

ISSN 2185-6699

秋田県総合食品研究センター報告

第 18 号

平成 28 年 (2016 年)

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

No. 18, 2016

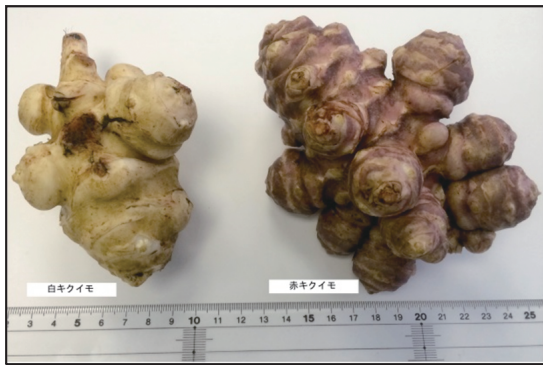


- 1 仕込蔵梁(はり)の上の神棚より採取
- 2 サンプルング用具

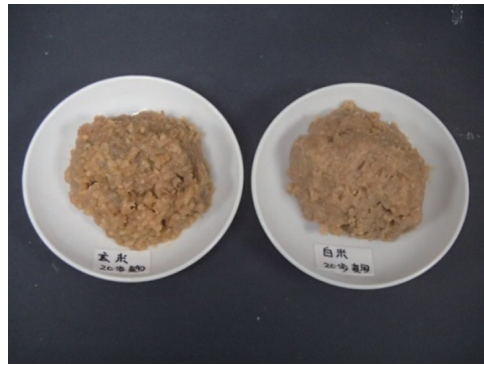
秋田蔵付分離酵母シリーズ純米酒の商品化
大野 剛、他 Vol.18 1-8 (2016)



清酒のビン内気相とビンの色が熟成に与える影響について
渡邊誠衛、他 Vol.18 9-16 (2016)



キクイモ熱水抽出液のフルクトース含有糖質
戸松 誠 Vol.18 17-20 (2016)



配合の異なる玄米麴味噌の評価
渡辺隆幸、他 Vol.18 21-24 (2016)



じゅんさい未利用部の高度利用化
畠 恵司 Vol.18 25-30 (2016)

目 次

1. 原著論文（報文）

- 1) 秋田蔵付分離酵母シリーズ純米酒の商品化 1
○大野 剛、渡邊誠衛、上原智美、高橋 仁

- 2) 清酒のビン内気相とビンの色が熟成に与える影響について 9
○渡邊誠衛、大野 剛、小林忠彦、佐渡高智

2. 原著論文（研究ノート）

- 1) キクイモ熱水抽出液のフルクトース含有糖質 17
○戸松 誠

- 2) 配合の異なる玄米麴味噌の評価 21
○渡辺隆幸、佐々木康子、尾張かおる、高橋 仁

3. 総説

- 1) じゅんさい未利用部の高度利用化 25
○畠 恵司

4. 特許の概要（2件） 31

5. 学会発表概要（26件） 33

6. 外部発表論文概要（11件） 51

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) 秋田蔵付分離酵母シリーズ純米酒の商品化 1
○大野 剛、渡邊誠衛、上原智美、高橋 仁

- 2) 清酒のビン内気相とビンの色が熟成に与える影響について 8
○渡邊誠衛、大野 剛、小林忠彦、佐渡高智

秋田蔵付分離酵母シリーズ純米酒の商品化

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

Tsuyoshi OHNO, Seiei WATANABE, Tomomi UEHARA,
and Hitoshi TAKAHASHI

【要約】

県内酒蔵から醸造に適した「蔵付き」微生物を分離選抜し、酒蔵の個性・特徴を具現化した商品群を開発した。選抜した原株は分離元の酒蔵でのみ使用する専用菌株とし商品の明確な差別化を図った。これにより、各酒蔵の個性と物語性を持つ多様な商品群「秋田蔵付分離酵母」純米酒シリーズの開発、商品展開が短期間に全県的に実現した。平成 22 年度に先行調査として県酒造組合と共同研究を行い、効率的な分離方法を確立、スムーズな分離選抜を実施した。多くの酒蔵では神棚や古い歴史のある場所から蔵付き酵母が選抜でき、平成 25 年度までには 25 社でその「蔵付分離酵母」を使用した現場仕込を実施した。秋田県秋田うまいもの販売課などと連携し、平成 24 年度は 4 番、25 年度は 13 番、26 年度は 25 番までの「秋田蔵付分離酵母」純米酒シリーズの商品化を規模を拡大しながら実施した。国民文化祭や JR 観光キャンペーンのイベントにも取り上げられ、県内蔵元の知名度向上や清酒の販売促進に貢献した。

【緒言】

県内では古来酒造業が栄え老舗の酒蔵が多い^{1)、2)}。それらの酒蔵には「蔵付き」微生物が住み付き、各酒蔵が醸造する清酒の特徴の一因となっている。優れたもろみから酵母を分離し、優良酵母を選抜した例は多く、本県でもきょうかい 6 号酵母³⁾や秋田流・花酵母 AK-1⁴⁾が活用されている。これらを活用した商品開発を行いたいという業界のニーズに応じ、分離選抜を行い、25 社で「秋田蔵付分離酵母」を使用した商品開発が実施された。これはそれぞれの酒蔵でのみ使用できる酵母で製造されたオンリーワン商品であり、様々な特徴を有する清酒を同一のプロモーションで発表できるほか、歴史的背景などの蔵元自体への興味も深めていただけた。一部蔵元では鑑評会の出品酒に使用するなど蔵の主流の酵母として活用している。本報では「秋田蔵付分離酵母」の分離選抜と秋田蔵付分離酵母シリーズ純米酒の商品化について報告する。

【実験方法】

1. 分離選抜試験

1) 清酒製造場からの酵母の分離

各製造場の環境から酵母の分離を試みた。エルメックス社 ST-25PBS を使用して、拭き取り法により実施した。分離が困難であった製造場については、後日再サンプリングも実施し、県内全製造場からの分離に努めた。

サンプルは採取後、速やかに適量を平板培地に塗布し、培養後の平板培地から酵母様微生物株（以下分離株）を釣菌した。

標準的な方法として、サンプルを攪拌後、約 400 μ l 相当を 2%アガー含有麴エキス Be' 6.5 平板培地に塗布、30°C で 24 時間から 72 時間培養し、目視により外観が酵母様であるコロニーを釣菌した。分離が困難であったサンプルについては、麴エキス Be' 6.5 に植菌し、発酵によるガスの発生が認められるまで 30°C で集積培養を実施した後、同様の作業を行った。バクテリア、糸状菌が優勢なサンプルについては、クロラムフェニコール 200ppm 添加の麴エキス培地、4%アルコール含有麴エキス培地等を適宜使用した^{5)、6)}。釣菌した分離株はアイソレーションにより純化した。

2) 一次選抜 アルコール生産性試験

秋田流・花酵母 AK-1 を対照とし、麴エキス Be' 6.5 に分離株を 1 白金耳植菌し、30°C、2 日間培養後のアルコール度を測定した。測定はガスクロマトグラフィ (HITACHI G-5000) によった。同時に培養後の外観観察、官能試験を実施した。

3) 二次選抜 モデル発酵試験

アルコール脱水麴を用いた培地でのモデル発酵試験を行った⁷⁾。

日本酒度は所定法、アルコール度については簡易法（アルコメイト）、酸度、アミノ酸度試料 1ml を用いた所定法⁸⁾ に準じた簡易法、香気成分はヘッドスペース法⁹⁾ と担当者 2 名の官能試験によった。

4) 仕込試験（白米 1 kg）

麴エキスにて 30°C、3 日間培養した酵母培養液を酒母とし、常法どおり三段仕込とした。仕込配合は以下の通り（表 1）¹⁰⁾。

使用白米は精米歩合 55%の秋田酒こまちを用い、総米は白米使用量を 1 kg とした。原料処理等は純米吟醸酒製造に準じた。対照酵母は秋田流・花酵母 AK-1 とこまち酵母¹¹⁾ とした。もろみ温度は留 7°C、最高品温 10°C（7 日目）到達後維持とした。清酒の製成は遠心分離にて行い、製成は、以下の①から④のいずれかへの該当により実施した。①日本酒度 ± 0 に達する。②日本酒度が戻る傾向を示す。③もろみ香気の変化する兆候がある。④もろみ日数 41 日に達する。

もろみ分析についてはモデル発酵試験の分析に使用した各簡易法で分析した。製成酒の一般分析は所定法⁸⁾ に従った。香気成分はガスクロマトグラフィーを用いたヘッドスペース法⁹⁾ にて測定した。官能試験は職員 4 名で実施した。

表 1 仕込試験（白米 1 kg）仕込配合

仕込配合 (グラム)	仕込区分				
	酒母	初添	仲添	留添	計
総米	—	233	307	460	1000
蒸米	—	153	253	387	793
麴米	—	80	54	73	207
汲水	—	300	420	680	1400

2. 商品化の検討

発酵試験（1 kg）により得られたもろみ経過と製成酒の分析結果、官能試験結果、分離株の分離場所などの情報をもとに、当センター職員と各製造場の担当者による評価を行い、実用化に耐えられる株であるかを決定した。最終的な株の選択は製造場が行った。製造場が実用に耐えられる株と判断した場合は共同研究契約を結び、共同研究により実用化の道筋がついた蔵元について、選抜された酵母が「永遠の眠りから覚めた順番」として蔵元に対する通し番号を付与した。この酵母は当該製造場の専用菌株とし、他者には譲渡しないこと、当センターに対し当該株の研究用途での権利を認めること等について確認し、菌株の提供を行った。また分離選抜した各蔵元の専用酵母群を「秋田蔵付分離酵母」と呼称することとした。

秋田蔵付分離酵母シリーズ純米酒の商品化では、酵母の特徴をわかりやすくするため、純米酒かつ一回火入れを製造条件とした。

食品製造上の安全性の確認のため、当該株の 18S rDNA の解析を行った。100℃5 分間煮沸した酵母懸濁液をテンプレート DNA とし、ポリメラーゼに Takara EX-taq[®] を使用、Takara PCR Thermal cycler Dice により増幅を行った¹⁾²⁾。増幅断片のシーケンシングと相同検索を実施し、*Saccharomyces cerevisiae* と相同であることを確認した。増幅断片の解析については秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに依頼した。

【実験結果と考察】

1. 分離選抜試験

1) 清酒製造場からの酵母の分離

平成 22 年度に県内で最も長い歴史を持つ（株）飛良泉本舗の蔵内 20 カ所のサンプリングを行い、酵母分離可能性が高い箇所を検討した。その結果、仕込蔵設置の神棚や伝統的酒造用器具などからの分離確率が高いことが確認されたため、各製造場の神棚等を中心に 3 箇所からサンプリングを行った（写真 1、2）。

平成 22 年から平成 26 年 3 月の事業終了までに、秋田県酒造組合会員の清酒製造場 35 場から 800 検体のサンプリングを実施し、1600 株を分離した。

2) 一次選抜 アルコール生産性試験

培養後の外観に膜生産がなく、官能試験により清酒として異常な香味のない株のうち、対照株の秋田流・花酵母 AK-1 と同等の 4.0%以上のアルコール生産性を示した株 810 株を二次選抜にすすめた。



写真1 サンプルング用具



写真2 仕込蔵梁（はり）の上の神棚より採取

3) 二次選抜 モデル発酵試験

発酵経過や一般成分分析、官能試験の結果から、全国で実用化されている 5 種類の酵母と比較して香気のタイプが異なる多様な酵母が取得できた。このうち総合的に清酒製造に適すると判断された株 29 製造場 350 株を選抜した（表 2）（図 1）。

表 2 モデル発酵液成分値

	アルコール (%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度	カプロン酸 エチル (ppm)	酢酸 イソamil (ppm)	酢酸 エチル (ppm)	イソamil アルコール (ppm)	プロパノール (ppm)	イソブタノール (ppm)
最高値	19.2	-0.5	5.0	2.1	7.8	40.2	399	157	184	71
最小値	11.8	-49.5	2.7	1.2	0.0	2.7	55	78	40	27
平均値	16.6	-16.4	3.5	1.7	1.3	13.6	150	118	92	49
標準偏差	1.6	11.2	0.5	0.2	1.4	7.1	55	13.5	24.8	9.7
きょうかい6号	18.1	7.6	2.6	1.1	1.3	22.6	176	147	80	64
きょうかい901号	17.0	8.0	2.7	1.0	1.2	29.5	244	142	73	81
AK-1	18.3	11.0	2.5	1.0	1.7	31.6	234	160	100	63
こまち酵母	17.0	-4.1	2.4	1.1	5.7	34.4	157	172	108	18
きょうかい1801号	18.0	1.5	2.4	1.2	8.8	19.8	180	111	115	40

4) 仕込試験（白米 1 kg）

選抜した 350 株について各製造場毎に精査し、各製造場上限 4 点としてさらに選抜し、発酵試験（白米 1 kg）にすすめた。製造場毎に可能な限り多様なタイプを選択するよう留意した。発酵力が旺盛で辛口傾向、発酵が穏やかで甘口傾向など様々な特徴を持った製成酒となった。酸度、アミノ酸度は高めの酒が多く、味わいのあるタイプの株が多かった（図 2）。

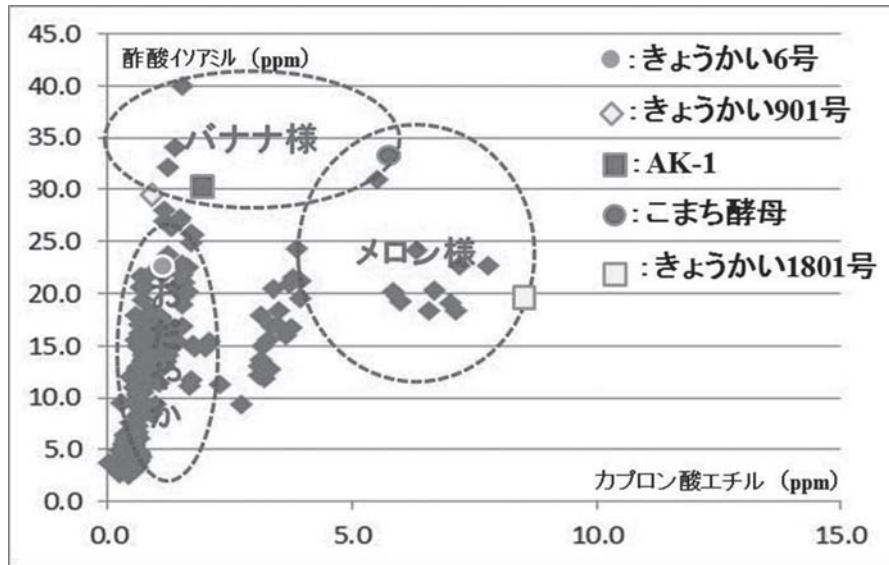


図1 モデル発酵液香気成分散布図

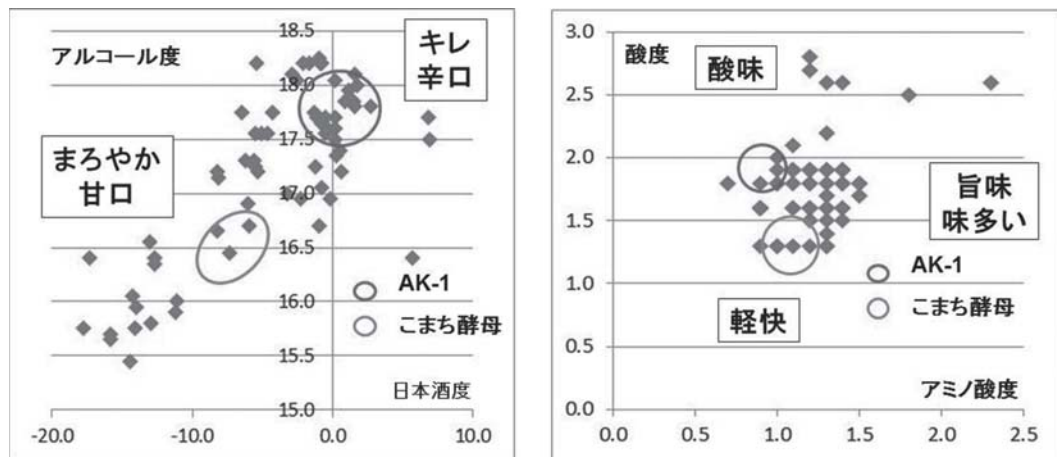


図2 仕込試験（白米 1 kg）製成酒成分散布図

香気成分や味わいのマップを作成し、従来酵母との比較を行った結果、現在実用化されている酵母とは異なった香味の特徴を有する株もあり、多様な酵母を取得できた。もろみの発酵経過や一般成分分析、官能試験の結果から、蔵元への提示株を選抜した。（個別データ 表示せず）

2. 商品化の検討と販売促進事業

仕込試験（白米 1 kg）を実施した株の分離元である 29 製造場に対し、製成酒と分析結果を提示した結果、平成 23 年度には 5 製造場、平成 24 年度には 13 製造場、平成 25 年度には 25 製造場での「秋田蔵付分離酵母」を用いた製造が実施された。実用化に進んだ各菌株については遺伝子解析を行い、*Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA と当該株の増幅断片が全領域で 100% マッチであることを確認しており、*Saccharomyces cerevisiae* と同定、食品製造上の安全性を確認した。

これら様々な酵母で醸されたバラエティに富んだ酒質を持つ商品群の販売促進を同じイベント内で一括して行うため、蔵元名よりも大きく通し番号をラベルに記した「番号ラベル」酒を企画し、「秋田蔵付分離酵母」純米酒シリーズとして主として720ml瓶で商品化した（写真3）。

本研究と同時期に実施された JR 東日本の観光キャンペーンおよび国民文化祭とタイアップしての販売促進イベントを各蔵元、秋田うまいもの販売課、(株)秋田県酒類卸、JR 東日本などと連携し、実施した。

○第一弾 期間：平成24年10月から12月

4 製造場参加。地域観光、地元の食とともに。各蔵元の地元で限定販売。

○第二弾 期間：平成25年10月から12月

13 製造場参加。観光客向け。県内料飲店、宿泊施設に優先配分。

○第三弾 期間：平成26年10月から12月

25 製造場参加。国民文化祭にあわせ実施。全種類飲み比べイベント開催。

○その他事業

秋田の新幹線で飲む秋田の酒販売促進事業（JR 協力事業）

新幹線内での瓶入り酒類の提供は例が少ない。

○秋田蔵付分離酵母のそのほかの活用

「番号ラベル」酒以外の展開は各社で自由とした。

複数の製造場において主たる酵母のうちの一つとして活用されているほか、蔵元の周年記念酒の醸造やそれぞれの特徴あるアイテム製造に用いられている。

平成27BY番号ラベルを除く関連商品：12 製造場 16 アイテム

（平成28年10月調べ）

生まれも育ちも秋田です。純米酒シリーズ：(株)秋田県酒類卸

秋田にしかない味わいと秋田にしかない色彩を：秋田うまいもの販売課

商標登録「秋田蔵付分離酵母」[®] 登録番号 5671179 （写真4）

【謝辞】

本事業にご協力いただきました、JR 東日本株式会社、(株)秋田県酒類卸、秋田県酒造組合、秋田県秋田うまいもの販売課の方々に感謝申し上げます。遺伝子解析に協力いただきました秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに御礼申し上げます。

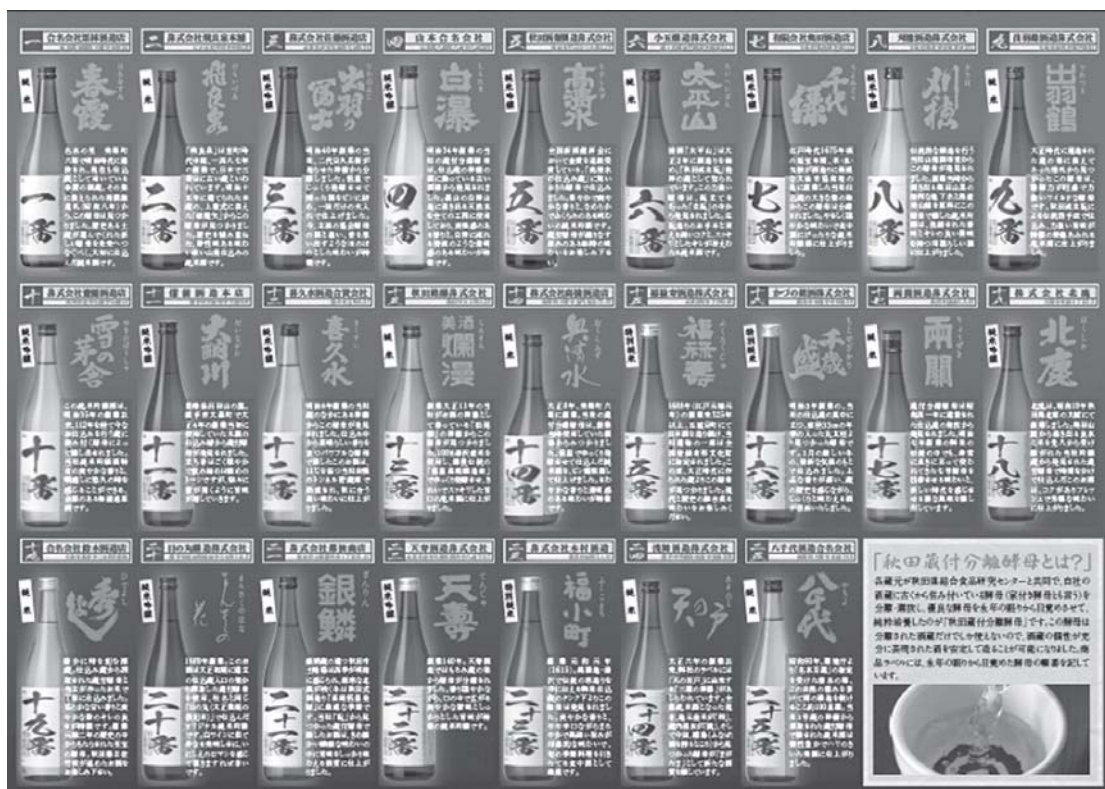


写真3 純米酒シリーズパンフレット：美の国あきたネット より



写真4 「秋田蔵付分離酵母」® デザイン登録

【引用文献】

- 1) 秋田県酒造組合編：秋田県酒造史
- 2) 秋田県酒造協同組合編：美酒王国秋田 あきたの蔵元
- 3) 小穴富司雄、本多紀元、原田保一、横沢義雄（1937）酵母比較清酒醸造試験 日本醸造協会誌 32, 2-11.
- 4) 齋藤久一、渡辺誠衛、田口隆信、高橋仁（1996）「きょうかい酵母清酒用第15号（秋田流・花酵母）」 日本醸造協会誌 91, 616-618.
- 5) 柏木 享（2002）桜の花から分離した酵母による清酒の商品化 日本醸造協会誌 97, 2-6.

