

ISSN 2185-6699

秋田県総合食品研究センター報告

第 22 号

令和 2 年 (2020 年)

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

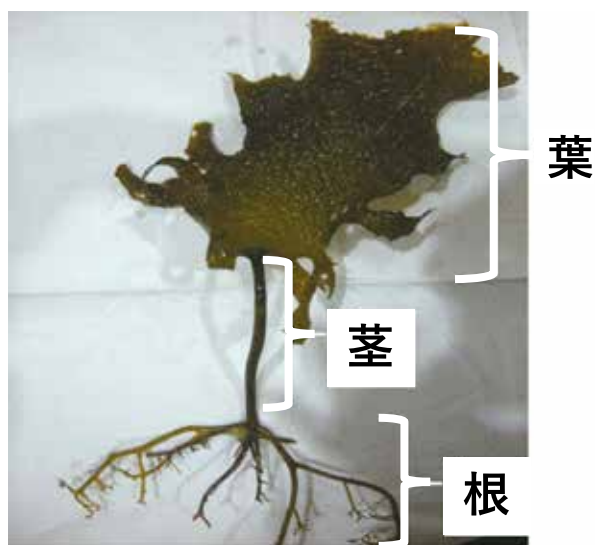
No. 22, 2020



キクイモのイヌリン糖鎖重合度組成比と遊離糖
戸松誠 No.22, 1-10 (2020)



アカモクの相対粘度とフコイダン調製法
戸松誠 他 No.22, 11-18 (2020)



海藻由来DPP4阻害物質について
高橋砂織 他 No.22, 19-28 (2020)

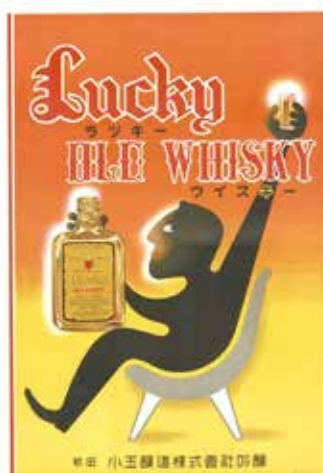


米菓の膨化に与える加熱条件の影響
高橋徹 他 No.22, 29-32 (2020)



あきたふうど ミーティング

秋田県内食品企業の女性従事者ネットワーク「あきたふうどミーティング」の取組
尾張かおる、児玉雅 No.22, 33-40 (2020)



秋田のウイスキーの歴史
杉本勇人、梅川結 No.22, 41-54 (2020)

目次

1. 原著論文（報文）（3件）

- 1) キクイモのイヌリン糖鎖重合度組成比と遊離糖・・・・・・・・・・1
○戸松誠
- 2) アカモクの相対粘度とフコイダン調整法・・・・・・・・・・11
○戸松誠、高橋佳奈*、中林信康*
（*秋田県水産振興センター）
- 3) 海藻由来 DPP4 阻害物質について・・・・・・・・・・19
○高橋砂織、畠恵司、中林信康*
（*秋田県水産振興センター）

2. 原著論文（研究ノート）（1件）

- 1) 米菓の膨化に与える加熱の影響・・・・・・・・・・29
○高橋徹、熊谷昌則、松井ふゆみ

3. 解説（2件）

- 1) 秋田県内食品企業の女性従事者ネットワーク・・・・・・・・33
「あきたふうどミーティング」の取組
○尾張かおる、児玉雅
- 2) 秋田のウイスキーの歴史・・・・・・・・・・41
○杉本勇人、梅川結

4. 特許の概要（4件）・・・・・・・・・・55

5. 学会発表概要（22件）・・・・・・・・・・57

6. 外部発表論文概要（8件）・・・・・・・・・・71

7. 外部発表論文再掲載（1件）・・・・・・・・・・77

8. 秋田県総合食品研究センター報告指針・・・・・・・・・・87

1. 原著論文（報文）（3件）

- 1) キクイモのイヌリン糖鎖重合度組成比と遊離糖 1
○戸松誠
- 2) アカモクの相対粘度とフコイダン調整法 11
○戸松誠、高橋佳奈*、中林信康*
（*秋田県水産振興センター）
- 3) 海藻由来 DPP4 阻害物質について 19
○高橋砂織、畠恵司、中林信康*
（*秋田県水産振興センター）

キクイモのイヌリン糖鎖重合度組成比と遊離糖

戸松 誠

(秋田県総合食品研究センター)

Makoto TOMATSU

【要約】

フルクトース重合体（フラクタン）の一種、イヌリンはキク科植物に多く含まれている水溶性食物繊維であり、そのフルクトース重合度（鎖長）は植物種やライフサイクルによって異なる広い分布性があり、鎖長の異なるものの集合体となっている。先に、秋田県産キクイモのイヌリンは低重合度のものがメインであることを報告したが、本報では秋田県産だけでなく国内産キクイモ共通の特徴であること、および年度によって低重合度の割合が約 20%変化していることがわかった。また、乾燥重量あたりのフラクトオリゴ糖合計値は産地によって約 1.7 倍、遊離糖合計値は約 1.8 倍の差があること、さらに同一の産地、事業者であっても年度によってフラクトオリゴ糖合計値で約 1.5 倍、遊離糖合計値で約 1.3 倍の差があることがわかった。以上より、生鮮品では低重合度イヌリンがメインであることは国内産キクイモに共通するものの、イヌリン糖鎖重合度組成比や遊離糖濃度は産地、事業者、年度によって大きく異なることがわかった。加工品でも原料キクイモのイヌリン糖鎖重合度組成比や遊離糖濃度に依存した組成比になるものが多いものの、加工法によっては大きな差があることがわかった。

【緒言】

キク科のキクイモ (*Helianthus tuberosus*) 塊茎にはデンプンがほとんど存在せず、代わりに高トリグリセリド血症に経口摂取での有効性が示唆されているイヌリンが多く含まれており¹⁾、俗に「血糖値の急激な上昇を防ぐ」、「コレステロールを下げる」などとも言われ、機能性表示食品として 40 件以上が届け出されている²⁾。イヌリンはフルクトース重合体（フラクタン）の一種で、シュークロース (Suc) にフルクトース (Fru) が $\beta 2 \rightarrow 1$ 結合で直鎖状に重合した分子量 3,000~5,000 の貯蔵多糖類で、還元末端にはグルコース (Glc) が結合しており³⁾、その鎖長は植物種やライフサイクルによって異なる広い分布性があり、鎖長の異なるものの集合体となっている。鎖長の短いものはフラクトオリゴ糖 (Suc に Fru が 1~数個結合) と呼ばれ、おなかの調子を整える機能が表示できる特定保健用食品の成分になっているほか、最近では機能性表示食品としても数件が届出されている²⁾。

Kocsis らは、オーストリアで栽培したキクイモの可溶性炭水化物の糖重合度 (DP) は 13~18 であったと報告している⁴⁾。著者は、秋田県産キクイモの熱水抽出液中にはフラクトオリゴ糖を主成分とする鎖長の短い Fru 含有糖質 (DP = 3~5) が多量に含まれていること等を明らかにしてきた⁵⁾。本報では、DP 値が小さいのが秋田県産キクイモだけの特徴なのかを検討するため、秋田県産と県外産のキクイモについてイヌリン糖鎖重合度

組成比の比較を行った。また、定量法が確立しているフラクトオリゴ糖（DP=3~5）や糖類等の遊離糖について比較を行った。また、生鮮品のサイズ・形状の違い、および加工品種類による含量の差異についても検討した。

【実験方法】

1) 試料・試薬

試料は表1、2に示した。液体試料を除き、水分はハロゲン水分計（OHAUS、MB35）で115°C、Autoモードで測定し、乾燥物重量を求めた。キクイモ生鮮試料は厚さ約5mmにスライスして凍結乾燥（東京理化器械、FDU-1110）後、粉碎（岩谷産業、ミルサー300DG）し、暗所でデシケーター中に保存した。凍結乾燥粉碎物についても水分測定し、乾燥物重量を求めた。フラクトオリゴ糖標品（1-ケストース；DP=3、ニストース；DP=4、およびフラクトフラノシルニストース（Fru-ニストース）；DP=5）は富士フィルム和光純薬から購入し、イヌリン（フジFF）はフジ日本精糖から入手した。

表1 キクイモ生鮮品試料のリスト

No.	販売者所在地(産地)	備考	入手年月
1-1	秋田県 鹿角市(同)	洗浄済み	2017.12.
1-2	〃	洗浄済み、長型	2018.11
1-3	〃	〃、丸型	〃
1-4	〃	〃、大型	〃
1-5	〃	〃、小型	〃
1-6	〃	軽く洗浄	2020.01
1-7		微酸性電解水洗浄	〃
1-8		1-6の除皮した実	〃
1-9		1-6の皮	〃
1-10	秋田県 北秋田市(同)	土付き	2017.12
1-11	〃	土付き、白系統	2018.11
1-12	〃	土付き、紅系統	〃
1-13	秋田県 三種町(同)	砂地土壌	2017.12
1-14	〃	砂地土壌、水はけ良	2018.11
1-15	〃	〃、水はけ不良	〃
1-16	秋田県 横手市(同)		2017.12
1-17	〃	洗浄あり、サイズ大	2018.11
1-18	〃	〃、サイズ小	〃
1-19	〃	洗浄なし	〃
1-20	〃		2020.01
1-21	秋田県 由利本荘市(同)		2017.12
1-22	秋田県 仙北市(同)		2017.12
1-23	秋田県 秋田市(同)		2017.12
1-24	北海道 釧路市(同)	無農薬、土付き	2017.12
1-25	青森県 むつ市(県産)	無農薬、土付き、有機 JAS	2017.12
1-26	和歌山県 御坊市(県産)	無農薬、土付き	2017.12
1-27	熊本県 菊池市(同)	無農薬、紅系統	2017.12

表2 キクイモ加工品試料のリスト

No.	販売者所在地(産地)	形態(名称表記)	備考	入手年月
2-1	秋田県 鹿角市(同)	チップス	無農薬、有機肥料	2017.12
2-2	〃	ヨーグルト、ハードタイプ	冷蔵品	2018.07
2-3	〃	ヨーグルト、ドリンクタイプ	冷蔵品	〃
2-4	〃	チップス		2020.01
2-5	〃	ペースト	冷凍品	〃
2-6	秋田県 北秋田市(同)	いぶり漬け(紅系統)		2017.12
2-7	〃	チップス		〃
2-8	〃	チップス(紅系統)		2019.12
2-9	〃	茶(粉末、紅系統)		〃
2-10	〃	ペースト:水=6:4(紅系統)	レトルト品	〃
2-11	秋田県 三種町(同)	粗粉碎、焙煎		2019.12
2-12	〃	パウダー		〃
2-13	〃	しょうゆ漬け		〃
2-14	秋田県 横手市(同)	パウダー		2020.01
2-15	〃	茶:ティーバッグ、焙煎	熱湯抽出* ¹⁾	〃
2-16	〃	〃、焙煎	冷水抽出* ²⁾	〃
2-17	秋田県 仙北市(同)	パウダー		2017.12
2-18		いぶりチップス		
2-19	北海道 新篠津村(道内)	茶:ティーバッグ、焙煎		2017.12
2-20	長野県 飯田市(国内)* ³⁾	茶:ティーバッグ、焙煎		2017.12
2-21	茨城県 かすみがうら市(県内)* ⁴⁾	茶(粉末)	低温乾燥	2017.12
2-22	茨城県 大子町(同)	パウダー(紅系統)	低温乾燥、無農薬	2017.12
2-23	和歌山県 上富田町(日高町)	パウダー	天日乾燥	2017.12
2-24	熊本県 菊池市(同)	パウダー、焙煎		2017.12

*¹⁾:熱湯抽出:tea bag1包(3g)を熱湯 500 mL に 5 分浸漬後、bag を取出し、放冷

*²⁾:冷水抽出:tea bag1包(3g)を冷水 500 mL に一晩浸漬後、bag を取出す

*³⁾:製品ラベル表示「イヌリン (45.2 g/100 g) 含有」

*⁴⁾:製品ラベル表示「イヌリン (42.41 g/100 g) 含有、EM 自然農法栽培

2) 熱水抽出液の調製

各凍結乾燥粉碎物に 10 mg/mL になるよう 85°C の熱水を加え、85°C で 1 時間加熱抽出した。放冷後、3,000 rpm で 5 min 遠心分離した上清を適宜、水で希釈して親水性 PTFE 材質の 0.45 μm フィルターで濾過し、抽出液とした。

3) 糖鎖重合度組成比と遊離糖の定量

糖鎖重合度組成比は、パルスドアンペロメトリック検出器 (PAD) を接続したイオンクロマト HPLC を用いた以下の条件でのイヌリン標品中の各 DP ピークのリテンションタイムと一致する各 DP のピーク面積をそれぞれ求め、その和 (全イヌリン) に対する相対比をイヌリン糖鎖重合度組成比とした。糖の定量も同様の条件で測定した Glc、Fru、

Suc、1-kestose、ニストース、および Fru-ニストースの各々のピークエリアから作成した検量線から求めた。

システム：Thermo Fisher Scientific, Dionex ICS-3000

カラム：CarboPac PA1 (4 × 250 mm)

移動相：A = H₂O

B = 0.1 M NaOH

C = 0.1 M NaOH/0.5 M CH₃COONa

グラジエント（再生時）

-17 ~ -14 min = A0%, B0%, C100% 流速：1.2 mL/min

-14 ~ -0.1 min = A90%, B10, C0% 流速：1.2-1.1 mL/min

-0.1 ~ 0 min = A90%, B10, C0% 流速：1.0 mL/min

グラジエント（分析時）

0 ~ 20 min = A90-20%, B10-80%, C0% 流速：1 mL/min

20 ~ 21 min = A20-2%, B80-98%, C0% 流速：1 mL/min

21 ~ 40 min = A2-0%, B98-40%, C0-60% 流速：1 mL/min

40 ~ 55 min = A0%, B0%, C100% 流速：1 mL/min

検出器：PAD

カラム温度：30°C

インジェクト量：25 μL

【結果と考察】

キクイモ生鮮品、および加工品の糖分析クロマトグラフの典型的な例は図1に示したように、Glc、Fru、Suc、および各 DP 値のイヌリン以外のピークはほとんど認められなかった。試料中に含まれる各 DP 値のイヌリンのピーク面積をそれぞれ求め、その和（全イヌリン）に対する相対比、すなわち、糖鎖重合度組成比で表したのが図2である。2017年度産で全国の生鮮品を比較すると、産地によって重合度組成比は異なっていたが、ほぼすべての試料で DP 値が大きくなるほど相対比の値が小さくなっており、重合度の小さいイヌリンがメインであることが秋田県産キクイモだけの特徴ではないことが示された。DP = 3 ~ 5 のイヌリンが 40 ~ 50% を占めるものが多かったなかで、80% を占めた試料があった。これらは 2019 年度産であり、前年度産までに比べ 20% 前後も高い値になっていたことから（No. 1-6 ~ 9, 20）、2019 年度産は低重合度のイヌリンの割合がそれまでに比べ顕著に増加したことが特徴となっていることが考えられる。一方、DP = 3 ~ 5 のイヌリンの割合が約 30% と最小の試料は、重合度の小さいものから大きいものまで、まんべんなく含まれていることが示された（No. 1-12, 27）。

加工品の加工法別のイヌリン糖鎖の重合度組成比を比較したが、加工法別の特徴は特に見いだせなかった（図3）。重合度の大小まんべんなく含まれているものは、高重合度までピークが検出されており、最高で DP = 41 までのイヌリンピークが検出できた（No. 2-8）。

キクイモ生鮮品の遊離糖分析結果を表3、図4に示した。2017年度産キクイモのフラクトオリゴ糖合計値は、FD 重量 100 g あたりの平均は 18.78 g で、最大 23.07 g（No. 1-22）と

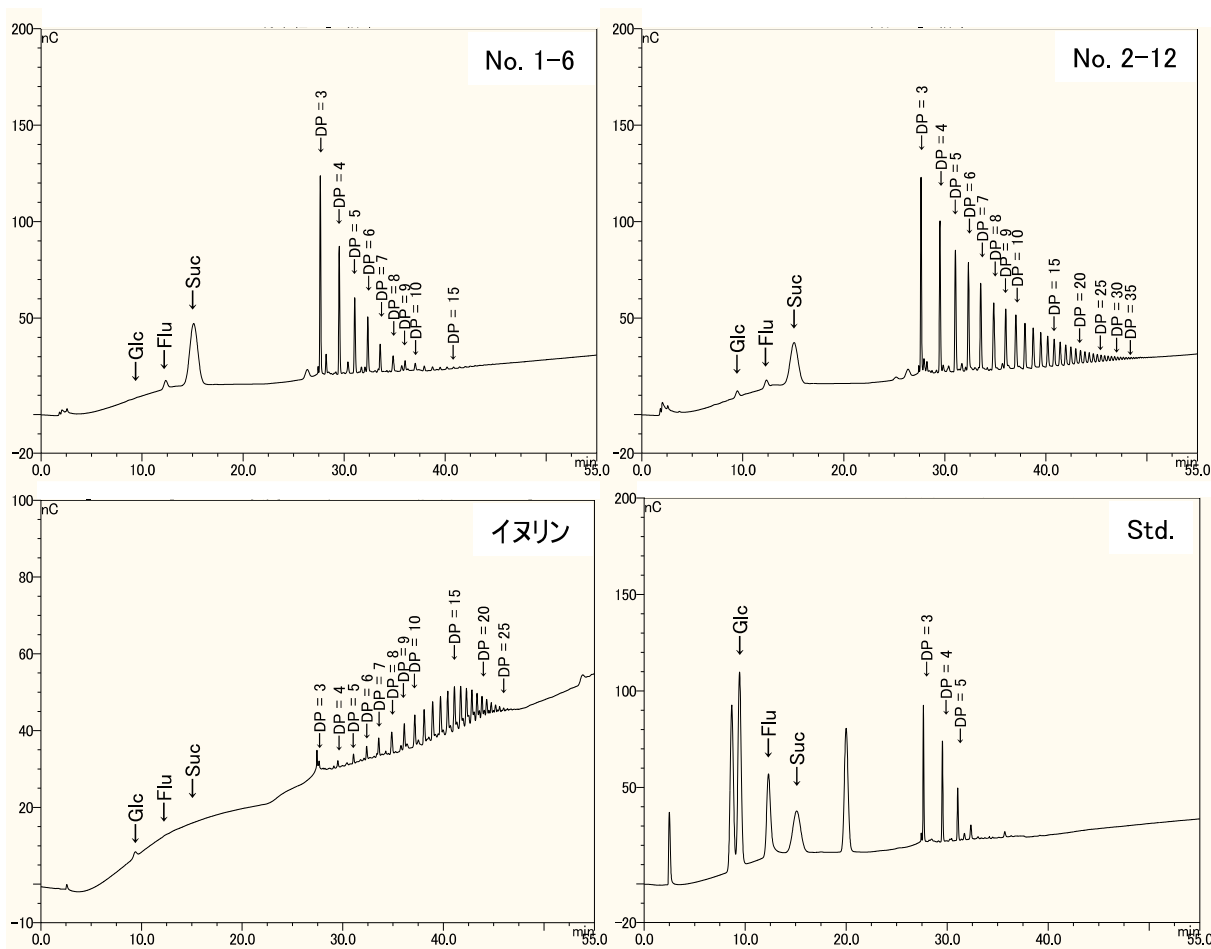


図1 糖分析クロマトグラム例

DP = 3:1-ケトース

DP = 4:ニストース

DP = 5:Fru-ニストース

最小 13.76 g (No. 1-27) には約 1.7 倍の差があり、また、生鮮重量 100 g あたりでも平均は 3.93 g で、最大 5.46 g (No. 1-22) と最小 2.58 g (No. 1-16) には約 2.1 倍もの差があり、産地による差が大きいことがわかった。遊離糖合計値でも同様に FD 重量 100 g あたりの平均で 34.86 g で、最大 40.90 g (No. 1-22) と最小 25.12 g (No. 1-27) には約 1.8 倍の差があった。次いで、秋田県内の同一事業者の年度別の変動を調べた結果、フラクトオリゴ糖合計値、遊離糖合計値ともに、2018 年度産が最も高く、次いで 2019、2017 の順であった。同じ産地、同じ事業者でも栽培年によって、フラクトオリゴ糖合計値で約 1.2~1.5 倍、遊離糖合計値で約 1.2 倍の差があることがわかった (表 4)。栽培条件が同じでも天候の影響を受けているものと考えられる。また、キクイモの形状やサイズが異なっても遊離糖含量はほとんど差がないことがわかった (No. 1-2~5 間、No. 1-17~18 間)。砂地と砂地以外との差はほとんどなく (No. 1-13~1-14, 15 間)、砂地の水はけの良否による差もほとんどなかった (No. 1-14~15 間)。皮と除皮したものとの比較では、フラクトオリゴ糖はほとんど差がないものの、Suc 濃度は皮の方が除皮したものの約 77%ほどと少なかった (No. 1-8~9 間)。

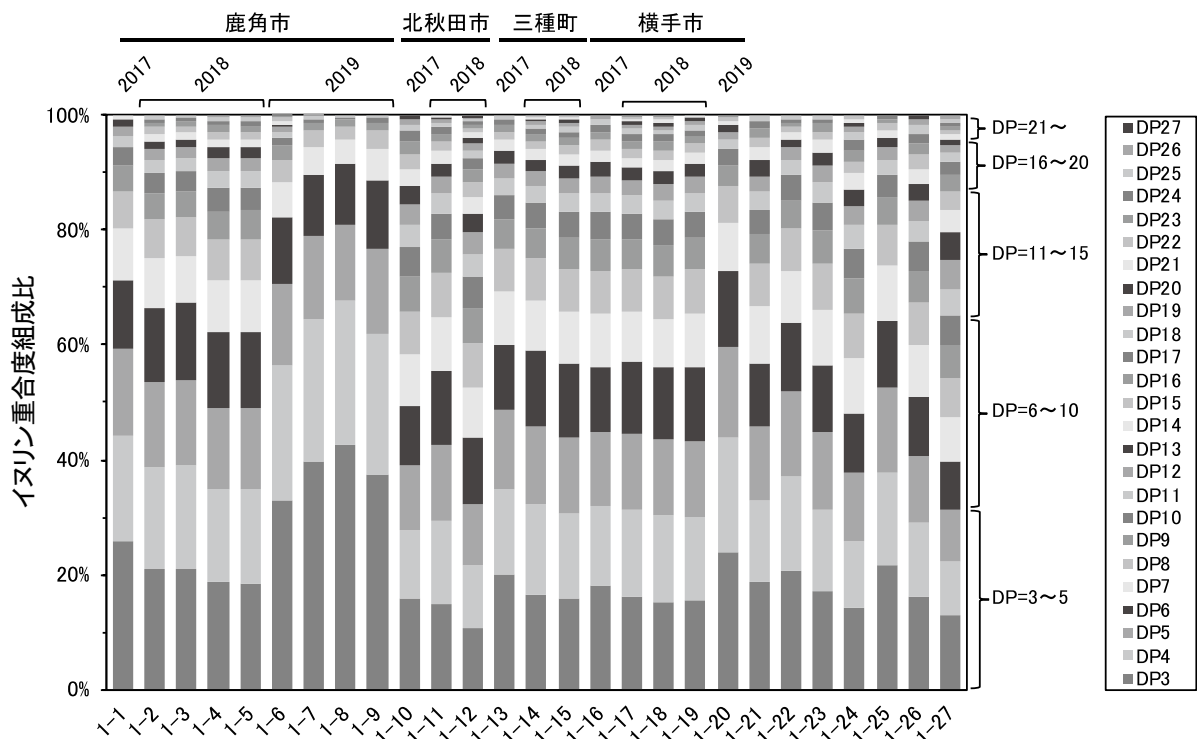


図2 産地別キクイモ生鮮品のイヌリン重合度組成比
試料 No. は、表1参照

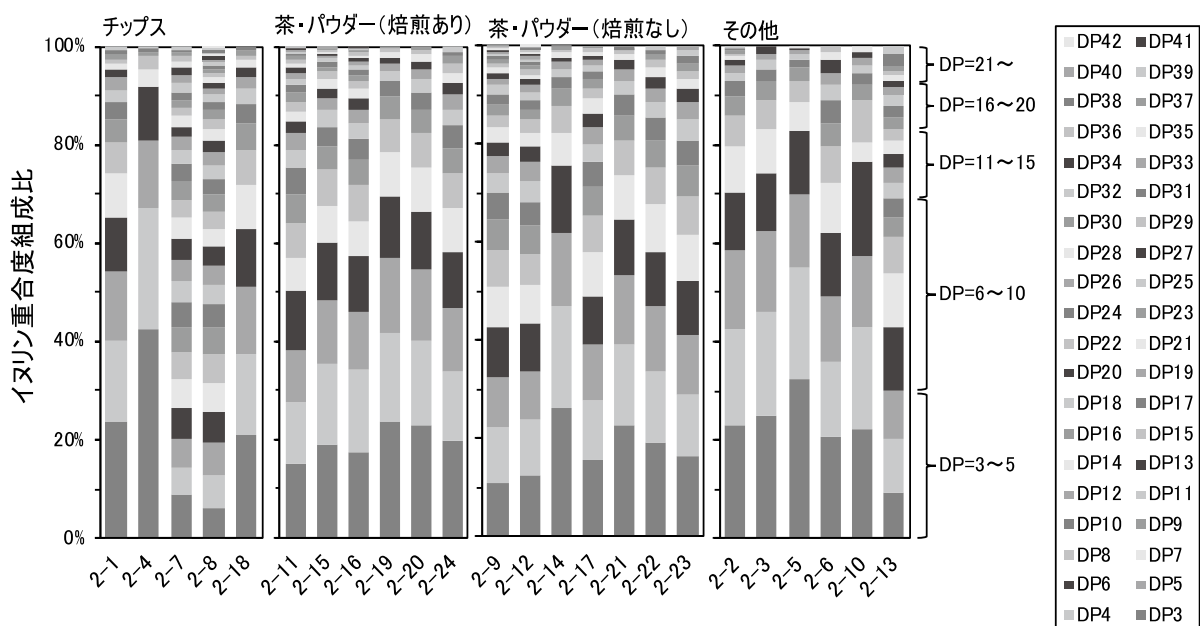


図3 キクイモ加工法別のイヌリン糖鎖重合度組成比
試料 No. は、表1参照

キクイモ加工品の遊離糖分析結果を表5、図5に示した。フラクトオリゴ糖合計値は、加工法別で比較すると焙煎したものが最高濃度であった。以下、加工法別に記載する。

- a) 茶・パウダー（焙煎あり）のフラクトオリゴ糖合計値はFD重量100gあたり最大37.80g、生鮮重量100gあたりでは35.42gであった（No. 2-19）。石黒と横田は、焙煎によ

表3 キクイモ生鮮品中の遊離糖含量

No.	%	g/100 g (FD 重)							g/100 g (新鮮重)						
		1-ケ ス ト ー ス	ニ ス ト ー ス	Fru- ニ ス ト ー ス	グ ル コ ー ス	フル ク ト ー ス	シュ ー ク ロ ー ス	フラ クト オリ ゴ 糖 計	1-ケ ス ト ー ス	ニ ス ト ー ス	Fru- ニ ス ト ー ス	グ ル コ ー ス	フル ク ト ー ス	シュ ー ク ロ ー ス	フラ クト オリ ゴ 糖 計
1-1	80.1	7.50	4.68	5.73	ND	2.21	15.85	17.91	1.50	0.93	1.14	ND	0.44	3.16	3.57
1-2	83.6	10.00	7.39	9.81	0.79	1.19	22.19	27.21	1.64	1.21	1.61	0.13	0.20	3.63	4.46
1-3	83.5	9.79	7.25	9.66	0.86	1.07	20.81	26.70	1.62	1.20	1.59	0.14	0.18	3.43	4.41
1-4	81.1	9.99	7.62	10.77	0.77	1.01	20.36	28.38	1.89	1.44	2.03	0.15	0.19	3.84	5.36
1-5	81.5	9.32	7.20	10.08	0.78	0.95	18.68	26.60	1.72	1.33	1.86	0.14	0.17	3.45	4.91
1-6	84.1	9.11	6.76	7.19	ND	1.05	17.71	23.06	1.45	1.08	1.15	ND	0.17	2.82	3.67
1-7	83.9	9.82	5.99	6.18	ND	0.32	17.86	21.99	1.58	0.97	1.00	ND	0.05	2.88	3.54
1-8	85.0	8.86	5.19	5.05	ND	0.75	18.56	19.10	1.33	0.78	0.76	ND	0.11	2.78	2.86
1-9	80.7	7.68	5.17	5.66	ND	0.96	14.24	18.51	1.48	1.00	1.09	ND	0.18	2.75	3.57
1-10	82.9	5.98	3.72	5.47	ND	2.26	9.30	15.16	1.02	0.64	0.93	ND	0.39	1.59	2.59
1-11	79.4	8.17	7.02	10.37	0.76	1.09	14.74	25.56	1.69	1.45	2.14	0.16	0.22	3.04	5.28
1-12	78.9	6.46	5.91	9.55	0.75	1.02	9.55	21.92	1.37	1.25	2.02	0.16	0.22	2.02	4.63
1-13	75.2	8.04	5.44	7.21	ND	2.26	16.91	20.69	1.99	1.35	1.79	ND	0.56	4.19	5.13
1-14	79.5	8.36	7.02	9.94	0.77	1.06	17.07	25.33	1.71	1.44	2.03	0.16	0.22	3.49	5.18
1-15	82.2	8.93	7.47	10.75	0.77	1.22	17.09	27.14	1.59	1.33	1.92	0.14	0.22	3.05	4.84
1-16	85.5	6.85	4.64	6.38	ND	2.28	14.15	17.87	0.99	0.67	0.92	ND	0.33	2.05	2.58
1-17	79.3	9.29	7.55	10.91	0.84	1.16	17.93	27.75	1.92	1.56	2.26	0.17	0.24	3.71	5.74
1-18	79.8	9.06	7.87	11.36	0.90	1.27	17.49	28.29	1.83	1.59	2.30	0.18	0.26	3.54	5.72
1-19	76.3	8.00	6.69	9.89	0.78	1.19	14.42	24.58	1.90	1.59	2.35	0.19	0.28	3.42	5.83
1-20	79.6	9.01	6.56	8.27	ND	ND	19.65	23.83	1.84	1.34	1.69	ND	ND	4.01	4.87
1-21	72.7	6.69	4.39	6.01	ND	2.49	11.48	17.09	1.83	1.20	1.64	ND	0.68	3.14	4.67
1-22	76.3	8.68	6.18	8.20	ND	2.37	15.46	23.07	2.06	1.46	1.94	ND	0.56	3.66	5.46
1-23	78.6	7.54	5.53	7.70	ND	2.46	15.07	20.76	1.61	1.18	1.65	ND	0.53	3.23	4.45
1-24	80.1	6.88	5.10	7.48	ND	2.34	9.74	19.46	1.37	1.02	1.49	ND	0.47	1.94	3.88
1-25	81.3	8.75	6.00	7.78	ND	2.25	19.76	22.52	1.64	1.12	1.45	ND	0.42	3.70	4.21
1-26	80.3	6.95	4.77	6.54	ND	2.61	14.21	18.27	1.37	0.94	1.29	ND	0.51	2.80	3.60
1-27	75.5	5.52	3.28	4.96	ND	2.61	8.75	13.76	1.36	0.80	1.22	ND	0.64	2.15	3.38
平均	80.3	8.19	6.01	8.11	0.23	2.45	15.89	22.32	1.60	1.18	1.60	0.05	0.54	3.09	4.38

ND: Not detected

るキクイモ中イヌリン含量の変動を調べ、170°C・30分間の加熱までは変化はほとんどなかったものの、190°C以上では温度が高く時間が長くなるにつれイヌリン含量が減少したことを報告している⁶⁾。また、190°C・15分間の加熱では未処理とほぼ同じ鎖長分布であるものの各鎖長ピーク面積が全体的に減少する傾向がみられ、190°C・30分間の加熱ではDP = 4のニストース以降の鎖長ピークは痕跡程度まで減少し、同様にSucのピークも激減したと述べている。今回の分析結果でも、焙煎した試料のニストースやFru-ニストースの値が顕著に減少していることはなかったものの、試料によっては、Suc

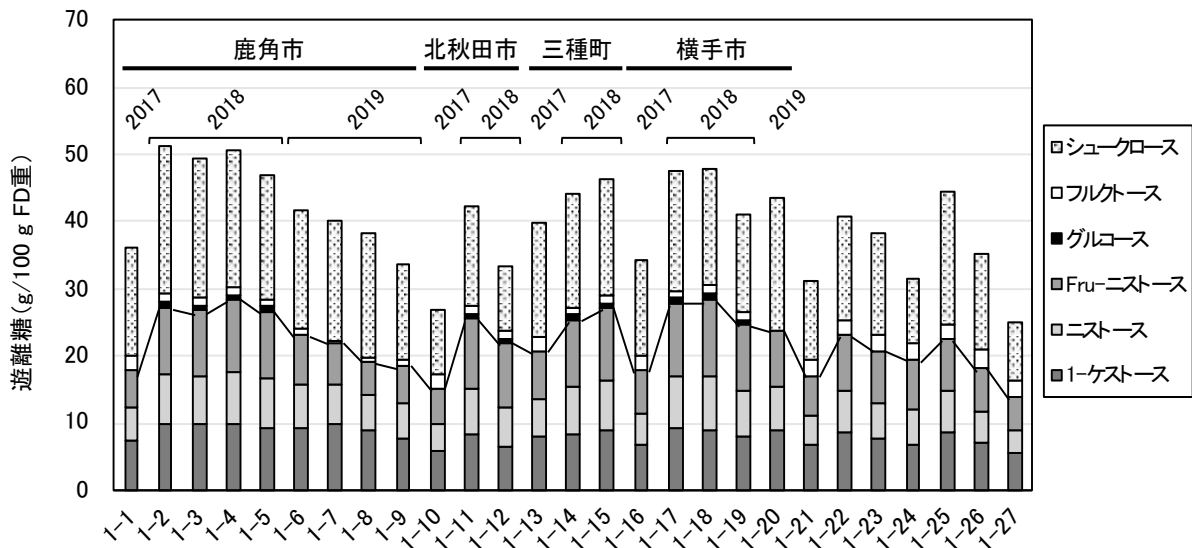


図4 産地別キクイモ生鮮品の FD 重量あたりの遊離糖含量棒グラフを結んだ線は、フラクトオリゴ糖合計値を表す。
試料 No. は、表1参照。

濃度がフラクトオリゴ糖合計値の半分以下のもの (No. 2-11, 15, 16) 、および、ほぼ同じ濃度のもの (No. 2-19, 20, 24) に分けられた。この違いは事業者や産地によって分けられるので、焙煎条件と原料キクイモの両方の影響を受けているものと考えられる。

表4 同一事業者(同一産地)の年度別遊離糖含量の変動(対 2017 年度)

産地	2017 年度		2018 年度		2019 年度	
	フラクトオリゴ糖計	遊離糖計	フラクトオリゴ糖計	遊離糖計	フラクトオリゴ糖計	遊離糖計
鹿角市	1.00	1.00	1.52	1.38	1.15	1.07
北秋田	1.00	1.00	1.57	1.41	—	—
三種町	1.00	1.00	1.27	1.14	—	—
横手市	1.00	1.00	1.50	1.33	1.33	1.27
平均	1.00	1.00	1.46	1.31	1.24	1.17

- b) パウダーや茶 (焙煎なし) では、砂地栽培の No. 2-12 を除き、各フラクトオリゴ糖はほぼ同じ濃度であったが、Suc 濃度は最大 22.04 g/100g FD 重量 (No. 2-21) 、最小 9.41 g/100g FD 重量 (No. 2-14) と約 2.3 倍と大きな差があった。
- c) チップス加工でも Suc 濃度がフラクトオリゴ糖合計値とほぼ同じ値になり遊離糖高含量のもの (No. 2-1, 4) と、約 6 割になり遊離糖低含量のもの (No. 2-7, 8) に分かれていた。この違いは事業者や産地によって分けられるので、チップス加工条件と原料キクイモの差によるものと考えられる。
- d) その他の加工法では、ペースト加工は原材料 (No. 1-6, 7) とほぼ同じ遊離糖含量を示す試料 (No. 2-5) と著しく低濃度になる試料 (No. 2-10) があり、ペースト加工条件の差によるものと考えられる。いぶり処理では原材料 (No. 1-10) に比べ、フラクトオリゴ糖が減少して Fru が増加している (No. 2-6) ことから、イヌリン重合度が小さくなっていることが示された。しょうゆ漬 (No. 2-13) では、フラクトオリゴ糖がほとんど検出さ

