産生させやすいタンパク質であることが考えられた。

【研究室紹介】

—澱粉食品の加工適正、消化性に関する研究及び食物アレルギーに関する研究—

主な研究拠点および指導教員

川崎医療福祉大学大学院 医療技術研究科 健康化学専攻・長野隆男教授

Tel : 086-462-1111, Fax : 086-463-3508, E-mail : naganot@mw.kawasaki-m.ac.jp

当該研究室における研究の概要説明

長野研究室は 2007 年 4 月に発足した新しい研究室です。おいしさ、健康、安全性など食品に関わる問題は多くあり、社会的にも関心が高く、解決が求められています。私たちは、近年特に問題視されている肥満、食物アレルギーに注目し、これらの問題を解決するために研究に励み、社会に貢献したいと思っています。

研究テーマ

- ・ 澱粉食品の加工適正、消化性
- ・ 食物アレルギー

研究の目的と意義

① 澱粉食品の加工適正、消化性

コンニャクの主要成分であるコンニャクグルコマンナンは、非澱粉系多糖の一つであり血糖値の上昇を緩やかにし、肥満を抑制する効果が知られています。現在、分子量の異なるコンニャクグルコマンナンが製品化されており、分子量の違いで老化や消化性に与える影響が異なると考えられます。分子量の異なるコンニャクグルコマンナンが澱粉の糊化・老化に与える影響を物性及び構造の面から、また消化性に与える影響を動物実験から明らかにすることを目的としています。本研究は、コンニャクグルコマンナンを利用して、肥満を中心に、おいしく健康的に食べることができる食品の開発に貢献できる研究を目指しています。

② 食物アレルギー

小麦は世界で最も多くの地域で主食として食べられています。一方、小麦は 3 大アレルゲンの 1 つであり、食物を摂取した後に運動することで引き起こされる食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) の最多原因食品としても報告されています。小麦が原因で発症する FDEIA を小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (WDEIA) といいます。WDEIA は、アレルギー症状の中で最も重篤な症状を示すことが知られていることから解決が望まれます。私たちは WDEIA の動物モデルを用いて、WDEIA の発症メカニズムを明らかにすること目的としています。「なぜ小麦製品を食べて、運動することでアナフィラキシー症状が引き起こされるのか？」WDEIA の発症メカニズムを明らかにすることで、アレルゲンとなりにくい、もしくはならない小麦加工食品の開発、FDEIA の予防に貢献できる研究を目指しています。

ゼミ活動

- ・ 週 1 回、その週の研究結果について報告・議論を行っています。
- ・ 月 1 回、矢野研究室と合同でゼミをおこない交流を行っています。
- ・ 研究成果は随時、日本栄養食糧学、アメリカ油化学会など国内外の学会・研究会で発表を行っています。

4-2 パイエル板細胞による IgA 産生誘導活性を有する天然物の探索

○内村俊文（博士前期2年生）¹、前田尚子¹、戸塚 護²、清水 誠²、波多野力¹、伊東秀之¹

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科創薬生命科学専攻、

²東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

【目的】

腸管免疫系は、腸管粘膜の免疫グロブリン A (IgA) 産生などの免疫応答を誘導することにより、病原性ウイルスや細菌感染、炎症性腸疾患などの消化管疾患のみならず、生体全体の恒常性維持や各種疾患予防や改善に寄与しているとされている。特に病原細菌の体内侵入阻止や菌の産生する毒素の中和には、腸管パイエル板で分化誘導された B 細胞が分泌する IgA が、重要な役割を果たしている点に注目し、パイエル板細胞による IgA 産生亢進作用を有する天然物の探索を目的として研究を行った。

【方法】

8 週齢の BALB/c 雌性マウスからパイエル板を摘出し、コラゲナーゼで処理後、リンパ球を得た。RPMI1640 培地で被験サンプルと共培養するか、または、被験サンプルと共にあらかじめ IgA 誘導刺激因子として LPS (lipopolysaccharide) を添加し、IgA 産生能を若干誘起させた状態において、被験サンプルによる IgA 産生能を ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) により測定した。

【結果・考察】

被験サンプルとして、免疫調節作用が報告されている十全大補湯、補中益気湯、小青竜湯の漢方処方エキスやミツバチ産品、および当研究室保有の天然物ライブラリーを中心に本活性の評価を行った。その結果、十全大補湯および補中益気湯エキスに IgA 産生亢進作用が認められ、それらの構成生薬のなかでも甘草に顕著な活性がみられた。また甘草の主成分である Glycyrrhizic acid に IgA 産生亢進作用が認められたことから、Glycyrrhizic acid が活性を示した漢方処方の IgA 産生亢進作用の活性本体の一つとして寄与している可能性が示唆された。

【研究室紹介】

主な研究拠点および指導教員

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科創薬生命科学専攻 生体機能性天然物化学・伊東秀之 准教授

当該研究室における研究の概要説明

天然素材の機能性開発および機能性天然有機化合物の生体内での活性本体の探究に関する研究を主に以下のテーマで行っています。

- ・薬用植物および食品素材の機能性成分の化学構造研究
- ・機能性天然物の生体利用性に関する研究
- ・食品—医薬品間相互作用に関する研究
- ・機能性ポリフェノールの抗酸化機構の解明
- ・脳神経賦活作用を有する天然物の探索研究
- ・プレバイオティクス作用を有する天然素材の開発研究
- ・細菌バイオフィルム形成阻害作用を有する天然物の探索研究
- ・腸管免疫系に影響を及ぼす天然物の探索研究

4-3 潰瘍性大腸炎患者の血中脂肪酸組成およびQOLについての検討

○藤坂優子（修士1年生）¹、小野晋平²、保手濱由基³、佐柄和子¹、川島愛子¹、

川上祐子¹

¹ 中国学園大学大学院現代生活学研究科、² 石川病院、³ 広島県立大学総合学術研究科

【目的】

潰瘍性大腸炎は炎症性腸疾患であり、原因不明の難治性慢性消化管疾患である。成因論については様々な要因が発症に影響を与えていると考えられており、中でも食物要因は本疾患発症に大きく関わっていると考えられている。そこで本研究では脂質制限が指示されている潰瘍性大腸炎患者を対象に、血漿と好中球のリン脂質における脂肪酸組成を分析し、脂肪酸摂取量や臨床検査値との関連について解析し、脂質栄養管理のあり方を考察した。また、QOLについても調査し、患者のQOLの状態を分析した。

【方法】

M外科医院通院中の潰瘍性大腸炎患者 17 名を対象に行った。血液検査データは、岡山医学検査センターにおいて測定されたものを使用した。食事摂取状況を食物摂取頻度調査で調査した。血漿および血球膜リン脂質脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで測定した。QOLをIBDQ質問紙で調査した。

【結果および考察】

血清総たんぱく、アルブミンがそれぞれ健常対照例よりも有意に低下し、ヘモグロビン、ヘマトクリットも有意に低値を示した。また、白血球数、顆粒球数が有意に高値であった。摂取脂肪酸量では、脂質エネルギー比率、オレイン酸、n-6/n-3 比で有意に低値を示した。好中球リン脂質の脂肪酸比率は、飽和脂肪酸は有意に低値を示し、一価不飽和脂肪酸、アラキドン酸/リノール酸比は有意に高値を示した。客観的QOLでは、体力の低下と病気についての不安が多い傾向となった。主観的QOLの健康度は、10点満点中平均約6点だった。QOL全体では、中等症が軽症よりも低い傾向がある。

血清総たんぱくやアルブミンが有意に低値を示したが、正常範囲に保たれており、栄養状態の明らかな低下はみられなかった。しかし、ヘモグロビンおよびヘマトクリットが低値を示し、貧血状態がみられた。これは腸管からの出血による鉄の喪失のために起こると考えられる。炎症の指標である白血球数、顆粒球数が高値を示したことは、病態との関連が認められる。好中球リン脂質の脂肪酸比率におけるアラキドン酸/リノール酸比の上昇は、内服薬によるアラキドン酸からのLTB₄等生理活性物質の産生抑制が関連していると考えられる。対象患者の摂取脂肪酸は、脂質エネルギー比率・n-6/n-3 比が健常対照例よりも制限され、食事療法の実践ができていると考えられ、17 名中 11 名が軽症例であり、6 名が中等症であり、重症例はいなかった。脂質の制限や n-6/n-3 比を低下させることは緩解維持に役立つと考えられる。QOLは、中等症が軽症よりも低い傾向があることから、病気の回復が患者のQOLを上昇させると考えられる。

【研究室紹介】 —脂肪酸を中心とした栄養治療に関する研究—

主な研究拠点および指導教員

中国学園大学大学院現代生活学研究科

臨床栄養研究室・川上祐子教授，川島愛子助教

TEL : 086-293-0247, FAX : 086-293-2798, E-mail : kyuko-333@cjc.ac.jp

URL : <http://www.cjc.ac.jp/>

当該研究室における研究の概要説明

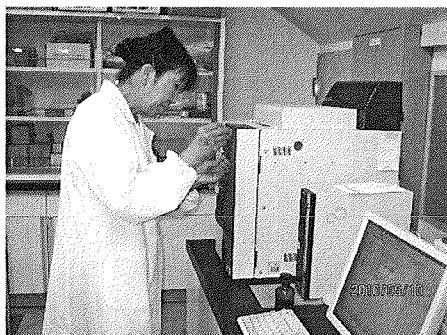
本研究室では、血漿・血球膜脂肪酸の分析を通して、病態に応じた脂肪酸を含めた栄養・食事摂取のあり方について研究している。

- ① 飽和脂肪酸の体への影響として炎症促進作用、インスリン抵抗性作用、肥満しやすい要因等
- ② n-6 系多価不飽和脂肪酸の代謝過程におけるアラキドン酸カスケードと生理活性物質との関連
- ③ n-3 系多価不飽和脂肪酸の抗炎症作用等。

炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）の患者における脂肪酸と再燃および緩解との関連について。

糖尿病患者における脂肪酸とインスリン抵抗性、肥満の関連に関する研究。

実際に医療機関と連携し、栄養食事指導を継続しながら、それぞれの疾患における血中脂肪酸の組成および摂取栄養素量・脂肪酸量との関連を継続して観察していく。



4-4 飲料中の天然着色料の安定性に及ぼす香料の影響

○橋本香織（修士課程1年生）、高尾奈津子、三宅教子、田村理江、多田幹郎

【目的】

加工食品には複数の食品添加物が使用されるが、それらの相互作用による変化についての知見は少ない。清涼飲料水の調製に際しては、その嗜好性の向上を目的として、香料と天然着色料が添加される。一般に、天然着色料は安定性に乏しく、香料は反応性に富んだ官能基を有していることから、両者の共存によって色調に変化が生じることが予想される。そこで、清涼飲料水に用いられる6種の天然着色料と8種の合成香料を用い、相互作用による色素の変化について調べた結果、6種の香料はいずれの色素に対しても顕著な影響は及ぼさないことを認めたが、①エチルマルトール (Ethyl maltol) が光安定性を増加させ、②シトラール (Citral) が熱安定性を低下させる傾向が認められた。本報告では、これら2種の香料について7種の天然着色料を対象として耐熱性試験と耐光性試験を行い、色素に与える影響を濃度依存性を含めて調べた結果について述べる。

【試料及び方法】

(試料)

天然着色料：4種のアントシアニン色素（紫イモ色素、赤キャベツ色素、ブドウ果汁色素、

紫トウモロコシ色素）、クチナシ青色素、ベニバナ黄色色素、コチニール色素

合成香料：エチルマルトール（官能基：環状ケトン、砂糖の香り）、シトラール（官能基：脂肪族アルデヒド、レモンの香り）

(被験溶液の調製方法)

クエン酸 24 g を純水 12 L に溶解し、30%クエン酸三ナトリウム溶液を用いて、pH3.0 に調整する。その溶液を攪拌しながら加熱し、93℃になった時点で加熱を終了し、実験対象の色素 6 ml を加える (OD at λ_{\max} : 0.3~0.8)。この溶液の 1 L に香料を目的の濃度（エチルマルトール: 0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、シトラール: 0.005%、0.01%、0.02%、0.05%）になるよう量り入れ、ペットボトル (200ml) に速やかにホットパックし、室温まで冷却し試験用サンプルとする。

(試験方法)

耐熱性試験：ペットボトルに入れた調製溶液を 50℃の暗所に 28 日間保管し、10 日目、20 日目及び 28 日目に色素残存率を求めた。

耐光性試験：ペットボトルに入れた調製溶液を、蛍光灯を用いて 2,000 Lux の照度で連続照射し、5 日目、10 日目、20 日目に色素残存率を求めた。

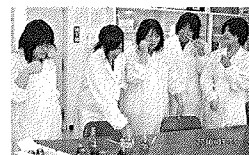
(色素残存率の算出方法)

調製直後の試験用サンプル溶液の極大吸収波長における吸光度を 100% として、安定性試験期間終了時に求めた吸光度との比から残存率を算出した。

【結果および考察】

本実験に用いた天然着色料は、いずれも熱および光に対して不安定であり、加熱時間、照射時間の延長に伴って色素は減少する。この経時変化は香料の添加によっても著しい変化は見られず、予備的研究で認められたエチルマルトールの耐光性効果およびシトラールによる耐熱性の低減については、本実験で追認することはできず、また香料が7種の天然着色料の安定性に与える影響も認められなかった。今後、酸化防止剤や保存料などとの相互作用について検討する予定である。

【研究室紹介】



主な研究拠点および指導教員

中国学園大学人間栄養学科《食品化学研究グループ》

教授 多田 幹郎、講師 田村 理江、助教 北島 葉子、助手 三宅 教子

〔大学院修士課程生〕 2年生1名、1年生：1名、〔学部卒業研究生〕 4年生：6名

当該研究室における研究の概要説明

本研究グループは、適宜小グループを組んで、以下のテーマについて、研究を続けています。

研究テーマ

【テーマⅠ】食品照射に関する研究

現在、食品照射の有用性（非加熱処理で食品の熱変化を伴わない。化学薬剤のように残留性が無く、いわゆる“エコ技術”である）が広く認識され、また、照射食品の健全性は、国際プロジェクト研究成果に基づき、WHOによって保証されていることから、現在53カ国で多くの食品への放射線照射が実用化されています。

このような社会事情を考えると、私達の研究成果が近い将来大きく役立つものと考えられ、以下の研究課題に取り組んでいます。

①照射食品の光励起ルミネッセンス（PSL）測定法による検知

現在、日本では照射食品の公定検知法として「熱ルミネッセンス（TL法）」が定められています。この方法は煩雑であるため簡便な方法が求められています。

これまでの私達の研究では、照射されたスパイスの検知にPSL法が有用であることを認め、さらに、他の食品への適用の可否を、残存微生物の増殖と組み合わせて研究しています。

②既存添加物（天然食品添加物）の調製原材料への放射線照射による目的成分の抽出効率への影響

原料ブドウに予め放射線を照射すると、ブドウ酒のアントシアニン含有量が増大すること、また、テングサに放射線を照射すると、寒天の収量が上がることなど、放射線照射は天然物からの有効成分の抽出効率が高まることが知られています。この研究は、着色料として使用される天然色素の抽出原材料に予め放射線照射することによって、微生物汚染の低減と同時に、目的色素の抽出効率が高まることを期待して、数種の原材料（ベニバナなど）を対象とした研究に取り組んでいます。

【テーマⅡ】食品着色料に関する食品学的研究

人が食品を評価する際に、色調は重要な評価基準です。そのため加工食品には様々な着色が施されており、最近では、消費者の天然志向、安全性の高まりにより天然色素の需要が主流となっています。一般に抽出された天然色素は光、熱などに対して不安定ですが、花卉や果実中では安定に存在しています。

このような生体内（各種化合物の混合物）での安定化の機構を明らかにすることによって、加工食品の色調維持についてのアイデアが得られると考え、以下の研究課題に取り組んでいます。

①飲料中の天然着色料の安定性に及ぼす共存添加物の影響

加工食品には複数の食品添加物が使用されていますが、それらの相互作用による変化についての知見を得るために、果汁の調製に用いられる天然着色料と合成香料を用いて、相互作用による色素の変化について研究を進めています。今後は、さらに酸化防止剤、保存料などの添加物との相互作用について検討します。

②食品の色が味覚に与える影響についての官能検査

食品の見た目（色）はおいしさを決める重要な要素であり、近年では様々な商品の登場により日本人が持つ色のイメージが変化してきています。そこで、本学の学生を対象として、若者が持つ食品の色に対するイメージと色が食品の味にどの程度影響を与えるのかを検査によって調査します。

4-5 食品中に含まれるニコチアナミンの定量法の開発

○黒田耕平（博士後期1年）¹、児玉幸彦²、松田真弥²、石原浩二²、益岡典芳¹

¹岡山理科大学大学院理学研究科材質理学専攻

²岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

【目的】

生体の代表的血圧上昇系であるレニン-アンジオテンシン系は高血圧症の成因や血圧維持に重要である。降圧薬としてアンジオテンシン変換酵素 (EC 3. 4. 15. 1, ACE) 阻害活性に注目し、副作用が少ないと考えられる食用植物に含まれる ACE 阻害物質を探索した。ACE 阻害活性の高い「かぼちゃ」からニコチアナミンを分離同定した。この化合物は多くの植物性食品に含まれるが、その正確な量は明確でないので定量法の開発を目標としている。本研究の目的は食品に含まれるニコチアナミンの定量をおこない、ACE 阻害活性との関係を明確にすることにある。

【方法】

植物性食品を小さく切りミキサーでホモジネートにして水抽出し、有機溶媒で洗った。濃縮物を陽イオン交換樹脂カラム (Amberlite IR-120B, H⁺型, 4 X 25 cm) で分けた。水洗いした後 2 M アンモニアで溶出した。溶出液を濃縮し、陰イオン交換樹脂カラム (Dowex 1-X4, 酢酸型, 2 X 12 cm) に着け、水、0. 3M 酢酸、3M 酢酸で溶出し分画した。分離同定には陽イオン交換樹脂カラム (Dowex 50W-X8, ピリジン型, 2 X 12 cm) で、酢酸-ピリジンで溶出した。ニコチアナミン分離定量はアミノ酸分析計で行う方法で検討した。ACE 阻害活性測定は ACE と合成基質を使って HPLC 法および比色法で測定した。

【結果および考察】

植物性食品中の ACE 阻害活性の測定から、かぼちゃ、ズッキーニに阻害活性が比較的高いことが明確になった、そこでかぼちゃの熱水抽出を行った。陽イオン交換樹脂カラムからの分離はアンモニア分画、続いて、陰イオン交換樹脂カラム (Dowex1-X4, 酢酸型, 2 X 12 cm) では 0. 3 M 酢酸分画に溶出された。陽イオン交換樹脂カラム (Dowex 50W-X8, ピリジン型, 2 X 12 cm) で精製した後、機器分析を行い既知のニコチアナミンと同定した。アミノ酸分析計ではパリンとシステインの間、43. 4 分に溶出された。検量線は 0 - 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の間で良い直線性を示した ($r=1. 0000$)。かぼちゃに含まれるニコチアナミン量は $34. 9 \pm 5. 4 \mu\text{g} / \text{g}$ であった。

【研究成果の波及効果】

高血圧症の患者さんは 3, 400 万人以上と言われている。また、ACE 阻害活性を持つニコチアナミンはほとんどの植物性食物に含まれるアミノ酸であるが、その含有量は明確でない。本研究はその量を明確にして食品の降圧効果を明確にしたい。また、構造は変化しにくいことから加工も容易でニコチアナミンを含んだ機能性食品の開発も考えられる。ACE 阻害活性以外の生理活性についても検討を計画している。

【研究室紹介】

—抗酸化活性の解析と活性酸素による生体傷害メカニズムの研究—

主な研究拠点および指導教員

岡山理科大学理学部臨床生命科学科 臨床生化学研究室 益岡典芳教授

Tel & Fax : 086-256-9593, E-mail: masuokan@dls.ous.ac.jp

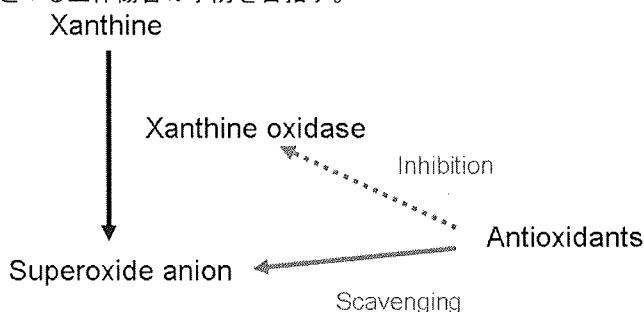
当該研究室における研究の概要説明

抗酸化活性の解析と活性酸素による生体傷害メカニズムの解析を中心に研究を進めている。将来は抗酸化剤による活性酸素により起こる生体傷害の予防を目指している。

研究テーマ

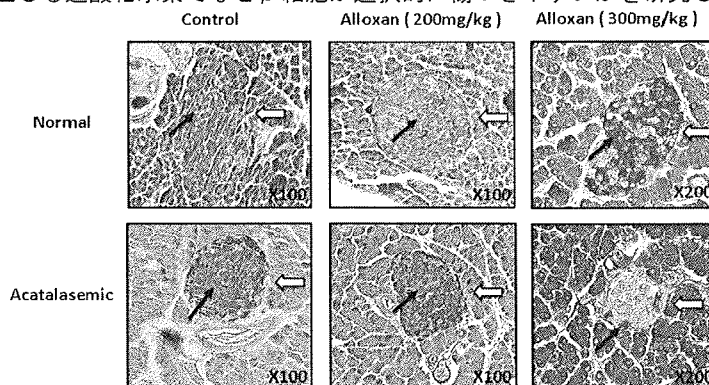
1. 抗酸化活性の解析

活性酸素による傷害予防に有効な抗酸化活性の測定はキサンチン—キサンチンオキシダーゼ系が一般に広く使用されている。しかし、この反応は酵素阻害、酵素修飾、スカベンジングなどに影響されるので、抗酸化活性の性質の詳細を解析している。この研究の成果は、(1)これまで既に測定されている抗酸化活性値についての理解を深める。(2) 化学構造と抗酸化活性の相関関係を明確にできると考えている。次のステップでは、生体への作用を解析することで、最終目的の食品に含まれる抗酸化剤で活性酸素により起こる生体傷害の予防を目指す。



2. 活性酸素による生体傷害メカニズムの解析

抗酸化活性酵素の1つであるカタラーゼの欠損症で起こる高原氏病の発症メカニズムの解析から研究を始めた。[N. Masuoka, *et al.* *J. Biol. Chem.* (2006)] 現在は、カタラーゼ欠損症のマウスは、正常マウスと比較して、酸化ストレス(アロキサン)により糖尿病になり易いことを明らかにしている。アロキサンによりランゲルハンス島の β 細胞の傷害が起こることは明確であるが、その際のアロキサンにより生じる過酸化水素でなぜ β 細胞が選択的に傷つきやすいかを研究している。



3. 抗酸化剤による酸化ストレス傷害予防

おかやまバイオアクティブ研究会 第37回シンポジウム

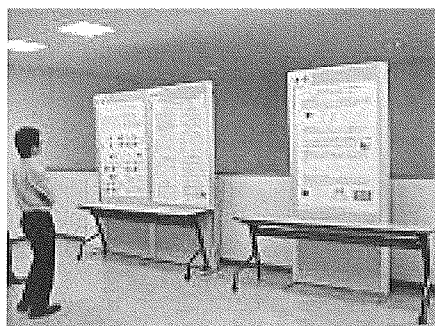
会長挨拶



講演風景



学生ポスター



懇親会



おかやまバイオアクティブ研究会 第 38 回シンポジウム
日時:平成 22 年 10 月 15 日(金)13 時 20 分～17 時 50 分
場所:岡山大学大学院自然科学研究科棟 2 階大講義室

【薬食同源:健康を鍵とする薬と食のつながり】

【基調講演】 13:20－14:15

「ニワトリ卵黄由来抗体 (IgY) の消化管感染症の予防・治療への応用」

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小熊 恵二 氏

【講演 1】 14:20－14:55

「機能性素材への応用をめざした放線菌由来酵素の開発」

岡山県農林水産総合センター・生物科学研究所 畑中 唯史 氏

学生プレゼン セッション

15:00－15:20

学生ポスターディスカッション・コーヒーブレイク

15:30－16:30

【講演 2】 16:35－17:10

「ローヤルゼリー (RJ) の生物作用とタンパクフリー RJ の開発」

(株)林原生物化学研究所・研究センター 牛尾 慎平 氏

【講演 3】 17:15－17:50

「タンニンおよび関連ポリフェノール研究の現段階」

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授 波多野 力 氏

事務局:(財)岡山県産業振興財団

おかやまバイオアクティブ研究会会長 辻 英明 (岡山県立大学保健福祉学部)

第 38 回シンポジウム実行委員長 成松 鎮雄 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

ニワトリ卵黄由来抗体 (IgY) の消化管感染症の予防・治療への応用

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病原細菌学、(株) ゲン・コーポレーション

小熊 恵二、児玉 義勝

はじめに

近年、感染症の予防・治療に、あるいはヘビ毒の治療などに、従来の馬で作製した抗血清の代わりにニワトリで作製した抗体が注目されている。ニワトリへの免疫が簡単のみならず、卵黄中に産生される抗体量は非常に多く、その精製も容易である。抗体の性状もこれまでのIgGと比較して、抗原結合力（アフィニティー）は高いと報告されている。卵黄粉末や粗精製したIgYを一日数g経口投与しても、通常はアナフィラキシーを起こさない。また、これらは常温でも長期間保存可能である。東南アジアではコレラ、病原性大腸菌、ロタウイルスなどによる下痢症が蔓延している。本研究ではIgYを乳製品や飲料水に混ぜ、経口投与することによりこれらを予防・治療しようというものである。医療状況の悪い洪水や津波、地震などの災害時にも、乳児から老人までに簡単に投与できる方法であるので、将来的には、幾つかの微生物や毒素に反応できる製品を開発する予定である。

