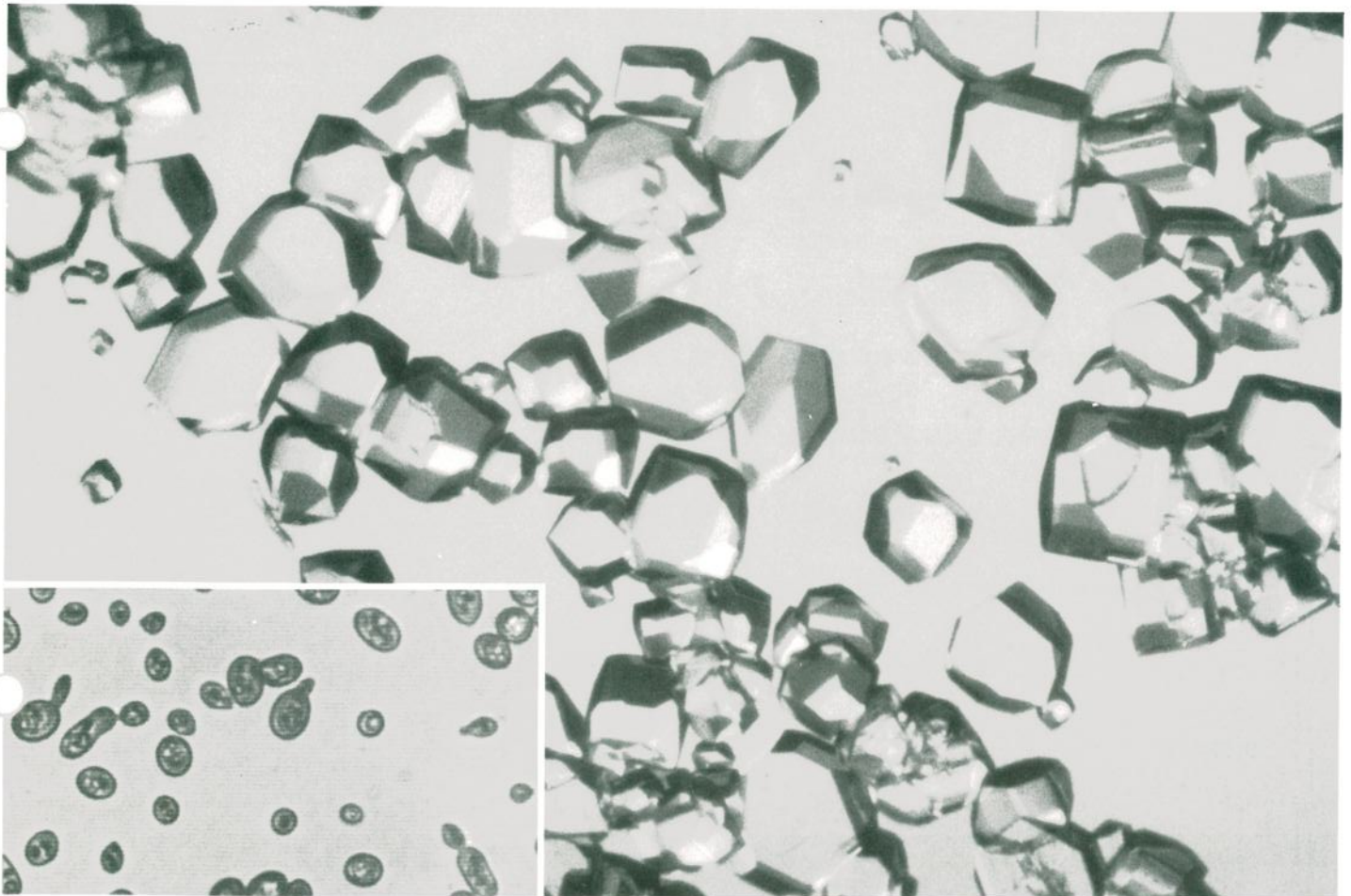




農業試験研究一世紀記念



表紙説明

低カロリー糖質「エリスリトール」の
結晶(中央)と生産酵母(左下)

(本文 7 ページ参照)

本号の紙面

国内情報..... 1
 食品加工技術としてのバイテク、ラクトスクロースの生産技術、エリスリトール生産技術、バイオリクターを利用した油脂の改質、スープ製造用味センサーシステム、人工酵素
 地域の先端研究..... 21
 熊本県での加圧食品の研究開発と実用化
 文献情報..... 24
 ペチュニア花色遺伝子のタギングとクローニング、雌雄決定に關与したスプライシング、新しいサブトラクション法、雌しへの乳頭細胞の機能阻害と花粉の受容力、*N. glauca* の感受性の変換
 国際学会レポート..... 31
 第38回国際食肉科学技術会議に参加して

目 次

国内情報

一島英治

食品加工技術としてのバイオテクノロジー……………1

藤田孝輝

ラクトスクロースの生産技術……………4

若生勝雄

低カロリー糖質・エリスリトールの生産技術……………7

下田忠久・和泉次夫

バイオリアクターを利用した油脂の改質……………9

林 研司

スープ製造工程用味センサーシステムの開発……………14

谷口 肇

人工酵素(タンパク質工学)——人工酵素開発の現状……………17

地域の先端研究

林田安生

熊本県での加圧食品の研究開発と実用化……………21

文献情報

トウモロコシのトランスポザブル・エレメント *Activator* による

ペチュニア花色遺伝子のタギングとクローニング……………24

雌雄の決定に関与したスプライシングの制御機構……………25

新しいサブトラクション方法——RDA……………26

Brassica においては雌しべの乳頭細胞の機能を阻害すると花粉の受容力も失う……………27

virF遺伝子を発現する *N. glauca* はノパリン型 *A. tumefaciens* の宿主になる……………29

国際学会レポート

三津本 充

第38回国際食肉科学技術会議に参加して……………31

ラクトスクロースの生産技術 (本文 4 ページ)



反応タンク (リアクター, 30m³) の上部

反応タンク内部の様子

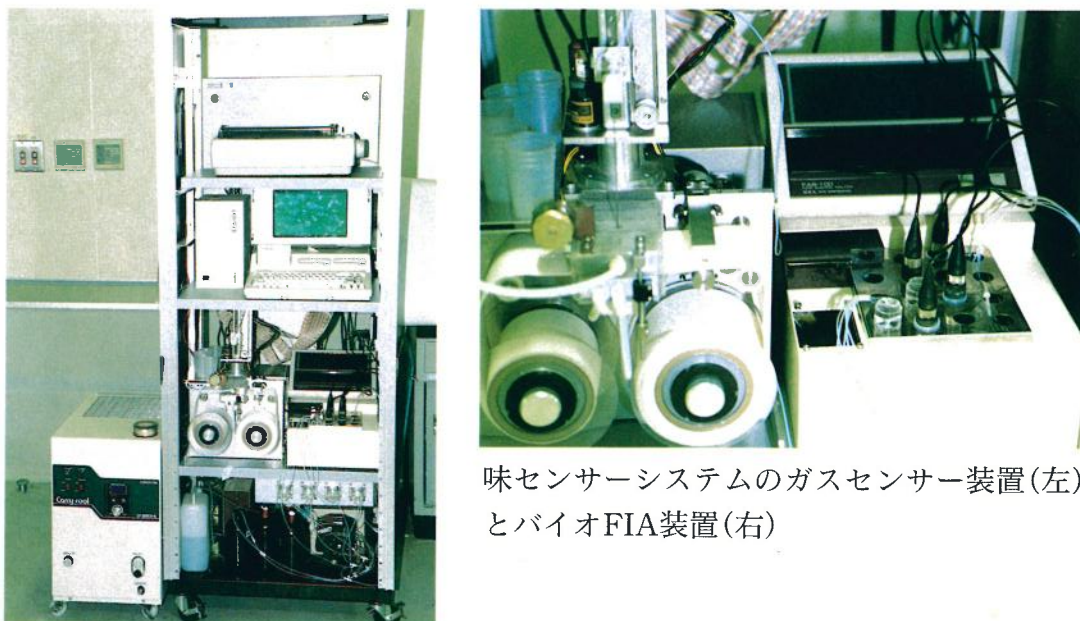
バイオリアクターを利用した油脂の改質 (本文 9 ページ)



三日月とバラ

(アイスクリーム上にチョコレートのをせた)
チョコレートは整形が難しいものであるが、
油脂をエステル交換法で改質することによっ
て細工が可能なチョコレートができるよう
になった。

スープ製造工程用味センサーシステムの開発 (本文 14 ページ)



味センサーシステムのガスセンサー装置(左)
とバイオFIA装置(右)

スープ製造工程用味センサーシステム

食品加工技術としてのバイオテクノロジー

東北大学農学部

一島英治

1. バイオテクノロジー

バイオテクノロジーを定義づけると、「微生物や、動物あるいは植物の培養細胞を材料とし、生化学、微生物学、化学工学などの科学ならびに技術の助けをかりて、生物のつくりだすものを工業生産に結びつける技術」といえる。これはまさに、生体利用技術の工業化にほかならない。広義にはバイオテクノロジーは、この外に生体模倣の技術（バイオミメティクス）も包含している。

食品加工のためのフード・バイオテクノロジーとしては前者が対象のバイオテクノロジーといえる。

食品加工の原点は、人類の祖先が今から5～6,000年も前に穀物を粉にひいたことにあるといわれている。さらに偶然に発見されたことだが、ひいた粉に水を混ぜこねてたものにパン種である野生の酵母がとび込んで「発酵パン」造りのテクノロジーをもたらした。

この発酵パン造りの技術は極めて古典的なものなのだが、今日いまだに継続して利用されているものである。

発酵パン製造の技術の開発と同じくらい古い時代から酒造りの技術が開発された。ブドウの果汁に含まれるグルコース(ブドウ糖)を原料としワインを造る技術、そしてオオムギなどを水に浸漬して麦芽とし貯蔵デンプンを糖化しビールを造る技術である。古くは、麦芽パンを水に仕込んでビールを造った記録が古代のエジプト王朝の壁画に残されている。

ビールは「液体のパン」と呼ばれた。また、乳からのチーズ造りもパンや酒と同じように古い歴史をもつバイオテクノロジーである。

古代にはじまったバイオテクノロジーは、19世紀後半からの近代微生物学の誕生を経て、20世紀後半の分子生物学の隆盛期を迎え、そして今日のニュー・バイオテクノロジーを開花させたのである。ニュー・バイオテクノロジーでは異種生物の遺伝子を細胞からとり出し、それを別の生物に組込んで遺伝子を発現したり、遺伝子産物を生産したりすることが可能となった。ニュー・バイオテクノロジーは物質生産技術の思想を革命的に変革したのとなっている。

ここでは、フード・バイオテクノロジーにとって重要なバイオリクター、細胞融合、遺伝子操作の3方向に焦点をあて食品加工の製造技術を展望した。

2. バイオリクター

食品は基本的には生物からなる。したがって、食品加工技術は食品素材である生物を加工し食品とするためのテクノロジーである。加工法は物理的な方法と化学的な方法があるが、いずれも食品の素材から食品へ変換するためのものである。食品素材から食品への変換の過程でバイオリクターを用いる。バイオリクターは直訳すれば生物反応容器である。しかし、バイオリクターは単なる容器ではなく、物質変換のための化学反応を触媒する物質を内蔵している反応容器である。食品加工の操作においては、生物素材を対象とするために、化学工業に比べると温和な条件

で行う必要がある。そして、ここに含まれる物質変換の化学反応を行うものこそ、生体触媒といわれる酵素や、酵素を持っている微生物で、これらの触媒能をもつものを予め不溶性の物質（担体という）に結合させたり、その中に包み込んだりしてバイオリクター内につめてバイオリクターを構築する。あるいは、酵素や微生物は遊離の状態バイオリクター内に入れるときには、バイオリクターの入口と出口に酵素や微生物がもれないように膜を張るメンブラン・リアクターの型で物質変換の反応を行うタイプのバイオリクターもある。

バイオリクターを用いて工業生産が行なわれているものに、グルコースの異性化によるフルクトース（果糖）生産のバイオリクターがある。このバイオリクターではキシロース イソメラーゼ（通称グルコース イソメラーゼ）という酵素を不溶性の担体に固定化したものを触媒として用いる。

装置としては、食品製造であるので充填層型の塔型の反応装置を用い、3塔ほどの複数のリアクターを直列につないで、原料である糖液を上から下へ通す下降式充填層型リアクターを用いることが多い。

デンプンをグルコースに糖化し、次いでフルクトースに異性化して異性化糖を製造する工業生産量は蔗糖の約1/2程度の規模となり、蔗糖産業をおびやかすほどになった。この技術は産業構造を変換する因子ともなっている。

その他にもバイオリクターにより製造している食品は多いが、有用な腸内細菌ビフィズス菌 (*Bifidobacterium*) の生育因子となるフルクトオリゴ糖が健康食品として市販されている。

3. 細胞融合（セル フェュージョン）

植物の特色として、どの器官から得た細胞であっても分化させると、元の植物を形成する「植物の全能性」という現象を示す。植物の組織に細胞間の接着作用をしているペクチンを分解するペクチナーゼを作用させると、植物細胞はばらばらとなり、いわゆる裸の細

胞である「プロトプラスト」ができる。プロトプラストを適当な培地に移すと分化した元の植物にもどすことができる。

異なった2種の植物からのプロトプラストを調製し、2種のプロトプラストをマンニトール—塩化カルシウムが存在するポリエチレングリコール (PEG) などの溶液に入れると、2種のプロトプラスト間で細胞融合（セルフェュージョン）を起こし、新規の形質を備えた細胞となる。この融合細胞を分化させると新規植物を作ることができる。細胞融合はPEGのかわりに電気融合法によっても細胞融合を行うことができる。

「オレタチ」はオレンジとカラタチからの体細胞雑種の融合植物で、耐寒性のカラタチの性質を利用し、南国の柑橘類であるオレンジを寒い国で作らせようとの意図のもとに作製された。

イネからのプロトプラストの作製ならびにプロトプラストからの植物体の再生も可能となり、イネの新品種の育種の大きな潮流となっている。

細胞融合は食品加工の新規の素材生物をつくるのに適している。

4. 遺伝子組換え技術

遺伝子組換え技術の基本となる分子生物学的な知見を次に掲げる。

- 1) Watson と Click により明らかにされた DNA は相補的な2本の鎖からなる (1953)。
- 2) 染色体外因子であるプラスミドやファージ (ウイルス) DNA の存在。これらは染色体 DNA とは独立に細胞質に存在しているため、外来遺伝子をこれらの小 DNA に接続し宿主細胞に挿入することがクローニングである。
- 3) 制限酵素群の発見 (1970～)、これらは DNA 上の特定の塩基配列を認識し、ホスホジエステル結合を加水分解する酵素である。
- 4) DNA リガーゼによる DNA の連結反応。1982年には、アメリカ、イギリスで組換え

DNAによるヒト型インスリンの実用化が認可された。糖尿病患者に対する福音となっている。

遺伝子組換え技術は、食品加工のなかでも微生物を加工技術として利用する醸造産業においては、多くの微生物の形質の改良を可能にした。例えば、酵母菌は野生型のもはデンプンを直接糖化できないのだが、遺伝子組換え技術により麴菌のグルコアミラーゼ遺伝子を導入した組換え酵母は、デンプンを原料とし直接アルコール発酵が可能となった。

