ISSN 2186-6023

サンケイ科学振興財団研究報告

Bulletin of the Sankei Science Scholarship Foundation

No. 22

２０１２

公益財団法人　サンケイ科学振興財団

The Sankei Science Scholarship Foundation

ま　え　が　き

当財団法人では、鹿児島県内の産業振興に寄与するための科学的研究で、とくに化学またはバイオに関する研究に対して、毎年助成を行っております。

この「サンケイ科学振興財団研究報告」第２２号は、当財団法人が平成２３年度に助成を行った研究の成果を収録したものであります。

平成２４年６月

公益財団法人　サンケイ科学振興財団

代 表 理 事　福　谷　　明

目　　次

１．鹿児島県で生産される食品素材から認知症予防因子の探索
（壺造り米黒酢およびもろみ末摂食による老化促進マウス認知機能の改善作用）
・・・・・・・・・・・・・・・１
鹿児島大学農学部獣医学科先端獣医科学講座
叶内　宏明

２．カンキツ白かび病菌由来ポリガラクツロナーゼのキメラタンパク質作出による病原性決定構造の解明
・・・・・・・・・・・・・・・１７
鹿児島大学農学部生物生産学科植物病理学研究室
中村　正幸・鶴屋　健太・松本　宜大・岩井　久

３．アイザメ筋肉からの健康機能性を有するペプチドの作製とその応用に関する研究
・・・・・・・・・・・・・・・２５
鹿児島大学水産学部食品・資源利用学分野生物化学研究室
塩﨑　一弘・市野　隼人

４．バイオエタノール添加ガソリンのための迅速簡便なエタノール濃度分析システムの開発
・・・・・・・・・・・・・・・３３
鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻
満塩　勝

５．肌ヌカを用いた新規米加工食品の開発
・・・・・・・・・・・・・・・４３
鹿児島県工業技術センター　食品・化学部
松永　一彦・下野　かおり・瀬戸口　眞治

６．乳房炎の早期診断マーカーとしての microRNA
・・・・・・・・・・・・・・・５５
鹿児島大学農学部獣医学科臨床獣医学講座画像診断学分野
三浦　直樹

７．微生物を用いた切り花用品質保持剤の開発
・・・・・・・・・・・・・・・６３
株式会社　しか屋
宮之原　綾子

鹿児島県で生産される食品素材から認知症予防因子の探索

（壺造り米黒酢およびもろみ末摂食による老化促進マウス認知機能の改善作用）

叶内　宏明

鹿児島大学農学部獣医学科先端獣医科学講座
〒890-0065　鹿児島市郡元 1−21−24
TEL：099-285-8716

要旨

認知症は治療方法が無いため、発症の予防が重要である。本実験では認知症の予防に壺造り米黒酢（黒酢）もしくは黒酢生産で生じる副産物のもろみ末の摂食が有効であるかどうか、老化促進マウス（SAM P8）を用いた 2 回の実験で検証した。認知機能は水迷路試験で評価した。1 回目の実験において、SAM P8 で認知機能の低下が認められ、0.5%もろみ末添加食を摂取した SAM P8 は認知機能の改善が認められた。また、認知症の原因と推測されるホモシステインについても検証を行ったが、24 週間高 Hcy 血症を維持させても認知能力に影響は認められなかった。2 回目の実験において 0.5%もろみ末の効果の再現性および 0.25%黒酢添加食摂食の認知機能への影響を検討した。もろみ末および黒酢ともに SAM P8 認知能力低下抑制作用が認められた。海馬 CA3 領域のアミロイド線維の蓄積は SAM R1 に比べ SAM P8 で亢進していた。もろみ末および黒酢摂取によって CA3 領域でのアミロイド線維の蓄積が SAM R1 と同程度まで減少した。認知機能障害に対してもろみ末もしくは黒酢摂食が有効であることが期待され、今後はこれら食品素材から有効成分の同定を試みたい。

1. 緒言

2010 年において認知症発症者は 200 万人以上と推計されている。iPS 細胞の研究が進み、再生医療による治療方法が期待されているが、ガン化などのリスクがあるため、ヒトへの臨床応用の道筋は不透明である。そのため、認知症発症の一次予防、もしくは発症後もその進行を緩やかにする二次予防が重要である。本研究では認知症発症のリスクファクターと指摘されているホモシステイン（Hcy）に着目した[1]。Hcy はメチオニンから生じるアミノ酸である。Hcy 代謝には葉酸、ビタミン B12、ビタミン B6 が必要であり、それらの欠乏は高 Hcy 血症へつながる。高 Hcy 血症と関連のある遺伝子変異は 5', 10'-methylene tetra hydro folate reductase（MTHFR）の 677 の C が T に変異する一塩基多型で認められる。CC、CT 型に比べ TT 型では血漿 Hcy 濃度が約 1.2 倍高い。約 20%の日本人で TT 型が認められる[2]。TT 型の場合、上記ビタミンの欠乏は血中ホモシステイン濃度の顕著な増加につながる[3]。高 Hcy 血症が認知症発症と相関が有ることが疫学調査から明らかにされている[4]。Hcy による認知症発症の原因としていくつかの仮説が有る[1]。一つ目は Hcy によって動脈硬化が進行し、生じた血栓が剥離し脳血管に詰まることで生じる脳血管性認知症。ホモシステインは動脈硬化のリスクファクターでもあると指摘されている[5]。二つ目は Hcy による神経細胞傷害による認知症。Hcy はシナプスでグルタミンを受容する NMDA 受容体を恒常的に活性化し、神経細胞にストレスを与

えることが報告されている[1]。また、神経原線維変化の原因であるリン酸化 Tau 蛋白質の増加を引き起こすとされている[1]。このように Hcy が認知症の原因となることが指摘されているが、6 ヶ月間の飼育期間に中程度の高 Hcy 血症を誘導したマウスにおいて認知機能の低下は認められていない[6]。しかし、葉酸、vitamin B6、B12 欠乏高メチオニン食を 10 週間与えた高 Hcy 血症マウスでは認知障害が認められることが報告されている[7]。しかし、この実験では血中の葉酸、vitamin B6、B12 が明らかに欠乏状態にあり、認知障害の原因が高 Hcy 血症によるのか葉酸、vitamin B6、B12 欠乏によるのか明らかではない。本研究ではホモシステインチオラクトンを経口投与し、高 Hcy 血症を 6 ヶ月間以上持続させた場合の認知機能の変化を検証した。

鹿児島県の福山町で始まった壺造り米黒酢（黒酢）は疲労、高血圧、動脈硬化などに効果があるとされ古くから利用されている。近年、脂質代謝改善作用、血圧降下作用、血糖低下作用などのエビデンスが得られ、実際に様々な生体機能調節機能を持つことが明らかにされつつある。黒酢は高い抗酸化作用を有する。認知症を発症した脳では正常な脳に比べて高い酸化状態にあることが指摘されており[8]、ブドウ果皮に含まれる抗酸化作用を持つレスベラトロール摂食は認知障害を改善することが報告されている[9]。レスベラトロールの認知機能改善作用は抗酸化作用だけではなく、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）の発現誘導を介した認知機能改善作用であると示唆されている。黒酢もしくはもろみ末が認知機能を改善するかどうかの研究はこれまでに報告がないため、今回、老化促進マウス（Senescence-accelerated mice, SAM P8）に黒酢関連製品の摂食が効果を示すかを検証するため二つの動物実験を行った。① Hcy 投与による高 Hcy 血症が SAM P8 マウスの認知機能に影響を及ぼすか、またその場合にもろみ末摂食が認知機能を改善するかの検討。② 1 の実験の再現性の確認もかねて SAM P8 の認知機能改善にもろみ末もしくは黒酢摂食が効果を示すかの検討。

2. 材料と方法

2.1. SAM P8 マウスの認知機能に対する Hcy 投与およびもろみ末の効果

（1）黒酢もろみ末

黒酢もろみ末は、壺造り米黒酢の発酵残渣（黒酢もろみ）をろ過圧搾機で圧搾し、搾り液と搾り粕に分離後、その搾り粕を真空乾燥機にて 110□、6.5 時間乾燥させ、さらに 148□、0.2MPa、4～5 秒殺菌して得られた。

（2）動物飼育

5 週齢雄の老化促進マウス SAM P8（20 匹）と同系統で老化抵抗マウス SAM R1（5 匹）を日本 SLC から購入した。一週間の予備飼育後に群分けを行なうための予備水迷路試験を 5 日間行った。泳ぎに異常が認められる個体が集中しないように 5 つの群（各群 5 匹）に分けた。7 週齢から以下の実験食と Hcy 添加水（23.7mM ホモシステインチオラクトン水を作製して自由飲水、32mg/10g BW/day 相当）を各群に与えた。ホモシステインチオラクトンは生体に吸収後すみやかに Hcy に代謝される。1 群（R1 群）には CE2 食、2 群（P8 群）には CE2 粉末食、3 群（P8 もろみ群）には CE20.5%（w/w）もろみ末添加末食、4 群（P8Hcy 群）には CE2 食とホモシステイン添加水、5 群（P8Hcy もろみ群）には 0.5%（w/w）もろみ末添加末食と Hcy 添加水を与えた。CE2 食およびもろみ末添加末食の作製は日本クレアに委託した。摂食開始から 14 週間後（21 週齢）、16 週間後（23 週齢）に水迷路試験を行った。スケジュールを図 1 に示した。2 回の各水迷路試験でプラットホームを設置する場所は変

更した。マウスは 24 週齢時にエーテル麻酔下で心採血により全血を採取し安楽死させた。各群の 2 匹は左心室から 10%中性ホルマリン溶液で全身還流を行い、脳、肝臓、腎臓、肺、下行大動脈、睾丸、脾臓、心臓、下肢を摘出してホルマリンに浸し、冷蔵保存した。残りの 3 匹のマウスは採血後、脳、肝臓、腎臓、肺、下行大動脈、睾丸、脾臓、心臓、腎臓周辺脂肪、睾丸周辺脂肪を摘出し重量を測定した後、液体窒素で凍結した。採取した血液から血漿を分離した。血漿中ホモシステイン濃度と血漿中過酸化脂質（TBARS）測定（和光純薬）に、血漿中アラニントランスフェラーゼ（ALT）、血漿中アスパラギン酸トランスフェラーゼ（AST）の測定を行った。ALT、AST、TBARS の測定は採血量が充分であった各群 3 匹で行った。脳、肝臓および腎臓から組織ホモジネートを作製し、TBARS 濃度および蛋白質濃度を測定した。動物の飼育は気温 20□、12 時間光照射 (8:00~20:00、白熱蛍光灯) の環境下で行った。本実験は鹿児島大学動物実験委員会で承認された後（A10029 号）、動物の愛護及び管理に関する法律（動物愛護法）（平成 17 年 6 月 22 日公布, 平成 18 年 6 月 1 日施行、環境省）を遵守して行った。



Fig. 1. Animal experimental schedule. Homocysteine contained water and each experimental diet were fed from seven-week age, and it gave till euthanized.

（3）モリス水迷路試験

プール設置の模式図を図 2 に示す。直径 1.2m プールは部屋の角に設置し、衝立てを立ててプールの四方を覆う。ゴールとなる足場（プラットホーム）はプールを 4 分割した右上の領域に水面からは認知できないように沈める。プラットホームの反対側の左下プール脇に目印となるダンボールを置き、実験者はプール右下に座る。水温は 25□に温めた。プラットホームを沈めていない領域にマウスを投入し、プラットホームにたどり着く時間を測定する。一日に左上、左下、右下からのゴールまでの到着時間を 3 回測定する。4 日間を訓練期間とする。最終日にプラットホームを撤去した条件でマウスを 120 秒間泳がせた場合にプラットホーム沈めていた場所を通過する回数およびそのエリアの滞在時間を数値化して認知能力を判定する。

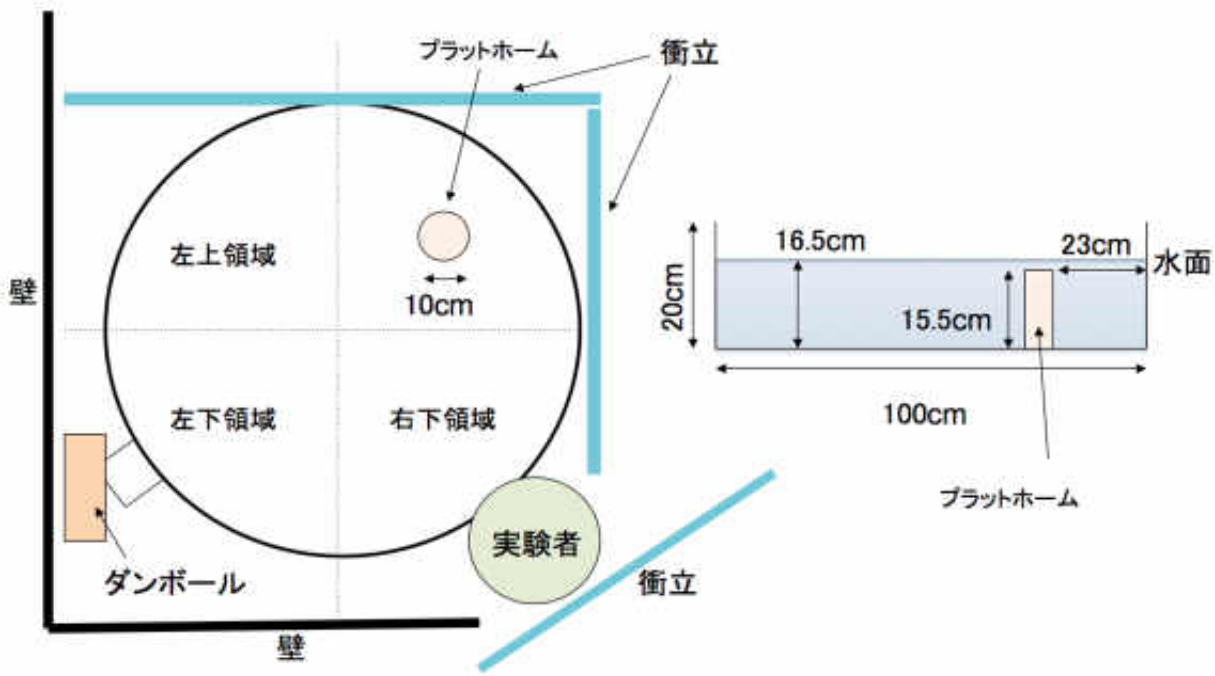


Fig. 2. The sketch of a pool. The pool was placed in the corner of the room. The Screen of two sheets were stood behind an experimenter so that the exterior might not go into a view. The platform is made of a transparent acrylic resin, and if it settles under the water surface, it cannot be recognized from the water surface. The left is a figure from the upper part and the right is a figure from the side. The dotted line shown with the left figure is shown in order to consider it as the mark of a domain, and there is no mark in the pool bottom in fact.

（4）ホモシステイン定量

血漿 45 µl に内部標準として 300 µM N-acetyl-L-cysteine 5 µl、還元剤として 100 mM の 2-carboxyethyl]phosphine 5 µl加え、4□で30分間反応した。反応後、10% (v/v) トリクロロ酢酸、1 mM EDTA をそれぞれ 25 µl ずつ加え、15490 g で 10 分間遠心した。上清 50 µl を別チューブに移し、1.55 M 水酸化ナトリウムを 10 µl、4 mM EDTA を添加した 125 mM ホウ酸緩衝液を 125 µl、4-fluoro-7-sulfobenzofurazan 5 µl を加えた後、60□で 60 分インキュベートした。この反応溶液を Ultra Fast Liquid Chromatograph (UFLC) Prominence（島津）に供した。移動相は 0.05 M リン酸カリウム緩衝液（pH. 1.9）-3%（v/v）acetonitrile を使用し、固定相には MERCK Chromolith® Column No.UM8125/004（メルク）を使用した。流量は 1 ml/min、励起波長は 385 nm、蛍光波長は 515 nm とした。検量線は各種濃度 (0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50、100、200µM) の DL-homocysteine 溶液を調製し、検出結果の DL-homocysteine のピークと N-acetyl-L-cysteine のピークとの面積比を縦軸、実際の DL-homocysteine thiolactone hydrochloride 濃度を横軸として作成した。

（5）統計解析

統計解析は SPSS バージョン 17 ソフトウェアを利用した。二群間の検定は Student's t-test、多重検定は one-way ANOVA Tukey 法で行なった。

2.2.　老化促進マウス認知障害に対するもろみ末および黒酢エキスの効果

（1）黒酢 10 倍濃縮液

黒酢（製品名：坂元のくろず）1000ml を凍結乾燥し粉末化する。これに蒸留水を加え、再び凍結乾燥を行う。この作業を 4 回繰り返し、黒酢中の酢酸を完全に除去する。得られた粉末を蒸留水 100ml に溶解したものを黒酢 10 倍濃縮液（黒酢エキス）とする。

（2）動物飼育

10 週齢雄の老化促進マウス SAM P8（27 匹）と同系統で老化抵抗マウス SAM R1（16 匹）を日本 SLC から購入した。一週間の予備飼育後に群分けを行なうための予備水迷路試験を 5 日間行った。泳ぎに異常が認められる個体が集中しないように三つの群に分けた。 R1 CE2 群は SAM R1（n=16）に CE2 食を、P8 CE2 群は SAM P8（n=9）に CE2 食を、P8 もろみ群は SAM P8（n=9）に 0.5% (w/w) もろみ添加 CE2 食を、P8 黒酢群は SAM P8（n=9）に 0.25% (w/w)黒酢エキス添加 CE2 食を与えた。マウスはケージに 1 匹ずつ飼育した。23 日間自由摂食自由飲水後に水迷路試験を 17 日間行った。水迷路試験を行っている期間も各実験食を与えた。実験終了後、心採血により全血を採取し安楽死させた。実験スケジュールを図 3 に示した。各群の 3 匹は左心室から 10%中性ホルマリン溶液で全身還流を行い、脳、肝臓、腎臓を摘出してホルマリンに浸し、冷蔵保存した。残りの 6 匹は採血後、脳、肝臓、腎臓、肺、睾丸、脾臓、心臓、腎臓周辺脂肪、睾丸周辺脂肪を摘出し重量を測定した後、液体窒素で凍結した。採取した血液から血漿と血清を分離した。血漿は過酸化脂質（TBARS）測定（和光純薬）に、血清は ALT、AST 測定（クリニカルパソロジーに委託）に用いた。凍結脳組織ホモジネートを作製して組織中の過酸化脂質（TBARS）および蛋白質濃度を測定した。動物の飼育は気温 20□、12 時間光照射 (8:00～20:00、白熱蛍光灯) の環境下で行った。本実験は鹿児島大学動物実験委員会で承認された後（A10030 号）、動物の愛護及び管理に関する法律（動物愛護法）（平成 17 年 6 月 22 日公布, 平成 18 年 6 月 1 日施行、環境省）を遵守して行った。



Fig. 3. Animal experimental schedule. Homocysteine contained water and each experimental diet were fed from twelve-week age, and it gave till euthanized.

（3）モリス水迷路試験

方法は前述の通りである。11 日間を訓練期間とし、最終日にプラットホームを撤去した条件でマウスを泳がせた場合にプラットホーム沈めていた場所を通過する回数およびそのエリアの滞在時間を数値化した。

（4）アミロイドオリゴマーの検出

ホルマリン固定組織をパラフィン包埋し、4μmの薄切り切片を作製した。脱パラフィン後、ProteoStat® Amyloid Plaque Detection Kit（Enzo, Plymouth Meeting, PA）を利用してアミロイドオリゴマーを染色した。方法は添付の説明書に従った。細胞核の像を得るためにDNAをDAPI染色した。レーザー共焦点顕微鏡で撮影後、海馬CA1、CA3、DG領域の蛍光強度をImage J software（NIH, Bethesda, MD）で数値化し、グラフに表した。

（5）統計解析

統計解析はSPSSバージョン17ソフトウェアを利用した。二群間の検定はStudent's t-test、多重検定はone-way ANOVA Tukey法で行なった。$P<0.05$を有意差有りとした。

3. 結果

3.1. SAM P8の認知機能におよぼすホモシステインおよびもろみ末摂食の影響

（1）Hcyおよびもろみ末を摂取後の体重、組織重量、各種生化学検査

表1に実験開始時から屠殺時までの体重の変化を示した。R1群に比べP8群は体重増加量、摂食効率が低かった。P8もろみ群はP8群に比べて摂食量が増え、体重増加量および摂食効率がR1群と同程度であった。P8Hcy群で体重増加量および摂食効率の低下が認められたが、P8Hcyもろみ群とP8群は同程度であった。表2に屠殺時の体重あたりの臓器重量を示した。P8群およびP8Hcy群は体重が軽いため各組織重量値が大きくなっている。睾丸周辺および腎臓周辺脂肪値がP8Hcy群で小さかった。ASTおよびALT値はP8Hcy群で有意差はないが高い傾向が認められた（表3）。P8Hcyもろみ群はP8Hcy群と比べて低い値であった。

Table 1. Effects of Moromi and/or Hcy Feeding on Body weight

	Body weight (g)				
	6wk	24 wk	gain	Food consumption (g/day)	Food efficiency (gain/intake)
R1	26.9±1.7	35.1±3.4	8.2±3.4	4.8±0.40	1.3±0.53
P8	25.8±1.4	32.2±3.4	6.4±2.2	4.8±0.40	1.1±0.32
P8 もろみ	26.3±0.8	33.8±2.3	7.5±1.4	5.2±0.37	1.3±0.27
P8Hcy	25.3±2.8	30.2±3.4	4.9±1.5	5.0±0.31	0.7±0.27
P8Hcy もろみ	25.6±1.0	32.1±4.1	6.5±3.3	4.9±0.49	1.0±0.48

mean±SD（n=5）

Table 2. Each Organ Weight (mg) per g of Body Weight.

	脳	肝臓	肺	心臓	脾臓
R1	13.0±1.3	52.0±0.3	5.2±0.6[a]	4.5±0.1	2.3±0.6
P8	13.8±1.2	61.2±1.4	5.9±0.1[ab]	5.2±0.5	3.0±0.8
P8 もろみ	13.1±1.1	63.6±5.0	5.4±0.2[a]	7.5±5.2	2.7±0.3
P8Hcy	14.7±1.6	59.3±3.1	6.8±0.6[b]	5.9±0.3	3.0±0.2
P8Hcy もろみ	14.1±1.5	60.4±2.0	6.4±0.3[b]	5.5±0.5	2.0±1.3

	睾丸	腎臓	睾丸周辺脂肪	腎周辺脂肪
R1	3.8±0.0[a]	15.2±4.0[a]	19.0±3.5	6.0±0.7
P8	5.9±0.4[b]	20.1±0.8[b]	15.6±8.4	8.6±3.0[a]
P8 もろみ	5.6±0.5[b]	17.6±1.4[ab]	20.0±7.3	6.7±3.3
P8Hcy	6.0±0.9[b]	21.1±0.9[ab]	7.5±3.6	2.4±1.4[a]
P8Hcy もろみ	5.7±0.7[b]	19.9±0.7[ab]	12.6±9.6	6.4±3.5

mean±SD (n=3). It is shown that a significant difference is between different characters ($p<0.05$).

Table 3. ALT and AST Value at the Time of the Euthanasia after Taking in Hcy and/or Moromi.

