

日本農芸化学会 中部支部  
第 154 回例会 若手シンポジウム

食の作り手  
-新しい付加価値を求めて-

要旨集

日時：平成 20 年 11 月 29 日（土）13：00 より

会場：岐阜大学応用生物科学部

（岐阜県岐阜市柳戸 1-1）

主催：日本農芸化学会中部支部

共催：岐阜大学、中部食品科学研究交流会

## 日本農芸化学会 中部支部 第154回例会 若手シンポジウム

日時：平成20年11月29日（土）13：00より

会場：岐阜大学応用生物科学部（岐阜県岐阜市柳戸1-1）

参加費：無料

### プログラム

#### I. 講演(101講義室)

13:00 開会の挨拶 中部支部長 前島 正義（名古屋大学）

13:05 「ワイン醸造について～故きを温ねて新しきを知る」  
安蔵 光弘（メルシャン株式会社）

13:35 「イタリアのパネトーネ種でつくるロングライフパン」  
丸山 佳美（株式会社コモ）

14:05 休憩

14:10 「実用化を意識した機能性食品素材の研究  
-低アレルギー化小麦粉と新規機能性オリゴ糖の開発と評価-」  
渡辺 純（（独）農研機構・食品総合研究所）

14:40 「機能性食品成分を見分ける糖鎖の利用法」  
矢部 富雄（岐阜大学 応用生物科学部）

II. 学生によるプレゼンテーション 15：15～16：00（101講義室）

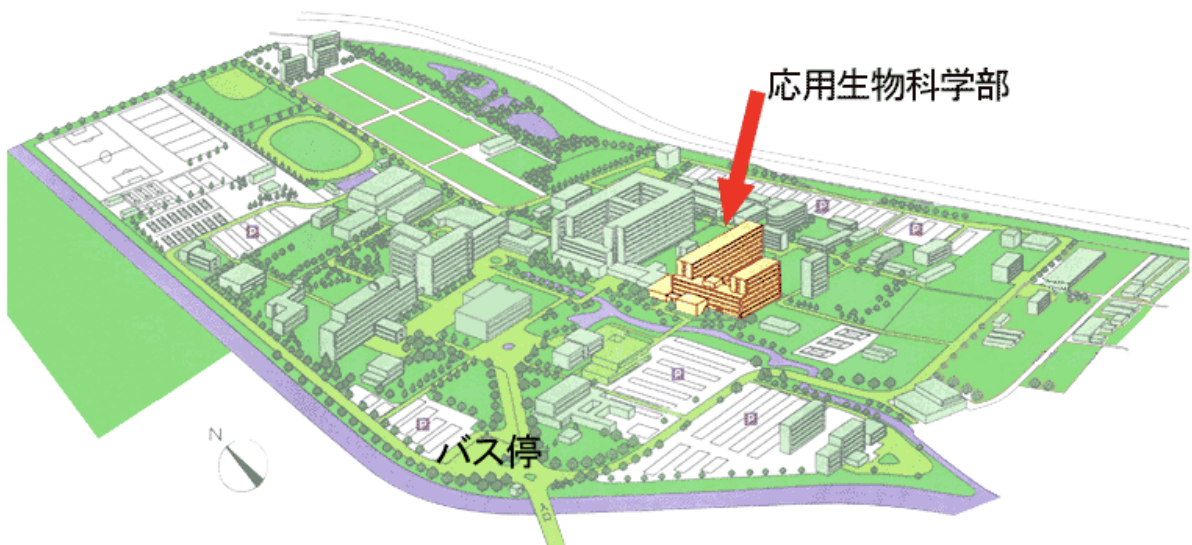
III. ポスター発表・交流会 16：00～17：30（第一会議室）

## 会場へのアクセス

岐阜駅、名鉄岐阜駅から、

- ・ 岐大ライナー
- ・ 岐阜大学・病院行

に乗車し、岐阜大学下車。所要時間約 25 分、運賃 310 円。



# シンポジウム

## 食の作り手

-新しい付加価値を求めて-

## 講演要旨

ワインの醸造で他の酒類の醸造と違うこととして、「果汁に既にかかなりの糖分が含まれている」とと、「ビールや清酒などの穀物の酒に比較して、pHがかなり低い」ことが挙げられる。

穀物の酒には「糖化」の工程がありますが、熟した醸造用ブドウは約22%もの糖分があり、この糖分は発酵して12%程度のアルコールに変わる。また、ブドウ果汁のpHは豊富な有機酸を含むことから、3.0～3.6程度。穀物の酒の醸造は、pHが比較的高くコンタミの危険率が高いので、乳酸菌やホップなどを利用して、安全な発酵に導いている。ワインのpH3.5前後のモロミは、穀物の酒に比べて雑菌の汚染が起きにくいと言える。こういった状況から、ワイン醸造はブドウをつぶせば、比較的安定な発酵に導くことができるといえる。ワイン醸造の歴史が他の酒に比べてかなり長いことも、こういった文脈で捉えることができる。

現在の高級なワイン造りで用いられる最新の醸造技術のいくつかは、昔から伝統的に行われていた作業の中から発想が出てきている。こういったことは、他の酒類の醸造でもよくあることですが、ワイン醸造に関しての「温故知新」をいくつか紹介する。

#### ①ステンレスタンクの形状

フランスでは1970年代からワインの発酵容器の素材として、それまでの木材に変わって、ステンレスが導入された。ステンレスは加工の自由度が高く、導入当初は縦長のものが多かったが、それまでの木材で作られたタンク(木桶)の形状が赤ワインの発酵に良いことが分かり、昔の木桶の形状に近いステンレスタンクが作られるようになった。

#### ②ワインの移動

ボルドーワインの最高峰のシャトーマルゴーでは、樽で熟成したワインを澱引き(上澄みを別な樽に移動することで、貯蔵の間に沈殿した酵母カスやポリフェノール・酒石等の沈殿を除くこと)する際に、圧搾空気を用いてポンプを使わずに行っている。これは新しい方法のようだが、ポンプが一般になる前の十八世紀ごろに、ふいごを用いて始まった技術がベースとなっている。現在でもポンプを用いるよりデリケートなやり方として、継続している。

#### ③除梗について

ブドウには房の中心に梗があり、青臭い匂いや渋みのあるタンニンが含まれるため、現在のワイン醸造では「除梗機」と呼ばれる機械で梗を取り除く。しかし良く熟したブドウの梗はもろく、折れてモロミの方に入ってしまう。そのため、この10年ほどの高級なワイン造りでは、除梗をしたあとにコンベヤー上にブドウを載せて、折れた梗を手で除くことが行われるようになった。これに対し、19世紀までは、畑で木の杵を使って梗を除くのは普通のやり方だった。当時はブドウ畑で手作業で梗を除くことは、稲の脱穀を畑でやるようなニュアンスがあった。1トン程度ならこの作業は手でできるが、現在のように10トン、100トンとなると、手では出来ない。

#### ④圧搾機について

白ワインは発酵前、赤ワインは発酵後に圧搾する。圧搾機は、中世以来長い間縦型の形状だったが、果皮をほぐす作業が大変だった。そのため、20世紀後半に横型の圧搾機が登場し、その後よりデリケートに搾れるバルーン式(風船を膨らます圧力で搾る)が登場した。現在では、一部の高級なワイン造りで、縦型圧搾機が復活して来ている。これは、効率は悪いがしぼられたワインの品質を優先した結果といえる。