ニワトリへの免疫は株式会社ゲン・コーポレーションが行った。本シンポジウムでは、まずIgYの有効性を示すため、これまでゲン・コーポレーションが進めてきた、虫歯（う蝕）形成と胃・十二指腸疾患にそれぞれ関係がある *Streptococcus mutans* と *Helicobacter pylori* の重要な病原因子であるグルコシルトランスフェラーゼ (GTase) とウレアーゼに対するIgYを作製し、ボランティアによりその効果を解析したデータ等を紹介した後、現在、私達と共同で進めているコレラ菌やコレラ毒素、ロタウイルスに対する効果を示し、上記の計画について説明する。

1. *Streptococcus mutans* と *Helicobacter pylori* に対する効果

1. *Streptococcus mutans* (ミュータンス菌)

S. mutans はGTaseにより蔗糖よりグルカンを形成する。これにより菌は菌に固着し虫

歯を形成する。GTaseに対する抗体を作製し、餌に混ぜ、ラットを用いてその効果を検討したところ、ブラックおよび虫歯の形成に対し優位の阻害が認められた。次いで計99名のボランティアを用いて実験を行った。ボランティアを1) IgY粉末、2) その製品（錠剤）、3) プラセボの投与群、および、4) 未処置（コントロール）の4グループに分けた。1日5回（毎食後と昼夕食間、就寝前）、計400 mg/日、5日間投与した後、総嫌気性細菌数、菌に付着している *S. mutans* 数や唾液中の *S. mutans* 数を測定した。総嫌気性細菌数は変化がなかったが、付着性 *S. mutans* 数や総 *S. mutans* 数は、IgYおよびその製品（錠剤）を投じたグループでは優位に低下した。

2. *Helicobacter pylori* (ピロリ菌)

H. pylori が胃内で生息するためには胃液を中和しなければならない。菌はウレアーゼによりこれを行っている。従って、ウレアーゼに対する抗体を作製し、その効果を検討した。まず、IgYが胃粘膜のムチン層にも浸透することを認めた。次いで、マウスを用いて、餌に抗体を混ぜ投与すると、菌数を低下させることを認めた。同様に、16名のボランティア (*H. pylori* 感染者) に、抗ウレアーゼ抗体を2g含むヨーグルトを1日2個ずつ摂食させ、3ヶ月後に感染菌を減少させるかを検討したところ、全ての摂食者において優位な効果が認められた。

II. 下痢症対策

1. コレラ

コレラは経口感染したコレラ菌 (01 と 0139 がある) が腸内で増殖し、産生されたコレラ毒素により米のとぎ汁様の下痢を呈する疾患である。今回は 01 と 0139 をホルマリンあるいは加熱処理により殺菌したものを全て混合した菌液と、リコンビナントタンパク質として作製したコレラ毒素の細胞への結合部分 (B subunit) に対し IgY を作製した。

作製した抗菌 IgY は、ELISA で 01 と 0139 に良く反応した。また、抗 B subunit IgY (以後、抗毒素抗体と記載) は、毒素と反応し、毒素による CHO 細胞の elongation (伸長化) を抑制した。

生後 4 日の幼弱マウスにコレラ生菌約 10^9 個 / $50 \mu\text{l}$ を経口投与すると、通常 1 日で死亡する。このマウスの実験系で、菌の接種後 3 時間目から 2 時間おきに、 1mg/ml の抗菌あるいは抗毒素抗体各 $50 \mu\text{l}$ を 14 回投与したところ、抗菌抗体はマウスの死亡を防いだが、抗毒素抗体はあまり良い効果を示さなかった。当然ながら両抗体を混合すると最も効果が良かったので、この混合抗体を用いて、生菌投与後 3 時間目から 4, 6, 8, 12 時間おきに 1 日間投与 (従ってそれぞれ 1 日に 6, 4, 3, 2 回投与) したところ、8 時間おき (1 日 3 回投与) で十分な効果が得られた。また、生菌投与 1 時間前に抗体を投与しても、それなりの効果が認められた。

2. Rota virus (ロタウイルス)

ロタウイルスはヒトや哺乳類、特に生後まもなくのウシや 5 歳以下の乳幼児に重症の下痢を発症し、時に死に至る。ウイルスは抗原性により A~G 群 (serogroup) に、さらに各血清群には複数の血清型 (serotype) がある。A 群はウイルスの最外層のタンパク質 (VP4) と糖タンパク質 (VP7) の違いにより、それぞれさらに 11 (P 血清型) と 14 (G 血清型) に分け

られる。ヒトには主に A 群の G1~G4 が感染するが、学童以上では C 群も感染する。下痢はコレラと類似しているのですが、かつては小児仮性コレラと言われていたが、現在はノロやアデノウイルス等によるものと総括され、乳幼児嘔吐下痢症 (感染性下痢症の代表例) と言われる。

ヒトより分離された G1, G2, G3 の血清型を示す HRV-408 株と、G2, G4 の血清型を示す HRV-248 を不活化し IgY を作製した。抗体の力価を CPE 阻止能などで測定した後、幼若マウス (5 日齢) の系で、その下痢症に対する効果を判定した。上記の抗体をそれぞれ経口投与した後、3 時間目に充分量のウイルスをそれぞれ経口接種したところ、コントロールの IgY を投与した群は下痢を発症したが、ウイルスに対する特異抗体を投与した系では著大な抑制効果が認められた。類似のことをウシ由来の分離株とその抗体でも行ったが、同様の結果が得られた。

以上の結果からコレラ菌・毒素やロタウイルスに対する IgY 抗体は、ヒトにおいても良好な結果が得られるものと推察されたので、昨年より、ミャンマーの Central DMR (Department of Medical Research) と共同で、ヒトの下痢症に対する効果を検討している。まだ開始したばかりであるが、時間があればこのデータも紹介したく思っている。

[講師プロフィール]

小熊 恵二 （おぐま けいじ）
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

学歴：

1971 年 北海道大学医学部医学科卒業
1971 年 同・大学院医学研究科博士課程入学
1971 年 医師免許取得
1973 年 同・大学院医学研究科博士課程退学
1976 年 医学博士（北海道大学）取得

職歴：

1973 年 北海道大学医学部細菌学講座・助手
1978 年 同・講師
1983 年 札幌医科大学微生物学講座・教授

1992 年 岡山大学医学部細菌学講座・教授
2005 年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・
医学部長
2005 年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・
社会環境生命科学専攻・教授

研究分野：

細菌（ボツリヌス、ペーチェット病、ヘリコバクター等）

受賞：

1974 年 日本細菌学会 黒屋奨励賞
1982 年 北海道大学医学部 高桑栄松奨励賞
1990 年 北海道知事賞、北海道医師会賞
2005 年 日本細菌学会 浅川賞

【講演 1】

機能性素材への応用をめざした放線菌由来酵素の開発

岡山県農林水産総合センター・生物科学研究所

畑中 唯史

生物科学研究所は、自然に恵まれた吉備中央町に位置し、この 10 月で満 14 歳を迎えた岡山県立の研究機関です。当研究所は、植物と微生物とを研究対象として取り上げ、遺伝子組み換え技術を中心に、バイオテクノロジーを活用し、基礎から応用研究へ発展させることを目的とし、中・四国地方では唯一といってもよいバイオ専門の研究所です。

私は、研究所設立当初から、一貫して放線菌が産生する酵素を題材とした研究を行ってまいりました。本日は、「葉食同源」ということで、放線菌由来酵素を用いた機能性素材の合成をからめつつ、この 14 年間行ってきた研究をふりかえりながら、ご紹介したいと存じます。

1. ホスホリパーゼ D (PLD) による機能性リン脂質の合成

PLD は、グリセロリン脂質のリン酸エステルを加水分解する酵素であるが、反応系に水酸基を有する化合物が存在すると、ホスファチジル基転移反応を触媒する。ホスファチジルセリン (PS) は、牛脳から抽出され、脳機能改善剤としての研究がなされてきたが、狂牛病の発生以来、安全・安心な原料から PLD を用いた酵素合成で PS は生産されるようになってきた。我々は、工業的に優れた PLD を得るために、土壌からスクリーニングを行い、産生量の多い放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株を得ることに成功した。TH-2 株由来 PLD を、工業的スケールで生産する目的で、大型培養設備での生産を試みたところ、大量の金属プロテアーゼ (SCMP) の産生がおこり、PLD の生産は大失敗した。その後、pH をコントロールすることにより、SCMP 産生は抑えられ、TH-2 株由来 PLD の工業生産手法は確立された。紆余曲折の後、TH-2 株は現在中国大陸に渡り、PLD を生産している^{1, 2)}。

2. ペプチダーゼのスクリーニング

放線菌といえば、抗生物質を作る微生物というイメージが強いが、実は *Streptomyces griseus* 由来のペプチダーゼは、アクチナーゼという商品名で市販されている。この菌株は、2008 年東京大学の西先生らのグループによって、全ゲノム配列が同定され報告されている。その情報によると、多くの遺伝子がペプチダーゼとしてアノテーションされ、ストレプトマイセス属細菌がペプチダーゼの遺伝子源として有力な候補のひとつであることを裏打ちしている。我々は、TH-2 株が大量にプロテアーゼを産生することをきっかけに、放線菌由来のペプチダーゼのスクリーニングを行った³⁻⁵⁾。

(1) 発現系の構築 ～失敗は成功の母～

これまでの食品産業用ペプチダーゼは、専ら変異剤処理して得られた産生菌株培養液から、菌体など不溶物を除去して得るものであるが、その生産性は低い。また前述したが、ペプチダーゼの構成比率を人為的に操作することは困難である。いくら優秀な酵素でも、生産量が低いままでは、経済性に見合わない。TH-2 株が、大量の金属プロテアーゼ SCMP を産生することを述べた。精製酵素の比活性値から逆算すると、0.3 g/L の生産量と見積もられた。我々はこの SCMP の高い生産性に着目した。そこで、富山県立大学の尾仲宏康先生と協力して、SCMP 遺伝子のプロモーターを利用した発現ベクター pTONA5a を作成した^{6, 7)}。

(2) 酵素によるペプチド合成

我々は、従来から放線菌由来ペプチダーゼの研究に取り組んできた。まず亜鉛を活性中心にもつロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) の逆反応 (= 脱水縮合反応) により、98% メタノール中でジペプチド合成に成功した⁸⁾。

その後、セリンを活性中心にもつ放線菌由来 S9A ファミリー酵素の一群が、エンド型ではなくエキソ型アミノペプチダーゼであることを見出した。本酵素の活性中心であるセリン残基をシステインに変異させた、中等度好熱菌由来 S9A ファミリーアミノペプチダーゼが、アミノ酸エステルとフリーのアミノ酸を基質として、アミノリシス反応によりペプチドを合成できる、という実験結果も得ている⁹⁾。更に、S33 ファミリーに属する放線菌由来プロリンアミノペプチダーゼ (PAP) に関しても、システイン型変異酵素は同様な反応を司るという知見を得ている¹⁰⁾。

【文献】

- 1) Purification, characterization, cloning and sequencing of phospholipase D from *Streptomyces septatus* TH-2. T. Hatanaka, T. Negishi, M. Kubota-Akizawa, T. Hagishita. *Enzyme Microbial Technol.* **31**:233-241 (2002)
- 2) ホスホリパーゼDおよびその製造法 畑中 唯史 他 特許 第4426664号
- 3) Purification, characterization cloning and sequencing of metalloendopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2. T. Hatanaka, J. Arima, Y. Uesugi and M. Iwabuchi. *Arch. Biochem. Biophys.* **434**: 289-298 (2005)
- 4) Gene cloning and overproduction of an aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2, and comparison with a calcium-activated enzyme from *Streptomyces griseus*. J. Arima, M. Iwabuchi and T. Hatanaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**: 531- 538 (2004)
- 5) Effect of salt on the activity of *Streptomyces* proline aminopeptidase. M. Uraji, J. Arima, Y. Uesugi, M. Iwabuchi and T. Hatanaka *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **1774**: 1462-1469 (2007)
- 6) pTONA5: a hyperexpression vector in streptomycetes. T. Hatanaka, H. Onaka, J. Arima, M. Uraji, Y. Uesugi, H. Usuki, Y. Nishimoto and M. Iwabuchi *Protein Expr. Purif.* **62**:244-248 (2008)
- 7) プロモーター及びその活性化方法 畑中 唯史 他 特許登録確定
- 8) Dipeptide synthesis by leucine aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2 and its application for synthesis of biologically active peptides. J. Arima, Y. Uesugi, M. Uraji, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka *Appl. Environ. Microb.* **72**: 4225-4231 (2006)
- 9) Engineered transaminopeptidase, aminolysin-*S* for catalysis of peptide bond formation to give linear and cyclic dipeptides by one-pot reaction. H. Usuki, Y. Uesugi, J. Arima, Y. Yamamoto, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka *Chem. Comm.* **46**: 580-582 (2010)
- 10) Prolyl aminopeptidase from *Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus* Strain NBRC 14270 and synthesis of proline-containing peptides by its S144C variant. Y. Yamamoto, H. Usuki, M. Iwabuchi, and T. Hatanaka *Appl. Environ. Microb.* **76**: 6180-6185 (2010)

[講師プロフィール]

畑中 唯史（はたなか ただし）
岡山県農林水産総合センター・生物科学研究
所 酵素機能研究グループ

2009年 酵素機能研究グループ グループ
2010年 改組により、岡山県農林水産総合セ
ンター生物科学研究所となり現在に
至る

学歴・職歴：

1987年 岡山大学大学院薬学研究科修士
課程（生理化学専攻）修了
1987年 (株)クラレ入社、中央研究所
1995年 岡山県赤十字血液センター入所
1996年 岡山大学より博士（薬学）取得
1996年 岡山県生物科学総合研究所採用

研究分野：
生化学、酵素化学

所属学会：
日本農芸化学会、日本生物工学会、日本放線
菌学会

【講演 2】

ローヤルゼリー (RJ) の生物作用とタンパクフリー RJ の開発

(株)林原生物化学研究所・研究センター 牛尾 慎平

ローヤルゼリー (RJ) は古くから機能性食品素材や化粧品素材として用いられてきた。林原でも、その機能性を実証すべく、各種細胞株を使用した試験に加え、RJ 経口投与による NC/Nga マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルに対する効果、ハムスター精巣における加齢に伴った退行性変化の改善作用、あるいはマウスの寿命に与える影響等について検討を行なってきた。

多くの作用が報告される一方、RJ 摂取によってアレルギー反応の一種であるアナフィラキシー症状が誘導される といった臨床報告が散見される。

この RJ 摂取によるアナフィラキシーを回避するため、RJ が本来有する生物作用はそのまま保持しつつ、高い安全性を有する商品を開発する

ことを目的として、各種検討を行なった。試行錯誤の結果、限外ろ過膜を用いて、RJ からアナフィラキシーの原因であるタンパク質を完全に除去し、生物作用を担う特徴成分のひとつである 10-ヒドロキシ-2-デセン酸等が含まれる低分子画分はそのまま保持した「タンパクフリーRJ」の調製方法を確立した。

「タンパクフリーRJ」は、ラットにおける PCA 反応試験においても良好な結果が確認されており、安全性の高い商品開発という当初の目的は達成されたと考えている。

本発表では、RJ ならびにタンパクフリーRJ の生物作用とともに、調製方法の一端について紹介させていただく。

〔講師プロフィール〕

牛尾 慎平 (うしお しんぺい)
株式会社 林原生物化学研究所・主管研究員

学歴・職歴：

1987年 九州大学農学部卒
1987年 (株)林原生物化学研究所・研究員
1999年 農学博士 (九州大学) 取得

1999年 (株)林原生物化学研究所・主任研究員
2001年 広島大学大学院生物圏科学研究科・
客員助教授
2004年 (株)林原生物化学研究所・主席研究員
2005年 広島大学大学院生物圏科学研究科・
客員教授
2009年 (株)林原生物化学研究所・主管研究員

タンニンおよび関連ポリフェノール研究の現段階

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
波多野 力

近年、種々の植物中のポリフェノール成分について、その抗酸化作用を基礎にした種々の活性が見いだされ、多くの食品の機能性成分として関心を集めている。ポリフェノールには、リグナンなどを含めた種々のフェニルプロバノイドやフラボノイドも含まれるが、ポリフェノールを構成する一大化合物群がタンニンである。

1. タンニン研究の歴史と現段階

タンニンは天然のポリフェノールで、タンパク質との強い結合力を有し、難溶性の複合体を形成する化合物群の総称で、化学構造によって大きく加水分解性タンニンと縮合型タンニンに大別される。タンニンがある種の薬用植物に多量含まれ、また、単離したタンニンについて、抗酸化作用の他、宿主介在性抗腫瘍作用や、抗ウイルス作用など、近年、多くの作用が見いだされてきているが、化学構造研究についてはアルカロイドやテルペノイドなどに比較するとその展開は遅いものであった。その原因は、タンニンの分子量が大きく、また構造類似の物質が同一植物中に多数共存することによって、化合物の単一性を確立したり、構造を解明したりすることが困難であったこと、さらに他種化合物の分離に使用されるシリカゲルなどの分離用担体に対して非可逆的な吸着や担体上での化学変化をおこすこと等があげられる。

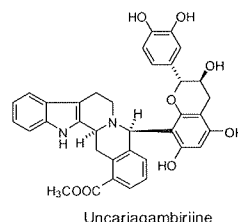
こうした困難はありながらも、1950-60年代を前後して、ドイツの K. Weinges らにより縮合型タンニンについて、また同じくドイツの O. Th. Schmidt らにより加水分解性タンニンについて、それぞれ先駆的な研究が開始された。さらに 1970 年代にはイギリスの E. Haslam らや、南アフリカの D. G. Roux らによって縮合型タンニンに関する研究が精力的に展開されてきたが、一方、加水分解性タンニンについては、我が国において岡山大学の奥田拓男教授のグループと九州大学の西岡五男教授のグループによって、その研究が展開されてきた。その嚆矢が奥田教授らによる Geraniin の

化学構造研究である。Geraniin は、日本の代表的な民間薬ゲンノショウコの主タンニン成分であり、黄色の結晶として得られたものであるが、水溶液中では主として 2 つの、またアルコール類の溶液中ではさらに多数の平衡混合物を形成し、その構造解明は困難であった。1982 年にその構造が確立され、¹⁾ 1998 年には X 線解析によってその構造が裏付けられた。²⁾

1980 年代からは多くのタンニンの単離構造解明が進められたが、中でも構造が特徴的なのは、加水分解性タンニンの oenothien B であった。このタンニンは 2 分子の tellimagrandin I から構成されたものに相当する構造を有し、2 個の valoneoyl 基によってグルコースどうしが架橋されて大環状構造を形成している。³⁾ このタンニンは、移植腫瘍に対する生存率を顕著に増大させることが明らかになった。⁴⁾

その後さらに多くのタンニンや関連の構造を有する低分子ポリフェノールの検討が進んだが、最近、我々は *Tamarix nilotica* というエジプト産の植物からタンニンの単離構造解明を進め、その中には、正常細胞に対して腫瘍細胞への細胞毒性が強いものが数種あることも見出している。⁵⁾

一方、インドネシア等で栽培される *Uncaria gambir* からは、カテキンとインドールアルカロイドのハイブリッド化合物に相当する構造の新規化合物 uncariagambirine をも最近見出している。⁶⁾



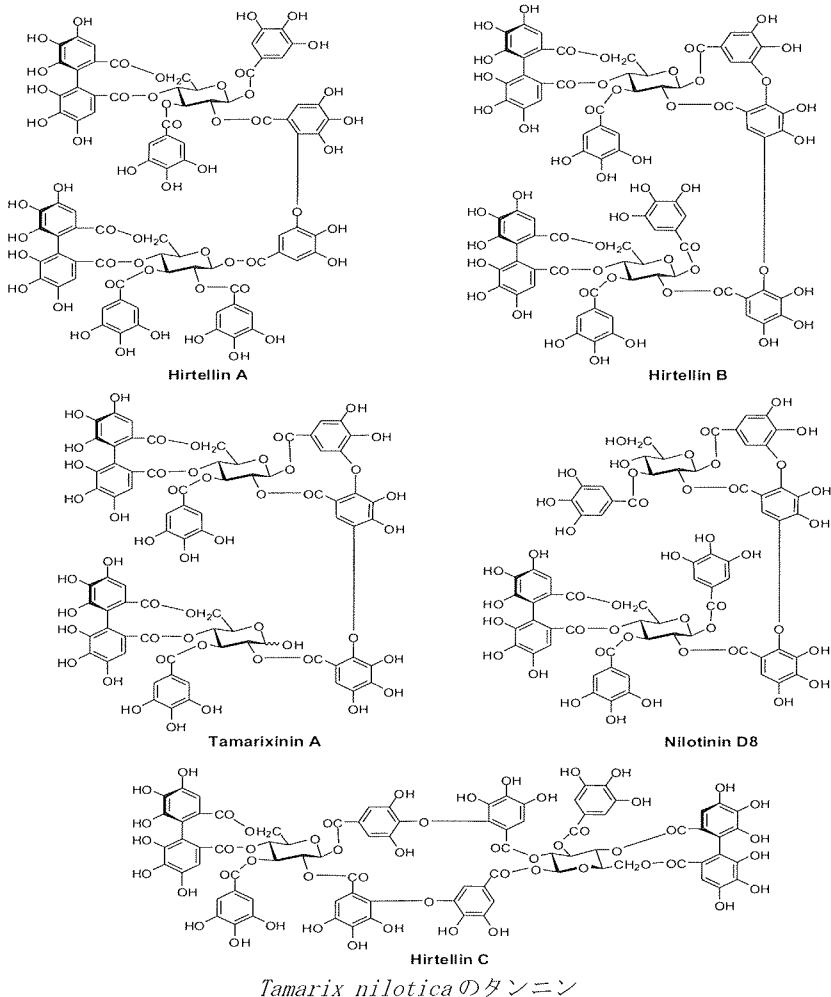
Uncaria gambir から見出したカテキン-インドール
ロイドハイブリッド化合物

2. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対するタンニンの作用

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、 β -ラクタム系抗生物質のみならず、多くの薬剤に対して耐性を有する多剤耐性菌であり、院内感染や日和見感染の主要な原因菌として大きな問題となっている。我々は、甘草のフラボノイドや、茶葉ポリフェノールおよびその変化産物、山椒の縮合型タンニンなどに MRSA に対する抗生物質の作用を回復させる作用を認めている。加水分解性タンニンについても corilagin や tellimagrandin I に MRSA の抗生物質耐性を回復させる作用が見いだされていることから、タンニンを多量含むフウ *Liquidambar formosana* の加水分解性タンニンの MRSA に対する抗生物質耐性抑制作用について検討を進めた。

その結果、フウから得た各種加水分解性タンニンのうち、MRSA に対して比較的強い抗菌活性を示した pentagalloylglucose および tellimagrandin II 等について、 β -ラクタム系薬剤の作用の回復を認めた。また、norfloxacin の MRSA に対する抗菌作用を増強することを認め、その機構について検討を進めた。MRSA の norfloxacin に対する耐性機構は、薬剤作用点の DNA gyrase および topoisomerase IV の変異によるものと、薬剤排出ポンプ (NorA) によるものが知られているが、pentagalloylglucose および tellimagrandin II はこれらの耐性機構よりもむしろ、細菌細胞膜に対する作用が大きく関与している可能性が示された。

現在、さらに多様な化合物群についても、類似の作用の検討を進めている。



【文献】

- 1) Okuda T., et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1982, 9.
- 2) Lugar P., et al., *Acta Crystallographica B*, 54, 687 (1998).
- 3) Hatano T., et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1990, 2735.
- 4) Miyamoto K., et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 99 (1993).
- 5) Orabi M. A. A., et al., *J. Nat. Prod.*, 73, 870 (2010).
- 6) Yoshikado N., et al., *Heterocycles*, 77, 793 (2009).