組換えDNA技術は、異種生物の遺伝子を他の生物のDNAに連絡させて発現させ、異種生物の遺伝子産物を得るという革命的な生物生産技術を確立した。このテクノロジーこそ、「狭義のバイオテクノロジー」と言われているものである。

チーズは乳タンパク質を加工し保存食としたものである。世界のバイオ産業の約3分の1を占める。チーズ製造の重要な工程は乳を凝固させる工程である。乳中に自然発生的に含まれる乳酸菌の生産する乳酸を利用する乳の凝固法は「酸による凝固法」で、最も古いタイプのチーズ製造法である。これに対して、仔ウシの第4胃に存在する凝乳酵素キモシン（レンニン）により乳中のカッパ-カゼインを限定的に分解し、それによりひき起こされる乳中のコロイドの不安定化によって乳を凝固させる「酵素による凝固法」がある。酵素法は仔ウシのキモシンの代りに微生物の凝乳酵素も利用されている。ムコール プシルス、ムコール ミイハイ、エンドチア パラシチカ、イルベックス ラクテウスなどの真菌類の酵素がチーズ工業の約6割に利用されている。仔ウシのキモシンを用いたチーズの要望が強く、遺伝子操作により仔ウシ、キモシン遺伝子の遺伝子産物が、大腸菌あるいは酵母により製造が可能となった。

大腸菌による仔ウシキモシンの凝乳酵素生産では、キモシンの前駆体であるプロキモシン遺伝子を大腸菌に組込み遺伝子産物を大腸菌の菌体内に封入体（インクルージョンボディ-）として生産させ、菌体を破碎して

封入体を分離後、これを可溶化する際にpH10~11の強アルカリ性の条件下の8M尿素存在下で可溶化したのち、酸性処理することにより自触的に活性型の酵素キモシンに転換することができる。

酵母は食品製造における安全性が保証されている微生物である。異種生物のタンパク質生産において、酵母を宿主とする遺伝子操作による酵素タンパク質の生産では、酵母のプロモーター及び分泌シグナルの制御下にプロキモシンを発現させると、高分泌変異株では培養液1ℓ当り20mgもの分泌量が認められている。

食品加工における遺伝子組換えタンパク質利用の成功は、チーズ産業であったからこそ大成功を収めたとも言える。それは、チーズ製造工程のうち乳の凝固工程という鍵反応を支配する酵素が唯一の酵素キモシンによって触媒されるからで、その酵素を異種の微生物により工業的に生産することが可能になったからである。

遺伝子操作の応用は、遺伝子産物の生産という面からだけではない。厚生省がまとめた1993年6月の全国調査では、三歳児の8%が「アトピー皮膚炎」で、過去に診断された子を加えると約3割に達している。「奇妙な」というギリシャ語からつけられた「アトピー」皮膚炎の多くにアレルギーが関与している。幼児のアレルギーには食品中のアレルゲンタンパク質が関わる。牛乳中の β -ラクトアルブミンや α S-カゼイン、卵のタンパク質（卵白のオボアルブミン、オボムコイド、コンアルブミン）、米では16Sタンパク質などがアレルゲンタンパク質である。これらのアレルゲンタンパク質をタンパク分解酵素で予め分解しアレルゲン活性を破壊して加工食品を作ることは現在すでに実施されている。将来においては、これらのアレルゲンタンパク質の遺伝子を遺伝子破壊により操作した食品素材の生産も可能となるであろう。そうすれば、食品アレルギーに悩む人々にとって大きな福音となる新規の食品加工への途がひらかれることになる。

国内情報

ラクトスクロースの生産技術

塩水港精糖(株)糖質研究所
藤田孝輝

1. はじめに

糖質は従来、エネルギー源（1次機能）および甘味料（2次機能）として用いられてきた。特にしょ糖は味質および物性の両面において、他の糖質に比べて非常に優れているため家庭でも、食品工業の分野においても多用されてきた。しかし、最近になり糖質の過剰摂取からくる肥満の問題や虫歯の原因物質としてその功罪が問われるようになった。また現在の食生活にみられる動物性タンパク質、脂肪の過剰摂取は、動脈硬化、高血圧、痛風、大腸がんなど現代病の増加の原因となっている。このような状況のもと低カロリーで虫歯になりにくい糖質が求められるようになってきた。さらに、健康への強い志向からこれまでの機能に加えて健康の維持や回復に寄与する生体調節機能ともいえる第3の機能を有するものが機能性糖質として話題になってきた。カップリングシュガー®、パラチノース、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖などは虫歯になりにくい甘味料や腸内の有用菌であるビフィズス菌を増殖する糖質としてすでに工業的規模で生産されている。これらはいずれもしょ糖や澱粉やラクトースを原料とし、微生物起源の糖転移酵素や加水分解酵素の糖転移作用によって合成されたオリゴ糖である。

我々はしょ糖の有効利用を念頭におき、しょ糖に劣らない味質を持つ新たな機能性糖質の開発を行ない、工業化に成功した。

2. 新規フラクトース転移酵素生産菌の検索と酵素の性質^{5,6)}

微生物の検索はしょ糖を唯一の炭素源とする培地を用い、そこに生育する微生物を拾った。さらにキシロースへの転移活性を有し、耐熱性が高い酵素生産菌を数株単離した。こ

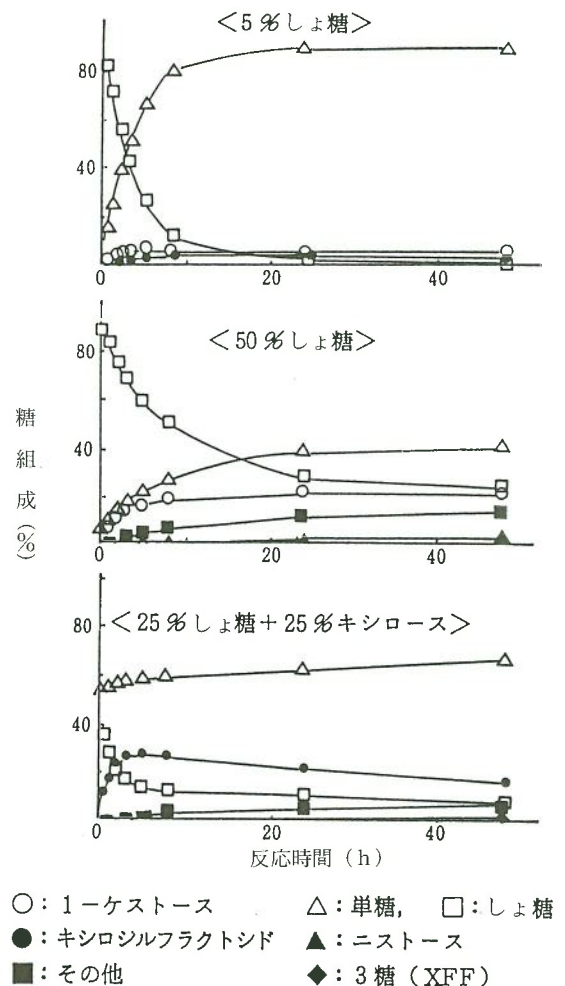


図1 *Arthrobacter* sp. K-1株のβ-フラクトフラノシダーゼの示す転移反応

FUJITA Koki

表1 *Arthrobacter* sp. K-1株の β -フラクトフラノシダーゼの諸性質

等電点	pI 4.3
分子量	
ゲル濾過	51,000
SDS-PAGE	52,000
至適pH (40°C, 10分間処理)	6.5~6.8
pH安定性 (40°C, 2時間処理)	5.5~10.0
至適温度 (pH6.5, 10分間処理)	55°C
温度安定性 (pH6.5, 30分間処理)	45°C (100%) 60°C (70%)
阻害剤	水銀, 銀, 銅, 亜鉛, 錫, 鉛, SDS
基質特異性	
シヨ糖	100%
エルロース	75
ラフィノース	60
キシロスクロース	59
ネオケストース	54
ラクトスクロース	39
スタキオース	11
1-ケストース	+
ニストース	+
レバンビオース	+
パラチノース	-
イヌロビオース	-
マルトース	-

のうち酵素生産性の最も高い菌株は *Arthrobacter* 属に属することがわかり, *Arthrobacter* sp. K-1 株と命名した。この菌株の生産する β -フラクトフラノシダーゼはしよ糖, エルロース, ラフィノース, キシロシルフラクトシドなどフラクトース以外の糖残基に β -2,1 結合でフラクトースが結合した糖質には高い特異性を示すが, フラクトース残基にさらにフラクトースが β -2,1 結合した1-ケストース, ニストースには作用しにくいことがわかった。本酵素の性質を表1に示した。

図1に示すように本酵素はしよ糖のみに作用させた場合, 5%濃度では主に加水分解反応を触媒し, 転移物の総量は5%にすぎない, 50%の高濃度でも転移物の総量は35%とあまり高くなかった。しかし, キシロースの存在下ではフラクトースはキシロースに優先的に転移しキシロシルフラクトシドを生成したが, しよ糖自身への転移物1-ケストースの生成はわずかであった。また受容体の存在によってしよ糖の分解活性も促進された。

この酵素は幅広い受容体特異性を示し, キ

シロースの他にガラクトース, ソルボース, アラビノース, フコース, マルトース, セロビオース, イソマルトース, キシロビオース, ラクトース, メリビオース等にフラクトシル基を転移した。本酵素はこのようにしよ糖自身には転移し難く, キシロースのような受容体分子の還元末端側の糖質のヘミアセタール水酸基に優先的にフラクトシル基を転移するため, フラクトースを含むヘテロオリゴ糖を合成するのに適した酵素である。

3. ラクトスクロース生産技術の確立^{7,8)}

ラクトスクロース (LS, 乳果オリゴ糖) はラクトースとしよ糖の部分構造を持つガラクトース, グルコース, フラクトースからなる3糖である。LSがビフィズス菌の選択的増殖活性を持つこと, ラクトースが比較的低価格で容易に入手できることからLSの工業的製造法を検討した。基本の反応条件はしよ糖とラクトースの比をほぼ1:1, 固形分濃度

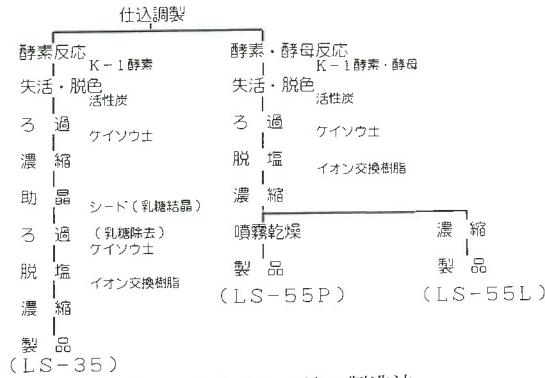


図2 乳果オリゴ糖の製造法

を40~50%, pHを6.0~6.5とし、55°Cで10数時間反応する。しかし、この時のLSの含量は30%であり、30%のラクトースが残存する。多量のラクトースは製品とした場合に結晶析出が問題となる。そのためラクトースの除去が必要であり、我々は精糖業で培った結晶化技術により、15%以下にラクトースを結晶化して除去することに成功した。その結果LSを35%含有するLS-35の製法が確立した。また反応系に副生するグルコースを特殊な酵母により資化させることにより除去し反応平衡をずらすことによって、LS含量を高めることに成功した。すなわち、しょ糖とラクトースの比をほぼ1:1、固形分濃度を40%に調整した基質に酵素および酵母を添加し、pHを6.5~7.0に調整しながら35°Cで30時間反応する。以下、図2に示す工程を経てLSを55%以上含む製品(LS-55LまたはP)が製造される。これらのLS-35、55は現在「乳果オリゴ糖®」として市販されている。

4. 乳果オリゴ糖の性質

LSの *in vitro* での消化試験の結果、胃酸

表2 乳果オリゴ糖LS-35の応用可能な分野

飲料	コーヒー・紅茶飲料・スポーツ飲料など
菓子	ケーキ・クッキー・スナック・各種和菓子など
デザート	各種アイスクリーム・プリン・ゼリーなど
キャンディ	ハードタイプ・ソフトタイプ・キャラメルなど
パン	各種パン類
乳製品	ヨーグルト・調製粉乳など
惣菜	煮豆・佃煮・小魚など
その他	飼料・ペットフードなど

によって1.5%, 小腸粘膜酵素によって5%のみが分解され難消化性の糖質であり、ヒトが経口摂取した場合でも血糖値およびインスリン濃度もほとんど変化はなく体内でも摂取したLSのほとんどが大腸に達し、ビフィズス菌の栄養源になるものと考えられる⁹⁾。実際にLS-98を1日あたり5g摂取した場合、摂取前に10.5%であったビフィズス菌の占有率は摂取7日で32.6%と3倍に増加し、摂取中止後7日では元の状態に戻っている¹⁰⁾。さらにLSを毎日1~2gと少量摂取でも、ビフィズス菌の増殖が確認された¹¹⁾。このように乳果オリゴ糖は、腸内に棲息する有用菌の代表であるビフィズス菌を選択的に増殖させ、著しく腸内菌相の改善を促進する。

LSの安全性に関しては国内外の公的機関において急性毒性・変異原性試験で安全であることが確認されている。またヒトにおいて0.6g/体重kgまでの摂取で下痢の発生は認められなかった¹²⁾。

LSの水分活性はLS-98で0.87, LS-35で0.83でしょ糖の0.84とほとんど同じ値を示している。また溶解度はLS-98で367g/100ml以上でしょ糖より高い溶解度を示した。また甘味度はしょ糖を100とするとLS-98で30, LS-55で50, LS-35で70となった。しょ糖より幾分高い粘度を示すが、水分活性、浸透圧、熱安定性ともしょ糖と同程度であり、しょ糖に類似したすばらしい利用特性を持っている。

5. 乳果オリゴ糖の用途

このLSは卓越したビフィズス菌増殖効果を有するばかりではなく、味質(味の品位)が非常にしょ糖に似ているため、高い評価を得ている。表2に示すように飲料、菓子、デザート、キャンディなど、広い分野に食品素材として用いられている。

文 献

1) Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H. and Kitahata, S. (1990) *Agric. Biol. Chem.*,

- 54: 913
- 2) Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H. and Kitahata, S. (1990) *Agric. Biol. Chem.*, 54: 2655
- 3) 藤田孝輝・大沢武司・三国克彦・原 耕三・橋本 仁・北畑寿美雄 (1991) 澱粉科学, 38: 1
- 4) 山中華代・藤田孝輝・荒川勝隆・青山葉子・三国克彦・桑原宣洋・安藤正康・嶋田昇三 (1993) 平成5年度日本農芸化学会講演要旨集, p. 282
- 5) 藤田孝輝・原 耕三・堺 修造・三宅俊雄・山下昌之・恒富保彦・光岡知足 (1991) 澱粉科学, 38: 249
- 6) 米山 勝・万代隆彦・阿賀 創・藤井和子・堺 修造・片山洋子 (1992) 栄食誌, 46: 101
- 7) 緒方幸代・藤田孝輝・石神 博・原 耕三・寺田 厚・原 宏佳・藤森 勲・光岡知足 (1993) 栄食誌, 46: 317
- 8) 三国克彦・藤田孝輝・榎原恵美子・桑原宣洋・尾形正裕 (1993) 澱粉科学, 40: 15

国内情報

低カロリー糖質・エリスリトールの生産技術

日研化学(株)大宮研究所
若生勝雄

1. はじめに

炭素数4コからなる糖アルコール, meso-Erythritol は, 大量生産技術がなかったためにあまり知られていなかったが, 食用キノコ¹⁾や果実²⁾, またはワイン, 清酒, 醤油等²⁾に含まれており, 長い間知らずに食べてきた糖質と言える。

エリスリトールの生産に関する研究は, 醗酵法, 化学合成法ともに1960年代に盛んに行われたが, 工業規模で生産されたことはなかった。その理由として, 生産効率が低かったこと, 当時の社会的ニーズが現在と比べてそれほど高くなかったことが推測される。

筆者らは過去の例を考慮し, 農林水産省食品総合研究所と実用化を目指した共同研究を行い, 生産菌の改良を含めた醗酵法の基礎技術を確認した(醗酵の概要を図1に示す)。また, 工業化技術については三菱化成㈱と共同研究を実施し, 効率的な生産が可能になった。

Aureobasidium sp.