他にもいくつかの例が挙げられるが、ワイン醸造に限らず、微生物を使って食品を作る産業は、長い間の試行錯誤の結果蓄積された知恵の中に、大きなヒントがある。古い時代の技術と言っても、後から科学的な妥当性が証明されたことも多くある。生物を相手にする時には、時間をかけて培われた「経験」はとても重要。「新しい技術」に見えるものが、「高品質な食品を作るため」でなく、「合理化」と「コスト削減」のために行われている場合も多いと言える。両者の違いを良く見据えて、時間のフィルターで濾過された「経験」の中にあるヒントを見つけられるようにしたい。

## S2 「イタリアのパネトーネ種でつくるロングライフパン」

丸山佳美（株式会社コモ）

現在、多種多様なパンが市販されているが、そのほとんどはパン酵母で発酵させて作られている。パン酵母とは、自然界に生息する酵母の中からガス発生が多い菌株を選抜し、人工的に培養して使いやすく加工したものである。使用される酵母はほとんどが *Saccharomyces cerevisiae* で、用途に合わせて様々な菌株が使用される。

パン酵母は 19 世紀に入って開発されたものであり、1920 から 30 年代に生産が本格化した。日本でも 20 世紀に入ってヨーロッパで開発されたパン酵母が輸入されるようになり、1931 年に国産のパン酵母が本格的に製造販売されるようになった。パン酵母を使用する事で製パン工程は著しく短縮でき、安定した品質のパンを大量に生産できるようになった事から、開発されてから 100 年足らずで製パンに欠かせない原料となった。

しかし発酵パンの歴史は古く、パン酵母が開発されるよりはるかに昔、今から 5-6000 年も前から人類のほとんどが発酵パンを食糧としてきた。その大半は小麦粉やライ麦粉などの穀物や水、果実などを自然に発酵させた発酵種でパンづくりを行っており、これらの方法は世界各地で伝統的に受け継がれてきた。発酵種の中でも乳酸菌の活性が強いものをサワー種といい、ドイツのライサワー種、アメリカのサンフランシスコサワー種、イタリアのパネトーネ種が有名である。これらの発酵種はガス発生の強弱によってではなく、主に粉と水による種継ぎによって自然に選抜・維持された酵母と乳酸菌でパン生地を発酵させる為、発酵に長時間かかり、品質も安定しづらい。しかし酵母と乳酸菌が長時間発酵に関与する事で独特の風味が形成され、また使用する添加物の少なさや日持ちの良さもあり発酵種は近年大きく注目されている。

パネトーネ種から作られるイタリアの菓子パン「パネトーネ」はその独特の風味や口どけの良さ、約半年間もの長期間日持ちする事で世界的に有名である。弊社は「パネトーネ」の美味しさを日本で広める為に、1984 年にパネトーネ種を使用したロングライフパンの製造販売を目的として設立された。パネトーネ種を使用するにあたって、イタリアのパンメーカーと技術提携を行い、伝統的な方法をそのまま日本で再現できるよう技術者から直接指導を受けた。パネトーネ種を他の地域で維持管理することは難しいとされてきたが、試行錯誤の結果、日本で安定してパネトーネ種を維持しロングライフパンを製造する事に成功した。パネトーネ種による製パンは、生息している微生物の増殖や活性化の為に複数の発酵工程をとる。さらに微生物によるガス発生量が少ない事から約 10 時間という長時間の最終発酵を伴うので、種継ぎを含めるとパンが出来上がるまでに合計 3 日間もの長い日数が必要となる。しかし当初パネトーネ種中の微生物叢やこれら発酵プロセスでの動向に関してはほとんど明らかとなっていなかったため、創業当初より東京農業大学の岡田早苗教授と共同でパネトーネ種中に生息している微生物の分離・同定および性状調査を行ってきた。これによりパネトーネ種およびその後の発酵工程には主要な微生物として酵母 *Candida milleri*、乳酸菌 *Lactobacillus sanfranciscensis* が関与している事や、各々の諸性質などが明らかとなった。さらに現在ロングライフパンの持つ軟らかさ保持能の要因などについて岐阜大学の岩本悟志准教授との共同研究を行っている。

このようにパネトーネ種を使ったロングライフパンづくりは古くて新しい伝統技術であり、消費者の自然志向や食品添加物を減らしたいという安全嗜好にも合致している。さらに乳酸菌の生死菌体がヒトの健康保持へ果たす機能性として、整腸作用、血中コレステロール低減作用、血圧降下作用、制ガン作用、免疫賦活作用が報告されている。パネトーネ種でつくるパンも死菌体ではあるが多量の乳酸菌体を含む事から、これら保健効果についても興味を持たれる。

パネトーネ種でつくるロングライフパンについてはまだまだ未知の部分が多いが、今後も伝統技術を守りつつ、これからのパンづくりに役立つ新たな知見を得るべく研究を行っていききたい。

食生活の改善を通じて健康を維持し、疾病を予防するという観点から食品の生体調節機能が大きく注目されている。しかし、有効な生体調節機能を有していたとしても、栄養特性、嗜好特性を伴わないものは、もはや「食品」とはいえない。実際に食べることを意図して研究をすすめることの重要性を感じている。ここでは、食物アレルギーを引き起こすという負の機能を低減して、逆にアレルギーを抑制するという正の機能性を付与した「低アレルギー化小麦粉」の開発を中心に、乳糖を原料とした新規機能性オリゴ糖の開発と評価に関する現在進行中の研究についても紹介したい。

### 1. 低アレルギー化小麦粉の開発

食物アレルギー患者は、食事制限等により生活上大きな制約が科されている。小麦は主要穀物であると同時に多くの食品に含まれていることから、日常の食生活から小麦を完全に除去することは非常に困難である。このような背景から、摂取してもアレルギー症状を引き起こさない「低アレルギー化小麦粉」製品が強く望まれてきた。アレルギーの構造を決定し、その構造を酵素処理によって網羅的に破壊すれば低アレルギー化は達成される。しかし、小麦の加工特性に大きく寄与するグルテンは、同時に主要なアレルギーの一つでもあり、その分解によりドウ形成能が失われて加工特性は著しく低下する。そこで、アレルギーの分解に用いる酵素としては、酵素自身がアレルギーとならないことに加え、デンプン分解活性の低い酵素を選抜した。これは、デンプンの加熱糊化を利用することで加工特性をある程度保持できると考えたからである。アレルギーの部分ペプチドが由来するアレルギーに対しての免疫応答を抑制するという報告がある。そこで、アレルギーの分解により生じるペプチドを残存させれば、小麦アレルギーに対する免疫応答、すなわち小麦アレルギーが抑制可能であると考え、ペプチド断片も残存させることにした。さらに、アレルギーの吸収を抑制する機能を有する酵素製剤を選抜した。このように、低アレルギー化小麦粉は加工特性を極力残しつつも、アレルギー性を低減させ、さらにアレルギー抑制性を付与するように設計されている。最終的に、薄力粉を出発原料とし、セルラーゼ製剤、アクチナーゼ製剤で2段階反応を行うという低アレルギー化工程を確立した。また、ピザ、パスタをはじめとする食品を作製するための最適材料配合と操作法を決定した。カップケーキを用いた臨床試験で、低アレルギー化小麦粉は大多数の小麦アレルギー患者に小麦アレルギー症状を引き起こさないことを明らかにした。小麦アレルギー特異的にアレルギー性気道炎症を示す動物モデルを用いて、低アレルギー化小麦粉は予期していたとおりアレルギー抑制活性を示すことを明らかにした。小麦アレルギー患者でも、長期間の低アレルギー化小麦粉の摂取によって小麦アレルギーが寛解して通常の小麦製品が摂取可能になった例が報告されている。