[講師プロフィール]

波多野 カ（はたの つとむ）
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

学歴：

昭和52年3月 静岡薬科大学卒業
昭和54年3月 岡山大学大学院薬学研究科修了
平成3年9月 学位取得[博士(薬学)]
(京都大学)

職歴：

昭和54年4月 岡山大学薬学部助手
平成5年6月 岡山大学薬学部助教授
平成7年9月 アメリカ合衆国農務省南部森林研
究所客員研究員(平成8年9月まで)
平成10年1月 放送大学岡山地域学習センター非
常勤講師(平成10年3月まで)

平成17年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究
科教授(現在に至る)

受賞：

平成 6年9月 日本生薬学会奨励賞
「生薬に含まれる活性酸素消去
作用成分の研究」

連絡先：

〒700-8530岡山市北区津島中1-1-1
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
TEL: 086-251-7936
E-mail: hatano@pharm.okayama-u.ac.jp

学生プレゼンテーション（研究室・研究内容紹介）

5-1 L6 筋管細胞におけるエネルギー代謝に及ぼす酢酸の影響

○田中あや(博士前期 1 年)、丸田ひとみ、我如古菜月、木本眞順美、辻英明、 高橋吉孝、
山下広美
岡山県立大学大学院・保健福祉学(栄養学)

【目的】

我々は、酢酸の抗肥満およびメタボリックシンドローム予防効果について検討してきており、酢酸を動物に投与すると、酢酸は速やかに血中に吸収された後、組織中に取り込まれ、AMP キナーゼ (AMPK) のリン酸化を促進すると報告してきた。AMPK は脂肪酸酸化や糖の取り込みの促進などさまざまなエネルギー代謝調節に関与するとされているが、AMPK の活性制御機構のメカニズムについてはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、その酢酸と AMPK 活性化との関連を検討することを目的として、L6 筋管細胞を用いて分化過程における AMPK および骨格筋分化に関連する MEF2A の発現動態、局在、ならびにそれらの活性化におよぼす酢酸の影響について検討を行った。

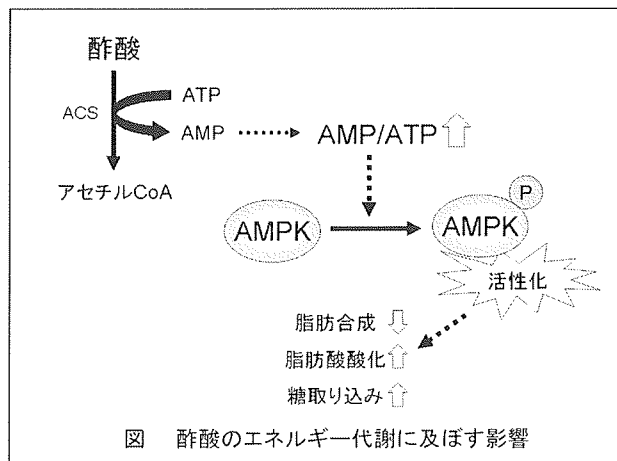
【方法】

L6 筋芽細胞を筋管細胞に分化誘導し、分化誘導後 11 日目まで培養した細胞を実験に用いた。L6 筋管細胞からタンパク質を抽出し、Western blotting にて AMPK および MEF2A のタンパク質発現量を測定した。また、分化誘導後 5 日目および 11 日目の細胞には、酢酸(最終濃度 500 μ M)を添加し、同様にそれらタンパク質発現量を測定した。タンパク質の細胞内局在の解析は、蛍光免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

【結果および考察】

L6 筋管細胞において、MEF2A およびリン酸化 AMPK の分化に伴う細胞内局在の変化をみると、分化が進行するにつれて核から細胞質へと移行していた。また、酢酸添加により MEF2A の細胞内局在が核内に移行することが観察された。分化レベルの違いによるそれらタンパク質の発現量に対する影響を調べると、MEF2A の発現量は分化に伴う変化が見られなかったが、分化が進むにつれてリン酸化 MEF2A レベルは有意に増加し、AMPK は発現量およびリン酸化レベル共、分化に伴い有意に増加していた。さらに、分化が進んだ細胞(分化誘導後 11 日目)に酢酸を添加することによって、AMPK および MEF2A のリン酸化の程度は増加していた。

このことから、分化が進行し MEF2A の局在が細胞質にある状態で酢酸を添加することにより、効率的に酢酸の作用を受けることが示唆された。



【研究室紹介】

—酢酸のエネルギー代謝に及ぼす影響—

主な研究拠点および指導教員

岡山県立大学大学院保健福祉学研究科・栄養学・山下広美教授

Tel&Fax : 0866-94-2150 E-mail : yamashit@fhw.oka-pu.ac.jp

当該研究室における研究の概要説明

我が国では、食の欧米化などの生活環境の変化に伴い、糖尿病などの生活習慣病、メタボリックシンドロームなどが深刻な社会問題となっている。それらを予防するには、肥満の予防・進行防止が不可欠である。

当研究室では、これまで生体における脂質代謝を中心としたエネルギー代謝に関する研究を行ってきており、酢酸は肝臓で脂肪酸代謝の過程で生成し、筋肉などの組織で生体燃料として利用されることを見出すと共に、肥満抑制、耐糖能改善効果があることを明らかにした。

現在、酢酸の機能性に注目し、酢酸のエネルギー代謝に及ぼす影響について動物や培養細胞を用いて研究を進めている。また、酢酸の持つ機能性を活かし、酢を効果的に摂取する目的でレシピの開発を行っている。

研究テーマ

- ・ 骨格筋におけるエネルギー代謝に及ぼす酢酸の影響
- ・ 脂肪細胞における脂肪滴肥大化抑制に関する研究
- ・ マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現に及ぼす酢酸の影響
- ・ 高週齢ラットと低週齢ラットの持久性運動と酢酸の影響
- ・ 高週齢ラットと低週齢ラットのエネルギー代謝に及ぼす酢酸の影響
- ・ 酢を使ったレシピ本の作成と出版に向けての基礎研究
- ・ 酸味抑制成分とその評価に関する研究

地域貢献（産学官連携の取り組み）

- ・ H19 年より「酢の機能性活用コンソーシアム」を立ち上げ、地域の業者と定期的に情報交換や勉強会を行っている。

5-2 既存添加物抽出原材料への放射線照射：殺菌効果、検知及び抽出効率

○高尾奈津子（修士課程2年生）、橋本香織、三宅教子、北島葉子、多田幹郎

中国学園大学大学院現代生活学研究科・人間栄養学科専攻

【目的】

天然添加物は、食材・食品から抽出・精製の工程を経て調製されるが、それらの原材料には多数の微生物が付着している。一方、天然添加物は、光、熱、酸素、酸、アルカリ等に不安定であるため穏やかな条件で抽出・調製される。したがって、最終製品への微生物の混入防止対策は困難であり、有効な非加熱殺菌方法として世界各国で実用化が進む放射線殺菌に期待が寄せられている。

本研究では、予め天然添加物調製原材料に放射線を照射して、殺菌効果の確認と光励起ルミネッセンス法（PSL法）による放射線照射の有無の判定の可否を調べ、2種類の色素抽出原材料について色素抽出効率への放射線照射の影響を調べた。

【試料及び方法】

天然添加物調製原材料：関連業界から入手した11種類（外国産10種類）[ベニバナ、コチニール、クチナシ、紫コーン、ペパーミント、レモングラス、烏龍茶、緑茶、紅茶、生姜、椎茸]を殺菌効果及び放射線照射の検知に関する実験に用いた。これらのうちベニバナ、コチニールは、色素抽出効率の測定に使用した。

放射線照射： ^{60}Co を線源として3、5、10、30 kGyの照射を行った。

微生物数測定：常法に準じて、試料をストマッカーで分離した後、標準寒天培地に菌液を塗布して37℃、24時間培養後のコロニー数を測定した。

PSL法による放射線照射の検知：試料中に混在するケイ酸系鉱物質は、放射線エネルギーを吸収して励起状態になり、これが光エネルギーを受けると光（蛍光：ルミネッセンス）を放射しながら安定化する。その蛍光を測定することを原理とする。本実験では、日本放射線エンジニアリング社製のES型を使用した。

色素抽出方法：食品添加物注解書記載の公定法に準じて、ベニバナ黄色素は常温水で、コチニール色素は、温水で抽出し、それぞれ、400 nm、490 nmにおける吸光度を求め、未照射試料との吸光度の比を%で表した。

【結果および考察】

本実験に用いた未照射の11種類の原材料のうち9種類からは微生物が検出されたが、2種（生姜、椎茸）からは残存微生物が検出されなかった。また、10種類についてはPSLシグナルが観察できなかったが、1種（生姜）からは明確なPSLシグナルが認められた。この結果から、生姜は放射線殺菌処理が施され、椎茸は、放射線以外の方法で殺菌処理が施されていることが示唆された。その後、全ての原材料にガンマー線を照射して残存微生物数を求めた結果、5 kGyの照射で殺菌できることを明らかにした。また、PSLシグナルを調べた結果、椎茸を含む10種類からは明確なシグナルが検出されたが、紫コーンからは検出されなかった。この結果は、紫コーンの試料中に鉱物質が混在していなかったためだと考えられる。

色素抽出原材料（ベニバナ、コチニール）に放射線照射を施すと、10 kGyまでは、線量に依存して色素抽出量が増大した。10 kGyの線量で、未照射と比べてベニバナ色素は約10%、コチニール色素は約15%増大することを認めた。しかし、30 kGyの照射試料では、未照射より減少したことから、色素の安定性と線量との関係性を調べることの必要性を感じた。

【研究室紹介】

—中国学園大学大学院現代生活学研究科人間栄養学科専攻—

《食品化学研究グループ（多田ゼミ）》紹介

主な研究拠点および指導教員

〔教員〕教授：多田幹郎、講師：田村理江、助教：北島葉子、助手：三宅教子

〔大学院修士課程生〕 2年生1名、1年生：1、研究生：1名

〔学部卒業研究生〕 4年生：5名

当該研究室における研究の概要説明

【テーマⅠ】食品照射に関する研究

平成17年に閣議決定された原子力政策大綱には、原子力エネルギー利用の推進と共に、放射線利用についても、「放射線利用は、国民生活の向上に大きく貢献しており、今後も発展することが望ましい」旨の記載があり、食品照射の法規制緩和を促す文章も記述されています。現在、この原子力政策大綱の見直し作業が行われていますが（10月中旬発表予定）、

その作業においても、食品照射の有用性が取り上げられており、わが国における食品照射の法規制緩和は近いと思われます。

“食品照射”と“照射食品”については、前回のシンポジウム要旨集の研究室紹介に記載されていますので詳しくは省略しますが、私達の研究成果が近い将来大きく役立つものと考えられ、以下の研究課題に取り組んでいます。

①照射食品の光励起ルミネッセンス（PSL）測定法による検知

現在、日本では照射食品の公定検知法として「熱ルミネッセンス（TL法）」と「アルキルシクロブタノン分析法」が定められていますが、これらの方法は煩雑であるため簡便な方法が求められています。これまでの私達の研究では、照射されたスパイスの検知にPSL法が有用であることを認め、さらに、他の食品への適用の可否を、残存微生物の増殖と組み合わせて研究しています。

②既存添加物（天然食品添加物）調製原材料への放射線照射による抽出効率の向上

原料ブドウに予め放射線を照射すると、ブドウ酒のアントシアニン含有量が增大することまた、テングサに放射線を照射すると寒天の収量が上がる、香辛料に放射線を照射すると芳香性が高まるなど、放射線照射は天然物からの有効成分の抽出効率を高めることが知られています。

私たちの研究室では、着色料として使用される天然色素の抽出原材料に予め放射線照射することによって、微生物汚染の低減と同時に、目的色素の抽出効率が高まることを期待して、数種の原材料を対象とした研究に取り組んでいます。

【テーマⅡ】食品着色料に関する食品学的研究

食品の色が味覚に大きく影響を及ぼすこと、食品の色は美味しさを決める重要な要素であることは古くから良く知られています。近年、様々な商品や新しい作物の登場により、日本人が持つ色のイメージが変化してきています。従って、味覚と色の関係も変化していることが予想されます。そこで、本学の学生を対象として、若者が持つ食品の色に対するイメージと色が味覚にどの程度影響を与えるかを官能検査によって調査しています。

5-3 ヤマブドウ果汁に含有される抗炎症成分の部分精製

○神谷 友規（博士前期2年生）¹、張 暁萌¹、有元 佐賀恵¹

¹ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】ポリフェノール類の中には抗炎症、抗発がん、抗酸化といった様々な作用を持つ物質が存在することが知られている。ヤマブドウ (*V. coignetiae*) には、多くのポリフェノール類が含まれており、当研究室では既にヤマブドウ果汁中の成分がマウスに誘導した炎症、皮膚発がんを抑制することを明らかにしている。そこで、本研究では、ヤマブドウ果汁に含まれる抗炎症活性を有する成分の単離、同定を目的とし、ヤマブドウ果汁中の抗炎症成分の精製を行った。

【方法】精製の方法は、まず 100% ヤマブドウ果汁をヘキサン、酢酸エチルの順で液液抽出し、活性が見られた抽出物を順相オープンカラム、さらに逆相オープンカラムを用いて精製し、その後、HPLC によって分離するといった工程で行った。抗炎症活性はマウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いて、LPS によって誘導した PGE_2 、NO 産生に対する抑制作用を指標とした。

【結果・考察】RAW264 細胞の培地にヤマブドウ成分を加え、1 時間培養後、LPS を加えて、誘導される PGE_2 と NO 産生を測定したところ、ヤマブドウ成分を加えない場合と比較して、産生抑制がみられた。ヘキサン、酢酸エチルにより液液抽出を行った結果、酢酸エチル抽出物に抗炎症活性がみられた。さらに、順相オープンカラムにより精製を行った結果、そのうち 1 つのフラクションに活性がみられ、それを逆相オープンカラムにより分離したところ、複数のフラクションにおいて PGE_2 もしくは NO、または両者の産生に対する抑制がみられた。このことから、ヤマブドウ果汁には複数の抗炎症性物質が含まれており、作用機序が異なるものも存在すると考えられる。

【研究室紹介】

主な研究拠点および指導教員

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）・分子毒性薬科学・有元佐賀恵准教授

研究テーマ

1. 新たな発がん抑制物質の発見、作用機構の研究
2. 発癌性物質と太陽光による遺伝子の傷を明らかにする
3. 農産物・食品の機能性を追及する

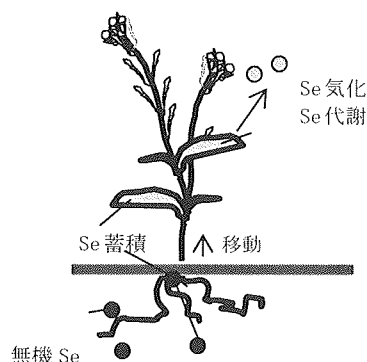
5-4 セレン耐性 *Arabidopsis thaliana* 変異体の解析

○大野美佐緒（博士後期2年生）¹、裏地美杉¹、中村宜督¹、森泉²、村田芳行¹
（¹岡山大学大学院自然科学研究科（農学系）、²岡山大学資源植物科学研究所）

【目的】

セレン（Se）は、ヒトを含む動物にとって微量必須元素の1つである。しかし、その過剰摂取は中毒を引き起こす。その毒性のために環境中のSe汚染が問題となっている。Seを除去する有効な方法の1つとして、Se耐性植物を利用したSe環境浄化が注目されている。この方法は環境に優しく、低コストで、広範囲にわたるSe汚染土壌からSeを除去することが可能であると考えられている。さらに、植物は無機セレンを代謝して無毒なジメチルセレニド（ Me_2Se ）という気体に変換して放出することができる。

本研究ではSe耐性シロイヌナズナ変異体 *sultr1;2* におけるSe耐性機構を解明し、更なるSe耐性植物を作出することを目的にした。



【方法】

◆ *sultr1;2* の Se 耐性の評価

sultr1;2（硫酸輸送体 SULTR1;2 ノックアウト変異体）とその野生株の種を 0~500 μM のセレン酸を添加した培地に播種し、25°Cで5日間培養した。培養後、シュートにクロロシスの起きた割合を調査した。

◆ *sultr1;2* の Se 蓄積能の評価

4~8週齢の *sultr1;2* とその野生株を 0、50、250 μM のセレン酸で5日間処理をした。その後、地上部を採取した。前処理後、地上部の亜セレン酸、セレン酸、有機セレン量を 2,3-Diaminonaphthalene を用いて決定した。

◆ Se 代謝関連遺伝子発現の調査

sultr1;2 とその野生株の種を 0、50、250 μM のセレン酸を添加した培地に播種し、25°Cで1週間培養した。地上部を採取し、RNAを抽出した。逆転写PCRを行いSe代謝関連遺伝子の発現量を調査した。

【結果および考察】

sultr1;2 は、その野生株よりもセレンに耐性を示した。それは遺伝子発現の結果から、セレン酸からジメチルセレニドへの代謝が促進された可能性が考えられた。

【研究室紹介】 —植物の生理学的機能の解明—

主な研究拠点および指導教員

岡山大学大学院自然科学研究科（農学系）・生物情報化学研究室・村田芳行教授

Tel: 086-251-8310, Fax: 086-251-8388, E-mail: muta@cc.okayama-u.ac.jp,

当研究室における研究の概要説明

植物ホルモンシグナリングと植物の環境ストレス耐性機構について研究を行なっている。

1. 植物ホルモンのシグナリングに関する研究

植物体内で生産され、微量で重要な生理作用を有する生長調節物質である植物ホルモンの受容から反応に至るまでの一連の過程の解明を行っている。特に、植物の乾燥ストレス応答に深く関与するアブシジン酸が誘導する気孔閉口の機構の解明を中心に研究を行っている。

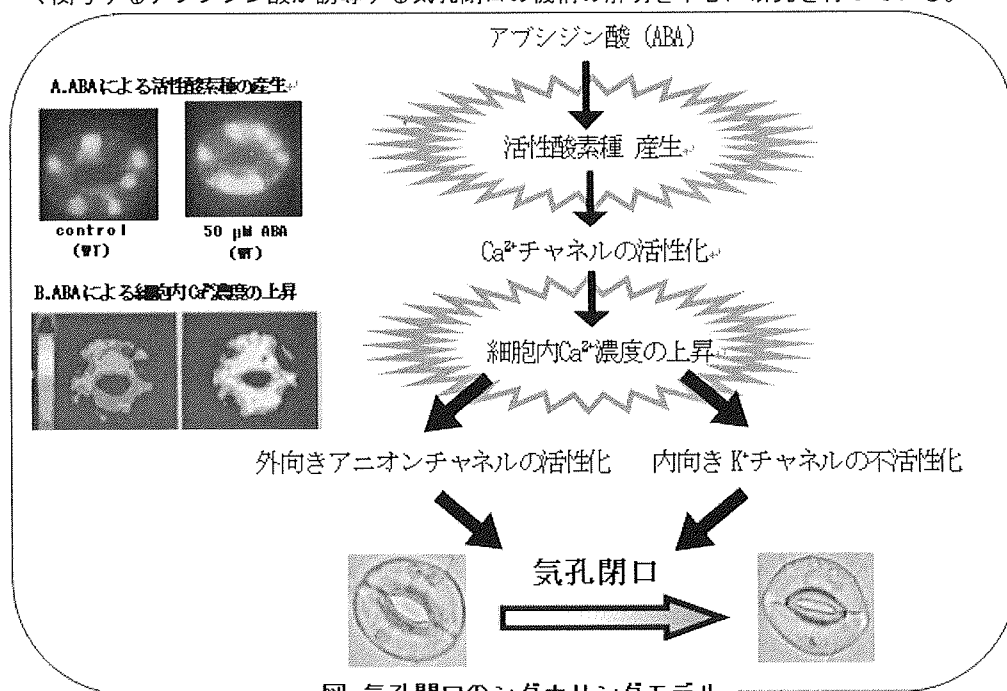


図 気孔閉口のシグナリングモデル

2. 植物の環境ストレス耐性機構の解明

植物は自ら移動することができず、その生育環境を受け入れ、応答し、生育している。しかし、生育環境の変化が極めて大きい場合には、それがストレスとなる。このような環境ストレスの中で、特に、乾燥ストレスと塩ストレスに対する耐性機構の解明することで、ストレス耐性を向上させる方法、またはストレスを軽減させる方法の開発を目指している。

また、重金属ストレス耐性の解明のため、植物に対して毒性をもつ、セレンに対する耐性機構の研究を行っており、最終的にはセレン耐性植物を作出し、植物による環境浄化に役立てることを目指している。

おかやまバイオアクティブ研究会 第38回シンポジウム

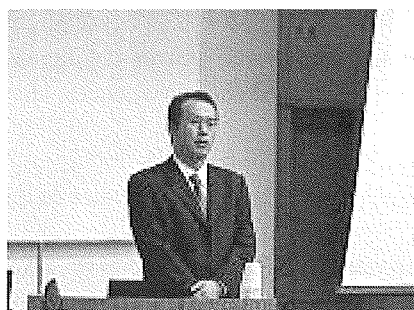
会長挨拶



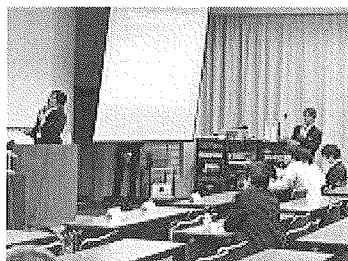
会場風景



講演風景



学生プレゼンテーション



Bioactive Okayama 2010
International Conference on Biologically Active Substances
Okayama Prefectural University
August 11-12, 2010

Program

(Wednesday, August 11)

- 8:20- Registration
- 9:15-9:25 Opening Address
 Hideaki Tsuji
 Organizer of Bioactive Okayama 2010
 Okayama Prefectural University, Japan
- 9:30-12:00 Oral Session 1
- 9:30-9:45 O1-1 Mitsuo Fukushima, Okayama Prefectural University, Japan
 Ethnic differences of factors responsible for elevation of blood glucose
 levels; in view of insulin secretory defect and insulin resistance
- 9:45-10:00 O1-2 Toshiko Suzuki-Yamamoto, Okayama Prefectural University, Japan
 Immunohistochemical study of PGF_{2α} autocrine pathway in the rat
 cerebellum
- 10:00-10:15 O1-3 Kazunori Takemoto, Okayama University of Science, Japan
 Low catalase activity is higher incidence of diabetes
- 10:15-10:30 O1-4 Makiko Suzuki, Okayama Prefectural University, Japan
 Effect of lipocalin-type prostaglandin D synthase on egg allergy
 development
- 10:30-10:45 Coffee Break
- 10:45-11:00 O1-5 Yuki Kawakami, Okayama Prefectural University, Japan
 Functional expression and site-directed mutagenesis of single-chain
 antibody to leukotriene C₄
- 11:00-11:15 O1-6 Eiji Okuma, Okayama University, Japan
 Role of glutathione in ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*
 Thailana
- 11:15-11:30 O1-7 Kenji Oda, Research Institute for Biological Sciences Okayama, Japan
 Negative regulation of anthocyanin biosynthesis with an F-box protein in
 Arabidopsis
- 11:30-11:45 O1-8 Mohammad Anwar Hossain, Okayama University, Japan
 Roles of protein phosphorylation and dephosphorylation on MeJA-
 induced cytosolic Ca²⁺ oscillations in *Arabidopsis* guard cells
- 11:45-12:00 O1-9 Ikuko Minami, Okayama University, Japan
 Effect of γ-irradiation on stability of lipid constituents of soybean
- 12:00-13:30 Lunch Break

- 13:30-17:00 Symposium: The Sixth International Symposium on Food and Nutrition
Research in East Asia and the Surrounds
- 13:30-13:45 S-1: Keynote Lecture
Mingyong Xie, Nanchang University, China
Study on structure and immune bioactivity of polysaccharides from nature products
- 13:45-14:00 S-2 Ming Li, Sichuan University, China
Case-control Studies on the copper nutritional status in premature neonates
- 14:00-14:15 S-3 Kazuko Kobayashi, Okayama University Graduate School of Medicine
Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Japan
Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb 'Saijo') peel improved dyslipidemia and its related production of atherogenic autoantigen complexes in low-density lipoprotein receptor-deficient mice
- 14:15-14:30 S-4 Gyu-Hee Lee, Woosong University, Korea
Production of spherical granules of micronized saltwort (*Salicornia herbacea*) powder with good solubility and fluency using a fluidized bed coater
- 14:30-14:45 S-5 Ding Zhi Fang, Sichuan University, China
Studies on a novel gene associated with metabolic syndrome
- 14:45-15:00 S-6 Nhunpong Daechacupt, Mae Fah Luang University, Thailand
Bioactive sericin production and its biological activities
- 15:00-15:15 Coffee Break
- 15:15-15:30 S-7 Hongbing Chen, Nanchang University, China
Phage display approach to define epitopes on buffalo beta-lactoglobulin
- 15:30-15:45 S-8 Zheng-yun Wu, Sichuan University, China
A newly isolated heterotrophic green microalga rich in lutein and neoxanthin
- 15:45-16:00 S-9 Kohei Kuroda, Okayama University of Science, Japan
Rapid determination method of nicotianamine using amino acid analyzer
- 16:00-16:15 S-10 Ki-Hong Yoon, Woosong University, Korea
Genomic Analysis for Carbohydrolytic Enzymes of *Paenibacillus woosongensis*
- 16:15-16:30 S-11 Md. Anowar Hossain, Okayama University, Japan
Molecular characterization of two glycoenzymes involved in the N-glycoprotein degradation during tomato fruit ripening
- 16:30-16:45 S-12 Md. Atiqur Rahman Khokon, Okayama University, Japan
Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*
- 17:00-17:15 Coffee Break
- 17:15-18:15 Plenary Lecture
Jian Feng Ma, Okayama University, Japan
Control of plant mineral transport for food quality and safety
- 18:30-20:30 Get-Together
2nd Floor of Student's Hall

(Thursday, August 12)

9:00-11:30 Oral Session 2

- 9:00-9:15 O2-1 Tom Takahashi, Okayama Prefectural University, Japan
Inhalation of carbon monoxide at low concentration ameliorates hemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats
- 9:15-9:30 O2-2 Miyuki Yokoro, Okayama Prefectural University, Japan
Catalase is a major protein target of methylation with PRMT1 in erythrocytes
- 9:30-9:45 O2-3 Aya Tanaka, Okayama Prefectural University, Japan
Effects of acetate on energy metabolism in L6 myotube cells
- 9:45-10:00 O2-4 Kazue Nakata, Okayama Prefectural University, Japan
Anti-stress effect by innate immunity activation
- 10:00-10:15 O2-5 Ping Tong, Nanchang University, China
Effect of heat treatment on the allergenicity and conformation of egg allergen ovomucoid
- 10:15-10:30 **Coffee Break**
- 10:30-10:45 O2-6 Natsuki Ganeko, Okayama Prefectural University, Japan
Evaluation of sour taste in grapefruit vinegar
- 10:45-11:00 O2-7 Mai Yamamoto, Okayama Prefectural University, Japan
Vaccination with an attenuated *Vibrio vulnificus* strains protects mice against infection
- 11:00-11:15 O2-8 Long-sheng Chen, Anhui Academy of Science and Technology, China
GC-MS analysis of volatile compounds in different parts of *Polygonatum Sibiricum*
- 11:15-11:30 O2-9 Bisong Yue, Sichuan University, China
Conservation of the giant panda *Ailuropoda melanoleuca* in China: successes and challenges

11:30-11:45 Coffee Break

11:45-13:35 Poster Session (We offer light refreshments)

- 11:45-11:50 P-1 Huan Li, Okayama Prefectural University, Japan
Study on the close relations between the consumption of rice and food culture in Japan
- 11:50-11:55 P-2 Mayumi Tabuchi, Okayama Prefectural University, Japan
Serum cytokeratin 18 level and its correlation with nutritional parameters in middle-aged Japanese males with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)
- 11:55-12:00 P-3 Zaki Utama, Hiroshima University, Japan
Beneficial effects of consumption of tempe on intestinal environment and functions of rats fed a high-fat diet
- 12:00-12:05 P-4 Nana Fujii, Okayama University, Japan
Urinary excretion of polyphenols and radical scavenging activity of urine from rats fed juice of yamabudo-grape (*V. coignetiae*)

- 12:05-12:10 P-5 Chihiro Iwasa, Kochi Women's University, Japan
Effect of pre-germinated brown rice derived steryl-glucoside on high-fat-fed mice
- 12:10-12:15 P-6 Michiko Fujikura, Okayama Prefectural University, Japan
Anti-allergic effects of the germinated grape seeds extract
- 12:15-12:20 P-7 Hiroyuki Sumi, Kurashiki University of Science and the Art, Japan
A new potency assay method of nattokinase by international unit
- 12:20-12:25 P-8 Hiroyuki Sumi, Kurashiki University of Science and the Arts, Japan
A functional food tempeh: anti-platelet aggregation activity observed in the first distillation fraction of tempeh
- 12:25-12:30 P-9 Yuka Takasuka, Okayama Prefectural University, Japan
Characterization of polyphenol compounds in *Polygonum cuspidatum*
- 12:30-12:35 P-10 Maya Matsuda, Okayama University of Science, Japan
Antioxidant activity of flavonoids
- 12:35-12:40 P-11 Mi-Kyung Kirn, Woo-Song University, Korea
Optimization for muffin added with dried burdock powder and oligosaccharide using response surface methodology
- 12:40-12:45 P-12 Shota Nonaka, FANCL Corporation, Japan
Effects of pre-germinated brown rice-derived steryl glycosides (PSG) on senescence-accelerated mice (SAMP8)
- 12:45-12:50 P-13 Yuya Kumagai, Research Institute for Biological Sciences Okayama, Japan
Characterization of Ca²⁺ sensitive region of *Streptomyces* mannanase
- 12:50-12:55 P-14 Kenjiro Nagaoka, Okayama University, Japan
N-glycosylation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 affects its enzymatic functions
- 12:55-13:00 P-15 Takahiro Ohara, Okayama University of Science, Japan
The biotransformation of the biological active compounds using plant cultured cells
- 13:00-13:05 P-16 Nasima Akter, Okayama University, Japan
Glutathione involves in methyljasmonate signaling in *Arabidopsis* guard cells
- 13:05-13:10 P-17 Rayhanur Jannat, Okayama University, Japan
Roles of hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells
- 13:10-13:15 P-18 Hang Qi, Okayama University, Japan
Hydrogen peroxide-dependent photocytotoxicity by Phloxine B in human leukemia cells
- 13:15-13:20 P-19 Takae Hanada, Okayama Prefectural University, Japan
RNA interference of prostaglandin E synthase induces anti-tumor effect in human A549 non-small cell lung cancer cells
- 13:20-13:25 P-20 Chie Imura and Ryoko Nakajima, Okayama Prefectural University, Japan
Colocalization of membrane-associated prostaglandin E synthase-2 and prostaglandin E₁ receptor EP in the cerebellum

- 13:25-13:30 P-21 Tomoko Morinaka, Okayama Prefectural University, Japan
Identification of leukocyte-type 12-lipoxygenase inhibitor in guava leaf extract
- 13:30-13:35 P-22 Wattana Sriphannam, Chiang Mai University, Thailand
 β -galactosidase from probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CM33 and molecular study
- 13:35-14:35 Poster Tour
- 14:35- Closing Address (Awards and Remarks)

PL- Control of plant mineral transport for food quality and safety

Jian Feng Ma

Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Chuo 2-20-1, Kurashiki, Japan. E-mail: maj@rib.okayama-u.ac.jp

Both plants and human beings require essential minerals for their healthy growth although the amount and kind of minerals differ between plants and human. Our mineral intake mainly originates from plants (foods), which take up minerals by the roots from soils. On the other hand, plants also take up toxic metals, which affect human health through food chain. Therefore, control mineral transport from soils to plants is an important issue for food quality and safety. In this symposium, I will talk about how plants take up essential, beneficial and toxic minerals, focusing on Fe, Si, Cd and As. Iron (Fe) is an essential element for plants and transporters required for its primary uptake and translocation from the roots to the shoots have been identified in barley and rice, respectively (1-2). Transporters for the uptake and distribution of Si, the most abundant mineral in the earth's crust, have also been identified in different plant species (3-6). Silicon is an essential element for human beings, which is required for the normal bone formation. It also has various beneficial effects for plants by alleviating biotic and abiotic stresses. On the other hand, transporters for the uptake of toxic As and Cd have been identified in rice (7-8). Discussion on how to enrich essential minerals and how to reduce toxic metals in the foods will be made.

