

秋田県総合食品研究センター報告

第 15 号

平成 25 年 (2013 年)

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

No. 15, 2013



醪の渋皮

☆渡邊誠衛他
「清酒成分に与える醪の
渋皮除去の影響」p.1

AOK139

親株



AOK139

-WS61

トランスポゾン

Crawler

による白色株



白色分生子

☆小笠原博信他
「トランスポゾン転移技術を利用した白色
麹菌株の育種と発酵食品への応用」p.19



雄及び雌ハタハタ

☆青柳・高橋(砂)他
「しよつるのアンギオテンシン
変換酵素阻害活性」p.8



アミノ酸分析装置

☆大能俊久他
「秋田県産米の遊離糖と
アミノ酸に関する研究」p.37

目 次

1. 原著論文（報文）	
1) 「清酒成分に与える醪の渋皮除去の影響について」・・・・・・・・・・	1
○渡邊誠衛、佐藤智美、大野 剛、高橋 仁	
2) 「しょっつるのアンギオテンシン変換酵素阻害活性」・・・・・・・・・・	8
青柳智則、横田早希、後藤 猛、塚本研一、○高橋砂織	
3) 「トランスポゾン転移技術を利用した白色麹菌株の育種と 発酵食品への応用」・・・・・・・・	19
○小笠原博信、佐々木康子、渡辺隆幸、佐藤 勉、瓜生 摂、 今野 宏、高橋砂織	
2. 原著論文（研究ノート）	
1) 「キシロースからコハク酸を生産する細菌の分離とその特性」・・	29
○戸松さやか、木村貴一、進藤 昌	
2) 「餅生地硬化性に及ぼす糯米の糊化特性」・・・・・・・・・・	33
○高橋 徹、佐々木 玲、熊谷昌則	
3) 「秋田県産米の遊離糖と遊離アミノ酸に関する研究」・・・・・・・・	37
○大能俊久、伊藤善輝	
3. 総説	
1) 「豆類由来アンギオテンシン変換酵素阻害物質」・・・・・・・・・・	41
○高橋砂織	
4. 特許の概要（3件）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	55
5. 学会発表概要（31件）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	57
6. 外部発表論文概要（8件）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	83
7. 秋田県総合食品研究センター報告規程・・・・・・・・・・・・	87

1. 原著論文（報文）（3 件）

- 1) 「清酒成分に与える醪の渋皮除去の影響について」
○渡邊誠衛、佐藤智美、大野 剛、高橋 仁
- 2) 「しょっつるのアンギオテンシン変換酵素阻害活性」
青柳智則、横田早希、後藤 猛、塚本研一、○高橋砂織
- 3) 「トランスポゾン転移技術を利用した白色麹菌株の育種と発酵食品への応用」
○小笠原博信、佐々木康子、渡辺隆幸、佐藤 勉、瓜生 摂、今野 宏、
高橋砂織

清酒成分に与える醪の渋皮除去の影響について

渡邊誠衛、佐藤智美、大野 剛、高橋仁
(秋田県総合食品研究センター 酒類グループ)

Seiei WATANABE, Tomomi SATO, Tsuyoshi OHNO, Hitoshi TAKAHASHI

【諸言】

近年、清酒の多様化、差別化、そして、より一層の高品質化を目的として積極的な優良清酒酵母の分離・育種が広く行われており、その実用株の開発が進められている。古くは、秋山ら¹⁾が、蔵元より泡無し酵母を分離し、大内ら²⁾はきょうかい7号酵母からフローズンフローテーション法により泡無し変異株を取得し、清酒製造の合理化に大きく貢献した。現在では、きょうかい601号、きょうかい701号、きょうかい901号酵母を始め、多くの酵母が泡無し化され、全国の蔵元で使用されている。

清酒醪で高泡を形成する泡有り酵母は、醪の泡の状ぼうで発酵状況を確認できるメリットがある反面、泡消し機の使用や、タンクの泡の清掃などの労力を必要とする。一方、泡無し酵母は、気泡に付着しないため醪で発酵が旺盛な時期でも“高泡”を形成しないため、仕込みの量を多くできることや、泡の清掃が不要なことなどのメリットがある³⁾。泡無し酵母の醪の状ぼうは、醪の中期の“玉泡”を過ぎた後“坊主”“チリメン泡”または“渋皮”になる場合と“厚蓋”や“飯蓋”になることが知られている⁴⁾。

我々は、蔵元で泡無し酵母を使用した吟醸酒造りの際、醪の厚い“渋皮”の発生を多く見ており、その存在の意義について考えてきた。管野ら⁵⁾は、醪後半の表面の厚い皮、いわゆる“地ブタ”の形成は米デンプンの胚乳細胞膜に酵母が凝集し、それが発酵と共に浮き上がって形成すると報告しているが、酵母の死滅率や、香気成分の飛散防止などの面で解明されていない部分が多い。

本報では、醪の“渋皮”の除去がその後の醪の発酵や成分に与える影響について検討し、“渋皮”存在について2、3の知見が得られたので報告する。

【実験方法】

1. 仕込み試験

原料米は、精米歩合70%のあきたこまちを使用し、総米1kgで行った。表1に示した仕込配合で3段仕込みで行った。酵母は、こまち酵母⁶⁾を使用し、品温は、恒温水槽により制御し、最高温度は12℃で純米酒を製造した。

表1 小仕込配合

	初添	仲添	留添	計
総米 (g)	233	307	460	1000
蒸米 (g)	154	253	387	794
麴米 (g)	80	53	73	206
水 (ml)	300	420	680	1400

2. 渋皮の除去

小仕込試験で、”渋皮“を除去しない醪を対照とし、除去した醪を試験区とした。”渋皮“の除去は、醪の表面に“渋皮”が発生した時点から2～3日毎に除去し、完全になくなるまで継続した。具体的には、醪日数が11日目、13日目、16日目、20日目、22日目、24日目、26日目、29日目、32日目、35日目、38日目の11回で、櫛入れとサンプリングをする前にザルで醪表面の“渋皮”のみをすくった。

3. 長期醪試験

醪の“渋皮”の除去がその後の醪の発酵や成分に与える影響について検討するために、長期醪試験を行った。実際の酒造りではありえないが、具体的には、酵母のメチレンブルー染色率が100%になるまで上槽を行わず、10℃で可能な限り発酵させ、醪の成分変化と酵母の状態を観察した。

4. 成分分析

醪をサンプリング後、遠心分離(10000rpm、10分)により上清を得た。上清について国税庁所定分析法注解⁷⁾に基づき、一般成分と香気成分を測定した。香気成分は、ガスクロマトグラフィーを用いて、ヘッドスペース法⁸⁾で測定した。

また、酵母密度と酵母の死滅率を指標としたメチレンブルー染色率は、トーマ氏の血球計を用いて測定した⁹⁾。

【結果と考察】

1. “渋皮”の発生と除去

当センターで試験した総米140kgの醪の状ぼうを参考までに図1～図3に示した。醪表面の“渋皮”はアルコール度数が12%を超えると発生した。初期段階では、部分的に白い薄い油様の膜から発生し、醪日数が長くなるにつれて全面が厚い“渋皮”に覆われた。泡無し酵母を使用した場合、泡が出ないため醪の状ぼうで発酵の程度を判断することが困難であるが、今回の結果から、“薄渋皮”の発生がアルコール12%の指標になることが分かった。



図1 玉泡 (醪 10 日目)



図2 薄渋皮 (醪 12 日目)



図3 渋皮 (醪 15 日目)



図4 厚渋皮 (醪 20 日目)

“渋皮”の除去は、薄い“渋皮”が発生した醪 11 日目から 2～3 日毎に行い、“渋皮”がなくなる醪 29 日目まで 11 回行った。

2. 酵母の変化

“渋皮”が発生した醪 11 日目から“渋皮”を除去した醪と、除去しない醪の酵母密度と、酵母の死滅率を指標としたメチレンブルー染色率を比較した。本試験では、“渋皮”除去の影響を長期的に観察するために、通常の上槽目標成分を設定せず、酵母のメチレンブルー染色率が約 100%になる 43 日まで発酵を継続した。

酵母密度とメチレンブルー染色率の挙動を図 5～図 6 に示した。なお、図 5 のグラフ中に“渋皮”を除去した日に矢印を記入した。

対照の“渋皮”を除去しない醪に比べ、“渋皮”を除去した醪は、酵母密度が 1.2×10^8 cells/ml まで急激に減少し、メチレンブルー染色率は、除去した醪の染色率がやや低めに推移した。“渋皮”を除去した 11 日目の醪の“渋皮”区分と醪区分の酵

母密度を測定した結果、醪区分が 1.53×10^8 cells/ml で、“渋皮”区分が 6.83×10^8 cells/ml であったことから、“渋皮”中には多量の酵母が存在しており、“渋皮”を除去することにより醪中の酵母数が少なくなったことが原因であることが確認された。

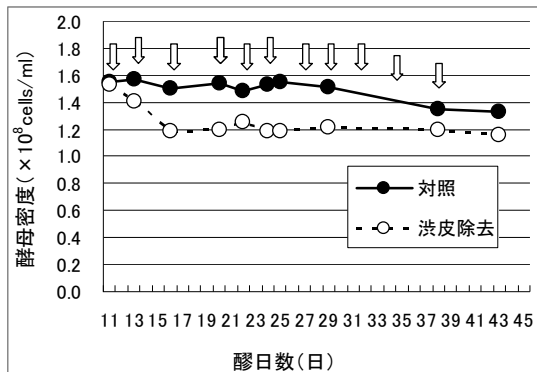


図5 酵母密度の変化

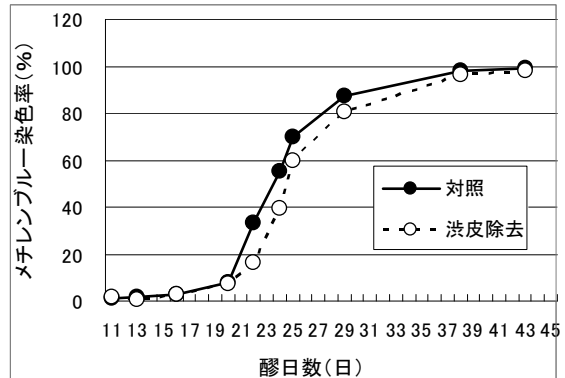


図6 メチレンブルー染色率の変化

3. 一般成分の変化

“渋皮”が発生する前日の醪 10 日目の成分は、ボーメ 3.5、アルコール 11.1%、酸度 1.40、アミノ酸度 0.70、グルコース 4.1%、ピルビン酸 265ppm だった。“渋皮”が発生した醪 11 日目から“渋皮”を除去した醪と、除去しない醪の成分を比較した。

アルコール度数、日本酒度の挙動を図 7 と図 8 に示した。“渋皮”を除去することにより、アルコールの生成速度が遅くなり、アルコールの生成量が少なくなった。関連して、日本酒度の減少も醪 24 日目まで緩慢になり、その後の長期醪では、いわゆる後溶けは高く推移した。“渋皮”を除去することにより醪中の酵母数が少なくなったことが発酵の緩慢の原因であることが確認された。

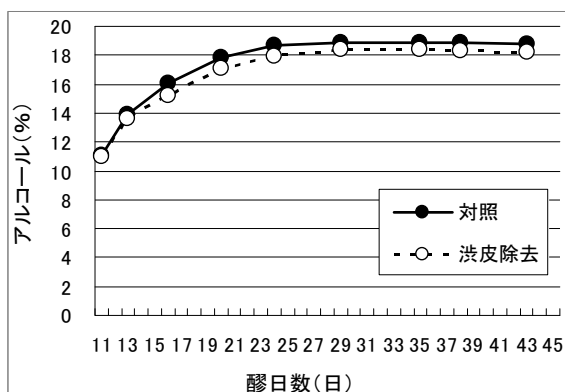


図7 アルコール度数の変化

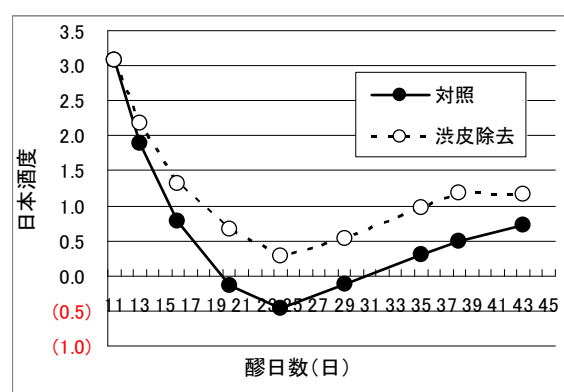


図8 日本酒度の変化

酸度とアミノ酸度の挙動を図 9 と図 10 に示した。“渋皮”を除去することにより、酸度の変化は確認されなかったが、アミノ酸度が少なく推移した。原らは¹⁰⁾、清酒醪

で酵母が死滅することにより、アミノ酸が増加する要因について詳細に報告している。“渋皮”を除去することにより、醪中の酵母のメチレンブルー染色率が低くなり、アミノ酸が減少したことは、それらを裏付ける結果となった。

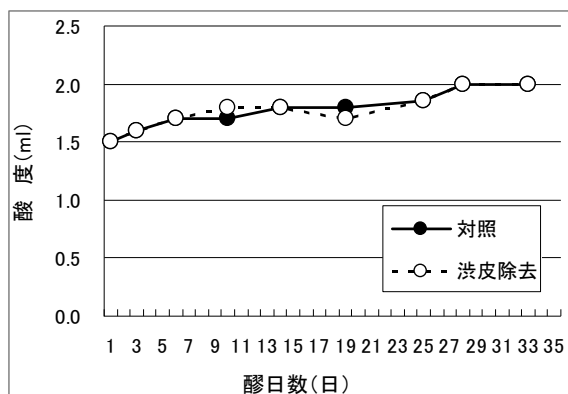


図9 酸度の変化

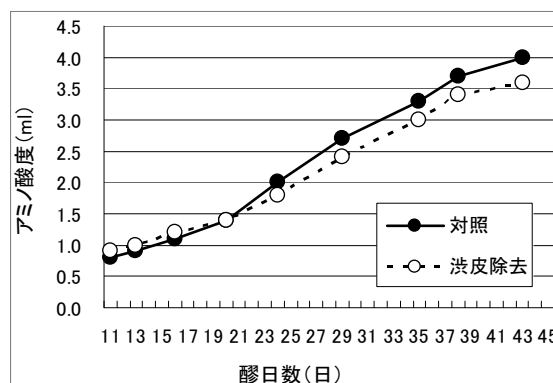


図10 アミノ酸度の変化

4. 香気成分の変化

清酒の主要な香気成分の酢酸エチル、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、カプロン酸エチルの4成分の挙動を図11～図14に示した。一般的な清酒は、成分値から判断して25日目付近で上槽するケースが多く、その範囲内では、4成分共に“渋皮”を除去した醪と除去しない醪では差異はなかった。醪日数を45日まで長期醪で観察すると、4成分共に減少する傾向が確認された。特に、酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルに減少が顕著であり、“渋皮”を除去した醪のほうが減少が大きかった。

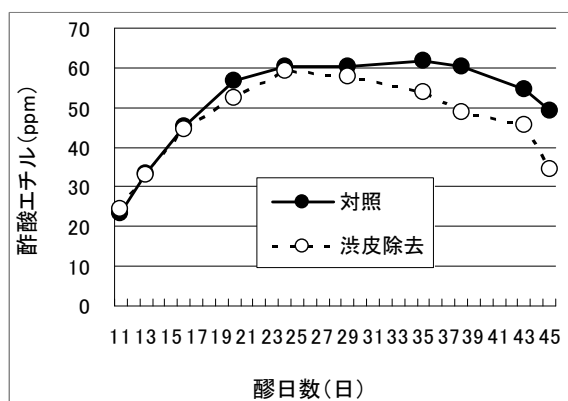


図11 酢酸エチルの変化

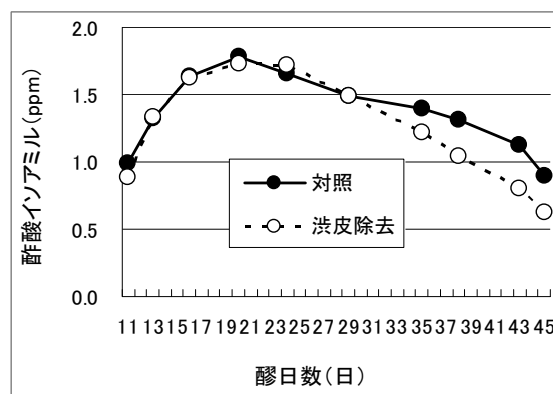


図12 酢酸イソアミルの変化

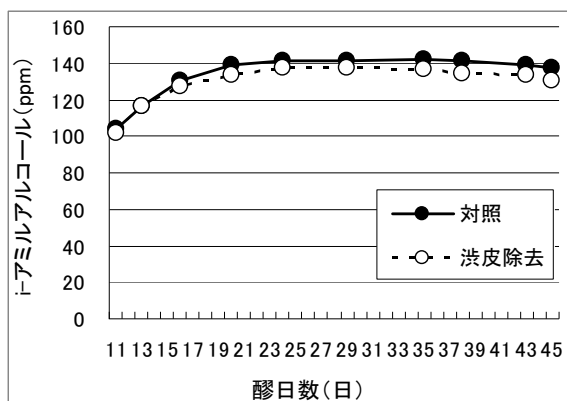


図 13 イソアミルアルコールの変化

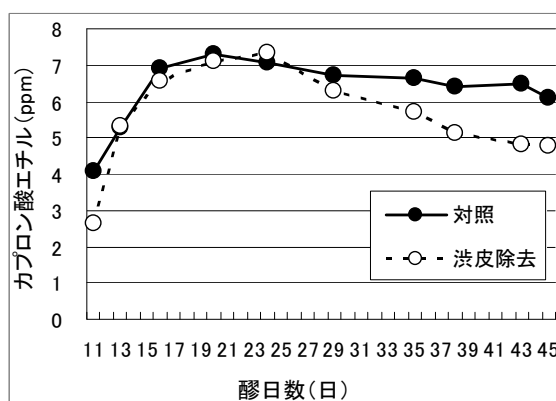


図 14 カプロン酸エチルの変化

以上の結果から、“渋皮”を除去した醪の発酵能の低下は、“渋皮”除去による酵母の減少によることが原因と考える。また、“渋皮”を除去した醪のアミノ酸の減少は、酵母数の減少と、酵母の死滅率の指標となるメチレンブルー染色率が低いこと、加えて“渋皮”の何らかの成分による相乗効果であると推察される。

長期醪による香気成分、特に酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの減少が“渋皮”を除去した醪に顕著であることは、推察の域は出てはいないが、“渋皮”による香気成分の飛散の防止や、何らかの影響により香気成分の分解が促進されていると考えられ、今後、詳細な検討が必要と思われる。

【引用文献】

- 1) 秋山裕一、岩田知栄子、長縄真琴 (1965) 泡なし酵母に関する研究 醗酵工学会誌 43, 629-634.
- 2) OUCHI K., and AKIYAMA H., (1971) Non-foaming Mutants of Sake Yeasts Selection by Cell Agglutination Method and by Froth Flotation Method, *Agricultural and Biological Chemistry*, 35, 1024-1032.
- 3) 布川弥太郎、大内弘造 (1980) 改訂 清酒酵母の研究 (清酒酵母研究会編) 231-244.
- 4) 清酒製造技術 (1979) (財)日本醸造協会編 201-202.
- 5) 管野信男 (1980) 改訂 清酒酵母の研究 (清酒酵母研究会編) 195-210.
- 6) 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 (2005) 色素培地を用いた優良酵母の育種とその酒造適性 秋田県総合食品研究所報告 7, 38-45.
- 7) 第三回改正国税庁所定分析法注解 (1973) (注解編集委員会編) 日本醸造協会 6-28
- 8) 吉沢 淑 (1973) Head space 法による清酒香気成分の迅速定量法 醸造協会誌 68, 59-61.
- 9) 第三回改正国税庁所定分析法注解 (1973) (注解編集委員会編) 日本醸造協会

230-232.

- 10) 原昌道、小幡孝之 (1977) 清酒もろみ末期のアミノ酸増加の要因について 醸造学会誌 72, 530-533.

しょっつるのアンギオテンシン変換酵素阻害活性

青柳智則¹、横田早希²、後藤 猛²、塚本研一³、高橋砂織^{3*}

(¹秋田大学・工学資源、²秋田大学大学院院・工学資源、

³秋田県総合食品研究センター、*責任著者)

Tomonori AOYAGI, Saki YOKOTA, Takeshi Gotoh,

Kenichi TSUKAMOTO and Saori TAKAHASHI

【要約】

しょっつるは魚を塩と共に熟成させて造る秋田の伝統的調味液で、鍋物の味付けなどに利用されてきた。これまでしょっつる製造の歴史は長いにも関わらず、機能性に関する研究は殆ど行われて来なかった。そこで、本研究では秋田県特産のしょっつるの機能性として血圧調節作用を持つアンギオテンシン変換酵素(ACE)に注目して、魚種の違いや発酵過程における ACE 阻害物質の生成について検討した。その結果、しょっつるの熟成にしたがって ACE 阻害活性が増加すること、魚種により ACE 阻害活性に違いがあることなどを見出した。特に、サワラやマダラを用いたしょっつるではハタハタなど他の魚種を用いた場合より ACE 阻害活性が強い傾向が見られた。本研究は、しょっつる由来 ACE 阻害活性に関する最初の報告である。

【緒言】

秋田の「しょっつる」は、石川の「いしる」や香川の「いかなご醤油」と並ぶ日本三大魚醤のひとつである。特に冬の鍋料理に使用され、ハタハタのしょっつる貝焼、じゅんさいのしょっつる貝焼などに調味料として用いられてきた。醤油や味噌と異なり煮詰まっても魚の色や野菜、豆腐などの材料の色合いが失われないなどの長所がある。また、畜肉や魚介類を問わず素材の旨味と風味を引き出すなど特殊な効果も持ち合わせている。秋田県総合食品研究センターではこれまでしょっつるの製造方法の改良などに関する研究を行い¹⁻⁶⁾、それらの成果を踏まえ普及を進めた結果、しょっつるの品質向上が図られている。しかしながら、しょっつるの機能性に関する研究はこれまで殆ど行われて来なかった。

食物の機能性の一つとして血圧調節作用がある。レニン・アンギオテンシン系(RAS, Renin Angiotensin-System、図 1)はヒトを含む哺乳類動物における血圧調節系として重要な役割を持っている^{7, 8)}。RAS では、腎臓から血中に放出されたレニンが、肝臓で生合成されたアンギオテンシンノーゲンに作用して、10 残基のアミノ酸で構成されるアンギオテンシン I (AI)を生成する。AI は不活性ホルモンであるが、血中の ACE により C 末端 His-Leu が切断されアンギオテンシン II(AII)となり血圧上昇作用を示す。このことから、高血圧の抑制には AII の生産、すなわちレニンあるいは ACE の活性を抑制する方策が考えられる。

これまでACE活性の制御による血圧上昇抑制を目指して各種食品やタンパク質分解物から阻害物質の探究が行われてきた。今回、郷土料理の鍋物や貝焼きとしての需要に支えられている秋田特産のしょっつるを用いてACE阻害活性を検討した。その結果、市販しょっつるにACE阻害活性を見出した。また、各種しょっつるの試験醸造を行い魚種の違いや発酵過程におけるACE阻害活性の消長についても検討したので報告する。

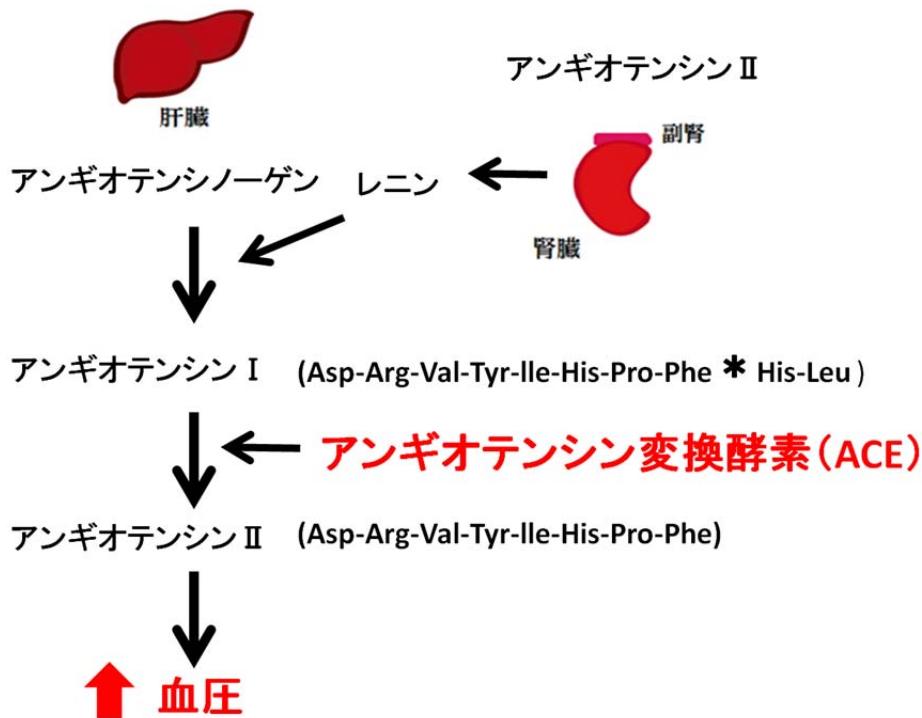


図1 レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構

【実験方法】

1. 市販しょっつる

原材料がハタハタのみのしょっつる3点と調味料添加しょっつる1点を用いた。

2. しょっつるの醸造試験

オスもしくはメスハタハタ100に対して食塩30、プロテアーゼM「アマノ」SD0.3を加え混合した。熟成初期は毎日攪拌を行い、常温で6か月間熟成させた。熟成終了後、85°C10分加熱処理を行い冷却後、濾過した試料をACE阻害活性測定に供した。

3. ACE阻害活性測定方法

ACE活性は新規蛍光消光基質を用いて測定した⁹⁾。以下に具体的なACEの阻害活性測定手順を示した。

[試薬類]

- (1) 組換え型ヒトACEは市販試薬(R&D Systems, 929-ZN, Lot FQJ020711)を用いた。
- (2) 蛍光消光基質 2-(*N*-methylamino) benzoyl (Nma)-Phe-His-Lys(*N*^ε-2,4-dinitrophenyl) (Dnp) は(株)ペプチド研にて依頼合成した。

[実験手順]

- (1) 5 μ l の組換え型ヒト ACE (5 mU/ml) に 5 μ l の阻害物質 (25% NaCl で希釈したしよつつる試料) を加え室温で 5 分間インキュベートした。
- (2) 40 μ l の基質溶液 (25 μ M Nma-Phe-His-Lys (Dnp), 0.1 M HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 0.01 % Triton X-100, and 0.02 % NaN_3) を加え 37°C で 30 分間反応させた。
- (3) 200 μ l の反応停止溶液 (0.1 M ホウ酸ナトリウム, pH10.5) を加えて反応を止めた。
- (4) 蛍光分光光度計 (F-2500、日立製) を用いて、励起波長 340 nm、蛍光波長 440 nm の条件で蛍光強度を測定した。標準物質として 1 μ M の Nma-His-Pro-Phe-His-Leu を用いた。
- (5) ACE 活性を 50 % 阻害するしよつつる濃度を IC_{50} として表示した。

4. ゲル濾過クロマトグラフィーによる ACE 阻害物質の分析

しよつつる由来 ACE 阻害物質の分量検討の目的でゲル濾過法による解析を行った。実験操作を以下に示した。

[実験手順]

- (1) 予め 10 % エタノールで平衡化した Bio Gel P-4 カラム (ϕ 2.5 cm \times 96.5 cm) に 5 ml のしよつつるを添加した。
- (2) サンプル添加後、10 % エタノールにて 52 ml/h の流速でサンプルを溶出した。
- (3) フラクションコレクター (SF-2120, アドバンテック製) を用いて 12 ml ずつ 120 分画を集めた。
- (4) 分光光度計 (U-3900, 日立製) を用いて 280nm の吸光度を測定した。ブランクとしては 10 % エタノールを用いた。
- (5) 溶出分画を蒸留水で 5 倍希釈し、ACE 阻害活性を測定した。

5. トリス・トリシン系 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

しよつつる熟成期間中のタンパク質の分解パターンを低分子タンパク質の分析に適したトリス・トリシン系 SDS-PAGE により解析した¹⁰⁾。電気泳動は以下の手順で行った。

[試薬類]

試料処理液

0.5 M トリス-塩酸緩衝液 (pH6.8)	1.0 mL (50mM)
2-メルカプトエタノール	0.1mL (1 %)
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.1 g (1 %)
グリセリン	2.0 mL (20 %)
ブロムフェノールブルー (BPB)	0.10%

蒸留水で 10 mL にした

泳動バッファー調製

2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol(トリス)	6.06 g (100 mM)
トリシン	4.47 g (50 mM)
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.5 g (0.1 %)

蒸留水で500 mLにした

[実験手順]

- (1) しょつつる 1 μ l に 19 μ l の試料処理液を、また分子量マーカー(LMW Standard, GEヘルスケアバイオサイエンス社製)に 15 μ l の試料処理液を加えた。その後、熱処理(100 $^{\circ}$ C、2 分間)を行った。
- (2) ゲルは E-R15S(トリシン系, アトー製)を使用した。電気泳動装置はアトー製 AE-6531 を用いた。
- (3) 熱処理を行ったサンプルを電気泳動用のゲルローダーチップを用いてウェルに注入した。
- (4) すべてのサンプルを添加後、20 mA の定電流で BPB がゲルの下端約 1 cm までくするように約 3 時間通電した。
- (5) 電気泳動終了後、ゲルを取り出し、染色液(0.05 %クマシーブリリアントブルー(CBB) R-250、50 %メタノール、10 %酢酸)に浸し 1 時間振とうした。
- (6) 染色液を取り除き、10 %酢酸、10 %イソプロパノール溶液を加え脱色した。脱色後、ゲルを乾燥させ、ラミネート処理を行い保存した。

【結果と考察】

1. 市販しょつつるの ACE 阻害活性

これまでしょつつるの機能性については殆ど検討されていなかった。著者らは、最近、簡便迅速測定用 ACE 蛍光消光基質 Nma-Phe-His-Lys(Dnp)を開発した⁹⁾。また、この測定方法を用いて酵素処理豆乳より新規 ACE 阻害ペプチド類を同定した¹¹⁾。今回、新規蛍光消光基質と組換え型ヒト ACE を用いて、しょつつるの ACE 阻害活性について検討した。

最初に市販しょつつるを用いて、ACE 阻害の濃度依存性を検討した。その結果、用いた全てのサンプルで濃度依存的に ACE 活性阻害活性を示すことが確認された(図 2)。各しょつつるの ACE の阻害度合、 IC_{50} の比較から製造法の違いにより ACE 阻害活性に大きな違いのあることが確認できた。3 社の製品の中で ACE 阻害活性が一番強いのは C 社で、一番弱いのが A 社であった。A 社の製品(○)はハタハタ以外にも調味料が含まれているのに対して、B(●), C(△)社の製品原料はハタハタ 100%である。よって、ハタハタのみで造られた製品がより ACE 阻害活性の強いことが分かった。また、C 社の 9 年熟成の製品(▲)については、若干 ACE 阻害が減弱しており、長期熟成中に徐々にではあるが ACE 阻害物質の分解が進んだ可能性が考えられた。

