

雑穀の食品機能及び遺伝子解析研究と 地域連携食品開発

課題番号：11794012

平成11年度～平成13年度 科学研究費補助金
(地域連携推進研究費) 研究成果報告書

平成14年4月

研究代表者 西澤 直行

(岩手大学 農学部 教授)

目次

はじめに	1
第1章 雑穀の栽培、成分	7
第1節 雑穀の栽培・生産と一般成分及び栄養価	7
1. 雑穀の栽培・生産	
2. 一般成分	
3. 栄養価	
第2節 アミノ酸、蛋白質、ペプチド組成	10
第2章 雑穀の食品機能性	33
第1節 雑穀蛋白質の <i>in vitro</i> の消化性	33
第2節 機能性について	37
1. 脂質代謝改善機能	37
2. 抗酸化性	41
3. 肝障害抑制機能	47
4. 抗アレルギー機能	56
5. ヒトにける雑穀の健康機能性	73
第3章 アワ種子貯蔵タンパク質の変異性の解析	75
第4章 雑穀種子の遺伝子解析	80
第5章 雑穀の耐病性	88
第6章 雑穀の栽培法改善	109
第7章 雑穀食品の地域連携開発研究と商品化・事業化	125
第1節 雑穀食品開発と商品化について	
1. 「雑穀パン」の開発研究と商品化	
2. モロコシ食品開発の開発と商品化	
1) 「へっちょこだんご」の開発、商品化	
3. 雑穀うどんの開発研究	
4. 雑穀醗酵食品の開発	130
第2節 雑穀栽培農機具の地域連携開発研究と商品化	134
第3節 本研究の成果を基にした起業化構想	135
第8章 まとめ	136
おわりに	138
謝辞	
資料：新聞報道など	

はじめに

キビ・アワ・ヒエなどの雑穀は、日本において古くから栽培されていた。今から5,500年前（縄文時代前期）の山内丸山遺跡に雑穀の種実の遺物が出土しており、すでにその頃から栽培化されていたことがうかがえる [1]。世界的に見ても、古代から人類が命の糧としてきたのは米麦のように高級な穀物ではなく、粗放な農耕によっても収穫され、また早・湿・寒冷・高温など不良気象に耐える雑穀類がまず選ばれたようである [2-38]。

穀類と呼ばれるものには、禾穀（かこく）類（イネ、ムギなどイネ科植物の種実）、菽穀（しゆくこく）類（ダイズ、アズキなどマメ科の種実）およびタデ科の作物であるソバなどがある [図 1] [2-4]。このうち、コムギ、オオムギ、コメ、およびダイズなどは、世界的に多量に生産され、主要食糧として重要視されている。そしてこれらの穀類を除いた残りの穀類を雑穀と称している。すなわち、アワ、ヒエ、シコクビエ、キビ、モロコシ、トウモロコシ、エンバク（オート麦）、ライムギ、ライコムギ（トリテイカレ）、ハトムギ、テフ、ソバなどがそれぞれである [5]。このうち日本でつくられているイネ科の雑穀は、アワ、キビ、ヒエ、ハトムギ、モロコシ、シコクビエである。これらのうちアワ、キビ、ヒエ、ハトムギはユーラシア起源、モロコシ、シコクビエはアフリカ起源の穀類と考えられている [6]。

現在では、雑穀は古代の作物で、日本の食文化は米によって支えられてきたという見解が主流である。しかし、弥生時代に稲作が伝来して以来、日本ではどんな時代においても、水田を開拓し稲作を奨励することが為政者の中心政策となっていた。だが、どの時代をとっても、日本の風土からすると全人口にいきわたるだけの米の生産はできず、主食は不足していた。そうして米のかわりに主食として食べられてきたのが、畑で栽培できるムギや雑穀類や根菜類であった。その代表的な食事が、少量の米にムギや雑穀類、あるいは芋類や大根を混ぜて炊いた糍飯（かてめし）や雑炊（糍飯を汁で薄めたもの）だったのである。そして戦前までは日本の人口の70%以上が農民であったことをふまえれば、日本民族は古来米の飯を主食としてきた、という通念は、今一度改めねばならない [7]。

終戦直後まで、さらに中山間地では昭和40年頃までも、日本人の食事はこのような糍飯や雑炊に一汁一菜が副食としてつくというものであった。そうした食事の形態は、マメを主原料とした味噌や野菜を煮合わせた雑魚などを多食する事でタンパク質やビタミン、カルシウムなどが摂取できるという、それなりの合理性があった [7]。雑穀タンパク質のそれ自身の栄養価は決して高くないが、制限アミノ酸のリジン、スレオニンをマメ類などで補足することによって充足できる [8]。

雑穀の生産量は少ないと思われがちであるが、世界で見ると主要穀物の小麦、米、トウモロコシの5億トンに対して、雑穀のそれは1億トンであり、大豆や魚の漁獲高とはほぼ同じ量が生産されている [9]。そのうち、6,600万トンはモロコシと家畜用のマイロで、残りおよそ2,800万トンは、キビ、アワ、ヒエ、テフ、トウジンビエなどの雑穀であり、食糧となっている [9]。インドやアフリカでは、現在でも雑穀が主要な穀類として栽培

され、主食に供せられている地方が多い [10]。しかし、国内の生産量は雑穀の農林統計がないため詳細は分からないが、国内の雑穀市場のおよそ 90 % は輸入品であると推定されているので、国内生産量は相当少ないと思われる [1]。

戦後その生産量を減らす一方であった雑穀だが、最近、このような雑穀および雑穀のある食生活が見直され、その需要も持ち直しつつあり、生産量、栽培面積はわずかながら増加傾向にあるという。都会では、高価な商品となって流通している状況がある。また、雑穀を使ったパンや麺、お菓子など新しい食品が開発され、既に市場に出回り、その種類は今後も増え続けると思われる。

主食としての穀物の重要性はますます高まっている。1995 年のアメリカ人のための食生活指針の改定 [11] では、穀物およびその製品の摂取推奨の順位がこれまでの 4 位から 3 位へ繰り上がった。また同時に、一般の消費者の啓蒙のための Food Guide Pyramid の食事グループも同様に順位を変更し、カロリーの多くを穀物およびその食品から摂るように勧めている。その 2000 年改定の 5 版においてももちろん主食としての重要性には変わりがない [12]。先般公表された日本の、新しい「健康づくりのための食生活指針」においても [13]、“ごはんなどの穀類をしっかりと”と主要な大項目に位置づけられている。日本の食生活指針で注目すべきことは、指針の 8 番目に“食文化や地域の産物を生かし、ときには新しい料理も”と、地場産農産物の消費を強調しており、地域の食品を見直し、日本型食生活を推進しようとしていることである。さらに、これまで考えられなかったような、給食にも地場産品を広げようとする動きが出始めている [14]。

また、最近のアメリカ穀物化学会の動向として、血中コレステロール低下作用や大腸ガン予防、また抗酸化作用などの健康機能を有する大麦、ライ麦、オートなどの穀類を機能性穀類 (Functional Cereals) と呼称し、なおかつ全粒穀物製品の摂取を盛んに勧めている状況がある。雑穀は、このような、健康のために穀類・野菜を中心にした植物性食品摂取へ回帰する傾向に適うものである [6,14]。

しかし、アワ、ヒエ、及びキビの健康機能や雑穀のゲノム・遺伝子情報についてはほとんどかいていないのが現状である。本研究は、研究代表者らの雑穀の健康機能研究成果 [15-18] をさらに展開すべく、より優れた食品機能性の発見や地域食品産業振興や地域社会への貢献できる食品開発、商品化・事業化、を以下のような目的で行なった。

- 1) 雑穀機能蛋白質・ペプチドの解析
- 2) 脂質代謝改善機能の解明
- 3) 新生理機能性の開発
- 4) 優れた食品機能性品種の探索のための品種・種子の遺伝学的解明
- 5) 雑穀種子のタンパク質
- 6) 耐病特性の解明
- 7) 適正省力栽培技術の確立
- 8) 雑穀食品の地域連携開発研究と商品化・事業化

引用文献

- 1) 西澤 直行, 大学から浄法寺町への提言—中山間地の活性化戦術—, 浄法寺町活性化研究会 編, pp72-84 (1999).
- 2) 椿 和文, 横田 俊平, 影山 恵, 大勝 美保, 池澤 善郎, 治療学, 25, 1161-1168 (1991).
- 3) Cole, S.G., Kagnoff, M.F., Ann.Rev.Nutr., 5, 241-266 (1985).
- 4) 江上 不二夫 ほか, 岩波生物学辞典 第3版, 岩波書店, pp14-37 (1981).
- 5) 小原 哲二郎, 雑穀—その科学と利用—, 樹村房 (1981).
- 6) 坂本 寧男, インド亜大陸の雑穀農耕文化, 学会出版センター (1991).
- 7) 神崎 宣武, 健康食 雑穀, 農文協 編, 農文協, pp114-128 (1990).
- 8) 西澤 直行, 地域農産物の品質・機能性成分総覧, サイエンスフォーラム, pp426-430 (1999).
- 9) Dendy, D. A.V., Sorghum and the millets : production and importance. In "Sorghum and Millets: Chemistry and Technology", ed. Dendy, D. A.V., American Association of Cereal Chemists, Inc, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 11-26 (1995).
- 10) 坂本 寧男, 雑穀のきた道, NHK ブックス (1988).
- 11) USDA and Health and Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 4th ed. (1995).
- 12) USDA and U.S. Department of Health and Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 5th ed. (2000).
- 13) 田中平三, 臨床栄養, 97, 270 (2000).
- 14) 西澤 直行, Techno Innovation, 農林水産先端技術産業振興センター (STAFF), 27-32 (2001).
- 15) Nishizawa, N., Oikawa, M., Nakamura, M., and Hareyama, S., Effect of lysine and threonine supplement on biological value of proso millet protein. Nutr.Rep.Int., 40, 239-245 (1989).
- 16) Nishizawa, N., Oikawa, M., and Hareyama, S., Effect of dietary protein from proso millet on the plasma cholesterol metabolism in rats. Agric.Biol.Chem., 54, 229-230 (1990).
- 17) Nishizawa, N., and Fudamoto, Y., Yoshiharu, The elevation of plasma concentration of high-density lipoprotein cholesterol in mice fed with protein from proso millet. Biosci.Biotechnol.Biochem., 59, 333-335 (1995).
- 18) 西澤 直行, 雑穀の健康機能と食品開発・商品化, 「雑穀が未来をつくる」、大谷みゆき、嘉田良平監修、p 91-102 創森社 (2001)

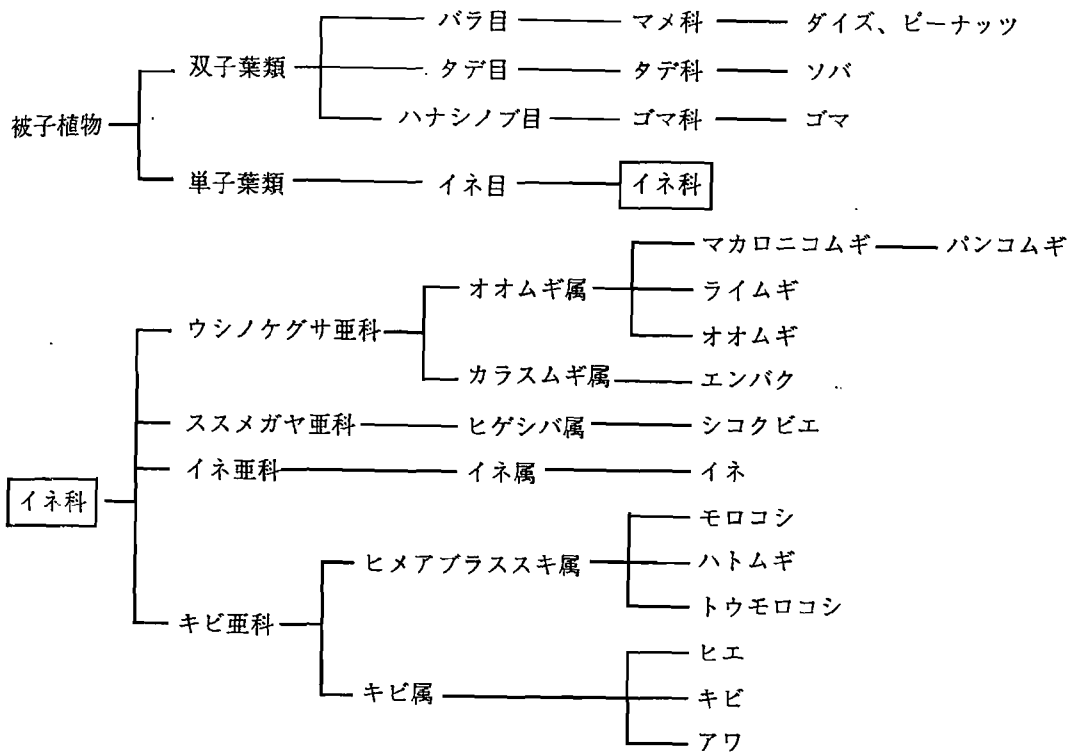


図1 . 主要な穀物類の生物学的分類

研究組織

研究代表者：西澤 直行 (岩手大学農学部・教授)

研究分担者：平 秀晴 (岩手大学農学部・教授)

研究分担者：高畑 義人 (岩手大学農学部・教授)

研究分担者：吉川 信幸 (岩手大学農学部・教授)

研究分担者：長澤孝志 (岩手大学農学部・助教授)

研究分担者：山下哲郎 (岩手大学農学部・助教授)

研究分担者：伊藤 芳明 (岩手大学農学部・助手)

研究分担者：小浜恵子 (岩手県工業技術センター・主任専門研究員)

研究分担者：菊地淑子 (岩手県農業研究センター-県北農業研究所・専門研究員)

平成11年～平成12年分担。平成12年岩手県職員移動のため常時参加できなくなったため研究分担者から除く

研究分担者：長谷川 聡 (岩手県農業研究センター-県北農業研究所・専門研究員)

平成12年～平成13年分担。平成12年岩手県職員移動による雑穀栽培法の分担のため研究分担者に追加

交付決定額 (配分額)		(金額単位：千円)	
	直接経費	間接経費	合計
平成11年度	26,800	0	26,800
平成12年度	24,000	0	24,000
平成13年度	11,400	0	11,400
総計	62,200	0	62,200

研究発表

(1) 学会誌等

1. Naoyuki Nishizawa, Daiki Sato, Yoshiaki Ito, Takashi Nagasawa, Yasuko Hatakeyama, Myeong-Rak Choi, You-Young Choi, And Yi Min Wei, Effects of Dietary Protein of Proso Millet on Liver Injury induced by D-galactosamine in Rats. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 66(1), 92-96, 2002 年 1 月
2. Kohama, K., T. Nagasawa and N. Nishizawa.
Polypeptide compositions and NH₂-terminal amino acid sequences of proteins in foxtail and proso millets. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63(11),1921-1926, 1999 年 11 月
3. 西澤直行、ヒエ、キビを原料とした雑穀パンの開発ー産学官民農の連携, *ANNALS*, 6, 9-12, 2002 年 1 月

(2) 口頭発表

1. 宮越 洋, 山口 奈津, 渡辺 満, 伊藤 芳明, 長澤 孝志, 西澤 直行, 雑穀ヒエの摂取がアレルギー反応に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会、2002 年 7 月
2. 宋 碩燦、吉川 信幸、長谷川 聡、勝部和則、原田 幸雄、*Fusarium roseum* によるキビ白斑葉枯病（新称）、日本植物病理学会大会、2002 年 4 月
3. 佐藤 大樹、長澤 孝志、伊藤 芳明、畠山 泰子、西澤 直行、ヒエのラット高コレステロール血症抑制効果、日本農芸化学会、2002 年 3 月 27 日
4. 佐藤 大樹、長澤 孝志、伊藤 芳明、西澤 直行、キビ蛋白質のラット肝障害抑制効果、日本農芸化学会、2001 年 3 月 25 日
5. 青山かえで、小浜恵子、長澤孝志、伊藤芳明、西澤直行高コレステロール血症での脂質代謝に及ぼす雑穀蛋白質摂取の効果、日本農芸化学会、2001 年 3 月 25 日
6. 張 蕾、高畑 義人、高橋 養一、長澤 孝志、伊藤 芳明、西澤 直行、崔明洛、崔西榮、魏益民、雑穀の種子たんぱく質と DNA 多型の解析による品種識別、日本農芸化学会、2001 年 3 月 26 日
7. 張 蕾、中野 織恵、伊藤 鈴、長澤孝志、伊藤 芳明、西澤直行モロコシの抗酸化機能とポリフェノール成分の分離、日本栄養・食糧学会、2001 年 5 月 8 日
8. N. Nishizawa, D. Sato, K. Oikawa, T. Nagasawa, Y. Ito, Wei Yi Min, Myeong-Rak Choi and You-Young Choi, Effects of dietary millet protein on galactosamine-induced hepatic injury and lipid metabolism in rats and hamsters, 17th International Congress of Nutrition, August 29, 2001.
9. 山口奈津、長澤孝志、伊藤芳明、西澤直行、雑穀の摂食がラット腹腔内細胞のヒスタミン放出に及ぼす影響、日本農芸化学会、2000 年 4 月 1 日
10. 及川和志、長澤孝志、西澤直行、ハムスターの脂質代謝に及ぼすキビ蛋白質摂取の影響、日本農芸化学会、2000 年 4 月 1 日
11. ラットの免疫機能に及ぼすキビ、ヒエの摂食効果の検討、山口奈津、長澤孝志、

- 伊藤芳明、西澤直行、日本農芸化学会東北支部大会、2000年9月16日
12. 青山かえで、小浜恵子、長澤孝志、伊藤芳明、西澤直行、高コレステロール血症での雑穀蛋白質摂取が脂質代謝に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会東北支部、2000年10月21日
 13. 西澤 直行、小浜 恵子、注目される雑穀の栄養価-- 雑穀の健康機能と食品開発 -- 国際雑穀食フォーラム、2000年8月26日
 14. 張 蕾、及川喜世美、長澤孝志、伊藤芳明、西澤 直行、モロコシの抗酸化性及び脂質代謝野及ぼす影響、日本栄養・食糧学会、2000年5月13日

(3) 出版物

1. 西澤直行、(雑穀が未来をつくる (大谷みゆき, 嘉田良平監修)), 創森社, pp.91-102, 2001年5月10日
2. 西澤直行, 長澤孝志, 青山かえで, 「大学から浄法寺町への提言--- 中山間地の活性化戦術 ---」 浄法寺町活性化研究会 編, 吉成印刷 (株), pp.72-84., 1999年12月20日
3. 西澤直行, キビ、アワ、ヒエの一般成分と機能性, (地域農産物の品質・機能性成分総覧 (津志田藤二郎監修)), サイエンスフォーラム, p 426-430, 2000年5月30日

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特許出願

- (1) 急性肝障害を抑制させる機能性を有するキビ蛋白質濃縮物、西澤 直行、(株)ベルセンター、特許、特願2001-71740号、出願平成13年3月14日、
- (2) 血液中の脂質濃度を低下させ、抗酸化機能を有するモロコシの抽出物、西澤 直行、西澤 直行、特許、特願2000-147044、出願平成12年5月18日

商標登録出願

- (1) 「雑穀パン」、西澤 直行、株式会社ベルセンター、商標登録出願、商願2002-019477、出願平成14年3月12日
- (2) 「へっちょだんご」、西澤 直行、株式会社ベルセンター、商標登録出願、商願2002-019478、出願平成14年3月12日

第1章 雑穀の栽培、成分

第1節 雑穀の栽培・生産と一般成分及び栄養価

1. 雑穀の栽培・生産

雑穀の栽培は容易である。栽培で何が一番大変かと云うと、草取りである。その辺をどのようにして改善、機械化をしていくのかが、今後の緊急の課題である。筆者らは、年配者の作業を容易にすることや若い人達が農業を儲かる事業としてやってもらうためにも、小規模機械化が重要であると考えており、後述のように、現所在地元農機具企業との連携で、個人用及び汎用の雑穀栽培農機具の開発、商品化した。

産地の概要として岩手県では、地域における正確な栽培面積、収量等の詳細は調査されていないが、個々の農家では3から5畝あるいは1反程度の小規模栽培が主体である。主要な生産地は軽米町、二戸市であるが、ヘクタール単位で栽培している地域は軽米町と胆沢町の農家のみである。

収量は、岩手県浄法寺町の例 [1]：平成9年度の浄法寺町の農家の栽培実績は、1反当たりの玄穀の収量が平均で、アワ 228 kg、ヒエ 215 kg であった。平成10年度の生産量は、モミの収量が、アワ 272 kg(最高 330kg、最低 225kg)、ヒエ 174kg(最高 200kg、最低 140kg) 及びキビで 243kg(最高 400kg、最低 145kg) であった。

二戸市の農家の例：収量を調べてみると、化成肥料を施肥した普通栽培ではキビ、アワ、ヒエの玄穀平均で 200~230kg である。野菜栽培の後地のような施肥量の多い畑では最高 300kg にも達する。また、この農家の完全有機栽培雑穀では、150 kg の収量である。なお、昭和 12、13 年の反当たりの収量は、岩田の論文によると、ヒエ 126kg、アワ 145kg、キビ 130kg である [2]。主に堆肥を使用していた戦前のこのような低い収量は、現在の化成肥料の施肥量を考慮すると妥当な値であろう。一方、外国の収量をみると、アフリカで 34~81.1[3]、アジアで 65.4kg と相当低く、粗放的栽培であることがうかがえる。収量の多い国は中国とソ連で、それぞれ 196.9、130kg であり、世界平均でも 53.9~90.6kg である [3,4]。

2. 一般成分

五訂日本食品標準成分表によると、雑穀の精白粒の主要成分は、炭水化物、蛋白質、食物繊維(水溶性と不溶性の総量)、次いで脂質である。アワ、ヒエ及びキビのその成分含量は、炭水化物 72.4~73.1%、蛋白質 9.7~10.6%、食物繊維 1.7~4.3 %、及び脂質が 1.7~3.7 % の範囲である。雑穀の蛋白質含量は、窒素肥料の施肥量に影響を大きく受けやすく、例えば蛋白質含量が 20% という非常に高いものもみられる。また可食部のビタミン含量は、B1 が 0.05~0.2mg/100 可食部、B2 が 0.03~0.07mg、ナイアシンは 1.7~2 mg である。ビタミン C は全く含まれていない。ミネラルの内、カルシウムがおおよそ 7~14mg、鉄 1.6~4.8 mg である。これらの雑穀のビタミンとミネラル含量をコメと比べてみると、ビタミン含量はコメ精白米とほぼ同様の値であるのに対して、ミネラルの量はカルシウムがコメの 1.4~2.8 倍、鉄が 2~6 倍も多く含まれている。これらのミ

ネラル含量を文献値 [3] のカルシウム含量が 10 mg、鉄 3.2~3.3 mg と比べてみてもほぼ同様の値を示している。このように、雑穀の一般成分をコメと比較すると、概して蛋白質、ミネラル、及び食物繊維含量が多く、ビタミンのそれはコメとほぼ同じ含量と云える。

雑穀の脂肪酸は主にリノール酸及びオレイン酸から構成されている。

3. 栄養価

そのアミノ酸スコア値は、FAO/WHO(1985) を評点パターンとして計算すると、キビで 11~20[5]、25[6]、27~33[4] と非常に低い。アワで 47[3]、43[7] である。また、ヒエで 29[4]、27[8] とやはり非常に低い。

雑穀蛋白質の生物価については、キビ蛋白質のラットの成長、消化率及び生物価を測定した結果、キビ蛋白質を単独であたえたラットは全く成長しない。キビ粉のみをラットに 21 日間与えた結果でも、同様に成長をしていない [9]。従って、上記の低いアミノ酸スコア値と併せて考えると、雑穀の蛋白質のそれ自身の栄養価は、云われているようには高くない。しかし、制限アミノ酸のリジン、スレオニンを補足することによって、カゼインと同等に成長は改善している [6]。この時の体重増加量、消化率及び生物価はそれぞれ、カゼインの 31.5 g、91.8%、74.4%の対して、キビのそれは 32.9g、92.0%、84.2%と同等かそれ以上の値を示している。

引用文献

- 1) 西澤直行、他：中山間地から健康新食品の開発——雑穀と健康——、(浄法寺町活性化研究会編：大学から浄法寺町への提言——中山間地の活性化戦術——)、p.72-84、吉成印刷 (1999)
- 2) 岩田久敬：雑穀類、芋類、樹実類の代用食試験 (農村食品及び天然食品の研究 第 1 報)、日本農芸化学会誌、16、27 (1940)
- 3) Segio, O.; Serna—Saldivar; Cassandra, M. McDonough; Lloyd W. Rooney, (Chapter 6), The Millets in "Handbook of Cereal science and Technology" ed. by Klaus J. Lorenz and Karel Kulp, p.271—300 (1991)
- 4) Dendy, David A.V.: Sorghum and millets: Chemistry and Technology (Dendy, David A.V. ed.), p.145, American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, USA (St. Paul) (1995).
- 5) Lorenz, K. and Dilsaver, W.: Proso millets. milling characteristics, proximate compositions, nutritive value of flours, Cereal Chem., 57, 16 (1980)
- 6) Nishizawa N. et al: Effect of lysine and threonine supplement on biological value of proso millet protein, Nutr. Rep. Intl., 40, 239 (1989)
- 7) 科学技術庁資源調査会・資源調査所編: 改訂日本食品アミノ酸組成表、大蔵省印刷局

(1986)

- 8) 平 宏和：食用作物のアミノ酸組成(第2報)、栄養と食糧、15、57(1962)
- 9) 田代 操、牧 善輔：きび蛋白質の栄養価、京都府立大学学術報告: 第28号、B7(1977)

第2節 アミノ酸、蛋白質、ペプチド組成 [31]

ヒトの食糧源として重要である種子貯蔵タンパク質成分に関する研究の歴史は非常に古く、19世紀末に提唱されたプロラミン、グロブリン、アルブミンという分類・命名法が今なお生きている。これらの貯蔵タンパク質は、種子細胞のプロテインボディというオルガネラに局在していることが判っている。イネ科作物の全重量の92%は胚乳であり、残りの5.6%が糠で、約3%が胚芽である。胚乳には主成分である澱粉のほかに数種の種子タンパク質が存在しており、澱粉粒やプロテインボディなどの顆粒構造をとっている [1]。穀類種子貯蔵タンパク質を溶解度をもとに初めて系統的に分析を行ったのは Osborne らであり、60~70%のアルコールに可溶であるグループをプロラミンとして定義している。プロラミンはオート麦や米を除き、穀類の主貯蔵タンパク質であり、その名称は、プロリンとアミド態窒素（現在ではグルタミンであることがわかっている）含量が高いことから命名された [2]。プロラミンとグルテリンは当初、異なるものとして分類されていた。しかし、現在では多くのグルテリンはプロラミンに構造的に常に近いものであり、内部の S-S 結合により高分子量のポリマーとして安定しているためにアルコールに不溶であることが知られている。

しかし、雑穀タンパク質のアミノ酸組成を解析した例はあるが [3-6] 個々の詳しいポリペプチド組成を解析した例はほとんどない。そこで本章においては、雑穀種子タンパク質が HDL 代謝に影響を及ぼしている可能性を検討する前段階として、雑穀種子タンパク質の分離やポリペプチド構成解析を実施した。

