

ISSN 2185-6699

# 秋田県総合食品研究センター報告

第 19 号

平成 29 年 (2017 年)

---

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

No. 19, 2017

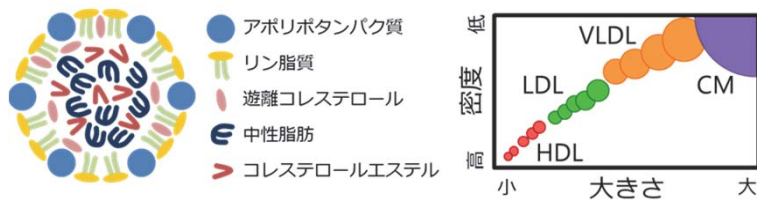


スマイルケア食  
エネルギーたんぱく質の補給に



低栄養の予防と改善を目指したスマイルケア食「青」マーク  
利用許諾商品の開発 熊谷昌則、他 Vol.19 1-9 (2017)

秋田オリジナル麺「あめこうじ」の特徴  
尾張かおる、他 Vol.19 11-14 (2017)



ヒト肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生能の  
獲得機構に関する研究 佐々木 玲 Vol.19 15-28 (2017)

地域特産食品ハタハタの特性解明と  
利用加工技術開発  
塚本研一 Vol.19 29-48 (2017)



しよつるの生産技術改良と用途開発研究  
塚本研一、他 Vol.19 49-56 (2017)

しよつるの歴史と将来  
杉本勇人、他 Vol.19 57-66 (2017)



# 目次

1. 原著論文（報文）	
1) 低栄養の予防と改善を目指した スマイルケア食「青」マーク利用許諾商品の開発 . . . . . 1 ○熊谷昌則、上原健二、渡邊健、渡邊和子、大野智子	
2. 原著論文（研究ノート）	
1) 秋田オリジナル麴「あめこうじ」の特徴 ～甘酒の甘さについて～ . . . . . 11 ○尾張かおる、佐藤友紀、須藤あさみ、黒崎文華、小笠原博信	
3. 総説	
1) ヒト肝細胞の形成過程における リポタンパク質産生能の獲得機構に関する研究 . . . . . 15 ○佐々木 玲	
2) 地域特産食品ハタハタの特性解明と利用加工技術開発 . . . . . 29 ○塚本研一	
3) しょっつるの生産技術改良と用途開発研究 . . . . . 49 ○塚本研一、杉本勇人	
4) しょっつるの歴史と将来 . . . . . 57 ○杉本勇人、塚本研一	
4. 学会発表概要（16件） . . . . .	67
5. 外部発表論文概要（12件） . . . . .	79
6. 秋田県総合食品研究センター報告規程 . . . . .	87



1. 原著論文（報文）（1件）

1) 低栄養の予防と改善を目指した

スマイルケア食「青」マーク利用許諾商品の開発 . . . . . 1

○熊谷昌則、上原健二、渡邊健、渡邊和子、大野智子





# 低栄養の予防と改善を目指した スマイルケア食「青」マーク利用許諾商品の開発

熊谷昌則<sup>1</sup>、上原健二<sup>1</sup>、渡邊健<sup>2</sup>、渡邊和子<sup>3</sup>、大野智子<sup>4,5</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総合食品研究センター、<sup>2</sup>あぐりこまち株式会社、

<sup>3</sup>有限会社宅配こまち、<sup>4</sup>元聖霊女子短期大学、<sup>5</sup>青森県立保健大学)

Masanori KUMAGAI, Kenji UEHARA, Ken WATANABE, Kazuko WATANABE  
and Tomoko OHNO

## 【要約】

本研究では、農林水産省が推進を図るスマイルケア食のうち、健康維持上栄養補給が必要な人向けの食品として制定されたスマイルケア食「青」マーク基準を満たすような低栄養の予防と改善を目指した「おかゆ」の開発に取り組んだ。その結果、開発商品に対して、農林水産省よりスマイルケア食「青」マーク利用許諾証が、全国で6社目、東北では初めて発行されるに至った。

## 【緒言】

近年、食生活が豊かになるとともに、栄養摂取過多、すなわち過食による肥満などの問題が、心臓病や脳卒中、糖尿病などの生活習慣病を引き起こす原因であるとして喫緊の対策が求められている。しかしながらその一方で、疾病や老化に伴う運動・感覚機能の低下や食欲不振による低栄養状態とは異なり、嚙んだり、飲み込んだりといった食機能には問題がなく、それなりに食べている（食べさせている）にもかかわらず、必要な栄養素量が十分に摂取できていない、いわゆる隠れ低栄養状態の高齢者が在宅療養患者などに多いことが指摘されるようになってきた<sup>1)</sup>。低栄養状態が続くことによって、健常な状態からフレイル<sup>2)</sup>という中間的な段階を経て、サルコペニアやロコモのリスクが高まり、結果として寝たきりや要介護状態へと移行することが懸念されるようになる。幸いなことに、フレイルという段階は、適切な対策によって、再び健常な状態に戻すことが可能であるとされることから、医療施設や老健施設などにおいては、医師や管理栄養士などによる積極的な介入が図られるようになっている。しかしながら、一般に在宅にあっては、食事管理の専門家などはおらず、老老介護や単身世帯の増加などの問題もあって、フレイルからの脱却は容易ではないのが現状である。

そこで本研究では、予防的対応の観点から、健常者を含む、在宅での低栄養の予防と改善を目的として、農林水産省が推進する、小売店でも購入しやすい、新しい介護食品のひとつであるスマイルケア食「青」マーク利用許諾商品の開発について検討した。

スマイルケア食<sup>3)</sup>は、介護食品の市場拡大を通じて、食品産業、ひいては農林水

産業の活性化を図るとともに、国民の健康寿命の延伸に資するべく、これまで介護食品と呼ばれてきた食品の範囲を整理し、新しい枠組みとして整備されたものである。スマイルケア食は、健康維持上栄養補給が必要な人向けの食品に「青」マーク、嚥むことが難しい人向けの食品に「黄」マーク、飲み込むことが難しい人向けの食品に「赤」マークを表示し、それぞれの方の状態に応じた「新しい介護食品」が選択できるようになっている。

このうち、スマイルケア食「青」マークの利用許諾基準は、エネルギーが 100kcal 以上（100g 又は 100ml 当たり）及び、100g（100ml）当たりのたんぱく質含有量が 8.1g（4.1g）以上、又は、100kcal 当たりのたんぱく質含有量が 4.1g 以上の基準を満たすものとなっており、マーク利用許諾ルールに適合していることを「自己適合宣言」として公表した上で、農林水産省に対してマーク利用の申請を行うものとされている<sup>4)</sup>。

本研究では、スマイルケア食「青」マーク利用許諾商品として「おかゆ」の開発に取り組んだ。おかゆは、消化不良あるいは飲み込みが困難なときの食事提供手段として最もポピュラーな食事形態のひとつと考えられるが、実際には水が主成分のため、栄養素量としては不足がちになる。参考のため、一般的なおかゆの栄養成分を表 1 に示したが、「青」マーク利用許諾基準を満たすには、相当の栄養素の強化が必要なことが分かる。そこで、本研究ではいかにしておかゆのエネルギー、たんぱく質を強化するか検討するとともに、利便性・簡便性が高く、保存性にも優れたレトルトおかゆの開発を目指した。

表 1 おかゆ（水稻精白米）の栄養成分

可食部 100g あたり

	エネルギー (kcal)	たんぱく質 (g)	脂質 (g)	炭水化物 (g)	灰分 (g)
全かゆ	<u>71</u>	<u>1.1</u>	0.1	15.7	0.1
五分かゆ	<u>36</u>	<u>0.5</u>	0.1	7.9	0

日本食品標準成分表 2017 年版（七訂）

## 【実験方法】

### 1) 介護食品に対するニーズ調査

事前検討として、平成 28 年 7 月～8 月に、秋田市内の介護支援事業所に勤務する介護員らの協力を得て、介護食に関するアンケート調査を実施した。

### 2) 「青」マーク表示基準を満たすおかゆの組成化検討

おかゆのエネルギー、たんぱく質を強化するための食品素材を調査し、それらを組み合わせ「青」マーク表示基準を満たすように栄養計算して配合されたおかゆを種々試作し、最終的に調製されたプロトタイプの官能試験を実施して嗜好性の評価を行った。

### 3) 「青」マーク表示基準の適合可否判定

一般財団法人日本食品分析センターによる栄養成分分析結果にもとづいて、プロトタイプの「青」マーク表示基準の適合可否判定を行った。

### 4) モニター試験

平成 28 年 12 月に、秋田市内の介護支援事業所ならびに介護施設などに勤務する介護員や栄養士などの協力を得て、プロトタイプの受容性評価のための試食モニター試験を実施した。

## 【結果と考察】

### 1) 介護食品に対するニーズ調査

この調査では、92 名からの回答が得られた。その属性は、男性 6 名、女性 86 名であり、年代は 20 代 1 名、30 代 9 名、40 代 19 名、50 代 33 名、60 代 29 名、未記入 1 名であった。職業別では、介護員が 71 名と最も多く、以下、薬剤師 8 名、介護支援専門員 4 名、看護師 1 名、その他 8 名となっていたことから、今回の結果は介護食を利用させる（食事介助する）立場にある専門職の方々の評価が反映されたものとみることができる。

市販介護食品について、知っていると答えたのは 89%であったのに対して、利用したことがあると答えたのはわずか 24%であった。したがって、認知度は高いものの、利用機会は少ないことが分かった。次に、市販介護食品に求めることは何か尋ねたところ、図 1 に示すように、食べやすさ、飲み込みやすさ、おいしさの次に栄養強化が求められていた。このことから、本研究で取り組む低栄養を予防するための栄養強化の観点はニーズにかなったものであると考えられる。

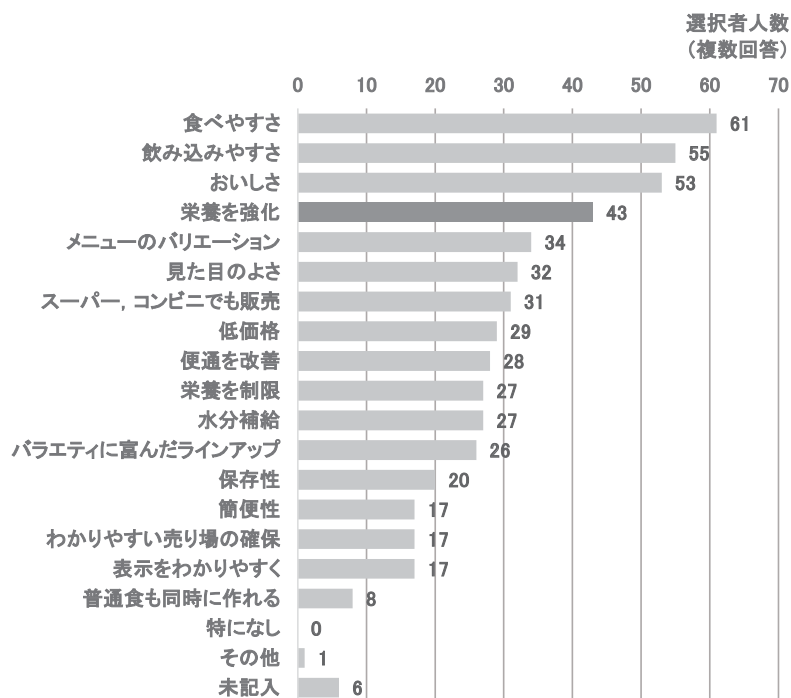


図 1 市販の介護食品に求めること（事前ニーズ調査 n=92）

## 2) 「青」マーク表示基準を満たすおかゆの組成化検討

おかゆの組成化検討にあたっては、「青」マーク表示基準を満たす条件のみならず、当然のことながら、前提としておいしく、繰り返し食べられることが求められた。また、利便性・簡便性が高く、保存性にも優れた製品を目指すため、高温高压処理、すなわちレトルトによる品質劣化が少ない原材料を用いる必要があった。

おかゆのエネルギー強化のため試行錯誤を繰り返し、最終的にはあずきと砂糖などを添加することによって基準を満たせないかどうか検討を進めた。あずきと砂糖による甘いしるこ風味の調味は、“おはぎ”や“秋田諸越”（小豆粉に砂糖を入れて練り固め、型打ちして乾燥させた干菓子）、そして“あずきでっち”（あずき、もち米、砂糖からなり、外観は羊羹状であるが、食べるとおはぎ。県南の東成瀬地区に伝わる郷土料理）などといった、県内でも比較的ポピュラーな味付けであることから、性別を問わず、老若男女に好まれる風味ではないかと期待された。なお、エネルギー強化の目的では糖質（4kcal/g）よりも油脂（9kcal/g）のほうが有効であるため、その添加を試みたものの、風味的に良好な配合を得ることができなかつたので今回は断念した。

次に、たんぱく質強化について検討した。ここでは、しるこ風味の味を損なわない素材としてゼラチンに着目した。素材調査の結果、ゼラチンを改良したコラーゲンペプチドには、加齢による影響を受けやすい部位（骨、関節、皮膚、爪、毛髪）に対して様々な機能性のあることが明らかになった<sup>5)</sup>。従来、コラーゲンの経口摂取による機能性発現については、肉や魚などの他のたんぱく質と同様に小腸でアミノ酸にまで分解されてから吸収されるため、コラーゲンのまま吸収されることはなく、しかも、コラーゲンが分解されたアミノ酸であっても、小腸で吸収された後、再度、コラーゲンとして合成されるわけではない、などの理由から一般には懐疑的な風潮にあった。しかしながら最近になって、コラーゲンが分解されて生じる特有のペプチドのPO（プロリルヒドロキシプロリン）とOG（ヒドロキシプロリルグリシン）は、ペプチドのまま小腸から吸収されることが示され、これらのペプチドには、コラーゲン合成、エラスチン合成、ヒアルロン酸合成などを促進する作用のあることが明らかになってきた<sup>5)</sup>。このようなコラーゲンの機能性についての再評価が行われるようになった機運のなかで、2015年、日本褥瘡学会は「褥瘡予防管理ガイドライン（第4版）」において、褥瘡患者に有効な栄養素として、従来の「亜鉛」、「アスコルビン酸」などに加えて、コラーゲンペプチドを新たに追加した。以上のような観点から、本研究では、おかゆのたんぱく質強化のため、コラーゲンペプチド（SCP-50NB；新田ゼラチン株式会社）を採用し、組成化検討に供した。

スマイルケア食「青」マーク表示基準では求められていないが、本研究では食物繊維の強化についても検討した。なぜならば、低栄養が懸念される状況にあつては便通にも問題のある場合が考えられるからである。また、糖質によるエネルギー強化は食後血糖値の急激な上昇を引き起こすことも懸念される。そこで本研究では、整腸作用や食後の血糖値スパイクを緩和させる機能が期待される素材として、水溶性食物繊維素材イソマルトデキストリン（ファイバリクサ；株式会社林原）の添加を試みた。食物繊維は食品表示基準により100g当たり3g以上含めば、「含む」旨

の表示が可能とされるため、この基準を満たすよう配合処方した。

以上のような、「青」マーク表示基準を満たすおかゆの組成化検討で得られたプロトタイプについて、聖霊女子短期大学で栄養士の資格取得を目指す学生 25 名の協力を得て、官能評価を実施したところ、香り、味、まとまりやすさ、そして総合的な評価が優れているとの結果が得られたため、これを最終組成と決定した。

### 3) 「青」マーク表示基準の適合可判定と利用許諾

スマイルケア食「青」マーク表示基準が満たされているかどうかを検証するために、一般財団法人日本食品分析センターに依頼分析した。その結果、エネルギー、たんぱく質量ともに、スマイルケア食「青」マーク表示基準を満たしていることが確認された。この結果を受けて、あぐりこまち株式会社（代表取締役 渡邊健）では、平成 28 年 11 月 17 日に、農林水産省に対してスマイルケア食「青」マーク利用許諾申請手続きを行った。また、同 11 月 19 日には、あぐりこまち株式会社ホームページ上にて、あずきがゆ（しるこ風味）の自己適合宣言書を公表した。これら一連の手続きを経て、同 11 月 24 日に、農林水産省より利用許諾証が発行されるに至った。これにより、全国で 6 社目、東北では初めての「青」マーク取得企業となった。しかも、主食としては全国でも初めての取得であった。

### 4) 試食モニター試験

この調査では、介護員や栄養士など 105 名からの回答を得た。その属性は、男性 25 名、女性 80 名であり、年代は 20 歳未満 1 名、20 代 5 名、30 代 24 名、40 代 29 名、50 代 28 名、60 代 10 名、70 代 3 名、80 代 5 名であった。職業別では、介護支援専門員、介護施設関係者、介護員、要介護者のいる家族が合わせて 43 名、管理栄養士・栄養士が 21 名、歯科医師、薬剤師、看護師が 9 名、その他が 32 名となっていた。先の事前ニーズ調査（図 1）では、介護員が多数を占めていたのに対して、今回のモニター試験では、より広範囲の属性群からの回答を得ることができた。

実際にプロトタイプであるあずきがゆ（しるこ風味）のおかゆを試食して評価してもらった結果は、図 2 に示すように、香り、味、食べやすさ、飲み込みやすさ、まとまりやすさ、べたつき、そして総合評価の各項目で、普通以上の評価を得ることが分かった。ただし、唯一、外観についてはやや悪いという結果となったが、その理由として、あずき粉末によるまだら状の見た目が悪いことが指摘された。1 食（200g）当たりの量については、多い、やや多いという意見が約 2/3 を占めるといふ結果（図 2 下）となり、再検討が必要となった。また、主食として食べるのか、間食として食べるのかによっても評価は異なることが指摘された。次に、層別しての結果について述べる。ほとんどの項目で、男性のほうが女性よりもやや良いとする傾向にあり、女性の評価がやや厳しいことがうかがわれた。1 食当たりの量については、女性は多いとする傾向にあるのに対して、男性はちょうど良いとする意見が多いなどの違いが見られた。

年代別の違いについてみると、60 歳未満の評価に比べて 60 歳以上では、外観、香り、総合評価の評点がよく、しかも飲み込みやすさやまとまりやすさ、べたつき

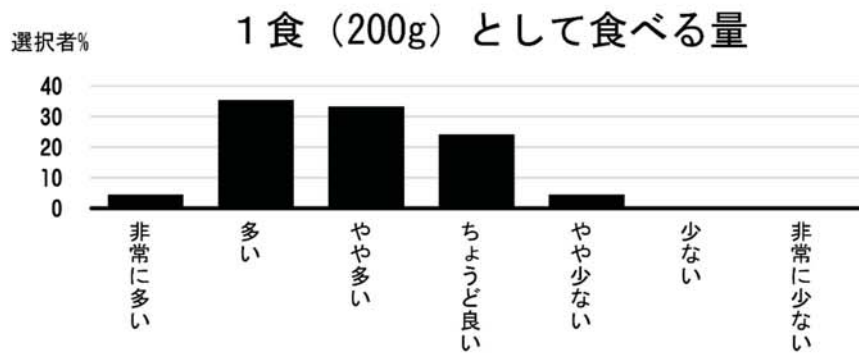
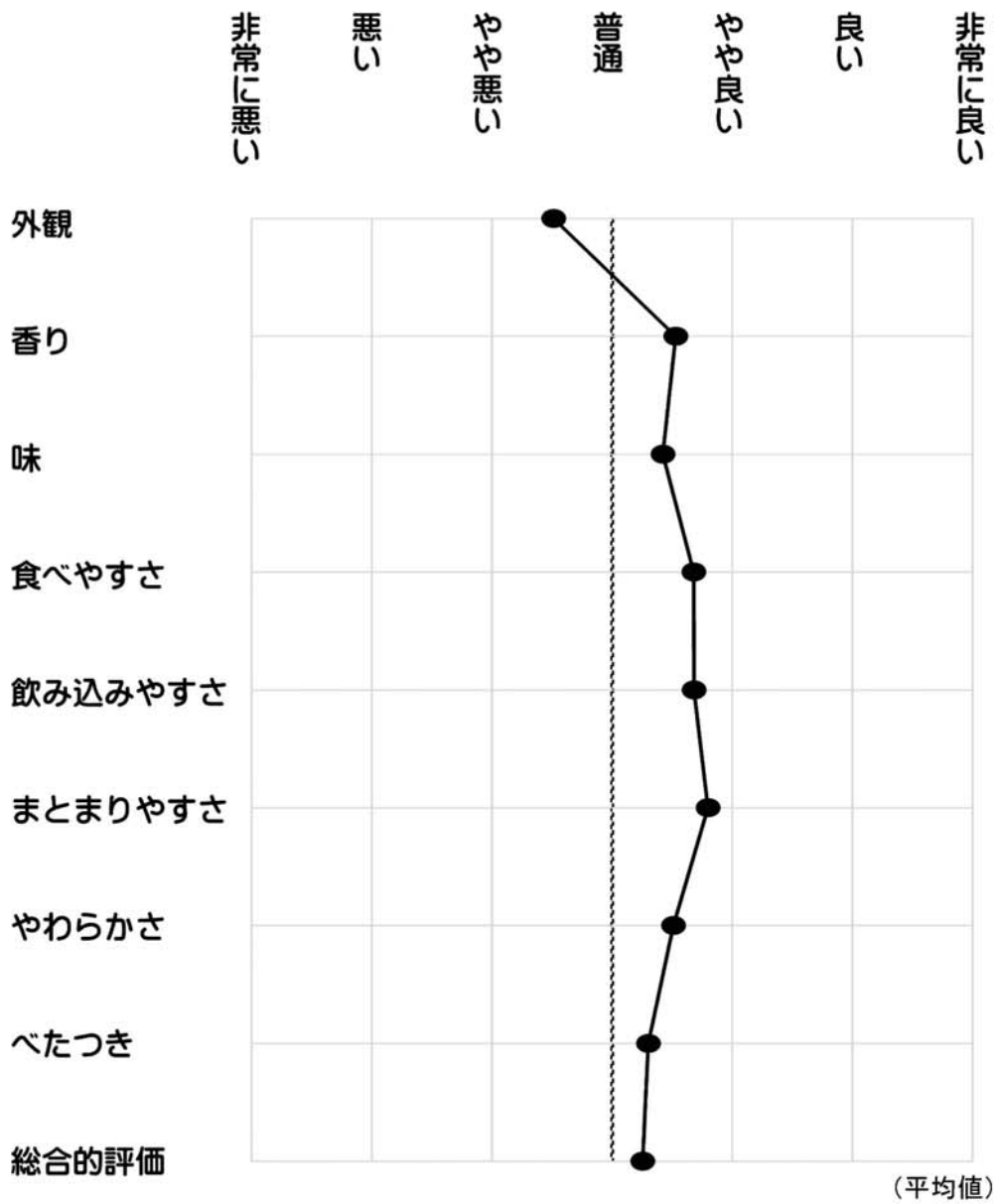


図2 プロトタイプ（あずきがゆしるこ風味）のモニター評価の結果  
（全体 n=105）

■ 歯科医師  
 看護師  
 薬剤師 n=9

■ 管理栄養士、栄養士 n=21

■ 介護支援専門員、介護員、  
 介護施設関係者、要介護者  
 のいる家族 n=43

□ その他 n=32

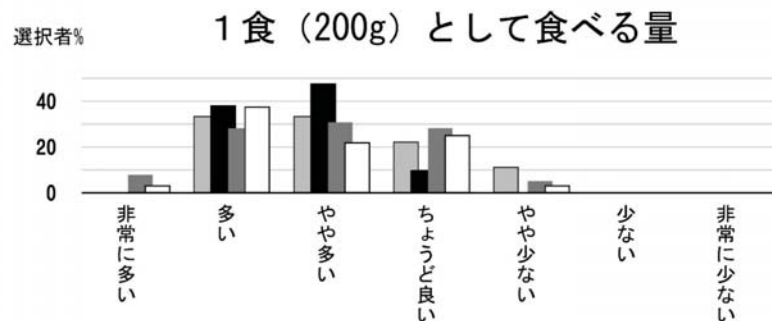
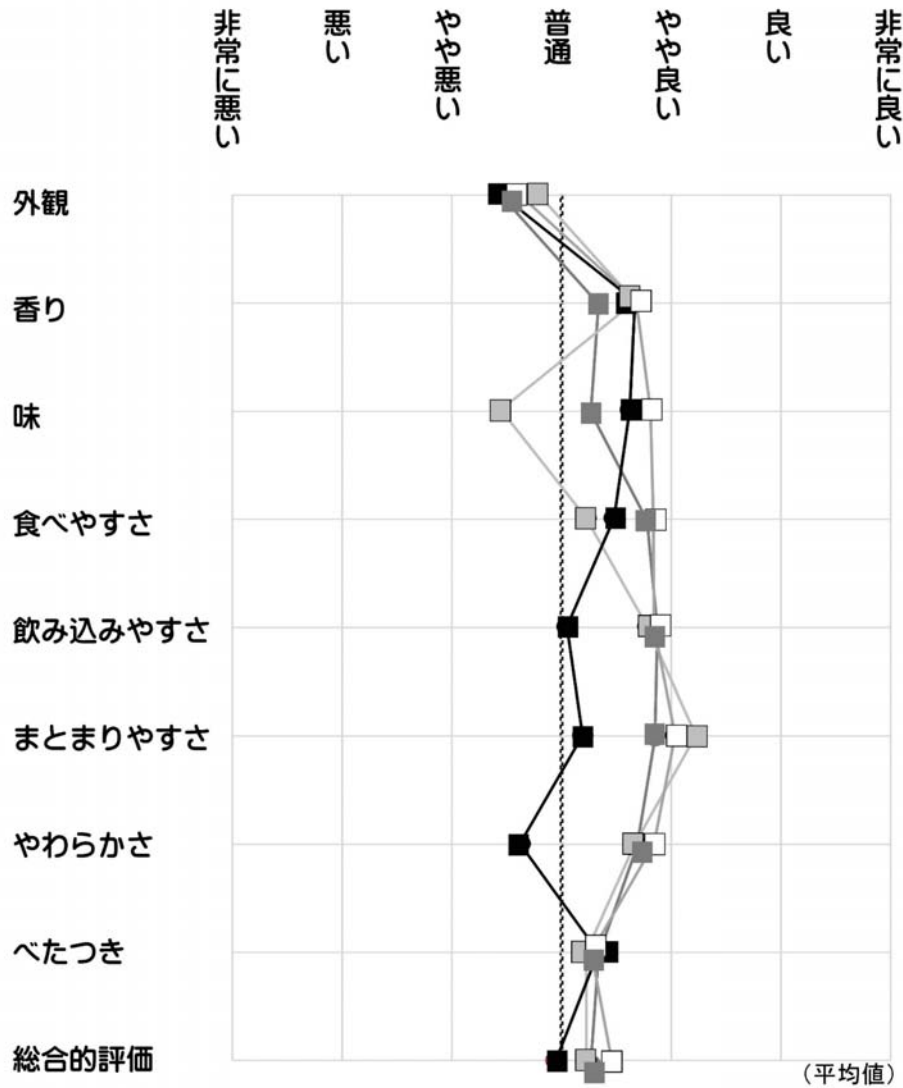


図3 プロトタイプ（あずきがゆしるこ風味）のモニター評価の結果  
 （職業別）

などといった嚥下機能に関わる特性についても高評価となり、高齢者からの支持を得ていたことが分かった。1食当たりの量については、若年者は多いという結果が多かったのに対して、逆に高齢者ではちょうど良いとする意見が多いという結果であった。

図3には職業別(属性別)による評価結果を示したが、特徴的なのは管理栄養士・栄養士の群の評価である。他群に比べて、飲み込みやすさ、まとまりやすさ、やわらかさといった物性面での評点が低く、厳しい評価結果となった。また、歯科医師・看護師・薬剤師の群では味の評価が良くなかった。

今回の調査においても、市販介護食品について知っているかどうか尋ねたところ、知っていると答えたのは91%であり、事前ニーズ調査とほぼ同様の結果であった。そこで、市販介護食品があることを知っていて、かつ、利用したことがあると答えた28名を抽出して全体の評価結果と比較したところ、味や食べやすさ、べたつき、総合評価の項目は、全体の評価結果よりも高評価であったのに対して、飲み込みやすさ、まとまりやすさ、やわらかさについては低評価であった。したがって、このような、飲み込みやすさ、まとまりやすさ、やわらかさといった主として嚥下機能に関わるような特性については改善が必要と考えられる。一方で、先に述べたように、60歳以上による評価では高評価であったことも含め、低栄養予防食品としてのターゲットに対する十分な配慮と対策について再検討する必要がある。

同様に、市販介護食品に求めることは何か尋ねたところ、事前ニーズ調査でも指摘された食べやすさ、飲み込みやすさ、おいしさ、栄養の強化を選択した回答者が多かったが、今回の調査では低価格を求めるとする意見も多かった点に注目する必要がある。

## 5) 商談会への出展

以上の成果により、平成29年1月25日(水)・26日(木)に東京ビッグサイトで行われた高齢者食と介護食の専門展示会&セミナー「メディケアフーズ展2017」(主催:UBMメディア株式会社)に企業出展し、スマイルケア食のプロモーション活動を行った(図4)。

また、平成29年1月31日にホテルメトロポリタン秋田で行われた6次産業化の推進に向けた異業種交流会(主催:秋田県・日本政策金融公庫秋田支店)に企業出展した。

いずれの商談会においても、あずきがゆ(しるこ風味)の評価は上々で、介護食、スマイルケア食に対する関心の高さ、期待感が伺えた。





図4 商談会への出展（メディケアフーズ展 2017）

【謝辞】

本研究の遂行に当たり、アンケート調査や試食モニター調査で多大なご協力をいただきました、有限会社やさしい手秋田企画事業室業務マネージャー中川希美さん、BFホールディングス管理栄養士谷口典子さん、秋田県身体障害者更生訓練センター管理栄養士高橋牧子さん、医療法人久盛会介護老人保健施設三楽園管理栄養士齋藤麻菜美さんに心より感謝申し上げます。

また、本研究の一部は、あきた産学官連携未来創造研究事業平成28年度フィージビリティスタディ事業の助成を受けたものです。

【引用文献】

- 1) 国立長寿医療研究センター（平成25年3月）平成24年度老人保健健康増進等事業在宅療養患者の摂食状況・栄養状態の把握に関する調査研究報告書 p14.
- 2) 一般社団法人日本老年医学会（平成26年5月）フレイルに関する日本老年医学会からのステートメント.
- 3) 添野覚（2017）スマイルケア食の現状と展望 砂糖類・でん粉情報 5月号 2-6.
- 4) 農林水産省食料産業局食品製造課（平成28年11月）スマイルケア食識別マーク利用許諾要領.
- 5) 小山洋一（2010）天然素材コラーゲンの機能性 皮革科学, 56, 71-79.