れず、Fru 濃度が高いことから、加工中あるいは保存中にイヌリン低重合化が起こっていると考えられる。

e) 飲用する際の抽出方法として熱湯抽出と冷水抽出を比較した結果では、熱湯抽出の方が

表5 キクイモ加工品中の遊離糖含量

No.	% (乾燥前)	g/100 g (FD 重)								g/100 g (新鮮重)					
	水分	1-ケ	ニス	Fru-	グル	フル	シュ	フラ	1-ケ	ニス	Fru-	グル	フル	シュ	フラ
		スト	ト	ニス	コー	クト	ーク	クト	スト	スト	スト	コー	クト	ーク	クト
		ース	ース	トース	ース	ース	ース	ース	ース	ース	ース	ース	ース	ース	ース
		ス	ス	ス	ス	ス	ス	糖計	ス	ス	ス	ス	ス	ス	糖計
2-1	5.7	8.53	5.38	6.62	ND	2.45	19.79	20.53	8.04	5.07	6.24	ND	2.31	18.65	19.35
2-2	—	—	—	—	—	—	—	—	0.31	0.23	0.29	0.04	ND	0.31	0.84
2-3	—	—	—	—	—	—	—	—	0.11	0.09	0.10	0.05	0.02	ND	0.30
2-4	6.5	8.10	4.61	4.66	ND	0.60	17.97	17.37	7.57	4.31	4.35	ND	0.56	16.79	16.24
2-5	84.2	7.83	5.69	6.78	0.31	0.37	12.16	20.31	1.24	0.90	1.07	0.05	0.06	1.93	3.22
2-6	67.1	4.74	2.86	3.77	2.59	3.85	2.60	11.36	1.56	0.94	1.24	0.85	1.27	0.86	3.74
2-7	6.0	3.62	1.70	2.99	0.00	2.42	3.38	8.31	3.40	1.60	2.82	0.00	2.27	3.18	7.82
2-8	6.20	2.45	2.23	4.09	0.43	0.35	5.54	8.77	2.30	2.09	3.84	0.40	0.33	5.20	8.22
2-9	5.4	5.57	4.77	7.59	0.61	0.64	10.79	17.93	5.27	4.52	7.18	0.58	0.61	10.22	16.97
2-10	91.1	0.79	0.34	0.45	0.18	0.31	0.55	1.58	0.07	0.03	0.04	0.02	0.03	0.05	0.14
2-11	3.1	2.45	1.96	4.02	0.29	0.29	3.21	8.44	2.38	1.90	3.90	0.28	0.28	3.11	8.18
2-12	4.0	4.38	1.77	3.65	0.11	0.18	2.31	9.80	4.20	1.70	3.51	0.11	0.17	2.21	9.41
2-13	88.9	0.08	0.09	0.13	6.10	6.03	6.22	0.30	ND	0.01	0.01	0.68	0.67	0.69	0.03
2-14	6.9	5.96	5.06	6.71	0.43	0.61	9.41	17.73	5.55	4.71	6.24	0.40	0.57	8.76	16.50
2-15	5.7	4.94	4.15	7.18	0.00	0.76	5.39	16.27	4.65	3.92	6.77	0.00	0.72	5.08	15.33
2-16	5.0	4.12	4.53	6.22	0.00	0.84	2.50	14.86	3.91	4.30	5.90	0.00	0.80	2.37	14.11
2-17	5.4	7.56	5.30	7.30	ND	2.38	13.34	20.17	7.16	5.02	6.91	ND	2.25	12.63	19.09
2-18	3.3	8.12	5.57	7.03	ND	2.70	15.31	20.71	7.85	5.38	6.79	ND	2.61	14.80	20.03
2-19	6.3	14.53	10.57	12.70	0.01	2.61	37.76	37.80	13.61	9.90	11.90	0.01	2.44	35.38	35.42
2-20	6.2	12.00	8.44	10.31	ND	2.47	28.02	30.74	11.25	7.91	9.67	ND	2.31	26.28	28.83
2-21	5.6	8.47	5.52	6.91	ND	2.42	22.04	20.90	8.00	5.21	6.53	ND	2.28	20.82	19.74
2-22	5.0	8.10	5.33	7.35	ND	2.53	13.90	20.78	7.70	5.06	6.98	ND	2.40	13.20	19.74
2-23	6.5	6.34	4.23	6.07	0.92	2.65	9.51	16.64	5.93	3.95	5.68	0.86	2.48	8.89	15.55
2-24	6.3	8.07	5.21	6.89	ND	2.35	16.04	20.18	7.56	4.88	6.46	ND	2.20	15.03	18.91

ND: Not detected

フラクトオリゴ糖合計で約 1.1 倍、遊離糖合計で約 1.2 倍、Suc 濃度で約 2.2 倍高い値であり (No. 2-15, 16)、熱湯抽出の方がやや甘みを感じることに一致した。Suc 濃度増加の原因として、熱湯抽出の際に 1-ケストースが Suc と Fru へ分解したとすれば Suc と Fru どちらも増えるはずであるが、増加は Suc のみで Fru は増加していないことから、熱湯によって Suc の抽出効率があがったためと考えられる。

【謝辞】

本研究は、秋田県 6 次産業化総合支援事業 (平成 27~30 年度) の一部支援を受けて、あきた菊芋プロジェクト (オフィス NORIMAKI、(株)栄物産、食 Navi ステーション、畠山農園、(株)村木組しらかば農園) の協力をいただいで実施したものであり、同プロジェクト会

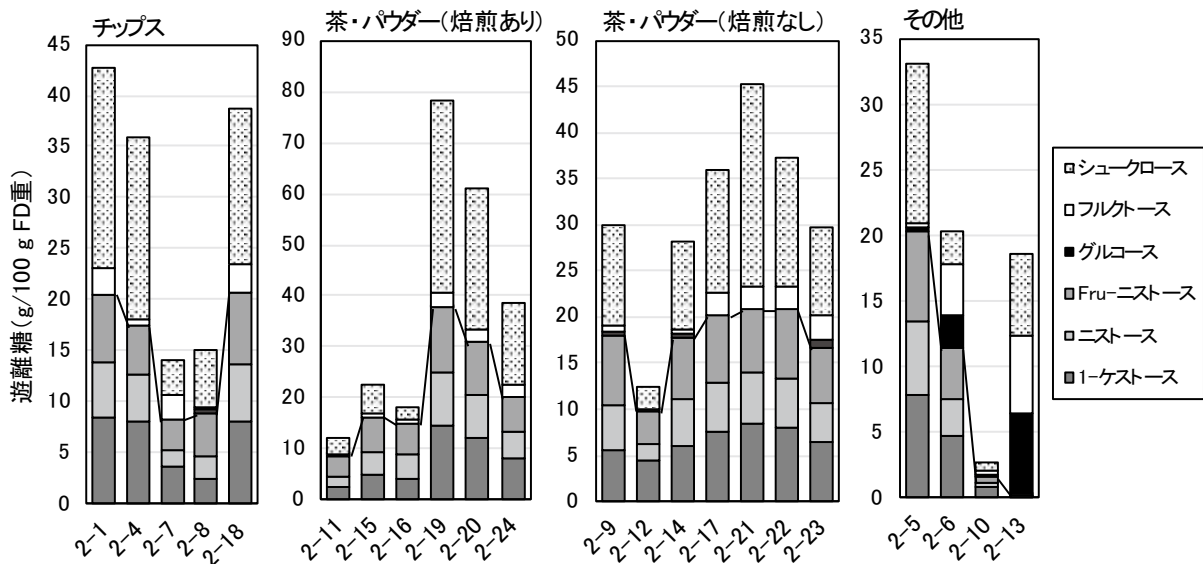


図5 産地別キクイモ生鮮品のFD重量あたりの遊離糖含量
棒グラフを結んだ線は、フラクトオリゴ糖合計値を表す。
試料No. は、表2参照。

員諸氏に感謝いたします。また、討議・助言をいただいた当センター食品加工研究所所長熊谷昌則博士、同研究員 松井ふゆみ博士および、秋田県農業経済課副主幹 武蔵重満氏に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 国立健康・栄養研究所、「健康食品」の素材情報データベース：イヌリン（2020-06-04 更新）<https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail565.html>（参照 2020-8-20）
- 2) 消費者庁、機能性表示食品の届出情報検索（2020-09-02 更新）<https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/>（参照 2020-9-10）
- 3) 今堀和友、山川民夫監修（1984）生化学辞典、p146, 東京化学同人、東京.
- 4) Kocsis L, Liebhard P, Praznik W (2007) Effect of seasonal changes on content and profile of soluble carbohydrates in tubers of different varieties of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *J Agric. Food Chem.*, **55**, 9401-9408, doi:10.1007/s00227-009-1136-y.
- 5) 戸松誠（2016）キクイモ熱水抽出液のフルクトース含有糖質 秋田県総合食品研究センター報告 **18**, 17-20.
- 6) 石黒浩二、横田聡（2018）焙煎によるキクイモ中のポリフェノールおよびイヌリンへの影響 日本食品科学工学会誌 **65**, 7-14, doi:10.3136/nskkk.65.7.

【略号】

DP：Degree of Polymerization（重合度）

Fru-ニストース：Fructofuranosyl-nystose（フラクトフラノシルニストース）

Fru：Fructose（フルクトース）

Glc：Glucose（グルコース）

PAD：Pulsed Amperometric Detector（パルスドアンペロメトリック検出器）

Suc：Sucrose（シュークロース）

アカモクの相対粘度とフコイダン調製法

戸松 誠、高橋佳奈*、中林信康*

(秋田県総合食品研究センター、*秋田県水産振興センター)

Makoto TOMATSU, Kana TAKAHASHI, and Nobuyasu NAKABAYASHI

【要約】

近年、健康効果が注目されたこともあり、全国各地で地元のアカモク（ギバサ）を原料とした商品化が盛んになっている。アカモクの最大の特徴である粘りについて、産地別のボイル刻み加工品のオストワルド粘度計を用いた相対粘度で比較したところ、秋田産が他に比べ高かった。次いで、秋田県男鹿半島の2地区において自生しているアカモクを雌雄別・経時的に採取し、生育場所・時期・雌雄別の分析を行った。相対粘度が最大になる時期は雌株の方が早く、地区によってもその時期は異なっていた。フコキサンチン含量は地区によっては雌雄間で差があり、最大1.5倍ほど雄株が高濃度であること、いずれも成長・成熟が進むほど減少していくことがわかった。

次いで、機能性が多数報告されている褐藻の酸性多糖であるフコイダンをアカモクから高純度で分画する方法を検討し、0.05 N 塩酸中で室温、2時間抽出することでアルギン酸の混入がほとんどない高純度のフコイダンが調製できることがわかった。しかし、この抽出条件では相対粘度が低下したことから、フコイダンは解重合状態であると考えられる。

【緒言】

日本全国に広く分布しているにも関わらず、秋田や佐渡、能登などの日本海側の一部地域でしか食利用されてこなかったホンダワラ科の褐藻アカモクは、秋田ではギバサと呼ばれ、その強力な粘性が愛されてきた馴染みのある海藻であり、雄株と雌株がある。近年、褐藻に含まれるフコキサンチンが、肥満モデル動物の内臓脂肪（白色脂肪）中に脱共役タンパク質 UCP 1 (uncoupling protein 1) を発現させることで脂肪の燃焼を助けることや糖尿病病態マウスの血糖値が正常レベルまで低下することが報告¹⁾されたことをはじめ、アカモク健康効果がマスコミ等で取り上げられたこともあり、全国的に地元のアカモクを利用加工した商品が作られるようになった。そのため、一時的に原料不足となった企業もあったことから、秋田県内のアカモク生産者、加工業者及び流通業者らで2018年に立ち上げた、「あきたのギバサ研究会」では、原料確保、品質評価、高付加価値化のための技術開発や販売強化等を行うことで海藻利用産業の発展を目指すことにしている²⁾。Uwaiらは、日本列島に繁茂するアカモクは遺伝的に異なる幾つかの集団に分かれており、日本海沿岸と関東・東北地方の太平洋沿岸のアカモク集団は地理的に分化していると報告している³⁾。市場関係者からは、秋田県産アカモクは県外産、特に太平洋側産に比べ粘りが強いとの声があることから、その差が遺伝的に異なるためであることや加工法の違いによるためであることなどが考えられている。

秋田県内においてアカモクの品質で最も重要視されているのは「ねばり」であるが、海藻の「ねばり」は「とろみ」、「粘り」、「糸引き性」など様々な特性の総称として用いられており、「ねばり」の評価基準はないものの簡易測定法としてオストワルド粘度計を用いた方法⁶⁾を参考に、アカモクでの適用をめざして最適条件を検討し、秋田県産と他県産の市販品で比較を行った。また、最も「ねばり」が増す抽出条件を検討するため、原藻について至適の抽出温度・時間の検討を行った。得られた至適抽出条件で秋田県内の2地区におけるアカモク生育場所、時期、雌雄別の「ねばり」の変動を追うとともに、フコキサンチン含量の変動も追った。

褐藻類の「ねばり」はフコイダンやアルギン酸に由来するとされる。フコイダンは、フコースを主要構成糖とし、他の多糖類と違って硫酸化フコースを多く含有することを特徴とする細胞間粘質多糖である⁴⁾。免疫力アップや抗がん作用などフコイダンの機能性研究が多数あるものの、その構成糖の組成や配列、分岐、硫酸基の結合位置、数、分子量などがさまざまな分子種であり、さらに種、環境、部位、生育時期によっても異なるとされる。このことが機能性研究がなかなか進展しない要因となっており、由来する褐藻種別に精製したフコイダごとに研究されているのが実状である⁵⁾。本研究では、アカモクのフコイダンについてアルギン酸の混入がない分画法などを検討した。

【実験方法】

1) 試料・試薬

分析に用いたアカモク湯通し品等、市販の海藻加工品は秋田市内のスーパーなどで購入した(表1)。フコキサンチンは Santa Cruz Biotechnology の Fucoxanthin、フコイダンは Sigma-Aldrich の Fucoidan from *Undaria pinnatifida*、アルギン酸は同じく Alginate sodium salt from brown algae low viscosity を用いた。

2) 相対粘度測定方法

市販のアカモクボイル刻み品を含む海藻加工品 1 g に水 19 mL を加え、よく混合後、室温で 30 分静置後、2重ガーゼ濾過した濾液 5 mL をオストワルド粘度計に供し、試料液面が目盛り線を通過する時間の測定を3回繰り返した。相対粘度(η_r)は(1)式で定義されるが、簡易的な測定のため、 $d=d_w$ と近似し、相対粘度を(2)式で算出した。

表1 分析試料のリスト(市販品)

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_w} = \frac{d \cdot t}{d_w \cdot t_w} \dots (1)$$

$$\eta_r = \frac{t}{t_w} \dots (2)$$

η : 試料液の粘度 [g/m³·s]

η_w : 水の粘度 [g/m³·s]

d : 試料液の密度 [g/m³]

d_w : 水の密度 [kg/m³]

t : 試料液の通過する時間 [s]

t_w : 水の通過する時間 [s]

	販売者所在地(産地)	備 考*	入手年月
1	秋田県 (青森、秋田)	アカモクボイル刻み	2019.02
2	秋田県 (秋田、青森)	〃	2018.11
3	秋田県 (秋田)	アカモクボイル刻み、冷凍	2018.07
4	秋田県 (青森、秋田)	アカモクボイル刻み	2018.08
5	秋田県 (秋田)	アカモクボイル刻み、冷凍	2018.06
6	秋田県 (日本海)	アカモクボイル刻み、冷凍	2019.02
7	秋田県 (男鹿)	アカモクボイル刻み、冷凍	2019.02
8	秋田県 (宮城)	アカモクボイル刻み	2019.02
9	宮城県 (三陸)	〃	2017.12
10	宮城県 (韓国)	〃	2018.11
11	宮城県 (中国)	アカモク他海藻 3 種入り調味付け	2019.02
12	新潟県 (日本)	アカモク調味付け	2019.02
13	秋田県 (男鹿)	ワカメ(ボイル)、冷凍	2017.12
14	秋田県 (国産)	ワカメめかぶ(胞子葉)ボイル刻み	2019.02
15	千葉県 (沖縄)	生モズク(解凍)	2019.02
16	秋田県 (秋田)	イシモズク(クロモ)(ボイル)、冷凍	2019.02

*:特に表記のないものは冷蔵

3) 相対粘度の至適抽出条件検討試料の調製

秋田市内スーパーにて購入したアカモク原藻を 30°C で一晩送風乾燥後、粉碎したものに、温度 40~100°C のお湯を加えて 15~90 分間、時々攪拌して抽出した。これを急冷し 4°C で一晩保存後、2 重ガーゼ濾過した濾液を試料とした。

4) 生育場所・時期・雌雄別の相対粘度測定試料の調製

秋田県男鹿半島南磯の台島地区にて、雌雄別に 2019 年 5 月 2 日~6 月 8 日、同じく西岸の戸賀地区にて 4 月 11 日~6 月 20 日まで約 1 週間おきに原藻を採取し、冷凍保存した。これを凍結乾燥(東京理化器械、FDU-1110)後、粉碎(岩谷産業、ミルサー300DG)し、暗所でデシケーター中に保存した。これに 60°C のお湯を加えて 10 mg/mL とし、時々攪拌しながら 60°C で 1 時間加温後、氷冷して 2 重ガーゼ濾過した濾液を試料とした。

5) フコキサンチン測定法

4) で得た凍結乾燥粉碎試料にメタノールを加えて 10 mg/mL とし、室温・暗所で一晩抽出し、10,000 rpm、5 分遠心分離した上清を分析用試料とした。フコキサンチンの定量は、フォトダイオードアレイ多波長検出器(PDA)を接続した HPLC を用いた方法⁷⁾を一部変更して以下の条件で行った。

システム：島津製作所 Nexera X2

カラム：YMC-Triart C18 メタルフリーカラム (1.9 μm, 12 nm) 2.1 × 150 mm

移動相：0.1%酢酸/77% アセトニトリル

流 速：0.3 mL/min

検出器：450 nm (PDA)

カラム温度：室温

インジェクト量：5 μ L

6) 酸性多糖類の電気泳動分析

フコイダンのセルロースアセテート膜電気泳動 (Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis : CAE) による分析法⁸⁾を一部変更して行った。すなわち、6×11 cm にカットしたセルロースアセテート膜 (東洋濾紙、SELECA-VSP) を 0.1 M クエン酸ナトリウムの電極液に約 1 分間浸してから引き出し、余分の水分を除いてから陽極側、陰極側それぞれの端から数 mm 重なるように電極液で濡らした幅 11cm の濾紙をセットする。陰極側の端から 1 cm の位置に 3 mm 間隔、3 mm 幅で 0.15 μ L スポットし、6 mA で 1 時間泳動後、0.5% トルイジンブルーの 3% 酢酸溶液で 1 分程度染色し、目視でバンドが鮮明になるまで水道水で脱色を繰り返した。膜がウェットな状態でポリプロピレン製のクリアポケットで挟んでシーリングし、スキャナーで画像保存した。

【結果と考察】

市販のアカモクボイル刻み加工品の相対粘度は、青森、秋田産原料のもの (図 1 中、1～7、平均 3.00) が他県や海外産原料のもの (図 1 中、8～12、平均 1.55) に比べ高かった。同じアカモクボイル刻み製品であっても製造会社ごとに加工工程が異なるので、これらの差が原料の違いのみに由来するわけではないものの、秋田産原料を含む製品の方が他に比べ相対粘度が高いことがわかった。また、他の海藻加工品 (図 1 中、13～16、平均 2.09) に比べても、秋田産原料アカモクボイル刻み加工品の相対粘度が高いことがわかった。アカモクの最大の特徴である粘りは、秋田県人にとって最も重視する点であり、加工業者も粘りを増すための加工方法を独自に開発し製品化としている。他方、もともと食経験のない他県においては、シャキシャキとした食感を重要視しているため⁹⁾、他の海藻加工品と同じかそれ以下の粘りとなるよう設計しているものと考えられる。

アカモクの粘性を最大に引き出す条件を求めるため、乾燥アカモクを原料に加熱条件を変えて調製した抽出液の相対粘度を等高線グラフで表示した (図 2)。至適条件を示す山は 60°C・60 分と 80°C・15 分以下の 2 つあること、80°C 以上では速やかに相対粘度が低下することが示された。

得られた至適条件 (60°C・60 分) で調製した生育場所、時期、雌雄別アカモクの相対粘度を比較した (図 3)。相対粘度のピークは戸賀地区が台島地区より早く出現すること、雄株のピークは雌株に遅れて出現することが示された (図 4)。アカモク枝先端部に形成された生殖器床の長さは戸賀地区で 4 月中旬に雄株で約 58 mm、雌株で約 47 mm に達してから一旦、20 mm 以上も短くなった後、徐々に長くなり 5/9 には雌株の一部で生殖器床が粘質物で覆われるとともに放卵が確認され、5/13 にはすべてで放卵しており (中林と高橋、投稿中)、5/9 から 5/13 にかけて雌株の相対粘度が急減した時期と一致していた。フコキサンチン濃度は地区によって雌雄間で差があり、戸賀地区では雄株の方が最大で約 1.5 倍高かった (図 4)。また、フコキサンチンは採取した初日が最も高濃度で、成長・成熟が進むほど減少していくことがわかった。金沢は、北海道産褐藻のフコキサンチン含量を調

べた中で2月採取したアカモクで 16.5 mg/100 g（新鮮重）、水分含量 83.8%と報告している¹⁰⁾。これを乾燥重量で表すと、1.02 mg/g となり、秋田産の採取初期の値の方が高濃度であった。

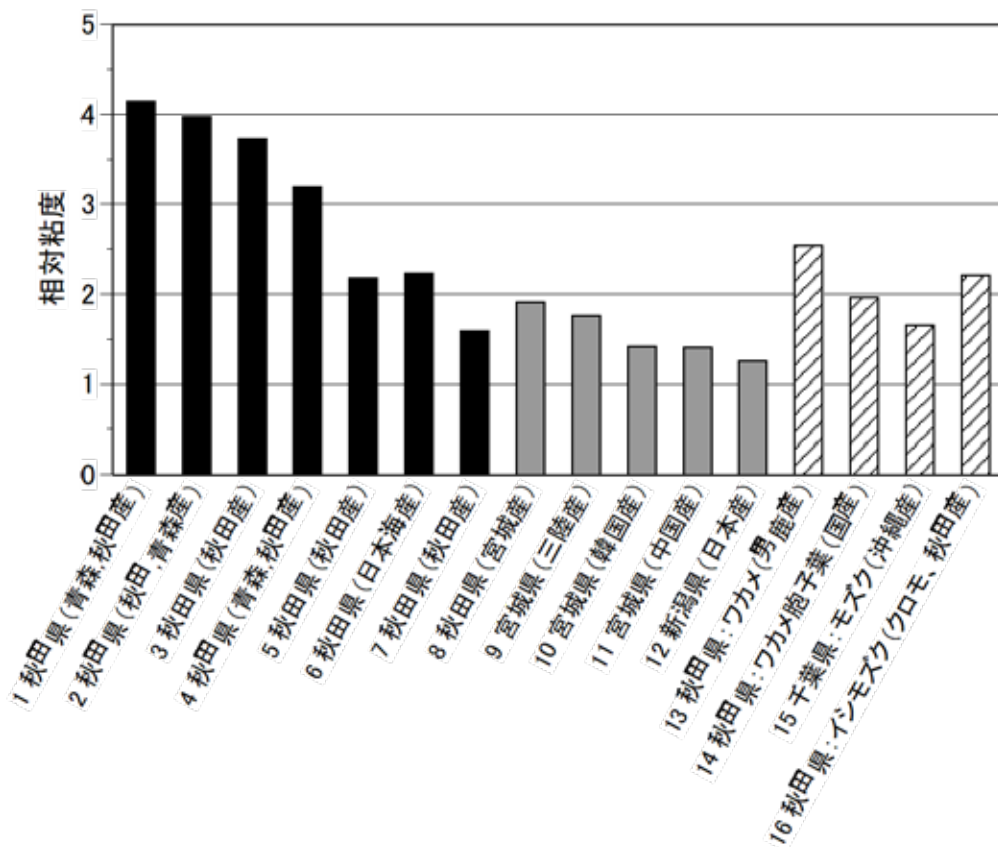


図1 海藻加工品の相対粘度
試料 1～12 はアカモク加工品、13～16 は他の海藻加工品。
試料の詳細は表1参照。

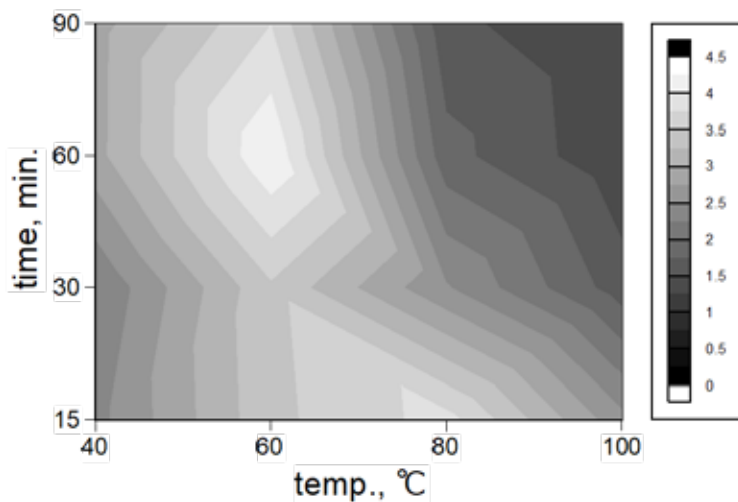


図2 相対粘度の至適抽出条件（温度、時間）

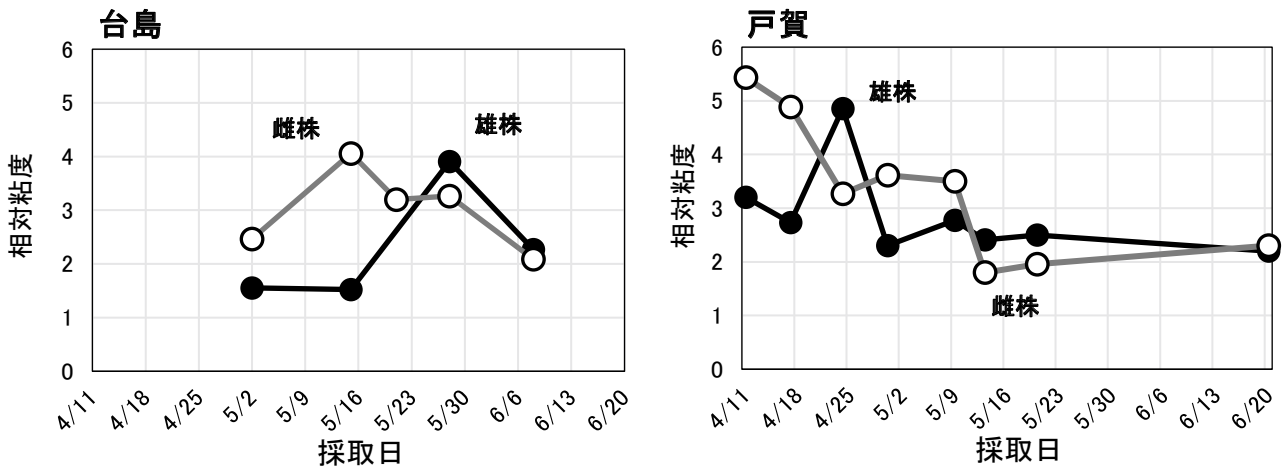


図3 生育場所・時期・雌雄別の相対粘度

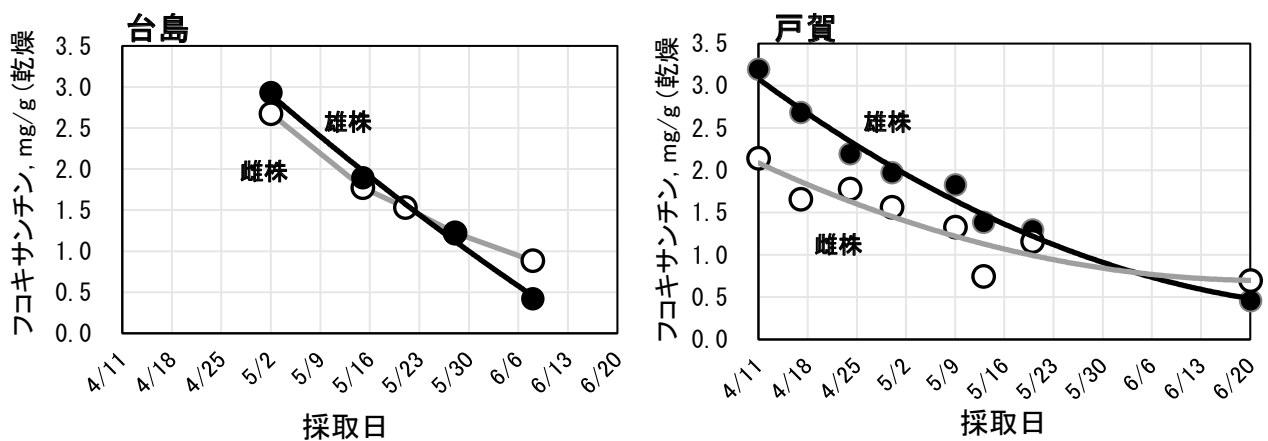


図4 生育場所・時期・雌雄別のフコキサンチン含量

尾島と金沢は、マコンブ乾燥粉末から酢酸ナトリウム (pH 4.5) で抽出したフコイダンには陰イオン交換体に吸着しない画分と吸着する画分が存在し、前者は高粘性の凝集体、後者は低粘性の解集合体で、凝集体は硫酸基の荷電が無効になるような高次構造をとっていると推定している¹¹⁾。また、凝集体フコイダンは加熱によって不可逆的に解集合体になり陰イオン交換体に結合したことから、凝集フコイダンの硫酸基は加熱により表面に露出したとの考えを述べている。図5Aに示した分画法でアカモクから塩酸濃度と加熱条件を変えて調製した抽出液(試料a)の相対粘度は、塩酸濃度が増すほど低下し、加熱によっても低下していた(図5B)。さらに、試料a、カルシウム添加で不溶化したアルギン酸画分(試料c)、これを除いた可溶のフコイダン画分(試料b)、それぞれについてCAE分析した結果、高粘性の非加熱・水抽出液では非常に大きく不明瞭なバンドが複数認められたが、85°C加熱するとクリアーな2つのメインバンドが検出された(図5C)。また、低粘性の0.025~0.1 N塩酸抽出液でも、非加熱の抽出液はクリアーなバンドとして検出できた。フコイダン画分(試料b)のメインバンドは塩酸濃度に比例して薄くなり、加熱抽出した場合は移動度が増していたことから硫酸基が分子表面に現れていると考えられる。アルギン

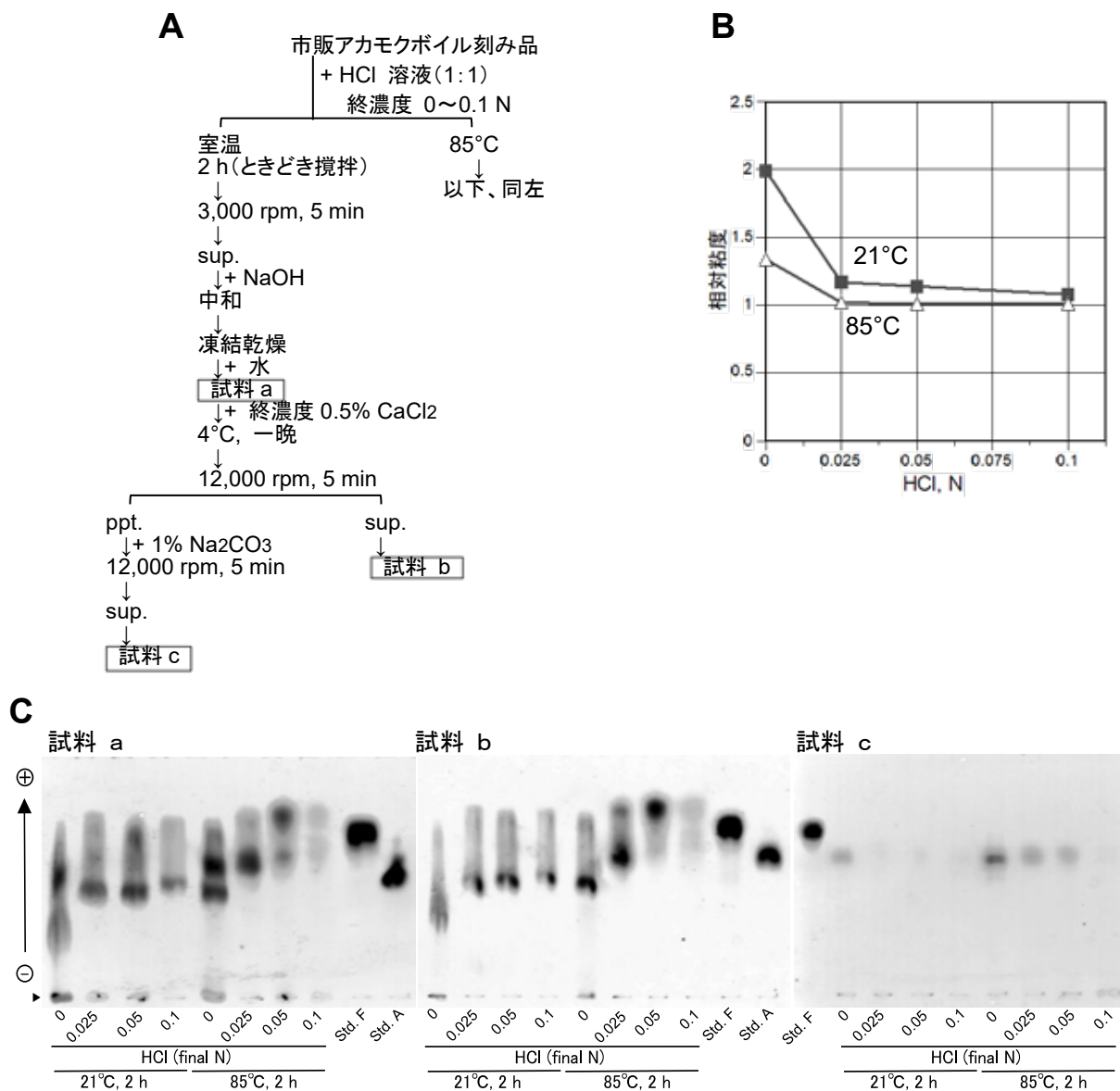


図 5 酸性多糖の分画と分析

分画のフローチャート(A)、試料 a の相対粘度(B)、試料 a, b, c の CAE 分析 (C)。

Std. F: フコイダン、Std. A: アルギン酸

▶: origin

酸画分 (試料 c) も塩酸濃度に比例して薄くなり、加熱した方が非加熱よりもバンドが濃かった。これらより、アカモクフコイダン高粘性の集合体が CAE で明瞭なバンドにならないのはマコンブフコイダンと同様、硫酸基が分子内部に向いているためであると推定される。なお、フコイダンのメインバンドの陽極側にブロードなバンドが認められ、硫酸化度の異なるフコイダンが多数存在していることを示していると考えられる。

非加熱・0.05 N 塩酸抽出がフコイダンのバンドが最も濃く、アルギン酸がほとんど検出されなかったことから、アカモクからの高含量・高純度の解集合体フコイダン抽出法であることがわかった。また、この条件で低粘度化されることはフコイダンの大量調製の操作

性向上が期待できる。今後は、アカモクの一生を通じた相対粘度やフコキサンチン・フコイタン含量の変化を追うとともに、大量調製した解集合体フコイタンの機能性解明、集合体フコイタンの高次構造解明と調製法の検討など未解明分野の取組みが必要であろう。

【謝辞】

本研究は、秋田県漁業協同組合と秋田県総合食品研究センターの共同研究（2018～2019）成果の一部であり、同組合 小西貴史氏に感謝いたします。また、討議・助言をいただいた、あきたのギバサ研究会（秋田県漁業協同組合、大高食品、(株)男鹿ぜん吉、(株)三高水産、武田水産(株)、(株)田沼屋慶吉、椿水産、渉水産、(株)秋田丸魚、(株)男鹿なび、丸水秋田中央水産(株)、秋田県農政部水産漁港課）の会員諸氏に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 宮下和夫 (2008) 海藻カロテノイド, フコキサンチンの多機能性 化学と生物 46, 483-490, doi:10.1271/kagakutoseibutsu.46.483.
- 2) 秋田県総合食品研究センター情報誌 ARIF Letter Vol.24 「ギバサ」 (2019年4月) https://www.pref.akita.lg.jp/uploads/public/archive_0000010320_00/ARIF_Letter_Vol.24.pdf (参照 2020-08-12)
- 3) Uwai S/, Kogame K/, Yoshida G/, Kawai H., and Ajisaka T. (2009) Geographical genetic structure and phylogeography of the *Sargassum horneri/filicinum* complex in Japan, based on the mitochondrial *cox3* haplotype. *Mar Biol*, 156, 901–911. doi:10.1007/s00227-009-1136-y.
- 4) 国立健康・栄養研究所、「健康食品」の素材情報データベース「フコイタン」(2020-06-01更新) <https://hfnet.nibiohn.go.jp/contents/detail750.html> (参照 2020-8-15)
- 5) Fitton H. J., Stringer D. S., Park A. Y., and Karpinić S. N. (2019) Therapies from Fucoïdan: New Developments. *Mar. Drugs*, 17, 571-586, doi:10.3390/md17100571.
- 6) 佐伯宏樹、片山茂 (2014) ガゴメ由来免疫賦活剤およびガゴメ由来の粘性多糖類の抽出方法 特許 5481036号
- 7) 吉本亮子 (2010) ワカメのフコキサンチン、食品中の機能性成分分析法マニュアル集 (四国地域イノベーション創出協議会 地域食品・健康分科会編) https://unit.aist.go.jp/shikoku/food_forum/manual/21T.pdf (参照 2020-9-25)
- 8) 日本健康・栄養食品協会 (2017) フコイタンの確認試験法(製品)、JHFA 品解説書: フコイタン食品 p35-37, 株式会社サンワ、東京.
- 9) 京都府、「丹後の新食感」海藻あかもくパンフレット <https://www.pref.kyoto.jp/suiji/documents/akamoku.pdf> (参照 2020-08-12)
- 10) 金沢和樹 (2012) 生体内で有効な機能を発揮する褐藻カロテノイドのフコキサンチン 日本食品科学工学会誌 59, 49-55, doi:org/10.3136/nskkk.59.49.
- 11) 尾島孝男、金沢和樹 (2015) 海産食物繊維の定量法の確立、研究成果第529集「農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト」(農林水産技術会議事務局編) p144-150, 株式会社福田印刷、福岡.

