The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

3S-Fp05 泡盛の熟成および仕次ぎの科学的考察

○塚原 正俊[1], 當間 士紋[1], 城間 力[1], 伊波 朋哉[1], 大城 彩音[1], 鼠尾 まい子[1], 外山 博英[2]
（[1]バイオジェット，[2]琉球大・農・亜熱生資）
tsuka@biojet.jp

泡盛は、国内の伝統的酒類では唯一熟成により香味豊かな「古酒（クース）」が生成されるという特徴を有する。その古酒は、芳醇でまろやかな味と香りの「古酒香」を有し、市場においても付加価値の高い泡盛として評価されている。また、沖縄県内の家庭では、子供の生誕時あるいは家の新築時に「甕」に入った泡盛を購入あるいは贈呈し、子供が成人したお祝いなどで振る舞われるなど、泡盛および熟成そのものが生活に定着し生きた沖縄の伝統文化として受け継がれている。

さらに、泡盛特有な熟成方法に「仕次ぎ」がある。仕次ぎは、異なる熟成期間の泡盛を保持し一定期間ごとに一部を連続的に継ぎ足す、という熟成方法であり、古酒の風味維持および付加価値上昇に寄与することが伝承的に伝えられてきた。また、この仕次ぎと類似した熟成技術は、世界の酒類の中でも泡盛とシェリー酒に限られ「仕次ぎ」そのものが、琉球王朝時代からの貴重な伝統文化的技術であると言える。

泡盛の熟成は、泡盛文化や醸造技術、新たな付加価値につながることから、産業界から応用研究を強く要望されている。

一方、熟成および仕次ぎの研究は、1）経年変化を追跡する必要があるため多大な労力を要する、2）熟成させる原酒の品質に左右される要素も大きくこのコントロールが容易ではない、3）数年の熟成の間に担当者や測定機器の更新が想定されるため厳密な比較解析が容易ではない、など多くの課題を有している。

熟成に関する研究成果としては、その時点で市販されている複数の一般酒（新酒）と古酒を解析し、統計解析を行うことで、古酒の特性を明らかにした例が挙げられる。これらの検討から、一群の古酒香成分（候補）が明らかになっている。一方、古酒香に対する寄与度や熟成における変化、熟成条件の関与などは明らかでない。また、仕次ぎに関しては、その科学的評価は皆無で、泡盛研究の大きな課題である。

我々は、これまでに古酒香成分の中で、1）生成機序が明らかになっている、2）古酒香への寄与度が十分高い、3）消費者アピールしやすい香気成分である「バニリン」に注目し、これを対象とした熟成の評価に関する研究開発を行い、下記の成果を得ている。

1. 酵母の選抜によりバニリンの前駆体「4-ビニルグアヤコール（4-VG）」を高めることができる

自然界から複数のフェルラ酸 /4-VG 変換活性を有する新規酵母を単離し、その中から泡盛醸造に適している菌株を選抜した。本酵母を用いて、4-VG を従来の約 10 倍含む泡盛醸造に成功し、熟成によりバニリンも約 10 倍になることを確認した。現在、同様の手法を用いた泡盛が、2 酒造所 4 銘柄販売されている。

2. バニリンの前駆体「4-VG」は熟成条件により変換速度、変換効率が変わる

新たに、蒸留方法、温度、保存容器、ヘッドスペースが異なる条件で熟成試験を行うことで、これらのうちの一部の条件で 4-VG からバニリンへの変換速度、および変換効率が変わることが分かった。このことから、熟成条件の重要性が明らかとなった。

3. 仕次ぎを行うことでバニリン濃度が上昇する

バニリンを指標とし短期間での評価が可能な「仕次ぎモデル」を構築することで、仕次ぎがバニリン濃度上昇に寄与することがわかった。本成果は、琉球王朝時代から経験的に伝えられてきた「仕次ぎ」文化の一端を科学的に解明した最初の例である。

以上の成果は、熟成による泡盛の高付加価値化に応用しうる、非常に重要な基盤情報であり、今後の泡盛の産業振興への応用が期待できる。

Scientific consideration of aging Awamori

○Masatoshi Tsukahara[1], Simon Toma[1], Riki Shiroma[1], Tomoya Iha[1], Ayane Oshiro[1], Maiko Nezuo[1], Hirohide Toyama[2]
([1]BioJet Co Ltd., [2]Dept. Biosci. Biotechnol., Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

