

[成果情報名] ニュートリゲノミクスによるフラボノイドの Maus 糖尿病症状軽減効果の解析

[要約] DNA マイクロアレイを用いた組織遺伝子発現の網羅解析により、糖尿病誘発マウスにおけるケルセチンの糖尿病症状軽減作用及びフロリジンの血糖値低下作用のメカニズムが示される。

[キーワード] ケルセチン、フロリジン、DNA マイクロアレイ、糖尿病

[担当] 食総研・食品機能研究領域・機能性評価技術ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8041

[区分] 食品

[分類] 研究・普及

[背景・ねらい]

健康に対する関心の高まり、健康食品の過剰摂取による健康被害の問題等から信頼性の高い機能性評価技術の開発が必要とされている。そこで、ニュートリゲノミクスで用いられる DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅解析により、機能性発現機構の解析を試みた。ケルセチンおよびフロリジン等のフラボノイドは生活習慣病予防効果を示すことが期待されている。そこで、糖尿病を誘発したマウスにケルセチンまたはフロリジンを摂取させ、糖尿病の症状と肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響等を調べ、これらフラボノイドの有効性と作用機構を解明する。

[成果の内容・特徴]

1. ケルセチンは糖尿病マウスでみられる血糖値の上昇を抑制する。また血中インスリン濃度の減少を抑制すると共に肝臓で酸化ストレスの指標である TBARS を減少させる (表 1)。
2. 肝臓の遺伝子発現解析では、ケルセチンが糖尿病の肝障害発症に関わる細胞周期制御因子遺伝子グループ (表 2) の発現を抑制し、細胞周期を回復させて肝障害を軽減することが示唆される。また、膵臓においても、ケルセチンは細胞周期制御因子 Cdkn1a の発現を抑制する。
3. 断片化した DNA を染色する TUNEL 法による肝臓組織の損傷の観察により、ケルセチン摂取による肝障害の軽減が確認される (図 1)。
4. 同様の試験で、フロリジンは糖尿病マウスの血糖値の上昇を抑制するが、血中インスリン濃度及び肝臓の TBARS レベルには影響を及ぼさない (図 2)。DNA マイクロアレイ及び RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行い、フロリジンは小腸で、糖尿病マウスで 3.4 倍に上昇したグルコース共輸送体 SGLT1 の発現を 2.1 倍まで有意に抑制することを明らかにする。グルコースの吸収を減少させ、結果として血糖値が低下する。

[成果の活用面・留意点]

1. DNA マイクロアレイによる組織遺伝子発現の網羅解析は食品成分の機能性発現機構の解明に活用することができる。
2. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析により機能性およびその発現機構を解明するためには、動物実験において適切な評価系を用い、遺伝子発現解析では適切な統計解析手法を用いることが重要である。

[具体的データ]

表1 ケルセチン摂取が糖尿病マウスの体重、血中グルコース濃度、血漿中インスリン濃度及び肝臓の酸化ストレスマーカー (TBARS) に対する影響

	Control	STZ	SQ 0.1 %	SQ 0.5 %
Weight (g)	28.49 ± 0.52	21.82 ± 1.32 ^a	22.85 ± 0.89 ^a	22.05 ± 0.88 ^a
Blood glucose (mg/dL)	101 ± 7.3	413.2 ± 42.2 ^a	333.7 ± 36.25 ^b	279.8 ± 29.2 ^b
Plasma insulin (ng/mL)	2.06 ± 0.10	0.47 ± 0.03 ^a	0.73 ± 0.04 ^a	1.02 ± 0.08 ^b
TBARS (nmol/g in liver)	15.21 ± 0.46	34.70 ± 1.38 ^a	28.32 ± 0.91 ^b	25.06 ± 0.96 ^b

異符号間において有意差有りとする P<0.05, n=6

STZ : ストレプトゾトシン (STZ) 処理により糖尿病を誘発したマウス、SQ 0.1% : 糖尿病マウスにケルセチン0.1%含有飼料を摂取させた、SQ 0.5% : 糖尿病マウスにケルセチン0.5%含有飼料を摂取させた

表2 ケルセチン摂取により糖尿病マウス肝臓で発現が抑制される細胞周期抑制因子グループの遺伝子

GenBank Accession No.	Gene symbol	Gene name	STZ	SQ 0.1 %	SQ 0.5 %
AK007630	<i>Cdkn1a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	12.28	7.76	7.09
BG065754	<i>Ccng1</i>	cyclin G1	3.06	2.51	1.96
BG065754	<i>Btg2</i>	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	2.42	2.42	1.68
U95826	<i>Ccng2</i>	cyclin G2	1.30	0.93	0.83
AW322026	<i>Btg1</i>	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	1.17	1.04	0.85
NM_009875	<i>Cdkn1b</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	1.07	0.63	0.86

0.5%ケルセチン摂取により細胞周期抑制因子グループの遺伝子が有意に抑制された (GSEA法, n=6, P<0.05, FDR<0.25)。無処理コントロールの遺伝子発現量を1として各群における遺伝子発現量の相対値を示す。STZ : ストレプトゾトシン (STZ) 処理により糖尿病を誘発したマウス、SQ 0.1% : 糖尿病マウスにケルセチン0.1%含有飼料を摂取させた、SQ 0.5% : 糖尿病マウスにケルセチン0.5%含有飼料を摂取させた

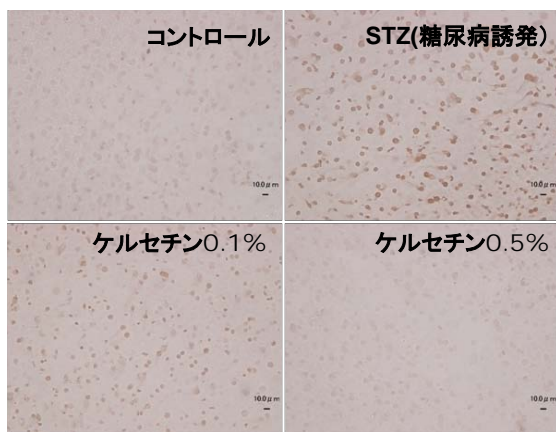


図1 ケルセチンの肝障害軽減効果

肝臓組織の損傷をTUNEL染色 (損傷を受けて断片化した核DNAを染色する方法) により観察した。コントロール : 糖尿病でない正常マウス、STZ (糖尿病誘発) : ストレプトゾトシン (STZ) 処理により糖尿病を誘発したマウス、ケルセチン0.1% : 糖尿病マウスにケルセチン0.1%含有飼料を摂取させた、ケルセチン0.5% : 糖尿病マウスにケルセチン0.5%含有飼料を摂取させた。

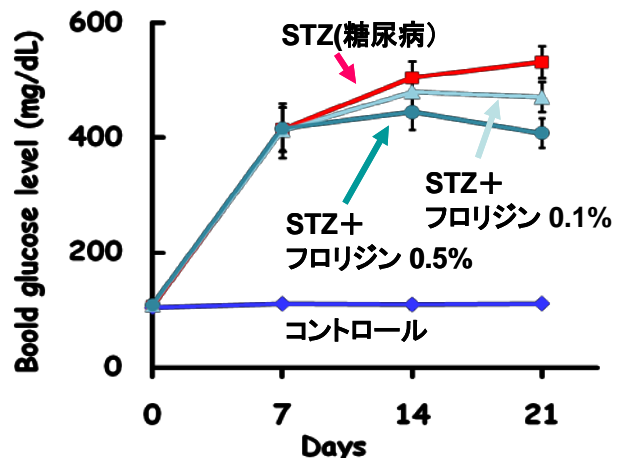


図2 フロリジン誘発糖尿病マウスにおける血糖値低下効果

ストレプトゾトシン (STZ) 処理7日後に糖尿病を誘発したマウスを群分けし、ケルセチン含有飼料を14日間摂取させた。コントロール : 糖尿病でない正常マウス、STZ (糖尿病) : STZ処理により糖尿病を誘発したマウス、STZフロリジン0.1% : 糖尿病マウスフロリジン0.1%含有飼料を摂取させた、STZ+フロリジン0.5% : 糖尿病マウスにフロリジン0.5%含有飼料を摂取させた。

[その他]

研究課題名 : 農産物・食品の機能性評価技術の開発及び機能性の解明

中課題整理番号 : 312e

予算区分 : 基盤、委託プロ (食品プロ)

研究期間 : 2006~2009年度

研究担当者 : 小堀真珠子、大池秀明

発表論文等 : 1) Kobori et al. (2009) *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 859-868.

2) Masumoto et al. (2009) *J Agric. Food Chem.* 57, 4651-4656.

[成果情報名] 腸内フラボノイド代謝改善食品の開発のためのエコール産生性評価方法の開発

[要約] イソフラボン、腸内フローラによって代謝され強いエストロゲン様作用を示すエコールに変換される。エコールの産生を高める食品を腸内フラボノイド代謝改善食品の一つと位置付け、その開発に資するためのエコール産生性評価法である。

[キーワード] エコール、イソフラボン、腸内フローラ、腸内フラボノイド代謝改善食品

[担当] 食総研・食品機能研究領域・機能生理評価ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8089

[区分] 食品

[分類] 研究・普及

[背景・ねらい]

イソフラボンは大豆に含まれ、種々の生活習慣病予防効果が期待されるフラボノイドの一種である。大豆イソフラボンの一つであるダイゼインは、腸内フローラ(腸内細菌叢)によって代謝され、エコール(equol)に変換される。変換されたエコールは、もとのイソフラボンよりもエストロゲン活性が強く、機能性が高い。しかし、エコール産生能は個人差が大きく、50~70%のヒトはエコール産生能が低いことが知られ、エコール産生に関与する腸内フローラの違いが産生能の差の原因と考えられている。腸内でエコールの産生を高める食品は新しいタイプの機能性食品(腸内フラボノイド代謝改善食品)として期待できる。そこで、成果情報では、腸内フラボノイド代謝改善食品の開発に利用可能なエコール産生性の評価方法を提供する。

[成果の内容・特徴]

1. 従来法では、糞便サンプルのエコール産生性測定には新鮮糞便を用いるため、測定は糞便サンプリング当日に限られ、エコール産生性評価においては糞便処理・測定時期の制約がボトルネックとなっている。嫌気性輸送培地にジメチルスルホキシドを加えて希釈したヒト糞便は、イソフラボン代謝活性を6カ月以上保持したまま保存可能であることを新たに見出した。この糞便試料を用いて*in vitro*でのイソフラボン代謝試験(図1)を行った。凍結保存処理を行ったヒト糞便希釈液に対して1%の食品成分を添加して嫌気培養すれば、アップルペクチン等の食品成分はエコール産生性を向上させ、グルコースは抑制することを示し(図2)、エコール産生性を向上させる食品の検索法として使うことができる。
2. マウスを用いた動物試験においてコレステロール添加した餌を与えたマウスでは非添加のマウスに比して消化管内容物のエコール濃度(図3)が低いことから、コレステロール添加した餌を与えて育てたマウスがエコール低産生性マウスとなり、食品成分のエコール産生能の評価系の一つとして活用し得る。

[成果の活用面・留意点]

1. 開発されたエコール産生性評価方法は、腸内フラボノイド代謝改善食品(エコール産生性向上食品)検索方法として使用できる。
2. エコール産生性が期待される食品成分については、動物試験やヒト試験を活用してその効果を検証する必要がある。エコール低産生性マウスは、エコール低産生性状態を改善させる食品成分の評価に活用することができる。
3. 今回開発したエコール産生性を向上させる食品の検索法と食品成分のエコール産生能の評価系は、テーラーメイド食品開発の基盤的技術の一つとして活用し得る。

[具体的データ]

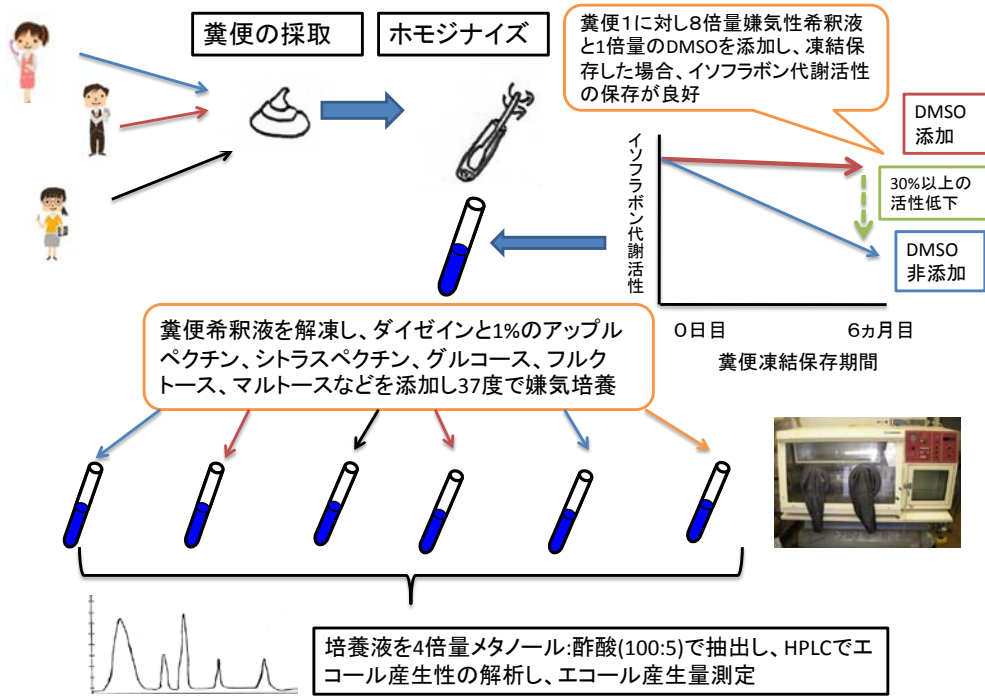


図1 エコーン産生量の測定方法の概要

イソフラボン代謝試験が行えるヒト糞便保存、培養法の開発によりエコーンの産生を高める食品の検索が可能となる

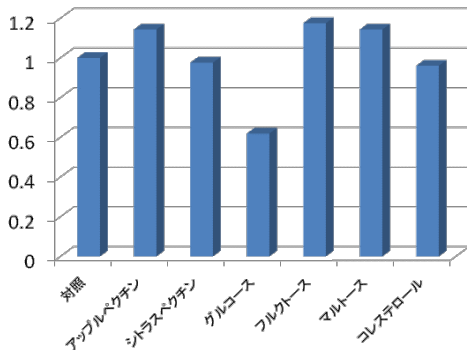


図2 1%食品成分を添加した *in vitro*でのイソフラボン代謝試験例
対照サンプルのエコーン濃度を1とした。

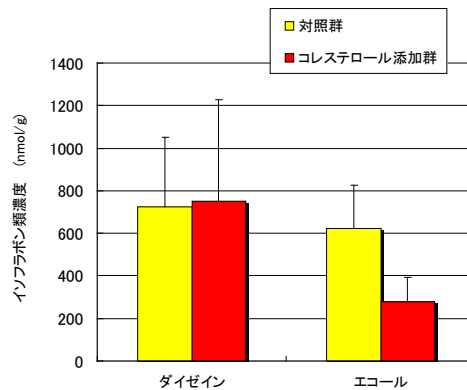


図3 コレステロール添加食給餌マウスの盲腸内容物のエコーンアグリコン濃度
対照群に比してコレステロール添加群でエコーンアグリコン濃度が有意に低下した。

[その他]

研究課題名：イソフラボン等を最適に摂取するための腸内フローラの制御法の開発

中課題整理番号：312e

予算区分：基盤、委託プロ(食品プロ)

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：田村基

発表論文等：1) Tamura M. et al. (2009) Antonie Van Leeuwenhoek 96(4) :621-626

2) Tamura M. et al. (2009) Nutr Res 29(12) :882-887.

3) Tamura M. et al. (2009) Food Sci Technol Res 15(2) :141-146.

[成果情報名] 熱水と化学処理を併用した効率的なもやし用緑豆種子殺菌方法の開発と評価

[要 約] 熱水処理と次亜塩素酸ナトリウム処理を併用することにより、もやし用緑豆種子に付着させた病原菌を効果的に取り除くことが可能であった。処理後の発芽率も十分高く、簡便かつ効果的な種子殺菌方法である。

[キーワード] もやし、種子殺菌、熱処理、次亜塩素酸ナトリウム

[担 当] 食総研・食品安全研究領域・食品衛生ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8021

[区 分] 食品

[分 類] 技術・普及

[背景・ねらい]

カイワレ大根・アルファルファ・もやしに代表される生食用芽もの野菜が原因食材と推定される食中毒が国内外で発生しており、大規模事例も報告されている。本食中毒の未然防止には原料種子の効果的な殺菌が極めて重要である。現状では、次亜塩素酸ナトリウム(~500 ppm)による殺菌が主流であるが、栽培する種子の種類や大きさや表面構造の違いにより、殺菌効果が一律に得られない等の問題がある。このような背景から、簡便かつ効果的な種子殺菌方法を開発するため、短時間の熱水処理と化学処理の併用によるもやし用緑豆(*Vigna radiata*)種子の殺菌効果について検証を行った。

[成果の内容・特徴]

1. もやし用の緑豆種子 (300 g) を短時間熱水処理 (85°C 40 秒間) することにより、種子表面に接種した大腸菌 O157:H7 およびサルモネラを検出限界以下にまで低下させることができる。殺菌種子から生産したもやしでは全てのサンプルで試験菌が検出されている (表 1)。
2. 緑豆種子の短時間熱水処理後に 2,000 ppm の次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)処理を 2 時間行うことにより、緑豆種子に接種した大腸菌 O157:H7 およびサルモネラを完全に殺菌することができる (表 1)。
3. 殺菌処理の有無に関わらず、種子の発芽率は商業的利用に十分な 96%以上を維持している。
4. 実用規模の装置を使用して、大規模殺菌試験 (1 回の種子処理量を 3 kg) を非病原性の大腸菌を接種した種子を用いて行った (図 1)。熱水処理と次亜塩素酸ナトリウム処理の併用による殺菌処理で種子の大腸菌は検出限界以下となった。殺菌種子を用いて生産したもやしからは、低い頻度であるが大腸菌が検出され (表 2)、完全に殺菌することは困難であった。しかしながら、熱水処理および化学処理を単独で行う殺菌方法と比較して、この両者を併用する手法の殺菌効果は極めて高く、もよしの安全性を従来に比べ飛躍的に高めるものである。

[成果の活用面・留意点]

1. 熱水処理は非常に簡便な殺菌方法であり、技術の導入が容易く、中小企業等でも広く活用されることが期待される。
2. 熱水処理と次亜塩素酸ナトリウム処理の併用は、現行の処理法よりも殺菌効果が高く、もよしの微生物汚染を従来よりも大きく低減できることが期待される。
3. 本手法による種子殺菌では、発芽率の顕著な低下は認められず、殺菌処理にともなう生産量の大幅な減少は起こらない。

[具体的データ]

表 1 汚染種子に対する熱水および次亜塩素酸ナトリウム併用処理の殺菌効果

処理条件*	大腸菌 O157:H7		サルモネラ	
	生菌数 (log CFU/g)	発芽後の陽性数 /総サンプル数	生菌数 (log CFU/g)	発芽後の陽性数 /総サンプル数
対照区	5.7±0.6	9/9	5.8±0.8	9/9
85℃ 40 秒間	検出限界以下	9/9	検出限界以下	9/9
85℃ 40 秒間 + 2,000ppm NaOCl 2h	検出限界以下	0/9	検出限界以下	0/9
20,000ppm NaOCl 20min	3.2±0.2	9/9	3.1±0.2	9/9

* 1 回の種子処理量は、300 g である。



図 1 非病原性大腸菌を接種した緑豆種子の大規模殺菌試験

表 2 現場での大規模試験による開発手法の殺菌効果の検証

処理条件*	生菌数 (log CFU/g)	発芽後の陽性数 /総サンプル数	発芽率 (%)
対照区	5.9±0.4	10/10	98
85℃ 40 秒間	検出限界以下	9/10	96
85℃ 40 秒間 + 2,000ppm NaOCl 2h	検出限界以下	3/10	97
20,000ppm NaOCl 20min	4.2±0.1	10/10	96

* 1 回の種子処理量は、3kg である。

[その他]

研究課題名：流通農産物・食品の有害生物の制御技術の開発

中課題整理番号：323e

予算区分：委託プロ（生産工程）

研究期間：2006～2009 年度

研究担当者：根井大介、Md. Latiful Bari、川本伸一

発表論文等：1) Bari et al. (2008) *J. Food Prot.*, **71**, 830-834.

2) Bari et al. (2009) *Foodborne Pathog. Dis.*, **6**, 137-143.

3) Bari et al. (2010) *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 51-56.

[成果情報名] 遺伝子組換え農産物検査の信頼性確保のためのダイズ CRM の生産・頒布

[要約] わが国の遺伝子組換え農産物の検査において、標準分析法を用いる試験室の内部質管理及び新規に開発した分析法の妥当性確認に利用可能な認証標準物質(CRM)を製造し、頒布する態勢を確立した。

[キーワード] 遺伝子組換え農産物、認証標準物質(CRM)、内部質管理

[担当] 食総研・食品分析研究領域・GMO 検知解析ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-7369 (CRM 頒布申し込み先：食総研・企画管理部・連携共同推進室 029-838-7369)

[区分] 食品

[分類] 技術及び行政・普及

[背景・ねらい]

農産物の供給体制を国際貿易に大きく依存するわが国において、遺伝子組換え(GM)農産物に関する表示基準の実効性を科学的に保証するものとして、食総研は、国立医薬品食品衛生研究所、農林水産消費安全技術センター等と共に GM 農産物の定性・定量検知法を開発してきた。組換えダイズ1系統、トウモロコシ5系統の定量分析法について、国際的に定められた手順に従った試験室間共同試験を実施し、その妥当性確認を行い、日本における標準分析法とした。食総研では、行政的な規制や製品の信頼性確保のための自主検査等の目的で、GM 農産物の分析をこの標準分析法で行う分析機関が、分析値の信頼性を保つために利用できる認証標準物質(CRM)を製造し、頒布することを目的として、CRM の製造法を確立する。

[成果の内容・特徴]

1. 国際的に通用するGM農産物のCRMの生産を行う目的で、標準物質生産のためのISOガイド34:2000 (JIS Q 0034:2001；標準物質生産者の能力に関する一般要求事項)及びISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025:2005)に基づく品質システムを構築し、認定を取得した(図1)。その品質システムのもとで、ダイズCRMの製造法を確立し、GMダイズが一定の割合で含まれるCRMを生産した。
2. 高純度の遺伝子組換え、および非組換えダイズの乾燥粉末を重量比に基づき混合し、均一な混合粉末とし、ランダムサンプリングと分析により均一性を確認後、標準分析法による試験室間共同試験を行う。その結果を技術委員会で審議して、標準分析法の分析精度を考慮に入れた不確かさ付した認証値を付与し、CRMとしての頒布を行っている(図2および図3)。
3. 現在、GMダイズ RoundupReadyTM Soybean (RRS)について2種類のCRMのセット NFRI-GM001 と NFRI-GM002 を頒布しており、RRS含有量の認証値は、NFRI-GM001 が、 <0.05 m/m%、 (0.069 ± 0.032) m/m% および (0.133 ± 0.030) m/m%、NFRI-GM002 が、 <0.05 m/m%、 (0.177 ± 0.076) m/m% および (6.10 ± 1.09) m/m% である(図3)。
4. 標準分析法を使用しても、実験室の環境、分析操作を行う分析者の技能、測定に用いる機器の状態により、分析値が真の値からずれることがあり、そのずれを検出し、常に真の値に近い妥当な分析値を得られるように測定環境などを整える“内部質管理”を行うために、本CRMを使用することができる。すなわち自らの分析値をCRMの認証値と比較してずれの大きさを確認し、必要な環境整備等を行う。
5. また、試験室間共同試験によらず重量混合比に基づく認証値が付与された頒布を目的としていないCRMについては、認証値を伏せたブラインド試料として、新規に開発した分析法の妥当性確認のための試験室間共同試験に用いている。

[成果の活用面・留意点]

1. 分析の際には、分析対象成分の認証値が付与されている標準物質を用いて内部質

管理を行うことが国際的にも求められおり、この CRM は、GM ダイズの検知を行う検査機関等での内部質管理に利用でき、分析結果の信頼性確保に役立つ。

- この CRM の頒布先は、原料ダイズの供給元との契約により、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）」の定める「遺伝子組換え農産物の品質表示基準」および「食品衛生法」に基づいて表示制度の実効性を確保する目的で標準分析法を利用している機関や分析所に、その用途についても内部質管理に限定している。なお、公的機関が実施する外部精度管理（技能試験）への利用はこの範囲として認めている。

[具体的データ]



図1 ISOガイド34に基づく標準物質生産者認定証



図3 GMダイズRRS検知用CRM

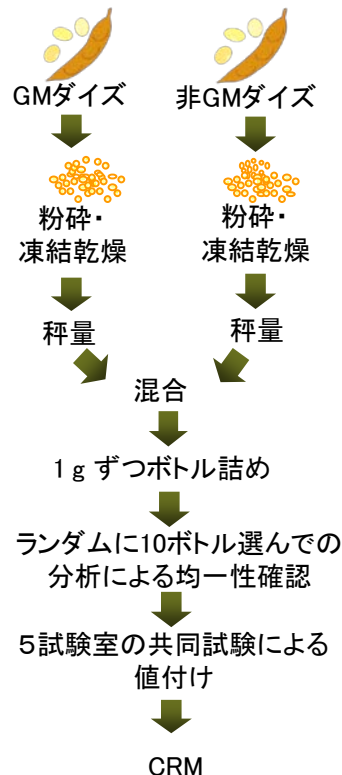


図2 ダイズCRMの製造手順

[その他]

研究課題名：汚染実態の把握に資する分析データの信頼性確保システムの確立及びリスク分析のための情報の収集・解析

中課題整理番号：321b

予算区分：基盤、その他の受託（消技セ）

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：橘田和美、古井聡、真野潤一、高島令王奈

発表論文等：Kodama, et al. (2009) J. AOAC 92: 223-233

[成果情報名] マイクロチャネル乳化デバイスの開発と液滴作製プロセスの解析

[要 約] 均一径微小液滴の生産性が大幅に改善されたマイクロチャネル乳化デバイスを開発した。また、CFD 手法を用いることにより、マイクロチャネル乳化における液滴作製挙動および液滴作製時の圧力・流動状態を詳細に解析することが可能である。

[キーワード] マイクロチャネル乳化、エマルション、液滴作製、CFD

[担 当] 食総研・食品工学研究領域・先端加工技術ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8025

[区 分] 食品

[分 類] 研究・普及

[背景・ねらい]

エマルションに分散している微小液滴のサイズとサイズ分布の精密制御が可能になれば、保存安定性、外観、呈味特性が高度に設計された乳化食品や薬理成分の徐放特性が高度に制御された乳剤（農薬、家畜用）の開発が可能になると期待される。マイクロチャネル乳化は、サイズが精密に制御された均一径微小液滴の製造が可能な先端乳化技術である。本技術の汎用化に対する課題は乳化デバイスの改良および大型化である。本研究では、上記課題に対処すべく新たなマイクロチャネル乳化デバイスを開発する。また、CFD（数値流体力学）手法を利用してマイクロチャネル乳化における液滴作製プロセスの解析も行う。

[成果の内容・特徴]

1. 非対称貫通孔型マイクロチャネルアレイ（図 1）は、液滴生産効率の向上を図るために改良されたマイクロチャネル乳化デバイスである。この乳化デバイス（WMS）は 24mm 四方の正方形であり、10mm 四方の中心部に多数のチャンネルが加工されている。乳化操作は、WMS デバイスが組み込まれた乳化モジュールを用いて行う。
2. WMS デバイスを用いることにより、均一径の微小液滴（直径 $>10\mu\text{m}$ ）を非常に高い生産速度で製造することができる。液滴生産速度の最大値は液滴材料の粘度に依存し、たとえば均一径の微小大豆油滴（直径 $30\mu\text{m}$ 程度）の最大生産速度は $100 \text{ L}/(\text{m}^2 \text{ h})$ ($10 \text{ mL}/\text{h}$) である。また、チャンネルサイズの大きな WMS デバイスを用いることにより、直径が最大で $180\mu\text{m}$ 程度の均一径微小大豆油滴の製造も可能である（図 2）。
3. CFD ソフトウェアを用いて非対称貫通孔型マイクロチャネルを含む計算領域を作成する。この計算領域を用いて CFD 計算を行うことにより、マイクロチャネルを介した液滴作製現象のシミュレーションが可能である（図 3）。また、液滴作製時の流動・圧力状態は、CFD 計算により得られたデータを用いて詳細に解析可能である。
4. 大型の平板溝型マイクロチャネル乳化デバイスの開発により、 $10\mu\text{m}$ 未満の均一径微小液滴の生産性向上を図ることができる。この乳化デバイス（CMS4、図 4）の大きさは 60mm 四方の正方形であり、14 列のマイクロチャネルアレイが加工されている。CMS4 デバイスを用いることにより、均一径微小液滴（直径 $10\mu\text{m}$ 程度）を既存のマイクロチャネル乳化デバイスと比べて 10 倍以上の高い生産性（ $1.5 \text{ mL}/\text{h}$ ）で製造可能である。

[成果の活用面・留意点]

1. 液滴生産性が向上したマイクロチャネル乳化デバイスが開発されたことにより、マイクロチャネル乳化技術を活用した試験研究のさらなる進展が期待される。均一径微小液滴の実用生産を実現するために本乳化装置のさらなる大型化が必要である。
2. CFD はマイクロチャネル乳化プロセスのシミュレーションと解析に有用なツールであり、実験的手法と CFD を併用することによるマイクロチャネル乳化デバイスの最適設計は、他のデバイス設計にも有益な研究情報として活用が期待される。