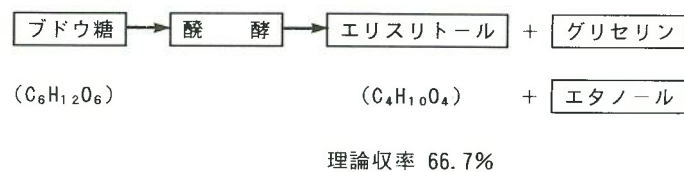


図1 エリスリトール醗酵の概要

2. エリスリトール生産菌の検索および改良

生産菌のスクリーニングは, 原料の高濃度仕込みを想定し, ブドウ糖50%の培地で行った³⁾。この条件下では一般の細菌類は生育せず, 耐糖性の優れた酵母が効率良く単離されたが, 検出されたエリスリトール生産菌は, 分離酵母およそ1,000株中わずか4株であった。別に行った樹液酵母の場合も検出率は1%以下と低く, 総じて糖濃度の高い環境から僅かな確率で検出されることがわかった。

生産性の最も高い分離株, *Aureobasidium* sp.⁴⁾ はブドウ糖40%の培地で45~50%のエリスリトール収率を示したが, 発泡性が強く,

気泡表面に吸着した菌体が流出する現象が見られた。そこで分離株に紫外線照射, γ 線照射およびニトロソグアニジン処理等を繰り返して行い, 変異株 SN-G42 株⁵⁾ を取得することができた。改良株は非発泡性であると同時に, ブドウ糖濃度80%以上の培地でもエリスリトールを生成する, 極めて高い耐糖性を示した。また, この株は安定性に優れ, 親戻りの現象は特殊な場合を除いて見られなかった(表紙)。

3. 大量生産技術

上記改良株による醸酵工程では, 収率, 生成速度等の生産性の改善が重要であったが, 精製負担の軽減についても配慮が必要であった。そこでブドウ糖, コーンステープリカーのみの培地から, 各種窒素源, 塩類, ビタミン等を含む複合培地へ改良を行った。この過程で, 生育環境の悪化はグリセリン蓄積量を増大させること, 増殖を促進または抑制する成分, エリスリトール生成に関与する成分等がおおよそ明らかにされた。改良の結果, 副生するグリセリン, エタノールを殆ど含まない醸酵液を得ることが可能になり, また, 着色物質, 塩類等の濃度を減少させることができた。

通気, 攪拌条件については, 培養終了時の菌濃度が乾燥量で約 40g/l になる条件であることが必要であった。この濃度以下ではアルコール醸酵に傾き, またこの濃度を越える条件(過剰通気)ではグリセリン, 菌体が増加し, 共にエリスリトール収率は低下した。

精製工程においては, 原料由来のオリゴ糖, 着色物質, 塩類等をいかに効率良く除去するかが重要な課題であった。従来のイオン交換樹脂, 活性炭および晶析法を組み合わせる方

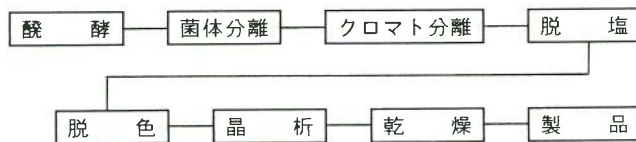


図2 エリスリトール製造プロセス

法では効率が悪く, コストアップの要因になることが明らかであった。そこで異性化糖の分離技術として実績のあるクロマト分離法による精製を試みた。その結果, エリスリトールの回収率をほぼ 100% に維持しながら, オリゴ糖, 着色物質等の不純物を95%以上除去することが可能になった。これによってクロマト分離以降の精製装置の小型化が実現した。エリスリトール製造プロセスの概要を図2に示した。

4. エリスリトールの生理的特性

エリスリトールは摂取量の90%以上が未変化のまま排泄されるため, そのエネルギー値は一般の消化性糖質の1/10 (0.4kcal/g) 以下である。奥ら⁶⁾ はラットにおける体内動態について詳細な検討を行っているが, それによるとエリスリトールの大部分は小腸から吸収された後, 90%以上が尿中に排泄され, 大腸で醸酵される量は10%以下である(図3)。

エリスリトールは虫歯の原因にならない非う蝕原性を示し⁷⁾, また緩下(下痢)作用は他の糖アルコールより弱く⁸⁾, 腸内細菌により醸酵されにくいことからガスの発生も少ない。

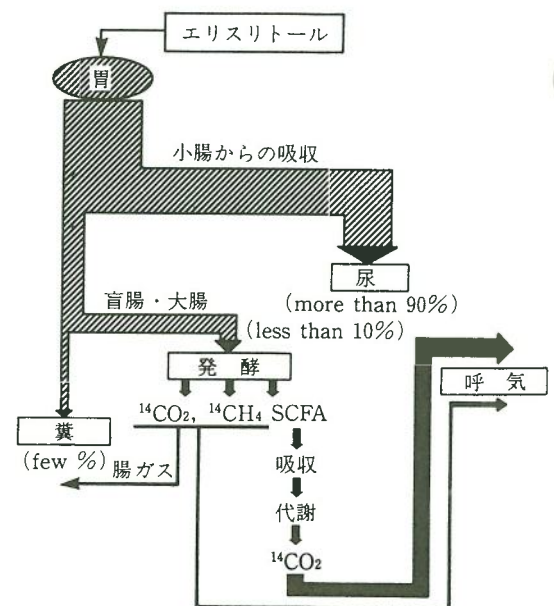


図3 エリスリトールの体内動態

5. エリスリトールの物性および用途

エリスリトールは良好な味質を有し、その甘味度は砂糖の70~80%であるが、後味が急激になくなるため、あっさりした甘味を与える。この性質は高甘味度甘味料の後味の改善に適している。

エリスリトールは結晶化が極めて容易であり(表紙)、その結晶が吸湿しにくいことから、水分を嫌う食品へ応用される。また、結晶の溶解熱が大きいことから(-180J/g)、吸熱作用を利用した冷涼感のある菓子類が作られている。

具体的な用途としては、高甘味度甘味料との併用による卓上甘味料やダイエット飲料、冷涼感または非う蝕性を活かした菓子類、あるいはpH安定化等を目的とした乳製品等に使用されている。

6. おわりに

30年ほど前に工業化されなかったエリスリトールが、その後の新たな技術の活用によっ

て実用化されたことは意義深いことである。しかし、生産にかかわる微生物のミクロな面については未知の部分が多く残されている。近い将来、こうした点が明らかにされ、より効率的な生産方式が開発されることを期待したい。

文 献

- 1) 吉田博・菅原龍幸・林淳二(1984)日本食品工業学会誌, 31: 765-771
- 2) 新藤辰二・佐々木義幸・三木哲道・萩原清和・市川富夫(1983)農化, 62: 623
- 3) 若生勝雄・川口嶽・久保直哉・春見隆文・林 清・飯野和久(1988)醸酵工学, 66: 209-215
- 4) 若生勝雄・石塚博明・川口嶽・久保直哉・春見隆文・林 清(1988)醸酵工学, 66: 217-223
- 5) Ishizuka, H. et al. (1989) *J. Ferment. Bioengi.* 68: 310-314
- 6) Oku, T. (1990) *Japan Clin. Nutr.* 11: 17-23
- 7) 川名部淳・池田正(1990)日大口腔科学, 16: 27
- 8) 丹羽弘司・引地登・桜井栄一・植田公孝・福勢元(1981)薬学雑誌, 101: 567

国内情報

バイオリクターを利用した油脂の改質

不二製油(株)食品研究所
下田忠久・和泉次夫

1. はじめに

最近では少なくなったが、夏のチョコレートは柔らか過ぎ、冬では固すぎる、あるいは白く斑点のあるチョコレートを経験された方は多いと思う。これは、チョコレートの原料である油脂に原因がある。チョコレートの油脂

SHIMODA Tadahisa
IZUMI Tsugio

は1, 3位に飽和脂肪酸, 2位に不飽和脂肪酸が結合したトリグリセライドが主成分である。脂肪酸の鎖長, 飽和度の違いにより油脂は柔らかくなったり, 硬くなったりする。また一方, チョコレートの原料であるカカオ脂は天然品で季節変動の影響を受けやすく, 一定の品質で, 一定の数量を得ることは難しかった。ここに, 品質が良く, 季節に変動されない油脂を作りたいという要望があった。

酵素は有史以来, 認識の有無は別にして人

類,特に日本においては微生物の酵素を利用して,酒,味噌,醤油等を作ってきた。近年,酵素を単離,精製して積極的にその特性を利用しようとする試みが酵素化学,タンパク質化学,遺伝子工学の発展と共に拡大している。

油脂工業においても1983年 Macrae がリパーゼを用いた油脂のエステル交換法を発表して以来世界各国で研究が進んだ。この小文では酵素を利用して油脂を改質する方法及び改質した例を紹介する。

なお本文中の略号は次のようである。

略号

- OOO: 1,2,3-triolein
- SSS: 1,2,3-tristearin
- SOS: 2-oleoyl-1,3-distearin
- POP: 2-oleoyl-1,3-dipalmitin
- BOB: 2-oleoyl-1,3-dibehenin
- SSO: 3-oleoyl-1,2-distearin
- PPO: 3-oleoyl-1,2-dipalmitin
- BBO: 3-oleoyl-1,2-dibehenin

2. エステル交換反応

図1に示したように,エステル交換反応とはトリグリセライド中の脂肪酸を他の油脂の脂肪酸または遊離の脂肪酸(又は脂肪酸エステル)と交換する反応である。無機触媒又は特異性の無いリパーゼを用いた時は組み合わせた反応物の均一化に最終的にはなる(図1-1)。1,3位特異リパーゼを用いると1位と3位のみに交換が起こり意図した油脂が得ら

れる。チョコレート油脂は先に述べたように,1,3位に飽和酸,2位に不飽和酸を持っている。そこで,図1-2に示した反応に従ってトリオレイン(OOO)にステアリン酸エチルエステル(S-Et)を混合しそれに固定化1,3位特異リパーゼを作用させると,SOSになる。SOS脂のみのチョコレートは硬いが軟らかいパーム油中のPOP脂と適当に配合することにより天然のチョコレート油脂と同等かあるいはそれ以上の物性を持つ油脂が得られる。

OOO油脂はオリーブ油が有名であるが,最近育種によりオレイン酸含量を高め,リノール酸,リノレイン酸含量を低くめたハイオレイックスフラワー油またハイオレイックヒマワリ油で得られるようになった。

次に,導入する脂肪酸であるが,遊離の酸が良いかエステルの形が良いかはその脂肪酸により変わる。長鎖飽和酸ではエステルの方が融点が低くなり使用し易い。

次に最も重要な反応を触媒する酸素リパーゼの選択であるが,リパーゼは生物界に広く分布し位置特異性,最適pH,最適温度,脂肪酸特異性がそれぞれ異なっている。安全性,位置特異性,安定性が高いこと,安定に供給出来ること,そこそこの熱安定性があること,廉価であることを考慮する必要がある。リパーゼの起源として *Rhizomucor* 属, *Rhizopus* 属, *Candida* 属, *Aspergillus* 属等のカビや *Pseudomonas* 属のような細菌,動物の膀胱などが使用されている。*Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus japonicus* 等のリパーゼは位置特異性が高く, *Pseudomonas cylindranea* のリパーゼは耐熱性がある。酵素は一般に菌体より分離精製されて使用されるが,培養時に菌体の保持体を添加しそのまま固定化も兼ねて菌体リパーゼを使用する方法も提案されている。

油脂に酵素を使用する場合,酵素が油脂に溶け難く拡散効率が悪く,その結果として反応性が落ちる。そこで,酵素を固定化して使用される。固定化により反応性の向上の外,繰り返し使用可能,安定性の向上,それらに

方法	原料	生成物
1-1 化学法 または 非特異性 リパーゼ法	$\begin{matrix} \text{E} & \text{A} & \text{C} \\ \text{B} & + & \text{B} \\ \text{A} & & \text{C} \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{E} & \text{A} & \text{A} & \text{E} & \text{A} & \text{A} & \text{E} & \text{A} & \text{A} & \text{E} & \text{A} & \text{A} \\ \text{A} & + & \text{A} & \text{B} & + & \text{A} & \text{C} & + & \text{A} & \text{C} & + & \text{A} \\ \text{B} & + & \text{B} & \text{B} & + & \text{B} & \text{B} & + & \text{B} & \text{B} & + & \text{B} \\ \text{A} & + & \text{B} & \text{A} & + & \text{A} & \text{C} & + & \text{C} & \text{C} & + & \text{C} \\ \text{C} & + & \text{C} & \text{C} & + & \text{C} & \text{C} & + & \text{C} & \text{C} & + & \text{C} \\ \text{C} & & \text{A} & \text{C} & + & \text{B} & \text{C} & + & \text{E} & \text{B} & + & \text{E} \end{matrix}$
1-2 1,3位特異 リパーゼ法	$\begin{matrix} \text{E} & \text{A} & \text{C} \\ \text{B} & + & \text{B} \\ \text{A} & & \text{C} \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{E} & \text{A} & \text{C} \\ \text{B} & & \text{C} \\ \text{A} & & \text{C} \end{matrix} + \begin{matrix} \text{E} & \text{A} & \text{C} \\ \text{B} & & \text{C} \\ \text{C} & & \text{C} \end{matrix}$

E : グリセロール基 A, B, C ; 脂肪酸基

図1 2種のトリグリセライド間のエステル交換反応により生ずる生成物

表1 乾燥条件の違いによる固定化酵素の加水分解活性とエステル交換活性

固定化法	加水分解活性 (U/g)	エステル交換活性 (day ⁻¹)
無処理	4 5 0 0	0
凍結乾燥	1 2 5 0	3. 0
減圧乾燥 (6 トール、室温)	1 2 4 0	3. 2
減圧乾燥 (15 トール、室温)	1 1 5 0	2 8. 5