2-1 方法

1) アワ、キビ、ヒエ試料

アワ、キビ、ヒエは平成8年に農家で栽培され精白した穀粒をミルで粉碎し、80メッシュのふるいにかけたものを n-ブタノールで数回脱脂した後、風乾して用いた。品種に関してははっきりしていない。分析に用いるまでは4℃で保存しておいた。また、各品種の雑穀は平成9年に岩手県農業研究センター県北農業研究所で栽培されたものを用いた。玄穀を乳鉢にて精白したものをすりつぶして粉碎した後、同様に脱脂して試料とした。

2) 種子タンパク質の抽出

脱脂粉碎し処理した試料は Landry-Maureax による溶媒分画 [7] に基づき、5画分のタンパクとして次の様に抽出した。

(I) 試料の10倍量の0.5M-NaClを加えて4℃、1時間攪拌抽出。これをアルブミン・グロブリン画分とした。

(Ⅱ) 残査に 70 % (V/V) イソプロパノール抽出した後、遠心分離により上清を回収した。キビとヒエに関しては溶媒濃度を 60、70、80 %と変化させて抽出を試みた。この画分を true prolamin 画分とした。

(Ⅲ) 残査に 0.6 % のメルカプトエタノール (2-ME) を含む 70 % イソプロパノールを同量加えて室温で 30 分間抽出して、prolamin-like 画分とした。

(Ⅳ) 残査に 0.6 % 2-ME を含む 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 10) を同容量加えて室温で 1 時間攪拌抽出し、上清を透析、凍結乾燥して glutelin-like 画分とした。

(Ⅴ) (Ⅳ) の抽出で用いた緩衝液に SDS を 0.5 % となるように加えたものを抽出溶媒とし室温で (Ⅳ) の残査を 1 時間攪拌抽出した後、透析・凍結乾燥して true-glutelin 画分とした。

3) SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli[8] の方法により、行った。

4) 2次元電気泳動

プロラミン画分の 2次元電気泳動はマルチフォア II システム (ファルマシア) を用いて固定化 pH 勾配による方法にて実施した。1次元目の等電点電気泳動はイモビラインゲル (pH3~10.5) を用いた。試料は 48 % 尿素、2 % (V/V) 2-ME、2 % ファルマライト 3-10、4 % TritonX-100 を含む溶液 100 μ l にタンパク質として 400 μ g を溶解し、泳動の目安として少量のブROMフェノールブルーを加えてゲルの陽極側に添加した。泳動は、300V、1mA で 4.5hr、5hr で 2,000 V まで到達させ、さらに 6.5hr 行った。1次元目終了後、1 % SDS、0.25 % DTT、6M ウレアを含む Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8) 10 ml でゲルを平衡化した。さらにヨードアセトアミドを加えてアルキル化を行った。2次元目は 8-18 % のグラジエントゲルを用いて 50 mA で 1.5 hr 泳動した。染色及びスポットの検出は 3) と同様に実施した。

5) アミノ酸組成分析

タンパク質の加水分解は常法に従い 6N 塩酸を用いて減圧下に封管し、110 $^{\circ}$ C、20 hr 行った。シスチンは過ギ酸酸化 [9] によりシステイン酸として定量した。SDS-PAGE 及び 2次元電気泳動で分離したポリペプチドは、PVDF メンブラン (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) にトランスバッファー (1) 0.3M Tris-HCl (pH10.4), 20% (V/V) メタノール、(2) 30 mM Tris-HCl (pH 10.4)、20 % メタノール (3) 40 mM 6-アミノ-n-ヘキサン酸 (pH 7.6)、20 % メタノールを用いてブロッキングし、膜上で気相による塩酸加水分解を実施した。加水分解終了後、30 % (V/V) メタノール-0.1N 塩酸にて膜から抽出し、試料とした。アミノ酸の定量は Pico-Tag (Waters, Bedford, MA, USA) を用いて実施した。

6) NH₂末端アミノ酸配列の決定

SDS-PAGE 及び 2 次元電気泳動で分離したポリペプチドの N 末端アミノ酸配列は 5) と同様にして PVDF メンブランにブロッティングした後、エドマン分解によるオートシーケンサー (G 1 0 0 5 A; Hewlett Packard, Palo Alto, USA) を用いて決定した。

2-2 結果

2-2-1 種子タンパク質の組成

1) タンパク質の構成

True prolamin の抽出はアワは室温で、キビ及びヒエは 60 °C に加温したイソプロパノールで実施した。室温で抽出した場合のキビとヒエは全タンパク質のそれぞれ 16 及び 23 % しか回収できなかった。このとき、抽出に用いるイソプロパノールの濃度を 80 % に上昇させてみたが、プロラミンの抽出率はむしろ減少した。(Table 2-1)。したがって、本実験における抽出は 70 % イソプロパノールを用い、アワは室温でキビ及びヒエを 60 °C にて抽出した。その結果得られたタンパク質組成を Table 2-2 に示す。アワ、キビ、ヒエの種子タンパク質含量はそれぞれ 10.9, 11.5 及び 9.9 % であった。ヒエは 60 °C で加温抽出しても全タンパク質の回収率があまり改善されず 39.7 % であった。アワ及びキビにおける各フラクションの占める割合はアルブミン・グロブリン画分が 4.9、3.6 %、プロラミン画分 (true prolamin + prolamin-like protein) が 64.1、80.0 %、グルテリン画分が (glutelin-like protein + true glutelin) 13.0、12.1 % であった。ヒエにおいては回収率が低かったが、抽出されたタンパク質中に占める割合はプロラミン画分が 43 % と最も多かった。

2) 各フラクションのアミノ酸組成

Table 2-3 は分画したアワ及びキビタンパク質の各フラクションのアミノ酸組成を示したものである。プロラミン画分は、グルタミン (あるいはグルタミン酸)、ロイシン、アラニン含量が多く、塩基性アミノ酸リジンが少ない。特にロイシン、アラニン含量が高く、この 2 種で約 30 % を占めており、全タンパク質のアミノ酸組成の特徴を反映している。麦や米など同じイネ科作物に比べて同じキビ亜科のトウモロコシやソルガムに組成が類似している。また、アルブミン、グロブリン画分は塩基性アミノ酸が多く、リジン、ヒスチジン含量が高い。これらの結果はすでに報告されている雑穀タンパク質を溶媒分画したアミノ酸分析とよく一致する [3-6, 10-12]。一方、還元剤の存在下でアルカリ性の緩衝液に抽出される glutelin-like protein は、総タンパク質に占める割合は低い

もの特徴的にプロリン含量が高い。しかし、このフラクションについて特に分画された知見はない。したがって、主成分であるプロラミンと glutelin-like protein についてポリペプチド構成やアミノ酸組成の特徴について更に検討を進めた。

2-2-2 プロラミン画分及び glutelin-like protein 画分のポリペプチド構成とアミノ酸組成の特徴

1) ポリペプチド組成

Fig. 2-1A はアワとキビの true prolamins, prolamins-like 画分 SDS-PAGE によって分離し、構成するポリペプチドを調べたものである。アワの true prolamins は 14, 19, 22-23, 27 kDa の主なポリペプチドから構成されており (レーン 1) 主成分はこのうち 22-23 kDa の部分と思われる。還元剤の存在下でアルコールに抽出される prolamins-like protein の構成ポリペプチドもほとんど変わらないが、14 kDa のポリペプチドは還元剤存在下の方が良く抽出され、27 kDa より高分子領域にいくつかのバンドが認められる (レーン 2)。

キビプロラミンの主ポリペプチドの構成数や分子量はアワとは異なっており、24, 17, 14 kDa のポリペプチドから構成されていた。その主成分は 24 kDa のポリペプチドであった。アワと同様に prolamins-like protein の構成はほとんど同じであるが、還元剤存在下で抽出することにより高分子領域にもバンドが見られる。

主たる構成タンパク質である true prolamins をあらかじめ還元処理を行わずに SDS-PAGE によって分離したのが Fig. 2-1B である。還元処理された試料では前述のように数本のバンドしか確認されなかったが、非還元サンプルでは高分子領域に多数のポリペプチドのバンドが確認できたことは、アワ及びキビプロラミンがサブユニット構造をとることを示している。さらに、個々の分子量を測定した結果、アワの非還元サンプルは 27, 22-23, 19 kDa の dimer と思われる位置にバンド (38-54 kDa) が見られる (レーン 2)。キビの結果では、非還元サンプルの主バンドは 48 kDa であるが、これは主成分 24 kDa の dimer と思われ、さらに 72, 96 kDa の trimer, tetramer と思われる位置にも検出されている (レーン 4)。対照的に、アワ、キビ 14k, 17k のポリペプチドはモノマー、ダイマーの位置には検出されなかった。

Glutelin-like protein の主なポリペプチドは、アワ、キビそれぞれ 17, 18 kDa である (Fig. 2-2)。どちらもブロードなバンドとして検出されており、アワに関しては他に 10, 27, 28 kDa のバンドが、キビには 27kDa のバンドが検出された。

2) ポリペプチドのアミノ酸組成

SDS-PAGE で分離した true prolamins 画分のポリペプチドを塩酸加水分解してアミノ酸組成を調べた結果を Table 2-4 に示した。アワ、キビともにアミノ酸組成の特徴によってそれぞれのポリペプチドは 2 つのグループに分類できた。1 つはプロラミンの主成分であるアワ: 27, 22-23, 19 kDa 及びキビ: 24kDa ポリペプチドであり、ロイシン、ア

ラニンが非常に多く総プロラミンにおけるこれらアミノ酸の割合の高さを反映するものである（グループA）。最もプロラミン中に占める割合が高いアワ 22-23 kDa とキビ 24 kDa ポリペプチドはシステイン含量が低かった。アワ 27 kDa ポリペプチドは、このグループ内では特徴的にシステイン含量が比較的高く、塩基性アミノ酸アルギニンの含量が高かった。

もうひとつのグループは、アワ：14 kDa、キビ：17, 14 kDa のポリペプチドであり、プロリン、メチオニン、システインに富むものである（グループB）。アワに関しては、prolamin like protein の 14kDa 付近のバンドをさらに 15-25% のグラジエントゲルを用いてさらに分離を試みた結果（Fig. 2-3）、メチオニン含量の非常に高い（15mol%）15 kDa のポリペプチドが見いだされた。これは Naren[13] らの報告しているアワ抽出画分（Setarin）と同一であろうと思われる。

Gutelin-like protein のアミノ酸組成は、前述のようにプロリンに富み、アスパラギン（あるいはアスパラギン酸）が非常に少ない。それぞれのアミノ酸組成を調べてみたが、量が少なすぎるため、全アミノ酸は決定できなかった。しかし、アワ、キビ 17、18 kDa のそれぞれの主ポリペプチドはともにプロリン含量が非常に高い（20 mol% 以上）ことが確認された。

3) 2次元電気泳動によるポリペプチド組成解析

True prolamin を 2次元電気泳動によりさらにポリペプチドの特徴を解析したのが Fig. 2-4 である。アワ、キビともに中性から塩基性の位置にすべてのポリペプチドは移動した。前述のように比較的塩基性アミノ酸含量の高いアワ 27 kDa ポリペプチドは、アルカリ側の先端まで移動した。アワ、キビのプロラミン中の主成分である 22-23 及び 24 kDa のポリペプチドを見てみると、主なサブユニットは同じ位置に移動したことから、同様の等電点を有するものと思われる。しかし、アワ 22-23 kDa のバンド中には多くのサブユニットが含まれており、中性付近のサブユニットを3つ以上含んでいる。キビの 24 kDa ポリペプチドも中性側にサブユニットを少なくとも2つは有しているが、アワのポリペプチドの方が数も等電点の pH 範囲も広い。アワの 19, 14 kDa 及びキビの 17, 14 kDa のポリペプチドは塩基性のサブユニットを含んでいたが、アワとキビの 14 kDa の等電点はほぼ同様であった。

2-2-3 プロラミンと glutelin-like protein の NH₂ 末端配列解析

2次元電気泳動により分離した true prolamin サンプル及び Fig. 2-2 で SDS-PAGE により分離した glutelin-like protein を PVDF 膜にブロッティングし、NH₂ 末端配列の決定を試みた。キビ 24kDa 及びアワ 23kDa ポリペプチドについては2次元電気泳動で分離された等電点の異なるスポットのうち、主サブユニットと思われるものの配列を分析した。アワ 27, 23kDa、キビ 24kDa 及び glutelin-like protein の主ポリペプチドであるアワ 17kDa、キビ 18 kDa が解析可能であり、その結果を Fig. 2-5 に示した。アワ 27, 23 kDa、

キビ 24kDa のポリペプチドは α -ゼイン [14-15]、ソルガムの主プロラミン [16] などキビ亜科のプロラミン主成分と相同性がみられた。特に Pro-Gln-Cys-Ser 配列はすべてにおいて保存されていた。アワ 19 kDa ポリペプチドもすべての配列は決定できなかったが、この配列が保存されていることが確認できた (Fig. 2-5A)。Fig. 2-5B に見られるように、glutelin-like protein の 17, 18 kDa のポリペプチドはプロリンに富む配列を示した。キビの 18 kDa では、 γ -ゼインの繰り返し配列に相同性のある、Pro-Pro-Pro-Leu-His 配列が認められた。

2-2-4 品種間によるプロラミン含量及びポリペプチド組成の差異

平成9年に岩手県農業研究センター県北農業研究所内の同一の圃場において同一施肥条件にて栽培されたアワ、キビ、ヒエの各栽培種について、前述の方法によってプロラミン画分を抽出し、全タンパク質含量との関係を調べたのが Fig. 2-6 である。タンパク質含量は、アワが9から13%、キビが11から14%、及びヒエが10から13%であった。アワの雪谷糯を除き、プロラミン含量の多少と全タンパク質量とはアワ品種間で、ほぼ相関していた。キビにおいては、全抽出率にばらつきがあるため、明確な相関は見られなかった。ヒエは相関が見られたが、タンパク質の抽出率が非常に悪かった。抽出したプロラミンを15%均一ゲルによる SDS-PAGE で分離したのが Fig. 2-7 である。アワにおいては品種によって19kDaのポリペプチドを有しないものもあり、調べた範囲においては穂型の差異と一致していた。キビについてはこの条件では明確な差異はみられなかった。中国産(精白穀粒：黒色)のアワやイスラエル産キビも岩手県内で栽培される種と同様の組成を示した。ヒエに関しては27、26、25kDaのポリペプチドは共通で、更に23kDaのバンドが見られるものと20kDaのバンドがみられるものの2種に分けられた。

2-3 考察

2-3-1 雑穀種子タンパク質の組成について

アワ、キビ、ヒエなどは、現在の先進諸国にとっては米や麦などの主用作物に比べて主食にはなっていない。日本においても、健康食としての位置づけであり、タンパク質源として主たるものでもない。しかしながら、アジア、アフリカ地域を主とする開発途上国の多くの人々にとっては主食であるとともに貴重なタンパク質資源であることから、その栄養価について調べた結果が多く報告されている。特にインド、スリランカなどでは栽培種とアミノ酸組成などのタンパク質源としての栄養価についての報告がみられる [11,17,18]。特にシコクビエ (Finger millet) は、米やトウモロコシと比べて、リジンを除き必須アミノ酸のバランスは見劣りせず、タンパク質としての栄養価が優れているとの報告もある [18]。

本実験におけるタンパク質の各フラクション組成をみると、大半がプロラミン画

分であることがわかる。アワ、キビ、ヒエタンパク質のリジン含量の低さはプロラミンの組成によるものであるが、例えば、メチオニンはむしろ高いことが Table 2-3、2-4 の結果からも読み取れる。リジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸は、アルブミン、グロブリン画分に多いことから、タンパク質としての栄養価を求めるのであれば、これらが高くなる育種の方向性も考えられる。しかし、本研究におけるアワ、キビ、ヒエのタンパク質解析の目的は血清 HDL 上昇との関連を明らかにすることにある。前述したように、植物タンパク質は一般的に動物タンパク質に比べて総コレステロールを減少させる効果が報告されており、特に最もよく調べられている大豆では LDL の減少がその主因と考えられている [42]。HDL 上昇の原因がアワ、キビ、ヒエのタンパク質のどの画分にあるのかを明らかにするためには、これら雑穀のタンパク質構成を調べる必要がある。

アワプロラミンは、70 % イソプロパノールで良く抽出されたが、キビは抽出率が低かった。還元剤存在下では抽出できたが、前述のように総タンパク質の 16.2 % しか抽出できなかった。Table 2-1 に見るように 60 °C で加熱することで良く抽出できることがわかった。70 % アルコールによってはプロラミンの一部はほとんど抽出されないと言われており、これらのほとんどはグルテリン態に分類されてきた [19]。本来有機溶媒で抽出されないものはプロラミンに分類すべきでないとの議論もある。熱処理はタンパクの構造変化を伴うものであるから、これはグルテリンに分類されるべきとも思われる。アワはアルコール可溶性のプロラミンが主成分であり、一方キビ、ヒエはグルテリン態が主成分との報告もある [20]。しかし、同一のポリペプチドであっても貯蔵条件により溶媒に対する溶解性が変わることも考えられる。すなわち、プロラミンポリペプチドが生合成され貯蔵部位に沈着した後、周囲のポリペプチドと相互作用によりシステイン残基の架橋高分子化、疎水結合の進行も考慮される。本実験においては Table 2-3 に見られるようにアミノ酸組成が非常に似ていること、室温で抽出した場合と加温して抽出した場合の SDS-PAGE パターンに差が見られなかったことから、プロラミンに分類するのが妥当と思われる。

2-3-2 プロラミンポリペプチド構造とアミノ酸組成のゼインとの相似

結果で述べたように、ロイシン、アラニンに富むグループ A に属するポリペプチドは、総プロラミンのほとんどを占めており、全プロラミンのアミノ酸組成を反映していた。一方、もうひとつの含硫アミノ酸 (Met, Cys) 及びプロリンの多いグループ B は、全プロラミンに対する割合は少ない。また、アワでは還元剤の存在下、良く抽出される。プロラミン画分が比較的メチオニン含量に富むのはこのポリペプチド群が存在するためである。非還元のプロラミンを泳動した場合の SDS-PAGE パターンをみると、グループ A はモノマー、ダイマー、オリゴマーの単純な会合構造をとっていることが予測される。Danno ら [10] と田代ら [6] の報告は、アワについてプロラミンがサブユニット構造をとることを示唆している。Danno らは非還元のプロラミンを分離し、分離したポリペプチドを還元、S-シアノエチル化したところ、同一のサブユニットから構成さ

れており、ホモオリゴマー構造をとっていると報告している。本研究で得られた結果は、アワのみでなくキビのプロラミンの主ポリペプチドもサブユニット構造をとるものであり、分子量からの推定であるが、ホモオリゴマー構造をとっていることを示唆するものである。したがって、アワやキビのタンパク質は、米や小麦とは異なり、その貯蔵タンパク質の大部分は単純なポリペプチドの重合体から成り立っているように予測される。

これらの結果は、雑穀のプロラミン中のポリペプチドはトウモロコシプロラミンであるゼインのサブユニット構成と相似していることを示唆している。すなわち、 α -ゼイン (19 及び 22k) にはアラニン、ロイシンが多く含まれ、総プロラミンの 75-85% を占めておりモノマー、オリゴマー構造をとる [21,22] といわれている。また、内部に繰り返し配列を有し、ヘリックス構造をとり、極性アミノ酸との水素結合により Fig.2-9 のような高次構造が提唱されている [23-26]。また、 β -ゼイン (16, 14 kDa) は Met, Cys に富み総プロラミンの 10-15 % を占め、還元剤の存在下で抽出される [21]。

ロイシン、アラニンに富むグループ A のポリペプチドの N 末端配列も α -ゼインとの相同性を示唆している。特に Pro-Gln-Cys-Ser の配列はすべてにおいて保存されているが、この Cys 残基は α -ゼインの唯一のものであることが報告されている。アワ 22-23 kDa、及びキビ 24 kDa ポリペプチドの Cys 含量は非常に少ないことからこの N 末端に存在するシスチンが唯一のものであるかもしれない。 β -ゼインにアミノ酸組成が類似しているグループ B のアワ 14kDa、キビ 14、17 kDa のポリペプチドについては多型性 (ミクロヘテロジェネティ) のため決定はできなかった。Bietz らは [16] イネ科作物のうち、麦類 (大麦、小麦、燕麦) 及び米が属する Festsucoideae subfamily と、ソルガム、Tripsacum、トウモロコシ、トウジンビエが属するキビ亜科 (Panicoideae subfamily) についてプロラミンの主成分を混合物のまま N 末端配列を決定しており、キビ亜科についてはトウジンビエ (Pearl millet) を除き相同性が見られたと報告している。本実験の結果は、これに加えて更にキビ亜科のアワ、キビも相同性を示すことを証明した。

G lutelin-like protein は γ -ゼインに相似しているものと推察される。 γ -ゼインは glutelin2[96] あるいは reduced soluble protein[23] と呼ばれており、以前はグルテリンに分類されていた。アワ、キビの glutelin-like protein は還元剤の存在下で γ -ゼインと同様に水溶性であり、プロリン含量が特徴的に高い。N 末端配列は Fig. 2-5 に示したように、Thr-His-Thr 配列が γ -ゼインと同一であり、プロリンの繰り返し配列を有している。やはり還元剤存在下で可溶性のタンパク質 (RSP) がソルガムで報告されており [24,26]、 γ -ゼインとのアミノ酸組成の比較は Table 2-5 に示したように、プロリン含量が顕著に高くヒスチジン含量が高いなどの相同性が見られる。アワ、キビの glutelin like protein も同様の傾向を示す。 γ -ゼインでは内部に Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu をモチーフとする 8 回の繰り返し配列を有しており、ソルガム由来のものでは全配列は決定されていないものの同様の配列を有しておりプロリン含量が高い。これらは SDS-PAGE でブロードのバンドを示し、その分子量は γ -ゼインが 27kDa、ソルガムのものが 28kDa と報告されている。アワ、キビにおける glutelin-like protein の分子量はそれに比べてかなり小さいものの、プロリン含量やヒスチジン含量などから同じカテゴリーのものと推察している。しかし、更に内部配列の検討を実施する

必要がある。

2-3-3 アワ、キビプロラミンと他の穀類プロラミン

トウモロコシでは登熟初期に β 及び γ -ゼインが生成され、そのポリペプチド内部に α -ゼインが集積すると言われている [27]。アワ、キビプロラミンも似たような特徴を有するポリペプチドを有していることから、同様の構造をとるのかもしれない。

Takumiらは、アワプロラミンの抗体を用いて、キビ、ヒエのプロラミンは免疫的に同一であるが、小麦、大麦、ライ麦プロラミンとはクロスしないと報告している [12]。さらに、kodo millet の 20 kDa のプロラミンに対するポリクローナル抗体と他の穀類との免疫的同一性も報告されている [28]。Kodo millet の抗体を用いた結果では、アワ、ヒエプロラミンとのクロスが確認され、特にヒエとは強く反応したとされている。ソルガム、トウジンビエ、トウモロコシプロラミンに含まれる 20 kDa 付近のポリペプチドのほか、族の異なる小麦とも免疫的な関連がみられたことから、米を除き共通のポリペプチドの存在を提唱している。

本実験の結果からもアワ、キビプロラミンポリペプチドは、アミノ酸組成の特徴やN末端配列のゼインとの相同性、あるいはアワとキビ間における2次元電気泳動により見出された等電点の同様なポリペプチドなどから共通のポリペプチドの存在も示唆された。しかし、例えば α -ゼインとのN末端配列の相同性を示したアワ 27 kDa ポリペプチドは塩基性アミノ酸が比較的多く、ゼインとの相違を有していたが、キビ中にはそのようなポリペプチドは見出せない。また中性付近のサブユニットの数や等電点もアワとキビでは異なっていた。また、アワとキビでは70%イソプロパノールに対する溶解性が異なるのは、前述したような貯蔵中の変化であるかもしれないが、もとの構造の相違による可能性が高い。各栽培品種の抽出を実施してみても、アワはすべての種において抽出率が良好であったが、キビは60℃でなければすべて抽出率が低く、栽培種によるばらつきがあった(モチ、ウルチ種との相関はない)。

2-3-4 栽培品種間におけるプロラミンポリペプチドの相違

岩手県における栽培品種は、各農家でさまざまである。地方によって各農家が伝統的な種子を使用している。岩手県農業研究センター県北農業研究所では収量、病害などを指標として機械化による輪作体系の実証やアワ、キビ、ヒエについて栽培奨励品種の選抜を実施している。アワでは虎の尾及び大槌 10、ヒエでは軽米在来(白)、キビでは田老系、釜石 16 を選択している [29,30]。結果 2-2-4 で述べたようにアワにおいては 19kDa のポリペプチドを有していないものがあり、それらは皆、円筒型の穂型をしていた。アワの種子の伝播ルートは明確でないが、中国産のものも 19Da のポリペプチドを有しており、どのように分布しているのか興味のあるところである。最もタンパク質含量が高かったのが西根 31 (モチ) の 13%であったが、栽培試験の結果からは、収量において虎の尾(ウルチ)、大槌 10 (モチ) に劣っていた。また、種子のタンパク質含

量とプロラミンの量はアワにおいては相関が認められた。アワの種子タンパク質については Monterio ら [11] がインド国内の 14 種のアワについて調べている。タンパク質含量は 11-18% と様々であり、高タンパク質の種はプロラミン画分が多く相関がみられ、アルブミン・グロブリン、グルテリンについては種のばらつきが大きいとされている。また、Monterio らはプロラミン画分の割合が上昇することはリジンの割合の低下を意味しておりタンパク質の質としては低下するとしている。タンパク質供給源としての質を求めるのであればリジン等の塩基性アミノ酸を多く含むアルブミン・グロブリン画分を増加させる育種方向も考えられる。また、アワの 15kDa ポリペプチドのようなメチオニン含量の高い品種を見出せば、大豆などメチオニンが不足したタンパク質との組み合わせの摂取で栄養改善を図ることも可能であろう。キビに関しては、やはり品種によりタンパク質含量が異なるものの品種による抽出率が異なり、単純な比較はできない。ポリペプチド組成については今回の SDS-PAGE 条件では相違はみられなかった。ヒエに関しては 3 種のみでの検討であるが、抽出率が低いものの、プロラミン含量との相関がみられるようである。またポリペプチド組成からは結果に示したように 2 種に分けられた。ヒエに関しては達磨は短稈で機械化しやすい特徴があるが、軽米在来（白）とは呈味性が異なるとの生産者の意見もある。本研究においては、ヒエに関しては抽出率の悪さから詳しい解析には至らなかったが、興味ある問題である。品種間差異については年変動も考慮するべきであり、施肥条件を変えた場合のタンパク質含量、ポリペプチド及びアミノ酸組成等の検討も必要であろう。

