

# 秋田県総合食品研究センター報告

第 14 号

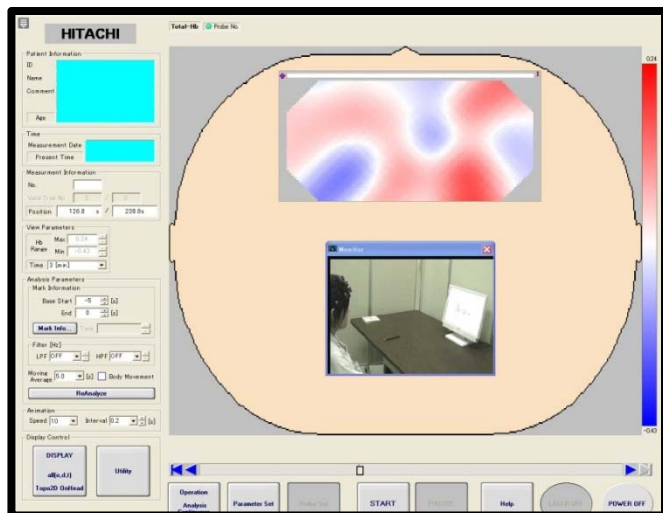
平成 24 年 (2012 年)

---

Bulletin of the Akita Research  
Institute of Food and Brewing  
(*ARIF*)

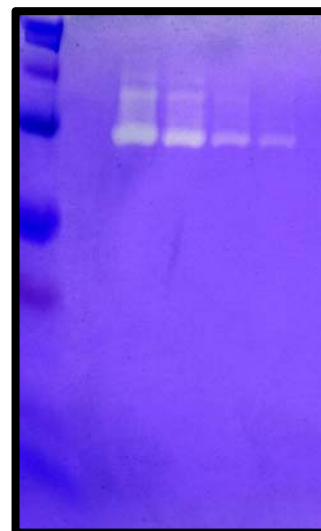
No. 14, 2012





**NRIS計測装置画面**

☆ 熊谷昌則  
「NIRSによる食品画像に  
対する個人の嗜好性判定」p.1



**MMP活性測定**

☆ 樋渡一之他  
「食材由来マトリックスメタロ  
プロテアーゼ阻害剤の探索」p.27



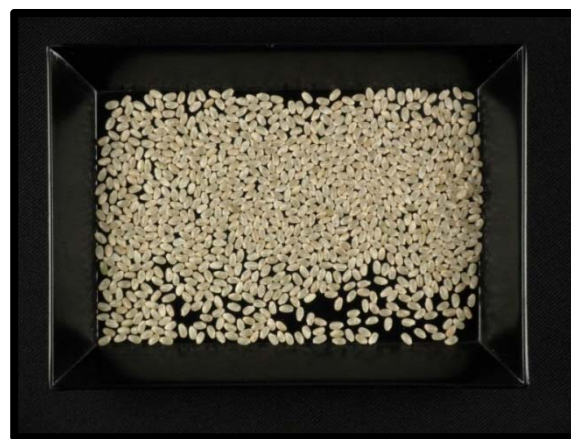
**クリアタイプ**



**濁りタイプ**

**発泡酒 試作品**

☆ 渡邊誠衛他  
「新規発泡性酒類の  
開発に関する研究」p.8



**粳発芽玄米**

☆ 大能俊久  
「粳発芽玄米と発芽玄米の炊飯  
によるγ-アミノ酪酸量の変化」p.23



## 目 次

1. 原著論文（報文）	1
2. 原著論文（研究ノート）	19
3. 総説	31
4. 特許の概要	59
5. 学会発表要旨	63
6. 外部発表論文概要	85
7. 秋田県総合食品研究センター報告」第1号～第13号総目次	93
8. 第1号～第14号人名索引	102
9. 秋田県総合食品研究センター報告規定	105



1. 原著論文（報文）

- 1) 「NIRS による食品画像に対する個人の嗜好性判定」・・・・・・・・・・1  
熊谷 昌則
- 2) 「新規発泡性酒類の開発に関する研究」・・・・・・・・・・8  
渡邊 誠衛、高橋 仁、大野 剛、佐藤 智美、田口 隆信





# NIRSによる食品画像に対する個人の嗜好性判定

熊谷昌則

(秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ)

Masanori KUMAGAI

## 【要 約】

本研究は、個人の感性・嗜好に係わる脳内情報を脳血流変化量にもとづいた NIRS (Near Infra- Red Spectroscopy) 信号で検出できないかどうか検討したものである。被験者に外部刺激としてコンビニエンスストアで販売されているスイーツの画像を見せて、被験者が食べたいと思って見ているときの脳血流変化と、そうではないときの脳血流変化の違いについて調べた。その結果、被験者ごとにその応答は異なるものの、嗜好の違いが NIRS 信号に反映され、被験者個人の嗜好をアンケート調査などで意思表示させることなく検出できる可能性が示された。

## 【緒 言】

近年、脳科学の成果、知見を商品開発やマーケティングに応用しようとする取り組みが活発に行われるようになってきた。その関心事のひとつには、消費者の本音や無意識の反応を引き出せるのではないかという期待感がある。

従来、感性や嗜好を測るには、アンケート調査法や官能検査法などによる質問紙法が用いられてきたが、これらの方法では、被験者の応答を口頭または記述により明示的に抽出しなければならないので、場合によっては客観性、再現性、信頼性などに欠けることがあった。

そこで、これまで筆者らは、食品の受容性や嗜好性、さらには食品を摂取した際の満足度や癒し感などを客観的に判断しうる新しい食品評価法の開発を目指して、NIRS (近赤外分光法: Near Infra- Red Spectroscopy) に着目し、これを適用すべく、種々の取り組みで実用化のための検証を重ねてきた<sup>1)</sup>。

NIRS は神経活動にもとづく脳血流変化を反映する脳内ヘモグロビン(酸素化ヘモグロビン: oxy-Hb, 脱酸素化ヘモグロビン: deoxy-Hb) の変化量を優れた時間分解能で、リアルタイムに記録できるのが特長である。測定は、完全に非侵襲であるばかりでなく、被験者の身体的な自由度が高く、座位でも可能である。その一方で、得られる脳血流変化量は相対的なもので、絶対量を知ることができない。また、NIR 光が拡散反射するのは大脳表層のみであり、深部の活動までは測定できないなどの問題もある。しかしながら、感性や嗜好性を評価するという目的のもとでは、他の脳機能計測法よりも NIRS のほうがその利点を最大限、活用できるため、むしろ NIRS のほうがより適している場合もある<sup>2)</sup>。

本研究では、前報<sup>3, 4)</sup>に引き続き、様々な食品画像を視覚刺激として与え、その

画像評価時の前頭前野における局所脳血流変化量から、被験者の嗜好や感性情報を非明示的に読み取れないかどうか検討した。

**【実験方法】**

被験者は、秋田県総合食品研究センター職員で、事前にインフォームドコンセントの手続きがとられた、健常な右利きの女性 8 名（20～40 代，平均年齢 31.5 歳）である。NIRS にもとづく脳血流変化量は、光トポグラフィー ETG-4000(日立メディコ) を使用し、被験者の前頭前野部位に図 1 のように 3×5 モードの光ファイバプローブを配置し、全 22ch で測定した。

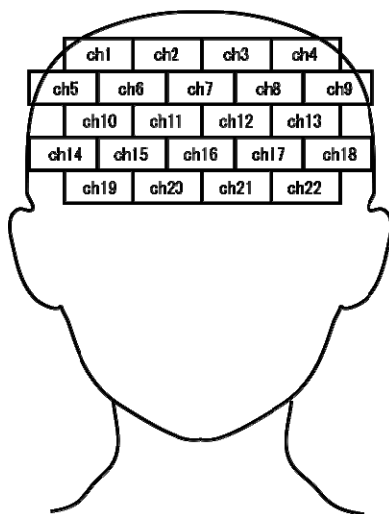


図 1 光ファイバプローブの配置

今回用いた食品画像は、コンビニエンスストアで販売されているスイーツ 19 品目の外観写真であり、図 2 に提示画像の例を示した。商品名、価格も併記されている。被験者には、17 インチの CRT 上にそれぞれの画像を 10 秒間ずつ呈示して、それぞれのスイーツを食べたいと思うかどうかを頭の中で判断させ、このときの脳血流変化量を測定した。被験者には脳血流測定後に、それぞれのスイーツに対して食べたいと思ったかどうかをアンケート方式により回答させた。

本研究でのデータ解析は、被験者の oxy-Hb の変化量に着目して、移動平均による平滑化処理後に、画像提示 0 秒を原点



- 
- 
- 



図 2 提示画像の例

とする 10 秒間の相対的脳血流変化量に対して行った。はじめに「食べたい」と思っ  
て見ていたときの画像と、「そうではない」ときの画像についてそれぞれ oxy-Hb  
の変化量を被験者ごとに比較評価した。次に、それぞれの嗜好ごとに oxy-Hb の変  
化量を加算平均し、両者の違いを把握した後、それぞれを差分処理して比較評価し  
た。判別分析は統計パッケージ PASW Statistics ver.18 を用いた。

【結果と考察】図 3 は、一例として被験者 A のそれぞれの提示画像 19 種に対する

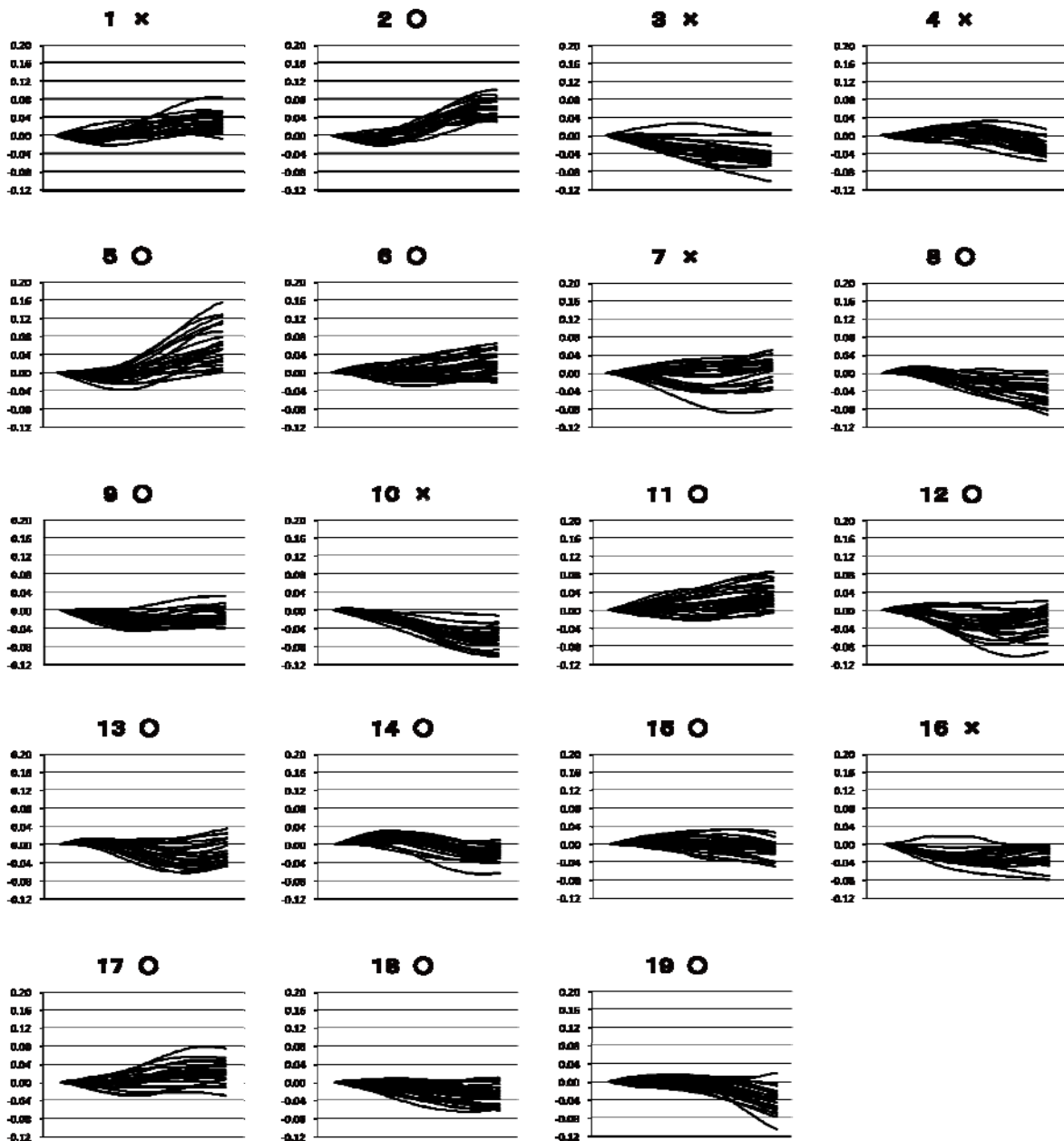


図 3 被験者 A の各画像に対する oxy-Hb の変化量

各図中の上部の数字は画像番号を表し、その隣の○は「食べたい」、×は「そうではない」ことを表す。横軸はすべて  
画像提示 0 秒～10 秒の時間／秒を表し、縦軸は 0xy-Hb の濃度長変化／mM・mm を表す。それぞれの曲線は、ch1～ch22 の  
oxy-Hb の変化量を表す。

oxy-Hb の変化量と、その嗜好性を示したものである。各図中の上部の数字はそれぞれ画像番号を表し、その隣の○印は被験者が「食べたい」と思って見ていたことを、そして×印は「そうではない」と思って見ていたことを表している。それぞれ、oxy-Hb の相対的変化量は、画像提示 0 秒の時を原点に換算して、その後の 10 秒間の経時的変化量を表している。これにより、被験者が「食べたい」と思って画像を見ているときの oxy-Hb の変化量と、「そうではない」ときの oxy-Hb の変化量の違

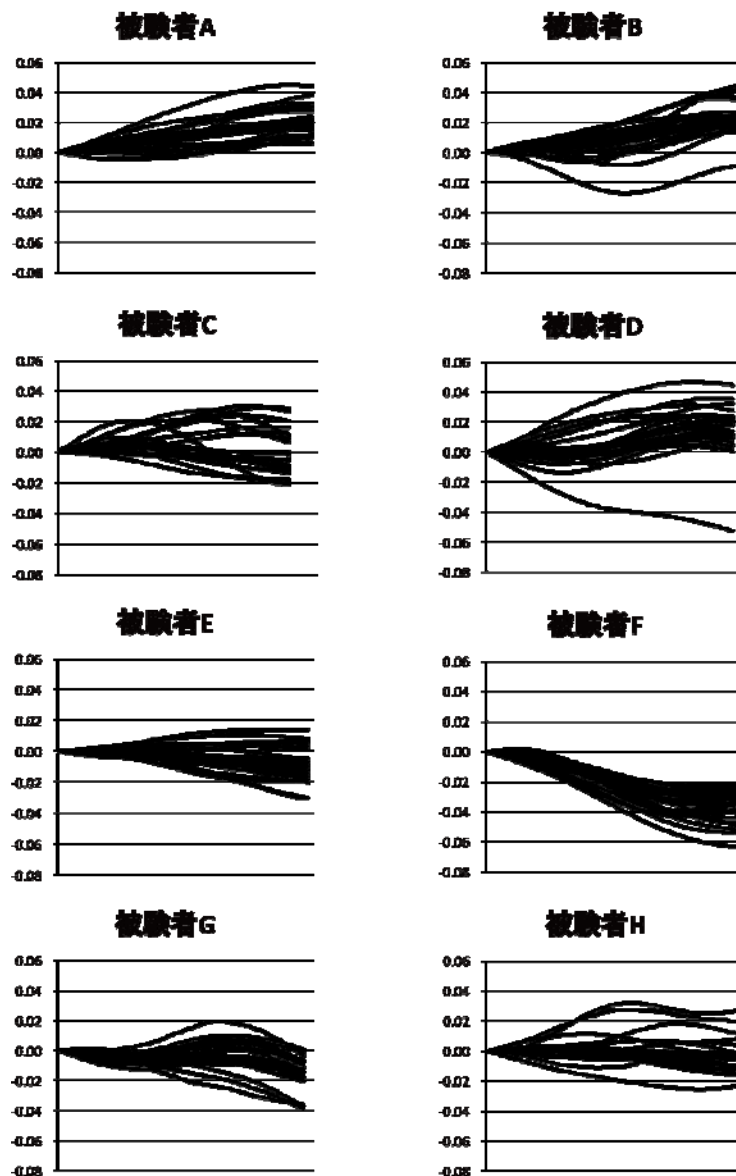


図 4 各被験者の脳血流変化の嗜好平均の差分

被験者ごとに「食べたい」と思って見ていたときの oxy-Hb の変化量から、「そうではない」と思って見ていたときの oxy-Hb の変化量を引いた差分を表す。横軸はすべて画像提示 0 秒～10 秒の時間/秒を表し、縦軸は Oxy-Hb の濃度長変化 /mm・mm を表す。それぞれの曲線は、ch1～ch22 の oxy-Hb の変化量を表す。

いが比較評価できる。同様にして、他の被験者 B から H までのグラフを作成し、概観したが、被験者間で普遍的に、「食べたい」ときと「そうではない」ときの oxy-Hb の変化量の違いを系統的に、かつ定量的に表すことはできなかった。

そこで次に、それぞれの被験者ごとに「食べたい」ときと、「そうではない」ときの単純加算平均を求めて比較した。加算平均を行うことで、被験者の反応を明瞭化したり、ノイズの混入したデータを取り除いたりすることができる。これにより、

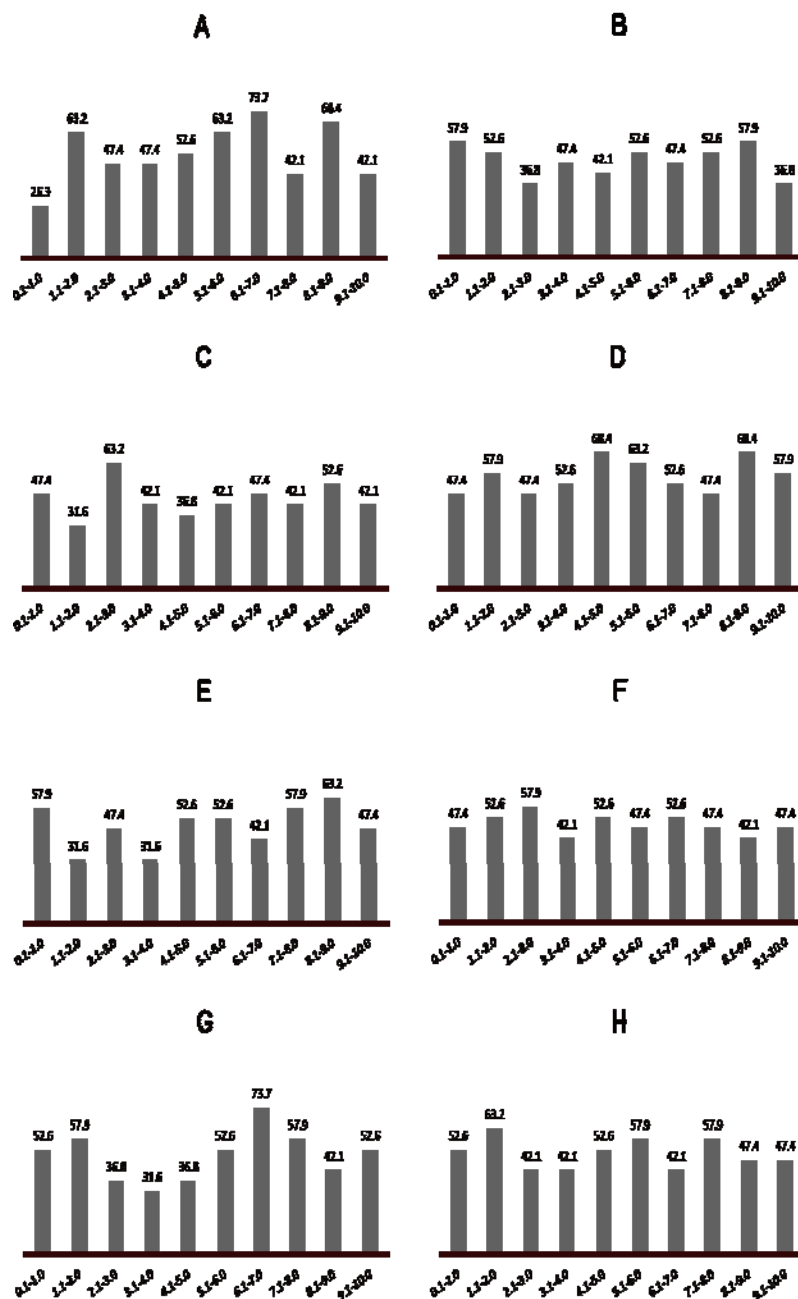


図5 全被験者の画像提示後、単位時間あたりの嗜好予測正答率/%

例えば、被験者 A の場合、6.1-7.0 秒間の oxy-Hb の変化量のデータを用いたとき、73.7% の正答率で被験者 A の嗜好が予測できることを表す。

それぞれの被験者について、「食いたい」と思って見ていたときの脳血流変化量と「そうではない」ときの脳血流変化量の平均的パターンを抽出することができた。ここでは被験者ごとの違いを明確にするために、「食いたい」と思って見ていたときの oxy-Hb の変化量から、「そうではない」と思って見ていたときの oxy-Hb の変化量を引いた差分を求めて、図 4 に示した。被験者 A, B は「食いたい」と思って見ているときの方が徐々に脳血流量が増大する傾向にあることが分かる。被験者 C, D, E, G, H は、それぞれの測定部位ごとに増大する部位と減少する部位が混在している。被験者 F にあっては、「食いたい」と思って見ているときの方が徐々に脳血流量が減少し、「そうではない」とときには脳血流量が増大する傾向にある。このように、個人差による違いはみられるものの、被験者ごとにその被験者専用の判別モデルを作成すれば個人の嗜好を検出できる可能性が示唆された。なお、ここで留意しなければならないことは、被験者間での比較ではなく、あくまでも被験者内での比較に限定されることである。なぜならば、NIRS では分光学的な光路長が計測できないため、得られるデータは Hb の相対的な変化であるという制約があるためである。したがって、複数人データの加算平均や被験者間データの直接比較などは、原理的に問題があるといわれている<sup>5)</sup>。

以上の観点にもとづき、さらなるデータ解析も被験者ごとに検討することとし、被験者ごとにそれぞれ判別モデルを作成し、その妥当性を検証した。図 5 は被験者

表 1 被験者 A の判断と脳血流変化にもとづく予測値

画像番号	被験者の判断	予測値
1	×	○
2	○	×
3	×	×
4	×	×
5	○	○
6	○	○
7	×	×
8	○	○
9	○	○
10	×	×
11	○	×
12	○	○
13	○	○
14	○	×
15	○	○
16	×	○
17	○	○
18	○	○
19	○	○

枠で囲ったところは誤判別であったことを示す。

に対して画像提示後の経過時間を 1 秒ごとのブロックに分けて、その間の oxy-Hb の変化量の平均値を用いて判別分析を行ったときの全被験者の単位時間あたりの嗜好予測正答率を示したものである。これにより、どの時間帯のデータを使えば嗜好の違いをうまく判別できるかがわかるが、被験者によってバラツキがあり、一様ではなかった。最も正答率の高かったのは、被験者 A と G の画像提示後 6.1-7.0 秒間の脳血流変化量にもとづいた判別で、このときの正答率は 73.7% (19 種類の画像のうち、15 種類の画像の嗜好を正しく判別) であった。なお、時間帯ごとの判別率の評価については、画像提示後の脳血流に影響を与えるまでのタイムラグを考慮する必要がある、この点については別途、検討が必要と考えている。判別結果の妥当性の評価は、ここでは外部刺激として食品画像 19 種類を用いているので、交差検定 (leave-one-out) により 18 種類のデータを既知試料として判別モデルを構築し、残りの 1 組のデータを未知試料とみなし、先の判別モデルで未知試料が判別できるかどうかを検証した。全体ではこの操作を 1 種類ずつ順に、19 種類の画像データに適用して、それぞれ判別できるかどうかを検証した。

判別分析の結果についてさらに詳しく解析するために、表 1 には、一例として被験者 A がそれぞれの画像に対してアンケートで答えた嗜好判断の結果と、本研究で得られた被験者 A の画像提示後 6.1-7.0 秒間の脳血流変化量にもとづいて予測された判別分析の結果を比較して示した。ところで、ここでいう被験者の判断とは、あくまでも脳血流測定後に内省報告により得られた結果である。したがって、実際に被験者がそれぞれの画像を見ていたときの判断とはタイムラグがあるので、被験者も気付かない、当時の判断とは異なる結果が含まれていてもおかしくない。言い換えると、脳血流変化にもとづいて予測された結果のほうが、そのときの被験者の判断を反映している可能性も捨て去ることができない。しかしながら、この点について言及するためには、さらなる検証が必要であり、現在、検討を始めている。また、測定部位ごとの情報についても精査しているところである。

本稿では、感性・嗜好に係わる脳内情報を NIRS 信号で検出できる可能性について述べた。今後は実証データのさらなる蓄積とともに、予測判別の精度の向上が求められる。

## 【謝 辞】

本研究の一部は科研費 (22500751) の助成を受けて実施されたことを記す。

## 【引用文献】

- 1) 熊谷昌則,高橋徹,佐藤文華,渡部雅実,堀一之,樋渡一之,戸枝一喜,秋山美展:脳機能計測による新しい食品の評価法の開発,秋田県総合食品研究所報告 10号,29-36 (2008).
- 2) 酒谷薫監修:NIRS-基礎と臨床-,新興医学出版社(2012).
- 3) 熊谷昌則,渡部素子,菅原千秋,高橋徹,秋山美展:食品の外観嗜好評価時における前頭前野局所脳血流動態の解析,秋田県総合食品研究センター報告 12号,1-6 (2010).
- 4) 熊谷昌則:NIRSによる脳血流変化量に基づく食品の嗜好性判断,秋田県総合食品研究センター報告 13号,1-6 (2011).
- 5) 福田正人:精神疾患の生理学における NIRS の意義,第 4 回日本脳イメージング研究会,(2005).

# 新規発泡性酒類の開発に関する研究

渡邊誠衛\*, 高橋 仁, 大野 剛, 佐藤智美, 田口隆信  
(\*秋田県総合食品研究センター 酒類グループ)

Seiei WATANABE , Hitoshi TAKAHASHI ,  
Tsuyoshi OHNO , Tomomi SATO , Takanobu TAGUCHI,

## 【要 約】

“やや甘口で上品な味と高い香りのフレッシュなシャンパン風”の新規な発泡清酒の製造を目的とし研究を行った。

主に官能試験による品質評価と適度な炭酸ガス量の付与条件を検討した結果、ビン内二次発酵法により高品質で安定性の高い新規発泡清酒の製造が可能となり、試作品の品質は高い評価を得ることができた。

応用技術として、香味に特徴のある発泡酒、ガス圧やにごりの割合の異なる発泡酒など、蔵元の個性をアピールした発泡清酒の製造が可能となった。

技術移転を進めた結果、技術相談による商品も含めて、本技術を応用した発泡清酒が10社の蔵元から商品化された。

## 【緒 言】

清酒の出荷量が1995年以来16年ぶりにプラスに転じた本県ではあるが、当時に比べると40%まで減少しており、依然厳しい状況に変わりはなく、清酒業界からは蔵元独自の個性ある清酒が求められている。その中でシェアは少ないながら消費拡大傾向にあるのが発泡清酒である。シャンパンを代表とする泡物は、かつてはクリスマスの定番から、いまや年間商品になってきており、推定ではあるが、年間2桁の伸び率で出荷額は20億円以上と言われており<sup>1)</sup>、消費者や業界のニーズが高く、可能性の大きな商品であり、各メーカーや各県の公設試が精力的に開発を進めている。

発泡清酒は、大きく分類して“にごり発泡清酒”と“清澄発泡清酒”があり、にごり発泡清酒は酵母が生存する活性清酒と、火入れにより酵母を死滅させている商品がある。一方、炭酸ガスの付与方法は、ビンや耐圧タンクを用いて酵母によって炭酸ガスを生成させる“ビン内またはタンク内二次発酵方式”<sup>2)~4)</sup>と、カーボネーターやカーボネーティングストーンを用いて炭酸ガスを吹き込む“炭酸ガス添加方式”がある。酒販店の店頭には、開発された発泡清酒用の酵母<sup>5) 6)</sup>を用いて、様々な製造方法で造られたバラエティー豊かな発泡清酒が陳列されている。

しかし、酵母が生きている発泡清酒は、①過度なビン内発酵のために開栓時に噴き出すケースや、②酵母や残存酵素の影響により急激に品質が劣化し、自己消化臭や粕様臭の発生など、酒質の安定性に大きな問題を抱えている。一方、炭酸ガス添加方式は、ガスを付与する際に高価で大掛かりな装置を必要としているなどの問題がある。

本報では、ビン内二次発酵法により高品質で安定性の高い新規発泡清酒の製造が可能となったので報告する。



## 【実験方法】

### 1. 市販発泡酒の品質調査

#### 1) 品質評価

酒販店から全国の市販発泡清酒（一部リキュールを含む）17点（A～Q）を購入した。秋田県内清酒メーカーの若手技術者で構成している秋田県清酒分析研究会の会員15名により、香り・味を中心に3段階評価で官能試験を行い、市販発泡清酒の品質調査と問題点の抽出を行い、本研究において目標とする発泡酒の品質の方向性を決定した。

#### 2) 炭酸ガス圧の測定

（株）藤原製作所製のガス圧計を用いて炭酸ガス圧（kg/cm<sup>2</sup>）を測定し、測定値を炭酸ガス吸収係数表により換算し、ガスボリューム（GV）で表した。

### 2. 酵母の分離・選択

軽快でさわやかなタイプとして酢酸イソアミル高生産株である秋田酵母 No.12を選択した<sup>7)</sup>。一方、華やかでフルーティなタイプとしてカプロン酸エチル高生産株は、きょうかい1801号（K-1801）を選択した<sup>8)</sup>。炭酸ガスを付与するための二次発酵用の酵母は、秋田流・花酵母（AK-1）<sup>9)</sup>、<sup>10)</sup>を用いた。

また、種麹菌は、当研究センターと（株）秋田今野商店と共同で開発して吟醸酒製造において実績のあるN54Gを選択した。

### 3. 炭酸ガスの付与方法

炭酸ガスの付与方法は様々な方法があるが、高価な設備の導入の必要もなく、少ロットでも実用化の可能性が高く、かつ、応用範囲の広いビン内二次発酵方式で炭酸ガスを付与することとした。

#### 1) 酵母添加時のアルコール濃度と酵母の活性

前培養は、YPD 液体培地（1% Yeast extract、2% Poly peptone、2% Glucose）で、30℃、3日間培養を行った。エタノール濃度を8～12%の5段階に調整したYPD 液体培地の入った5ml試験管に初発菌数 $1 \times 10^7$  cells/mlとなるように酵母添加し、30℃、7日間静置培養した。

酵母の増殖は、増殖に伴う菌体の濁度で判定し、4段階（－：増殖無し～+++：増殖多い）で示した。活性の程度は、ダーラム管中の炭酸ガス量で判定し、4段階（－：ガス無し～+++：ガス多い）で示した。

#### 2) 酵母添加時のグルコース量と炭酸ガス発生量

グルコース濃度を1～10%の10段階に調整したYPD 液体培地を用いて、初発菌数 $1 \times 10^7$  cells/mlになるように酵母を添加し、30℃、7日間、完全発酵させ炭酸ガス量を測定し、グルコース濃度と炭酸ガス発生量の関係を検討した。

#### 3) 酵母添加時の初発菌数と炭酸ガス発生量

YPD 液体培地（1% Yeast extract、2% Poly peptone、2% Glucose）180ml

に、初発菌数を  $1 \times 10^3 \text{cells/ml}$  ~  $1 \times 10^7 \text{cells/ml}$  の 5 段階に調整して酵母を添加し、 $30^\circ\text{C}$ 、7 日間、完全発酵させ、初発添加酵母数と炭酸ガス発生量の関係を検討した。

#### 4. 二次発酵させるための培地の検討

ビン内二次発酵法による発泡清酒の試作品を検討するにあたり、二次発酵させるためのベースとなる培地の検討を行った。具体的には、使用時の酒母、中期の醪、後期の醪の 3 種類を二次発酵させる前のベース培地として検討し、二次発酵後の品質について官能試験を中心に検討した。

#### 5. 試作品の作成

##### 1) 酵素糖化液の検討

二次発酵ベース培地への補糖を目的として、酵素四段法を検討した。天野製菓社製の 6 種類の酵素（グルク吟、グルク SG、フルコアミラーゼアマノ SD、コクゲン L、TG-B、プロテアーゼ M）それぞれ 4g を水 600ml に溶解させ、蒸米 400g を投入して、 $55^\circ\text{C}$  で 5 時間糖化を行い蒸米糖化液を作成し、生成グルコース量、液化の状態、官能試験から蒸米酵素糖化液作成のための最適酵素剤を選定した。

##### 2) 試作品の作成

試作品用の二次発酵ベース培地は、アルコール 10% 生成時の醪に、グルク SG を使用した蒸米糖化液と酸度を調整したものとした。具体的には、酸度を 1.5 と 3.0 の 2 区分に調整し、酵素糖化液でグルコースを 3.5% と 7.0% の 2 区分に調整し、それぞれ組み合わせて 4 種類の二次発酵ベース培地を作成した。ベース培地には、高酢酸イソアミル高生産株の秋田酵母 No.12 と高カプロン酸エチル生産株の K-1801 の 2 種類のタイプを使用した。二次発酵用の酵母は秋田流・花酵母 (AK-1) を使用した。

発酵型式は、ビン内二次発酵を採用し、初発菌数  $1 \times 10^7 \text{cells/ml}$  となるように酵母を添加し、 $30^\circ\text{C}$ 、3 日間発酵させた。

二次発酵前後の成分のうち、日本酒度は、京都電子社製の振動式密度計 (DA-310)、一般成分は国税庁所定分析法<sup>1)</sup>、香気成分は、アジレント社製のガスクロマトグラフィーを用いてヘッドスペース法<sup>2)</sup>で測定した。

#### 6. 試作品の評価

4 種類の試作品について官能試験を行い、品質について評価した。

一回目は、7 種類の市販発泡酒と 4 種類の試作品をパネラー 8 名で官能試験を行った。二回目は、11 種類の市販発泡酒と 4 種類の試作品をパネラー 20 名で官能試験を行った。

## 7. 品質安定性試験

試作品について、①生酒、②火入れ酒、③凍結酒について、3ヶ月間貯蔵した後、成分分析と官能試験により品質の安定性を検討した。

### 【 結果と考察 】

#### 1. 市販発泡酒の品質調査

市販発泡酒は、清酒表示のものが多く、リキュール表示のものもあり、アルコール度数や甘さ、酸味にバラエティがあった。

購入した17点の発泡酒について、秋田県内蔵元の若手研究員のパネラー15名で、香り・味を中心に官能試験を行った結果、品質にバラエティはあったが、やや特徴不足で、粕様の香りや、香味の変化したものが多く、全体の評価はあまり良くなかった。

市販発泡酒の炭酸ガス圧を、対照のシャンパン、ガス入り炭酸飲料、ビールと比較すると、清澄タイプの発泡酒は、ガスボリューム (GV) で1.8~4.0GVと炭酸ガス圧に幅があった。また、にごり活性タイプの発泡酒は4.0GV付近で、シャンパンよりは低い、高めの炭酸ガス圧だった。炭酸ガスの付与方法は、炭酸ガス添加、タンク内二次発酵、ビン内二次発酵の3種類が基本だったが、混合型もあった。

以上から、本研究で目標とする酒質は、“やや甘口で上品な味と高い香りのフレッシュなシャンパン風の清酒”で炭酸ガス圧をおおよそ5.0GVと設定した。

表1 市販発泡清酒の品質

	商品名	原材料	アルコール(%)	酒 類	品質
1	市販酒A	米、米麴	4.5~5.5	清酒(発泡性)①	◎
2	市販酒B	米、米麴	6~7		○
3	市販酒C	米、米麴	5~6		×
4	市販酒D	米、米麴	11	清酒・発泡性①	×
5	市販酒E	米、米麴	11		○
6	市販酒F	米、米麴	7		×
7	市販酒G	米・米麴	7~8	清酒(発泡性)①	×
8	市販酒H	米・米麴・糖類	6~7		×
9	市販酒I	米・米麴	5~7		×
10	市販酒J	米・米麴・糖類・酸味	7~8		○
11	市販酒K	清酒・糖類・米焼酎・酸味料	7	リキュール・発泡性①	○
12	市販酒L	清酒+大豆・紫黒米色素	5		◎
13	市販酒M	米・米麴・醸造用アルコール	15	清酒・発泡性	○
14	市販酒N	米・米麴・クエン酸	7		×
15	市販酒O	米・米麴	6~7		×
16	市販酒P	米・米麴	7~8		◎
17	市販酒Q	リキュール清酒(発泡性)	7~8		○

	炭酸ガス含有量(20℃、GV)													
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	
シャンパン											5.0	↔	5.5	
清涼飲料①							3.7	↔	3.8					
ビール					2.6	↔	2.8							
清涼飲料②				1.9	↔	2.0								
清澄発泡清酒					1.8	↔				4.0				
にごり活性清酒								4.0	↔	4.1				

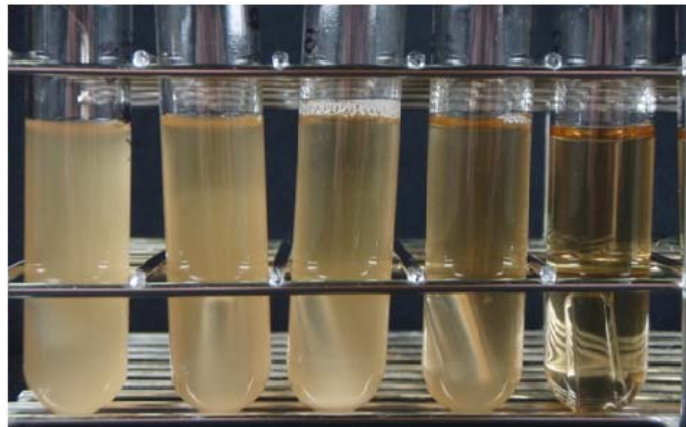
図1 市販発泡清酒の炭酸ガス圧

## 2. 炭酸ガスの付与方法の検討

炭酸ガスの付与方法は大きく分けて2通りの方法があり、1つめは“二次発酵方式”でビンや耐圧タンクを用いて酵母による二次発酵で炭酸ガスを付与させる方法、2つめは、“炭酸ガス添加方式”でカーボネーターやカーボネーティングストーンを用いて炭酸ガスを付与させる方法がある。

### 1) 酵母による二次発酵に及ぼす初発アルコール濃度の影響

アルコール存在下における酵母の増殖と発酵を調べるために、エタノール濃度を8~12%の5段階に調整したYPD液体培地を用いて30℃、7日間、完全発酵させて検討した。図2に示すようにエタノール濃度12%以上では増殖・発酵はできなかったことから、酵母による二次発酵を行う際には、二次発酵ベースは初発のアルコール濃度を11%以下にすることとした。