- 6) 松田義弘、工藤普平、小関敏彦、上木厚子、上木勝司 (2005) 分子系統解析を用いたサクランボ果実からの香気生産 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株の分離 日本醸造協会誌 **100**, 199-208.
- 7) 齋藤久一、渡辺誠衛、田口隆信、高橋仁、中田健美、岩野君夫、石川雄章 (1992) アルコール脱水麴を用いる培地による優良酵母の分離とその性状 日本醸造協会誌 **87**, 915-921.
- 8) 注解編集委員会編：第4回改定国税庁所定分析法注解 p7-33, 日本醸造協会
- 9) 吉沢叔 (1973) Head Space 法による清酒香気成分の迅速測定法 日本醸造協会誌 **68**, 59-61.
- 10) 渡辺誠衛、田口隆信、高橋仁、大野剛、杉本勇人 (2008) 色素培地を用いた交雑法による吟醸酒用酵母の育種 秋田県総合食品研究所報告 **10**, 1-8.
- 11) 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.
- 12) Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 329-337.

清酒のビン内気相とビンの色が熟成に与える 影響について

渡邊誠衛、大野 剛、小林忠彦^{*}、佐渡高智^{**}

(秋田県総合食品研究センター 酒類グループ

^{*}秋田醸造株式会社、^{**}秋田清酒株式会社)

Seiei WATANABE, Tsuyoshi OHNO, Tadahiko KOBAYASHI,
and Takanori SADO

【要約】

我々は、清酒の品質保持と様々な要因との関係を検討している。本報では、ビン内の気相と熟成との関連を検討した結果、清酒への二酸化炭素置換または窒素置換が、貯蔵中のオフフレーバーの発生抑制効果があることが分かった。また、ビンの色と熟成との関連を検討した結果、遮光環境下においても水色のビンにオフフレーバー（硫化物臭、脂肪酸臭等）が強く発生し、銅と高い正の相関があり、添加試験でも再現性が確認できた。

【諸言】

近年、清酒製造について酵母や麹菌などの微生物や原料米の開発がめざましく進んできた。1980年代以降の吟醸酒ブームを受けて、高エステル生産性酵母が開発され、きょうかい酵母、各都道府県の酵母や、企業独自の多くの酵母が実用化されて、香りの面で色々な個性を持った清酒を楽しむことができるようになってきた。原料米についても、都道府県や企業独自で開発し、味の面でも個性豊かになり、これらの微生物や原料の特性をクリアに表現した吟醸酒・純米酒が増えてきている。

清酒は適熟を過ぎると、色の増加や老香などの香りの変化、味の重さや雑味が発生してくる。主な要因としては、時間の経過に伴い、温度や光、酸素などがあり、特に酸素と酒質との関係の研究は、ビールをはじめとして多くの報告がある¹⁻⁴⁾。

一方、近年、商品の多様化に伴い、様々な形状のビンや、カラフルな色のビンが増えており消費者の購買意欲に一役かっている。我々は、ビンの色の違いによって清酒の熟成のスピードが異なることを経験的に実感しているが、研究報告の多くは、ビンの色の違いによって日光や蛍光灯などの光の透過力が異なり、それによって酒質に与える影響に関する内容である⁵⁻⁷⁾。

我々は、清酒のビン内の気相と熟成の関係と、ビンの色と熟成の関係を検討し、新たな知見を得たので報告する。

【実験方法】

1. 市販酒のビン内空間の酸素濃度

初めに、市販清酒のビン内の酸素濃度を調査する目的で、秋田県産市販酒 27 点を店頭から購入し、ビン内空間の酸素濃度を調べた。具体的には、清酒を恒温水槽で 20℃にし、開栓直後に理研計器(株)製のポータブル酸素モニター 0X-07TypeA を用いて測定した。

2. ビン内の気相が清酒の熟度に与える影響

ビン内の空間の気相の違いが、貯蔵中の清酒の熟度に影響するかどうかを検討した。火入済みの純米吟醸酒を 180ml ビンに 150ml 入れ、二酸化炭素または窒素を約 15 秒間バブリングし、王冠で完全に密栓した試料を作成した。光の影響を受けずに熟成スピードを速めるため、遮光環境下で 45℃、50 日間の熟成加速試験を行った。

未処理と、二酸化炭素または窒素をバブリングした 3 種類について、王冠を開封直後に酸素濃度と溶存酸素を測定した。ビン内のヘッドスペースの酸素濃度は前記同様に、また、清酒中の液体の溶存酸素は、メトラー・トレド社製の Seven2Go™ を用いて測定した。

また、熟成加速後の清酒について、当センターと秋田県分析研究会の会員の計 10 名による官能試験と、熟成に関連する項目の着色度⁸⁾、3-デオキシグルコソン (3-DG)⁹⁾、遊離脂肪酸¹⁰⁾ および香気成分¹¹⁾ を測定した。

3. ビンの色を変えた清酒の熟成加速試験

ビンの色と清酒の熟成の関係を明らかにする目的で、色の違う 720ml 用の 10 種類のビン (①透明クリアビン、②透明フロストビン、③水色クリアビン、④青色クリアビン、⑤緑色クリアビン、⑥緑色フロストビン、⑦茶色クリアビン、⑧茶色フロストビン、⑨黒色クリアビン、⑩黒色フロストビン) に、市販の火入済みの純米吟醸酒を入れ、遮光した環境で 45℃で約 50 日間の熟成加速試験を行った。熟成加速後の試料について、前記同様に官能試験と熟成に係る項目を分析した。

また、ビンの色を構成している金属に着目し、熟成加速試験後の試料について、アジレントテクノロジー社製のマイクロ波原子発光分析装置 4200-MP-AES を用いて、バリウム、ナトリウム、クロム、銅、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉛、アルミニウム、カドミウム、コバルト、鉄の 12 成分を測定し、官能試験のオフフレーバーとの関連性を検証した。

4. 金属添加試験

ビンの色とオフフレーバーとの関連から、ビン色を構成している金属の関与が疑われた。そこで、関連する主な金属を清酒に添加して、オフフレーバー発生との関係を検討した。具体的には、火入済みの純米大吟醸酒に、銅、アルミニウム、鉄、マンガンを追加し、現場を想定して 5℃で 77 日間貯蔵後、官能試験によりオフフレーバーの発生を検証した。金属は、原子吸光分析用の 1000ppm の標準液を調整して、銅とアルミニウムは 200ppb、鉄とマンガンは 400ppb を添加した。

【結果と考察】

1. 市販酒のビン内空間の酸素濃度

店頭から購入した秋田県産市販酒 27 点のビン内空間の酸素濃度を測定した結果を図 1 に示した。ビン内空間の酸素濃度は、10.0%から 20.4%と大きな幅があることが分かった。これらの試料についても酸素濃度と品質の関係を明らかにする目的で官能試験と、熟成に関連する項目の着色度、3-デオキシグルコソン、遊離脂肪酸および香气成分を測定したが、酸素濃度との間に有意な差はなかった。理由として、27 種類の市販酒は、原料や製造工程や貯蔵条件など多くの要因が異なっていて、単にビン内空間の酸素濃度だけでは酒質との関係の説明がつかないためと考えられた。

一方、本実験で使用したポータブル酸素モニターは、安全管理の簡易な機器ではあるが、ビン内空間の酸素濃度を簡易に測定することができ商品の出荷時の製品管理にも応用可能と思われた。

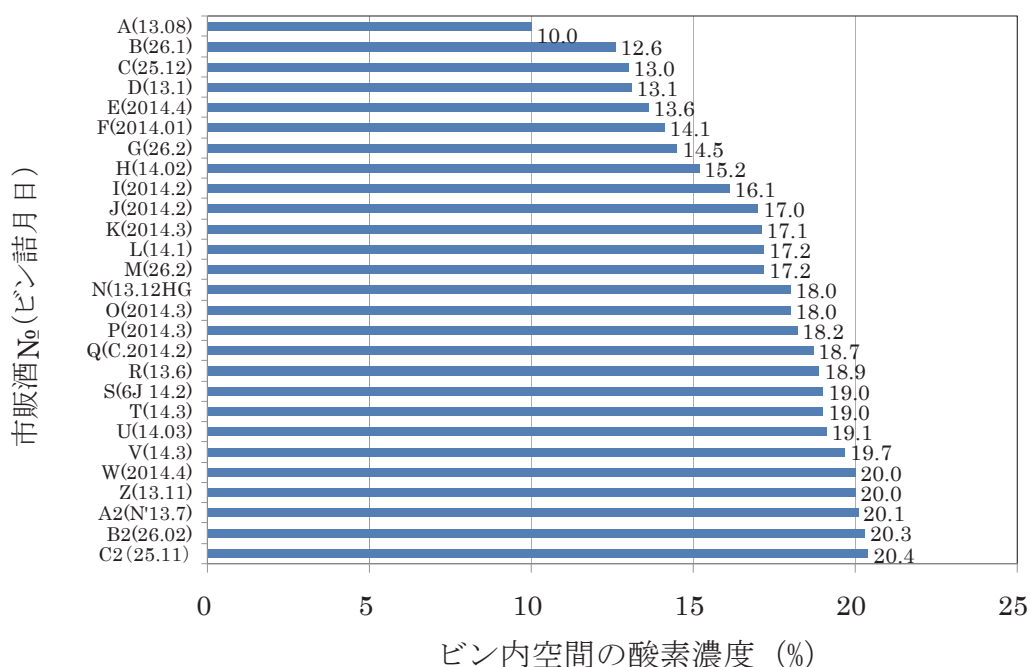


図 1 市販清酒のビン内空間の酸素濃度

2. ビン内の気相が酒質に与える影響

(1) 官能試験結果

未処理の清酒、二酸化炭素置換、窒素置換の 3 種類の清酒について、熟成加速後の官能試験の結果を図 2 に示した。未処理の清酒に比べ、二酸化炭素置換と窒素置換の清酒は、品質評価とオフフレーバーの強弱に明らかに違いがあった。いずれも、未処理に比べ、二酸化炭素置換と窒素置換の清酒は品質の評価が高く、オフフレーバーの発生にも抑制効果が認められた。

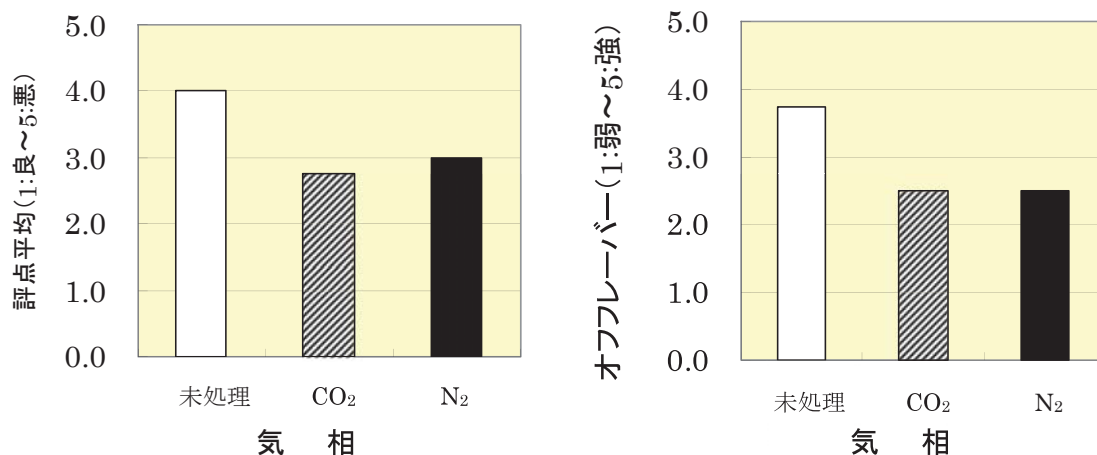


図2 熟成加速清酒の官能試験結果

(2) 酸素濃度と溶存酸素濃度

官能試験と酸素濃度や溶存酸素との関係を明らかにする目的で、未処理の清酒、二酸化炭素置換、窒素置換の3種類の清酒について、熟成加速後のビン内空間の酸素濃度と、清酒中の溶存酸素を測定した結果を図3に示した。

未処理に比べ、二酸化炭素置換と窒素置換の清酒は、ビン内空間の酸素濃度と溶存酸素の濃度が低く、品質とオフフレーバーの発生には酸素濃度と溶存酸素量が大きく関係していることが確認された。

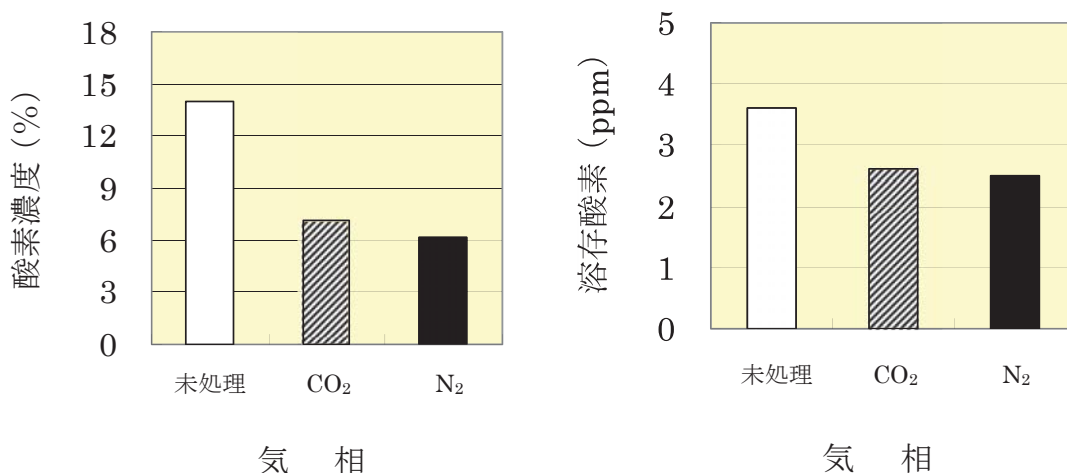


図3 ビン内空間の酸素濃度と清酒の溶存酸素量

熟成に関係する成分として熟成加速後の3試料について比較した結果、着色度には差異はなかったが、未処理に比べ二酸化炭素置換と窒素置換した清酒は、3-DGと遊離脂肪酸が増加傾向、香気成分の酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルのエステル類の減少傾向が確認された。

溶存酸素低減による清酒の品質保持を目的とした研究は、ビール業界を含め古くから精力的に行われてきた。宝酒造(株)では、清酒の溶存酸素低減による品質保持に関

する研究を勢力的に行っており、清酒には、最適溶存酸素濃度があることや、ビンの色と熟成との関係も報告している¹⁻⁴⁾。白鶴酒造(株)は、発酵中の溶存酸素濃度をオンラインで制御する技術を開発している¹²⁾。本結果もそれらの研究の裏付けになった。

清酒醸造では、上槽した清酒が商品になるまで酸素に触れる多くの工程があるが、空気への接触を可能な限り短時間で少なくすることが、商品の品質維持に重要であることが再確認された。

3. ビンの色が酒質に与える影響

遮光環境下で 10 種類の色の違うビンに入れた熟成後の清酒の官能試験の結果を図 4 に示した。ビンの色の違いと熟成によるオフフレーバーの強弱に大きな差異があった。オフフレーバーの発生は濃い色のビンほど弱くなる傾向が認められたが、水色のビンはオフフレーバーが特異的に強く、硫化物臭、脂肪酸臭、漬物臭、老香といった指摘を受けた。ビンの色の違いと酒質との関係は、光の波長と透過性に依存している報告が多いが⁵⁾、遮光環境で行った報告はなく、本実験は、3 回の確認試験でもほぼ同様な結果を得ており極めて興味深いと考える。

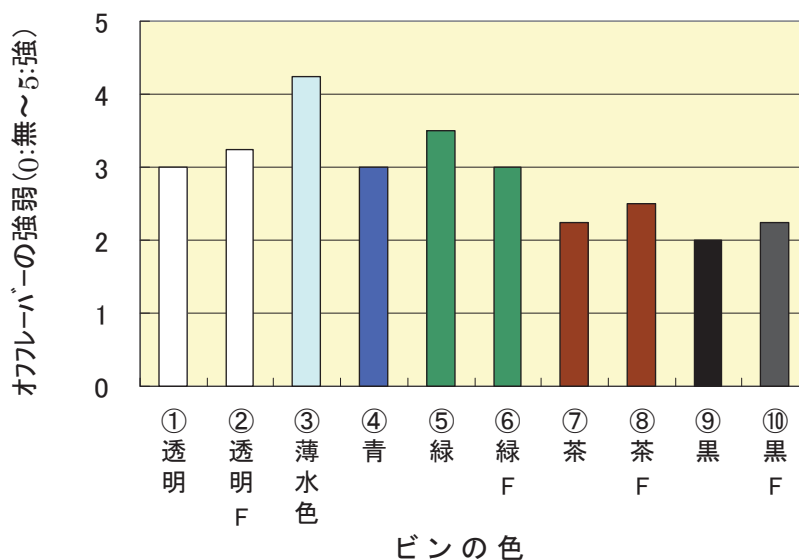


図 4 ビンの色と熟成加速酒の官能試験結果

4. 熟成加速酒の金属類の分析

我々は、熟成中に発生するオフフレーバーがビンの色を構成する金属に関連性があると推察し、熟成加速後の清酒について金属 12 成分を測定した。表 1 には測定値、図 5 には 12 成分の合計を透明ビンとの差を示した。

金属 12 成分の合計では、透明ビンに比べ、ビンの色が黒くなるにつれて増加傾向が確認された。

オフフレーバーの強弱と 12 成分の金属の関係について相関分析を行った結果を表

2に示した。その結果、オフフレーバーの強さと銅の間には、相関係数が0.814と1%水準で有意性があり、高い正の相関が確認された。図6に示したように、水色のビンの銅の量が最も多く、清酒のオフフレーバーの一要因になっていると推察された。

ガラスビンの着色には、①金属イオン、②非金属イオン、③金属コロイドによる3種類の方法があり、①の金属イオンが一般的で、ガラスの原料に主として金属酸化物（硫化物や塩化物の場合もあり）を加えて色をつけるといわれている。主な例として、青色はコバルト銅、緑色はクロムが一般的で、クロム・鉄・銅、茶色は鉄と硫黄（還元剤として炭素と一緒に使う）、黒色は、濃い色を出すマンガン、クロム、ニッケル、コバルト、鉄、銅などのさまざまな着色剤を混ぜ合わせるといわれている。本結果で確認されたビン色毎の成分は、これらを裏付けるものであり、水色や青のビンから溶出された銅が何らかの作用で、老香、過熟、漬物臭、獣様臭のオフフレーバーを発生させたと考える。

他の熟成に関係する成分では、着色度、3-DG、遊離脂肪酸、香氣成分にいずれも差異は認められなかった。

表1 ビンの色の違いと熟成酒の金属成分

	(ppm)											
	Ba	Na	Cr	Cu	K	Mg	Mn	Pb	Al	Cd	Co	Fe
①透明	0.00	9.88	0.03	0.06	17.60	8.76	1.79	0.24	0.07	0.10	0.08	0.06
②透明F	0.00	9.67	0.03	0.06	18.08	8.87	1.79	0.30	0.07	0.07	0.11	0.08
③水色	0.00	9.16	0.03	0.12	18.33	8.86	1.74	0.30	0.08	0.05	0.11	0.06
④青色	0.00	10.19	0.03	0.08	18.14	8.92	1.82	0.30	0.07	0.05	0.12	0.08
⑤緑色	0.00	10.03	0.03	0.07	18.19	8.84	1.82	0.31	0.06	0.05	0.13	0.06
⑥緑色F	0.01	10.66	0.03	0.07	17.57	8.85	1.83	0.30	0.06	0.04	0.12	0.08
⑦茶色	0.00	10.35	0.03	0.07	17.57	8.95	1.85	0.30	0.10	0.03	0.13	0.09
⑧茶色F	0.00	10.30	0.03	0.06	18.27	9.10	1.85	0.30	0.10	0.02	0.12	0.08
⑨黒色	0.01	10.61	0.04	0.05	17.82	9.20	1.88	0.28	0.11	0.02	0.11	0.07
⑩黒色F	0.00	10.20	0.03	0.04	17.79	9.30	1.88	0.28	0.07	0.02	0.10	0.08