本研究の成果は、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*誌上に発表した [31]。

引用文献

- 1) 種子生理化学会編"種子のバイオサイエンス"、学会出版センター (1995).
- 2) Osborne, T. B., "The vegetable proteins", 2nd edn., Longmans, Green and Co., London (1924).
- 3) 小原哲二郎,"雑穀—その科学と利用—"、樹書房 (1981) .
- 4) 平 宏和、食用作物のアミノ酸組成 (第 2 報)、日本栄養・食糧学会誌、15, 57-61 (1962).
- 5) 牧 善輔、田代 操、粟プロラミンのポリペプチド組成、日本栄養・食糧学会誌、32, 317-320 (1979).
- 6) 田代 操、雑穀タンパク質に関する栄養化学的研究、日本栄養・食糧学会誌 34, 191- 200 (1981).
- 7) Landry, J., and Moureaux, T., Hetero genetic des glute___牧榆__††_榆
lins du grain de maïs, extraction selective et composition an acides amines des trois
fractions isolees. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52, 1021-1037 (1970).
- 8) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of
the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 9) Moore, S., On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol.*

- Chem., 238, 235-237 (1963).
- 10) Danno, G., and Natake, M., Isolation of foxtail millet proteins and their subunit structure. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 913-918 (1980).
 - 11) Monterio, P. V., Virpaksha, T. K., and Rao, D. R., Proteins of Italian millet: Amino acid composition, solubility fractionation and electrophoresis of protein fractions. *J. Sci. Food Agric.*, 33, 1072-1079 (1982).
 - 12) Takumi, K., Udaka, J., Kanoh, M., Koga, T., and Tsuji, H., Polypeptide compositions and antigenic homologies among prolamins from Italian, common and Japanese millet cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 72, 141-147 (1996).
 - 13) Naren, A. P., and Virupaksha, T. K., α and β -Setarins: Methionine-rich proteins of Italian millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.). *Cereal Chem.*, 67, 32-34 (1990).
 - 14) Marks, M. D., and Larkins, B. A., Analysis of sequence microheterogeneity among zein messenger RNAs. *J. Biol. Chem.*, 257, 9976-9983..
 - 15) Geraghty, D. E., Messing, J., and Rubenstein, I., Sequence analysis and comparison of cDNAs of the zein multigene family. *EMBO J.*, 1, 1329-1335 (1982).
 - 16) Bietz, J. A. , Cereal prolamins evolution and homology related by sequence analysis. *Biochemical Genetics*, 20, 1039-1053 (1982).
 - 24) Taylor, J. R. N., Benecke, R. V., and Carlsson, F. H. H., Distribution, Purification and N-terminal amino acid sequence of sorghum reduced-soluble protein. *J. Cereal Sci.*, 9 ,169-177 (1989).
 - 17) Gopal, D. H., Protein concentrates from Italian millet (*Setaria italica*) and their enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 29, 97-108 (1988).
 - 18) Ravindran, G., Seed protein of millets: amino acid composition, proteinase inhibitors and in-vitro protein digestibility. *Food Chem.*, 44, 13-17 (1992).
 - 19) Shewry, P. R., and Tatham, A. S., The prolamins storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.*, 267, 1-12 (1990).
 - 20) Parameswaran, K. P., and Thayumanavan, B., Homologies between prolamins of different minor millets. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 48, 119-126 (1995).
 - 21) Esen, A., A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.*, 5, 117-128 (1987).
 - 22) Paulis, J. W., Disulfide structures of zein proteins from corn endosperm. *Cereal Chem.*, 58, 542-546 (1981).
 - 23) Wilson, C. M., Shewry, P. R., and Mifflin, B. J., Maize endosperm

- proteins compared by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Cereal Chem.*, 58, 275-281 (1981).
- 24) Agros, P., Pedersen, K., Marks, M.D., and Larkins B. A., A structural model for maize zein proteins. *J. Biol.Chem.* 257, 9984-9990 (1982).
- 25) Garratt, R., Oliva, G., Caracelli, I., Leite, A., and Arruda, P., Studies of the zein-like \pm prolamins based on an analysis of amino acid sequences: Implications for their evolution and three-dimensional structure. *Proteins Struc. Func. Genet.* 15, 88-89 (1993).
- 26) Matsushima, N., Danno, G., Takezawa, H., and Izumi, Y., Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1339, 12-14 (1997).
- 26) Evans, D. J., Schussler, L., and Taylor, J. R. N., Isolation of reduced-soluble protein from sorghum starchy endosperm. *J. Cereal Sci.*, 5, 61-65 (1987).
- 28) Lending, C. R., Larkins, B. A., Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Plant Cell*, 1, 1011-1023 (1989).
- 28) Parameswaran, K. P., and Thayumanavan, B., Isolation and characterization of a 20 kD prolamin from kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*)(L.): Homology with other millets and cereals. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 50, 359-373 (1997).
- 29) 菊地淑子、平成9年度岩手県農業研究センター成績書
- 30) 菊池淑子、岩手県北部のアワ、ヒエ、キビの優良系統、グリーンレポート、311,4-5 (1998).
- 31) Kohama, K., Takashi, Nagasawa and N. Nishizawa (1999). Polypeptide composition and NH₂-terminal amino acid sequences of proteins in foxtail and proso millets, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(11), 1921-1926.

Table 2-1. Amount of prolamin extracted from millets using different concentrations of isopropanol

Isopropanol concentration (% v/v)	Prolamins extracted (mg)		
	Foxtail millet	Proso millet	Japanese millet
60	450	85	150
70	498	88	170
80	368	53	107

Prolamins were extracted from defatted flour of 15g.

Table 2-2. Protein distribution in seed of foxtail, proso and Japanese millet

Cereal	Protein content	Protein fraction(% of total protein)					Recovery %
		Albumin-globulin	True prolamin	Prolamin-like	Glutelin-like	True glutelin	
Foxtail millet	10.9	4.9	56.5	7.6	2.2	10.8	82.0
Proso millet	11.5	3.6	79.0*	1.0	1.9	10.2	95.7
Japanese millet	9.9	5	17.2*	7.0	1.7	8.8	39.7

* True prolamin was extracted at 60°C.

Table 2-3. Amino acid composition of polypeptides of prolamin and glutelin-like protein
(mol % of total amino acid)

	Foxtail millet				Proso millet					
	Albumin-globulin	True prolamin	Prolamin like	Glutelin like	True glutelin	Albumin-globulin	True prolamin	Prolamin like	Glutelin like	True glutelin
Asx	8.8	5.4	4.8	1.8	7.5	7.8	4.2	2.7	2.5	8.2
Thr	4.9	3.8	4.0	6.3	4.7	4.3	2.9	3.9	4.5	4.7
Ser	6.6	6.5	6.7	2.5	6.1	6.2	8.4	6.3	3.8	6.1
Glx	13.3	21.0	20.7	24.0	13.1	13.3	21.1	22.8	24.8	12.7
Pro	5.2	9.3	10.4	13.6	6.8	5.0	8.2	10.0	13.0	6.3
Gly	11.1	2.2	2.6	9.6	7.5	9.9	1.9	4.4	10.0	8.8
Ala	10.1	15.7	15.0	5.6	11.7	9.6	17.1	13.2	11.1	10.1
Cys	4.9	1.6	2.1	4.0	1.6	4.9	1.8	5.5	1.7	0.8
Val	6.1	5.2	4.2	6.9	6.3	6.0	4.7	4.0	5.3	6.6
Met	1.3	2.2	4.2	3.4	3.0	1.6	2.7	5.2	2.1	2.8
Ile	3.2	3.9	3.4	3.8	4.5	3.2	3.7	2.9	2.0	4.4
Leu	6.3	14.5	12.4	6.6	10.2	6.4	12.6	9.1	7.2	8.2
Tyr	2.2	2.4	2.5	5.5	2.5	1.9	3.1	3.7	2.7	3.3
Phe	2.7	3.7	3.9	0.6	3.8	3.0	4.4	2.5	0.6	3.5
His	2.3	1.2	1.5	3.0	2.0	2.4	1.6	2.5	5.0	2.5
Lys	3.3	0.1	0.2	0.2	3.4	4.5	0.1	ND	0.8	4.5
Arg	7.9	1.2	1.5	2.7	5.3	9.9	1.4	1.6	2.8	6.4

Values show mean for 3 measurements.

ND means not detected.

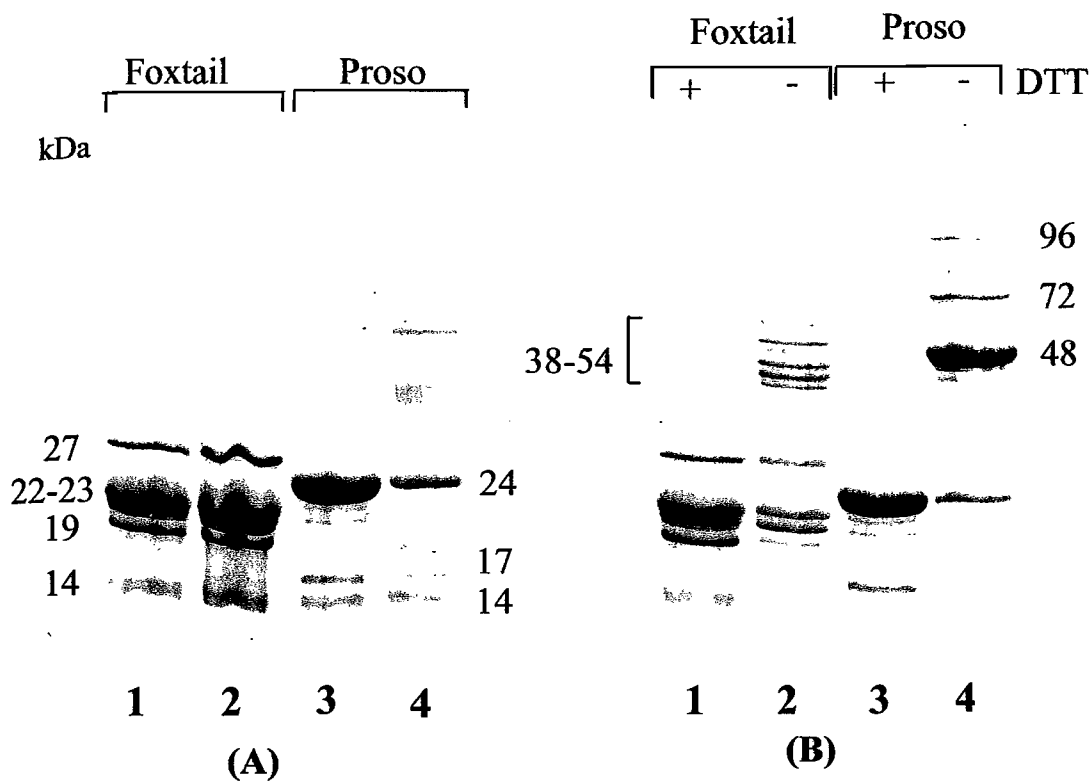


Fig. 2-1. SDS-PAGE patterns of true prolamins and prolamins-like proteins from cultivars of foxtail and proso millets.

(A) Patterns for true prolamins (lane 1) and prolamins-like proteins (lane 2) extracted with 70% isopropanol and 70% isopropanol containing 0.6% mercaptoethanol from foxtail millet; lanes 3 and 4 are those from proso millet, respectively. Prolamins (lane 3) was extracted at 60°C.

(B) SDS-PAGE patterns of true prolamins with or without the reducing reagent.

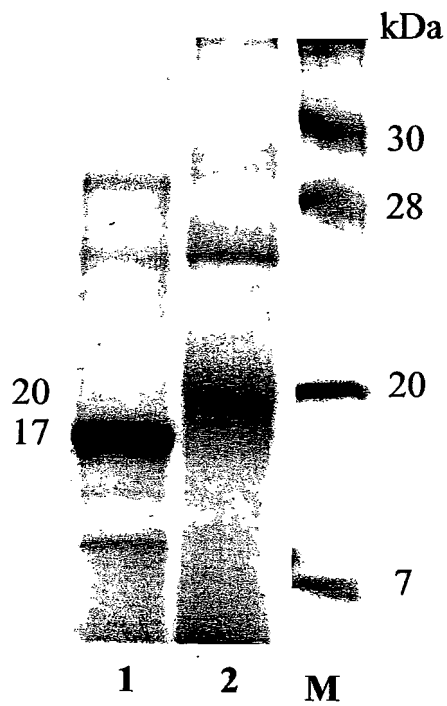


Fig. 2-2. SDS-PAGE patterns of glutelin-like protein from the millet cultivars.

Lanes 1 and 2 show the glutelin-like protein from foxtail millet and from proso millet respectively. M shows molecular marker.

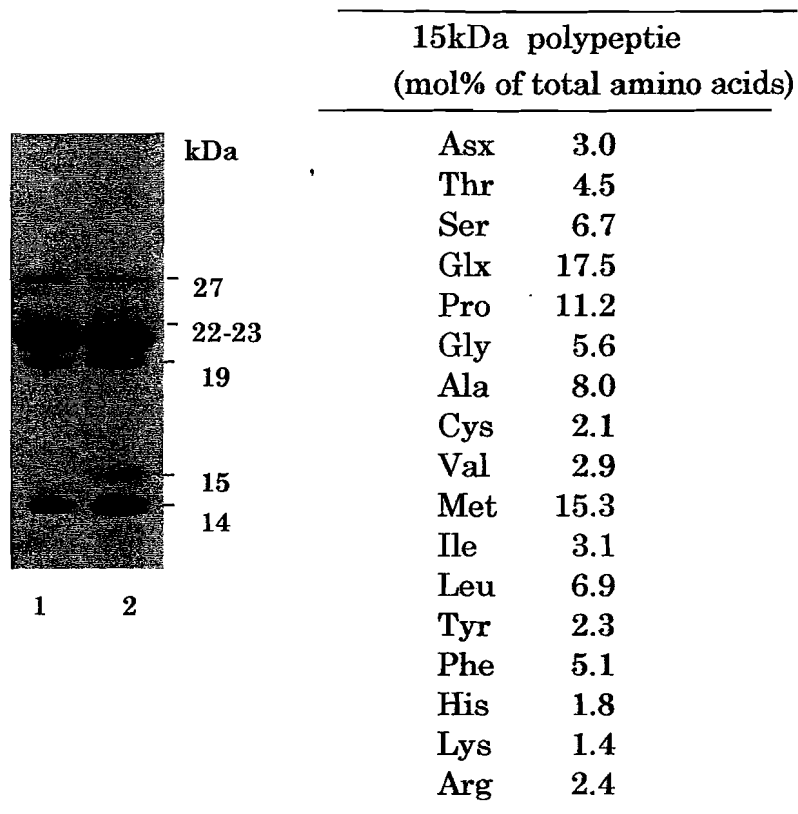


Fig. 2-3. SDS-PAGE and amino acid composition of methionine rich polypeptide from foxtail millet.

Lane 1 and 2 are true prolamin and prolamin-like protein, respectively.

Table 2-4. Amino acid comparison of the polypeptides of prolamin
(mol % of total amino acids)

	Foxtail millet				Proso millet			
	27kDa	22-23kDa	19kDa	14kDa	24kDa	17kDa	14kDa	14kDa
Asx	6.7	6.3	5.5	3.4	5.3	2.7	3.0	3.0
Thr	2.7	3.6	3.7	5.7	2.5	4.5	5.3	5.3
Ser	7.3	6.4	7.3	4.7	9.2	4.9	6.0	6.0
Glx	16.4	19.4	18.7	18.1	21.7	21.3	17.9	17.9
Pro	7.7	8.2	8.4	13.3	7.3	10.4	9.8	9.8
Gly	7.0	2.1	2.5	4.7	1.4	7.6	7.1	7.1
Ala	11.1	15.6	15.8	9.9	17.8	9.9	7.8	7.8
Cys	3.7	0.6	1.3	2.7	0.4	1.4	3.1	3.1
Val	3.7	6.0	4.8	3.5	4.9	4.7	3.7	3.7
Met	3.2	1.3	1.7	7.9	1.1	9.1	10.6	10.6
Ile	4.1	4.8	3.9	3.2	4.0	2.9	3.4	3.4
Leu	13.5	17.2	16.3	6.9	14.2	8.1	7.2	7.2
Tyr	3.5	2.6	3.0	3.9	3.0	5.3	5.7	5.7
Phe	4.0	4.1	3.9	6.9	4.4	1.8	2.6	2.6
His	1.8	1.2	1.2	1.9	1.6	2.6	1.4	1.4
Lys	0.5	0.1	0.7	1.3	0.3	0.9	1.9	1.9
Arg	3.3	0.8	1.4	2.2	1.2	2.2	3.5	3.5

Each value shows the mean from 3 measurements.

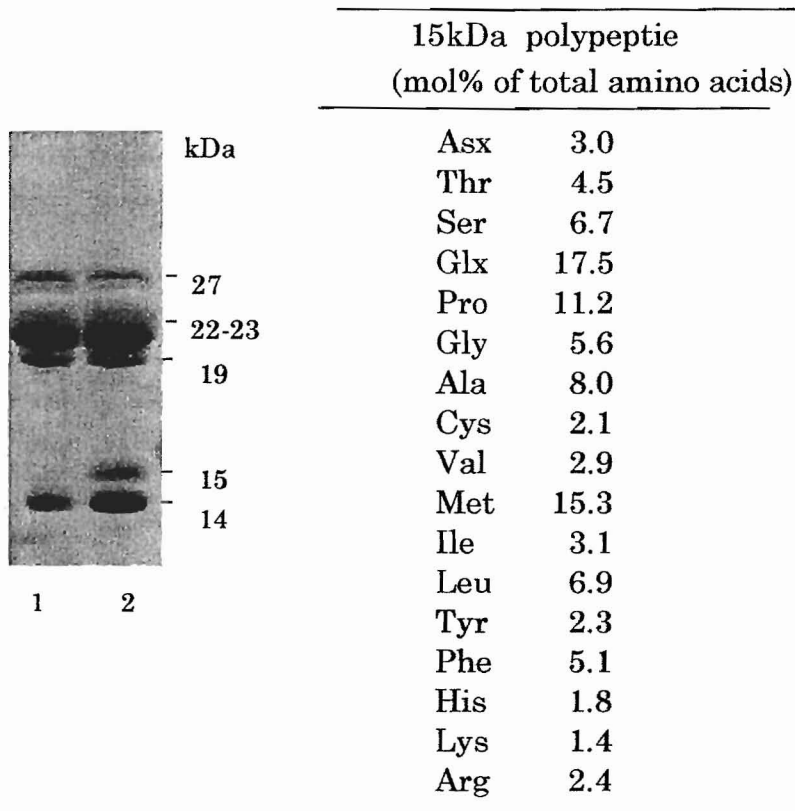


Fig. 2-3. SDS-PAGE and amino acid composition of methionine rich polypeptide from foxtail millet.

Lane 1 and 2 are true prolamin and prolamin-like protein, respectively.

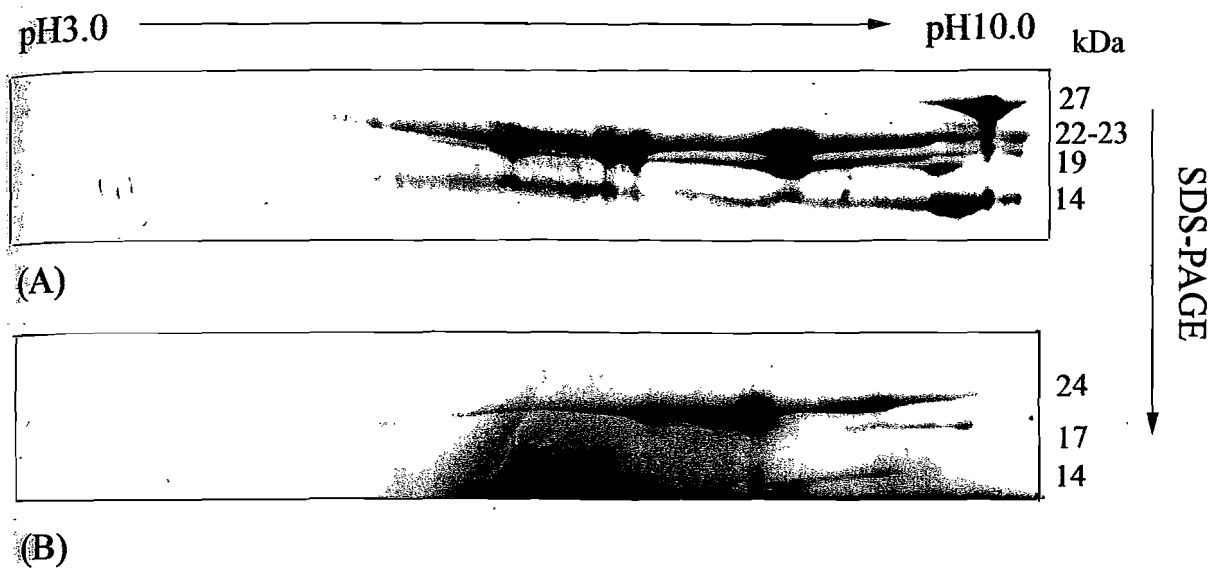


Fig. 2-4. Two-dimensional electrophoresis of prolamins.
 (A) True prolamins from foxtail millet; (B) true prolamins from proso millet.

	1		10
27kDa foxtail millet	I-L-I	P-Q-C-S	T-I P -Q-Y
23kDa foxtail millet	V-L-V	P-Q-C-S	V A - A - I -I
24kDa proso millet	F- I -N	P-Q-C-S	L- A - A - S - A
22kDa α -zein(pZ22.1)	F-I-I	P-Q-C-S	L-A-P-I-A
19kDa α -zein(A30)	T-I-F	P-Q-C-S	Q-A-P-I-A
Sorghum prolamins	V- I -I	P-Q-C-S	L-A-P-I-A

(A)

	1		10
γ -zein	T-H-T-S-G-G-C-G-C		Q-P-P-P-P-V-H-L-
			P-P-P-V-H-L
Sorghum reduced soluble protein	T-L-T-S-G-G-C-G-C		Q-P-P-H-L-P-P-P-
			V-H-L
17kDa foxtail millet	T-H-T-C-P-P-H-Q-Q		P-P-P
20kDa proso millet	T-H-T-A-G-Q-A-P-P-P		L-H

(B)

Fig. 2-5. Homology comparison of the NH₂-terminal sequences of millet polypeptide and other cereal prolamins. (A) Comparison of millet prolamins, maize α -zein[93,94] and the main prolamins polypeptide from sorghum[95].(B) Comparison of millet glutelin-like protein, maize γ -zein [96] and the reduced soluble protein of sorghum[97].

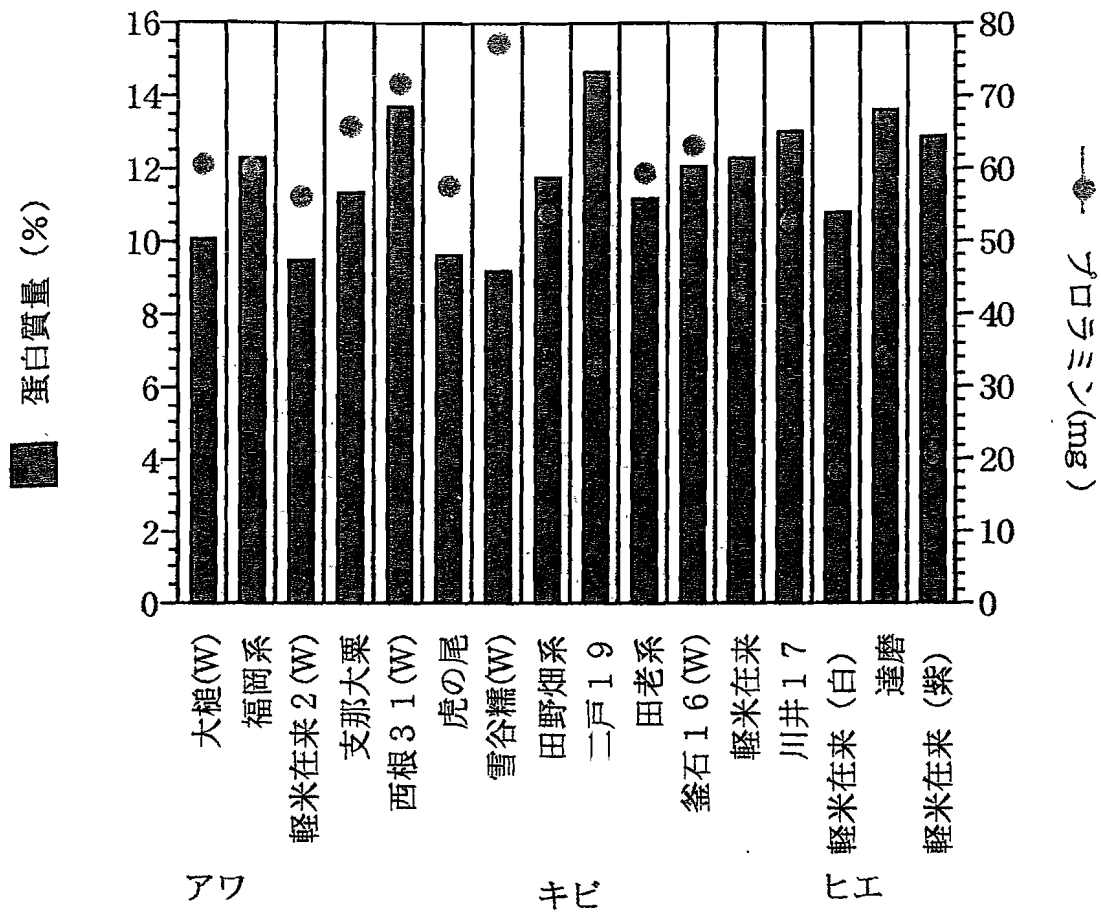


Fig.2-6. Protein and prolamins content from millet cultivars
 Prolamins was extracted from 1.5g of millet flour.
 W means waxy type.