### 2. 新規機能性オリゴ糖の開発と評価

乳製品中の主要な糖質は乳糖である。我々は *Ruminococcus albus* NE-1 のセロビオースエピメラーゼ (CE) を単離し、その遺伝子のクローニングに成功しているが、CE が乳糖をエピラクトース (4-O-β-D-galactopyranosyl-D-mannose) に異性化することを明らかにした。さらに、エピラクトースがビフィズス菌や乳酸菌といった腸内の善玉菌を増殖させること、ミネラル吸収の促進、脂質代謝の改善といった生理機能を有することを明らかにした。CE で処理することで乳製品中の乳糖を種々の生理機能が期待されるエピラクトースに変換可能であることから、実用化にはまだハードルが多く残るものの、乳製品の高付加価値化につながるものと期待して研究をすすめている。

矢部富雄（岐阜大学応用生物科学部）

機能的食品を開発するためには、生理活性物質を効率良く評価するスクリーニング系の開発が重要です。しかしながら、ある食品成分がどんな生理機能をもつのかを調べようとするとき、選択する評価指標によっては、せっかくの素材をみすみす見逃してしまうことにもつながりかねません。もし、複数の生理機能に共通の評価指標を適用できれば、一次スクリーニング系として、より広範な生理活性物質を網羅的にとらえることが可能となります。

私たちは、このアイデアを具体化するために、培養細胞を用いて機能的食品成分を評価する方法の開発を進めています。

動物細胞表面には、プロテオグリカン糖鎖と呼ばれる生体高分子が存在しており、細胞外環境に応じて細胞の生理機能を調節する役割を担っていることが近年分かってきました。この糖鎖の一種であるヘパラン硫酸は、硫酸基転移酵素によりさまざまなパターンの硫酸化修飾を受け、特定の硫酸化パターンが特定のタンパク質の結合に重要であることが知られています。また、ヘパラン硫酸の硫酸化パターンの変化と生理機能の発現の間には、相関関係が認められることから、ヘパラン硫酸糖鎖が生体内機能調節因子である可能性が示唆されます。

そこで、私たちはマウス線維芽細胞（L-M細胞）を用いて、細胞外刺激に応じた細胞表面上ヘパラン硫酸糖鎖の変化を調べることにしました。L-M細胞は、アドレナリンによる刺激によって神経成長因子を産生し、細胞外に分泌します。アドレナリン添加時に、細胞表面に発現したヘパラン硫酸糖鎖の構成単位二糖の硫酸化パターンをHPLCを用いて分析したところ、硫酸化度が無添加時に比べて上昇することが分かりました。また、硫酸基転移酵素群の発現量をRT-PCRによって確認すると、グルコサミン残基の6位を硫酸化する酵素の発現パターンに有意な相違が認められました。以上より、食品中に機能成分が含まれるかどうかの一次スクリーニングとしてヘパラン硫酸の構造変化を測定することの有用性が示されました。

上述の研究と平行して、スクリーニング系に必要なハイスループットに対応できるよう、硫酸化パターンを識別するツールの開発を行っています。一般的にタンパク質の構造を識別するツールとして使われるのは「抗体」ですが、動物細胞に広く存在する糖鎖を抗原とした抗体の作製は非常に困難です。そこで、私たちはファージディスプレイという方法を使って、糖鎖の硫酸化パターンを識別するペプチドの同定を試みました。その結果、血液抗凝固作用が知られているヘパリン糖鎖を標的として、特異的に結合するペプチドが得られました。このペプチドは、同様に硫酸基をもつ糖鎖であるコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸にはまったく結合しませんでした。このペプチドを可視化プローブとして利用することにより、機能的成分がもたらす細胞表面上の糖鎖構造の変化を効率的に検出することが可能となります。

現在のところ得られている糖鎖認識ペプチドはまだ少ないですが、さまざまな硫酸化パターンを識別するペプチドをライブラリー化し、このペプチドを用いて細胞表面の変化を効率的に検出できるようにすることで、広範な生理活性物質を網羅的にとらえる第一歩となると考えています。





# ポスター発表 要旨

## P1 機能性物質とヘパラン硫酸糖鎖の相関関係についての解析

○永見圭太郎、西田光貴、金丸義敬、矢部富雄（岐阜大院・応生科・資源生命）

【目的】 グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸（HS）糖鎖は、硫酸化構造を多様に変化させることで、様々な成長因子やウイルスなどの特異的な結合が可能となり、種々の生理機能を調節している。我々は、機能性物質が細胞に作用し機能を発揮するときに、細胞表面上の HS 糖鎖が変化しているのではないかと考え、HS が物質の機能性評価の指標とならないかを検討している。そこで本研究では、機能性物質によって細胞表面 HS 糖鎖がどのような影響を受けるのかを明らかにすることを目的としている。

【方法】 マウス線維芽細胞（L-M 細胞）にアドレナリンを添加すると、神経成長因子を分泌することが知られている。このときの HS 量の変化を調べるために、アドレナリンを添加して培養した L-M 細胞をトリプシン処理し、細胞表面 HS 糖鎖を回収した。そして、この HS を HS 分解酵素によって二糖単位に分解し、232 nm における吸光度を測定した。次に HS の構造変化を調べるため、L-M 細胞から回収した HS を陰イオン交換クロマトグラフィーに供した後、コンドロイチン硫酸分解酵素で共存しているコンドロイチン硫酸を除去した。その後、HS を二糖単位に分解し、HPLC により構造分析を行った。さらに、HS 硫酸基転移酵素の発現量を調べるために、細胞から RNA を調製し、cDNA を合成した後に PCR を行って、硫酸基転移酵素の発現量の変化を調べた。

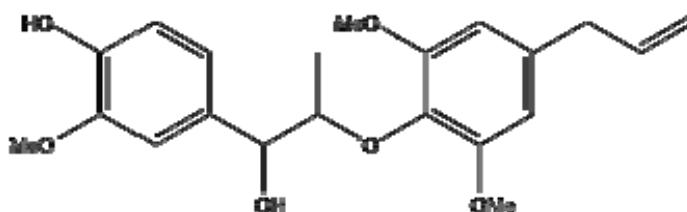
【結果】 アドレナリン添加 L-M 細胞は、無添加時と比較して、HS 量に変化が見られなかった。しかし、HPLC による分析の結果、アドレナリン添加によって HS の硫酸化度が増加していた。さらに、グルコサミン残基の 6 位を硫酸化する酵素の発現パターンの変化も認められた。これらの結果より、機能性物質によって細胞表面 HS 糖鎖構造が変化することを示した。

## P2 ナツメグ (*Myristica fragrans*) 中の細胞増殖抑制物質

○工藤絵美、今井邦雄、勝崎裕隆（三重大院・生資）

香辛料から、様々な抗酸化物質や抗菌物質など生物機能物質が単離構造決定されている。今回は、細胞増殖抑制機能に着目し、市販の香辛料からスクリーニングを行った。中でも、活性の強かったナツメグについて、活性成分の単離、構造解析を目的に研究を進めた。

市販の香辛種7種についてエタノール抽出を行った。各抽出物100  $\mu\text{g}$ を $10^5$ あたりのショウジョウバエ細胞S2に添加し、細胞増殖抑制活性を調べた。その結果ナツメグとペパーミントに活性が認められた。特に活性の強かったナツメグについて、各種クロマトグラフィーで精製を行った。最終的に活性成分の単離に成功した。単離された物質について、NMRを中心とした機器分析による構造解析の結果、 $\alpha$ -[1-[2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)phenoxy]ethyl]-4-hydroxy-3-methoxy-benzenemethanol と同定した。この物質は、終濃度14  $\mu\text{M}$ で40%細胞増殖阻害することが判明した。