References

- (1) Murata, K., Ma, J. F., Yamaji, N., Ueno, D., Nonoto, K. and Iwashita, T. 2006. A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J* 46: 563-572.
- (2) Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N. and Ma, J. F. 2009. OsFRL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol* 149: 207-205.
- (3) Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. and Yano, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.
- (4) Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M. and Yano, M. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209-211.
- (5) Yamaji, N., Mitani, N. and Ma, J. F. 2008. A Transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *Plant Cell* 20: 1381-1389.
- (6) Yamaji, N. and Ma, J. F. 2009. A transporter at the node responsible for inter-vascular transfer of silicon in rice. *Plant Cell* 21:2878-2883.
- (7) Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X. Y., Su, Y. H., McGrath, S. and Zhao, F. J. 2008. Transporters of arsenic in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS* 105: 9931-9935.
- (8) Ueno, D., Koyama, E., Kono, I., Ando, T., Yano, M. and Ma, J. F. 2009. Identification of a novel major quantitative trait locus controlling distribution of Cd between roots and shoots in rice. *Plant Cell Physiol* 50:2223-2233.

S-2. Case-control studies on the copper nutritional status in premature neonates

Ming Li¹, Chengyu Huang¹, Xinghui Liu², Yuan Liu³, Ge Gao⁴, Xiaocheng Nie⁵, and Yuan Yang⁶

¹Department of Nutrition and Food Safety, West China Public Health School, Sichuan University, Chengdu, China. ²West China Women's & Children Hospital, Chengdu Municipal Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, China. ³Sichuan Maternity and Children Health Institute, Chengdu, China. E-mail: lilian@126.com

1. Objectives

The study is designed to evaluate the nutritional status of copper in preterm infants and their mothers, explore reliable, sensitive and specific indices for evaluating eupreure nutritional status of pregnant women and neonates

2. Methods

2.1 Dietary survey: The food frequency and intake, especially the foods rich in copper which include potato and grains, liver, sea foods, beans, mushrooms and algae and nuts, half a year before and during this gestation were investigated by food frequency method. Calculate the copper and relative nutrients intakes by China Food Composition 2002 edition

2.2 Establish the methods to determine the mineral levels in biological sample by means of axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).

2.3 Determine the copper levels in the maternal and the cord plasma, placenta, breast milk, meconium, and amniotic fluid by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).

2.4 Analyze the activities of erythrocyte Cu/Zn-SOD, plasma CP and ENZ/RID Cp in both the maternal and the neonatal plasma.

3. Results

(1) The intakes of foods rich in copper consumed by preterm mothers are less than those by full-term mothers half a year before and during pregnancy. Among the foods, grains, sea foods, mushroom and algae makes are significantly less during pregnancy than those of full-term mothers ($P<0.05$).

(2) The copper nutritional status in both preterm infants and their mothers are worse than those of full-term ($P<0.05$). And the smaller gestation age is both the preterm neonates and their mothers, the worse is their copper nutritional status.

(3) ENZ/RID Cp is the sensitive, specific and effective biological index to evaluate copper nutritional status in pregnant women and neonates. The activities of CP are also another sensitive, specific and effective biological index to evaluate copper nutritional status of neonates

4. Conclusions

It is the first time to integrating copper levels of several biological samples and cuprum enzymes to evaluate the copper nutritional status for both neonates and mothers. And the results indicate that the copper nutritional status of preterm neonates and their mothers are significantly lower than that of full-term neonates and their mothers.

S-1. Study on structure and immune bioactivity of polysaccharides from natural products

Danfei Huang, Shaoping Nie, and Mungyong Xie

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, 330047, PR China. E-mail: mynie@ncu.edu.cn

Polysaccharides are a class of biomacromolecules that are relatively widespread occurrence in nature and possess antitumor, antiinflammatory, antimicrobial, antiviral, antipain, and immunomodulatory activities and are being employed for the treatment of hepatitis, AIDS, cancer and many other diseases. The most promising biopharmaceutical activities of polysaccharides are their immunomodulatory and antitumor effects. So far, more than 300 kinds of polysaccharides were isolated from natural products. Among these, water-soluble polysaccharides isolated from traditional Chinese medicine plants are most important. It has been proved that they closely relate with infection, cancer, inflammation, and some autoimmune diseases. Furthermore, because they have no cytotoxicity and come from a wide variety of sources, plant polysaccharides received widespread attention from the whole world. The enormous potential variability in polysaccharide structure offers the highest capacity for carrying biological information. Herein, the relationships between the structures and biological activities are recently getting an increase of attention in the world. In this review, specific examples of polysaccharide with immunomodulatory activities will be briefly discussed.

A polysaccharide (PLP) was isolated from the seeds of *Plantago asiatica* L. by using the AKTA purifier 100 system combined with gel permeation chromatography (GPC). Its purity and molecular weight (Mw) were determined by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). GC-MS was used to determine the monosaccharides composition. The results showed that the PLP was homogenous. The molecular weight (Mw) was found to be 1849268 Da. Rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose were found in PLP with the mol ratios of 0.05:1.00:1.00:0.05:0.06:0.10.

In order to illustrate the possible immunomodulatory mechanism of PLP, a model of studying immunological activity of phytochemicals by using dendritic cells (DCs) as the target cells was established. Based on the preliminary results, the effects of PLP were studied on the differentiation, development, maturation, and immigration of DCs. The effect of PLP on cytotoxicity of specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) induced by DCs was also studied. By using mixed lymphocyte reaction (MLR) method combined other methods, it was found that PLP could improve the proliferation of T cell and enhance the specific cytotoxicity activity of CTL by improving the expression of adhesion and co-stimulating molecules on the surface of DCs and secretion of Th1 related cytokines. By elevating the expression level of CCRT on DCs, it was proved that PLP could enhance the migration of DCs. These results showed that PLP had significant immunoenhancing activity by inducing the maturation of DCs.

Recently, the biological activities of polysaccharides complexes derived from natural products have received much attention in the field of biomedical sciences. However, the lack of defined structural and mechanistic information has limited us to study their potential for clinical use. Therefore, future studies should focus on investigation of the relationship between their structure and biological activities, elucidation of their immunomodulatory mechanisms at the cellular and molecular levels, and improvement of their biological activities by chemical modifications.

S-3. Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb 'Saijo') peel improved dyslipidemia and its related production of atherogenic autotagentic complexes in low-density lipoprotein receptor-deficient mice

Kazuko Kobayashi¹, Nanhui Quai^{1,2}, Yukana Matsunami¹, Masahiro Ide¹, Marina Makarova¹, Lienhua Shen^{1,4}, Shoichi Ohno¹, Yang, Zheng¹, Haruo Kobayashi¹, and Eiji Matsura¹

¹Departments of ¹Cell Chemistry and ²Biotechnology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan. ³Cardiovascular Center, First Hospital, Jilin University (Changchun 130021), China. ⁴Department of Pathology, IM, Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, Russia. ⁵Okayama Agricultural Development Institute, Akaoka, 709-0801, Okayama. ⁶Regional Cooperative Research Organization, Okayama Prefectural University, Soga, Okayama 719-1197, Japan. E-mail: kazuko.ohs@md.okayama-u.ac.jp

Roles of persimmon (*Diospyros kaki*, Thunb 'Saijo') peel were investigated on developing atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice in view of lipid metabolism, physio-biological oxidation, production of its related atherogenic autotagentic, and anti-atherogenic natural antibody production.

Male LDLR-deficient mice fed a high fat diet or a high fat diet supplemented with 10% dried and powdered persimmon peel (PP) for 12 weeks. The PP supplementation significantly reduced the increment of plasma cholesterol and triglyceride levels. The high fat diet feeding increased plasma level of oxidized LDL/β₂-glycoprotein I (oxLDL/β₂GPI) complexes as an atherogenic autotagentic, while the PP supplementation significantly reduced the increment ($p<0.05$). After the 12-week feeding, atherosclerotic plaque in the mice fed the diet supplemented with PP decreased by 70% as compared to that in mice fed the high fat diet ($p<0.005$). The PP feeding also reduced urinary 11-dehydrothromboxane B₂, a stable metabolite of platelet activation marker (thromboxane A₂), but IgM level of anti-oxLDL antibodies was not changed.

These results demonstrate that persimmon peel may have an anti-atherogenic property through normalization of lipid metabolism and reduced production of the atherogenic antigen complexes.

S-4. Production of spherical granules of micronized saltwort (*Salicornia herbacea*) powder with Good solubility and fluency using a fluidized bed coater

Gyu-Hee Lee*, and Myung-Gon Shin

Department of Food Science and Biotechnology, Woosung University 17-2, Jayang-dong Donggu, Daegu 710-718, Korea *E-mail: gyuhlee@hanmail.net

This research was performed to develop the saltwort powder granule for increasing fluency and applications scope of saltwort. Saltwort has some healthy effect such as smooth bowing effect, prevention of blood hypertension and diabetes and strengthens the stomach activity; therefore, it has been used as healthy functional food. Recently, the application trends of healthy food are that they use the whole healthy functional food. Therefore, in this study, the whole saltwort was used for making saltwort powder granule.

The dried whole saltwort was pulverized to 15, 27, 46, and 100 µm by using air classify-miller. Then, the sensory characteristics of the 4 pulverized saltwort powders were evaluated by using quantitative descriptive analysis (QDASM). As sensory analysis result, panelist could not feel the rough texture at 15 and 27 µm. Therefore, 27 µm saltwort powder was selected for further study because the energy for making 15 µm particle size need more than those for 27 µm. After choice the particle size, saltwort powder was dispersed into water contained with 0, 5, 10 and 15 % soluble solid contents of saltwort aqueous extract, respectively. The dispersed solution with saltwort powder and various saltwort extract soluble solid were dried and coated in fluid bed coater for making saltwort powder granule. Then the four saltwort powder granules were analyzed the granule fluency, water solubility and sensory characteristics.

The saltwort granule made of saltwort powder and 10% saltwort extract soluble solid was represented the adequate granule fluency and solubility and the most consumer acceptance. Therefore, the methods to make the saltwort powder granule by using 10% saltwort extract soluble solid were selected for further study. Then, the response surface methodology (RSM) was applied to optimize for making the saltwort powder granule with the most granule fluency and consumer acceptance by using pilot scale fluid bed coater. In RSM design, the factors were flow rate (FR, mL/min), atomization pressure (AP, kPa) and product temperature (PT, °C) and the optimizing condition were decided by using yield. After analysis of RSM, the predicted yield was 85.4% at the optimizing condition when FR, AP and PT were 0.69mL/min, 264.14 kPa, and 70°C, respectively. Finally, the saltwort powder granules were made by using industrial fluid bed coater (50kg capacity) based on optimized pilot scale condition. After operating, the total yield of saltwort powder granule was 96%, the yield of 0.2-0.6 mm saltwort granule was 84%. The relative saltiness compare to NaCl was 0.39, the consumer acceptance of saltwort granule was 6.4, which means good acceptance.

In conclusion, the pulverized whole saltwort can make the granule with only saltwort aqueous extract without any additives by using fluid bed coater. The saltwort powder granule will be used as the basic materials of healthy food and salt substitute with excellent fluency and solubility.

S-6. Bioactive sericin production and its biological activities

Nhunpong Daecheaput¹*, Kittirat Saharat¹ Anongnat Guising¹, Sirirung Wongsakul¹, and Teerawit Waratnujwong²

¹School of Science, Mae Fah Luang University, 57100 Chiang Rai, Thailand and ²School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University, 57100 Chiang Rai, Thailand *E-mail: tee_teerawit@yahoo.com

Nowadays, batch degumming of silk is mostly carried out in alkaline condition containing with sodium carbonate and Alkapon[®] soap by boiling at 95°C for 45 min that cause various effects to sericin protein such as dispersion, insoluble form and chemical contamination. From these problems, Thai Silk's industry (*Chul Thai Silk Co., Ltd.*) would like to find out new degumming process for improving the quality of sericin protein as by-product from wastewater and reused in many applications. Our bioactive sericin compound (sericin hydrolysate) was produced by using electrolyzed alkaline water process with proteolytic enzyme (Trypsin). The optimal hydrolysis conditions (pH of 11.2, temperature of 50 °C and the enzyme/substrate ratio of 1:100) were estimated by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and zymogram analysis with molecular weight lower than 20 kDa.

Furthermore, bioactive sericin was tested the biological activities in the area of antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammation. Bioactive sericin exhibited excellent antioxidant activities in three measurements, including the reducing power, the ferrous ion-chelating activity and the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) scavenging assay. The results also showed that bioactive sericin had potent to inhibit tyrosinase activity when 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) was used as a substrate. Finally, the macrophage cell line RAW 264.7 was used for testing the efficiency of bioactive sericin as anti-inflammation agent by monitoring cell viability and level of nitric oxide. The pre-result suggested that this compound might be significantly to inflammation-preventive activities.

This study showed a potential of bioactive sericin, which may be used as valuable ingredients in the food supplement or in the pharmaceutical and medical industries.

Keywords: bioactive sericin, electrolyzed alkaline water, protease enzyme (Trypsin), antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammation

S-5. Studies on a novel gene associated with metabolic syndrome

Ding Zhi Fang*, Yong Liao, Xiao Yan Cui, and Jinxin Chen

Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China *E-mail: dzfang@scu.edu.cn

Identification and characterization of novel genes involved in derangement of metabolisms of glucose and triglycerides are important in understanding the development of metabolic syndrome (MS) and atherosclerosis. Model rats with certain phenotypes of MS were introduced by a high-carbohydrate diet. The rat hepatic subtracted cDNA libraries were constructed and screened. A novel cDNA of full length was identified by screening of a human hepatic cDNA library with a mixture as probes of the differentially expressed fragments from the rat hepatic subtracted cDNA libraries. The corresponding gene of the cDNA was temporarily named metabolic syndrome-associated gene (*MSAG*). The predicted protein encoded by *MSAG* contains 110 amino acids and has a theoretical molecular weight of 11667.04 and an isoelectric point of 4.91. The mRNA level of *MSAG* in HepG2 cells, a human hepatoma cell line, was significantly increased by glucose and decreased by insulin concentrations higher than physiological levels. Immunofluorescent analyses with specific antibody to the protein (*MSAG*) showed *MSAG* was located mainly in cell nucleus and existed weakly in plasma membranes and cytoplasm. The level of *MSAG* in nucleus was significantly elevated when incubated with the increasing glucose concentrations, whereas no obvious changes were observed in plasma membranes and cytoplasm. RT-PCR assays revealed that *MSAG* was expressed mainly in liver, muscle, heart and pancreas in C57BL/6J adult mouse.

A cell line being transfected with *MSAG* cDNA sequence and having the stable overexpression of *MSAG* was established, and incubated with different glucose concentrations at 5.5 mmol/L, 11 mmol/L, 22 mmol/L, and 33 mmol/L. The glucose uptake was significantly decreased in the *MSAG* transfected cells compared with that in control cells ($p < 0.05$) when incubated with a glucose concentration 55 mmol/L.

The mRNA levels of some genes related to glucose metabolism including the *glucokinase* (*GK*), *glucokinase regulatory protein* (*GKRP*), *glycogen synthase 2* (*GS2*), *liver glycogen phosphorylase* (*GPL*) and *glycogen synthase kinase 3 beta* (*GSK-3β*) were measured by RT-PCR. The results showed that the mRNA levels of *GKRP* and *GS2* were significantly up-regulated and down-regulated respectively in *MSAG* over expression cells compared with those the control cells ($p < 0.05$).

These results suggest that *MSAG* may be involved in the metabolism and/or its regulation of glucose, especially under non-physiological conditions, and further in the development of metabolic syndrome. *MSAG* can regulate the glucose metabolism possibly through altering the activity of glucokinase regulatory protein and glycogen synthase 2.

S-7. Phage display approach to define epitopes on buffalo beta-lactoglobulin

Huangbing Chen^{1,2}, Xin Li^{1,2}, Ping Tong^{1,2}, and Fahui Liu^{1,2}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, P. R. China; ²Jiangxi-DAL Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, P. R. China *E-mail: chbgy@163.com

Beta-lactoglobulin belongs to lipocalin protein family, which is recognized as the most allergenic protein, and it is absent in breast milk. Moreover, bovine β-lactoglobulin has been proved to be one of the most offending proteins in milk allergy, and cross-reactivity is existed between bovine β-lactoglobulin and buffalo β-lactoglobulin. All the previous studies implied that buffalo milk is also one of the allergic food, and a clear defining of IgG/ IgE binding epitopes on buffalo β-lactoglobulin would help to understand the mechanism in buffalo milk allergy.

To define rabbits IgG binding epitopes on buffalo β-lactoglobulin, a high throughput screening and epitope mapping approach was developed on the basis of phage display technology. Six mimic epitope regions, including AA14-20, AA26-32, AA36-42, AA70-80, AA82-86 and AA149-156 on buffalo β-lactoglobulin were obtained by the panning of phage display peptide library with specific rabbit sera against buffalo β-lactoglobulin, and eight rabbit IgG binding epitopes were further identified using SPOTTM peptide arrays. The eight epitopes were located in the position of AA21-30, AA25-34, AA29-38, AA73-82, AA77-86, AA87-96, AA134-143, AA150-159 on buffalo β-lactoglobulin, respectively, and two of them, AA134-143 and AA150-159, were found not to be reported on bovine β-lactoglobulin. Additionally, two set of amino acids including Ser-Pro-Leu-Thr-Glu-Asn-Lys and Pro-Leu-Asn-Glu-Asn-Lys-Asp, corresponding to the amino acids residues of conformational mimotope on buffalo β-lactoglobulin, were defined by the panning of disulfide constrained phage display peptide library with specific rabbit sera against buffalo β-lactoglobulin. Based on the analysis of these amino acids with the web tool of MIMOX, a total of six of conformational mimotopes were defined.

Phage display technique was successfully introduced into the epitope mapping of buffalo β-lactoglobulin, and it may be also useful for other milk allergens.

S-8. A newly isolated heterotrophic green microalga rich in lutein and neoxanthin

Zheng-yun Wu¹, Wen-xue Zhang¹, Juan Zeng¹, Yue Jiang², and Jian-min Jin²

¹Department of Food Engineering, College of Light Industry & Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; ²Department of Biology and Kwong Living Trust Food Safety & Analysis Laboratory, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong; E-mail: wzy5607@sina.com

Microalga is a potential resource of functional food. Besides growing autotrophically by fixing carbon dioxide under illumination, some microalga can also be cultivated heterotrophically with high cell density and productivity, which is especially meaningful for industrial mass production. In recent years, producing carotenoids by microalga received increasing attention. Among the different carotenoids, lutein is an important carotenoid accumulating in macula area and was reported to be able to reduce the risk for age-related macular degeneration and cataracts; neoxanthin is generally regarded as a minor carotenoid in alga and plant, but a recent research shows it had more significant suppressive effects on adipocyte differentiation compared with many other carotenoids.

Although considerable achievement has been gained in production of some carotenoids such as beta-carotene and astaxanthin, there is still very limited progress in elevating the cellular contents of some primary carotenoids like lutein. Further progress may require isolating, breeding or constructing high capacity strains.

In this research, we isolated a heterotrophic unicellular green alga from Fuman River Chengdu, China by streak plate method combined with bacteria and mould inhibitors. Amplification and sequencing of 18S rDNA shows that the isolated small subunit rRNA sequence was 98-99% identities to *Scenedesmus* sp. The strain was thus identified as belonging to the genus *Scenedesmus* and was designated *Scenedesmus* SCU01.

Heterotrophic cultivation results show that the alga not only displayed a high growth rate (0.04 h⁻¹) but also was rich in lutein and neoxanthin (both attained about 4 mg/g dry cell). The effects on cell growth and cellular contents of lutein and neoxanthin by several important operation parameters were then investigated by flask cultivations. It was found that higher glucose concentration resulted in higher biomass concentration, while the cell contents of both lutein and neoxanthin were almost unaffected; insufficient nitrogen supply decreased biomass concentration and cellular neoxanthin content significantly while cellular lutein content was less affected, the aeration did not show any significant effect on biomass, lutein and neoxanthin within the range investigated.

These results indicated that the isolate was potentially useful for commercial carotenoids production as well as further investigating the mechanism of carotenoid biosynthesis by microalga.

S-10. Genomic analysis for carbohydrateolytic enzymes of *Paenibacillus wonsoungensis*

Ki-Hong Yoon

Department of Food Science and Biotechnology, Wonsong University 17-2, Jayang-dong Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea; E-mail: ykhi@wou.ac.kr

The genus *Paenibacillus* was originally proposed by Ash on the basis of reclassification of three *Bacillus* strains into *P. polymyxa*, *P. alvei* and *P. mucronis*. One hundred sixteen species of *Paenibacillus* were reported to date, in which some strains were derived from other genus such as *Bacillus* and *Clostridium* by reclassification. Others were identified as new strains, which were isolated from various sources including soil, wastewater, insect gut, warm spring and phyllosphere. Many strains produced hydrolytic enzymes for carbohydrates. Also, *P. lentus* have been used as industrial strain for producing mannanase by Chemgen (USA), and *Paenibacillus* sp. is used as a xylanase producer by Korean company. *P. wonsoungensis* was isolated as a novel xylan-degrading bacterium from forest soil. It also produces various kinds of hydrolytic enzymes such as xylanase, cellulase, amylase, β -mannanase, β -mannosidase, β -xylosidase, α -galactosidase, β -galactosidase and β -glucosidase.

In order to analyze enzyme systems for degradation of cellulose materials, its genomic DNA was partially sequenced with assembled contigs of 86 and total contig length of 5,651,089 bp. In the 55 contigs, ORFs were investigated, and then their amino acid sequences were compared with the sequences of proteins in the NCBI database using the BLAST search program. Numbers of the putative ORFs were found to be six for endo-xylanase, six for β -xylosidase, two for acetyl xylan esterase, one for α -arabinofuranosidase, seven for endo-glucanase, two for exo-glucanase, four for β -glucosidase, four for endo-mannanase, one for β -mannosidase, and five for β -galactosidase.

Firstly, four putative xylanase genes amplified by PCR were introduced into pUC19. After confirming their nucleotide sequences, gene products produced from recombinant *E. coli* were analyzed. Among them, three products showed xylanase activity while one had very low activity. Two xylanases belong to GH family 11 were partially or completely purified from a cell-free extract of the recombinant *E. coli*. Their physicochemical properties including temperature profiles and pH profiles for enzyme reaction, thermostability, pH stability and metal ion effects were investigated. In addition, their hydrolytic activities and final hydrolyzate were determined toward several substrates.

