

秋田県総合食品研究センター報告

第 17 号

平成 27 年 (2015 年)

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

No. 17, 2015



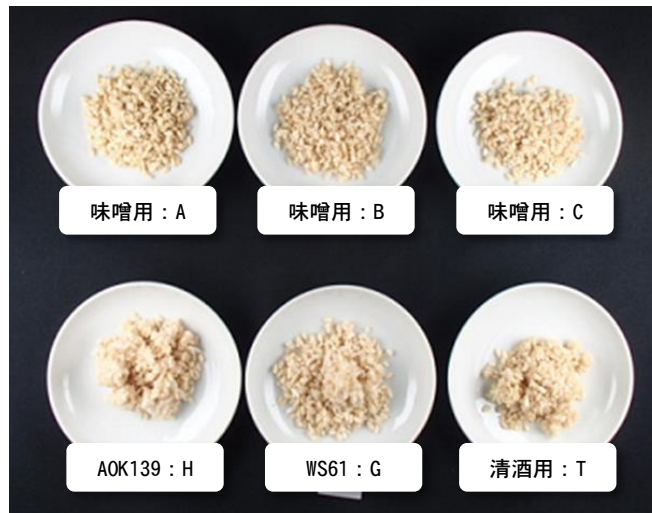
1 乾燥麴・粉末麴

2 乾燥麴・粉末麴の保存試験



2

新規麴菌“CK-33”を用いた乾燥麴及び粉末麴の開発
渡邊誠衛 他 Vol.17 1-7 (2015)



99%精米を用いた味噌の特長
渡辺隆幸 他 Vol.17 8-14 (2015)

精油成分「 α -ピネン」の香り



森林浴



ミョウガ



シュンギク

精油芳香がワーキングメモリ課題遂行時のNIRS脳血流変化量に及ぼす影響
熊谷昌則 Vol.17 15-18 (2015)

謝 辞

本報告書の総説「味噌の持つ高血圧抑制物質について」は、日本醸造協会誌第 110 巻、9 号に掲載された原稿の再掲載です。

再掲載許可をいただきました公益財団法人日本醸造協会・日本醸造学会に厚く御礼を申し上げます。

目次

1. 原著論文（報文）

- 1) 新規麹菌“CK-33”を用いた乾燥麴及び粉末麴の開発 1
○渡邊誠衛、大友理宣

- 2) 99%精米を用いた味噌の特長 8
○渡辺隆幸、佐々木康子

2. 原著論文（研究ノート）

- 1) 精油芳香がワーキングメモリ課題遂行時のNIRS脳血流変化量に
及ぼす影響 15
○熊谷昌則

3. 総説

- 1) 味噌の持つ高血圧抑制物質について 19
○高橋砂織

4. 特許の概要（3件） 33

5. 学会発表概要（24件） 35

6. 外部発表論文概要（8件） 53

7. 秋田県総合食品研究センター報告規程 57

1. 原著論文（報文）（2件）

- 1) 新規麹菌“CK-33”を用いた乾燥麴及び粉末麴の開発・・・・・・・・・・1
○渡邊誠衛、大友理宣

- 2) 99%精米を用いた味噌の特長・・・・・・・・・・・・・・・・・・8
○渡辺隆幸、佐々木康子

新規麴菌“CK-33”を用いた乾燥麴及び粉末麴の開発

渡邊誠衛、大友理宣*

(秋田県総合食品研究センター 酒類グループ、*秋田銘醸株式会社)

Seiei WATANABE, Masanobu Ohtomo

【 諸 言 】

麴は、清酒や味噌・醤油・漬物、濁酒や甘酒などわが国の伝統的発酵食品に欠かせないものであり、海外でも、和食の無形文化遺産登録に伴う和食ブームや、國酒の海外輸出の後押しによる日本酒ブームを背景に注目が高まっている。さらに近年、麴の機能性を有した化粧品、栄養成分を有したサプリメントなど多種多様な商品に使われ始めている。

清酒醸造において、麴は冷凍して保存期間を延長している例も一部あるが、ほとんどの場合、常温において出麴後数時間から数日以内に使用しなければならず、保存期間を長くするための研究が行われてきた。麴の保存性を高める方法として、自然乾燥法、熱風乾燥法、アルコール脱水法、真空乾燥法などがあり、尾関らの真空乾燥法による研究報告^{1), 2), 3), 4)}を含めて一部実用化に至っている。

一方、種麴菌の開発も精力的に行われており、本県においては、株式会社秋田今野商店と当センターが共同で、グルコアミラーゼ活性が高くチロシナーゼ活性が低い種麴菌 CK-33 (特許第 5803009 号) を開発した。本麴菌を利用した全てのこうじをブランド名“あめこうじ”で統一し、関連企業に積極的な売り込みを進めている。

本報では、CK-33 を用いた麴の保存性を高め、通年使用と利用範囲の拡大を目的として、乾燥試験や保存試験を検討し、2、3 の知見を得たので報告する。

【 実 験 方 法 】

1. 麴の調整

1) 麴蓋法

原料米は、精米歩合 55% の秋田酒こまち 1.5kg を用いて、試験区として本県オリジナル種麴菌 CK-33、対照区として N54G 菌を 50g/白米 100kg 使用し、通常の麴蓋法で製麴した。

2) 自動製麴法

CK-33 菌を用いて KOS 式全自動製麴装置で通常の麴よりやや水分を低めにした麴を調整した。

3) 市販乾燥麴

対照として徳島製麴(株)製の精米歩合 60% の乾燥麴を使用した。

2. 乾燥方法と粉末方法

数枚のアルミのお盆に麴 500 g ずつ入れ、ヤマト科学㈱の送風定温恒温器 DN600 を用いて 30℃、40℃、50℃で温風乾燥を行った。2 時間毎に各 150 g ずつサンプリングし、直後に㈱ケット科学研究所の赤外線水分計 FD-720 を用いて水分を測定した。麴のグルコアミラーゼ活性は、キッコーマンバイオケミファ㈱の糖化力測定キットを用いて、 α -アミラーゼ活性は、キッコーマンバイオケミファ㈱の α -アミラーゼ測定キットを用いて測定した。乾燥は、各温度 16 時間で終了とした。

粉末化は、パナソニックのミル MJ-M31 を用いて破碎し粉末麴を作成した。

3. 乾燥麴と粉末麴を用いた糖化試験

水分を考慮し、乾燥麴と粉末麴、各 2.5g に 55℃のお湯を 10ml 加え、55℃で 6 時間糖化を行った。糖化後遠心分離 (3,000rpm、10 分) により得た糖化液を㈱アタゴの糖度計 PAL-1 を用いて糖度を測定した。なお、対照として市販乾燥麴を用いて同様に行った。

4. 乾燥麴と粉末麴の保存加速試験

乾燥中に経時的に採取した乾燥麴と粉末麴を密閉したサンプル容器に各 6g 入れ、37℃で 10 ヶ月の条件で劣化の加速試験を行った。保存終了後の試料について肉眼による着色の観察と酵素活性について調べた。

【 結果 及 と 考 察 】

1. CK-33 を用いた麴の酵素活性

出麴直後の麴の酵素活性を測定した結果、CK-33 の麴はグルコアミラーゼ活性が 464(U/dry g)、 α -アミラーゼ活性が 593(U/dry g) となり、対照の N54G に比べグルコアミラーゼ活性は対照の N54G の 1.5 倍、グルコアミラーゼ活性と α -アミラーゼ活性の比 (G/ α) は 0.78 となり、CK-33 のグルコアミラーゼ活性が高い特性が確認された。(表 1)

表 1 CK-33 の酵素力価

試料 (菌名)	グルコアミラーゼ (U/dry g)	α -アミラーゼ (U/dry g)	G/ α 比	水分 (%)
N54G	304	696	0.44	27.72
CK33	464	593	0.78	28.47

2. 乾燥条件の検討

KOS 式全自動製麴装置で製麴した CK-33 の麴 (水分 26.8%) を用いて温風乾燥試験

を行った。

第1図に示すように、時間の経過と共に麴の水分が低下し、水分10%以下となる乾燥条件は、30℃乾燥で12時間、40℃乾燥で4時間、50℃乾燥で2時間だった。30℃乾燥では水分10%以下にするには長時間かかることから、短時間の乾燥麴の調整には40℃または50℃乾燥が適していると判断された。

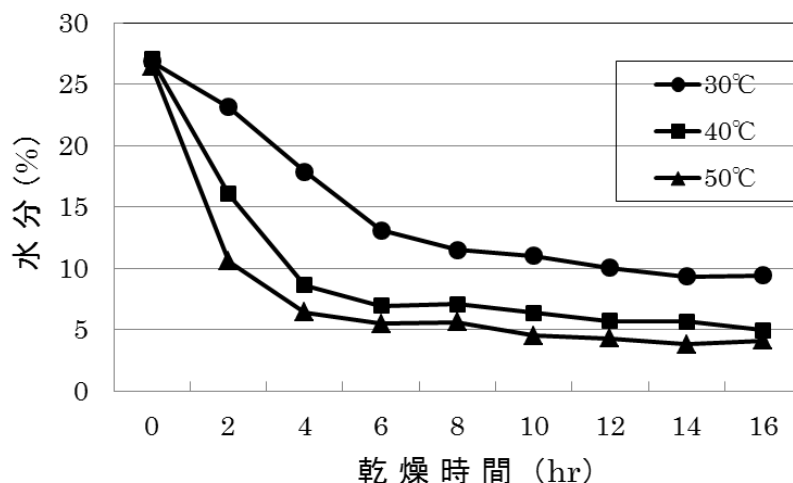


図1 乾燥中の麴の水分変化

乾燥中の麴の酵素活性を第2図と第3図に示した。本試験に供した麴は、乾燥前でグルコアミラーゼ活性が315(U/dry g)、 α -アミラーゼ活性が879(U/dry g)であり、乾燥時間の経過と共に前半やや増加傾向が認められたが、失活することもなく乾燥終了時の16時間まで十分に酵素活性を維持しており、40℃、50℃の乾燥条件でも酵素活性には問題がないことが分かった。

以上の結果から、市販の乾燥麴の水分が6.7%で保存性が高いことを考慮すると、①水分が10%以下であること、②酵素活性を維持していること、③短時間で乾燥できること等を満たす温風乾燥条件は、40℃で6時間または50℃で4時間が適当と判断された。

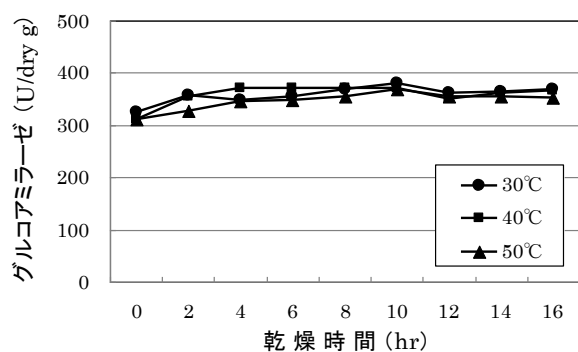


図2 乾燥中の麴のグルコアミラーゼ活性

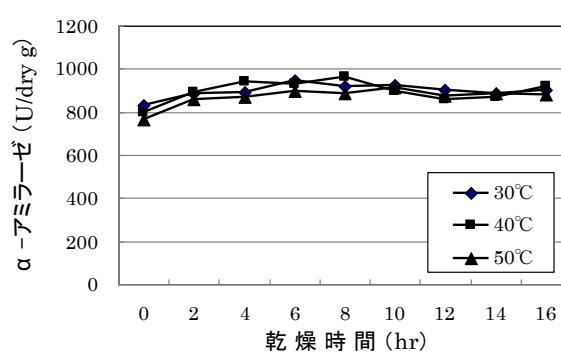


図3 乾燥中の麴の α -アミラーゼ活性

3. 乾燥麴の粉末化

30℃、40℃、50℃で乾燥中にサンプリングした試料の中から水分が16%以下の30℃で16時間、40℃で2、4、6時間、50℃で2、4、6時間の7試料に加え、乾燥前の麴を含めた8種類の麴についてミルで粉碎し、粉末化の状態を肉眼と手触りによる観察を行った。

その結果、乾燥前の麴と、水分10%台の40℃で2時間と50℃で2時間の麴は水分がいずれも10%以上で粉碎後にかたまりになり、粉末化の適性は良くなかった。その中では、水分が7%以下の40℃で6時間と50℃で4時間と6時間乾燥させたものが細かくさらさらの粉末状態になった。(表2)

表2 粉末化適性結果

試料		水分	粉末化適性
乾燥温度	乾燥時間	(%)	(×:なし~◎:あり)
スタート	0hr	26.8	×
30℃	16hr	9.4	○
	2hr	16.0	×
40℃	4hr	8.6	○
	6hr	6.9	◎
	2hr	10.6	△
50℃	4hr	6.4	◎
	6hr	5.5	◎

4. 乾燥麴と粉末麴の糖化試験

前試験に供した8試料に市販乾燥麴を加えた9種類の乾燥麴と、それを粉末化した粉末麴7種類の計16種類の試料について55℃、6時間糖化後の糖度(Brix度)を表3に示した。糖化試験の結果、乾燥前の麴(スタート0hr)に比べ乾燥麴(粒状)と粉末麴(粉状)のいずれも十分な糖分の生成が確認できた。液化状態も良好であり、乾燥中の麴の酵素活性値(図2、図3)が反映される結果となった。本乾燥条件では、いずれの乾燥麴も乾燥化や粉末化による酵素の失活はなく、十分な糖化力を維持していることが確認できた。

表 3 糖化試験結果

乾燥条件		糖化後 Brix度	
乾燥温度	乾燥時間	乾燥麴(粒)	粉末麴(粉)
スタート	0hr	14.6	—
30°C	16hr	14.3	14.6
	2hr	14.4	—
40°C	4hr	14.6	14.4
	6hr	14.9	14.7
50°C	2hr	14.6	14.4
	4hr	14.9	14.6
	6hr	14.9	14.9
参考 市販乾燥麴		14.7	14.6

5. 乾燥麴・粉末麴の保存試験

18 種類の試料について、密閉したサンプル容器に約 6g 入れ、遮光条件下で 37°C の培養室で 10 ヶ月保存加速試験を行った写真を図 4 に示した。

乾燥麴（粒状）については、水分が多い試料ほど着色が進み、水分が少ないほど白い状態を維持していた。特に、着色が進んでいたのは乾燥前（水分 26.8%）と 40°C 2 時間（水分 16.0%）、次いで 50°C 2 時間（水分 10.6%）、30°C 16 時間（水分 9.4%）であり水分量が多いほど着色が進んでいた。糖とアミノ化合物のメイラード反応が温度や水分によって促進されたと推察された。その中では、水分が 7% 以下の 40°C で 6 時間と 50°C で 4 時間と 6 時間乾燥させたものが良好な保存状態を維持していた。

粉末麴（粉状）については、図 4 に示すように水分が 15% 以上の乾燥前の麴と 40°C 2 時間の麴は粉末化が困難であったが、粉末可能な試料については、着色の強弱はほぼ粒状の乾燥麴と同じ傾向が見られ、水分が 7% 以下の 40°C で 6 時間と 50°C で 4 時間と 6 時間乾燥させたものが良好な保存状態を維持していた。



図 4 37°C、10 ヶ月保存後の試料

6. 保存試験後の酵素力価

水分が多く着色が進み、かつ粉末化できなかった試料は実用化の可能性が低いと判断し本試験からは除き、保存性の高かった40℃で4時間と6時間、50℃で2時間と4時間と6時間乾燥させた乾燥麴（粒状）及び粉末麴（粉状）の貯蔵前の酵素力価を100として37℃10ヶ月保存後の酵素力価の相対活性（残存率）を図5と図6に示した。

過酷な保存条件のためか、グルコアミラーゼ活性と α -アミラーゼ活性共に残存率が50%程度に低下したが、 α -アミラーゼ活性は乾燥状態が良いほど粒状、粉状共に残存率が高い傾向を示した。

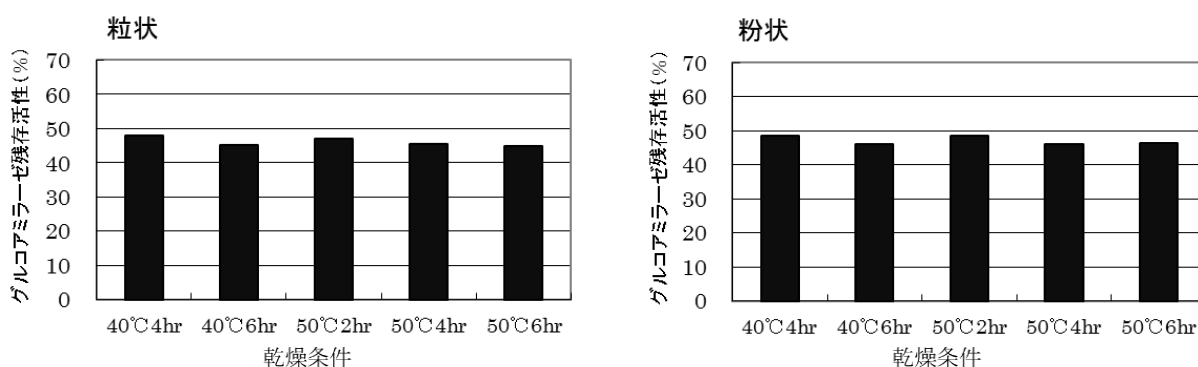


図5 保存後の残存グルコアミラーゼ活性

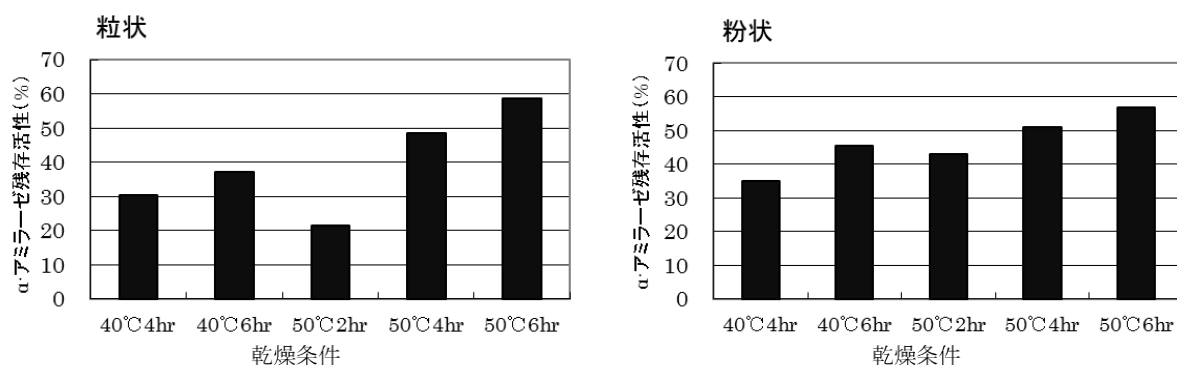


図6 保存後の残存 α -アミラーゼ活性

【まとめ】

本試験では、秋田オリジナル麴 CK-33 の“あめこうじ”の保存性を高めるための最適乾燥条件の検討と、素材として多目的利用が可能な粉末化について検討した。

- (1) 送風定温恒温器を用いて、40℃で6時間、または、50℃で4時間以上乾燥させたものが水分7%以下になり、乾燥前の麴の酵素活性をほぼ100%維持しており、糖化試験の結果を含めてこれらの乾燥条件では麴の品質に問題のないことが分かった。一方、粉末化も水分に依存する部分が多く、40℃で6時間、または、50℃で4時間以上で乾燥させたものが粉末化に適していた。
- (2) 37℃の保存試験においては、酵素活性の低下が見られたが、その中では水分が

少ない麴ほど α -アミラーゼ活性の残存率が高い結果となった。また、着色変化についても水分が少ないほど着色が少なく、7%以下の水分ではほとんど変化が見られなかった。

[引用文献]

- 1) 尾関健二、山本忠行、浜地正昭、本馬健光 (1988) 乾燥麴の貯蔵中の品質変化について 醸造協会誌 **83**, 47-51.
- 2) 尾関健二、山本忠行、浜地正昭、本馬健光 (1988) 貯蔵乾燥麴による清酒小仕込試験 醸造協会誌 **83**, 131-135.
- 3) 尾関健二、山本忠行、浜地正昭、本馬健光 (1988) 貯蔵乾燥麴による実地醸造試験 醸造協会誌 **83**, 496-500.
- 4) 尾関健二、本馬健光 (1989) 米麴の乾燥貯蔵について 醸造協会誌 **84**, 447-452.