海藻由来 DPP4 阻害物質について

高橋砂織、畠恵司、中林信康*、

(秋田県総合食品研究センター、*秋田県水産振興センター)

Saori TAKAHASHI, Keishi HATA, and Nobuyasu NAKABAYASHI

【要約】最近、血糖値を調節するホルモンとして消化管ホルモンの一つであるインクレチンが注目されている。インクレチンは、腸管から血中に分泌され、膵臓のβ細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称である。一方、DPP4 (Dipeptidyl peptidase 4) は、インクレチンを分解するセリンプロテアーゼで、DPP4 活性を阻害するとインクレチン分解が抑制され、結果として血中インスリン濃度が一定に保たれることで血糖値の上昇が抑制される (図 1)。本研究では、各種食材抽出液を用いて DPP4 阻害活性を探索した。その結果、秋田県産海藻のツルアラメに強い DPP4 阻害活性を認めた。阻害物質の精製を進めた結果、ツルアラメ由来ポリフェノール類が DPP4 阻害物質であることが明らかとなった。

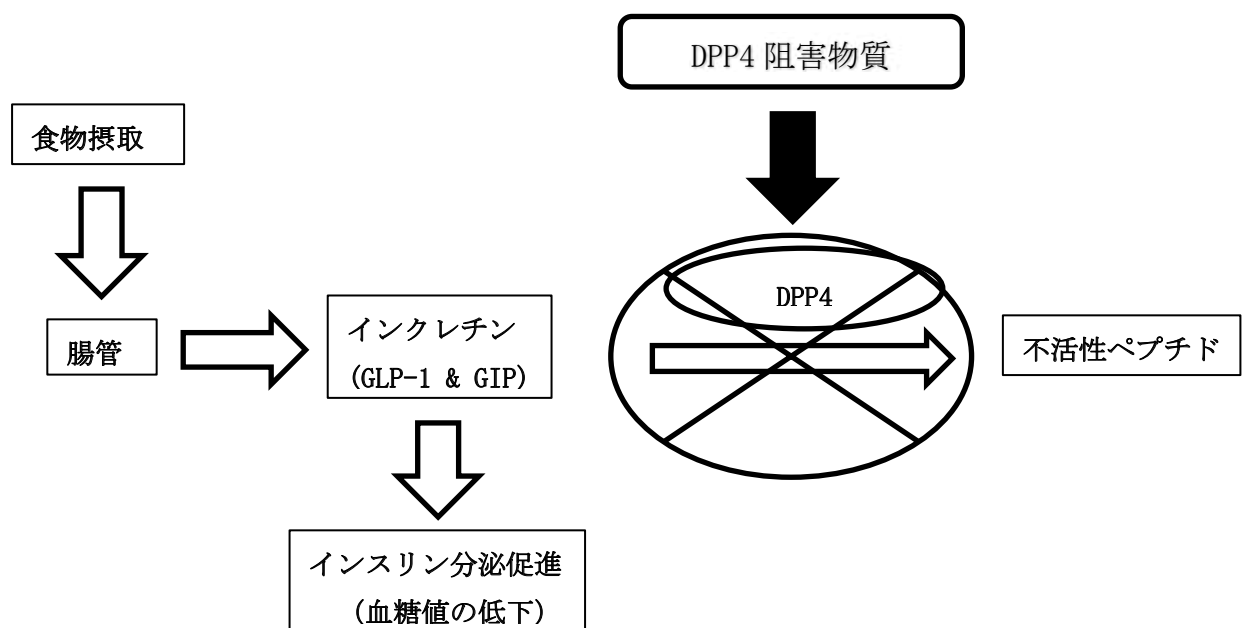


図 1 DPP4 阻害物質の生理的役割

【緒言】厚生労働省の平成 28 年 (2016) 「国民健康・栄養調査」の結果では、糖尿病有病者と糖尿病予備軍は、約 1000 万人と推計されている。また、糖尿病の可能性を否定出来ない者も約 1000 万人と推計されており、両方を合わせると国民の 2 割近くが糖尿病もしくは糖尿病の可能性があり、医療費負担などで大きな社会問題とな

っている¹⁾。糖尿病では、インスリンの分泌が減少してインスリンの作用が弱くなることで、血中グルコース濃度が高い状態が継続し、長期間継続すると全身の臓器に様々な障害が起こってくる。血糖値を調節する消化管ホルモンであるインクレチンは、インスリンの分泌を促進し、血糖値を正常に保つ作用がある(図1)。インクレチンは、食物摂取で消化管から分泌され膵臓のβ細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称で、グルコース依存性分泌刺激ホルモン(GIP: Glucose-dependent insulintropic polypeptide)とグルカゴン様ペプチド1(GLP-1: Glucagon-like peptide-1)が知られている。インクレチンは、血液中DPP4により速やかに分解されることから、DPP4阻害剤の開発が活発に行われ、十数年前から多くのDPP4薬が糖尿病の初期治療薬として臨床で使われている²⁻⁴⁾。一方、DPP4がペプチダーゼであることから、各種タンパク質分解物からDPP4阻害ペプチドの探索も行われている^{5,6)}。我々は、これまで秋田県産食材の機能性探索の一環として、高血圧関連酵素レニンの阻害物質探索を行い、大豆由来サポニン、ウド由来カウレン酸や秋田県産米由来不飽和脂肪酸などを同定している⁷⁻¹¹⁾。また、大豆サポニンに関しては、高血圧モデルラットでその血圧抑制効果が示されている¹²⁾。今回、秋田県産海藻類を対象としてDPP4阻害活性を探索した結果、ツルアラメに強い阻害活性を見いだした。阻害物質の精製を進めた結果、ツルアラメ由来ポリフェノール類が、DPP4阻害物質であることを見いだしたので報告する。

【方法】

(試薬類)

Gly-Pro-MCA及びDiprotin Aは、(株)ペプチド研究所(彩都市、大阪府)製を、また、組換え型DPP4は、Annoba社製(台湾)を用いた。フェノール試薬、没食子酸一水和物やその他の試薬類は、和光純薬製特級試薬を用いた。

(DPP4活性測定法)

これまで、DPP4の活性測定には発色基質であるGly-Pro-pNA(p-nitro aniline)が用いられてきた。本基質は、感度が低いことから蛍光基質であるGly-Pro-MCA(methyl coumarin amide)を基質とした迅速高感度測定方法を開発した。40 µl (1 µl 10 mM Gly-Pro-MCA in DMSO + 39 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, and 0.02% Tween 20: Assay buffer)に5 µlのDPP4(50 ng/ml Assay buffer)及び5 µlの比検溶液(コントロールの場合にはAssay buffer)を加え37°Cで30分間反応後、200 µlの1%酢酸溶液を添加し反応を停止した。その後、励起波長380 nm及び蛍光波長440 nmで蛍光強度を測定した。

(総ポリフェノール定量方法)

ポリフェノールは、芳香環に結合した2つ以上の水酸基を有した化合物の総称である。総ポリフェノール量は、国際標準規格ISO 14502-1に準拠して測定した¹³⁾。具体的には、0.1 mlの標準没食子酸溶液(10, 20, 30, 40, 50 µg/ml)もしくは検定資料に0.5 mlの10%フェノール試薬を加え室温で5分間保持した。これに0.4 mlの

7.5% 炭酸ナトリウム溶液を添加し、室温で 60 分間反応させた後、765 nm の吸光度を測定した。没食子酸の標準曲線から、用いた試料のポリフェノール総量を没食子酸当りに換算した。

(試料の抽出)

ツルアラメを各部位（葉、茎及び根、図 4）ごとに分けて凍結乾燥した後、ミキサーで粉碎した。凍結乾燥粉末試料 5 g に 300 ml のエタノールを加えて、室温で 2~3 時間攪拌後、TOYO No.2 濾紙で濾過した。濾液をロータリーエバポレーターで約 20 ml まで濃縮し、沈殿を遠心分離で除去し、再度ロータリーエバポレーターで濃縮・乾固し重量を測定した。

【結果と考察】

(DPP4 活性測定方法の評価)

今回用いた新規活性測定方法で、DPP4 阻害活性が正しく評価出来るか否かを検定する目的で、DPP4 の代表的阻害剤である Diprotin A を用いて DPP4 の阻害を検討した。図 2 に示すように Diprotin A (Ile-Pro-Ile, Mr =341.45) の濃度依存的に DPP4 活性の低下認められ 50% 阻害濃度 (IC₅₀ 値) は、12.5 µg/ml (36.7 µM) と求められた。この値は、既に報告されている IC₅₀ 値 24.7 µM とほぼ同等であり¹⁴⁾、阻害活性を正しく評価出来ることが分かった。

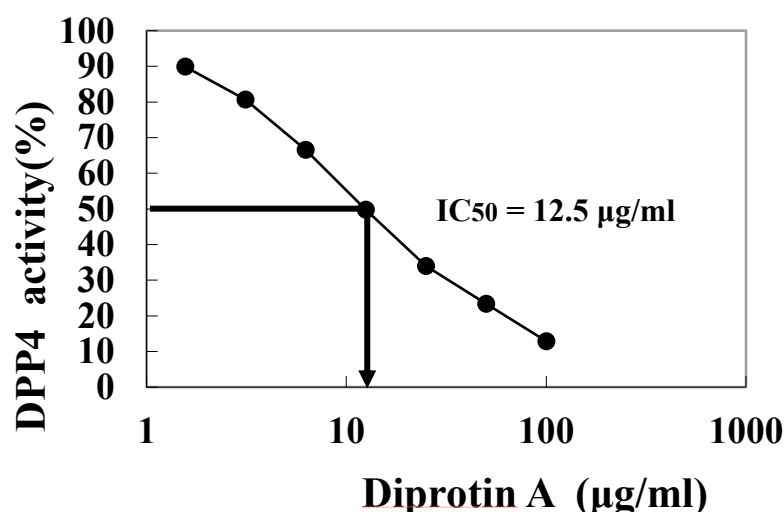


図 2 Diprotin A による DPP4 阻害

(食物由来 DPP4 阻害物質の探索)

これまで、県産の野菜、山菜、キノコ類から多くの機能性物質が同定されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら、海藻類には際立った機能性が見いだされていなかった。今回、当センサーが保有する海藻類のエキスを用いて、DPP4 阻害活性を検討した。その結果、ツ

ルアラメのメタノール抽出液に DPP4 阻害活性を見いだした (図 3)。

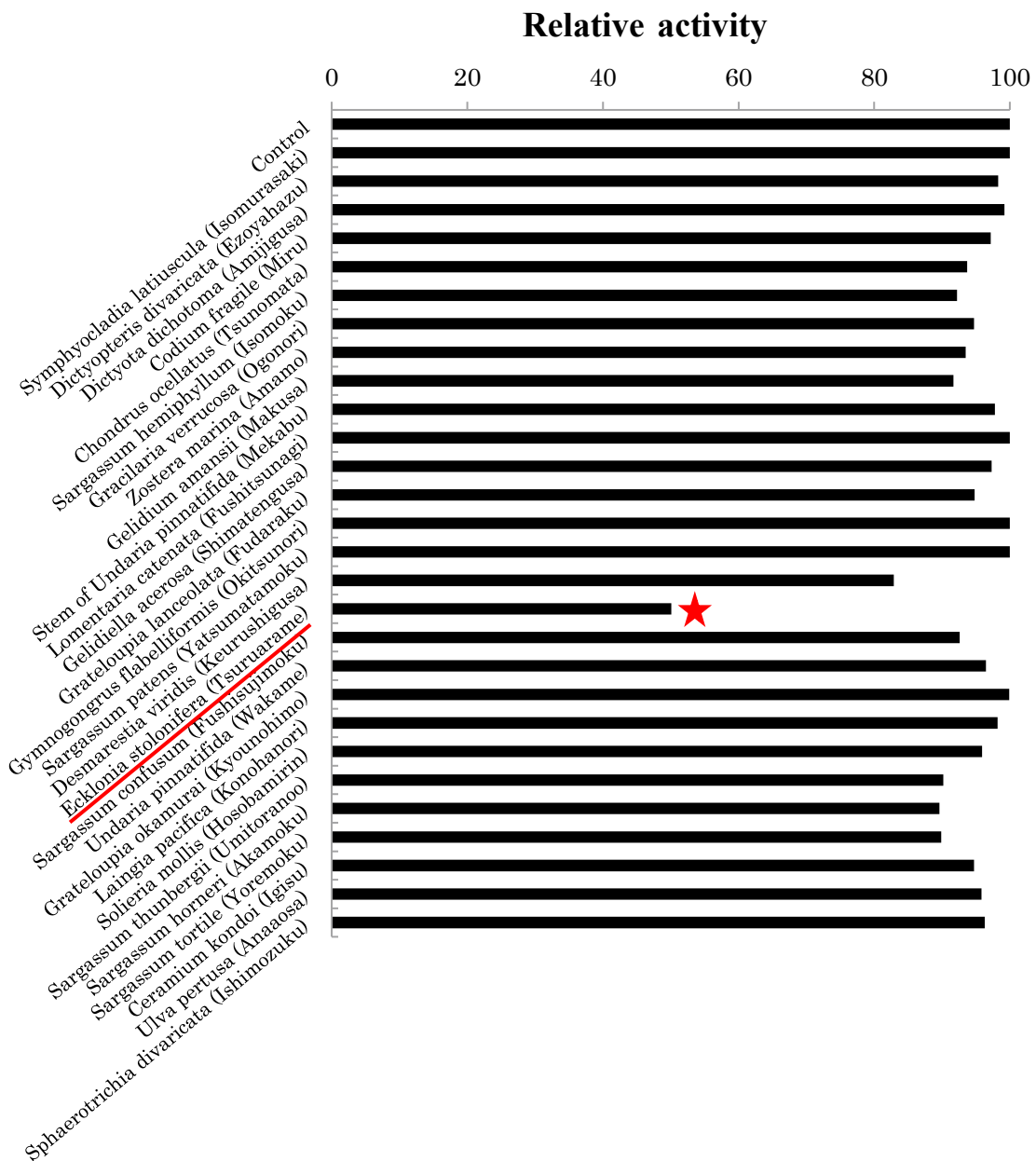
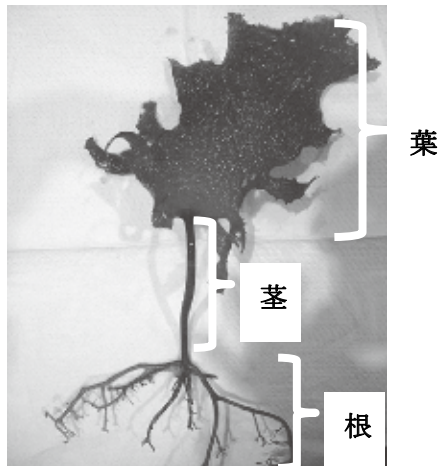


図 3 各種海藻抽出液による DPP4 阻害活性

(ツルアラメ抽出液の DPP4 阻害活性について)

ツルアラメ抽出液に強い DPP4 阻害活性が見いだされたことから、藻体のどの部位に阻害活性が局在しているかを検討した。秋田県男鹿地域で採取したツルアラメ 2 個体 (試料 A 及び B) を葉、茎及び根に分画し、それぞれを凍結乾燥した (図 4)。凍結乾燥試料をミキサーで粉末化し、エタノールで抽出後 DPP4 阻害活性の検定に用いた。



各部位の凍結乾燥重量

	試料 A	試料 B
葉	56.7 g	53.1 g
茎	8.3 g	7.1 g
根	15.5 g	26.7 g

図4 ツルアラメの生体の写真（左、資料 A）及び各部位の凍結乾燥重量

ツルアラメ凍結乾燥品粉末から得られたエタノール抽出物の量は、試料 A の葉が 241 mg、茎が 262 mg、根が 176 mg で、試料 B の葉が 268 mg、茎が 237 mg、根が 216 mg であり、試料 A 及び B とともに各部位からの抽出物量に大きな差は認められなかった。次に、各部位の抽出物による DPP4 阻害活性を測定した。

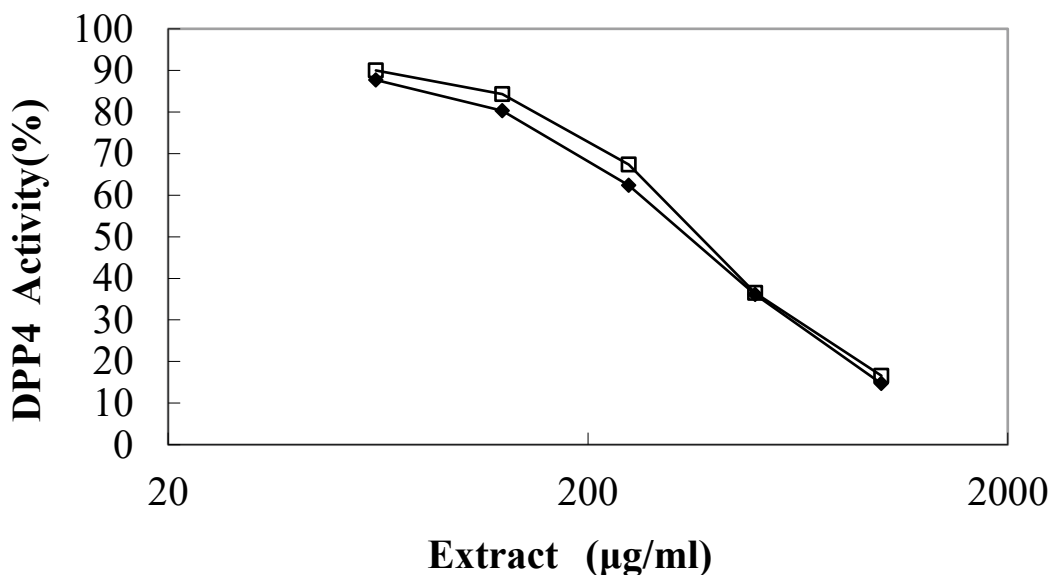


図5 試料 A (◆) 及び試料 B (□) の葉抽出物による DPP4 阻害活性

図5に試料 A 及び B の葉抽出物による DPP4 阻害パターンを示した。各試料とも濃度依存的に DPP4 活性を阻害し、IC₅₀ 値は、試料 A が 345µg/ml 及び試料 B が 375

μg/ml と求められた。一方、試料 A の茎と根の IC₅₀ 値は、340 μg/ml 及び 500 μg/ml、試料 B の茎と根の IC₅₀ 値は、340 μg/ml 及び 640 μg/ml と求められ、ツルアラメ個体の DPP4 阻害物質は、主に葉と茎に存在していることが示された。

(ツルアラメ葉抽出物のクロマトグラフィーによる分画)

ツルアラメ抽出物 (566 mg) を 50 ml の 20%メタノールに溶解し、蒸留水で平衡化した Sep-Pack Vac C₁₈ 35cc カラム(Waters 社製)に添加した。カラムを 15%メタノール 100 ml で洗浄後、100%メタノールで吸着物質を溶出した。溶出液を減圧乾固し、約 200 mg の試料を取得した。得られた試料の IC₅₀ 値は、280 μg/ml と求められた。

次に、得られた試料 20 mg を蒸留水に 2 ml に溶解し、C₁₈ODS (オクタデシルシリカ) カラム (Waters 社製、φ 10 x 300 mm) に添加した。カラムを蒸留水 20ml で洗浄後、0%から 100%メタノールの 90 分間のリニアグラジエントにより、DPP4 阻害物質を溶出した。流速は、2 ml/分/分画とし、280 nm の吸光度と測定するとともに、5μl を用いて DPP4 阻害活性を測定した。

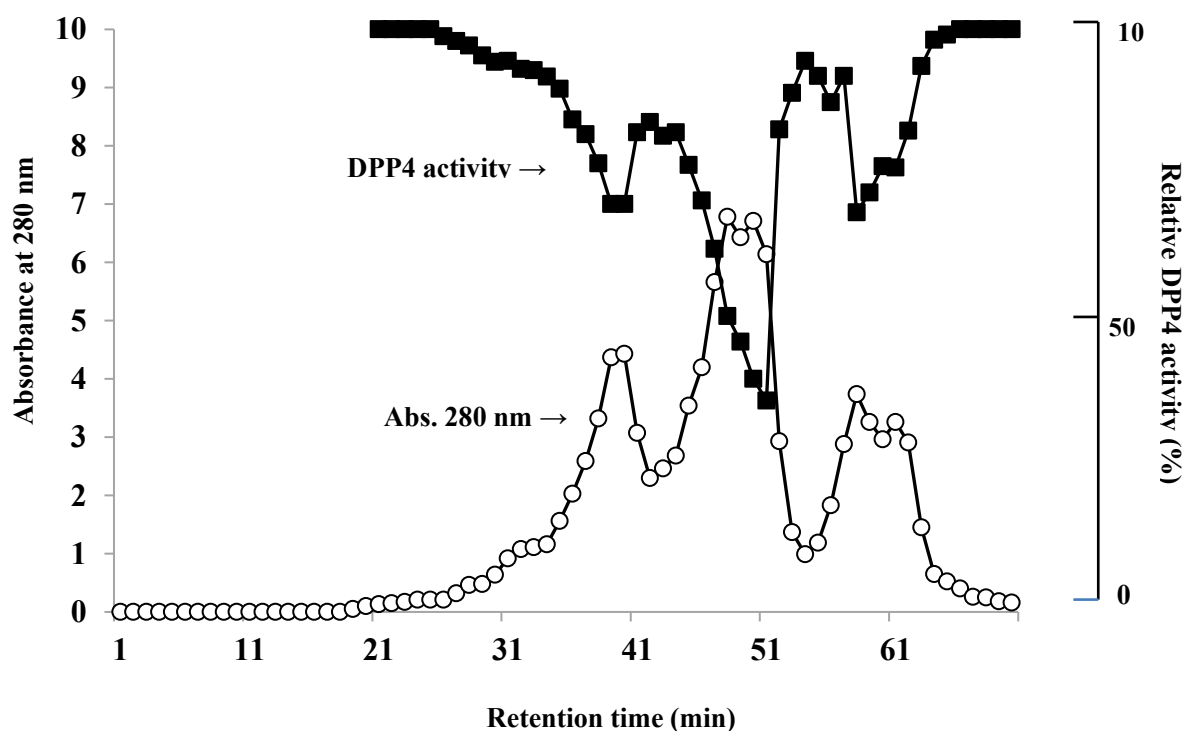


図 6 ODS カラムによる DPP4 阻害物質の分画 (その 1)

70 分間までの溶出パターンを表示した。(○) は、280nm の吸光度を、(■) は、DPP4 阻害活性を示した。

メタノール濃度の上昇に伴い、280 nm の吸光度ピークが複数溶出した。吸光度のピークに対応して DPP4 阻害活性が認められた。280 nm の吸収はフェノール性化合

物の存在を示すことから、公定法により溶出液のポリフェノール量を定量した。図 7 にポリフェノール類の定量結果を示した。

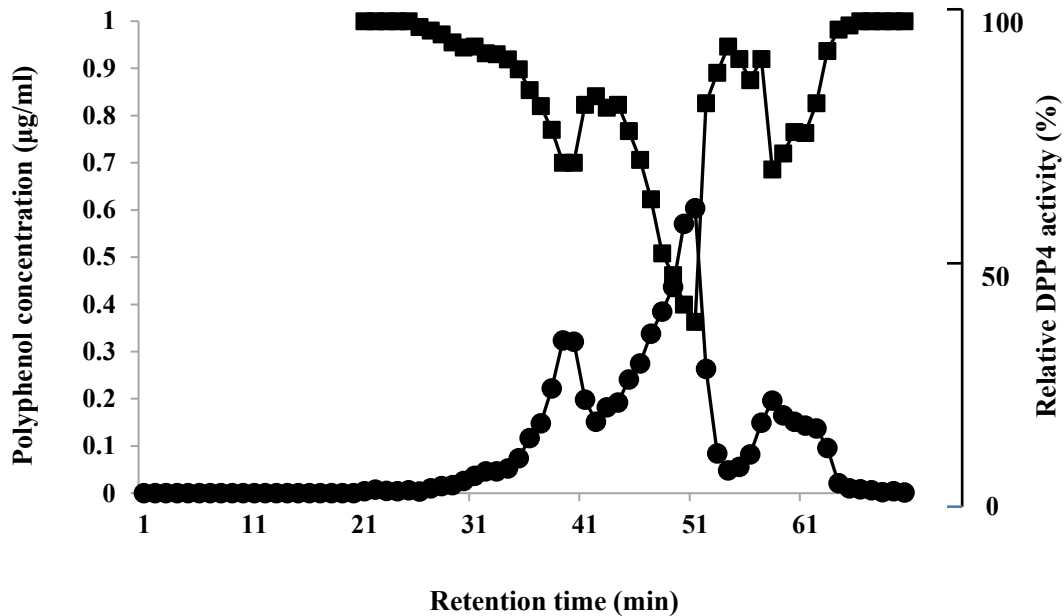


図 7 ODS カラムによる DPP4 阻害物質の分画 (その 2)

70 分間までの溶出パターンを表示した。(●) は、ポリフェノール量を、(■) は、DPP4 阻害活性を示した。

図 6 と図 7 を比較して分かるように、280 nm の吸収とポリフェノール量がほぼ一致しており、ポリフェノール量に対応して DPP4 阻害活性が認められている。すなわち、ツルアラメ由来 DPP4 阻害物質は、ツルアラメに含有されるポリフェノール類であることが示された。今後、各ポリフェノールピークの精製と構造解析により、ポリフェノール類の構造機能相関解析が待たれる。

(各種海藻類のポリフェノール含有量について)

図 8 に各種海藻のポリフェノール含有量を表示した。一見して分かるように、ツルアラメの抽出液が、他の海藻の抽出液に比べて格段にポリフェノール類の多いことが認められた。ツルアラメの抽出液中ポリフェノール量は約 400 µg/mg 抽出物と求められており、抽出物中の約 40% がポリフェノール類である。ポリフェノール類には様々な機能性が知られており、ツルアラメ由来ポリフェノール類も DPP4 阻害で示されたような、糖尿病予防効果が期待される。データには示していないが、ツルアラメの抽出液には高血圧関連酵素であるレニンやアンギオテンシン変換酵素阻害活性なども見いだされていることから、ツルアラメが新たな機能性素材としての可能性があり、今後の展開が期待される。

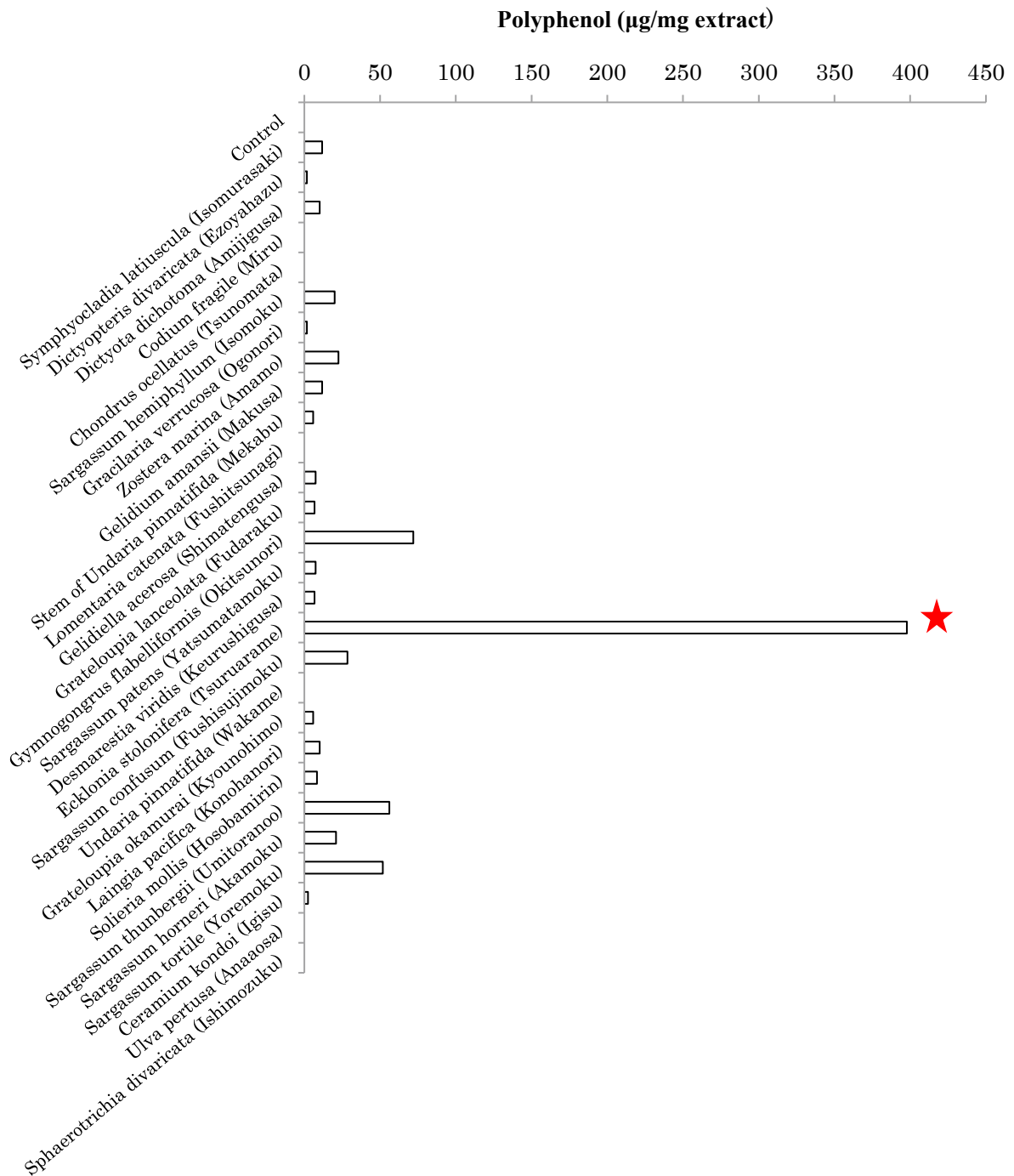


図8 各種海藻抽出物中のポリフェノール含有量

【引用文献】

1. 平成 28 年度「国民健康・栄養調査」
<https://www.mhlw.go.jp/stflhpoudou/0000177189.html>
2. Dicker D. (2011) DPP-4 inhibitors. Impact on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Diabetes Care*, **34**(suppl. 2) S276-S278.
doi:org.10.2337/dc11.s229
3. Karaginanis T., Boura P., and Tsapas A. (2014) Safety of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: a perspective review. *Therapeutic Advance in Drug Safety*, **5**(3) 138-146, doi:10.1177/2042098614523031
4. Gallwitz B. (2019) Clinical use of DPP-4 inhibitors. *Frontiers in Endocrinology*, **10**, Article 389, doi:10.3389/fendo.2019.000389
5. Power O, Nongonierma A. B., Jakeman P., and FitzGerald R. J. (2014) Food protein hydrolysate as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Science*, **73**, doi:10.1017/S0029665113003601
6. Lui R., Cheng J., and Wu H. (2019) Discovery of food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptide: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**,463; doi:10.3390/ijms20030463.
7. Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., and Yamagda S. (2008) Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin is the novel human renin inhibitor in soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **72**(12), 3232-3236. doi:org./10.1271/bbb.80495
8. Takahashi S., Hori K., Hokari M., Gotoh T., and Sugiyama T. (2010) Inhibition of human renin by saponins. *Biomedical Research*, **31**(2), 155-159. doi:org/10.2220/biomed.31.155
9. Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Hokari M., Suzuki N., Kodama, I., Yoshizawa Y., and Gotoh T. (2010) The occurrence of renin inhibitor in rice: Isolation, identification, and structure and function. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74**(8), 1713-1715. Doi:org/10.1271/bbb.100233
10. Takahashi S., Tokiwano T., Suzuki N., Yoshizawa Y., and Gotoh T. (2010) Renin inhibitory activity in rice and cereals. *Journal of Biological Macromolecules*, **10**(3), 83-91.
11. Takahashi S., Tokiwano T., Hata K., Hokari M., Yoshizawa Y., and Gotoh T. (2011) Isolation and identification of human renin inhibitor from *Aralia cordata* (Udo). *Journal of Biological Macromolecules*, **11**(3), 83-89.
12. Hiwatashi K., Shirakawa H., Hori K., Yoshiki Y., Suzuki N., Komai M., and Takahashi S. (2010) Reduction of blood pressure by soybean saponins, renin

inhibitor from soybean, in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74**(11), 2310-2312.

doi:org/10.1271/bbb.100328

13. Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. ISO 14502-1: 2005.
14. Hsu K-C., Tung Y-S., Huang S-L., and Jao C-L. (2013) Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of peptides in porcine skin gelatin hydrolysate. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, INTECH, 205-218.
15. 堀一之、畠恵司、高橋砂織 (2003) 秋田県産農水産物の生理機能性の解明とその応用 ～食材から化粧品素材へ～ (総説) 秋田県総合食品研究所報告、**5**, 61-69.
16. 畠恵司、堀一之、高橋砂織 (2006) 秋田県産農水産物の生理機能性の解明とその応用 ～癌転移抑制物質の探索研究～ (総説) 秋田県総合食品研究所報告、**8**, 27-33.
17. 高橋砂織 (2012) 食物由来レニン阻害物質に関する研究 (総説) 秋田県総合食品研究センター報告、**14**, 26-29.

