

D 体アミノ酸添加培養による血栓溶解酵素ナットウキナーゼの活性比較

千葉科学大学 薬学部 薬学科 柳澤泰任、高木菜帆

オルガノフードテック（株）伊藤隆章、倉敷芸術科学大学 須見洋行

セールスポイント： ① 納豆菌は D 体アミノ酸を添加しても増殖できることが明確になった。

② D 体アミノ酸を添加すると、ナットウキナーゼ活性が数倍高まることを確認した。

③ サプリメントへの応用だけではなく、詳細構造の解明につながる。

1. 研究目的

日本の伝統食品である納豆の中には、血栓溶解酵素ナットウキナーゼ（NK）や骨形成物質に必須であるビタミンK₂（MK-7）など数多くの生理活性物質が含まれており、サプリメントだけではなく予防薬、治療薬としての応用への注目度は高い。当研究室ではこれまでに、共同研究でNKの構造解析や生産性について研究報告を行ってきた。NKには、血栓溶解や血圧安定効果などが認められることから、臨床分野でも使用されはじめている。今回このように有用なNKの生産性をさらに高めることを目的に、D体アミノ酸での添加培養のNK生産性を確認した。

2. ナットウキナーゼの生産量

Fig.1 は 1 %D体アミノ酸を添加して41℃、7日間液体培養を行い、遠心分離後の培養液上清をフィブリン平板にて1、4、18時間で溶解活性（NK活性）を調べた結果である。1 %のDアミノ酸を加えると、NK生産しないアミノ酸もあったが、NK活性は非添加アミノ酸培養に比べて、Phe、Lys、Pro、Asn、の1 %Dアミノ酸を添加した培養では、NK活性が最大時で8倍以上の活性を生産していることから、Dアミノ酸を添加しても納豆菌が増殖することを確認した。Fig. 2は、Dアミノ酸添加でNK活性が高かった6種類のアミノ酸と、NK活性が認められなかった1種類のアミノ酸についてのフィブリン平板の写真を示している。シャーレ内に人工血栓を作り、各サンプルがどれだけ人工血栓を溶かしたのかを示している。シャーレ内の白色が人工血栓、黒

色が培養液をサンプルとしてどれだけ人工血栓を溶かしたのかを示している。

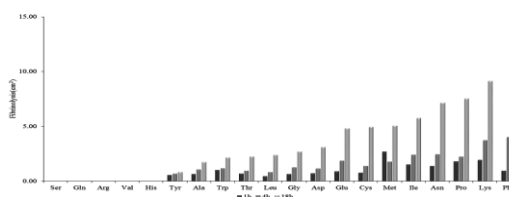


Fig. 1 Fibrinolytic activity increased by the addition of 1% D-amino acids

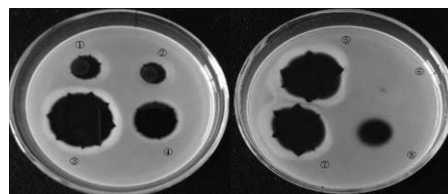


Fig. 2 Fibrinolysis activity

Comparative amino acid concentration 1% of

① Gly ② Ala ③ Phe ④ Met

⑤ Lys ⑥ Arg ⑦ Pro ⑧ Leu

3. 応用先

アミノ酸は天然ではL体のみを使用され、D型アミノ酸は「非天然型」として考えられ、納豆菌では（Glu）の成分の70%以上はD型Gluであることは報告されている。今回の実験では1 %Dアミノ酸を添加してNK活性が数倍増加したことを認めた。ナットウキナーゼの生産方法に応用してサプリメントの更なる開発に期待が持てると思われた。また、高生産が可能になればNK詳細構造の解明にも期待が持てると思われた。

特許出願

「ナットウキナーゼの生産方法」

皮膚組織における皮下脂肪細胞の機能解析とその制御に関する研究

工学部 バイオ・応用化学科 平井由夏, 重松千尋, 金久朱里,
井手彩和加, 小林愛菜, 吉本 聖 (安藤研究室)