99%精米を用いた味噌の特長

渡辺隆幸、佐々木康子

(秋田県総合食品研究センター)

Takayuki WATANABE and Kouko SASAKI

【緒言】

玄米は白米に比べ、ビタミン、ミネラル、フェルラ酸などの有用成分を豊富に含んでいるものの、玄米外側のワックス層の存在により、通常の製麹は困難であるとされている。実際、我々も予備試験において洗米、一晚浸漬後、こしきで1時間蒸した玄米に一般の味噌用種麹を用いて製麹したところ、麹菌の生育がほとんど認められず、種付け後72時間経過後も麹らしい状態にならなかった。そのため種麹が玄米上で生育しやすい環境を作るため、何らかの工夫が必要と考えられた。そこで1%だけ削る99%精米を用いて製麹したところ、順調に麹となることが確認できた。以上の予備検討の結果から、今回の試験は玄米の特長を活かした味噌の開発に役立てるため、玄米とほとんど変わらない成分を有し、かつ製麹しやすい99%精米を原料として味噌の製造試験を行った。試験1では種麹の比較試験を行い、種麹の違いが玄米麹の性状、酵素力価さらには味噌の成分に与える影響を検討した。試験2では99%精米に適した種麹を用いた味噌製造試験を実施し、通常の味噌との比較により99%精米使用味噌の優れている点すなわち特長を明らかにすることを試みた。

【実験方法】

試験1. 市販種麹の比較試験

99%精米に対する市販種麹の製麹特性を以下のように調べた。味噌用8点、売り麹用10点、清酒用2点、焼酎用2点の計22点の種麹を用いて秋田県産あきたこまちの99%精米を用いて麹蓋製麹を実施した。性状スコアはハゼ込み及びハゼまわりにより、極めて良好：4、良好：3、普通：2、やや不良：1として評価した。麹の各種酵素力価は10倍量の20mM酢酸緩衝液(pH5.0)または水により5℃、1晩浸漬抽出した後、キット法(キッコーマン)および醤油試験法により測定した。キシラナーゼ、セルラーゼ、米糠分解活性は1昼夜透析した酵素液を用いて測定した。なお米糠分解活性は醤油試験法のセルラーゼの測定方法に準じて精米時に発生した米糠を基質として還元糖発生量により測定した。すなわち精米時に発生した米糠をオートクレーブ処理した後、0.5%懸濁液を作成し基質とした。基質と酵素液各1ml混和し、30℃で60分加熱後、200 μ l採取し、ソモギネルソン法により還元糖を測定し、反応前の還元糖量との差により活性を求めた。リパーゼは片桐ら¹⁾の方法に準じて滴定法により測定した。

味噌の仕込み試験は中国産大豆を0.8atm/cm²、45分間蒸煮、放冷した大豆2kg、

米麴 1.2kg、食塩 420g、種水（酵母含む）100ml を 3 点混合後、らい砕して仕込んだ。30℃、1 ヶ月温醸後、切り返しを行い、さらに 20℃で 2 ヶ月間熟成させた後、分析を行った。味噌の DPPH ラジカル捕捉活性およびポリフェノール量の測定は味噌に対して 10 倍量の水またはメタノールを加えて抽出した液を用いて Yamaguchi²⁾らの方法に準じて測定した。すなわち試料溶液 200 μ l に 100mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.4) 800 μ l を混合後さらに 500 μ M の DPPH エタノール溶液 1ml を加えて混合、暗所 20 分放置後に 517nm を測定した。2 連 3 回の試験を実施し、没食子酸の検量線から相当量を計算した。

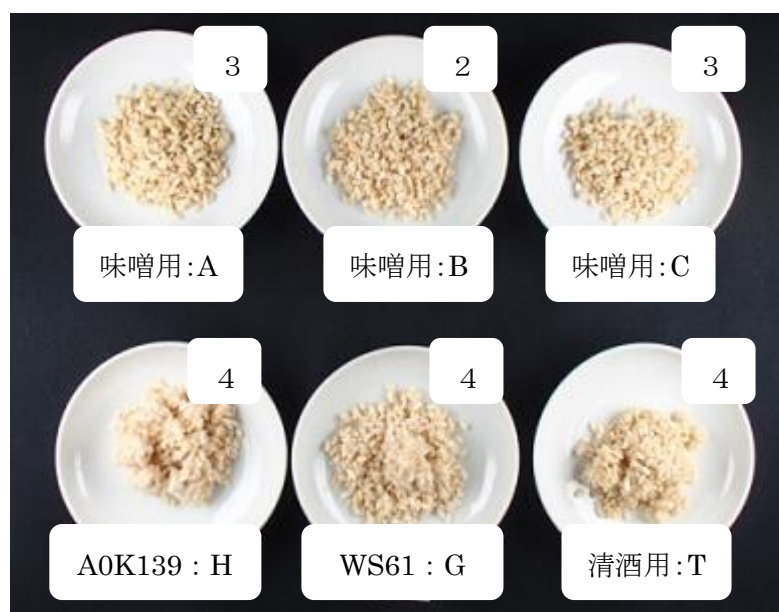
試験 2. 99%精米味噌の製造試験

状貌スコアのすぐれた種麴を選択し、味噌の製造試験を行い、アミノ酸等の一般成分とラジカル捕捉活性について測定し 99%精米使用味噌と白米使用味噌(対照)との比較を行った。

【結果】

試験 1. 市販種麴の比較試験

99%精米を用いた製麴において 22 点の種麴中極めて良好な生育を 4 点、良好な生育を 12 点が示した。一般的な味噌用種麴を用いた麴 3 点と極めて生育良好な麴 3 点の状貌を図 1 に示した。また表 1 に 99%精米麴の酵素力価を、図 2 に状貌スコアと米糠分解活性の相関図を示した。



上段 味噌用種麴を使用、下段 左から AOK139、WS61、清酒用（吟醸酒用）種麴使用、下段の方が生育極めて良好。サンプルの右上に状貌スコアを記載。

図 1 99%精米を用いた麴の状貌

表 1 各種種麴を用いた 99%精米麴の酵素力価

用途	記号	状貌スコア	糖化力	α -アミラーゼ	キシラナーゼ	セルラーゼ	米糠分解活性	リパーゼ	AP	NP
味噌用	A	3	1.68	38.2	1.09	0.013	4.94	0.63	650	706
味噌用	B	2	1.50	27.0	0.75	0.067	2.31	1.47	518	490
味噌用	C	3	1.38	23.8	1.11	0.007	4.27	0.42	444	542
味噌用	D	2	1.45	29.8	2.47	0.889	2.07	0.63	518	453
味噌用	E	1	1.28	15.3	1.54	0.020	2.58	1.37	275	226
味噌用	F	3	1.66	33.7	1.49	1.364	3.98	1.74	790	910
味噌用	G	4	4.46	80.8	1.89	0.843	6.46	1.89	557	476
味噌用	H	4	4.33	70.1	2.23	1.805	7.07	0.63	545	465
売り麴用	I	3	2.41	38.9	2.55	0.889	3.41	0.68	692	616
売り麴用	J	3	1.43	27.4	4.47	0.194	2.24	0.37	576	600
売り麴用	K	3	1.37	24.6	2.68	0.074	3.08	1.68	436	430
売り麴用	L	3	1.52	23.9	2.39	0.234	3.31	1.63	482	478
売り麴用	M	1	1.72	25.9	1.39	1.545	1.07	1.79	660	500
売り麴用	N	3	1.56	25.5	1.32	0.736	3.14	1.68	659	702
売り麴用	O	3	1.36	21.9	1.46	1.728	2.78	1.68	508	579
売り麴用	P	3	1.42	20.7	1.58	0.412	2.48	1.79	518	583
売り麴用	Q	3	3.19	59.1	0.85	0.883	4.63	1.68	499	246
売り麴用	R	4	3.73	75.4	0.58	2.401	6.63	1.53	763	568
清酒用	S	3	1.55	32.2	1.51	0.361	4.25	1.74	560	617
清酒用	T	4	1.30	21.5	1.32	0.167	4.33	1.58	361	378
焼酎用	U	2	3.71	3.2	2.81	0.929	2.91	1.89	712	218
焼酎用	V	2	5.79	1.7	1.22	1.284	3.33	0.89	478	122
生育との相関			0.6270	0.6697	0.0688	0.3108	0.7944	-0.0600	0.3495	0.3081

売り麴とは甘酒、漬け物用など汎用な目的で販売される麴を示す。

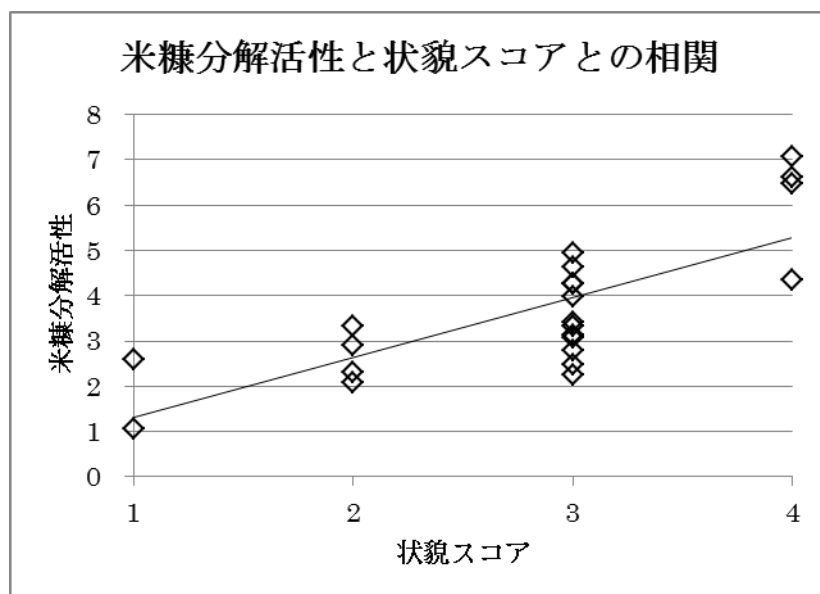


図 2 状貌スコアと米糠分解活性の相関

99%精米麴では種麴の違いによりセルラーゼ、キシラナーゼ、糖化力、 α アミラーゼ、リパーゼ等の酵素力価にも差が生じた。状貌スコアと酵素力価との相関では米糠分解活性（単相関係数 0.7944）をはじめ糖化力、 α -アミラーゼと高かったが、酸性プロテアーゼ（AP）、中性プロテアーゼ（NP）やセルラーゼ、キシラナーゼ、リパーゼとは高くなかった。図 2 でも明らかなように生育が良好で状貌の良い麴は高い米糠分解活性を有している傾向が認められた。

各種種麴を用いて製造した味噌の DPPH ラジカル捕捉活性を図 3 に、ポリフェノール量を図 4 に示した。

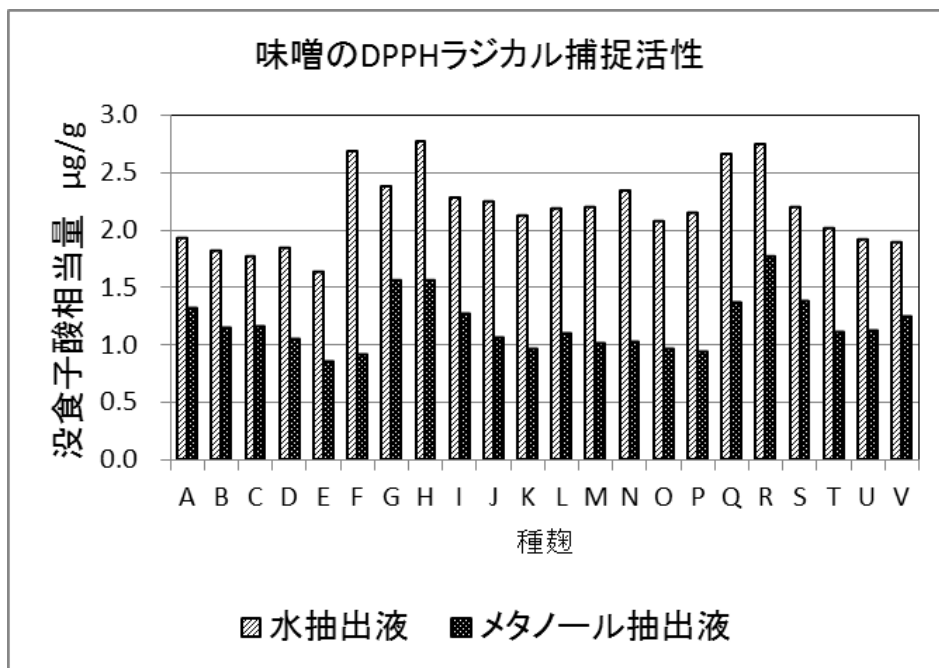


図3 各種種麴を用いて製造した味噌の DPPH ラジカル捕捉活性

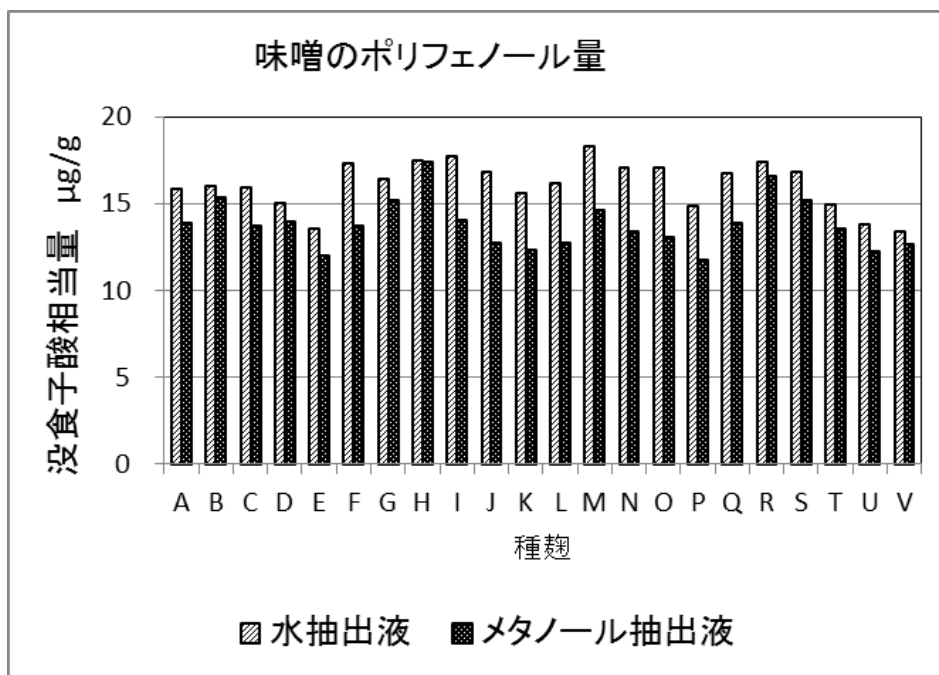


図4 各種種麴を用いて製造した味噌のポリフェノール量

味噌抽出液中のラジカル捕捉活性は種麴の違いにより最大 1.7 倍、ポリフェノール量は最大 1.4 倍の違いを認めた。

試験 2. 99%精米味噌の製造試験

状貌スコアのすぐれた 99%精米に適した菌株の一つである WS61 (表 1 での記号 G) を用い、製麴と味噌製造試験を実施したところ 99%精米による麴は、同時に製麴した白米の麴よりも各種の酵素力価が高いことを認めたが、糖化力のみ酵素活性が低か

った（表2）。さらに99%精米を用いた味噌は白米を用いた味噌と比較して仕込み直後から熟成終了時までラジカル捕捉活性が高く（図5）、またアミノ酸総量、グルタミン酸、アスパルギン酸(表3)、フェルラ酸量も多いことが認められた（図6）。

表2 麴の酵素力価

原料	種麴	糖化力	α -アミラーゼ	AP	NP	セルラーゼ	キシラーゼ	米糠分解活性
白米	WS61	10.2	62.3	2481	2012	0.76	1.16	3.69
99%精白米	WS61	6.2	82.3	6778	6099	2.14	3.19	3.48

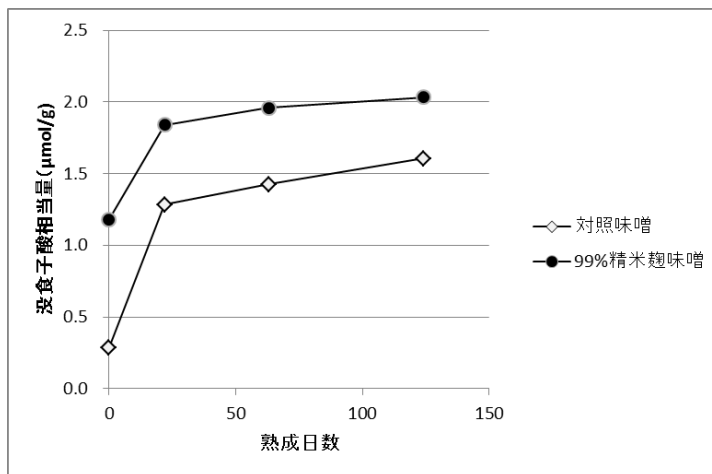


図5 味噌のラジカル捕捉活性

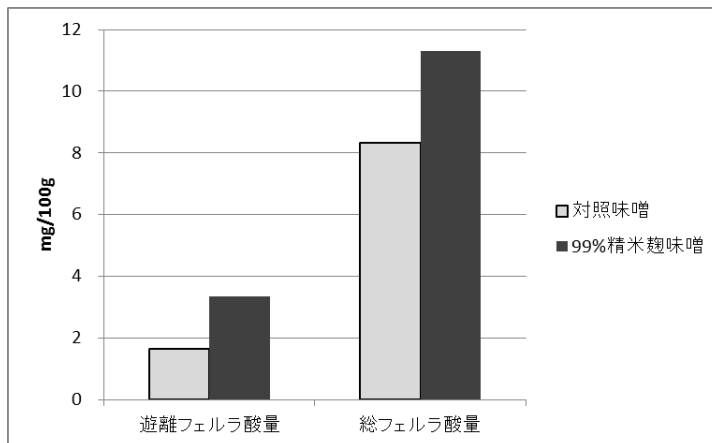


図6 味噌のフェルラ酸量

表3 味噌のアミノ酸量

	mg/100g		b/a
	対照味噌(a)	99%精米麴味噌(b)	
Asp	94	153	1.63
Thr	49	72	1.48
Ser	80	117	1.47
Glu	183	272	1.49
Gln	64	84	1.31
Gly	41	63	1.52
Ala	91	123	1.34
Val	77	108	1.41
Met	32	39	1.23
Cysta	6	6	0.97
Ile	83	112	1.34
Leu	140	178	1.27
Tyr	70	79	1.13
Phe	123	152	1.24
GABA	13	12	0.93
Orn	1	1	1.08
His	17	27	1.52
Lys	110	140	1.28
Arg	168	212	1.27
合計	1442	1952	1.35

【考察】

玄米がビタミンなどの栄養成分を豊富に含む健康素材であることは広く認知されており、消費者の健康志向に対応して玄米味噌や発芽玄米味噌が市場で認められている。玄米を麴化して味噌を製造する玄米麴味噌に関する研究例は極めて少ないものの、伊藤³⁾が消費者の健康志向に対応する味噌の一つとして玄米麴味噌の製造方法について説明しており、軽く精米することで製麴しやすくなると紹介している。この前例に倣えば99%精米を用いた味噌も玄米味噌と呼んで差し支えないと考えるが、どこまでの精米歩合が玄米と許容できるかについては業界でのルール作りに期待したいと考える。今回の試験では99%精米麴を用いて味噌を製造することで予想されたDPPHラジカル捕捉活性の増強を確認できた。味噌のDPPHラジカル捕捉活性には熟成中に生成するメラノイジンが寄与していることが報告^{4,5)}されている。また松田⁶⁾は麦麴のエタノール抽出液のDPPHラジカル捕捉活性が製麴過程で増加し、この増加にフェルラ酸のみならず他のポリフェノール類の関与することを推定している。以上の研究と同様に99%精米麴を用いた味噌のラジカル捕捉活性には熟成中に増加するメラノイジンとフェノール化合物の双方の寄与が考えられる。通常の味噌との比較で

99%精米味噌のラジカル捕捉活性が仕込み時から高い原因としては遊離型のフェルラ酸などのポリフェノール類が大きく関与していると推測する。

今回、99%精米で麴を作ることにより白米で作る麴よりも中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼとも活性が強まり、味噌中のアミノ酸が増加することを認めたことは新しい知見と言える。我々は99%精米を用いた味噌のうま味の増強を認めており、通常味噌よりもアミノ酸量が多く、うま味が強いことは玄米を用いた味噌の特長となる可能性がある。

99%精米に各種種麴を用いて製麴した結果、試験した22点の種麴すべてにおいて製麴が可能であった。しかし種麴により生育の程度と生産する酵素活性に差異があり、状貌スコアと米糠分解活性には強い正の相関を認めた。米糠分解活性等の組織分解活性が99%精米上での麴菌生育に大きな関連を持つことが示唆されている。さらに種麴の違いによる味噌中の酵素力価の差異は味噌中のポリフェノール量、およびラジカル捕捉活性についても影響を与えていることが認められ、種麴選択の重要性も改めて確認できた。今後、玄米麴味噌の特長を高めるために麴菌などの醸造微生物の活用方法について詳細な検討の必要性を感じている。

【引用文献】

- 1) 片桐充昭, 清水純夫 (1994) 味噌中の脂肪酸エチル生成に対する温度条件ならびにリパーゼ活性の影響, 日本食品低温保蔵学会誌, 20, No.4, 175-180
- 2) Tomoko Yamaguchi, Hitoshi Takamura, Teruyoshi Matoba, and Junji Terao (1998) HPLC Method for Evaluation of Free Radical-scavenging Activity of Foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, 62, 1201-1204
- 3) 伊藤寛, 健康志向味噌について (1984) 醸造協会誌, 79, 12, 846-850
- 4) 下橋淳子, 西山一郎 (2008) 味噌の色調と抗酸化性との関係, 日本食生活学会誌, 19, No.3, 247-250
- 5) 松尾眞砂子, 人見英里 (2007) 味噌の種類調理法および添加香辛料による抗酸化性の変化, 日本食品科学工学会誌, 54, No.11, 503-508
- 6) 松田茂樹, 工藤康文 (2000) 麦味噌および大麦麴に含まれるフェルラ酸と抗酸化性, 日本食品保蔵科学会誌, 126, No.4, 199-203

2. 原著論文（研究ノート）（1件）

- 1) 精油芳香がワーキングメモリ課題遂行時の NIRS 脳血流変化量に及ぼす影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15
○熊谷昌則

精油芳香がワーキングメモリ課題遂行時の NIRS 脳血流変化量に及ぼす影響

熊谷昌則

(秋田県総合食品研究センター)

Masanori KUMAGAI

【緒言】

各種刺激の脳機能賦活効果を「見える化」するために、NIRS 脳血流変化量を指標とした評価システムの構築について検討している。今回は、記憶課題のワーキングメモリ課題遂行時の NIRS 脳血流変化量に及ぼす α -ピネン (図 1) の影響について若干の知見を得たので報告する^{1,2)}。 α -ピネンとは、松などの樹木に含まれるモノテルペン的一种で、森林浴効果などが知られている³⁾。 α -ピネンには、交感神経の活動を抑制し、リラックス状態を作り出すという報告³⁾や、ストレスの程度との相関があるとされる β 波のパワースレベルが α -ピネンにより低下するという報告⁴⁾などがある。一方でまた、 α -ピネンはミョウガや春菊などにも含まれており、巷間ではミョウガを食べると物忘れしやすくなるなどという俗説も知られているが、記憶との関連において α -ピネン刺激による神経活動を調べた報告は見当たらなかった。

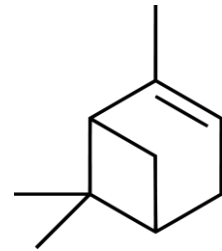


図 1 α -ピネンの構造式

【実験方法】

本実験には、当センター倫理委員会の承認に基づき、事前に同意の得られた健康成人の男性 5 名、女性 2 名 (20~23 歳、全員右利きであることを確認) に対して実験参加者としての協力を求めた。参加者には、刺激呈示システム SP-POST01 (日立ハイテクノロジー) を用いた記憶に係わる 2 種類の前頭葉賦活課題を与えた (図 2)。すなわち、空間性ワーキングメモリ課題として、円形に配置された 8 個の正方形のうち 4 箇所が赤く塗られた画像を標的刺激 (S1) として 1.5 秒間呈示し、それを記憶させた後、7 秒の遅延時間後に、8 箇所の正方形のうち 1 箇所のみが赤く塗られた画像を試験刺激 (S2) として呈示し、S2 で現れた赤い正方形の位置が、はじめに覚えた S1 の 4 箇所の赤い正方形の位置のいずれかに一致しているか否かを判断させた。他方、言語性ワーキングメモリ課題として、意味のない組み合わせの 4 個のひらがなを標的刺激 (S1) として 1.5 秒間呈示し、それを記憶させた後、7 秒の遅延時間後に、1 個のカタカナが表示された画像を試験刺激 (S2) として呈示し、S2 で現れたカタカナがはじめに覚えた S1 の文字のいずれかに一致しているか否かを判断させた。これらのタスクをそれぞれ 15 回繰り返し、1セッションと