エタノール濃度	→	8%	9%	10%	11%	12%
増殖	→	+++	+++	++	+	—
発酵	→	+++	+++	+++	++	—

図2 アルコール濃度と酵母の増殖・発酵

### 2) 炭酸ガス発生量に及ぼすグルコース濃度の影響

グルコース濃度を1~10%の10段階に調整したYPD液体培地180mlを用いて、初発菌数  $1 \times 10^7$  cells/ml となるように酵母を添加し、30℃、7日間、完全発酵後の炭酸ガス量を測定し、グルコース量と炭酸ガス発生量の関係を検討した。その結果、図3に示すように、完全発酵の場合グルコース4%以上になるとGVが6以上となり、ビンからガスが噴き出す場合があり、二次発酵後のGVは、5以下が望ましいことが分かった。

適度な糖分を残した発泡清酒を造るためには、二次発酵前のベース培地のグルコース量の調整と、発酵条件の検討、加えて炭酸ガス量と官能試験を総合的に判断していかなければならないことが分かった。

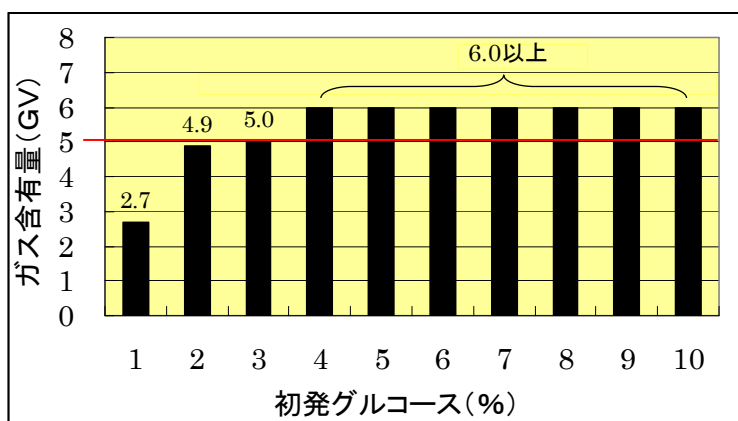


図3 グルコース量と炭酸ガス発生量

### 3) 炭酸ガス発生量に及ぼす初発菌数の影響

前記同様にYPD液体培地（グルコース2%一定）180mlを用いて、初発菌数を  $1 \times 10^3$  cells/ml ~  $1 \times 10^7$  cells/ml の5段階に調整して酵母を添加し、30℃、7日間、完全発酵させ、初発菌数と炭酸ガス発生量の関係を検討した。

図4に示すように、30℃、7日間の完全発酵した場合、初発菌数が多くなるにつれて炭酸ガス発生量は多くなる傾向が確認された。二次発酵で短期間で最適な炭酸ガスを付与させるためには、初発菌数は  $1 \times 10^7$  cells/ml が望ましいと考えられた。

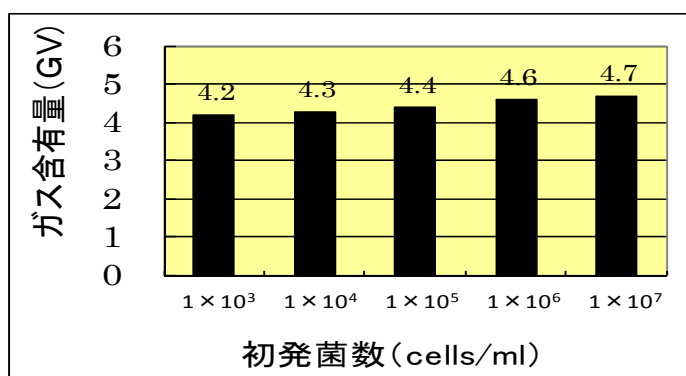


図4 初発菌数と炭酸ガス発生量

以上の結果から、ビン内二次発酵方式で、できる限りアルコールを生産せずに 5GV 以下の適度な炭酸ガスのみを付与させる条件として以下の通りとした。①酵母の発酵に可能なアルコール濃度を 11%以下とする。②発酵後の品質を考慮して二次発酵酵母添加前のグルコース濃度を 5～10%とする。③二次発酵用添加酵母の初発菌数  $1 \times 10^7$  cells/ml、二次発酵条件 30℃で、2～3 日間の発酵とする。

#### 4. 試作品の作成

##### 1) 酵素糖化液の検討

二次発酵ベース培地への補糖を目的として、6 種類の酵素剤を用いた蒸米酵素糖化液を作成した。表 2 に示すように、グルク S G を使用した蒸米糖化液でグルコース量が 23.3%で液化状態も良く、官能的に“上品な甘さ”となった。二次発酵ベース培地の補糖用の酵素としてグルク S G が最適と考えられた。

表 2 蒸米酵素糖化液の成分及び官能

	酵素剤	Brix (度)	Glucose (%)	味	溶け 状態	総合 判定
1	グルク吟	30.9	27.0	甘強い、やや苦味、やや粕味	液状	○
2	<b>グルクSG</b>	<b>29.7</b>	<b>23.3</b>	<b>甘い、上品</b>	<b>液状</b>	<b>◎</b>
3	グルコアミラーゼ アマノ SD	28.0	28.3	甘い、上品、砂糖様	のり状	△
4	コクゲンL	30.8	5.2	甘しょっぱい、	粒残	×
5	TG-B	29.8	9.1	甘少ない、粉っぽい、水飴様	粒残	×
6	プロテアーゼM	30.7	24.1	甘強い、苦味	液状	×

##### 2) 試作品の製造条件

以上の結果から、発泡酒試作品の製造条件の一例を以下の通りに設定した。

- ① ビン内二次発酵法とした。
- ② 二次発酵ベース培地用の酵母は、高酢酸イソアミル高生産株の秋田酵母 No.12 と高カプロン酸エチル生産株の K-1801 の 2 種類のタイプを使用し、種麹菌はグルコアミラーゼをバランスよく生産する N54G ( (株) 秋田今野商店製) を用いた。
- ③ アルコール約 10%生成時の二次発酵ベース培地にグルク S G の蒸米糖化液を添加して糖分を調整し、乳酸で酸度を調整した。具体的には、酸度を 1.5 と 3.0 の 2 区分に、グルコースを 3.5%と 7.0%の 2 区分に調整し、それぞれの組み合わせで 4 種類の二次発酵ベース培地を調整した。
- ④ 二次発酵用の酵母として、秋田流・花酵母 (AK-1) を用いて初発菌数  $1 \times 10^7$  cells/ml となるよう添加し、30℃、2 日間発酵させ、必要な炭酸ガス量を付与させた 4 種類のタイプの試作品を作成した。

表 3 には、ビン内二次発酵前後の成分変化を示した。ビン内二次発酵により、アルコールと酸度が増え、グルコースが減少した。作成した 4 種類の試作品は、アル

コール 10%程度で、グルコースと酸度と炭酸ガス圧の異なる発泡酒となった。

表 3 ビン内発酵前後の成分変化

試作品 No	発酵前成分			ビン内発酵 30℃,2日間	試作品 No	発酵後成分			
	アルコール (%)	グルコース (%)	酸度 (ml)			アルコール (%)	グルコース (%)	酸度 (ml)	ガス圧 (GV)
1	9.6	3.5	1.5	→	1	10.1	2.5	1.8	4.5
2	9.6	3.5	3.0		2	10.1	2.5	3.2	4.5
3	9.6	7.0	1.5		3	10.2	6.0	1.8	4.9
4	9.6	7.0	3.0		4	10.2	6.0	3.2	4.8



図 5 発泡酒 試作品

## 5. 官能試験結果

清酒分析研究会所属の県内蔵元若手技術者らパネラー8名で、7種類の市販発泡酒と4種類の試作品の官能試験を行った結果、試作発泡酒の評価順位は11点中、2位、3位、4位、5位と好成績を得た。(表4) また、県内杜氏らパネラー12名で11種類の市販発泡酒と4種類の試作品の官能試験を行った結果、試作発泡酒の評価順位は16点中、1位、2位、4位、5位と高い評価を得た。(表5)

発泡清酒の品質で重要な項目は、“ガスの強さ・泡の細かさ・甘・酸の濃さ・上品さ”であるが、“甘すぎる、もう少し薄くても良い、ガス圧は良い”等の改善点も指摘された。

表 4 発泡酒試作品 官能試験結果①

No	商品	アルコール (%)	評点 (平均点)
1	市販酒-1	5%	3.1
2	市販酒-2	5%	1.5
3	市販酒-3	7~8%	3.8
4	市販酒-4	7~8%	3.4
5	市販酒-5	13%	3.6
6	市販酒-6	9%	3.3
7	市販酒-7	11%	3.3
8	試作品①	約12%	2.2
9	試作品②	約12%	2.4
10	試作品③	約12%	2.4
11	試作品④	約12%	2.4

5点法 (1:良~5:悪)

表 5 発泡酒試作品 官能試験結果②

No	商品	酒 類	アルコール (%)	備 考	平均
1	市販酒-1	清酒(発泡性)①	5	発泡清酒	2.0
2	市販酒-2	日本酒(発泡性)①	6	すっきり低アルコール 微発泡酒	2.7
3	市販酒-3	清酒(発泡性)①	7	発泡純米酒	3.7
4	市販酒-4	清酒(発泡性)①	7~8		3.3
5	市販酒-5	清酒(発泡性)①	7~8		3.2
6	市販酒-6	日本酒 炭酸ガス含有①	8	Sparkling発泡清酒	3.0
7	市販酒-7	清酒(炭酸ガス入り)	9	にごり酒に炭酸ガスをプラス	3.5
8	市販酒-8	日本酒	11	弾ける純米大吟醸	3.1
9	市販酒-9	清酒(発泡性)①	13	ビン内発酵による繊細な泡	3.8
10	市販酒-10	日本酒	14	スパークリング純米酒	4.2
11	市販酒-11	清酒	15	シャンパンタイプの発泡にごり酒	4.6
12	市販酒-12	日本酒	15	微発泡性生酒	4.3
13	試作品①	日本酒	約12	ビン内発泡	1.8
14	試作品②	日本酒	約12	ビン内発泡	2.0
15	試作品③	日本酒	約12	ビン内発泡	2.5
16	試作品④	日本酒	約12	ビン内発泡	2.5

5点法 (1:良~5:悪)

## 6. 品質安定性試験

試作品①について貯蔵試験を行い、官能試験により品質評価を行った。貯蔵試験前に-25℃で凍結したものを対照として試作発泡酒の、火入れ酒と生酒を1℃で3カ月貯蔵したものの官能試験を行った。パネラー5名で5点法で評価した結果、表6に示すように対照の-25℃凍結貯蔵酒に比べ、火入れ酒と生酒のいずれも1℃で3カ月貯蔵後の品質にオフフレーバー等の欠点はなく、高品質を維持していた。

表 6 貯蔵酒の官能試験結果

	貯蔵条件	平均	短 評
1	凍結酒(対照)	2.2	香り新鮮、甘渋、フレッシュ、味多い
2	試験(火入酒)	2.2	味スッキリ、キレ良い
3	試験(生酒)	1.6	ガスやわらか、味ソフト、味きれい

5点法 (1:良~5:悪)

## 7. 応用技術

本研究成果を応用することによって、よりバラエティのある発泡酒を製造することが可能と考える。一例として、酵母や麹菌を変えることによって香味に特徴のある商品、初発菌数や二次発酵条件を変えることでガス圧の異なる商品、また、にごりの割合の異なる商品など、蔵元の個性をアピールした発泡清酒の製造が可能となる。

一方、本技術は、発泡清酒のみならず、多種のアルコール飲料にも活用可能であり、現在、ワインのスパークリング化の商品開発も進行中である。本県特産のリンゴを用



いたシードルや、他の果実等を用いた発泡性を有するアルコール飲料の開発・商品化への大きな可能性を有しており、県内酒造業界における酒類の需要回復と企業の活性化に結び付けば幸いである。

最後に、本研究に際して、ご協力頂いた秋田県酒造組合、県内の酒造メーカー、秋田県清酒分析研究会、秋田県杜氏組合の皆様に感謝致します。

## 【 引用文献 】

- 1) 平成 20 年度「秋田食科学フォーラム」講演会(2008)
- 2) 酒類総合研究所、日本酒造組合中央会：特開 2004-113162「発泡性低アルコール清酒の製造法」
- 3) 株式会社喜多屋：特開 2003-189841「発泡性清酒及びその製造方法」
- 4) 株式会社一ノ蔵：特開 2000-189148「発泡性低アルコール清酒及びその製造方法」
- 5) 工藤晋平, 松田義弘, 村岡義之, 小関敏彦：山形県工業技術センター報告 35, 1-7(2001)
- 6) 山形県, (独)科学技術振興機構：特開 2004-215644「チロソール高生産性酵母変異株及び酵母を用いた発酵アルコール飲料の製造法」
- 7) 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 大野剛：秋田県総合食品研究所報告, 12, 14-23(2010)
- 8) 吉田清, 稲橋正明：醸協, 104, 823(2009)
- 9) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章：醸協, 87, 915-921(1992)
- 10) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 石川京子, 中田健美, 佐無田隆, 岩野君夫, 石川雄章：醸協, 89, 906-912(1994)
- 11) 注解編集委員会編：第四回改定国税庁所定分析法注解, p7-33, 日本醸造協会(1973)
- 12) 吉沢 淑：醸協, 68, 59-61(1973)



## 2. 原著論文（研究ノート）

- 1) 「少量かつ均質な餅生地調製法及び力学特性評価法の確立による餅生地評価系の構築」・・・・・・・・・・ 19  
佐々木 玲、高橋 徹、熊谷 昌則
- 2) 「粳発芽玄米と発芽玄米の炊飯による $\gamma$ -アミノ酪酸量の変化」・・・・ 23  
大能 俊久
- 3) 「食材由来マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の探索」・・・・ 26  
樋渡 一之、畠 恵司、堀 一之、高橋 砂織



# 少量かつ均質な餅生地の調製法

## 及び力学特性評価法の確立による餅生地評価系の構築

佐々木 玲\*、高橋 徹、熊谷 昌則

(\*秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ)

Akira SASAKI, Toru TAKAHASHI, Masanori KUMAGAI

### 【緒言】

餅は日本の伝統的食品であり、年始を始めとする祝い事や伝統行事には欠かせないものである。近年、この餅という伝統的食品の分野でも食のアウトソーシング化が進み、家庭内で餅を搗いて作るよりも、スーパーやコンビニなどから切り餅や赤飯、おはぎなどといった餅製品を購入する機会が増えている。これは糯米が一般家庭よりも米飯加工企業での利用が多くなってきていることを示している。そのため、糯米にも食品の原料として、それぞれの最終製品に適した加工特性が求められるようになった。

一般に糯米の加工特性は餅にしたときの硬化速度が影響する。硬化速度が速い糯米は硬化・成形を必要とする切り餅や米菓等に適し、逆に硬化速度の遅い糯米は硬化・成形を必要としないおはぎや大福等に適する。つまり、糯米の硬化性の違いは、その糯米がどのような餅加工品に適するかを決める大きな要因となる。

餅の硬化性を測定する方法は、餅生地の自重によるたわみ角度<sup>1)</sup>、テンシプレッサー貫入抵抗<sup>1)</sup>、レオメーターによる針侵入抵抗<sup>2)</sup>、テクスチュロメーター硬度からの判定<sup>3)</sup>などの実用的測定が行われているが、いずれの方法も均質な餅生地の調製が重要である。餅生地の調製には糯米を蒸してから搗く方法（搗き餅）と、製粉した糯粉に湯を加えて練る方法（練り餅）とがある。搗き餅は餅生地の調製に数百g程度の精米が必要となるため、数十gと比較的少量の糯米を用いる場合は、製粉し、練り餅で餅生地を調製することが多い。しかし、商業用は餅搗き機で捏ねた搗き餅が主流であり、少量の糯米を用いる場合であっても搗き餅での餅生地に対する評価が需用者から望まれる。また、少量の糯米から搗き餅で餅生地を調製し、評価することは、糯米の加工特性を育種の比較的早い段階で把握することに繋がる。

以上のことから、少量（50g以下）の糯米を用い、搗き餅での餅生地の加工特性評価が可能となれば、製造現場のみならず、育種選抜においても有用な評価技術となり得る。ほとんどの糯米加工品は餅生地を経由して加工される。そこで、糯米加工品の基本となる餅生地を少量の糯米から搗き餅で調製し、硬化性を指標として評価する方法の確立を目指した。

## 【実験方法】

### 1. 実験試料

市場より購入した平成 22 年度産糯玄米 3 品種を用いた。

きぬのはだ（秋田県産，秋田県奨励品種）

こがねもち（新潟県産）

ヒヨクモチ（熊本県産）

餅加工業界ではこがねもちは硬化が速く，ヒヨクモチは硬化が遅い品種とされる。

### 2. 精米少量での餅生地調製法（図 1）

糯玄米は試験の直前に精米機 BT-AE05-HL（象印マホービン株式会社）で搗精歩合  $90.0 \pm 0.5\%$  となるよう搗精した。糯精米 40g を  $15^\circ\text{C}$  で水に 16 時間浸漬後，30 分間の水切りしたのち，餅搗き機 PFC-20FK（株式会社東芝）を用いて蒸煮した。蒸煮 25 分後，蒸留水を 6ml 散水した<sup>4)</sup>。蒸米をファリノグラフ 8101 型（BRABENDER 社製，図 2）にて 3 分間混捏した。混捏後の餅生地を成形容器に入れ，15 分間のプレス成形を行い，厚さ約 8mm の餅生地を調製し，評価に用いるまで  $4^\circ\text{C}$  で保存した。尚，上記条件にて同一品種につき餅生地を 3 回調製した。

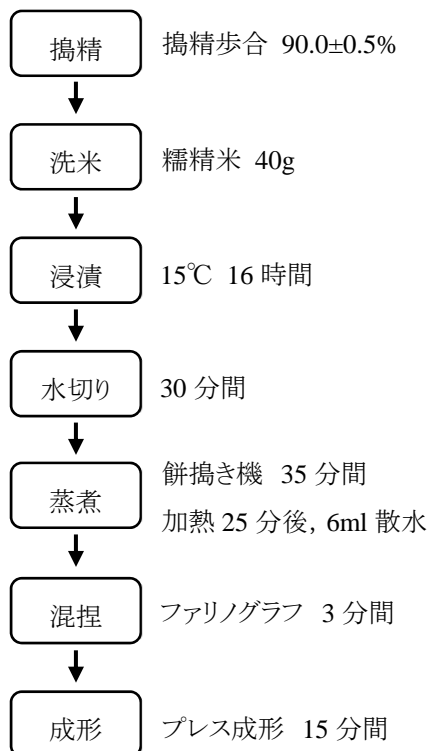


図 1 少量餅生地の調製方法

### 3. 餅生地の力学特性測定法

餅生地を  $4^\circ\text{C}$  で 24 時間冷蔵後，万能試験機 5544（Instron 社製，図 3）にて硬化性を測定した。測定条件は，直径 2mm の金属製治具を用い，圧縮および引っ張り速度  $2\text{mm/s}$ ，圧縮ひずみ 0.50 とした。1 サンプルにつき 3 回繰り返し測定し，これを 3 反復行った。

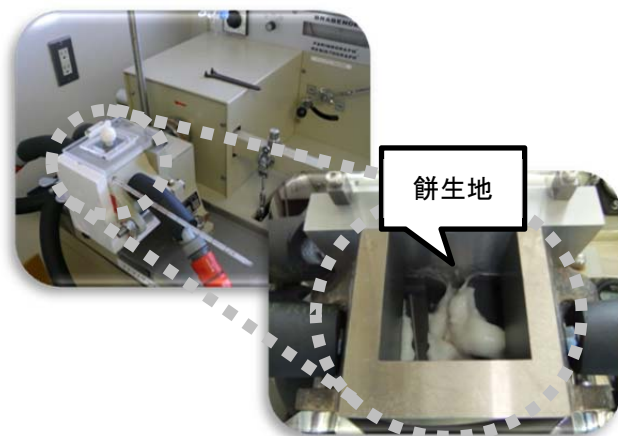


図 2 ファリノグラフによる餅生地の調製



図 3 万能試験機 5544

## 【結果と考察】

### 1. 餅生地調製法に関する検討

少量の糯米で均質な餅生地を調製するためには、①蒸し工程での糯米澱粉の十分な糊化と②迅速で均一な混捏（搗き）がポイントとなる。そこで、少量の糯米を用いた硬化性測定用餅生地の調製法を検討し、図1のように確立した。餅生地の調製に用いる精米量が少ないため、蒸煮中は澱粉の糊化とともに加熱による蒸米の乾燥が考えられた。そのため、蒸煮の途中に6ml散水することで蒸米の乾燥を防いだ<sup>2)</sup>。これらより、得られる餅生地の水分量に差はないと判断した。尚、予備試験の結果、各試料の吸水率に差がなかったことが分かっている。したがって、得られる餅生地の水分量に差はないと判断した。

混捏に使用したファリノグラフはパン生地の評価に用いるミキサーを模した装置で、生地を捏ねた際の抵抗の変化を調べることができる。ファリノグラフを用いた混捏によって、均質な餅生地を調製することが可能となったため、ファリノグラフは少量の餅生地調製に適した装置であったと言える。

以上のことから、構築した方法により少量の糯米から搗き餅による均質な餅生地の調製が可能となった。

### 2. 餅生地の物性評価系の検討

図4は圧縮・引張り試験によるきぬのはだで調製した餅生地の力-時間曲線である。圧縮時最大力を硬さ(N)、引張り時最大力の絶対値を粘り(N)、引張り時の負側の曲線で囲まれた面積を付着性(J)と定義した。尚、こがねもち及びヒヨクモチにおいてもきぬのはだと同様なパターンの曲線が得られた。

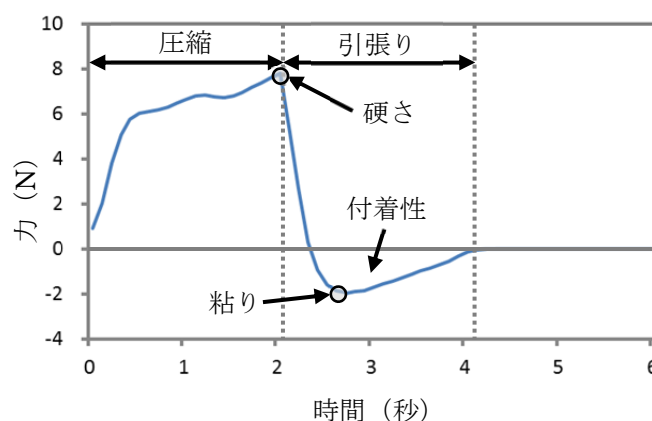


表1に各糯米の物性測定値の平均値と標準偏差を示した。

図4 圧縮・引張り時における餅生地の力-時間曲線

表1 餅生地の硬さ、粘りおよび付着性

	硬さ (N)	標準偏差	粘り (N)	標準偏差	付着性 ( $\times 10^{-3}$ J)	標準偏差
きぬのはだ	7.46 <sup>a</sup>	0.54	1.83 <sup>a</sup>	0.14	3.36 <sup>a</sup>	0.27
こがねもち	7.21 <sup>a</sup>	0.68	1.63 <sup>b</sup>	0.02	3.27 <sup>a</sup>	0.15
ヒヨクモチ	5.28 <sup>b</sup>	0.68	1.36 <sup>c</sup>	0.24	2.75 <sup>b</sup>	0.54

3反復の平均値，異なるアルファベット間で有意差有り( $p < 0.05$ )

硬さ、粘りおよび付着性について品種間で差が見られた。特に硬さについて、こがねもちが 7.21N であり、ヒヨクモチの 5.28N と比較して明らかに硬かった。これは餅加工業界での一般的な評価と一致する。以上のことから、餅生地の硬化性を数値化し評価することが可能となった。

#### 【まとめ】

本研究では糯米の加工特性を評価するため、少量の糯米による餅生地の調製法と硬化性を指標とした餅生地の力学特性評価系を構築し、糯米 3 品種にて試験を行った。その結果、品種間で物性測定値に差が見られ、特に硬さでは餅加工業界の評価と一致する結果が得られた。これにより餅生地の硬化性を数値化し評価することが可能となった。今後、構築した方法を用いて糯米の 1. 品種間、2. 生産年における硬化性の差異について明らかにしていく予定である。

#### 【引用文献】

- 1) 江川和徳, 吉井洋一: 産地・品種を異にした糯米による餅の硬化性. *新潟食品研報*, **25**, 29-33 (1990).
- 2) 稲津脩: 第 29 回澱粉研究懇談会資料集, 26-30(1989).
- 3) 柳瀬肇, 遠藤勲, 竹生新治郎: もち米の品質, 加工適性に関する研究.(第 2 報)国内産もち米の貯蔵と加工適性. *食総研報* **39**, 1-14(1982).
- 4) 中森朋子: 4. もち生地の物性と色の評価. *北海道立農業試験場資料*, **35**, 61-65 (2005)



# 粳発芽玄米と発芽玄米の炊飯による

## $\gamma$ -アミノ酪酸量の変化

大能俊久

(秋田県総合食品研究センター 食品開発グループ)

Toshihisa OHNO

### 【緒 言】

玄米を発芽させた発芽玄米は、炊飯が容易で食べやすく、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) が豊富な点が長所とされる<sup>1)</sup>。さらに、粳がついた状態で発芽させた粳発芽玄米も同じように GABA を豊富に含む<sup>2)</sup>。両者の長所とされる GABA 量がどの程度存在し、炊飯によってどのように変化するかは興味深い事項である。そこで、粳発芽玄米、発芽玄米に含まれる GABA 量とそれらが飯になった際の GABA 量を併せて調べた。その結果、粳発芽玄米には発芽玄米より多量の GABA が存在することが示された。また、粳発芽玄米の GABA 量は炊飯により増加することも分かった。そして、炊飯による変化の原因についても検討を行った。

### 【実験方法】

#### 1. 試料

試料として、秋田県産あきたこまちを使用したA社の粳発芽玄米(粳発芽玄米A)、秋田県産あきたこまちを使用したB社の粳発芽玄米(粳発芽玄米B)、産地品種不明のC社の発芽玄米を使用した。これらに加えて秋田県産あきたこまち玄米も参考とすべく調べた。

#### 2. 粳発芽玄米、発芽玄米とその飯の GABA 量の測定

上記各種米の GABA の定量は以下のように行った。各種米を粉砕後 10 倍量の 8% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を加えて 10°C 以下で 1 時間抽出し、遠心分離して採取した上清を等量の 0.04N 塩酸溶液で希釈し 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過した。その溶液を日本電子製全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V で測定した。なお、各種米のこの値を米の GABA 量と表記する。

飯の GABA の定量は以下のように行った。各種米に対して 1.8 から 1.9 倍量の水を加えて 1 時間浸漬を行った後、真空内釜圧力 IH 炊飯ジャー (象印マホービン (株)、NP-HT10 型) によりふつうモードで炊飯を行った。炊飯に要した時間は 50~60 分である。その飯を採取し、4 倍量の蒸留水を加えて飯を充分つぶした後、約 5°C の低温実験室に 20 分間保管した。その溶液に等量の 16% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を加えて 5 分静置した後、遠心を行い採取した上清を等量の 0.04N 塩酸溶液で希釈し、0.45

$\mu\text{m}$  のフィルターでろ過して上記アミノ酸分析機で定量した。なお、各種米のこの値を飯の GABA 量と表記する。

比較を行いやすくするため、米、飯ともに水分 15% を含有する米 100g 当りに含まれる GABA 量で結果を示した。

### 3. グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 活性の測定

各種米を粉砕して 1g を採取し、0.1M リン酸バッファー (pH6.0) 8ml を加えて 10°C 以下で 1 時間振とう抽出を行った。その懸濁液を 10°C 以下で遠心分離して上清 1ml を採取した。37°C で約 5 分間予備加熱を行った後に 0.2M のグルタミン酸ナトリウム 1 水和物を 0.125ml、10mM のピリドキサル-5'-リン酸 1 水和物を 0.125ml 加えて 37°C で 1 時間反応させた。その後、5 分間沸騰浴中で加熱処理して反応を停止させたものを試料溶液とした。上記上清 1ml を 5 分間沸騰浴中で加熱後に 0.2M グルタミン酸ナトリウム 1 水和物を 0.125ml、10mM ピリドキサル-5'-リン酸 1 水和物を 0.125ml 加えたものをブランク溶液とした。試料溶液、ブランク溶液それぞれの遠心分離した上清を等量の 0.04N 塩酸溶液で希釈し、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過して上記アミノ酸分析機で GABA 量を定量し、両者の差から GAD 活性を求めた。水分 15% を含有する米 100g が 37°C で 1 時間に生成する GABA 量で結果を示した。

## 【結果と考察】

### 1. 粳発芽玄米、発芽玄米とその飯の GABA 量

粳発芽玄米、発芽玄米、玄米の米の GABA 量を表 1 に示す。粳発芽玄米 A、B は米 100g 当たり 21.5mg、20.6mg であり、発芽玄米は 11.8mg であった。玄米の GABA 量が 4.8mg であることから、粳発芽玄米は玄米に比べて GABA 量が 4 倍以上であり、発芽玄米の 2.5 倍に比べて量が多かった。粳発芽玄米の方が発芽玄米より GABA 量が多い傾向を示すことは、大久ら<sup>2)</sup>が報告しており、今回も同様の結果となった。

これらを飯とした場合の結果も表 1 に示す。発芽玄米は 12.1mg であり、加熱前とほとんど変わらなかった。一方、粳発芽玄米 A、B は 32.3mg、26.2mg となり、それぞれ加熱前の 1.5 倍、1.3 倍に増加した。また、玄米も飯となったことで 10.0mg まで GABA が増加した。結果として、粳発芽玄米の飯は玄米の飯の 3.2 倍、または 2.6 倍の GABA 量となり、発芽玄米の飯は 1.2 倍の GABA 量となった。

表1 各種米と飯のGABA量

品名	米のGABA量 (mg)	飯のGABA量 (mg)
粳発芽玄米A	21.5	32.3
粳発芽玄米B	20.6	26.2
発芽玄米	11.8	12.1
玄米	4.8	10.0

水分15%を含有する米100g当りに含まれるGABA量で示した。

表2 各種米のGAD活性

品名	GAD活性(mg)
粳発芽玄米A	219
粳発芽玄米B	161
発芽玄米	0.9

水分15%を含有する米100gが37°Cで1時間に生成するGABA量で示した。

以上から、粳発芽玄米は玄米の段階で GABA 量が多く、飯になった際にさらに増加することが分かった。一方、発芽玄米は飯になった際ほとんど増加せず、玄米の飯より GABA 量は多いもののその差は小さいことが分かった。

## 2. 粳発芽玄米、発芽玄米の GAD 活性

GAD 活性の結果を表 2 に示す。粳発芽玄米 A、B は、219mg、161mg と高かったのに対して、発芽玄米は 0.9mg と低かった。発芽玄米は GAD 活性が低くなったため、炊飯中に GAD が働かず、そのため飯の GABA 量が増加しなかったのであろうと推測できる。逆に、粳発芽玄米 A、B は GAD 活性が高いため炊飯中に GAD が働いてグルタミン酸から GABA が生成し、飯の GABA 量が増加したのでであろうと推測できる。発芽玄米で GAD 活性が低下した理由としては、吸水した発芽玄米を加熱乾燥する時に熱的ダメージが大きかったことなどが推測される。

## 【引用文献】

- 1) 石渡健一, 食品工業, **45**, 58-65(2002).
- 2) 大久長範, 大能俊久, 森勝美, 食科工, **50**, 316-318(2003).

# 食材由来マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の探索

樋渡一之\*、畠恵司、堀一之、高橋砂織

(\*秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ)

Kazuyuki HIWATASHI, Keishi HATA, Kazuyuki HORI and Saori TAKAHASHI

## 【緒言】

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)は、コラーゲンやエラスチン等の細胞外マトリックスの分解を主な機能とする金属プロテアーゼの総称で、ヒトでは MMP-1 から-28 で構成されるファミリーを形成している。

癌細胞は転移する際に MMP を細胞外に分泌して周囲の細胞外マトリックスを破壊することから、MMPは癌の転移に密接に関与していることが知られている<sup>1)</sup>。また、MMPは皮膚の光老化反応にも関与しており、特に紫外線によるしわの形成に深く関わっている<sup>2)</sup>。したがって、MMP 阻害物質は癌転移抑制効果やしわ形成防止効果があると考えられており、多くの製薬企業や化粧品企業が MMP 阻害物質の製品化を目的とした研究開発を実施している。

そこで本研究では、秋田県内産の食材から MMP 阻害物質を単離・同定することを目指し、山菜・海草類の抽出エキスに対して MMP 阻害活性によるスクリーニングを行った。

## 【実験方法】

### 1. MMP-2 の取得

定法<sup>3)</sup>に従い、培養中に MMP-2 を培地へ大量に分泌するヒト線維肉腫細胞株 HT1080 の培養上清を濃縮し、透析後に DEAE-Sepharose FF、Gelatin-Sepharose 4B、ConA-Sepharose 4B、HiTrap Heparin HP の4段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。精製した酵素の MMP 活性の有無をゼラチンザイモグラフィーで検定し、同定をウエスタンブロッティングで行った。さらに MMP が金属酵素であることから、金属酵素阻害剤(1,10-フェナントロリン)が影響を及ぼすか否か検討した。

### 2. ゼラチンザイモグラフィー<sup>4)</sup>

精製した MMP-2 を 1%ゼラチンゲルを用いた SDS-PAGE に供した後、ゲルを反応緩衝液に浸して 37°C で 16 時間酵素反応を行った。その後ゲルを CBB で染色し、MMP によるゲル中のゼラチン分解の阻害度を測定した。

### 3. プロ酵素の活性化<sup>5)</sup>

MMP-2 は培養上清中にプロ酵素として分泌される。そのため、そのままでは合成基質を用いた活性測定はできない。そこで 4-アミノフェニル酢酸水銀(4-aminophenylmercuric acetate, APMA)を用いて活性化処理を行い、活性化に要する時間について検討した。

### 4. 合成基質による MMP-2 阻害活性測定<sup>6)</sup>

基質として、蛍光消光型合成ペプチド基質 ((7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Leu-[N<sup>3</sup>-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diamino-propionyl]-L-Ala-L-Arg-NH<sub>2</sub>, MOCAC-PLGL(Dpa)AR、ペプチド研究所)を用いた。本基質は分解前の状態では蛍光を有しないが、MMP-2 によって分解されると消光基である Dpa が外れて蛍光を発する。これを利用し、蛍光強度を測定することで MMP-2 の酵素活性を測定することができる。

加えて、阻害物質の共存下で酵素反応を行うことにより、阻害物質の MMP-2 阻害能を検定することが可能である。阻害活性のスクリーニング対象としては、総合食品研究センター食材エキストライブラリーにストックされている秋田県産山菜(39 種)および海藻(28 種)のメタノール抽出エキスを用いた。

基質溶液に一定濃度に調製した山菜・海藻エキスおよび APMA で活性化した MMP-2 を添加し、37°C で 16 時間反応させた。反応終了後、MMP による基質の分解を蛍光(Ex 328nm、Em 393nm)で測定し、測定対象の MMP 阻害活性を評価した。予備的に測定を行ったところ、多くのエキスが測定に使用する波長域に吸収や蛍光を持つことが判明し、阻害活性の測定を妨害することが明らかとなった。そこでエキス中の妨害物質の存在を考慮し、一定程度その影響を除外した上で阻害効果を測定するため、以下の式により MMP 阻害活性(= Inhibitory Index)を求めることとした。

$$\text{“Inhibitory Index”} = \text{“Inhibitory Effect (%)”} - \text{“Interfering Effect (%)”}$$

Inhibitory Effect: MMP の基質分解による蛍光が阻害された割合

Interfering Effect: 標準蛍光物質の蛍光が妨害された割合

エキス自体が測定波長域に自家蛍光を有する場合は実際の阻害活性の評価が困難であるため、結果から除外した。

## 【結果と考察】

### 1. MMP-2 の精製と活性化

カラムクロマトグラフィーによる MMP の精製を行った。ザイモグラフィーの結果から精製した酵素は確かにゼラチン分解活性を有していることが確認され(図1A)、ウエスタンブロットティングの結果から精製した酵素は MMP-2 であることが同定された(図1B)。また、1,10-フェナントロリンによる酵素活性の阻害に用量依存性が確認されたことから(表1)、精製酵素が金属酵素であることが示唆され、これは既報の MMP-2 の特性と一致していた。APMA による活性化条件を検討したところ、終濃度 1mM、37°C、24 時間の APMA 処理で合成基質を分解することが可能となった(表2)。

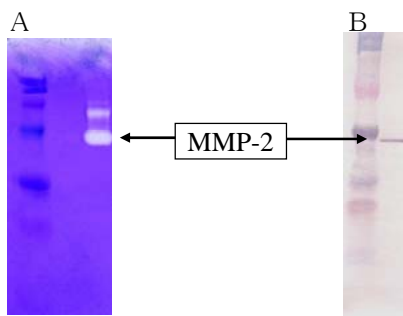


図 1

#### A 精製酵素によるゼラチンザイモグラム

1%ゼラチンゲルを用いた SDS-PAGE で試料を分離した後、ゲルを反応緩衝液に浸して 37°C で 16 時間酵素反応を行った。その後ゲルを CBB で染色し、MMP によるゲル中のゼラチン分解を測定した。

#### B MMP-2 の同定

一次抗体として抗ヒト MMP-2 抗体を用いたウエスタンブロットティングを行った。

表 1 MMP-2 活性に対する 1,10-フェナントロリンの影響

1,10-フェナントロリン (mM)	残存活性 (%)
0	100
0.01	79.5
0.1	18.0

表 2 MMP-2 活性に及ぼす APMA による活性化時間の影響

活性化時間 (hr)	相対活性 (%)
0	N.D.
4	20.8
24	100

N.D., Not Detectable.

