

# わかりはじめた味覚の分子メカニズム

## 1. はじめに

ヒトを含めて動物が感じる味を研究の対象とするとき、甘味、苦味、塩味、酸味そしてうま味の5つの味は基本味として、辛味や渋味などその他の味とは別に扱われる。刺激の受容と伝達という観点から、基本味は味覚受容器である味蕾で受容され味神経を介して脳の味覚野に伝達される味覚として一般体性感覚と区別されるが、その他の味は味覚の他に口腔内に生じる痛覚、温覚、触覚などの体性感覚の要素を多く含んでいる。基本味が基本と称されるのは、光の3原色のように、その組合せによってすべての味を作り出すことが可能であるという考え方に基づいている。これは私たちが感じる味の感覚に基づいて提案された考え方であり、分子的な基盤が不明のまま受け入れられてきた。しかし、最近、分子生物学的研究の進展によって、味が受容される分子機構が明らかにされ始めた。

## 2. 味蕾：味の受容と伝達を担う構造

味の受容機構の前に、まず、味蕾についてご紹介したい。味蕾は、30~70個の細胞の集合体で、舌、軟口蓋、咽頭の上皮に存在する。口腔側には味孔という開口部があり、呈味物質はここから味細胞に達する。味蕾には様々な細胞が含まれているが、紡錘形で味孔に達している細胞の中に味刺激の受容を担当する味細胞が含まれている。味蕾は総数の約 $2/3$ 程度が舌に存在しており、舌では、先端側に散在する茸状乳頭、基部側の有郭乳頭そして側部の葉状乳頭という3つの乳頭に味蕾が局在している。舌の先端側の味蕾には鼓索神経、基部側の味蕾には舌咽神経という脳神経が連絡しており、味細胞で受容された味覚情報はこれらの味神経を介して脳に伝達される。図1に、マウスの舌と味蕾を图示している。有郭乳頭

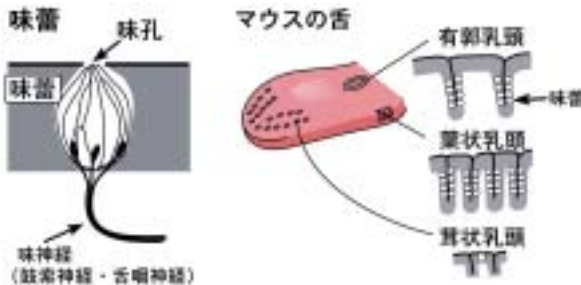


図1 味蕾の構造および舌の乳頭

は、周囲に円形の溝を持つ乳頭で、この溝に多くの味蕾が並んでいる。マウスの場合には有郭乳頭は舌の基部に1つあるが、ヒトでは10個程度がV字形に並んでいる。葉状乳頭でも味蕾は溝に分布している。一方、茸状乳頭ではその頭頂部に味蕾がある。茸状乳頭に含まれる味蕾の数は、マウスの場合にはそれぞれの乳頭に1つずつであるが、ヒトの場合は1～4個程度で、味蕾を持たない場合もある。ヒトとマウスでは乳頭と味蕾の分布にこのような違いが認められるが、味蕾の構造と味の受容・伝達の機構は基本的に共通であると考えられる。

### 3. 味の受容機構（甘味・うま味・苦味）

味受容機構を明らかにするために、今日まで様々な解析が試みられてきた。甘味については、タンパク質分解酵素プロナーゼEを舌表面に作用させることで味覚感受性が低下することから、甘味受容には味細胞の細胞膜に存在する受容体タンパク質が関与することが示唆されていた<sup>1)</sup>。しかし、甘味との関係が最初に明らかになった分子は受容体ではなく受容体と共役するGタンパク質gustducinであった。Gタンパク質は遺伝子ファミリーを形成しており、この遺伝子ファミリーに属する分子は、受容体を含む他の遺伝子ファミリーの場合と比較して、特に良く保存されたアミノ酸配列を含んでいることが知られていた。この点に着目した研究者らは、その保存された配列に対するPCRプライマーを設計し、RT-PCRによって、まず、Gタンパク質のクローニングを試みた。その結果、1992年に味蕾を含む組織から新規のGタンパク質をコードする遺伝子がクローニングされgustducinと命名された<sup>2)</sup>。このgustducin遺伝子は味蕾で強く発現しており、gustducin遺伝子が破壊されたノックアウトマウスでは甘味だけでなく苦味の感受性も低下することが示された。これが、ほ乳類において、味覚感受性に関与する遺伝子が明らかにされた最初の報告で、1996年のことである<sup>3)</sup>。

一方、受容体に関しては、嗅覚受容体に保存されているアミノ酸配列に着目してRT-PCRが行われ、1992年のgustducinの発見にわずかに遅れて1993年に舌上皮に発現する新規のGタンパク質共役型受容体をコードする遺伝子がクローニングされた<sup>4)</sup>。しかし、この受容体と味覚との関係は明らかにされなかった。この報告に続き、1999年になって、その後の甘味受容体の発見に結びつく2つの新しい受容体遺伝子、T1r1、T1r2（当初はTR1、TR2として報告された）のクローニングが報告された<sup>5)</sup>。これらの受容体は、単一の味細胞で発現する遺伝子のライブラリーを作製して、その中から味蕾で強く発現する遺伝子を選別するという方法でクローニングされた。T1r1は茸状乳頭に、T1r2は葉状乳頭と茸状乳頭に特に強く発現しており、それぞれ味蕾を構成する一部の細胞でだけ発現することが示された。クローニングされた当初、これらの受容体がどのような味の受容体であるかは明らかではなかったが、相互に高い相同性を示すことから、新しい遺伝子ファミリー（T1rファミリー）に分類された。また、マウスのゲノムサザン解析からこの

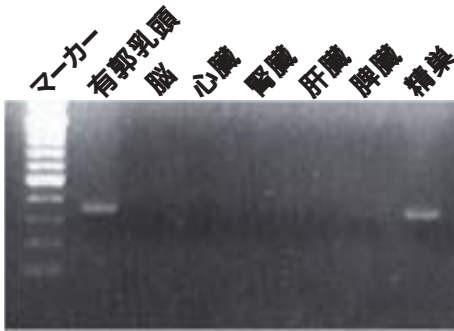


図2 T1r3遺伝子の発現 (RT-PCR)  
矢尻がT1r3のバンドを示す。

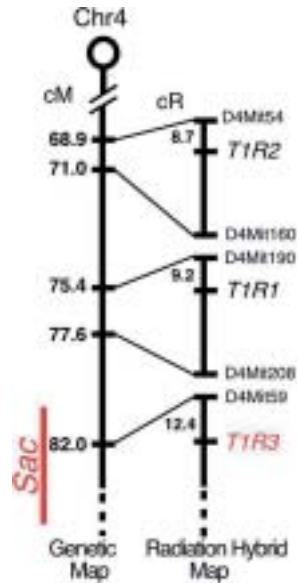


図3 T1r3遺伝子の染色体マッピング  
T1r3はSac遺伝子座に位置していた

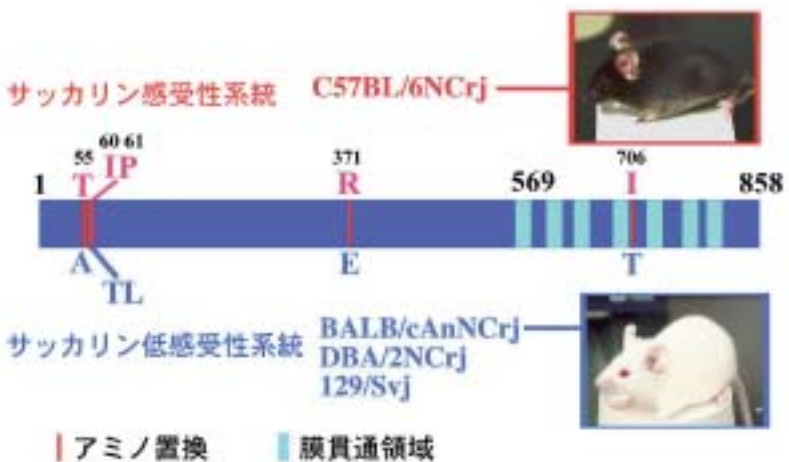


図4 サッカリン低感受性マウス系におけるT1r3のアミノ酸置換

T1rファミリーはT1r1, T1r2の2つのメンバーだけから構成される可能性が高いと予想された。一方、実験マウスには多くの系統があるが、このマウス系統間には甘味や苦味に対する感受性に差があることが知られており、それらの感受性を支配する遺伝子座が染色体上にマップされていた。そこで、機能を推定するために、T1r1とT1r2についても染色体上の位置の解析がただちに行われ、第4染色体の遠位端にある甘味の感受性を支配する*Sac*遺伝子座の近傍に位置していることが明らかにされた<sup>6)</sup>。しかし、これらの遺伝子の位置は*Sac*遺伝子座とは重なっていなかった。

筆者らは他の受容体は多くのメンバーからなるファミリーを形成することが多いこと、T1rファミリーが*Sac*遺伝子座の近傍にマップされることから、*Sac*遺伝子座にはT1rファミリーに属する別の受容体が存在し、甘味受容体として機能しているのではないかと考え、遺伝子の探索を進めた。T1rファミリーで保存されたアミノ酸配列に基づきPCRプライマーを作製してRT-PCRを行った結果、有郭乳頭から新規の受容体をコードする遺伝子のクローニングに成功した<sup>7)</sup>。この遺伝子はT1r1, T1r2と高い相同性を持つことからT1rファミリーに属する受容体をコードしていることが明らかになり、T1r3と命名された。T1r3は、精巢での発現は認められるものの、味蕾を含む組織に特異的に発現していた(図2)。また、他のT1rファミリーの受容体と同様に、味蕾の一部の細胞にのみにT1r3の発現が認められた。ただし、有郭・葉状・茸状の乳頭間で発現強度が大きく異なっているT1r1, T1r2とは異なり、T1r3はすべての乳頭の味蕾で強い発現が認められた。さらに、1) マウスの第4染色体の*Sac*遺伝子座にマップされること(図3)、2) 甘味感受性を支配する*Sac*遺伝子座に関する変異体マウス系統(サッカリン低感受性マウス系統)には共通したアミノ酸置換(Thr55Ala, Ile60Thr, Pro61Leu, Arg371Glu, Ile706Thr)が認められることから(図4)、T1r3が*Sac*遺伝子座にコードされる甘味受容体遺伝子であることが強く示唆された。

この2001年のT1r3遺伝子のクローニングは、ほ乳類の甘味受容体が発見された最初の例となったが、この時点で味覚受容体遺伝子のクローニング競争は激化しており、この年には我々の他に、世界で5つのグループがほぼ同時にT1r3遺伝子を報告することになった<sup>8,9,10,11,12)</sup>。他のグループは、ゲノムデータベースの検索によって*Sac*遺伝子座付近に存在するGタンパク質共役型の受容体遺伝子を見出すという方法によって、T1r3を発見していた。さらに、サッカリン低感受性マウス(129/Sv)に感受性タイプ(C57BL/6)のT1r3遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作製され、このマウスの甘味感受性がサッカリン感受性マウス(C57BL/6)とほぼ同じ程度まで回復することが示され、T1r3が甘味受容体として機能することが証明された<sup>11)</sup>。また、培養細胞にラットの受容体遺伝子を強制発現させて味応答を測定したところ、T1r3とT1r2を共発現させたときにだけ甘味応答がみられることが明らかになり、T1r3は単独では甘味受容体として機能せず、

表1 味覚受容体T1rファミリーのまとめ

遺伝子	遺伝子発現強度		(複合体の形成) 味覚受容体としての機能
	茸状乳頭	有郭乳頭	
T1r1	+++	+	 アミノ酸・うま味受容体 甘味受容体
T1r2	+	+++	
T1r3	+++	+++	

T1r2とヘテロ複合体を形成して甘味受容体として機能することが示された<sup>11)</sup>。また、興味深いことに、T1r3はT1r1とヘテロ複合体を形成すると多くのアミノ酸に対して応答するアミノ酸受容体として機能することが示された<sup>13)</sup>。さらに、ヒトのT1r3とT1r1のヘテロ複合体は、アミノ酸のうち、うま味物質であるL-グルタミン酸に特に高い応答がみられ他のアミノ酸には殆ど応答しないことが明らかにされ、うま味受容体として機能していることが示されている<sup>14)</sup>。表1には、T1rファミリーの「各乳頭における発現強度」と「複合体の形成と味受容体としての機能」についてまとめている。

一方、苦味受容体は、2001年の甘味受容体T1r3遺伝子のクローニングよりわずかに早く、2000年にクローニングされていた<sup>15)</sup>。この苦味受容体は、まず、ヒトのプロピルチオウラシル (PROP) の苦味に対する感受性に関する遺伝子座の解析に基づいてヒトの第5染色体のゲノム配列の解析を行って見いだされた。この受容体も遺伝子ファミリーを形成していたが、先に発見されたT1r1, T1r2が長い膜外領域を持っているのに対して、この受容体の膜外領域は短く、別のファミリーとして新たにT2rと命名された。(この時、当初TR1, TR2と呼ばれていた遺伝子がT1r1, T1r2という名称に変更された。) T1rファミリーに比べて、T2rファミリーを形成する受容体の総数は多く、ヒトでは40~80個と推定された。また、T2rファミリーは、第5染色体の他に、第7染色体と第12染色体にT2r遺伝子クラスターが見いだされた。

一方、マウスの系統間の味覚感受性の差に基づく行動学的解析からは、シクロヘキシミド (Cyx), キニーネ (Qui), スクロースオクタアセテート (Soa), ルフィノースアセテート (Rua), カッパーギリシネイト (Glb) の苦味に対する感受性は、それぞれ単一遺伝子支配を受けていることが示されていた。さらに、これらの苦味感受性を支配する遺伝子は、唾液中のプロリンリッチタンパク質の発現を支配する第6染色体遠位端のPrp遺伝子座と強い遺伝子連鎖を示すことから、このPrp遺伝子座近傍に苦味感受性を支配する遺伝子がクラスターを形成していることが示唆されていた。ヒトのT2rファミリーで見いだされた遺伝子クラスターのう

ち第12染色体のクラスターは9つのT<sub>2r</sub>受容体に加えて*Prp*遺伝子を含んでいた。さらに、この領域のマウスのシンテニー領域（種をこえたゲノム間で相同な領域）は、マウス第6染色体の遠位端近傍の苦味感受性遺伝子の存在が予想されていた領域であり、これらの結果からT<sub>2r</sub>ファミリーが苦味受容体であることが強く示唆された。マウスからもT<sub>2r</sub>遺伝子のクローニングが進められ、培養細胞に強制発現させて味覚応答を測定する実験系によって第6染色体に位置するmT<sub>2r5</sub>がC<sub>yx</sub>を受容する苦味受容体であることが証明された<sup>16)</sup>。さらに、この他のT<sub>2r</sub>遺伝子についてC<sub>yx</sub>, PROP, Qui, Soaなど様々な苦味物質に対する受容能の解析が進められた結果、T<sub>2r</sub>に属する受容体はそれぞれ特定の苦味物質に対する受容能を持つことが明らかになった。この結果は、これらの苦味物質に対する感受性がそれぞれ単一の遺伝子支配を受けているという知見と一致していた。

一方、T<sub>2r</sub>遺伝子の発現解析から、T<sub>2r</sub>は味蕾を構成する細胞の一部のみで発現するが、各味細胞はそれぞれ一つのT<sub>2r</sub>を発現するのではなく複数のT<sub>2r</sub>受容体を同時に発現していることが明らかにされた。この結果は、苦味を受容する味細胞がさまざまな苦味物質に対して応答する可能性を示唆していた。しかし、ラットの味蕾にカルシウム濃度指示薬を取り込ませて、カルシウム濃度上昇によって検出される味覚応答を測定した結果は、味細胞がそれぞれ特定の苦味物質にだけ応答することを示していた<sup>17)</sup>。このように、一つの味細胞に多くの苦味受容体が発現しているという発現解析と、味細胞が特定の苦味物質にだけ応答するという応答解析の間には未解決の問題が残されたままである。

味覚受容体の解析が精力的に進められているが、1) 受容体に続く細胞内の情報の伝達に参与する分子、2) 各味細胞が受容する味の種類など、味の受容機構には依然として不明な点が多く残されている。筆者らはGタンパク質gustducinとT<sub>1r</sub>受容体との関係を中心に解析を進めてきた。これらの遺伝子について、これまでの有郭乳頭における発現解析から明らかにされていたことは次のように限られていた。1) T<sub>1r3</sub>とT<sub>1r2</sub>は同じ細胞で発現しており、この細胞は甘味を受容する細胞と考えられる。2) 甘味受容体T<sub>1r3</sub>・T<sub>1r2</sub>と苦味受容体T<sub>2r</sub>はそれぞれ別の細胞で発現しており、甘味を受容する細胞と苦味を受容する細胞は別であると考えられる。3) T<sub>1r1</sub>は有郭乳頭ではほとんど発現しておらず、有郭乳頭には、うま味受容体であるT<sub>1r3</sub>とT<sub>1r1</sub>の複合体を発現する細胞はほとんどない。4) Gタンパク質gustducinを発現する細胞は苦味受容体T<sub>2r</sub>を発現しているが、甘味受容体は発現していないことから、gustducinは苦味情報の伝達に参与すると考えられる。

しかし、3)については、「味覚の神経応答の解析から、有郭乳頭でもうま味が受容されることが示される。」、また、4)については、「gustducin遺伝子を破壊したノックアウトマウスでは苦味だけでなく甘味の感受性も低下する。」など、説明しきれない問題が生じていた。そこで、これらの問題を解決するために、遺伝子発現解析の検出感度を上げると同時に、これまでおろそかにされていた茸状乳

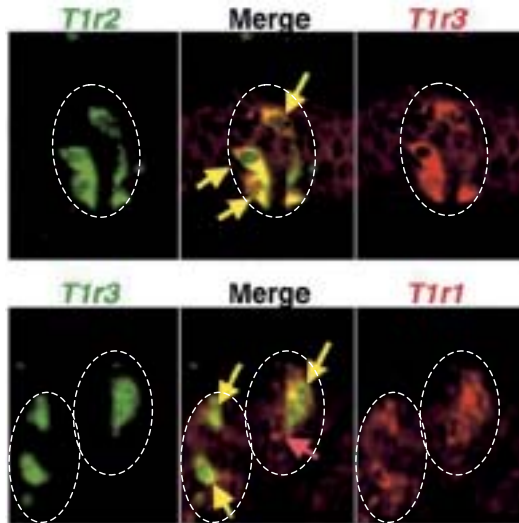


図5 マウスの有郭乳頭におけるT1rファミリーの発現  
 (2重蛍光in situ ハイブリダイゼーションによる検出)  
 赤と緑のシグナルが重なると黄色のシグナルとして確認される。(上段) T1r3とT1r2の両方を発現する細胞が認められる。この受容体の組合せは甘味受容体を形成する。(下段) T1r3とT1r2の両方を発現する細胞が認められる。この受容体の組合せはうま味受容体を形成する。破線は味蕾の輪郭を示す

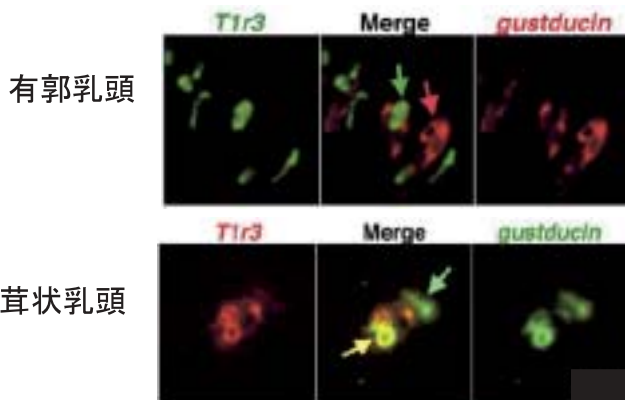


図6 gustducinとT1r3遺伝子の発現の比較  
 有郭乳頭では、T1r3を発現する細胞のうちgustducinを発現する細胞の割合は12%にすぎないが、茸状乳頭ではT1r3を発現する細胞の76%がgustducinを発現していた。

頭での解析を行った<sup>18)</sup>。その結果、まず、T1r1の発現が有郭乳頭でも検出された。この発現はT1r3を発現する細胞でも確認されることから、有郭乳頭でのうま味受容体T1r3・T1r1の発現が示された(図5)。また、gustducin遺伝子の発現は、有郭乳頭では主に苦味受容体T2rと重なり甘味受容体T1r3・T1r2とは殆ど重ならなかったが、茸状乳頭では大部分が甘味受容体と重なることが明らかになった(図6)。この結果は、gustducin遺伝子のノックアウトマウスにおける苦味と甘味の味覚応答の低下は、有郭乳頭における苦味受容と、茸状乳頭における甘味受容の低下によって説明できることが示された。これらの解析によって明らかになったT1r受容体とgustducin遺伝子の発現の関係は、図7のベン図に示している。それぞれの遺伝子を示す範囲はそれぞれの遺伝子を発現する細胞の数を反映しており、重なる領域はそれぞれの遺伝子を共発現する細胞の数を表している。この結果から、T1r3とT1r2を共発現しており甘味を受容すると予想される細胞は、有郭乳頭ではその大部分が、また、茸状乳頭ではその約半数がT1r1を共発現しており、甘味と同時にうま味を受容する可能性があることが示唆されている。ただし、有郭乳頭におけるT1r1の発現はT1r2と比較して弱く、これらの細胞の主たる機能は甘味の受容であると予想される。

T1rおよびT2rという味覚受容体の発見は、近年のゲノム解析の進展と分子生物学的手法に負うところが大きいですが、その基礎となっているのはマウスの遺伝学であり、マウスの味覚感受性の行動学的解析であった。最近、T1r3遺伝子のノックアウトマウスについて2つの論文が発表された<sup>19, 20)</sup>。これらの論文でもノックアウトマウスは、まず味覚感受性が行動学的手法によって解析され、それに加えて味神経の味覚応答解析が行われている。一方の論文では、T1r3ノックアウトマウス

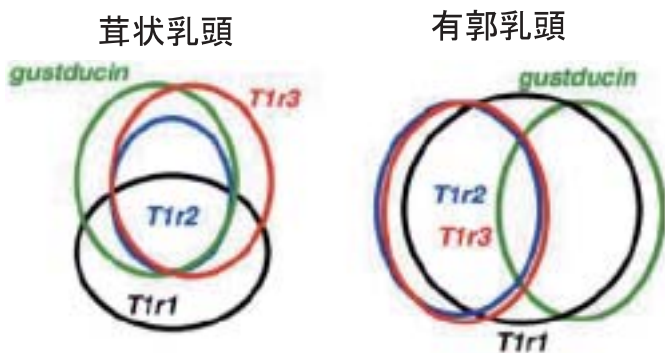


図7 T1rファミリーとgustducinの発現の相互関係



では甘味応答が大きく低下し、うま味応答についても一部の低下が見られると報告された。これは、T1r3の甘味およびうま味の受容における機能を証明すると同時に未知の受容体が存在することを示唆していた。しかし、もう一方の論文では、ノックアウトマウスでは甘味とうま味の応答がともにほぼ完全に消失すると報告されている。この結果の差は、これら2つの論文の遺伝子ノックアウトの手法の差が原因である可能性もあるが、それ以上にマウスの行動学的解析と味覚の神経応答の解析の技術的な差を反映しているのではないかと予想される。味覚に関する遺伝子の研究は、単に分子の解析や組織・細胞の形態の観察にとどまらず、動物個体の行動学的解析を必要とするところに研究の難しさがあるといえる。

#### 4. 飽食ホルモンレプチンによる味細胞の甘味感受性の調節

疲れたときには、甘い物やすっぱい物がおいしく感じられるなど、私たちは、体調の変化に応じて嗜好性や味覚の感受性が変化していることを経験的に知っているのではないだろうか。これは生体の生理状態を反映する調節作用の存在を示している。このような調節作用については、ラットにリジン欠乏食を与え続けるとリジンを好んで食べるようになるといったモデル系を使って、中枢神経系(脳)を介した調節機構について解析されてきた。しかし、最近、飽食ホルモンであるレプチンが味蕾において甘味の受容を選択的に抑制することが明らかにされ、中枢神経系ばかりでなく味覚情報の入り口である味の受容の段階でも生理状態を反映した味覚感受性の調節が行われていることが示された。

レプチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンで、間脳の視床下部に作用して、摂食を抑制すると同時にエネルギー代謝を亢進することによって体重の増加を制御していることが知られている。このレプチンの受容体に変異を持つマウス(*db/db*)では脂肪細胞からのレプチンの情報を受け取ることができず、高度の肥満となる。九州大学を中心とするグループは、まず、この変異体マウス(*db/db*)では、味覚神経の応答のうち甘味に対する応答だけが增大していることを明らかにした。これは、レプチンが甘味を受容する味細胞の感受性を調節している可能性を示していた。さらに、正常マウスの腹腔内にレプチンを投与すると甘味に対する神経応答が選択的に抑制されること(図8)、マウスから単離した味細胞はレプチンによって興奮性が低くなることが明らかになった。筆者らもこの解析に参加し、マウスの舌の上皮では、味蕾を含む領域にだけレプチン受容体の強い発現が認められることを明らかにした(図9)。このようにして、レプチンが甘味を受容する味細胞に直接作用して甘味感受性を抑制していることが明らかにされた<sup>21)</sup>。2000年のこの発表は、味細胞に生理状態を反映する感受性の調節機構が存在することが示された最初の例となった。このような味細胞における調節機構の解析は始まったばかりであるが、今後、さらに研究が進み、生理状態と味覚の関係が解明されると期待される。

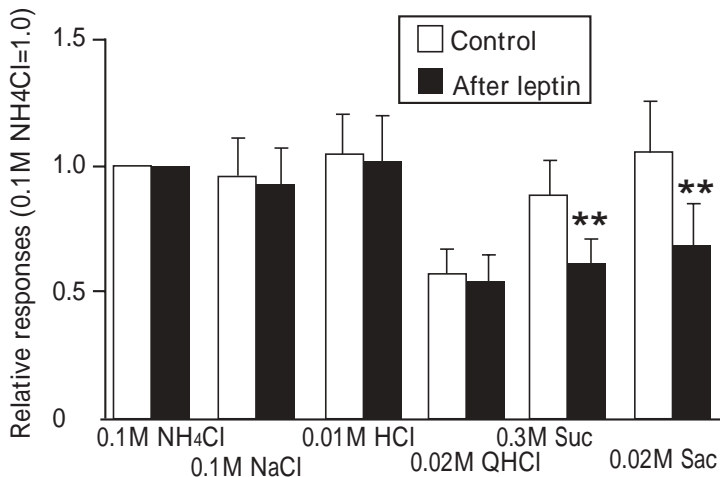


図8 味神経の応答に対するレプチンの効果

C57BL/6マウスの腹腔にレプチン (100ng/g of b.w.) を投与する前 (Control) と投与した後 (After leptin) の鼓索神経 (舌先端に連絡する味覚神経) の味刺激に対する応答を測定した。NH<sub>4</sub>Clに対する応答を1.0として比較している。塩味 (NaCl), 酸味 (HCl), 苦味 (QHCl, 塩酸キニーネ), 甘味 (Suc, ショ糖; Sac, サッカリン) に対する応答を比較した

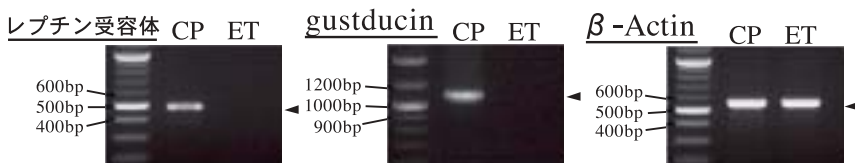


図9 舌上皮におけるレプチン受容体の発現 (RT-PCR)

舌上皮の味蕾を含む領域 (CP: 有郭乳頭) と味蕾を含まない領域 (ET) についてRT-PCRによって遺伝子発現を検出した。レプチン受容体とgustducinは味蕾を含む領域 (CP) にだけ発現していた。ポジティブコントロールの  $\beta$ -Actinは、味蕾を含まない領域にも検出されている

## 5. 味細胞の分化

近年、味覚障害の増加が問題となっているが、この味覚異常の代表的な原因の一つとして、味蕾の異常があげられている。ヒトを含む哺乳類の味蕾を構成する細胞は、生涯を通して、平均して約10日の周期で常に新しい細胞に置き換わっていることが知られている<sup>22, 23)</sup>。マウスを用いた解析から味蕾の細胞は味蕾の周囲の上皮細胞と同じ細胞に由来していることが明らかにされており<sup>24)</sup>、これは、味

を受容する能力を持たない味蕾周囲の上皮細胞が増殖して味蕾に細胞を供給していることを示している。これらの細胞は味蕾に入って味を受容する味細胞へと分化するが、この分化過程で、味細胞は味を受容して興奮し、その情報を味神経に伝達するという神経細胞としての性質を獲得する。また、手術によって味神経を切断すると味蕾構造が約10日で消失することから、味蕾の維持には味神経が必要であることが知られている。

このように、味を受容する細胞は味神経に依存しながら絶えず新しい細胞に置き換えられており、今日、味を感じた細胞と2週間後に味を感じる細胞はまるで違う細胞であるということになる。しかし、私たちは同じ食べ物であれば基本的にはいつも同じように味を感じている。これは味蕾の中で様々な味を感じる味細胞が、常にバランスよく分化し、さらに味神経との正常な連絡を形成するからである。味覚異常の原因の一つは、この味蕾を構成する味細胞の分化の異常である。しかし、味細胞の分化の分子機構はこれまでほとんど解析されていなかった。唯一、明らかにされていたことは、味蕾から分泌されるBDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor; 脳由来神経栄養因子) が味神経で発現するBDNFの受容体trkB (Neurotrophin Receptor Tyrosine Kinases B; 受容体型チロシンリン酸化酵素B) に作用して、味神経の生存を助けているということであった<sup>25)</sup>。BDNF遺伝子のノックアウトマウスでは、味蕾からのBDNFの分泌が失われてしまうので、味蕾構造を維持するために必要な味神経が生存することができなくなる。その結果として、味蕾も消失してしまう。しかし、1) 神経に由来する味蕾維持に必要な因子、2) 味蕾への細胞の供給に必要な細胞増殖に関与する因子、3) 味蕾の細胞の分化の分子機構などはまったく明らかになっていなかった。

筆者らは、細胞増殖と細胞分化という観点から、味蕾の維持機構の解析を進めてきた。まず、動物の個体発生において細胞の増殖や分化に関与していることが知られている様々な分子について、味蕾周辺での発現の解析を行った。その結果、味蕾の基底部の細胞で分泌性の誘導因子であるSonic hedgehog (Shh) が発現し、その周囲ではShhの受容体であるPatched1 (Ptc) が発現していることが明らかとなった<sup>26)</sup> (図10)。このPtcを発現する領域は、味蕾への細胞供給を担う細胞増殖が行われるとされている領域と重なっていた。ShhからPtcへのシグナルは、神経細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしており、Ptcの発現はShhによって誘導されることが知られている。さらに、手術によって味神経を切断して味蕾構造の消失を誘導すると、神経切断後の数時間以内にShhの発現が消失し、続いてPtcの発現が消失した。この段階では、味蕾の構造は残っており、味覚受容体などの発現も検出された。味神経切断後にShhとPtcの発現がこのように急速に失われることは、神経切断後に起こる味蕾への細胞の供給の停止と関連すると予想された。一方、味細胞が上皮細胞に由来していながら神経の性質を持つ細胞に分化することから、神経細胞の分化に関与する遺伝子発現調節因子(転写因子)の解析を進めた。

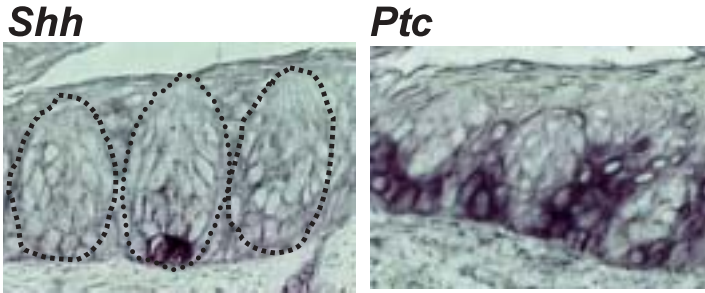


図10 マウスの有郭乳頭の味蕾におけるShhとPtcの発現

### Mash1

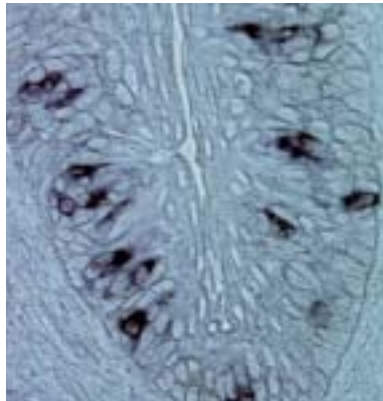


図11 マウスの有郭乳頭におけるMash1の発現

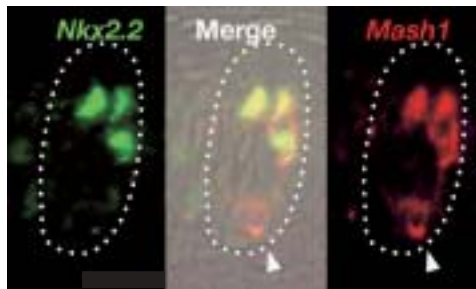


図12 Mash1とNkx2.2の共発現（マウス有郭乳頭）  
Mash1を発現する細胞のうち、味蕾内に長く伸長した細胞にはNkx2.2の発現が認められた。基底部の丸い細胞ではMash1を発現しNkx2.2を発現しない細胞が認められた（矢尻）。

その結果、神経細胞の分化の初期段階に重要な役割をもつ転写因子Mash1が味蕾の中で発現していることが明らかになった<sup>27)</sup>(図11)。また、マウスの有郭乳頭にある味蕾は胎児期ではなく生後に形成されることが知られているが、この味蕾が形成される過程では、Mash1は味覚受容体など味の受容に関係する遺伝子よりも先に発現することが明らかになった。さらに、gustducinを発現する細胞では、嗅覚の神経細胞の分化の過程でMash1の発現に続いて発現する転写因子NeuroDが発現することが報告され<sup>28)</sup>、神経細胞で見られる転写因子の段階的発現が味蕾にも見られることが明らかになった。また、Mash1を発現している細胞ではShhによって発現が誘導されることが知られている転写因子Nkx2.2が発現しており(図12)、Shhのシグナルが味細胞への分化にも影響している可能性が示された<sup>29)</sup>。このように、分化増殖の誘導因子やさまざまな転写因子についての解析が進んできた。しかし、これらの因子が実際に味蕾の細胞の増殖や分化に影響することは直接的には証明されておらず、培養系などを利用した実証的な解析手法の開発が必要となっている。

## 6. おわりに

この数年の間に味覚の分子機構の解析が進み、味覚受容体が明らかにされた。この間に大変な進歩をしたということが出来るが、現在では、その知見を利用してヒトの味覚受容体を培養細胞で発現させて新規の呈味物質や味覚修飾物質を探索する試みが行われるようになり、新たな競争の時代に入った感がある。生理状態を反映した味覚の調節機構については、解析は始まったばかりであるが、味覚機能をヒトの健康な生活に役立てるために重要な情報が数多く眠っていると期待される。一方、味細胞の分化の解析が進めば、味覚異常の原因解明や治療法の開発に役立つことが期待されればかりでなく、味細胞の培養が可能になる可能性がある。もし、その延長線に、様々な生理状態を反映する調節機構を備えた培養味細胞があるなら、私たちの味覚に対する理解を深めるために大いに役立つであろう。

(食品機能部味覚機能研究室 三浦 裕仁)

## 参考文献

- 1) Hiji, Y.: Selective elimination of taste responses to sugars by proteolytic enzymes. *Nature*, 256, 427-429 (1975)
- 2) McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J. and Margolskee, R.F.: Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, 357, 563-569 (1992)

- 3) Wong, G.T., Gannon, K.S. and Margolskee, R.F.: Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, **381**, 796-800 (1996)
- 4) Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S.: Multiple genes for G protein-coupled receptors and their expression in lingual epithelia. *FEBS Lett.*, **316**, 253-256 (1993)
- 5) Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J. and Zuker, C.S.: Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, **96**, 541-551 (1999)
- 6) Li, X., Inoue, M., Reed, D.R., Huque, T., Puchalski, R.B., Tordoff, M.G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G.K. and Bachmanov, A.A.: High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (*Sac*) and the putative sweet taste receptor (*T1R1*) gene (*Gpr70*) to mouse distal chromosome 4. *Mamm. Genome*, **12**, 13-16 (2001)
- 7) Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 236-242 (2001)
- 8) Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H. and Buck, L.B.: A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.*, **4**, 492-498 (2001)
- 9) Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. and Margolskee, R.F.: *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat. Genet.*, **28**, 58-63 (2001)
- 10) Sainz, E., Korley, J.N., Battey, J.F. and Sullivan, S.L.: Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J Neurochem*, **77**, 896-903 (2001)
- 11) Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J. and Zuker, C.S.: Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381-390 (2001)
- 12) Bachmanov, A.A., Li, X., Reed, D.R., Ohmen, J.D., Li, S., Chen, Z., Tordoff, M.G., de Jong, P.J., Wu, C., West, D.B., Chatterjee, A., Ross, D.A. and Beauchamp, G.K.: Positional cloning of the mouse saccharin preference (*Sac*) locus. *Chem. Senses*, **26**, 925-933 (2001)
- 13) Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J. and Zuker, C.S.: An amino-acid taste receptor. *Nature*, **416**, 199-202 (2002)
- 14) Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E.: Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4692-4696 (2002)

- 15) Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P. and Zuker, C.S.: Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, **100**, 693-702 (2000)
- 16) Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng L., Guo, W., Zuker, C.S. and Ryba, N.J.P.: T2rs Function as Bitter Taste Receptors.: *Cell*, **100**, 703-711, (2000)
- 17) Caicedo, A. and Roper, S.D.: Taste Receptor Cells That Discriminate Between Bitter Stimuli. *Science*, **291**, 1557-1760 (2001)
- 18) Kim, M.-R., Kusakabe, Y., Miura, H., Shindo, Y., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Regional expression pattern of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 500-506 (2003)
- 19) Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y. and Margolskee, R.F.: Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, **301**, 850-853 (2003)
- 20) Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J. and Zuker, C.S.: The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, **115**, 255-266 (2003)
- 21) Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H. and Ninomiya, Y.: Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11044-11049 (2000)
- 22) Beidler, L.M. and Smallman, R.L.: Renewal of cells within taste buds. *J. Cell. Biol.*, **27**, 263-272 (1965)
- 23) Farbman, A.I.: Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue. Kinet.*, **13**, 349-357 (1980)
- 24) Stone, L.M., Finger, T.E., Tam, P.P. and Tan, S.S.: Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1916-1920 (1995)
- 25) Nosrat, C.A., Blomlof, J., ElShamy, W.M., Ernfors, P. and Olson, L.: Lingual deficits in BDNF and NT3 mutant mice leading to gustatory and somatosensory disturbances, respectively. *Development* **124**, 1333-1342 (1997)
- 26) Miura, H., Kusakabe, Y., Sugiyama, C., Kawamatsu, M., Ninomiya, Y., Motoyama, J. and Hino, A.: Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse. *Mech. Dev.*, **106**, 143-145 (2001)
- 27) Kusakabe, Y., Miura, H., Hashimoto, R., Sugiyama, C., Ninomiya, Y. and Hino, A.: The neural differentiation gene Mash-1 has a distinct pattern of expression from the taste reception-related genes gustducin and T1R2 in the taste buds. *Chem. Senses*, **27**, 445-451 (2002)

- 28 ) Suzuki, Y., Takeda, M. and Obara, N.: Expression of NeuroD in the mouse taste buds. *Cell. Tissue. Res.*, **307**, 423-428 ( 2002 )
- 29 ) Miura, H., Kusakabe, Y., Kato, H., Miura-Ohnuma, J., Tagami, M., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Co-expression pattern of Shh with Prox1 and that of Nkx2.2 with Mash1 in mouse taste bud. *Gene. Expr. Patterns.*, **3**, 427-430 ( 2003 )



# 走査型プローブ顕微鏡による 生体と食品のナノレベル計測

## 1. はじめに

生体は、ナノメートルサイズの様々な分子、タンパク質、DNA、脂質、糖鎖およびそれらの複合体から形作られている。生体組織の構造は、それらがもつ機能と密接に結びついており、ナノレベルの構造計測は、様々な生命現象を解明していくための有効な手段となっている。一方、食品分野ではナノレベルの構造解析は端緒についたばかりである。食品素材の微細構造は食感や食味において重要な役割を持つはずであるが、食品素材のナノレベル構造が計測された例はまだわずかであり、それぞれの食品の性質や機能性と微細構造の関係については不明な点が多く残っている。今後、食品の性質や微細構造を探っていく上で、食品のナノ構造計測の必要性は高まっていくものと思われる。

従来、食品を含む生体由来試料の高分解能構造解析装置としては、まず走査型電子顕微鏡 (SEM, Scanning electron microscope) や透過型電子顕微鏡 (TEM, transmission electron microscope) が用いられてきた。しかしながら、電子顕微鏡の場合、観察は真空中で行われ、さらに重金属による被覆や染色も必要となる。そのため、得られる観察データは、その試料が実際に機能している「生」の状態を反映しているとは言い難い。また、タンパク質については、X線構造解析やNMRによって正確な構造を決定可能であるが、すべての場合に有効なわけではなく、多大な労力・時間と大掛かりな装置が必要といった制約がある。

このような問題をクリアする高分解能計測手段としては、原子間力顕微鏡 (AFM, atomic force microscopy) に代表される走査型プローブ顕微鏡 (SPM, scanning probe microscopy) 技術が筆頭にあげられる<sup>1)</sup>。SPMは、大気中や液中で試料を「生」の状態で見ることが可能な新しい方法であり、最近、後述のように生体計測への応用が進みつつある。

本稿では、SPM、中でもAFMと走査型近接場光顕微鏡 (SNOMまたはNSOM, Scanning near-field optical microscope) をとりあげて、それらの計測原理の概要、及び、それらによる生体試料や食品素材の実際の計測例について紹介する。

## 2. 走査型プローブ顕微鏡 (SPM)

### 2.1 SPMの種類と特徴

上記のように、SPMは、大気中や液中において、試料の表面形状をそのままの状態で見ることが可能な高分解能計測方法であり、1980年代初頭から半ばにかけて様々なタイプが登場した。SPMは、電子顕微鏡に比べ試料の前処理や操作が容易なことから、材料科学の分野においてはナノレベルの形状や構造の計測手

法として、すでに多く使用されている。SPMは、その名の通り、鋭い探針（プローブ）で試料表面を走査し、その表面の情報（凹凸、光強度、トンネル電流、摩擦係数、他）を記録し、コンピュータ上でデータを画像に再構成するのを基本的な動作原理としている。探針で試料表面を走査する際の制御方式と取得するデータの別によって様々なタイプのSPMが考案されており、それぞれに異なった名称が付けられている。例えば、1981年に開発された最初のSPMは走査型トンネル顕微鏡（STM, Scanning tunneling microscope）で、導電体と探針間のトンネル電流を検出して探針を制御している。また、1986年に登場したAFMでは探針の先端と物体間に働く極微弱な反発力（原子間力）を検出しながら、探針で物体表面を走査している。その他、探針と物体の摩擦力を検出する摩擦力顕微鏡（FFM, Friction force microscope）、探針と物体に働く磁気力を用いる磁気力顕微鏡（MFM, Magnetic force microscope）、表面電位を使うKelvinプローブ顕微鏡（KPM, Kelvin probe microscope）など様々なSPMが考案されている。また、光の情報を得るSNOMも1984年に考案されている。表1にこれらのSPMの名称と測定項目をまとめた。表中のSPMのうち、食品素材や生体試料の計測に適するのはAFMとSNOMである。

SPMは、電子顕微鏡が通常真空中で観察するのと異なり、生体試料を大気中や液中で「生」のままナノメートルレベルの分解能で計測できることを特徴としている。そのため、開発当初より生体試料への応用が期待されていたが、初期のSPMのハードウェアが、材料分野の計測のみを考慮して設計されていたことや生体試料の前処理方法も不明な点が多かったことなどから、期待通りの成果がなかなか得られなかった。しかしながら、最近になって光学顕微鏡と組み合わせた機

表1 代表的な走査型プローブ顕微鏡の種類

名称	略称（英名）	主な計測項目
走査型トンネル顕微鏡	STM (Scanning tunneling microscope)	導電性物質の形状
原子間力顕微鏡	AFM (Atomic force microscope)	絶縁物質を含む物質 表面の形状
摩擦力顕微鏡	FFM (Friction force microscope)	摩擦力の分布
マイクロ粘弾性顕微鏡	VEM (Visco-elasticity microscope)	粘弾力の分布
磁気力顕微鏡	MFM (Magnetic force microscope)	表面近傍磁場の分布
Kelvinプローブ顕微鏡	KFM (Kelvin force microscope)	表面電位の分布
走査型熱顕微鏡	SThM (Scanning thermal microscope)	温度分布
走査型近接場光学原子間力顕微鏡	SNOM (Scanning near-field optical microscope)	蛍光強度、偏光等

種や操作がさらに簡易になった機種が登場したこと、探針の制御法が大きく改善されことなどから、生体試料観察の成功例が蓄積してきている。このような状況の変化の下、SPMは、その特性と相まって今後の食品素材や生体試料の高分解能構造計測における重要な手法の一つになるものと期待されている。

## 2.2 AFM

AFMは、最も広く使用されているSPMであり、鋭い探針で物体表面の近傍をなぞり、その凹凸を記録し、コンピュータ上で凹凸のデータを画像に再構成するのが基本的な動作原理である。探針は半導体製造技術で作られた高さ $10\mu\text{m}$ 程度、先端径が $20\text{nm}$ 以下の特殊なものを使用する。現在のところ、実用的な最高の分解能は、大気中で高さ方向 $0.1\text{nm}$ （1）程度、平面方向 $0.5\text{nm}$ 程度、溶液中ではその十倍程度である。基本的にAFMは、物体表面の凹凸を測定しているが、凹凸の測定と同時に物体表面の弾性や粘性の分布を測定したり、微小な力を計測することも可能で、さまざまな応用が考えられている。装置本体の大きさはデスクトップ型のパソコン程度で、除振台や制御装置も含めても小型実験台ほどのスペースがあれば設置可能である。

## 2.3 SNOM

一方、SNOMは、近接場光と呼ばれる特殊な光を利用することにより、光学限界を超える分解能で、試料の光情報を計測するタイプのSPMである。近接場光は例えばナノメートルレベルの孔に可視光を当てた場合、孔の直径が光の波長に比べ小さいため、ほとんどの光は漏れないが、ごく一部、僅かにしみ出す光が存在する。この光を、近接場光と呼ぶ。通常の光（伝搬光）と異なり、空間を遠方まで伝搬することができず、速やかに減衰する。そのため、近接場光は、発生した領域のごく近傍のみに局在するため、その性質を上手く応用することにより、通常の光を利用する場合に比べてはるかに高い分解能での計測が可能になる。従来、SNOMとしては、探針を横振動させながら走査するシアーフォース型（SNOM/ShFM, Scanning near-field optical / shear force microscope）が多く使われていたが、筆者らがナノレベル計測に用いているのは、新たに開発された走査型近接場光学原子間力顕微鏡（SNOM/AFM, Scanning near-field optical / atomic force microscope）である。SNOM/AFMは、光ファイバーを探針として用いて使い、AFMと同じ原理によって制御することにより、光の情報の計測と同時に、高い分解能で凹凸の計測もできるように工夫した顕微鏡である。なお、前述の表1中に示したSNOMは広義の名称で、SNOM/AFMやSNOM/ShFMを含む一般名である。

図1にSNOM/AFMの探針と動作原理を示した。探針は光ファイバーを鋭く尖らせ、先端を曲げることでAFM用とほぼ同じように凹凸を計測できる（図1a）。この光ファイバー製の探針は「光プローブ」と呼ばれ、外側をアルミニウムなどの

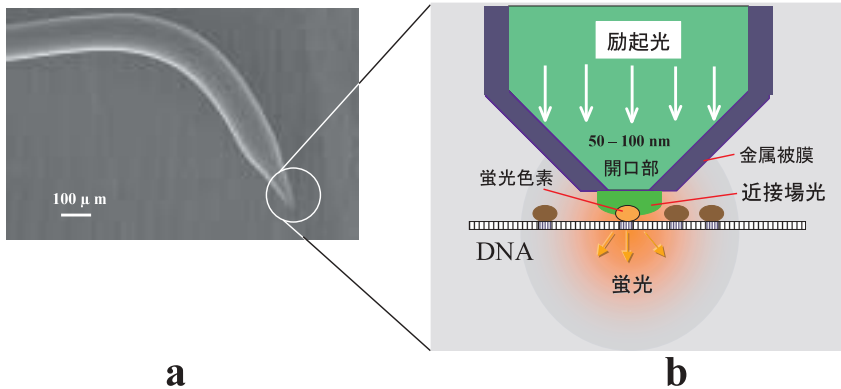


図1 走査型近接場光学原子間力顕微鏡 (SNOM/AFM) の探針と動作原理  
 a. SNOM/AFMの光ファイバー製の探針 (光プローブ) の電子顕微鏡写真  
 b. 光プローブ先端部分の模式図。プローブの先端には50nm程度の開口部があり、そのごく近傍に近接場光が発生し、蛍光色素を励起する。蛍光は下部に置いたレンズで集光する。

