

第 180 回必須アミノ酸研究協議会  
(平成 17 年度夏期シンポジウム)

平成 17 年度必須アミノ酸研究委員会  
夏期シンポジウム

「比較生物学的視点から見たアミノ酸・ペプチドの活用」

## 講演要旨集

世話人 長澤孝志(岩手大学農学部)

平成 17 年 8 月 29 日(月)13:00 ~ 16:30  
ホテル大観(盛岡市つなぎ温泉)

「比較生物学的視点から見たアミノ酸・ペプチドの活用」

- 13 : 00 挨拶  
西澤直行（岩手大学）
- 13 : 05 世話人挨拶  
長澤孝志（岩手大学）
- 13 : 10 シジミの低温処理によるオルニチンの生成と新規トリペプチド  
内沢秀光（青森県工業総合研究センター）
- 13 : 55 魚類のアミノ酸・ペプチド研究における最近の進歩  
竹内俊郎（東京海洋大学）
- 14 : 40 休憩
- 14 : 50 休眠する昆虫由来の特異的ペプチドの構造と機能  
鈴木幸一（岩手大学）
- 15 : 35 微生物によるアミノ酸生産と代謝研究の新展開  
臼田佳弘（味の素株式会社ライフサイエンス研究所）
- 16 : 10 総合討論  
（司会 長澤孝志）
- 16 : 30 閉会挨拶  
必須アミノ酸研究委員会委員長 清水 誠（東京大学）

## シジミの低温処理によるオルニチンの生成と新規トリペプチド

青森県工業総合研究センター 内沢秀光

季節変動や収穫後の砂抜き方法、貯蔵方法などの前処理の違いによるシジミ抽出液の成分変化を比較検討していたところ、オルニチン含量の少ない抽出液と多い抽出液があることに気がついた。文献を調べてみると、水産物の鮮度低下とオルニチン含量の増加に関する多くの報告が存在した<sup>1,2)</sup>。またオルニチンは微生物により産生されることが知られており、オルニチン発酵は産業的にも応用されている<sup>3)</sup>。これらのことから、シジミ抽出液のオルニチン含量が増加した理由は、シジミの鮮度が低下したことによる死後の自己消化や微生物の増殖によるものと考えられた。しかし、新鮮なシジミを用いても、収穫後の処理条件の違いによりオルニチン含量の異なる抽出液が得られたことから、鮮度以外の要因によることが明らかになった。そこで、シジミ収穫後の処理方法と抽出液のオルニチン含量を比較検討した結果、収穫後冷凍せずに抽出した場合はオルニチン含量が少なく、冷凍したシジミから得られた抽出液は高くなることを見出した<sup>4)</sup>。また、冷凍によりオルニチン含量は数倍に増加するが、それ以外のアミノ酸は -アラニンを除きほとんど変化せず、オルニチンに極めて特徴的な現象であった。同様の操作をホタテ、アサリおよびハマグリを用いて試みたが、オルニチン含量は変化せず、冷凍処理によるオルニチン含量の増加はシジミに特徴的であることが示唆された。

シジミの冷凍処理によりオルニチン含量が増加することから、オルニチンの生理機能に関する文献を検索したところ、興味深い報告があった。須田ら<sup>5)</sup>は、各種アミノ酸およびアミノ酸混合液を用いてマウスへの大量エタノール投与試験における効果を検討し、アラニンとオルニチンのモル比が4対1の組み合わせに著しい救命効果があることを報告している。シジミ抽出液に含まれる最も多い遊離アミノ酸はアラニンである。抽出液にはオルニチンも含まれているがその量は少ない。そこで、シジミを冷凍処理しオルニチン含量を増加させアラニンとオルニチンのモル比を4対1に調整した抽出液を用いて、須田らと同様にマウスへの大量エタノール投与試験における効果を検討した。その結果、オルニチン含量を増加させることでマウスの救命効果が高まることが明らかになった。