- セールスポイント: ① 化粧品業界ではあまり研究されていない皮下組織に注目した
② 成熟脂肪細胞の放出因子に、色素細胞のメラニン生成促進作用を見出した
③ 肥満が“しみ”に与える影響に関する研究につなげる

1. 研究目的

“しみ”の形成には色素細胞の過剰なメラニン生成が大きく関わっている。メラニン生成には角化細胞や線維芽細胞との細胞間相互作用が関わっていることがよく知られているが、皮下脂肪細胞とメラニン生成との関係に着目した研究は少ない。

そこで今回、培養期間が長く過剰に脂肪滴を蓄積させた成熟脂肪細胞（肥満組織に多く存在する脂肪細胞）や、未分化能を持つ前駆脂肪細胞に着目し、脂肪細胞がしみや肥満とどのように関わっているかを明らかにすることを目標に研究を行った。

また、脂肪細胞と食食作用を有する線維芽細胞との関係についても実験を行った。

2. 実験方法

- ① 色素細胞 (MC) を用い、前駆脂肪細胞 (preAC) と、成熟脂肪細胞 (matureAC) をそれぞれ共培養した。6 日後にメラニン生成量を測定した。
- ② 線維芽細胞 (HDF) を用い、前駆脂肪細胞と成熟脂肪細胞を①と同様に共培養した。1 日後に線維芽細胞に COOH 基修飾ビーズを投与し食食量を評価した。

3. 実験結果及び考察

前駆脂肪細胞と比較し、成熟脂肪細胞では

メラニン生成が促進した (Fig. 1)。また、線維芽細胞による COOH ビーズの食食量も成熟脂肪細胞では増加した (Fig. 2)。

成熟脂肪細胞は、色素細胞のメラニン生成や、線維芽細胞の食食能を増加する因子を放出していることが示唆された。

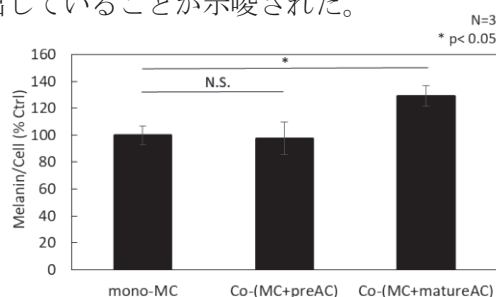


Fig. 1 脂肪細胞との共培養による色素細胞のメラニン生成量の変化

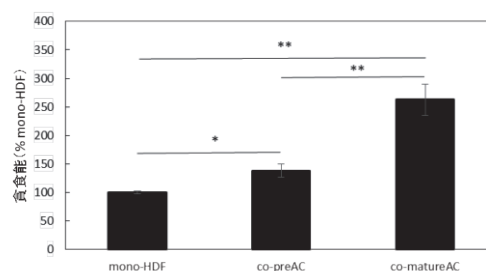


Fig. 2 脂肪細胞との共培養による線維芽細胞の COOH ビーズ食食能の変化

4. 今後の展開

今回の実験より、脂肪細胞の成熟がメラニン生成に関与していることが判明した。今後は脂肪細胞の分化を抑制することにより“しみ”を予防する研究に役立てたい。

皮膚における黄変化への真皮線維芽細胞の影響と評価の応用に向けて

工学部 バイオ・応用化学科 陶山真幸、大谷光祐、三島裕聖、柳 大樹、
大萩権明、吉田萌生（安藤研究室）

- セールスポイント： ① 継代老化を再現できる過酸化水素誘導老化モデルの作成に成功した
② 線維芽細胞自身が黄色化することがわかった
③ 皮膚細胞の老化モデルを用いて、肌の黄ぐすみの原因解明につなげたい

1. 研究目的

皮膚の老化に関する研究を実施するために、老化した細胞が必要となる。そのため、短期間で恒常的に老化モデル細胞を得ることができる方法の作製に着手した。その際、老化モデル細胞で黄変化が確認された。タンパク質がカルボニル化されることで黄変化することが報告されているので、老化モデル細胞中にカルボニル化タンパク質が存在するかを確認した。