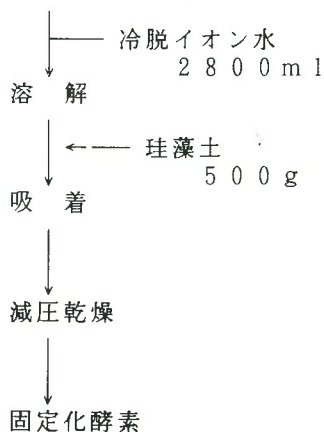
よるコストメリットが計られる。

担体としてはイオン交換樹脂、珪藻土、多孔性ガラス、疎水性樹脂、菌体、合成樹脂アルミナ等が使用されている。固定化は物理吸着、イオン吸着、疎水結合、共有結合、包接等によりなされている。それぞれ一長一短があり、各者各様に工夫を凝らしている。一般には吸着法は簡便で安全性が高くなるが、水が多くなると脱離の恐れがある。共有結合法は結合が強く安定であるが、結合させる際の酵素の失活、試薬の残留を考慮する必要がある。

図2と表1に珪藻土に吸着させ固定化する方法とその際の乾燥条件によりエステル交換活性が変化することを示す。

反応形式はバッチ反応、カラム反応が考え得る。バッチ反応は反応状態をコントロールするには適しているが、操作が煩雑になる。一方、カラム反応では連続で反応を行わせることができ、一旦カラムを組み立てると後は楽になる。この選択は製造する物の多寡によると思われる。

1、3位特異性リパーゼ (500g)



珪藻土へのリパーゼの固定

図2 珪藻土へのリパーゼの固定化例

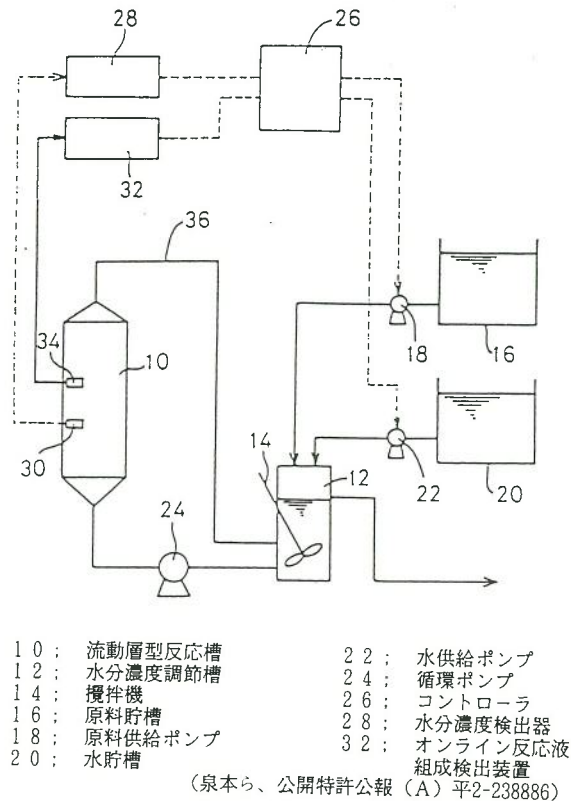


図3 酵素反応制御装置を備えた反応装置

鐘淵化学の特許によれば、反応槽の中に一定量の基質を流入し、水分を一定に保つようコントロールして反応させ、反応物を抜き出す方法を提示している (図3)。ユニリーバは最近、図4に示したような2段反応形式を提示した。この方法は1段目で生じた反応を阻害する反応生成物 (脂肪酸) を除去し、平衡をずらすことにより2段目の反応をより速く、収量良くすることに特徴がある。図5に充填塔型リアクターのフローを示す。

エステル交換反応はジグリセライドの多寡により反応速度が変動する。しかし、ジグリセライドは最終製品であるチョコレート品質に悪影響を与える。そのため、いかに水分を抑え反応させるかが重要な点になる。

また、酵素は通常のランダムエステル交換

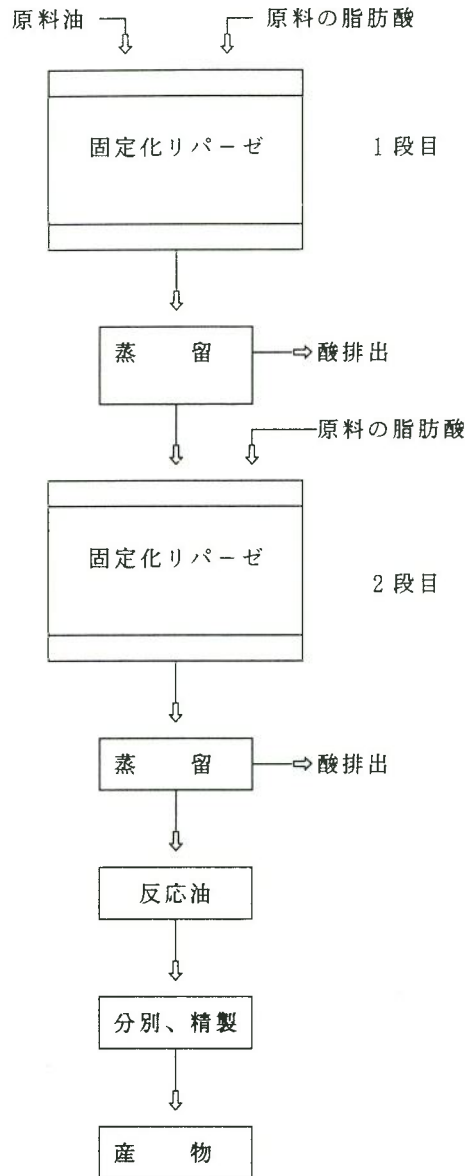


図4 2段反応によるエステル交換
[Inform 4: 583(1993)より]

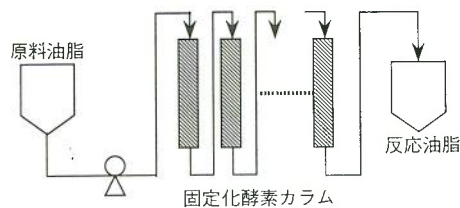


図5 充填塔型リアクター(乾燥系)フロー

に使用される無機触媒に比べ、反応速度が遅く価格が高いため、繰り返し使用することが必要である。そこで初期活性を高くし、使用中の酵素の失活をなるべく小さくする工夫がなされる。バッチ反応形式よりカラム反応形式の方が酵素の安定性は高い。

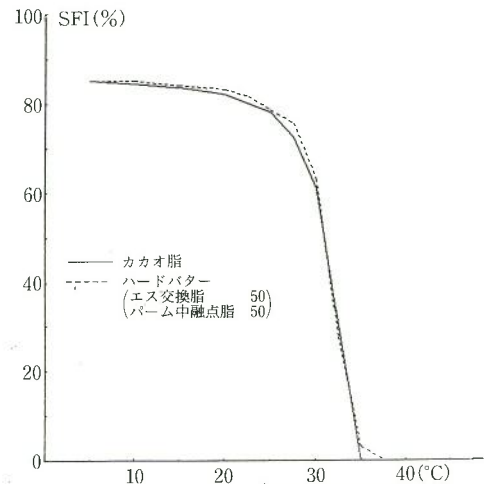


図6 ハードバターとカカオ脂の固体脂指数(Solid Fat Index)の比較

このようにして得られた反応油は通常の脱色、脱臭により精製される。精製油とパーム中融点部油脂とで作られたハードバターとカカオ脂のSFI(固体脂指数)を図6に示す。

このハードバターは口に溶け、耐熱保型性、スナップ性等チョコレート性状がカカオ脂と同等であり、優れたハードバターである。

3. その他の反応

安定結晶粉末油脂：対称トリアシルグリセリンには結晶多形(Polymorphism)現象がある。これは油脂をどのように固めたか、あるいはその後どのような温度に晒したかによっていろいろな結晶構造を取ることである。カカオ脂では6種類の結晶多形に分類されており、V型、VI型が安定な結晶であり、チョコレートではカカオ脂がV型である時が一番おいしいとされている。その結晶を作るためにテンパリングと言う操作を行う。この操作は結構煩雑なのでより簡単な方法が蜂屋らによって詳しく検討され、粉末油脂結晶の効果と機能が明らかにされた。すなわち、SOSやBOB(B:ベヘン酸)の安定結晶粉末を少量チョコレート生地に添加混合することにより、テンパリング工程が大幅に簡略化できる。おもしろいことに、SSS, SSO, BBOではそのような作用は見いだされていない。またPOPになると多量に入れないとだめである。

表2 金属エステル交換と酵素エステル交換による可塑性油脂の相違点

		金属エステル交換	酵素エステル交換
反 応	触媒 反応方式 反応後処理 収率	ナトリウムメチラート等 バッチ式 リン酸洗浄及び水洗 約97%	1、3位特異リパーゼ 連続カラム方式 不要 ほぼ100%
製 品 質	脱色性 口溶け しみ出し耐性 結晶性	悪い やや悪い やや悪い 経時的しまり現象	良好 良好 良好 経時変化無し

このBOBもハイオレイック油脂とベヘン酸とを1、3位特異リパーゼを用いて反応させて得ることができる。

可塑性に優れた油脂：マーガリン、ショートニングのような可塑性、展延性が要求される製品の油脂は通常、高融点脂、中融点脂、液体油の組み合わせで構成されている。パーム油とラウリン系油脂を金属エステル交換して得る方法もあるが、この方法では3飽和トリアシルグリセリンが増大して口溶けが悪くなり、反応中に酸価の上昇、着色等が見られる。そこで、パーム系油脂とラウリン系油脂の1、3位特異リパーゼによるエステル交換反応を行った。その結果を表2に示す。

表より明らかなように口溶け、脱色性、しみ出し耐性、結晶性等優れたものが得られた。

栄養面からの油脂：油脂の栄養についてはトリグリセライドの脂肪酸組成のみならず位置まで判った油脂が純粹に得られるようになったので研究が進んでいる。そこで、多価不飽和脂肪酸を多く含む油脂や低級脂肪酸を多くした油脂、低級脂肪酸と高級脂肪酸を組み合わせ肥らない油脂、あるいは2位の位置にパルミチン酸を含んだものに1位と3位に消化吸収の良い不飽和酸を入れ栄養価の高い油脂を作ることが試みられている。

その他：食品の機能性の向上のために、不飽和脂肪酸と低級脂肪酸を組み合わせマイナス温度になっても凍結しない油脂、あるいは温度変化の激しい条件下でもチョコレートが

白くならない油脂等が開発されている。

4. 今後の課題

以上述べて来たように天然の油脂が持つ欠点を酵素により改質し、より良いものができることが徐々に判ってきた。今後は人の健康と安全を考えたいうえで、より美味しい食品の開発に結び付く油脂の開発に向かうであろう。また、食品に限らず広く、医療、化粧品用途を初めとして油脂は使用されている。その分野にも発展して行くものと期待されてる。

文 献

- 1) Macrae, A.R. (1983) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 291-294
- 2) 橋本征雄 (1988) 油脂 41: 62-66
- 3) 沢村紀夫 (1989) 月刊フードケミカル 1989-7: 49-53
- 4) Malcata, F.X. et al (1990) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 7: 890-910
- 5) 泉本英次・京谷 晋・福田秀樹・中西英二 (1990) 公開特許公報 (A) 平2-238886
- 6) Hashimoto Y., (1991) *Indust. Appli. of Immobili. Biocatal.* ed. by Tanaka, A. et al, Published by Marcel Dekker, Inc., 337-351
- 7) 西元次雄・和泉次夫・久保田隼人 (1992) 油化学 41: 960-968
- 8) Quinlan P., (1993) *Inform* 4: 580-585

国内情報

スープ製造工程用味センサーシステムの開発

(株)ニチレイ味覚評価室
林 研司

1. 研究の背景と目的

食品の製造工程においては品質の安定化は、極めて重要な課題である。特に調理食品の分野では、従来官能的な手法によってしか検査を行なうことができなかつた。そのため、熟練した味覚のスペシャリストの確保が不可欠であった。生産性及び専門家の不足という点からもこれに代わる品質評価のシステム開発の必要に迫られている。

2. 呈味及び香りセンサーについて

(1) 食品の味に係わる五感とセンサーによる模倣

広い意味での食品の味覚は五感にかかわる視覚、触覚、嗅覚、聴覚、味覚(狭義)があるとされている¹⁾。対象となる食品の種類によりそれぞれの感覚の影響の度合は異なると思われる。従来の研究では、単一の感覚器官の働きをセンサーで模倣することを当面の目標にしている場合が多いように思われる²⁻⁶⁾。単一の感覚器官の働きをセンサーで模倣すること自体かなり難しい課題であり、複数の感覚に与える影響をセンサーでシミュレーションしようとするについては、今のところ研究の実施例は少ない。

しかしながら実際の食品を対象とする場合、呈味成分単独、あるいは香気成分単独の影響をセンサーで評価して品質を判断するのでは、判断を誤る恐れが大きい。やはり複数の感覚

による評価にできるだけ近い形でモニターできるセンサーシステムが必要である。

本研究では、このようなアプローチの手初めとして狭義の味覚に係わる呈味成分の影響と嗅覚に係わる香気成分の測定をセンサーで行い、それらの値と人間の官能評価値の間の相関性を検討するという方法を試みた。

センサーとしては、従来から多くの研究が行われている酵素センサーと酸化物半導体型のガスセンサーを用い、これに従来からスープ等の評価の指標の測定に経験的に用いられてきた糖度計(単位:ブリックス)を組み合わせ、それらの測定値を官能評価値に関係づける方法でシステムの構築を行った。

(2) 呈味センサー

本稿では、呈味成分をセンシングするものを「味センサー」と呼び、呈味成分以外の影響も含めて、より人間の官能に近いものをセンシングすることを目的としたものを「味センサーシステム」と呼ぶことにする。

味センサーについて概観すると、生物の機能を模倣するアプローチ²⁾と酵素センサーなどを用いて化学成分を測定する工学的アプローチに分けられる。食品には30~40程度の呈味成分とその他の成分が含まれているが、それらのすべてをセンサーで定量することは現実的ではない。

(3) 香りセンサー

生物の機能を模倣する香りセンサーのアプローチについても、実用段階まで開発されればかなり有力な手段になり得るが、現在は、基礎研究の段階である³⁾。一方、酸化物半導体の香りセンサーとしての研究は、以前から多く行なわれている^{4, 5)}。

HAYASHI Kenji

(4) 食品の味と呈味成分の研究手法の応用
 食品の味と呈味成分の関係については古くから多くの研究が行なわれている。その中でも、特にオミSSIONテスト手法は、基礎的な研究手法として、広く用いられている¹⁾。この手法により、多数の呈味成分の中から、官能的な評価に影響するごく少数の重要な呈味成分を系統的に絞りこむことが可能である。酵素センサーなどで食品の味の評価を行なうシステムを開発する場合には非常に有効な手法であるが、この方法を食品の味のセンシングシステムの開発に応用を試みた例は、ほとんど見られないようである⁶⁾。