金属でコーティングされ、内部にレーザー光を通すことが可能である。光プローブの先端には50nm程度の開口があり、開口付近に発生する近接場光を使って、試料に標識した蛍光色素を励起する (図1b)。これまで、標識した蛍光色素を蛍光顕微鏡で観察可能であったが、分解能は回折限界のため数百nm以上に限られていた。しかしながらSNOM/AFMでは、50nm程度の開口を利用して、励起光をあたかもスポットライトのように絞って走査することが可能のため、分解能が飛躍的に向上し、ナノレベルの分解能で蛍光シグナルの位置を検出できる。このようにSNOM/AFMは、光の回折限界以下での蛍光標識の位置計測や分光データの取得など、多くの重要な情報を得ることができるため、従来の光学顕微鏡を超える分解能での遺伝子位置の解析計測や高精度での遺伝マーカーのマッピングなど、特にゲノム解析分野における活用が期待されている。

#### 2.4 SPMの問題点

SPMは、様々な制御方式の探針によって液中や大気中で「生」の生体試料をナノレベルの分解能で計測できる優れた能力を持つ。しかし、その一方で探針を使用するが故の問題点もある。それは、探針自体の形状によって得られる画像が大きく異なるという点である。AFMを例にとれば、図2に示すように探針は強度維持のため一般に円錐形またはピラミッド型で、先端がある角度を持っている。したがって物体の表面を走査する際に、凹凸が大きすぎると探針の側面で物体を走査する場合が生ずる。また、回り込んだ物体の裏側は測定できず、全体の形状を正しく測定することは困難である。得られる画像は、あくまで真上から見た凹凸

像であり、探針の影響があることを考慮しなければならない。また、コンピュータによる探針制御の限界から、大きな凹凸には追従できないことがあり、探針の形状と制御の両面から表面の凹凸の大きさは重要な問題になる。なお、試料に極端な凹凸がなく平坦であれば、分解能が高いことから非常に鮮明な画像を得ることができる。現在探針に関しては、先端の角度を狭めたり、先端にカーボンナノチューブを着けてより先端径を小さくするなどの開発が行われている。

食品素材や生体試料では、表面の凹凸が大きく、不均一で、柔らかいのが特徴である。これらの特徴はSPMにとっては最も不得手とする項目である。数 $\mu\text{m}$ 四方以下の範囲で高低差が数 $\mu\text{m}$ 以上あるような試料も少なくなく、そのような場合には前述の探針の形状が大きく影響する。このような試料で高分解能計測を実現するには、なるべく平坦な場所を探して計測を行うことが望まれるが、そのためには、数 $\mu\text{m}$ 程度、場合によっては $1\mu\text{m}$ 以下の精度で目的の場所を位置決めする必要がある。また、生体試料の柔らかさも重要な問題であり、柔軟な表面をうまく走査できるように探針を厳密に制御したり、あるいは表面が変形しないように試料の構造をある程度固定する必要も生ずる。さらに、SNOM/AFMでの計測では、装置が高感度であるため、夾雑物に由来する非常に微弱な光でも検出してしまい、ノイズとなって本来の情報を埋もれさせてしまう恐れがある。

以上のようにSPMで食品素材や生体試料を計測するにはいくつかの解決すべき点がある。しかし、最近では、探針の制御法の改善など装置の改良が進み、操作性が大きく改善されたこと、生体試料の計測例が多くなるにつれて試料の固定法や光学顕微鏡との組み合わせ測定などの計測ノウハウが蓄積してきたことなどあって、比較的容易に高分解能計測や自然に近い状態での計測が可能になっている。SNOM/AFMによる光計測の場合でも、試料調製法や蛍光色素による標識方法、

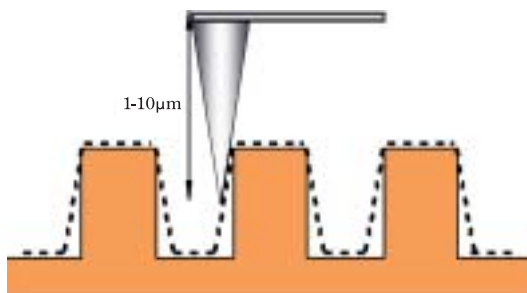


図2 AFM探針の形状と計測限界

試料の凹凸が鋭いと、探針の側面で試料を走査することになり、探針の先端は点線のような軌跡をとるので側面部分の正確な形状は計測できない。

光プローブ自体の構造，光プローブの制御方法，励起された微弱蛍光の検出法など様々な技術的な課題を検討した結果，現在では，後述のように生物試料のナノ計測が可能になっている．

### 3．AFMによる計測例

#### 3.1 生体試料

AFMによる生体試料の計測については，AFMの開発以来，枚挙に暇がないほどの計測例があり，その対象はDNA，多種多様なタンパク質，染色体，細胞など多岐にわたっている．最近では，液中で計測できることを利用して，従来の光学顕微鏡以上の解像度で動物細胞の移動の様子を計測したり<sup>2)</sup>，生きた細胞表面の弾性率変化をマッピング計測して細胞の運動との関係を調べること<sup>3)</sup>も可能になっている．さらに，液中での走査速度を向上させ，ミオシンの動きを直接ビデオ相当の動画で計測することも可能になった<sup>4)</sup>．ここでは，AFM計測の具体例として，筆者らのグループで行った染色体計測について紹介する．

染色体は古くから光学顕微鏡で観察されてきたので，構造はすでに良く分かっているように思われているが，詳細な構造はほとんど明らかにされていない．AFMを使って染色体全体を計測したところ，中央部や腕部のくびれ構造（セントロメア，二次狭窄）を高分解能で計測できた（図3 a）．さらに，高倍率での計測では40-50 nm程度の超微粒子構造や超微粒子が連なった繊維状構造を直接可視化することができた（図3 b）．この繊維状構造の直径は，DNAがコアヒストンに巻き付いたヌクレオソームがさらにらせん状に凝集して構築されるソレノイド構造（30nmファイバ）の大きさとほぼ等しいことが分かった．

さらに一つの染色体に注目し，スライドガラス上で種々の濃度のNaCl水溶液でタンパク質を抽出除去し，その都度，形状の変化を計測・比較した．その結果，低濃度ではほとんど変化はなかったが，2.0 MのNaClで抽出タンパク質を除去した場合，染色体の構造のコンパクト化と高さの減少が認められた<sup>5)</sup>．このように，AFMを用いることで，タンパク質を抽出除去する前と後の画像を従来にはない高分解能で比較することが可能になり，さらに，抽出除去したタンパク質を化学的に比較することも可能である．

AFMは探針により表面を走査して形状像を得るという特性上，高分解能のデータを得るためには，夾雑物を極力排除し，清浄な表面をもつ試料を作成しなくてはならない．そのため，試料によっては特別な前処理法を開発する必要がある．前記の染色体計測の場合には，通常の光学顕微鏡観察用の試料調製法では，夾雑物が多くAFM計測には適さなかったため，SEM用の前処理方法を元に，酢酸による洗浄等の工程を導入した新しい試料調製法を開発し，染色体表面の高分解能計測に成功した<sup>6)</sup>．いずれにしてもAFMによる生体試料の計測では，試料の調整法と探針の精密な制御がポイントになる．

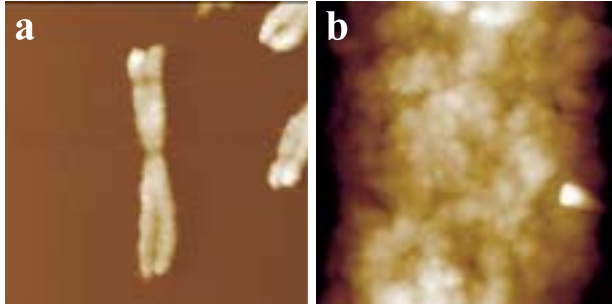


図3 オオムギ染色体表面のAFM計測

- a. オオムギ染色体の形状像．走査範囲：12 x 12  $\mu\text{m}$ ．
- b. オオムギ染色体の表面の拡大像．直径約40～50nmの粒子状構造が繋がっているのが計測される．走査範囲：1 x 1  $\mu\text{m}$ ．

### 3.2 食品素材

食品素材を直接AFMで観察する研究は、これまでいくつか散見されるものの、現在のところその例はあまり多くない。ここでは、筆者らによるデンプン粒子内構造のナノレベル計測およびオオムギ子葉鞘細胞表面の液中計測の例を示す。

デンプン粒子内の高次構造は化学分析や透過型電子顕微鏡により推定されているが、電子顕微鏡観察では、試料の固定、切片の作成、染色などの煩雑な前処理が必要であった。図4に、AFMでデンプン粒子内の高次構造を計測した例<sup>7,8)</sup>を示す。水中でデンプン粒子を微粒子化した後、粒径が1  $\mu\text{m}$ 以下の粒子を回収し、大気中でその表面を計測した。図4左は通常凹凸像、図4中央は偏差像である。偏差像は、探針の制御信号と実際の探針の動きとの差を表示した像で、実際は試料凹凸のエッジ部分を強調した画像となるので、形状像と併記し、試料の微細構造を解析計測することができる。これらの結果から、粒径が数十nm程度の超微粒子構造がデンプン粒子内に多数存在していることが容易に計測できた。また、これらの超微粒子が直鎖状に繋がっている構造（図4右）やレンガ状の構造も計測されており、デンプン粒子内のシングルクラスター構造を直接計測できたものと考えている。

AFMの特徴の一つに溶液中での計測がある。図5には、オオムギ子葉鞘細胞の表面を溶液中でAFM計測した例<sup>9)</sup>を示す。切り出し直後の生の細胞（図5a）に比べ、常圧大気中（図5b）と0.38 MPaのキセノンガス雰囲気下（図5c）で保存した場合細かい凹凸が計測された。一方、0.48 MPaで保存した場合には（図5d）凹凸は計測されず、切り出し直後と同等の細胞表面を維持していることが明らかになった。さらに同じ試料を、走査範囲を狭めて、さらに高い分解能で計測したところ、クチクラ層が剥離し、一次細胞壁であるセルロース繊維束と考えられる



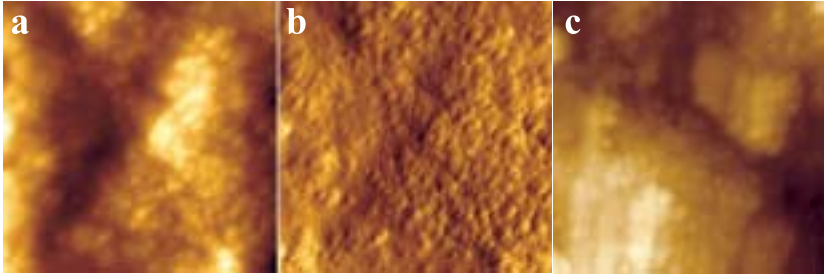


図4 デンブロン粒子内の微細構造のAFM計測

- トムロコシデンブンの凹凸像．直径20-30nmの超微粒子構造が計測できる．走査範囲：800 x 800nm，以下同様．
- トムロコシデンブンの偏差像．エッジ部分が強調され凹凸像と比較することにより超微粒子構造が明瞭になる．
- 甘藷デンブンの凹凸像．直径20-30nmの超微粒子が直鎖状の構造を取っている例．

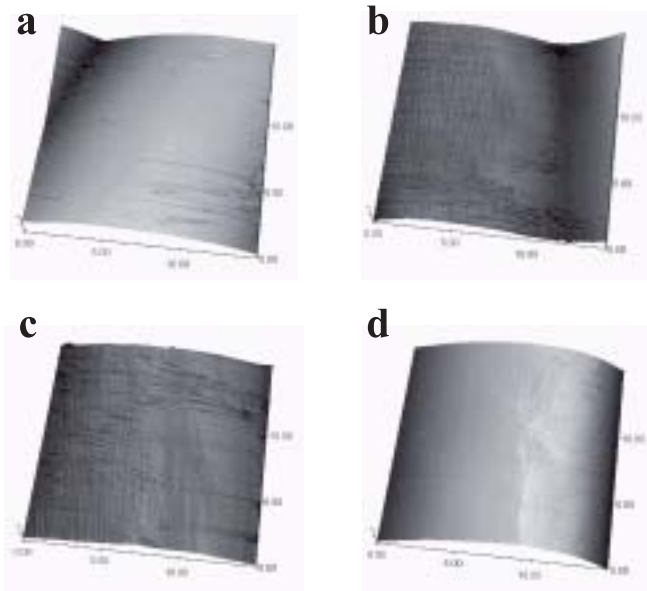


図5 オオムギ子葉鞘細胞表面の液中AFM計測

- 切り出し直後のオオムギ子葉鞘細胞表面を液中でAFMにより計測した形状像．走査範囲：15 x 15  $\mu\text{m}$ 、以下同様．
- 切り出し後，常圧の大気中で保存した子葉鞘細胞の表面．
- 切り出し後，0.38Mpaのキセノンガス雰囲気中で保存した子葉鞘細胞の表面．
- 切り出し後，0.48Mpaのキセノンガス雰囲気中で保存した子葉鞘細胞の表面．



構造が計測された。これらの結果から、クチクラ層を保持できるキセノンガスの保存圧力条件が明らかになった。AFMを用いることで、水溶液中であっても細胞表面の $1\mu\text{m}$ 角の構造を高さ $50\text{nm}$ 程度の分解能で明らかにすることが可能である。

食品素材のAFM計測はこの他にも、例えば、セルラーゼによりセルロースが資化される過程をAFMで計測し、フィブリル化の様子を可視化してマイクロフィブリルの大きさを実測した研究<sup>10)</sup>、香気成分を保持した食品添加物噴霧乾燥粒子の表面構造を直接AFMで計測して、SEMなどでは観察が難しいナノレベルでの表面構造と香気成分の揮発性との関係を解明する検討、あるいはプロセスチーズのカゼインミセルの可視化などの検討などを行っている。

#### 4. SNOM/AFMによるゲノム解析例

##### 4.1 DNA上の遺伝子位置の検出 (DNA-nanoFISH)

従来からDNAや染色体上の遺伝子の位置を蛍光色素で標識し、光学顕微鏡を使ってその位置を観察するFISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法が用いられている。遺伝子の存在と大まかな位置を観察する方法として利用されているが、光学顕微鏡を使用するため分解能が制限されていた。それに対して、筆者らのグループは、特定塩基配列をFISH法により蛍光標識したDNAを基板の上に直線的に固定し、SNOM/AFMを用いてナノスケールで、直接的かつ効率的に計測する技術を開発した。ここでは、ファージDNA上を材料にして、蛍光標識した特定の塩基配列のDNA上での位置を高感度に計測した例を図6に示す。

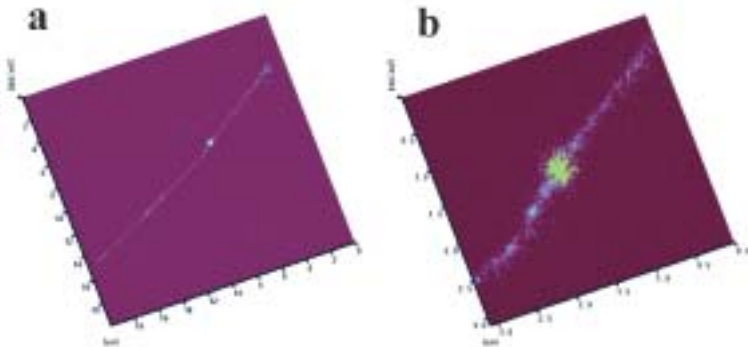


図6 特定塩基配列を標識したDNAのSNOM/AFM計測 (DNA-nanoFISH)

- Alexa532結合PNAで中央部の遺伝子の配列を標識したDNA。DNAはYOYO-1で染色されている。532nm励起と488nm励起を重ね合わせ像。走査範囲： $20 \times 20\mu\text{m}$ 。
- 標識部位の拡大図。表示範囲： $3 \times 3\mu\text{m}$ 。

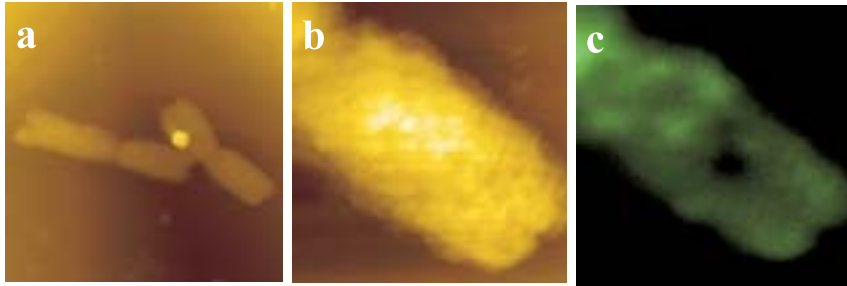


図7 蛍光バンド処理染色体のSNOM/AFM計測

- SNOM/AFMにより計測したオオムギ染色体の形状像．走査範囲：12 x 12  $\mu\text{m}$ ．
- aの右側の染色体の腕部の形状像．走査範囲：4 x 4  $\mu\text{m}$ ．
- bと同時計測した蛍光像．形状像では染色体表面は平坦だが、蛍光像ではスポット状に蛍光強度の強い領域がある．走査範囲：4 x 4  $\mu\text{m}$ ．

ファージ<sup>ea47</sup>遺伝子の先頭部の15塩基の配列にAlexsa532色素（励起波長532 nm，蛍光波長570nm）を結合したPNA（peptide nucleic acid）プローブを作成し、ハイブリダイゼーションにより標識した．ファージDNAは、2本鎖DNAの蛍光染色試薬YOYO-1（励起波長488 nm，蛍光波長510 nm）によって染色した．このDNA試料をMethyltrimethoxysilaneにて表面改質したマイカ基板<sup>11)</sup>上に、吸上法<sup>12)</sup>により配向させた後、励起光に488および532 nmのレーザーを用いて計測した．励起された蛍光は倒立型光学顕微鏡の光学系を通してAPD（avalanche photodiode）により検出した．その結果、図6aのように、予想される位置（ファージDNAのほぼ中央部）にAlexa532の蛍光が計測された．図6bは、標識部位の拡大図であり、ターゲット遺伝子の位置が300nm以下の分解で検出されていることがわかる．以上のように、SNOM/AFMによって、わずか15塩基の領域を通常の光学顕微鏡の限界を超える分解能で計測することが可能となり、特定遺伝子マッピングの可視化の可能性が示された<sup>13, 14)</sup>．

なお、この研究の過程でマイカ基板上にDNAを任意の方向に固定する方法<sup>15)</sup>や固定したDNA上に適当な間隔で金属超微粒子を固定する方法<sup>16)</sup>などを開発し、DNAをナノレベルの新素材として使える可能性を示すことができた．

#### 4.2 染色体蛍光バンドのSNOM/AFM計測

SNOM/AFMである程度の厚さを持つ生物試料を計測した場合、試料表面で励起された蛍光が試料内部の立体構造により散乱され、強度が低下して蛍光信号を十分検出できない恐れがある．しかしながら、染色体のように数百nm程度の厚さの生物試料では、SNOM/AFMにより表面形状と蛍光強度の同時計測が可能であった<sup>17)</sup>．その例として、蛍光バンド処理（染色体の判別や高次構造推定のため用い

られる手法)を施した染色体の表面形状と蛍光像をSNOM/AFMにより同時に計測した結果を図7に示す。図7aはSNOM/AFMにより計測したオオムギ染色体の全体像(形状像)である。図7bとcは、そのうちの右側染色体の腕部の形状像と蛍光像を高倍率で同時測定した結果を示している。形状像では、染色体の腕部はほぼ様な厚みを持っており、顕著な高低差は計測されなかったが、蛍光像では特定の領域のみに高い蛍光強度が計測された。表面形状と蛍光強度の間には相関はなかった。以上の結果は、計測された蛍光強度分布が染色体の高低など形状に依存するのではなく、DNAの含量や塩基組成など染色体内部の高次構造を反映していること示唆している。

#### 4.3 染色体の FISH領域のナノ計測(染色体-nanoFISH)

染色体のテロメア領域をFISHし、蛍光顕微鏡観察した場合、図8aに示すように、FISHによる蛍光は通常1つの輝点として観察される。蛍光顕微鏡観察において1つの輝点とされた領域をAFM及SNOM/AFMでナノ計測した後、同じ領域の形状をAFMで計測した例を図8b, cに示した。図8bはAFMでの形状像で、直径数十nmのクロマチンファイバーが折り重なっている様子が鮮明に計測できた。前述した通り、SNOM/AFMでも形状像は計測可能であるが、現状では光プローブの先端径が大きい(10倍以上)ため、高分解能の形状像を得るためにAFM用のシリコン探針で形状像を取り直す必要がある。図8cは、図8bのAFM計測による形状像にSNOM/AFM計測で得られた蛍光像を画像処理後に重ねた図である。その結果、光学顕微鏡ではほぼ1点であった蛍光の信号が大きく2点に分かれていることが明

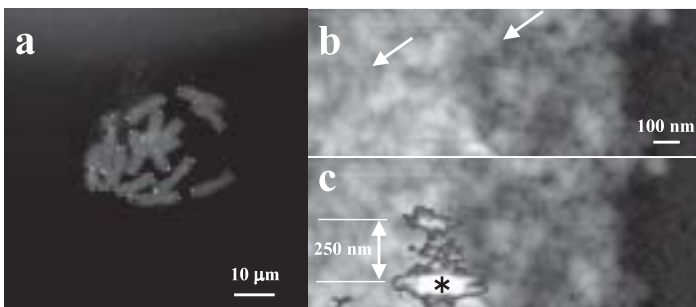


図8 テロメアFISH処理染色体のSNOM/AFM計測(染色体-nanoFISH)

- a. オオムギ染色体のテロメア領域の蛍光顕微鏡による計測例。
- b. テロメア領域のナノレベルでの形状像, AFM探針使用。矢印はクロマチンファイバーの例。
- c. bにSNOM/AFMによる蛍光像(\*)を重ねた形状像。光学顕微鏡で1点にしか見えない蛍光信号が250nm離れた2点として計測された。

らかになった<sup>18, 19)</sup>。また、特定のクロマチンファーバー上の蛍光信号を検出できる可能性も示唆された。

以上に示した一連の結果は、SNOM/AFMを用いることで、FISHの分解能を光学限界を超えて高められることを示すものである。筆者らの研究グループでは、この光学限界を超えるFISH法をnanoFISH（またはナノFISH）と命名し、DNAと染色体を対象にさらに検討を進めている。

## 5. SPMによる解析の将来

SPM、特にAFMにより液中での柔らかい試料を生のまま計測することは、生物学分野のみならず、食品分野からも非常に強く要望されながら未だ実現できていない重要な課題である。ようやくAFMメーカーでもその重要性を認識し、2003年度から装置および探針の開発プロジェクトが開始され、筆者らのグループも実際の試料を使った溶液中での計測と装置の評価で共同研究を行っている。一方、SPMは、単に「見る」だけの道具ではなく、探針によりpNレベルの力を測ったり対象物をナノメートルの距離で動かしたりすることが可能である。SPMの探針に抗体などのタンパク質を結合させてタンパク質間相互作用を定量的に検出する研究を、同じプロジェクト内で開始している。最終的には、多数の探針を使い、丁度DNAチップのイメージで、網羅的にタンパク質間の定量的相互作用計測を可能にしたいと考えている。

また、探針で生体試料から微量の物質を回収する試みも開始した。すなわち、染色体からAFMの探針を用いて直接DNAを回収し、染色体上の任意の部分の染色体物理地図構築や塩基配列解読を実現しようとする「SPMダイレクトゲノム解析法」を、農業生物資源研究所と共同で、2003年度から(独)農業・生物系特定産業技術研究機構生研センターのプロジェクトとして開始した。

1986年のAFMの発表当初から期待されていた溶液中での計測やナノ操作は、約20年を経て、ようやく実現の段階にあると考えられる。

## 6. おわりに

SPMは発明されてから20数年の技術である。材料科学分野では順調に発展してきたが、生物系の試料への適用には、前述したような様々な問題点があり、それらを解決していくための期間が必要であった。しかし、最近になって、探針、装置およびその制御アルゴリズムの進歩や試料調製法の改良により、ほとんどの問題がクリアできる見通しが立つようになり、SPMの生体試料への適用は急速に進んでいる。このような状況にあって、SPMが生物学分野でも認知され始めており、従来は機械系研究者がほとんどであったSPMの利用者が、生物系研究者の間でも増えつつある。