以上の結果より、合成基質による簡便な MMP-2 の阻害活性測定方法が確立され、スクリーニングが実施可能となった。

## 2. MMP-2 阻害活性のスクリーニング

1で開発した合成基質による MMP-2 の阻害活性測定法を用いて、秋田県産山菜・海藻エキスを試料とした阻害物質のスクリーニングを行った。多くのメタノール抽出エキスで MMP の阻害効果が確認され、その結果を表3にまとめた。

表3 山菜および海藻メタノールエキスのMMP-2阻害活性

	和名	学名	Inhibitory Effect (%)	Interfering Effect (%)	Inhibitory Index	
山菜	スギナ	<i>Equisetum arvense</i>	25.7	14.5	11.1	
	ゼンマイ	<i>Osmunda japonica</i>	6.5	0.6	5.9	
	ワラビ	<i>Pteridium aquilinum</i>	16.0	12.7	3.3	
	クサソテツ	<i>Matteuccia struthiopteris</i>	74.1	72.5	1.6	
	ミヤマイラクサ	<i>Laportea macrostachya</i>	64.5	12.2	52.2	
	ウワバミソウ	<i>Elatostema umbellatum</i>	38.2	18.5	19.7	
	イタドリ	<i>Reynoutria japonica</i>	78.7	47.2	31.5	
	ギシギシ	<i>Rumex japonicus</i>	65.3	45.7	19.6	
	ニリンソウ	<i>Anemone flaccida</i>	52.3	42.1	10.2	
	ウスバサイシン	<i>Asiasarum sieboldii</i>	48.0	43.0	5.0	
	コンロンソウ	<i>Cardamine leucantha</i>	67.4	34.1	33.4	
	ワサビ	<i>Wasabia japonica</i>	26.6	17.4	9.2	
	トリアシショウマ	<i>Astilbe thunbergii</i>	59.1	42.9	16.1	
	ヤグルマソウ	<i>Rodgersia podophylla</i>	76.8	41.1	35.7	
	クズ	<i>Pueraria lobata</i>	34.5	12.4	22.1	
	ウド	<i>Aralia cordata</i>	14.8	3.0	11.9	
	タラノキ	<i>Aralia elata</i>	43.3	1.9	41.4	
	ヒレハリソウ	<i>Symphytum officinale</i>	26.5	14.0	12.5	
	モミジガサ	<i>Cacalia delphinifolia</i>	67.8	39.1	28.7	
	ノアザミ	<i>Cirsium japonicum</i>	69.3	53.0	16.3	
	フジアザミ	<i>Cirsium purpuratum</i>	97.2	93.8	3.4	
	フキ	<i>Petasites japonicus</i>	65.1	50.5	14.6	
	オニノゲシ	<i>Sonchus asper</i>	90.7	76.0	14.7	
	ノカンゾウ	<i>Hemerocallis fulva</i>	65.1	58.3	6.8	
	オオギバボウシ	<i>Hosta montana</i>	35.1	32.1	3.0	
	ミョウガ	<i>Zingiber mioga</i>	18.7	1.1	17.6	
	海藻	アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	3.3	2.5	0.8
		ミル	<i>Codium fragile</i>	78.2	6.9	71.3
		アミジグサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	47.6	18.8	28.8
		エゾヤハズ	<i>Dictyopteris divaricata</i>	98.5	16.7	81.8
イシモズク		<i>Sphaerotrichia divaricata</i>	27.9	14.9	12.9	
ケウルシグサ		<i>Desmarestia viridis</i>	78.7	9.4	69.3	
フミスジモク		<i>Sargassum confusum</i>	64.5	38.7	25.8	
イソモク		<i>Sargassum hemiphyllum</i>	90.5	29.7	60.7	
アカモク		<i>Sargassum horneri</i>	24.0	19.5	4.5	
ヤツマタモク		<i>Sargassum patens</i>	74.1	25.4	48.7	
ヨレモク		<i>Sargassum siliquastrum</i>	88.3	53.7	34.5	
マクサ		<i>Gelidium elegans</i>	69.3	60.0	9.3	
キョウノヒモ		<i>Grateloupia okamurae</i>	63.3	34.2	29.1	
フダラク		<i>Grateloupia lanceolata</i>	97.2	46.4	50.8	
ホソバミリン		<i>Solieria tenuis</i>	67.8	8.7	59.1	
ツノマタ		<i>Chondrus ocellatus</i>	50.5	25.6	24.9	
フシツナギ		<i>Lomentaria catenata</i>	51.4	14.3	37.0	
イギス		<i>Ceramium kondoi</i>	29.9	27.4	2.5	
コノハノリ		<i>Laingia pacifica</i>	65.1	7.1	58.0	
イソムラサキ		<i>Symphyocladia latiuscula</i>	93.4	60.6	32.8	

中でも特に、山菜ではミヤマイラクサに、海草ではエゾセハズ、ミル、ケウルシグサ、イソモク、フダラク、ホソバミリン、コノハノリ等に高い MMP-2 阻害活性が認められた。なお、抽出エキス自体が測定域で自家蛍光を有していたため、モロヘイヤ (*Corchorus olitorius*)、シオデ (*Smilax riparia*)、コハギボウシ (*Hosta albo-marginata*)、ノビル (*Allium grayi*)、カタクリ (*Erythronium japonicum*)、ホンナ (*Cacalia hastata*)、ニワトコ (*Sambucus sieboldiana*)、ツルニンジン (*Codonopsis lanceolata*)、コシヤク (*Anthriscus sylvestris*)、エゾニュウ (*Angelica ursina*)、ハマボウフウ (*Glehnia littoralis*)、セリ (*Oenanthe javanica*) の山菜 12 種とオゴノリ (*Gracilaria vermiculophylla*)、オキツノリ (*Ahnfeltiopsis flabelliformis*)、アマモ (*Zostera marina*)、ウミトラノオ (*Sargassum thunbergii*)、ツルアラメ (*Ecklonia stolonifera*)、ワカメ (*Undaria pinnatifida*) の海草 6 種の測定結果は結果から除外した。

以上の結果より、本研究では秋田県内産の山菜・海草類の抽出エキスから MMP-2 阻害活性を見出すことができた。ただし今回用いたスクリーニング手法は蛍光基質を用いた簡便な方法であり、試験物質に妨害物質が存在する場合真に正しい結果を得ることは困難である。しかし、蛍光物質を用いた場合でも山菜・海藻エキスによる阻害能の濃度依存性を確認するなど、正確性を高めることは可能であり、その手法について検討する必要がある。今後、MMP-2 阻害物質を単離・同定するためには、今回と異なる方法、例えばゼラチンゼイモグラム等によって阻害活性の二次スクリーニングを実施することで今回得た結果の精度をより高め、阻害物質の抽出源となる食材を決定する必要がある。

#### 【引用文献】

- 1) K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, *Cell*, **41**, 52-67 (2010).
- 2) T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, JJ. Voorhees, GJ. Fisher, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**, 20-24 (2009).
- 3) G. Murphy, T. Crabbe, *Methods Enzymol.*, **248**, 470-484 (1995).
- 4) S. Yamagata, Y. Ito, R. Tanaka, S. Shimizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 158-162 (1988).
- 5) A. Sellers, E. Cartwright, G. Murphy, JJ. Reynolds, *Biochem. J.*, **163**, 303-307 (1977).
- 6) Y. Masui, T. Takemoto, S. Sakakibara, H. Hori, Y. Nagai, *Biochem Med.*, **17**, 215-21 (1977).





### 3. 総説

- 1) 「食物由来レニン阻害物質に関する研究」・・・・・・・・・・ 31  
高橋 砂織
  
- 2) 「麹菌トランスポゾン *Crawler* の構造および転移特性と  
醸造産業への応用」・・・・・・・・ 48  
小笠原 博信



# 食物由来レニン阻害物質に関する研究

高橋 砂織

(秋田県総合食品研究センター)

Saori TAKAHASHI

【要約】レニン・アンギオテンシン系 (Renin-angiotensin system, RAS) は、哺乳類において最も解析が進んでいる昇圧機構である。これまで、RAS の制御を目指して活性測定が容易なアンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin I converting enzyme, ACE) の阻害物質探索研究が数多く行われてきた。ACE は、RAS 以外にカリクレイン・キニン系にも作用し、カリジンやブラジキンの分解にも関与することが明らかとなっている。そこで、RAS の最上流に位置しており基質特異性も厳密なレニンに注目して阻害物質探索系の構築を試みた。その結果、組換え型ヒトレニンの高発現系を確立するとともにヒトレニン活性測定用の新規蛍光消光基質を開発することでレニン阻害物質探索系を構築した。本測定法を用いて各種食材抽出液を探索した結果、大豆、米や山菜にレニン阻害活性を見出した。さらに、それら阻害物質の構造を明らかにするとともに一部の阻害物質に関しては構造機能相関解析を行ったので、これら最近の知見を解説する。

(本総説で用いた略語)

ACE, Angiotensin I converting enzyme; AI, Angiotensin I; AII, Angiotensin II; Dnp, 2,4-dinitrophenyl; GlcNAc, *N*-acetyl-D-glucosamine; ManNAc, *N*-acetyl-D-mannosamine; Nma, 2-(*N*-methyamino) benzoyl; PPE, prorenin processing enzyme; RAS, Renin-angiotensin system; RIA, radioimmunoassay; RnBP, Renin binding protein.

## 1. 緒言

血圧は、電解質、神経系やホルモン系で巧みに制御されている。神経系での制御においては緊張や体位変動などに伴い無意識のうちに適正な血圧を制御出来る機構が備わっている。一方、レニン・アンギオテンシン系は最も研究が進んでいる血圧上昇機構であり、100年以上の研究の歴史がある。腎臓に血圧上昇を引き起こす物質の存在することが1898年に初めてTigerstedtとBergmannにより報告された [1]。この物質は、腎臓のラテン名に因んでレニンと命名された。レニンの実態は長い間不明であったが、1939年にHelmerとPageにより酵素であることが証明された [2]。さらに、1977年にInagamiとMurakamiにより世界で初めてブタの腎臓からレニンが単離された。レニンの精製は困難を極め、微生物由来のアスパルティックプロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンを用いたアフィニティーカラムの開発により精製が成功した [3]。ブタ腎臓から精製したレニンの分子量は約4万で、糖タ

ンパク質であることが示されている。ブタ腎臓レニンの精製に引き続き、1980年にはYokosawaらによりヒト腎臓由来レニンの精製も行われた [4]。その後、レニンに関する生化学的、分子生物学的研究は飛躍的に発展し、レニン・アンギオテンシン系の全容がほぼ解明された [5, 6]。

図1にレニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構を示した。レニンは、主に腎臓で生合成されておりレニン顆粒と呼ばれる内分泌顆粒内に貯留されている。顆粒内のレニンは、ホルモンや神経の作用で血中に分泌される。血中のレニンは、糖タンパク質で且つ唯一のレニン基質であるアンギオテンシノーゲンに作用してN末端10残基目と11残基目の結合を特異的に切断し、10残基のアミノ酸からなるアンギオテンシン I (AI)を生成する。AIは不活性ペプチドで、肺循環系や血管内皮細胞に存在するアンギオテンシン I 変換酵素 (Angiotensin I converting enzyme, ACE) によりN末端2残基が切除され活性型ホルモンのアンギオテンシン II (AII) に変換される。AIIは直接血管内皮細胞に作用して血管を収縮させ血圧上昇を引き起こす。また、AIIは副腎に作用してアルドステロンの分泌を促進する。その結果、腎臓でのナトリウムの再吸収が活発となり、これに伴い血液中の水分量が多くなることで血圧が上昇する。

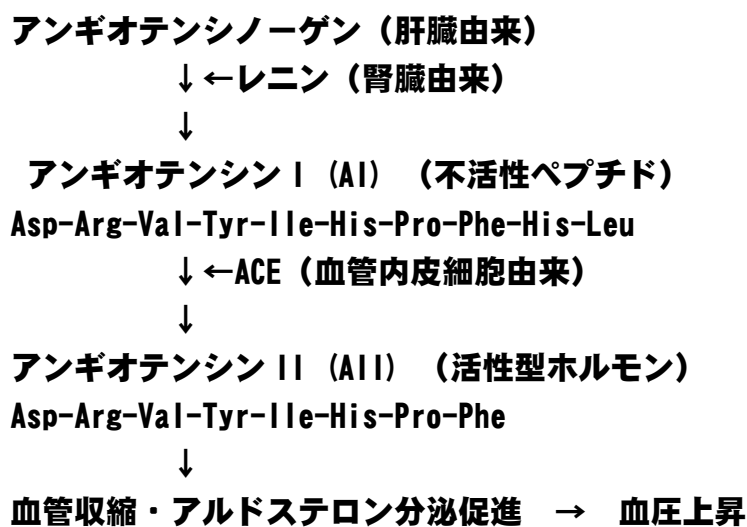


図1. レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構

これまで RAS の制御を目指して様々な薬剤が開発されている。その中で最初に市場されたのが ACE 阻害薬のカプトプリルである [7]。カプトプリルは長い間抗高血圧薬として使用されておりその効果が実証されている。一方で健康志向の高まりから ACE をターゲットとした特定保健用食品の開発が活発に進められており、「血圧が高めの方」向けの飲料が多数市場されている。

レニン阻害剤に関しては、ACE 阻害薬の開発に比べその歴史は浅く、数年前に漸くレニン阻害剤「アリスキレン」が市場された [8-10]。アリスキレンは、最近日本でも認可され、効果が明らかとなっている。レニン阻害物質に関連して、我々も内在性レニン阻害物質であるレニン結合タンパク質 (Renin binding protein, RnBP) に注目してその諸性質を明らかと

した [11-15]。RnBP はレニンと同様、腎臓で生合成されており、レニンと結合して高分子型レニンを形成し、レニン活性を強く阻害することが示されている [16]。最近、RnBP が糖質関連酵素 *N*-アセチルグルコサミン(*N*-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) 2-エピメラーゼであることが判明し、多機能タンパク質として注目されている [17-22]。GlcNAc 2-エピメラーゼは、GlcNAc と *N*-アセチルマンノサミン (*N*-acetyl-D-mannosamine, ManNAc)との相互作用を触媒する酵素であり、安価な GlcNAc から医薬原材料となる ManNAc の生産に応用出来る可能性があり、本酵素の大量生産系の構築と効率的利用方法の開発が望まれている [23]。

前述のように、食物由来 ACE の阻害物質探索は 30 年以上研究の歴史がある。しかしながら、食物由来レニン阻害物質に関する研究は殆ど行われて来なかった。その理由として、レニンの精製が困難であること [3, 4, 24]、活性測定方法が煩雑で且つ高価な放射標識化合物が必要であること [25] などの理由が挙げられる。我々は、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いた高効率組換え型ヒトレニン生産系を開発するとともに、簡便迅速なレニン精製方法を確立した。また、レニン活性測定用の新規蛍光消光基質の開発にも成功した。さらに、本測定系を用いて各種食材よりレニン阻害物質を探索した結果、大豆、米や山菜などにレニン阻害物質を見出した。一方、レニン阻害物質の構造機能相関についても新たな知見を得たので解説する。

## 2. 組換え型ヒトレニン発現系の構築

### (1) 大腸菌を用いた組換え型ヒトレニンの発現、巻き戻しと応用

レニンは、N 末端領域にプレ・プロ配列を持っており組換え型ヒトレニン (recombinant human renin, rh-renin) の発現と巻き戻しには多くの時間と労力を必要とした。Imai らは、大腸菌による組換え型ヒトレニンの発現を最初に試みた [26]。大腸菌にヒトプレプロレニン cDNA を導入し発現を行った結果、プレプロレニンの菌体内発現は確認されたものの、発現タンパク質は全て封入体を形成し活性型レニンを取得することは出来なかった。

我々も、大腸菌での高発現ベクター pET32a (Novagen 社製、Darmstadt, Germany)を用いてレニンの発現を試みた [27]。pET32a は、N 末端領域にチオレドキシシン遺伝子が導入されており組換えタンパク質の安定化を目指して設計された高発現ベクターである。本ベクターにヒトプレプロレニン cDNA を組み込んだ発現ベクター pETHRN1 を構築し、大腸菌での高発現に成功した。発現したプレプロレニンの大部分は封入体を形成した。この封入体は超音波破碎と遠心分離の操作で高純度に精製が可能であった。本封入体を 6M の塩酸グアニジンで可溶化後、高濃度のアルギニンと界面活性剤を含む緩衝液で透析し、透析により段階的にアルギニンと界面活性剤の濃度を低下させることでプロレニンの巻き戻しに成功した。表 1 に巻き戻しに使用した緩衝液組成を示した。

巻き戻し効率は数%程度であり、改善の余地が認められた。巻き戻しが終了したプロレニンにトリプシンを作用させて、活性型レニンを取得した。得られた活性型レニンを用いて、放射免疫測定法 (Radioimmunoassay, RIA) でレニン活性を測定することで、レニン阻害物質の探索が可能となった。RIA を用いたレニン活性測定の場合には超高感度測定が可能であることから、本巻き戻し酵素を用いて食物由来レニン阻害物質を探索した。その結果、

市販味噌の一部にレニン阻害活性を見出した。味噌からのレニン阻害物質の精製も試みたが阻害物質の含有量が少なく、完全精製には至らなかった（未発表データ）。しかし、本研究で味噌の原材料の一つである大豆にレニン阻害物質の局在していることが明らかとなり、後述する通り大豆由来レニン阻害物質の精製と構造解析研究の礎となった。

**表 1 プレプロレニンの巻き戻しに使用した緩衝液組成 [27]**

- 
- A. 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.5 M L-Arginine, 0.15 M NaCl, 5% sucrose, and 0.5% Brij 35.
  - B. 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.25 M L-Arginine, 0.15 M NaCl, 5% sucrose, and 0.5% Brij 35
  - C. 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.1 M L-Arginine, 0.15 M NaCl, 5% sucrose, and 0.5% Brij 35
  - D. 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.15 M NaCl, 5% sucrose, and 0.5% Brij 35
  - E. 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.25 M 0.15 M NaCl, and 5% sucrose
- 

**\*はじめに 0.5 M L-アルギニンを含む緩衝液 (A) で透析する。**

**逐次、透析により L-アルギニン濃度を下げる (B)-(D)。**

**最後に透析により界面活性剤 Brij 35 を除き、巻き戻しが完了する (E)。**

大豆にレニン阻害活性が見出されたことより、大豆以外の豆類におけるレニン阻害活性に興味を持たれた。そこで、雑豆類のレニン阻害活性について検討した [28]。具体的には、15 種類 (1. 丹波大納言小豆、2. 夏早生小豆、3. 実取りささげ、4. 赤種三尺長ささげ、5. 本金時菜豆、6. 虎丸鶉豆、7. 長鶉菜豆、8. 大白花菜豆、9. 大紅花菜豆、10. 白花早生鶉豆、11. 白刀豆、12. 早生そら豆、13. 仁徳一寸そら豆、14. うすい豌豆、15. つるなし房なり豌豆) の品種が定かな雑豆類を入手しレニン阻害活性を検討した。豆類は一般的に水に浸漬する時間が阻害物質の抽出効率に影響を与えることが知られている。そこで、丹波大納言小豆を用いて浸漬時間とレニン阻害割合について検討した。その結果、浸漬 20 ~30 時間後に抽出される阻害物質が最大となることを見出した。そこで、全ての雑豆を 1 昼夜水に浸漬した後に熱水抽出を行った。抽出液を Sep-Pack Vac C18 35cc (Waters, Massachusetts, USA) に吸着し十分に蒸留水で洗浄した後、吸着物をメタノール溶出した。メタノール画分を減圧乾固し、最終濃度 0.2 mg/ml におけるレニン阻害活性を測定した。その結果、調べた全ての雑豆類にレニン阻害活性の存在することが明らかとなった。さらに解析を進めた結果、雑豆類は高レニン阻害グループ (グループ 1) と低レニン阻害グループ (グループ 2) に大別されることが判明した (図 2)。また、SDS-電気泳動による分析で、阻害パターンとタンパク質のパターンとが類似することが示めされた。今後、雑豆類のタンパク質量やタンパク質の種類と阻害強度の関係解明が望まれる。

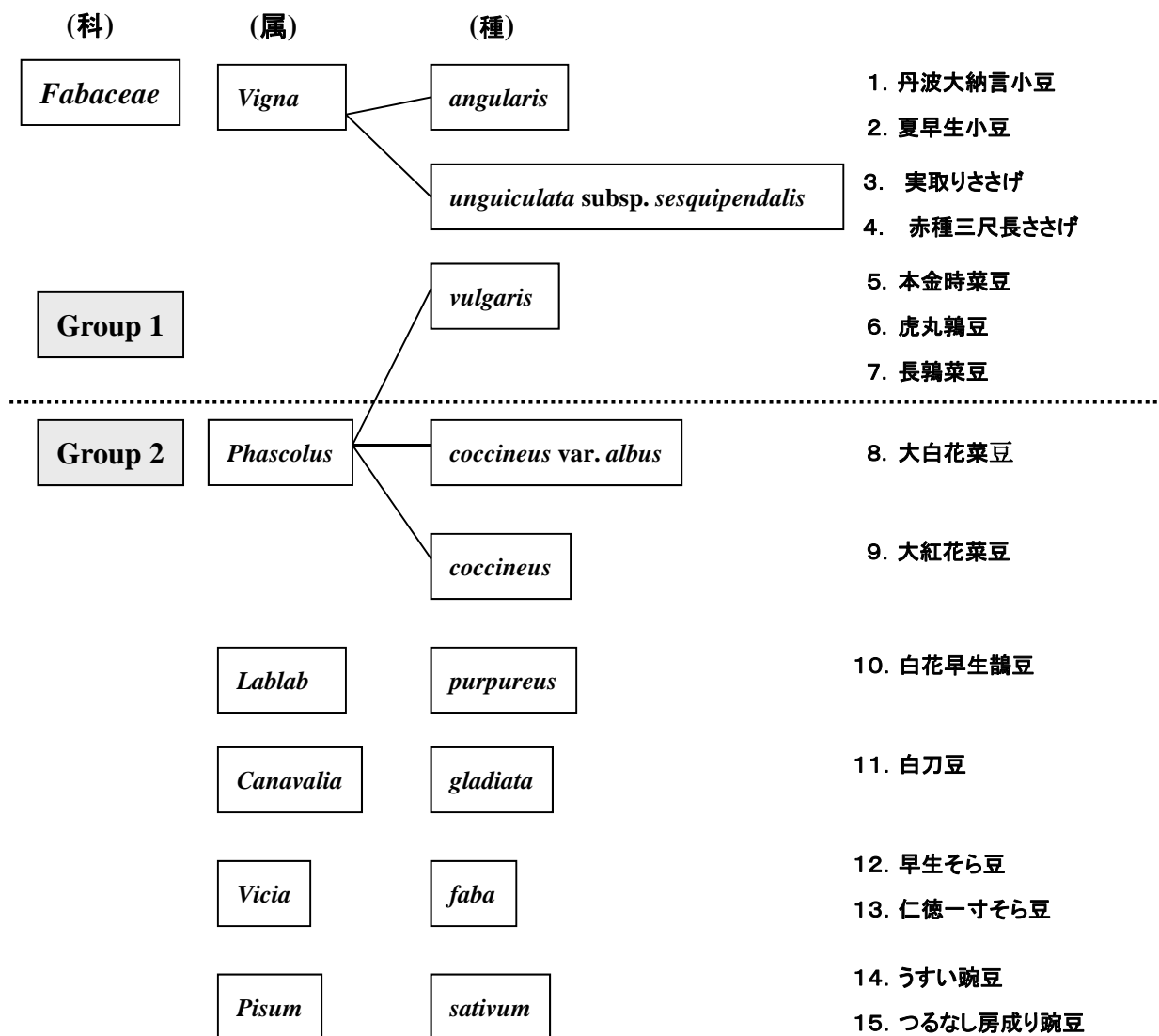


図2 雑豆類の分類とレニン阻害活性によるグループ分け  
文献 28 を一部改正。

## (2) バキュロウイルス・昆虫細胞発現系による組換え型ヒトレニンの発現

大腸菌で発現したプロレニンの場合、巻き戻し作業には多大な労力と時間が必要で、より効率的な発現系の検討を進めた。大腸菌を用いた低温発現ベクターでの発現、酵母での発現やカイコでの発現を試みた。しかしながら、いずれの発現系においてもレニン活性は検出することが出来なかった。最後にたどり着いたのが、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系である。本発現系は、膜タンパク質など本来大腸菌や酵母では発現が困難なタンパク質の発現解析に適していることが示されており、レニン発現への応用を試みた。Invitrogen社の Bac-to-Bac システムを用いて組換え型ヒトプロレニン発現ベクターを構築し、ヨトウ蛾中腸由来の Sf-9 細胞を用いて発現を行った。その結果、ウイルス感染培養中期にプロレニンが大量に発現し、さらに培養最後期に活性型レニンの発現することが示された。活性型レニンが培養最後期に出現することから、培養最後期の培養液を用いてレニンの精

製を進めた。活性型レニンの精製には、アスパルティックプロテアーゼの阻害剤であるペプスタチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーが有効であり、本クロマトグラフィーと Mono Q カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーで組換え型ヒトレニンの精製に成功した (表 2) [29]。200ml の培養液から最終的に 0.613 mg の精製レニンを取得した。収率は 35.4% であり、これからバキュロウイルス・昆虫細胞発現系でのレニンの発現量を試算すると 8.66mg/l と求められ、本発現系の優秀さが示されている。

表2 Sf-9 細胞で発現した組換え型ヒトレニンの精製 [29]\*

精製ステップ	全タンパク質 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
培地	857	470	0.550	100
ペプスタチンカラム	1.69	171	101	36.4
Mono Q	0.613	166	270	35.3

\*培養最後期の培地 200ml を用いて精製を行った。

精製したレニンは SDS-電気泳動で単一のバンドとして泳動され、その分子量は約 40,000 と求められた。N-末端 10 残基のアミノ酸配列は、NH<sub>2</sub>-Leu-Gly-(X)-Thr-Thr-Ser-Ser-Val-Ile-Leu-と同定された。3 番目のアミノ酸残基は未同定であるが、Cys 残基と推察される。この N 末端配列は、成熟型ヒトレニンの N 末端配列の 3 残基目からの配列と一致しており、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系で発現した組換え型ヒトレニンは、本来のプロセシングサイトから 2 残基下流側で加水分解された分子であることが示された [29]。このことより、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系には本来のプロセシング酵素とは異なる別のプロレニンプロセシング酵素の存在することが示唆された。実際、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系由来プロレニンプロセシング酵素 (Prorenin processing enzyme, PPE) の解析も行い、PPE がバキュロウイルスゲノム遺伝子にコードされているシステインプロテアーゼであることを証明した [30, 31]。

### 3. 新規レニン活性測定方法の開発

#### (1) 既存のレニン活性測定方法

前述の通り、レニンの研究は 100 年以上の歴史を持っているが、その間レニン活性測定方法の開発には多くの労力が費やされて来た。研究開始当初は、動物に腎臓の抽出液を注射し血圧の上昇度合いを目安にレニン活性を評価していた [1,2]。しかしながら、動物の血圧を再現性良く測定するには熟練した技術が必要であり、特定の研究施設でしかレニン活性の評価は出来なかった。1969 年に Haber らによりレニンの活性測定に AI の RIA が導入されレニン活性測定の感度と再現性が格段に向上した [25]。それでも、血液からのレニン基質の部分精製、<sup>125</sup>I 標識 AI の購入や RI 施設の完備などレニン活性の測定には多くの解決すべき課題があった。

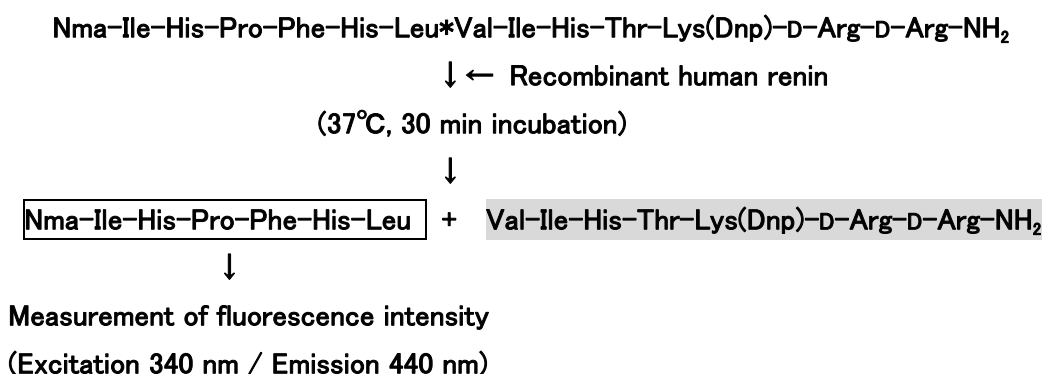


レニンは基質認識領域が広く、他のプロテアーゼに比べ合成基質の開発が遅れていた。1981年 Murakami らにより初めてブタレニン活性測定用の蛍光合成基質が開発された [32]。基質の構造は、Succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu\*Leu-Val-Tyr-MCA (\*, ブタレニンによる切断部位)であり、レニンによる加水分解で生じた Leu-Val-Tyr-MCA をアミノペプチダーゼで完全消化し、最終的にアミノメチルクマリン (AMC)の蛍光を測定してレニン活性を評価する 2 段階酵素反応法である。この方法は比較的簡便で感度的にもレニンの精製に応用が可能である。しかしながら、2 段階の酵素反応が必要であること、基質阻害が顕著であることなどからあまり普及はしていない。

## (2) レニン活性測定用新規蛍光消光基質の開発

レニンは基質認識部位の配列が厳密で、ブタレニンの場合アンギオテンシノーゲンの N 末端の 6 残基目から 13 残基目までの 8 残基の配列を認識して 10 残基目 Leu と 11 残基目 Leu の結合を特異的に認識する。そこで、この認識部位を基本として N 末端側に蛍光物質である *N*-メチルアミノベンゾイル基 [2-(*N*-methyamino)benzoyl, Nma] をまた、C 末端領域にリシンの ε アミノ基に 2, 4,-ジニトロフェニル基 [2,4-dinitrophenyl, Dnp] を導入したブタレニン活性測定用の蛍光消光基質を開発した [19]。本基質を用いることで、ブタレニンの活性測定が比較的容易に行えるようになった。その結果、RnBP とレニンとの相互作用解析が飛躍的に進展した[20, 21, 33-35]。ブタ腎臓から精製したレニンと本基質を用いてレニン阻害物質探索研究を手がけたが、レニンと基質となるアンギオテンシンノーゲンの構造は種により大きく異なることが知られていることから、組換え型ヒトレニンの入手を待って本格的なレニン阻害物質の探索を進めることとした。

前述の通り、2007 年にバキュロウイルス・昆虫細胞発現系により組換え型ヒトレニンが効率よく発現されることを見出した [29]。この時同時にヒトレニン活性測定用の蛍光消光基質を開発した。組換え型ヒトレニン活性測定の概要を図 3 に示した。



(\*, scissile peptide bond. Assay buffer: 50 mM Na-Phosphate buffer, pH 6.5 containing 0.1 M NaCl, 0.02% Tween 20 & 0.02% NaN<sub>3</sub>)

図3 蛍光消光基質を用いたヒトレニン活性の測定方法

ブタレニン基質の場合も同様であったが、一般にレニンの基質認識部位配列には疎水性アミノ酸が多く存在しており溶解性に問題があった [19, 32]。そこで、溶解性の向上を目指して Lys(Dnp) の C 末端側に生物学的に不活性な D-Arg を 2 残基導入して溶解性の向上を目指した。D-Arg を導入することで溶解性が向上し基質濃度を数十  $\mu\text{M}$  まで上げることが可能となった。そのために基質阻害も殆ど認められなかった。その結果、組換え型ヒトレニンと本基質を用いることで、各種食材由来レニン阻害物質の探索が容易となった。

#### 4. 食物由来レニン阻害物質について

##### (1) 大豆由来レニン阻害物質と構造機能相関解析

前述の通り最初に市販味噌にレニン阻害活性を見出した。味噌原材料のレニン阻害活性を検討したところ、阻害物質は大豆に由来することが明らかとなった。次に、大豆のどの部位に阻害物質が局在するかを調べた。その結果、子葉に比べ胚軸に単位重量当たり約 3 倍の阻害物質の局在することが判明した。大豆胚軸は、挽き割り納豆製造時に廃棄物として大量に排出される。そこで、挽き割り納豆の県内大手メーカーである (株) ヤマダフーズと共同で大豆胚軸からレニン阻害物質の精製を試みた。精製の概略を図 4 に示した。

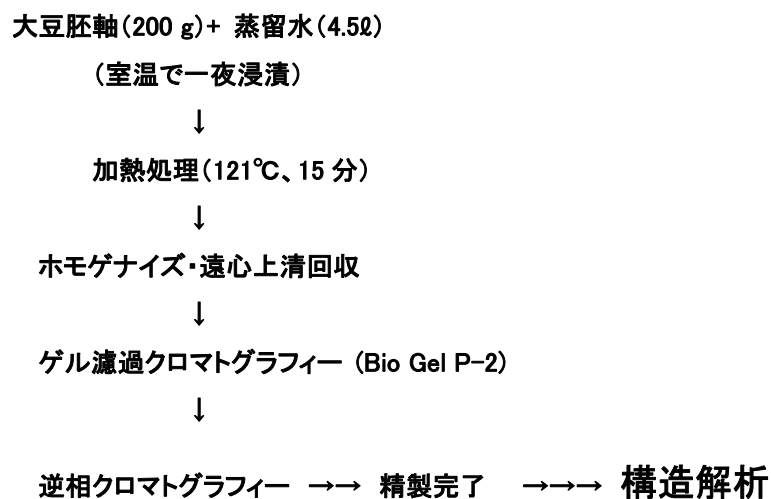


図4 大豆胚軸からのレニン阻害物質の精製

NMR 解析、IR スペクトル解析や標準物質との直接比較により、大豆由来レニン阻害物質の構造をソヤサポニン I と同定した [36、図 5]。ソヤサポニン I は、組換え型ヒトレニン及びブタ腎臓由来レニンを強く阻害し、組換え型ヒトレニンに対する  $K_i$  値は  $37.5\mu\text{M}$  と求められた。一方、レニンと同じくアスパルティックプロテアーゼであるペプシンや他のプロテアーゼ類には作用を示さなかった。したがって、ソヤサポニン I はレニンを特異的に阻害することが明らかとなった。試験管内の実験で効果が認められたことより、高血圧モデルラットを用いて血圧降下作用を検証した。精製したソヤサポニン I を大量に入手することが困難であることから、大豆より部分精製したソヤサポニン I を用いて高血圧モデルラットに投与試験を行った。毎日体重 1 kg 当たり 40 mg の部分精製ソヤサポニン I を経口投与し、7 週間後の収縮期血圧を疑似投与ラットと比較した。その結果、疑似投与ラットの血圧が 228

± 7.4 mmHg (mean ± S.D.)であったのに比べ、ソヤサポニン I 投与ラットでは 217 ± 10.6 mmHg (mean ± S.D.)であり、明らかな血圧上昇抑制効果が観察された [36, 37]。これまでソヤサポニン I の生理作用として肝機能保護作用 [38] や免疫調節作用 [39] のあることは知られていたが、血圧上昇抑制効果のあることは新たな機能性の発見であり特許も併せて申請した [40]。

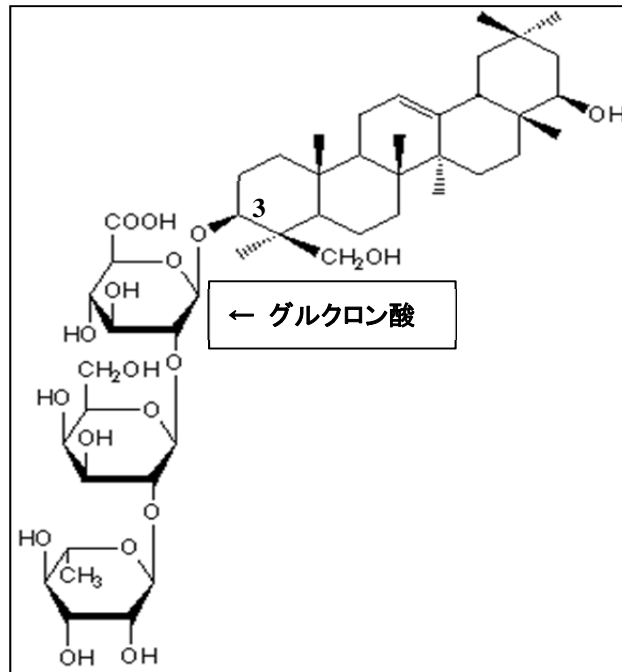


図5 ソヤサポニン I の構造

ソヤサポニン I にレニン阻害活性を見出したことより、サポニンの構造とレニン阻害活性との相関に興味を持たれた。そこで、各種サポニン類を入手しレニン阻害活性を検討した。その結果、サポゲノールの 3β 位にグルクロン酸が結合したいわゆるグルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることを明らかとした [41]。

## (2) 米由来レニン阻害物質と構造機能相関解析

各種食材由来レニン阻害物質を探索した結果、「ごはん」にもレニン阻害活性を見出した。そこで、秋田県奨励米のレニン阻害活性について検討した。各種奨励米を粉砕しメタノール抽出後レニン阻害活性を検定した。その結果、調べた全ての品種にレニン阻害活性の存在することが示された (表 3) [42]。そこで、秋田県の代表品種である「あきたこまち」を用いてレニン阻害物質の精製を試みた。米粉をメタノール抽出した後、遠心分離で上清を回収した。上清を減圧乾固後、各種クロマトグラフィーで阻害物質の精製を行った。その結果、米由来レニン阻害物質として遊離不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を同定した [42]。これらの不飽和脂肪酸は米の脂質成分の大部分を占めることから植物油のレニン阻害を検討した。しかしながら、大豆油、コーン油やごま油などのトリグリセリドにレニン阻害活性は認められなかった。オレイン酸やリノール酸などのありふれた遊離不飽和脂肪酸が米由来のレニン阻害物質であることは、にわかには信じがたいので過去の論文

を探ってみた。その結果、1978年に Kotchen らによりラットのレニン活性が遊離脂肪酸で阻害されることが報告されていた [43]。さらにその10年後には血中のレニン阻害物質の一つがリノール酸であること[44]、リノール酸の静脈注射により高血圧モデルラットで、血圧低下作用のあることが報告されている [45]。これらの報告は、米由来レニン阻害物質のオレイン酸及びリノール酸のレニン阻害効果を支持するものである。

表3 秋田県奨励米抽出液のレニン阻害活性

品種名	IC <sub>50</sub> (μg/ml)*1
あきたこまち	280
でわひかり	250
はえぬき	170
ひとめぼれ	280
めんこいな	150
ササニシキ	160
たかねみのり	180
ゆめおぼこ	270

\*1IC50 は 50%阻害を引き起こす抽出液濃度を示す。

表4 各種遊離脂肪酸によるレニン活性阻害

脂肪酸 (炭素長:不飽和度)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)*1
パルミチン酸 (16:0)	N. I.*2
ステアリン酸 (18:0)	N. I.*2
<i>cis</i> -パクセン酸 (18:1)	29.7
オレイン酸 (18:1)	28.3
リノール酸 (18:2)	37.4
リノレン酸 (18:3)	33.4
アラキドン酸 (20:4)	41.1
エイコサペンタエン酸 (20:5)	41.0
ドコサヘキサエン酸 (22:6)	25.0

\*1IC50 は 50%阻害を引き起こす濃度を示す。

\*2N. I. は、阻害無しを示す。

一価及び二価の遊離不飽和脂肪酸がレニン阻害を持つことが明らかになったことより、遊離多価不飽和脂肪酸および遊離飽和脂肪酸のレニン阻害に興味を持たれた。そこで、各種飽和脂肪酸及び多価不飽和脂肪酸を用いてレニン阻害活性を検討した。その結果、遊離の飽和脂肪酸にレニン阻害活性は認められなかったが、用いた全ての多価不飽和脂肪酸にレニン阻害活性が確認された(表4) [42]。多価不飽和脂肪酸は、抗酸化性が高く多くの生理機能が報告されている。新たな機能性としてレニン阻害活性が見出されたことより、今後、動物実験等での血圧降下作用の検証が必要と考えられた。