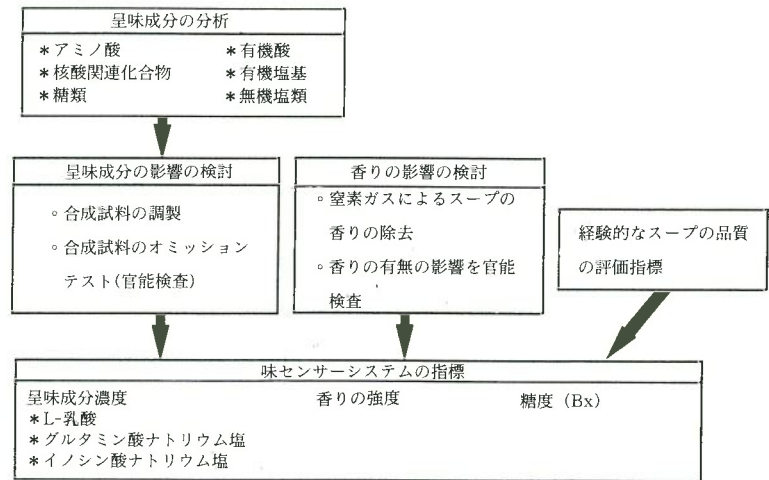


図1 味センサーシステムの指標の選定

3. スープ製造工程用味センサーシステムの開発

(1) コンソメスープを選定した理由

対象として、コンソメスープを選んだのは、①野菜と肉を長時間熱水抽出したもので、食品の味の基本的な成分を含んでいること、②均一の液体であるため、サンプリング上の複雑さが少ないこと、③テクスチャーなどの要因の影響が小さいことなどによる。

(2) 指標成分の絞り込みとセンサーシステムの開発

以上の検討の結果、グルタミン酸ナトリウム、イノシン酸ナトリウム、乳酸等が味に大きく影響していると考えられた(図1)。そこでこれらの呈味成分の定量用に、マルチチャンネル酵素 FIA 装置を開発した(図2)。

香りについても同様のテストを行なった結果、官能評価に大きく影響することがわかった(図1)。そこで香り測定用センサーとしての研究が進んでいる^{4, 5)} SnO₂ 系のガスセンサーを用い、工場などで迅速、正確にサンプリングできる装置の開発を行いシステムに組み込んだ(図2、口絵)。

(3) 官能評価値とセンサー値の相関性の検討

専門の味覚評価パネルの評価値 CE とこのシステムの各センサーによる測定値 TE をプロットした(図3)。

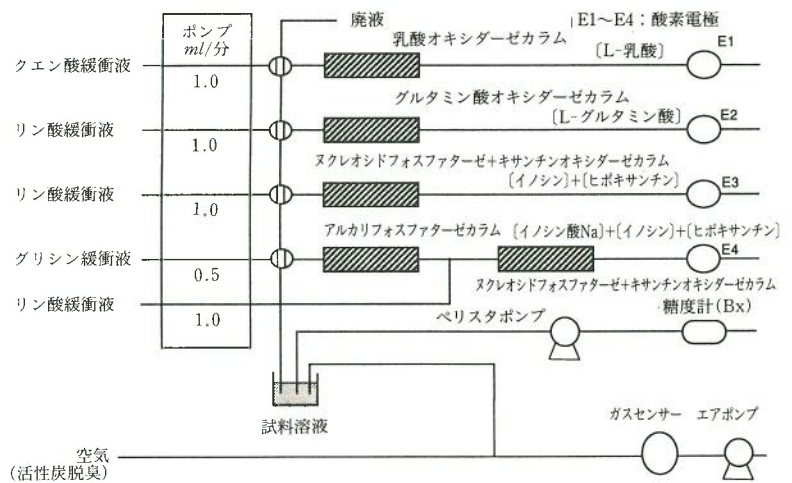


図2 味センサーシステム

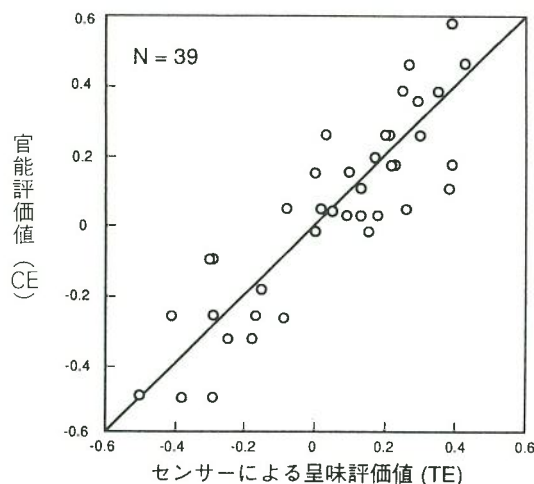


図3 官能評価値と呈味評価値の相関性

重回帰式: $TE = 0.69Bx - 0.0012 \cdot SE + 0.019[\text{Lactic acid}] + 0.73G - 8.4$
 $SE = [\text{GluNa}] \cdot (1 + 0.12[\text{IMP}])$ (mg/dl)
 G = ガスセンサーの出力比(サンプル水)
 CE = パネルの総合評価の平均値

呈味性の評価をセンサーで行おうとすると、現段階では大部分のセンシング方法が基礎研究の段階でなかなか適当なものがない。しかしながら食品の味に関する研究手法を指標の絞り込みに応用することで、専門の味覚評価パネルの官能評価の結果と良好な相関性が得られるような味覚評価システムの開発が可能であった。

4. 今後の課題

本研究で用いたガスセンサーで、選択性の低いSnO₂系の素子を用いているため、ガスセンサーの出力の差が、あまり大きくない。そこで精度良く測定するためには、繰り返し測定が必要で、迅速性の点でまだ十分とは言えない。そのような点を考慮に入れると今後の課題としては、①さらに的確に香りの質や強さの差が迅速に測定できるガスセンサーの開発、②多変量解析やニューロコンピューティングなどを用いることでより正確で誤りの少ない情報処理システムの開発等が挙げられる。現在これらの課題について開発を行っている。その中で香りについては、一部進展があったので以下に簡単に触れておきたい。

(1) 加熱香气センサーの開発

スープ製造工程用センサーの開発のなかで特にスープの風味の良否に加熱香气の影響がかなり大きいことがわかった。そこで手初め

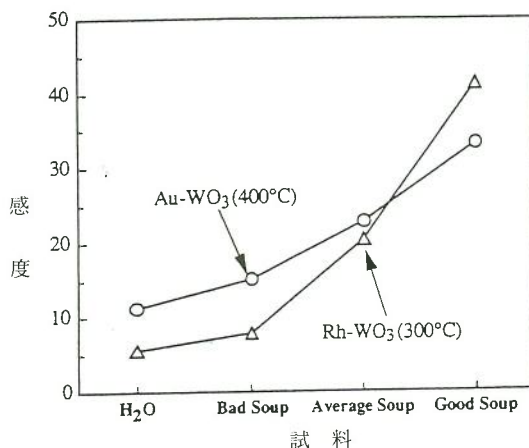


図4 Rh-WO₃とAu-WO₃によるスープの香り強度の測定例

に(食品の代表的な加熱香气成分として知られる⁷⁾)ピラジン類に対して選択的なガスセンサーの開発を九州大学(山添教授, 三浦助教授)及び電気化学計器㈱と共同で行った。その結果スープ中の他の代表的な成分に比べて、ピラジン類に対して高い選択性を示すセンサーが得られた。またこのセンサーで標準品、及びそれよりも香りの評価の高かったものと低かったもの3品について測定を行ったところ、香り評価の高かったサンプルほど高い出力が得られ⁸⁾(図4)、従来用いていたSnO₂系のガスセンサーに比べると、サンプル間の品質の違いをかなり明確に再現性良く識別し得る可能性が示された。

5. おわりに

最後に本研究は、農林水産省食品産業オンラインセンサー技術研究組合において、電気化学計器㈱と共同で行ったものである。このような研究の場を与えられた農林水産省食品流通局の方々、及び専門的立場から有益な助言をしていただいた先生方に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 小俣靖 (1986) “美味しさ”と味覚の科学, 日本工業新聞社
- 2) 林健司・都甲潔・山藤馨 (1991): 日経サイエンス, 10: 68
- 3) Chang, S.M., Tamiya, E., Karube I. (1991) *Biosensor and Bioelectronics*, 6: 9
- 4) 江原勝夫 (1989) センサー技術, 9: 59
- 5) 江原勝夫・若林俊佑・小泉武夫 (1985) 食品機械装置, 12: 71
- 6) 林健司・金谷昌敏・船崎菜穂美・要藤健・浅野泰一 (1989) 2 C 20, 電気化学協会秋季大会講演要旨集
- 7) Maga, J.A., Sizer, C.E. (1973) *Critical Reviews in Food Technology*, 39-115
- 8) 前川知輝・阿武裕一・玉置純・浅野泰一・林健司・三浦則雄・山添昇 (1992) 第4回国際化学センサー学会要旨集, 3: 23

国内情報

人工酵素（タンパク質工学）

人工酵素開発の現状

岩手県醸造食品試験場

谷口 肇

1. はじめに

人工酵素（タンパク質工学）という題を頂いたが、この2つの語の意味するところは必ずしも一致しない。酵素は高い触媒能と基質特異性を持ったタンパク質で、その骨格は遺伝子に組み込まれており、したがって生物により生産される。狭義の人工酵素は酵素のような触媒活性及び基質特異性を持つ低分子の合成化合物と定義されよう。タンパク質の代わりにシクロデキストリン、ポルフィリン、コバラミン等を用い、それに金属や特定の官能基等を化学的に結合した合成化合物に酵素類似機能を発揮させようとしたものである。

抗体は哺乳動物が生産する免疫グロブリンの1種で、巨大タンパク質であるが抗原を認識する特異性は極めて高い。この点に注目してこれに触媒活性を付与して、酵素としての機能を持たせたものが抗体酵素（触媒抗体とも言う）である。抗体酵素も広義の人工酵素に入れられよう。

また、近年、ある種のRNAに触媒活性があることが見いだされ、このようなRNAも酵素の1種であると考えられるようになった。

厳密には人工酵素とは言えないが、天然の酵素に手を加えて、本来の機能を強化したり新しい機能を付与したりする研究が数多く行われている。このように、天然の酵素に手を加えて本来の機能と異なる酵素を作り出すことをタンパク質工学と言う。望ましい機能を持つ酵素を得たいという実用的な見地からは、

タンパク質工学による新酵素の創出が最も期待できる人工酵素であろう。

2. 合成化合物による人工酵素

酵素の本質は高い触媒機能である。その多様で特異性の高い触媒能は、合成化学の分野で使われる各種金属触媒もはるかに及ばない。しかし酵素はその本体がタンパク質であるため、高温高压や酸アルカリなど極端な環境では失活してしまう。また、生体から特定の酵素を多量に得ることは、現在でもなお非常に難しい。酵素機能を持つ低分子の合成化合物が得られれば、天然の酵素の弱点が克服され、酵素の利用の面からも、その機能を解析する基礎的な面からも、その意義は大きい。

シクロデキストリンはグルコース6-8残基からなる環状化合物である。環の外側は親水的であるのに対して内側は比較的疎水的で、ここに芳香族化合物や脂肪酸を取り込む性質を持っている。この性質が酵素の基質結合部位の働きに似ていることに着目して、環の外

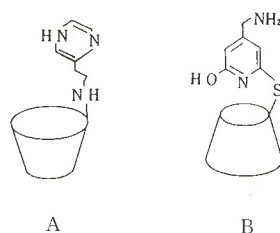


図1 人工酵素としてのシクロデキストリン誘導体

A: イミダゾール基を導入したもの
 B: ピリドキサル基を導入したもの
 : シクロデキストリン

TANIGUCHI Hajime

縁に種々の官能基を導入した誘導体が合成されている。図1のAは加水分解酵素の活性中心にも存在するイミダゾール基を導入したもので、フェニルエステルの加水分解を促進する。Bはアミノ酸代謝に関係する多くの酵素の補酵素であるピリドキサルを導入したもので、アミノ酸を取り込んで脱アミノ化反応を促進する。クラウンエーテルやシクロファン等の環状化合物も同様に人工酵素の出発材料として研究されている。

プロトポルフィリンは4個のピロール基を持つ分子量563の環状化合物である。これと鉄の錯塩はヘモグロビンの補欠分子族であるばかりでなく、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、シトクロムP-450等の補酵素である。これらの酵素ではこの錯体がタンパク質と結合して酵素機能を発揮しているが、タンパク質無しで触媒活性を示すポルフィリン誘導体の合成が種々試みられている。三価マンガニ・テトラピリジンポルフィリン類錯体は、シトクロムP-450類似の人工酵素として、オレフィンのエポキシ化を行う。亜鉛ポルフィリン錯体であるクロロフィルは、タンパク質と複合体を作って光合成の反応中心を形成している。ポルフィリン錯体だけで光化学反応を行う人工光合成系が研究されている。

コバラミンはビタミンB₁₂とも呼ばれ、異性化、脱離、転移、還元など水素移動に関与する酵素の補酵素である。シアノコバラミンに疎水基を導入して疎水性ビタミンB₁₂誘導体を合成し、これを2分子膜ベシクルに組み込んで人工酵素を構築している。このベシクルは炭素骨格の組み替え反応や5員環から6員環への環拡大反応を触媒する。

このように種々の人工酵素が作られているが、触媒活性及び基質特異性の両面で天然酵素を越えるものは出ていない。食品工業への利用にはまだ時間がかかると思われる。

3. 抗体酵素とリボザイム

1986年、エステル結合の加水分解反応を触媒する抗体が、人工的に初めて創り出された。

酵素 (Enzyme) 機能を持った抗体 (Antibody) という意味でこれを抗体酵素 (Antibody enzyme, Abzyme) と呼んでいる。多くの酵素反応では基質は遷移状態を経て生成物に変換される。この遷移状態に近い中間体またはその類似物を化学的に合成し、これと特異的に結合する抗体を調製すれば、得られた抗体は触媒活性を持つと考えられる。モノクローナル抗体を得る技術が確立してこれが現実になった。現在、エステルやペプチドの加水分解活性を持つ多くのモノクローナル抗体が調製され、抗体酵素としての機能が調べられている。有機合成では普通ラセミ体を得られるが、酵素反応では光学活性な生産物が得られる。抗体酵素を使って天然には存在しないフッ素化合物の光学活性な生産物が得られている。

抗体酵素は通常の酵素より大きなタンパク質であり抗体の生産には多くの費用がかかる。このことから考えて抗体酵素はまだ基礎的研究の段階にあると言えよう。

RNA に酵素活性 (RNA 切断活性) が見いだされたのは1989年で、酵素は全てタンパク質であるとするそれまでの酵素学の常識を打ち破るものであった。このようなRNAは、酵素 (Enzyme) 機能を持つRNA (Ribonucleic acid) という意味でリボザイム (Ribozyme) と名付けられた。リボザイムは多くの生物にその存在が知られるようになり、「エンドヌクレアーゼ」としてRNAのプロセッシングに重要な役割を果たしていると考えられる。リ