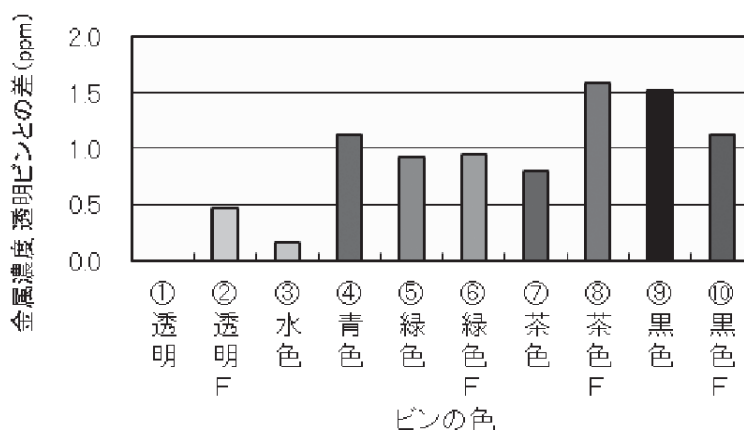


図5 熟成酒の全金属量（透明ビンとの差）

表2 オフフレーバーと金属の相関分析

Ba	Na	Cr	Cu	K	Mg	Mn	Pb	Al	Cd	Co	Fe	オフフレーバー	評価	
	0.563	0.699	-0.204	-0.305	0.389	0.391	-0.053	0.528	-0.444	0.060	0.009	-0.421	-0.338	Ba
		0.436	-0.682	-0.541	0.433	0.867	0.105	0.274	-0.561	0.355	0.512	-0.797	-0.721	Na
			-0.400	-0.095	0.490	0.492	-0.038	0.530	-0.443	0.053	-0.237	-0.437	-0.444	Cr
				0.513	-0.551	-0.820	0.309	-0.127	0.280	0.160	-0.481	0.814	0.738	Cu
					-0.020	-0.416	0.473	0.039	-0.035	0.120	-0.280	0.534	0.602	K
						0.761	-0.043	0.553	-0.791	-0.023	0.385	-0.708	-0.586	Mg
							0.022	0.403	-0.729	0.237	0.564	-0.920	-0.843	Mn
								-0.067	-0.461	0.892	0.232	0.233	0.247	Pb
									-0.562	0.117	0.174	-0.561	-0.544	Al
										-0.555	-0.449	0.569	0.477	Cd
											0.354	-0.047	-0.094	Co
												-0.604	-0.519	Fe
													0.954	オフフレーバー

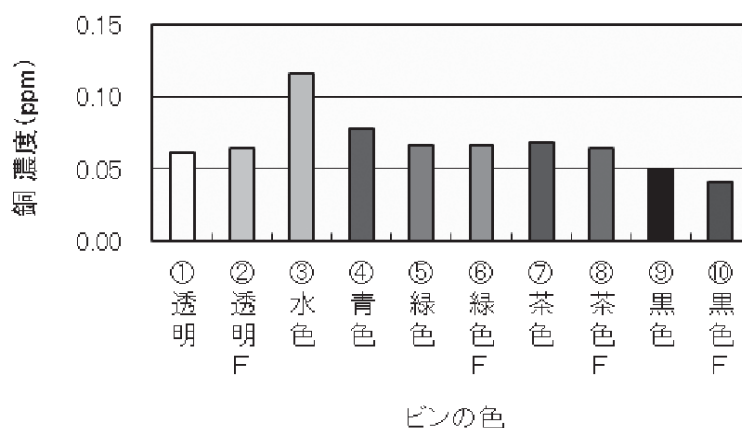


図6 熟成酒の銅濃度

5. 熟成加速酒の金属類の分析

オフフレーバーと金属の関係を確認する目的で、主な4種類の金属（銅、アルミニウム、鉄、マンガン）を添加後、5°Cで77日間貯蔵酒を官能試験によりオフフレーバーの強弱を図7に示した。

銅添加酒で硫化物臭・脂肪酸臭の強いオフフレーバーが指摘された。本結果は、前記の水色ビンで溶出された銅とオフフレーバー発生との関係を裏付けるものとなった。今後は、オフフレーバーの成分を測定すると共に、清酒の熟成に及ぼす銅の影響について詳細に検討する必要がある。

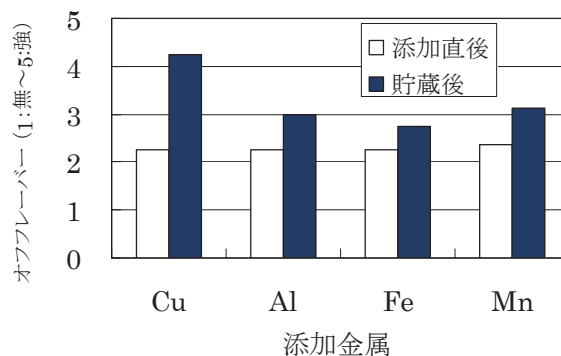


図7 金属添加貯蔵酒の官能結果

【まとめ】

- (1) 秋田県産市販酒 27 点のビン内空間の酸素濃度を測定した結果、ビン内空間の酸素濃度は、10.0%から 20.4%と大きな幅があることが分かった。
- (2) 清酒への二酸化炭素置換と窒素置換は、貯蔵中のオフフレーバー発生抑制効果があることが分かった。
- (3) ビンの色と遮光環境下の貯蔵酒のオフフレーバーの発生を検討した結果、水色のビンにオフフレーバー（硫化物臭、脂肪酸臭等）が強く発生し、銅と高い正の相関があり、添加試験でも再現性が確認できた。

【引用文献】

- 1) 岡本匡史、山内徹、矢野駿太郎、黒瀬直孝、川北貞夫、高橋康次郎、中村輝也（1999） 溶存酸素低減による清酒の品質保持（第1報） 日本醸造協会誌 **94**, 827-832.
- 2) 小川慶治、山中寿城、岡本匡史、黒瀬直孝、川北貞夫、高橋康次郎、中村輝也（2001） 溶存酸素低減による清酒の品質保持（第2報） 日本醸造協会誌 **96**, 719-725.
- 3) 小泉亜希子、山中寿城、岡本匡史、平井信行、黒瀬直孝、小川慶治、川北貞夫、垂水彰二、高橋康次郎（2003） 溶存酸素低減による清酒の品質保持（第3報） 日本醸造協会誌 **98**, 125-131.
- 4) 岡本匡史、山内徹、川北貞夫（2002） 溶存酸素低減による清酒の品質保持 日本醸造協会誌 **97**, 172-177.
- 5) 佐藤信（1973） 清酒の色 化学と生物 **11**, 398-402.
- 6) 中村欽一（1971） 清酒の日光着色 日本醸造協会誌 **66**, 13-17.
- 7) 中村欽一、蓼沼誠、茂木宏茂、浜地正昭、佐藤信（1970） 光線および貯蔵による清酒の変化に関する研究 日本醸造協会誌 **65**, 153-158.
- 8) 注解編集委員会編（1973） 第四回改定国税庁所定分析法注解 p27, 日本醸造協会
- 9) 岩野君夫、衣山陽三、中村伝市、大町得蔵、河地元彦（1970） 清酒の出荷管理に関する研究（第2報） **65**, 63-65.
- 10) 栗林喬、金桶光起、渡邊健一（2012） 酵素法による清酒の遊離脂肪酸の定量 **107**, 624-631.
- 11) 吉沢淑（1973） Head space 法による清酒香気成分の迅速定量法 日本醸造協会誌 **68** (1), 59-61.
- 12) 永井英雄（2003） 清酒醸造における溶存酸素の影響 清酒酵母の研究 90年代の研究 p138-143, 日本醸造協会.

キクイモ熱水抽出液のフルクトース含有糖質

戸松 誠

(秋田県総合食品研究センター 食品開発グループ)

Makoto TOMATSU

【緒言】

キク科のキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) 塊茎には、非消化性の多糖類で腸内細菌が利用できる水溶性食物繊維であるイヌリンが多く含まれ、イヌリンには高トリグリセリド血症に経口摂取での有効性が示唆されている¹⁾。また、俗に「血糖値の急激な上昇を防ぐ」、「コレステロールを下げる」などとも言われている。イヌリンは、フルクトース (Fru) が $\beta 2 \rightarrow 1$ 結合で直鎖状に重合した分子量3,000~5,000の貯蔵多糖類で、還元末端にはグルコース (Glc) が結合している²⁾。イヌリンの鎖長は植物種や植物のライフサイクルによって異なる広い分布性があり、鎖長の異なるものの集合体となっている。工業的にシュクロース (Suc) にカビ由来の糖加水分解酵素であるフラクトシルトランスフェラーゼを作用させて生産されたフラクトオリゴ糖 (SucにFruが1~3個結合) は、おなかの調子を整える機能が表示できる特定保健用食品の成分となっている。フラクトオリゴ糖の甘味度はSucの約30~60%で、低う触・難消化性であり、さらに高脂血症改善やビフィズス菌選択資化性による腸内菌叢改善や便秘改善などが報告されている³⁾。

本研究では秋田県産キクイモの熱水抽出液中には鎖長の短いFru含有糖質が多量に含まれていること、さらに加工処理によるこれらの糖の増減等について明らかにした。

【実験方法】

1) 試料

キクイモ塊茎は、有限会社栄物産 (秋田県北秋田市) から提供されたもの (2015年12月採取) のうち、根皮の色が紅紫色をした系統 (赤キクイモ)、および白色の系統 (白キクイモ) を水で洗浄後、厚さ約5mmにスライスし、凍結乾燥 (東京理化工機 FDU-1110) した。キクイモのペースト、およびペーストのレトルト処理品は、同社の赤キクイモを原料として株式会社マルイシ食品小坂工場で製造したものを使用し、凍結乾燥した。キクイモ粉末は、同じく赤キクイモを原料に栄物産で製造した商品名「生き生き笑顔茶 赤キクイモ」を使用した。いぶりは、赤キクイモを原料に秋田県内のいぶり大根製造業者に製造委託したものをを用いた。水分量はハロゲン水分計 (OHAUS MB35) で測定し、乾燥物重量を求めた。イヌリン標品 (Inulin from chicory) はSigma-Aldrichから、1-ケストース、およびニストースは和光純薬工業から購入した。

2) 熱水抽出液の調製

凍結乾燥試料20mgに超純水10ml添加し、85°Cで1時間加熱抽出し、放冷後、3,000rpmで5min遠心分離した上清を0.45 μ mフィルター濾過した。

3) 糖質の定量

糖の分析は、イオンクロマトグラフ（Dionex DX500）を用い、以下の条件で行った。標品として Glc、Fru、Suc、1-kestose、ニストースのピークエリアから検量線を作成し、各糖を定量した。

カラム：CarboPac PA1 (4 × 250 mm)

移動相：A = H₂O

B = 0.1 M NaOH

C = 0.1 M NaOH/0.5 M CH₃COONa

グラジエント：0–15 min = A90–20%, B10–80%, C0%

15–60 min = A20%, B80–0%, C0–80%

60–65 min = A20%, B0%, C80%

65–80 min = A90%, B10%, C0%

流速：1 ml/min

検出器：Pulsed electrochemical detector (PED)

インジェクト量：25 μl

4) Fru 含有糖質の定量

2) で調製した可溶性炭水化物 0.1 ml に 0.3 N 過塩素酸 0.9 ml を加え、80°C で 20 分間加熱分解し、放冷後、生成した Glc、Fru、Suc を 3) の条件で定量した。酸分解で生じた Glc と Fru の和から、分解した Suc の量を減じたものを求める以下の式で算出した。また、糖重合度 DP は Prosky と Hoebregs の方法に準じた⁴⁾。

$$\text{Fru 含有糖質} = [(\text{Glc}_a - \text{Glc}_b) + (\text{Fru}_a - \text{Fru}_b) - (\text{Suc}_b - \text{Suc}_a)] \times f$$

f : 0.9 (Glc から無水 Glc への補正係数)

a : 4) で求めた酸分解後の糖

b : 3) で求めた酸分解前の糖

$$\text{DP} = (\text{Fru}_a - \text{Fru}_b) / (\text{Glc}_a - \text{Glc}_b) + 1$$

【結果と考察】

標品の酸分解前後の糖分析クロマトグラムを図 1 に示した。酸分解前は DP=15 (RT 46.32 min) を最大に鎖長の長いピークがほとんどを占めていたが、酸分解によってこれらは全て分解されて Glc と Fru のみとなり、本法でイヌリンを含めた Fru 含有糖質の定量ができることを確認した。

一方、図 2 に示したとおり、酸分解前のキクイモ試料は DP=3 の 1-kestose のピークが最も大きく、次いで DP=4 のニストース、以下、順次鎖長が増すにつれてピーク面積は減少していた。また、酸分解で生じた Glc と Fru の比率を比較すると標品に比べ Glc の比率が高いことがわかった。こ

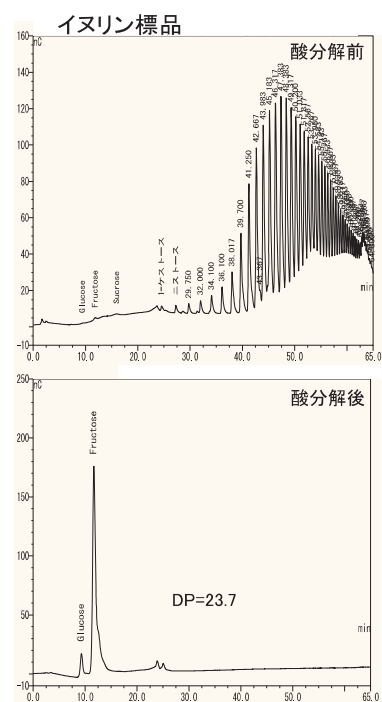


図1 標品の糖分析クロマトグラム

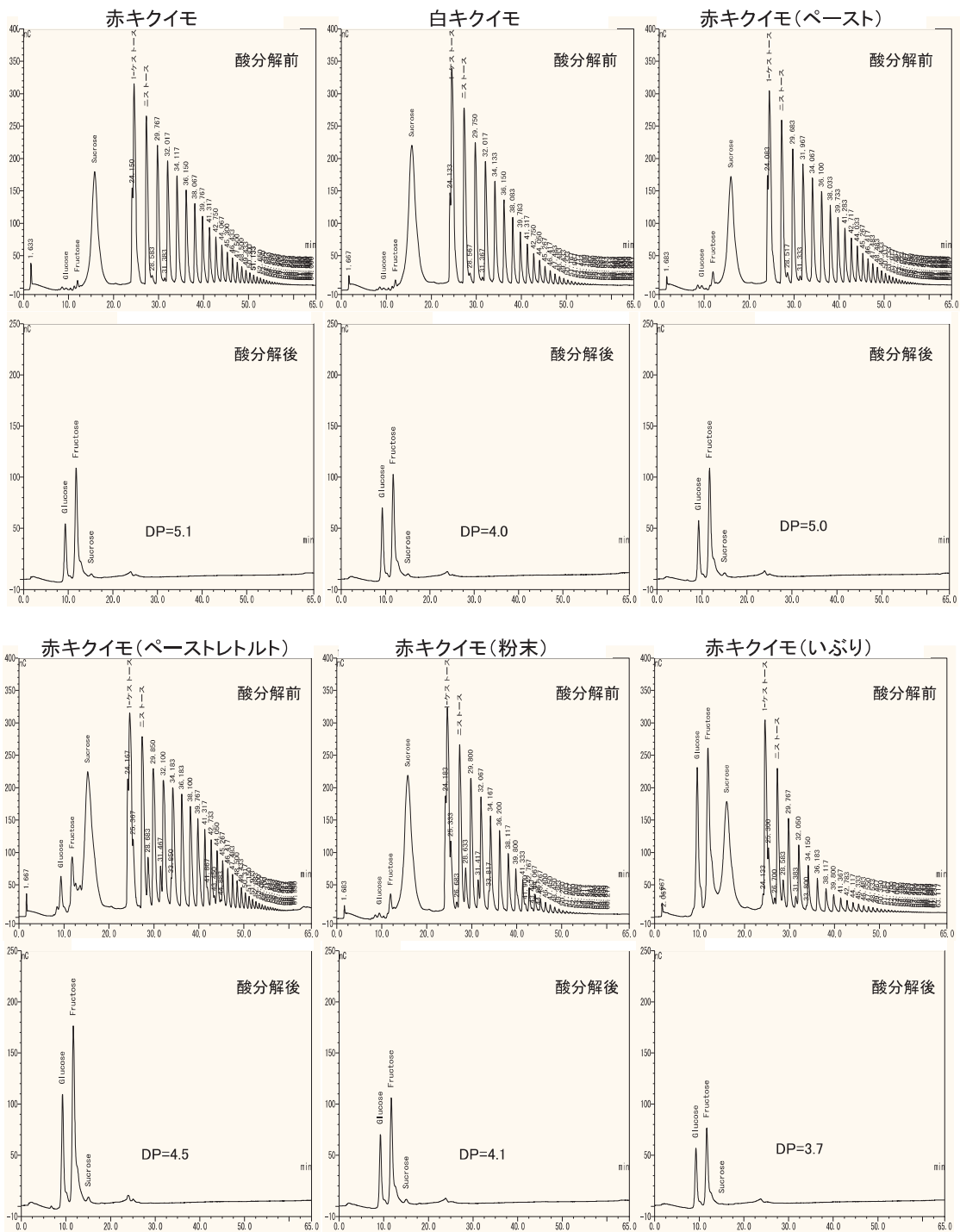


図2 各試料の糖分析クロマトグラム

これは、キウイモ試料中のイヌリン DP 値はイヌリン標品に比べ、著しく小さいためであると考えられる。以上より、キウイモ熱水抽出液の Fru 含有糖質は、1-kestose、nystose 等のフラクトオリゴ糖を主成分とする Fru 含有糖質であることが示された。

Kocsisk らは、オーストリアで栽培したキウイモの可溶性炭水化物と DP 値を調べ、可溶性炭水化物は早生品種で乾物あたり 60~68%、晩生品種では 56~64%、DP 値はいずれの品種でも 13~18 であったと報告している⁵⁾。今回の結果は乾燥重量あたりのイヌリン含量が 47~55%であり、Kocsisk らと近い値であったが、DP 値は 4~5 と大きく異なるものであった。

これについては、品種、栽培条件、収穫後の状態等、検討すべき点が多くある。

また、キクイモの加工処理によって乾燥重量あたりの Fru 含有糖質量は変化した(表1)。ペーストのレトルト処理では73.6%(=40.8/55.4)に、いぶり加工では50.9%(=28.1/55.2)に減少した。レトルト処理では加熱処理による熱分解、いぶり処理ではキクイモ中に残存したイヌリナーゼおよび、いぶり工程での化学反応や漬け込み時の微生物により減少したと考えられる。特に赤キクイモと赤キクイモ(いぶり)を比較すると、いぶりによってニーストースよりも鎖長の長い糖の減少、および Glc と Fru の増加が顕著であり(図2)、呈味性が向上したことがうかがえた。今後は、フラクトオリゴ糖やイヌリンの機能として知られている血糖値上昇抑制効果等について検討していく予定である。

表1 キクイモ熱水抽出液の Fru 含有糖質量

	水分(%)* ¹	Wet* ²	Dry* ²
赤キクイモ	81.5	10.2	55.2
白キクイモ	81.0	9.0	47.3
赤キクイモ(ペースト)	79.5	11.4	55.4
赤キクイモ(ペーストレトルト処理)	76.6	9.5	40.8
赤キクイモ(粉末)	3.5	49.2	51.0
赤キクイモ(いぶり)	48.4	14.4	28.1

*¹:凍結乾燥前

*²:湿重量(Wet)および乾燥重量(Dry)100gあたりの重量 g

【謝辞】

糖分析をご協力いただいた須藤あさみ氏に感謝いたします。また、討議・助言をいただいた当センター熊谷昌則博士、秋田県農業経済課副主幹 高橋喜代孝氏に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 国立健康・栄養研究所情報センター健康食品情報研究室運用サイト (2016)
(<http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail565.html>)、「健康食品」の素材情報データベース「イヌリン」
- 2) 今堀和友、山川民夫監修 (1984) 生化学辞典 p146, 東京化学同人、東京.
- 3) 日高秀昌、栄田利章、足立堯、斉藤安弘 (1987) フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開発 本農芸化学会誌 **61**, 915-923.
- 4) Prosky L, Hoebregs H (1999) Methods to determine food inulin and oligofructose. *J. Nutr.*, **129**, 1418-1423.
- 5) Kocsis L, Liebhard P, Praznik W (2007) Effect of seasonal changes on content and profile of soluble carbohydrates in tubers of different varieties of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *J. Agricul. Food Chem.*, **55**, 9401-9408.

