

を発揮するのに必要な最小処理濃度を見積もるための貫通試験を行なっている。貫通試験は社団法人日本木材保存協会第13号に準拠している。その結果、デカン酸濃度が初期濃度の50%からその1/5となった10%でも、その防蟻効力は規格を十分上まわることを明白にしている。

さらに本製剤の防蟻効力持続期間を見積もるために、床下土壌上と28℃恒温室内における製剤中のデカン酸の消失速度を測定している。その結果、3年後のデカン酸の残存率は京都床下土壌上で93%、28℃恒温室内で62%であることを明らかにしている。この残存率の値を用いて6年後の製剤中のデカン酸含有量をシュミレーションしている。それによると京都床下では初期の50%から46.2%、28℃恒温室内では19.4%に減少すると見積もっている。これらの値はいずれも必要最小処理濃度10%を大きく上まわっているので、使用規定通りに適正処理を行なえば、少なくとも6年間、有効性100%の防蟻効力を本製剤は持続すると推測している。

以上のように、本論文は天然物を利用した環境保全型防蟻剤の開発を目指して、種々の天然物の防蟻効力を検討し、デカン酸を主成分とする安全性が高く効力持続期間の長い環境保全型防蟻剤を創製している。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成17年2月22日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏 名	岩 井 和 也
学位の種類	博 士（農学）
学位記番号	農 第 8 7 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	コーヒー豆の機能性食品素材としての利用に関する研究
論文審査委員（主 査）	教授 藤 田 藤 樹 夫
	（副主査） 教授 駒 井 功 一 郎
	（副主査） 教授 田 中 裕 美

論文内容の要旨

コーヒー飲料製造工場から排出されるコーヒー抽出残渣には、マンナンやアラビノガラクトサンなどのヘミセルロースが40~50% (乾燥重量) 含まれており、この残渣を酵素分解して得たオリゴ糖を有望な素材資源として利用することに着目した。本研究ではまず、コーヒー豆由来のアラビノガラクトサン分解微生物をスクリーニングし、分離株 *Aspergillus fumigatus* No.232 株の菌が生産するガラクタナーゼを精製してその酵素の化学的諸性質を明らかにすると共に、本酵素をアラビノガラクトサンに作用させて得られた生成物の機能性も評価した。

一方、コーヒー豆の形を崩した欠け豆や未熟豆など等級規格外のコーヒー豆は不良品として最終製品にはならず、有効利用されていないのが現状である。そこで、これら規格外の豆の機能性食品素材としての利用方法を考え、含有するクロロゲン酸類にも注目し、コーヒー生豆からクロロゲン酸異性体の単離方法を確立し、単離したクロロゲン酸異性体の生理活性を *in vitro* で比較した。

さらに、クロロゲン酸を原材料に新たな生理機能を持つ物質へ酵素変換する方法を確立し、得られた生成物の機能性についても検討した。

I. アラビノガラクトサン分解酵素の精製と諸性質

Aspergillus fumigatus No.232 株が培養液上清に生産した酵素を精製し本酵素の比活性値、分子量、pH、最大活性、酵素活性阻害などの諸性質を検討し、また、カラマツ由来のアラビノガラクトサンを基質としたときの本酵素はコーヒー由来のアラビノガラクトサンに高い特異性をもつことを明らかにした。

本酵素を用いてアラビノガラクトサンを分解し、得られた β -D-ガラクトピオースの腸内細菌による資化性を調べ、*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属の腸内有用菌の増殖を促進したことから、ヒト腸内フローラを改善できることを示唆した。