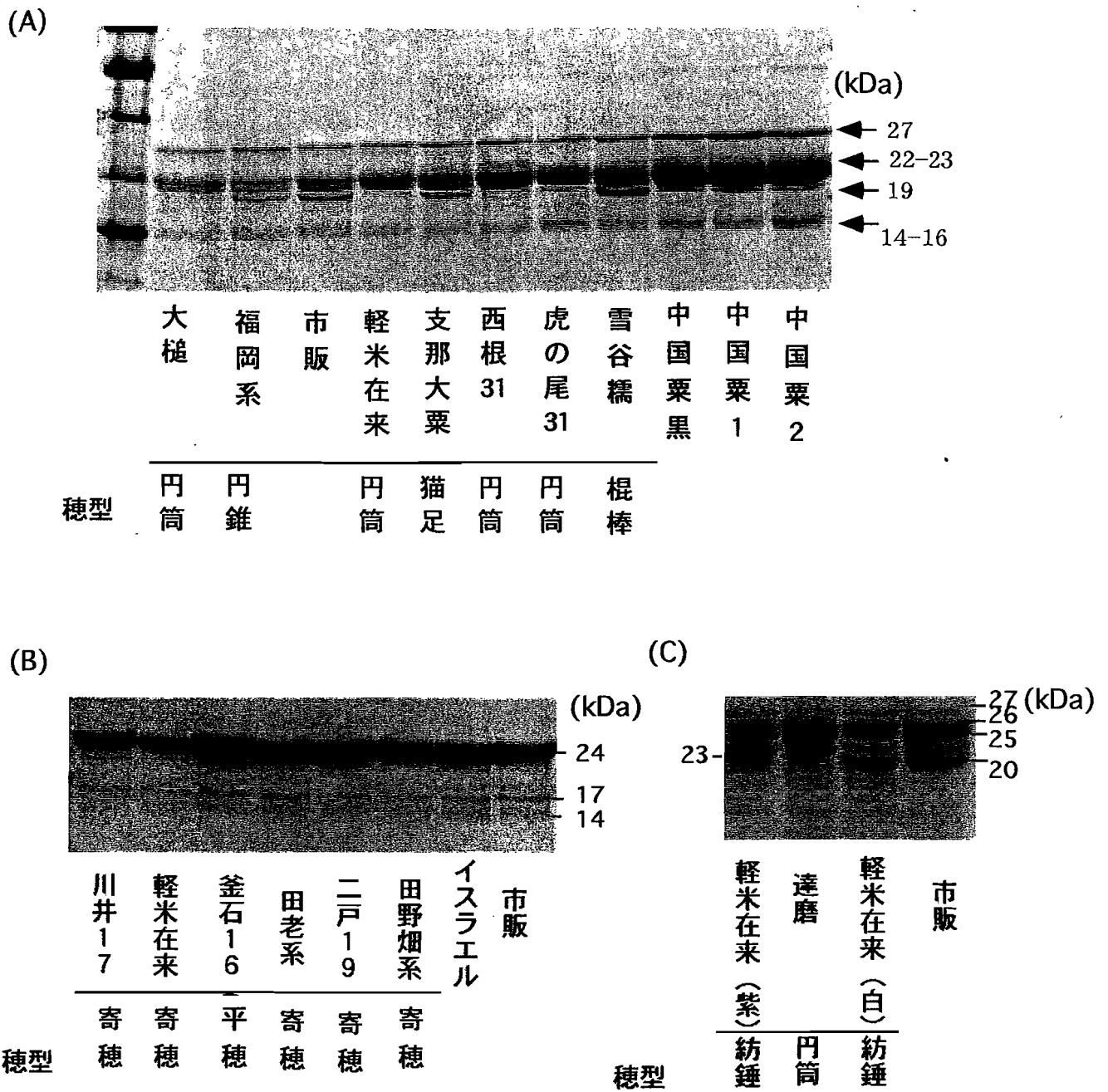


Fig. 2-7 . Polypeptide composition of prolamin from varieties of millets. Each sample was extracted from (A) foxtail millet; (B) proso millet; (C) Japanese millet, respectively.

第2章 雑穀の食品機能性

第1節 雑穀蛋白質の *in vitro* の消化性

健康機能を脂質代謝改善機能の観点から食品蛋白質を評価した場合、植物性蛋白質は、動物性蛋白質に比べてはるかに血中コレステロール低下機能性効果が大きい [1]。この効果は、大豆蛋白質におけるような消化管における不消化産物の胆汁酸吸着による再吸収阻害機能による作用が大きいと考えられている [2-4]。

そこで本節では、雑穀蛋白質においてもこのような難消化性があるかどうかを、ペプシン消化で検討した。

1. 方法

アワ及びキビタンパク質のペプシン消化

アワ及びキビ true prolamins 画分のタンパク質として 10mg に 5ml の 0.1M P-K buffer (pH 3.0) を加え、5mg/ml ペプシン (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, 2,500U/mg) を 500 μ l 添加して 37 $^{\circ}$ C で消化試験を実施した。37 $^{\circ}$ C で 2hr、4hr、6hr 及び 20hr 反応させ、3,000 rpm で遠心して上清と沈殿を分離し、沈殿に 300 μ l の SDS-PAGE buffer (2% SDS、5% 2-ME を含む 62.5 mM Tris-HCl buffer pH 6.8) に溶解して 100 $^{\circ}$ C、5 min 加熱後、SDS-PAGE を行った。15-25% のグラジエントゲルに試料を添加した後、泳動した。脱脂したアワ粉、キビ粉もタンパク質として 10mg を用いて同様に消化試験を実施した。

2. 結果と考察

アワ及びキビの true prolamins 画分をペプシンにより消化し、残査中に含まれるタンパク質の各ポリペプチド消化の経時変化をみたのが Fig. 1A である。アワの場合は本条件において 2 時間後には分子量が数千以下となっているがキビの場合は 6 時間後でも各ポリペプチドが残っていた。酵素ペプシンでの消化に関しては、キビプロラミンの方が分解されにくいことがうかがえる。同様の消化を 2M 尿素の存在下で行うとアワ、キビともに分解時間が早まるもののやはりキビの分解が遅いことがわかった (Fig. 1B)。アルコール可溶性画分にプロテアーゼインヒビター等の存在は考慮しにくく、全体の構造に起因するものと思われた。

全アワ粉及びキビ粉を用いて同様のペプシン消化を実施したのが Fig. 1C であるが、やはりキビのプロラミンの 24 kDa、主ポリペプチドが残査に残っているのが認められる。したがってプロラミンのペプシン分解におけるアワ、キビの分解の相違は、抽出操作によるものではなく、その構造に起因することがこの結果から推測される。

またペプシン消化でみられたように消化酵素による分解も異なり、キビプロラミンの

消化が遅い傾向を示した。2 M尿素の存在下でも傾向が変わらないことも構造の相違を裏付けるものであろう。これらの結果は共通するポリペプチドの存在を示唆するとともに更にアワ、キビそしてトウモロコシとの貯蔵タンパク質構造の相違を予測させるものである。

ペプシン・パンクレアチンあるいはペプシン単独による *in vitro* 消化はタンパク質の生物価と相関するとも言われている [5] が、西澤ら [6] によれば制限アミノ酸、リジン、スレオニンの添加によってキビタンパク質はカゼインと同等の生物価を示すと結果を得ている。また、田代ら [7] によっても、アワタンパク質について、リジン、スレオニンの添加によってタンパク質効率比 (PER) 及び正味タンパク質効率 (NPR) が大幅に改善されたとの報告があり、キビタンパク質についても同等である [8] とされている。In vivo での消化性についてはアワ、キビで相違があるのか検討が必要である。アワ、キビの近縁種であるソルガムのタンパク質については消化性について、*in vitro* やラットを用いた実験及びヒトでの実験で加熱時の消化性の悪さが指摘されている。すなわち生であればほぼ消化されるものの (80-90%)、加熱加工により小麦やトウモロコシ、米よりも消化性が低くなる (50%前後) と報告されており、その主因は含有するタンニン等によるものではないとされている [9,10]。しかし、トウモロコシやトウジンビエについては加熱加工の問題はほとんどないとされている [11]。また、ソルガムのほか、キビタンパク質の消化性の低さについても指摘されており [12]、これら穀類タンパク質の消化性についてあまり解明はされていない。MacLean らや Mertz らによりソルガムの加工には工夫がなされ、エクストルーダー処理、あるいはスーダンの発酵食品 Nasha として消化率を改善し、優れた離乳食として活用している例もある [10,13,14]。

島貫の結果 [15] によれば、キビタンパク質摂取後のラット門脈血中のアミノ酸組成とキビタンパク質のアミノ酸組成は相関がないとしており、*in vitro* の消化もかなり低いとしている。キビタンパク質の消化性に関しては HDL 代謝への影響との関連を含め、さらなる検討が必要である。

引用文献

1. Carroll, K.K. and Hamilton, R.M.G. EFFECTS OF DIETARY PROTEIN AND CARBOHYDRATE ON PLASMA CHOLESTEROL LEVELS IN RELATION TO ATHEROSCLEROSIS. *J.Food Sci.* 40:18-23, 1975.
2. Sugano, M, Goto, S, Yamada, Y, Yoshida, K, Hashimoto, Y, Matsuo, T and Kimoto, M Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J.Nutr.* 120:977-985, 1990.
3. Ogawa, Takashi, Gatchalian-Yee, Marites, Sugano, Michihiro, Kimoto, Minoru, Matsuo, Takaharu and Hashimoto, Yukio Hypocholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in rats fed no cholesterol. *Biosci.Biotech.Biochem.* 56:1845-1848, 1992.
4. Wang, Ming-Fu, Yamamoto, Shigeru, Chung, Hei-Mei, Chung, Shu-Ying, Miyatani, Shuichi, Mori, Masahiro, Okita, Takuo and Sugano, Michihiro Antihypercholesterolemic effect of

- undigested fraction of soybean protein in young female volunteers. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* 41:187-195, 1995.
- 5) Akesson, W. A., and Stahmann, M. A., A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, 83, 257-261 (1964).
 - 6) Niishizawa, N., Oikawa, M., Nakamura, M., and Hareyama, S., Effect of lysine and threonine supplement on biological value of proso millet protein. *Nutr. Rep. Int.*, 40, 239-245 (1989).
 - 7) 田代 操、雑穀タンパク質に関する栄養化学的研究、*日本栄養・食糧学会誌* 34, 191-200 (1981).
 - 8) 田代操、牧善輔 *京都府立大学報（理学・生活科学）* 23, 23- (1977).
 - 9) Axtell, J. D., Kirleis, A. W., Hassen, M. M., Mason, N. D., Mertz, E. T., and Munck, L., Digestibility of sorghum proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1333-1335 (1981).
 - 10) Mertz, E. T., Hassen, M. M., Cairns-Whittern, C., Kirleis, A. W., Tu, L., and Axtell, J. D., Pepsin digestibility of proteins in sorghum and other major cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1-2, (1984).
 - 11) Ejeta, G., Hassen, M. M., and Mertz, E. T., In vitro digestibility and amino acid composition of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and other cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6016-6019 (1987).
 - 12) Millward, D. J., The nutritional value of plant-based diets in relation to human amino acid and protein requirements. *Proc. Nutr. Soc.*, 58, 249-260 (1999).
 - 13) Graham, G. G., Maclean, W. C. Jr, Morales, E, Hamaker, B. R, Kirleis W., Mertz, E. T, and Axtell, J. D., Digestibility and utilization of Protein and energy from Nasha, a traditional Sudanese fermented sorghum weaning food. *J. Nutr.* 116, 978-984 (1986).
 - 14) MacLean, W. C. Jr, Lopez de Romana, G, Gastanaduy, A., and Graham, G.G., The effect of decortication and extrusion on the digestibility of sorghum by preschool children. *J. Nutr.*, 113, 2071-2077 (1983).
 - 15) 島貫茂文 岩手大学農学部修士論文 (1996) .

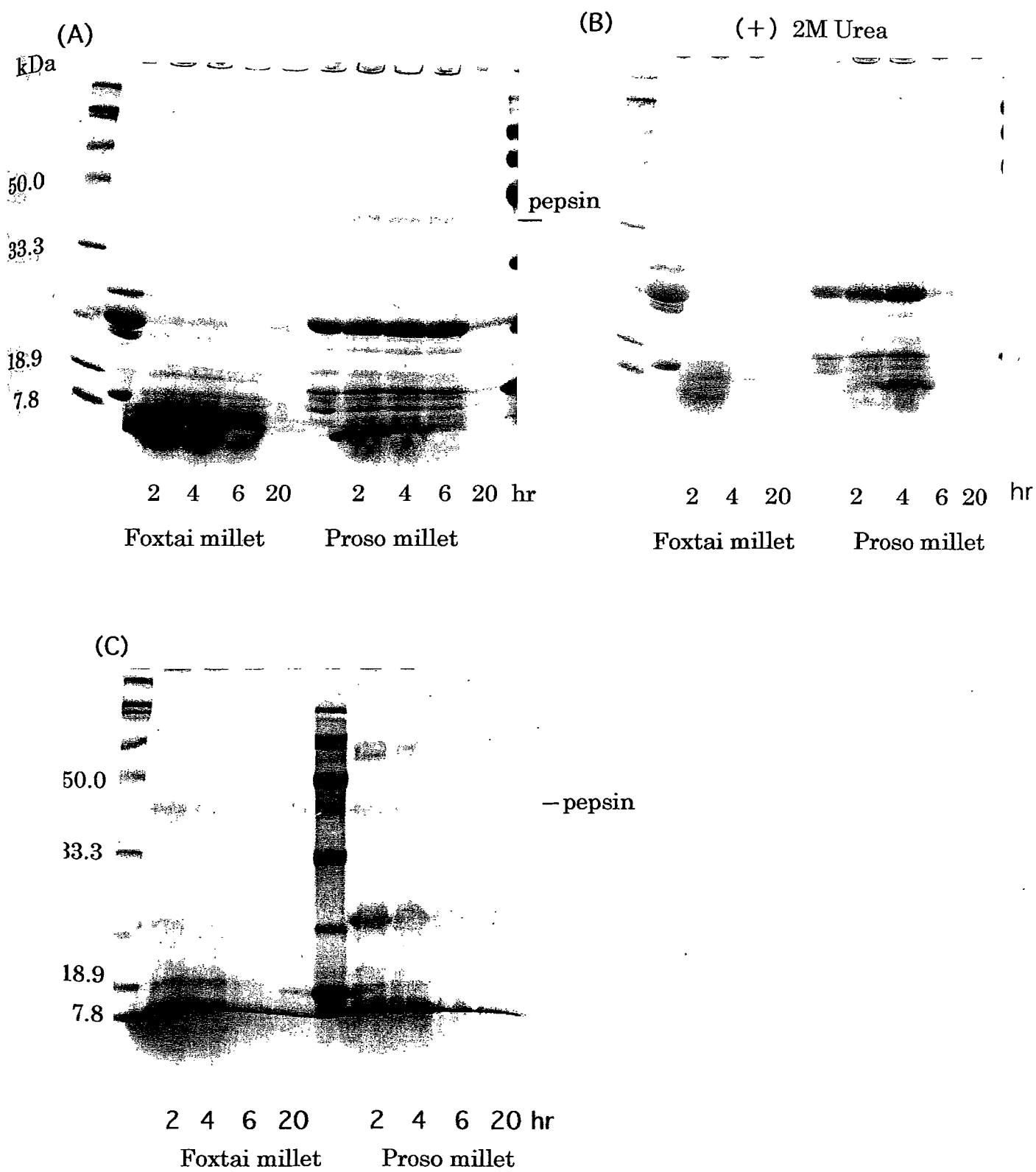


Fig. 1 : Pepsin digestibility of foxtail and proso millet prolamin
 (A) Hydrolysates of true prolamin from millets ; (B)Hydrolysates under 2M urea;
 (C) Hydrolysates of whole flour.

第2節 機能性について

1. 脂質代謝改善機能

キビ蛋白質摂取による血中コレステロール上昇抑制効果

雑穀のアワ、キビ、ヒエなどを摂取すると、体内での脂質代謝に好影響を及ぼすことが明らかになってきた。西澤らは、雑穀蛋白質摂取が血中のHDL-コレステロール濃度を上昇させることを見いだした [1-3]。その他にも雑穀蛋白質を摂取した動物（ラット、ハムスター）では、カゼイン摂取動物よりも血中の総コレステロールおよび中性脂肪濃度が低くなることを確認している。

本研究は、雑穀（キビ）蛋白質摂取による血中コレステロール上昇抑制の機構を明らかにすることを目的とした。

[方法]

1. 雑穀蛋白質の調製

実験に用いた雑穀は岩手県産のキビ（*Panicum miliaceum* L.）とした。動物実験飼料の蛋白質源として用いるために、キビの蛋白質を濃縮した [4]。すなわち、精白キビの粉末をアミラーゼ処理してデンプンを加水分解後、遠心分離で除去した。得られた沈殿を脱脂、乾燥して蛋白質濃縮物を調製した。この濃縮操作によって、原料の精白キビでは13%程度であった蛋白質含量が、キビ蛋白質濃縮物では90%程度になり、飼料用カゼインと同程度になった。

2. 動物実験1

飼料はAIN-76飼料に準じて、蛋白質含量20%になるように調製した。蛋白質源をカゼイン（C群）、またはキビ蛋白質（M群）として、キビ蛋白質群には制限アミノ酸である、Lys,Thrを添加し [4]、Metを添加しない以外は同じ組成にした。

実験には、Wistar系ラット、雄、4週齢を用いた。予備飼育後、それぞれの飼料群に分けて2週間飼育した後解剖し、血液と肝臓を採取した。また、飼育終了直前の2日間、糞を採取した。37

3. 動物実験2

高コレステロール血症状態でのキビ蛋白質の効果を調べるための実験を行った。ラットに高コレステロール血症を発症させるために飼料にコレステロール1%、コール酸ナトリウム0.25%を添加した。それ以外は動物実験1と同様の組成にし、蛋白質源によっ

てHC群（カゼイン）、MHC群（キビ蛋白質）と分けた。

実験1と同様に、Wistar系ラット、雄、4週齢を用い、各飼料で2週間飼育し、血液、肝臓、糞を採取した。

4. 脂質成分の分析

実験1, 2ともに、採取した血液は総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪を市販のキットで測定し、総コレステロールとHDL-コレステロールとの差からLDL-コレステロールを算出した。肝臓の一部は、Folchらの方法に準じてクロロホルム-メタノールにて脂質を抽出し[5]、コレステロールと中性脂肪を市販のキットで測定した。糞の一部はSautierらの方法を参考にして96%エタノール(70℃)で環流抽出し[6]、胆汁酸量を測定した。また一部は肝臓同様にクロロホルム-メタノールで抽出して[5]、コレステロールを測定した。

5. 脂質代謝関連物質の mRNA 発現測定

実験1, 2ともに、採取した肝臓の一部からAGPC法にてtotal RNAを抽出し[7]、HMG CoA reductase、cholesterol 7 α -hydroxylase および LDL receptor について、RT-PCR法により mRNA の発現を調べた。

[結果および考察]

1. キビ蛋白質摂取のコレステロール代謝への効果（実験1）

血漿の総コレステロール濃度はC群に比べてM群で有意に低かった。また、HDL-コレステロールの総コレステロールに対する割合は、C群が0.39であったのに対して、M群が0.49とキビ摂取群でHDLコレステロールの割合が大きくなった。このことは、キビ摂取群の血中総コレステロール値の低下はHDLの割合を下げることなく、LDL-コレステロールのみを有意に低下させたことによるものであった。

中性脂肪濃度はC群に比べてM群で有意に低かった。

肝臓中の脂質濃度は血中脂質濃度と同様の傾向を示し、コレステロールはC群よりM群で有意に低くなった。中性脂肪もM群の方がC群よりも有意に低かった。

2日間の糞重量はC群よりもM群で有意に多かった。糞中に排泄されるコレステロール、胆汁酸ともに、糞重量と同様、C群よりもM群で有意に増加した。

コレステロールおよび胆汁酸の排泄が増えていることから、キビ蛋白質には腸管からのコレステロール吸収を阻害して排泄を促進する効果を有することが示唆された。

コレステロール合成過程での律速酵素であるHMG CoA reductase、コレステロールから胆汁酸への異化過程での律速酵素であるcholesterol 7 α -hydroxylase、および組織へのコレステロール取り込みに関与するLDL receptorの3つについて肝臓でのmRNA発現を調べた。

C群とM群とで比較すると、cholesterol 7 α -hydroxylaseが増加傾向を示したものの全ての mRNA 発現量に有意な差はなかった。

2. 高コレステロール血症でのキビ蛋白質摂取の効果 (実験2)

血漿コレステロール濃度は、コレステロールを負荷した HC および MHC 群ではどちらも実験1のC群に比べて有意に高かった。コレステロールを負荷した両群では HDL-コレステロールが低下し、LDL-コレステロールが高くなっており、コレステロール負荷時にはキビ蛋白質摂取によるコレステロール低下作用が見られなかった。また、コレステロールを負荷した群の方がコレステロールを負荷していない群よりも中性脂肪濃度が低かった。HC 群と MHC 群を比較すると、MHC 群で血中中性脂肪濃度が低い傾向が見られた。

肝臓のコレステロール濃度は、コレステロールの負荷によって有意に上昇し、キビ蛋白質摂取による低下は見られなかった。また、肝臓の中性脂肪濃度は血中の中性脂肪濃度とは逆にコレステロール負荷群の方が、コレステロールを負荷していない群よりも多かった。MHC 群の方が HC 群よりも、中性脂肪濃度が有意に低かった。

糞重量は、コレステロールの負荷によって有意に多くなった。また実験1と同様にカゼイン群よりキビ群で有意に多かった。糞中に排泄されるコレステロールおよび胆汁酸量もまたコレステロールを負荷した群で有意に増加し、かつ、キビ群の方が多かった。

肝臓でのコレステロール代謝関連物質3種の遺伝子発現を調べた結果、全て MHC 群で HC 群に比べて有意な上昇、または増加傾向が見られた。このことは、コレステロール負荷状態ではキビ摂取群でコレステロール代謝が促進していることを示唆する。

以上のように、キビ蛋白質はカゼインに比べて血中脂質濃度を下げる働きを有したが、コレステロール負荷を行うとキビ蛋白質摂取の効果が見られなかった。

しかし、高コレステロール血症状態では、肝臓でのコレステロール関連酵素などの mRNA が強く発現していることから、キビ蛋白質摂取によってコレステロール代謝がより促進されていることが示唆された。

糞中へのコレステロールおよび胆汁酸排泄量と、肝臓での遺伝子発現の結果とを併せ考えると、コレステロール負荷を行わない状態でのキビ蛋白質の血中コレステロール低下作用は、コレステロールの吸収抑制や排泄促進によるものであることが示唆された。

また高コレステロール血症状態ではキビ摂取群で、コレステロール代謝が亢進して排泄を促進する方向にあるにも関わらず、血中コレステロール濃度の有意な低下は見られなかったことから、今回の動物実験ではコレステロール負荷によって、体内にコレステロールが過剰に存在していて、体外への排泄が追いつかない状態であったことが推察される。

引用文献

- 1) Nishizawa, N., Oikawa, M., and Hareyama, S., Effect of dietary protein from proso millet on

- the plasma cholesterol metabolism in rats. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 229-230 (1990).
- 2) Nishizawa, N., and Fudamoto, Y., The elevation of plasma concentration of high-density lipoprotein cholesterol in mice fed with protein from proso millet. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 333-335 (1995).
 - 3) Nishizawa, N., Shimanuki, S., Fujihashi, H. Watanabe, H., Fudamoto, Y., and Nagasawa, T., Proso millet protein elevates plasma level of high-density lipoprotein: a new food functionality of proso millet. *Biomed. Environ. Sci.*, 9, 2-3 (1996).
 - 4) Nishizawa, N., Oikawa, M., Nakamura, M., and Hareyama, S., Effect of lysine and threonine supplement on biological value of proso millet protein. *Nutr. Rep. Int.*, 40, 239-245 (1989).
 - 5) Folch, J., Less, M., and Sloane-Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).
 - 6) Sautier, C., Doucet, C., Flament, C., and Lemonnier, D., Effects of soy protein and saponins on serum, tissue and feces steroids in rat. *Atherosclerosis*, 34, 233-241 (1979).
 - 7) Chimczynski, P., and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.*, 162, 156-159 (1987).

2. 抗酸化性

モロコシの生体内抗酸化機能性への影響

モロコシの特徴の一つはポリフェノール類を多く含むことである。お茶やブドウ酒など多くの食品中のポリフェノール類で、様々な生理機能が報告されており、特に最近では、様々な疾病の主要な原因と云われている生体内過酸化反応を抑制する効果が注目されている [1,2]。しかし、モロコシ中のポリフェノールまたはモロコシのこの観点からの食品機能性についての研究は全くなされていない。そこで本研究では、ラットにモロコシを給与した時の血中、組織中過酸化脂質量への影響について検討した。

○脂質の過酸化について

生体脂質の過酸化では、初めに脂質が酸素化されて第一次生成物であるヒドロペルオキシド (ROOH) が生成され、これを蓄積する反応が進む (1st Stage)。蓄積したヒドロペルオキシドが分解されるとアルデヒドなどの第二次生成が生じる (2nd Stage)。アルデヒド類は生体内では蛋白質などと非特異的に反応して終結する (3rd Stage)。よって、過酸化脂質の測定においては、Stage の異なる複数の生成物を検出、定量することが必要である。本実験においては、1st Stage 生成物をヘモグロビン - メチレンブルー法 (Hb - MB 法) [3] により、2nd Stage 生成物を TBA 法 [4] によって評価した。

3-1 動物実験の方法

(1) 動物の飼育および解剖

○動物の飼育

実験動物および動物の飼育条件は、以下の通りである。ただし本実験では、ラットは1群6匹ずつ用意した。表2-1の飼料で2週間飼育した後、解剖し、血液と肝臓を採取し、分析を行った。

なお、飼料摂取量および体重増加量は、両群の間で差はみられなかった。

【飼料組成】

モロコシ飼料の組成を表 2-1 に示した。

表 2-1. 飼料の組成.