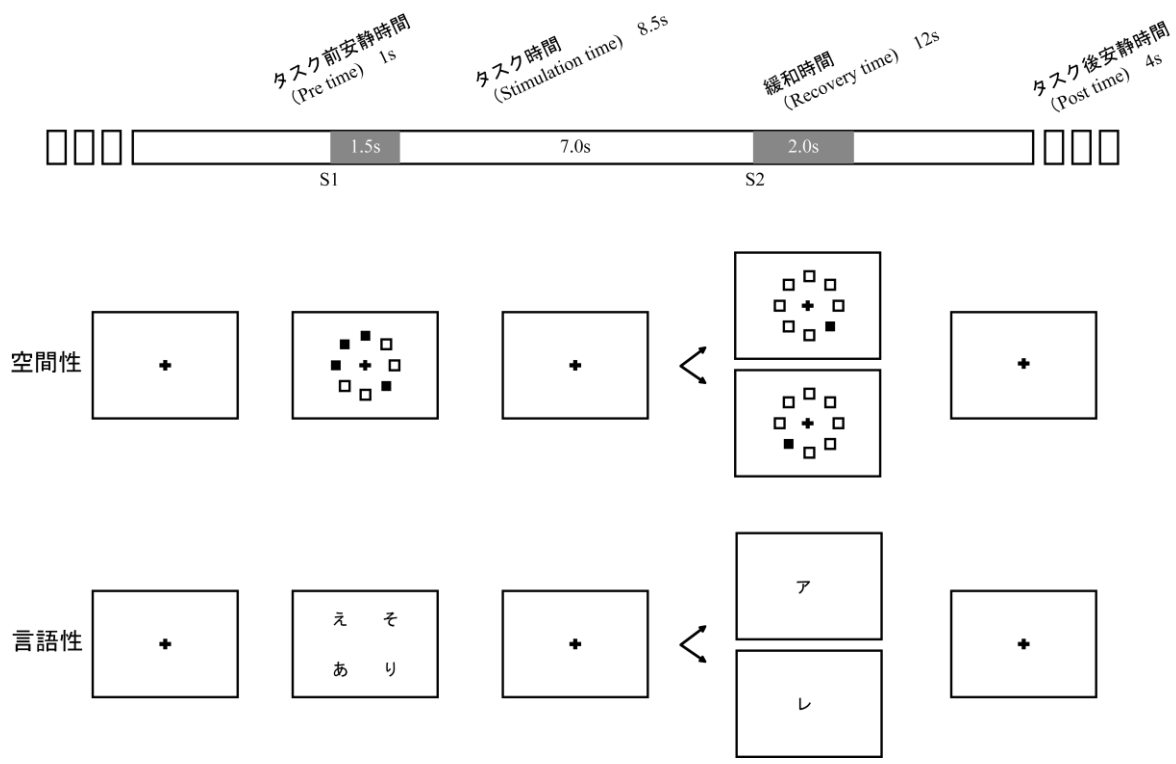


図2 ワーキングメモリ課題

した。参加者には、セッションごとに、 α -ピネンを匂い刺激として負荷した。課題遂行時における前頭前野の脳血流変化量は、光トポグラフィーETG-4000（日立メディコ）を用いて測定し（図3）、関心領域（ROI）における酸素化ヘモグロビン（Oxy-Hb）信号に着目し、その変化量を加算平均して参加者ごとの平均波形とした。

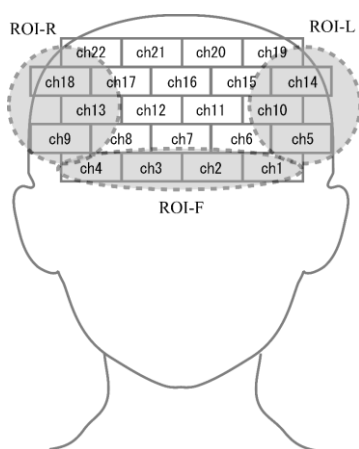


図3 センサ配置

【結果と考察】

ワーキングメモリ課題遂行時の平均反応時間と正解率を図4に示した。空間性ならびに言語性ワーキングメモリ課題のいずれについても、 α -ピネンによる刺激負荷によって課題に対する参加者の平均反応時間は短縮されたが、一方で正答率はやや低下した。ただし、これらの傾向は参加者一様ではなかった。

次に、それぞれの課題遂行時における前頭前野脳血流変化量について示す。図5には一例として、参加者Aの空間性ワーキングメモリ課題遂行時の右背側部におけるOxy-Hbの変化量を示したが、ここでは、Oxy-Hb上昇と脱酸素化

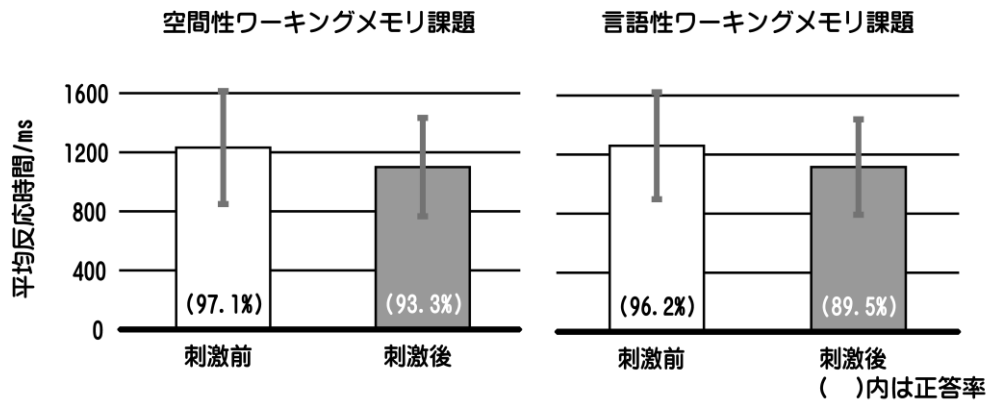


図4 ワーキングメモリ課題遂行時の平均反応時間と正解率

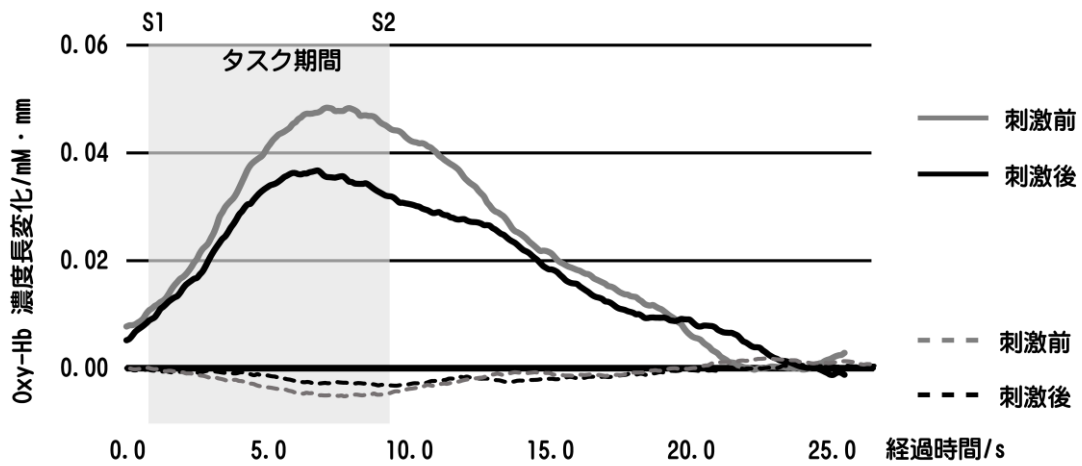


図5 参加者Aの空間性ワーキングメモリ課題遂行時の脳血流変化(右背側部)

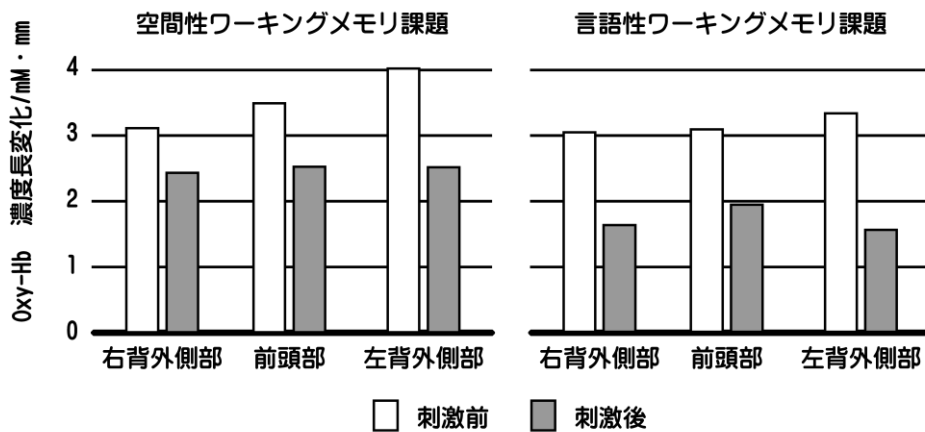


図6 参加者Aの課題遂行時の脳血流変化

ヘモグロビン) Deoxy-Hb の低下が認められたことから、この間に脳の神経活動が亢進していることが推察される⁵⁾。これらの神経活動は、 α -ピネン刺激の負荷により Oxy-Hb の減少を誘発した。これらの現象を、前頭部 (Ch1,2,3,4)、左背外側部 (Ch5,10,14) ならびに右背外側部 (Ch9,13,18) のそれぞれの局所ごとに解析したのが図 6 である。空間性と言語性のワーキングメモリ課題間で顕著な差は認められなかったが、いずれの課題においても α -ピネンによる刺激負荷によってそれぞれの部位間における Oxy-Hb が減少した。

さて、ここでは参加者全体の結果ではなく、参加者 A の Oxy-Hb 変化量について、その結果を例示してきた。その理由として、NIRS 信号の解析、評価において、複数の実験参加者から得られたデータを集団解析して、多くの人に普遍的に共通して認められる現象かどうかを、現状では単純に確認することができないという制約があるためである。なぜならば、ここで得られている NIRS 信号は、Hb 濃度そのものではなく、光路長との積の形として、Hb 濃度の変化量を濃度長変化 / mM・mm として表現したものである⁶⁾。しかも、光路長は計測部位によって異なり、また個人間のバラツキも大きいいため、個人データ解析を行ったうえで、それぞれを比較せざるを得ない。したがって本実験では、参加者 A と同様に α -ピネン刺激により脳血流が低下したのは 7 名中 4 名であったので、結果としては、参加者一様ではなかったものの、 α -ピネン刺激により NIRS 脳血流は低下する傾向が示唆されたというのが結論である。先に示した、ワーキングメモリ課題に対する反応時間の短縮と正解率の低下が、脳血流の低下によって説明できるかどうかについては本実験結果のみでは明確に判断できなかった。今後は、引き続き参加者数を増やして検証ならびに追加実験を行って、他の精油芳香成分との比較検討も行う予定である。

【謝 辞】

本研究の一部は科研費 (25350174) の助成を受けて実施された。

【文 献】

- 1) 熊谷昌則 (2014) 精油芳香が前頭葉賦活課題遂行時の NIRS 脳血流変化量に及ぼす影響, 第 18 回日本光脳機能イメージング学会学術集会抄録集, 19.
- 2) 熊谷昌則 (2014) ワーキングメモリ課題遂行時の NIRS 脳血流変化量に及ぼす精油芳香の影響, 生体医工学シンポジウム 2015 予稿集, 24.
- 3) 近藤照彦, 小林功, 武田淳史, 谷田貝光克 (2011) 森林浴の香りが生体に及ぼす生理学的効果について, *Aroma Res*, **12**, 161-165.
- 4) 森川岳 恒次祐子 宮崎良文 (2005) 濃度の異なる α -ピネンの吸入が生体に及ぼす影響, 日本木材学会大会第 55 回研究発表要旨集, 82.
- 5) 灰田宗孝 (2003) 脳機能計測における光トポグラフィ信号の意味, *MEDIX*, **36**, 17-21.
- 6) 酒谷薫監修 (2012) NIRS—基礎と臨床—, pp103-107, 新興医学出版社, 東京.

3. 総説 (1 件)

- 1) 味噌の持つ高血圧抑制物質について 19
○高橋砂織

本稿総は、日本醸造協会誌第 110 巻 第 9 号に掲載された解説の再掲載です。掲載をご快諾いただきました公益財団法人日本醸造協会・日本醸造学会に深謝いたします。

味噌の持つ高血圧抑制物質について

味噌の効能に関する研究は多く、抗酸化性や抗腫瘍性など多くの論文が報告されている。著者らは、ここ 10 年ほど味噌中の血圧調節作用物質に注目し、レニン、キマーゼ、アンギオテンシン変換酵素やアンギオテンシン変換酵素 2 阻害物質の探索を行った。その結果、味噌には複数の血圧関連酵素阻害物質が存在することを見出された。味噌の効能に新たな可能性が期待されている。

高橋 砂 織

1. はじめに

味噌は古来より日本人の生活に欠かせない食材として珍重されてきた。戦国時代においては、味噌は兵糧の一つとして重要な位置を占めており、1日に兵士一人当たり水1升、米6合、塩1匁、味噌2匁が支給されていたなどの古い記録も残っている。また、宮澤賢治（明治29年～昭和8年）の代表的な詩である「雨ニモマケズ（昭和6年11月3日作）」には「雨ニモマケズ 風ニモマケズ～（中略）～一日ニ玄米四合ト味噌ト少シノ野菜ヲタベ アラユルコトヲ ジブンヲカンジョウニイレズ～」との記述があり、昭和初期においても味噌は日常生活に重要な位置を占めていたことが伺える。味噌は栄養学的面からビタミン類や必須アミノ酸類を多く含むことは周知の事実であるが、その効用についても癌のリスク低減効果や生活習慣病予防効果などの生理機能効果のあるところが報告されている。我々は、哺乳類で最も重要な血圧調節系であるレニン・アンギオテンシン系（Renin-angiotensin system, RAS）に注目して、各種食材からRAS関連酵素の阻害物質の探索を進めてきた。その中で、味噌にもRAS関連酵素阻害物質が豊富に含まれている事を見出した。本解説では、味噌に含まれるレニン、キマーゼ、アンギオテンシン変換酵素（ACE）や最近注目を集めつつあるアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）阻害物質について解説する。

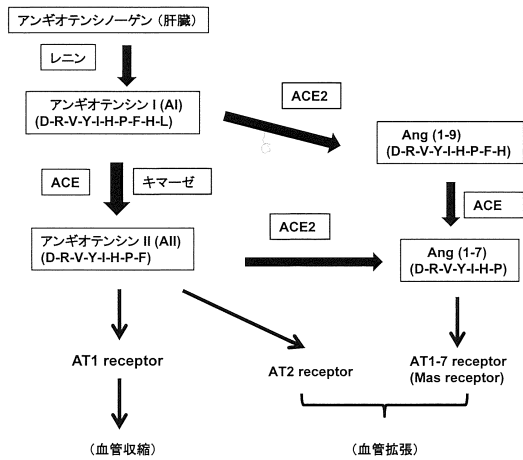
2. RAS による血圧調節について

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（活性中心にアスパラギン酸を持つタンパク分解酵素の総称）で、主に腎臓の傍糸球体細胞で合成され、レニン顆粒と呼ばれる分泌顆粒内に成熟型酵素として貯留されている。顆粒内のレニンは様々な刺激で血中に放出され、肝臓で合成されたアンギオテンシノーゲンのN末端側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ギオテンシンI（AI）を生成する。生じたAIは、不活性ホルモンで、血中の主に肺循環中にACEによりC末端2残基His-Leuが切除され、活性型のアンギオテンシンII（AII）となる。AIIは、アンギオテンシンタイプ1受容体（AT1R）を介して血管を収縮させ、血圧上昇を引き起こす（第1図）。皆様ご存じのようにこれまで、ACEを標的とした医薬品や血圧が高めの方用の特定保健用食品が数多く開発されている。

一方、2000年に2つのグループからACEの相同遺伝子であるACE2の存在が報告された^{1,2)}。ACE2は、カルボキシペプチダーゼの一種類で心臓、肺や睾丸で特異的に発現している。生理的には、AIからアンギオテンシン1-9（A1-9）をまたAIIからはアンギオテンシン1-7（A1-7）を生成する。A1-9からもACEの作用でA1-7が生成される。両方の経路で生じたA1-7は、AIIの作用とは逆にアンギオテンシンタイプ2受

Anti-hypertensive Compounds in Miso.

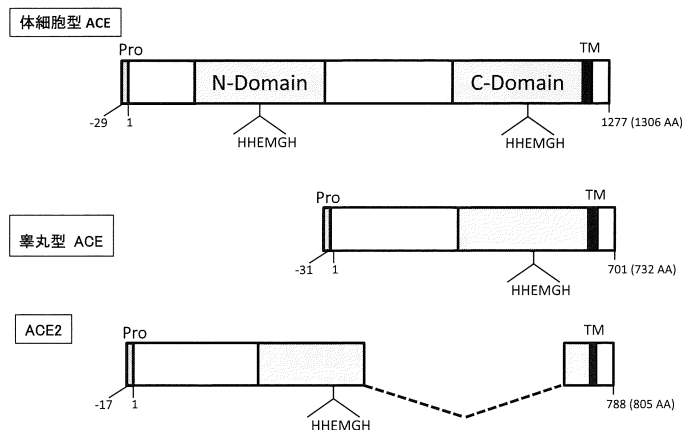
Saori TAKAHASHI (Akita Research Institute of Food and Brewing, Food Processing Research Station)



第1図 レニン-アンギオテンシン系による血圧調節機構

容体 (AT2R) を介して血管を拡張させることで血圧降下作用を示す (第1図)³⁾。一方, ACE2は膜タンパク質であり, 重症急性呼吸器症候群 (Severe acute respiratory syndrome, SARS) の原因となるコロナウイルス類が持つスパイクタンパク質の受容体であることが知られている^{4,8)}。さらに ACE2は, 結腸炎の原因因子であるとともに, デキストラン硫酸で惹起された腸炎の原因となっている⁹⁾。したがって, ACE2の活性化因子や阻害因子は, ACE2が関与する疾患の予防や治療に重要な役割を持つことが期待される。

第2図に体細胞型 ACE, 睾丸型 ACE 及び ACE2の構造模式を示した。体細胞型 ACEは, NドメインとCドメインの2つの活性中心部位を持っている。これに対して睾丸型 ACEは, Nドメインの活性部位を欠損しており, Cドメイン活性中心部位のみを有している。NドメインとCドメインはそれぞれ独立した発現系を用いた解析から, 両ドメインともにアンギオテンシン I と合成基質 Hippuryl-Histidyl-Leucine (Hip-His-Leu) の分解活性を持つことが示されている^{10,11)}。また NaCl に対する感受性が Nドメインの方が高く, 低濃度の NaCl で活性が飽和するなど, NドメインとCドメインの活性発現様式に若干の相違があることなどが明らかとなっている¹²⁾。ACE2の活性中心付近のアミノ酸配列は, 体細胞型 ACEのNドメインと相同性が高い。これまで, ACEに関しては各種食材から阻害物質の探索が数多く報告されており, ACE阻害を標榜した血圧が高めの方用の特定保健用食品の開発が盛んに行われている。一方, 医薬品としての ACE2の阻害剤や活性化化合物の開発も進んでいる。ACE2の阻害剤は, 抗 SARS 薬や抗腸炎薬として用いられる。逆に ACE2の活性化剤は, 高血圧予防薬や抗心筋症薬などとして期待される。このように ACE2作用薬剤の開発は期待されているが, 食物由来 ACE2作用物質に関する研究は, ACE2の活性測定法の開発が遅れていたことから最近まで殆ど行われて来なかった。我々は最近 ACE2の高感度蛍光消



第2図 体細胞型 ACE, 睾丸型 ACE 及び ACE2の構造比較

HHEMGGH は, 活性中心近傍アミノ酸配列 (His-His-Glu-Met-Gly-His) を示す。それぞれの酵素は, N末端のプロ領域 (Pro) 及び C末端側に膜貫通領域 (Transmembrane domain, TM) を持つ。

光基質を開発し、各種食材より ACE2 作用物質の探索と構造解析を進めている。

3. 組換え型ヒトレニンの発現と精製

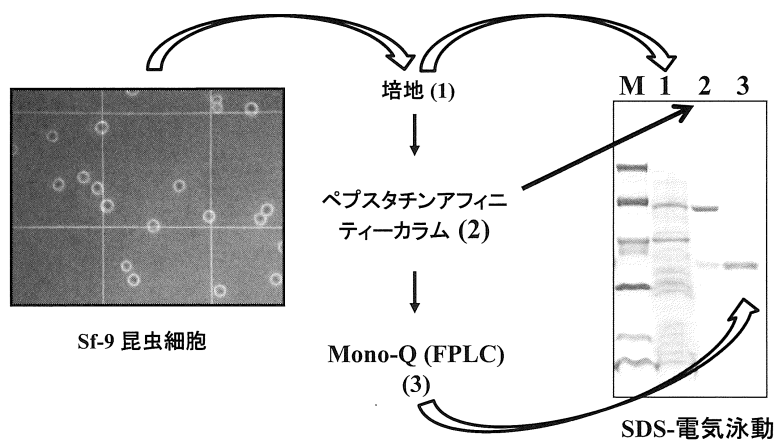
RAS においてレニンは律速酵素として最も重要視されてきた。しかしながら、レニンの活性測定方法が複雑であったことより、食物由来レニン阻害物質の探索研究は遅れていた。我々は、最初は大腸菌を用いて組換え型ヒトレニンの発現を試みた。しかしながら、レニンがシグナル配列を持つこと、またアスパラギン酸結合型糖鎖を複数持つことなどから大腸菌の発現では組換えタンパク質が全て封入体を形成し、活性型酵素を得ることが出来なかった。各種発現系を試みた結果、バキュロウイルス・昆虫細胞系を用いることで培養最後期に培地中に活性型レニンが生産されることを見出した。バキュロウイルス・昆虫細胞発現系で活性型レニンが分泌されることは初めての知見であり、ペプスタチンアフィニティーカラムを用いることで活性型レニンの精製が可能となった(第3図)¹³⁾。バキュロウイルス・昆虫細胞発現系におけるレニンの活性化機構の詳細を検討した結果、バキュロウイルス遺伝子中に組み込まれているシステインプロテアーゼがプロレニン活性化酵素として作用していることが示されて