2. 原著論文（研究ノート）（1件）

1) 米菓の膨化に与える加熱の影響・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

○高橋徹、熊谷昌則、松井ふゆみ

米菓の膨化に与える加熱条件の影響

高橋徹、熊谷昌則、松井ふゆみ
(秋田県総合食品研究センター)

Toru TAKAHASHI, Masanori KUMAGAI, and Fuyumi MATSUI

【緒言】

米菓の品質にはつや等の外観や香味も関与するが、テクスチャー（食感）の寄与が大きく、米菓生地膨化がこの良否を左右するとされている¹⁾。米菓生地の膨化は、焼成中に生地の水分が水蒸気に変化し、その蒸気圧の上昇によって引き起こされ、生地中の水分含量や糊化澱粉の粘弾性変化などに影響を受ける^{2,3)}。また、膨化を向上させる目的で、焼成工程前にホイロと呼ばれる予備加熱工程が設定されることがあるが、この工程は生地温度の上昇による水分含量調整や生地の軟化が膨化を促進し、高品質な米菓を製造するための重要な工程である。しかしながら、予備加熱条件が米菓の膨化に与える影響に関する報告はほとんどなく、勘や経験に頼っているのが現状である。そこで、本研究では実験計画法を用いて予備加熱温度と焼成温度の最適条件を探索することを目的とした。

【実験方法】

実験には粳米（国産）を原料とした薄手の米菓生地（約49×43mm、厚さ約1mm、奥羽食品工業㈱製造）を用いた。塩化ナトリウム飽和水溶液でデシケーター内の相対湿度を平衡化（75.3%、25℃）⁴⁾させ、この中に煎餅生地を約1ヶ月間静置して生地水分を調整した。この時の煎餅生地の水分含量は11.4%であった。煎餅生地の予備加熱は恒温器（DN-600、ヤマト科学㈱）にアルミ製容器に生地を置き、所定の温度で15分間だけ加熱したが、送風の影響を明らかにするために生地を覆った実験区を設けた。焼成にはオーブンレンジ（NE-BS900、パナソニック）を用い、付属の天板に予備加熱後の生地を載せ、所定の温度で8～18分間だけ加熱した。焼成後の煎餅生地の縦、横および厚さをノギスで計測し、計算から求めた容積をその重量で除して見かけの比容積を算出し、膨化の度合いとした。

最適な予備加熱および焼成条件を求めるために実験計画法における応

答曲面計画のひとつである中心複合計画⁵⁾を用いて、本研究では加熱工程に着目して2因子(予備加熱温度および焼成温度)、3

表 1 中心複合計画による因子水準

因子	コード化された因子水準		
	-1	0	1
X ₁ 予備加熱温度 (°C)	40	60	80
X ₂ 焼成温度 (°C)	170	210	250

水準(予備加熱温度: 40、60 および 80°C; 焼成温度: 170、210 および 250°C)の実験(表 1)を実施した。中心点での2回の繰り返し実験を含む合計10回の実験を実施した。各条件とも20枚の生地を使用し、その正規性を Shapiro-Wilk 検定から評価したところ、いずれも正規性から逸脱していなかったため、平均値をそのまま解析に用いた。また、(1)式による応答曲面から比容積が最大になる最適条件を探索した。なお、実験の計画および解析には統計解析ソフトウェア(JMP14.0、SAS Institute Japan)を用いた。

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1X_2 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 \quad (1)$$

【結果と考察】

予備加熱時に生地を覆わずに開放下で加熱した条件を(A)蓋なし、アルミ製容器を生地にかぶせ、送風が直接当たらない条件を(B)蓋ありとする。表 2 に素焼き煎餅比容積の分散分析表を示した。どちらもあてはま

表 2 素焼き煎餅比容積の分散分析表

(A) 蓋なし

要因	自由度	平方和	平均平方	F値	p値(Prob>F)
モデル	5	5630028.1	1126006	32.29	0.0025
誤差	4	139491.4	34873		
あてはまりの悪さ(LOF)	3	135806.7	45269	12.29	0.2060
純粹誤差	1	3684.7	3685		
全体	9	5769519.5			
R ² = 0.976					

(B) 蓋あり

要因	自由度	平方和	平均平方	F値	p値(Prob>F)
モデル	5	2751687.0	550337	32.65	0.0024
誤差	4	67426.4	16857		
あてはまりの悪さ(LOF)	3	19809.9	6603	0.14	0.9253
純粹誤差	1	47616.5	47617		
全体	9	2819113.5			
R ² = 0.976					

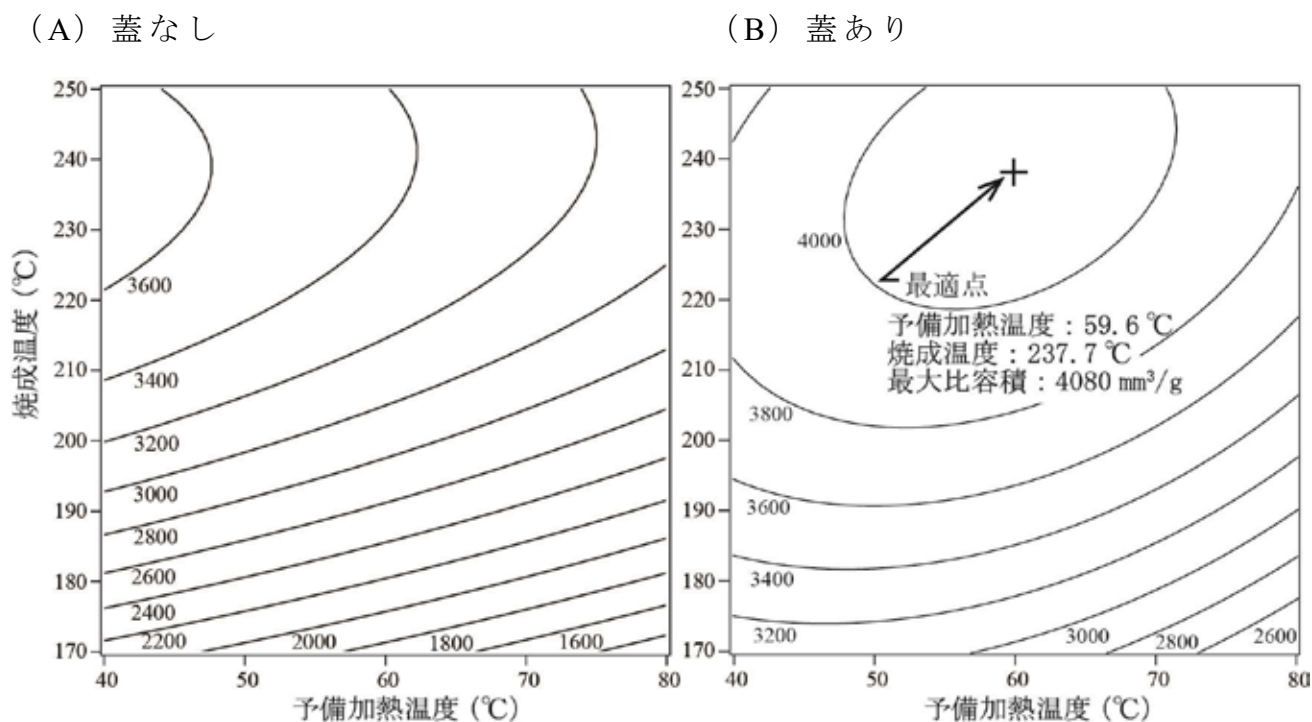


図 1 加熱条件が異なる素焼き煎餅比容積の等高線図

りの悪さはなく、決定係数も高い ($R^2=0.976$) ことから、(1) 式に十分適合すると判断された。(1) 式による予測式から描かれた等高線図を図 1 に示す。条件 (A) は極値を含まない鞍型の応答曲面となり、比容積が最大となる条件は予備加熱温度および焼成温度がそれぞれ 40.0°C および 238.0°C で、このときに期待される比容積は $3693\text{mm}^3/\text{g}$ であった。一方、条件 (B) の場合、山型の応答曲面になっており、最適条件はホイロ温度が 59.6°C 、焼成温度が 237.7°C で、このとき期待される比容積は $4080\text{mm}^3/\text{g}$ であった。そこで、最適条件に最も近い設定値である予備加熱温度が 60°C 、焼成温度が 240°C で生地を焼成した結果、その比容積は $3976\text{mm}^3/\text{g}$ となった。この値は最大予測値 $4080\text{mm}^3/\text{g}$ の 95%信頼区間である $3873\sim 4287\text{mm}^3/\text{g}$ に含まれており、本モデル式によって比容積は予測可能であることを確認した。

煎餅や米スナック菓子生地の水分含量が 11%前後のときに、その膨化率が最大^{6,7)}になる。そこで、本研究では生地水分を 11.4%に調整したが、予備加熱条件によってその比容積も異なった。予備加熱に用いた恒温器は強制対流方式であるため、条件 (A) においては、送風による生地の乾燥が進行すると考えられた。条件 (A) の応答局面には極値が存在せず、比容積が最大となる予備加熱温度は 40°C であり、設定した中で最も低い温度であった。このことは、予備加熱温度が上昇するにしたがって比容積

が小さくなることを意味しており、送風が生地表面へ直接的に当たること
とで、膨化の推進力となる水分が低下したことを示唆した。本研究では薄
い生地を使用した。厚みのある生地を用いた場合にはテクスチャー変
化も含めて顕著な結果になることも予想されるが、今後の課題としたい。

米菓生地の予備加熱や焼成には専用設備を用いるのが一般的だが、生
地の予備加熱には食品用乾燥機、焼成にはベーカリーオープン⁸⁾をそれぞ
れ流用することが想定される。特に、食品用乾燥機を用いる場合には生地
に送風が直接的に当たらないようにすることで、生地の過乾燥による膨
化低下の抑制できる。既存設備の利用でも米菓の品質が保たれば、米菓
製造への新規参入もこれまで以上に容易になることが期待される。

【謝辞】

煎餅生地を恵与していただいた奥羽食品工業株式会社に感謝します。

【引用文献】

- 1) 有坂将美 (1994) 米菓製造における澱粉の性質評価に関する研究
新潟県食品研究所報告 特別号, 1-58.
- 2) 杉本勝之 (1980) 澱粉の膨化に関する研究 日本食品工業学会誌
27, 635-645. DOI: 10.3136/nskkk1962.27.12_635
- 3) Takei R., Maruyama K., Washio H., Watanabe T., and Takahashi T
(2019) Effects of rheological properties of rice dough during
manufacture of rice cracker on the quality of the end products. *J.
Texture Studies*, 50, 139-147. DOI: 10.1111/jtxs.12380
- 4) 平田孝、林徹 訳 (1981) 食品と水分活性 p254, 学会出版センタ
ー、東京.
- 5) 芳賀敏郎 (2014) 医薬品開発のための統計解析第2部実験計画法改訂
版 p229-237, サイエンティスト社、東京.
- 6) 志賀一三 (1973) せんべい製造に関する研究 愛知県食品工業試験所
年報 14, 76-81.
- 7) Chen C.-M., and Yeh A.-I. (2000) Expansion of rice pellets:
Examination of glass transition and expansion temperature. *J.
Cereal Science*, 32, 137-145. DOI: 10.1006/jcers.2000.0332
- 8) 吉井洋一、鍋谷隆史、諸橋敬子、江川和徳 (2003) ベーカリーオープン
を用いた米菓の製造法 新潟県農業総合研究所食品研究所センター研
究報告 37, 1-10.

3. 解説・解説（2件）

- 1) 秋田県内食品企業の女性従事者ネットワーク・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
「あきたふうどミーティング」の取組
○尾張かおる、児玉雅
- 2) 秋田のウイスキーの歴史・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
○杉本勇人、梅川結

秋田県内食品企業の女性従事者ネットワーク 「あきたふうどミーティング」の取組

尾張かおる、児玉 雅

(秋田県総合食品研究センター)

Kaoru OWARI and Masa KODAMA

【要約】

秋田県内の食品産業で働く女性の連携とリーダー育成のため、総合食品研究センター（以下、センターと称する。）が事務局となり、県内食品企業の女性従事者ネットワーク事業を立ち上げた。事業の立ち上げにあたっては、キックオフミーティングとしてセンター研究成果発表会にて事業の概要説明と特別講演を実施し、あきた食品振興プラザと共同で研修会を開催したとともに、県内3地区（中央、県北、県南）で交流会を行った。さらに、名称とシンボルマークを決めるワークショップを開催し、連携体の名称を「あきたふうどミーティング」と決定した。

【緒言】

秋田県では、2018年総理府統計¹⁾によると、高齢化率が全国で最も高い36.4%で、人口減少の加速化が大きな課題となっている。また、国立社会保障・人口問題研究所の予測²⁾では、2045年の秋田県人口は60万1649人となると推計されている。これらのことから、県内企業で働く人が減少していく一方で、それぞれが能力を十分に発揮し、活躍することが今後ますます求められている。

平成28年4月に女性の職業生活における活躍の推進に関する法律「女性活躍推進法」が施行された。また、秋田県でも平成28年度から32年度の5年間の計画期間とした「第四次秋田県男女共同参画計画」が同法と一体的に制定された。このように、女性の社会参画のより一層の促進を図る動きが活発化している。

平成29年秋田県の工業統計³⁾によると、秋田県において正社員で働く女性のうち食料品産業に従事する人数は、平成19年度では901人だったのに対し、平成29年度では1,028人と増加している（従業者30人以上の事業所に関する統計表）。それに呼応するように、山内杜氏組合の杜氏資格試験に女性として初めて合格した酒造メーカーの職員、味噌醤油品評会醤油の部で首席の杜氏表彰を受賞した醸造メーカーの若手女性職員などの個人に加え、女性スタッフによるプロジェクトチームを立ち上げ、新商品開発やイベントを実施しているホテル

など、秋田県内でも女性の活躍事例が多くなってきているものの、その活躍は限られたものとなっている。また、平成 29 年就業構造基本調査（総務省統計）⁴⁾によると、本県の管理的職業従事者に占める女性の割合は 12.0%であり、全国順位は 40 位と低迷している。さらに大都市の大企業とは異なり、秋田県は中小企業が多く職員の人数も限られるなかで、それぞれの事業者が単独で女性職員の能力を伸ばす取り組みを行うことは難しい。

そこで、センターでは以下の取り組みを行うこととした。

- ① 連携支援：本県の食品関連企業で商品開発や製造に関わる女性従事者の連携体（ネットワーク）を形成し、交流会の場を提供する。
- ② 女性のリーダー育成支援：女性従事者のスキルアップ、リーダー育成のための勉強会を実施する。

これらの取り組みにより、個々の能力を認め、伸ばすこと、ひいては老若男女問わず、それぞれが持ち味を発揮できる社会を目指したい。

【事業計画】

1) キックオフミーティング

センターと関連のある県内食品関連事業者の方々を対象に、事業の趣旨と開始を宣言するとともに、特別講演により事業の必要性の理解を得る。

2) 交流会

食品関連事業者等の女性従事者とその活躍を支援する方々（性別を問わない）を対象に、県内 3 か所でネットワークの基礎となる交流会を行う。

3) 研修会

主に管理的な立場の方を対象に、企業が伸びるために今必要なこととして、従業員の能力を生かすための考え方や実践例を紹介する。県内の食品関連事業者の多くが加盟する「秋田県中小企業団体中央会」の協力を得て、同会が事務局となっている「あきた食品振興プラザ」（参加企業 105 社）の研修会を共同で開催する。

4) ワークショップ

ネットワークの象徴となる「愛称」と「シンボルマーク」を選定するために、デザインの専門家を講師とするワークショップを開催する。対象は、3 回の交流会に参加した食品関連企業等の女性従事者やその活躍を支援する方々（性別を問わない）とする。

5) ウェブサイト

センターのホームページ内に、情報提供や情報共有を目的とするウェブサイトを開設する。

【活動結果】

1) キックオフミーティング

センターでは、研究や事業の成果と内容を県民に広く知ってもらうために、研究成果発表会を毎年開催している。令和元年度は、7月4日に「新たな連携の形を探る」というサブテーマで開催した。

本事業のキックオフミーティングは、この会の第1部研究発表に続く第2部において行った。最初に、本事業の主担当研究員が概要説明を行った。続いて(株)あきた総研 取締役 降矢育歩ふりや いくほ氏が「業界の伸びしろはズバリ “女性のひらめき”」という演題の特別講演を行い、「商品戦略には消費行動の8割を占める女性視点が欠かせないこと、そしてこれからはダイバーシティ(多様性)を意識して、時代の変化に対応していくことが重要であること」などを述べた。「男性には男性の、女性には女性の持つ能力があること、たとえば男性は女性より動体視力や空間認識能力が高く、女性は男性より嗅覚やマルチタスク能力、色彩認知力が高い人が多い。これを理解し相互に補い合うことができれば、食品業界はさらに伸びる」という解説は、本事業のスタートに活力を与えるものであった。



図1. 研修会の様子

第3部のポスターセッションでは、秋田県中央地区の企業における、女性従事者が中心となって企画・開発した商品の紹介を行った。

2) 交流会の開催

令和元年7月4日(木)	中央地区	: 秋田市	5社から7人の参加
令和2年1月22日(水)	県北地区	: 大館市	6社から8人の参加
令和2年1月29日(水)	県南地区	: 横手市	7社から11人の参加

交流会は、県内3か所で行った。中央地区は7月開催のセンター研究成果発表会に合わせて、県北地区と県南地区は、1月にそれぞれ単独で開催した。

これまで技術支援等でセンターと接点があった県内食品関連企業に参加者を募った結果、16社から延べ26人が参加した。参加者の性別の内訳と業務内容の内訳は、以下のとおり。(図2、3)

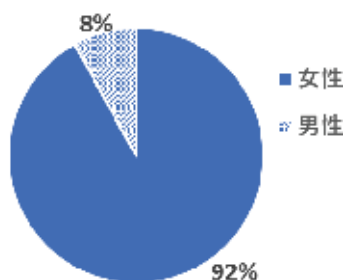


図2. 参加者の性別の内訳

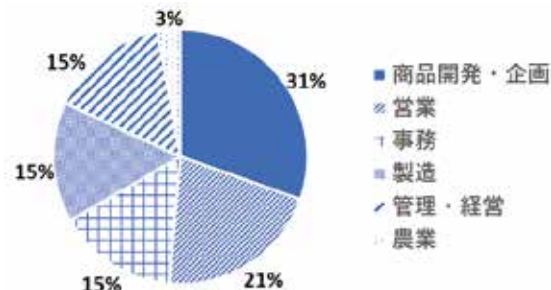


図3. 参加者の業務内容内訳

内容は、中央地区では参加者の自己紹介、県北・県南地区では、参加者の自己紹介とともに各地域の女性リーダーから事例発表をしていただいた。講師は、県北地区では大館市の株式会社陽気な母さんの店 石垣一子代表取締役社長と、県南地区では横手市の一般社団法人浅舞婦人漬物研究会 佐藤征子会長にお願いした。このお二人の活躍のスタートは、ともに男性への遠慮があつて女性が前に出てはいけないという風潮が強く、自分の財布も持っていなかった時代である。彼女らは、女性が経済的に自立することを目指し、地域の風土を生かした組織を女性だけで立ち上げ、さらにそれを継続し現在進行形で発展させている方々であり、まさに女性の視点や発想を活かしてビジネスにつなげている本県の女性リーダーのモデル的存在である。

石垣氏からは、『立ち上げは、平成9年。地元でとれる農産物や蕎麦など加工品をリヤカーで売り歩くスタイルだった。平成12年に、常設直売所開設のため女性100人の署名を集めて市議会に公的資金援助を申し込んだが、7人の男性の陳情が優先された結果、却下された。その時には声をあげて泣いてしまったが、「女性はすぐに諦めるという前例を作ってしまったら、後に続く女性に迷惑をかけてしまうから、絶対諦めてはいけない」と腹をくくり、会員100人が一人3万円ずつ出資することとし、その後4年かけて常設直売所をスタートさせた。』というお話があつた。

その後、「会社組織にしてからある部門が赤字になってしまった。それは、社内で一番の高齢者が担当する部門であつた。どうしたものか悩んだ末、会社からその部門を切り離し独立採算制にしたところ、本人たちのやる気が違つてきた。仕事のスピードは若い人のように手早くできないけれども、高齢者だからこそできる丁寧な仕事ぶりや就業時間の見直し等の工夫が功を奏して、お客様に喜ばれるようになり、売り上げが以前より増えて、会社もその部門も黒字になつた。」との話があり、ピンチを切り抜け笑顔に変えたリーダーの決断とその結果に、参加者全員が大きくなつた。



図4. 交流会(中央地区)



図5. 交流会(県北地区)

佐藤氏からは、「昭和 45 年は減反政策が打ち出された年で、県南地域に多い米農家にとっては収入減少が見込まれたため大きな痛手であった。当時、県南では自家消費用の野菜を作り、自分たちで食べるための漬物づくりをしていた農家が多かったため、現在の浅舞婦人漬物研究会の前身である農協婦人部では、各農家の余剰野菜を使って漬物の製造販売をしようと考えた。運転資金として一口 2 千円の出資案を考案したが、当時の農家では 2 千円というのは個人では捻出することが難しい金額だったため、各農家の男性たちはこの案に猛反対した。けれどもこのままではいけないと考え、当時の農協婦人部員 250 人から賛同を得て、浅舞婦人漬物研究会を立ち上げた。野菜の生産と一次加工までを周辺の農家に依頼し、それを買って農協婦人部が漬物に加工していたのだが、発足当時は一次処理方法がバラバラで品質が一定しなかった。そこで漬物の勉強会を何度も行って一次処理方法を統一し、それを各農家に徹底してもらった結果、品質を安定させることができるようになった。」という話があった。

新商品開発に関しては、「酒粕を使用した粕漬けと、各家庭にあった味噌を使った味噌漬けが発足当初からの 2 枚看板で、現在も売れ筋トップと 2 位。粕漬けは手間がかかる分非常に高級品であるが、それ以外にも新商品開発が必要と考え、会の内部で新商品開発コンクールを毎年行ってきた結果、商品数は 30 品目まで拡大した。新商品開発コンクールは、現在も毎年行っている。」と紹介された。そのほか、「シーラーがない時代にろうそくで袋を密閉し、ホッチキスで値札をつけていたことがあったが、それを持って商談会に参加したところ、見かねた他の漬物業者から指導を受けたこともあった。」などといったエピソードも紹介された。



図 6. 交流会 (県南地区)

交流会終了後のアンケートで参加者から寄せられたコメントを見ると、「女性は男性の言うとおりにするのが当たり前の時代から、女性がお金を稼ぐまでの苦勞された歩みに感動した。」「心で思っているだけでなく、それを口に出して意見を言うことも大事である。良いものを生み出すきっかけとなる。」など、新たな「気づき」を得られた参加者がいた。

参加者の自己紹介では、自社の看板商品や自分のかかわっている仕事の紹介をもらった。他企業の方の話を「聞く」ことも、自分の仕事や思いを「語る」ことも、参加者にとって非常に新鮮な体験だったようである。「女の人が多く、話しやすかったが、男性にも(特に管理職)聞いてほしい気がした。」「自社以外の人と話すことで、新たな視点を得られた。」「社内に籠っていて行き詰まりを感じていたが、交流会をきっかけに何か打破できそうだ。」といったコメントがア

ンケートに寄せられた。

食品製造には、原料はもちろん、調味料などの資材が必要であり、それを販売するには流通が必要であるが、そのようなメンバーが一堂に会し、仕事を紹介し合うことで、今まで目に見えなかった繋がりが目に見えるネットワークになったように感じられた。

3) 研修会の開催

令和元年 11 月 26 日(火) 第 2 回あきた食品振興プラザ研修会

1. ワークライフバランス&令和時代の管理職『イクボス』のススメ

講師：合同会社あきたこまちネット ほんだ まきひろ 本田正博氏

2. サトーグループのダイバーシティの取組みと販路拡大について

講師：株式会社サトー仙台支店第一営業グループ課長 たなか じゅんこ 田中順子氏

女性活躍には、企業の経営者の理解と協力が不可欠である。そこで秋田県中小企業団体中央会の協力により、あきた食品振興プラザ会員(主に経営者)のための研修会を 11 月 26 日に共同で開催した。講師二人から「育児する男性や働く女性の環境や意識の改革」はもちろん、それを支える「上司の意識改革の重要性」について、さらには「性別にかかわらず各自がパーソナリティを伸ばす職場づくりが重要」であることをそれぞれの経験を交えて語っていただいた。参加者は管理的立場にあり、かつ女性活躍の推進に意識の高い方が多く、共感をもって聞いていただけた。

4) ワーキンググループの活動

活動の象徴となる愛称とシンボルマークを、令和 2 年 2 月 13 日(木) ワークショップで決めることとした。しかし、交流会参加者が一堂に会することが難しかったため、事前にメールにより愛称案を募集し、投票により意見の集約を行った。多くの交流会参加者が意見を述べ、集まった愛称案は最終的に 38 個となった。ワークショップでは、



図 7. ワークショップ

参加可能であったメンバーが投票結果を基にしながら、さらに交流会の雰囲気や世の中の流れ、ダイバーシティの観点など幅広い分野を検討し、議論を重ねた。その結果、当日の参加者の意見が一致して選ばれた愛称が「あきたふうどミーティング」である。「ふうど」は「food」と「風土」の二つの意味をあわせ持ち、地域食文化の交流ができる場所をイメージするというものである。

シンボルマークの候補は2つあったため、愛称が決定した後、これについても投票を行った。その結果、「ペロリ」マーク（図8）に決定した。デザインを担当した Little A の鎌田あかね氏（秋田市在住デザイナー）による「美味しいものを食べて満足している舌をイメージ」したマークであったのだが、投票に参加したメンバーからは「風土のイメージがある」や「人のつながりを感じさせる」といった意見もいただき、交流会で生まれたネットワークの意識が表出したことを感じる事ができた。



図8. 愛称とシンボルマーク

5) ホームページによる周知

センターのホームページ (<http://www.arif.pref.akita.jp/>) 内に、「あきたふうどミーティング」公式サイトをオープンさせる予定で、現在準備を進めている。このサイトでは、メンバーの交流や開発商品の紹介などのほか、あきたふうどミーティングのイベントの紹介や今後の活動報告なども行う予定となっている。

【今後の予定】

「あきたふうどミーティング」では、交流会や食品プラザと共同の研修会を今後も実施したいと考えている。アンケートで人気があった「秋田の食文化」に関するセミナーのほか、メンバーが働いている企業の工場を相互に視察・見学するなどして、さらなるネットワークの強化を図りたい。また、センターの研究課題とも連携した活動を行う予定である。今始まった交流が、近い将来、秋田県の食品関連業界にとって力強い絆となり、発展の礎となることを切に願っている。

【引用文献】

- 1)内閣府、第1章 高齢化の状況（第1節 4）（更新時不明）
https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2019/html/zenbun/s1_1_4.html（参照 2020-10-1）
- 2)国立社会保障・人口問題研究所、日本の地域別将来推計人口（平成30（2018）年推計）（平成31年2月18日）
http://www.ipss.go.jp/pp-shicyoson/j/shicyoson18/6houkoku/houkoku_3.pdf（参照 2020-10-1）
- 3)秋田県、工業統計調査結果（平成29年）（平成30年10月18日）
<https://www.pref.akita.lg.jp/pages/archive/36894>（参照 2020-10-1）
- 4)総務省統計局、平成29年就業構造基本調査の結果（平成30年7月13日）
<https://www.stat.go.jp/data/shugyou/2017/index2.html>（参照 2020-10-1）

【謝辞】

本事業の一部は、「公益財団法人伊徳地域振興財団」の助成を受けて行われました。成果発表会において特別講演をしていただいた(株)あきた総研・降矢育歩取締役、交流会で進行を担当していただいた公立大学法人秋田県立大学・吉尾聖子コーディネーター、研修会で講師を引き受けていただいた合同会社あきたこまちネット・本田正博代表社員および(株)サトー仙台支店第一営業グループ・田中順子課長、交流会で貴重な経験をお話しいただいた株式会社陽気な母さんの店石垣一子代表取締役社長、および一般社団法人浅舞婦人漬物研究会・佐藤征子会長、「あきたふうどミーティング」のシンボルマークのデザインを考案していただいた Little A・鎌田あかね氏には心より感謝申し上げます。

また、研修会を共同で開催していただいた秋田県中小企業団体中央会様に感謝いたします。

最後に、本事業の設立・運営にあたり、センター職員諸氏の協力を得ました。特にご尽力いただいた奥山澄子元センター企画管理室長（現県生活センター所長）、嘉藤佳奈子元センター企画管理室長（現県被災者受入支援室長）、熊谷昌則センター食品加工研究所長および樋渡一之企画班長の諸氏に感謝いたします。

秋田のウイスキーの歴史

杉本勇人、梅川 結

(秋田県総合食品研究センター)

Hayato SUGIMOTO and Yui UMEKAWA

【要 約】

ジャパニーズウイスキーの人気の国内外で高まっている。新しいウイスキー蒸溜所が日本各地にでき、クラフトウイスキーへの参入が多くなった。昭和初期にも多くのメーカーがウイスキー製造に参入している。当時は戦後の酒不足を補うため、全国にクラフトと言うべき地ウイスキーメーカーが20~30社あった。その頃、秋田でも大成酒造株式会社と両関酒造株式会社がウイスキーを製造していた。また“大雄村史”によれば、秋田から泥炭（ピート*1）を取り寄せたウイスキー会社があったという。秋田ではどのようなウイスキーが製造され、どこへピートを提供していたのか。現存する資料と取材等の調査から、その実態を考察した。

1. 緒 言

現在、世界中でウイスキーがブームとなっている。日本産のウイスキー、すなわちジャパニーズウイスキーの人気の国内外で高まっている。1980年代にウイスキーは「日本の国民酒」と言われるまでに成長し、地方の酒造メーカーもウイスキーづくりに参入し、「地ウイスキーブーム」が起きた。しかし、昭和58（1983）年をピークにウイスキーの消費は減少に転じ、ジャパニーズウイスキーは以降、四半世紀にわたって低迷に苦しむことになった^{1, 2)}。平成12（2000）年以降の燻製ブームやシングルモルトウイスキーの人気上昇と共に、平成20（2008）年にはトリス・角ハイボールの人気の再燃し、平成26（2014）年のNHK朝の連続ドラマ「マッサン」の放送で、その消費はV字回復してきた。その後、新しいウイスキー蒸溜所が日本各地にでき、クラフトウイスキーへの参入が多くなった。ジャパニーズウイスキーの活況は大手メーカーだけが担っているわけではなく、このクラフトウイスキーも重要な役割を担っている。

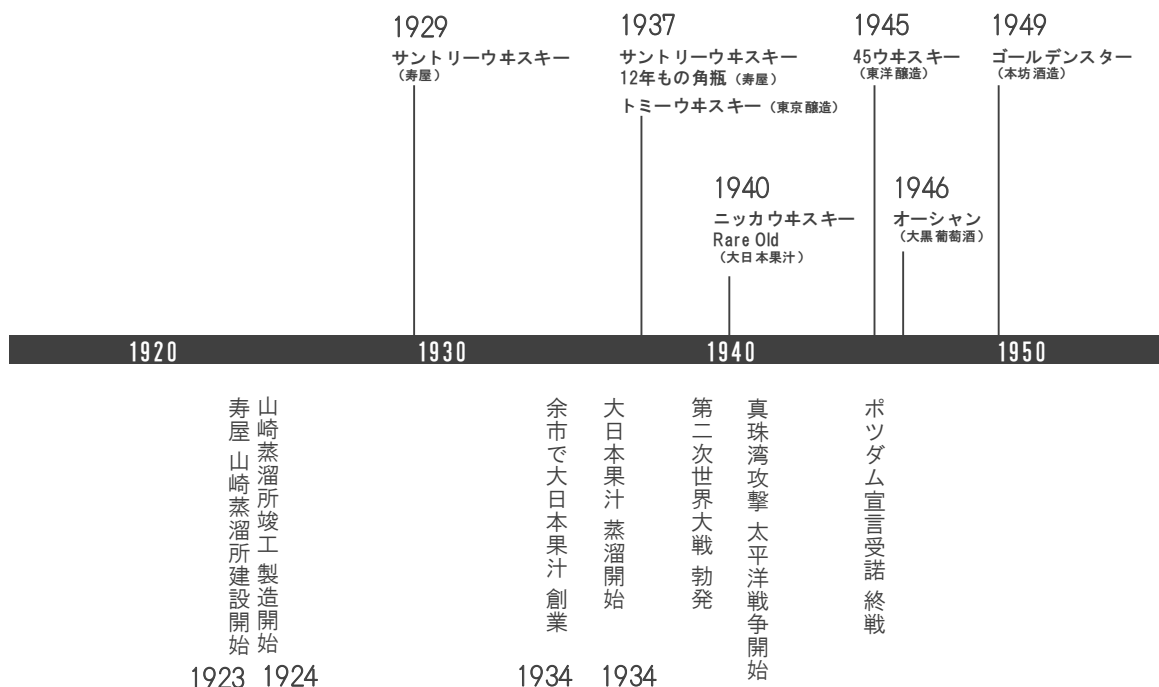
日本にウイスキーが伝えられたのは、江戸時代末期の嘉永6（1853）年、ペリー提督が来航した「黒船来航」の際とされている。この時にスコッチウイスキーとアメリカンウイスキーが持ち込まれたとされており、交渉に当たった日本側の役人や通訳にこのウイスキーが振舞われていた。明治期に本場のウイスキーも輸入品として入ってきたが、舶来嗜好の流行により、アルコールに香料や砂糖などを加えた模造ウイスキ

ー（イミテーションウイスキー）*² がつくられるようになった¹⁻³）。

表1に示したように、本格的なウイスキーづくりは1920年代に入ってからで、大正12（1923）年に株式会社寿屋（現サントリー株式会社）の鳥井信治郎が、本格ウイスキーの製造を企画した。寿屋は、京都府と大阪府の境に位置する山崎に蒸溜所を建て、日本人として初めてスコッチウイスキーの製法を学んだ竹鶴政孝を初代所長に迎えた。そして昭和4（1929）年に、国産ウイスキー第1号となる「サントリーウキスキー」（白札）が発売された^{1, 2}。多額の投資と長い年月を要した「白札」であったが、清酒保護時代であったため売れ行きが悪く、スコッチ独特の燻製香が当時の日本人になじみが少なく、評判も芳しくなかった。また、ジョニーウォーカーの赤（5円）に比べ、白札は4円50銭と高価であった²⁻⁵。後に鳥井は、スコッチイミテートの道を脱し、独自の方向を目指して進み始めた⁷。そして日本人の味覚に合うウイスキーとして、昭和12（1937）年に「サントリーウキスキー12年もの角瓶」（現在のサントリー角）をリリースした^{1, 2}。一方で竹鶴は、スコッチに夢を追いつづけ、鳥井との約束どおり、昭和8（1933）年に寿屋を退社し、昭和9（1934）年に大日本果汁株式会社（現ニッカウキスキー株式会社）を創業した⁴。2年後にウイスキーの製造を開始し、昭和15（1940）年に「ニッカウキスキー Rare Old」を発売した^{2, 5}。

この他にも、昭和12（1937）年に東京醸造株式会社が「トミーウキスキー」、昭和20（1945）年に東洋醸造株式会社（現旭化成株式会社）が「45ウキスキー」、昭和21（1946）年に大黒葡萄酒株式会社（現メルシャン株式会社）が「オーシャン」を発売している¹。その後、本坊酒造株式会社顧問の岩井喜一郎が、竹鶴から受取ったスコットランドでの「実習報告」（竹鶴ノート）を基に、マルスウイスキーの原点となる「ゴールドンスター」を昭和24（1949）年に完成させている。

表1 ジャパニーズウイスキー年表（1920 - 1950）



当時は戦後の酒不足を補うため、全国にクラフトと言うべき地ウイスキー企業が20～30社あったが、そのほとんどは軍用燃料アルコール等を原料としたイミテーションウイスキーを製造していた。そのためか、地方で製造されるウイスキーについての情報はほとんど表に出てこない。少ない資料を基に、秋田の地ウイスキーについて調べて見ると、日本のウイスキー史にインパクトを与えるほどの興味深い事実が見えてきた。

“秋田県酒造史 技術編”によると、秋田のウイスキーは「ポットスチルの蒸溜釜を設置し、檜樽まで購入し、モルトによる本格ウイスキーの製造を試みた」という⁸⁾。つまり秋田には、本格ウイスキーを製造していた企業が存在していたのである。また“大雄村史”によると、ウイスキー製造に必要なピート*1を秋田から取り寄せたウイスキー会社があったという⁹⁾。大手企業でなければ為し得なかった本格ウイスキーを、秋田で製造することができたのはなぜだろうか。それは、どのようなウイスキーだったのか。そして、秋田のピートはどこへ提供されていたのだろうか。現存する資料と取材等の調査から、その実態を明らかにしてゆく。

2. 秋田での本格的なウイスキー製造

昭和21(1946)年2月13日付けの秋田魁新報に、秋田で完成した洋酒について記載されている。



すばらしい洋酒 大麥等を原料にし 大成酒造で完成 だが縣民には一滴も入らぬ

相次ぐお酒減石に銘醸地秋田は大きな衝撃に見舞はれ、業界が真剣な打開策を練っているがお酒の原料は米でありこれを使はぬとせば合成酒の醸造か洋酒の製造に轉換するより方法はない南秋飯田川大成酒造會社では戦時の酒造規制に對應し逸早く合成酒生産を目的に太平山本舗小玉合名會社を親工場となし優良な合成酒をつくり市場へ送ると同時に洋酒の研究に着手し、阪大醸造科出身の若き杜氏小玉健吉（二七）君が復員以來最後の活を入れサントリーウヰスキーの第三級を凌ぐ程のウヰスキーとブランデーが出来たので、愈よ日本雑酒共同組合の手に移しラツキーウヰスキーと銘打ちアルコール成分不足に喘ぐ巷へお目得する

大麥を主原料としたものへ玉蜀黍、切干甘藷で作った酒精を配合加味した酒精分四十二度の濃厚度であり

本年は二百五十石醸造の豫定だが原料の入手と睨み合わせ來年度から千石まで作る準備を進めたるも折角本縣で出来た優秀洋酒が既存の配給統制のため縣民へ一滴も入らぬといふ窮屈な問題が起き、洋酒マニヤをがっかりさせている、雑酒統制のきびしい規則に製品の全部が共販組合に押へられ原則として六大都市以外絶対配給してはならぬといふのだ、せめて地元で作った何割かを地場配給にふり向けて欲しいと目下同社と税務署が共販組合に對し折衝中であるが希望が實現しきうである

同社配造部長小玉確治氏 配合調熱など嚴密な分析を行ひ、やつと仕上げたが、酒造工程二週間の即製は一つの特徴といへるがサントリー式に三年度とか、五年度といふ素晴らしいものをつくる準備工程時代にあり、もつと立派なものをつくる積りだが縣民の需要に應ずる事が出来ぬとせば残念なので、その方の解決にも馬力をかけている

吉井秋田税務署長談 洋酒の第三級に認定したが十分の價值はある、販賣配給價格四合壘一本一二圓となるが、六大都市以外の地元配給も認めるやう申達した、地元生産高の何割になるかが問題で、當然地場配給は出来るだらう
(昭和 21 年 2 月 13 日 秋田魁新報 謄写)

戦後、秋田でウヰスキーを製造していたのは、大成酒造株式会社（現小玉醸造株式会社）であった。そのウヰスキーは大麥を原料としてつくられており、これにトウモロコシなどの穀物類でつくられたアルコールを加え、雑酒第三級^{*3}としてリリースされていた。当時の大成酒造の社長が、ブリティッシュ・アメリカン・タバコ（BAT）社が製造・販売する煙草ブランド「LUCKY STRIKE」が好きで、そこから「ラッキーウヰスキー」と命名したという（図 1, 2）。