(g/100g)	カゼイン	モロコシ50%
蛋白質含量 (%)	17.4	22.4
ポリフェノール量 (%)	—	1.0
カゼイン	20.0	20
モロコシ	—	50
コーン油	5.0	5.0
ビタミン混合	1.0	1.0
塩混合	3.5	3.5
重酒石酸コリン	0.2	0.2
セルロース	5.0	—
コーンスターチ	65.3	20.3

○解剖

ラットはエーテル麻酔下で開腹し、0.1 Mのエチレンジアミン四酢酸 2 ナトリウム塩 (EDTA) で処理したシリンジで下行大静脈から採血した。血液は、4℃、2000 × g で 20 分間遠心分離し、上清の血漿をマイクロチューブに小分けにし、分析まで -80℃ で保存した。

採血後、肝臓を生理的食塩水で灌流して脱血し、液体窒素で速やかに凍結後、分析まで -80℃ で保存した。

血中および組織中の過酸化脂質量の測定

(2) 分析方法

○血漿中チオバルピツール酸反応生成物質 (TBARS) の測定 [3]

本方法は、簡便かつ鋭敏な方法として広く用いられてきた。実際は 2nd Stage 生成物のみならず、1st および 3rd Stage 生成物から遊離されるアルデヒド類をも測定することになり、1 ~ 3rd Stage 生成物を総合的に TBARS として評価することになる。

【原理】

脂質過酸化生成物の第二次生成物であるマロンジアルデヒド (MDA) を酸性条件下で TBA と反応させて、生じる赤色色素を定量して過酸化脂質度を測定する。

【試薬】

- ・ 1/12 N 硫酸
- ・ 10% リンタンゲステン酸
- ・ チオバルピツール酸 - 氷酢酸溶液

0.67 %チオバルビツール酸と氷酢酸を 1 : 1 (V/V) に混合した。

・ *n*-ブタノール

・ テトラエトキシプロパン - メタノール溶液

約 10 nmol/ml になるようにメタノールに溶解した。

(試薬は全て特級を使用、和光純薬工業(株)、大阪)

【方法】

血漿 20 μ l を 15 ml のキャップ付き試験管に取り、1/12 N 硫酸 4.0 ml と 10 % リンタングステン酸 0.5 ml を加え、攪拌して室温に 5 分間放置した後、2000 g で 10 分間遠心分離した。沈殿に 1/12 N 硫酸 2.0 ml と 10 % リンタングステン酸 0.3 ml を加え攪拌した後、2000 \times g で 10 分間遠心分離した。沈殿に水 4.0 ml を加え懸濁し、チオバルビツール酸 - 氷酢酸溶液 を 1 ml 加え攪拌した後、沸騰水中 95 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。流水中で速やかに冷却後、*n* - ブタノールを 5.0 ml 加えて 5 分間振とうし、2000 \times g で 15 分間遠心分離した。上層の *n* - ブタノール層中の蛍光強度を、島津分光蛍光光度計 RF-5300 PC 型 (島津製作所) を用いて、励起波長 515 nm、蛍光波長 553 nm で測定した。標準物質には、テトラエトキシプロパン - メタノール溶液を用い、MDA 当量として求めた。

○肝臓中 TBARS の測定 [5]

【試薬】

・ 1.15 % 塩化カリウム

・ 1 % リン酸

・ 0.67 % チオバルビツール酸

・ *n*-ブタノール

・ テトラエトキシプロパン - メタノール溶液

約 10 nmol/ml になるようにメタノールに溶解した。

【方法】

組織約 500 mg に冷 1.15 % 塩化カリウムを 4.5 ml 加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネート溶液 0.5 ml を 15 ml のキャップ付き試験管に取り、1 % リン酸 0.3 ml、0.67 % チオバルビツール酸 1.0 ml 加え、攪拌した後、沸騰水中 95 $^{\circ}$ C で 45 分間加熱した。流水中で速やかに冷却後、*n* - ブタノールを 4.0 ml 加えて 5 分間振とうし、2000 \times g で 15 分間遠心分離した。上層の *n* - ブタノール中の吸光度を、紫外可視分光光度計 V-530 型 (日本分光、東京) を用いて 535 nm と 520 nm の 2 波長で測定しその差を求めた。標準物質として、テトラエトキシプロパン - メタノール溶液を用いた。

○血漿脂質ヒドロペルオキシドの測定 [4]

血漿脂質ヒドロペルオキシドの測定は、ヘモグロビン - メチレンブルー法によって行った。

過酸化脂質の測定には、前述した TBA 法がよく用いられてきた。しかし、TBA 法

が指標とするアルデヒドは反応性が高く、すぐに近くの分子と反応するためあまり蓄積せず、代謝もされやすい。従って、過酸化の進行を知るためには第一生成物である脂質ヒドロペルオキシドの定量が必要である。ヒドロペルオキシドの測定方法としては、Miyazawa らの化学発光高速液体クロマトグラフ法 (CL-HPLC 法) [6] が一般的に評価を受けているが、特殊な装置を必要とするために、その他の方法の開発も進められている。今回用いた Yagi らの Hb-MB 法は簡便な比色法であり、脂質ヒドロペルオキシドの測定に対する特異性も高いため、今後臨床で活用されることが期待されている方法である。

【原理】

メチレンブルー誘導体 10-(N-メチルカルバモイル)3,7-(ジメチルアミノ)-フェノチアジン (MCDP) はヘモグロビンの触媒によって脂質ヒドロペルオキシドと反応して、メチレンブルーを生成する。したがって、生成したメチレンブルー量を吸光度計で測定して、脂質ヒドロペルオキシド量を知ることが可能となる。

【方法】

ヘモグロビン-メチレンブルー法 (Hb-MB 法) を用いた、デタミナー-LPO (協和メデックス (株)、東京) で測定した。

3-2 結果

○血漿 TBARS 量

図 2-1 に血漿 TBARS 量を示した。

血漿 TBARS 量はカゼイン群で 5.2 nmol、モロコシ群で 5.5 nmol で、両群に差はみられなかった。

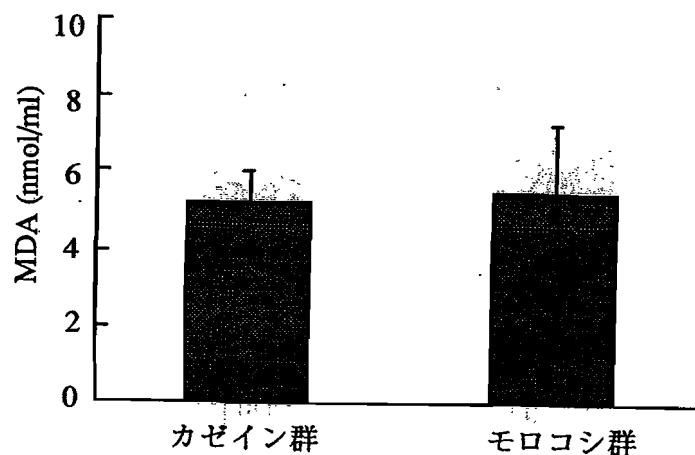


図 2-1.モロコシ飼料摂取による血漿 TBARS 量への影響.

○肝臓 TBARS の測定

図 2-2 に肝臓 TBARS 量を示した。

肝臓の TBARS 量はカゼイン群で 45.8 nmol、モロコシ群で 40.3 nmol で、両群に差はみられなかった。

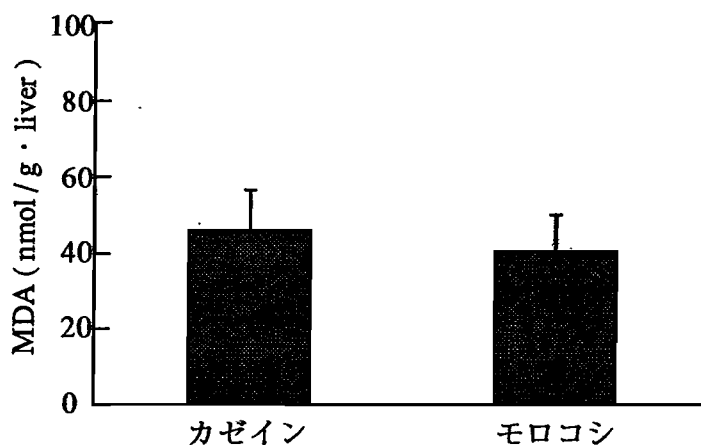
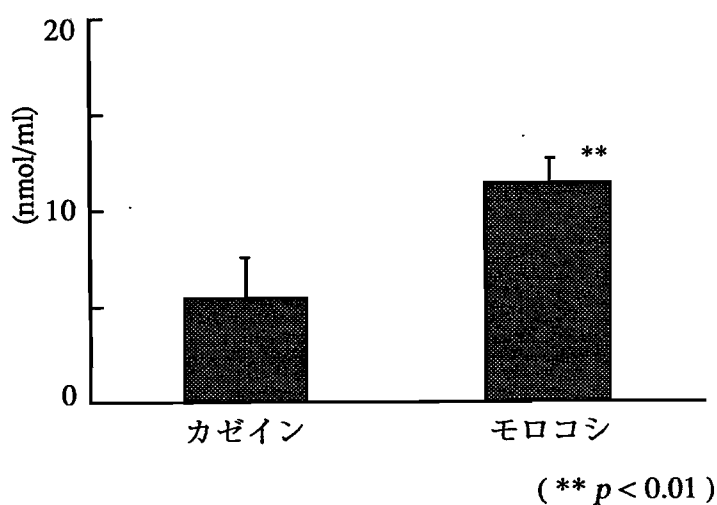


図 2-2.モロコシ飼料摂取による肝臓 TBARS 量への影響.

○血漿脂質ヒドロペルオキシドの測定

図 2-3 に血漿脂質ヒドロペルオキシド量を示した。

血漿脂質ヒドロペルオキシド量はカゼイン群で 5.4 nmol に対してモロコシ群で 11.5 nmol と有意に増加していた。($p < 0.01$)



(** $p < 0.01$)

図 2-3.モロコシ飼料摂取による 血漿脂質ヒドロペルオキシド 量への影響.

2-3 考察

血漿および肝臓中の TBARS 量は両群で差はみられなかったが、血漿ヒドロキシペル

オキシド量がモロコシ群で有意に増大していた。本来、ポリフェノール類では抗酸化性が期待される場所であり、実際に、*in vitro* においては、血漿を銅存在下で過酸化させるときにモロコシのポリフェノールを添加すると TBARS の生成が抑制されるといった結果を得ている (結果は示していない)。これらのことは、*in vitro* において示された抗酸化性が *in vivo* で単純に再現されるものではないことを確認することとなったが、この結果について説明しようとするときまず考えられることは、使用したモロコシが酸化していたのではないかという点である。食品中の脂質などは空気中の酸素による酸化を受けやすい。この様に、油脂中の不飽和脂肪酸が酸素と反応することを自動酸化と呼び、この反応機構はラジカル連鎖反応によって説明されている [7]。前述した生体成分の脂質過酸化のスキームも、こういった食品の研究を応用したものである。食品で実験を行う際の基本的な前提として試料の粉碎は使用する度に随時行うべきであるが、モロコシ中の脂質のみならず、ポリフェノール成分などの過酸化の影響を除くためと考えられる。今回使用したモロコシは、粉碎後1ヶ月程経っていたものであったため、こうしたことも、今回の結果の一端となっているものと考えられる。

引用文献

- 1) T. Ishikawa, M. Suzuki, T. Ito, H. Yosida, M. Ayaori, M. Nishiwaki, A. Yonemura, Y. Hara and H. Nakamura, *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 261-266 (1997).
- 2) B. Fuhrman, A. Lavy and M. Aviram, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 549-554 (1995).
- 3) K. Yagi, S. Komura, N. Kayahara, T. Tatano and N. Ohisi, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 20, 181-193 (1996).
- 4) K. Yagi, *Biochem. Med.*, 15, 212-216 (1976).
- 5) M. Uchiyama, M. Mihara, *Anal. Biochem.*, 86, 271-278 (1978).
- 6) Y. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Suzuki and K. Yasuda, *Methods enzymol.*, 233, 324-332 (1994).
- 7) 並木 満夫, 中村 良, 川岸 舜朗, 渡邊 乾時二, 現代の食品化学, 三共出版 (1993).

3. 肝障害抑制機能

キビタンパク質のラット肝機能障害抑制効果 [1]

肝臓は、左右の上腹部、横隔膜の下に存在し、成人で約 1,000 ~ 1,400 g の体内最大の臓器である。栄養素（糖、タンパク質、脂質、ビタミン）の代謝、ホルモン代謝、解毒作用、胆汁酸合成などきわめて多岐にわたる機能を有している。そのため肝臓がウイルスやアルコールなどによって障害を受けると、食欲不振、嘔吐、全身倦怠感、黄疸など様々な栄養代謝に関する障害が起こる。

肝障害といってもその原因や発生機序は多種多様であり、まだ不明な点も多い。また、ヒトに見られる肝障害をそのまま実験動物で再現させることは非常に困難である。現在用いられている肝障害モデルの作成には、肝臓に障害を与える薬物による方法、肝臓切除や胆管切除などの外科的な方法がある。ヒトにおける急性肝障害の中で最も多いのはウイルス性肝炎であるが、小動物によるこの疾患モデルの作成は成功していない。一般に行なわれている急性肝障害作成法は、肝障害を引き起こす薬物の投与によるものであり、代表的な薬物として、四塩化炭素、D-ガラクトサミン、オロト酸、ジメチルニトロソアミンなどが挙げられる。肝障害時には、逸脱酵素（GOT、GPT、LDH 等）の上昇、アルブミンの低下などが肝細胞の変性壊死に起因して起こり、さらにビリルビンの上昇などが胆汁うっ滞に起因して起こるため、これらの値が肝障害の指標となっている。

肝障害時には血中のフィッシャー比が低下することから [2,3]、肝障害時の食事療法としてフィッシャー比の高い食品の摂取が進められている。フィッシャー比の高い食品としては、牛肉や牛乳、鶏卵などの動物性タンパク質が主に挙げられるが、キビタンパク質もフィッシャー比の高い食品である。また、フィッシャー比以外の要因により、肝障害に対して抑制効果が見られた食品としてお茶やキノコなどが報告されているが [4,5]、食餌タンパク質としては、コムギのグルテンが、ガラクトサミン肝障害の抑制効果を有するという報告がある [6]。グルテンはコムギのプロラミンであるグリアジンとグルテリンであるグルテニンから形成されており、タンパク質中の 92% がプロラミンとグルテリンで占められるキビタンパク質と性質的に類似していることが考えられる。そのためキビタンパク質にも肝障害抑制効果を有する可能性がある。

そこで本節では、ウイルス性肝炎モデルであるガラクトサミン肝障害、および薬物性肝障害モデルである四塩化炭素肝障害の発症をキビタンパク質が抑制するかどうかについて検討した。

(1) 方法

(1-1). ラットによる D-ガラクトサミン投与実験

実験動物は、5週齢の Wistar 系雄ラット（日本クレア；東京）15頭を用意した。購入時のラットの平均体重は 113 g であった。3日間の予備飼育の後に各群5頭ずつの計3群に群分け（平均体重 120 g）した。予備飼育後、Table 1 の飼料を自由摂取させて飼育した。14日目に D-ガラクトサミン（800 mg/kg 体重）、また対照群には生理食塩水を腹腔内注射した。D-ガラクトサミン投与の前後4時間は絶食状態にさせた。D-ガラクトサミン投与から20時間後にジエチルエーテル麻酔下で開腹し、下大静脈から採血した後に屠殺した。血液は真空採血管に移して10分間室温で放置した後、4℃、3,550 ×g で15分間遠心分離し、血清サンプルを得た。肝臓は、生理食塩水で灌流を行なった後に採取し、重量を測定した。血清、肝臓サンプルは -80℃ で保存した。

実験飼料の調製

実験飼料は Table 1 に示した。実験群はタンパク質源としてカゼインを含むカゼイン飼料と、濃縮キビ蛋白質に制限アミノ酸であるリジン、スレオニンを追加した飼料を調製した。飼料中のタンパク質含量は20%となるように調製した。それぞれのアミノ酸添加量は、カゼインのアミノ酸組成を基準としたときに濃縮キビに不足している分を追加した。

D-ガラクトサミンの調製

D-ガラクトサミン塩酸塩をフィルター（0.20 mm、ADVANTEC；東京）を通した生理食塩水に溶解し、ガラクトサミン濃度が 300 mg/ml となるように調製した。さらに 1 N 水酸化ナトリウムで pH 7.0 に調整した。

肝機能障害の評価方法

血清中の GOT 活性の測定 [7]

グルタミン酸・オキザロアセティック・トランスアミナーゼ（GOT）は、アスパラギン酸・ α -ケトグルタル酸とグルタミン酸・オキザロ酢酸とのアミノ基転移反応を触媒する酵素で、肝臓や心筋に多く存在している。これらの臓器に障害が起こったり壊死したりすると血液中に GOT が逸脱するために、血清中の GOT 活性が増加するといわれている。血清 GOT 活性の測定は、劇症肝炎や心筋梗塞などの疾患の診断上の有力な指

標となる [8]。

血清中の GOT 活性の測定は、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（還元型）を用いた酵素反応速度測定 UV 法による GOT 測定用キット（GOT-UV テストワコー、和光純薬工業（株）；大阪）を用いた。

【試薬】

- ・ GOT 用基質緩衝液 リン酸緩衝液 pH 7.4 80 mmol/L
 L-アスパラギン酸 125 mmol/L
 α -ケトグルタル酸 12 mmol/L

- ・ GOT 用エンザイム・コエンザイム

溶解時 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
 還元型 (β -NADH) (酵母由来) 0.12 mmol/L
 リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) (ブタ心臓由来) 160 単位/ml
 乳酸脱水素酵素 (LDH) (ウサギ筋肉由来) 300 単位/ml

GOT 用エンザイム・コエンザイム (15 ml 用) 1 びんに GOT 用基質緩衝液を正確に 15 ml を加え溶解し、GOT 測定試薬とした。調製後の試薬は、当日中に使用した。

- ・ 80 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 (希釈液)

80 mM リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 81 ml と 80 mM リン酸水素一ナトリウム・2 水和物 19 ml 混合した。

【方法】

血清 200 ml に 35 °C で予備加熱した GOT 測定試薬を 2 ml 加え、軽く振り混ぜ混和し、35 °C に保った分光光度計 (JASCO V-530、日本分光 (株) ; 東京) 中で 2 分間放置し、次いで波長 340 nm で正確に 2 分間の吸光度の減少を測定した。肝障害時には酵素活性が正常時の数十倍まで上昇するため血清をあらかじめ 80 mM リン酸緩衝液で 40 倍に希釈して用いた。

活性の計算式は、吸光度変化 ($\Delta E/2 \text{ min}$) $\times 400$ とし、単位は国際単位で表した。

血清中の GPT 活性の測定 [9]

グルタミン酸・ピルビク・トランスアミナーゼ (GPT) は、アラニン・ α -ケトグルタル酸とグルタミン酸・ピルビン酸とのアミノ基転移反応を触媒する酵素で、肝臓や腎臓に主に存在している。これらの臓器に障害が起こったり壊死したりすると血液中に GPT が逸脱するために、血清中の GPT 活性が増加するといわれている。血清 GPT 活性の測定は、急性肝炎や慢性肝炎などの疾患の診断上の有力な指標となる [45]。

血清中の GPT 活性の測定は、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（還元型）

を用いた酵素反応速度測定 UV 法による GPT 測定用キット（GPT-UV テストワコー、和光純薬工業（株）；大阪）を用いた。

【試薬】

- ・ GPT 用基質緩衝液 リン酸緩衝液 pH 7.4 80 mmol / L
 D,L-アラニン 80 mmol / L
 α -ケトグルタル酸 18 mmol / L

- ・ GPT 用エンザイム・コエンザイム

溶解時 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

還元型 (β -NADH) (酵母由来) 0.12 mmol / L

乳酸脱水素酵素 (LDH) (ウサギ筋肉由来) 1,400 単位 / ml

GPT 用エンザイム・コエンザイム (15 ml 用) 1 びんに GPT 用基質緩衝液を

正確に 15 ml を加え溶解し、GPT 測定試薬とした。調製後の試薬は、当日中に使用した。

- ・ 80 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 (希釈液)
 第 4 章、第 2 節、2-1. と同様に調製した。

【方法】

血清 200 ml に 35℃ で予備加熱した GPT 測定試薬を 2 ml 加え、軽く振りまぜ混和し、35℃ に保った分光光度計中で 2 分間放置し、次いで波長 340 nm で正確に 2 分間の吸光度の減少を測定した。肝障害時には酵素活性が正常時の数十倍まで上昇するため血清をあらかじめ 50mM リン酸緩衝液で 20 ないし 30 倍に希釈して用いた。

活性の計算式は、吸光度変化 ($\Delta E / 2 \text{ min}$) \times 400 とし、単位は国際単位で表した。

血清中の LDH 活性の測定 [10]

乳酸脱水素酵素 (LDH) はピルビン酸と乳酸との間の酸化還元反応に関与する酵素である。生体内では肝臓、腎臓、心筋、骨格筋などの組織に分布し、これらの臓器に障害が起こったり壊死したりすると血液中に LDH が逸脱するために、血清中の LDH 活性が増加するといわれている。血清中の LDH の測定は、肝硬変、腎疾患、心筋梗塞、悪性腫瘍などの疾患の診断上の有力な指標となる [45]。

血清中の LDH 活性の測定は、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型) を用いた酵素反応速度測定 UV 法による LDH 測定用キット (LDH-UV テストワコー、和光純薬工業 (株)；大阪) を用いた。

【試薬】

- ・ LDH 用基質緩衝液 リン酸緩衝液 pH 7.5 50 mmol / L

ピルビン酸リチウム 0.62 mmol/L

・LDH 用コエンザイム (NADH)

溶解時

β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

還元型 (β -NADH) (酵母由来) 0.18 mmol/L

LDH 用エンザイム・コエンザイム (15 ml 用) 1 びんに LDH 用基質緩衝液を正確に 15 ml を加え溶解し、LDH 測定試薬とした。調製後の試薬は、当日中に使用した。

・50 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 (希釈液)

50 mM リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 84 ml と 50 mM リン酸水素一ナトリウム・2 水和物 16 ml 混合した。

【方法】

血清 200 μ l に 35 $^{\circ}$ C で予備加熱した LDH 測定試薬を 0.05 ml 加え、軽く振りまぜ混和し、35 $^{\circ}$ C に保った分光光度計中で 2 分間放置し、次いで波長 340 nm で正確に 2 分間の吸光度の減少を測定した。肝障害時には酵素活性が正常時の数倍まで上昇するため血清をあらかじめリン酸緩衝液で 20 倍に希釈して用いた。

活性の計算式は、吸光度変化 ($\Delta E/2 \text{ min}$) $\times 1,720$ とし、単位は国際単位で表した。

統計処理

本実験で得られたデータの計算および整理には、Macintosh の Excel 4.0、KaleidaGraph 3.0 を使用した。データは、平均値と標準誤差で表した。また、異なる群間で有意差があるかどうかを検討するために Instat Ver. 2.03 を使用し、One-way ANOVA で検定した。有意差が認められた場合、Tukey Multiple Comparison Test によりどの群間で有意差があるかを検定した。

(2) 結果

カゼイン飼料を摂取し生理食塩水を投与した群を CS 群、カゼイン飼料を摂取し D-ガラクトサミンを投与した群を CG 群、キビ飼料を摂取し D-ガラクトサミンを投与した群を PG 群とした。体重増加量、試料摂取量に有意な差はなかった。肝臓重量、肝臓比率は、PG 群が有意に高い値を示した (Table 2)。血清中の GOT、GPT、LDH 活性に関しては、CS 群と比較して CG、PG 群の両群で顕著に上昇し、肝障害を発症していた。また、CG 群と比較して PG 群のこれらの酵素活性は有意に低かった (Table 2)。

(3) 考察

ガラクトサミン肝障害は、ウイルス性肝炎のモデルを作成するために使用されている試薬である。その作用機構としては、ガラクトサミンが肝臓中で代謝されて UDP-ガラ

クトサミンを生成するため、肝臓中のUDP量が減少する。その結果、ヌクレオチドのUTP量が減少し、RNAの合成、さらにはタンパク質の合成が阻害されて肝細胞の壊死や変性が起こり、肝障害を発症させるといわれている [11,12]。それらの肝細胞の壊死により肝細胞中に特異的に存在するGOT、GPT、LDHなどの酵素が血中に流出するため、肝疾患の指標として血液中のこれらの酵素活性を測定している。

ガラクトサミン肝障害に対しては、カゼイン飼料を摂取した群と比較して、キビタンパク質飼料を摂取した群で血清中のGOT、GPT、LDH活性が有意に低かった。従って、キビタンパク質はヒトのウイルス性肝炎モデルであるガラクトサミン肝障害に対して有効であることが示唆された。一方の肝障害に対してのみ抑制効果が見られたこと、また血清中のフィッシャー比に差があまりなかったことから、キビタンパク質の抑制効果はフィッシャー比によるものではないことが考えられる。

しかし、キビタンパク質の消化性が低く、このような難消化性のペプチドのゆっくりとした消化によって、体内へのアミノ酸の供給が長時間続き、アミノ酸の効果が長く持続していることも考えられる。

ガラクトサミン投与4時間前からラットを絶食させているため、キビが肝細胞中でガラクトサミンに直接作用したのではなく、キビタンパク質を摂取し続けたことで何らかの体質改善が行なわれたために肝障害を抑制したと考えられる。ガラクトサミン肝障害については、グルタミンやセリンなどのアミノ酸による抑制効果が報告されている [13] が、しかし、アミノ酸の効果はUDP量の減少を抑制することで肝障害を抑制しているのではないことが分かっている [6]。ガラクトサミン肝障害時の血清中の酵素活性と肝臓重量には負の相関性があると言われており、肝臓の膨潤が何らかのシグナルとなって肝臓の代謝を変化 [14] させ、肝障害を抑制しているのではないかと考えられている。キビタンパク質を摂取した群では肝臓重量が有意に高くなったことから、キビタンパク質の抑制効果も同じ作用によるものではないかと推測される。

本実験結果の結論として、従来報告されている食事蛋白質含量より低いレベルの食事蛋白質含量肝障害に効果を現した。この結果は、キビ蛋白質が肝障害予防に機能する新たな食品素材となろう。

本研究の結果は、*Biosci. Biotech. Biochem.* 誌上に発表した [1]。

引用文献

- [1] Naoyuki Nishizawa, Daiki Sato, Yoshiaki Ito, Takashi Nagasawa, Yasuko Hatakeyama, Myeong-Rak Choi, You-Young Choi, and Yi Min Wei, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 92-96 (2002).
- [2] Fischer, J.E., Yshimura, N., Aguirre, A., James, J.H., Cummings, M.G., Abel, R.M., and Deindoerfer, F., *Am. J. Surg.*, 127, 40-47 (1974).
- [3] Rosen, H.M., Yshimura, N., Hodgman, J.M., and Fischer, J.E., *Gastroenterology*, 72, 483-487 (1977).
- [4] Sugiyama, K., He, P., Wada, S., Tamaki, F., Saeki, S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,

- 62, 609-611 (1998).
- [5] Lee,E.W., He,P., Kawagishi,H., and Sugiyama,K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2001-2004 (2000).
- [6] Manabe,A., Cheng,C., Egashira,Y., Ohta,T., and Sanada,H., *J.Nutr.Sci.Vitaminol.*, 42, 121-132 (1996).
- [7] Cooper,A.J.L., *Methods in Enzymology*, 113, 66-69 (1985).
- [8] 谷村孝, 榎本眞, 毒科学の基礎と実際 1, 日本毒科学会, 111-141 (1995).
- [9] Cooper,A.J.L., *Methods in Enzymology*, 113, 69-71 (1985).
- [10] Bernstein,L.H., and Everse,J., *Methods in Enzymology*, 41, 47-48 (1975).
- [11] Kepper,D., Lesch,R., Reytter,W., and Decker,K., *Exptl. Mol. Pathol.*, 9, 279-290 (1968).
- [12] Kepper,D., Pausch,J., and Decker,K., *J. Biol. Chem.*, 249, 211-216 (1974).
- [13] Wang,B., Ishihara,M., Egashira,Y., Ohta,T., and Sanada,H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 319-322 (1999).
- [14] Baquet,A., and Hue,L., *J. Biol. Chem.*, 265, 955-959 (1990).

Table 1. Composition of Experimental Diets (%)

Dietary protein	Casein	Proso millet protein
Casein ^a	22.2	—
Protein concentrate of proso millet	—	29.4
Salt mixture ^b	3.5	3.5
Vitamin mixture ^b	1.0	1.0
Corn oil ^c	5.0	5.0
Choline bitartrate ^d	0.2	0.2
Cellulose ^a	5.0	5.0
Corn starch	62.8	53.7
D,L-Methionine ^c	0.3	—
L-Lysine·HCl ^d	—	1.9
L-Threonine ^e	—	0.3
Protein content	20.1	20.8

^a Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan.

^b AIN-76 composition.

^c Ajinomoto Co., Tokyo, Japan.

^d Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan.

^e Nihon Kayaku Co., Tokyo, Japan.