II. コーヒー豆に含まれるクロロゲン酸類の精製と機能性

ロブスタ種のコーヒー生豆 (Indonesia) をエタノール抽出して、7種類のクロロゲン酸類を単離した。これらクロロゲン酸類は、コーヒー果実の成熟に伴い CQA 類は未熟果 (青緑色) から過熟果 (黒色) まで徐々に増加していく傾向にあったが、diCQA (ジカフェオイルキナ酸) 類は含量に変化は見られず、また品種や産地の違いによるクロロゲン酸類の含量では Indonesia 産のロブスタ種が最も多く含有していた。得られたクロロゲン酸類の生理活性を *in vitro* で測定した。ジカフェオイルキナ酸 (diCQA) は、 α -tocopherol、ascorbic acid よりも高い DPPH ラジカル消去活性を示し、スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性も、diCQA は CQA の2倍、5-FQA の4倍の活性を示した。また、diCQA は、arbutin や ascorbic acid、クロロゲン酸よりも2.0~2.2倍強いチロシナーゼ阻害活性を示し、さらに diCQA は芳香族アミンや複素環アミンに対して CQA より2倍高い抗変異原活性を示した。これらの結果は、クロロゲン酸類のカフェオイル基とその数、C7位の二重結合がさまざまな生理活性の発現に関わっている

ことを示唆した。

またクロロゲン酸類は細胞毒性試験から、U937細胞 (ヒト組織球性リンパ腫由来)、KB細胞 (ヒト鼻咽頭ガン由来)、WI-3813 sub 2 RA細胞 (肺繊維芽細胞由来)、MCF-7細胞 (ヒト乳ガン由来) の増殖を抑制し、U937細胞ではアポトーシスが観察された。とくに KB細胞の増殖を強く抑制したことから、クロロゲン酸類を強化したコーヒー飲料には咽頭ガンの予防効果が期待できると考えている。

III. クロロゲン酸とリパーゼを用いた桂皮酸誘導体の酵素合成と生理活性

まず、クロロゲン酸加水分解酵素 (CQA esterase) はクロロゲン酸をカフェ酸とキナ酸に加水分解する酵素で、すでに *Aspergillus niger* と *A. japonicus* の培養液から精製されている。一方、2-Caffeic acid phenethyl ester (2-CAPE) はプロポリスの活性成分として単離され、抗酸化や抗菌、抗炎症、腫瘍細胞増殖抑制効果など多様な生理活性をもつことが明らかにされている。

CQA esterase はクロロゲン酸と 2-Phenethyl alcohol (2-PA) から 2-CAPE に変換し、さらにカフェ酸と 2-PA を基質として酵素反応させても 2-CAPE が生成したこと、2-PA を 2-Phenethyl bromide に代えても 2-CAPE が生成したことから、本酵素は加水分解反応以外にエステル置換反応と縮合反応、臭素置換反応も触媒できる多機能酵素であることを明らかにした。また、2-PA の代わりに 1-PA を基質に用いて CQA esterase を作用させると、(S)-1-CAPE (e.e.50%) が生成したことから、本酵素は光学特異性も有することを明らかにした。

本酵素を用いた 2-CAPE への最適変換条件は、クロロゲン酸と 2-PA を基質としたエステル置換反応でモル変換率 50%であった。この反応は水が共存する条件下で、加水分解反応と並行してエステル置換反応が高い収率で進行するところが特徴的である。

得られた 1-CAPE と 2-CAPE には、紫外線吸収や抗酸化、抗菌、抗ガン活性の他にインフルエンザウイルス増殖阻止活性が確認された。とくに 1-CAPE は 2.5ppm で A 型ウイルス 92% と B 型ウイルス 95% の増殖を阻害し、有望な抗インフルエンザ剤として期待できる。また、これらの物質はウイルス感染細胞内でのウイルス複製を阻害していることを明らかにした。

次に diCQA はクロロゲン酸より高い生理活性を示したが、コーヒー生豆中の含量が少ない。そこで、クロロゲン酸と Vinyl caffeate を基質として diCQA へ酵素変換することを考えた。まず市販の Vinyl cinnamate (VCi) とクロロゲン酸から Cinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) に変換できる酵素の探索と最適変換条件を検討した。

そこで、市販リパーゼ 21 種類をスクリーニングした結果、リパーゼ AL のみが CCQA へ変換できることを見いだした。

しかしながら得られた CCQA の抗酸化活性はクロロゲン酸と同程度で、diCQA ほど高くなかったことから、抗酸化活性の発現にはジヒドロキシ構造が重要であり、また Vinyl caffeate とクロロゲン酸から diCQA に変換できる酵素

