

平成 17 年度 第二回合同学術講演会

# 講演要旨

日時:平成 17 年 11 月 4、5 日(金、土)

会場:帯広経済センタービル 6階 大会議室

日本農芸化学会北海道支部  
日本土壌肥料学会北海道支部  
日本応用糖質科学会北海道支部  
日本生物工学会北日本支部  
北海道農芸化学協会

連絡先:帯広畜産大学畜産学部、木下幹朗 (0155-49-5545)

北海道大学大学院農学研究科、橋床泰之 (011-706-3839)

帯広経済センタービル（帯広商工会議所）・6階 大会議室  
 （帯広駅より徒歩5分、Tel: 0155-49-5545）

および

十勝ビール（会場より徒歩5分、Tel: 0155-26-4141）

へのアクセス

### 札幌発 帯広方面列車時刻表

	スーパーとかち 1号	スーパーおおぞら 3号	とかち 3号	スーパーおおぞら 5号
札幌発	08:02	09:04	10:16	11:51
(新札幌)	08:10	09:13	10:25	11:59
帯広着	10:31	11:35	13:14	14:10

### 帯広発 札幌方面列車時刻表

	スーパーおおぞら 8号	とかち 10号	スーパーおおぞら 10号	スーパーとかち 12号	スーパーおおぞら 12号
帯広発	14:54	16:22	17:46	19:10	20:14
(新札幌)	17:09	19:05	20:05	21:31	22:22
札幌着	17:17	19:14	20:13	21:39	22:32

### 指定席往復割引きっぷ(R きっぷ)

「ゆき」と「かえり」に特急普通車指定席をご利用になれる往復割引きっぷです。

区間(おねだん)

設定区間	おねだん
札幌市内～帯広	11,940 円



## 平成17年度 第二回合同学術講演会日程

【11月 4日(金)】 於帯広経済センタービル 6階 大会議室  
(〒080-8711 帯広市西3条南9丁目1番地)

- ・ シンポジウム「産官学連携による地域新産業創出への挑戦」  
オーガナイザー 小田有二 (北海道農業研究センター)

開会 小田有二 (北海道農業研究センター) (14:00~14:10)

S-1. 北海道産の小麦粉を活用したプロジェクトの紹介

山本 嘉彦 (江別製粉(株)) (14:10~14:50)

S-2. てん菜糖蜜を原料とした糖脂質セレブロシドの発酵生産

田村 雅彦 (日甜製糖(株)) (14:50~15:30)

休憩 (15:30~15:40)

S-3. 高度リン酸化澱粉及びアントシアニン色素を含有する馬鈴薯を用いた機能性食品の開発

福島 道広 (帯畜大) (15:40~16:20)

S-4. 初乳成分の高度利用技術の開発-とくにミルクオリゴ糖利用を中心として

浦島 匡 (帯畜大) (16:20~17:00)

S-5. 都市エリア産学官連携促進事業

— 機能性を重視した十勝産農畜産物の高付加価値化に関する技術開発 —

佐山 晃司 ((財)十勝圏振興機構) (17:00~17:20)

総合討論 (17:20~17:30)

閉会 (17:30)

- ・ 懇親会: (18:00~20:00)

場所 : 十勝ビール (会場より徒歩5分、Tel: 0155-26-4141)

参加費 : 一般 4000 円、学生 2000 円

【11月 5日(土)】 帯広経済センタービル 6階 大会議室

- ・ 一般講演 (9:30~12:00)

講演様式: Power Point (OHP 対応可)、パワーポイントファイルは Windows XP を OS とした、Power Point version 2003 で作動することを確認しておいて下さい。可能な限り、1日目の11月4日(金)に受け付けにて、各自持参したファイルを支部が用意しましたノートパソコンにコピーして下さい。ここで、最終的な作動確認を行うことができます。

講演時間: 発表12分、討論3分

## プログラム

### A 会場

(座長: 崎浜靖子)

- 9:30 (A-1) 植物培養細胞のシュート再生能に対するアザシチジンの効果  
○殿村元基<sup>1</sup>, 高野 翔<sup>2</sup>, 猪狩和成<sup>2</sup>, 得字圭彦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>帯広畜大, <sup>2</sup>奈良先端大)
- 9:45 (A-2) インゲンマメ starch synthase III の酵素特性および N 末領域の機能解析  
○朝尾彩子<sup>1</sup>, 瀬野浦武志<sup>1</sup>, 磯野直人<sup>2</sup>, 濱田茂樹<sup>1</sup>, 伊藤浩之<sup>1</sup>, 松井博和<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>北大院農, <sup>2</sup>三重大生物資源)
- 10:00 (A-3) *Ruminococcus albus* 由来セロビオース 2-エピメラーゼの精製および反応特性  
○梅根伸悟, 山口幸三, 小林泰男, 渡辺賢二, 濱田茂樹, 伊藤浩之, 松井博和  
(北大院農)

(座長: 福田健二)

- 10:15 (A-4) メチロトローフ酵母のアルコールオキシダーゼ(AOD)アイソザイムの多様性とその形成機構  
○伊藤尚志, 藤村朱喜, 田所司行, 木下博貴, 宮地竜郎, 中川智行, 冨塚 登  
(東農大生物産業)
- 10:30 (A-5) 低温性酵母 *Cystofirbasidium capitatum* 由来ペクチナーゼについて  
○中川智行, 長岡俊紀, 宮地竜郎, 冨塚 登 (東農大生物産業)
- 10:45 (A-6) 低温性酵母 *Cystofirbasidium capitatum* のフルクトースビスリン酸アルドラーゼの発現制御  
○藤村朱喜, 長岡俊紀, 伊藤尚志, 宮地竜郎, 中川智行, 冨塚 登  
(東農大生物産業)

(座長: 小野寺秀一)

- 11:00 (A-7) 酪農場の溜水から分離した *Escherichia coli* のトレハラーゼについて  
村松 圭, ○星川太志, 稲垣 翼, 菊地政則 (酪農大院食品科学)
- 11:15 (A-8) *Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase の Met198 変異酵素の機能  
○佐分利 亘, 森 春英, 大塚博昭, 岩井 岳, 奥山正幸, 木村淳夫 (北大院農)
- 11:30 (A-9) 大腸菌 Trehalase(TreA)の触媒残基の部位特異的変異導入による解析  
○西塔沙織, 森 春英, 奥山正幸, 千葉誠哉, 木村淳夫 (北大院農)
- 11:45 (A-10) Glycoside hydrolase family 31 酵素の活性中心に保存されている Arg 残基の役割  
○汐川由希子, 奥山正幸, 森 春英, 千葉誠哉, 木村淳夫 (北大院農)

## B会場

(座長:斎藤勝一)

- 9:30 (B-1) 単生窒素固定菌 *Klebsiella oxytoca* のイネ植物体内における感染メカニズムについて  
○黒岩博史<sup>1</sup>, 須藤麻希子<sup>1</sup>, 大坂 剛<sup>1</sup>, 奥山英登志<sup>2</sup>, 湯本 勲<sup>3</sup>, 森田直樹<sup>3</sup>, 大和田琢二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>帯広畜大, <sup>2</sup>北大院地環研, <sup>3</sup>産総研生物機能工学)
- 9:45 (B-2) 糸状菌 *Amylomyces rouxii* によるポテトパルプ抽出物残渣の乳酸発酵  
○波佐康弘<sup>1</sup>, 三浦俊治<sup>2</sup>, 日高 智<sup>3</sup>, 橋本 誠<sup>3</sup>, 大西正男<sup>3</sup>, 小田有二<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大院連農, <sup>2</sup>雪印種苗, <sup>3</sup>帯広畜大, <sup>4</sup>北海道農研)
- 10:00 (B-3)  $O\text{-}\beta\text{-D-Fructopyranosyl(2}\rightarrow\text{6)glucopyranose}$  合成酵母の検索  
○岡田秀紀<sup>1</sup>, 川添直樹<sup>1</sup>, 山森 昭<sup>1</sup>, 小野寺秀一<sup>2</sup>, 塩見徳夫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>大高酵素(株), <sup>2</sup>酪農大院)
- 10:15 (B-4) Behavior of bovine lactoferrin on the growth of *Bifidobacterium longum*  
○Md. Morshedur Rahman, Woan-Sub Kim, Toshiaki Ito, Haruto Kumura, Kei-ichi Shimazaki  
( Laboratory of Dairy Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

(座長:石塚 敏)