2. 実験方法

- ① 培養真皮線維芽細胞に 250 μ M の過酸化水素を 8 日間以上投与し、過酸化水素誘導老化モデルを作製した。このモデルと継代老化モデルにおいて β -ガラクトシダーゼ、自家蛍光、リソソーム、ROS (活性酸素種)、MnSOD (ミトコンドリアが有する ROS 消去酵素) の 5 つの老化マーカーに着目し、老化の再現性を評価した。
- ② 継代老化モデル及び過酸化水素誘導老化モデルにおいてカルボニル化タンパク質を検出するために 20 μ M Fluorescein-5-thiosemicarbazide/0.1M MES-Na (pH5.5) を投与した。

3. 実験結果及び考察

継代老化モデルと過酸化水素誘導老化モデルで 5 つの老化マーカーで同様の結果が見られた（データ省略）。この結果から、過酸化水素誘導老化モデルでの老化現象が示唆された。また、両モデルで細胞の黄変化が確認され（図 1）、カルボニル化タンパク質が検出された（図

2）。この結果から、老化した細胞の黄変化はカルボニル化タンパク質の生成が関与している可能性が考えられた。

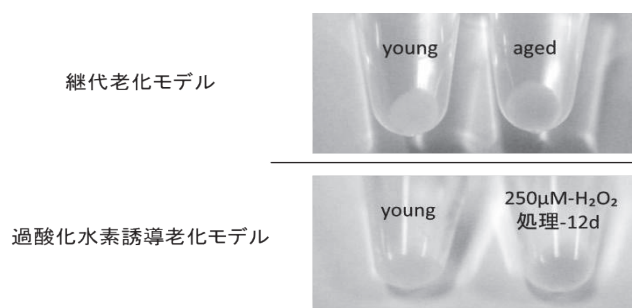


図 1. 継代老化モデル及び過酸化水素誘導老化モデルの細胞の黄変化

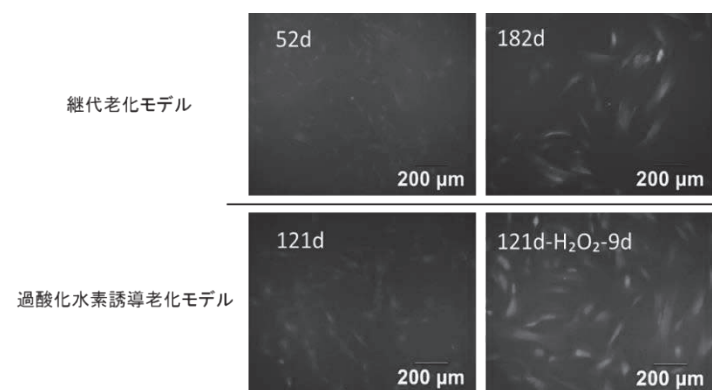


図 2. 継代老化モデル及び過酸化水素誘導老化モデルのカルボニル化タンパク質検出

4. 今後の展開

継代老化モデル及び過酸化水素誘導老化モデルにおいて黄変化が認められたため、老化と黄変化の関係性を解明したい。また、この両モデルにおいて黄変化の原因を解明することで、肌における黄ぐすみの原因の解明につなげたい。

赤外超解像顕微鏡を利用した生体試料の観測

理学部 化学科 酒井 誠、高橋広奈、秦 真誉、藤原光希（酒井・高橋研究室）

- セールスポイント： ① 1 μm 以下の高い空間分解能での赤外分光イメージング
 ② 生体試料内のタンパク質二次構造の分布を観測可能
 ③ 偏光依存性測定により分子の配向を解明

1. 赤外分光で分子構造を調べる

分子は赤外光を吸収（赤外吸収）して振動します。振動の仕方は分子の種類で大きく異なるため赤外吸収は「分子の指紋」と呼ばれ、分子の構造や周囲の環境に関する重要な情報を私たちに与えてくれます。それゆえ、赤外吸収を調べることは学術領域だけでなく、産業界においても分析のために広く活用されています。