いる¹⁴⁾。組換え型ヒトレニンが容易に入手出来るようになったことより、本酵素を用いて味噌を含む各種食材からレニン阻害物質の探索が可能となった。

4. RAS 関連酵素基質の開発

1) レニン及びキマーゼ基質の開発

これまで、レニン活性はアンギオテンシンノーゲンを基質として生じた AI をラジオイムノアッセイ法 (RIA) で測定する方法が広く用いられてきた。RIA は、超高感度でレニン活性を測定することが可能であるが、基質となるアンギオテンシンノーゲンを動物の血漿から精製する必要があること、¹²⁵I- 標識 AI が高価であること、当然のことながら RI 実験室内での作業が必要であること、さらに廃棄物の処理が高額であることなど多くの問題があり、レニン活性を測定出来る機関は限られていた。また、最近では標識化合物の入手が困難になるなどレニン活性の測定には多くの問題があった。そこで、レニンの蛍光消光基質開発に取り掛かった。アンギオテンシンノーゲンのレニン認識部位の構造は動物種により異なることから、重要度を加味してヒトレニン測定用の基質開発を行った。ヒトアンギオテンシンノーゲンの N 末端領域の配列を基に N 末端に蛍光物質 N-メチルアントラニル酸 (Nma)



第3図 組換え型ヒトレニンのバキュロウイルス・昆虫細胞系での発現、精製及び SDS-電気泳動解析
ヒトプレプロレニンを組み込んだバキュロウイルスをヨトウガ中腸由来 Sf-9 細胞に感染させた。感染培養最後期の培地を用いて、ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィー及び Mono Q FPLC により組換え型ヒトレニンを精製した。M：分子量マーカー上部より、96 kDa、66 kDa、45 kDa、30 kDa、20.1 kDa 及び 14.4 kDa。レーン 1：培地、レーン 2：ペプスタチンアフィニティークロマトグラフィー溶出液、レーン 3：Mono-Q カラム溶出液。

Nma-His-Pro-Lys(Dnp) を選択した¹⁷⁾。以上述べてきたように、RASを構成する全ての酵素（レニン、キマーゼ、ACE及びACE2）の蛍光消光基質を開発した。これら全ての基質は励起波長340nm及び蛍光波長440nmで共通していることから、蛍光プレートリーダーを用いることで酵素と基質の組み合わせによりRAS系の全酵素活性を同一プレート上で測定出来る大きなメリットがある（第4図）。

5. 味噌中のレニン阻害物質¹⁸⁾

上述の通り最初にレニン阻害物質探索系を構築し、各種食材抽出液のレニン阻害活性を検討した。その結果、秋田県内で市販されている味噌にレニン阻害活性を見出した。そこで、味噌には普遍的にレニン阻害物

質が普遍的に存在するのか、さらに味噌熟成中のレニン阻害物質の挙動について検討した。全国レベルでの味噌の比較が必要であることから、中央味噌研究所より提供された平成22年度産市販味噌73点及び全国味噌鑑評会優秀見本味噌7点及び秋田県味噌醤油組合から提供された秋田県味噌醤油品評会出品味噌16点の味噌抽出液を作成し、C18逆相カラム吸着画分についてレニン阻害活性を調べた。味噌の種類により、抽出物の量や全阻害ユニット（TIU, Total inhibition units）に差異は認められたものの、測定した全ての味噌試料にレニン阻害活性が確認された（第1表）。試料ごとのTIUを比較してみると、全国味噌鑑評会優秀見本味噌（米味噌5点、豆、麦味噌各1点）計7点の平均は49.9、秋田県味噌醤油品評会出品味噌（米

第1表 味噌抽出液 RAS系酵素阻害活性

市販味噌

味噌 No.	種類	レニン阻害活性 (TIU)	キマーゼ阻害活性 (TIU)	ACE阻害活性 (TIU)
1	米みそ	92.0	211.9(3)	97.4(9)
2	米みそ	62.6	58.2	51.0
3	米みそ	97.2	190.7(4)	50.4
4	米みそ	72.9	82.6	115.0(3)
5	米みそ	45.0	64.2	60.2
6	米みそ	135.1(2)	82.0	82.9
7	麦みそ	39.2	66.7	106.1
8	麦みそ	61.1	62.4	55.9
9	豆みそ	62.3	117.5	116.5(2)
10	調合みそ	71.0	130.5	66.2
11	米みそ	33.9	59.5	88.4
12	米みそ	84.7	63.1	59.3
13	米みそ	93.4	78.1	84.1
14	米みそ	87.5	60.1	37.2
15	米みそ	40.2	63.2	170.2(1)
16	米みそ	109.8(7)	68.1	43.2
17	麦みそ	40.6	60.5	36.3
18	米みそ	98.0	169.9(6)	54.5
19	米みそ	111.4(6)	168.9(7)	34.3
20	米みそ	101.4(9)	67.6	68.4
21	米みそ	44.4	65.3	95.4(10)
22	米みそ	75.5	90.4	61.4
23	米みそ	58.8	96.7	52.1
24	米みそ	73.9	102.0	73.2
25	米みそ	63.8	98.1	43.5
26	米みそ	67.1	61.8	68.6
27	米みそ	29.6	126.6	42.8
28	米みそ	21.8	87.4	83.5
29	米みそ	88.9	129.0	59.1
30	麦みそ	76.4	115.0	157.9
31	麦みそ	79.7	57.3	32.8
32	米みそ	79.2	71.9	57.4
33	米みそ	100.2(10)	129.7	42.1
41	米みそ	51.7	58.8	9.4
42	米みそ	50.2	40.6	50.9

43	調合みそ	32.2	59.0	13.4
44	調合みそ	36.5	78.7	39.3
45	米みそ	40.9	55.4	41.7
46	米みそ	40.6	67.7	59.8
47	米みそ	35.7	41.9	41.1
48	米みそ	31.7	31.7	35.2
49	米みそ	34.6	38.4	108.2(5)
50	米みそ	55.5	73.7	8.7
51	米みそ	41.2	69.9	47.9
52	米みそ	169.6(1)	242.2(1)	88.3
53	米みそ	57.3	116.3	43.6
54	調合みそ	39.8	95.6	46.7
55	調合みそ	28.3	79.6	45.8
56	調合みそ	25.3	61.4	41.9
57	米みそ	52.6	74.1	43.1
58	米みそ	37.0	97.6	52.9
59	米みそ	34.8	67.5	51.9
60	米みそ	47.9	94.4	57.2
61	米みそ	37.5	78.9	51.3
62	米みそ	39.2	91.7	49.0
63	米みそ	27.4	80.3	51.5
64	米みそ	34.1	93.2	65.6
65	米みそ	29.6	56.0	52.7
66	米みそ	48.3	63.2	59.0
67	米みそ	30.4	78.6	49.3
68	米みそ	37.1	124.8	59.8
69	米みそ	17.8	87.7	48.4
70	米みそ	44.7	105.5	44.2
71	米みそ	24.3	57.1	50.9
72	米みそ	64.5	87.6	64.5
73	米みそ	48.0	69.7	73.2
74	米みそ	87.3	110.3	88.2
75	米みそ	43.7	64.6	62.3
76	米みそ	40.0	91.2	74.8
77	米みそ	56.0	213.8(2)	100.5(8)
78	米みそ	55.0	96.3	71.6
79	米みそ	37.7	79.9	92.0
80	豆みそ	131.1(4)	182.7(5)	105.8(6)
市販味噌平均		58.6	90.6	61.4

H22 年度 全国味噌鑑評会 出品

34	米みそ (優秀見本)	82.4	75.7	22.7
35	米みそ (優秀見本)	21.2	22.2	55.2
36	米みそ (優秀見本)	41.3	39.5	64.5
37	米みそ (優秀見本)	40.0	30.5	39.0
38	米みそ (優秀見本)	30.3	39.1	24.7
39	豆みそ (優秀見本)	48.7	93.1	21.8
40	麦みそ (優秀見本)	85.7	83.1	40.3
全国味噌鑑評会 サンプル平均		49.9	54.7	38.3

味噌) 16 点の平均は 61.5 であった。また、全国の市販味噌(米味噌 60 点, 調合味噌 6 点, 麦味噌 5 点, 豆味噌 2 点) 73 点の平均は 58.6 であった。その結果、味噌には普遍的にレニン阻害物質の存在することが明らかとなった。味噌の種類ごとの TIU を比較してみると、米味噌 59.2, 調合味噌 38.9, 豆味噌 96.7, 麦味噌 59.4 であり、豆味噌のレニン阻害活性が強い傾向が見て取れる。

味噌の品質には、用いる種麹、酵母や乳酸菌が大きく影響していることが知られている。そこで、各種微生物が味噌中のレニン阻害物質に与える影響を調べるために、麹菌 2 種類 ((株) 秋田今野商店製山吹 3 号及び AOK139) を用い、酵母 (秋田県総合食品研究センター保存株 AM-2) 及び乳酸菌 (秋田県総合食品研究センター保存株 AL-1) の添加有無をそれぞれ変えた 8 試験区の醸造試験を行った。本醸造試験において酵母添加味噌における初発菌数は 10^5 オーダーで、熟成途中に 10^6 オーダーに増加し、熟成終了時には 10^4 オーダーであった。また、乳酸菌添加味噌の初発菌数は 10^6 オーダーであり、熟成 1 ヶ月までその菌数は維持され、熟成終了時には 10^3 まで減少した。熟成終了後、酵母添加味噌には発酵香が感じられ、乳酸菌添加味噌にはボディ感があり、それぞれタイプの異なる味噌に仕上がった。これら醸造微生物の異なる味噌 8 点の熟成過程におけるレニン阻害活性を第 5 図に示した。いずれの試験醸造味噌においても仕込み初期にレニン阻害活性が高く、熟成が進むにつれてレニン阻害活性が減少傾向にあることが認められた。味噌の熟成期間を通じて、試験区間に大きな違いは無く、麹菌、酵母や乳酸菌の添加有無はレニン阻害活性に大きな影響を与えていないことが示された。

後述する通り大豆胚軸はソヤサポニン I を多く含んでいることが明らかとなっている。そこで、大豆胚軸

H22 年度 秋田県味噌醤油品評会出品

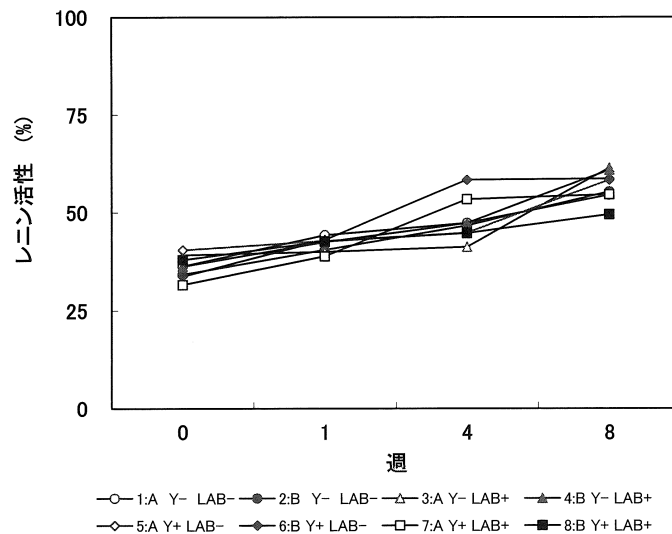
A4	米みそ	29.4	44.2	36.6
A6	米みそ	105.4(8)	138.6(9)	85.4
A8	米みそ	131.5(3)	129.1	90.1
A10	米みそ	56.0	146.4(8)	114.6(4)
A12	米みそ	53.1	37.6	39.5
A14	米みそ	28.0	48.9	49.9
A18	米みそ	29.0	72.1	36.3
A20	米みそ	48.2	50.3	35.3
A21	米みそ	128.8(5)	137.3(10)	98.2
A22	米みそ	44.5	58.0	29.4
A23	米みそ	75.8	93.8	71.0
A24	米みそ	31.4	47.3	30.2
A25	米みそ	69.5	73.2	51.3
A26	米みそ	34.5	62.0	49.1
A27	米みそ	53.8	69.4	48.0
A28	米みそ	65.4	46.0	52.5
秋田県品評会 サンプル平均		61.5	78.4	57.3

*TIU (Total inhibition unit) は全阻害活性を示す。括弧内の数字は、阻害活性上位 10 番の順位を示している。(1) は全阻害活性が最も強かったものを示す。高橋他, 文献 18 参照。

を配合した味噌の試験醸造を行った。予想通り大豆胚軸の配合が高い味噌ほど残存するレニン阻害活性が高いことが明らかとなった。大豆胚軸 100% の味噌は、通常の大豆を使用した場合の約 2 倍のレニン阻害活性を保持した (第 6 図)。以上の結果より大豆胚軸の配合は味噌のレニン阻害活性増強に有効であることが示された。

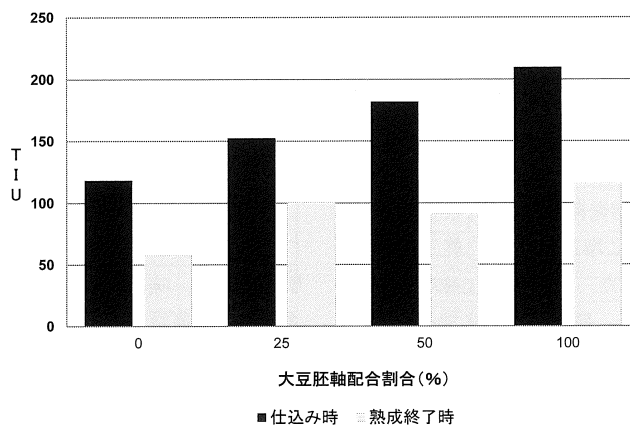
6. 味噌由来レニン阻害物質の同定¹⁸⁾

味噌に普遍的にレニン阻害物質が含まれることが判明したので、味噌由来レニン阻害物質の精製を進めた。まず味噌の原材料である大豆と麹抽出液及び試作味噌抽出液のレニン阻害活性を検討した。その結果、味噌のレニン阻害物質は大豆由来であること、味噌の熟成が進むにつれて、レニン阻害活性の低下する傾向のあることが明らかとなった。レニン阻害物質が大豆由来であることから、大豆での阻害物質の局在を調べたところ、レニン阻害物質は子葉に比べ胚軸に約 3 倍多く含まれることを見出した。そこで、挽き割り納豆製造時に廃棄物として扱われる胚軸よりレニン阻害物質の精製を試みた。750g の大豆胚軸より各種クロマトグラフィーを駆使して約 70mg の阻害物質を取得した。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 解析の結果、大豆由来レニン阻害物質はソヤサポゲノール B 骨格を持ち糖鎖としてラムノピラノース、ガラクトースやグルクロン酸な



第5図 醸造用微生物の違いによる試験醸造味噌中のレニン阻害活性¹⁸⁾

仕込み直後、1週目、4週目及び8週目にサンプリングし、抽出液を作成しレニン阻害活性を測定した。仕込み初期の味噌のレニン阻害活性が高く、熟成が進むにつれて阻害強度が減少する傾向が見られる。凡例は、麹菌 A：山吹3号，B：AOK139，酵母(Y)の有無：+，-，乳酸菌(LAB)の有無：+，-を示す。

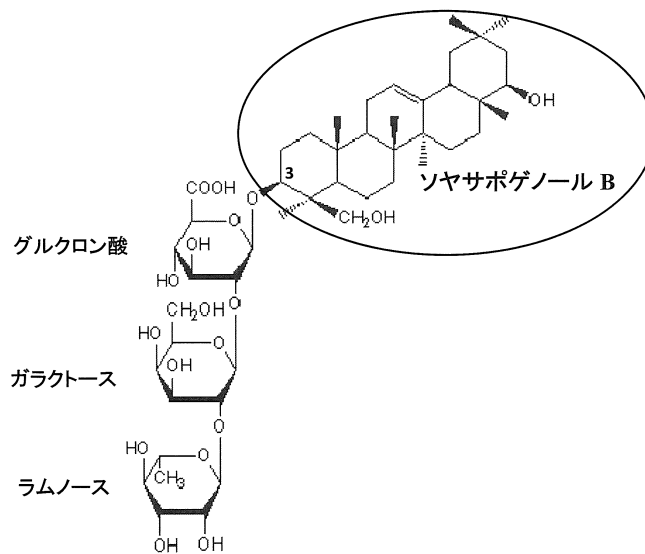


第6図 大豆胚軸配合試験醸造味噌のレニン阻害活性(TIU)の推移¹⁸⁾

胚軸の配合割合を0%、25%、50%及び100%とした味噌を試験醸造した。仕込み直後(仕込み時)及び60日間熟成(熟成終了時)した味噌の抽出液を作成し、レニン阻害活性を測定した。胚軸配合割合が高い味噌ほどレニン阻害活性の高いことが分かる。

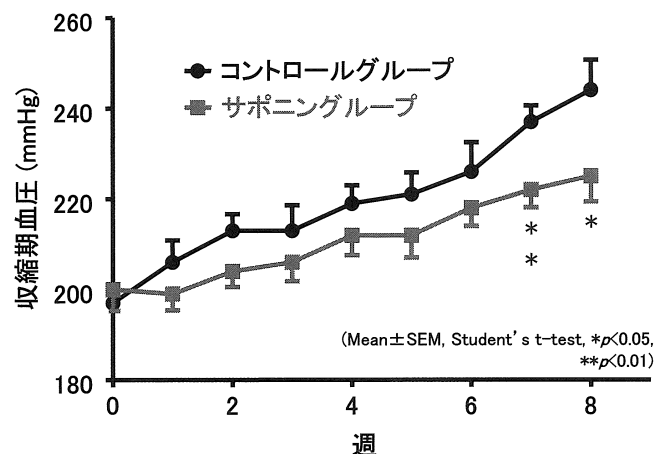
どを持つことが示された。最終的に標準物質との直接比較から、大豆由来レニン阻害物質をソヤサポニンIと同定した(第7図)。これまでに、ソヤサポニンIの生理機能性に関しては抗酸化性や抗変異原性などの報告はあったが、高血圧関連酵素に対する作用は報告されておらず、ソヤサポニンIに新たな機能性が付与

された。ソヤサポニンの有用性については動物実験においても示されており、高血圧モデルラットへの経口投与試験で、高血圧抑制効果が示されている(第8図)¹⁹⁾。したがって、ソヤサポニンが、血圧が高めの方用の特定保健用食品候補としても注目されている。



第7図 ソヤサポニン I の化学構造

ソヤサポニン I は、食物由来最初のレニン阻害物質として同定された¹⁵⁾。各種サポニン類を用いた解析から、サポゲノールの3位にグルクロン酸が結合したグルクロニドサポニンがレニン阻害サポニンであることが判明している。



第8図 高血圧モデルラットを用いたソヤサポニンの血圧上昇抑制効果の検証¹⁹⁾

試薬用大豆サポニン水懸濁液を 80 mg/kg 体重/日の割合で高血圧モデルラットに経口投与し、毎週血圧を測定した。コントロールとしてサポニンの代わりに蒸留水を投与した。サポニン投与1週目で血圧上昇抑制効果が観察された。7週目及び8週目に有意な血圧上昇抑制効果が認められた。

7. 味噌のレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性²⁰⁾

上述のように味噌に初めてレニン阻害物質が見出され、ソヤサポニン I が阻害化合物と同定されている。RAS にはレニン以外にキマーゼや ACE が重要酵素と

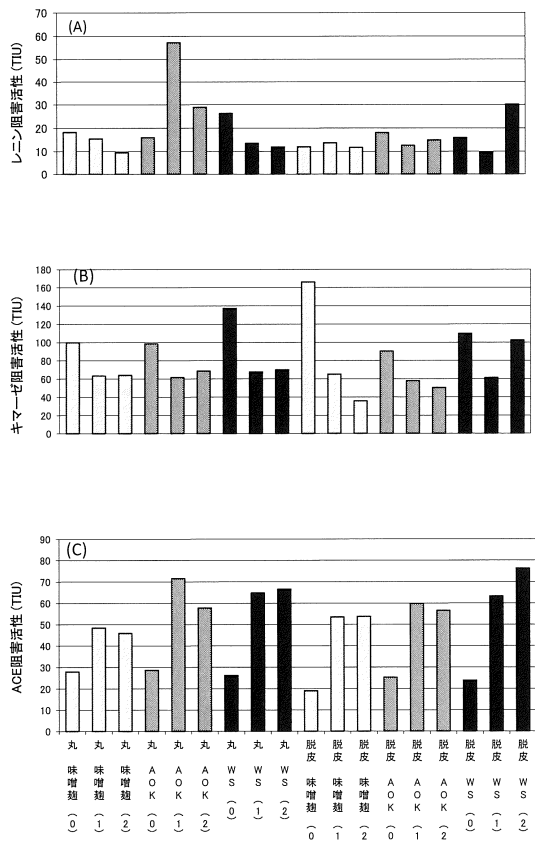
して上げられる。そこで前述の味噌抽出液を用いて C18 逆相カラム吸着画分についてレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を調べた。その結果、味噌の種類により阻害強度に相違はあるものの、調べた全ての味噌抽出液にレニン、キマーゼ及び ACE 阻害物質の含ま

れることが明らかとなった（第1表）。各酵素阻害に関与する因子としてレニンはソヤサポニンIが最も重要な化合物であることが示されている。3種類の酵素阻害を検討したことから、それぞれの酵素阻害の相関を検討した。その結果、味噌抽出液中のレニン阻害活性とキマーゼ阻害活性の間に高い相関（ $y = 0.8103x + 37.756$ ）が認められた。一方、レニン阻害活性とACE阻害活性（ $y = 0.1785x + 49.309$ ）やキマーゼ阻害活性とACE阻害活性（ $y = 0.499x + 55.459$ ）との間に相関は認められなかった。レニン阻害活性とキマーゼ阻害活性との間に相関が見られてことから、ソヤサポニンIによるキマーゼ阻害活性を検討した。その結果、ソヤサポニンIはレニンとほぼ同等にキマーゼ阻害活性を持つことが明らかとなっている（データ未提示）。一方、味噌抽出液C18逆相カラム吸着画分のACE阻害物質はペプチドであり、また、ゲルろ過の分析などから複数の阻害ペプチドの存在が示されている。

8. 大豆及び麴の違いによる味噌中のRAS系酵素阻害活性²⁰⁾

上述の通り、味噌には普遍的にレニン、キマーゼやACE阻害物質が含まれている。そこで、味噌中のそれら阻害活性が原料大豆や用いる麴菌により違いが生じるか否かを検討した。2種類の大豆（丸大豆と脱皮大豆）と3種類の麴菌（味噌用麴、AOK139及びWS61）の組み合わせで試験醸造した味噌の阻害活性を経時的に追跡した。ちなみに、麴菌AOK139株は、秋田今野商店製の味噌用麴菌でWS61株は、AOK139株を親株としてトランスポゾン技術を応用して秋田県総合食品研究センターで開発した味噌用白色麴菌である。