[具体的データ]

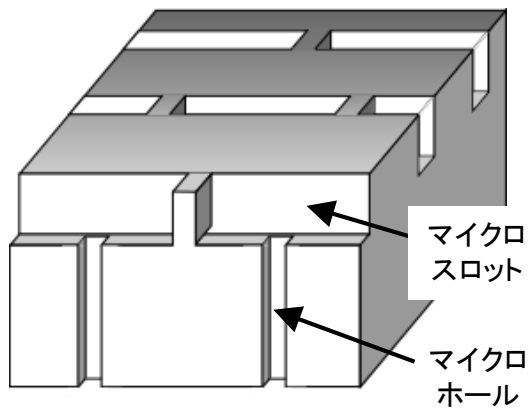


図1 非対称貫通孔型マイクロチャネルアレイ(シリコン製)の拡大模式図

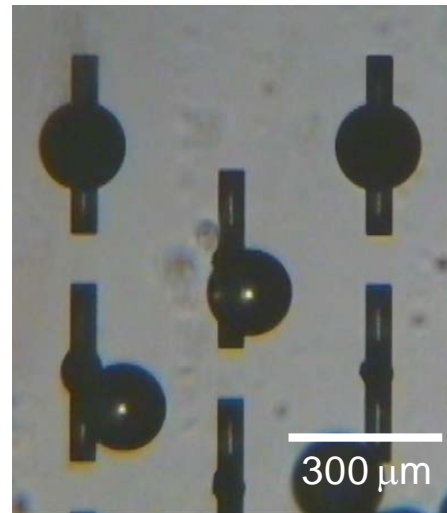


図2 非対称貫通孔型マイクロチャネルを介した均一径微小大豆油滴の作製

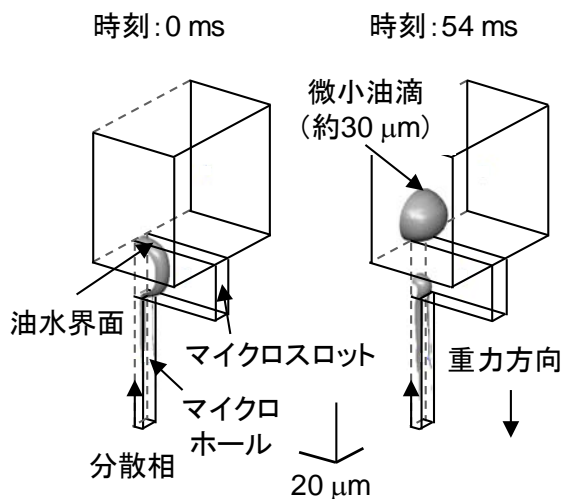


図3 液滴作製プロセスのCFDシミュレーション結果(分散相:大豆油、連続相:水)

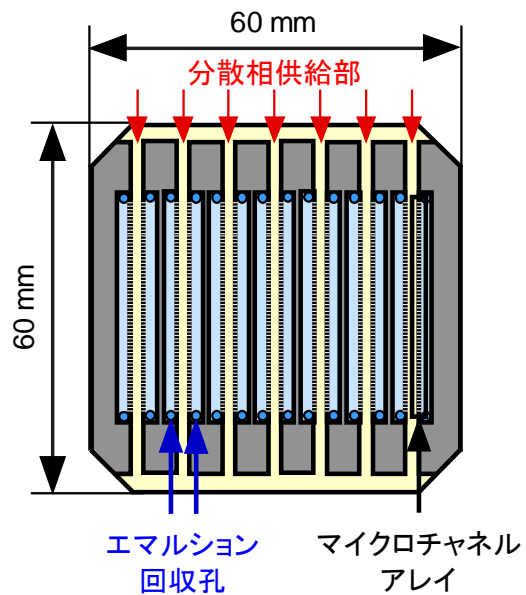


図4 大型平板溝型マイクロチャネル乳化デバイスの模式図

[その他]

研究課題名：マイクロチャネル乳化を用いたマイクロ/ナノ粒子作製

中課題整理番号：313d

予算区分：委託プロ（食品ナノ）

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：小林功、植村邦彦

発表論文等：1) Kobayashi et al. (2009) Microfluid. Nanofluid. 7(1):107-119

2) Kobayashi et al. (2008) Microfluid. Nanofluid. 5(5):677-687

3) Kobayashi et al. (2008) Microfluid. Nanofluid. 4(3):166-177

[成果情報名] 食品微生物挙動データベースの開発

[要 約] 食品産業界で食品製造や衛生管理に広く利用できる、食中毒菌および腐敗菌を含む 29 種類の菌種、18 種類の食品群における細菌の増殖する／しない環境条件（温度、pH、水分活性）と、増殖速度の情報を一括して検索可能とした微生物挙動に関するデータベース MRV (Microbial Responses Viewer) を開発した。

[キーワード] 微生物増殖、死滅、予測微生物学

[担 当] 食総研・食品工学研究領域・食品高圧技術ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-7152

[区 分] 食品

[分 類] 技術・普及

[背景・ねらい]

食品業界において、微生物制御は極めて重要な課題の一つである。特に衛生管理の定量性、客観性が重要となってきた。加工食品の製造・流通条件の設定においては、細菌を増殖させない条件設定が求められることが多く、増殖曲線を得ることよりもむしろ環境条件の組合せによって対象とする細菌を増殖させないための条件を見出すことが重要である。対象とする細菌の増殖／非増殖条件を検索可能とするデータベースが多くの食品企業にとって重要な役割を果たすことが予想される。そこで、本研究では細菌の増殖／非増殖データを既存の国際予測微生物データベース ComBase (コンベース、<http://www.combase.cc/>) に収録されているデータから抽出して、食品産業界が要望しているデータを容易に検索可能とする新たな微生物挙動データベースを開発することを目的とする。

[成果の内容・特徴]

1. 開発したデータベース MRV (<http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J/>)では、種々の環境条件（温度、pH、水分活性）における各種細菌の増殖（●）／非増殖（○）データに加えて、対象となる細菌の増殖速度の情報を数理モデル化して等高線化したグラフを表現し、増殖／非増殖グラフと一体化した。これによって温度、pH、水分活性の各要因の組合せにおける増殖／非増殖条件を検索可能とするだけでなく、増殖の速さ（速度）に関する情報も同時に検索可能である（図1）。
2. 食品の種類毎に増殖／非増殖データが検索可能とただだけでなく、増殖速度を他の食品あるいは他の菌種と比較検討することも可能である（図2）。
3. 食中毒菌および腐敗菌を含む 29 種類の菌種、18 種類の食品群における各種微生物挙動データ約 3 万件に容易にアクセスでき、網羅的な検索も可能である。

[成果の活用面・留意点]

1. 食品産業において、データベースによる情報共有や予測モデルを活用した定量的な衛生管理を広く実施することで、無駄のない的確な消費・賞味期限の設定が可能となる。さらに、商品開発においては予測モデルを活用することで、材料処方から流通条件に至る製品設計を飛躍的に効率化することができ、開発コストの低減が期待される。
2. 食品産業界において微生物挙動に関する情報を共有することは、業界全体として安全性を確保していく上で極めて重要である。従来は文献情報による共有が限界であったが、本研究によって開発した MRV によって、効率的な情報共有が可能となる。
3. 本データベースは試験研究結果を元にして、数理モデルを構築してデータを提供しているため、実際に検索データを参照して食品の設計、製造、流通に反映させる際には事前に試験を行い検証することが必要不可欠である。

[具体的データ]

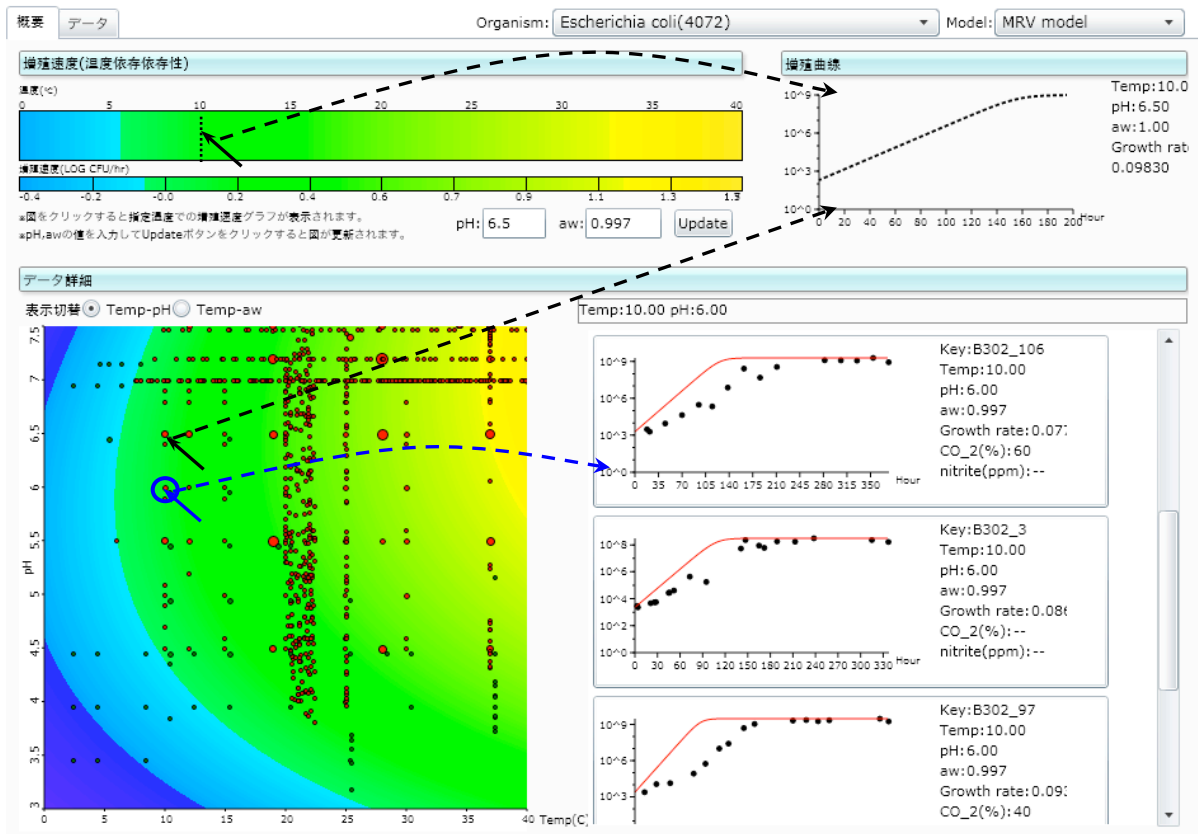


図 1 MRV による検索結果画面の例（大腸菌の培地環境におけるデータ）
等高線グラフ上（青：増殖速度低→黄：増殖速度高）でのポイントの動きに追従して増殖曲線をリアルタイムに描画、各ポイントをクリックで時間変化データを参照

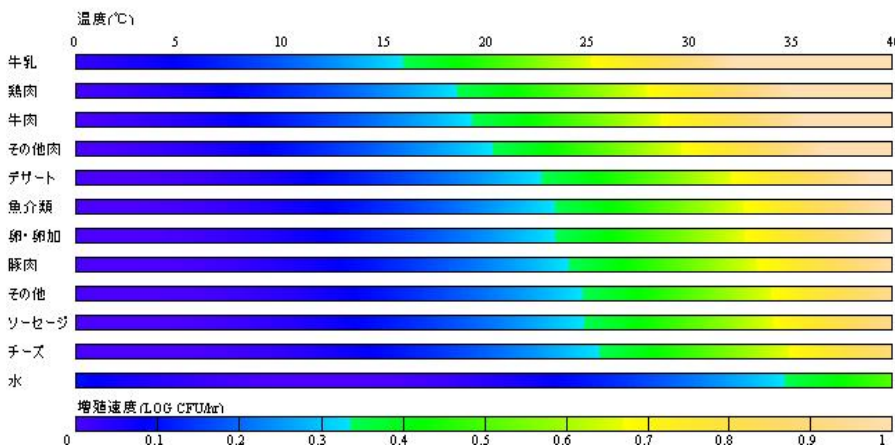


図 2 各種食品における増殖速度の温度依存性の検索結果の例（低温増殖性食中毒細菌 *L. monocytogenes* のデータ）

[その他]

研究課題名：予測モデルを活用した食品製造条件の最適化

中課題整理番号：323e

予算区分：食品健康

研究期間：2007~2009 年度

研究担当者：小関成樹

発表論文等：1) Koseki, S. (2009) Int. J. Food Microbiol., 134: 75-82.

2) Microbial Responses Viewer (MRV), <http://cbnfri.dc.affrc.go.jp/MRV-J/>

[成果情報名] 低濃度ストレプトマイシン耐性変異による微生物の有用物質生産能力増強

[要 約] 新規な低濃度ストレプトマイシン耐性変異である *rsmG* 変異は、バクテリアにおける有用物質（生理活性物質、酵素等）生産を活性化する。また、低濃度および高濃度ストレプトマイシン耐性を順次導入することにより、微生物育種を簡便に行うことが出来る。

[キーワード] 微生物生産、バクテリア、薬剤耐性変異、微生物育種

[担 当] 食総研・食品バイオテクノロジー研究領域・生物機能解析ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8124

[区 分] 食品

[分 類] 研究・普及

[背景・ねらい]

発酵産業に資する有用微生物の育種は、遺伝子工学技術の利用を除いて、従来、ランダムな変異導入を基本とした手法により行われてきたが、変異部位の特定および変異株の性状検討に膨大な手間と時間を要するという問題があった。

既に我々は、バクテリアに対してリボゾームを標的とした抗生物質ストレプトマイシンに対する耐性を付与することにより、リボゾームタンパク質 S12 に変異を導入、それにより蛋白質合成能を高めて生理活性物質、酵素等の有用物質の生産性向上を達成出来ることを報告している（文献 1）。本研究では、S12 変異株より低濃度のストレプトマイシンに対してのみ耐性を示す新規のストレプトマイシン耐性変異変異株が存在し、これらの株も有用物質生産能の向上が見られることを発見した。この低濃度ストレプトマイシン耐性変異の原因を探ると共に、本変異及び S12 変異を利用した簡便で効率的な微生物育種法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 放線菌のアクチノロージン（青色色素）生産性を指標としたスクリーニング系によりみいだした新規な低濃度ストレプトマイシン耐性変異は、バクテリアの有用物質生産能を著しく活性化する（図 1）。
2. 低濃度ストレプトマイシン耐性変異の染色体上の変異部位を、最新のゲノム解析法である CGS（comparative genome sequencing）法により探索すると、*rsmG* 遺伝子内に変異が見いだされ、この遺伝子は真正細菌 16S リボゾーム RNA において共通に見られる 7-メチルグアノシン（m⁷G）修飾に関わるメチル化酵素をコードしている（図 2）。
3. *rsmG* 変異によるストレプトマイシン耐性獲得メカニズムとしては、16S リボゾーム RNA の m⁷G 修飾の消失によるリボゾームのストレプトマイシンへの親和性の低下が考えられる。
4. *rsmG* 変異株のリボゾームも S12 変異株のそれと同様に高い蛋白質合成能を示す。
5. 低濃度ストレプトマイシン耐性変異である「リボゾーム RNA メチル化酵素 RsmG 変異」と高濃度耐性変異である「リボゾームタンパク質 S12 変異」の逐次的導入により、微生物育種を効率的に実施できる（図 3）。

[成果の活用面・留意点]

1. *rsmG* 変異による有用物質生産の活性化は、放線菌以外のバクテリアにおいても効果が期待できる。
2. *rsmG* 変異の取得はストレプトマイシンの最小生育阻止濃度（MIC）の 3~5 倍程度、S12 変異の取得は MIC の 10~50 倍程度の濃度において耐性株を選抜する。
3. 通常、低濃度ストレプトマイシン耐性株の 3~50% が *rsmG* 変異株であることから、本育種法では少なくとも 50 株程度の耐性株の検討が望ましい。

[具体的データ]

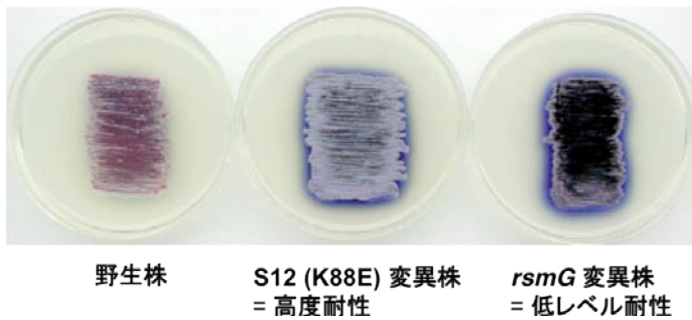


図1 ストレプトマイシン耐性変異によるアクチノロージン (青色色素)生産性の活性化

rsmG 変異により、S12 変異 (88 番目のリジンがグルタミン酸に置換) と同様にアクチノロージン生産が活性化される。

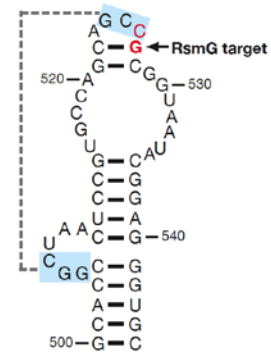


図2 RsmG によるメチル化部位

赤字で示した塩基はストレプトマイシンと結合する。

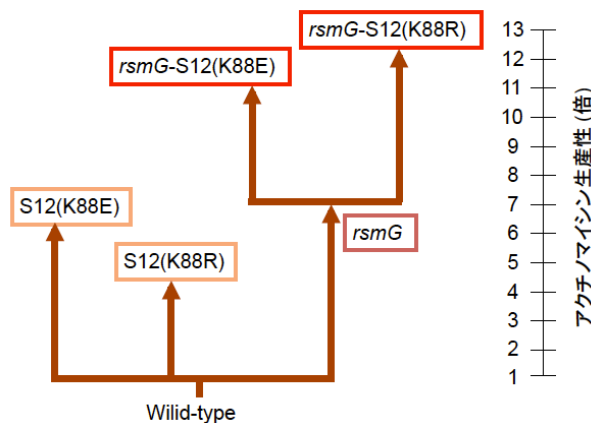


図3 *rsmG* 及び S12 変異の導入によるアクチノマイシン生産菌の育種

rsmG 変異及び S12 変異 (88 番目のリジンがグルタミン酸またはアルギニンに置換) を順次導入することにより、アクチノマイシン生産が 10 倍以上に活性化される。

[その他]

研究課題名：バイオテクノロジーを利用した新食品素材の生産技術の開発及び生物機能の解明・利用

中課題整理番号：313e

予算区分：基盤、科振調費、科研費

研究期間：2005～2009 年度

研究担当者：岡本晋、稲岡隆史、越智幸三

発表論文等：1) Ochi K. *et al.* (2004) *Adv. Appl. Microbiol.* 56:155-184

2) Okamoto S. *et al.* (2007) *Mol. Microbiol.* 63(4):1096-1106

3) Nishimura K. *et al.* (2007) *J. Bacteriol.* 189(10):3876-3883

4) Tanaka Y. *et al.* (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75(14):4919-4922

[成果情報名] 溶液 X 線散乱クロマトグラフィー法による食品に関連するタンパク質の特性解析

[要約] ゲル濾過クロマトグラフィーと溶液 X 線散乱法を組み合わせた測定法は、溶液中でタンパク質を分離すると同時に当該タンパク質の溶液中における構造情報をリアルタイムで獲得できる。

[キーワード] 生体高分子の溶液構造物性、溶液 X 線散乱法、クロマトグラフィー

[担当] 食総研・食品バイオテクノロジー研究領域・生物機能制御ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8115

[区分] 食品

[分類] 研究・普及

[背景・ねらい]

アレルギー性タンパク質や動物の消化管粘液糖タンパク質などの食品に関連するタンパク質の構造に関する情報は、食品の機能解析や農作物や食品中の機能性高分子物質の探索等に有用で、食品産業・農業における様々な分野での活用が期待される。これらのタンパク質は、会合体や複合体あるいは不定形で結晶化の困難なもの、または NMR 解析には適さない巨大分子であるものが多く、これらの構造解析手法として溶液散乱法の有効性が注目されている。しかし、溶液中のタンパク質は溶媒条件により多様な形状あるいは分子集合状態であるため、これらを分離と同時に溶液構造を評価する方法の開発が待たれている。本研究は、ゲル濾過クロマトグラフィーと溶液 X 線散乱法を組み合わせることにより、食品に関連するタンパク質をクロマトグラフィーで分離すると同時に溶液中の分子サイズ、分子量および分子鎖構造が評価可能であることを明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離溶出後、溶出液を濃度決定のための紫外吸光度計（あるいは示差屈折計）および構造評価のための放射光溶液 X 線散乱測定システムでオンラインモニターする（図 1）。
2. アレルギー性を有する会合性タンパク質である牛血清アルブミン（BSA）の本測定法の適用において、クロマト溶出液の溶液 X 線散乱時分割測定により得られた試料溶出時の散乱データの小角領域の解析より、単量体および各会合体の分子サイズ（回転半径）と分子量が評価できることがわかる（図 2）。
3. また、食品タンパク質である卵白アルブミン、大豆トリプシンインヒビターおよび卵白リゾチームについて、分子量と本測定法で得られた溶出時の散乱角ゼロの散乱強度 $I(0)$ を溶出試料濃度 C_p で除した値の直線的相関関係から（図 2 挿入図）、新規生体高分子物質の溶液中の分子量を溶出時間と関係なく評価できることが示唆される。
4. さらに、特定溶出位置の散乱データの解析から分離直後の分子鎖構造の評価が可能であり、消化管粘液糖タンパク質ムチン（分子量約 200 万）は、球状タンパク質である卵白アルブミンとは異なり、ランダムコイル構造を取っていることが明らかである（図 3）。

[成果の活用面・留意点]

1. この測定法を利用して、食品関連生体高分子の混合物を分離と同時に分子サイズ、分子量および分子鎖構造を評価することにより、溶媒条件や加工条件の変化にとまなう食品関連生体高分子の会合や解離あるいは複合体形成などの相互作用解析への応用が可能である。
2. 放射光溶液 X 線散乱測定装置は、高エネルギー加速器研究機構などの放射光施設において利用が可能である。また、本手法の適用可能性を広げるために、生体高分子を対象とした溶液 X 線散乱測定装置の高度化を進める予定である。

[具体的データ]

図1 溶液X線散乱クロマトグラフィー測定システムの構成

サンプルをHPLCゲル濾過カラムに注入し、紫外吸光度計およびX線散乱測定装置でモニターする。

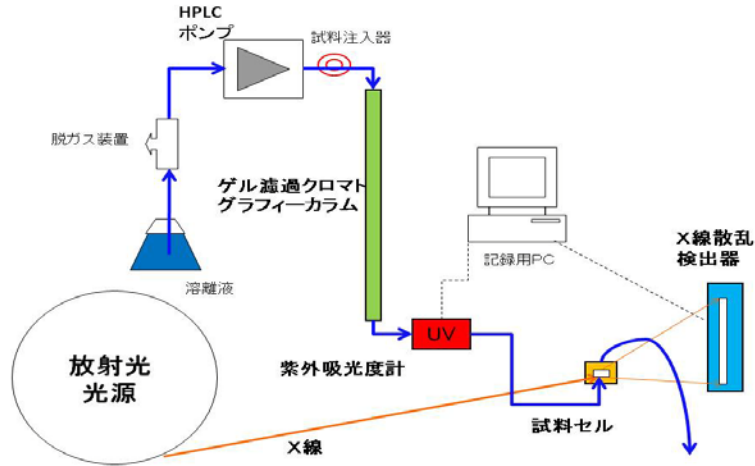


図2 アレルゲン性タンパク質牛血清アルブミン(BSA)のクロマトグラム

BSA(10mg)をHPLCゲル濾過カラム(Superdex 200, 600 X 16mm)に供した。溶液(50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7)中のBSAは少なくとも4種(高次会合体(A)、3量体(T)、2量体(D)、単量体(M))の構造を示す。

分子量既知の食品タンパク質試料について本手法を利用した際、分子量と角度ゼロにおける散乱強度 $I(0)$ を溶出試料濃度 C_p で除した値とは優れた相関を示す(挿入図)。

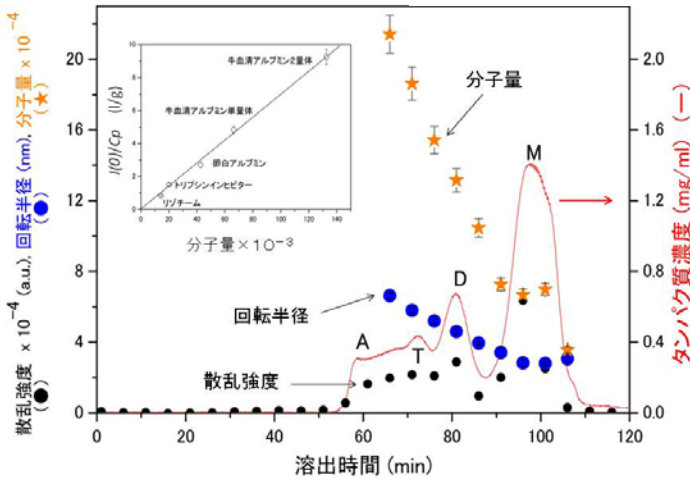
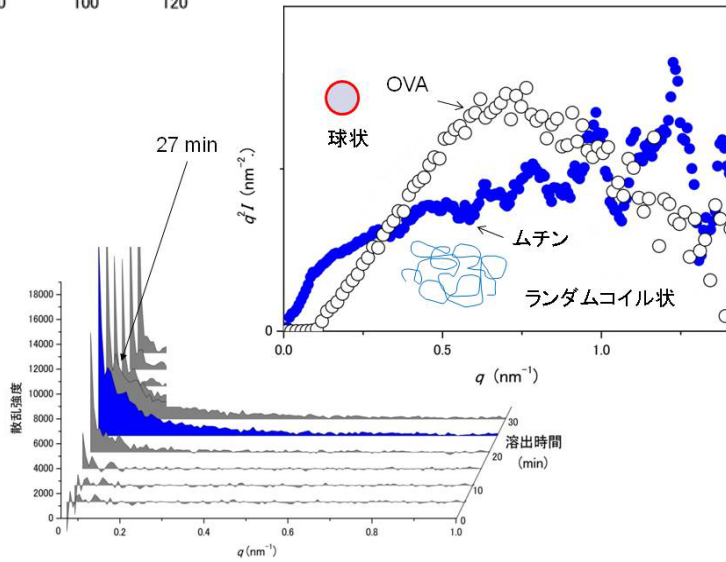


図3 消化管粘液糖タンパク質ムチンの散乱パターン

ムチン(5mg)をHPLCゲル濾過カラム(GF7MHQ, 300 X 7.5mm)に供した。

特定の溶出位置(27分)の散乱データ(青色部分)を、散乱ベクトル $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ 、 λ はX線波長、 2θ は散乱角)に対する q の2乗と散乱強度の積($q^2 I$)のプロット(●)から、溶液(50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7)中のムチンの構造はランダムコイル状であり、卵白アルブミン(OVA; ○)の構造についての同様の解析からは球状であることを示す。



[その他]

研究課題名：溶液散乱法によるタンパク質系素材から成る超分子形成の特性解明とその解析手法の開発

中課題整理番号：313e

予算区分：基盤

研究期間：2006年度～2009年度

研究担当者：渡邊康

発表論文等：Watanabe, Inoko (2009) J.Chromatogr.A 1216(44):7461-7465

[成果情報名] フランスパンの官能評価における標準的用語体系の確立

[要 約] 日本におけるフランスパンの標準的な官能評価用語体系を確立した。候補用語 96 語から、官能評価および多変量解析によって 23 語を選定し、定義と評価の方法を設定した。

[キーワード] 官能評価、フランスパン、評価用語、テクスチャー、味、におい

[担 当] 食総研・食品機能研究領域・食品物性ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8031

[区 分] 食品試験研究

[分 類] 研究・参考

[背景・ねらい]

近年の人気の高まりを反映して、フランスパンは多くのベーカリーショップで市販されている。しかし、フランスパンの官能評価法は確立されておらず、「黄金色の皮」「引きが強い」等の曖昧な表現で品質が評価されることが多く、商品開発、品質管理、販売の場での混乱の一因となっている。そこで、日本におけるフランスパンの官能評価における標準的な用語体系を確立する。

[成果の内容・特徴]

1. 東京都内で市販される多数のフランスパンを試料とし、フランスパンの専門家の官能評価によって、評価用語の候補リストを作成した。リストは 96 語で構成されており、外観 35 語、におい 37 語、味 4 語、テクスチャー 20 語である。
2. 候補用語 96 語から、市販フランスパンを試料とした官能評価と多変量解析によって、フランスパンのプロファイリングに有効な評価用語 23 語を抽出することができた。外観 11 語、におい 5 語、味 1 語、テクスチャー 6 語である（表）。あわせて、各用語の定義と評価の方法を表のとおりとする。
3. 様々な条件で調製した 23 種のフランスパンの官能評価の結果、表の 23 語が評価用語として妥当と考えられる。
4. 主成分分析の結果、23 語のうち 16 語はフランスパンの主要な官能特性に関わることが示唆される（表中の*）。

[成果の活用面・留意点]

1. 小麦粉、水、イースト、塩のみから調製されるフランスパンを対象とする。
2. 材料配合、ミキシング、発酵、焼成等の調製条件とフランスパンの品質との関係を調べる際に有効である。また、マーケティング、営業、販売等にも活用できる。
3. 表の 23 語は総合的なフランスパンのプロファイリングに有効であるが、例えば、においに特化した評価の場合、96 語から評価用語を再選定することが可能である。すなわち、96 語はフランスパン用語のデータベースとして用いることができる。
4. 主要な官能特性に関わる 16 語は、フランスパンの評価員の訓練等に有効である。