## 2. 原著論文（研究ノート）（1件）

- 1) 秋田オリジナル麴「あめこうじ」の特徴 ～甘酒の甘さについて～ . . . 11  
○尾張かおる、佐藤友紀、須藤あさみ、黒崎文華、小笠原博信



## 秋田オリジナル麴「あめこうじ」の特徴

### ～甘酒の甘さについて～

尾張かおる、佐藤友紀、須藤あさみ、黒崎文華、小笠原博信  
(秋田県総合食品研究センター)

Kaoru OWARI, Tomonori SATOH, Asami SUTOH, Fumika KUROSAKI  
and Hironobu OGASAWARA

#### 【緒言】

秋田県には麴を利用した多数の伝統食品がある。この秋田の麴文化をさらに全国に広めることができるように、秋田県総合食品研究センター（以下 総食研と略す）は株式会社秋田今野商店と共同で、平成 22 年から独自の手法で麴を開発した<sup>1-3)</sup>。当初は吟醸酒用として開発したこの麴は、グルコアミラーゼ活性が高いことから強い甘さが特徴であるが、同時にすっきりとした味わいもあったことから食品加工用としても活用している。秋田オリジナル麴「あめこうじ」と名付けられたこの麴で作る甘酒の甘さの特徴について、検討を行った。

#### 【方法】

##### 1. 米麴の酵素活性測定

米麴の酸性プロテアーゼは国税庁所定分析法注解<sup>4)</sup>に従い測定した。 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼはキッコーマンバイオケミファ株式会社の $\alpha$ -アミラーゼ測定キット、グルコアミラーゼ測定キット、及び酸性カルボキシペプチダーゼ測定キットを用いて測定した。

##### 2. 甘酒製造試験と成分分析

米麴と水を 1:2 の重量比で混合し、58℃で糖化して甘酒を作成した。糖化時間による成分変化を測定するため最初の 1 時間は 15 分ごと、その後は 1 時間ごとに 6 時間行いサンプリングした。

##### 3. 甘酒の成分分析

甘酒の一部を遠心分離し上清のブリックス糖度、グルコース濃度、及びアミノ酸濃度を測定した。ブリックス糖度はブリックス計、グルコース濃度は和光純薬工業株式会社製グルコース C II-テストワコー、及びアミノ酸は日本電子製全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V を用いてそれぞれ測定した。

##### 4. 甘酒官能試験

官能評価に用いた甘酒は市販の甘酒（「あめこうじ」使用のもの 4 点、「あめこ

うじ」以外のもの4点)、及び市販米麴(「あめこうじ」3点、「あめこうじ」以外1点)を方法2に従って調整したもの合計12点である。パネル13人により、「甘さ」と「すっきり感」について5点法による評価(評点が小さいほど高評価)を行った。

## 【結果と考察】

### 1. 麴の糖化関連酵素活性とグルコース濃度

県内で市販されている「あめこうじ」と白色麴各1点をモデル麴として、測定したアミラーゼ活性を表1に示す。 $\alpha$ -アミラーゼ活性は「あめこうじ」より白色麴が高かったが、グルコース生成に影響の強いグルコアミラーゼ活性は「あめこうじ」が白色麴の約1.8倍高かった。

この麴を6時間糖化して甘酒を製造し、甘さの指標となるブリックス度とグルコース濃度を測定した。経時的变化をそれぞれ図1、図2に示す。ブリックス度は「あめこうじ」甘酒と白色麴甘酒でほとんど差がなかったが、グルコース濃度はいずれの時間においても「あめこうじ」甘酒が白色麴甘酒を上回っていた。「あめこうじ」甘酒のグルコース濃度が高いのは、グルコアミラーゼ活性が高いことに起因していると考えられた。また、グルコース濃度に差があるにも関わらずブリックス度がほぼ同じであることは、白色麴甘酒には「あめこうじ」甘酒にはないグルコース以外の固形成分が存在している可能性が示唆された。

表1 米麴の水分とアミラーゼ活性

	$\alpha$ -アミラーゼ U/乾燥麴 g	グルコアミラーゼ U/乾燥麴 g
あめこうじ	71.49	4.20
白色麴	89.73	2.34

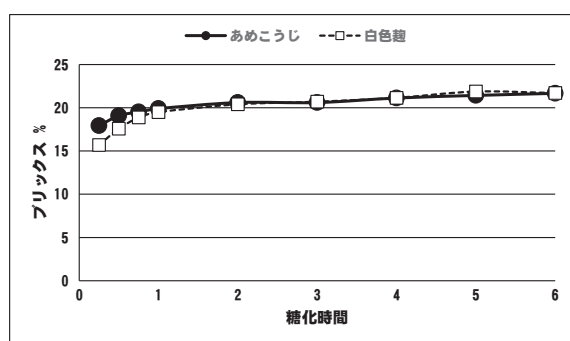


図1 糖化時間とブリックス糖度 (%)

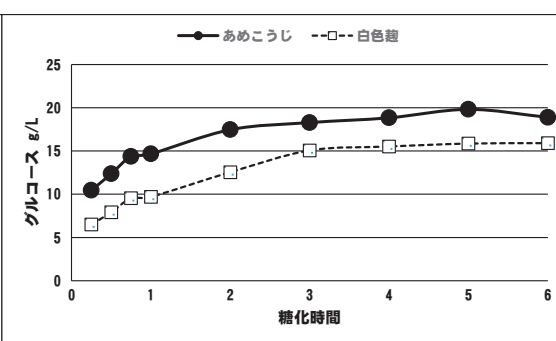


図2 糖化時間とグルコース濃度

## 2. 麴のタンパク分解関連酵素と遊離アミノ酸

県内で製造された「あめこうじ」8点と白色麴2点を用いて、酸性プロテアーゼ活性と酸性カルボキシペプチダーゼを測定した。

両酵素とも、平均値では「あめこうじ」の方が低く最低値も同様であったが、最高値は「あめこうじ」の方が高かったことから、麴によりバラツキがあることが示唆された。

4時間糖化して得た甘酒の遊離アミノ酸量を測定し、両酵素活性との関連を調べた結果を図3、4に示す。「あめこうじ」8点のタンパク分解酵素活性は遊離アミノ酸量と相関があり、酵素活性が低いほど遊離アミノ酸量が少なかった。

表2 米麴のタンパク分解関連酵素活性

	酸性プロテアーゼ U / g 乾燥麴		酸性カルボキシペプチダーゼ U / g 乾燥麴	
	あめこうじ	白色麴	あめこうじ	白色麴
平均	3585	4107	2.07	2.40
最高	5180	4123	3.12	2.73
最低	1728	4091	0.83	2.07

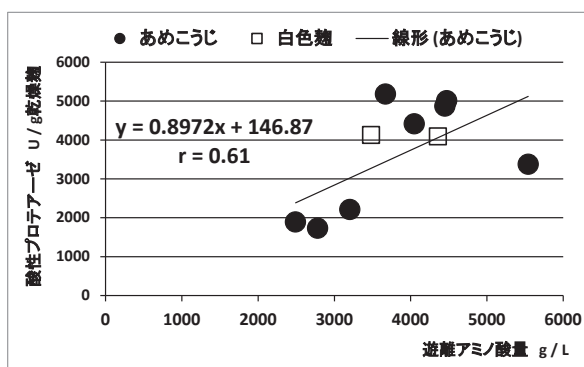


図3 遊離アミノ酸量と酸性プロテアーゼ活性

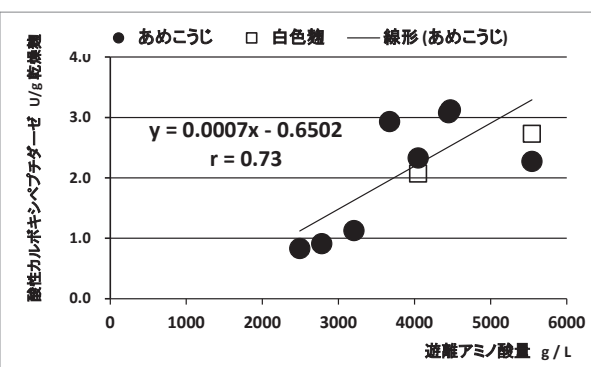


図4 遊離アミノ酸量と  
酸性カルボキシペプチダーゼ活性

## 3. 甘酒官能試験

「あめこうじ」を用いた甘酒は「甘いがすっきりしている」と表現されることが多い。このことを確認するために、総食研職員13名をパネルとして「甘さ」および「すっきり感」について官能試験を行い、その結果を表3に示した。平均値では両方とも「あめこうじ」甘酒の評価がよかったが、t検定を行ったところ「あめこうじ」甘酒と他の麴を用いた甘酒には有意差はなかった。

この甘酒のグルコース濃度と遊離アミノ酸量を測定し、評点と比較した結果を図5、6に示す。甘酒のグルコース量は甘酒製造時の糖化条件等により異なり、濃度はおよ

そ6%~12%生成されていた。「あめこうじ」以外の甘酒では甘さの評価とグルコース濃度に負の相関が見られ、グルコース濃度が上がるに従い甘さの評価がよかった。が、「あめこうじ」甘酒ではグルコース濃度が上がると甘さの評価が下がる傾向がわずかに見られ、「あめこうじ」甘酒のグルコース濃度には適量があることが考えられた。甘酒のすっきり感は一般的に遊離アミノ酸量に関与していると言われていたが、今回の結果においても相関が高い傾向であった。しかし、「あめこうじ」以外を用いた甘酒でも、遊離アミノ酸量が「あめこうじ」甘酒より少ないものがあつたことから、原料処理や製麹方法などを注意することにより、「あめこうじ」独特のすっきり感がさらに向上するのではないかと考えられた。

表3 甘酒の官能試験結果 (評点が小さいほど高評価)

麹菌	甘さの評価		すっきり感の評価	
	あめこうじ n = 7	あめこうじ以外 n = 5	あめこうじ n = 7	あめこうじ以外 n = 5
平均	2.4	2.6	2.5	2.9
最小	1.6	2.2	2.2	1.9
最大	2.9	2.9	2.9	3.3

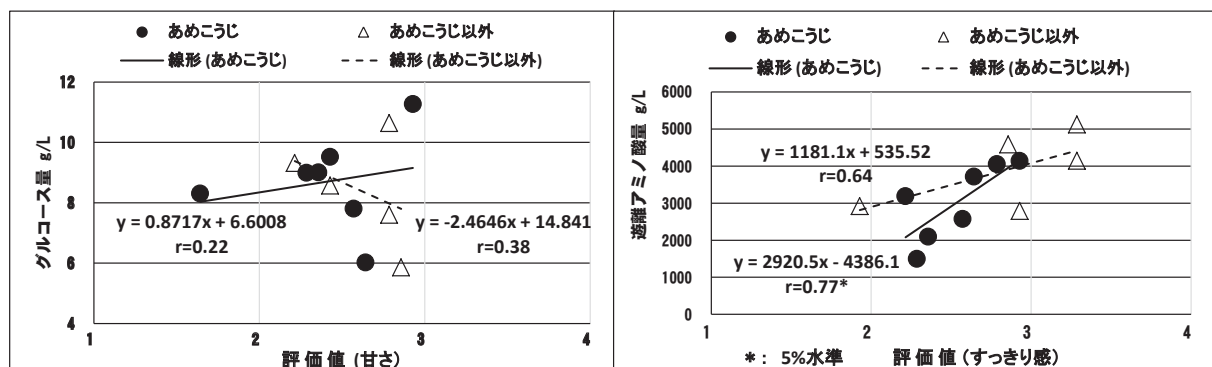


図5 官能評価 (甘さ) とグルコース量

図6 官能評価 (すっきり感) と遊離アミノ酸量

【引用文献】

- 1) Ogasawara, H., Obata, H., Hata Y., Takahashi S., Gomi K. (2009) *Crawler*, a novel *Tc1/marinert* type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 441-449.
- 2) 小笠原博信、佐々木康子、渡辺隆幸、佐藤勉、瓜生撰、今野宏、高橋砂織 (2013) トランスポゾン転移技術を利用した白色麹菌株の育種と発酵食品への応用 秋田県総合食品研究センター報告 **15**, 19-28.
- 3) 特許第5803009号 「新規麹菌」(27年9月11日)
- 4) 第四回改正国税庁所定分析法注解(注解編集委員会編)(1993) p223-226, 日本醸造協会、東京.



### 3. 総説 (4 件)

- 1) ヒト肝細胞の形成過程における  
リポタンパク質産生能の獲得機構に関する研究 . . . . . 15  
○佐々木 玲
- 2) 地域特産食品ハタハタの特性解明と利用加工技術開発 . . . . . 29  
○塚本研一
- 3) しょっつるの生産技術改良と用途開発研究 . . . . . 49  
○塚本研一、杉本勇人
- 4) しょっつるの歴史と将来 . . . . . 57  
○杉本勇人、塚本研一



# ヒト肝細胞の形成過程における リポタンパク質産生能の獲得機構に関する研究

佐々木 玲

(秋田県総合食品研究センター 食品機能グループ)

Akira SASAKI

## 【要約】

本研究は、肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生能の獲得機構について明らかにすることを目的に行った。はじめに、肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現パターンにより、ヒト培養肝細胞株（6種）を未分化型、高分化型および正常型に分類した。また、これらの肝細胞株が分泌するリポタンパク質を精密に分析することにより、未分化型はリポタンパク質を産生しないこと、高分化型と正常型が産生するリポタンパク質の粒子サイズに違いがあることを明らかにした。これらの成果は、分化段階によって肝細胞により産生されるリポタンパク質の種類が異なることを示している。またリポタンパク質の精密な分析は、肝細胞の分化段階を判断する上で適切であることから、新規な分化マーカーとして有用であることを提案した。

VLDL（超低密度リポタンパク質）の形成には、ApoB100 遺伝子（アポリポタンパク質 B100）および MTP（ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質）遺伝子の発現が必須であり、これらは肝細胞の分化に関与する HNF（肝細胞核因子）タンパク質群の制御下にある。そこでヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞を用いて、HNF タンパク質群が肝細胞の形成およびリポタンパク質産生能に与える影響について検証した。遺伝子工学的な手法による HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  タンパク質の同時強制発現により、間葉系幹細胞から肝細胞への分化を促され、さらに MTP タンパク質の発現が誘導されることを明らかにした。しかしながら、ApoB100 遺伝子の発現は誘導されたことが明らかになったが、ApoB100 タンパク質の発現レベルは非常に低く、またリポタンパク質は検出されなかった。以上の結果より、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  タンパク質の同時強制発現は、肝細胞への分化および MTP タンパク質の発現を誘導できること、一方、リポタンパク質産生能の獲得には、さらなる要因による ApoB100 遺伝子の活性化が必要であることを提唱するに至った。

本研究の成果は、肝細胞におけるリポタンパク質産生機構について新たな知見を提供するものである。またこれらの知見は、リポタンパク質を標的とした新たな作用機序による脂質異常症改善薬の開発につながるものである。

## 1. 緒言

肝臓は、糖や脂質、薬物などの代謝に関わる中心的臓器であり、その機能の多くは肝実質細胞（以下、肝細胞）が担っている。新規薬物の探索や薬物の毒性試験などの創薬研究の分野において、肝臓を生体外で再現した肝臓モデルの開発が求められている。従来から肝臓モデルの構築に用いられてきたヒト初代培養肝細胞は、慢性的な供給不足や機能を維持したままの継代培養が困難といった課題が挙げられる<sup>1)</sup>。そこで近年、ES 細胞や iPS 細胞などから肝細胞を分化誘導する試みが行われている。しかしながら、未だ機能的にヒト初代培養肝細胞と同等な分化誘導肝細胞は得られていない。

脂質の代謝は肝細胞が担う重要な機能の一つである。脂質代謝のバランスが崩れ、血液中の脂質が増減した状態を脂質異常症という。脂質異常症は、動脈硬化を引き起こし、心筋梗塞や脳梗塞などの血管系疾患のリスク要因となる。血液中において中性脂肪(TG)およびコレステロールなどの脂質は、親水性のアポリポタンパク質およびリン脂質に包まれたリポタンパク質として存在する<sup>2)</sup> (図 1)。リポタンパク質は、小腸上皮細胞および肝細胞において合成され、粒子の大きさや密度の違いにより、カイロミクロン (CM)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、高密度リポタンパク質 (HDL) の主要 4 分画に分類される (図 2)。肝細胞で合成される VLDL および LDL はそれぞれ、肝臓から末梢組織への TG およびコレステロールの輸送に関与し<sup>3,4)</sup>、HDL は末梢組織から肝臓へのコレステロールの逆転送に関与する<sup>5)</sup> (図 3)。肝細胞はその分化過程においてリポタンパク質産生能を獲得するが、その分子機構について未だ不明な点が多い。そこで本研究では、肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生能の獲得機構の解明を目的とした。そこでまず、由来の異なる種々のヒト培養肝細胞株における既知の肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量およびそれぞれのヒト培養肝細胞株が産生するリポタンパク質プロファイルの詳細な解析を行い、肝細胞の分化段階とリポタンパク質産生能の関連性を検証した。次に、肝細胞への分化を誘導する転写因子の発現が幹細胞から肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響について検証した。

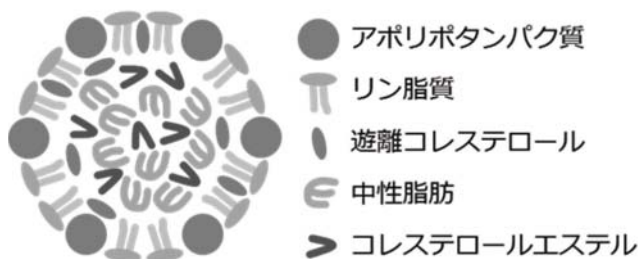


図1. リポタンパク質の構造

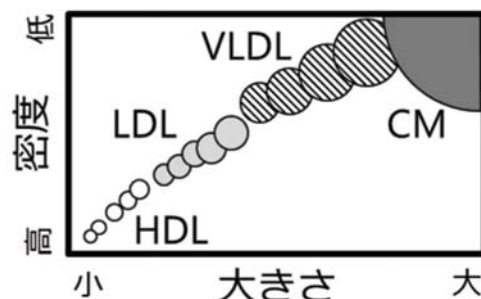


図2. リポタンパク質の種類

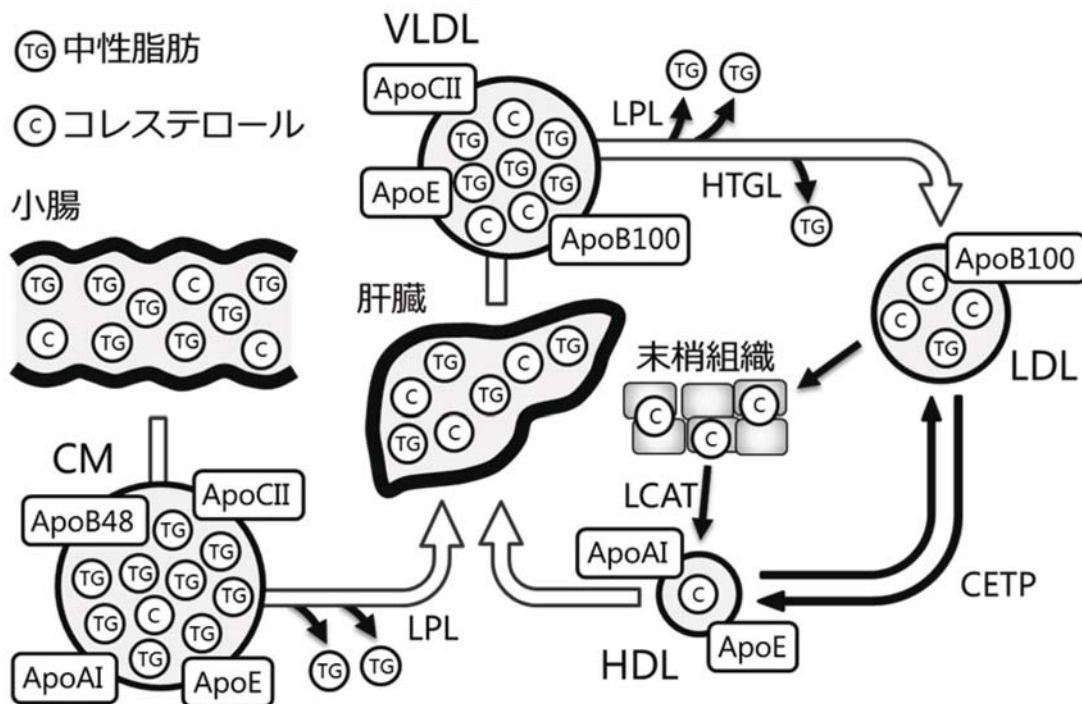


図3. リポタンパク質の代謝

## 2. 分化段階の異なるヒト培養肝細胞株におけるリポタンパク質産生の解析<sup>6)</sup>

ヒト肝臓株化細胞である HepG2 細胞において、酪酸ナトリウムによる分化誘導処理は、肝特異的転写因子遺伝子群および脂質代謝関連遺伝子群の発現を亢進させることから<sup>7)</sup>、肝細胞の分化とリポタンパク質産生を含む脂質代謝に関連が予測された。そこではじめに、由来の異なる種々のヒト培養肝細胞株を既知の肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現パターンに従って分類し、それぞれの分化段階を評価した。次に、ヒト培養肝細胞株が産生するリポタンパク質を詳細に解析し、肝細胞の分化段階とリポタンパク質産生能の関連を検証した。

### 1) 肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現解析

リアルタイム RT-PCR 法により、ヒト培養肝癌細胞株 (HLE 細胞、HLF 細胞、HepG2 細胞、HuH-7 細胞および HepaRG 細胞) およびヒト初代培養肝細胞 (HC 細胞) における肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現解析を行った。その結果、HLE 細胞および HLF 細胞において、肝特異的転写因子である HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$ 、血清タンパク質であるアルブミン (ALB) およびトランスフェリン (Tf) の mRNA がほとんど発現していないことが明らかとなった (図 4)。また、HepaRG 細胞および HC 細胞における薬物代謝酵素遺伝子 CYP2C9 および CYP3A4 の mRNA 発現量は、他の培養肝細胞株と比較して有意に高いことが明らかとなった (図 5)。

次に、肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現パターンの類似性に基づいたクラスター解析を行い、それぞれの肝細胞を分類したところ、それぞれの培養肝細胞株は

3つのグループ、未分化型（HLE、HLF）、高分化型（HepG2、HuH-7）、正常型（HepaRG、HC）に分類された（図6）。

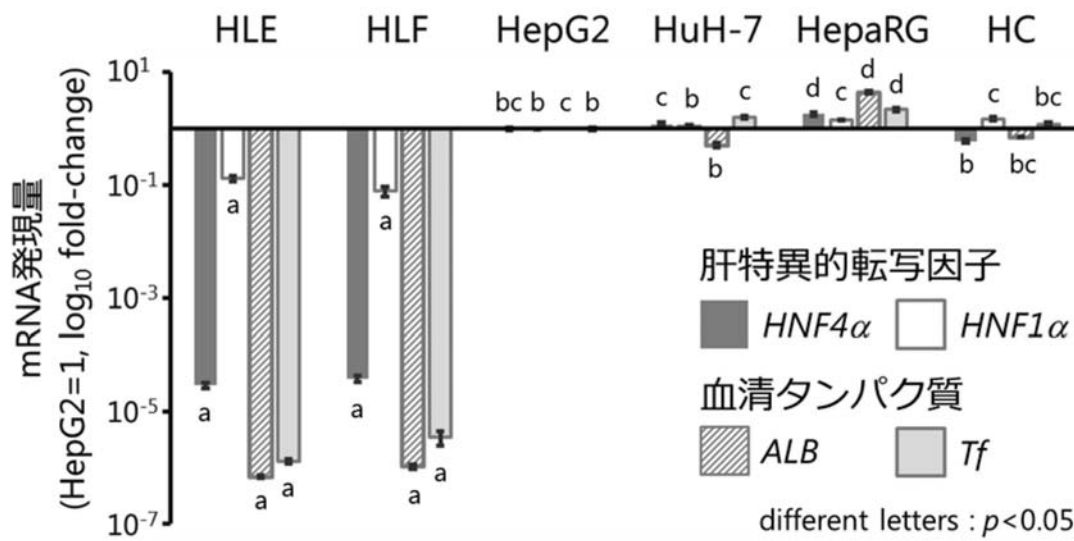


図4. ヒト培養肝細胞株における肝細胞分化マーカー遺伝子群のmRNA発現

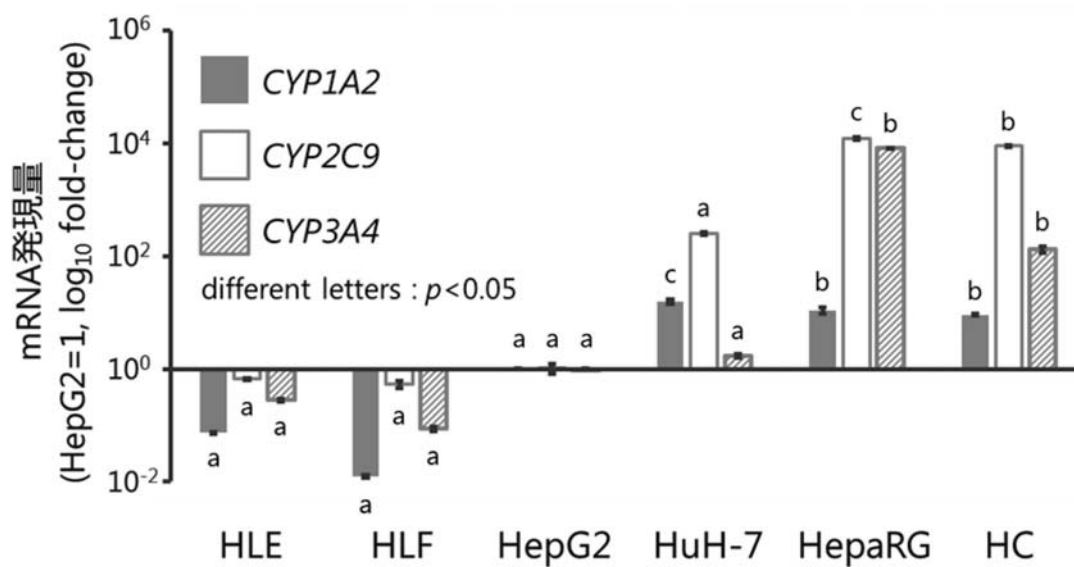


図5. ヒト培養肝細胞株における薬物代謝酵素遺伝子群のmRNA発現

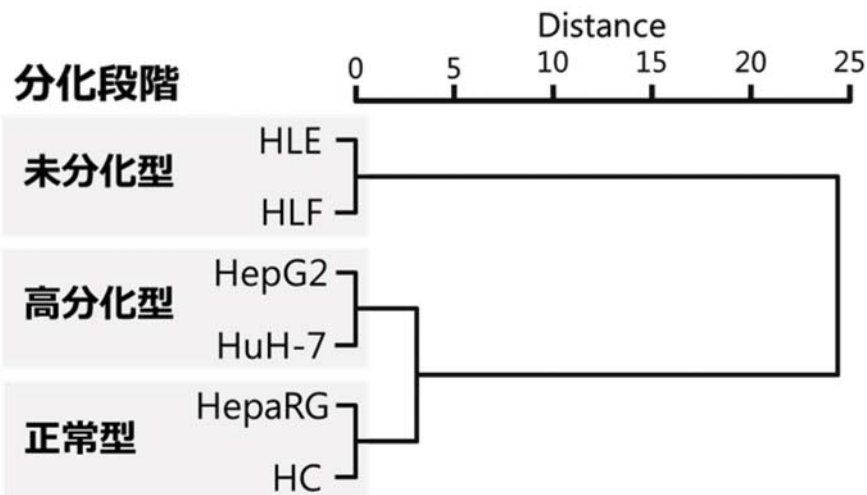


図6. ヒト培養肝細胞株のクラスター解析

## 2) ヒト培養肝細胞株の培養上清に含まれるリポタンパク質プロファイルの解析

LipoSEARCH 法<sup>8-11)</sup>により、それぞれの培養上清に含まれるリポタンパク質を詳細に解析した結果、高分化型 (HepG2、HuH-7) および正常型 (HepaRG、HC) では、すべてのリポタンパク質画分においてピークが検出された。このことから、高分化型、および正常型はリポタンパク質を産生することが判明した (図 7)。さらに、それぞれが産生するリポタンパク質画分の割合を検証したところ、正常型では VLDL 画分が多いのに対し、高分化型では LDL 画分が多いことが明らかとなった (図 8)。このことから、高分化型の産生するリポタンパク質の大きさは、正常型と比較して、小さいことが判明した。一方、未分化型の培養上清からはいずれのリポタンパク質画分においてもピークが検出されず (図 7)、リポタンパク質を産生できないことが明らかとなった。

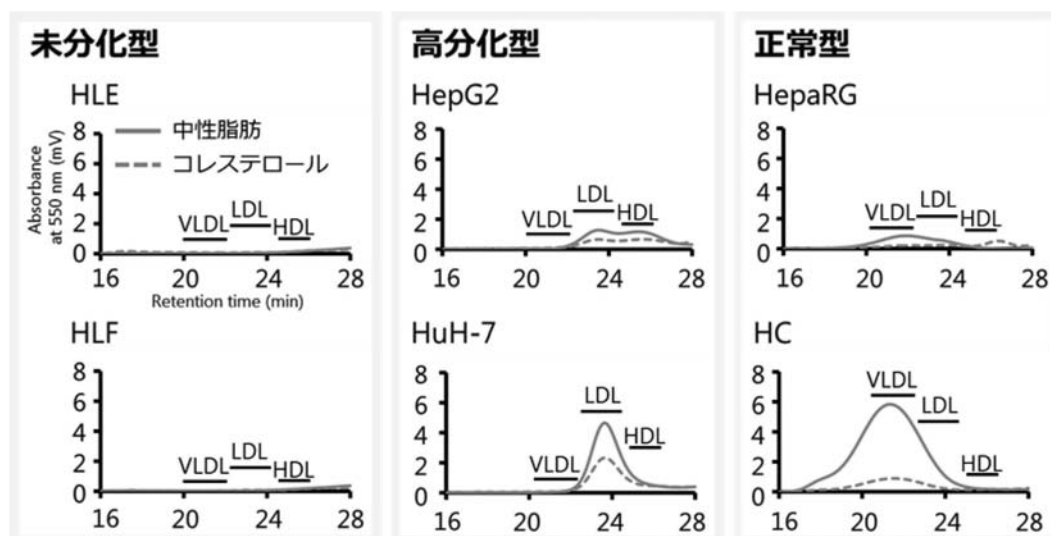


図7. ヒト培養肝細胞株における培養上清のリポタンパク質プロファイル

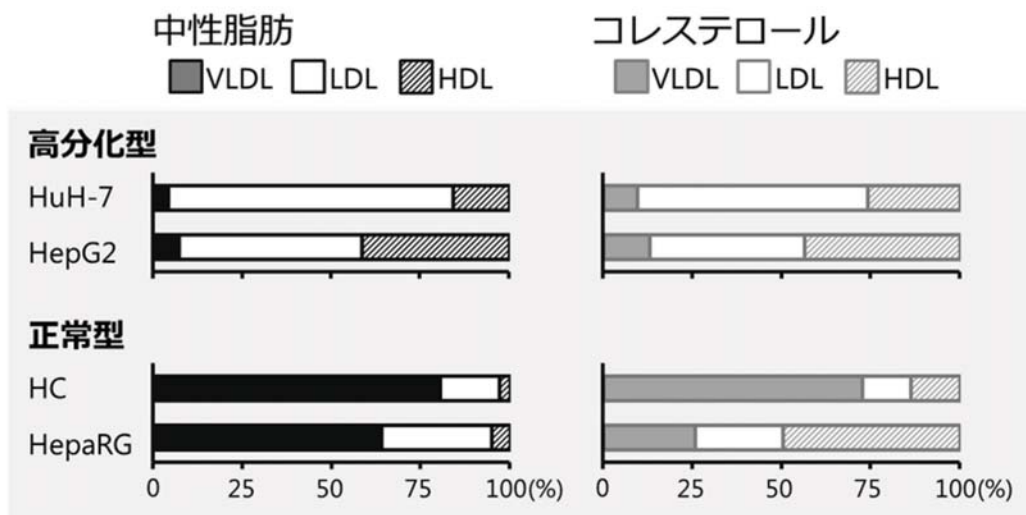


図8. ヒト培養肝細胞株が産生する各リポタンパク質画分に含まれる脂質量の割合

### 3) 脂質代謝関連遺伝子群の発現解析

リアルタイム RT-PCR 法により、それぞれの培養肝細胞株における脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現解析を行った。その結果、未分化型における脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量は、高分化型および正常型と比較して低く (図 9)、特にリポタンパク質の形成に関わる遺伝子群 (ApoA1、ApoB100 および MTP) の mRNA 発現量が著しく低かった (図 10)。このことから、未分化型 (HLE、HLF) では、リポタンパク質が形成されていないと考えられる。

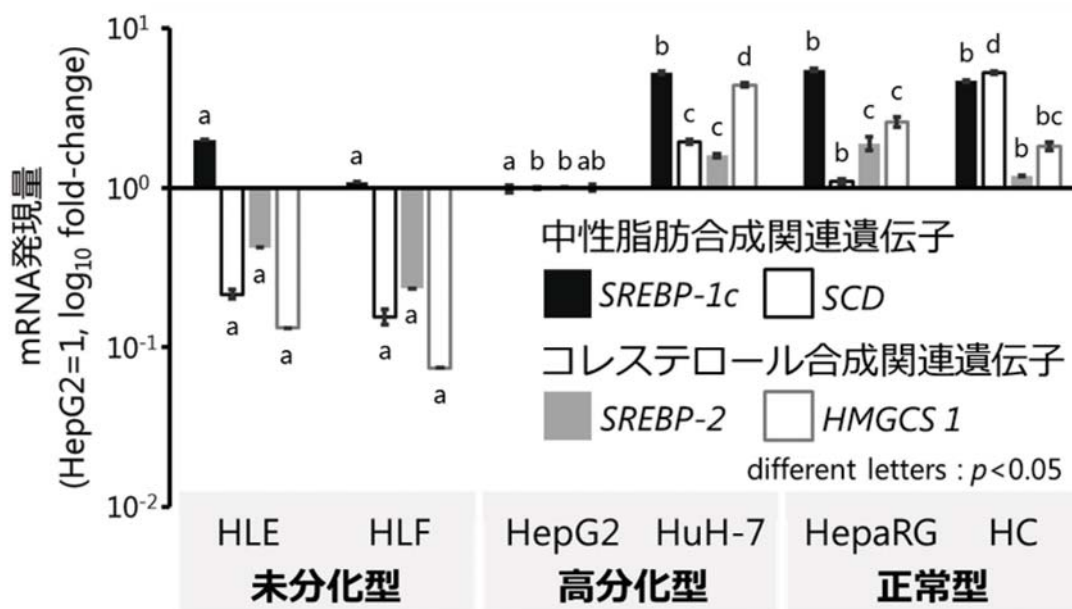


図9. ヒト培養肝細胞株における脂質合成関連遺伝子群のmRNA発現



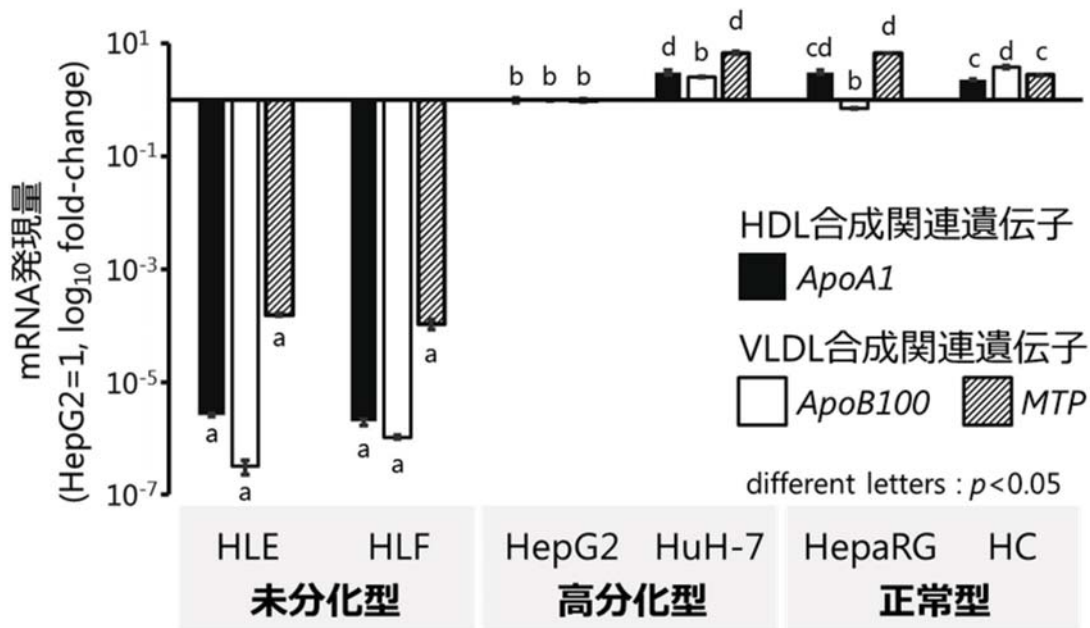


図 10. ヒト培養肝細胞株におけるリポタンパク質合成関連遺伝子群の mRNA 発現

以上の結果から、肝細胞はその分化段階によりリポタンパク質の産生能および性状に違いがあることが明らかとなり、リポタンパク質の解析が肝細胞の分化段階を判断する新たな分化マーカーになることが示唆された。

### 3. 肝細胞核因子の強制発現がリポタンパク質産生に与える影響<sup>12)</sup>

肝細胞での VLDL の合成には、HNF (肝細胞核因子) 群の制御下にある ApoB (アポリポタンパク質 B100) および MTP (ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質) の発現が必須である<sup>13-19)</sup>。しかしながら、HNF 群が誘導する肝細胞への分化とリポタンパク質産生の関連について着目した研究はこれまで行われていない。そこで、ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において HNF 群を強制発現させることにより、HNF 群が肝細胞への分化およびリポタンパク質産生に与える影響について検証した。

#### 1) HNF 群の強制発現が肝細胞への分化に与える影響

肝細胞核因子である FOXA2、HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  をそれぞれ単独で強制発現させた UE7T-13 細胞並びに HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  を同時に強制発現させた UE7T-13 細胞をそれぞれ樹立し、細胞の形態変化およびリアルタイム RT-PCR 法により、各クローン株における肝細胞分化マーカー遺伝子群 ( $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) および ALB) および薬物代謝酵素遺伝子 (CYP) 群の mRNA 発現を比較した。また、細胞内および培養上清に含まれる脂質の定量、加えてウェスタンブロット法およびリアルタイム RT-PCR 法により、脂質代謝関連遺伝子群の発現解析を行った。HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  の発現により、細胞の形態が紡錘状から敷石状に変化し (図 11)、AFP の

mRNA 発現が誘導された (図 12)。さらに、HNF1 $\alpha$ の発現は他の HNF 群の発現よりも CYP 群の mRNA 発現を強く誘導した (図 13)。これらのことから、HNF1 $\alpha$ の発現が肝細胞への分化に与える影響が大きいことが示唆された。さらに、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は、敷石状への細胞形態の変化や AFP の mRNA 発現誘導に加え、ALB の mRNA 発現を誘導し (図 12)、CYP 群の mRNA 発現をさらに強く誘導した (図 13)。これらのことから、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は各 HNF の単独発現よりも、肝細胞への分化をより強く誘導すると考えられた。

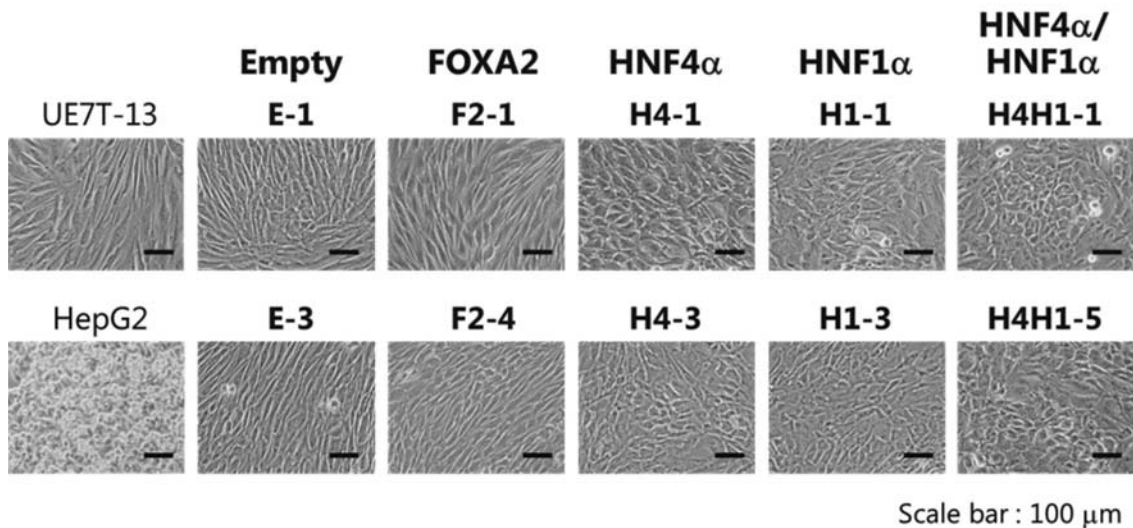
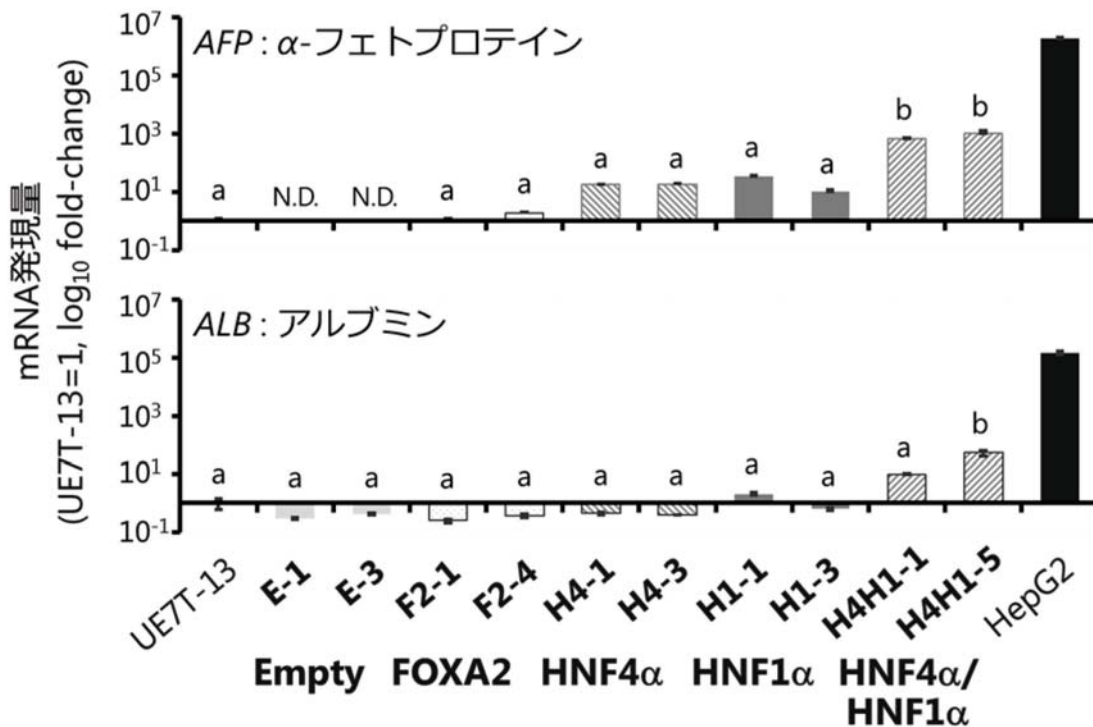


図 1 1. HNF発現ベクター導入細胞における細胞形態



N.D. : not detected, different letters :  $p < 0.05$  except for HepG2 cells.