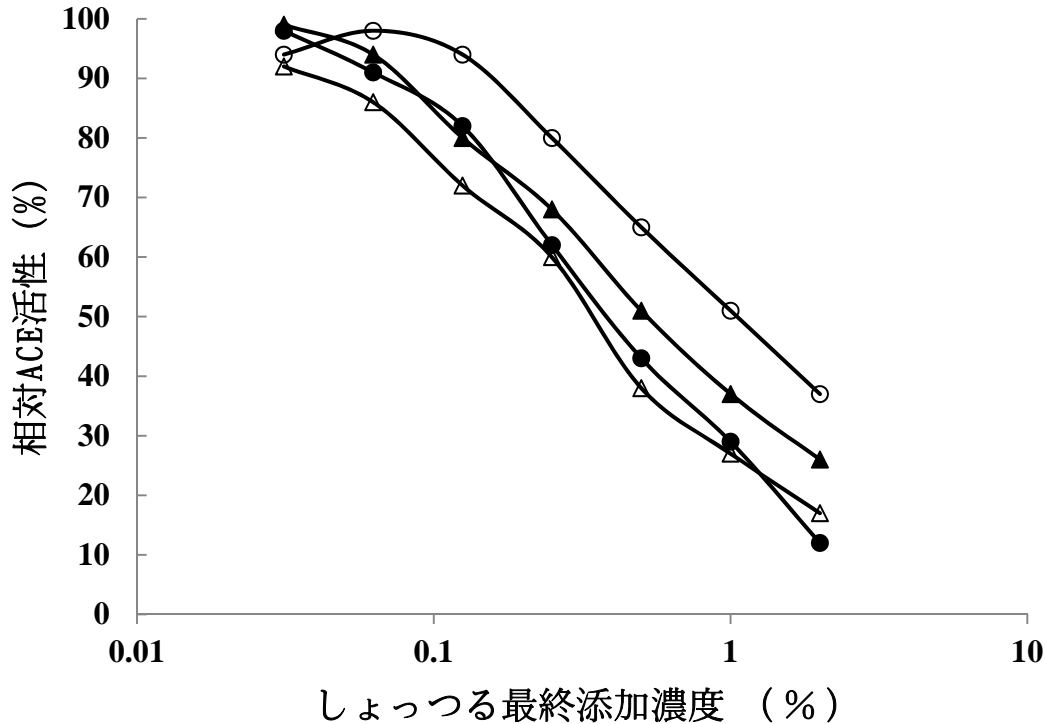


図2 市販しよつるによる ACE 阻害活性測定

○, A社(IC₅₀=1.00%) ; ●, B社(IC₅₀=0.38%) ; △, C社(IC₅₀=0.34%) ;

▲, C社・長期熟成品(IC₅₀=0.52%)

2. 魚種の違いによる試験醸造しよつるの ACE 阻害活性

ハタハタを用いたしよつるに ACE 阻害が認められたことにより、ハタハタ以外の魚を用いて試作したしよつるの ACE 阻害を検討した。用いた魚は、近年日本海で増加している秋田県産「サワラ」、秋田県で冬期に穫れる秋田県産「マダラ」、それに比較的安価に入手可能な秋田県産「スケトウダラ」とした。

図3に各種魚種を用いて熟成したしよつるの ACE 阻害活性を示した。その結果、サワラ (○、●) とマダラ (△、▲) を用いたしよつるがハタハタ (□) やスケトウダラ (■) を用いたしよつるよりも ACE 阻害活性の強いことが示された。サワラを用いて製造したしよつるの場合には、酵素を添加して醸造したしよつる (○、IC₅₀=0.13%) が酵素未添加のしよつる (●、IC₅₀=0.16%) に比べ若干 ACE 阻害活性の強い傾向が見られた。マダラを用いたしよつるの場合には、内蔵の有無で ACE 阻害活性に大きな違いは認められなかった。

ハタハタ、サワラ及びマダラを用いたしよつるのアミノ酸組成を図4に示した。サワラやマダラしよつるは旨味アミノ酸であるアラニン、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、セリンやトレオニンなどがハタハタしよつるより多く含まれていることが分かる。

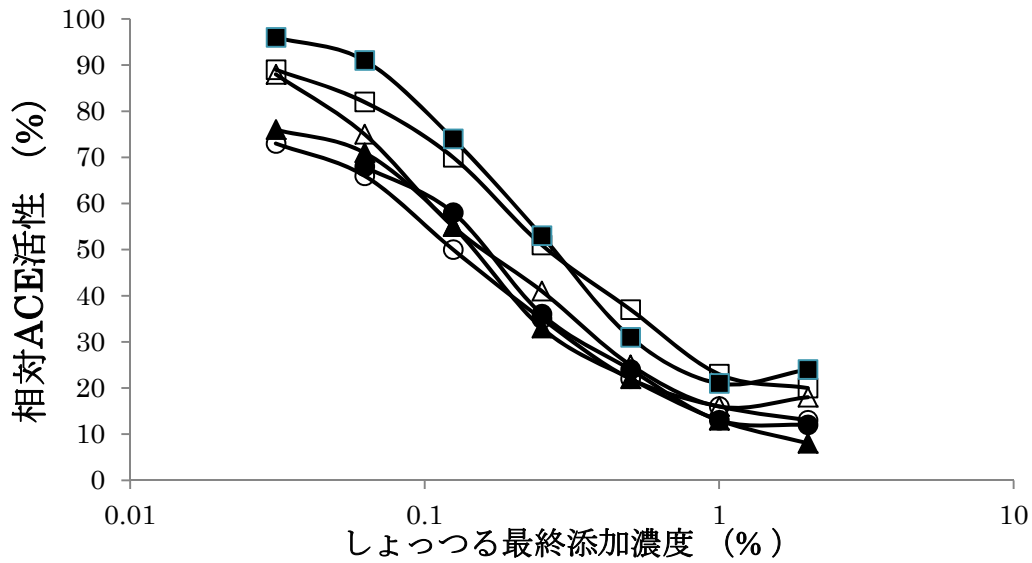


図3 魚種の違いによるしよつつの ACE 阻害活性

- , サワラ(酵素添加あり) (IC₅₀=0.13 %), ●, サワラ(酵素なし) (IC₅₀=0.16 %)
- △, マダラ(内臓含有) (IC₅₀=0.16 %), ▲, マダラ (IC₅₀=0.15 %),
- , ハタハタ (IC₅₀=0.26 %), ■, スケトウダラ (IC₅₀=0.28 %)

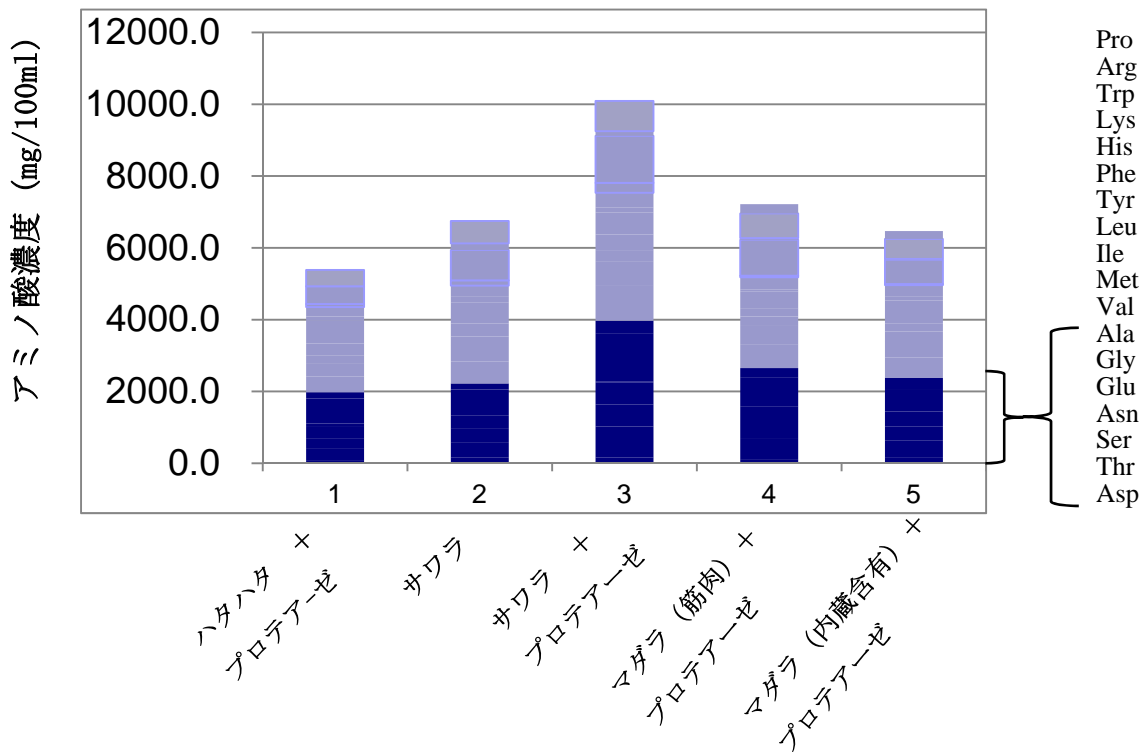


図4 各種しよつつのアミノ酸組成

棒グラフ (グレー) は、図の右側に示したプロリンからバリンの合計で、黒部分はそれぞれの旨味アミノ酸 (アラニンからアスパラギン酸) の合計を示す。

サワラやマダラはハタハタやスケトウダラに比べて内臓の割合が少なく、筋肉量が多いことから用いた魚のタンパク質量がしょっつるのアミノ含量やACE阻害活性に反映していると考えられる。

3. ハタハタの性別の違いによるしょっつるの ACE 阻害活性

オスハタハタおよびメスハタハタを用いてしょっつるを試験醸造し、ハタハタの性差によるしょっつる中の ACE 阻害活性を検討した。

(1) オスハタハタしょっつるの場合

図5に仕込み直後から1か月目までの ACE 阻害活性の結果を示した。仕込み直後には ACE 阻害活性はほとんど認められなかった。しかし、仕込み1週間後には ACE 阻害活性が認められ1か月目まで徐々に阻害活性は増加した。

図6に仕込み1か月から6か月目までの結果を示した。ACE 阻害活性は1か月から6か月まで大きな変化が認められなかった。次に、ゲル濾過クロマトグラフィーで1か月から3か月目までのしょっつるを分析した。ゲル濾過において1~3か月目のしょっつる全てで低分子領域に ACE 阻害活性が認められた。しかしながら、1か月から3か月まで全体としての阻害活性パターンに大きな変化は認められなかった。今回熟成を加速する目的で酵素を添加した結果、数週間~1か月程度で急速に熟成が進み、初期段階からペプチドの遊離が起こったと考えられる。急激なペプチド遊離の後に、アミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼが徐々に作用して、6か月~数年かけて完熟したしょっつるに仕上がるものと推察される。

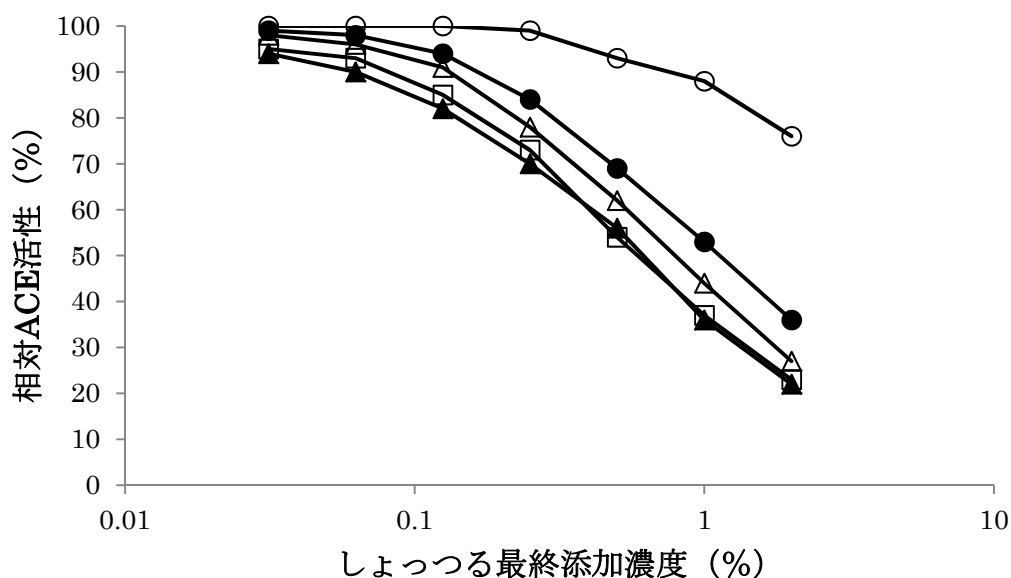


図5 オスハタハタしょっつる熟成期間 (0日~1か月) における ACE 阻害活性

○, 0日 ($IC_{50} > 1.00$ %) ; ●, 1週間 ($IC_{50} = 1.08$ %) ; △, 2週間 ($IC_{50} = 0.76$ %)

▲, 3週間 ($IC_{50} = 0.60$ %) ; □, 1か月 ($IC_{50} = 0.58$ %)

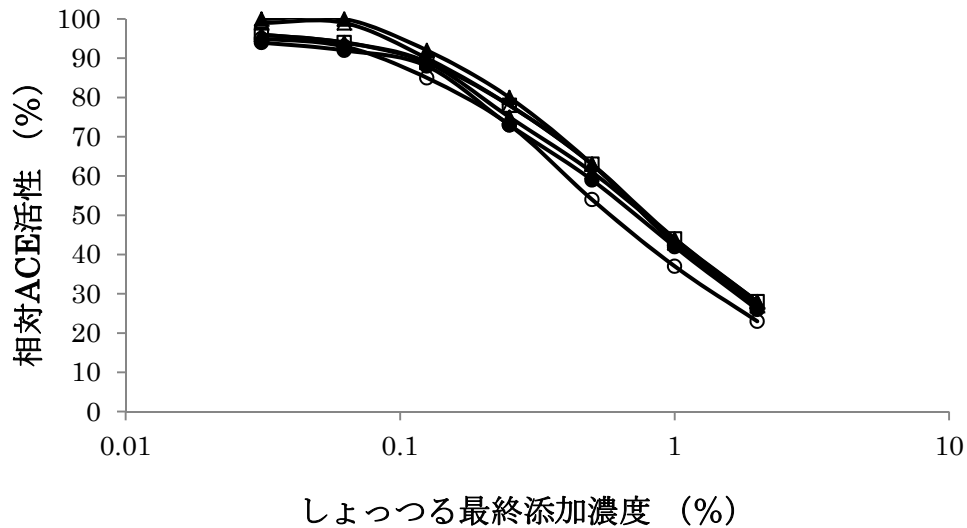


図6 オスハタハタしよつたる熟成期間1か月~6か月におけるACE阻害活性

○, 1か月($IC_{50}=0.58\%$); ●, 2か月($IC_{50}=0.71\%$); △, 3か月($IC_{50}=0.78\%$)
▲, 4か月($IC_{50}=0.79\%$); □, 5か月($IC_{50}=0.80\%$); ■, 6か月($IC_{50}=0.78\%$)

(2) メスのハタハタしよつたるの場合

図7に仕込み直後から1か月目までのメスハタハタしよつたるのACE阻害活性結果を示した。オスハタハタしよつたるの場合と同様に仕込み直後にはACE阻害活性はほとんど認められなかった。しかし、仕込み1週間後にはACE阻害活性が認められ1か月目まで徐々に阻害活性は増加した。一方、仕込み1か月から6か月目までの結果を図8に示した。ACE阻害活性は1か月から6か月までの熟成期間中オスハタハタと同様に大きな変化は認められなかった。

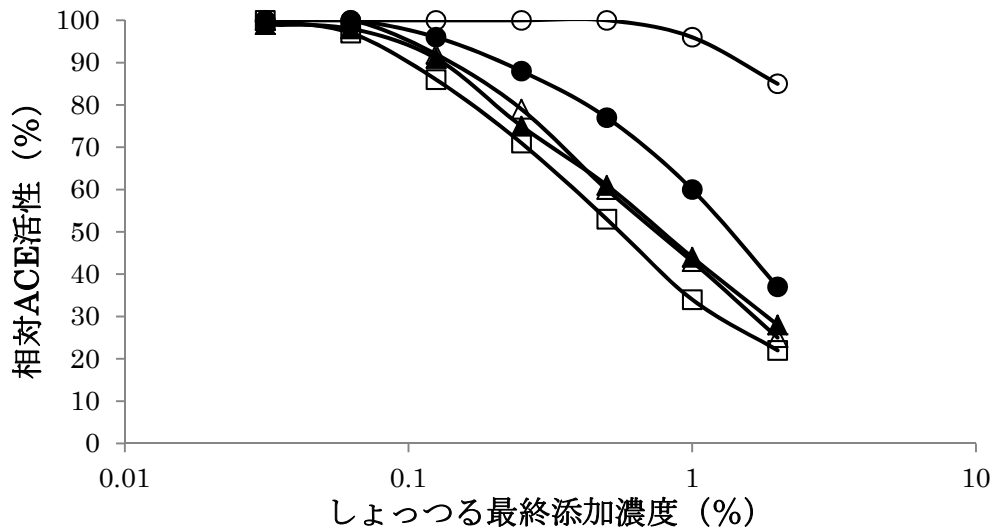


図7 メスハタハタしよつたる熟成期間0日~1か月におけるACE阻害活性

○, 0日($IC_{50}>1.00\%$); ●, 1週間($IC_{50}=1.31\%$); △, 2週間($IC_{50}=0.75\%$)
▲, 3週間($IC_{50}=0.80\%$); □, 1か月($IC_{50}=0.55\%$)

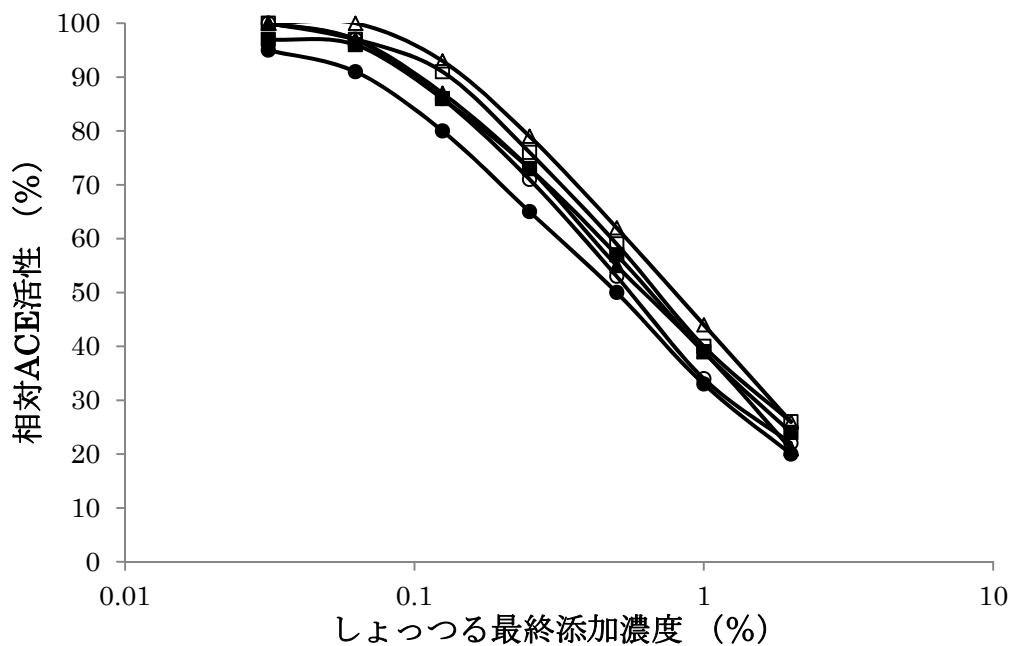


図8 メスハタハタしよつる熟成期間1か月~6か月におけるACE阻害活性

○, 1か月($IC_{50}=0.55\%$); ●, 2か月($IC_{50}=0.50\%$); △, 3か月($IC_{50}=0.77\%$)

▲, 4か月($IC_{50}=0.62\%$); □, 5か月($IC_{50}=0.71\%$); ■, 6か月($IC_{50}=0.68\%$)

(3) SDS-PAGEによるしよつるの分析

しよつるの熟成期間におけるタンパク質の分解パターンをトリス・トリシン SDS-PAGE で解析した結果を図9に示した。今回用いたしよつるは、熟成期間終了後 85 °Cの加熱処理を行い、大部分のタンパク質を熱変性させて除いている。加熱処理でも沈殿しにくいタンパク質についての解析結果である。オスハタハタ及びメスハタハタしよつるとともに、仕込み直後から3週間目までは、30 KDa から 60KDa の高分子領域にタンパク質バンドが検出されており、魚肉タンパク質の分解は進んではいるものの不十分な分解にとどまっていることが分かる。1か月以上熟成したしよつるでは、オス、メスしよつるとともに高分子量タンパク質のバンドは殆ど消失し、14.4 KDa 以下のタンパク質断片がスメアとなっているのが分かる。この結果は、熟成が進むにつれてタンパク質が徐々に分解され、断片化し、生じたペプチド類がアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼなどによりアミノ酸へ分解されることを示している。

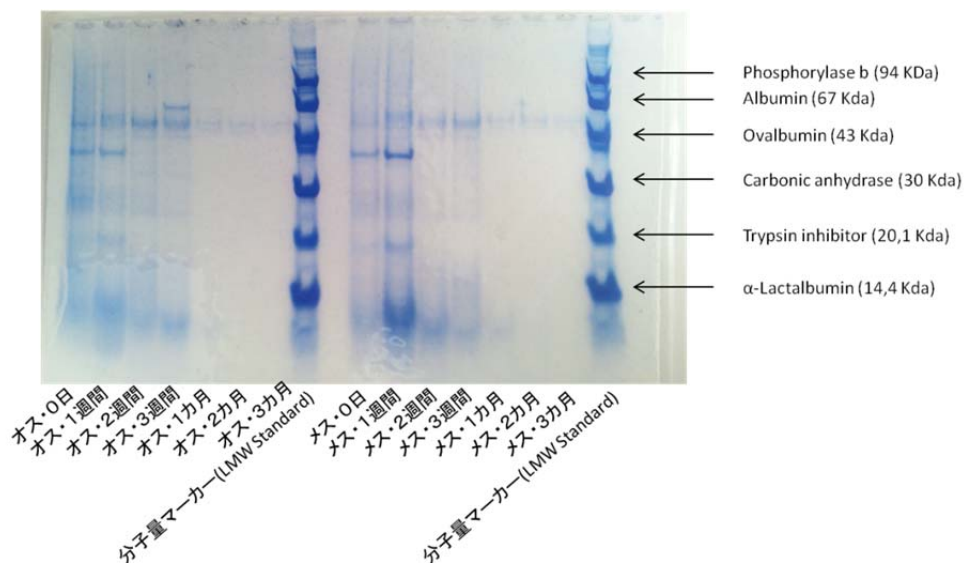


図9 ハタハタしよつつの SDS-PAGE

オスおよびメスハタハタしよつつの 1 μl を試料として用いた。
 電気泳動後タンパク質を CBB R-250 で染色した。

4. まとめ

これまでACE活性の制御による血圧上昇抑制を目指して各種食品やタンパク質分解物から阻害物質の探究が行われてきたが、しよつつの機能性に関する研究は全く行われていなかった。今回、郷土料理の鍋物や貝焼きとしての需要に支えられている秋田特産のしよつつを用いてACE阻害活性を検討した。その結果以下の知見が得られた。

- (1) 新規蛍光消光基質と組換え型ヒトACEを用いて市販しよつつのACE阻害活性について検討した結果、原料の違いによりACE阻害活性に大きな相違が認められた。
- (2) ハタハタ以外の魚種を用いて試験醸造したしよつつにおいては、魚種及び内蔵と筋肉の相対含量に応じてACE阻害活性に相違が見られた。
- (3) オスハタハタおよびメスハタハタしよつつの発酵過程におけるACE阻害活性を検討した結果、仕込み直後から急激にACE阻害活性が増加し、1か月～6か月まで安定して阻害活性が保持された。一方、性差によるACE阻害活性の違いは認められなかった。

5. 参考文献

- 1) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (1999) しよつつる風調味料の開発 -市販・自家醸品の品質について- 秋田県総合食品研究所報告 **1**, 69-78.
- 2) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2000) しよつつる風調味料の開発 (第2報) -コウナゴによる試験醸造- 秋田県総合食品研究所報告 **2**, 9-16.
- 3) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2000) しよつつる風調味料の開発 (第3報) -コアミによる試験醸造- 秋田県総合食品研究所報告 **2**, 17-28.
- 4) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2001) しよつつる風調味料の開発 (第4報) -小アジを用いたしよつつるの試験醸造- 秋田県総合食品研究所報告 **3**, 12-18.
- 5) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2001) しよつつる風調味料の開発 (第5報) -グルコン酸を用いたしよつつるの試験醸造- 秋田県総合食品研究所報告 **3**, 19-24.
- 6) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2002) しよつつる風調味料の開発 (第6報) -ハタハタ・イワシを用いたしよつつるの試験醸造- 秋田県総合食品研究所報告 **4**, 11-24.
- 7) Persson P. B., (2003) Renin: Origin, secretion and synthesis. *Journal of Physiology*, **552**, 667-671.
- 8) 高橋砂織 (2012) 食物由来レニン阻害物質に関する研究 秋田県総合食品研究センター報告 **14**, 31-47.
- 9) Takahashi S., Ono H., Gotoh T., Yoshizawa-Kumage K., and Sugiyama T., (2011) Novel internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y. *Biomedical Research*, **32**, 407-411.
- 10) Schägger H. and von Jagow G., (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368-379.
- 11) Tomatsu M., Shimakage A., Shinbo, M., Yamada S., and Takahashi S., (2013) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soya milk. *Food Chemistry*, **136**, 612-616.

トランスポゾン転移技術を利用した白色麹菌株の育種と 発酵食品への応用

小笠原博信^{1*}、佐々木康子¹、渡辺隆幸¹、佐藤勉²、瓜生撰²、今野宏²、高橋砂織¹
(¹秋田県総合食品研究センター 応用微生物グループ、²(株)秋田今野商店)
Hironobu OGASAWARA, Koko SASAKI, Takayuki WATANABE, Tsutomu SATO,
Setsu URYU, Hiroshi KONNO, and Saori TAKAHASHI

【要約】

麹菌が保有している活性型DNAトランスポゾン *Crawler* を用いた遺伝子改変技術の実用株における有用性について検討した。「まるごと秋田味噌」に使用されている味噌用麹菌 *Aspergillus oryzae* AOK139 株を高温処理することによって、*wA* 遺伝子(ポリケタイド合成酵素)のコード領域内に *Crawler* が転移挿入した白色分生子変異株 (WS61 株) を開発した。WS61 株による米麹を用いた味噌、甘酒、および野菜の麹漬を試作して品質について調べたところ、味噌熟成における組織分解活性や甘さ等の官能評価の面で従来の白色系種麹よりも良好な評価が得られた。

【緒言】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、千年以上もの昔から酒、味噌、醤油をはじめ、様々な発酵食品に用いられており、私たちの生活には欠かすことのできない微生物となっている。また、2006年に日本醸造学会は日本の醸造産業の貴重な財産であるとして麹菌を「国菌」と認定・宣言した。秋田県においても発酵食品における麹の重要性は高く、特に漬物や水産加工等への米麹利用の多いことが本県の伝統食品の特徴の一つとなっている。

昨今、醸造食品の需要は漸減していく傾向にあるが、特徴的な純米酒や吟醸酒は好調を維持している。また、「まるごと秋田味噌」のような高品質素材や米麹の機能性を有する「こだわり食品」に対する嗜好性も根強く、特徴的な新商品開発に力が注がれている。これら発酵食品の開発には、優良な麹菌を親株とした多様な麹菌群が必要と考えられる。そのための手法として、優良株からの自然突然変異のみでは確率は低く、また、UVや遺伝子変異薬剤による育種では麹菌の生育や活性低下をきたす場合が多いため¹⁾、醸造適性に影響が少なく様々な麹菌株を得ることができる技術が望まれていた。

近年明らかにされた麹菌ゲノム²⁾のデータベースを活用し、筆者らは有用麹菌育種のための新規遺伝子工学的手法の開発を進めてきた。その中で、麹菌の内在性トランスポゾン遺伝子に着目し、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。その解析から実用麹菌株においてトランスポゾン配列を新たに見出し、その内在性の DNA トランスポゾン *Crawler* が高濃度の銅イオン処理や高温ストレス処理により麹菌内において転移活性を示すことを初めて発見した³⁾。また、*Crawler* は実用麹菌株に広く分布していること⁴⁾も既に明らかとなっていたことから、転移を利用した実用麹菌株育種の可能性が示唆された。

本研究では「まるごと秋田味噌」に使用されている抗変異原活性や大豆等の高分解活性を有する味噌用麹菌 *A. oryzae* AOK139 株^{5,6)}のさらなる優良株取得を目指し、*Crawler* の転移活性を利用して白色変異株の育種を試みた。さらに、得られた白色株の実用性評価を目的に味噌の小仕込み試験や甘酒および野菜の麹漬試験を行った。

【実験方法】

1. トランスポゾン転移による麹菌変異株の作成と白色変異の選抜

1) 麹菌株と麹菌の培養

変異株作成の親株として「まるごと秋田味噌」に使用されている味噌用麹菌 *A. oryzae* AOK139 株 ((株) 秋田今野商店) を用いた。麹菌は PDA (potato dextrose agar, Difco 社) プレートまたは YPD 液体培地 (0.5% Bacto yeast extract (Difco), 1% Bacto peptone (Difco), 1% glucose) に植菌し 30°C で培養した。

2) 麹菌の DNA 抽出

約 10⁶cfu の分生子を YPD 液体培地 2ml に接種し、30°C にて 16-24 時間振とう培養 (150rpm) した。得られた菌糸を TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で洗浄後、ISOPLANT (ニッポンジーン社) を用いて DNA を抽出し、PCR 用のテンプレートを調整した。

3) PCR 増幅と DNA シーケンシング

分生子の着色性に関与する *wA* (ポリケタイド合成酵素) 遺伝子 (AO090102000545) のプロモーター領域 (約 1kbp)、N 末側コード領域 (約 2.8kbp)、および C 末側コード領域 (約 3.8kbp) を増幅可能なプライマーを設計した。DNA ポリメラーゼには *Ex-Taq* (タカラ・バイオ社) を用い、アニーリング温度は 57°C としプロトコールに従って PCR を行った。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動により分析し、*Crawler* (1.3kbp) 挿入が推定される PCR バンドは GeneClean II キット (Bio101 社) を用いて抽出・精製を行った。次に *Crawler* の内部プライマーを用いて DNA シーケンシングを行い (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, ABI 社; 秋田県立大学・バイオテクノロジーセンター)、得られた DNA 配列データを麹菌ゲノムデータベース (DOGAN, <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/top>) と照合し、*Crawler* 挿入位置の決定を行った。

4) 定量 RT-PCR

PDA プレートに生育した分生子を集菌し、ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて全 RNA を抽出・精製した。SuperScript II (Invitrogen 社) を用いて cDNA を合成した後、*wA* 遺伝子の C 末側を増幅するプライマーセットを用いて iQ SYBR

Green Supermix (バイオラッド社) および Chromo4 (バイオラッド社) によりヒストン H4 遺伝子を対照として発現定量を行った。

5) *Crawler* 活性化のための麴菌分生子の高温ストレス処理と白色変異株の選抜

PDA プレートで 30°C・7-10 日間培養して得られた麴菌 AOK139 株の分生子を 0.1% Tween80 水溶液に懸濁し、2 回洗浄後、約 10^7 cfu/ml となるように滅菌水に再度懸濁した。分生子懸濁液を振とう (150rpm) しながら 52°C・6 時間の高温ストレス処理を行い *Crawler* の転移活性化を図った。処理した分生子懸濁液を PDA プレートに塗布し、30°C・7-10 日間培養した。生育したコロニーの外観により着色性の低いコロニーを選抜、保存し PCR による DNA 分析を行った。