Table 2. Effects of Dietary Proteins on Food Intake, Body and Liver Weights, and Serum Enzyme Activities in Rats Injected with D-Galactosamine (Experiment 1)

Dietary group	CS	CG	PG
Initial body weight (g)	120 ± 1	120 ± 1	120 ± 1
Final body weight (g)	222 ± 3	219 ± 3	219 ± 2
Weight gain (g/14d)	101 ± 2	99.4 ± 2.3	98.9 ± 2.7
Food intake (g/14d)	224 ± 4	222 ± 6	232 ± 7
Liver weight (g)	12.6 ± 0.5a	9.0 ± 0.4b	13.6 ± 0.9a
Relative liver weight (g/100g body weight)	5.7 ± 0.2a	4.2 ± 0.2b	6.2 ± 0.4a
Activities of serum enzyme (IU)			
GOT	28.4 ± 0.7a	3464 ± 207b	2362 ± 148c
GPT	14.1 ± 0.8a	1128 ± 30b	868 ± 51c
LDH	68.8 ± 11.5a	6605 ± 191b	5324 ± 365c

Values are mean ± SEM of 5 rats. Within the same row, means not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

4. 抗アレルギー機能

ヒエ摂取がラット腹腔細胞のヒスタミン遊離と血中 IgE 濃度に及ぼす影響

ヒエ (*Ekchinochloa utilis* L.) は、イネ科キビ亜科キビ属の一年生草木で、英名では Japanese barnyard millet、または Japanese millet などと表記される。日本、東南アジアなどで栽培されるヒエの原産地として、中国説などがあるが、現在では世界的にもヒエを栽培して食物としている国はほとんどない。また、中国では作物とはなっておらず雑草であり、最近の学説では日本で栽培化されたものと考えられている。ヒエはウルチ種が主体であり、種実の色は多くは黄褐、暗褐色である。ヒエは生育中における性質が極めて強く、冷湿な気候や地味の悪い土地にもよく生育し、よく実り、その種実は穀類中最も長期保蔵に耐えるなどの特性を有する。また、ヒエは古来より備荒作物としての役割を果たしてきた。江戸期の大凶作を救い、明治、大正、昭和と米作の改良が進められた時代でも、そのようなヒエの特性、特にヒエが冷害に強い性質が買われ、日本全国の間地、東北、北海道などの冷害に見舞われやすい地方に栽培されてきた。ヒエは、「冷え」に耐えることが語源とされ、岩手県、青森県、北海道など寒冷地や高冷地が主要な産地で、岩手県の閉伊地方は、稗貫郡の地名が残っており、「ヒエが多く作られる地方」とも言われている（柳田國男説）。わが国では、1880 年頃には全国で約 10 万ヘクタールも作付されていたが、1967 年には 8,360 ヘクタールに激減し、現在ではすでに国の統計調査もない [1-3]。ヒエの生産量についての詳細なデータはないが、国内生産量の約 80 % が岩手県産であると思われる。

ヒエを使った代表的な調理法としては、精白粒を米と混炊してヒエ飯として利用されてきたが、キビと同じようにヒエみそ、ヒエしょうゆ、麺・パスタ製品、クッキー・ケーキ、パンなども市販されている。ヒエはビタミン B1 やタンパク質に富み、最近では郷土食や代替食として見直されてきている。またヒエは、穀物の中でも最もアレルギーになりにくい食品と言われている。しかし、そのアレルギー改善機能については全く研究されていない。

このように、雑穀の中でもヒエご飯として最も多く食べられており、また食物アレルギーの食物療法でも用いられるキビだが、そのアレルギー応答に及ぼす影響についての研究はこれまで全く行われていない。そこで本章では、岩手県は日本における雑穀の主要な産地であり、特にヒエは、国内総生産量の 8 割を県産が占めるとされている。ヒエがアレルギー代替食品としてだけでなく、アレルギー改善機能を有するかを探るために、ヒエの摂取がラットのアレルギー応答に及ぼす影響について検討を行った

3-1 Wistar 系ラットを用いた動物実験

3-1-1 試料

実験飼料を調製するにあたり、ヒエの水分、粗タンパク質、粗脂肪を定量した。試料として用いた精白ヒエは、1998年岩手県浄法寺町で堀口京子さんが生産したヒエ（達磨：だるま）を購入した。

(1) ヒエの成分

ヒエの成分を表4-1、に示した。

(2) ヒエタンパク質の濃縮

ヒエは糖質の性質がキビと若干異なるためか、キビに比べて糊化したときの粘度が高く、キビと同条件で濃縮を行うと加水分解の効率が劣るため、酵素反応時の基質（精白ヒエ粉）の濃度を少し低くしてヒエタンパク質の濃縮を行った。

【試薬】

- ・ラクターゼ SR-40（洛東化成工業(株)、滋賀）
- ・エンチロン GA-4（洛東化成工業(株)、滋賀）
- ・ヘキサシアン（一級、和光純薬工業(株)、大阪）

【方法】

精白したキビを超遠心粉碎機（西ドイツ製）で粉碎した後、この粉碎物400gをビーカーにとり純水3Lを加え、ガスコンロで加熱して90℃にし、温風乾燥機中で90℃で30分間糊化させた。糊化後60℃まで冷ました後、グルコアミラーゼ（エンチロンGA-4）1mlをマイクロピペットで、また α -アミラーゼ（ラクターゼSR-40）250mgを純水約20mlに溶解して加え、60℃で24時間反応させた。反応中は5、6回攪拌した。反応終了後、7700×gで8分間遠心分離し、得られた沈澱を凍結乾燥した。凍結乾燥した加水分解物約150gあたりヘキサシアン2Lを加えて混ぜ、3～4時間放置後定性濾紙（No.2 500mm、ADVANTEC、東京）で濾過し、残渣に同様にヘキサシアンを加え、これを5回繰り返した。脱脂後、風乾した。今回得られた濃縮ヒエのタンパク質は40.0%であった。

3-1-2 動物実験の方法

(1) 実験動物および飼育方法

4週齢のWistar系雄ラット（日本クレア、東京）を各群5匹になるように用意した。ラットは個別にステンレスケージに入れ、室温22±1℃、明暗サイクル12時間とし、午前6時から午後6時に照明をつけた動物室で飼育した。実験に使用した基本飼料は、購入後3日間はAIN-76準拠飼料（16%カゼイン）と水を自由摂取させ、4日目に平均体重（約68.2g）が各群で同じになるように群分けした。対照群は免疫時リン酸緩衝液PBS(-)のみを投与するカゼイン食非感作群、オボアルブミン（以後OVAと略す）

による免疫を行うカゼイン食感作群とした。実験群は、実験開始からカゼインタンパク質飼料を摂食させたのち、3回目の追加免疫を行う飼育28日からはヒエ飼料を摂食させるカゼイン/ヒエ食感作群、また、実験開始からヒエ飼料を摂食させるヒエ食感作群とした。飼育14日目に初回免疫、飼育21、28、35日目に追加免疫を行い、飼育42日目にOVAを経口投与した。また、飼育14、28、42日目に尾静脈より採血（注射針25G、1mlシリンジを使用）を行った。飼育49日目に採血、屠殺して腹腔細胞を採取した。動物実験の概要を図4-1に示した。

【実験飼料】

実験飼料はAIN-76飼料組成に準じて調製した。タンパク質を16%として、カゼインを蛋白質源としたカゼイン飼料、濃縮ヒエおよび精白ヒエ粉を蛋白質源としたヒエ飼料を調製した。ヒエ飼料にはリジンを添加しないとラットは成長しないことがこれまでの実験から明らかになっているので、これらのアミノ酸をそれぞれ添加した。また、ヒエ飼料に添加する植物油およびセルロースは、カゼインに添加する量から、精白ヒエに含まれる粗脂肪および食物繊維量[4]を差しい引いた量を添加した。各飼料組成を表4-2に示した。

(2) 動物の感作および解剖

ラットの感作および解剖は、以下のように行った。

ラットのI型アレルギー応答をみる際、ラットを能動感作してIgE抗体を産生させる必要があるが、IgE抗体の産生は各種の要因、たとえば動物の遺伝的形質、年齢や抗原の処理法（投与方法、アジュバンド）などによって強い影響を受ける。食物タンパク質のみの投与ではIgEの産生が弱いため、抗原はアジュバンドとともに血管、腹腔、皮下、皮内へ投与される。このようなアジュバンドとして、水酸化アルミニウム（Alum）、百日咳ワクチン、Freund's complete adjuvant（FCA）、シリカゲル、HgCl₂、リポ多糖類などが用いられる[5]。しかし、これらアジュバンドの抗体産生増強のメカニズムは不明部分が多い。本研究では、IgE抗体産生のための抗原形態として有用である、水酸化アルミニウムアジュバンドに吸着させたオボアルブミン（Alum吸着OVA）を用いて行った。タンパク質抗原はアルミニウムゲルと強く結合し、注射局所から徐々に生体に放出され、免疫細胞を持続的に刺激することにより免疫応答を強くすると考えられる。作製法を以下に述べた[6]。

○水酸化アルミニウムアジュバンド吸着オボアルブミン（Alum吸着OVA）の作製

【試薬】

- ・オボアルブミン（Grade V；Sigma Chemica Co.、USA、以下OVAと略す）
- ・10%ミョウバン（AlK(SO₄)₂・12H₂O）水溶液
メンブランフィルターで濾過滅菌した後、4℃で保存した。
- ・0.25N水酸化ナトリウム

・リン酸緩衝液：PBS(-)

NaCl 8.0 g、Na₂HPO₄ · 2H₂O 2.9 g、KCl 0.2 g、KH₂PO₄ 0.2 g を純水に溶解した後 1N NaOH で pH 7.4 とした。オートクレーブで 121℃ で 20 分間滅菌して保存した。

【方法】

50 ml コニカルチューブ (FALCON) に 10 % ミヨウバンを 10 ml 入れ、攪拌しながら 0.25 N NaOH を 22.8 ml 滴下した。室温で 10 分静置した後、室温、遠心分離機 H - 500R (国産) で 1000×g で 10 分間遠心分離して上清を除去し、沈澱に滅菌水を 50 ml となるように加えて攪拌し Al(OH)₃ を洗浄した。室温、1000×g で 10 分間遠心分離して上清を除去した後、OVA 17mg/ 20ml PBS を加えて攪拌し、室温で 30 分間静置した。室温、1000×g で 10 分間遠心分離した後、上清に残った OVA 量の吸光度を 280 nm の波長で分光光度計 (UV - 1200、島津) で測定して吸着された OVA 量を確認 (OVA 1 mg/ml 時に A₂₈₀ = 0.75 として計算した) し、沈澱を OVA 125 mg/ml となるように PBS(-) で希釈した。

この Alum 吸着 OVA を、ラット 1 頭に対し 0.8 ml の頸背部皮下投与 (注射針 25G、1 ml シリンジを使用) により感作を行った。

○解剖

解剖の方法は以下のように、河野ら [7] の方法に準じた。ラットはエーテル麻酔下、解剖用はさみで胸部の皮膚を切り開いて胸筋を露出させてから心臓採血 (注射針 21G、10 ml シリンジ (テルモ (株)) を使用) し、屠殺した。血液は、ウォーターバス中で 37℃ で 60 分置いて凝固させ、4℃ で 2 時間置いた後、4℃、3000×g で 15 分間遠心分離した。上清の血清をマイクロチューブに小分けにし、分析まで - 80℃ で保存した。採血後、以下に述べるようにラット腹腔細胞を採取した。

(3) 血清 IgE の測定

血清 IgE の測定は、以下のように行った。ELISA 法は、簡便で、特異性、感度に優れた測定法であり、種々の成分を検出する ELISA キットも市販されているが、ラットの IgE 抗体を検出する ELISA キットはまだ種類が少なく、特に抗原に特異的な IgE 抗体を測定する場合、よほど一般的な抗原でない限り、そのような ELISA キットを入手するのは困難である。

そこで今回は、既に確立されているマウス IgE 抗体の微量定量法 [8] をもとに、ELISA 法による、ラット総 IgE 抗体および OVA 特異的ラット IgE 抗体の定量法を検討・確立し、ラット血清中の IgE 抗体の測定を行った。

○ラット血清総 IgE の測定

【試薬】

・ 0.15 M リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS(-), pH 7.4)

全ての試薬を添加溶解した後、1N NaOH で pH 7.4 とし、1L とした。

・ 3 % ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS(-) (BSA-PBS)

BSA（グロブリン不含、生化学用；和光純薬工業株式会社、大阪）30 g を PBS(-) に溶解した。

・ 0.05 % Tween 20 を含む PBS(-) (T-PBS)

予め 10 % Tween 20（関東化学株式会社、東京）を調製しておき、この 5 ml を PBS(-) 1L 溶解した。

・ 0.1M クエン酸 - 0.2M リン酸緩衝液 (PH 5.0) : 発色用緩衝液

クエン酸一水和物 4.20 g、Na₂HPO₄ · 2H₂O 14.33 g を純水に溶解した後、1N NaOH で pH 5.0 とした。

・ 30 % 過酸化水素水

・ o-フェニレンジアミン (OPD)（一級、和光純薬株式会社、大阪）

・ ビオチン標識マウス抗ラット IgE モノクロナル抗体 (MCA 193B ; Serotec LTD.、UK)

PBS(-) で 1 mg/ml に希釈し使用した。

・ ヤギ抗ラット IgE ポリクロナル抗体 (GARa/IgE(Fc)7s ; Nordic Immunological Laboratories、Netherlands)

10 mg/ml のものを PBS(-) で 2000 倍希釈して使用した。

・ ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジン (Southern Biotechnokogy Associates, Inc.、UK)

T-PBS で 1000 倍に希釈して使用した。

・ ラット IgE k 鎖 (PRP07 ; Serotec LTD.、UK)

【方法】

EIA 用 96 穴マイクロプレート (グライナー EIA プレート 96 穴平底、イミュロン 600、無コーティング ; Greiner、Germany) のウェルに抗ラット IgE モノクロナル抗体 5 mg/ml PBS(-) を 50 ml 加え、1 晩、4 °C で吸着させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。3 % BSA-PBS をウェルに 100 ml 加え 1 晩、4 °C で抗体非吸着部をブロックした後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。既知濃度ラット IgE 抗体 k 鎖を 1 mg/ml の濃度から T-PBS で希釈し、10 段階の希釈系列を作製して標準液として使用した。未知検体 (ラット血清) を T-PBS で 10 倍に希釈し、ウェルに 50 ml 加えた。作製した 10 段階の希釈系列も同様にウェルに加え、2.5 時間、室温で反応させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。ビオチン標識抗ラット IgE モノクロナル抗体 (1 mg/ml PBS(-)) をウェルに 50 ml 加え、1 時間、室温で反応させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 1000 倍に希釈し、ウェルに 50 ml 加え、1 時間、室温で反応させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。発色用緩衝液 100 ml に o-フェニレンジアミン (OPD) 40 mg、30 % 過酸化水素水 40 ml を加え発色液とし (用時調製)、この発色液をウェルに 50 ml 加え、30 分、室温、暗所で反応させた。2 M H₂SO₄ をウェルに 50 ml 加えて反応を止め、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 450) で波長 490 nm の吸光度を測定した。既知濃度ラット IgE 抗体 k 鎖の吸光度から検体の IgE 濃度を算出した。

○ラット血清 OVA 特異的 IgE の測定

a. ビオチン標識 OVA の調整

OVA 特異的抗体を検出するために、ビオチン標識 OVA を調整した。ビオチン標識は、Guesdon [74] らの方法を改変して行った。

【試薬】

- ・ OVA (Grade V ; Sigma Chemical Co., USA)
- ・ ビオチニル - N - ヒドロキシサクシニイミドエステル (BHSE) (E-Y LABS INC., USA)
- ・ 0.15M リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS(-)、pH 7.4)
- ・ 20 % NaN₃

【方法】

OVA 2 mg / 1 ml PBS(-) を攪拌しながら 50 mg/ml BHSE を 40 ml 添加し 1 分攪拌後、室温で 3 時間反応させた。その後 PBS(-) で 4 回透析して遊離したビオチンと未反応の BHSE を除去した。

透析は、Seamless Cellulose Tubing (Size : 8/32 ; Viskase Sales Corp.) の透析膜を用いて行った。市販透析膜には保存剤やグリセロールが含まれているので、使用前にガラスビーカーに純水と透析膜を入れ、約 10 分煮沸し、純水で洗浄した。透析膜の底を縛り、上部よりピペットでビオチン化 OVA 溶液 1 ml を入れて上端をストッパーで止め、さらにその上を縛り、透析チューブを PBS(-) 1L が入ったビーカーに入れ、低温下 (5℃前後) スターラーの上で静かに攪拌した。4 時間後、外液の PBS(-) を交換してさらに 4 時間攪拌を続け、これを 4 回繰り返した。透析終了後、ストッパーを外して内液をピペットで吸い取り、PBS(-) で 2 ml とした。

b. ビオチン標識 OVA の非ビオチン化アミノ基の定量

調製したビオチン標識 OVA のビオチン化の割合を確認するために、非ビオチン化アミノ基の定量を行った。

【試薬】

- ・ ニンヒドリン試薬 (日本電子アミノ酸分析機用ニンヒドリン試薬セット、日本電子株式会社、東京)
- ・ 50 % エタノール

【方法】

ビオチン標識 OVA (OVA として 1 mg/ml PBS(-)) 1 ml および OVA (1 mg/ml PBS(-)) 1 ml にニンヒドリン試薬 1 ml を加え、15 分、沸騰水浴上で反応させた。氷水で冷却後、50 % エタノール 2 ml を加えて適度な濃度にし、570 nm で吸光度を測定した。

作製したビオチン標識 OVA のアミノ基は 45.2 % がビオチン化されていた。ビオチン標識した BSA を用いて抗 BSA 抗体およびアビジンへの結合能を確認した実験 [74] では、この程度のアミノ基のビオチン化では影響がないことから、このビオチン標識 OVA を ELISA に用いることにした。

作製したビオチン標識 OVA は、マイクロチューブに入れて -20℃ で保存し、使用時

は T-PBS で OVA 濃度 2 mg/ml に希釈して用いた。

c. ラット血清 OVA 特異的 IgE の測定

抗原特異的 IgE 抗体の測定法は OVA をプレートにコートし、二次抗体にビオチン化抗ラット IgE 抗体を用いることもできるが、試料中に抗原に反応する他クラスの抗体が多く混在する場合には、これらの抗体はコーティングした抗原に反応する抗 OVA-IgE 抗体を阻害し、真の抗 OVA-IgE 抗体が測定できない。それゆえ、抗 IgE 抗体を始めに固相化し、微量 IgE 抗体のみを結合させた段階後、抗原に反応する IgE 抗体を検出する方法を考慮した [8]。

【試薬】

・ 0.15 M リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS(-), pH 7.4)

・ 3 % ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS(-) (BSA-PBS)

BSA (グロブリン不含、生化学用；和光純薬工業株式会社、大阪) 30 g を PBS(-) に溶解した。

・ 0.05 % Tween 20 を含む PBS(-) (T-PBS)

予め 10 % Tween 20 (関東化学株式会社、東京) を調製しておき、この 5 ml を PBS(-) 1L に溶解した。

・ 0.1M クエン酸-0.2 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) : 発色用緩衝液

・ 30 % 過酸化水素水

・ o-フェニレンジアミン (OPD) (一級、和光純薬株式会社、大阪)

・ マウス抗ラット IgE モノクロナル抗体 (MCA 193 ; Serotec LTD.、UK)

・ ビオチン標識 OVA (OVA 濃度 2 mg/ml T-PBS)

・ ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Inc.、UK)

T-PBS で 1000 倍に希釈して使用した。

【方法】

EIA 用 96 穴マイクロプレート (グライナー EIA プレート 96 穴平底、イミュロン 600 ; greiner, Germany) のウェルに抗ラット IgE モノクロナル抗体 5 mg/ml PBS(-) を 50 ml 加え、1 晩、4 °C で吸着させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。3 % BSA PBS をウェルに 100 ml 加え 1 晩)、4 °C で抗体非吸着部をブロックした後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。未知検体 (ラット血清) を T-PBS で 10 倍に希釈し、ウェルに 50 ml 加え、2.5 時間、室温で反応させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。ビオチン標識 OVA (OVA 濃度 2 mg/ml T-PBS) をウェルに 50 ml 加え、1 時間、室温で反応させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 1000 倍に希釈し、ウェルに 50 ml 加え、1 時間、室温で反応させた後、T-PBS でウェルを 3 回洗浄した。発色用緩衝液 100 ml に o-フェニレンジアミン 40 mg、30 % 過酸化水素水 40 ml を加え発色液とし (用時調製)、この発色液をウェルに 50 ml 加え、30 分、室温、暗所で反応させた。2 M H₂SO₄ をウェルに 50 ml 加えて反応を止め、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 450) で波長 490 nm の吸光度を

測定した。

(4) HPLC によるヒスタミンの測定

ヒスタミンの測定は、以下のように行った。ヒスタミンの測定には、バイオアッセイ、蛍光法、RIA 法、ELISA 法、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) 法があり、測定限界は蛍光法で 1 ng/ml、RIA 法、ELISA 法、HPLC 法で 0.1 ng/ml である。そこで、試料中のヒスタミンを *o*-フタルアルデヒドと反応させたものを、HPLC を用いて精製した後、ヒスタミンを蛍光法で測定する方法 (プレ・カラム法) により行った。

○試験溶液の調製

1% 過塩素酸を加えた試料は、0.45 mm のミリポーフフィルター (DISMIC - 13HP、ADVANTEC) を通して濾過した。他の試料は、以下の方法によって蛋白質を除去した。

【試薬】

- ・ 20% トリクロロ酢酸 (TCA)
- ・ ジエチルエーテル
- ・ 五酸化二リン

【方法】

試料 500 ml に冷 20% TCA 500 ml を加え、4℃ で 2 時間放置した後、遠心分離機 (himac CR 15D、日立) で、4℃、4000×g で 10 分間遠心分離して蛋白質を除去し、上清 500 ml をフタ付試験管に取った。ジエチルエーテル 2 ml を加え、振盪攪拌して TCA を抽出した後、上層のジエチルエーテルをパスツールピペットで除去し、これを 3 回繰り返した。試料中に微量に残ったジエチルエーテルは湯煎にかけて気化させ、五酸化二リンの入ったデシケーター内で減圧乾燥した。これを純水 100 ml で溶解し注入試料とした。

○HPLC 装置および測定条件

【試薬】

- ・ 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 12.0)

ホウ酸 2.472 g に 40ml の純水を加え、続いて 1N NaOH を加えながら pH 12.2 に合わせ、その後純水を加えて 100 ml とした。

- ・ OPA 試薬

o-フタルアルデヒド 25 mg をメタノール 0.5 ml で溶解した後、0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 12.0) と 2-メルカプトエタノール 25 ml を加えて用時調製し、遮光保存した。

- ・ リン酸緩衝液

リン酸二水素ナトリウム・二水和物 6.90 g/L と EDTA・2Na 0.19 g/L を純水に溶解し、2 M リン酸で pH 3.1 とした。

- ・ アセトニトリル

【注入試料】

注入直前に、試料 100 ml に OPA 試薬 60 ml を加えて混合した。

【HPLC の条件】

ポンプ	Waters 2690 Separations Module
検出器	Waters 474 Scanning Fluorescence Detector
波長	Ex 360 nm Em 440 nm
カラム	Symmetry C18 100 Å 5mm 4.6×250 mm (Waters, Medford, MA, USA)
移動相	A 液 リン酸緩衝液 (pH3.1) : アセトニトリル = 90 : 10 B 液 アセトニトリル
流速	1 ml /min
温度	40℃
注入量	10 ml
標準溶液	二塩酸ヒスタミン 1.217 mM
分析システム	Waters Millennium32 ソフトウェア

○実験結果の統計学的処理

結果は一群あたりの平均値±標準偏差 (SD) で表した。

実験結果の統計学的処理は、Graphad Software (CA, USA) の InStat 2.0 を使用し、Analysis of variance (ANOVA) を行った。ANOVA によって異なる群間に何らかの有意差があることが確認された場合は、Bonferroni Multiple Comparison Test によってさらに詳しく対照群との有意差を検討した。

3-1-3 結果

(1) Wistar 系ラットの実験飼育期間の体重増加量および飼料摂取量

実験飼育期間の体重増加量、および飼料摂取量の結果を表 4-3 に示した。

飼育期間中の体重増加は 1 日平均 5.8 g の体重増加であり、順調に成長した。飼育期間中の総体重増加量は、カゼイン食感作群に比較してカゼイン/ヒエ食感作群、ヒエ食感作群で少ない傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。飼料摂取量は、カゼイン食感作群に比較してカゼイン食非感作群 ($p < 0.05$)、ヒエ食感作群 ($p < 0.05$) で有意に多かった。カゼイン食非感作群は抗原による感作を行わなかったため、摂食量が減少しなかったためと考えられる。飼料効率は、カゼイン食感作群に比較してカゼイン食非感作群 ($p < 0.01$)、カゼイン/ヒエ食感作群 ($p < 0.001$)、ヒエ食感作群 ($p < 0.001$) で有意に低かった。

(2) ヒエ飼料摂取による Wistar 系ラット血清 IgE 抗体への影響

A. ヒエ飼料摂取による Wistar 系ラット血清中総 IgE 抗体の変化

飼育期間中のラット血清中総 IgE 抗体濃度の変化を図 4-2 に示した。

各感作群とも 初回免疫の飼育 14 日目を以降増加傾向を示したが、3 回目の追加感作を行う飼育 28 日目ではカゼイン食感作群と比較して、ヒエ食感作群 ($p < 0.05$) で有意に低かった。その後 OVA 経口投与 3 日後の飼育 42 日目には各感作群で最高値となり、飼育終了までは減少傾向を示した。カゼイン食非感作群は、OVA 経口投与後も IgE 値の上昇はみられなかった。

B. ヒエ飼料摂取による飼育 42 日目 (OVA 経口投与 3 日後) の Wistar 系ラット血清中 OVA 特異的 IgE 抗体への影響

飼育 42 日目の血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価の結果を図 4-3 に示した。

カゼイン食感作群と比較して、有意差はみられなかったが、カゼイン/ヒエ食感作群、ヒエ食感作群で低い傾向がみられた。

(3) ヒエ飼料摂取による Wistar 系ラット腹腔細胞のヒスタミン遊離への影響

A. ヒエ飼料摂取による Wistar 系ラット腹腔マスト細胞内のヒスタミン量への影響

ラット腹腔マスト細胞内のヒスタミン量の結果を図 4-4 に示した。

カゼイン食感作群 1.20 ± 0.67 mg/105 cells と比較して、カゼイン食非感作群 1.38 ± 0.67 mg/105 cells、カゼイン/ヒエ食感作群 1.11 ± 0.30 mg/105 cells、ヒエ食感作群 0.80 ± 0.45 mg/105 cells であり、カゼイン/ヒエ食感作群、ヒエ食感作群で減少傾向を示した。

B. ヒエ飼料摂取によるカルシウムイオノフォア刺激時の Wistar 系ラット腹腔細胞のヒスタミン遊離への影響

5 mM カルシウムイオノフォア刺激時のラット腹腔細胞のヒスタミン遊離率の結果を図 4-5 に示した。

カゼイン食感作群 81.0 ± 35.1 % と比較して、カゼイン食非感作群 38.2 ± 41.0 %、カゼイン/ヒエ食感作群 82.3 ± 32.2 %、ヒエ食感作群 91.3 ± 41.3 % であり、ヒエ摂取による差はみられなかった。

C. ヒエ飼料摂取による OVA 刺激時の Wistar 系ラット腹腔細胞のヒスタミン遊離への影響

1000 mg/ml OVA 刺激によるラット腹腔細胞のヒスタミン遊離率の結果を図 4-6 に示した。

カゼイン食感作群 10.3 ± 6.1 % と比較して、カゼイン食非感作群 -0.9 ± 1.8 %、カゼイン/ヒエ食感作群 4.9 ± 6.2 %、ヒエ食感作群 5.6 ± 4.1 % であり、有意差は認められなかったが、カゼイン/ヒエ食感作群、ヒエ食感作群で低い傾向がみられた。

3-1-4 考察

本節では、ヒエの摂取がOVA感作したWistar系ラットの血清IgE抗体および腹腔マスト細胞のヒスタミン遊離に及ぼす影響について検討した。

Wistar系ラットをOVAで感作したときの血清総IgEは、第3章3-1のWistar系ラットでの結果と同様に、飼育期間後半までに100～200ngに上昇し、感作を行わなかった群では飼育期間を通じて上昇がみられず、個体差は大きかったものの、OVAによる感作は成立していた〔図4-2〕。そして、飼育28日目までの血清総IgEはヒエの摂取によって有意に抑制されていた。飼育39日目のOVA経口投与後の血清総IgEは各群で差がみられなかったが、飼育42日目（OVA経口投与3日後）の血清OVA特異的IgEは、カゼイン食感作群と比較して、カゼイン/ヒエ食感作群、ヒエ食感作群と、ヒエの摂食期間が長くなるほど低くなる傾向がみられた〔図4-3〕。

飼育28日目までヒエを摂取していたのは、ヒエ食感作群のみである。この時点までの血清総IgEの上昇が抑えられていた理由として、まず摂取していた食餌中のタンパク質の違いが考えられる。免疫系に栄養を与えるという点から考えると、タンパク質の摂取が不十分な場合には免疫の働きが弱まり、優れたアミノ酸を多く含んでいる動物性タンパク質の摂取は免疫の働きを強化する。ヒエ飼料のタンパク質源はヒエタンパクのみである。制限アミノ酸は添加したが、タンパク質の消化性という点ではカゼインタンパクに劣ることが予想される。そのため、カゼイン摂取時ほどには免疫の働きが強まらず、抗体の産生能力も高まらなかったとも考えられる。しかし、確かにヒエ飼料はカゼイン飼料に比べて飼料効率が低かったが、体重増加量では差はみられなかった。加えて、植物性タンパク質の消化性はカゼインに劣るとするのが理由であるなら、第3章3-1のキビ摂取による実験でも差がみられるはずだが、キビ摂取ではこのような差はみられなかった。よって、ヒエ飼料のタンパク質源が植物性タンパク質であることまたその消化性のみで説明されるものではなく、他の因子が影響していると考えられる。

カルシウムイオノフォアによるヒスタミン遊離は、カゼイン/ヒエ食感作群で減少傾向がみられたが、ヒエ食群ではみられなかった〔図4-5〕。

OVAによるヒスタミン遊離はカゼイン/ヒエ食感作群およびヒエ食感作群で減少傾向がみられた〔図4-6〕。OVA特異的IgEも低い傾向にあることから、ヒエ摂取によりIgE産生が抑えられたことが一因として考えられる。

引用文献

- 1) 小原 哲二郎, 雑穀—その科学と利用—, 樹村房 (1981).
- 2) 丸善食品総合辞典, 五十嵐 脩・小林 彰夫・田村真八郎 編, 丸善株式会社 (1998).
- 3) 古沢 典夫, 健康食 雑穀, 農文協 編, 農文協, pp184-200 (1990).
- 4) 食品の食物繊維・無機質・コレステロール・脂肪酸含量表, 食品成分協会編, 医歯薬出版株式会社 (1985).
- 5) 今泉 勝巳, 食物アレルギー, 菅野 道廣・岸野 泰雄 編, 光生館, pp169-188 (1995).
- 6) 大河 原進, 樋口 重典, 吉永 秀, 新生化学実験講座 12 分子免疫学 II, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp316-325 (1991).