図 1 2. HNF発現ベクター導入細胞における肝細胞分化マーカー遺伝子群のmRNA発現

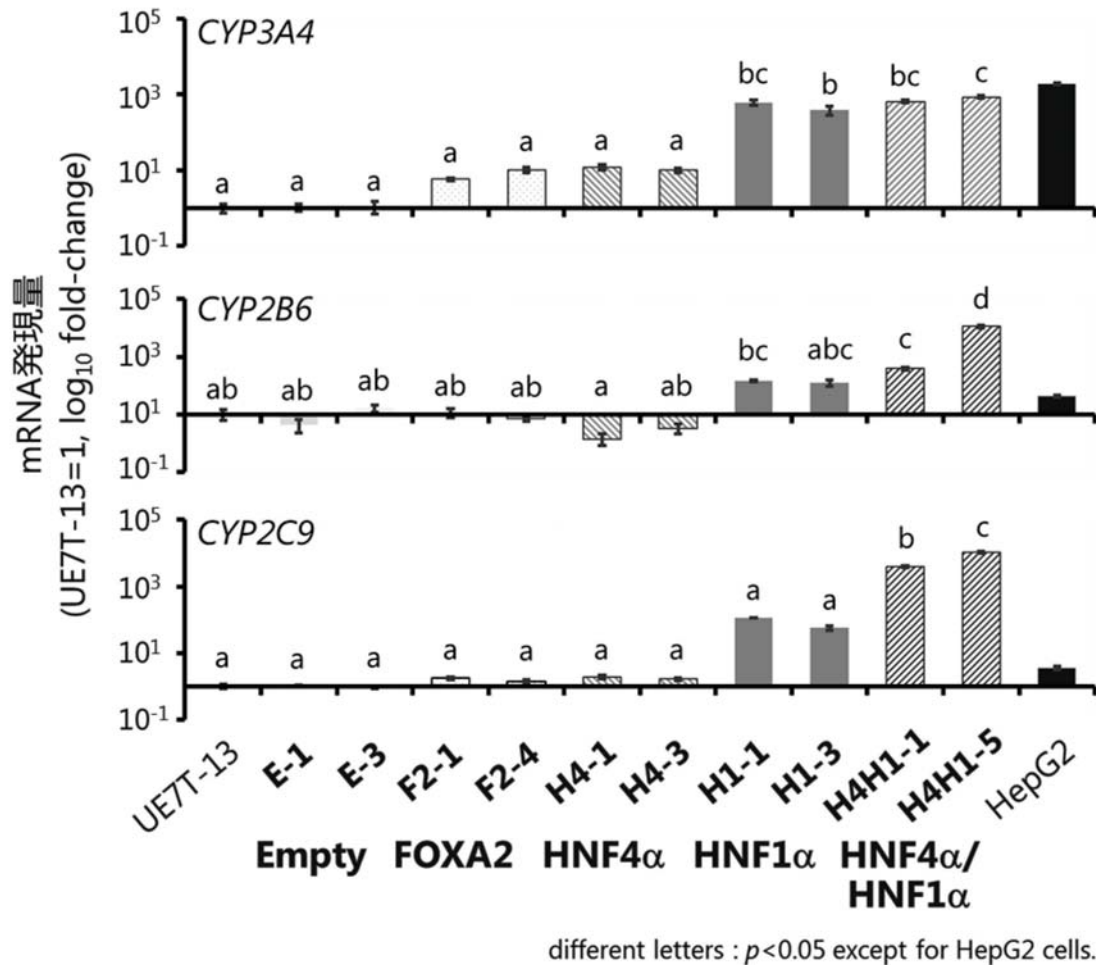


図 1 3. HNF発現ベクター導入細胞における薬物代謝酵素遺伝子群のmRNA発現

## 2) HNF 群の強制発現がリポタンパク質産生に与える影響

HNF1αの単独発現およびHNF4α/HNF1αの同時発現は、細胞内への脂質蓄積量を増加させた(図14)が、培養上清における脂質量に影響はみられなかった(図15)。これらのことから、いずれのHNFを発現させてもリポタンパク質産生能の獲得には至らないものの、HNF4α/HNF1αの同時発現によって細胞内脂質蓄積量はHepG2細胞と同等であった。

HNF4αおよびHNF1αの単独発現はそれぞれ、ApoB100およびMTPのmRNA発現量を増加させた(図16)。しかし、ApoB100およびMTPタンパク質の発現を誘導するに至らなかった(図17)。一方、HNF4α/HNF1αの同時発現は、ApoB100およびMTPのmRNA発現を共に増加させ(図16)、ApoB100タンパク質の発現誘導には至らなかったものの、MTPタンパク質の発現を誘導した(図17)。これらの結果から、リポタンパク質産生能の獲得には、HNF4α/HNF1αの同時発現によるMTPタンパク質の発現誘導に加え、さらなる肝細胞への分化関連遺伝子の導入などによる、ApoB100の発現誘導が必要であることが示唆された。

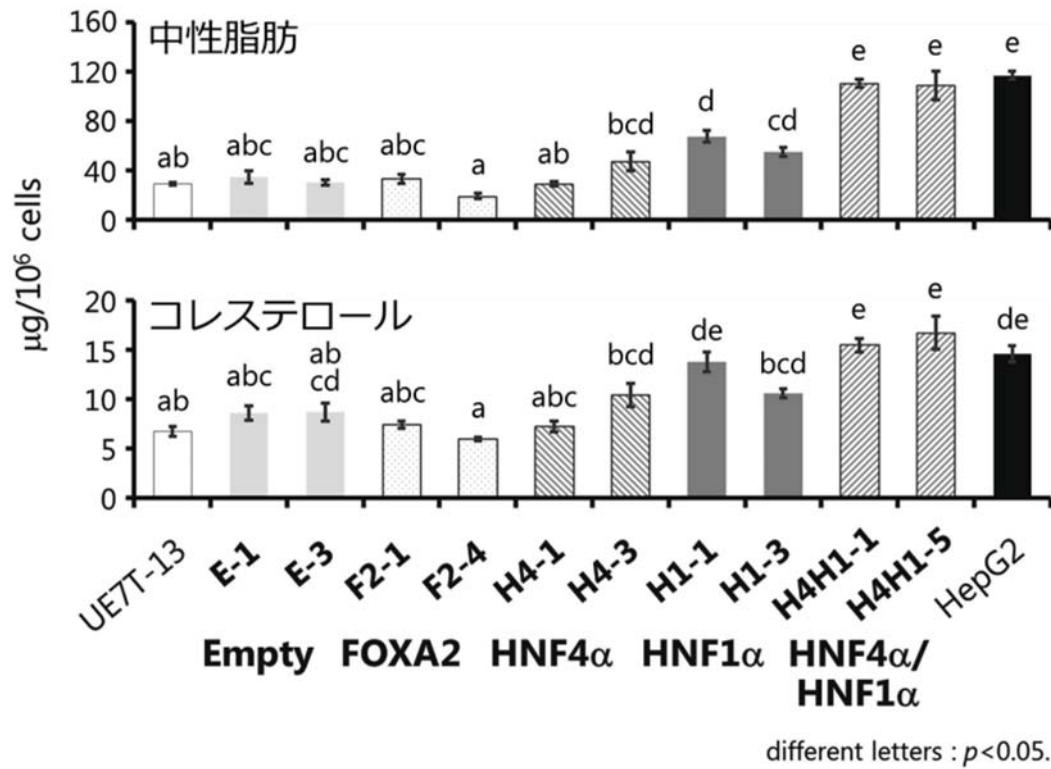


図 1 4 . HNF発現ベクター導入細胞における細胞内脂質量

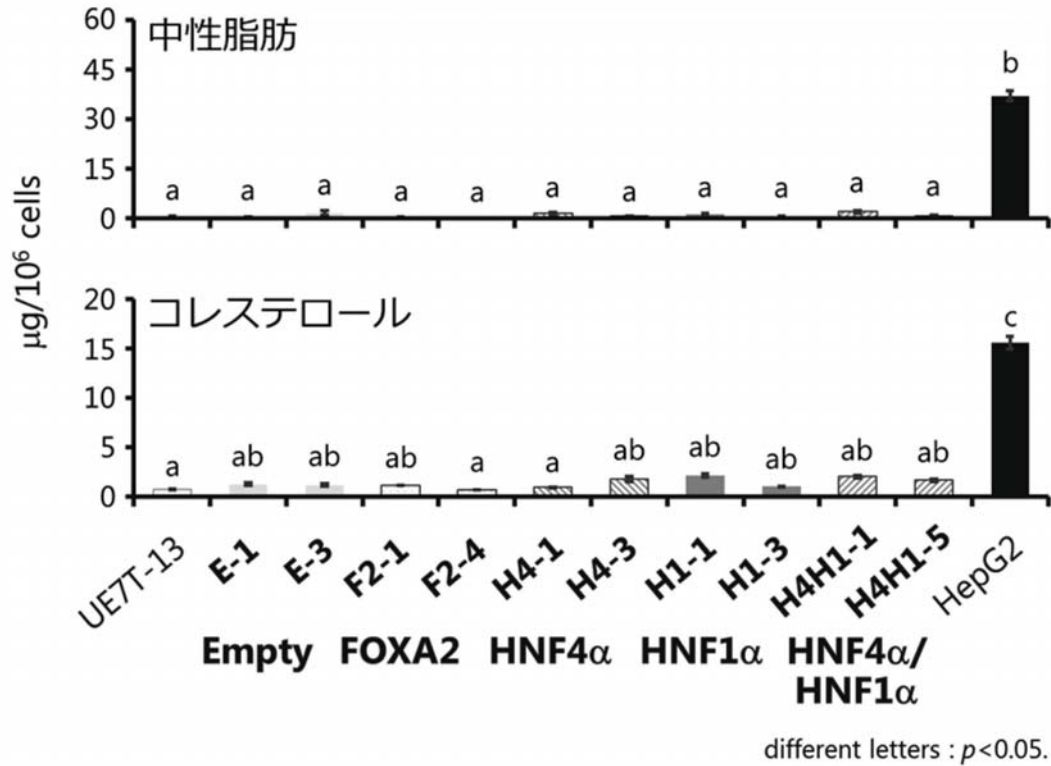
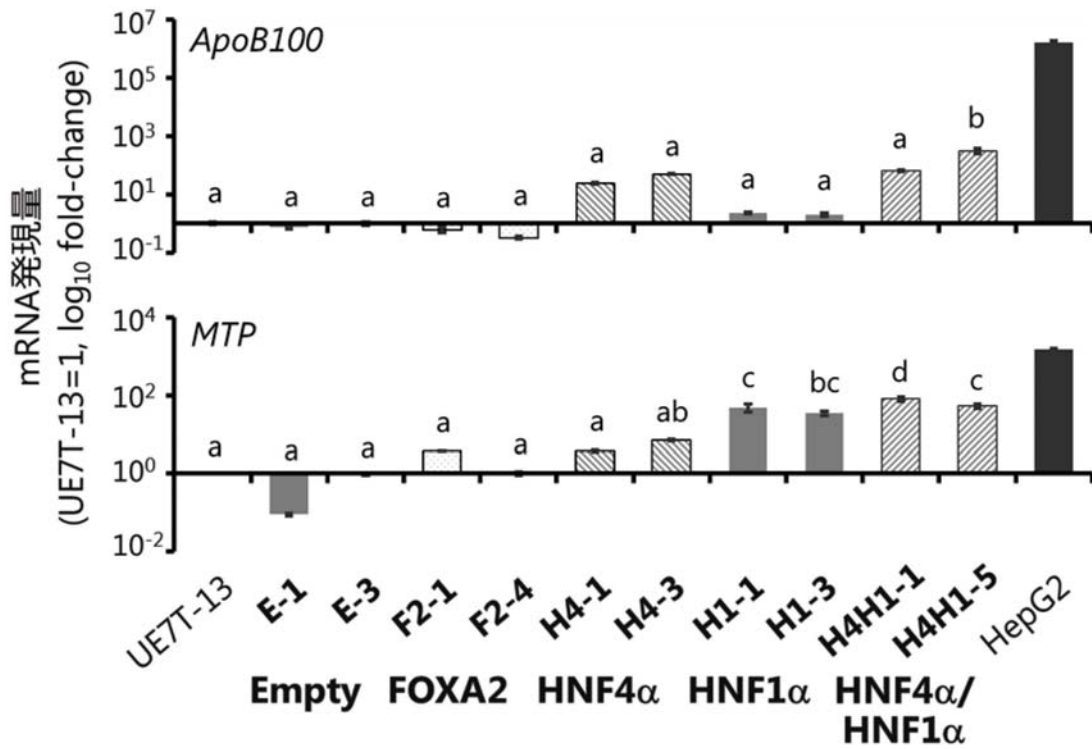


図 1 5 . HNF発現ベクター導入細胞における培養上清中の脂質量



N.D. : not detected, different letters :  $p < 0.05$  except for HepG2 cells.

図 1 6 . HNF発現ベクター導入細胞におけるApoB100およびMTP mRNA発現量

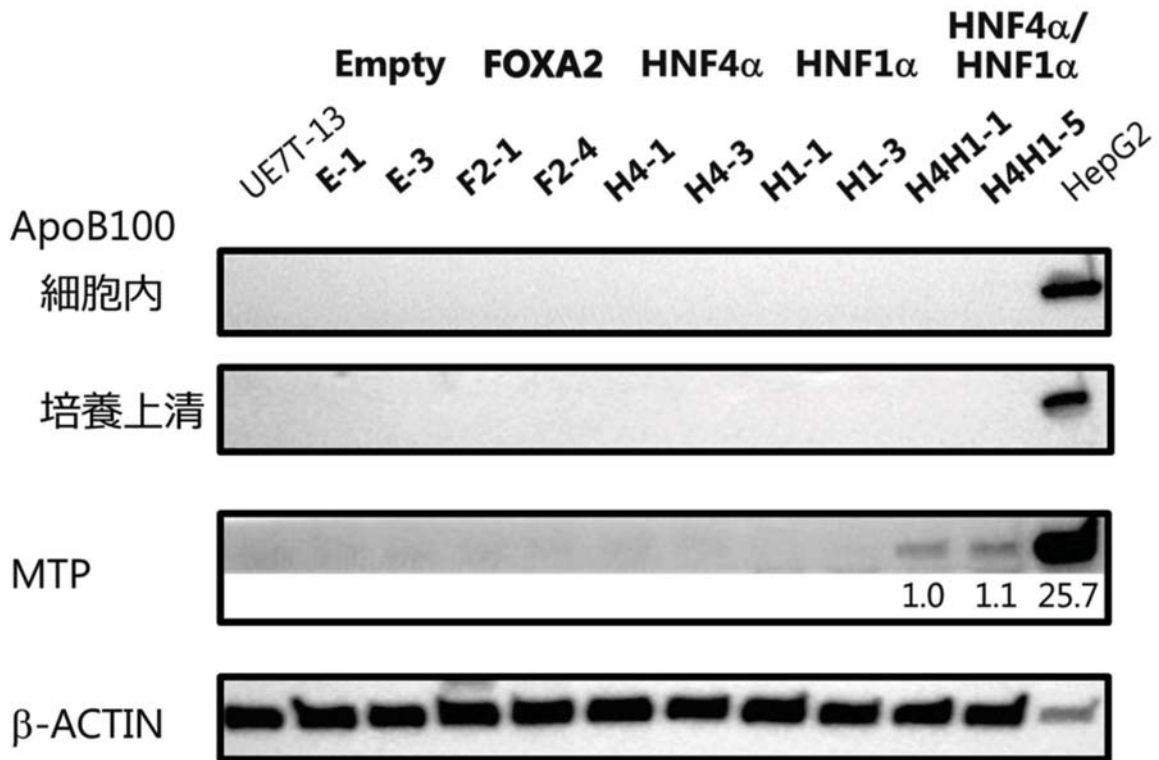


図 1 7 . HNF発現ベクター導入細胞におけるApoB100およびMTPタンパク質の発現

#### 4. 総括

本研究の結果から、分化段階が異なる肝細胞におけるリポタンパク質の産生能、また産生されるリポタンパク質の性状に差異があることを見出し、肝細胞の産生するリポタンパク質の解析が肝細胞の分化段階を判断する新たな分化マーカーになることを提示した。また、ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞における HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は、肝細胞への分化を強く誘導し、細胞内への脂質の蓄積を促進することを見出した。さらに、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現により、MTP タンパク質の発現が誘導されることを明らかにした。しかしながら、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現のみでは、十分な ApoB100 タンパク質の発現誘導には至らなかったことにより、リポタンパク質産生能の獲得にはさらなる ApoB100 の効率的な発現誘導が必須であると考えられる。以上のように、ヒト肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生の獲得機構に関する新たな知見が示された。

#### 【謝辞】

本総説は、筆者の秋田県立大学大学院生物資源科学研究科生物資源科学専攻における博士論文の内容をまとめたものです。博士課程への在籍にあたり、秋田県研究職員大学院博士後期課程研修支援事業補助金の助成を受けました。秋田県および関係各位に深く感謝いたします。

研究の遂行と論文の執筆にあたり、主査をお願いいたしました秋田県立大学大学院生物資源科学研究科生物資源科学専攻分子細胞機能研究グループ動物分子工学研究室教授 小林正之博士、副査をご担当いただいた同大学院分子細胞機能研究グループ分子生物学研究室教授 村田純博士、微生物機能研究グループ生物科学研究室准教授 春日和博士、特別審査員をご担当いただいた同大学院微生物機能研究グループ生物科学研究室教授 小嶋郁夫博士には多くの有益な助言と御指導をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の大部分は秋田県総合食品研究センターで行われました。食品加工研究所主席研究員 熊谷昌則博士、食品機能グループ上席研究員 畠恵司博士、企画管理室主任研究員 樋渡一之博士をはじめとする職員の皆様に御指導、御協力、激励を賜りました。厚く御礼申し上げます。

## 【引用文献】

- 1) Ebert A. D., Svendsen C. N. (2010) Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 367-372.
- 2) Shen C. N., Slack J. M., Tosh D. (2000) Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nature Cell Biol.*, **2**, 879-887.
- 3) Davis R. A., Boogaerts J. R., Borchardt R. A., Malone-McNeal M., Archambault-Schexnayder, J. (1985) Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Varied synthetic response of individual apolipoproteins to fasting. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14137-14144.
- 4) Havel R. J. (1984) The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J. Lipid Res.*, **25**, 1570-1576.
- 5) Tall A. R. (1998) An overview of reverse cholesterol transport. *Eur. Heart J.*, **19**, A31-35.
- 6) Sasaki A., Kimura F., Miura M., Toshima G., Takahashi J., Maruya S., Kobayashi M. and Hata K. (2017) Lipoprotein profiles of hepatic cell lines at various stages of differentiation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **53**, 93-95.
- 7) Takahashi J., Kimura F., Miura M., Iwama Y., Toshima G., Hata K. (2013) Advantages of assessing lipoprotein profiles in hepatic cell differentiation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **49**, 554-556.
- 8) Usui S., Hara Y., Hosaki S., Okazaki M. (2002) A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J. Lipid Res.*, **43**, 805-814.
- 9) Okazaki M., Usui S., Ishigami M., Sakai N., Nakamura T., Matsuzawa Y., Yamashita S. (2005) Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 578-584.
- 10) Toshima G., Iwama Y., Kimura F., Matsumoto Y., Miura M., Takahashi J., Yasuda I., Arai N., Mizutani H., Hata K., Usui S., Okazaki M. (2013) LipoSEARCH®; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. *J. Biol. Macromol.*, **13**, 21-32.
- 11) Okazaki M., Yamashita S. (2016) Recent advances in analytical methods on lipoprotein subclasses: calculation of particle numbers from lipid levels by gel permeation HPLC using "spherical particle model". *J. Oleo Sci.*, **65**, 265-282.
- 12) Sasaki A., Hiwatashi K., Kumagai K., Hata K. and Kobayashi M. (2017) Relationships between the expression of hepatocyte nuclear factors and factors essential for lipoprotein production in a human mesenchymal stem cell line, UE7T-13. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 262-270.
- 13) Elovson J., Chatterton J. E., Bell G. T., Schumaker V. N., Reuben M. A.,

- Puppione D. L., Reeve J.R., Young N. L. (1988) Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *J. Lipid Res.*, **29**, 1461–1473.
- 14) Hussain M. M., Shi J., Dreizen P. (2003) Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J. Lipid Res.*, **44**, 22–32.
- 15) Hussain M. M., Bakillah A. (2008) New approaches to target microsomal triglyceride transfer protein. *Curr. Opin. Lipidol.*, **19**, 572–578.
- 16) Sparks J. D., Dong H. H. (2009) FoxO1 and hepatic lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, **20**, 217–226.
- 17) Hayhurst G.P., Lee Y.H., Lambert G., Ward J.M., Gonzalez F.J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1393–1403.
- 18) Ladias J.A., Hadzopoulou-Cladaras M., Kardassis D., Cardot P., Cheng J., Zannis V., Cladaras C. (1992) Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15849–15860.
- 19) Sheena V., Hertz R., Nousbeck J., Berman I., Magenheim J., Bar-Tana J. (2005) Transcriptional regulation of human microsomal triglyceride transfer protein by hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ . *J. Lipid Res.*, **46**, 328–341.



# 地域特産食品ハタハタの特性解明と利用加工技術開発

塚本研一

(秋田県総合食品研究センター)

Kenichi TSUKAMOTO

## 【要約】

秋田県特産のハタハタ漁獲量は一時期年間約 70 トンまで激減したが、漁業関係者の努力で 3,000 トンまで回復した。漁獲量が安定すると品質保持技術、品質特性把握および新規加工技術開発などの研究開発ニーズが大きくなってきた。しかし、ハタハタを食料や加工原料としてとらえた研究は少なく、ハタハタ利用加工を進める上で多くの科学的な基礎知見が必要であった。本研究は秋田県を代表する地域特産食品ハタハタを研究対象とし将来的にも地域特産食品として存続させるため、その食品科学特性を明らかにし、問題点の解決と品質改善のための技術開発を行ったものである。

これまでほとんど研究されていなかった地域特産食品ハタハタの多くの特徴を明らかにした。ハタハタの漁獲時期では9月の脂質含量が多く美味しい条件を備えており、新しい旬の時期であることを明らかにした。その脂質は強い抗酸化性があることも科学的に証明した。ブリコの粘り物質は新規なタンパク質であり、ブリコの接着と硬化は海水塩濃度で作用する酵素が関与する可能性を明らかにした。また、ハタハタずしは乳酸発酵の有無で2つに分類できることを科学的に明らかにした。ハタハタの9月漁獲、ハタハタ脂質の抗酸化剤としての利用、ハタハタずしの味の選択性など新たに提案できる。また、現在のハタハタ利用上の問題点について解決技術を検討し、12月の短期集中漁獲による魚価低下を避けるため、畜養による出荷調整技術を開発した。冷凍保存と魚卵加工の障害原因が酵素作用である可能性から、加熱による酵素失活処理を検討し冷凍保存法と魚卵加工技術を新たに開発した。乳酸発酵が不安定であった問題から、ハタハタずしに乳酸菌を添加し乳酸発酵を改善した品質安定化技術を開発した。今後はハタハタが地域特産食品としてより長く続いて行くよう、高品質な新しい地域特産食品をめざし今後も研究開発を進めていく必要がある。

## 1. 緒言

地球方緯度の東経 140 度線と北緯 40 度線が交わる秋田県は東北地方の日本海側に位置している。秋田県は北側の青森県境に白神山地や十和田湖、東側の岩手県境に八幡平を含む奥羽山脈や田沢湖、南側の山形県境に鳥海山、西側は日本海に接し内陸には豊かな川や湖沼、そして田園地帯という自然に満ちた地域である。豊かな自然のもと、特色ある食文化が形成され引き継がれてきており<sup>1,2)</sup>、伝統食品や特産食品なども多数存在している<sup>3,4)</sup>。秋田県で生産される農産物では「あきたこまち」を主とし

た米が代表的である。東北北部に位置しながら比較的穏やかな気候のため、全国有数の米生産県となっている。米を原料とする加工品としては第1に清酒があり、秋田県の加工食品の生産額では上位にある。その他の米加工関係で特徴的なものでは米麴生産も盛んであり、清酒の他に米麴を利用して味噌、水産物漬物に分類されるハタハタずし、野菜漬物（麴漬）、甘酒などが生産されている。また、全国的にも有名な米加工品としては「きりたんぼ」が上げられる。米以外の食品でも地域特産食品と言われるものが多く、水産物ではハタハタ、イワガキ、ギバサ等、水産加工品ではハタハタずし、しょつつる等、農産物ではジュンサイ、トングリ等、加工品ではいなにわうどん、畜産物では比内地鶏とその加工品などが上げられる。

ここで一般的に地域特産食品とは何であるかその定義について考えてみる。我々は観光旅行やビジネス出張旅行の際、旅行先での食べ物を楽しみにすることが多い。旅行先の食べ物情報を事前調査し名物等を把握しておくか、その旅行先の住人からその場で直接情報を入手している。そして目的と食品を堪能した後、おみやげとして購入し、その土地へ行った証拠を持ち帰ることが行われる。このような地域に特産的にある食品は全国各県各市町村で数多く存在し、地域の食品産業振興の柱となっている場合もある。この地域特産食品と呼ばれるためにはどのような条件があるか、秋田県の食品を例として以下に示す。

① 食文化的・伝統的要素のある地域特産食品

- ・伝統的にその地域で生産されている産物や伝統的加工技術がある。

生産物の例：米、ハタハタ等

加工技術の例：いなにわうどん、きりたんぼ、しょつつる等

- ・食嗜好がその地域で他の地域より強い食品である。

粘りとヌルが特徴の食品の例：キバサ、ブリコ（ハタハタ卵）、ジュンサイ

- ・旬の時期がある食品であり、食べることを楽しみにしているが毎日食べなくともよく、ある程度値段が高くても買う食品である。

食品の例：山菜・キノコ類、ジュンサイ、きりたんぼ鍋、ハタハタ等

② 地域振興的要素のある地域特産食品

- ・地域食品産業振興のため近年導入された生産物や、開発された加工品である。

転作物の例：ジュンサイ、トングリ等

特殊なワインの例：マルメロ、マタタビ、イチジク、ナシ等

③ その他の地域特産食品

- ・生産消費量は他の地域よりも多い食品である。

食品の例：米、ハタハタ、イワガキ等

- ・他の地域でも入手可能であるがその地域では必ず入手できる食品である。

食品の例：きりたんぼ、比内地鶏、ジュンサイ、いなにわうどん等

- ・その地域のおみやげ物となる食品である。

食品の例：秋田清酒、ハタハタずし、ジュンサイ瓶詰

地域特産食品は大きくは生鮮品（1次生産物）と加工品に分けられるが、全国的な

知名度や流通・消費量が多い秋田県の地域特産食品は主に生鮮品であり、県外にも多く流通し用途としては業務、家庭用料理食材が多いと考えられる。たとえば、米（あきたこまち）、比内地鶏、ジュンサイ等が上げられ、全国共通に受け入れられる食材である。一方、食文化的・伝統的要素の強い地域特産は主に加工品であり地域内流通が多いが、おみやげ物や贈答品として秋田県外にも流通している。きりたんぼ、ハタハタずし、しょつつるなどに代表され、知名度はあるが全国的に食べられている量は少ないと思われる。秋田県の地域特産食品には以上のような特徴があるが、これからの地域特産食品の将来を展望すると 50 年後にそのままの形で生き残っている可能性は小さいのではないかと考えられる。なぜなら時代や世代の移り変わりは確実に進行するものであるため、地域特産食品といえども生き残るためには進化していくことが必要と考えられる。特に消費者の嗜好変化に対応し、成熟社会の多種・多様さに適応しなければならず、消費者の信頼を得るためにはその食品の品質が良いことが必要不可欠である。その風味や食感等の品質を改善し、消費者に求められる品質に進化させて行くことに地域特産食品に未来があると考えられる。これまで、トンプリ、ジュンサイ、きりたんぼ等では品質向上のため技術開発が進められている<sup>5)</sup>。したがって伝統を頑なに守ることも価値のあることではあるが、地域生産、加工流通、消費等のフードシステムを考慮しながら、新しい素材、加工技術、流通システムおよび情報を導入し、高品質な新しい地域特産食品を生産することも求められることとなる。

さて地域特産食品の将来を考える時、重要な要素として原材料の資源量も上げられる。海産魚類のような天然資源を地域特産食品とする場合はその将来は資源量の増減に左右されることになるが、秋田県ではハタハタがその代表例とすることができる。日本においてハタハタ *Arctoscopus japonicus* は日本海と北海道沿岸を中心に水深 250 m 付近に主に生息しており、秋田県で漁獲されるハタハタは青森県から新潟県沖を回遊・移動する日本海北部系群に属している<sup>6)</sup>。そして毎年 11 月下旬から 12 月上旬にかけて産卵のため秋田県の沿岸を中心に回遊するため、季節ハタハタ漁の対象となり秋田県のハタハタ年間漁獲量の半数以上がこの期間に水揚げされる。したがって、秋田県にとってハタハタは重要な魚種であり代表的な地域特産物でもある。ハタハタは雷が多発する時期に回遊し漁獲されることから「雷の魚」やかみなりの別名で「はたがみ」などと古くは呼ばれ、漢字では「鱒」と書かれる。このように秋田県において冬の到来を告げる魚として、また旬の味として古くから親しまれてきたハタハタは平成 14 年に県の魚に制定された<sup>7)</sup>。秋田県におけるハタハタの漁獲量は昭和 40 年代には年間 2 万トンを超えることもあったが、昭和 50 年代には 1 万トンを下回り、平成 3 年には約 70 トンまで落ち込んだ。資源回復を目指した秋田県の漁業関係者等の努力で平成 4 年から 3 年間の自主禁漁した後、資源管理や種苗生産放流などを実施した結果、ハタハタ資源は順調に回復しており日本における資源管理型漁業の代表例となっている<sup>8)</sup>。平成 16 年には漁獲量約 3,200 トン、金額は約 10 億円で全国第 1 位となるまで漁業資源が回復した<sup>9)</sup>。ハタハタ鮮魚や加工原料としての流通量の増大に伴い品質保持や原料特性の把握、新規加工技術の開発等、主要な地域特産食品としての