[具体的データ] 表 フランスパンのプロファイリングに有効な評価用語 23 語

	項目	定義・方法等
外観	クープの開き具合*	クープが勢いよく開いているか否か; [開いていない⇔しっかり開いている]
	のっぺりした感じ*	表面の凹凸が少なく人工的な感じがするか否か; [弱い⇔強い]
全体	断面の形*	断面の形が丸いか、底が平らで平べったいか; [丸い⇔平べったい]
	くすみ*	くすんだ感じか、鮮やかで透明感のある感じか; [ない⇔はっきり認められる]
クラスト	色ムラ*	数 cm の色の濃い部分がまだらに入っているか否か; [ない⇔はっきり認められる]

	焼き色の濃さ*	色ムラ、こげムラを除いた部分の焼き色の濃いか薄い;[薄い⇄濃い]
	ひびの大きさ*	表面のヒビが小さいか大きくて深いか(量の多さではない);[小さい⇄大きい]
	表面の気孔の状態	表面の気孔が小さいか大きい(量の多さではない);[小さい⇄大きい]
	クラストの厚さ	断面積に対するクラストの厚さ(底部は除く);[薄い⇄厚い]
クラム	グレー	クラムの色が白いかグレーか;[白⇄グレー]
	溶けた感じ*	クラムが溶けた感じがするか否か;[弱い⇄強い]
におい 全体	黒ビール*	黒ビール(標準見本;ギネス)のにおいがするか否か;[ない⇄強い] 方法:パン全体を押してにおいを出しながら評価する。紙袋に断面を上パンを入れ(袋上部はパンから約5cm)、袋上部を開けてにおいを嗅ぐ。
	カラメル*	カラメル(標準見本;グラニュー糖100:水5のカラメル)のにおいがするか否か;[ない⇄強い] 方法:クラスト部分のクープ周辺("jet")を嗅いで評価する。
クラスト	焼き栗*	焼き栗(標準見本;天津甘栗)のにおいがするか否か;[ない⇄強い] 方法:パン側面のクラストを嗅いで評価する。
	ナッツ*	ナッツ(標準見本;殻付きヘーゼルナッツ)のにおいがするか否か;[ない⇄強い] 方法:パン側面のクラストを嗅いで評価する。
	糊化でんぷん	でんぷん(標準見本;白飯)のにおいがするか否か;[ない⇄強い] 方法:パンの切り口のクラムのみを嗅いで評価する。
味 クラム	甘味	甘味がするか否か(標準見本;ぶどう糖溶液1.0%=3.0, 2.0%=9.0);[ない⇄強い] 方法:鼻をつまんでクラムを食べて評価する。
	テクスチャー クラスト	歯切れ*
噛み応え*		10回噛むのに必要な力の総量が大きい小さい;[ない/ある] 方法:クラスト試料(2cm角)を奥歯で10回噛む。10回噛むのに必要とした力の総量を評価する。
クラム	しっとり感*	パンの断面を指で撫でてパサパサしているかしっとりしているか;[パサパサ⇄しっとり] 方法:3cm幅にスライスしたパンの断面のクラムを人差し指で触って評価する。
	かたさ*	パンの断面を指で押して変形させるのに必要な力が大きい小さい;[やわらかい(力が小さい)⇄かたい(力が大きい)] 方法:3cm幅にスライスしたパンの断面のクラムを人差し指で押して評価する。
	弾力	クラムを軽く奥歯で噛んで変形させ、離れたときに変形がどの程度戻ろうとするか;[弱い⇄強い] 方法:1辺2cmの立方体のクラム試料を奥歯でゆっくり80%くらいまで圧縮し、その後、歯を離して評価する。
	くちやつき	咀嚼しているときに口中で液状になるのが早い遅い;[早い⇄遅い] 方法:1辺2cmの立方体のクラム試料を奥歯で約20回咀嚼してから判断する。噛み方は特に指定しない。

補足 クラスト:外側の着色した硬化部分 クラム:内部の柔らかい部分 クープ:パン表面のカッティング

【その他】

研究課題名:高性能機器及び生体情報等を活用した食品評価技術の開発

課題 ID:313-f

予算区分:交付金、科研費、生研センター

研究期間:2004~2009年度

研究担当者:早川文代、鵜飼奈緒子(日仏商事)、西田純司(日仏商事)、風見由香利、神山かおる

発表論文等:Hayakawa, et al. (2010) *J. Sensory Studies*, 25(1), 76-93

[成果情報名] NMRによるR型レクチンC末端ドメイン糖結合部位の結合活性測定

[要約] 通常のNMR滴定実験法及び今回改良を行ったNMR滴定実験法を用いることで、R型レクチンC末端ドメインの同一分子内に存在する2つの糖結合部位それぞれに対する糖結合活性を同時に測定することに成功した。

[キーワード] 核磁気共鳴法、NMR、レクチン、糖、結合活性

[担当] 食総研・食品分析研究領域・状態分析ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8033

[区分] 食品試験研究

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

R型レクチンファミリーと呼ばれる糖認識ドメインは、 β -trefoilという共通の構造を持つにもかかわらず、そのリガント結合活性はさまざまであり、しかもその機能は多岐にわたることが知られている。その糖鎖認識メカニズムを解明することは、その機能を知る上で重要であるとともに、グライコプロテオミクスにおける糖鎖プロファイラーや糖鎖・糖タンパク質関連のバイオマーカーの開発等への基盤研究としても重要である。R型レクチンファミリーに属するタンデムリピート型タンパク質のレクチンは、一般に、単独ドメインでは赤血球凝集活性を持たないと考えられているが、ここで用いたR型レクチンC末端ドメイン(EW29Ch)は、単独ドメインでも赤血球凝集能を持つ。そこで本研究においては、R型レクチンファミリーの糖鎖認識メカニズム解明のために、EW29Ch中に存在する2つの糖結合部位それぞれの糖結合活性を核磁気共鳴(NMR)法により測定した。

[成果の内容・特徴]

1. NMR滴定実験法により、EW29Chは分子内に2つの糖結合部位(α 糖結合部位と γ 糖結合部位)を持ち、それぞれラクトースとの結合において異なる化学交換速度(α 糖結合部位は遅い交換、 γ 糖結合部位は速い交換)を持つことがわかった(図1)。この糖結合部位は、最近報告されたEW29Ch-ラクトース複合体のX線結晶構造で示された2つの糖結合部位と一致する。結晶構造では、糖との相互作用において2つの糖結合部位でほとんど差が見られなかったが、今回のNMR滴定実験では2つの糖結合部位において化学交換速度に大きな違いが認められた。
2. 速い化学交換を示す γ 糖結合部位の糖結合活性については、通常のNMR滴定実験法により解離定数(=1/結合定数)を求めた。一方、遅い化学交換を示す α 糖結合部位については通常のNMR滴定実験法で糖結合活性を算出することは難しかった。そこで、タンパク質濃度を常法に比べ非常に低くして測定を行ったが、低濃度でのシグナル強度低下によって解離定数を求める式へのフィッティングが良くなかったことから、その式から得られる解離定数の理論曲線を用いることにより α 糖結合部位の解離定数を算出した(図2)。その結果、2つの糖結合部位においてラクトースに対する糖結合活性が約100倍違うことがわかった(表1)。
3. 飽和移動差(STD)-NMR法により、EW29Chに対する糖の相互作用部位(エピトープ)を解析することができた(図3)。この結果は、上記の複合体X線結晶構造から得られた糖のエピトープとほぼ同じであった。

[成果の活用面・留意点]

1. 通常のNMR滴定実験法に加えて、今回改良を行ったNMR滴定実験法により、同一分子内に存在する化学交換速度の異なる複数のリガント結合部位のそれぞれのリガント結合活性を同時に算出することができる。但し、強い結合活性(解離定数がnM以下の場合)を持つリガントに対しては適用できない。

[具体的データ]

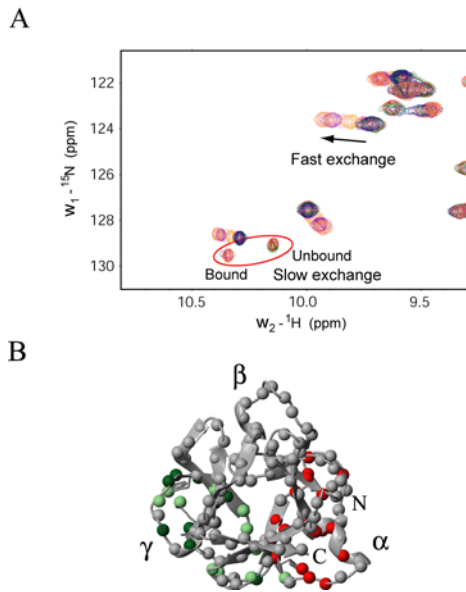


図1. (A) EW29Chにラクトースを添加した時のNMR滴定実験におけるHSQCスペクトルの変化。速い交換を示すシグナルと遅い交換を示すシグナルが観測された。

(B) すでに報告されているEW29Chの結晶構造

(PDB:2ZQN)に、今回NMR滴定実験でシグナルが変化した残基をマッピングした構造の図。赤は、遅い交換、緑は速い交換が見られた残基を示す。

表1. NMR滴定実験法により算出した α 糖結合部位及び γ 糖結合部位の各種糖に対する解離定数 (K_d)。なお、 α 糖結合部位とガラクトースの結合では、中間の化学交換を示すことから、 K_d を算出できなかったため、概算で表す。

糖	K_d (mM)	
	α 糖結合部位	γ 糖結合部位
ラクトース	0.01-0.07	2.66 ± 0.30
ガラクトース	$\sim 10^{-1}$	3.89 ± 0.37
メチル β -D-ガラクトピラノシド	0.02-0.08	2.88 ± 0.21

[その他]

研究課題名：核磁気共鳴 (NMR) 法を用いての有用タンパク質の構造及び分子間相互作用解析による機能の解明

中課題整理番号：313f

予算区分：科研費

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：逸見光、久野敦 (産総研・糖鎖医工学研究センター)

発表論文等：H. Hemmi, A. Kuno, et al. (2009) FEBS J. 276 (7), 2095-2105

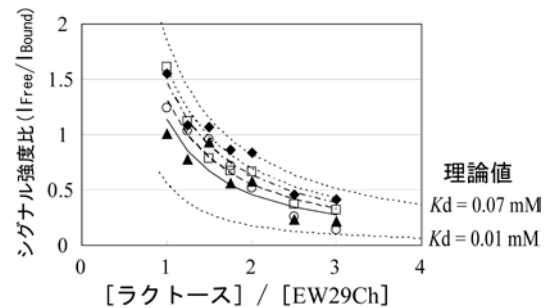


図2. 今回改良したNMR滴定実験法によるEW29Chの α 糖結合部位とラクトースとの ^{15}N - ^1H HSQCスペクトル解析の結果。ラクトース添加に伴う α 糖結合部位中の各残基(アスパラギン酸-18 (□)、セリン-28 (▲)、トリプトファン-33 (◆)、グルタミン-44 (○))の遊離状態と結合状態とのNMRシグナル強度比の変化と $K_d = 0.01\text{mM}$ または $K_d = 0.07\text{mM}$ とした場合の解離定数を求める式から得られた理論曲線。

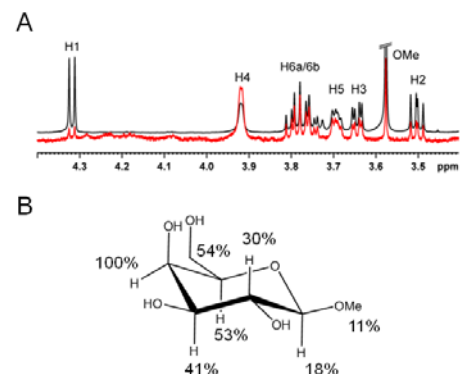


図3. (A) メチル β -D-ガラクトピラノシド (β -Me-Gal) とEW29Chの混合溶液の1次元STD-NMRスペクトル(赤)とプロトンNMRスペクトル(黒)。(B) β -Me-Galの構造にSTD-NMRスペクトルで一番大きなシグナル(H4プロトン)を100%としたときの各シグナルの相対強度をマッピング。相対強度が高い程、EW29Chとの相互作用が強い。

[成果情報名] コクゾウムシの越冬生態と水分の関係

[要 約] コクゾウムシ成虫が玄米貯蔵庫で秋季に倉庫から脱出することを確認し、それを実験的に再現した。また、コクゾウムシ成虫は水を与えると越冬が可能であることを明らかにした

[キーワード] コクゾウムシ、貯穀害虫、越冬、米貯蔵

[担 当] 食総研・食品安全研究領域・食品害虫ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8081

[区 分] 食品試験研究

[分 類] 技術・参考

[背景・ねらい]

貯蔵米の大害虫であるコクゾウムシの成虫は、秋季に倉庫から脱出して越冬すると古くから言われているが、詳細な情報はない。本研究ではコクゾウムシの周年での行動の変化を把握し、コクゾウムシ成虫の越冬行動と水分との関連性を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. 茨城県内の玄米貯蔵庫において、冬季のコクゾウムシ成虫（図 1A）の活動を調査したところ、11 月頃にベイトトラップ（玄米を金網に入れたもの）よりもスティッキートラップ（粘着板）で採集されるようになった（図 2）。これは越冬前にコクゾウムシ成虫の生理状態が餌探求型から越冬場所探索型にシフトしたためだと思われる。また、4 月頃から越冬を終えた成虫が再び餌探求型にシフトし、ベイトトラップで成虫が採集された。冬季には貯蔵庫のそばに置かれているブロックの下などから越冬している成虫を採集できた。
2. モデル試験としてスチール製倉庫に実験容器を置き、その容器内に卵～蛹約 126 頭、成虫 32 頭を含む玄米を入れた容器と水分を補給した隠れ場所を設置したところ、11 月頃から米の入った容器から脱出する成虫が観察された（図 3）。
3. このコクゾウムシ成虫の越冬行動と水分との関連性を明らかにするために、コクゾウムシ、コクゾウムシと同属近縁種のコクゾウムシ（成虫では越冬できないと言われているが詳細な情報はない）、別属のコクヌストモドキ（成虫が樹皮下で越冬することが確認されているが貯蔵庫内での越冬率は不明；図 1B）の成虫の冬季の生存率を、水を与えた条件と水を与えない条件で調査した。一実験区当たりの成虫は 30 頭で、水は管瓶を加工した給水器で与え、成虫の餌として玄米を設置した。コクゾウムシでは水を与えた場合は 2 / 3 程度が越冬できたが、水を与えなかった場合は 3 月の調査ですべての成虫が死亡していた。コクゾウムシは水の存在に関わらず、2 月の調査ですべての成虫が死亡していた。コクヌストモドキでは水の存在に関わらず、少数が越冬した。コクゾウムシとコクヌストモドキではその後、一部の成虫は生存し続け、1 年以上生存するものもいることが明らかになった（図 4）。

[成果の活用面・留意点]

1. コクゾウムシが貯蔵庫を脱出しようとする行動や水分を要求する特性を利用した殺虫法の開発が可能である。
2. 水分を与えると越冬が可能である理由は現時点で不明である。

[具体的データ]

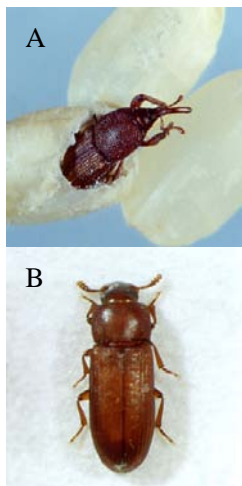


図1 コクゾウムシ成虫 (A) とコクヌストモドキ成虫 (B)

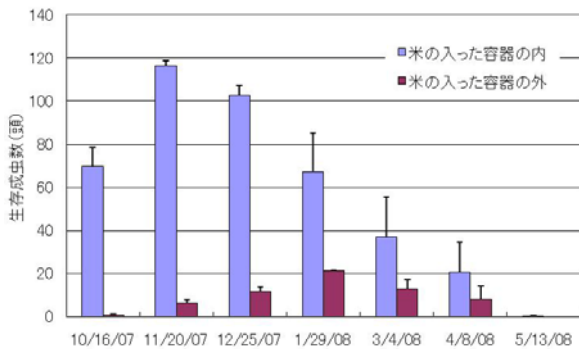


図3 スチール製倉庫内におけるコクゾウムシ成虫の生存数と生息場所

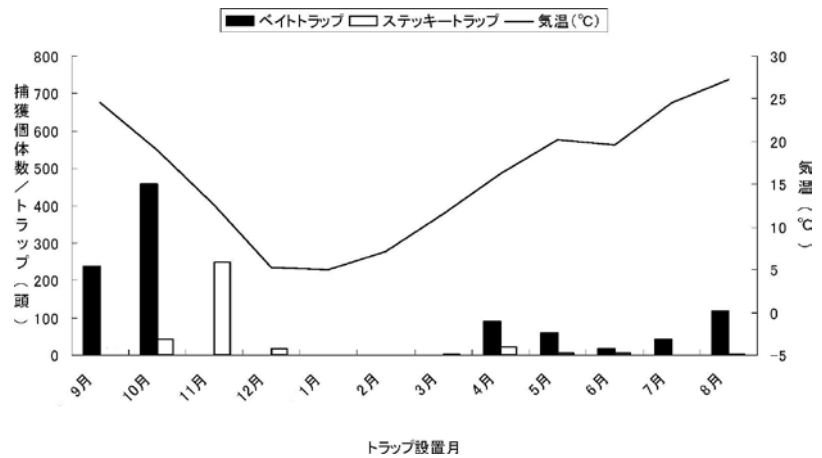


図2 茨城県内の玄米貯蔵庫におけるコクゾウムシ成虫のトラップ別周年捕獲数

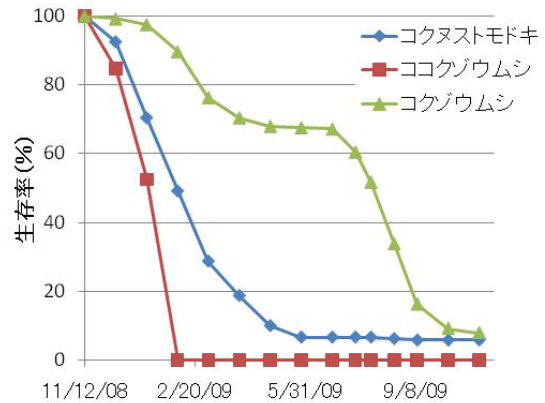


図4 水分を与えた場合の3種の貯穀害虫の生存率

[その他]

研究課題名：食品害虫の生態解明とそれを利用した防除技術の開発

中課題整理番号：323e

予算区分：基盤

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：今村太郎、宮ノ下明大、松阪守（国際衛生株式会社）、峯岸利充（国際衛生株式会社）、石向稔（国際衛生株式会社）、中北宏（つくば防虫協議会）

発表論文等：松阪ら（2009）家屋害虫、31(1): 27-36.

[成果情報名] 直播栽培法による道産水稻品種「ほしまる」のタンパク質含量の低減と品質特性

[要約] 北海道の水稻栽培地域において、乾田直播法および湛水直播法により生産した「ほしまる」は、移植栽培法よりタンパク質含量が低減しており、かつ良質である。

[キーワード] 乾田直播、湛水直播、水稻品質、タンパク質

[担当] 食総研・食品素材科学研究領域・穀類利用ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8045

[区分] 食品試験研究、北海道農業・水田・園芸作

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

北海道内の良質水稻の生産地域において、栽培における省力、高効率、低コスト化のために直播栽培の導入が検討されている。作業効率が高い乾田直播栽培法および湛水直播栽培法により生産した直播用水稻品種「ほしまる」のタンパク質含量、アミロース含量、主食利用における米飯の品質特性を解明することを目的とする。

[成果の内容・特徴]

1. 湛水直播法の栽培による「ほしまる」のタンパク質含量は、深川、中富良野および岩見沢地区において、移植法栽培におけるものに対して低い。他方、乾田直播法栽培によるタンパク質含量は、追肥を実施した一部の栽培区で含量が上昇するが、概して移植法栽培に比べて低い(表1)。
2. 「ほしまる」の品質特性を乾田直播法、湛水直播法および移植法ごとの測定平均値を基にタンパク質含量、アミロース含量、米飯外観の評価値(炊飯食味値)、米飯の物性値である硬さ、粘り、米飯の表層老化度について、国内一般粳米の物理化学特性データベース*と比較・検証した(図1)。
 - タンパク質含量は、国内平均値に対して移植法が有意に高く、次いで、乾田直播法、湛水直播法の順で、湛水直播法は国内平均値よりやや高い水準である。
 - アミロース含量は、国内の一般粳米平均値よりも総じてやや高いが、栽培法による有意な含量の違いは見られない。
 - 米飯外観の評価値である炊飯食味推定値は、湛水直播法、次いで乾田直播法において高く、移植法の一般道内産品種よりも高く、米飯の外観品質が良質に類する。
 - 米飯の物性は、全国の平均値に対して、移植法では米飯の粘りが弱い。他方、湛水直播法では、米飯の硬さと粘りが全国の平均値と同等であり、乾田直播法では、硬さが同等で粘りがやや弱い。
 - 米飯保蔵時の表層の硬くなりやすさ(冷ご飯へのなりやすさ)を推定する米飯の表層老化度は、道内産のやや低アミロース米である「おぼろづき」が低く、耐老化性が高いといえるが、「ほしまる」は低アミロース米に次いで低い。

*国内一般粳米の物理化学特性データベース(農林水産省委託プロ 加工業務プロにおいて構築中)

[成果の活用面・留意点]

1. 「ほしまる」は米飯外観品質および米飯の物性とも良質であり、さらに道内産一般粳米の中でも耐老化性が優れる品種である。用途は家庭用および業務用飯米が考えられる。
2. 乾田直播法および湛水直播法栽培時の施肥管理法は、精米タンパク質含量の変動要因となる。

[具体的データ]

表1 「ほしまる」の精米タンパク質含量

栽培法	栽培地	N	平均値	最大値	最低値
移植	計	17	7.7	9.0	6.5
	上川農試・比布圃場	2	7.7	8.8	6.5
	北農研・札幌圃場	3	7.8	9.0	6.6
	岩見沢現地	12	7.7	8.0	7.3
乾田直播	計	13	7.2	9.2	5.3
	上川農試・比布圃場	4	7.2	7.4	7.1
	北農研・札幌圃場	1	7.9	-	-
	北農研・美唄圃場	2	8.8	9.2	8.4
	当麻現地	3	7.0	7.7	6.1
	深川現地	2	6.8	7.3	5.9
	剣淵現地	1	7.3	-	-
	追肥				
湛水直播	計	91	6.8	8.0	5.3
	上川農試・比布圃場	41	6.6	7.5	5.3
	深川現地	26	7.1	7.7	5.8
	中富良野現地	6	6.6	7.9	5.7
	西神楽現地	2	7.5	8.0	6.9
	岩見沢現地	8	7.1	7.9	6.5
	岩見沢現地	8	7.3	8.0	6.7
	落水出芽 作溝湛水散播				

※ タンパク質含量は、燃焼法による窒素含量の測定(Leco, FP-528を使用)から、窒素-タンパク質換算係数5.95を乗じて求めた。
試験区ごとに3回測定した平均値を使用した。

※ 2007年産および2008年産の試験米についての測定値を栽培地ごとに集計した。Nは試験区の数を示す。

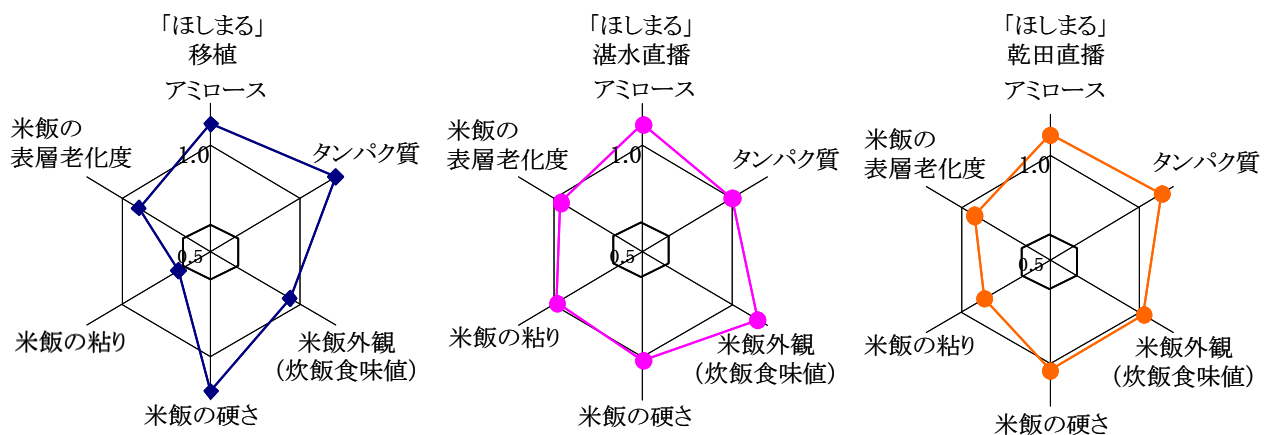


図1 品質特性の比較

- ・アミロース:内側ほど含量が低いことを示す。米飯の物性および食味に影響する。
- ・タンパク質:内側ほど含量が低いことを示す。米飯の物性および食味に影響する。
- ・米飯外観(炊飯食味値):外側ほど米飯の外観評価が良い。
- ・米飯の硬さ:外側ほど米飯が硬いことを示す。
- ・米飯の粘り:外側ほど米飯の粘りが強いことを示す。
- ・米飯の表層老化度:内側ほど米飯保蔵時に表層が硬くなりにくい特性を有する。
- ・黒線(外側)は、国内の良質一般粳米の平均値を示す(一般粳米の物理化学特性のデータベースに基づく)。
- ・移植法、湛水直播法および乾田直播法の栽培法ごとの試験米の測定結果の平均値により比較。

[その他]

研究課題名：先端技術を活用した食品の加工利用技術の開発

中課題整理番号:313d

予算区分：交付金プロ(北海道水稻・野菜営農)

研究期間：2007～2009年度

研究担当者：鈴木啓太郎、大坪研一(新潟大)

[成果情報名] 微粒化米粉の粉体特性

[要約] 気流式粉砕機等を用いて調製した平均粒径が3～30 μm の微細な米粉の流動性は伝統的な米粉と比較して低く、利用時には加工機械内部における詰まりに注意する必要がある。

[キーワード] ジェットミル、ハンマーミル、Carrの流動性指数、粒子形状

[担当] 食総研・食品工学研究領域・製造工学ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8029

[区分] 食品試験研究

[分類] 技術・参考

[背景・ねらい]

近年、米粉利用への関心の高まり及び微粉砕技術の進展により、微粉砕による新たな米粉の用途創出への期待が高まっている。しかしながら粉体は粒子径が小さくなるにしたがい流動性が低下することが指摘されており、微粉砕された米粉を使用する際には加工機械内部におけるブリッジ、ラットホールなどの粉体の架橋・閉塞や、取扱い時における飛散が発生する危険性が懸念される。これらの問題に対処するための加工機械の仕様・性能選定の指標として、微粉砕された米粉の流動性及び噴流性の評価が求められている。

[成果の内容・特徴]

1. 粉砕条件を調整することにより、気流式粉砕機（ジェットミル）にて平均体積粒径約3、15、30 μm 、衝撃式粉砕機（ハンマーミル）にて平均体積粒径約30、60、100 μm の粳米（コシヒカリ）玄米および精米ならびに糯米（マンゲツモチ）精米を原料とした米粉を調整した（図1）。
2. 平均粒径が約15 μm までは粒径が小さくなるにしたがい、米粉の流動性は低下するが、平均粒径15 μm 以下では米粉は取扱い中に凝集粒子塊を形成するため流動性が低下しない（図2）。
3. 同程度の平均粒径の米粉であれば、ジェットミルにて粉砕された米粉の流動性はハンマーミルにて粉砕されたものと比較して高く、米粉の粉体特性は粉砕方法に影響される。粒子形状は粒径が小さくなるに従い丸みを帯びる（図3）。
4. 平均粒径30 μm 以下に微粉砕された米粉の流動性は、上新粉と比較すると極めて低く（図2）、従来の米粉を原料として使用している加工ラインにおいては問題を生じる危険性が懸念されるが、小麦粉と比較すると流動性は同程度であり、小麦粉を原料として使用している加工ラインに、代替原料として微粉砕された米粉を使用する際には問題が発生する可能性は低い。
5. 平均粒径30 μm に微粉砕された米粉の噴流性は従来の米粉と明確な違いは見られないが、分散性は向上する。微粉砕された米粉には強い発塵性が懸念されることから作業員による吸引や粉塵爆発などに対して注意を払う必要がある。

[成果の活用面・留意点]

1. 微粉砕された米粉を加工食品原料として用いる際の機器の仕様選定において、機器内面にコーティングが必要であるかどうか、振動ホッパーが必要であるかどうかなどの判断に、流動性指数のデータを活用することができる。
2. ここで示された流動性指数は水分が10～14%の米粉についてのものであり、高水分の米粉を用いる際には別途検討が必要である。

[具体的データ]