論文審査結果の要旨

生産菌を広くスクリーニングすれば、目的の酵素を見いだすことができると確信している。このことは未利用コーヒー豆から調製した diCQA とクロロゲン酸を酵素変換して得られた 2-CAPE は、ともに高い生理活性をもっていた。とくに 2-CAPE は正常細胞に対する毒性が低く抗ガン、抗ウイルス活性など特徴ある活性をもっており、今後 in vivo での実験を経て製品への応用開発が期待できる。

以上、上記一連の結果から、本研究ではコーヒー豆に含まれる未利用資源であるアラビノガラクトンとクロロゲン酸類に注目し、その機能性を解明して、コーヒー抽出残渣や等級外コーヒー豆が資源として有効利用できることを明らかにしただけでなく、通常飲用されているコーヒー抽出液が多様な健康増進機能を有することを証明する手掛かりを提供したといえる。

さらに、クロロゲン酸類を原材料として、多様な機能性を有する物質に酵素変換できることを明らかにした。このことから本研究はコーヒー豆の機能性食品素材としての利用に道を開くものである。

コーヒー豆の形を崩した欠け豆や未熟豆など等級規格外のコーヒー豆は不良品として最終製品にはならず、有効利用されていないのが現状である。そこで、これら規格外の豆の機能性食品素材としての利用方法を考え、含有するクロロゲン酸類に注目し、コーヒー生豆からクロロゲン酸異性体の単離方法を確立し、単離したクロロゲン酸異性体の生理活性を in vitro で比較している。

さらに、クロロゲン酸を原材料に新たな生理機能を持つ物質へ酵素変換する方法を確立し、得られた生成物の機能性についても検討している。

第1章は生豆由来のアラビノガラクトンを分解できる微生物を探索し、*Aspergillus fumigatus* No.232 培養液から酵素を精製し本酵素の諸性質を検討し、また、カラマツ由来のアラビノガラクトンを基質としたときの本酵素はコーヒー由来のアラビノガラクトンに高い特異性をもつことを明らかにした。

本酵素を用いてアラビノガラクトンを分解し、得られた β -(1 \rightarrow 6)-D-ガラクトピオースの腸内細菌による資化性を調べ、*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属の腸内有用菌の増殖を促進したことから、ヒト腸内フローラを改善できることを示唆している。

一方、第2章のコーヒー豆に含まれるクロロゲン酸類の精製と機能性については、ロブスタ種のコーヒー生豆 (Indonesia) をエタノール抽出して、7種類クロロゲン酸類を単離している。これらクロロゲン酸類は、コーヒー果実の成熟に伴い CQA 類は未熟果 (青緑色) から過熟果 (黒色) まで徐々に増加していく傾向にあったが、diCQA (ジカフェオイルキナ酸) 類は含量に変化は見られず、また品種や産地の違いによるクロロゲン酸類の含量では Indonesia 産のロブスタ種が最も多く含有していた。得られたクロロゲン酸類の生理活性を in vitro で測定した結果、ジカフェオイルキナ酸 (diCQA) は、 α -tocopherol、ascorbic acid よりも高い DPPH ラジカル消去活性を示し、スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性も、diCQA は CQA の 2 倍、5-FQA の 4 倍の活性を示した。また、diCQA は、arbutin や ascorbic acid、クロロゲン酸よりも 2.0~2.2 倍強いチロシナーゼ阻害活性を示し、さらに diCQA は芳香族アミンや複素環アミンに対して CQA より 2 倍高い抗変異原活性を示すことを示唆している。これらの結果は、クロロゲン酸類のカフェオイル基とその数、C7 位の二重結合がさまざまな生理活性の発現に関わっていることを示唆している。またクロロゲン酸類は細胞毒性試験から、U937 細胞 (ヒト組織球性リンパ腫由来)、KB 細胞 (ヒト鼻咽頭ガン由来)、WI-3813 sub 2 RA 細胞 (肺繊維芽細胞由来)、MCF-7 細胞 (ヒト乳ガン由来) の増殖を抑制し、U937 細胞ではアポトーシスが観察された。とくに KB 細胞の増殖を強く抑制したことから、クロロゲン酸類を強化したコーヒー飲料には咽頭ガンの予防効果が期待できることを明らかにした。