2. 味噌小仕込み試験

1) 種麴および製麴

市販の白色種麴 8 種 (表 2、(株) 秋田今野商店製) および味噌用麴菌 AOK139 株の白色変異株から選抜した WS61 株で試作した種麴を用い、麴蓋により米麴の製麴を行った。

2) 麴の酵素活性測定

出麴の酵素力価について、糖化力、 α -アミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼは株式会社キッコーマン社製のキットを用いて酵素力価を測定した。酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼは国税庁所定分析法に準じて測定した。セルラーゼ、ペクチンリアーゼは醤油試験法に準じて測定を行った。リパーゼはオリーブオイルを基質として滴定法⁷⁾で測定した。大豆種皮分解活性は 121°C、15 分オートクレーブにかけた大豆種皮の粉末を基質としてセルラーゼと同様に測定した。すなわち大豆種皮をオートクレーブ処理した後、風乾、粉碎して粉末を得た。0.5g の大豆種皮粉末を水 60ml に懸濁、200mM 酢酸緩衝液(pH5.0)5ml を加え 100ml とし基質を作成した。基質 1ml と麴抽出酵素液 1ml を混和し、37°C・1 時間保持した。反応前後の混和液 100 μ l をそれぞれ採取し、ソモギネルソン法により増加した還元糖量を求めて 1 分間にグルコース 1mg に相当する還元糖を遊離する活性を 1 単位 (U) とした。

3) 味噌の小仕込み方法

食塩濃度 11.5%、麴歩合 10 (大豆と等量)、仕込み規模 4.0kg になるようにそれぞれの米麴を用いた仕込みを行った。この時、当センター保存酵母 AM1 を味噌 1g あたりの菌数が 10^5 個となるように添加を行った。仕込み味噌は 30°C・1 ヶ月の温醸後、切り返しを実施し、さらに室温 (20°C) にて 2 ヶ月の熟成を行った。

4) 試験味噌の分析と官能試験

熟成後のみそについて、pH、色差計による色調、およびガスクロマトグラフによる脂肪酸組成の測定により比較を行った。また、パネル 5 名による官能試験を実施し、5 点法による評価 (評点が小さいほど高評価) を行った。

3. 甘酒および野菜の麴漬製造試験

1) 種麴と米麴の酵素活性測定

市販種麴 10 種類（白麴 1 号菌、白麴 2 号菌、白麴 3 号菌、白麴 4 号菌、白麴 5 号菌、新白麴菌、白麴雪こまち、白麴すずらん、吟醸用 No.5 菌、および吟味、(株)秋田今野商店製）と WS61 株を用いて米麴を作成し、酵素活性の測定を行った。

2) 甘酒製造試験

米麴と水を 1 : 2 の重量比で混合し、56°C で 3 時間糖化して甘酒を作製し、グルコース濃度の測定を行った。

3) 麴漬製造試験

麴漬用の野菜には市販のナス、ダイコン、カブ、ハクサイ、ニンジン、およびキャベツを用いた。食塩濃度 3% となるよう 5°C で 3 日間の下漬を行った。麴漬用の糖化液は米麴と水を重量比 1 : 1 の割合で混合し、56°C・3 時間の糖化を行い作製した。本漬は下漬野菜 300g に対し麴糖化液 150g を混合して 5°C・3 日間の漬込みを行って、官能試験に供した。

4) 麴漬の官能試験

パネルに麴漬サンプルを「好き」「どちらでもない」「嫌い」の 3 つに分類してもらい、好き : 2 点、どちらでもない : 1 点、嫌い : 0 点として点数化し合計点を算出した。次に WS61 株を使用したサンプルの合計点を 1.0 として換算した数値で表した。数値が大きいほど良好であったことを示す。

【結果と考察】

1. 麴菌 AOK139 株における *Crawler* 転移と白色分生子変異株の取得

麴菌 AOK139 株は最初に *Crawler* 転移が発見された実用麴菌 OSI1013 株(月桂冠保有株)と同様にゲノム中に 20 コピー以上の活性型の配列を有しているため、*Crawler* 転移技術を応用した新しい AOK139 株の育種が可能と考えられていた。そこで、*Crawler* 転移を誘発する 50°C 付近の高温ストレス処理条件について検討したところ、52°C・6 時間処理によって着色性などの外観が異なるコロニーが多数得られることが分かった。この時の生存率は 1/50~1/100 であった。同ストレス処理による白色変異株のスクリーニングを行ったところ、3 株の白色分生子株が得られた。それらを純化後、分生子の着色性に関与しているポリケタイド合成酵素遺伝子 (*wA*、AO090102000545) 域について PCR により調べたところ、*Crawler* 挿入を示す 1.3kbp の増加が認められる株を 1 株得ることができた (図 1)。これを WS61 株とし、挿入位置の解析や種麴としての安定性評価試験を行った。

2. 挿入位置の解析と *wA* 遺伝子発現比較

wA 遺伝子への *Crawler* 挿入が推定された PCR フラグメントを用いて、*Crawler* の N 末外側配列と C 末外側配列について DNA シーケンシングを行い、得られた DNA 配列情報から挿入位置の決定を行った。*Crawler* の挿入様式に従い DNA 配列の TA

部分を組換えて *wA* 遺伝子のコード領域の中央部 (+3150 の位置) に逆向きに挿入が成されていた (図 2)。さらに *wA* 遺伝子の発現量について定量 RT-PCR による比較を行ったところ WS61 株では親株 AOK139 株の 1/100 以下であり、ほとんど発現は認められなかった (図 3)。このことから WS61 株では *Crawler* 挿入により *wA* 遺伝子が機能しなくなり白色分生子の表現型となったものと推定される。

AOK139 株 (親株)

WS61 株

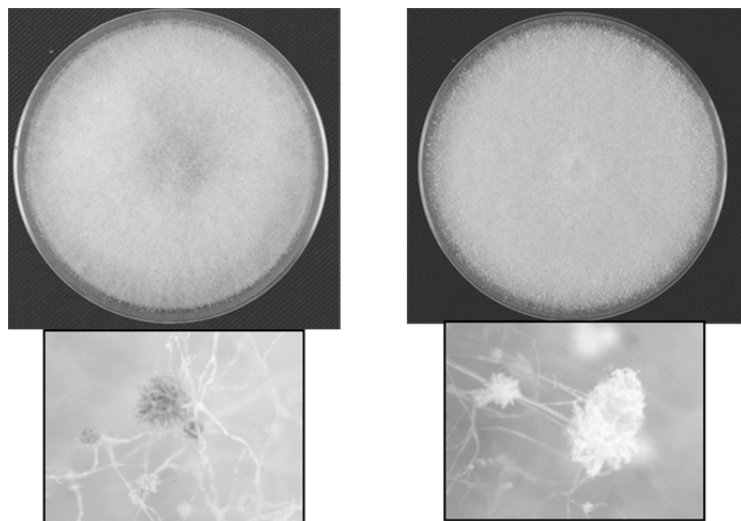


図 1 コロニー (PDA プレート) の外観と分生子の顕微鏡写真

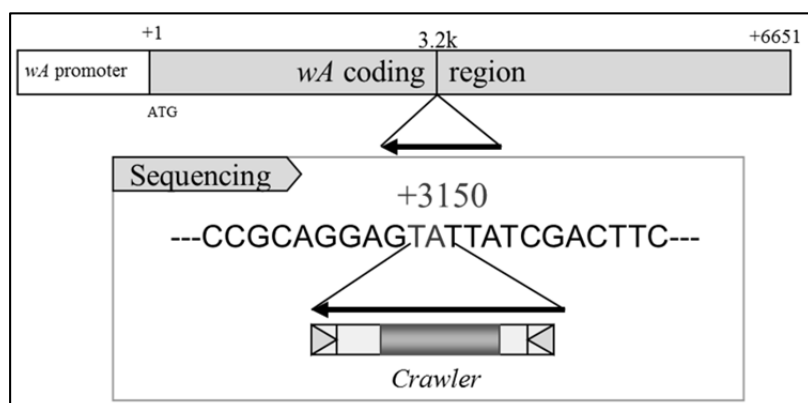


図 2 *wA* 遺伝子への *Crawler* 挿入マッピングと周辺 DNA 配列
矢印は *Crawler* の挿入方向を示す

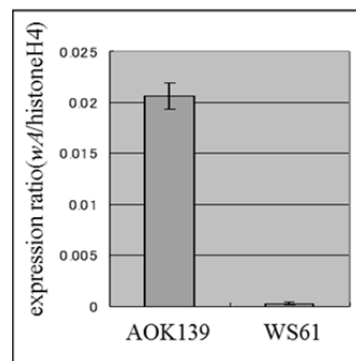


図 3 定量 RT-PCR による *wA* 遺伝子の発現比較

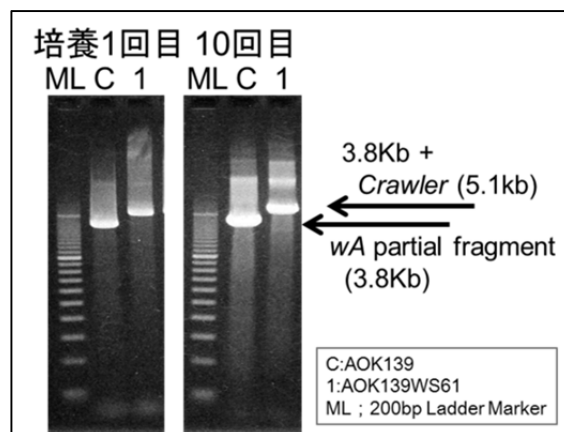
3. WS61 株の種麴としての安定性

実用麴菌株としての開発を見据え、白色分生子の形質の安定性について検討した。玄米を培地としたモデル種麴培養と PDA を用いたプレーティング培養を繰り返す行い、肉眼による緑褐色の分生子を有する復帰株の検出と *wA* 遺伝子の *Crawler* 挿入領域について PCR により確認を行った。その結果、10 回の繰り返し培養においてプレート上での WS61 株からの復帰変異株および *wA* 遺伝子からの *Crawler* の脱落は検出されなかった (表 1、図 4)。

表1 繰り返し培養における復帰株の検出

培養回数	1	2	5	10
復帰株の検出	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

図4 繰り返し培養における *wA* 遺伝子中の *Crawler* 検出



4. 製麴および味噌小仕込み試験による市販白色種麴との比較

WS61 株は種麴としての安定性も示され、遺伝的に安定である。予備試験からその製麴特性、酵素の生産能力は親株の AOK139 と同等であることが示されている。また、味噌の小仕込み試験においてもアミノ酸組成、脂肪酸生成量に由来する抗変異原活性やマルトオリゴ糖含量などの機能性は親株と同等であったが、親株よりもやや明るい色調の味噌が醸造されることが示された⁴⁾。そこで、WS61 株の特徴をさらに明らかにすることを目的として、小仕込み試験による市販白色種麴との比較を行った。

味噌の仕込み原料として製麴した各種麴による米麴の酵素力価測定結果を表2に示した。

表2 白色種麴使用米麴の酵素活性 (U/g)

種麴	α-アミラーゼ	糖化力	酸性プロテアーゼ	中性プロテアーゼ	酸性カルボキシペプチダーゼ	セルラーゼ	ペクチンリアーゼ	リパーゼ	大豆種皮分解活性
白麴1	35.6	1.27	3072	3655	1.57	1.46	0.001	33.9	0.32
白麴2	25.7	0.47	2598	3070	1.97	1.26	0.013	26.1	0.34
白麴3	35.3	0.70	2059	2632	1.74	1.10	0.015	31.7	0.29
白麴4	30.0	0.70	2353	2778	1.86	1.40	0.015	30.6	0.37
白麴5	28.0	1.03	2320	2891	1.71	1.60	0.024	28.9	0.51
白麴6	32.0	0.88	2810	3103	2.16	1.65	0.018	33.3	0.48
白麴7	30.2	0.85	3284	3135	2.20	1.65	0.027	31.7	0.28
白麴8	22.2	0.68	2941	2989	1.97	1.49	0.018	28.3	0.30
WS61	28.7	2.75	2892	2615	2.06	1.79	0.013	42.8	0.78

WS61 株は他の白色種麴と比較して糖化力が極めて高く、またセルラーゼも比較的高かった。加えてリパーゼや大豆種皮の分解活性も高いことが認められた。この結果から WS61 は親株である AOK139 の特徴を WS61 も引き継ぎ、従来の白色種麴よりも組織分解力、脂質分解力が高く、他の種麴に無い性質を有していることが明らかとなった。

表3 熟成終了時の色と pH

	Y%	x	y	pH
白麴1	12.65	0.4571	0.3982	5.15
白麴2	14.58	0.4532	0.3997	5.20
白麴3	13.73	0.4562	0.3994	5.21
白麴4	13.12	0.4582	0.4008	5.26
白麴5	13.06	0.4574	0.3993	5.21
白麴6	13.18	0.4546	0.3984	5.27
白麴7	12.74	0.4604	0.3998	5.20
白麴8	13.03	0.4579	0.3996	5.22
WS61	11.75	0.4660	0.4003	5.18

表4 熟成終了時の味噌脂肪酸組成

種麴	遊離脂肪酸(mg/100g)						脂肪酸エチル(mg/100g)					
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	合計	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	合計
白麴1	309	42	152	624	112	1239	20	4	46	99	21	191
白麴2	111	18	42	269	41	481	12	3	16	39	7	78
白麴3	148	23	59	362	59	650	11	3	18	41	8	81
白麴4	110	20	48	287	47	512	8	3	15	33	7	66
白麴5	120	21	51	306	49	547	9	3	15	35	7	69
白麴6	221	21	51	313	53	659	10	3	15	35	7	70
白麴7	195	18	43	281	46	582	9	3	15	35	7	70
白麴8	223	21	47	322	51	665	12	3	17	37	7	76
WS61	250	51	214	761	139	1414	28	8	81	164	35	317

表5 官能試験の結果

	色	香り	味	組成	総合
白麴1	3.00	3.60	3.00	3.60	3.20
白麴2	3.20	3.80	3.20	4.20	3.40
白麴3	3.00	3.60	3.40	3.60	3.40
白麴4	3.20	3.00	3.00	3.60	3.00
白麴5	3.00	2.80	3.00	3.80	3.00
白麴6	3.20	3.00	2.60	4.00	3.00
白麴7	3.20	3.20	2.60	3.80	3.00
白麴8	3.20	2.80	3.00	3.80	2.80
WS61	2.40	2.20	2.20	2.80	2.00

5点法で実施した。評点が低いほど高評価を示す。(パネル5名)

味噌醸造試験における味噌の色調および pH の分析結果を表 3 に示した。WS61 株を用いた味噌は x 値（赤味）が高く、Y%（明るさ）が低く、やや着色が進んだ仕上がりになっていた。

WS61 株使用味噌は他の白色種麴を用いた味噌と比較して味噌中の遊離脂肪酸、脂肪酸エチルエステルが多かった（表 4）。味噌中の遊離脂肪酸、脂肪酸エチルエステルはリノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸が主たる構成成分となっており、これらの不飽和脂肪酸は遊離型、エステル型とも抗変異原性等の生理機能性を示すことが報告されている。また脂肪酸エチルエステルは味噌の主要な香氣成分⁹⁾としても知られている。今回、脂肪酸エチルエステル量の味噌の香りに与える詳細な検討は実施していない。しかし、WS61 株を使用した味噌の着色性は高かったが、官能試験の結果では色、味、香り、組成、総合すべての項目において、他の白色種麴よりも高い評価を得た（表 5）。

以上のことから、WS61 株は味噌醸造において他の白色種麴よりも優れた特長を有していることが認められた。さらに、製麴試験より WS61 株は売り麴用の米麴としても従来の白色種麴に無い特長を活かせることが期待された。

5. WS61 株の甘酒および漬物への加工適性の評価

漬物への実用可能性を探るため、WS61 株を用いた甘酒と各種野菜を用いた麴漬製造試験を行い、市販白麴菌との比較を行った。

甘酒のグルコース濃度は WS61 株が最も高く（図 5）、麴の α -アミラーゼ活性と糖化力が高かったことに起因していると考えられた。官能検査の結果、WS61 株を使用した甘酒は甘味が強いという理由から比較的好まれていることが分かった（図 6）。

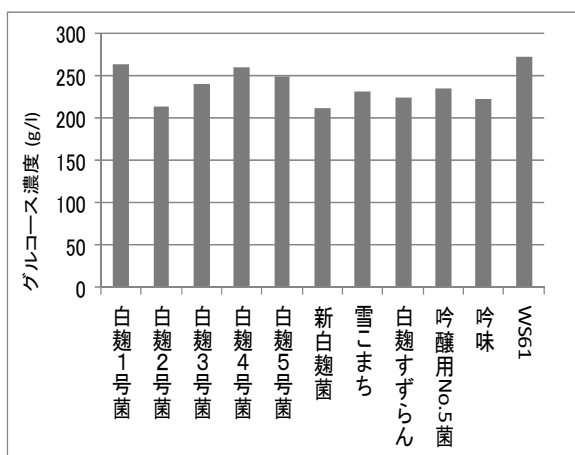


図 5 甘酒のグルコース濃度

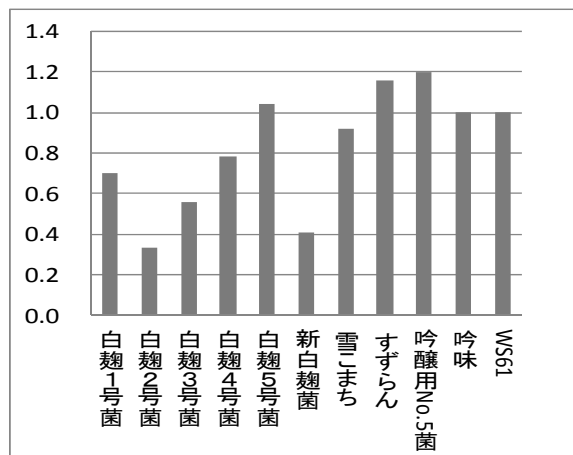


図 6 甘酒の官能検査結果

様々な野菜を用いた麴漬では、予備製造試験として市販種麴 10 種類の麴を用いて麴漬を試作し、官能試験を行って上位 5 種類の麴漬を選択した。それら 5 種類の麴菌と WS61 株の糖化液を用いて、麴漬を試作した。

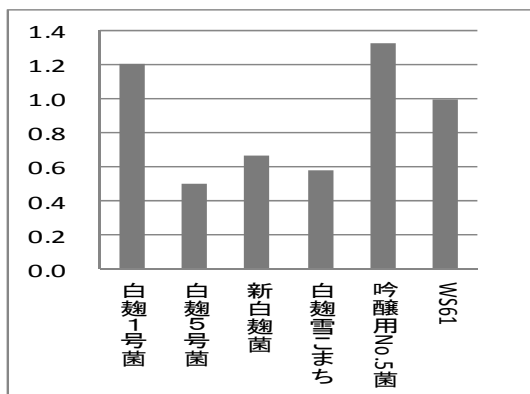


図7 ナス麴漬の官能検査結果

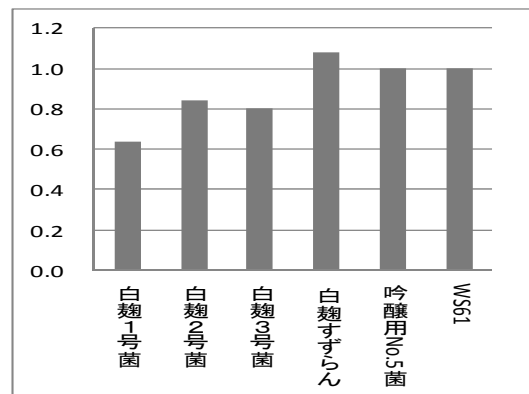


図8 ダイコン麴漬の官能検査結果

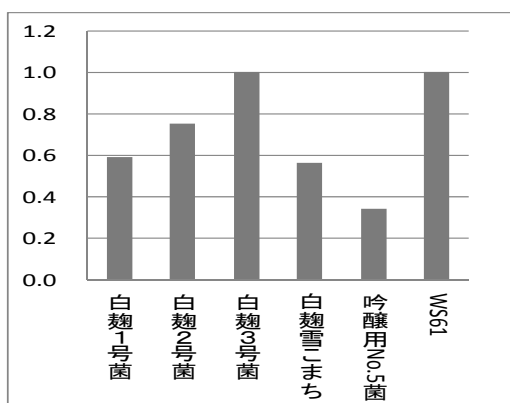


図9 カブ麴漬の官能検査結果

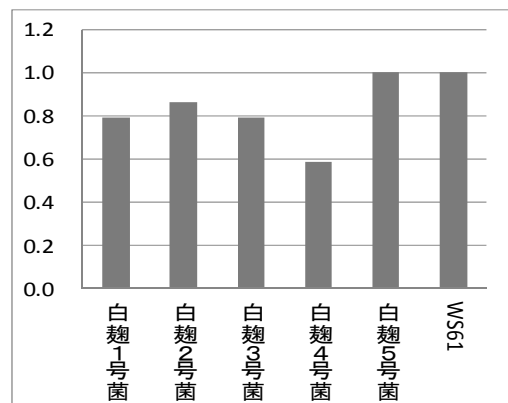


図10 ハクサイ麴漬の官能検査結果

官能試験の結果、ナス麴漬とダイコン麴漬では、WS61株を使用した麴漬は甘味が強く麴らしい風味があることから比較的好まれていることが分かった(図7、図8)。カブ麴漬とハクサイ麴漬では、WS61株を使用した麴漬は甘味が強く味のバランスが良いことから最も好まれているという結果が得られた(図9、図10)。ニンジン麴漬とキャベツ麴漬では、WS61株を使用した麴漬は甘味が強く麴らしい風味があることから中程度に好まれていることが分かった。

以上の結果から、WS61株は麴の糖化関連の酵素等の活性が高いという特徴を有し、WS61株を使用した麴の甘酒と麴漬は「甘さ」が強いことを主な理由として概ね好まれていることから、WS61株は漬物用実用株としても有望であることが認められた。

以上、トランスポゾン *Crawler* を用いた実用麴菌の遺伝子改変による育種は、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判明し、さらに、味噌醸造や売り麴、および甘酒や麴漬などにも有望な新しい麴菌株の開発に繋がったことから新規実用株を得るための有効な手法であることが示された。麴菌おけるトランスポゾン研究は新規の遺伝子機能解析法への応用の他、吟醸酒用麴菌やハタハタ寿司など水産加工用麴菌の開発など醸造・食品業界からの要望にこたえることができる「組換えによらない」多様な麴菌株の開発に直接繋がるものと期待される。

【謝辞】

麹菌トランスポゾンの遺伝子解析においてご指導賜りました東北大学大学院農学研究科教授・五味勝也先生に衷心より感謝いたします。また、麹菌遺伝子の DNA シーケンシングを行っていただきました秋田県立大・バイオテクノロジーセンターに御礼申し上げます。

本研究の成果の一部は平成 23 年度 JST A-STEP【FS】探索タイプ(AS231Z01283E)の助成を受けて行われました。

【引用文献】

1. 原山文徳 (2001) 味噌醸造への白色醤油麹菌の利用について、日本醸造協会誌、**96**, 397-385.
2. 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. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, **438**, 1157-1161.
3. Ogasawara, H., Obata, H., Hata, Y., Takahashi, S., Gomi, K. (2009) *Crawler*, a novel *Tc1/mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions, *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 441-449.
4. 小笠原博信、小畑浩、秦洋二、高橋砂織、五味勝也 (2005) 麹菌(*Aspergillus oryzae*)の *impala* 様 DNA トランスポゾンの菌株間多様性 2005 年度日本農芸化学会大会要旨集 p60.
5. 渡辺隆幸、尾張かおる、堀一之、高橋光一 (2004) 遊離脂肪酸含量および抗変異原性に基づく味噌用麹菌の選択 食品科学工学会誌 **51**、698-702.
6. 秋田県、秋田今野商店：発酵食品用種麹及び該種麹を用いる発酵食品の製造法、特許第 4049220 号
7. 片桐充昭 (1996) 米・麦味噌の脂肪酸エステルの生成 醸造協会誌 **91**、222-227.
8. 小笠原博信、渡辺隆幸、佐藤勉、今野宏、五味勝也 (2011) 内在性トランスポゾンによる麹菌変異株を用いた味噌醸造試験、平成 23 年度日本醸造学会学大会要旨集 p3.
9. 安平仁美、糸賀啓治、望月務(1973) 味噌熟成への酵母の利用 (第 9 報) 味噌の香りに関する研究(6)、信州味噌研究所報告、**14**、33-34.

2. 原著論文（研究ノート）（3件）

- 1) 「キシロースからコハク酸を生産する細菌の分離とその特性」
○戸松さやか、木村貴一、進藤 昌
- 2) 「餅生地硬化性に及ぼす糯米の糊化特性」
○高橋 徹、佐々木 玲、熊谷昌則
- 3) 「秋田県産米の遊離糖と遊離アミノ酸に関する研究」
○大能俊久、伊藤善輝

キシロースからコハク酸を生産する細菌の 分離とその特性

戸松 さやか、木村 貴一、進藤 昌
(秋田県総合食品研究センター、バイオリファイナリーグループ)
Sayaka TOMATSU, Kiichi KIMURA and Sho SHINDO

【諸言】

地球温暖化問題や化石資源の枯渇問題から再生可能なバイオマスを用いたバイオリファイナリーが注目を集めており、バイオエタノールを中心とした研究が進められている。バイオリファイナリーはバイオマスを原料としてエネルギーや化学製品の新しい製造システムであり、化石燃料資源を用いた従来のエネルギーや化学製品の製造システムに代わるものである。このため、バイオリファイナリーは限りある化石資源を使わず地球温暖化防止や循環型社会の形成に役立つ技術として各国で技術開発が進められている¹⁾。アメリカではバイオリファイナリーの核となる基幹物質を12種類選定し²⁾、新しい化学産業創設に向けた研究開発が活発に行われている。一方で、サトウキビやトウモロコシを用いた場合、食糧と競合する原料を使用することで食糧や家畜飼料の高騰を招くという問題を生じている。そこで現在注目されているのが非可食資源である稲わらなどのセルロース系バイオマスである。セルロース系バイオマス糖化液に含まれる糖は主に6炭糖のグルコースと5炭糖のキシロースであり、低コスト化を図るためにはすべての糖を効率的に物質変換できることが必要となる³⁾。しかし、グルコースを利用できる菌株はいくつか知られているが、キシロースを利用できる菌株は非常に少ない。

我々はセルロース系バイオマスから変換される製品をバイオエタノールだけではなく付加価値の高いコハク酸などを生産するバイオリファイナリー技術の開発を行うことを目的に研究を行っている。今回、自然界からキシロースを利用してコハク酸を生産する菌の取得を行い、その性質を検討した。

【実験方法】

1. コハク酸生産菌の分離

秋田県内の土壌281点から採取したサンプルを滅菌水に懸濁したものを、M17液体培地(2%キシロース、0.017%ブロモクレゾールパープルと10ppmシクロヘキシミド添加)、SCD寒天培地(2%キシロース、0.8%炭酸マグネシウム添加)、普通寒天培地(2%キシロース、10ppmシクロヘキシミドと0.8%炭酸マグネシウム添加)、それぞれに加え25℃で静置培養した。M17液体培地では変色したものをM17(10%キシロース、0.8%炭酸マグネシウム添加)寒天培地で培養した。それぞれの寒天培地でクリ

アゾーンを形成した株を選抜した。さらにキシロースと炭酸マグネシウムを5%添加したM17液体培地およびAS液体培地(0.15%リン酸二ナトリウム12水和物、0.1%リン酸一ナトリウム2水和物、0.1%塩化ナトリウム、0.02%塩化マグネシウム、0.02%塩化カルシウム)⁴⁾で培養した上清をペーパークロマトグラフィー(展開溶剤;エタノール:アンモニア:水=20:5:3)⁵⁾で有機酸の分離を行い、コハク酸を生産した株を選抜した。

2. コハク酸生産能の検討

糖を5%とYeast Extract1.5%を含むAS培地に炭酸マグネシウムを5%添加し、30℃、100rpm振盪培養した発酵液の上清を、F-キット(JKI)を用いた酵素法によりコハク酸生産量を測定した。

3. バイオマス(稲わら)糖化液を用いた発酵試験

稲わら15gに2%硫酸を入れ、100gにしたものを110℃、1時間オートクレーブし、水酸化ナトリウムを用いてpH6.0に調整後、50℃でメイセラゼ・ヘミセルラーゼを用いて酵素糖化した上清を糖化液とした。この糖化液に炭酸マグネシウムを5%添加し、30℃、100rpm振盪培養した。生産物の定量は、F-キットグルコース、F-キットコハク酸、F-キットD-/L-乳酸(JKI)、キシロース測定キット(Megazyme)を用いた酵素法により行った。

【結果と考察】

1. 自然界からコハク酸生産菌の分離

キシロースを炭素源とする培地で酸生成が見られた菌株についてコハク酸生産能を検討したところ、101株でコハク酸の生成が確認され、コハク酸生産能が15g/l以上の35株を得た。さらに、コハク酸生産能が高い4株(No.119、156、300、311)の同定を行い、16SrDNAの相同性およびAPI20E(シスメックス・バイオメリユー株)同定キットにより、No.119、156、300の3株は*Serratia fonticola*、No.311は*Serratia plymuthica*と同定された。これまでに*Serratia fonticola*と*Serratia plymuthica*のコハク酸生産に関する報告はない。次にコハク酸生産に優れたNo.156について、さらに詳しく性質の検討を行った。

2. コハク酸生産菌No.156の性質の検討

糖の消費と生産物について検討したところ、キシロースからは効率的にコハク酸が生産されるが、グルコースからはD-乳酸と若干のコハク酸が生産された(図1)。他の糖についても検討したところ、フルクトース、マンノース、ソルビトールからは主にD-乳酸が、ガラクトース、L-アラビノース、スクロースからはコハク酸が生産され、糖の種類によりコハク酸とD-乳酸の生産割合が異なる結果となった(図2)。