第9図に試験醸造味噌中のレニン、キマーゼ及びACE阻害活性を示した。レニン阻害活性に関しては丸大豆を用いた場合、味噌用麴とWS61株において醸造期間が長くなるにつれて阻害活性が減少する傾向があった。AOK139株では、一時的にレニン阻害活性が上昇した。AOK139株はリパーゼ活性が高く、生じた遊離の脂肪酸がレニン阻害を引き起こしている可能性が考えられる。一方、脱皮大豆を用いた場合には味噌用麴とAOK139株の間に大きな差は無かった。ただし、WS61株を用いるとレニン阻害活性は1ヶ月



第9図 大豆と麴の異なる試験醸造味噌のレニン阻害活性(A)、キマーゼ阻害活性(B)及びACE阻害活性(C)の変化²⁰⁾

横軸の丸は、丸大豆をまた、脱皮は脱皮大豆を用いた場合を示す。また、AOKは麴菌としてAOK139株をまた、WSは麴菌としてWS61株を用いた場合を示す。

目では減少傾向が見られ、2ヶ月目では逆に阻害活性の増加が観察された（第9図A）。

キマーゼ阻害活性については、丸大豆及び脱皮大豆を用い異なる麴菌を使用した場合、醸造期間が長くなるにしたがって阻害活性が減少する傾向が見られた。しかながら、レニン阻害活性の場合と同様にWS61株を用いた試験区では1ヶ月目に阻害活性が減少し、2ヶ月目に阻害活性の増加が観察された（第9図B）。阻害物質の同定には至っていないが、レニン阻害物質とキマーゼ阻害物質とは同一の挙動を示すことから、同一の化合物がレニン及びキマーゼの両酵素活性を阻

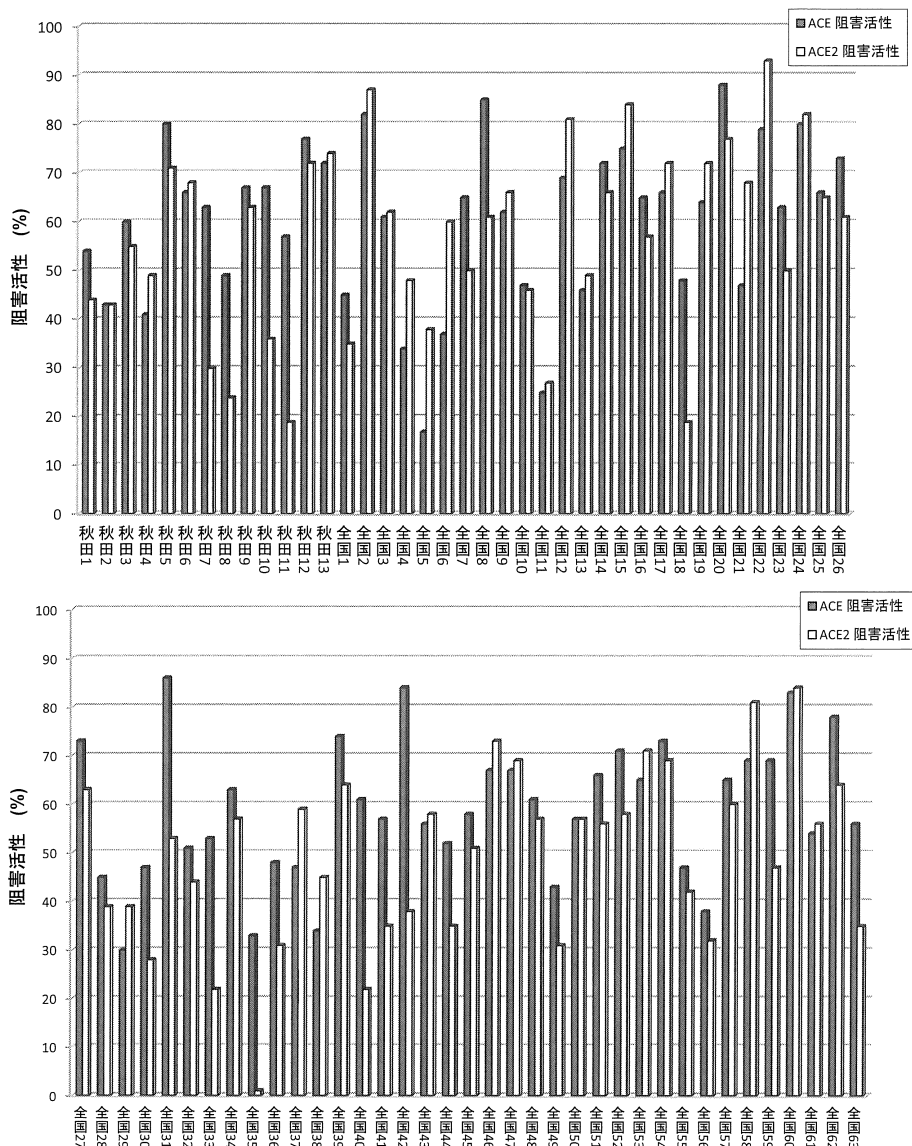
害している可能性がある。

ACE 阻害活性に関しては、丸大豆及び脱皮大豆いずれの大豆を用いた場合においても麹菌の種類に関わらず熟成が進むにしたがって阻害活性が強くなる傾向が見られた（第9図C）。味噌にはACE阻害ペプチドの存在が知られており、熟成により阻害ペプチドが

増加するものと推察される。

9. 味噌中の ACE2 阻害活性²¹⁾

次に市販味噌中の ACE2 阻害活性を検討した。中央味噌研究所より恵与頂いた市販味噌 50 点を含む全国市販味噌 63 点及び秋田産市販味噌 13 点、計 76 点



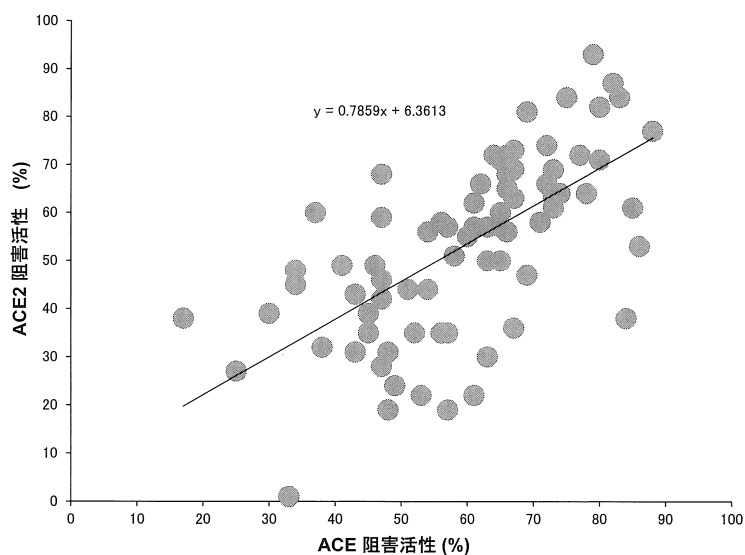
第10図 市販味噌抽出液の ACE2 及び ACE 阻害活性²¹⁾

秋田産市販味噌 13 点及び全国市販味噌 63 点の結果を示した。ACE2 阻害活性は全国味噌 No.22 が最も強く、ACE 阻害活性は全国味噌 No.20 が強かった。

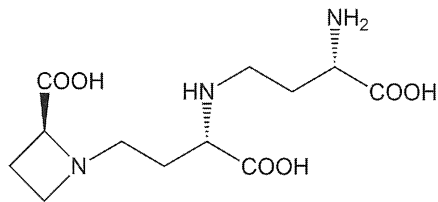
の味噌を入手し、熱水抽出液を調製した。それらについて組換え型ヒト ACE2 と新規開発の ACE2 測定用基質（第 4 図）を用いて ACE2 阻害活性を調べた。その結果、阻害強度に差はあるものの調べた全ての味噌に ACE2 阻害活性を確認した。したがって味噌には普遍的に ACE2 阻害物質の含まれることが明らかとなった（第 10 図）。ACE2 阻害活性と併行して ACE の阻害活性についても検討した。味噌抽出液の ODS 吸着画分に ACE 阻害活性の存在することは述べたが（第 9 図 C）、熱水抽出液そのものでも ACE 阻害活性を測定することが可能であり、味噌抽出液には ACE 阻害活性も普遍的に存在することが示された。また、味噌中の ACE2 阻害活性と ACE 阻害活性の割合がほぼ同一であることが示された。そこで、両酵素の阻害活性について相関性を調べた。第 11 図に示す様に、両酵素の阻害活性には比較的高い相関が見られた。このことは、味噌由来 ACE2 阻害物質と ACE 阻害物質とが同一の化合物である可能性を示している。そこで、両酵素活性阻害の強かった味噌抽出液をゲルろ過で分画し、ACE2 及び ACE の阻害活性を検討したところ、同一画分に両酵素の阻害活性が認められたことより、味噌中の ACE2 阻害物質と ACE 阻害物質は同一分子である可能性が強く示唆された。

10. ACE2 阻害物質の精製と構造解析^{17, 21)}

味噌中に ACE2 阻害物質が存在することから、味噌の原材料である大豆と麹菌の熱水抽出液を調製し、ACE2 阻害を検討した。その結果、大豆に ACE2 阻害活性が局在していることを見出した。そこで、大豆からの阻害物質精製に取り掛かった。大豆の熱水抽出液を調製し、各種クロマトグラフィーを駆使して阻害物質を単離した。その結果、100g の大豆より約 9.0 mg の精製標品を取得した。精製した ACE2 阻害物質の (M + H)⁺ は、ESI-MS で 304.1 と求められた。この値はニコチアナミンの理論値と一致した。また、¹H-NMR スペクトル、ODS カラムクロマトグラフィーや TSKgel amide-80 カラムクロマトグラフィーでの保持時間やカチオン交換カラムを用いたアミノ酸分析の結果は、標準物質（ニコチアナミン）と同一であった。したがって、大豆由来 ACE2 阻害物質をニコチアナミンと同定した（第 12 図）。ニコチアナミンは、植物由来の ACE 阻害物質として知られている^{22, 23)}。植物生理学的には、ムギネ酸合成系の中間化合物で高等植物に広く存在が認められている化合物である²⁴⁾。これまで、食物由来 ACE2 阻害物質の探索研究は行われておらず、今回初めて、食物由来 ACE2 阻害物質としてニコチアナミンを同定した。



第 11 図 市販味噌中の ACE2 阻害活性と ACE 阻害活性との相関関係²¹⁾



第 12 図 ニコチアナミンの化学構造^{17, 21)}

最近、ACE2 阻害剤が開発されている。それら阻害物質の中には SARS コロナウイルスと細胞との融合を阻止するものや腸炎予防効果を示す化合物なども知られている。ニコチアナミンは食物由来でありその安全性が担保されていることから、生体機能調節物質としての様々な応用が期待される。

11. まとめ

味噌には RAS 系酵素類の阻害物質が普遍的に存在することが明らかとなった。レニン阻害物質として同定されたソヤサポニン I や ACE2 阻害物質として同定されたニコチアナミンは大豆由来である。ニコチアナミンは ACE 阻害物質でもあるが、味噌の熟成中には多くの ACE 阻害ペプチドが生成する。ACE 阻害ペプチドは、麹菌や酵母が分泌するタンパク質分解酵素により生成されるものである。このように味噌中には多くの機能性物質が存在している。今後も古来より日本人に馴染みの深い味噌に新たな機能性が見出される可能性が高く、機能性を強化した味噌が日本人の健康維持により貢献出来る可能性を秘めている。

(秋田県総合食品研究センター、食品加工研究所)

謝 辞

味噌の機能性に関する研究は、平成 22 年度、平成 24 年度及び平成 26 年度一般社団法人 中央味噌研究所・研究助成により行われました。関係各位に深謝いたします。

引用文献

1) Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R. E., and Acton S.: *Circ. Res.*, **87**, e1-e9

(2000).

2) Tipnis S. R., Hooper N. M., Hyde R., Karran E., Christie G., and Tuner A. J.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 33238-33243 (2000).

3) Yagil Y. and Yagil C.: *Hypertension*, **41**, 871-873 (2003).

4) Li W., Moore M. J., Vasilieva N., Sui J., Wong S. K., Berne M. A., Somasundaran M., Sullivan J. L., Luzuriaga K., Greenough T. C., Choe H., and Farzan M.: *Nature*, **426**, 450-454 (2003).

5) Wong S. K., Li W., Moore M. J., Choe H., and Farzan M.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 3197-3201 (2004).

6) Li F., Li W., Frazan M., and Harrison S. C.: *Science*, **309**, 1864-1868 (2005).

7) Kuba K., Imai Y., Rao S., Gao H., Guo F., Guan B., Huan Y., Yang P., Zhang Y., Deng W., Bao L., Zhang B., Liu G., Wang Z., Chappell M., Liu Y., Zheng D., Leibbrandt A., Wada T., Slutsky A. S., Liu D., Qin C., Jiang C., and Penninger J. M.: *Nature Med.*, **11**, 875-879 (2005).

8) Hashimoto T., Perlot T., Rehman A., Trichereau J., Ishiguro H., Paolino M., Sigl V., Hanada T., Hanada R., Lipinski S., Wild B., Camargo S. M. R., Singer D., Richter A., Kuba K., Fukamizu A., Schreiber S., Clevers H., Verrey F., Rosenstiel P., and Penninger J. M.: *Nature*, **487**, 477-481 (2012).

9) Byrnes J. J., Gross S., Ellard C., Connolly K., Donahue S., and Picarella D.: *Inflamm. Res.*, **58**, 819-827 (2009).

10) Soubrier F., Alhenc-Galas F., Hubert C., Allengrini J., John M., Tregear G., and Corvol P.: *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, **85**, 9386-9390 (1988).

11) Ehlers M. R. W., Fox E. A., Strydom D. J., and Riordan J. F.: *Proc. Natl. Acad. U. S. A.*, **86**, 7741-7745 (1989).

12) Wei L., Alhenc-Galas F., Corvol P., and Clauser E.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 9002-9008 (1991).

13) Takahashi S., Hata K., Kikuchi K-I., and Gotoh T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).

14) Gotoh T., Awa H., Kikuchi K-I., Nirasawa S., and Takahashi S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 370-374 (2010).

- 15) Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., and Yamada S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 3232-3237 (2008).
 - 16) Takahashi S., Ono H., Gotoh T., Yoshizawa-Kumagai K., and Sugiyama T.: *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).
 - 17) Takahashi S., Yoshiya T., Yoshizawa-Kumagai K., and Sugiyama T.: *Biomed. Res.*, **36**, in press (2015).
 - 18) 高橋砂織, 佐々木康子, 渡辺隆幸: 中央味噌研究所報告, **33**, 165-177 (2012).
 - 19) Hiwatashi K., Shirakawa H., Hori K., Yoshiki Y., Suzuki N., Hokari M., Komai M., and Takahashi S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2310-2312 (2010).
 - 20) 高橋砂織, 佐々木康子, 小笠原博信, 渡辺隆幸: 中央味噌研究所報告, **35**, 129-140 (2014).
 - 21) 高橋砂織, 小笠原博信, 渡辺隆幸: 中央味噌研究所報告, **37**, 印刷中 (2016).
 - 22) Hayashi A. and Kimoto K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **53**, 331-336 (2007).
 - 23) Kuroda K., Ishihara K., and Masuoka N.: *J. Food Res.*, **2**, 49-54 (2013).
 - 24) Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., and Nishizawa N K.: *Plant Cell*, **15**, 1263-1280 (2003).
-

4. 特許の概要（3件）

- 1) 発明の名称：肝細胞分化ステージを評価する新規測定方法
- 2) 発明の名称：植物バイオマスから重金属を除去する方法
- 3) 発明の名称：新規酵素、該酵素の製造方法、ならびにその利用

1) 発明の名称：肝細胞分化ステージを評価する新規測定法

発明者：畠恵司

高橋純一郎、戸嶋彦、三浦瑞穂（(株)スカイライト・バイオテック）

公開番号：特開 2014-204713

公開日：平成 26 年 10 月 30 日

【要約】

【課題】胚性幹細胞などから成熟肝細胞を作成する際の分化ステージ評価において、簡便・迅速且つ細胞を殺すことなく評価する方法を提供する。

【解決手段】細胞を培養した上清に分泌される、コレステロール、中性脂肪、リン脂質のうち少なくとも 1 種類を含む脂質を分析する工程を含む、細胞の肝臓分化度の評価方法。肝細胞から分泌されるリポタンパク質の構成成分を定量することで肝細胞の分化ステージの評価が可能となった。

2) 発明の名称：植物バイオマスから重金属を除去する方法

発明者：進藤昌

頼泰樹、横山咲、服部浩之（秋田県立大学）

公開番号：特開 2014-231058

公開日：平成 26 年 12 月 11 日

【要約】

【課題】ファイトレメディエーション技術による土壌浄化後に収穫されるカドミウム高含有バイオマスの有効な利用技術を提供する。

【解決手段】重金属、特にカドミウムを高度に含む植物バイオマス（稲わら、葉菜、根菜類）に硫酸あるいは塩酸を添加することにより、植物バイオマス中のカドミウムを溶液中に溶解させた後に、ジチオカルバミン酸化合物およびまたは液体キレート樹脂を添加して、酸溶液中のカドミウムを固定、沈殿させ、植物バイオマス中のカドミウムを除去することにより、カドミウムフリーの有用なバイオマス資源を生産する。

3) 発明の名称：新規酵素、該酵素の製造方法、ならびにその利用

発明者：金子隆宏（秋田県総合食品研究センター）

特許番号：特許第 5799375 号

登録日：平成 27 年 9 月 4 日

【要約】

〔課題〕生澱粉粒に作用し、粉体としての形状は残しつつ、その物性のみを改変し得る酵素、および当該酵素の有効な製造方法を提供すること。

〔解決手段〕澱粉が α 化されることのない温度帯で生澱粉粒にきわめてよく作用し、かつ熱失活せしめ得る生澱粉分解酵素、および当該酵素生産菌株からの遺伝子のクローニングによる、酵素の効率的な製造技術を完成した。本発明により多数の空洞を有する澱粉粒が生産され、澱粉の物性を改変するのみならず、その空洞内に香味成分、薬効成分などを包接しうる可食性包接担体の製造が可能となった。

5. 学会発表要旨 (24 件)

1) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2014 年 5 月 10 日、アキタパークホテル (秋田市)

演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ paenidase (パエニダーゼ) ホモロ
ーグの構造と活性

発表者：○葦澤悟¹、高橋砂織² (¹国際農研セ、²秋田県総食研セ)

2) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2014 年 5 月 10 日、アキタパークホテル (秋田市)

演題名：昆虫細胞発現系の培養によるヒトアンギオテンシン変換酵素 2 の生産

発表者：○宮脇 舞¹、高栖智明²、横田早希¹、葦澤 悟³、高橋砂織⁴、後藤 猛¹
¹秋田大院工資、²秋田大工資、³国際農研、⁴秋田県総食研

3) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2015 年 5 月 10 日、秋田パークホテル (秋田市)

演 題：リポタンパク質プロファイル評価による新規脂質異常症改善薬評価系の構築

発表者：○畠恵司¹、岩間由香²、木村文子²、中川志穂²、三浦瑞穂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)

4) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2014 年 5 月 10 日、秋田パークホテル (秋田市)

演題名：内在性トランスポゾンによる麹菌変異株の麹酵素活性と味噌醸造適性

発表者：○小笠原博信 (秋田県総食研セ)、渡辺隆幸 (秋田県総食研セ)、
佐藤勉 ((株) 秋田今野商店)、今野宏 ((株) 秋田今野商店)、
高橋砂織 (秋田県総食研セ)、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

5) 発表学会：日本食品科学工学会第 61 回大会

発表日と場所：2014 年 8 月 30 日、中村学園大学 (福岡市)

演題名：米のグルタミン酸脱炭酸酵素活性に関する研究

発表者：○大能俊久、高橋砂織

6) 発表学会：日本生物高分子学会 2014 年度大会

発表日と場所：2014 年 9 月 12 日、信州大学 (長野県上田市)

演題名：味噌中のレニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性について

発表者：○高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸 (秋田県総合食品研究センター)

7) 発表学会：平成 26 年度日本農芸化学会北海道支部・東北支部合同支部大会

発表日と場所：2014 年 9 月 23 日、北海道大学 (札幌市)

演題名：食物由来レニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性

発表者：○高橋砂織 (秋田県総食研)、葦澤悟 (国際農林水産業研究センター)

8) 発表学会：第 48 回 日本栄養・食糧学会 東北支部大会

発表日と場所：2014 年 11 月 1 日、東北大学農学部 (仙台市青葉区)

演題：米糠発酵素材の抗メタボリックシンドローム作用の検討

発表者：○樋渡一之¹、佐々木玲¹、高嶋亜希子²、大友理宣²、岩間由香³、戸嶋彦³、
熊谷昌則¹、畠恵司¹

(¹秋田県総食研、²秋田銘醸、³スカイライト・バイオテック)

9) 発表学会：日本官能評価学会 2014 年度大会

発表日と場所：2014 年 11 月 8 日、東京家政大学（東京都）

演題名：簡便で嗜好性の高いハンバーグ調理法の検討

発表者：○大野智子¹、小松千鶴¹、佐々木玲²

¹ 聖霊女子短大、² 秋田県総食研

10) 発表学会：第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス

発表日と場所：2014 年 11 月 15 日、東北大学川内北キャンパス（仙台市）

演題名：麴菌 *Aspergillus oryzae* のザゼンソウ発熱関連遺伝子と相同性を示す遺伝子の発現比較

発表者：○小笠原博信（秋田県総食研セ）、渡辺隆幸（秋田県総食研セ）、

伊藤菊一（岩手大農・寒冷バイオ）、五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

11) 発表学会：秋田応用生命科学研究会 第 24 回講演会

発表日と場所：2014 年 12 月 5 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：食用地衣類のレニン及びキマーゼ阻害活性

発表者：○葦澤悟（国際農研）、程永強（中国農大）、山本好和（秋田県大）、

高橋砂織（秋田県総食研）

12) 発表学会：秋田応用生命科学研究会 第 24 回講演会

発表日と場所：2014 年 12 月 5 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：バキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞発現系によるヒト型 ACE2 の発現パターン解析及び精製酵素の特性

発表者：○宮脇舞¹、横田早希¹、後藤猛¹、葦澤悟²、高橋砂織³

(¹秋田大院工資、²国際農研、³秋田県総食研)

13) 学会発表：第 10 回バイオマス科学会議 日本エネルギー学会

発表日と場所：2015 年 1 月 14 日、(独) 産業技術総合研究所（つくば市）

演題名：杉微粉碎物からの高温同時糖化発酵によるバイオエタノールの生成

発表者：○西田孝伸¹、進藤昌²、榊郁子¹、高橋武彦¹、森英明¹

(¹秋田県立大学、²秋田県総合食品研究センター)

14) 学会発表：第 10 回バイオマス科学会議 日本エネルギー学会

発表日と場所：2015 年 1 月 14 日、(独) 産業技術総合研究所（つくば市）

演題名：セルロース系バイオマスの酵素糖化時における酵素使用量の低減と回収率向上を目指したブロッキング剤による酵素のリグニン吸着防止技術の開発

発表者：○進藤昌¹、中島光康²、山田 智²

(¹秋田県総合食品研究センター、²日油株)

15) 発表学会：第 14 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会

発表日と場所：2015 年 2 月 4 日、産総研（つくば市）

演題名：てんこ小豆（黒ささげ）の機能性について

発表者：○高橋砂織、佐藤 愛、熊谷昌則、畠 恵司、渡辺隆幸

16) 学会発表：第3回みそ技術研究発表会

発表日と場所：2015年2月27日、全中全味ビル(東京)

演題名：99%精米を用いた麴および味噌の特長について

発表者：○渡辺隆幸、佐々木康子、小笠原博信(秋田県総食研)

17) 発表学会：日本農芸化学会 2015年度大会

発表日と場所：2015年3月27日、岡山大学(岡山市)

演題名：アンギオテンシン変換酵素2基質の開発と応用

発表者：○高橋砂織¹、畠 恵司¹、熊谷久美子²(¹秋田県総食研、²(株)ペプチド研)

18) 発表学会：日本農芸化学会 2015年度大会

発表日と場所：2015年3月27日、岡山大学(岡山市)

演題名：肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生との関係

発表者：○佐々木玲^{1,3}、三浦瑞穂²、木村文子²、高橋純一郎²、小林正之³、畠恵司¹

¹秋田県総食研、²(株)スカイライト・バイオテック、³秋田県立大院生資

19) 発表学会：日本農芸化学会 2015年度大会

発表日と場所：2015年3月28日、岡山大学(岡山市)

演題名：Processed soymilk significantly reduced blood pressure in spontaneously hypertensive rats compared to regular soymilk

発表者：○Alauddin Md¹、Hitoshi Shirakawa¹、Kazuyuki Hiwatashi²、Atsushi Shimakage³、Saori Takahashi²、Mamoru Shinbo³、Michio Komai¹(¹Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agriculture, Tohoku University, ²Akita Research Institute of Food and Brewing, ³Yamada Foods Co., Ltd.)