### (3) 雑穀由来レニン阻害物質

米にレニン阻害物質の存在することが明らかになったことから、次に糯米、長粒米や雑穀類のレニン阻害活性について検討した [46]。表5に粳米、糯米及び酒米のレニン阻害活性及び遊離不飽和脂肪酸量を示した。

表5 各種米抽出液のレニン阻害活性

試料	抽出物量 (mg/g powder)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	全阻害活性 (U/mg powder)	遊離脂肪酸濃度 (μmol/ml)*1	
				OA*2	LA*3
<b>(粳米)[42]</b>					
あきたこまち	5.7	280	4.04	0.68	2.49
<b>(糯米)</b>					
たつこもち	10.0	88	22.73	1.83	4.13
きぬのはだ	10.1	125	16.03	3.22	7.54
<b>(酒米)</b>					
美山錦	6.1	155	7.82	1.47	3.72
あきた酒こまち	5.8	170	6.82	1.21	3.08
<b>(長粒米)</b>					
インディカ米	3.7	270	2.74	1.27	3.49

\*1 10 mg/ml の抽出液を用いて脂肪酸濃度を測定した。

\*2 OA, オレイン酸

\*3 LA, リノール酸

前述の通り秋田県奨励品種全てにレニン阻害活性が認められたが、糯米、酒米や長粒米など調べた全ての米にレニン阻害活性が認められた。したがって米には遍くレニン阻害活性の存在することが明らかとなった。レニン阻害活性とオレイン酸・リノール酸の濃度がほぼ相関することより、米由来のレニン阻害物質はこれら両遊離不飽和脂肪酸に起因することが示唆された(表5)。

次に、米以外の雑穀類におけるレニン阻害活性を検討した(表6) [46]。

表6 雑穀抽出液のレニン阻害活性

試料	抽出物量 (mg/g powder)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	全阻害活性 (U/mg powder)	遊離脂肪酸濃度 ( $\mu$ mol/ml)* <sup>1</sup>	
				OA* <sup>2</sup>	LA* <sup>3</sup>
そば	39.8	173	44.7	2.66	2.61
強力粉	11.9	>1000	N. D.* <sup>4</sup>	0.12	0.76
薄力粉	14.2	>1000	N. D.* <sup>4</sup>	0.30	1.95
ライ麦	20.1	490	8.20	1.60	5.52
粟	36.3	>1000	N. D.* <sup>4</sup>	0.09	0.62
ひえ	28.7	265	21.6	2.39	7.15
きび	21.9	>1000	N. D.* <sup>4</sup>	0.11	0.41
アマランサス	40.9	>1000	N. D.* <sup>4</sup>	0.23	0.54

\*<sup>1</sup>10 mg/ml の抽出液を用いて脂肪酸濃度を測定した。

\*<sup>2</sup>OA, オレイン酸

\*<sup>3</sup>LA, リノール酸

\*<sup>4</sup>N. D., 測定不可

調べた雑穀類では、そばに強いレニン阻害活性が認められた（表6）。そば以外では、ライ麦やひえに比較的強いレニン阻害活性が検出された。しかしながら、小麦粉類、粟、きびやアマランサスにレニン阻害活性は認められなかった。これら試料のオレイン酸とリノール酸含量を調べてみたところ、レニン阻害活性と遊離不飽和脂肪酸含量が必ずしも一致しておらず、ライ麦やひえにレニン阻害を妨害する物質の存在する可能性が示唆された。そば由来の機能性物質としてルチンが有名である。ルチンは、古くから抗炎症作用や血流改善効果のあることが知られている。そこで、ルチンにレニン阻害活性があるか否かを検討したが、試薬として販売されているルチンにレニン阻害活性は認められなかった（未公開データ）。

いずれにしても米以外の雑穀類にもレニン阻害活性を見出したことは最初の知見であり今後これらレニン阻害活性を持つ雑穀類の研究も重要であると考えている。

#### （4）山菜由来レニン阻害物質

次に、野菜や山菜類のレニン阻害活性について検討した。34種類の乾燥試料のメタノール抽出液を用いてレニン阻害活性を検討した [47]。用いた大部分の野菜、山菜類にレニン阻害活性は認められなかったが、ウコギ科に属するタラノキとウドに比較的強いレニン阻害活性が確認された（図6）。そこで、比較的入手が容易なウドに注目してレニン阻害物質の精製と同定を試みた。



図6 各種山菜類のレニン阻害活性 [47]

山菜類のメタノール抽出液を用いてレニン阻害活性を検定した。最終抽出液濃度が0.1 mg/mlの時のレニン活性割合を示した。阻害物質の存在しない場合のレニン活性を100%とした。

ウドの乾燥粉末をメタノールで抽出後、各種クロマトグラフィーで精製を進め、最終的に分取薄層クロマトグラフィーで精製を完了した。その結果、ウド由来レニン阻害物質として(-)-kaur-16-en-19-oic acid, pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid (B) 及び pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid を同定した [47]。これら3種類の化合物は、いずれも疎水性が高く阻害活性測

定には DMSO などの有機溶媒の使用が必要であり、取り扱いに細心の注意が必要であった。これら化合物は、抗炎症作用やカリウムチャンネルに対する作用などが知られていたがレニン阻害活性については最初の知見である。すなわち、これらの化合物は山菜由来最初のレニン阻害物質となる。

## 5. まとめ

本総説では、入手が困難であった組換え型ヒトレニンの発現系構築と精製方法の確立さらには新規レニン測定方法の開発により、食物由来レニン阻害物質探索が可能となった経緯を解説した。さらにこの探索系を用いて各種食材をスクリーニングした結果、日頃食べ慣れている、味噌、大豆、米や山菜のウドなどにレニン阻害活性を見出した。さらにそれら阻害物質を精製し、構造決定するとともに構造機能相関についても言及した。今後、本測定系を用いて、新たな食材からのレニン阻害物質の探索、さらには動物での検証などを通じて食物由来レニン阻害活性を標榜した特定保健用食品の開発が望まれる。

## 【謝 辞】

レニン及び RnBP の研究を進めるにあたりご指導・ご助言を賜りました筑波大学名誉教授・村上和雄先生、熊本大学医学部名誉教授・三浦洌先生、国立循環器病センター生化学部元部長・三宅可浩先生、並びに同センター研究所生化学部元研究員・大沢多美子先生に感謝申し上げます。

GlcNAc 2-エピメラーゼ並びにレニン阻害物質の研究では秋田県総合食品研究センターの多くの方々にご協力頂きました。厚く御礼を申し上げます。また、多くのご助言を頂きました奈良女子大学教授・井上裕康先生、徳島大学教授・福井清先生、秋田大学医学部教授・杉山俊博先生、秋田大学工学資源学部教授・後藤猛先生、秋田県立大学生物資源科学部教授・吉澤結子先生、同助教・常盤野哲生先生に御礼を申し上げます。レニンの発現解析には秋田大学大学院・安和広乃氏（現・千代田工業株式会社）や同大学院・小野洋樹氏（現・和光純薬工業株式会社）の協力を得ました。記して感謝の意を表します。

## 【引用文献】

- [1] Tigerstedt R., & Bergman P. G., Niere und Kreislauf. *Scand. Arch. Physiol.*, **8**, 223-271 (1898).
- [2] Helmer O. M., & Page I. H., Purification and some properties of renin. *J. Biol. Chem.*, **127**, 757-763 (1939).
- [3] Inagami T., & Murakami K., Pure renin Isolation from hog kidney and characterization. *J. Biol. Chem.*, **252**, 2978-2983 (1977).
- [4] Yokosawa H., Holladay L. A., Inagami T., Hass E., & Murakami K., Human renal renin. Complete purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3498-3502 (1980).
- [5] “Renin-angiotensin” A centenary symposium of the discovery of the renin-angiotensin system, Ulfendahl H. R., & Aurell M., eds., Portland Press Ltd, London (1998).
- [6] “キニンとアンギオテンシン —生体調節の分子機構—“ 松尾寿之、鹿取信 監修、



大石幸子、加藤久雄、三宅可浩 編集、講談社サイエンティフィク (1994).

- [7] Ondetti M. A., Rubin B., & Cushman D. W., Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **4288**, 441-444 (1977).
- [8] Müller D. N., & Luft F. C., Direct renin inhibition with Aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **1**, 221-228 (2006).
- [9] Campbell D. J., Interpretation of plasma renin concentration in patients receiving Aliskiren therapy. *Hypertension*, **51**, 15-18 (2008).
- [10] Brown M. J., Aliskiren. *Circulation*, **118**, 773-784 (2008).
- [11] Takahashi S., Ohsawa T., Miura R., & Miyake Y., Purification of high molecular weight (HMW) renin from porcine kidney and direct evidence that HMW renin is a complex of renin with renin binding protein (RnBP). *J. Biochem.*, **93**, 265-273 (1983).
- [12] Takahashi S., Ohsawa T., Miura R., & Miyake Y., Purification and characterization of renin binding protein (RnBP) from porcine kidney. *J. Biochem.*, **93**, 1583-1594 (1983).
- [13] Takahashi S., Miura R., & Miyake Y., A study on renin binding protein (RnBP) in the human kidney. *J. Biochem.*, **97**, 671-677 (1985).
- [14] Inoue H., Fukui K., Takahashi S., & Miyake Y., Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a porcine kidney renin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6556-6561 (1990).
- [15] Takahashi S., Inoue H., & Miyake Y., The human gene for renin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **267**, 13007-13013 (1992).
- [16] Tada M., Takahashi S., Miyano M., & Miyake Y., Tissue-specific regulation of renin-binding protein gene expression in rats. *J. Biochem.*, **112**, 175-182 (1992).
- [17] Maru I., Ohta Y., Murata K., & Tsukada Y., Molecular cloning and identification of *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney as a renin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16294-16299 (1996).
- [18] Takahashi S., Takahashi K., Kaneko T., Ogasawara H., Shindo S., & Kobayashi M., Human renin-binding protein is the enzyme *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase. *J. Biochem.*, **125**, 348-353 (1999).
- [19] Takahashi S., Kumagai M., Shindo S., Saito K., & Kawamura Y., Renin inhibits *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (renin-binding protein). *J. Biochem.*, **128**, 951-956 (2000).
- [20] Takahashi S., Hori K., Takahashi K., Ogasawara H., Tomatsu M., & Saito K., Effects of nucleotides on *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerases (renin-binding proteins): Comparative biochemical studies. *J. Biochem.*, **130**, 815-821 (2001).
- [21] Takahashi S., Ogasawara H., Takahashi K., Hori K., Saito K., & Mori K., Identification of a domain conferring nucleotide binding to the *N*-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (renin binding protein). *J. Biochem.*, **131**, 605-610 (2002).
- [22] Luchansky S., Yarema K. J., Takahashi S., & Bertozzi C. R., GlcNAc 2-epimerase can serve a catalytic role in sialic acid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8035-8042 (2003).

- [23] Lee J-O., Yi J-K., Lee S-G., Takahashi S., & Kim B-G., Production of N-acetylneuraminic acid from N-acetylglucosamine and pyruvate using recombinant human renin binding protein and sialic acid aldolase in one pot. *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 121-125 (2004).
- [24] Takahashi S., Miura R., Yutani C., & Miyake Y., Purification and characterization of human kidney renin. *J. Biochem.*, **99**, 307-310 (1986).
- [25] Haber E., Koerner T., Page L. B., Kliman B., & Purnode A., Application of radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **29**, 1349-1355 (1969).
- [26] Imai T., Cho T., Takamatsu H., Hori H., Saito M., Masuda T., Hirose S., & Murakami K., Synthesis and characterization of human prorenin expressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **100**, 425-432 (1986).
- [27] Takahashi S., Ogasawara H., Watanabe T., Kumagai M., Inoue H., & Hori K., Refolding and activation of human prorenin expressed in *Escherichia coli*: Application of recombinant human renin for inhibitor screening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006).
- [28] Takahashi S., Hori K., Kumagai M., & Wakabayashi S., Human renin inhibitory activity in legumes. *J. Biol. Macromol.*, **7**, 49-54 (2007).
- [29] Takahashi S., Hata K., Kikuchi K-I, & Gotoh T., High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: Rapid purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).
- [30] Gotoh T., Awa H., Kikuchi K-I, & Takahashi S., Expression and in situ processing of human prorenin to active renin in Baculovirus-infected Sf-9 cell cultures under several infective conditions. *Biochem. Eng. J.*, **43**, 216-220 (2009).
- [31] Gotoh T., Awa H., Kikuchi K-I, Nirasawa S., & Takahashi S., Prorenin processing enzyme (PPE) produced by baculovirus-infected Sf-9 insect cells: PPE is the cysteine protease encoded in AcMNPV gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 370-374 (2010).
- [32] Murakami K., Ohsawa T., Hirose S., Takada K., & Sakakibara S., New fluorogenic substrate for renin. *Anal. Biochem.*, **110**, 232-239 (1981).
- [33] Takahashi S., Takahashi K., Kaneko T., Ogasawara H., Shindo S., Saito K., & Kawamura Y., Identification of functionally important cysteine residues of the human renin binding protein as the enzyme N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase. *J. Biochem.*, **129**, 529-535 (2001).
- [34] Takahashi S., Ogasawara H., Hiwatashi K., Hata K., Hori K., Kouzumi Y., & Sugiyama T., Amino acid residues conferring nucleotide binding properties of N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (renin binding protein). *Biomed. Res.*, **26**, 117-121 (2005).
- [35] Takahashi S., Hori K., Ogasawara H., Hiwatashi K., & Sugiyama T., Effects of nucleotide on the interaction of renin with GlcNAc 2-epimerase (renin binding protein). *J. Biochem.*, **140**, 725-730 (2006).
- [36] Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., & Yamada S., Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor from soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 323-3236 (2008).

- [37] Hiwatashi K., Shirakawa H., Hori K., Yoshiki Y., Suzuki N., Hokari M., Komai M., & Takahashi S., Reduction of blood pressure by soybean saponins, renin inhibitor from soybean, in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2310-2312 (2010).
- [38] Ikeda T., Udayama M., Okawa M., Arao T., Kinjo J., & Nohara T., Partial hydrolysis of soyasaponin I and the hepatoprotective effects of hydrolytic products. Study of structure-hepatoprotective relationship of soyasapogenol B analogs. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 359-361 (1998).
- [39] Tachibana H., Fujimura Y., Yano S., & Yamada K., Immunological modulative activity of soybean saponins: Suppressive effects of soybean saponins on high affinity IgE receptor expression. *Soy Protein Res. Jpn.*, **6**, 104-107 (2003).
- [40] 高橋砂織、堀一之、樋渡一之、山田清繁、新保守「ソヤサポニン I を含有するレニン阻害剤」  
特願 2008-180633 特開 2010-18552
- [41] Takahashi S., Hori K., Hokari M., Gotoh T., & Sugiyama T., Inhibition of human renin by saponins. *Biomed. Res.*, **31**, 155-159 (2011).
- [42] Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Kodama I., Hokari M., Suzuki N., Yoshizawa Y., & Gotoh T., The occurrence renin inhibitor in Rice: Isolation, identification, and structure-function relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1713-1715 (2010).
- [43] Kotchen T. A., Welch W. J., & Talwalkar R. T., In vitro and in vivo inhibition of renin by fatty acids. *Am. J. Physiol.*, **234**, E593-E599 (1978).
- [44] Talwalkar R. T. & Kotchen T. A., Inhibition of renin by plasma linoleic acid. *Am. J. Med. Sci.*, **296**, 192-197 (1988).
- [45] Reddy S. R., Talwalkar R., T., Downs J., & Kotchen T. A., Effects of linoleic acid infusion on blood plasma in normotensive and hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, **257**, H611-H617 (1989).
- [46] Takahashi S., Tokiwano T., Suzuki N., Kodama I., Yoshizawa Y., & Gotoh T., Renin inhibitory activity in rice and cereals. *J. Biol. Macromol.*, **10**, 83-91 (2010).

# 麴菌トランスポゾン *Crawler* の構造および転移特性と 醸造産業への応用

小笠原 博信

(秋田県総合食品研究センター 応用微生物グループ)

Hironobu OGASAWARA

## 【要約】

実用麴菌株より新たな DNA トランスポゾン配列を見出し、高濃度の銅イオンストレスや高温ストレス下でのみ転移活性を有することを麴菌で初めて発見した。この活性型トランスポゾンを *Crawler* と命名し、遺伝子構造、転移特性や麴菌株内での分布について解析を行った。*Crawler* は実用麴菌株内に広く分布し、味噌用麴菌でもその転移活性が認められ、その転移挿入によって白色分生胞子を形成する新たな麴菌株が得られている。

## 1. 緒言

麴菌 *Aspergillus oryzae* は、古来我が国の伝統的発酵食品である酒、味噌、醤油をはじめ、様々な食品に用いられており、千年以上にわたって我が国の豊かな食文化に貢献してきた。今日でも醸造産業や私たちの生活には無くてはならない重要な微生物である。秋田県においては漬物や水産加工等への米麴としての利用比率が他県に比べて高く、本県の伝統食品の特徴となっている。

多くの先人達による生化学的研究や遺伝子工学的研究によって麴菌の様々な特性と有用遺伝子の解析が成されてきたが、2005 年、日本の産学官研究グループによって明らかにされた麴菌全ゲノム解読の成果<sup>1)</sup>により、ゲノム情報を活用した網羅的な遺伝子解析研究のための基盤が確立してきた。翌 2006 年に日本醸造学会は日本の貴重な財産である麴菌を「国菌」と認定・宣言した。同時に秋田県においても最も重要な醸造微生物の一つであることは周知のとおりである。

近年、筆者らは麴菌の多様性と醸造現場での様々な麴菌株の相互作用の歴史を理解する手がかりの一つとして、麴菌に内在するトランスポゾン (transposon) 遺伝子に着目し、転移活性を持つトランスポゾンの検索と機能解析を行っている。トランスポゾンとは、ゲノム上のある位置から別の位置へ転移することができる可動性 DNA 因子のことである。麴菌においては全ゲノム解読から初めてトランスポゾンを有することが明らかとなったが、それまではトランスポゾン活性は見つかなかった。

このような状況の中、筆者らは実用麴菌株よりトランスポゾン配列を新たに見出し、その内在性トランスポゾンが麴菌において転移活性を有することを初めて発見することができた<sup>2)</sup>。本稿ではこの活性型トランスポゾン *Crawler* の遺伝子構造、転移特性や麴菌株内での分布等の解析結果について述べる。さらに、*Crawler* 転移

活性を利用した実用麹菌株育種への応用についても検討し、新しく得られた味噌用麹菌株の特徴についても解説する。

## 2. 糸状菌のトランスポゾン研究と麹菌における探索

トランスポズンはトウモロコシの色変わりを引き起こす転移性因子として発見されたが、その後の研究により、様々なトランスポゾン配列が原核生物からヒトに至るまで多くの生物に広く分布していることが知られている。トランスポズンはその構造と転移機構により2種類に大別されている<sup>3)</sup>。一つはRNAを介して逆転写したDNAを他の位置に転移するレトロトランスポゾン (retrotransposon) (Class I) で、一般に転移に必要な *gag* や *pol* と呼ばれる幾つかの酵素群をコードする5~7kbのユニットから成っている。もう一方はトランスポナーゼ (transposase) のみをコードし、この酵素によりゲノム中のDNAユニットを切り出して転移する1~2kbのユニットのDNAトランスポゾンである (Class II) (図1)。

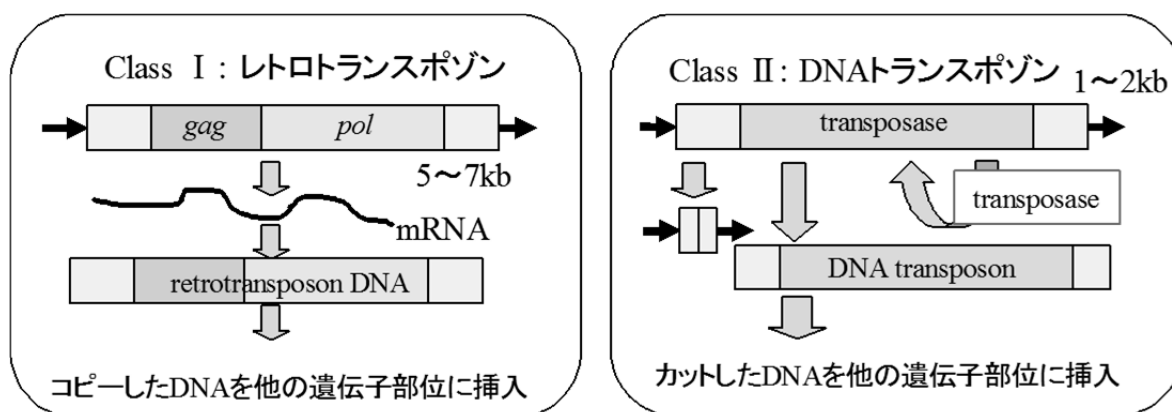


図1 レトロトランスポゾンとDNAトランスポゾンの転移機構の違い

*gag*: RNA結合安定化タンパク質

*pol*: 転移に関わる酵素群 (逆転写酵素やインテグラーゼなど)

糸状菌においてトランスポズンは新しい研究テーマとして15年ほど前より精力的に研究がなされ、*niaD* 遺伝子を用いたトランスポゾン・トラッピング (transposon trapping) 等により、*Fusarium* 属や *Neurospora* 属等で、両クラスの各種活性型トランスポゾンが多数単離され、特性解明がなされてきている<sup>4, 5)</sup>。*Aspergillus* 属においても、*A. niger* の *Tan1*<sup>6)</sup> や *Ant1*<sup>7)</sup> など、転移活性を持つと推定されるトランスポゾンが報告されており、また、*A. fumigatus* においても *Afut1*<sup>8)</sup> などのレトロトランスポゾン配列の存在が報告されている。

麹菌 *A. oryzae* においても EST (expression sequence tag) 解析やゲノム情報<sup>1)</sup> をもとに1種のDNAトランスポゾンとTIRエレメント (*Aot1*)、および5種のレトロトランスポゾン *Aoret1*, *Aoret2*, *Aoret3*, および *AoLTR1*, *AoLTR2* がRIB40株ゲノムより同定されていた<sup>9)</sup>。その中で幾つかのエレメントはmRNAの転写などが観察されたものの、転移活性は認められていなかった。そこで、さらに広く麹菌株の検索を進めたところ、実用株であるOSI1013株 (月桂冠保有実用株) の *niaD*

変異株の中から、偶発的に *niaD* 遺伝子内に転移したと推定される新規の活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* が見出された。偶発的ではあるが新規に *niaD* 遺伝子への挿入が起こっていることから、麴菌遺伝子内での転移活性が期待され、転移活性の検出やその機能解析を行った<sup>2)</sup>。

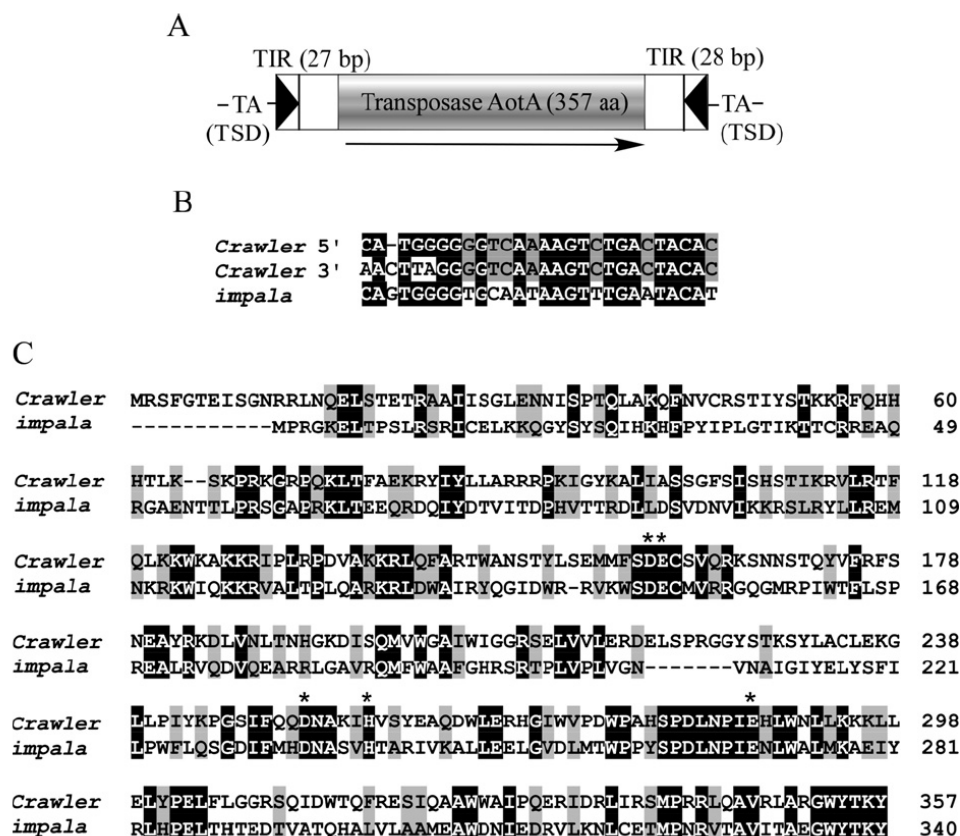


図2 麴菌 DNA トランスポゾン *Crawler* の遺伝子構造

A: DNA トランスポゾンとしての構造的特徴

B: TIR の DNA 配列相同性比較

C: Transposase のアミノ酸配列相同性比較 (星印は DDE モチーフ)

### 3. 麴菌の DNA トランスポゾン *Crawler* の特徴

この挿入エレメントの DNA 配列を解析したところ、内部に 357 アミノ酸からなる transposase と推定される ORF (*aotA*) が存在し、100 bp ほどの配列を介した両端に存在する逆方向反復配列 TIR(terminal inverted repeat)とその外側に位置する同方向反復配列 TSD(target site duplication) (TA, 2bp) の特徴から、全長 1290 bp からなる典型的な Class II の DNA トランスポゾンであることが判明した (図 2 A)。TIR は既知の DNA トランスポゾンとはやや異なり 28bp の内 6bp が不完全な配列であったが、*Fusarium* 属の DNA トランスポゾンである *impala*<sup>10)</sup> の TIR と相同性が高いことが判った (図 2 B)。さらに、推定アミノ酸配列からは *impala* の transposase と相同性が高いことが示され (一致アミノ酸残基 31%、相同性アミノ酸残基 66%)、保存領域には endonuclease 活性に必要な DDE モチーフも有して

いた (図 2 C)。 *impala* は線虫やショウジョウバエの DNA トランスポゾン を代表とする *Tc1/mariner* ファミリーに属し、転移活性が高い糸状菌由来の DNA トランスポゾンとして知られ<sup>11)</sup>、異種糸状菌の変異株作出や機能遺伝子の tagging などにも応用されている<sup>12)</sup>。

サザン・ブロット解析の結果より、麴菌の新規 DNA トランスポゾンは OSI1013 株においては 16 バンド以上が認められ、多コピーで存在していることが確認された (図 3)。糸状菌における Class II 型のトランスポゾンは 5-20 コピー存在している場合が多く<sup>13)</sup>、コピー数の面においても活性型 Class II の特徴を有していた。

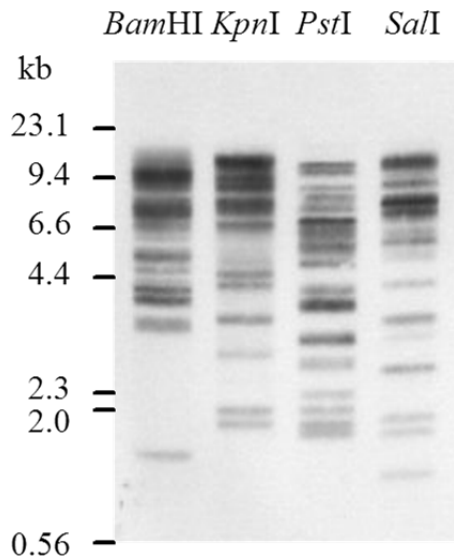


図 3 *Crawler* のサザン・ブロット解析 (OSI1013 株)  
各レーン：消化に用いた制限酵素  
プローブ：*Crawler* の全長 DNA

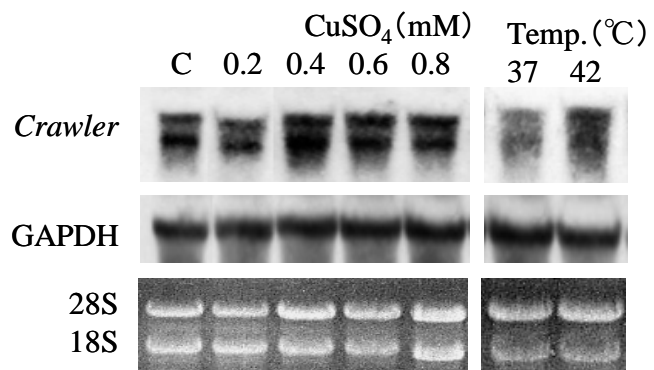


図 4 Transposase *aotA* のノーザン・ブロット解析  
プローブ：*Crawler* の全長 DNA  
GAPDH 遺伝子：発現量の対照として  
28S,18SrRNA は臭化エチジウムで染色

#### 4. 強ストレスによる *Crawler* の活性化とトランスポゾン・トラッピング法

多コピーで存在している *Crawler* は、*impala* との類似性とも合わせて、麴菌内で転移活性を示すことが期待された。そこで、トランスポゾンの活性化条件を検討するため、OSI1013 株の transposase 遺伝子 (*aotA*) の転写活性についてノーザン・ブロット解析により調べたところ、*Crawler* は通常の液体培養条件下でも、ある程度の転写がなされていることが判明した。次に、より高い転移誘発を目的に、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) のレトロトランスポゾン *MAGGY* などで活性化効果<sup>14)</sup> が報告されている Cu 存在下での培養や高温などのストレス処理による *Crawler* 転写活性に及ぼす効果について検討した。その結果、液体培養麴菌体に対し、高温処理や  $\text{CuSO}_4$  水溶液処理を行うことで、わずかではあるがトランスポゾン mRNA 転写量の増加が認められた (図 4)。これらのことから、*A. oryzae* においても *M. grisea* と同様にストレスに対応してトランスポゾン遺伝子の転写量を増加させる性質があることがわかった。

そこで、ストレス処理後の麴菌分生胞子を用いたトランスポゾン・トラッピング

を行った。トランスポゾン・トラッピングとはトランスポゾンの転移活性を利用し、特定の遺伝子にトランスポゾンの転移挿入が起きた株を選択培地によりポジティブ・スクリーニングする方法である。従来から対象遺伝子としてトラッピングが行われている *niaD* (nitrate reductase) 遺伝子<sup>13, 15)</sup> に加え、機能が欠損した場合、同様に  $\text{KClO}_3$  耐性となる *crnA* (nitrate permease) 遺伝子についてもトランスポゾン挿入が起きたかどうかを PCR 法により調べた (図 5)。その結果、分生胞子を長時間にわたって熱ストレスや高濃度の  $\text{CuSO}_4$  水溶液で処理することにより *crnA* 遺伝子への *Crawler* 転移挿入がトラッピング (スクリーニング) された。また、 $\text{KClO}_3$  を含む選択培地において高温で培養した場合や、さらには高濃度の  $\text{CuSO}_4$  を含む CD 培地上で着生した分生胞子を用いてスクリーニングすることによっても、*crnA* への挿入が推定される 3.5kb のバンドが認められた (図 6 A)。分生胞子のストレス処理において *M. grisea* で示された短時間でのストレス処理や低濃度の Cu ストレスでは転移株がトラッピングされていないことから、転移誘発には通常の醸造・発酵培養条件とは大きくかけ離れた条件を必要とすることが明らかとなった<sup>2)</sup>。

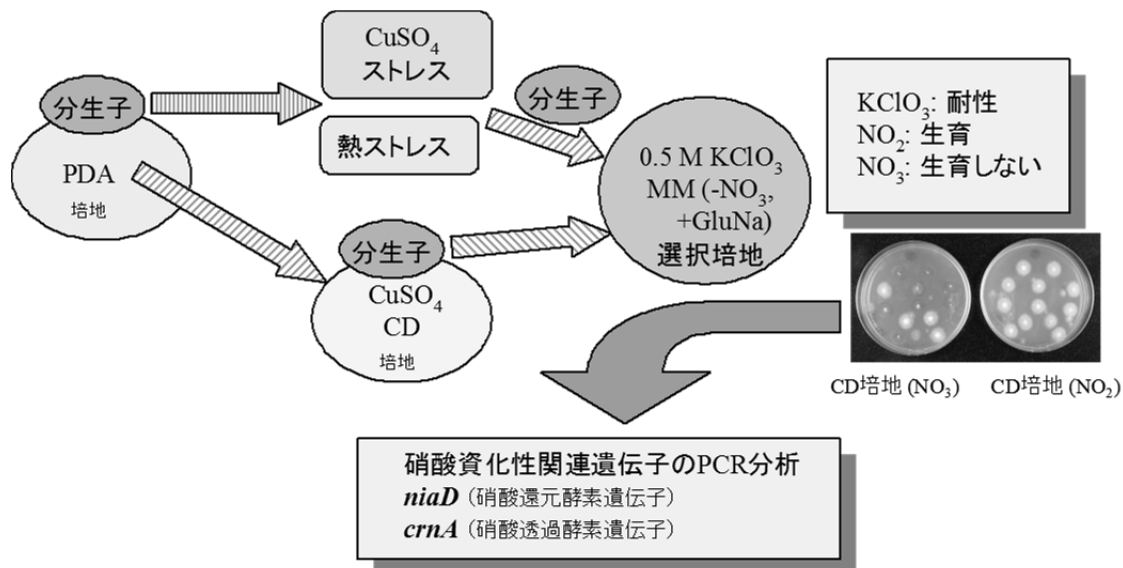


図 5 トランスポゾン・トラッピング法の概略

## 5. *Crawler* 転移株の多様な挿入位置

さらに、分生胞子を形成させるときの Cu ストレス濃度について検討したところ、*crnA* 遺伝子への挿入が高頻度で観察された Cu 濃度より高い Cu ストレス条件によって *niaD* 遺伝子への *Crawler* 挿入株が得られるようになった (図 6 B)。また、 $\text{KClO}_3$  スクリーニング時の高温培養によっても *crnA* 遺伝子への挿入株が得られた。

図 7 に得られたいくつかの *Crawler* 挿入株と挿入位置を示した。*crnA* 遺伝子内での挿入位置や方向については様々であったが、挿入位置の配列は、DNA トランスポゾンの特性に従って TSD の 2bp (TA) を組換えて挿入が起きていた。一方、挿入位置の周辺領域について比較したが、コンセンサス配列は見出されなかった。

従来から報告のある *niaD* 遺伝子に加え、*crnA* 遺伝子についてもトランスポゾン・トラッピングに有効であることが初めて示された。*niaD* および *crnA* 遺伝子は、



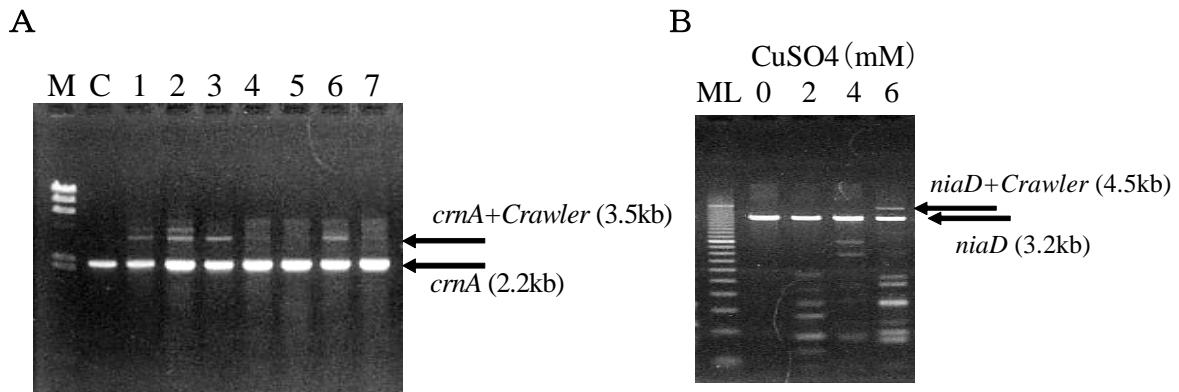


図6 PCR スクリーニングによるトランスポゾン・トラッピングの結果

A : ストレス処理の違いによる *crmA* トラッピング

M :  $\lambda$ -*Hind*III マーカー

C : 対照区 (分生孢子処理、30°C・6hr、滅菌水)

1 : 分生孢子処理、42°C・6hr、滅菌水

2 : 分生孢子処理、30°C・6hr、9mM CuSO<sub>4</sub>

3 : 0.5M KClO<sub>3</sub>-CD プレート・37°C 培養後収穫した分生孢子

4 : 2mM CuSO<sub>4</sub>-CD プレート・30°C 培養後収穫した分生孢子

5 : 2mM CuSO<sub>4</sub>-PDA プレート・30°C 培養後収穫した分生孢子

6 : 4mM CuSO<sub>4</sub>-CD プレート・30°C 培養後収穫した分生孢子

7 : 4mM CuSO<sub>4</sub>-PDA プレート・30°C 培養後収穫した分生孢子

B : *niaD* トラッピングに及ぼす CuSO<sub>4</sub> ストレスの効果

CuSO<sub>4</sub>-CD プレート・30°C 培養後収穫した分生孢子によるスクリーニング

ML : 200bp ラダー・マーカー

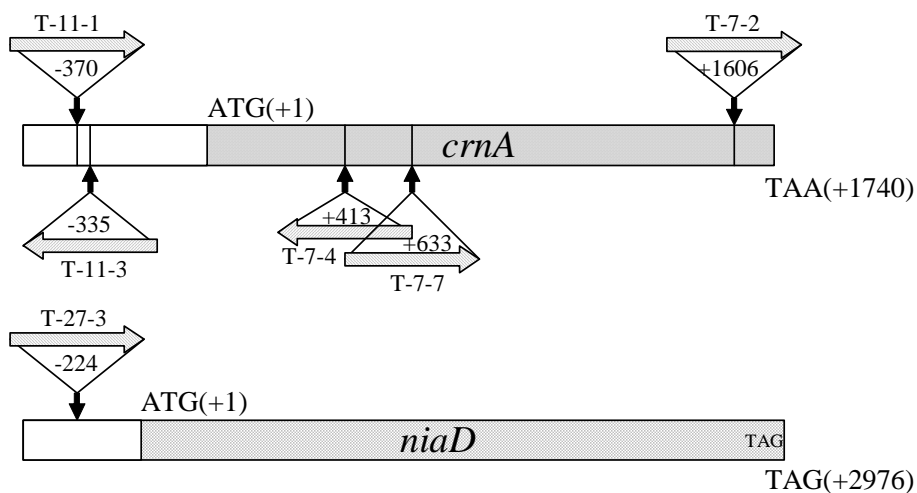


図7 *Crawler* 挿入のマッピング

*Crawler* 挿入位置の数字は ATG を+1 としたときの相対位置

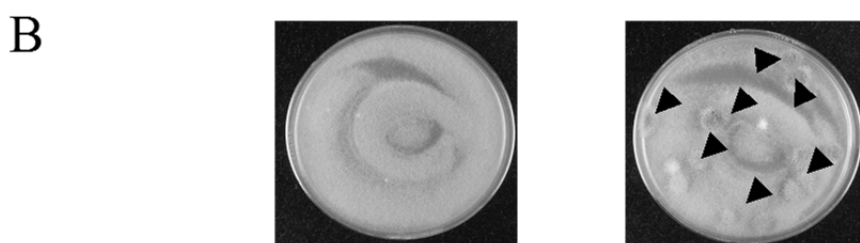
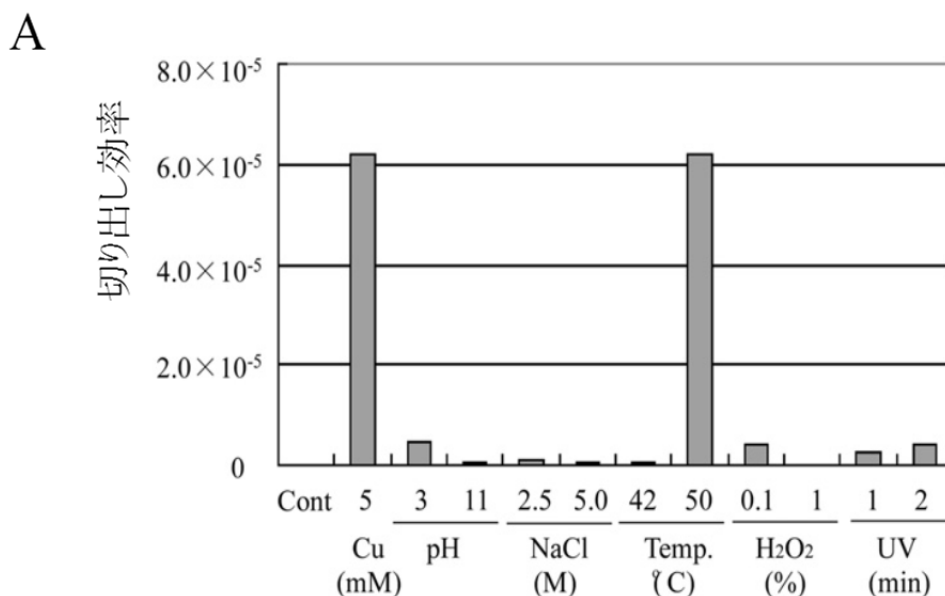
矢印は *crmA*、*niaD* 遺伝子に対する挿入方向

矢印上の数字は *Crawler* 挿入変異株 No.