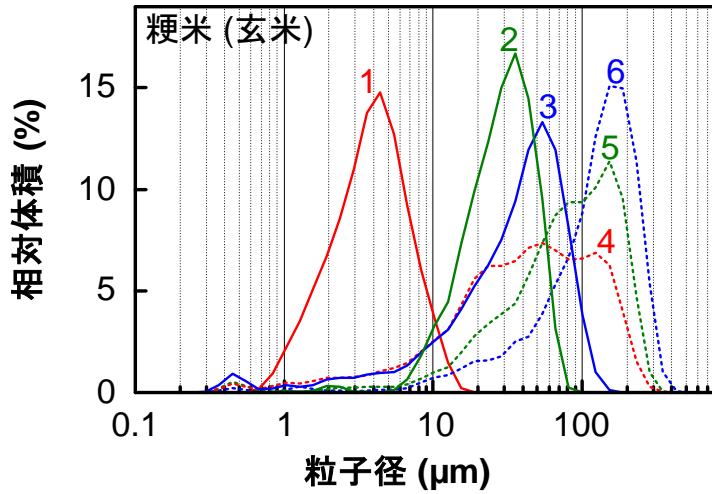


図1 米粉の粒度分布（粳米玄米）

粉碎方法および平均粒径は

1. ジェットミル、3.4 μm
2. ジェットミル、16.5 μm
3. ジェットミル、26.6 μm
4. ハンマーミル、33.0 μm
5. ハンマーミル、61.5 μm
6. ハンマーミル、94.2 μm

（粳米精米および糯米精米においてもほぼ同様）

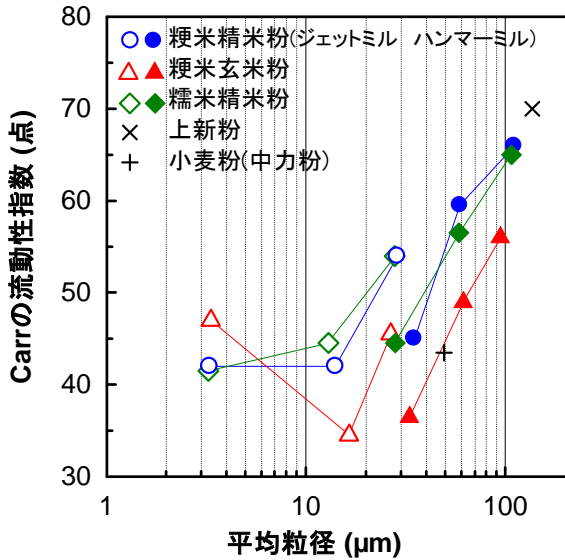


図2 粉碎方法および平均粒径による米粉の流動性指数の変化ならびに上新粉および小麦粉（市販品）の流動性指数

図3 粉碎方法および平均粒径による米粉の粒子形状の違い（粳米精米）

[その他]

研究課題名：先端技術を活用した食品の加工利用技術の開発

中課題整理番号：313d

予算区分：食品ナノ

研究期間：2007～2009年度

研究担当者：岡留博司、竹中真紀子、五月女格、五十部誠一郎

発表論文等：五月女格ら（2009）日本食品工学会誌 10（2）:95-106

[成果情報名] 膜分離工程の最適化のための浸透圧-吸着抵抗モデルを用いた解析

[要 約] 浸透圧-吸着抵抗モデルを適用することにより、種々の条件下で卵白アルブミンを限外ろ過した際の透過流束を推算することができ、透過流束を規定する要因が、膜面における浸透圧の上昇と溶質吸着による透過抵抗の増大であることが明らかとなった。

[キーワード] ゲル層、限外ろ過、浸透圧、溶質吸着、卵白アルブミン

[担 当] 食総研・食品工学研究領域・反応分離工学ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-7323

[区 分] 食品試験研究

[分 類] 技術・参考

[背景・ねらい]

タンパク質溶液の限外ろ過における分離性能を規定している要因が、ゲル層形成であるのか、あるいは膜面近傍における浸透圧の上昇であるのかという、学界での長年の疑問を解決するため、様々な条件下で卵白アルブミン水溶液の限外ろ過実験を行い、透過流束および溶質阻止率の挙動を解析する。その結果をもって、膜分離工程の最適化に資する。

[成果の内容・特徴]

1. 未処理の卵白アルブミン溶液と遠心分離処理した卵白アルブミン溶液を限外ろ過した際の透過流束は、いずれの場合も浸透圧-吸着抵抗モデル（膜面での浸透圧の上昇と溶質吸着による透過抵抗の増大とを考慮）により良好に推算できた（図1）。未処理の溶液の場合には、ゲル層が形成されるのに対し、遠心分離した溶液では、ゲル層は形成されなかった。このことから、膜面上に観察されるゲル状の堆積層は、変性した卵白アルブミンの凝集物により形成されるものであることが明らかとなった。また、透過流束を規定する主たる要因が、膜面上におけるゲル層形成ではなく、膜面近傍での浸透圧の上昇と溶質吸着による透過抵抗の増大であることが明らかになった。
2. 精密濾過膜を用いて同様の実験を実施したところ、ゲル層が観察された未処理の卵白アルブミン溶液においては阻止率は1に近い値を示し、透過流束は浸透圧-吸着抵抗モデルで推算される値にほぼ一致した。一方、ゲル層が観察されなかった遠心分離処理後の溶液では、透過流束は、モデルによる推算値より極めて大きなものになった（図2）。このことから、ゲル層は、卵白アルブミン自身に対する阻止性能を有しているものの、溶媒の透過に対しての抵抗にはならないことが明らかになった。
3. 溶質の膜への吸着の影響を検証する実験では、ろ過することにより卵白アルブミン溶液を限外ろ過膜の細孔内に送り込むことによって、単に膜を浸漬するよりも吸着平衡に到達するまでの時間が短縮されたが、最終的な透水性（純水透過流束：PWF）には、違いが見られなかった（図3）。このことから、膜細孔内での溶質吸着が、膜の透過抵抗に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

[成果の活用面・留意点]

1. タンパク質の限外ろ過における膜分離性能（透過流束および溶質阻止率）を規定する要因が明らかとなったことは、効率的な膜分離システムを構築する上での対応方針の策定に有用である。
2. 浸透圧-吸着抵抗モデルは、フィッティング・パラメータ用いることなく透過流束を推算することができるため、その汎用性は高い。
3. 浸透圧-吸着抵抗モデルの活用のため、各種溶液の浸透圧データの蓄積が必要である。

[具体的データ]

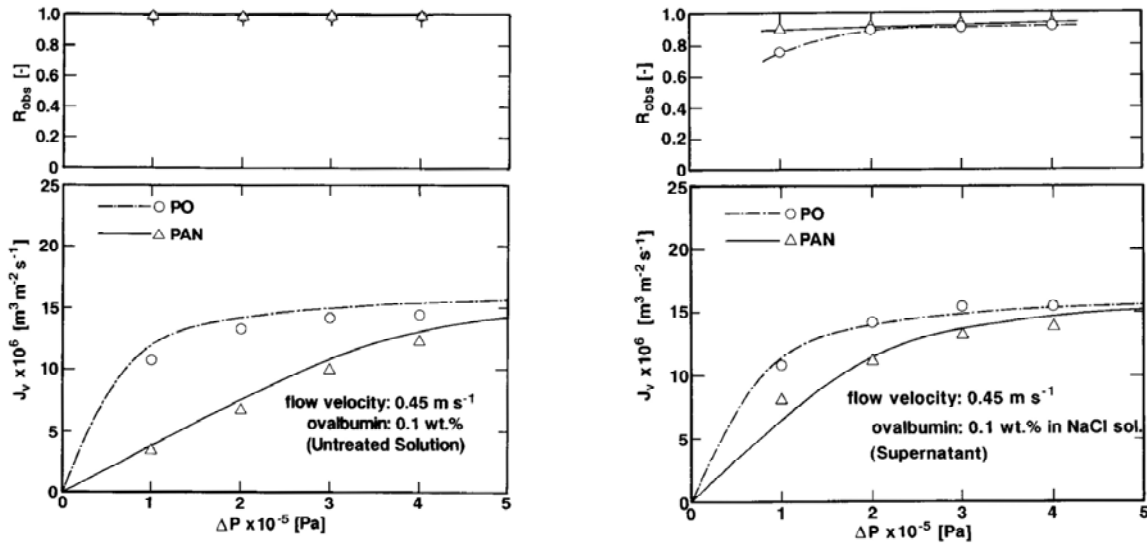


図1 卵白アルブミン溶液を限外ろ過処理した際のろ過圧力 ΔP と透過流束 J_v および見かけの阻止率 R_{obs} との関係（左図は未処理の溶液、右図は遠心分離処理した溶液。PO はポリオレフィンを素材とする膜、PAN はポリアクリロニトリルを素材とする膜。図中のプロットは、実験結果を示す。また、図中の曲線は、浸透圧-吸着抵抗モデルを用いて得られた推算値を表す。）

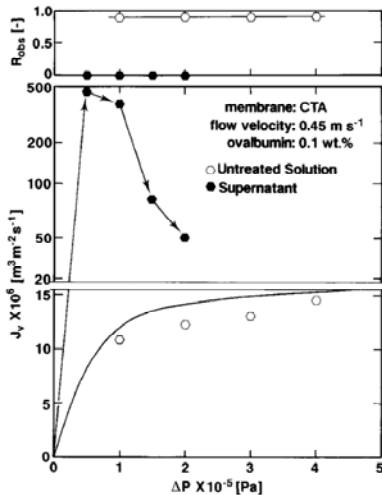


図2 卵白アルブミン溶液を精密ろ過処理した際のろ過圧力 ΔP と透過流束 J_v および見かけの阻止率 R_{obs} との関係（図中の白プロットおよび黒プロットは、それぞれ未処理および遠心分離処理後の溶液での実験結果を示す。また、図中の曲線は、浸透圧-吸着抵抗モデルを用いて得られた推算値を表す。）

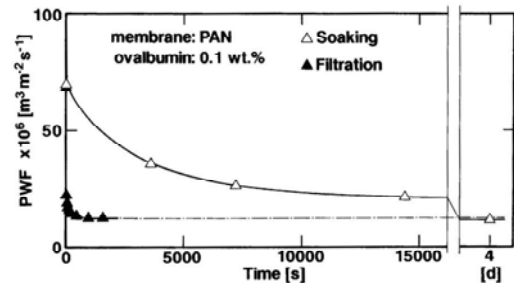


図3 卵白アルブミン溶液への浸漬処理と卵白アルブミン溶液のろ過処理での限外ろ過膜の透水性（純水透過流束：PWF）の変化

[その他]

研究課題名：高度微細膜分離システムの構築

中課題整理番号：313d

予算区分：基盤

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：鍋谷浩志、蘆原昌司

発表論文等：H. Nabetani *et al.* (2009) *Food Sci. Technol. Res.*, **15** (3) 225-232.

[成果情報名] 原子間力顕微鏡用樹脂探針の作製による迅速アレルギー検出技術の開発

[要約] 原子間力顕微鏡を用いた食品中のアレルギーを検出する技術を開発するためにマイクロ光造形法による樹脂探針を試作することで、多くの分子の計測が可能となる。

[キーワード] 原子間力顕微鏡 (AFM)、アレルギー、マイクロ光造形法、樹脂探針

[担当] 食総研・食品工学研究領域・ナノバイオ工学ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8054

[区分] 食品試験研究

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope;AMF) の微弱力検出機能を応用し、食品中のアレルギーを迅速に検出する技術の開発を進め、アレルギータンパク質と抗アレルギー抗体の微弱な相互作用力を検出することに成功した。今年度は、存在比の少ないアレルギー分子の検出効率を向上のため、先端面積の大きな樹脂製探針を開発し、その評価を行なった。本技術は、将来的に生産工程におけるアレルギー検査などへの応用が考えられる。

[成果の内容・特徴]

1. 通常の市販金被覆 AFM 探針に抗アレルギー抗体を結合させ、探針と試料の間に働くピコニュートンの相互作用力を検出することに成功した (図 1)。
2. 計測は位置を移動しながら 200~300 回の相互作用力計測を行い、統計的にアレルギーの有無を判別するが、これに要する時間は解析まで含めて 5~10 分程度である。また、抗体固定探針は、使い捨てでなく、繰り返し使用が可能である。
3. モデル系タンパク質 (フェリチン)、 β -ラクトグロブリン (牛乳主要アレルギー)、グリアジン (コムギ主要アレルギー)、オボムコイド (卵白主要アレルギー) を基板に被覆固定し、非特異的吸着を抑制するための界面活性剤及びプロッキング剤を加えた溶液中で抗アレルギー抗体を固定した探針と基板の間に働く相互作用力を計測した。その結果、いずれの場合も参照試料 (非抗原試料) に比べ、有意に大きい相互作用力を検出できた。
4. 市販の探針の場合、先端径は 20 nm 程度 (タンパク質が数分子入る程度) で、ppm レベルのアレルギー分子の計測は困難であるため、マイクロ光造形法により先端面積を拡大した樹脂製の探針を試作した。試作探針は市販探針に比べて数十倍の先端径をもつにも関わらず、非特異的吸着力は市販探針並に小さく、アレルギー検出が可能であることを検証した (図 2, 3)。今回開発した樹脂製探針の場合、一回の測定で、数 100 から 2000 程度の分子に対する計測が可能である。

[成果の活用面・留意点]

現在、試作中の先端面積の大きな樹脂製探針を使用すれば、市販探針を使用した場合に比べ、より高感度なアレルギー検出が可能となる。今後、探針形状、制御手法等の検討を行なった上で、食品由来の実試料への展開を想定している。

[具体的データ]

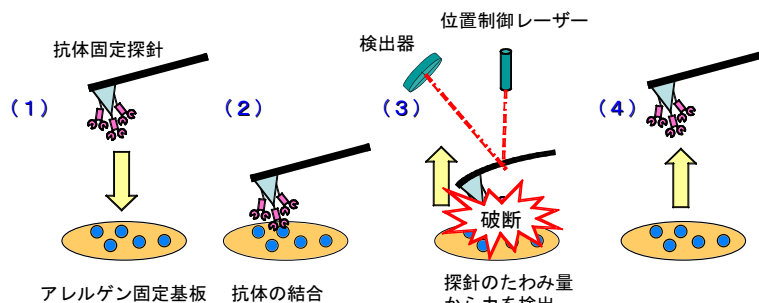


図1 (1)抗体固定探針を基板に近づけ、(2)抗原と短時間接触させた後、(3)上方へ移動させ、(4)結合破断時の力計測から抗体抗原分子間の結合の有無を検出する。

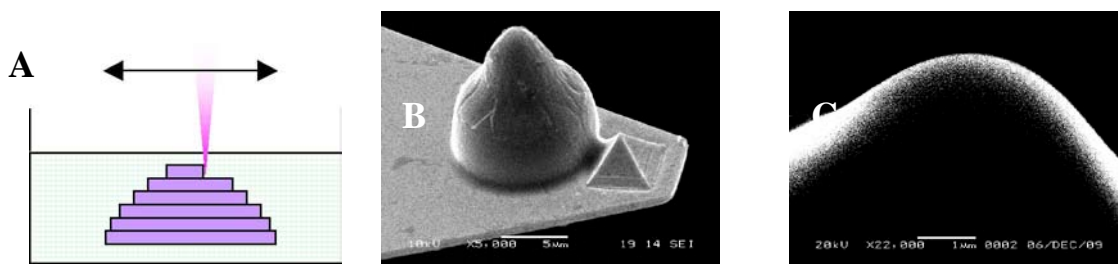


図2 マイクロ光造形法の原理と作製した探針
(A) 液状の光硬化樹脂にレーザー照射し、樹脂を固化させて探針を作製。(B) 作製したカンチレバーのSEM像。(C) 樹脂製探針の先端部(別探針)。先端径は市販探針に比べはるかに大きい。

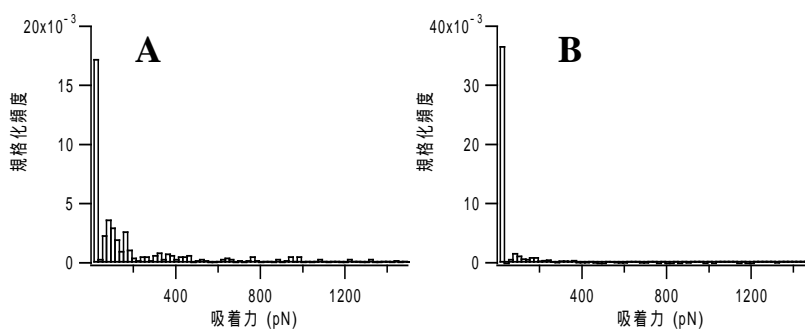


図3 樹脂製探針によるアレルゲン検出実験
(A) アレルゲンあり、(B) アレルゲンなし。(A)に有意に大きい吸着力が検出された。

[その他]

研究課題名：アレルゲンの新規検出技術の開発

中課題整理番号：313f

予算区分：基盤

研究期間：2007年～2009年度

研究担当者：杉山滋、若山純一、小堀俊郎

発表論文等：

- 1) Wakayama, J., Sekiguchi, H., Akanuma, S., Ohatni, T., Sugiyama, S., Method for reducing nonspecific interaction in antibody-antigen assay via atomic force microscopy. Anal. Chem. 380, 51-58 (2008).
- 2) 若山純一、大谷敏郎、杉山 滋, SPM ナノセンサーと食品応用、「バイオセンサーの先端科学技術と応用」(シーエムシー出版), pp.303-311 (2007)

[成果情報名] 感受性増強剤を利用した抗生物質耐性選抜による新規麹菌形質転換系

[要約] 麹菌は多くの抗生物質に耐性のため、抗生物質耐性選抜による形質転換は困難であるが、感受性増強剤併用による新規ブレオマイシン耐性選抜形質転換系を開発した。本技術は栄養要求性を持たない野生株の遺伝子組換えに利用できる。

[キーワード] 麹菌、薬剤耐性、形質転換、ブレオマイシン、感受性増強剤

[担当] 食総研・微生物利用研究領域・糸状菌ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8077

[区分] 食品

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

日本醸造学会より「国菌」と認定され、麹菌として利用される *Aspergillus oryzae* は日本の醸造産業において重要な産業微生物であるが、多くの抗生物質に対して耐性を示すため、利用可能な抗生物質耐性マーカーは極めて限られており、形質転換実験を用いた研究の障害となっている。

本研究は、*A. oryzae* の遺伝子研究において必須の技術である形質転換における新規抗生物質耐性選抜系の開発を目指す新たな視点として、抗生物質感受性を増強する薬剤（抗生物質感受性増強剤）の効果を検証する。次に、それらを利用することにより従来利用困難であったブレオマイシン耐性マーカーによる形質転換系を開発する。

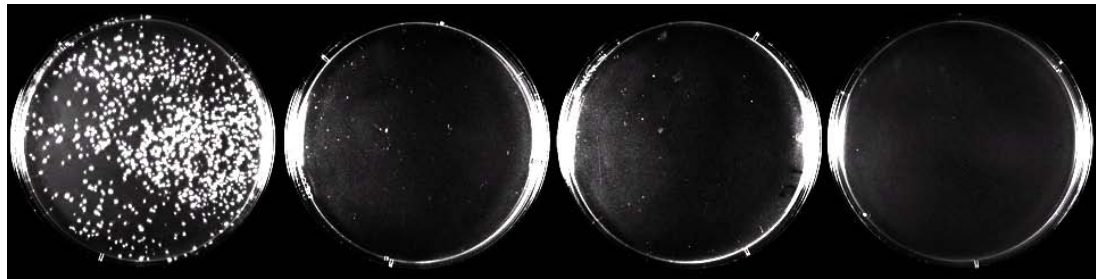
[成果の内容・特徴]

1. *A. oryzae* のブレオマイシン感受性増強剤として、ブレオマイシンの細胞膜透過性を増大させる界面活性剤と、その菌体内からの排出を阻害する ATP-binding cassette (ABC) 排出ポンプ阻害剤を投与することを特徴とする。
2. 界面活性剤 Triton X-100 及び、ABC 排出ポンプ阻害剤クロルプロマジン培地に添加すると、*A. oryzae* のブレオマイシン感受性が顕著に増強する（図 1）。
3. 形質転換により *A. oryzae* にブレオマイシン耐性遺伝子を導入すると、同遺伝子を保持する *A. oryzae* のみがブレオマイシン耐性を示してコロニーを形成する（図 2 A）。
4. ブレオマイシン耐性遺伝子を選抜マーカーとして利用した形質転換系にて外来酵素遺伝子を *A. oryzae* へ導入し、ブレオマイシン耐性を有するコロニーを選抜することで、当該酵素遺伝子を保持する *A. oryzae* を選抜できる（図 2 B）。
5. 外来酵素遺伝子導入株は、宿主株に対して有意に高い酵素活性を示す（図 2 C）。

[成果の活用面・留意点]

1. 本研究成果は *A. oryzae* 遺伝子研究を実施している醸造メーカー研究所を含む国内外の研究機関、大学等において活用できる。
2. 既存の栄養要求性選抜マーカー遺伝子と異なり、本成果のブレオマイシン耐性マーカー遺伝子は *A. oryzae* ゲノム内にほとんど相同な領域を持たないため、*A. oryzae* 遺伝子のジーンターゲットングによる破壊実験に用いる選抜マーカー遺伝子として最適である。
3. 本研究成果により薬剤耐性優性選択マーカーが利用可能となるため、あらかじめ宿主菌株に栄養要求性を付与する必要がなく、簡便な形質転換を可能とする。
4. 本研究成果による *A. oryzae* の抗生物質に対する感受性の上昇は、増感剤存在下における一過性の現象であり、*A. oryzae* の性状になんら影響を与えるものではない。

[具体的データ]



Triton X-100	-	+	-	+
クロルプロマジン	-	-	+	+
ブレオマイシン	+	+	+	+

図1 界面活性剤 (Triton X-100) 及びABC排出ポンプ阻害剤 (クロルプロマジン) の麹菌ブレオマイシン感受性への影響：形質転換では赤枠で示した条件を利用

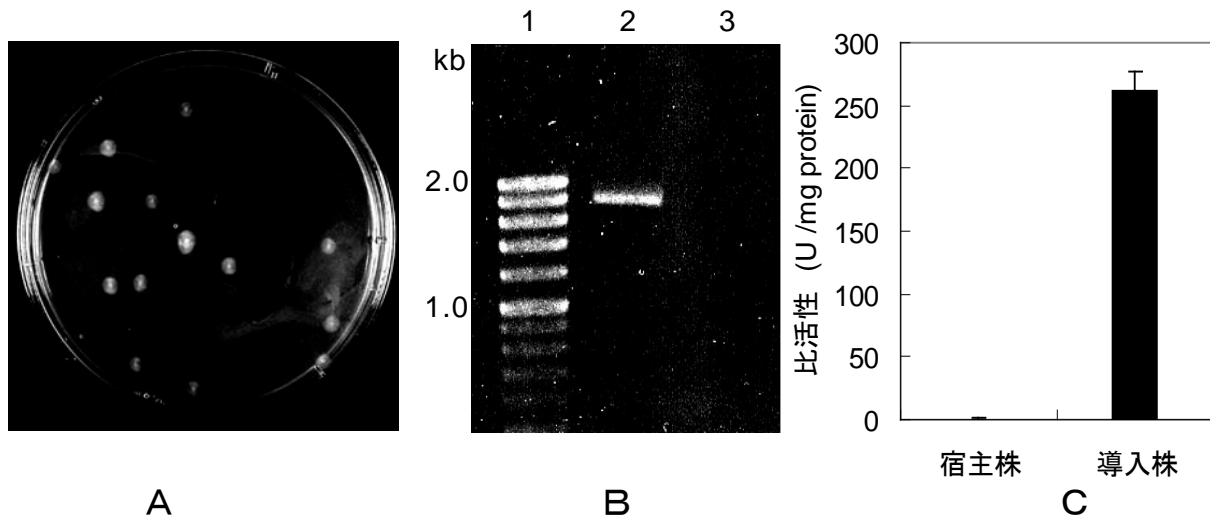


図2 ブレオマイシン耐性による外来遺伝子による *A. oryzae* の形質転換

A：ブレオマイシン耐性による形質転換株の選抜

B：外来遺伝子導入のPCRによる確認

 レーン1：DNAサイズマーカー、 レーン2：外来遺伝子導入株、

 レーン3：宿主対照

C：外来酵素遺伝子導入株の発現酵素活性の確認

 宿主株の当該酵素活性は検出限界以下のためエラーバーのみ表示

[その他]

研究課題名：バイオテクノロジーを利用した新食品素材の生産技術の開発及び生物機能の解明・利用

中課題整理番号：313e

予算区分：基盤

研究期間：2006～2009年度

研究担当者：鈴木聡、多田功生、福岡真里、竹谷博子、塚越芳樹、松下真由美、小田康介（広大医）、楠本憲一、柏木豊、杉山政則（広大医）

発表論文等：Suzuki S. *et al.* (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383: 42-47

[成果情報名] 遺伝子シャッフリングと突然変異を組み合わせた新規酵素改変法

[要 約] 遺伝子シャッフリングとランダム変異導入を組み合わせることで、大きく構造を改変した活性型キメラ酵素を作出することができる。本手法により、食品加工用酵素アエロモナスアミノペプチダーゼの大幅な耐熱化が達成できた。

[キーワード] 遺伝子工学、熱安定性、食品加工用酵素、アミノペプチダーゼ

[担 当] 食総研・食品バイオテクノロジー研究領域・酵素研究ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8071

[区 分] 食品試験研究

[分 類] 研究・参考

[背景・ねらい]

食品加工用酵素アミノペプチダーゼは、食品中のタンパク質分解、発酵食品の熟成時間の短縮、調味料の製造等に用いられる。食品加工においては雑菌の繁殖防止や加工時間の短縮等のため 60℃以上の反応温度が求められるが、一般的に酵素はこの温度では変性し活性を失うことが多い。そこで本研究では、遺伝子工学的手法を用いた新規な酵素改変法により、アミノペプチダーゼの熱安定性の向上を試みる。熱安定性等の酵素特性を改変する方法としては、複数の酵素遺伝子を入れ替える「遺伝子シャッフリング法」および酵素遺伝子の塩基をランダムに変異させる「突然変異法」が知られているが、前者は、酵素の性質を大幅に変化できる可能性があるものの活性型酵素が得られにくく、また、後者は活性型酵素が得られやすいものの特性の大きな変化は期待できないという問題がある。そこで本研究では、両者を組み合わせることによりそれぞれの問題を解決して効率的に酵素を高機能化する手法を開発し、これをアミノペプチダーゼの耐熱化に利用する。

[成果の内容・特徴]

1. 熱安定性に乏しい（約 30℃、図 1）食品加工用酵素アエロモナスアミノペプチダーゼを、熱安定性が高い（約 65℃、図 1）ビブリオアミノペプチダーゼと遺伝子シャッフリングでキメラ化することにより、耐熱性の付与を試みた（図 2）。しかしながら、得られたキメラ酵素はインクルージョンボディを形成し、不活性であった。
2. この不活性型キメラ酵素にエラープローン PCR 法によりランダム変異を導入して活性型の取得を試みた。ランダム変異キメラ酵素遺伝子で形質転換した大腸菌ライブラリーのコロニーを PVDF 膜に転写し、発現タンパク質を PVDF 膜に固定後、発色基質であるロイシンパラニトロアニリド（Leu-pNA）を塗布したろ紙を接触させて、活性化酵素を発色させ、活性型酵素を選択した（図 3）。
3. 最終的に得られた変異酵素の熱安定性は約 50℃であり、60℃でも約 75%の活性が残存した（図 1）。一方、変異酵素の酵素活性（ K_m 0.15 mM、 k_{cat} 30 s⁻¹）は食品加工用酵素アエロモナスアミノペプチダーゼ（0.14 mM、40 s⁻¹）と同等であり、本酵素改変法で、酵素の活性を損なうことなく、その熱安定性のみ大幅に向上した酵素の作出に成功した。

[成果の活用面・留意点]

1. 作成した食品加工用酵素アエロモナスアミノペプチダーゼは 60℃で利用できる
2. 本酵素改変法は、熱安定性の向上のみでなく、pH 特性の改善、基質特異性の改変等にも応用可能であり（図 3）、他の食品加工用酵素の高機能化にも適用できる。

[具体的データ]

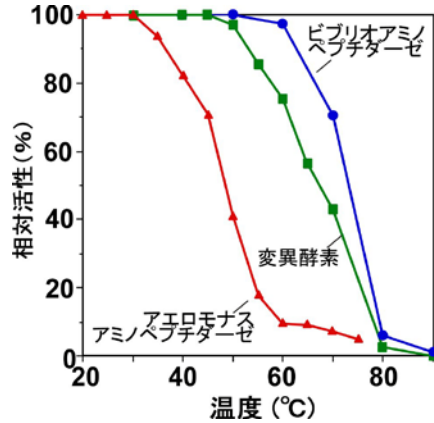


図1 各種酵素の熱安定性
30分間加熱後の残存活性を測定した。

変異酵素：本新規酵素改変法によって得られた酵素

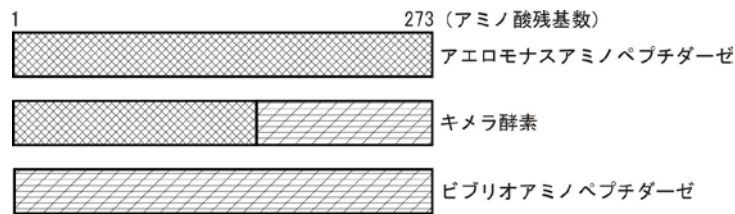


図2 遺伝子シャッフリングによるキメラ酵素の構築

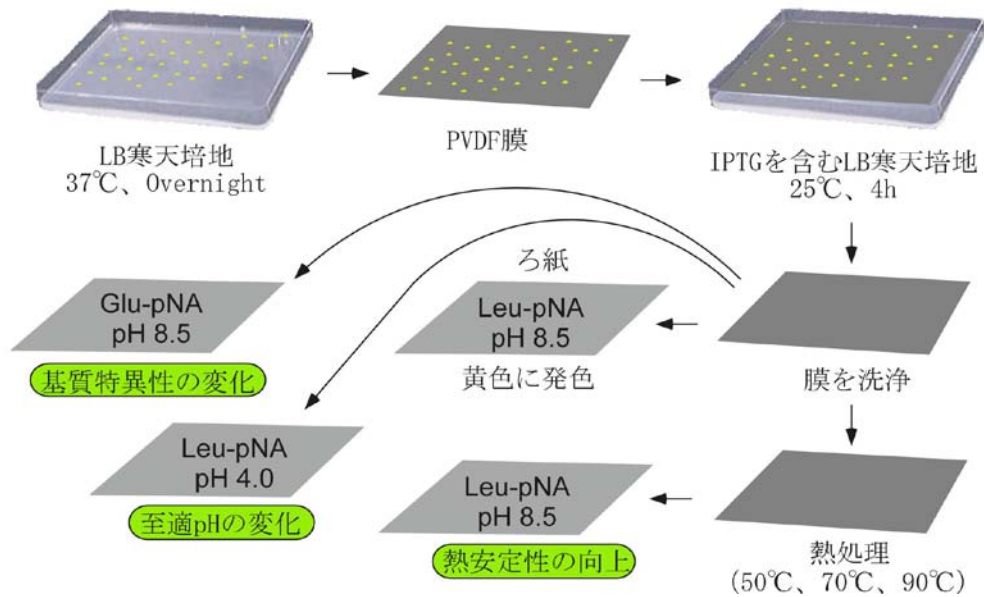


図3 変異アミノペプチダーゼのスクリーニング方法

基質特異性や至適pHの改変等のスクリーニングにも利用できると考えられる。

[その他]