20) 発表学会：日本畜産学会 第119回大会

発表日と場所：2015年3月28日、宇都宮大学(宇都宮市)

演題名：EGAM1N および EGAM1C によりマウス ES 細胞の細胞運命を転換する

発表者：○佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、菊池貴裕¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ)

21) 発表学会：日本畜産学会 第119回大会

発表日と場所：2015年3月28日、宇都宮大学(宇都宮市)

演題名：ウシ iPS 細胞樹立への応用を目指したマウス iPS 細胞樹立システムの構築

発表者：○菊池貴裕¹、佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、福田智一³、

小林正之¹(¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ・³東北大院農)

22) 発表学会：日本畜産学会 第119回大会

発表日と場所：2015年3月29日、宇都宮大学(宇都宮市)

演題名：EGAM1N ホメオタンパク質はマウスの発生過程において重要な転写因子と会合する

発表者：○野中愛純¹、佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、菊池貴裕¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ)

23) 発表学会：日本畜産学会 第 119 回大会

発表日と場所：2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：アンチセンス Oct4 MO を用いることによる遺伝子ノックダウン効果の検証

発表者：○佐藤由貴¹、佐藤梓織¹、菊池貴裕¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

（¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ）

24) 発表学会：日本畜産学会 第 119 回大会

発表日と場所：2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：移植胚の受胎率向上を目指した遺伝子組み換えウシ線維芽細胞増殖因子 4(FGF4)の開発

発表者：○熊谷友希¹、菅原彩子¹、伊藤俊彦¹、佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、菊池貴裕¹、野中愛純¹、

佐々木玲^{1,2}、小林正之¹（¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ）

1) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2014 年 5 月 10 日、アキタパークホテル（秋田市）

演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ *paenidase*（パエニダーゼ）ホモロジーの構造と活性

発表者：○菫澤悟¹、高橋砂織²（¹国際農研セ、²秋田県総食研セ）

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の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが見出されている。高橋らは 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*（パエニダーゼ）と命名し、その性質を明らかにした (*J. Biochem.* **139**, 197-202, 2006)。今回我々は、*paenidase* のアミノ酸配列と相同性をもつ各種ホモロジーをクローニングし、大腸菌における発現を行うとともに、これらの酵素活性を調べた。BLAST データベース解析により、*paenidase* のアミノ酸配列の相同性を解析したところ、種々の β -lactamase、penicillin-binding protein、D-Ala-D-Ala carboxypeptidase と 35~50% の相同性があることが明らかになった。これらのうち、全長カバー率及びアミノ酸残基一致率の高い 3 種類のホモロジー (D14、DF、JDR) を選択し、遺伝子合成を行った。つぎに、大腸菌においてこれらのホモロジーを発現させたところ、全てにおいて可溶性組換え酵素を得ることに成功した。つづいて、得られた組換え酵素について、suc-[D-Asp]-MCA 分解活性を検討した結果、D14 は活性を示したが、DF 及び JDR は活性を示さなかった。さらに、*paenidase*、D14、DF、JDR のホモロジーモデリングを行い、活性部位近傍に位置するアミノ残基について解析した。その結果、*paenidase* 及び D14 (D-Asp 基質分解活性あり) においてアミノ酸残基が一致し、なおかつ DF 及び JDR (D-Asp 基質分解活性なし) においてアミノ酸残基が異なるものは、6 カ所存在することが明らかとなった。また、DF 及び JDR には *paenidase* 及び D14 に無い構造が 1 カ所存在することが明らかとなった。以上の結果は、*paenidase* の基質認識機構を考察するうえで、有力な手掛かりになると考えられる。

2) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2014 年 5 月 10 日、アキタパークホテル（秋田市）

演題名：昆虫細胞発現系の培養によるヒトアンギオテンシン変換酵素 2 の生産

発表者：○宮脇 舞¹，高栖智明²，横田早希¹，菫澤 悟³，高橋砂織⁴，後藤 猛¹

¹秋田大院工資，²秋田大工資，³国際農研，⁴秋田県総食研

1. 緒言

哺乳動物における重要な血圧調節系にレニン - アンギオテンシン系 (RAS)がある。この系では、アンギオテンシン変換酵素 (ACE)により不活性型のアンギオテンシン I (AngI)が活性型のアンギオテンシン II (Ang II)に変換され、血圧上昇を引き起こす。近年、Ang II を基質にすることで RAS を負に調節して心血管等の機能を制御するアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2)が見いだされた。本研究では、ACE2 の詳細な機能解析を目指し、昆虫細胞発現系によるヒト ACE2 の生産を目的とした。

2. 実験方法

2.1 ACE2 の生産と精製

His タグを付加した ACE2 の cDNA を導入した組換えバキュロウイルス (vACE2)を Bac-to-Bac システムにより作成し、これを Sf9 昆虫細胞に MOI 0.1 pfu/cells で接種して、28°C、100 rpm の条件で旋回振とう培養を行った。感染培養後に回収した細胞に 0.5% TritonX-100 含有 PBS を加え、遠心分離して得られた上清を Ni-アフィニティークラムに通し、吸着した ACE2 を 500 mM イミダゾールで溶出させた。

2.2 ACE2 の分析

ACE2 (93.8 kDa)の発現と精製度は、anti-His タグ抗体による Western blotting および SDS-PAGE によって分析した。ACE2 の活性測定は、蛍光消光基質 Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH を用いて測定した。

3. 結果と考察

感染培養による ACE2 発現の経時的挙動を Western blotting により調べたところ (Fig.1)，3 日目以降の細胞画分に目的の分子量 93.8 kDa 付近にバンドが確認され、培地画分には確認されなかった。これより、細胞画分に His タグが付加した ACE2 が発現していることが分かった。一方、ACE2 の経時的な生成量を ACE2 活性により調べた結果 (Fig.2)，ACE2 活性は感染 2 日目から細胞内で増加し始めて 3 日目以降にほぼ一定となるが、培地中にも 3 日目以降に増加が認められた。これより、His タグを含む部位が加水分解された ACE2 が感染 3 日目から細胞外に漏出することが示唆された。細胞画分の ACE2 を Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した結果を Fig.3 に示す。精製前の雑タンパク質はほとんどが取り除かれ、非常に濃い ACE2 のバンドが確認された。

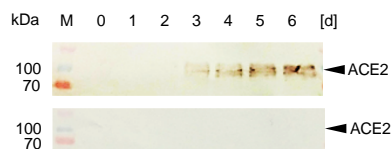


Fig.1 細胞画分発現分析結果
細胞画分(上)，培地画分(下)

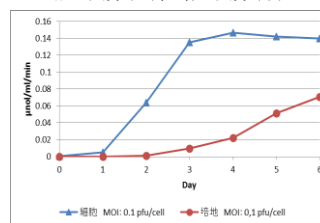


Fig.2 培地 1ml/min の ACE2 活性結果

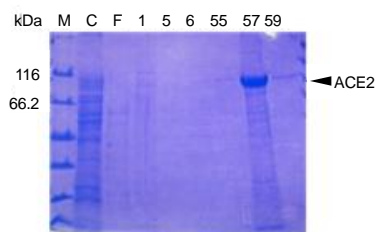


Fig.3 SDS-PAGE, M:分子量マーカー, C:精製前,
F:未吸着成分, 数字:フラクション No.

3) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2015 年 5 月 10 日、秋田パークホテル（秋田市）

演題：リポタンパク質プロファイル評価による新規脂質異常症改善薬評価系の構築

発表者：○畠恵司¹、岩間由香²、木村文子²、中川志穂²、三浦瑞穂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）

リポタンパク質は、アポリポタンパク質、リン脂質、中性脂肪およびコレステロールからなる球状粒子であり、粒子サイズや比重に従い、キロミクロン (chylomicron、CM)、VLDL、LDL、HDL の主要クラスに大別される。(株)スカイライト・バイオテックでは、これら 4 種主要リポタンパク質および 13 種サブクラスをゲル濾過 HPLC で分画後、リポタンパク質中の脂質をインライン酵素反応で定量することで、創薬ならびに診断支援サービスを行っている（サービス名、LipoSEARCH®）。我々は LipoSEARCH®を活用することにより、ヒト由来の肝細胞あるいは小腸上皮細胞が産生するリポタンパク質中の脂質を定量することで、脂質異常症改善薬剤探索系を構築した。ヒト肝癌細胞 HepG2 は VLDL、LDL、HDL の 3 種リポタンパク質を産生する。我々の評価系において、抗コレステロール薬のスタチンは、これらリポタンパク質中のコレステロールを主に抑制し、フィブラート系薬剤は両者の分泌を抑制するなど、各々の薬剤の特長を捉えた結果が得られた。一方、ヒト大腸癌細胞である Caco2 は、酪酸ナトリウム処理により、小腸上皮細胞に分化することが知られている。この小腸上皮細胞に分化した Caco2 細胞でもリポタンパク質の産生が認められ、既知のリポタンパク質合成阻害である Pluronic L-81 処理により、リポタンパク質の分泌の抑制が観察された。

4) 発表学会：日本生化学会東北支部第 80 例会

発表日と場所：2014 年 5 月 10 日、秋田パークホテル（秋田市）

演題名：内在性トランスポゾンによる麹菌変異株の麹酵素活性と味噌醸造適性

発表者：○小笠原博信（秋田県総食研セ）、渡辺隆幸（秋田県総食研セ）、

佐藤勉（(株)秋田今野商店）、今野宏（(株)秋田今野商店）、

高橋砂織（秋田県総食研セ）、五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

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

【方法】WS61 株の白色分生子形成など形質の安定性については、モデル種麹培養とプレーティング培養を繰り返し行い、肉眼による復帰株の検出と wA 遺伝子領域の PCR により確認

を行った。製麴特性については、親株と WS61 株を麴蓋法により製麴し、酵素力価の測定（キッコーマン製キット）、糖化試験および糖分析（DIONEX）により比較を行った。味噌醸造試験は麴歩合 10 歩（原料大豆：原料米＝1：1）、食塩 12%、仕込重量 8kg で実施した。

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

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

5) 発表学会：日本食品科学工学会第 61 回大会

発表日と場所：2014 年 8 月 30 日、中村学園大学（福岡市）

演題名：米のグルタミン酸脱炭酸酵素活性に関する研究

発表者：○大能俊久、高橋砂織

【目的】演者らがこれまで報告を行ってきた加熱処理を行うことで米中の γ -アミノ酪酸（GABA）を増加させる処理^{1)~4)}や発芽玄米では、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）が働いて GABA が生成すると考えられる。しかし、米に含まれる GAD 活性についての報告は少ない。そこで、玄米に含まれる GAD 活性を測定し、保存による変化について調べた。また、玄米の部位別の GAD 活性についても調べた。

【方法】玄米は秋田県産あきたこまちを使用した。GAD 活性の測定は土谷らの方法⁵⁾を参考にして以下のようにして行った。100mM リン酸バッファー（pH5.5）に、最終濃度がそれぞれ 50mM、50 μ M になるようにグルタミン酸ナトリウムとピリドキサーール-5'-リン酸を加えて全体量を 5ml にした溶液を試験管にとり、37 $^{\circ}$ C で予備加熱をする。その後米粉を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。次に沸騰湯浴中に試験管を 5 分間静置して酵素を失活させる。8%になるようにトリクロ酢酸を加えて 15 分間振とうする。その後遠心分離を行い、上清に等量の 0.4N 水酸化リチウムを加える。この溶液を 0.45 μ m のフィルターでろ過し、ろ液中の GABA 量を日本電子製全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V で測定した。米粉を加えた直後に沸騰湯浴中で酵素失活させた値を差し引いて GAD 活性を算出した。1 分間に 1 μ mol の GABA を生成する GAD 活性を 1U とし、米粉 1g 当たりの GAD 活性として示した。

【結果】玄米の GAD 活性は 0.76U/g であり、15 $^{\circ}$ C に 1 年保存することで GAD 活性は約 20% に減少した。胚の GAD 活性は 5.8U/g であり、玄米の最外層の糠は 4.5U/g で、内層に進むに従って GAD 活性は減少していた。

¹⁾特許番号 5417584

²⁾日本食品科学工学会第 58 回大会講演集, p.62

³⁾日本食品科学工学会第 59 回大会講演集, p.86

⁴⁾日本食品科学工学会第 60 回記念大会講演集, p.68

⁵⁾土谷他, 醸協, 97, 382-386(2002)

6) 発表学会：日本生物高分子学会 2014 年度大会

発表日と場所：2014 年 9 月 12 日、信州大学（長野県上田市）

演題名：味噌中のレニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性について

発表者：○高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸（秋田県総合食品研究センター）

【目的】味噌は古来より好まれてきた日本食には欠かせない基本調味料の一つである。味噌の機能性としては、ラジカル消去活性や抗変異原性などが知られている。最近、味噌原料の一つである大豆にレニン阻害物質の存在が見出され、その物質がソヤサポニン I と同定されている [1]。今回、レニン・アンギオテンシン系制御の重要な役割を持つ酵素類としてレニン、アンギオテンシン I 変換酵素(ACE)及びキマーゼに注目して、味噌由来阻害活性について検討した。

【方法】組換え型ヒトキマーゼは R&D Systems 社製をまた組換え型ヒト ACE は Sigma-Aldrich 社製を用いた。組換え型ヒトレニンは既報により調製した[1]。キマーゼ及びレニンの活性測定には、蛍光消光基質 (Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-Thr-His-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂)を用いた[1, 2]。ACE の活性測定には、Nma-Phe-His- Lys(Dnp)を用いた[3]。

【結果・考察】全国市販味噌及び秋田県産味噌計数十種類の抽出液中の各種酵素阻害活性を検討した。その結果、味噌には普遍的にレニン・アンギオテンシン系関連酵素阻害活性の存在することが明らかとなった。大豆や醸造微生物の違いによる酵素阻害活性についても併せて報告する。

【参考文献】

1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008).

2. *Report of Central Miso Research Institute* (in Japanese), **35**, 129-140 (2014).

3. *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).

【謝辞】本研究は、一般社団法人中央味噌研究所助成金により行われた。

7) 発表学会：平成 26 年度日本農芸化学会北海道支部・東北支部合同支部大会

発表日と場所：2014 年 9 月 23 日、北海道大学（札幌市）

演題名：食物由来レニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性

発表者：○高橋砂織（秋田県総食研）、菫澤悟（国際農林水産業研究センター）

【目的】血圧は神経系やホルモンなど様々な機構でコントロールされている。その中でもレニン・アンギオテンシン系 (RAS) は哺乳類で最も良く研究が進んでいる血圧制御系である。

RAS を構成する酵素の中ではアンギオテンシン変換酵素 (ACE) に関する研究の歴史が最も長く、1970 年代に ACE 阻害を目指した治療薬として初めてカプトプリルが開発された[1]。また、食物由来 ACE 阻害物質の探索も盛んに行われてきた。今回、RAS を構成するレニン、ACE やキマーゼに注目して各種食材よりこれら酵素の阻害物質の探索を行った。

【方法】組換え型ヒトレニンは既報により発現し、精製した酵素を用いた[2]。組換え型ヒト ACE 及びキマーゼは市販酵素を用いた。レニン及びキマーゼ活性測定用の蛍光消光基質として Nma-Ile-His-Pro-Phe*His-Leu-Val**Ile-His-Thr-Val-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ (*, キマーゼによる切断部位; **, レニンにより切断部位)を用いた。ACE 活性測定用基質としては Nma-Phe*His- Lys(Dnp) (*, ACE による切断部位)を用いた[3]。

【結果】各種食材抽出液を用いて RAS 系酵素の阻害活性を測定した。その結果、最初に味噌にレニン阻害活性を見出した。味噌の原材料を検討した結果、レニン阻害物質は大豆由来であり阻害物質をソヤサポニン I と同定した。また、米や山菜のウドにもレニン阻害物質の存在することを見出した。米由来のレニン阻害物質は、遊離不飽和脂肪酸のオレイン酸及びリノール酸と同定された。ウド由来のレニン阻害物質は、カウレン酸及びピマラジエン酸と同定された。また、各種市販味噌の酵素阻害活性を検討し、味噌にはレニン、ACE やキマーゼ阻害物質が普遍的に存在することを示した。また、中国や東南アジア由来各種食材の抽出液を調製し阻害活性を検討した結果、豆鼓や豆醬などにレニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性が見出された。今後、これら阻害物質の構造機能相関を解析する予定である。

【参考論文】

1. Williams G., H., & Hollenberg N. K., *N. Engl. J. Med.*, **297**, 184-188 (1977).
2. Takahashi S., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008).
3. Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).

8) 発表学会：第 48 回 日本栄養・食糧学会 東北支部大会

発表日と場所：2014 年 11 月 1 日、東北大学農学部（仙台市青葉区）

演題：米糠発酵素材の抗メタボリックシンドローム作用の検討

発表者：○樋渡一之¹、佐々木玲¹、高嶋亜希子²、大友理宣²、岩間由香³、戸嶋彦³、熊谷昌則¹、畠恵司¹

(¹秋田県総食研、²秋田銘醸、³スカイライト・バイオテック)

【背景・目的】メタボリックシンドローム(MS)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る。その増加が大きな社会問題となっていることから、我々は MS の予防を目的とした新しい食品素材の開発に取り組んでいる。その中の1つである、米糠を乳酸菌によって発酵させて製造した米糠発酵素材¹⁾は、高脂肪食負荷ラットにおける脂質異常改善作用²⁾、高血圧自然発症ラットにおける血圧上昇抑制作用³⁾等の生理機能を有することから、種々な食品に活用されている。

本研究では MS がある程度進行した病態のモデルとして脂肪肝モデルマウスを作成し、米糠発酵素材が脂肪肝からの回復にどのような影響を与えるか検討した。

【方法】8 週齢の C57BL/6J マウス（雄）に高脂肪食（HFD32、日本クレア）を自由摂食させて 6 週間飼育し、脂肪肝モデルマウスを作製した。この脂肪肝モデルマウスに、AIN-93M 組成粉末飼料（対照群）または AIN-93M 組成に 2% の米糠発酵素材を混合した粉末飼料（試験群）を 1 週間給餌（摂食量を測定）後、16 時間絶食させて解剖に供して血漿を採取、各臓器重量を測定した。血液生化学値の分析は富士ドライケム 3500V（富士フイルムメディカル）、リポタンパク質解析は我々が開発したゲルろ過 HPLC 法（LipoSEARCH）を用いて実施した。肝臓内の脂質含量は、一部改変した Folch 法で脂質を抽出した後、中性脂肪はコレステスト TG、コレステロールはコレステスト CHO（ともに積水メディカル）で定量した。

【結果・考察】試験食と対照食で栄養成分、摂取カロリー、摂食量に大きな差は認められなかった。脂肪肝モデルマウスの臓器重量、血液生化学値等に対する米糠発酵素材の影響を検討した結果、肝臓内脂質含量には影響を与えなかったが、試験群のみに腸間膜周囲脂肪蓄積を低減する傾向が認められた。血中リポタンパク質組成と肝機能マーカーには影響を与えなかったが、試験群では血糖値が有意に低下していた。

米糠発酵素材は食餌性肥満に対して脂質異常症改善作用を有することから、脂肪肝、すなわち肝臓内の脂質蓄積に対する作用を予想したが、この作用は認められなかった。しかし血糖値減少を促進したことから、臓器重量の結果と併せて、MS の進行に対しても緩やかな軽減作用が期待できる。

- 【文献】1)大友理宣ほか、*生物工学会誌*、**84**(12)、479-483 (2006)
2)大友理宣ほか、*生薬学雑誌*、**65**(1)、33-38 (2011)
3)樋渡一之ほか、*日本食品科学工学会誌*、**57**(1)、40-43 (2010)

9) 発表学会：日本官能評価学会 2014 年度大会

発表日と場所：2014 年 11 月 8 日、東京家政大学（東京都）

演題名：簡便で嗜好性の高いハンバーグ調理法の検討

発表者：○大野智子¹⁾、小松千鶴¹⁾、佐々木玲²⁾

¹⁾ 聖霊女子短大、²⁾ 秋田県総食研

【目的】ハンバーグは、子どもから大人まで幅広く好まれており、家庭でもよく作られる代表的な肉料理である。また、調理の簡便化、調理時間の短縮化を図った調理器具としてシリコンスチーマーが人気である。本研究では、簡便で嗜好性の高いハンバーグの調理法を検討することを目的に、加熱条件の異なるハンバーグの物性と食味評価を行った。