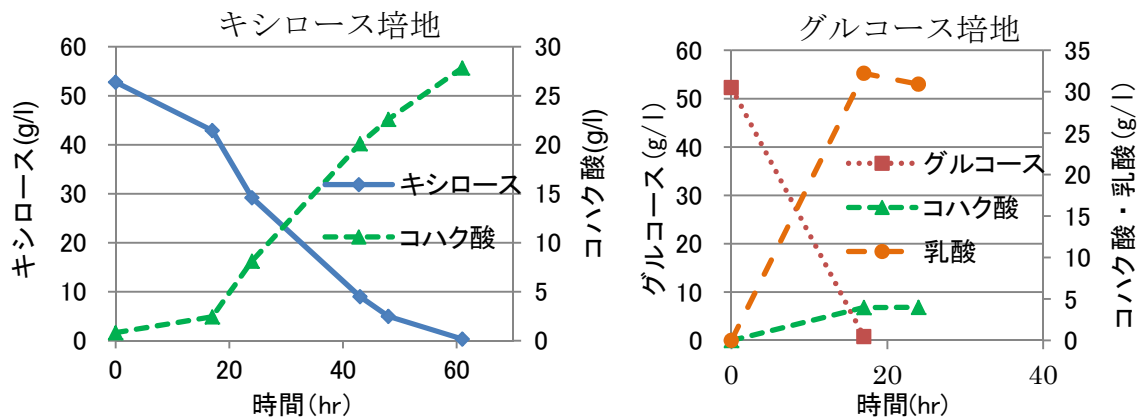


図 1. キシロースおよびグルコース培地における糖の消費と生成物の継時的変化

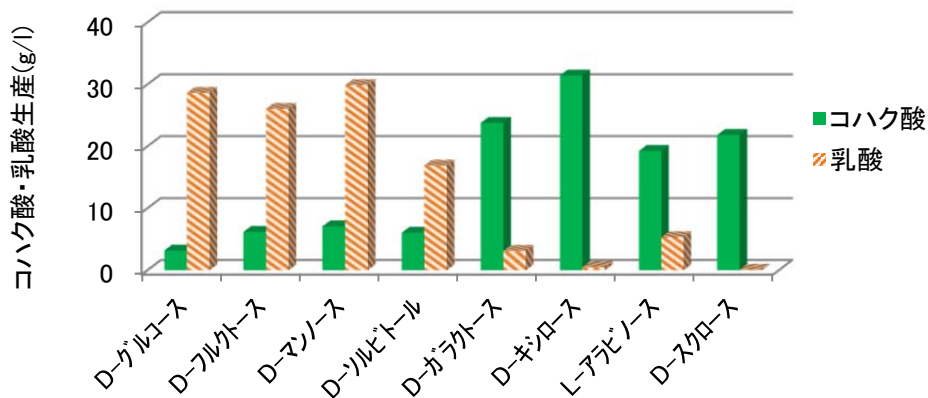


図 2. 糖の利用と生産物量

また、グルコースとキシロースが 3 : 1 (グルコース 39g/l、キシロース 13g/l) の割合で含む培地での生産性を検討したところ、グルコースの消費と共に D-乳酸を生産し、その後キシロースが消費され、コハク酸を生産することが分かった (図 3)。また、グルコースは対数増殖期に消費され、定常期までに完全に消費して、その後キシロースが消費されると推察され、糖の代謝経路は非常に興味深い結果となった。

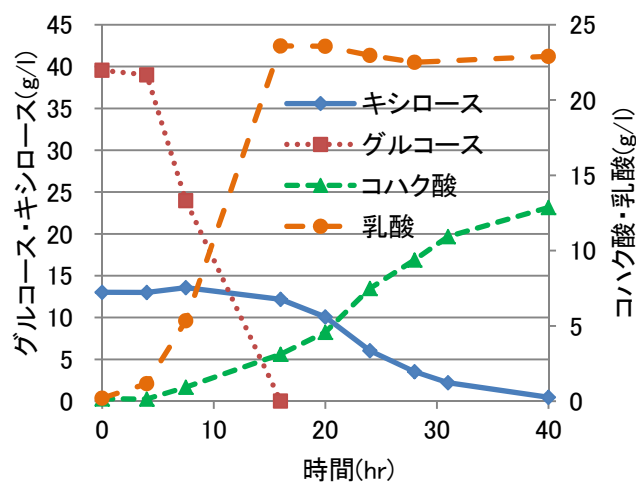


図 3. グルコース・キシロース混合培地での発酵経過

3. バイオマスからコハク酸生産の検討

グルコース 35.8g/l、キシロース 11.9g/l を含む稲わら糖化液を用いてコハク酸生産能を検討したところD-乳酸 25.0g/l とコハク酸 11.4g/l の生産が認められた(図4)。このことから、実バイオマスでの利用も可能であることが示唆された。

バイオリファイナリーの観点からこれらの菌株は、グルコース・キシロースを含む糖化液からはD-乳酸とコハク酸の同時生産、またはグルコースをエタノールや他の物質に変換した後の残ったキシロースでコハク酸生産など、様々な用途に利用できると考えられる。

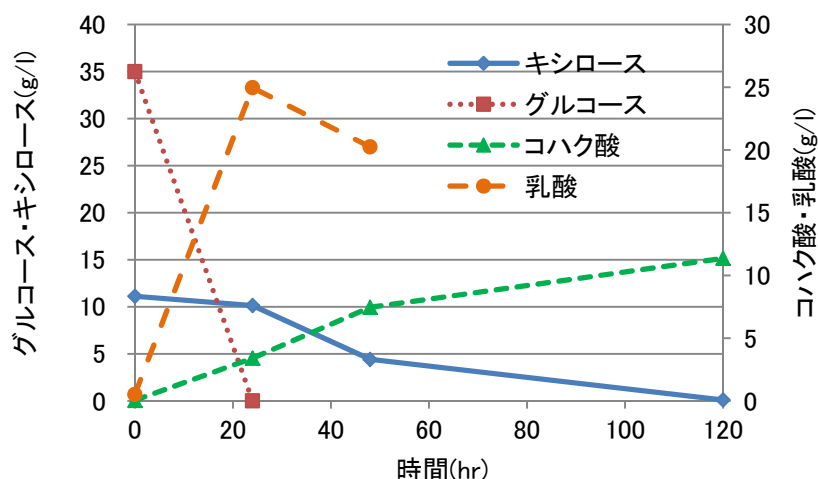


図4. 稲わら糖化液での発酵経過

【引用文献】

- 1) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (2005) バイオリファイナリーの研究・技術動向調査報告書 財団法人バイオインダストリー協会、東京.
- 2) Werpy T. and Petersen G., (2004) Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I -Results of Screening of Potential Candidate from Sugars and Synthesis Gas. The U.S. Department of Energy.
<http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>
- 3) 乾将行、湯川英明 (2010) バイオリファイナリーの現状と展望 繊維と工業 66, 150-153.
- 4) Liu Y. P., Zheng P., Sun Z. H., Ni Y., Dong J.J., and Zhu L.L., (2008) Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99, 1736-1742.
- 5) Agarwal L., Isar J., and Saxena R. K., (2005) Rapid screening procedures for identification of succinic acid producers. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 63, 24-32.

餅生地硬化性に及ぼす糯米の糊化特性

高橋 徹、佐々木 玲*、熊谷 昌則*

(秋田県総合食品研究センター 食品開発グループ、*食品機能グループ)

Toru TAKAHASHI, Akira SASAKI and Masanori KUMAGAI

【緒言】

我が国における水稻米に占める水稻糯米の生産量（平成 21 年）は約 3.5%¹⁾であるが、糯米は菓子や飲料等の加工品原材料として多目的に利用されており、6 次産業化の推進のためにも戦略的な作物と考えられる。糯米はアミロースを含まないため、粳米に比べて澱粉の老化が遅い。ところが、水稻糯品種には、餅生地の状態で、硬化性の大小に違いがあることも知られている。硬化速度が速い糯米は切り餅や米菓等に適し、逆に硬化速度の遅い糯米は軟らかさの持続性が求められる大福等の餅菓자에適する。したがって、餅生地の硬化性は糯米の加工適性の大きな要因となる。一方、餅生地硬化性は糯米の加工適性を左右するだけでなく、実需者のニーズに応じた新たな品種の育種・選抜時においても重要な指標となる。育種の初期段階では、米の生産量も限られるため、少量の試料で多面的に硬化性が評価できることが望ましい。本研究では、構築した少量餅生地硬化性評価システム²⁾と従来の硬化性ランク³⁾との関係から、本システムが硬化性の普遍的な評価法であるのことの確認、また、糯米の糊化特性との関係を明らかにして、餅生地硬化性を多面的に捉えることを目的とした。

【実験方法】

1. 試料米

試験には市販されている 2010 年度産の水稻糯玄米 9 品種（表 1）を購入し、研削式精米機（BT-AE05-HL、象印マホービン株式会社）にて、歩留まりが 90%となるように搗精した。精米は、チャック式の簡易密閉袋に入れ、各種測定に用いるまで、15℃の恒温庫にて保管した。なお、使用した糯米は、餅生地の硬化性の程度が「硬化性ランク³⁾」として示されている品種である。

表1 実験に用いた糯品種と硬化性ランク

品 種	生産地	硬化性ランク ³⁾
こがねもち	新潟県	7
タンチョウモチ	福井県	2
ヒメノモチ	山形県	4
ヒヨクモチ	熊本県	1
みやこがねもち	宮城県	7
もちひかり	埼玉県	5
マンゲツモチ	山口県	3
滋賀羽二重糯	滋賀県	3
峰の雪もち	埼玉県	4

生産年はいずれも2010年

2. 糯米粉の糊化特性測定

糯精米は、目開き 0.5mm のスクリーンを装着した粉碎機にて粉碎し、米粉を得た。

米粉懸濁液の加熱・冷却時の粘度特性は、温度制御攪拌型迅速粘度測定装置（RVA-3D型、NEWPORT SCIENTIFIC 社）にて測定した。米粉 2.5g（乾物）をアルミニウム製円筒試料容器に入れ、これに脱塩水 22.5g を加えて手攪拌した。40℃で 5 分間保持後、毎分 2℃で 95℃まで昇温し、同温度で 10 分間保持後、毎分 2℃で 25℃まで冷却するプログラムにて温度を制御した。得られた粘度特性曲線から粘度上昇温度（PT）、加熱時最高粘度（PV）とその時の温度（PV_{tp}）、最終粘度（FV）をそれぞれ求めた。また、米粉の示差走査熱量測定（DSC）は、次のとおりである。すなわち、米粉 15mg（乾物）と脱塩水 35mg を 70μl 容量の銀製密封試料容器に密封した。示差走査熱量測定装置（DSC120、セイコーインスツル）を用い、脱塩水を対照として、25℃で 20 分間保持した後、毎分 1℃で 130℃まで加熱して得られた DSC 曲線から、糊化開始温度（T₀）、糊化ピーク温度（T_p）、糊化終了温度（T_c）および糊化に伴うエンタルピー変化（ΔH）をそれぞれ求めた。

3. 餅生地調製の調製および力学特性測定

餅生地の調製および力学特性測定は佐々木ら²⁾の方法にて実施した。すなわち、精米 40g を洗米後、約 10 倍量の 15℃の脱塩水に 16 時間の浸漬後、精米をザルに上げ、30 分間水切りをした。この精米を金網に敷き、餅搗き機（PFC-20FK、株式会社東芝）の内釜へ静置し、蒸し機能を使用して 30 分間蒸煮した。蒸し操作を開始して、25 分後に上蓋を開け、蒸米の表面へ 5ml の脱塩水を散布した。蒸米は直ちに 50℃に設定したミキサー（50g 容量）を装着したパン生地物性測定装置（ファリノグラフ、ブラバンダー）へ投入し、3 分間混捏した。搗き上げた餅生地は、金属製の型箱（厚さ 8mm）へ充填し、室温下で加圧成形後、型箱から外し、食品用樹脂製フィルムで包み、4℃で 24 時間保存した。冷蔵し、硬化させた餅生地の力学特性は、直径 2mm の金属製治具を装着した単軸圧縮・引っ張り型万能試験機（Instron 5544、インストロンカンパニーリミテッド）にて測定された。圧縮速度は 2mm/s、圧縮ひずみは 0.50 に設定し、室温（約 23℃）下で測定した。なお、測定時の餅生地の温度は 20～22℃であった。1 サンプルにつき 3 回測定し、これを 3 反復行った。餅生地の硬さは力学特性測定の圧縮ひずみが 0.50 時の力と定義した。

【結果と考察】

図 1 に糯米粉の代表的な RVA 曲線を示した。硬化性ランクの小さいヒヨクモチやたんちょうもちの粘度上昇温度（PT）は、こがねもちよりも約 5℃も低く、硬化性ランクと PT 間には正の相関が確認された。また、硬化性ランクの大きい品種は、加熱時最高粘度（PV）とその時の温度

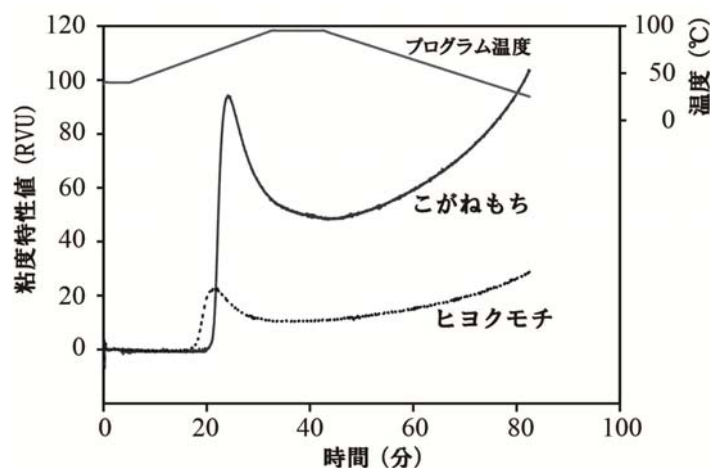


図 1 糯米粉の代表的な RVA 曲線

(PV_{tp})、および最終粘度 (FV) も高い値を示し、これらの特性値と硬化性ランク間にも正の相関関係が見られた。これらの結果は、石崎ら³⁾や辻井ら⁴⁾の報告と矛盾しない。また、RVA 測定から求めたピーク温度は、糯米アミロペクチン中の長鎖の割合との間に正の相関があるとされている⁵⁾。図2にこがねもちとヒヨクモチのDSC曲線を示した。こがねもちの糊化開始温度 (T_0) は約8°C、糊化ピーク温度 (T_p) は約6°C、それぞれヒヨクモチと比較して上昇した。DSCにおける T_0 および T_p と硬化性ランク間にもRVA特性値と同様に、それぞれ正の相関が見られたことから、糯米粉の糊化特性から硬化性ランクの予測が可能であることがわかった。

餅生地硬化性は、数百gの糯米から調製した餅生地をつり下げた時のたわみ⁶⁾から評価されてきたが、この方式とも相関がある、果実硬度計⁷⁾や単軸圧縮・引張り試験機⁸⁾を用いた力学特性測定による簡便で客観的な評価法が主流になりつつある。両者には相関があるとされており、本研究における力学特性測定から求めた各品種の餅生地の硬さと硬化性ランク間にも正の相関が確認され、先行研究と同様に、硬化性の客観評価に適していることが明らかとなった。次に、本研究で得られた餅生地の硬化性(硬さ)と糊化特性値との関係について検討した。硬化性とRVAによるPT(図3)、 PV 、 PV_{tp} およびFV間ならびにDSCによる T_0 および T_p 間にはそれぞれ正の相関関係が確認され、特にPTと T_0 は高い相関係数であった。以上のことから、水稻糯品種の餅生地の硬化性が、多面的な方法で客観的に評価可能となった。

【引用文献】

- 1) http://www.komenet.jp/_member/mochigome/index.html 最近の「もち米」に関する情勢 米穀機構糯米事業部ホームページ.
- 2) 佐々木 玲、高橋 徹、熊谷 昌則 (2012) 圧縮および引張り強度による餅硬化性評

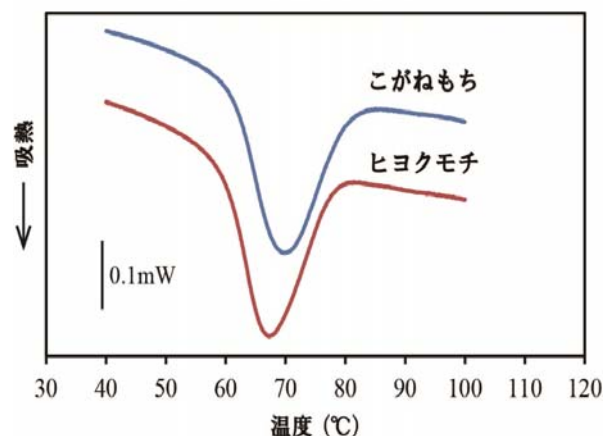


図2 糯米粉の代表的なDSC曲線

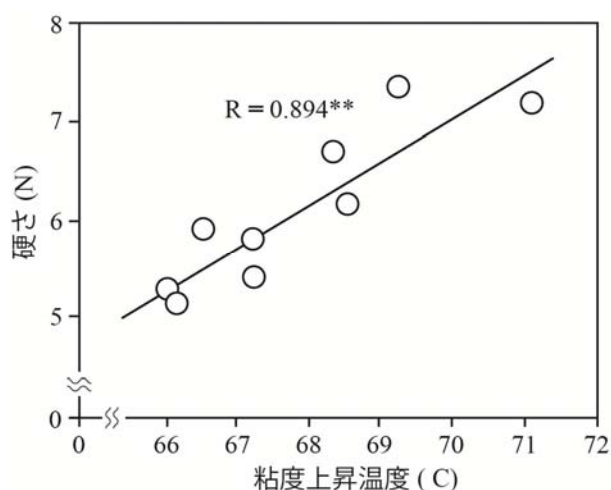


図3 餅生地硬さとRVAによる粘度上昇温度との関係

価システムの構築 秋田県総合食品研究センター報告 **14**, 19-22.

- 3) 石崎和彦、中村恭子、東聡志、小林和幸、阿部聖一、星豊一 (1996) もち品種の加工特性に関する研究 第3報こがねもちに由来するもち品種のもち硬化性 北陸作物学会報 **31**, 16-17.
- 4) 辻井良政、北村亮子、内野昌孝、高野克己 (2007) モチ米の加工特性に及ぼす胚乳アミラーゼの影響について 日本食品保蔵科学会誌 **33**, 63-69.
- 5) 五十嵐俊成、木下雅文、神田英毅、中森朋子、楠目俊三 (2008) アミロペクチン単位鎖長分布による水稻糯品種の餅硬化性評価 日本応用糖質科学会誌 **55**, 13-19.
- 6) 山下浩(1996) もち イネ育種マニュアル(山本隆一、堀末登、池田良一共編) 養賢堂 70-73.
- 7) 佐藤弘一、斎藤真一、吉田智彦 (2005) 水稻糯品種の餅硬化性、糊化特性および尿素崩壊性による選抜方法 日本作物学会紀事 **74**, 310-315.
- 8) 江川和徳、吉井洋一 (1990) 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.

秋田県産米の遊離糖と遊離アミノ酸に関する研究

大能俊久、伊藤善輝*

(秋田県総合食品研究センター 食品開発グループ、*こまち農業協同組合)

Toshihisa OHNO and Yoshiteru ITO

【緒言】

米の食味に関する研究の一環として、精米に含まれる呈味成分である遊離糖や遊離アミノ酸が調べられている¹⁾⁻³⁾。しかし、玄米における遊離糖や遊離アミノ酸を調べた報告は多くはない⁴⁾。また、秋田県産米における遊離糖や遊離アミノ酸を調べた報告は少ない。そこで、秋田県産米の特徴を明らかにするべく、玄米とその精米に含まれる遊離糖と遊離アミノ酸を調べた。加えて、搗精による含有量の変化についても検討を行った。

【実験方法】

1. 試料

減農薬減化学肥料による栽培を行った平成24年秋田県湯沢市産あきたこまち玄米を篩選別に向け、1.9mm以上の玄米を得て玄米試料とした。その玄米を山本製作所製ライスパル VP-31 で歩留まり90%に搗精したものを精米試料とした。

2. 遊離糖、遊離アミノ酸の測定

上記米をサイクロンサンプルミル (UDY Corporation) で粉碎した米粉1gを円筒濾紙中に採り、80%エタノール約50mlを加えて20分加熱還流を行った。その後エタノールを回収した。円筒濾紙に約30mlの80%エタノールを加えて再度20分の加熱還流を行い、その後エタノールを回収した。回収したエタノールを合わせて減圧濃縮を行い溶液を乾固させた後、超純水5mlに溶かした (A液)。

A液を0.45 μ mのフィルターでろ過して、糖分析システム DX-500 (ダイオネクス社製) を用いて高性能陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) で分析した。検出器は Pulsed amperometric detector ED40 (ダイオネクス社製) を用いた。米に含まれる糖はショ糖、グルコース、フルクトースが主であることから、これら3つの糖の定量を行った。それぞれの市販試薬を用いて検量線を作成して試料の遊離糖含量を求めた。

遊離アミノ酸の測定は、A液に等量の0.04N塩酸を加えた後0.45 μ 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。

【結果と考察】

1. 玄米と精米の遊離糖

玄米と精米の遊離糖量を表1に示す。玄米も精米も遊離糖量は、多い方から順にショ糖、グルコース、フルクトースであった。吉井と有坂も新潟県産コシヒカリの玄米と精米について80%エタノールで加熱還流抽出を行って、ショ糖が一番多く、グルコース、フルクトースの順である事を報告している⁴⁾。また、その含有量を比較すると今回の結果は吉井と有坂の報告に比べて、玄米、精米とも、グルコース、フルクトース量は少ないものの、ショ糖量は多くなっていた。3つの糖を足した総遊離糖量は玄米では吉井と有坂の報告に比べて10%増加しており、精米では50%増加していた。また、同じく80%エタノールで加熱還流抽出を行って遊離糖量を調べた杉山らの報告にある新潟県産コシヒカリの精米に存在するショ糖、グルコース、フルクトース3つの糖を足した総量と比べると、今回のあきたこまちの精米の総遊離糖量は2倍以上であった³⁾。

玄米から精米を調製する搗精によって、ショ糖は35%に低下したが、グルコースやフルクトースはほとんど変わらない値であった。以上から、ショ糖は糠層に多く存在し、グルコースやフルクトースは糠層と胚乳にほぼ均等に存在すると考えられる。

表1 玄米と精米の遊離糖

品名	グルコース (mg% ^{a)})	フルクトース (mg% ^{a)})	ショ糖 (mg% ^{a)})	総遊離糖 (mg% ^{a)})
玄米	16.7	4.9	1103.2	1124.8
精米	16.9	5.1	387.4	409.4

a)無水物換算

2. 玄米と精米の遊離アミノ酸

玄米と精米の主要な9種の遊離アミノ酸量を表2に示す。9種の内含有量が多いアミノ酸は多い順に、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、アラニン、セリン、γ-アミノ酪酸（GABA）であった。吉井と有坂は新潟県産コシヒカリの玄米と精米について75%エタノールで加熱還流抽出を行い、主なアミノ酸は多い順にアスパラギン、アラニン、グルタミン酸、セリン、プロリンであることを報告している⁴⁾。また、杉山らは80%エタノールによる加熱還流抽出で新潟県産コシヒカリ精米中の遊離アミノ酸量を調べ、主なアミノ酸は多い順にアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリンであることを報告している³⁾。今回の結果と主なアミノ酸やその順序が若干異なるのは、品種や生産した年の気象条件などが影響したのではないかと推測されるが、確かなことを述べるためには更なる研究が必要である。

表2 玄米と精米の遊離アミノ酸

品名	アスパラギン酸 (mg% ^{a)})	スレオニン (mg% ^{a)})	セリン (mg% ^{a)})	アスパラギン (mg% ^{a)})	グルタミン酸 (mg% ^{a)})	グリシン (mg% ^{a)})	アラニン (mg% ^{a)})	GABA (mg% ^{a)})	アルギニン (mg% ^{a)})
玄米	16.97	0.98	2.98	4.34	29.58	0.59	3.29	3.13	1.64
精米	5.06	0.38	1.37	1.83	8.97	0.34	1.47	1.09	0.33

a)無水物換算

含有量自体を比較すると、玄米の総遊離アミノ酸量は吉井と有坂が調べた新潟県産コシヒカリに比べて3倍以上存在し、一番存在量が多いグルタミン酸は、玄米も精米も吉井と有坂が調べたものに比べて10倍以上存在していた⁴⁾。また、玄米から精米を調製する搗精によって各アミノ酸は20～58%に減少した。このことから、9種のいずれのアミノ酸も糠層にその大部分が存在していると考えられた。

米の遊離糖や遊離アミノ酸の定量は、種々の要因から測定者によりかなりの相違が認められる³⁾。そのため、今回の結果だけでは断定することはできないが、今回調べた秋田県産米は他の米と比較して遊離糖や遊離アミノ酸が多い可能性があると考えられる。

【引用文献】

- 1) 竹生新治郎、渡辺正造、杉本貞三、酒井藤敏、谷口嘉廣 (1983) 米の食味と理化学的性質の関連 澱粉科学 **30**, 333-341.
- 2) 田島眞, 堀野俊郎, 前田万里, Son, J. R. (1992) 米粒外層から抽出されるオリゴ糖類 日本食品工業学会誌 **39**, 857-861.
- 3) 杉山智美、小西雅子、寺崎太二郎、畑江敬子、島田淳子 (1995) 米粒中の微量成分とその偏在 日本食品科学工学会誌 **42**, 401-409.
- 4) 吉井洋一、有坂将美 (1992) 米菓製造工程における糖、アミノ酸の成分量変化、新潟食品研究所・研究報告 **27**, 7-14.

3. 総説 (1 件)

- 1) 「豆類由来アンジオテンシン変換酵素阻害物質」
○高橋砂織

豆類由来アンギオテンシン変換酵素阻害物質について

高橋 砂織

(秋田県総合食品研究センター)

Saori TAKAHASHI

【要約】

大豆を含む豆類は世界的に見ても消費が多く、特に大豆は日本では古くから味噌、納豆、豆腐や湯葉などに加工され多くの食品に利用されている。豆類はタンパク質、脂質、ビタミンやミネラルを多く含み健康に良いことが知られている。さらに、食物繊維やポリフェノールなどの機能性成分も含まれている。本総説においては、大豆とその加工品の高血圧制御物質について最近の知見を紹介する。

1. 緒言

豆類は美味しく且つ健康に良い食べ物として古来より多くの人々から愛されてきた。世界的に見ると、豆類の中では大豆と落花生の生産量が多く、特に大豆は世界の豆生産量全体の約 50%を占めている。日本における大豆の生産は、米の生産調整による転作が進み、平成 24 年度には約 23.6 万トンとなっているがこれは国内消費量の 6~7%に過ぎず、大部分を輸入に頼っている¹⁾。国内における大豆の生産量は北海道、東北や九州が多く、平成 24 年度の生産量の上位 8 番目までの順番は北海道、宮城県、佐賀県、福岡県、新潟県、秋田県、山形県、滋賀県である¹⁾。

ところで、大豆を含む豆類には多くの機能性物質が含まれている。大豆の機能性物質としては、エストロゲン様の作用を有するイソフラボン類²⁾、癌抑制効果が期待されるフィチン酸³⁾、抗酸化性や血圧上昇抑制効果が認められている大豆サポニン^{4,7)}やアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を有し血圧降下作用が期待されるニコチアナミン¹⁰⁾などが知られている。

レニン・アンギオテンシン系 (RAS) は哺乳類で最も解析が進んでいる昇圧系の一つである。RAS の一員として重要な役割を持つ ACE の阻害物質研究は古くから行われている。図 1 に ACE の作用機序を示した。ACE は、レニンで生成されたアンギオテンシン I に作用して活性型ホルモンであるアンギオテンシン II を生成するとともに、炎症作用や降圧作用を持つブラジキニンに作用して不活性化する。したがって ACE は高血圧治療の重要なターゲットの一つとして古くからその阻害薬の研究が進められてきた。その結果、代表的な阻害物質として最初にカプトプリルが開発された。カプトプリルは、高血圧治療薬の第一候補として長い間使用されてきたが、空咳などの副作用があり現在、副作用が少ないレニン阻害剤のアリスキレンが注目されている。ところで、食物由来 ACE 阻害物質に関する研究は数多く報告されており、低分子化合物やペプチド類が同定されている。本総説では、豆類の機能性として ACE 阻害効果

を中心に最近の知見を解説する。

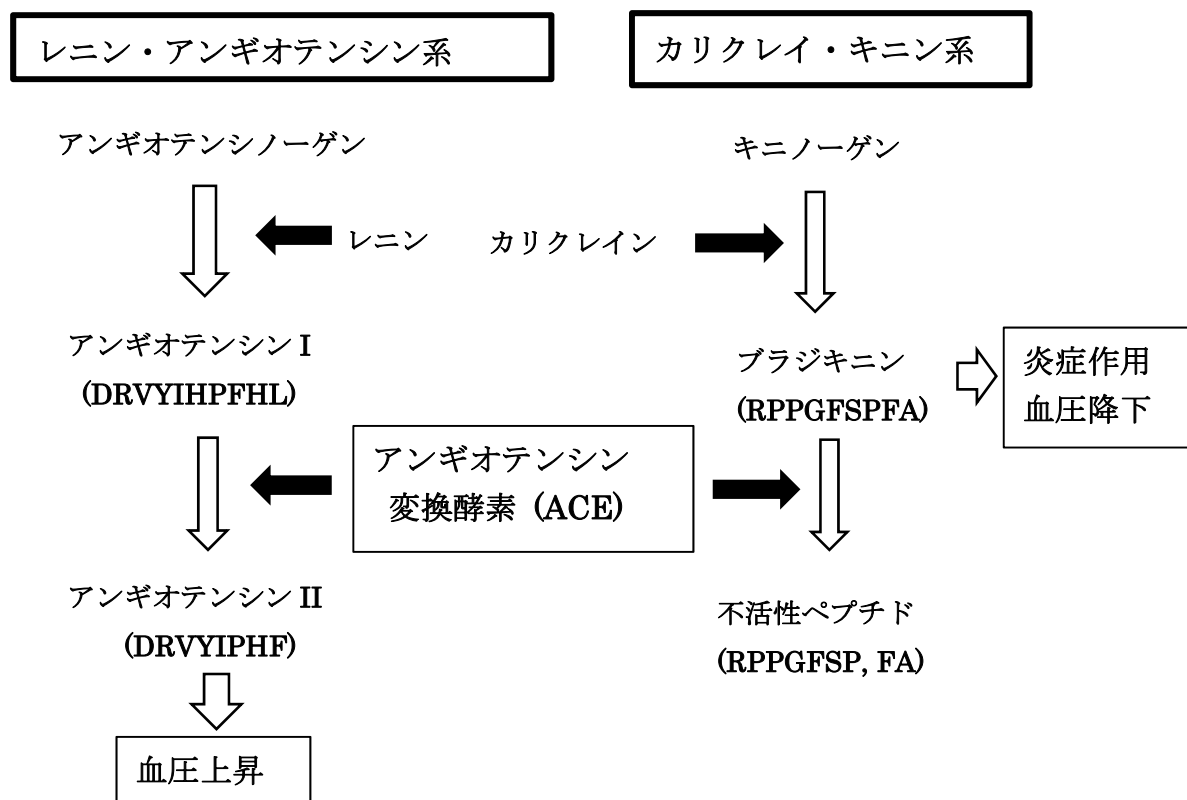


図1. ACEの作用機序

2. 豆類由来低分子 ACE 阻害物質

豆類の ACE 阻害活性については味噌、醤油、豆腐餛 (とうふよう) などの発酵食品を対象とした研究が多く発表されている⁸⁻¹³⁾。Kinoshita らは、醤油から ACE 阻害物質を精製し、その構造をニコチアナミン (*N*[*N*-(3-amino-3 carboxy propyl)-3-amino-3- carboxypropyl]azetidine-2-carboxylic acid, NA) と同定した⁸⁾ (図2)。NA は、ACE 活性を強く阻害し、その IC₅₀ 値は 0.26μM と求められている。また、高濃度の NA (20 mg/kg) の本態性高血圧モデルラット (SHR) への単回投与試験では、1 時間後、4 時間後及び 8 時間後にそれぞれ 24、20 及び 19mmHg の血圧低下が観察されている⁸⁾。醤油の NA は、大豆由来であり、その後、各種豆類に存在する NA の定量が行われ、豆類には普遍的に NA の存在することが明らかとなっている¹⁴⁾。NA は非タンパク質性のアミノ酸で、高等植物に広く存在し、植物生理学的には土壤中からの 2 価イオン吸収に重要な役割を担っている¹⁵⁾。ACE は、金属酵素で活性中心のヒスチジンクラスターに保持された Zn⁺⁺ を持っている。NA は強力なキレート作用により ACE 活性を阻害するほか、NA 中のアゼチジン酸 2-カルボン酸 (図2の左側の化学構造) がプロリンのアナログとしての作用を持ち ACE 活性を阻害すると考えられている⁸⁾。