今後、SEMの発展がそうであったように、機械系研究者（装置の改良）と生物

系研究者（試料調整調製方法の改善，問題点の機械系研究者へのフィードバック等）が相互に補完することで，SPMを生物試料計測へ本格的に展開できるものと考えられる．特に，溶液中で自然に近い状態でナノレベル計測を行うことは，従来の光学顕微鏡やSEMでは考えられなかった新たな情報の収集が可能になると期待できる．

またSPMは，ナノレベルでの力測定や操作も可能になりつつあり，単なる「顕微鏡」ではなく観察から操作までをナノレベルでこなす総合ツールと捉えるべき段階に達している．生物試料の計測をより容易かつ正確に行うためのハードウェアの改良や開発も各SPMメーカーにおいて進められていることから，生物学および食品科学におけるSPMの有用性は，今後ますます大きくなると考えられる．さらなる発展を期待したい．

## 謝辞

本研究の一部は，(独)農業・生物系特定産業技術研究機構生研センター基礎研究推進事業，科学振興調整費，NEDO((独)新エネルギー・産業技術総合開発機構)他の補助により推進されている．

(企画調整部研究企画科長 大谷 敏郎)

(食品工学部計測工学研究室 杉山 滋)

## 参考文献

- 1) 日本表面科学界編：ナノテクノロジーのための走査型プローブ顕微鏡，丸善，(2002)．
- 2) T. Ushiki, S. Yamamoto, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto and M. Shigeno: Atomic force microscopy of living cells, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 3761-3764 (2000)．
- 3) M. Nagayama, H. Haga and K. Kawabata: Drastic change of local stiffness distribution correlating to cell migration in living fibroblasts, *Cell Motil Cytoskeleton*, **50**, 173-179 (2001)．
- 4) 安藤敏夫：高速原子間力顕微鏡 - 液中ナノメーター世界の高速撮影 - ，*化学と工業*，**55**，877-879 (2002)．
- 5) X-Q. Liu, S. Sugiyama, Q-Y. Xu, T. Kobori, S. Hagiwara and T. Ohtani: Atomic force microscopy study of chromosome surface structure changed by protein extraction , *Ultramicroscopy* , **94**, 217-223 (2003) ．
- 6) S. Sugiyama, T. Yoshino, H. Kanahara, M. Shichiri, D. Fukushi and T. Ohtani: Effects of acetic acid treatment on plant chromosome structures analyzed by atomic force microscopy, *Anal. Biochem*, **324**, 39-44 (2004) ．

- 7) T. Ohtani, T. Yoshino, T. Ushiki, S. Hagiwara and T. Maekawa: Atomic force microscopic imaging of rice starch granule structure in nanometer scale, *J. Electron Microscopy*, **49**, 487-489 (2000).
- 8) T. Ohtani, T. Yoshino, S. Hagiwara and T. Maekawa: High-resolution imaging of starch granule structure using atomic force microscopy, *Starch/Stärke*, **52**, 150-153 (2000).
- 9) T. Yoshino, I. Sotomei, T. Ohtani, S. Isobe, S. Oshita and T. Maekawa: Observations of xenon gas-treated barley cells in solution by atomic force microscopy, *J. Electron Microscopy*, **49**, 483-486 (2000).
- 10) 大原浩樹, 中村 博文, 野尻 宙平, 吉野 智之, 大谷 敏郎, 窪田 英俊, 河野 敏明: *Trichoderma viride*由来エンドグルカナーゼ の作用機構, 日本農芸化学会2002年度大会講演要旨, p.124, 2002.3.
- 11) M. Sasou, S. Sugiyama, T. Yoshino and T. Ohtani: Molecular flat mica surface silanized with methyltrimethoxysilane for fixing and straightening DNA, *Langmuir*, **19**, 9845-9849 (2003).
- 12) H. Nakao, H. Hayashi, T. Yoshino, S. Sugiyama, K. Otobe and T. Ohtani: Development of novel polymer-coated substrates for straightening and fixing DNA, *Nano Letters*, **2**, 475-479 (2002).
- 13) 吉野智之, 大谷敏郎: SNOM/AFMの生物試料への応用顕微鏡学会, 電子顕微鏡 (日本顕微鏡学会誌), **38**, 94-97 (2003).
- 14) J-M. Kim, T. Hirose, S. Sugiyama, T. Ohtani and H. Muramatsu: Visualizing a hybridized PNA probe on a DNA molecule with near-field optical microscopy, *Nano Letters*, **4**, 2091-2097 (2004).
- 15) H. Nakao, M. Gad, S. Sugiyama, K. Otobe. and T. Ohtani: Transfer-printing of highly aligned DNA nanowires, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7162-7163 (2003).
- 16) H. Nakao, H. Siigi, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Nagaoka, S. Sugiyama and T. Ohtani: Highly Ordered Assemblies of Au Nanoparticles Organized on DNA, *Nano Lett.* **3**, 1391-1394 (2003).
- 17) T. Yoshino, S. Sugiyama, S. Hagiwara, T. Ushiki and T. Ohtani: Simultaneous collection of topographic and fluorescent images of barley chromosomes by scanning near-field optical/atomic force microscopy, *J. Electron Microscopy*, **51**, 199-203 (2002).
- 18) D. Fukushi, M. Shichiri, S. Sugiyama, T. Yoshino, S. Hagiwara and T. Ohtani: Scanning near-field optical/atomic force microscopy detection of FISH signals beyond the optical limit, *Exp. Cell Res.*, **289**, 237-244 (2003).
- 19) T. Ohtani, M. Shichiri, D. Fukushi, S. Sugiyama, T. Yoshino, T. Kobori, S. Hagiwara, and T. Ushiki: Imaging of Chromosomes at Nano-Meter Scale

Resolution using Scanning Near- Field Optical/Atomic Force Microscopy,  
*Arch. Histol. Cytol.*, **65**, 111-120 (2002).





# 食品産業廃棄物の再資源化

## 1. はじめに

21世紀は環境の時代と言われ、農業や食品産業においては早急に環境保全型産業への転換を迫られている。食品や農業分野で出荷から加工で発生する非食部は従来であれば、農産物を栽培している農地に還元し肥料として使用することが通常であるが、農産物等の輸入増加と食品工場の大型化などの現状では、発生した副産物の農地への還元には限界があり、副産物の処理が緊急な課題となっている。環境保全型産業への転換のための技術開発としては省資源・省エネルギー型技術の導入が不可欠であり、具体的には加工プロセス中のエネルギー利用の効率化と副産物・廃棄物の発生を抑制した加工工程の構築、発生した未低利用資源のリサイクル技術・変換技術の開発にある。これらの見地に立って研究機関において様々な検討が行われている。当方の例を例えると電気加工を用いた省エネ・非熱的処理により高品質食品の製造及び環境負荷低減を図る技術開発、さらに副産物の発生を低減化する技術（効率的脱水技術）、副産物の高次変換技術（生分解性素材開発などの工業資材化を含めた変換技術）による再資源化技術開発である。

これらの開発はプロセスによっては関連企業、大学との共同において効率的な研究の実施が出来る体制によって実施することが前提となる。食品加工技術に関する工学的ニーズについては、図1に示したように技術開発の目標としては、1つめは高度の食品加工技術の開発・熟劣化の少ない高品質食品、安全な生鮮物の供



図1 食品加工技術に関する工学研究のニーズ

給を可能にする技術の提供といった、いわば食品産業での食品生産面に寄与することであり、2つめは、変換技術の開発・食品副産物の再資源化、食品産業での廃棄物処理コストの低減による環境負荷の低減といった、食品産業が社会的義務とし検討すべき環境保全技術に寄与することである。製造工学研究室では、食品産業からの副産物・廃棄物処理技術について一貫した研究を進め、最近では高次の変換技術として包装資材などへの応用を想定した生分解性素材の開発及び評価を実施している。開発する生分解性素材の1つの用途としては、農産物あるいは食品一般の包装資材が考えられる。化学合成包装資材による農産物及び食品の包装は、野菜、肉、鮮魚などの発泡スチロールのラップ掛け包装やカップ麺など流通・販売時の利便性や品質保持の用途で広く利用されており、用途に合わせた特性を持った様々な包装資材が開発されている。これらの包装資材は我々の食生活に欠くことのできないものと言える。高分子ポリマーを用いた化学合成素材は、加工性に優れていると同時に、ガス透過性などをコントロールしやすく、また非常に安定であるなどの多くの利点を持っている。反面、これらの素材は天然の素材と異なり微生物等における分解がしにくく、また焼却時には大量の熱や排ガスを発生するなど、廃棄処理時に環境汚染を生じることが地球規模の問題となっている。この問題から原材料の高分子ポリマーを生分解性にすることで化学合成品の廃棄物の問題回避が図られようとしている。農産物を原料に包装素材を作成するためには、その完全生分解性素材（たとえば、デンプン、タンパク質）を活用してどのように既存の合成包装材の特性を再現するかという改質・加工技術にかかっている。我国で大量に利用されている発泡スチロール包材をターゲットにして、それにとってかわる膨化デンプンを主体とする完全生分解性容器素材もしくは容器加工技術の開発を行っており、さらに膨化デンプン素材の欠点となる耐水性の付与や一般的なフィルム形態の生分解性素材の開発について、トウモロコシタンパクを用いて行っている。これらの生分解性包装資材は化学合成包装資材に比べると、現段階では十分に利用用途にあわせた特性を再現できていないことや非常にコストが高いことがネックとなっているが、最近、化学合成包装資材作成時に使用されている化学物質の一部が環境ホルモンとしてリストアップされたことや二酸化炭素削減の動きにみるように人や環境に優しい包装資材への要望は益々高まっている。さらに、生分解性包装資材の原料として農産物由来の素材を用いることで従来の農産物においては非食部として利用価値の低い素材等や食品副産物資材の効果的な利用により農産物の高度利用が図れると考えている。未利用資材を含めた農産物由来のデンプンやタンパク質などの天然高分子を主原料とした生分解性素材の開発について述べる。

## 2. 生分解性素材の開発状況

生分解性資材はポリ乳酸系プラスチックをはじめとして世界中で利用が進んで

おり、用途にあわせた改質も進んでいる。これらの資材は、化学合成プラスチックと非常に似た特性を持ち、使用している自然界の環境では分解が極めて遅く、ある程度の熱を加えて加水分解処理を行なうことが必要であり、厳密な意味での生分解性とは言いがたいが、一般の使用中の劣化がしないため、安定的に使用でき、かつ使用後の処理を行なうことで、土壌などへ還元できる意味で環境保全型プラスチックと言える。またこれらが植物原料から生産されることでCO<sub>2</sub>削減の意味も大きく注目されている。これらのポリ乳酸系などの生分解性プラスチックにおいては、現在ガラス繊維の代わりに竹繊維を添加してコスト低減と強度向上を行なった事例があるなど、その製造コストの低下と物性の改善から実際に利用検討が進んでいる。おからなどの副産物から直接製造する素材はポリ乳酸系プラスチックのように化成プラスチックを完全に代替できる特性は無いが完全生分解性であり、短時間使用する包装容器であるとか、農業資材への利用においては一般家庭での処理や農地への還元が容易である利点を生かして利用可能な分野もあると考えている。

生分解性素材の用途展開として、繊維、不織布、フィルム、シート、射出成型品、ボトル、発泡成型品等の製品形態において、生分解性の必要な分野や望ましい分野を中心に用途展開が考えられている。例えば、自然環境下で使用される水産、農業、園芸、土木資材分野から、日常生活において廃棄物処理が問題となる包装分野（包装フィルム、食品容器、買い物袋、緩衝材等）や生活資材（生ごみ袋、紙おむつ、トイレタリー用品等）が対象となる。生分解性素材の市場は現在では年々増加している。主な生分解性素材としては表1に示すものがある。このなかで、我々が着目しているのは農産物の利用率向上につながり、また素材変換コストも比較的安価な天然高分子材料の活用である。ここではセルロース系の素

表1 生分解性素材の開発の現状

	微生物による生産	天然高分子材料の活用	化学合成高分子
特徴	高い生分解性 生体適合性	高い生分解性 通気性	種々の物理化学的性質物が作成可能 コスト低 既存の合成加工装置が使用可能
用途	魚網・釣糸 薬物放出調整基材	農業用フィルム 鉢・ひも	各種包装材 冷凍食品・インスタント飲食品容器
問題点	コスト高 耐熱性・機械的強度の幅が狭い	* 熱可塑性がない * 水に弱い	完全分解するために共重合体反応の制御が必要
開発課題	株菌の育種改良 培養方法の改良 ポリマー生産菌の探索	加工方法の開発 耐水性の付与 他のバイオマスの利用	共重合反応の制御の開発 物理化学的性質と生分解性との関係 解明

\*ゼインを用いた場合の最大の利点としては、この部分での欠点を補い、使用用途の拡大、利便性を高めることにある。

(\*出典) 原田哲彌, 生分解性プラスチックのコスト試算と経済性分析, (株) インターリサーチ社, p26, 1993年3月

表2 プラスチック容器の長所と短所

長 所	短 所
軽量 量産が可能 外観の自由度が高い（透明タイプから着色） 耐衝撃性を有する 耐薬品性・耐水性を有する	使用温度に制約がある 寸法変化を生じやすい（温度や圧力により） 静電気の発生（汚れの付着の問題） 表面が傷つきやすい 内部添加剤の移行の恐れがある

材について示したが、これらは耐水性の付与が大きな問題となっている。我々はデンブンをを用いた発泡容器の開発に加えて、この問題解決に水に溶けにくいトウモロコシタンパク質のゼインに着目しフィルム開発を行った。用途においては、特に農業分野や食品分野で使用されている資材化を目的としている。食品包装の持つ課題としては、1. 微生物や物理的・化学的要因による変敗防止と品質保持、2. 衛生確保、3. 生産の合理化及び省力化、4. 流通・輸送の合理化、5. 商品価値の増大、6. 消費者の取り扱いの利便性などが挙げられるものがある。

プラスチック容器及びフィルムは、表2に示すような長所から食品包装としての条件を満たす素材として多く利用され、さらに最近では鮮度・品質保持に必要なバリアー性や各種調理加工に適應する耐熱性の付与、複合化に必要な接着剤の開発等を進めている。しかし、これらのプラスチック素材においてはリサイクル・廃棄処理システムの構築や安全性の問題も重要な課題となっており、農産物などからの食品包装資材開発の要望も高まっている。現状の食品包装に求められる条件を十分に満たすものが開発されるにはまだ時間がかかると予想するが、環境保全型産業への転換が急務とされる現在、代替できる分野・資材を検索し、随時適用していくことが重要であると考えている。以後、包装資材としての大きな用途である発泡容器（トレイ）やフィルムへの未利用部位を含めた農産物素材の変換技術について述べる。

### 3. デンブンで作る発泡性容器

デンブン材料として市販薄力コーンスターチを用い、基本的にはそのまま、あるいは油脂（ゴマ油またはオレイン酸、2 または8w/w%）添加し、2 軸エクストルーダー（MaxTemp.80°C、スクリュウ回転80rpm、処理時水分40%）で処理した後水分25%に調整した未膨化ペレットを使用した。膨化機器は試作上下式焼型を用いた。市販膨化デンブンと発泡スチロールについて、予備的に強度と微細構造を比較した。表3に示すようにデンブンの焼成成型品は強度的には十分な強度を有しているが、柔軟性に欠け、さらには密度も大きい。断面で見ると完全な独立気泡緻密構造ではなく、所々に孔と連結気泡が存在している。発泡スチロール

表3 市販膨化デンプンと発泡スチロールの強度比較

測定対象	破断応力 ( $\text{kg} / \text{cm}^2$ )*
焼成成型品スナック	28.5
発泡スチロール容器 (カップ)	28.3
発泡スチロール容器 (総菜容器)	21.3
発泡大型スチロール容器	18.6

\*測定は4回平均 使用プランジヤーは2mm直径、貫入速度 2cm / minで測定

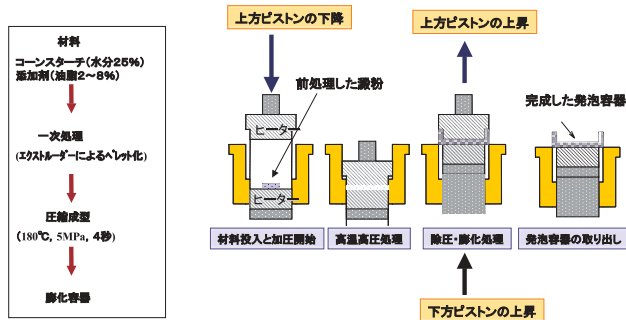


図2 発泡容器の作成方法及び圧縮成形法のプロセス

系では全体膨化によるためか均一独立気泡が全域にわたって存在し、この構造が有る程度の強度を確保しながらもややフレキシブルな特徴を与えていると思われる。これらの構造の差を念頭に発泡容器の試作を試みた。図2に示す作成方法及び圧縮成型方法により試験を行った。上下可動の金型で圧縮加熱され、材料溶融温度到達後に圧縮が若干解除されて膨化し続いて排出される機構である。その結果、組成にかかわらず、粉状では5MPaでも熱伝達が十分では無く不完全な溶融膨化となった。一方、予めペレット化した場合は均一な膨化が得られ、膨化生地は市販の発泡スチロールにほぼ匹敵するものであった。微細構造もほぼ独立した微細な気泡から構成されている。油脂無添加ではデンプンの 化のため耐水性は全く見られず直ちに水に溶解するが、油脂添加では特にゴマ油がより微細な気泡生成を促進し水中で膨潤するものの、1時間後でも溶解は認められず、部分的にせよ耐水性は確保できた。

#### 4. トウモロコシタンパク質からの耐水性生分解性フィルム<sup>1-4)</sup>

天然高分子材料からの生分解性のフィルム開発はデンプンや大豆タンパク等を

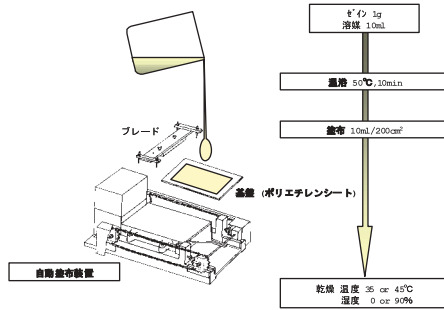
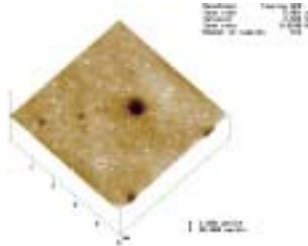


図3 ゼインを用いたフィルム作成方法



透明な生分解性フィルム



原子間力顕微鏡で見た表面  
-1辺 5ミクロン-

図4 トウモロコシのタンパク質からつくった生分解性フィルム

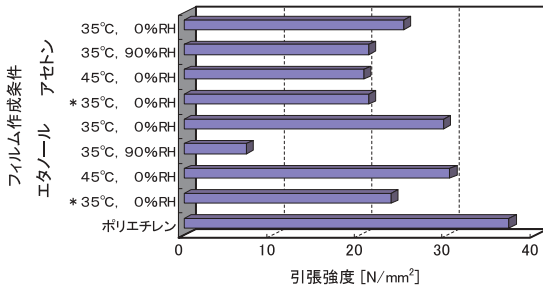


図5 各作成条件下でのゼインフィルムの引張強度  
\* 乾燥温度及び湿度を示す

用いても行われているが、これらは水溶性が高く、耐水性の低さが大きな問題となっている。前に述べたデンプンでの発泡容器も十分な耐水性の付与は困難であった。そこでコーンでの澱粉製造時の副産物であるトウモロコシタンパクのゼインを材料としたフィルム開発とその物性等の評価を行った。我々が着目したトウモロコシタンパク質は溶媒可溶性のプルアミンの主成分となるゼインであり、トウモロコシ種子中のタンパク質の約50～55%を占める。トウモロコシから製造されるコーンスターチを例に挙げると、原料用トウモロコシの年間使用量は、300万トンを超えており、1990年度における産物として生じるグルテンミールは、約16万トン（約5%）である。グルテンミールは、飼料用約15万トン、醸造用約1万トンとして処分されており、その取引価格は、40～70円/kgであり、コストも安価である。

図3に示すような手順で、ゼインを溶媒（70%アセトン，80%エタノール）に溶解したゼイン溶液（濃度：10%，35%）10mlをキャストイング装置を用いて200cm<sup>2</sup>の広さに塗布し、その後いくつかの乾燥条件（温度：35，45，湿度：0%，90%）で乾燥し、フィルムを作成し、引張強度等による機械的特性、接触角や透水速度等による耐水性の有無、ガス透過係数や透湿度によるフィルム素材としての評価を行っている。図4に作成したフィルムについて示す。作成されたゼインフィルムの物理特性を見てみると破断強度などはポリエチレンフィルムと同様の特性を有しており、また作成条件や乾燥条件によりフィルムの物性が変わることが明らかになった。たとえば、農産物や食品包装で重要となるガス透過性についても酸素と二酸化炭素で測定を行った結果、使用する溶媒の種類や乾燥条件により、ガスの選択透過性のあるものや透過性が非常に大きいフィルムが作成できた（図5）。これらの物性の変化は作成条件に依存したフィルム構造の変化によるものであると思われる。このフィルムの生分解性について、検討した結果を写真1に示す。フィルムは、使用する可塑剤や土壌中の水分の量により分解速度が異なるが、乳酸を可塑剤にして、保水率60%（湿った状態の土壌）においては3ヶ月以内での分解が確認されている。これらの結果から耐水性のある生分解性素材としてゼインが有効なこと、さらに作成条件によって物性が変化することで用途に合わせた素材開発も可能であることが明らかになった。

包装容器の処理の問題において、今まで食品容器包装リサイクル高度化技術開発事業等により化成品容器の処理（主にリサイクル処理）や生分解性素材での代替技術、それらの分解性処理等については大学、民間企業による検討が実施されてきた。生分解性素材についても汎用性の高い合成系の利用が中心に進んでいるが、その場合は生分解における処理時間が比較的に長いこと、それらの素材にデンプン等の天然高分子素材を混合することで生分解性の改善を図るなどの動きもある。農業分野でのマルチフィルムや施設用ビニールなどでは表面の汚れや劣化が激しくリサイクル処理が困難とされており、これらについては生分解性素材へ

の代替が検討されている。我々もこの汚れなどによりリサイクルなど処理コストが高くなるこれらの分野への用途開発も実施している。具体的には温室被覆資材・マルチフィルム資材などを念頭においた耐候試験で耐久性や特性の変化を光透過性の測定や物性測定などにより、試作しているゼインフィルムを含むいくつかの生分解性素材の利用可能性も検討している。

#### 5. 耐水性付与のための膨化成形デンプン容器へのタンパク質フィルム接着

精製したタンパク質ゼインはコストが高く、固形素材として利用するには不向きである。そのため、先に作成したデンプンを主素材とした固形素材の表面をゼインでコーティングして耐水性を付与する方法を検討した。70%アセトンにゼインを重量比で10%溶解した溶液とし、乾燥・被膜化した。接着は80%エタノールゼイン高濃度溶液を糊とし、別にアセトン溶液から調整したゼインフィルムを接着した。図6にゼインフィルムの接着法について示す。

ゼイン・アセトン濃厚溶液を糊として用いなかった理由は、溶剤蒸散が早く、接着が困難であることを回避すると同時に、糊から蒸散するアセトンによる既成アセトンフィルムの構造崩壊の可能性を極力抑えるためである。アルコール溶液の糊のみでも若干の耐水性が得られたが、不十分であるのに対し、アセトンフィルムを接着した場合は24時間後でも良好な耐水性を示し、当初の24時間耐水性の目標はほぼ達成することができた。図7にデンプン発泡容器にゼインフィルムを接着した状況の電子顕微鏡写真と耐水性試験でのフィルム接着タイプの良好な耐水性を示す。また強度的にも全体としての穿孔強度は、それぞれがほぼ積算される値を示した。

実用化に際しては、効率的な固形素材へのコーティングの方法の検討やコーティング初期で固形素材への浸透による構造のゆがみなどの阻止などの課題がある

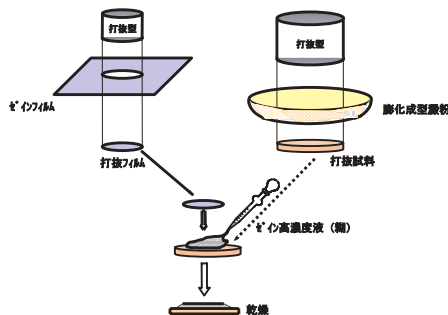


図6 デンプン発泡容器へのゼインフィルムの接着方法



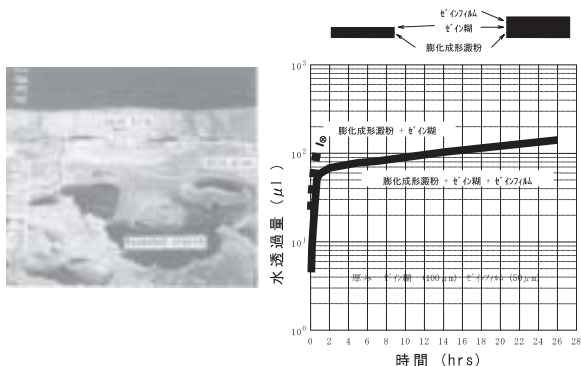


図7 発泡容器へのゼインフィルム接着状況と耐水性

が，このような耐水性付与のための耐水性素材のコーティング処理は，農業や食品分野での副産物の生分解性素材への利用促進や食品容器などに利用する際の固形素材表面からの成分の食品への移行や微生物汚染などの防止にも有効と考えられる．