- 7) 河野 重勝, 大幡 勝也, 免疫実験操作法 II, 右田 俊介ら編, 南江堂, 1130-1042 (1995).
- 8) 宮島宏明, 平野隆雄, 新生化学実験講座 12 分子免疫学 II, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp292-298 (1991).

表 4 - 1. ヒエの水分、粗タンパク質、粗脂肪.

	g / 100 g	水分	粗タンパク質	粗脂肪
ヒエ		14.8	11.2	0.9
ヒエ 食品成分表値 ^a		12.0	9.8	3.7

a. 科学技術庁資源調査会編「四訂日本食品成分表」[50].

表 4 - 2. Wistar 系ラットを用いたヒエ飼料での動物実験飼料組成.

	(%)	
	カゼイン飼料	ヒエ飼料
カゼイン ^a	18.32	-
濃縮ヒエタンパク	-	18.00
精白ヒエ粉	-	69.04
AIN-76塩類混合物 ^b	3.50	3.50
AIN-76ビタミン混合物 ^c	1.00	1.00
植物油 ^d	5.00	4.08
コリン重酒石酸塩 ^e	0.20	0.20
セルロース粉末 ^a	5.00	3.03
トウモロコシデンプン ^f	66.74	-
L-Lysin-HCl ^d	-	1.15
D,L-Metionine ^g	0.24	-
タンパク質	15.4	15.6

a オリエンタル酵母工業(株)、仙台

b AIN - 76 精製飼料組成 (表 3 - 2)

c AIN - 76 精製飼料組成 (表 3 - 3)

d 味の素(株)、東京

e 和光純薬工業(株)、大阪

f 星山商店、盛岡

g 日本化薬(株)、東京

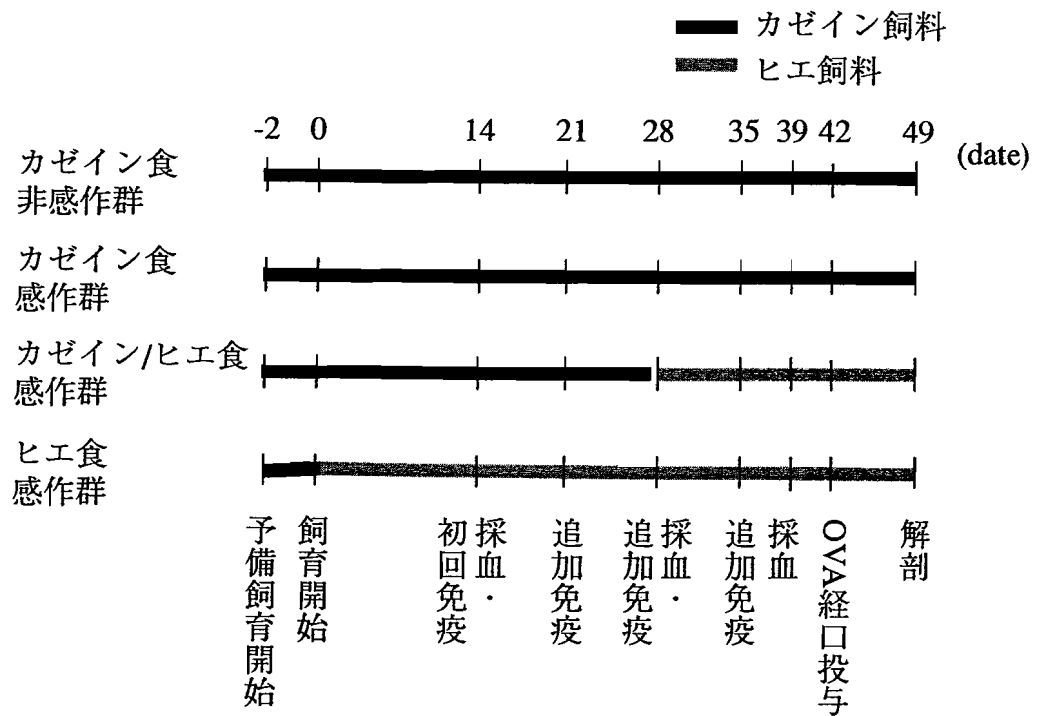


図 4 - 1. Wistar 系ラットを用いたヒエ飼料での動物実験の概要.

表 4 - 3. Wistar 系ラットを用いたヒエ飼料での動物実験

飼育期間 (49 日間) 各群の体重、体重増加量、飼料摂取量、飼料効率.

	カゼイン食 非感作群 (n=5)	カゼイン食 感作群 (n=5)	カゼイン /ヒエ食 感作群 (n=5)	ヒエ食 感作群 (n=5)
実験食開始時の体重 (g)	65.5±3.6	65.8±3.3	71.7±5.7	72.8±4.1
実験終了時の体重 (g)	357.2±17.3	353.3±20.3	349.9±11.8	350.9±16.1
体重増加量 (g)	291.7±14.2	287.5±20.7	278.2±6.8	278.1±12.5
飼料摂取量 (g)	976.9±29.2 *	909.3±47.1	952.7±20.2	971.3±21.8 *
飼料効率 (g)	0.30±0.01 **	0.32±0.01	0.29±0.00 ***	0.29±0.01 ***

数値は 1 群あたり、5 匹の平均±標準偏差を示す。

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 ; カゼイン食感作群との統計的な有意差を示す。

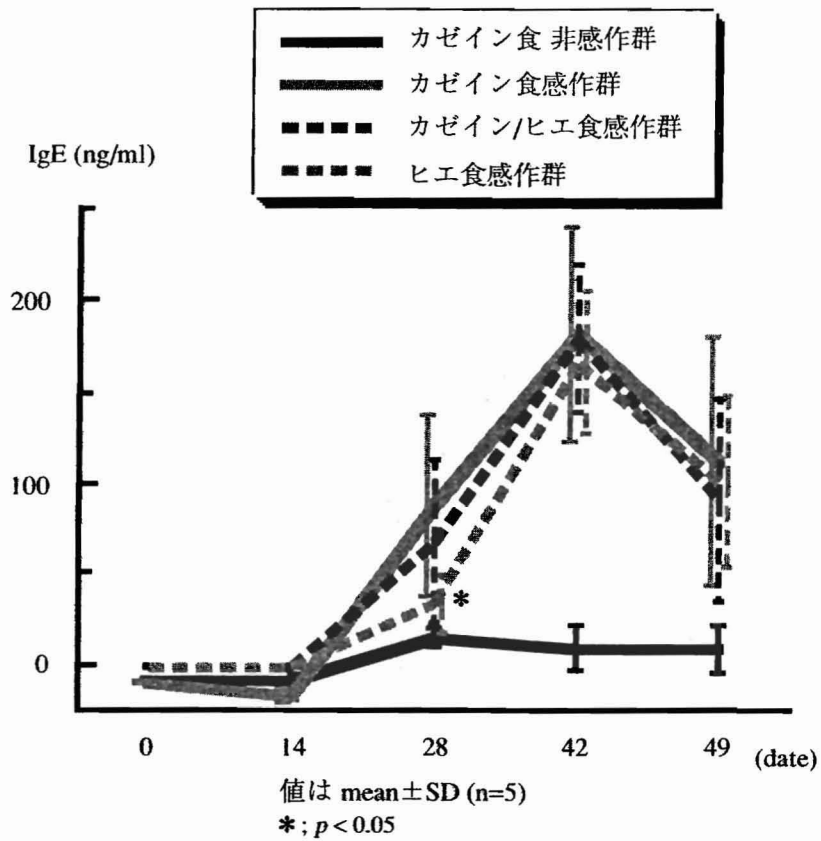


図 4-2. ヒエ飼料摂取による Wistar 系ラット血清中総 IgE 抗体濃度の変化.

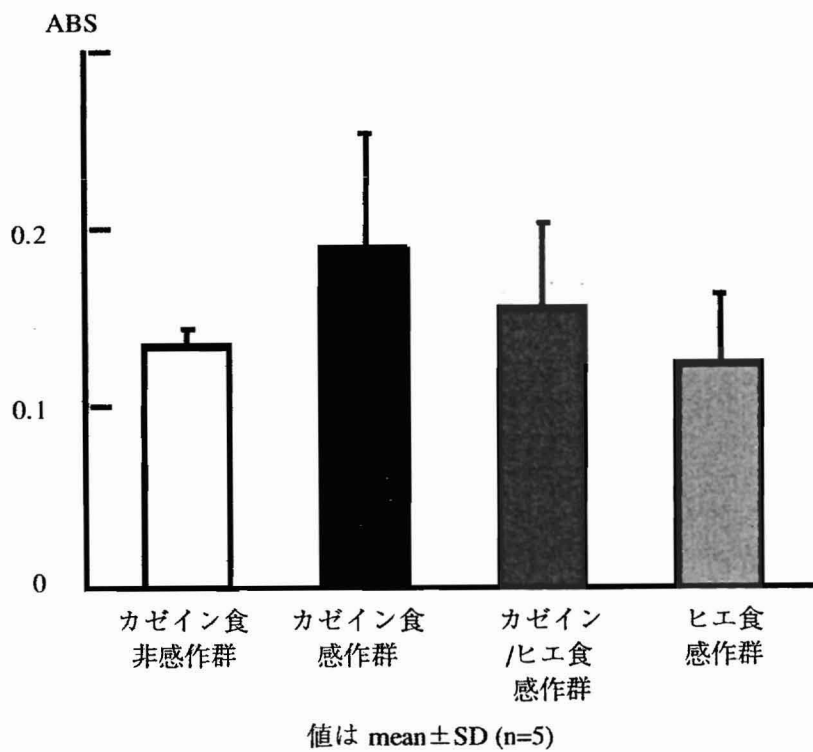


図 4-3. ヒエ飼料摂取による飼育 42 日目 (OVA 経口投与 3 日後) の Wistar 系ラット血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価への影響.

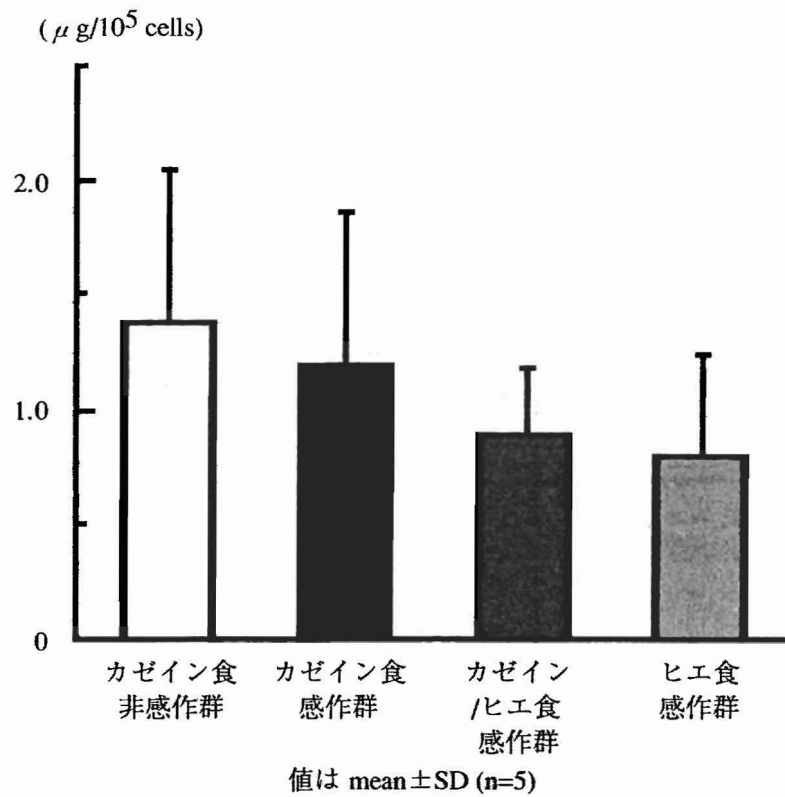


図 4-4. ヒエ飼料摂取によるWistar 系ラット腹腔マスト細胞内のヒスタミン量への影響.

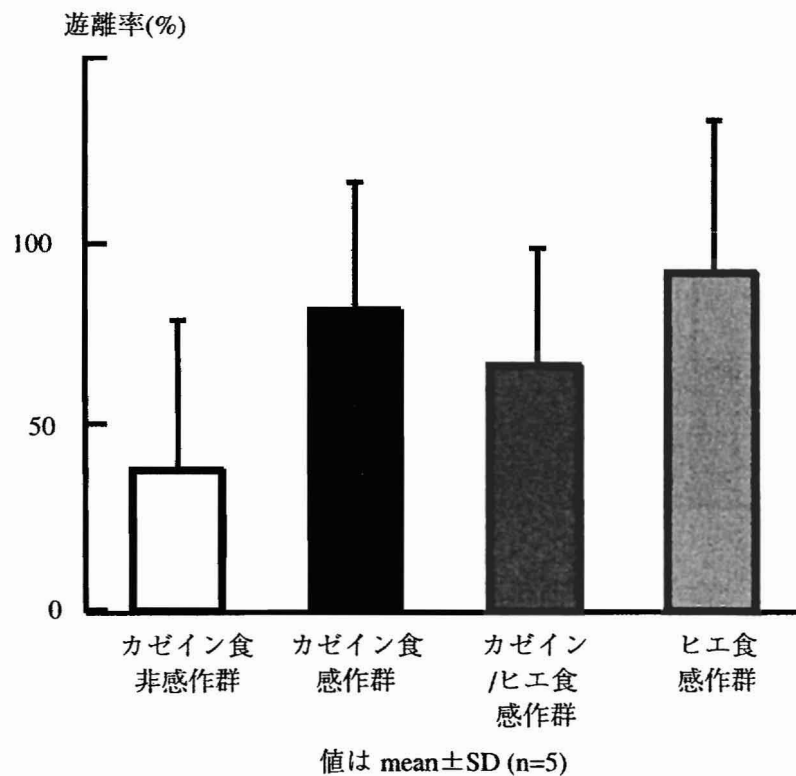


図 4-5. ヒエ飼料摂取によるカルシウムイオノフォア刺激時のWistar 系ラット腹腔細胞のヒスタミン遊離への影響.

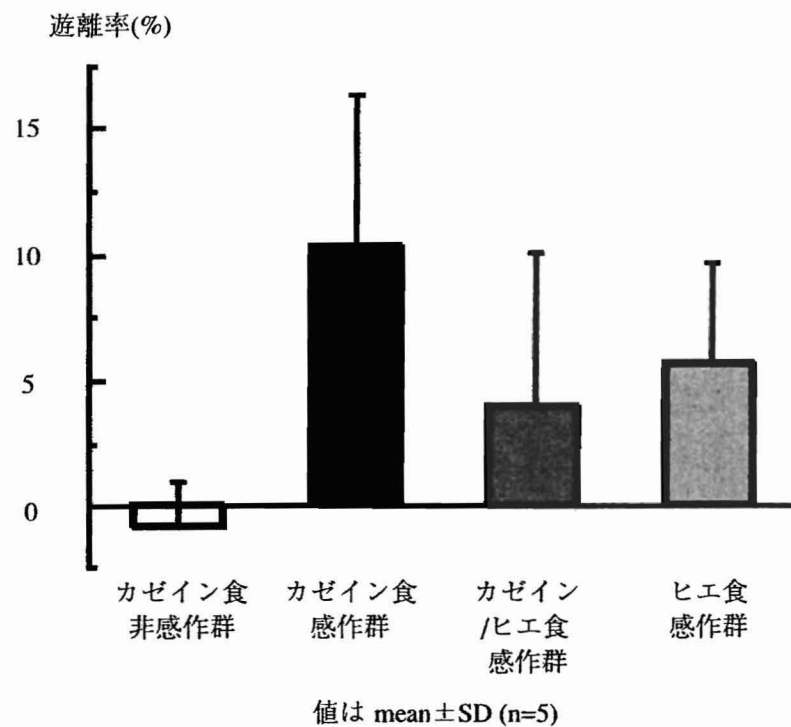


図4-6. ヒエ飼料摂取によるOVA刺激時の
Wistar系ラット腹腔細胞のヒスタミン遊離への影響.

5. ヒトにける雑穀の健康機能性

キビ、アワ、ヒエの生理機能性については、報告者らの研究で、動物実験で、キビ蛋白質には、善玉コレステロールである血中の高密度リポ蛋白質 (HDL)―コレステロール濃度を顕著に上げる作用がある事が解った [1,2]。アワ、ヒエの蛋白質にも同様の効果の他、高コレステロール食餌における脂質代謝改善機能があることを確認している。血中の HDL―コレステロールには、動脈壁などの末梢組織から過剰のコレステロールを引き抜くいわゆるコレステロール逆転送の働きがあり、その機能によって動脈硬化症を予防したり、軽減化する。更には、HDL―コレステロールは、LDL(悪玉)―コレステロールの酸化抑制や血栓防止、最近では抗エンドトキシン機能の新規な生理機能性が報告されており、それによって健康を保つ機能があると思われる。このような機能性が、どの蛋白質成分に由来しているのか探索研究を進めている。

しかし、ヒトを対象とした雑穀のこのような生理機能性の効果は全く検討されていない。そこで本実験では、キビご飯をヒトに食べさせたときの、機能性をしらべた。

方 法

成人男女 12 名のボランティアを募り、以下のような食事条件で、行った。

6 名には、2 日間の予備日の基礎食事の後、30 日間、主食の白米に 20%精白キビを混合したキビご飯を毎日 3 食摂取した (実験群)。各人の献立は、第 6 次日本栄養所要量に沿って、個人に適合した摂取量を算出し、それにのっとって作成した。一方、キビを除いた白米食の摂取した 6 名を対象群とした。

この間、10 日ごとに空腹時採血を行い、以下の血中成分を測定した：血中アルブミン、グロブリン、総コレステロール、血 HDL-コレステロール、中性脂肪、鉄、カルシウム、亜鉛、GOT,GPT, γ -GTP、ヘモグロビン、糖化ヘモグロビン、グルコース、インスリン。

本実験は、ヘルシンキ宣言 (1964 年)(2000 年修正) の精神に則り、医師の健康管理下で、被験者の健康を最優先し、被験者には自由意志に基づいたものであり、研究の途中であっても被験者に不都合があった場合、いかなる場合でも即座に、しかも何らかの不利な扱いを受けることなく被験者をやめる (キビ食事の摂取をやめ、採血やアンケートを拒否する) 権利があることをインフォームドコンセントで、十分理解したうえで行った。

結果と考察

実験群の実験期間中には、体重の変化は減少傾向にあった。このことは、血中の中性脂肪の減少傾向と合わせて考えると、キビの体脂肪減少機能性を示唆している。

実験群の血中の総コレステロール濃度は、実験開始時から、終了時には、対象群と比較して低下を示した。また、血中の LDL-コレステロール及び中性脂肪濃度も、同様な低下傾向を示した。一方、善玉コレステロールである HDL-コレステロール濃度は、実験

開始時の濃度を低下することなく経過した。

特徴的な効果は、3名の肝機能障害を示す高い GOT, GPT, γ -GTP の値が、それぞれ平均値で 58、82、100、に明確に低下した。

これらの結果は、雑穀のキビは、脂質代謝改善機能に加えて、肝機能改善効果もあわせて有する機能食品素材であることを示唆していよう。この肝障害抑制機能は、既に報告した [3] 動物実験の結果をヒトでも効果のあることを裏づけており、今後の肝障害を抑制するような機能食品開発研究にとって、その機能性素材の解明研究が非常に重要である。

引用文献

- 1) Nishizawa, N., Oikawa, M., and Hareyama, S., Effect of dietary protein from proso millet on the plasma cholesterol metabolism in rats. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 229-230 (1990).
- 2) Nishizawa, N., and Fudamoto, Y., Yoshiharu, The elevation of plasma concentration of high-density lipoprotein cholesterol in mice fed with protein from proso millet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 333-335 (1995).
- 3) Naoyuki Nishizawa, Daiki Sato, Yoshiaki Ito, Takashi Nagasawa, Yasuko Hatakeyama, Myeong-Rak Choi, You-Young Choi, and Yi Min Wei, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 92-96 (2002).