図1 ラッキーウイスキー（小玉醸造 提供）

ラベルには、最高級のハイランド麦芽や日本の他のウイスキーが含まれていると記載されている。また、上部ラベルには雑酒第二級と記されている

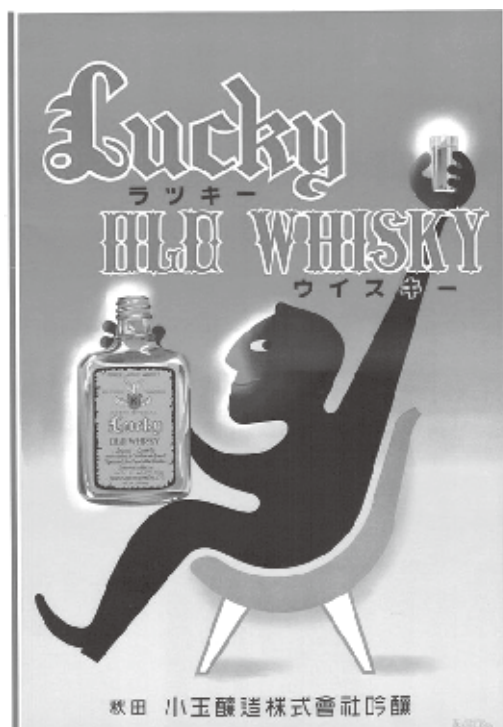


図2 ラッキーウイスキーのポスター（小玉醸造 提供）

“秋田県酒造史 技術編”には、「本格ウイスキーの製造を試みた」と記載されており、聞き取り調査でも、ポットスチルと檜樽でウイスキー製造していたということから、大成酒造では「本格ウイスキー」を製造するための設備が整っていたと思われる。

しかしながら、「本格ウイスキー」とは3年以上貯蔵したモルトウイスキー（雑酒第一級^{*3}）のことで、穀物類からつくられたアルコールを加えていたラッキーウイスキーは、当時の官報で認定されたサントリーウイスキーやニッカウイスキーのような「本格ウイスキー」ではなかった。また、秋田魁新報には「酒造工程二週間」と記載されており、雑酒第三級に分類されていたことから、当初のラッキーウイスキーは、大麦からつくられたニューポット^{*4}に他のアルコールを加え、着色等を施して仕上げたものと推定される。しかし、当時の秋田税務署長が「洋酒の第三級に認定したが十分の価値はある」とコメントしていることから、ラッキーウイスキーは、イミテーションウイスキーと一線を画していたことが窺われる。

後にラッキーウイスキーは雑酒第二級^{*3}に分類されており、配造部長の小玉確治が「サントリー式に三年度とか、五年度といふ素晴らしいものをつくる準備工程時代にあり」とコメントしていたことから、ベースのウイスキーを、ニューポットから自社製モルトウイスキーへ変更したものと推定される。

以上の考察から、大成酒造が製造したラッキーウイスキーは「本格ウイスキー（モルトウイスキー）」ではなかったが、大麦を原料として「本格的につくられたウイスキー」だったと考えられる。

大成酒造では千石までの増産準備を進め、順調に見えたラッキーウイスキーであったが、昭和 24（1949）年の酒類配給公団の廃止によって、その状況は大きく変わる。秋田県内に、アイデアルウイスキー、オーシャンやトリスウキスキー（図 3）など、大手企業のウイスキーが進出しはじめた。その影響か、大成酒造（昭和 25（1950）年 10 月 1 日に小玉醸造株式会社に改めている）は、昭和 27（1952）年頃からウイスキーの製造を中止し、ウイスキー免許と権利をニッカウキスキーに売却した上、ポットスチルも処分している。そして昭和 52（1977）年には、酒類原料アルコールや焼酎など一切の生産を廃止し、解散している¹⁰⁾。



秋田魁新報 広告 昭和 25 年 1 月 26 日



秋田魁新報 広告 昭和 25 年 2 月 22 日



秋田魁新報 広告 昭和 25 年 8 月 9 日

図 3 秋田県内に進出したウイスキーメーカーの広告

大手企業以外に、本格的なウイスキー製造の技術とノウハウを持っていなかったこの時代に、大成酒造はどのようにして技術とノウハウを得、本格的なウイスキーをつくることができたのだろうか。

時を同じくして、鹿児島県にある本坊酒造株式会社が、本格的なウイスキーを昭和

24 (1949) 年に完成させている。このウイスキー製造には、竹鶴政孝の「実習報告」(竹鶴ノート)(図4)を受取った岩井喜一郎が関係している。岩井はこの報告書に基づき、本格的なウイスキーづくりを本坊蔵吉に指導し、マルスウイスキーの原点となる「ゴールデンスター」を完成させている。その岩井は、明治42(1909)年に摂津酒造に入社し、独自の岩井式アルコール連続蒸溜装置を考案した、蒸溜酒製造の専門家であった¹¹⁾。つまり、「実習報告」のようなウイスキー製造の手引書と蒸溜技術があれば、大手以外でも本格的なウイスキーの製造は可能であったことになる。

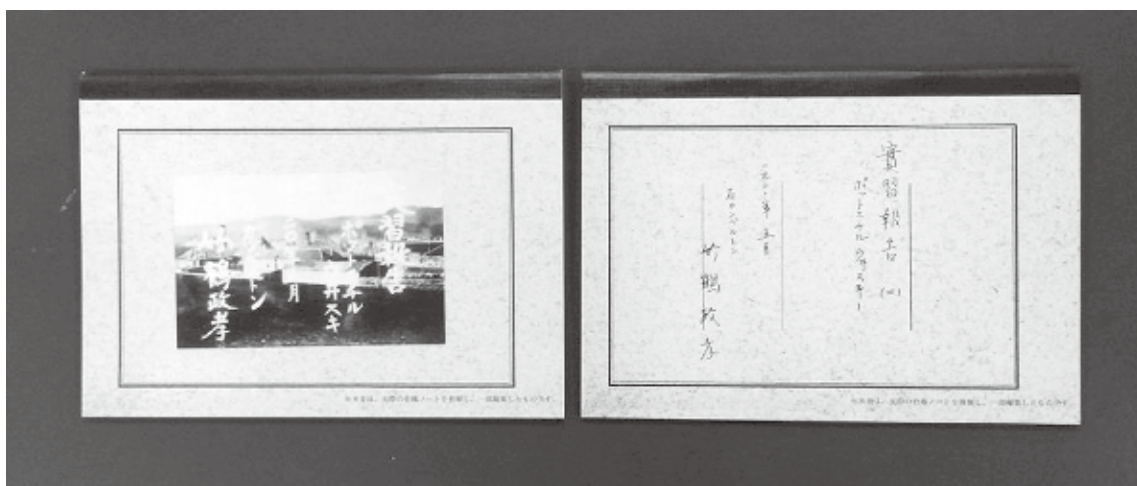


図4 竹鶴政孝の「実習報告」(レプリカ)

しかし「実習報告」は、昭和50年代まで南九州在住の旧摂津酒造関係者によって保管されていたことから、それまで一般に出回っていない¹¹⁾。「実習報告」以外に手引書が存在しなければ、大成酒造で本格的なウイスキーを製造することは不可能であったと思われる。しかし、大成酒造が本格的なウイスキーを製造していたということは、「実習報告」以外に、ウイスキー製造に関する情報が存在したことになる。そこで昭和初期の文献を調査してみたところ、次の報文を見つけ出した。

昭和13(1938)年の「日本醸造協会雑誌 第33巻 第8号」に、大蔵省醸造試験所の本多紀元が「ウキスキーの話」を執筆している。そこには糖化条件や発酵温度、蒸溜の区分(カット)など、詳細なウイスキー製造方法が記載されていた¹²⁾(図5)。この「ウキスキーの話」と竹鶴の「実習報告」を照らし合わせてみると、仕込量や温度などの数値が一致しないことから、本多が独自に入手した情報を基に書かれたものと考えられる。

当時の大成酒造ではこの雑誌を購読、もしくは秋田県醸造試験場(現：秋田県総合食品研究センター 醸造試験場)で閲覧することは可能であった。従って、この報文からウイスキー製造に関する情報を得ていた可能性がある。

一方、ラッキーウイスキーの製造に携わった小玉健吉は、陸軍時代に、燃料として製造されていたブタノールの発酵についての研究を行っており、その分別蒸溜も行っていたという。発酵と蒸溜について精通していた小玉が、この報文を手にしていただければ、本格的にウイスキーを製造することは十分可能であったと推定される。また小

玉は、大蔵省醸造試験所と関係の深かった東北帝国大学（現東北大学）の植村研究室へ頻繁に足を運んでおり、そこでウイスキー製造のノウハウを得ていた可能性もある。

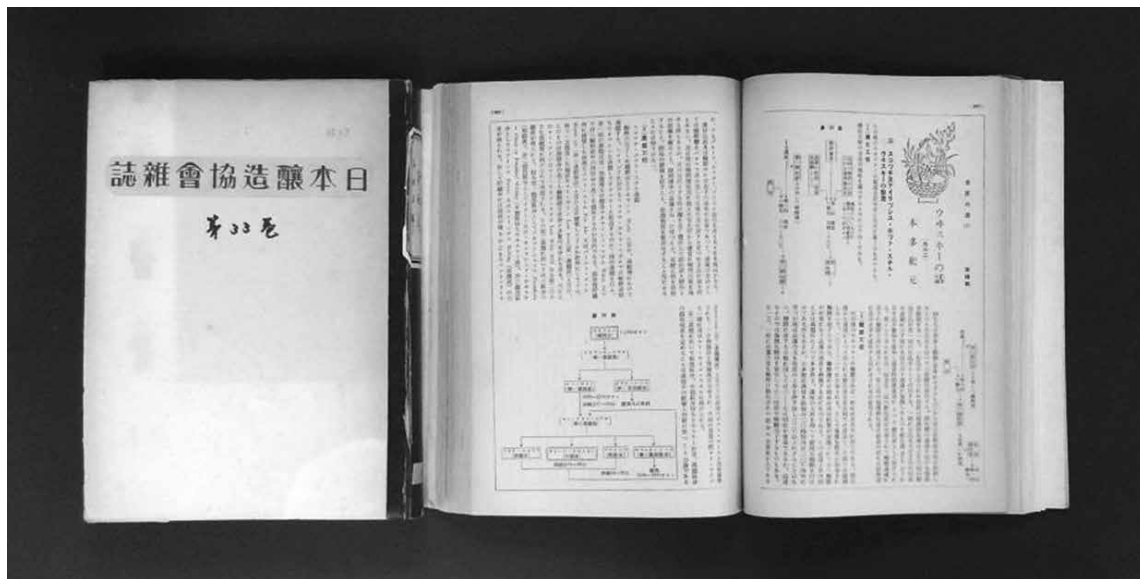
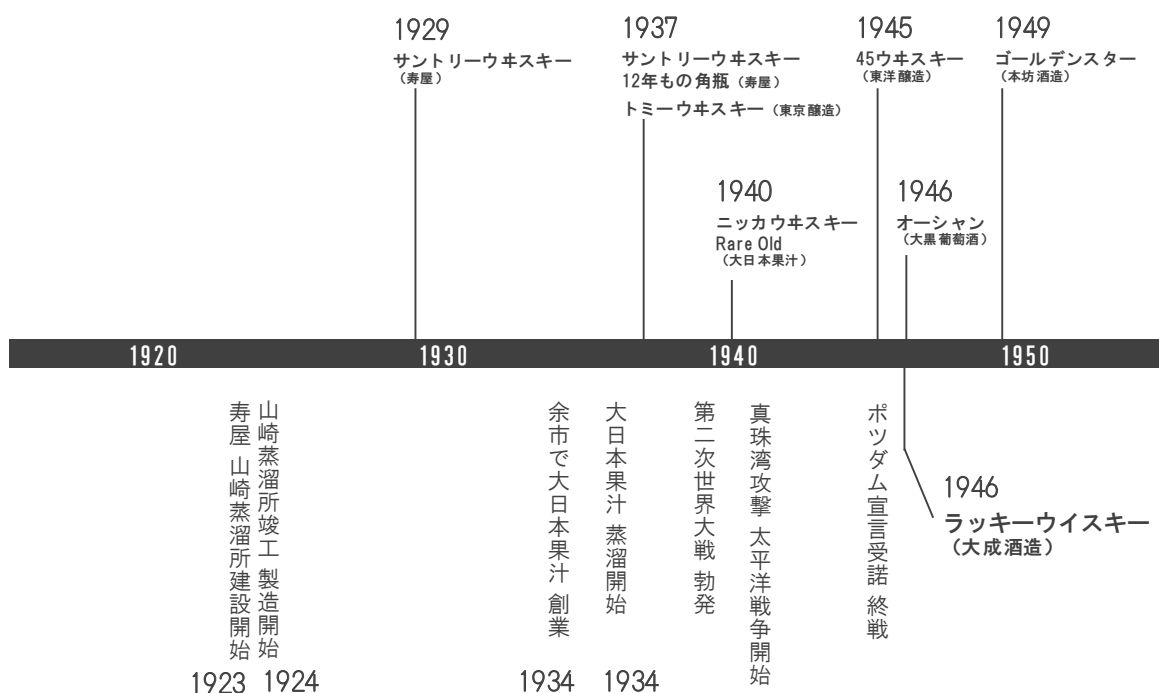


図5 日本醸造協会雑誌 第33巻 第8号「ウイスキーの話（其の二）」

大成酒造では「本格ウイスキー」の商品化までは至らなかったものの、短期間でウイスキーを仕上げ、サントリー式の製造準備を進めるなど、地方の企業でありながら、大手企業に比肩する技術力を有していたと推測される。「本格的なウイスキー」製造に広げるならば、大成酒造は、寿屋、東京醸造、大日本果汁に次ぐ、企業であったかも知れない。

表2 ジャパニーズウイスキー年表（1920 - 1950） ラッキーウイスキーを含める



3. ラッキーウイスキーの味わい

ラッキーウイスキーはバーボンウイスキーに近い味わいだったというが、関連資料に味わいに関する情報はなく、その事実を確認することができない。そこで県内のオーセンティック・バーに協力してもらい、店舗に在庫しているラッキーウイスキーを探すことにした。そして県内の老舗バーで、白い陶器ボトルに移し替えられたラッキーウイスキー「The Kodamas」(図6)を見つけ出すことができた。ボトルには、ワンショット分しか残っていなかったが、所有していたバーの厚意により、筆者とウイスキーの有識者でテイastingさせてもらうことができた。

そのラッキーウイスキー(The Kodamas)は、甘さがあり、樽香をしっかりと感じるバーボン様の味わいのウイスキーであった(表3)。このことからラッキーウイスキーの製造では、バーボン樽やシェリー樽などの中古樽を使用せず、内側を焼き焦がした新樽を使用したものと推測される。アメリカの煙草「LUCKY STRIKE」から命名されたラッキーウイスキーが、アメリカのバーボンウイスキー風に仕上げられていたことは、大変に興味深い。



図6 陶器ボトルに詰替えられたラッキーウイスキー「The Kodamas」

表3 ラッキーウイスキーのテイastingノート

Aroma 香り	バーボン様の香りとカラメル様の香りがあり、軽やかでやや個性的。老香の奥に、わずかに酢酸エチルや酢酸臭を感じる。
Flavor 味わい	淡くまるやかだが、樽香をしっかりと感じ、甘さがある。かつてはリッチな味わいだった名残を感じる。
Finish 余韻	中程度で、シェリー様の香りが広がる。
Total 総合評価	確かに、バーボンウイスキー様の味わいがあった。経年劣化で軽やかになっているが、当時は、深い味わいのウイスキーだったと思われる。

4. 秋田での雑酒製造

戦中戦後、全国的に清酒製造が僅少となり、この酒不足を補うため、合成清酒製造を目的とした蒸溜酒製造工場が秋田にあった。当時、大成酒造株式会社、両関酒造株式会社及び株式会社木村酒造は、連続式蒸溜機を設置し、合成清酒や焼酎などを製造していた。その中でウイスキーを生産していたのは、大成酒造と両関酒造であった。

この時代のウイスキーは雑酒に分類されており、分類中にはスピリッツなども含ま

れていたが、大半はウイスキーであった。秋田県の雑酒生産量は、昭和 19 (1944) 年度：0 石、昭和 20 (1945) 年度：279 石、昭和 21 (1946) 年度：235 石、昭和 22 (1947) 年度：256 石、昭和 23 (1948) 年度：263 石、昭和 24 (1949) 年度：148 石、昭和 25 (1950) 年度：31 石、昭和 26 (1951) 年度：25 石と推移している。戦後は酒類の生産量が潤沢になってきたため、昭和 24 (1949) 年頃からウイスキーは売れなくなり、各社は本業の清酒生産に専念しはじめた。そのため昭和 27 (1952) 年度には、雑酒の生産量が 0 石となった⁸⁾。秋田県におけるウイスキー製造は、終戦時の酒不足を補う一時的なもので終わってしまったようである。

前述のとおり、大成酒造では大麦を使用して本格的にウイスキーを製造していたが、両関酒造ではイミテーションウイスキー^{*2}を昭和 20 (1945) 年から製造していた。当初、両関酒造で製造していたウイスキーは 100%の模造品で、樽詰めせず、アルコールに香料や砂糖などを加えるだけだった。後に酒税法が改定になり、5%のモルトウイスキーの添加が義務化された。両関酒造は、添加用のウイスキーをニッカウヰスキーから購入し、自社のウイスキーに混ぜて、雑酒第三級^{*3}の「両関ウヰスキー」として販売した。当時の社長の「伊藤仁右衛門」から名を取り、「トニーウヰスキー」という名称にする予定であったが、「トミーウヰスキー」や「トリスウヰスキー」と間違われる上、模倣したと指摘されることを想定し、社名をそのままに「両関ウヰスキー」にしたという。



昭和 25 年 5 月 28 日 昭和 25 年 7 月 4 日
秋田魁新報 広告



昭和 25 年 9 月 20 日
秋田魁新報 広告



昭和 25 年 2 月 26 日
秋田魁新報 広告

図 7 昭和 25 年のウイスキー広告

順調に生産量を増やした両関ウヰスキーであったが、昭和 24 (1949) 年頃から売れなくなり製造を中止するが、ウイスキー免許は所有しつづけ、残った添加用のモルト

ウイスキーは在庫として抱えていた。“両関創業百年史”によると、昭和 33 (1958) 年に本格ウイスキーをつくった¹³⁾との記載があるが、税務署からウイスキー免許の返上を迫られ、在庫のモルトウイスキーを売ったのが昭和 33 (1958) 年であった。実際には、ウイスキーを製造していない。その後、ウイスキーの権利はニッカウヰスキーに譲渡している¹³⁾。

両関酒造でも本格的に蒸留酒をつくっていた実績がある。昭和 18 (1943) 年から昭和 20 (1945) 年に葡萄酒を造っており、その流れでブランデーを昭和 20 (1945) 年に 13 石製造している¹³⁾。そのブランデーはヤマブドウやリンゴを原料としたもので、樽での熟成も行っていった。しばらくは、それらの樽が両関酒造にあったという。

5. 東京醸造と秋田のピート

大正末期から昭和初期にかけて、本格ウイスキー（モルトウイスキー）づくりに挑戦した企業が 3 社あった。寿屋、東京醸造、そして大日本果汁である^{2, 14)}。

その中の 1 社、東京醸造は武井守正らによって創立され、後に中村豊雄^{*5}らによって経営された企業である。そこでは、ぶどう酒（ポートワイン）、ブランデー、リキュールなどを製造しており、特に自らの名をとって「トミー」の銘柄で売り出された国産第 2 号のモルトウイスキーは、好評を得ていた^{2, 15)}。

その頃、戦後の一時的な混乱期を得て、昭和 25 (1950) 年頃からウイスキー需要が増えはじめる。経済復興が軌道にのり、衣食の最低水準が保証され、生活に若干の余裕が出てきた上、進駐軍の影響によって生活様式がアメリカナイズ（洋風化）された。それにより、ウイスキー需要を支える社会的基盤も形成されたのである。しかし、“うまい、安い”をキャッチフレーズに新装販売されたトリスウヰスキーが、ウイスキーの成長をリードしたため、昭和 20 年代後半から昭和 30 年代前半にかけて、ウイスキー業界は二級ウイスキー^{*6}を中心に激しい販売競争を繰り広げることになる¹⁶⁾。

そのような状況下で東京醸造は、秋田からピート^{*1}を取り寄せ、進駐軍を相手に「TOMY'S MOLT」という TAX FREE の特級ウイスキー^{*6}を製造したが¹¹⁾、二級ウイスキーの特売戦の影響を受け、昭和 30 (1955) 年に倒産した¹⁶⁾。

上記のとおり、秋田からピートを取り寄せたウイスキー会社とは、東京醸造のことであった。そして、これを裏付ける内容が“大雄村史”に記載されている。

「ウイスキー会社がウイスキーに着臭のため、泥炭を貨車で取寄せたという話もあったが、この話はそれだけで終わったようである⁹⁾」

この記載から、東京醸造が秋田から取り寄せたピートは、大雄村産（現横手市大雄）のものであったと推測される。また、「この話はそれだけで終わったようである」との記載から、このピートの取り寄せは 1 回限りで、東京醸造倒産の数年前だったと推定される。

6. 秋田でのピートの産出と利用

秋田県には、雄物川流域と八郎潟付近にはピート*¹層が存在し、横手市大雄の田根森地区が主な産地となっている。雄物川河口の秋田市付近にもピートが大量に堆積しているが、採掘するところがない。八郎潟付近のピートは、天王村（現潟上市天王）、払戸村（現男鹿市払戸）及び鶴川村（現三種町鶴川）等で採掘されていた。ピートが採掘される地域では、石油が主流になる昭和30年代後半まで家庭用の燃料として使われていた。ピートそのものより、ピートの灰の方が用途は広く、肥料、酒造、製紙、染色、洗剤、釉薬、薬用などに使用されていた¹⁷⁾。ピートのほとんどは県内で利用されており、県外での利用は東京醸造のウイスキー製造だけであったようである。

我々は、スコットランドのアイラ島産のピートと横手市大雄産のピートを入手し、その特性を調査した。横手市大雄産のピートは、アイラ島産のピートに比べて色はやや薄い、焚くとタール香がより強い（図8）。

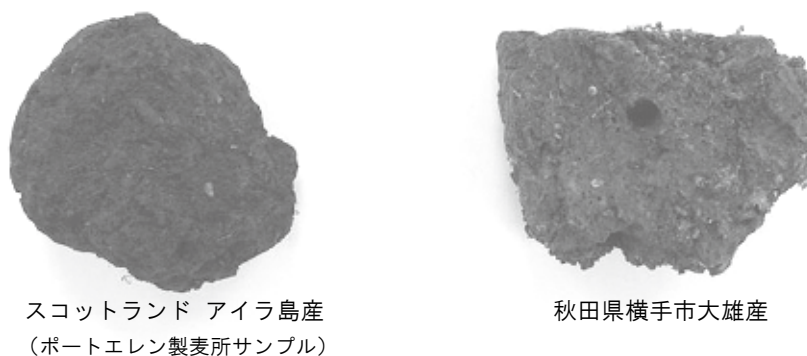


図8 ピートのサンプル

東京醸造では、大雄産ピートの特徴を生かし、新たなモルトウイスキーを販売することで再起を図ったと思われる。現在であれば特徴あるウイスキーとして重宝されるが、このモルトウイスキーのリリースは、時代が早過ぎたのである。

7. これからの秋田のウイスキー

先述したとおり、かつての秋田には独自のウイスキー製造技術があり、ウイスキー製造に必要なピート*¹も産出される。また、秋田の年間平均気温を見てみると、サントリー白州蒸溜所、ニッカウキスキー宮城峡蒸溜所、キリンディスティラリー富士御殿場蒸溜所などと類似している。このように、良質なウイスキーをつくるための技術と条件は、秋田に揃っている。現在、県内でのウイスキー製造に向けた動きがあり、このウイスキーが実現すれば、約70年ぶりの復活となる。当時、為し得なかった本格ウイスキー（モルトウイスキー）ができたならば、どのような味わいになるのか、期待が膨らむ。

【謝 辞】

ラッキーウキスキーの写真とポスターを提供してくださいました小玉醸造株式会社様、「実習報告」(竹鶴ノート)を提供してくださいました株式会社ドリームリンクの木越勉様、横手市大雄のピートについて情報提供頂きました横手市大雄文化財保護協会副会長兼横手市大雄生涯学習奨励員の小林勝哉様、ピートサンプルを提供してくださいました森岡寅吉様、及び Smacco Farm の梅川尚季様、ラッキーウキスキーの探索にご協力いただきました BAR ル・ヴェールの佐藤謙一様、及び Cocktail & Whiskey Lady の長澤欽一様に心より感謝申し上げます。また、新聞記事の掲載をご快諾いただき、調査にご協力いただきました株式会社秋田魁新報社の田中敏雄様、聞き取り調査にご協力いただきました小玉醸造株式会社の小玉真一郎様、両関酒造株式会社の伊藤雄太郎様、及び秋田総合科学センターの高橋慶太郎様、そして当センターにウイスキー研究の機会をくださり、多大なご協力をいただきました株式会社ドリームリンクの村上雅彦様に深く感謝申し上げます。

*1 ピート：シダやコケ類、草、灌木、ヘザー（エリカ科の低木、ヒースに同じ）などが堆積してできた泥炭（草炭）のこと。ウイスキーでは、大麦麦芽を乾燥させる際にこれを燃やして使用する場合がある。ウイスキー特有のスモーキーフレーバーやピート臭は、このピートの燻煙によってもたらされる¹⁸⁾。

*2 模造ウイスキー（イミテーションウイスキー）：
アルコールに色素と香料を加えてつくられたウイスキー。混成酒の一種でもあり、混成ウイスキー又は合成ウイスキーとも言われていた。その製造法の一例は、次の通りである。45%アルコール 99.8 L に、ウイスキーエッセンス 27 ml、ショ糖 180 g、グリセリン 160 ml、酢酸エチル少量を混和し、カラメルで適宜着色する。ウイスキーエッセンスは、アルコール 1000 に対し、酢酸エチル 250、硝酸エチル 200、キャラウェイ油 1、アニス油 1、杜松実（ジュニパーベリー）油 2 を溶解してつくられる¹⁹⁾。

*3 雑酒第一級、第二級、第三級：次の様に分類されていた²⁾。

昭和18（1943）年の級別区分		
級数	アルコール度数	本格ウイスキー混和率
一級	43度以上	30%以上
二級	43度以上	30%未満
三級	40度以上	一級、二級に該当しないもの

昭和24（1949）年の級別区分		
級数	アルコール度数	本格ウイスキー混和率
一級（甲類）	43度以上	30%以上
二級（乙類）	40度以上	5%以上
三級（丙類）	40度以上	一級、二級に該当しないもの

*4 ニューポット：ポットスチル（単式蒸溜器）から溜出した未熟成のモルトウイスキー。

*5 中村豊雄：スコットランドなどへ行かずに、初めて国産モルトウイスキーをつくった人物。早稲田大学の政経学部出身でありながら、応用化学と醸造技術について研鑽を積んでいた¹⁵⁾。

*6 特級ウイスキー、一級ウイスキー、二級ウイスキー：次の様に分類されていた²⁾。

昭和28（1953）年の級別区分		
級数	アルコール度数	本格ウイスキー混和率
特級	43度以上	30%
一級	40度以上	5%以上
二級	特級、一級に該当しないもの	特級、一級に該当しないもの

【引用文献】

- 1) 土屋 守 (2020) ビジネス教養としてのウイスキー KADOKAWA
- 2) 土屋 守 (2020) ビジネスに効く教養としてのジャパニーズウイスキー 祥伝社
- 3) 古賀邦正 (2018) 最新 ウイスキーの科学 熟成の香味を生かす驚きのプロセス (ブルーバックス) 講談社
- 4) 竹鶴政孝 (1975) 私のウイスキー人生 日本醸造協会雑誌 70, 357-360
- 5) 永井史郎 (1992) 日本にウイスキーを誕生させた先覚者たち 日本醸造協会誌 87, 241
- 6) 竹鶴政孝 (1968) 日本のウイスキー100年の歩み 日本醸造協会雑誌 63, 1209-1210
- 7) 佐治敬三 (1974) 断絶と革新サントリー発展の歴史 日本醸造協会雑誌 69, 72-74
- 8) 秋田県酒造組合 (1981) 秋田県酒造史 技術編 秋田県酒造組合
- 9) 大雄村史編纂委員会 (2001) 大雄村史 大雄村
- 10) 秋田県酒造組合 (1988) 秋田県酒造史 本編
- 11) 和知英樹、高橋矩彦 (2017) ジャパニーズウイスキー 第二創世記 STUDIO TAC CREATIVE
- 12) 本多紀元 (1924) ウイスキーの話 (其の二) 日本醸造協会雑誌 33, 932-938
- 13) 伊藤仁右衛門商店 (1974) 両関創業百年史 伊藤仁右衛門
- 14) 河合 忠 (2006) スコッチから日本の味を造るジャパニーズ・ウイスキー (3) —戦前の三大ジャパニーズ・ウイスキー— モダンメディア 51, 341-346
- 15) 藤沢市編さん委員会 (1977) 藤沢市史 第六巻 藤沢市
- 16) 萩原 勝 (1976) 産業界シリーズ36 酒類業界 教育社新書
- 17) 秋田青森爾縣下の泥炭 (1909) 地学雑誌 21, 510
doi:10.5026/jgeography.21.7_510
- 18) 土屋 守 (2018) ウイスキーコニサー資格認定試験 教本 2018 (上) ウイスキー文化研究所
- 19) 大谷義夫 (1950) 最新醸酵工業 産業図書株式会社

4. 特許の概要 (4 件)

1) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードする遺伝子、前記遺伝子を含有する発現プラスミド、前記発現プラスミドで形質転換された改質転換体及び前記酵素の製造方法

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

特許番号：第 6535960 号

登録日：2019 年 6 月 14 日

2) 発明の名称：菌体外多糖生産性乳酸菌およびその利用

発明者：木村貴一、戸松 誠、高橋 慶太郎（秋田県総食研）

近藤 敦（テーブルマーク株式会社）

公開番号：特開 2019-198270

公開日：2019 年 11 月 21 日

3) 発明の名称：魚醤油の製造法

発明者：木村貴一（秋田県総食研）

公開番号：特開 2020-5588

公開日：2020 年 1 月 16 日

4) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有する原核微生物由来ポリペプチドの医薬用途

発明者：久場敬司（秋田大・医）、葦澤悟（JIRCAS）、中原和彦（JIRCAS）、

今井由美子（医薬基盤研）、高橋砂織（秋田県総食研）

公開番号：特開 2020-37538

公開日：2020 年 3 月 12 日

1) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素2活性を有するポリペプチド、前記ポリペプチドをコードする遺伝子、前記遺伝子を含有する発現プラスミド、前記発現プラスミドで形質転換された改質転換体及び前記酵素の製造方法

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

特許番号：第 6535960 号

登録日：2019 年 6 月 14 日

【要約】

【課題】アンギオテンシン変換酵素2は、ヒトを含む哺乳類の血圧調節機構であるレニン・アンギオテンシン系における重要な酵素の一つである。アンギオテンシン変換酵素2はレニン・アンギオテンシン系を負に調節して血圧降下作用を示す。本酵素は膜結合酵素で且つ糖鎖を持つことから組換え型酵素の取得が困難である。そこで、微生物由来ヒト型アンギオテンシン変換酵素2相同酵素を探索した。

【解決手段】各種微生物由来遺伝子情報を探索した結果、秋田県有特許微生物（特許第 4775997 号）である *Paenibacillus* sp. B38 株にヒト型アンギオテンシン変換酵素2と同様の酵素化学的性質を持つカルボキシペプチダーゼ、B38-CAP を見出した。また、B38-CAP の大腸菌での発現系を構築するとともに、組換え型酵素の精製方法を確立した。

2) 発明の名称：菌体外多糖生産性乳酸菌およびその利用

発明者：木村貴一、戸松 誠、高橋 慶太郎（秋田県総食研）

近藤 敦（テーブルマーク株式会社）

公開番号：特開 2019-198270

公開日：2019 年 11 月 21 日

【要約】

【課題】菌体外多糖（exopolysaccharide;EPS）生産性の乳酸菌、及び、該乳酸菌を含む食品組成物の提供

【解決手段】ラクトコッカス・ラクティス__サブスピーシーズ__ラクティス__KLC4192B 株（寄託番号 NITE__P-02581）；ラクトコッカス・ラクティス__サブスピーシーズ__ラクティスに属し、KLC4192B 株と科学的性質が同一である菌株。または、ラクトコッカス・ラクティス__サブスピーシーズ__ラクティスに属し、特定の配列のヌクレオチド配列と 98%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなる 16S__rRNA 遺伝子を有する菌株。菌体外多糖生産性乳酸菌、及び、穀類粉を含む食品組成物。

3) 発明の名称：魚醤油の製造法

発明者：木村貴一（秋田県総食研）

公開番号：特開 2020-5588

公開日：2020 年 1 月 16 日 (2020. 1. 16)

【要約】

【課題】魚醤油に含まれる特徴的な香気やうま味を損なわず、不快香気のみを知覚させない魚醤油の製造技術を提供することを目的とする。

【解決手段】最新の嗅覚知覚理論から、多様な食品を添加して魚醤油中の不快香気のみを知覚させない食材を探したところ、この機能をオイゲノール含有食品から見いだした。オイゲノールを魚醤油に添加したところ、魚醤油中の不快香気を知覚しなくなることを新規に見いだした。オイゲノールの最適添加量を検討することで、課題を解決した。

4) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有する原核微生物由来ポリペプチドの医薬用途

発明者：久場敬司（秋田大・医）、葦澤悟（JRCAS）、中原和彦（JRCAS）、

今井由美子（医薬基盤研）、高橋砂織（秋田県総食研）

公開番号：特開 2020-37538

公開日：2020 年 3 月 12 日

【要約】

【課題】アンギオテンシン変換酵素 2 は、血圧調節に重要な役割を担っている。動物由来アンギオテンシン変換酵素 2 は、多様な糖鎖を持つ糖タンパク質であり、疎水性細胞膜貫通領域を持つ膜タンパク質であることから、遺伝子組換え技術を利用して大量に生産できるものが求められていた。そこで、動物以外を由来とするアンギオテンシン変換酵素 2 の発見を目的として、医薬として利用できる物質の探索を試みた。

【解決手段】本発明者らは、意外にも *Bacillus subtilis* 由来カルボキシペプチダーゼがアンギオテンシン変換酵素 2 と良く似た立体構造を持つことを *in silico* スクリーニングにより初めて見出した。つづいて、秋田県有特許微生物（特許第 4775997 号）である *Paenibacillus* sp. B38 株にもヒト型アンギオテンシン変換酵素 2 と同様の酵素化学的性質を持つカルボキシペプチダーゼ、B38-CAP を見出した。また、大腸菌で発現し、精製した B38-CAP を用いて各種動物実験を実施した結果、B38-CAP が高血圧抑制、心肥大抑制や肺の急性炎症抑制に効果のあることが示された。

5. 学会発表論文概要 (22件)

1) 発表学会：日本生化学会東北支部 第85回例会・シンポジウム

発表日と場所：2019年6月8日、東北大学星陵キャンパス（仙台市）

演題名：ザゼンソウ *SBP1* 遺伝子の発熱組織特異的な発現に関する研究

発表者：○谷本悠¹、梅川結²、伊藤菊一^{1,3}

（¹岩手大院・総合科学、²秋田県総食研、³岩手大・次世代アグリ）

2) 発表学会：日本調理科学会東北・北海道支部会

発表日と場所：2019年6月15日、蔵元レストランせきのいち（一関市）

演題名：パンの食感と味の持続性の関係について

発表者：○石川匡子¹、田村あかり¹、三浦翔太郎¹、高橋徹²

（¹秋田県立大、²秋田県総食研）

3) 発表学会：第67回日本海水産物利用担当者会議

発表日と場所：2019年7月4日、新潟県水産会館（新潟市）

演題名：発酵スターターの添加がしよつづの品質に与える影響（第2報）

—中規模仕込みしよつづの特性—

発表者：○高橋徹¹、上原健二¹、須藤あさみ¹、渡辺隆幸¹、塚本研一¹、

船津保浩²（¹秋田県総食研、²酪農学園大）

4) 発表学会：日本調理科学会2019年度大会

発表日と場所：2019年8月26日、中村学園大学（福岡市）

演題名：うま味・甘味との相互作用による味増強効果と味の持続時間との関係性

発表者：○山崎桃子¹、石川匡子²、高橋徹³、塚本研一³

（¹秋田県立大院、²秋田県立大、³秋田県総食研）

5) 発表学会：日本調理科学会2019年度大会

発表日と場所：2019年8月26日、中村学園大学（福岡市）

演題名：秋田県の家庭料理：副菜の特徴 ～漬物を中心とした多彩な副菜～

発表者：○高橋徹¹、熊谷昌則¹、高山裕子²、大野智子³、山田節子⁴、

三森一司²、逸見洋子⁵、駒場千佳子⁶、長沼誠子⁵

（¹秋田県総食研、²聖霊短大、³青森県立保健大、⁴元聖霊短大、

⁵元秋田大、⁶女子栄養大）

6) 発表学会：第66回日本栄養改善学会学術総会

発表日と場所：2019年9月7日、富山県民会館（富山市）

演題名：スマイルケア食の認知度向上を目指す秋田県の取り組み

発表者：○熊谷昌則、松井ふゆみ（秋田県総食研）

7) 発表学会：第92回日本生化学会大会

発表日と場所：2019年9月19日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：原核微生物由来D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ

（パエニダーゼ）の結晶構造解析

発表者：○葺澤悟¹、木平清人²、吉矢拓³、熊谷久美子³、中原和彦¹、高橋砂織⁴
(¹国際農研、²JAXA、³(株)ペプチド研、⁴秋田県総食研)

8) 発表学会：第92回日本生化学会大会

発表日と場所：2019年9月20日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：発熱植物ザゼンソウにおける *trans-resveratol di-O-methyl transferase*
に関する研究

発表者：○谷本悠¹、梅川結²、伊藤菊一^{1,3}

(¹岩手大院・総合科学、²秋田県総食研、³岩手大・次世代アグリ)

9) 発表学会：第92回日本生化学会大会

発表日と場所：2019年9月20日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：発熱植物ザゼンソウの無益回路に関する研究

発表者：○後藤広太¹、梅川結²、伊藤菊一^{1,3}

(¹岩手大・農、²秋田県総食研、³岩手大・次世代アグリ)

10) 発表学会：食品開発展 2019

発表日と場所：2019年10月3日、東京ビックサイト（東京都）

演題名：枝豆を丸ごと粉末化した「爛漫枝豆粉末」の特性

発表者：梅川結（秋田県総食研）

11) 発表学会：平成31年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2019年10月16日、北とぴあ（東京都）

演題名：清酒製造場における米麴への混入微生物の同定と混入微生物が清酒品質
に及ぼす影響の評価

発表者：○佐藤友紀、上原智美、大野剛、進藤昌、渡邊誠衛（秋田県総食研）

12) 発表学会：平成31年度日本醸造学会

発表日と場所：2019年10月16日、北トピア（東京都）

演題名：清酒のフェルラ酸、フェルラ酸エチル及び呈味性ピログルタミンペプチドの
レベル変動要因の検討

発表者：○橋爪克己¹、伊藤俊彦¹、白戸香緑¹、天野奈緒美¹、大野剛²、
進藤昌²、渡邊誠衛²、奥田将生³

(¹秋田県立大、²秋田県総食研、³酒類総研)

13) 発表学会：第62回全国酒造技術指導機関合同会議

発表日と場所：2019年10月18日、中央合同庁舎第4号館（東京都）

演題名：醸造工程の微生物を制御することによる日本酒の高品質化

発表者：○渡邊誠衛、佐藤友紀、上原智美、大野剛、進藤昌

(秋田県総食研)

**14) 発表学会：International Congress on Biotechnology and Genetic Engineering
(Biocon-2019)**

発表日と場所：2019年10月29日、Paris Marriott Charles de Gaulle Airport Hotel
(Paris, France)

演題名 : Inhibition of DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai).