そこで、オルニチン含量を増加させるシジミ収穫後の処理条件をさらに検討した。シジミの処理温度を4 から-10 まで2 きざみに設定し、抽出液のオルニチン含量の変化を調べた結果、-2 では増えずに-4 で顕著に増加し、-6 以下よりも高くなることを見出した<sup>4)</sup>。また、-4 での処理においては24時間後にオルニチン含量は最大となった。さらに、-4 で16時間処理しオルニチン含量を増加させた後、5 あるいは15 にするとオルニチン含量は減少するが、再び-4 にするとオルニチン含量は増加した。このことから、環境温度によりオルニチン含量が変化し、オルニチン含量はシジミによって制御されている可能性が示唆された。

さらに、シジミ抽出液のオルニチン含量を増加させる方法を種々検討していた過程で、シジミ抽出液を加水分解するとオルニチンが生成することを見出した。この

ことは、加水分解処理によりオルニチンを生成する前駆物質が抽出液中に存在することを示している。オルニチンは一般にタンパク質を構成するアミノ酸ではないことから、オルニチン含有物質の構造に興味を持たれた。そこで、シジミ抽出液からオルニチン含有物質の分離精製を試み構造解析の結果、新規トリペプチド( $\beta$ -Ala-Orn-Orn)であることが明らかになった。さらに、シジミの低温処理によるトリペプチド含量の変化を検討した結果、オルニチン含量の増加とともにトリペプチド含量は減少することが分かった。このことから、シジミを低温処理するとトリペプチドが分解されてオルニチンが生成することが示唆された。

-4 処理によりオルニチン含量が増加すると、逆にトリペプチド含量が減少する。トリペプチドの生理機能については今後の課題であるが、オルニチンとトリペプチドのどちらの生理機能を優先するかにより、シジミを低温処理するかしないかを選択することになるであろう。今後の新商品開発に活かしていきたいと思う。

## 謝辞

本研究の一部は、経済産業省「平成 13 年度地域新生コンソーシアム研究開発事業」の補助を受け、財団法人 21 あおもり産業総合支援センターが管理法人、青森県産業技術開発センター（現工業総合研究センター）松江一総括研究管理監（現青森県立保健大学教授）が総括研究代表者となり、同センター、株式会社福島商店、および弘前大学との共同研究により行われた成果です。また本講演内容は、岩手大学大学院連合農学研究科小野伴忠教授の指導により博士論文<sup>6)</sup>としてまとめられたものが基となっています。心から感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) M. Matsumoto and H. Yamanaka, Changes in Contents of Glycolytic Metabolites and Free Amino Acids in the Muscle of Kuruma Prawn during Storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(9), 1515-1520 (1990).
- 2) Y. Otsuka, S. Tanaka, K. Nishigaki and M. Miyagawa, Changes in Contents of Arginine, Ornithine, and Urea in the Marine Invertebrates stored in Ice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**(6), 863-866 (1992).
- 3) 好田肇: アルギニン, シトルリン, オルニチン発酵. 発酵と工業, **40**(6), 541-551 (1982).
- 4) H. Uchisawa, A. Sato, J. Ichita, H. Matsue, and T. Ono, Influence of Low-temperature Processing of the Brackish-water Bivalve, *Corbicula japonica*, on the Ornithine Content of Its Extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(6), 1228-1234 (2004).
- 5) 須田都三男、文豊、堀口正晴: 急性アルコール負荷時のアラニン・オルニチン投与作用. *Pharma Medica*, **5**(8), 75-80 (1987).
- 6) 内沢秀光: 貝類の凍結処理による成分変化とその利用に関する研究 (2005).