麴菌の染色体上で *niaD-niiA* (nitrite reductase)-*crnA* のクラスター構造を形成している<sup>1, 16)</sup>。*niiA* 欠損株は  $\text{KClO}_3$  耐性ではスクリーニングされてこなかったため挿入株は得られていないが、このクラスター領域はトランスポゾンが転移しやすい「ホット・スポット (hot spot)」になっているものと推定される。

## 6. *Crawler* 挿入株を用いた転移活性化条件の再検討

*Crawler* 転移条件のさらなる検討と切り出し効率の計測を行うため、*crnA* 遺伝子プロモーター領域内に *Crawler* 挿入を有する T-11-1 株 (図7) を用いて、再転移による栄養要求復帰変異株のスクリーニングを行った。様々なストレス条件下での切り出し効率を測定したところ、転移挿入株が得られた条件と同様の高温処理ならびに Cu ストレスで高い *Crawler* の切り出し効率(復帰効率)が得られた。また、Cu 濃度の増加に伴い転移効率の上昇も認められている<sup>2)</sup>。他のストレス処理においては、酸処理 (pH3)、過酸化水素水 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 処理および UV 照射によっても Cu ストレスと比較し 1/10~1/20 程度の切り出し効率ではあったが、低頻度ながら *Crawler* の活性化効果が認められた (図8)。



対照区 (0 mM  $\text{CuSO}_4$ )    ストレス区 (5 mM  $\text{CuSO}_4$ )

図8 様々なストレスによる *Crawler* の切り出し効率

A : 切り出し効率の比較

B : 切り出し効率の計測プレート

復帰変異株がパッチ状のコロニー (矢頭が示す) として計測される。

## 7. *Crawler* の足跡配列 (Footprint) の特徴

転移した DNA トランスポゾンには先に挿入されていた遺伝子上に特有の足跡 (footprint) を残すことが知られている<sup>9,17)</sup>。*Crawler* についても T-11-1 株、T-11-3 株 (逆向き挿入) および T-28-2 株 (図 7) から誘導した復帰株の切り出し位置の配列を調べたところ、2bp の TSD (TA) と CTT という共通配列が新に残されていることが判った。C は TIR の 5' 端から、TT は 3' 端からそれぞれ由来したと推定される。調べた 24 復帰株がすべて同じ Footprint 配列を残しており (表 1)、幾つかの多様性を示す *impala* や *Fot1* とは異なり、糸状菌の中では特徴的な footprint であると言える。

表 1 復帰変異株における *Crawler* 切り出し部位の Footprint

Strains	No. of clones sequenced	Footprint
T-11-1 ( <i>crnA</i> <sup>-</sup> , F)	9	-ATATCCTATCT <b>Actt</b> TATCAACCTTAC-
T-11-3 ( <i>crnA</i> <sup>-</sup> , R)	9	-GATATCATATTA <b>aag</b> TACCATAATATC-
T-28-2 ( <i>niaD</i> <sup>-</sup> , F)	6	-CGTTATATGGT <b>Actt</b> TAACAAGGAGTT-

- ・複製された TSD は太字、新たに残された 3bp は斜体文字
- ・T-11-3 株では *Crawler* が逆方向に挿入されていたため、他の 2 株に相補な配列が footprint として残されている。

## 8. 各種麴菌株における *Crawler* の分布

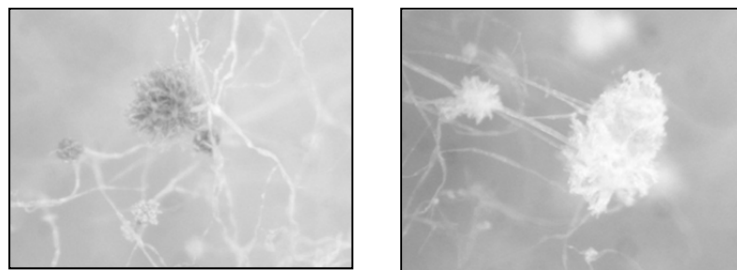
転移活性が明らかとなった *Crawler* エレメントの麴菌内での分布について PCR スクリーニングおよびサザン・ブロット解析により調べた。保存株 RIB 株 (酒類総合研究所) や実用株 AOK 株 (秋田今野商店) 中の *A. oryzae* や醤油用麴菌 *A. sojae* の多くの実用麴菌に *Crawler* エレメントは広く分布していることが明らかとなった<sup>18)</sup>。*A. oryzae* と *A. sojae* はゲノム全体の相同性が 75% と低い<sup>19)</sup> にもかかわらず、両株に多く分布していることはゲノム進化の上から興味を持たれるところである。この分布の広さは *Crawler* が過去においても転移活性が高かったことを示し、醸造現場での麴菌利用や長年の育種選抜過程において相互に接点があり、*Crawler* 遺伝子が水平伝搬した可能性なども推察される。

## 9. *Crawler* 転移活性の実用株育種への応用

*Crawler* が麴菌に広く分布していることを基にその利用技術として、実用株のトランスポゾン変異育種があげられる。醸造・発酵時の生育条件とは異なる強力なストレスによって *Crawler* 転移を誘発し優良株の遺伝子改変を行うことで、いわゆる「組換えによらない」分子育種も可能である。実用株から得られるトランスポゾン変異株は直接、発酵や食品加工に利用できると考えられ、醸造・食品加工現場でのメリットは大きいものと期待される。現在、味噌用麴菌 AOK139 株 (秋田今野商店) を親株とした様々な株の取得を目指し、*Crawler* 転移活性を利用した研究を進

めているところである。その中で、高温ストレスにより分生胞子の着色性に関与する *wA* 遺伝子のコード領域に *Crawler* が挿入した白色分生胞子変異株 (図 9) や気中菌糸や分生胞子形成など外観形態の大きく異なる変異株も多数得られてきている<sup>20)</sup>。*wA* 遺伝子への *Crawler* 挿入は PCR による *wA* 増幅バンドの 1.3Kbp の増加や挿入箇所領域の DNA シーケンシングにより確認された。そこで、AOK139 白色分生胞子株を用いた味噌の小仕込み試験では脂肪酸生成に由来する抗変異原活性やマルトオリゴ糖などの機能性は親株と同等であったが、明るい色調の味噌が醸造されることが示された<sup>21)</sup>。以上のことから、モデルケースとして行った味噌小仕込み試験より、醸造株における *Crawler* 変異による遺伝子改変育種の実用性が示唆された。

さらに、新しく育種された株は特定の遺伝子領域に *Crawler* というマーカーを持つことになり、麹菌の遺伝子判別や菌株管理にも有効で強力なツールとしても役立つと思われる。



AOK139 親株

AOK139 株 *wA::Crawler* 変異株

図 9 味噌用麹菌 AOK139 株の分生胞子の外観 (写真)

## 10. 今後の研究展望

DNA トランスポゾン *Crawler* は麹菌も含めて *Aspergillus* 属糸状菌において、染色体上での転移活性が証明された初めての内在性トランスポゾン・ユニットである。では、なぜ麹菌においては *Fusarium* 属等の野生型糸状菌と異なり、トランスポゾン転移が容易に起きないのであろうか？ おそらく長年の醸造現場での育種により *A. oryzae* はトランスポゾン変異に対抗する様々な抑制機構を獲得した株が安定した醸造用株として受け継がれてきた結果ではないかと推定される。したがって、本稿で示したように通常の麹菌培養条件や醸造条件とはかけ離れた強力なストレスにより、トランスポゾンに対する抑制機構を回避し、*Crawler* 転移を誘導できたと考えている。実際に通常の培養条件下でも発現している mRNA はコード領域内での splicing や poly(A) 付加による不活性化を受けている比率が高いが、ストレス強度の増加に伴ってインタクトな mRNA 分子種の比率が増加し、転移頻度も高くなることが観察されている<sup>22)</sup>。

このような転移特性は不完全な TIR に起因している可能性もあり、*impala* タイプの完全型 TIR に改変することで転移活性が向上するのではないかと考えられる。麹菌においても転移活性の高い *Crawler* や TIR ユニットが創出されれば、*impala*<sup>23)</sup> や *Vader*<sup>24)</sup> による Tagging への利用と同様に、RIB40 株へ導入することで遺

伝子機能の特定に利用できると考えられる。

麴菌におけるトランスポゾン研究は新規の遺伝子機能解析法と醸造・食品業界からの要望にこたえる新たな麴菌株育種法の開発に直接繋がるものと期待される。

### 【謝辞】

本稿に記した内容は東北大学大学院農学研究科 五味勝也教授のご指導のもとで行われたものであり、衷心より感謝いたします。また、研究の遂行に当たり実用麴菌 OSI1013 株とトランスポゾン配列情報をご提供いただきました月桂冠総合研究所長 秦洋二博士、遺伝子解析用の保有株や実用株を分与いただきました（独法）酒類総合研究所醸造技術応用研究部門長 山田修博士、並びに（株）秋田今野商店代表取締役社長 今野宏博士に深く感謝いたします。

### 【引用文献】

- 1) Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H. : *Nature*, **438**, 1157-1161 (2005)
- 2) Ogasawara, H., Obata, H., Hata, Y., Takahashi, S., Gomi, K. : *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 441-449 (2009)
- 3) Daboussi, M. J. : *J. Genet.*, **75**, 325-339 (1996)
- 4) Anaya, N., Roncero, M. I. G. : *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 637-47 (1995)
- 5) Kinsey, J. A., Helber, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1929 – 1933 (1989)
- 6) Nyssonen, E., Amutan, M., Enfield, L., Stubbs, J., Dunn-Coleman, N. S. : *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 50-56 (1996)
- 7) Glayzer, D.C., Roberts, I.N., Archer, D.V., Oliver, R.P. : *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 432-438 (1995)
- 8) Neuveglise, C., Sarfati, J., Latge, J.P., Paris, S. : *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1428-1434 (1996)
- 9) 佐藤元洋、五味勝也、秋田修 : 農化大会要旨、p62 (2002)
- 10) Langin, T., Capy, P., Daboussi, M. J. : *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 19-28 (1995)

- 11) Hua-Van, A., Langin, T. Daboussi M. J. : *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 1959-1969 (2001)
- 12) Dufresne, M., Hua-Van, A., de Wahab, H. A., M'Barek, S. B., Vasnier, C., Teyssset L., Kema, G. H. J., Daboussi, M. J. : *Genetics*, **175**, 441-452 (2007)
- 13) Gomez-Gomez, E., Anaya, N., Roncero, M. I. G., Hera, C. : *Fungal Genet. Biol.*, **27**, 67-76 (1999)
- 14) Ikeda, K., Nakayashiki, H., Takagi, M., Tosa, Y., Mayama, S. : *Mol. Genet. Genomics.*, **266**, 318-325 (2001)
- 15) Chalvet, F., Grimaldi, C., Kaper, F., Langin, T., Daboussi, M. J. : *Mol. Biol. Evol.*, **20**, 1362 - 1375 (2003)
- 16) Kinghorn, J.R. : "Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation" pp. 69-87. *Oxford Science Publications*, (1989)
- 17) Daboussi, M. J., Langin, T., Brygoo, Y. : *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 12-16 (1992)
- 18) 小笠原博信、小畑浩、秦洋二、高橋砂織、五味勝也 : 農化大会要旨、p60 (2005)
- 19) Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robnett, C. J., and Wicklow, D. T. : *Mycologia*, **78**, 955-959 (1986)
- 20) 小笠原博信、佐藤勉、今野宏、五味勝也 : 生物学大会要旨、p15 (2009)
- 21) 小笠原博信、渡辺隆幸、佐藤勉、今野宏、五味勝也 : 醸造学会学大会要旨、p3 (2011)
- 22) 小笠原博信、小畑浩、秦洋二、高橋砂織、五味勝也 : 農化大会要旨、p190 (2007)
- 23) Carr, P. D., Tuckwell, D., Hey, P. M., Simon, L., d'Enfert, C., Birch, M., Oliver, J. D., Bromley, M. J. : *Eukaryotic Cell*, **9**, 438-448 (2010)
- 24) Hihlal, E., Braumann, I., van den Berg, M., Kempken, F. : *Appl. Envir. Microbiol.*, **77**, 2332-2336 (2011)

#### 4. 特許の概要

- 1) 発明の名称：エタノールの製造方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59
- 2) 発明の名称： $\gamma$ -アミノ酪酸富化米と富化玄米粉及び  
それらの製造方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59
- 3) 発明の名称：イネ変異体、澱粉の製造方法、澱粉、及び  
イネ変異体の製造方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 60
- 4) 発明の名称：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ  
及びその生産菌・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 60
- 5) 発明の名称：癌転移抑制用トリテルペン誘導体及び該トリテルペンを用いた  
癌転移抑制用組成物・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
- 6) 発明の名称：架橋ネットワーク構造が形成された食品と  
その製造方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61





## 1) 発明の名称：エタノールの製造方法

発明者：進藤昌

公開番号：特開 2011-87478

公開日：平成 23 年 5 月 6 日

### 【要約】

#### [課題]

バイオマスに由来する 6 炭糖及び 5 炭糖を含有する糖化液を酵母により発酵させてエタノールを製造するに際し、エタノールの収率を十分に向上させることが可能な方法の提供。

#### [解決手段]

タンパク質の含有量がバイオマスの乾燥質量を基準として 1.5～12 質量%であり且つセルロースを含有するバイオマスを、アンモニアにより処理し、得られる改質バイオマスについて加水分解処理を行い、6 炭糖類及び 5 炭糖類を含有する糖化液を得る。該糖化液について、6 炭糖類をエタノールに変換可能な酵母を用いてエタノール発酵を行い、1 次発酵液を 60℃未満の温度に保持した状態で、エタノール濃度が 4% (w/v) 以下となるように、1 次発酵液中のエタノールを除去する。エタノール除去後の 1 次発酵液について、5 炭糖類をエタノールに変換可能な酵母を用いてエタノール発酵を行うことにより、2 次発酵液を得る。

## 2) 発明の名称： $\gamma$ -アミノ酪酸富化米と富化玄米粉及びそれらの製造方法

発明者：大能俊久、塚本研一

公開番号：特開 2011-160747

公開日：2011 年 8 月 25 日

### 【要約】

#### [課題]

本発明は、加水工程(水浸漬や加湿風による加水)や乾燥工程を必要とすることなく、極めて簡便な操作のみで、玄米中の $\gamma$ -アミノ酪酸含量を顕著に増加させる方法を提供することを技術的課題とする。

#### [解決手段]

酸素透過度 10000ml/m<sup>2</sup>/24hrs/atm (25℃, 100%RH) 以下の材質からなる密閉可能な容器中において、水分含量 10～17%の玄米 (もしくは玄米粉) を、40～150℃の温度で加熱保存することを特徴とする、 $\gamma$ -アミノ酪酸を増加させた玄米の製造方法、; 前記製造方法によって製造された $\gamma$ -アミノ酪酸含量を増加させた玄米 (もしくは玄米粉)、; を提供する。

### 3) 発明の名称：イネ変異体、澱粉の製造方法、澱粉、及びイネ変異体の製造方法

発明者：藤田直子、浅井裕貴、中村保典（以上、秋田県立大）、高橋徹

公開番号：特開 2012-19742（特願 2010-160660）

公開日：2012 年 2 月 2 日

#### 【要約】

イネスターチシンターゼ IIIa 型 (SSIIIa) 及びイネ枝作り酵素 IIb 型 (BEIIb) の遺伝子座が劣性ホモであり、遺伝的に固定されていることを特徴とするイネ変異体が生産する澱粉は、アミロースの割合が 40%以上であり、アミロペクチンが B 形結晶を示す。また、本澱粉の糊化粘度パターンは低粘度で老化性が高い。

### 4) 発明の名称：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ及びその生産菌

発明者：高橋砂織、小笠原博信、畠恵司、樋渡一之、堀一之

特許番号：特許第 4775997 号

登録日：平成 23 年 7 月 8 日

#### 【要約】

##### [課題]

ペプチド鎖内の D-アスパラギン酸を認識してその C 末端側を特異的に切断する新規な微生物由来酵素を提供する。また、そのような酵素を生産し得る微生物を提供する。

##### [解決方法]

目的とする酵素の活性を測定するために、新規基質サクシニル-D-アスパラギン酸 *p*-ニトロアニリド (Suc-D-Asp-pNA) を考案した。これを用いて土壌由来菌類をスクリーニングし目的とする酵素生産菌の分離に成功した。すなわち、本発明により D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼを生産する微生物が提供される。該微生物は、16srRNA 遺伝子の塩基配列から、*Paenibacillus* sp. B38 株と同定された。また、該酵素は、*Paenibacillus* sp. B38 株由来であることよりパエニダーゼ (Paenidase) と命名された。

**5) 発明の名称：癌転移抑制用トリテルペン誘導体及び該トリテルペン誘導体を用いた癌転移抑制用組成物**

発明者：畠恵司、堀一之、高橋砂織、坂本賢二 ((株)坂本バイオ)、  
向山俊之 ((株)坂本バイオ)、辻村範行 ((株)坂本バイオ)

特許番号：特許第 4810642 号

登録日：平成 23 年 9 月 2 日

**【要約】**

本特許は、植物トリテルペン誘導体であるルパン型トリテルペンが、悪性黒色腫、神経芽腫などの神経冠細胞から派生する腫瘍細胞のアクチンフィラメント脱重合を促進することで、これら細胞の運動性を抑制に、最終的には癌転移を抑制する事実に基づくものである。したがって、これら特長を応用することで、癌転移抑制薬剤ならびに組成物を提供が可能となった。

**6) 発明の名称：架橋ネットワーク構造が形成された食品とその製造方法**

発明者：木村貴一、高橋慶太郎、工藤道男

特許番号：特許第 4868418 号

取得日：平成 23 年 11 月 25 日

**【要約】**

本特許は、グルテンを全く使用せずに米粉パンや米粉麺を製造する技術です。本特許製法で作った米粉麺は、長時間の煮込みにも煮崩れや麺伸びしない特性を有します。また、米粉に限定されず、あらゆる粉体をパンや麺など自由な形状に成形し加工することができます。グルテンとは小麦に含まれるタンパク質成分で、パンや麺の骨格となる非常に重要な成分です。従来は、米粉のようにグルテンを含まない粉末を成形し、パンや麺を作ることは非常に困難でした。

本特許はグルテンの作用を見直し、デンプンから構成されるグルテン様素材を開発することで、上記の問題を解決しました。グルテン様素材と穀物粉体を練り上げることで、米粉に限定せずにパンや麺を作ることができます。

本特許を利用すると、グルテン無添加で米粉パンや煮溶けしにくい米粉麺の製造が可能で、グルテンをはじめとする小麦成分を一切含まないため、コムギ（グルテン）アレルギーの方のための食品を開発することが可能です。

また、除タンパク質処理を施した米粉を使用し、米粒形状に成形することで、タンパク質の摂取が制限されている腎臓疾患の方にも安心して食して戴ける米様食品の開発が可能です。



## 5. 学会発表要旨 (30 件)

### 1) 発表学会：第 65 回日本栄養・食糧学会

発表日と場所：2011 年 5 月 15 日、お茶の水女子大学（東京都）

演題名：新規脂質異常症改善作用探索系を用いたジュンサイ(*Brasenia schreberi*)の機能性評価

発表者：○高橋純一郎、木内高信 ((株)スカイライト・バイオテック)、浜田健太郎 ((株)ハーベステック)、畠恵司 (秋田県総合食品研究センター)

### 2) 発表学会：第 18 回秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2011 年 5 月 27 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. B38 由来セロビオース 2-エピメラーゼのクローニングと大腸菌における発現

発表者：○葦澤悟 (独法 国際農林水産業研究センター)  
高橋砂織 (秋田県総合食品研究センター)

### 3) 発表学会：第 14 回日本光脳機能イメージング研究会

発表日と場所：2011 年 7 月 23 日、星陵会館（東京都）

演題名：NIRS による脳血流変化量に基づく食品の嗜好性判断

発表者：○熊谷昌則 (秋田県総合食品研究センター)

### 4) 発表学会：第 77 回日本生化学会東北支部例会

発表日と発表場所：2011 年 7 月 23 日（仙台市）

演題名：表面プラズモン共鳴によるサポニンおよび脂肪酸のレニン活性阻害－結合相関解析

発表者：○後藤 猛<sup>1</sup>、鎌田淑恵<sup>2</sup>、小野洋輝<sup>2</sup>、菊地賢一<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>秋田大院・工学資源, <sup>2</sup>秋田大・工学資源, <sup>3</sup>秋田県総食セ)

### 5) 発表学会：2011 年度日本土壌肥料学会大会

発表日と場所：2011 年 8 月 7 日、エポカルつくば（つくば市）

演題名：カドミウム含有長香穀バイオマスの有効利用  
(第一報) 糖化過程でのカドミウムの除去

発表者：○服部浩之<sup>1</sup>、高野いずみ<sup>1</sup>、頼 泰樹<sup>1</sup>、進藤 昌、戸松さやか  
(秋田総食研、<sup>1</sup>秋田県立大学)

**6) 発表学会：平成 23 年度化学工学会札幌大会**

発表日と場所：2011 年 8 月 25 日、北海道大学（札幌市）

演題名：サポニンおよび不飽和脂肪酸のレニン阻害活性と表面プラズモン共鳴による結合相関解析

発表者：(秋田大院工資) ○後藤 猛・(秋田大工資)鎌田淑恵・(秋田大院工資) 菊地賢一、(秋田県総食研セ) 堀 一之・(秋田県総食研セ) 高橋砂織

**7) 発表学会：第 26 回キチン・キトサンシンポジウム**

発表日と場所：2011 年 8 月 30 日、奈良国際会議場（奈良市）

演題名：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. B38 由来セロビオース 2-エピメラーゼのクローニングと大腸菌における発現

発表者：○葦澤 悟（独法 国際農林水産業研究セ）・高橋砂織（秋田県総食研セ）

**8) 発表学会：2011 日本感性工学会年次大会**

発表日と場所：2011 年 9 月 5 日 工学院大学（東京都）

演題名：経験価値設計による地域特産物ブランド価値の構築

発表者：○高畠 聡（秋田県総合食品研究センター）

**9) 発表学会：日本食品科学工学会第 58 回大会**

発表日と場所：2011 年 9 月 10 日、東北大学（仙台市）

演題名：玄米の加熱処理による  $\gamma$ -アミノ酪酸の富化

発表者：○大能俊久、保苺美佳、塚本研一（秋田県総合食品研）

**10) 発表学会：日本食品科学工学会第 58 回大会**

発表日と発表場所：2011 年 9 月 10 日、東北大学（仙台市）

演題名：二重変異体米澱粉の構造および物理化学特性

発表者：○高橋徹、保苺美佳（秋田県総合食品研究センター）

浅井裕貴、豊澤佳子、中村保典、藤田直子（秋田県立大学）

**11) 発表学会：16<sup>th</sup> International Conference on Biopolymer and Purification**

発表日：2011年9月18日、Puerto Vallarta (Mexico)

演題名：Correlation between human renin-inhibitory activity and SPR response of saponins and unsaturated fatty acids

発表者：○Gotoh, T.<sup>a</sup>, Kamada, T.<sup>a</sup>, Kikuchi, K.-I.<sup>a</sup>, Hori, K.<sup>b</sup>, and Takahashi, S.<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Applied Chemistry, Akita University, 1-1 Tegata Gakuen-Cho, Akita 010-8502, Japan

<sup>b</sup>Akita Research Institute of Food and Brewing, 4-26 Sanuki Arayamachi, Akita

**12) 発表学会：第 84 回日本生化学会大会**

発表日と場所：2011 年 9 月 23 日、京都国際会議場（京都市）

演題名：遊離不飽和脂肪酸はレニン活性を阻害する

Free unsaturated fatty acids inhibit renin activity *in vitro*.

発表者：○高橋砂織<sup>1</sup>、常盤野哲生<sup>2</sup>、畠 恵司<sup>1</sup>、樋渡一之<sup>1</sup>、吉澤結子<sup>2</sup>、  
後藤 猛<sup>3</sup>（<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>秋田県立大学・生物資源、<sup>3</sup>秋田大学・  
工学資源）

**13) 発表学会：日本応用糖質科学会平成 23 年度大会（第 60 回）**

発表日と場所：2011 年 9 月 28 日、北海道大学（札幌市）

演題名：イネスターチシンターゼ（SS）と枝作り酵素（BE）間の二重変異体  
米澱粉の物理化学特性

発表者：○高橋徹、保莉美佳（秋田県総合食品研究センター）  
矢後ひかり、中村保典、藤田直子（秋田県立大学）

**14) 発表学会：第 63 回日本生物工学会大会**

発表日と場所：2011 年 9 月 28 日、東京農工大学（東京都）

演題名：麴菌(*Aspergillus oryzae*)分生子におけるストレス応答によるトランスポゾン  
遺伝子転写産物の動的変動

発表者：○小笠原博信<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>1</sup>、五味勝也<sup>2</sup>  
（<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>東北大院農・生物産業創成）

**15) 発表学会：平成 23 年度日本醸造学会大会**

発表日と場所：2011 年 10 月 4 日、北とぴあ（東京都）

演題名：内在性トランスポゾンによる麴菌変異株の味噌醸造適性

発表者：○小笠原博信<sup>1</sup>、渡辺隆幸<sup>1</sup>、佐藤勉<sup>2</sup>、今野宏<sup>2</sup>、五味勝也<sup>3</sup>  
（<sup>1</sup>秋田県総合食品研究センター、<sup>2</sup>（株）秋田今野商店、  
<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成）

**16) 発表学会：平成 23 年度日本醸造学会大会**

発表日と場所：2011 年 10 月 5 日、北とぴあ（東京都北区）

演題名：収穫年の異なる「秋田酒こまち」白米のデンプン特性の解析

発表者：○佐藤智美、高橋仁、高橋徹、田口隆信（秋田総食研）、  
中村保典（秋田県大）

**17) 発表学会：日本食品科学工学会平成 23 年度東北支部大会**

発表日と場所：2011 年 11 月 12 日、秋田カレッジプラザ（秋田市）

演題名：澱粉の尿素溶解特性を指標としたモチ硬化性ランクの推定

発表者：○小玉郁子<sup>1,3</sup>、柴田知佳<sup>2</sup>、藤田直子<sup>3</sup>、石川匡子<sup>3</sup>、高橋徹<sup>4</sup>、川本朋彦<sup>1</sup>、  
加藤和直<sup>1</sup>、佐藤健介<sup>1</sup>、松波摩耶<sup>5</sup>、中村保典<sup>3</sup>、秋山美展<sup>3</sup>（<sup>1</sup>秋田農林  
水産技セ農試、<sup>2</sup>木村食品工業(株)、<sup>3</sup>秋田県立大学、<sup>4</sup>秋田県総食研セ、<sup>5</sup>東  
北大学)

**18) 発表学会：第 34 回日本分子生物学会年会 BMBJ2011**

発表日と場所：2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜

演題名：癌細胞選択的毒性を有するタラノメ由来 aralin の膜受容体の解析

Analysis of membrane receptor of aralin, a cancer-selective cytotoxic protein  
from *Aralia elata*

発表者：○大塚寛子<sup>1</sup>、秋山弘匡<sup>1</sup>、後藤良隆<sup>1</sup>、戸松 誠<sup>2</sup>、米納 孝<sup>1</sup>、飯田直幸<sup>3</sup>、  
服部成介<sup>3</sup>、川崎 靖<sup>4</sup>、田代文夫<sup>1</sup>（<sup>1</sup>東理大・基礎工、<sup>2</sup>秋田総食研、<sup>3</sup>北  
里大・薬、<sup>4</sup>岩手医大・薬)

**19) 発表学会：日本エネルギー学会 第 7 回バイオマス科学会議**

発表日と場所：2012 年 1 月 18 日、岩手県情報交流センター（盛岡市）

演題名：カドミウム(Cd)高含有バイオマスからのバイオエタノール生産と Cd の除去

発表者：○進藤 昌、戸松さやか、増田祥子、服部浩之<sup>1</sup>、頼 泰樹<sup>1</sup>（秋田総食研、  
<sup>1</sup>秋田県立大学）

**20) 発表学会：日本エネルギー学会 第 7 回バイオマス科学会議**

発表日と場所：2012 年 1 月 18 日、岩手県情報交流センター（盛岡市）

演題名：バイオマス糖化液および模擬糖化液におけるアルコール発酵阻害機構の  
解明と比較

発表者：○西田孝伸、進藤 昌、戸松さやか、佐々木美希子、上村毅<sup>1</sup>  
（秋田総食研、<sup>1</sup>J X 日鉱日石エネルギー(株)）

**21) 発表学会：日本エネルギー学会 第 7 回バイオマス科学会議**

発表日と場所：2012 年 1 月 18 日、岩手県情報交流センター（盛岡市）

演題名：乾式粉碎した杉材の酵素糖変換・エタノール変換の研究

発表者：○梅沢俊策<sup>1</sup>、高橋武彦<sup>1</sup>、伊藤一志<sup>1</sup>、小林淳一<sup>1</sup>、伊藤新<sup>1</sup>、進藤 昌  
（秋田総食研、<sup>1</sup>秋田県立大学）

**22) 発表学会：平成 23 年度 第 11 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会**



発表日と場所：2012年1月31日、産総研つくばセンター（つくば市）  
演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ  
発表者：○高橋砂織（秋田県総食研セ）・葺澤悟（独法・国際農林水産業研究セ）

**23) 発表学会：平成 23 年度 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会**

発表日と場所：2012年2月1日、産総研 つくばセンター（つくば市）  
演題名：食物由来レニン阻害物質  
発表者：○高橋砂織（秋田県総合食品研究センター）

**24) 発表学会：第 46 回秋田化学技術協会研究技術発表会**

発表日と場所：2012年3月1日、秋田大学（秋田市）  
演題名：硬化性を指標とした餅生地 の物性評価系の構築  
発表者：○佐々木玲、高橋徹、熊谷昌則（秋田県総合食品研究センター）

**25) 発表学会：2012 年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2012年3月23日、京都女子大学（京都市）  
演題名：*Bacillus* sp. Y18 アミノペプチダーゼによる脱苦味処理は ACE 及び  
レニン阻害活性を保持する  
発表者：○葺澤 悟、程 永強<sup>1</sup>、李 里特<sup>1</sup>、後藤 猛<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>3</sup>（国際農研、  
<sup>1</sup>中国農大・食品科学、<sup>2</sup>秋田大学・工学資源、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

**26) 発表学会：2012 年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2012年3月25日、京都女子大学（京都市）  
演題名：ウド(*Aralia cordata*) 由来レニン阻害物質の精製と同定  
発表者：○高橋砂織<sup>1</sup>、常盤野哲生<sup>2</sup>、畠恵司<sup>1</sup>、佐藤（保刈）美佳<sup>1</sup>、吉澤結子<sup>2</sup>、  
後藤 猛<sup>3</sup>（<sup>1</sup>秋田県総合食品研究センター、<sup>2</sup>秋田県立大学・生物資源、  
<sup>3</sup>秋田大学大学院・工学資源）

**27) 発表学会：農芸化学会 2012 年度大会**

発表日と場所：2012年3月25日、京都女子大学（京都市）  
演題名：レニン阻害活性を強化した味噌の開発  
発表者：○渡辺隆幸、佐々木康子、高橋砂織（秋田県総合食品研究センター）

**28) 発表学会：2012 年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2012年3月25日、京都女子大学（京都市）  
演題名：アンギオテンシン I 変換酵素およびカルボキシペプチダーゼ Y の  
新規蛍光消光基質の開発

発表者：高橋砂織，小野洋輝<sup>1</sup>，○後藤 猛<sup>1</sup>，熊谷（吉澤）久美子<sup>2</sup>，  
杉山俊博<sup>3</sup>（秋田県総食研セ，<sup>1</sup>秋田大院・工資，<sup>2</sup>（株）ペプチド研，  
<sup>3</sup>秋田大院・医）

**29) 発表学会：2012年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2012年3月25日、京都女子大学（京都市）

演題名：タイの発酵魚食品プラーラー中のレニン阻害活性物質

発表者：○中原 和彦、菰澤 悟、野田澤 茜、ゲシニー トラクーンティワコン<sup>1</sup>、  
プルンチャイ タンカナクン<sup>1</sup>、後藤 猛<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>3</sup>（国際農研、  
<sup>1</sup>カセサート大学、<sup>2</sup>秋田大学・工学資源、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

**30) 発表学会：The 9<sup>th</sup> International *Aspergillus* Meeting and 11<sup>th</sup> European  
Conference on Fungal Genetics**

発表日と場所：2012年3月29,31日 フィリップス大学（マールブルク、ドイツ）

演題名：Post-transcriptional suppression against potential transposable elements by cryptic  
splicing and premature polyadenylation in *Aspergillus oryzae*

発表者：○Hironobu Ogasawara<sup>1</sup>, Saori Takahashi<sup>1</sup>, and Katsuya Gomi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Akita Res. Inst. Food and Brewing, Akita, Japan. <sup>2</sup> Graduate School of  
Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Japan.