	ALT	AST
	(unit)	
R1	362±62	39.7±76.0
P8	362±149	50.3±15.9
P8 もろみ	271±34	42.3±5.8
P8Hcy	995±1050	309.0±446.9
P8Hcy もろみ	581±372	99.7±40.7

mean±SD（n=3）

2）血漿ホモシステイン濃度変化

飼育期間中の Hcy 濃度変化を表 4 に示した。採血は 8、16 および 24 週齢で行った。実験食およびホモシステイン投与からそれぞれ 1 週間（8wk）、9 週間（16wk）、17 週間（24wk）が経過している。Hcy を投与していない群では最大で 5.1 μM であった。Hcy 投与群では 8 週齢以降、ヒトで高 Hcy 血症とされる 15 μM よりも高値を示した。P8Hcy 群と P8Hcy もろみ群の間に差は認められなかった。

Table 4. Hcy concentration in each period.

	Plasma Hcy (μM)		
	8wk	16wk	24wk
R1	1.6±0.4[a]	2.9±0.2[a]	3.0±0.4[a]
P8	2.0±0.5[a]	5.1±1.9[a]	3.2±0.6[a]
P8 もろみ	1.5±0.4[a]	4.1±0.8[a]	3.2±1.1[a]
P8Hcy	23.6±3.9[b]	74.7±31.0[b]	34.8±10.9[b]
P8Hcy もろみ	18.1±7.9[b]	77.9±21.9[b]	37.0±18.7[b]

mean±SD(n=5). The test of significance was performed between the groups of each week-old.
It is shown that a significant difference is between different characters ($p<0.05$).

（3）過酸化脂質濃度

血清および各組織中酸化状態の検討は脂質の過酸化によって生じるチオバルビツール酸と反応するマロンジアルデヒド（MDA）等を指標とした（表 5）。血漿、肝臓および腎臓において TBARS 値に顕著な差は認められなかったが、脳では P8 もろみ群および P8Hcy もろみ群で高い傾向が会った。

Table 5. The lipid peroxidation level of each organ.

	TBARS 値			
	血漿	肝臓	腎臓	脳
	μM	（μM/mg of protein）		
R1 (n=3)	38.3±11.7	0.75±0.12	0.83±0.13	0.61±0.12[abc]
P8 (n=3)	43.3±13.1	0.72±0.08	0.89±0.14	0.40±0.05[ac]
P8 もろみ (n=3)	37.5±8.1	0.69±0.16	1.02±0.05	0.83±0.13[bde]
P8Hcy (n=3)	40.0±16.7	0.66±0.12	1.13±0.12	0.59±0.13[d]
P8Hcy もろみ (n=3)	41.0±8.3	0.58±0.06	0.99±0.14	1.08±0.12[ce]

It is shown that a significant difference is between different characters ($p<0.05$).

（4）水迷路試験

摂食開始から 14 週間後（21 週齢）から水迷路試験を開始した。10 日間のトレーニング期間において、各群間でゴールへの到達時間に差は認められなかった。11 日目にゴールとなるプラットホームを撤去し、プローブテストを行った。図 4 左はプラットホームを設置していた領域に滞在した時間（滞在時間）、図 4 右はプラットホームを設置していた上を通過した回数（通過回数）をグラフ化した（平均値+SD）。P8 群は R1 群に比べて滞在時間および通過回数の値が低かった。P8 もろみ群は R1 群と同程度の滞在時間および通過回数であった。一方、P8Hcy 群は P8 群と、P8Hcy もろみ群は P8 もろみ群とほぼ同程度の値であった。水泳スピードに各群間で顕著な差はなかった。

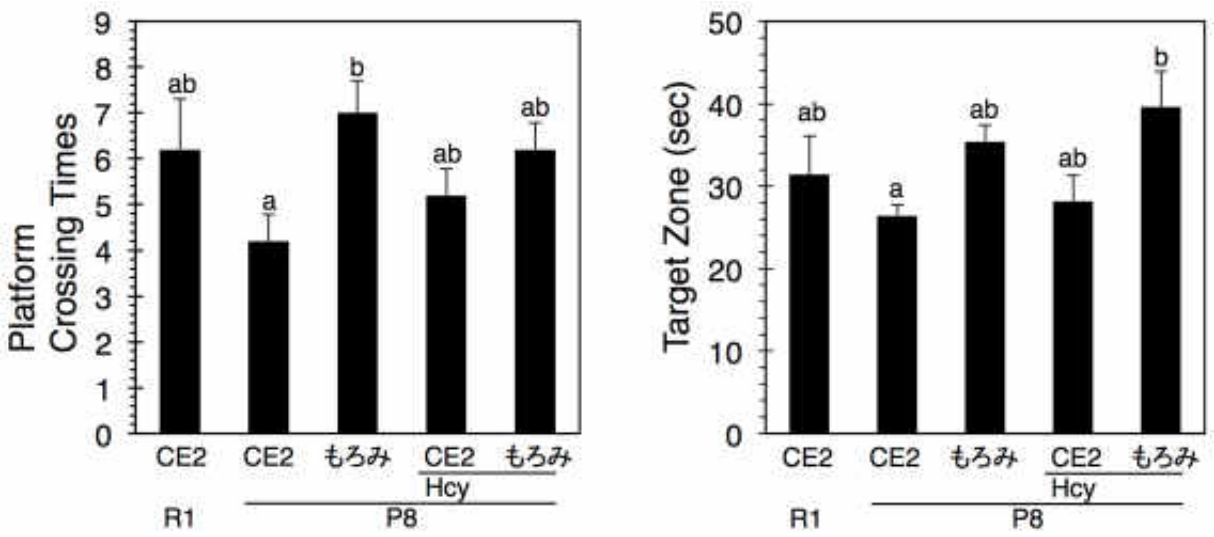


Fig. 4. Water maze test at the end of the experiment (23 week-old). The water maze examination was carried out on each mouse 3 times for ten days. The probe test was carried out on the 11th day. Left, target zone staying time. Right, platfome Crossing Times. mean+SD (n=5). It is shown that a significant difference were between different characters. ($p<0.05$)

3.2. SAM P8 の認知機能におよぼす黒酢エキスおよびもろみ末摂食の影響

（1）体重、組織重量、ALT および AST 値

表 6 に実験開始時と屠殺時の体重を示した 11 週齢の SAM R1 マウスと SAM P8 マウスの体重を比べると SAM P8 マウスの体重が有意に軽かった。屠殺時 18wk の体重もまた 11wk と同様に有意な差が認められたが、P8 群、P8 もろみ群、P8 黒酢群の間に有意な差は認められなかった。体重増加量にも有意差は認められなかったが P8 もろみ群は他の群と比べて高値であった。表 5 に屠殺時の体重あたりの臓器重量を示した。R1 マウスに比べて P8 マウスの体重が軽いため各組織の体重あたりの臓器重量は R1 マウスに対して P8 マウスの各群で値が大きくなっている。しかし、睾丸周辺および腎臓周辺脂肪重量値は R1 マウスに比べて P8 マウスで小さい。表 8 に屠殺時の ALT、AST 値を示した。各群間の各値に有意な差は認められなかった。

Table 6. The Body Weight Change after Taking in Moromi or Kurozu.

	Body weight (g)		
	11 wk	18 wk	Gain
R1 (n=16)	32.2±1.9[a]	34.0±2.1[a]	1.8±1.1
P8 (n=9)	27.9±2.1[b]	29.9±2.1[b]	2.0±0.9
P8 もろみ (n=9)	26.8±1.5[b]	29.4±2.0[b]	2.5±1.1
P8 黒酢 (n=9)	28.4±1.5[b]	30.1±1.7[b]	1.7±1.1

mean±SD. It is shown that a significant difference is between different characters ($p<0.05$).

Table 7. Each Organ Weight (mg) per g of Body Weight.

	脳	肝臓	肺	心臓
R1 CE2(n=13)	13.3±0.5	50.0±2.8[a]	6.1±1.2	6.1±1.2
P8 CE2(n=6)	14.8±1.0	56.1±3.5[b]	6.3±1.7	6.3±1.1
P8 もろみ(n=6)	14.8±0.6	56.7±7.0[ab]	6.7±1.3	6.7±1.3
P8 黒酢(n=6)	14.8±0.9	55.4±6.5[ab]	6.5±0.8	6.5±0.8

	睾丸	腎臓	睾丸周辺脂肪	腎周辺脂肪
R1 CE2 (n=13)	4.0±0.5[a]	14.0±1.9	25.0±5.4[a]	13.6±6.3
P8 CE2 (n=6)	6.3±0.6[b]	16.3±1.7	16.2±5.6[b]	7.6±5.5
P8 もろみ (n=6)	6.7±0.9[b]	16.5±2.6	9.2±6.3[b]	7.1±4.7
P8 黒酢 (n=6)	6.2±0.6[b]	16.4±1.7	14.8±4.2[b]	7.6±3.0

It is shown that a significant difference is between different characters ($p<0.05$).

Table 8. ALT and AST Value at the Time of the Euthanasia after Taking in Moromi or Kurozu.

	ALT	AST
R1 CE2 (n=16)	34.7±28.8	220±186
P8 CE2 (n=9)	48.2±52.6	216±173
P8 もろみ (n=9)	49.8±17.7	301±199
P8 黒酢 (n=9)	34.3±17.0	192±177

mean±SD

(5) 血漿過酸化脂質濃度

実験終了時の血漿中過酸化脂質濃度を表 9 に示した。各群間に有意な差は認められなかったが、R1 マウスに比べて P8 マウスで低い傾向があり、P8 黒酢では顕著に低値であった。と P8 群の間に有意な差は認められなかった。

Table 9. Lipid peroxidation level of plasma or brain.

	TBARS 値	
	血漿 (μM)	脳 (μM/mg of protein)
R1 (n=16)	35.2±7.7	0.90±0.23
P8 (n=9)	28.6±13.3	0.81±0.08
P8 もろみ (n=9)	23.2±8.7	0.83±0.06
P8 黒酢 (n=9)	14.5±4.0	0.73±0.07

mean±SD

（3）水迷路試験

摂食開始 23 日後から開始した水迷路訓練期間の結果を図 5 に示した。P8 群に比べて P8 もろみ群および P8 黒酢群はゴール到着時間が早い傾向があり、トレーニング開始 12 日以降に有意な差が認められる場合があった。P8 群と R1 群の間に有意な差は認められなかったが、R1 群で早い傾向が認められた。

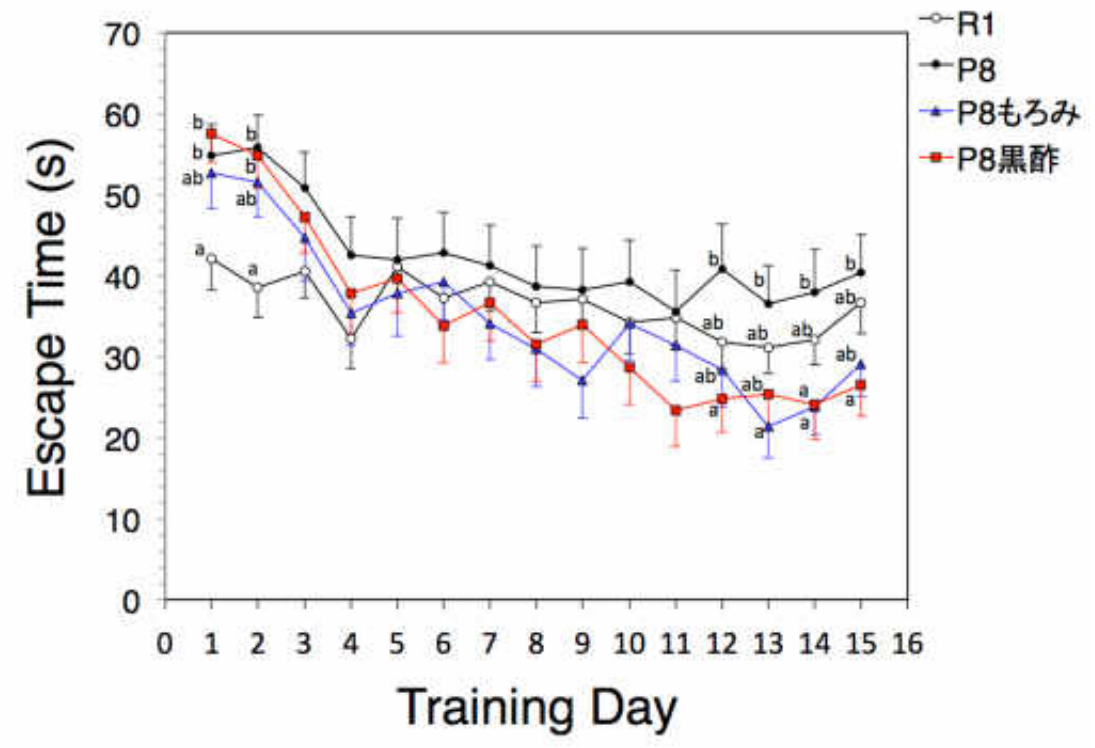


Fig. 5. The result of the water maze test. After releasing the mouse into water, the escape time to the platform used as the goal was measured. The water maze examination was carried out on each mouse 3 times for 16 days. The average value within a group was shown in the graph. It is shown that a significant difference is between different characters in each day ($p<0.05$).

図 6 に 16 日目に行ったプローブテストの結果を示した。各群間で統計的に有意な差は認められなかった。プラットホームがある領域に滞在する時間、プラットホーム上を通過した回数はいずれも R1 群に比べて P8 群で低い傾向であった。P8 もろみ群および P8 黒酢群は P8 群に比べて高値な傾向があった。

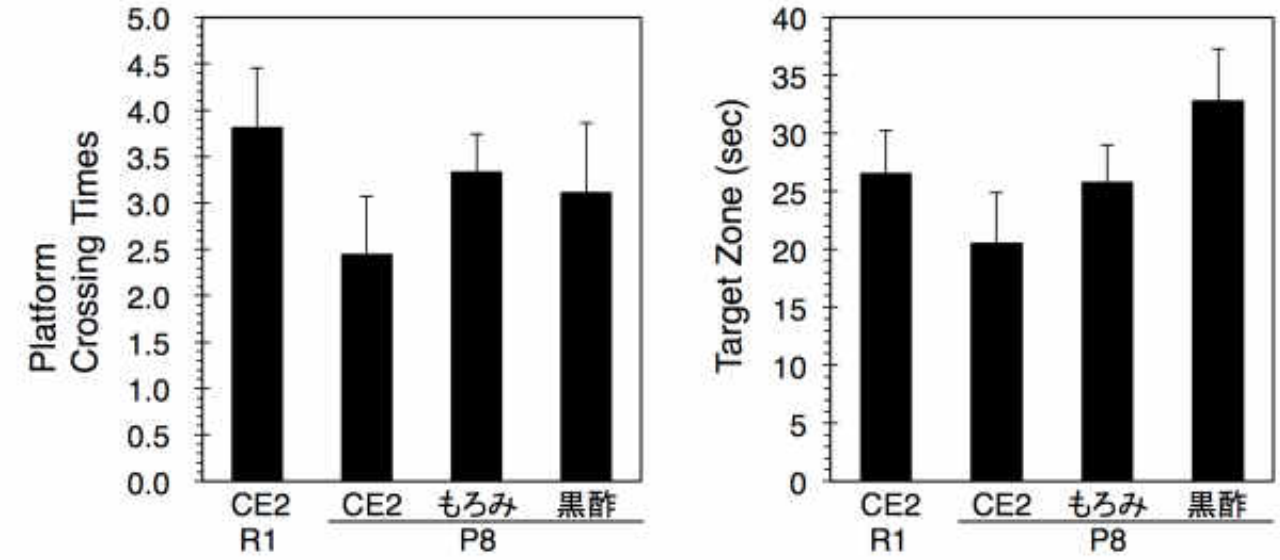


Fig. 6. Result of probe test. The probe test was carried out on the 16th day after training. This test was carried out on the none of the platform for 120 seconds. Time to stay at the upper right region in which the platform was settled, and the number of times of crossing the place where the platform had been settled is measured. mean±SD

図 7 に海馬領域 CA1 および CA3 領域に蓄積したアミロイド蛋白質量を数値化しグラフにした。ここで示すアミロイドはアミロイドβだけを指すのではなく、水に難容性の繊維状蛋白質を検出している。各群間に有意差は認められないが、R1 に比べて P8 で高い傾向があり、CA3 領域ではもろみ末、特に黒酢エキス摂取によって R1 群と同程度であった。アミロイドβ1-40 および 1-42、リン酸化 Tau の免疫組織化学的検討を行ったが、染色像に各群間で差は認められなかった。また、アポトーシスの指標となる TUNEL 染色による DNA 断片化細胞の検出を行ったが、これも全ての群間で差は認められなかった。

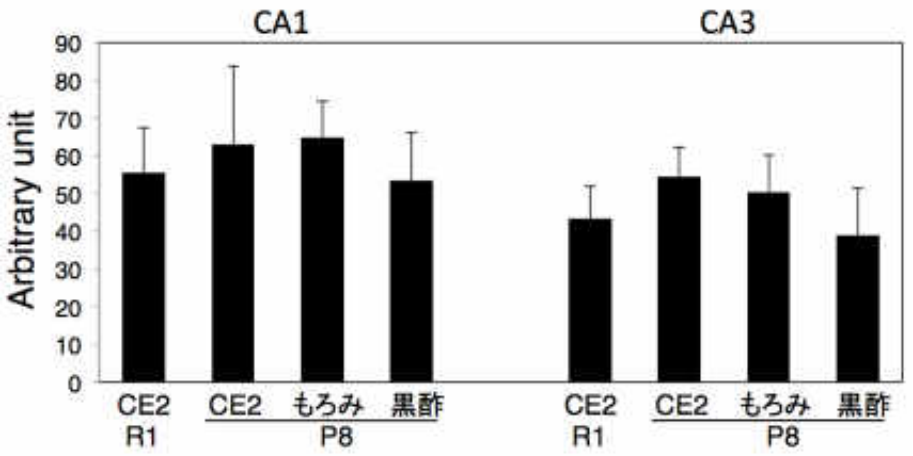


Fig. 7. Semi-quantitative Detection of Amyloid Plaque in a Hippocampus CA region. Hippocampus CA region tissue section was prepared, and of the amyloid plaque was detected by ProteoStat® Amyloid Plaque Detection Kit. The fluorescent image was captured using a confocal laser scanning microscope. The fluorescence intensity of CA1 or CA3 domain was evaluated by image J software and the results were shown in the graph. mean±SD (n=3)

4. 考察

老化促進マウスを用いて、壺造り米黒酢関連製品の認知能力改善作用を検討した。一つ目の実験ではHcy投与によって認知能力が憎悪するかも同時に検討した。本実験において血中Hcy濃度はヒトで高Hcy血漿と判断される基準である15μM以上であったが、14週間の投与認知能力に影響は認められなかった。Hcy投与によってALTおよびAST値の上昇や脂肪重量の減少が認められており、肝機能障害が現れている可能性がある。もろみ末摂食によってHcyによるALTおよびAST値が改善された。Hcyの細胞傷害性の原因のひとつにHcyの自己酸化により生じる活性酸素種の産生がある。しかし、本実験においては血漿、肝臓、腎臓、脳組織において過酸化の亢進は認められなかった。Hcyは再メチル化によりメチオニンに、硫黄基転移によりシスタチオニンに変換される。これら代謝物の蓄積による代謝異常が原因となって肝障害が起こっている可能性や、高Hcy値はメチル基供与反応のメチル基ドナーとして重要なS-アデノシルメチオニン値を低下させることが知られており、メチル基転移異常による肝機能障害が起こっている可能性が考えられるが詳細は不明である。同時に行った別の実験においてC57/BLマウスにHcyを10ヶ月間投与した場合、投与開始から5ヶ月目で認知能力の低下が認められ、Hcyによる認知能力低下には長期間のHcy投与が必要であることが示唆された（未発表）。

16週間もろみ末を投与した23週齢SAM P8マウスの認知能力をプローブテストで評価した結果、P8マウスで低下した認知機能がもろみ末摂食により、正常コントロールとなるR1マウスと同程度となった。もろみ末摂食が認知機能の維持に効果を持つ可能性を示している。本実験では5週齢マウスを購入して認知機能の評価を行ったが、記憶トレーニング期間中にSAM R1マウスとSAM P8マウスの認知能力に期待した差が認められなかった。そのため、当初4週間の摂食期間の予定を16週間まで延長することとなった。本実験の再現性ならびに黒酢エキスの効果を検証するため、次の実験では10週齢SAMマウスを用いた。

新規に購入した10週齢SAM P8マウスに約一ヶ月間のもろみ末もしくは黒酢エキスを投与した。水迷路試験による認知能力を検討した結果、トレーニング期間中、もろみ末、黒酢エキスを投与したマウスは投与していないSAM P8マウスに比べてゴールへの到達時間が早くなった。トレーニング開始から12日目以降は有意差が認められた。プローブテストによる評価においても、もろみ末、黒酢エキス摂食によってSAM P8マウスの認知能力が改善される傾向があった。もろみ末は0.5%（w/w）を添加した食餌を与えた結果である。マウスが一日5g摂食したとすると体重（35g）あたりの摂取量は約0.71 g/kg BW/dayで、これを体重60kgのヒトが摂取する量に換算すると一日に43gのもろみ末に相当する。黒酢エキスは0.25%（w/w）を添加した食餌を与えた結果である。マウスが一日5g摂食したとすると体重（35g）あたりの摂取量は約0.36 g/kg BW/dayで、これを体重60kgのヒトが摂取する量に換算すると一日に21gのもろみ末もしくは黒酢エキスに相当する。黒酢エキスは10倍濃縮液であるため出発材料の壺造り米黒酢原液では214gとなる。今回の実験で使用した、もろみ末黒酢ともに非常に高用量であるため、より低用量で効果が認められるかどうかの検討が必要である。

SAM P8マウスの長期飼育においてアミロイドβの蓄積[10]、アセチルコリンエステラーゼの活性化が認められている[11]。アセチルコリンエステラーゼが認知症患者では高くなっており、現在使用される認知症の唯一の薬剤が抗アセチルコリンエステラーゼ剤である。今回二つの摂食実験によって、

もろみ末の経口摂取によってSAM P8マウスの認知能力が維持される可能性を示した。また黒酢エキスの摂食も同等の効果を持つことが期待されるが、再現性の検討が求められる。SAM P8 マウスにおいて認知症進行の鍵となる原因はよくわかっていない。そのため、もろみ末や黒酢エキスがどのようなメカニズムで作用しているかは不明である。認知症の原因として酸化状態の亢進が報告されているが、本実験ではもろみ末、黒酢エキスいずれも脳内の酸化を亢進させた結果が得られており、抗酸化作用ではないと推測される。海馬CA1およびCA3領域アミロイド線維の蓄積がP8マウスで認められた。もろみ末および黒酢の摂取によってCA3領域のアミロイド線維の蓄積が減少し、特に黒酢の効果が強かった。老人斑の原因であるアミロイドβペプチドの凝集や神経原線維変化の原因であるリン酸化タウ蛋白質の凝集を組織切片上で検出を試みたが、R1マウスとP8マウスで差が認められなかった。今回屠殺時、17週齢（4ヶ月齢）である。この週齢は水迷路での認知機能障害の差が確認され始める時期である。10ヶ月齢になればアミロイド斑が免疫組織化学的検討で検出されるが、17週齢では免疫組織化学的な検出が困難であることがわかった。脳組織ホモジネートを用いたウェスタンブロッティングで今後検討する。今回、高齢なマウスを用いなかった理由は認知症発症前段階から発症初期において、進行を予防可能であるかを検証するためであった。週齢が更に進んだマウスを用いて検討することも今後必要であるかもしれない。

5. 結論

SAM P8マウスを用いた認知症試験を行った。3ヶ月程のHcy投与はSAM P8マウスの認知能力に影響を及ぼさないことが明らかになった。0.5%（w/w）もろみ末を添加した食餌はSAM P8マウスの認知能力低下を予防する作用を持つことが、二回の摂食実験から示唆された。0.25%（w/w）黒酢エキス添加食ももろみ末添加食と同等の効果が認められた。SAM P8 マウスでは海馬領域のアミロイド線維の蓄積がSAM R1マウスよりも進んでいたが、もろみ末および黒酢エキスはアミロイド線維の蓄積を予防した。脳内酸化状態は通常値と変化がないため、もろみ末や黒酢エキスによる認知機能改善効果は抗酸化能以外の作用によると推測される。鹿児島県で生産される食品素材から認知症予防因子の探索が目的であり、今後、もろみ末や黒酢エキスから予防因子の同定を試みたい。

6. 引用文献

1. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett. 2006. 580(13):2994-3005.
2. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Shindo T, Minamino T, Ohno M, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. Circulation. 1997. 95(8):2032-2036.
3. de Bree A, Verschuren WM, Bjørke-Monsen AL, van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJ, Blom HJ. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. Am J Clin Nutr. 2003. 77(3):687-693.
4. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2002. 346(7):476-483.
5. Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a

systematic review and meta-analysis. Mayo Clin Proc. 2008. 83(11):1203-1212.
6. Bernardo A, McCord M, Troen AM, Allison JD, McDonald MP. Impaired spatial memory in APP-overexpressing mice on a homocysteinemia-inducing diet. Neurobiol Aging. 2007. 28(8):1195-1205.
7. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH.B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Aug 26;105(34):12474-12479.
8. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991. 88(23):10540-10543.
9. Harada N, Zhao J, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K. Resveratrol improves cognitive function in mice by increasing production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. J Nutr Biochem. 2011 in press.
10. Banks WA, Robinson SM, Verma S, Morley JE. Efflux of human and mouse amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 from brain: impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience. 2003. 121(2):487-492.
11. Wang F, Chen H, Sun X. Age-related spatial cognitive impairment is correlated with a decrease in ChAT in the cerebral cortex, hippocampus and forebrain of SAMP8 mice. Neurosci Lett. 2009. 454(3):212-217.