研究開発の必要性が大きくなっていった。過去のハタハタに関する研究としては産卵期近くのハタハタの化学成分とアミノ酸組成に関して大野<sup>10)</sup>の研究が、ハタハタのその他成分に関して浅野<sup>11)</sup>、斎藤ら<sup>12)</sup>の研究があった。またハタハタの加工に関しては元広、沼倉<sup>13)</sup>の冷凍すり身に関する研究と山浜<sup>14)</sup>の燻製加工に関する研究のみであった。ハタハタの消費拡大や加工利用用途拡大を進め、品質を向上させていくためには多くの科学的な基礎的知見が必要不可欠である。本研究は秋田県を代表する地域特産食品ハタハタを対象として、最初に現状の品質特性を解明して問題点を明らかにしていった。次に問題点を解決し品質を改善する方法を検討し、また新しい品質を創り出す方法を探求していった。すなわち地域特産食品ハタハタの品質特性について明らかにした。ハタハタの漁獲量および流通実態の把握、ハタハタ成分の季節的変動とハタハタ脂質の抗酸化性の分析、ハタハタずしの地域特性と発酵・熟成機構および脂質安定性について分析した。また、ハタハタの品質で重要な卵塊「ブリコ」のゼリー状タンパクの性質、ハタハタ卵の接着と硬化機構を解明した。そしてその分析と問題点把握をもとに地域特産食品ハタハタとブリコの品質改善について技術開発を行った。すなわち畜養による品質保持技術および冷凍保存による品質保持技術の開発を雌ハタハタ卵巢の品質を指標として行った。また、卵のソフト化による新しい魚卵加工品開発とハタハタずしの乳酸菌スターター添加による発酵安定化技術の開発など、この研究結果を応用した食品技術開発を行った。

本研究は秋田県の多くの地域特産食品の中からハタハタを研究対象とし、50年後においても地域特産食品として継続することを願い、これまでほとんど科学的に研究されていなかった地域特産食品ハタハタの品質特性について明らかにすることを目的とした。次に品質特性等を明らかにして問題点の解決と品質改善のための技術開発を行った。本研究成果がハタハタの市場評価向上による需要拡大、品質改善のための基礎的知見となるとともに、ハタハタの資源管理と調和した消費構造の確立と、ハタハタ関連産業の発展の一助となることを期するものである。

秋田の県の花はフキノトウ、県の鳥はヤマドリそして県の魚はハタハタである。この中で堂々と食卓の中央に上ることができるのはハタハタだけである。

## 2. 秋田県産ハタハタの食品科学的特性解明

### 1) ハタハタの漁獲と流通特性の解明

ハタハタ漁獲の特徴と流通実態等を明らかにした。第1は産卵のため秋田県沿岸に接岸するハタハタを主に漁獲するため、短期集中型であり漁獲集中時に魚価の低下が著しかった。第2としては消費地が秋田県内に集中していることが挙げられる。また、第3はハタハタの流通経路では漁獲から消費者までの間に取り扱い業者が多く、一般的な魚介類の流通経路と同様であり、地域内流通というメリットが活かされてはいなかった。秋田県内のハタハタ鮮魚の流通を図1に、加工用ハタハタの流通を図2に示した。以上から鮮魚流通としては主に鮮度保持に留意し、品質保持を行う必要がある。消費者の嗜好、選択に対応できるような品質保持技術や供給体制を整備すること

は、漁獲の短期集中による極端な安値を回避するためだけでなく、安心して安全に食べられるハタハタを消費者に広く供給するために必要であると考えられる。

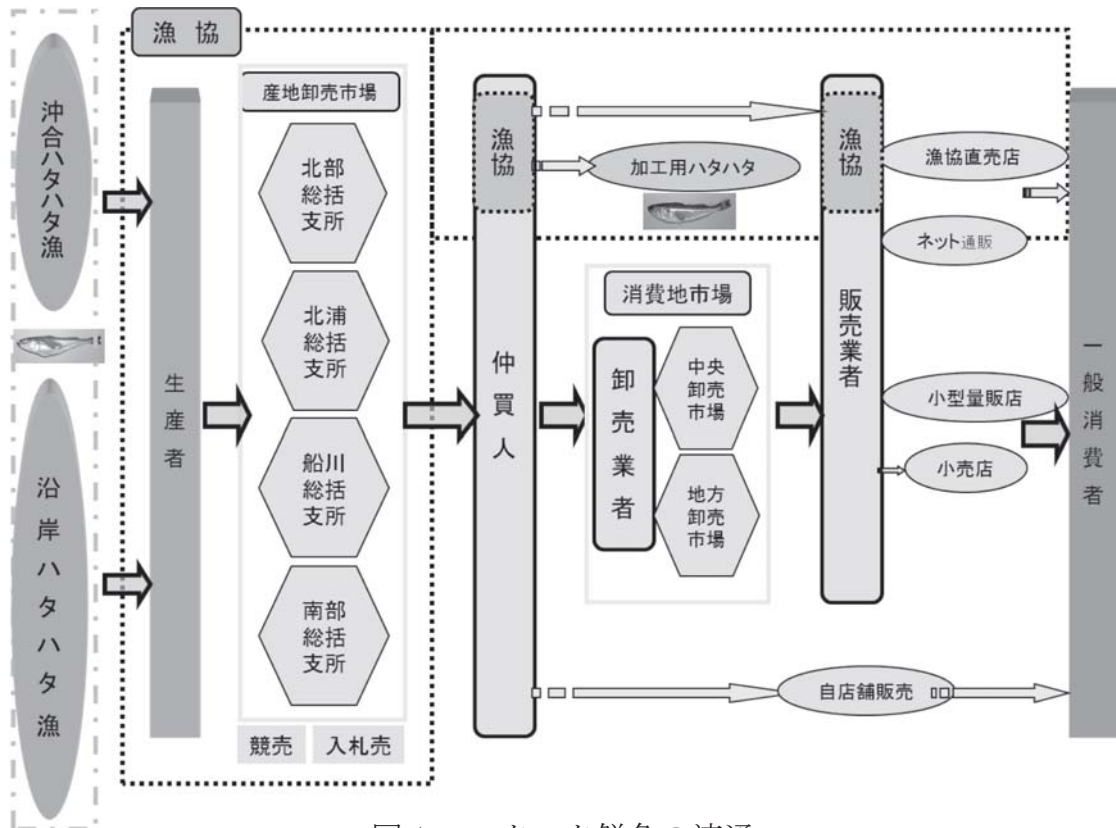


図1 ハタハタ鮮魚の流通

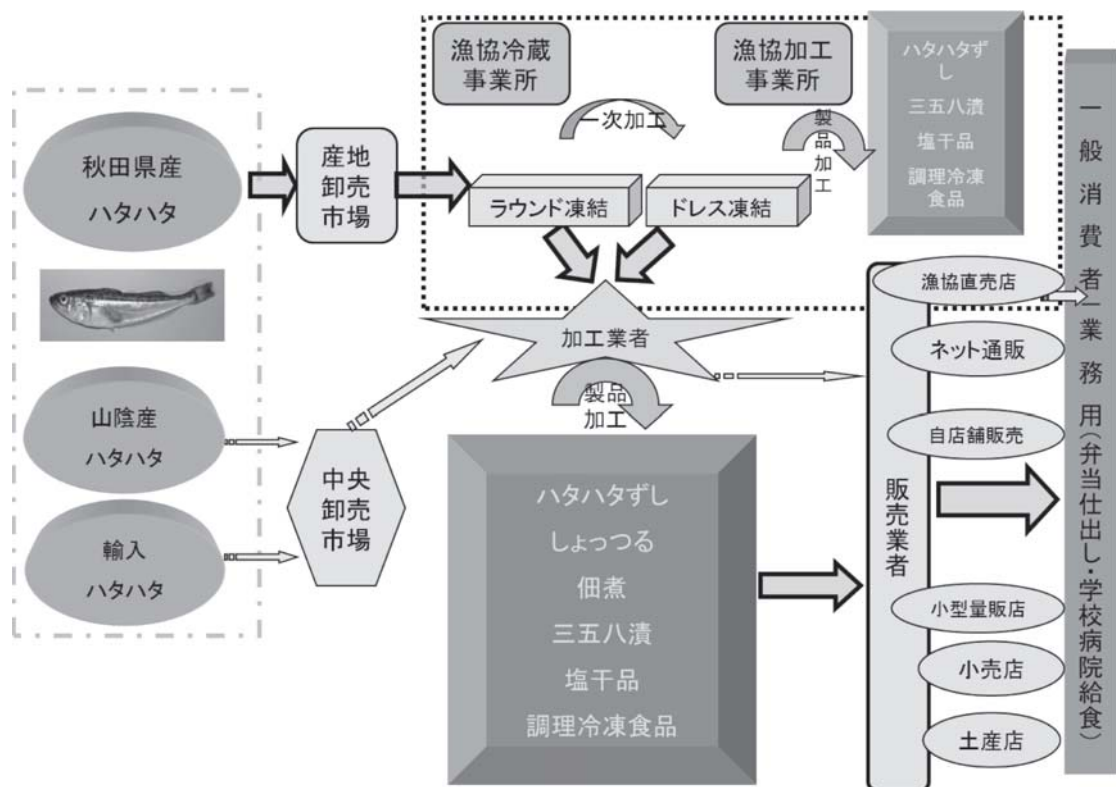


図2 加工用ハタハタの流通

## 2) ハタハタの魚肉と生殖巣における化学成分の季節的変動

ハタハタ魚肉と生殖巣における化学成分の季節的変動について検討した。第1に秋田県沿岸海域で漁獲されたハタハタ魚肉および生殖巣における水分、脂質含量、脂肪酸組成、遊離アミノ酸、核酸関連物質および有機酸の季節的変動について明らかにした<sup>15)</sup>。魚肉中粗脂肪含量は9月に最高値、12月に低い値を示したが、脂肪酸組成の有意な差はなかった。卵巣の重量と粗脂肪量は成熟とともに増加したが、脂肪酸組成の変動はなかった。これらの変動は摂餌と性成熟に関連すると考えられた。食品として9月は肉中粗脂肪含量が多く遊離アミノ酸含量が最高となり肉が美味であり、12月は卵巣重量が多く卵巣が美味であると考えられた。加工方法としてハタハタ肉は塩干品やすり身への加工、卵巣は新しい魚卵加工品への展開が期待される。また、詳細はハタハタ脂質成分等の自然環境および畜養環境における変動として5.1)で解説する。

## 3) ハタハタ脂質の抗酸化性の解明

ハタハタ脂質に見られる抗酸化性を検討した。ハタハタ脂質にはEPA（イコサペンタエン酸）やDHA（ドコサヘキサエン酸）といわれるn-3系多価不飽和脂肪酸が比較的多い割合で含まれ、抗動脈硬化作用や血栓症予防効果などの生理的効果が期待される。しかし、一般には魚油に含まれる高度不飽和脂肪酸は非常に酸化されやすいという特徴があるため、ハタハタ脂質の酸化について調べた。抽出脂質の劣化試験におけるPOV（過酸化価）経時的変化では対照のゴマサバ脂質に比べ、ハタハタ脂質は非常に酸化されにくいことが明らかとなった。また、ハタハタ脂質添加によりゴマサバ脂質POV上昇が明らかに抑制された。ハタハタ脂質クラスではPL画分が特にPOVを指標とした酸化に対して安定であった。PL（リン脂質）画分単独ではPOV上昇がないが脂肪酸分解があり脂質劣化が起こり、ハタハタホール脂質ではPOV上昇および脂肪酸分解両者がないことから、脂質中の不ケン化物等の酸化抑制物質とPL画分の相乗効果による抗酸化の可能性が示唆された。本研究ではハタハタ脂質が非常に酸化されにくい脂質であることが確認された。また、詳細はハタハタ脂質の抗酸化機構として5.2)で解説する。

## 4) 秋田産ハタハタずしの化学成分と微生物相の地域特性

秋田県で代表的なハタハタ加工品であるハタハタずし製品についてその品質の特徴を明らかにした<sup>16)</sup>。秋田産のハタハタずし製品について秋田県内沿岸3地域の代表的製品の製品形態、各種化学成分、遊離アミノ酸、有機酸、遊離糖類、微生物について検討した結果、以下の特徴を明らかにした。特にA（北部）、B（中央部）、C（南部）沿岸3地域の有機酸平均を図3に示した。

- ①秋田県沿岸北部の製品は原料にハタハタ、米、野菜を主に使用し、熟成期間が短く乳酸発酵がない「早ずし」である。主に食酢処理による酢酸の浸透により微生物を抑制していた。
- ②沿岸中央部の製品は原料にハタハタ、米、米麴、野菜を主に使用し、乳酸発酵がある「なまなれずし」である。使用原材料では「いずし」に近く、米麴、野菜を使用し乳酸発酵を促進する伝統的な製造法に近かった。

③沿岸南部の製品は原料にハタハタ、米飯、米麴、野菜を主に使用し、米飯の米麴による糖化を十分に行っているが、乳酸発酵はない「早ずし」である。使用原材料では「いずし」に近いが、食酢処理による酢酸の浸透および米飯の米麴による十分な糖化と砂糖添加による水分活性低下で微生物を抑制していた。

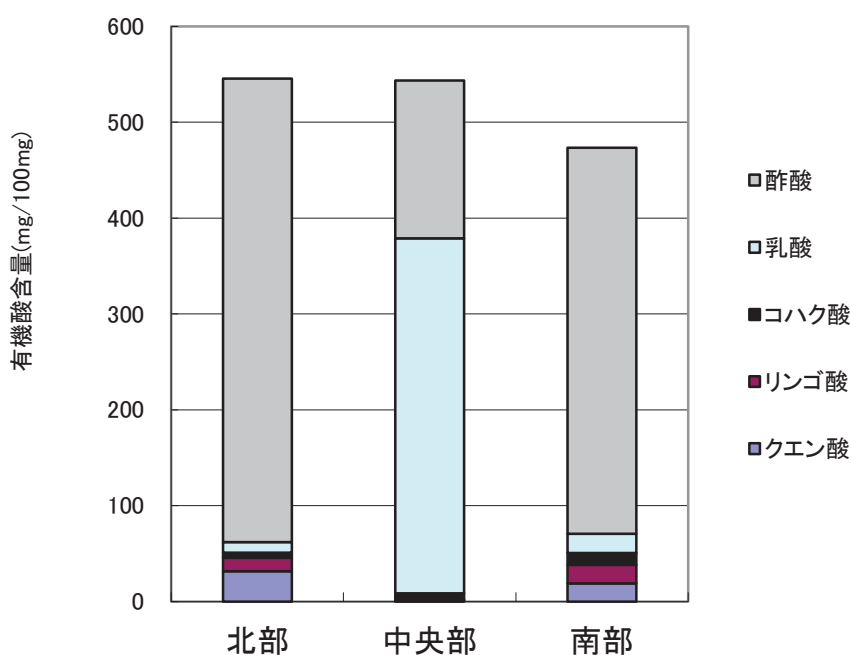


図3 秋田県沿岸3地域ハタハタずし製品の有機酸組成

これらの結果から秋田県のハタハタずし製品は乳酸発酵がある「なまなれずし」タイプと乳酸発酵を抑制している「早ずし」タイプの大きく2つに分類された。両者は原材料や漬け込み方法等で異なる部分が多く、その由来は異なると推定された。したがって3地域でそれぞれ異なるため3つに分類することができ、それぞれの地域に伝わる伝統的製造方法に由来していると考えられた。しかし、3地域の中では伝統的製造法からの変化が少ないハタハタずしは沿岸中央部地域の製品であると考えられた。今後、各地域別に熟成中の成分と微生物相の経時的変化を明らかにして、科学的根拠に基づいた適正な製造条件を確立することがハタハタずしの品質向上のために必要であり、重要な課題であると考えられる。また、詳細は秋田産ハタハタずしの起源と分類として5.3)で解説する。

#### 5) ハタハタずし発酵・熟成機構の解明

乳酸発酵のある「なまなれずし」に分類された沿岸中央部の市販ハタハタずし製品の製造方法で試作し、熟成中の化学成分、微生物相の変化を分析してその発酵・熟成

機構の特徴を検討した。ハタハタずしは古くからの製造方法や長年の勘と経験により製造されることが多く、これらの解析と科学的根拠に基づいた製造は行われていないのが現状である。安定した高品質な製品を製造するためには、微生物制御を主体とした科学的製造技術を確立すること、現在の勘と経験による製造に科学的根拠を与えることが必要であり、それが重要なことである。ハタハタずし熟成中には各成分の経時的変化が認められた。沿岸中央部のハタハタずし熟成機構として熟成初期から中期(0~10日)には魚肉部分から米飯部分への酢酸と遊離アミノ酸の移行、また米飯部分の米麴による糖化と糖化により生成した遊離糖の米飯部分から魚肉部分への移行が進むと考えられる。熟成中期から終期(10~18日)に乳酸菌による乳酸発酵があり、乳酸生成と発酵風味の付与や酵母による熟成風味生成が起こることが推定され、さらに味等の熟れが進行していく。したがって沿岸中央部のハタハタずしの熟成は成分移行と発酵の進行による味の熟れであると考えられる。ただし、熟成条件によっては乳酸発酵が不安定であるという問題点も明らかとなり、乳酸菌が優先的に増殖するような製造方法の確立が課題である。また、「早ずし」に分類された2地域ではボツリヌス菌を中心とした品質上好ましくない微生物を抑制するための処理が乳酸菌の生育を抑えていたため、その処理が品質を左右する重要な工程となっている。したがってこれらの地域の熟成機構は、沿岸中央部と異なり、成分移行と味の熟れのみ基本としているものと考えられる。

#### 6) ハタハタずしの脂質酸化の特徴

ハタハタ鮮魚脂質の抗酸化性が、加工品であるハタハタずし中においても維持されるか検討した。ハタハタずしとサバずしのPOV、AV(酸価)および脂肪酸組成を指標とした脂質酸化に関してはほとんど同様の傾向を示した。POVの抑制は5℃保存、AVの抑制と脂肪酸分解抑制は0~5℃保存が最適な条件であった。このことは低温保存が脂質酸化抑制に効果があるが、POVに関しては微生物の過酸化分解作用を惹起させるため微生物が活動できると思われる5℃以上が必要であることを示唆している。ハタハタずしやサバずしのような「なまなれずし」は発酵食品であり、ハタハタずし製品には乳酸菌、酵母およびその他の微生物が多く検出される。このことからハタハタずしやサバずしも微生物が存在し、脂質酸化で生成した過酸化分解物のため、POV値の上昇が少なかったと推察される。このことから加工方法としての「なまなれずし」加工はPOVを指標とした脂質酸化を低く維持するためには有効な加工方法であると考えられる。さらにこの結果からは通常に想定される冷蔵保存温度である5℃においてはハタハタずし、サバずしいずれもPOVは安定していたことから、保存温度としては5℃が適しており、POVを指標とした保存性では30日の保存が可能であると考えられる。したがって、「なまなれずし」加工は脂質酸化しやすいサバにおいても5℃以下で製造および保存することで酸化を受けにくくなり、酸化を抑える加工方法として優れていると考えられる。さらにハタハタずしにおいては、サバずしの不飽和脂肪酸が分解したと考えられる室温保存においても、脂肪酸組成の変化がなくサバずしよりも抗酸化性が強いことがわかった。以上から秋田県の伝統的食品であるハ



タハタずしを主とした「なまなれずし」は、ハタハタの保存方法の1つとして脂質酸化抑制の点でも優れていることがわかった。ハタハタずしは EPA、DHA のように酸化しやすいが生理機能的に優れた脂肪酸を含んでいるが、抗酸化性を有しているため、脂質代謝改善など生活習慣病予防に役立つことが期待される優れた食品であると考えられる。

### 3. ハタハタ卵塊「ブリコ」の特性解明

#### 1) ハタハタ卵塊粘質物の化学的特性の解明

ハタハタの卵塊（ブリコ）について、その品質上重要な要素である粘り成分であるゼリー状物質について検討した。ブリコのゼリー状物質は卵塊構造を維持するために不可欠なものであり、卵塊の中心のコアから始まり個々の卵に繋がり卵を包み込んでいた（図4）。

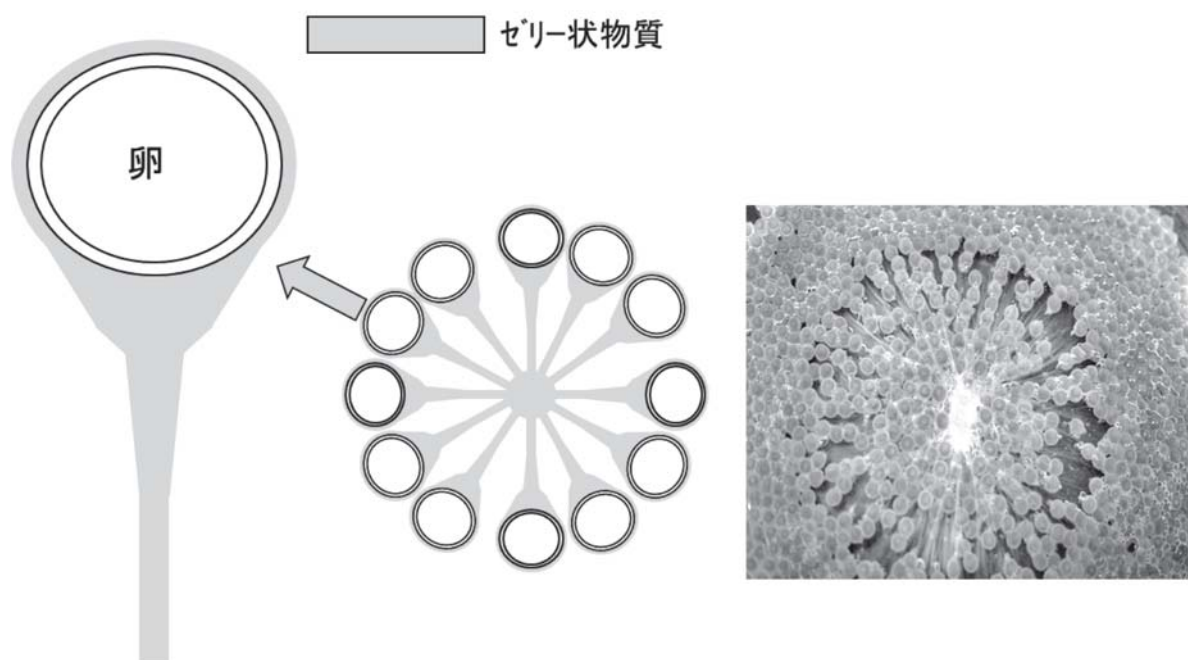


図4 ハタハタ卵塊の構造

それは海水中で海藻に絡まりやすい構造であり、海藻に付着した状態で卵塊が硬化する。ゼリー状物質は卵塊の接着と硬化に関与する重要な機能を持つ物質であると考えられる。ゼリー状物質は加熱すると曳糸性の粘質物に変化し、卵粒と分離することができた。粘質物として分離したゼリー状物質の成分は蛋白質が主成分であり、**SDS-PAGE** で分析した結果、単一の蛋白質であり分子量が 43 k Da であった。粘質物は新規な蛋白質であり、4 量体サブユニット構造も示唆された。ブリコを加熱調理した後は海水中のように固まらず、内部に独特の強い粘りのある粘質物が多く、その食感が特に好まれている。ゼリー状物質がなぜ加熱により粘りが強くなるか、本研究からは解明できなかったため今後の課題となった。

## 2) ハタハタ卵塊の接着と硬化機構の解明

ブリコの接着と硬化に関して検討した。海水中で接着、硬化する性質は未受精の卵でも存在し、ブリコの調理、加工時に硬くなるため障害となることが多かった。そのため、その接着と硬化についてゼリー状物質との関連も含め明らかにし、調理、加工への応用を目指した。第1に海水中での接着と硬化は浸透圧ではなく塩濃度に依存することがわかった。さらに接着と硬化はナトリウムイオンとカルシウムイオン濃度に依存することがわかった。また、硬化については特にカルシウムイオンが必要であった。ゼリー状物質は海水と同濃度のナトリウムイオンとカルシウムイオン溶液に徐々に溶解する性質があることが判明した。ゼリー状物質を除去した卵は卵同士の間、接着、硬化が認められなくなることから、卵塊の接着、硬化においてゼリー状物質の重要性が示唆された。以上からハタハタ卵塊の接着は塩濃度に大きく依存し、海水と同濃度の塩により卵粒を覆っているゼリー状物質の一部溶解による卵膜の露出、それに続き卵同士が卵膜やゼリー状物質で接触し接着すると考えられた。

## 3) ハタハタ卵塊の接着と硬化における酵素の役割

ブリコの接着と硬化に関して酵素阻害剤による卵の接着と硬化阻害から、酵素の関与について検討した。その阻害効果から卵膜硬化はタンパク質架橋酵素であるトランスグルタミナーゼであると考えられた。酵素阻害剤による卵の接着と硬化阻害試験、卵硬化における卵膜タンパク質変化試験および卵硬化の実体顕微鏡による観察を総合的に考え、ハタハタ卵塊の接着と硬化のメカニズムを推定した。すなわち卵の接着は海水同濃度のナトリウムイオンとカルシウムイオンによりゼリー状物質が一部溶解し、卵膜の一部が露出することから始まる。卵膜内ではカルシウムイオン浸透によりカルシウムイオン依存のトランスグルタミナーゼが活性化し、膜内タンパク質が架橋、重合し硬化が進行する。膜外排出性のトランスグルタミナーゼ (TG) がゼリーで仮接着した卵膜同士が接着、重合することで接着が完成すると推定された。

また、詳細はハタハタブリコの接着・硬化機構として 5.4) で解説する。

## 4. 地域特産食品ハタハタとブリコの品質改善技術の開発

### 1) ハタハタの畜養による品質保持法の特徴

地域特産食品ハタハタとブリコの品質改善技術を開発することを目的とした。ハタハタは短期集中型であり漁獲集中時に魚価の低下が著しいため、最低でも 2~3 週間の出荷調整のための技術開発が必要であった。また、卵の食感は酵素作用により凍結や塩蔵で変化し、卵が硬くなり本来の粘りも消失するため、冷凍保存でも変化しない品質保持技術の開発が必要であった。そこで畜養による品質保持技術と冷凍保存による品質保持技術について検討した。また、ハタハタ卵塊いわゆるブリコの粘り等の食感は雌ハタハタの品質上で重要である。ブリコの粘りのみを指標として評価した場合は雌ハタハタのみで雄の混入がない状態で無給餌畜養した場合、4 週まで品質保持が可能であった (図 5)。しかし魚肉脂質や魚肉タンパク質は分解傾向にあり、産卵より生命維持が優先され生殖巣成分の分解すること、ブリコの形態的变化から総合的に

判断すると、その品質変化がほとんどないことから2週までは畜養による品質保持が可能であると考えられた。また、この方法を実用化するためには今後、ストレスを軽減した畜養方法を検討し、さらに品質変化が少なく長期に品質保持できるような検討が必要である。

## 2) ハタハタの冷凍保存による品質保持法の特徴

雌ハタハタは冷凍魚とするとハタハタ卵本来の食感が失われ、商品価値が極度に低下するという問題点があった。そこで魚肉は加熱せず、卵の入った腹部のみ加熱する方法を検討した結果、腹部のみ露出させ魚体をすべてアルミホイルで覆い電子レンジを使用し高周波加熱する方法が品質改善効果は大きかった。さらに魚肉もブリコも生に近く凍結魚の品質改善法としては適していると考えられた。今後はこの方法の実用化を目指すためには、より簡便にアルミホイル等で覆う方法、高周波加熱の連続化等実用的な検討が必要である。また、糖液による凍結変性防止効果も見られたことから、この併用等も合わせて今後検討を進める必要がある。

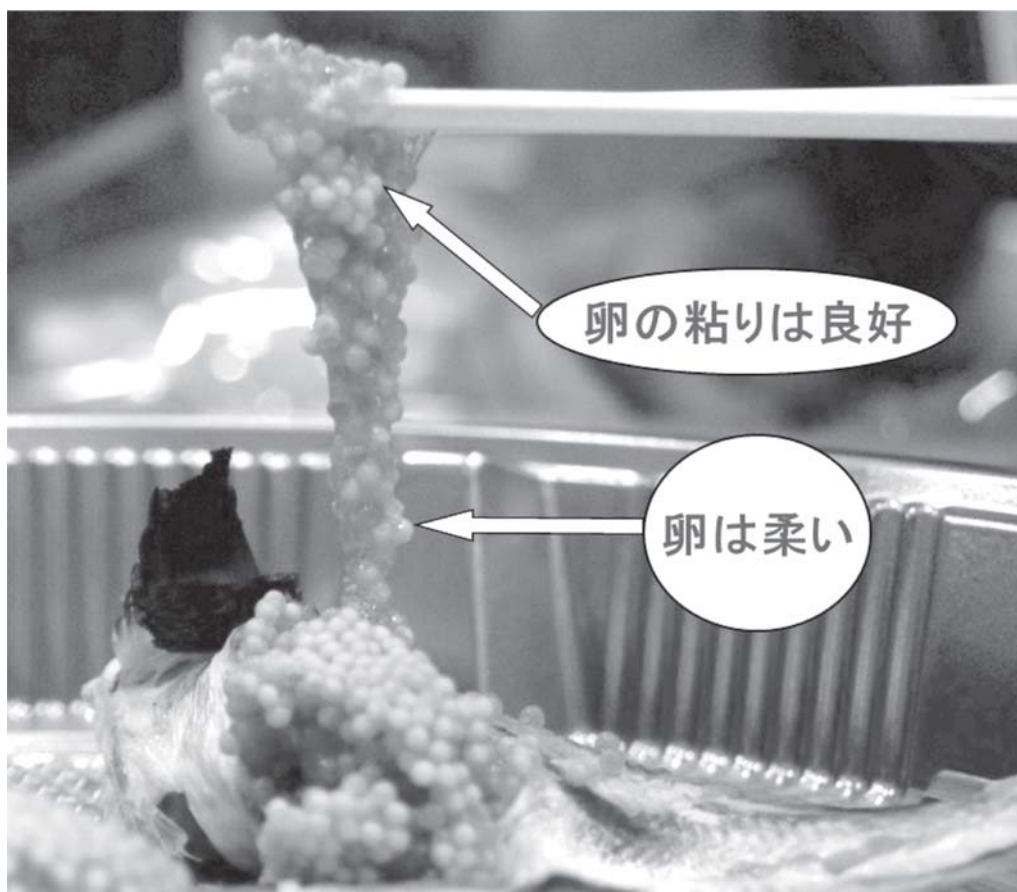


図5 畜養焼きハタハタのブリコの粘り

### 3) ハタハタ卵加工品とハタハタずしの開発

秋田県の手ハタハタ加工品としては手ハタハタずし、手ハタハタ麴漬（三五八漬け）がこれまでは比較的多く作られていた。手ハタハタ資源が回復した近年はこの他にしょつつる、味噌漬け、つみれ団子、メ手ハタハタ、唐揚げ、甘露煮、フライ、かまぼこなど新しい加工品開発の動きが多くなっている。さらに手ハタハタの特徴としては産卵期に多く漁獲されるため、雌手ハタハタは成熟した卵を多く抱卵している。既存の魚卵加工品としてはタラコ、イクラ、スジコ、カズノコなど日本人には好まれる加工品が多い。しかし、手ハタハタにはかつては産卵後、海岸に打ち上げられたブリコを加熱調理した非常に硬い加工品が存在したが、現在は原料事情から存在しないため、新しく食べやすい手ハタハタ卵加工品の開発も望まれるところである。したがって新しい手ハタハタ加工品開発は手ハタハタの資源管理と調和した利用加工を推進するためには必要である。新しく食べやすい手ハタハタ卵加工品の開発、乳酸発酵安定化のため乳酸菌をスターターとして添加した新しい手ハタハタずしの開発について検討した。手ハタハタ卵塊の品質特性から、ゼリー状物質、接着および硬化の酵素作用が手ハタハタ卵加工の障害となっている問題点があった。そこで新たに開発した卵塊加熱分離法によりゼリー状物質の膨潤と卵粒からの分離除去、それと同時にトランスグルタミナーゼの失活を行い、これまでにない新しい食感の手ハタハタ卵加工が可能となった。実用化のためには生卵塊ではなく凍結卵塊を原料とする必要があるが、やや食感が劣るため凍結および解凍時にも酵素作用の制御が必要であると考えられた。また、酵素作用の制御により接着や硬さを調整することも可能であると考えられるため、手ハタハタ卵加工品には硬さや、成形による形態の違いなど多様性が期待される。現在はこれらの特性を利用、制御して手ハタハタ卵加工品が製造販売されている。また、手ハタハタずしの「なまなれずし」タイプは乳酸発酵が不安定であるという問題点があった。乳酸菌の *Lactobacillus brevis* IFO 12005 をスターターとして添加することにより、乳酸発酵の安定化、さらには GABA（ $\gamma$ -アミノ酪酸）による生理機能性の付与効果も認められた。ただし実用化のためには適正な熟成温度管理が必要であり、実際の製造条件にスケールアップしながら問題点をさらに検討していく必要がある。スターターとして添加する乳酸菌についても *Lactobacillus brevis* 以外を検討し、さらに風味、安全性の向上に効果のある乳酸菌を検索していくことも今後の重要な課題である。以上、地域特産食品手ハタハタの品質改善の特徴は、すべて現在の品質上の特性や問題点を十分に分析し、それを解決するための方法を開発することが基本となっている。まだ、特性が解明できない部分や、問題点の解決方法が開発できないところもあるが、今後は秋田県の地域特産食品が進化し、さらに発展を継続するように研究開発を進めることが望ましい。

## 5. 新たな知見の総括

本研究において初めて明らかにした知見について他の研究報告なども参考に総合的に考察し以下にまとめた。ただし、証明が不十分なところもあり推定的な解釈も多いため、今後さらに証明を積み上げる必要があると考える。

### 1) ハタハタ脂質成分等の自然環境および畜養環境における変動 (図6)

ハタハタ脂質成分の変動と環境の関係を総合的に考察し以下にまとめた。

- ①生物としてのハタハタは産卵が重要であり、性成熟が優先され生殖巣が発達する。
- ②畜養では生命維持が優先され生殖巣や肉の成分は分解傾向である。
- ③性成熟前に食餌で脂質成分を蓄積するため9月の肉は美味である。
- ④産卵期の12月は生殖巣に脂質や他の栄養成分が蓄積するため食べる価値が大きい。
- ⑤以上の研究結果から9月漁獲の増加取り組みと12月のブリコ加工、シラコ利用を新たに提案できる。