研究課題名：バイオテクノロジーを利用した新食品素材の生産技術の開発及び生物機能の解明・利用

中課題整理番号：313e

予算区分：基盤

研究期間：2008～2009年度

研究担当者：菫澤悟、林清

発表論文等：1) Nirasawa S., Hayashi K. (2008) Biotechnol. Lett. 30:363-368

[成果情報名] 稲わら原料特性に対応したバイオエタノール製造のための前処理技術「CaCCO法」

[要約] 稲わら中のセルロース、キシランに加え、共存するショ糖や澱粉からも糖質を回収できる前処理技術（CaCCO法）では、水酸化カルシウム前処理後の固液分離工程を省き、遊離性の高い糖質の流亡を抑えられる。

[キーワード] 稲わら、ショ糖、澱粉、バイオエタノール、CaCCO

[担当] 食総研・糖質素材ユニット、作物研・稲収量性研究チーム

[代表連絡先] 電話 029-838-7189

[区分] バイオマス

[分類] 技術・参考

[背景・ねらい]

稲わら原料を用いて 100 円/L 程度の低コストでバイオエタノールを製造するためには、繊維質中のみならずショ糖、澱粉等の易分解性糖質由来の発酵性糖質も回収する必要がある。その一方で、繊維質の前処理法として有効性の高いアルカリ前処理法の多くは、後段に固液分離を必要とし、遊離しやすい糖の流亡を招く。そこで、固液分離工程を必要としない、繊維質のアルカリ前処理工程を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 稲わら原料を粉砕し、水酸化カルシウムの懸濁液と反応させた後、炭酸ガスで中和し、中和後の塩である炭酸カルシウムを反応槽内に残す前処理工程（CaCCO法: Calcium Capturing by Carbonation）では、一般的なアルカリ処理後に行われる固液分離工程を省き、ワンバッチで前処理、糖化及び発酵反応ができることが特徴である（図1）。
2. 稲わらの水酸化カルシウム処理後、塩酸中和・固液分離工程により回収した固形分（HCl 中和物）と、炭酸ガス中和物（CaCCO）を基質として用い、酵素糖化率を比較した場合、易分解性糖質を殆ど含まないコシヒカリ由来の稲わらでは、キシランの糖化率が高い。易分解性糖質を多く含むリーフスターでは、グルカンの糖化率も高い（図2）。
3. CaCCO法での前処理稲わらを基質とし、二種類の酵母（*Kluyveromyces marxianus* 及び *Pichia stipitis*）を用いた並行複発酵により、グルコース及びキシロースの量から計算されるエタノールの理論収率に対して 75.3%の収率となる（図3）。
4. 反応槽内に残存する炭酸カルシウムは、蒸留残渣の燃焼により灰分として回収後、熱処理により酸化カルシウムとして再生可能である。

[成果の活用面・留意点]

1. CaCCO法を用いると、前処理から糖化・発酵までのワンバッチ処理が可能である。また、アルカリ中和時に必要となる炭酸ガスは、発酵及びボイラー燃焼時の副生物を用いることができる。
2. CaCCO法は、稲わらのみならず、ショ糖や澱粉を含む多様な草本茎葉原料やホールクロップに対して適用可能である。ただし、グルコースやフラクトースなどの遊離還元糖は、アルカリ処理に対して不安定であり、エタノール収率低下の原因となることから、スイートソルガムなどの遊離還元糖を多く含む原料を用いる際には、搾汁後のバガスのみを前処理に供する等、工程を検討する必要がある。

[具体的データ]

【CaCCO法】

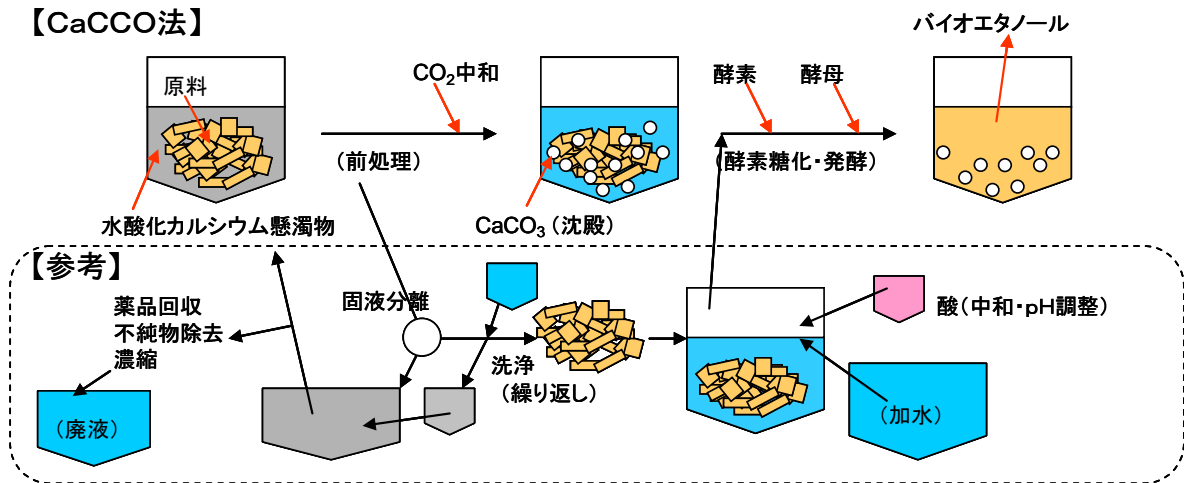


図1 CaCCO法を軸としたバイオエタノール製造工程の概要
点線内は、水酸化カルシウム処理後に固液分離を伴う典型的工程の概要（参考）

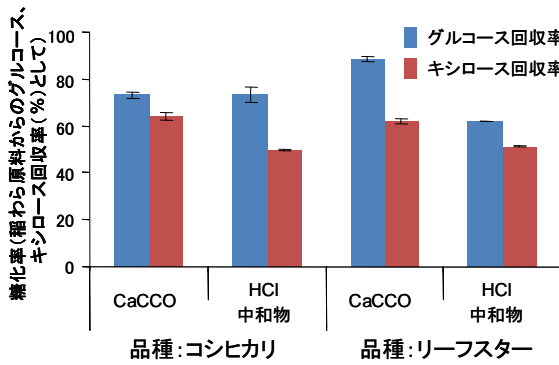


図2 稲わらの水酸化カルシウム前処理後の中和法の違いによる糖化率の差

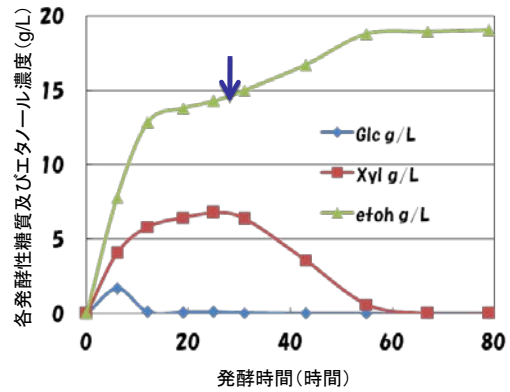


図3 二種類の酵母を用いた稲わら前処理物の並行複発酵時における発酵性糖質の消長及びエタノールの生成

K. marxianus によりグルコースの発酵を行い、25時間後（矢印）に *P. stipitis* を追加してキシロースを発酵
稲わら：コシヒカリ由来

[その他]

研究課題名：未利用バイオマス及び資源作物を原料とした低コスト・高効率バイオエタノール変換技術の開発

課題 ID：224-b

予算区分：委託プロ（バイオマス）

研究期間：2007年度～2009年度

研究担当者：徳安健、朴正一、城間力、Muhammad Imran Al-Haq、池正和、近藤始彦、荒井（三王）裕見子、井田仁

発表論文等：朴正一ら： *Biosci. Biotechnol. Biochem.*(2009) 73, 1072-1077.

[成果情報名]カンショ「九州 159 号」を用いた効率的バイオエタノール生産技術

[要約]低温糊化性澱粉を有するカンショ「九州 159 号」を原料として、原料磨砕物の粘性低下後に糖化・発酵を行う工程(CARV 法)によりバイオエタノールを製造すると、液化を 60℃程度で行うことが可能となり、液化工程に要するエネルギーを大幅に低減できる。

[キーワード]カンショ、CARV 法、エタノール、低温糊化性澱粉

[担当]食総研・糖質素材ユニット、九州農研・サツマイモ育種研究チーム

[代表連絡先]電話 029-838-7189

[区分]バイオマス・変換技術

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

バレイショで開発した新しいバイオエタノール製造工程 (CARV (Conversion After Reduction of Viscosity) 法、平成 20 年度成果情報) の応用範囲を拡大するため、カンショへの適応を検討する。カンショへの CARV 法適応について、品種による製造時におけるエタノール変換効率や熱エネルギー消費量の低減効果も明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. カンショの CARV 法によるエタノール変換工程について効率を評価する (図 1)。本法では、固液分離工程のみならず、ハンドリング向上のための加水工程も省くことが可能となる。
2. 「九州 159 号」と「ダイチノユメ」の成分特性は大きく変わらない (表 1)。「九州 159 号」では、60℃以上での液化で既に 90℃以上での液化と同等のエタノール収率が得られるのに対し、「ダイチノユメ」では、80℃以下はエタノール収率が低く、特に 70℃以下では 50℃と同程度の収率しか得られない (図 2)。
3. 「九州 159 号」を用い、60℃で液化を行った CARV 法によるエタノール変換を行った際の原料 kg あたりのエタノール収量は 180 ml であり、理論収率の 90%となる。
4. 「九州 159 号」と「ダイチノユメ」からエタノール 1 L を得る際の液化工程 (熱処理プロセス) に用いられるエネルギー消費及び CO₂消費量の試算データからは、「九州 159 号」を用いた低温液化により約 50%の節減効果が見られる (表 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. 「九州 159 号」のような低温糊化性澱粉を有するバイオエタノール原料の開発により、加熱に伴う変換コストのみならず、エネルギー消費及び CO₂消費量が低減できる。
2. 「九州 159 号」のような低温糊化性澱粉を有するカンショを用いてバイオエタノールを製造するには、澱粉量増加など原料特性のさらなる改良が求められる。
3. 60℃での液化による微生物汚染は、数リットル規模のバッチ試験では問題とならないが、スケールアップを行う際には注意する必要がある。

[具体的データ]

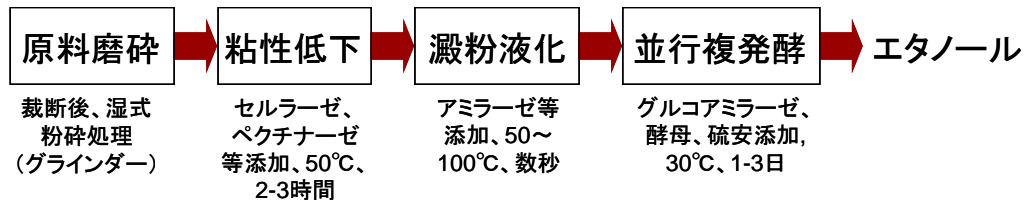
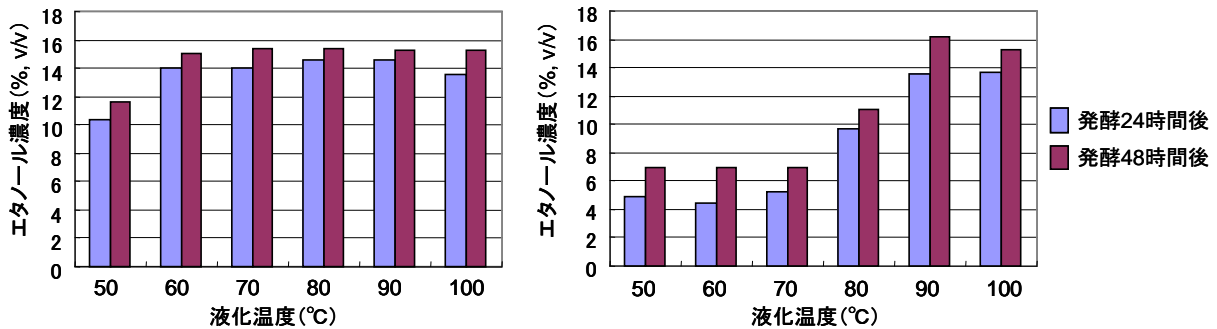


図1 CARV法によるカンショからのバイオエタノール製造工程の概要

表1 供試した二種類のカンショの原料特性

	澱粉 (%, wb)	澱粉 (%, db)	ショ糖 (%, db)	ブドウ糖 (%, db)	果糖 (%, db)	含水率 (%)	初期 pH
九州 159 号	25.4	68.7	2.4	0.7	0.4	59.4	5.5
ダイチノユメ	29.3	70.1	3.0	0.3	0.2	59.5	5.5

wb, 湿重量ベース; db, 乾燥重量ベース



九州 159 号 (理論エタノール濃度 17.0%)

ダイチノユメ (理論エタノール濃度 17.3%)

図2 カンショ原料の CARV 法による澱粉液化時における温度とエタノール濃度の関係

表2 液化温度の違いによる熱処理プロセスのエネルギー消費量及び CO₂ 生成量の低減効果に関する試算

	エネルギー消費量(MJ/L エタノール)	CO ₂ 生成 (kg/L エタノール)
九州 159 号 (液化温度 60℃)	0.7 MJ/L	0.05 kg/L
ダイチノユメ (液化温度 90℃)	1.4 MJ/L	0.10 kg/L

15,000 kL/年の生産規模で、原料から換算して 90%の発酵収率でエタノール製造を行ったものと仮定。

[その他]

研究課題名：未利用バイオマス及び資源作物を原料とした低コスト・高効率バイオエタノール変換技術の開発

課題 ID：224-b

予算区分：委託プロ (バイオマス)

研究期間：2007 年度～2009 年度

研究担当者：徳安健、Sathaporn Srichuwong、椎名武夫、折笠貴寛 (宮城大学)、吉永優、片山健二、小林透

発表論文等：Sathaporn Srichuwong, et al, *Biomass and Bioenergy*, (2009) 33, 890-898.

[成果情報名]アルカリ-CARV 法によるテンサイからの効率的バイオエタノール生産技術

[要約]テンサイ根冠部を原料として、磨砕物の NaOH 処理・中和後に粘性低下処理を行うエタノール製造工程（アルカリ-CARV 法）によりバイオエタノールを製造する。アルカリ処理により粘性低下効率が大幅に向上し、理論収率の 90%を越えるエタノールが得られる。

[キーワード]テンサイ、アルカリ-CARV 法、エタノール

[担当]食総研・糖質素材ユニット、北農研・寒地バイオマス研究チーム

[代表連絡先]電話 029-838-7189

[区分]バイオマス・変換技術

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

バレイショで開発した新しいバイオエタノール製造工程（CARV（Conversion After Reduction of Viscosity）法、平成 20 年度成果情報）の応用範囲を拡大するため、テンサイ根冠部への適応を検討する。テンサイ根冠部に対して、直接、CARV 法を適用した際には、バレイショやカンショの変換時の 20 倍量程度の酵素を必要とし、実用性が低い。エステル構造に富むテンサイのペクチン構造がその一因であると推測される。そこで、エステル結合の加水分解を促すアルカリ処理を前段に用いた新しいバイオエタノール製造工程として、アルカリ-CARV 法を提案する。

[成果の内容・特徴]

1. 供試したテンサイ「北海 87 号」の根冠部試料では、湿重量あたり 69.1%程度のショ糖を含み、ブドウ糖、果糖は遊離状態では検出されない。澱粉の存在も無視できる(0.3%)ことから、磨砕物の粘性低下後には、糊化・液化工程を行わずに、直接、酵母による発酵を行うことができる。アルカリ処理・中和の後段に酵素による粘性低下処理を行うエタノール製造工程として、新たにアルカリ-CARV 法を考案した（図 1）。
2. 室温・1 時間のアルカリ処理によって、後段の酵素処理時における粘度低下を促すには、添加するアルカリ（NaOH）処理濃度は 0.1 N 程度が望ましい（図 2）。本アルカリ処理により、後段の粘性低下処理に要する酵素使用量は、バレイショやカンショに対して使用したレベル（0.25 mg/g-乾燥基質）にまで低減する。アルカリ処理を行わずに酵素処理のみを行った場合には、十分な粘性低下が起こらず、ファーメンターでの攪拌は極めて困難となる。
3. ジャーファーメンターを用いてテンサイ根冠部をアルカリ-CARV 法によりエタノール変換した結果、エタノール収率は理論値の 90%を越える（表 1）。エステル結合の切断により、酢酸及びメタノールの遊離が観察されるが、発酵後におけるこれらの物質の存在量は低く、酵母の発酵阻害効果を考慮する必要はない。

[成果の活用面・留意点]

1. 本工程は熱殺菌工程を含まないことから、微生物汚染の可能性がある。特に、スケールアップ時や連続運転時における微生物汚染を考慮し、適宜、殺菌技術を導入する必要がある。
2. テンサイ根冠部細胞壁の改質により酵素糖化性を向上させると、本工程が一層効率化すると期待される。遺伝資源の探索や変異導入等による研究の進展が重要と考えられる。

[具体的データ]

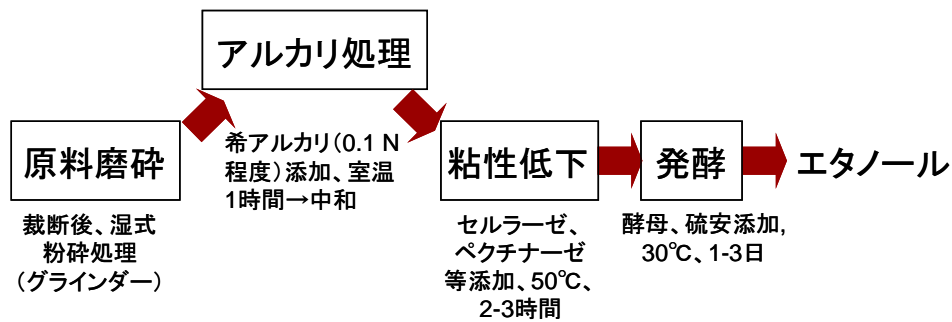


図1 アルカリ-CARV法によるテンサイからのバイオエタノール製造工程の概要

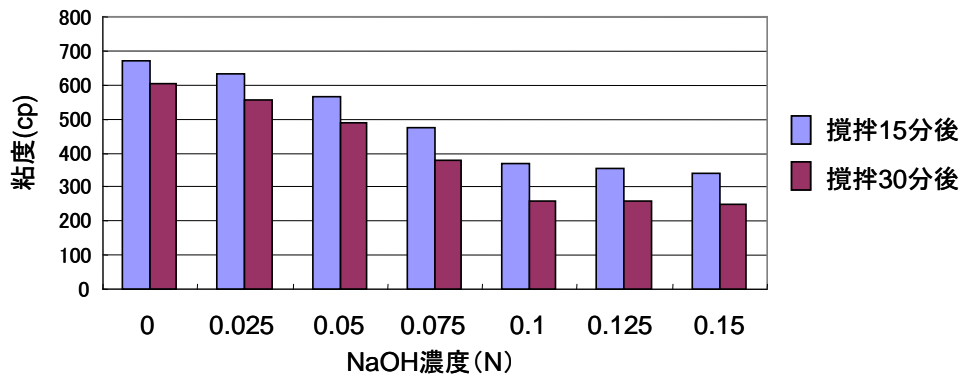


図2 テンサイ根冠部磨砕物のアルカリ処理濃度と酵素処理時における粘性低下との関係
ラピッド・ビスコ・アナライザーを用いて、各濃度でのアルカリ処理（室温、1時間）を行い中和後、攪拌しつつ酵素処理を開始し、各時間における粘度を測定。

表1 アルカリ-CARV法によるテンサイ根冠部からのエタノール製造時の収率と発酵阻害物濃度

	エタノール濃度 (v/v)	発酵収率 (%)	酢酸濃度 (% w/v)	メタノール濃度 (% w/v)
24 時間後	7.25	90.2	0.09	0.32
48 時間後	7.34	91.3	0.10	0.32

原料 3 kg をファーメンターを用いて *Saccharomyces cerevisiae* により発酵、初期固形分濃度 16.8%

[その他]

研究課題名：未利用バイオマス及び資源作物を原料とした低コスト・高効率バイオエタノール変換技術の開発

課題 ID：224-b

予算区分：委託プロ（バイオマス）

研究期間：2007 年度～2009 年度

研究担当者：徳安健、Sathaporn Srichuwong、高橋宙之

発表論文等：Sathaporn Srichuwong, et al, *Biomass and Bioenergy*, 33, 890-898 (2009).

[成果情報名] 稲わらからのエタノール生産のコスト、エネルギー収支、CO₂ 排出量の評価

[要約] 稲わらからのバイオエタノール生産における、糖化方式、施設規模、エタノール変換効率、残さからの熱回収の有無などの各種要因とコスト、エネルギー収支および CO₂ 排出量との関係を俯瞰できる。

[キーワード] 稲わら、バイオエタノール、ライフサイクルアセスメント、濃硫酸加水分解法、酵素糖化法、コスト、エネルギー収支、CO₂ 排出量

[担当] 食総研・流通工学ユニット・糖質素材ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8027 E-mail shiina@affrc.go.jp

[区分] バイオマス

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

バイオエタノール原料として最も期待される稲わらからのエタノール生産プロセスについて、俯瞰的な評価を実施するとともに、プロセス設計や重要な技術開発課題の抽出等に資するため、プラント規模（年間エタノール生産量：万 kL/年）、エタノール変換効率（糖化収率と発酵効率の積、以下 ϵ と表記）、ボイラによる残さからの熱回収の有無などがコスト、エネルギー収支および CO₂ 排出量に及ぼす影響について、ライフサイクルアセスメント（LCA）手法を適用し、主としてシナリオに基づく解析を実施する。

[成果の内容・特徴]

1. 稲わらは農業廃棄物としての取扱となるため、解析対象範囲は、粃の収穫で生じる藁の収集以降のプロセスとする（図 1）。稲わら価格は、本プロジェクト研究における設定値である 15,000 円/t-dry とする。稲わら収集のためのロールベラーの燃料、稲わら搬送のためのトラック（4 t（圃場→工場・集積所）、10 t（集積所→工場））の燃料（稲わらの平均貯存量、エタノール生産規模、 ϵ から収集すべき範囲を円で近似）、エタノール生産工程で使用される電力、燃料、蒸気、試薬、酵素などの量、施設費、人件費などから解析を実施する（詳細については発表論文を参照）。
2. 濃硫酸加水分解法による稲わらからのエタノール生産（以下、NEDO 法）において、 ϵ の違いがコストおよび CO₂ 排出量に及ぼす影響は、プラント規模との関係で、図 2、図 3 のように整理され、 ϵ の向上は、コストおよび CO₂ 排出量の低減に非常に大きく貢献する。なお、ガソリン代替利用で、いずれの条件でも CO₂ 排出量が削減される。
3. NEDO 法における熱回収の有無、稲わら収集のための中間集積所の有無が正味エネルギー比（エタノールのエネルギー／投入化石エネルギー）（Net Energy Ratio, NER）に及ぼす影響は、プラント規模との関係で図 4 に整理される。その結果、ボイラによる残さ（主としてリグニン）からの熱回収（熱効率を 67% に設定）の有無は、NER に大きく影響するとともに、コストと CO₂ 排出量にも大きく影響するため、残さの有効活用がプロセスの効率化に不可欠であるといえる。
4. 酵素糖化法による稲わらからのエタノール生産のコストに関するトルネード分析を含む解析により、現状目標の総コスト（約 175 円/L）、将来目標の総コスト（約 100 円/L）におけるコスト分担は、図 5 の通り整理される。稲わらからのエタノール生産においては、原料費（稲わら）が全体コストに占める割合が大きく、圃場での収集の効率化等による稲わら価格の低減が不可欠であると考えられる。

[成果の活用面・留意点]

1. 解析は、実在の施設を対象としたものではなく、シナリオに基づくものであり、実際のエタノール生産システムの解析結果とは異なる可能性がある。
2. 本解析結果は、稲わらからのエタノール生産の全体像把握、プロセス設計の参考、技術開発課題の選定と優先度設定、等への活用が望ましい。

[具体的データ]

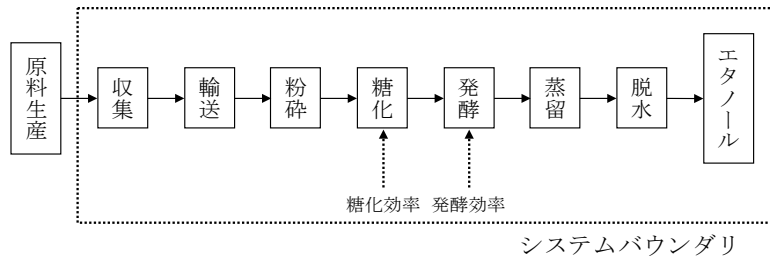


図1 稲わらからのエタノール生産における解析範囲（システムバウンダリ）

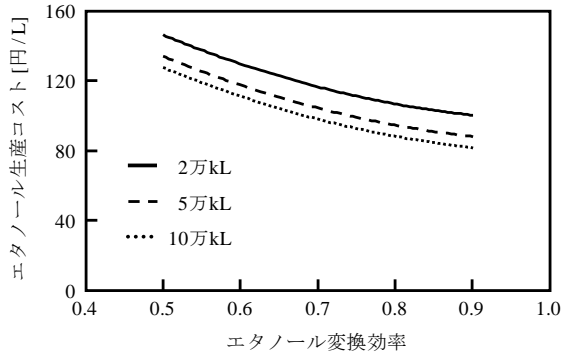


図2 プラント規模・エタノール変換効率がコストに及ぼす影響（NEDO法）

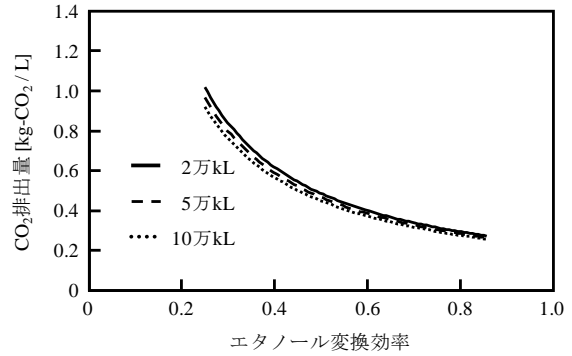


図3 プラント規模・エタノール変換効率がCO₂排出量に及ぼす影響（NEDO法）

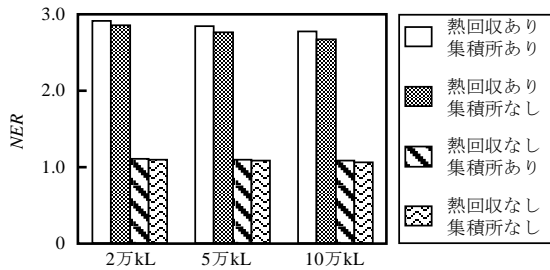


図4 プラント規模・熱回収・バイオマス集積所の有無がNERに及ぼす影響（NEDO法）

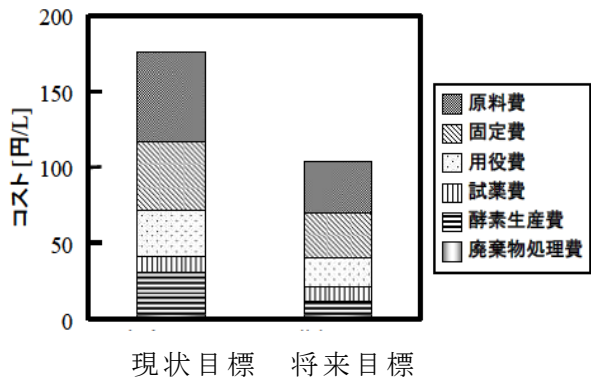


図5 酵素糖化法による稲わらからのエタノール生産のコスト構造

[その他]