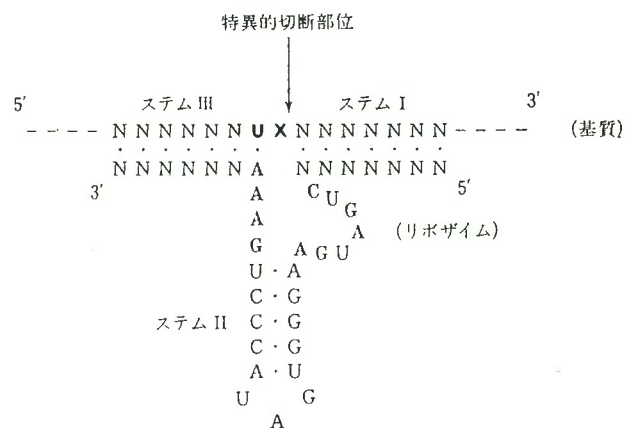


図2 ハンマーヘッド型リボザイム

リボザイムは一般的な酵素タンパク質に比べて遥かに小さく、そのRNA切断機能は自身の塩基配列に直接結びついている。したがって、基質RNA中の特定の塩基配列を認識して切断するリボザイムを設計することはタンパク質の場合に比べて遥かに容易である。一例として図2にハンマーヘッド型リボザイムを示した。触媒活性はタンパク質に比べて低いようだが、ウイルス病や遺伝病の治療への応用が期待され、活発に研究されている。

4. タンパク質工学による酵素機能の 改変

酵素タンパク質の機能を人工的に改変する方法は大きく分けて2通りある。一つはタンパク質に化学的修飾を加えることにより、その酵素機能に変化を引き起こさせる方法である。ズブチリシンのチロシン残基をニトロ化してその基質特異性を変えたり、リパーゼにポリエチレングリコールを結合させて有機溶媒中でも作用できるようにしたりする例はよく知られている。固定化酵素は食品工業でもよく用いられるが、酵素を不溶性の単体に結合してpHや温度に対する安定性を増加させた例は数多い。

人工的改変のもう一つの方法は、遺伝子操作技術を用いて酵素の機能を改変するもので、狭義のタンパク質工学はこの方法を指す。この方法の手順は①目的酵素遺伝子のクローニング、②遺伝子の塩基配列の決定、③酵素のアミノ酸配列の決定、④アミノ酸配列中の変異部位の決定、⑤前記④に基づく変異遺伝子の作成、⑥変異遺伝子による改変酵素の生産である。これらの手順中、①～③、⑥はほぼ確立された手法である。⑤も部位特異的変異法の開発により、遺伝子中の任意の塩基を他の任意の塩基に置換する技術が確立した。

図3にヒトリゾチームの2つのアミノ酸(Gln86とAla92)残基をAsp残基に置換してカルシウム結合能を付与して耐熱性を増加させた例を示した。この他にも、耐熱性の増加したアミラーゼやプロテアーゼ、触媒活性が

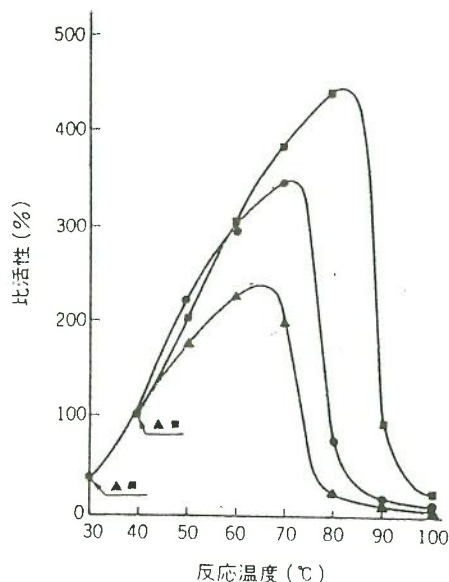


図3 タンパク質工学によるヒトリゾチームの耐熱性の向上

- ▲— 元の酵素 (野生株)
- 組換え酵素
- 組換え酵素 (Ca結合型)

増加したり基質親和性が変化したズブチリシン、リガンド親和性が変化したラクテートデヒドロゲナーゼ、等多数報告されている。遺伝子組換え技術を利用して作られるために、これらの酵素は組換え酵素とも呼ばれる。安全性のガイドラインができれば、近い将来、これら組換え酵素の一部は食品工業にも利用されよう。

5. 新酵素の設計

上に述べたタンパク質工学の手順中、④だけはまだ確立された方法がない。耐熱性酵素を作り出す時には、既存の非耐熱性および耐熱性酵素のアミノ酸配列を比較して後者に特異的なアミノ酸を前者に入れて行くと言う方法がよく取られる。自然界の例をよく調べて、そこに用いられている方法を真似ようとする考え方である。また、耐熱性を増すには酵素タンパク質の安定性を増すことが重要であるとの考え方から、S-S結合や疎水結合が出来やすいようにアミノ酸配列を改変する方法もしばしば使われている。このような場合には、そのタンパク質の高次構造に関する知見

が非常に役立つくる。

しかしながら現在のところ、経験則や断片の原理を組み合わせる試行錯誤を重ねているのが現状であろう。目的に合った遺伝子をピタリと設計することはまだ不可能である。そのためには、タンパク質の構造と機能に関する知見の一層の集積と鋭い洞察が必要と思われる。高次構造解析にはNMRとX線解析が大きな威力を発揮するものと期待される。またコンピューターグラフィクスを含めたデータ解析技術が果たすべき役割も大きい。

このような研究が進めば、既存の酵素の改良にとどまらず、将来、全く新しい酵素を設計生産することが可能になる。

文 献

- 1) フーズバイオテクノロジー事典編集委員会編(1988)人工酵素とタンパク質工学, フーズバイオテクノロジー事典, 215-222産業調査会事典出版センター
- 2) 鈴木春男(1989) バイオサイエンスとインダストリー 47:507-510
- 3) 川上純司・西川 諭(1992) 化学と生物 30:244-248
- 4) 三浦謹一郎・大島泰郎・渡辺公綱編著(1988) タンパク質工学 啓学出版
- 5) 三浦謹一郎他編(1992) 蛋白質工学の進展, 蛋白質核酸酵素臨時増刊 37:292-370, 641-682

食品のバイオテクノロジー関係の既掲載情報についてのご案内

食品のバイオテクノロジーにつきましては、既に下記について本誌に掲載しております。今回の特集と併せてご利用下さい。

国内情報

酵母 (*S. cerevisiae*) の液胞生理機能欠損変異株の単離とその性質 (1989)

13: 8~10 北本勝ひこ (国税庁醸造試験所)

冷凍耐性パン酵母の開発 (1989)

15: 10~13 高野博幸 (食品総合研究所)

低アミロース, 高アミロペクチン小麦品種とめん適性 (1990)

20: 6~8 黒田 晃 (農業研究センター)

たんぱく質の一次構造中の生理機能性ペプチド配列 (1990)

22: 11~13 河村幸雄 (食品総合研究所)

バレイショ生澱粉を強力に分解するアミラーゼ (1991)

24: 13~15 谷口 肇 (食品総合研究所)

甘藷焼酎の特徴香の生成機作 (1992)

30: 4~6 太田剛雄 (国税庁醸造試験所)

酵母の染色体上に存在するキラ-遺伝子について

33: 7~10 後藤邦康 (国税庁醸造試験所)

地域の先端研究

通気カラム式バイオリアクターによる果実酢の生産 (1992)

34: 17~19 山下純隆 (福岡県農業総合試験場)

特別情報

食品加工・流通における新技術 (1988)

9: 21~27 梅田圭司 (食品総合研究所)

地域の先端研究

熊本県での加圧食品の研究開発と実用化

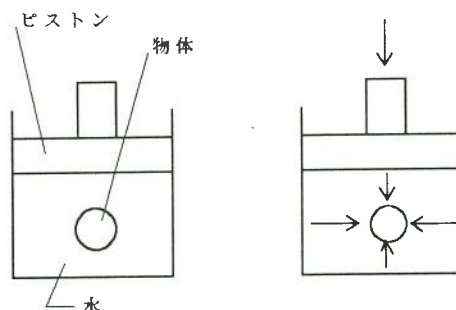
熊本県工業技術センター 微生物応用部
林田安生

1. はじめに

従来、食品加工に使用されるエネルギーは熱が主体である。調理や殺菌、乾燥等の食品加工技術はどれも加熱処理の応用技術として発展してきた。しかし、過度の加熱処理は食品の風味を損ない栄養分を破壊する欠点がある。現在の食品業界では食品素材本来の風味をなるべく残して付加価値を高める傾向があり、様々な無・短時間熱調理法が数多く検討されてきた。

食品に数千気圧程度の圧力を加えて食品を加工する方法では、温度の上昇はほとんど無く、熱に弱い香気成分やビタミン等の低分子物質が破壊されづらい状況でタンパク等の変性や酵母・黴等のある種の微生物の殺菌等が可能である(図1)。これらの特徴を生かし、日本国内でこの技術を応用したジャム・ジュース・シャーベット等が実用化されている。また、これまでの加熱型食品加工技術とは根本的に異なる加工法が着目され多くの研究が進行中である。

一方、熊本県ではこの高圧処理に関する研究を継続的に行っている食品製造業者は皆無であった。また、研究を実施しようにも高圧処理技術を修得した技術者の育成が進んでおらず、試作機購入等の研究コストが比較的高い現状(平成2年当時)では、1団体でこの技術を導入するには高いリスクが伴った。そこで、県内食品業界全般から、この高圧技術に係る技術の修得、研究、普及への多様な対



物体を水等の媒体の中に浸し、ピストンで圧力を加えると圧力は物体に均等に加わる。均等に圧力が加わるので、空隙がない物体は潰れない。

図1 静水圧を加える

応が当センターに望まれていた。

2. 熊本県での研究の取り組み

このように多様な対応が望まれるなか、県工業技術センターでは平成2年度に「食品への高圧技術に関する研究」をスタートさせ、全国で展開されているこの技術についての情報を収集するとともに、高圧処理の予備試験に取り組んだ。高圧処理装置にはセラミック用の加圧成型機を用い、様々な食品における高圧処理の影響、微生物の殺菌試験等基本的なデータを蓄積した。

また、高圧処理技術の技術普及を図るため、平成2年度及び平成3年度にこの技術に係る技術普及講習会を実施した。食品高圧技術の提唱者であり第1人者である京都大学 林力丸 助教授(現:京都大学教授)を講師として実施したこの講習会は2度とも多くの県内食品製造関係者等の参加があり、目的である県内食品製造業界への高圧技術の周知を達成できた。

HAYASHIDA Yasuo

更に平成3年度、工業技術センターに食品用高圧処理装置が導入された。導入された試作装置は圧力槽容量が5リットルで従来の試作機の10倍程度の容量をもっており（平成3年11月当時）、加工食品を試作するに十分満足できる装置であった。

ここにおいて、工業技術センターの技術水準の向上と県内企業への周知、加圧食品が試作できる程度の能力をもつ加圧試験機の導入が達成されたとして、平成3年度に県内企業等12団体からなる熊本県高圧食品研究会を開催した。そして、平成4年度はこの研究会での活動を踏まえて更に研究を進めたいと希望する企業との共同研究を実施した。結果、酒類における世界初の加圧食品の実用化に成功

するなど多くの成果を得ることができた。

3. 熊本県高圧食品研究会

平成3年11月から平成4年3月まで開催したこの研究会は、12団体の参加者と当センター担当者で構成され、試作研究を主体とした活動を実施した。参加者がそれぞれ自分のテーマを持ち、当センター職員の指導をうけながら試作するスタイルで、それ故研究対象は醸造食品・果実加工品・海産物等幅広い範囲にわたり多くの知見を得ることができた（表1）。なお、通常は各個研究を実施している参加者相互の連絡をとるため検討会も開催した。

表1 技術普及講習会（食品高圧技術）

実施年月	題目	講師
平成2年8月	「食品への高圧利用技術の応用」	京都大学 林力丸助教授(現教授)
平成2年8月	「加圧食品の研究と開発」	京都大学 林力丸助教授(現教授)

表2 熊本県高圧食品研究会

会長	石田清和（熊本県味噌醤油協同組合技術顧問）
参加者（研究テーマ）	
・浦島食品工業(株)	（生のりの食材への応用）
・熊本県果実連	（柑橘果汁の高圧処理による成分性状等の把握）
・九州大豆食品協業組合	（大豆加工食品製造前処理としての浸漬大豆への利用）
・コープ食品(株)九州工場	（超高圧とデンプンのα化等について）
・千代の園酒造(株)	（酒類の高圧処理に関する研究）
・(株)福田農場ワイナリー	（食肉・果実への高圧処理技術の応用）
・フンドーダイ(株)	（無添加味噌への高圧の利用）
・ホシサン(株)	（高圧処理によるみそ・しょうゆの殺菌）
・森川健康堂(株)	（高圧処理技術を利用した食品原料の変化）
・熊本製粉(株)	（高圧の小麦粉製品への応用）
他1社	
助言者	林力丸（京都大学助教授） 堀恵一（三菱重工(株)主任）
事務局担当	工業技術センター 微生物応用部
内容	○発足式及び機器使用講習会開催（平成3年11月18日） ○参加各企業の試作研究とそれに係る工業技術センターの技術指導 ○先進企業見学会開催（平成4年1月13日から1月14日まで） ○中間検討会（平成4年2月8日） ○結果検討会（平成4年3月13日）

4. 共同研究（濁り生酒の開発）

前年の研究会を踏まえて共同研究の希望が複数あり、それぞれの団体と共同研究を実施した。その中の1つである「加熱処理しない[濁り酒]の開発」について紹介する。

平成4年に清酒の級別制度廃止に伴い、清酒業界は新しい環境に対応を求められていた。この対応手段の1つとして新製品の開発があげられる。熊本県内の清酒製造元である千代の園酒造(株)は上記研究会で清酒酵母の殺菌について成果をあげ、加熱処理をしない濁り酒の開発を行うため、共同研究を希望された。

図2、図3に清酒オりに4000気圧までの圧

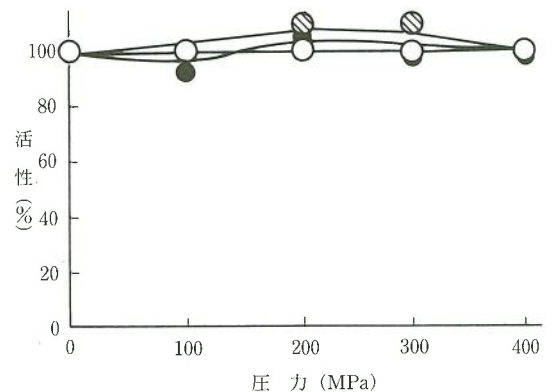


図2 酒オリ中のグルコアミラーゼの不活化に及ぼす圧力の効果
加圧処理は2°C(○)、10°C(●)、20°C(●)で30分間おこなった。

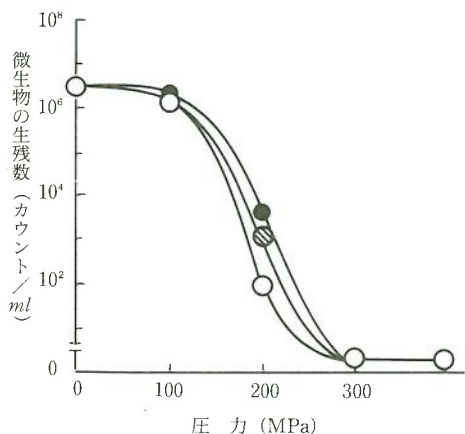


図3 酒オリ中の微生物の不活化に及ぼす圧力の効果
加圧処理は2°C(○), 10°C(◎), 20°C(●)で30分おこなった。

力を加えたときのグルコアミラーゼの活性と生菌数の消長を示す。グリコアミラーゼを始めとして、総アミラーゼ・酸性プロティナーゼ等の酵素は4000気圧程度の圧力では影響をほとんど受けなかったが、酵母・乳酸菌等は3000気圧程度の圧力で死滅した。なお、殺菌効果は加圧する時間が長く温度が低い程高かった。しかしながら、生酒の香りはよく残しているものの若干の風味変化を伴った。そこ