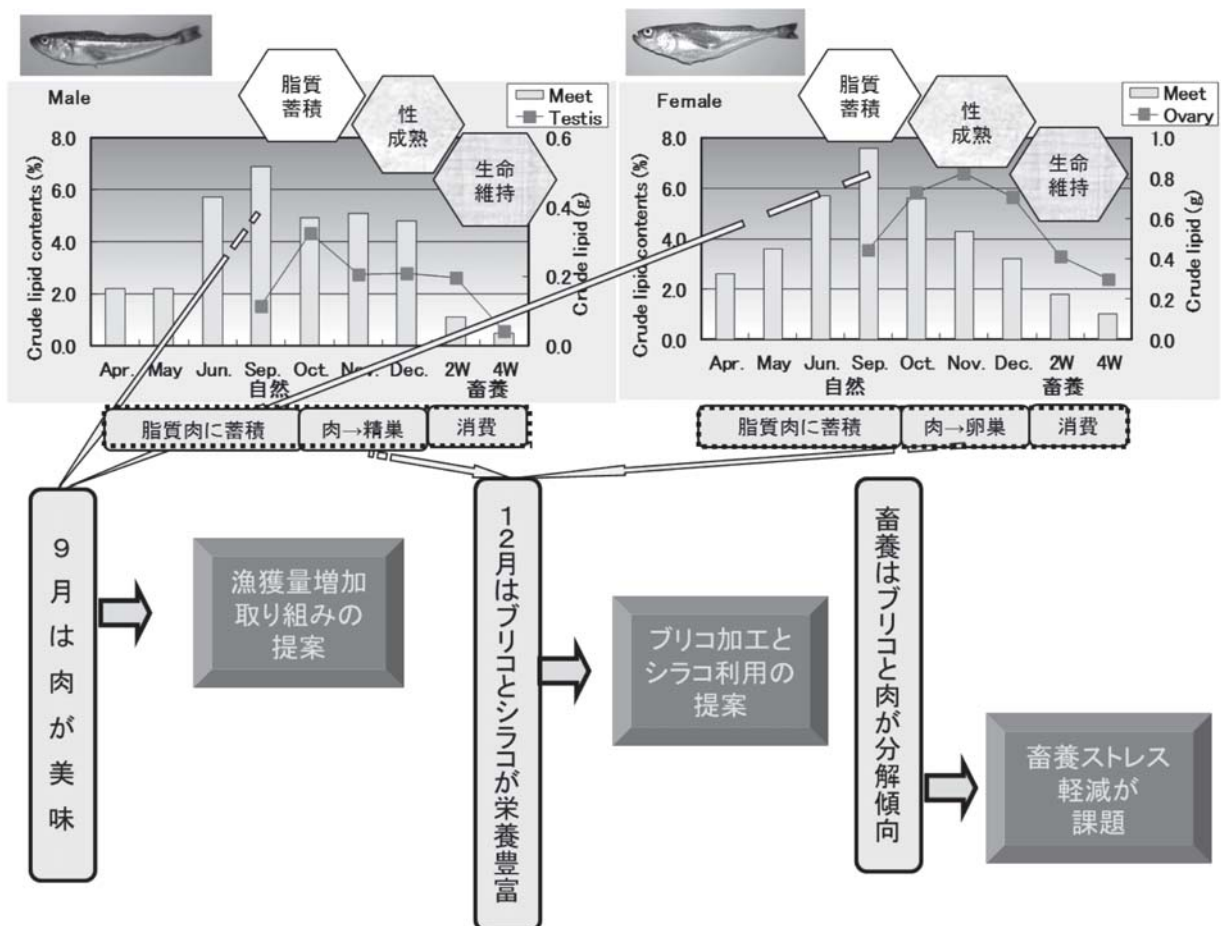


図6 ハタハタ脂質成分等の自然環境および畜養環境における変動

2) ハタハタ脂質の抗酸化機構 (図7)

ハタハタ脂質の抗酸化の機構を総合的に考察し以下にまとめた。

- ①一般に脂質中の不飽和脂肪酸の酸化は主に活性酸素等から始まるラジカル連鎖反応により発生・進行し<sup>17,18)</sup>、ヒドロペルオキシラジカル等を経て過酸化脂質となり、さらにカルボニル化合物等に変化する。
- ②ハタハタ総脂質中で抗酸化性が認められたリン脂質画分は、分子内の主にエタノールアミンが脂肪酸ラジカルや過酸化物をアルコールに分解し過酸化物の蓄積を抑制する<sup>19)</sup>が、リン脂質画分単独では不飽和脂肪酸が変化し減少してしまう。
- ③ハタハタ総脂質中の不ケン化物画分が、ラジカル連鎖反応の初期反応を中和してラジカル連鎖反応の進行を初期の段階で防止するため、ハタハタ脂質全体の不飽和脂肪酸変化、減少は起こらないと推定される。
- ④抗酸化性におけるリン脂質と不ケン化物の相乗効果が示唆されたが、トコフェロールにおける同相乗効果のメカニズム<sup>20)</sup>から推定して、不ケン化物中の抗酸化物質がリン脂質で再生されることにより抗酸化性が持続する機構であると推定された。
- ⑤以上の研究結果からハタハタ脂質抗酸化性を利用した加工品や脂質自体の酸化防止剤等としての利用を新たに提案できる。

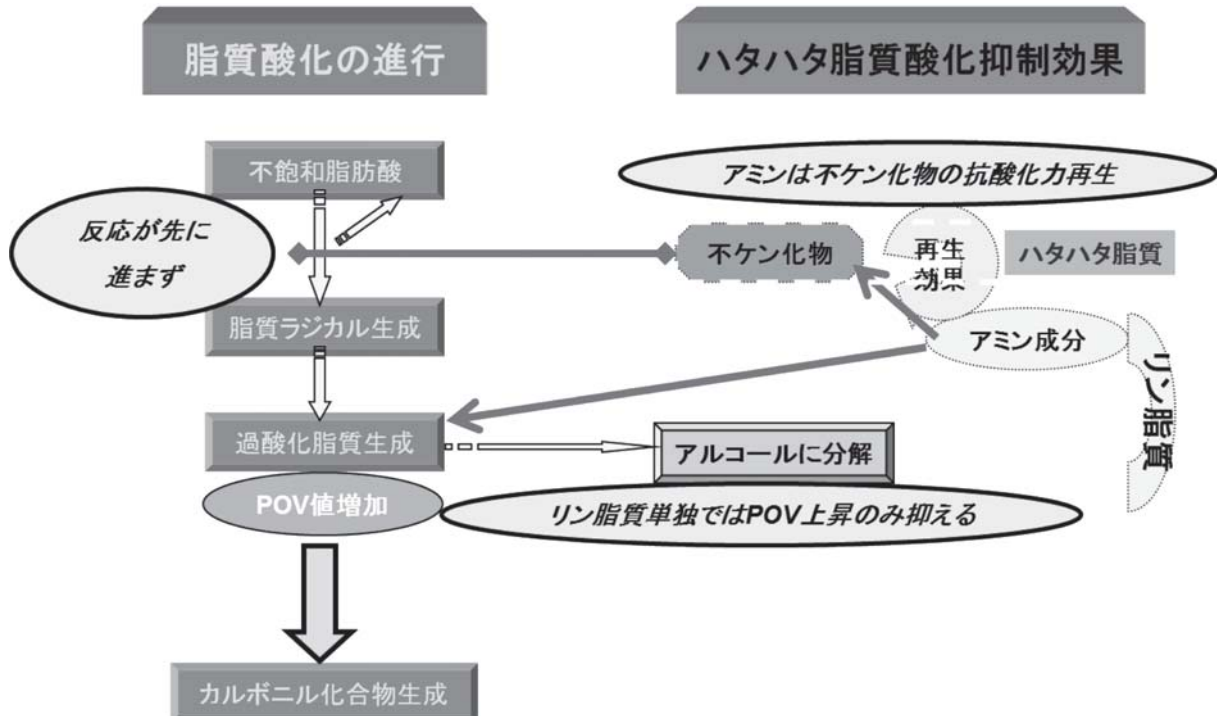


図7 推定されるハタハタ脂質の抗酸化機構

### 3) ハタハタブリコの接着・硬化機構 (図8)

ハタハタブリコの接着と硬化機構を総合的に考察し以下にまとめた。

- ①ゼリー状物質は接着剤の機能を持ち、ブリコが海藻に絡まるのを助け、また卵同士を仮接着する役割がある。
- ②ゼリー状物質が海水に徐々に溶解し卵膜同士がゼリー状物質を挟んで接触する。
- ③溶解したゼリー状物質の部分は最終的に隙間となり、卵塊内の海水通路となる。
- ④塩濃度依存性で膜外排出性のTGが接着部タンパク質と卵膜を架橋、重合し接着すると推定される。
- ⑤同時にCa依存性のTGで卵膜内タンパク質を架橋、重合し硬化すると推定される。
- ⑥卵接着部と卵膜が硬化し硬い卵塊 (ブリコ) となる。
- ⑦以上の研究結果から、今後ハタハタブリコの接着と硬化機構に TG が関与することが科学的に証明できれば、海水等の高塩濃度で作用する TG は新しい発見であること、この TG やゼリー状物質の特殊接着剤等としての利用可能性を新に提案できる。

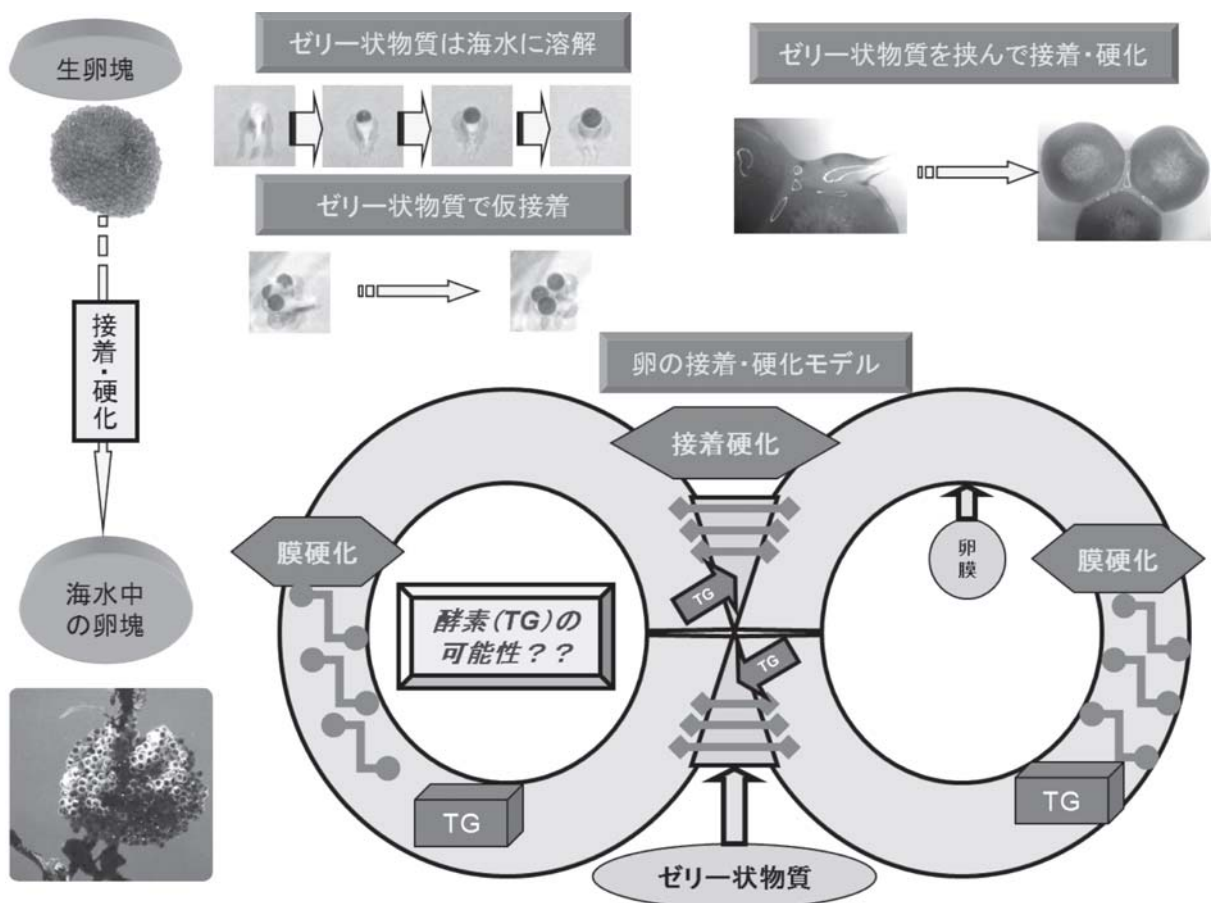


図8 推定されるハタハタ卵塊の海水中での接着・硬化機構

4) 秋田産ハタハタずしの起源と分類 (図9)

秋田県3地域の秋田産ハタハタずしの起源と分類について総合的に考察し以下にまとめた。

- ①すしの起源は現在の鮎ずしの様な「なれずし」と言われ、分類としては「なれずし」、「なまなれずし」および「早ずし」の3つがある<sup>21)</sup>。
- ②「なれずし」は魚と米飯のみで長期の乳酸発酵と熟成で作られ、「なまなれずし」米飯と魚に加えて米麴や野菜等を加え乳酸発酵を促進する製造法で、「早ずし」は乳酸発酵を抑え短期熟成で製造される。
- ③秋田産ハタハタずしは沿岸中央部(ハタハタずしB)が「なまなれずし」に分類され、魚、米飯、米麴および野菜を使用する「いずし」である。
- ④沿岸北部(ハタハタずしA)および南部(ハタハタずしC)が「早ずし」に分類されるが由来が異なり、沿岸北部は魚、米飯および野菜を使用する「すし漬け」に由来し、南部は中央部と同様に「いずし」に由来する。
- ⑤秋田産ハタハタずしは3種類あり味の選択性があることが特徴である。

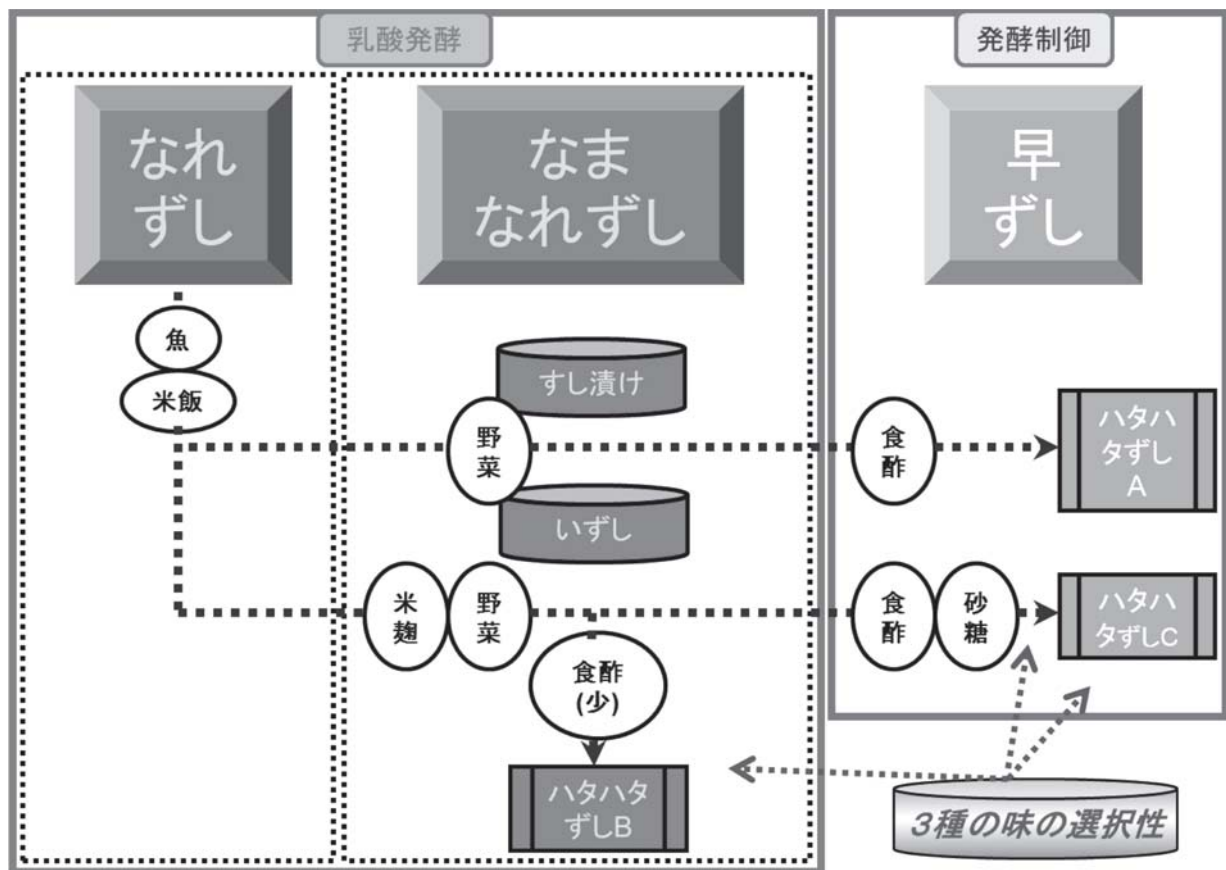


図9 秋田産ハタハタずしの分類



5) ハタハタ加工品の製造方法 (図10)

地域特産食品ハタハタとブリコの品質改善技術で開発した製造方法を、高周波加熱冷凍保存ハタハタ、新しいブリコ加工品、乳酸菌添加ハタハタずしについて新しい製造方法の提案として以下にまとめた。

①高周波加熱冷凍ハタハタ

ハタハタの旬の価値であるブリコの粘りを周年的に市場に提供することができる。

②新ブリコ加工品

これまでに無かった魚種の魚卵加工品であると同時に、新しい食感のハタハタブリコの加工が可能となった。

③乳酸菌添加ハタハタずし

不安定であった乳酸発酵を安定化し、新しい風味と機能性を付与した付加価値の向上したハタハタずしを製造できる。

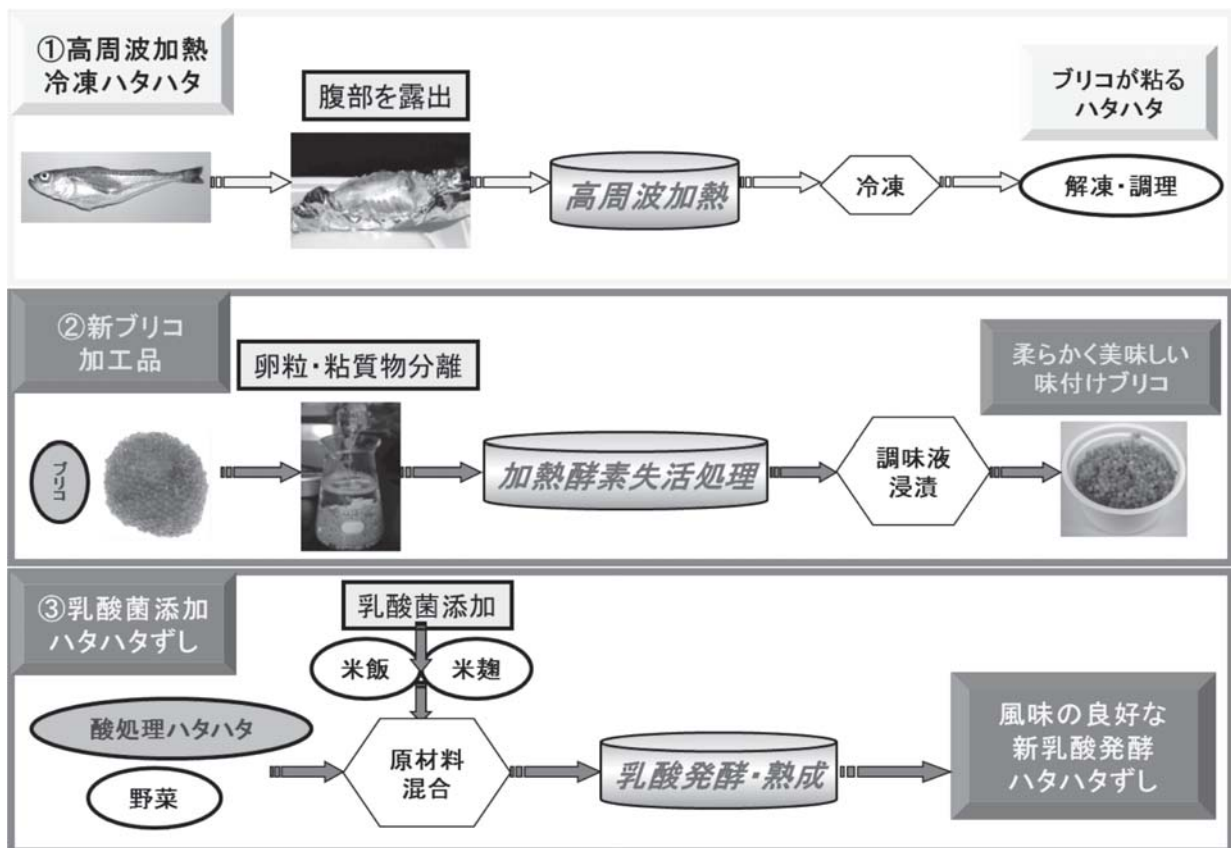


図10 各種ハタハタ地域特産食品

## 6. 地域特産食品の研究開発モデル (図 1 1)

これまでのハタハタ品質特性、品質問題点および品質改善の研究開発事例を地域特産食品の研究開発モデルとしてまとめた。

- ①地域特産品の品質特性を十分に把握することが、特性利用・品質制御、品質改善および新しい技術開発への第1段階である。
- ②品質特性を熟知し問題点は何かを把握することが第2段階である。
- ③その問題点を解決するためどのような技術開発が必要か検討し、その技術開発を行うことが第3段階である。
- ④この研究手法により、ハタハタずしのような伝統食品の新しい技術導入による進化やブリコの接着・硬化抑制技術による新しい魚卵加工品開発という方向性も見えてきた。
- ⑤この一連の研究手法は地域特産食品の品質改善への有効性は大きく、他の地域特産食品の品質改善においてもその成果が十分に期待できることを提案できる。

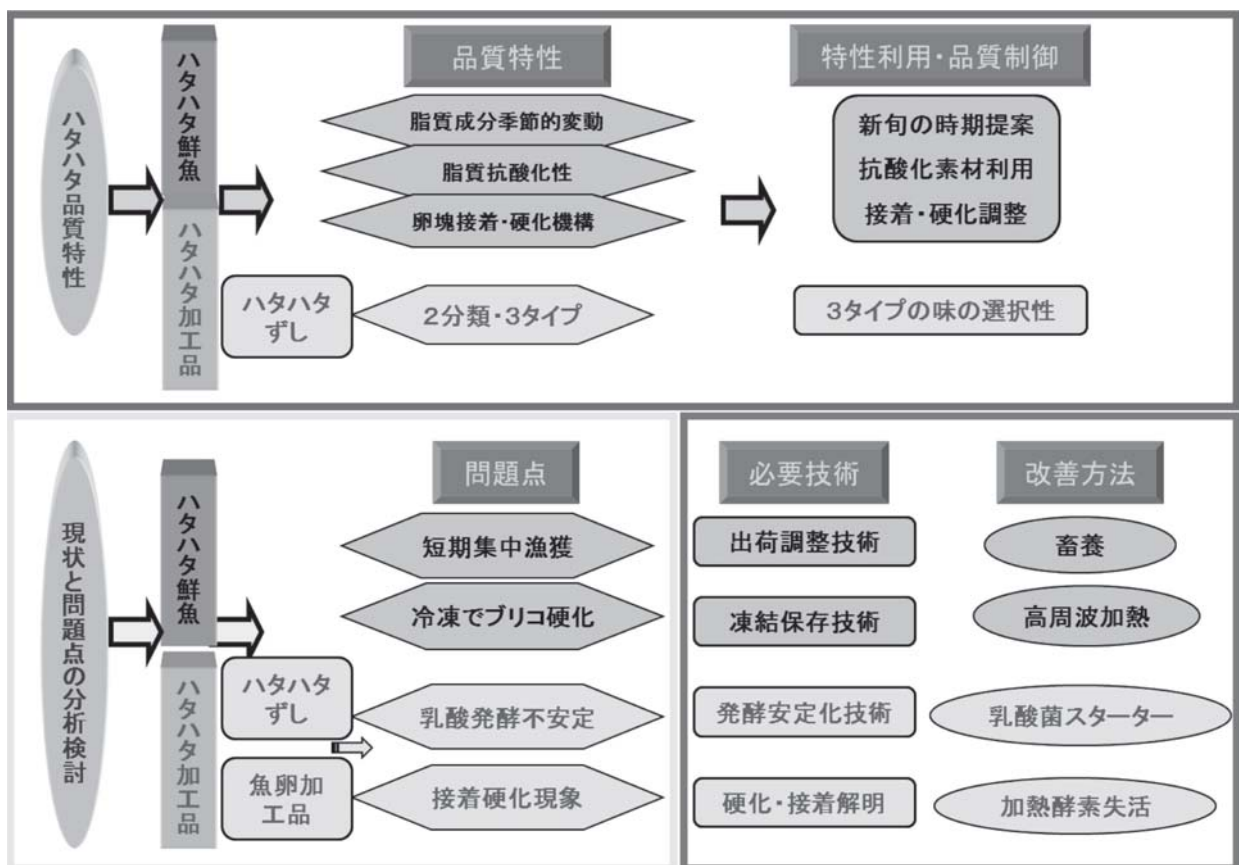


図 1 1 地域特産食品の研究開発モデル

## 7. おわりに

これまでほとんど研究されていなかった地域特産ハタハタの多くの特徴を明らかにした。ハタハタの漁獲時期では9月の脂質含量が多く美味しい条件を備えており、新しい旬の時期であることを明らかにした。その脂質は強い抗酸化性があることも科学的に証明した。ブリコの粘り物質は新規なタンパク質であり、ブリコの接着と硬化は海水塩濃度で作用する酵素が関与する可能性を明らかにした。また、ハタハタずしは乳酸発酵の有無で2つに分類できることを科学的に明らかにした。ハタハタの9月漁獲推奨、ハタハタ脂質の抗酸化剤としての利用、ハタハタずしの味の選択性など今後普及していく必要がある。また、現在のハタハタ利用上の問題点について解決する技術を検討した。12月の短期集中漁獲による魚価低下を避けるため、畜養による出荷調整技術を開発した。冷凍保存と魚卵加工の障害原因が酵素作用である可能性から、加熱による酵素失活処理を検討し冷凍保存法と魚卵加工技術を新たに開発した。乳酸発酵が不安定であった問題から、ハタハタずしに乳酸菌を添加し乳酸発酵を改善した品質安定化技術を開発した。秋田県の「県の魚」であるハタハタが地域特産としてより長く続いて行くよう、高品質な新しい地域特産食品をめざし今後もさらに研究開発を進めていく必要がある。秋田のハタハタ研究が今後とも発展することを祈念する。

最後に、本研究を進めるにあたりお世話になりましたすべての方に心より感謝申し上げます。

### 【引用文献】

- 1) 藤田秀司、三浦トシ、長崎京子、成田玲子 (1986) 「聞き書秋田の食事」(日本の食生活全集秋田編集委員会編) p1-357, (社)農山漁村文化協会、東京.
- 2) 太田雄治 (1972) 「秋田たべもの民俗誌」 p1-309, 秋田魁新報社、秋田.
- 3) 藤井建夫 (1993) 伝統食品の知恵—その伝承に向けて 「伝統食品の知恵」(藤井建夫監修) p4-15, (株)柴田書店、東京.
- 4) 菅原久春 (1995) しょっつるの製造と利用 「魚醤文化フォーラム in 酒田」(石谷孝佑編) p32-37, (株)幸書房、東京.
- 5) 大久長範 (1995) 新技術による地域特産品の洗練「最新地域食品加工の手引き」(農林水産技術情報協会編) p32-37, (社)家の光協会、東京.
- 6) 杉山秀樹 (2002) ハタハタの生物特性. 「ハタハタの生物特性と種苗生産技術」 p7-12, (社)日本栽培漁業協会、東京.
- 7) 秋田県農林水産部水産漁港課、秋田県水産振興センター (2002) 「県の魚ハタハタ」 p1-15, 秋田県、秋田.
- 8) 農林統計協会 (1996) 図説 漁業白書 平成7年度版 p108-109, (財)農林統計協会、東京.
- 9) 東北農政局秋田統計・情報センター (2006) 平成16年 秋田県漁業の動き p16-27, 東北農政局秋田統計・情報センター、秋田.

- 10) 大野悦子 (1971) 秋田県特産食品の研究Ⅳ ハタハタの化学成分とアミノ酸組成  
秋田大学教育学部研究紀要 **21**, 71-79.
- 11) 浅野元一 (1978) 秋田県特産食品の研究Ⅶ ハタハタから調製したタンパク濃縮物 (F P C) 秋田大学教育学部研究紀要 **28**, 77-93.
- 12) 斎藤勝美、杉山秀樹、Carlos A. Strussmann、隆島史夫、川端克彦 (1994) 海水および海産魚の精漿・卵巣液中の元素について 日本海水学会誌 **48**, 248-256.
- 13) 元広輝重、沼倉忠広 (1974) ハタハタ冷凍すり身のアクトミオシンについて 冷凍 **49**, 17-21.
- 14) 山浜敏一 (1974) ハタハタの燻煙加工について 市販ハタハタの実態と製品特性について 山形農林学会報 **31**, 40-46.
- 15) 塚本研一、戸枝一喜、船木勉、和田芙美子、松本祥子、松永隆司 (2007) 秋田県沿岸で漁獲されたハタハタ *Arctoscopus japonicus* の肉および生殖巣中の脂質成分の季節的変動 日本水産学会誌 **73**, 897-904.
- 16) 塚本研一、戸枝一喜、船木勉、大久長範、松永隆司 (2007) 秋田産ハタハタずしの化学成分と微生物相の地域特性 日本食品科学工学会誌 **54**, 313-319.
- 17) 和田俊、後藤直宏 (2004) 食品脂質の酸化とその機構 「食品機能学-脂質-」 p93-112, 丸善(株)、東京.
- 18) 二木鋭雄 (1986) 過酸化脂質の生成機構「過酸化脂質と栄養」(五十嵐脩、金田尚志、福場博保、美濃真 編) p7-25, (株)光生館、東京.
- 19) Saito H, Ishihara K. (1997) Antioxidant Activity and Active Sites of Phospholipids as Antioxidant. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1531-1536.
- 20) 瀬川丈史、原節子、戸谷洋一郎 (1995) 魚油の高度不飽和脂肪酸に対するリン脂質の酸化防止挙動(第3報)トコフェロールに対する含窒素リン脂質の相乗作用の機構 油化学 **44**, 36-42.
- 21) 本間伸夫、渋谷歌子、新宮璋一、石原和夫、佐藤恵美子 (1989) 東西の食文化の日本海側の接点に関する研究(Ⅲ) いずし系すし及びなれずし系すし 県立新潟女子短大研究紀要 **26**, 41-50.

# しよつつるの製造技術改良と用途開発研究

塚本研一、杉本勇人

(秋田県総合食品研究センター)

Kenichi TSUKAMOTO and Hayato SUGIMOTO

## 【要約】

秋田県には豊かな自然環境のもと特色ある食文化が形成され引き継がれており、伝統食品や特産食品なども多数存在している。しよつつるは日本三大魚醤油の1つであり特産食品の1つである。しかし、これまでのしよつつるの用途は、秋田の郷土料理であるしよつつる鍋やしよつつるかやき等の鍋物用調味料のみで使用され、その用途が狭かった理由としては「しよつつる」の高い食塩濃度（約25%）と独特の魚風味に原因があると考えられる。本研究は秋田県を代表するしよつつるを研究対象とし将来的にも地域特産食品として存続させるため、その特性を明らかにし、品質改善のための製造技術開発や新しい用途の開発を行ったものである。

## 1. 緒言

秋田県の魚醤油しよつつるは石川県のいしる、香川県のいかなご醤油とともに日本の三大魚醤油のひとつである。秋田県の伝統的特産品でもあるしよつつるの製法は、主な原材料として魚介類と食塩のみを使用することが特徴である。原材料として加える食塩は飽和食塩濃度となるように使用量を調整することで、腐敗を抑制しながら魚介類の持つ自己消化酵素により2年以上の時間をかけ分解される。したがって、その主な成分は魚介類のタンパク質が分解したアミノ酸やペプチドであり、独特の魚の風味と強い旨味を特徴とする調味料である。

しよつつるは昭和に入ってから25社の製造業者が製造を行っていたようであるが、現在はこのうち数社のみが製造を行っている状況である。さらに、これらの製造業者は小規模であるため、しよつつる生産量の統計値は無いが秋田県内では現在10社に満たない製造業者が製造を行い、製造数量は70トン程度であると推定される。また、しよつつるの消費については秋田県内がほとんどであると推定されるが、鉄道の駅や飛行機旅客ターミナルの売店等では、おみやげや贈答用としての販売されており、県外でも消費されている。

さて、これまでのしよつつるの用途は、秋田の郷土料理であるしよつつる鍋やしよつつるかやき等の鍋物用調味料としてのみ使用されてきた。その用途が狭かった理由としてはしよつつるの高い食塩濃度（約25%）と独特の魚の風味に原因があると考えられる。このようなしよつつるであるが、その栄養成分は魚のタンパク質が分解したアミノ酸やペプチドであり、第一には必須アミノ酸等栄養的に必要なアミノ酸の供給

源となる。また、多くのペプチドには哺乳類の血圧抑制に関わるアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性があり、しょつつるにも阻害活性が認められている<sup>1)</sup>。これらの栄養機能性に関しては今後の研究が期待される場所である。

また、しょつつるにはこれまで定義や規格は存在しなかったが、現在のところ秋田県で製造される魚醤油はすべてしょつつるとされ、魚醤油の地方名であると言える。日本国内にもいしる、いかなご醤油などの伝統的魚醤油や近年開発された新しい魚醤油が多数あるが、しょつつるという名前を使うのは秋田県の魚醤油のみに限られている。しょつつるの定義や規格については秋田県のしょつつる製造者の団体であるしょつつる研究会が地理的表示（GI）を申請する中で原案を作成している。GI 認定や地域ブランド確立等、今後の進展が待たれる場所である。

## 2. しょつつるの一般的製造工程

以下に原料特性、仕込み方法、熟成管理、精製方法について説明する。図 1 には一般的なしょつつるの製造工程を示した。

### 1) 原料の適性

しょつつるの原料としてはイワシ、コウナゴ、ハタハタなど比較的安価な魚種が使用される。したがって、ハタハタの場合は雄が使用される。秋田県では、ハタハタは産卵のため接岸する 12 月上旬に多く漁獲され季節ハタハタとして親しまれているが、雄が約 7 割を占め雌より単価が低く原料として適している。ハタハタでもハタハタ以外の魚種でも、しょつつる製造で最も重要なものは自己消化酵素であると考えられる。したがって、鮮度が良好な魚介類が望ましい。実際は、凍結原料が製造時期や製造量の調整のしやすさから使用され、鮮度が比較的よければ原料として使用可能である。自己消化酵素はタンパク質分解酵素が主であり、魚介類のタンパク質が徐々に分解しペプチドが生成し、さらにアミノ酸まで分解する。魚介類のタンパク質はその構成アミノ酸として旨味系アミノ酸のアスパラギン酸やグルタミン酸が多く、両方で全アミノ酸の 20% 以上を占める場合もある。したがって、魚介類のタンパク質が自己消化酵素で分解されると旨味の強い液体となり、これがしょつつるである。その他の原材料としては原料魚介類に対して 30% を使用する食塩であるが、これは並塩などの精製塩が使用される。海水のにがり成分が多く含まれる食塩もあるが、これを使用してもしょつつるの品質には影響が少ないため、安価な食塩が使用されている。

### 2) 仕込み方法

しょつつる仕込み時の食塩添加は原料魚介類に対して 30% の食塩を基本としているが、製造業者によっては異なる場合もある。食塩混合は、原料魚介類に直接まぶしながらよく混合する。食塩が均一に混ざらない場合は食塩濃度のばらつきができて、濃度の低い部分では腐敗等の変質が起こる可能性がある。また、原料魚がハタハタ、イワシ等小型のものはそのまま食塩と混合するが、タラ等の大きい魚は適当な大きさに切り混合する。1 回の仕込量は製造業者によって異なり、100kg 程度から 10t 以上までと範囲が広い。しょつつるの場合、他の都道府県の魚醤油製造で使用される水産加