Secondly, four putative β -xylosidase genes were amplified by PCR, followed by introducing into expression vector pET23a in the absence of their stop codons. Three resultant genes were highly expressed by IPTG in *E. coli* BL21(DE3), but they scarcely had β -xylosidase activity. Other one gene product was expressed at lower level than them, and it was found to show higher β -xylosidase activity.

S-9. Rapid determination method of nicotianamine using amino acid analyzer

Kohei Kuroda¹, Maya Matsuda, Kohji Ishihara, and Noriyoshi Masuoka²

¹Graduate School of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan; ²E-mail: masuoka@dis.ous.ac.jp

Introduction

More than twenty-five million persons in Japan are suffered hypertension. Renin-angiotensin system, a main elevation mechanism of blood pressure, is important for the keeping of blood pressure. To moderate hypertension, several angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors in the system were used to decrease the blood pressure. It was also known that extracts from some foods indicated inhibitory activity for ACE. As we considered that inhibitory components for ACE in foods are safe and may be useful for preventing hypertension, at first, we examined inhibitory activity of ACE in foods. Then, we isolated a compound having the activity from pumpkin (*Cucurbita moschata*) and identified the compound is nicotianamine, 2, 3', 3'-N-[N-(5-amino-3-carboxypropyl)-5-amino-3-carboxyl]-azetidine-2-carboxylic acid. For determination of nicotianamine in foods, we developed a rapid determination method using amino acid analyzer.

Methods

Foods (10 g) were cut small pieces and homogenized with water. The mixture was filtrated, and the extract was evaporated. The residue was dissolved with water and applied to a cation exchange column (Amberlite IR-120B, H⁺-form, Φ 2 X 12 cm), and the column was eluted with water and then 2 M ammonia. Ammonia fraction was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved with water and applied to an anion exchange column (Dowex 1 X4, acetate-form, Φ 2 X 12 cm). The column was eluted with water, 0.3 M and then 3 M acetic acid. The eluate with 0.3 M acetic acid was collected and evaporated. The residue was dissolved with water and analyzed with amino acid analyzer (Hitachi L-8800, Tokyo).

Results and Discussion

From examining extracts from more than 50 foods, we indicated that pumpkin (*Cucurbita moschata*), natchin (*C. pepo*) and shiso (*Perilla frutescens*) have high inhibitory activities. We chose pumpkin and examined nicotianamine contents. Pumpkin contained 34.9 \pm 5.4 μ g/g. We will discuss about relations between inhibitory activities of ACE and nicotianamine contents in foods.

S-11. Molecular characterization of two glycoenzymes involved in the N-glycoprotein degradation during tomato fruit ripening

Md. Anwar Hossain^{1,2}, Ryohi Nakano³, Kotake Nakamura⁴, Md. Tofazzal Hossain¹, and Yoshinobu Kimura⁵

¹Department of Biofunctional Chemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh; ³Department of Plant Function and Regulation, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan; ⁴Kagame Research Institute, Kagame Co., Ltd., Natsu-gun, Tochigi 329-27, Japan; ⁵E-mail: dms1945@is.okayama-u.ac.jp

It has been reported that free N-glycans and its associated glycoenzyme levels increase during fruit ripening, indicating that turnover of N-glycoprotein are closely associated with the fruit ripening or softening. To elucidate the relationship between the N-glycan turnover, expression of glycoenzymes and fruit ripening, we have characterized two glycoenzymes such as acidic α -mannosidase and peptide-N-glycanase from tomato fruits at molecular levels.

Purified native α -mannosidase (Man-Le) gave two separate bands, of molecular masses of 70 kDa (L-subunit) and 47 kDa (S-subunit), on SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions. On the other hand, the molecular weight was estimated to be 230 kDa by gel filtration, indicating that Man-Le functions in a tetrameric structure in plant cells. The N-terminal sequence of the L-subunit and the S-subunit were determined to be L-Y-M-V-Y-M-T-K-Q-G- and X-X-L-E-Q-R-S-F-S-Y-Y- respectively. Man-Le showed optimum activity at about pH 6 and 40°C, and the activity was completely inhibited by both swainsonine and 1-deoxy-mannojirimycin. The Man-Le hydrolyzed the α -mannosidase linkages from both high-mannose type and plant complex type N-glycan, but preferred a truncated plant complex type structure to high-mannose type N-glycans bearing a1-2 mannosyl residues. We cloned and expressed a cDNA from tomato fruits in *Pichia pastoris* and identified the α -mannosidase activity in cell lysate. α -mannosidase gene is a 10 kb spanned containing 30 exons and located at chromosome 6. The gene-encoded-protein is single polypeptide chain of 1028 amino acids containing glycosyl hydrolase superfamily domain 38 with predicted molecular mass of 116 kDa. The physico-chemical properties of recombinant enzymes are same as that of native enzyme. A molecular 3-D model shows that all catalytically important residues of Man-Le are conserved and superimposed with Ca atoms of animal lysosomal α -mannosidase, indicating that active site conformation and catalytic mechanism of plant acidic α -mannosidase can be same as that of animal one.

We have also cloned and expressed a cDNA from tomato fruits that encoded an acidic peptide-N-glycanase in the *Pichia* culture supernatant. The PNGase-gene-encoded protein is a single polypeptide chain of 588 amino acids with a predicted molecular mass of 65.8 kDa. The deduced amino acid sequence showed 37.0% similarity with animal PNGase A. The recombinant tomato PNGase showed optimum activity at pH 4.5 and 40°C. It did not require any metal ions for full enzymatic activity and could release the complex-type N-glycan from glycoproteins. Our phylogenetic analysis reveals that the plant acidic PNGase is completely different from the ubiquitous cytosolic PNGase and is involved in a different de-N-glycosylation mechanism associated with plant development and fruit ripening. These results will be useful to decipher the role of N-glycan as well as both glycoenzymes in fruit ripening/softening.

S-12. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*

Md. Atiqur Rahman Khokon¹, Eiji Okuma¹, Mohammad Anwar Hossain¹, Shintaro Munemasa¹, Misugi Uraji¹, Yoshimasa Nakanura¹, Izumi C. Mori¹, and Yoshiyuki Murata^{1,2}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima-Naka, Okayama, 700-8530, Japan and ²Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan. E-mail: murata@cc.okayama-u.ac.jp

Salicylic acid (SA), a ubiquitous phenolic phytohormone, is involved in many plant physiological processes including stomatal movement. We analyzed SA-induced stomatal closure, production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), cytosolic calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$), oscillations and inward-rectifying potassium (K^+) channel activity in *Arabidopsis*. SA-induced stomatal closure was inhibited by pre-treatment with catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), suggesting the involvement of extracellular ROS. A peroxidase inhibitor, SHAM (salicylhydroxamic acid) completely abolished SA-induced stomatal closure whereas neither an inhibitor of NADPH oxidase (DPI) nor *atrbuhf* mutation impairs SA-induced stomatal closures. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) stainings demonstrated that SA induced H_2O_2 production. Guard cell ROS accumulation was significantly increased by SA, but that ROS was suppressed by exogenous CAT, SOD and SHAM. NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) suppressed the SA-induced stomatal closure but did not suppress guard cell ROS accumulation whereas SHAM suppressed SA-induced NO production. SA failed to induce $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in guard cells while K^+ channel activity was suppressed by SA. These results indicate that SA induces stomatal closure accompanied with extracellular ROS production mediated by SHAM-sensitive peroxidase and intracellular ROS accumulation, which suppresses K^+ channel activation.

O1-2. Immunohistochemical study of PGF_{1α} autocrine pathway in the rat cerebellum

Toshiko Suzuki-Yamamoto¹, Nozomi Onoue, Mai Takakura, Chie Inuira, and Ryoko Nakajima
Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja 719-1197, Japan. E-mail: toshiko@hw.oka-pu.ac.jp

Prostaglandin (PG) F_{1α} has biological actions such as pain transmission (allodynia), and induction of the postsynaptic depolarization of cerebellar Purkinje cell dendrites and hippocampal mossy fibers in central nervous system. PGF_{1α} synthase (PGFS) has at least three isoforms, namely, PGFS I, PGFS II, and prostanoil/prostaglandin F synthase. PGFS I and PGFS II belong to the aldo-keto reductase superfamily, and catalyze the reductions of PGH₂ to PGF_{2α} and PGD₂ to 9α,11β-PGF₂. PGH₂ is synthesized from arachidonate by cyclooxygenase (COX-1/COX-2), and PGD₂ is synthesized from PGH₂ by PGD synthase. The two isoforms have different Km values for PGD₂, i.e., 120 μM for PGFS I and 10 μM for PGFS II. Additionally PGFS II is able to metabolize dihydrotestosterone which is one of the androgenic hormones. We demonstrated the localization of PGFS I and II in rat cerebellum by immunohistochemical analysis. PGFS I existed in somata and dendrites in Purkinje cells, and PGFS II was expressed intensely in astrocytes and weakly in Purkinje cells. Furthermore, COX-2 and PGF_{1α} receptor, namely FP, were also present in somata and dendrites in Purkinje cells, but not in glial cells. Thus, the complete pathway of PGF_{1α} synthesis existed in Purkinje cells and the colocalization of enzymes and receptor indicates that PGF_{1α} exerts an autocrine action there. PGFS II in glial cells may act to metabolize PGD₂ or dihydrotestosterone. These results suggest that PGFS I and PGFS II have distinct biological actions via different cell groups in the rat cerebellum.

O1-1. Ethnic differences of factors responsible for elevation of blood glucose levels; in view of insulin secretory defect and insulin resistance

Mitsuo Fukushima

Division of Clinical Nutrition and Internal Medicine, Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University E-mail: fukushima@hw.oka-pu.ac.jp

Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous disorder characterized by impaired insulin secretion and/or decreased insulin sensitivity (insulin resistance). Evaluation of insulin secretory capacity and insulin sensitivity is essential for elucidation of pathophysiology, prevention, classification, and therapeutic choice in patients with diabetes. Impaired glucose regulation (IGR) is defined as a category between normal glucose tolerance (NGT) and DM according to the result of oral glucose tolerance test (OGTT). IGR is further divided into three subgroups, isolated impaired fasting glucose (IFG) characterized by increasingly impaired fasting plasma glucose levels (FPG) and 2-hour plasma glucose levels (2-h PG) within normal limits, isolated impaired glucose tolerance (IGT) characterized by increasingly impaired 2-h PG and FPG within normal limits, and IFG/IGT characterized by both increased FPG and 2-h PG. Type 2 diabetes is also divided into 3 subgroups, DM/IFH, DM/IFH, and DM/IFH (Diabetes Care 2003, Metabolism 2004). We categorized IGR and DM into 6 subgroups as stated above according to the FPG and 2-h PG and examined insulin secretion and sensitivity in Japanese. According to the analyses of OGTT results, it was considered both decreased insulin secretory capacity and insulin sensitivity played roles in elevating FPG. On the other hand, the decline of insulin secretory capacity was significant throughout the elevation of 2-h PG.

According to the analyses of minimal model, we have revealed insulin secretory capacity is decreased, and induces of insulin sensitivity is widely distributed from low to high in Japanese diabetic patients. In contrast, Caucasian diabetic patients had decreased insulin sensitivity, and insulin secretory capacity was widely distributed from low to high. There are big differences between mean BMI of Japanese (23-25) and Caucasian (around 30) type 2 diabetic patients, however, the prevalence of diabetes in Japanese are similar with United States. Taken together with these results, Japanese are considered vulnerable to diabetes due to reduced reserve capacity of insulin secretion with a little impairment of insulin sensitivity in contrast with Caucasian diabetes with remarkable insulin resistance.

O1-3. Low catalase activity is higher incidence of diabetes

Kazunori Takemoto¹, Koji Taniuchi², Da-Hong Wang³, Keiki Ogino⁴, and Noriyoshi Masuko⁴

¹Medical Science Education Center, Okayama University of Science, Okayama, Japan, ²Department of Life Science, Okayama University of Science, Okayama, Japan, ³Department of Public Health, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, Okayama, Japan E-mail: k-take@edu.kas.ac.jp

Catalase has a predominant role in protecting oxidative damage caused with hydrogen peroxide. No catalase activity in blood is acatalasemia and low activity is hypocatalasemia. As a higher incidence of diabetes mellitus was shown in Hangarian acatalasemic and hypocatalasemic patients, we examined whether low catalase activity is associated with diabetes.

When the blood glucose concentration of acatalasemic mice (3% activity of normal mice) was compared with that of normal mice, no significant difference between them was seen. The normal and acatalasemic mice were administered intraperitoneally with alloxan (200 mg/kg of body weight) as oxidative stress.

One week after the oxidative stress, blood glucose concentration of the acatalasemic mice was higher than that of normal mice. No significant difference was seen about the numbers of β-cells, in islet of Langerhans, between normal mice administered alloxan and the control mice. However, in acatalasemic mice administered alloxan, the numbers for β-cells decreased by about 30% from the control mice. And the mass for β-cells of the acatalasemic mice was decreased significantly.

As alloxan generates hydrogen peroxide in the presence of reduced glutathione, these results indicate that catalase protects pancreatic β-cells from the damage with hydrogen peroxide and suggest that lower catalase activity develops higher incidence of diabetes.

O1-4. Effect of lipocalin-type prostaglandin D synthase on egg allergy development

Makiko Suzuki^{1,2}, Miki Hironori¹, Hidetsugu Fujigaki¹, Hideaki Tsuji¹, Yoshitaka Takahashi, Mitsuru Seidima³, and Masumi Kimoto¹

¹Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Japan, Okayama 719-1197, ²Department of Informative Clinical Medicine, Gifu University Graduate School of Medicine, Yanagida 1-1, Gifu 501-1194, Japan, E-mail: suzukim@hw.oka-pu.ac.jp

Food allergies in pediatrics have been increasing. However, it is not clear what causes some people to develop allergies while others remain tolerance to remain food allergen. Hen's egg is one of the most frequent causes of food allergy in infants and young children. Egg allergy is classified into IgE-mediated type 1 hypersensitive reactions. We previously reported that lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) bound to IgE in egg-allergic patients' sera. L-PGDS produces PGD₂ which causes directly allergic reactions. Recently, it was reported that allergic reactions were enhanced in L-PGDS transgenic mice compared with wild-type mice when they were induced to asthma. From these evidences, we suggest that L-PGDS takes part in the induction of IgE- and/or non IgE-mediated hypersensitive reactions in egg-allergic patients. In this study, we treated mice with L-PGDS in addition to ovalbumin (OVA) and studied the effect on egg allergy development.

We used a recombinant L-PGDS (rL-PGDS) as an immunogen to BALB/c mice. BALB/c mice were immunized intraperitoneally with 50 µg OVA and aluminum potassium sulfate (Alum) 1 mg on days 0, 14. On days 28, 30, 32, 35, 37 and 39, their mice were subsequently treated orally with saline (S) or 50 µg OVA (O) or 50 µg OVA containing 3 µg rL-PGDS (O+L). Serum levels of total IgE and OVA-IgE were measured by ELISA. Levels of IL-4 in the splitters were determined by real-time RT-PCR.

Serum levels of total and OVA-IgE were increased in O+L group compared with that in O group. Expression levels of IL-4 were also increased in O+L group similarly to IgE level.

Our results show that oral administration of 50 µg OVA induce immune tolerance and L-PGDS lead to up-regulation of OVA-IgE by preventing immune tolerance by OVA. It is considered that this effect of L-PGDS relates to Th1/Th2 balance.

O1-6. Role of glutathione in ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*

Eiji Okuma¹, Md Sarwar Jahan¹, Shintaro Munemasa¹, Ken-ichi Ogawa², Megumi Watanabe-Sugimoto¹, Yoshimasa Nakamura¹, Iumi C. Mori¹, and Yoshiyuki Murata^{1,3,4}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama, Japan, 700-8530, ²RIHS OKAYAMA (Research Institute for Biological Sciences, Okayama), 7549-1 Yoshikawa, Kibichuo-cho, Okayama, Japan, 716-1241, ³Institute of Plant Science and Bioresearches, Okayama University, Kurotsuchi, Japan, 710-0046, Japan, E-mail: mura@cc.okayama-u.ac.jp

Abscisic acid (ABA) induced stomatal closure, which suppresses water loss, leading to the tolerance of plants to stress conditions. ABA signaling involves redox regulation including ROS production. Glutathione (GSH), one of the most abundant low molecular-weight thiol compounds maintains redox homeostasis under normal and stressful conditions in higher plants. Although it is reported that GSH is involved in many physiological responses and guard cells accumulate more GSH than other epidermal cells do, roles of GSH on ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* remain to be elucidated.

In this study, we investigated effects of GSH on ABA-induced stomatal closure. ABA induced stomatal closure along with decreasing GSH contents but dark condition induced stomatal closure without changing GSH contents. In order to clarify whether GSH is involved in the redox regulation of ABA-induced stomatal closure, we employed *Arabidopsis thaliana*, two low GSH mutants, *cad2-1*, which is deficient in the key GSH biosynthesis enzyme, γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) and *chl-1*, which is defective in a light-harvesting antenna in photosystem II and a GSH-decreasing chemical, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). The *cad2-1* or *chl-1* mutation, or depletion of GSH by CDNB enhanced stomatal sensitivity to ABA. Meanwhile, in *cad2-1* and *chl-1* plants, GSH monoethyl ester (GSHmce) increased GSH level and lowered stomatal sensitivity to ABA. Neither *cad2-1* nor *chl-1* mutation significantly enhances ABA-induced ROS production in guard cells. In addition, GSH did not affect activation of I_{K1} currents by ABA via ROS production during ABA-induced stomatal closure.

Taken together, these results suggest that GSH could modulate some signaling factors downstream of activation of I_{K1} currents in ABA signaling to control ABA sensitivity in guard cells.

O1-5. Functional expression and site-directed mutagenesis of single-chain antibody to leukotriene C₄

Yuki Kawakami¹, Yoshiko Kashibawa¹, Chiaki Yamashita¹, Yuko Kurahashi¹, Hiromi Danasu¹, Hiroyuki Toh¹, Mitsuaki Sugahara², Masashi Miyano³, Shozo Yamamoto⁴, and Yoshihiko Takahashi¹

¹Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Okayama 719-1197, Japan, ²Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Human Life and Science, Teikoku Women's College of Liberal Arts, Kanagawa-shi, Kyoto 602-0893, Japan, ³The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan, ⁴Division of Bioinformatics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan, ⁵Structural Biophysics Laboratory, RIKEN SPring-8 Center, Harima Institute, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan E-mail: kawaka@hw.oka-pu.ac.jp

Leukotriene C₄ (LTC₄) is synthesized by binding of glutathione to LTA₄, an epoxide derived from arachidonic acid, and further metabolized to LTD₄ and LTE₄. We previously prepared a monoclonal antibody with a high affinity and specificity for LTC₄. To explore the structure of the antigen-binding site of a monoclonal antibody against LTC₄ (mAbLTC), we isolated full-length cDNAs for heavy and light chains of mAbLTC. The heavy- and light chains consisted of 461 and 238 amino acids including a signal peptide with molecular weights of 51,089 and 26,340, respectively. An expression plasmid encoding a single-chain antibody comprising variable regions of the mAbLTC heavy (V_H) and light (V_L) chains (scFvLTC) was constructed and expressed in COS-7 cells. The recombinant scFvLTC showed a high affinity with LTC₄ comparable to mAbLTC. The scFvLTC also bound to LTD₄ and LTE₄ with 48% and 17% reactivities, respectively, as compared with LTC₄ binding, whereas the antibody showed almost no affinity for LTB₄. To compare the primary structure of V_H and V_L with those of other prostanoid monoclonal antibodies, we determined the cDNA sequence of variable region of the antibodies against prostaglandin E₂, 11-dehydro-thromboxane B₂, and 2,3-dinor-6- α -ketoprostaglandin F₂ α . We focused on a unique Ser-Lys-Tyr sequence located on the complementarity-determining region 3 of V_L in the scFvLTC and substituted Lys-249 to Arg, Ala, and Glu by site-directed mutagenesis. The affinity of K249R for LTC₄ was not different from that of wild-type scFvLTC, whereas K249A and K249E showed 1/2 and 1/4-1/8 reactivities to LTC₄ as compared with wild-type scFvLTC. The results suggest that Lys-249 in the scFvLTC contribute the binding to LTC₄.

O1-7. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis with an F-box protein in *Arabidopsis*

Kenji Oda¹, Tsutomu Saitou¹, Naoki Yokotani¹, Youichi Kondou¹, Takanari Ichikawa¹, Fumio Matsuda², Miyako Kusano², Misugi Uragi¹, Yoshiyuki Murata¹, Masaki Iwabuchi¹, Hirohiko Hirochika¹, and Minami Matsui¹

¹Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry, and Fisheries, Research Institute for Biological Sciences, 7549-1 Yoshikawa, Kibichuo, Okayama 716-1241, Japan, ²Plant Science Center, RIKEN Tsukuba Institute, 1-7-22 Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, Kanagawa 239-0043, Japan, ³Graduate School of Natural Science and Technology, Division of Bioscience, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan, ⁴National Institute of Agricultural Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan, E-mail: oda@bio-niss.com

Anthocyanins are pigments distributed widely among flowers, fruits, and vegetables. Due to their possible health benefits as dietary antioxidants, interest in anthocyanins has intensified recently. The mechanism of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* has been well-studied mainly using recessive anthocyanin-less mutants named transparent testa (tt). Several TT genes encode transcription factors and the transcriptional regulation is critical for anthocyanin biosynthesis.

Among our library of transgenic *Arabidopsis* expressing rice full-length cDNAs (tl-cDNAs), we found a dominant mutant R10933 that was clearly characterized by yellowish testa. The mature leaves and stems of R10933 were apparently brighter green and contained less anthocyanin compared to wild-type. However, transcripts of the biosynthetic genes in R10933 were comparable to those in wild-type. These indicate that R10933 is a novel dominant mutant of anthocyanin biosynthesis.

Exogenous application of naringenin, an intermediate of anthocyanin biosynthesis, and flavonoid-targeted metabolomic analysis revealed that R10933 has a defect in an early step of flavonoid biosynthesis.

A rice tl-cDNA encoding an uncharacterized F-box protein is integrated in the genome of R10933. When the tl-cDNA was overexpressed in wild-type *Arabidopsis*, the anthocyanin-less phenotype was reappeared, showing that the F-box protein is responsible for the repression of anthocyanin. Overexpression of an *Arabidopsis* homolog also reduced anthocyanin in mature plants.

F-box proteins mediate the degradation of target proteins in the ubiquitin/proteasome proteolytic pathway. Under yeast two-hybrid system, the F-box protein bound to *Arabidopsis* chalcone synthase (CHS), but not to other enzymes catalyzing anthocyanin biosynthesis. Protein gel blot hybridization revealed that CHS protein is greatly reduced in R10933.

These findings suggest that in addition to the transcriptional regulation, anthocyanin biosynthesis is controlled at the proteinaceous level negatively through the degradation of CHS by the F-box protein.

O1-8. Roles of protein phosphorylation and dephosphorylation on MeJA-induced cytosolic Ca^{2+} oscillations in *Arabidopsis* guard cells

Mohammad Anwar Hossain¹, Shintaro Munemasa², Yoshimasa Nakamura³, Izumi C. Mori², and Yoshiyuki Murata^{1*}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 1-1-1 Tushima-naka, Okayama 700-8530, Japan, ²Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan, ³E-mail: mura@cc.okayama-u.ac.jp

Some portion of methyl jasmonate (MeJA) signaling and abscisic acid (ABA) signaling in guard cells is shared commonly. MeJA as well as ABA induces elevation of cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) in guard cells to lead to stomatal closure. ABA-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations have been well-studied but MeJA-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations still remains to be clarified. In this study, we investigated effects of K252a (broad-range protein kinase inhibitor) and okadaic acid (OA, protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A inhibitor) on MeJA-, ABA-, and Ca^{2+} -induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations in *Arabidopsis* ecotype Columbia guard cells expressing Ca^{2+} reporter yellow cameleon 3.6 (YC3.6) to elucidate mechanism of MeJA-induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations. K252a abolished MeJA-, ABA- and Ca^{2+} -induced stomatal closure and suppressed MeJA-, ABA- and Ca^{2+} -elicited $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations whereas OA did not inhibit either stomatal closure or $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillations induced by MeJA-, ABA- and Ca^{2+} , which is consistent with stomatal movements. Interestingly, MeJA- and ABA-induced stomatal closure was inhibited by OA in *Arabidopsis* ecotype Wassilewskija, which is different from the results in Columbia shown above. These results indicate that OA sensitivities were different according to the *Arabidopsis* ecotype. Taken together, present results suggest that MeJA signaling could involve activation of K252a-sensitive protein kinases but not activation of an OA-sensitive protein phosphatase in *Arabidopsis* ecotype Columbia guard cells.

O1-9. Effect of γ -irradiation on stability of lipid constituents of soybean

Ikuko Munami¹, Setsuko Todoriki², Yoshimasa Nakamura³, and Yoshiyuki Murata^{1*}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 1-1-1 Tushima-naka, Okayama 700-8530, Japan, ²National Food Research Institute, 2-1-12 Kamondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan ³E-mail: mura@cc.okayama-u.ac.jp

Soybean is one of the world's most important grains and a main foodstuff in Asian countries. Soybean and its processed products are known as health foods due to their high content of protein and fatty acids.

Like other crops, grains are vulnerable to microbial contamination and insect infestation during storage and transportation, resulting in quality deterioration and economic loss. Food irradiation using γ -rays and electron beam is one of the currently practiced methods to reduce microbial load and to disinfest grains. In recent years, this process has gained importance because of the ban on ethylene oxide and methyl bromide and because extensive studies have established it as a safe method.

Radiation process at high dosage can cause oxidative changes in lipid constituents to cause deterioration of foods. Unsaturated lipids are susceptible to oxidation with irradiation. However, there has been few report of effect of radiation on lipid profile of the plant foodstuffs despite the large amounts of unsaturated fatty acids in plants.

In this study, we investigate effects of γ -radiation on lipid compositions of soybean and soybean oil.