食品副産物などの生分解性素材への変換に際しては，それらの多くが高水分であり，構造なども植物組織を保持している場合には，いくつかの前処理が必要となる．次に一般的な食品副産物の利用に際して必要となる脱水処理などについて述べて，それらの処理を経た副産物を利用した射出成形素材の開発について紹介する．

## 6. 食品副産物の生分解性素材への変換技術<sup>5,6)</sup>

食品産業からの廃棄物として特徴的な動植物性残渣の場合，家畜飼料，肥料としての再資源化が最も簡便で一般的であったが，現在の食品産業の集約化や家畜農家における高品質肉生産のための飼料への要望などの状況から，必ずしも再資源化の方策として将来的にも安定的な利用があるとは考えにくい．しかし，可燃性の一般産業廃棄物と同様に焼却処理を行うことも資源の有効利用の面，環境負荷の低減の面からも問題である．そこで，従来飼料化の場合においては飼料効率を向上できる配合を考慮すべきであるし，また給仕しやすい形への前処理や変換処理技術の導入が望まれる．畜産分野の関係者においてもこれらの食品廃棄物の効率的な飼料への利用についても検討が始まっている．さらに，従来の素材以外への変換として，生分解性を特徴とした工業素材化への変換，廃棄物に内包される有用物質の抽出・高度利用なども今までの基礎検討を踏まえて，システムとしての検討を行うべきである．

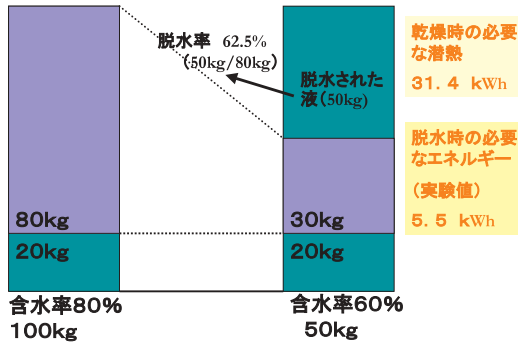


図8 脱水処理時に必要なエネルギー量

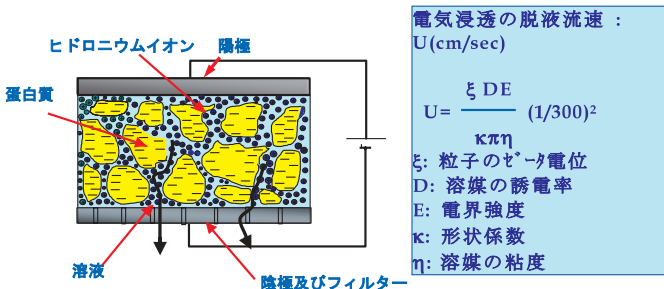


図9 電気浸透の作用機作と脱液流速式

我々は食品産業での副産物・廃棄物の有効な再資源化のためのキーテクノロジーとして、それらの大半が高水分であることから効果的な固液分離（脱水）技術について、主にスクルー系の装置による機械圧搾処理と材料の前処理の検討を進めている。副産物の再資源化には、低水分化が不可欠であるが、当然低コストで効率的な脱水処理が必要である。図8が示すように、これらの副産物の処理において80%以上の含水率を持っている素材において初期の脱水処理を機械的圧搾で行うことで、最初から乾燥によって低水分化を行う場合と比べて非常に少ないエネルギーでの処理が可能となるため、その実用化のための検討を進めてきた。機械的圧搾における液状物の分離には、個々の材料の水分状態から限界がある。所定の圧力で圧搾した場合に内部の液圧が零になる時点で圧搾による脱液は停止される。この時点での固形分の含水率を圧縮平衡含水率と呼ぶ。これは圧搾圧力を増加することで下げることが出来るが、食品等の副産物中の水は他成分に吸着

されたり、微小間隙での表面張力等で保水されているために、圧搾のみでの脱水には限界がある。機械的圧搾装置としては、高い圧力を用いてこの圧縮平衡含液率までに短時間に到達することが求められる。しかし、材料性状からこの含液率に限界がある場合に、材料からの水（液体）の分離を促進する処理の併用が考えられる。1つの処理法として活性汚泥処理において既に実用化されているのが、電気浸透法である。電気浸透法について簡単に説明する。液媒（通常は水）の中の活性汚泥などの粒子が荷電を持ち、粒子周辺の水が平衡状態を保つために逆の荷電を持っている状態を考える（電気2重層）。この対象物を電界の中においた時、希薄液体であれば、電荷を持った固形物が電極に引きつけられる（電気泳動）。一方、固形粒子が動き得ない場合に、粒子周辺の液媒が移動する現象を電気浸透と呼ぶ。図9に簡単な作用図と電気浸透による脱液速度式を示す。具体的には活性汚泥はマイナスの荷電を持っている。そこでフィルター側に陰極を置き、圧搾操作側に陽極を置くことで、水はプラスの荷電を持っているので、マイナス極に引っ張られることで水の系外への排出が促進されることになる。現在汚泥等の脱水処理にベルトプレスとフィルタープレスに電気浸透を併用した装置が実用化されている。

フィルタープレス方式は試料の注入方式からスラリー形状に適し、処理時間や圧力を設定することが容易である特徴を持ち、電気浸透処理においては電極の極性を処理毎に交換することで電極の腐食等を抑える利点を持つ。ベルトプレス方式も対象処理物としては汚泥であり、スラリー状の試料は前濃縮脱水部でろ過され、ろ過ケーキが電気浸透脱水部での電極ドラムと陰極となっているベルトの間の圧搾圧力下で電気浸透により脱水される。ベルトプレスでの圧搾処理の場合、圧搾作用点での処理時間が比較的短い、材料性状の自由度があり、連続式である特徴を持つ。これらの電気浸透処理では2次的効果としてのジュール熱による試料温度の上昇も認められ、低水分化に寄与している。食品副産物の場合、脱水処理による容積削減に加えて、腐敗防止等の要望も強く、電気浸透によるジュール熱の発生による温度上昇は、電気浸透処理の1つの利点と見ることが出来る。

電気浸透を利用したオカラ単独のバッチ式での脱水実験では、脱水効果はpH依存性が高く（pH5.6、pH4.2、pH7.2の順）、また処理電圧の増加により、脱水効果は向上した（図10）。電気浸透の推進力となるゼータ電位は、オカラではpH7.2が高く、pH4.2ではほぼ0である。逆に大豆蛋白の等電点付近のpH4.2では蛋白の凝集による離水性が高い。今回の実験では2つの作用からpH5.6付近で最大の脱水効果が得られた。廃ヨーグルトや焼酎粕との混合系ではバッチ式ではいずれの混合比においても処理電圧50Vで対照に比べて脱水率が向上した（図11）。またスクリーンプレスにおいては圧搾処理のみでも高い脱水率を示した。これらの結果はオカラとヨーグルトの混合により、脱水機構が改善される内部構造の変化が生じた可能性を示唆している。食品廃棄物の混合処理により、脱水効果が向上する

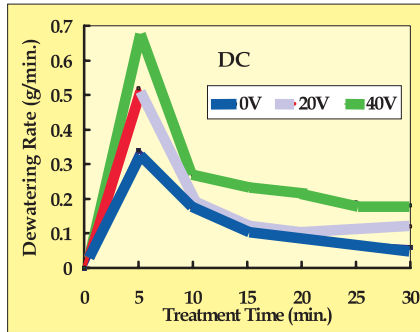


図10 オカラの脱水速度  
(電気浸透処理での電圧の影響 - 圧搾圧力0.04MPa)

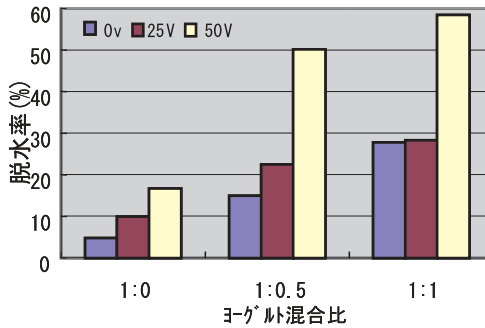


図11 廃ヨーグルト添加によるオカラ脱水率の変化  
(圧搾圧力0.04MPa)

表4 必要な副産物・廃棄物の変換技術

前処理	目的
粉碎処理(湿式・乾式)	減容化・組織破壊
固液分離処理	成分濃縮・減容化
乾燥処理	成分濃縮・安定性
変換処理	目的
微生物利用	素材化、エネルギー材料
物理化学処理	素材化(生分解性素材等)
熱処理	熱源・炭化

ことは、これらの二次利用においても飼料等に利用する場合には、栄養価の向上も期待されるために、作用機構を解明し、実用化への可能性を検討している。

電気浸透では、直流処理の場合、有機物の豊富な材料での変性や内部試料の水分勾配が脱水効率の低下を引き起こすので、低周波交流による改善を試みている。オカラの脱水処理では、0.2 Hz処理での脱水率が最も高くなり（37%）、電気浸透による溶液の移動の促進、オカラ内部の水分勾配の調整に低周波数処理が有効であることが認められた。また電気浸透処理で懸念される電極金属による変色などの変質も通常の直流処理に比べて軽減された。これらの結果から周波数の調整等で脱水率の向上や品質を損なわない食品脱水処理が出来る可能性が示唆されている。このような脱水・乾燥処理で効率的な副産物の前処理が再資源化には必要であるが、他にも表4に示すような処理が必要である。特に粉碎処理は、植物細胞に由来する強固な構造を破壊し、生分解性素材化において強度向上のために繊維素材として利用することに有効である他、エネルギー生産においては、微生物や酵素の受容性を増し、資化率を向上するのにも有効である。

我々が開発した生分解性素材の原料としては、脱水処理を経た乾燥処理で低水分化した素材を連続式の粉碎装置において微細化したオカラや果汁残渣、茶抽出残渣などを用いている。

## 7. 射出成形法による低コスト固形素材の開発<sup>7-9)</sup>

生分解性を持ち、汎用的な利用が可能な耐水性素材開発のために先に述べたような表面コーティングした生分解性固形素材の開発を試みた。しかし、この方法では、製造方法が複雑で、また均一なコーティング処理が困難なため、ゼインを多く含むコーンデンプンの副産物であるコーングルテンミールを直接原料にした

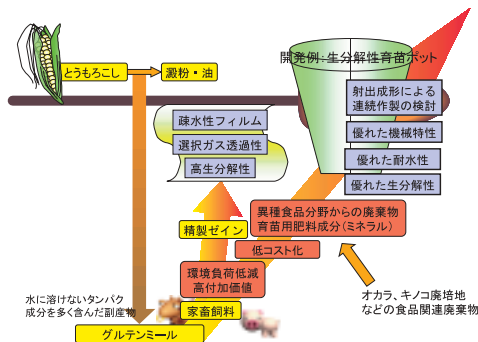


図12 食品副産物を原料にした生分解性素材の開発フロー

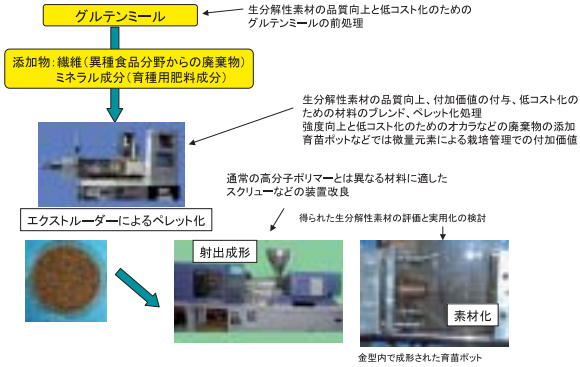


図13 射出成形法による固形素材の製造方法

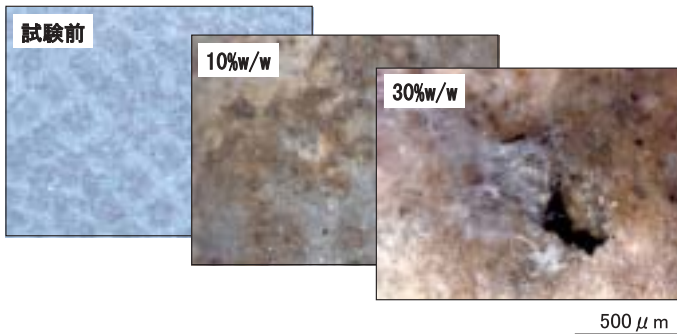


写真1 生分解性フィルムの土壤中の分解状況 (試験80日後)

表5 オカラの添加による生分解性素材の機械特性変化

	破断強度 (MPa)	伸張率 (%)
コントロール (コーングルテンミールのみ)	2.29 ± 0.23	3.80 ± 1.23
オカラ 乾物20%添加	2.56 ± 0.16	4.25 ± 0.43

10回測定平均及び標準偏差

生分解性素材の開発を検討した。我々の食品副産物を原料にした生分解性素材の開発の流れを図12に示す。低コストでかつ耐水性を持つ固形素材の開発方法とは、一般的にプラスチック固形素材を製造する手法である射出成形法を用いるものである。射出成形法とは、ペレット成形した高分子ポリマーを射出成形機のスクリ

ユー回転でシリンダー内に充填し、高温高圧の中で溶融して、コップなどの成形物の鑄型（金型）の中へスクリーの移動により射出して、金型内で成形された樹脂を冷却して、取り出す方法で一般的なプラスチック成形手法の1つである。ゼインを含むコーングルテンミールを主原料にして、農産廃棄物であるオカラや農産物の茎葉、キノコの廃培地（オガク스가ベース）などの植物繊維成分を強度向上剤として添加した材料での射出成形法による固形素材化に成功した。この製造工程を図13に示すが、まずコーングルテンミールやオカラなどの原料を調整して、エクストルーダーでペレット化し、そのペレットを射出成形機で育苗ポット（写真2）に成形した。表5に成形した素材の機械特性を示すが、固形素材として通常の化成プラスチックに比べて若干低い使用に耐える強度を得た。特にオカラなどの繊維分を多く含む副産物を乾燥し、粉碎したものを10 - 20%添加したものは、無添加に比べて強度が一割程度向上した。また成形素材は、図14に示すように、オカラ以外に米糠や茶殻、リンゴなどの搾汁残渣などについても機械特性が向上し、特に成形素材を乾燥することで、その強度はさらに向上した。この研究は、昭和産業と日本製鋼所の共同研究により実施されたものであり、生産性の利点（コスト、成形性、成形物の形状の自由度）が多い射出成形法を用いること

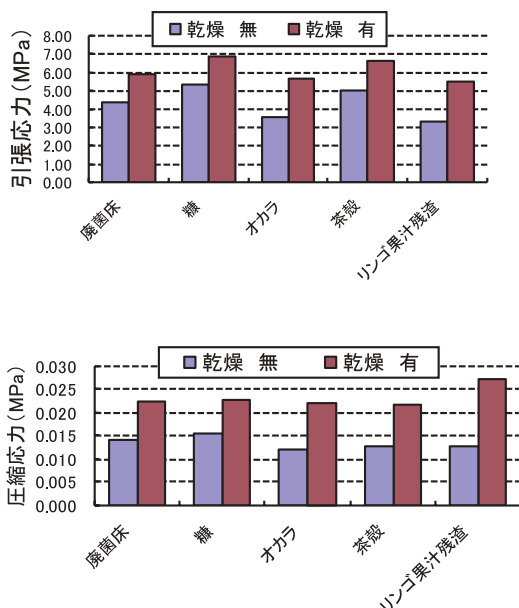


図14 各食品廃棄物の添加による物性の改善

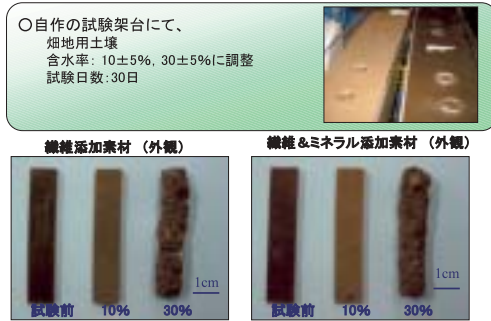


図15 土壌中生分解性試験

表6 原料の配合の一例

原 料	配合割合 (乾物換算)
CGM (g)	0.9
Fiber (g)	0.1
Glycerol (g)	0.1
Ethanol (ml)	0.15
Water (g)	0.15

オカラ，果汁残渣などが利用可能

でコスト低減と実際の使用に耐える固形成形物を得ることが出来た。タンパク質も他の高分子と同様な熱可塑性を有していることが知られていた。しかし、熱熔融時の物性が温度により容易に変化するため射出成形処理は実際には使われていなかった。今回は、従来的高分子ポリマーの処理に比べて、射出成形時の高い圧力の設定と厳密な温度設定、さらには射出スクリーンの形状などの改良によって、安定的な射出成形法を開発した。さらに土壌中の生分解性の試験を実施して、湿潤土壌ではほぼ1ヶ月で分解することを確認した(図15)。この技術では、コーングルテンミールの他、グリセリン(可塑剤)、オカラ、野菜等の残渣、キノコ廃培地などの食品副産物から資材が得られるため、コストの低減を図ることができる。素材の前処理も水分調整と粉碎のみであり、その後のペレット化や射出成形処理も連続大量処理の可能なプロセスであり、処理コストは非常に安価である。

一例として表6に示すような原料組成の場合には、写真2に示すような約30gのポットで1個7-8円と見積もられる。この値は、一般の化成プラスチックに比べれば、まだ数倍高いが、ポリ乳酸などの他の生分解性ポリマーに比べれば安価となっている。また植物の育苗ポットなどの製造では、材料をペレット化する



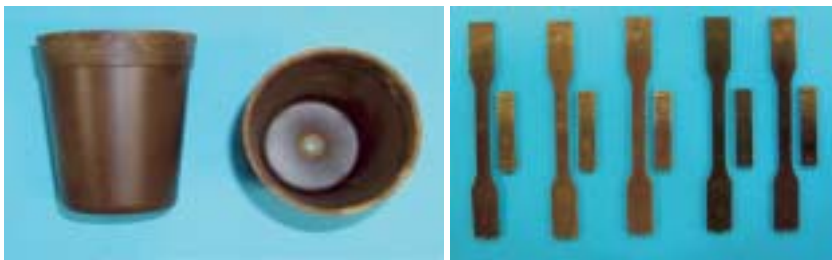


写真2 射出成形法を用いた生分解性素材

右：育苗ポット

左：強度測定用試料片

-原料:コーングルテンミール、オカラ、グリセリン等-



- 花き研究所における栽培試験  
(実用性の評価、改善)



- 果樹研究所における  
防草シートの試験

写真3 農業資材としての評価試験

際に植物の生長に有効な微量元素などを添加しておくことにより、土壌中で生分解するにしたがって、拡散溶出し、安定的に植物へ供給することが可能となる。写真3に花き研究所及び果樹研究所の協力を得て行った栽培時の評価試験風景を示す。

初期の育苗ポットでは、1週間程度から崩壊が始まり、また2週間程度経過後に苗の生長が遅れ、その後に枯死するケースなどが認められた。この結果から、育苗ポットの成形時の原料の配合や微量元素の添加量を削減し、ポットの改善に努めた結果、崩壊開始が約3週間と延長でき、また苗の正常な生育も確認している。さらに前に述べた表面へのコーティング処理でも同様の構造の安定化の効果

が認められた．また写真3に示すような防草シートへの利用なども想定されている．特に長期的な利用が可能なポットにおいて溶出する成分に肥料効果が期待できる高機能の資材は，農業での栽培管理の効率化や農地での過剰施肥の改善などの副次的な効果も期待できる．実用化に向けた原料の配合や成形条件の最適化，さらには他の生分解性ポリマーとのブレンドなども含めて検討している．

開発した射出成形素材に関連して，素材として使用できる食品産業や農業での副産物の検索，さらに用途として野菜などの流通容器や使い捨て食品容器などへの展開を検討している．

## 8．おわりに

生分解性素材の開発においては，一般資材としての品質向上を図ると共に，コストの低減を原材料コスト及び処理コスト両面から検討する必要がある．また生産・流通サイドから消費者サイドを含めた全ての段階で環境保全型システムへの移行が必要であるとの認識を持つことが重要であろう．我々も開発した生分解性素材製造技術を核にして，図16に示すような循環型システムの構築に向けた検討を進めていく予定である．今まで様々な食品加工技術を開発することで農産物からの新食品変換技術を確立してきたが，今後は農産物などの天然資源を利用した非食品素材への変換技術も重要な研究課題と位置づけ，研究を進展していく必要があると感じている．

(食品工学部製造工学研究室 五十部誠一郎)



図16 農産副産物からの生分解性資材の開発のコンセプト

## 引用文献

- 1) T.Yoshino, S.Isobe, and Takaaki Maekawa, J.American Oil Chemists ' Society,79 (4), 345-349 (2002)
- 2) R.Paramawati, T.Yoshino and S.Isobe, Food Sci. Technol. Res.,7 (3), 191-194 (2001)
- 3) 吉野智之,五十部誠一郎,前川孝昭,農業施設学会誌 31,4,225-231 (2001)
- 4) T.Yoshino, S.Isobe and T.Maekawa, J. American Oil Chemists ' Society, 77 (7), 699-704, (2000)
- 5) 吉野智之,石崎勝也,河野省一,植村邦彦,五十部誠一郎,日本食品科学工学会第45回大会講要,156 (1998)
- 6) S.Isobe et al.,JARQ, 31,2,137-146 (1997)
- 7) S.Isobe et al.,Proceedings of 11th Annual Meeting of BioEnvironmental Polymer Society,p20 (2003)
- 8) 伍強賢ら,2003年度農業施設学会大会講演要旨, p.40 - 41,平成15年8月6日
- 9) Q.Wu,H.Sakabe,S.Isobe,Ind.Eng.Chem.Res.,42,6765-6773,2003



# タンパク質再生技術

## 1. はじめに

遺伝子組換え技術により、ヒトを始めとする様々な生物種由来の有用タンパク質を大腸菌等の微生物を宿主として大量に生産することが可能となって久しい。しかしながら、大腸菌内で発現させたタンパク質は、不溶性かつ不活性な凝集体 (inclusion body: 封入体) となる場合が多く (一説には封入体を形成する確率は75%にも達するといわれている)、タンパク質の大量発現における最大の問題となっている。この問題を解決し、活性のあるタンパク質の大量調製を可能とすべく20年来様々な試みがなされて来た。代表的な手法として、以下のものがある。

### 1) 分子シャペロンとの共発現

通常、細胞内で翻訳されたタンパク質は分子シャペロン (後述) と呼ばれる介添え役のタンパク質の助けを借りて正しい立体構造を形成する。組換えタンパク質の大量調整時においては、この分子シャペロンが不足することが封入体形成の一因と考えられ、そこで分子シャペロンも同時に大量発現させてこれを補う。

### 2) 発現宿主の検討

最も一般的な宿主である大腸菌の代わりに酵母、昆虫や動物の培養細胞、カイコなどに目的タンパク質を生産させる。

### 3) 試験管内でのタンパク質生産

遺伝子の転写から翻訳までの全てを試験管内で行う。ウサギの網状赤血球系、コムギ胚芽系などが知られており、キットとして販売もされている。

一方、現時点でも大腸菌による発現系は、最も安価で簡便な生産系であると考えられている上、形成された封入体自身は90%以上の純度で目的タンパク質を含有し、プロテアーゼによる分解からも保護されているため精製そのものは容易であるという利点がある。こうした点を踏まえて、封入体から活性のあるタンパク質を効率的に得ることを可能にする技術はないか? という観点からの研究も展開されてきた。これは正しい高次構造を取れずに封入体を形成したタンパク質の間違った構造を解きほぐした (アンフォールディング) 後、正しい高次構造に巻き戻す (リフォールディング) ことを目指した “タンパク質再生技術” の確立を目的とした一連の研究であり、英語のカタカナ書きであるリフォールディングという言い方が最も一般的に使用されている。筆者らもこのリフォールディングの観点からタンパク質再生技術の開発に取り組み2000年末に基本的な技術 (以下CA法と呼ぶ) の確立に成功すると共に、2001年秋にはタカラバイオ株式会社からキット販売に至るなど実用化にも成功した。そこで本稿では、CA法開発に至る経緯、