## 1) 発表学会：第 65 回日本栄養・食糧学会

発表日と場所：2011 年 5 月 15 日、お茶の水女子大学（東京都）

演題名：新規脂質異常症改善作用探索系を用いたジュンサイ(*Brasenia schreberi*)の機能性評価

発表者：○高橋純一郎、木内高信（株）スカイライト・バイオテック）、浜田健太郎（株）ハーベステック）、  
島恵司（秋田県総合食品研究センター）

脂質異常症改善薬用の研究開発には、主に動物試験が用いられているが、費用や時間の短縮・効率化のための *in vitro* 評価系が注目を集めている。今回我々は、独自のリポタンパク質解析法 (LipoSEARCH®) を用い、肝臓由来細胞の培養上清に分泌される中性脂肪・コレステロール量に対する影響を詳細に分析することで、脂質異常症改善作用評価系の開発を行った。さらに、新規 *in vitro* 測定系で、秋田県産食材を数種類評価し、顕著な活性が認められた試料については *in vivo* 評価との相関を調べた。

試験に用いた食材中、ジュンサイのエタノールエキスにヒト肝臓細胞 (HepG2) からの中性脂肪・コレステロール分泌抑制能が認められた。また、ジュンサイエキスには、HepG2 細胞の中性脂肪・コレステロール合成に関わる遺伝子群の発現を抑制能が確認された。そこで、高脂肪食負荷マウスに、同時にジュンサイエキスを給与する動物試験を実施した結果、内臓脂肪蓄積の抑制ならびに血中脂質の正常化が観察された。これらの結果は、ジュンサイは脂質異常症の改善が期待できる食材であるとともに、本研究で開発した *in vitro* 脂質異常症改善作用評価系は、動物試験代替法としての可能性を示唆するものであった。

## 2) 発表学会：第 18 回秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2011 年 5 月 27 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. B38 由来セロビオース  
2-エピメラゼのクローニングと大腸菌における発現

発表者：○葺澤悟（独法 国際農林水産業研究センター）

高橋砂織（秋田県総合食品研究センター）

【目的】次世代シーケンサーにより解析した *Paenibacillus* sp. B38<sup>1)</sup> ゲノム塩基配列から、ヒトレニン結合タンパク質 (N-アセチルグルコサミン 2-エピメラゼ)<sup>2)</sup> と相同性のある酵素を *in silico* スクリーニングし、これをクローニングするとともに大腸菌で発現させ、得られた組換え酵素の性質を解析したので報告する。

【方法】ゲノム塩基配列、酵素アミノ酸配列の相同性検索には BLAST を用いた。酵素遺伝子の取得は *Paenibacillus* sp. B38 より精製したゲノムを鋳型とした PCR 法により行った。大腸菌における酵素生産は pET28a を用いた。酵素活性は、GlcNAc、Lactose 及び Cellobiose を基質に用い、DIONEX-HPLC で分析した。分子会合の解析には Superdex 200 (10/30) カラムを用いた。

【結果と考察】*Paenibacillus* sp. B38 ゲノム塩基配列より、ヒトレニン結合タンパク質 (GenBank Acc. No. D01085<sup>3)</sup>) とアミノ酸配列の相同性をもつ配列を検索したところ、約 20% の相同性をもつ ORF を得た。この ORF より推定されるアミノ酸配列は、種々の微生物ゲノムから推定されるアミノ酸配列と約 40-60% の相同性があった。つぎに、大腸菌により本酵素を生産し、その基質特異性を調べたところ、lactose 及

び cellobiose はエピメリ化した。GlcNAc はエピメリ化しなかった。このことから、本酵素はセロビオース 2-エピメラーゼであることが示唆された。既知のセロビオース 2-エピメラーゼと 37-44% のアミノ酸配列の相同性があった。また、ゲルろ過の解析により、活性型酵素は SH 基還元状態で二量体を形成しており、酸化状態では単量体で不活性であることが明らかになった。また、SH 基修飾剤である N-ethylmaleimide 及び iodoacetic acid により活性が阻害されることから、遊離 SH 基が活性発現に必須であることが推定された。本酵素においても、ほ乳類エピメラーゼにおいて活性発現に必須な 380 番目のシステイン残基<sup>4)</sup>が保存されており、このことは酵素の構造機能相関を考察する上で大変興味深い。

#### 【参考文献】

1. Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202 (2006)
2. Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **125**, 348-353 (1999)
3. Inoue, H., Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **110**, 493-500 (1991)
4. Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **126**, 639-642 (1999)

#### 3) 発表学会：第 14 回日本脳機能イメージング研究会

発表日と場所：2011 年 7 月 23 日、星陵会館（東京都）

演題名：NIRS による脳血流変化量に基づく食品の嗜好性判断

発表者：○熊谷昌則（秋田県総合食品研究センター）

近年、脳科学の手法を取り入れたニューロ・マーケティング（神経マーケティングまたは心脳マーケティング）に関心が持たれている。マーケティングに脳機能計測の手法を取り入れることによって、消費者心理や行動スタイルの解明につながり、消費者の本音や無意識下の反応が引き出せるのではないかと期待されている。本研究の目的は、食品の外観評価時における被験者の嗜好や感性情報を非明示的に、脳血流変化を指標として脳から直接、読み取れないかどうかを検証することである。インフォームドコンセントの手続きがとられた健常な右利きの 20~40 代の女性に対して、光トポグラフィー ETG-4000（日立メディコ）を用いて、嗜好選択された食品画像を見ているときのタスク中と、そうではない画像を見ているときのタスク中の脳血流量の変化を比較した。その結果、食品画像刺激に対する外観評価時に嗜好選択の違いが前頭前野両側部の脳血流量に何らかの影響を及ぼしていることが示唆されたが、それは異なる被験者間で普遍的な応答とはいえなかった。しかしながら、同一の被験者内で構築された判別モデルを使えば、その被験者個人の嗜好や感性情報を非明示的に抽出できる可能性がある。ただし、さらなる精度向上が必要であり、実験方法やデータ解析法の改善が求められる。本研究の一部は科研費（22500751）の助成を受けて実施された。

#### 4) 発表学会：第 77 回日本生化学会東北支部例会

発表日と発表場所：2011 年 7 月 23 日（仙台市）

演題名：表面プラズモン共鳴によるサポニンおよび脂肪酸のレニン活性阻害—結合相関解析

発表者：○後藤 猛<sup>1</sup>，鎌田淑恵<sup>2</sup>，小野洋輝<sup>2</sup>，菊地賢一<sup>1</sup>，高橋砂織<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>秋田大院・工学資源，<sup>2</sup>秋田大・工学資源，<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

## 【緒言】

レニンとは血圧上昇を誘起するレニン-アンギオテンシン系の活性起点として重要である。高血圧治療薬の開発を目的としてレニン阻害物質の探索が行われ、豆類や穀類の抽出物からサポニンや脂肪酸がレニン阻害物質として同定された。その中で Soyasaponin I については血圧降下作用も確かめられている。さらなるレニン阻害物質の発見が期待されるが、レニン活性阻害試験には蛍光基質を利用するため、試料中の蛍光性不純物が広範かつ正確なスクリーニングの障害となっていた。そこで本研究では、表面プラズモン共鳴(SPR)によるレニン阻害物質探索の可能性を探るため、サポニンおよび脂肪酸のレニン阻害と結合との相関を調べた。

## 【実験方法】

ヒトプレプロレニン cDNA 導入組換えバキュロウイルスを Sf-9 昆虫細胞に感染させてヒトレニンを高発現させ、これを Pepstatin-aminohexyl Sepharose と MonoQ HR5/5 により単一に精製した。SPR 分析には Biacore 2000 を使用し、アミンカップリング法によりレニンをセンサーチップに固定化させた。DMSO 含有 HBS 緩衝液に溶解したサポニンおよび脂肪酸を通液し、SPR 応答を比較した。

## 【結果と考察】

センサーチップへのレニン固定化に及ぼす pH の影響を調べ、レニンの等電点以下の pH 4.0 で高い固定化量が得られた。そこで、このレニン固定化チップを用い、種々のサポニンおよび脂肪酸の SPR を調べた。その結果、レニン阻害活性を有するサポニン (Soyasaponin I & II, Chikusetsusaponin IV, Glycyrrhizin, MGGA) および脂肪酸 (cis-Vaccenic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Arachidonic acid, EPA, DHA) は全て大きな SPR 応答を示した。これに対し、レニン阻害活性の無いサポニン (Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Saikosaponin c, Glycyrrhetic acid) と脂肪酸 (Palmitic acid, Stearic acid) は、ほとんど SPR 応答を示さなかった。これより、SPR はレニン阻害物質探索の一次スクリーニングに利用できることが分かった。一方、レニン阻害活性が無い Saikosaponin b<sub>2</sub> も例外的に SPR 応答を示し、レニンに対する異なる結合性が示唆された。さらに、各サポニンの SPR に対する濃度依存性を調べ、結合定数 ( $K_A$ ) を求めた。

## 5) 発表学会：2011 年度日本土壌肥料学会大会

発表日と場所：2011 年 8 月 7 日、エポカルつくば (つくば市)

演題名：カドミウム含有長香穀バイオマスの有効利用

(第一報) 糖化過程でのカドミウムの除去

発表者：○服部浩之<sup>1</sup>、高野いずみ<sup>1</sup>、頼 泰樹<sup>1</sup>、進藤 昌、戸松さやか (秋田総食研、<sup>1</sup>秋田県立大学)

カドミウム (Cd) 汚染土壌の修復にファイトレメディエーションが実用化されつつある。この方法では、Cd を含んだ多量のバイオマスが生産されるが、その処分法は今のところ焼却以外にない。本研究は、この Cd を含むバイオマス資源を有効利用するため、バイオエタノールを生産し、その残渣を Cd 除去後堆肥として利用する方法の確立を目的として実施している。ここでは、Cd を含んだイネ (長香穀) 中のセルロース、ヘミセルロースをグルコース、キシロースに糖化する過程での Cd の除去について検討した結果を報告する。

## 6) 発表学会：平成23年度化学工学会札幌大会

発表日と場所：2011年8月25日、北海道大学（札幌市）

演題名：サポニンおよび不飽和脂肪酸のレニン阻害活性と表面プラズモン共鳴による結合相関解析

発表者：(秋田大院工資) ○後藤 猛・(秋田大工資)鎌田淑恵・(秋田大院工資)(正)菊地賢一

(秋田県総食研セ)堀 一之・(秋田県総食研セ)高橋砂織

### 1. 緒言

血圧と血液量の制御に重要なレニン・アンギオテンシン系 (RAS)においてレニンは中心的な役割を果たすアスパルティックプロテアーゼであり、レニンの阻害物質には高血圧抑制効果が期待できる。これまで我々は昆虫細胞バキュロウイルス発現系により活性型ヒトレニンの大量生産と簡便な精製に成功し、1) さらに、自己消光蛍光基質を用いたスクリーニングにより大豆の抽出物からレニン阻害物質として Soyasaponin I を同定した。2) 一方、RAS に作用して血圧上昇の抑制が期待できる物質として n-3 ポリ不飽和脂肪酸の報告がある。本研究では、種々のサポニンや脂肪酸についてヒトレニン阻害活性を調べ、さらに表面プラズモン共鳴 (SPR)分析により、種々サポニンおよび脂肪酸のレニン結合と阻害との相関を明らかにする。

### 2. 実験方法

2.1 レニンの生産と精製 ヒトプレプロレニン cDNA を導入した組換えバキュロウイルスを Sf-9 昆虫細胞に感染させ、発現したヒトレニンを Pepstatin-aminohexyl Sepharose と MonoQ HR5/5 のカラムクロマトグラフィーにより単一に精製した。

#### 2.2 レニン活性測定 自己消光蛍光基質

Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\*Val-Ile-Thr-Lys(Dnp)-D-Agr-D-Arg-NH<sub>2</sub> (\*:レニンによる切断部位)を用いた。レニン反応溶液を 37°C で 30 min インキュベートし、遊離した蛍光性ペプチドを励起波長 340 nm, 測定波長 440 nm で測定した。

#### 2.3 SPR 分析 SPR 分析には

Biacore 2000 を使用した。N<sup>ε</sup>-ethylcarbodiimide で活性化したセンサーチップ金薄膜上にレニンを固定化し、サポニンおよび脂肪酸を所定濃度で溶解した。DMSO-HBS (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Tween 20)を 20 μl/min で通液して固定化レニンと反応させた。なお、固定化レニンの洗浄・再生には 10 mM Glycine-HCl (pH3.0)を用いた。

### 3. 結果と考察

所定濃度のサポニンまたは脂肪酸の存在下でヒトレニンをアッセイし、ヒトレニンの相対活性を調べた。その結果、サポニン類の中では、Soyasaponin I の他に Soyasaponin II, Chikusetsusaponin IV, Glycyrrhizin, Monoglucuronyl glycyrrhetic acid (MGGA)に 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) 30-75 μM のレニン阻害活性が認められたが、Soyasapogenol B, Ginsenoside Rb1, Saikosaponin c, Glycyrrhetic acid, Saikosaponin b2 にはレニン阻害活性はほとんど無かった。

## 7) 発表学会：第26回キチン・キトサンシンポジウム

発表日と場所：2011年8月30日、奈良国際会議場（奈良市）

演題名：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. B38 由来

セロビオース 2-エピメラーゼのクローニングと大腸菌における発現

発表者：○葺澤 悟（独法 国際農林水産業研究セ）・高橋砂織（秋田県総食研セ）

【目的】次世代シーケンサーにより解析した *Paenibacillus* sp. B38<sup>1)</sup>ゲノム塩基配列から、ヒトレニン結合タンパク質（N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ）<sup>2)</sup>と相同性のある酵素を *in silico* スクリーニングし、これをクローニングするとともに大腸菌で発現させ、得られた組換え酵素の性質を解析したので報告する。

【方法】ゲノム塩基配列、酵素アミノ酸配列の相同性検索には BLAST を用いた。酵素遺伝子の取得は *Paenibacillus* sp. B38 より精製したゲノムを鋳型とした PCR 法により行った。大腸菌における酵素生産は pET28a を用いた。酵素活性は、GlcNAc、Lactose 及び Cellobiose を基質に用い、DIONEX-HPLC で分析した。分子会合の解析には Superdex 200 (10/30)カラムを用いた。

【結果と考察】*Paenibacillus* sp. B38 ゲノム塩基配列より、ヒトレニン結合タンパク質（GenBank Acc. No. D01085<sup>3)</sup>）とアミノ酸配列の相同性をもつ配列を検索したところ、約 20%の相同性をもつ ORF を得た。この ORF より推定されるアミノ酸配列は、種々の微生物ゲノムから推定されるアミノ酸配列と約 40-60%の相同性があった。つぎに、大腸菌により本酵素を生産し、その基質特異性を調べたところ、lactose 及び cellobiose はエピメリ化した但 GlcNAc はエピメリ化しなかった。このことから、本酵素はセロビオース 2-エピメラーゼであることが示唆された。既知のセロビオース 2-エピメラーゼと 37-44%のアミノ酸配列の相同性があった。また、ゲルろ過の解析により、活性型酵素は SH 基還元状態で二量体を形成しており、酸化状態では単量体で不活性であることが明らかになった。また、SH 基修飾剤である N-ethylmaleimide 及び iodoacetic acid により活性が阻害されることから、遊離 SH 基が活性発現に必須であることが推定された。本酵素においても、ほ乳類エピメラーゼにおいて活性発現に必須な 380 番目のシステイン残基<sup>4)</sup>が保存されており、このことは酵素の構造機能相関を考察する上で大変興味深い。

### 【参考文献】

1. Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202 (2006)
2. Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **125**, 348-353 (1999)
3. Inoue, H., Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **110**, 493-500 (1991)
4. Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **126**, 639-642 (1999)

## 8) 発表学会：2011日本感性工学会年次大会

発表日と場所：2011年9月5日 工学院大学（東京都）

演題名：経験価値設計による地域特産物ブランド価値の構築

発表者：○高島 聡（秋田県総合食品研究センター）

## 1. はじめに

秋田県産米の淡雪こまちについて、「節電」という観点から炊飯法等の検討を行い、「経験価値モジュール」を基本フレームワークとした「淡雪こまち」の米、米飯の経験価値について再検討し、新たなる淡雪こまち米のブランド価値の構築を行ったので、これについて報告する。

## 2. 経験価値モジュールを基本とした「経験価値設計」～経験価値創造によるブランド化～

コロンビア大学のバーンド・H・シュミットの経験価値モジュールを基本フレームワークとし、「SENCE」、「FEEL」、「THINK」、「ACT」、「RELATE」のモジュールごとにその経験価値について検討し、経験価値の改良、強化、調整等を行う。その結果を実際のものづくりにフィードバックし、ブランドづくりを行う手法を「経験価値設計」として試みた。

## 3. 異なった観点からの地域特産米ブランドの構築～新たなる「淡雪こまち」米ブランド価値の構築～

「節電」という観点から、電気炊飯器によらない淡雪こまちの炊飯法について検討し、従来とは異なった観点からの米穀としての「淡雪こまち」のブランド価値の構築を図るべく、経験価値設計の手法により検討した。

表1 異なった観点からの「淡雪こまち」米・米飯の経験価値

分類	「淡雪こまち」米・米飯の経験価値
SENCE	やわらかく、粘りがあり、モチモチした食感 冷めての硬くならない
FEEL	東北地域限定生産の米品種 「自然豊かな米どころ・東北」への励まし
THINK	電気炊飯器によらない炊飯ができることの蘊蓄 節電対策にもなる炊飯法を選択出来る米品種であることの社会的存在意義
ACT	節電等エネルギー問題対応の一助となる米品種、電気炊飯以外の炊飯法を選択する ライフスタイルの差別化の自意識
RELATE	震災等をきっかけに、米食文化を見直し、日本の食文化守り、さらに創造していく ことの喜び、使命感

## 4. まとめ

経験価値設計により地域特産ブランドの構築を試みた。経験価値モジュールをフレームワークとし、5つのモジュールに対し、製品アイテムにモジュール項目を付加することにより消費者等により共感の得られる商品ブランドへの構築が可能になると考えられた。

## 9) 発表学会：日本食品科学工学会第58回大会

発表日と場所：2011年9月10日、東北大学（仙台市）

演題名：玄米の加熱処理によるγ-アミノ酪酸の富化

発表者：○大能俊久、保莉美佳、塚本研一（秋田県総合食品研）

【目的】発芽玄米は、玄米を水に浸漬し発芽させた玄米であり、玄米に含まれるグルタミン酸脱炭酸酵



素の働きにより  $\gamma$ -アミノ酪酸が増加していることが大きな特徴である。しかし、水に浸漬するため、腐敗や臭いの発生などが問題とされる。玄米を水に浸漬することなく、そのまま加熱処理することで  $\gamma$ -アミノ酪酸を増加させられるならば、腐敗等の問題を解消できると考えられる。そこで、玄米を加熱処理することで  $\gamma$ -アミノ酪酸を増加させられるかについて検討した。

【方法】アルミパウチに秋田県産あきたこまち玄米を入れてシーラーで封をしたものを加熱処理に供した。加熱は恒温乾燥機または恒温水槽で行い、加熱温度は 40~100°C とした。 $\gamma$ -アミノ酪酸を含む遊離アミノ酸の定量は以下の方法で行った。玄米を粉碎後 10 倍量の 8% トリクロロ酢酸溶液を加えて 10°C 以下で 1 時間抽出を行った。抽出液を遠心して上清を採取し、等量の 0.04N 塩酸溶液で希釈し 0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過して日本電子製全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V で測定した。

【結果】水に浸漬することなく、加熱処理することで玄米中の  $\gamma$ -アミノ酪酸が増加し、最大で 3.5 倍以上となった。加熱温度が低いと  $\gamma$ -アミノ酪酸量が最大値になるまで時間がかかり、加熱温度が高いと早く最大量となった。 $\gamma$ -アミノ酪酸以外の遊離アミノ酸の挙動を調べたところ、グルタミン酸とアスパラギン酸は減少し、グリシン、アラニン、バリンなどは増加していた。

#### 10) 発表学会：日本食品科学工学会第 58 回大会

発表日と発表場所：2011 年 9 月 10 日、東北大学（仙台市）

演題名：二重変異体米澱粉の構造および物理化学特性

発表者：○高橋徹、保莉美佳（秋田県総合食品研究センター）

浅井裕貴、豊澤佳子、中村保典、藤田直子（秋田県立大学）

【緒言】イネ胚乳澱粉の生合成には複数の酵素が関与している。澱粉生合成関連酵素が欠損したイネ同士を交配させて二重変異体を作成することに成功し、得られた米澱粉の構造や物性評価を基に酵素、澱粉構造、物性の関係を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】すでに単離されている澱粉直鎖伸長酵素 (SS) の一つである *SS IIIa* 変異体 ( $\Delta$ SS IIIa) を片親にして、 $\Delta$ SS IVb または澱粉枝作り酵素 (BE) の変異体 ( $\Delta$ BE IIb) を交配したイネ二重変異体とそれらの親変異体系統および野生型 (日本晴) の精製米澱粉を分析に用いた。各澱粉の鎖長構造解析、形態観察、粒度分布測定、RVA による糊化特性を測定した。RVA 測定後の糊液の低温保持時のレオロジー特性を動的粘弾性測定装置によって測定した。

【結果と考察】 $\Delta$ SS IIIa と  $\Delta$ SS IVb の玄米重量は野生型とほぼ同じであったが、 $\Delta$ BE IIb と二重変異体 ( $\Delta$ SS IIIa/ $\Delta$ SS IVb および  $\Delta$ SS IIIa/ $\Delta$ BE IIb) は減少した。変異体のアミロース量は 30~46% と野生型よりも非常に高かった。RVA 測定から、典型的な日本型米の糊化特性曲線を示す日本晴に対して二重変異体米澱粉は粘度上昇温度が高く、加熱時ピーク粘度が非常に低いかピークを持たず、膨潤・糊化しにくい澱粉であると考えられた。変異体米澱粉糊液の貯蔵弾性率は、日本晴の約 10~100 倍まで増大した。この結果から、二重変異体米澱粉は野生型よりも老化が速いことが示唆され、特異的な鎖長構造に由来するためと考えられる。本研究はイノベーション創出基礎的研究推進事業 (生研センター) の援助にて実施された。

**11) 発表学会 : 16<sup>th</sup> International Conference on Biopolymer and Purification**

発表日 : 2011年9月18日、Puerto Vallarta (Mexico)

演題名 : Correlation between human renin-inhibitory activity and SPR response of saponins and unsaturated fatty acids

発表者 : O.Gotoh, T.<sup>af</sup>, Kamada, T.<sup>a</sup>, Kikuchi, K.-I.<sup>a</sup>, Hori, K.<sup>b</sup>, and Takahashi, S.<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Applied Chemistry, Akita University, 1-1 Tegata Gakuen-Cho, Akita 010-8502, Japan*

<sup>b</sup>*Akita Research Institute of Food and Brewing, 4-26 Sanuki Arayamachi, Akita 010-1623, Japan* †E-mail: [tgotoh@ac5.as.akita-u.ac.jp](mailto:tgotoh@ac5.as.akita-u.ac.jp)

Renin, a highly specific aspartic protease synthesized mainly in juxtaglomerular cells in the kidney, catalyzes the conversion of angiotensinogen to angiotensin I, a rate-determining step in the renin-angiotensin system, which controls blood pressure in mammals [1]. Angiotensin I is then converted by angiotensin converting enzyme to angiotensin II, which increases blood pressure by acting as a potent vasoconstrictor and by stimulating the secretion of aldosterone that causes kidney tubules to increase the reabsorption of sodium and water into the blood. Thus, renin is a major target to treat high blood pressure. We have reported that recombinant human-renin (rh-renin) was efficiently produced by the baculovirus expression vector system and purified by affinity column chromatography [2]. Using an internally quenched fluorescent (IQF) substrate, soyasaponin I was identified in soybeans as a renin-inhibitory compound [3]. In the present study, we assayed some other saponins for renin-inhibitory activity and determined IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration). As shown in Figure 1, soyasaponin II, chikusetsusaponin IV, glycyrrhizin, and monoglucuronyl glycyrrhetic acid (MGGA) were found to inhibit rh-renin with IC<sub>50</sub> values of 30-75  $\mu$ M. On the other hand, soyasapogenol B, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, saikosaponins b<sub>2</sub> and c, and glycyrrhetic acid did not affect renin activity. We further examined molecular interaction between these saponins and rh-renin using a surface plasmon resonance (SPR) optical biosensor. Purified rh-renin was immobilized on Au sensor chips. The SPR response was determined for saponins having renin-inhibitory activity, but not for ones having no renin-inhibitory activity, except for saikosaponin b<sub>2</sub>. Saikosaponin b<sub>2</sub> may bind at non-active sites of rh-renin. Since n-3 polyunsaturated fatty acids were reported to reduce the systolic blood pressure in a model of human renin hypertension rats [4], various kinds of fatty acids were also examined for IC<sub>50</sub> and SPR response in the same way. As a result, unsaturated fatty acids (*cis*-Vaccenic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid, EPA, and DHA) only were found to inhibit rh-renin. The SPR response was observed as well for these unsaturated fatty acids. These results indicate that the SPR analysis with immobilized rh-renin was applicable to screening of potential renin-inhibitory compounds from natural foodstuffs.

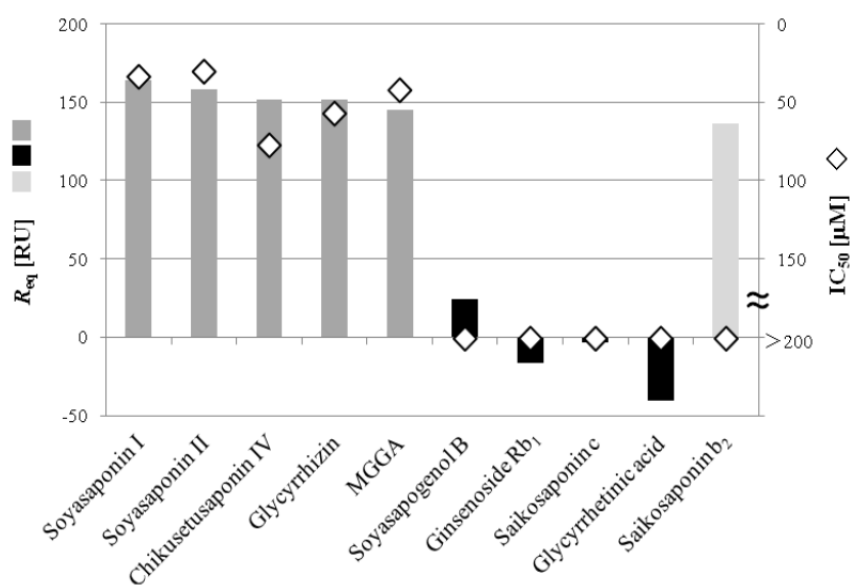


Figure 1. Correlation between renin inhibition and SPR response of saponins.

*Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236.

[4] Fisher, R., Dechend, R., Qadri, F., Markovic, M., Feldt, S., Herse, F., Park, J-K., Gapelyuk, A., Schwarz, I., Zacharzowsky, U.B., Plehm, R., Safak, E., Heuser, A., Schiedewan, A., Luft, F.C., Schunck, W-H., and Muller, D.H. (2008) *Hypertension*, **51**, 540-546.

[1] Persson, P.B. (2003)

*J. Physiol.*, **552**, 667-671.

[2] Takahashi, S., Hata, K., Kikuchi, K-I., and Gotoh, T. (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613.

[3] Takahashi, S., Hori, K., Shinbo, M., Hiwatashi, K., Gotoh, T., and Yamada, S. (2007) *Biosci.*

## 12) 発表学会：第84回日本生化学会大会

発表日と場所：2011年9月23日、京都国際会議場（京都市）

演題名：遊離不飽和脂肪酸はレニン活性を阻害する

Free unsaturated fatty acids inhibit renin activity *in vitro*.

発表者：○高橋砂織<sup>1</sup>、常盤野哲生<sup>2</sup>、畠 恵司<sup>1</sup>、樋渡一之<sup>1</sup>、吉澤結子<sup>2</sup>、後藤 猛<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>秋田県立大学・生物資源、<sup>3</sup>秋田大学・工学資源)

【目的】レニンは、レニン・アンギオテンシン系による血圧制御機構において律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、レニン・アンギオテンシン系制御を目指してアンギオテンシン変換酵素を標的とした食物由来阻害物質の探索研究が多数行われている。しかしながら、食物由来レニン阻害物質の研究に関しては、酵素入手や活性測定などの問題から殆ど研究が進んでいなかった。我々は、バキュロウイルス・昆虫細胞培養系を用いたヒトレニンの高発現系を構築するとともに、レニン特異的新規蛍光消光基質の開発を進め、これらを用いて各種素材よりレニン阻害物質を探索した [1,2]。その結果、大豆由来レニン阻害物質としてソヤサポニン I を同定した [3-5]。今回、米由来レニン阻害を同定するとともに、阻害物質の構造と機能相関について解析した。また、同定したレニン阻害物質を動物へ給餌し、血圧への影響を検討した。

【方法】組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・Sf-9 昆虫細胞培養系により発現し、ペプスタチンアフィニティーカラム等により単一に精製した [3, 4]。レニン活性の測定には、Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-

Leu\*Val-Ile-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub> (\*, 基質切断部位)を用いた。米由来レニン阻害物質は、米粉のメタノール抽出液より各種クロマトグラフィーにより精製し構造解析に供した。本態性高血圧自然発症ラット(SHR)にオレイン酸添加飼料を8週間給餌し、1週間ごとに摂食量、体重及び血圧を測定した。

【結果と考察】300gの米粉より約60mgのレニン阻害物質を精製して構造解析を行い、阻害物質をオレイン酸及びリノール酸と同定した。オレイン酸及びリノール酸は、レニン活性を拮抗的に阻害し、その*Ki*値は、それぞれ15.8及び19.8μMと求められた。一方、SHRへのオレイン酸給与実験では明瞭な高血圧抑制効果は認められなかった。また、脂肪酸類の構造と阻害活性について検討した結果、遊離多価不飽和脂肪酸類にレニン阻害活性を認めたが、トリグリセリド類や遊離飽和脂肪酸類にレニン阻害活性は認められなかった。

#### 【参考論文】

1. S. Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. and Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006)
2. S. Takahashi *et al.*, *J. Biol. Macromol.*, **7**, 49-54 (2007)
3. S. Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. and Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007)
4. S. Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. and Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008)
5. S. Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.*, **31**, 155-159 (2010)

### 13) 発表学会：日本応用糖質科学会平成23年度大会（第60回）

発表日と場所：2011年9月28日、北海道大学（札幌市）

演題名：イネスターチシンターゼ（SS）と枝作り酵素（BE）間の二重変異体米澱粉の物理化学特性

発表者：○高橋徹、保莉美佳（秋田県総合食品研究センター）

矢後ひかり、中村保典、藤田直子（秋田県立大学）

【目的】澱粉生合成関連酵素が欠損したイネの胚乳変異体米の交配による二重変異体を作成し、米澱粉の構造や物性評価を基に酵素、澱粉構造、物性の関係を明らかにすることで澱粉生合成メカニズムの全貌解明を目標としている。今回は二重変異体米澱粉のうち、SSIIIaと3つのBEアイソザイムの組み合わせの影響について調べた。

【方法】SSIIIa変異体（*ΔSSIIIa*）と同時に3つのBEアイソザイムをそれぞれ欠損させたイネ二重変異体である *ΔSSIIIa/ABEI*、*ΔSSIIIa/ABEIIa* および *ΔSSIIIa/ABEIIb* の精製米澱粉を分析に用い、各澱粉の鎖長分布測定、糊化特性および糊液（10wt%）の低温保持時のレオロジー特性を測定した。

#### 【結果と考察】

*ΔSSIIIa/ABEI* の玄米重量は日本晴よりも減少したが、*ΔSSIIIa/ABEIIa* は増加した。これらの澱粉粒の形状は親系統と同様に丸みを帯びており、ゲルろ過測定からはアミロペクチン長鎖の減少とアミロースの増加が明らかとなった。RVA測定より、これらの粘度上昇温度は日本晴よりも高く、ピーク粘度は非常に低かった。*ΔSSIIIa/ABEIIb* はこれらの二重変異体よりもさらにピーク粘度が小さく、低温保持における弾性率の増大が顕著であった。この結果から、*ΔSSIIIa/ABEI* および *ΔSSIIIa/ABEIIa* はSSIIIaの欠損、

*ΔSSIIIa/ΔBEIIb* は *BEIIb* 欠損の影響がそれぞれ大きいことが示唆された。本研究はイノベーション創出基  
礎的研究推進事業（生研センター）にて実施された。

#### 14) 発表学会：第63回日本生物工学会大会

発表日と場所：2011年9月28日、東京農工大学（東京都）

演題名：麹菌(*Aspergillus oryzae*)分生子におけるストレス応答によるトランスポゾン遺伝子転写産物の  
動的変動

発表者：○小笠原博信<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>1</sup>、五味勝也<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総合食研セ、<sup>2</sup>東北大院農・生物産業創成)

【目的】高濃度の  $\text{Cu}^{2+}$  や高温などのストレスを受けると麹菌の活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は mRNA の cryptic splicing や ORF 内 poly(A) 付加が減少し、全長 mRNA 比率が増加することで転移活性（機能化）を示す。ストレス応答 cDNA ブラウザーによる探索から機能化が推定される新たなトランスポゾン配列も見出されてきている<sup>1)</sup>。本研究ではそれら新規および既にアノテーションされているトランスポゾン遺伝子を対象にストレス条件下での mRNA 分子種変動について解析を行った。

【方法】 $\text{Cu}^{2+}$  処理および高温処理を行った分生子より全 RNA を抽出し、RT-PCR や 3'-RACE および転写産物の cDNA 配列決定により、splicing の変化と poly(A) 付加位置の変動について解析を行った。

【結果】未アノテーション領域より見出されていた幾つかの transposase やレトロトランスポゾンの gag 様配列、および既知の *implala* 様配列 (AO090023000251) ではストレスにより splicing 阻害が認められた。一方、新規 DNA トランスポゾン *AoTan1* では cryptic splicing は検出されなかったが、ORF 内の poly(A) 付加の減少と 3'-UTR 領域への付加が認められるようになった。以上のことから、麹菌内のトランスポゾン様遺伝子は *Crawler* と同様の制御により転移抑制がなされていることが示唆された。

1) 小笠原・他，農化大会要旨，p99(2010)

#### 15) 発表学会：平成23年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2011年10月4日、北とぴあ（東京都）

演題名：内在性トランスポゾンによる麹菌変異株の味噌醸造適性

発表者：○小笠原博信<sup>1</sup>、渡辺隆幸<sup>1</sup>、佐藤勉<sup>2</sup>、今野宏<sup>2</sup>、五味勝也<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総合食品研究センター、<sup>2</sup>(株)秋田今野商店、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成)

【目的】麹菌が保有している活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は通常の醸造条件下での転移は認められていないが、高濃度 Cu や高温ストレス処理により顕著な転移活性を示す。我々はこの特性を実用株に利用した「組換えによらない」遺伝子改変育種法について検討を行ってきた。これまでに、「まるごと秋田味噌」に使用され、抗変異原活性や植物組織の高分解活性を特徴とする味噌用麹菌 *Aspergillus oryzae* AOK139 株から、高温処理によって *wA* 遺伝子（ポリケチド合成酵素）コード領域内に *Crawler* が転移挿入した白色分生子変異株（WS61 株）が取得されていることから<sup>1)</sup>、新規育種法の実用性評価を目的に WS61 株を用いた製麹試験、小仕込みによる味噌醸造試験を行い親株との醸造適性比較を行った。

【方法】白色分生子変異株（AOK139-WS61）の安定性については、モデル種麹培養とプレーティング培

養を繰り返し行い、肉眼による復帰株の検出と *wA* 遺伝子領域の PCR により確認を行った。親株と WS61 株を麴蓋法により製麴し、酵素力価の測定 (キッコーマン製キット)、糖化試験および糖分析 (DIONEX) により比較を行った。味噌醸造試験は麴歩合 10 歩、食塩 12%、仕込重量 8kg で実施した。

【結果】(1)10 回の繰り返し培養においてプレート上および PCR でも WS61 株の復帰変異株は検出はされなかった。(2) WS61 株の麴蓋製麴での品温経過等の製麴特性は親株と同等であったが、やや白色の出麴となった。(3)糖化力や ACP およびチロシナーゼなどの米麴の酵素力価は親株と比較して大きな差は認められなかった。(4)糖化液のグルコースやマルトース組成にも大きな差は認められなかった。(5)熟成後の味噌のアミノ酸組成には大きな差は認められなかったが、外観および色差計の測定結果から WS61 株を用いることで淡色傾向となることが認められた。

以上の結果より、トランスポゾン *Crawler* を用いた遺伝子改変は、白色分生子変異以外の形質は親株とほぼ同等であることが示され、新規実用株を得るための有効な手法であることが示唆された。

1)小笠原他：第 61 回日本生物工学会大会講演要旨集,p15 (2009)

## 16) 発表学会：平成 23 年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2011 年 10 月 5 日、北とぴあ (東京都北区)

演題名：収穫年の異なる「秋田酒こまち」白米のデンプン特性の解析

発表者：○佐藤智美、高橋仁、高橋徹、田口隆信 (秋田総食研)、中村保典 (秋田県大)

【目的】イネ栽培時の気象条件は、原料米の清酒製造に関係する特性に影響を与えることが報告されている。奥田らは酒米統一分析法の蒸米消化性がイネの出穂後 1 ヶ月の平均気温 (以下、出穂後気温) と高い相関があり、米の溶解性に関する酒造適性を予測できる可能性を示唆している。そこで、私たちは収穫年の異なる「秋田酒こまち」白米のデンプン特性を分析し出穂後気温との関係を検討した。

【方法】平成 18 年から 22 年の 5 カ年について秋田県湯沢市の同一生産者の圃場において栽培された「秋田酒こまち」の精米歩合 40% 白米を使用した。各試料は収穫後 1 ヶ月以内に精米し、ビニール袋に密封し 15°C 以下で保存したものである。白米は粉碎後、定法により希アルカリ処理後、300 メッシュの篩を通し、エタノール、アセトンで洗浄して精製デンプンとした。デンプンの糊化特性は、RVA (ラピドビスコアアナライザー)、DSC (示差走査熱量計) で測定した。アミロペクチンの鎖長分布はデンプンをイソアミラーゼ処理後、APTS を用いた蛍光修飾法によりキャピラリー電気泳動で測定した。

【結果】①RVA では、収穫年の古い白米デンプンの最高粘度が大きくなる傾向が見られた。セットバックは、アミロース含量と正の相関があり、出穂後気温とは負の相関であった。粘度上昇開始温度は白米粉、デンプンともに出穂後気温と高い正の相関が見られ、特にデンプンではその傾向が顕著であった。②DSC では、糊化開始温度が RVA の粘度上昇開始温度と同様に、出穂後気温と高い相関を示した。③古米化の影響を調べるために白米の遊離脂肪酸を大坪らの方法により測定した結果、古米化による増加傾向は認められなかった。④デンプンの鎖長分布では、DP6-13 において出穂後気温と高い正相関が認められた。⑤麴酵素液による蒸米消化試験の結果、実醸造の消化特性のイメージとは異なり、出穂後気温と消化液のブリックス値に相関は見られなかった。

出穂後気温とデンプンの RVA 粘度上昇開始温度、DSC 糊化開始温度、および鎖長分布 DP6-13 比は出

穂後気温と高い相関を示したが、白米の消化試験との相関が認められなかったことから、古米化による要因やデンプン以外の成分の影響が考えられた。

#### 17) 発表学会：日本食品科学工学会平成23年度東北支部大会

発表日と場所：2011年11月12日、秋田カレッジプラザ（秋田市）

演題名：澱粉の尿素溶解特性を指標としたモチ硬化性ランクの推定

発表者：○小玉郁子<sup>1,3</sup>、柴田知佳<sup>2</sup>、藤田直子<sup>3</sup>、石川匡子<sup>3</sup>、高橋徹<sup>4</sup>、川本朋彦<sup>1</sup>、加藤和直<sup>1</sup>、  
佐藤健介<sup>1</sup>、松波摩耶<sup>5</sup>、中村保典<sup>3</sup>、秋山美展<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>秋田農林水産技七農試、<sup>2</sup>木村食品工業株、<sup>3</sup>秋田県立大学、<sup>4</sup>秋田県総食研七、<sup>5</sup>東北大学)

【目的】モチの製造工程において、モチの硬化特性は製造時間を左右する重要な要因である。本研究では、こがねもちを親として硬化性が異なるモチ品種について、尿素溶解における澱粉溶出反応からモチの硬化性を定量的に評価する方法を検討した。

【方法】モチ4品種の精米を試験に用いた。尿素溶解は従来の方法を一部改変し、異なる温度条件における澱粉の溶出量をヨウ素呈色反応から求め、溶解反応における活性化エネルギーを算出した。

【結果と考察】品種ごとに温度および時間に対する溶解特性が異なっており、また、すべての品種において時間と温度に比例して吸光度は高くなった。吸光度が最も高くなったのはヒメノモチであり、最も低い品種はこがねもちであった。反応速度論による澱粉の尿素溶解特性をモデル化した結果、活性化エネルギー値はモチ品種の硬化ランクと高い正の相関を示し、尿素溶解法がモチ硬化性の評価方法として有効であることが示された。

#### 18) 発表学会：第34回日本分子生物学会年会 BMBJ2011

発表日と場所：2011年12月14日、パシフィコ横浜

演題名：癌細胞選択的毒性を有するタラノメ由来 aralin の膜受容体の解析

Analysis of membrane receptor of aralin, a cancer-selective cytotoxic protein from *Aralia elata*

発表者：○大塚寛子<sup>1</sup>、秋山弘匡<sup>1</sup>、後藤良隆<sup>1</sup>、戸松 誠<sup>2</sup>、米納 孝<sup>1</sup>、飯田直幸<sup>3</sup>、服部成介<sup>3</sup>、  
川崎 靖<sup>4</sup>、田代文夫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東理大・基礎工、<sup>2</sup>秋田総食研、<sup>3</sup>北里大・薬、<sup>4</sup>岩手医大・薬)

Aralin from *Aralia elata* is a new type II ribosome-inactivating protein (RIP). Its A-chain exhibits RNA N-glycosidase activity to inactivate the ribosome and inhibit protein synthesis, while B-chain is the Gal and its derivatives-specific lectin. Aralin preferentially induces apoptosis in cancer cells compared with normal cells. However, the mechanism of selective toxicity of aralin against cancer cells is still obscure. In this study, to identify the potent aralin receptor, we analyzed the membrane proteins by far Western blotting with aralin and anti-aralin antibody, and LC/MS. The obtained data suggested that aralin receptor is the 110-kDa high density lipoprotein binding protein (HDLBP), which is processed form of 150-kDa HDLBP and existing in lipid raft as an active HDL receptor. The expression levels of 110-kDa HDLBP of various cancer cells were higher than those of normal cells. Furthermore, we established 110-kDa

HDLBP-knockdown HeLa cells using miRNAs. The sensitivity of these cells against aralin was robustly reduced. In contrast, 110-kDa HDLBP-over-expressing cells were not obtained by only forced expression of 150-kDa HDLBP. Expectedly, sensitivity of these cells against aralin was comparable to the control cells. Thus, these results indicate that the processed 110-kDa HDLBP is the authentic aralin receptor and its expression level determines the sensitivity toward aralin.