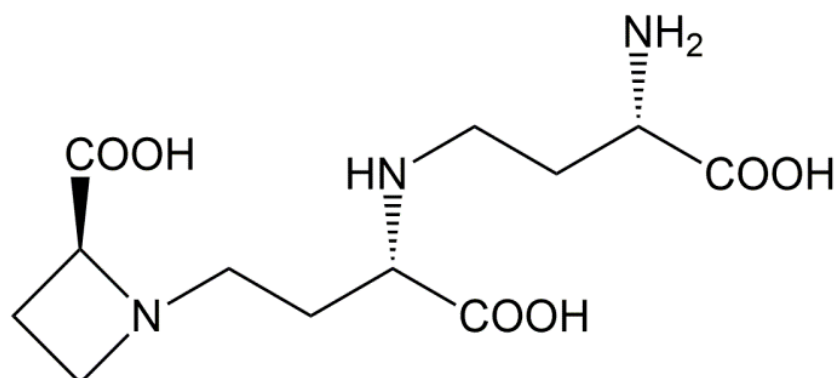


図2. ニコチアナミンの化学構造

NAの由来は異なるが、ハヤトウリ由来NAのヒト型高血圧モデル動物への投与試験も行われている。Hayashiらは、ハヤトウリ由来NAのつくば高血圧マウス (THM)の血圧及ぼす影響を検討した¹⁶⁾。THMは、ヒトレニン遺伝子を導入した雌マウスとヒトアンジオテンシンノーゲン遺伝子を導入した雄マウスを交配することで作成されたヒト型高血圧モデルマウスである。本モデルマウスは、前述のSHRとは異なり、ヒトレニン遺伝子とヒトアンジオテンシンノーゲン遺伝子の両方の遺伝子を持つRAS系亢進型の高血圧モデルマウスであり、高血圧の成因が明らかなモデル動物である¹⁷⁾。TMRの体重20gあたり1mgのニコチアナミンを胃内に単回投与し血圧を経時的に測定した。その結果、純水を投与したコントロール群の収縮期血圧は、 135.6 ± 4.7 mmHgであり投与後24時間まで有意な血圧変動は認められなかった。しかしながら、NA投与群では投与前 132.1 ± 5.7 mmHgから投与1時間後には 115.5 ± 12.0 mmHgまで有意な血圧低下を示した。また、HPLC法を用いて血中NA濃度を追跡した結果、NA投与後1時間で血中NA濃度が最も高く、6時間後には低下し、24時間後には検出されなかった。以上の結果から、NAはRAS系が亢進しているTHMに対して血圧降下作用を持つことが証明された¹⁶⁾。

3. 大豆発酵食品や大豆タンパク質加水分解物に含まれるACE阻害ペプチド

各種大豆発酵や大豆タンパク質のプロテアーゼ分解物のACE阻害活性や血圧降下作用に関しては多くの報告がある¹⁸⁻²¹⁾。Wuらは、脱脂大豆のアルカララーゼ消化物の抗高血圧作用について検討した¹⁸⁾。アルカララーゼは、*Bacillus licheniformis*由来のアルカリプロテアーゼで、subtilisin Aを主体とする酵素剤である。脱脂大豆にアルカララーゼを添加し、pH9.0、50°Cで12分間反応を行ったのち、酸処理でアルカララーゼを失活させるとともに未分解物を沈殿させた。上清を分子量10000の限外濾過膜に通し、通過液をイオン交換樹脂で部分精製した。ペプチドの回収率は原材料の約14%であった。得られたペプチドを100mg、500mg、1000mg/kg of body weightでSHR

に単回経口投与し、血圧の変動を観察した。その結果、投与ペプチドの濃度依存的に血圧の低下が観察された。一方、Loらは、90-95%のタンパク質を含有する分離大豆タンパク質 (SPI, Soy Protein Isolate)に胃のタンパク質分解酵素であるペプシン及び膵液由来各種消化酵素を含むパンクレアチンを作用させた消化物の ACE 阻害活性について検討した¹⁹⁾。まず SPI に塩酸酸性下でペプシンを 0 分、20 分、40 分及び 60 分間作用させ、それぞれの時間に反応溶液の pH を炭酸水素ナトリウム溶液で pH5.3 にしてペプシンを失活させる。その後、水酸化ナトリウム溶液で pH7.5 に調整し、パンクレアチンを 0~180 分間作用させた後、沸騰水中で反応を停止後、それぞれの試料について ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害活性は、ペプシンの 20 分間反応で最大となり、パンクレアチンを作用させると徐々にではあるが阻害活性が低下した。コントロールの未処理 SPI に ACE 阻害活性は認められなかった。酵素消化物の ACE に対する 50%阻害値、IC₅₀は 0.28±0.04 mg/ml であった。また、各種クロマトグラフィーで分画した標品の IC₅₀は 0.13±0.03 mg/ml から IC₅₀は 0.93±0.08 mg/ml であった。分画した殆どの画分に ACE 阻害活性が認められたが、低分子で且つ疎水性が高いペプチドに阻害活性の強い傾向が認められた。以上の結果より大豆タンパク質の消化管由来酵素での分解物は、生理的条件でも効果が期待出来るものと推察された。

韓国の大豆発酵ペーストや沖縄の伝統的発酵食品である豆腐鯨からの ACE 阻害ペプチドの精製が報告されている^{20, 21)}。Shinらは、発酵大豆ペーストの水抽出液に ACE 阻害活性を見出した²⁰⁾。各種クロマトグラフィーを用いて本阻害物質を精製し、その構造を His-His-Leu と決定した。ACE に対する His-His-Leu の IC₅₀ 値は、2.2µg/ml と求められ、本ペプチドは強力な ACE 阻害活性を持つことが示された。また合成ペプチドを用いて SHR への静脈投与試験を行った結果、5mg/kg of body weight の 3 回投与で有意な血圧低下が観察された。一方、琉球大学農学部の Kuba らは、沖縄特産の大豆発酵食品である豆腐鯨に ACE 阻害活性を見出した²¹⁾。豆腐のような水抽出液から逆相クロマトグラフィーやゲル濾過などで 2 種類の阻害物質を精製した。得られた阻害物質の構造は、Ile-Phe-Leu 及び Trp-Leu と同定された。

BLAST サーチの結果、Ile-Phe-Leu は、β-コングリシニンの α 及び β-サブユニット由来であり、また、Trp-Leu はグリシニンの B、B1A もしくは BX-サブユニット由来であることが示されている。

4. プロテアーゼ処理納豆由来 ACE 阻害物質の構造と高血圧抑制作用

納豆は ACE 阻害物質を含むことが知られている^{11, 22)}。しかしながら、納豆由来 ACE 阻害物質に関する詳細な研究は行われていない。そこで、プロテアーゼ処理納豆由来 ACE 阻害物質の精製と同定を試みた²³⁾。標的酵素としては、ウサギ肺由来 ACE を用い Bz-Gly-His-Leu を基質として Freidland らの方法により ACE 活性を評価した²⁴⁾。納豆菌は、(株)ヤマダフーズ製を使用し、40°C で 14~15 時間発酵後、10°C で保存した。酵素処理挽き割り納豆製造においては、納豆菌を接種する際に食品

添加物である天野エンザイム社製のプロテアーゼ製剤を煮豆に添加し、発酵を行った。初めに挽き割り納豆と極小粒納豆の ACE 阻害活性の経時変化を検討した。発酵終了後に 4℃で保存した場合、保存 6 日目に ACE 阻害活性はほぼ一定となり、極小粒納豆では保存初日の約 1.7 倍に、挽き割り納豆では約 3.0 倍に増加し、挽き割り納豆の方が ACE 阻害活性の上昇度合の高いことが示された。また、極小粒納豆と挽き割り納豆との ACE 阻害活性を比較した場合、保存期間を通じて挽き割り納豆の方が大きく、その差は最大で 2.5 倍であった。一方、酵素処理挽き割り納豆の ACE 阻害活性は、保存期間を通じて通常の挽き割り納豆よりも有意に高い値を示した。そこで、酵素処理挽き割り納豆を用いて ACE 阻害ペプチドの精製を試みた。各種クロマトグラフィーを駆使して 11 種類の ACE 阻害ペプチドを同定した。表 1 に酵素処理挽き割り納豆由来 ACE 阻害ペプチドのアミノ酸配列とそのペプチドの由来タンパク質を示した。表 1 の中で、*で示したペプチド、Ile-Ile、Ile-Asp、Ile-Phe-Tyr、Leu-Phe-Tyr 及び Leu-Tyr-Tyr は、今回新規に見出された ACE 阻害ペプチドである。

表 1 酵素処理納豆由来 ACE 阻害ペプチド及び由来タンパク質²³⁾

アミノ酸配列	由来する大豆タンパク質
Ile-Ile*	β-アミラーゼ 他
Ile-Asp*	サイクイン 他
Ile-Phe-Tyr*	ユビキチン特異的プロテアーゼ 他
Leu-Phe-Tyr*	RNA-結合タンパク質 他
Leu-Tyr-Tyr*	リポオキシゲナーゼ 他
Ile-Phe	フラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ 他
Leu-Ile	NADH デヒドロゲナーゼサブユニット 7 他
Leu-Phe	ペルオキシダーゼ 他
Leu-Ile-Tyr	逆転写酵素 他
Ile-Ile-Tyr	フィトールキナーゼ 他
Trp-Gly-Pro	プロテインジスルフィダーゼファミリー 他

*, 新規 ACE 阻害ペプチド

酵素処理挽き割り納豆抽出液の血圧降下作用を検証するために、酵素処理挽き割り納豆の粗抽出液を Sep-Pak C18 35cc に吸着させメタノールで溶出・減圧乾燥した試料を調整した。本試料溶液 (40 mg/ml H₂O)を脳卒中易発性高血圧自然発症ラット SHPSP/Izumo に 80mg/kg of body weight の割合で経口投与し、血圧の変動を解析した。対象として水を投与した群における血圧の変動は観察されなかった。これに対し、試料群では投与 1 時間から有意な血圧降下を示し、最終測定である 6 時間後まで有意に血圧が低下していた。以上の結果から、酵素処理納豆抽出物中のペプチド類は *in vitro* で ACE 阻害活性を示すとともに *in vivo* においても高血圧モデルラットにおい

て血圧降下作用を示すことが明らかとなった²³⁾。

5. ACE の迅速活性測定方法の開発

これまで ACE の活性測定においては、Hippuryl (Hip)-His-Leu を基質として用いて、ACE により生じた Hippuric acid をエーテル抽出し、減圧乾燥後緩衝液に溶解し、235 nm の吸光度を測定する方法²⁵⁾、Hippuric acid を HPLC で分析する方法²⁶⁾ や生じた His-Leu をアルカリ条件で *o*-フタルアルデヒド(OPA)と反応して蛍光強度を測定する方法²⁴⁾などが用いられてきた。蛍光標識法は分光学的に Hippuric acid を定量する方法より約 1 桁高い測定感度を有しており、多くの研究者が愛用している。しかしながら、上述の方法はいずれもエーテル抽出、HPLC 分析や酵素反応後の蛍光誘導体化反応など多くの操作が必要であり、簡便で且つ高感度な ACE 測定方法の開発が望まれていた。我々は、これまでにレニン活性測定用の高感度蛍光消光基質を開発し²⁷⁾、これを用いて様々な食材よりレニン阻害物質を同定している^{5, 6, 28-30)}。そこで、ACE 活性測定用の蛍光消光基質の開発を試みた³¹⁾。

最初にアンギオテンシン I の C 末端領域の配列を参考にするとともに、C 末端プロリン残基が ACE との親和性を上げるとの考えから Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro を設計した。次に、Lys(Dnp)を C 末端に配置した Nma-His-Pro-Lys(Dnp)を考案した。これら 2 種類の蛍光消光基質と Hip-His-Leu を基質として ACE で生じた His-Leu を OPA で蛍光誘導体化する方法とを比較した (図 3)。

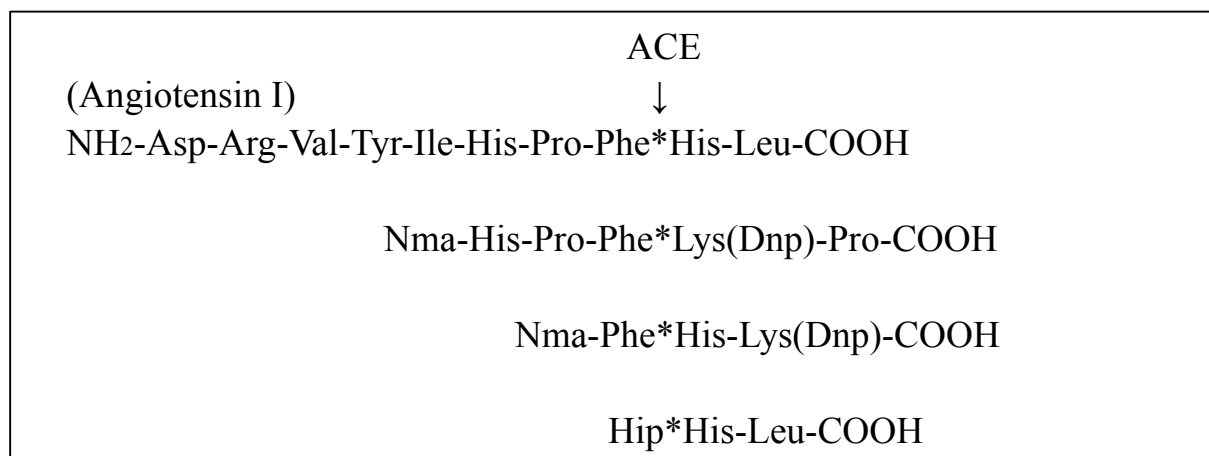


図 3 ACE 活性測定用蛍光消光基質の設計³¹⁾

ACE 標品は、ウサギ肺由来 ACE 及び組換え型ヒト ACE を用いた。表 2 にウサギ肺 ACE を用いた場合の各基質に対する反応動学的定数を示した。C 末端に Pro を導入した Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro の場合、基質との親和性を反映する K_m 値は 16.2 μM であり、Nma-Phe-His-Lys(Dnp)の 38.3 μM に比べ約 2 倍親和性の高いことが分かる。しかし、基質の回転数 k_{cat} を見てみると Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro は、30.8 s^{-1} で、Nma-Phe-His-Lys(Dnp)の値 196 s^{-1} の約 1/8 である。結果とし

て基質の性能を示す k_{cat}/K_m は、Nma-Phe-His-Lys(Dnp)の方が Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro に比べ約 3 倍大きく、Nma-Phe-His-Lys(Dnp)がウサギ肺 ACE に対して優れた基質であることが示された。Hip-His-Leu の場合は、蛍光消光基質 Nma-Phe-His-Lys(Dnp)の約 1/6 の相対活性しか持たず、蛍光消光基質の優位性が示されている。

表 2 蛍光消光基質及び Hip-His-Leu を基質とした場合のウサギ肺由来 ACE の反応動力学的定数³¹⁾

基質構造	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	相対活性 (%)
Nma-Phe-His-Lys(Dnp)	38.3	196	5.12	100
Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro	16.2	30.8	1.90	37.2
Hip-His-Leu	1020	838	0.82	16.0
Hip-His-Leu*	1330			

*, 引用論文 Friedland and Silverstein²⁴⁾より.

表 3 蛍光消光基質及び Hip-His-Leu を基質とした場合の組換え型ヒト ACE の反応動力学的定数³¹⁾

基質構造	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	相対活性 (%)
Nma-Phe-His-Lys(Dnp)	30.4	487	16.0	100
Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro	6.3	44.6	7.36	46.0
Hip-His-Leu	1670	509	0.30	1.9
Hip-His-Leu*	1540	408	0.26	1.6

*, 引用論文 Wei *et al.*³²⁾より.

一方、組換え型ヒト ACE を用いた場合の各基質の反応動力学的定数を表 3 に示した。C 末端に Pro を導入した Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro の場合、基質との親和性を反映する K_m 値は 6.3 μM であり表 2 に示したウサギ肺 ACE に比べ約 2.5 倍であり組換え型ヒト ACE により親和性が高いことが示された。また、本基質は、Nma-Phe-His-Lys(Dnp)の 30.4 μM に比べても約 5 倍親和性の高いことが分かる。し

かし、基質の回転数 k_{cat} を見てみると Nma-Phe-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro は、 44.6 s^{-1} であるのに対して Nma-Phe-His-Lys(Dnp) の場合は 487 s^{-1} と約 11 倍である。結果として基質の性能を示す k_{cat}/K_m は、Nma-Phe-His-Lys(Dnp) が Nma-Phe-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro に比べ約 2 倍大きく、Nma-Phe-His-Lys(Dnp) が組換え型ヒト ACE に対して優れた基質であることが分かった。また、表 2 と 3 を比較すると、Nma-Phe-His-Lys(Dnp) は、ウサギ ACE よりも組換え型ヒト ACE に対して優れた基質であることが明らかであり、今後臨床診断薬としての応用などが期待される。比較として用いた Hip-His-Leu の場合は、Nma-Phe-His-Lys(Dnp) の約 1/50 の相対活性しか持たず、ここでも蛍光消光基質の優位性が明らかとなっている。

今回合成した ACE 活性測定用蛍光趣向基質 Nma-Phe-His-Lys(Dnp)-COOH の他の酵素活性測定への応用を探る目的で、ペプチドの C 末端アミノ酸を逐次分解するカルボキシペプチダーゼの活性測定を試みた。カルボキシペプチダーゼの活性測定には、一般的に N 末端をカルボキシベンゾイル化(CBZ)した CBZ-Phe-Leu などが用いられている。本基質を用いてカルボキシペプチダーゼで生成したアミノ酸をニンヒドリン発色で検出する方法が定法となっている。この方法は 2 段階反応でありまた感度が良くないなどの問題があった。そこで、市販の 2 種類のカルボキシペプチダーゼすなわち酵母由来のカルボキシペプチダーゼ Y 及びブタ膵臓由来カルボキシペプチダーゼ B を用いて本基質の有用性を検討した。その結果、Nma-Phe-His-Lys(Dnp)-COOH はカルボキシペプチダーゼ B では分解されないが、カルボキシペプチダーゼ Y の良好な基質となることが判明した。

表 4 Nma-Phe-His-Lys(Dnp) 及び CBZ-誘導体を基質とした場合のカルボキシペプチダーゼ Y の反応動学的定数³¹⁾

基質構造	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Nma-Phe-His-Lys(Dnp)	60.2	105	1.74
CBZ-Ser-Leu*	1700	17.9	0.011
CBZ-His-Leu*	1800	1.4	0.001

*, 引用論文 Hayashi³³⁾ より.

表 4 に蛍光消光基質と CBZ-ペプチド基質を用いた場合の反応動学的定数を示した。基質の親和性 K_m は、CBZ-ペプチド基質に比べ Nma-Phe-His-Lys(Dnp) の方が 2 桁小さく、Nma-Phe-His-Lys(Dnp) がカルボキシペプチダーゼに非常に良く認識されていることが分かる。また、基質の回転数 k_{cat} も Nma-Phe-His-Lys(Dnp) が CBZ-Ser-Leu の約 6 倍、CBZ-His-Leu の約 80 倍であり結果として Nma-Phe-His-Lys(Dnp) が両基質の 2 桁～3 桁優れた基質であると判断された³¹⁾。今後、Nma-Phe-His-

Lys(Dnp)を用いた測定が普及することで、ACE 阻害物質探索研究やカルボキシペプチダーゼ研究スピード加速が期待される。

6. 酵素処理豆乳由来 ACE 阻害物質

前述の通り、プロテアーゼ処理納豆には新規の ACE 阻害ペプチドの存在することが知られている²³⁾。そこで、納豆に用いたものと同様のプロテアーゼを用いて豆乳への添加効果を検討した³⁴⁾。

原材料大豆としてリポオキシゲナーゼ欠損品種である「すずさやか」を使用した豆乳（株式会社ヤマダフーズ製）に大和化成製食品添加用プロテアーゼ PROTIN SD-PC10F を 0-1% 添加し、50°C で 16 時間反応後、75°C、90 分間の加熱で酵素を失活させた。酵素処理豆乳の ACE 阻害活性測定には、ウサギ肺由来 ACE を標的酵素とし、且つ前述の高感度簡便・迅速測定が可能である Nma-Phe-His-Lys(Dnp) を基質として用いた³¹⁾。ACE 阻害活性が強かった 1% プロテアーゼ処理豆乳より、C₁₈ カラムを用いた逆相 HPLC 等で阻害ペプチド類を精製し、ペプチドシーケンサーで構造を決定した。得られた配列を基にペプチドを合成し、阻害活性を検証した。

豆乳は本来殆ど ACE 阻害活性を殆ど持っていない。しかしながら、プロテアーゼ処理により酵素の濃度依存的に ACE 阻害活性が出現した。ACE の阻害強度を示す IC₅₀ 値は、プロテアーゼ添加割合 0.01% で 8.75 µg/ml、0.1% で 1.55 µg/ml 及び 1.0% で 0.26 µg/ml であり、プロテアーゼ処理により急激に ACE 阻害ペプチドの生成することが確認された。次に、1% プロテアーゼ処理豆乳から ACE 阻害ペプチドの精製を行い、得られた構造を基に合成したペプチド類を用いて ACE 阻害の詳細を検討した。

表 5 酵素処理豆乳由来 ACE 阻害ペプチド及び由来タンパク質³⁴⁾

アミノ酸配列	由来する大豆タンパク質
FFYY*	硝酸運搬タンパク質 NRT1-5 他
WHP*	フィターゼ 他
FVP*	D-ミオイノシトール 3-リン酸合成酵素
LHPGDAQR*	β-コングルシニン β サブユニット
IAV*	グリシニン G1 他
VNP*	ジニトロピコリン酸合成酵素 他
LEPP*	イノシトールリン酸リン酸化酵素 他
WNPR*	パルメート様ペンタフォリレート 1 他
LPP	フラバノン 3-水酸化酵素 他
LLP	2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素他
FV	イソフラボン合成酵素 1 前駆体 他

アミノ酸は一文字表記とした。*、新規 ACE 阻害ペプチド

表5に得られた ACE 阻害ペプチドのアミノ酸配列と由来する大豆タンパク質を示した。この中で、FFYY (Phe-Phe-Tyr-Tyr)、WHP (Trp-His-Pro)、FVP (Phe-Val-Pro)、LHPGDAQR (Leu-His-Pro-Gly-Asp-Ala-Gln-Arg)、IAL (Ile-Ala-Leu)、VNP (Val-Asn-Pro)、LEPP (Leu-Glu-Pro-Pro)及び WNPR (Trp-Asn-Pro-Arg)の8種類のペプチドは新規 ACE 阻害ペプチドであり、特許も申請している³⁵⁾。これらのペプチドの中では、FFYY が ACE に対する阻害が最も強く、その IC₅₀ 値は 1.9 μM と求められている。一般的な ACE 阻害ペプチドの IC₅₀ 値は数 μM から数十 μM であり¹⁸⁻²⁰⁾、FFYY は食物由来で最も強い ACE 阻害ペプチドの一つと言える。本酵素処理豆乳の高血圧モデルラットへの投与試験においても明瞭な血圧降下作用が示されており、今後血圧が高めの方用の特定保健用食品の開発が望まれる。

謝辞

本総説で引用したレニン阻害物質や ACE 阻害物質関連論文の共同研究に加わって頂きました皆様方に厚く御礼を申し上げます。

【引用文献】

1. 農林水産省大豆関連データ集.
http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/
2. Setchell K. D.R. (2001) Soy isoflavones-benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Journal of American College of Nutrition*, **20**, 354s-362s.
3. Fox C. H., and Eberl M., (2002) Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, **10**, 229-234.
4. Yoshiki Y., Kudou S., and Okubo K., (1998) Relationship between chemical structure and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **62**, 2291-2299.
5. Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., and Yamada S., (2008) Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor from soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**, 3232-3236.
6. Takahashi S., Hori K., Hokari M., Gotoh T., and Sugiyama T., (2010) Inhibition of human renin activity by saponins. *Biomedical Research*, **31**, 155-159.
7. Hiwatashi K., Shirakawa H., Hori K., Yoshiki Y., Suzuki N., Hokari M., Komai M., and Takahashi S., (2010) Reduction of blood pressure by soybean saponins, renin inhibitor from soybean, in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience*

- Biotechnology and Biochemistry*, **74**, 2310-2312.
8. Kinoshita E., Yamakoshi J., and Kikuchi M., (1993) Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**, 1107-1110.
 9. Kataoka S., (2005) Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (shyoyu) and its components. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, **100**, 227-234.
 10. Kuroda K., Ishihara K., and Matsuoka N., (2013) Characterization of nicotianamine isolated from soybean. *Journal of Food Research*, **2**, 49-54.
 11. Okamoto A., Hanagata H., Matsumoto E., Kawamura Y., Koizumi Y., and Yanagida F., (1995) Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of various fermented foods. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 1147-1149.
 12. Kuba M., Tanaka K., Rawata S., Takeda Y., and Yasuda M., (2003) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **67**, 1278-1283.
 13. Shin Z. I., Yu R., Park S. A., Chung D. K., Ahn C. W., Nam H. S., Kim K. S., and Lee H. J., (2001) His-His-Leu, an Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3004-3009.
 14. Takenaka T., (2011) Properties of angiotensin I-converting enzyme (ACE). In: Soybean –Biochemistry, chemistry and physiology- (Ng T-B ed.), p21-30, InTech Europa, Rijeka, Croatia.
 15. Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., and Nishizawa N. K., (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *The Plant Cell*, **15**, 1263-1280.
 16. 林あつみ、中山知子、村上和雄、青柳康夫、木元幸一 (2005) つくば高血圧マウス血圧に及ぼすニコチアナミンの影響 日本栄養・食糧学会誌 **58**, 315-321.
 17. Fukamizu A., Takimoto E., Sugiyama K., Hatae T., Seo M. S., Takahashi S., Sugiyama F., Kajiwara N., Yamami K., and Murakami K., (1993) Dependent of angiotensin production in transgenic mice carrying either the human renin or human angiotensinogen genes on species-specific kinetics of the renin-angiotensin system. *Drug Research*, **43**, 222-227.
 18. Wu J. and Ding X., (2001) Hypertension and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **49**,

501-506.

19. Lo W. M. Y. and Li-Chan E. C. Y., (2005) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy proteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 3369-3376.
20. Shin Z-I., Yu R., Park S-A., Chung D. K., Ahn C-W., Nam H-S., Kim K-S., and Lee H. L., (2001) His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exert antihypertensive activity in vivo. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3004-3009.
21. Yasuda M., (2011) Fermented tofu, Tofuyo. In: Soybean –Biochemistry, chemistry and physiology- (Ng T-B ed.), p299-322, InTech Europa, Rijeka, Croatia.
22. 伊部さちえ、吉田恵子、熊田薫 (2006) 納豆のアンジオテンシ I 変換酵素阻害活性 日本食品科学工学会誌 **53**, 189-192.
23. 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 (2011) 食品・臨床栄養 e2011 1-8.
24. Freidland J., and Silverstein E., (1976) A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin I-converting enzyme. *American Journal of Clinical Pathology*, **66**, 416-424.
25. Cushman D. W., and Cheung H. S., (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637-1648.
26. Chiknas S. G., (1979) A liquid chromatography-assisted assay for angiotensin-converting enzyme (peptidyl dipeptidase) in serum. *Clinical Chemistry*, **25**, 1259-1262.
27. Takahashi S., Hata K., Kikuchi K-I., and Gotoh T., (2007) High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: Rapid purification and characterization. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**, 2610-2613.
28. Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Kodama I., Hokari M., Suzuki N., Yoshizawa Y., and Gotoh T., (2010) The occurrence of renin inhibitor in rice: Isolation, identification, and structure-function relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74**, 1713-1715.
29. Takahashi S., Tokiwano T., Suzuki N., Kodama I., Yoshizawa Y., and Gotoh T., (2010) Renin inhibitory activity in rice and cereals. *Journal of Biological Macromolecules*, **10**, 83-91.
30. Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Hokari M., Yoshizawa Y., and Gotoh T., (2011) Isolation and identification of human renin inhibitor from *Aralia cordata* (Udo). *Journal of Biological Macromolecules*, **11**, 83-89.