- 10:30 (B-5) 北方小果実アロニアとハスカップの生体内抗酸化活性について  
○佐藤浩志, 小栗牧人, 西村弘行 (道東海大生物工)
- 10:45 (B-6) トマトの動脈硬化予防効果について(第一報)抽出物の抗酸化活性および ACE 阻害活性  
西村弘行, ○田中 聖, 上田千絵, 遠藤祐貴, 原田英之 (道東海大生物工)
- 11:00 (B-7) カバノアナタケの抗酸化活性  
稲垣美幸, ○工藤雄博, 小野寺秀一, 塩見徳夫 (酪農大院食品栄養科)

(座長:園山 慶)

- 11:15 (B-8) 赤ワイン発酵後圧搾粕に含まれる機能性脂質  
○佐々木岳, 柚木恵太, 得字圭彦, 広瀬秀司\*, 大西正男  
(帯広畜大畜産生命, \*池田町ブドウ酒研)
- 11:30 (B-9) ナガイモの加工処理による粘度低下とその防止法  
○松田陽介, 妙田貴生, 永井 毅, 永島俊夫 (東京農大食品科)
- 11:45 (B-10) Pork peptone stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and suppresses appetite in rats  
○Kaosar Sufian, Tohru Hira, Kyoko Miyashita, Takashi Nishi, Hiroshi Hara  
(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

・ 日本農芸化学会北海道支部報告会 (13:30~13:50)

・ 特別講演

増田宏志氏 (帯広畜大) (14:00~15:00)

「ニンジンの新しい体細胞胚形成系について」

座長: 塩見徳夫 (酪農大院)

棟方正信氏 (北大院工) (15:00~16:00)

「鮭皮コラーゲンのバイオマテリアル開発」

座長: 関川三男 (帯広畜大院)

## シンポジウム要旨

### S-1 北海道産の小麦粉を活用したプロジェクトの紹介 (江別製粉株式会社) 山本嘉彦

小麦粉には様々な用途があるが、ここでは需要が多いパンと中華麺用に絞って話を進めていく。弊社のお客様で北海道産小麦を使用する2次加工業者は多数あるが、食品の安全、安心を求め北海道産を選択する場合と、味にこだわった結果、北海道産にいきついた場合がある。後者の場合は、純度の良し悪しや蛋白の高低は問題にならず、うどん用の品種であるホクシンでも十分に対応できることがある。問題なのは、大量に生産し消費することを前提に物づくりをする加工業者への供給である。ライン化し、人間の手がさほど介在しない工場で使用する小麦粉は、外国産並の機械耐性を持つことが必要となる(1年間を通して品質が安定していることも大切な要素である)。すなわちタンパク質含量が多いこと、グルテンが強靱であることが要求される。北海道の小麦では、春まきの品種がこの品質条件を満たす。しかしながら、春まきの品種は収量が少ない事や、病気等に弱い、収穫時期の天候が好ましいものではない等で輪作体系の一環で栽培される事が多く、積極的に栽培する方向には行っていない。潜在的な消費を含めてこの需要を満たすとすれば、栽培リスクが低く収量の多い春まきの品種を作るか、現存の品種での栽培技術を改善するか、もしくは秋まきで品質がパンや中華麺に向く品種を作ることである。

産学官連携による地域新産業創出のテーマのもと、北海道産の超強力・強力小麦粉を用いた新高付加価値食品の開発という課題に取り組んだコンソーシアムに参画したのも前述の背景がある。研究内容としては、諸特性の優れる2系統の小麦品種開発。麺帯発酵に適したアルカリ耐性乳酸菌株として *Lb. plantarum* を取得し、発酵即席麺の製造条件や発酵による麺物性改善効果、保存安定性条件などを検討。ブレンド粉の特性解明を行い、最適ブレンド小麦粉調製の基礎データを取得。二次元電気泳動法による小麦品種特異的タンパク質を同定しその成果を冷凍パン生地や発酵即席麺生地の物性解析、製粉時の小麦粉等級判別、ブレンド粉の原料小麦品種判別等に応用している。本年度でこのプロジェクトを終えることとなるが、小麦粉は当然ながら、各種パン、冷凍生地のパン、生ラーメン、即席麺、パスタが商品化されている。

江別麦の会は、1998年に行われた『全国焼き菓子コンペin江別』の実行委員会のメンバーが立ち上げた会である。生産者を筆頭に、JA・農試・改良普及センター・市役所・大学・食加研・製粉会社が小麦の勉強会を始め、中京地区や小豆島の視察等の活動を通して、栽培・加工技術の確立や用途開発、販売先の開拓等に取り組んできた。平成11年に小豆島の製麺会社と共同開発して江別産『ホロシリ』を使用した手延べそうめん「北こがね」を発売した。さらに、会員以外の麦関係者が参集する「小麦サミット」も4年目を迎え、『ハルユタカ』の初冬まき栽培等を紹介している。現在、この栽培方法は滝川市や和寒町、下川町等に広がりがつつあり、初冬まき生産組合が発足した。平成15年からは、「江別経済ネットワーク」の一員として江別小麦麺を開発している。麦の会の母体となった『焼き菓子コンペ』はその後2002年に『菓子祭りin江別』と名を変え、2006年に3回目の開催を予定している。

昨今、地産地消が話題になっているが、小麦の世界では非常に難しいことであった。このことは、小麦生産者が自分の栽培している小麦の味を確かめることができないという事実凝縮されている。小麦は、製粉しその粉を加工しなければ食することができない。現状の製粉工場では最低でも20tの量の小麦を必要とするが、発生した小麦粉の消費に頭を抱えてしまう。弊社で開発した小規模製粉システム『F-ship』は500Kg単位での製粉が可能であり、小麦の地産地消実現の壁を1枚取り払ったと自負している。しかしながら、粉に加工するだけでなく、その地域の加工業者が消費者と共に切磋琢磨し、より高度な加工品を創造しなくては素材を提供するだけの北海道というレッテルは剥がせない。地域がしっかりと食品産業を育て、自ら主導権を握って中央の市場へ物を供給するために弊社もできる限りのお手伝いをさせていただきたいと考えている。弊社のもつシステムとノウハウをご活用いただければ幸いである。

## S-2 てん菜糖蜜を原料とした糖脂質セレブロシドの発酵生産 (日本甜菜製糖株式会社) 田村雅彦

研究背景)弊社および日本製粉株式会社、よつ葉乳業株式会社、北海道農業研究センター、帯広畜産大学は独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援センターの委託試験研究として平成 14 年度より「北海道の農畜産加工副産物を原料とした糖脂質セレブロシド発酵生産技術の開発」を産学官の研究コンソーシアム(セレブロシドコンソーシアム)として取り組んでいる。この技術開発では北海道で大量に存在する地域資源である、てん菜糖蜜(ビートモラセス)および乳清(チーズホエー)を原料として、新たに発見した酵母を培養することによりセレブロシドを効率的に大量生産することを目的としている。本演題ではビートモラセスの有効活用を目的とした取り組みについて紹介する。

甜菜は北海道の主要畑作物であり、それを原料とする製糖業は地域の基幹産業である。しかし、近年の甘味離れと内外価格差により、取り巻く環境は厳しい状況となっている。ビートモラセスは製糖業の副産物であり、年間約13,000t産出しているが、用途が限られており有効活用が望まれる資源である。本研究の1つであるビートモラセスを発酵原料とする取り組みでは、パン酵母と同属である *Saccharomyces kluyveri* およびワイン醸造や製パン用としても利用される *Kluyveromyces thermotolerans* 培養/発酵培地として活用して、トイレットリー製品や化粧品分野での活用が広まっているセラミド(遊離型セラミド)とセレブロシド(グルコシルセラミド)を含有する酵母菌体を大量に取得する技術開発を目指している。

### 方法・結果及び考察)

1. 好氣的条件での菌体生産 *Saccharomyces kluyveri* はクラブツリー効果ネガティブな性質をもつ菌株である。研究機関保存株を用いた検討を行い、セレブロシド含量と菌体収量の両面から菌株をグループ分けした結果、菌体収量とセレブロシド含量には相反する関係があった。グループ分けされたセレブロシド高蓄積群から単孢子分離を行い、既存の菌株と比較した結果から、CBS4800 株に由来する孢子分離株 SP-25 株を菌体収量とセレブロシド含量を両立している株として選択した(1)。

この菌株については大量培養を実施し、パイロットレベルでのセレブロシド回収を試みている。また、*Saccharomyces kluyveri* から得られたセレブロシドには 1,2-DMH で誘導される ACF 抑制が確認されている(2)。