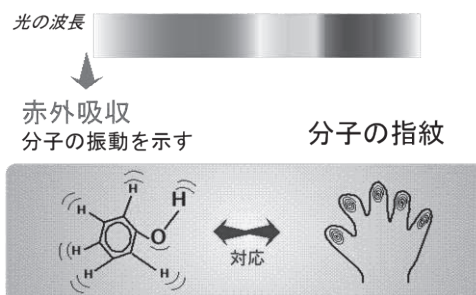


Fig. 1 光の波長と赤外吸収の特徴

2. 赤外超解像顕微鏡で生体試料を観察する

赤外分光を顕微鏡技術に応用すると、微小な生体試料の構造解析が期待されます。しかしながら、市販の赤外顕微鏡で生体試料を観察すると、光の回折限界による制限のため、細胞をはじめとする極微小生体試料の観測は不可能でした。そこで私たちは、回折限界を突破した高い空間分解能を有する「赤外超解像顕微鏡」の開発を行いました。

3. 赤外超解像顕微鏡法の観測例

私たちの赤外超解像顕微鏡は、市販の赤外顕微鏡では観測不可能であった生体試料内部の微小構造を高い空間分解能で観察することができるだけでなく、不均一系から分子配向を含めた規則性を抽出することにも非常に有効であり、生体試料を含めた微小試料観測の新たなツールとして期待しています。

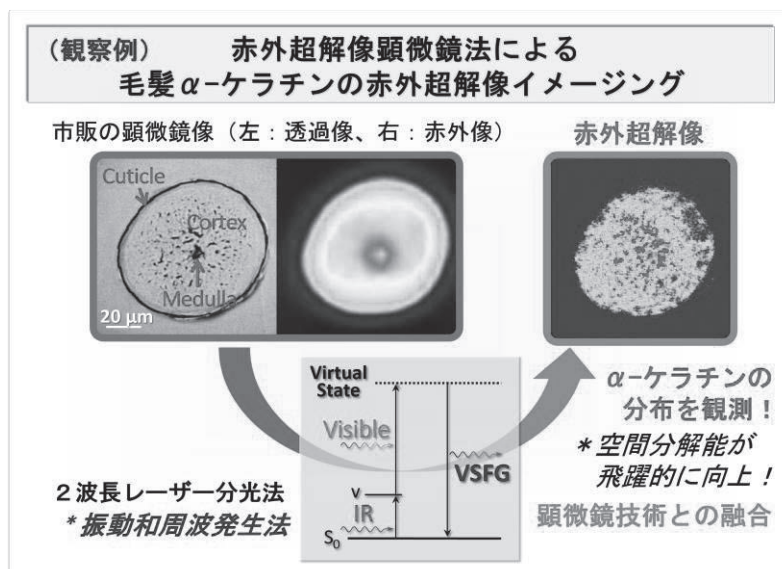


Fig. 2 赤外超解像顕微鏡による観測例

機能性食品・化粧品素材ジヒドロフェルラ酸の乳酸菌による発酵生産

理学部 生物化学科 三井亮司、向田 潤（三井研究室）、丸善製薬株式会社

- セールスポイント： ① ジヒドロフェルラ酸の様々な生理活性（抗肥満・血糖値改善 etc.）。
 ② ジヒドロフェルラ酸の乳酸菌を使用して発酵生産。
 ③ 乳酸発酵条件下でジヒドロフェルラ酸を 100%近い収率で生産可能。

1. 研究目的

近年、飽食や運動不足等の生活習慣が原因となり、肥満、2型糖尿病、肥満、高血圧症、インスリン抵抗性等といった生活習慣病が大きな問題となっている。これら生活習慣病を改善するにあたり、医薬品による治療だけでなく、天然物由来あるいは食品由来の成分による予防・治療等も注目されている。ジヒドロフェルラ酸は、このような生活習慣病の改善に寄与する cAMP ホスホジエステラーゼ活性阻害作用、ジペプチジルペプチダーゼ IV 活性阻害作用等を有することが報告され、その機能性に関心が集まっている。本研究では「スマート乳酸菌®」として上市している機能性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 22A-3 株ほか乳酸菌数種を使用して、米糠などから抽出されるフェルラ酸をジヒドロフェルラ酸へと高収率で生産させる発酵法を確立した。