P3

### ニンニク含硫成分の TRPV1 賦活性化

○ 小泉佳名子<sup>1</sup>、岩崎有作<sup>1,2</sup>、成川真隆<sup>1,2</sup>、飯塚裕司<sup>3</sup>、細野（深尾）友美<sup>3</sup>、  
関泰一郎<sup>3</sup>、有賀豊彦<sup>3</sup>、渡辺達夫<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>静岡県大院・生活健康、<sup>2</sup>Global COE Program、<sup>3</sup>日本大学・生物資源科学)

トウガラシ辛味成分 Capsaicin (CAP) は TRPV1 を介した体熱産生亢進作用を有する。これまでに我々は CAP と同様に TRPV1 を活性化させる食品成分の探索を行ってきた。本研究では、ニンニク中の含硫成分である diallyl sulfide (DAS)、diallyl disulfide (DADS)、diallyl trisulfide (DATS) に着目し、それらの TRPV1 活性測定を行った。

【方法】rat TRPV1 を強制的に発現させた CHO 細胞株を用い、sample を投与したときの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を FLEXstation™ II にて測定した。また、sample の作用が TRPV1 に特異的かどうかを調べるため、TRPV1 選択的 antagonist である capsazepine (CPZ) 共存下での測定も行った。

【結果・考察】DAS、DADS、DATS において、濃度依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が確認された。それらの最大活性は CAP の半分程度であった。また、どの成分においても CPZ の投与によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が抑えられた。これらのことより、DAS、DADS、DATS は TRPV1 特異的に作用していることがわかった。

CAP の TRPV1 を介した体熱産生機構は次のように考えられている。CAP が感覚神経に発現している TRPV1 に作用することで副腎からのアドレナリン分泌が促進される。このアドレナリンが肝臓あるいは脂肪組織でのグリコーゲンや脂肪分解を促進する。その結果として、血中のエネルギー基質濃度の上昇が起こり、最終的に体熱産生亢進をさせる。これまでにニンニク含硫成分がアドレナリンやノルアドレナリン濃度を上昇させ、体熱産生亢進効果を有することが報告されている。今回の結果より、ニンニク含硫成分の体熱産生効果に TRPV1 が関与する可能性が考えられた。

P4

### レンカ (*Nelumbo nucifera*) に含まれる血管新生抑制成分の探索

○ 岡村直樹、宇野裕美子、太田敏郎、加治和彦、熊澤茂則

(静岡県立大学大学院生活健康科学研究科)

#### 【目的】

血管新生とは、既存の血管から新たに血管を伸長することであり、固形腫瘍、糖尿病性網膜症や関節リウマチなど様々な疾病に関与していることが明らかとなっている。本研究では、血管新生の抑制による疾病の予防や再発予防を目的として、これまでの研究で血管新生抑制活性があることが認められているレンカ (*Nelumbo nucifera*: 蓮の花) から血管新生抑制成分を単離し、その構造解析を行うことを試みた。

#### 【方法】

レンカエタノール抽出物をオープンカラムクロマトグラフィーにより 40 画分に粗分画した。次に、TLC と HPLC により成分パターンを分析し、40 画分中 10 種類の画分を選出した。これらについて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に血管類似の管腔を形成させる *in vitro* 血管新生モデル (サンドイッチ法) を用いて管腔形成抑制活性を調べた。

#### 【結果】

10 種類の画分中 4 画分に活性が認められた。この粗分画物の中から、特に活性の強かったものを、さらに逆相分取 HPLC に供して単離、精製し、複数の活性成分を得た。これらの成分を、NMR、MS などの各種分析機器を用いて構造解析したところ、既知化合物ではあるが、フラボノイドの一種である kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone)、アルカロイドの nuciferine (1,2-dimethoxy-6-methyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinoline) を同定することができた。また、血管新生抑制活性は認められなかったが、レンカからいくつかの成分を単離し、同定することができた。

P5

## ORAC 法を用いたプロポリスの抗酸化活性評価

○幡野愛、野中孝、熊澤茂則（静岡県立大学・食品栄養科学部）

田澤茂実、荒木陽子（アピ株式会社長良川リサーチセンター）

【目的】プロポリスとは、ミツバチが周辺の植物から採取した樹脂状物質を巣に蓄えたものである。プロポリスには抗酸化作用や抗菌作用などの様々な生理活性が報告され、日本においてはブラジル産を中心に健康食品として広く利用されている。プロポリスは起源植物により成分組成が異なっており、ヨーロッパや中国などで採取されるポプラ由来のものと、ブラジル南東部で採取されるアレクリン（バッカリス）由来のものが代表的である。起源植物が異なれば、生理活性も異なる。我々は、これまでに DPPH 法などを用いて、様々な産地のプロポリスの抗酸化活性を評価してきた。今回、近年米国において、食品の抗酸化能の指標になりつつある ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法をプロポリスに応用し、他の抗酸化活性測定法による結果との比較を行った。

【方法】プロポリスは、ブラジル産や中国産など、産地や起源植物が異なる数種類の試料を用いた。これらのプロポリス原塊をエタノールで抽出したものを評価用試料とした。ORAC 法は既報に準じ、96 穴マイクロプレートを用い、蛍光強度を測定することで、各プロポリスの ORAC 値 (Trolox 当量) を求めた。

【結果】各プロポリスの ORAC 値は、4000~15000  $\mu\text{mol TE/g of extracts}$  であり、産地による活性の違いが認められた。特に、中国山東省産の赤いプロポリスが高い ORAC 値を示した。DPPH や FRAP など高い抗酸化活性を示していたプロポリスは ORAC 法においても高い活性値を示した。今回の我々の検討により、ORAC 法はプロポリスの抗酸化活性評価においても有効な評価法になり得ることが示唆された。

P6

沖縄産プロポリスの起源植物に含まれるプレニルフラボノイドの  
定量分析と抗酸化活性

○百瀬昇、村瀬真代、熊澤茂則（静岡県立大学大学院生活健康科学研究科）

福本修一（株式会社ポッカコーポレーション）

【目的】これまでの当研究室における研究により、沖縄産プロポリスの起源植物として、トウダイグサ科の植物オオバギ (*Macaranga tanarius* Muell. Arg.) が同定されている。ミツバチはオオバギの果実表面の樹脂腺をプロポリスの原料に用い、その樹脂腺中には特異なプレニルフラボノイド化合物が含まれていることが明らかになっている。オオバギは雌雄が存在する植物であるが、雌雄差や、葉や花などの部位別による含有成分の違いについては不明である。本研究では、今後、オオバギを機能性植物素材として有効に利用するために、オオバギに含まれるプレニルフラボノイド化合物について詳細に定量分析を行うとともに、抗酸化活性を評価した。

【方法】沖縄で採取したオオバギの雌雄株を部位別に分別し、メタノールで抽出したものを分析用試料とした。この試料について、PDA-HPLC を用いてオオバギに含まれるプレニルフラボノイド化合物の定量分析を行った。定量の際の標準物質としては分析対象としたプレニルフラボノイド化合物と同様のフラバノン骨格を有する eriodictyol と naringenin を用いた。また、抗酸化活性評価として、それぞれの植物部位の DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。

【結果】オオバギに含まれるプレニルフラボノイド化合物は植物の各部位によって含有量が異なっていた。雌雄ともに、葉柄や茎、若葉などにはプレニルフラボノイド化合物はほとんど含まれていなかったが、葉や花、果実には多く含まれていた。果実に含まれるプレニルフラボノイド化合物は、表面の樹脂腺の部分に集中していた。また、植物のどの部位においても、強い DPPH ラジカル捕捉活性が認められた。