第3章 アワ種子貯蔵タンパク質の変異性の解析

緒言

種子貯蔵タンパク質は、種子の登熟につれて種子の子葉や胚乳に蓄積される。これらは種子が発芽し光合成を行うまでの植物の初期成育段階において幼植物の栄養源となっている。また、種子貯蔵タンパク質は人間や動物にとっても重要なタンパク質栄養源となっている。一般的に、穀物の主要な種子貯蔵タンパク質の組成は植物種によって異なり、イネ科穀物の場合はプロラミンが主要なタンパク質であり、マメ科植物の場合はグロブリンである。これら種子貯蔵タンパク質は栄養的に優れているが、動物性タンパク質に比較すると劣っている場合が多い。すなわち、イネ科穀物はリジンが、マメ科の場合は含硫アミノ酸が制限アミノ酸となって栄養価を低下させている。

一方、様々な植物種においては、種内で種子貯蔵タンパク質の組成に遺伝的な変異性が存在することが知られており、その変異性を利用した種子貯蔵成分の遺伝的改良や植物種の多様性の解析が行われている(種子生理生化学研究会 1995)。

本研究は、イネ科の雑穀であるアワ (*Setaria italica*) 及びマメ科穀類のダイズ (*Glycine max*) の種子貯蔵タンパク質について、アワではプロラミンに焦点をあて遺伝的変異性を調査し、ダイズでは現在まで得られているグロブリンのサブユニット欠失性を集積した系統の遺伝的安定性とアミノ酸組成について解析した。

1. アワ種子貯蔵タンパク質プロラミンの変異性

序論

アワの種子貯蔵タンパク質は、プロラミンとグルテリンが全タンパク質の80%を占めており、そのうちプロラミンが60%、グルテリンが20%である(小原 1981)。アミノ酸組成は、キビ、ヒエ、モロコシなどの他の雑穀のアミノ酸組成と類似しており、リジンが制限アミノ酸となっている。主要なタンパク質であるプロラミンとグルテリンのリジン含量を比較すると、プロラミン(0.33 g/16gN)はグルテリン(7.0 g/16gN)に比べてリジン含量が顕著に低いことが知られている(平 1962)。

一方、プロラミンタンパク質は、アワの系統によって遺伝的変異があることが報告されている(Nakayama et al. 1999a)。そこで、プロラミンを構成するタンパク質バンドを極端に欠失することで、相対的にリジン含量の多いグルテリンなどのタンパク質を増加させることができれば、リジン含量の高いアワ系統の作出が可能となり、アワの食品価値が向上すると考えられる。本研究では、多くの系統を用いプロラミンタンパク質の遺伝的変異性を調査した。

材料および方法

(1) 植物材料

アワ (*Setaria italica*) 38 系統、その雑草型 5 系統及び野生祖先種エノコログサ (*S. viridis*) 3 系統を供試した (表 1)。これらは、岩手大学農学部栄養化学研究室西澤直行教授より譲渡頂いた。また、貯蔵タンパク質プロラミンのバンド組成の標準品種として農水省生物資源研究所 (現 (独) 農業生物資源研究所) ジーンバンクより譲り受けた 10 系統を用いた (表 1)。

(2) SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE は Nakayama et al. (1999a) の方法に従った。タンパク質の抽出は種子 1 粒から行ない、1 系統につき 6 粒を分析した。種子を葉包紙で包み、乳棒で粉碎し、粉末をマイクロチューブに入れ、アワプロラミン用抽出液 (0.2% SDS、5M 尿素、1%メルカプトエタノール、0.05M Tris-HCl 緩衝液、pH8.0 に 70%エタノール濃度になるようにエタノールを添加) 200 μ l を加えて、Micro Mixer E-36 (TAITEC) で 15 分間振盪後、4 $^{\circ}$ C で 10000rpm 5 分間遠心分離し、上清に冷アセトン (-20 $^{\circ}$ C) を 1ml 加え、-20 $^{\circ}$ C に 3 時間以上静置した。4 $^{\circ}$ C で 10000 rpm 10 分間遠心分離し、沈殿したタンパク質に抽出液を 50 μ l 加え溶解後、10 μ l を SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE は 19.5%アクリルアミドゲルで行い、タンパク質の染色は Quick-CBB (和光純薬) を用いて行った。

(3) 交雑

プロラミンのバンドパターンに変異の見られた系統について、標準品種と交雑を行った。交雑は、両親の穂を開花時に同一の交配袋でかぶせる方法で行った。本方法では、自殖種子が多く採種されることが予想されるが、その中に交雑種子も得られることが報告されている。

結果および考察

各系統 6 粒ずつを用い、アワ、雑草型及びエノコログサ 46 系統の種子プロラミンバンドの変異性を SDS-PAGE により分析した。各バンドの判別は、バンドパターンのわかっている標準品種 10 系統 (図 1) をもとに行った。アワの種子プロラミンのバンドは 6 本知られており、それらはすべて 20~30kDa の分子量の範囲にあり、Pro1 と Pro2 の 2 つの独立した遺伝子座の 8 つの対立遺伝子によって支配されていると考えられている (Nakayama et al. 1999a, b)。そのうち、Pro1 座はバンド 3 を支配する 2 つの対立遺伝子 (*Pro1a* と *Pro1null*) があり、Pro2 座はバンド 1、2、4、5、6、null を支配する 6 つの対立遺伝子 (*Pro2a*~*Pro2f*) があることが報告され、Pro2 座の対立遺伝子が 1 つあるいは 2 つプロラミンバンドを支配することから、Pro2 座は密接に連鎖した 2 つの遺伝子座のクラスターであることが推察されている (Nakayama et al. 1999a)。

本研究で調査した46系統のプロラミンのタイプを表1に示した。アワについては調査した38系統のうち30系統がII型 (*Pro1null*, *Pro2a*) であり、その他IV型 (*Pro1null*, *Pro2b*) が1系統、V型 (*Pro1a*, *Pro2c*) が2系統、VI型 (*Pro1null*, *Pro2c*) が2系統であった。また、すでに報告されているタイプと異なるタイプが2タイプ3系統見つかった。これらは、1、4、5のバンドを持っている‘軽米系粳’、‘軽米系褐粳’と、1、3、4、5のバンドを持っている‘二戸アワ-2’であった。これらタイプの遺伝子支配については、*Pro1*座はバンド3を支配していることから前者は*Pro1null*、後者は*Por1a*と見なされるが、*Pro2*座に関しては、遺伝子座がホモになっていると思われる各系統については3つのバンドが出ることは従来の考えからは考えにくく、このようなタイプが出た原因として、(1)*Pro2*座に関してヘテロタイプのもを分析した、(2)*Pro2*座は密接に連鎖した2つの遺伝子座のクラスターと考えられているが、3つの遺伝子座のクラスターであること等が考えられる。このことを確かめるために、標準タイプと交雑を行ったが、現在まで雑種と思われるものは得られていない。中国由来の雑草型のアワ5系統のプロラミンタイプはすべてIV型であり、野生祖先種であるエノコログサ3系統はすべてIII型であり、いずれも他のタイプは見いだされなかった。

引用文献

- Nakayama, H., H. Namai and K. Okuno (1999a) Genes controlling prolamins biosynthesis, *Por1* and *Pro2*, in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) Beauv. *Genes Genet Syst.* 74: 93-97.
- Nakayama, H., H. Namai and K. Okuno (1999b) Geographical variation of the allelase at the two prolamins loci, *Pro1* and *Pro2*, in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) Beauv. *Genes Genet Syst.* 74: 293-297.
- 小原哲二郎 (1981) 雑穀 その科学と利用 樹村房、東京
- 種子生理生化学研究会 (1995) 種子のバイオサイエンス 学会出版センター、東京
- 平 宏和 (1962) 種子のアミノ酸組成に関する研究」. *植物学雑誌* 75: 273-277.

表1. 植物材料およびアワ貯蔵タンパク質プロラミンのバンドパターン

系統	由来*	プロラミンバンド**						型
		1	2	3	4	5	6	
a. 岩手大学栄養化学研究室								
岩手系粳	岩手県岩手町	-	-	-	+	-	-	II
岩手系糯	岩手県岩手町	-	-	-	+	-	-	II
軽米系粳	岩手県軽米町	+	-	-	+	+	-	?
軽米系糯	岩手県軽米町	-	-	-	+	-	-	II
軽米系褐粳	岩手県軽米町	+	-	-	+	+	-	?
福岡系	岩手県二戸市	-	-	-	+	-	-	II
猫足	(株)サカタのタネ	-	-	-	+	-	-	II
中国渡来	中国	-	-	-	+	+	-	IV
福島(飯豊系)	福島農試	+	-	-	+	-	-	VI
福島(桧枝岐系)	福島農試	-	-	-	+	-	-	II
福島(金山系)	福島農試	-	-	-	+	-	-	II
岡山勝央町在来粳	岡山県の種苗会社	-	-	-	+	-	-	II
名古屋(愛三種苗)	愛三種苗(愛知県)	-	-	-	+	-	-	II
山形村バッテリー村在来	岩手県山形村	-	-	-	+	-	-	II
大巻系		+	-	+	+	-	-	V
虎の尾粳	岩手県北農試	-	-	-	+	-	-	II
支那大粟	中国	+	-	-	+	-	-	VI
雪谷 糯		-	-	-	+	-	-	II
二風谷在来-1	北海道二風谷	-	-	-	+	-	-	II
二戸 黒アワ		-	-	-	+	-	-	II
二戸 アワ-1		+	-	+	+	-	-	V
二戸 アワ-2		+	-	+	+	+	-	?
二戸 中国アワ	中国	-	-	-	+	-	-	II
山形村(堀口)	岩手県山形村	-	-	-	+	-	-	II
県北農研 虎の尾	東北農試	-	-	-	+	-	-	II
大槌10	岩手県大槌町	-	-	-	+	-	-	II
栄養 中国-1	中国	-	-	-	+	-	-	II
栄養 中国-2	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-1	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-2	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-3	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-4	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-5	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-6	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-7	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-8	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-9	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安-10	中国	-	-	-	+	-	-	II
延安雑草-1	中国	+	-	-	+	-	-	VI
延安雑草-2	中国	+	-	-	+	-	-	VI
延安雑草-3	中国	+	-	-	+	-	-	VI
延安雑草-4	中国	+	-	-	+	-	-	VI
延安雑草-5	中国	+	-	-	+	-	-	VI
エノコログサ-黒		-	-	+	+	+	-	III
エノコログサ-白		-	-	+	+	+	-	III
エノコログサ-分岐		-	-	+	+	+	-	III
b. 標準品種								
万作糯	生物研ジーンバンク	-	-	+	+	-	-	I
浪不知	生物研ジーンバンク	-	-	-	+	-	-	II
冀特1号	生物研ジーンバンク	-	-	+	+	+	-	III
高39	生物研ジーンバンク	-	-	-	+	+	-	IV
PI391639	生物研ジーンバンク	+	-	+	+	-	-	V
猫足	生物研ジーンバンク	+	-	-	+	-	-	VI
猪伏早生	生物研ジーンバンク	-	+	-	-	-	-	VII
青半谷	生物研ジーンバンク	-	+	-	-	+	-	X
PI458626	生物研ジーンバンク	-	-	+	+	-	+	X I
ヒジ長	生物研ジーンバンク	-	-	-	+	-	+	X II

*: 空欄は由来不明、 **: + : 有、 - : 無

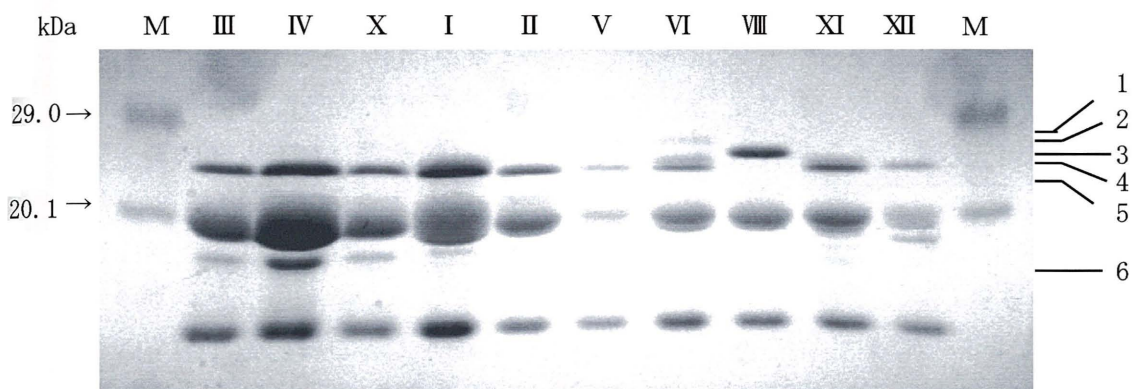


図1. アワプロラミンタンパク質の標準系統のバンドパターン
 上部のローマ数字は、プロラミンのタイプを表す。
 M: 分子量マーカー

第4章 雑穀種子の遺伝子解析

雑穀は、世界各地、アジア、ヨーロッパ、南米、アフリカなどで栽培され、利用されてきた穀類である。近年、雑穀は、血中の脂質濃度を減少すること、善玉HDL-コレステロールを上昇すること [1,2,3]、肝障害の進行を抑制することを明らかにした [4]。日本では、米・小麦アレルギー患者の代替穀物として、また国民の健康志向を反映して、近年、雑穀の需要が高まっています。岩手県内でも、県北地域を中心に栽培面積が増加し、新たな食品開発も行われている。岩手県の風土に適する在来種から比較的栽培しやすく、外観品質も良い優良品種も選定されている。さらに、より安定かつ多収量、また食味や食品機能性に優れた優良品種の開発が今後行われることが期待される [5]。ところが、現在栽培されている品種は、由来がはっきりしていないものが多く、栽培上の熟期の早晩、穂型、粒色などから区別し、その存在する地方名を付して品種名としているものが少なくない。このような農業形質と品種間の遺伝的差異を結び付けることができれば、より適確な品種開発や、系統維持が可能となるであろう。そのためには、現存する各品種間の遺伝的特徴を明らかにする必要がある。そこで、本研究ではアワについて種子蛋白質とDNA多型の解析による品種識別を行い、品種の近縁関係を調べた。

第1節 アワ種子蛋白質の品種間の差異

アワ種子蛋白質は、アルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリンから構成して、そのうちプロラミンの含量は64.1%であり、アワ蛋白質の主成分である [6]。ここでアワのプロラミンを抽出しSDS-PAGEを行って、アワ品種間の差異をみた。

【方法】

用いた実験用のアワの品種は表4-1に示した。アワ種子の粉末に70%エタノールと尿素とSDSを含むトリス-塩酸緩衝液で抽出した上清に、あらかじめ冷却したアセトンを加え、-20℃一晚静置した後、遠心分離して得られた沈澱をトリス-塩酸緩衝液で溶解しました []。それをサンプルとして電気泳動を行いました。電気泳動は、分離ゲル、19.5%濃度のアクリルアミドゲルを、濃縮ゲル、4.5%濃度のアクリルアミドゲルを用いて行った。泳動終了後、CBBで染色を行った。

【結果】

SDS-PAGE分析により、アワ種子のプロラミンサブユニットの調査を行った。アワ種子のプロラミンサブユニットは、分子量14、19、22-23、27KDの主なポリペプチドから構成される [6]。品種によって電気泳動のパターンに特徴的な違いが見られましたが、泳動パターンが似ていても、穂型などの農業形質は異なる品種があった。

アワ種子蛋白質のパターンだけによる品種の識別が難しいので、AFLP法でアワのゲ

ノム DNA 多型を分析した。

第2節 DNA 多型の解析による品種識別

本研究で用いた DNA フィンガープリント法とは、ゲノム DNA などを対象にその塩基配列の違いや発現量の差を利用し、サンプルの DNA 多型をパターンとしてとらえる方法であり、その応用の広さと解析技術の進歩により様々な手法が開発されてきた。DNA フィンガープリント法の中で最も新しい手法である AFLP 法は、サンプル DNA を制限酵素で切断して、その中から特定の塩基配列を持つものだけを選択的に PCR 増幅して、検出する方法である [7]。制限酵素による切断のされ方とそれにより得られた DNA 断片の制限酵素 site 近接配列の多型を利用してゲノム DNA の多型を検出出来るため、1 回の分析で得られる多型として利用できるマーカーが多く、他の手法の 10~100 倍のマーカーが得られる。また、PE Applied Biosystems 社 (ABI) の蛍光自動シーケンサーでは、GeneScan や Genotyper ソフトウェアを利用できるため、コンピューターによるデータの解析が容易である。本研究では AFLP 法を用いることにした。AFLP 法による遺伝子多型分析の流れを示した (図 4-1)。

作業は DNA の抽出、AFLP 反応、DNA シーケンサーによるバンド検出、ソフトウェアでのデータ処理、系統樹作成の、5つの過程に分けられます。市販のキットである ISOPLANT を用いて抽出したアワのゲノム DNA を EcoRI と MseI の2種類の制限酵素で切断します。そして両方の切断面にそれぞれ特異的な二本鎖のアダプタ DNA を結合させる後、二段階 PCR による選択的な増幅を行います。得られた DNA 断片を DNA シーケンサーで検出し、そのデータのバンドパターンの比較を行います。ここでの多型バンドのデータを基に、最後は系統樹を作成する。

【方法】

1.ゲノム DNA 抽出法および定量法

a.ゲノム DNA 抽出法

DNA の抽出は市販の DNA 調整キット (ISOPLANT, ニッポンジーン社) を使用し、キットに指示されている抽出法を改良して行った。

精白済みアワに Solution I を加え、ペッスルでキビ種子を押しつぶして粉碎した。Solution II を加え、激しく混合した後、50℃、30分間インキュベートした。これにより、Solution II の主成分である塩化ベンジルによって、細胞壁、細胞膜、核膜等が破壊され、DNA が水相 (界面活性剤を含んでいる Solution I) に溶け出す。つぎに、Solution III を加え、混合後、15分間氷冷した後、微量高速冷却遠心機で 15000 rpm、15分、4℃で遠心分離した。有機相の塩化ベンジルや遠心後に認められる白い固形物等、水相以外の物

質ができるだけ混入しないように、水相のみを 1.5 ml 遠心チューブに採取した。水相以外の物質が混入してしまった場合には、再度遠心分離を行った。つぎに、エタノール、3 M 酢酸ナトリウム 30 ml を加え混合した後、15000rpm、10 分、4°C で遠心分離し、エタノール沈殿を行った。水相を除き、沈殿を TE バッファー 100ml に溶解した後、RNase を 2ml (終濃度 20mg/ml) 加え、1~2 秒攪拌し、室温で 30 分間放置して RNA を分解した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理を二回行った。エタノールと 3M 酢酸ナトリウムを加え、エタノール沈殿をし、沈殿を 70%エタノール 2 で洗浄した。エタノールを完全に除去するために沈殿を真空乾燥機で乾燥させた。得られた沈殿を TE に溶解してゲノム DNA サンプルとし、後の AFLP 法による品種判別に使用するまで -20°C で保存した。

b. DNA の紫外線吸収による定量 [8]

この方法は DNA の定量に最もよく用いられる迅速な方法である。核酸に含まれる 5 種類の塩基 (G,A,T,C,U) は 260nm 付近に強い吸収極大を持つ [8] ので、この吸収を利用して定量した。なお、二本鎖 DNA の場合は 260nm での吸光度が 1.0 のときに、DNA 濃度が 50mg/ml となる。DNA 溶液 5ml を 20 倍希釈し、分光光度計で 260nm と 280nm の 2 波長の吸収を測定した。

2. ABI Plant Mapping Kit による AFLP 反応 [6]

(1) ゲノム DNA テンプレートの調製 (制限酵素、ライゲーション反応)

ゲノム DNA を特定の 4 塩基 (TTAA) を認識して切断する Mse I と 6 塩基 (GAATC) を認識して切断する EcoR I の 2 種類の制限酵素で切断する。これにより両側に EcoR I による切断面を持つもの、一方に EcoR I 切断面、他方に Mse I 切断面を持つもの、両側に Mse I 切断面を持つものという 3 つの異なるタイプの DNA フラグメントができる。次に、Mse I 切断面と EcoR I 切断面にそれぞれ特異的な二本鎖のアダプタ DNA を結合させる。その結果、両末端がアダプタで修飾されたものになる。これをゲノム DNA テンプレートとする。

(2) 二段階 PCR による選択的な増幅

1) Preselective PCR 反応

アダプタ DNA とそれに隣接する制限酵素認識配列がプライマーの結合部位となり、DNA 断片の増幅が行われる。このとき、二つのプライマーの 3'末端に特定塩基を一個ずつ付加する。ただし、ゲノムサイズが 500Mb 以下の場合は M-末端にのみ付加する。特定塩基を付加することにより、制限酵素切断部位の塩基配列と付加された塩基配列を合わせもつ DNA 断片のみを選択的に増幅して、対象となる DNA 断片の数を減らす。一つの特異塩基で増幅される DNA 断片の数を 4 分の 1 に減らすことができるので、このステップで増幅される DNA 断片の数は 4 分の 1 ないし 16 分の 1 に減ることになる。

この段階では、まだ断片数が多く、その上標識されていないので、以下のような Selective PCR 反応を行ない、さらに DNA 断片の選択と可視化を図る。

2) Selective PCR 反応

二種類の Preselective PCR Primer の 3'末端に更にそれぞれ二つの特定塩基を付加し、Selective PCR primer とし、EcoR I 末端 (E-末端) の primer にのみ蛍光標識しておく。このステップでのプライマーは、64 種類の異なるプライマーペアから選択することができる (8 種類の EcoR I と 8 種類の Mse I 側のプライマーペア 64 通り)。これらのプライマーはそれぞれ 3 つの選択的なヌクレオチドを持っている。一つ目は Preselective PCR に用いられたものと同一であり、続く二つのヌクレオチドの組み合わせは 16 通りある。これら三つのヌクレオチドすべてがマッチするヌクレオチドを含んだフラグメントだけが選択的に増幅され、このステップで Preselective PCR 反応の DNA 断片数を 256 分の 1 に減らし、E-末端を持つ断片のみが蛍光標識される。

これで初めて増幅された DNA 断片が数的にもサイズの (断片長) にも電気泳動で分離できるようになる。この増幅された DNA 断片の長さの違いを自動シーケンサーで検出し、バンドパターンをサンプル間で比較して違いを解析する。

3. 自動シーケンサーによるデータ解析

Selective PCR 反応産物は、自動シーケンサー (Genescan ソフトウェアを搭載した ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) で検出、分析した。泳動サンプルは、専用チューブに脱イオンホルムアミド、GeneScan -500[ROX]size standard と Selective PCR 反応産物を混合した後、95℃で 2 分間熱変性し、直ちに氷中に置いた。これを自動シーケンサーにかけ、品種間の DNA 断片の有無を解析した。

4. 遺伝的距離の計算と品種間のグループの分け

a. 遺伝的距離の計算

自動シーケンサーで得られた各サンプル間の DNA 断片の有無を 0 (無) 1 (有) などのデジタルデータに変換した後、そのデジタルデータを基に、各品種間の遺伝的距離を計算した。遺伝的距離は Nei と Li の相似性の指数を使って計算した [9]。 $Similarity = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$ 、 N_{ab} は a と b 品種間に共通するフラグメント数であり、 N_a と N_b は、それぞれ a と b 品種の総フラグメント数である。

b. アワ品種間のグループの分け

自動シーケンサーで得られた各サンプルの DNA 断片を全部抽出して標準サンプルの DNA 断片として使用される。各サンプルの DNA 断片がその仮定の標準サンプルの DNA 断片と比較して、同じサイズの DNA フラグメントがあれば 1、なければ 0 で表現されるバンドの有無を 1/0 に変換したデジタルデータを基に、個体間の遺伝距離はユークリッド距離の計算法で計算した。ユークリッド距離のデータに基づき [10]、

StatPartner た変量分析ソフトを利用して、アワ品種間のグループに分けた。

【結果】

本研究で使用している EcoRI 側のプライマーは 8 種類、各プライマーの付加塩基配列は、AA, AC, AG, AT, TA, TC, TG, TT であり、 MseI 側のプライマーは 8 種類で、各プライマーの付加塩基配列は、CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC, CTG, CTT であり、合わせて 64 種類のプライマーセットがある。アワに対する適切なプライマーセットを明らかにするために、韓国品種 2 つ、日本の品種二風谷在来種、雪谷モチ、支那大粟の 3 つを用い、64 通りのプライマーセットで AFLP を行った。プライマーセットによるゲノム DNA の増幅状況と検出されるバンド数と多型バンド数を比べた。

64 種類のプライマーセット中で、検出したゲノム DNA の断片がよく増幅され、バンド数検出されたバンド数と多型バンドが多いプライマーセットの 10 セットを用い、実験用のサンプルを分析した。

自動シーケンサーで得られたデジタルデータを基に、各品種間の遺伝的距離を Nei と Li の相似性の指数を使って計算した。韓国の二つの品種は、日本の各品種と比較すると、遺伝距離の相似性の指数が日本の各品種間の遺伝距離の相似性の指数より遠いことが明らかにした。この結果によって、日本の品種間は、韓国の品種と比べて高い相似性があることが示唆された。更に、日本の品種の中で、岩手在来種と岩手系粳、軽米系と福島（飯豊系）、福岡と岩手系モチの遺伝距離は最も近いと、名前の異なる品種のゲノム DNA でも非常に相似することは示唆されました。

また、自動シーケンサーで得られた各サンプルの DNA 断片を全部抽出して標準サンプルの DNA 断片として使用される。個体間の遺伝距離はユークリッド距離の計算法で計算して、実験サンプルをグループに分けた。

韓国、中国、日本の 31 品種のアワはおおざっぱに 2 つのグループに分けられました。岩手県の品種はほとんど一つのグループに集中して、中国、韓国および北海道、名古屋の品種と離れていることがわかりました。これによって、岩手県産のものは外国産更に岩手県と離れている地域の国産品と区別できる可能性があることが示唆されました。また、その中に、同じく北海道で栽培する品種である雪谷（モチ）と二風谷在来種、中国品種 2 と中国品種 4、岩手県在来種と岩手系ウルチ、中国在来種と猫足の遺伝距離が近いので、それぞれの 2 つの品種は元々同じ品種から分化してきたことが考えられる。

引用文献

- 1) 西澤 直行：化学と生物，31：567，学会出版センター(1994)
- 2) Nishizawa, N., Oikawa, M. and Hareyama, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 54 : 229 (1990)
- 3) Nishizawa, N. and Fudamoto, Y. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 : 333 (1995)
- 4) Nishizawa N, Sato D, Ito Y, Nagasawa T, Hatakeyama Y, Choi MR, Choi YY,

- Wei YM. : *Biosci. Biotech. Biochem.* 66 : 92 (2002)
- 5) 西澤直行 : 大学から浄法寺への提言—中山間地の活性化戦術— : 72 (1999)
 - 6) Kohama K, Nagasawa T, Nishizawa N. : *Biosci Biotechnol Biochem.* 63:1921 (1999)
 - 7) Vos P., Hogers R., Bleeker M. Et al. : *Nucleic Acids Res.*, 23 : 4407 (1995)
 - 8) 村松正實編 : ラボマニュアル遺伝子工学 増補版 : 34, 丸善 (1990)
 - 9) Nei, M. and Li, W.-H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 5269 (1979)
 - 10) 長谷川 政美, 岸野 洋久 : 分子系統学, p39, 岩波書店 (1999)

ゲノムDNAの抽出

市販抽出キット (ISOPLANT)

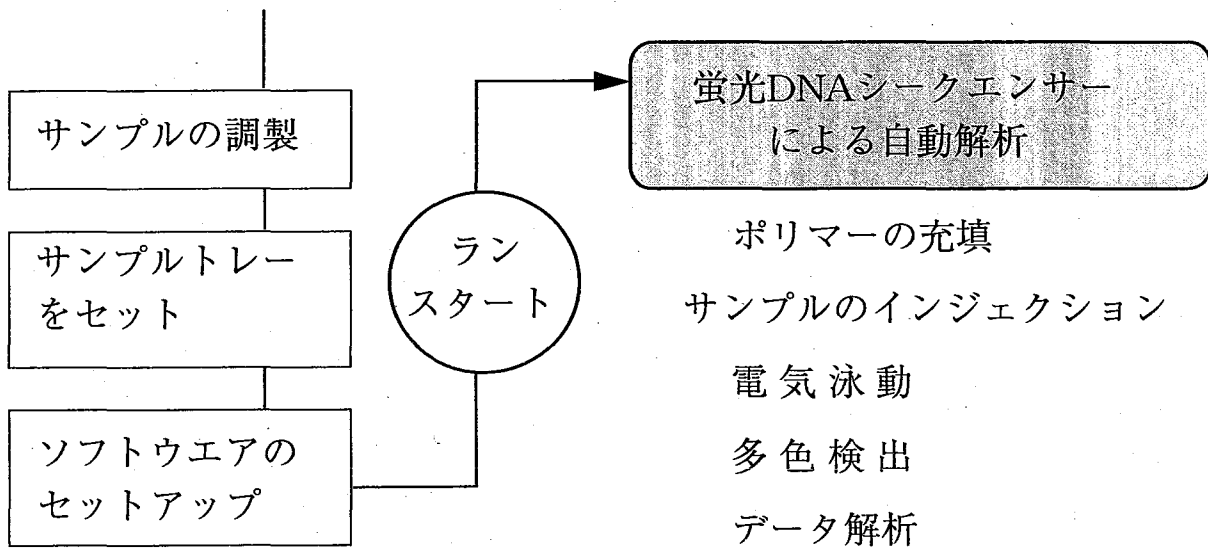
ABI Plant Mapping KitによるAFLP反応

ゲノムDNAテンプレートの調製
制限酵素・ライゲーション反応

PCR反応

Preselective PCR 反応
Selective PCR 反応

ABI DNAシーケンサーによる検出と解析



ABI GenotyperによるDNA多型表の作成

カテゴリの作成

DNA断片のスコアリング

多型バンドの有無(1/0)表の作成

ソフトウェアによる系統樹作成

図4-1 AFLP法による遺伝子多型分析の流れ

表4-1 実験で使用したアワ品種のリスト

番号	サンプル名	番号	サンプル名
1	岩手系モチ	16	中国品種6
2	岩手在来種	17	支那大粟
3	岩手系粳	18	中国在来種
4	韓国品種1	19	軽米 (かふ)
5	韓国品種2	20	軽米系粳
6	韓国品種3	21	軽米モチ
7	韓国品種4	22	軽米系
8	韓国品種5	23	雪谷モチ
9	韓国品種6	24	福岡
10	雑草 (大)	25	二風谷在来種
11	雑草 (小)	26	大野村
12	中国品種2	27	猫足
13	中国品種3	28	虎の尾
14	中国品種4	29	福島 (郡山系)
15	中国品種5	30	福島 (飯豊系)
		31	名古屋