2. 発酵条件での菌体生産 *Kluyveromyces thermotolerans* は *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール発酵菌株と同等以上の発酵性能をもち、さらには菌体残渣からセラミドとセレブロシドの回収が可能であることが分かった。双方の生産をリンクさせることで生産コストの低減が可能と考えられる。また、アルコール発酵条件でのセラミド/セレブロシド構成成分において鎖長や不飽和化における変化が見られた(3)。

- (1) Tamura, M., O. Matsumoto, N. Takakuwa, Y. Oda and M. Ohnishi., 2005. Production of cerebroside from beet molasses by the yeast *Saccharomyces kluyveri*. Food Biotechnology, 19, 95-105.
- (2) Aida, K., M. Kinoshita, M. Tanji, T. Sugawara, M. Tamura, J. Ono, N. Ueno and M. Ohnishi., 2005. Prevention of aberrant crypt foci formation by dietary maize and yeast cerebroside in 1, 2-dimethylhydrazine-treated mice. J. Oleo Sci., 54(1), 45-49.
- (3) Tamura, M., K. Kimura, K. Yunoki, O. Matsumoto, N. Takakuwa, Y. Oda and M. Ohnishi., 2005. Simultaneous production of sphingolipids and ethanol by the yeast *Kluyveromyces thermotolerans*. Folia Microbiologica (submitted)

### S-3 初乳成分の高度利用技術の開発—とくにミルクオリゴ糖を中心として (帯広畜産大・畜産衛生) 浦島 匡

北海道内では年間に40万頭、十勝管内では年間に10万頭の乳牛が1年間に出産する。そこから初乳は分娩後1回目の搾乳により8リットルが採集され、うち半分は子ウシに摂取させ、それ以外のものは出荷されないで主に酪農家で自家消費されている。未利用の初乳の利用を図るなら、1年間に計算上北海道内で1600トン、十勝管内で400トンの回収が可能である。

発表者ら含まれる成分含量の変動データに基づき、分娩後とくに48時間以内に搾乳されたものを初乳と定義する。初乳には抗体、ラクトフェリンなどの生理活性物質も豊富に含まれているが、発表者らはその中で抗感染因子やプレバイオティクスとしての生理活性が注目されるミルクオリゴ糖に着目し、その高度利用開発をめざして生研機構異分野融合コンソーシアムを発足させた。初乳中にミルクオリゴ糖は9種の中性糖ならびに11種の酸性糖(シアル酸含有オリゴ糖)が発見されており、その含有量は1リットルあたり1グラム以上である。それらの中でとくに3'-シアリルラクトースが主要成分であり、同糖の生理活性に着目してその高度利用を図る。

コンソーシアムは、シアル酸含有オリゴ糖を食品素材や家畜飼料用素材として利用するために、有機溶媒を使用しない方法での分画技術の確立を行う。分離した同成分は、各種の細菌、ウイルス、原虫、寄生虫に対する抗感染効果や免疫調整効果を調べるとともに、それを化学修飾してシアログリコサイドとし、インフルエンザウイルスなどのウイルスに対する宿主細胞侵入阻止作用、病原性の原虫に対する侵入阻止作用を調べる。またシアログリコサイドを繊維素材に固定化し、ウイルス侵入阻止効果を有するフィルターの開発を行う。

そのような試みにより、初乳より分画したシアル酸含有オリゴ糖や化学的誘導体による抗感染性を付与した家畜飼料素材、機能性食品素材、医薬品素材の開発を推進するものである。

## S-4

高度リン酸化澱粉及びアントシアニン色素を含有する馬鈴薯を用いた機能性食品の開発-生研センター・生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業-

(<sup>1</sup>帯広畜産大・畜産科学, <sup>2</sup>北農研)

○福島道広<sup>1</sup>, 島田謙一郎<sup>1</sup>, 橋本 誠<sup>1</sup>, 野田高弘<sup>2</sup>

### ① 研究目的及び目標とする成果

北海道では年間100万トンの馬鈴薯が澱粉へと加工され、水産練り製品、片栗粉、麺類製造などに使われているが、価格の安い輸入コーンスターチ等に押されて厳しい状況に追い込まれている。本研究は、当該地域の作物学、糖質科学、醸造、栄養生化学といった多面的な研究分野において実績のある大学・独立行政法人研究機関に加え、商品開発能力の高い食品会社が加わり、北海道の重要な畑作物である馬鈴薯を有効活用する研究開発を通じて新産業を創出することを目的としている。すなわち、高度リン酸化澱粉とアントシアニン色素をともに高濃度蓄積した馬鈴薯を選定し、それを原料とした抗酸化作用、脂質代謝改善作用、などの多面的な機能性を有する新規な食品やビールなどの飲料を開発する。

### ② 研究開発の計画・方法

独立行政法人農業研究機構北海道農業研究センターは、当研究機関の保有する品種・系統の中から、高度リン酸化澱粉とアントシアニン色素をともに高濃度蓄積する有望系統材料の選定を行い、高度リン酸化澱粉・澱粉粕の特性を解明し、さらには微生物を用いた澱粉粕の発酵技術を開発する。藤女子大学は澱粉について、帯広畜産大学は澱粉粕、アントシアニンなどの健康機能性に関して解析する。ハウス食品(株)は、高度リン酸化澱粉やアントシアニン色素を高濃度蓄積する馬鈴薯を利用し、新規な食品を開発する。東京農業大学・十勝ビール(株)は、高度リン酸化澱粉とアントシアニン色素をともに高濃度蓄積する馬鈴薯を利用し、ビールをはじめとした新規な飲料を開発する。

### ③ 高度リン酸化澱粉粕及びアントシアニンの健康機能性の解明

馬鈴薯の需要拡大のために、機能性を有するアントシアニン色素を含有する紫肉または赤肉の品種が育成されている。また馬鈴薯澱粉粕は用途が限られており廃棄されているのがほとんどである。本研究では、新しく育成されたアントシアニン含有馬鈴薯及び高度リン酸化澱粉製造過程で生じた澱粉粕の新たな健康機能性を見いだすことを目的とした。

その結果、937ppm リン含有のホッカイコガネ澱粉粕及び 580ppm リン含有のベニマル澱粉粕では、体重増加量、摂取量には差はみられなかったが、血清脂質濃度は低下する傾向がみられ、特にホッカイコガネ澱粉粕では血清中性脂肪濃度を、ベニマル澱粉粕では血清コレステロール濃度を対照区に比べ有意に低下させていた。さらに盲腸内での短鎖脂肪酸の増加、糞便中への胆汁酸排泄増加がみられた。脂質代謝に関わる遺伝子 mRNA の発現ではコレステロール 7 $\alpha$  水酸化酵素及び脂肪酸合成酵素 mRNA 発現がそれぞれ増加する傾向と減少する傾向が認められた。以上、澱粉粕の脂質代謝改善効果は上記の作用機序によって血清脂質を低下させている可能性が示唆された。次に、馬鈴薯アントシアニンの健康機能性について検討を行った。その結果、ラットへの GalN 投与による急性毒性試験では紫色素画分及び赤色素画分共に血清 GOT、GPT、ALP、LDH 活性を有意に低下させており、さらに肝臓中の過酸化脂質濃度の低下傾向及び還元型グルタチオン濃度の増加傾向がみられた。特に紫色素画分ではそれらの値が有意な差で認められた。以上の結果より、馬鈴薯アントシアニン色素には肝障害抑制効果及び抗酸化効果を有する可能性が示唆された。

今後は、これらの成果をコンソーシアムの他研究機関に発信して、新規の食品・飲料開発の素材として活用されることを期待している。

## S-5 都市エリア産学官連携促進事業－機能性を重視した十勝産農畜産物の高付加価値化に関する技術開発 (科学技術コーディネーター) 佐山晃司

北海道及び帯広市は平成 17 年度の文部科学省都市エリア産学官連携促進事業に『農産物に特化したライフサイエンス領域』に応募し、幸いにして採択頂いた。以下本事業の概要を報告しご参考に供したい。

目的)都市エリア産学官連携促進事業の目的とするところは、大学などの有する研究シーズと、地域社会のニーズを融合させ、新規事業を創出するなど、個性ある地域社会の持続的発展を目指す知的イノベーションであり、いわば新しい地域興しである。

既に終了したものを含めて全国 45 エリアで展開されており、北海道では平成 15 年に開始された函館エリアに次いで二番目である。函館エリアは水産物、具体的には地域の特産品であるガゴメコンブとイカに絞込んだ事業を展開中である。

十勝エリアでは我が国有数の畑作、酪農畜産地帯である特色(個性)を活かし、BSE の研究で世界をリードする帯広畜産大学をコア研究機関と位置づけ、本事業に取り組んでいる。