P7

虚血ストレスに対するブラジル産水抽出プロポリスの  
網膜神経細胞保護作用に関する遺伝子解析

○中島佳美<sup>1</sup>、嶋澤雅光<sup>1</sup>、成田幸夫<sup>2</sup>、三島敏<sup>2</sup>、原英彰<sup>1</sup>  
(岐阜薬科大・薬効解析学<sup>1</sup>、アピ(株)長良川リサーチセンター<sup>2</sup>)

【目的】プロポリスは、ミツバチが巣を補強するために植物の樹脂や新芽の滲出物を集めたもので、抗腫瘍、抗菌、抗炎症などの作用を有することが報告されている。我々はこれまでに水抽出プロポリス(WEP)の新しい効果としてマウス中大脳動脈閉塞誘発脳梗塞モデルおよびマウス *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)誘発網膜障害モデルにおける保護効果を報告した。そこで今回我々は、*in vitro* 虚血ストレスに対する WEP の保護作用について検討し、細胞保護作用に関与する成分の同定および遺伝子発現の解析を行った。

【方法】ラット由来網膜神経節細胞株(RGC-5)に、*in vitro* 虚血再灌流ストレス(Oxygen glucose deprivation; OGD/reoxygenation)を与え、細胞障害を誘発させた。細胞生存率は formazan による細胞内代謝酵素活性測定により定量した。さらに、WEP の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、RGC-5 に OGD 4時間および reoxygenation 18時間のストレスを与えた直後に RNA を抽出し、約 22,000 遺伝子に対して網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行い、定量 PCR (qRT-PCR)により確認した。

【結果および考察】WEP は RGC-5 の OGD/reoxygenation 誘発細胞死に対して 4-200  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で濃度依存的に有意な細胞保護作用を示し、WEP の主成分であるカフェオイルキナ酸類も有意な保護作用を示した。このことから WEP の OGD/reoxygenation 誘発細胞死に対する細胞保護作用には一部、その主要成分であるカフェオイルキナ酸類の関与が示唆された。さらに、DNA マイクロアレイおよび qRT-PCR の結果、WEP は OGD/reoxygenation ストレスにより発現減少した抗酸化関連遺伝子、casein kinase II (CK2)の回復および OGD/reoxygenation ストレスにより発現増加したアポトーシスに関与する細胞死関連遺伝子 Bcl-2-related ovarian killer protein (Bok)の発現抑制に影響を及ぼすことで網膜神経細胞保護作用を示している可能性が示唆された。

P8 フラボノール類と血清アルブミンとの結合には B 環の水酸基が重要である

○中務真結、石井剛志、森 大気、中山 勉 (静岡県大・食品栄養)

【目的】フラボノール類は、高い抗酸化作用や抗炎症作用を有し、動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病への予防効果が期待されている。摂取したフラボノール類の一部は、血中に多量に存在するヒト血清アルブミン (HSA) と相互作用することが報告されており、分子内に存在する脂溶性ポケットに疎水性相互作用により結合すると考えられている。一方、B 環にカテコール構造を有する植物ポリフェノールは、酸化によりキノン構造を経ることでグルタチオンや蛋白質中のチオール基と共有結合する。本研究では、フラボノール類と HSA との相互作用を分析し、B 環構造の違いが結合様式 (共有結合・非共有結合) に与える影響を検討した。

【結果と考察】 B 環の水酸基の数が異なる 4 種のフラボノール類 (ミリセチン、ケルセチン、ケンフェロール、ガラングイン) と HSA との親和性を、HSA カラムを備えた HPLC を用いて評価した。移動相の pH は、フラボノール類の酸化を抑制するために弱酸性とした。その結果、保持時間は B 環の水酸基の数が多きほど長く、3 つの水酸基を有するミリセチンが最も親和性が高かった。次にチオール基との共有結合反応を評価するために、4 種のフラボノール類とチオール基含有ペプチドを中性条件下でインキュベートした。質量分析による解析の結果、チオール基との反応性においても、3 つの水酸基を有するミリセチンが最も高かった。そこで、ミリセチンと HSA とをインキュベートし、各種検討を行ったところ、ミリセチンと HSA との結合様式は、反応モル比、溶媒の pH および抗酸化剤の有無により異なることが明らかとなった。また、ミリセチンが酸化され易い条件ほど共有結合の割合が高まった。以上の結果より、(1) フラボノール類と HSA との相互作用には B 環に存在する水酸基の数が強く影響すること、(2) B 環の酸化状態が HSA との結合様式を決定することが示唆された。

## P9 血清アルブミンによるエピガロカテキンガレートの酸化抑制機構の解明

○蓑田香奈子<sup>1</sup>、石井剛志<sup>1</sup>、市川達也<sup>1</sup>、鈴木友紀子<sup>2</sup>、菅 敏幸<sup>3</sup>、中山 勉<sup>1</sup>  
(静岡県大・食品栄養<sup>1</sup>、(株) アルバック・技術開発部<sup>2</sup>、静岡県大・薬学<sup>3</sup>)

【目的】緑茶の主要成分であるエピガロカテキンガレート (EGCg) は様々な生理活性を有しているが、中性以上の pH を示す水溶液中では B 環構造が酸化され易く不安定である。我々は、ヒト血清アルブミン (HSA) 存在下で EGCg の安定性が高まることを見出し、その安定化に HSA との相互作用や遊離のチオール基による抗酸化作用が関与していることを報告した。本研究では、EGCg と HSA との相互作用に影響するカテキン類の構造特性を明らかにし、EGCg の安定化に付随する HSA の酸化修飾を解析することで、HSA による EGCg の酸化抑制機構の解明を試みた。

【方法および結果】HSA との相互作用に関与する EGCg の構造特性を検討するために、(1) ガレート基の有無、(2) B 環の水酸基の数、(3) B 環の立体配置、(4) 水酸基のメチル化の位置の異なるカテキン類を水晶発振子マイクロバランス法と HSA カラムを備えた HPLC により分析し、HSA に対する親和性を評価した。その結果、カテキン類と HSA との相互作用にはガレート基の存在が最も重要であること、B 環の水酸基の数が增加することで親和性が高まることが明らかとなった。これは、HSA との親和性が低いエピガロカテキンの酸化が、HSA 存在下において全く抑制されないことを支持する結果であった。次に、EGCg の安定化に伴う HSA の構造変化を検討したところ、EGCg の安定化には、HSA の遊離チオール基の酸化および蛋白質カルボニルの生成を伴うことが明らかとなった。これまでの研究から、チオール基は自身が酸化されることでカテコールからキノンへの酸化を抑制することや、生成したキノンは蛋白質中のアミノ基と反応することで蛋白質カルボニルを生成し、自身はカテコールに還元されることが報告されている。以上の結果より、HSA は EGCg と相互作用し、自身が酸化されることで B 環の酸化を抑制し、酸化安定性を高めることが示唆された。現在、更なる知見を得るために結合構造や酸化修飾部位の解析を進めている。

## P10 メチオニン代謝に対するビタミン B<sub>6</sub> 欠乏の影響と葉酸の添加効果

○山本 紘平<sup>1</sup>、伊佐 保香<sup>2</sup>、中川 智行<sup>1,2</sup>、柘植 治人<sup>3</sup>、早川 享志<sup>1,2</sup>

(1. 岐阜大・農学研究科 2. 岐阜大・応用生物科学 3. 中部大・応用生物学)