発表者 : Yuto Tsutsumi¹, Keiko Ishizuka¹, Misato Baba¹, Kosaku Nishimura², Keishi Hata³, Saori Takahashi³, Shozo Sakuda⁴, Teisuke Takita¹, Kenji Kojima¹ and Kiyoshi Yasukawa¹ (¹Kyoto Univ. ²Toyo Inst. Tech., ³Akita Res. Inst. Food & Brew., ⁴Teikyo Univ.)

15) 発表学会 : 令和元年度全国食品技術研究会

発表日と場所 : 2019年10月31日、つくば国際会議場 (つくば市)

演題名 : 「いぶりがっこ」の品質調査と製造工程に関する研究

発表者 : ○佐々木康子、渡辺隆幸 (秋田県総食研)

16) 発表学会 : 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所 : 2019年12月1日、神戸国際会議場 (神戸市)

演題名 : Inhibition of the DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai)

発表者 : Keiko Ishizuka¹, Yuto Tsutsumi¹, Misato Baba¹, Kosaku Nishimura^{1,2}, Keishi Hata³, Saori Takahashi³, Shozo Sakuda⁴, Teisuke Takita¹, Kenji Kojima¹, and Kiyoshi Yasukawa¹ (¹Div. of Food Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., ²Toyo Inst. of Food Technol., ³Akita Res. Inst. of Food and Brew., ⁴Grad. Sch. of Sci. and Eng., Teikyo Univ.)

17) 発表学会 : 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所 : 2019年12月3日、神戸国際会議場 (神戸市)

演題名 : JUNSAIKOMACHI, dietary supplement with water shied extract and sake cake dry powder.

発表者 : Keishi Hata¹, Sayaka Tomatsu¹, Yui Umekawa¹, Akiko Takashima², Muketaka Sano²
(¹Akita Res. Inst. Food & Brew., ²Sano Inc.)

18) 発表学会 : 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所 : 2020年12月3日、神戸国際会議場 (神戸市)

演題名 : Plasma lipoprotein profiles and free choline levels in NASH model rats
-Novel minimally invasive indicators for NASH-

発表者 : Koji Kuriyama¹, Junichiro Takahashi¹, Takanobu Kikuchi¹, Kazuyuki Hiwatashi², Akira Sasaki², and Keishi Hata²
(¹Skylight Biotech Inc., ²Akita Res. Inst. Food & Brew.)

19) 発表学会 : 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所 : 2020年12月4日、神戸国際会議場 (神戸市)

演題名 : PXB-cells for the study of lipid metabolism: Robust and human-specific lipid profile in human hepatocytes freshly isolated from chimeric mice with human liver.

発表者 : Masakazu Kakuni¹, Masaki Takahashi¹, Akira Sasaki², and Keishi Hata²
(¹PhenixBio Co. Ltd., ²Akita Res. Inst. Food & Brew.)

20) 発表学会：令和元年度土木学会東北支部技術研究発表会

演題名：酒米栽培における下水処理水の投入負荷量が生育特性および環境負荷に及ぼす影響

発表日と場所：2020年3月7日、秋田大学(秋田市)

発表者：○北林怜¹、増田周平¹、高階史章¹、岡野邦宏²、宮田直幸²、
大野剛³、Phung Duc Luc⁴、Pham Viet Dung⁴、渡部徹⁴
(¹秋田高専、²秋田県立大、³秋田県総食研、⁴山形大)

21) 発表学会：第54回日本水環境学会年会

発表日と場所：2020年3月16日、岩手大学(盛岡市)

演題名：酒造好適米栽培における下水処理水の最適利用手法の開発に向けた実験的検討

発表者：竹田壮太¹、増田周平¹、高階史章²、岡野邦宏²、宮田直幸²、
大野剛³、Phung Duc Luc⁴、Pham Viet Dung⁴、渡部徹⁴
(¹秋田高専、²秋田県立大、³秋田県総食研、⁴山形大)

22) 第93回日本薬理学会年会

発表日と場所：2020年3月16日～18日(ポスター発表、要旨発表のみ)

演題名：アンギオテンシン変換酵素2(ACE2)様活性を持つB38-CAPによる降圧作用と心不全改善作用 (Identification of B38-CAP as an ACE2-like enzyme to suppress hypertension and cardiac dysfunction in mice.)

発表者：久場敬司¹、湊隆文¹、菰澤悟²、佐藤輝紀³、山口智和¹、渡邊博之³、今井由美子⁴、高橋砂織⁵ (¹秋田大院・生化、²国際農研、³秋田大・循環器内科、⁴医薬基盤研、⁵秋田県総食研)

1) 発表学会：日本生化学会東北支部 第85回例会・シンポジウム

発表日と場所：2019年6月8日、東北大学星陵キャンパス（仙台市）

演題名：ザゼンソウ *SBP1* 遺伝子の発熱組織特異的な発現に関する研究

発表者：○谷本悠¹、梅川結²、伊藤菊一^{1,3}

（¹岩手大院・総合科学、²秋田県総食研、³岩手大・次世代アグリ）

要旨：ザゼンソウは早春の開花期に生殖器官である肉穂花序が特異的に発熱し、その体温を 23℃程度に維持できる恒温植物である。ザゼンソウを含む発熱性植物の熱産生にはミトコンドリア内膜に局在するシアン耐性呼吸酵素 AOX (alternative oxidase) が密接に関与することが明らかとなっている。本研究においては、ザゼンソウの発熱組織において AOX と共発現する遺伝子群を同定するため、発熱性肉穂花序を対象とした次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を実施した。その結果、ザゼンソウ肉穂花序において AOX よりも高い発現レベルを示す遺伝子として、*SBP1* (*selenium binding protein 1*) を見出した。SBP1 は methanethiol oxidase 活性を介したヒト口腔外由来口臭への関与が指摘されている酵素である。ザゼンソウ各組織における *SBP1* の発現を詳細に解析したところ、本遺伝子は発熱組織特異的に AOX と共発現していることが判明した。以上の結果に基づき、ザゼンソウの発熱現象における SBP1 の機能について議論したい。

2) 発表学会：日本調理科学会東北・北海道支部会

発表日と場所：2019年6月15日、蔵元レストランせきのいち（一関市）

演題名：パンの食感と味の持続性の関係について

発表者：○石川匡子¹、田村あかり¹、三浦翔太郎¹、高橋徹²

（¹秋田県立大、²秋田県総食研）

要旨：近年、消費者の嗜好性の多様化から、食感が明確に異なるパンが多種類販売されている。食感は咀嚼に伴う味の溶出度合に影響を与えるため、パンの食感の違いは咀嚼した際に感じられる味強度の変化に繋がると考えられる。そこで、パンの咀嚼に伴う味強度変化および味の持続時間を、官能評価および味覚センサもよる評価を行った。加水量にて食感を変えたパンや保存状態にて食感を変えたパンを調製した。唾液量測定、官能評価および味覚センサ測定を行った。咀嚼時に感じられる塩味の持続時間は、加水量が少ないパンほど長く感じられた。味覚センサ測定の結果、塩味、旨味コク、苦味雑味は圧縮回数に伴い増加した。ヒトが識別可能な濃度差であるウェーバー比 20 % は、味覚センサにおける味強度 1 目盛りに対応する。A、B の味強度は同じ圧縮回数でも約 1 違っており、味覚センサによって味の違いを認識可能であることが示唆された。

3) 発表学会：第 67 回日本海水産物利用担当者会議

発表日と場所：2019 年 7 月 4 日、新潟県水産会館（新潟市）

演題名：発酵スターターの添加がしょつつの品質に与える影響（第 2 報）

－中規模仕込みしょつつの特性－

発表者：○高橋徹¹、上原健二¹、須藤あさみ¹、渡辺隆幸¹、塚本研一¹、
船津保浩²（¹秋田県総食研、²酪農学園大）

要旨：これまでの非ヒスタミン生産乳酸菌を発酵スターターとして添加したしょつつ小規模（1kg）製造試験から、乳酸菌発酵スターターの添加によるヒスタミン蓄積抑制の一定の効果は確認されたが、食塩濃度が 20%以下でヒスタミン生成菌の初発菌数が 10^2 CFU/g オーダー以上では、基準値以上のヒスタミンが蓄積することを明らかにした。また、しょつつ中の遊離アミノ酸総量は食塩濃度にかかわらず同水準であり、乳酸菌発酵スターターを添加してもうま味に關与するアミノ酸であるグルタミン酸が減少することはなかった。今回は、前年度の仕込み量を約 20 倍にスケールアップしてしょつつを試作した際の品質について検討した。乳酸菌発酵スターターおよびヒスタミン生成能を有する乳酸菌株を添加した中規模しょつつ製造試験を実施した。いずれの試験区でもヒスタミン含量は基準値を大幅に下回った。遊離アミノ酸総量は食塩濃度にかかわらず同水準であり、グルタミン酸は乳酸菌発酵スターターを添加しても減少しなかった。また、低塩化によって、有機酸含量が増加しており、官能評価の結果からも品質の向上が期待される。

4) 発表学会：日本調理科学会 2019 年度大会

発表日と場所：2019 年 8 月 26 日、中村学園大学（福岡市）

演題名：うま味・甘味との相互作用による味増強効果と味の持続時間との関係性

発表者：○山崎桃子¹、石川匡子²、高橋徹³、塚本研一³

（¹秋田県立大院、²秋田県立大、³秋田県総食研）

要旨：我々はこれまで、塩味（NaCl）とうま味（グルタミン酸ナトリウム：以下 Glu）の相互作用により味が増強すること、これに甘味アミノ酸（アラニン：以下 Ala、グリシン：以下 Gly）を添加するとさらに味が強く感じられること、味強度には味のバランスや持続時間が影響することを明らかにし、この知見をすまし汁など比較的低濃度の食塩水へ応用することで、10%以上の減塩を可能にした。本研究では、鍋や煮物の汁など比較的高塩分濃度の食品の減塩を目指し、高濃度食塩水に対するうま味・甘味アミノ酸の味増強効果を検討した。NaCl 1.0% および Glu 0.137%の混合溶液に、Ala 0.14~0.51%あるいは Gly 0.16~0.68%を添加した溶液を調製した。これら溶液と Glu 添加食塩水の味強度を比較した。また、口に含んだ際に感じた味を強い順に順位付けし、味のバランスを評価した。さらに TDS 法により味の持続時間、味覚センサ測定にて味質を評価した。Glu 添加食塩水との比較により減塩率を算出したところ、Ala・Glu 添加食塩水は 20~

30%、Gly・Glu 添加食塩水は 20%の減塩が可能であることが分かった。味のバランスは減塩率上昇に伴い、甘味やうま味が強く、塩味が弱くなり、味覚センサーでも同様の結果を示した。しかし、これらの結果にアミノ酸種での違いは認められなかった。TDS 法にて味の持続時間を評価した結果、Ala・Glu 添加食塩水は減塩しても基準と同程度であったのに対し、Gly・Glu 添加食塩水は減塩すると短くなった。よって高濃度食塩水では、甘味アミノ酸の違いは味の持続時間に影響し、これが味増強効果や減塩率に繋がることが示唆された。

5) 発表学会：日本調理科学会 2019 年度大会

発表日と場所：2019 年 8 月 26 日、中村学園大学（福岡市）

演題名：秋田県の家料理：副菜の特徴 ～漬物を中心とした多彩な副菜～

発表者：○高橋徹¹、熊谷昌則¹、高山裕子²、大野智子³、山田節子⁴、

三森一司²、逸見洋子⁵、駒場千佳子⁶、長沼誠子⁵

(¹秋田県総食研、²聖霊短大、³青森県立保健大、⁴元聖霊短大、

⁵元秋田大、⁶女子栄養大)

要旨：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、「副菜」に着目してその特徴と調理特性について明らかにすることを目的とした。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）において、昭和 35～45 年頃に調理を担当していた対象者 19 名（女性、74.2±7.8 歳）に聞き書き調査を実施した。調査から得られた 110 の料理のうち、副菜に該当した料理の特徴および調理特性について検討した。副菜に該当した 36 の料理のうち、漬物が 13 と約 1/3 を占めていた。有名となった「いぶりがっこ」の他に、「ふかしなす漬け」や「平良かぶの漬物」等、米麴を使用する漬物も見られた。漬物の原料となるダイコン、カブ、ナスには伝統野菜も用いられている。また、山菜やキノコ料理も豊富で、「ぜんまいの一本煮」、「カタクリの花のクルミ和え」、「ぼっけみそ」、「なめこと大根おろしの酢の物」、「なつつ」などが挙げられた。「なつつ」は、漬物の原型ともいわれ、野菜やキノコをだし汁や塩辛で和えたものである。「てん（ところてん）」、「えご」、「寒天料理」に代表される、寒天（海藻）を利用した料理は県内全域で食されており、その種類も豊富であった。他県では日常的に食されている「煮しめ」が、正月（年越し）や行事の料理として継承されている地域もあった。

6) 発表学会：第 66 回日本栄養改善学会学術総会

発表日と場所：2019 年 9 月 7 日、富山県民会館（富山市）

演題名：スマイルケア食の認知度向上を目指す秋田県の取り組み

発表者：○熊谷昌則、松井ふゆみ（秋田県総食研）

要旨：【目的】秋田県では、2017年に「あきたスマイルケア食研究会」を設立し、産学官が連携して低栄養予防食品などのスマイルケア食の開発と普及促進に取り組んでいる。現在、スマイルケア食の認知度向上が課題となっていることから、昨年度に引き続き、以下の取り組みを実施した。

【方法】一般消費者向け、食品事業者向け、管理栄養士等専門家向けにそれぞれ効果的な施策を検討し、実施した。

【結果】在宅介護者等の一般消費者向けには、出前講座やイベント出展などによる啓蒙活動の他、スーパー等小売店の協力を得て PR 販売を実施したことにより、スマイルケア食購入の機会も増えるなど、一定の成果が得られた。しかしながら、将来的なリスクがあるにせよ、今現在、顕在的なニーズを自覚していないアクティブシニア層については、スマイルケア食には無関心な傾向が感じられ、動機付けの工夫が必要である。食品事業者向けについては、個別対応によりスマイルケア食の開発を促し、技術支援した結果、スマイルケア食「青」マーク利用許諾商品は計 10 事業者（全体の 28.6%）34 商品（同 22.8%）となり、秋田県が全国最多となった。これらは、地場産食材の積極的な取り扱いや地域の伝統料理などをスマイルケア食として提供していることが特長であり、大手メーカーなどによる商品群との差別化を図っている。一方、管理栄養士等専門家向けについては、本学会での事例報告や、介護関連専門会議等イベントへの参加、メディケアフーズ展におけるブース出展などを通じて、スマイルケア食の積極的な周知を図り、在宅介護における摂食支援の環境改善を目的としたスマイルケア食の活用などを提案した。

7) 発表学会：第 92 回日本生化学会大会

発表日と場所：2019 年 9 月 19 日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ
（パエニダーゼ）の結晶構造解析

発表者：○葦澤悟¹、木平清人²、吉矢拓³、熊谷久美子³、中原和彦¹、高橋砂織⁴
（¹国際農研、²JAXA、³（株）ペプチド研、⁴秋田県総食研）

要旨：これまで、一部の細菌の細胞膜に D 型アミノ酸の存在することが知られていたが、近年、哺乳類の生体内にも遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが見出されている。さらに、これらの D 型アミノ酸が様々な病態と関連することが示唆されている。特に、D-アスパラギン酸が注目されており、アミロイド β タンパク質ではアスパラギン酸残基の D 型変

異がアミロイドタンパク質の凝集を引き起こすことが示唆されている。高橋らはD-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp. B38 株) を分離するとともに、産生する酵素を paenidase (パエニダーゼ) と命名し、その性質を明らかにした¹⁾。また、葦澤らは、paenidase がペニシリン結合タンパク質の一種であることを明らかにした²⁾。今回我々は、paenidase の全体構造を明らかにするとともに、基質結合部位を推定した。Paenidase の結晶化は、国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟で行った。回折実験は、SPring-8 (兵庫県佐用郡) 及び Photon Factory (茨城県つくば市) で行った。宇宙実験の結果、paenidase の高品質結晶を取得することに成功し、約 2.25 Å の回折点を確認するとともに、paenidase の全体構造を構築した。つぎに、得られた結晶にD-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ阻害剤である i-DAEP (Bz-Arg-His-[D-Asp]-CH₂Cl) をソーキングし、酵素阻害剤複合体結晶を取得した。得られた結晶を解析したところ、i-DAEP の D-Asp 残基の側鎖と、paenidase の Arg121 の側鎖が結合していることが明らかになった。さらに、部位特異的変異法により Arg121 を各種アミノ酸 (Ala, Ile, Glu, His, Lys) に変異させ、各種変異体 (R121A, R121I, R121E, R121H, R121K) を作製し、それらの活性を測定した。その結果、R121A, R121I, R121E, R121H は Wild-type に比べて著しく活性が低下した。一方、R121K は他の変異体より活性を保持していた。以上の結果から、paenidase の基質認識には、Arg121 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

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

2) S. Nirasawa *et al.*, *J. Biochem.* **164**, 103-112, 2018.

8) 発表学会：第92回日本生化学会大会

発表日と場所：2019年9月20日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：発熱植物ザゼンソウにおける *trans-resveratol di-O-methyl transferase* に関する研究

発表者：○谷本悠¹、梅川結²、伊藤菊一^{1,3}

(¹岩手大院・総合科学、²秋田県総食研、³岩手大・次世代アグリ)

要旨：ザゼンソウ (*Symplocarpus renifolius*) は寒冷環境で発熱し、外気温の変動にも関わらずその熱産生器官の温度を 23°C 程度に維持できる恒温性を有している。本植物の器官特異的な熱産生にはミトコンドリア内膜に局在するシアン耐性呼吸酵素 (AOX) の関与が指摘されている (Moore *et al.*, 2013)。本研究においては、ザゼンソウの熱産生組織に着目し、当該組織で AOX と同等以上の発現を示す遺伝子群の検索と同定を試みた。ザゼンソウの発熱および非発熱組

織を用いた次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行ったところ、*trans-resveratrol di-O-methyltransferase (ROMT)* が発熱組織において *AOX* と共に高レベルで発現していることが判明した。ROMT は resveratrol を pterostilbene に変換する反応を触媒することが知られているが、これまでザゼンソウを含む発熱植物において解析された事例はない。本研究においては、ROMT の発現プロファイルから同遺伝子産物のザゼンソウにおける機能を考察したい。

9) 発表学会：第 92 回日本生化学会大会

発表日と場所：2019 年 9 月 20 日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：発熱植物ザゼンソウの無益回路に関する研究

発表者：○後藤広太¹、梅川結²、伊藤菊一^{1,3}

（¹岩手大・農、²秋田県総食研、³岩手大・次世代アグリ）

要旨：ザゼンソウをはじめとする発熱植物は、呼吸活性の増大により特定の器官の温度を積極的に上昇させることが知られている。ザゼンソウの肉穂花序は、氷点下を含む外気温の変動にも関わらず、発熱によりその体温を 20°C 内外に維持できる恒温性を有している。これまでの研究から、ザゼンソウを含む発熱植物の熱産生にはミトコンドリア電子伝達系に存在するシアン耐性呼吸酵素 *AOX* の関与が指摘されている。本研究においては、従来の *AOX* を介したミトコンドリア呼吸とは異なる熱産生メカニズムの存在を検討するため、ザゼンソウ肉穂花序における解糖経路に着目した解析を行った。具体的には、次世代シーケンサーを用いた解析から、ザゼンソウの解糖経路に関わる全遺伝子群を同定すると共に、RNA-seq により詳細な発現解析を行った。その結果、熱産生組織において *PFK* と *FbPase* が *AOX* と共発現していることを見出した。これらの結果は、ザゼンソウの熱産生組織において *PFK* と *FbPase* から構成される無益回路が機能していることを示唆している。以上の結果に基づき、ザゼンソウの新たな熱制御メカニズムについて議論したい。

10) 発表学会：食品開発展 2019

発表日と場所：2019 年 10 月 3 日、東京ビックサイト（東京都）

演題名：枝豆を丸ごと粉末化した「爛漫枝豆粉末」の特性

発表者：○梅川結（秋田県総食研）

要旨：米どころ秋田を代表する酒造会社の一つである秋田銘醸株式会社は、これまで日本酒製造の副産物を用いた新たな食品素材開発に積極的に取り組んできた。同社のブランドである「爛漫」を題した「爛漫酒粕粉末」は、生理機能性を

も有する食品素材として利活用されている。近年は、秋田県で年間 800 t 超生じる規格外枝豆を鞘ごと粉末化した「爛漫枝豆粉末」を開発した。今回は、食品機能(栄養、おいしさ、並びに生理機能性)の観点から当該粉末の特性を紹介する。

11) 発表学会：平成 31 年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2019 年 10 月 16 日、北とぴあ（東京都）

演題名：清酒製造場における米麴への混入微生物の同定と混入微生物が清酒品質に及ぼす影響の評価

発表者：○佐藤友紀、上原智美、大野剛、進藤昌、渡邊誠衛（秋田県総食研）

要旨：【目的】清酒製造においては、酵母、乳酸菌、麴菌の 3 者が一般的な醸造用途に用いられる。一方、これら以外の菌が製造工程に混入するケースも多く、いわゆる 4VG の発生や火落ちの原因となる場合がある。そのため、清酒製造場の衛生状況を適切に把握・制御し、製成酒の品質を安定化させることは重要である。

本研究では、秋田県内製造場の米麴における麴菌以外の微生物を同定し、それらの製造工程への混入が清酒品質に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】秋田県内の一部の清酒製造場から採取した米麴の希釈液を YPD-Agar に塗布し、培養後に目視確認されたコロニーをシーケンス解析に供した。シーケンス結果を基に、PCR によって米麴への混入微生物を検出する方法を検討した。混入微生物による影響を評価するため、アルコール脱水麴を加えた麴エキス中に K1801 と米麴から単離した微生物を添加し、発酵試験に供した。

遠心分離後の上清についてアルコール濃度、香気成分、アミノ酸、オリゴ糖を分析した。さらに、単離微生物を用いた米麴を作成、発酵試験を行い、酒質への影響を評価した。

【結果】シーケンス解析の結果、*Staphylococcus* 属、*Bacillus* 属、*Leuconostoc* 属、いわゆる野生酵母を中心とする 15 種の微生物株が同定された。*Staphylococcus* と *Bacillus* については米麴懸濁液を直接のテンプレートとした PCR での検出が可能となった。発酵試験においては、*Staphylococcus haemolyticus* (理研 BRC) または *Bacillus subtilis* (理研 BRC) を添加した試験区においてカプロン酸エチルをはじめとする吟醸香の低減と、Glu、Ala、Gly 等一部のアミノ酸の増大が認められた。一方、アルコール濃度、発酵経過、オリゴ糖に試験区間で差はなかった。以上より、清酒製造における米麴への混入微生物は *Staphylococcus* 属が中心ながらも幅広く存在し、香気成分やアミノ酸組成に影響することが示唆された。

12) 発表学会：平成 31 年度日本醸造学会

発表日と場所：2019 年 10 月 16 日、北トピア（東京都）

演題名：清酒のフェルラ酸、フェルラ酸エチル及び呈味性ピログルタミルペプチドのレベル変動要因の検討

発表者：○橋爪克己¹、伊藤俊彦¹、白戸香緑¹、天野奈緒美¹、大野剛²、
進藤昌²、渡邊誠衛²、奥田将生³

(¹秋田県立大、²秋田県総食研、³酒類総研)

要旨：清酒醸造において製成酒のフェルラ酸、フェルラ酸エチル及び呈味性ピログルタミル (pGlu) ペプチドレベルに影響を及ぼす要因を検討した。その結果、製成酒のフェルラ酸濃度は、白米のフェルラ酸含有量と高い相関 (0.782**；1%有意) を示し、また麴抽出液のフェルロイルエステラーゼ活性 (0.804**) 及びフェルロイルオリゴ糖生成活性 (FSFA) (0.619**) とも高い相関を示した。この結果から、白米のフェルラ酸の多寡はフェルロイルエステラーゼ及び FSFA のレベル変動を引き起こし、それを介して製成酒のフェルラ酸及びフェルラ酸エチル濃度に影響を及ぼすことが示唆された。白米の粗タンパク質含有量の多寡に応じて生成する苦味ペプチド濃度は変動し、一度生成した苦味ペプチドはもろみの進行とともに苦味ペプチドを基質とする酸性カルボキシペプチダーゼによって分解され、より呈味が弱い (pGlu)L が蓄積することが示唆された。

13) 発表学会：第62回全国酒造技術指導機関合同会議

発表日と場所：2019 年 10 月 18 日、中央合同庁舎第 4 号館（東京都）

演題名：醸造工程の微生物を制御することによる日本酒の高品質化

発表者：○渡邊誠衛、佐藤友紀、上原智美、大野剛、進藤昌

(秋田県総食研)

要旨：本研究では、清酒製造場の米麴における麴菌以外の微生物を同定し、それらの製造工程への混入が清酒品質に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

清酒製造場から採取した米麴の希积液を YPD-Agar に塗布し、培養後に目視確認されたコロニーをシーケンス解析に供した。さらに混入微生物による影響を評価するため、単離した微生物を用いて製麴し、発酵試験を行った。

シーケンス解析の結果、Staphylococcus 属、Bacillus 属、Leuconostoc 属、いわゆる野生酵母を中心とする 15 種の微生物株が同定された。単離微生物を用いた発酵試験において、製麴時の微生物添加によるもろみ経過、上槽後の酒質、オフフレーバーの強弱に対する影響がそれぞれ認められた。

**14) 発表学会 : International Congress on Biotechnology and Genetic Engineering
(Biocon-2019)**

発表日と場所 : 2019年10月29日、Paris Marriott Charles de Gaulle Airport Hotel
(Paris, France)

演題名 : Inhibition of DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase and
HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai).

発表者 : Yuto Tsutsumi¹, Keiko Ishizuka¹, Misato Baba¹, Kosaku Nishimura², Keishi Hata³,
Saori Takahashi³, Shozo Sakuda⁴, Teisuke Takita¹, Kenji Kojima¹ and Kiyoshi
Yasukawa¹ (¹Kyoto Univ. ²Toyo Inst. Tech., ³Akita Res. Inst. Food. & Brew.,
⁴Teikyo Univ.)

要旨 : Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) possesses two distinct enzymatic activities, RNA- and DNA-dependent DNA polymerase and RNase H activities. We previously reported that ethanol- and water-extracts of *Brasenia schreberi* strongly inhibited not only the DNA polymerase activity to incorporate dTTP into poly(rA)-p(dT)₁₅ but also the RNase H activity to hydrolyze the RNA strand of an RNA/DNA hybrid. In addition, these extracts inhibited HIV-1 replication in human cells with EC₅₀ values of 1 to 2 µg/ml¹.

We have been doing study to identify HIV-1 RT inhibitory components in the extracts of Junsai. The fractions with strong inhibitory activity were obtained from the boiled water-extracts of Junsai by reversed phase liquid chromatography (Sep-Pak and Capcell-Pak C18). The DNA polymerase activity was measured by counting the amounts of ³H-labelled dTTP incorporated into the template-primer in the reaction with or without Junsai extracts. Five compounds (named A to E) were detected only in the fractions with strong inhibitory activity in LC-Q-Tof/MS. The structure of compounds D and E were estimated to be gallotannin. Compound E, which is 1,3,6-Tri-*O*-galloyl-β-D-glucose and was commercially obtained from Sigma. However, it did not inhibit the DNA polymerase activity of HIV-1 RT.

1) T. Hisayoshi *et al.* (2015) *J. Nat. Med.* **69**: 432-440

15) 発表学会 : 令和元年度全国食品技術研究会

発表日と場所 : 2019年10月31日、つくば国際会議場 (つくば市)

演題名 : 「いぶりがっこ」の品質調査と製造工程に関する研究

発表者 : ○佐々木康子、渡辺隆幸 (秋田県総食研)

要旨 : 「いぶりがっこ」は、燻煙工程 (燻り工程) を有する独特な漬物である。市販のいぶりがっこは、各製造業者独自の燻り工程と漬込工程により製造されていることから、成分には様々な違いがあると予想される。菅原らにより1980年から1990年にかけて市販品の調査研究が行われたが、その後、調査研究はほとんど行われていなかった。そこで、市販品の調査を行い、成分面からいぶりがっこ

の特徴を明らかにした。また、燻り工程は、燻り温度と燻り時間の工程管理が経験に基づいて行われており、燻り温度とダイコンの水分変化の関係やダイコンの成分変化については調査されていなかった。燻り工程は温度コントロールが難しいため、熱風乾燥機を用いたモデル乾燥試験を実施することにより、乾燥温度の違いがダイコンの水分や成分に与える影響について検討した。

16) 発表学会：第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所：2019年12月1日、神戸国際会議場（神戸市）

演題名：Inhibition of the DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai)

発表者：Keiko Ishizuka¹, Yuto Tsutsumi¹, Misato Baba¹, Kosaku Nishimura^{1,2}, Keishi Hata³, Saori Takahashi³, Shozo Sakuda⁴, Teisuke Takita¹, Kenji Kojima¹, and Kiyoshi Yasukawa¹ (¹Div. of Food Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., ²Toyo Inst. Food Technol., ³Akita Res. Inst. Food and Brew., ⁴Grad. Sch. of Sci. and Eng., Teikyo Univ.)

要旨：**Objectives:** Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) possesses two distinct enzymatic activities, RNA- and DNA-dependent DNA polymerase and RNase H activities. We previously reported that ethanol- and water-extracts of *Brasenia schreberi* (Junsai) strongly inhibited not only the DNA polymerase activity to incorporate dTTP into poly(rA)-p(dT)₁₅ but also the RNase H activity to hydrolyze the RNA strand of an RNA/DNA hybrid. In addition, these extracts inhibited HIV-1 replication in human cells with EC₅₀ values of 1 to 2 µg/ml¹⁾. In this study, we attempted to identify HIV-1 RT inhibitory components in the extracts of Junsai.

Methods: The fractions with strong inhibitory activity were obtained from the boiled water-extracts of Junsai by reversed phase liquid chromatography (Sep-Pak and Capcell-Pak C18). The DNA polymerase activity was measured by counting the amounts of ³H-labelled dTTP incorporated into the template-primer in the reaction with or without Junsai extracts.

Results: Five compounds (named A to E) were detected only in the fractions with strong inhibitory activity in LC-Q-Tof/MS. The structure of compounds D and E were estimated to be gallotannin. Compound E, which is 1,3,6-Tri-*O*-galloyl-β-D-glucose and was commercially obtained from Sigma. However, it did not inhibit the DNA polymerase activity of HIV-1 RT.

Conclusion: HIV-1 RT inhibitory components were partially purified from the extracts of Junsai.

References: 1) T. Hisayoshi *et al.* (2015) *J. Nat. Med.* **69**: 432-440

17) 発表学会： 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所：2019年12月3日、神戸国際会議場（神戸市）

演題名： JUNSAIKOMACHI, dietary supplement with water shield extract and sake cake dry powder.

発表者： Keishi Hata¹, Sayaka Tomatsu¹, Yui Umekawa¹, Akiko Takashima², Muketaka Sano²

(¹Akita Res. Inst. Food & Brew., ²Sano Inc.)

要旨： We previously demonstrated that administration of a dietary supplement containing water shield extract and sake cake dry powder markedly increased the number of days with defecation and defecation frequency compared with a placebo group. Furthermore, the subjects simultaneously reported improvement of skin conditions such as "noticeable pores" by intake of the supplement. Based on these results, we developed a stick jelly type of dietary supplement containing water shield extract and sake cake dry powder, named "JUNSAIKOMACHI". In the present study, we evaluated the effects of JUNSAIKOMACHI on the skin condition of 28 healthy adult females by a subjective survey in a before–after clinical test.

The study was performed based on the following schedule: 28 subjects were administered one packet/day of JUNSAIKOMACHI for 28 days, and their subjective reports of 16 symptoms of skin condition were assessed using visual analogue scores (VAS). Marked improvements were recognized in "dry skin" and "makeup finishing" of healthy adult females by administration of JUNSAIKOMACHI in the first 14 days. Further intake of JUNSAIKOMACHI up to 28 days significantly affected 9 symptoms, and a marked difference in VAS of "makeup runs easily" was observed between Day 14 and Day 28.

18) 発表学会： 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所：2019年12月3日、神戸国際会議場（神戸市）

演題名： Plasma lipoprotein profiles and free choline levels in NASH model rats
-Novel minimally invasive indicators for NASH-

発表者： Koji Kuriyama¹, Junichiro Takahashi¹, Takanobu Kikuchi¹, Kazuyuki Hiwatashi², Akira Sasaki², and Keishi Hata²

(¹Skylight Biotech Inc., ²Akita Res. Inst. Food & Brew.)

要旨： Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) becomes to be serious liver disease in industrialized country including Japan. Recently, it was reported that increase in very low density lipoproteins (VLDL)-sizes and plasma free choline level is highly correlated with

liver steatosis and fibrosis, and might be minimally invasive indicator of NASH. Methionine-choline deficient (MCD) diet fed animals are usually used as NASH model; however, validations of these minimally invasive biomarkers in MCD-diet fed animals, remain to be unclear. In the present study, plasma lipoprotein profiles and plasma free choline levels in MCD-diet fed rats are measured, it was whether these markers also are useful for screening NASH agents using MCD-diet fed animal.

The microscopic observations of livers in normal and MCD diet fed rats (control and MCD group, respectively) revealed that numerous of large oil droplets and fibrosis progressions were observed in MCD group. These results suggested that MCD diet feeding induce NASH in rat livers. Plasma cholesterol, triglycerides concentrations in all major classes of lipoprotein were higher than control group. Furthermore, increase of VLDL size were observed according to induction of NASH. The plasma free choline levels increased in MCD group, whereas phospholipid contents in liver, in which phosphatidylcholine are more than half, lowered in the group, suggesting that the abnormality in absorption of free choline probably into liver was caused by NASH progression.