工残渣を主原料とせず、原料魚介類を丸ごと使用することを特徴としている。

### 3) 分解・熟成の管理

分解・熟成は通常は常温で2年以上漬け込み、自己消化酵素により分解するのを待つ。その間、昆虫等の異物が入らないよう管理に注意する必要がある。漬け込み容器の容量は製造業者により異なる。分解・熟成中に可能であれば定期的に攪拌を行うことも重要である。これにより分解・熟成中に生じる可能性のある塩分濃度ばらつきをなくし、特に低塩分による腐敗等の変質を防止することができる。また、均一で一定のしょっつる製品を製造するためにも重要である。また、分解・熟成中は常温で特に温度制御は行わないため、多少の仕上がりの違いはその年の気候により生じてくる。そのため全窒素などの分析値により終了を管理することが望ましい。

### 4) 精製

次に分解・熟成終了後の精製では、煮沸工程で沸騰まで加熱し10分程度煮沸する。この工程で油脂の分離と未分解のタンパク質等の凝集があり、後の汙過工程を容易にするとともに、自己消化酵素の失活と殺菌の効果がある。煮沸液は骨などの未分解物を粗汙過し、冷却する。冷却後は汙過精製工程に入るが、本工程は清澄なしょっつるを製造するために重要な工程である。かつては海砂など使用されたが、現在は汙布で未分解物や脂質を荒汙過した後、汙過器や汙過助剤等を使用し清澄なしょっつる液とする。その後の瓶詰は瓶詰後の加熱殺菌は行わないため、しょっつるを90℃以上に加熱し、そのまま冷却せず充填することが望ましい。瓶は別に加熱殺菌しておくことが必要である。このことで耐塩性菌の殺菌効果が期待できる。

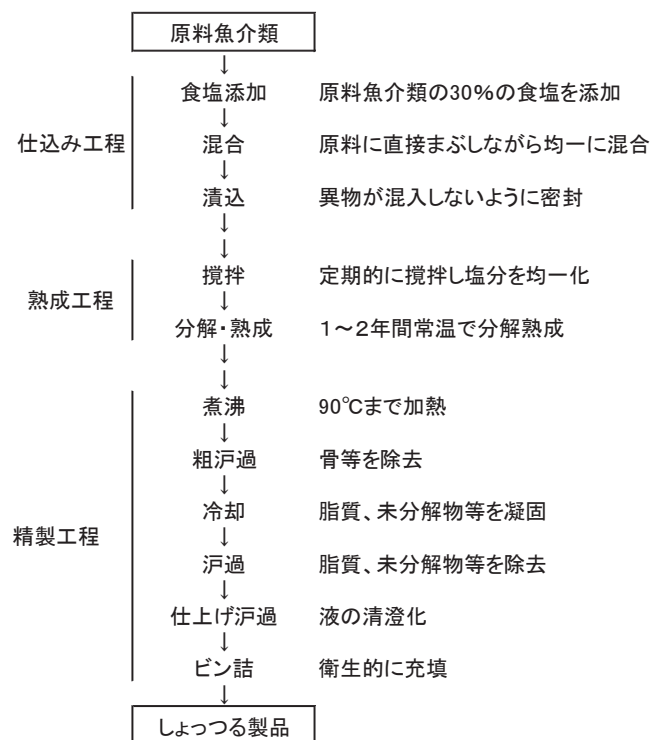


図1 「しょっつる」の一般的製造工程

### 3. しょっつるの製造技術改良

これまでのしょっつるの用途は秋田の伝統的食べ方である鍋物用（しょっつる鍋、しょっつるかやき）として使われるのがほとんどであり、その用途は限定的となっていた。その理由として古くからの食文化の他、しょっつるの高い食塩濃度（約25%）と独特の魚の風味が上げられる。そこで秋田の伝統的特産品の製造を将来的に維持するためにも、しょっつるの消費拡大を推進することが必要と考える。そのためにはしょっつるの用途開発が不可欠である。そこで魚臭く、しょっぱいというイメージからの脱却を目指し、しょっつる製造技術の改良に取り組むこととなった。従来のしょっつるは常温で2年以上の分解・熟成期間があるが、秋田県では冬季の気温が低いため分解がほとんど進まないか、著しく遅くなる期間があると推定される。そこで分解・熟成期間短縮のため、製造技術改良を検討することとした。研究開発を進めた結果、タンパク質分解酵素の添加により分解・熟成期間の短縮が可能であることが判明した。タンパク質分解酵素の他に醤油麹を使用する方法も検討したが、風味が従来のしょっつるとかけ離れたものとなったため、風味に影響しないタンパク質分解酵素を使用する方法を採用した。タンパク質分解酵素もその起源により働きが異なるが、糸状菌（*Aspergillus oryzae*）由来のA社製工業用プロテアーゼ製剤を使用することで生産技術改良が実現した。図2に酵素製剤を使用しない従来法と酵素法の遊離アミノ酸の比較分析値を示した。酵素法は従来法と比較して1年分解・熟成で旨味系アミノ酸のグルタミン酸(Glu)、アスパラギン酸(Asp)およびその他アミノ酸(others)が多く、2年分解・熟成でも同様の結果であった。酵素法は1年分解・熟成と2年分解・熟成で旨味系アミノ酸と遊離アミノ酸総量がほとんど同じであり分解・熟成期間としては1年でも可能であると考えられる。これらの結果から酵素法は分解・熟成期間を短縮できるだけでなく、1年では遊離アミノ酸総量も従来法の約3倍となり、きわめて効率的生産が可能なる方法であることがわかった。したがって酵素法を製造方法として採用することで分解・熟成期間の短縮と旨味の増強が同時に可能となった。

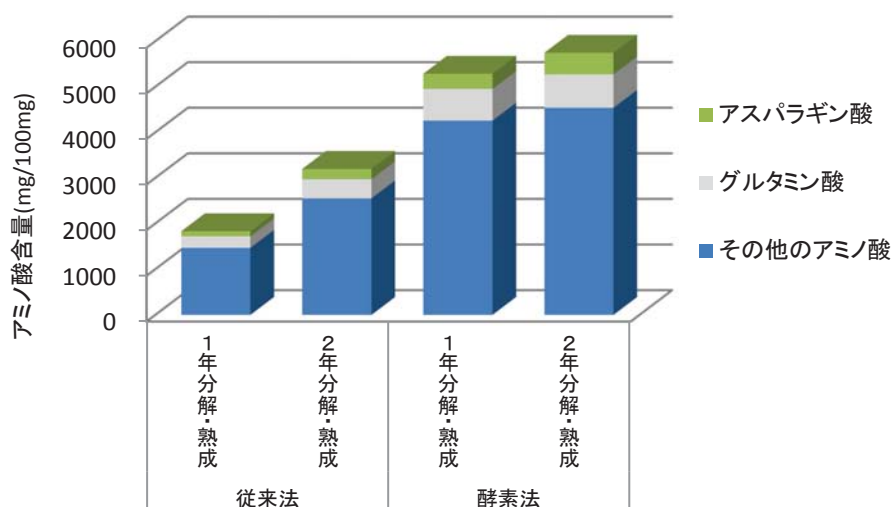


図2 ハタハタ「しょっつる」の遊離アミノ酸



#### 4. 酵素法による地魚しょっつるの開発

しょっつるにおいて酵素法による製造技術改良で効率的生産が可能となったが、仕込み初期の徹底した攪拌による部分的腐敗防止を組み合わせることで、分解・熟成期間の短縮と旨味増強に加え原料魚の風味付与ができるようになった。そこで酵素法により試作した各原料魚しょっつるの遊離アミノ酸を分析し、比較検討した。旨味系アミノ酸のグルタミン酸(Glu)、アスパラギン酸(Asp)およびその他アミノ酸(others)について図3に示した。これらの試験は常温で1年間の分解・熟成であるが、サワラ試験区が旨味系アミノ酸と遊離アミノ酸総量で最も多く、次にマダラ、スケトウタラ、ハタハタの順であった。また高橋らによる同様の試験<sup>2-5)</sup>を抜粋して図4に示した。これらは2年分解・熟成であるが、試験区の中では遊離アミノ酸総量でコアミ、イワシ、コウナゴ、アジ、ハタハタの順で多かった。旨味系アミノ酸量ではアジが最も多く、次にコアミ、イワシ、コウナゴ、ハタハタの順であった。これらの結果から原料魚種によりしょっつるの遊離アミノ酸総量が大きく異なることがわかった。また、原料魚種により総遊離アミノ酸中の旨味系アミノ酸比率も大きく異なることがわかった。特にアジは旨味系アミノ酸比率が28%であり、しょっつるの中で最大であった。この他は22.6%（サワラ）から19.4%(イワシ)でほぼ同じであった。このように原料魚種の違いによって、遊離アミノ酸総量、旨味系アミノ酸比率および原料魚の風味を活かした特徴のあるしょっつるが製造可能であり、新たな商品開発へも展開できることがわかった。

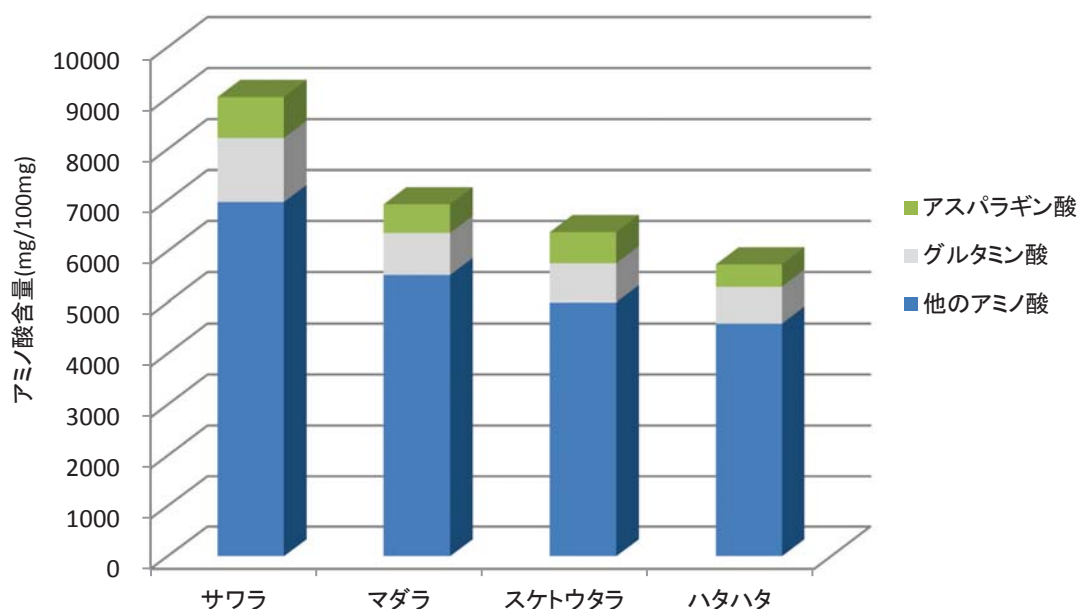


図3 しょっつる原料魚別の遊離アミノ酸①

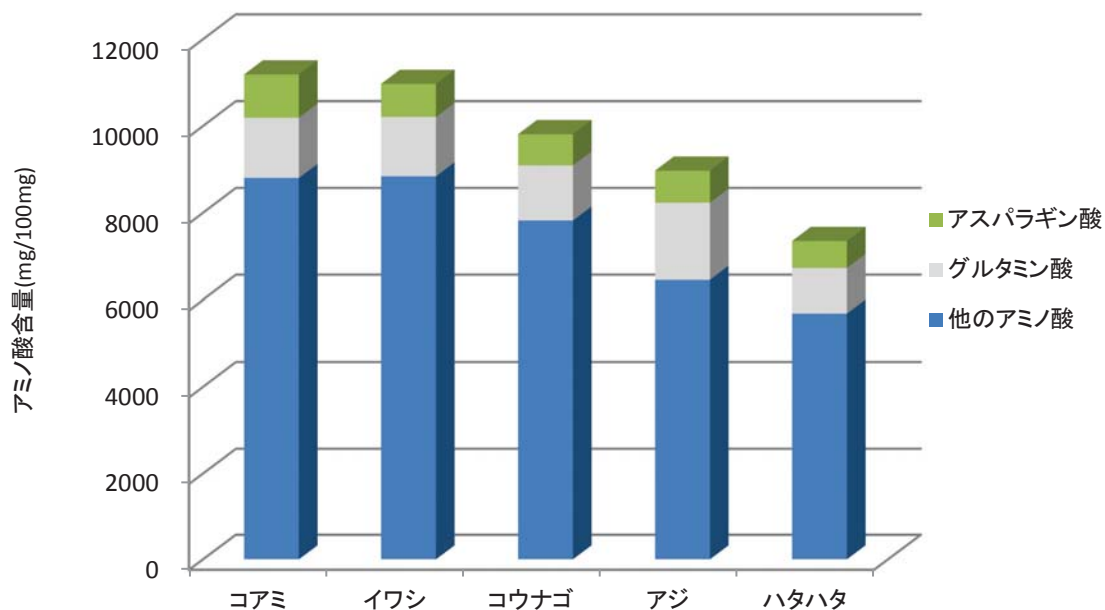


図4 しょつつる原料魚別の遊離アミノ酸②

## 5. しょつつるの用途開発

しょつつるが多くの消費者から愛用され、その生産量が増大して行く方向が望ましい。そのためにはしょつつるの用途拡大が不可欠であり、魚臭く、しょっぱいというイメージからの脱却を目指しながら、しょつつるの用途開発改良に取り組むこととなった。

### 1) しょつつるを利用した加工品開発

しょつつるはこれまで鍋物用の味付け調味料としての用途のみであった。しかし、旨味と風味に特徴があるため、その用途は加工品にも拡大可能と考えられる。そこで最初に検討したのが、しょつつるを調味液として使用して、魚の開きを漬け込むしょつつる干しである<sup>6)</sup>。秋田県地魚のひとつであるホッケを使用した「ホッケのしょつつる干し」が開発された。元号が平成になってから特にハタハタ資源が激減したため、当時秋田県で漁獲量が比較的多かったホッケが加工品に使用された。平成15年以降ハタハタ資源が順調に回復し、漁獲量が安定してからは雄ハタハタを原料としたハタハタしょつつる干しが製造されるようになった。しょつつる干し用の調味液は商品によってはみりん等の他の調味料と混合し、あるいは適宜希釈され使用される。また、ハタハタのつみれに調味液として使用したハタハタ団子（しょつつる入り）や予めしょつつる鍋用に調製されたしょつつる鍋スープも商品化されている。これらを図5に示した。また、ドレッシング、めんつゆ等への展開等、可能性が大きく新たな用途拡大が期待される。



図5 しよつる利用加工食品

## 2) 秋田県におけるしよつると地域振興

最近では秋田県においてそれぞれの地域のしよつるを利用し地元商工会等が中心となって地域振興を図る動きが見られるようになった。その中で代表的な例を紹介する。

### ①男鹿しよつる焼きそば

秋田県沿岸部で男鹿半島にある男鹿市は、県内でも有数のハタハタ水揚げ地である。従来、しよつる製造業者は存在しなかったが、ハタハタ資源の復活とともにハタハタのしよつるも復活させようと、地元醸造会社がハタハタしよつるの製造販売を開始した。また、男鹿市の商工会が中心となり、そのハタハタしよつるを核とした地域振興を図るべく、活動を開始した。その結果としてハタハタしよつるを利用した焼きそばを地域の特産メニューとした「男鹿しよつる焼きそば」を飲食店メニューとして展開した。原材料等の基本的なルールを決定し、あとは各飲食店のオリジナルを加えることで約30店舗において実施している。現在、秋田県内でも男鹿の名物として定着している。男鹿しよつる焼きそばの例を図6に示した。

### ②鱈しよつるを核とした地域振興

秋田県沿岸南部のにかほ市は、350年続く鱈を奉納する祭りがあるほど鱈漁が盛んな地域で、鱈は市の魚となっている。マダラを原料とした酵素法によるしよつるが「鱈しよつる」として地元醸造会社で製造がされるようになった。また、にかほ市の商工会が中心となり、鱈しよつるを核とした地域振興を図るべく、「よかつ鱈にかほ市へ」の活動を開始している。約20店舗の飲食店では鱈しよつるを共通食材として、あとは各飲食店の創作によりオリジナルメニューを提供している。寿司、鍋物、茶碗蒸し等の和食、ブイヤベース、パスタ、ピザ等の洋食、ラーメン、うどん等の麺類、クッキー、せんべい、どら焼き等の菓子類まで利用が拡大している。今後のさらなる展開が期待される。鱈しよつるの利用例を図7に示した。



図6 「男鹿しよつる焼きそば」



図7 「鱈しよつる」利用例

## 6. 今後の展開

近年は、伝統食品であるしよつるに関して品質向上への取り組みが多くなっている。また、加工品への用途開発や地域振興への利用も進んでいる。さらに消費拡大を図るための技術的課題としては、約25%という高塩分の低塩化が上げられる。また、発酵技術と融合させた風味の改良等も今後の課題である。さらなる用途開発、輸出も含めた秋田県外での消費拡大のためには、技術開発が今後も重要となってくる。秋田の魚醤油しよつるの今後の発展が大いに期待される場所である。

### 【引用文献】

- 1) 青柳智則、横田早希、後藤猛、塚本研一、高橋砂織 (2013) しよつるのアンギオテンシン変換酵素阻害 秋田県総合食品研究センター報告 15, 8-18.
- 2) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2000) しよつる風新調味料の開発 (第2報) 秋田県総合食品研究所報告 2, 9-16.
- 3) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2000) しよつる風新調味料の開発 (第3報) 秋田県総合食品研究所報告 2, 17-24.
- 4) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2001) しよつる風新調味料の開発 (第4報) 秋田県総合食品研究所報告 3, 12-18.
- 5) 高橋光一、戸松誠、柴本憲夫、熊谷昌則 (2002) しよつる風新調味料の開発 (第6報) 秋田県総合食品研究所報告 4, 11-18.
- 6) 福田裕、山澤正勝、岡崎恵美子監修 (2005) 全国水産加工品総覧 p110-112, 光琳、東京.

# しょっつるの歴史と将来

杉本勇人、塚本研一

(秋田県総合食品研究センター)

Hayato SUGIMOTO and Kenichi TSUKAMOTO

## 【要約】

地理的表示 (GI : Geographical Indication) の運用に伴い、申請に必要な商品の特性や歴史的背景を見直す動きが見られる。我々は秋田の伝統調味料の一つである「しょっつる」に着目し、その歴史的背景を調査した。しょっつるは、塩づけした魚が自然分解 (発酵) してできたとされており、近海漁業と製塩業がさかんであった新屋・浜田地域が原点である。男鹿・天王地域でも古くからしょっつるが造られており、そのほとんどが自家製であったが、昭和 60 年頃商業的な生産が始まった。能代・八森地域では、かつてしょっつるを「イシル」、「イシロ」などと呼んでおり、品質の良くないしょっつるも出回っていたが、平成 14 年から当研究センターの支援により高品質なしょっつるを製造している。商業的なしょっつるの製造はその他の地域で増えており、仙北市角館でイワナのしょっつる、にかほ市でタラのしょっつる、鹿角市でアジのしょっつるが製造されている。平成 28 年には「しょっつる研究会」が結成され、しょっつるの品質向上、用途拡大、販売力強化や地域ブランドの確立を目標として活動している。その活動の中で「しょっつるロゴマーク」作成や、GI 申請も行っている。今後、伝統食としてのしょっつるを守るには、新たな価値の創造と産業システムの開発・強化が必要である。

## 1. 緒言

平成 27 年 6 月から「特定農林水産物等の名称の保護に関する法律 (GI 法)」(平成 26 年法律第 84 号) が施行され、農林水産省では、生産業者の利益の増進と需要者の信頼の保護を図ることを目的とした地理的表示 (GI : Geographical Indication) を、知的財産として保護する制度を運用している。農林水産物・食品等の名称で、その名称から産地と特性が特定できる商品を GI 認証している<sup>1)</sup>。これに伴い各地で GI 認証を行う動きが活発化しており、申請に必要な商品の特性や歴史的背景を見直す動きも見られる。こうした動向に対応するため、我々は秋田の伝統調味料の一つである「しょっつる」に着目し、その歴史的背景を調査することにした。本調査は、今後のしょっつるの研究を推進していく際の方向性を考える上で必要な知見として、また将来的にしょっつるを秋田県の地域特産食品として存続・発展させるための方策を考える上で重要な知見として報告するものである。

## 2. しょつつるの歴史

昭和13年3月10日 秋田さきがけ新報夕刊（図1）に、新屋の仙葉善治商店の仙葉善治氏が次の内容を記載している。

『当今と違ひ昔は新屋濱方面にも、  
 鰯や鰯がいつも大漁で、且つ濱邊  
 に鹽田を作り、澤山の鹽を産出したも  
 のである。その漁れ立ての魚類を、然も  
 出来立ての鹽を以て桶へ漬け、二  
 三年放置して居れば、醗酵して骨も頭も  
 全部どろどろになる。これを搾ると  
 恰度色のない醤油のやうになるので、  
 それを調味料として一般的に廣く  
 愛用されたのである。』

仙葉善治氏が記載したとおり、新屋・浜田地域（秋田市）は、江戸中期に製塩業がさかんであった。この頃発達してきていた近海漁業と共に、食物の保存用調味料として塩は重要な産業であった<sup>2)</sup>。新屋・浜田地域の製塩はかなり古くから行われており、一説によると織田信長が北陸地方の一向宗徒を弾圧した1570年前後に、加賀国（石川県）から新屋・浜田地域に逃れた人達から製塩法と近海漁業を学んだとされている<sup>3)</sup>。

現在の雄物川河口（放水路）一帯は、かつて浜港の新屋浜であった（写真1）。そこでとれた魚はいったん塩づけにし、雄物川の川港へ運ばれ、仙北方面などに川船で運んで売っていた。その時によって魚が売れ残ることがあり、売れ残った魚は再び浜に持ち帰り、浜倉の桶に入れて貯蔵していた。

その貯蔵していたものが自然分解（発酵）して「しょつつる」ができたという<sup>2, 3)</sup>。



図1 昭和13年3月10日 秋田さきがけ新報夕刊

しょつつるの語源は、「塩汁（しおじる）」と言ったのを「しょつつる」と聞き間違えたのが始まりとされていて、命名者も命名年月も分かっていない<sup>4,5)</sup>。

江戸時代に佐竹侯が新屋の大門助右衛門に命じてしょつつるを造らせたと言われており、江戸時代の行商がしょつつるの商いをしていたという文献もある<sup>3)</sup>。しょつつる製造の正確な起源は定かではないが、製塩業の時期から江戸時代中期に始まったと推測される。



写真1 傾斜のある砂浜が続く現在の新屋浜

一方で、男鹿・天王地域（男鹿市・潟上市）や能代・八森地域（能代市・八峰町）にも古くからしょつつるの食文化がある。次に、各地域のしょつつるの歴史を解説する。浜田地域と八森地域については郷土誌等に記載が無く、男鹿・天王地域については近年の動向に関する記載がないため、これら3地域については我々が独自に調査を行った。

#### 【新屋・浜田地域】

昭和初期には、新屋の佐藤佐七（佐藤佐七商店）、高橋寅蔵（高寅商店）、仙葉善治（仙葉善治商店）がしょつつる業者としてあげられていた<sup>2)</sup>。佐藤佐七商店は創業が明治28年で最も古く、昭和8年にしょつつるを「秋田塩魚汁」としてはじめて東京へ持っていき、しょつつるが秋田県の特産として全国的に知られるようになり、販路が全国に拡大した。その功績が認められ、昭和42年に秋田市文化功労章を受賞するなど、幾多の賞を受けている<sup>6)</sup>。高寅商店は創業が大正12年頃で、しょつつる製造のほか、豚肉、鮮魚、煮干し、乾物、ハタハタ寿司、ギバサなどを製造販売していた。仙葉善治商店は、味噌醤油の醸造とあわせてしょつつるの製造も行っており、しょつつるの製造は昭和10年頃から行い、約200石の生産量があった<sup>7)</sup>。

昭和初期に農林省が魚醤油の製造を奨励したことから、昭和10年に千葉県銚子のヤマサ醤油が魚醤油を調査し、『魚醤油ニ関スル情勢ニ就キテ』を報告している。その中で秋田のしょつつるが紹介され、当時の新屋地域のものと思われる製造法も記載されている<sup>8)</sup>。この報告書の原本の写しは、仙葉善治商店に残っている。

浜田地域では、高橋五郎治が明治40年に創業（現在の秋田しょつつる製造元）し

ており、高橋寅蔵は大正 12 年にここから分家している。浜田地域のしょつつる業者は専業ではなく、兼業の業者が多かった。かつての浜田村は、田畑も少なく、3 月、4 月になると北海道松前（ニシン場）へ出稼ぎに出ており、その合間にしょつつるを製造し、販売をしていた。浜田地域では塩も製造しており、夏場は午前中に浜の砂をならして海水を撒き、昼にはその砂を集めて釜で煮詰めて塩を製造していた。冬場は海水を直接煮詰めて塩を製造していた。かつての浜田浜には、塩製造の小屋がたくさん並んでいたという（写真 2、3）。



写真 2 平たんな砂浜が続く現在の浜田浜



写真 3 浜田浜に並ぶ小屋

当時塩は、米と同じくらい貴重なものであった。塩は専売品であり、権利がないと売ることにはできなかったが、しょつつるにすることで自由に売ることができた。この地域の人々は、味噌醤油を製造するより、豊富に捕れた塩と魚でしょつつるを製造する方が手間もコストもかからないため、しょつつるを盛んに製造していた。

新屋地域では、街中でしょつつるを製造するため、住民から「臭い」などの苦情が出た。そのため新屋には、古くからしょつつるの製造を行っていた佐藤佐七商店、高寅商店、仙葉善治商店の 3 業者しかなかったようである。一方、浜田地域は、しょつつるを製造する業者が多く、ほとんどが浜辺の小屋で製造していたため、住民からの苦情は出なかったという。

新屋の街中でしょつつるの製造を行うことに対する逆風が強まる中、仙葉善治商店は、魚からのしょつつる製造を止め、昭和 27 年からしょつつる中間原料を浜田の高橋五郎治から仕入れている。仙葉善治商店では中間原料に、その時代に合った味付けを施し、「塩魚汁」ブランドでしょつつるを販売し、県内外にその名が広く知られている。新屋の他社が廃業する中で、仙葉善治商店が品質の良いしょつつるを供給し続けることができたのは、高橋五郎治との協力体制があったからである。この協力体制は、ウイスキーを全世界に広めたスコッチウイスキーのオフィシャル（蒸留酒製造業者）とボトラーズ（ブレンド・瓶詰め業者）の関係<sup>9)</sup>に類似していることが、非常に興味深い。

浜田地域には、最盛期に 20 軒ほどのしょつつる製造業者があった。当時は敗戦で物資が極度に欠乏しており、しょつつるは醤油の代替品として盛んに製造され、昭和



20年には、秋田市内だけでもしよつつる製造業者は25軒を数え、最盛期を迎えた。その後、物資が出回るようになると醤油の代替品としてのしよつつるの需要は少なくなり、製造業者が減少し始めたという<sup>4)</sup>。

しかし我々の調査では、しよつつるを醤油のように「かける」「つける」などで食べる習慣はこの地域はなく、専ら「しよつつる鍋」「かやき（貝焼き）」の味付けに使ったという。浜田地域では家族一人ひとりにかやき用鍋があり、毎日のようにかやきを食したというが、現在ではハタハタが捕れる時期くらいにしか食さなくなった。しよつつるの需要の減少は、この食生活の変化が主たる原因と考えられる。

現在、新屋・浜田地域では、仙葉善治商店と秋田しよつつる製造元が残るだけとなった（写真4、5）。秋田しよつつる製造元の3代目の高橋謙治氏は、昭和33年から約60年間しよつつるの製造に携り、しよつつるが衰退してゆく中でも、伝統の製法を守りながらしよつつるを製造し続け、この地域のしよつつるを支えてきた。この業績は秋田のしよつつるにとって、非常に大きなものである。



写真4 仙葉善治商店



写真5 秋田しよつつる製造元の火入れ釜

### 【男鹿・天王地域】

男鹿・天王地域のしよつつるの始まりは明らかではないが、新屋風土記によると、江戸時代に男鹿方面の船も新屋に魚をみずあげした<sup>3)</sup>という記載がある。また、菅江真澄が江戸時代末期の文化年間に男鹿地域を回った際の遊覧紀の中で、ネレケモチ（くず米を粉にし、そば粉と混ぜて湯で練った餅で、ネリケモチともいう）にハタハタのしよつつるを付けて食べたことが記載されている<sup>10)</sup>。この頃、男鹿・天王地域にしよつつるが伝わったのではないかと思われる。

男鹿地域の脇本地区ではハタハタでしよつつるを造っており<sup>11)</sup>、五里合地区ではハタハタ、イワシ、コウナゴ<sup>12)</sup>、北浦地区ではコウナゴ、ハタハタ<sup>13)</sup>、船越地区ではハタハタで<sup>14)</sup>しよつつるを造っていた記録がある。新屋・浜田地域のしよつつる製造法とは異なり、魚と塩以外に「麴」を使って造っている<sup>11-13)</sup>。船越地区は麴を使わず、ハタハタの頭と塩でショカラ（塩辛）やしよつつるを造っていた<sup>14)</sup>。

江戸時代の船越地区は、ハタハタを陸路で送る際に必ず通過しなければならなかった地点で、ハタハタ屋役があった。この時代の船越地区は、五城目や能代から出る雑

穀や木材などを集積し、加賀の商船や土崎港の船などと盛んに取引していた<sup>14)</sup>。

男鹿地域のしょつつるは麴を使って造るため、見た目や味わいが醤油に近くなる。そのためかこの地域のしょつつるは、しょつつる鍋のみならず、魚や野菜を煮るときの味付けにも利用されていた。また、ネレケモチやシダモチ（くず米を粉にし、熱湯でこねて丸め茹でたもの）には、しょつつるをつけて食していた<sup>11-13,15)</sup>。このような「つける」という利用法は、新屋・浜田地域のしょつつるとは異なる特徴で、醤油に近い利用法である。先の新屋・浜田地域で、「醤油の代替品としてのしょつつるの需要が減少した」と記述したが、その影響を受けたのは男鹿地域である。

天王地域にも古くからイサジャ（あみ）の塩辛やハタハタのしょつつるがあり、塩も製造していた。この地域は昔から漁業が盛んで、イワシ、ハタハタ、イトヨ、ハゼなどが多くとれ、これらを原料にしょつつるが造られていた<sup>16)</sup>。このように男鹿・天王地域では、古くから盛んにしょつつるが造られていたが、そのほとんどが家庭での製造に留まっていた。

男鹿地域での商業的なしょつつるの製造は昭和 60 年頃からで、原料にトビウオ、イシモチ、ハタハタなどを使い、男鹿水産加工事業協同組合（写真 6）が製造していた。このしょつつるの製造は、協同組合に参画していた諸井醸造所が中心となって行っていた。当初、ハタハタに魚の麴を加えて製造していたが、魚臭さが残るため、当時流行していた「めんつゆ」を足すことで魚臭さを消して商品にしていたという。「しょつつる」というよりは、「だし」に近いものであった（写真 7）。これは、現在のしょつつるを利用した「白だし」商品の原型と言える。



写真 6 男鹿水産加工事業協同組合の施設  
（現在は武田水産が所有している）



写真 7 しょつつるだし

平成 4 年に高寅商店が廃業する際に、諸井醸造所（写真 8）がしょつつるの原料を引き取り、これに雑魚を加えて、だし系のしょつつるを製造していた。その後、当研究センターの支援により、ハタハタ 100%のしょつつるの製造を平成 7 年に開始し、平成 9 年から発売を開始している（写真 9）。

天王地域では、男鹿地域の商業的な製造開始から少し前に、内田水産と戸田水産がしょつつるを商業的に製造していた。原料は、マメアジと八郎潟のイサジャであった。



写真8 諸井醸造所



写真9 ハタハタ 100%しよつつの仕込み

### 【能代・八森地域】

かつて能代地域では、しよつつるは「イシル」、「イシロ」などと呼ばれていた。アミ、小イワシ、小アジ、ハタハタの頭、小エビ、コウナゴなどを原料に造っており、そば餅に付けて食したり、鍋ものの味付け、お浸し、和え物に利用された。イサジャに塩と麴を加えて塩辛にし、これもイシロと呼んだ。また、川エビや沼エビを使い、塩と麴で塩辛を造り、貝焼きの味付けや、魚や肉、野菜を煮付ける際の調味料として使ったとされている<sup>17)</sup>。

八森地域の各家庭でも古くからしよつつるを造っており、醤油のない時代に、コウナゴやハタハタの頭のしよつつるを造り、使っていた。このハタハタの頭は、ハタハタ寿司製造の際に廃棄物として出たもので、これを原料にしたしよつつるの味は良いものではなかった。戦後、救荒食として食されていたシダモチにこのしよつつるを付けて食べていたが、あまりの不味さに、当時の子供たちは空腹でも食べなかったという。

この地域のしよつつるは、食べ方や原料、物流の観点から、男鹿地域の流れを組んでいたものと思われ、「つける」という利用法が共通している。

商業的なしよつつるの製造は、鈴木水産（精製は能代の第一物産で行っていた）とかがもく海産が行っていたが、現在は製造していない。その後、この地域からしよつつるの食文化が薄れていったが、平成14年に秋田県漁協北部総括支所漁協女性部の「ひより会」が当研究センターの支援により、しよつつるの製造を開始した。ここでは、かつてのしよつつるとは違い、ハタハタの身だけを使用した吟醸しよつつるなど、高品質なしよつつるを製造している。

## 【その他の地域】

- 大館（大館市）：ハタハタの頭に麴と塩を混ぜてしょつつるを造っていた。しょつつるは、晩飯の貝焼きのだし汁として使用した<sup>18)</sup>。
- 三種（三種町）：森岳では、ジュンサイをそえたしょつつるかやきを食していた。八竜では、ドジョウたたきの吸い物にしょつつるを使用した<sup>10)</sup>。
- 南外（大仙市）：ハタハタが大漁にとれた時に塩と麴でしょつつるを造っており、冬の鍋料理や薄めて各種料理に使用されていた<sup>19)</sup>。
- 西目（にかほ市）：イサジャ、イワシに塩をしてしょつつるを造り、鍋物の調味料としていた<sup>20、21)</sup>。西目出戸地区では、八の字ガニやカスラ貝でもしょつつるを造っている。
- 鳥海（由利本荘市）：ハタハタの頭でしょつつるを造っていた<sup>22)</sup>。

これらのしょつつるのほとんどは自家製造・自家消費であり、商業的な製造は行われていなかったようである。最近になり、商業的な製造に新規参入する業者が、「その他の地域」で増えている。平成 19 年に仙北市角館で安藤醸造がイワナのしょつつる製造を始めており、平成 25 年にはにかほ市で日南工業がタラのしょつつる製造を始めている。平成 27 年には鹿角市のヤマヨフーズがアジのしょつつる製造を始めている。