【目的】メチオニン代謝系の中間体であるホモシステイン (Hcy) のさらなる代謝にはビタミン B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) を補酵素に要求するイオウ転移経路と葉酸を要求する再メチル化経路がある。両経路による Hcy の除去能力が Hcy 蓄積に深く関与しており、これまでに B<sub>6</sub> 欠乏時における Hcy 蓄積について報告してきた。しかし B<sub>6</sub> 欠乏だけでは Hcy の蓄積は起こらず、メチオニン過剰などの他の要因と組み合わせると Hcy 蓄積を起こすと考えられる。そこで B<sub>6</sub> 欠乏でメチオニン過剰摂取時における Hcy 蓄積の軽減要因として、葉酸の添加効果について検討した。

【方法】実験飼料としてコントロール飼料 (C)、B<sub>6</sub> 欠乏飼料 (D)、B<sub>6</sub> 欠乏+葉酸添加 (10 mg/kg 飼料) 飼料 (F) の各飼料中にメチオニン 6 または 9 g/kg 添加 (6、9) した 6 種の実験飼料を調製し、4 週齢の Wistar/ST 系雄ラットをこれら飼料で 35 日間飼育した (群名：C6、C9、D6、D9、F6、F9)。なお飼料は D9 群に対するペアフィーディングにより与えた。解剖後、血漿、肝臓を摘出し、血漿 Hcy、肝臓 S-adenosylmethionine (SAM) と S-adenosylhomocysteine (SAH)、血漿と肝臓中の B<sub>6</sub> ビタマーを HPLC 法で測定した。

【結果と考察】C 群と比べると B<sub>6</sub> 欠乏条件の 4 群で血漿 Hcy の上昇傾向が見られ、特に D9 群で顕著だった。さらに F9 群では D9 群と比較して Hcy が有意に低値を示した。また D9 群では肝臓 SAH 含量の有意な増加が認められたが F9 群では C9 群と有意な差はなかった。以上の結果より、B<sub>6</sub> 欠乏状態でのメチオニン代謝系の異常により惹起された肝臓 SAH の増加や血漿 Hcy の上昇は、葉酸の添加により軽減できることが示唆された。

## P11 飛騨・美濃伝統野菜(十六ささげおよび飛騨紅かぶ葉部)の摂取効果

○吉川卓志<sup>1</sup>, 千田真里<sup>2</sup>, 前澤重禮<sup>1,2,3</sup>, 中川智行<sup>1,2</sup>, 早川享志<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>岐阜大・農・生物資源利用学専攻, <sup>2</sup>岐阜大・応用生物, <sup>3</sup>ぎふクリーン農業研究センター)

【目的】十六ささげと飛騨紅かぶ葉部の抗酸化活性が強いことが *in vitro* において調べられている。本実験においては、これら野菜を摂取した場合の *in vivo* での抗酸化効果を調べるとともに、食物繊維成分摂取による大腸内環境改善効果を合わせて調べることを目的とした。

【方法】AIN-76 標準飼料 (C) を基準とし、脂質レベルは通常の 5% に加え 10% の 2 レベルを設け、十六ささげ (S) あるいは飛騨紅かぶ葉部 (K) の凍結乾燥粉末を食物繊維レベルとして 5% 含む飼料を調製し (C5, C10, S5, S10, K5, K10), これらの飼料をラットに 3 週間投与した。飼育期間中に新鮮糞および尿を回収し、飼育最終日に血液、肝臓、盲腸、精巣周辺脂肪、腎臓周辺脂肪を摘出した。抗酸化評価のために TBARS や総グルタチオン量を測定するとともに、盲腸内容物は pH, 短鎖脂肪酸量とフェノール系化合物 (フェノール, *p*-クレゾール) を、肝臓は活性酸素消去系の SOD 活性および過酸化脂質消去系の GSH-px 活性を、新鮮糞と尿はフェノール系化合物の測定に供した。

【結果】10% の脂質を添加する事で肝臓中の TBARS が有意に増加し、赤血球中の総グルタチオン量は野菜を添加した群で上昇した。SOD 活性に有意な差は無かったが、C10 群と K10 群を比較した際に GSH-Px 活性が有意に増加した。また、野菜の添加により盲腸内のフェノール量が増加し、糞中では S5 および S10 群で、尿中では S10 群で有意な増加がみられた。盲腸内の *p*-クレゾール量が S5 群および S10 群で減少した一方で、K5 および K10 群では有意に増加し、尿中では S10 群および K10 群で有意に増加した。主要な短鎖脂肪酸である酢酸の増加が野菜を添加する事で顕著となり、その結果として総短鎖脂肪酸量は有意に増加した。また、脂質を添加する事でプロピオン酸が減少する事が観察された。

## P12 アミノ酸は生体組織の酸化ストレスを抑制できるか？

-Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 試験-

○片山茂<sup>1</sup>, 峯芳徳<sup>2</sup>, 中村宗一郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>信州大・農, <sup>2</sup>University of Guelph)

酸化ストレスとは生体内で活性酸素種が過剰に発生した状態であり、各種変性疾患や老化進行を招く要因となる。様々な生活環境要因が活性酸素を生成する一方、特定の抗酸化食品は体内の活性酸素を除去する働きが知られる。本研究では、アミノ酸の酸化ストレス抑制作用についてヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を用いて検討した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による IL-8 産生抑制を酸化ストレスの指標としたところ、システイン、バリン、イソロイシン、ロイシン、トリプトファン、ヒスチジン、リジン、アラニンで顕著な効果が認められた。システインはグルタチオン (GSH) 合成酵素を活性化し、細胞内 GSH レベルを上昇させた。バリン、イソロイシン、ロイシンの分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) は GST-S-トランスフェラーゼ (GST) 及びカタラーゼ活性を増加させた。トリプトファン、ヒスチジン、リジンは GST, アラニンは GSH レダクターゼを活性化させた (Fig. 1)。以上の結果は、特定のアミノ酸がその構造に基づき腸管上皮細胞において抗酸化ストレス作用を発揮することを示唆する。

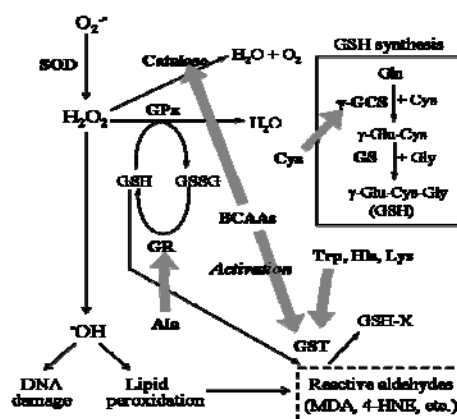


Fig. 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発の酸化ストレスに対するアミノ酸の抑制効果の仮説メカニズム



## P13 $\gamma$ -トコフェロールと脂質過酸化二次生成物 4-Oxo-2-nonenal の反応

○齊藤史恵、岩本悟志、山内 亮 (岐阜大学 連合農学研究科)