31. Takahashi S., Ono H., Gotoh T., Yoshizawa-Kumagae K., and Sugiyama T., (2011) Novel internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y. *Biomedical Research*, **32**, 407-411.
32. Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., and Clauser E., (1991) The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 9002-9006.
33. Hayashi R., (1976) Carboxypeptidase Y. *Methods in Enzymology*, **45**, 568-572.
34. Tomatsu M., Shimakage A., Shinbo M., Yamada S., and Takahashi S., (2013) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya milk. *Food Chemistry*, **136**, 612-616.
35. 特願 2012-022513 (特開 2013-159677)

4. 特許の概要 (3 件)

- 1) 発明の名称：脂質代謝改善剤、機能性食品、食品添加物、抗酸化剤、
医薬、動脈硬化予防・改善剤、化粧品、及び脂質代謝改善剤の製造方法
- 2) 発明の名称：セルロース系バイオマスからのエタノールの製造方法
- 3) 発明の名称：油脂組成物及びその製造方法

- 1) 発明の名称：脂質代謝改善剤、機能性食品、食品添加物、抗酸化剤、医薬、動脈硬化予防・改善剤、化粧品、及び脂質代謝改善剤の製造方法
発明者：畠恵司、木内高信 ((株) Harvestech)、浜田健太郎 ((株) Harvestech)
公開番号：特開 2012-167069
公開日：平成 24 年 9 月 6 日

【要約】

[課題]

効果の高い脂質代謝改善剤を提供する。

[解決手段]

ジュンサイ (*Brasenia schreberi*) を加工して脂質代謝改善剤を製造する。この脂質代謝改善剤は、血中中性脂肪値を低下させる。また、特に全 LDL に占める small, dense LDL (sdLDL) の割合を低下させる。実際に、この脂質代謝改善剤は、in vitro 実験にて、脂肪酸合成系及びコレステロール合成系の脂質代謝関連遺伝子の発現を低下させる。また、ヒトにおいても、LDL コレステロールの分子量の減少を抑え、sdLDL を少なくすることができる。

- 2) 発明の名称：セルロース系バイオマスからのエタノールの製造方法
発明者：進藤昌、西田孝伸
公開番号：特開 2012-170395
公開日：平成 24 年 9 月 10 日

【要約】

[課題]

セルロース系バイオマスに由来する糖化液から効率的にエタノールを製造する方法を提供する。

[解決手段]

ピキア・スティピティスによるキシロースからエタノールを生成する際の間代謝物であるグルコース-6-リン酸、フルクトース-1, 6-ビスリン酸およびピルビン酸を代謝する酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ケトラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を増強したピキア・スティピティス突然変異株を用い、発酵物質阻害に対する耐性能を付与することでより効率良いアルコール発酵を行うことからなる。

3) 発明の名称：油脂組成物及びその製造方法

発明者：池本敦（秋田大学）、堀一之、白川和宏（(株)西木村総合公社）

特許番号：特許第4877595号

登録日：平成23年12月9日

【要約】

[課題]

本発明は、脂質消化酵素であるリパーゼによる加水分解反応の基質となりにくく、摂取後のトリアシルグリセロール（中性脂質）の増加が抑制され、体への蓄積性が少なく、かつ保存安定性および風味が良好であるアケビ油の1,2-ジアシルグリセロ-3-アセテートを主成分とする食用油脂組成物を提供することを目的とする。

[解決手段]

本発明は、アケビ科植物の種子を乾燥させ、搾油もしくは溶媒抽出で、粗原油を調整し、粗原油に対し3～20%の水を加水し50～120℃で5～30分間攪拌した後、一晚静置させてビリ分及びリン脂質を主とするガム質を除去し、上清の油脂を濾過し、液状汎用型油脂組成物を製造する1,2-ジアシルグリセロ-3-アセテートを主成分とする液状汎用型油脂組成物の製造方法である。

また、前記製造方法により製造された液状汎用型油脂組成物をドレッシング、マヨネーズ、サプリメント、化粧品に利用したものである。

5. 学会発表要旨 (31 件)

1) 発表学会：日本生化学会東北支部会

発表日と場所：2012年5月26日、山形大学医学部（山形市）

演題名：レニン・アンジオテンシン系関連酵素類の新規活性測定方法について

発表者：小野洋輝¹、後藤 猛¹、熊谷久美子²、杉山俊博³、○高橋砂織⁴

（¹秋田大学院・工学資源、²（株）ペプチド研、³秋田大学院・医、
⁴秋田県総食研）

2) 発表学会：第20回 秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2012年6月8日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：中国地域食料資源に含まれる機能性成分の検索及び利用技術の開発

発表者：葦澤悟（独法 国際農林水産業研究センター）、李里特（中国農業大学）、
後藤猛（秋田大学）、高橋砂織（秋田県総食研）

3) 発表学会：第98回発酵食品セミナー

発表日と場所：2012年7月19日、日本醸造協会（東京都）

演題名：みそ中のレニン阻害活性について

発表者：高橋砂織（秋田県総食研）

4) 学会発表：第21回日本エネルギー学会

発表日と場所：2012年8月6日、工学院大学（東京都）

演題名：高温発酵性酵母を用いた新2段階発酵法によるグルコース・キシロース
からのバイオエタノール生産

発表者：○進藤 昌、西田孝伸（秋田県総食研）

三橋秀一（バイオエタノール革新技术研究組合）

5) 発表学会：SICE(The Society of Instrument and Control Engineers) Annual Conference 2012(計測自動制御学会国際会議)

発表日と場所：2012年8月22日、秋田大学(秋田市)

演題名：Extraction of Personal Preferences Implicitly using NIRS

発表者：Masanori Kumagai (Akita Research Institute of Food and Brewing)

6) 発表学会：日本調理科学会平成24年度大会

発表日と場所：2012年8月25日、秋田大学（秋田市）

演題名：水稻糯米の品種特性が硬化性に与える影響の解明

発表者：高橋徹、佐々木玲、熊谷昌則（秋田県総食研）

7) 発表学会：食品酵素化学研究会第 12 回学術講演会

発表日と場所：2012 年 8 月 25 日、岩手大学（盛岡市）

演題名：小腸上皮細胞分化に伴う脂質合成酵素群の変動と新規脂質異常症改善素材
探索系の開発

発表者：○畠恵司¹、木村文子²、伊藤瑞穂²、岩間由香²、戸嶋彦²、高橋純一郎²
（¹秋田県総食研、²（株）スカイライト・バイオテック）

8) 発表学会：食品酵素化学研究会第 12 回学術講演会

発表日と場所：2012 年 8 月 25 日、岩手大学（盛岡市）

演題名：高血圧関連酵素の新規活性測定方法の開発と応用

発表者：○高橋砂織¹、小野洋輝²、熊谷（芳澤）久美子³、後藤 猛²
（¹秋田県総食研、²秋田大院・工学資源、³（株）ペプチド研）

9) 発表学会：平成 24 年度日本食品科学工学会大会

発表日と場所：2012 年 8 月 29 日、藤女子大学（札幌市）

演題名：酵素処理豆乳の ACE 阻害作用について

発表者：戸松誠²、○嶋影逸¹、新保守¹、山田清繁¹、高橋砂織²
（¹（株）ヤマダフーズ、²秋田県総食研）

10) 発表学会：日本食品科学工学会第 59 回大会

発表日と場所：2012 年 8 月 30 日、藤女子大学（札幌市）

演題名：加熱処理による玄米γ-アミノ酪酸量の変化と水分量について

発表者：○大能俊久、塚本研一（秋田県総食研）

11) 発表学会：日本食品科学工学会第 59 回大会

発表日と場所：2012 年 8 月 31 日、藤女子大学（札幌市）

演題名：二重変異体米澱粉ゲルの糊化・老化特性に及ぼす澱粉鎖長構造の影響

発表者：高橋徹¹、中村保典²、藤田直子²（秋田県総食研¹、秋田県立大²）

12) 発表学会：2012 日本感性工学会年次大会

発表日と場所：2012 年 9 月 1 日 東京電機大学（東京都）

演題名：地域特産物販売促進における感性マーケティング手法の利用の検討

発表者：○高畠 聡（秋田県総食研）

13) 発表学会：化学工学会第 44 回秋季大会

発表日と場所：2012 年 9 月 19 日、東北大学（仙台市）

演題名：アンギオテンシン I 変換酵素の新規自己消光蛍光基質の開発と反応

発表者：小野洋輝¹、○後藤 猛¹、熊谷（芳澤）久美子²、杉山俊博³、
高橋砂織⁴（¹秋田大・院・工学資源、²（株）ペプチド研、

³秋田大・院・医、⁴秋田県総食研)

14) 学会発表：15th European Congress of Biotechnology

発表日と場所：2012年9月23日、(イスタンブール)

演題名：Production of bioethanol with novel fermentation system using high temperature tolerance *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitidis* from *cellulosic biomass*.

発表者：Sho Shindo, Takanori Nishida

(Akita Research Institute of Food and Brewing)

15) 学会発表：World Resources Forum 2012

発表日と場所：2012年10月22日、(北京)

演題名：Bioethanol production and cadmium removal from phytoremediation plant

発表者：Sho Shindo, Shoko Masuda, (Akita Research Institute of Food and Brewing)、
Hiroki Rai and Hiroyuki Hattori (Akita Prefectural University)

16) 発表学会：第46回 日本栄養・食糧学会東北支部大会

発表日と場所：2012年11月17日、山形大学農学部(鶴岡市)

演題名：アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド高含有納豆の開発

発表者：嶋影逸¹、新保守¹、山田清繁¹、Ardiansyah²、白川仁²、駒井三千夫²、
○樋渡一之³、戸松誠³、高橋砂織³

(¹ヤマダフーズ、²東北大・院農・栄養、³秋田県総食研)

17) 発表学会：第25回日本動物細胞工学会2012年度国際大会(JAACT2012)

発表日と場所：2012年11月30日、名古屋国際会議場(名古屋市)

演題名：An in vitro assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating lipoprotein profiles from human intestinal epithelium-like cells

発表者：○Keishi Hata¹, Gen Toshima², Fumiko Kimura², Mizuho Itoh², Yuka Iwama²,
Junichiro Takahashi² (¹Akita Research Institute of Food and Brewing,
²Skylight Biotech Inc.)

18) 発表学会：第21回秋田応用生命科学研究会 学術講演会

発表日と場所：2012年12月7日、秋田県総合食品研究センター(秋田市)

演題名：塩魚汁(しょっつる)のアンジオテンシン変換酵素阻害活性

発表者：青柳智則¹、後藤猛²、塚本研一³、○高橋砂織³

(¹秋田大学・工学資源、²秋田大学・院・工学資源、³秋田県総食研)

19) 発表学会：細胞アッセイ研究会 シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来

発表日と場所：2012年12月10日、東京大学（東京都）

演題名：LipoCULTURE, a novel assay system for antihyperlipidemic agents by assessing lipoprotein profiles from human hepatoma cell line

発表者：○Koji Kuriyama¹, Junichiro Takahashi¹, Keishi Hata²

(¹Skylight Biotech Inc., ²Akita Research Institute of Food and Brewing)

20) 発表学会：第35回 日本分子生物学会大会

発表日と場所：2012年12月14日、福岡国際会議場（福岡市）

演題名：Involvement of D-aspartic acid isomerization of lung proteins in the pathogenesis of chronic obstructive lung disease (COPD)

発表者：小笠原正人¹、尾谷三枝子²、葦澤 悟³、高橋砂織⁴、前山一隆¹、山内広平⁵（¹愛媛大・医・薬理、²神戸学院大・薬、³国際農林水産業研究センター、⁴秋田県総食研、⁵岩手医大・呼吸器内科）

21) 発表学会：第85回日本生化学会大会

発表日と場所：2012年12月16日、福岡国際会議場（福岡市）

演題名：自己蛍光消光基質を用いた血圧調節系酵素類の活性測定方法について

発表者：高橋砂織¹、小野洋樹²、常盤野哲生³、熊谷（芳澤）久美子⁴、後藤猛²

（¹秋田県総食研、²秋田大・院・工学資源、³秋田県大・生物資源、⁴（株）ペプチド研）

22) 学会発表：日本エネルギー学会 第8回バイオマス科学会議

発表日と場所：2013年1月9日、広島大学（東広島市）

演題名：カドミウムを高濃度に吸収した稲わらからのバイオエタノール生産とカドミウムの分離

発表者：○進藤 昌、増田祥子（秋田県総食研）

頼 泰樹、服部浩之（秋田県立大学）

23) 学会発表：日本エネルギー学会 第8回バイオマス科学会議

発表日と場所：2013年1月9日、広島大学（東広島市）

演題名：高効率アルコール発酵のための二段階発酵法の開発と使用する酵母の改良

発表者：○西田孝伸、進藤昌、佐々木美希子、柏谷香織（秋田県総食研）

三橋秀一（バイオエタノール革新技術研究組合）

24) 発表学会：平成24年度 LS-BT 合同成果発表会

発表日と場所：2013年2月5日、産総研（つくば市）

演題名：ACE阻害ペプチドを富化した豆乳の開発

発表者：戸松誠¹、嶋影逸²、新保守²、山田清繁²、○高橋砂織¹
(¹秋田県総食研、²(株)ヤマダフーズ)

25) 発表学会：平成 24 年度 LS-BT 合同成果発表会

発表日と場所：2013 年 2 月 5 日、産総研（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の性質

発表者：○葦澤悟（国際農林水産業研究センター）、高橋砂織（秋田県総食研）

26) 発表学会：みそ技術研究発表会

発表日と場所：平成 25 年 2 月 22 日、全中全味ビル（東京都）

演題名：新規白色分生子麹菌株を用いた味噌醸造試験

発表者：○渡辺隆幸¹、佐々木康子¹、佐藤勉²、瓜生 摂²、今野宏²、小笠原博信¹

(¹秋田県総食研、²(株)秋田今野商店)

27) 学会発表：2nd Biotechnology world Congress

発表日と場所：2013 年 2 月 18 日、(ドバイ)

演題名：Cadmium removal and bioethanol production from phytoremediation plant
by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

発表者：Sho shindo, Shoko Masuda, (Akita Research Institute of Food and Brewing)、
Hiroki Rai and Hiroyuki Hattori (Akita Prefectural University)

28) 発表学会：2013 年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2013 年 3 月 25 日、東北大学（仙台市）

演題名：キシロースからコハク酸生産する細菌の分離とその特性

発表者：○戸松さやか、木村貴一、進藤昌（秋田県総食研）

29) 発表学会：日本農芸化学会 2013 年度大会

発表日と場所：2013 年 3 月 26 日、東北大学（仙台市）

演題名：魚醤油（しよっつる）の ACE 阻害活性について

発表者：青柳智則¹、後藤猛²、塚本研一³、○高橋砂織³

(¹秋田大学・工学資源、²秋田大学・院・工学資源、³秋田県総食研)

30) 発表学会：2012 年度 日本農芸化学会大会

発表日と場所：2013 年 3 月 26 日、東北大学川内キャンパス（仙台市青葉区）

演題名：発酵大麦エキスは脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの高血圧症を改善する

発表者：○植田一馬¹、Ardyansyah^{2,3}、白川仁²、Puspo Giriwono²、小口一起²、

外英樹⁴、樋渡一之⁵、高橋砂織⁵、駒井三千夫² (¹東北大・農・栄養学、

²東北大・院農・栄養学、³Food science and Technology Study Program,

Universitas Bakrie, Indonesia、⁴三和酒類、⁵秋田県総食研)

31) 発表学会：日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム

発表日と場所：2013 年 3 月 27 日、東北大学（仙台市）

演題名：変異体米澱粉の物理化学特性（澱粉生合成研究の最前線と変異体米澱粉の産業利用可能性）

発表者：高橋徹（秋田県総食研）

1) 発表学会：日本生化学会東北支部会

発表日と場所：2012年5月26日、山形大学医学部（山形市）

演題名：レニン・アンジオテンシン系関連酵素類の新規活性測定方法について

発表者：小野洋輝¹、後藤 猛¹、熊谷久美子²、杉山俊博³、○高橋砂織⁴

(¹秋田大学院・工学資源、²(株)ペプチド研、³秋田大学院・医、
⁴秋田県総食研)

レニン・アンジオテンシン系は、哺乳類において最も重要な血圧調節系である。レニンは主に、腎臓の傍糸球体細胞で生合成され様々な刺激で血中に放出される。血中のレニンは唯一の基質であるアンジオテンシノーゲンのN末端から10番目と11番目の結合を特異的に切断し、10残基のアミノ酸で構成されるアンジオテンシン I (AI) を生成する。AI は不活性ペプチドで、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) によりC末端2残基が切除され活性型のアンジオテンシン II (AII) となる。一方、肥満脂肪顆粒中に存在するキモトリプシン様セリンプロテアーゼであるキマーゼも ACE と同様に AI から AII を生成することが知られている。血圧の制御や特定保健用食品開発を目指した食物由来これら酵素類の阻害物質探索においては、目的とする酵素類の簡便かつ迅速な活性測定方法の開発が重要である。今回、レニン、ACE やキマーゼの活性測定に関連して各種酵素に対応した蛍光消光基質を設計し、その評価を行った。各種酵素類の生理基質のアミノ酸配列を基にして、N末端に蛍光物質 *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をリジンの ϵ アミノ基に導入した Lys (Dnp) を有する各種蛍光消光基質を合成した。その結果、レニン、ACE やキマーゼ活性測定用基質として Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ や Nma-Phe-His-Lys (Dnp) などを開発した。

2) 発表学会：第20回 秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2012年6月8日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：中国地域食料資源に含まれる機能性成分の検索及び利用技術の開発

発表者：菑澤悟（独法 国際農林水産業研究センター）、李里特（中国農業大学）、
後藤猛（秋田大学）、高橋砂織（秋田県総食研）

【目的】東・東南アジア地域では、在来農林水産物や伝統発酵食品などの多様な地域食料資源があり、機能性食品やその他新たな加工食品の原料として利用できるものが数多くある。一方、各地域独特の特殊な原料・製造方法・発酵微生物などにより生産された食品については、これまでに知られていない有用な生理機能性成分などが見つかる可能性が高く、それらの物質を機能性食品などの原料として利用することができれば、地域食料資源に対して大きな付加価値をつけることが可能となる。そこで今回は、中国地域食料資源からレニン及び ACE 阻害活性をもつ食品を検索するとともに、

α -グルコシダーゼ阻害活性を有する中国おから発酵食品に含まれる微生物の特性解明を目的とした。

【方法】 レニン及び ACE 活性測定は高橋らの方法 (Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610 (2007) ; *ibid*, **72**, 3232 (2008); Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407 (2011))で行った。 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定はラット小腸アセトンパウダー、4-ニトロフェニ α -D-グルコピラノシドを用いた。菌株は(独)製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門(NBRC)から入手した。

【結果と考察】中国大豆発酵食品に含まれるレニン及びACE阻害活性を検索したところ、種々の豆豉、豆醬にレニン阻害活性は0-81%、ACE阻害活性は13-99%存在することが明らかになった。阻害活性の強さの違いは発酵食品を製造する工程や微生物の種類によるものと考えられるが、現在のところ詳細は不明である。また、エンドウ豆粉、甜酒葯(藜草を加えた餅麴)にそれぞれ92%、76%のレニン阻害活性が存在することが明らかになった。つぎに、おから発酵食品より単離した微生物 *Bacillus subtilis* B2株 (Zhu *et al.*, *Food Chemistry*, **109**, 737 (2008)) のゲノム解析の結果、*B. amyloliquefaciens* と相同性があることが明らかとなった。そこで、NBRCより菌株を取得し、 α -グルコシダーゼ阻害物質生産能を検討した。*B. amyloliquefaciens* 3022株、14141株、及び15535株を、LB液体培地、LB寒天培地、米、小麦、トウモロコシ、大豆で培養あるいは発酵させ、得られた培養液または発酵物抽出液の α -グルコシダーゼ阻害活性を測定したところ、いずれの場合も活性阻害が認められた。一方、対照として市販納豆菌及び *B. subtilis* 13719株を用いた場合は、活性阻害は見られなかった。

3) 発表学会：第98回発酵食品セミナー

発表日と場所：2012年7月19日、日本醸造協会(東京都)

演題名：みそ中のレニン阻害活性について

発表者：高橋砂織(秋田県総食研)

< 血圧は、神経系や様々なホルモンで調節を受けている。中でもレニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構の研究は長い。 >

(発表の概要)

1. 塩分の過剰摂取と高血圧の関係について
2. レニン・アンギオテンシン系について
3. レニンの発現系構築について
4. レニン阻害剤の開発
5. みそ由来レニン阻害物質について
6. 大豆由来レニン阻害物質
7. 雑豆由来レニン阻害物質

8. サポニンの構造とレニン阻害活性相関

9. 全国市販味噌のレニン阻害活性

10. 米由来レニン阻害物質

11. 野菜山菜由来レニン阻害物質

12. まとめ

- ・レニンは血圧調節の要の酵素である。
- ・味噌には普遍的にレニン阻害物質が含まれる。
- ・味噌のレニン阻害物質の多くは大豆由来である。
- ・大豆のレニン阻害物質はソヤサポニン I である。
- ・米にもレニン阻害物質が存在している。
- ・米由来レニン阻害物質は、遊離不飽和脂肪酸のオレイン酸とリノール酸である。
- ・玄米は、良質なタンパク質を含んでいる。
- ・玄米—味噌—野菜—大豆の組み合わせで健康な食生活を取り戻す。

4) 学会発表：第 21 回日本エネルギー学会

発表日と場所：2012 年 8 月 6 日、工学院大学（東京都）

演題名：高温発酵性酵母を用いた新 2 段階発酵法によるグルコース・キシロースからのバイオエタノール生産

発表者：○進藤 昌、西田孝伸（秋田県総食研）

三橋秀一（バイオエタノール革新技术研究組合）

【目的】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グルコース・キシロ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。これまでに、非遺伝子組み換え菌による 2 段階発酵法を開発し報告している。今回、発酵工程のエネルギーの低減を目指して、高温発酵性酵母を用いた新規なバイオエタノール生産システムを開発したので報告する。

【方法および結果】バイオマスは、エリアンサスを用いた。前処理・糖化は、上村ら¹⁾の方法を用いた。エタノール生産は、グルコースからのエタノール生産を自然界から分離した高温発酵性酵母 *Schizosaccharomyces japonicas* SS4-5 を使用し、キシロ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 を使用した新規な 2 段階発酵法により行った。グルコース濃度 8%、キシロース濃度 5%のエリアンサス糖化液を用いてエタノール生産を行った結果、1 段階目でグルコースからのエタノール生産を 42℃で行うことによりエタノール生産と蒸留を同時に行うことができた。さらに 2 段階目で 5%濃度のキシロースからエタノールを生産することができた。本方法により発酵 24 時間でエタノール収率 85%を達成した。1) 上村ら 第 39 回石油・石油化学討論会（2009）

5) 発表学会:SICE(The Society of Instrument and Control Engineers) Annual Conference 2012(計測自動制御学会国際会議)

発表日と場所:2012年8月22日、秋田大学(秋田市)

演題名:Extraction of Personal Preferences Implicitly using NIRS

発表者:Masanori Kumagai(Akita Research Institute of Food and Brewing)

To evaluate personal preferences for food and other items, questionnaire methods and interview methods are often used. Using such methods, individual subjective responses are extracted using words or descriptions expressed explicitly by an adjective and adjective / verb. These responses are sometimes ambiguous and are insufficient to obtain reliable results. Furthermore, these explicit evaluations sometimes run short of objectivity, reproducibility, and reliability. Consequently, they might not be useful for non-explicit evaluation.

In this study, a trial was performed to extract personal preferences implicitly using near-infrared spectroscopy (NIRS), an optical method that has recently been identified as a safe, portable, and low-cost signal acquisition tool for measuring cortical activity with monitoring of the oxygen concentration of cerebral blood flow (CBF) in humans. Eight subjects were asked to evaluate food pictures of two kinds mentally and decide which they preferred. The NIRS signals were observed during their decision-making and the differences of the brain blood flows were analyzed based on personal preferences. Experimental results demonstrated the potential of NIRS methods to extract personal preferences implicitly.

6) 発表学会：日本調理科学会平成 24 年度大会

発表日と場所：2012年8月25日、秋田大学（秋田市）

演題名：水稲糯米の品種特性が硬化性に与える影響の解明

発表者：高橋徹、佐々木玲、熊谷昌則（秋田県総食研）

【目的】糯米澱粉はアミロペクチンのみから構成され、アミロースをほとんど含まない。しかしながら、品種によっては調理・加工・摂食に影響を及ぼす硬さや粘り、コシなどが異なることも知られている。近年の米加工品への需要拡大において、品種の特徴を十分に捉えることが、商品開発の戦略上でも重要である。特に餅生地硬さは、加工特性上重要視されている。そこで、糯米加工品の基本となる餅生地を少量の糯米での調製および評価方法を確立し、品種間の差異を明らかにすることを目的とした。

【方法】洗米後浸漬した糯精米 40g は餅搗き機を用いて蒸煮した。サンプル量が少ないことから、蒸煮中の乾燥を防ぐために蒸し工程の途中で散水を施した。蒸米を 50℃ に設定したファリノグラフに投入して混捏・攪拌によって餅生地を得た。これを成形容器に入れ、厚さ約 8mm まで圧延して 24 時間冷蔵庫に保存した。餅生地の硬さは、

直径 2mm の金属製治具を装着した万能試験機にて、圧縮および引張り速度 2mm/s、圧縮ひずみ 0.50 での力学特性測定から得られた力-時間曲線の圧縮時のピークとした。糯米粉の糊化特性は、DSC および RVA にて測定した。【結果】餅生地 of 力学特性測定から、「こがねもち」は硬く、「ヒヨクモチ」は軟らかい評価が得られ、硬化性ランク¹⁾と相違しない結果が得られた。また、ファリノグラフによる混捏時の抵抗値が大きくなると、餅生地も硬くなりやすい傾向にあることがわかった。さらに、餅生地の硬さと糯米粉の DSC 測定による糊化温度、RVA 測定による粘度上昇温度および粘度ピーク温度との間には正の相関が見られた。1)石崎他 北陸作物学会報, 31, 16(1996)

7) 発表学会：食品酵素化学研究会第 12 回学術講演会

発表日と場所：2012 年 8 月 25 日、岩手大学（盛岡市）

演題名：小腸上皮細胞分化に伴う脂質合成酵素群の変動と新規脂質異常症改善素材探索系の開発

発表者：○畠恵司¹、木村文子²、伊藤瑞穂²、岩間由香²、戸嶋彦²、高橋純一郎²

（¹秋田県総食研、²(株)スカイライト・バイオテック）

【目的】食事からの脂質、糖質ならびにアミノ酸などの栄養素は、主に小腸から吸収されるため、小腸におけるこれら栄養素の吸収をコントロールすることは、脂質異常症を始めとした生活習慣病の予防・改善に役立つ。我々はこれまで、ヒト肝細胞から分泌されるリポタンパク質中の脂質（中性脂肪やコレステロール）を独自の 방법으로評価することにより、脂質異常症改善素材の探索系を開発し、幾つかの食材についてモデル動物試験やヒト臨床試験との相関性について検証した¹⁻³⁾。本研究では、小腸上皮細胞から分泌されるリポタンパク質プロファイルを測定することにより、腸管からの脂質吸収を標的にした抗メタボ活性の探索系を開発したので報告する。

【方法】小腸上皮細胞は、ヒト大腸癌細胞株（Caco-2）を ThinCert®（Greiner、12 mm、8.0・m）上に接着後、4 日間酪酸ナトリウム処理による分化を誘導することで作成した。小腸上皮細胞への分化は、透過型電子顕微鏡観察における微絨毛の形成や、小腸アルカリホスファターゼ（IAP）などのマーカー遺伝子の発現を RT-PCR で測定することで確認した。小腸上皮細胞からの脂質の吸収は、小腸上皮細胞をオレイン酸ナトリウムならびにリゾホスファチジルコリン（LysoPC）を処理し、分泌されるリポタンパク質中の脂質量を LipoSEARCH®で定量することで行った。

【結果】酪酸ナトリウム処理した Caco-2 細胞は、濃度依存的に微絨毛形成ならびに小腸マーカーの発現が誘導された。特に、5 mM の濃度では、IAP の発現を 8.1 倍に亢進するなど、効率良く小腸上皮細胞への分化が誘導された。中性脂肪合成の基質であるオレイン酸ナトリウムとリポタンパク質合成・分泌を促進することで知られている LysoPC による小腸上皮細胞からのリポタンパク質の分泌への影響を検討した結果、0.75 mM オレイン酸ナトリウムおよび 0.2 mg/ml LysoPC が、リポタンパク質分泌を

最も促進することが判明した。さらに、リポタンパク質の分泌抑制物質である Pluronic L-81 により、同細胞からのリポタンパク質の分泌が阻害されるなど、既存薬の効果も確認できた。

さらに、上記に加えて、我々が動物試験等で脂質異常症改善活性を認めた食品素材に関する研究結果を発表する。

【参考論文】

1. Itoh, M., et al. *Biotechnol. Lett.* 31, 953-957 (2009)
2. Takahashi, J. et al. *J. Nat. Med.*, 65, 670-674 (2011)
3. 畠 他 *New Food Industry*, 54 (4), 19-27 (2012)

8) 発表学会：食品酵素化学研究会第 12 回学術講演会

発表日と場所：2012 年 8 月 25 日、岩手大学（盛岡市）

演題名：高血圧関連酵素の新規活性測定方法の開発と応用

発表者：○高橋砂織¹、小野洋輝²、熊谷（芳澤）久美子³、後藤 猛²

（¹秋田県総食研、²秋田大院・工学資源、³（株）ペプチド研）

【目的】レニン是非常に特異性の高いアスパルティックプロテアーゼで、主に腎臓の傍糸球体細胞で生合成され分泌顆粒（レニン顆粒）に貯蔵されている。顆粒内レニンは各種刺激で血中に放出され唯一の基質であるアンギオテンシノーゲンに作用して、アンギオテンシン I (AI) を遊離させる。AI は、不活性ホルモンで、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) により C 末端 2 残基が切除され活性型のアンギオテンシン II (AII) となる。AII は、直接血管を収縮させ、血圧上昇を引き起こす。また、副腎からのアルドステロン分泌を促進し、体液を増加させることで血圧を上昇させる。一方、肥満細胞には ACE と同様に AI から AII を生成するキモトリプシン様酵素キマーゼの存在することが知られている。レニン・アンギオテンシン系 (RAS) の制御に関しては、これまで酵素の入手が容易で且つ活性測定が簡便な ACE を標的酵素として各種食材より阻害物質の探索が行われてきた。しかしながら、レニンやキマーゼ阻害物質探索研究は殆ど行われていない。本研究では RAS 系の酵素を網羅的に解析する為の新規蛍光消光基質の開発とレニン阻害物質探索系の構築について解説する。

【方法】ACE 及びキマーゼは市販の組換え型酵素を入手した。組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現し、ペプスタチンアフィニティーカラムで精製した [1, 2]。各種蛍光消光基質は、生体内基質のアミノ酸配列を基に、N 末端に蛍光物質である *N*-メチルアントラニル酸を (Nma) をまた C 末端側に蛍光消光物質であるジニトロフェニル基をリジンの ε アミノ基に導入した Lys (Dnp) を有する各種蛍光消光基質を合成した。

【結果】組換え型ヒトレニン活性測定用基質として Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*Val-Ile-Thr-His-Lys (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ を開発した [1, 2]。一方、

ACE の蛍光消光基質として Nma-Phe-His-Lys(Dnp) を開発した [3]。本基質は、酵母由来カルボキシペプチダーゼであるカルボキシペプチダーゼ Y の活性測定にも有用であることが示された。さらに、キマーゼの活性測定にレニン活性用基質の有用性が示唆された。これらの活性測定方法を用いることで食物由来阻害物質等の迅速探索が可能となった。

【参考論文】

1. Takahashi S., *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).
2. Takahashi S., *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008).
3. Takahashi S., *et al. Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).