The search for anti-dementia factor form foods produced in Kagoshima prefecture

Hiroaki Kanouchi

Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24, Korimoto, Kagoshima-city, Japan
Tel/Fax +81-99-285-8716; E-mail, kano@agri.kagoshima-u.ac.jp

There have not been developed any clinical treatments of dementia yet. It has been thought that the prevention of dementia is important. We investigated the anti-dementia effect of oral consumptions of Korozu related products, Kurozu extract and Moromi, using senescence accelerated mice (SAM P8). In the first experiment, we fed SAM P8 mice on 0.5% Moromi containing diet to and compared the cognitive function using water maze test among control mice, SAM P8 mice, and Moromi fed SAM P8 mice. SAM P8 mice showed cognitive dysfunction, and the cognitive function was improved in Moromi fed SAM P8 mice. It has been suggested that homocysteine (Hcy) is a risk factor of Alzheimer's disease. We prepared hyperhomocysteinemia mice (over 15 μM of plasma Hcy) by oral feeding of homocysteine containing water for 24 weeks. However, the cognitive dysfunction of these mice was not different from normal mice. In the second experiment, we fed SAM P8 mice on 0.5% Moromi or 0.25% Kurozu extracts containing diets. The effect of Moromi on cognitive function was reconfirmed, and Kurozu extracts also showed suppressing effect of the cognitive dysfunction in SAM P8 mice. An accumulation of amyloid proteins at hippocampus CA3 region was recognized in SAM P8 mice compared to control mice. The accumulation in SAM P8 mice was decreased in Kurozu extract group. These experiments suggest that Moromi or Kurozu extracts containing diet are good for the prevention of cognitive dysfunction.

カンキツ白かび病菌由来ポリガラクツロナーゼのキメラタンパク質作出による病原性決定構造の解明

中村　正幸・鶴屋　健太・松本　宜大・岩井　久

鹿児島大学農学部生物生産学科植物病理学研究室
〒890-0065 鹿児島市郡元１−２１−２４
TEL:099-285-8683

要旨

本研究では、白かび病菌(*Geotrichum candidum*)の病原性因子であるポリガラクツロナーゼ(PG)について、キメラタンパク質を構築し、病原性を決定している構造領域の解明を行った。病原性株 S31 由来 S31PG1 の PG 触媒部位を含む領域を非病原性株 S63 由来 S63PG1 の同領域と入れ替えたキメラ PG を作出した。その結果、キメラ PG は、S31PG1 同様、病原性を左右しているプロトペクチナーゼ(PP)活性を示し、レモン果皮のアルベドを分解する能力も持っていた。そこで、組換え領域の二次構造を比較したところ、触媒部位の上部(N 末端側)のサブサイト構造に違いが見られ、S31PG1 には存在しない α-ヘリックス構造が、S63PG1 に存在していた。以上のことより、PG のサブサイト構造に PP 活性を決定している領域があることが示唆された。

1. 緒言

白かび病菌(*Geotrichum candidum* LinK ex Pers.)は、土壌、乳製品、動植物遺体上に一般的に存在し、汚水の指標菌にも利用され[19]、主に腐生生活を営むが、ときに植物のみでなくヒトや動物にも病原性を示す酵母様糸状菌である[6,7,8]。

白かび病菌には、カンキツ果実に病原性を示す病原性株と示さない非病原性株が存在する(Butler, 1965)。病原性株による白かび症状は、水浸状の軟腐症状を示し、病斑進展が極めて早い。一般的に軟腐症状は、病原菌の産出する細胞壁分解酵素 (クチナーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、キシラナーゼなど) による植物細胞壁の分解によることが考えられている[2,3,5]。本菌もまた、ペクチン分解酵素の一種であるポリガラクツロナーゼ(PG; poly (1, 4-D-galacturonide) glycanohydrolase, E.C.3.2.1.15)を分泌し、これまでに、病原性株 S31 および非病原性株 S63 より、それぞれの PG 遺伝子(*S31pg1*、*S63pg1*)がクローニングされ、分裂酵母を用いた PG の発現系により、病原性と非病原性を左右しているのは、PG の持つプロトペクチナーゼ(PP)活性の有無(S31PG1 活性有り、S63PG1 活性無し)によるものであることが明らかとなっている[16]。

PG 活性と PP 活性の働きは、同じ触媒部位で行われ、PG 活性は、ポリガラクツロン酸を基質にし、PP 活性は、不溶性であるプロトペクチンが基質である。プロトペクチンは、植物組織内に存在している重合度が高く、他の多糖類やタンパク質などと結合し、複雑な構造をとっている。しかし、PG の触媒部位い結合するのは、プロトペクチン内に存在するポリガラクツロン酸である。つまり、

PG により、PP 活性が異なるのは、プロトペクチン内にあるポリガラクツロン酸に結合できるかどうかが鍵であり、その結合能は、PG の触媒部位の周りにあるサブサイト構造が影響しているではないかと予想される。そこで、本研究では、S31PG と S63PG1 を用い、サブサイト構造を入れ替えたキメラ PG を作出し、サブサイト構造が PP 活性に関わっているかどうかを調査した。

2. 材料と方法

2.1 菌株、培養およびプラスミド

PG 発現には、分裂酵母である SP-Q01 *Schizosaccharomyces pombe* (*leu1*-32 *h*¯) (Stratagene) を用いた。培地には、YPAD 液体および寒天培地(ペプトン 20g、酵母抽出物 10g、デクストロース 20g、硫酸アデニン 40mg、水 1l、寒天 15g) 50ml を用い、30℃で培養した。プラスミド増幅には、*Epicurian coli* XL1-Blue を用い、LB 液体および寒天培地(NaCl 10g、トリプトン 10g、酵母抽出物 5g、寒天 20g、水 1,000ml)にて、37℃で培養した。PG 発現用プラスミドには、pAUR224(Takara)を用いた。

2.2 キメラ PG 発現ベクターの構築

S31pg1 の触媒部位を含むサブサイト領域をプライマーS63-31-Fu-F01、S63-31-Fu-R01(Table 1)を用い、S31pg1 を含む pBlue-S31pg1[16]を鋳型に、PCR を行った。増幅産物は、pT7Blue にクローニング後、*Kpn*I 処理を行い、切断断片をライゲーションに用いた。

次に、*S63pg1* 内部にもう 1 つの *Kpn*I サイトを導入するために、pAUR-S31pg1Sig-S63pg1[16]を鋳型に、プライマーS31pg1-Exp-F、S63pg1-Exp-R、S63pg1-Kpn1-B、S63pg1-Kpn1-C(Table1)を用い、*in vitro* mutagenesis PCR を行った。

*Kpn*I サイトを導入した *S63pg1* を *Kpn*I 処理し、触媒部位とサブサイト領域を取り除き、同酵素で処理した S31pg1 由来断片を In Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech)を用い連結した(pAUR-Chi-PG1)。大まかな流れは、Fig. 1 に示した。

Table 1 Primers used in this study

Primers	Nucleotide sequences
S63-31-Fu-F01	5’-ACTGTTATCTTTGACGGTACCACCACTTTTGGT-3’
S63-31-Fu-R01	5’-GAGGAGGTAGTAGTTGGTACCAGAGCTCTTAAC-3’
S31pg1-Exp-F	5’-CCGCTCGAGATGCTTTTCTCTAAAT-3’
S63pg1-Kpn1-B	5’-GTAGTAGTTGGTACCCTTAGCAAGAACG-3’
S63pg1-Kpn1-C	5’-GGGTACCAACTACTACCTCCTCTGTGG-3’
S63pg1-Exp-R	5’-CGCGGATCCCTAGTTCTTGCAAGTA-3’

2.3 酵素活性の測定

PG 活性は、Milner と Avigad の方法[15]に従って行い、PG 活性の 1unit は、1 時間に D-ガラクツロン酸 1μmol に相当する還元糖を遊離する活性量と定義した。

PP 活性は、カルバゾール・硫酸法[4] により、レモン由来のプロトペクチンより遊離した可溶性

ペクチン量を測定した。プロトペクチンは、レモン果皮から削り取ったアルベド組織を、2%ヘキサメタりん酸ナトリウム溶液で、可溶性ペクチンを洗い流し、カルバゾール・硫酸で反応しうる可溶性ペクチンを全て取り除いて得た。PP 活性の 1unit は、1 時間に 1μmol D-ガラクツロン酸に相当する可溶性ペクチンを遊離する活性量と定義した。

2.4 立体構造解析

Swiss-Model [12, 17, 18] を利用し、ホモロジーモデリング法により、PG の立体構造を予測した。二次構造の比較には、Dali pairwise comparison[13]を用いて行った。

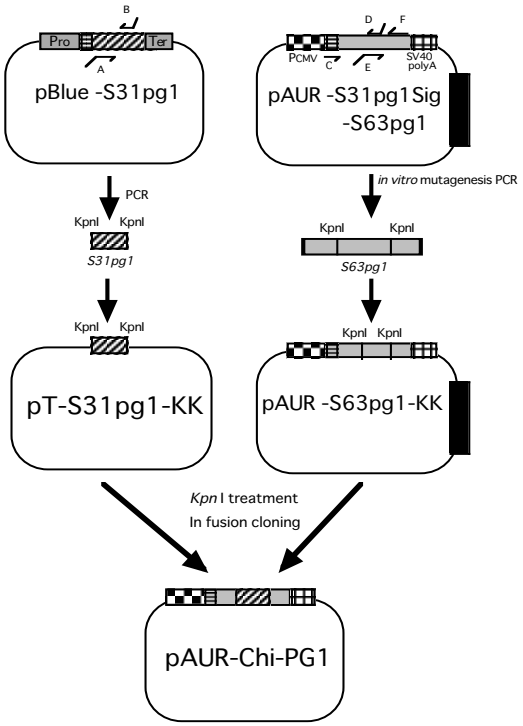


Fig. 1 Construction of chimera polygalacturonase expression vector. Primers are A: S63-31-Fu-F01, B: S63-31-Fu-R01, C: S31pg1-Exp-F, D: S63pg1-Kpn1-B, E: S63pg1-Kpn1-C, F: S63pg1-Exp-R.

3. 結果と考察

3.1 キメラ PG の PG 活性

構築したキメラ PG 発現ベクターpAUR-Chi-PG1 を *S. pombe* に導入し、PG 活性測定の簡易検定法である cup-plate assay 法 [11]により発現株をスクリーニングした。株により、活性の程度が異なったため、最も高い PG 活性を示す株を選抜した(データは示していない)。

S31PG1、S63PG1 およびキメラ PG の PG 活性を Milner と Avigad の方法 [15]で測定した結果、いずの PG もそれぞれ、0.5 unit/ml、1.0 unit/ml、0.1 unit/ml の PG 活性を示し、キメラ PG も、活性のある状態で発現していた(Table 2)。しかし、キメラ PG の活性 unit が、S31PG1 や S63PG1 と比べ低かったことから、おそらく、タンパク質の発現量が低かった可能性が考えられた。

3.2 キメラ PG の PP 活性

S31PG1、S63PG1 およびキメラ PG の PP 活性をカルバゾール・硫酸法[4]により測定した結果、S31PG1 では、1.3 unit/ml と高い活性を示し、また、キメラ PG も、0.6 unit/ml の活性を示した(Table 2)。一

方、S63PG1 は、PP 活性を全く示さなかった。以上の結果から、触媒部位の周りにあるサブサイト構造が、PP 活性を担っている可能性が示唆された。

Table 2 Polygalacturonase (PG) and protopectinase (PP) activities

PG	PG activity (unit/ml)	PP activity (unit/ml)
S31PG1	0.5	1.3
S63PG1	1.0	0
Chimera PG	0.1	0.6

3.3 キメラ PG のレモン果皮分解能

次に、S31PG1、S63PG1 およびキメラ PG のレモン果皮(アルベド)に対する分解能を調べた(Fig. 2)。その結果、S31PG1 およびキメラ PG は、アルベドを良く分解したが、S63PG1 は、ほとんど分解しなかった。以上の結果からも、サブサイト構造が、アルベド分解に影響していることを示している。S63PG1 を作用させてレモン果皮で一部分解されているアルベドがあるが、これは、レモン果皮内に存在する可用性ペクチンが分解され、一部遊離されたものである。

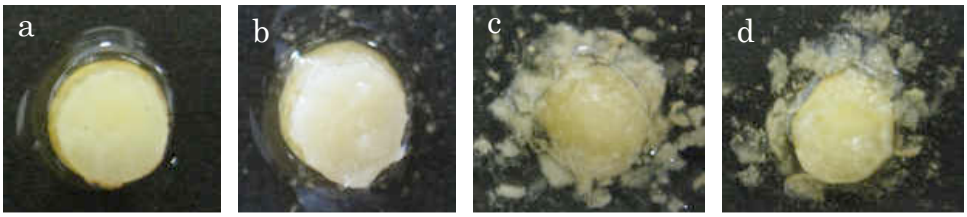


Fig. 2 The ability to degrade lemon peel (albedo) of expressed polygalacturonases (PGs). a: negative control (culture broth of *Schizosaccharomyces pombe*), b: S63PG1, c: S31PG1, d: chimera PG.

3.4 PG 二次構造の比較

S31PG1 と S63PG1 に二次構造を比較した。その結果、触媒部位の上部(N 末端側)に集中して、構造の異なる箇所が認められた(Fig. 3)。中でも、S31PG1 の GSNS(92-95)の構造は、コイルであるのに対し、S63PG1 の GGNG(91-94)は、α-ヘリックス構造になっており、大きく異なっていた(Fig. 3, 4)。つまり、このサブサイト構造の違いが、PP 活性(病原性)を左右している可能性が示唆された。

これまでに、PG が病原性に与える影響について、関与しているとする報告がある [10, 14, 20]一方で、関与しないとする報告もある [1, 9]。これまで、この矛盾点を説明するためには、酵素の発現量に差があるのではないかということしか言えなかった。また、非病原微生物でも高い酵素活性を示すものは存在し、発現量の違いだけでこの矛盾点を説明するには無理があった。しかし、本研究の結果から、PG には、活性量の異なる PP 活性を示すものが存在し、この PP 活性の程度が病原性に影響していることが明らかとなった。さらに、この PP 活性の違いは、PG のサブサイト構造の違いが影響しており、この違いが、プロトペクチンへの結合能を決定している可能性が示唆された。

PG の結合基質であるポリガラクツロン酸は、植物組織内で多くの物質と結合し、重合度も高いことから、極めて複雑な構造内に埋もれていることになる。つまり、この複雑な構造に埋もれてい

る基質とうまく結合するために、サブサイト構造は、重要なのではないかと思われる。また、これまでは、不溶性ペクチンを分解する酵素があるのではという概念だけはあり、それをポリメチルガラクツロナーゼ(PMG)と呼び、PG と区別していた。しかし、PG などの他のペクチナーゼ活性が検出されてしまい、PMG の特異的な活性測定法はないという理由から、その存在は確定していなかった。しかし、PMG 活性とは、PG の持つまさに PP 活性のそのものを指していた可能性があり、PG とは別ものと考えていたことが、その存在を不確かなものにしていたのではないかと考えられる。

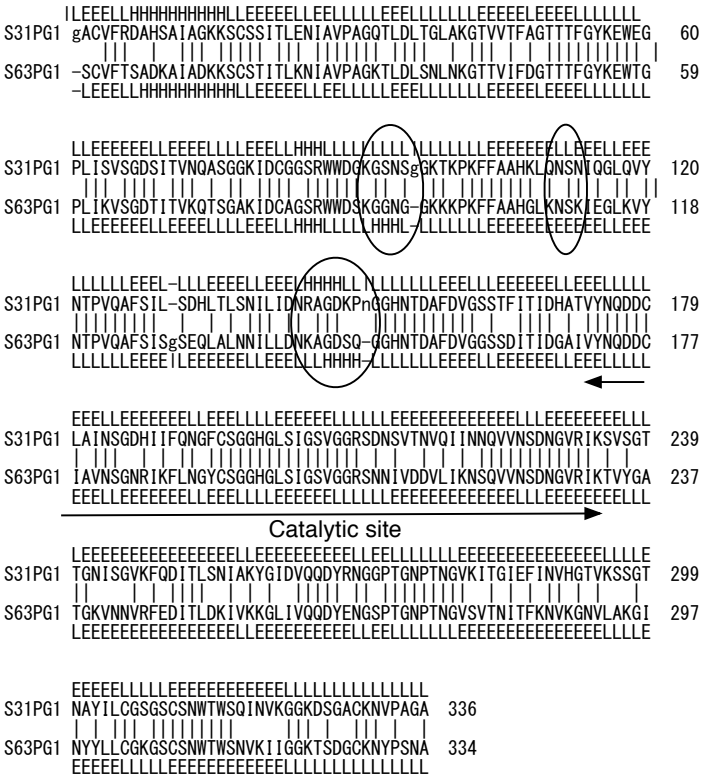


Fig. 3 Comparison of secondary structures of S31PG1 and S63PG1. Different structures are circled. E: β -sheet, H: α -helix, L: coil.

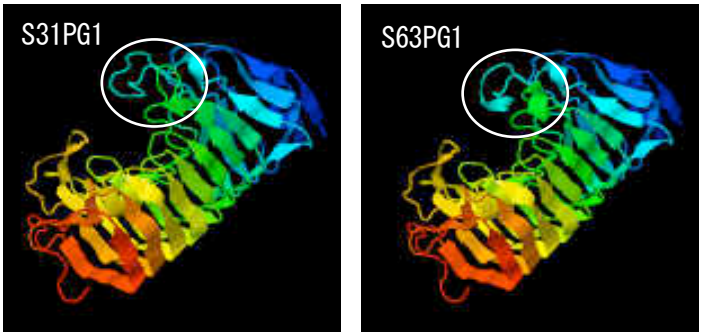


Fig. 4 Comparison of predicted protein of structures (ribbon diagrams) of S31PG1 and S63PG1. Different structures are circled.

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申しあげる。

5. 引用文献

1. Apel-Birkhold, P. C. and Walton, J. D. (1996). Cloning, disruption, and expression of two endo-beta-1, 4-xylanase genes, *XYL2* and *XYL3*, from *Cochliobolus carbonum*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4129-4135
2. Barmore, C. R. and Brown, G. E. (1979). Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum*. Phytopathology 69: 765-678
3. Bateman, D. F. and Millar, R. L. (1966). Pectic enzyme in tissue degradation. Ann. Rev.Phytopthol. 4: 119-146
4. Bitter, T. and Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole raction. Anal. Biochem. 4: 330-334
5. Brown, W. (1965). Toxins and cell-wall dissolving enzymes in relation to plant disease. Ann. Rev. Phytopthol. 3: 1-18
6. Butler, E. E. (1960). Pathogenicity and taxonomy of *Geotrichum candidum*. Phytopathology 50:665-672
7. Butler, E. E., Webster, R. K. and Eckert, J.W. (1965). Taxonomy, pathogenicity and physiological properties of the fungus causing sour rot of citrus. Phytopathology 55:1262-1268
8. Carmichael, J. W. (1957). *Geotrichm cadidum*. Myclologia 49: 820-830.
9. Di Pietro, A. and Roncero, M. I. G. (1998). Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. Mol. Plant-Microbe Interact.11: 91-98
10. Dickman, M. B., Podila, G. K. and Kolattukudy, P. E. (1989). Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. Nature 342:446-448
11. Dingle, J., Reid, W. W. and Solomons, G. L. (1953). The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. Ⅱ Application of the“cup-plate”assay to estimation of enzymes. J. Sci. Food Agric. 4: 149-155
12. Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. Electrophoresis 18: 2714-2723
13. Hasegawa, H. and Holm, L. (2009) Advances and pitfalls of protein structural alignment. Curr. Opin. Struct. Biol. 19:341-348
14. Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Yamamoto, H. (2001). Endpolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 749-757

15. Milner, Y. and Avigad, G. (1967) A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. Carbohydr. Res. 4:359- 361

16. Nakamura, M. Nakamura, K. and Iwai, H. (2009) Establishment of heterologous expression of polygalacturonase S63PG1 from nonpathogenic isolate S63 of *Geotrichum candidum*. J. Gen. Plant Pathol. 75:276-280

17. Peitsch, M.C. (1995). Protein modeling by E-mail. Bio/Technology 13: 658-660

18. Peitsch, M.C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. Biochem. Soc. Trans. 24: 274-279

19. Tubaki, K. (1962). Studies on a alime-foming fungus in polluted water. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 3: 29-35

20. Yakoby, N., Freeman, S., Dinoor, A., Keen, N. T. and Prusky, D. (2000). Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. Mol.Plant-Microbe Interact. 13: 887-891

Clarification of pathogenicity determining structures of polygalacturonases from *Geotrichum candidum* by constructing a chimera protein

Masayuki Nakamura・Kenta Tsuruya・Takahiro Matsumoto・Hisashi Iwai
Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

Abstract

In this study, we constructed a chimera polygalacturonase (PG) protein by recombining *S31pg1* and *S63pg1*. The expressed chimera PG showed not only PG activity but also protopectinase (PP) activity and degraded lemon peel (albedo), indicating that the recombinant region has an important role in PP activity. Thus, we compared the secondary structures of the recombinant regions of S31PG1 and S63PG1. Interestingly, the upper sites that are adjacent to the substrate-binding sites differed; there is a difference in the a-helix structures of the sites. S63PG1 has an additional a-helix structure (Gly91–Gly94) in the region. The predicted structures suggest that the upper regions could be involved in affinity to the protopectin in lemon peel and thereby determine binding, i.e., pathogenicity.