## 19) 発表学会：日本エネルギー学会 第7回バイオマス科学会議

発表日と場所：2012年1月18日、岩手県情報交流センター（盛岡市）

演題名：カドミウム(Cd)高含有バイオマスからのバイオエタノール生産とCdの除去

発表者：○進藤 昌、戸松さやか、増田祥子、服部浩之<sup>1</sup>、頼 泰樹<sup>1</sup>（秋田総食研、<sup>1</sup>秋田県立大学）

【目的】Cdなどの重金属に汚染された土壌の浄化方法として、植物に吸収させて除去するファイトレメディエーション法が期待されている。しかし、この方法では、植物中にCdを多く含むため、処分法として焼却以外にない。そこで、我々は、Cdを含むバイオマス資源を有効利用するため、バイオエタノールを生産し、その残渣をCd除去後堆肥として利用する方法の確立を目的として研究を行った。今回、Cdを含んだイネ（長香穀）からのバイオエタノール生産とCdの除去について検討を行ったので報告する。

【方法および結果】ファイトレメディエーション法で得られたCdを高含有する長香穀からのバイオエタノール生産とCdの分離方法について検討を行った。はじめに、糖化液の作成方法について検討を行った結果、アルカリ処理、硫酸処理、微粉碎処理、酵素処理法の中で硫酸処理法が最も糖の生成量とCdの分離量が多くなることが判明し、75%の糖収率と72%のCd分離に成功した。次にCdを含む糖化液からのエタノール生産について検討を行った結果、グルコース濃度が4%で、エタノール収率96%を達成した。

## 20) 発表学会：日本エネルギー学会 第7回バイオマス科学会議

発表日と場所：2012年1月18日、岩手県情報交流センター（盛岡市）

演題名：バイオマス糖化液および模擬糖化液におけるアルコール発酵阻害機構の解明と比較

発表者：○西田孝伸、進藤 昌、戸松さやか、佐々木美希子、上村毅<sup>1</sup>（秋田総食研、<sup>1</sup>J X日鉱日石エネルギー(株)）

バイオマスからの還元糖の生成を効率化するために化学的あるいは物理的に強力な前処理が行われる。前処理により生成された物質によるC5糖発酵の阻害が知られている。前処理方法の種類により異なった発酵阻害物質が生成され、異なった作用機序によりアルコール発酵が阻害されることが予想される。そこで、アルコール発酵中の酵母細胞に由来する代謝物を網羅的に解析（メタボローム解析）し、バイオマス糖化液と熱処理によりメイラード反応生成物を生成させた模擬糖化液におけるアルコール発酵阻害機構の解明をと発酵阻害機構の比較を試みた。各糖化液で発酵を24時間行った*Pichia stipitis* SS39-1株の細胞から代謝物を調製し、メタボローム解析に供与した。合成培地で発酵させた細胞を同様の解析により解析したものを対照とした。バイオマス糖化液と模擬糖化液の両方で対象と比較してペントースリン酸経路の代謝物に蓄積が見られた。しかしながら、バイオマス糖化液と模擬糖化液では蓄積の内容が



異なり、それぞれピルビン酸とグルコース-6-リン酸の蓄積が顕著に見られた。以上の結果から、前処理として行う方法により発酵阻害の原因が変化することが示唆された。

## 21) 発表学会：日本エネルギー学会 第7回バイオマス科学会議

発表日と場所：2012年1月18日、岩手県情報交流センター（盛岡市）

演題名：乾式粉碎した杉材の酵素糖変換・エタノール変換の研究

発表者：○梅沢俊策<sup>1</sup>、高橋武彦<sup>1</sup>、伊藤一志<sup>1</sup>、小林淳一<sup>1</sup>、伊藤新<sup>1</sup>、進藤 昌（秋田総食研、  
<sup>1</sup>秋田県立大学）

本研究では、乾式微粉碎により結晶化度を低下させた杉材微粉末を用いて、酵素による高濃度糖化と酵母によるエタノール発酵をより効率的に行うため検討を進めている。エタノール発酵試験を行う上で、糖化後の糖化液及び木粉残渣を含んだ糖化液において発酵阻害が確認されており、この糖化液中の発酵阻害要因を取り除くことが課題となる。そこで、発酵阻害要因を除去するため、酵素糖化し固液分離した糖化液と木粉残渣を含んだ糖化液に活性炭とイオン交換樹脂をそれぞれ混ぜエタノール発酵試験を行った。その結果、発酵阻害要因を取り除き、発酵時間を短縮することができた。

## 22) 発表学会：平成23年度 第11回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会

発表日と場所：2012年1月31日、産総研つくばセンター（つくば市）

演題名：原核微生物由来D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ

発表者：○高橋砂織（秋田県総食研セ）・葦澤悟（独法・国際農林水産業研究セ）

【背景と目的】最近、動物の生体内にD-アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが報告されている。しかしながら、D-アミノ酸含有タンパク質の分解に関与する酵素に関する報告は少ない。我々は、自然界よりD-アスパラギン酸を特異的に認識するエンドペプチダーゼ生産菌を分離し、酵素の特性を明らかにした[1]。今回、本酵素の大腸菌での発現系を構築するとともに各種部位変異体を作成し、活性部位の同定を目指した。

【結果と考察】土壌より放線菌や細菌類を純粋培養した微生物バンクを作成した。それらの培養液を調整し、Suc-D-Asp-pNAの分解活性を指標として、目的の酵素生産菌を分離した。放線菌約2,000株および細菌類約800株をスクリーニングし目的とする酵素生産細菌B38株を分離した。本菌は、16s rRNAの解析などから*Paenibacillus*属と同定された。そこで、酵素をPaenidase (*Paenibacillus* D-aspartyl endopeptidase)と命名した。さらに、本酵素遺伝子をクローニングするとともに各種部位変異体を作成し、大腸菌の発現系を用いて解析した。その結果、Ser64, Lys69, Tyr149が活性発現に重要であることが示された。

【参考論文】 [1] Takahashi S., et al. *Journal of Biochemistry*, **139**, 197-202 (2006)

## 23) 発表学会：平成23年度 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会

発表日と場所：2012年2月1日、産総研つくばセンター（つくば市）

演題名：食物由来レニン阻害物質

発表者：○高橋砂織（秋田県総合食品研究センター）

**【背景と目的】** レニンは、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) における血圧調節機構において律速酵素として重要な役割を担っている (Fig. 1)。これまで、RAS の制御を目指して食物由来のアンジオテンシン変換酵素 (ACE)阻害物質の探索が行われている。しかしながら、食物由来レニン阻害物質の探索に関する研究は殆ど行われていなかった。我々は、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて組換え型ヒトレニンの大量発現系を構築するとともに、レニンの新規活性測定法を開発し、各種食材よりレニン阻害物質を探索した。その結果、大豆、米、雑穀や山菜などにレニン阻害物質を見出した。

**【方法】** 組換え型ヒトレニンは、ヒトプロレニン cDNA を挿入したバキュロウイルスを構築し、Sf-9 昆虫細胞で発現した。本発現系において、培養最終期にプロレニンの活性化が確認された。活性型レニンはペプスタチンカラムと Mono Q カラムを用いて精製した。レニン活性は、新規蛍光消光基質 (N-methyl-anthranil-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\*Val-Ile-His-Thr-Lys-Lys-2, 4 dinitrophenyl-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>, \*scissile peptide bond)を用いて測定した。また、各種食材のメタノール抽出液を用いてレニン阻害活性を検定した。

**【結果及び考察】** 味噌に食物由来としては初めてレニン阻害活性を見出した。味噌の原材料を検討した結果、レニン阻害物質の起源が大豆と判明した。一方、レニン阻害物質が大豆胚軸に局在することが明らかになったことから、大豆胚軸より各種クロマトグラフィーを用いてレニン阻害物質を精製し、その構造をソヤサポニンIと同定した (Fig. 2) [2]。また、各種サポニン類を用いてレニン阻害活性を検討したところ、サポゲノールの3位にグルクロン酸が結合した、いわゆるグルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることが明らかとなった。さらに、高血圧自然発症ラット(SHR-SP)に対する大豆サポニンの投与試験により、大豆サポニンが高血圧抑制効果のあることが実証された。さらに、各種食材よりレニン阻害物質を探索したところ、米にもレニン阻害物質の存在を見出し、その構造を遊離不飽和脂肪酸であるオレイン酸及びリノール酸と同定した。各種遊離脂肪酸類によるレニン阻害活性を検討したところ、遊離飽和脂肪酸にレニン阻害活性は認められなかった。一方、リノレン酸、アラキドン酸、EPA や DHA などの遊離多価飽和脂肪酸ではレニン活性阻害が認められた。最近、山菜にもレニン阻害活性を見出し、ウド由来レニン阻害物質としてカウレン酸 (kaureic acid) 及びピマラジエン酸 (pimaradienoic acid) を同定した。今後これらの化合物についても動物試験を行い、血圧降下作用を検証していく予定である。

## 24) 発表学会：第46回秋田化学技術協会研究技術発表会

発表日と場所：2012年3月1日、秋田大学（秋田市）

演題名：硬化性を指標とした餅生地 の物性評価系の構築

発表者：○佐々木玲、高橋徹、熊谷昌則（秋田県総合食品研究センター）

近年、食の外注化が進み日本の伝統的食品である餅においても作るから買うへ変化が見られる。そのため、糯米は食品原料としてそれぞれの餅加工品に適した加工特性が求められるようになった。糯米の加工特性は餅の固まりやすさ、つまり硬化性が影響する。餅の硬化性を評価する方法として餅生地の自重によるたわみ角度やテンプレッサー貫入抵抗などがあるが、いずれの方法も数十gと比較的少量の

糯米を用いる場合、製粉した糯粉に湯を加えて練る、練り餅で餅生地を調整することが多い。しかし、商業用は餅搗き機を用いた搗き餅が主流であるため、需用者の多くは搗き餅で調製した餅生地の硬化性に対する評価を求める。そこで、本研究では少量の糯米（50g 以下）から搗き餅で餅生地を調製する方法および硬化性を指標として餅生地を評価する方法の確立を目指した。糯米の蒸煮途中に散水することで加熱による乾燥を防ぎ、混捏にフェリノグラフを用いることで少量の糯米で均質な餅生地を調製することが可能となった。次に調製した餅生地を万能試験機(Instron 5544)による圧縮・引張り試験に供し、硬さを測定したところ、糯米品種間で餅生地の硬さに差が見られ、餅加工業界の評価と一致する結果が得られた。以上のことから、餅生地の硬化性を数値化し評価することが可能となった。

## 25) 発表学会：2012年度日本農芸化学学会大会

発表日と場所：2012年3月23日、京都女子大学（京都市）

演題名：*Bacillus* sp. Y18 アミノペプチダーゼによる脱苦味処理はACE及びレニン阻害活性を保持する

発表者：○菑澤 悟、程 永強<sup>1</sup>、李 里特<sup>1</sup>、後藤 猛<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>3</sup>（国際農研、<sup>1</sup>中国農大・食品科学、<sup>2</sup>秋田大学・工学資源、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

【目的】大豆タンパク質やカゼインなどのタンパク質加水分解物は栄養補助食品や低アレルゲン化食品の製造に用いられる重要な食品素材である。また、これらには血圧低下作用を有するACE阻害ペプチドが含まれており、機能性食品素材としても用いられる。しかしながら、これらの加水分解物は強い苦味を呈することから、直ちに食品に利用することは出来ない。そこで、これらの苦味を低減するアミノペプチダーゼを取得することを目的とした。

【方法】アミノペプチダーゼ生産菌の検索にはL-leucine-p-nitroanilideを基質として用いた。塩基配列、アミノ酸配列の相同性検索にはBLASTを用いた。酵素遺伝子の取得は*Bacillus* sp. Y18より精製したゲノムを鋳型としたPCR法により行った。苦味強度測定はヒト官能テスト法により行った。レニン<sup>1,2)</sup>及びACE<sup>3)</sup>活性測定は高橋らの方法で行った。

【結果】中国雲南省土壌よりアミノペプチダーゼ生産菌*Bacillus* sp. Y18を単離した。つぎに、菌体培養上清より各種クロマトグラフィーを用いて分子量約50kDaのアミノペプチダーゼ(apBY18)を精製するとともに、エドマン分解法により20番目までのアミノ酸配列を決定した。つづいて、各種PCRにより得られたDNA断片の塩基配列を決定し、これよりapBY18の全アミノ酸配列を推定した。その結果、apBY18前駆体は464アミノ酸残基からなること、シグナルペプチド、プロペプチドが存在することが明らかになった。また、アミノ酸配列の相同性を解析したところ、各種細菌由来アミノペプチダーゼと相同性があることが明らかとなった(*Bacillus* sp. 2\_A\_57\_CT2: 63%; *Bacillus* sp. NRRL B-14911: 63%; *Bacillus megaterium* QM B1551: 59%; *Ornithinibacillus* sp. TW: 59%)。つぎに、大腸菌によりapBY18の発現を行ったところ、活性型酵素が得られた。この組換え酵素を用いて、各種酵素特性を解析した。その結果、至適温度は50°C、至適pHは8.5であり、EDTAにより阻害を受けることが明らかとなった。また、合成基質に対する活性はLeu>Met>Arg>Ala>Lysであった。さらに、大豆粉のペプシン分解物、カゼインのトリプシン分解物の苦味を低減するとともに、それらのACE及びレニン阻害活性は保持した。このことから、apBY18は加水分解物に含まれる苦味ペプチドに作用してその苦味を低減するが、ACE及びレニ

ン阻害ペプチドには作用しないことが示唆された。

1) Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007)

2) *Ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008)

3) Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.* (2011) *in press*

## 26) 発表学会：2012年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2012年3月25日、京都女子大学（京都市）

演題名：ウド(*Aralia cordata*)由来レニン阻害物質の精製と同定

発表者：○高橋砂織<sup>1</sup>、常盤野哲生<sup>2</sup>、畠恵司<sup>1</sup>、佐藤（保刈）美佳<sup>1</sup>、吉澤結子<sup>2</sup>、後藤 猛<sup>3</sup>（<sup>1</sup>秋田県総合食品研究センター、<sup>2</sup>秋田県立大学・生物資源、<sup>3</sup>秋田大学大学院・工学資源）

【目的】レニンは、レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構において律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、活性測定が容易なアンギオテンシン変換酵素を標的として各種食材よりその阻害物質の探索が多数行われてきた。しかしながら、レニンを標的酵素とした食物由来阻害物質の探索は殆ど行われていなかった。我々は食物由来レニン阻害物質の探索系を構築し [1]、これまでに大豆からソヤサポニンI [2]をまた米から遊離脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を同定した [3]。さらに、各種サポニン類を用いた解析から、グルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることを明らかとした [4]。今回、各種山菜よりレニン阻害物質を探索した結果、ウド (*Aralia cordata*) にレニン阻害活性のあることを見いだすとともに、阻害物質を単離しその構造を解析した。

【方法】組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系で発現しペプスタチンアフィニティーカラム等で精製した [1]。レニン活性の測定には新規蛍光消光基質 (*N*-methylantranyl-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\*Val-Ile-Thr-His-*N*<sup>ε</sup>-2,4-dinitrophenyl-Lys-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>) を用いた [1, 2]。各種山菜の凍結乾燥粉末のメタノール抽出液を調製し、レニン阻害検定用に用いた。

【結果】山菜（34種類）のメタノール抽出液を用いてレニン阻害活性を検定した。その中でウド抽出液が最も強いレニン阻害活性を示した。そこで、ウド凍結乾燥品のメタノール抽出液を用いて阻害物質の精製を行った。精製には、C<sub>18</sub>逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過やC<sub>18</sub>PTLCを用いた。C<sub>18</sub>PTLCにおいて阻害物質は極性の相違により2成分に分離された。構造解析の結果、高極性化合物は(-)-kaur-16-en-19-olic acidと同定された。低極性化合物は異性体であるpimara-8(14), 15-dien-19-olic acidとpimara-9(11), 15-dien-19-olic acidの4:1の混合物であることが示された。これらの化合物はヒト型レニン以外にブタ腎臓レニンを阻害したが、他のプロテアーゼには作用を示さず、レニン特異的阻害物質であることが示された。

### 【参考文献】

[1] Takahashi S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007), [2] Takahashi S. *et al.*, *ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008), [3] Takahashi S. *et al.*, *ibid.*, **74**, 1713-1715 (2010), [4] Takahashi S. *et al.*, *Biomed. Res.*, **31**, 155-159 (2010).

## 27) 発表学会：農芸化学会2012年度大会

発表日と場所：2012年3月25日、京都女子大学（京都市）

演題名：レニン阻害活性を強化した味噌の開発

発表者：○渡辺隆幸、佐々木康子、高橋砂織（秋田県総合食品研究センター）

【背景・目的】レニンは高血圧の原因酵素であるが、大豆や味噌抽出物にその阻害活性が認められており [1]、またその阻害に大豆中のソヤサポニンIが大きく関与していることが明らかになっている [2]。味噌は原料や製造法が多様であることから、本研究では様々な味噌のヒト型レニン阻害活性を検討し、製造条件と阻害活性との関連を調べた。さらに味噌のレニン阻害活性を強化する味噌の開発を目的に大豆胚軸を大豆と代替した味噌の製造試験を行い、そのレニン阻害活性を調べた。

【方法】レニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現し、ペプスタチンアフィニティークラムで精製した。レニン活性は新規レニン活性測定用蛍光消光基質を用いて測定した [2,3]。味噌 (10g) に蒸留水 100 ml を加えホモゲナイズ後 105°C、10 分間のオートクレーブ処理をした。遠心上清を ODS カラムに添加し、蒸留水で十分に洗浄後 100ml のメタノールで溶出した。溶出液を減圧乾燥後、秤量し DMSO に溶解して阻害検定に用いた。

【結果】味噌のサンプルとした全国の市販味噌 73 点、全国味噌鑑評会優秀見本味噌 7 点、秋田県味噌醤油品評会出品味噌 16 点の味噌の抽出物はいずれもレニン阻害活性を示し、味噌には普遍的にレニンの働きを阻害する物質が含まれていることが示された。また小仕込み試験により、麹菌の違い、酵母、乳酸菌の添加の有無は味噌抽出物のレニン阻害活性に影響を与えないことを認めた。さらにソヤサポニン I を多く含むことが予想される大豆胚軸を味噌製造時に大豆の代替えとして使用することにより、最大で 2 倍のレニン阻害活性を有する味噌の製造が可能であることが示唆された。

#### 【参考論文】

1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006).
2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3226 (2008).
3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).

【謝辞】本研究は、平成 22 年度社団法人中央味噌研究所研究助成により行われました。

## 28) 発表学会：2012 年度日本農芸化学学会大会

発表日と場所：2012 年 3 月 25 日、京都女子大学（京都市）

演題名：アンギオテンシン I 変換酵素およびカルボキシペプチダーゼ Y の新規蛍光消光基質の開発

発表者：高橋砂織<sup>1</sup>、小野洋輝<sup>1</sup>、○後藤 猛<sup>1</sup>、熊谷（吉澤）久美子<sup>2</sup>、杉山俊博<sup>3</sup>

（秋田県総合食研<sup>1</sup>、<sup>1</sup>秋田大院・工資、<sup>2</sup>（株）ペプチド研、<sup>3</sup>秋田大院・医）

【目的】レニン・アンギオテンシン系は、哺乳類で最も研究が進んでいる血圧調節機構である。その中でアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) は古くから研究が行われており、本酵素の代表的阻害剤としてカプトプリルやリシノプリルが知られている。また、食材由来の各種 ACE 阻害物質の探索が数多く報告されており、特定保健用食品開発につながったケースも数多く見受けられる。

ACE の活性測定には、Hippuryl (Hip)-His-Leu が広く用いられており、加水分解産物の Hippuric acid を抽出して分光学的手法で測定するか、His-Leu を蛍光標識して測定する方法が一般的である。今回、ACE

の迅速活性測定用新規蛍光消光基質を開発したので報告する。さらに、本基質を用いることで、カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の活性測定も簡便・迅速に行えることが判明したので併せて報告する。

【方法】ACE の生理基質であるアンギオテンシン I の N 末端アミノ酸配列を基にして、N 末端側に蛍光物質である *N*-メチルアントラニル酸 (Nma) を、また C 末端に蛍光消光物質であるジニトロフェニル基 (Dnp) をリジンの  $\epsilon$  アミノ基に導入した Lys(Dnp) を有する新規蛍光消光基質 Nma-Phe-His-Lys(Dnp) を合成した。また、C 末端に Pro を導入することで ACE の基質結合能が強まるとの報告があることから、C 末端に Pro を導入した Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro も併せて合成した。これら新規合成基質および Hip-His-Leu とウサギ肺由来 ACE (Rab-ACE)、組換え型ヒト ACE (Rh-ACE) および CPY を用いて反応動力学的解析を行った。

【結果】Nma-Phe-His-Lys(Dnp)、Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro、Hip-His-Leu を基質として用い場合の Rab-ACE および Rh-ACE に対する  $k_{cat}/K_m$  値はそれぞれ 5.12, 1.90, 0.80  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  および 16.0, 7.36, 0.30  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  と求められた。したがって、これらの基質の中で、Nma-Phe-His-Lys(Dnp) が Rh-ACE の優れた基質であることが示された。また、本基質は、CPY の基質としても有用であることが示された。

## 29) 発表学会：2012 年度日本農芸化学学会大会

発表日と場所：2012 年 3 月 25 日、京都女子大学（京都市）

演題名：タイの発酵魚食品プラーラー中のレニン阻害活性物質

発表者：○中原 和彦、菘澤 悟、野田澤 茜、ゲシニー トラクーンティワコン<sup>1</sup>、

プルンチャイ タンカナクン<sup>1</sup>、後藤 猛<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>3</sup>（国際農研、<sup>1</sup>カセサート大学、<sup>2</sup>秋田大学・工学資源、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

【目的】プラーラーは、様々な淡水魚を主原料として食塩や米ぬか等とともに発酵させたタイの伝統発酵食品である。我が国の塩辛やなれずしに通じる伝統食品であり、地域食料資源として重要な食材・栄養源となっている。プラーラーには、発酵による原料魚成分の分解物や微生物の代謝産物等、生理機能性を示す物質が含まれている可能性があるものの、現段階ではあまり研究が進んではいない。本研究では、血圧低下作用（レニン阻害活性）を有する物質を取得する目的で、プラーラー成分のスクリーニングを行い、強い活性を示した画分から活性物質を精製し、構造推定を行った。

【方法】レニン阻害活性測定は、組換え型ヒトレニン及び蛍光消光基質を用いる高橋らの方法により行った<sup>1</sup>。タイ各地で収集したプラーラー（固形物）のメタノール抽出物を調製し、レニン阻害活性を測定し、強い活性を示す試料から、液々分配及び逆相 HPLC により活性物質を精製し、質量分析により構造を推定した。

【結果】タイ中部から収集されたプラーション（*Channa striata*, カムルチーの一種）を原料とするプラーラーのメタノール抽出物に最も強いレニン阻害活性が検出された。これをヘキサン：水 = 1 : 1 により分液したところ、ヘキサン層にほとんどの活性が回収された。次に、逆相 HPLC によりヘキサン画分を分離し、分取した各ピークの活性を測定し、2 つの主要な活性画分を見出した。この 2 つの画分を繰り返し分取して、最終的にはほぼ純粋な画分 A, B を得た。それぞれについて質量分析を行ったところ、A はリノール酸、B はドコサヘキサエン酸であると推定された。それぞれの標準物質について HPLC のリテンションタイ

ム、質量分析スペクトルおよびレニン阻害活性について比較し、同一物質であると結論づけられた。発酵に用いられた原料魚プラーチョンの脂質組成データから、これら2つの物質は原料中のトリグリセリドが発酵中に加水分解されて遊離してきたものと考えられた。現在、タイにおいて発酵過程におけるこれら物質の生成の経時変化について検討を行っている。また、プラーチョン以外の淡水魚を原料とするプララーについてもレニン阻害活性が広く検出されたが、これらについても多くがヘキサン層に回収され、HPLC 分析により、上記2つの物質を含む遊離不飽和脂肪酸であることが示唆された。遊離不飽和脂肪酸のレニン阻害活性については、高橋らにより既に報告されている2)。

1) Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007)

2) Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1713-1715 (2010)

### 30) 発表学会 : The 9<sup>th</sup> International *Aspergillus* Meeting and 11<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics

発表日と場所 : 2012年3月29,31日 フィリップス大学 (マールブルク、ドイツ)

演題名 : Post-transcriptional suppression against potential transposable elements by cryptic splicing and premature polyadenylation in *Aspergillus oryzae*

発表者 : ○Hironobu Ogasawara<sup>1</sup>, Saori Takahashi<sup>1</sup>, and Katsuya Gomi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Akita Res. Inst. Food and Brewing, Akita, Japan. <sup>2</sup> Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Japan.

An active DNA transposon *Crawler* isolated from the genome of industrially important fungus *Aspergillus oryzae* transposes under extreme stress conditions [1]. A stress-fluctuation cDNA browser with DOGAN-DB was constructed to survey transposon-like genes such as *Crawler*. Full length of DNA sequences encoding transposable elements were frequently identified. Among them, a novel element homologous to *Tan1* from *A. niger* was identified and tentatively designated *AoTan1* that shows multiple characteristics of class II transposon [2].

Changes of the transcripts from several transposable elements were analyzed under extreme stress conditions such as CuSO<sub>4</sub> or heat shock by the method of RT-PCR and 3'-RACE.

The mRNA analyses revealed that cryptic splicing occurred in the mRNA from *gag*-like elements in a retrotransposon *AoLTR1* and from a deduced DNA transposon(AO090023000251) homologous to *implala* under the normal culture condition. In the case of *AoTan1*, cryptic splicing could not be observed, whereas premature polyadenylations were detected within coding region of the transposase. By the stress treatments, the increasing in mature mRNA molecules from those elements was caused, allowing the full-length to be produced.

These results suggested that *A. oryzae* might possess a common defense system against the potential transposable elements by post-transcriptional regulation such as cryptic splicing or premature polyadenylation as observed in the active transposon *Crawler*.

1) H. Ogasawara *et al.* *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 441-449 (2009)

2) H. Ogasawara *et al.* 26th FGC Abstract Book, p148 (2011)





6. 外部発表論文概要 (14 件) . . . . . 85

1) 論文題名 : **Citronellol and geraniol, components of rose oil, activate peroxisome proliferator- activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  and suppress cyclooxygenase-2 expression.**

著者名 : Michiko Katsukawa, Reiko Nakata, Satomi Koeji, Kazuyuki Hori, Saori Takahashi, and Hiroyasu Inoue

雑誌名 : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 1010-1012 (2011)

発行日 : 2011 年 5 月 23 日

2) 論文題名 : **In vitro screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells**

著者名 : Junichiro Takahashi, Gen Toshima, Yukie Matsumoto, Fumiko Kimura, Takanobu Kiuchi, Kentaro Hamada, Keishi Hata

雑誌名 : *Journal of Natural Medicines*, **65**, 670-674 (2011)

発行日 : 2011 年 6 月 11 日

3) 論文題名 : **セルロース系バイオマスからの 2 段階発酵によるバイオエタノール生産**

著者名 : 進藤 昌

雑誌名 : *ケミカルエンジニアリング*, **56**, 707-712 (2011)

発行日 : 2011 年 9 月 1 日

4) 論文題名 : **Chitinase from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus: Rapid purification from Sf-9 medium and the mode of action.**

著者名 : Tamo Fukamizo, Hirokazu Saito, Mamiko Muzishima, Takayuki Ohnuma, Takeshi Gotoh, Kazuyuki Hiwatashi, and Saori Takahashi

雑誌名 : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 1763-1769 (2011)

発行日 : 2011 年 9 月 23 日

5) 論文題名 : **近赤外分光分析法による五味子の産地地判別及び薬効成分の定量**

著者名 : 李華, 菊地良栄, 熊谷昌則, 天野敏男, 藤原一彦, 林 金明, 小川信明

雑誌名 : *分析化学*, **60**, 813-817 (2011)

発行日 : 2011 年 10 月 5 日

6) 論文題名：麴菌におけるトランスポゾン (*Crawler*) 活性の発見と実用株育種への応用

著者名：小笠原 博信

雑誌名：発酵・醸造食品の最新技術と機能性Ⅱ (分担執筆)、p60-69、  
シーエムシー出版

発行日：2011年10月31日

7) 論文題名：Novel effect of adenosine 5'-monophosphate on ameliorating hypertension and the metabolism of lipids and glucose in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

著者名：Ardiansyah, Hitoshi Shirakawa, Takuya Koseki, Kazuyuki Hiwatashi,  
Saori Takahashi, Yoshinobu Akiyama, and Michio Komai

雑誌名：Journal of Agricultural and Food Chemistry, **59**, 13238-13245 (2011)

発行日：2011年11月21日

8) 論文題名：Isolation and identification of human renin inhibitor from *Aralia cordata* (Udo)

著者名：Saori Takahashi, Tetsuo Tokiwano, Keishi Hata, Mika Hokari, Yuko Yoshizawa,  
and Takeshi Gotoh

雑誌名：Journal Biological Macromolecules **11**, 83-89 (2011)

発行日：2011年12月1日

9) 論文題名：米糠発酵素材のメタボ予防効果について

発表者：大友理宣, 畠恵司

雑誌名：Food Style, **21**, 50-52 (2011)

発行日：2011年12月1日

10) 演題名：Internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin converting enzyme and carboxypeptidase Y

著者名：Saori Takahashi, Hiroki Ono, Takeshi Gotoh, Kumiko Yoshizawa-Kumagae, and  
Toshihiro Sugiyama

雑誌名：Biomedical Research, **32**, 407-411 (2011).

発行日：2011年12月16日

**11) 論文題名：プロテアーゼ処理挽き割り納豆からの ACE 阻害物質の精製・同定  
と高血圧自然発症ラットにおける納豆の血圧上昇抑制作用**

著者名：嶋影 逸、新保 守、山田清繁、Ardiansyah、白川 仁、駒井三千夫、樋  
渡一之、戸松 誠、高橋砂織

雑誌名： *食品・臨床栄養* e2011, 1-8 (2011)

発行日：2011 年 12 月

**12) 論文題名：Starch properties of waxy rice cultivars influencing rice cake hardening**

著者名：Ikuko Kodama, Chika Shibata, Naoko Fujita, Kyoko Ishiukawa,  
Toru Takahashi, Yasunori Nakamura, Tomohiko Kawamoto, Kazunao Kato,  
Kensuke Sato, Maya Matsunami, Yoshinobu Akiyama

雑誌名： *Japan Journal of Food Engineering*, **12**, 157-162 (2011)

発行日：2011 年 12 月

**13) 論文題名：Lupeol supplementation improve blood pressure and lipid metabolism  
parameters in stroke-prone spontaneously hypertensive rats**

著者名：Ardiansyah, Eri Yamaguchi, Hitoshi Shirakawa, Keishi Hata, Kazuyuki Hiwatashi,  
Kousaku Ohinata, Michio Komai

雑誌名： *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 183-185 (2012)

発行日：2012 年 1 月 23 日

**14) 論文題名：レニン阻害活性を強化した味噌の開発**

著者名：高橋砂織、佐々木康子、渡辺隆幸

雑誌名： *中央味噌研究所報告* **33**, 165-170 (2012)

発行日：2012 年 3 月 7 日



1) 論文題名 : Citronellol and geraniol, components of rose oil, activate peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  and suppress cyclooxygenase-2 expression.

著者名 : Michiko Katsukawa, Reiko Nakata, Satomi Koeji, Kazuyuki Hori, Saori Takahashi, and Hiroyasu Inoue

雑誌名 : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 1010-1012 (2011)

発行日 : 2011 年 5 月 23 日

要約 :

We evaluated the effects of rose oil on the peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR) and cyclooxygenase-2 (COX-2). Citronellol and geraniol, the major components of rose oil, activated PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ , and suppressed LPS-induced COX-2 expression in cell culture assays, although the PPAR $\gamma$ -dependent suppression of COX-2 promoter activity was evident only with citronellol, indicating that citronellol and geraniol were the active components of rose oil.

2) 論文題名 : In vitro screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells

著者名 : Jyunichiro Takahashi, Gen Toshima, Yukie Matsumoto,

Fumiko Kimura, Takanobu Kiuchi, Kentaro Hamada, Keishi Hata

雑誌名 : *Journal of Natural Medicines*, **65**, 670-674 (2011)

発行日 : 2011 年 6 月 11 日

要約 :

We screened the antihyperlipidemic effects of seven edible plants by evaluation of the triglyceride (TG) and cholesterol profiles secreted from HepG2 cells. We found that the water- and ethanol-extracts of *Brasenia schreberi* at 100  $\mu\text{g/ml}$  exhibited strong inhibitory activities against TG and cholesterol secretions from HepG2 cells stimulated with sodium oleate. Real-time RT-PCR analysis demonstrated that ethanol extract of *B. schreberi* (BSET) attenuated the expression of the sterol regulatory element binding protein-1c and -2, fatty acid synthase and HMG CoA synthase-1 genes, which are involved in lipid synthesis in hepatocyte/hepatoma cells. Furthermore, we studied the action of BSET on adipose tissue accumulation and serum parameters in mice fed a high-fat diet (HFD). BSET suppressed mesenteric and epididymal adipose tissue accumulation and normalized serum TG and glucose, but not cholesterol levels in HFD-fed mice.

### 3) 論文題名：セルロース系バイオマスからの2段階発酵によるバイオエタノール生産

著者名：進藤 昌

雑誌名：ケミカルエンジニアリング 56,707-712 (2011)

発行日：2011年9月1日

要約：

セルロース系バイオマスから低コストでバイオエタノール生産を行うために、効率的な前処理技術の開発とペントース・ヘキソースからの高収率エタノール生産技術の開発が求められている。そこで、アンモニア処理バイオマス酵素糖化液を用いて新規な2段階発酵システムによるバイオエタノール生産について検討を行った。バイオマスは、エリアンサス、スイッチグラス、ネピアグラス及びエゾノキヌヤナギを用いた。前処理はアンモニアによる高圧処理を行い、糖化はセルラーゼによる加水分解を行った。その結果、エタノール生産は、ヘキソースからのエタノール生産を *Saccharomyces cerevisiae*、ペントースからのエタノール生産を自然界より分離した *Pichia stipitis* SS1-2 を用いた2段階発酵法により行った。その結果、各種バイオマス糖化液を2段階発酵法でバイオエタノール生産を行わせることにより *P.stipitis* SS1-2 を単独で用いた場合よりもエタノール収率が向上し、何れのバイオマスも90%以上となった。

### 4) 論文題名：Chitinase from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus:

**Rapid purification from Sf-9 medium and the mode of action.**

著者名：Tamo Fukamizo, Hirokazu Saito, Mamiko Muzishima, Takayuki Ohnuma, Takeshi Gotoh, Kazuyuki Hiwatashi, and Saori Takahashi

雑誌名：*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 1763-1769 (2011)

発行日：2011年9月23日

要約：

*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) chitinase is involved in the final liquefaction of infected host larvae. We purified the chitinase rapidly to homogeneity from Sf-9 cells infected with AcMNPV by a simple procedure using pepstatin-aminohexyl- Sepharose column. In past studies, a recombinant AcMNPV chitinase was found to exhibit both exo- and endo-chitinase activities by analysis using artificial substrates with a fluorescent probe. In this study, however, we obtained more accurate information on the mode of action of the chitinase by HPLC analysis of the enzymatic products using natural oligosaccharide and polysaccharide substrates. The AcMNPV chitinase hydrolyzed the second  $\beta$ -1, 4 glycosidic linkage from the non-reducing end of the chitin oligosaccharide substrates [(GlcNAc) $_n$ ,  $n=4, 5,$  and  $6$ ], producing the  $\beta$ -anomer of (GlcNAc) $_2$ . The mode of action was similar to that of *Serratia marcescens* chitinase A (SmChiA), the amino acid sequence of which is 60.5% homologous to that of AcMNPV enzyme. The enzyme also hydrolyzed solid  $\beta$ -chitin, producing only (GlcNAc) $_2$ . The AcMNPV chitinase processively hydrolyzes solid  $\beta$ -chitin in a manner similar to SmChiA. The processive mechanism of the enzyme appears to be advantageous in liquefaction of infected host larvae.

#### 5) 論文題名：近赤外分光分析法による五味子の産地判別及び薬効成分の定量

著者名：李華，菊地良栄，熊谷昌則，天野敏男，藤原一彦，林 金明，小川信明

雑誌名：分析化学、60, 813-817 (2011)

発行日：2011年10月5日

要約：

本研究では、定性・定量分析法である近赤外分光分析法を用いて産地と品種が異なる五味子の非破壊、迅速、簡便な産地判別及び薬効成分の非破壊、迅速定量の可能性を検討した。その結果、NIR スペクトルを測定し主成分分析を用いることで、北五味子と南五味子を迅速に判別することができた。また、同じ北五味子で産地が異なる場合でも迅速に産地判別することができた。さらに、重回帰分析法を使って、NIR スペクトルから、五味子中の Schisandrin と Schisantherin A の含有量を非破壊で迅速に定量できることが分かった。本方法を用いることで、非破壊で迅速に多数の五味子の分析が可能となり、今後の薬草の判別・分析に大きく貢献できることが期待できる。

#### 6) 論文題名：麴菌におけるトランスポゾン (Crawler) 活性の発見と実用株育種への応用

著者名：小笠原 博信

雑誌名：発酵・醸造食品の最新技術と機能性Ⅱ (分担執筆)、p60-69、シーエムシー出版

発行日：2011年10月31日

要約：

近年、筆者らは麴菌の多様性と醸造現場での様々な麴菌株の相互作用の歴史を理解する手がかりの一つとして、麴菌に内在するトランスポゾン (transposon) 遺伝子に着目し、転移活性を持つトランスポゾンの検索と機能解析を行っている。トランスポゾンとは、ゲノム上のある位置から別の位置へ転移することのできる可動性 DNA 因子のことである。麴菌においては全ゲノム解読から初めてトランスポゾンを有していることが明らかとなったが、それまで、トランスポゾン活性は見つかっていなかった。その後、実用麴菌株の探索から新たなトランスポゾン配列が見出され、筆者らはその内在性トランスポゾンが麴菌において転移することを初めて明らかにした。本稿ではこの活性型トランスポゾンである Crawler の遺伝子構造や転移特性について解説するとともに、トランスポゾン活性を利用した実用株育種への応用について述べた。

7) 論文題名 : **Novel effect of adenosine 5'-monophosphate on ameliorating hypertension and the metabolism of lipids and glucose in stroke-prone spontaneously hypertensive rats**

著者名 : Ardiansyah, Hitoshi Shirakawa, Takuya Koseki, Kazuyuki Hiwatashi,

Saori Takahashi, Yoshinobu Akiyama, and Michio Komai

雑誌名 : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 13238–13245 (2011)

発行日 : 2011年11月21日

要約 :

The aim of the study was to investigate the effects of adenosine 5'-monophosphate (AMP) in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). Male rats (10 weeks old) were divided into three groups: a control group fed an AIN-93 M diet and two others fed supplemental AMP (17.5 and 87.5 mg/kg diet) for 3 weeks. AMP effectively improved hypertension, plasma triglyceride, and HDL-cholesterol, glucose, kidney function parameters, hepatic lipid, enhances plasma nitric oxide, and plasma adiponectin accompanied by the up-regulation of mRNA expression levels of the hepatic adiponectin receptor 2. Single and chronic oral administration of AMP affected the hepatic mRNA expression levels of genes involved in  $\beta$ -oxidation, fatty acid synthesis, and AMP-activated protein kinase. Furthermore, a single oral dose of AMP (40 mg/kg body weight) improved hypertension and hyperglycemia in SHRSP. In conclusion, AMP displays a novel effect in ameliorating metabolic-related diseases in SHRSP and could be beneficial as a functional food.