配合の異なる玄米麴味噌の評価

渡辺隆幸、佐々木康子、尾張かおる、高橋仁
(秋田県総合食品研究センター 応用微生物グループ)
Takayuki WATANABE, Kouko SASAKI, Kaoru OWARI
and Hitoshi TAKAHASHI

【緒言】

前報¹⁾において我々は99%精米を用いた麴は、中性および酸性プロテアーゼ活性が高く、この麴を用いた味噌は総アミノ酸量とフェルラ酸量が増え、ラジカル捕捉活性が高いことを報告した。また検討した22点の種麴の中でAOK139やWS61の生育が良く、99%精米の製麴に適していることを認めている。

今回は、より製造現場で活用しやすい技術知見を得るため、玄米に対して種麴AOK139を用いて製麴し、麴歩合の異なる味噌を製造して官能評価を実施した。

【実験方法】

製麴：原料米は秋田県産あきたこまちの玄米または白米10kg、種麴は株式会社秋田今野商店製AOK139、3.5gを用いて麴蓋法により製麴した。原料米の処理は洗米時に研ぐように5分間洗い一夜浸漬後、水切りを1時間してから、こしきで60分間蒸し、放冷により品温が40℃になった時点で種付けして34℃恒温庫に引き込んだ。20時間後に麴蓋に盛り込み、30℃恒温庫に入れ、以後手入れを行いながら、製麴し、引き込み後40時間出麴とした。

味噌：製麴した麴と中国産大豆を用い、麴歩合10歩もしくは20歩の配合により、食塩濃度11%として仕込み後30℃で30日経過後に切り返しを行い、その後20℃で3ヶ月間熟成した。

麴および味噌の分析は前報¹⁾と同様に行った。

【結果と考察】

前報¹⁾で報告したとおり、玄米を製麴することは困難であるが、今回、玄米を研ぐように洗い、さらに玄米の製麴に適した種麴AOK139を用いることにより、製麴が可能となった。

製麴した麴の酵素力価を表1に示した。

対照（白米麴）に比べると玄米麴はプロテアーゼの活性が高い一方、糖化力、 α アミラーゼ活性は低かった。セルラーゼ、キシラナーゼの活性に大きな差は認められなかった。

表1 麴の酵素力価

(u/g)

	AP	NP	糖化力	α -アミラーゼ	セルラーゼ	キシラナーゼ
白米麴	475	479	5.90	56.43	1.75	3.60
玄米麴	797	674	2.90	50.34	1.90	3.84

AP：酸性プロテアーゼ、NP:中性プロテアーゼ

味噌熟成終了時の色（表2）では明るさ（Y%）の差は認められなかったが、x（赤み）とy（黄色み）は玄米麴味噌の方が対照よりも大きかった。またラジカル捕捉活性（図1）も玄米麴味噌の方が強かった。

表2 味噌の色とpH

10歩麴	Y%	x	y	pH
玄米	12.71	0.4636	0.4130	5.16
白米	12.20	0.4583	0.4067	5.31
20歩麴	Y%	x	y	pH
玄米	14.19	0.4622	0.4186	5.29
白米	14.67	0.4529	0.4097	5.27

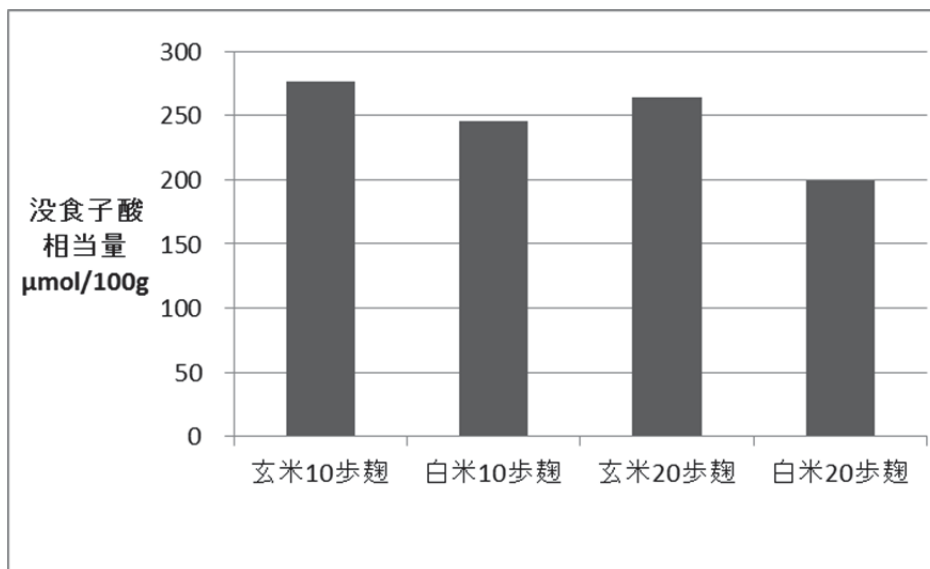


図1 味噌のラジカル捕捉活性

味噌の遊離アミノ酸総量の比較では玄米麴味噌が対照よりも10歩麴で1.3倍、20歩麴でも1.2倍多いことが認められた。うま味アミノ酸であるグルタミン酸やアルギ

ニン、アスパラギン酸、ロイシンなども麴歩合にかかわらず玄米麴味噌の方が 1.3 倍以上多かった。有機酸では特にリンゴ酸量が多いことが認められた。

表3 味噌のアミノ酸と有機酸

mg/100g	玄米10歩麴 (a)	白米10歩麴 (b)	a/b	玄米20歩麴 (c)	白米20歩麴 (d)	c/d
Asp	282	200	1.4	230	166	1.4
Thr	116	82	1.4	89	66	1.4
Ser	178	130	1.4	89	105	0.9
Asn	0	8	0.0	0	8	0.0
Glu	411	298	1.4	315	235	1.3
Gln	113	94	1.2	88	87	1.0
Gly	100	71	1.4	82	60	1.4
Ala	187	144	1.3	151	116	1.3
Cit	0	0		0	0	
Val	173	127	1.4	134	101	1.3
Cys	0	0		0	0	
Met	59	47	1.2	47	37	1.3
Cysta	12	9	1.2	0	5	0.0
Ile	179	137	1.3	130	105	1.2
Leu	291	228	1.3	215	173	1.2
Tyr	163	122	1.3	113	97	1.2
Phe	180	137	1.3	132	105	1.3
GABA	18	16	1.1	19	19	1.0
Orn	2	4	0.6	3	5	0.6
His	49	33	1.5	36	25	1.4
Lys	228	173	1.3	167	132	1.3
Trp	1	0		4	0	
Arg	304	234	1.3	226	179	1.3
Pro	196	153	1.3	160	123	1.3
合計	3243	2449	1.3	2433	1950	1.2
mg/100g	玄米10歩麴 (a)	白米10歩麴 (b)	a/b	玄米20歩麴 (c)	白米20歩麴 (d)	c/d
クエン酸	800	723	1.1	742	618	1.2
リンゴ酸	51	36	1.4	51	29	1.7
コハク酸	13	20	0.7	14	18	0.8
乳酸	0	0		0	0	
ギ酸	0	0		0	0	
酢酸	53	56	0.9	41	44	0.9
ピログルタミン酸	257	195	1.3	201	146	1.4
合計	1174	1030	1.1	1049	855	1.2

味噌の官能検査に熟練したパネルによる官能検査の結果、玄米麴味噌が色や、香り、味において高く評価された（表4）。色調が優れていたことや、アミノ酸量が多いことが影響していると考えられる。組成的には玄米の粒が残ることが特徴的で特に 20 歩麴の味噌で顕著であった。（図2）

表4 味噌の官能検査の結果

10歩麴	色	味	香り	組成	総合
玄米	2.25	2.50	2.50	2.50	2.25
白米	2.75	3.00	3.00	2.50	2.75
20歩麴	色	味	香り	組成	総合
玄米	2.00	2.50	2.25	3.00	2.25
白米	2.75	3.50	3.25	2.50	3.00

パネル4名

スコアは5点法（1：優れている、2：やや優れている、3：普通、
4：やや難あり、5：難あり）
点数が低いほど良好。

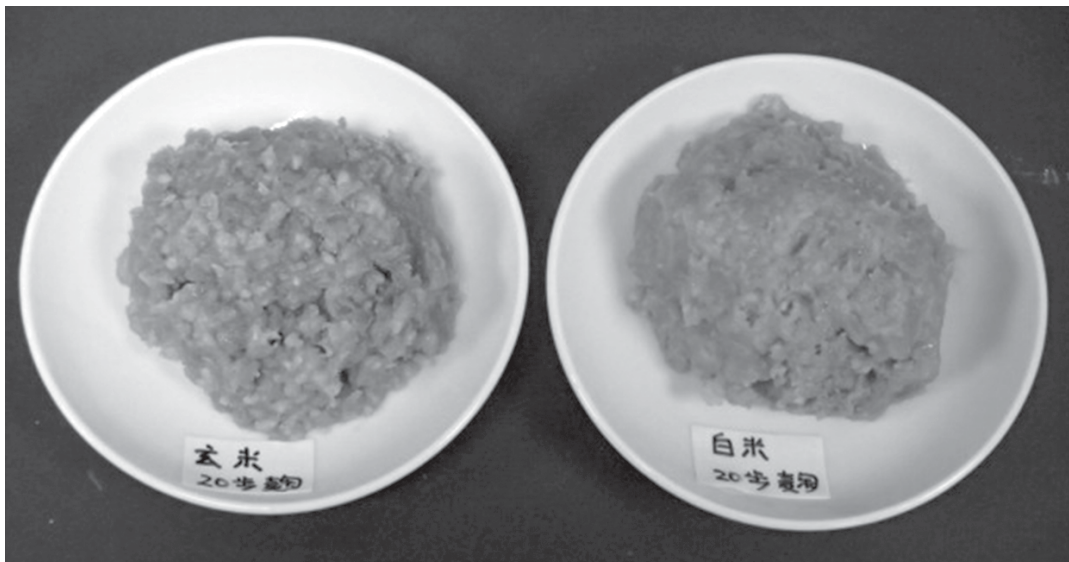


図2 20歩麴味噌の状貌
左側：玄米、右側：白米

【引用文献】

- 1) 渡辺隆幸、佐々木康子（2015） 99%精米を用いた味噌の特長 秋田県総合食品研究センター報告 17, 8-14.

3. 総説 (1 件)

- 1) じゅんさい未利用部の高度利用化・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
○畠 恵司

じゅんさい未利用部の高度利用化

畠 恵司

(秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ)

Keishi HATA

【要約】

秋田県三種町特産品である“じゅんさい”の生理機能について研究を行った。その結果、じゅんさい抽出物には、ヒト肝細胞における中性脂肪およびコレステロールの合成系を抑制し、これら血中脂質成分の過剰産生を抑制することが判明した。そこで、脂質異常症を誘発したモデル動物試験、メタボ傾向の被験者を対象としたヒト介入試験を行い、同作用を検証した結果、じゅんさい抽出物あるいはじゅんさい乾燥物には、細胞レベルでの試験同様に、内臓脂肪蓄積抑制、血液の脂質異常症マーカーレベルの改善が認められた。次にじゅんさいの生理機能性をベースにした事業化を、秋田県、三種町、三種町森岳じゅんさいの里活性化協議会、(株)Harvestechなどが中心となり検討した。その成果として、食用と競合しない未利用部（開いた葉ならびに茎の一部）を、三種町内の施設で乾燥させ（一次加工）、事業連携先であるオリザ油化(株)に供給するというビジネスモデル構築した。また、オリザ油化(株)においても、じゅんさいの生理機能性を独自に解明し、「ジュンサイエキス」の開発・上市に至った。

1. 緒言

じゅんさい (*Brasenia schreberi*) は、ハゴロモモ科（別名ジュンサイ科）の淡水に生息する多年生水生植物である。その分布は広く、東南アジア、インド、アフリカ、オーストラリア、アメリカに至る。日本では北海道から九州地方に分布するが、すでに絶滅した地域もある。別名、沼縄（ぬなわ）とも呼ばれ、古くは万葉集にも登場する。じゅんさいの一番の特徴は、茎の先端の芽（若葉）の部分や若葉の裏面を厚く覆うゼリー状のガラクトマンナンという多糖性粘液で¹⁾、この粘質層は水分の蒸散防止あるいは微生物などからの防御を担っている。

秋田県三種町は日本一の産地で、5月中旬よりお盆過ぎまで沼は一面を鮮やかな緑色の葉で覆われる。最近では、同町の重要な農水産資源であると共に、“摘み取り体験”あるいは“流しじゅんさい”などの観光資源としても脚光を浴びている。しかしながら、平成3年度をピークに年々出荷量が減少し、採取するじゅんさい農家の高齢化と共に同町における解決すべき重要課題となっている。一方、我々は平成7年開所以来、秋田県産食材の生理機能性解明の研究を行ってきた。その過程で、じゅんさいは約30%のポリフェノール（乾燥重量比）が含まれていることがわかり、他の食材と比較しても強い抗酸化能を有することを確認した。そこで、じゅんさいに焦点を当て、種々の生理機能を探索した結果、メタボ予防・改善効果があることを明らかにした。

本稿ではこれらの生理機能をもとに、「ジュンサイエキス」として上市、国内外への商品展開した経緯を概説する。

2. 脂質異常症改善機能の探索と検証

肝臓は、血中脂質を吸収し、分解・再合成する器官である。このため肝臓の脂質合成を阻害する薬剤が活発に開発され、スタチンやフィブラートはその代表として知られている。我々は㈱スカイライト・バイオテック（秋田市）と共同で、ヒト肝細胞を使用し、薬剤や食品素材の有する脂質異常症改善活性の細胞レベルで探索する方法を開発し、主に製薬企業に対する受託分析サービスを行っている（サービス名：LipoCULTURE）。本評価系において高コレステロール血症の治療薬であるスタチン系の薬剤は、コレステロールの合成を選択的に阻害するが、中性脂肪の合成系に影響を与えないことを確認している。一方、中性脂肪とコレステロール合成系の両者に有効なフィブラート系薬剤は、両者の分泌を抑制することが分かり、各種薬剤の特長を捉えた評価系であることが確認された²⁾。

LipoCULTURE を活用し、じゅんさいを含む秋田県産食材が有する脂質異常症改善活性の探索を行った。その結果、じゅんさいに肝細胞における顕著な脂質合成阻害作用が認められた。また、同時に作用メカニズムについても検討した結果、じゅんさい抽出物は、肝細胞の中性脂肪およびコレステロール合成遺伝子の発現を抑制することで、同作用を示すことがわかった³⁾。肝細胞レベルで、じゅんさいの有する脂質合成系抑制活性を確認したため、秋田県産食材の生理機能性を解明し、機能性素材としての事業化を進めることを主業務として設立された㈱Harvestech（当時秋田市、現在は本社横浜市）と以後共同研究を開始した（表 1）。

じゅんさいの脂質異常症改善作用を検証するため、脂質異常症のモデル動物試験を行った。じゅんさい抽出物を含む市販高脂肪食と、高脂肪食のみを2週間給餌したマウスの体重ならびに臓器重量測定、血液生化学分析を行った。試験期間におけるマウスの餌摂取量や、試験終了時の体重増加に対するじゅんさいの影響はなかった。内臓組織重量を測定した結果、じゅんさい抽出物を含む高脂肪食を給餌したマウスの肝臓重量ならびに腸管膜周囲脂肪重量は、高脂肪食のみを給餌した区と比較して有意に減少した。この結果より、じゅんさい抽出物が、高脂肪食給餌マウスの内臓脂肪蓄積を抑制されたものと考えられる。同時に採取した血液中の脂質プロファイルを調べた結果、肝臓から分泌される中性脂肪ならびにコレステロールが、高脂肪食のみを給餌した区と比較して減少しており、じゅんさい抽出物はマウス肝臓における脂質の再合成を抑制することが示唆された。

次に、ヒト介入試験を行い、じゅんさいの機能性を検討した。本試験では、腹囲 90cm 以上のメタボリックシンドロームの傾向がある健常男性 12 名を、じゅんさい乾燥粉末摂取群 8 名、非摂取群 4 名に分け、平行群間比較試験を実施した。じゅんさいを加熱乾燥加工した粉末を含有するサプリメントを作製し、摂取群は、1 日あたり 2.5g 粉末を 10 週間継続摂取した。評価項目として、一般的な健康診断で用いられる身長、

体重などの他に、動脈硬化罹患リスクと相関が高い、血中小型 LDL コレステロール（超悪玉コレステロール）濃度を測定した。身体検査・理学検査・血液検査・尿検査等においては、有害事象と判断されるような変化は認められず、本試験条件下における被験品の安全性が確認された。一方、じゅんさい乾燥粉末を摂取した被験者は、超悪玉コレステロールと呼ばれる小型 LDL コレステロール値の改善が認められた。超悪玉コレステロールは通常の悪玉コレステロールよりも血中滞在時間が長く、血管内皮に取りこまれて酸化変性しやすい性質を有するため、動脈硬化を引き起こしやすくなると考えられている。以上の結果より、じゅんさい乾燥物が生活習慣病の予防改善効果、抗動脈硬化機能を有する可能性が示唆された⁴⁾。

表 1 じゅんさい事業～開始から上市まで～

2010	秋田県総合食品研究センターと(株)Harvestech 間で「じゅんさい」の機能性に関する共同研究開始
2011	「じゅんさい」の機能性に関する特許出願、学会発表、学術論文発表
2012	オリザ油化(株)より「ジュンサイエキス」上市
2013	「じゅんさい」の機能性に関する特許成立
2014	「ジュンサイエキス」配合商品（サプリメント、化粧品等）が各社より販売開始
2015	「ジュンサイエキス」がハラル認証取得
2016	秋田県内企業より「ジュンサイエキス」配合商品が発売

3. オリザ油化株式会社との連携

秋田県東京事務所の仲介で、じゅんさいの機能性データに関するデータに興味があるというオリザ油化(株)（愛知県一宮市）と、2011年5月 ifia Japan（東京ビッグサイト）会場で面談した。じゅんさいの脂質異常症改善作用に関する学術論文をもとに協議した結果、市場にない素材で、且つポリフェノール高含量など、機能性素材としての訴求ポイントもしっかりしているということで、連携をすすめることとなった。

また、オリザ油化(株)ではじゅんさいの研究を独自に開始し、特に葉に高含有されるポリフェノールに着目し、成分探索を行った。これまでの研究では、カナダ産のじゅんさいから没食子酸、ケルセチンおよびケルセチン 7-O-グルコシドの単離が報告されていたが、これらに加えて、新規物質を含む 17 種類のポリフェノール化合物を単離し、構造決定を行った。この新規物質はじゅんさいという和名にちなんでジュンサイノシド A（図 1）と命名された。また、同社ではじゅんさいが有する新たな機能性も幾つか見出した⁵⁾。コラーゲンやエラスチンを分解する酵素を抑制することで、シワやたるみを抑える作用、腸内環境を整えることで、腸内悪玉菌が産生する臭気を減らす作用⁶⁾、皮下脂肪の蓄積を抑制する作用である。特に、じゅんさい抽出物を摂取した女性被験者は、この皮下脂肪蓄積の抑制作用により、ヒップ付近に生じるセルライトの改善が認められた。

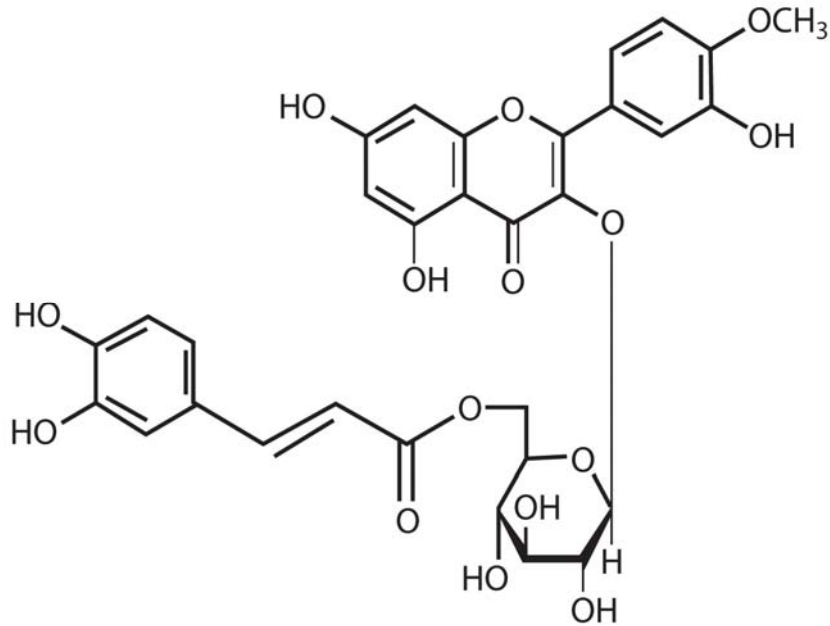


図1 ジュンサイノシド A

4. 三種町じゅんさい供給体制の構築

オリザ油化(株)と連携することで、じゅんさいの新たな展開が可能になったが、産地である三種町からじゅんさいを安定供給するためには、種々の問題を解決する必要があった。まず、可食部ではなく、7月下旬の収穫後期から開いた葉や茎を集中的に採集することで原料コストを下げた。また、じゅんさいの水分含量は95%を超えるため、非常に腐敗しやすい。そのため、大量の未利用部位を腐敗しない水分含量まで、できる限りコストをかけずに乾燥する方法が不可欠であった。そこで、三種町商工会、じゅんさいの活性化協議会の方々と共に低コストな乾燥法について検討した。具体的には、未利用部を回収、各商工会員宅で天日乾燥を行ったものについて、水分含量ならびにポリフェノール含量を測定し、どのような環境下でどのくらいの日数をかければ、一定の品質に達するかを調査した。非常に原始的な方法だが、未利用部の収穫時期が、食用じゅんさいの収穫後の7月下旬以降とせざるを得なかったことが逆に幸いし、水分含量10%未満まで乾燥することは容易であることが分かった。現在は、(有)森岳食品のハウス乾燥施設を活用し、オリザ油化(株)にじゅんさい乾燥物を出荷している。

5. オリザ油化(株)からの「ジュンサイエキス」の上市と活用商品

ユニークな生理機能が見出されたこと、供給体制が整ったことで、三種町産じゅんさい未利用部のオリザ油化(株)への出荷が始まった。2012年食品開発展(東京ビッグサイト)のオリザ油化(株)ブースで「ジュンサイエキス」(食品用途2種、化粧品用途3種)が上市された。関係者一同会してのスナップ写真を図2に示す。個人的には、嬉しさよりも安堵感が強かったことを覚えている。



図2 「ジュンサイエキス」上市

6. ハラル認証取得

ハラル（ハラール）とはイスラム法において「合法的なもの」を意味する。イスラム教徒（ムスリム）は「豚肉(豚由来の食品や添加物を含む)」「血液」「酒類」「イスラム法に則って食肉処理されていないもの」などは口にしてはならない（これらはハラームと呼ばれる）。従って、ハラル認証とはイスラム教の戒律に則って調理・製造された商品であることを証する制度を言う。オリザ油化(株)では、主に東南アジア向けの出荷を目的に、「ジュンサイエキス」（食品用途素材 2 種、化粧品用途素材 2 種）についてハラル認証を取得した。現在、マレーシアあるいはインドネシアへの同エキスが輸出され、現地での機能性食品および化粧品原料として使用されている。

7. じゅんさいの A ターン

「ジュンサイエキス」上市以来、多くの食品および化粧品の開発に活用されてきたが、秋田県内企業での商品開発はなされていなかった。2015～2016 年にかけて、AdeB カンパニー(株)（秋田市）より、美容パックおよび化粧水「Subtract」が発売された。また、(有)rets（秋田市）よりシャンプーが発売された。秋田県では、A ターンという言葉で、秋田県内への就職・定住を呼び掛けている。秋田出身の方もそれ以外の方も、秋田に来てほしいとの願いを込めて、オールターン (ALL Turn) の”A”と秋田 (Akita) の”A”とをかけた言葉である。秋田県三種町で生まれの“じゅんさい”が、愛知県一宮市で修業を積んだあと、A ターンを経て、秋田県内産業に貢献し始めた。

【引用文献】

1. 角田万里子、三崎旭 (2004) じゅんさい"多糖類の構造特性 (特集 食品における多糖類の構造と物性(3)) 食品・食品添加物研究誌 209, 298-304.
2. Itoh M., Abe Y., Iwama Y., Kimura F., Satoh M., Shoji M., Takahashi J., Toshima G.,

- Hiroki S., Hiwatashi K., Hata K. (2009) HPLC analysis of lipoproteins in culture medium of hepatoma cells: an in vitro system for screening antihyperlipidemic drugs. *Biotech. Lett.*, **31**, 953-957.
3. Takahashi J., Toshima G., Matsumoto Y., Kimura F., Kiuchi T., Hamada K., Hata K. (2011) In vitro screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells. *J. Nat. Meds.*, **65**, 670-674.
 4. 畠恵司, 木内高信, 高橋純一郎, 浜田健太郎 (2012)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～ *New Food Industry* **54**, No.4, 1-9.
 5. Shimoda H., Nakamura S., Hitoe S., Terazawa S., Tanaka J., Matsumoto T., Matsuda H. (2014) Anti-adipogenic polyphenols of water shield suppress TNF- α -induced cell damage and enhance expression of HAS2 and HAPB2 in adiponectin treated dermal fibroblasts. *Nat. Prod. Chem. Res.*, **2**: 146.
 6. 下田博司 (2012) 白キクラゲおよびジュンサイの腸内環境改善作用 (特集 腸を健康にして美長寿を目指す) *Food style 21* **18**, 76-79.