アイザメ筋肉からの健康機能性を有するペプチドの作製と その応用に関する研究

塩﨑　一弘・市野　隼人

鹿児島大学水産学部食品・資源利用学分野生物化学研究室
〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20
TEL：099-286-4170

要旨

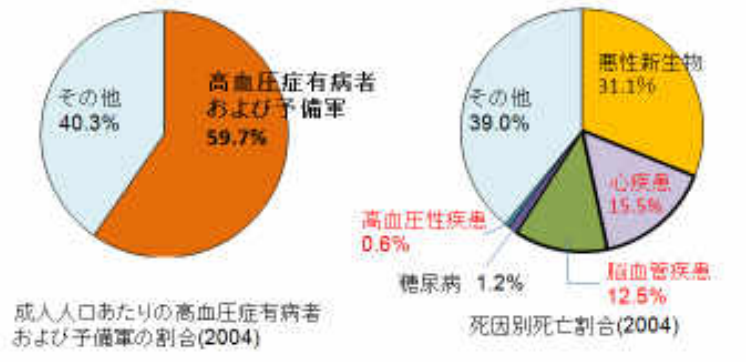
高血圧症は脳、心疾患の原因であり、日本人成人男性では 6 割以上が高血圧症およびその予備軍とされる。そこで本研究では、鹿児島県近海の未利用資源であるアイザメ筋肉から血圧降下作用を示す物質の探索を行った。昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II を生成する酵素である Angiotensin-I converting enzyme（ACE）の阻害活性を指標にスクリーニングを行ったところ、筋肉をプロテアーゼ処理して得られたペプチド混合物に高い ACE 阻害活性があることが明らかとなった。一方、サメ筋肉中に含まれる内在性物質には ACE 阻害活性は認められなかった。ACE 阻害活性を示したペプチド混合物について作製条件を詳細に検討した結果、非常に強い阻害活性を示す混合物の作製に成功した。このペプチドは苦みも少なく、食品添加物としての点からも優れていた。

続いてこのペプチド混合物に含まれる活性ペプチドの単離を試みた。透析により低分子画分を得た後に、逆層カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分画を行った。その結果、混合物中に複数の ACE 阻害ペプチドの存在が示唆された。そこで、プロテアーゼ分解物中における最も強力なペプチドの単離を試み分画を進めた結果、高い ACE 阻害活性を有するペプチドのピークが同定された。

1. 緒言

鹿児島県近海には多くの種類のサメが生息している。サメは浅海性と深海性に区分する事ができ、その生態や組織の成分組成などは大きく異なる。アイザメは鹿児島県近海に生息する深海性のサメであり、与論島近辺では漁獲対象となっている。アイザメは肝臓に大量のスクアレンを含んでいる有用種であり、与論島では水揚げされたアイザメから肝臓を摘出、処理した後に島外への出荷を行っている。一方、肝臓以外の部位はほとんど利用されておらず、筋肉部位に関しては島内において一部が食用とされているだけである。廃棄物処理の観点から、この未利用部位である筋肉を有効利用する事は重要であると考えられ、さらにアイザメ筋肉に新しい価値を見出すことは、漁業や島内産業への寄与が期待できる。しかし、サメ筋肉は一般に尿素を多く含んでおり、鮮度低下と共に多量のアンモニアが生成されるため、通

常の食品としての利用は難しい現状がある。



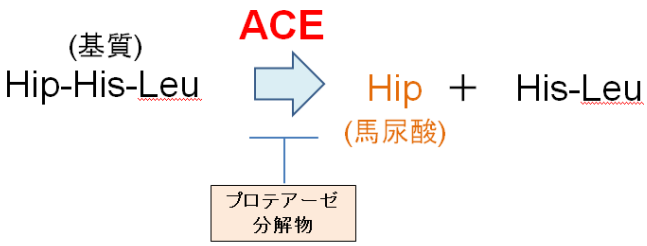
そこで本研究では、高血圧症に対する健康機能性食品に着目した。高血圧症は日本人成人男性の 6 割以上が罹患、もしくはその予備軍であるとされている。高血圧症は脳、心疾患の原因であることから、高血圧の予防および治療はこれら致死性疾患を抑制し、患者の QOL の改善や医療費の抑制に繋げることが可能である [1]。高血圧治療を考える際に重要なのは「血圧が高めの方」である高血圧予備軍の数を減少させる事である。なぜなら、「血圧が高めの方」は食事療法などによる十分な血圧改善が期待できるからである。最近、食事による高血圧の軽減策として機能性食品による降圧効果が注目されている。食品および天然物由来の血圧降下作用を持つ特定保健用食品として、イワシやワカメ、乳製品由来のペプチドを含んだ商品が販売されており、大きな市場を形成している [2]。機能性食品には副作用が無く、継続して摂取できるなどのメリットが挙げられる。

そこで本研究では、鹿児島県の未利用資源であるアイザメ筋肉を原料とする抗高血圧作用を示す物質の探索を行う。本グループではこれまで、キク科植物由来の平滑筋弛緩物質や二枚貝からの降圧ペプチドについて報告してきた [3-5]。天然物由来のペプチドは安全性が高く、また体内動態解析が容易である。また、プロテアーゼ処理によりペプチドを作出することで未利用資源の利用が可能となる利点がある。本報告では、アイザメ筋肉からの強力な降圧ペプチドの作製条件を明らかにする事を目的とし、活性ペプチドの分離条件についても検討を行った。

2. 理論

レニンーアンジオテンシン系では、まず腎臓からレニンが分泌されることにより肝臓のアンジオテンシノーゲンが分解され、アンジオテンシン I が生成し、さらに肺に存在する ACE によってアンジオテンシン I がアンジオテンシン II へと分解される。アンジオテンシ II は、血管壁平滑筋の収縮、アルドステロンの分泌を介した体液量の増加、ナトリウムイオンの再吸収の亢進などの作用により、生体内で強い血圧上昇を生じさせる。また、ACE は血圧降下作用のあるブラジキニンを分解することによっても血圧上昇作用を示す。このように、レニンーアンジオテンシン系における ACE の働きは重要であることから、現在、臨床では ACE の阻害剤であるカプトプリルやエナラプリルが高血圧症患者への第一次選択薬になっている。

本研究における降圧ペプチドの探索は、ACE に対する阻害作用を指標に行った。ウサギ肺由来 ACE を合成基質である Hip-His-Leu と反応させ、試料存在下で遊離してくる馬尿酸(Hip)量の変化を測定し、試料の ACE 阻害活性を求めた。



3. 実験

ペプチド作製に用いたプロテアーゼは 10 種とした。それぞれの至適条件下においてアイザメ筋肉を各プロテアーゼで 5 時間処理し、反応終了後に遠心分離して得られた上清をペプチド混合物として試験に供した [6]。各ペプチド混合物について収率、ACE 阻害活性、呈味試験などを行い、最も強力な ACE 阻害ペプチドの産生条件について検討した。

最も高い ACE 阻害活性が得られたペプチドの最適産生条件を用いて、ペプチド混合物の大量調製を行い、そこに含まれる ACE 阻害活性ペプチドの単離を試みた。透析により低分子画分を得た後に、逆層カラムを装着した HPLC により分画を行った。

4. 結果および考察

アイザメ筋肉を各プロテアーゼで処理しペプチドの作製を行ったところ、その各収率は 12%前後であった。ACE（3mU）に対する各ペプチド混合物の阻害活性を測定したところ、0%から 80%前後の阻害が認められた（Fig. 1.）。なお、筋肉に含まれる内在性物質には ACE 阻害活性は認められなかった。阻害が高かったペプチド混合物を生成したプロテアーゼ 3 種（パパイン、P アマノ、サモアーゼ）に着目し、プロテアーゼ処理時間を 1、5、9、12 時間と設定し、ペプチドの作製を行った後に、再び ACE 阻害活性を評価した。その結果、サモアーゼのプロテアーゼで 5 時間処理したものが最も ACE 阻害活性が高く認められた（Fig. 2.）。

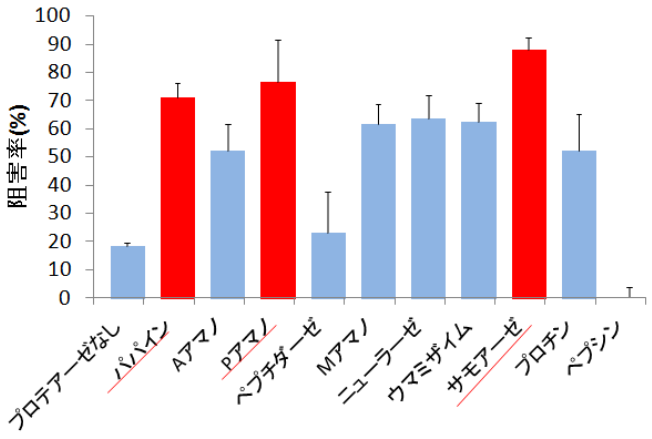


Fig. 1. ACE inhibition by shark hydrolysates

また、プロテアーゼ分解物には苦みを持つ物が多い事が知られているため、ブラインド法による呈味試験を行った。苦みを 5 段階で評価したところ、サモアーゼ処理により生成したペプチドが最も苦みが少なかった。この事は、サメ筋肉を機能性食品として応用する際に非常に有利であると示唆された。

今回得られたペプチド混合物の ACE 阻害活性を既知のペプチドと比較するため、阻害活性が強かったペプチド 3 種について IC_{50}（μg/ml）値を求めた。その結果、IC_{50} 値は 144.2μg/ml

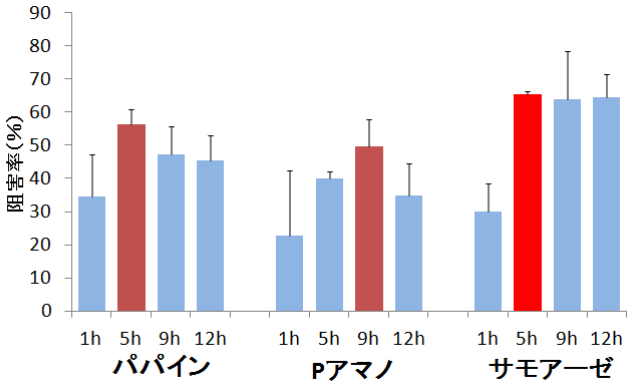


Fig. 2. Effect of the protease-incubation time on ACE inhibition

（パパイン生成ペプチド）、172.2 μg/ml（P アマノ生成ペプチド）、84.2 μg/ml（サモアーゼ生成ペプチド、Fig. 3.）であり、サモアーゼ生成ペプチドで最も高い比活性を得る事が出来た。この IC_{50} 値を他の報告例と比較したところ、ワカメプロテアーゼ分解物の IC_{50} 値が 86 μg/ml であり、今回得られたペプチド混合物はこれとほぼ同程度の阻害活性である事が明らかとなった [7]。このワカメプロテアーゼ分解物は特定保健用食品の有効成分として使用されている事と合わせて考えると、本研究で得られたサモアーゼ生成ペプチドは非常に高い ACE 阻害活性を有しており、*in vivo* における降圧作用が期待できることがわかった。

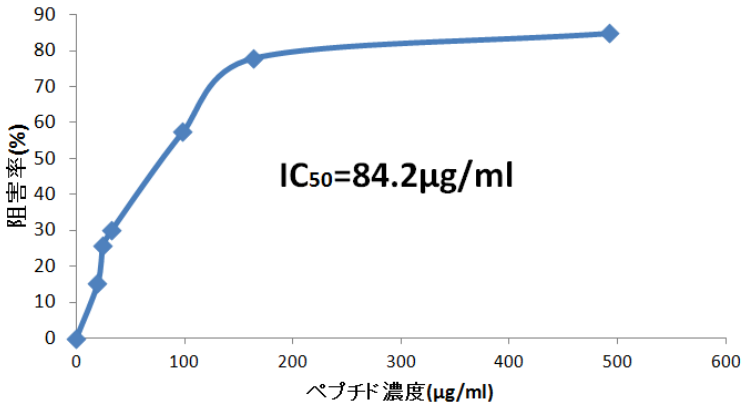


Fig. 3. ACE inhibition by Thermoase®-produced hydrolysate

続いてサモアーゼ処理より得られたペプチドに含まれる有効成分の精製を試みた。アイザメ筋肉 300g をプロテアーゼ処理し、得られた分解物を透析膜（分子量 14,000）で透析した。体内吸収効率が高い短鎖ペプチドに照準を絞るため、低分子画分を HPLC による分画に供した。逆層カラムを用いたグラジエント溶出による分画を行い、複数の画分を得た。この画分を ACE 阻害活性測定に供したところ、peak73 に最も高い阻害活性が認められた。そこで peak73 をさらに分画を進めたところ、活性ペプチドの単離に成功した。現在、ペプチド配列の決定をプロテインシークエンサーにて行っている。

本研究において、アイザメ筋肉をプロテアーゼ処理して得られたペプチド混合物に高い ACE 阻害作用が認められ、さらに混合物に含まれる活性ペプチドの精製に成功した。今回高い ACE 阻害活性ペプチドを生成したサモアーゼは、Leu、Ile、Val、Phe のような大きな疎水性側鎖を持つアミノ酸残基のアミノ基側のペプチド結合を特異的に加水分解するプロテアー

ゼである。これまでの報告から ACE 阻害ペプチドの多くは N 末端側に疎水性アミノ酸を含む事が報告されていることから、アイザメ筋肉より ACE 阻害ペプチドを作製するのに適したプロテアーゼである事が示唆された。今後はペプチドの配列決定を行い、高血圧自然発症ラットへの投与試験による *in vivo* 降圧効果の検討を行う予定である。

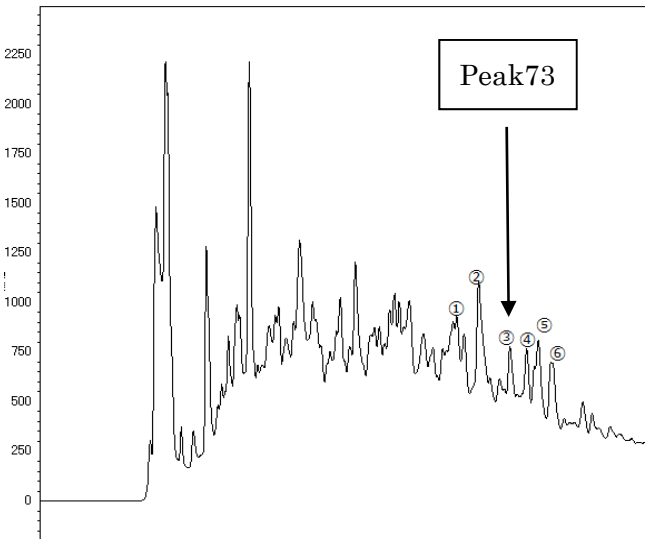


Fig. 4. Separation of ACE inhibition peptides
derived from Thermoase®-hydrolysate

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いたサンケイ科学振興財団に篤く感謝申しあげます。また食品加工用プロテアーゼを提供して頂いた天野エンザイム株式会社に感謝いたします。

6. 参考文献

1 Waldemar, G., Vorstrup, S., Andersen, A., Pedersen, H. and Paulson, O. (1989) Angiotensin-converting enzyme inhibition and regional cerebral blood flow in acute stroke. Journal of Cardiovascular Pharmacology. **14**, 722-729

2 林 浩孝, 大野 智, 橋本 慎太郎, 新井 隆成, 鈴木 信孝 (2008) 特定保健用食品「血圧が高めの方に適する」表示をした食品について. 日本補完代替医療学会誌. **5**, 37-47

3 Shiozaki, K., Fujii, A., Nakano, T., Yamaguchi, T. and Sato, M. (2006) Inhibitory effects of hot water extract of the Stevia stem on the contractile response of the smooth muscle of the guinea pig ileum. Biosci Biotechnol Biochem. **70**, 489-494

4 Shiozaki, K., Shiozaki, M., Masuda, J., Yamauchi, A., Ohwada, S., Nakano, T., Yamaguchi, T., Saito, T., Muramoto, K. and Sato, M. (2010) Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. Fish Sci. **76**, 865-872

5 Shiozaki, K., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M. and Sato, N. (2004) The protective

effect of stevia extract on the gastric mucosa of rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) fed dietary histamine. Aquacult Res. **35**, 1421-1428

6 Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K. and Kobayashi, A. (2002) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (Undaria pinnatifida) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. J Agric Food Chem. **50**, 6245-6252

7 Sato, M., Oba, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Kahara, T., Funayama, K. and Kobayashi, A. (2002) Antihypertensive effects of hydrolysates of wakame (Undaria pinnatifida) and their angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. Ann Nutr Metab. **46**, 259-267

Preparation of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from shark muscle

Kazuhiro Shiozaki and Hayato Ichino

Laboratory of Marine biochemistry, Faculty of Fisheries, Kagoshima University
4-50-20 Shimoarata, Kagoshima 890-0056, Japan

Angiotensin-I converting enzyme (ACE) plays a crucial role in the hypertension. Here, we tried to find ACE inhibitory peptides from the protease hydrolysates of shark muscle. The muscle was digested by food processing proteases for 5h, and then peptide fractions were obtained. The yields in these fractions were about 12%. Three peptide fractions were found to possess significant inhibition activity toward ACE, while endogenous peptides did not show the inhibition. The protease incubation time was assessed to obtain more effective peptides. The most potent peptide fraction was prepared by Thermoase® digestion for 5 hr. The bitterness of the peptide fraction was little, indicating the possibility of usage of shark-derived peptide as food ingredients.

Next, we tried to identify ACE inhibitory peptide from Thermoase® hydrolysate. The crude peptide was dialyzed (MWCO:14,000) and low molecular fraction was fractionated by HPLC using reverse-phase column. Because some ACE inhibitory peptides were found in some fractions, the most potent fraction was applied to the further separation by HPLC. Finally, the peak of active peptide was identified.

バイオエタノール添加ガソリンのための迅速簡便な エタノール濃度分析システムの開発

満塩　勝

鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻
〒890-0065　鹿児島市郡元 1-21-40
TEL：099-285-8342

要旨

近年、地球温暖化を防ぎ、化石燃料の使用量を抑えるためにエタノール添加ガソリンの普及が進められている。しかし、エタノール添加ガソリン中のエタノール含有量を迅速勘弁に計測する方法は開発されていない。そこで本研究では、金属薄膜層を石英棒側面に形成することにより、フローセル型で表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用し、迅速簡便にセル内の屈折率を計測できるセンサーシステムを構築し、ガソリンに添加されているエタノールの濃度測定を行う分析方法の開発を試みた。

通常 SPR 現象を利用する研究では金または銀を使用することが多いが、本研究では安価で入手が容易なアルミニウムを金属薄膜層として用いて研究を行った。その結果、紫色の LED 光源を使用した場合にエタノール添加ガソリンの屈折率範囲において良好な応答を示し、濃度管理が可能なセンサーとして期待できることが分かった。しかし、長時間ガソリン中に浸漬したアルミニウム表面を原子間力顕微鏡及び X 線光電子分光法を用いて観測したところ、硫黄を含む分子の吸着が示唆され、長期間の使用に関しては表面保護等が必要であることも分かった。

１．緒言

近年、途上国の発展に伴いエネルギー資源の需要が高まっている。その中でも使用用途が広く加工が容易な石油は消費量が常に増加傾向にある [1)]。また、石油の消費の低減に加え地球温暖化の対策の一環として、バイオエタノール添加ガソリンの使用が始まっている。2004 年～2020 年の間に現行のガソリンをエタノールを 3%添加したガソリン(以下 E3 ガソリン)と変更した場合の設備投資や改修を含めた削減費用対効果は 11,000 円/ton-CO2 と、太陽電池(全発電所を太陽電池発電にした場合:140,000 円/ton-CO_2)やハイブリッドカー(64,000 円/ton-CO_2)と比較すると CO_2 排出の削減を安価に行うことが出来る [2)]ため、経済的な面から考えても今後その利用が増大することが予測される。

しかし、燃料へのエタノールの添加は、日本国内においては「揮発油などの品質の確保などに関する法律の一部改正法（改正品確法)」により 3 体積%までしか認められていない [3)]。さらに、エタノール添加ガソリンは吸湿しやすく、エタノール含有量が

多いと現在のガソリンエンジンの樹脂類を劣化させる性質を持つなど、多くの理由からその濃度管理の重要性が高まっている。

しかし、現在ガソリンとエタノールの添加に関する研究は、ガスクロマトグラフ-マススペクトロメトリー(GC-MS)やフーリエ変換赤外吸光光度法(FT-IR)、および核磁気共鳴法(NMR)を利用した計測と、それらの結果をニューラルネットワークと呼ばれる脳の神経回路を模した学習能力を有する演算システムを利用した含有量の予測 [4-6]などの成分分析や添加による影響に関する研究がほとんどであり、連続・その場測定ができないため、科学的な意義は大きいが一般の消費者の支援に直接つながるものではない。

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)現象とは、プリズムなどの高屈折率媒体表面に金属薄膜層を形成し、プリズムの内表面から光を入射させて全反射を起こさせた時に、入射光の波長や入射角に依存して発生するエバネッセント波と、金属およびこれと接触している物質の屈折率によって波長が決まる表面プラズモン波との共鳴により、反射光の一部が減衰する現象である。SPR 現象は金属と試料との開演のみで起こる現象のため、試料の色や浮遊物の影響を受けにくく、光と電子との相互作用なので迅速な応答が得られることが特徴である。SPR 現象に関する研究では、白色光を使って吸収波長を求めるか、角度を変化させて共鳴角を計測する場合が多いが、分光光度計や高精度回転台などが必要となり、扱いの煩雑となり、故障率をあげる原因ともなる。

これに対して、本研究では金属薄膜層を光ファイバーや石英棒側面に形成することにより SPR 現象を効率よく利用し、透過光の強度を計測するだけで試料の濃度や屈折率を計測できセンサーシステムを構築することに成功している [10-14]。さらに、SPR 現象を利用する場合、通常は化学的安定性が高い金または SPR 利用効率が高い銀が使用されるが、本研究室では、これまでにアルミニウムでも SPR 現象を利用できることを見いだしている [11]。そこで本研究では、安価で取り扱いが容易なアルミニウムを金属薄膜層とし、エタノールを添加したガソリンのエタノール含有量を迅速簡便に計測するセンサーシステムを構築し、その性能の評価と長期使用におけるガソリン成分のセンサーへの影響について検討を行った。

２．理論

２．１ 表面プラズモン共鳴(SPR)現象

光が高屈折率が高い媒体から低い媒体へ臨界角以上の入射角で入射するとき、全反射が起こり、反射点において光の入射角や波長に依存して波数が決まるエバネッセント波が発生する。この時、高屈折率媒体表面に厚さ数十 nm 金属薄膜が存在すると、表面に存在する自由電子が共鳴し、表面プラズモン波が発生し、この波数に対応したエネルギーの波長や入射角の光が吸収される。この共鳴現象は表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)と呼ばれ、吸収されるエネルギーは金属薄膜と接触している試料の誘電率によって決定される。一般的に誘電率は屈折率と密接な関係があるため、SPR 現象により吸収される波長や角度を測定することにより、試料の屈折

率を知ることができる。Fig. 1 に共鳴角を測定するタイプの SPR センサーの模式図を示す。金属薄膜としては、通常 40～60 nm の厚さの金または銀が用いられる。

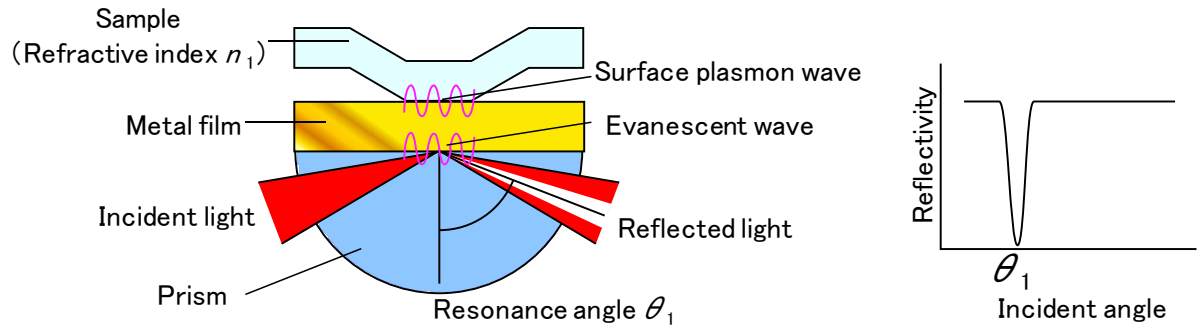
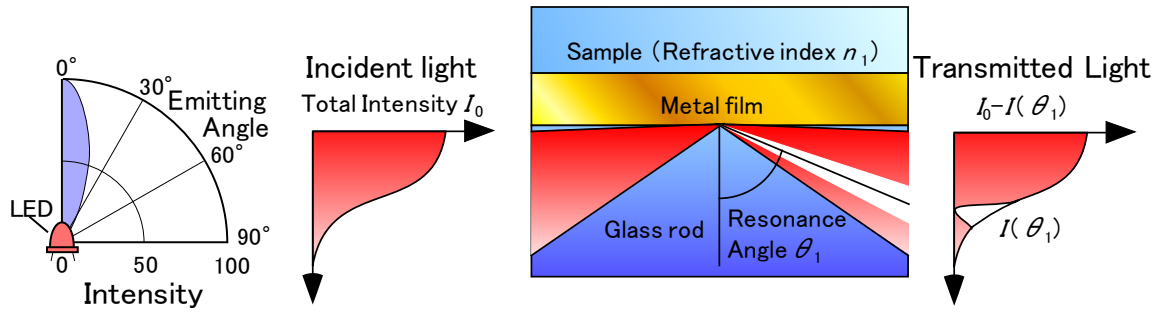


Fig. 1 A principle of the SPR phenomenon with a bulk prism.