秋田県全域のしょつつる製造業者は 10 社未満で、製造量は年間 70 トン程度（我々の聞き取り調査による数値）である。全国的に魚醤油が見直される中、しょつつるも例外ではなく、生産量は増加傾向にある。特に、しょつつるを利用した「白だし」などの需要が拡大しており、今後も伸びていくと期待される。

### 3. しょつつる研究会と地理的表示（GI）取得

秋田県において、平成 28 年に「しょつつる研究会」が結成された。会員は、県内しょつつる製造業社 7 社とその製造関連業者 3 社、当研究センターからなっている。各会員はハタハタ、タラ、アジ、イワシ、イワナなど、秋田の地魚を中心とした原料を使用し、それぞれ特徴的なしょつつるを製造している。しょつつる研究会では、しょつつるの品質向上、用途拡大、販売力強化や地域ブランドの確立を共通の目標として活動を行っている。その活動の中で共通で使用できる「しょつつるロゴマーク」を作成し、商標登録（図 2）を行った。また、地理的表示（GI）にも申請を行っている。



図 2 しょつつるロゴマーク

Design：杉本勇人  
Arrangement：鎌田あかね  
Supervision：五十嵐潤、しょつつる研究会  
Advice：あきた産業デザイン支援センター  
商標登録 第 5901185 号  
区 分 第 30 類 秋田県産の魚醤油  
商標権者 秋田県

#### 4. 今後の展開と将来

GI 認証制度により、各地で伝統食品を見直し、それを守る動きが見られる。しかし、認証や単なる守りだけでは、逆に衰退の一途をたどることになる。伝統食品が衰退する理由として、次の3つがある。

1. 新しい技術の導入
2. 現在の食生活・食文化に合わない
3. 後継者がいない

1は、かつて使っていた技術の良さを見直し、温故知新の考え方で解決していく必要がある。2は、現在の食生活・食文化に合わせた、新たな価値の創造が必要である。3は、人的要因もあるが、1と2を見直すことで解決する可能性がある。

しょつつるをこの3つの理由で考えると、2の「現在の食生活・食文化に合わない」であり、新たな価値の創造が必要である。

今回の歴史調査を通して各地域のしょつつるに共通していることは、「鍋にしか利用できない」、「臭い」、「不味い」、「しょっぱい」などのネガティブ・レスなイメージが多かったことである。特に、中高年層でそのようなイメージが多かった。しょつつるにはこのようなネガティブ・レスな考え方があったため、問題解決型の商品開発となり、利用法が広がらなかつたと思われる。このような状況では、新たな価値の創造も難しくなってくる。

新たな価値の創造には、ポジティブ・アップの考え方が必要であり、今のしょつつるに必要な考え方である。「臭いは、不味いではない」、「しょっぱいは、濃いである」など、ネガティブ・レスをポジティブ・アップに変換して考えていけば、商品開発のアイデアが無限に広がるはずである。

我々は、しょつつるの新たな価値として「うま味」に着目し、それを全面に出すかたちで「しょつつる研究会」の活動を行ってきた。「うま味」というポジティブ・アップの考え方が、各種展示会やイベントを通して食品事業者や消費者に伝わり、今その効果が出ようとしている。また、しょつつる研究会としょつつるを利用する食品加工業者や飲食店との交流・意見交換の場として、「しょつつる利用加工協議会」を平成29年11月に設立した。ここでもポジティブ・アップの考え方を提案し、更なるしょつつるの活用と利用法を創造している。

これによりしょつつるの良さが広まれば、各家庭のテーブルにしょつつるが置かれているというライフスタイルも夢ではない。それを実現するためには、使用法に合わせた希釈倍率などの記載や、一滴ずつ垂らすなどの使用法に合わせた容器の開発が必要である。

一方で各種加工品にしょつつるが利用され、その生産量が拡大することが望まれるが、そのためには産業システムの開発が必要である。先に記載した、仙葉善治商店と秋田しょつつる製造元との協力体制がその一例である。このような分業システムは、中小企業が生産量を拡大するために有効な手段であるが、それ実現するには各社をまとめる協同組合等が必要である。

伝統あるしょつつるの将来を創造していくには、歴史調査から得られた知見を基に、どのような価値を見だし、どのような方策で産業システムを強化していくのかが重要なポイントとなる。また、GI 認証された際に、しょつつるの歴史的背景と価値が再認識されるため、老舗企業を核としたブランディング戦略が必須となる。しょつつるの品質と顧客への満足度を高めながら、どのように産業を活性化していくのかが、将来のしょつつるに課せられた使命である。

#### 【謝辞】

新聞記事の掲載についてご快諾くださいました秋田魁新報社様に感謝申し上げます。また、歴史調査にご協力いただきましたしょつつる研究会の皆様には深謝いたします。

#### 【引用文献】

- 1) 農林水産省ホームページ [http://www.maff.go.jp/j/shokusan/gi\\_act/index.html](http://www.maff.go.jp/j/shokusan/gi_act/index.html)
- 2) 大島正美 (2006) 秋田市新屋郷土史－近代の新屋衆のあゆみ－
- 3) 中川良太郎 (1983) 新屋風土記－海と川と丘のある町－
- 4) 渡辺一 (1977) ハタハター生態からこぼれ話まで－ 無明舎
- 5) 渡辺一 (1990) 雑魚のつぶやき 秋田魁新報社
- 6) 川口彌之助 (1988) 新屋衆の歩いた道 秋田文化出版社
- 7) 改訂新屋郷土誌編集委員会 (1970) 改訂新屋郷土誌 日吉神社
- 8) 田中則雄 (2004) 魚醬及び魚醬油と昭和初期に於ける日本の魚醬油調査について 野田市研究 15, 163-192.
- 9) 橋口孝司 (2012) ウイスキーの教科書 新星出版社
- 10) 太田雄治 (1972) 秋田たべもの民俗誌 秋田魁新報社
- 11) 大島建彦 (1985) 男鹿脇本の民俗
- 12) 磯村朝次、他 (1990) 男鹿五里合民俗誌
- 13) 男鹿市教育委員会 (1998) 男鹿半島－その自然・歴史・民俗
- 14) 磯村朝次郎 (1978) 船越誌－その自然と歴史－ 船越経友会
- 15) 藤田秀司他 (1986) 日本の食生活全集5 聞き書 秋田の食事 農山漁村文化協会
- 16) 天王町役場 (1974) 天王町誌
- 17) 能代市史編さん委員会 (2004) 能代市史 特別編 民俗
- 18) 大館市史編さん委員会 (1981) 大館市史 第四巻
- 19) 南外村史編集委員会 (2003) 南外村史 通史編
- 20) 西目町史編集委員会 (1998) 西目町史 資料編
- 21) 西目町史編集委員会 (2001) 西目町史 通史編
- 22) 鳥海町史編纂委員会 (1985) 鳥海町史

#### 4. 学会発表概要 (16 件)

##### 1) 発表学会：第 27 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2016 年 5 月 27 日、秋田県総合食品研究センター (秋田市)

演題名：昆虫細胞によるヒトアンギオテンシン変換酵素 2 ECTO ドメインの生産

発表者：○熊谷将太<sup>1</sup>、白取隆生<sup>1</sup>、横田早希<sup>1</sup>、後藤猛<sup>1</sup>、葦澤悟<sup>2</sup>、高橋砂織<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>秋田大院理工、<sup>2</sup>国際農研、<sup>3</sup>秋田県総食研)

##### 2) 発表学会：日本調理科学会平成 28 年度大会

発表日と場所：2016 年 8 月 29 日、名古屋学芸大学 (愛知県日進市)

演題名：秋田県の家庭料理 主食の特徴 ―ごはんものを中心とした調理特性―

発表者：○大野智子<sup>1</sup>、山田節子<sup>1</sup>、三森一司<sup>1</sup>、高山裕子<sup>1</sup>、熊谷昌則<sup>2</sup>、高橋徹<sup>2</sup>、逸見洋子<sup>3</sup>、

駒場千佳子<sup>4</sup>、長沼 誠子<sup>3</sup> (<sup>1</sup>聖霊女子短大、<sup>2</sup>秋田県総食研、<sup>3</sup>秋田大、<sup>4</sup>女子栄養大)

##### 3) 発表学会：日本生物高分子学会 2016 年度大会

発表日と場所：2016 年 9 月 9 日、東邦大学理学部 (千葉県船橋市)

演題名：食物由来レニン・アンギオテンシン系阻害物質の網羅的解析

発表者：○高橋砂織、佐藤愛、畠恵司 (秋田県総食研)

##### 4) 発表学会：日本脂質栄養学会第 25 回大会

発表日と場所：2016 年 9 月 12 日、秋田にぎわい交流館 AU (秋田市)

演題名：NASH 薬・改善食材探索法の確立と新規鑑別マーカーの開発

発表者：○畠恵司<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1</sup>、樋渡一之<sup>1</sup>、戸嶋彦<sup>2</sup>、木村文子<sup>2</sup>、三浦瑞穂<sup>2</sup>、岩間由香<sup>2</sup>、

中川志穂<sup>2</sup>、田中秀子<sup>2</sup>、大類はるな<sup>2</sup>、高橋純一郎<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総食研、<sup>2</sup>(株)スカイライト・バイオテック)

##### 5) 発表学会：第 109 回日本繁殖生物学会

発表日と場所：2016 年 9 月 13 日、麻布大学 (相模原市)

演題名：動物胚の受胎率向上を目指した技術開発：線維芽細胞増殖因子 4 (FGF4) の生物活性に重要な部位の解明

発表者：○熊谷友希<sup>1</sup>、平出美鈴<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研)

##### 6) 発表学会：第 109 回日本繁殖生物学会

発表日と場所：2016 年 9 月 13 日、麻布大学 (相模原市)

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立を目指した iPS 細胞誘導ベクターとウシ LIF 発現フィーダー細胞の開発

発表者：○平出美鈴<sup>1</sup>、熊谷友希<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、福田智一<sup>3</sup>、小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研、<sup>3</sup>岩手大院・連合農)

##### 7) 発表学会：第 89 回日本生化学会大会

発表日と場所：2016 年 9 月 27 日、仙台国際センター (仙台市)

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) の構造機能相関

発表者：○葦澤悟<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>2</sup> (<sup>1</sup>国際農研、<sup>2</sup>秋田県総食研)

##### 8) 発表学会：第 28 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2016 年 12 月 9 日、秋田県産業技術センター (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（パエニダーゼ）前駆体の特徴

発表者：○葦澤悟<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>2</sup>（<sup>1</sup>国際農研、<sup>2</sup>秋田県総食研）

**9) 発表学会：日本エネルギー学会 第12回バイオマス科学会議**

発表日と場所：2017年1月19日、東京大学弥生講堂（東京都）

演題名：乾式粉砕機タンデムリングミルおよび湿式粉砕機マイクロスによる粉砕物の特性比較

発表者：○西田孝伸<sup>1</sup>、進藤昌<sup>2</sup>、榊郁子<sup>1</sup>、森英明<sup>3</sup>、高橋武彦<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>秋田県立大、<sup>2</sup>秋田県総食研、<sup>3</sup>（株）奈良機械）

**10) 発表学会：第16回LS-BT合同研究成果発表会**

発表日と場所：2017年1月31日、産総研（つくば市）

演題名：てんこ小豆（黒ささげ）由来アンギオテンシン変換酵素2阻害物質について

発表者：○高橋砂織<sup>1</sup>、吉矢拓<sup>2</sup>、熊谷（吉澤）久美子<sup>2</sup>、河野泰広<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>秋田県総食研、<sup>2</sup>（株）ペプチド研、<sup>3</sup>産総研）

**11) 発表学会：第16回LS-BT合同研究成果発表会**

発表日と場所：2017年2月1日、産総研（つくば市）

演題名：「じゅんさい」の抗メタボ効果について

発表者：畠恵司、○高橋砂織（秋田県総食研）

**12) 発表学会：第51回秋田化学技術協会研究技術発表会**

発表日と場所：2017年3月2日、秋田大学（秋田市）

演題名：昆虫細胞による可溶性アンギオテンシン変換酵素2の生産

発表者：○白取隆生<sup>1</sup>、横田早希<sup>2</sup>、熊谷将太<sup>2</sup>、宮脇舞<sup>1</sup>、葦澤悟<sup>3</sup>、高橋砂織<sup>4</sup>、後藤猛<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>秋田大学院工学、<sup>2</sup>秋田大学院理工、<sup>3</sup>国際農研、<sup>4</sup>秋田県総食研）

**13) 発表学会：日本農芸化学会 2017年度大会**

発表日と場所：2017年3月18日、京都女子大学（京都市）

演題名：ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  の共発現は MTP の発現を誘導する

発表者：佐々木玲<sup>1,2</sup>、樋渡一之<sup>2</sup>、熊谷昌則<sup>2</sup>、畠恵司<sup>2</sup>、小林正之<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>秋田県大院・生資科、<sup>2</sup>秋田県総食研）

**14) 発表学会：日本畜産学会 第122回大会**

発表日と場所：2017年3月28日、神戸大学（神戸市）

演題名：動物胚の受胎率向上を目指した、FGF4 のヘパリン結合能と細胞増殖促進活性に重要な部位の解明

発表者：○熊谷友希<sup>1</sup>、平出美鈴<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>秋田県大院・生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研）

**15) 発表学会：日本畜産学会 第122回大会**

発表日と場所：2017年3月28日、神戸大学（神戸市）

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立に必要な遺伝子組換えウシ LIF の開発

発表者：○平出美鈴<sup>1</sup>、楠原夏生<sup>1</sup>、桜岡みづき<sup>1</sup>、鈴木崇浩<sup>1</sup>、熊谷友希<sup>1</sup>、佐藤卓<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>

、小林正之<sup>1</sup>（<sup>1</sup>秋田県大院・生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研）

**16) 発表学会：日本畜産学会 第122回大会**



発表日と場所：2017年3月28日、神戸大学（神戸市）

演題名：ホメオタンパク質 EGAMIN および EGAM1C によるマウス ES 細胞から胎盤幹細胞への分化転換

発表者：佐藤卓<sup>1</sup>、佐藤梓織<sup>1</sup>、古舘千秋<sup>1</sup>、熊谷友希<sup>1</sup>、平出美鈴<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研)



## 1) 発表学会：第 27 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2016 年 5 月 27 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：昆虫細胞によるヒトアンジオテンシン変換酵素 2 ECTO ドメインの生産

発表者：○熊谷将太<sup>1</sup>、白取隆生<sup>1</sup>、横田早希<sup>1</sup>、後藤猛<sup>1</sup>、葦澤悟<sup>2</sup>、高橋砂織<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>秋田大院理工，<sup>2</sup>国際農研，<sup>3</sup>秋田県総食研）

緒言：アンジ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-アンジオテンシン-システムを負に調節し、血管拡張作用などにより血圧を降下させる。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を用いた組換えヒト (rh)ACE2 の大量生産を試みたところ、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することが分かった。そこで本研究では、ヒト ACE2 の膜貫通ドメインと CYTO ドメインを除いた、ECTO ドメインの C 末端に His タグを直接付加した組換え体 (shACE2) 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 shACE2 の発現を試みた。

実験方法：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 (MOI) 1.0 pfu/cell で感染させて培養し、一日毎にサンプリングした。培地面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碎後、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 と Western blotting、さらに人工自己蛍光消光基質を用いた酵素活性測定により shACE2 の発現挙動を調べた。

結果と方法：組換えバキュロウイルス感染培養における細胞内画分の 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 Western blotting 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 shACE2 の生成が認められ、封入体が形成されていることが分かった。一方、培地面分について、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。また、抗 His タグ抗体を用いた Western blotting を行ったところ、shACE2 の分子量付近にバンドが確認され、His タグを有する shACE2 が培地に放出されていることが分かった。次に、shACE2 生成量の増加を目指し、MOI の検討を行った。MOI を 0.01, 0.1, 1.0 pfu/cell の 3 つの条件で感染させて生細胞率が 50% 以下に低下するまで培養し、shACE2 生産の挙動を調べた。その結果、MOI 1.0 pfu/cell 以上では発現した shACE2 の多くが細胞内に蓄積したのに対し、MOI 0.1 pfu/cell 以下では発現した shACE2 は細胞外へ溶出していた。したがって、shACE2 の生産には培地面分に活性が高く、培養日数が比較的短い MOI 0.1 pfu/cell が適していると考えられた。

## 2) 発表学会：日本調理科学会平成 28 年度大会

発表日と場所：2016 年 8 月 29 日、名古屋学芸大学（愛知県日進市）

演題名：秋田県の家料理 主食の特徴 ―ごはんものを中心とした調理特性―

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

【目的】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抽出し、前大会では 110 の料理に関する地域特性および地域特有の料理の特徴について明らかにした。本調査では、得られた料理の「主食」に着目し、その特徴について解明することを目的とした。

【方法】秋田県内 8 調査地域（鹿角・北秋田・山本・秋田・由利・仙北・平鹿・雄勝）にて、昭和 35～45 年頃調理を担当していた対象者 19 名（女性、74.2±7.8 歳）に実施した聞き書き調査から得られた 110 の料理について、主食・主菜・副菜・汁物・その他（おやつ等）に分類した。そのうち、主食に該当する料理を抽出し、特徴および調理特性について調査した。

【結果】主食 10・主菜 22・副菜 36・汁物 17・その他 25 に分類された。主食に該当した料理は、全て米を主原料としたごはんものであり、そば・うどん等の麺類はなかった。調理の特徴あるものとしては、主に県北部で食されていた、ごはんを半搗きにして棒に刺して焼いた「きりたんぼ」、てんこ小豆の色素で濃い赤紫色に仕上げた「てんこ小豆の赤飯」等が挙げられた。赤飯は、県内全域にて定着していたハレ食だが、甘味嗜好傾向の強い県南部では調味料として砂糖が用いられていた。また、米・ごはん利用として、各種餅菓子、「鱒の一匹寿司」等もみられた。本調査において主食に該当した料理は、ハレ・日常食ともにごはんものが中心であったことから、秋田県の稲作に適した風土および長期保存に工夫を要した気候が背景となり、米どころ秋田に根付いた米食文化および発酵食文化についても解明することができた。

### 3) 発表学会：日本生物高分子学会 2016 年度大会

発表日と場所：2016 年 9 月 9 日、東邦大学理学部（千葉県船橋市）

演題名：食物由来レニン・アンギオテンシン系阻害物質の網羅的解析

発表者：○高橋砂織、佐藤愛、畠恵司（秋田県総食研）

【目的】血圧は神経系やホルモン系など様々な機構で調節されている。ホルモン系による血圧調節機構においてレニン・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 を構成する各種酵素類の測定系を開発しており、迅速高感度阻害活性測定法を確立している。今回、各種食材由来 RAS 阻害物質を網羅的に解析した。また、レニンや ACE 阻害物質を同定した。

【方法】RAS 関連酵素として、レニン、キマーゼ、アンギオテンシン変換酵素（ACE）及びアンギオテンシン変換酵素 2（ACE2）を標的とした。組換え型ヒトレニンは、既報により発現・精製した標品を使用した[1, 2]。その他のヒト型組換え酵素類は、市販品を用いた。レニン、キマーゼ、ACE 及び ACE2 の活性測定には、蛍光消光基質類を用いた[1-4]。

【結果】各種野菜・山菜類、穀類や味噌などの抽出液を用いて RAS 系酵素阻害活性を検討した。その結果、ある種の野菜山菜類にレニン、キマーゼ、ACE や ACE2 阻害活性を見だし、そのいくつかの阻害物質の構造を決定した。また、味噌に RAS 系酵素阻害活性の存在することを見出した。

【考察】各種食材より見いだされた RAS 阻害物質を基とした機能性食品の開発が期待される。

【参考論文】1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2610-2613 (2007), 2. *ibid.*, 72, 3232-3236

(2008), 3. *Biomed. Res.*, 32, 407-411 (2011), 4. *ibid.*, 36, 219-224 (2015).

#### 4) 発表学会：日本脂質栄養学会第 25 回大会

発表日と場所：2016 年 9 月 12 日、秋田にぎわい交流館 AU (秋田市)

演題名：NASH 薬・改善食材探索法の確立と新規鑑別マーカーの開発

発表者：○畠恵司<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1</sup>、樋渡一之<sup>1</sup>、戸嶋彦<sup>2</sup>、木村文子<sup>2</sup>、三浦瑞穂<sup>2</sup>、岩間由香<sup>2</sup>、  
中川志穂<sup>2</sup>、田中秀子<sup>2</sup>、大類はるな<sup>2</sup>、高橋純一郎<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総食研、<sup>2</sup>(株)スカイライト・バイオテック)

【目的】非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、メタボリック症候群が蔓延し始めた我が国でも、患者が増大すると考えられている病態である。従来の NASH 診断方法は、肝臓に太く長い針を刺して組織の一部を採取し調べる「肝生検」が必須で、低侵襲性マーカーの開発は急務であった。また、迅速・簡便に NASH を鑑別できるマーカーは、創薬においても重要である。我々は横浜市立大学医学部と共同で、NASH 患者では血液中の遊離コリンが高値であることを突き止め、診断業務を開始している。本研究では NASH モデル動物を作成し、血漿中の遊離コリン濃度やリポタンパク質プロファイルを解析し、これらマーカーが、主として創薬においても有効かどうかを検討した。

【方法】SD ラットを 3 群 (各群 7 匹) に分け、普通食 (コントロール群)、高脂肪食 (脂肪肝モデル群)、コリン・メチオニン欠乏食 (NASH 群) を 11 週間給与した後、一週間通常食に戻し飼育した。肝臓について重量計測ならびに HE 染色を行った。血漿は、遊離コリンおよび LipoSEARCH® など各種生化学分析に供した。

【結果】コントロール群と比較して、NASH 群では肝臓の大脂肪滴蓄積ならびに血漿中のヒアルロン酸高値など、特有のマーカーが確認できた。LipoSEARCH®の結果、NASH 群は、キロミクロン中の中性脂肪値上昇および VLDL の大粒子化など、ヒト NASH 患者で確認されたりポタンパク質代謝異常が認められた。さらに、NASH 群ラットの血漿中の遊離コリン濃度は、コントロール群ならびに脂肪肝モデル群と比較して、有意に上昇していた。

【考察・結論】肝臓切片の HE 染色画像ならびに血漿マーカーからコリン・メチオニン欠乏食の長期間摂取により、SD ラットにおいても NASH が誘発された。NASH 誘発ラットを、さらに一週間通常食を与えることで、血漿中の遊離コリンの蓄積がみられ、ヒト臨床研究での結果と一致する評価系が構築できた。また、血漿中の遊離コリン濃度やリポタンパク質プロファイルは、NASH の診断マーカーであると共に、創薬における病態の評価マーカーとしても有効であることが示唆された。

#### 5) 発表学会：第 109 回日本繁殖生物学会

発表日と場所：2016 年 9 月 13 日、麻布大学 (相模原市)

演題名：動物胚の受胎率向上を目指した技術開発：線維芽細胞増殖因子 4 (FGF4) の生物活性に重要な部位の解明

発表者：○熊谷友希<sup>1</sup>、平出美鈴<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研)

【目的】FGF4 は、胎盤形成に必須な細胞増殖因子である。私たちは、FGF4 添加培養によるウシ体外受精胚の胎盤前駆細胞数の増加を示したことを機に、FGF4 をウシ胚の受胎促進に応用すること

を考案した。そこで、生物活性を増強した FGF4 の創出を目指している。その過程で、FGF4 に存在するシステイン(Cys)残基を欠失させた場合、FGF4 のヘパリン結合能および細胞増殖促進活性が消失する可能性があることを発見した。そこで本研究ではマウス FGF4 を例として、FGF4 の生物活性に重要な領域を同定するために、アミノ酸配列を改変した FGF4 を開発し、ヘパリン結合能および細胞増殖促進活性を検討した。【方法および結果】 FGF4 は、分子内に Cys 残基が 2 個 (Cys84, 151) 存在する。FGF4( $\Delta$ Cys84)発現ベクターは、N 末端側を Cys84 まで欠失させた [Asn85-Leu202]を発現する。加えて、Cys 残基を点変異した、2 種の点変異型マウス FGF4 発現ベクターを構築した。FGF4(Cys84Ser)は、N 末端側の Cys 残基のみを点変異した。FGF4(Cys84Ser;Cys151Ser)は、両方の Cys 残基を点変異した。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、いずれも変異型 FGF4 を発現させることができた。次に、変異型 FGF4 をヘパリンカラムクロマトグラフィーに供し、ヘパリン結合能を比較した。溶出画分について Western blotting により検討したところ、FGF4( $\Delta$ Cys84)のシグナルは消失した。しかし、FGF4(Cys84Ser)では非変異型 FGF4 と同等のシグナル強度で検出された。このことから、FGF4 分子内の Cys84 はヘパリン結合能に関与しないことが判明した。さらに、WST-8 を用いて細胞増殖促進活性について評価したところ、FGF4( $\Delta$ Cys84)は細胞増殖促進活性も示さないことが判明した。現在、点変異型 FGF4 の細胞増殖促進活性について検討している。

## 6) 発表学会：第 109 回日本繁殖生物学会

発表日と場所：2016 年 9 月 13 日、麻布大学（相模原市）

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立を目指した iPS 細胞誘導ベクターとウシ LIF 発現フィーダー細胞の開発

発表者：○平出美鈴<sup>1</sup>、熊谷友希<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、福田智一<sup>3</sup>、小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研、<sup>3</sup>岩手大院・連合農)

【目的】本研究室では、ウシ iPS 細胞から卵子・精子を作り出し、無限の遺伝資源として恒久的に活用できる技術を開発することを目指している。本研究ではウシ iPS 細胞誘導ベクター、およびウシ iPS 細胞の未分化状態維持に必要であると推定しているウシサイトカイン LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を発現するフィーダー細胞の開発を試みた。【方法および結果】OCT4・SOX2・KLF4・NANOG を単一のベクターにより発現するウシ OSKN 発現ベクターと、ウシ c-MYC・L-MYC・LIN28・GLIS1 を個別に発現するベクターを構築した。構築した iPS 細胞誘導ベクターの誘導活性を検証するために、iPS 細胞へ誘導しやすいと考えられているマウス体細胞に導入した。その結果、開発したウシ iPS 細胞誘導ベクターは、マウス iPS 細胞を誘導する活性を発揮することが示された。次に、ウシ LIF を発現するフィーダー細胞を開発するために、ウシ LIF 発現ベクターを構築してマウス胎仔線維芽細胞株 STO 細胞に遺伝子導入した。培養上清についてウェスタンブロットングにより解析したところ、LIF に相当するシグナルが明確に検出された。この培養上清を用いてマウス ES 細胞を培養したところ、未分化状態を維持する活性を有していることが示された。現在、これらの発現ベクターをウシ体細胞に遺伝子導入し、iPS 細胞へ誘導する活性について検証している。

## 7) 発表学会：第 89 回日本生化学会大会

発表日と場所：2016年9月27日、仙台国際センター（仙台市）

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）の構造機能相関

発表者：○葦澤悟<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>2</sup>（<sup>1</sup>国際農研、<sup>2</sup>秋田県総食研）

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<sup>1)</sup>。今回我々は、paenidase前駆体構造を明らかにし、各ドメインの役割を推定した。また、paenidaseのアミノ酸配列と相同性をもつ各種ホモロ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。さらに、基質結合部位の候補について、部位特異的変換を行い、構造と機能について解析した。相同性解析BLAST、MEROPSデータベース、及び膜貫通領域解析ツールTMHMM及びTMpredを用いて、paenidase前駆体のアミノ酸配列の相同性を解析したところ、クラスBペニシリン結合タンパク質と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種類のホモログ（D14、DF、JDR）について、これらの組み換え体を発現させ、可溶性組換え酵素を取得した。得られた組換え酵素について、高橋らの方法<sup>1)</sup>により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、MOE（Molecular Operating Environment、CCG社、カナダ）を用いて、paenidase、D14、DF、JDRのホモロジーモデリングを行い、活性部位近傍5Å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。これらの基質認識部位候補について、部位特異的変換を行い、構造と活性について解析を行った。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.

## 8) 発表学会：第28回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2016年12月9日、秋田県産業技術センター（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（パエニダーゼ）前駆体の特徴

発表者：○葦澤悟<sup>1</sup>、高橋砂織<sup>2</sup>（<sup>1</sup>国際農研、<sup>2</sup>秋田県総食研）

生体を構成する重要な物質であるアミノ酸には、2種類の光学異性体（L型およびD型）が存在する。地球上の生物は、これらのうちL型アミノ酸によって構成されており、D型アミノ酸は一部の細菌の細胞壁に存在するのみであると考えられてきた。しかしながら、近年の分析手法の進歩により、哺乳類の生体内にもD型アミノ酸の存在が見出されている。さらに、これらのD型アミノ酸の中でも、特にD-アスパラギン酸が、タンパク質の異常な折り畳みが原因で生じるヒトの疾病（アルツハイマー病、白内障）の病変組織や、皮膚の老化した組織に存在することが報告され

ている。高橋らは、新規 D-アスパラギン酸基質を合成し、D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp. B38 株) を分離するとともに、産生する酵素を paenidase (PAE) と命名し、その性質を解析した<sup>1)</sup>。これまでに我々は、PAE 遺伝子を同定し、大量発現系を構築するとともに、PAE の活性部位をアミノ酸変異法により推定した。また、前田らは、PAE により分解したペプチドの分析方法を、小笠原らは慢性閉塞性肺疾患の病変組織に PAE 感受性ペプチドが含まれることをそれぞれ報告した<sup>2,3)</sup>。今回我々は、PAE 前駆体を構成する各ドメインの特性を解析した。

PAE 前駆体のアミノ酸配列を BLAST 及び MEROPS データベース解析、TMHMM 膜貫通領域解析したところ、PAE 前駆体はクラス B ペニシリン結合タンパク質と同様に、膜貫通アンカー、N 末端ドメイン、トランスペプチダーゼドメインから構成されることが明らかとなった。また、PAE 前駆体遺伝子を大腸菌により発現させたところ、菌体破砕液上清に suc-[D- $\alpha$ -Asp]-MCA 分解活性が認められたが、発現したタンパク質は部分分解していた。さらに、PAE 成熟体に相当するトランスペプチダーゼドメインの活性部位近傍のアミノ酸変異を行ったが、基質結合に関与する部位の特定には至らなかった。

- 1) S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202, 2006.
- 2) H. Maeda *et al.*, *Anal Chem*, **82**, 561-568, 2015
- 3) M. Ogasawara *et al.*, *Exp Lung Res*, **42**, 245-262, 2016

#### 9) 発表学会：日本エネルギー学会 第 12 回バイオマス科学会議

発表日と場所：2017 年 1 月 19 日、東京大学弥生講堂（東京都）

演題名：乾式粉砕機タンデムリングミルおよび湿式粉砕機マイクロスによる粉砕物の特性比較

発表者：○西田孝伸<sup>1)</sup>、進藤昌<sup>2)</sup>、榊郁子<sup>1)</sup>、森英明<sup>3)</sup>、高橋武彦<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>秋田県立大、<sup>2)</sup>秋田県総食研、<sup>3)</sup>(株)奈良機械)

要約：乾式粉砕機であるタンデムリングミル (TR) で粉砕された杉の木粉を糖化酵素による糖化率は湿式粉砕機であるマイクロス (MIC) による粉砕物の糖化率よりも 20% 以上高くなる。リグノセルロースはセルロース、ヘミセルロース、リグニンにより形成された強固な構造を持っており、酵素糖化を効率化するためにこの構造を破壊するのが粉砕である。リグニン分解酵素ラッカーゼがリグニンを分解することで稲わら等では糖化率が上昇することが報告されている<sup>1)</sup>。このことから、この強固な構造において基礎となるのがリグニンであると考えられる。そこで、TR と MIC の粉砕物をラッカーゼによるリグニン分解処理に供与し、糖化率の変化を検証した。TR による粉砕木粉ではラッカーゼ処理により糖化率の変化は見られなかった。一方で、MIC による粉砕物ではラッカーゼ処理による糖化率が 30% ほど上昇した。TR と MIC のラッカーゼ処理によるリグニン含量の低下は 15~20% 程度であった。このことから、TR により粉砕された木粉では強固な構造が破壊され、リグニンが糖化酵素のセルロースへの結合等を抑制しえない状態になっているものと予想される。1) 津谷浩晃ら、秋田高専研究紀要、**45**、73-79 (2010)

#### 10) 発表学会：第 16 回 LS-BT 合同研究成果発表会

発表日と場所：2017 年 1 月 31 日、産総研（つくば市）

演題名：てんこ小豆（黒ささげ）由来アンギオテンシン変換酵素 2 阻害物質について



発表者：○高橋砂織<sup>1</sup>、吉矢拓<sup>2</sup>、熊谷（吉澤）久美子<sup>2</sup>、河野泰広<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>秋田県総食研、<sup>2</sup>（株）ペプチド研、<sup>3</sup>産総研）

【目的】レニン・アンギオテンシン系は哺乳類で最も解析が進んでいる昇圧系である。これまで、本系の調節を目的として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）を標的酵素として各種食材よりその阻害活性を探索した。その結果、秋田産てんこ小豆（黒ささげ）に強い阻害活性を見いだした。

【方法】酵母で発現した組換え型ヒト ACE2 は Calbiochem 社より購入した。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*-methylanthranilic acid をまた C 末端側に蛍光消光残基 *N*<sup>ε</sup>-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】先に、大豆の熱水抽出液に強い ACE2 阻害活性を見いだしその阻害物質の構造をニコチアナミンと同定した<sup>1)</sup>。今回、秋田県で赤飯用小豆として重用されている「てんこ小豆（黒ささげ）」の熱水抽出液に大豆より強い ACE2 阻害活性を見いだした。そこで、各種クロマトグラフィーを用いて阻害物質を部分精製し、その阻害活性について検討した。得られた標品には高濃度のニコチアナミンが存在しており、てんこ小豆抽出液中の ACE2 阻害活性の大部分がニコチアナミン由来と考えられた。

1) *Biomed. Res.*, **36**, 219-224 (2015)

## 11) 発表学会：第 16 回 LS-BT 合同研究成果発表会

発表日と場所：2017 年 2 月 1 日、産総研（つくば市）

演題名：「じゅんさい」の抗メタボ効果について

発表者：畠恵司、○高橋砂織（秋田県総食研）

背景・目的：「じゅんさい (*Brasenia schreberi*)」は、ハゴロモ科（別名ジュンサイ科）に属する淡水に生育する多年生水性植物である。秋田県では、三種町で多く生産されており県の特産物の一つとなっている。しかしながら、農家の高齢化などからその生産量は減少傾向にあり新たな付加価値向上が望まれていた。そこで、当研究センターでは平成 7 年開設以来秋田県産食材の生理機能性解明の研究を進めている。その過程で、「じゅんさい」には乾燥重量の約 30% ものポリフェノールを含有することを見いだした。そこで、「じゅんさい」にフォーカスして研究を進めた結果、メタボ予防効果及び改善効果のあることを見いだした。現在では「じゅんさい」の機能性を活かした様々な商品が上市されている。本発表では、「じゅんさい」の脂質代謝改善機能及び脂肪蓄積抑制作用などについて基礎研究から実用化までの経緯を紹介する。