19) 発表学会： 第7回国際フードファクタ会議(ICoff2019)

発表日と場所：2019年12月4日、神戸国際会議場（神戸市）

演題名：PXB-cells for the study of lipid metabolism: Robust and human-specific lipid profile in human hepatocytes freshly isolated from chimeric mice with human liver.

発表者：Masakazu Kakuni¹, Masaki Takahashi¹, Akira Sasaki², and Keishi Hata²

(¹PhenixBio Co. Ltd., ²Akita Res. Inst. Food & Brew.)

要旨：We have previously demonstrated successful mass production of a chimeric mouse model with humanized liver (PXB-mouse[®]) as well as human hepatocytes freshly isolated from these mice (PXB-cells[®]). In this study, we investigated the utility of PXB-cells for lipid metabolism-related research in comparison with HepG2 and HuH7 cell lines.

PXB-cells secreted 4.7 $\mu\text{g}/10^6$ cells of cholesterol (Chol) and 49.5 $\mu\text{g}/10^6$ cells of triglyceride (TG), and these amounts were similar to or larger than those in HepG2 and HuH7 cell lines. Strikingly, 80.2% of Chol and 93.3% of TG secreted by PXB-cells were attributed to VLDL fraction, which was in contrast with the HepG2 (Chol; 20.0%, TG; 8.3%) and HuH7 (Chol; 32.7%, TG; 43.8%). In addition, high levels of gene expression were confirmed for several lipid metabolism-related genes in PXB-cells.

20) 発表学会：令和元年度土木学会東北支部技術研究発表会

演題名：酒米栽培における下水処理水の投入負荷量が生育特性および環境負荷

に及ぼす影響

発表日と場所：2020年3月7日、秋田大学（秋田市）

発表者：○北林怜¹、増田周平¹、高階史章¹、岡野邦宏²、宮田直幸²、

大野剛³、Phung Duc Luc⁴、Pham Viet Dung⁴、渡部徹⁴

（¹秋田高専、²秋田県立大、³秋田県総食研、⁴山形大）

要旨：下水処理水は、窒素・リン・カリウムなどの栄養塩を含むため、作物栽培の代替肥料として用いることで、肥料費用の節約と放流域の水質改善が期待できる。既往の研究において、下水処理水を水稲栽培に活用することで、安全で、基本的な醸造特性を満たし、特色のある酒造好適米（酒米）が栽培できる可能性が示されている。しかし、投入方法や投入量が酒米の生育特性、品質特性および環境負荷に及ぼす影響は定量的に明らかにされていない。そこで本研究では、下水処理水を活用した酒米栽培の生育特性、品質評価および環境負荷の評価を目的として、下水処理水を異なる負荷で投入したポット試験を行った。その結果、下水処理投入量の増加にともない、生育指標は増加した。また、玄米品質としては醸造に求められる各種指標を充足した。さらに、土壌と玄米における有害物質濃度は、基準値に抵触するような顕著な蓄積は見られなかった。一方で、水質や温室効果ガスの変動は大きく、かつ両者の関係性は不明確であったことから、定量的な評価のためには根圏の生物化学的反応の詳細評価が必要と考えられた。

21) 発表学会：第54回日本水環境学会年会

発表日と場所：2020年3月16日、岩手大学（盛岡市）

演題名：酒造好適米栽培における下水処理水の最適利用手法の開発に向けた実験的検討

発表者：竹田壮太¹、増田周平¹、高階史章²、岡野邦宏²、宮田直幸²、

大野剛³、Phung Luc⁴、Pham Dung⁴、渡部徹⁴

（¹秋田高専、²秋田県立大、³秋田県総食研、⁴山形大）

要旨：近年、農業分野における下水道資源の利活用に注目が集まっており、窒素・リン・カリウム（以下、K）などの栄養塩を含む下水処理水（以下、処理水）の活用は、省資源型・環境保全型農業の構築に資すると期待されている。既往の研究において、下水処理水の活用により、重金属の蓄積がなく、醸造品質を充足し、K含有量の高い特色のある酒造好適米（酒米）が可能であることが示されている。一方で、処理水投入が玄米の生育特性、玄米品質、安全性、および環境負荷に及ぼす影響は定量的に明らかにされていない。本研究では、処理水の投入方法および投入量を変動させた酒米栽培を3シーズンにわたって行い、処理水を活用した酒米栽培手法について、総合的に評価を行った。その

結果、後の投入量を間断灌漑などで抑制することで、良好な生育と品質の確保に加え、玄米への特色の付与を達成できると考えられる。一方で、玄米や土壌への重金属など有害物質の蓄積は見られず、安全衛生上の問題がないことが確認された。

22) 第 93 回日本薬理学会年会

発表日と場所：2020年3月16日～18日（ポスター発表、要旨発表のみ）

演題名：アンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2)様活性を持つ B38-CAP による降圧作用と心不全改善作用 (Identification of B38-CAP as an ACE2-like enzyme to suppress hypertension and cardiac dysfunction in mice.)

発表者：久場敬司¹、湊隆文¹、菝澤悟²、佐藤輝紀³、山口智和¹、渡邊博之³、今井由美子⁴、高橋砂織⁵（¹秋田大院・生化、²国際農研、³秋田大・循環器内科、⁴医薬基盤研、⁵秋田県総食研）

要旨：Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a negative regulator of the renin-angiotensin system, critically involved in blood pressure regulation, heart function, lung injury, or fibrotic kidney disease. Recombinant human ACE2 protein (rhACE2), currently clinically evaluated to treat acute lung failure, is a glycosylated protein, requiring time- and cost-consuming protein production in mammalian cells. Here we show that the B38-CAP, a carboxypeptidase derived from *Paenibacillus sp.* B38, is a novel ACE2-like enzyme to decrease angiotensin II levels in mice. Comparative analysis of protein 3D structures revealed that B38-CAP homologue shares structural similarity to mammalian ACE2 without any apparent sequence identity, containing the consensus HEXXH amino acid sequence of the M32 peptidase family. In vitro, recombinant B38-CAP protein catalyzed the conversion of angiotensin II to angiotensin 1-7, as well as other known ACE2 target peptides, with the same potency and kinetics as human ACE2. Treatment with B38-CAP reduced plasma angiotensin II levels and suppressed angiotensin II-induced hypertension, cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. Moreover, continuous infusion of B38-CAP inhibited pressure overload-induced pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction in mice, without any overt toxicity of liver and kidney. Our data identify the bacterial B38-CAP as an ACE2-like carboxypeptidase, which exhibits ACE2-like functions in vitro and in vivo. These results indicate that evolution has shaped a bacterial carboxypeptidase to a human ACE2-like enzyme. Bacterial engineering could be utilized to design improved protein drugs for hypertension and heart failure.

6. 外部発表論文概要 (8件)

1) 論文題名：酒粕とジュンサイが原料のご当地サプリメント

著者名：畠恵司 (秋田県総食研)

雑誌名：日本醸造協会誌, **114** (4), 174-180 (2019)

発行日：2019年4月15日

2) 論文題名：去痰作用を有する食品素材探索

～ネギエキ스는気道上皮細胞におけるムチン過剰産生を正常化する～

著者名：畠恵司¹、岩下淳²、高嶋亜希子³

(¹秋田県総食研、²秋田県立大学、³(株)サノ)

雑誌名：食品と開発, **54** (5), 78-80 (2019)

発行日：2019年5月1日

3) 論文題名：秋田県内中小規模食品事業者向けヒト臨床試験システムの構築

著者名：佐々木玲 (秋田県総食研)

雑誌名：食品と開発, **54** (8), 62-64 (2019)

発行日：2019年8月1日

4) 論文題名：小腸上皮細胞を用いた抗メタボ素材評価系

著者名：高橋純一郎¹、戸嶋彦¹、大友理宣²、畠恵司³

(¹スカイライトバイオテック、²秋田銘醸、³秋田県総食研)

雑誌名：Foodstyle21, 23(8) (2019)

発行日：2019年8月10日

5) 論文題名：Factors affecting levels of ferulic acid, ethyl ferulate and taste-active pyroglutamyl peptides in sake

著者名：Katsumi Hashizume¹, Toshihiko Ito¹, Karin Shirato¹, Naomi Amano¹, Tetsuo Tokiwano¹, Tsuyoshi Ohno², Sho Shindo², Seiei Watanabe² and Masaki Okuda³
(¹Akita Pref. Univ., ²Akita Res. Inst. Food & Brew., ³Natl. Res. Inst. Brew.)

雑誌名：Journal of Bioscience and Bioengineering **129**(3), 322-326 (2020)

<https://doi.org/10.1016/j.jbosc.2019.09.021>

発行日：Available online, 2019年10月28日

6) 論文題名：Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB cells, human normal hepatocytes from chimeric mice with human liver.

著者名：Keishi Hata¹、Sayaka Tomatsu¹、Masaki Takahashi²、Akira Sasaki¹、Yui Umekawa¹、Kazuya Miyashita³、Kazumi Ogura³、Gen Toshima³、Masahiro Maeda^{3,4}、Junichiro Takahashi⁴、Masakazu Kakuni² (¹Akita Res. Inst. Food & Brew., ²PhenixBio, ³Immuno-Biol. Lab., ⁴Skyligh Biotech)

雑誌名：Biomedical Research (Tokyo) **41** (1), 33-42 (2020)

<https://doi.org/10.2220/biomedres.41.33>

発行日：2020年2月1日

7) 論文題名：Examination of the influence of cedar fragrance on cognitive function and behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer type dementia

著者名：Yuya Takahashi¹, Sho Shindo², Takashi Kanbayashi^{1,3}, Masahiro Takeshima¹, Aya Imanishi¹, Kazuo Mishima^{1,3} (1Akita Univ. Grad. Sch. Med., ²Akita Res. Inst. Food & Brew., ³Univ. Tsukuba)

雑誌名：*Neuropsychopharmacology Reports*, **40**(1), (2020) Open Access
<https://doi.org/10.1002/npr2./12096>

発行日：2020年2月9日

8) 論文題名：B38-CAP is a bacteria-derived ACE2-like enzyme that suppresses hypertension and cardiac dysfunction.

著者名：Takafumi Minato^{1#}, Satoru Nirasawa^{2#*}, Teruki Sato^{1,3#}, Tomokazu Yamaguchi¹, Midori Hoshizaki⁴, Tadakatsu Inagaki⁵, Kazuhiko Nakahara², Tadashi Yoshihashi², Ryo Ozawa¹, Saki Yokota⁶, Miyuki Natsui¹, Souichi Koyota⁷, Taku Yoshiya⁸, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye⁸, Satoru Motoyama⁹, Takeshi Gotoh⁶, Yoshikazu Nakaoka⁵, Josef M. Penninger^{10,11}, Hiroyuki Watanabe³, Yumiko Imai⁴, Saori Takahashi¹², Keiji Kuba^{1#*} (¹Dept. Biochem. and Metab. Sci., Akita Univ. Grad. Sch. Med., ²Japan Internal. Res. Cent. Agric. Sci., ³Dept. Cardiovascular. Med., Akita Univ. Grad. Sch. Med., ⁴Natl. Inst. Biomed. Inno., Health and Nutrition, ⁵Res. Inst. Natl. Cerebral and Cardiovasc. Cent., ⁶Dept. Materials Sci., Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ., ⁷Biosci. Educ. Res. Support Cent., Akita Univ., ⁸Peptide Inst., Inc., Osaka ⁹Dep. Surg., Akita Univ. Grad. Sch. Med., ¹⁰IMBA -Inst. Mol. Biotech. of the Austrian Acad. Sci., Campus Vienna BioCenter, Vienna 1030, Austria. ¹¹Dep. Med. Genetic. Life Sci. Inst., University of British Columbia, Vancouver, Canada. ¹²Akita Res. Inst. Food and Brew., #equal first author.

雑誌名：*Nature Communications*, **11**, 1058 (2020)
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14867-z>

発行日：2020年2月26日

1) 論文題名：酒粕とジュンサイが原料のご当地サプリメント

著者名：畠恵司（秋田県総食研）

雑誌名：日本醸造協会誌, **114** (4), 174-180 (2019)

発行日：2019年4月15日

要約：全国4位の生産量の酒どころ秋田県では、多量の酒粕が同時期に多量に産出される上に保存中にも発酵が進むなど、一定の品質を保つことが困難なため、十分な利活用がなされていない。一方、秋田県北西部に位置する三種町は日本一のジュンサイ産地である。しかしながら、摘み手の高齢化や外国産のジュンサイの影響もあり、2016年の生産量は440トンにまで減少した。こうした背景のもと、同町では、三種町森岳じゅんさいの里活性化協議会を設立し、ジュンサイ摘み取り体験などの企画を通じて、ジュンサイの普及・消費拡大に取り組んでいる。

本稿では、(株)サノ（秋田市）と共同開発した「酒粕とジュンサイ」を原料にした美容・健康サプリメント（商品名：「潤彩小町」）について、開発段階に合わせた3度のヒト臨床試験、すなわちプラセボ対照二重盲検、オープン試験、ユーザー調査を実施し、便通改善作用・美肌効果を検証した。これらヒト臨床試験による機能性検証は、「潤彩小町」の販売・促進を狙うものであると同時に、「酒粕乾燥粉末+ジュンサイエキス」を配合した新たな商品に応用できる。こうして誕生したのが、2018年11月から発売された「潤彩健美」、シャルヌ化粧品(株)である。今後は他の機能性素材を含めた機能性検証を行い、新たな商品開発に繋げたい。

2) 論文題名：去痰作用を有する食品素材探索

～ネギエキスは気道上皮細胞におけるムチン過剰産生を正常化する～

著者名：畠恵司¹、岩下淳²、高嶋亜希子³

(¹秋田県総食研、²秋田県立大学、³(株)サノ)

雑誌名：食品と開発, **54** (5), 78-80 (2019)

発行日：2019年5月1日

要約：秋田県におけるネギの栽培は、主に園芸メガ団地で行われ、国内で生産されるネギ46.5万トン（平成28年度産）のおよそ2.7%にあたる1.2万トンを生産している。しかしながら、収穫されたネギのうち3割程度が、形状や長さの点で規格外として廃棄されるため、こうした規格外品の新たな用途開発が急務である。我々は、ネギ抽出物のヒト気道上皮細胞におけるムチン産生抑制作用、つまり痰の粘性を下げる作用（去痰作用）を見出した。さらに、固形から液状の加工食品まで、幅広く配合可能なエキス噴霧乾燥品を試作し、去痰作用を細胞レベルで確認した。今後は、動物実験やヒト介入試験を通じて、ネギエキスの去痰作

用を検証し、痰が重篤な肺炎に至りやすい高齢者や、COPD（Chronic Obstructive Pulmonary Disease：慢性閉塞性肺疾患）患者を対象とした商品開発に繋げたい。

3) 論文題名：秋田県内中小規模食品事業者向けヒト臨床試験システムの構築

著者名：佐々木玲（秋田県総食研）

雑誌名：食品と開発, **54** (8), 62-64 (2019)

発行日：2019年8月1日

要約：食品への機能性表示は、食品の差別化・ブランド化に拍車をかけるが、我が国において機能性を表示することができる食品は、国が個別に許可した特定保健用食品、国の規格基準に適合した栄養機能食品、そして平成27年4月に新しく制度化された機能性表示食品といった保健機能食品に限られる。決められた栄養成分について決められた表現しか用いることができない栄養機能食品を除き、特定保健用食品や機能性表示食品では、表示しようとする食品の機能性に関する科学的根拠をヒト臨床試験または文献評価で示さなければならない。一方、保健機能食品以外の一般食品（いわゆる健康食品）では、「すっきり」や「くっきり」などといった抽象的な表現や体験談などで有効性をほのめかすケースが多いが、近年健康食品の差別化・高付加価値化においても、ヒト臨床試験における有効性の検証が必要になってきている。

全体の約半数を小規模事業者が占める秋田県の食品産業は、従来のヒト臨床試験を実施できる企業がほとんどないのが現状である。そこで我々は秋田県内の食品産業を支援するため、トクホ・機能性表示食品レベルではないものの、主に感覚や感情の強度を評価する際に用いられる visual analog scale 法を用いることで食品の効果を簡便に判別できるヒト臨床試験システムを構築した。本稿では、上記ヒト臨床試験システムについて、秋田県産機能性食品素材であるジュンサイエキスとアイスプラント粉末からなる青汁の摂取が健康状態に与える影響について検証した事例を基に解説した。

4) 論文題名：小腸上皮細胞を用いた抗メタボ素材評価系

著者名：高橋純一郎¹、戸嶋彦¹、大友理宣²、畠恵司³

(¹スカイライトバイオテック、²秋田銘醸、³秋田県総食研)

雑誌名：Foodstyle21, 23(8), (2019)

発行日：2019年8月10日

要約：食事に含まれる中性脂肪は、膵リパーゼによりモノグリセリドと遊離脂肪酸に分解され、コレステロール、胆汁酸およびリン脂質とミセル形成し、小腸上皮細胞に取り込まれる。小腸上皮細胞において再合成された中性脂肪はコレス

テロールなどとともに、リポタンパク質と呼ばれる球状粒子として体内に吸収される。したがって、この小腸上皮細胞における中性脂肪の再合成やリポタンパク質の産生抑制は、体内への脂質吸収を阻害する結果として脂質異常症の改善に繋がる。本稿では、小腸上皮細胞から吸収されたリポタンパク質を、LipoSEARCH®で分析する新規脂質吸収系構築や、米糠発酵素材の小腸上皮細胞における脂質産生抑制作用を概説した。

5) 論文題名 : **Factors affecting levels of ferulic acid, ethyl ferulate and taste-active pyroglutamyl peptides in sake**

著者名 : Katsumi Hashizume¹, Toshihiko Ito¹, Karin Shirato¹, Naomi Amano¹, Tetsuo Tokiwano¹, Tsuyoshi Ohno², Sho Shindo², Seiei Watanabe² and Masaki Okuda³ (¹Akita Pref. Univ., ²Akita Res. Inst. Food & Brew., ³Natl. Res. Inst. Brew.)

雑誌名 : *Journal of Bioscience and Bioengineering* **129**(3), 322-326 (2020)
<https://doi.org/10.1016/j.jbosc.2019.09.021>

発行日 : Available online, 2019年10月28日

要約 : Factors affecting ferulic acid, ethyl ferulate and taste-active pyroglutamyl (pGlu) peptides levels in sake were analyzed using small-scale sake brewing tests on eighteen rice samples with differing cultivar variety, cropped year and area, and polishing rate. Ferulic acid concentration in sake was highly positively correlated with its content in rice ($r [0.782^{**}$, double asterisk indicates 1% significance level), feruloyl esterase (FE) activity ($r [0.804^{**}$) and feruloylated saccharide forming activity (FSFA) ($r [0.619^{**}$) in the rice koji. The results suggested that ferulic acid in rice induced FE activity and FSFA, and these two enzymes accelerated the formation of ferulic acid in sake mash. The concentration of bitter-tasting peptides in sake was highly positively correlated with crude protein content in rice ($r [0.786^{**}$), and negatively correlated with acid carboxypeptidase (ACP) activity to (pGlu)LFGPNVNPWH ($r [0.612^{**}$), fermentation length ($r [0.820^{**}$), and pyroglutamyl leucine ((pGlu)L) concentration in sake ($r [0.502^{*}$; 5% significance level). The observation suggested that bitter-tasting peptides are initially formed in sake mash in accordance with protein content in rice, and are then hydrolyzed to smaller peptides, such as (pGlu)L. An ACP specific to the hydrolysis of bitter-tasting peptides was suggested by the observation that ACP activity to (pGlu)LFGPNVNPWH was significantly correlated (0.612^{**}) to their formation whereas an ACP to Cbz-Glu-Tyr was not ($r [0.220$). It was suggested that (pGlu) oligopeptide ethyl esters were formed during the decomposition of bitter-tasting peptides to which

the ACP to (pGlu) LFGPNVNPWH might contribute.

6) 論文題名 : Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB cells, human normal hepatocytes from chimeric mice with human liver.

著者名 : Keishi Hata¹、Sayaka Tomatsu¹, Masaki Takahashi², Akira Sasaki¹, Yui Umekawa¹, Kazuya Miyashita³, Kazumi Ogura³, Gen Toshima³, Masahiro Maeda^{3,4}, Junichiro Takahashi⁴, Masakazu Kakuni² (¹Akita Res. Inst Food & Brew., ²PhenixBio, ³Immuno-Biol. Lab., ⁴Skyligh Biotech)

雑誌名 : *Biomedical Research (Tokyo)* **41** (1), 33-42 (2020)

<https://doi.org/10.2220/biomedres.41.33>

発行日 : 2020年2月1日

要約 : We investigated lipid metabolism in PXB-cells, which are human primary hepatocytes isolated from liver-humanized mice, and HepG2 and HuH-7 human hepatoma cell lines. Lipoprotein levels were higher in PXB-cells than in the 2 other cell lines, and PXB-cells mainly released triglycerides and cholesterol as very low density lipoprotein (VLDL), similar to actual liver tissue, whereas the major lipoprotein released from the 2 hepatoma cell lines was LDL. RT-PCR analysis demonstrated that the gene expression levels of apolipoprotein B100 (APOB100), the apolipoprotein of VLDL/LDL, were similar in PXB-cells and HepG2 cells, while the overexpression of APOC2, APOC3, and APOE, which are components of VLDL, but not LDL, was observed in PXB cells. A protein immunoassay revealed that ApoB100 levels secreted from PXB-cells and HuH-7 cells were similar; however, APOC3 levels were higher in PXB-cells than in the two other cell lines. We also examined the anti-lipidemic activities of fenofibrate using this assay system. Fenofibrate suppressed lipoprotein production from PXB-cells in a dose-dependent manner mainly by activating the β -oxidation pathway. These results suggest that PXB-cells produce high levels of lipoproteins and are suitable for screening anti-lipidemic agents.

7) 論文題名 : Examination of the influence of cedar fragrance on cognitive function and behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer type dementia

著者名 : Yuya Takahashi¹, Sho Shindo², Takashi Kanbayashi^{1,3}, Masahiro Takeshima¹, Aya Imanishi¹, Kazuo Mishima^{1,3} (¹Akita Univ. Grad. Sch. Med., ²Akita Res. Inst. Food & Brew., ³Univ. Tsukuba)

雑誌名 : *Neuropsychopharmacology Reports*, 40(1), (2020) Open Access.

<https://doi.org/10.1002/npr2.12096>

発行日 : 2020年2月9日

要約 : We examined whether symptoms of dementia are improved by olfactory nerve stimulation in Alzheimer type dementia patients. First, a stick-type olfactory identification ability test was performed in patients with Alzheimer type dementia, to select patients without olfactory dysfunctions. Then, these patients were randomly assigned into the intervention (n = 19) and the control groups (n = 17). To evaluate the effects of olfactory nerve stimulation, we exposed the intervention group to a disinfecting ethanol with added aroma extracts from cedar and the control group to the ethanol without the added aroma extracts. Each group underwent the intervention for 8 weeks, cognitive and behavioral functions were evaluated before and after treatments using the Neuropsychiatric Inventory (NPI), the Japanese version of Zarit Caregiver Burden interview (J-ZBI), and the Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog). A significant improvement was observed in the NPI score and J-ZBI in the intervention group compared to the control group at 4 and 8 weeks. On the other hand, there was no significant difference in the score of ADAS-cog. Exposure to cedar fragrance improved behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) in Alzheimer type dementia and may reduce the burden of nursing care. In addition to its effectiveness, the procedure is simple and minimally invasive and would be a valuable non-pharmaceutical treatment.

8) 論文題名 : **B38-CAP is a bacteria-derived ACE2-like enzyme that suppresses hypertension and cardiac dysfunction.**

著者名 : Takafumi Minato^{1#}, Satoru Nirasawa^{2#*}, Teruki Sato^{1,3#}, Tomokazu Yamaguchi¹, Midori Hoshizaki⁴, Tadakatsu Inagaki⁵, Kazuhiko Nakahara², Tadashi Yoshihashi², Ryo Ozawa¹, Saki Yokota⁶, Miyuki Natsui¹, Souichi Koyota⁷, Taku Yoshiya⁸, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye⁸, Satoru Motoyama⁹, Takeshi Gotoh⁶, Yoshikazu Nakaoka⁵, Josef M. Penninger^{10,11}, Hiroyuki Watanabe³, Yumiko Imai⁴, Saori Takahashi¹², Keiji Kuba^{1#*} (¹Dept. Biochem. and Metab. Sci., Akita Univ. Grad. Sch. Med., ²Japan Internal. Res. Cent. Agric. Sci., ³Dept. Cardiovascular. Med., Akita Univ. Grad. Sch. Med., ⁴Natl. Inst. Biomed. Inno. Health and Nutrition, ⁵Res. Inst. Natl. Cerebral and Cardiovasc. Cent., ⁶Dept. Materials Sci., Grad. Sch. Eng. Sci., Akita Univ., ⁷Biosci. Educ. Res. Support Cent., Akita Univ., ⁸Peptide Inst., Inc., Osaka ⁹Dep. Surg., Akita Univ. Grad. Sch. Med., ¹⁰IMBA -Inst. Mol. Biotech. of the Austrian Acad. Sci., Campus Vienna BioCenter, Vienna 1030, Austria. ¹¹Dep. Med. Genetic. Life Sci. Inst., University of British Columbia, Vancouver, Canada. ¹²Akita Res. Inst. Food and Brew., #equal first author.

雑誌名 : *Nature Communications*, 11, 1058 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14867-z>

発行日 : 2020年2月26日

要旨 : Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is critically involved in cardiovascular physiology

and pathology, and is currently clinically evaluated to treat acute lung failure. Here we show that the B38-CAP, a carboxypeptidase derived from *Paenibacillus* sp. B38, is an ACE2-like enzyme to decrease angiotensin II levels in mice. In protein 3D structure analysis, B38-CAP homologues share structural similarity to mammalian ACE2 with low sequence identity. In vitro, recombinant B38-CAP protein catalyzed the conversion of angiotensin II to angiotensin 1-7, as well as other known ACE2 target peptides. Treatment with B38-CAP suppressed angiotensin II-induced hypertension, cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. Moreover, B38-CAP inhibited pressure overload-induced pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction in mice. Our data identify the bacterial B38-CAP as an ACE2-like carboxypeptidase, indicating that evolution has shaped a bacterial carboxypeptidase to a human ACE-like enzyme. Bacterial engineering could be utilized to design improved protein drugs for hypertension and heart failure.

7. 外部発表論文再掲載（1件）

1) 論文題名 : **Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB cells, human primary hepatocytes from liver-humanized mice: proposal of novel in vitro system for screening anti-lipidemic drugs.**

著者名 : Keishi Hata¹、Sayaka Tomatsu¹, Masaki Takahashi², Akira Sasaki¹, Yui Umekawa¹, Kazuya Miyashita³, Kazumi Ogura³, Gen Toshima³, Masahiro Maeda^{3,4}, Junichiro Takahashi⁴, and Masakazu Kakuni² (¹Akita Res. Inst. Food & Brew., ²PhenixBio, ³Immuno-Biol. Lab., ⁴Skyligh Biotech)

雑誌名 : *Biomedical Research (Tokyo)* **41** (1), 33-42 (2020)

<https://doi.org/10.2220/biomedres.41.33>

発行日 : 2020年2月1日

Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB-cells[®], human primary hepatocytes from liver-humanized mice: proposal of novel *in vitro* system for screening anti-lipidemic drugs

Keishi HATA¹, Sayaka TOMATSU¹, Masaki TAKAHASHI², Akira SASAKI¹, Yui UMEKAWA¹, Kazuya MIYASHITA³, Kazumi OGURA³, Gen TOSHIMA⁴, Masahiro MAEDA^{3,4}, Junichiro TAKAHASHI⁴, and Masakazu KAKUNI²

¹ Akita Research Institute of Food & Brewing, 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan; ² PhoenixBio Co., Ltd., 3-4-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-Shi, Hiroshima 739-0046, Japan; ³ Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., 1091-1 Naka Aza-Higashida, Fujioka-Shi, Gunma 375-0005, Japan; and ⁴ Skylight Biotech Inc., 100-4 Sunada, Iijima-aza, Akita-Shi, Akita 011-0911, Japan

(Received 22 November 2019; and accepted 1 December 2019)

ABSTRACT

We investigated lipid metabolism in PXB-cells, which are human primary hepatocytes isolated from liver-humanized mice, and HepG2 and HuH-7 human hepatoma cell lines. Lipoprotein levels were higher in PXB-cells than in the 2 other cell lines, and PXB-cells mainly released triglycerides and cholesterol as very low density lipoprotein (VLDL), similar to actual liver tissue, whereas the major lipoprotein released from the 2 hepatoma cell lines was LDL. RT-PCR analysis demonstrated that the gene expression levels of apolipoprotein B100 (ApoB100), the apolipoprotein of VLDL/LDL, were similar in PXB-cells and HepG2 cells, while the overexpression of ApoC2, ApoC3, and ApoE, which are components of VLDL, but not LDL, was observed in PXB-cells. A protein immunoassay revealed that ApoB100 levels secreted from PXB-cells and HuH-7 cells were similar; however, ApoC3 levels were higher in PXB-cells than in the two other cell lines. We also examined the anti-lipidemic activities of fenofibrate using this assay system. Fenofibrate suppressed lipoprotein production from PXB-cells in a dose-dependent manner mainly by activating the β -oxidation pathway. These results suggest that PXB-cells produce high levels of lipoproteins and are suitable for screening anti-lipidemic agents.

Serum-insoluble lipids circulate in the bloodstream as lipoproteins, which are macromolecular complexes of free cholesterol, cholesterol esters, triglycerides, phospholipids, and apolipoproteins (Apo). Lipoproteins mainly produced in intestinal epithelial tissues and the liver are separated into 4 major classes based on their particle size and density. Chylomicrons (>80 nm) released in intestinal epithelium cells are transported to the liver through lymphatic vessels after their conversion to chylomicron remnants by lipoprotein lipase. Very low density lipo-

protein (VLDL, 30–80 nm) and LDL (16–30 nm) with lipids and apolipoprotein B100 (ApoB100) are mainly synthesized in the liver and transport serum lipids to each tissue. High density lipoprotein (HDL, 8–16 nm) with ApoA is an important lipoprotein for the collection and transport of excess serum cholesterol. High levels of VLDL and LDL and/or low levels of HDL cause dyslipidemic diseases, such as hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia, and are associated with an increased risk of atherosclerotic disease (11, 13, 24).

The attenuating activities of crude drugs or food-stuffs on metabolic syndrome have been examined (7, 10). In many cases, experimental animals, such as dyslipidemic mice/rats, have been used to screen anti-metabolic syndrome activities; however, studies using experimental animals are very expensive, and

Address correspondence to: Keishi Hata, Akita Research Institute of Food & Brewing, 4-26 Sanuki, Araya-machi, Akita 010-1623, Japan
Tel: +81-18-888-2000
E-mail: hata@arif.pref.akita.jp

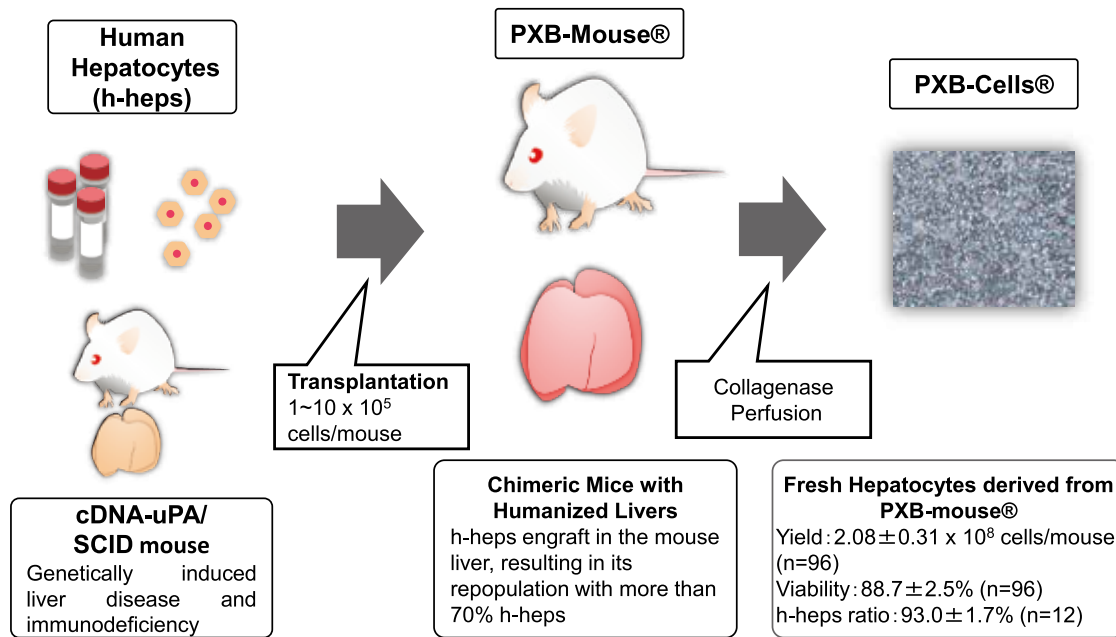


Fig. 1 Preparative procedure of PXB-cells from urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficiency (uPA/SCID) mice with humanized livers (PXB-mouse®)

difficulties are associated with simultaneously evaluating many test samples. We previously developed a novel system for evaluating anti-lipidemic agents by assessing lipoprotein profiles secreted from HepG2 human hepatoma cells (6). The anti-lipidemic effects of water shield extracts were demonstrated in the assay system, and their effects were confirmed in experimental animals and a pilot clinical study (20). However, a number of issues need to be resolved, such as differences in the lipoprotein profiles of hepatoma cells and human primary hepatocytes (18). PXB-cells® are fresh hepatocytes isolated from humanized mouse livers repopulated completely with human hepatocytes by transplantation (14). Advances have been achieved in the application of PXB-cells to the study of drug metabolism and hepatitis virus infection (5, 25); however, their application to other fields, such as lipid/sugar metabolism, has progressed to a lesser extent. In the present study, we examined the lipoprotein profiles of PXB-cells and investigated whether they were suitable for screening anti-lipidemic activities *in vitro*. The results obtained suggest that PXB-cells produce high levels of lipoproteins and are suitable for screening anti-lipidemic agents.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. PXB-cells were isolated from humanized

murine livers 16 weeks after transplantation according to a previously described procedure (Fig. 1), seeded at 4×10^5 cells in collagen-coated 24-well microplates (Day 0), and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 20 mM HEPES, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-proline, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 50 nM dexamethasone, 44 mM NaHCO_3 , 5 ng/mL EGF, 0.1 mM ascorbic acid 2-phosphate, 2% DMSO and antibiotics. The HepG2 and HuH-7 human hepatoma cell lines were from the RIKEN Cell BANK and maintained in DMEM containing 10% FBS and antibiotics.

Lipid assay. PXB-cells on Day 13, or hepatoma cells precultured for 20 h in collagen-coated 24-well microplates (4×10^5 cells, respectively), were incubated in 500 μL William's E medium supplemented with Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (CM-4000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 2 days. Intracellular cholesterol and triglyceride levels were assessed using the Cholestest Cho Kit and TG Kit (Sekisui Medical, Tokyo, Japan), respectively, according to the laboratory procedure described in each manual. Culture media were subjected to a lipoprotein assay using LipoSEARCH® (22).