トコフェロール (Toc) は天然に存在する脂溶性ビタミンであり、高い抗酸化能を有するため、脂質酸化の防止において重要である。一方、 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドである 4-Oxo-2-nonenal (ONE) は、脂質ヒドロペルオキシドがさらに分解を受けて生成する脂質過酸化二次生成物である。ONE は、DNA やタンパク質との反応性が非常に高く、細胞毒性を示し、様々な疾病の原因になることが報告されている。本研究では、 $\gamma$ -Toc と ONE との反応性について検討を行った。 $\gamma$ -Toc と ONE を塩酸酸性のアセトニトリルに溶解し、37°C で反応させた。反応生成物は HPLC を用いて分離し、構造解析を行った。 $\gamma$ -Toc と ONE の反応物を HPLC 分析したところ、新たに3つのピーク (1-3) が認められた。これらのピークを分取し、NMR によって構造解析を行った結果、化合物 1 と 2 は、 $\gamma$ -Toc の 5 位に ONE が結合した、5-(1-(furan-2-yl)pentyl)- $\gamma$ -tocopherol と 3-(1-butyl-4,5,7-trimethyl-7-(4,8,12-trimethyltridecyl)-8,9-dihydro-7H-furo[3,2-f]chromen-2-yl)propanal であると決定した。一方、化合物 3 は化合物 2 にさらにもう 1 分子の ONE が結合した 1-(1-butyl-4,5,7-trimethyl-7-(4,8,12-trimethyltridecyl)-8,9-dihydro-7H-furo[3,2-f]chromen-2-yl)-4-(furan-2-yl)octan-3-one であった。すなわち  $\gamma$ -Toc は ONE と反応して、5 位の炭素に ONE が結合することが示された。またこれら化合物の生成機構を検討した結果、反応初期に生成した化合物 1 はフラン環の開環により化合物 2 へと転換し、さらにもう 1 分子の ONE が結合して化合物 3 が形成されることが明らかとなった。以上の結果より、 $\gamma$ -Toc は ONE を最大 2 分子捕捉して付加体を形成することが示された。

## P14 DNA アレイによるカテキンの脂質代謝改善作用機構解析

○齋藤裕樹、金丸義敬、長岡 利 (岐阜大学・応用生物科学部)

【目的】アポリポタンパク質 B (apoB) は、低密度リポタンパク質 (LDL) の主要なタンパク質であり、LDL レベルは apoB レベルに依存することから、apoB 遺伝子発現を調節する因子を探索し、その機構を解明することは、高コレステロール血症や動脈硬化症に対する新しい予防改善法の構築のために有効である。当研究室では、ヒト肝ガン由来株化細胞である HepG2 細胞において、赤ワインに含まれるレスベラトロールが apo A-I 分泌量を有意に増加させ、apoB 分泌量を有意に減少させることを報告した。そこで本研究では、動脈硬化症を引き起こす要因として考えられている LDL の主要タンパク質である apoB に注目し、茶に含まれるポリフェノールであるエピガロカテキンガレート (EGCG) の HepG2 細胞における apoB 分泌に対する影響を検討することを目的とした。また、脂質代謝には様々な遺伝子が関与しておりその作用機構は複雑であるため、EGCG の脂質代謝関連遺伝子発現に対する影響について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

【方法】HepG2 細胞に、10  $\mu$  M、25  $\mu$  M EGCG を添加して 24 時間培養し、培地を回収し apoB 分泌量を測定した。また、細胞からトータル RNA を回収し、apoB、LDL 受容体 (LDL-R)、ミクロソームトリアシルグリセロール転移タンパク質 (MTP) などの脂質代謝関連遺伝子の発現を DNA マイクロアレイやリアルタイム定量 PCR 法により測定した。

【結果】EGCG 添加により、コントロールと比較して apoB 分泌量は有意に減少した。LDL-R mRNA がコントロールと比較して有意に増加し、MTP mRNA に有意な変化は見られなかった。また、DNA マイクロアレイにおいても、LDL-R の mRNA レベルがコントロールと比較して有意に増加 (2.1 倍) した。EGCG による脂質代謝改善効果には LDL-R の活性化が重要であることを明らかにした。

**P15****転写依存的な核マトリックス結合が複製開始に与える影響**

○下京未来、齋藤辰朗、杉村和人、田口寛、奥村克純（三重大・院・生物圏生命）

複製・転写といった様々な核内イベントは、核マトリックスと呼ばれる核内ネットワーク構造を足場にして行われると考えられている。核マトリックスとは、細胞を界面活性剤・ヌクレアーゼで処理した後に残る、タンパク質・DNA・RNA の複合体である。転写や複製は核マトリックス上に形成されたファクトリー中で行われている。細胞周期 S 期における DNA 複製は、複製開始点を起点として開始される。ヒトなどの高等真核生物は、ゲノム上に多数の複製開始点を持ち、これにより効率的な DNA 複製を可能にしている。しかしながら、高等真核生物において複製開始点として同定されている領域は未だ少ない。複製開始点を規定する共通配列もないことから、複製開始点選択には一次配列だけではなく、ヒストン修飾や転写、核内配置などの様々な因子が複雑に作用しているのではないかと考えられている。我々はこれまで、複製・転写活性と核マトリックスとの関係について研究してきた。本研究では、複製・転写依存的な DNA の核マトリックス結合に加え、この二つのイベントの関係性を明らかにすることを目的とした。まず、各種ヒト培養細胞由来の新生鎖 DNA を鋳型としたリアルタイム PCR 解析により、*LAMIN B2*, *β-GLOBIN*, *C-MYC*, *HSP70* 遺伝子領域に存在する複製開始点を確認した。さらに、G1 期に同調した HeLa 細胞を用いて複製開始点の核マトリックス結合について解析した。その結果、S 期までに複製開始点の核マトリックス結合量が増加することが分かった。転写と複製の関係性に関しては、*HSP70* をモデルに解析した。本領域内には一つの複製開始点が存在し、熱ストレス処理により転写を誘導できる。HeLa 細胞における *HSP70* の転写量を G1 期の初期から後期の各時期で RT-PCR 解析したところ、G1 期中期で転写量の減少がみられた。この結果と核マトリックス結合量の変化から、このタイミングで複製開始点が核マトリックスに結合することの重要性が示唆された。さらに、G1 期中期の HeLa 細胞に熱ストレスを与え、転写を誘導した。その際の、*HSP70* における複製開始点活性化への影響について報告する。

**P16 DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC によるセントロメア領域の不安定化**

○伊藤克、杉村和人、田口寛、奥村克純（三重大・院・生物圏生命）

DNA のメチル化は哺乳類ゲノムを生理的に修飾する唯一の機構であり、遺伝子の転写抑制およびヘテロクロマチン形成を介してゲノム機能を幅広く調節している。DNA メチル化異常は発がん、老化といったプロセスへと個体を導くことが知られている。5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) はシトシンアナログであり、DNA メチル化酵素 (Dnmts) と共有結合し Dnmts を不活化し、DNA 脱メチル化を引き起こす。その薬剤特性から 5-aza-dC はエピジェネティクスの研究に広く用いられている。更には、がん治療への利用も期待されている。しかしながら、その重要性に反し、5-aza-dC の作用機構について完全な理解は得られていない。本研究は、5-aza-dC による Dnmts の阻害に付随して起こる種々の核内イベントを捉えることを目的とし、マウスセントロメア領域を主な対象として解析を行った。マウスセントロメア領域はセントロメアヘテロクロマチンとセントロメア周辺ヘテロクロマチンからなり、DNA メチル化レベルが高く、クロマチンが高度に凝縮した転写不活性な領域である。マウスセントロメアヘテロクロマチン及びセントロメア周辺ヘテロクロマチンは、それぞれ minor satellite repeat (MiSat)、major satellite repeat (MaSat) と呼ばれる反復配列から構成されている。当研究室はこれまでに、5-aza-dC 処理によりセントロメア領域のヒストン修飾が、ヘテロクロマチン特異的なものから、ユークロマチン特異的なものへと変換することを示している。今回の解析では、5-aza-dC はセントロメア領域のクロマチン凝集度を低下させ、同領域の転写を爆発的に活性化されることを明らかにした。また DRB (RNA Pol II 阻害剤) 処理により、これら転写産物は減少したことから、セントロメア領域の転写は RNA Pol II 依存的であることが示された。ゲノムワイドな現象として 5-aza-dC 処理細胞において、複製依存的な  $\gamma$ -H2AX の蓄積、染色体ブリッジの増加を確認した。これらの結果から、5-aza-dC はセントロメア領域の正常なエピジェネティクスの破綻を導き、染色体全体を不安定化させることが示された。