その内容、並びに今後の展開に関して解説する。

## 2. 従来のリフォールディング手法

開発した手法の特徴を明確にするため、最初に従来法に関して簡単に整理しておく。いずれの手法も、第一段階は、封入体を形成したタンパク質の間違った構造を完全に解きほぐす（アンフォールディング）段階を経る。通常、塩酸グアニジン、もしくは尿素のような変性剤が使用される。さらに、間違ったジスルフィド結合もこの段階で完全に還元しておく必要があるため、このアンフォールディングにはジチオスレイトールなどの還元剤が添加される。この段階に続いて実際のリフォールディングの過程に入っていく訳であるが、最も一般的な手法が稀釈透析法<sup>1)</sup>である。これはアンフォールディングに用いた塩酸グアニジンなどの変性剤を徐々に低下させることにより（この徐々に！がポイント）タンパク質の高次構造形成を促す手法である。目的タンパク質は、変性剤の存在により可溶化状態を維持しているため、この方法では変性剤濃度の低下に伴いタンパク質の再凝集が生じることが多く効率的な手法とは言い難い。しかし、中にはこの方法で比較的容易にリフォールディングするタンパク質も存在し、最も初期の頃から試みられている手法である。さらに、単に稀釈するのみではなく、少しでもリフォールディング効率をあげるべく、アンフォールディング後のタンパク質の一端を固相上に固定し、変性剤の濃度を徐々に低下させていくなどの改良がなされてきた（Refolding on Resin）。また稀釈透析の過程で生じる凝集体の問題を解決する目的で、各種の添加剤を加える手法も報告されており、Dilution additive methods<sup>2)</sup>と呼ばれている。添加剤としてよく知られているものとして、アルギニン、ポリエチレングリコール、界面活性剤などがある。特に近年では、アルギニン添加により良好な結果を得たとの報告が多い。

これら従来法のいずれもが成功例として報告されつつも、決め手となる手法とはなり得なかったわけだが、その問題点を整理すると以下ようになる。

- 1) 複雑な操作が必要である（多数のサンプルの処理が困難）。
- 2) 操作に時間がかかる（数日間かけて変性剤を徐々に稀釈する場合もある）。
- 3) リフォールディング効率が低い。
- 4) 汎用性に欠ける（対象タンパク質毎に適した条件を検討する必要がある）。

## 3. “人工シャペロン” というアイデア

1990年代後半よりアンフォールディングに用いた変性剤を単に稀釈するだけでなく、変性剤の稀釈に伴うタンパク質分子の凝集を防ぎ、さらにリフォールディングを促すような化合物を添加する手法が検討され始めた。細胞内で翻訳完了直後の新生タンパク質は、分子シャペロンと呼ばれる一連のタンパク質分子の助けにより不規則な凝集体の形成を免れた後、次の段階で正しい高次構造形成を促

される。この一連の過程を試験管内で再構成することを目指した手法であることから、用いられる化合物を試験管内で機能する分子シャペロンと見なし、“人工シャペロン”という用語も使用されている<sup>3)</sup>。筆者らが開発したCA法も、この人工シャペロンによるフォールディング過程の再構成という視点に基づいたものである。人工シャペロンとして注目されている物質として、筆者らが着目した環状糖質以外にも、リボソーム固定化担体<sup>1)</sup>、両親媒性ポリマー分子集合体（ナノゲル）<sup>2)</sup>、熱応答性ブロックコポリマー分子集合体<sup>6)</sup>などが上げられる。いずれの手法もリフォールディング実験に汎用されてモデルタンパク質に対しては一定の効果をあげており、今後の封入体への適用などの発展が期待されている。そうした中で、重合度17～数百におよぶ大環状-1,4-グルカン（高重合度シクロアミロース：CA）を利用したCA法は研究用試薬としてキット化されすでに販売が開始されており、多くの研究者の評価や批判を基に改良を重ねるべき段階に達している<sup>7)</sup>。

#### 4. “人工シャペロン”によるリフォールディングの原理

筆者らが開発したCA法は、大腸菌内で新生タンパク質が正しい立体構造を形成していく過程を非常に単純化して捉え、その過程を模倣し試験管内で再構築したものである。大腸菌細胞内のタンパク質濃度は20%程度といわれており、かなり混み合った状態である。さらに、翻訳直後の新生タンパク質は高次構造を形成していないため極めて凝集し易い状態であるため、お互いの凝集を如何に防ぐか、また立体構造を形成していないタンパク質はプロテアーゼの攻撃を受け易いのでプロテアーゼによる分解から如何に身を守るかが極めて重要である。ここで機能するのが分子シャペロンである。シャペロンとは、社交界にデビューしたての令嬢の付き添い役の意味であるが上手いネーミングである。細胞内において新生タンパク質は、まず上流で働く分子シャペロンであるDnaJ, DnaKタンパク質、などに補足され凝集から保護される。さらに下流に働く分子シャペロンであるGroEL/ESタンパク質により正しい立体構造へとフォールディングされ、機能を有するタンパク質へと成熟する（図1）。CA法の開発は、この細胞内の過程をタンパク質の凝集を防ぐ段階、タンパク質のフォールディングを促す段階の2段階に単純化し、各々の段階において機能しえる人工シャペロンを検索することから始まった。第一段階に機能する人工シャペロン候補として界面活性剤を、第二段階に機能する人工シャペロン候補として環状糖質（界面活性剤を取り込むであろう包接能力に期待）に着目し、最適な人工シャペロンの検索を進めた。

結果的に確立されたCA法は、以下の3つの反応から成る（図2）。

- 1) 封入体を形成しているタンパク質の間違った高次構造をアンフォールディングする。間違った構造を完全に解きほぐす目的から、6M（最終濃度）の塩酸グアニジンを使用する。アンフォールディングされたタンパク質は細胞内におけるタンパク質のフォールディング過程を模倣した次の2過程によ

・細胞内でのタンパク質フォールディング過程を模倣し、試験管内で再構成する

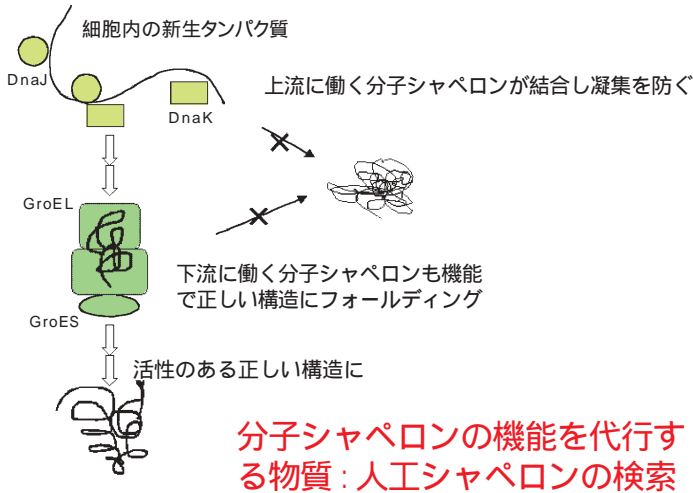


図1 大腸菌細胞内におけるタンパク質のフォールディング過程と本技術との関連

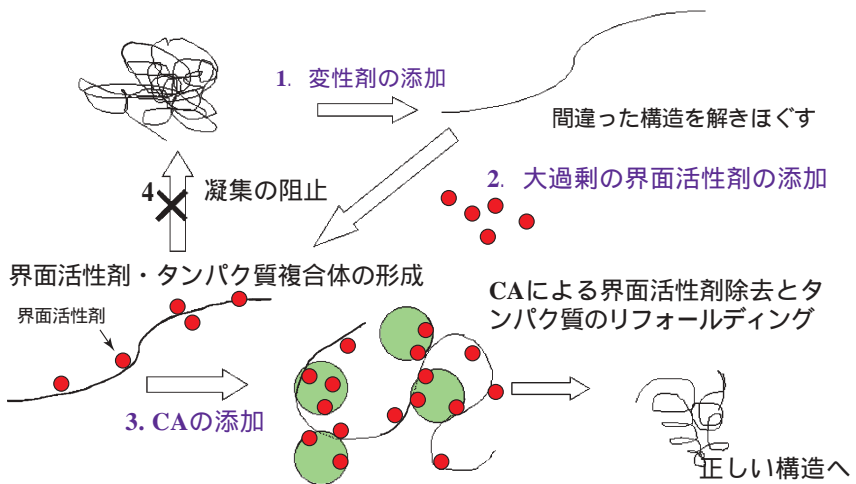


図2 CA法によるタンパク質リフォールディング過程



リフォールディングされる。

- 2) 変性剤を除去（稀釈）する段階．変性剤の稀釈に伴うタンパク質分子の不規則な凝集の阻止が問題となる．この問題は，大過剰の界面活性剤溶液を添加することにより解決された．タンパク質分子に応じた適切な界面活性剤の選択が重要となる．タンパク質は界面活性剤と複合体を形成することにより，再び不規則な凝集体を形成することから逃れる．
- 3) タンパク質・界面活性剤複合体から界面活性剤を剥離し，タンパク質の正しい高次構造形成と活性の回復を促す過程．この最終過程において大環状-1,4-グルカンであるCAの包接能が極めて効果的に機能することが明らかとなった．CAの包接能，つまり糖のリングの機能が本手法のポイントである．

## 5．重合度シクロアミロースの人工シャペロンとしての機能

環状-1,4-グルカンとして，シクロデキストリン（以下CDと省略）が良く知られているが，最初にCDの包接能の人工シャペロンとしての可能性に着眼したのが Gellmanらである<sup>8)</sup>．彼らは，TritonX-100（界面活性剤）と $\beta$ -CD（重合度7）を組み合わせることで，従来リフォールドが困難な酵素として知られていた変性クエン酸シンターゼ（CitSynと省略）の活性を65%まで回復させることに成功した．これは従来法による活性回復率（通常40%以下）から判断するとかなりの高率である．しかしながら， $\beta$ -CDは溶解性が低く，包接能に寄与する疎水性空洞の大きさに制約があるなどの問題がある（図3）．

$\beta$ -CDのような従来型の環状グルカンに対して，重合度が17～数百におよぶ高

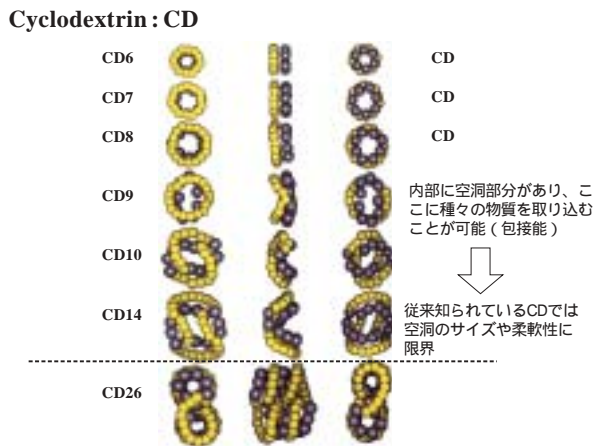
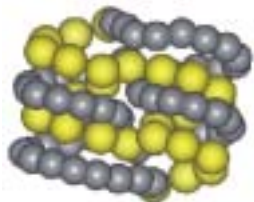


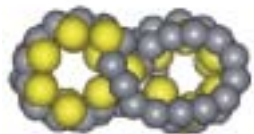
図3 CDの構造

## CA :高重合度シクロアミロース



17～数百のグルコースが  
環状につながった新規糖質

江崎グリコ(株)生物化学研究所  
が合成に成功



内部に空洞部分があり、  
ここに種々の物質を取り込む  
ことが可能(包接能)

図4 重合度26のCAの結晶構造

重合度シクロアミロース (CA) の合成に江崎グリコ(株)生物化学研究所が最近成功した<sup>9)</sup>。CAは、疎水性部位の構造が柔軟性に富んでいることが予想され(図4)、種々の無機、有機化合物と包接体を形成可能なことが期待される。タンパク質の再凝集を防ぐ目的では、対象タンパク質に応じて様々な界面活性剤が選択されるため、その構造にかかわらず良好な包接能を示すことが汎用性の高い技術開発につながると考えられる。実際にCAは、長いアルキル基をもつ界面活性剤の包接が可能である。複数の封入体に対して良好な結果を与える界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)もアルキル基の長さはC16であり、その他有望な界面活性剤もC16、C18のものが多い(後述)。また、重合度26のCAに関しては、その結晶構造が明らかにされ、界面活性剤であるSDSを包接する様子をシミュレーションした結果も示されている。さらにCAは、実験に供するのに十分な溶解度を有している。筆者らは、このCAの性質が人工シャペロンとして優れていることに着目し、新たな人工シャペロン系の構築を試み、キットの原型となる手法の確立<sup>10)</sup>に至った。

### 6. CA法開発に関するデータ

CA法を開発するにあたり、異なった特徴を有する3種類のタンパク質をモデルタンパク質として選定し検討を行った。CitSyn(分子量49,000/モノマーのダイマー酵素、主たる構造をヘリックス)、炭酸脱炭酸酵素B(CABと省略、分子量30,000のZn酵素、主たる構造はシート)、およびリゾチーム(分子量15,000、4

つの分子内S-S結合を有する)である。これらの酵素は構造上の共通点が無く、いずれも自然にリフォールディングする可能性が低く、さらにリフォールディング効率の評価(変性前の活性を100%とした場合の活性回復で評価)が容易という観点から選択された。これらのリフォールディング結果を示すと共に、手法の詳細について解説する。

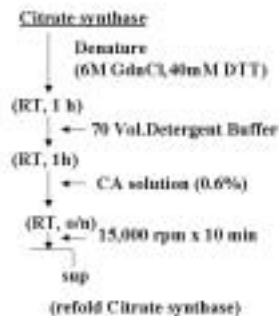
### 1) オリゴマー酵素への適用

CitSynは、従来からリフォールディングの困難な酵素として、リフォールディング手法検討のための材料として用いられていたが、最大の特徴はダイマー酵素という点である。最終濃度6Mの塩酸グアニジンにより1時間処理し完全にアンフォールディングした後、30種類以上の界面活性剤とCAもしくはCDの組み合わせによるリフォールディング効率を検討した。その結果、非イオン性界面活性剤であるTween40、Tween60(最終濃度0.05%)と1時間反応させタンパク質・界面活性剤複合体を形成させた後、CA(最終濃0.6%)の包接能により複合体から界面活性剤を剥離させると共に高次構造形成を促したところ、100%近い活性を回復させることに成功した(表)。さらにリフォールディングに要する時間に注目した場合、CA添加後1時間以内に活性がほぼ完全に回復していた(図5)。これは、変性剤処理による最初の反応から始まる全反応が半日以内で完了可能なことを意味している。

表I.Citrate Synthaseのリフォールディング効率

イオン性界面活性剤	CA(%)	CA(%)
CTAB	30.2	9.8
SDB 34	0	0.0
非イオン性界面活性剤		
CaE2		
CHIFB	0	25.0
CHIFB	0	35.7
CHIFB	0	26.4
Dq 52	0	36.7
Lauryl PS	15.7	0
CaFE2		
Triton X-100	2.9	3.0
Ca surfact E2		
Tween 20	76.5	54.0
Tween 40	100	100
Tween 60	100	100
Tween 80	81.6	95.7
Tween 81	19.2	11.0

CA(%)=重合前(2-4%)、CA(%)=重合後(4%以上)  
活性回復率は以上の数値のあったもののみ記載



リフォールディング効率(活性の回復で評価)  
変性前の活性を100%とした。

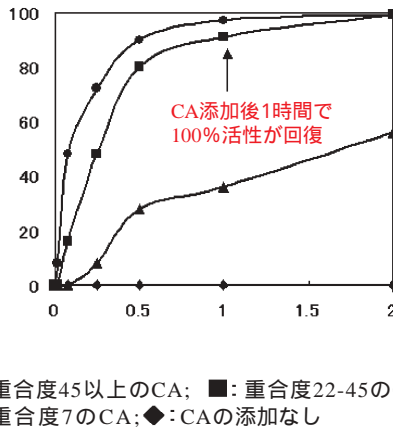


図5 CAによるCitrate synthaseの活性回復の経時変化  
最終濃度で0.6%のCAを添加し、一定時間毎に活性の回復を測定した。

## 2) 金属酵素への適用

炭酸脱炭酸酵素B (CAB) はアンフォールディングされにくい酵素であるため、塩酸グアニジンとの反応時間は16時間とした。他の実験方法は、CitSynと同様である。しかしながら、有効な界面活性剤の種類に、大きな違いが見られた。非イオン系界面活性剤にほとんど効果が見られないのに対して、イオン系界面活性剤であるCTAB, SB3-14を用いた際に90%の高率でリフォールディングが達成された。

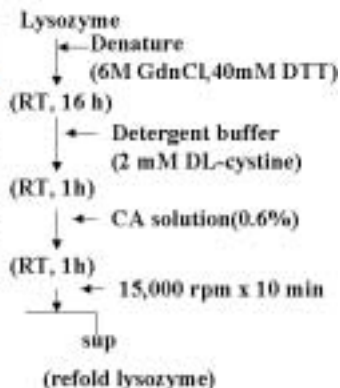
## 3) 分子内ジスルフィド結合を有する酵素への適用

構造・機能研究や産業上の利用のために必要とされている多くのタンパク質は、ジスルフィド結合を含むものである。しかしながら正確なジスルフィド結合の再生は容易ではない。この目的に適用可能な手法とするため、リゾチームを還元条件下(4 mM DTTを含む6 M塩酸グアニジン)で16時間処理しS-S結合を切断した後、リフォールディング可能を検討した。CAB同様にCTAB, もしくはSB3-14溶液にDL-システインを添加することにより、極めて高率な活性回復が観察された(表)。この結果からCAによるリフォールディング手法は、正しいS-S結合の形成にも適用可能な手法であることが示唆された。

表II.還元条件下で変性したLysozymeの  
リフォールディング効率

	CA(S)	CA(L)
CTAB	48.9	91.9%
SB 3-14	50.3	85.2
SB 12	34.8	42.4
N-ethyltrimethyl ammonium bromide	48.7	66.7
Hexadecyltrimethyl ethyl ammonium bromide	58.0	77.2
Hexadecylpyridium chloride monohydrate	49.9	39.2
Dodecyltrimethyl ammonium bromide	35.4	14.6

リフォールディング効率: 活性の回復で評価  
変性前の活性を100%とした。活性回復10%以上の効果のあるもののみ記載



## 7. 封入体への適用に際して

実際にCA法により封入体からタンパク質をリフォールディングする際に注意すべき点に関しても情報が蓄積されつつある。封入体からのリフォールディング条件決定のためのプロトコールは、図6に示した通りであり、条件決定後のスケールアップは十分可能である。

各段階ごとの注意点を記載していくと以下ようになる。

1) 先ずリフォールディングに供するタンパク質濃度であるが、封入体懸濁液を調製し、Lowryの変法により定量して、25~30mg/mlの濃度が上限であると思われる。懸濁液であるので不正確ではあるが、筆者らは必ずタンパク質濃度は定量している。収率を落とさないためのタンパク質濃度上限の簡便な目安としては、塩酸グアニジン（最終濃度6M）による変性タンパク質溶液が十分な流動性を確保していることである（A280を測定した場合、25が限界?）。変性剤により間違った高次構造を完全にアンフォールディングしておくことは、リフォールディング効率を上げるために必須である。従って、変性時間は標準で1時間としているが、場合によっては1晩以上変性処理を行っている。また、誤ったS-S結合はこの段階で還元しておくことが必須であるので、40mM（最終濃度）DTTを同時に添加する。

2) 次に界面活性剤の添加であるが、効果が期待される界面活性剤の代表的なものとして、筆者らの研究室では4種類の界面活性剤による事前検討を行っている。すなわちイオン系界面活性剤であるTween 40, Tween 60, 非イオン性界

<p><u>8 <math>\mu</math>l 封入体懸濁液</u></p> <p>25 <math>\mu</math>l of 8M塩酸グアニジン (最終濃度: 6M)  0.3 <math>\mu</math>l of 4M DTT (最終濃度 40 mM)  (室温, 1時間) (場合によっては一晩)</p> <p>8 <math>\mu</math>l 変性タンパク質溶液  560 <math>\mu</math>l of 界面活性剤溶液(最初の検討は0.1%)  (含 2mM DL-cystine)  (室温, 1 時間)</p> <p>142 <math>\mu</math>l of 3 % CA溶液(最終濃度0.6%)  (室温, 1時間以上)  遠心(15,000rpm <math>\times</math> 5 min)</p> <p><u>上清</u>  (リフォールディング溶液)</p>
---

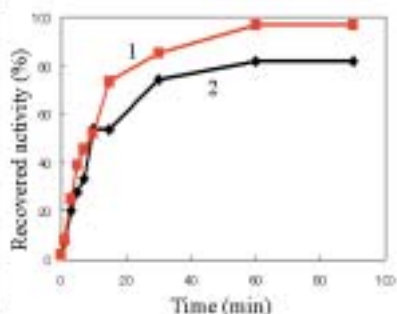
図6 封入体からのリフォールディング条件決定のためのプロトコール

面活性剤であるCTAB, SB3-14である。殆どの場合、添加濃度0.05~0.12% (通常, 0.1%の濃度で最適な界面活性剤の種類を決定)の範囲に至適濃度がある。0.15%を超えるとリフォールディング効率は顕著に低下する。変性溶液に対して70倍容量の界面活性剤溶液を添加するが、転倒混和により素早く混合した後、室温で1時間静置する。いずれの界面活性剤でも良好な結果が得られる場合は、品質(界面活性剤は、そのポリオキシエチレン鎖やアルキル基の長さの不均一性など、品質は一定しない。メーカーによる品質の差も大きいので注意を要する)、安定性、リフォールディング後の扱い易いさを考慮して、CTAB、ないしはSB3-14を選択することを薦める。また、正しい位置でのS-S結合形成を促すためにDL-システンを添加している。S-S結合再生の手法として、チオールジスルフィド酸化還元緩衝液(酸化型グルタチオン:GSSGと還元型グルタチオン:GSHを加えた緩衝液)がよく使用されている<sup>10)</sup>。DL-システンの代わりに様々な比率のGSH/GSSGを添加し、比較検討を行ったところ、安価なDL-システんで十分にリフォールディングされることが示された(表 )。

- 3)最後に3%CA溶液を添加し(最終濃度0.6%)、さらに室温で1時間静置する。この段階で、CAが界面活性剤を包接した不溶性の包接化合物を形成し白色沈殿を生じる場合があるが、沈殿量とリフォールディング効率に相関はない。前述の界面活性剤の濃度範囲で実験を行っている限りでは、0.6%以上にCA濃度を上げて、顕著なリフォールディング効率の改善はみられない。ここで

表III. 還元状態(DTT存在下)で変性したLysozymeの  
リフォールディング効率

	活性回復 (%)
(一)	0
2 mM DL-cystine	92
GSH/GSSG	1
	2
	5
	10
	20



GSH: glutathion;  
GSSG: oxidized glutathion

1: DL-cystine, 2: GSH/GSSG (-5)

リフォールド効率: 活性の回復で評価: 変性前の活性を100%とした

最も注意を要するのは、CA溶液の取り扱いである。CAの環状構造はその包接能に必須である。よって、CAの開環はリフォールディング効率に致命的な影響を及ぼす。CA溶液へのアミラーゼや細菌の汚染を防ぐためにCA溶液の調製はオートクレーブ滅菌水を用い、調製後の取り扱いにおいても汚染を防ぐように配慮すべきである。

本技術が従来法に比べ優れている点を整理すると以下ようになる。

- 1) 操作が簡単である(自動化, スケールアップへの対応が容易)。
- 2) 汎用性が高い(対象タンパク質に応じて条件を検討する必要がない)。
- 3) 操作に要する時間が短い(数日要していたものが半日程度に)。
- 4) 活性型への変換効率が高い(80%以上活性が回復するものが多い)。

## 8. リフォールディング試料の取り扱いとリフォールディング効率の確認

CAの添加後1時間を経過した試料を15,000rpm × 5分間、遠心することにより得られる上清をリフォールディング溶液としている。CA添加後12時間以上静置することによりリフォールディング効率が劇的に改善される例もあるので、最初の段階ではCA溶液を添加後1晩放置し、リフォールディング効率を確認した方が無難かもしれない。リフォールディング効率は、上清画分と沈澱画分に回収される目的タンパク質をSDS-PAGE上で見積もることにより行い、さらに活性測定法がある場合には、活性を確認しリフォールディングの良否を検定している。ただし、タンパク質によっては、界面活性剤により活性が阻害される場合もあるので、