Key words Awamori, aging, Vanillin, flavor

3P-001 ADLib システムを利用した抗体遺伝子迅速改変技術による抗体エンジニアリング

○橋本 講司 , 黒澤 恒平 , 村山 晃歩 , 太田 邦史
（東大院・総合文化）
kohta@bio.c.u-tokyo.ac.jp

単一の抗体産生細胞から得られるモノクローナル抗体は、抗原認識能などの性質が均一で無限に生産可能であるため、医薬品や診断薬に利用される機会が増えている。

モノクローナル抗体の作製方法としてはハイブリドーマ法が有名であるが、作製に長期間を要する (約 3 か月) など課題も多い。所属研究室ではモノクローナル抗体を 1~2 週間で作製する技術を開発した (ADLib システム)。ADLib システムでは、ニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞をトリコスタチン A(TSA) という薬剤で処理し、抗体遺伝子可変領域の多様化を促進する。そして、互いに異なる抗体遺伝子を持つ細胞集団を抗体ライブラリーとして利用し、モノクローナル抗体産生細胞を樹立する。ADLib システムは迅速性だけでなく、*in vitro*作製系ゆえ免疫寛容などの制約を受けない点が特長である。そのため、脂質など多様な抗原に対する抗体が作製可能である。

最近我々のグループは、抗体遺伝子の一部 (Fc 領域) をヒト型に改変した DT40 細胞を樹立し、ADLib システムで直接ヒトキメラ抗体を獲得することに成功した。しかしながら、細胞株の樹立に多大な労力と時間を要することが課題だった。そこで最近、Cre-loxP システムを抗体遺伝子に導入し、抗体 Fc 領域を迅速かつ容易に改変できるシステムを開発した (Cre-In システム)。Cre-In システムによって、遺伝子導入後約 4 日間でほぼ確実に抗体 Fc 領域を改変した細胞株を構築することが可能になった (陽性率 >98%)。

本発表では、Cre-In システムの概要と、本システムを用いた抗体エンジニアリングの種々の応用例を示す。

Rapid antibody engineering in ADLib system

○Koji Hashimoto, Kohei Kurosawa, Akiho Murayama, Kunihiro Ohta
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words antibody, ADLib, DT40, genome engineering

3P-002 B 細胞抗原レセプター依存性アポトーシスの制御によるニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いた高親和性抗体の作製

○古賀 舞 , 池田 美香 , 小嶋 宏侑 , 川上 夏奈江 , 渡邊 康二 , 徳光 浩 , 曲 正樹 , 大森 斉 , 金山 直樹
（岡山大院・自・化学生命）
nkanayam@okayama-u.ac.jp

当研究室では抗体遺伝子への変異導入を任意に ON/OFF 可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、in vitro 抗体作製システムを構築してきた。本システムでは、抗体ライブラリーを作製して任意の抗体を取得できるほか、既存の抗体遺伝子を DT40-SW に導入してその変異能力によって親和性成熟させることが可能である。一方、目的の抗原に対する抗体を発現する細胞を取得する際、細胞表面の抗体 (B 細胞抗原レセプター；BCR) が強く架橋されると目的細胞の増殖が抑制されることが懸念される。B 細胞増殖因子 BAFF を増殖培地へ添加することにより、BCR の抗原架橋による DT40 細胞の増殖抑制を回避できることを第 63 回大会で報告した。本発表では、抗アポトーシス因子 Bcl-2 の過剰発現が、BCR が抗原により強く架橋された場合の増殖抑制を解除する方法として有効であることを報告する。DT40-SW ライブラリーから取得したハプテン NP に特異的なクローンは、より高い親和性を示す NIP を固層に固定して反応させると増殖抑制が示した。一方、この細胞株に Bcl-2 遺伝子発現ベクターを導入した安定形質転換体では、BCR 架橋依存的な増殖抑制は BAFF を添加した場合と同様に解除された。この方法は、高親和性クローンの取得への応用が可能であると考えられ、現在、外来の抗体遺伝子を導入した DT40-SW 細胞株を用いて、任意の目的抗体の親和性成熟における有効性について検討中である。

High-affinity antibody generation using the chicken B cell line DT40-SW by regulating B cell receptor-mediated apoptosis.

○Mai Koga, Mika Ikeda, Hiroyuki Kojima, Kanae Kawakami, Koji Watanabe, Hiroshi Tokumitsu, Masaki Magari, Hitoshi Ohmori, Naoki Kanayama
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Sci. Tech., Okayama Univ.)

Key words DT40 cells, antibody, affinity maturation, apoptosis

NII-Electronic Library Service