Total fatty acid was extracted from irradiated and non-irradiated soybean samples according to Folch method with some modifications and fatty acid composition was determined using gas chromatography. There were no considerable differences in fatty acid compositions between non-irradiated soybean and γ -irradiated soybean at 10, 40, and 80 kGy with ^{60}Co or ^{137}Cs . This γ -radiation produced a trace amount of isomerized unsaturated fatty acids, which was much less than those in non-irradiated food of animal origin.

To eliminate effects of other constituents of soybean, soybean oil was exposed to γ -radiation and its fatty acid composition was determined. Under the condition that oxygen was removed from samples during γ -radiation, there were no drastic changes in fatty acid compositions of soybean oil γ -irradiated at 10 and 40 kGy compared with non-irradiated sample. Geometrical isomerization of unsaturated fatty acids in soybean oil by γ -radiation was suppressed under an anaerobic condition.

These results present that lipid composition of soybean is not drastically affected by γ -radiation and that γ -irradiation under an anaerobic condition diminished changes of fatty acids.

O2-1. Inhalation of carbon monoxide at low concentration ameliorates hemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats

Toru Takahashi¹, Yoshie Yokote², Chikako Kakehashi³, Masaharu Mori¹, and Kiyoshi Morita²

¹Department of Nursing Care, Okayama Prefectural university, Kuboki 111, Soya 719-1197, Japan, ²Department of Anesthesiology and Resuscitology, Okayama University Medical School, E-mail: takatoru@hw.oka-pu.ac.jp

Hemorrhagic shock (HS) induces pulmonary inflammation that leads to acute lung injury. Carbon monoxide (CO), a by-product of heme catalysis, was shown to have potent cytoprotective and anti-inflammatory effects.

In the present study we examined the effects of CO inhalation at low concentration on lung injury induced by HS in rats. Rats were subjected to HS by bleeding to achieve mean arterial pressure of 30 mmHg for 60 min followed by resuscitation with shed blood. HS animals were maintained either in room air, or exposed to CO at 250 ppm for 1 hour before and 3 hours after HS.

HS caused an increase in the DNA binding activity of NF- κ B and AP-1 in the lung followed by the upregulation of pulmonary gene expression of TNF- α , iNOS and IL-10. HS also resulted in an increase in myeloperoxidase activity and wet/dry ratio in the lung, and more prominent histopathological changes including congestion, edema, cellular infiltration and hemorrhage. In contrast, CO inhalation significantly ameliorated these inflammatory events as judged by fewer histological changes, less upregulation of inflammatory mediators and less activation of NF- κ B and AP-1. Of note, the protective effects against lung injury afforded by CO were associated with further increases of mRNA expression of IL-10 in the lung.

These findings suggest that inhaled CO at a low concentration ameliorated HSR-induced lung injury and attenuated inflammatory cascades by upregulation of anti-inflammatory IL-10.

O2-2. Catalase is a major protein target of methylation with PRMT1 in erythrocytes

Miyuki Yokoro¹, Makiko Suzuki¹, Kaeko Murata², Chie Otsuka³, Yoshitaka Takahashi¹, Hiromi Yamashita¹, Hideaki Tsuji¹, and Masunori Kimoto^{1*}

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural university, 111 Kuboki, Soya, Okayama 719-1197, Japan, ²Department of Life Science, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashinaka, Osaka 577-8502, Japan, ³Department of Biochemistry, Shujitsu University School of Pharmacy, 1-6-1 Nishigawara, Naka-ku, Okayama 703-8516, Japan, ³E-mail: kimoto@hw.oka-pu.ac.jp

Accumulating evidence for post-translational modification has revealed an important role of the methylation of arginine residues in proteins in manifold cellular processes, including RNA processing, transcriptional regulation, signal transduction, DNA repair, and protein-protein interactions. On the other hand, N^7 , N^8 -dimethylarginine (asymmetric dimethylarginine; ADMA) released in body fluids through proteolysis of the methylated proteins is known to serve as a potent inhibitor of NO synthases. We and others have previously shown that plasma ADMA level (PAL) increased in patients with cardiovascular disorders, in which NO availability was reduced, and speculated that the impaired NO production may contribute to the initiation and progression of their diseases. However, the regulatory mechanism of PAL remains to be elucidated. Recently, we found that ADMA was actively metabolized by enzyme system in erythrocytes, suggesting that the cells may regulate the NO-NOS system by modulating plasma ADMA. In this study, we investigated the occurrence and identification of the proteins containing ADMA residues in erythrocytes with the aim of determining a source of plasma ADMA.

Erythrocytes were prepared from rat blood by centrifugation, and the crude extract was subjected to 2-dimensional gel electrophoresis and then western blotting with ASYM24 antibody raised against ADMA residues in protein. Two peptides were detected on a membrane as the spots reacted with the antibody. One of them was identified "catalase" by LC/MS/MS analysis after tryptic digestion in the gel. Further, only 16-kDa peptide in the digestion products from human catalase with lysyl endopeptidase was immunoblotted with the antibody. The result of N-terminal amino acid sequence analysis revealed that it was M350-K480 peptide containing R365 predicted to be dimethylated asymmetrically with PRMT1. Subsequently, we obtained the recombinant proteins of PRMT1 and catalase expressed in a cell-free system and *E. coli*. Using them, GST pull-down assays were carried out to demonstrate the interaction between PRMT1 and catalase. On the result, PRMT1-catalase interaction was confirmed. These findings suggest that catalase is a potential target for methylation by PRMT1 in erythrocytes and may be a source of plasma ADMA.

O2-3. Effects of acetate on energy metabolism in L6 myotube cells

Aya Tanaka¹, Hitomi Maruta, Natsuki Ganeko, Masumi Kimoto, Hidesaki Tsuji, Yoshitaka Takahashi, and Hiromi Yamashita²

¹Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kubuki, Soja-shi, Okayama 719-1197, Japan. ²E-mail: yamashita@hw.oka-pu.ac.jp

Obesity causes excess fat accumulation in adipose tissue, skeletal muscles and the liver. We have reported that acetate had a profound anti-obese and anti-diabetic function in animal models of obesity and type 2 diabetes. Orally administered acetate was immediately taken up from the intestine and excreted into the blood stream. The acetate was then absorbed by tissues and activated to acetyl-CoA with the concomitant formation of AMP by the catalytic activity of acetyl-CoA synthetase (AcCoS) in the cytosol. The increase in AMP concentration led to an increase in the AMP/ATP ratio, following the phosphorylation of AMPK. AMPK acts as the key metabolic master switch, and regulates a number of enzymes involved in lipid homeostasis. The ingested acetate activated AMPK by increasing the AMP/ATP ratio in the liver, and decreased the transcripts of the lipogenic genes. Acetate also increased AMP/ATP ratio and activated AMPK in the skeletal muscle. The skeletal muscle is one of the most important insulin-responsive organs in the body. In this study, we investigated the effects of acetate on L6 myotube cells. Treatment with acetate increased AMP/ATP ratio, phosphorylated of AMPK, transcripts of myoglobin and Glut4 genes, and those protein expressions in L6 myotube cells. It is concluded that acetate has effects on lipid metabolism in the skeletal muscles and may have functions that work against obesity and obesity-linked diseases.

O2-5. Effect of Heat Treatment on the Allergenicity and Conformation of Egg Allergen Ovotransferrin

Ping Tong^{1,2}, Yin Zhang^{1,2}, Jinyan Gao^{1,3}, Hongbing Chen^{1,2}, and Shan Jian^{1,2}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, P.R.China; ²Jiangxi-QA Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, P.R.China; ³Department of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, P.R.China. E-mail: apiril41288@gmail.com

Among egg white proteins, ovotransferrin (OVT) is one of the major allergens. In order to assess the relationship between the allergenicity and the structure of OVT, it was treated by heating at temperatures in the range of 55°C to 100°C for 5min to 60 min. The immunoreactivity of OVT binding to IgE and IgG were measured by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with egg allergic patients' sera and rabbit polyclonal antibodies; the secondary structure was analyzed by circular dichroism (CD), the surface hydrophobicity and sulphydryl groups were assessed by fluorescence and UV absorption spectroscopy, respectively.

The results showed heat treatment influenced both the allergenicity and the structure of the OVT. Heating at low temperature increased the binding activities of OVT both to IgG and IgE, while the antigenicity and the allergenicity of OVT were decreased when the heating temperature increased to greater than 70°C. The CD showed that the secondary structure of the heat-treated OVT was changed. The ANS fluorescence probe emission spectra analysis demonstrated that the heat treatment induced an increase in surface hydrophobicity of OVT, implying the changes of the tertiary and quaternary structure of OVT. UV absorption spectra showed that the UV absorption intensity of heat-treated OVT samples raised with the increasing of heating time, and slight blue shift of the absorbing peak was observed as the heating time increased, too, indicating that the polarity of microenvironment of Tyr and Trp has changed, and peptide bond may be destroyed. The increasing of antigenicity and allergenicity of the heat-treated OVT may relate to the unfolding of conformational structure, which could expose the antigenic epitopes buried inside the native molecule onto the surface of the molecule, while the decreasing may be caused by the cleavage of disulphide bonds and the rearrangements of disulphide bonds which could induce conformational changes.

Thus, the changes of conformation of OVT after heat treatment significantly influenced the allergenicity of OVT, and heat destroyed predominantly the conformational epitopes of OVT, rather than with limited effect on sequential epitopes of OVT.

O2-4. Anti-stress effect by innate immunity activation

Kazuo Nakata¹, Mai Yamamoto², Koichiro Yamamoto³, Hiroyuki Inagawa⁴, Gen-Ichiro Soma^{1,4}

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural university, Soja, Okayama 719-1197 Japan, ²MACROPHI Inc., 2217-44-301 Hayashi-cho, Takamatsu-shi, Kagawa 761-0301, Japan, ³Department of Integrated and Holistic Immunology, Faculty of Medicine, Kagawa University, 1730-1 Ozu-ikenobe, Miki-cho, Kida-gun, Kagawa 761-0793, Japan, ⁴Institute for Health Sciences, Tokushima Bunri University, Yamashiro-cho, Tokushima 770-8514, Japan. E-mail: nakata@hw.oka-pu.ac.jp

[Background] The innate immune system plays an essential role in the maintenance of homeostasis to keep our health. Thus, it is thought that the control of innate immune system is able to achieve maintenance of health and prevent of disease.

We have been studying on the control to activation of macrophages which plays central role in innate immune systems. On the contrary, psychological stress, which is major stressor in human life, may induce immuno-suppression mainly in macrophages, which causes various physical disorders. In this study, we investigated the effect of the activation of macrophages by a normal flora *Lactococcus agglomerans*-derived IP-PA1 to the stress resistance.

[Methods] BALB/c mice were orally administered with IP-PA1 (10 µg/g body weight/day) for two weeks, then, psychological stress was placed on during additional one week. We injected dexamethasone (Dex; 1 µg/g body weight) which induces condition that mimics human psychological stress. The degree of stress was estimated by the change of body weight and concentration of fasting plasma glucose. Immunological activity was determined by measuring the production of nitrogen oxide (NO) by stimulation with LPS in peritoneal macrophages.

[Results and Discussion] Mice supplemented with IP-PA1 did not affect the normal increase of body weight in mice. Injection of Dex to these mice, however, induced weight losses in mice. Production of NO decreased in the peritoneal macrophages isolated from the Dex-administrated mice. Supplementation of IP-PA1 after administration of Dex, however, prevent reduction of NO production to the level when Dex was not administered. These results suggest that consecutive intake of IP-PA1 may lessen the immunocompetence reduction due to psychological stresses.

O2-6. Evaluation of sour taste in grapefruit vinegar

Natsuki Ganeko¹, Nobuko Komiyama¹, Yurie Taga¹, Masumi Kimoto¹, Hidesaki Tsuji¹, Masaki Habara², and Hiromi Yamashita¹

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural university, Kubuki 111, Soja 719-1197, Japan, ²Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University, Motooka 744, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan. E-mail: yamashita@hw.oka-pu.ac.jp

Obesity is a big problem throughout the world. Previously we reported that orally administered acetate, the main component in vinegar, had an anti-obese and anti-diabetic function in animal models (OLETF rats). Recently it has been reported that daily intake of vinegar decreased body weight and abdominal fat content in human. Vinegar would prevent obesity and obesity-linked diseases, however, the sourness of vinegar make it difficult to intake it effectively. In this study, in order to develop the way to reduce the sourness of vinegar, we attempted to make grapefruit vinegar and evaluate the sourness by sensory test and taste sensor.

Grapefruit was soaked in grain vinegar with a content of 10-80% (w/v) for 3 or 6 days. From the result of sensory test, the more of grapefruit content soaked in the vinegar, the easier it could be taken than intact grain vinegar. Concentration of acetate in the grapefruit vinegar showing the highest estimation was 1-2% (w/v), and the pH was more than 3. Acetate content and pH were likely to be important factors that contribute to easier intake. By the taste sensor analysis, the more of grapefruit content in the vinegar, it showed the lower in sourness. Taste sensor could estimate pH level in grapefruit vinegar and sourness estimated by taste sensor was correlated with that by sensory test.

The results obtained in this study indicated that grapefruit vinegar may be one of the way for reducing sourness to be able to intake easier, and the sour taste could be estimated by the taste sensor.

O2-7. Vaccination with an attenuated *Vibrio vulnificus* strains protects mice against infection

Mai Yamamoto¹*, Jianbo Xiao², Kohei Hosohara³, Rie Segawa⁴, Miyuki Inoue¹, Michiko Nakai¹, Kenji Yokota², Keiji Oguma², and Koichiro Yamamoto¹

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, Kuroki 111, Soja, Okayama 719-1197, Japan, ²Graduate School of Health Science, Okayama University, Okayama 700-8558, Japan, ³Department of Bacteriology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan, ⁴yamak6212@thw.oka-pu.ac.jp

Vibrio vulnificus is one of important pathogens of foodborne diseases and wound infection. This pathogen causes fatal septicemia rapidly in immunocompromised hosts after they contact with contaminated seawater or seafood with this organism. Although infection with this organism is rare, the mortality rate is more than 50%. For the rapid progress and the high mortality, vaccination is considered an effective way to control infection with *V. vulnificus* in a high risk population. In this study, we confirmed effects of vaccination with an attenuated mutant strain in mice.

We applied Signature-Tagged Mutagenesis (STM) to generate attenuated mutants from a *V. vulnificus* strain, OP11 which was isolated from a patient. Twelve insertion mutants were selected and the virulence of these mutants were determined by the minimal lethal dose (MLD). Compared to parent virulent strain, one of mutants, S10-T79, showed much lower virulence. The DNA sequence flanking to the transposon insertion site in S10-T79 was determined and searched at DNA Data Bank of Japan. IMP dehydrogenase gene of *V. vulnificus* strain CMCP6 chromosome 1 exhibited highly homologous at the insertion region of the transposon. This result suggests that S10-T79 can not survive in mice and showed less virulence because of disruption of IMP dehydrogenase. The S10-T79 strain was administered for experimental vaccination to mice twice with a two-week interval without adjuvant. These immunized mice were challenged with the virulent parent strain and observed their survival up to 36 hr. All unimmunized mice were killed within 36 hr, but almost all mice which were immunized with S10-T79 survived.

In this experiment, we found that attenuated mutant S10-T79 have a potentiality as live vaccine candidate. However the recovery of pathogenicity in the mutants by the removal of the transposon still remains. To remove this possibility, complete knock-out of the gene from the *V. vulnificus* is underway for establishment of safe and effective vaccine strains.

O2-9. Conservation of the giant panda *Ailuropoda melanoleuca* in China: successes and challenges

Bisong Yue

Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered Wildlife, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China. E-mail: bseyue@scu.edu.cn

The giant panda, *Ailuropoda melanoleuca* is perhaps the most powerful and well-known global icon in biodiversity conservation. The fossil record indicates that it was once widespread in southern and eastern China as well as in neighbouring countries. However, the species is now restricted to six mountain ranges in south-western China. The giant panda was first described in 1869 and the first nature reserve for the species was established in 1963. There are now 59 reserves specifically set up for this species, covering c. 71% of the species' habitat. The range-wide survey in 2006 indicated a total of 1,596 individuals in the wild, >40% higher than in the second survey in the 1980s. At the same time there has been successful ex situ conservation, with a total of 294 giant pandas presently maintained in captivity at various facilities throughout the world. The survivorship of giant panda cubs in captivity has increased from 20% in 1970s to 98%.

The giant panda populations are still threatened by habitat fragmentation and degradation, bamboo shortage and mismanagement of reserves. The six mountain ranges of the panda's habitat are separated by agriculture or cleared forests, infrastructure construction (such as highways, dams, tourism and plantation forestry). Further habitat degradation occurred in the Wenchuan earthquake of 12 May 2008 and more than 1,200 km² of giant panda habitat were damaged. The giant panda relies on bamboo, however, collection of bamboo shoots is one of the major income sources for local farmers, and this has led to conflicts between conservation and development in some of the panda reserves. Although numerous reserves for giant panda were established at present, many of these reserves do not, however, fulfil their conservation mandate, being short of funds, infrastructure, staff and professional conservationists, and they do not have capacity for monitoring and protection. Although the panda population in captivity has increased, the genetic diversity of the captive population is low compared to that in the wild and the genetics of the captive population need to be carefully managed. The final destination for pandas bred in captivity is reintroduction to the wild. Preliminary studies on reintroduction have been carried out in the last few years and the information from these trials will help guide future panda reintroductions.

Key words: giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*, conservation

O2-8. GC-MS analysis of volatile compounds in different parts of *Polygonatum sibiricum*

Long-sheng Chen^{1,2}*, De-fang Pan¹, Shu-wen Xu¹, Feng-tian Len¹, and Ling Cai²

¹Anhui Academy of Science and Technology, Hefei 230031, China; ²College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China. E-mail: longshengchen@yahoo.com.cn

Steam distillation extraction followed by GC-MS combined with quantification by peak area normalization method was used to analyze volatile compounds in the roots and stems of *Polygonatum sibiricum*. Results showed that 26 compounds were identified, accounting for 90.87% of the total volatile compounds from the roots of *Polygonatum sibiricum*, that 37 compounds were identified, accounting for 94.58% of the total volatile compounds from the stems of *Polygonatum sibiricum*. There are 13 compounds existing in the roots and stems, 4 of which in the relative content were less than 0.5%, 9 of which were different in the relative content greater than 0.5%.

Key words: *Polygonatum sibiricum*; volatile oil; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

P-1. Study on the close relations between the consumption of rice and food culture in Japan

Huan Li¹*, Hisae Sugiyama², and Tacko Shigenobu-Kishimoto¹

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, Kuroki 111, Soja, Okayama 719-1197, Japan, ²Municipal office of Tsuyama City, Yamakita 520, Tsuyama, Okayama 708-8501, Japan. E-mail: tskishim@thw.oka-pu.ac.jp

The consumption of rice has been reduced since 1962 in Japan. According to the statistical report of MAFF, the average amount of rice consumption was 58.8 kg as a staple food (61.4 kg as a food including rice cake) per person in 2007, in spite of the peak was 117.2 kg (118.3 kg) in 1962 respectively. A decrease of the rice consumption is accompanied by the decline of self-sufficiency in food.

We considered about the substitution of rice flour for wheat flour and the rise of self-sufficiency in food. If we substitute rice flour for wheat flour in half of bread and noodles, the food self-sufficiency ratio on a supplied calories basis will be improved only five percents. Besides, we analyzed the eating frequency of a rice cake called "mochi" on January, based on the questionnaire survey in Okayama Prefectural University's students (n=180). At the beginning of the New Year, Japanese eat glutinous (or waxy) rice cakes in soup with vegetables or meat, called "zoni". Many students have eaten "zoni" only the first day on January. The average frequency of eating "zoni" on January was 2.4 days per person.

The Japanese dietary pattern consists of rice as a staple food, combined with a variety of other food, such as fish, meat, vegetables, milk and fruits. As a staple food boiled non-glutinous (or non-waxy) rice is eaten at regular meals. This dietary pattern was well-balanced from nutritional point of view. The present study suggested the close relations between the consumption of rice and Japanese food culture even now. The food self-sufficiency ratio on a supplied calories basis was seldom improved by the substitution of rice flour for wheat.

In order to promote the consumption of rice and to prevent nutritional imbalance, following obesity and lifestyle-related disease, we should keep the consumption of rice such as a staple food or "mochi" and maintain the succession of Japanese food culture.

P-2. Serum cytokeratin 18 level and its correlation with nutritional parameters in middle-aged Japanese males with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)

Mayumi Tabuchi¹, Takayo Kawakami, and Kayoko Tomioka

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, Kubaki 111, Soja, Okayama 719-1197, Japan. E-mail: tabuchi@hw.oka-pu.ac.jp

Cytokeratin (CK) 18 M30 antigen has been proposed as a diagnostic marker of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). We studied the significance of serum CK18 levels as a marker of NAFLD in middle-aged Japanese males, we determined serum M30- and M65-antigen levels and examined correlations among CK18 levels, liver function tests, fatty acid metabolism and TNF- α .

Seventy-seven males (39-70 years) who underwent health check-ups at Okayama Saiseikai Health Check Center were enrolled. Fatty liver was diagnosed by abdominal ultrasonography. The participants were diagnosed as having NAFLD (n=42) or non-fatty liver (control; n=35).

Serum CK18-M30 and M65 levels were significantly higher in the NAFLD group than in controls (p<0.05, respectively). In NAFLD, both M30 and M65 correlated positively with BMI, AST, ALT and plasma dihydro- γ -lipoic acid but negatively with AST/ALT ratio. M30 also correlated positively with TNF- α in the NAFLD group.

Serum CK18 analysis may be useful for assessment of disease progression in NAFLD.

P-3. Beneficial effects of consumption of tempe on intestinal environment and functions of rats fed a high-fat diet

Zaki Utama¹*, Yonghui Xu², Sofya Suidasari¹, Okazaki Yukako², Junji Inoue¹, Hiroyuki Kuninobu¹, and Norihisa Kato^{1,2}

¹Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University; ²Fuji Women's University; ³Apikon Co., Ltd.; ⁴Kuninobu Co., Ltd. E-mail: nkato@hiroshima-u.ac.jp

In Indonesia, tempe (a fermented soy bean product) is widely consumed and extensively used in main meals and snacks. While it is recognized the roles of tempe in providing nutritious food and disease prevention, the link between intestinal health and tempe are not well understood. In this study we investigated the effect of dietary tempe and soy protein isolate (SPI) on the intestinal health functions in rats fed a high-fat diet.

Growing male Sprague Dawley rats were fed a control diet (30% beef tallow and 25% casein) (net protein, 17.4%) and the test diet containing tempe (produced by *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 and sterilized by heat treatment) at 25% (net protein, 11.2% for tempe and 6.2% for casein) or SPI at 12.3% (net protein, 11.2% for SPI and 6.2% for casein) for 21 days. Feces were collected for fecal 3 days.

Gains in body weight and food efficiency were slightly greater in the tempe group than in the other groups. Consumption of tempe markedly reduced fecal secondary bile acid (thiocholic acid), the risk factor of colon cancer and colitis. Fecal IgA and mucin (indices of intestinal immune and barrier functions) from the tempe group showed the markedly greatest value, followed by SPI and control groups, respectively. There was no difference among the three groups for the serum IgA. Tempe generated higher levels of cecum organic acids, including acetic acid, butyric acid, propionic acid, and succinic acid. Analysis of profile of cecum microflora by T-RFLP method revealed that the proportion of bacteroides was significantly lower in the tempe and SPI groups than the control group. This study provided the first evidence for the favorable effects of tempe on secondary bile acids, IgA, mucin and organic acids. Tempe intake may provide new opportunities for enhancing intestinal health functions.

P-4. Urinary excretion of polyphenols and radical scavenging activity of urine from rats fed juice of yamabudo-grape (*V. coignetiae*)

Nana Fujii¹, Mari Nishimura, and Sakae Arimoto-Kobayashi

¹Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima, Kura-ku, Okayama 700-8530, Japan. E-mail: gsh422039@o.s.okayama-u.ac.jp

Polyphenols including anthocyanins are known to have antimutagenic, anti-carcinogenic and radical-scavenging activities. *Vitis coignetiae*, or yamabudo in Japanese, is a vine tree that belongs to the genus grape, although it is not a common grape (*V. vinifera*). The fruit of *V. coignetiae* is commonly used for the production of juice, wine and vinegar. The concentration of polyphenolic compounds and minerals (Ca and Fe) in *V. coignetiae* was reported to be higher than in common grape. Previously we have found that the juice from *V. coignetiae* could inhibit the mutagenicity of heterocyclic amines derived from cooked food in the Ames test. We also found anti-carcinogenic activity in juice from *V. coignetiae* evaluated with the two-stage mouse skin carcinogenesis assay.

In this study, we performed a quantitative analysis of urinary polyphenols excreted from rats fed juice from *V. coignetiae* to determine the bioavailability of polyphenols from the juice. We also investigated whether the radical scavenging activity in urine increased with the feeding of juice from *V. coignetiae*.

Five-week-old male rats (Sprague-Dawley) were fasted for 16 hr. Group-A rats were given 10 mL/kg of juice from *V. coignetiae* and group-B rats were given same volume of water by gavage. Urine samples were collected from 0 hr to 4, 4 to 8, 8 to 24, 24 to 36 and 36 to 48 hr. The polyphenol and creatinine content in urine samples was then determined. The antioxidant and radical scavenging activity of urine samples was also determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay.

When juice from *V. coignetiae* was administered, the polyphenol content and DPPH scavenging activity increased from 4 hr following administration. From 4 hr to 12 hr following administration, the polyphenol content and DPPH scavenging activity increased and was higher in urine from rats fed the juice (group-A) compared with rats fed water (group-B).

We concluded that polyphenols in juice from *V. coignetiae* were absorbed in the digestive tract and excreted in the urine within 12 hr, and that anti-oxidant activity of the juice polyphenols remained in the urine.

