

毒性試験を、また FK-23 抽出物については急性、亜急性および慢性毒性試験、並びに変異原性試験を行った。その結果、いずれの試験においても FK-23 標品、FK-23 抽出物のいずれにも明らかな毒性は認められなかった。

臨床試験

試験の主旨、考えられる作用および副作用を十分に説明し、同意を得たスギ花粉症患者を対象に試験を行った。試験群患者には、スギ花粉が飛散する前から、FK-23 抽出物 1 日量 1.0g を 28 日間経口摂取させ、鼻および眼の症状、並びに抗アレルギー薬の使用量を指標として、対照群患者と比較検討した。その結果、試験群では鼻の

症状、特に鼻閉が緩和され、治療薬の使用量が減少した。また、本態性高血圧症患者を対象とした試験において、FK-23 抽出物が明らかな血圧低下作用を示すことも報告している。

結論

ヒト由来乳酸菌 *E. faecalis* FK-23 標品、特に FK-23 抽出物は、高血圧および I 型アレルギーのモデル実験系、並びに患者において、それぞれ血圧低下作用、並びに I 型アレルギー抑制作用を示すことが検証され、その安全性の確認と相まって、機能性食品としての有用性が示唆された。

氏名	河津 哲
学位記番号	生博 乙第 21 号
学位記授与の日付け	平成 13 年 7 月 18 日
学位論文題目	植物バイオマスを有効利用するための分子育種学的研究
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・神山 康夫 助教授・粟冠 和郎 助教授・木村 哲哉 奈良先端科学技術大学院大学 教授・新名 惇彦

要 旨

本論文は、再生産可能な植物バイオマスを有効に利用することを目的として行った分子育種学的研究をまとめたものである。概要は以下のとおりである。

(1) *Bacillus polymyxa* 由来 β -amylase 遺伝子の解析

デンプン分解酵素の β -amylase 遺伝子を、細菌 *Bacillus polymyxa* からクローニングし、その遺伝子構造を明らかにした。大腸菌にクローニングできた 4.8kb の DNA 断片からは、3 種の多型 ss-amylase が生産され、そのうちの 70kDa の β -amylase 遺伝子をコードする 3.1kb の DNA 断片の塩基配列を決定した。この遺伝子領域には終始コドンを見いだすことはできなかったが、2,808bp からなる一つの遺伝子読枠があり、N 末端に 33 あるいは 35 アミノ酸残基からなる分泌シグナルを含む 936 アミノ酸残基からなる β -amylase 遺伝子の構造が明らかになった。元菌である *Bacillus polymyxa* を chymostatin の存在下でプロテアーゼを阻害して培養した結果、約 160kDa の巨大な β -amylase が生産され、多型 β -amylase はプロテアーゼの加水分解によって生産されることが示唆された。

(2) セルラーゼ遺伝子発現によるセルロースバイオマスの利用

セルロースバイオマスを有効利用する酵素としてルーメン細菌 *Ruminococcus albus* が生産する endo-1,4-ss-glucanase (EgI) を用いた。この EgI はエンド型のセルラーゼ活性に加えて、 β -xylosidase 活性も持つ植物細胞壁分解酵素であることが判明している。この EgI 遺伝子の分泌配列と成熟蛋白質の N 末端より 15 アミノ酸に相当する遺伝子領域を欠失させた改良遺伝子 (t-EgI 遺伝子) をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御によってタバコ培養細胞で発現させたところ、形質転換細胞は内在性セルラーゼの約 30 倍の強い活性を示した。そのセルラーゼ活性の 95% は細胞質内に存在したためか、形質転換したタバコ培養細胞の生育にはほとんど影響しなかった。得られた形質転換タバコは細胞質内に可溶性蛋白質の 0.1~0.5% に相当する量の t-EgI を蓄積していたが、形態も、生育も正常であった。さらに、形質転換タバコ細胞を破碎すると t-EgI は、タバコの細胞壁成分を基質として分解反応を行った。従って、t-EgI 遺伝子を発現している植物体は“セルラーゼをカ