内容)本事業は産学官の共同研究事業と研究交流事業より構成されている。予算は年間 1 億円で期間は 3 ヶ年(平成 17/6-20/3)である。

### (1)共同研究事業

メインテーマは『機能性を重視した十勝産農畜産物の高付加価値化に関する技術開発』であり、機能性を切り口として十勝産の農畜産物の見直しを行い、機能性食品の開発など新規事業の創出を目指している。

具体的には以下の 5 のサブテーマより構成されている。

- ・馬鈴薯からの有用ペプチドの生産技術開発
- ・ソバ、豆類の健康機能性スプラウトの研究開発
- ・長いもを利用した機能性食品の開発
- ・ナチュラルチーズの高品質化と安全性確保技術の開発
- ・DNA マイクロアレイ法を用いた食品機能評価システムの構築

### (2)研究交流事業

本事業を円滑に進めるため『都市エリア産学官連携推進委員会』を設置し、下部組織として『事業ワーキンググループ』、『研究ワーキンググループ』を立ち上げ、その活動を通じて本事業の推進を図っている。研究成果については積極的に公表し、本エリアで展開されている他の農畜産関連プロジェクトとも連携を取り合いながら、十勝エリアを国際的な農畜産科学研究のモデルエリアとして発展させて行くという共通認識の下、研究交流事業を積極的に進めて行く。

その他)本事業の中核機関は財団法人十勝圏振興機構が担い、産学官の連携が円滑に進展するように、総力を挙げて取り組んでいる。本事業の実働的メンバーは産(民間)として 11 社、学として 3 大学、官として 5 研究機関であり、今後の展開に応じて産のメンバーの参入を積極的に進めて行く予定である。現在 60 名を超える研究者、技術者が本事業に取り組んでおり、必ずや大きな成果があるものと期待している。

## 一般講演要旨

### A-1

植物培養細胞のシュート再生能に対するアザシチジンの効果

(<sup>1</sup>帯広畜産大畜産生命、<sup>2</sup>奈良先端大院バイオ)

○殿村元基<sup>1</sup>、高野 翔<sup>2</sup>、猪狩和成<sup>2</sup>、得字圭彦<sup>1</sup>

目的) 植物細胞は一旦体細胞として分化した後にも脱分化し、再び器官や個体を作り直す分化全能性を持っている。体細胞からのシュート再分化はタバコ、シロイヌナズナをはじめとする多くの植物で起こることが知られており、この再生の過程は①体細胞の脱分化、②シュート形成能の獲得、③シュート形成の3段階で起こると考えられている。このうち脱分化と再分化能の獲得は、カルス化のときに起こると考えられる。しかし、カルス化を長期にわたって行うと、細胞はシュート形成能を失ってしまい、シュート誘導条件下でも再生が起こらなくなる。本研究では、シロイヌナズナのカルス培養の長期化による再分化能低下の原因の可能性として、DNAのメチル化について試験した。メチル化阻害剤アザシチジンのシュート再分化に対する影響と、シュート形成関連遺伝子の発現パターンについて解析した。また、低メチル化変異体におけるシュート再生についても調べた。

結果) アザシチジンをカルス培養期間に与えると、長期間培養しても、シュート再生培地へ移した時の再生率低下が軽減されることを見出した。DNA低メチル化変異体の *ddm1* においても同様に、カルス培養が長期化してもシュート形成率は高いままだった。これらのことから、カルス培養時にメチル化状態が変化し、シュート再生に関連する遺伝子群の発現が起こりにくくなっているのではないかと考えた。そこで、*STM*、*WUS*、*CUC1* といったシュート形成に関わる遺伝子について RT-PCR を行い、培養時の発現パターンの変化を調べた。カルス培養期間が長くなると、*STM* の発現レベルは低くなり、*WUS* は高くなった。また、シュート誘導培地へ移植したときに、*CUC1* の発現レベルの上昇が鈍化していた。これらの現象は、アザシチジンを添加することで、部分的に回復した。

### A-2

インゲンマメ starch synthase III の酵素特性および N 末領域の機能解析

(<sup>1</sup>北大院農・応生科、<sup>2</sup>三重大学・生物資源)

○朝尾彩子<sup>1</sup>、瀬野浦武志<sup>1</sup>、磯野直人<sup>2</sup>、濱田茂樹<sup>1</sup>、伊藤浩之<sup>1</sup>、松井博和<sup>1</sup>

【研究背景】植物のデンプン合成に関与する酵素の一つである、starch synthase (SS) は ADP-グルコースのグルコース残基をグルカン鎖の非還元末端に転移する反応を触媒する。高等植物には少なくとも 5 種の SS アイソザイムが存在する。そのうち、SSIII に関する報告は少なく、酵素機能については未だ明らかにされていない。SSIII の N 末側にはすべての SS アイソザイムに共通する保存領域とは別に、500 アミノ酸残基以上からなる巨大な付加領域が存在する。この領域は植物起源に関わらずすべての SSIII で高度に保存されていることから、何らかの機能を有していると推測された。本研究ではインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 由来完全長 SSIII および N 末領域を欠失した変異酵素 ( $\Delta$ N-SSIII) の大腸菌発現酵素の性質を調べ、SSIII の酵素化学的性質および N 末領域の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】完全長 SSIII と  $\Delta$ N-SSIII をそれぞれ大腸菌体内で発現し、電気泳動的に均一に精製した組換え酵素の諸性質を調べた。完全長 SSIII はインゲンマメ由来の他の SS アイソザイムと比べ約 10~100 倍の極めて高い比活性を示した。一方、 $\Delta$ N-SSIII の比活性は完全長 SSIII の約 1/10 にまで低下した。アミロペクチン、グリコーゲンおよび ADP-グルコースに対する速度パラメータを両酵素間で比較したところ、 $\Delta$ N-SSIII のグルカン鎖に対する  $K_m$  値が顕著に上昇していた。また、 $\Delta$ N-SSIII の至適 pH はわずかに酸性側にシフトした。以上の結果から、SSIII の N 末付加領域はグルカン鎖との結合や酵素の構造維持に関与することが示唆された。

*Ruminococcus albus* 由来セロビオース 2-エピメラーゼの精製および反応特性

## A-3

<sup>1</sup> 北大院農・応生科, <sup>2</sup> 北大院農・生資生

○梅根伸悟<sup>1</sup>, 山口幸三<sup>1</sup>, 小林泰男<sup>2</sup>, 渡辺賢二<sup>1</sup>, 濱田茂樹<sup>1</sup>, 伊藤浩之<sup>1</sup>, 松井博和<sup>1</sup>

【研究背景】セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は、セロビオースの還元末端側グルコースに作用し、グルコシルマンノースの生成を触媒する酵素である。天然に多量に存在するセルロース等は、難分解性でありその有効利用は不十分な状況といえる。セルロース資化性微生物には、難分解性多糖の加水分解酵素だけではなく、これらの糖を異性化あるいは転移することで多種多様な糖を作り出す有用酵素が多く存在すると考えられる。その一つである CE は、1967 年に酵素活性が確認され、1969 年に反応機構が予測されたが、以来 CE に関する報告は全くない。本研究では、菌体培養の特殊性と酵素存在が微量であることから困難とされた CE の精製に世界に先駆けて成功したので、その反応特性とともに報告する。

【方法・結果及び考察】本研究ではセルロース資化性微生物である *Ruminococcus albus* を用いた。本微生物は反芻動物の第一胃に棲息する絶対嫌気性菌であり、炭酸ガスを用いた絶対嫌気条件下での培養を必要とする。濾紙を炭素源とした CE 誘導培地 18 L で *R. albus* を培養し、培養上清から粗酵素液を調製した後、5 段階のクロマトグラフィーを行うことにより、電気泳動的に単一のタンパク質を得た。SDS-PAGE から算出される分子量は約 41,000 であり、最終的には 102  $\mu$ g の精製酵素が得られた。本酵素をセロビオース以外のオリゴ糖及び各種単糖を基質として反応させ、薄層クロマトグラフィーで解析した結果、 $\beta$ -1,4 結合を有するラクトースとセロオリゴ糖において反応生成物が確認された。これらの基質特異性及び反応生成物の解析結果より、本酵素は、基質の  $\beta$ -1,4 結合並びに還元末端グルコースを認識することが示唆された。

## A-4

メチロトロフ酵母のアルコールオキシダーゼ(AOD)アイソザイムの多様性とその形成機構  
(東京農大・生物産業・食品科学)

○伊藤尚志, 藤村朱喜, 田所司行, 木下博貴, 宮地竜郎, 中川智行, 冨塚 登

【目的】メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* はメタノール代謝の初段階酵素 AOD を 9 種のアイソザイムとして保持しており<sup>1)</sup>、本アイソザイムはメタノール代謝におけるホルムアルデヒド生産量を調節することでメタノール代謝を巧みに制御すると推測されている<sup>2)</sup>。一方、我々は AOD アイソザイムが *P. methanolica* のみでなく、メチロトロフ酵母群に広く分布するものと考えている。本研究ではメチロトロフ酵母における AOD アイソザイムの多様性とその形成機構について解析した。

【結果および考察】メチロトロフ酵母 18 株の AOD ザイモグラム解析を行った結果、*Candida pignaliae* および *C. sonorensis* が *P. methanolica* 同様に AOD アイソザイムを形成した。これらの 9 種の AOD アイソザイムは、Rf 値が最も小さい AOD と最も大きい AOD が共に異なる N 末端アミノ酸配列を保持していた。また、両株はサザン解析の結果、2 種の AOD 遺伝子を保持することが明らかになった。よって、両株の AOD アイソザイムは *P. methanolica* 同様、2 種の AOD 遺伝子産物のランダムな会合により形成されるものであり、このような AOD アイソザイムを有するメチロトロフ酵母は自然界に広く分布するものと推察された。

<sup>1)</sup> Nakagawa *et al.* (1999) *Yeast* 15:1223.