9) 発表学会：平成 24 年度日本食品科学工学会大会

発表日と場所：2012 年 8 月 29 日、藤女子大学（札幌市）

演題名：酵素処理豆乳の ACE 阻害作用について

発表者：戸松誠²、○嶋影逸¹、新保守¹、山田清繁¹、高橋砂織²

(¹株ヤマダフーズ、²秋田県総食研)

【目的】これまでの研究より、挽き割り納豆作製時に食品添加物のプロテアーゼ製剤を用いることで、既存の粒納豆よりもアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性が約 3 倍高い酵素処理挽き割り納豆を作製すると共に、この納豆より新規な ACE 阻害ペプチド 5 種類を精製・同定した[1]。これを受け本研究では、納豆よりも取扱いが容易な豆乳に上述のプロテアーゼ製剤を作用させて、高い ACE 阻害活性を有する新規な大豆ペプチドの単離を目指した。

【方法】ACE 活性は我々が開発した新規蛍光消光基質を用いて測定した[2]。(株)ヤマダフーズ製「飲みやすい豆乳」に上述のプロテアーゼ製剤を終濃度 0.1%(w/w)となるように加えて 50℃で 16 時間反応させた。これを 75℃、90 分間加熱して酵素を失活させ、酵素処理豆乳を作製した。酵素処理豆乳を固相抽出カラムに供して得たメタノール溶出画分をエバポレータで濃縮乾固させた。得られた固形物を 10mM トリス緩衝液 (pH7.0) に溶解させた後、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーに供し、ACE 阻害活性が高い 10 画分を得た。これら 10 画分をそれぞれプロテインシークエンサーに供して、各画分に含まれる ACE 阻害ペプチドのアミノ酸配列を解析するとともに、活性ペプチドを合成した。

【結果】解析の結果、上述の 10 画分のうち 8 画分から新規 ACE 阻害ペプチド 8 種類を得た。これらの ACE 阻害ペプチドの中で Phe-Phe-Tyr-Tyr、Trp-His-Pro の 2 種類のペプチドの ACE50%阻害濃度 (IC₅₀) は、それぞれ 1.9 μM および 4.8 μM であり、既知の ACE 阻害ペプチドと比較しても十分に強いことが判った。

【参考論文】

1. 嶋影逸 他、食品・臨床栄養 e2011, 1-8 (2011)
2. Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, 32, 407-411 (2011)

10) 発表学会：日本食品科学工学会第 59 回大会

発表日と場所：2012 年 8 月 30 日、藤女子大学（札幌市）

演題名：加熱処理による玄米 γ -アミノ酪酸量の変化と水分量について

発表者：○大能俊久、塚本研一（秋田県総食研）

【目的】発芽玄米は玄米を水に浸漬するため、腐敗や臭いの発生などが問題とされる。これらの問題を解決するため、水に浸漬せず加熱処理することで γ -アミノ酪酸 (GABA) を増加させる方法を考案した¹⁾。この方法では、玄米の水分量によって GABA 量が増加する可能性がある。そこで、水分量が GABA 量に与える影響を調べた。

【方法】秋田県産あきたこまちの同一玄米から、水分の異なる 3 つの玄米を調製した (13.3%、15.1%、17.5%)。それぞれについて、非加熱、70°C15 時間加熱、80°C8 時間加熱の 3 つの処理を行った。加熱処理は、玄米をアルミパウチ中に密封した後パウチごと恒温乾燥機に入れて行った。GABA を含む遊離アミノ酸の定量は、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 時間抽出し、遠心して採取した上清を等量の 0.04N 塩酸溶液で希釈し 0.45 μ 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。玄米を精米したものについても同様に定量を行った。

【結果】水分 13.3%では、加熱しても GABA は玄米 100g 当たり 12mg 未満であった。水分 15.1%、17.5%では加熱により 14mg 以上にまで増加した。これらのことから、加熱によって GABA を増加させる場合、水分が 15.1%、17.5%の方が 13.3%よりも玄米の GABA 量が多くなることが分かった。また、これらの玄米を精米したものも GABA 量が精米 100g 当たり 7mg を超えるものがあり、GABA 高含有精米としての利用も有望だと考えられた。

¹⁾第 58 回日本食品科学工学会大会講演要旨集, p. 62

11) 発表学会：日本食品科学工学会第 59 回大会

発表日と場所：2012 年 8 月 31 日、藤女子大学（札幌市）

演題名：二重変異体米澱粉ゲルの糊化・老化特性に及ぼす澱粉鎖長構造の影響

発表者：高橋徹¹⁾、中村保典²⁾、藤田直子²⁾（秋田総食研¹⁾、秋田県立大²⁾）

【目的】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変異体澱粉は、粒形態や結晶形、アミロース量やアミロペクチン構造が変化し、特に変異体同士を交配した二重変異体において、その特徴が顕著になるこ

とを報告した。今回は、澱粉の結晶化度の定量化および老化特性を中心とした諸特徴について報告する。

【方法】澱粉直鎖伸長酵素 (SS) の一つであるである SSIIIa 変異体 ($\Delta SSIIIa$) を片親にして、澱粉枝作り酵素 (BE) の変異体 ($\Delta BEIIb$) を交配したイネ二重変異体 ($\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$) とそれらの親変異体系統および対照 (日本晴) の精製米澱粉を分析に用いた。相対澱粉結晶化度 (RSC) は、一定重量の内部標準物質として (CaF_2) を澱粉に混合して、X 線回折 (XRD) を元に算出した。澱粉の糊化特性は DSC および RVA、糊液のレオロジー特性は動的粘弾性測定装置によってそれぞれ測定した。また、各変異体澱粉の老化挙動を把握するために、低温下で一定時間保存した澱粉ゲルの力学特性測定を実施した。

【結果】XRD から求めた親系統の変異体および二重変異体の RSC は、日本晴よりも低下した。この結果は、変異体および二重変異体の DSC における糊化エンタルピー量の減少を支持した。変異体および二重変異体澱粉ゲル (20%) の力学特性曲線は、破断点が明瞭で低ひずみ側で観察されるパターンであることが、対照と大きく異なっていた。中でも、 $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$ が顕著であった。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) の支援にて実施された。

12) 発表学会：2012 日本感性工学会年次大会

発表日と場所：2012 年 9 月 1 日 東京電機大学 (東京都)

演題名：地域特産物販売促進における感性マーケティング手法の利用の検討

発表者：○高畠 聡 (秋田県総食研)

1. はじめに

サービスを含めた広い意味での秋田県地域特産物の販売促進のフレームワークとして、「経験価値マーケティング」等の感性マーケティング手の利用を検討したのでこれについて報告する。

2. 経験価値モジュールをフレームワークとした「経験価値設計」手法

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、高付加価値化を行う手法を「経験価値設計」手法を検討した。

3. 「感性価値づくり」によるマーケティング手法における地域特産物の販売促進

「感性価値づくり」によるマーケティング手法とは、「楽しさ」、「安心感」、「かっこよさ」、「作り手への共感」など、規格やスペック等では表現できない「価値」である「感性価値」に注目し、これを利用したマーケティング手法である。秋田の地域特産物の商品コンセプト構築にこの「感性価値づくり」によるマーケティング手法を感性マーケティング手法のひとつの手法として、その利用を検討した。今回の研究では、

秋田県鹿角地域で生産されている「淡雪こまち」米の販売促進について、特に玄米食としての「淡雪こまち」米の利用について検討した。

表1 「淡雪こまち」米・米飯の感性価値（経験価値モジュール）

分類	「淡雪こまち」米・米飯の感性価値
SENCE	やわらかく、粘りがあり、モチモチした食感、冷めても硬くならない通常の白米炊飯モードで玄米が炊飯できる
FEEL	鹿角地域限定生産の米品種、直蒔栽培等他の品種とは異なることの優越感「自然豊かな米どころ・あきた」への郷愁
THINK	低アミロース米、寒冷地適作、直播き栽培等の他の米品種にはないうんちく中山間地で栽培できる地域特産品種であることの社会的存在意義
ACT	農業問題解決の一助となる米品種を選択するライフスタイルの差別化の自意識
RELATE	伝統的食文化である米食文化を再評価し、あらたなる食文化の創造することの喜び、満足感

4. まとめ

経験価値設計により地域特産ブランドの再構築の手法の開発構を試みた。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、製品にモジュール項目を付加することによりブランド価値の高い地域特産ブランドの再構築が可能になると考えられた。

13) 発表学会：化学工学会第44回秋季大会

発表日と場所：2012年9月19日、東北大学（仙台市）

演題名：アンギオテンシンI変換酵素の新規自己消光蛍光基質の開発と反応

発表者：小野洋輝¹、○後藤 猛¹、熊谷(芳澤) 久美子²、杉山俊博³、高橋砂織⁴（¹秋田大・院・工学資源、²（株）ペプチド研、³秋田大・院・医、⁴秋田県総食研）

【諸言】 これまでACEの活性測定にはHippuryl (Hip)-His-Leuを基質とし、反応によって脱離した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に用いられてきた。しかし、この方法はACE阻害物質を広くスクリーニングするには簡便性の点で問題があった。そこで、本研究ではACEの迅速活性測定法の開発を目的に新規な自己消光蛍光(IQF)基質を調製し、ヒト組換えACEおよびウサギ肺ACEに対する反応特性を調べた。さらに、本基質のエキソ型ペプチダーゼ活性測定への応用についても調べた。

【実験方法】 ACEの新規基質として、分子内に蛍光物質である*N*-methylantranil(Nma)と蛍光消光物質である2,4-dinitrophenyl(Dnp)を有するNma-Phe-His-

Lys(Dnp) および Nma-His-Pro-Phe-Lys(Dnp)-Pro を合成した。ACE には市販のヒト組換え ACE およびウサギ肺由来 ACE (Sigma) を用い、ACE 溶液 5 μ l に IQF 基質を含む 45 μ l の酵素反応溶液 (0.1 M HEPES, 0.3 M NaCl, 0.01% Triton X-100, 0.02% NaN₃, pH 7.5) を加えて 37°C で 30 min インキュベートした後、0.1 M Triethanolamine、pH 9.5 を 0.2 ml 加え励起波長 340 nm、測定波長 440 nm の条件で蛍光強度を測定した。一方、従来基質 Hip-His-Leu の反応においては、インキュベート後に 50 μ l の 0.1 N NaOH と 10 μ l の 1% *o*-phtalaldehyde を加えて室温に 10 min 静置した後、140 μ l の 0.1 N HCl を加えて励起波長 355 nm、測定波長 460 nm で蛍光強度を測定した。

【結果と考察】 ACE の生理基質 Angiotensin I のアミノ酸配列 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) を基に、N 末端側に Nma を、また C 末端に Dnp をリジンの ϵ 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 末端への Pro の導入が ACE との親和性を増大させるとの報告があることから、Nma-His-Pro-Phe*Lys(Dnp)-Pro も併せて合成した。なお、* は予想される切断部位である。これらの IQF 基質を市販のヒト組換え ACE およびウサギ肺 ACE とインキュベートしたところ、どちらも高い反応性を示すことが分かった。そこで、ACE 阻害剤 Lisinopril を用いた滴定曲線からこれら ACE 濃度をそれぞれ求め、さらに ACE 反応における各基質の反応速度パラメーターを Lineweaver-Burk プロットにより求めた。その結果、どちらの ACE 反応においても新規 IQF 基質は従来基質よりも反応性が非常に優れていることが分かった。

14) 学会発表 : 15th European Congress of Biotechnology

発表日と場所 : 2012 年 9 月 23 日、(イスタンブール)

演題名 : Production of bioethanol with novel fermentation system using high temperature tolerance *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitis* from cellulosic biomass.

発表者 : Sho Shindo, Takanori Nishida

(Akita Research Institute of Food and Brewing)

Lignocellulosic biomass sources have the potential to act feedstock for the sustainable production of organic liquid fuels. Although the discovery of xylose-fermenting yeasts has enhanced interest in the microbial conversion of renewable lignocellulosic resources to bioethanol, various problems occurred in the development of an efficient fermentation: the main problem is that these yeast strains exhibit low ethanol-tolerance and low ethanol productivities from xylose, compared to those obtained from D-glucose with other microorganism. We reported the novel bioethanol production system using *Saccharomyces cerevisiae*

and *Pichia stipitis* from a mixture of glucose and xylose. Firstly, mixture of glucose and xylose was fermented by *S. cerevisiae*. When glucose was converted bioethanol completely, the fermented broth was treated by gas-stripping method in order to remove the bioethanol. Secondly, the treated broth was fermented by *P. stipitis*. To improve the efficiency of xylose fermentation, it is necessary to remove the bioethanol from fermentation broth. We isolated the high temperature fermentability yeast cells named SS4-5 from soil in Japanese mountain. This SS4-5 can produce the bioethanol at 44C from glucose. When we used the SS4-5 instead of *S. cerevisiae* with novel two-step fermentation system, the bioethanol production and bioethanol volatilization were occurred simultaneously at 42C. Since we can delete the ethanol removing process in novel two step fermentation, low cost bioethanol production was achieved using this system.

Reference

S. Shindo *et al.*, Production of bioethanol with novel two-step fermentation system using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* from *Salix pet-susu*. 14th European Congress of Biotechnology (2009)

15) 学会発表 : World Resources Forum 2012

発表日と場所 : 2012年10月22日、(北京)

演題名 : Bioethanol production and cadmium removal from phytoremediation plant

発表者 : Sho Shindo, Shoko Masuda, (Akita Research Institute of Food and Brewing)、
Hiroki Rai and Hiroyuki Hattori (Akita Prefectural University)

Natural processes such as volcanic eruptions, continental dusts and metal working industries lead to emission of heavy metals. These heavy metals are toxic because they cause DNA damage and their carcinogenic effects in animals and humans are probably caused by their mutagenic ability. Various engineering such as soil excavation, soil washing, or burning or pump and treat system are already being used to remediate metal contaminated soils. However, these techniques are not fully acceptable as they destroy the biotic components of soil and are technically difficult and expensive to implement. Phytoremediation is an emerging technology, which uses plants to remove pollutants from contaminated sites. On the other hand, bioethanol is an ideal fuel for transportation use since it is easily transported and charged to vehicles. Lignocellulosic biomass sources, such as agricultural and ultimately energy crops, have the potential

to act feedstock for the sustainable production of organic liquid fuels. Although the discovery of xylose-fermenting yeasts has enhanced interest in the microbial conversion of renewable lignocellulosic resources to ethanol, various problems occurred in the development of an efficient fermentation: the main problem is that these yeast strains exhibit low ethanol-tolerance and low ethanol productivities from xylose, compared to those obtained from D-glucose with other microorganism. We reported that the novel ethanol production system using *S. cerevisiae* and *P. stipitis* from a mixture of glucose and xylose [1]. When *Salix pet-susu* was investigated using novel ethanol production system, ethanol was produced with 87% of ethanol yield[2]. In this study, bioethanol production and cadmium removal from phytoremediation plant was investigated. We used the rice straw (*Oryza sativa* L.) for the remove of cadmium from contaminated sites. *Oryza sativa* L. was contained 80ppm of cadmium after phytoremediation treatment. When *Oryza sativa* L. was treated by 2% of sulfuric acid and enzymes, 75% of sugar yield and 90% of cadmium release were achieved. Furthermore, 96% of ethanol yield was achieved from saccharified solution with two-step fermentation system using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipits*.

References

- [1] S. Shindo *et al.*, Production of bioethanol with novel two-step fermentation system using *S. cerevisiae* and *P. stipits* from cellulosic biomass. The Pacific Rim Summit on Industrial Biotechnology and Bioenergy (2008)
- [2] S. Shindo *et al.*, Production of bioethanol with novel two-step fermentation system using *S. cerevisiae* and *P. stipitis* from *Salix pet-susu*. 14th European Congress of Biotechnology (2009)

16) 発表学会：第46回 日本栄養・食糧学会東北支部大会

発表日と場所：2012年11月17日、山形大学農学部（鶴岡市）

演題名：アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド高含有納豆の開発

発表者：嶋影逸¹、新保守¹、山田清繁¹、Ardiansyah²、白川仁²、駒井三千夫²、

○樋渡一之³、戸松誠³、高橋砂織³

(¹ヤマダフーズ、²東北大・院農・栄養、³秋田県総食研)

【背景・目的】メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪の蓄積に加えて、高血糖、高血圧、脂質代謝異常のうち2つ以上を合併した状態のことであり、その増加が大きな社会問題となっている。そこで我々はメタボリックシンドロームの予防を目的として、ヒトの昇圧機構であるレニン-アンジオテンシン系で血圧調節に重要な役割を果たしているアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害物質の探索、その血圧上昇抑制作

用に関する研究、さらにこれを生かした新しい食品の開発を行っている。

納豆は蒸したダイズを納豆菌で発酵させた日本特有の大豆発酵食品であり、ACE 阻害物質を含むことが報告されている。そこで我々は ACE 阻害活性が高く、高血圧対策に有用な納豆を開発することを目的として、製造方法による阻害活性の違いなど、詳細を検討した。さらに、阻害物質を含む納豆粗精製物を高血圧ラットに投与し、*in vivo* における血圧低下作用の有無を確認した。

【方法】ACE 阻害活性の測定は、基質として Hippuryl-His-Leu を用い、その分解物を オルトフタルアルデヒドで蛍光誘導体化させ、蛍光強度を測定 (Ex355nm、Em460nm) することで行った。粒納豆と挽き割り納豆、さらにプロテアーゼを添加した挽き割り納豆 (プロテアーゼ納豆) について阻害活性の詳細を検討した。ダイズを水に浸漬、蒸煮した後、納豆菌の芽胞を接種して 40℃で 14-15 時間発酵させた。加えて、プロテアーゼ納豆には接種時にプロテアーゼを添加した。発酵終了後、10℃で保存して継時的に阻害活性を測定した。プロテアーゼ納豆の熱水抽出液を各種クロマトグラフィーに供し、ACE 阻害物質を単離した。精製した阻害物質はペプチドと推定されたことから、プロテインシーケンサーによりそのアミノ酸配列を決定した。熱水抽出液を ODS カラムに添加し、メタノール溶出画分を粗精製物として脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP、12 週齢、雄) に体重 1kg あたり 80mg となるように強制経口投与した。投与直前および投与 1、2、4、6 時間後の血圧をテイルカフ法で測定した。

【結果・考察】納豆の ACE 阻害活性は粒<挽き割り<プロテアーゼの順に高く、また粒、挽き割りで継時的に上昇したことから、保存中に納豆菌由来のプロテアーゼによりダイズタンパク質が切断されることで阻害物質が生成したものと考えられる。プロテアーゼ納豆から阻害物質を精製するとペプチドであり、その配列は Ile-Ile、Ile-Phe-Tyr、Leu-Tyr-Tyr 等であった。また同納豆粗精製物を SHRSP に投与したところ、対照群と比較して収縮期血圧が有意に低下した。以上の結果により、納豆菌の接種時にプロテアーゼ処理を行うことで高い ACE 阻害活性を有する納豆の製造が可能であることが明らかになり、製造した納豆は *in vivo* においても血圧低下作用を示すことが示唆された。

17) 発表学会：第 25 回日本動物細胞工学会 2012 年度国際大会 (JAACT2012)

発表日と場所：2012 年 11 月 30 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

演題名：An *in vitro* assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating lipoprotein profiles from human intestinal epithelium-like cells

発表者：○Keishi Hata (Akita Research Institute of Food and Brewing), Gen Toshima, Fumiko Kimura, Mizuho Itoh, Yuka Iwama, Junichiro Takahashi, (Skylight Biotech Inc.)

1. Introduction

Excessive intakes of lipids such as triglycerides (TG) and cholesterol cause hyperlipidemic diseases. In many cases, experimental animals have been used for screening antihyperlipidemic activities in crude drugs or foodstuffs; however, these studies are very expensive and it is difficult to evaluate many test samples at one time.

The human colon cancer cell line, Caco-2, is known to differentiate into intestinal epithelium-like cells. In the present study, we developed a novel screening system for antihyperlipidemic agents by assessing the lipoproteins secreted from differentiated Caco-2 cells after separation by HPLC ¹.

2. Experimental

Caco-2 cell differentiation into intestinal epithelium-like cells was confirmed by observation of microvilli formations with TEM and measuring marker gene expressions with RT-PCR. Lipid absorptions from cells were determined by LipoSEARCH®.

3. Results and discussion

Na butyrate at 5 mM markedly up-regulated intestinal differentiation markers in Caco-2 cells such as numerous microvilli formations and intestinal alkaline phosphatase. We studied the optimum concentrations of lysophosphatidyl choline (lysoPC, an enhancer of lipoprotein secretion) and Na oleate (a component of TG) on lipoprotein secretion from differentiated Caco-2 cells. As the result, 0.2 mg/ml lysoPC and 0.75 mM elevated TG and cholesterol secretion by 4.2- and 2.7-fold, respectively, over that from differentiated Caco-2 cells treated with Na oleate alone. Pluronic L-81, which is inhibitor of lipoprotein secretion, suppressed lipid secretion from differentiated Caco-2 cells in a dose dependent manner.

4. Conclusions

In the present study, we developed an evaluation system for lipoprotein secretion from intestinal epithelium-like cells. This assay system is useful for the study of lipid absorption in the intestine and screening for anti-hyperlipidemia agents to target intestinal lipid transport.

References

1. Takahashi J. et al. 3 Biotech. doi: 10.1007/s13205-012-0085-1

18) 発表学会：第21回秋田応用生命科学研究会 学術講演会

発表日と場所：2012年12月7日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：塩魚汁（しよっつる）のアンギオテンシン変換酵素阻害活性

発表者：青柳智則¹、後藤猛²、塚本研一³、○高橋砂織³

(¹秋田大学・工学資源、²秋田大学・院・工学資源、³秋田県総食研)

【背景と目的】 レニン・アンギオテンシン系はヒトを含む哺乳類動物における血圧調節系として重要な役割を持っている。この系では腎臓から血中に放出されたレニンが、肝臓から分泌されたアンギオテンシノーゲンに作用して、その N 末端ペプチドが切り出され 10 残基のアミノ酸で構成されるアンギオテンシン I (AI) を生成する。AI は不活性ホルモンであるが、血中のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) により C 末端 His-Leu が切断されることで活性型のアンギオテンシン II となり生理機能を発揮する。これまで ACE に注目して各種発酵食品やタンパク質分解物から阻害物質の探究が行われてきた¹⁾。秋田の「しょつつる」は、石川の「いしる」や香川の「いかなご醤油」と並ぶ日本三大魚醤のひとつである。しかしながら、しょつつるの機能性に関する研究は全く行われてこなかった。今回、秋田特産のしょつつるを用いて ACE 阻害活性を検討した。その結果、市販しょつつるに ACE 阻害活性を見出した。また、試験醸造により魚種の違いや発酵過程における ACE 阻害活性の消長についても検討したので報告する。

【方法】 ACE 活性は新規蛍光消光基質、*N*-methylantranilic acid (Nma)-Phe-His-*N*^ε-2,4-dinitrophenyl-lysine (Lys (Dnp)) を用いて測定した²⁾。5 μl の 25 ng/ml 組換えヒト ACE (R&D Systems, 929-ZN, Lot FQJ020711) に 5 μl の阻害物質を加え室温で 5 分間インキュベートした。これに 40 μl の基質溶液 (0.1 M HEPES, pH 7.5 containing, 0.3 M NaCl, 25 μM (Nma)-Phe-His-Lys (Dnp), 0.01 % Triton X-100, and 0.02 % NaH₃) を加え 37°C で 30 分間反応させた。その後、200 μl の Stop Buffer (0.1 M Na-Borate, pH 10.5) を加えて反応を止め、励起波長 340 nm, 測定波長 440 nm の条件で蛍光強度を測定した。

【結果】 市販のしょつつるとしては、ハタハタのみ使用した製品とハタハタ以外の魚と調味料からなる製品を用いた。その結果、製造法の違いにより ACE 阻害活性に大きな違いが認められた。試験醸造のしょつつるでは、熟成後に ACE 阻害活性が増加し、長期熟成で阻害活性の低減する傾向が観察された。一方、魚種の違いや内臓・筋肉の割合によっても ACE 阻害活性に違いが見られた。

【参考文献】

- 1) Tomatsu M., Shimakage A., Shinbo, M., Yamada S., and Takahashi S., *Food Chemistry* (2013) *in press*
- 2) Takahashi S., Ono H., Gotoh T., Yoshizawa-Kumage K., and Sugiyama T., *Biomedical Research*, **32**, 407-411 (2011)

19) 発表学会：細胞アッセイ研究会 シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来
発表日と場所：2012年 12月 10日、東京大学（東京都）
演題名：LipoCULTURE, a novel assay system for antihyperlipidemic agents by

assessing lipoprotein profiles from human hepatoma cell line

発表者：○Koji Kuriyama¹, Junichiro Takahashi¹, Keishi Hata²

(¹Skylight Biotech Inc., ²ARIF)

Lipoproteins are complexes of cholesterol, triglycerides (TG), phospholipids, and apolipoproteins, and transport lipids in the blood stream. The evaluation of lipoprotein profiles is known to be useful in predicting the risk of atherosclerotic events such as hyperlipidemia, and several techniques for lipoprotein analysis have been employed. HepG2 human hepatoma cells are known to be equipped with systems which biosynthesize TG and cholesterol, pack them into lipoproteins, and release them into the culture medium. In the present study, we developed a novel screening system for antihyperlipidemic agents by assessing the profile of lipoproteins secreted from hepatoma cells after separation by HPLC.

Briefly, we examined the effects of 2 antihyperlipidemic agents on the lipoprotein profiles of HepG2 cells. Simvastatin selectively suppressed cholesterol secretion, and fenofibrate inhibited both TG and cholesterol secretion from the cells. We screened the antihyperlipidemic effects of some edible plants by evaluation of triglycerides (TG) and cholesterol profiles secreted from HepG2 cells stimulated with sodium oleate. We found that the water and ethanol extracts of *Brasenia schreberi* at 100 μ 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 gene expressions responsible for lipid synthesis of hepatocyte/hepatoma cells. To confirm the antihyperlipidemic activities of BSET *in vivo*, we studied the actions of BSET on adipose tissue accumulations and serum parameters in high-fat diet (HFD) fed mice. BSET suppressed mesenteric and epididymal adipose tissue accumulations and normalized serum TG and glucose, but not cholesterol levels in HFD fed mice.

Herein, we developed a novel system for antihyperlipidemic agents by assessing lipoprotein profiles from human hepatoma cell line, and examined the antihyperlipidemic effects of some edible plants using this assay system. BSET showed markedly lowered TG and cholesterol releases from oleate-stimulated hepatoma cells, and attenuated expressions of genes required for TG and cholesterol synthesis in HepG2 cells. Furthermore, BSET also reduced the accumulation of adipose tissues in HFD-diet mice by normalizing serum TG level. These results suggested that our developed *in vitro* evaluation system is useful for screening the antihyperlipidemic activities of foodstuffs and crude drugs.

20) 発表学会：第35回 日本分子生物学会大会

発表日と場所：2012年12月14日、福岡国際会議場（福岡市）

演題名：Involvement of D-aspartic acid isomerization of lung proteins in the pathogenesis of chronic obstructive lung disease (COPD)

発表者：小笠原正人¹、尾谷三枝子²、蕪澤 悟³、高橋砂織⁴、前山一隆¹、山内広平⁵（¹愛媛大・医・薬理、²神戸学院大・薬、³国際農林水産業研究センター、⁴秋田県総食研、⁵岩手医大・呼吸器内科）

[Background]

Cigarette smoke induced oxidative stress is largely involved in the pathogenesis of COPD. Although robust investigation of COPD susceptible genes are reported, the intimate molecular mechanisms are still remains to be elucidated. We focused on posttranslational modification of proteins that is involved in the regulation of oxidative stress adaptation. Notably, aspartic acid isomerization in the proteins involved in oxidative stress response or mitochondrial function can induce disruption of protein structure. Therefore we hypothesize that accumulation of D-aspartic acid in the proteins induce endoplasmic reticulum stress response and apoptotic cell death.

[Methods]

Human lung biopsy samples under approval of ethical committee were analyzed. Human lung tissue extracts were prepared followed by digestion with Paenidase I, D-aspartic acid specific endopeptidase. Proteins were separated by 2-dimensional electrophoresis. Proteins containing D-asp were identified by mass spectrometry.

[Results and discussion]

Paenidase I sensitive proteins were consisted of Glutathione-S transferase P1(GSTp1), peroxiredoxin-2, prohibitin, and Serum Amyloid ponponent(SAMP) in COPD cases. These proteins indicated 30~40% isomerization in COPD patients, while they were ~7% in controls. Taken together, These proteins are mainly involved in regulation of balance of oxidants-antioxidants. Therefore disruption of tertiary structure could induce malfunction of oxidative stress response.

21) 発表学会：第85回日本生化学会大会

発表日と場所：2012年12月16日、福岡国際会議場（福岡市）

演題名：自己蛍光消光基質を用いた血圧調節系酵素類の活性測定方法について

発表者：高橋砂織¹、小野洋樹²、常盤野哲生³、熊谷（芳澤）久美子⁴、後藤猛²
（¹秋田県総食研、²秋田大・院・工学資源、³秋田県大・生物資源、
⁴（株）ペプチド研）

【目的】 レニン・アンギオテンシン系（RAS）は哺乳類において最も解析が進んでいる血圧調節系の一つである。レニンは非常に特異性の高いアスパルティックプロテアーゼで、生理的基質としては唯一アンギオテンシンノーゲンが知られている。アンギオテンシン I (AI) 変換酵素（ACE）は、アンギオテンシン I の C 末端 2 残基を切断し、アンギオテンシン II (AII) を生成する。また ACE は、ブラジキニンの C 末端 2 残基を切断して不活性ペプチドに分解することが知られている。一方、肥満細胞で生産されるキマーゼも AI に作用して AII を生成することが知られている。これら酵素の活性測定には RIA, ELISA, 蛍光基質や発色基質などが用いられてきた。今回、N 末端に蛍光物質 N-メチルアントラニル酸をまた C 末端部分にリシンの ε アミノ基にジニトロフェニル基を導入した各種蛍光消光基質を合成し、これら RSA 系酵素類の迅速活性測定法を検討したので報告する。

【方法】 組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系により発現し精製した標品を用いた。レニン活性測定用基質として、レニンの基質認識配列 His-Pro-Phe- His-Leu*Val-Ile-His (*possible scissile bond), を含む各種蛍光消光基質を合成した。また、ACE 活性測定用基質として Nma-His-Pro-Phe-Lys (Dnp)-Pro と Nma-Phe-His-Lys (Dnp) を合成した。酵素反応後、励起波長 340 nm、蛍光波長 440nm により蛍光強度を測定した。基質切断部位は MALDI TOF/MS により同定した。

【結果】 組換え型ヒトレニン基質としては、Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ が優れており、Leu-Val 結合がレニンにより特異的に切断されていることが確認された。ACE は、Nma-His-Pro-Phe-Lys (Dnp)-Pro に比べ Nma-Phe- His-Lys (Dnp) を効率良く加水分解することが示された。キマーゼは、両 ACE 基質に対して殆ど反応性を示さず、レニン基質である Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Lys (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ を効率良く分解することが示された。現在、これら基質と酵素類を用いて各種試料からの阻害物質探索を進めている。

22) 学会発表：日本エネルギー学会 第 8 回バイオマス科学会議

発表日と場所：2013 年 1 月 9 日、広島大学（東広島市）

演題名：カドミウムを高濃度に吸収した稲わらからのバイオエタノール生産と
カドミウムの分離

発表者：○進藤 昌、増田祥子（秋田県総食研）
頼 泰樹、服部浩之（秋田県立大学）

カドミウム (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 を含む植物をバイオマス資源として有効利用するため、バイオエタノールの生産と残渣を Cd 除去後に堆肥として利用する技術開発を目的として研究を行った。昨年度の本会議において、Cd を高濃度で含有する稲わらからの Cd の分離技術とバイオエタノール生産技術について報告した。今回、稲わらからのバイオエタノール生産において、単行複発酵と併行発酵によるバイオエタノール生産技術の開発を行ったので報告する。単行複発酵では、濃縮された糖化液に含まれる阻害物質の除去方法について検討を行い、キレート交換樹脂で処理することにより、阻害物質を除去できることを明らかにし、さらにエタノール生産においてグルコースからのエタノール収率 93% を達成した。また、42°C で発酵可能な 6 炭糖発酵酵母を用いて併行複発酵を行ったところ、28°C で行った時よりもエタノール収率が 1.17 倍高くなった。

23) 学会発表：日本エネルギー学会 第 8 回バイオマス科学会議

発表日と場所：2013 年 1 月 9 日、広島大学（東広島市）

演題名：高効率アルコール発酵のための二段階発酵法の開発と使用する酵母の改良

発表者：○西田孝伸、進藤昌、佐々木美希子、柏谷香織（秋田県総食研）

三橋秀一（バイオエタノール革新技术研究組合）

セルロース系バイオマス糖化液から効率良くバイオエタノールを生成するためにグルコースとキシロースを別々の酵母によりエタノールに変換する二段階発酵法の開発と使用する酵母の改良を行った。我々は、42°C でグルコースをエタノールに変換可能な酵母の取得に成功している。今回、キシロース資化性酵母 *Pichia stipitis* を突然変異誘導処理や発酵阻害要因への馴化処理を供与した結果、複数の発酵阻害要因に対して従来の株よりも高い耐性能を有する酵母変異株 TT-E8 株の取得に成功した。TT-E8 株は pH3.0 でも発酵が可能であるため雑菌汚染防除にも有用である。エリアンサス糖化液からの新二段階発酵システム（一段階目は耐熱性酵母を用いた 42°C でのグルコースからのエタノール生産、二段階目は TT-E8 株によるキシロースからのエタノール生産）によるエタノール生産ではエタノール収率 90% を達成することが出来た。

24) 発表学会：平成 24 年度 LS-BT 合同成果発表会

発表日と場所：2013 年 2 月 5 日、産総研（つくば市）

演題名：ACE 阻害ペプチドを富化した豆乳の開発

発表者：戸松誠¹、嶋影逸²、新保守²、山田清繁²、○高橋砂織¹

(¹秋田県総食研、²(株)ヤマダフーズ)