研究課題名：フードサプライチェーンの環境および環境影響の評価

中課題整理番号：313-c

予算区分：委託研究プロジェクト「バイオマス」

研究期間：2008年度～2009年度

研究担当者：椎名武夫・折笠貴寛（宮城大学）・徳安健・Poritosh ROY・井上貴至（三菱総研）・小島浩司（三菱総研）・中村宣貴

発表論文等：1)折笠、徳安、井上ら（2009）農機誌、71(5)：45-53

[成果情報名]水熱前処理における高消化性ソルガム bmr 株の有用性

[要約]高消化性ソルガムである bmr 株は、天然型より低温度の水熱処理で十分な糖化が得られることから、前処理コストを削減可能であるとともに、発酵阻害物質であるフラン化合物の生成抑制効果も期待できる。

[キーワード]ソルガム、高消化性ソルガム(brown mid rib (bmr)、水熱処理

[担当]食総研・生物機能利用ユニット、九州沖縄農研・周年放牧研究チーム、九州沖縄農研・バイオマス・資源作物開発チーム

[代表連絡先]電話 029-838-8063

[区分]バイオマス

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

ソルガム、イナワラなどのリグノセルロース系バイオマスは、未処理の状態では、バイオマスに含まれるリグニン等の影響により繊維分の 50%以上が糖化されずに残る。この問題を解決するために、多くの前処理法が開発されている。しかしながら、材料の特性と前処理の関係を明らかにした研究は殆ど行われていない。そこで、リグニン合成酵素遺伝子に変異があり、未処理の状態においても糖化性に優位性を示すソルガム bmr 株を材料として、水熱前処理におけるバイオマスの品種特性を評価する。

[成果の内容・特徴]

1. ソルガム bmr 株（九州交 4 号）と天然株（SIL-05）のディスクミル破碎物を水分含量 70%(w/w)に調整し、水熱前処理すると、各々のソルガムのヘミセルロース含量が減少し、可溶性成分が増える。水熱処理温度が上昇するとその傾向はより顕著に現れる（表 1）。
2. 市販セルラーゼ、ヘミセルラーゼ混合酵素液を用いて、水熱前処理したソルガムの最大酵素糖化率を評価すると、200℃の水熱処理では、両ソルガムとも 95%以上の非常に高い糖化率が得られるが、180℃の水熱処理では、天然型ソルガム（SIL-05）の糖化率が著しく低下し、約 74%となるのに対し、bmr 株（九州交 4 号）では 90%以上の糖化率が得られる（図 1）。
3. 本法はソルガムの水分含量を変化させずに水熱処理を行うものであり、余計な水分を加えることなく高い糖化率を得られることから、バイオマスの加熱に要する熱量を最小限に抑えることができる。また、余計な水分の使用を抑えることから、廃液処理等のコストを低減することが可能である。
4. ソルガム bmr 株を用いれば、天然型ソルガムを使用した場合より、低温な水熱処理でも前処理効果が高いため、加熱に要するエネルギーと前処理コストを削減できる。

[成果の活用面・留意点]

1. 一般的に水熱前処理においては、処理温度が高温になるほど糖の回収率が落ち、発酵阻害物質であるフラン化合物の生成が促進されるが、bmr 株は、よりマイルドな条件での処理が可能であり、この様な水熱処理の問題点を回避できる可能性がある。

[具体的データ]

表1 固体水熱前処理による各ソルガム成分（乾重量比）の変化

	SIL-05			九州交4号		
	未処理	180℃	200℃	未処理	180℃	200℃
可溶成分	41.4	37.6	41.6	24.0	32.3	26.9
セルロース	33.6	32.4	26.3	41.0	42.4	44.4
ヘミセルロース	15.2	7.2	2.0	23.2	8.7	3.7
その他	9.8	22.8	30.13	11.7	16.6	25.1

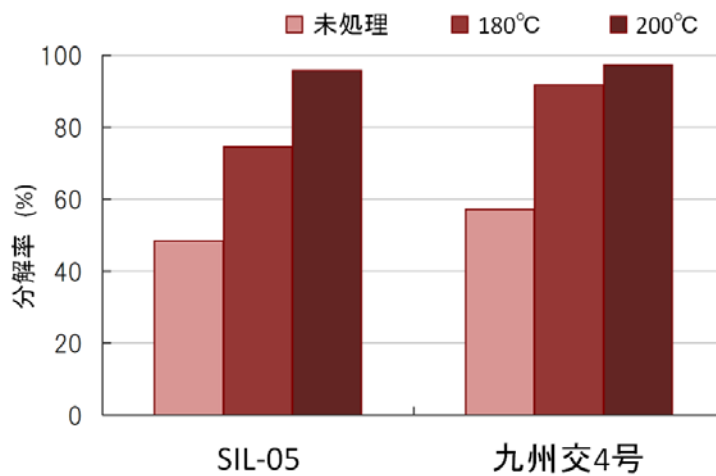


図1 固体水熱前処理したソルガムの最大酵素糖化率（糖化に用いた酵素は、セルクラスト 1.5L、ノボザイム 188、マルチフェクトキシラナーゼの混合酵素（重量比 4:3:1）。酵素反応は 45℃で 72 時間行った。）

[その他]

研究課題名：担子菌による whole crop の直接エタノール発酵技術の開発

中課題整理番号：224-b

予算区分：委託プロ(バイオマス)

研究期間：2008 年～2009 年度

研究担当者：金子哲、我有満、高井智之、水野亮二、一ノ瀬仁美、前原智子

発表論文等：Mizuno R. et al. (2009) Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(7):1671-1673

[成果情報名] エノキタケ Fv-1 株によるセロオリゴ糖の直接エタノール発酵

[要約] エノキタケ Fv-1 株は、セロオリゴ糖をグルコースと変わらない高い変換効率で直接エタノールに変換できる。この時、セロオリゴ糖は β -グルコシダーゼにより単糖にまで分解されて代謝されている。

[キーワード] エノキタケ、セロオリゴ糖、連結バイオプロセス (Consolidated bioprocessing (CBP))

[担当] 食総研・生物機能利用ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8063

[区分] バイオマス

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

バイオ燃料製造では、食料と競合しないリグノセルロースを原料としたエタノール生産技術の開発が望まれている。現在の主流な方法である酵素糖化法では、エタノール製造コストに占める糖化酵素の価格が高いことが問題である。そこで、糖化酵素の生産と、エタノール生産能の両方を持つエノキタケ Fv-1 株を用いて、バイオマスを直接エタノールに変換することにより、糖化酵素を使用しないエタノール製造技術「糖化発酵連結バイオプロセス (CBP)」の開発を目指している。そこで、セルロース由来のオリゴ糖を原料として、エノキタケ Fv-1 株のエタノール生産能力を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. エノキタケ Fv-1 株は、糖化酵素を添加することなく、セロオリゴ糖 (セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース) をグルコースの場合とグルコースと変わらない高い変換効率でエタノールに変換する (図 1)。
2. セロオリゴ糖のエタノール発酵時、 β -グルコシダーゼ活性が増加したことから、エノキタケ Fv-1 株の糖化発酵 CBP によるエタノール生産では、糖化酵素として β -グルコシダーゼが生産されている (図 1)。
3. セロオリゴ糖のエタノール発酵時、セロオリゴ糖は培養初期に消失し、単糖であるグルコースの産生が観察されることから、エノキタケ Fv-1 株は、セロオリゴ糖をグルコースにまで分解し、利用していると考えられる (図 1)。

[成果の活用面・留意点]

1. エノキタケ Fv-1 株を用いた糖化発酵 CBP バイオエタノール生産では、生産される糖化酵素の主成分は、エキソ型酵素である β -グルコシダーゼである。そこで多糖であるセルロースを原料とした場合には、糖化速度が下がり、エタノールの生産性が低下する可能性がある。
2. 市販のセルラーゼ製剤では、バイオマスの糖化時に β -グルコシダーゼが不足していることが指摘されており、バイオマスの糖化では、別に製造した β -グルコシダーゼ製剤を混合している。エノキタケを用いることで、 β -グルコシダーゼを混合する必要がなくなり、バイオエタノール生産時の糖化酵素のコストを削減できる。

[具体的データ]

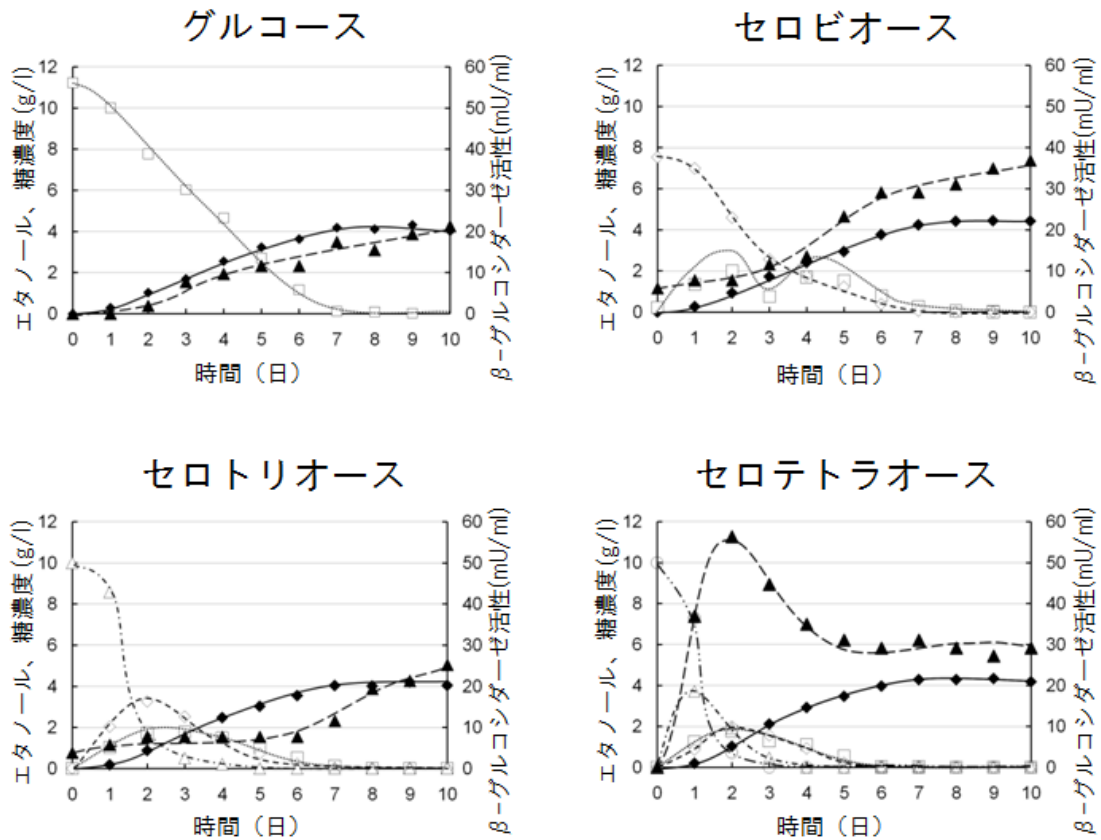


図1 エノキタケによるセロオリゴ糖のエタノール発酵 (◆, エタノール; ▲, β -グルコシダーゼ活性; □, グルコース; ◇, セロビオース; △, セロトリオース; ◇, セロテトラオース。発酵開始時の糖濃度, 1%)

[その他]

研究課題名：担子菌による whole crop の直接エタノール発酵技術の開発

中課題整理番号：224-b

予算区分：委託プロ(バイオマス)

研究期間：2007年～2009年度

研究担当者：金子哲、水野亮二、一ノ瀬仁美、前原智子

発表論文等：Mizuno R. et al. (2009) Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(10):2240-2245

[成果情報名] 登熟期の高温によるイネ穎果の水分分布の変化

[要約] 磁気共鳴画像法により可視化したイネ穎果内の水分分布によると、登熟期に高温ストレスを受けた場合、乳熟期の胚乳中心部における水分の早期凋落は、胚乳中心部の白濁の発生と時期的・空間的にほぼ一致する。

[キーワード] イネ、磁気共鳴画像法、高温登熟、白未熟粒、水分分布

[担当] 作物研・稲収量性研究チーム

[代表連絡先] 電話 029-838-8952

[区分] 作物、関東東海北陸農業・関東東海・水田作畑作

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

登熟期の高温によりデンプン粒の発達が異常となり白未熟粒が形成されるが、その生理メカニズムに関しては、デンプン合成に関わる酵素の活性や遺伝子発現の変化に着目した研究がなされてきた。一方、胚乳内の水分状態は酵素活性などを通してデンプン合成に影響すると考えられるが、高温ストレスの水分動態への影響と白未熟粒形成との関係は明らかではない。

そこで、穎果内の水分分布と白未熟粒発生との時期的・空間的な関係を明らかにする目的で、磁気共鳴画像法(MRI)を用い、高温ストレス下におけるイネ穎果内の水分動態を調査する。

[成果の内容・特徴]

1. 水稻品種「コシヒカリ」を 1/5000a ポットで栽培し、開花期以降、昼夜温 (13/11 h) が 26/20°C の対照区と 33/27°C の高温区のバイオトロンで生育させ、穂の上位 3 番目の枝梗までに着生する強勢穎果を実験に供試する。
2. 高温区で生育させた場合の穎果では、乳熟期から糊熟期にかけて白濁が発生し始め、完熟時に胚乳中心部に白濁を形成する心白粒や乳白粒、背部に白濁を形成する背白粒が多発する (図 1)。
3. 高温区の胚乳中心部の白濁部では、アミロプラストの間に大きな隙間が見られ、単粒と不完全な複粒のアミロプラストが多く観察される (図 2)。すなわち、デンプン蓄積の初期段階においてデンプン合成が阻害され、デンプン粒の発達が不十分なまま成熟期を迎えたと考えられる。
4. MRI を用いて乳熟期・糊熟期・黄熟期におけるイネ穎果の中央部横断面の水分分布をみると、高温区は対照区と比べて、乳熟期では粒重は同程度であるが胚乳中心部の水分が低く、一方、糊熟期以降では高い特徴がある (図 3)。すなわち、乳熟期から糊熟期にかけての胚乳中心部における水分の早期凋落は、胚乳中心部における白濁の発生と時期的・空間的にほぼ一致する。

[成果の活用面・留意点]

1. 高温による穎果の生育促進を考慮に入れ、高温区では対照区に比べて糊熟期で 1 日、黄熟期で 2 日早い開花後日数の穎果を実験に供試している。
2. 水分分布は MRI で測定したプロトン密度強調画像をもとに推定し、シグナル強度が高いほど、水分が高いことを示す。
3. 高温ストレスによる心白粒や乳白粒の発生には水分動態が関係している可能性があるが、背白粒の発生との関係については不明である。
4. 高温登熟による白未熟粒発生の基礎的知見になる。

[具体的データ]

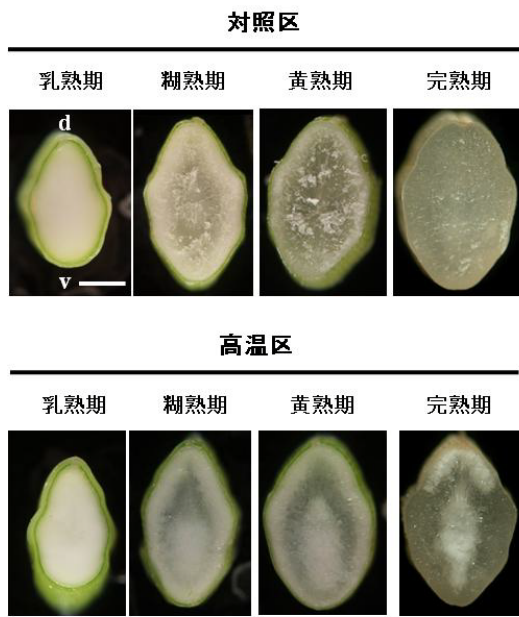


図1. 对照区と高温区における登熟粒の横断面観察. d:背側, v:腹側. Bar=1mm

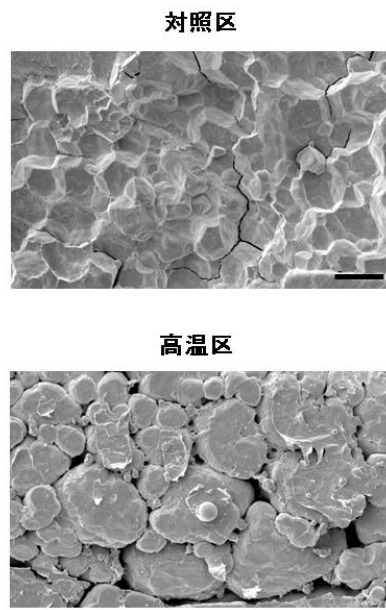


図2. 对照区(上図)と高温区(下図)の玄米の胚乳中心部における走査電子顕微鏡観察. Bar=10µm

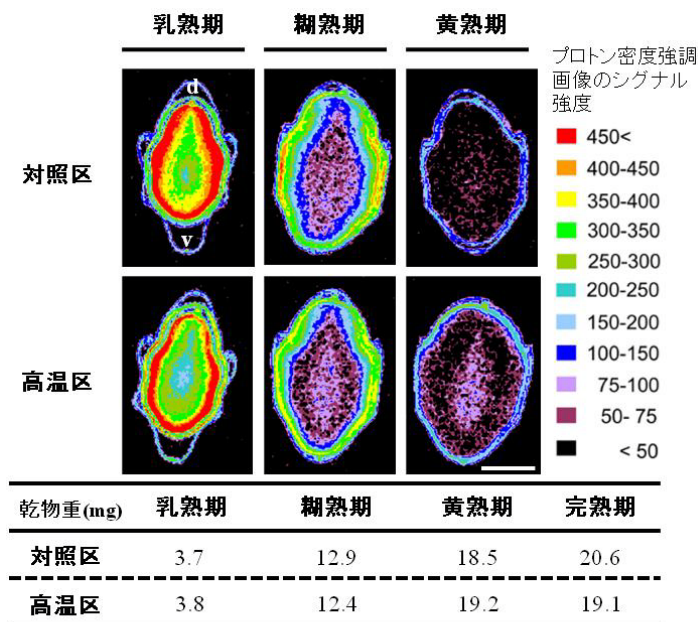


図3. MRIによる登熟粒横断面のプロトン密度強調画像. 図下の表はMRI測定に用いた穎果の乾物重(mg). d:背側, v:腹側. Bar = 1 mm

[その他]

研究課題名： イネゲノム解析に基づく収量形成生理の解明と育種素材の開発

中課題整理番号： 221-c

予算区分： 交付金（実用遺伝子）

研究期間： 2007～2008 年度

研究担当者： 石丸 努、近藤始彦、岩澤紀生、井田 仁、堀金明美（食総研）、吉田充（食総研）

発表論文等： Ishimaru T. et al (2009) J. Cereal Sci. 50: 166-174.

[成果情報名]IgE 産生を抑制する茶葉中加水分解型タンニン類

[要約]加水分解型タンニンであるテオガリンおよび「茶中間母本農6号」に見出される1,2-di-*O*-galloyl-4,6-*O*-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl- β -D-glucopyranose(G-ストリクチニン)は、ヒト末梢血リンパ球からのIgE産生を抑制する。

[キーワード]チャ、テオガリン、G-ストリクチニン、IgE産生、茶中間母本農6号

[担当]野菜茶研・野菜・茶機能性研究チーム

[代表連絡先]電話 0547-45-4101

[区分]野菜茶業・茶業、食品

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

アレルギーは世界中で増加しており、今後、さらに食品成分による予防が必要になる疾病の1つである。過去に茶葉中加水分解型タンニンであるストリクチニンによるIgE産生抑制(抗アレルギー作用)を認めており、茶葉中の新たなIgE産生抑制物質を見出すため、保有するチャ品種に加水分解型タンニンを探索し、その抗アレルギー活性を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. 茶葉中加水分解型タンニン類には、既知のストリクチニン以外にテオガリンおよび1,2-di-*O*-galloyl-4,6-*O*-(*S*)-hexahydroxydiphenoyl- β -D-glucopyranose (G-ストリクチニン)が存在する(図1)。G-ストリクチニンは、「茶中間母本農6号」に高含量で存在し、他の9品種には全く見出されない(表1)。
2. ヒト末梢血リンパ球をIL-4およびCD40抗体で刺激してB細胞のクラススイッチ誘導を行い、G-ストリクチニン、テオガリン、ストリクチニンを添加すると、テオガリンは0.1nM以上、G-ストリクチニン、ストリクチニンは1nM以上でIgE産生を抑制する(図2)。

[成果の活用面・留意点]

1. この抗アレルギー作用は、細胞試験により得られた成果であり、動物試験、ヒト介入試験を行ってさらに検討する必要がある。
2. ストリクチニンの抗アレルギー作用については、<http://www.naro.affrc.go.jp/top/seika/2000/nivot/nivot00042.html> を参照。

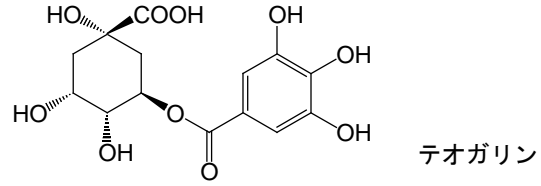
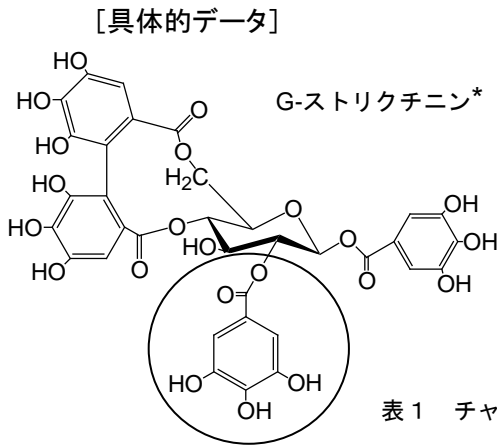


図1 茶葉中加水分解型タンニンの化学構造式
*G-ストロクチニン：ストロクチニンでは、○の部分
がOH基に置き換わる

表1 チャ品種（一番茶）の化学成分値(g/100g、乾物重)

品種	G-ストロクチニン	テオガリン	ストロクチニン	カフェイン	EGCG*	EGC*	ECC*	EC*	EGCG3**Me*
やぶきた	0.00	0.12	1.40	2.95	6.12	3.68	1.39	1.35	0.00
さやまかおり	0.00	0.09	2.23	2.93	5.45	2.40	1.52	0.96	0.06
かなやみどり	0.00	0.13	0.91	3.30	6.68	4.73	1.64	1.50	0.25
ゆたかみどり	0.00	0.12	1.00	3.12	6.77	4.27	1.78	1.61	0.12
さえみどり	0.00	0.10	0.98	2.46	4.28	3.03	1.15	1.08	0.04
まきのはらわせ	0.00	0.15	0.82	2.98	6.81	4.22	2.30	1.80	0.11
べにふうき	0.00	0.16	1.41	3.99	8.14	3.62	2.57	1.42	0.74
大葉烏龍	0.00	0.26	1.10	3.80	6.23	2.76	1.02	0.78	0.31
おくゆたか	0.00	0.18	1.22	2.72	5.34	3.23	1.40	1.34	0.04
茶中間母本農6号	8.76	0.67	1.10	2.76	4.88	1.76	2.44	0.78	0.23

*EGCG；エピガロカテキン-3-O-ガラレート,EGC；エピガロカテキン,ECG；エピカテキンガラレート,EGCG3**Me；エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガラレート

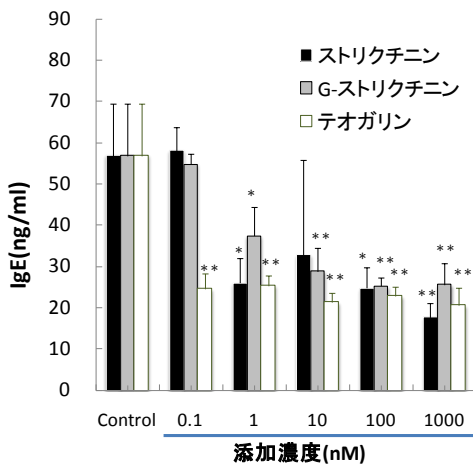


図2 ヒト末梢血リンパ球抗体産生に及ぼす加水分解型タンニンの影響

値はそれぞれの値の平均値±SD で表した。統計処理は Dunnett's test で行った。

*:control と有意差あり ($P<0.05$)、**:control と有意差あり ($P<0.01$)

[その他]

研究課題名：動物、ヒトを用いた薬理効果試験、生体吸収性・安定性・成分特性等の解明による茶葉中抗アレルギー成分、抗ストレス成分の飲食品、医薬部外品への応用

中課題整理番号：312b

予算区分：基盤

研究期間：2004～2009年度

研究担当者：山本（前田）万里、本間大樹（アサヒ飲料）、田頭素行（アサヒビール）、根角厚司、荻野暁子、物部真奈美、神田智正（アサヒビール）

発表論文等：Honma D. et al. (2010) J. Sci. Food Agric. 90:168-174

[成果情報名] 緑茶抽出液に含まれる免疫賦活活性成分とその効果的抽出法

[要約] 緑茶抽出液に含まれる免疫系の活性化に有効な茶成分は、幼葉の水溶性高分子画分に多く含まれる RNA とエピガロカテキン (EGC) であり、冷水抽出することによりこれら成分をより効果的に利用できる。

[キーワード] 茶、免疫賦活作用、水溶性高分子画分、ssRNA、EGC 比率

[担当] 野菜茶研・野菜・茶機能性研究チーム

[代表連絡先] 電話 0547-45-4101

[区分] 野菜茶業・茶業、食品

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

緑茶の免疫調節機能は以前から報告されており、水溶性高分子画分の免疫賦活作用についてはいくつかの報告があるが、その詳細は明らかではない。また、カテキン類も免疫調節作用を有する報告があるものの、その多くは抗炎症作用や抗アレルギー作用であり、免疫賦活作用についての報告は少ない。そこで、緑茶抽出液中の水溶性高分子画分 (crude tea polysaccharide: TPS) に含まれる活性成分を探索し、その作用機序と緑茶カテキン類の免疫賦活作用について明らかにするとともに、これら成分の効果的抽出法について明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. マクロファージ様細胞の貪食活性を指標に緑茶の水抽出液から分離した TPS の免疫賦活作用を評価すると、幼葉 (芽から3葉までの上位葉) 由来の TPS は、成熟葉 (4葉以下の下位葉) 由来の TPS に比べて高い免疫賦活活性を示す。活性の高い TPS は活性の低い TPS に比べて免疫賦活作用を有することが知られている核酸 (特に RNA) を多く含む (図1)。
2. TPS の活性が Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 7 の阻害作用を有する immunoregulatory DNA sequences (IRS) 661 および 954 により阻害されることから、活性を持つ TPS は、ssRNA のレセプターとして知られている TLR 7 を介して免疫賦活作用を誘導することが示唆される (図2)。
3. EGC およびエピガロカテキンガレート (EGCG) にマクロファージ様細胞の貪食能を活性化作用があり、その活性の強さは EGC > EGCG である。EGCG と EGC を 1 : 1 で混合すると活性が低下する (図3A) が、EGC 比率の上昇に伴い活性が上昇し、EGCG/EGC 比が 1 : 3 以上で有意となる (図3B)。
4. 茶の抽出温度が高温 (80℃) の場合、抽出液中の EGCG/EGC 比は免疫賦活に無効な 1 : 1 であるが、抽出温度を下げるに従い EGC の含有比が高くなり、4℃では免疫賦活に効果的な活性成分比率である 1 : 3 以上となる (図4)。また、TPS も熱水抽出よりも冷水抽出の方が、活性が高い (データ省略) ことから、冷水抽出によりこれら成分を効果的に抽出できる。

[成果の活用面・留意点]

1. 幼葉由来 TPS 及びカテキン類をマウスに経口投与した実験でも腸管免疫系 (パイエル板細胞 IgA 産生能) の活性化において同様の結果を得ている。

[具体的データ]

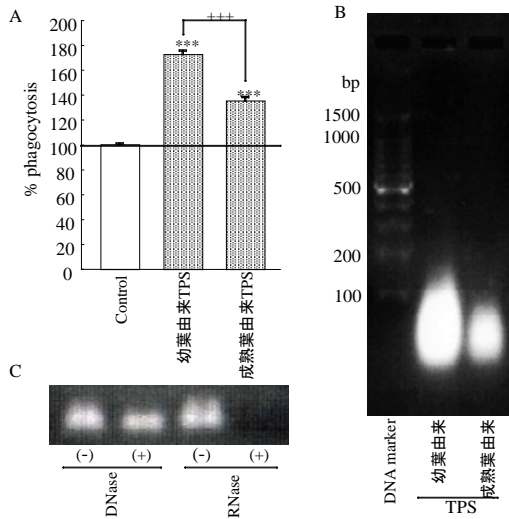


図1 成熟または幼葉由来の TPS の免疫賦活活性の違いと RNA 含有量の違い

A: TPS (100 $\mu\text{g/mL}$) のマクロファージ様細胞に対する食食刺激活性。TPS を添加しないコントロールの活性を 100% とする相対値。B: TPS のアガロースゲル電気泳動像 (EtBr 染色)。C: DNA 分解酵素又は RNA 分解酵素で処理した TPS のアガロースゲル電気泳動像 (EtBr 染色)。