2. 乳酸菌によるフェルラ酸の還元

培地にフェルラ酸を加えて *L. plantarum* 22A-3 株を静置培養すると、わずかにジヒドロフェルラ酸の生成が確認できた。また、これに加えて4-ビニルグアヤコールの生成も見られた。4-ビニルグアヤコールはフェルラ酸の脱炭酸反応による生成物であるため、*L. plantarum* 22A-3 株のフェルラ酸に対する反応は4-ビニルグアヤコールとジヒドロフェルラ酸の2つの経路が推定された。様々な検討を経て、私たちはこの2つの経路の切り替えが培養液の溶存酸素にあることを突き止めた。そこで培養液中の溶存酸素を除いて培養を開始することで、ジヒドロフェルラ酸のみが効率的に培養液中に蓄積されることが明らかになり、その収率はほぼ100%となった。この反応に関与する酵素系にも着目し、酵素反応にてジヒドロフェルラ酸を生産させる方法についても検討中である。

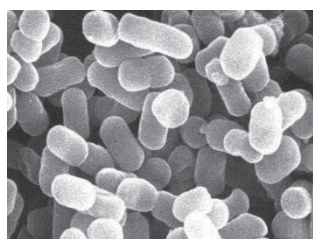


Fig. 1 *L. plantarum* 22A-3

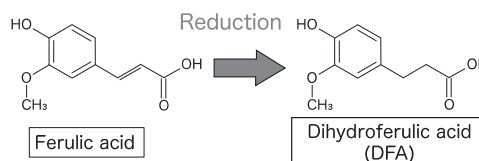


Fig. 2 乳酸菌によるフェルラ酸の還元

3. 応用先

ジヒドロフェルラ酸がクルクミンやポリフェノールの分解産物で血中にも検出されるなど、機能性の本体物質の可能性も示唆される。ジヒドロフェルラ酸の機能性は多岐にわたっており、食品や化粧品などへの機能性の付与に用いることができる機能性原材料として、また、近年の発酵ブームの主役でもある乳酸菌を用いた発酵製造法は、ジヒドロフェルラ酸の機能性に加え、乳酸菌の機能性も付与できる。

特願2017-140401号「3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸類縁化合物の生産方法」

UV-LED を搭載した流水殺菌装置の性能評価方法に関する検討

工学部 生命医療工学科 猶原 順、万 軒碩、大橋悠樹央、家長宜孝、池野将慶（猶原研究室）
千代田工販(株) 浦上逸男

- セールスポイント： ① UV-LED を搭載した流水殺菌装置の開発
② 流水殺菌装置の性能評価方法の検討
③ 従来法（殺菌灯）に替わる殺菌方法

1. 研究目的

UV-LEDは、従来の殺菌灯（水銀ランプ）に代わる新たな殺菌用光源として期待されており、すでにUV-LEDを搭載した流水殺菌装置も散見されるようになった。しかし、その性能については表記方法さえ統一されていないため、比較検証もきわめて困難な状況にある。

そこで、本実験ではUV-LEDの実用に資することを目的として流水殺菌装置の性能評価方法について検討した。

2. 実験方法

流水殺菌装置には、SUS製のクロス配管（内径：23mm、全長：110mm）にUV-LEDを2個搭載した構造の装置を使用した（図1参照）。UV-LEDの発光分布や出力等は不明である。

殺菌性能は、従来の殺菌灯（主波長：254nm）であらかじめ値付けされた生物線量計を使用して流水殺菌試験を行い、装置の換算等価紫外線照射量（RED）を求める方法で評価した。