<sup>2)</sup> Nakagawa *et al.* (2002) *Yeast* 19:1067.

## A-5

低温性酵母 *Cystofirobasidium capitatum* 由来ペクチナーゼについて  
(東京農大・生物産業・食品科学)

○中川智行, 長岡俊紀, 宮地竜郎, 冨塚 登

【目的】ペクチンは植物細胞壁の構成多糖の一つで、植物性食材の食品加工を様々な形で妨げる。我々は食品中のペクチン除去に有効な低温性産業酵素の開発を目的に、自然界から 5 株の低温性ペクチン資化性酵母をスクリーニングし、それら菌株が持つペクチナーゼについて検討を行ってきた。本研究では *C. capitatum* PPY-1 株の持つペクチナーゼを精製し、それらの酵素化学的諸性質について報告する。

【結果および考察】*C. capitatum* PPY-1 株はペクチナーゼとしてポリガラクトソナーゼ(PG)、ペクチンリアーゼ(PNL)を持ち、両酵素はともに 0°C においても十分な酵素活性を示した。また、PG の至適 pH は 4.4 であるのに対し、PNL は 8.0 であった。また、PG はペクチン酸に対して高活性を示し、PNL はメチルエステル化度が高いペクチンに対して高活性を示した。さらに、両酵素はペクチン酸およびペクチンの粘性を低下させる作用を持ち合わせていたことから、*C. capitatum* PPY-1 株由来両ペクチナーゼは食品中のペクチン除去に適した、新規低温性産業用酵素として利用できるものと思われる。

(1) Nakagawa T *et al.* (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 419-421.

(2) Nakagawa T *et al.* (2006) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42: In press.

## A-6

低温性酵母 *Cystofilobasidium capitatum* のフルクトースビスリン酸アルドラーゼの発現制御  
(東京農大・生物産業・食品科学)

○藤村朱喜, 長岡俊紀, 伊藤尚志, 宮地竜郎, 中川智行, 冨塚 登

【目的】低温環境に対し、生物は酵素を低温適合型へ改変したり、適応に必要な諸因子の発現制御を行い、円滑な代謝を維持していると考えられる。我々は低温性酵母 *Cystofilobasidium capitatum* の低温適応機構を解析しており、その機構は中温性酵母とは異なると推測している。本研究では出芽酵母において低温誘導性遺伝子(LOT)として報告されているフルクトースビスリン酸アルドラーゼ(FBA)<sup>1)</sup>をターゲット遺伝子として用い、*Cys. capitatum* *FBA1* の一次構造とその転写制御について解析を行った。

【結果および考察】*Cys. capitatum* *FBA1*(*CcFBA1*) の cDNA は 1,080bp からなる ORF を含み、その推定アミノ酸配列は *Cryptococcus neoformans* Fba1p と 72%、*Ustilago maydis* Fba1p と 66%の相同性を示した。また、*CcFba1p* は aldolase class-II signature 1 および 2 を保持していた。一方、*FBA1* は *Kluyveromyces lactis* では酸素濃度により、出芽酵母では低温により発現が制御されていることから、*CcFBA1* のこれら発現誘導を解析した。その結果、*CcFBA1* は酸素の有無にかかわらず発現され、また、生育温度による発現の差異は認められなかった。これらのことから、*CcFBA1* は低温環境での生育に適合した結果、低温による誘導が解除され、どのような温域においても構成的にかつ強力に発現していると考えられる。

<sup>1)</sup>Zhang L. *et al.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 531-535.

## A-7

酪農場の溜水から分離した *Escherichia coli* のトレハラーゼについて

(酪農大院 食品科学)

村松 圭, ○星川太志, 稲垣 翼, 菊地政則

【目的】我々はこれまでに、酪農場の排水や溜水を、家畜糞便、牛乳および圃場堆肥などが混在する特殊でユニークな環境と考え、多糖やオリゴ糖などを資化する微生物のスクリーニングを行ってきた。今回、溜水中より分離した 64 株の細菌から、トレハロースを資化し、菌体内にトレハラーゼを産生する細菌 (*Escherichia coli*) を見出したので報告する。

【方法】溜水より分離した 64 株を、1%のトレハロースを炭素源とした Barsikow 液体培地を用いて、25°Cで 24 時間培養を行い、培養液の色、pH、濁度(O.D.<sub>650</sub>)の変化からトレハロースの資化性を判断した。粗酵素は、1%のトレハロースを炭素源とした合成培地を用いて、28°Cで 24 時間振盪培養し、得られた菌体を超音波破碎して作成した。酵素活性は、トレハロースを基質として遊離したグルコース量を測定し、1 分間に 1  $\mu$  mol のトレハロースを分解する酵素量を 1U とした。

【結果】調査した 64 株のうち、ほとんどの株がトレハロースを炭素源とした培地で良好な増殖を示した。その中で、トレハロースの資化性が高いと判定した No.01、25、35、47 および、高い 1-Kestose 分解活性を有することが確認されている No.24 を加えた 5 株について 24 時間菌を培養し、菌体内酵素活性を調べたところ、No.01 以外のすべての株でトレハラーゼ活性が見られた。良好な酵素生産を示した 4 株について培養中のトレハラーゼ活性の推移について調べたところ、4 株中最も高い活性を示したのは、No.24 と 47 であり、No.24 は培養 24 時間後、No.47 は培養 36 時間後において、どちらも 1.47U/ml の酵素活性を示した。また No.25 は培養 36 時間後に 1.40U/ml、No.35 は 24 時間後に 0.88U/ml の酵素活性を示した。以上の 4 株について同定試験を行ったところ、全ての菌株が *E.coli* であった。

## A-8

*Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase の Met198 変異酵素の機能

(北大院農・応生科)

○佐分利 亘, 森 春英, 大塚博昭, 岩井 岳, 奥山正幸, 木村淳夫

研究背景) *Streptococcus mutans* 由来 dextran glucosidase は isomaltooligosaccharide や dextran などの非還元末端の $\alpha$ -1,6 結合を加水分解し、 $\alpha$ -glucose を遊離する。本酵素は一次構造に基づき、 $\alpha$ -amylase をはじめとする glycoside hydrolase family 13 に属す。我々はこれまでに本酵素の基質特異性に重要な部位の決定を目的として、長鎖基質やグルコシド結合に対する特異性に重要なアミノ酸残基を明らかにしてきた。本研究では基質との相互作用が予測された Met198 を他の 19 種のアミノ酸に置換した変異酵素を作製し、その性質を明らかにしたので報告する。

方法・結果および考察) Met198 変異酵素をそれぞれ大腸菌により生産した。これらの変異酵素のうち M198P は活性を示さなかったが、その他の変異酵素は野生型酵素の 9.9-150%の活性を示した。基質特異性を調べたところ、全ての変異酵素が野生型酵素と同様に $\alpha$ -1,6 結合のみを特異的に加水分解したため、変異導入によるグルコシド結合への特異性に変化は認められなかった。しかし M198F/I/L 以外の変異酵素において三糖に対する特異性に変化が認められた。すなわち M198N/W では isomaltotriose に対する特異性が高まり、その他の変異酵素では panose に対する特異性が高まった。このことはサブサイト+2 における基質特異性が変化したことを意味する。興味深いことに M198W および Y は isomaltose に対する反応において高濃度基質による活性化すなわち負の協同性を示した。さらに M198 への変異導入は糖転移活性にも変化を与えた。M198A/G/W は野生型酵素より高い糖転移活性を示した。