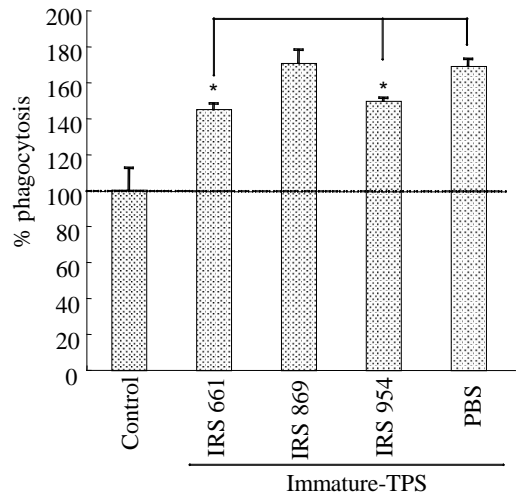


図2 TLR 阻害作用を有する IRS による幼葉由来 TPS の活性変化

TPS を添加しないコントロールの活性を 100% とする相対値。IRS661 は TLR7、IRS954 は TLR7 および TLR9、IRS869 は TLR9 の活性を阻害する。IRS 濃度は 1 μM 。PBS は無阻害コントロール (IRS 添加なし)。* $p < 0.05$ vs. PBS

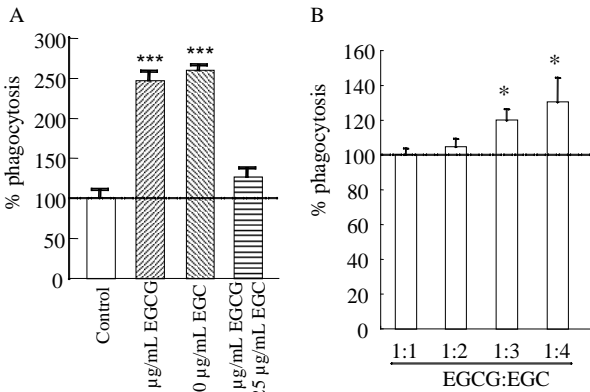


図3 茶に含まれる主要カテキンである EGCG と EGC の免疫賦活活性

A: EGCG、EGC と混合液 (1:1) の食食刺激活性。培養液中の総カテキン濃度は 50 $\mu\text{g/mL}$ 。カテキンを添加しないコントロールの活性を 100% とする相対値。B: EGCG と EGC の混合比を変えたカテキン溶液の食食刺激活性。1:1 の活性を 100% とする相対値。培養液中の総カテキン濃度は 100 $\mu\text{g/mL}$ 。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Control or 1:1

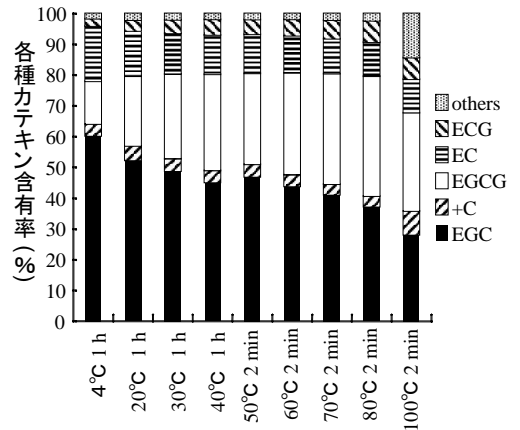


図4 茶を抽出する時の水温の違いによるカテキン成分の含有比率の違い

茶葉 2.5 g に対して D.W. 100 mL で抽出。

[その他]

研究課題名：野菜・茶の免疫調節作用、生活習慣病予防作用を持つ機能性成分の評価法と利用技術の開発

中課題整理番号：312b

予算区分：基盤

研究期間：2006～2009 年度

研究担当者：物部真奈美、山本（前田）万里

発表論文等：(1) Monobe et al. (2007) J. Agric. Food Chem. 55: 2543-2547

(2) Monobe et al. (2008) J. Agric. Food Chem. 56: 1423-1427

[成果情報名]「べにふうき」緑茶連続飲用による血圧上昇抑制

[要約] 血圧が高めの被験者が「べにふうき」緑茶を8週間連続飲用すると、試験開始時に比べ有意に収縮期血圧が低下する。

[キーワード] エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(メチル化カテキン; EGCG3"Me)、 「べにふうき」緑茶、収縮期血圧、アンジオテンシンI変換酵素 (ACE)、ミオシン軽鎖リン酸化抑制

[担当] 野菜茶研・野菜・茶機能性研究チーム

[代表連絡先] 電話 0547-45-4101

[区分] 野菜茶業・茶業、食品

[分類] 技術・参考

[背景・ねらい]

茶葉中カテキン、特にエピガロカテキンガレート (EGCG) は血圧上昇に関わるアンジオテンシンI変換酵素活性の阻害作用を持つことが知られている。そこで、EGCGと構造が類似したメチル化カテキン (EGCG3"Me) を多く含有する「べにふうき」緑茶の新たな機能性を見出すため、血圧が高めの被験者に飲用させるヒト介入試験を行い、その作用機序を解明する。

[成果の内容・特徴]

1. 血圧が少し高めの正常高値血圧 (収縮期血圧 130~139mmHg または拡張期血圧 85~89mmHg) および軽症高血圧 (収縮期血圧 140~159mmHg または拡張期血圧 90~99mmHg) の成人男性 10 人に「べにふうき」緑茶 (EGCG3"Me 34mg、EGCG 126mg 含有) ティーバッグを熱湯で抽出し、1日2回ずつ飲用してもらうオープン試験では、飲用4週間後から血圧が低下し、8週間後では収縮期で有意な低下 (平均 8.65mmHg) が認められる (図1)。
2. 軽症高血圧の成人男性 20 人を無作為に2群に分け、「べにふうき」緑茶 (EGCG3"Me 25mg、EGCG 122mg 含有)、「やぶきた」緑茶 (EGCG 151mg 含有) カプセルを1日2回ずつ摂取してもらう群間比較二重盲検試験では、「べにふうき」群では、摂取8週間後ではスタート時に比べ、収縮期で平均 6.2mmHg、拡張期で平均 3.2mmHg 低下し、「やぶきた」群との差が認められる (図2)。
3. EGCG3"Me および EGCG は、アンジオテンシン II を生成して血圧上昇の原因となるアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 活性を抑制する。その強さは EGCG3"Me > EGCG であり、0.1mM 以上で両者間で有意差がある (図3)。
4. EGCG3"Me および EGCG は、本態性高血圧を抑制すると考えられる平滑筋収縮に関わるミオシン軽鎖(MLC)リン酸化 (*in vitro* 試験) を抑制し、その強さは EGCG > EGCG3"Me である。動物が肝臓で EGCG から代謝物として生成する EGCG4"Me には MLC リン酸化抑制活性は認められない (図4)。

[成果の活用面・留意点]

1. MLC リン酸化では、上記のカテキンの他、弱いながらエピカテキンガレート (ECG) も抑制効果を示す。

[具体的データ]

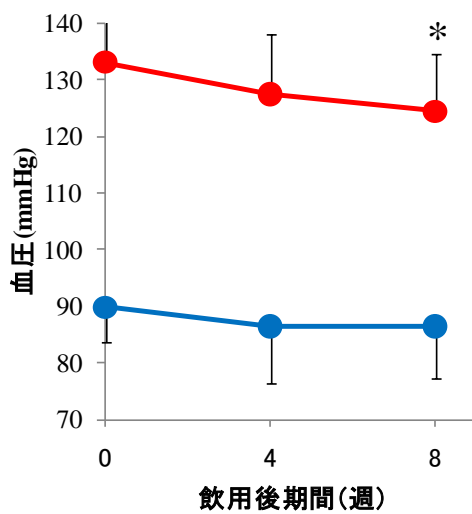


図1 血圧に与える「べにふうき」緑茶連続飲用の影響（オープン試験）

●：収縮期血圧、●：拡張期血圧、値はそれぞれ週のスコアの平均値±SD で表す。統計処理は Student t-test。*:スタート時と有意差あり (P<0.05)

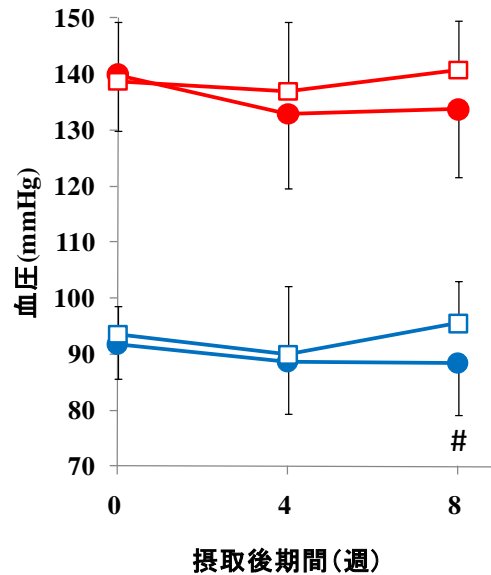


図2 血圧に与える「べにふうき」緑茶連続摂取の影響（群間比較二重盲検試験）

●：べにふうき緑茶、□：やぶきた緑茶、上側（赤）が収縮期血圧、下側（青）が拡張期血圧を示す。統計処理は Student t-test。#:やぶきた群に対する差あり (P<0.1)

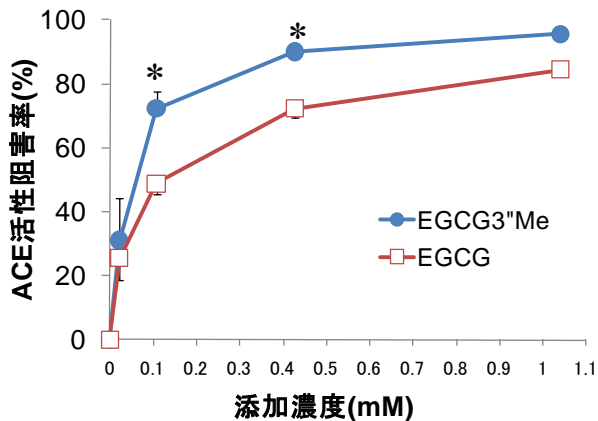


図3 アンジオテンシン I 転換酵素 (ACE) 活性に及ぼすカテキンの影響

●：EGCG3"Me、□：EGCG、値は平均値(n=3)±SD で表す。統計処理は、Dunnett's test。*:EGCG と有意差あり (P<0.05)。

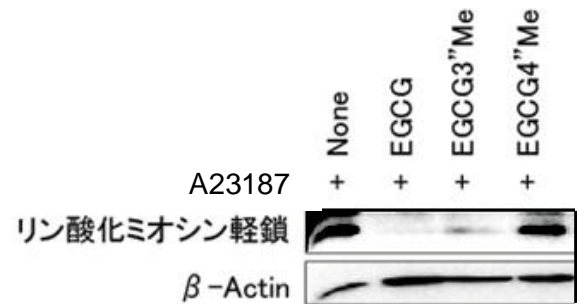


図4 リン酸化ミオシン軽鎖レベルに及ぼす茶葉中カテキンの影響

KU812 細胞に各成分 50μM 添加後、カルシウムイオノフォア A23187 5μM で刺激後の状態をウエスタンブロットで検出。EGCG4"Me;エピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル) ガレート。β-Actin はハウスキーピング遺伝子として正常発現のコントロールとした。

[その他]

研究課題名：動物、ヒトを用いた薬理効果試験、生体吸収性・安定性・成分特性等の解明による茶葉中抗アレルギー成分、抗ストレス成分の飲食品、医薬部外品への応用

中課題整理番号：312b

予算区分：基盤、委託プロ（食品）

研究期間：2006～2009 年度

研究担当者：山本（前田）万里、栗田郁子（森永製菓）、亀井優徳（森永製菓）、立花宏文（九州大学）

発表論文等：1)山本ら「血圧調整剤及びこの血圧調整剤を含有した医薬品」特開2007-70338

2)Kurita I. et al. (2010) J.Agric. Food Chem. 58:1903-1908

[成果情報名]可視・近赤外分光法を用いるトマトリコペン含有量の簡易非破壊計測

[要約]可視・近赤外分光法を用いる非破壊計測により、トマトのリコペン含有量が簡易に計測できる。

[キーワード]トマト、リコペン、可視・近赤外分光法、非破壊計測

[担当]野菜茶研・野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム

[代表連絡先]電話 059-268-4636

[区分]野菜茶業・野菜品質・機能性、食品

[分類]技術・普及

[背景・ねらい]

リコペン（全てトランス型）は桃色系および赤色系トマト果実中の主要なカロテノイド（赤色素）であり、機能性成分として注目されている。また、熟度指標としても利用できる。糖度は着色開始頃から変わらないが熟したトマトの方が食味は良いと言われており、熟度を評価することにより糖度だけでは不足する食味評価を補うことが出来るため、生産・流通業者から簡易で高精度な計測法開発の要望が高い。

トマトに含まれるリコペンの非破壊計測においては、有効な波長が可視域に存在するために色の測定値や568nmの吸光度の利用が検討されてきたが、より一層の信頼を得るためには精度の向上を図る必要がある。そこで、トマトに含まれるリコペン含有量をより高精度に（誤差を小さく）非破壊計測するため、可視・近赤外分光法を用いる方法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. トマトの赤道部を試料台中央にある受光部にセットして2カ所計測（図1）し、その平均値を1果実の値（果実全体の平均濃度）とする。着色むらが明らかな場合は着色の薄い部分と、通常着色が濃いその反対側を計測する。1回の計測に要する時間は1秒以内である。
2. 非破壊計測時の鍵となる波長は500～630 nmの間に存在し、リコペン含有量が高くなると吸収が強くなってピークが長波長側にシフトする（図2a）。鍵となる2次微分スペクトルの可視域の波長（568、626nm）と組み合わせる補正的な近赤外域の波長として、品温や光路長を補正可能な856nmやブロードな水の吸収帯に位置する946nm（図2b）を採用する（表1）。
3. 上述の可視および近赤外域の波長における吸光度の2次微分値を組み合わせることで次の非破壊計測検量線（重回帰式）が作成できる。

$$\text{リコペン(mg/100g)} = 8.17 - 5 \times A''_{568} + 6960 \times A''_{626} - 123000 \times A''_{856} - 12500 \times A''_{946}$$

* $A''_{\text{波長}}$: 各波長(nm)における吸光度の2次微分値

4. リコペンの実測値と非破壊計測値との間には高い相関が認められ、リコペン含有量が計測範囲7～18mg/100gにおいて、ほぼ誤差20%以内で計測可能である（図3）。

[成果の活用面・留意点]

1. トマトの生産、育種、流通現場で熟度、食味、リコペン含有量評価に活用できる。
2. 本成果はフルーツセレクターの波長拡張型（株）クボタ）を利用する場合に得られた結果である。本装置では糖度も同時に非破壊計測できる。
3. 非破壊計測時には室内の蛍光灯下より明るい場合に、トマトを黒布で覆うなどして外光を遮断する必要がある。
4. リコペン含有量が7mg/100g以下のトマトおよび18mg/100g以上の高いトマトでは、非破壊計測時の誤差が大きくなる。後者の小果では非破壊計測値が低くなる傾向がある。
5. 従来のハンディ型色差計を用いる非破壊計測と比較すると、誤差は小さい。
6. 近赤外分光法を用いる果実糖度の非破壊計測と誤差は同程度である。

[具体的データ]



図1 トマト品質の非破壊計測 (インタラクタンス方式) 光ファイバー末端の試料台の外側から可視・近赤外光がリング状にトマトに照射され、吸収された光が試料台の中央部にある受光部で検出される様子を示す。

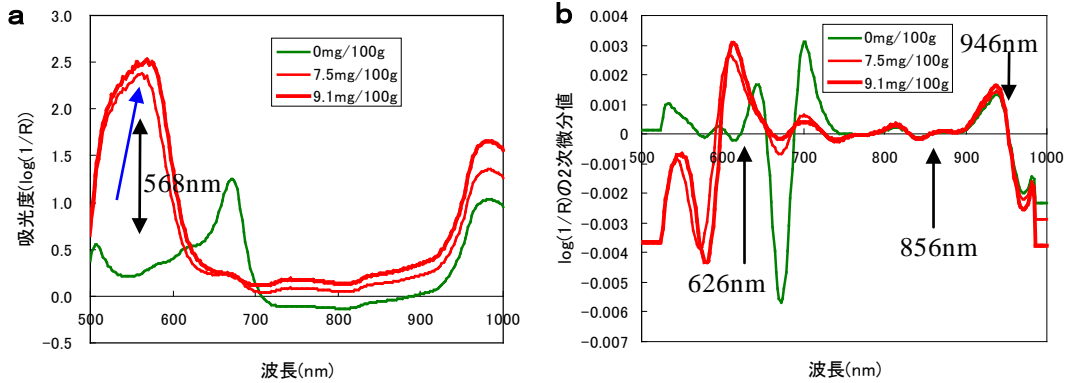


図2 トマトの可視・近赤外スペクトル
a 原スペクトル、b 2次微分スペクトル (「ボンジョルノ」のリコペン含有量0 (未熟果)、7.5 (赤熟)、9.1mg/100g (完熟)、青色矢印はピークのシフトを示す。)

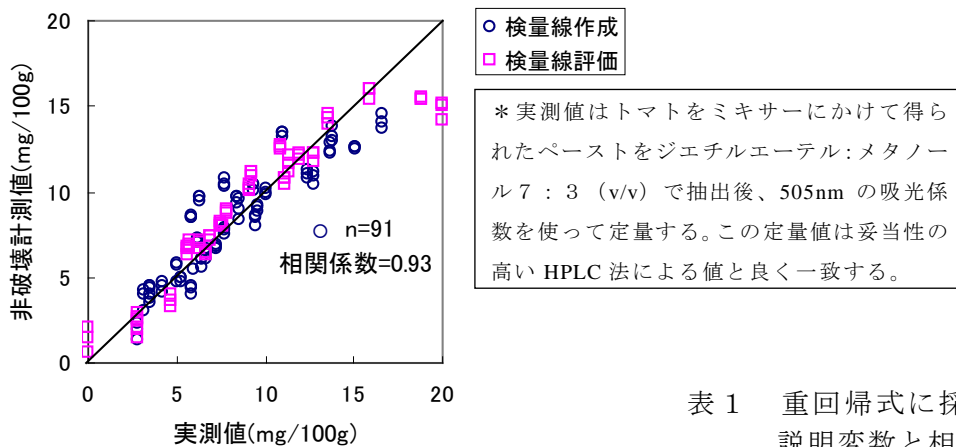


図3 トマトのリコペン含有量の実測値*と非破壊計測値のプロット

表1 重回帰式に採用した説明変数と相関係数

重回帰式の説明変数*	相関係数
568、626nm	0.91
568、626、856、946nm	0.93

*示した波長における吸光度の2次微分値

[その他]

研究課題名：野菜の安全性評価法の高度化技術の開発

中課題整理番号：323c

予算区分：実用技術

研究期間：2007～2009年度

研究担当者：伊藤秀和、森本進（株）クボタ）、堀江秀樹

発表論文等：伊藤、森本（2009）照明学会誌、93:510-513

[成果情報名] 2,3-*trans*-ガレート型カテキンを認識する水溶性非環状ファン化合物

[要約] 3つの芳香環から構成される水溶性非環状ファンレセプター (1, 2) は、8種類のカテキン類 (EGCG、ECG、GCG、CG、EGC、EC、CG、C) と水中で 1:1 の複合体を形成する。特にレセプター (1) は 2,3-*trans*-ガレート型カテキンに対して高い親和性を有する。

[キーワード] 非環状ファン化合物、カテキン類、複合体、センシングデバイス

[担当] 野菜茶研・野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム

[代表連絡先] 電話 0547-45-4101

[区分] 野菜茶業・茶業、食品

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

カテキン類に対する高度なセンシング技術を実現するためには、その分子構造を識別するレセプター分子の開発が不可欠である。カテキン類のような芳香族化合物の水中における分子認識は、これまでシクロファンやシクロデキストリン等の環状化合物を利用して行われてきた。しかし、センシングデバイスへの応用を考慮すると、合成の簡便さから非環状化合物を用いる方が有利である。そこで、水溶性非環状ファン化合物を化学合成し、カテキン類との親和性を評価することにより、レセプター分子としての有効性を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. レセプター (1, 2) は、イソフタロイルクロリドとフタロイルクロリドからそれぞれ 4 工程で簡便に合成することができる (図 1)。
2. レセプター (1, 2) は共に、8種類のカテキン類 (EGCG、ECG、GCG、CG、EGC、EC、CG、C) と水中で化学量論比 1:1 の複合体を形成する ($^1\text{H-NMR}$ を用いた Job プロットによる解析)。
3. レセプター (1) は非ガレート型カテキンよりもガレート型カテキンと強く結合する。さらに、ガレート型カテキンの中では、2,3-*trans* 型に高い親和性を示す (表 1)。
4. レセプター (2) も、2,3-*trans*-ガレート型カテキンに対して相対的に高い親和性を有する傾向はあるが、レセプター (1) と比較すると、その結合力は小さい (表 1)。
5. レセプター (1) と GCG (2,3-*trans*-ガレート型カテキン) の混合水溶液の NOESY スペクトル (空間的に近い核に関する情報が得られる NMR スペクトル) は、図 2 (a) の両矢印で結ばれたプロトン間に分子間のクロスピークを与える。したがって、2,3-*trans*-ガレート型カテキンに対するレセプター (1) の結合部位は三つの芳香環で囲まれた空間であると推測される。
6. レセプター (1) と EGCG (2,3-*cis*-ガレート型カテキン) の混合水溶液の NOESY スペクトルは、図 2 (b) の両矢印で結ばれたプロトン間に分子間のクロスピークを与える。この結果は、レセプター (1) と 2,3-*cis*-ガレート型カテキンの間に、同程度のエネルギーを持つ複数の複合体構造が存在することを示唆する。
7. レセプター (1) がカテキン類の化学構造の差異を認識可能である事実は、レセプター分子として非環状ファン化合物の有効性を示すものである。

[成果の活用面・留意点]

1. レセプター (1) の化学構造は、カテキン類に応答するセンサーやクロマトグラフィーカラム充填剤の修飾に応用可能である。

[具体的データ]

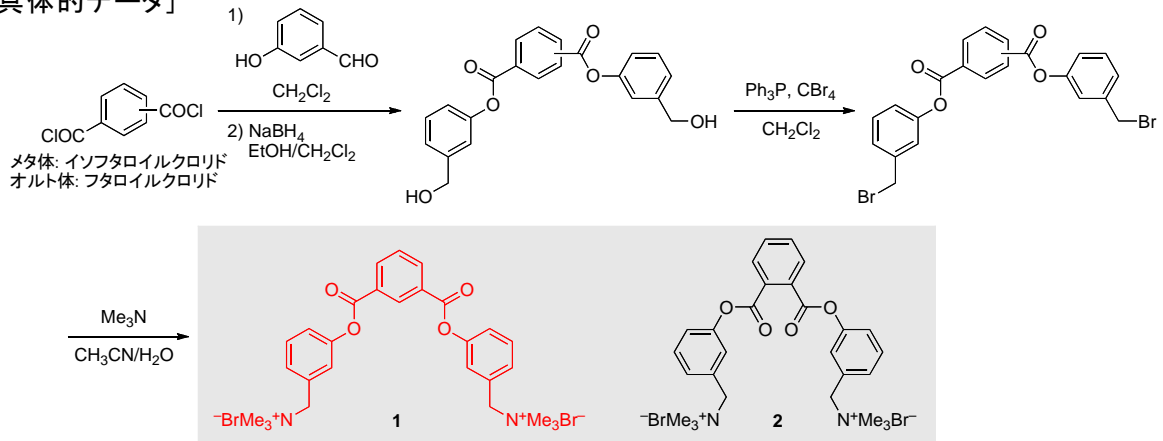


図1 レセプター (1、2) の合成

表1 $^1\text{H-NMR}$ 滴定法によって算出されたレセプター (1、2) と8種類のカテキン類との重水中 (300 K) における結合定数 (M^{-1})

レセプター	ガレート型				非ガレート型			
	EGCG	ECG	GCG	CG	EGC	EC	GC	C
1	310 ± 9	362 ± 11	698 ± 13	766 ± 24	69 ± 6	59 ± 15	102 ± 7	100 ± 15
2	123 ± 7	106 ± 12	286 ± 16	279 ± 12	108 ± 16	80 ± 16	81 ± 16	77 ± 16

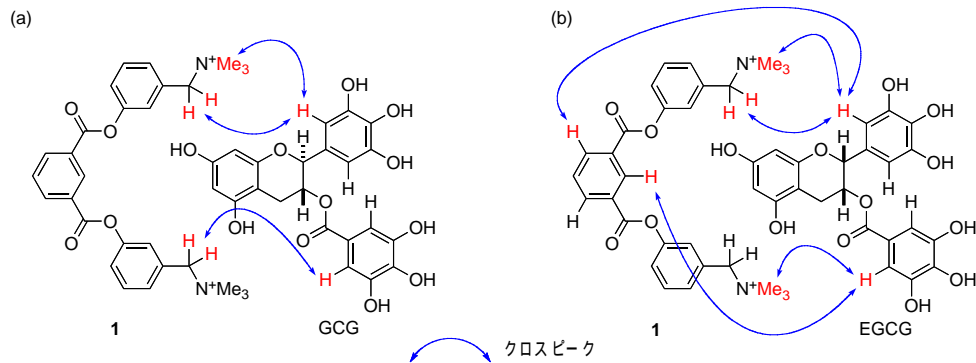


図2 レセプター (1) と GCG および EGCG の水溶液の NOESY スペクトル上で観測される分子間のクロスピーク (図中の矢印で結ばれるプロトン同士は空間的に近い位置にある)

[その他]

研究課題名: 野菜・茶の食味食感評価法の高度化と高品質流通技術の開発

中課題整理番号: 311g

予算区分: 所内プロ (次世代味覚センサ)

研究期間: 2008~2009 年度

研究担当者: 林宣之、氏原ともみ

発表論文等: Hayashi N. and Ujihara T. (2008) J. Org. Chem. 73:4848-4854

[成果情報名]水溶液中でのモノグルコシルルチン／カテキン複合体形成による淡色効果

[要約]緑茶由来のカテキン類は水溶液中で黄色のフラボノール配糖体であるモノグルコシルルチンと複合体を形成し、淡色効果を起こす。この効果はガレート型カテキンの方が非ガレート型カテキンより大きい。

[キーワード]茶、モノグルコシルルチン、カテキン類、複合体形成、淡色効果、水色

[担当]野菜茶研・野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム

[代表連絡先]電話 0547-45-4101

[区分]野菜茶業・茶業、食品

[分類]研究・参考

[背景・ねらい]

緑茶水色の主体をなすフラボノール配糖体は芳香族化合物であり、カテキン類など他の芳香族化合物と容易に複合体を形成し、その結果フラボノール配糖体水溶液の色が変化すると予想される。そこで、緑茶浸出液における水色の発現機構の一端を解明するために、フラボノール配糖体とカテキン類との複合体形成の有無、またそれによるフラボノール配糖体水溶液の色の変化を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. ルチンに1分子のグルコースが結合したモノグルコシルルチン(図1)水溶液に、茶浸出液中での存在比を反映するようモル比で4当量のカテキン類を添加すると、淡色効果が起こるが、その淡色効果はガレート型カテキンの方が非ガレート型よりも大きい。2,3-*cis*-ガレート型カテキン[エピガロカテキンガレート(EGCG)、エピカテキンガレート(ECG)]と2,3-*trans*-ガレート型カテキン[ガロカテキンガレート(GCG)、カテキンガレート(CG)]との間には顕著な差は見られない(図2)。
2. この淡色効果はモノグルコシルルチン／カテキン複合体の形成によるものであり、これらの複合体の化学量論比は1:1である(分光光度計を用いたJob plotによる解析より)。表1に示した結合定数の大きさより、ガレート型カテキンの方が非ガレート型よりもモノグルコシルルチンとの複合体を形成しやすいと言え、この違いが淡色効果の大きさに反映されると考えられる。また2,3-*trans*-ガレート型カテキンの方が2,3-*cis*-ガレート型カテキンよりも結合定数が大きい(表1)。
3. カテキン分子のどの部分が複合体形成に関与しているのかを明らかにするために、カテキン分子のA環、水酸基が2つまたは3つのB環、およびガロイル基を模した4種類のポリフェノール(それぞれ5-メトキシレゾルシノール、カテコール、ピロガロールおよびメチルガレート)について、それぞれモノグルコシルルチンとの複合体形成の有無を確認すると、ガロイル基に相当するメチルガレートのみが淡色効果を起こし大きな結合定数を示す(表1)。5-メトキシレゾルシノールおよびピロガロールはわずかにモノグルコシルルチン水溶液の吸光度を変化させるが、変化が小さすぎるため結合定数は算出不可能である。カテコールでは吸光度は変化しない。したがって、モノグルコシルルチンとの複合体形成においてはカテキン分子内のガロイル基が主要な役割を担うと考えられる。

[成果の活用面・留意点]

1. 本成果は、ケルセチンの配糖体であり、茶に含有される主要なフラボノール配糖体の一つであるルチンの誘導体のモノグルコシルルチンをモデル化合物として使用しての実験結果である。ルチンとの構造の類似性から、緑茶に含有されるフラボノール配糖体についても同様の現象が起こりうると考えられる。

[具体的データ]

図1 モノグルコシルルチンおよびルチンの構造

図2 カテキン類添加によるモノグルコシルルチン水溶液の吸光度の変化

A: 2,3-*cis*-カテキン/モノグルコシルルチン, B: 2,3-*trans*-カテキン/モノグルコシルルチン
EGCG:エピガロカテキンガレート, ECG:エピカテキンガレート, EGC:エピガロカテキン、
EC:エピカテキン、GCG:ガロカテキンガレート、CG:カテキンガレート、GC:ガロカテキン、
C:カテキン

表1 水溶液中 (26°C) でのモノグルコシルルチン/カテキン複合体の結合定数 (M⁻¹)^a

	EGCG	ECG	EGC	EC	GCG	CG	GC	C	メチル ガレート
結合定数	6660	6804	1700	- ^b	17659	18518	1186	479	7128

^a 誤差は ECG で 15%、EGCG と GC で 20%、EGC、GCG、CG およびメチルガレートで 25%、
C で 35%

^b 誤差が大きいため算出不能

[その他]

研究課題名：野菜・茶の食味食感評価法の高度化と高品質流通技術の開発

課題 ID：311g

予算区分：所内プロ（緑茶水色発現機構）

研究期間：2007～2008 年度

研究担当者：氏原ともみ、林宣之

発表論文等：Ujihara T. and Hayashi N. (2009) Biosci. Biotechnol. Biochem. 73 (12) :2773-2776

[成果情報名] キュウリの「ヘタ」と「実」の切り口をこすりあわせることにより渋味を低減できる

[要約] キュウリ果実を切断すると、維管束から渋い液が滲出する。渋味成分（アク）の主体はギ酸である。果実のツル側の先端部分（ヘタ）を切断し、残った部分（実）と切り口同士をこすりあわせると、果実中の維管束液の量が減少し、果実の渋味を低減できる。

[キーワード] キュウリ、ギ酸、渋味、維管束、アク抜き、食味改善

[担当] 野菜茶研・野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム

[代表連絡先] 電話 059-268-4101

[区分] 野菜茶業・野菜品質・機能性、食品

[分類] 研究・参考

[背景・ねらい]

キュウリ果実のヘタ（果実のツル側の先端部分）を切断し、実（残った果実部分）と切り口同士をこすりあわせるとアクがとれるという伝承があるが、真偽は定かではなかった。そこで、アクの原因物質を解明し、アク抜きのメカニズムを明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. キュウリ果実を輪切りにすると、果皮近傍の維管束から液が滲出する。この液には渋味がある。
2. 維管束から滲出した液には 100mg/L 以上の濃度でギ酸が含まれ（図1）、またギ酸塩の水溶液は維管束滲出液同様の渋味がある。一方、果実全体から調製した液中ではギ酸は定量限界以下となり検出されないことから、果実の維管束中に局在するギ酸が渋味に寄与すると考えられる。
3. あらかじめ果実のツル側の端（ヘタ）を切りとり（図2）、残りの部分（実）とこすりあわせてから、果実中央部で切断すると、この処理をせずに切断した時と比べて、切り口に滲出する液の量は低下する（図3）。
4. ヘタと実のこすりあわせによって、官能的にも渋味が低下する（図4）。本処理によって、果実の維管束中のギ酸を含む液が排出されるため、渋味が低下するものと考えられる。
5. ヘタと実をこすりあわせる調理手法は、果実の渋味を低下させるので、アク（渋味）抜きに有効である。

[成果の活用面・留意点]

1. キュウリの果汁全体が渋いのではなく、渋味が強いのは、キュウリの切り口に滲出する液のみである。この滲出液は短時間に固化し、固化すると渋味を示さなくなる。ヘタと実のこすりあわせによる渋味の低下は、切断直後のキュウリを食べる際に特に認知しやすい。
2. 調理方法として汎用されるキュウリの板ずりについても、果皮近傍の組織を破壊するため、維管束に溜まった渋味成分を除去する効果が期待できる。

[具体的データ]

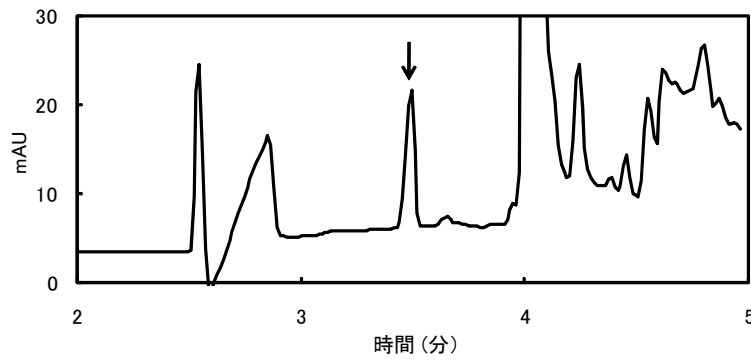


図1 キュウリ果実切断面に滲出した液をキャピラリー電気泳動法により分析した結果

↓: ギ酸 (切り口に滲出した液中の濃度 100mg/L) .