供試菌は、枯草菌芽胞体（栄研化学製）と大腸菌 k12（岡山理大株）を使用した。

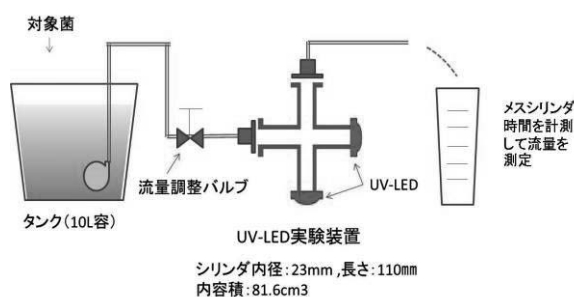


図1 UV-LED 流水殺菌装置による殺菌試験のフロー

3. 実験方法及び考察

枯草菌芽胞体の殺菌灯による生残率曲線の結果を図2に示した。さらにその枯草菌芽胞体

で装置の通水試験を実施した結果を図3に示した。

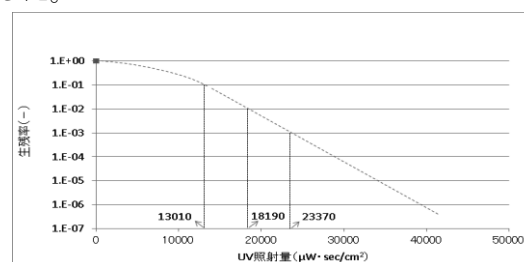


図2 殺菌灯（λ=254nm）による枯草菌芽胞体の生残率曲線

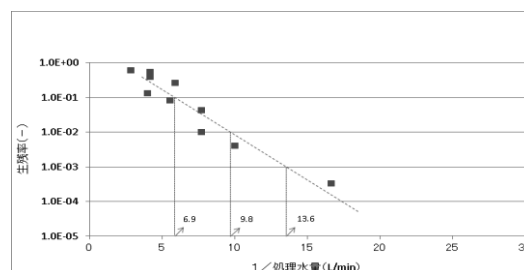


図3 枯草菌芽胞体による装置の通水試験結果

図2及び図3から装置の通水量とUV照射量（λ=254nmに換算したRED）の関係を算出し図4に示した。

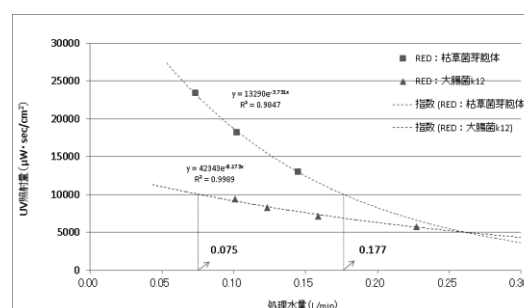


図4 枯草菌芽胞体及び大腸菌 k12 による装置の RED

以上の結果から装置の枯草菌芽胞体に対する性能は、0.177L/minの水量時にUV照射量10mJ/cm²（λ=254nm換算RED）の効果を得ることが実証された。よって本方法は殺菌性能をUV照射量で比較検証できる実用上有用な評価方法であることが示された。

乳酸菌で元気はつらつ & 美肌菌でお肌ぷりっぷり

工学部 バイオ・応用化学科 野嶽勇一

- セールスポイント： ① 乳酸菌発酵食品の機能性を評価
② 乳酸菌を直接的に活用した新しいスキンケア法を構築
③ 乳酸菌と機能性食品、美肌菌とスキンケア、ヒト常在菌、をキーワードとした豊富な産学共同研究の経験

1. ヒト常在菌に関する研究活動

「善玉菌の機能性を活用して常在菌叢を制御した場合、健康増進に役立つ！」と考え、「乳酸菌と腸内細菌による食を介した予防医学研究」と「美肌菌と皮膚常在菌に着目したスキンケア研究」に従事してきました。現在は、乳酸菌がつくり出す物質（乳酸菌生産物質）が示す有用作用を解析する研究や、アトピー性皮膚炎に対する美肌菌の応用研究に奮闘しています。

「常在菌の機能性を健康に繋げよう」とする発表者の研究理念の下、新規の製品（食品・飲料・化粧品）開発を目的とした産学共同研究にも積極的に取り組んでいます。

2. 乳酸菌による食を介した予防医学研究

予防医学の概念が浸透する中、腸内細菌の制御や健康増進に対する乳酸菌の有効性が謳われています。発表者においても、乳酸菌発酵食品の有用性に早くから着目してきました。すなわち、16種のヒト常在乳酸菌による複合培養法を開発し、この手法によって豆乳から新規の乳酸菌生産物質を調製しました。これまでに実施した乳酸菌生産物質に関する種々の解析実験から、乳酸菌生産物質が ①ガン細胞増殖抑制、②肝保全、③脂質代謝改善、④アレルギー・アトピー性皮膚炎抑制、⑤発毛促進、等の生理作用を示すことを明らかにしてきました。乳酸菌生産物質の有用作用上の特性を把握し、生理活性物質や発現機序に関する多くのエビデンスを蓄積しています。