「じゅんさい」の脂質異常症改善機能と機能性素材としての可能性：肝臓は脂質代謝に重要な役割を持っている。一方、脂質合成阻害剤の開発が活発に行われている。当研究センターは秋田市の（株）スカイライト・バイオテックとの共同で、細胞レベルでの薬剤や食品素材の持つ脂質異常症改善作用の新規探索方法を開発した。本測定方法を用いて、秋田県産食材に含まれる脂質異常症改善作用の探索を行った結果、「じゅんさい」に顕著な肝臓細胞における脂質合成阻害作用を見いだした。細胞レベルでの脂質異常症改善効果が認められたことより、モデル動物での試験を行った。機能性素材メーカーである（株）Harvestech 社との共同で、高脂肪食及び「じゅんさい」

抽出物を含む高脂肪食をマウスに 2 週間給餌し、体重、臓器重量及び血液生化学分析を行った。その結果、「じゅんさい」抽出物を含む高脂肪食給餌群で、肝臓重量及び腸間膜周囲脂肪重量が高脂肪食給餌群に比べ明らかに低下していた。次に、ヒト介入試験に進んだ。腹囲 90cm 異常のメタボ傾向のある健常男性を対象として「じゅんさい」乾燥粉末摂取及び非摂取に分け、平行群間比較試験をおこなった。その結果、「じゅんさい」粉末を摂取した被験者群において VLDL コレステロール値の改善が認められた。この結果は、「じゅんさい」粉末が生活習慣病の予防改善効果及び抗動脈硬化機能を持つことを示唆している。これらの知見は「じゅんさいに含まれるメタボ予防改善機能」の特許となっている（特許第 5344494 号）。本特許は、平成 28 年度東北地方発明表彰で、「特許庁長官賞」を受賞した。本特許は機能性素材としての「じゅんさい」の発展に大きく貢献している。「じゅんさい」には抗メタボ効果以外に様々な機能性が見いだされており、栽培面積の拡大については県内産業振興へと繋がることを期待している。

## 12) 発表学会：第 51 回秋田化学技術協会研究技術発表会

発表日と場所：2017 年 3 月 2 日、秋田大学（秋田市）

演題名：昆虫細胞による可溶性アンギオテンシン変換酵素 2 の生産

発表者：○白取隆生<sup>1</sup>、横田早希<sup>2</sup>、熊谷将太<sup>2</sup>、宮脇舞<sup>1</sup>、葦澤悟<sup>3</sup>、高橋砂織<sup>4</sup>、後藤猛<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田大学院工資、<sup>2</sup>秋田大学院理工、<sup>3</sup>国際農研、<sup>4</sup>秋田県総食研)

【目的】レニン・アンギオテンシン系は哺乳類で最も解析が進んでいる昇圧系である。これまで、本系の調節を目的として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) について膜貫通領域を欠損させた可溶性アンギオテンシン変換酵素 2 の生産系構築を目指した。

【方法】PCR 法により膜貫通領域を欠損したトランスファーベクターを構築した。これを Bac-to-Bac システムを用いた部位特異的トランスポジションにより組換えバックミドベクターを作製し、さらにこれを Sf9 昆虫細胞にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを作成した。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*-methylantranilic acid をまた C 末端側に蛍光消光残基 *N*<sup>ε</sup>-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、本基質を用いて ACE2 活性を測定した。

【結果と考察】多重感染度 (MOI) 0.01pfu/cell の条件で感染培養した細胞の培地及び細胞画分の活性測定及び抗 His タグ抗体を用いた Western Blotting を行った結果、His タグを有する可溶性 ACE2 が培地に確認された。次に、MOI を変化させて感染培養実験を行い、抗 ACE2 抗体を用いた Western Blotting を行い MOI の違いによる可溶性 ACE2 の挙動を検討した。その結果、MOI が高いほど感染初期から細胞画分に可溶性 ACE2 の発現が確認された。今後、MOI を最適化した条件での培養液から可溶性 ACE2 を精製し、詳しい性質を検討する予定である。

## 13) 発表学会：日本農芸化学会 2017 年度大会

発表日と場所：2017 年 3 月 18 日、京都女子大学（京都市）

演題名：ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  の共発現は MTP の発現を誘導する

発表者：佐々木玲<sup>1,2</sup>，樋渡一之<sup>2</sup>，熊谷昌則<sup>2</sup>，畠恵司<sup>2</sup>，小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院・生資科、<sup>2</sup>秋田県総食研)

【目的】中性脂肪 (TG) やコレステロールなどの脂質は血中を循環するため、アポリポタンパク質やリン脂質と結合し、リポタンパク質を形成する。脂質代謝の中心的役割を担う肝細胞は、その形成過程においてリポタンパク質産生能を獲得すると考えられるが、その詳細は不明である。我々はこれまでに、リポタンパク質の精密な分析は、肝細胞の分化段階を判断する上で有用な分化マーカーになることを提案した<sup>1)</sup>。そこで本研究では、肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生能の獲得機構を解明するため、ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞を用いて、肝細胞の分化に關与する肝細胞核因子 (HNF) 群が肝細胞への分化およびリポタンパク質産生能に与える影響について検討した。

【方法】UE7T-13 細胞において、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  共強制発現細胞を樹立し、リアルタイム RT-PCR 法により、肝細胞分化マーカー遺伝子 (AFP, ALB) の発現解析を行った。次に、オレイン酸 (0.75 mM) 添加培養を行い、細胞内および培養上清中の TG およびコレステロール量を定量した。さらに、リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により、超低密度リポタンパク質の形成に必要な ApoB100 および MTP の発現解析を行った。

【結果および考察】HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  共強制発現細胞における AFP および ALB の mRNA 発現量は、コントロールと比較してそれぞれ  $6.9 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$  倍、9.8~52.0 倍に大きく増加した。しかし、これらの発現量はヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞の発現量には及ばなかった。HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  共強制発現細胞における TG およびコレステロールの細胞内含量は、コントロールと比較してそれぞれ有意に高く ( $p < 0.01$ )、HepG2 細胞と同程度だった。しかしながら、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  共強制発現細胞の培養上清から TG およびコレステロールはほとんど検出されなかった。このことから、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  の共強制発現は細胞内への脂質の蓄積を促進するが、リポタンパク質の産生には至らないことが示唆された。また、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  共強制発現細胞における MTP および ApoB100 の mRNA 発現量は、コントロールと比較して、それぞれ 53.3~81.4 倍、63.6~310.8 倍に増加した。しかしながら、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  共強制発現細胞において、MTP は検出されたものの、ApoB100 は検出されなかった。以上の結果から、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  の共強制発現は、肝細胞への分化および MTP の発現を誘導できる一方、リポタンパク質産生能の獲得には、さらなる要因による ApoB100 の活性化が必要であると考えられる。

1) Sasaki A., et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* (2016)

#### 14) 発表学会：日本畜産学会 第 122 回大会

発表日と場所：2017 年 3 月 28 日、神戸大学 (神戸市)

演題名：動物胚の受胎率向上を目指した、FGF4 のヘパリン結合能と細胞増殖促進活性に重要な部位の解明

発表者：○熊谷友希<sup>1</sup>、平出美鈴<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>秋田県大院・生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研)

【目的】マウス胚において、線維芽細胞増殖因子 4 (FGF4) は胎盤形成に必要な細胞増殖因子である。また、FGF はヘパラン硫酸と結合することにより、FGF 受容体との結合が安定化する。私達は、FGF4 を動物胚の受胎率向上に応用することを考案した。そこで、哺乳動物モデルであるマウスの

FGF4 を例として、ヘパリン結合能および細胞増殖促進活性に重要な部位を同定するために、点変異型 FGF4 を開発した。【方法】FGF4 分子中に 2 個のみ存在する C を S に点変異した、点変異型マウス FGF4 発現ベクター 3 種 (C84S, C151S, C84S;C151S) を構築した。これらが大腸菌により発現させ、ヘパリンカラムクロマトグラフィーによりヘパリン結合能を検証した。続いて、マウス胎仔線維芽細胞株 Balb/c 3T3 細胞を用いて細胞増殖促進活性を検証した。【結果】C84S および C151S においてヘパリン結合能が増強する傾向が示された。逆に、C84S;C151S においては減弱する傾向が示された。また、これらの点変異型 FGF4 により細胞増殖促進活性が示されたが、いずれも減弱する傾向が認められた。

#### 15) 発表学会：日本畜産学会 第 122 回大会

発表日と場所：2017 年 3 月 28 日、神戸大学（神戸市）

演題名：ウシ iPS 細胞の樹立に必要な遺伝子組換えウシ LIF の開発

発表者：○平出美鈴<sup>1</sup>、楠原夏生<sup>1</sup>、桜岡みづき<sup>1</sup>、鈴木崇浩<sup>1</sup>、熊谷友希<sup>1</sup>、佐藤卓<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>（<sup>1</sup>秋田県大院・生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研）

【目的】私達はウシの遺伝資源を育種素材として活用することを目指して、iPS 細胞の樹立研究に着手した。iPS 細胞の未分化状態を維持するためには、サイトカイン LIF が必要である。本研究では、培養液に添加するためのウシ LIF およびウシ LIF を発現するフィーダー細胞を開発した。

【方法】強力な CAG プロモーターの下流にウシ LIF を組込んだウシ LIF 発現ベクターを構築し、ヒト胎児腎細胞株 293T 細胞へ一過性に遺伝子導入し、培養上清を回収した。また、赤色蛍光タンパク質を組込んだウシ LIF 発現ベクターをマウス胎仔線維芽細胞株 STO 細胞へ安定的に遺伝子導入し、赤色蛍光が強い細胞をセルソーターにより分取した。【結果】ウエスタンブロッティングにより、293T 細胞の培養上清にウシ LIF が検出された。この培養上清を 3000 倍希釈にて用いても、マウス ES 細胞の未分化状態を維持することができた。ウシ LIF 発現 STO 細胞について、セルソーターを用いて計 2 回分画したところ、未分画、1 回分画と比較して、培養上清に含まれるウシ LIF が多いことが判明した。

#### 16) 発表学会：日本畜産学会 第 122 回大会

発表日と場所：2017 年 3 月 28 日、神戸大学（神戸市）

演題名：ホメオタンパク質 EGAM1N および EGAM1C によるマウス ES 細胞から胎盤幹細胞への分化転換

発表者：佐藤卓<sup>1</sup>、佐藤梓織<sup>1</sup>、古舘千秋<sup>1</sup>、熊谷友希<sup>1</sup>、平出美鈴<sup>1</sup>、佐々木玲<sup>1,2</sup>、小林正之<sup>1</sup>（<sup>1</sup>秋田県大院生物資源、<sup>2</sup>秋田県総食研）

【目的】マウス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。また、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。私達は最初の細胞分化において発現量が増加する、ホメオタンパク質 EGAM1N および EGAM1C を発見した。EGAM1N または EGAM1C 発現ベクターを導入したマウス ES 細胞において、LIF 非添加・FGF4 添加培養により、胎盤誘導マスター転写因子である Cdx2 の発現が大きく増加する。そこで、EGAM1N または EGAM1C による、ES 細胞から胎盤幹 (TS) 細胞への分化転換を試みた。【方法および結果】EGAM1N または EGAM1C 発現マウス ES 細胞株に対して、TS 細胞樹立培養を行ったところ、いずれの ES 細胞株とも TS 細胞様コ

ロニーを形成した。また、蛍光免疫染色法により、一部の細胞はTS細胞マーカー陽性であることが判明した。この時、TS細胞マーカーであるElf5 mRNAの発現が大きく増加していた。一方、胎盤細胞への分化誘導培養を行った場合、胎盤系列細胞マーカーであるP11, P12, Tpbpa, Plp-Lの発現が大きく増加することが判明した。以上の結果より、EGAM1N または EGAM1C の強制発現により、ES細胞からTS細胞へ分化転換したと考えられる。



## 5. 外部発表論文概要 (12件)

1) 論文題名 : リポフェクション法による遺伝子導入と *piggyBac* トランスポゾンシステムを組み合わせた非ウイルスベクターによる高効率なマウス iPS 様細胞の樹立技術の開発

著者名 : 菊地貴裕、楠原夏生、野中愛純、熊谷友希、平出美鈴、佐々木玲、福田智一、小林正之  
雑誌名 : 東北畜産学会報 **68**, 16-22, (2016)

発行日 : 2016年3月10日

2) 論文題名 : Exogenous expression of homeoprotein EGAM1N prevents *in vitro* cardiomyogenesis by impairing expression of *T* and *Nkx2.5*, but not *Mef2c*, in mouse embryonic stem cells.

著者名 : Asumi Nonaka, Michiko Yoshida, Momoe Iha, Yusuke Kubo, Yumi Kihara, Takahiro Kikuchi, Yuki Kumagai, Akira Sasaki, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Cytotechnology*, **68**, 2431-2436, (2016)

発行日 : 2016年3月17日

3) 論文題名 : 高温発酵性酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* SS4-5 株を用いた杉微粉砕物からの同時糖化発酵による バイオエタノールの生成

著者名 : 西田孝伸、進藤昌、増田祥子、榊郁子、高橋武彦、森英明

雑誌名 : *Journal of the Japan Institute of Energy*, **95**, 283-288 (2016)

発酵日 : 2016年4月28日

4) 論文題名 : Formation of Guaiacol by Spoilage Bacteria from Vanillic Acid, a Product of Rice *Koji* Cultivation, in Japanese Sake Brewing

著者名 : Toshihiko Ito, Mahito Konno, Yoichiro Shimura, Seiei Watanabe, Hitoshi Takahashi, and Katsumi Hashizume

雑誌名 : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 4599-4605 (2016)

発行日 : 2016年5月26日

5) 論文題名 : The protective role of protein L-isoadipyl (D-aspartate) O-methyltransferase for maintenance of mitochondrial morphology in A549 cell.

著者名 : Masahiro Ogasawara, Mieko Otani, Masachika Shudo, Yohei Inaba, Satoru Nirasawa, Saori Takahashi, Takeshi Kiyoi, Yuki Tanaka, Kenji Kameda, Naoki Kunugita, Kazutaka Maeyama, Keiji Sano, Masahiro Yamashita, and Kohei Yamauchi

雑誌名 : *Experimental Lung Research*, **42**, 245-262 (2016)

発行日 : 2016年6月21日

6) 論文題名 : Knockdown of gene expression by antisense morpholino oligos in preimplantation mouse embryos cultured *in vitro*.

著者名 : Yuki Sato, Shiori Sato, Takahiro Kikuchi, Asumi Nonaka, Yuki Kumagai, Akira Sasaki, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Analytical Biochemistry*, **509**, 41-45 (2016)

発行日 : 2016年7月2日

7) 論文題名 : Lipoprotein profiles of hepatic cell lines at various stages of differentiation.

著者名 : Akira Sasaki, Fumiko Kimura, Mizuho Miura, Gen Toshima, Junichiro Takahashi, Sayuri Maruya, Masayuki Kobayashi, and Keishi Hata

雑誌名 : *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **53**, 93-95 (2017)

発行日 : 2016年9月9日 (電子版)

**8) 論文題名 : Suppressive effects of welsh onion extracts on mucus hyper-production in human airway cells**

著者名 : Akiko Takashima, Kimihiko Sano, Jun Iwashita, and Keishi Hata

雑誌名 : *Letters in Health and Biological Sciences*, **1**, 1-3 (2016)

発行日 : 2016年9月17日

**9) 論文題名 : 粉碎時の温度が木質バイオマスの乾式粉碎効率に与える影響の検討**

著者名 : 森英明、大村幸正、進藤昌、西田孝伸

雑誌名 : 秋田県立大学ウェブジャーナル **3**, 6-12 (2016)

発酵日 : 2016年9月30日

**10) 論文題名 : Relationships between the expression of hepatocyte nuclear factors and factors essential for lipoprotein production in a human mesenchymal stem cell line, UE7T-13.**

著者名 : Akira Sasaki, Kazuyuki Hiwatashi, Masanori Kumagai, Hata Keishi, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **81**, 262-270 (2017)

発行日 : 2016年11月14日

**11) 論文題名 : In vitro and in vivo antidiabetic effects of the ethanol extract from *Lentinula edodes* (Shiitake)**

著者名 : Akiko Takashima, Kimihiko Sano, Gen Toshima, Junichiro Takahashi, Fumika Kurosaki, Akira Sasaki, Kazuyuki Hiwatashi, and Keishi Hata

雑誌名 : *Nutrafoods*, **15**, 279-284 (2016)

発行日 : 2016年12月1日

**12) 論文題名 : Thermal and rheological characteristics of mutant rice starches with widespread variation of amylose content and amylopectin structure.**

著者名 : Toru Takahashi, and Naoko Fujita

雑誌名 : *Food Hydrocolloids*, **62**, 83-93 (2017)

発行日 : 2016年7月19日 (電子版)



1) 論文題名：リポフェクション法による遺伝子導入と *piggyBac* トランスポゾンシステムを組み合わせた非ウイルスベクターによる高効率なマウス iPS 様細胞の樹立技術の開発

著者名：菊地貴裕、楠原夏生、野中愛純、熊谷友希、平出美鈴、佐々木玲、福田智一、小林正之

雑誌名：東北畜産学会報 68, 16-22, (2016)

発行日：2016年3月10日

要約：本研究では、*piggyBac* トランスポゾンシステムとリポフェクション法を組み合わせることにより、特殊な実験機器や組換え体の高度な拡散防御を要することなく、マウス iPS 細胞を高効率に作出できる技術を開発した。まず最初に、マウス線維芽細胞への遺伝子導入に適した導入試薬を選択した。種々のリポフェクション試薬（計 7 種）により、GFP 発現ベクターをマウス胎仔線維芽細胞株 E6/E7-MEF 細胞と初代マウス胎仔線維芽細胞に遺伝子導入し、遺伝子導入効率を比較した。その結果、いずれの細胞種においても 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。次に ViaFect を用いて、マウス iPS 細胞誘導 *piggyBac* ベクターと *piggyBac* トランスポザリゼ発現ベクターを同時にマウス胎仔線維芽細胞株に遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を試みた。遺伝子導入から約 3 週間後、iPS 細胞に特徴的なドーム状の細胞コロニーが形成され、かつ、iPS 細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が検出された。さらに、iPS 細胞誘導ベクターに組み込んでいない、iPS 細胞マーカーである NANOG の明確な発現が検出された。これらの結果より、iPS 細胞が樹立できたと考えられる。iPS 細胞の樹立効率を算出したところ約 0.2%であり、レトロウイルスベクターを使用する従来法と比較しても、同等な樹立効率であることが判明した。本研究で開発したマウス iPS 細胞の樹立技術は、産業動物の iPS 細胞も含めて、iPS 細胞の樹立に有効な新規転写因子や合成化合物・天然化合物のスクリーニングに応用できると考えられる。

2) 論文題名：Exogenous expression of homeoprotein EGAM1N prevents in vitro cardiomyogenesis by impairing expression of *T* and *Nkx2.5*, but not *Mef2c*, in mouse embryonic stem cells.

著者名：Asumi Nonaka, Michiko Yoshida, Momoe Iha, Yusuke Kubo, Yumi Kihara, Takahiro Kikuchi, Yuki Kumagai, Akira Sasaki, and Masayuki Kobayashi

雑誌名：*Cytotechnology*, 68, 2431-2436, (2016)

発行日：2016年3月17日

要約：Generation of multiple cell types from embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem cells is crucial to provide materials for regenerative medicine. EGAM1N has been found in preimplantation mouse embryos and mouse ES cells as a functionally unclassified homeoprotein. Recently, we reported that expression of EGAM1N suppressed the in vitro differentiation of ES cells into progenitor cells that arise in early embryogenesis. To clarify the effect of EGAM1N on terminal differentiation, embryoid bodies (EBs) were prepared from ES cells expressing exogenous *Egam1n*. In EBs expressing *Egam1n*, cardiomyogenesis was inhibited by impairing the expression of crucial transcription factors Brachyury *T* and *Nkx2.5* in the generation of mesoderm and cardiomyocytes, respectively. Expression levels of *Mef2c*, another crucial gene for cardiomyogenesis, were unaffected.

Conversely, the expression levels of *Gata6* and *Plat*, markers for the primitive endoderm lineage, and *Cdx2*, a marker for the trophectoderm lineage, were increased. These results suggested that certain cell populations in EBs expressing Egam1n preferentially differentiated to such cell lineages. Our results suggest that EGAM1N not only affects the generation of progenitor cells during early embryogenesis, but also the progression of terminal differentiation, such as cardiomyogenesis, in mouse ES cells.

**3) 論文題名 : 高温発酵性酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* SS4-5 株を用いた杉微粉砕物からの同時糖化発酵による バイオエタノールの生成**

著者名 : 西田孝伸、進藤昌、増田祥子、榊郁子、高橋武彦、森英明

雑誌名 : *Journal of the Japan Institute of Energy*, **95**, 283-288 (2016)

発酵日 : 2016年4月28日

要約 : 本報告は、実験は杉微粉末からの高温同時糖化発酵によるバイオエタノール製造に関するものである。振動型粉砕機ダンデムリングミルにより処理された杉微粉末は酵素糖化において効率的に糖に変換される。杉微粉末と高温発酵性酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* SS4-5 を用いた 40°Cでの高温同時糖化発酵ではエタノールの生産が阻害された。そこで、高温条件下で効率的にエタノール生産が行えるように改良するために SS4-5 株の細胞を UV 処理に供与した。変異処理の結果、私達は高温条件下で安定してエタノール生産が可能な変異株 SS4-5SP 株を取得した。SS4-5SP 株を用いた 40°Cでの高温同時糖化発酵ではエタノール生産とエタノール収率は 51.11g/L と 93.38%であった。高効率のエタノール生産は SS4-5SP 株を用いた高温同時糖化発酵により行うことができる。

**4) 論文題名 : Formation of Guaiacol by Spoilage Bacteria from Vanillic Acid, a Product of Rice *Koji* Cultivation, in Japanese Sake Brewing**

著者名 : Toshihiko Ito, Mahito Konno, Yoichiro Shimura, Seiei Watanabe, Hitoshi Takahashi, and Katsumi Hashizume

雑誌名 : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 4599-4605 (2016)

発行日 : 2016年5月26日

要約 : The formation of guaiacol, a potent phenolic off-odor compound in the Japanese sake brewing process, was investigated. Eight rice *koji* samples were analyzed, and one contained guaiacol and 4-vinylguaiacol (4-VG) at extraordinarily high levels: 374 and 2433  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry mass *koji*, respectively. All samples contained ferulic and vanillic acids at concentrations of mg/kg dry mass *koji*. Guaiacol forming microorganisms were isolated from four rice *koji* samples. They were identified as *Bacillus subtilis*, *B. amylolique faciens/subtilis*, and *Staphylococcus gallinarum* using 16S rRNA gene sequence.

These spoilage bacteria convert vanillic acid to guaiacol and ferulic acid to 4-VG. However, they convert very little ferulic acid or 4-VG to guaiacol. Nine strains of *koji* fungi tested produced vanillic acid at the mg/kg dry mass *koji* level after cultivation. These results indicated that spoilage bacteria from guaiacol form vanillic acid, which is a product of

*koji* cultivation in the sake brewing process.

5) 論文題名 : The protective role of protein L-isoaspartyl (D-aspartate) O-methyl-transferase for maintenance of mitochondrial morphology in A549 cell.

著者名 : Masahiro Ogasawara, Mieko Otani, Masachika Shudo, Yohei Inaba, Satoru Nirasawa, Saori Takahashi, Takeshi Kiyoi, Yuki Tanaka, Kenji Kameda, Naoki Kunugita, Kazutaka Maeyama, Keiji Sano, Masahiro Yamashita, and Kohei Yamauchi

雑誌名 : *Experimental Lung Research*, **42**, 245-262 (2016)

発行日 : 2016 年 6 月 21 日

要約 : **Purpose:** The increasing amount of evidence with abnormal aging process have been involved in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Mice with deficient protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyl transferase 1 (PCMT1) expression reveal acceleration of aging and result in the increased proportion of D-aspartate (D-Asp) residues and dysfunction in proteins. Furthermore, mitochondrial morphology and functions are associated with COPD and IPF pathogenesis. The purpose of the current study was to investigate the role of PCMT1 on mitochondrial morphology using A549 cells. **Materials and Methods:** We investigated PCMT1, prohibitin 1 (PHB1), mitochondrial membrane proteins expression, mitochondrial morphology, and the proportion of D-Asp residues in PHB1 in A549 cells with (PCMT1-KD) and without the context of decreased PCMT1 expression

(PCMT1-Cont) using electron microscopy, fluorescence staining, Western blot analysis, and the ATP content per cells. To investigate the effects of the PCMT1-KD cells, we developed double-transfected cell lines containing either the cytosolic or the endoplasmic isoform of PCMT1. **Results:** We found a significant higher proportion of D-Asp residues in PHB1 in PCMT1-KD cells than that in PCMT1-Cont cells. The PCMT1-KD cells without smoke extract exposure were characterized by a significantly increased proportion of the D-Asp residues in PHB1, damaged mitochondrial ultrastructure, and a tendency toward the fission direction of the mitochondrial dynamics followed by a significant decrease in the cellular ATP content. **Conclusion:** The increased proportion of the D-Asp residues may contribute to COPD pathogenesis, via irreversible protein conformational changes, followed by mitochondrial dysfunction.

6) 論文題名 : Knockdown of gene expression by antisense morpholino oligos in preimplantation mouse embryos cultured *in vitro*.

著者名 : Yuki Sato, Shiori Sato, Takahiro Kikuchi, Asumi Nonaka, Yuki Kumagai, Akira Sasaki, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Analytical Biochemistry*, **509**, 41-45 (2016)

発行日 : 2016 年 7 月 2 日

要約 : Knockdown of gene expression by antisense morpholino oligos (MOs) is a simple and

effective method for analyzing the roles of genes in mammalian cells. Here, we demonstrate the efficient delivery of MOs by Endo-Porter (EP), a special transfection reagent for MOs, into preimplantation mouse embryos cultured *in vitro*. A fluorescein-labeled control MO was applied for monitoring the incorporation of MOs into developing 2-cell embryos in the presence of varying amounts of EP and bovine serum albumin. In optimized conditions, fluorescence was detected in 2-cell embryos within a 3-h incubation period. In order to analyze the validity of the optimized conditions, an antisense *Oct4* MO was applied for knockdown of the synthesis of OCT4 protein in developing embryos from the 2-cell stage. In blastocysts, the antisense *Oct4* MO induced a decrease in the amount of OCT4 protein to less than half. An almost complete absence of OCT4-positive cells and nearly complete disappearance of the inner cell mass in the outgrowths of blastocysts were also noted. These phenotypes corresponded with those of *Oct4*-deficient mouse embryos. Overall, we suggest that the delivery of MOs using EP is useful for the knockdown of gene expression in preimplantation mouse embryos cultured *in vitro*.

**7) 論文題名 : Lipoprotein profiles of hepatic cell lines at various stages of differentiation.**

著者名 : Akira Sasaki, Fumiko Kimura, Mizuho Miura, Gen Toshima, Junichiro Takahashi, Sayuri Maruya, Masayuki Kobayashi, and Keishi Hata

雑誌名 : *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **53**, 93-95 (2017)

発行日 : 2016年9月9日 (電子版)

要約 : We studied the lipoprotein profiles of human hepatic cells at various stages of differentiation. The production of three major classes of lipoproteins, very low-density lipoprotein (VLDL), low-density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL), was detected in three well-differentiated human hepatoma cell lines and primary human hepatocytes; however, these lipoproteins were not detected in the culture medium in which undifferentiated hepatoma cell lines were grown. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis demonstrated that the expression levels of apolipoprotein A1 (ApoA1), ApoB100, and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) were markedly lower in the undifferentiated hepatoma cell lines than in the well-differentiated hepatoma cell lines and primary hepatocytes. These results indicate that apolipoprotein synthesis, and triglyceride-transport by MTP might be rate-limiting steps in lipoprotein production in mature hepatic cells.

**8) 論文題名 : Suppressive effects of welsh onion extracts on mucus hyper-production in human airway cells**

著者名 : Akiko Takashima, Kimihiko Sano, Jun Iwashita, and Keishi Hata

雑誌名 : *Letters in Health and Biological Sciences*, **1**, 1-3 (2016)

発行日 : 2016年9月17日

要約 : We investigated the suppressive effects of Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) on the hyper-production of mucins in NCI-H292 human lung cancer cells. Periodic acid-Schiff staining showed that the 50% (v/v) ethanol extract of Welsh onion suppressed mucus glycoprotein production in cells, whereas the water and ethanol extracts did not. A real-time RTPCR analysis demonstrated that the 50% ethanol extract attenuated the gene expression of MUC2 and MUC5AC, which are major airway mucus components, in NCI-H292 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Furthermore, dot blot hybridization revealed that the extract at 100  $\mu$ g/ml attenuated the hyper-production of the MUC5AC protein in LPS-stimulated NCI-H292 cells.

#### 9) 論文題名 : 粉砕時の温度が木質バイオマスの乾式粉砕効率に与える影響の検討

著者名 : 森英明、大村幸正、進藤昌、西田孝伸

雑誌名 : 秋田県立大学ウェブジャーナル 3, 6-12 (2016)

発酵日 : 2016年9月30日

要約 : 粉砕温度が木質バイオマスの粉砕特性に与える影響に着目した。粉砕物を杉とし、湿式および乾式の二つの粉砕方法を用いて粉砕特性の検討を行った。湿式粉砕は粉砕温度 100°C以下が保障されるが乾式粉砕は保障されない。乾式粉砕では粉砕筒を加熱し、粉砕筒温度を室温から150°Cまでの一定温度に保持して粉砕した。得られた結果は次の通り。湿式粉砕の粉砕粒径のピークは7~8  $\mu$ m と乾式粉砕の数十  $\mu$ m よりも一桁程度小さかった。しかしながら、湿式粉砕の糖化酵素 Ctec2 による糖化率は 50%程度で乾式粉砕の 80%よりもかなり低かった。杉の糖化率に対する熱的な影響を調べるために微粉砕前の杉粗粉末を熱処理して糖化率を測定した。すると概ね 120~130°Cの範囲に糖化率のピークを持つ結果が得られた。そこで、粉砕筒温度 100~150°Cを中心に乾式加熱粉砕実験を行った。その結果、粉砕筒温度を概ね 110~120°Cとすると糖化率が向上する結果が得られた。これにより、例えば糖化率 60%を得るのに必要な粉砕時間は、従来の 14~15 分から約 8 分に減少する。

#### 10) 論文題名 : Relationships between the expression of hepatocyte nuclear factors and factors essential for lipoprotein production in a human mesenchymal stem cell line, UE7T-13.

著者名 : Akira Sasaki, Kazuyuki Hiwatashi, Masanori Kumagai, Hata Keishi, and Masayuki Kobayashi

雑誌名 : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81, 262-270 (2017)

発行日 : 2016年11月14日

要約 : To clarify the mechanisms regulating lipoprotein production by hepatocyte nuclear factors (HNFs), we generated four kinds of transfectants in human bone marrow mesenchymal stem cells: UE7T-13, stably expressing FOXA2 (also known as HNF3 $\beta$ ), HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  or co-expressing HNF4 $\alpha$ , and HNF1 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ ). In HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  transfectants, cellular contents of triglycerides (TG) and cholesterol were markedly higher than in UE7T-13 cells and comparable to those in human hepatoma HepG2 cells. However, TG and cholesterol, which

are secreted from cells as components of lipoproteins, were hardly detected in the medium for any of the transfectants. ApoB100 and MTP, which are essential for the formation and secretion of lipoproteins, were undetectable and detected at low levels, respectively, in HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  transfectants. We suggest that enforced co-expression of HNF4 $\alpha$  and HNF1 $\alpha$  is effective for cellular lipid accumulation, while additional factors are probably required for lipoprotein formation and secretion.

**11) 論文題名 : In vitro and in vivo antidiabetic effects of the ethanol extract from *Lentinula edodes* (Shiitake)**

著者名 : Akiko Takashima, Kimihiko Sano, Gen Toshima, Junichiro Takahashi, Fumika Kurosaki, Akira Sasaki, Kazuyuki Hiwatashi, and Keishi Hata

雑誌名 : *Nutrafoods*, 15, 279-284 (2016)

発行日 : 2016年12月1日

要約 : We herein examined the expression patterns of glucose transporters (GLUTs) in Caco-2 human colon cancer cells that spontaneously or chemically differentiated into intestinal epithelial cells. An RT-PCR analysis demonstrated that the expression of intestinal glucose transporters such as GLUT-1 and -2 was increased by both types of differentiation. We evaluated the inhibitory effects of extracts from *Lentinula edodes* on glucose transport in intestinal Caco2 cells induced with sodium butyrate at 5 mM. The ethanol extract of *L. edodes* (LEE) at 0.1 mg/ml markedly inhibited glucose intake through the monolayer of differentiated Caco-2 cells; however, water and the 50% (V/V) ethanol extract did not affect glucose transport through these cells at the same concentration. We also investigated the effects of LEE on plasma glucose levels in hyperglycemic mice induced by feeding a high fat diet (HFD). The results obtained showed that LEE reduced plasma glucose levels by 64.0% in HFD-fed mice.

**12) 論文題名 : Thermal and rheological characteristics of mutant rice starches with widespread variation of amylose content and amylopectin structure.**

著者名 : Toru Takahashi, and Naoko Fujita

雑誌名 : *Food Hydrocolloids*, 62, 83-93 (2017)

発行日 : 2016年7月19日 (電子版)

要約 : Of starch biosynthesis-related enzymes, starch synthases (SSs) and starch branching enzymes (BEs) play important roles in the control of starch structure. Measurements of the particle size distribution, swelling power, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD) and dynamic viscoelastic measurements were used to investigate the physicochemical properties of rice endosperm starch from SSIIIa, granule-bound starch synthase (GBSSI) and/or BEIIb deficient mutants including double mutants having widespread variation of amylose content and amylopectin structure. The predicted relative starch crystallinity (RSC) of A-type starches and B-type starches of these mutants, as computed

based on amylopectin contents, were almost equal. These results suggest that SSIIIa and BEIIb deficiency does not affect the degree of crystallinity of amylopectin. A newly developed double mutant line (*ss3a/be2b*) with high amylose content (ca. 45%) and a lower proportion of amylopectin short chains showed a higher temperature of gelatinization. Moreover, retrogradation of the gel was extremely rapid. Additionally, *be2b* with extremely low proportion of amylopectin short chains and lower amylose contents (28%) showed higher gelatinization temperature and more rapid retrogradation than *ss3a*, with a lower proportion of amylopectin long chains with  $DP \leq 33$  and higher amylose content (30%). Granules of *ss3a/be2b* and *be2b* in gels after viscoelastic measurement were mostly maintained, indicating that most starch granules were not ruptured during heating. These results clarify that not only amylose contents but also the fine structure in amylopectin strongly affected rice gel viscoelastic properties.





## 6. 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<sup>1)</sup>、や総食研<sup>2-4)</sup>などのように番号を付し、そのリストを一括して引用文献の項に記載する。
6. 投稿中の論文、私信、未発表結果は、引用文献に入れず本文中に括弧で示し引用する。
7. 本文中に他の論文の著者名を引用する場合には、混乱の起こらない限り姓のみとする。著者が 2 名の論文は、両者の姓を併記し、3 名以上の場合は、筆頭著者以外を「他」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19号

発行日 平成29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】