<分析条件>キャピラリー管: 内径 0.075mm ×長さ 80cm,
電圧: -30kV, 検出: 200nm (間接), 電気泳動液: 10mM 2,6-ピリジンジカルボン酸, 0.5mM セチルトリメチルアンモニウムブロミド,
pH 4.5.

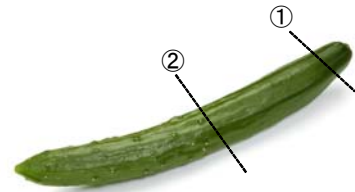


図2 キュウリの切断部位

①で切断し、右上を「ヘタ」、左下を「実」とした。②で切断し、滲出液を収集した。

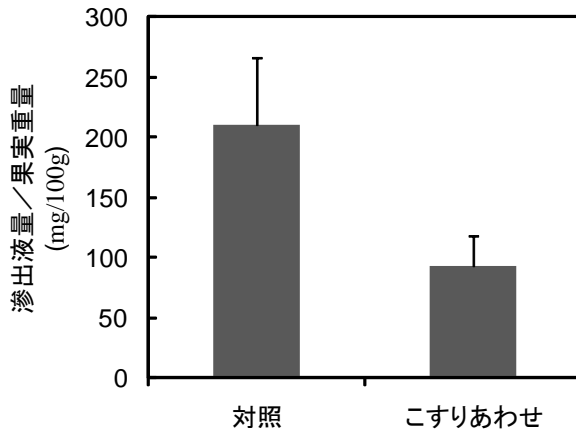


図3 ヘタと実のこすりあわせによる切り口への滲出液量の低減 (n=5)

図2の①で切断し、2分間こすりあわせ処理をした後に②で切断し、切り口に滲出した液量をティッシュペーパーにしみこませ定量。対照区では①での切断・こすりあわせ処理を省いた。

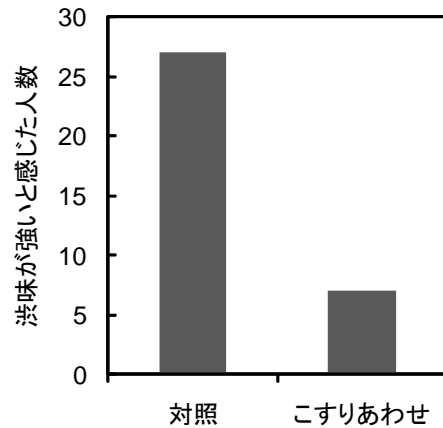


図4 ヘタと実のこすりあわせによる渋味の低減効果

図2の①で切断し、2分間こすりあわせ処理した後に②の部位を素手で折り、直ちに折った部位を喫食させた。対照区では切断・こすりあわせ処理を行わずに喫食し、渋味の強い方を回答させた。

1%水準の危険率で有意差あり (n=34)。

[その他]

研究課題名: 野菜・茶の食味食感評価法の高度化と高品質流通技術の開発

中課題整理番号: 311g

予算区分: 委託プロ (加工)

研究期間: 2006 ~ 2009 年度

研究担当者: 堀江秀樹、玉木有子 (新潟医療福祉大)

発表論文等: 堀江、玉木 (2008) 日本調理科学会誌、41:378-382

[成果情報名]マクロファージからのロイコトリエン B₄ 産生を抑制する乳酸菌の簡易検索法

[要約]炎症反応を引き起こすロイコトリエン B₄ の産生を抑制する乳酸菌の検索に使用できる。当該方法は培養細胞を用いており、動物・ヒトから採取した白血球を用いる従来法よりも簡便である。

[キーワード]プロバイオティクス、乳酸菌、抗炎症、ロイコトリエン B₄

[担当]畜産草地研・畜産物機能研究チーム

[代表連絡先]電話 029-838-8688

[区分]畜産草地

[分類]研究・普及

[背景・ねらい]

ロイコトリエン B₄ (LTB₄) は生体恒常性維持などの生体調節機能を持つ重要な物質であるが、過剰に生産されると炎症反応を引き起こし、炎症性腸疾患などの原因になるとされている。これまで LTB₄ 産生を抑制する物質の検索においては、動物・ヒト (ドナー) から LTB₄ 産生細胞を採取して行なわれてきたが、操作が煩雑であり、ドナーの状態により結果が異なる可能性が指摘されている。近年、乳酸菌による生理的効用 (プロバイオティック機能) について世界的に関心が高まってきている。そこで本研究では容易に入手できる培養細胞を用い、乳酸菌を被験物質として、LTB₄ 産生抑制活性の簡易検索法を開発することを目的とする。

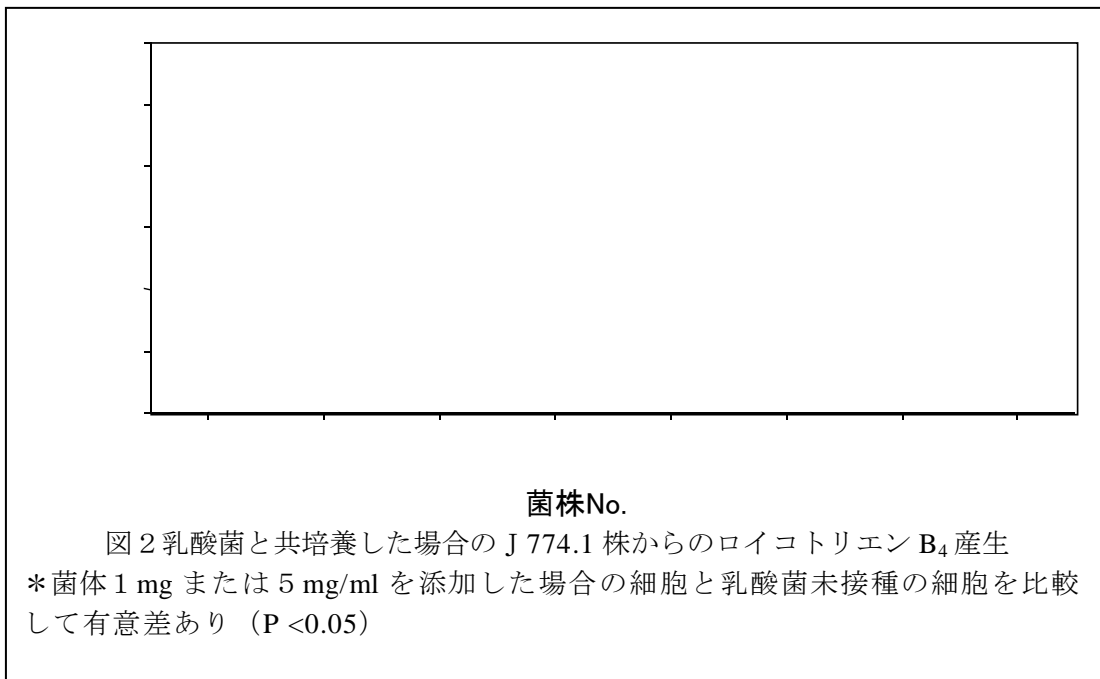
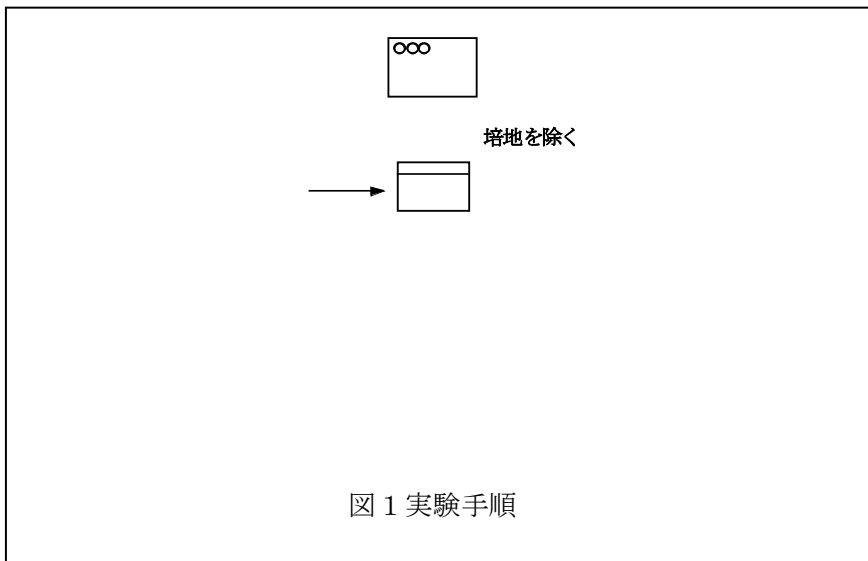
[成果の内容・特徴]

1. BALB/c マウス由来マクロファージ J 774.1 株 (アメリカンタイプカルチャーコレクション TIB67、理化学研究所バイオリソースセンター J 774.1) を 5×10^5 /ml で播種し、10%ウシ胎児血清 (FCS) -RPMI1640 培地 (100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、0.5 μ M 2-メルカプトエタノール添加) で2日間培養後、乳酸菌 (生菌、1 mg または 5 mg/ml) を、カルシウムイオノフォア A23187 (20 μ g/ml エタノール) 存在下で共培養し、培養2-3時間後の培養上清中の LTB₄ 量を測定する (図1)。
2. 汎用されている培養細胞株を用いてもマクロファージからの LTB₄ 産生を確認できる (図2)。カルシウムイオノフォア無添加の場合、LTB₄ 産生は検出されなかった。
3. 供試した乳酸菌7株について、菌株により差はあるものの5 mg/ml 添加では、供試したすべての乳酸菌にマクロファージからの LTB₄ 産生抑制活性が見られる (図2)。

[成果の活用面・留意点]

1. ドナーを必要としない簡便な LTB₄ 産生抑制活性を有する乳酸菌の検索法として利用できる。
2. 乳酸菌以外の物質についても簡便な LTB₄ 産生抑制活性測定法として応用が見込まれる。
3. J 774.1 以外の培養細胞株については、実験条件の検討が必要である。
4. 選抜された乳酸菌の抗炎症作用の実証には、生体での効果の検証が必要である。

[具体的データ]



[その他]

研究課題名：プロバイオティック乳酸菌等を活用した機能性畜産物の開発

中課題整理番号：312d

予算区分：基盤、委託プロ（食品）

研究期間：2006～2009 年度

研究担当者：木元広実、鈴木チセ、小林美穂、佐々木啓介、水町功子

発表論文等：Kimoto-Nira et al. (2009) Int J Food Microbiol. 129:321-324

[成果情報名] イネ品種「初山吹」由来の新規アルカロイド oryzamutaic acids B～G の構造

[要約] oryzamutaic acids B～G (2～7) は、イネ品種「初山吹」の胚乳に含まれる特異な含窒素複素環骨格を有する新規アルカロイドである。

[キーワード] 水稻、初山吹、アルカロイド、oryzamutaic acids B～G

[担当] 九州沖縄農研・イネ発酵 TMR 研究チーム

[代表連絡先] 電話 0942-52-0670

[区分] 九州沖縄農業・水田作、作物

[分類] 研究・普及

[背景・ねらい]

九州沖縄農業研究センターは、イネ品種「キヌヒカリ」に γ 線を照射することで突然変異を誘発させ、胚乳が黄色を呈する品種「初山吹」を育成した（平成 20 年度研究成果情報）。「初山吹」は、その呈色から識別性を必要とする飼料米、酒造用掛米、黄色素原料などへの利用が期待されている。近年担当者らは、「初山吹」の胚乳より、新規黄色素 oryzamutaic acid A を単離した（平成 20 年度研究成果情報）。oryzamutaic acid A (1) は、特異な含窒素複素環骨格を有するため、その生合成の点から非常に注目されている。本研究では、「初山吹」胚乳由来の黄色素に関する研究の一環として、その胚乳に含まれる未知成分の同定を行う。

[成果の内容・特徴]

1. oryzamutaic acids B～G (2～7) は、「初山吹」の胚乳（精米）をメタノール水溶液 (MeOH/H₂O, 1:9) で抽出し、その抽出物を C₁₈ カラムおよび C₁₈ HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で分離・精製することにより単離される。
2. oryzamutaic acids B (2) および C (3) の分子式は、HRESIMS（高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析）の結果より、C₁₇H₂₃N₃O₄（不飽和度が 8）である。これらは、¹³C NMR（核磁気共鳴）および DEPT（Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer）135 スペクトルの解析結果より、2 個のカルボニル基を含む 4 個の 4 級炭素、7 個のメチン炭素、および 6 個のメチレン炭素からなる 17 個の炭素を持つ。また oryzamutaic acids D～G (4～7) の分子式は、C₁₇H₂₅N₃O₄（不飽和度が 7）である。これらは、2 個のカルボニル基を含む 4 個の 4 級炭素、5 個のメチン炭素、および 8 個のメチレン炭素からなる 17 個の炭素を持つ。
3. oryzamutaic acids B (2) および C (3) の構造および相対立体配置は、1D NMR (¹H NMR、¹³C NMR) および 2D NMR (¹H-¹H DQFCOSY、HSQC、HMBC、NOESY) スペクトルの解析結果より、それぞれ図 1 の 2 および 3 である。また oryzamutaic acids D～G (4～7) の構造および相対立体配置は、それぞれ図 1 の 4～7 である（oryzamutaic acid E (5) は単結晶 X 線構造解析の結果により推定）。
4. oryzamutaic acids A～C (1～3) は C-7 と C-8、N-3 と C-13、および C-5 と C-6 間の二重結合を有し黄色であるが、oryzamutaic acids D～G (4～7) は C-7 と C-8 間の二重結合がなく無色である（図 1）。
5. oryzamutaic acid A (1) および oryzamutaic acids B～G (2～7) は、それぞれ 4 および 3 分子のアミノ酸から生合成されると考えられる。

[成果の活用面・留意点]

1. oryzamutaic acids A～G (1～7) の生合成に関する研究や「初山吹」の胚乳の安全性および機能性に関する研究における基礎的な知見として利用できる。
2. oryzamutaic acid E (5) の単結晶 X 線構造解析データは、Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-1223-336-033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk) から無料で得られる (CCDC 746590)。

[具体的データ]

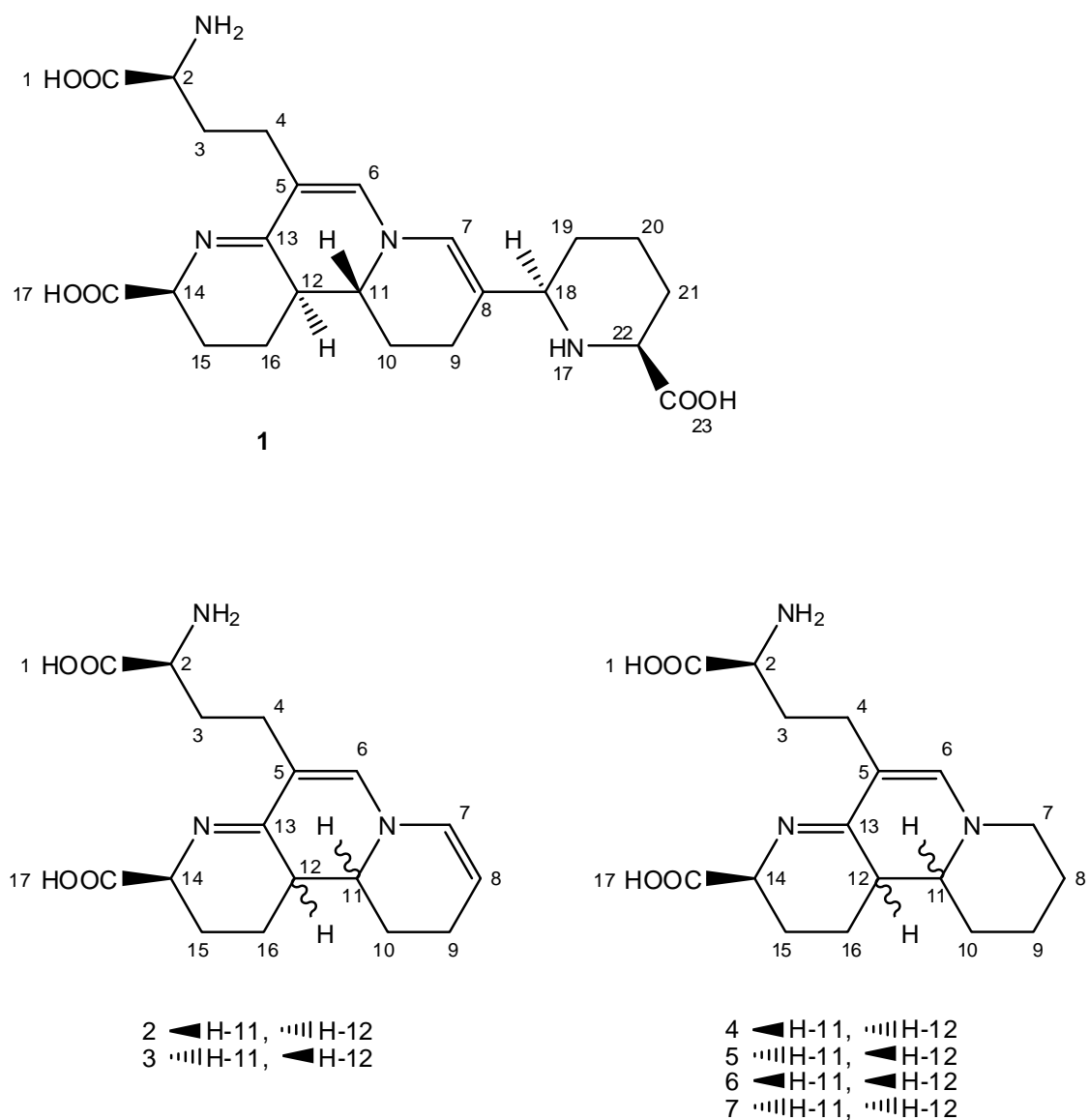


図1 oryzamutaic acids A ~ G (1 ~ 7) の構造

[その他]

研究課題名：地域条件を活かした飼料用稲低コスト生産技術及び乳牛・肉用牛への給与技術の確立

課題 ID：212b.5

予算区分：基盤

研究期間：2006 ~ 2009 年度

研究担当者：中野洋、小瀬村誠治（慶應義塾大学）、吉田充、鈴木利貞（香川大学）、岩浦里愛、梶亮太、坂井真、広瀬克利（神戸天然物化学株式会社）

発表論文等：Nakano et al. (2010) Tetrahedron Lett. 51(1), 49-53

【成果情報名】 熱帯牧草 *Brachiaria humidicola* の根から分泌する生物的硝化抑制物質ブラキアラクトンの同定

【要約】 熱帯牧草 *Brachiaria humidicola* の根から分泌される硝化抑制作用を持つ物質「ブラキアラクトン」を同定した。*Brachiaria humidicola* を栽培した圃場の土壌ではアンモニア酸化が抑えられ、土壌からの亜酸化窒素発生が抑制される。

【キーワード】 生物的硝化抑制、熱帯牧草 *Brachiaria humidicola*、ブラキアラクトン、亜酸化窒素

【所属】 国際農林水産業研究センター 生産環境領域

【分類】 研究 A

【背景・ねらい】

土壌中の微生物の働きにより起きるアンモニアの硝化（アンモニアが亜硝酸を経て硝酸へと酸化される反応、図 1）は土壌中での窒素循環に重要な役割を果たす一方、農業生産に用いられる窒素肥料の大幅な損失や土壌環境汚染を引き起こす一つの原因ともなっている。また、温室効果ガスである亜酸化窒素の土壌からの放出の一要因でもあることが知られている。ある種の植物が根から硝化を抑制する物質を分泌することを生物的硝化抑制作用（図 1）と呼んでおり、熱帯牧草 *Brachiaria humidicola*（BH）を用いてその作用について検討してきた。本研究はこの牧草が持つ生物的硝化抑制機構を明らかにして、本作用を用いた、より窒素利用効率が高く環境負荷の低い栽培体系を確立することを目指したものである。

【成果の内容・特徴】

1. BH が根より分泌する硝化抑制物質を C₁₈ 逆相クロマトグラフィー等により、遺伝子組み換えアンモニア酸化細菌の発する冷光を指標にして精製した。El mass および ¹H、¹³C、2 次元 NMR による構造解析の結果、新規環状ジテルペン物質「ブラキアラクトン」（図 2）を同定した。本物質は 5-8-5 員環と γ-ラクトン環を含む構造をとり、この牧草の根分泌液の持つ生物的硝化抑制活性の 60~90% に寄与している。さらにブラキアラクトンの分泌量は化学的硝化抑制剤であるニトラピリン換算で年間 5.0~14.6kg/ha に相当し、土壌中の硝化細菌数や硝化速度に影響を及ぼすのに十分な量である。
2. コロンビアにある国際熱帯農業センター（CIAT）において、BH2 系統（CIAT-679 と CIAT-16888）を 3 年間栽培したほ場における土壌中の硝化に関連した微生物群集は、同一地区内の裸地や大豆栽培ほ場に比べて 1/2 以下に減少し（図 3 の AOA、AOB）、土壌の硝化作用が 9 割（図 3 の棒）、亜酸化窒素発生量が 6 割以上（図 4）抑制されることが確認された。
3. 以上の結果は BH の根圏における生物的硝化抑制作用を証明するものである。

【成果の活用面・留意点】

1. 本牧草の生物的硝化抑制作用を活かす作付け体系の開発が期待される。
2. ブラキアラクトンの生合成機構を解明することにより、生物的硝化抑制能を持たない作物への本作用の付与が可能になる。

[具体的データ]

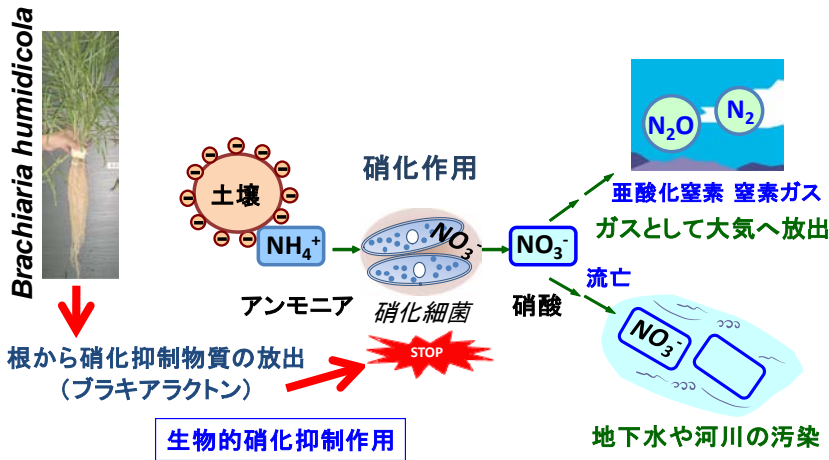


図1 硝化作用と生物的硝化抑制作用

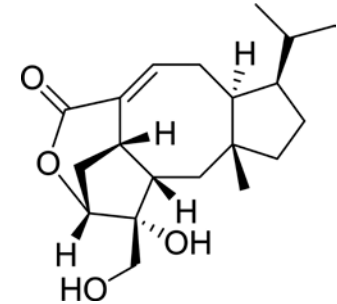


図2 ブラキアラクトンの構造式

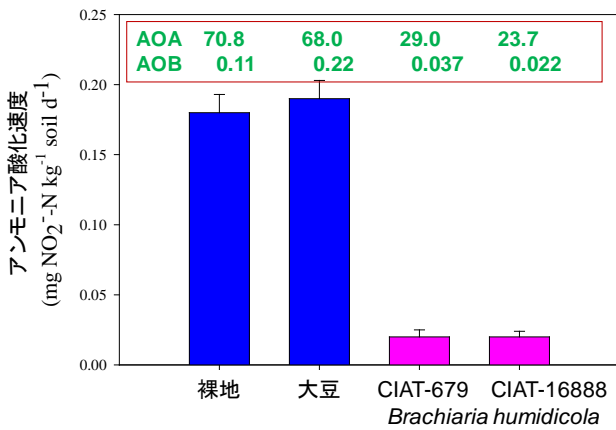


図3 土壌の硝化速度

緑字はアンモニア酸化アーキア数 (AOA)、アンモニア酸化細菌数 (AOB) を示す (単位: 百万コピー / g 乾土)。

大豆は ICAP34 を用いている。

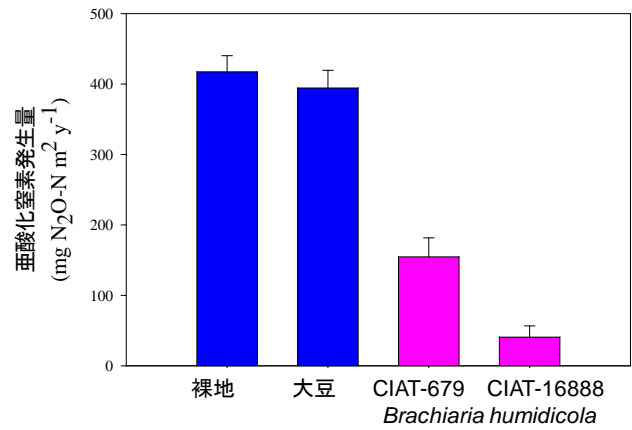


図4 亜酸化窒素発生量

[その他]

研究課題: 生物的硝化抑制作用の解明とその利用

中課題番号: A-2)-(4)

予算区分: 交付金 [硝化抑制]

研究期間: 2009 年度 (2006~2010 年度)

研究担当者: G.V.スバラオ・石川隆之・中原和彦・吉橋忠・伊藤治・小野裕嗣 (以下食総研)・亀山眞由美・吉田充

発表論文等: G. V. Subbarao, K. Nakahara, M. P. Hurtado, et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106(41), 17302-17307