4. 特許の概要（2件）

1) 発明の名称：アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド、該ペプチドを含有する
アンジオテンシン変換酵素阻害剤、組成物及び食品、並びに、該ペプチドの製造方法

発明者：戸松誠、高橋砂織

嶋影逸、山田清繁（(株)ヤマダフーズ）

2) 発明の名称：レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤、並びにレニン阻害活性及び／又は
キマーゼ阻害活性を有する食品

発明者：葦澤悟（国際農林水産業研究センター）

高橋砂織

1) 発明の名称：アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド、該ペプチドを含有する
アンジオテンシン変換酵素阻害剤、組成物及び食品、並びに、該ペプチドの製造方法

発明者：戸松誠、高橋砂織

嶋影逸、山田清繁（(株)ヤマダフーズ）

特許番号：特許第 5799842 号

登録日：平成 27 年 9 月 4 日

【要約】

【課題】少量の摂取でアンジオテンシン変換酵素(Angiotensin Converting Enzyme、以下「ACE」と略す)を有効に阻害し、かつ副作用の心配が無く、高血圧者が日常生活の中で容易に経口摂取できる新規の ACE 阻害ペプチド、及びこれらのペプチドを含むアンジオテンシン変換酵素阻害剤、組成物及び食品、並びにその製造法を提供すること。

【解決手段】これまで知られていない新規な化学構造(アミノ酸配列)を有し、更には優れた ACE 阻害活性を有する次のペプチド 8 種を見いだした。

(1)Phe-Phe-Tyr-Tyr, (2)Trp-His-Pro, (3)Phe-Val-Pro, (4)Leu-His-Pro-Gly-Asp-Ala-Glu-Arg, (5)Ile-Ala-Val, (6)Val-Asn-Pro, (7)Leu-Glu-Pro-Pro, (8)Trp-Asn-Pro-Arg。

これらペプチドは、例えば豆乳タンパク質を加水分解することで製造できる。

2) 発明の名称：レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤、並びにレニン阻害活性及び／又は
キマーゼ阻害活性を有する食品

発明者：葦澤悟（国際農林水産業研究センター）

高橋砂織

公開番号：特開 2015-147736（特願 2014-19845）

【要約】

【特許の概要】地衣類であるスルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ由来のレニン阻害活性、キマーゼ阻害活性を提供することにある。

【解決手段】スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ、又はスルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ抽出物又はスルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ抽出物を含有するレニン阻害活性、キマーゼ阻害活性及び降圧剤。

5. 学会発表概要 (26 件)

1) 発表学会：日本生化学会東北支部 第 81 例会

発表日と場所：2015 年 5 月 9 日 (土)、東北大学片平さくらホール (仙台市)

塩題名：新規アンギオテンシン変換酵素 2 測定用蛍光消光基質の開発とその応用

発表者：○高橋砂織¹、熊谷久美子²、畠恵司¹、宮脇舞³、横田早希³、後藤猛³、
 菰澤悟⁴、杉山俊博⁵ (¹秋田県総食研、²(株)ペプチド研、³秋田大院・工資、
 ⁴国際農研、⁵秋田大院・医)

2) 発表学会：日本生化学会東北支部 第 81 例会

発表日と場所：2015 年 5 月 9 日 (土)、東北大学片平さくらホール (仙台市)

塩題名：バキュロウイルス感染昆虫細胞によるヒト型 ACE2 の細胞内外生産挙動及び
 その特性解析

発表者：○横田早希¹、宮脇舞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)

3) 発表学会：第 25 回 秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2015 年 6 月 12 日 秋田県総合食品研究センター (秋田市)

演題名：中国における機能性食品素材及び食品加工用酵素の開発

発表者：○菰澤悟 (国際農研)、程永強 (中国農業大学)、高橋砂織 (秋田県総食研)

4) 発表学会：日本光脳機能イメージング研究会 第 18 回学術集会

発表日と場所：2015 年 7 月 25 日、星陵会館 (東京都)

演題名：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

発表者：○熊谷昌則 (秋田県総食研)

5) 発表学会：日本調理科学会 平成 27 年度大会

発表日と場所：平成 27 年 8 月 24 日、静岡県立大学 (静岡市)

演題名：次世代に伝え継ぐ日本の家庭料理～秋田県の聞き書き調査結果 (第 1 報)～

発表者：○大野智子¹、山田節子¹、三森一司¹、高山裕子¹、熊谷昌則²、高橋徹²、逸見洋子³、
 駒場千佳子⁴、長沼誠子³ (¹聖霊短大、²秋田県総食研、³秋田大、⁴女子栄養大)

6) 発表学会：日本調理科学会 平成 27 年度大会

発表日と場所：平成 27 年 8 月 24 日、静岡県立大学 (静岡市)

演題名：次世代に伝え継ぐ日本の家庭料理 ～秋田県の聞き書き調査結果 (第 2 報) 地域特有の
 料理の特徴～

発表者：○高山裕子¹、山田節子¹、三森一司¹、大野智子¹、熊谷昌則²、高橋徹²、逸見洋子³、
 駒場千佳子⁴、長沼誠子³ (¹聖霊短大、²秋田県総食研、³秋田大、⁴女子栄養大)

7) 発表学会：日本食品科学工学会 第 62 回大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、京都大学 (京都市)

演題名：秋田オリジナルワカメの特徴

発表者：○大能俊久 (秋田県総食研)、中林信康 (秋田県水産振興セ)、塚本研一 (秋田県総食研)

8) 発表学会：第 65 回 東北畜産学会宮城大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、東北大学 (仙台市)

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立を目指した研究：EGAM1 ホメオタンパク質群がマウス iPS 細胞の樹

立に与える影響

発表者：○ 菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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秋田県総食研、³東北大院・農)

9) 発表学会：第 65 回 東北畜産学会宮城大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、東北大学（仙台市）

演題名：ホメオタンパク質 EGAM1N の強制発現はマウス ES 細胞の終末分化に影響する

発表者：○野中愛純¹、吉田美智子¹、菊地貴裕¹、熊谷友希¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹
(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研)

10) 発表学会：第 65 回 東北畜産学会宮城大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、東北大学（仙台市）

演題名：動物胚の受胎促進を目指した改変型 FGF4 タンパク質の開発

発表者：○熊谷友希¹、菊地貴裕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秋田県総食研)

11) 発表学会：日本生物高分子学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 9 月 10 日 香川大学（高松市）

演題名：味噌中の ACE 及び ACE2 阻害活性について

発表者：○高橋砂織、小笠原博信、渡辺隆幸（秋田県総食研）

12) 発表学会：第 108 回 日本繁殖生物学会大会

発表日と場所：2015 年 9 月 18 日、宮崎大学（宮崎市）

演題名：ホメオタンパク質 EGAM1N の強制発現がマウス ES 細胞の心筋分化に与える影響

発表者：○野中愛純¹、吉田美智子¹、菊池貴裕¹、熊谷友希¹、佐々木玲^{1,2}、小林 正之¹
(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研)

13) 発表学会：第 108 回 日本繁殖生物学会大会

発表日と場所：2015 年 9 月 18 日、宮崎大学（宮崎市）

演題名：EGAM1 ホメオタンパク質群の共発現がマウス iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響

発表者：○ 菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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、^{1,2}秋田県総食研、³東北大院・農)

14) 発表学会：第 108 回 日本繁殖生物学会大会

発表日と場所：2015 年 9 月 18 日、宮崎大学（宮崎市）

演題名：動物胚の受胎率向上を目指した遺伝子組換え FGF4 の開発：生物活性に重要な領域の同定
のための N 末端短縮型マウス FGF4 の生産

発表者：○熊谷友希¹、菊地貴裕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秋田県総食研)

15) 発表学会：生体医工学シンポジウム 2015

発表日と場所：2015 年 9 月 25 日、岡山国際交流センター（岡山市）

演題名：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

発表者：○熊谷昌則（秋田県総合食品研究センター）

16) 発表学会：日本生化学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場（神戸市）

演題名：新規アンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 基質の開発及び
大豆由来 ACE2 阻害物質の同定

発表者：○高橋砂織¹、吉矢拓²、熊谷久美子²、杉山俊博³

(¹秋田県総食研、²(株)ペプチド研、³秋田大院・医)

17) 発表学会：日本エネルギー学会 第 11 回バイオマス科学会議

発表日と場所：2016 年 1 月 20 日、新潟コンベンションセンター (新潟市)

演題名：同時糖化発酵残渣を用いた杉微粉末からの同時糖化発酵

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秋田県総食研)

18) 発表学会：第 15 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会

発表日と場所：2016 年 2 月 2 日、産業技術総合研究所 (つくば市)

演題名：大豆由来アンギオテンシン変換酵素 2 阻害物質について

講演者：○高橋砂織¹、吉矢拓²、熊谷(芳澤)久美子²、杉山俊博³

(¹秋田県総食研、²(株)ペプチド研、³秋田大院・医)

19) 発表学会：第 18 回 化学工学会学生発表会

発表日と場所：2016 年 3 月 5 日、静岡大学浜松キャンパス (浜松市)

演題名：バキュロウイルス感染 Sf9 昆虫細胞によるヒト ACE2 の生産挙動と酵素反応性

発表者：○熊谷将太¹、白取隆生¹、宮脇舞¹、横田早希¹、菫沢悟²、高橋砂織³、後藤猛¹

(¹秋田大学、²国際農研、³秋田県総食研)

20) 発表学会：化学工学会 第 81 回年会

発表日と場所：2016 年 3 月 13 日、関西大学 (吹田市)

演題名：昆虫細胞による組換えアンギオテンシン変換酵素 2 の生産と特性解析

発表者：○横田早希¹、白取隆生¹、熊谷将太¹、宮脇舞¹、菫沢悟²、戸松誠³、高橋砂織³、

後藤猛¹ (¹秋田大、²国際農研、³秋田県総食研)

21) 発表学会：日本農芸化学会 2016 年度大会

発表日と場所：2016 年 3 月 28 日、北海道大学 (札幌市)

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 (パエニダーゼ)

ホモログの構造と活性

発表者：○菫沢悟¹、高橋砂織² (¹国際農研、²秋田県総食研)

22) 発表学会：日本農芸化学会 2016 年度大会

発表日と場所：2016 年 3 月 28 日、札幌市教育文化会館大ホール他 (札幌市)

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秋田県大院・生物資源)

23) 発表学会：日本畜産学会 第 121 回大会

発表日と場所：2016 年 3 月 29 日、日本獣医生命科学大学 (武蔵野市)

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立を目指した、非ウイルスベクターによる高効率なマウス iPS 細胞樹立技術の開発

発表者：○平出美鈴¹、楠原夏生¹、菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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秋田県総食研、³東北大院・農)

24) 発表学会：日本畜産学会 第121回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：FGF4により、初期胚に含まれる胎盤前駆細胞の形成を促進する：構造と生物活性の関連

発表者：○熊谷友希¹、菊地貴裕¹、野中愛純¹、佐々木玲^{1,2}、高橋利清³、小林正之¹

(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研、³秋田畜試)

25) 発表学会：日本畜産学会 第121回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：マウス初期胚から発見したホメオタンパク質 EGAM1N は、転写因子 NANOG とヘテロ複合体を形成する

発表者：野中愛純¹、菊地貴裕¹、熊谷友希¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研)

26) 発表学会：日本畜産学会 第121回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：マウス初期胚から発見したホメオタンパク質 EGAM1C による iPS 細胞の樹立促進効果

発表者：○菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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秋田県総食研、³東北大院・農)

1) 発表学会：日本生化学会東北支部 第 81 例会

発表日と場所：2015年5月9日（土）、東北大学片平さくらホール（仙台市）

塩題名：新規アンギオテンシン変換酵素2測定用蛍光消光基質の開発とその応用

発表者：○高橋砂織¹、熊谷久美子²、畠恵司¹、宮脇舞³、横田早希³、後藤猛³、
菫澤悟⁴、杉山俊博⁵（¹秋田県総食研、²（株）ペプチド研、³秋田大院・工資、
⁴国際農研、⁵秋田大院・医）

レニンとは主に腎臓で生成され様々な刺激で血中に分泌される。血中のレニンは肝臓で生成されたアンギオテンシノーゲンに作用して10残基のアミノ酸から構成されるアンギオテンシン I (AI) を生成する。生じた AI は不活性ペプチドで、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) もしくはキマーゼにより C 末端2残基が切除され、アンギオテンシン II (AII) となり、血圧上昇を引き起こす。本研究では、ACE の相同遺伝子として見出され、多様な機能を持つアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に注目して、新規蛍光消光基質開発を目指すとともに、組換え型酵素の特性解析などに応用した。

ACE2 の作用物質探索や組換え型酵素特性解析には ACE2 特異的且つ高感度の基質開発が必須である。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 の基質特異性を考慮した構造とはなっておらず、便宜的に用いられているにすぎない。そこで、本研究では最初に ACE2 の基質開発に取り組んだ。アンギオテンシン II の ACE2 切断部位を基に、各種 Nma-Xaa-Pro-Lys (Dnp) を合成し、ACE2 による分解速度を LC-MS を用いて解析した。その結果、高感度蛍光消光基質 Nma-His- Pro-Lys (Dnp) の開発に成功した。次に、本基質を用いてバキュロウイルス・昆虫細胞発現系で発現した組換え型ヒト ACE2 の特性解析を行った。その結果、感染培養初期には膜結合型酵素が大部分を占めていたが、培養中期から後期にかけて培地中に酵素活性が見出された。この時、C 末端側に付加した His タグの分解が観察された。この事は、膜結合領域近傍がプロテアーゼによる加水分解に感受性が高い領域であることを示唆している。一方、開発した基質を用いて ACE2 阻害物質の探索を行った結果、大豆や山菜などに阻害物質の存在することを見出した。今後、本基質と組換え型 ACE2 を用いて詳細な反応動学的解析や ACE2 阻害物質の構造機能相関解析などを進める予定である。

2) 発表学会：日本生化学会東北支部 第 81 例会

発表日と場所：2015年5月9日（土）、東北大学片平さくらホール（仙台市）

塩題名：バキュロウイルス感染昆虫細胞によるヒト型 ACE2 の細胞内外生産挙動及び
その特性解析

発表者：○横田早希¹、宮脇舞¹、後藤猛¹、菫澤悟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が (RAS) 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 (AI) が活性型のアンギオテンシン II (AII) に変換され、血圧上昇を引き起こす。さらに近年、AII 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 ACE2 が見いだされた。本研究では、昆虫細胞発現系によるヒト型 (h) ACE2 の効率的な生産を目的とし、細胞内外における生産挙動の解析および

精製酵素の特性解析を行った。

【実験方法】C 末端に His タグを付加した hACE2 の cDNA を導入した組換えバキュロウイルス (vACE2) を Bac-to-Bac システムにより作製し、これを Sf9 昆虫細胞に MOI 0.1、1、10 pfu/cells で接種して、5 日間感染培養を行った。その後、培養液を培地画分と細胞画分に分け、Western blotting によって hACE2 (98 kDa) の発現を確認した。また、hACE2 の活性は蛍光消光基質 Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH (Anaspec 社製) または新たに開発した Nma-His-Pro-Lys(Dnp)-OH を用いて測定した。

【結果と考察】感染培養における hACE2 の生産挙動を、抗 His タグ抗体を用いた Western blotting により調べた結果、細胞画分では培養 2 日目以降で hACE2 のバンドが検出され、活性も認められた。一方で培地画分ではバンドが検出されないものの培養後期には高い活性が見られた。そこで抗 ACE2 抗体を用いた Western blotting を行った結果、3 日目以降では培地画分にもバンドが検出された。このことから培養後期において hACE2 は、C 末端の His タグを含む部位が加水分解され細胞外に漏出することが分かった。この細胞外漏出挙動はどの MOI 条件でも同様であり、His タグ融合 hACE2 の生産量にも大きな差は見られなかったため、hACE2 の生産には、ウイルス量が少なく、比較的培養時間の短い MOI 1 pfu/cell が適していると考えられる。さらに、Ni-アフィニティクロマトグラフィーにより高純度の hACE2 が得られ、最終的に培養量 500 ml 当たり約 1.7 mg の hACE2 が得られた。また、生産した精製 hACE2 の速度論的解析も行ったので、併せて報告する。

3) 発表学会：第 25 回 秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2015 年 6 月 12 日 秋田県総合食品研究センター (秋田市)

演題名：中国における機能性食品素材及び食品加工用酵素の開発

発表者：○葦澤悟 (国際農研)、程永強 (中国農業大学)、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。こ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。また、地域独特の発酵食品の製造に用いられる微生物には、食品加工産業上有用な酵素を生産するものが存在する可能性がある。そこで今回は、中国西部の青海省及び雲南省地域食料資源から、血圧関連酵素であるレニン、キマーゼ、ACE 阻害活性、及び ACE2 亢進活性をもつ食品を検索するとともに、発酵食品や土壌に含まれる微生物からカルボキシペプチダーゼ生産菌を取得することを目的とした。

【方法】レニン、キマーゼ、ACE 及び ACE2 活性測定は高橋らの方法 (1-5) で行った。カルボキシペプチダーゼ生産菌の検索には Nma-His-Pro-Lys(Dnp) を基質として用いた (5)。苦味強度測定はヒト官能テスト法により行った。

【結果と考察】各種食材のメタノール抽出液のレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を検索したところ、強い阻害活性を有するものが存在することが明らかになった。一方、ACE2 亢進活性については、強い活性を有するものは得られなかった。つぎに、各種発酵食品及び土壌から単離した微生物について、それぞれの培養上清のカルボキシペプチダーゼ活性を測定したところ、比較的活性の強い 6 種類の微生物を取得することに成功した。これらのうち、一部の培養上清はカゼイン

のトリプシン分解物の苦味を低減する作用を示すことが明らかとなった。

【文献】

1. Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610 (2007)
2. Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232 (2008)
3. Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407 (2011)
4. 高橋他 中央味噌研究所報告 **35**, 129-140 (2014)
5. Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.*, *in press* (2015)

4) 発表学会：日本脳機能イメージング研究会 第18回学術集会

発表日と場所：2015年7月25日、星陵会館（東京都）

演題名：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

発表者：○熊谷昌則（秋田県総食研）

【目的】本研究は、脳機能賦活に係わる各種刺激を探索するために、NIRS脳血流変化量を指標とした新規の評価系を構築することを目的としている。今回は、 α -ピネンによる匂い刺激が、ワーキングメモリに与える影響を評価するための手法について検討した。 α -ピネンは、松などの樹木や、ミョウガ、春菊などに含まれるモノテルペン的一种で、リラックス効果などが知られている。

【方法】本研究は、当センター倫理委員会の承認と、参加者の同意を得て実施された。協力を求めた参加者は、健常成人の男性5名、女性2名(20-23歳)で、全員右利きであることを確認した。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)を用いた前頭葉賦活課題を2種類(空間性ならびに言語性ワーキングメモリ課題)課し、このとき α -ピネンを匂い刺激として負荷した。それぞれの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 ETG-4000(日立メディコ)を用いて測定(22Ch)し、酸素化ヘモグロビン(Oxy-Hb)信号と脱酸素化ヘモグロビン(Deoxy-Hb)信号について、それぞれの変化量を加算平均して参加者ごとの平均波形とした。

【結果】前頭葉賦活課題である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。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、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)に着目して解析した。その結果、例えば、参加者Aの右背側部ではOxy-Hbの上昇とDeoxy-Hbの低下が認められ(空間性課題遂行時)、 α -ピネン刺激の負荷によりOxy-Hbの減少が認められた。これらの動態は、参加者一様ではなかったものの、 α -ピネン刺激により脳血流は低下する傾向にあった。現在、空間性課題と言語性課題の違いによる脳血流変化量の局在性や α -ピネン刺激負荷による影響について解析を進めており、本手法が脳機能を賦活させるための刺激探索法として適用可能かどうか検討中である。本研究の一部は科研費(25350174)の助成を受けて実施された。