8) 論文題名 : **Isolation and identification of human renin inhibitor from *Aralia cordata* (Udo)**

著者名 : Saori Takahashi, Tetsuo Tokiwano, Keishi Hata, Mika Hokari, Yuko Yoshizawa, and

Takeshi Gotoh

雑誌名 : *Journal Biological Macromolecules*, **11**, 83-89 (2011)

発行日 : 2011年12月1日

要約 :

We screened for human renin inhibitory activity in wild vegetables and found renin inhibitory activity in methanol extract of *Aralia cordata*. Physico-chemical data on the isolated inhibitors were identical to those of (-)-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenic acid, KA) and pimaradienoic acids (PDA, 8:2 mixture of pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid: pimara-9(11) 15-dien-19-oic acid). Kinetic studies with KA and PDA indicated partial noncompetitive inhibitions, with  $K_i$  values of 69.5 and 89.4  $\mu$ M, respectively. KA and PDA also inhibited porcine renin but had nearly no effect on other proteinases. This is the first demonstration of renin inhibitors in wild vegetables.



9) 論文題名： 米糠発酵素材のメタボ予防効果について

発表者：大友理宣， 畠恵司

雑誌名： *Food Style*, 21, 50-52 (2011)

発行日：2011年12月1日

要約：

秋田銘醸株式会社で製造・販売を行っている米糠発酵素材の脂質代謝改善作用を調べた。本素材は高脂肪食負荷ラットの内臓脂肪蓄積抑制ならびに血中中性脂肪の正常化を行った。ヒト肝臓細胞を用いた評価においても、肝臓細胞から分泌される中性脂肪やコレステロールを低減させた。さらには、ビーグル犬の体重増加も緩和する事も判明した。現在、同素材は、抗メタボ用途で数社からのペットフードに活用されている。

10) 論文題名：プロテアーゼ処理挽き割り納豆からの ACE 阻害物質の精製・同定と高血圧自然発症ラットにおける納豆の血圧上昇抑制作用

著者名：嶋影 逸、新保 守、山田清繁、Ardiansyah、白川 仁、駒井三千夫、樋渡一之、戸松 誠、高橋砂織

雑誌名：食品・臨床栄養 e2011, 1-8 (2011)

要約：

血圧上昇抑制作用は、納豆の機能性の一つとして知られている。納豆はレニン-アンジオテンシン系の鍵酵素アンジオテンシン変換酵素 (ACE) を阻害することで、血圧上昇抑制作用を発揮していると推察されている。納豆の血圧上昇抑制作用に関しては、これまでいくつかの研究報告がなされているが、納豆由来の血圧上昇抑制物質については知見がほとんどない。我々は、ACE 阻害活性が通常の挽き割り納豆よりも約 1.5 倍高いプロテアーゼ処理挽き割り納豆より、ACE 阻害物質を精製・同定した。その結果同定された ACE 阻害物質には、新規な ACE 阻害ペプチド Ile-Ile, Ile-Asp, Ile-Phe-Tyr, Leu-Phe-Tyr 及び Leu-Tyr-Tyr が含まれることが判った。更にプロテアーゼ処理挽き割り納豆より粗抽出物を調製し、脳卒中易発性高血圧自然発症ラットに経口投与 (抽出物の投与量はラットの体重 1kg あたり 80mg) すると、有意な収縮期血圧降下を確認することができた。

11) 演題名 : **Internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin converting enzyme and carboxypeptidase Y**

著者名 : Saori Takahashi, Hiroki Ono, Takeshi Gotoh, Kumiko Yoshizawa-Kumagae, and  
Toshihiro Sugiyama

雑誌名 : *Biomedical Research*, **32**, 407-411 (2011).

発行日 : 2011 年 12 月 16 日

要約 :

Angiotensin I-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) is one of the most important enzymes in the renin-angiotensin system, a major blood pressure control system in mammals. We synthesized novel internally quenched fluorogenic (IQF) substrates for ACE based on the cleavage site of angiotensin I, introducing N-methyl anthranic acid (Nma) and N $\epsilon$ -2,4-dinitrophenyl-lysine (Lys(Dnp)) at the N- and C-terminal regions. Kinetic parameters of the synthesized IQF substrates Nma-Phe-His-Lys(Dnp) and Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro were compared with those of a common peptide substrate for ACE, hippuryl (Hip)-His-Leu. The  $k_{cat}/K_m$  values of Nma-Phe-His-Lys(Dnp), Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro, and Hip-His-Leu were 5.12, 1.90, and 0.80  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  for rabbit lung ACE, and 16.0, 7.36, and 0.30  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  for recombinant human (rh)-ACE, respectively. These results indicate that Nma-Phe-His-Lys(Dnp) is an excellent substrate for rh-ACE. Carboxypeptidase Y also hydrolyzed Nma-Phe-His-Lys(Dnp) efficiently with  $K_m$ ,  $k_{cat}$ , and  $k_{cat}/K_m$  values of 60.2  $\mu\text{M}$ , 105  $\text{s}^{-1}$ , and 1.74  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , respectively. On the other hand, carboxypeptidase B did not hydrolyze IQF substrates. The newly developed IQF substrate, Nma-Phe-His-Lys(Dnp), is a valuable tool for ACE and carboxypeptidase studies.

12) 論文題名 : **Starch properties of waxy rice cultivars influencing rice cake hardening**

著者名 : Ikuko Kodama, Chika Shibata, Naoko Fujita, Kyoko Ishiukawa,

Toru Takahashi, Yasunori Nakamura, Tomohiko Kawamoto, Kazunao Kato,

Kensuke Sato, Maya Matsunami, Yoshinobu Akiyama

雑誌名 : *Japan Journal of Food Engineering*, **12**, 157-162 (2011)

発行日 : 2011 年 12 月

要約 :

Hardening process in the manufacture of rice cakes is the most important process, because it is time-consuming process. We aimed to develop a new cultivar of waxy rice characterized by both high yield and excellent processing properties. For this purpose, the urea dissolution and X-ray diffraction (XRD) methods were employed in order to quantitatively assess the factors associated with rice cake hardness. In this study, rice starch dissolution rate and measurement of relative starch crystallinity (RSC) are discussed. It is supposed that dissolution rate and RSC are closely related to rice cake hardening, are suitable parameters for quantifying rice cake hardening, and are useful for predicting the hardness of new novel cultivars.

**13) 論文題名 : Lupeol supplementation improve blood pressure and lipid metabolism parameters in stroke-prone spontaneously hypertensive rats**

著者名 : Ardiansyah, Eri Yamaguchi, Hitoshi Shirakawa, Keishi Hata, Kazuyuki Hiwatashi, Kousaku Ohinat, Michio Komai

雑誌名 : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 183-185, 2012

発行日 : 2012 年 1 月 28 日

要約 :

Supplementation of lupeol (0.67 g/kg-1) to the AIN-93M-based diet and fed for 7 weeks of stroke-prone spontaneously hypertensive rats were significantly decreased in blood pressure compared with the controls group. The urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine was significantly lower in lupeol group. Finally, lupeol treatment affect on hepatic mRNA expression levels of genes involved in triglyceride and cholesterol synthesis.

**14) 論文題名 : レニン阻害活性を強化した味噌の開発**

著者名 : 高橋砂織、佐々木康子、渡辺隆幸

雑誌名 : *中央味噌研究所報告* **33**, 165-170 (2012)

発行日 : 2012 年 3 月 7 日

要約 :

高血圧の原因酵素であるレニンの阻害に大豆中のソヤサポニン I が関与していることから、本研究では大豆を使用した代表的な発酵食品である味噌のヒト型レニン阻害活性を詳細に検討した。サンプルとして供した全国の市販味噌 73 点、全国味噌鑑評会出品味噌 7 点、秋田県味噌醤油品評会出品味噌 16 点の味噌の抽出物はいずれもレニン阻害活性を示し、味噌には普遍的にレニンの働きを阻害する物質が含まれていることが示された。また、麹菌の違い、酵母、乳酸菌の添加の有無は味噌抽出物のレニン阻害活性に影響を与えないことを小仕込み試験で認めた。さらにソヤサポニン I を多く含むことが予想される大豆胚軸を味噌製造時に大豆の代替えとして使用することにより、最大で 2 倍のレニン阻害活性を有する味噌の製造が可能であることが示唆された。



## 7. 「秋田県総合食品研究センター報告」第1号～第13号総目次

(報文、研究ノート、総説)

### 第1号 (1999年)

#### 【原著論文】

- 「酒造好適米『吟の精』の選抜と酒造適性について」・・・・・・・・・・1-1  
○高橋 仁、田口隆信、渡辺誠衛、石川京子、田中健美、斎藤久一、佐無田隆、  
岩野君夫、石川雄章
- 「紫黒米を用いた赤色を有する清酒の製造について」・・・・・・・・・・1-8  
○高橋 仁、渡辺誠衛、佐渡高智
- 「秋田県産ブドウによる醸造適性試験」・・・・・・・・・・1-14  
○立花忠則
- 「DNA分析による秋田県奨励米1粒からの品種判別技術の開発」・・・・・・・・1-28  
○小笠原博信
- 「青大豆の豆腐加工適性について」・・・・・・・・・・1-35  
○秋山美展、高橋 徹、熊谷昌則、薛 文通
- 「中国における大豆関連商品に市場と加工技術の動向」・・・・・・・・1-48  
○秋山美展
- 「コアミ塩辛に関する研究 ―塩・アルコール併用による品質の向上―」・・・・1-62  
○戸松 誠、石川匡子、塚本研一、高橋光一、柴本憲夫
- 「しよっつる風味調味料の開発 ―市販・自家醸品の品質について―」・・・・1-69  
○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則

#### 【研究ノート】

- 「糖質関連酵素等を利用した大豆加工廃棄物からのオリゴ等類の  
生産について」・・・・・・・・・・1-79  
○高橋砂織、戸枝一喜
- 「ジュール加熱による液体連続加熱装置の開発」・・・・・・・・・・1-82  
○秋山美展
- 「玄米の発芽に伴うγ-アミノ酪酸の生成」・・・・・・・・・・1-85  
○大久長範、阿部雪子

### 第2号 (2000年)

#### 【原著論文】

- 「市販きりたんぼ鍋セットの品質特性  
―食品産業の視点からみたきりたんぼの伝承性と現代化の様相―」・・・・2-1  
○熊谷昌則、高橋 徹、畠 康子、大久長範
- 「しよっつる風味調味料の開発 (第2報) ―コウナゴによる試験醸造―」・・・・2-9

- 高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「しょつつる風味調味料の開発（第3報） —コアミによる試験醸造—」・・・ 2-17
- 高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「ホッケの高付加価値加工技術の開発 I —成分と鮮度—」・・・・・・・・・・ 2-25
- 塚本研一、戸松 誠、石川匡子、柴本憲夫、山田潤一
- 「ホッケの高付加価値加工技術の開発 I I —塩干品とスナック風食品—」・・・ 2-29
- 塚本研一、戸松 誠、折戸めぐみ、柴本憲夫、山田潤一
- 「ソフト清酒用酵母とそれを用いたソフト清酒の開発」・・・・・・・・・・ 2-36
- 渡辺誠衛、高橋 仁、田口隆信、中田健美、立花忠則、斎藤久一
- 「秋田味噌用乳酸菌AL-1の開発」・・・・・・・・・・ 2-45
- 渡辺隆幸、尾張かおる、高橋光一、伊藤信義

**【研究ノート】**

- 「ワラビ保存性の改善に及ぼす温度処理の効果」・・・・・・・・・・ 2-57
- 菅原久春、大久長範、小林昭一
- 「新しいタイプの市販清酒の調査」・・・・・・・・・・ 2-61
- 田中健美

**第3号（2001年）**

**【原著論文】**

- 「水稻新品種めんこいなの食味に関わる理化学的性質」・・・・・・・・・・ 3-1
- 大能俊久、高橋 徹、熊谷昌則、大久長範
- 「比内地鶏ガラの加工適性」・・・・・・・・・・ 3-6
- 熊谷昌則、高橋光一
- 「しょつつる風味調味料の開発（第4報）  
—小アジを用いたしょつつるの試験醸造—」・・・・・・・・・・ 3-12
- 高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「しょつつる風味調味料の開発（第5報）  
—グルコン酸を用いたしょつつるの試験醸造—」・・・・・・・・・・ 3-19
- 高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「秋田県産ハタハタずし製品の品質」・・・・・・・・・・ 3-25
- 塚本研一、戸松 誠、菅原真理、戸枝一喜、柴本憲夫、山田潤一
- 「粳穀の爆砕・蒸煮処理残渣及びその灰化物の諸性質」・・・・・・・・・・ 3-32
- 戸枝一喜、吉田 徹
- 「長期保存が可能な酒粕及び白色乾燥粕の開発  
—醸造副産物の有効利用に関する研究—」・・・・・・・・・・ 3-35
- 木村貴一

- 「膜電位計測型味覚センサによる清酒の評価」・・・・・・・・・・ 3-44  
 ○熊谷昌則、進藤 昌、渡辺誠衛
- 「秋田県産ブドウからのMLF乳酸菌の分離」・・・・・・・・・・ 3-49  
 ○大野 剛、立花忠則
- 「白神こだま酵母の学校給食用パンへの利用」・・・・・・・・・・ 3-57  
 ○熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織

**【研究ノート】**

- 「デジタルピペットの定量性と操作因子」・・・・・・・・・・ 3-65  
 ○秋山美展
- 「起泡特性を利用した簡便な大豆加工品サポニンの検知法について」・・・・・・・・ 3-68  
 ○堀 一之、辰巳英三、殷 麗君、張 曉峰、李 里特

**第4号 (2002年)**

**【原著論文】**

- 「きりたんぼ製造における製品の冷却特性」・・・・・・・・・・ 4-1  
 ○高橋 徹、熊谷昌則、佐々木康子、大久長範
- 「秋田県の伝統的食品『赤ずし』に関する微生物的考察」・・・・・・・・・・ 4-6  
 ○佐々木康子、菅原真理、柴本憲夫
- 「しよつつる風味調味料の開発 (第6報)  
 —ハタハタ・イワシを用いたしよつつるの試験醸造—」・・・・・・・・・・ 4-11  
 ○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「味噌のHEMF生成における仕込条件の影響」・・・・・・・・・・ 4-19  
 ○尾張かおる、高橋光一、渡辺隆幸
- 「γ-アミノ酪酸高含有米糠の製造法」・・・・・・・・・・ 4-25  
 ○戸枝一喜、青木淳子、熊谷 亮、伊藤 汎
- 「酒粕及び麹菌からの糖質関連有用物質の生産について」・・・・・・・・・・ 4-30  
 ○木村貴一、高橋慶太郎、立花忠則、高橋砂織
- 「遠心分離方式によする清酒の上槽工程自動化技術の開発」・・・・・・・・・・ 4-42  
 ○田口隆信、中田健美、立花忠則、斎藤久一
- 「栽培地区別醸造用ブドウの特徴およびワインの品質」・・・・・・・・・・ 4-50  
 ○戸松さやか、大野 剛、立花忠則

**【研究ノート】**

- 「焼成カルシウム存在下でボイル処理したエダマメ」・・・・・・・・・・ 4-59  
 ○大久長範、大能俊久、龐 中存
- 「学校給食用白神パンの品質に関する研究」・・・・・・・・・・ 4-62

○熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織

## 第5号(2003年)

### 【原著論文】

「米麴および市販米味噌の抗変異原性」・・・・・・・・・・・・・・・・・・5-1

○渡辺隆幸、尾張かおる、高橋光一、柴本憲夫

「安全、高品質な食品の製造に関する研究 ー米麴の製造法についての検討ー」・5-7

○柴本憲夫、渡辺隆幸、佐々木康子、菅原真理

「安全、高品質な食品の製造に関する研究 ーいぶり大根漬についてー」・・・・5-14

○佐々木康子、菅原真理、柴本憲夫

「攪拌式造粒 ー真空乾燥法によるぬか床用乳酸菌スターターの粉末化ー」・・・・5-21

○佐々木康子、菅原久春、鈴木聡美、柴本憲夫

「食品包装容器等のプラスチック素材のポータブル近赤外分光装置による判別」・・・・・・・・・・・・・・・・・・5-27

○熊谷昌則、天野敏男、小川信明

「秋田県産ハタハタずし製品の成分と官能評価」・・・・・・・・・・・・5-33

○塚本研一、戸松 誠、熊谷昌則、保刈美佳、戸枝一喜、船木 勉

「大豆および米遺伝資源試料の活性酸素消去活性とその相乗効果」・・・・5-40

○秋山美展、大久長範、高田吉丈、島田信二、山口誠之

「DNA鑑定による新奨励米『めんこいな』の品種判別技術の開発」・・・・5-48

○小笠原博信、高橋砂織

### 【研究ノート】

「無洗米の米飯テクスチャーと貯蔵による変化」・・・・・・・・・・・・5-55

○大能俊久、堀 一之、大久長範

「乾めんの電子顕微鏡による断面観察」・・・・・・・・・・・・5-58

○大久長範、大能俊久

### 【総説】

「秋田県産農水産物の生理機能性の解明とその応用・・・・・・・・5-61  
ー食材から化粧品素材へー」

○堀 一之、畠 恵司、高橋砂織



## 第6号 (2004年)

### 【原著論文】

- 「安全、高品質な食品の製造に関する研究  
—比内地鶏製品についての検討—」・・・・・・・・・・6-1  
○菅原真理、柴本憲夫
- 「安全、高品質な食品の製造に関する研究 —広域流通を目的とした賞味期限の  
長いきりたんぼの製造について—」・・・・・・・・・・6-8  
○佐々木康子、菅原真理、高橋 徹、熊谷昌則、柴本憲夫
- 「大豆種皮からの酵素処理によるマンノース、マンノオリゴ糖の製造法」・・・・・・・・6-13  
○戸枝一喜、保刈美佳
- 「稲庭うどん製造工程への携帯方近赤外分光装置の適用」・・・・・・・・・・6-18  
○熊谷昌則、大久長範、小川信明
- 「温度感受性味噌酵母とその利用」・・・・・・・・・・6-25  
○高橋慶太郎、渡辺隆幸、秋山美展
- 「新しい吟醸酒用自動製麹機の開発と吟醸酒の醸造試験」・・・・・・・・・・6-32  
○田口隆信、高橋 仁、渡辺誠衛、新野葉子、中田健美、立花忠則、斎藤久一

### 【研究ノート】

- 「加熱処理が米粉の糊化特性に与える影響」・・・・・・・・・・6-41  
○高橋 徹、三浦 靖、小林昭一

### 【総説】

- 「新しい活性酸素種およびその消去成分の検出・定量」・・・・・・・・・・6-45  
○秋山美展、大久保一良
- 「秋田味噌醤油品評会出品物分析結果のまとめ」・・・・・・・・・・6-50  
○尾張かおる、渡辺隆幸、高橋光一

## 第7号 (2005年)

### 【原著論文】

- 「近赤外スペクトルによるビールのパターン認識分類」・・・・・・・・・・7-1  
○熊谷昌則、高橋 豊、進藤 昌、小川信明
- 「味覚センサによる市販食用塩の味質評価」・・・・・・・・・・7-6  
○熊谷昌則、三浦幸子、杉本真帆、石川匡子、松永隆司
- 「マンナナーゼ生産菌の分離と培養条件の検討」・・・・・・・・・・7-12  
○戸枝一喜、保刈美佳
- 「食品の加熱工程における加熱履歴表現モデルの構築」・・・・・・・・・・7-17  
○秋山美展、高橋 徹、大久長範、長縄明大
- 「高品質味噌を目的とする県産大豆の蒸煮条件の検討」・・・・・・・・・・7-23

○尾張かおる、渡辺隆幸

「秋田県産酒造原料米における酒造適性の経年変動」・・・・・・・・・・7-31

○高橋 仁、渡辺誠衛、大野 剛、田口隆信、中田健美、立花忠則、田口トモ子

「色素培地を用いた優良酵母の育種とその酒造適性」・・・・・・・・・・7-38

○渡辺誠衛、新野葉子、田口隆信、高橋 仁、大野 剛、中田健美、立花忠則

#### 【研究ノート】

「秋田酒こまちと蕎麦におけるγ-アミノ酪酸の分布」・・・・・・・・・・7-47

○大久長範、大能俊久、高橋 仁

「食品工場におけるカビの発生事例」・・・・・・・・・・7-49

○佐々木康子、菅原真理

「県産味噌のイソフラボン量と配糖体、アグリコンの比率」・・・・・・・・・・7-53

○渡辺隆幸、尾張かおる、高橋慶太郎

「食用担子菌類が持つ各種酵素活性」・・・・・・・・・・7-57

○樋渡一之、小笠原博信、堀 一之、高橋砂織

#### 【総説】

「安全、高品質な食品製造に関する研究 ―秋田県内中小企業食品製造工場におけるHACCP簡易構築の取り組み―」・・・・・・・・・・7-61

○菅原真理、佐々木康子

### 第8号 (2006年)

#### 【原著論文】

「加熱処理による米粉の改質ならびにその調理・加工適性の解明」・・・・・・・・8-1

○高橋 徹、三浦 靖、小林昭一

「米味噌の脂肪酸エチルエステル生成に与える種麴、酵母と酵素剤の影響」・・・・8-7

○渡辺隆幸、尾張かおる、堀 一之

「ジュンサイの品質向上技術の開発 ―黒変解明と黒変除去―」・・・・・・・・8-15

○杉本勇人、塚本研一、山田幸樹

#### 【研究ノート】

「カバノアナタケ抽出液の保存方法」・・・・・・・・・・8-23

○大久長範、今野祐子

#### 【総説】

「秋田県産農水産物に含まれる生理活性物質  
―癌転移抑制物質の探索研究―」・・・・・・・・・・8-27

○畠 恵司、堀 一之、高橋砂織

## 第9号 (2007年)

### 【原著論文】

- 「大豆リュウホウを用いた高品質味噌製造の検討  
—多麴および新規麴菌の利用—」・・・・・・・・・・9-1  
○尾張かおる、渡辺隆幸
- 「秋田の水のミネラルバランスと味覚センサ応答パターン」・・・・・・・・・・9-5  
○熊谷昌則、大野 剛、高橋 仁、中田健美
- 「北東北産雑穀類の利用 (第1報) —雑穀麴パンの製造試験—」・・・・・・・・・・9-10  
○畑山 誠、秋山美展、高橋慶太郎
- 「北東北産雑穀類の利用 (第2報) —雑穀麴みその製造試験と抗変異原性—」・9-15  
○畑山 誠、渡辺隆幸、尾張かおる、高橋慶太郎
- 「アルコール感受性酵母を用いた新しいタイプの清酒の開発」・・・・・・・・・・9-20  
○渡辺誠衛、大野 剛、田口隆信

### 【総説】

- 「清酒業界における密度測定について  
—浮ひょうと振動式密度計との測定値の比較—」・・・・・・・・・・9-27  
○若林三郎

### 【解説】

- 「特許制度と各種支援制度について」・・・・・・・・・・9-35  
○佐々木康子

## 第10号 (2008年)

### 【原著論文】

- 「色素培地を用いた交雑法による吟醸酒用酵母の育種」・・・・・・・・・・10-1  
渡辺誠衛、田口隆信、高橋 仁、大野 剛
- 「フキノトウ由来生理機能性成分の評価と発酵食品への応用」・・・・・・・・・・10-9  
渡辺隆幸、堀 一之
- 「秋田の地下水・湧水の水質特性の解析」・・・・・・・・・・10-14  
熊谷昌則、大野 剛、高橋 仁、吉田知司
- 「放線菌由来の耐熱性生澱粉分解酵素のクローニング」・・・・・・・・・・10-19  
“Molecular cloning of a thermostable raw starch digesting amylase gene from a  
*Streptomyces* sp.”  
金子隆宏

### 【総説】

- 「脳機能計測による新しい食品の評価法の開発」・・・・・・・・・・10-29

熊谷昌則、高橋徹、佐藤文華、渡部雅美、堀一之、樋渡一之、戸枝一喜、  
秋山美展

### 第11号 (2009年)

- 「高齢者の嗜好に合致した加工食品の開発と品質評価技術」・・・ 11-1  
高橋 徹、塚本研一、戸枝一喜、秋山美展、熊谷昌則
- 「生澱粉分解酵素の酵母による高発現」・・・ 11-9  
金子隆宏、戸松 誠
- 「秋田県の伝統食品「こざきねり」の商品化への取り組み」・・・ 11-13  
菅原真理，加藤明津子，佐藤文華，菅原千秋，高橋徹，熊谷昌則

### 第12号 (2010年)

#### 【原著論文】

- 「食品の外観嗜好評価時における前頭前野局所脳血流動態の解析」・・・ 12-1  
熊谷昌則、渡部素子、菅原千秋、高橋徹、秋山美展\*  
(\*秋田県立大学生物資源科学部)
- 「ハタハタ白子の素材化とその利用例について」・・・ 12-7  
菅原千秋、保莉美佳、加藤明津子、高橋徹、塚本研一、熊谷昌則
- 「秋田酵母 No. 12 と秋田酵母 No. 15 の開発」・・・ 12-14  
渡辺誠衛、田口隆信、高橋仁、大野剛
- 「マイタケ (*Grifola frondosa*) による米飯テクスチャーの改良」・・・ 12-24  
大能俊久

#### 【研究ノート】

- 「乳酸菌の神経成長因子様活性」・・・ 12-29  
戸松 誠、木村貴一、戸枝一喜\*  
(\*東京農業大学生物産業学部)

#### 【総説】

- 「フキノトウの抗肥満効果に関する研究」・・・ 12-33  
渡辺隆幸

- 「清酒醸造における蒸米タンパク質の酵素分解に関する研究」・・・12-47  
高橋仁、伊藤俊彦\*、佐藤勉\*\*、岩野君夫\*  
(\*秋田県立大学生物資源科学部、\*\* (株) 秋田今野商店)

## 第13号 (2011年)

### 【原著論文】

- 「NIRSによる脳血流変化量に基づく嗜好性判断」・・・13-1  
熊谷昌則
- 「蓄養による雌ハタハタの品質保持技術の開発」・・・13-7  
塚本研一、船木勉\*  
(\*秋田県農林水産技術センター・水産振興センター)
- 「清酒もろみへの糖添加を利用した新規酒造技術の検討」・・・13-17  
大野剛、高橋仁、杉本勇人、田口隆信
- 「有色米を原料とした新規甘味素材の試作」・・・13-24  
金子隆宏

### 【研究ノート】

- 「加熱初期に米粒から離脱する成分とデンプンを添加して炊飯した米飯の特徴」・・・13-31  
大能俊久
- 「秋田県大滝温泉水を用いた味噌小仕込み試験」・・・13-35  
渡辺隆幸、佐藤恵里

### 【総説】

- 「食品成分によるメタボリックシンドローム予防・改善効果に関する研究」・・・13-39  
樋渡一之

8. 「秋田県総合食品研究所報告」第1号～第14号人名索引  
(報文、研究ノート、総説)

[号 - ページ、太字下線は筆頭著者を示す。]

【あ】

- 青木淳子 [4-25]  
秋山美展 [1-35, 1-48, 1-82, 3-65, 5-40, 6-25, 6-45, 7-17, 9-10, 11-1, 12-1]  
阿部雪子 [1-85]  
天野敏雄 [5-27]  
石川京子 [1-1]  
石川匡子 [1-62, 2-25, 7-6]  
石川雄章 [1-1]  
伊藤俊彦 [12-47]  
伊藤信義 [2-45]  
伊藤 汎 [4-25]  
岩野君夫 [1-1]  
大久保良一 [6-45]  
大能俊久 [3-1, 4-59, 5-55, 5-58, 7-47, 12-24, 13-31, 14-27]  
大野 剛 [3-49, 4-50, 7-31, 7-38, 9-5, 9-15, 10-1, 10-14, 12-14, 13-17, 14-8]  
大久長範 [1-85, 2-1, 2-57, 3-1, 4-1, 4-59, 5-40, 5-55, 5-58, 6-18, 7-17, 7-47,  
8-23]  
小笠原博信 [1-28, 5-48, 7-57, 14-48]  
小川信明 [5-27, 6-18, 7-1]  
折戸めぐみ [2-29]  
尾張かおる [2-45, 4-19, 5-1, 6-50, 7-23, 7-53, 8-7, 9-1, 9-15]

【か】

- 加藤明津子 [11-13, 12-7]  
金子隆宏 [10-19, 11-9, 13-24]  
木村貴一 [3-35, 4-30, 12-29]  
熊谷昌則 [1-35, 1-69, 2-1, 2-9, 2-17, 3-1, 3-6, 3-12, 3-19, 3-44, 3-57, 4-1,  
4-11, 4-62, 5-29, 5-33, 6-8, 6-18, 7-1, 7-6, 9-5, 10-14, 10-29, 11-1,  
11-13, 12-1, 12-7, 13-1, 14-1, 14-19]  
熊谷 亮 [4-25]  
小林昭一 [2-57, 6-41, 8-1]  
今野祐子 [8-23]

【さ】

- 斎藤久一 [1-1, 2-36, 4-42, 6-32]

佐々木 玲 [14-19]  
 佐々木(畠)康子 [2-1, 4-1, 4-6, 5-7, 5-14, 5-21, 6-8, 7-49, 7-61, 9-35]  
 佐渡高智 [1-8]  
 佐藤恵里 [13-35]  
 佐藤 勉 [12-47]  
 佐藤智美 [14-8]  
 佐藤文華 [10-29, 11-13]  
 佐無田隆 [1-1]  
 柴本憲夫 [1-62, 1-69, 2-9, 2-17, 2-25, 2-29, 3-12, 3-19, 3-25, 4-6, 4-11, 5-1, 5-7, 5-21, 6-1, 6-8]  
 島田信二 [5-40]  
 進藤 昌 [3-44, 7-1]  
 菅原千秋 [11-13, 12-1, 12-7]  
 菅原真理 [3-25, 4-6, 5-7, 5-14, 6-1, 6-8, 7-49, 7-61, 11-13]  
 菅原久春 [2-57, 5-21]  
 杉本真帆 [7-6]  
 杉本勇人 [8-15, 10-1, 13-17]  
 鈴木聡美 [5-21]  
 【た】  
 高田吉丈 [5-40]  
 高橋慶太郎 [3-57, 4-30, 4-62, 6-25, 7-53, 9-10, 9-20]  
 高橋光一 [1-62, 1-69, 2-9, 2-17, 2-45, 3-6, 3-12, 3-19, 4-11, 4-19, 5-1, 5-14, 6-50]  
 高橋砂織 [1-79, 3-57, 4-30, 4-62, 5-48, 5-61, 7-57, 8-27, 14-23, 14-31]  
 高橋 徹 [1-35, 2-1, 3-1, 4-1, 6-8, 6-41, 7-17, 8-1, 10-29, 11-1, 12-1, 12-7, 14-19]  
 高橋 仁 [1-1, 1-8, 2-36, 6-32, 7-31, 7-38, 7-47, 9-5, 10-1, 10-14, 12-14, 12-47, 13-17, 14-8]  
 高橋 豊 [7-1]  
 田口隆信 [1-1, 2-36, 4-42, 6-32, 7-31, 7-38, 9-20, 10-1, 12-14, 13-17, 14-8]  
 田口トモ子 [7-31]  
 立花忠則 [1-14, 2-36, 3-49, 4-30, 4-42, 4-50, 6-32, 7-31, 7-38]  
 辰巳英三 [3-68]  
 塚本研一 [1-62, 2-25, 2-29, 3-25, 5-33, 8-15, 11-1, 12-7, 13-7]  
 戸枝一喜 [1-79, 3-25, 3-32, 4-25, 5-33, 6-13, 7-12, 10-29, 11-1, 12-29]  
 戸松さやか [4-50]  
 戸松 誠 [1-62, 1-69, 2-9, 2-17, 2-25, 2-29, 3-12, 3-19, 3-25, 4-11, 5-33, 11-9, 12-29]

【な】

中田健美 [1-1, 2-36, 2-61, 4-42, 6-32, 7-31, 7-38, 9-5]  
長縄明夫 [7-17]  
新野葉子 [6-32, 7-38]

【は】

畠 恵司 [5-61, 8-27, 14-23]  
畑山 誠 [9-10, 9-15]  
樋渡一之 [7-57, 10-29, 13-40, 14-23]  
船木 勉 [5-33, 13-7]  
保刈美佳 [5-33, 6-13, 7-12, 12-7]  
堀 一之 [3-68, 5-55, 5-61, 7-57, 8-7, 8-27, 10-9, 10-29, 14-23]

【ま】

松永隆司 [7-6]  
三浦幸子 [7-6]  
三浦 靖 [6-41, 8-1]

【や】

山口誠之 [5-40]  
山田幸樹 [8-15]  
山田潤一 [2-25, 2-29, 3-25]  
吉田知司 [10-14]  
吉田 徹 [3-32]

【わ】

若林三郎 [9-27]  
渡辺誠衛 [1-1, 1-8, 2-36, 3-44, 6-32, 7-31, 7-38, 9-20, 10-1, 12-14, 14-8]  
渡辺隆幸 [2-45, 4-19, 5-1, 5-7, 6-25, 6-50, 7-23, 7-53, 8-7, 9-1, 9-15, 10-9, 12-33, 13-35]  
渡辺雅美 [10-29]  
渡部素子 [12-1]

【他】

薛 文通 [1-35]  
殷 麗君 [3-68]  
張 曉峰 [3-68]  
李 里特 [3-68]  
龐 中存 [4-59]



## 秋田県総合食品研究センター報告規定

### 【総則】

1. 秋田県総合食品研究センター報告は、食品研究に関する幅広い分野の原著論文（報文及び研究ノート）、総説、特許の要約、学会発表要旨及び既報論文再録等を掲載する。原著論文（報文及び研究ノート）は独創的なものであり、価値ある新事実や結論を含むものでなければならない。
2. 投稿者は、原則として秋田県総合食品研究センターの職員とする。
3. 論文の用語は、原則として日本語とする。

### 【掲載論文の種類】

原著論文（報文及び研究ノート）と総説の2種類とする。原著論文は、論文として未発表のものに限る。ただし、講演要旨、会議議事録などに発表した内容を投稿することは妨げない。

### 【掲載論文等のページ数と注意事項】

（報文及び総説）論文自身が独立しており、完結した内容でなければならない。論文の長さは特に限定しないが、10ページ程度であることが望ましい。

（研究ノート）限られた部分の発見や、新しい実験方法など、報文としてはまとまらないものであっても、報告する価値のあるもの。論文は、4ページ以内にまとめること。

（特許の要約）1/2ページにまとめること。

（学会発表要旨）1ページ以内にまとめること。

（外部発表論文要約）外部発表論文や著書等について、論文題名、著者名、雑誌もしくは著書名、巻、最初と最後のページ及び発表年を記載するとともに、要約を1ページ以内に記載する。

### 【審査】

1. 原著（報文及び研究ノート）及び総説に関しては、複数の編集委員によりその論文の価値判断がなされ、掲載の可否が決定される。
2. 編集委員は、論文の内容、文章などについて著者に改正を助言し、あるいは疑義の解明を求めることが出来る。
3. 編集委員の質問や意見に対して明確な回答がなされた場合には、速やかに修正原稿を提出しなければならない。

### 【原稿の書き方】

1. 一般的注意事項：論文の記述は正確を期し、全編にわたり簡潔明瞭であること。
2. 原稿は、「Word」を用いて作成し、A4版縦長様式で提出すること。
3. 原稿の書体は、原則として明朝体を用い、表題は18ポイント、本文は12ポイントとし、読みやすいように明瞭に印字すること。
4. 原稿は、オフセット印刷となるので、上下、左右には2.5 cmの余白を設ける。

### 【論文の形式】

1. 報文は、次の形式をとる。
  - (1) 要約、(2) 緒言、(3) 実験方法、(4) 結果、(5) 考察、(6) 引用文献の順とする。謝辞は、文献の前に入れる。
2. 研究ノートは、次の形式をとる。
  - (1) 緒言、(2) 実験方法、(3) 結果と考察、(4) 引用文献とする。
3. 総説は、特に形式にこだわらないが、最初に要約を付ける。
4. 図表は、本文中では図1あるいは表1などと表記する。
5. 引用文献は、本文中の該当人名や事項の後に上付き小文字で、秋田県<sup>1)</sup>、や総食研<sup>2-4)</sup>などのように番号を付し、そのリストを一括して引用文献の項に記載する。
6. 投稿中の論文、私信、未発表結果は、引用文献に入れず本文中に括弧で示し引用する。
7. 本文中に他の論文の著者名を引用する場合には、混乱の起こらない限り姓のみとする。著者が2名の論文は、両者の姓を併記し、3名以上の場合は、筆頭著者以外を「他」と略記する。
8. 定義を必要とする略号や記号の使用は最小限にとどめる。使用するときには、初出の箇所に正式名を書き、続けて括弧内に略号をいれる。用いた略号は文末（引用文献のあと）に一括して表示する。また、表題には略号を用いない。

### 【引用文献】

1. 引用文献には、本文中での引用順に番号を付けて記載する。
2. 引用文献は、著者名、雑誌名もしくは著書名、巻、号、最初と最後のページ、発行年の順に記載する。
3. 著者名は、姓名とも記し、全著者名を記載する。
4. 欧文雑誌は、イタリック、巻はボールドとする。
5. 和文誌名は、科学技術文献速報、また、欧文誌名は、*Chemical Abstract* や *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 投稿規定等を参照のこと。

【単位と物質の名称】種々の物質単位及びその用語や記号は、国際単位系・SI(metric system)を基本とする。常用的に用いられている物質名のうち、極めて使用頻度が高く、使い方が国際的に統一されている物質名は、定義なしで使用できる。

【学名】学名にはイタリックを用いる。

本規定は平成11年4月1日より施行する。

平成21年4月1日、一部改正

平成23年4月1日、一部改正

秋田県総合食品研究センター報告  
第14号

委員長 田口 博  
副委員長 高橋 砂織

委員 塚本 研一  
同 熊谷 昌則  
同 進藤 昌  
同 高橋 仁  
同 小笠原 博信  
同 尾張 かおる

発行 平成24年12月25日  
発行者 秋田県総合食品研究センター  
〒010-1623  
秋田市新屋町字砂奴寄 4-26  
電話：018-888-2000（代）  
FAX：018-888-2008  
<http://www.arif.pref.akita.jp/>

【無断複製を禁ず】