乳酸菌生産物質に関する分子レベルの解析研究によって、乳酸菌（生産物質）がマルチな健康機能性を示す根拠を解き明かし、食を介し

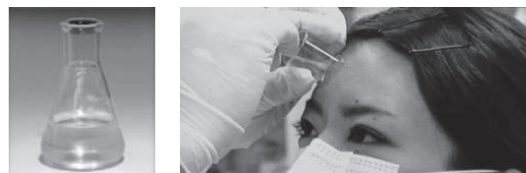


Fig. 1 豆乳の乳酸菌生産物質と美肌菌を採取している様子
た予防医学への貢献を目指しています。

3. 美肌菌に着目したスキンケア研究

美容業界では、基礎化粧品から得られるスキンケア効果の個人差やその経時的な減衰が長年の課題とされています。これらの課題に対して、発表者は「生きた善玉菌（美肌菌）を含むプロバイオティクスコスメを皮膚に塗布し、皮膚常在菌を好ましい状況に制御する」ことを可能にした新規スキンケア法（美肌菌戻し法）を構築しました。本法では、「個人の美肌菌を直接的に活用するバイオスキンケア」、「長く継続するスキンケア効果」、「個人の肌質に合致し易いオーダーメイド型」等、基礎化粧品の開発において重要なキーワードを同時に実現しています。

本法では、個人の額部から採取した皮膚常在菌の中から美肌菌を単離し、培養後に基礎化粧品として加工します。化粧水へ混和してその個人の皮膚（顔部）に美肌菌を戻し、より多くの美肌菌を皮膚に定着させます。本法の継続は美肌菌が産生するスキンケア物質の供給レベルを押し上げることから、皮膚の保湿が改善します。本法によって、皮膚の弱酸性化やキメの状態も向上することが確認されています。現在では「世界初的美肌菌基礎化粧品」の開発にも成功しています。

ワインをはじめとした醸造・発酵と食品の機能性評価

ワイン発酵科学センター 金子明裕

- セールスポイント： ① ワインをはじめとした醸造・発酵
② 酒類・発酵食品の解析・分析
③ 食品の機能性評価

1. 背景と研究目的

岡山理科大学はワインプロジェクトの拠点となる「ワイン発酵科学センター」を開設しました。ワインの醸造機器や酒類・食品の分析機器、酵母・乳酸菌の培養装置などを備えています。

当研究室では、ワインの醸造をはじめ、発酵科学の分野において、「美味しさ」や「機能性」を科学的に解明します。ワイン、日本酒・ウィスキー等酒類に加え、発酵食品の成分分析、発酵方法、製造・精製方法等の検討を行います。

また、ワインをはじめ、さまざまな発酵食品の製造に用いられる酵母や乳酸菌といった微生物の機能を遺伝子・細胞レベルで解析し、有用な株の育種につなげる研究を行います。さらに、ワインに含まれるポリフェノールをはじめとした食品の機能性成分の解析を行います。

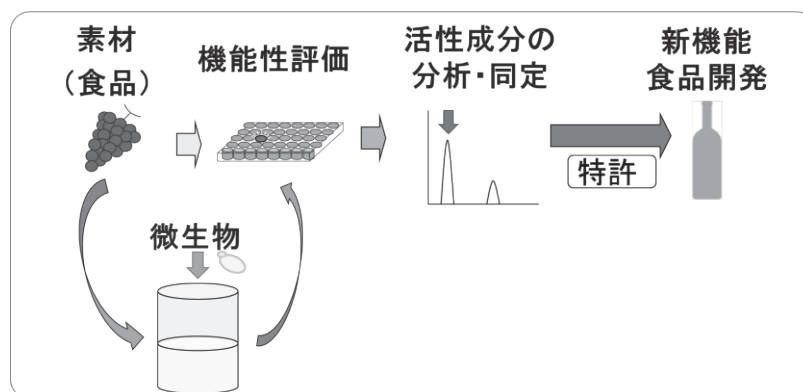
2. 方法

1) 醸造技術

ワイン醸造において、ブドウから新しい香りを引き出す、ワインの香りを高める、機能性成分を引き出すといった醸造・発酵方法を研究しています。そのための酵母選抜・育種、発酵方法、ブドウ栽培方法の検討を行います。