２．２ 金属蒸着 SPR ガラス棒センサー

市販の SPR センサーは、角度や波長の掃引が必要なため、分光光度計や高精度の回転台を必要とする。しかし、これらは精密な機器で扱いが難しく、また機器が大きくなる原因ともなる。

LED は発光の強度と放出角度に相関があり、Fig. 2(a)に示すように LED の頂点から放出される光が最も強く、そこから角度が大きくなるにしたがって急激に強度が減衰する。これを利用すると、入射角と入射光の強度に相関が生まれるため、Fig.2(b)のようにガラス棒の側面に金属薄膜層を形成し、LED を光源として光を入射した場合、透過光の強度を測定することで試料の屈折率を知ることができる。



(a) (b)

Fig. 2 A principle of the SPR phenomenon with a metal-deposited glass rod.

３．実験

Fig. 3 に実験に用いた装置の模式図及びセンサーセルの写真を示す。本研究では、アルミニウムを 15 または 30 nm の厚さで蒸着した石英ガラス棒をセンサーとし、これをステンレス製のセンサーセル内に固定した。セルは発光ダイオード(LED)およびフォトダイオード(PD)を所定の位置に固定できるようになっており、光軸合わせ等が不要な設計になっている。

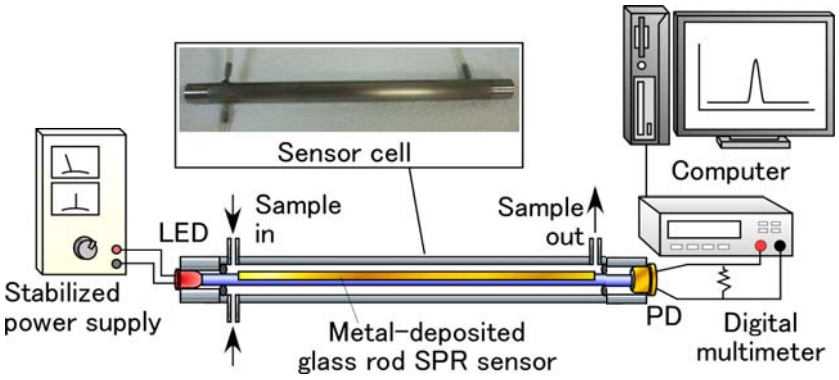


Fig. 3 Schematic representation of the sensor system.

光源の LED(Rohm, SLA-560LT-3F)は安定化電源を用いることで輝度を安定させ、透過してきた光は PD(浜松ホトニクス, s2386-44K)と抵抗(15 KΩ)を用いて電圧としてデジタルマルチメータ(Yokogawa, 7555-1)で読み取り、コンピュータで記録と解析を行った。

本研究で溶媒となるガソリンは、すべて同一のガソリンスタンドから購入したレギュラーガソリンであり、購入後 2 週間程度で使い切るように実験を行った。
これにエタノールを添加して濃度既知のエタノール添加ガソリンを調整し、センサーシステムの評価に用いた。

試料はマイクロチューブポンプを用いてセンサーセル内に導入され、センサーの応答が安定した後の 30 秒間の透過光の強度の平均を応答として記録した。また、各濃度のエタノール添加ガソリンは、Abbe 屈折率計(Atago, DR-A1)を用いて屈折率も測定した。

４．結果と考察

４．１ 市販の Abbe 屈折率計による各濃度のエタノール添加ガソリンの屈折率の測定

Fig. 4 に Abbe 屈折率計で測定した各濃度のエタノール添加ガソリンの屈折率を示す。ガソリンは揮発性が高く、計測中に屈折率が変わっていくため、Fig. 4 は各濃度について 1 つの試料を 5 回測定し、その平均を屈折率とし、±標準偏差をエラーバーとして表示している。濃度と屈折率の関係を見ると、全体の傾向としてはエタノール濃度の増加にしたがって屈折率が下がっていることが分かる。これは、ガソリンとエタノールの屈折率がそれぞれ約 1.421 と約 1.375 であるため、エタノール添加量が増加するにしたがって屈折率が下がるためである。しかし、Fig. 4 の 1～5 体積%の範囲における隣り合った濃度間の屈折率の変化量はエラーバーの範囲よりも小さいため、1%台の濃度変化を正しく図れているとは言い難い。本予備実験により、エタノール添加ガソリンについて市販の屈折率計による 1%台の濃度の差違の測定が極めて難しいことが分かった。

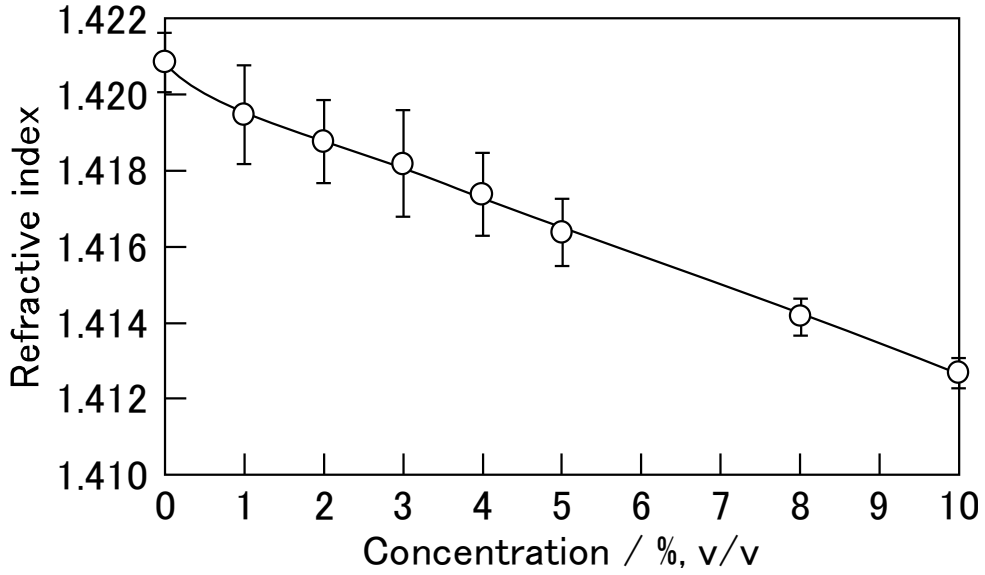


Fig. 4 Refractive indices of the ethanol-gasoline mixtures.

４．２ アルミニウム蒸着ガラス棒センサーの応答特性

Fig.5 は(a)15 nm、(b)30 nm のアルミニウム蒸着ガラス棒センサーの応答特性である。図中の E0 から E10 の屈折率範囲は、それぞれエタノール添加量 0 体積%から 10 体積%の時の屈折率の変化を示しており、この屈折率範囲における良好な傾きを持った応答曲線が最も本研究への使用に適したセンサーであることを示している。Fig. 5 より、15 nm の紫色 LED を使用した場合と、30 nm の青色 LED を使用した場合が良好な応答を示しているが、30 nm の青色の場合は E0 付近から傾きが浅くなっていることから、本研究では Al 15 nm 蒸着のセンサーに紫色 LED を組み合わせるのが最も良いことが分かった。

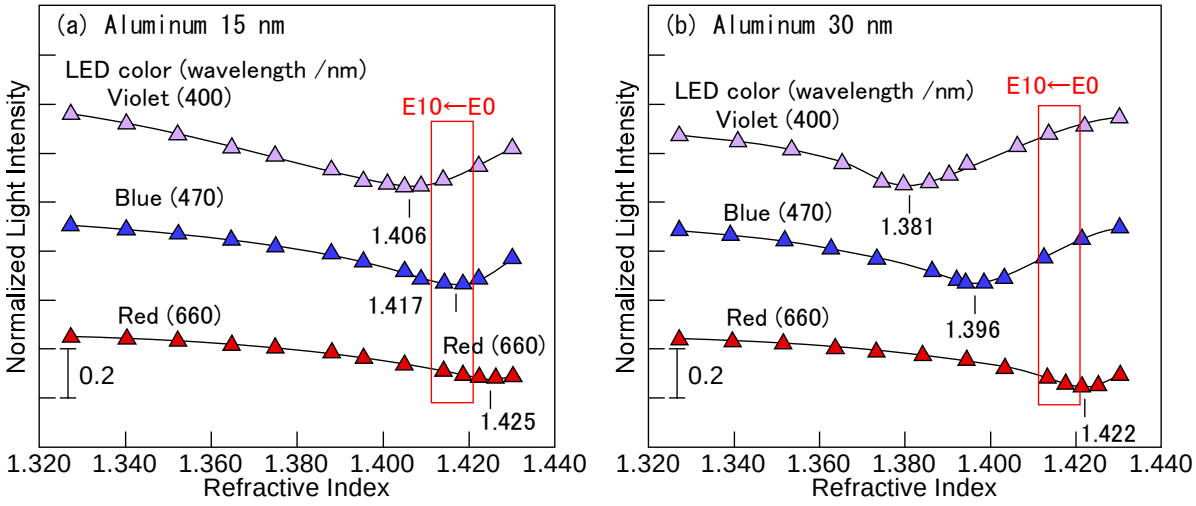


Fig. 5 Response curves of the Al-deposited glass rod SPR sensor with various LEDs.

４．３ エタノール添加ガソリンへの適用

Fig. 6 に 0～10 体積%のエタノールを添加したガソリンに対する金蒸着ガラス棒センサーの応答を示す。センサーを透過してきた光は、E0 測定時の透過光の強度で規格化

してある。センサーセル内に試料を導入すると直ちに透過光の強度が減少し、数分以内に安定した。この安定にかかる時間はポンプの流入速度に依存するため、流速の大きなポンプを使用することによって応答時間を更に短縮することが可能である。また、信号とノイズの割合を考えると、更に 1/10 程度の濃度変化まで測定できることが期待できる。しかし、実験開始時の E0 と終了時の E0 について、透過光強度の差が見られた。これはガソリン中の成分の吸着の影響ではないかと考えられた。

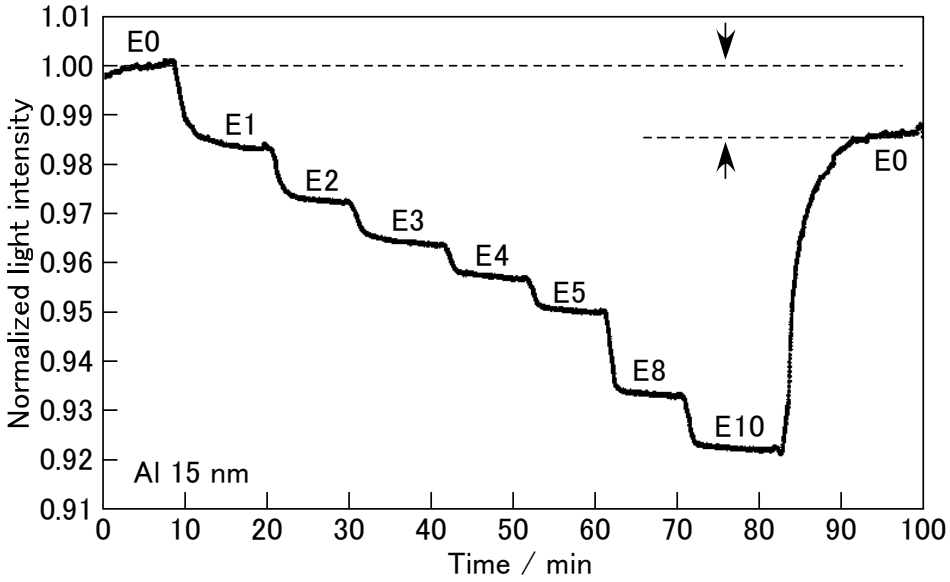


Fig. 6 Response of the sensor to the ethanol-gasoline mixtures with various concentrations.

４．４ 長期使用で予想される問題点

Fig. 7 はガソリンへの 24 時間浸漬前後の 15 nm の膜厚のアルミニウム薄膜表面の原子間力顕微鏡(AFM)の画像である。Position1 および 2 は決まった場所ではなく、任意の 2 点である。浸漬前は粒径のそろった表面であるが、浸漬後は、Position1 のように変化が見られない場所の他に、Position2 のように大きな塊状の吸着物らしき凹凸が見られた。これはガソリン中に残留している硫黄を含んだ分子ではないかと考え、X 線光電子分光法により、AFM と同条件にさらしたアルミニウム薄膜の XP スペクトルを測定した。Fig. 8 に C1s、O1s、Al2p、S2p の XP スペクトルを示す。C、O、Al は大きな変化は見られなかったが、S のスペクトルの形状が大きく変化していた。また、図示はしていないが N1s の測定も行い、変化がないことを確認している。これらの結果から、本センサーは現状では短期間の使用は可能であるが、長期間の使用時には何らかの表面保護が必要であることが分かった。

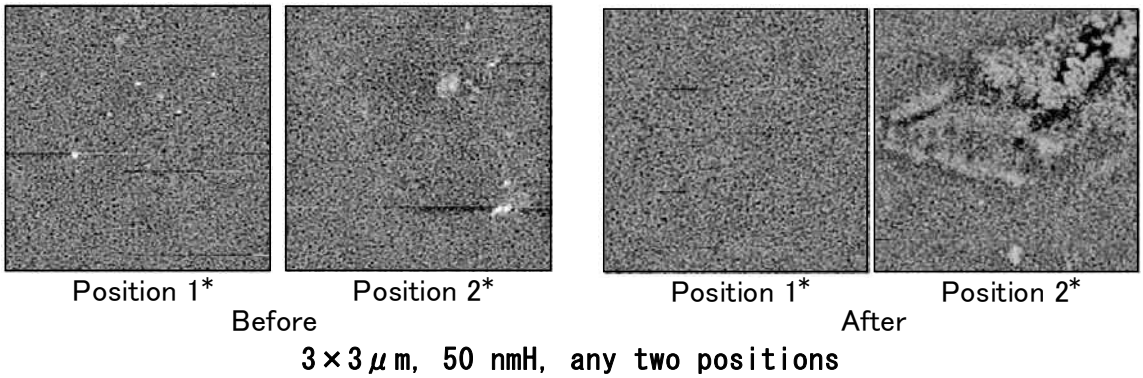


Fig. 7 Surface image of the aluminum film before and after dipping into the gasoline for 24h.

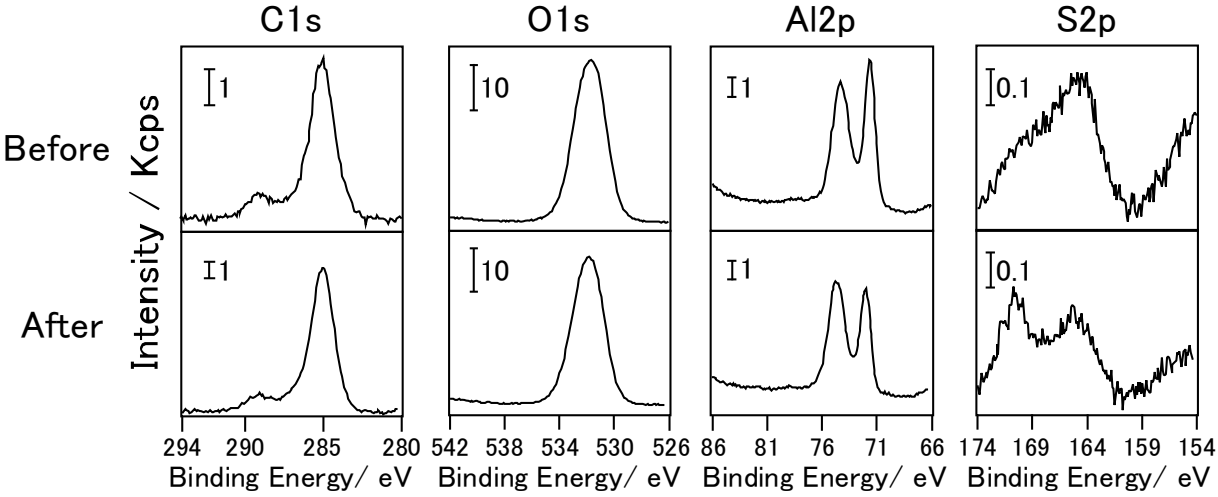


Fig. 8 XP spectra of the aluminum surface before and after dipping into the gasoline for 24h.

５．結 論

側面にアルミニウムを蒸着したガラス棒を用いて、SPR 現象を利用したセンサーを構築でき、これを用いてエタノール添加ガソリン中のエタノール濃度を測定できることがわかった。SPR 現象は光と電子の相互作用なので、応答速度はきわめて早く、迅速に濃度測定が可能なセンサーシステムを構築できることが期待できる。しかし、センサーが長時間ガソリンと接触することで、アルミニウム表面に堆積物が発生することもわかった。堆積物は XPS による測定から硫黄原子を持ったものであることが分かり、ガソリンに残留している硫黄を含む分子の影響であることが予想された。

本研究により、エタノール添加ガソリンの濃度管理用のセンサーについて、その基礎的な知見を得ることができた。今後は吸着を防ぎ、長時間の測定に耐えるセンサーについての研究を展開していく予定である。

６．謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成をしていただいた財団法人サンケイ科学振興財団に深謝申し上げます。また、研究に関して助言を頂いた肥後盛秀教授にお礼申し上げます。

７．引用文献

1) 経済産業省 資源エネルギー庁 日本のエネルギー事情, http://www.enecho.meti.go.jp/topics/energy-in-japan/energy2009html/japan/index.htm, (2009).
2) 環境省 第3回再生可能燃料利用推進会議(平成15年10月10日) 資料2, http://www.env.go.jp/earth/ondanka/renewable/03/index.html, (2003).
3) 経済産業省資源エネルギー庁 揮発油等の品質の確保等に関する法律の一部を改正する法律の概要, http://www.enecho.meti.go.jp/topics/080916/080916.htm, (2008).
4) V. O. Santos Jr., F. C. C. Oliveira, D. G. Lima, A. C. Petry, E. Garcia, P. A. Z. Suarez, J. C. Rubim, *Anal. Chim. Acta*, **547**, 188 (2005).
5) R. M. Balabin, R. Z. Safieva, E. I. Lomakina, *Chem. Intel. Labo. Syst.*, **88**, 183 (2007).
6) A. P. Singh, S. Mukherji, A. K. Tewari, W. R. Kalsi, A. S. Sarpal, *Fuel*, **82**, 23 (2003).
7) H. Raether, Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings, Springer-Verlag, Berlin, (1988).
8) J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B*, **54**, 3 (1999).
9) S. Kawata (ed.), Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons, Springer, Berlin, (2001).
10) M. Mitsushio, M. Higo, *Anal. Sci.*, **20**, 689 (2004).
11) M. Mitsushio, K. Miyashita, M. Higo, *Sens. Actuators A*, **125**, 296 (2006).
12) M. Mitsushio, K. Watanabe, Y. Abe, M. Higo, *Sens. Actuators A*, **163**, 1 (2010).
13) M. Mitsushio, Y. Abe, M. Higo, *Anal. Sci.*, **26**, 949 (2010).
14) M. Mitsushio, M. Higo, *Anal. Sci.* **27**, 247 (2011) 247-252.

Development of convenient sensor system for rapid measurement of a concentration of an ethanol-gasoline mixture

Masaru Mitsushio

Department of Chemistry, Biotechnology, and Chemical Engineering,
Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University
1-21-40, Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan
Tel/Fax +81-99-285-8342; E-mail: m-mitsus@apc.kagoshima-u.ac.jp

An aluminum-deposited glass rod sensor system for measurement of ethanol concentration in a gasoline-ethanol mixture has been developed. This sensor has a LED as a light source and a PD as a detector of light intensity and it is based on surface plasmon resonance phenomenon. Aluminum was deposited on a half side of a glass rod and fixed in a glass tube. It allows easy and direct monitoring of an ethanol concentration. The transmitted light intensity from the sensor decreases as the ethanol concentration increases. However, deposits of the sulfur compound were observed on the aluminum surface with an atomic force microscope and an X-ray photoelectron spectroscopy.