## P17 トランスジェニックニワトリによるタンパク質医薬品の生産

○笹本貴子、水谷昭文、小島康広、小島純、稲吉勇仁、西島謙一、三宅克英、飯島信司（名古屋大学工学研究科 生物機能工学分野遺伝子工学研究グループ）

現在、次世代の組換えタンパク質生産法として、トランスジェニック動物が注目されている。中でもニワトリの卵中へ医薬品タンパク質を大量生産できれば、飼育スペースや成長期間などの点で大型哺乳動物よりも優れた動物工場システムを確立できると考えられる。我々は、鳥類初期（孵卵 55 時間）胚へ高力価レトロウイルスを感染させることで遺伝子サイレンシングを回避し高発現が可能であることを明らかとし、これを利用してモデル抗体を卵一個あたり 0.2 グラムもの高さで生産することに成功している。一方、多くのタンパク質は糖タンパク質であり、体内での生理活性に付加糖鎖の構造が大きく関与することが知られている。そこで、トランスジェニックニワトリによって生産した組換え抗体の糖鎖を解析した。

卵白より精製した組換え抗体では、本来糖鎖末端に存在するシアル酸とその内側に存在するガラクトースが欠失していることが明らかとなった。その原因を解析するために、卵白を作る輸卵管組織におけるガラクトース転移酵素遺伝子 ( $\beta$  3-galactosyltransferase, GalT) の発現を RT-PCR 法により解析した。その結果、GalT3 は高発現していたものの、GalT1,2 の発現は極めて弱いことが明らかとなった。昆虫細胞に生産させたガラクトース転移酵素の活性を *in vitro* で測定したところ、GalT1,2 の活性は確認されたものの、GalT3 の活性は検出できなかった。卵管の組織抽出液の活性も極めて低く、このことがガラクトースが付加しない原因であるものと考えられた。各組織のガラクトース転移酵素活性は GalT1 遺伝子の発現強度に概ね一致したため、輸卵管において GalT1 遺伝子を強発現するトランスジェニックニワトリの作製を試みた。解析結果についてもあわせて報告したい。なお、本研究の一部は生研センター・新技術新分野創出のための基礎研究推進事業の支援を受けて行われた。

## P18 ゼラチン/アラビアガム複合コアセルベートマイクロカプセルの作製

○石橋美枝、岩本悟志、山内 亮（岐阜大学・応用生物科学部）

【緒言】近年、粒径の揃った（単分散）マイクロカプセルが注目され、研究開発が進められている。コアセルベートマイクロカプセルは、エマルションの油滴表面に皮膜（コアセルベート）を形成させ調製される。本研究では、マイクロチャンネル（MC）乳化法を用いて、単分散エマルションを調製し、単分散油滴を用いたマイクロカプセル化を行った。

【方法】ゼラチンの 1.0wt% 溶液を連続相、大豆油を分散相として MC 乳化を行った。このエマルションに 2.0wt% アラビアガム溶液と蛍光標識ゼラチン溶液を加え、40°C に保ったまま pH 4.0 に調整し、ゼラチンとアラビアガムによるコアセルベートを油滴表面に析出させた。得られたマイクロカプセルを共焦点顕微鏡（CLSM）で観察した。

【結果】MC 乳化法で平均液滴径が 33.2  $\mu\text{m}$ 、相対標準偏差が 5.0% の単分散エマルションを得ることが出来た。図 1 に作製されたマイクロカプセルの CLSM 画像を示す。カプセルの光学的断面図から、油滴の表面にゼラチン/アラビアガム複合コアセルベートが析出していることが確認できた。マイクロカプセル化の操作による油滴径への影響は小さいと考えられたが、油滴が 1 つからなる単核球形のマイクロカプセルやそれらが凝集した多核のカプセルも観察された。カプセル化の操作の検討が今後必要である。

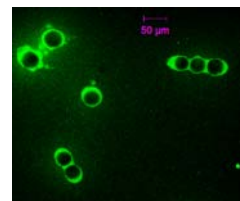


図1 マイクロカプセルの CLSM 画像

**P19 レニン-アンギオテンシノーゲン反応における触媒残基近傍の Ser および Thr 残基の役割**

中根千晶、吉岡祐一郎、岩田英之、○桑澤彰伍、中村征夫、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅(岐阜大学・応用生物科学部)

【目的】血圧調節において重要な役割を担うレニン-アンギオテンシン系の律速酵素レニンは、アスパルティックプロテアーゼに分類される。アスパルティックプロテアーゼは触媒残基として2つの Asp 残基を持ち、その pH 依存曲線は一般的に pH 4 付近に至適 pH を持つ典型的なベル型を示す。しかし、レニン反応の pH 曲線は肩があった曲線や双丘型の曲線を示し、レニン反応は酸性と塩基性に至適 pH を持つ2つの反応で構成されていると考えられる。Asp 側鎖の pKa が約4であることから、レニンの塩基性反応には Asp 以外の残基の関与が示唆される。本研究では、塩基性 pH でプロトン供与体となり得る水酸基ならびにグアニジル基を側鎖に持つ Ser、Thr および Arg の関与を調べた。

【方法・結果】レニンの活性中心近傍に位置し、種間でよく保存されているヒトレニン Thr39、Ser41、Thr80、Arg82、Thr85、Thr227、Ser230、Ser233 を Ala へと改変した T39A、S41A、T80A、R82A、T85A、T227A、S230A、S233A 改変型ヒトレニンを作製し、組み換え型ヒツジアンギオテンシノーゲンを基質として pH 依存性を調べた。アスパルティックプロテアーゼ間で保存されている触媒モチーフの DTGS および DTG を改変した T39A、S41A、T227A は酵素活性を示さなかった。T80A は野生型と同じ pH5.5 と pH8.5 の2ピークを示したが、野生型に比べ、塩基性ピークが僅かに低かった。R82A は変化がなかった。T85A は pH7.5~8.5 に肩があった pH5.5 の1ピークを示し、野生型に比べ、塩基性ピークが顕著に低かった。S230A、S233A は pH7~7.5 に肩があった pH6.0~6.5 の1ピークを示した。これらの結果より、Ser230 と Ser233 は触媒 Asp 側鎖の pKa 値を上昇させていることが明らかとなった。また、Nフラップに位置する Thr80 と Thr85 は塩基性 pH における触媒活性に寄与していることが示唆された。

**P20 企業紹介 天野エンザイム株**

**○天野 仁**

会社概要:

天野エンザイム株は、① 医薬用、食品・工業用、診断薬用酵素剤の製造ならびに販売、② 医薬品、動物用医薬品、飼料添加物の製造ならびに販売を事業内容とする企業です。固体培養と液体培養の2つの生産方式で多種多品目の酵素製剤を製造販売しており、その製品は世界各国で、医薬・食品・工業・診断薬などの幅広い分野で利用されています。

会社沿革:

創業は1889年であり、1948年に天野製薬株として設立後、1993年に酵素事業に特化し、2000年に現社名に変更しました。

企業理念:「酵素を通して新しい価値を創出し、社会に貢献します」

天野エンザイムは、創業以来100年余の間、「自然と共生し、資源を大切にする日本の文化・伝統」の中で生まれ、その文化や伝統を受け継いできました。私たちは、こうした文化を、「酵素に係わる」ことによって生み出される付加価値を通して 世界に発信し、社会へ提供することによって、「企業は社会のためにある」という理念を実現します。

酵素の応用例:

食品工業用、医薬用、診断薬用などでの応用例をいくつかご紹介いたします。