プセル化した植物”として畜産業や食品加工業への応用が期待できる。

(3) ユーカリ属植物の形質転換技術の開発

植物を利用した物質生産は、太陽エネルギーを利用して省労力、低コストな合理的生産方法である。特にユーカリ属植物は成長性が早く、環境適応性があり、木材やパルプ生産に適しているので世界各地で植林がされている。バイオマスの生産性を高めるために、生物種を越えた遺伝子の導入を可能にする形質転換システムの開発を、パルプ原料木であるユーカリ属植物 (*Eucalyptus camaldulensis*) に対して、苗条原基の形成を経由する再分化系を用いて行った。さらに、形質転換効率を高めるために茎頂組織から組織培養で誘導した早生分枝が *Agrobacterium* 感染に適した組織であることを見出した。また、早生分枝を遮光条件のもと α -naphthaleneacetic acid を添加した前培養を行った後に *Agrobacterium* 感染することによ

り、形質転換効率が向上できることも明らかにした。最終的に形質転換に優れたクローン CPT1 を選抜することによって、約6ヶ月の期間で早生分枝2.6組織に1植物体の頻度で形質転換ユーカリを得ることができる効率の良い形質転換系を完成した。

(4) 形質転換ユーカリの製紙産業への応用

事業植林に利用されているユーカリ樹種 *E. camaldulensis* からモノリグノール合成の最終酵素である cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) 遺伝子を PCR 法で単離し、そのアンチセンス遺伝子を *E. camaldulensis* に導入し、CAD 活性が抑制された形質転換ユーカリ (樹幹下部における CAD 活性がコントロールの 5.4–56.4%) を得た。CAD 活性の抑制程度の高い形質転換体では木部表面に赤褐色の着色が見られ、アルデヒド基の蓄積等によるリグニン構造の変化が観察され、蒸解工程におけるエネルギーコストの低減が示唆された。

氏名	山下 政統
学位記番号	生博 乙第 22 号
学位記授与の日付け	平成 13 年 7 月 18 日
学位論文題目	酵素分解大豆ゾリン脂質の工業化および澱粉食品への応用に関する研究
論文審査委員	主査 教授・久松 眞 教授・小宮 孝志 教授・古市 幸生 中部大学 教授・谷口 肇

要 旨

天然の乳化剤である大豆リン脂質をホスホリパーゼで加水分解して得られる大豆リゾリン脂質は、親水性の食品用乳化剤として優れた特性をもち、澱粉食品の品質改良剤となり得ることが示唆されていた。しかし、これまでの大豆リゾリン脂質は分解率が低いものであったために、食品への応用範囲は大豆リン脂質と同様に限られたものであった。そこで、高分解率の大豆リゾリン脂質を工業的に製造し、幅広い食品への利用を目的として、まず分解率を高めた大豆リゾリン脂質を調製する酵素分解反応を検討した。高分解率の大豆リゾリン脂質を工業レベルで製造することに成功した結果、これまで研究がなされていなかった大豆リゾリン脂質の界面活性能などの溶液物性、澱粉複合体形成能、澱粉に対する作用について基礎研究が可能となった。

第1編では、まずホスホリパーゼA₂を用いた大豆リン脂質の加水分解反応において、HPLC分析法によるその分解測定方法を確立した。その結果この分解反応は緩衝液、pH、温度、時間、カルシウム濃度に大きく影響を受けることが明らかになった。この結果により、高分解率の酵素分解大豆リゾリン脂質を工業的に製造するための条件設定が可能となった。また、このHPLC法は従来の分析法に比べて簡便でしかも再現性の高い定量法であることから、大豆リゾリン脂質の製造工程管理に大いに貢献した。

第2編では、種々の分解率をもつ酵素分解大豆リゾリン脂質を調製し、その界面活性能と各種水溶液中における透過率などを検討した。その結果、大豆リゾリン脂質は各種水溶液中でミセルを形成すること、またその表面張力および界面張力は分解率の増加とともに低下すること