肌ヌカを用いた新規米加工食品の開発

松永　一彦・下野　かおり・瀬戸口　眞治

鹿児島県工業技術センター　食品・化学部
〒 899-5105　鹿児島県霧島市隼人町小田 1445-1
TEL：0995-43-5111

要　　旨

肌ヌカについてクッキーの材料としての適性を評価した。また，麹を作用させた肌ヌカ糖化物の物性を調べ，肌ヌカ糖化物の材料としての適性について検討した。糖分が少ない肌ヌカに糖質を補うことで，肌ヌカはクッキーの材料に適し，小麦の代替品になりうることを確認した。肌ヌカに加えて，米油や米粉など米由来原料にこだわったクッキーを試作できた。肌ヌカを糖化させることで，単糖類やアミノ酸が増加した。また，健康被害が危惧されるフィチン酸を低減させ，イノシトールや水溶性無機成分を高めると期待された。しかし，肌ヌカ糖化物及びこれを用いたクッキーは苦味を呈した。苦味をもつアミノ酸総量が著しく増加したこと，また不溶性無機成分が可溶化したこと等が要因として考えられるが，この苦味を抑制する技術が今後の課題である。

１．緒　　言

玄米の外側約10％は一般的に米糠と呼ばれ，構造的に種皮，外胚乳，糊粉層，胚芽で構成される。私たちは搗精後の胚乳を主成分とする残り約90％を精白米として食し，米糠は米油を中心に化粧品の原料や食品添加物等に再利用されている。環境負荷低減の一環で無洗米が登場したが，精白米を洗う手間が省ける長所と相まって無洗米の流通量は増加している。無洗米は，搗精により米糠を取り除いた後，更に無洗米加工が施された米で，鹿児島県においても無洗米の流通量は増加している。しかし，無洗米加工後に残る肌ヌカは残留農薬や重金属の心配が少なく栄養価に富んでいるメリットを有するにもかかわらず，肥料や飼料に利用されるだけである。

近年，小麦の代替として精白米，玄米，米糠に注目が集まってきている。精白米，玄米，米糠を材料にして，小麦とは別の栄養的特徴をもつ菓子類が既に市場に出回り，特に小麦アレルギー向け商品としての価値は高い。

肌ヌカは玄米や米糠以上に安全性が高く，また精白米よりもビタミンやミ

ネラルなどの微量成分を含み，その栄養価は高い。

一般に，米等の澱粉系の材料に麹を作用させると，麹由来の酵素により澱粉が分解し，甘味をもつグルコースが生成する（糖化）。また，麹は多種類の酵素をもつために単糖類に限らず様々な成分を生成し，またその中には機能性を有す成分も含まれている。肌ヌカはデンプンやタンパク質が多いため，糖化による機能性向上に期待できる。

そこで，肌ヌカについてクッキーの材料としての適性を評価し，また麹による肌ヌカ糖化物の特徴及びその材料としての適性について検討したので報告する。

２．実験方法

２．１ 材料

肌ヌカは，(株)鹿児島パールライスより提供を受けたものを使用した。小麦，グラニュー糖，バター，米油，卵等は，市販品を使用した。麹は河内源一郎商店製の焼酎用黄麹及び焼酎用白麹を用いた。

２．２ クッキーの試作

材料を混練・成形後，オーブンで170℃，20分間焼成した。なお，バター，米油，水は混練物の粘性を確認しながら適量を加えた。

２．３ 成分分析

(1)水分

105℃で３時間乾燥し，重量減少分を基に算出した。

(2)デンプン価

25%塩酸で加水分解後，ソモギー変法により直接還元糖を測定し，0.9を乗じて求めた。

(3)タンパク質

ケルダール法（FOSS製）により窒素分を測定し，タンパク係数5.95を乗じて算出した。

(4)灰分

800℃で灰化し，重量減少分を基に算出した。

(5)無機成分

ナトリウム，カリウム，鉄，カルシウム，マグネシウムは原子吸光光度計（パーキンエルマー製）を使用し，リンはモリブデンブルー法で分析した。

(6)糖組成

RI検出器付き高速液体クロマトグラフ（日本分光(株)製）で分析を行い，カラムはShodex KS801，移動相は水とした。

(7)アミノ酸組成

アミノ酸分析装置（日本ウオーターズ(株)）製を用い，AccQ・Tag法によるプレカラム蛍光誘導体化検出法で分析を行った。カラムはAccQ・Tagカラム，移動相は100mM酢酸ナトリウム，5.6mMトリメチルアミン（pH5.7及びpH6.8），アセトニトリル，超純水のグラジエントとした。

３．結果及び考察

３．１ クッキーの材料としての肌ヌカの適性評価

通常クッキーは，小麦粉，砂糖，バター，卵等を主材料に製造されるが，今回小麦粉に替わって肌ヌカを使用し，クッキーの材料としての適性を評価した。なお，工業技術センター食品・化学部の職員で試食を行い，味，香り，食感を評価した。

肌ヌカの主成分を分析した結果をTable１に示した。肌ヌカは，小麦粉（薄力粉）に比べてタンパク，灰分，脂質は多いが，デンプン価は低かった。

Table１　肌ヌカの主成分（%）

	水分	デンプン価	タンパク	灰分	脂質[注1]
肌ヌカ	7.0	41.9	12.1	9.8	15
小麦粉（薄力粉）	11.9	72.8	7.8	0.4	1.7

注１：日本食品分析センター調べ

肌ヌカ単独では糖質が不足しているため，馬鈴薯デンプンを副原料として使用し，以下の配合条件でクッキーを試作した（Table２）。なお，試作に際しては，肌ヌカと馬鈴薯デンプンの合計量が100gになるように設定した。

Table２　配合条件（１）（ｇ）

	①	②	③	④	⑤	⑥
肌ヌカ	50	60	70	80	90	100
馬鈴薯澱粉	50	40	30	20	10	0
グラニュー糖	25	25	25	25	25	25
バター	25	30	35	40	45	45

試食の結果をTable３に示した。味，香り，食感は，肌ヌカと馬鈴薯デンプンの配合割合で大きく変化した。肌ヌカの割合が少ないほど味は苦く，ヌカ臭を強く感じ，食感も非常に硬かった。一方，肌ヌカの割合が多すぎると，多様な香りがあってサクサク感を感じるものの，焦げ臭が強く感じられた。

Table３　味，香り，食感の評価（１）

	①	②	③	④	⑤	⑥
味	×	○	○	○	×	×
香り	×	○	○	○	×	×
食感	×	○	○	○	○	×
総合評価	×	○	○	○	×	×

肌ヌカは脂質が多く，また米油も入手しやすいことから，米由来原料にこだわって，バターに替わり米油を使用した（Table４）。米油を使用することでバター特有の香ばしさは無くなったが，味，香り，食感はバターを用いたときと同じ傾向を示し，米油を使えることが確認できた（Table５）。

Table４　配合条件（２）（ｇ）

	①	②	③	④	⑤	⑥
肌ヌカ	50	60	70	80	90	100
馬鈴薯澱粉	50	40	30	20	10	0
グラニュー糖	25	25	25	25	25	25
米油	21	20	20	20	20	22

Table５　味，香り，食感の評価（２）

	①	②	③	④	⑤	⑥
味	×	○	○	○	×	×
香り	×	○	○	○	×	×
食感	×	○	○	○	○	×
総合評価	×	○	○	○	×	×

糖質を補う副原料について検討した。澱粉系の材料は複数あるが，安価で入手しやすいコーンスターチ，上新粉，米粉，片栗粉で試作した（Table６）。なお，試作は評価の高かった表４の③を採用した。油との親和性の違いから，副原料の種類で使用した米油の量に差があったが，試作品を味見したところ，

Table６　配合条件（３）（ｇ）

	①	②	③	④	⑤
肌ヌカ	70	70	70	70	70
コーンスターチ	30	0	0	0	0
上新粉	0	30	0	0	0
米粉	0	0	30	0	0
片栗粉	0	0	0	30	0
馬鈴薯澱粉	0	0	0	0	30
グラニュー糖	25	25	25	25	25
米油	30	40	20	10	20

Table７　味，香り，食感の評価（３）

	①	②	③	④	⑤
味	○	○	○	○	○
香り	○	○	○	○	○
食感	○	○	○	○	○
総合評価	○	○	○	○	○

副原料に由来する特徴のある味，香り，食感になり，全試作品で評価が高かった（Table７）。

通常クッキー作りでは水は使用しない。しかし，肌ヌカを糖化するに当たって水が使われることから，水の影響を検討する必要がある。そこで，材料の一部に水を使用した。なお，これまでの試作で評価の高かった配合割合を採用し（Table４の③），同時に卵の乳化について検討した（Table８）。

Table８　配合条件（３）（ｇ）

	①	②	③	④
肌ヌカ	70	70	70	70
馬鈴薯澱粉	30	30	30	30
グラニュー糖	25	25	25	25
米油	20	10	20	10
水	20	10	20	10
卵	0	卵黄/卵白	卵黄	卵白

Table９　味，香り，食感の評価（３）

	①	②	③	④
味	○	○	○	○
香り	○	○	○	○
食感	×	○	○	×
総合評価	×	○	○	×

味，香りに水は影響しなかったが，水を用いることで，クッキーは非常に硬くなった。また，玉子の卵白を使用しても同様に非常に硬くなった。しかし，卵黄を加えたことによる乳化作用で硬さは改善し，卵黄と併用することで水の使用が可能であることが確認できた（Table９）。

３．２ 肌ヌカ糖化物の物性及び材料としての適性評価

肌ヌカの糖化により糖分及び機能性成分が生成されることで，甘味料無添加や機能性向上の効果が期待される。そこで，糖化作用の強い黄麹並びにクエン酸を多く生成する白麹を用いて糖化処理を行い，糖化物の味見と成分分析を行った（Table10）。なお，成分分析に際しては，以下の前処理を実施した。精秤した糖化物を100mLにメスアップし，超音波で試料を均一にした後，濾紙，フィルター及び限外濾過で濾過して分析に供した。

Table10　肌ヌカの糖化条件

サンプル	肌ヌカ(g)	粉末麹(g)	水(g)	反応温度/時間
①	35	5（黄麹）	25	60℃/24時間
②	35	5（白麹）	25	60℃/24時間
③	35	0	25	60℃/24時間
④	5	0	100	室温/直後

糖分析を行った結果，グルコース，グリセロールを全サンプルで検出できた（Fig.１）。無処理（④）のものは，グルコースが含まれなかったが，糖化させることでグルコースが生成し，黄麹で28.6%，白麹で26.5%となった。肌ヌカの糖化物が甘味料の代替になることを確認できた。水だけを加えて60℃，24時間反応させた試料（③）も3.4%生成したが，肌ヌカにもともと含まれる酵素が作用したと考えられる。一方，肌ヌカは15%程の脂質を含み，

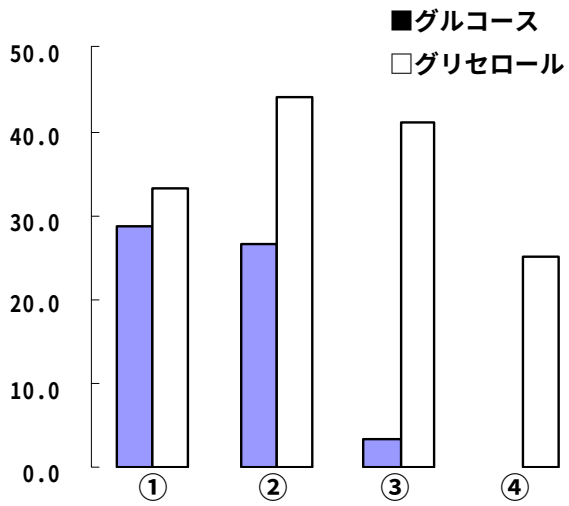


Fig.1　肌ヌカ及び糖化物の糖組成

しかもリパーゼの活性が高いことから，全サンプルでグリセロールを多く認めた。

玄米の微量成分の一つにフィチン酸がある。フィチン酸はイノシトールにリン酸がエステル結合した構造をとり，強いキレート作用を持っている。この作用により，玄米中ではカルシウム，マグネシウム，鉄等と結合したフィチン酸塩の形態をとっている。玄米はヌカ層に有用な微量成分を含むため健康食品として認知される一方で，摂取量が多くなるとミネラル欠乏症等の健康障害を引き起こすことが危惧される。ミネラル欠乏症は，体内に取り込まれた水溶性金属類がフィチン酸の強いキレート作用により不溶化し，体内に吸収されず金属の欠乏を引き起こす症状である。このフィチン酸は肌ヌカにも含まれると推測されるが，食品として提供する場合，健康被害を招く危険性があるためフィチン酸を低減する必要がある。フィチン酸はフィターゼの作用を受けてイノシトールとリン酸に分解することが知られている。そこで，リン酸を分析してフィチン酸の分解について検討した（Fig.2）。

図は，肌ヌカの全リン酸を100とした時の溶出したリン酸量を相対的に示している。無処理の④ではほとんどリン酸が溶出していないが，これはリン酸が不溶性のフィチン酸塩として存在しているためであると考えられる。試料③でリン酸の相対的溶出量が約60%に増えているが，これはもともと肌ヌカに含まれるフィターゼの作用による思われる。麹で処理した試料（①，②）では，さらにリン酸が溶出し，白麹で処理したものはほぼ全量が溶出している。麹の作用によりフィチン酸がイノシトールとリン酸へ分解し，リン酸が溶出したと推測される。また，キレート結合していた不溶性の無機成分は，

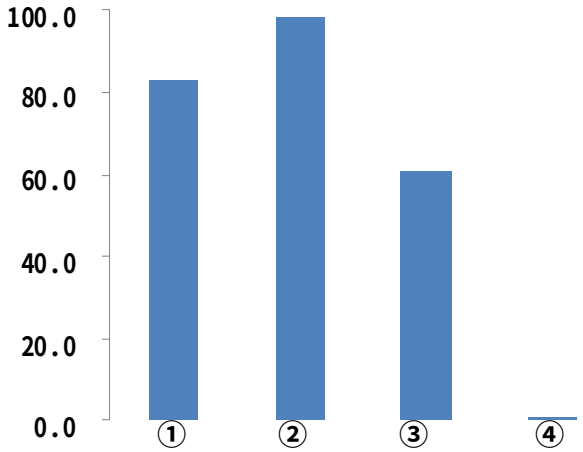


Fig.2　肌ヌカ及び糖化物のリン酸溶出

フィチン酸の分解を受けて体内で利用しやすい水溶性となったと考えられる。加えてコレステロールや脂肪の代謝を促す等の機能性を持つイノシトールが多く含まれると期待された。

次に，アミノ酸組成について調べた（Table11)。もともと肌ヌカはアミノ酸を総量で約560mg/100g含むが，水を加えて反応させたことで（③)，総量が約 760mg/100gに増加した。アミラーゼやリパーゼと同様に，肌ヌカが持つタンパク分解酵素の作用を受けて生成したと考えられる。しかし，麹で処理することによって各アミノ酸は増加し，総量としては４倍以上になった。

①から④の条件で処理したものを味見したところ，麹処理したものに苦味を強く感じた。一般的に苦味成分としてアミノ酸や無機成分，ポリフェノール等がある。苦味のあるアミノ酸としてヒスチジン，アルギニン，チロシン，バリン，メチオニン，イソロイシン，ロイシン，フェニルアラニンがあるが，これらの総量も約20倍から30倍に増加し，苦味を持つアミノ酸が他のアミノ酸より著しく増加しいている。また肌ヌカは無機成分も多く（Table12)，特にフィチン酸の分解を受けて水溶性の無機成分が増加していることも要因の一つと推測される。

糖化物を用いてクッキーを試作した。試作は評価の高かった表７の③に倣い，肌ヌカに代わって肌ヌカの糖化物（黄麹）を代用，またグラニュー糖は使用しなかった。なお，白麹による糖化物は，クエン酸による酸味が感じられたため，黄麹糖化物だけを材料とした。糖化物35g，馬鈴薯澱粉15g，米油5g，卵（卵黄/卵白）1/4個を材料にクッキーを試作し，味見をしたところ糖化物と同様に苦味を強く感じた。馬鈴薯澱粉の量を増やすことで苦味は和ら

いだが、完全に解消されることはなかった。この苦味を抑制する技術が今後の課題である。

Table11　肌ヌカ及び糖化物のアミノ酸組成（mg/100g）

アミノ酸	①	②	③	④
Asp	205	146	74	109
Glu	204	158	124	113
Ser	89	64	16	14
Asn	66	119	69	67
Gly	105	107	102	27
Gln	295	298	N.D.	39
His	19	18	N.D.	N.D.
Thr	62	33	4	N.D.
Ala	218	178	71	28
Arg	223	282	52	20
GABA	93	80	59	45
Pro	125	216	127	82
Tyr	70	117	9	6
Val	91	117	10	6
Cys-Cys	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Met	33	62	N.D.	N.D.
Ile	59	65	3	1
Leu	120	159	12	2
Orn	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Phe	70	99	9	2
Lys	62	97	15	2
Trp	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
合計	2209	2415	759	561

N.D.:検出されず

Table12　肌ヌカの灰分組成（%）

灰分	無機成分(mg/100g)					
(%)	Na_2O	K_2O	CaO	MgO	FeO	P_2O_5
9.8	791	2230	73	1899	21	4608

４．結　　言

肌ヌカについて，クッキーの材料としての適性を評価し，また肌ヌカ糖化物の物性を調べ，肌ヌカ糖化物の材料としての適性について検討した。その結果，以下のことが明らかとなった。

(1)糖分の少ない肌ヌカに糖質を補うことで，肌ヌカが小麦の代替品になりうることを確認した。また，肌ヌカに加えて，米油や米粉など米由来原料にこだわったクッキーを製造できた。

(2)肌ヌカを糖化させることで，単糖類やアミノ酸を高めることが出来た。またフィチン酸を低減させるとともに，イノシトール，水溶性無機成分を高めることが期待された。

(3)肌ヌカ糖化物及びこれを用いたクッキーは苦味を呈した。苦味を持つアミノ酸が著しく多く生成されたこと，また不溶性無機成分が可溶化したことが要因として考えられるが，実用化する上で苦味の抑制が課題として残った。

謝　　辞

本研究を遂行するにあたり，研究費助成をして頂いたサンケイ科学振興財団に深く御礼申し上げます。また，肌ヌカを提供していただいた(株)鹿児島パールライスに厚くお礼申し上げます。

Development of New Rice Processed Food Using Hadanuka

Kazuhiko MATSUNAGA, Kaori SHIMONO, Shinji SETOGUCHI
Food and Chemistry Division,Kagoshima Prefectural Institute Of Industrial Technology
1445-1 Oda Hayato-cho Kirishima-shi,Kagoshima,Japan

Abstract

Cookie was made as an experiment using hadanuka,and property as a material of cookie was evaluated.It is investigation about the physical properties of hadanuka on which koji was made to act,and as a material of cookie was examined.There is little saccharide of hadanuka,but it was suitable for the material of cookie by adding sugar to hadanuka.The cookie adhering to rice origin materials,such as rice bran oil and rice flour,has been made as a experiment. Saccharide and amino acid increased by making koji act on hadanuka. The phytic acid with which it is apprehensive about health impairment is reduced.It was expected that inositol and a water-soluble inorganic ingredient were raised.However,hadanuka on which koji was made to act and the cookie using this presented bitter taste.Although the bitter -tasting amino acid total amount's having increased and the thing which the insoluble inorganic ingredient solubilized are considered as a factor,the technology which controls bitter taste is a future subject.

乳房炎の早期診断マーカーとしてのmicroRNA

三浦　直樹

鹿児島大学農学部獣医学科臨床獣医学講座画像診断学分野
〒890-0065　鹿児島市郡元 1-21-24
TEL：099-285-3527

要旨

近年、新規疾患バイオマーカーとして注目されているmicroRNAの乳房炎の診断マーカーとしての可能性を探索した。乳房炎発症牛と非乳房炎発症牛の乳汁を採取し、qRT-PCRにて炎症マーカーとして報告されているmicroRNAの発現を測定した。miR-125b(p=0.0404)とmiR-205(p=0.0223)において、乳房炎発症牛で有意にCt値の低下（microRNA発現の増加）がみられた（Wilcoxon-Kruskal-Wallisの検定）。乳房炎発症牛のCalifornia mastitis test（ＣＭＴ）凝集陽性乳汁中のmiR-125b発現は発熱を伴う牛は発熱していない個体よりも2.4倍と4.2倍高値を示した。乳房炎発症牛においてmiR-222はいずれもＣＭＴ凝集反応陽性乳汁が同一個体の陰性乳汁よりも高値を示した。今回、microRNA-125bは乳房炎発症牛特異的発現microRNAの可能性が示唆された。今後はサンプル数を増やして、１）解析結果の再現性の確認、２）乳房炎治療依存性のmicroRNAの発現変化、３）乳房炎発症予測microRNAの検討も必要である。

1. 緒言

産業動物の経済的損失を最小限にするには、疾病の早期診断と予防は重要である。酪農産業において乳房炎は繁殖障害と並び、経済動物として高泌乳牛を確立する過程で避けられない問題である。乳房炎の７０％は臨床症状を示さない潜在型とも言われ臨床症状以外の特異的な診断法の開発が望まれる。

microRNAはin situ且つon timeで作用し幅広い生命現象（正常な個体発生から、生理的応答、病態の発生と転帰など）で重要な役割を果たし、１）病態のメカニズムを遺伝子発現からタンパク質合成の調節レベルで理解できる、２）組織病態特異性の高いmicroRNA分子が直接疾患のマーカーになる分子である[1)]。

これまで、牛のmicroRNAに関しては筋肉隆々のピエモンテ牛とホルスタイン種牛の筋肉においてmicroRNA-206の発現に変化があったとする報告[2)]や脂肪細胞のmicroRNAの発現を調べ､腰背側部の脂肪の厚さにmicroRNA-378が関与することなどが報告されている[3)]。一方で乳汁中のmuicroRNAの発現は授乳期のヒトの乳汁中と正常な牛の乳汁中のmicroRNAの存在が１報ずつ報告されているのみである[4､ 5)]。

今回の研究は近年、新規の疾患バイオマーカーとして注目されているmicroRNAの乳房

炎の診断マーカーとしての可能性を探索することを目的とし、１）乳房炎発症牛、２）非乳房炎発症牛の乳汁を採取し、qRT-PCRにて既存の炎症マーカーとして確立されているmicroRNAの発現を測定した。

2. 実験

2-１実験供試牛

実験には搾乳中の乳牛 7 頭を用いた。乳汁は各牛４乳頭から採取し、California mastitis test（ＣＭＴ）法の変法にて乳房炎の有無を確認した。

2-２乳汁サンプル採取処理

採取乳汁は牧場から実験室まで４度にて保管移送し、12577×g で 10 分間（4℃）遠心後、上澄みを分離し、RNA の抽出まで－８０℃にて保存した。

2-３RNA 抽出

mirVana™ PARIS™ Kit(Applied Biosystems)を用いて、キットに推奨されるプロトコールに従い、Total RNA を抽出した。各サンプルは、条件を統一するために、すべて 300μl を抽出に用いた。

2-４microRNA 定量的逆転写 PCR 反応(qRT-PCR)

qRT-PCR はTaqMan microRNA を用いて、キットに推奨されるプロトコールに従い行った。本研究では hsa-miR-122、hsa-miR-222、hsa-miR-125b、hsa-miR-204、hsa-miR-205(Applied Biosystems) を解析に使用した。