## A-9

大腸菌 Trehalase (TreA) の触媒残基の部位特異的変異導入による解析  
(北大院農・応生科)

○西塔沙織, 森 春英, 奥山正幸, 千葉誠哉, 木村淳夫

研究背景) trehalase は trehalose を特異的に加水分解し、 $\alpha$ -glucose と  $\beta$ -glucose を等量遊離する。多くの trehalase は類似した一次構造を持つが、その立体構造や触媒残基は明らかではない。速度論的解析からはカルボキシル基の触媒反応への関与が示唆されている。そこで今回、大腸菌 trehalase (TreA) の部位特異的変異による解析を詳細に行い、触媒残基を推定した。

方法・結果及び考察) 大腸菌 DH5 $\alpha$  から *treA* 遺伝子をクローニングした。TreA 成熟タンパク質の C 末端に His<sub>6</sub> タグを付加した組換え酵素を大腸菌で生産し、タグの親和性により精製した。30°C、18 時間の培養液 1 L あたり 51 mg の精製酵素を得た。比活性は 305 U/mg、分子量は 61,000 (SDS-PAGE) で最適 pH は 6.0、温度安定性が 50°C 以下であった。次に配列の類似する 101 の trehalase において完全に保存されている酸性アミノ酸残基 Glu155、Asp160、Glu216、Asp312、Asp448、Glu496 に変異を導入した。D160N および E216Q ではタンパク質が生産されなかった。E155Q、D312N、D448N、E496Q の詳細を調べた。2 mM trehalose および  $\alpha$ -glucosyl fluoride (GF) に対する速度は野生型に比べいずれも  $10^{-2}$ ~ $10^{-5}$  倍に低下した。D312N は野生型の速度と比較すると trehalose よりも GF を約 100 倍よく加水分解した。また、trehalose を基質としたときの  $pK_{a1}$  および  $pK_{a2}$  がそれぞれ 1.6 および 1.3 上昇した。D448N では、 $pK_{a1}$  が 1.6 以上、 $pK_{a2}$  が 0.9 低下した。また、ギ酸添加により活性が約 6 倍に上昇した。以上から D312N が酸触媒、D448N が塩基触媒である可能性が高いことが示唆された。

## A-10

Glycoside hydrolase family 31 酵素の活性中心に保存されている Arg 残基の役割  
(北大院農・応生科)

○汐川由希子, 奥山正幸, 森 春英, 千葉誠哉, 木村淳夫

研究背景) 糖質加水分解酵素はアミノ酸配列の類似性から glycoside hydrolase family に分類される。glycoside hydrolase family 31 (GH31) には非還元末端の  $\alpha$ -グルコシド結合を加水分解する  $\alpha$ -glucosidase、 $\alpha$ -キシロシド結合に作用する  $\alpha$ -xylosidase、イソマルトシル基を転移する isomaltosyl transferase、 $\alpha$ -glucan を脱離反応により分解する  $\alpha$ -glucan lyase など多様な反応を示す酵素が含まれる。どの酵素においても活性中心には触媒反応を行う Asp 残基に加え、Arg 残基が保存されている。すなわち、この Arg 残基は酵素反応において重要な機能を有していると考えられる。本発表では *Schwanniomyces occidentalis*  $\alpha$ -glucosidase を用いて、Arg 残基の変異酵素を作製し、その基質特異性から Arg 残基の触媒反応における役割について考察する。

方法・結果及び考察) 変異酵素の作製を酵母 *Pichia pastoris* の発現系で行った。GH31 で活性中心に保存されている Arg 残基は *S.occidentalis*  $\alpha$ -glucosidase では Arg630 に相当する。Arg630 を Lys、Met、Glu、Gln に置換した酵素 (R630K、R630M、R630E、R630Q) を作製したが、R630Q では組換えタンパク質が生産されなかった。その他の変異酵素では maltose 加水分解活性が大きく減少した。R630M 変異酵素を用いて、maltose の分解速度パラメータを求め、野生型酵素と比較した。 $K_m$  値より  $k_{cat}$  や  $k_{cat}/K_m$  に大幅な減少が見られ、ES<sup>\*</sup> の安定化に寄与していることが示唆された。また脱離能の高いフルオリド基を持つ  $\alpha$ -glucosyl fluoride に対する反応速度の減少が maltose の減少より少ないことから Arg 残基が酸塩基触媒残基の働きに影響を与えていることが予想された。

単生窒素固定菌 *Klebsiella oxytoca* のイネ植物体内における感染メカニズムについて

## B-1

(<sup>1</sup>帯畜大・生資科, <sup>2</sup>北大院・地環研, <sup>3</sup>産総研・生物機能工学)

○黒岩博史<sup>1</sup>, 須藤麻希子<sup>1</sup>, 大坂 剛<sup>1</sup>, 奥山英登志<sup>2</sup>, 湯本 勲<sup>3</sup>, 森田直樹<sup>3</sup>,  
大和田琢二<sup>1</sup>

### 【目的】

植物体内に生息している微生物は一般に内生菌と呼ばれる。その中で単生窒素固定菌は、マメ科植物と根粒菌にみられるような相利共生を営んでいる可能性が考えられている。これまでに私たちの研究室では、単生窒素固定菌の1種である *Klebsiella oxytoca* をイネに接種すると、植物体の成長が促進されること、更に、生体にとってストレス障害となる過酸化水素を分解する酵素、catalase をコードする遺伝子を導入した高 catalase 生産株では、その効果がさらに増加することを報告した(2004, 植物微生物研究会, Sudo *et al*)。このような成長促進効果の機序を解明するにあたり、本研究では、植物体内に侵入した単生窒素固定菌の、植物体内における局在性および移動速度を、マーカー菌を使って明らかにすることを目的とした。

### 【方法と結果】

単生窒素固定菌 *Klebsiella oxytoca* 4201T に、*gus* 遺伝子を mating 法により導入し、GUS マーカー菌を構築した。イネ *Oryza sativa*(L.) cv. Kasalath の実生根部に、構築されたマーカー菌を接種し、一定時間経過毎に植物体を培地から回収した。表面殺菌後、植物体各部位における菌密度を希釈平板法により測定した。一方、植物体組織を GUS 染色し、接種菌の局在性を調べた。その結果、菌密度は、茎部で最も低い傾向を示した。また GUS 染色において、茎の維管束組織とみられる部位が青色を呈していたことから、根部に接種された菌は茎の維管束系を通過して地上部へと移動していることが示唆された。また、菌が根部から葉部にまで到達する時間は、平均しておよそ 24h 以内、遅くとも 48h 以内であると推察された。接種後の菌密度は、およそ 72h で植物体各部位における増加が緩やかになり、その後は安定する傾向が見られた。

## B-2

糸状菌 *Amylomyces rouxii* によるポテトパルプ抽出物残渣の乳酸発酵

(<sup>1</sup>岩手大院・連農, <sup>2</sup>雪印種苗, <sup>3</sup>帯広畜大, <sup>4</sup>北海道農研)

○波佐康弘<sup>1</sup>, 三浦俊治<sup>2</sup>, 日高 智<sup>3</sup>, 橋本 誠<sup>3</sup>, 大西正男<sup>3</sup>, 小田有二<sup>4</sup>

目的) 北海道では毎年 100 万トンのパレイシヨがデンプンへと加工されており、その際にポテトパルプと呼ばれる残渣が発生する。その年間発生量約 10 万トンの大部分は、家畜用飼料や堆肥原料となっている。これまでに、ポテトパルプを食品工業用酵素剤のペクチナーゼで処理すると、その抽出物に優れた麵ほぐし効果のあることを見出した。今回は、抽出残渣を家畜用飼料として利用するため、糸状菌 *Amylomyces rouxii* によって乳酸発酵させ、その成分の変化を調べた。

方法) *Amylomyces rouxii* CBS 438.76 は滅菌した小麦ふすまで 25°C、3~5 日間増殖させ、ふすま麴とした。試験区は(A)無添加、(B)ふすま麴 1%添加、(C)市販乳酸菌スターター0.005%添加、(D)ふすま麴および乳酸菌の両方添加で、これらをポリ袋に入れて密封し、25°C、21 日間発酵させた。