Real-time RT-PCR. Total RNA was isolated using the QuickGene RNA cultured cell kit S (Fujifilm

Table 1 Primer sequences used in the present study

Gene name	Forward	Reverse
ACC	5'-TGATGTCAATCTCCCCGAGC-3'	5'-TTGCTTCTTCTCTGTTTTCTCCCC-3'
ACOX1	5'-TCAACCCGGAGCTGCTTAC-3'	5'-GCTGGAAGTCTGGGTCGTF-3'
ACSL1	5'-AGCGGCGCCTTAAATAGCA-3'	5'-CATGGGCTTGCATTGTCCT-3'
Angptl3	5'-CCAGAACACCCAGAAGTACT-3'	5'-TCTGTGGTTCTTGAATACTGATC-3'
Angptl4	5'-GCCTATAGCCTGCAGCTCAC-3'	5'-CAAGTGGAGAAGGGTACGGA-3'
Angptl8	5'-TTCCATCCAGGCAGATTC-3'	5'-AGGTCTTAAAGGCTCACG-3'
Albumin	5'-ACTGCATTGCCGAAGTGG-3'	5'-GCAGCACGACAGAGTAATCA GGA -3'
ApoA1	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'
ApoA2	5'-GCAGCAACTGTGCTACTCCACA-3'	5'-GCAAAGAGTGGGTAGGGACAGG-3'
ApoA5	5'-ACGCACGCATCCAGCAGAAC-3'	5'-TCGGAGAGCATCTGGGGGTC-3'
ApoB100	5'-TCGCCTGCCAAACTGCTTC-3'	5'-CATTGGTGCCTGTGTTCCATTC-3'
ApoC2	5'-GAATCTCTCTCCAGTTACTGGG-3'	5'-GAATCAGGCTAGAGTTGGGAG-3'
ApoC3	5'-TACATGAAGCACGCCACCAAG-3'	5'-AGCCACGGCTGAAGTTGGTC-3'
ApoE	5'-GGGCGCTTTTGGGATTAC-3'	5'-CAACTCCTTCATGGTATCG-3'
CACT	5'-GCTATCCCCAGCTTTTTTGCA-3'	5'-AGCACTTGATCCGTTCTCCA-3'
CYP1A2	5'-AACAAGGGACACAACGCTGAAT-3'	5'-GGAAGAGAAAACAAGGGCTGAGT-3'
CYP2C9	5'-CCTCTGGGGCATTATCCATC-3'	5'-ATATTTGCACAGTAAAACATAGGA-3'
CYP2B6	5'-ATGGGGCACTGAAAAAGACTGA-3'	5'-AGAGGCGGGACACTGAATGAC-3'
CYP3A4	5'-CCAAGCTATGCTTTCACCG-3'	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
DGAT1	5'-GGCCTTCTCCACGAGTACC-3'	5'-GGCCTCATAGTTGAGCACG-3'
DGAT2	5'-AGTGGCAATGCTATCATCAT-3'	5'-GAGGCCTCGACCATGGAAGAT-3'
FAS	5'-CAGCAGTTCACGGACATGGAG-3'	5'-CGGCACGCAGCTTGTAGTAGA-3'
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'
GPAM	5'-AACCCAGTATCCCGTCTTT-3'	5'-CAGTCACATTGGTGGCAAAC-3'
HMGCoAR	5'-TACCATGTGAGGGGTACGTC-3'	5'-CAAGCCTAGAGACATAATCATC-3'
HTGL	5'-TTCAGAAAAACAGATGACCTACTACTTC-3'	5'-CTGATCTTCGCTTTGATGATGTTTTAGAC-3'
Lipin1	5'-TGAAAAGGGGCTCTGTGGAC-3'	5'-ACTACAGAGCTGCTTGACGG-3'
MCAD	5'-GGTGCTGTTGGATTAGCACAAAGA-3'	5'-TTTCGACGACCAGAATCAACCTC-3'
MGAT1	5'-CAGGGCCGATGTCCATTGG-3'	5'-GGGTATGCCAGTCAAAGTAAAGC-3'
MGAT2	5'-CCTTCGGGGAGAATGACCTAT-3'	5'-GAGGGAGATGCCCATGATCTT-3'
MGAT3	5'-ATGGGAGTTGCCACAACCC-3'	5'-CAGAGTGACGTGAAGAGGAGG-3'
MTPP	5'-TCTCTACTCGGGTTCTGGCATTCTA-3'	5'-GCTGCGATTAAGGCTTCCAGTC-3'
PPAR α	5'-GCAATGGAAGTGGATGACAGTGA-3'	5'-TGCTCTGCAGGTGGAGTCTGA-3'
PPAR γ	5'-TGGAATTAGATGACAGCGACTTGG-3'	5'-CTGGAGCAGCTTGCCAAAACA-3'
SCD	5'-TGAACAGTGCTGCCACCTC-3'	5'-CGGCCATGCAATCAATGAAG-3'
SREBP1c	5'-GGCTCCTGCCTACAGCTTCT-3'	5'-CAGCCAGTGGATCACCACA-3'
SREBP2	5'-CTATGGAGCAGCTCAACGTCA-3'	5'-CCGTAGCGACAGTAGCAGGTCA-3'

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACOX, peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase; ACSL, long chain acyl-CoA synthase; Angptl, angiopoietin-like protein; Apo, apolipoprotein; CACT, carnitine acylcarnitine translocase; CYP, cytochrome P450; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; FAS, fatty acid synthase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GPAM, glycerol-3-phosphate acyltransferase mitochondrial; HMGCoAR, HMG-CoA reductase; HTGL, hepatic triglyceride lipase; MCAD, medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase; MGAT, monoacylglycerol acyltransferase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SCD, stearoyl-CoA desaturase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein

Wako, Osaka Japan). Template cDNA synthesis was performed with 5 μ g of total RNA using the Prime-Script RT reagent Kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan). In a fluorescent temperature cycler (CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 2.5% of each RT reaction solution was amplified in 25 μ L of 1 \times SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) containing 0.2 μ M of

each primer. Samples were incubated in the thermal cycler for an initial denaturation at 95°C for 10 s, followed by 40 PCR cycles. Each cycle consisted of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s. The relative expression level of each mRNA was normalized by the amount of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. The primer sequences used in the present study were shown in Table 1.

Western blotting. Cell lysates were prepared using RIPA buffer (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Cell lysates (10 µg/lane) were separated on 4–15% gradient SDS-polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes. After blocking with a Blocking Reagent (Nacalai Tesque), each membrane was incubated with anti-acyl-CoA synthetase long chain 1 (ACSL1, 1 : 3,000; ab89854; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-monoglyceride acyl transferase-1 (MGAT1, 1 : 3,000; ab38857; Abcam), anti-glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial (GPAM, 1 : 8,000; sc-398135; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), or anti-β-actin antibodies (1 : 3,000; IMG-5142A; IMGENEX, San Diego, CA, USA). The membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1 : 30,000; W4021; Promega, Madison, WI, USA) or anti-rabbit IgG (1 : 30,000; W4011; Promega) as secondary antibodies at appropriate concentrations. The enzyme reaction was detected using an ECL prime Western Blotting Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA). Chemiluminescent signals were detected using a Light-Capture II imaging system (AE-6982/C/FC; ATTO, Tokyo, Japan) and CS Analyzer (ver. 3.0 software; ATTO).

ELISA. Angiopoietin-like proteins (Angptls), albumin, ApoB100, and ApoC3 in cultured media were measured using the Angptl3, 4, or 8 ELISA Kit (Immuno-Biological Laboratories, Fujioka, Japan), LZ-test “Eiken” U-ALB (Eiken Chemical, Tokyo, Japan), human ApoB100 assay kit (Immuno-Biological Laboratories), and human APOC3 ELISA Kit (Abcam), respectively, according to the laboratory procedure described in each manual.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean ± standard deviation (SD). The significance of differences was analyzed using the Kruskal-Wallis test with Steel (Tables 3 and 5) and Steel-Dwass (Figs. 2 and 5) multiple comparison tests and the Mann-Whitney U-test (Table 4 and Fig. 7). A value of $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS & DISCUSSION

Hepatic properties of PXB-cells

To clarify the differentiation stages of PXB-cells and the 2 hepatoma cell lines, we briefly examined the expression of 5 hepatic markers at the mRNA and protein levels. The RT-PCR analysis revealed higher expression levels of albumin and 4 cytochrome P450 genes in PXB-cells than in the HepG2

Table 2 Comparison of gene expression levels in PXB-cells and human hepatoma cell lines

	Relative intensity/GAPDH (-fold)		
	PXB-cells	HepG2 cells	HuH-7 cells
Hepatic marker			
Albumin	21.6*	1.0	3.3*
CYP1A2	2451.9*	1.0	0.8
CYP2C9	7160.7*	1.0	86.3*
CYP2B6	1.6*	1.0	0.1*
CYP3A4	1363.6*	1.0	15.2*
Lipid metabolism			
ApoA1	3.1*	1.0	2.0*
ApoA2	0.1*	1.0	0.7
ApoA5	2.6*	1.0	<0.1*
ApoB100	2.2*	1.0	1.7*
ApoC2	7.4*	1.0	0.4*
ApoC3	81.1*	1.0	7.3*
ApoE	2.6*	1.0	<0.1*
MTTP	4.9*	1.0	2.3*
SREBP1c	18.1*	1.0	17.9*
FAS	2.5*	1.0	2.4*
SCD	1.8*	1.0	1.5
ACSL1	45.7*	1.0	3.0*
ACC	1.5	1.0	1.1
MGAT1	16.7*	1.0	1.1
MGAT2	3.6*	1.0	0.1*
MGAT3	1.0	1.0	0.8
DGAT1	3.1*	1.0	3.3*
DGAT2	6.0*	1.0	3.6*
GPAM	13.4*	1.0	1.2
Lipin1	2.2*	1.0	1.1
SREBP2	1.6*	1.0	0.9
HMGCoAR	0.8*	1.0	1.1

Data are expressed as the mean ± standard deviation ($n = 4$, * $P < 0.05$ vs HepG2 cells).

and HuH-7 cell lines (Table 2). PAS staining showed the marked accumulation of glycogen, an important function in livers, in PXB-cells, and extracellular albumin levels were 11.1-fold higher in PXB-cells than in HepG2 cells ($P < 0.01$) and 5.0-fold higher than in HuH-7 cells ($P < 0.01$) (Fig. 2). These results suggested that PXB-cells maintained mature hepatocyte properties more stably than the 2 hepatoma cell lines.

Lipid-producing ability of PXB-cells

We previously developed an *in vitro* assay system to assess lipoprotein profiles from the human hepatoma cell line, HepG2 and used the assay system to screen anti-dyslipidemia activities in drugs and foodstuffs. We examined whether PXB-cells are more suitable for assessing lipoprotein profiles than hepatoma cells. Intra- and extracellular cholesterol and tri-

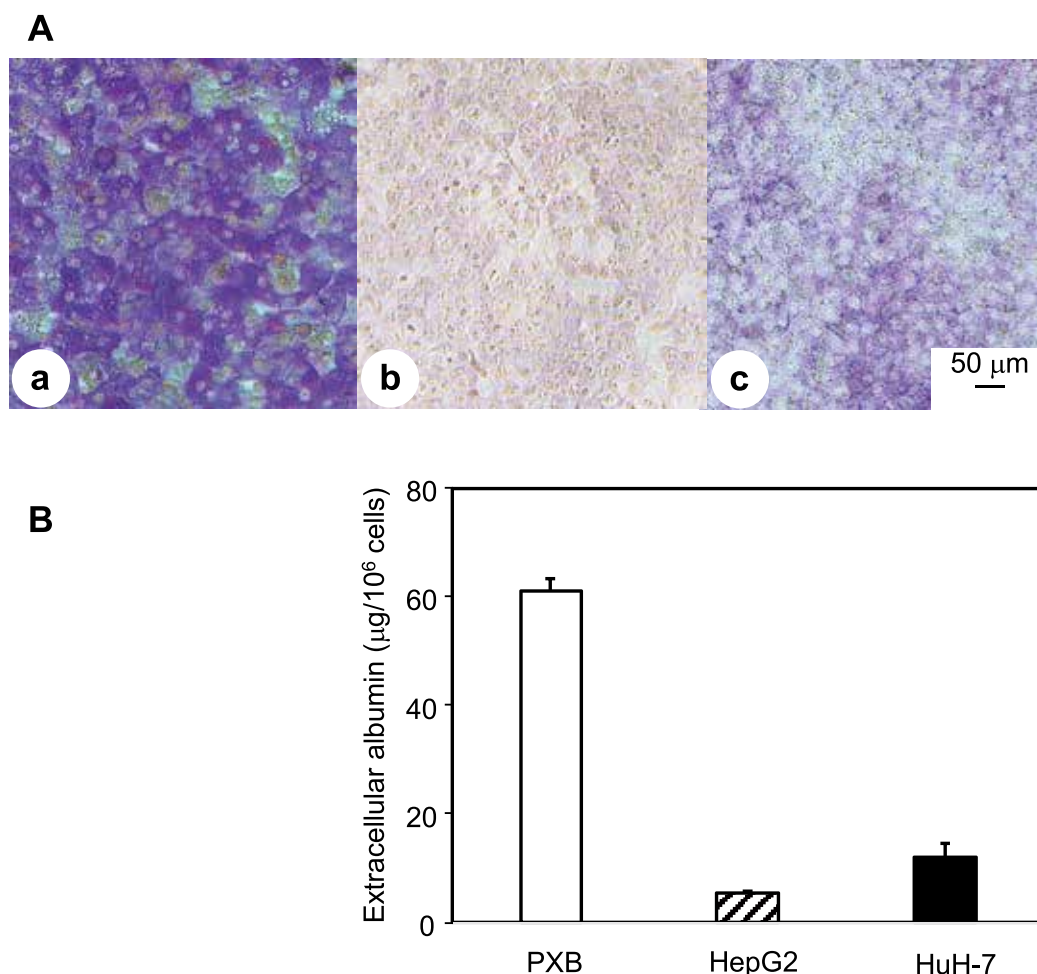


Fig. 2 Hepatic properties of PXB-cells and hepatoma cell lines. **A:** PAS staining of PXB-cells (a), HepG2 cells (b), and HuH-7 (c) cells. Note that the marked accumulation of glycogen is observed in PXB-cells than in hepatoma cell lines. **B:** Extracellular albumin contents of PXB-cells (open bar), HepG2 cells (hatched bar), and HuH-7 cells (closed bar).

glyceride levels in the 3 hepatic cell lines were summarized in Table 3, and Fig. 3 shows the lipoprotein profiles in culture media. Intra- and extracellular cholesterol levels in PXB-cells were similar to those in HuH-7 cells and higher than those in HepG2 cells. When the gene expression levels of sterol regulatory element-binding protein2 and HMG CoA reductase — a transcriptional factor and key enzyme in cholesterologenesis — were examined, they in PXB-cells and HuH-7 cells were similar to those in HepG2 cells. The intracellular triglyceride content of PXB-cells was 5.8- and 1.2-fold higher than those of HepG2 and HuH-7 cells. The extracellular triglyceride content of PXB-cells was also higher, and, thus, we examined the expression levels of genes involved in triglyceride synthesis to clarify why PXB-cells possess a high capacity to produce triglycerides. The gene expression levels of fatty acid

synthase and stearoyl-CoA desaturase, which are enzymes involved in the fatty acid synthesis pathway, were higher in PXB-cells than in HepG2 cells, but similar to those in HuH-7 cells (Table 2). The gene expression levels of ACSL1, MGAT1, and GPAM in PXB-cells were markedly different from those in the other 2 cell lines (>10-fold vs both cells). The results of a Western blotting analysis showed that PXB-cells more strongly expressed these proteins, particularly ACSL1, than the 2 other hepatoma cells (Fig. 4). These results suggested that the transacylation step, but not fatty acid synthesis, is key for the higher triglyceride synthesis in PXB-cells.

Major lipoprotein classes from PXB-cells

We previously reported that human primary hepatocytes mainly secreted VLDL-sized lipoproteins, and hepatoma cell lines mainly produced LDL-sized li-

Table 3 Intra- and extracellular lipid contents of PXB-cells and 2 hepatoma cell lines

	PXB-cells	HepG2 cells	HuH-7 cells
Cell number ($\times 10^6$ cells)	0.3	0.9	0.5
Cholesterol ($\mu\text{g}/10^6$ cells)			
intracellular	41.5 \pm 0.5	12.3 \pm 0.1	41.0 \pm 0.9
extracellular	5.0 \pm 0.1	0.5	4.9 \pm 0.1
VLDL fraction (> 30 nm)	4.1 \pm 0.1	0.1	1.6
LDL fraction (16–30 nm)	0.5 \pm 0.1	0.2	2.2
HDL fraction (8–16 nm)	0.3	0.3	1.1 \pm 0.1
Triglycerides ($\mu\text{g}/10^6$ cells)			
intracellular	163.1 \pm 4.6	28.2 \pm 2.4	137.2 \pm 3.6
extracellular	53.8 \pm 1.0	1.2	12.1 \pm 0.2
VLDL fraction (> 30 nm)	50.2 \pm 1.0	0.1	5.3 \pm 0.2
LDL fraction (16–30 nm)	3.1	0.5	6.3 \pm 0.2
HDL fraction (8–16 nm)	0.5	0.6 \pm 0.1	0.4

Hepatic cells at a density of 4×10^5 cells/ml (1 mL) were precultured in collagen-coated 24-well microplates for 20 h and then incubated in William's E medium with CM4000 for 48 h. Triglyceride and cholesterol levels in cells and culture media were measured.

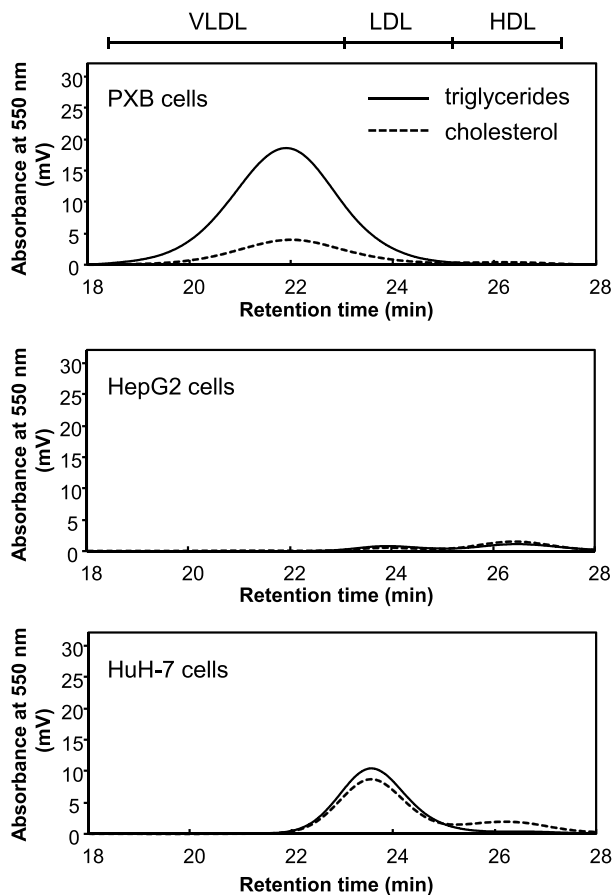


Fig. 3 Lipoprotein profiles from 3 hepatic cell lines. Three hepatic cell lines seeded on collagen-coated 24-well microplates were cultured in William's E medium supplemented with CM-4000 for 48 h, and the levels of triglycerides and cholesterol in culture media were measured. Data are representative of 4 independent experiments.

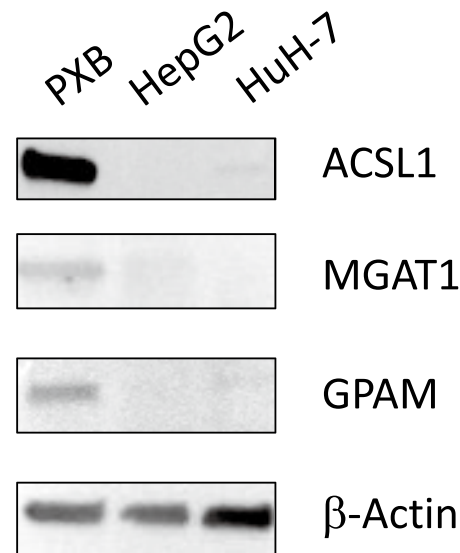


Fig. 4 Expression of enzymes involved in the transacylation of PXB-cells. Proteins (10 $\mu\text{g}/\text{lane}$) in 3 hepatic cell lysates were separated by SDS-PAGE, followed by Western blotting with anti-ACSL1, MGAT1, and GPAM antibodies.

poproteins (18). PXB-cells mainly released cholesterol and triglycerides in the VLDL fraction (Table 2 and Fig. 3) because these cells are primary hepatocytes. To clarify whether the major lipoproteins released from PXB-cells and the 2 hepatoma cell lines were VLDL and LDL, respectively, we measured the gene expression levels of Apo in the 3 cell lines. Apo were classified into 5 major classes, ApoA to ApoE (8, 17). ApoB100, which is encoded by the ApoB gene, is synthesized in hepatic tissues and a

structural component of VLDL and LDL. ApoB100 gene expression levels were 2.2-fold and 1.7-fold higher in PXB-cells and HuH-7 cells, respectively, than in HepG2 cells, while its extracellular levels were 10.3- ($P < 0.01$) and 12.3-fold ($P < 0.01$) higher. The results of an ELISA analysis on ApoB100 in cultured media also supported the high VLDL/LDL contents of this lipoprotein in PXB-cells and HuH-7 cells. Three Apo — ApoC2, C3, and E — which were distributed in VLDL, but not LDL, were strongly expressed in PXB-cells and weakly in HepG2 and HuH-7 cells at the mRNA level (Table 3). We then measured extracellular ApoC3 levels in the 3 hepatic cell lines (Fig. 5). The results obtained showed that the extracellular ApoC3 contents of PXB-cells were 302.6-fold ($P < 0.01$) and 60.0-fold ($P < 0.01$) higher than those of HepG2 and HuH-7 cells. These

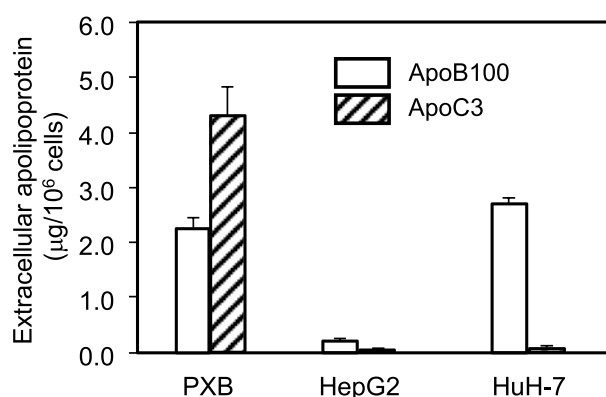


Fig. 5 ApoB100 and ApoC3 levels secreted from PXB-cells. Extracellular ApoB and ApoC contents of 3 hepatic cell lines were measured using the respective ELISA kits.

results suggested that PXB-cells and HuH-7 cells release triglyceride-rich lipoproteins; however, PXB-cells produce both VLDL and LDL, similar to liver tissues, whereas the 2 other hepatoma cell lines synthesized LDL, but not VLDL.

Evaluation of anti-lipidemic agents by lipoprotein profiles of PXB-cells

The present study demonstrated that PXB-cells produce high levels of lipoproteins, similar to liver tissues; however, the responses of PXB-cells to anti-lipidemic agents remain unclear. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) ligands, such as fenofibrate, have been shown to reduce plasma triglyceride levels by stimulating β -oxidation in the liver (2, 4). We examined the effects of fenofibrate on the lipoprotein profile of PXB-cells in order to clarify whether these cells are useful for screening anti-lipidemic activities in drugs. Table 4 and Fig. 6 show that fenofibrate reduced triglycerides and cholesterol levels in culture media in a dose-dependent manner. A real-time RT-PCR analysis demonstrated that fenofibrate at 50 μ M did not affect the expression levels of genes involved in fatty acid synthesis and transacylation steps, such as FAS and diacylglycerol acyltransferases; however, it markedly increased those of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1, carnitine acylcarnitine translocase, and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, which are PPAR α -regulated enzymes in β -oxidation, without affecting PPAR α gene expression levels (Table 5). Furthermore, fenofibrate markedly increased the gene expression levels of ApoA2 and ApoA5, but not those of ApoB, ApoC2, or ApoC3. These results demon-

Table 4 Effects of fenofibrate on intra- and extracellular lipid contents of PXB-cells

	Fenofibrate (μ M)			
	untreated	10	50	100
Cell number ($\times 10^6$ cells)	0.3	0.3	0.3	0.3
Cholesterol (μ g/10 ⁶ cells)				
intracellular	26.0 \pm 4.5	25.5 \pm 1.9	21.5 \pm 4.2	25.8 \pm 1.2
extracellular	5.8 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3	4.5 \pm 0.3 ^a	3.9 \pm 0.2 ^a
VLDL fraction	4.7 \pm 0.3	4.3 \pm 0.3	3.4 \pm 0.2 ^a	2.6 \pm 0.2 ^a
LDL fraction	0.8	0.7	0.7	0.8
HDL fraction	0.4 \pm 0.1	0.4	0.4	0.5 \pm 0.1
Triglycerides (μ g/10 ⁶ cells)				
intracellular	175.7 \pm 26.7	182.4 \pm 23.5	185.0 \pm 26.9	189.9 \pm 29.2
extracellular	68.4 \pm 2.9	61.0 \pm 4.1	41.5 \pm 2.8 ^a	27.7 \pm 2.3 ^a
VLDL fraction	62.7 \pm 2.8	55.4 \pm 3.8 ^a	36.9 \pm 2.7 ^a	23.6 \pm 2.0 ^a
LDL fraction	5.1 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	4.3 \pm 0.1 ^a	3.7 \pm 0.2 ^a
HDL fraction	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.4	0.4

Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 4$, ^a $P < 0.05$ vs untreated group).

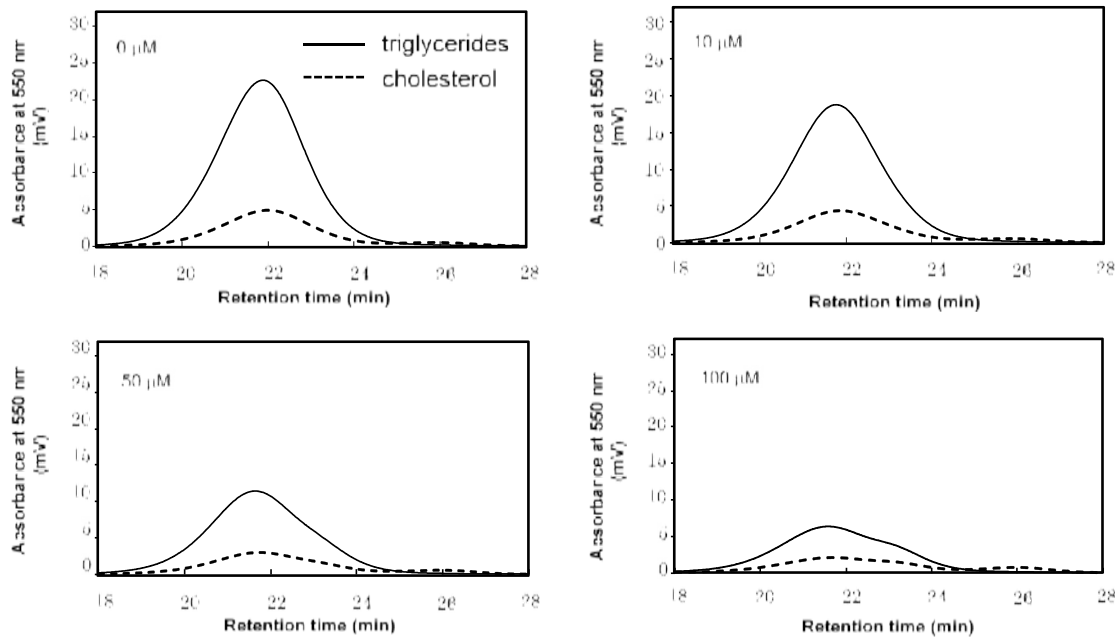


Fig. 6 Effects of fenofibrate on the lipoprotein profile of PXB-cells. Following the treatment of PXB-cells with fenofibrate at concentrations of 10–100 μM for 48 h, a lipoprotein assay was performed by LipoSEARCH[®].

strated that PXB-cells responded to fenofibrate in a known manner (16).

Angptls are a family of proteins that are structurally similar to angiopoietins, and its members are involved in angiogenesis, similar to angiopoietins (15). Since Angptl3, 4, and 8 from the liver are responsible for regulating the activities of plasma lipoprotein lipase/hepatic triglyceride lipase, and a deficiency (overexpression) in any one of these causes dyslipidemia, their roles in lipid metabolism have attracted a great deal of attention (1, 12, 19). The transcriptional regulation of these members is well known (3, 27), and Angptl4 (fasting-induced adipose factor, Fiaf) in mouse hepatocytes and human hepatoma cells is up-regulated by PPAR α ligands (9); therefore, we herein examined the levels of the 3 Angptl members in fenofibrate-treated PXB-cells (Fig. 7). Fenofibrate at 50 μM induced Angptl4, as reported previously, at both the mRNA and extracellular protein levels. This agent had a negligible effect on Angptl3 and Angptl8 gene expression levels, and increased extracellular Angptl3 levels by 1.7-fold from those in untreated cells. It currently remains unclear whether fenofibrate up-regulates Angptl3 protein production and/or its secretion from PXB-cells. Further studies are needed to reveal including the involvement of Angptl members in post-secretory modifications to lipoprotein.

In the present study, we revealed some of the

Table 5 Effects of fenofibrate on the expression of genes involved in lipid metabolism in PXB-cells

Gene name	Relative intensity/GAPDH (fold)	
	untreated	fenofibrate-treated
<i>β-Oxidation</i>		
PPAR α	1.0	1.1 \pm 0.1
ACOX1	1.0 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3*
CACT	1.0 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1*
MCAD	1.0 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2*
<i>Apolipoprotein</i>		
ApoA1	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
ApoA2	1.0 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1*
ApoA5	1.0 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2*
ApoB100	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
ApoC2	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
ApoC3	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2
ApoE	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
<i>Lipid synthesis</i>		
PPAR γ	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
SREBP1c	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
FAS	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.3
SCD	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1
MGAT2	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
DGAT1	1.0 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2
DGAT2	1.0	1.0
GPAM	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
SREBP2	1.0	1.3 \pm 0.1*
HMGCoAR	1.0	1.1 \pm 0.1

PXB-cells were treated with or without 50 μM fenofibrate for 48 h, and RNA expression levels were analyzed. Data are expressed relative to untreated control cells and represent the mean \pm SD ($n = 4$, * $P < 0.05$ vs the untreated group).

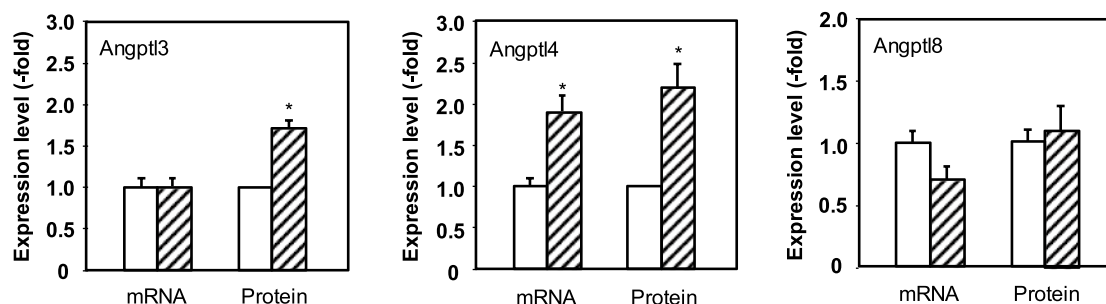


Fig. 7 Effects of fenofibrate on the expression of Angptls. PXB-cells were treated with (hatched bar) or without (open bar) fenofibrate for 48 h, and the gene and protein expression levels of Angptls were analyzed by RT-PCR and ELISA. The basal levels of extracellular Angptl3, 4, and 8 released from untreated cells were 107.4 ± 3.4 , 3.4 ± 0.1 , and 3.0 ± 0.4 ng/ 10^6 cells, respectively.

properties of lipid metabolism in PXB-cells using comparisons with well-differentiated hepatoma cells, and demonstrated that PXB-cells are suitable for lipid metabolism research, such as screening novel anti-lipidemic agents.

Acknowledgement

The study was supported in part by “Subsidies for projects to promote the enhancement of manufacturing technology for small and medium enterprises” from the Japan Ministry of Economy, Trade and Industry.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Chi X, Britt EC, Shows HW, Hjelmaas AJ, Shetty SK, Cushing EM, Li W, Dou A, Zhang R and Davies BSJ (2017) ANGPTL8 promotes the ability of ANGPTL3 to bind and inhibit lipoprotein lipase. *Mol Metab* **6**, 1137–1149.
- Fruchart JC and Duriez P (2006) Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today (Barc)* **42**, 39–64.
- Fugier C, Tousaint JJ, Prieur X, Plateroti M, Samarut J and Delerive P (2006) The lipoprotein lipase inhibitor, ANGPTL3 is negatively regulated by thyroid hormone. *J Biol Chem* **281**, 11553–11559.
- Guo Q, Wang PR, Milot DP, Ippolito MC, Hernandez M, Burton CA, Wright SD and Chao Y (2001) Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters. *Biochim Biophys Acta* **1533**, 220–232.
- Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes N, Chayama K and Tateno C (2015) Novel robust *in vitro* hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol* **185**, 1275–1285.
- Itoh M, Abe Y, Iwama Y, Kimura F, Satoh M, Shoji M, Takahashi J, Toshima G, Sasaki H, Hiwatashi H and Hata K (2009) HPLC analysis of lipoproteins in culture medium of hepatoma cells: an *in vitro* system for screening antihyperlipidemic drugs. *Biotechnol Lett* **31**, 953–957.
- Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006) Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin. *J Atheroscler Thromb* **13**, 247–255.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall Jr SC and Weisgraber KH (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* **25**, 1277–1294.
- Mandard S, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, Kleemann R, Bakker A, Veenman F, Wahli W, Müller M and Kersten S (2004) The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J Biol Chem* **279**, 34411–34420.
- Matsumoto K, Yokoyama SI and Gato N (2010) Bile acid-binding activity of young persimmon (*Diospyros kaki*) fruit and its hypolipidemic effect in mice. *Phytother Res* **24**, 205–210.
- Miller GJ and Miller NE (1975) Plasma-high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* **1**, 16–19.
- Nakajima K, Kobayashi J, Mabuchi H, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Imamura S, Ai M, Otokozawa S and Schaefer EF (2010) Association of angiopoietin-like protein 3 with hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase activities in human plasma. *Ann Clin Biochem* **47**, 423–431.
- National Cholesterol Education Program (1994) Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation* **89**, 1333–1445.
- Ohshita H and Tateno C (2017) Propagation of human hepatocytes in uPA/SCID mice: producing chimeric mice with humanized liver. *Methods Mol Biol* **1506**, 91–100.
- Oike Y, Yasunaga K and Suda T (2004) Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis. *Int J Hematol* **80**, 21–28.
- Rakhshandehroo M, Knoch B, Muller M and Kersten S (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res*, **2010**, doi:10.1155/2010/612089.
- Ramasamy C (2014) Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab* **52**, 1695–1727.
- 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* **53**, 93–95.
19. Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T and Olivecrona G (2006) Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17450–17455.
 20. Takahashi J, Toshima G, Matsumoto Y, Kimura F, Kiuchi T, Hamada K and Hata K (2011) *In vitro* screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells. *J Nat Med* **65**, 670–674.
 21. Toshima G, Iwama Y, Kimura F, Matsumoto Y, Miura M, Takahashi J, Yasuda H, Arai N, Mizutani H, Hata K, Usui S and Okazaki M (2013) LipoSEARCH[®]; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. *J Biol Macromol* **13**, 21–32.
 22. Wilson PW, Abbott RD and Castelli WP (1988) High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* **8**, 737–741.
 23. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K and Tateno C (2010) *In vitro* evaluation of cytochrome P450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metab Pharmacokinet* **25**, 539–550.
 24. Zhang R (2016) The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol* **6**, 150272.

8. 秋田県総合食品研究センター報告指針

【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。

（外部発表論文再掲載）当研究センター職員が筆頭著者もしくは責任著者となっている外部発表論文について、出版社等の了解が得られた場合は再掲載出来るものとする。

【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と。
2. 原稿は、「Word」を用いて作成し、A4 版縦長様式とする。
3. 原稿の書体は、原則として MS 明朝体を用い、表題は 18 ポイント、本文は 12 ポイントとする。文章中（全角）では句点「。」及び句読点「、」を用いる。半角の場合には、終止符「.」及びカンマ「,」を用いる。
4. 原稿の上下、左右には 2.5 cm の余白を設ける。

【論文の形式】

1. 報文は、次の形式をとる。
【要約】、【緒言】、【実験方法】、【結果】、【考察】、【引用文献】の順とする。
【謝辞】は、【引用文献】の前に入れる。
2. 研究ノートは、次の形式をとる。
【緒言】、【実験方法】、【結果と考察】、【引用文献】とする。
3. 総説は、特に形式にこだわらないが、最初に要約を付ける。
4. 図表は、本文中では図 1 あるいは表 1 などと表記する。
5. 引用文献は、本文中の該当人名や事項の後に上付き小文字で、秋田県¹⁾、や総食研^{2,4)}などのように番号を付し、そのリストを一括して引用文献の項に記載する。
6. 投稿中の論文、私信、未発表結果は、引用文献に入れず本文中に括弧で示し引用する。
7. 本文中に他の論文の著者名を引用する場合には、混乱の起こらない限り姓のみとする。著者が 2 名の論文は、両者の姓を併記し、3 名以上の場合には、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。
6. ウェブサイト中の記事に関しては、著者名、「ウェブサイトの題名」・ウェブサイト

名称、更新日、入手日付を記載する。

7. 引用文献に doi (Digital Object Identifier)番号が付与されている場合は、その旨を併せて記載する。

(例 : *J. Biochem.*, 164(2), 103-112. doi:10.1093/jb/mvy033)

(引用文献記載例)

- 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. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.080
- 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. doi: org/10.316/nskkk.47.632
- 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.
- 5) 特許庁、特許情報プラットフォーム (J-PlatPat) の刷新について (平成 31 年 4 月) https://www.jpo.go.jp/support/j_platpat/sassin_190425html (参照 2019-11-19)

【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。

令和 元年 1 1 月 2 2 日、一部改正。

令和 2 年 9 月 2 5 日、一部改正。

秋田県総合食品研究センター報告 第22号

発行日 令和2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】