必ず界面活性剤の活性への影響は検討しておく。さらにタンパク質の2次構造を反映したスペクトルが得られる円二色性(circular dichroism:CD)測定などにより何らかの構造を取っていることを確認して、次の段階に移っている。

リフォールディング後の試料の取り扱いとしては、通常のタンパク質溶液の扱いと基本的には変わらない。ただし、精製などの操作を行う際に過剰の界面活性剤が邪魔になる場合がある。その場合には、非極性のポリスチレン系の吸着剤(筆者らの研究室ではBioRadのBioBeadsを使用)を1/5容量添加し2時間混和することにより、遊離のイオン系界面活性剤はほぼ完全に、非イオン系界面活性剤の場合は90%程度を除去可能である。また、リフォールディング溶液中に存在するCAであるが、イオン交換樹脂には結合しないこと、分子量の範囲が5,000前後であること等から、タンパク質精製の過程におけるカラム操作などを経ることにより分離可能である。

## 9. 封入体への適用例

モデルタンパク質ではなく、実際の封入体への適用事例として、本稿では受容体のリガンド認識領域の再構築を紹介する<sup>(11)</sup>。対象とした受容体は、動脈硬化危険因子である酸化LDLを認識するスカベンジャー受容体ファミリーに属する受容体であり、ヒト大動脈内皮細胞由来のhuman C-type lectin like oxidized low density lipoprotein receptor (hLOX-1)である。この受容体は、細胞質領域、一回の膜貫通領域、細胞外領域の3つからなりC末側がリガンド認識には特に重要である(図7)。hLOX-1のリガンド認識に必須の領域、並びに、細胞外領域全長を大腸菌体内で大量発現させると封入体を形成する。この封入体にCA法によるリフォールディングを試みると90%以上が可溶性画分に移行した(図8)。さらに可溶性画分に回収されたリガンド認識領域を精製後CD測定を行うと、CA法により立体構造形成が促されヘリックスの存在を示す特徴的なスペクトルが観察された(図9)。さらに、その特異的なリガンド認識能の再構築を評価するため、リフォールディング完了後のリガンド認識領域とリガンドとの相互作用を表面プラズモン共鳴により確認した。その結果、hLOX-1が細胞上で機能する時同様、LDLに対する親和性は低いですが、変性LDLである酸化LDL、並びにアセチル化LDLに対しては高い親和性を示し、その機能も再構築されていることが確認された。

さらに、受容体のN末側のみをビオチン化した状態で大腸菌体内に大量に蓄積させた後に再構築することにも成功し、ストレプトアビジン(ビオチンとの特異的結合能を利用して、ビオチン化タンパク質の固定化に頻繁に用いられるタンパク質)を介することにより、リガンド認識領域(C末側に存在)の向きを描えて、目的に応じた基板上に固定化することも可能となった<sup>(12,13)</sup>。膜タンパク質である受容体機能の解析と利用には多くの克服すべき問題点があるが、その解決に向けての一つの手法となり得ると期待される。



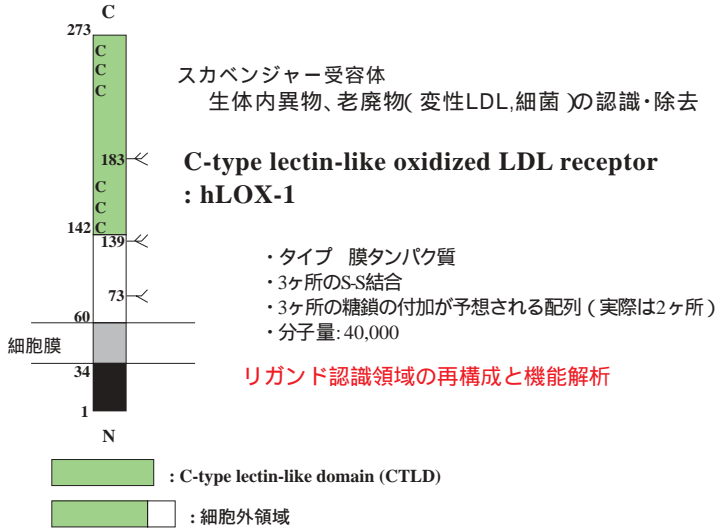


図7 hLOX-1の構造

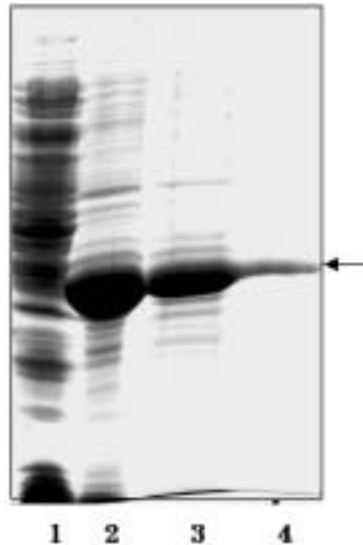
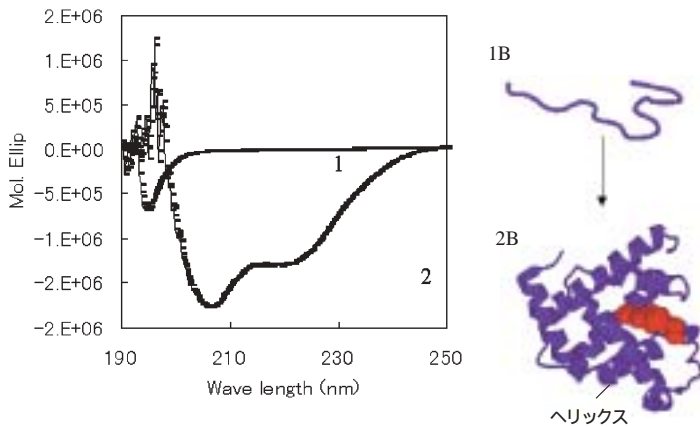


図8 リフォールディング後のリガンド認識領域  
 レーン1 : リフォールディング前の可溶性画分、 2 : リフォールディング前の不溶性画分、 3 : リフォールディング後の可溶性画分 : hLOX-1のリガンド認識領域



- 図 9 リフォールディング前後のCDスペクトル変化
1. リフォールディング前：一定の構造をとっていないことを示すスペクトルが得られ、実際のタンパク質の構造は1Bのようであると考えられる。
  2. リフォールディング後：208nm, 222nm付近に負の極大を、193nm付近に正の極大を示すスペクトルが得られ、2Bに観られるようなヘリックス構造が形成されたことが予測される。

## 10. CA法の問題点

CA法によるリフォールディングの場合、現時点で明らかな問題点がある。現在その点を解決する改良法を検討中であるが、問題点を認識した上で実験計画を立てることが可能なように、以下に整理しておく。

- 1) プレプロタイプで発現するタンパク質（トリプシンなど）の成熟体領域のみを発現した場合のリフォールディングは不可能である（プレプロ配列にフォールディングに必要な配列が含まれているためと思われる）。

### 2) 試料の稀釈の問題

CA法のプロトコールに従うと、過剰量の界面活性剤の添加、CAの添加などにより、リフォールディング溶液は、最終的には100倍以上に稀釈される。容量の増加に伴い取り扱いが面倒になる他、目的タンパク質濃度の低下により検出が困難になることがある。この点も考慮し、リフォールディング系に供するタンパク質濃度は、リフォールディング効率に影響を与えない範囲で、可能な限り高くしておくことが望ましい。

## 11. 今後の展開

本技術により、今までリフォールディングが不可能だった多くのタンパク質を活性型へ再生する可能性が開けてきたように思われる。しかしながら、現時点でも解決すべき課題があり、より簡便で効率的な手法へと改良を進めていく予定である。

### 1) リフォールディング溶液中に存在するフリーの界面活性剤の除去法

界面活性剤がリフォールディング後のタンパク質の精製、機能解析などで問題になる場合が想定される。現時点では本文中でふれたように非極性のポリスチレン系の吸着剤を利用しているが、産業レベルでのタンパク質調製を考えた場合、非効率な手法である。イオン系、非イオン系双方に適用可能なフリーの界面活性剤を除去方法を現在検討中である。

### 2) リフォールディングされたタンパク質の品質

筆者らのグループでは、リフォールディング効率を活性回復で評価しているが、果たして全ての分子が同一の天然状態の構造にまでリフォールディングされているのか確認していない。特にDL-シスチンを添加するだけという単純な手法で本当に全ての分子で正しいS-S結合が形成されているのか、不安が残るところである。本稿で取り上げたりゾチームに関しては、当所の状態分析研究室の協力により、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析計によりS-S結合が間違いなく形成されていることを確認している。現時点では、高次構造解析を試みているグループなどによる厳密な評価を待っている状態である。

### 3) タンパク質分子に結合している界面活性剤の解釈

リフォールディング過程で用いた界面活性剤が、リフォールディング後のタンパク質に結合したままである可能性は極めて高い。タンパク質の産業上の利用、あるいは構造解析などの分野において、この点が問題になるか否かはその目的によるが、結合量に関する的確な情報提供を可能にする解析系の構築も目指している。

### 4) CAの安定供給

CAは比較的高価な試薬である。現在CAの供給先である江崎グリコ株式会社・生物化学研究所における研究の進展に伴い、2001年のキット販売開始時に比べて、安価な供給が可能になってきている。さらなる検討により、産業レベルにおける大容量リフォールディングに適応するような人工シャペロンの開発を目指したい。

## 12. おわりに

本技術は、従来法を大きく上回る汎用性の高いリフォールディング手法としてキット化され、2001年11月よりタカラバイオ(株)より研究用試薬 (Refolding CA

Kit)として発売が開始された。多くの研究者に使用して頂き、様々な観点から評価、批判を受けることが現時点では大切なことである。使用例が蓄積され評価を受ける中で、さらに優れた技術とすべく改良を重ねていきたい。本技術が、タンパク質の構造、機能解析、並びに有効利用のためのタンパク質調製技術として、さらにはリフォールディング過程の解析手法として、ポストゲノムシークエンス時代のタンパク質研究に少しでも貢献できたら幸いである。

## 謝辞

本研究は、農林水産省「民間結集型アグリビジネス創出技術開発事業」、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構基礎研究推進事業の助成を受けて進められたものである。

(応用微生物部生物変換研究室 町田 幸子)

## 引用文献

- 1) Marston, F.A.O. (1986), *Biochem. J.*, 240, 1-12
- 2) Wetlaufer, D.B. and Xie, T. (1995), *Prot. Sci.*, 4, 1535-1543
- 3) D. Rozema, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2373 (1995)
- 4) M. Yoshimoto, et al., *J. Chromatogr. B*, 743, 93 (2000)
- 5) Y. Akiyoshi, et al., *Bioconjugate Chem.*, 10, 321 (1999)
- 6) R. Kuboi, et al., *J. Chromatogr. B*, 743, 215 (2000)
- 7) 町田幸子ほか *BioView*, 41, 7 (2002)
- 8) D. Rozema, & S.H. Gellman., *Biochemistry*, 35, 15760 (1996)
- 9) T. Takaha, et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 2902 (1996)
- 10) S. Machida, et al., *FEBS Lett.*, 486, 131 (2000)
- 11) Q. Xie, et al., *Protein Expression and Purification*, 32, 68-74 (2003)
- 12) 町田幸子ほか 特願2003-304624 (2003)
- 13) S. Machida, et al., US patent 10-653687 (2003)

# 近赤外分光法による果実糖度の測定

## 1. はじめに

最近、「光センサ」と書かれた段ボール箱をスーパーで見かけるようになった。光センサという可視光を用いたセンサのように思われるが、これは農協や市場などで用いられている慣用語で、「近赤外光」という光を使って果実糖度を非破壊的に測定する選別機あるいは検出器を意味している。

当初、果物の選別はサイズあるいは重量のみで行われていたが、色彩の測定可能なカラーセンサが出現して色や傷が選別の対象なり、そして化学成分が測定できるセンサが出現して糖度（甘さ）が選別の対象となった。「光センサ」の言葉は必ずしも適正な用語ではないが、カラーセンサと区別するため便宜的にこの言葉が使われるようになったと思われる。

ここでは、近赤外分光法による果実糖度の測定の原理、これまでの研究の概要、糖度選別機の種類、糖度選別の利用方法及び今後の課題などについて述べる。

## 2. 「近赤外光」とは？

「近赤外光」はテレビの電波などでおなじみの電磁波の一種で、波の性質を有している。波の山と山（あるいは谷と谷）の間隔を波長といい、近赤外光は波長の順番で見ると可視光と赤外光の間にある。可視光は色として、（遠）赤外光は熱として認識できるが、近赤外光は人間の感覚では感知できない。近赤外光の波長の下限は明瞭ではないが、一般に800～2500nm（ナノメートル）（ $10^{-9}$ mのこと）の電磁波を「近赤外光」と呼ぶ。

## 3. 近赤外光の吸収

近赤外光を果物などの対象物に照射すると、ある特定な波長の光のみが吸収される。そして、光が吸収される強度（吸光度）は光を吸収する物質の濃度に比例する。それは次のような原理によるものである。

図1は果実の甘さの素であるショ糖の化学構造を示したものである。この図から、ショ糖はC-H、O-Hの原子団から成り立っていることが分かる。通常、C-H、O-Hなどの原子団はそれぞれ特有の振動数で振動している。その分子振動と共振する光が対象物に照射されると、その光のエネルギーの一部が原子団により吸収される。その結果、分子振動は激しくなり、照射光は減衰する。光の減衰の程度は光が遭遇する原子団の数、すなわち濃度に比例する。

## 4. 近赤外スペクトル

対象物に照射する光の波長を変えながら、光の減衰の程度（吸光度）を連続的

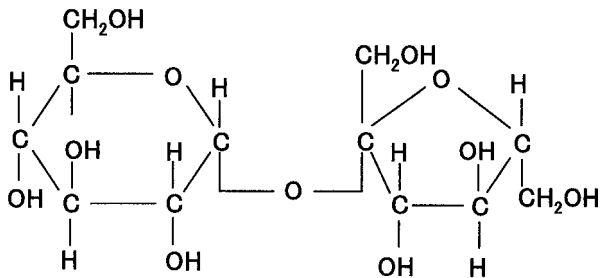


図1 ショ糖の化学構造

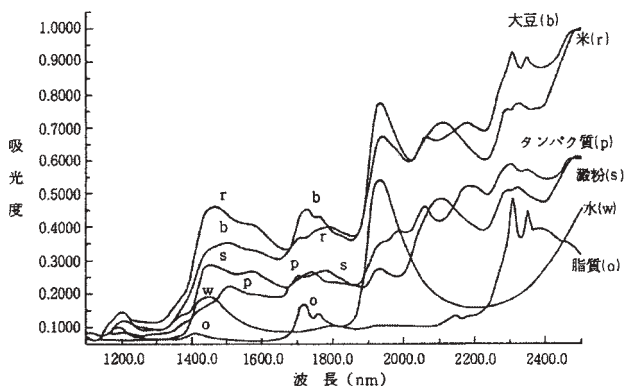


図2 米、大豆及び主要成分の近赤外スペクトル<sup>1)</sup>

に測定したグラフを近赤外スペクトルと呼ぶ。

図2は大豆及び米、並びにそれぞれの主要成分である水、タンパク質、脂質、澱粉の近赤外スペクトルである<sup>1)</sup>。吸光度は光の吸収される程度が大きいほど高い値を示す。構成成分の吸収バンドは、成分特有の原子団に基づくもので、米及び大豆のスペクトルにおいても内容成分特有の吸収バンドが見られる。大豆、米のいずれの試料でも観察される1935 nmの吸収バンドは主に水によるものである。米のスペクトルの2100 nmに見られる吸収バンドは主に澱粉によるもので、澱粉含量の少ない大豆ではこの吸収バンドは顕著でない。2180 nmに見られるタンパク質の吸収バンド、並びに2305 nm及び2345 nmに見られる脂質の吸収バンドはタンパク質、脂肪含量の多い大豆においてははっきりと見ることができる。

以上のように、近赤外スペクトルには複数の成分の情報が含まれており、近赤外法においては、これらのスペクトルから重回帰分析などの統計的手法を用いて対象物の品質に係わるいろいろな情報が抽出、解析される。

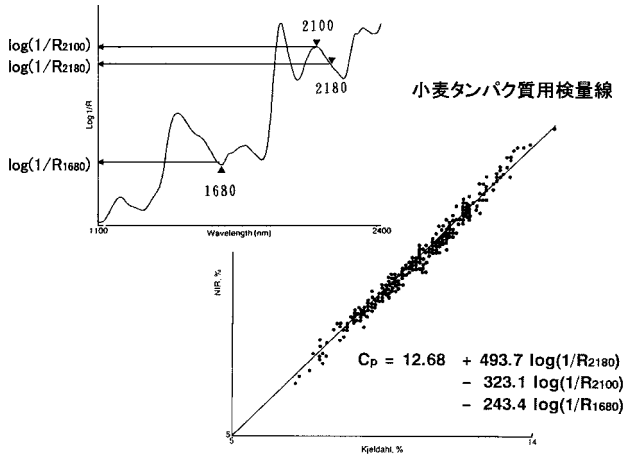


図3 小麦粉のタンパク質測定用検量線の仕組み

## 5. 定量分析

農産物のような多成分を含む試料の特定成分の濃度を測定するには、検量線と呼ばれる多項式（関係式）が必要になる。

図3は小麦粉のタンパク質含量 $C_p$ を求める例で、検量線は次式で示される。

$$C_p = 12.68 + 493.7 \times \log(1/R_{2180}) - 323.1 \times \log(1/R_{2100}) - 243.4 \times \log(1/R_{1680})$$

ここで、 $\log(1/R_{2180})$ 、 $\log(1/R_{2100})$ 、 $\log(1/R_{1680})$ はそれぞれ2180、2100、1680 nmにおける吸光度である。2180 nmはタンパク質の吸収バンド、2100 nmは澱粉の吸収バンド、1680 nmは成分に依存しない中立のバンドである。粉碎試料の場合1680 nmに粒度の情報が反映さる。小麦粉のタンパク質含量を求める検量線はタンパク質、澱粉及び試料粒度の複数の情報から構成されていることが分かる。図3の2180 nm、2100 nm及び1680 nmにおける吸光度 $\log(1/R)$ を上記の式に代入するだけで、小麦粉のタンパク質を求めることが可能である。青果物用の検量線も同様の考えの基に作成される。

## 6. 果実糖度測定への応用

近赤外分光法（以後、近赤外法という）が青果物に应用されたのは1985年以降で、米国農務省のBirthらの研究グループの行った研究<sup>2)</sup>が最初である。図4に示すような青果物用に開発された装置“Biospect”が用いられた。上部から照射された近赤外光は産物内で散乱反射を繰り返し、ラパークッション（R）を施した

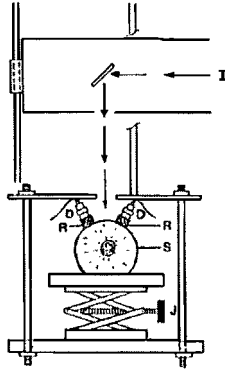


図4 “Biospect”によるタマネギのスペクトル測定<sup>2)</sup>  
S：試料，D：検出器，R：クッション

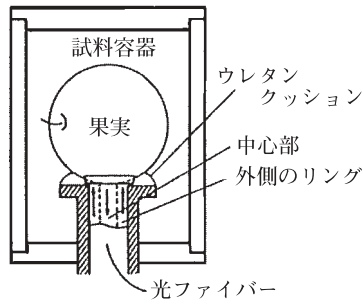


図5 モモ果実のスペクトル測定<sup>5)</sup>

検出器(D)で検出される。200グラム～380グラムの重量のタマネギ29個を用いた実験において、近赤外法により推定された乾物量は実際の化学分析値と高い相関をなし、両者の相関係数は0.995、標準誤差は0.42%であった。この場合の乾物の主要成分は炭水化物である。その後、同研究グループはネットメロンの可溶性固形物(SS)の測定<sup>3)</sup>を行っている。

我が国では、モモ<sup>4,5)</sup>、リンゴ<sup>6)</sup>、温州ミカン<sup>7)</sup>などへの応用試験が行われた。図5に、インタラクタンスという方法によるモモ果実のスペクトル測定方法を示す<sup>4,5)</sup>。光ファイバーは同心円状に2重構造になっており、外側のリングを介して光が果実に照射される。果実内で散乱反射されてもどってきた光は光ファイバーの中心部を通り検出器に達する。光ファイバーの先端には外光を遮断し、試料を保持するためウレタンクッションが貼られている。果実を光ファイバーの先端に置くだけで、そのスペクトルが測定される。モモ果実(清水白桃)を供試し、果実赤道



部のスペクトルデータと糖度（Brix値）を基に重回帰分析を行った実験で、近赤外法で推定した果実糖度（Brix値）は従来法で測定した値と高い相関をなし、最も良好な検量線において両者の重相関係数は0.97、検量線作成時の標準誤差（SEC）は $0.48^{\circ}\text{Brix}$ であった。未知試料に対する標準誤差（SEP）及びバイアスは、それぞれ $0.50^{\circ}\text{Brix}$ 及び $0.01^{\circ}\text{Brix}$ であり、モモ果実の糖度は近赤外法により丸のまま精度よく測定できることが明らかになった。これが近赤外法により果実糖度を非破壊的に精度よく測定できることを示した我が国最初の研究である。この測定方式は、果皮が薄い果実であれば、どんな種類の果実にも適用可能である。

## 7. 温州ミカンへの応用

市販の近赤外装置は穀類などの粉体試料やワインなどの液状試料を対象に試料室が設計されている。そのため、丸のままの果実はそのまま測定できず、これまで色々な工夫がなされてきた。前述したモモ果実もその一例である。温州ミカンの場合、最初に引出し型直接測定方式が検討された。次に、積分球型あるいは2重リング型の光ファイバー方式が検討され、最後に透過型の光ファイバー方式が検討された。それぞれの内容は次のとおりである。

### 7.1 引出し型直接測定方式

試料室が引出し方式の近赤外装置及び特別に試作された果実用引出し（試料室）が利用された。果実用引出しは試料台が上下可動式になっており、大きさが異なる果実でも測定面を積分球の直下に調整できる。図6のように測定面を上にして果実を試料台に置き、測定面の高さを調整し、1100～2500nmの波長域のスペクトルが測定される。1次・2次スペクトル及び糖度（Brix値）を基に重回帰分析を行った結果、相関係数0.7～0.8、検量線評価時の標準誤差（SEP） $0.7\sim 0.8^{\circ}\text{Brix}$ の検量線が得られた。後述する透過方式に比較して測定精度はあまりよくない。丸のままの果実の反射スペクトルは、果肉を注意深く取り除いた果皮のみのスペク

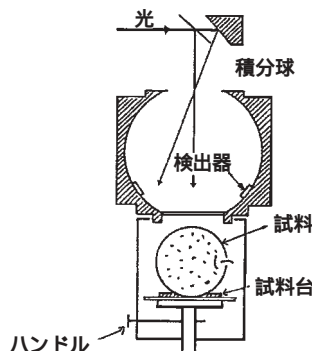


図6 引出し方式によるスペクトル測定

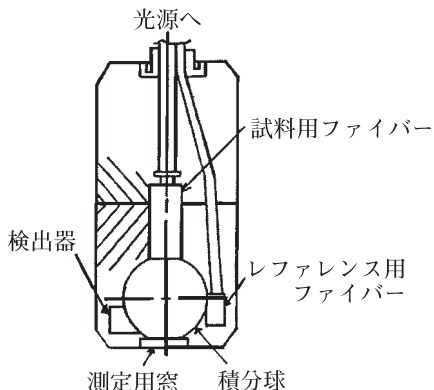


図7 積分球型光ファイバー方式の検出部<sup>3)</sup>

トルとほぼ同じであることから、反射スペクトルは果実内部の果汁成分の情報を反映していない可能性が高い。

### 7.2 積分球型光ファイバー方式

その後、図7のような光ファイバーを利用した研究が行われた<sup>3)</sup>。光ファイバーの先端には小さな積分球が取り付けられており、分光された光は積分球を介して試料に照射される。測定用窓が試料に接するように配置される。試料で散乱反射した光は積分球内で均一化され、均一化した光の一部が積分球内に取り付けられたセンサーで検出される。レファレンス用のファイバーを別に持っているため、基準板の測定を必要としない。光ファイバーの先端を試料に接触させるだけで、700～2500 nmの波長域のスペクトルを測定することができる。1次・2次スペクトル及び糖度（Brix値）を基に重回帰分析を行った結果、相関係数0.90～0.95，SEP 0.95～1.12°Brixの検量線が得られている。検量線作成用試料の糖度分布が広いことから、相関係数の値は高くなっているが、SEPの値も大きくなっており、測定精度はあまりよくない。引出し方式の場合と同様、得られたスペクトルは果実内部の果汁成分の情報を反映していない可能性が高い。