P-5. Effect of pre-germinated brown rice derived steryl-glucoside on high-fat-fed mice

Chihiro Iwasa¹*, Mami Kawamura², Shota Nonaka², Yasuhide Okuhara², Mitsuo Kise², Seigo Usuki³, Robert K. Yu⁴, and Hiroyuki Watanabe¹

¹Department of Nutritional Science, Kochi Women's University, Ite 2751-1, Kochi 781-8515, Japan; ²FANCI Research Institute, FANCI Corporation, Yokohama 244-080, Japan; ³Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912, U.S.A. E-mail: watanabe@cc.kochi-wu.ac.jp

Pre-germinated brown rice (PR) has physiological functions, which was not provided by brown rice (BR), as the increase in its functional ingredients during the process of germination. Therefore, this study was investigated the effect of steryl-glucosides extracted from PR (PSG) on fat metabolism as well as its relationship between energy metabolism and behavioral physiology in mice fed high-fat diet supplemented with or without PSG. More sterol fraction was extracted from PR bran than BR bran. Main compounds in this fraction were confirmed to have a glycoside structure¹.

Mice fed 30% high-fat diet increased body fat compared with those fed 7% fat diet. The increase in body fat was diminished PSG supplementation. We found that high fat diet decreased oxygen consumption and locomotor activity, and in contrast, increased immobility time in the forced swim test (FST) and in the tail suspension test (TST). However, high-fat diet with PSG increased oxygen consumption and locomotor activity. The immobility times in the FST and TST was increased in mice fed high-fat diet with PSG. Our results suggested that PSG may improve fat metabolism in mice generally and depressive state caused by a high-fat diet.

* Usuki S. et al., J Lipid Res. 49(10):2188-96, 2008

P-6. Anti-allergic effects of the germinated grape seeds extract

Miki Hiemori¹*, Michiko Fujikura¹, Keiko Okura¹, Kenji Morata², Kosuke Sakai³, Koji Ochiai⁴, Makiko Suzuki¹, Masumi Kimoto¹, and Hideaki Tsuji¹

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, 111, Kuboki, Seiga, Okayama 719-1197, Japan, ²Department of Animal Science, University of Chubu, Tatsuta, CA 93616, USA, ³Seelife-tech, Inc., 1266 Tamura, Nagaoka, Shiga 526-0829, Japan, ⁴E-mail: hiemori@hwa.oka-pu.ac.jp

A large amount of grape seeds accumulates as waste products of the wine and grape juice industries. Grape seeds are rich in polyphenols which have potential health benefits, but absorption of polyphenols into human body is low. As we showed previously, the polyphenols obtained from germinated grape seeds extract (GGSE) exhibit high water-solubility and as a result, the absorption into human body was improved. GGSE obtained with aqueous ethanol is presumed to have diverse physiological functions. In fact, the anti-oxidation activity of GGSE is shown to be greater than that of non-germinated grape seeds. However, the anti-allergic effects of GGSE remained unknown. Therefore, this study investigated the inhibitory effects of GGSE in allergic reactions.

It is well known that in type I-allergies, degranulation from mast cells release chemical mediators which induce an inflammatory response. In this study, the effect of GGSE on degranulation in rat basophilic leukemia 2H3 (RBL-2H3) cells was examined using a combination of anti-dinitrophenyl IgE antibody and dinitrophenylated albumin (DNP-Album). As an index of the degranulation of the cells, the activity of β -hexosaminidase released from the secretory granules was measured. The release of β -hexosaminidase from the RBL-2H3 cells in the presence of GGSE was inhibited. Additionally, GGSE showed a stronger inhibitory effect than leaf extract from Chinese sweet tea, *Rhus sumatrensis* or seeds extract of *Shiso*, *Perilla frutescens*, which are known to be anti-allergic food materials. Furthermore, passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction on the ears of male ICR mice was performed to evaluate the anti-allergenicity *in vivo*. The PCA reaction in mice orally administered GGSE (1,000 mg/kg) before the DNP-Album challenge was significantly suppressed compared to the control mice administered only saline.

In conclusion, the present study demonstrated that GGSE has anti-allergic effects both *in vivo* and *in vitro*. These findings suggest GGSE could be useful as the functional food material to reduce allergic symptoms, and then grape seed agricultural waste would be utilized effectively.

P-8. A functional food tempeh : Anti-platelet aggregation activity observed in the first distillation fraction of tempeh

Hiroyuki Sumi¹* and Masatoshi Imai²

¹Department of Life Science, Kurashiki University of Science and the Arts, Nishimura 2640, Tsuruyama-cho, Kurashiki 712-8503, Japan. *E-mail: sumi@chem.kusa.ac.jp

Inhibitory activity against human platelet aggregation is observed for natto, but in the case of tempeh (a traditional food in Indonesia, also made from fermented soybeans), for which the seed bacteria is the genus *Rhizopus*, there is no knowledge of such activity. The current test used major natto and tempeh products sold on the market in Japan and tempeh manufactured from isolated *Rhizopus oligosporus*. As a result of atmospheric distillation, a strong anti-platelet aggregation activity was observed in the first distillation fraction.

The polypeptide S of Nihon Pharmaceutical Co., Ltd. was used. The main strains of tempeh were selected from products sold on the market, then pure culture (slant culture) was performed on *Rhizopus oligosporus*, and the resulting substance was used in the test. The tempeh sold on the market came from a product manufactured by Marusa Foods (Shizuoka) from the seed bacteria of Hot Planning Co. and a product called "Tokiva's Tempeh" manufactured by Tokiva Foods K.K. (Tokyo) from the seed bacteria of Akita Konno Co., Ltd. (using soybeans from Tokachi, Hokkaido).

A strong activity for the inhibition of platelet aggregation was observed in fractions of tempeh that reaches the boiling point under atmospheric pressure. The substance had thermolabile fractions with low molecular weight, no color, and a refreshing fragrance. Activity like this has not been observed in natto under these conditions. Through shaking culture performed at 37°C, it was also confirmed that the platelet aggregation inhibition activity reached its maximum level after 2 days, and then gradually disappeared after 4 days and 7 days.

Skilfully produced tempeh is said to have an attractive fragrance similar to a rose. The fragrance of the extract in the current test could be described as something similar.

P-7. A new potency assay method of nattokinase by international unit

Hiroyuki Sumi¹*, Sawa Naito², Chieko Yataegi³, Tadanori Ohsugi⁴, Yasuhide Yanagisawa⁵, and Masumi Maruyama⁶

¹Department of Life Science, Kurashiki University of Science and the Arts, Nishimura 2640, Tsuruyama-cho, Kurashiki 712-8503, Japan, ²Department of Pharmacy, Chiba Institute of Science, Choshi, Chiba 288-0235, ³Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan, ⁴E-mail: sumi@chem.kusa.ac.jp

Nattokinase has a single-stranded polypeptide structure with 275 amino acid residues linked together, at pI 8.7 with a molecular weight of 27,724. It is clearly different from subtilisins like Carlsberg and Nagase (BPN⁺), with a different amino acid configuration despite the high homology of the substances.

The current study used synthetic amide substrates specific to nattokinase and established a standard product for nattokinase in order to examine a new assay method for the potency of nattokinase.

Nattokinase (in standard product form) for the assay of potency was supplied by Honda Trading Corp. The standard product was purified from the culture of *Bacillus subtilis natto* to produce a single type of protein. Natto products commonly sold on the market were purchased for the test. Carlsberg, Nagase, and subtilisins were purchased from Sigma-Aldrich.

The standard fibrin plate method was used to take measurements using artificial thrombi.

The synthetic amide substrate that showed the strongest specificity to the standard nattokinase product was Br-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA. The potency of the standard nattokinase product, which was calculated from this result was 423U/g. The substrate with the second highest specificity was Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (21.5μmol/min), followed in order by MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA, H-D-Ile-Pro-Arg-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA, p-tyr-Glu-Pro-Val-pNA, p-tyr-Glu-Gly-Arg-pNA, H-D-Pro-Phe-Arg-pNA, and H-D-Val-Leu-Arg-pNA. There are many types of *Bacillus subtilis* bacteria that are not classified as *Bacillus subtilis natto*. An evaluation council convenes each year in Japan to promote the safety and quality of natto as a food. The six different subtilisins were also determined for nattokinase activity. The fact that both the nattokinase that we purified in this study and the Nis-egino, Takashashi and Nansue strains that typify the strains used in fermentation processes from the distant past showed strong specificity to Br-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA is a very important element in establishing the definition of *Bacillus subtilis natto*.

P-9. Characterization of polyphenol compounds in *Polygonum cuspidatum*

Yuka Takasuka¹, Azami Nishi¹, Akiko Ishikawa², Makiko Suzuki¹, Hiromi Yamashita¹, Masumi Kimoto¹ and Hideaki Tsuji¹

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, Kuboki 111, Seiga, Japan 719-1197, ²Department of Nutritional Science, Faculty of Food Culture, Kurashiki University, Nagaoka 3315, Tamashina, Kurashiki, Okayama 710-0292, Japan. *E-mail: tsuji@hwa.oka-pu.ac.jp

Polygonum cuspidatum is a perennial plant of polygonaceae genus, which is grown on the wasteland in Japan, Korea and China. In Japan, its young shoots are eaten as mountain herbs, and, in India and Southeast Asia, its dried leaves are used as a kind of cigarette without nicotine. On the other hand, the dried roots of the plant are utilized as a traditional Chinese medicine. The roots are also known to abundantly contain resveratrol. Resveratrol was found in a pericarp of grapes as an effective component exhibiting various functions such as antioxidant, anticancer, anti-inflammatory and the improvement of lipid metabolism. In the perennial plant, resveratrol has been elucidated to be one of the effective components. However, other polyphenol compounds including resveratrol in the plant have not characterized well. In the present study, polyphenol compounds in the plant have been characterized.

Polyphenol compounds in its crushed leaves or shoots were extracted successively with water and with 70% ethanol, and the compounds in its roots frozen in liquid nitrogen were also extracted with 70% ethanol. Then, each extract was concentrated with an evaporator at room temperature under reduced pressure. The polyphenol compounds in each concentrate were analyzed by reversed-phase HPLC, UV spectrometry and mass spectrometry, and by digestion with β -glucuronidase.

In the extracts of the leaves and the shoots, any component corresponding to authentic resveratrol was not detected. However, some components which show the similar spectra to that of authentic chlorogenic acid were found to occur in the extracts. These findings suggest that these extracts do not contain any resveratrol, but that they contain the chlorogenic acid-related compounds. In the extract of roots, in addition to the component corresponding to resveratrol, two components which have similar spectra to that of authentic resveratrol were detected. One of them was eluted at the same position as that of authentic polydatin, resveratrol 3-O- β -glucuronide. The UV spectra of the two components were coincided with that of resveratrol. These components were shown to be hydrolyzed to glucose and resveratrol by β -glucuronidase. Furthermore, mass spectrometric analyses showed that [M-H]⁺ of these components are 391.1, which corresponds to the sum of the molecular masses of resveratrol and D-glucose. These findings suggest that one of the two components is polydatin and that the other component is a resveratrol β -monoglucuronide.

The above observations demonstrate that the plant contain chlorogenic acid and resveratrol derivatives and provide an idea that the plant is utilized as a raw material in developing various functional foods.

P-10. Antioxidant activity of flavonoids

Moya Matsuda¹, Kohei Kuroda¹, Isao Kubo², and Noriyoshi Matsuo³*

¹Graduate School of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan; ²University of California, Berkeley, California 94720-3114, USA; ³E-mail: matsuoka@dis.ous.ac.jp

Xanthine oxidase was derived from xanthine dehydrogenase with oxidative stress, like ischemia-reperfusion. Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22) catalyzed the oxidative reaction of hypoxanthine with oxygen to uric acid and two active oxygen species, hydrogen peroxide and superoxide anion. Superoxide anion generated by xanthine oxidase lead to peroxidative damages in cells, and antioxidants, the radical scavengers and the enzyme inhibitors, are useful to prevent postischemic tissue injury. Therefore, to find the antioxidants in natural products, antioxidant activities were examined by using xanthine oxidase. When we examined antioxidant activity of gallic acid and alkyl gallates by using xanthine oxidase, we noticed that the antioxidant activity consisted of three reactions [(A), (B) and (C)]. With (A) reaction, antioxidants work as the inhibitor of xanthine oxidase. With (B) reaction, antioxidants reduce the enzyme to increase hydrogen peroxide formation instead of superoxide anion generation. With (C) reaction, antioxidants work as scavengers to remove superoxide anion generated. Finally, we deduced that gallic acid and alkyl gallates worked as inhibitors of the reaction and reduced the enzyme to increase hydrogen peroxide formation. It is known that flavonoids have strong antioxidant activity like gallic acid and alkyl gallates, and apigenin, one of flavonoids, binds xanthine oxidase at the xanthine binding site competitively to inhibit uric acid formation. However, effects of flavonoids containing apigenin on superoxide anion generation catalyzed by xanthine oxidase, antioxidant activity, were not examined enough. As we examined antioxidant activity of flavonoids, we want to discuss about it.

P-12. Effects of pre-germinated brown rice-derived steryl glycosides (PSG) on senescence-accelerated mice (SAMPR)

Shota Nonaka¹, Chihiro Iwasa², Manu Kawamura², Yasuhide Okuhara², Mitsuo Kise¹, Seigo Usuki¹, Robert K. Yu¹, and Hiroyuki Watanabe¹*

¹FANCI Research Institute, FANCI Corporation, Yokohama 244-0806, Japan; ²Department of Nutritional Science, Kochi Women's University, Ite 2751-1, Kochi 781-8213, Japan; ³Institute of Molecular Medicine and Genetics, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912, U.S.A. E-mail: syonta_nonaka@fanci.co.jp

Objective:

Pre-germinated brown rice (PR) has a superior physiological effects compared to brown rice (BR); we have reported that this is due to steryl glycosides that increases during the germination process (*). We also reported that a fraction containing steryl glycosides extracted from PR (PSG fraction) suppresses increases in visceral fat in diet-induced obese mice. In the present study, we fed PSG fraction to senescence-accelerated mice (SAMPR) and investigated its effects on various senescence-related symptoms.

Methods and Results:

SAMPR (21-weeks-old) were divided into four groups based on diet, specifically AIN93G diet that was given ad libitum for 18 weeks: 1) white rice; 2) PR; 3) 0.08% PSG; and 4) 0.8% PSG. No significant differences were observed for body weight among four groups, but the survival rate was approximately 70% in the white rice group compared to 100% in the PR and both PSG groups. In addition, compared to the white rice group, the PR and both PSG groups had higher O₂ consumption and locomotor activity levels, a significantly longer swimming time, and significant improvements in lipid and glucose metabolism parameters.

Conclusion:

We found the first evidence that PSG is effective for improving various senescence-related symptoms in SAMPR.

¹Usuki S. et al., J Lipid Res. 49(10):2188-96, 2008.

P-11. Optimization for muffin added with dried burdock powder and oligosaccharide using response surface methodology

Min-Kyung Kim

Dept. of Food Science & Biotechnology, Won-Song University 17-2, Jayong-Dong, Dang-Gu, Daegu, Republic of Korea E-mail:kyungdc@hanmail.net

Burdock(wuoung in Korea), *Arctium lappa* (Asteraceae) is rich in inulin, phenolic acids, sulfur-containing compounds and potassium and has unique flavor and taste, so has been recommended traditionally as the diuretic and diabetic remedy as well as food. Also it has beneficial effects on hypertension, gout, arteriosclerosis, hepatitis and other inflammatory disorders. The antimutagenicity, anticarcinogenicity, and antiaging effects of it are considered to be originated from its antioxidant ability which was shown to be a lignin-like compound. Oligosaccharides have a mild sweet taste and low caloric. Also it has been interested as a partial substitute of fats and sugars which improves texture of food. Because of these reasons, various types of oligosaccharides have been synthetically produced. When oligosaccharides are consumed, the undigested portion serves as the food of intestinal microflora. Depending on the type of oligosaccharide, different bacterial groups are stimulated or suppressed. Clinical researches have reported that oligosaccharides can increase the colony counts of useful in the colon while simultaneously reduce those of harmful bacteria. This study was performed to find the optimal component for a muffin with the addition of dried burdock powder and oligosaccharides.

The experiment was designed by CCD (Central Composite Design) and evaluation by means of RSM (Response Surface Methodology) which included 12 experimental points with 3 replicates for two independent variables, burdock powder and oligosaccharides. The muffin for experiments were made following a traditional recipe except for replacing part of the flour with dried burdock powder (5%, 15%, 25%), and replacing part of the sugar with oligosaccharide (25%, 50%, 75%). The compositional and functional properties of prepared products were measured, and these values were applied to the mathematical models. By use of F-test, yellowness, hardness, resilience, taste, color, texture, flavor and overall quality were expressed by linear model, while lightness, redness, adhesiveness and cohesiveness expressed by a quadratic model. In the polynomial models developed by RSM for sensory evaluation color, flavor, texture, taste and overall quality were highly effective to describe the relationships between the factors (p<0.05). The estimated response surfaces confirmed that the amount of burdock powder had a negative effect on color (p<0.01). Increase in the amount of oligosaccharide led to an increase of the sensory score on texture, flavor and overall quality at all the burdock powder levels. On the other hand, increase in the amount of burdock powder caused a decrease of the sensory score on texture, taste and overall quality, regardless of oligosaccharide levels.

The optimal mixing ratio of burdock powder and oligosaccharides for muffin was determined 5.39% of dried burdock powder and 55.81% of oligosaccharides.

P-13. Characterization of Ca²⁺ sensitive region of Streptomyces mannanase

Yuya Kumagai¹*, Hirokazu Usuki², Yukihiko Yamamoto¹, Akihiro Yamazato¹, Takafumi Mukaihara¹, and Tadashi Hatanaka¹

¹Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries, Research Institute for Biological Sciences (RIBS), 754-1 Kohcho-cho, Kago-gun, Okayama 716-1241, Japan; ²Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Japan. E-mail: ykumagai@bio-ribs.com

Mannanase (E.C. 3.2.1.78) is an enzyme that degraded β-1,4-linked mannose in hemicelluloses, and characterization of enzymatic properties is useful information for industrial application. In a preliminary study, we found two types of mannanase; one is dependent on calcium ion in its active form, the other constantly shows its activity. The regulation of mannanase activity by metal ion is still unknown compared to enzymatic characters. Here, we investigated the calcium ion sensitive region by using the chimeras between two *Streptomyces* mannanases.

The genes of two mannanases from *Streptomyces thermotolerans* NBRC14274 (StMan) and *Thermobifida fusca* NBRC14071 (TfMan) were obtained by Inverse PCR and PCR, respectively, and expressed by pET28a and *E. coli* (BL21Gold (DE3)) as an N-terminal His-tagged form. Mannanase activity was determined using Azo-Carbo galactomannan.

Two mannanases were successfully expressed and purified approximately 4-6 mg per 50 mL by metal affinity resins. We then examined the effect of calcium ion on the mannanase activity in the reaction mixture containing 1 mM EDTA or 1 mM calcium. As a result, StMan activity was up-regulated by calcium ion and down-regulated by EDTA, while TfMan activity did not affect by EDTA or calcium ion. This result leads to that StMan possesses calcium-sensitive region, which did not show TfMan. Next, we constructed two chimeras, TfMan-StMan and StMan-TfMan, constituted by a restriction site (ApoLI) the catalytic domain of each one-third region of 5'-terminus to that of two-third region of 3'-terminus.

Based on the study of two chimera properties, TfMan-StMan chimera was confirmed to show the calcium-dependence activity. Thus, the function of activity regulation is present in C-terminal region of StMan. We now constructed random chimera library to identify the novel calcium ion sensitive residues.

P-14. N-glycosylation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 affects its enzymatic functions

Kenjiro Nagao¹*, Nobumitsu Hanioka, and Shizuo Narimatsu

¹Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tushima-naka, Kato-Ku, Okayama 700-8530, Japan *E-mail: dph421003@is.okayama-u.ac.jp

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are glycoproteins localized in the endoplasmic reticulum membrane of various organs and tissues, and the major phase II drug-metabolizing enzyme that catalyzes the glucuronidation of endogenous compounds (bile acids and steroids) and xenobiotics (drugs, environmental chemicals and dietary constituents). It has been reported that most of UGT isoforms undergo N-glycosylation by post-translational modification, but there is little information about N-glycosylation of UGTs. In the present study, we investigated whether N-glycosylation of human UGT2B7 influences its enzymatic functions.

By site-directed mutagenesis, we constructed cDNAs encoding UGT2B7 mutants in which amino acid residues (67, 68 and 315 asparagine) to be N-glycosylated were replaced with glutamine. Each cDNA was transfected into HEK293 cells, and stable expression cells were obtained. The expression in the cell S9 fractions of UGT2B7 wild-type (WT) and four mutants (N67Q, N68Q, N315Q and N68Q/N315Q) was confirmed by Western blotting, and zidovudine (AZT) glucuronidation activities were measured by HPLC.

In Western blotting, the migration distance of the N67Q protein was similar to that of WT, but those of N68Q and N315Q were different. Moreover, the treatment of the WT and mutants with PNGaseF, a glycosidase, resulted in a similar migration profile. Thus, it was thought that the two sites (68 and 315 asparagine) of UGT2B7 protein were N-glycosylated. The K_m values for AZT glucuronidation by N68Q and N315Q were 1.5 times and the value for N67Q/N315Q was 3 times higher than that of the WT. It is suggested that N-glycosylation influences the affinity of UGT2B7 for the substrate.

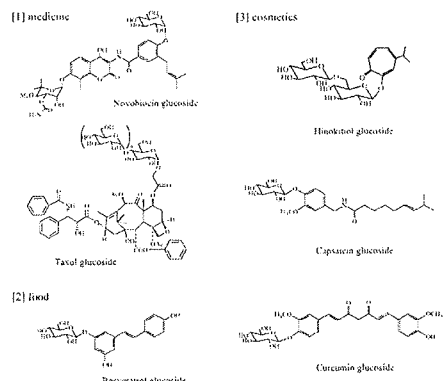
P-15. The biotransformation of the biological active compounds using plant cultured cells

Takahiro Ohara¹*, Ryoshei Yamamoto¹, Hiroya Imai¹, Megumi Kitagawa¹, Hirotaka Hirano¹, and Hiroki Hamada^{1,2}

¹Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho Kato-Ku, Okayama 700-0005, Japan *E-mail: hamada@dis.ous.ac.jp

The biotransformation of the foreign substrate using the living cells is interested in medical, pharmaceutical and organic synthesis fields. In such a status we had studied the biotransformation of foreign substrate using plant cultured cells.

In this presentation we report the biotransformation of the biological active compounds using plant cultured cells and the plant cultured cells have a stereoselective reduction, enantioselective oxidation, regioselective hydroxylation and glycosylation for the biotransformation of the biological active compound. The biotransformation product is shown below.



P-16. Glutathione involves in methyl jasmonate signaling in *Arabidopsis* guard cells

Nasuna Akter¹*, Muhammad Abdus Sobhan¹, Mohammad Anwar Hossain¹, Misugi Uraji², Ken-ichi Ogawa³, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori¹, and Yoshiyuki Murata^{1,2}

¹Division of Bioscience, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan; ²Research Institute for Biological Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan; ³Institute of Plant Science and Resources (IPSR), Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan *E-mail: mura@cc.okayama-u.ac.jp

Methyl jasmonate (MeJA)-induced stomatal closure, which requires reactive oxygen species (ROS) production and elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in guard cells. Glutathione (GSH) regulates many bio-functions via redox state of GSH pools in plants and modulates ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. We investigated the involvement of GSH in MeJA signaling using a GSH deficient *chlornal-1* (*chl-1*) mutant and the Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6) technique. MeJA as well as ABA induced stomatal closure accompanied with decreasing intracellular GSH. MeJA induced more stomatal closure in the *chl-1* mutant than in wild type. However, MeJA induced ROS production in the mutants as well as wild type plants and MeJA induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in wild-type guard cells regardless GSH monoethyl ester (GSHme) treatment to increase intracellular GSH contents. These results suggest GSH modulated signaling factors downstream of ROS production and $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in not only ABA signaling but also MeJA signaling in *Arabidopsis* guard cells.

P-17. Roles of hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells

Ryoharur Jannat¹*, Misugi Uraji¹, Miho Morofuji¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori¹, and Yoshiyuki Murata^{1,2}

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 1-1-1 Tushima-naka, Okayama 700-8530, Japan; ²Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan *E-mail: mura@cc.okayama-u.ac.jp

Reactive oxygen species (ROS), especially hydrogen peroxide (H_2O_2), is one of the important second messengers in abscisic acid (ABA) signaling in guard cells. Catalase is one of major H_2O_2 scavengers that play an important role in controlling cellular H_2O_2 levels. To investigate roles of endogenous ROS in guard cell signaling, we examined ABA induced stomatal closure, second messengers ROS and nitric oxide (NO) productions and cytosolic alkalization in *cat1-1* and *cat1 cat3* mutant plants. Under normal condition, neither *cat1* nor *cat1 cat3* double mutation affects stomatal aperture while these mutation decreased catalase activity and increased ascorbate peroxidase activity and ROS and NO accumulation. ABA induced more stomatal closure in these mutants than in wild type along with ROS and NO production and cytosolic alkalization like wild type. These results suggest that transient change of ROS level could be closely involved in ABA signaling during ABA-induced stomatal closure.

P-18. Hydrogen peroxide-dependent photocytotoxicity by Phloxine B in human leukemia cells

Huang Qi¹, Hiroshi Takano¹, Yoji Kato², Yoshiyuki Murata³, and Yoshimasa Nakamura⁴

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan, ²School of Human Science and Environment, University of Hyogo, Himeji 660-0092, Japan, ³E-mail: yossan@cc.okayama-u.ac.jp

Since food color is one of important indices of food value judgment, various food colorants are used in food processing. During food preservation, many environmental factors can influence food color as well as taste and flavor. Especially, light and oxygen are attributable to decolorization, leading to deterioration of quality. Phloxine B (PhB, D&C Red No. 28), an artificial xanthene colorant, has been used as a red coloring agent in drugs, foods and cosmetics in Japan. PhB has been reported to act as an efficient photosensitizer damaging to cellular DNA and membrane lipids, but little effort has been devoted to the study of this colorant as a medicinal agent. In this study, we investigated inhibitory effect of PhB on cell viability in human leukemia HL-60 and Jurkat cells. We also measured the intracellular and extracellular hydrogen peroxide levels induced by photo-irradiated PhB. Furthermore, to clarify which reactive species are involved, we examined the effects of antioxidants on PhB-induced photocytotoxicity.