## 魚類のアミノ酸・ペプチド研究における最近の進歩

東京海洋大学 竹内俊郎

魚類は淡水魚、汽水魚、海水魚、あるいは冷水性、温水性、熱帯性と生息水域の違いにより別けられるとともに、食性の違いにより肉（魚）食性、雑食性、草（微細藻類）食性に別けられ、配合飼料で生産される養殖魚は 10 数種類に達する。

これまで、魚類の栄養要求はまず冷水性淡水魚であるニジマスの研究が 1950 年代から精力的に進められ、その後、温水性淡水魚のコイやウナギ、そして温水性海水魚であるマダイ、ブリへと移り、現在に至っている。魚類の栄養要求における研究では、主に数 g から数 10 g の稚魚と呼ばれるサイズの魚が研究されてきた。魚類におけるこれまで 50 年間の研究により、特徴的なことは、1) 魚類は一般的に炭水化物を利用しにくく、エネルギー源としてはタンパク質と脂質を利用しやすいように体内での代謝が行われること、2) 淡水魚と海水魚により脂肪酸代謝が異なり、淡水魚はリノール酸やリノレン酸を必須脂肪酸とするが、海水魚では不飽和化酵素の欠損により、(E)イコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸(DHA)を必須脂肪酸とすること、3) 無胃魚のコイなどは有胃魚と異なり、第 3 リン酸カルシウムを利用しにくいことから、結果として配合飼料中の主成分である魚粉中のリンを利用しにくいこと、などが挙げられる。この様な中、生息水域や食性の違いにかかわらず必須アミノ酸の種類は 10 種類( Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val )であり、各アミノ酸の要求量に大きな違いはないとされてきた。

しかし、最近になり、海水魚の一部でタウリンが必要であり、特に仔稚魚期（魚の赤ちゃん時代）には必須である可能性が示唆されるに至った。一方、海水魚の仔稚魚期の餌としては生物餌料（ワムシやアルテミア）が使用されているが、微粒子配合飼料のタンパク質源として、ペプチドが用いられ効果を挙げている。さらに、ウナギのふ化幼生であるレプトケファルスの餌として、サメ卵に大豆ペプチドやオキアミ抽出物を用いることによりシラスウナギにまで飼育できたことは最近のトピックスである。これら仔稚魚期は哺乳動物で言えば未熟児の状態であり、近年の研究により、タウリンを始め、ペプチド、DHA、リン脂質、カルニチン、など乳児用粉ミルクに添加されている栄養素と同様のものを要求することがわかってきた。

本シンポジウムでは、魚類におけるタウリン要求の特長、特に代謝や行動に及ぼす影響について紹介するとともに、いまだ開発途上である微粒子飼料へのペプチドの有効性について述べることにする。

# 休眠する昆虫由来の特異的ペプチドの構造と機能

岩手大学農学部 鈴木幸一

## 1. 昆虫テクノロジー分野

小型動物のショウジョウバエやセンチュウを実験素材として、長寿や記憶、そして抗認知症の分子機構の研究が展開されている。これらの研究の特性は、ゲノム情報利用、トランスジェニック個体の作出、そして豊富な突然変異体の活用で裏打ちされている。

一方、昆虫関連生産物を加工して直接そのアミノ酸やペプチドを機能性食品として利用している分野もある。フィブロインタンパク質の加水分解によるアミノ酸、ペプチドもこの範疇に入る。この例は昆虫テクノロジーのひとつであり、生物界で最も豊富な種を有している昆虫に期待されている新しい展開である(鈴木、2005)。

## 2. 休眠する昆虫への期待

休眠現象は微生物・植物から哺乳類の多くの生物種で認められ環境変動への適応的現象であるが、同時に特異的な遺伝子の発現や代謝産物が期待される。例えば、休眠越冬する生物には多価アルコールの存在以外に、アラニンやプロリンの普遍的な大量蓄積が認められる。この休眠している昆虫を素材として、わが国原産の天蚕(ヤママユ)からペントペプチドと、除草昆虫のコガタリハムシから41個のアミノ酸で構成されるコノトキシン様ペプチドを単離することができた。これらの新規のペプチドには、休眠中の生体内でこれまで報告されていない機能が期待できる。