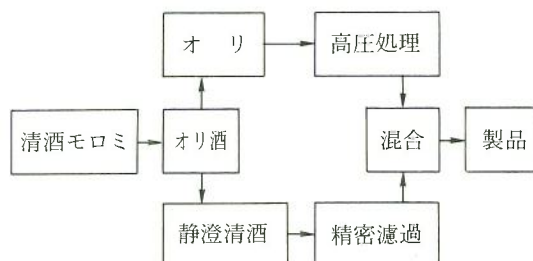
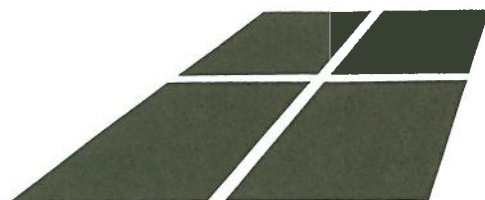


図4 生オリ酒の製造工程

で、濁り酒をオリと生酒に分離した精密膜処理と高圧処理を併用して濁り酒を製造した(図4)。製造した濁り酒は生の風味をよく残していた。また、技術の併用により高圧処理のみで製造する方法に比べ生産量を飛躍的に高めることができ、コストを試験販売できる程度に抑えることができた。この製品は平成5年6月から共同研究企業(千代の園酒造株)より試験販売され現在に至っている。

この他、実用化には至っていないものの多くの成果を共同研究で得ることができた。熊本県での「食品へ的高圧利用の研究」は、平成4年度に終了したが、平成5年度からも技術指導の一環として対応していく予定である。



農業試験研究一世紀記念シンボルマーク

水田をシンボルとすることで歴史を、透視図にすることで広がり発展を表現しました。

文献情報

トウモロコシのトランス
ポーザブル・エレメント
*Activator*によるペチュニ
ア花色遺伝子のタギング
とクローニング

トランスポーザブル・エレメントは、遺伝子への挿入によって突然変異体が誘発できるという性質を利用して、遺伝子の機能を研究する道具として用いられてきた。より最近では、タギングによって遺伝子を単離するのにも有効な手段として用いられてきている。しかしながら、植物のトランスポーザブル・エレメントで十分研究され、突然変異誘発や遺伝子のタギングに一般的に用いられるのはトウモロコシとキンギョソウの二つの植物に限られている。これまでにトウモロコシのトランスポーザブル・エレメント *Activator* (*Ac*)やキンギョソウのトランスポーザブル・エレメントを他の植物に導入しようという試みが多く、研究者によってなされ、*Ac*については、タバコ、トマト、ジャガイモ、シロイヌナズナおよびペチュニアで動くことが示された。しかし、これまでこれらヘテロの系で *Ac* によって突然変異が誘発された例はなかった。また、ペチュニアには内在性のトランスポーザブル・エレメントの存在が知られているが、これまでにこれによって遺伝子のタギングに成功した例はない。この論文では、トウモロコシの *Ac* をペチュニアに導入することによって、花の pH を制御する遺伝子のタギングに成功したことを報告している。これは、異種の植物のトランスポーザブル・エレメントによって遺伝子の単離に成功した初めての例である。

花の色は多くの遺伝子によって制御されており、その中には色素合成や細胞の pH を支配するものなどが含まれる。目で見えるマーカーであるためにこれまでトウモロコシやキンギョソウから多くの遺伝子が単離されてきたが、この論文の著者らもこのマーカーに着

目し、ペチュニアにおいて、pH の変化によって花の色に影響を及ぼす遺伝子 Ph6 が *Ac* タギングによって単離された。

まずストレプトマイシン耐性遺伝子を転移のマーカーとする *Ac* をアグロバクテリウムを介してペチュニアに形質転換した。*Ac* の切り出しが起こってストレプトマイシン耐性となった個体を自家受粉して劣性ホモをいくつか得た。そのうちの一つは、Ph6 遺伝子への *Ac* の挿入による突然変異によって、野生型よりうすい花の色を示し、ところどころに復帰突然変異によって起こった濃い色のセクターが現れた。次にこの突然変異体から *Ac* をプローブとするタギングによって、変異した遺伝子を単離した。

単離された遺伝子が変異した遺伝子と同一のものであることの確認は突然変異復帰体の解析によって行われた。つまり表現型が野生型に復帰したすべての突然変異復帰体において、遺伝子断片の長さが *Ac* の切り出しによって野生型の長さに戻っていた。また多くの突然変異復帰体において、飛び出した *Ac* がゲノム上の別の位置に転移していたことが示された。

単離された遺伝子が花の pH を変化させる遺伝子であることは、突然変異体が野生型や突然変異復帰体よりも低い花の pH を示すこと、花特異的に発現する遺伝子であること、これまでに知られている pH 遺伝子との比較などによって推定された。

Ac による遺伝子タギングがトウモロコシ以外の植物にも応用できることが示されたことは画期的なことである。ランダムな突然変異を起こす T-DNA タギングと較べ、*Ac* は元の挿入位置から比較的近傍に転移するという性質があるので、この性質を利用して、単離しようとしている遺伝子の染色体上の位置がわかっている場合などでは、より標的をのぼったタギングが可能であるという長所がある。しかしながら、*Ac* による突然変異は不安定、つまり復帰突然変異によってもとに戻りやすいという問題がある。転移の頻度がそれに関して重要であるが、ペチュニアにおいて

もトウモロコシの場合と同じく、転移の頻度は遺伝的背景に依存しているようである。変異誘発の頻度を落とさず、復帰突然変異の頻度を落として安定化させるためにトウモロコシでは、*Ac*と異なり、それ自身では転移酵素の遺伝子を持たない *Ds* を利用した系が他の研究者によって開発されている。

(抄訳 高辻博志—生物研)

(TAKATSUJI Hiroshi)

Tagging and cloning of a Petunia flower color gene with the maize transposable element *Activator*

Chuck, G. et al.

Plant Cell 5 : 371-376 (1993)

文献情報

雌雄の決定に関与したスプライシングの制御機構

Drosophila melanogaster では、胚発生の過程において、雌雄を決定する最終的な産物が生産されるまでに多数の調節遺伝子が段階的に働いていることが知られており、これらの調節には、スプライシングによる制御が関与している。

調節遺伝子の一つである *transformer (tra)* から転写される pre-mRNA の一つ目のイントロンには、雌に特異的な3'スプライスサイトと、性に非特異的な3'スプライスサイトが存在し、これらのサイトを使い分けることによって雌雄間で異なる mRNA が形成されている。*tra* の制御には Sex-lethal (Sxl) gene が関与しており、Sxl 由来のタンパク質が、*tra* の性非特異的なサイトのポリピリミジン領域に作用し、このサイトにおけるスプライシングを抑制することにより、雌特異的なサイトのスプライシングを活性化させる。このポリピリミジン領域は、スプライスゾームを形成する初期の段階で、U2snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particle) が pre-mRNA

のランチポイントに結合するとき必要とする補足因子、すなわち U2AF が結合する領域であるため、著者らは、Sxl の標的は、この U2AF ではないかと考えた。

U2AF と Sxl の関係を解明するに先立ち、著者らは、*tra* pre-mRNA の *in vitro* でのスプライシング効率を上げるため、*tra* のエクソンと AdML (adenovirus major late gene) の5'スプライスサイトを置き換えた M-*tra* を構築した。これを用いた *in vivo* システムは、*in vivo* で観察されたように、Sxl に依存した3'スプライスサイトの制御を再現することができた。

まず初めに、*tra* の2つの3'サイトに対する Sxl と U2AF の結合力を RNA mobility shift assay により測定したところ、Sxl は性非特異的なサイトと高い結合力を示したが、雌特異的なサイトとは高濃度でも結合が認められなかった。一方、U2AF はどちらのサイトとも結合したが、雌特異的なサイトとの結合力は性非特異的なサイトの100分の1であった。Sxl と U2AF の3'サイトに対する結合力を K_d で比較すると、Sxl が高い結合力を示すのは *tra* の性非特異的なサイトのみで、*tra* の雌特異的なサイトを含め、供試した *Drosophila* およびヒトのいくつかの遺伝子の3'サイトとはいずれも U2AF の方が高い結合力を示した。また、Sxl と U2AF の濃度を変えて同時に加え、2つのサイトに対する結合能力を比較したところ、これら2つの因子は性非特異的なサイトへの結合に関してのみ拮抗しており、Sxl と U2AF との比に依存してスプライスサイトの選択が行われていることが明らかとなった。すなわち、Sxl は、性非特異的な3'スプライスサイトに特異的に結合することにより、このサイトへの U2AF の結合を阻害し、結合力の低い雌特異的なサイトへの U2AF の結合を可能にして、雌特異的なスプライシングを活性化している。

Sxl と U2AF は両者ともポリピリミジン領域結合タンパク質であるが、Sxl は性非特異的な3'サイトのスプライシングを抑制し、U2AF はこれを活性化するというように、両者

の機能は異なっている。このことは、U2AFにはSxlに存在していないアルギニン・セリンリッチなエフェクタードメインが存在することに起因するのではないかと著者らは考えた。そこで、Sxlの完全な結合ドメインにU2AFのエフェクタードメインを結合したUsxタンパク質を作成し、その性質を調べたところ、UsxはSxlと同様、性非特異的3'スプライスサイトと高い結合力を示し、雌特異的サイトとの結合は認められなかった。一方、Usxはスプライスサイトの雌特異的な制御に関与しておらず、さらに、U2AFを取り除いた反応系においても性非特異的なスプライシングを誘導したことから、UsxはU2AFと同じ機能を持つことが明らかとなった。

今後、他の遺伝子のスプライシング制御が、*tra*と同様、スプライスサイトへのU2AFの結合を調節することによって行われているかを決定することが重要であると考えられる。

(抄訳 大平有紀—東北大・農)

ODAIRA Yuki

The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA
Valcarcel, J., R. Singh, P.D. Zamore and R. Green

Nature 362 : 171, 11 March 1993

文献情報

新しいサブトラクションの方法—RDA

従来、サブトラクション法を用いて、欠失変異体ゲノムの欠失部分のクローニングをおこなう試みがなされてきた(*dystrophin* 遺伝子のクローニングなどはその例)。しかし、従来のサブトラクション法は濃縮の効率も低いため、濃縮後でもサンプルからターゲットのDNAを選び出すことに膨大な手間がかかることが多く、複雑な真核生物のゲノムの解

析にサブトラクションを適用した場合の成功例はそれほど多くはないし、適用できるのはゲノムにかなり大きな欠失がある場合に限られていた。

Lisitsynらが開発したサブトラクション法(RDA=Representational Difference Analysis)はその意味で、少ない出発材料で済み、煩雑な操作は少なく、もっとも有難いことには目的のDNA断片に対する濃縮の度合は 10^5 から 10^6 倍にも達するため(従来の方法では10~100倍)ターゲットとする欠失DNA断片のみが得られるという点で、誰でも手がけられるより効果的な遺伝子の解析手段であるといえる。

とはいえ、RDAによるサブトラクションの基本的な原理が従来の方法と大きく異なっているわけではない。例としてゲノムの欠失による変異体を利用してこの欠失部分をつかまえてくる場合を考えてみよう。この場合のサブトラクションの原理とは、従来どおり、目的のDNA断片を含むもの(野生型)、含まないもの(変異体)それぞれのゲノムの制限酵素断片の間でハイブリダイゼーション(分子雑種形成)をおこない、野生型のDNAの中から、目的DNAを含まない変異体のDNAと分子雑種を形成したものを排除する、というものである。

しかし、RDAでは従来のサブトラクションの原理に基づく濃縮(subtractive enrichment)に加え、PCRによる増幅(kinetic enrichment)が組み合わされている。上記の例に従えば、野生型のDNA断片(筆者らの用語ではtester)には予め両端にアダプターをつけておき、大過剰の変異体DNA(同上driver)とのハイブリダイゼーションの後、用いたアダプターに相補的なプライマーを使ってPCRを行うのである。さて、このハイブリダイゼーションの際に形成されるハイブリッド(分子雑種)には次の3種がある。(1)tester同士のハイブリッド(両側にアダプター配列を持ち、PCRによって指数関数的に増幅される)。(2)testerとdriverとのハイブリッド(片側のみにアダプターを持つので、

リニアな増幅が起こる)。(3) driver 同士のハイブリッド (アダプターを持たないので増幅は起こらない)。すなわち、例えば 20 回の PCR サイクルで、(1)の場合理論的には 2^{20} 倍に増幅されるのに対して、(2)の場合にはわずかに 20 倍、また (3)の場合には全く増幅されない。

このように RDA では PCR による増幅 (kinetic enrichment) が、従来のサブトラクションにおけるターゲット DNA 以外の (カラムクロマトグラフィーなどによる) 物理的な排除と同様な役割を果たすのである。その後ハイブリッドを形成しなかった一本鎖 DNA を特異的なスクレアーゼにより消化する。このような、ハイブリッド形成 → PCR → 一本鎖 DNA 消化、という過程を数サイクル経ることにより、変異体では欠失している目的の DNA 断片 (difference products) が得られる。

実は RDA において得られる DNA 断片には、(上記の driver DNA とハイブリッド形成するかしないかによる選別の他に) 第二の選別がかかっている。すなわちハイブリッド形成 → PCR という過程に用いる制限酵素断片は (tester についても driver についても) ゲノムの全領域を含むものではなく、そこから PCR で増幅が可能な比較的短い断片 (彼らはこれを amplicon と呼んでいる) のみが選別されている (→ representations of the genomes)。このようにしてゲノムの複雑さのある程度減じておくことが、それ以降のステップがうまく進むためにはかなり重要らしい。もちろん使用した制限酵素によっては、ターゲットの DNA 断片が amplicon から排除される場合もあり得るが、これは適当な制限酵素を遊ぶことで回避できる。

筆者らは RDA を実際に二つの場面に適用している。その一つは、ヒトのゲノム DNA サンプルに不純物として λファージ DNA またはアデノウイルス DNA を加えたものを用いたときに、difference product としてウイルス DNA が得られるかどうかを示したモデル実験。もう一つは RDA を用いて、ヒトの

姉妹の間で多型を示す RFLP プローブを得るという実験である。筆者らはいずれの場合においても目的の DNA 断片を得ることに成功している (得られた difference product はいずれも 1kbp を超えることはなかった)。

RDA はさまざまに応用可能であり、たとえば、未知のウイルスやトランスポソンの解析、ガン細胞の遺伝的解析、また RFLP プローブのより効果的な検索など遺伝学的な解析に絶大な威力を発揮することが期待される。

(抄訳 浜田和行—日本たばこ・植物開発研)