We observed that HL-60 cells were more susceptible to PhB- and hydrogen peroxide-induced cytotoxicity than Jurkat cells. Catalase completely inhibited PhB-induced photocytotoxicity, suggesting that hydrogen peroxide might act as a major mediator for this phenomenon. Actually, photo-irradiated PhB produced a significant amount of hydrogen peroxide in the media. Furthermore, methionine, a hypochlorous acid (HOCl) scavenger, significantly attenuated hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HL-60 cells but not in Jurkat cells. In vitro experiments revealed that halogenated tyrosine was detected in bovine serum albumin treated with photo-irradiated PhB and HL-60 cell lysate but not Jurkat one. These results suggested that myeloperoxidase, specifically expressed in neutrophils or monocytes, plays a pivotal role in the hydrogen peroxide-sensitive toxic mechanism in HL-60 cells.

P-20. Colocalization of membrane-associated prostaglandin E synthase-2 and prostaglandin F₂ receptor EP in the cerebellum

Chie Imura¹, Ryoko Nakajima², Mai Takakura³, Nozomi Onoue⁴, Kazunori Toida⁵, Kazunori Ishimura⁶, and Toshiko Suzuki-Yamamoto⁷

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural university, 111 Kuboki, Soja, Okayama 719-1197, Japan, ²Department of Anatomy, Kawasaki Medical University, 577 Matsushima, Kurashiki Okayama 701-0192, Japan, ³Department of Anatomy and Cell Biology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan. These authors contributed equally to this work. ⁷E-mail: toshiko@lhw.oka-pu.ac.jp

Prostaglandin (PG) E₂ is the most abundant prostaglandin *in vivo*, and involved in various biological phenomena such as smooth muscle dilation/contraction, inflammation, fever, pain transmission, wakefulness promotion. PGE₂ is synthesized by PGE synthase (PGES) which catalyzes the isomerization from PGH₂, which is synthesized from arachidonic acid by cyclooxygenase (COX). PGES has at least three isoforms, namely membrane-associated PGES (mPGES)-1, mPGES-2, and cytosolic PGES (cPGES). In this report, we focused on the localization of mPGES-2 in the rat cerebellum. The expression of cerebellar mPGES-2 was detected by RT-PCR and Western blot. Immunocytochemistry demonstrated that the intense immunoreaction of mPGES-2 was observed in soma and proximal dendrites of Purkinje cells. Among PGE₂ receptor subtypes, at least EP1, EP2 and EP3 were also expressed in Purkinje cells. These findings suggest that PGE₂, synthesized by mPGES-2 in Purkinje cells acts by autocrine fashion, and it might participate in the control of neuronal activity in the rat cerebellum.

Furthermore the other PG synthase, PGF₂ synthase (PGFS) was also co-localized with PGF₂ receptor (FP) in Purkinje cells in the cerebellum (Toshiko Suzuki-Yamamoto et al.). Considering these results together, the different types of PG synthesis pathway and their receptors exist in Purkinje cells, and the balance of the synthesis between PGE₂ and PGF₂ might be important to maintain neuronal homeostasis.

P-19. RNA interference of prostaglandin F₂ synthase induces anti-tumor effect in human A549 non-small cell lung cancer cells

Takae Hanada¹, Hideo Ishikawa², Sayuri Tanaka³, Yuki Kawakami⁴, Yoshiaki Takahashi⁵, Masaharu Mori⁶, Tomoko Michihata⁷, Yoshihiro Omiya⁸, and Toshiko Suzuki-Yamamoto⁹

¹Department of Nutritional Science, and ²Department of Nursing, Okayama Prefectural University, Kuboki 111, Soja, Okayama 719-1197, Japan, ³Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ikeda-Okada 563-8577, Japan, ⁴Department of Medicine, Hokkaido University, Kita 15 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido, Japan. ⁹E-mail: toshiko@lhw.oka-pu.ac.jp

Prostaglandin (PG) E₂ participates in the development of various tumors including lung cancer. In PGE₂ biosynthesis, cyclooxygenases (COX-1/COX-2) convert arachidonic acid to PGH₂, which is isomerized to PGE₂ by prostaglandin H synthase (PGES). PGES has at least three isoforms, microsomal type mPGES-1 and mPGES-2, and cytosolic cPGES.

In the present study, the expression of three PGES isoforms was observed in human lung adenocarcinoma with an immunohistochemical analysis. We demonstrated an anti-tumor effect by PGES repression in the human non-small lung cancer cell line A549. A549 cells constitutively expressed these PGES isoforms and COX-2, and release large amount of PGE₂. mPGES-1 or mPGES-2 knockdown using RNA interference technology decreased PGE₂ release, but cPGES knockdown did not. The phenomena was related to the expression of anti-tumorigenic and apoptotic factors. PGES knockdown cells implanted subcutaneously into nude mice suppressed the tumorigenesis. These findings suggest that the terminal PGES isoforms are involved in a cross-talk mechanism that regulates a PGE₂ release, and that the combined repression of the PGES isoforms induces the anti-tumor effect. Thus, these isoforms may be a new target for non-small cell lung cancer therapy.

P-21. Identification of leukocyte-type 12-lipoxygenase inhibitor in guava leaf extract

Tomoko Morinaka¹, Yuki Kawakami², Tomoko Hosokawa³, Hirokazu Kobayashi⁴, Akiko Yoshioka⁵, Toshiko Suzuki-Yamamoto⁶, Miyuki Yokoro⁷, Masumi Kuno⁸, Hideaki Tsuji⁹, Hiromi Yamashita¹⁰, Shinobu Doi¹¹, Chikao Yutani¹², Teruyuki Kanada¹³, and Yoshiaki Takahashi¹⁴

¹Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University, Kuboki 111, Soja 719-1197, Japan, ²Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan, ³Research Center, Bizen Chemical Co Ltd, Tokushima 363, Atanari 769-0716, Japan. ¹⁴E-mail: ystaka@lhw.oka-pu.ac.jp

Oxidative modification of LDL is one of the critical steps for the development of atherosclerosis and leukocyte-type 12-lipoxygenase highly expressed in macrophages is shown to play an essential role in this process. We have demonstrated that leukocyte-type 12-lipoxygenase was required for LDL oxidation using mouse macrophage-like J774A.1 cells overexpressing the enzyme. Recently we found that guava leaf extract inhibited not only leukocyte-type 12-lipoxygenase activity but also LDL oxidation by J774A.1 cells overexpressing the enzyme. Oral administration of guava leaf extracts to apo E knockout mice at 100 mg dry extract weight/kg body weight for 16 weeks significantly reduced the area of atherogenic lesion developed in aorta and aortic sinus.

In the present study we purified the major components inhibiting leukocyte-type 12-lipoxygenase contained in the guava leaf extracts using reverse-phase HPLC with a linear gradient from 30% to 100% methanol in water. Fractions eluted at 10-12 min (fraction A) and at 22-24 min (fraction B) had the enzyme-inhibiting activity. The active compound contained in fraction B showed UV absorbance peaks at 255 and 364 nm and cochromatographed with authentic quercetin which we previously identified as one of the components inhibiting leukocyte-type 12-lipoxygenase in the guava leaf extract.

The compound contained in fraction A was purified to a single peak as determined in two reverse-phase and a straight-phase HPLC conditions. This compound showed a UV absorbance peak at 272 nm and a potent leukocyte-type 12-lipoxygenase-inhibitory activity, with the IC₅₀ value of 0.17 µg/ml. A negative ESI-MS analysis determined the molecular ion at *m/z* 197.0447 ([M-H]⁻) suggesting the molecular formula of C₁₅H₁₀O₆, which was consistent with that of ethyl gallate. The structure was completely assigned by means of ¹H-NMR spectral data of the compound, and the compound cochromatographed with authentic ethyl gallate on reverse-phase-HPLC. The *in vivo* effect of this compound on the LDL oxidation and the development of atherosclerosis is now under investigation.

P-22. β -galactosidase from probiotic strain *Lactobacillus fermentum* CM33 and molecular study

Wattana Sriphannam¹*, Goro Takata², Kenji Yamamoto³, and Chatchai Khanoognoh^{1,4}

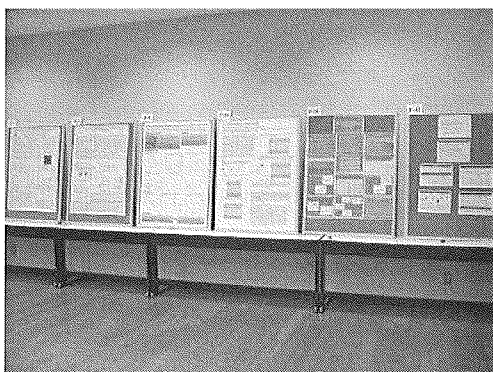
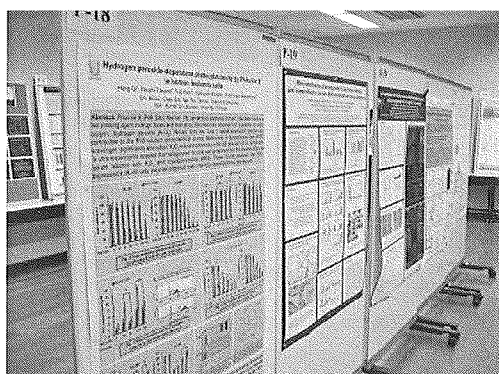
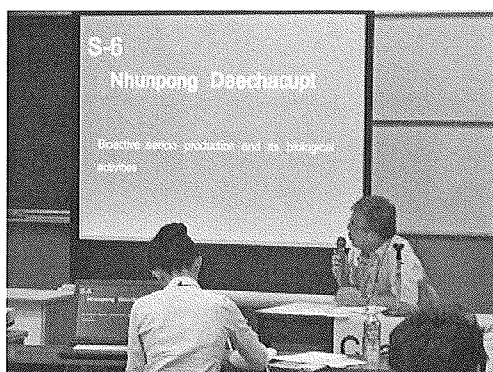
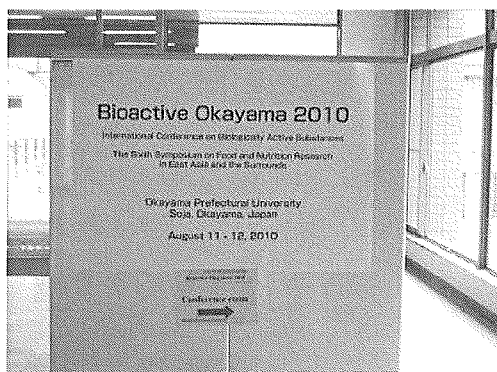
¹Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Thailand.

²Rare Sugar Research Center, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa, Japan.

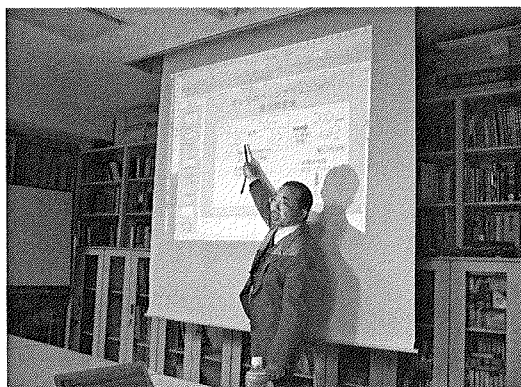
³Graduate School of Biosciences, Kyoto University, Kyoto, Japan. *E-Mail: auekhnn@chiangmai.ac.th

Lactobacillus strain from healthy infant feces was identified and investigated in vitro for functional characteristics as potential probiotic strain. *Lactobacillus* strain, identified as *L. fermentum* CM33, showed good survival under simulated gastrointestinal conditions compare with known probiotic strains (*L. gallinarum* JCM 2011 and *L. agilis* JCM 1187). *L. fermentum* CM33 also showed β -galactosidase activity. The statistical design experiments were applied to optimize the β -galactosidase production and the optimal medium composition determined as 5.5% (w/v) lactose, 0.0% (w/v) tryptone, 0.2% (w/v) beef extract, 0.05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.01% (w/v) KH_2PO_4 . The highest β -galactosidase activity (1.33 U/ml) was obtained after 24 hours cultivation at 37°C. Applying optimized medium containing 0.5% (w/v) Tween80, we achieved a maximum activity of 4.15 U/ml after 16 hours of cultivation, which was 29.6-folds higher than the initial values that obtained with the non-optimized medium. β -Galactosidase from this strain was purified to apparent homogeneity by ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction. The enzyme is a heterodimer consisting of two subunits of 35 and 72 kDa, as determined by gel electrophoresis. Heterodimeric β -galactosidase of this strain is encoded by two overlapping genes, lacL(1887 bp) and lacM(960 bp). The coding regions of the lacL/M genes were cloned and successfully over expressed in *E. coli* using an expression system based on the T5 RNA polymerase promoter. Recombinant β -galactosidase was purified to apparent homogeneity, characterized and compared with the native β -galactosidase from *L. fermentum* CM33. The obtained recombinant β -galactosidase also showed the capability of transgalactosidase activity and possibility to use in oligosaccharides synthesis.

Bioactive Okayama 2010 (Photo Gallery)



第1回研究室訪問
日時：平成22年12月
場所：岡山大学 神崎 浩研究室、中村宜督研究室



平成 23 年度おかやまバイオアクティブ研究会 シンポジウム予告

おかやまバイオアクティブ研究会 第 39 回シンポジウム

日時:平成 23 年 6 月 10 日(金)13 時～19 時

場所:川崎医科現代医学教育博物館 3F 小講堂

【医、食、運動:健康で長生きするために】

【基調講演】 13:10－14:10

「食事が消化管疾患に及ぼす影響

川崎医科大学 春間 賢 氏

【講演 1】 14:15－15:05

「コンニャクグルコマンナンと健康」

清水化学株式会社 清水 寿夫 氏

学生プレゼン セッション

15:10－15:35

学生ポスターディスカッション・コーヒーブレイク

15:35－16:15

【講演 2】 16:20－17:10

「健康をもとめて—免疫学がおしえてくれた運動の不思議—」

川崎医療福祉大学 矢野 博巳 氏

懇親会 17:30－19:00

川崎病院 8F レストラン楷の木

会則

(名称)

第1条 この会は、おかやまバイオアクティブ研究会（以下「研究会」という。）と称する。

(目的)

第2条 この研究会は、生理活性およびそれに関連する物質（以下、「生理活性」という。）に関する研鑽や情報交換及び人的交流などを行い、食品・医薬品関連技術及び産業の発展に寄与する。

(事業)

第3条 この研究会は、上記の目的を達成するために、次の事業を行う。

- (1) 生理活性に関するセミナー及びシンポジウム等の開催
- (2) 生理活性に関する共同研究の推進
- (3) 会員に対する生理活性に関する技術・開発に係わる相談の実施
- (4) 会員相互の交流、情報交換
- (5) その他会報の発行等前条の目的を達成するために必要な事項

なお、上記(3)において、相談実施の過程で、知り得た事柄については守秘義務を負うものとする。

(会員)

第4条 この研究会は、生理活性の研究に携わっている人ならびに生理活性に関心を持つ人で、会費を納入した次の会員により構成する。但し、名誉会員は役員会で選出し、会費は徴収しない。

- (1) 団体会員
- (2) 個人会員
- (3) 学生会員
- (4) 名誉会員

(会員の責務)

第5条 会員は、この研究会の一員として、その目的達成のために積極的に努めなければならない。

(入会)

第6条 この研究会へ入会するためには、役員の紹介を必要とする。

(役員)

第7条 この研究会に役員として、会長1名、副会長4名以内、幹事20名以上と監査2名を置く。

2 役員の選出は、会員総会で行う。なお、役員は会員の中から選出するものとする。

3 会長は、研究会を代表し、役員会その他会務を総括する。

4 副会長は、会長を補佐し、代行する。

5 幹事は、研究会の運営その他会務を行う。

6 監査は、会計を監査する。

7 役員の任期は2年とする。ただし、再任は妨げない。

(役員会)

第8条 会長、副会長および幹事、監査により、役員会を構成する。

2 役員会は、この研究会の運営その他会務を執行する。

3 この役員会に、必要に応じて委員会を設けることができる。

(会員総会)

第9条 年1回以上、必要に応じて会員総会を開催する。

2 会員総会は、会長が招集する。

3 会員総会は、会長が議長となり、次の事項を議決する。

- (1) 事業計画および予算

(2) 事業報告および決算

(3) 会費の徴収など

(4) その他役員会で必要と認められた事項

4 会員総会は、会員の過半数の出席により成立し、議決は出席会員の過半数により決する。ただし、委任状の提出による出席および議決は妨げない。

(分科会)

第 10 条 この研究会に、必要に応じて分科会を設けることができる。

(会計)

第 11 条 この研究会の経費は、会費、助成金、寄付金その他の収入をもってあてる。

(会費)

第 12 条 この研究会の会費は、次のとおりである。

(1) 団体会員 20,000 円

(2) 個人会員 4,000 円

(3) 学生会員 1,000 円

(事業年度)

第 13 条 この研究会の事業年度は、毎年 4 月 1 日から翌年 3 月 31 日までとする。

(事務局)

第 14 条 この研究会の事務局は、財団法人岡山県産業振興財団に置く。

(会則の変更)

第 15 条 この会則の変更には、会員総会の議決を要する。

付則 1 この会則は平成 9 年 5 月 27 日から施行する。

2 設立当初の役員の任期は第 7 条 9 の規定にかかわらず、平成 9 年 5 月 27 日から平成 11 年 5 月 26 日までとする。

3 設立当初の事業年度は第 13 条の規定にかかわらず、平成 9 年 5 月 27 日から平成 10 年 3 月 31 日までとする。

付則 この会則は平成 13 年 6 月 19 日から施行する。

付則 この会則は平成 17 年 7 月 25 日から施行する。

付則 この会則は平成 19 年 5 月 25 日から施行する。

付則 この会則は平成 20 年 10 月 31 日から施行する。(第 3 条)

付則 この会則は平成 21 年 4 月 1 日から施行する。(第 4 条の 3 項・第 12 条の 3 項)

平成 21 年度～平成 22 年度役員（任期：平成 23 年 3 月 31 日まで）

（敬称略）

会 長	辻	英	明	岡山県立大学保健福祉学部教授		
副会長	永	原	國	夫	キミセ醤油(株)代表取締役会長	
副会長	川	崎	博	己	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授	
幹事	石	原	浩	二	岡山理科大学理学部臨床生命科学研究科講師	
幹事	石	原	伸	一	岡山県産業労働部産業振興課課長（担当：浅野正己 副参事）	
幹事	伊	東	秀	之	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科准教授	
幹事	奥	田	潔		岡山大学大学院自然科学研究科教授	
幹事	太	田	義	雄	中国学園大学現代生活学部教授	
幹事	亀	井	千	晃	岡山大学名誉教授・特命教授	
幹事	神	崎	浩		岡山大学大学院自然科学研究科（農）教授	
幹事	菊	永	茂	司	ノートルダム清心女子大学人間生活学部教授	
幹事	木	村	吉	伸	岡山大学大学院自然科学研究科教授	
幹事	木	本	眞	順	美	岡山県立大学保健福祉学部栄養学科教授
幹事	小	寺	幸	広		湧永製薬(株)ヘルスケア研究所分析科学研究室室長
幹事	小	林	昭	雄		大阪大学大学院工学研究科教授
幹事	小	林	東	夫		岡山県立大学地域共同研究機構産学官連携推進センター 産学官連携コーディネータ
幹事	須	見	洋	行		倉敷芸術科学大学産業科学技術学部教授
幹事	清	水	芳	雄		備前化成(株)代表取締役社長
幹事	高	畑	京	也		長浜バイオ大学教授
幹事	多	田	幹	郎		中国学園大学現代生活学部教授
幹事	友	近	健	一		岡山学院大学人間生活学部食物栄養学科教授
幹事	中	村	宜	督		岡山大学大学院自然科学研究科准教授
幹事	長	澤	治	子		神戸女子大学家政学部管理栄養士養成課程教授
幹事	中	島	伸	佳		岡山県立大学保健福祉学部栄養学科准教授
幹事	中	島	博			岡山県中小企業団体中央会会長 （担当：金田行彦 連携振興部連携開発課長）
幹事	*長	野	隆	男		川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科教授
幹事	成	松	鎮	雄		岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授
幹事	野	崎	信	行		岡山県工業技術センター専門研究員
幹事	畑	中	唯	史		岡山県農林水産総合センター生物科学研究所専門研究員
幹事	服	部	恭	一郎		日本オリーブ(株)社長（担当者：徐恵美 生産技術部課長）
幹事	浜	田	博	喜		岡山理科大学理学部臨床生命科学研究科教授
幹事	藤	原	恵	子		(株)フジワラテクノアート代表取締役社長 （担当：狩山昌弘 取締役）
幹事	益	岡	典	芳		岡山理科大学理学部臨床生命科学研究科教授
幹事	増	田	秀	樹		小川香料(株)機能素材本部長
幹事	松	浦	栄	次		岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授
幹事	三	宅	文	夫		岡山県農林水産総合センター所長 （担当者：栗木隆吉 産学連携推進課長）
幹事	山	本	耕	一郎		岡山県立大学保健福祉学部教授
幹事	山	本	登	志	子	岡山県立大学保健福祉学部准教授
幹事	山	本	洋	子		岡山大学資源生物科学研究所教授
監査	合	田	榮	一		岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授
監査	阪	田	功			ポルフィリン研究所所長
名誉会員	山	本	格			岡山大学名誉教授
〃	三	橋	正	和		(株)林原生物化学研究所参与

23. 3. 31 現在

23. 3. 31 現在

(参考) おかやまバイオアクティブ研究会会則抜粋

第7条 この研究会に役員として、会長1名、副会長4名以内、幹事20名以上と監査2名を置く。

(第7条 第2～8号は略)

7 役員の任期は2年とする。ただし、再任は妨げない。

おかやまバイオアクティブ研究会 入会申込書 (団体会員用)

年 月 日

団体名	ふりがな	
住 所	〒	
代表者	役職	ふりがな
		氏名
担当者	役職	ふりがな
		氏名
TEL	()	—
FAX	()	—
E-mail	@	
ホームページ	http://www.	

* 個人情報の取り扱いについては、本研究会の運営目的以外に利用したり、第三者に提供することはありません。

研修会等案内 ☐ メール ☐ FAX (理由 :)

* 研修会等のご案内につきましては基本的には「メール」で連絡させていただきますが、「FAX」を希望される場合は、お知らせください。

<お問い合わせ先>

おかやまバイオアクティブ研究会 事務局 (財) 岡山県産業振興財団
〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀 5301 テクノサポート岡山 3 階
Tel: 086-286-9651 Fax: 086-286-9676

おかやまバイオアクティブ研究会 入会申込書 (個人会員用)

年 月 日

氏 名	ふりがな		
住 所	〒		
所 属		役 職	
TEL	()	—	
FAX	()	—	
E-mail	@		
ホームページ	http://www.		

* 個人情報の取り扱いについては、本研究会の運営目的以外に利用したり、第三者に提供することはありません。

研修会等案内 ☐ メール ☐ FAX (理由:)

* 研修会等のご案内につきましては基本的には「メール」で連絡させていただきますが、「FAX」を希望される場合は、お知らせください。

<お問い合わせ先>

おかやまバイオアクティブ研究会 事務局 (財) 岡山県産業振興財団
〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀 5301 テクノサポート岡山 3 階
Tel: 086-286-9651 Fax: 086-286-9676

おかやまバイオアクティブ研究会 入会申込書 (学生会員用)

年 月 日

大学名	ふりがな	
大学住所	〒	
加入者名	学年等	ふりがな
		氏名
TEL	()	—
FAX	()	—
E-mail	@	
ホームページ	http://www.	

* 個人情報の取り扱いについては、本研究会の運営目的以外に利用したり、第三者に提供することはありません。

研修会等案内 ☐ メール ☐ FAX (理由:)

* 研修会等のご案内につきましては基本的には「メール」で連絡させていただきますが、「FAX」を希望される場合は、お知らせください。

<お問い合わせ先>

おかやまバイオアクティブ研究会 事務局 (財) 岡山県産業振興財団
〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀 5301 テクノサポート岡山 3 階
Tel: 086-286-9651 Fax: 086-286-9676

【編集後記】

近年、世界各地で発生していた大きな天災。そのニュースを聞く度に遠い世界の話だと思っていたことが、ついに日本でも起こってしまいました。この度の東日本大震災により被害を受けられた皆様には、心よりお見舞い申し上げます。地震に大津波、さらに原発と、それらを取り巻く想定外の問題が次々と露呈し、これからの日本はどうなってしまうのだろうかという途方に暮れる話題が続く一方で、被災地の方々の復興に向けた力強い志し、これまで知らない者同士だった人々が同じ目標に向かって協力し合い、少しずつ確実に前に進んでいる姿を見ると、自分たちも負けてはいられない！というパワーを分けてもらっている気がします。

このような不安定な情勢の中、今年も無事に「バイオアクティブ」第24号を刊行することができました。

本研究会は、本年度2つの大きな試みを行いました。すなわち、「Bioactive Okayama 2010」を国際会議として岡山県立大学と共催し、岡山県下の大学その他、東アジアの国々からも参加者を募り、盛況を収めました。また、大学の研究室を開放し、より深く研究内容を企業へ紹介する場を設けました。これを機に、さらに広くバイオ産業の発展を志す仲間を増やし、協力して、世界にはばたく成果や人材を生み出していくことを期待しております。

今後とも会員の皆様には、本研究会の益々の発展のためにご理解とご協力を賜りますよう、宜しく願い申し上げます。

岡山県立大学 中田 和江

おかやまバイオアクティブ研究会会報

「バイオアクティブ」

通巻24号 2011年6月10日発行

創刊1998年1月25日

企画：おかやまバイオアクティブ研究会編集委員会

編集・製作：おかやまバイオアクティブ研究会

編集委員：中田和江、中島伸佳、松浦栄次、

山本洋子、辻 英明

会報編集局：〒719-1197 総社市窪木111番地

岡山県立大学保健福祉学部栄養学科内

TEL&FAX：(0866) 94-2143

E-mail：htsuji@fhw.oka-pu.ac.jp

印刷・製本：西尾総合印刷株式会社