【方法】材料となる牛・豚合いびき肉、たまねぎ、有塩バター、生パン粉、牛乳、卵、塩、こしょう、ナツメグ、サラダ油を混捏後、縦 7cm、横 8cm、厚さ 2cm の小判型に成形し、シリコンスチーマーを用いた電子レンジ、フライパン、オーブンによる加熱調理操作にて調製したハンバーグを試料とした。物性は、試料中央部分を縦横 20 mm に 3 等分し、厚さ 23±3 mm

で、万能試験機 (INSTRON 社 5544) により、硬さ、凝集性の測定を行った。測定条件は、樹脂製円柱型プランジャー16mmΦを用い、測定速度 1 mm/sec、歪率 50%とした。官能評価は 20 代の女子学生 32 名をパネルとし、外観、香り、旨味、硬さ、舌触り、風味、総合評価の 7 項目による 5 段階評点法にて実施した。測定条件は、50±5℃とした。得られたデータの解析は、一元配置分散分析を行った。

【結果】物性測定では、オーブン、電子レンジ、フライパン加熱の順に硬いという結果が得られた。凝集性は、フライパンが電子レンジ加熱と比較して有意に高い傾向が認められた ($p<0.05$)。官能評価では、オーブン加熱における硬さを除き、全ての項目において全試料が好ましいと判断された。従来のフライパンやオーブン加熱だけではなく、シリコンスチーマーを用いた電子レンジ加熱も、ハンバーグを調製する上で、簡便で嗜好性の高い調理法であることが示唆された。

10) 発表学会：第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス

発表日と場所：2014 年 11 月 15 日、東北大学川内北キャンパス (仙台市)

演題名：麴菌 *Aspergillus oryzae* のザゼンソウ発熱関連遺伝子と相同性を示す遺伝子の発現比較

発表者：○小笠原博信 (秋田県総食研セ)、渡辺隆幸 (秋田県総食研セ)、

伊藤菊一 (岩手大農・寒冷バイオ)、五味勝也 (東北大院農・生物産業創成)

【目的】麴造りでは種麴菌の違いによって、初期から温度が上がりやすい前急型と徐々に温度が上がる前緩型がある。菌株による発熱に関与する遺伝子発現の違いを想定し、既に解明されている発熱植物ザゼンソウの発熱関連遺伝子である alternative oxidase 遺伝子 (SrAOX) と uncoupling protein 遺伝子 (SrUCPa, SrUCPb) の相同検索を行った。その結果、2 種の AOX (AoAOX2, AoAOX7) と 3 種の UCP (AoUCPa2, AoUCPa3, AoUCPb5) を見出し、麴温度特性の異なる菌株におけるそれら遺伝子の発現について検討した。

【方法】前急型味噌用麴菌 AOK209 株と前緩型 AOK139 株および RIB40 を用いて米麴を作成し、24 時間と 48 時間目に定性 RT-PCR を行った。AOK139 株の高温処理による DNA トランスポゾン *Crawler* 変異株の中から 25℃における生育が良好で米麴の平均温度がより高い株 AOK139-LT4, LT33, LT40 を選抜した。24 時間目の麴から調製した total RNA を用いて qRT-PCR を行い、各遺伝子の転写量比較を行った。

【結果】定性 RT-PCR では AoUCPa3 および AoUCPb5 が 24 時間目で発現が認められ、バンド強度は AOK209 > = RIB40 > > AOK139 であった。AOK139 の高温型 *Crawler* 変異株 LT4 では AoAOX7 と AoUCPb5, LT33 株では AoUCPa2 の転写上昇がそれぞれ認められた。さらに LT44 株では 5 種の遺伝子全ての転写比率が親株より高くなっていた。以上、これら発熱相同遺伝子は麴造りでの温度上昇に寄与していることが推定された。

11) 発表学会：秋田応用生命科学研究会 第 24 回講演会

発表日と場所：2014 年 12 月 5 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：食用地衣類のレニン及びキマーゼ阻害活性

発表者：○葦澤悟（国際農研）、程永強（中国農大）、山本好和（秋田県大）、
高橋砂織（秋田県総食研）

【目的】レニンは、レニン・アンジオテンシン系における血圧調節上、律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、活性測定が容易なアンジオテンシン I 変換酵素（ACE）を標的として各種食材よりその阻害物質の探索が多数行われてきた。しかしながら、レニンを標的酵素とした食物由来阻害物質の探索は殆ど行われていなかった。高橋らは、ヒト型組換えレニンと消光性蛍光基質を組み合わせたレニン阻害活性の測定方法を確立し[1]、これまでに大豆からソヤサポニン I [2]をまた米から遊離脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を同定した[3]。今回、各種食材よりレニン阻害物質を探索することを目的とした。また、ACE と同様にアンジオテンシン I に作用し、アンジオテンシン II を生成する酵素キマーゼについても同様に検索した。

【方法】レニン[1, 2]、キマーゼ[4]及び ACE[5]活性測定は高橋らの方法で行った。各種食材のメタノール抽出液、熱水抽出液を調製し、阻害活性検定用に用いた。また、*in vivo* における作用の検証は、各種抽出液を生後 12 週齢の雄性の高血圧自然発症ラット(SHR)に単回経口投与し、経時的に血圧を測定した。

【結果と考察】各種食材抽出液のレニン阻害活性を測定したところ、食用地衣 (*Sulcaria sulcata*, *Lobaria kurokawae*) に強い活性があることが明らかになった。*Sulcaria sulcata* は日本でバンダイキノリ、中国で樹花菜として、*Lobaria kurokawae* は中国で樹胡蝶として食されている。一方、これらの ACE 阻害活性を測定したところ、比較的lowかった。また、キマーゼについて、これらの抽出液の阻害活性を測定したところ、高い阻害活性を示した。つぎに、これらの抽出液の SHR における作用を検討したところ、抽出液投与後、4~6 時間において、コントロール群に比べ有意な血圧上昇抑制効果が確認された。

【参考文献】

- [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.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1713-1715 (2010)
- [4] 高橋他 中央味噌研究所報告 **35**, 129-140 (2014)
- [5] Takahashi S. *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011)

12) 発表学会：秋田応用生命科学研究会 第 24 回講演会

発表日と場所：2014 年 12 月 5 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：バキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞発現系によるヒト型 ACE2 の発現パターン解析及び精製酵素の特性

発表者：○宮脇舞¹、横田早希¹、後藤猛¹、菰澤悟²、高橋砂織³

(¹秋田大院工資、²国際農研、³秋田県総食研)

【目的】哺乳動物における重要な血圧調節系にレニン-アンギオテンシン系 (RAS) がある。この系では、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) により不活性型のアンギオテンシン I (AngI) が活性型のアンギオテンシン II (Ang II) に変換され、血圧上昇を引き起こす。近年、Ang II を基質として RAS を負に調節して心血管等の機能を制御するアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) が見いだされた。本研究では、ACE2 の詳細な機能解析を目指し、昆虫細胞発現系によるヒト型 ACE2 の生産及び精製酵素の特性解析を行った。

【方法】ACE2 の生産と精製 His タグを付加した ACE2 の cDNA を導入した組換えバキュロウイルス (vACE2) を Bac-to-Bac システムにより作成し、これを Sf9 昆虫細胞に MOI 0.1, 1, 10 pfu/cells で接種して、28°C、100 rpm の条件で旋回振とう培養を行った。感染培養後に回収した細胞に 0.5% TritonX-100 含有 PBS を加え、遠心分離して得られた上清を Ni-アフィニティー樹脂と混合し、吸着した ACE2 を 100 mM 及び 200 mM イミダゾールで溶出した。透析により活性画分のイミダゾールを除去後、-80°C で保存した。ACE2 の分析 ACE2 (98 kDa) の発現は、抗 His タグ抗体を用いた Western blotting で、また、酵素の純度は SDS-PAGE によって確認した。ACE2 の活性は、蛍光消光基質 Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Anaspec 社製) または Nma-His-Pro-Lys(Dnp)-OH を用いて測定した。

【結果と考察】感染培養による ACE2 発現の経時的挙動を Western blotting により調べたところ、3 日目以降の細胞画分には ACE2 の分子量 98 kDa にバンドが検出されたが、培地画分には検出されなかった。また、ACE2 の経時的な生成量を ACE2 活性により調べた結果、感染 2 日目から細胞内で活性が増加し始め、3 日目以降には培地中にも活性が認められた。これより、His タグを含む部位が加水分解された ACE2 が感染 3 日目から細胞外に漏出することがわかった。以上の結果から、ACE2 を精製するためには感染前期の細胞画分を用いることが最も効率的であることがわかった。約 500 ml の感染培養の細胞画分から全タンパク質を抽出し、Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより His タグ融合 ACE2 の精製を行い、約 1.4 mg の高純度 ACE2 を取得した。また、得られた精製酵素を用いたカイネティクス解析も行ったので、併せて報告する。

13) 学会発表：第 10 回バイオマス科学会議 日本エネルギー学会

発表日と場所：2015 年 1 月 14 日、(独) 産業技術総合研究所 (つくば市)

演題名：杉微粉碎物からの高温同時糖化発酵によるバイオエタノールの生成

発表者：○西田孝伸¹、進藤昌²、榊郁子¹、高橋武彦¹、森英明¹

(¹秋田県立大学、²秋田県総合食品研究センター)

バイオエタノールの製造は一般的にバイオマスの前処理、糖化、発酵、蒸留の流れで行われる。バイオエタノールの製造を商業的に成り立たせるには 40g/L 以上のエタノールを生成させ、蒸留工程でのエネルギーコストを低減することが必要となる^{a)}が、これを実現するには高

濃度のバイオマスから高い糖化効率で糖を生成する必要がある。リング状の粉碎媒体を用いた振動型粉碎機（タンデムリングミル）による前処理により得られた杉の微粉碎物は60%近くの高い糖化率が得られ、また、高温発酵性酵母SS4-5株は40℃でも高いエタノール発酵能を示すことができる。高いバイオマス濃度でも効率的に糖化を行うことができる同時糖化発酵は酵素と酵母の至適温度の違いによる効率の低下が問題とされていたが、SS4-5株を用いることで酵素と酵母の至適温度を近づけることができ、その問題を軽減できる。タンデムリングミルによる杉の微粉碎物を原料とし、SS4-5株を用いた40℃での同時糖化発酵を行い、約40g/Lのエタノールを生成させることに成功した。

a) Koppram and Olsson: *Biothechnol Biofuels*,7(1),54(2014)

14) 学会発表：第10回バイオマス科学会議 日本エネルギー学会

発表日と場所：2015年1月14日、(独)産業技術総合研究所（つくば市）

演題名：セルロース系バイオマスの酵素糖化時における酵素使用量の低減と回収率向上を目指したブロッキング剤による酵素のリグニン吸着防止技術の開発

発表者：○進藤昌¹、中島光康²、山田 智²

(¹秋田県総合食品研究センター、²日油(株))

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を生成するためには、糖化液作成時に使用する酵素使用量の低減と酵素の回収率を向上させることが有効である。しかし、セルラーゼなどの糖化酵素は、リグニンへ吸着するため添加酵素が有効に作用しないばかりか、酵素の回収率も低くなる。そこで、リグニンへの吸着を抑えるために、酵素反応液に新たに合成したブロッキング剤の添加効果を検討した。その結果、15種類の高分子を合成し検討を行ったところ、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを含有する合成高分子A-NAが、リグニンへの吸着を80%阻止することができた。また、杉粉碎物を酵素糖化したところ合成高分子A-NAを0.5%添加した反応液で酵素使用量を低減することができ、添加酵素量0.2%（杉粉碎物に対して）添加で酵素1.5%添加に相当する反応速度と糖化率を得た。また、反応液中には、合成高分子を添加した場合には、十分な酵素が遊離しており酵素が回収できることが判明した。さらに回収液を使用して酵素糖化を行ったところ、杉粉碎物を糖化できることが判明した。

15) 発表学会：第14回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会

発表日と場所：2015年2月3日、産総研（つくば市）

演題名：てんこ小豆（黒ささげ）の機能性について

発表者：○高橋砂織、佐藤 愛、熊谷昌則、畠 恵司、渡辺隆幸

<背景・目的>

秋田では、赤紫の発色が良好なことから赤飯用として「てんこ小豆（黒ささげ）」が愛用されている。これまで大豆や通常の小豆の機能性については多くの報告がある。その中で、大豆

由来のソヤサポニン I は、レニン活性を強く阻害するとともに高血圧モデルラット (SHR) の経口投与試験で、血圧降下作用のあることが報告されている (1、2)。しかしながら、てんこ小豆の機能性に関する研究は皆無である。今回、血圧調節系として最も解析が進んでいるレニン・アンギオテンシン系 (RAS) に注目して、てんこ小豆抽出液の RAS 系各酵素への影響を検討した。また、培養細胞系を用いて脂質代謝作用についても検討した。

<方法>

国産小豆、タイ産てんこ小豆及び秋田産てんこ小豆のエタノール及び熱水抽出液を調製し、試験に用いた。レニン、キマーゼ及びアンギオテンシン変換酵素 (ACE) の活性測定には、蛍光消光基質を用いた (1、3)。脂質代謝改善効果の検討にはマウス 3T3-L1 細胞を用いた。マウス 3T3-L1 細胞に対して脂肪細胞分化処理を行い、作成した脂肪細胞を用いて、てんこ小豆抽出液の脂質蓄積抑制効果を検討した。また、培養細胞から分化誘導した小腸、肝臓や脂肪組織の人工モデル臓器を用いて評価を行った (4)。

<結果・考察>

各豆類の熱水抽出液にレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性が認められた。その中で、秋田産てんこ小豆抽出液は、国産小豆やタイ産てんこ小豆抽出液に比べ、全ての酵素に対して強い阻害活性が認められた。秋田産てんこ小豆熱水抽出液のレニン、キマーゼ及び ACE に対する IC50 値は、69.0、8.6 及び 11.0 µg/ml であった。一方、脂肪細胞や人工モデル臓器を用いた検討では、豆の種類による相違は認められなかった。以上の結果より、秋田産てんこ小豆熱水抽出液には高血圧関連酵素類に対する阻害物質が豊富に含まれることが明らかとなった。今後、てんこ小豆由来の各酵素阻害物質の精製と構造解析を進める予定である。

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

2) Takahashi S., *et al.*, *ibid.*, **74**, 3210-3212 (2010)

3) Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011)

4) Takahashi J., *et al.*, *3 Biotech*, 213-218 (2012)

<謝辞>

本研究の一部は、平成 25 年度公益財団法人日本豆類基金助成により行われた。

16) 学会発表：第 3 回みそ技術研究発表会

発表日と場所：2015 年 2 月 27 日、全中全味ビル(東京)

演題名：99%精米を用いた麴および味噌の特長について

発表者：○渡辺隆幸、佐々木康子、小笠原博信 (秋田県総食研)

【目的】玄米は白米に比べ、ビタミン、ミネラル、フェルラ酸などの有用成分を豊富に含んでいるものの、玄米外側のワックス層の存在により、通常の製麴は困難であるとされている。

今回の研究は玄米の特長を活かした味噌の開発に役立てるため、玄米に近い成分を有する 99%精米を原料として種麴の比較試験を行った。さらに 99%精米に適した種麴を用いた味噌の製造試験を実施し、通常の味噌との比較によりその特長を明らかにした。

【方法および結果】味噌用 8 点、売り麴用 10 点、清酒用 2 点、焼酎用 2 点の計 22 点の種麴を用いて 99% 精米を用いて麴蓋製麴を実施し、状貌スコアと酵素力価を測定比較したところ極めて良好な生育を 4 点、良好な生育を 12 点が示した。生育な良好な麴は高い米糠分解活性を有している傾向が認められた。またセルラーゼ、キシラナーゼ、糖化力、 α アミラーゼ、リパーゼ等についても種麴の違いによる差を認めた。

それぞれの麴を用いて味噌を製造し、味噌の 10 倍量の水またはメタノールにより抽出したサンプルをラジカル捕捉活性とポリフェノール量の測定に供した。ラジカル捕捉活性は最大 1.7 倍、ポリフェノール量は最大 1.4 倍の違いを種麴により認めた。

99% 精米使用味噌と白米使用味噌(対照)との比較のため、状貌スコアのすぐれ 99% 精米に適した菌株の一つである WS61 を用い、製麴と味噌製造試験を実施したところ 99% 精米による麴は、同時に製麴した白米の麴よりも各種の酵素力価が高いことを認めた。さらに 99% 精米を用いた味噌は白米を用いた味噌と比較してラジカル捕捉活性が高く、またアミノ酸総量、フェルラ酸量も多いことが認められた。

17) 発表学会：日本農芸化学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 3 月 27 日、岡山大学（岡山市）

演題名：アンギオテンシン変換酵素 2 基質の開発と応用

発表者：○高橋砂織¹、畠 恵司¹、熊谷久美子²（¹秋田県総食研、²（株）ペプチド研）

レニン・アンギオテンシン系は昇圧系として重要な役割を持っている。腎臓で生合成されたレニンは、様々な刺激で血中に放出され、アンギオテンシンノーゲンよりデカペプチド、アンギオテンシン I (AI) を生成する。AI はアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) によりオクタペプチド、アンギオテンシン II (AII) となり血管収縮を引き起こす他、副腎からのアルドステロン分泌を促進し、結果として血圧上昇を引き起こす。一方、肺、心臓や腎臓には ACE のホモログであるアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) の存在することが知られている。ACE2 は AI より A1-9 をまた、AII より A1-7 を生成する。A1-7 及び A1-9 は AII とは反対に血管弛緩を引き起こし、血圧降下をもたらす。一方、ACE2 は膜タンパク質であり、重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) の原因となるコロナウイルス類が持つスパイクタンパク質の受容体であることが知られている。したがって、ACE2 の活性化因子や阻害因子はこれら疾患の予防や治療に寄与することが期待される。本研究では、ACE2 活性測定方法について検討するとともに、阻害物質の探索系を構築し各種食材より ACE2 作用物質の探索をおこなった。

これまで、ACE2 の活性測定にはカスパーゼ用の基質である MCA-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Lys (Dnp) や MCA-Ala-Pro-Lys (Dnp) などが用いられてきた。しかしながら、これらの基質は ACE2 の基質特異性を加味して合成されておらず、より効率的な基質開発が望まれていた。そこで、ACE2 の AII 認識部位アミノ酸配列を基に N 末端に 2-(N-methylamino)benzoyl (Nma) 基をまた、C 末端に *N*^ε(2,4-dinitrophenyl)-L-Lys (Lys(Dnp)) を導入した各種蛍光消光基質(Nma-

Xaa-Pro-Lys(Dnp))を合成し、ACE2 との反応性を検討した。その結果、Nma-His- Pro-Lys(Dnp) が ACE2 の最も優れた基質であることが示された。本基質と組換え型 ACE2 (CALBIOCHEM) を用いて、至適 pH、塩濃度や界面活性剤濃度などを検討し ACE2 阻害活性測定条件を設定した。各種食材の抽出液を用いて ACE2 活性に及ぼす影響を検討した結果、ある種の山菜や野菜類の抽出液に ACE2 阻害活性の存在が確認された。今後、阻害物質の精製及び構造解析を進める予定である。

18) 発表学会：日本農芸化学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 3 月 27 日、岡山大学（岡山市）

演題名：肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生との関係

発表者：○佐々木玲^{1,3}、三浦瑞穂²、木村文子²、高橋純一郎²、小林正之³、畠恵司¹

¹秋田県総食研、²(株)スカイライト・バイオテック、³秋田県立大院生資

【目的】リポタンパク質は、リン脂質、コレステロールおよびそのエステル、中性脂肪ならびにアポリポタンパク質からなる球状粒子である。肝臓は、各組織への脂質（主に中性脂肪とコレステロール）の供給ならびに余分な脂質の回収を担うために VLDL(Very Low Density Lipoprotein)、LDL(Low Density Lipoprotein)、HDL(High Density Lipoprotein)の主要 3 種のリポタンパク質を合成する。それ故、肝臓における脂質合成を制御することができる化合物は、脂質異常症改善の主な薬剤として上市されている。特に肝実質細胞は、脂質代謝以外にも薬物代謝、解毒などに関わるため、ES/iPS 細胞などの幹細胞から誘導し、これらの評価に利用する研究が活発化してきた。一方、我々は、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞が VLDL、LDL、HDL を培養上清に分泌することや、既知の薬剤でそれらの分泌が抑制される事を見出し、新規脂質異常症薬探索系を開発した¹⁾。さらに、HepG2 細胞の分化に従い、リポタンパク質産生が亢進されることを見出し、リポタンパク質自体が肝細胞の新たな分化マーカーとして応用できる可能性を示した²⁾。本研究では、分化のステージが異なる肝由来細胞のリポタンパク質産生と、リポタンパク構成分子の遺伝子発現量を調べ、肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生能との関係を詳細に検討した。

【方法】ヒト未分化型肝癌細胞 2 株（HLE および HLF）、高分化型肝癌細胞 3 株（HepG2、HuH-7、HepaRG®）、ならびに正常ヒト肝細胞の培養上清に産生されるリポタンパク質量を LipoSEARCH®で定量した。これら細胞の脂質代謝関連遺伝子の発現量を Real-time RT-PCR で定量した。

【結果及び考察】上記肝由来細胞株のなかで、高分化型肝癌細胞 3 株と正常肝細胞ではリポタンパク質の産生が認められた。しかしながら、未分化型肝癌細胞株である HLE および HLF は 3 種の主要リポタンパク質を産生しなかった。そこで、各細胞株間での脂質代謝関連遺伝子群の発現量を検討した結果、脂肪酸合成酵素、コレステロール合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素、あるいはそれらを制御する SREBP-1c、SREBP-2 の遺伝子発現量に大

きな差は認められなかった。一方、リポタンパク質を産生しない未分化型肝癌細胞株では、リポタンパク質を産生する高分化型肝癌細胞株ならびに正常ヒト肝細胞と比較して、VLDL/LDLの主要アポリポタンパク質である ApoB-100ならびにHDLの主要アポリポタンパク質である ApoA-1 の発現量が非常に低いことが判明した。以上の結果から、アポリポタンパク質の誘導がリポタンパク質産生の鍵となると推察される。

現在、我々は間葉系幹細胞株に、肝細胞系への分化を誘導する転写因子を遺伝子導入した細胞株を得ており、これらの遺伝子発現とリポタンパク質産生との相関について検討を行っている。

1) Itoh M. *et al.*, *Biotech. Lett.* **31**, 953-957 (2009).

2) Takahashi J. *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **49**, 554-556 (2013)

19) 発表学会：日本農芸化学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 3 月 28 日、岡山大学（岡山市）

演題名：Processed soymilk significantly reduced blood pressure in spontaneously hypertensive rats compared to regular soymilk

発表者：○Alauddin Md¹, Hitoshi Shirakawa¹, Kazuyuki Hiwatashi², Atsushi Shimakage³, Saori Takahashi², Mamoru Shinbo³, Michio Komai¹ (¹Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agriculture, Tohoku University, ²Akita Research Institute of Food and Brewing, ³Yamada Foods Co., Ltd.)