HAMADA Kazuyuki

Cloning the differences between two complex genomes

Lisitsyn, N., N. Lisitsyn and M. Wigler
Science 259 : 946-951 (1993)

文献情報

Brassica においては雌しべの乳頭細胞の機能を阻害すると花粉の受容力も失う

植物の受粉反応には花粉と柱頭上の乳頭細胞間の相互作用が重要な役割を果たしている。*Brassica* や *Arabidopsis* などを含むアブラナ科植物では、花粉が柱頭に付着後、吸水発芽し、花粉管が乳頭細胞に侵入して、受精に至る。この受粉時の乳頭細胞の機能を明らかにするために、柱頭及び葯で特異的に発現するプロモーターに毒素遺伝子をつないだキメラ遺伝子を作って形質転換植物を作出した。プロモーターとしては柱頭乳頭細胞と葯で特異的に発現し、自家不和合性に関連していると考えられている *Brassica* の S 糖タンパク質遺伝子 (S-locus glycoprotein; SLG) のプロモーター (3.65kb) を用いた。そのうしろにタンパク質の翻訳反応を阻害するジフテリア毒素 A 遺伝子 (DT-A) を連結したキメラ遺伝子を構築し、アグロバクテリウムを介してナタ

ネ(*B. napus* cv. Westar)に導入して、15個体のトランスジェニック植物体を得た。

毒素遺伝子を導入した形質転換体は、乳頭細胞と花粉の発達に関して異常が認められた。形質転換体では乳頭細胞の分化は正常に起こるが、途中で発育を停止していた。乳頭細胞の長さはいろいろな程度のものがあったが、平均すると非形質転換体の約半分であった。形質転換体の柱頭を電子顕微鏡によって観察したところ、細胞質のオルガネラの分布にも異常が認められた。また、形質転換体は様々な程度の花粉不稔率を示した。花粉の不稔は、毒素遺伝子の発現により、2核期以降に小胞子の生育が停止したためと考えられる。毒素遺伝子の発現はタペート細胞や他の葯の組織に対して直接影響を及ぼさなかったが、形質転換体のタペート細胞の消失が非形質転換体に比べ遅れているのが観察された。

次に、乳頭細胞におけるタンパク質の生合成活性を調べるために、乳頭細胞で作られるSLR1-糖タンパク質をイムノブロットで検出した。SLR1-糖タンパク質は *Brassica* の乳頭細胞で特異的に生合成されているが、乳頭細胞の極端に短い形質転換体では殆ど検出されなかった。また、³⁵Sで標識したメチオンを柱頭組織を取り込ませて、生合成されるタンパク質を検出した結果、形質転換体の乳頭細胞ではタンパク質の生合成が対照に比べ減少していることが明らかになった。

正常柱頭に形質転換体の花粉を受粉しても比較的良い花粉発芽を示し、花粉管が柱頭に侵入しているのが認められた。しかし、形質転換体の柱頭に正常な花粉を受粉すると、花粉管の侵入はほとんど見られなかった。面白いことに、このプロモーターは柱頭の成熟に伴って発現することが知られているが、形質転換体でも開花3~4日前の未成熟な柱頭では花粉管の侵入が観察され、柱頭の成熟に伴って花粉管が侵入しなくなるので、毒素遺伝子の発現に伴い花粉管は柱頭に侵入できなくなると考えられる。この研究グループでは同じキメラ遺伝子を導入した *Arabidopsis* の例を以前に報告しているが(Thorsnessら1993),

*Arabidopsis*の乳頭細胞においても、*Brassica*と同様にタンパク質の生合成に異常が見られた。しかし、*Brassica*の場合とは異なり、かなりの数の花粉管の侵入が認められた。

アブラナ科の自家不和合性の認識機構には、プロテインカイネースを介したタンパク質のリン酸化が重要な役割をしていると考えられている。そこで、花粉と柱頭の相互作用とタンパク質のリン酸化の関係を調べるため、柱頭をプロテインホスファターゼ阻害剤(okadaic acid, microcystin-LR)によって処理したところ、*Brassica*の柱頭では花粉管の侵入が阻害された。一方、*Arabidopsis*の柱頭への処理では花粉管の侵入に影響を与えなかった。このことから、*Brassica*の受粉反応には、タンパク質のリン酸化が何らかの役割をしていると推測される。

本研究より、*Brassica*の乳頭細胞の伸長を抑制し、特異的タンパク質合成を阻害すると、花粉の発芽が起こらなくなることが示された。そして、形質転換体やホスファターゼ処理における *Brassica* と *Arabidopsis* の受粉反応の違いから考えると、*Brassica* と *Arabidopsis* の花粉管の侵入に関して、タンパク質のリン酸化/脱リン酸化反応の必要性の違いがあることが示唆された。

(抄訳 高崎剛志—東北大・農)

TAKASAKI Takeshi

Ablation of papillar cell function in *Brassica* flowers results in the loss of stigma receptivity to pollination

Kandasamy, M.K., M.K. Thorsness, S.J. Rundle, M.L. Goldberg, J.B. Nasrallah and M.E. Nasrallah.

Plant Cell 5: 263-275 (1993)

文献情報

virF遺伝子を発現する *N. glauca* はノパリン型 *A. tumefaciens* の宿主になる

Agrobacterium tumefaciens は様々な植物にクラウンゴールという腫瘍の形成を引き起こす。この腫瘍化の決定因子は細菌中の Ti (Tumor inducing) plasmid に存在する T 領域と vir 領域にある。T 領域は、植物ホルモンであるオーキシン、サイトカイニンと特殊なアミノ酸誘導体であるオパインを合成する遺伝子を含み、T-DNA として植物の染色体に組み込まれる。

Ti plasmid は腫瘍中で生産される主要なオパインの種類によってオクトピン型、ノパリン型、アグロピン・マンノピン型に分類されている。一方、vir 領域はバクテリア内で発現するオペロン群 (virA~virG) からなり、これらは T-DNA が植物の染色体に組み込まれるのに必須な遺伝子や輸送の効率および宿主範囲に関わる遺伝子である。また、vir 領域に含まれる遺伝子は Ti plasmid の種類によって若干異なる。例えば、virF はオクトピン型には存在するがノパリン型には存在しない。オクトピン型 *A. tumefaciens* は *Nicotiana glauca* に対して強い腫瘍形成力を持つが、virF⁻株やノパリン型株の *N. glauca* に対する腫瘍形成能は著しく低下することから、virF は宿主範囲の決定に関わることが示唆されている。

virE や virF の欠損株はその他の vir 遺伝子欠損株とは異なり helper 菌 (T-DNA は持たないが正常な vir 遺伝子を持つ) との co-infection により腫瘍形成能が回復することが知られている。また、この helper 菌は vir 遺伝子発現の誘導に関わる virA, virG 以外にも T-DNA の輸送系に関与すると考えられている virB, virD を必要とする。これらのことから、VirE, VirF タンパク質またはそ

の代謝産物は T-DNA の輸送系を介して植物細胞に運ばれるのではないかと推測されている。著者らは、VirF の細胞内局在性を抗体を用いて調べた結果、その大部分は細胞質に存在しており、培地中には分泌されていなかった。さらに、virF⁻株の *N. glauca* に対する腫瘍形成能は培地中に VirF タンパク質を加えても回復されなかった。また、野性株の腫瘍形成能が培地に VirF の抗体を加えても影響を受けなかった。これらの実験から、VirF タンパク質はそれ自体が、腫瘍形成過程で vir 遺伝子がコードする輸送系によって植物細胞に運ばれ、T-DNA の植物染色体への組込みを促進していることが推測された。

次に、CaMV 35S promoter-virF キメラ遺伝子を *N. glauca* に導入し、VirF タンパク質を発現する形質転換植物を得た。virF を持たないノパリン型およびオクトピン型 virF⁻株は virF⁻植物には腫瘍化を引き起こさなかったのに対して、virF⁺植物にはオクトピン型野性株と同等の腫瘍形成を示した。この改変された腫瘍形成能は形質転換植物のホルモンに対する感受性が上がった結果である可能性も否定できない。そこで著者らは、GUS-intron をレポーター遺伝子として持つバイナリーベクターを導入した virF⁻菌を leaf disk 法により virF⁺植物および virF⁻植物植物に感染させ、GUS の発現を調べた。その結果、virF⁺植物の GUS 活性は virF⁻植物のそれよりも著しく高かったことから、virF⁺植物は VirF タンパク質を発現することにより、virF⁻菌からの T-DNA の取込みの効率を著しく高めたと結論した。

著者らの結果から、VirF タンパク質は腫瘍誘導過程において植物の細胞に運ばれ、そこで T-DNA の輸送に関わる役割を果たしている可能性が強く示唆された。

(抄訳 村瀬誠一 植工研)

MURASE Makoto

Transgenic *N. glauca* plants expressing bacterial virulence gene virF are converted into hosts for nopaline strains of *A.*

第38回国際食肉科学技術会議に参加して

農林水産省 中国農業試験場 産肉利用研究室
三津本 充

1. 会議の概要

パリから電車で3時間半程南へ下がった所にあるクレルモンフェラン市で1992年8月23～28日に開催された第38回国際食肉科学技術会議に、科学技術庁の国際研究集会派遣制度により参加することができました。



写真1 ポスター発表をしている著者

この会議は第1回（1955年）から第32回（1986年）まではヨーロッパ食肉研究者会談として行なわれ、第33回（1987年）からは世界的視野を進めるために国際食肉科学技術会議と改称されました。食肉科学の分野における唯一の国際的研究集会であり、肉畜の成長、食肉品質、加工肉、食肉衛生、分析法等の研究が多年にわたり発表、論議されていて、毎年世界各国から多くの研究者が参加しています。私も以前から一度出席してみたいと思っていた会議でした。

今回の会議の全体テーマは「消費者主導型の産業において如何に研究は生き残れるか」

でした。日本の食肉分野はどちらかと言うと産業主導型であり、世界の認識と異なっているのがわかります。食品安全性の面からも日本人はもっと「これが食べたい」という好みを産業界に主張すべきでしょう。

2. 発表

「ビタミンCの混和、塗布、浸漬処理による牛肉の色素と脂質の安定化」と題して発表（本研究集会での一般発表はすべてポスター発表）を行いました（写真1）。



写真2 米国ウィスコンシン大学のCassens教授夫妻

牛肉は冷蔵庫で保存されていても、時間が経つにつれて、鮮紅色から茶色に変色し、酸化臭が生じてきます。また、挽肉はスライス肉よりも早く変色し、腐敗しやすいことはよく知られています。これは次の機構によると考えられます。肉色素であるミオグロビンが酸化されて茶色のメトミオグロビンが生じ、牛肉中の脂質も時間の経過とともに酸化されていきます。この時、肉色素と脂質の酸化は相互に作用して進行すると考えられます。また、金属イオンは色素と脂質両者の酸化を促

進みます。さらに、細菌が増殖すると、肉は腐敗していくとともに酸素が細菌に消費されて、酸素分圧が下がり、メトミオグロビンが形成されます。挽肉ではミンチする際に空気、細菌およびミンチ機からの鉄が混入されるため、上述の変化がカット肉よりも早く進行します。

そこで、抗酸化作用を有するビタミンCを牛肉に用いて、貯蔵中における牛肉色の退色と脂質の酸化の程度に及ぼす効果を検討しました。その結果、①牛挽肉に0.5%のビタミンCを混和すると対照に比べ肉色素と脂質の酸化を5日間遅らせました。②牛カット肉の表面に10%ビタミンC溶液を20gの肉に0.1mlの割合で表面塗布すると対照に比べて3日間退色を遅らせました。③1%ビタミンC溶液に牛カット肉を20秒間浸漬すると対照に比べて肉色と脂質の酸化を2日間遅らせるとの知見が得られました。

これらの機構として、ビタミンCが食肉中に含まれているビタミンEと共に抗酸化剤として働き、ミオグロビンと脂質の酸化を抑制したと考えました。

3. 所 感

米国ウィスコンシン大学に留学時の指導教官のCassens教授夫妻(写真2)と再会でき、また今まで文献で名前を知っていた人たちとも会えて話しをすることができ、有意義でした。

招待講演者のKanner博士がスライドで私の論文の図(筋肉中ビタミンE濃度と肉色素および脂質酸化との関係の図)を引用して講演されたときは驚きました。自分の研究が世界の主流からずれていないことが認識できました。

また、フランス農業研究所(INRA)の食肉研究者のRenner博士から「お前の名前を知っているから、パーティーに来ないか」と誘われました。20人程の会で食肉科学の著名人が多くおられ、その中に招待を受けたことは

光栄でした。

食肉処理場の一つを見学し、フランスの食肉品質管理(牛の枝肉ごとに品種名、重量、格付、屠殺月日、屠殺場所、屠殺人名が明記され、コンピューター処理されている)と衛生管理(毎日、床や壁、機材を洗浄し、清潔にしている)を見ることができました。しかし、屠殺の現場は見せてもらえず、また建物内部での写真撮影は許可されませんでした。日本では嫌われている豚尻のシャロレーの枝肉を初めて見ました。フランスでの雄肥育は肉用牛全体の約半数とのことでした。

前回のドイツでの会議では、発展途上国の研究者への旅費補助が行われたそうですが、今回はなかったため出席者のほとんどが先進国からの白人で占められていたのは国際学会としては多少残念でした。

クレルモン フェランでは暑くて、連日30℃を超え、ホテルは冷房なしで、窓も少ししか開かず、夜も蒸し暑かったです。出発前、テレビで世界の天気を見ていて、避暑ができると思っていたのですが、とんでもない思い違いでした。

会議期間中は毎晩懇親会が行われ、ホテルに戻れるのは夜中の12時を過ぎてからということが度々でした。「これがフランス式の歓迎なのかな。それにしてもフランス人はタフだ」と思いました。

バスや電車から見える農村風景で印象深かったのはヒマワリをたくさん栽培していることでした。ヒマワリは種子油を採るためであり、しばり粕は家畜の飼料にしているとのことでした。また、酪農が盛んで牛が多くいました。牧草地や小麦用の農耕地が多くみられ、フランスは農業国であることが実感できました。

パリでの滞在時間は余りありませんでしたが、凱旋門、エッフェル塔、ノートルダム寺院、コンコルド広場、オルセー美術館を見て回ることができました。フランスの歴史や芸術の一端にふれ、その重厚さに感銘しました。

編集後記

「農業試験研究一世紀記念」協賛第3号として「食品のバイオテクノロジー」を特集しました。本号の課題と執筆者の選定に当っては、食品総合研究所の佐々木堯企画連絡室長から格別の御協力を得ました。また、表紙写真につきましては、日研化学株式会社大宮研究所

の若生勝雄氏が本号のためにわざわざ撮影してくださいました。両氏に厚くお礼申しあげます。次号（11月15日発行）では環境関連のバイオテクを特集する予定にしていますので、御期待下さい。

(大畑記)

ブレイン テクノニュース (第39号)

平成5年9月15日発行

発行者 浜口 義 曠

発行所 生物系特定産業技術研究推進機構

〒160 東京都新宿区新宿6丁目24-16 日本生命新宿6丁目ビル3F
TEL. 03-3205-6565 FAX. 03-3205-6566

編 集 (社)農林水産技術情報協会

〒103 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6F
TEL. 03-3667-8931 FAX. 03-3667-8933