逆転写反応は、0.2ml PCR チューブ(FastGene)に各ターゲット micro RNA 特異的 RT Primer 1.5μl、２倍希釈抽出 RNA 溶液 2.5μl、Reaction Mix 3.5μl [Reverse transcription buffer、dNTPs (2mM)、RNase inhibitor (0.5U/μl)、MultiScribe™ reverse transecriptase(7U/μl)]を混和し、16℃で 30 分間、42℃で 30 分間、85℃で 5 分間反応を行った。次に RT 産物 1.3μl を 96 ウェルプレート(3425-00, BIO-BIK)に分注し、TaqMan® universal master mix Ⅱ, no UNG と TaqMan microRNA assay 試薬(Applied Biosystems)を混和し、リアルタイム PCR システム 7300 (Applied Biosystems)を用いて、PCR 反応を行った。PCR 反応は、 95℃で 10 分間反応させた後、95℃15 秒、60℃1 分間を 40 サイクルで行った。

2-５qRT-PCR 反応結果の解析

リアルタイム PCR で得られた結果は、Applied Biosystems Sequence Detection Software Version 1.4 7300stem SDS software Core Application を用いて解析した。各反応毎に増幅曲線に対して、閾値を設定し、サンプル個々の Ct 値を算出した。各サンプル 2 回の Ct 値を測定し、平均を各サンプルの Ct 値とした。40 サイクルでも増幅曲線が得られず、

Ct 値が算出できなかったものはターゲットの microRNA が発現していないと判断した(ND;not detected)。

次に得られた各サンプルの Ct 値から⊿⊿Ct 法を用いた相対的定量法により、サンプル間での目的遺伝子(発現量を比較したい遺伝子)の相対発現比を比較した。本研究では、すべての反応の Ct 値の平均値を基準とし Ct 値の差(目的遺伝子の Ct 値－すべての平均 Ct 値)から⊿Ct 値をサンプル毎に算出した。その後、各 microRNA 毎に、すべてのサンプルの中で⊿CT 値の最も大きいサンプルを基準サンプルとして、他のサンプルの⊿Ct 値の差(各サンプルの⊿Ct 値－基準サンプルの⊿Ct 値)から⊿⊿Ct 値をサンプル毎に算出した。結果は、基準サンプルを 1 とした際の相対発現比 $x=2^{-\Delta\Delta Ct}$ として算出した。

2-６統計

各群間の Ct 値の差を Wilcoxon-Kruskal-Wallis の検定で解析し、$P<0.05$ を統計的有意と判断した。

3. 結果

3-１乳房炎牛の評価

7 頭中 3 頭で少なくとも 1 乳頭に CMT 検査にて凝集反応が見られ、乳房炎を発症していた。乳房炎発症牛 3 頭中２頭では発熱（４０℃以上）があった。

Table 1. Ct values of the microRNA qRT-PCR

Non-masitis	CMT	miR-122	miR-125b	miR-222	miR-204	miR-205
A－1		ND	ND	31.7	ND	35.8
A－2		35.9	ND	31.8	ND	34.5
B－1		35.0	ND	31.9	ND	ND
B－2		ND	37.0	28.9	ND	31.9
C－1		37.4	ND	31.1	35.7	ND
C－2		ND	34.3	28.6	ND	39.6
D－1		39.4	ND	30.7	ND	36.3
D－2		ND	ND	28.8	ND	37.2
Average		36.93	35.62	30.43	35.75	35.88
S D		1.69	1.36	1.34	0.00	2.36

Mastitis		miR-122	miR-125b	miR-222	miR-204	miR-205
E－1	+	36.9	24.3	24.1	36.5	30.0
E－2		37.3	26.2	31.8	39.2	31.8
F－1	+	37.1	25.6	29.8	ND	33.3
F－2		35.2	24.9	31.3	ND	32.7
G－1	+	ND	23.5	27.7	ND	32.0
G－2		37.9	23.6	29.9	37.6	32.8
Average		36.90	24.68	29.11	37.79	32.10
S D		0.91	0.98	2.60	1.12	1.09

Alphabet indicates each cows and following number indicates the breast. CMT; California mastitis test and + indicated the positive result. ND; not detected.

3-２　microRNA qRT-PCR 解析

qRT-PCR は各２乳房分の乳汁を解析し、乳房炎牛ではＣＭＴ凝集反応陽性乳汁と陰性乳汁を選んだ（非乳房炎発症牛；８、乳房炎発症牛のＣＭＴ凝集反応陽性；３、陰性；３）。

microRNA qRT-PCR 解析の結果は table 1 に示す。乳房炎発症牛では miR-204 が３乳房、miR-122 が１乳房で検出できなかった。非乳房炎発症牛では miR-222 のみが全例で検出できたが、それ以外は全例検出できたものはなく、miR-204 は１乳房のみで検出された。

miR-125b(p=0.0404)と miR-205(p=0.0223)において、乳房炎発症牛で有意に Ct 値の低下（microRNA 発現の増加）がみられた（Figure 1)。

非乳房炎発症牛、乳房炎発症牛のＣＭＴ凝集陽性乳汁と陰性乳汁の比較を⊿⊿Ct 法を用いた相対的定量法により行った。miR-125b では乳房炎発症牛（1781.2 倍から 11473.4 倍）が非乳房炎発症牛（測定可能であった 2 乳房で 1 倍と 6.5 倍）よりも著しく発現が増加しており、さらに、乳房炎発症牛で発熱（40℃以上）した個体のＣＭＴ凝集陽性乳汁（6496.7 倍と 11473.4 倍）は発熱していない個体のＣＭＴ凝集陽性乳汁（2700.1 倍）よりも高値を示した。乳房炎発症牛において miR-222 はいずれもＣＭＴ凝集反応陽性乳汁が同一個体の陰性乳汁よりも高値を示した（サンプル牛Ｅ，Ｆ，Ｇの陽性乳汁の相対発現値；220.4、4.1、18.2 倍で陰性乳汁の相対発現値；1.1、1.5、3.9 倍)。

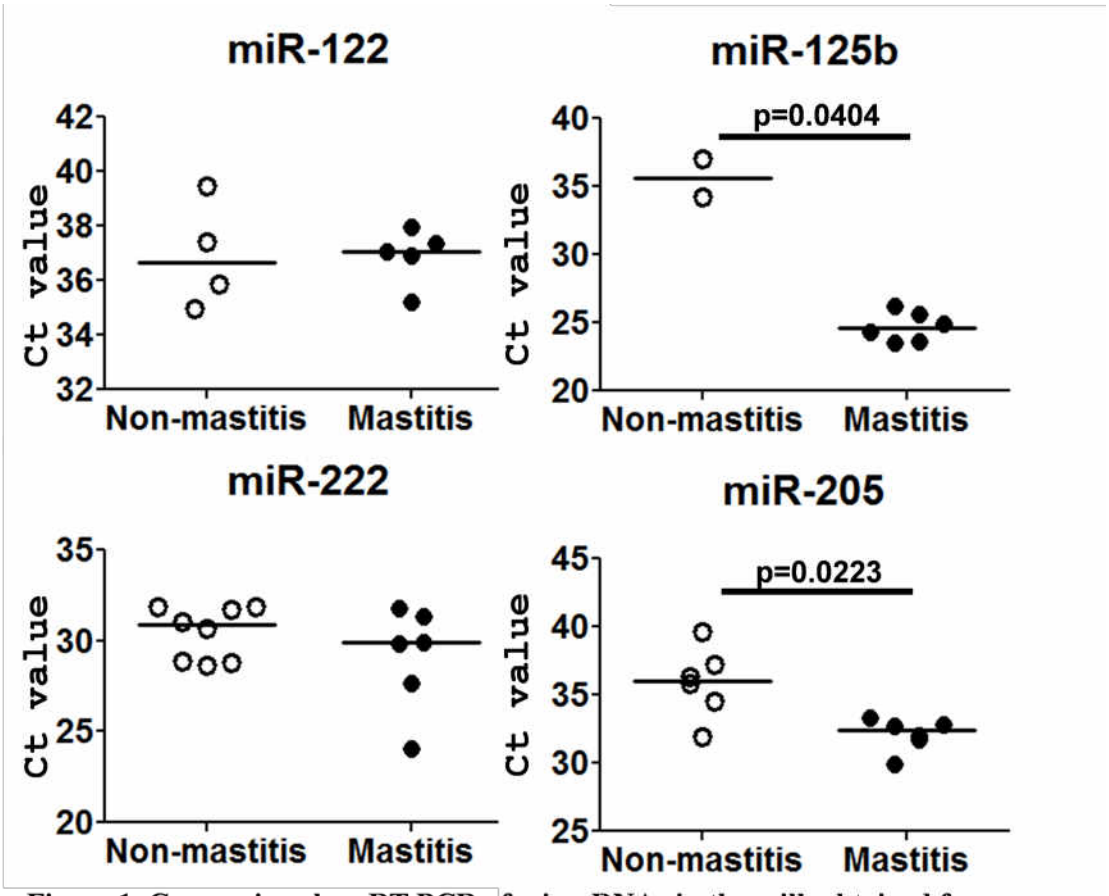


Figure 1 Comparison by qRT-PCR of microRNAs in the milk obtained from non-mastitis cow (open circle) or mastitis cow (closed circle). Horizontal line indicated median value.

4. 考察

これまで乳汁中の microRNA の発現に関する報告は少なく [4,5]、乳房炎発症牛の乳汁の microRNA の発現に関する報告はない。今回、qRT-PCR 法にて乳房炎乳汁中の microRNA を測定することに成功した。

特に乳房炎乳汁中では、microRNA-122 と 204 以外は 34 サイクル以内に増幅曲線も得られ十分に測定が可能であった。特に microRNA-125 b に関しては平均 Ct 値が 24.7 サイクルと著しく発現増加が認められた。一方で非乳房炎乳房の乳汁における Ct 値は microRNA-222 以外では多くのサンプルで 35 サイクル以上の反応が必要であり、今回選択した microRNA-222 以外の microRNA は正常な乳汁中には多く存在しないと考えられた。さらに microRNA-204 は多くのサンプルで検出できず、検出可能であったサンプルでもすべて 35 サイクル以上であったことから、乳汁中にはほとんど存在しないと考えられる。

乳房炎発症牛の乳汁中で多く発現していた microRNA-125b は非乳房炎発症牛では発現が認められた場合も Ct 値が 34 サイクル以上であり、乳房炎発症牛特異的発現 microRNA の可能性が示唆された。また、microRNA-125b は臨床的に重度の乳房炎牛でより高値をしめすことから乳房炎の重症度を反映している可能性も考えられる。

今回の結果の microRNA 発現パターンで興味深いのは乳房炎発症牛の microRNA-125b ではＣＭＴ凝集反応の陽性、陰性にかかわらず高値であること。一方で microRNA-222 は乳房炎発症乳汁でのみ高値を示すことであり、乳房炎を発症していない乳房からの乳汁中で高値を示さないことはより、乳房炎診断の選択性の高いマーカーとなる。

乳房炎発症乳汁中には白血球などの細胞成分が多く含まれることから、測定に白血球などの混入は否定できない。しかしながら、サンプルは採取後冷蔵で保存し、遠心後に細胞成分と分離してＲＮＡを抽出していること。また、多くの microRNA が CMT の陽性と陰性に依存しない変化を示していることから、今回の結果は乳汁中の microRNA を測定していると判断した。

今後はサンプル数を増やして解析結果の再現性の確認、さらに、同一個体から継時的にサンプリングを行い、乳房炎の治療に伴い microRNA の発現量が変化するかの検討が必要である。また、乳房炎発症前の乳汁 microRNA 測定を行い発症の予測が可能であるのかの検討も必要である。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いた財団法人鹿児島科学研究所に、心より深謝申し上げます。実験サンプルの採取、解析に協力いただいた鹿児島大学農学部学生の前村忠君と宮崎大学農学部助教の北原豪先生に心より深謝申し上げます。

6. 引用文献

1. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 6:857-66. (2006).

2. Miretti S, Martignani E, Taulli R, Bersani F, Accornero P, Baratta M. Differential expression of microRNA-206 in skeletal muscle of female Piedmontese and Friesian cattle. Vet J. 190:412-3. (2011).
3. Jin W, Dodson MV, Moore SS, Basarab JA, Guan LL. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. BMC Mol Biol. 11:29. (2010).
4. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. Silence. 1:7.(2010).
5. Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda T, Aoki N. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. Biochem Biophys Res Commun. 396:528-33. (2010).

MicroRNA as the new biomarker in milk of daily cow with or without mastitis

Naoki Miura

Department of Veterinary science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University

1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

Recently, the microRNA is promising the diagnostic biomarker of the several diseases in human medicine. Previous studies indicated that microRNA exists in milk both human and daily cow. However, no report has been investigated the existence of microRNA in mastitis cow's milk. In this study, we hypothesized that microRNA will be a diagnostic marker for mastitis of the daily cow. We measured Ct values of several microRNAs (miR-122, 125b, 222, 204, 205) in the milk from the cows with or without mastitis by qRT-PCR. The Ct value of the miR-125b and miR-205 was significantly decreased in the milk of mastitis (Wilcoxon-Kruskal-Wallis; $p<0.05$). Our findings suggests that the milk from mastitis cow contains the specific set of the microRNA depend on the condition. Further study including the large number of samples is required to certify whether the microRNA is the diagnostic biomarker for mastitis of the daily cow.

微生物を用いた切り花用品質保持剤の開発

宮之原　綾子

株式会社　しか屋
〒891-0144 鹿児島市下福元町 3840
TEL：099-267-7896

要旨

近年、植物の品質改善のために微生物を含んだ製剤が園芸などの分野で利用されている。弊社においても食品由来の弊社保有微生物が、水挿しした切花の日持ちを改善することを明らかにしていた。しかし、その際用いていた製剤は 3 種菌の混合物であり、効果的に作用している微生物の特定はできていない。そこで本研究では微生物の持つ切り花の品質保持能を明確にし、微生物を用いた切り花の活性剤の開発を目指した。弊社保有の微生物を単独で活け水に添加したところ、納豆菌が切り花の日持ちや活け水の清澄維持に有効であることがわかった。また、当該納豆菌がハイイロカビ原因菌である *Botrytis cinerea* に対して競合的に作用し、増殖を抑制することを、シャーレ上および植物体上で明らかにした。さらに、切り花の日持ちにはグルコースとフルクトースの混合物が非常に有効であることを示した。それらの糖と納豆菌を合わせることで、全て食品由来である、新規の切り花用品質保持剤の開発に成功した。この新製品の効果を数値的、組織学的に証明した他、多種の花でも品質の保持効果が得られることも明らかにした。

１．緒言

我が国の花卉生産額は世界第 3 位となっている。また、国産花卉由来の取引額（購入者価格）は約 9,412 億円となっており、酪農と同程度の大きな市場である。また鹿児島県は花卉の生産が盛んであり、産出額でも全国 10 位以内である。消費者の花の品質保持への関心は非常に高く、消費者の切り花への要望として日持ちする花へのニーズが高いことが農林水産省の調査でも示されている [1)]。

切り花の鮮度低下の原因として、生け水中の茎や葉の腐敗や導管の閉塞、栄養分の枯渇、内因性のエチレンの増加などがあげられる。これらを改善するため数種の品質保持剤が市販されている。それらの有効成分は重金属の銀や界面活性剤、防腐剤などの化学物質からなっており、環境や生物に与える影響が懸念されている。

一方、弊社はこれまでに、酵母、乳酸菌、納豆菌の三種菌混合液が花の日持ちに有効であることを実験で明らかにした。しかし、どの微生物がその効果をもたらすかは明確になっていない。そこで本研究では、弊社保有の酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、乳酸菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、納豆菌(*Bacillus subtilis var. natto ;* 納豆製造用)を別個もしくは各種割合にて活け水中に添加し、花の日持ちや水の汚染状態、悪臭発生状況を検討し、効果的に働いている微生物やその混合割合について明らかにする。その上で食品製造に用いられる安全な微生物を用いて切り花の活性剤を開発し、日持ち効果、水の汚染度合、悪臭発生状況の改善など効果を有する、機能的でかつ、環境負荷の少ない、安全な品質保持剤の開発を目指す。

２．実験

2.1. 花の日持ちおよび活け水の濁りに対する微生物種の影響

使用する花は国産のガーベラとし、生花店で購入した。花の先端から 30cm になるように水中で切り戻し実験に供した。水、酵母培養液、乳酸菌培養液、納豆菌芽胞液をそれぞれ活け水に添加し、ガーベラの日持ちを確認した。1 区 3 本ずつ、2 回の試験を行った。実験期間中の花と活け水の写真撮影を毎日行った。期間中の活け水の濁度は分光光度計（SHIMADZU UV-2500PC）により活け水の 660nm の吸光度を測定した。

2.2. 納豆菌のカビ抵抗性試験

ハイイロカビに罹患している花弁を PDA 培地（日水製薬株式会社製）で培養し、増殖した *Botrytis cinerea* を単離、純粋培養し、被検菌とした。「カビ検査マニュアル　カラー図譜」[2] に基づき、ペーパーディスク法による抗カビ試験を行った。すなわち、被検菌を PDA スラント培地で 7 日間培養したものに、生理食塩水を加え分生子懸濁液を作製した。PDA 寒天培地に分生子懸濁液を塗抹した後、中央に滅菌したペーパーディスクを置き、そこに納豆菌芽胞液を滴下して 30℃で 7 日間培養した。

また、植物体上でのカビ防除効果を検討した。使用する花はピンクバラの品種の一つであるプリティ　アバランチェとし、農家で入手した。花の先端から 30cm になるように水中で切り戻し、葉は 3 枚を残し全て切り落とした。実験区を 4 区設定し、それぞれ以下の処理を行った。処理を行ったあと、日を追って花の観察を行った。

１）水を噴霧した。（対照区）
２）花や葉に*Botrytis cinerea*の分生子懸濁液を噴霧した。（カビ区）
３）花や葉に*Botrytis cinerea*の分生子懸濁液と納豆菌芽胞液の混合液を噴霧した。（カビ＋納豆菌区）
４）納豆菌芽胞液を花や葉に噴霧し、その3日後*Botrytis cinerea*の分生子懸濁液を噴霧した。（納豆菌→カビ区）

2.3. 糖の選定

使用する花はプリティ アバランチェとし、農家で入手した。花の先端から30cmになるように水中で切り戻し、葉は3枚を残し全て切り落とした。実験区を3区設定し、それぞれ以下を活け水として花を挿し、日を追って花の観察を行った。

(1)水
(2)砂糖（市販上白糖）＋納豆菌
(3)グルコース＋フルクトース＋納豆菌

花の日持ちの指標として、花全体の重量を測定し、実験開始時から終了時の植物体重量変化率を比較した。

2.4. 製品の効果確認

完成した活性剤の日持ち及び退色抑制効果を実証するために、切り花実験を行った。

2.4.1　供試材料

使用する花は赤色バラの品種の一つであるレッドスターとし、市場で入手した。花の先端から30cmになるように水中で切り戻し、葉は3枚を残し全て切り落とした。

2.4.2.　活性剤処理

開発した活性剤を活け水に対して50倍希釈になるように添加し、バラを挿した。対照区として活性剤無添加の区を設定した。1つの花瓶に1本バラを挿し、各区3本ずつ用意した。

2.4.3.　花弁色調測定

外側花弁が水平になったときを満開とみなし、その時のブルーイングの出現状況を目

視により確認した。ブルーイングとは花の劣化に伴う花色の変化で、花弁が青みがかってくることをいう。また、花の外側から2～3層目の花弁を用いて定量的花色測定を行った。花弁の中央部の色調を分光側色計（MINOLTA CM-3600d）を用いてL*（明度）、クロマティクネス指数（a*,b*）、C*（彩度）値を測定した。また、その値より色調図を作成した。

2.4.4. 花弁組織観察

花弁のほぼ中央部位から約5×5mm角の小片を切り取り，安全かみそりの刃を用いて，徒手法により生切片を作製して，光学顕微鏡（OLYMPUS BH-2）により花弁の断面を観察した。

2.4.5. 花の日持ち

花が萎れ、観賞価値が無くなった日を「日持ち評価レファレンステストマニュアル　バラ（スタンダード）」[3]を基準として評価し、日持ち日数とした。

3．結果

3.1. 花の日持ちおよび活け水の濁りに対する微生物種の影響

実験 24 日目の花・活けの様子を Fig.1 に、活け水の濁度を Fig.2 に示す。納豆菌の区で日持ちが良好であった。また、水の悪臭の発生も少なく、濁りも少なかった。酵母・乳酸菌の区では花の日持ちは短く、水の濁りや悪臭発生が顕著であった。以上より、3 種菌のうち、納豆菌が花の日持ちに効果的に作用していることが示唆された。

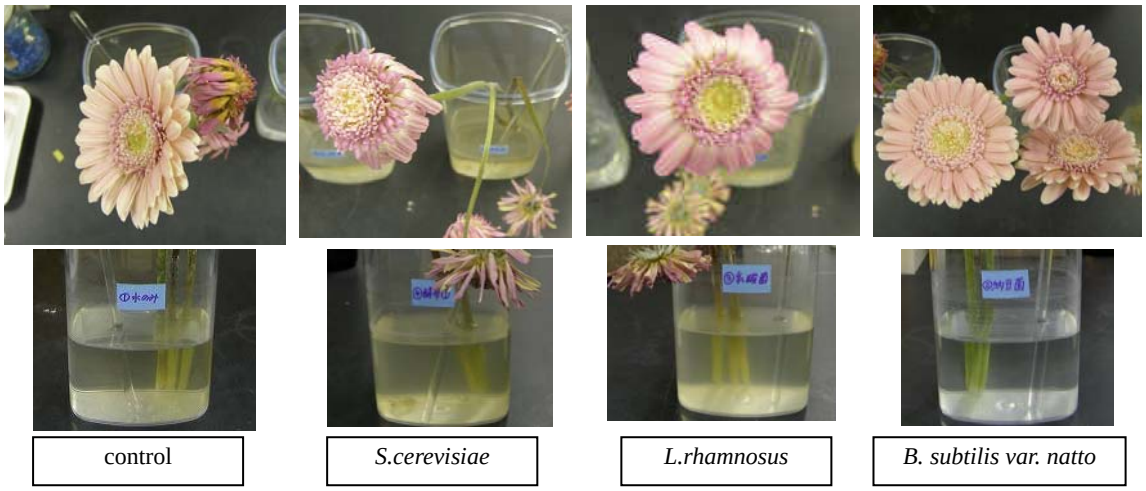


Fig1. Effect of microorganism on the vase life of cut gerbera and turbid of vase water (day 24).

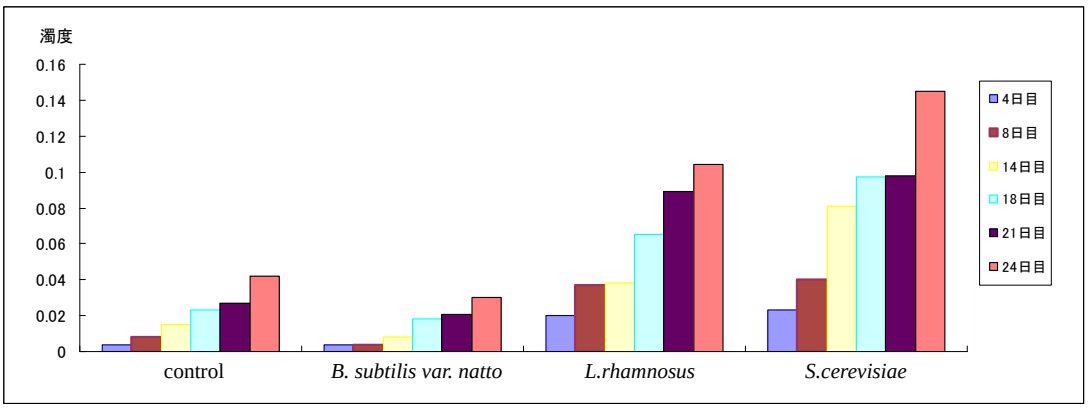


Fig2.　Turbidity change of vase water during experiment period.