5) 発表学会：日本調理科学会 平成27年度大会

発表日と場所：平成27年8月24日、静岡県立大学（静岡市）

演題名：次世代に伝え継ぐ日本の家庭料理～秋田県の聞き書き調査結果（第1報）～

発表者：○大野智子¹、山田節子¹、三森一司¹、高山裕子¹、熊谷昌則²、高橋徹²、逸見洋子³、
駒場千佳子⁴、長沼誠子³

(¹聖霊短大、²秋田県総食研、³秋田大、⁴女子栄養大)

日本調理科学会特別研究平成 24～25 年度『次世代に伝え継ぐ 日本の家庭料理』の聞き書き調査を通して、秋田県における次世代に伝えるべき家庭料理を析出すると共に、その地域特性を明らかにすることを目的とした。調査地域は、行政区分に準じた鹿角、北秋田、山本、秋田、由利、仙北、平鹿、雄勝の 8 地域とし、昭和 35～45 年頃までに郷土料理として定着した次世代に伝え継ぎたい家庭料理の聞き書き調査を実施した。聞き書きにより得られた料理は 110 であった。全地域において挙げられた料理は、日常食の山菜料理、かやき料理であった。漁業が盛んな山本地域では、「しょつつる」や「えご」等、魚や海藻を主とした料理が並んだ。雄勝地域では、年神に供えた鏡餅を夏季まで保存し、長寿を祈願して 6 月 1 日に食べる「凍み餅（歯固め餅）」がハレ食とされていた。また、秋田の象徴とも言える「いぶりがっこ」、「ふかしなす漬け」等の発酵食が日常食に挙げられた。

6) 発表学会：日本調理科学会 平成 27 年度大会

発表日と場所：平成 27 年 8 月 24 日、静岡県立大学（静岡市）

演題名：次世代に伝え継ぐ日本の家庭料理 ～秋田県の聞き書き調査結果（第 2 報）地域特有の料理の特徴～

発表者：○高山裕子¹、山田節子¹、三森一司¹、大野智子¹、熊谷昌則²、高橋徹²、逸見洋子³、
駒場千佳子⁴、長沼誠子³

(¹聖霊短大、²秋田県総食研、³秋田大、⁴女子栄養大)

日本調理科学会特別研究平成 24～25 年度『次世代に伝え継ぐ 日本の家庭料理』の聞き書き調査を通して、秋田県における次世代に伝えるべき家庭料理を析出すると共に、その地域特性を明らかにすることを目的とした。秋田県内 8 調査地域の 110 の料理について、地域特有の料理の特徴（主材料・調理・調味法）及びその背景要因を検討した。主材料として、最も多かったのは米で、「ごはんもの」で、他にも、おやつ・お茶うけや行事食に多数出現した。全県で食されているてんこ小豆の赤飯は、県南部の甘味嗜好など、地域によって調味に違いがみられる代表的な料理であった。各地で生産された米は様々な調理・調味法が工夫され、ハレ食・日常食として、それぞれの地域で親しまれてきたことが分かる。これら地域特有の料理は、地域の気候・風土に根ざした食材と調理・加工法により生まれているため、それらの背景とともに継承していくことが必要である。

7) 発表学会：日本食品科学工学会 第 62 回大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、京都大学（京都市）

演題名：秋田オリジナルワカメの特徴

発表者：○大能俊久（秋田県総食研）、中林信康（秋田県水産振興セ）、塚本研一（秋田県総食研）

【目的】これまで秋田県では三陸を起源とするナンブ系ワカメが一般的に養殖されてきた。ナンブ系ワカメは葉部が大型であり収量が多いことがその理由である。秋田県で採れる天然ワカメは

葉部が小型ではあるものの、葉部とメカブ部が軟らかく、またメカブ部は薄くて粘りが強いという特徴が指摘されている。そこで、秋田県では秋田県産天然ワカメから従来の優良な特徴を保持したままで大型となるワカメの育成を目指して現在選抜育種を行っている。その秋田オリジナルワカメの成分における特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】秋田オリジナルワカメ、ナンブ系ワカメ、秋田県産天然ワカメ、以上3系統の葉部とメカブ部を乾燥後粉碎して試料とした。水分量は105℃で加熱乾燥して求めた。粗タンパク質量は、SUMIGRAPH NCH-21（住化分析センター製）による燃焼法で窒素量を求め、6.25を掛けて算出した。粗脂肪量はSOXTEC SYSTEM HT6（TECATOR製）を使用し、ジエチルエーテルによる加熱抽出を行って求めた。灰分は550℃で灰化したものが黒かったので、イオン交換水を加え溶解して乾燥後、550℃でさらに灰化处理して求めた。遊離アミノ酸量の測定は、8%トリクロロ酢酸溶液を加えて10℃以下で1時間抽出を行った。抽出液を遠心分離し、得られた上清に水酸化リチウム溶液を加えてpH調製した後0.45μmのフィルターでろ過してサンプル溶液とし、全自動アミノ酸分析機JLC-500/V（日本電子製）で定量した。

【結果】秋田オリジナルワカメと秋田県産天然ワカメはナンブ系ワカメに比べて粗タンパク質量が高かった。また、秋田オリジナルワカメはメカブの粗脂肪量が高かった。遊離アミノ酸は、3系統の葉、メカブともにアラニンが突出して多く、3系統の中では天然ワカメで遊離アミノ酸量が高めであった。

8) 発表学会：第65回 東北畜産学会宮城大会

発表日と場所：2015年8月28日、東北大学（仙台市）

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立を目指した研究：EGAM1 ホメオタンパク質群がマウス iPS 細胞の樹立に与える影響

発表者：○ 菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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秋田県総食研、³東北大院・農）

【目的】iPS細胞は体細胞から作出されているのにもかかわらず、ES細胞と同等な分化多能性を保持していることが証明されている。また、マウス iPS 細胞から分化誘導して作製した精子・卵子より、産仔が得られることが報告された(Hayashi *et al.*, Cell 2011; Hayashi *et al.*, Science 2012)。本研究室では優良ウシの遺伝資源を恒久的に活用するために、ウシ iPS 細胞の樹立、および精子または卵子への分化誘導方法の確立を目指している。一方、本研究室では、マウス桑実胚において発現量が増加するEGAM1 ホメオタンパク質群(EGAM1、EGAM1N、EGAM1C)を発見した。EGAM1N および EGAM1C は、ES 細胞の未分化状態を安定化することが示されている。体細胞に由来する細胞株においてEGAM1 ホメオタンパク質群を強制発現させた場合、ES 細胞の分化多能性の維持に重要な遺伝子である *Oct4*、*Nanog* または *Esrrb* の発現が誘導された。精子または卵子への分化能を持つ、高品質なウシ iPS 細胞は未だに樹立されていないが、EGAM1 ホメオタンパク質群により、高品質なウシ iPS 細胞が樹立できることを期待している。そこで本研究では、EGAM1 ホメオタンパク質群がマウス iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響について検討した。

【方法】マウス iPS 細胞の樹立に必要な遺伝子4種(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*)を同時に発現することができるマウス iPS 細胞誘導ベクターをマウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞へ遺伝子導入し、マウス iPS 細胞の誘導培養を行った。遺伝子導入の際にEGAM1 発現ベクター、EGAM1N 発現

ベクター、EGAM1C 発現ベクター、または Empty ベクターを同時に遺伝子導入した。マウス iPS 細胞の樹立培養後、幹細胞マーカーであるアルカリホスファターゼ (AP) 活性を示す細胞コロニー数を計数した。

【結果】マウス iPS 細胞の樹立の際に *Egam1c* を同時に発現させることにより、コントロールと比較して、AP 活性陽性コロニー数が 1.2 倍 ($p < 0.05$) に増加することが示された。すなわち、EGAM1C の共発現により、マウス iPS 細胞の樹立効率を向上できる可能性が示された。

9) 発表学会：第 65 回 東北畜産学会宮城大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、東北大学（仙台市）

演題名：ホメオタンパク質 EGAM1N の強制発現はマウス ES 細胞の終末分化に影響する

発表者：○野中愛純¹、吉田美智子¹、菊地貴裕¹、熊谷友希¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研)

【目的】マウスの発生過程において、最初の細胞分化は 8 細胞期から桑実期にかけて開始する。本研究室では、桑実期に発現量が増加するホメオタンパク質 EGAM1N を発見した (Saito *et al.*, Biol Reprod, 2010)。マウス ES 細胞において EGAM1N を強制発現させた場合、発生初期に出現する前駆細胞群への分化を抑制することが判明している (Sato *et al.*, J Biosci Bioeng, 2015)。一方、ES 細胞から中胚葉系列の代表的な終末分化細胞である心筋細胞を誘導できる。そこで本研究では、EGAM1N 強制発現 ES 細胞を心筋細胞へ分化誘導し、EGAM1N が ES 細胞の終末分化に及ぼす影響について検討した。

【方法および結果】EGAM1N 強制発現 ES 細胞から胚様体を作成し、接着培養して心筋細胞へ分化誘導した。このとき、拍動の有無を経時的に観察し、心筋細胞への分化能を検討した。また、接着培養した胚様体から cDNA を合成して、リアルタイム PCR により未分化マーカー遺伝子および分化マーカー遺伝子の発現量を定量した。コントロールでは、7 日目にはほぼ全ての胚様体で拍動が観察されたが、EGAM1N 強制発現 ES 細胞では拍動がほとんど観察されず、心筋細胞マーカー遺伝子の発現量は大きく減少した。この時、未分化マーカー遺伝子の発現量はコントロールと同様に減少した。よって、EGAM1N 強制発現 ES 細胞も分化したことが示された。一方、栄養外胚葉マーカー遺伝子の発現量は有意に上昇した。心筋細胞への分化を促進する転写因子 NKX2.5 タンパク質について Western blotting により検討したところ、発現量の低下が認められた。すなわち、EGAM1N の強制発現により心筋細胞への分化が抑制され、栄養外胚葉への分化が促進されたことが示された。

以上の結果より、マウス ES 細胞における EGAM1N の強制発現は、発生初期の前駆細胞群への分化だけでなく、終末分化にも影響することが示唆された。胚様体の分化誘導では、中胚葉以外の分化細胞も含まれる。それらへの分化に及ぼす影響を明らかにするために、分化マーカー遺伝子の発現について検討中である。

10) 発表学会：第 65 回 東北畜産学会宮城大会

発表日と場所：2015 年 8 月 28 日、東北大学（仙台市）

演題名：動物胚の受胎促進を目指した改変型 FGF4 タンパク質の開発

発表者：○熊谷友希¹、菊地貴裕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秋田県総食研)

【目的】 マウス胚盤胞において、内部細胞塊から分泌された線維芽細胞増殖因子 4 (FGF4) は 2 型 FGF 受容体を介して胎盤前駆細胞の形成を促進する。従って、FGF4 は胎盤形成に必要な不可欠な細胞増殖因子であることが明らかにされている。そこで本研究室では、ウシ・ブタ・ヒトなど、動物胚の受胎促進に FGF4 を応用することを考案し、生物活性を増強した FGF4 の創出を目指している。本研究ではその前段階として、哺乳動物モデルであるマウスを例として、生物活性に重要な領域を同定するために N 末端側を短縮化した改変型 FGF4 を生産した。

【方法】 改変型マウス FGF4 をコードする cDNA を大腸菌用発現ベクターに組み込み、N 末端に His タグを付加した HismFGF4 発現ベクター 3 種と、Met (開始コドン) を付加した MmFGF4 発現ベクター 3 種を構築した。FGF4 (Kuroda) は、ヒト FGF4 において活性増強が報告された N 末端側短縮体に対応する。FGF4 (コアドメイン) は、FGF4 のコアドメインのみに対応する。FGF4 (Δ Cys84) は、FGF4 分子内に存在する可能性がある S-S 結合が生物活性に重要か検討するため、Cys84 まで短縮した。大腸菌を形質転換し、改変型 FGF4 の発現を試みた。また、FGF4 のヘパリン結合性を利用し、ヘパリンカラムクロマトグラフィーにより改変型 FGF4 の精製を試みた。

【結果】 SDS-PAGE 後の CBB 染色により、HismFGF4 発現ベクター導入大腸菌において予測分子量にほぼ一致するタンパク質の発現が認められた。一方、MmFGF4 発現ベクター導入大腸菌では検出されなかった。しかし、Western blotting により、予測分子量とほぼ一致したタンパク質が検出できたが、HismFGF4 と比較してタンパク質発現量が約 8 倍少なかった。また、ヘパリンカラムクロマトグラフィーにより HismFGF4 (3 種) を精製できた。しかし、HismFGF4 (Δ Cys84) は検出するうえで他 2 種の HismFGF4 よりも 15 倍以上、長い検出時間を要した。

以上のことから、HismFGF4 (Δ Cys84) はヘパリンへの結合力が弱いことが示唆された。また、MmFGF4 タンパク質の発現量は少ないことが判明した。

11) 発表学会：日本生物高分子学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 9 月 10 日 香川大学 (高松市)

演題名：味噌中の ACE 及び ACE2 阻害活性について

発表者：○高橋砂織、小笠原博信、渡辺隆幸 (秋田県総食研)

【目的】 味噌は日本食には欠かせない調味料の一つである。これまでの研究で味噌には、ラジカル消去活性や抗変異原性などの存在が知られている。我々は、味噌の原料である大豆にレニン阻害物質を見出だし、その化合物をソヤサポニン I と同定した [1]。今回、レニン・アンギオテンシン系の中で重要な役割を持つ酵素類としてアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 及びアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に注目して、味噌由来阻害活性について検討した。

【方法】 組換え型ヒト体細胞 ACE 及び ACE2 はそれぞれ R&D Systems 社製及び Calbiochem 社製を用いた。ACE の活性測定には、Nma-Phe-His-Lys (Dnp) を用いた [2]。ACE2 活性測定用の蛍光消光基質として Nma-His-Pro-Lys (Dnp) を開発した [3]。

【結果・考察】 全国市販味噌 50 点及び秋田県産市販味噌 13 点及び大豆の種類や麹菌の種類異なる試験醸造味噌を試作し、それら抽出液中の ACE 及び ACE2 の阻害活性を検討した。その結果、味噌には普遍的に両酵素の阻害物質の存在することが明らかとなった。阻害物質の精製と構造解析についても言及する予定である。

【参考文献】1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008), 2. *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011), 2. *Biomed. Res.*, **36**, in press (2015).

【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。

12) 発表学会：第 108 回 日本繁殖生物学会大会

発表日と場所：2015 年 9 月 18 日、宮崎大学（宮崎市）

演題名：ホメオタンパク質 EGAM1N の強制発現がマウス ES 細胞の心筋分化に与える影響

発表者：野中愛純¹、吉田美智子¹、菊池貴裕¹、熊谷友希¹、佐々木玲^{1,2}、小林 正之¹

(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研)

【目的】私達はマウス初期胚及び ES 細胞において発現しているホメオタンパク質 EGAM1N を発見した (Saito *et al.*, *Biol. Reprod.*, 2010)。マウス ES 細胞において EGAM1N を強制発現させた場合、細胞分化が抑制されることが判明している (Sato *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2015)。そこで本研究では、EGAM1N 強制発現が代表的な中胚葉系列の終末分化細胞である心筋細胞への分化に及ぼす影響について明らかにするために、胚様体形成法による分化誘導を行い、心筋細胞への分化能について検討した。

【方法】EGAM1N を強制発現させた ES 細胞を 5 日間浮遊培養し、胚様体を形成させた。その後、胚様体を 7 日間接着培養して心筋細胞へ分化誘導した。このとき、拍動の有無を経時的に観察し、心筋細胞への分化能を検討した。次に、接着培養 4 日目と 6 日目の胚様体から cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて、心筋細胞への分化を促進する転写因子 (*Nkx2.5*) および心筋細胞マーカー (α -MHC, *MLC2v*) の発現量を定量した。

【結果及び考察】コントロール株では、接着培養開始 3-4 日目から拍動が観察されはじめ、7 日目にはほぼ全ての胚様体で拍動が観察された。しかし、EGAM1N 強制発現株においては拍動がほとんど観察されず、心筋細胞への分化が強く抑制されたことが示唆された。胚様体の接着培養 6 日目における α -MHC および *MLC2v* 発現量は、コントロール株と比較して有意に減少していた。すなわち、拍動率の低下および心筋細胞マーカー発現量の低下より、心筋細胞への分化が強く抑制されていることが示された。また、接着培養 6 日目における *Nkx2.5* 発現量もコントロール株と比較して有意に減少した。このことから、EGAM1N が *Nkx2.5* の発現を抑制することにより、*Nkx2.5* が関与する心筋細胞への分化促進経路が機能せず、心筋細胞への分化が抑制されたと考えられる。

13) 発表学会：第 108 回 日本繁殖生物学会大会

発表日と場所：2015 年 9 月 18 日、宮崎大学（宮崎市）

演題名：EGAM1 ホメオタンパク質群の共発現がマウス iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響

発表者：○ 菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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、^{1,2}秋田県総食研、³東北大院・農)

【目的】私達は、マウス桑実胚において発現量が増加する EGAM1 ホメオタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した。EGAM1N および EGAM1C は、ES 細胞の未分化状態を安定化することが示されている。また、体細胞に由来する細胞株において EGAM1 ホメオタンパク質群を強制発現させた場合、ES 細胞の分化多能性の維持に重要な遺伝子である *Oct4*, *Nanog* または *Esrrb* の発現が誘導された。これらのことから、EGAM1 ホメオタンパク質群により iPS 細胞の樹立効率を向上で

きることが期待される。そこで本研究では、EGAM1 ホメオタンパク質群がマウス iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響について検討した。

【方法】山中ファクター4 因子を発現することができるマウス iPS 細胞誘導ベクターをマウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞へ遺伝子導入し、iPS 細胞の誘導培養を行った。その際に EGAM1 ホメオタンパク質群のそれぞれの発現ベクター、または Empty ベクターを同時に遺伝子導入した。樹立培養後、アルカリホスファターゼ (AP) 染色を行い、AP 活性を示した細胞コロニー数を計数した。

【結果】 *Egam1c* を同時に発現させた場合、コントロールと比較して、AP 活性陽性コロニー数が 1.2 倍 ($p < 0.05$) に増加することが示された。すなわち、*Egam1c* を同時に発現させることにより、マウス iPS 細胞の樹立効率を向上できる可能性が示された。

14) 発表学会：第 108 回 日本繁殖生物学会大会

発表日と場所：2015 年 9 月 18 日、宮崎大学（宮崎市）

演題名：動物胚の受胎率向上を目指した遺伝子組換え FGF4 の開発：生物活性に重要な領域の同定のための N 末端短縮型マウス FGF4 の生産

発表者：○熊谷友希¹，菊地貴裕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秋田県総食研)

【目的】マウス胚盤胞において、線維芽細胞増殖因子 4 (FGF4) は FGFR2 を介して胎盤前駆細胞の増殖を促進することにより、胎盤形成に必要な不可欠な細胞増殖因子である。このことから、FGF4 はマウスの生殖に重要な細胞増殖因子であることが証明されている。そこで本研究室では、FGF4 を動物胚の受胎促進に応用することを考案した。本研究では、生物活性を増強した FGF4 の創出を目指し、その前段階として哺乳動物モデルであるマウスの FGF4 を例として、生物活性に重要な領域を同定するために N 末端を短縮化した FGF4 を生産した。

【方法および結果】成熟型のマウス FGF4 は [P³¹-L²⁰²] により構成される。N 末端短縮型マウス FGF4 をコードする 3 種の発現ベクターを構築した。FGF4 (Kuroda) [A⁶⁹-L²⁰²] は、ヒト FGF4 において活性増強が報告されている短縮体に対応する。FGF4 (コアドメイン) [L⁷⁶-L²⁰²] は、FGF ファミリー間で相同性が高いコアドメインのみに対応する。FGF4 (Δ Cys⁸⁴) [N⁸⁵-L²⁰²] は、FGF4 分子内に 2 個存在するシステイン残基が生物活性に重要か検討するため、Cys⁸⁴ までを欠失させた。これらの FGF4 発現ベクターにより大腸菌を形質転換したところ、3 種の N 末端短縮型 FGF4 を発現させることができた。また、FGF4 が示すヘパリン結合性を利用して、ヘパリンカラムクロマトグラフィーにより精製を試みた。溶出画分を解析したところ、CBB 染色では FGF4 (Kuroda) と FGF4 (コアドメイン) は検出されたが、FGF4 (Δ Cys⁸⁴) は検出できなかった。しかし、Western blotting では 3 種全てにおいて検出できた。すなわち、3 種の遺伝子組換え FGF4 を大腸菌により発現させ、精製することができた。しかし、FGF4 (Δ Cys⁸⁴) はヘパリンへの結合力が弱いことが示唆された。現在、マウス線維芽細胞株を用いて細胞増殖促進活性を検討している。

15) 発表学会：生体医工学シンポジウム 2015

発表日と場所：2015 年 9 月 25 日、岡山国際交流センター（岡山市）

演題名：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

発表者：○熊谷昌則（秋田県総合食品研究センター）

【はじめに】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、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 -ピネンの影響について調べた。 α -ピネンは松などの樹木に含まれるモノテルペンの一種であり、森林浴効果などが知られている。また、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がある。

【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常成人の男性 5 名、女性 2 名（20-23 歳、全員右利きであることを確認）に実験参加者として協力を求めた。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 2 種類の前頭葉賦活課題を与えた。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、光トポグラフィイー ETG-4000（日立メディコ）を用いて測定し、関心領域（ROI）における酸素化ヘモグロビン（ O_{xy} -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。