### 7.3 二重リング（インタラクタンス）型光ファイバー方式

図5のようなインタラクタンス方式の光ファイバーを利用した研究が行われた。果実を光ファイバーの先端に置くだけで680～1235 nmの波長域のスペクトルが測定される。1次・2次スペクトル及び糖度（Brix値）を基に重回帰分析を行った結果、相関係数0.67～0.71，SEP 0.70～0.76°Brixの検量線が得られている。この精度は果皮の薄いモモ果実<sup>5)</sup>で得られた精度（相関係数：0.97，SEP:0.50°Brix）ほど

高くない．前述した2つの方法の場合と同様，得られたスペクトルは果実内部の果汁成分の情報を反映していない可能性が高い．

#### 7.4 透過型光ファイバー方式

前述した3つの方法で高い測定精度が得られない理由として，測定されたスペクトルが果実内部の果汁の成分情報を反映していないことが考えられる．そこで，果実内に光を通す方法が検討された．詳細は次項で述べる．

### 8．透過方式による温州ミカン糖度の測定

図8に透過スペクトルの測定装置を示す．分光した光を上部より試料に照射し，透過光は試料の直下に配置したシリコン検出器で測定される．丸のままの果実及び果皮を注意深く取り除いた果実について，果実の赤道部及び果柄部からのスペクトル（波長域：680～1235 nm）が測定され，あわせて，搾った果汁のスペクトルも測定された．

図9は測定装置の応答の直線性が確認された680～935 nmの波長域のスペクトルである．果実径が大きいかほどスペクトルは上方へシフトする．2微分処理を施してもこの果実の大きさの影響は除去できない．

透過スペクトルから果実の大きさの影響を除く方法として，個々の果実のスペクトルを同一径の果実のスペクトルに換算する方法，すなわち各測定波長点における吸光度値をそれぞれの果実の直径で割り算する方法が考えられる．そこで，スペクトルの中に果実の直径と関連した情報が存在するかどうか検討された．図10は吸光度と果実径あるいはBrix値との間の相関係数を各波長ごとにプロットした図（相関プロット）である．糖度に無関係で果実の直径と相関の高い波長844

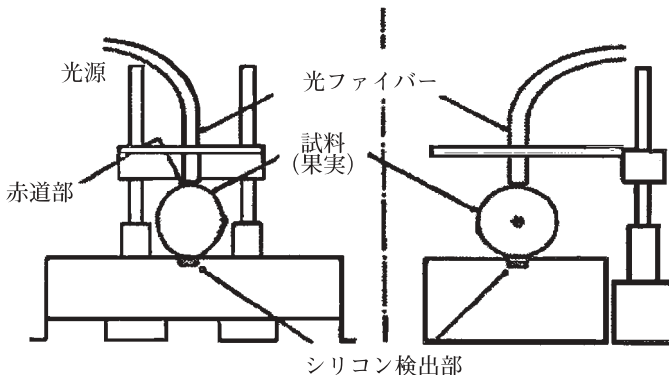


図8 透過方式による温州ミカンのスペクトル測定<sup>7)</sup>

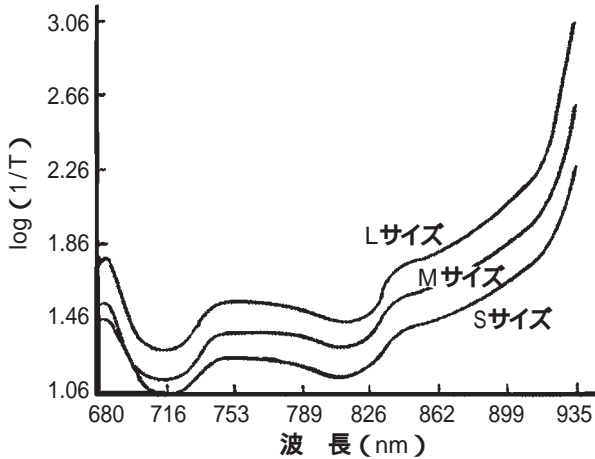


図9 温州ミカンの透過スペクトル<sup>7)</sup>

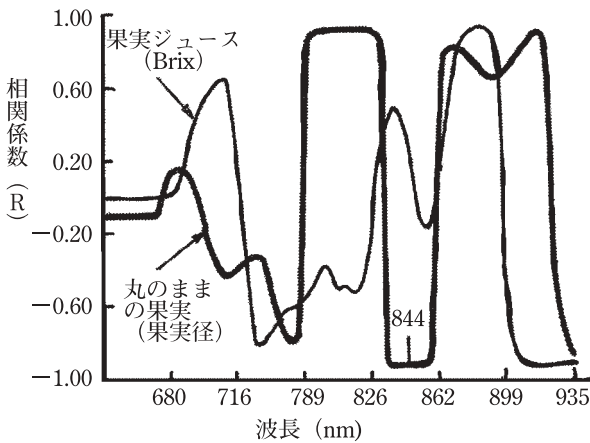


図10 Brix値と2次微分値、及び果径と2次微分値の間の相関プロット<sup>7)</sup>

nmが存在することが明らかになった。この波長は水の吸収バンドである。各試料の2次微分スペクトルを各々試料のこの波長の2次微分吸光度値で割ることにより、果実の大きさに影響されない正規化2次微分スペクトルが得られた(図11)。

正規化2次微分スペクトルと糖度を基に重回帰分析及び評価を行ない、表1及び表2の結果が得られている。果実の測定方向別に解析結果を比較すると、果実の赤道部からの測定において高い精度が得られた。温州ミカンの糖度はじょうの

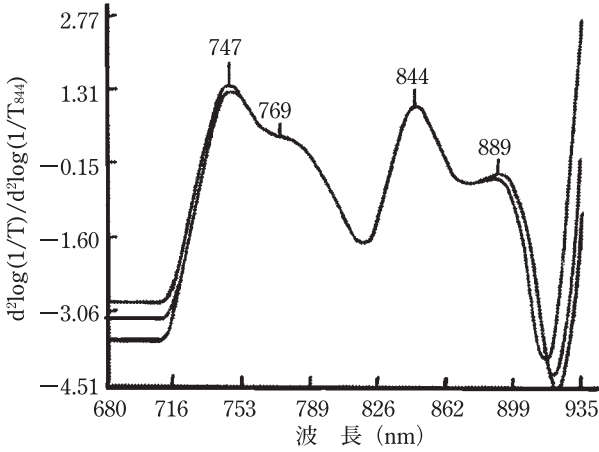


図11 温州ミカンの正規化2次微分スペクトル<sup>7)</sup>

表1 果実測定部位が糖度用検量線の作成及び評価に及ぼす影響<sup>7)</sup>

測定部位	選択波長 (nm)				R	SEC (°Brix)	SEP (°Brix)	Bias (°Brix)
	1	2	3	4				
赤道部	914	769	745		0.971	0.44	0.45	-0.01
	914	769	745	786	0.989	0.28	0.32	-0.02
果柄部	919	770	745		0.941	0.61	0.71	0.10
	919	770	745	785	0.979	0.37	0.48	0.04

表2 試料の形態が糖度用検量線の作成及び評価に及ぼす影響<sup>7)</sup>

試料形態	選択波長 (nm)				R	SEC (°Brix)	SEP (°Brix)	Bias (°Brix)
	1	2	3	4				
丸のままの果実	914	769	745	786	0.989	0.28	0.32	-0.02
皮を剥いた果実	901	760	878	980	0.991	0.26	0.28	0.02
ジュース	765	922	978		0.996	0.17	0.25	0.03

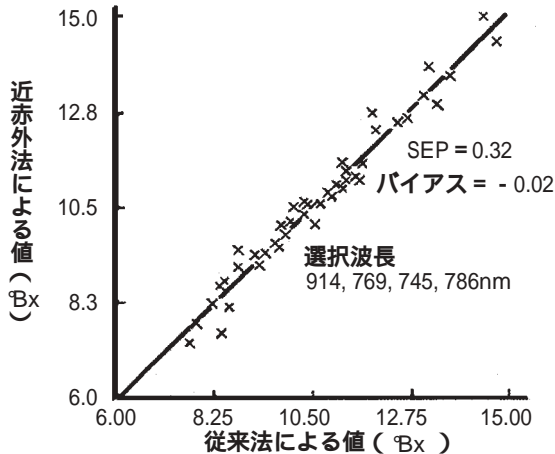


図12 温州ミカン糖度の近赤外値と化学分析値の関係<sup>7)</sup>

う（果実内の小袋）ごとに異なっているが、対角に位置するじょうのうの糖度の平均値は果実全体の平均糖度に近い<sup>7)</sup>。果柄からの測定の場合、光は限られたじょうのうあるいはじょうのうの隙間を通過するのに対し、赤道部からの測定の場合、光は対角に位置する複数のじょうのうを通過する。このことが測定精度を向上させる理由と考えられる。

試料の形態別に解析結果を比較すると、得られた検量線の精度はジュースで最もよく、次いで皮を剥いた果実、丸のままの果実の順であった。丸のままの果実でも、相関係数 0.989, SEP 0.32°Brixと非常によい結果が得られている（図12）。透過方式では、果皮の測定精度に及ばず影響はほとんど無視できること、及び丸のままの果実でもジュースとほぼ同程度の精度で測定可能であることが分かる。丸のままの果実の検量線で採用された波長の914nm はショ糖に帰属される。

同様な方法に関し、果実の品種、産地、収穫時期、年次などの測定精度に及ぼす影響について精力的な検討もなされている<sup>9)</sup>。

## 9. 温度補償型検量線の開発

近赤外スペクトルは試料温度の影響を受けやすい。共同選別施設では果実試料の温度を事前に調整することは困難である。そこで、試料温度の影響を受けない検量線の開発が行われた<sup>10)</sup>。

試料温度は果実試料に含まれる水のスペクトルに影響を及ぼす。化学成分が変化しなくても温度が変化するだけで水の吸収バンドの強度が変化する。従って、

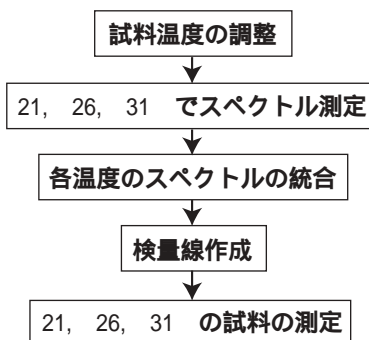


図13 温度補償型検量線の作成手順<sup>10)</sup>

表3 試料温度がバリデーションに及ぼす影響<sup>10)</sup>

試料温度 ( )	温度補償無し		温度補償有り	
	SEP	Bias	SEP	Bias
31	0.50	0.20	0.46	- 0.03
26	0.44	0.05	0.39	- 0.01
21	0.49	- 0.33	0.41	- 0.02

試料温度の変化によるスペクトルの変動は、求めようとする成分以外の未知成分の変化によるスペクトルの変動と同じ現象と考えられる。すなわち、試料温度は未知成分の一つと考えられた。このような発想のもとに、検量線作成用試料温度を人為的に変動させることにより、温度補償型の検量線を開発する方法が開発された。

図13は温度補償型検量線の作成手順を示したものである。スペクトル測定は通常の検量線作成ではある一定の温度で行われるが、温度補償型検量の場合異なった複数の温度で行われる。表3は重回帰分析の結果である。通常の検量線では試料温度が検量線作成時と異なるとバイアス（測定値の偏り）が発生するが、温度補償型検量線の場合バイアスは発生しない。試料温度の変化によるスペクトルの変動を打ち消すような仕掛けが検量線の中に自動的に組み込まれたことになる。

表4 糖度選別機の種類

---

(1) 反射方式	
(2) 透過方式	全照射・遮光方式 部分照射・非接触方式

---

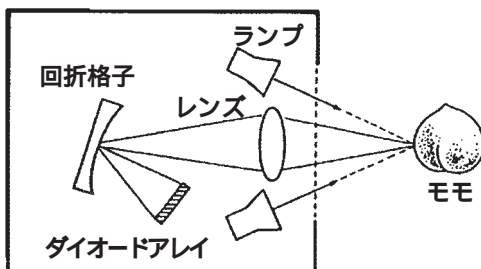


図14 モモの糖度選別機（反射方式）

## 10. 果実糖度選別機

果実糖度選別機はスペクトルの測定方式の違いにより表4のように反射方式と透過方式に大別される。透過方式は更に全照射・遮光方式と部分照射・非接触方式に分けられる。全照射・遮光方式とは赤道部の全部に光を照射し、果実の下へ透過した光を完全な遮光状態で検出する方式である。一方、部分照射・非接触方式とは果実の赤道部の一部に光を照射し、その反対側から透過光を非接触で測定する方式である。

反射方式の例として、モモ糖度選別機（図14）がある。その1号機が山梨県西野農協に導入された。選別されたモモは「糖度保証付き果実」として差別化されて販売されている。お皿状のコンベアに乗せられた果実はセンサー部を通過する瞬間2個のタングステンハロゲンランプによって腹部を照射され、果実表皮及び表皮に近い果肉層で反射された光が集光部によって捕らえられ、回折格子及びダイオードアレイによって近赤外吸収スペクトルが測定される。予め作られた検量線により、果実の糖度が瞬時に算出さる。本方式は果実糖度の部位によるバラツキを直接受ける欠点があるが、果実の性状をうまく利用することによりこの欠点を低減することが図られている。例えば、モモ果実の場合、縫合線と直角をなす果実赤道部（腹部）が平均糖度を示すことから、その部分がセンサ部を向くよう



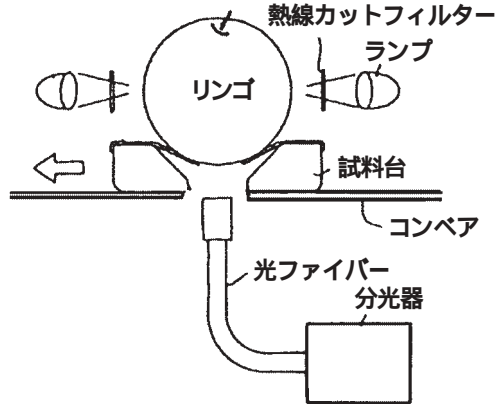


図15 リンゴの糖度選別機（全面照射・遮光方式）

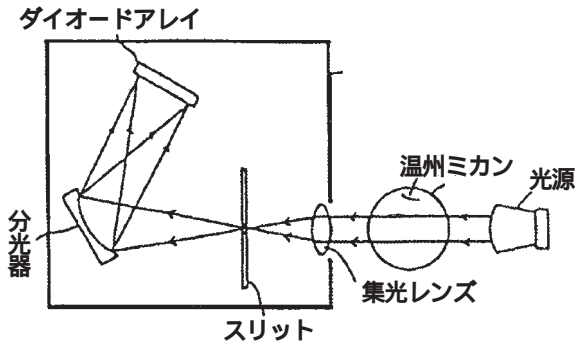


図16 温州ミカンの糖度選別機（部分照射、非接触方式）

に果実はコンベア上で揃えられる。選別速度は毎秒3個程度である。

透過方式の全照射・遮光方式の例として、リンゴ糖度選別機（図15）がある。ベルトコンベアの試料台上の果実が測定部を通過するとき、コンベアの側に設置された多数のランプにより果実赤道部のほぼ全面が照射される。試料台は中心部に穴が空いており、果実内を透過した光は試料台の穴を通して下に抜け、コンベアの直下に設けられたセンサユニットに達し、果実の透過スペクトルが測定される。予め作られた検量線を用いてスペクトルから糖度が瞬時に算出される。選別速度は毎秒3個程度である。赤道部以下の果実全部を光が透過することから、測定部位の違いによる測定誤差が比較的小さくなるという特徴がある。

透過方式の部分照射・非接触方式の例として、温州ミカン糖度選別機（図16）

がある。ベルトコンベア上の果実がセンサ部を通過するとき、果実の赤道部の一部がランプで照射される。果実内部を通過して反対側へ透過した光が非接触の状態ダイオードアレイによって捕らえられ、果実の透過スペクトルが測定される。前述した装置と同様、予め作られた検量線を用いてスペクトルから糖度が瞬時に算出される。非接触状態で計測を行えることから、従来の選果機を改造することが比較的容易ある。

## 11. 糖度選別機の測定データの活用状況と今後の課題

糖度選別機の登場によって、糖度を含む品質に関連した膨大な情報が毎日発生している。糖度選別機導入の成否はこの情報を如何に使いこなすかにかかっているとんでも過言ではない。情報の活用方法として、販売戦略への活用、清算業務への活用、栽培技術への活用が考えられる。

### 11.1 販売戦略への活用

現在、農協では高糖度産物だけを選別してこれを有利販売しようとする方法と、低糖度産物を格別品として取り除いて（いわゆる足切りをして）販売する方法とが取られている。前者の場合、高糖度品は通常品より高い単価で販売することができるが、残りの産物の販売が不利になる危険性がある。したがって、高糖度品全部を選別し特上品として販売することは必ずしも有利にならない。後者の場合、商品の中に格別品が含まれないようになることから、市場における農協の信頼が向上する効果がある。現在のところ後者の方式を採用している農協が多いようである。

新しい規格を考え出した農協もある。信州いいだ農協は外観には多少問題があ



図17 内部品質を保証する「優糖生」のシール

るが内部品質は最高である果実を、「優等生」の言葉をもじって「優糖生」という新しい出荷規格をもうけて出荷した(図17)。市場での反響はよく、糖度・外観両方とも優れた果実に劣らず高値で取引されているという。いままで考えられなかった販売戦略である。

糖度選別機から得られる糖度に関する情報の販売戦略への応用はまだ試行錯誤の段階であり、新しい情報伝達手段として注目をあびているインターネットなどと組み合わせることにより、全く新しい販売形態が生み出される可能性がある。

### 11.2 精算業務への活用

農家の手取りはこれまで外観によって評価された等級及びサイズに基づいて決定されてきた。すなわち、大玉で外観のよい産物を生産する農家ほど手取りが多かったのである。したがって、外観は多少悪いが味では負けないとする農家にとって必ずしも満足いく精算方法ではなかった。このような中で、糖度選別機の出現はこの精算業務に大きな変革をもたらしている。すなわち、糖度を加味した新たな単価表が作成されたのである。各農家は内容品質に見合った収入が得られるようになり、このことは生産意欲の向上につながっている。農協離れした組合員も農協に戻るという効果も発生した。これらのことは糖度選別機の導入によりもたらされた最も顕著な効果の一つである。

### 11.3 栽培技術への活用

糖度選別機では各農家ごとの糖度分布及び等級・階級のデータが保存されている。ある農協ではこれらのデータが毎日各農家に報告されている。すなわち、農協に出荷された産物の品質に関する通信簿が出荷した本人に毎日渡されているわけである。したがって、品質の良い果樹園と品質の悪い果樹園の比較をすることにより栽培技術の底上げが可能になる。この方法による栽培技術指導は始まったばかりであり、内部品質を向上させるための栽培技術に関する基礎的研究や具体的な指導方法の確立が必要である。

### 11.4 選別装置の測定精度の維持

糖度選別機は近赤外法を応用した装置である。したがって、近赤外法の特徴(宿命)をそのまま引き継いでいる。すなわち、定量分析を行うためには化学分析値を基にして開発した検量線が必要であり、その検量線は検量線作成に用いた試料が代表する母集団にしか適用できない。また、検量線作成用試料のスペクトルを測定した装置の光学系と比較してハード的な狂いがあると誤差が発生する。例えば、前者では産物の品種、生産地、栽培条件、収穫時期などが問題となり、後者では光源、センサーの経時変化、試料セルの汚れなどが問題となる。したが

って、糖度選別機の精度を維持するには、日常的な点検と定期的な精度の検査が必要である。

これは農協単独で解決できる問題ではなく、国、メーカ、農協が協力して対処すべき問題である。

## 12. 日常の点検方法

前述したように、近赤外装置は光源・センサーの経時変化、及び試料セルの汚れなどハード的な微妙な変化により測定誤差を生ずる危険性を有する。したがって、ルーチン分析において、測定開始時にはハードの点検が不可欠である。サトウキビの格付け検査では近赤外法を基軸とするいわゆる「サトウキビ品質評価システム」が構築されているが、このシステムにおいて近赤外装置の日常の点検には基準試料が用いられている。すなわち、サトウキビの組成に似た糖水溶液のモデルサンプルが準備されており、容器に内容成分の含量が明示してある。このモデルサンプルを装置に掛けて正常な値が標示されれば装置に異常がないことになり、そのままルーチン分析に使用できる。異常な値が表示された場合は近赤外管理センターの役割を果たしている日本食品分析センターにその旨を連絡し、指示を仰ぐことになっている。必要に応じて行う測定誤差の修正のための検量線のバイアス補正は近赤外管理センターの責任で行われる。信頼性を確保するため、現地での検量線の修正は出来なくなっている。

以上は「サトウキビ品質評価システム」での日常の点検方法であるが、糖度選別機の場合も類似した点検方法を構築する必要がある。果実の場合、基準試料としてのモデル果実の入手は困難で、実際の果実を使わざるを得ない。すなわち、実際の果実を選別機に掛けて、糖度の推定値と化学分析値を比較する方法が有力であろう。この場合、現地オペレータの研修・教育が不可欠になる。また、化学分析のための試料のサンプリング方法及び化学分析方法の統一が必要である。それは農産物の場合成分値がサンプリングする部位によって大きく異なるからである。

## 13. 精度の定期的な検査方法

装置が正常に作動したとしても測定誤差が発生する危険性がまだある。それは検量線と今後測定するであろう産物との相性の問題である。前述したように検量線は検量線作成時に用いた試料が代表する母集団にしか適用できない。したがって、産物の品種、生産地、栽培条件、収穫時期が異なると誤差を生じる危険性がある。これを防止あるいは早期発見をするためには、定期的な検査が必要である。前述した「サトウキビ品質評価システム」では試料の抜き取り検査が実施されている。すなわち、現地の近赤外装置に掛けた試料を凍結し、それを近赤外管理センターへ凍結したまま輸送、同センターで化学分析し、近赤外装置で求めた成分

値と比較検討される。近赤外管理センターでは現地で作動している近赤外装置ごとの「カルテ」が準備されており、測定誤差等のデータがこれに記録され管理されている。測定誤差が拡大する傾向にある場合、その原因を究明するとともに、測定誤差を小さくするためのバイアス補正などの処置が図られる。

糖度選別機の場合も類似した精度の検査方法が必要である。すなわち、次のような方法が想定される。糖度選別機に掛けた産物を選別機から抜き取り、クール宅配便等により糖度選別機管理センター（仮称）へ輸送、同センターで糖度を分析、糖度選別機による推定値と比較し、測定誤差を「カルテ」に記録する。測定誤差の変動を監視することにより、選別機の測定精度を保証することが可能となる。糖度測定に対する信頼性を確保するために、糖度選別機管理センターは公的機関が行うことが重要である。

#### 14. おわりに

現在、糖度選別機の測定精度に関する公的機関による管理は行われていない。すなわち、野放しの状態である。シーズンの始めのオペレータの研修、日常の機器の点検、及び定期的な精度の確認を行っているメーカーもあるが、何も行っていないメーカーもある。

既に、数百台の糖度選別機が農協に導入されており、機種及びメンテナンスの有無による測定精度の違いが次第に明るみになってきている。

混乱が大きくなる前に、糖度選別機の測定精度の維持・管理のための国レベルの精度管理体制を早急に整備することが焦眉の課題となっている。

（分析科学部非破壊評価研究室 河野 澄夫）

#### 参考文献

- 1) 岩元睦夫・河野澄夫・魚住 純：近赤外分光法入門，幸書房（1994）。
- 2) G. S. Birth, G. G. Dull, W. T. Renfroe and S. J. Kays: *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 297-303 (1985)。
- 3) G. G. Dull, G. S. Birth, D. A. Smittle and R. G. Leffler: *J. Food. Sci.*, **54**, 393-395 (1989)。
- 4) S. Kawano, H. Watanabe and M. Iwamoto: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International NIRS Conference (Ed. M. Iwamoto and S. Kawano), Korin, Tokyo, Japan, pp.343-352 (1990)。
- 5) S. Kawano, H. Watanabe and M. Iwamoto: *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **61**, 445-451 (1992)。
- 6) 天間毅・上田英介・松江一・篠木藤敏・対馬 武夫：第6回非破壊計測シン

ポジウム, (社) 日本食品工業学会, p.98-102 (1990).

- 7) S. Kawano, T. Fujiwara and M. Iwamoto: *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **62**, 465-470 (1993).
- 8) 永井耕介: 第2回近赤外研究会講演要旨, 農林水産省食品総合研究所, p.25-28 (1993).
- 9) 宮本久美: 第2回近赤外研究会講演要旨集, 農林水産省食品総合研究所, p.19-24 (1993).
- 10) S. Kawano, H. Abe and M. Iwamoto: *J. Near Infrared Spectrosc.*, **3**, 211-218 (1995).