3.2. 納豆菌のカビ抵抗性試験

ペーパーディスク試験の結果、中央のペーパーディスク（納豆菌を含む）の周辺の *Botrytis cinerea* に対して、納豆菌の増殖とともに阻止円が形成された（Fig.3）。これより納豆菌は *Botrytis cinerea* に抗カビ活性を示すことがわかった。

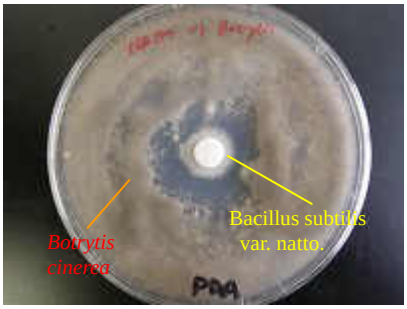


Fig.3
Antifungal activity of *Bacillus subtilis var. natto*.

植物体への噴霧試験の結果を Fig.4 および Table.1 に示す。試験開始後 3 日目には分生子懸濁液を含む溶液を散布した(2)～(4)において、花弁に茶色の斑点が観察された。7 日後には(2)カビ区において花が萎れ始め、(3)カビ＋納豆菌区でも 1 本花が萎れた。14 日目には(1)対照区、(2)カビ区において花が完全に萎れたが、納豆菌胞子液を含む溶液を散布した(3)カビ＋納豆菌区、(4)納豆菌→カビ区では 1 本しか萎れなかった。14 日目の(4)納豆菌→カビ区の花弁と葉を採取し、納豆菌用培地（GSP Agar）で培養したところ、納豆菌が増殖した（Fig.4）。以上より、納豆菌の噴霧により、ハイイロカビの病斑進展が抑制されることが示唆され、花弁および葉面上の納豆菌の存在も確認できた。

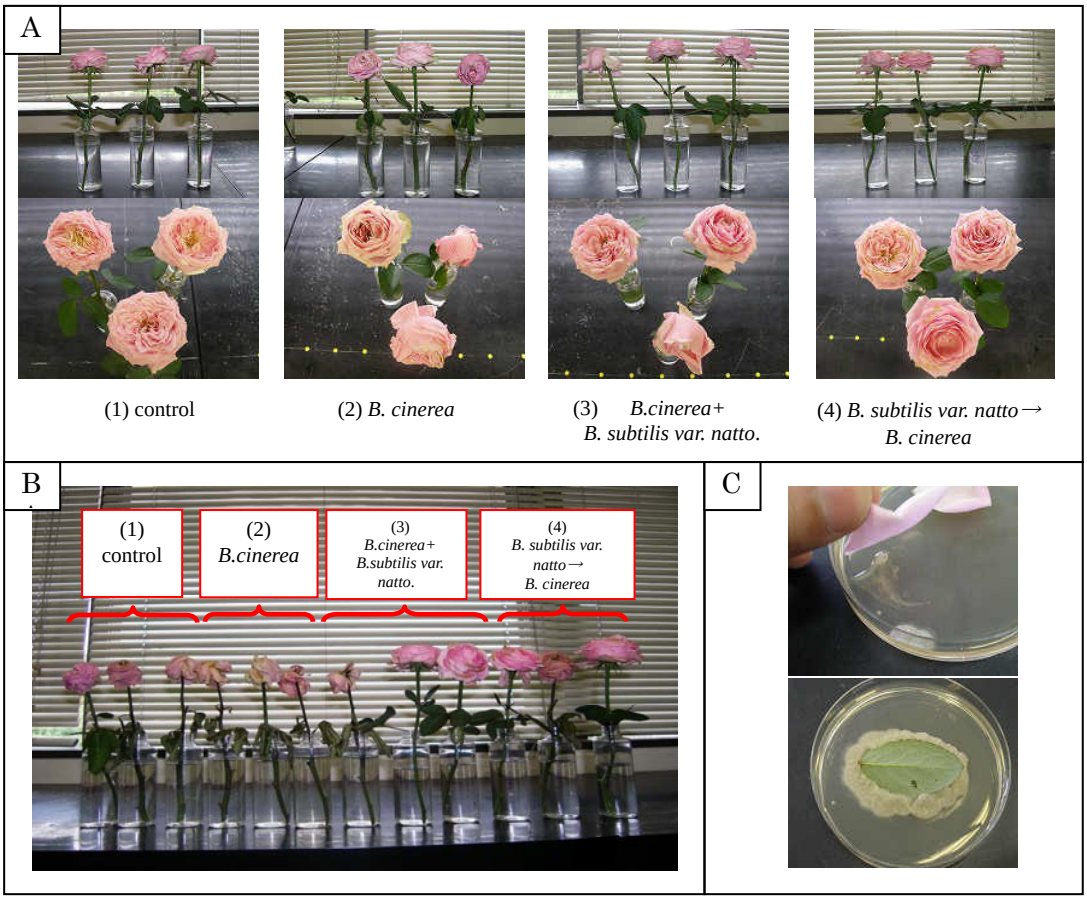


Fig.4 A) B) Flower longevity of cut roses as affected by spray treatment. Photographs were taken 7 d (A) and 14 d (B) after treatment.
C) *Bacillus subtilis var. natto*. on petal and leaf from (4) plant.

	3day	7day	14day
(1) control	◎	◎	×
(2) *B. cinerea*	◎	△	×
(3) *B.cinerea* + *B. subtilis var. natto.*	◎	○	△
(4) *B. subtilis var. natto*→*B. cinerea*	◎	◎	○

Table.1 Flower longevity of cut roses as affected by spray treatment.
◎good ○: slightly better △: slightly bad ×: bad

3.3 糖の種類による日持ちの違い

実験開始5日目の花の様子をFig.5に示す。(2)砂糖＋納豆菌区では3日目から萎れが見られ始め、全て開花しきらずに激しく萎れた。水と日持ちがあまり変わらず、効果は見られなかった。一方、(3)グルコース＋フルクトース＋納豆菌区では、中心部まできれいに開花し、実験終了後まで花弁、茎、葉ともに張りを維持していた。活け水においても濁りがみられなかった。重量変化率の変化をFig.6に示す。(3)グルコース＋フルクトース＋納豆菌区で重量が保たれており、外観・重量ともに劇的な日持ちが確認された。

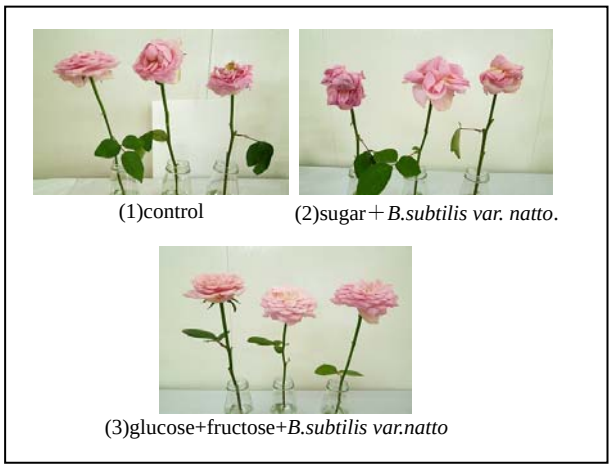


Fig.5 Flower longevity of cut roses as affected by addition of sugar or glucose/fructose. Photographs were taken 5 d after treatment.

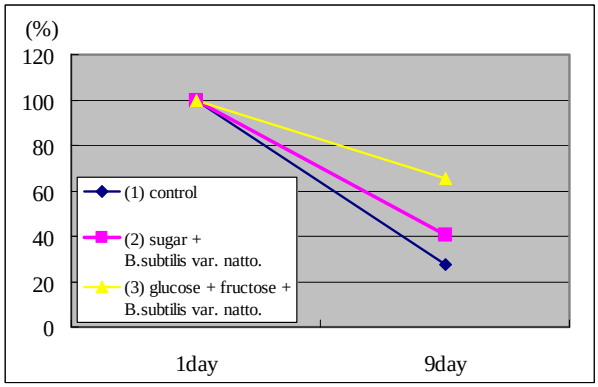


Fig.6 Ratio of weight variation of plant during experimental period.

3.4. 製品の効果確認

3.4.1. 花弁色調測定

9日目のバラの様子をFig.7に示した。Fig.7に示すとおり、試験開始後9日目で水のみの区では明らかにブルーイングが出現した。一方、活性水区ではブルーイングは出現せず、鮮やかな赤を維持していた。また、定量的花色測定の結果をFig.8に示した。L*（明度）、クロマティクネス指数（a*,b*）、C*（彩度）値とも活性水使用区の花の値が有意に高く(P<0.01; n=9)、色

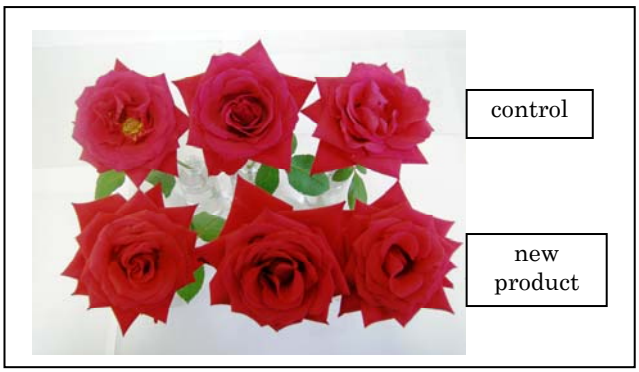


Fig.7 Bluing suppression on rose flower color by use of new product. Photographs were taken 5 d after treatment.

調図からも花色が明るく保たれていることがわかった(Fig.9)。

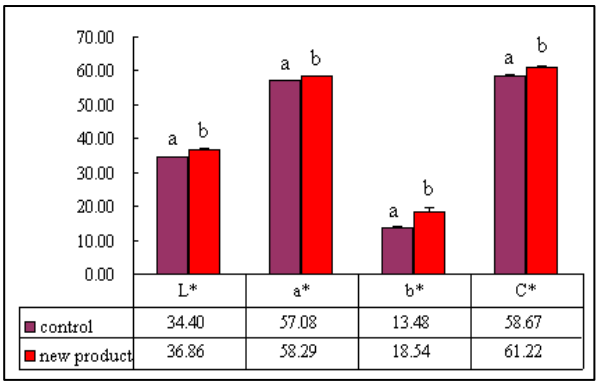


Fig.8 Effect of treatment with new product on petal coloration of fully opened roses.

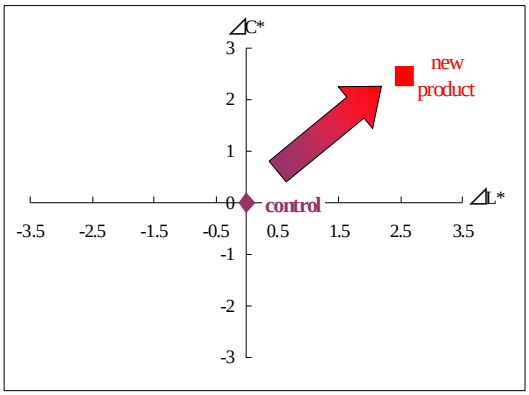
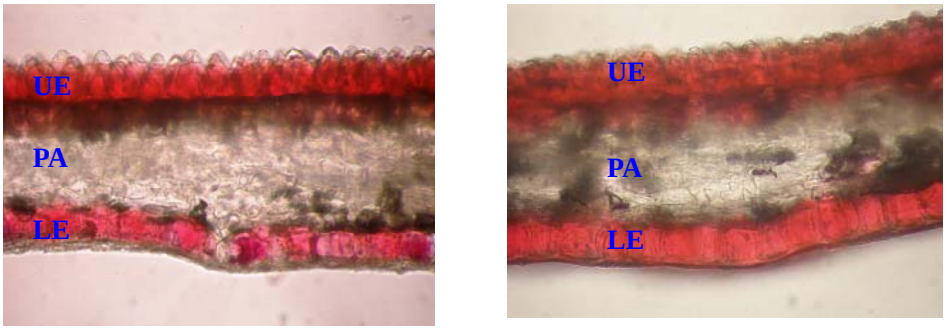


Fig.9 Effect of treatment with new product of expression of color tone in rose petals.

3.4.2 花弁表皮の組織観察

Fig.10 に結果を示した。水のみの区は下面表皮細胞中のアントシアニンの色が抜けているのに対し、活性水使用区では上面・下面とも細胞中色素が維持されているのが分かった。



control **new product**

Fig10. Structures in petal epidermal cells.
UE：Upper epidermal cells ：PA：parenchyma LE：Lower epidermal cells

3.4.3. 日持ち日数

水のみの区では12～15日で観賞価値を失うのに対し、活性水使用区では多少花が傾いたが17日以上花色は鮮やかで花弁もしっかりとしており、長い日持ちが確認できた(Fig.11)。

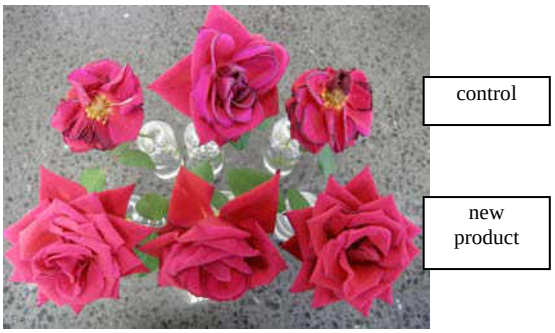


Fig.11 Flower longevity of cut roses as affected by addition of new product.
Photographs were taken 17 d after treatment.

４．考察

本研究では微生物を用いた安全な切り花の活性剤の開発を目指した。

弊社製品である三種菌混合液を切り花に散布、もしくは活け水へ添加することで、品質の改善がみられることが示唆されていた。効果的な微生物を追究するために単菌ごとに試験を行ったとこ

ろ、納豆菌が花の日持ちや水の清澄維持に効果があることが明らかとなった。

また、納豆菌が持つハイイロカビへの抵抗性も明確にした。「日持ち評価レファレンステストマニュアル　バラ（スタンダード)」によると、花の日持ち評価において『ハイイロカビの発生』が評価項目に入っていることから、ハイイロカビへの抵抗性は花の日持ちにおいて重要であることが分かる。バチルスなど、植物に対する微生物の抗病性は従来から経験的に知られており、ナス[4)5)]イチゴ[6)]など多種の作物への試験も行われている。また、バチルスを用いた微生物農薬も数種市販されている。しかし、これらの製品は微生物農薬として特化した菌種、菌株を用いており、実際に納豆製造現場で用いている納豆菌を使用していない。本研究での実験ではいずれも実際の納豆製造に使用されている納豆菌株を用いており、食用として用いられている納豆菌でも植物の品質改善効果を持つことが明らかになった。これは、安全性の面や、使用者の安心感を得る上でも非常に重要な点である。

また、より花の日持ち効果を得るために糖と微生物の併用を試みた。花の品質保持と糖の関連性は非常に深い。多くの花で糖の添加により花持ちの延長[7)]、つぼみの開花促進[8)]および花色の向上に有効であること[9)-11)]が報告されている。糖質が品質保持効果を示す最大の理由は、花弁細胞の膨圧を維持するとともに吸水を促進し、水分バランスを良好にすることであると考えられている。今回の試験でバラにおいてはグルコースとフルクトースにより日持ちが劇的に改善されることが分かった。バラでは、代謝糖の蓄積はグルコースとフルクトースの形で蓄積される[12)]ことから、効果的な花弁の開花および花持ちに関連していると思われる。

以上の過程で完成した新商品の効果を数値的データで示すために種々の実験を行った。花色に関してはブルーイングの有無で判定した。ブルーイングは赤色系バラ花弁に多く見られ，花色発現機構上並びに栽培・育種学上重要な問題として色素化学的あるいは細胞組織学的に多くの研究がなされてきた[13)-18)]。今回の実験において外観においても明らかに花色退色抑制が見られるほか、色差計で花色の測定を行うことにより、新製品の使用で花色の退色抑制が有意にみられることが数値的にも実証された。さらに、花弁の組織の観察も行った。Yuらによると、花のブルーイングは、老化に伴い花弁の下面表皮細胞中に出現する青色構造物を起点として起こる[19)]。今回の研究で活性水は下面表皮細胞中の青色構造物の出現を抑制し、その結果ブルーイングが抑制されていることが観察により示された。

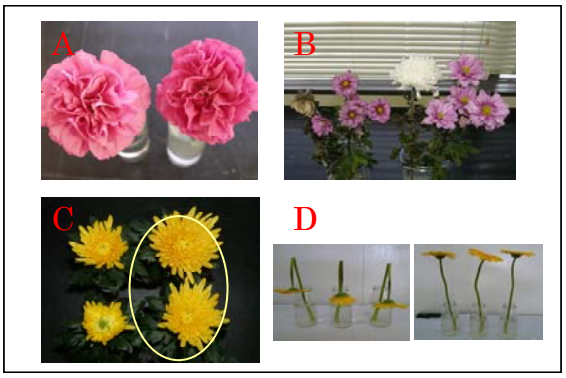


Fig.12　Freshness preservation of cut flowers by treatment with new product. Left side flower was treated with water and right side flowers was treated with new product.
A: carnation　B: chrysanthemum and Spray mum
C: chrysanthemum　D: gerbera

上記のバラの実験の他にも数種の花で実験を重ね、カーネーションやキク、ガーベラで完成した活性液の効果を実証することが出来た。結果をFig.12に示す。花種によって、退色の抑制、花径の増大、花の日持ちの延長など得られる効果は異なるが、いずれも花の良好な状態の維持につながる効果が得られた。花の種類により老化の要因は異なり[12)]、そのため、花の品質保持剤は花種により区別されていることも少なくない。しかし、今回開発された活性液は幅広い花に効果的であることが明らかとなった。

以上の研究より、食品に用いられる安全な微生物を用いて切り花の活性剤を開発し、その効果を示すことが出来た。

５．　謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いた財団法人鹿児島科学研究所に厚く御礼申し

上げます。また、御懇篤なご指導とご助言を頂いた鹿児島県工業技術センター食品・化学部の皆様に心より感謝いたします。

６． 引用文献

1) 農林水産省(平成22年)　花き産業振興方針　参考資料.
2) 高鳥浩介　監修「カビ検査マニュアル　カラー図譜」. テクノシステム.
3) 財団法人日本花普及センター「日持ち評価レファレンステストマニュアル　バラ（スタンダード)」http://www.jfpc.or.jp/_userdata/himochi/ver6/27.pdf
4) 農業技術センター, ボトキラー水和剤のダクト内処理によるナス灰色かび病防除
5) 石井貴明･嶽本弘之 (2007) Bacillus subtilis製剤を散布したナス花弁上でのBacillus subtilisの菌数と灰色かび抑制効果との関係. Jpn.J.Phytopathol.73(3)
6) 小河原孝司･富田恭範・田中有子・長塚久 (2006) トマト灰色かび病の防除実態と微生物殺菌剤を利用した化学合成殺菌剤の散布回数削減. 茨城県農業総合センター園芸研究所研究報告.14 : 35-42.
7) Halevy, A. H. and S. Mayak. (1981) Senescence and postharvest physiology of cut flowers, part 2. Hort. Rev. 3: 59-143.
8) 小山佳彦・宇田　明 (1994) カーネーションのつぼみ開花および品質に及ぼす温度，照度，ショ糖濃度の影響. 園学雑. 63: 203-209
9) Ichimura, K. and T. Hiraya. (1999) Effect of silver thiosulfate complex (STS) in combination with sucrose on the vase life of cut sweet pea flowers. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 23-27.
10) Ichimura, K. and M. Korenaga. (1998) Improvement of vase life and petal color expression in several cultivars of cut *Eustoma* flowers using sucrose with 8-hydroxyquinoline sulfate. Bull. Natl. Res. Veg. Ornam. Plants Tea. Japan. 13: 31-39.
11) Maekawa, S. and N. Nakamura. (1978) Studies on the coloration of carnation flowers. Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ. 13: 7-12.
12) 市村一雄 (2010) 切り花における収穫後の生理機構に関する研究の現状と展望. 花き研報. Bull.Ntl.Inst.Flor.Sci 10:11-53,
13) Yasuda , H (1970) Studies on “bluing effect” in the petals of red rose, I. Some cytochemical observations on epidermal cells having a bluish tinge. Bot. Mag. Tokyo 83:233-236.
14) Yasuda , H (1973) Studies on “bluing effect” in the petals of red rose, III. The histochemical detection of iron in the bluing petals of rose. Jour. Fac. Sci. Shinshu Univ .8:91-94.
15) Yasuda , H (1974) Studies on “bluing effect” in the petals of red rose, II. Observation on the development of the tannin body in the upper epidermal cells of bluing petals. Cytologia 39:107-112.
16) Yasuda , H (1976) Studies on “bluing effect” in the petals of red rose, IV. Calcium in the blue spherical body. Jour. Fac. Sci. Shinshu Univ. 11:41-46.
17) Yasuda , H and Kikuchi ,M (1978) Studies on “bluing effect” in the petals of red rose , V. A survey of the various bluing types. Jour. Fac. Sci. Shinshu Univ. 13: 79-86.
18) Yasuda , H (1982) Studies on “bluing effect” in the petals of rose, VI. Further observations on the development of blue color of the spherule. Cytologia 47: 717-723.
19) Yu, L, F and Yasuda , H (1993) Studies on the browning phenomenon in red rose petals. I cytological and histological observations of the fresh petals exhibiting the browning phenomenon. Jour. Fac. Sci. Shinshu Univ .28: 71-79.

Development of Biological Formulation to Keeping Flowers Quality

Ayaco Miyanohara
SHIKAYA Co., Inc.
3840 Shimofukumoto, Kagoshima, 891-0144, Japan

Abstract

In recent years the use of microorganism formulation is on the increase in order to improve of plant's quality. In our company, we confirmed that our microorganism that used for food improve in cut flower longevity. But, the formulation was mixture of 3 type strain, the effective bacterial strain and the effect of formulation are not confirmed yet. So in this study, we aimed at revealing microbial ability for flowers quality keeping, and development of flowers quality keeping biological formulation. Cut flower was treated with our 3 type microorganism singly. This experiment show that *Bacillus subtilis var. natto* was effective in longevity of flower and clarification of vase water. We show that the *Bacillus subtilis var. natto* has competition with *Botrytis cinerea* which is pathogen of gray mold, and growth of *Botrytis cinerea* was inhibited by *Bacillus subtilis var. natto* on dish and plant. Furthermore, we indicated dramatic availability of mixture of glucose and fructose for flower longevity. We combined the mixture with *Bacillus subtilis var. natto,* and we succeeded in the development of the new type flowers quality keeping agent which consist of material derived from food. Our experiment demonstrated not only effect of new product numerically and histologically, but also availability of new product for multiple kind of flower.

平成２４年６月１５日　発行

鹿児島市南栄二丁目９番地
（サンケイ化学株式会社内）
電話　099-268-7588
公益財団法人　サンケイ科学振興財団