【結果】前頭葉賦活課題遂行時における α -ピネンの匂い刺激負荷は、参加者の O_{xy} -Hb 変化量を低下させた。このとき、空間性ならびに言語性ワーキングメモリ課題の違いによって、 O_{xy} -Hb 動態はやや異なっていた。関心領域として設定した前頭部（ROI-F：Ch1、2、3、4）、右背外側部（ROI-R：Ch9、13、18）ならびに左背外側部（ROI-L：Ch5、10、14）における若干の局在性も認められたが、これらは参加者間でバラツキがあった。いずれの課題についても α -ピネン負荷により、参加者の平均応答時間は短縮される傾向にあったのに対して、正答率はやや低下した。今後は、参加者数を増やして検証を進め、他の精油芳香成分との比較も検討する予定である。なお、本研究は科研費（25350174）の助成を受けて実施された。

16) 発表学会：日本生化学会 2015 年度大会

発表日と場所：2015 年 12 月 1 日 神戸国際会議場（神戸市）

演題名：新規アンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）基質の開発及び

大豆由来 ACE2 阻害物質の同定

発表者：○高橋砂織¹、吉矢拓²、熊谷久美子²、杉山俊博³

（¹秋田県総食研、²（株）ペプチド研、³秋田大院・医）

【目的】動物の血圧は神経やホルモンなどでたくみにコントロールされている。レニン・アンギオテンシン系（RAS）は最も解析が進んでいる昇圧系である。我々は、これまでに RAS を構成するレニン、アンギオテンシン変換酵素（ACE）やキマーゼなどの高感度蛍光消光基質を開発している。

今回、ACE の相同遺伝子として見出された ACE2 の高感度基質の開発を行うとともに、本基質を活用して大豆由来 ACE2 阻害物質を単離し、その構造を明らかとした。

【方法】1) 酵素類：組換え型ヒト ACE 及び ACE2 は市販酵素を用いた。2) 蛍光消光基質の合成：ACE2 のアンギオテンシン II 切断部位配列を基に、N 末端に蛍光物質 *N*-methyl anthranilic acid をまた C 末端側に蛍光消光残基 *N*^ε-2,4-dinitrophenyl-lysine (Lys(Dnp)) を導入した Nma-Xaa-His-Lys(Dnp)類を固相合成した。グループ A として Ile 及び 9 種類のアミノ酸を含む混合基質をグループ B として Leu と His を含む 9 種類のアミノ酸を含む混合基質を合成し、ACE2 による Nma-Xaa-His 生成と基質分解を LC-MS で経時的に追跡した。3) 酵素活性測定方法：pH や塩濃度を検討し、最適反応条件を設定した。酵素反応終了後、励起波長 340 nm 及び蛍光波長 440 nm で蛍光強度を測定した。

【結果】ACE2 活性測定用基質として 19 種類の Nma-Xaa-Pro-Lys(Dnp)を合成し ACE2 による分解産物を LC-MS を用いて解析した。その結果、ACE2 の最良基質として Nma-His-Pro-Lys(Dnp)を開発した。反応動学的解析の結果、 k_{cat}/K_m は、 $7.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と求められ、既報の蛍光合成基質 MCA-Ala-Pro-Lys(Dnp)用いた値 $7.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ より約 10 倍性能の良いことが示された。一方、大豆の熱水抽出液に ACE2 阻害物質(ACE2iSB)の存在することを見出し、各種クロマトグラフィーで精製した。ACE2iSB の (M+H)⁺は、ESI-MS で 304.1 と求められた。さらに、¹H-NMR スペクトル、ODS や TSKgel amide-80 を用いた HPLC の挙動やアミノ酸分析の結果を既知物質と比較検討した結果、ACE2iSB をニコチアミンと同定した。

謝辞：本研究の一部は、一般社団法人中央味噌研究所助成金により行われた。

17) 発表学会：日本エネルギー学会 第 11 回バイオマス科学会議

発表日と場所：2016 年 1 月 20 日、新潟コンベンションセンター（新潟市）

演題名：同時糖化発酵残渣を用いた杉微粉末からの同時糖化発酵

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秋田県総食研)

バイオエタノールの製造は主に前処理・糖化・発酵・蒸留の 4 工程で構成されている。バイオエタノールの製造コストを低減するためには上記の 4 工程において省エネルギーで低コストの技術を開発する必要がある。発酵工程では微生物の調整コストが大きな問題となる¹⁾。バイオマス糖化液からのエタノール生成では酵母細胞の回収が容易であり、回収した酵母細胞を繰り返し用いることで調整コストを低減することができる。しかしながら、より効率的な同時糖化発酵 (SSF) では発酵残渣の存在により酵母細胞のみの回収は困難である。そこで、発酵残渣に含まれる酵母細胞を SSF 中に増殖させ、増殖させた酵母細胞によりエタノールを生成することを考えた。我々の SSF は水で懸濁した木粉に糖化酵素と酵母細胞を添加したものであり、同様の条件で調製した糖化液では酵母細胞の増殖は見られなかった。しかしながら、炭素源以外の栄養源としてコーンステープリカーを添加することで菌の増殖が可能となった。コーンステープリカーを添加した状態の同時糖化発酵の残渣を用いた SSF により 72 時間で 40g/L 以上のエタノールを生成することに成功した。1) 片倉啓雄：生物工学会誌, Vol. 89, No. 4, 177-180 (2011)

18) 発表学会：第 15 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会

発表日と場所：2016年2月2日、産業技術総合研究所（つくば市）

演題名：大豆由来アンギオテンシン変換酵素2阻害物質について

講演者：○高橋砂織¹、吉矢拓²、熊谷（芳澤）久美子²、杉山俊博³

（¹秋田県総食研、²（株）ペプチド研、³秋田大院・医）

【目的】 レニン・アンギオテンシン系による血圧調節機構に関する研究の歴史は長く、その重要構成要素であるアンギオテンシン変換酵素（ACE）をターゲットとした特定保健用食品の開発も盛んに行われている。今回、ACEの相同遺伝子として見出されたアンギオテンシン変換酵素2（ACE2）の新規蛍光消光基質を開発するとともに大豆抽出液に ACE2 阻害物質を見だしその構造を明らかとした。

【方法】 組換え型ヒト ACE2 は Calbiochem 社製を用いた。ACE2 のアンギオテンシン II 切断部位配列を基に、N 末端に蛍光物質 *N*-methyl anthranilic acid をまた C 末端側に蛍光消光残基 *N*^ε-2,4-dinitrophenyl-lysine (Lys(Dnp)) を導入した新規蛍光消光基質 Nma-His-Pro-Lys(Dnp) を合成した。

【結果】 反応動学的解析の結果、ACE2 の Nma-His-Pro-Lys(Dnp) に対する k_{act}/K_m 値は、 $7.17 \mu M^{-1} s^{-1}$ であり、既知の蛍光消光基質 MCA-Ala-Pro-Lys(Dnp) を用いた場合の k_{act}/K_m 値は、 $0.77 \mu M^{-1} s^{-1}$ であり本基質の優位性が示された。一方、各種食材の抽出液を用いて ACE2 の阻害活性を検討した結果、大豆の熱水抽出液に ACE2 阻害物質が存在することを見出し、各種クロマトグラフィーを用いて阻害物質を精製した。阻害物質の (M+H)⁺ は、ESI-MS で 304.1 と求められた。¹H-NMR スペクトル、ODS 及び TSKgel amide-80 を用いた HPLC の挙動やアミノ酸分析の結果を既知物質と比較した結果、大豆由来 ACE2 阻害物質をニコチアナミンと同定した。ニコチアナミンは食物由来最初の ACE2 阻害物質である。

謝辞：本研究の一部は、一般社団法人中央味噌研究所助成金により行われた。

19) 発表学会：第 18 回 化学工学会学生発表会

発表日と場所：2016年3月5日、静岡大学浜松キャンパス（浜松市）

演題名：バキュロウイルス感染 Sf9 昆虫細胞によるヒト ACE2 の生産挙動と酵素反応性

発表者：○熊谷将太¹、白取隆生¹、宮脇舞¹、横田早希¹、菝沢悟²、高橋砂織³、後藤猛¹

（¹秋田大学、²国際農研、³秋田県総食研）

【目的】 アンギオテンシン変換酵素2（ACE2）は、哺乳動物の重要な血圧調節系であるレニン・アンギオテンシン・システムを負に調節し血管拡張作用などにより血圧を低下させる。また、ACE2 は気管支、肺、心臓、消化器など多くの臓器で発現しており、SARS コロナウイルスの受容体ともなっている。したがって、高血圧抑制や疾病予防の観点から ACE2 の亢進物質並びに阻害物質の探索が求められている。当研究グループでは昆虫細胞発現系を用いた組換えヒト (rh)ACE2 の大量生産を試みた。その結果、細胞膜に発現した rhACE2 は細胞外側で切断され、精製用の His タグが除去された ECTO ドメインが培地中に蓄積した。そこで本研究では、膜貫通ドメインおよび CYTO ドメインを除き、ETCO ドメインに His タグを直接付加した可溶性 (s)ACE2 の cDNA を有する組換えバキュロウイルスを新たに構築し、これを昆虫細胞に感染させて sACE2 の発現を試みた。

【方法】 組換えバキュロウイルスの作製には Bac-to-Bac システム (Invitrogen) を用いた。目的

遺伝子を有するトランスファーベクターを In-Fusion 反応より構築し、大腸菌 DH10Bac を形質転換した。部位特異的トランスポジションにより生成した組換えバクミド DNA を Sf9 細胞へトランスフィクションし、組換えバキュロウイルスを作製した。組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞に感染多重度 0.1 pfu/cell で感染させて培養し、一日毎にサンプリングした。培地画分と細胞画分に分け、さらに細胞画分は超音波照射による破砕後、細胞内可溶性画分と不溶性画分に分離した。これらについて SDS-PAGE を行い、CBB 染色とウサギ抗 ACE2 抗体およびヤギ抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロッティング、人工自己蛍光消光基質を用いた酵素活性測定により sACE2 の発現挙動を調べた。

【結果と考察】 調製した組換えバキュロウイルスにより感染培養を 4 日間行った結果、培養 2 日目から生細胞率が大きく低下し、バキュロウイルスの感染が確認された。そこで、細胞内画分について自己蛍光消光基質を用いて調べたところ、ACE2 活性は感染 1 日目から増加し、2 日目以降減少する傾向を示した。さらに、細胞内可溶性画分と不溶性画分について抗 ACE2 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、細胞内可溶性画分と不溶性画分の両方に sACE2 が認められ、封入体が形成されていることが分かった。一方、培地画分について、ACE2 活性は、感染 2 日目に大きく増加し、それ以降ほぼ一定の値となった。さらに、抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、sACE2 の分子量付近にバンドが確認され、His タグを有する sACE2 が培地に放出されていることが分かった。

20) 発表学会：化学工学会 第 81 回年会

発表日と場所：2016 年 3 月 13 日、関西大学（吹田市）

演題名：昆虫細胞による組換えアンジオテンシン変換酵素 2 の生産と特性解析

発表者：○横田早希¹、白取隆生¹、熊谷将太¹、宮脇舞¹、菝沢悟²、戸松誠³、高橋砂織³、後藤猛¹（¹秋田大、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-アンジオテンシン系が (RAS) ある。この系では、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) により不活性型のアンジオテンシン I (AI) が活性型のアンジオテンシン II (AII) に変換され、血圧上昇を引き起こす。さらに近年、AII を基質として RAS を負に調節し、心血管等の機能を制御する ACE2 が見いだされた。ACE2 は、活性型の AII からアミノ酸残基 1 つを切断してアンジオテンシン 1-7 へ変換することで血管を拡張させ、血圧降下を導く。また、ACE2 は気管支、肺、心臓、消化器など多くの臓器で発現することや SARS (重症急性呼吸器症候群) コロナウイルスのレセプターともなることが報告されている。本研究では、ACE2 の詳細な機能解析とその阻害物質ならびに充進物質の探索を目指し、昆虫細胞発現系による組換えヒト (rh)ACE2 の生産および精製酵素の特性解析を行った。

【方法】 3' 側に His タグ配列を付加したヒトプロ ACE2 cDNA を PCR により増幅し、pFastBac1 のポリヒドロリンプロモーター下流の挿入し、トランスファーベクター pFastBac1-ACE2-His6 を調整した。さらに Bac-to-Bac システム (Invitrogen) を用いた部位変異的トランスポジションにより組換えバクミド DNA を調整し、これを Sf9 昆虫細胞にトランスフェクションすることで組換えバキュロウイルス (vACE2) を作製した。

細胞密度 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml の Sf9 昆虫細胞に vACE2 を感染多重度 (MOI) 0.1、1.0、10 pfu/cell で接種し、28°C で 5 日間感染培養を行った。

【結果と考察】 MOI 0.1 で感染培養を行い、24 時間ごとに採取した培養液について酵素活性測

定とウエスタンブローディングにより rhACE2 の生産挙動を調べた。まず、細胞分画では培養 2 日目以降に活性が認められ、抗 His タグ抗体を用いたウエスタンブローディングでも rhACE2 のバンドが検出された。一方、培地画分では培養後期に高い活性が見られたものの、rhACE2 のバンドは検出されなかった。そこで、培地画分について抗 ACE2 抗体を用いたウエスタンブローディングを行ったところ、3 日目以降に明瞭なバンドが認められた。このことより培養中後期において rhACE2 は His タグを含む C 末端側で加水分解され、細胞外に漏出していることが分かった。この細胞外漏出挙動はどの MOI 条件でも同様であり、His タグ融合 rhACE2 の生産量にも大きな差は認められなかった。rhACE2 の生産にはウイルス量が少なく比較的培養時間が短い MOI 1.0 pfu /cell が適していると考えられる。さらに、Ni-アフィニティクロマトグラフィーにより高純度の rhACE2 が得られ、最終的に培養液 500 ml 当たり約 1.7 mg の rhACE2 が得られた。また、精製標品の速度論的解析及び N 末端アミノ酸配列解析も行った。

21) 発表学会：日本農芸化学会 2016 年度大会

発表日と場所：2016 年 3 月 28 日、北海道大学（札幌市）

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（パエニダーゼ）

ホモローグの構造と活性

発表者：○ 蕪澤悟¹、高橋砂織²（¹国際農研、²秋田県総食研）

【目的】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。さらに、これらの D 型アミノ酸が様々な病態と関連することが示唆されている。特に、D-アスパラギン酸が注目されており、アミロイド β タンパク質ではアスパラギン酸残基の D 型変異がアミロイドタンパク質の凝集を引き起こすことが示唆されている。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¹⁾。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ーグをクローニングし、大腸菌における発現を行うとともに、それらの酵素活性を調べた。

【方法】アミノ酸配列の相同性解析には BLAST 及び MEROPS データベースを用いた。大腸菌における各種遺伝子の発現には、pET-28a 及び *Escherichia coli* BL21 (DE3) 株を用いた。酵素活性測定は高橋らの方法で行った¹⁾。ホモロジーモデリングは MOE (Molecular Operating Environment、CCG 社、カナダ) を用いて行った。

【結果】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 種類のホモローグ (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ーグ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 5 Å 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。

1) S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202, 2006.

22) 発表学会：日本農芸化学会 2016 年度大会

発表日と場所：2016 年 3 月 28 日、札幌市教育文化会館大ホール他（札幌市）

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秋田県大院・生物資源)

【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。我々は昨年度、肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生に高い相関があることを報告し、リポタンパク質が肝細胞の新たな分化マーカーとして使用できる可能性を示した。幹細胞から成熟肝細胞への分化誘導法は数多く報告されているが、リポタンパク質を指標に評価した例はない。そこで、本研究ではリポタンパク質産生能を指標に、幹細胞へ肝特異的転写因子を導入して得られた肝細胞様細胞を評価し、肝特異的因子とリポタンパク質産生能の関係を検討した。

【方法】ヒト間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞株に肝特異的転写因子 FOXA2、HNF4a および HNF1a を導入し、それぞれ安定的に発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞株について、細胞内に蓄積および細胞外に分泌した中性脂肪およびコレステロールを定量した。また、これら細胞株の脂質代謝関連遺伝子群の発現量を Real-time RT-PCR で定量した。

【結果】FOXA2、HNF4a および HNF1a いずれの安定株発現株においても細胞外への中性脂肪およびコレステロールの分泌は認められなかったが、HNF4a および HNF1a 安定発現株では細胞内への中性脂肪およびコレステロールの蓄積傾向が認められた。遺伝子発現量解析の結果、HNF4a の発現により VLDL/LDL の主要アポリポタンパク質である APOB の発現量が増加傾向であること、HNF1a の発現により VLDL の会合・分泌に関与するミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 MTTP の発現量が増加傾向であることがそれぞれ判明した。しかしながら、APOB および MTTP の発現量が十分でなかったため、HNF4a および HNF1a の両安定発現株で細胞外への中性脂肪およびコレステロールの分泌が認められなかったと推測した。

現在、HNF4a および HNF1a を安定的に共発現する細胞株を樹立し、細胞外への中性脂肪およびコレステロールの分泌を検討するとともに、リポタンパク質合成に関与する脂質代謝関連遺伝子の発現量解析を進めている。

23) 発表学会：日本畜産学会 第 121 回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立を目指した、非ウイルスベクターによる高効率なマウス iPS 細胞樹立技術の開発

発表者：○平出美鈴¹、楠原夏生¹、菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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秋田県総食研、³東北大院・農)

【目的】 本研究室では有限なウシ遺伝資源を恒久的に活用するために、iPS 細胞の樹立研究に着手した。本研究は、iPS 細胞の樹立に要する基盤技術を整備することを目的として、*piggyBac* トランスポゾンシステムとリポフェクション法を用いることにより、マウス iPS 細胞を高効率で作製する技術を開発した。

【方法】 *GFP* 遺伝子を組込んだベクターを、新規に開発されたリポフェクション試薬（計 7 種）を用いてマウス胎仔線維芽細胞に遺伝子導入した。2 日後、ヘキスト 33342 により核を染色し、遺伝子導入効率を算出した。最も導入効率が高かったリポフェクション試薬を用いて、マウス iPS 細胞誘導 *piggyBac* ベクターをマウス胎仔線維芽細胞に遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立効率を算出した。

【結果と考察】 *ViaFect* を用いた場合、最も遺伝子導入効率が高いことが判明した。*ViaFect* により iPS 細胞誘導 *piggyBac* ベクターを線維芽細胞に遺伝子導入した結果、ドーム状のコロニー形成およびアルカリフォスファターゼ活性が示された。このときのアルカリフォスファターゼ陽性コロニーの生成率は約 0.2 %であった。

24) 発表学会：日本畜産学会 第 121 回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：FGF4 により、初期胚に含まれる胎盤前駆細胞の形成を促進する：構造と生物活性の関連

発表者：○熊谷 友希¹、菊地 貴裕¹、野中 愛純¹、佐々木 玲^{1,2}、高橋 利清³、小林 正之¹

(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研、³秋田畜試)

【目的】 マウスの胚発生において、FGF4 は胎盤形成に必須な細胞増殖因子である。私たちは FGF4 添加培養により、ウシ体外受精胚の胎盤前駆細胞数が増加することを示した。そこで FGF4 を胚の受胎促進に応用することを考案し、生物活性を増強した FGF4 の創出を目指している。本研究はマウス FGF4 を例として、生物活性に重要な領域を同定するために、N 末端側領域を改変した FGF4 を開発した。

【方法】 変異型マウス FGF4 発現ベクター 3 種を構築した。FGF4 (Kuroda) は、ヒトにおいて活性増強が報告された N 末端側短縮体に対応し、FGF4 (コアドメイン) は、FGF ファミリーのコアドメインのみに対応する。FGF4 (Δ Cys⁸⁴) は S-S 結合を形成できない N 末端短縮体である。これらが大腸菌により発現させ、ヘパリンカラムにより精製を試みた。続いて、マウス胎仔線維芽細胞株を用いて細胞増殖促進活性を検討した。

【結果】 ヘパリンカラムにより、これらの FGF4 を精製できた。しかし、FGF4 (Δ Cys⁸⁴) において、ヘパリン結合能の大きな減弱が示唆された。一方、いずれの FGF4 においても細胞増殖促進活性が検出された。現在、Cys 残基を Ser 残基に変異させることにより S-S 結合を形成できない FGF4 を調製し、ヘパリン結合能と細胞増殖促進活性への影響について検討している。

25) 発表学会：日本畜産学会 第121回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：マウス初期胚から発見したホメオタンパク質 EGAM1N は、転写因子 NANOG とヘテロ複合体を形成する

発表者：野中愛純¹、菊地貴裕¹、熊谷友希¹、佐々木玲^{1,2}、小林正之¹

(¹秋田県大院・生物資源、²秋田県総食研)

【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、ホメオタンパク質 EGAM1N を発見した。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。一般にホメオタンパク質は複合体を形成して機能するが、EGAM1N の複合体形成は不明である。そこで本研究では免疫沈降法により、EGAM1N とホメオタンパク質 NANOG、または OCT4 とのヘテロ複合体の形成、および EGAM1N によるホモ複合体の形成について検討した。

【方法】ES 細胞特異的なタンパク質が発現していないヒト胎児腎由来 293T 細胞に、NANOG・OCT4・EGAM1N・FLAG タグ付加 EGAM1N を個別に強制発現させて細胞破碎液を調製し、免疫沈降に供した。Western blotting により、NANOG または OCT4、FLAG タグ付加 EGAM1N と共沈した EGAM1N を検出した。

【結果および考察】NANOG と EGAM1N が共沈することが示された。一方、OCT4 と EGAM1N の共沈は検出されなかった。また、FLAG 付加 EGAM1N と EGAM1N の共沈は検出されなかった。従って、EGAM1N は NANOG とヘテロ複合体を形成し、未分化状態の安定化に寄与すると考えられる。また、EGAM1N はホモ複合体を形成しないことが示唆された。

26) 発表学会：日本畜産学会 第121回大会

発表日と場所：2016年3月29日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）

演題名：マウス初期胚から発見したホメオタンパク質 EGAM1C による iPS 細胞の樹立促進効果

発表者：○ 菊地貴裕¹、野中愛純¹、熊谷友希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秋田県総食研、³東北大院・農)