2) 食材の発酵と機能性評価

さまざまな食品の発酵を行います。また、発酵食品・食品の抗酸化活性や培養細胞を用いて機能性評価を行います。



3. 応用先

1) 醸造・発酵食品の評価

ワインをはじめ、日本酒・ウィスキー等酒類、さらに、食品・発酵食品の成分分析、発酵方法、製造・精製等の検討が可能です。

2) 食品の機能性評価

食品から機能性成分を見つけ出すには、食品の機能性を見出し、その活性成分を明らかにすることが必要です。当研究室では食品の活性成分の探索・評価を行います。

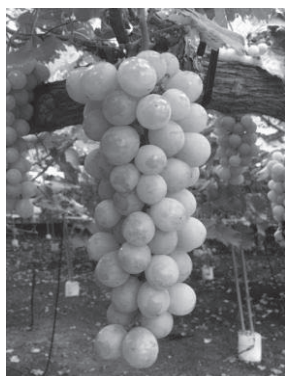
マスカットオブアレキサンドリア種の醸造用ブドウ栽培と醸造特性

ワイン発酵科学センター 岡田紗和、坂本尚也、高橋千秋
ふなおワイナリー有限会社 狩山恭三

- セールスポイント： ① 地域産業の活性化・街おこし
② ワインの高品質化
③ 新しい醸造スタイルの提案

1. はじめに

マスカットオブアレキサンドリアは北アフリカ原産のブドウ (*Vitis vinifera*) で、生食用・ワインやブランデー・干しブドウとして栽培される。ワイン用にはデザートワインやテーブルワイン、スパークリングワインとして使用される。光沢のある淡い黄緑色で長円形の大きな実をつけ、強い甘味とムスク香（麝香）を有する¹。



岡山県倉敷市船穂町はマスカットオブアレキサンドリアの生産地として知られ、日本一の栽培面積と出荷量を誇ってきた。特に、加温栽培は他の産地に先駆けて成功し、高度な栽培技術により早期出荷のブドウを中心に高級ブドウの優良産地として不動の地位を得てきた²。しかしながら昨今は、人気の低迷と栽培の繁雑さから、シャインマスカットに改植する農家や離農者が増えている。そこで、マスカットオブアレキサンドリアを地域特産品として保護し、産業として再確立する必要性が出てきた。我々は栽培管理の省力化とブドウの小粒化、また華やかな香りを引き出すような栽培方法の確立とワインの高品質化に向けて研究を開始したので報告する。

2. 栽培方法とブドウの分析結果

ふなおワイナリーのハウス栽培内の10カ所を試験区に設定し、5月よりブドウ樹の新梢管理や花きり作業を行い成長の様子を観察した。8月中旬より10日間毎に各試験区のブドウの分析を行った。

3. マスカットオブアレキサンドリアを用いたワインの小仕込み試験

平成29年9月22日ふなおワイナリーで収穫した各試験区のブドウを用いて小仕込試験を行った。果汁を21° Brixまで補糖し、ピロ亜硫酸カリウムを添加した。またリンゴ酸と酒石酸を用いて補酸を行い、発酵助剤と酵母を加え発酵を開始した。アルコール発酵がほぼ終了した時点で発酵を止めた。

各試験区の小仕込試験の結果はフォーラムで発表する。

4. 応用先

岡山県内および中国四国エリア内のブドウ栽培農家及びワイナリーに対して、地域に適応しなおかつ醸造用に使用できるブドウ品種の選抜や醸造方法の提案、および試験醸造を受託することができる。また受託分析も行っている。またブドウの分野に限らず広い分野で地域活性化を含め商品化を前提にした受託研究ができる。

5. 参考文献

1. iv.ucdavis.edu/files/24342.pdf
2. 倉敷市より資料提供