レニン・アンジオテンシン系 (RSA) は、哺乳類において最も重要な血圧調節機構である。これまで、RAS の制御を目指して、ACE やレニン阻害薬の開発が盛んに行われてきた。また、食物由来 ACE やレニン阻害物質の探索も行われている。我々は食物由来レニン阻害物質として大豆より初めてソヤサポニン I を同定した [1]。今回、豆乳を酵素処理することで強い ACE 阻害活性を持つことを見出した。また、酵素処理豆乳より新規 ACE 阻害ペプチド類を同定した [2, 3]。現在、本酵素処理豆乳を用いた機能性食品の開発に取り組んでいる。

[1] Takahashi S., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008)

[2] Tomatsu M., *et al.*, *Food Chem.*, **136**, 612-616 (2013)

[3] 特願 2012-02251

25) 発表学会：平成 24 年度 LS-BT 合同成果発表会

発表日と場所：2013 年 2 月 5 日、産総研（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の性質

発表者：○葺澤悟（国際農林水産業研究センター）、高橋砂織（秋田県総食研）

【背景】これまで、一部の細菌の細胞膜に D 型アミノ酸の存在することが知られていたが、近年、哺乳類の生体内にも遊離 D 型アミノ酸や D 型アミノ酸含有タンパク質の存在が見出されている。我々は、D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp. B38 株) を分離するとともに、産生する酵素を paenidase と命名した (S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202, 2006)。また、paenidase 遺伝子クローニングを行い、成熟 Paenidase は 322 アミノ酸残基からなり、Ser、Lys、Tyr 残基を活性部位とするペニシリン結合タンパク質と相同性があることを明らかにした。今回は、大腸菌を用いて異種発現を行い、paenidase の生産を行うとともに、得られた組み換え paenidase の特性解析を行った。

【方法及び結果】大腸菌 BL21 (DE3) 株-pET ベクター系を用いて、活性型 paenidase の生産を行った。次に、得られた組換え paenidase を用いて基質特異性を解析したところ、paenidase は suc-[D- α -Asp]-pNA を加水分解したが、suc-[D- α -Glu]-pNA、suc-[D- α -Ala]-pNA、suc-[D- α -Leu]-pNA、Ac-[D- α -Phe]-pNA には作用しなかった。また、合成ペプチドを用いた実験では、D- α -Asp の C 端側を加水分解したが、L- α -Asp、L- β -Asp、D- β -Asp には作用しなかった。以上のことから、paenidase は厳密な基質認識を行っていることが示唆された。

26) 発表学会：みそ技術研究発表会

発表日と場所：平成 25 年 2 月 22 日、全中全味ビル（東京都）

演題名：新規白色分生子麴菌株を用いた味噌醸造試験

発表者：○渡辺隆幸¹、佐々木康子¹、佐藤勉²、瓜生 摂²、今野宏²、小笠原博信¹
(秋田県総食研¹、(株)秋田今野商店²)

【目的】麴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。

我々は味噌の抗変異原活性増強や植物組織の高分解活性を特徴とする麴菌 AOK139 を高温処理することにより *wA* 遺伝子（ポリケタイド合成酵素）コード領域内に *Crawler* が移転挿入した新しい白色変異株 WS61 を取得している。WS61 は 10 回の繰り返し培養においても復帰変異株は検出されておらず、遺伝的に安定である。その製麴特性、酵素の生産能力は親株の AOK139 と同等であり、また味噌の製造試験においてもアミノ酸組成などにおいて親株と同等であることを認めている。以上のことからトランスポゾン *Crawler* を用いた育種は新規実用株を得るための有効な手法であることが示されている。しかしながら育種された新規白色分生子株 WS61 の市販種麴との比較はまだ行われていない。今回は WS61 試作種麴を用い、複数の製造条件において米麴と味噌の製造試験を実施し、市販種麴との比較により、WS61 の特徴を明らかにすることを目的とする。

【方法および結果】味噌用種麴、AOK139、WS61 それぞれを用いた製麴試験を実施したところ WS61 使用の麴は良好な酵素力価を有していた。丸大豆、脱皮大豆をそれぞれ用いた 4kg 規模の味噌製造試験においても親株と同等以上の遊離脂肪酸生産能力を示した。また市販白色種麴 8 点と比較したところ、WS61 は最も強い糖化力を示し、従来の種麴にない特徴を示した。また製造した味噌官能検査の結果でも、良好な結果を得た。以上、WS61 は米麴と味噌製造において従来の種麴にない特長を有していることを認めた。

27) 学会発表：2nd Biotechnology world Congress

発表日と場所：2013 年 2 月 18 日、(ドバイ)

演題名：Cadmium removal and bioethanol production from phytoremediation plant by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

発表者：Sho shindo, Shoko Masuda, (Akita Research Institute of Food and Brewing)、
Hiroki Rai and Hiroyuki Hattori (Akita Prefectural University)

Natural processes such as volcanic eruptions, continental dusts and metal working industries lead to emission of heavy metals. These heavy metals are toxic because they cause DNA damage and their carcinogenic effects in animals and humans are probably caused by their mutagenic ability. Various engineering such

as soil excavation, soil washing, or burning or pump and treat system are already being used to remediate metal contaminated soils. However, these techniques are not fully acceptable as they destroy the biotic components of soil and are technically difficult and expensive to implement. Phytoremediation is an emerging technology, which uses plants to remove pollutants from contaminated sites. In this study, bioethanol production and cadmium removal from phytoremediation plant was investigated. We used the rice straw (*Oryza sativa* L.) for the remove of cadmium from contaminated sites. *Oryza sativa* L. was contained 80ppm of cadmium after phytoremediation treatment. When *Oryza sativa* L. was treated by 2% of sulfuric acid and enzymes, 75% of sugar yield and 90% of cadmium release were achieved. Furthermore, production of bioethanol from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using *Schizosaccharomyces japonicus* was investigated. 15 (g/L) of bioethanol was produced after 30 hr.

28) 発表学会：2013 年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2013 年 3 月 25 日、東北大学（仙台市）

演題名：キシロースからコハク酸生産する細菌の分離とその特性

発表者：○戸松さやか、木村貴一、進藤昌（秋田県総食研）

【目的】地球温暖化問題や限られた化石資源への対策としてバイオエタノールが注目されており、食糧と競合しない稲わら等の草本系や、間伐材などの木質系バイオマスを中心としたバイオエタノール製造の開発が行われている。しかし、製造コストが高いため、普及の為の低コスト化技術の開発が急がれている。我々はセルロース系バイオマスから変換される製品をバイオエタノールだけではなく付加価値の高いコハク酸などを生産するバイオリファイナリー技術の開発を行うことを目的に研究を行っている。今回、自然界からキシロースを利用してコハク酸を生産する菌の取得を行い、その性質を検討した。

【方法】自然界から採取したサンプルを滅菌水に懸濁し、キシロースを炭素源とする寒天培地に 0.8%炭酸マグネシウムを添加し、25℃で培養した。寒天培地でクリアゾーンを形成した株を酸生産菌として選抜し、さらにキシロース 5%を含む培地に炭酸マグネシウムを 5%添加し、25℃で培養した上清をペーパークロマトグラフィーで有機酸の分離を行い、コハク酸を生産した株を選抜した。コハク酸は、F-キットコハク酸（JKI）を用いた酵素法により測定した。

【結果】キシロースを炭素源とする培地で酸生成が見られた菌株についてコハク酸生産能を検討したところ、101 株でコハク酸の生成が確認され、コハク酸生産能が 15g/l 以上の 35 株を得た。さらに、コハク酸生産能が高い 4 株の同定を行い、16SrDNA の相

同性および API20E (シスメックス・バイオメリュー株) 同定キットにより、3 株は *Serratia fonticola*、1 株は *Serratia plymuthica* と同定された。また、稲わら糖化液を用いてコハク酸生産能を検討したところ、コハク酸生産が認められたことから、実バイオマスでの利用も可能であった。これらの株はキシロースからのコハク酸生産に優れており、グルコースからは D-乳酸を生成する。グルコース・キシロース混合培地では D-乳酸とコハク酸を同時に作り、特に *S. fonticola* の 3 株は D-乳酸の生産量が大きく、*S. plymuthica* はコハク酸の生産量が高い特徴があった。バイオリファインリーの観点からこれらの菌株は様々な用途に利用できると考えられる。

29) 発表学会：日本農芸化学会 2013 年度大会

発表日と場所：2013 年 3 月 26 日、東北大学 (仙台市)

演題名：魚醤油 (しょつつる) の ACE 阻害活性について

発表者：青柳智則¹、後藤猛²、塚本研一³、○高橋砂織³

(¹秋田大学・工学資源、²秋田大学・院・工学資源、³秋田県総食研)

【目的】 レニン・アンギオテンシン系 (RAS) は、哺乳類における血圧調節系として重要な役割を持っている。その中でアンギオテンシン変換酵素 (ACE) は、レニンにより生じた不活性ペプチドのアンギオテンシン I を活性型ペプチド、アンギオテンシン II に変換する RAS 系の制御酵素の役割を持っている。これまで ACE に注目して様々な食材より阻害物質の探索が行われてきた。我々は、豆乳に注目し ACE 阻害ペプチドの探索を行い、プロテアーゼ処理豆乳に新規の ACE 阻害ペプチドを見出した¹⁾。今回、秋田特産の魚醤油 (しょつつる) における ACE 阻害活性について検討した。また、魚種の違いや発酵過程における ACE 阻害活性の消長についても検討したので報告する。

【方法】 ACE 活性は新規蛍光消光基質、*N*-methylantranlyl-Phe-His-Lys(2, 4-dinitrophenol)を用いて測定した²⁾。組換え型ヒト ACE (Sigma 社製) に阻害物質を加え室温で 5 分間インキュベートする。これに最終濃度 0.02mM となるように基質溶液を加え 37 °C で 30 分間反応後、励起波長 340nm および蛍光波長 440nm で蛍光を測定した。試験醸造魚醤油は原料魚 100 に対して食塩 30、プロテアーゼ M「アマノ」SD (天野エンザイム製) 0.3 を加え混合し、熟成初期には毎日攪拌しながら 1~24 ヶ月熟成した。熟成終了後は 85°C 10 分加熱後冷却し、濾過した試料を ACE 阻害活性測定及び成分分析に供した。

【結果】 市販の魚醤油 (しょつつる) では、製造法の違いにより ACE 阻害活性に大きな違いが認められた。試験醸造の魚醤油では、熟成後に ACE 阻害活性の増加し、長期熟成で阻害活性の低減する傾向が観察された。一方、魚種の違いや内臓の割合によっても ACE 阻害活性に違いが認められた。現在、ハタハタしょつつるからの ACE 阻害ペプチドの同定を試みている。

【参考文献】

- 1) Tomatsu M., Shimakage A., Shinbo, M., Yamada S., and Takahashi S., *Food Chemistry* (2013) *in press*
- 2) Takahashi S., Ono H., Gotoh, T., Yoshizawa-Kumage K., and Sugiyama T., *Biomedical Research*, **32**, 407-411 (2011)

30) 発表学会：2012年度 日本農芸化学会大会

発表日と場所：2013年3月26日、東北大学（仙台市青葉区）

演題名：発酵大麦エキスは脳卒中易発性高血圧自然発症ラットの高血圧症を改善する

発表者：○植田一馬¹、Ardyansyah^{2,3}、白川仁²、Puspo Giriwono²、小口一起²、

外英樹⁴、樋渡一之⁵、高橋砂織⁵、駒井三千夫²（¹東北大・農・栄養学、

²東北大・院農・栄養学、³Food science and Technology Study Program,

Universitas Bakrie, Indonesia、⁴三和酒類、⁵秋田県総食研）

【目的】生活習慣病を引き起こす危険因子は血圧と直接的に関わっており、血圧の5 mmHgの減少によって生活習慣病の発症が16%減少するといわれている。焼酎かすは焼酎製造過程において、もろみを蒸留した後に残る不揮発性物質であり、従来、飼料や肥料などにしか利用されず、一部は廃棄されており、その高付加価値利用が期待されている。これまでに、本研究室では焼酎かすから調製される発酵大麦エキス（FBE）が、慢性アルコール摂取ラットやリポ多糖誘発性の肝障害モデルラットにおいて、肝障害を抑制することを見出した。本研究では、脳卒中易発性高血圧自然発症ラット（SHRSP）にFBEのポリフェノール画分を投与し、血圧や血糖値に及ぼす影響を解析した。

【方法】＜FBEの分画＞FBEをスチレン系吸着樹脂で吸着させ、エタノールで溶出させたものをFBEPとした。＜単回投与試験＞雄性15週齢のSHRSP/Izmを16時間絶食後、FBEP（2.0 g/kg b.w.）を経口投与し、投与後0、1、2、4、6時間後の収縮期血圧、および血漿パラメーター（中性脂肪、コレステロール、グルコース）を測定した。＜長期投与試験＞雄性10週齢のSHRSP/Izmを3群に分け、それぞれ飼料として、コントロール食（AIN-93M組成）、FBEP1食（FBEP 4g/kg飼料含有）、FBEP2食（FBEP 20g/kg飼料含有）を与え、3週間飼育した。飼育期間中、収縮期血圧、拡張期血圧を毎週tail-cuff法により測定した。また、12週齢時に経口糖負荷試験（OGTT）を行った。飼育終了後、16時間絶食させ解剖し、血漿、肝臓などを採取した。

【結果】＜単回投与試験＞FBEP投与後1時間から6時間まで、収縮期血圧が有意に低下した。また、血漿中性脂肪、総コレステロール、グルコース値も減少した。＜長期投与試験＞3群間で、体重、摂食量、臓器重量に差は見られなかった。飼育2週目から両FBEP投与群で収縮期血圧、拡張期血圧が有意に減少し、高血圧症の改善が見られた。FBEPはin vitro試験において、アンジオテンシンI変換酵素の阻害活性を有していたことから、本阻害活性により血圧低下が見られること考えられた。OGTTでは、群間で顕著な差は見られなかったが、解剖時の血漿グルコース、インスリン値がFBEP1

群でコントロール群に比べ有意に低下しており、インスリン抵抗性の改善が示唆された。また、血漿中のカタラーゼ、SOD 活性の有意な上昇、および 8-OHdG 量の低下が、FBEP1 群で見られた。さらに、肝臓での抗酸化関連遺伝子 mRNA 量が FBEP1 群で有意に上昇していた。以上の結果から、FBEP は肝臓での抗酸化遺伝子の発現を上昇させ、SHRSP が示す病態を改善することが示唆された。

31) 発表学会：日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム

発表日と場所：2013 年 3 月 27 日、東北大学（仙台市）

演題名：変異体米澱粉の物理化学特性（澱粉生合成研究の最前線と変異体米澱粉の産業利用可能性）

発表者：高橋徹（秋田県総食研）

【目的】澱粉生合成関連酵素は、生合成の最終産物である澱粉の構造や物性に大きな影響を与える。澱粉の特性は米の食味や加工特性に大きく影響するため、各酵素の作用機序の解明が重要な役割を担う。我々は、遺伝的背景が明確で、特定の澱粉生合成関連酵素が欠失した突然変異体米およびこれらを交配した二重変異体が生産する澱粉に着目した。澱粉直鎖伸長酵素（SS）の一つである *SSIIIa* 変異体 ($\Delta SSIIIa$) を片親にして、澱粉枝作り酵素（BE）の *BEIIb* 変異体 ($\Delta BEIIb$) を交配した二重変異体 ($\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$) を代表として、米澱粉の物理化学的特性を X 線回折（XRD）、示差走査熱量分析（DSC）、動的粘弾性測定によって詳細に調べた結果から、特定の酵素の欠損と物理化学特性、澱粉鎖の構造との関連について述べる。

【方法】 $\Delta SSIIIa$ の結晶形は A 型、 $\Delta BEIIb$ および $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$ はそれぞれ B 型を示し、これらの相対澱粉結晶化度（RSC）は対照（日本晴）よりも低下したが、アミロース量の増加に伴うアミロペクチン量の相対的な減少に起因するためと考えられる。DSC の結果から、 $\Delta BEIIb$ および $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$ の糊化ピーク温度は $\Delta SSIIIa$ および日本晴よりも有意に上昇した。アミロペクチン量で基準化した糊化エンタルピー (ΔH) は、日本晴と $\Delta SSIIIa$ 間、 $\Delta BEIIb$ と $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$ 間でほぼ同値となり、後者が前者よりも大きいことから、アミロペクチンの二重らせん形成に寄与する鎖のうち、DP15~24 の鎖の顕著な増加が ΔH の増加にも影響を与えることが分かった。澱粉懸濁液の動的粘弾性測定から、貯蔵弾性率 (G') の立ち上がり温度およびピーク値は、DSC の結果を支持した。また、冷却時の G' は $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$ が顕著に大きく、 $\Delta SSIIIa$ および $\Delta BEIIb$ の結果を加味すると、老化の初期段階において、アミロースの存在はもとより、長鎖のアミロペクチンの効果が色濃く、アイソザイム *BEIIb* は澱粉の糊化・老化に大きな影響を与える因子であると推察された。本研究から、各澱粉の物性が鎖長構造に裏打ちされていることを明らかにすることができ、澱粉生合成関連酵素（アイソザイム）の機能特性の解明への寄与や変異体米の選抜や産業利用時の指標となることが期待される。

6. 外部発表論文概要 (8 件)

1) 論文題名：無洗米副産物を用いた *Lactobacillus brevis* IF012005 による
 γ -アミノ酪酸の生産

著者名：大友理宣，保苺美佳，押部明德，畠恵司，戸枝一喜

雑誌名：日本食品保蔵科学会誌(2012)，38，19-24

発行日：2012年1月20日

2) 論文題名：メタボ改善素材開発におけるリポタンパク質プロファイル解析の意と
応用～機能性素材探索からヒト臨床試験まで～

著者名：畠恵司，木内高信，高橋純一郎，浜田健太郎

雑誌名：*New Food Industry* (2012)，54，19-27

発行日：2012年4月1日

3) 論文題名：昇圧系律速酵素レニン阻害による血圧対策食品の探索

著者名：堀一之、高橋砂織

雑誌名：薬用食品の開発Ⅱ（分担執筆），p106-114，シーエムシー出版

発行日：平成24年4月

4) 論文題名：Nondestructive estimation of strength deterioration in photo-
voltaic backsheets using a portable near infrared spectrometer

著者名：Hua Li, Ryoei Kikuchi, Masanori Kumagai, Toshio Amano, Haoning Tang,
Jin-Ming Lin, Kazuhiko Fujiwara, Nobuaki Ogawa

雑誌名：*Solar Energy Materials and Solar Cells* (2012)，101，166-169

発行日：2012年6月1日

5) 論文題名：「あきた食品トライアルネット」の設立とその運用

著者名：樋渡一之

雑誌名：*Food Style 21* (2012)，16，23-25，

発行日：2012年9月1日

6) 論文題名：米糠発酵粉末を含む犬用補助栄養食の有用性と満足度に関する
アンケート調査

著者名：橋爪千恵，大友理宣，高倉はるか，高嶋亜希子，畠恵司

雑誌名：ペット栄養学会誌(2012)，15，2-79

発行日：2013年1月25日

7) 論文題名 : Novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide
derived from soya milk

著者名 : Makoto Tomatsu, Atsushi Shimakage, Mamoru Shinbo, Seihan Yamada, and
Saori Takahashi

雑誌名 : *Food Chemistry* (2013), **136**, 612-616

発行日 : 平成 2013 年 1 月

8) 論文題名 : Differentiation- and apoptosis-inducing activities of rice bran
extracts in a human colon cancer cell line

著者名 : Akiko Takashima, Masanobu Ohtomo, Tsugio Kikuchi, Jun Iwashita,
Tatsuya Abe, Keishi Hata

雑誌名 : *Journal of Food Science and Technology* (2013), **50**, 595-599

発行日 : 2013 年 3 月

1) 論文題名：無洗米副産物を用いた *Lactobacillus brevis* IF012005 による
γ-アミノ酪酸の生産

著者名：大友理宣，保苺美佳，押部明德，畠恵司，戸枝一喜

雑誌名：日本食品保蔵科学会誌 (2012), 38, 19-24

発行日：2012年 1月 20日

要約：

Lactobacillus brevis IF0 12005および無洗米副産物 (NWRB)を用いてγ-アミノ酪酸 (GABA)の効率的な生産法を検討した。NWRBを唯一の炭素源として IF0 12005を用いた乳酸発酵によるグルタミン酸(MSG)からのGABA生成率 (変換率)は 2.8mg/g (25.7%)と低かった。そこで、NWRB [加水割合 3倍 (NWRBに対して)]を酵素処理することで、IF012005の発酵に必要な栄養素である (少糖, アミノ酸)を増量した酵素処理 NWRBを開発した。酵素処理 NWRBを用いた IF012005によるGABA生成量 (変換率)は 10.8 mg/g (98.7%)と著しく改善されたが、培着は4日間を要した。酵素処理 NWRBの加水割合を無洗米粕重量の 4倍から 6-8倍に増加させることで、GABA変換率 91%以上で培養期間が1日に短縮された。さらに、7倍加水した酵素処理 NWRBにおけるさらなる GABA高生産性を検討した。結果、NWRB重量に対し MSG (W/W)を 8-24%添加区では、GABA変換率は97%以上であり、24%区では GABAが13.8 mg/g生産された。30 lジャー培養装置による酵素処理 NWRB 20kgスケールの培育により 97%のGABA変換率で 16.1 mg/gのGABA含有組成物を製造することができた

2) 論文題名：メタボ改善素材開発におけるリポタンパク質プロファイル解析の意義
と応用～機能性素材探索からヒト臨床試験まで～

著者名：畠恵司，木内高信，高橋純一郎，浜田健太郎

雑誌名：New Food Industry (2012), 54, 19-27

発行日：2012年 4月 1日

要約：

2008年 4月に特定健康診査 (通称メタボ健診)が始まり、メタボリック・シンドロームや脂質異常症への注目が高まり、これらを改善する機能性食品素材の研究・開発がますます盛んに行われるようになってきた。こうした研究開発には、主に疾患モデル動物への投与による評価が用いられているが、個体差が少なく、開発に要する費用や時間の短縮・効率化が期待できる in vitro の評価系の確立が重要である。今回我々は、ゲル濾過 HPLC によるリポタンパク質解析法を用い、ヒト肝臓癌由来細胞の培養上清に分泌されるリポタンパク質の脂質プロファイルを分析することで、新たな“抗メタボ素材”の in vitro 探索評価系を開発した。さらに、本評価系を用いて、実際に脂質異常症改善効果を示す食用植物を探索した。顕著な改善作用が認められた秋田県の特産品であるジュンサイ (*Brasenia schreberi*) については、モデル動物実験ならびにヒト臨床試験を実施し、脂質異常症改善効果をさらに検証した。

3) 論文題名：昇圧系律速酵素レニン阻害による血圧対策食品の探索

著者名：堀 一之、高橋砂織

雑誌名：薬用食品の開発Ⅱ (分担執筆), p106-114, シーエムシー出版

発行日：平成 24年 4月

要約：血圧調節系であるレニン-アンジオテンシン系のうち、レニンは律速酵素であ

るのも関わらず基質特異性が高く、封入体を形成しやすいなど研究対象としてハードルの高いものであった。

著者らは、ヒトレニン遺伝子をバキュロウイルスに組換えヨトウガ由来の Sf-9 昆虫細胞で発現させることにより、活性型のヒトレニンが得られること、分子内での消光性を有しアンジオテンシノーゲンのレニン切断部位を模した蛍光基質によるヒトレニン阻害系を開発することの2つのキーテクノロジーにより、ヒトレニンそのものをターゲットとした食品由来の抗高血圧成分を探索できる系を開発した。

そして、グルグロニドサポニンと呼ばれる $3\beta-O$ -糖鎖の一番目に結合する糖が $\beta-D$ -グルグロン酸である化学構造を有するサポニン群に共通してヒトレニン阻害活性があることを明らかにした。

4) 論文題名: Nondestructive estimation of strength deterioration in photovoltaic backsheets using a portable near infrared spectrometer

著者名: Hua Li, Ryoei Kikuchi, Masanori Kumagai, Toshio Amano, Haoning Tang, Jin-Ming Lin, Kazuhiko Fujiwara, Nobuaki Ogawa

雑誌名: *Solar Energy Materials and Solar Cells* (2012), **101**, 166- 169

発行日: 2012年6月1日

要約:

Photovoltaic (PV) backsheets composed of polyvinylidene difluoride (PVDF) and polyethylene terephthalate (PET) films were evaluated via principal component analysis (PCA) of near infrared (NIR) spectral datasets obtained using a portable NIR spectrometer. The discrimination of material and the degree of deterioration of the backsheets following heating and humidifying or irradiating with UV light was examined. Multiple linear regression (MLR) analysis was also employed to evaluate the degree of deterioration. The reference values (peel and tensile strength) were obtained via the International Electrotechnical Commission (IEC) 61215 and Underwriters Laboratories (UL) 1703 standard methods. The values of the peel strength and tensile strength after heating/humidifying treatment correlate quite strongly with the NIR predicted values ($R^2=0.946$ and $R^2=0.973$, respectively). These results show that the degree of deterioration of a PV backsheet can be nondestructively and easily determined via NIR spectroscopy.

5) 論文題名: 「あきた食品トライアルネット」の設立とその運用

著者名: 樋渡一之

雑誌名: *Food Style 21* (2012), **16**, 23-25,

発行日: 2012年9月1日

要約:

2007年度から2009年度にかけては文部科学省の都市エリア産学官連携促進事業に採択され、中核研究機関となって「中・高齢者の心身両面を支える米等を利用した食品の開発と食品産業クラスターの形成」を目的とした研究開発を進めてきた。本論文では、都市エリア事業の成果の一つである、食品のヒト試験を迅速・低コストで実施できる独自のネットワーク「あきた食品トライアルネット」設立の経緯や運用、その現状について解説した。

6) 論文題名：米糠発酵粉末を含む犬用補助栄養食の有用性と満足度に関する
アンケート調査

著者名：橋爪 千恵, 大友 理宣, 高倉 はるか, 高嶋 亜希子, 畠 恵司

雑誌名：ペット栄養学会誌 (2012), 15, 2-79

発行日：2013年 1月 25日

要約：

米糠発酵粉末は、米糠を植物性乳酸菌により乳酸発酵させて作出したものである。これまでにラットに継続的に経口投与した結果、米糠発酵粉末には内臓脂肪重量および血中中性脂肪値の減少作用が認められることが明らかになっている。本研究では、年齢、性別、体重の異なる様々な犬種の家庭犬を対象として、イヌそれぞれの体重に従った量の米糠発酵粉末をサプリメントとして8週間継続的に摂取させ、その変化を飼い主へのアンケート形式により調査した。投与開始直前、投与2、4、6および8週間後における腹囲と体重の計測、行動学的変化、生理学的変化、およびサプリメントの印象に関するアンケート設問の回答を集積し、解析に用いた。サプリメントを8週間継続投与できた個体はモニター全体の81.5%であった。個体の腹囲および体重の変動率を比較したところ、開始前に比べ4週間後、6週間後、および8週間後において、腹囲が有意に減少した。また、8週間後のサプリメントの嗜好性についてのアンケート設問では、「ほかのおやつやフードより好んで口にした」あるいは「ほかのおやつやフードと同等の嗜好性が見られた」とした回答が、モニター全体の70.4%となっていた。これらのことから、本サプリメントには継続投与によって腹囲の減少効果が認められ、補助栄養食でありながら、その嗜好性はイヌのおやつやフードとして許容される高さを持つと思われた。

7) 論文題名：Novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides
derived from soya milk

著者名：Makoto Tomatsu, Atsushi Shimakage, Mamoru Shinbo, Seiha Yamada, and
Saori Takahashi

雑誌名：*Food Chemistry* (2013), 136, 612-616

発行日：平成2013年1月

要約：

Inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE) are useful in treating hypertension, and many have been derived from food products, including soybeans. Using the industrial protease PROTIN SD-NY10, we developed a processed soya milk (PSM) with enhance ACE inhibitory activity. The ACE inhibitory activity of PSM ($IC_{50} = 0.26$ mg/ml) was greater than that of regular soya milk ($IC_{50} = 8.75$ mg/mL). Novel eight ACE inhibitory peptides were purified from PSM by reversed-phase chromatography. FFYY (IC_{50} , 1.9 μ M), WHP (4.8 μ M), FVP (10.1 μ M), LHPGDAQR (10.3 μ M), IAV (27.0 μ M), VNP (32.5 μ M), LEPP (100.1 μ M), and WNPR (880.0 μ M). The IC_{50} values of these peptides are comparable to those for other ACE inhibitory peptides from wheat, chicken, bonito, wine, etc. Due to the relative low IC_{50} values of several peptides identified in this study, they may serve as ideal base components of food supplements for patients with hypertension.

8) 論文題名 : Differentiation- and apoptosis-inducing activities of rice bran extracts in a human colon cancer cell line

著者名 : Akiko Takashima, Masanobu Ohtomo, Tsugio Kikuchi, Jun Iwashita, Tatsuya Abe, Keishi Hata

雑誌名 : *Journal of Food Science and Technology* (2013), 50, 595-599

発行日 : 2013年 3月 19日

要約 :

Rice bran water extract (RBWE) and ethanol extract (RBEE) at 1.0 mg/ml markedly inhibited the proliferation of LS174T human colon cancer cells. RBEE but not RBWE induced apoptosis. RBWE promoted the production of intestinal mucin (MUC2). Real-time RT-PCR demonstrated that RBWE up-regulated the expression of MUC2 and sucrase-isomaltase complex (a differentiation marker of colon cancer cells), and attenuated that of proliferating cell nuclear antigen at the mRNA level in a dose-dependent manner. These findings suggested that RBWE suppress the proliferation of colon cancer cells by inducing differentiation not apoptosis.

7. 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、学会発表要旨及び外部発表論文要約等を掲載する。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：文章は平易且つ簡潔な「である」調とする。数字や英字は原則として半角とする。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 版縦長様式とする。
3. 原稿の書体は、原則として MS 明朝体を用い、表題は 18 ポイント、本文は 12 ポイントとする。文章中（全角）では句点「。」及び句読点「、」を用いる。半角の場合には、終止符「.」及びカンマ「,」を用いる。
4. 原稿の上下、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。
【要約】、【緒言】、【実験方法】、【結果】、【考察】、【引用文献】の順とする。
【謝辞】は、【引用文献】の前に入れる。
2. 研究ノートは、次の形式をとる。
【緒言】、【実験方法】、【結果と考察】、【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¹⁾、や総食研²⁻⁴⁾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」もしくは「ら」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。

【引用文献記載方法】

1. 雑誌は、著者名、(年号)、論文表題、雑誌名、巻、ページ（最初と最後）、の順に記載する。
2. 単行本は、著者名、(年号)、論文表題、書名、(編者)、ページ（最初と最後）、出版社、出版都市とする。
3. 著者名は、姓名とも記し、全著者名を記載する。
4. 欧文雑誌の略記は、Index Medicus による。誌名はイタリックとし、巻はボールドとする。
5. 和文誌名は略記しない。

(引用文献載例)

- 1) Tomatsu M, Shimakage A, Shinbo M, Yamada S, Takahashi S (2013) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya milk.

Food Chem, **135**, 612-616.

- 2) Inagami T (1998) Angiotensin receptors: molecular biology and signaling.
In:
Renin-Angiotensin. (Ulfendahl HR, Aurell M, eds), p25-35, Portland Press Ltd, London.
- 3) 小笠原博信、高橋砂織 (2000) STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別
日本食品科学工学会誌 **47**, 632-637.
- 4) 作田庄平 (2004) アロサミジンとキチナーゼ：キチン・キトサンの開発と応用
(平野茂博監修) p153-164, 株式会社シーエムシー出版、東京.

【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。

平成 25 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 15 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 渡邊 誠衛
同 小笠原 博信
同 尾張 かおる

発 行 平成 25 年 12 月 5 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】