【目的】本研究室では、マウス初期胚および ES 細胞で発現している EGAM1 ホメオタンパク質群 (EGAM1, EGAM1N, EGAM1C) を発見した。また EGAM1N および EGAM1C は、ES 細胞の未分化状態を安定化することが示された。そこで本研究では、EGAM1 ホメオタンパク質群の同時発現がマウス iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響について検討した。

【方法】始めに、マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞における EGAM1 ホメオタンパク質群 mRNA の発現パターンを比較した。次に、マウス iPS 細胞の樹立の際に、EGAM1 ホメオタンパク質群のいずれかを同時に発現させた。iPS 細胞の樹立培養後、幹細胞マーカーであるアルカリホスファターゼ (AP) 活性を検出した。

【結果と考察】マウス iPS 細胞においても、ES 細胞と同様に EGAM1 ホメオタンパク質群が発現していること、分化誘導前後の発現パターンが ES 細胞とよく一致していることが判明した。また、EGAM1C を同時に発現させることにより、コントロールと比較して AP 活性陽性コロニー数が有意に増加することが示された。以上のことから、iPS 細胞の樹立の際に EGAM1C を同時に発現させる

ことにより、iPS 細胞の樹立を促進できる可能性が示された。現在、EGAM1 ホメオタンパク質群が iPS 細胞の品質に与える影響について検討を開始している。

6. 外部発表論文概要 (11件)

1) 論文題名 : **Aralin, a type II ribosome-inactivating protein from *Aralia elata*, exhibits selective anticancer activity through the processed form of a 110-kDa high-density lipoprotein-binding protein: A promising anticancer drug.**

著者名 : Hiroko Otsuka, Yoshitaka Gotoh, Takashi Komeno, Takahide Ono, Yasushi Kawasaki, Naoyuki Iida, Yoshio Shibagaki, Seisuke Hattori, Makoto Tomatsu, Hirotada Akiyama, and Fumio Tashiro

雑誌名 : *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **453**, 117-123 (2014)

発行日 : 2014年10月10日

2) 論文題名 : **Processed soymilk effectively ameliorates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats.**

著者名 : Md Alauddin, Hitoshi Shirakawa, Kazuyuki Hiwatashi, Atsushi Shimakage, Saori Takahashi, Mamoru Shinbo, and Michio Komai

雑誌名 : *Journal of Functional Foods*, **14**, 126-132 (2015)

発行日 : 2014年1月29日

3) 論文題名 : **Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai) and *Petasites japonicus* (Fuki) components.**

著者名 : Tetsuo Hisayoshi, Mayu Shinomura, Kanta Yokokawa, Ikumi Kuze, Atsushi Kinoshita, Kumi Kawaji, Eiichi N. Kodama, Keishi Hata, Saori Takahashi, Satoru Nirasawa, Shohei Sakuda, and Kiyoshi Yasukawa

雑誌名 : *Journal of Natural Medicines*, **69**, 432-440 (2015)

発行日 : 2015年2月18日

4) 論文題名 : **Partial inhibition of differentiation associated with elevated protein levels of pluripotency factors in mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1N homeoprotein.**

著者名 : Shiori Sato, Masato Nakazawa, Yumi Kihara, Yusuke Kubo, Yuki Sato, Takahiro Kikuchi, Asumi Nonaka, Akira Sasaki, Jun Iwashita, Jun Murata, Masahiro Hosaka, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120**, 562-569 (2015)

発行日 : 2015年3月26日

5) 論文題名 : **Surface plasmon resonance application study using immobilized recombinant human renin to screen for renin inhibitory activity.**

著者名 : Takeshi Gotoh, Ken-Ichi Kikuchi, Kazuyuki Hori, and Saori Takahashi

雑誌名 : *Japanese Journal of Food Safety*, **22**, 18-24 (2015)

発行日 : 2015年4月24日

6) 論文題名 : **マウス ES 細胞におけるホメオタンパク質 EGAM1N または EGAM1C の強制発現は動物胚の形態形成に関与する Wnt ファミリー遺伝子の発現を誘導する.**

著者名 : 佐藤由貴、佐藤梓織、菊地貴裕、野中愛純、佐々木玲、小林正之

雑誌名 : 東北畜産学会報 **65**, 14-21 (2015)

発行日：2015年6月15日

7) 論文題名：Nicotianamine is a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor in soybean.

著者名：Saori Takahashi, Taku Yoshiya, Kumiko Yoshizawa-Kumagai, and Toshihiro Sugiyama

雑誌名：Biomedical Research, 36, 219-224 (2015)

発行日：2015年6月24日

8) 論文題名：味噌の持つ高血圧抑制物質について（総説）

著者名：高橋砂織

雑誌名：日本醸造協会誌 110, 636-648 (2015)

発行日：2015年9月15日

9) 論文題名：杉微粉碎物の酵素糖化に及ぼすリン脂質ポリマーの影響

著者名：進藤昌

雑誌名：Journal of the Japan Institute of Energy, 94, 1098-1104 (2015)

発酵日：2015年11月20日

10) 論文題名：Fermented barley extract supplementation ameliorates metabolic state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

著者名：Ardiansyah, Hitoshi Shirakawa, Puspo E. Giriwono, Kazuki Oguchi, Kazuma Ueda, Hideki Hokazono, Kazuyuki Hiwatashi, Saori Takahashi, Shoko Sato, and Michi Komai

雑誌名：Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 79, 1876-1883 (2015)

発行日：2015年11月30日

11) 論文題名：味噌由来アンギオテンシン変換酵素2作用物質に関する研究

著者名：高橋砂織、小笠原博信、渡辺隆幸

雑誌名：中央味噌研究所報告 37, 46-58 (2016)

発行日：2016年3月31日

1) 論文題名 : **Aralin, a type II ribosome-inactivating protein from *Aralia elata*, exhibits selective anticancer activity through the processed form of a 110-kDa high-density lipoprotein-binding protein: A promising anticancer drug.**

著者名 : Hiroko Otsuka, Yoshitaka Gotoh, Takashi Komeno, Takahide Ono, Yasushi Kawasaki, Naoyuki Iida, Yoshio Shibagaki, Seisuke Hattori, Makoto Tomatsu, Hirotada Akiyama, and Fumio Tashiro

雑誌名 : *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **453**, 117-123 (2014)

発行日 : 2014年10月10日

要約 : Aralin from *Aralia elata* is a newly identified type II ribosome-inactivating protein, which preferentially induces apoptosis in cancer cells. In this study, we identified that the aralin receptor is a 110-kDa high-density lipoprotein-binding protein (HDLBP), which functions as a HDL receptor. The sensitivities of tumor cell lines to aralin were dependent on the expression levels of the 110-kDa HDLBP and its forced expression in aralin-resistant Huh7 cells conferred aralin sensitivity. HDLBP-knockdown HeLa cells showed a significant aralin resistance *in vitro* and *in vivo*. Conversely, ectopic expression of the 150-kDa HDLBP resulted in increased aralin sensitivity *in vivo*, accompanying enhanced expression of the 110-kDa HDLBP. Thus, these results showed that the 110-kDa HDLBP in lipid rafts acted as an aralin receptor and that its expression levels determined aralin sensitivity, suggesting that aralin could be a promising anticancer drug for HDLBP-overexpressing tumors.

2) 論文題名 : **Processed soymilk effectively ameliorates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats.**

著者名 : Md Alauddin, Hitoshi Shirakawa, Kazuyuki Hiwatashi, Atsushi Shimakage, Saori Takahashi, Mamoru Shinbo, and Michio Komai

雑誌名 : *Journal of Functional Foods*, **14**, 126-132 (2015)

発行日 : 2014年1月29日

要約 : Processed soymilk was produced from original soymilk by treatment 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). Processed soymilk significantly decreased systolic blood pressure in SHR at a dose of 0.167 and 0.583 ml/kg body weight after single oral administration. Chronic administration (3 weeks) of processed soymilk significantly reduced both systolic and diastolic blood pressure elevation at same doses in SHR. After chronic administration inhibitory activity of ACE in serum was found significantly higher compared to non-processed soymilk whereas similar in thoracic aorta. Serum angiotensin II (vasoconstrictor) level was found significantly lower compared to non-processed soymilk. Serum and liver lipid profile was found almost similar to non-processed soymilk. In conclusion, processed soymilk ingestion may have high blood pressure lowering effect and ameliorate cardiovascular diseases related to hypertension.

3) 論文題名 : Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai) and *Petasites japonicus* (Fuki) components.

著者名 : Tetsuo Hisayoshi, Mayu Shinomura, Kanta Yokokawa, Ikumi Kuze, Atsushi Kinoshita, Kumi Kawaji, Eiichi N. Kodama, Keishi Hata, Saori Takahashi, Satoru Nirasawa, Shohei Sakuda, and Kiyoshi Yasukawa

雑誌名 : *Journal of Natural Medicines*, **69**, 432-440 (2015)

発行日 : 2015年2月18日

要約 : Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) possesses two distinct enzymatic activities, RNA- and DNA-dependent DNA polymerase and RNase H activities. In the current HIV-1 therapy, all HIV-1 RT inhibitors inhibit the DNA polymerase, but not the RNase H, activity. We previously reported that ethanol- and water-extracts of *Brasenia schreberi* (Junsai) inhibited the DNA polymerase activity of HIV-1 RT [Hisayoshi T et al. (2014) *J Biol Macromol* 14:59-65]. In this study, we screened 43 edible plants, and found that among them ethanol- and water-extracts of *Brasenia schreberi* and water-extract of *Petasites japonicus* strongly inhibited not only the DNA polymerase activity to incorporate dTTP into poly(rA)-p(dT)₁₅ but also the RNase H activity to hydrolyze the RNA strand of an RNA/DNA hybrid. In addition, these three extracts inhibited HIV-1 replication in human cells with EC₅₀ values of 1 to 2 · g/ml. These results suggest that *Brasenia schreberi* and *Petasites japonicus* contain novel substances that inhibit HIV-1 replication through inhibiting the DNA polymerase or RNase H activity of HIV-1 RT.

4) 論文題名 : Partial inhibition of differentiation associated with elevated protein levels of pluripotency factors in mouse embryonic stem cells expressing exogenous EGAM1N homeoprotein.

著者名 : Shiori Sato, Masato Nakazawa, Yumi Kihara, Yusuke Kubo, Yuki Sato, Takahiro Kikuchi, Asumi Nonaka, Akira Sasaki, Jun Iwashita, Jun Murata, Masahiro Hosaka, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120**, 562-569 (2015)

発行日 : 2015年3月26日

要約 : We previously reported that transcripts encoding the homeoprotein EGAM1N are expressed in preimplantation mouse embryos and embryonic stem (ES) cells and indicated that exogenous expression of EGAM1N inhibited differentiation of ES cells. In order to clarify the mechanisms underlying maintenance of the undifferentiated state by expression of EGAM1N, we generated mouse MG1.19 ES cells stably expressing EGAM1N. In the presence of leukemia inhibitory factor (LIF), Egam1n-expressing cells showed accelerated growth with a significant increase in Myc expression. Control transfectants with an empty vector formed relatively flattened cell colonies similar to those observed in parental, feeder-free MG1.19 cells. In contrast, Egam1n transfectants formed tightly aggregated cell colonies with increased localization of CDH1 at cell-to-cell interfaces. The levels of core

pluripotency factors, including POU5F1, SOX2, and TBX3, were also increased. The expression of EGAM1N resulted in no obvious changes in the production of receptors, protein kinases, or transcription factors involved in the LIF signaling pathway. However, the expression of Tbx3 transcripts was induced, and although the expression of genes encoding POU5F1, SOX2, and all genes downstream of LIF signaling examined was almost unchanged. In a clonal proliferation assay, the undifferentiated state of Egam1n transfectants was better maintained than that of the control. Overall, we suggest that ectopic expression of EGAM1N could encompass stabilization of the undifferentiated state by increases in the cellular levels of pluripotency factors and the promotion of cell growth in a nearly independent manner from the enhancement of LIF signaling in MG1.19 ES cells.

5) 論文題名 : Surface plasmon resonance application study using immobilized recombinant human renin to screen for renin inhibitory activity.

著者名 : Takeshi Gotoh, Ken-Ichi Kikuchi, Kazuyuki Hori, and Saori Takahashi

雑誌名 : *Japanese Journal of Food Safety*, **22**, 18-24 (2015)

発行日 : 2015年4月24日

要約 : Renin is an important target to be inhibited for the treatment of high blood pressure, since the enzyme catalyzes the first rate-determining step in the renin angiotensin system, which controls blood pressure in mammals. Renin inhibitory compounds have been found in several foodstuffs, soybeans and cereals, and identified as certain saponins and unsaturated fatty acids. The present study determined SPR responses of saponins and unsaturated fatty acids using recombinant human (rh)-renin, which were produced by insect cells baculovirus expression system and immobilized to sensor chips, and demonstrated that there is fairly well correlation between SPR responses and half maximal (50%) renin inhibitory concentration. In addition, SPR responses of several legume extracts to the immobilized rh-renin mostly agreed with their inhibitory activity. These results indicate that the SPR analysis with immobilized rh-renin is applicable to the screening of potential renin-inhibitory compounds from natural foodstuffs.

6) 論文題名 : マウス ES 細胞におけるホメオタンパク質 EGAM1N または EGAM1C の強制発現は動物胚の形態形成に関与する Wnt ファミリー遺伝子の発現を誘導する.

著者名 : 佐藤由貴、佐藤梓織、菊地貴裕、野中愛純、佐々木玲、小林正之

雑誌名 : 東北畜産学会報 **65**, 14-21 (2015)

発行日 : 2015年6月15日

要約 : 我々は、マウス初期胚および ES 細胞において発現する EGAM1 ホメオタンパク質群 EGAM1N および EGAM1C を発見した。マウス ES 細胞においてこれらを強制発現させた場合、未分化状態の維持もしくは細胞分化に影響することが示されている。一方、EGAM1 ホメオタンパク質群は初期胚だけでなく、着床後の発生過程でも発現していることより、臓器や組織の形成にも関与することが推定される。そこで本研究では、胚の形態形成に深く関与することが知られているサイトカ

イン WNT をコードする Wnt ファミリー遺伝子 (全 19 種) に注目し, マウス ES 細胞における当該タンパク質群の強制発現により発現が誘導されるか, DNA マイクロアレイ解析を用いてスクリーニングを行った。その結果, EGAM1N 強制発現細胞および EGAM1C 強制発現細胞において, Wnt2・Wnt3・Wnt4・Wnt6・Wnt7a・Wnt10a・Wnt10b の明確な活性化を同定した。また, WNT の主要な産生細胞である, 上皮細胞のマーカー遺伝子の発現が誘導されることも見出した。以上の結果より, マウス ES 細胞における EGAM1N および EGAM1C の強制発現は, 上皮細胞に例示される WNT 産生細胞の形成を促進すること, もしくは Wnt ファミリー遺伝子の発現を誘導することが考えられる。すなわち, EGAM1 ホメオタンパク質群はこれらを介して, マウス胚の形態形成に関与する可能性が考えられる。本研究により得られた知見は, 当該タンパク質群は着床後の家畜胚の発生にも深く関与することを示唆する。

7) 論文題名 : Nicotianamine is a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor in soybean.

著者名 : Saori Takahashi, Taku Yoshiya, Kumiko Yoshizawa-Kumagai, and Toshihiro Sugiyama

雑誌名 : *Biomedical Research*, **36**, 219-224 (2015)

発行日 : 2015 年 6 月 24 日

要約 : Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a carboxypeptidase which is highly homologous to angiotensin-converting enzyme (ACE). ACE2 produces vasodilator peptides angiotensin 1-7 (A1-7) from angiotensin II (AII). In the present study, we synthesized various internally quenched fluorogenic (IQF) substrates (fluorophore-Xaa-Pro-quencher) based on the cleavage site of AII introducing N-terminal fluorophore *N*-methylantranilic acid (Nma) and C-terminal quencher *N*^ε-2,4-dinitrophenyl-lysine [Lys(Dnp)]. The synthesized mixed substrates “Nma-Xaa-Pro-Lys(Dnp)” were hydrolyzed by recombinant human (rh) ACE2. The amount of each product was determined by LC-MS with fluorescence detection and it was found that Nma-His-Pro-Lys(Dnp) is the most suitable substrate for rhACE2. The K_m , k_{cat} , and k_{cat}/K_m values of Nma-His-Pro-Lys(Dnp) on rhACE2 were determined to be 23.3 μM , 167 s^{-1} , and 7.17 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, respectively. Using the rhACE2 and the newly developed IQF substrate, we found rhACE2 inhibitory activity in soybean and isolated the active compound soybean ACE2 inhibitor (ACE2iSB). The physicochemical data on the isolated ACE2iSB were identical to those of nicotianamine. ACE2iSB strongly inhibited rhACE2 activity with an IC_{50} value of 84 nM. This is the first demonstration of an ACE2 inhibitor from foodstuffs.

8) 論文題名 : 味噌の持つ高血圧抑制物質について (総説)

著者名 : 高橋砂織

雑誌名 : 日本醸造協会誌 **110**, 636-648 (2015)

発行日 : 2015 年 9 月 15 日

要約 : 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 アヲルコトヲ 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・アンジオテンシン系 (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 系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、アンジオテンシ変換酵素 (ACE) や最近注目を集めつつあるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 阻害物質について解説する。

9) 論文題名：杉微粉碎物の酵素糖化に及ぼすリン脂質ポリマーの影響

著者名：進藤昌

雑誌名： *Journal of the Japan Institute of Energy*, **94**, 1098-1104 (2015)

発酵日：2015 年 11 月 20 日

要約：リグノ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、酵素反応液にリン脂質ポリマーを添加し、酵素糖化への影響を検討した。その結果、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)とメタアクリル酸(MA)の共重合体(PMA)が、粉碎された杉の酵素糖化率を向上させた。また、MPCとMAのモル分率が1:9(PMA10)の時に最も杉リグニンへの吸着を阻害した。また、PMA10の濃度が0.025g/g dry mass以上で酵素糖化率が最大になった。

10) 論文題名：Fermented barley extract supplementation ameliorates metabolic state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

著者名：Ardiansyah, Hitoshi Shirakawa, Puspo E. Giriwono, Kazuki Oguchi, Kazuma Ueda, Hideki Hokazono, Kazuyuki Hiwatashi, Saori Takahashi, Shoko Sato, and Michi Komai

雑誌名： *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **79**, 1876-1883 (2015)

発行日：2015 年 11 月 30 日

要約：We studied the effects of fermented barley extract P (FBEP) in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHPS). Male 10-week-old SHPS were divided into three groups that were fed: an AIN-93M diet (control), a low dose of FBEP (4g/kg; FBEP1), and a high dose of FBEP (20 g/kg; FBEP2) for three weeks. Hypertension was significantly improved by the use of FBEP supplementation. The FBEP diet improved triglyceride, insulin sensitivity, enhanced plasma catalase, and superoxide dismutase activities, and decreased plasma 1-hydroxy-2-deoxyguanosine levels. In addition, the FBEP diet upregulated hepatic antioxidative genes and modulated Nrf2 protein levels in the liver. Furthermore, a single

oral dose of FBEP (2 g/kg body weight) was able to lower blood pressure in SHRSP. In conclusion, our data suggest that increased expression of hepatic antioxidative genes and modulation of Nrf2 may play a role in the regulation of metabolic diseases in SHRSP consuming a FBEP diet.

11) 論文題名：味噌由来アンギオテンシン変換酵素 2 作用物質に関する研究

著者名：高橋砂織、小笠原博信、渡辺隆幸

雑誌名：中央味噌研究所報告 37, 46-58 (2016)

発行日：2016年3月31日

要約：レニン・アンギオテンシン系 (RAS) は最も重要な血圧調節機構の一つである。我々は、これまでに味噌にレニン阻害活性を見出し、原材料の大豆から食物由来最初のレニン阻害物質としてソヤサポニン I を同定した。また、RAS を構成するキマーゼやアンギオテンシン変換酵素 (ACE) などにも注目してこれら酵素の新規測定法の開発を行うとともに各種味噌抽出液のレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を検討した。その結果、味噌にはこれら酵素の阻害物質が普遍的に存在することを明らかとしている。本研究では、ACE の相同遺伝子として見出された ACE2 に注目し、味噌由来 ACE2 作用物質について検討した。最初に、ACE2 の活性測定方法の開発を目指した。ACE2 の AII 認識部位アミノ酸配列を基に各種蛍光消光基質を合成し、ACE2 の最良基質として Nma-His-Pro-Lys(Dnp) を開発した。本測定系を用いて市販味噌 76 点 (全国味噌 63 点、秋田県産味噌 13 点) の熱水抽出液の ACE2 並びに ACE 活性に及ぼす影響を検討した。その結果、味噌の熱水抽出液中には普遍的に ACE2 阻害活性並びに ACE 阻害活性の存在することが示された。次に大豆の種類や麹菌の種類の違い、さらには酵母の添加の有無による味噌中の ACE2 作用物質の変動を解析する目的で味噌の試験醸造をおこなった。大豆として国産大豆と中国産大豆を、麹菌として WS61 株及び CK33 株を、また、酵母添加の有無など 8 通りの試験醸造を行った。その結果、ACE2 阻害活性は味噌の仕込み時に高く、熟成にしたがい徐々に阻害活性が低減し、4 週目以降は阻害活性が保持されることが示された。また、大豆や麹菌の違いによる ACE2 阻害活性の大きな違いは認められなかった。味噌中の ACE2 阻害物質の由来を検討したところ、阻害物質は大豆由来であることが判明した。そこで、大豆から各種クロマトグラフィーを用いて ACE2 阻害物質を精製した。さらに、各種機器分析の結果から大豆由来 ACE2 阻害物質をニコチアナミンと同定した。ニコチアナミンは、食物由来最初の ACE2 阻害物質である。

7. 秋田県総合食品研究センター報告規程

【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18号

発行日 平成28年12月1日
発行者 秋田県総合食品研究センター報告 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】