## 3. 細胞増殖抑制ならびにカルシウムチャンネルブロッカー機能

ラット肝がん細胞を利用し昆虫由来のペントペプチドを合成してその影響を解析した。その結果、細胞増殖抑制効果が確認され、しかもアポトーシス誘導ではなくG1/G0期を増加することから細胞休止機能があると推定した(Yang et al., 2004)。

コノトキシン様ペプチドにはN型電位依存性のカルシウムチャンネルブロッカー機能があり、さらにヒトの白癬菌属 *Trichophyton rubrum* に対し孢子発芽抑制を示した(Tanaka et al., 2003)。

## 4. 文献

鈴木幸一(分担): 昆虫テクノロジー研究とその産業利用、シーエムシー出版、3(2005)。

Tanaka, H. et al.: Peptides 24, 1327 (2003)。

Yang, P. et al.: J. Insect Biotech. and Seric. 73, 7 (2004)。

## 微生物によるアミノ酸生産と代謝研究の新展開

味の素株式会社 ライフサイエンス研究所 臼田佳弘

微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いた MSG (monosodium glutamate) 発酵の成功以来、多くのアミノ酸の工業生産が微生物を用いた発酵法によって行なわれてきた。アミノ酸生産のための微生物の育種は、従来、遺伝学的手段を用いて微生物の代謝調節機構に関わる各種変異株をつくり出すことが主流であったが、1980年代からは、遺伝子組み換え技術を含めたバイオテクノロジー技術も次々に開発され、活用されてきた。近年では、ゲノム解析技術とそれに伴うポストゲノム解析技術の進展により、著しい技術的進展を見せている。現在では、多数のアミノ酸が、*C. glutamicum* や *Escherichia coli* といった微生物を用いた発酵法により工業生産されている。MSG の全世界での生産量は年間 160 万トンを超え、食添用、飼料用、医薬用等の多様な用途に利用される D,L-Met は 50 万トン、飼料用が主な用途である L-Lys は 70 万トンに達していると推定される。アミノ酸発酵及び代謝研究の新たな展開として、L-Met の発酵生産に向けた取り組みとメタノールを原料とする Lys 発酵生産への取り組みを紹介したい。

D,L-Met は合成法により生産され、L-Met は主にアセチル化した D,L-Met を酵素分割することにより製造されている。微生物を用いた発酵法では、L-Met を直接生産することが可能と考えられるが、その工業的なプロセスは未だ開発されていない。*E. coli* はモデル生物として多くの生化学的、遺伝学的知見が豊富で、1997年にゲノム配列が決定されている。これらの知見を生かし、Met 生合成経路遺伝子の発現を抑制する Met リプレッサー遺伝子の欠損化、Thr 生合成経路の遮断、Met 分解経路弱体化と Met 生合成経路の鍵酵素の Met によるフィードバック阻害の解除を行なった結果、培地中に Met を排出する株を得た。

現在発酵法によるアミノ酸生産は糖質系原料が主流であるが、将来的に渡って安定的に利用できる原料とも限らない。メタノールは比較的安価で豊富に存在する C1 化合物の一つであり、微生物にはメタノールをエネルギー源として生育できる菌株が多く知られている。この中で、*Methylophilus methylotrophus* は、安全性が高く生育速度も高い菌株である。本株のゲノム解析を行い、C1 資化経路を始めとして全アミノ酸の代謝経路を予測したところ、本菌株は、リブローズモノリン酸経路に加えて合計 4 つのホルムアルデヒド資化経路を有していることが推定された。重要な C1 資化酵素である Hexulose phosphate synthase をコードすると推定される *hps* 遺伝子は 2 種類存在し、膜貫通ドメインと予想される領域を 2 つ持つ従来にない新しいタイプの *hps* 遺伝子である可能性が示唆された。また、本菌株に Lys によるフィードバック阻害が解除された *E. coli* Lys 生合成経路鍵酵素 (*dapA*\*) を導入・発現させ、さらに *C. glutamicum* の Lys 排出担体遺伝子の変異型遺伝子 (*lysE24*) を導

入することで、メタノールから生成した Lys を菌体外に排出することに成功した。