Processed soymilk was produced from regular soymilk with commercially available proteinase (PROTIN SD NY10) to generate inhibitory peptides against angiotensin-I converting enzyme (ACE) and was investigated for its hypotensive effect on spontaneously hypertensive rats (SHR). Single and chronic oral administration of processed soymilk at a dose of 0.0167, 0.167 and 0.583 ml/kg body weight and 2 ml/kg body weight non-processed soymilk as control was conducted using animal model hypertension 10 weeks old male SHR. Single oral administration of processed soymilk significantly reduced systolic blood pressure at a dose of 0.167 and 0.583 ml/kg body weight compared to regular soymilk. Chronic administration (3 weeks) of processed soymilk reducing both systolic and diastolic blood pressure elevation at same dose in SHR. After chronic administration, inhibitory activity of ACE in serum was found significantly higher compared to regular soymilk. Serum angiotensin II (vasoconstrictor) level was found significantly lower compared to regular soymilk. Furthermore, serum and liver lipid profile was found almost similar to regular soymilk. In conclusion, processed soymilk ingestion may have high blood pressure lowering effect and ameliorate cardiovascular disease related to hypertension.

20) 発表学会：日本畜産学会 第119回大会

発表日と場所：2015年3月28日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：EGAM1N およびEGAM1C によりマウスES細胞の細胞運命を転換する

発表者：○佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、菊池貴裕¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

（¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ）

【目的】哺乳動物における最初の細胞分化は胎仔前駆細胞と胎盤前駆細胞への分化である。胎仔前駆細胞より樹立されるES細胞は、胎盤形成に寄与できないことが知られている。私達は最初の細胞分化時に発現量が増加する、ホメオタンパク質EGAM1NおよびEGAM1Cを発見した。EGAM1NまたはEGAM1C発現ベクター導入マウスES細胞において、LIF非添加・FGF4添加（*Cdx2*発現誘導）培養により、胎盤幹(TS)細胞マーカーである*Cdx2*の発現量が大きく増加することが判明している。そこで、EGAM1NまたはEGAM1Cによる、ES細胞から胎盤細胞への細胞運命の転換を試みた。【方法】EGAM1NまたはEGAM1C発現マウスES細胞株に対して、*Cdx2*発現誘導培養を6日間行った。引き続き、TS細胞樹立培養を行い、経時的に形態観察を行った。また、蛍光免疫染色法により、ES細胞マーカーおよびTS細胞マーカーの発現について検討した。【結果】コントロール株はES細胞様のコロニーを形成したのに対し、EGAM1NまたはEGAM1C発現株はTS細胞様コロニーを形成した。また、コロニーを構成する一部の細胞はES細胞マーカー陰性、かつ、TS細胞マーカー陽性であった。従って、EGAM1NまたはEGAM1CによりES細胞の細胞運命を転換できる可能性が考えられる。現在、胎盤細胞マーカー遺伝子群の発現について検討中である。

21) 発表学会：日本畜産学会 第119回大会

発表日と場所：2015年3月28日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：ウシiPS細胞樹立への応用を目指したマウスiPS細胞樹立システムの構築

発表者：○菊池貴裕¹、佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、福田智一³、

小林正之¹（¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ・³東北大院農）

【目的】本研究室では、iPS細胞を利用したウシ遺伝資源の利活用を目指している。しかし、ウシiPS細胞は山中ファクター4因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc*)の導入では樹立することができない。本研究では準備段階として、マウスiPS細胞の樹立システムを構築した。その際、組換えDNA配列を宿主細胞のゲノムに組み込み、再び除去できる*piggyBac*トランスポゾンシステムを応用した。【方法】山中ファクターcDNAおよびGFPcDNAを自己開裂2Aペプチド配列(E2A,F2A,P2A)コードDNAでPCRにより連結し、*Oct4-F2A-Klf4*および*Sox2-E2A-cMyc-P2A-GFP* DNA配列を作製した。これらの配列と、強力な動物細胞用CAGプロモーター、さらに*piggyBac*トランスポゾンベクターを組合わせて、単一の発現ベクターからなるマウスiPS細胞誘導ベクターを構築した。【結果】マウスiPS細胞誘導ベクターをマウス胎仔線維芽細胞株に遺伝子導入後、iPS細胞の樹立培養を行ったところ、マウスiPS細胞に特徴的なドーム状の細胞コロニーが形成された。また同コロニーにおいて、幹細胞マーカー

であるアルカリホスファターゼ活性および NANOG タンパク質の発現が検出された。現在、遺伝子発現誘導システムと組合わせたマウス iPS 細胞誘導ベクターの開発を進めている。

22) 発表学会：日本畜産学会 第 119 回大会

発表日と場所：2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：EGAM1N ホメオタンパク質はマウスの発生過程において重要な転写因子と会合する

発表者：○野中愛純¹、佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、菊池貴裕¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ)

【目的】本研究室では、動物胚における細胞分化制御機構を解明するために、マウス初期胚において発現量が増加する mRNA を探索した。その結果、EGAM1N ホメオタンパク質を発見した。未分化細胞のモデルであるマウス ES 細胞において EGAM1N を強制発現させた場合、未分化状態が安定化されることが示されている。ホメオタンパク質は、他の転写因子と会合することにより機能することから、EGAM1N はマウスの発生過程において重要な転写因子と会合する可能性が考えられる。そこで本研究では、発生過程において重要な転写因子 NANOG および OCT4 と EGAM1N との会合について検討した。【方法】GST 共沈法および免疫沈降法を用いて、NANOG または OCT4 が共沈するか Western blotting により検出した。【結果および考察】GST 融合 EGAM1N と NANOG または OCT4 が共沈することが示された。また、免疫沈降法により EGAM1N と NANOG または OCT4 が共沈することが示された。よって、EGAM1N と NANOG または OCT4 が会合し、マウス発生過程において機能する可能性が考えられる。加えて、NANOG、OCT4 と EGAM1N は直接的に会合する可能性が考えられる。現在、マウス発生過程における EGAM1N の機能の全体像を解明するために、EGAM1N と転写因子 SOX2, KLF4, TBX3 との会合についても検討中である。

23) 発表学会：日本畜産学会 第 119 回大会

発表日と場所：2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：アンチセンス Oct4 MO を用いることによる遺伝子ノックダウン効果の検証

発表者：○佐藤由貴¹、佐藤梓織¹、菊池貴裕¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ)

【目的】アンチセンスモルフォリノオリゴ (アンチセンス MO) は、簡単な操作・少ない毒性のもと、遺伝子発現を効率的に阻害できることが期待される。これまでに、透明帯を有するマウス初期胚への MO 導入条件を検討したところ、培養液に MO (10 μ M)、MO 導入試薬である Endo-Porter (6 μ M)、および BSA (60 μ g/ml) を添加することにより、効率的に MO を導入できることが判明した。Oct4 遺伝子は欠損胚の表現型が解明されていることから、本研究ではアンチセンス Oct4 MO を用いて遺伝子ノックダウン効果を検証した。【方法】コントロール MO またはアンチセンス Oct4 MO を添加した培養液により、マウス 2 細胞期卵を培養した。Western blotting または蛍光免疫染色により、OCT4 発現、内部細胞塊および栄養外胚葉の形成に及ぼ

す影響を検討した。【結果】 アンチセンス *Oct4* MO の添加により、桑実期から OCT4 発現の減少が認められた。outgrowth 胚では、NANOG (内部細胞塊マーカー)陽性細胞数が減少し、CDX2 (栄養外胚葉マーカー)陽性細胞数が増加した。以上の結果より、アンチセンス *Oct4* MO を添加して培養したマウス初期胚と *Oct4* 欠損胚は、同様な表現型を示すことが判明した。すなわち、アンチセンス MO の導入により、遺伝子欠損胚と同様な表現型を観察できると考えられる。

24) 発表学会：日本畜産学会 第 119 回大会

発表日と場所：2015 年 3 月 29 日、宇都宮大学 (宇都宮市)

演題名：移植胚の受胎率向上を目指した遺伝子組み換えウシ線維芽細胞増殖因子 4(FGF4)の開発

発表者：○熊谷友希¹、菅原彩子¹、伊藤俊彦¹、佐藤梓織¹、佐藤由貴¹、菊池貴裕¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹ (¹秋田県大院生物資源・²秋田総食研セ)

【目的】 マウスの胚発生において、線維芽細胞増殖因子 4(FGF4)は胎盤形成に関与する、必要不可欠な細胞増殖因子である。また、体細胞クローンウシ胚の正常な発生と *FGF4* 遺伝子の発現には関連性が指摘されている。本研究室では、*FGF4* を受精卵の受胎促進に応用することを考案し、遺伝子組換えウシ *FGF4* を開発した。【方法および結果】 His タグを含むアミノ酸配列を N 末端に付加した、成熟型ウシ *FGF4*(Pro³²-Leu²⁰²;HisbFGF4)を大腸菌において発現させた。しかし、PBS 中で冷蔵した場合、HisbFGF4 は Ser⁵⁴ と Leu⁵⁵ の間で切断され N 末端側が短縮化された。そこで、N 末端側をあえて短縮化したウシ *FGF4*(Leu⁵⁵-Leu²⁰⁶;HisbFGF4L)を生産した。予測した通り、HisbFGF4L は PBS 中で冷蔵しても安定であった。また、HisbFGF4L は初代ウシ線維芽細胞に対して、HisbFGF4 と同等の細胞増殖促進活性を示した。そこで、タンパク質工学的改変がなされている HisbFGF4L は、FGFR を介して作用するか検証した。初代ウシ線維芽細胞に FGFR 阻害剤 PD173074 とともに HisbFGF4L を作用させたところ、HisbFGF4L が示す細胞増殖促進活性は完全に消失した。以上の結果より、HisbFGF4L は FGFR を介して生物活性を発揮することが示された。

6. 外部発表論文概要 (8 件)

1) 論文題名 : **Non-surgical treatment of canine oral malignant melanoma: A case study of the application of complementary alternative medicine**

著者名 : Hiroyasu Itoh, Toshiyuki Mukaiyama, Takahiro Goto, Keishi Hata, Kazuo Azuma, Takeshi Tsuka, Tomohiro Osaki, Tomohiro Imagawa, Yoshiharu Okamoto

雑誌名 : *ONCOLOGY LETTERS*, 7 (6), 1829–1830, 2014

発行日 : 2014 年 4 月 7 日

2) 論文題名 : **Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity by *Brasenia schreberi* (Junsai) components**

著者名 : Tetsuro Hisayoshi, Mayu Shinomura, Atsushi Konishi, Junji Tanaka, Hiroshi Shimoda, Keishi Hata, Saori Takahashi, Kiyoshi Yasukawa

雑誌名 : *J. Biol. Macromol.*, 14 (1), 59-65, 2014

発行日 : 2014 年 5 月 1 日

3) 論文題名 : **Renin inhibitors in foodstuffs: Structure-function relationship**

著者 : Saori Takahashi, Takeshi Gotoh, Keishi Hata, Tetsuo Tokiwano, Yuko Yoshizawa, Kazuyuki Hiwatashi, Hironobu Ogasawara, and Kazuyuki Hori

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules*, 14, 17-84 (2014)

発行日 : 2014 年 10 月 1 日

4) 論文題名 : **A simple turbidimetric assay using chitin nanofiber as the substrate for determination of chitinase activity**

著者 : Tomoyo Nishihara, Asami Miyano, Takayuki Ohnuma, Takeshi Gotoh,

Saori Takahashi, Kazue Narihiro, Kazuhiko Yamashita, and Tamo Fukamizo

雑誌名 : *Journal of Applied Glycoscience* 61, 113-116 (2014)

発行日 : 2014 年 10 月 20 日

5) 論文題名 : **Differentiation-inducing and anti-proliferative activities of lupeol on canine melanoma cells**

著者名 : Kikumi Ogihara, Yuko Naya, Yoshiharu Okamoto, Keishi Hata

雑誌名 : *SpringerPlus*, 3, 632-637, 2014

発行日 : 2014 年 10 月 25 日

6) 論文題名 : **Clinical systemic lupeol administration for canine oral malignant melanoma**

著者名 : Inoru Yokoe, Kazuo Azuma, Keishi Hata, Toshiyuki Mukaiyama, Takahiro Goto, Takeshi Tsuka, Tomohiro Imagawa, Norihiko Itoh, Yusuke Murahata, Tomohiro Osaki, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto

雑誌名 : *MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY*, 3 (1), 89-92, 2015

発行日 : 2014 年 10 月 30 日

7) 論文題名 : **米のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の分布と貯蔵による変化**

著者名 : 大能俊久、高橋砂織

雑誌名 : *日本食品科学工学会誌*, 61, 552-554 (2014)

発行日 : 2014 年 11 月 15 日

8) 論文題名 : **Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined commercial enzymes**

著者 : Hiroki Maeda, Takumi Takata, Norihiko Fujii, Hiroaki Sakaue, Satoru Nirasawa,
Saori Takahashi, Hiroshi Sasaki, and Noriko Fujii

雑誌名 : Analytical Chemistry, 87, 561-568 (2015)

発行日 : Web. 公開 2014年12月5日

1) 論文題名 : Non-surgical treatment of canine oral malignant melanoma: A case study of the application of complementary alternative medicine

著者名 : Hiroyasu Itoh, Toshiyuki Mukaiyama, Takahiro Goto, Keishi Hata, Kazuo Azuma, Takeshi Tsuka, Tomohiro Osaki, Tomohiro Imagawa, Yoshiharu Okamoto

雑誌名 : *ONCOLOGY LETTERS*, 7 (6),1829–1830, 2014

発行日 : 2014年4月7日

要約 :

This report describes a dog with a clinical stage III oral malignant melanoma that was treated with complementary alternative medicine (CAM). The CAM included high temperature hyperthermia, dendritic cell therapy and lupeol injections. Surgery, radiation and chemotherapy were not performed. Two months after the start of treatment, the tumor disappeared and after six months, the follow-up examinations revealed no recurrence or metastasis of the tumor. Quality of life (QOL) of the dog was maintained; therefore, the application of CAM may be an effective treatment for canine oral malignant melanoma. The effective application of CAM has the potential to prolong life and maintain an excellent QOL for pets.

2) 論文題名 : Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity by *Brasenia schreberi* (Junsai) components

著者名 : Tetsuro Hisayoshi, Mayu Shinomura, Atsushi Konishi, Junji Tanaka, Hiroshi Shimoda, Keishi Hata, Saori Takahashi, Kiyoshi Yasukawa

雑誌名 : *J. Biol. Macromol.*, 14 (1), 59-65, 2014

発行日 : 2014年5月1日

要約 :

We screened for inhibitory activities of 25 wild vegetables and fruits for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT). Among them, ethanol- and water-extracts of *Brasenia schreberi* (Junsai) and water-extract of *Petasites japonicus* (Fuki) strongly inhibited the HIV-1 RT activity to incorporate dTTP into poly(rA)-p(dT)₁₅. We tested HIV-1 RT inhibitory activities of 15 polyphenols, isolated from *Brasenia schreberi*. Among them, gossypetin and hypolaetin 7-Oglucoside inhibited the activity.

3) 論文題名 : Renin inhibitors in foodstuffs: Structure-function relationship

著者 : Saori Takahashi, Takeshi Gotoh, Keishi Hata, Tetsuo Tokiwano, Yuko Yoshizawa, Kazuyuki Hiwatashi, Hironobu Ogasawara, and Kazuyuki Hori

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules*, 14, 17-84 (2014)

発行日 : 2014年10月1日

要約 : Renin, a highly specific aspartic proteinase originated from kidney, is a rate-limiting enzyme in renin-angiotensin system. Recently, we developed effective expression system for recombinant

human (rh) renin using baculovirus-insect cell expression system, and simple and rapid assay method for rh-renin using internally quenched fluorogenic (IQF) substrate. Using the purified rh-renin and the IQF substrate, we constructed rapid and sensitive renin inhibitor screening system. Using the system, we found renin inhibitors in various foodstuffs. The isolation and characterization of renin inhibitors from soybean, rice, and wild vegetables and structure-function relationship of the inhibitors are also discussed.

4) 論文題名 : A simple turbidimetric assay using chitin nanofiber as the substrate for determination of chitinase activity

著者 : Tomoyo Nishihara, Asami Miyano, Takayuki Ohnuma, Takeshi Gotoh,
Saori Takahashi, Kazue Narihiro, Kazuhiko Yamashita, and Tamo Fukamizo

雑誌名 : Journal of Applied Glycoscience 61, 113-116 (2014)

発行日 : 2014年10月20日

要約 : A simple turbidimetric assay using chitin nanofiber as the substrate was employed to measure chitinase activity. The higher dispersive properties of chitin nanofiber enabled the degradation of chitin to be monitored turbid metrically. When non-processive chitinases, a family GH18 chitinase from the tobacco plant and a GH19 chitinase from rye seeds, were added to the β -chitin nanofiber suspension, no significant changes were observed in the turbidity of the suspension, however, the amounts of the reducing sugars produced were significantly high and small amounts of GlcNAc and (GlcNAc)₂ were detected by HPLC in the reaction mixture. However, the addition of a processive family GH18 chitinase, *Serratia marcescens* chitinase B or chitinase from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, resulted in a significant decrease in the turbidity of the chitin nanofiber suspension, and produced large amounts of reducing sugars including GlcNAc and (GlcNAc)₂. The rate of decreases in turbidity was clearly dependent upon the enzyme concentration. We concluded that turbidimetric assay using β -chitin nanofibers as the substrate was useful for measuring the activities of processive chitinases.

5) 論文題名 : Differentiation-inducing and anti-proliferative activities of lupeol on canine melanoma cells

著者名 : Kikumi Ogihara, Yuko Naya, Yoshiharu Okamoto, Keishi Hata

雑誌名 : *SpringerPlus*, 3, 632-637, 2014

発行日 : 2014年10月25日

要約 :

Canine melanoma is the most common oral malignant tumor reported in the field of veterinary medicine. We found that lupeol, a lupine triterpene, inhibited mouse melanoma cell growth in vitro and in vivo by inducing cell differentiation. In the present study, we examined the

differentiation-inducing activities of lupeol on 4 canine melanoma cells in vitro and in vivo. The induction of canine melanoma cell differentiation by lupeol was confirmed by evaluating some differentiation markers such as tyrosinase with real-time RT-PCR. Furthermore, we transplanted canine melanoma cells into a severe combined immunodeficiency mouse, and studied the anti-progressive effects of lupeol on tumor tissue. The gene expression of microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase, and tyrosinase-related protein-2, which are markers of pigment cell differentiation, was induced in 4 canine oral malignant melanoma cells by lupeol, and the agent markedly inhibited tumor progression in canine melanoma-bearing mice.

6) 論文題名 : **Clinical systemic lupeol administration for canine oral malignant melanoma**

著者名 : Inoru Yokoe, Kazuo Azuma, Keishi Hata, Toshiyuki Mukaiyama, Takahiro Goto, Takeshi Tsuka, Tomohiro Imagawa, Norihiko Itoh, Yusuke Murahata, Tomohiro Osaki, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto

雑誌名 : *MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY*, 3 (1), 89-92, 2015

発行日 : 2014 年 10 月 30 日

要約 :

Canine oral malignant melanoma (COMM) is the most aggressive malignant tumor in dogs. Lupeol is a triterpene extracted from various fruits and vegetables that reportedly inhibits melanoma cell proliferation in vitro and in vivo. In this study, the efficacy of subcutaneous lupeol for spontaneous COMM was evaluated. A total of 11 dogs (3, 5 and 3 dogs diagnosed with clinical stage I, II and III melanoma, respectively) were evaluated. Subcutaneous lupeol (10 mg/kg) was administered postoperatively at various time points to treat these 11 COMM cases. Of the 11 subjects, 7 exhibited no local recurrence 180 days postoperatively and no severe adverse effects were observed in any of the cases. Furthermore, no distant metastasis was observed during the experimental period. Therefore, systemic lupeol may prevent local tumor progression and distant metastasis and may be a novel adjuvant treatment for the treatment of COMM.

7) 論文題名 : **米のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の分布と貯蔵による変化**

著者名 : 大能俊久、高橋砂織

雑誌名 : 日本食品科学工学会誌, 61, 552-554 (2014)

発行日 : 2014 年 11 月 15 日

要約 : 玄米に含まれる GAD 活性について検討を行った。水分 14.7% の玄米は、15°C に貯蔵することで徐々に GAD 活性が減少し、12 ヶ月後には貯蔵前の約 30% まで減少した。玄米粉を使用した貯蔵試験により、貯蔵時の水分と貯蔵温度が GAD 活性の減少に影響することが示唆された。GAD 活性は胚で一番高く、100~94% の表層粉も胚に対して 77% の活性があったが、内層へ行くに従い減少しており、糠部分に大部分が存在していた。

8) 論文題名 : Rapid survey of four Asp isomers in disease-related proteins by LC-MS combined commercial enzymes

著者 : Hiroki Maeda, Takumi Takata, Norihiko Fujii, Hiroaki Sakaue, Satoru Nirasawa,
Saori Takahashi, Hiroshi Sasaki, and Noriko Fujii

雑誌名 : Analytical Chemistry, 87, 561-568 (2015)

発行日 : Web. 公開 2014年12月5日

要約 : Until relative recently, it was considered that D-amino acids were excluded from living systems except for the cell wall of microorganisms. However, D-aspartate residues have now been detected in long-lived proteins from various tissues of elderly humans. Formation of D-aspartate in proteins induces aggregation and loss of function, leading to age-related disorder such as cataracts and Alzheimer disease. A recent study used LC-MS to analyze isomers of Asp residues in proteins precisely without complex purification of the proteins. However, to identify the four Asp isomers ($L\alpha$, $L\beta$, $D\alpha$ and $D\beta$) on the chromatogram, it was necessary to synthesize reference peptide containing 4 different Asp isomers as standards. Here, we describe a method for rapidly and comprehensively identifying Asp isomers in proteins using a combination of LC-MS and commercial enzymes without synthesizing reference peptides. The protein sample is treated with trypsin plus Asp-N, trypsin plus PIMT, trypsin plus paenidase, and the resulting peptides are applied to LC-MS. Because Asp-N hydrolyzes peptide bonds on the N-terminus of only $L\alpha$ -Asp residues, it differentiates peptides containing $L\alpha$ -Asp from those containing the other three isomers. Similarly, PIMT recognizes only peptides containing $L\beta$ -Asp residues, and paenidase internally cleaves the C-terminus $D\alpha$ -Asp residues. This approach successfully applied to the analysis of all tryptic peptides in aged lens. The comprehensive quantitative data of Asp isomer formation in age-related proteins obtained via this method might be used as biomarkers of age-related disease.

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17号

発行日 平成27年12月1日
発行者 秋田県総合食品研究センター
報告書編集委員会
〒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】