結果) 試験区中、(B)と(D)の pH は 3 日目で 4.6 から 4.0 まで低下し、その後はほぼ一定となった。(C)は 7 日目以降、徐々に低下したが、(A)はほとんど変化しなかった。このような pH の変化は、乳酸の生成と一致していた。(B)と(D)はポリ袋中に発生する炭酸ガスによって膨張し、エタノールの生成が認められた。発酵後の成分を調べたところ、糸状菌を添加することにより可溶性糖類が減少し、揮発性成分が増加していることが分かった。キノコの熱水抽出残渣についても同様に発酵させたところ、マッシュルームにおいて(B)と(D)は(A)と(C)よりもすばやく乳酸が生成したが、(D)は(B)よりもエタノールが少なかった。シイタケの pH は(B)では(A)とほとんど変わらず、(D)ですみやかに低下した。乳酸の生成はマッシュルームより 1/3 程度しかなかった。以上のように *Amylomyces rouxii* は繊維質の多い原料の乳酸発酵に適していた。

## B-3

O-β-D-Fructopyranosyl(2→6)glucopyranose 合成酵母の検索

(<sup>1</sup>大高酵素(株), <sup>2</sup>酪農大・院)

○岡田秀紀<sup>1</sup>, 川添直樹<sup>1</sup>, 山森 昭<sup>1</sup>, 小野寺秀一<sup>2</sup>, 塩見徳夫<sup>2</sup>

研究背景)植物エキス発酵飲料(FPE)は、原料の果物、野菜類及び海草等の数十種類の植物エキスをショ糖の浸透圧を利用して抽出し、主として酵母、乳酸菌によって発酵させ、約半年間熟成して製造された褐色、粘ちょう性の飲料である。ラットの生涯飼育試験において、FPEの投与により寿命延長効果が示唆されている。また、ラットのアルコール性胃粘膜障害の抑制効果も示した。さらに、FPEは、発酵熟成中にいくつかの糖質を生成することが認められた。その一つを分離し、TOF-MS、完全メチル化メタノリゼートのGC分析およびCOSY、HSQC、HMBC等の二次元NMRにより構造解析したところ新規の糖、O-β-D-Fructopyranosyl(2→6)glucopyranose(糖1)であることが確かめられた<sup>1)</sup>。今回は、FPEから糖1を合成する発酵菌の分離を試みた。

方法・結果及び考察)植物エキス発酵飲料の発酵熟成中の液から分離した酵母5株(Y-1,-2,-3,-4,-5)をYPD培地(1.5L)を用いて30°Cで3日間培養後、遠心分離して集菌しこれを超音波破碎した。破碎後、遠心分離した上澄みを透析後、内液を濃縮し粗酵素液(20mL)とした。粗酵素液10mLをpH 5.0の緩衝液に溶解したGlucose30%+Fructose30%液100mLに加え、37°Cで反応させた。反応液についてHPLC分析を行ったところY-1株のみ粗酵素反応液中に糖1と同じ保持時間の糖が検出された。この反応液について活性炭クロマトグラフィーおよびAmide-80、ODS-80Tsカラムを用いたHPLCを行い糖1を単離した。糖1は各種HPLC、TOF-MS、<sup>1</sup>H-、<sup>13</sup>C-NMRによりO-β-D-Fructopyranosyl(2→6)glucopyranoseであることが確認された。現在、糖1を合成する酵母菌株を同定中である。

1) 日本応用糖質科学会 講演要旨集 p.42 (2005)

## B-4

Behavior of bovine lactoferrin on the growth of *Bifidobacterium longum*

(Laboratory of Dairy Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

○Md. Morshedur Rahman, Woan-Sub Kim, Toshiaki Ito, Haruto Kumura, Kei-ichi Shimazaki

Lactoferrin is a multifunctional glycoprotein that present mainly in milk and other exocrine secretions. The protein is well known for its antimicrobial characteristics. But lactoferrin does not inhibit the growth of certain kinds of lactic acid bacteria rather promotes their growth. Bifidobacteria are such kinds of bacteria that show growth responses towards lactoferrin. It is hypothesized in the published paper that presence lactoferrin binding protein in bifidobacteria might be involved with this phenomenon. Interestingly, it is also reported that growth of *Bifidobacterium longum* (*B. longum* ATCC 15707) is not stimulated by lactoferrin and does not possesses lactoferrin binding protein.

In this study, we investigated the in vitro growth responses of three strain of bifidobacteria in the presence of bovine lactoferrin. We also detected lactoferrin binding protein on these strains by far western blotting using biotinylated lactoferrin and horseradish peroxidase conjugated streptavidin. The binding of bovine lactoferrin to the bifidobacterial cells under native condition was inspected by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) using biotinylated lactoferrin and FITC-conjugated avidin.

None of the strain of *B. longum* shows growth responses towards bovine lactoferrin. Surprisingly, all the strain possesses lactoferrin binding protein in their membrane fraction having molecular weight of 67 kDa. The CLSM results also show the binding at one pole of all bifidobacterial cells tested.

The results of the present study made our understanding towards the role of lactoferrin binding protein complicated. Further studies are going on to elucidate the mechanism.

## B-5 北方小果実アロニアとハスカップの生体内抗酸化活性について (道東海大・生物工) ○佐藤浩志, 小栗牧人, 西村弘行

動脈硬化をはじめ生活習慣病の発症は、慢性的なフリーラジカル障害によってもたらされると考えられ、そのメカニズムも明らかになりつつある。生活習慣病には血管障害を伴う疾患が多く、活性酸素と生体内脂質との反応で生成される過酸化脂質が引き金になっていると考えられている。過酸化脂質(LOOH)から生じる $\text{LOO}\cdot$ 、 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{LO}\cdot$ 、 $\text{L}\cdot$ 等の活性酸素種は、動脈硬化や発ガン・老化などの病原を誘導することと潜在的な関わりがあると推測されており、これらはヒトの健康にとって有害であると考えられている。Heme( $\text{Fe}^{3+}$ ) (ヘム蛋白、赤肉に由来するミオグロビン等)を触媒とする反応によって生じる $\text{LOO}\cdot$ は、 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{LO}\cdot$ 、 $\text{L}\cdot$ と比べて半減期が長く、その寿命の長さゆえに他のフリーラジカルよりも生体に有害である可能性が高いと推測されている。この過酸化脂質の抑制には、植物系食材の天然抗酸化活性物質が有効であるとされている。本研究では、北方小果実アロニアとハスカップについて抗酸化活性物質の単離・同定およびヒト介入における生体内抗酸化活性について検討を行った。

試料には大滝村産アロニアと美唄産ハスカップを用いた。常法に従って、溶媒分画を行い、各種クロマトグラフィーによって抗酸化活性物質を単離し、各種スペクトル解析によって同定した。抗酸化活性検定法は、*in vitro*アッセイ系として、DPPHラジカル捕捉活性法および化学発光(CL)-脂質ペルオキシラジカル捕捉活性法を用いた。さらに*in vivo*アッセイ系として、CL-HPLC法を用いてヒト血漿中における過酸化リン脂質の定量を行った。

## B-6 トマトの動脈硬化予防効果について(第一報)抽出物の抗酸化活性 およびACE阻害活性 (道東海大生物工) 西村弘行, ○田中聖, 上田千絵, 遠藤祐貴, 原田英之

1.目的: わが国では、食生活の欧米化などのライフスタイルの変化により、虚血性心疾患や脳血管障害などの動脈硬化性疾患が年々増加し、病死も癌と並ぶに至っている。動脈硬化性疾患を予防するためには、低密度リポタンパク質(LDL)が活性酸素種により酸化されるのを抑制したり、血圧上昇を抑えたりすることが重視されている。われわれは、これまで道産作物の中で抗酸化活性と降圧作用に関連したアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性の両方を同時に持つ食材をスクリーニングしてきた。その中から今回は、道内で多く生産されているトマトに着目し、抗動脈硬化食材としての可能性を追究した。ただし、今回は色素成分で知られるリコピン以外の成分を調べた。

2.方法: 仁木産のトマトをエタノールで抽出し、極性の差およびpHの差を利用して分画を行った。DPPHラジカル捕捉活性、化学発光(CL)-脂質ペルオキシラジカル捕捉活性さらに、ヒトLDL酸化抑制活性をそれぞれについて調べ、トマト成分の抽出・分画物の抗酸化活性を比較した。一方、血圧上昇抑制効果は、従来法より抽出・分画を行いACE阻害活性で判定を行った。それぞれの活性成分については、各種クロマトグラフィーで分画を行った。

3.結果および考察: トマト抽出・分画物のDPPHラジカル捕捉活性を調べた結果、エーテルおよび酢酸エチル抽出分画で、その中でも有機酸性画分に高い活性を示した。さらに化学発光(CL)-脂質ペルオキシラジカル捕捉活性では、ブタノール抽出画分に高い活性があり、ポリフェノール配糖体と考えられている、一方、ACE阻害活性では、水画分に高い活性を示し、陽イオン交換樹脂およびセルロースカラムで分画し、現在単離・同定を検討している。

## B-7

カバノアナタケの抗酸化活性

(酪農大院・食品栄養科学) 稲垣美幸, ○工藤雄博, 小野寺秀一, 塩見徳夫

目的) 我々は、農産食品およびその廃棄物の有効利用を目的として、これまでにポテトペプチド<sup>1)</sup>および植物エキス発酵飲料<sup>2)</sup>の抗酸化活性について調べてきた。今回、カバノアナタケの栄養機能性を明らかにするために、このものの抗酸化活性を調査した。

方法) カバノアナタケの子実体をミキサーで粉碎し、このうち 50g を 1L の蒸留水に懸濁した。100°C、30 分間煮沸してろ過した残渣についてこの抽出操作を 5 回繰り返して、得られたろ液をあわせて減圧濃縮し、凍結乾燥したものをカバノアナタケ熱水抽出物とした。このカバノアナタケ熱水抽出物について、β-カロテン退色法、ロダン鉄法、赤血球膜ゴースト法を用いた抗酸化試験、DPPH 法を行い、*in vitro*での抗酸化活性を評価した。また、アルコール性胃粘膜障害を指標とした抗酸化試験を行い、*in vivo*での抗酸化活性についても測定した。

結果) β-カロテン退色法、ロダン鉄法、赤血球膜ゴースト法、および、DPPH 法により測定したカバノアナタケ熱水抽出物の酸化抑制率およびラジカル捕捉能は、それぞれ 72%(終濃度 10 μg/mL)、98%(終濃度 200 μg/mL)、35%(終濃度 0.05%)、66%(終濃度 0.04%)であった。また、アルコール性胃粘膜障害を指標とした抗酸化試験の結果、胃粘膜障害は、100mg/体重 kg のカバノアナタケ水溶液投与群で、コントロール群と比較して約 40%抑制された。

1) *J Nutr Sci Vitaminol*, 49, 451-455 (2003)

2) 日本栄養・食糧学会誌 58 巻、209-215 (2005)

## B-8

赤ワイン発酵後圧搾粕に含まれる機能性脂質

(帯広畜大・畜産生命, \*池田町ブドウ・ブドウ酒研)

○佐々木岳, 柚木恵太, 得字圭彦, 広瀬秀司\*, 大西正男

【背景】赤ワインは、アルコール発酵過程でブドウ果実から溶出する多くの機能性成分を含有しており、高機能性食品として認知されている。一方、赤ワイン製造過程において、ブドウの果皮や種子を含むブドウ圧搾粕が排出され、それは原料ブドウ重量の 20%にも達する。これにはブドウ果実由来の脂質やポリフェノールなどの有用成分が多く残存していると推測されるが、現状では十分には利活用されていない。本研究では、食品素材としての赤ワイン圧搾粕の利用価値を評価する一環として、脂溶性成分についての詳細な分析を行った。

【方法】清見種のブドウを除梗・破碎後、7 日間アルコール発酵を行い、圧搾して得られた粕を二日間天日で乾燥させ、粉碎後にエタノール抽出を行った。エタノール抽出物中の脂質含量は Folch 法により定量した。各脂質成分をケイ酸カラムクロマトグラフィーおよび TLC により分離し、メチルエステル化あるいはトリメチルシリル誘導体化してから GC-MS 分析に供した。

【結果・考察】圧搾粕乾燥物中には、果皮、種子および梗がそれぞれ 50%、34%および 16%の割合で含まれていた。エタノール抽出物(収率 9%)中の脂質成分の割合は 81%(圧搾粕 1g 当り 77mg)であった。ポリフェノール成分の割合は 5.9%で、これは赤ワインの約 1/5 量(原料ブドウ当り)に相当した。全脂質は 85%の中性脂質と 15%の極性脂質から構成されており、主要な中性脂質クラスはトリアシルグリセロール、トリテルペノイド、4-デスマチルステロールおよび長鎖アルコールであった。トリテルペノイドとしては、オレアノール酸(3 β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid)が最も多く、次いでオレアノールアルデヒド(3 β-hydroxyolean-12-en-28-al)およびオレアノン酸(3-oxoolean-12-en-28-oic acid)であった。このように、ブドウ果皮のワックス成分として知られているオレアノール酸類がアルコール発酵後の圧搾粕中に著量含まれており、これらの化合物には多彩な機能性が報告されているので、赤ワイン圧搾粕は有用な機能性食品素材と判断される。

## B-9

ナガイモの加工処理による粘度低下とその防止法

(東京農大・食品科学) ○松田陽介, 妙田貴生, 永井 毅, 永島俊夫

【目的】ナガイモは凍結あるいは凍結乾燥処理によりその特有の粘度が低下することが報告されている。ナガイモの粘度はその品質に大きく関与している。本研究では、これらの処理による粘度低下の原因を探り、その防止法について検討した。

【方法・結果】とろろを種々の条件で凍結あるいは凍結乾燥処理を行ない、その粘度を測定したところ、処理前に比べて粘度は低下した。この要因を解明するため、とろろから粘質物を抽出し凍結及び凍結乾燥処理を行なった。粘質物の水分量を調整後、遠心分離して得られた上清は、粘度の低下とともにタンパク質量が減少した。このことから、凍結あるいは凍結乾燥時におけるとろろの粘度低下は粘質物を構成するタンパク質の変性に伴う不溶化が主な要因と考えられた。次に粘度低下を防止するために、とろろに各種糖類を凍結及び凍結乾燥処理時に添加した。その結果、糖の添加区では粘度低下率は低かった。なかでもグルコースおよびソルビトールの添加区ではそれが顕著であった。また添加時期は、凍結及び凍結乾燥処理前に添加することで高い粘度を示した。このことから、糖類の添加が粘性に関与するタンパク質の不溶化を防止する役割を果たすことが推察された。

以上より、凍結及び凍結乾燥処理におけるナガイモの粘度低下防止には、処理前に糖類、特にソルビトールの添加が有効であることが明らかとなった。

## B-10

Pork peptone stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and suppresses appetite in rats

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

○Kaosar Sufian, Tohru Hira, Kyoko Miyashita, Takashi Nishi, Hiroshi Hara

<BACKGROUND> We previously demonstrated that soybean  $\beta$ -conglycinin peptone (BconP) suppresses food intake through binding to rat small intestinal brush border membrane (BBM) and cholecystokinin (CCK) release from enteroendocrine cells. The aim of the present study was to find new appetite suppressant peptides from other protein sources.

<METHOD> We prepared peptic hydrolysates (peptone) from beef, pork, chicken, egg yolk and egg white, and examined their activities for 1) Binding to rat small intestinal BBM, 2) Induction of satiety in rats, 3) CCK release from murine enteroendocrine cell line (STC-1).

<RESULTS and DISCUSSION> Among the tested hydrolysates, chicken and pork peptone (ChickP and PorkP) bound to rat BBM with the highest ability as evaluated by surface plasmon biosensor (BIACORE). The orogastric preload of PorkP suppressed food intake in rats similar with that produced by BconP, and the suppressive effect of PorkP was dose-dependent. PorkP stimulated CCK release greater than BconP from enteroendocrine STC-1 cells in a dose-dependent manner. These results suggest that PorkP could interact directly with the small intestinal CCK cells to release the hormone and suppresses appetite through CCK release.

## 北海道農芸化学協会特別会員御芳名

アサヒビール株式会社北海道工場	関 販 テ ク ノ 株 式 会 社
ベル食品株式会社	キリンビール株式会社千歳工場
池田町ブドウ・ブドウ酒研究所	財団法人北海道農業企業化研究所
福 山 醸 造 株 式 会 社	日 本 化 学 飼 料 株 式 会 社
春 雪 さ ぶ ー る 株 式 会 社	日本新薬株式会社千歳クリエートパーク
雪印乳業株式会社札幌研究所	日本甜菜製糖株式会社(技術部製造課)
有限会社北海道バイオ技術研究所	ニッカウヰスキー株式会社北海道工場
岩 田 醸 造 株 式 会 社	サッポロビール株式会社北海道工場
北海道立十勝圏地域食品加工技術センター	札 幌 酒 精 工 業 株 式 会 社
北海道糖業株式会社技術研究所	高砂香料工業株式会社札幌出張所
北海道和光純薬株式会社	十勝農業協同組合連合会農産化学研究所
北 海 三 共 株 式 会 社	株 式 会 社 和 科 盛 商 会
北 海 製 罐 株 式 会 社	よつ葉乳業株式会社中央研究所