第3章ではクロロゲン酸トリパーゼを用いた桂皮酸誘導体の酵素合成と生理活性について検討している。クロロゲン酸加水分解酵素 (CQA esterase) はクロロゲン酸をカフェ酸とキナ酸に加水分解する酵素で、すでに *Aspergillus niger* と *A. japonicus* の培養液から精製されている。一方、2-Caffeic acid phenethyl

ester (2-CAPE) はプロボリスの活性成分として単離され、抗酸化や抗菌、抗炎症、腫瘍細胞増殖抑制効果など多様な生理活性をもつことが明らかにされている。CQA esterase はクロロゲン酸と 2-Phenethyl alcohol (2-PA) から 2-CAPE に変換し、さらにカフェ酸と 2-PA を基質として酵素反応させても 2-CAPE が生成したことから、2-PA を 2-Phenethyl bromide に代えても 2-CAPE が生成したことから、本酵素は加水分解反応以外にエステル置換反応と縮合反応、臭素置換反応も触媒できる多機能酵素であることを明らかにした。また、2-PA の代わりに 1-PA を基質に用いて CQA esterase を作用させると、(S)-1-CAPE (e.e.50%) が生成したことから、本酵素は光学特異性をもつことを明らかにした。

本酵素を用いた 2-CAPE への最適変換条件は、クロロゲン酸と 2-PA を基質としたエステル置換反応でモル変換率 50% であった。この反応は水が共存する条件下で、加水分解反応と並行してエステル置換反応が高い収率で進行するところが特徴的である。得られた 1-CAPE と 2-CAPE には、紫外線吸収や抗酸化、抗菌、抗ガン活性の他にインフルエンザウイルス増殖阻止活性が確認された。とくに 1-CAPE は 2.5ppm で A 型ウイルス 92% と B 型ウイルス 95% の増殖を阻害し、有望な抗インフルエンザ剤として期待できる。また、これらの物質はウイルス感染細胞内でのウイルス複製を阻害していることを明らかにした。

diCQA はクロロゲン酸より高い生理活性を示したが、コーヒー生豆中の含量が少ない。そこで、クロロゲン酸と Vinyl caffeate を基質として diCQA へ酵素変換することを考えた。まず市販の Vinyl cinnamate (Vci) とクロロゲン酸から Cinnamoyl caffeoyl quinic acid (CCQA) に変換できる酵素の探索と最適変換条件を検討した。そこで、市販リパーゼ 21 種類をスクリーニングした結果、リパーゼ AL のみが CCQA へ変換できることを見いだした。

しかしながら得られた CCQA の抗酸化活性はクロロゲン酸と同程度で、diCQA ほど高くなかったことから、抗酸化活性の発現にはジヒドロキシ構造が重要であり、また Vinyl caffeate とクロロゲン酸から diCQA に変換できる酵素生産菌を広くスクリーニングすれば、目的の酵素を見いだすことができると確信している。このことは未利用コーヒー豆から調製した diCQA とクロロゲン酸を酵素変換して得られた 2-CAPE は、ともに高い生理活性をもっていた。とくに 2-CAPE は正常細胞に対する毒性が低く抗ガン、抗ウイルス活性など特徴ある活性をもっており、今後 in vivo での実験を経て製品への応用開発が期待できそうである。

以上、上記一連の結果から、本研究ではコーヒー豆に含まれる未利用資源であるアラビノガラクトンとクロロゲン酸類に注目し、その機能性を解明して、コーヒー抽出残渣や等級外コーヒー豆が資源として有効利用できることを明らかにしただけでなく、通常飲用されているコーヒー抽出液が多様な健康増進機能を有することを証明する手掛かりを提供したといえる。さらに、クロロゲン酸類を原材料として、多様な機能性を有する物質に酵素変換できることを明らかにしたことはコーヒー豆の機能性食品素材としての利用に道を開くものであり、博士論文として価値あるものと考えられる。

氏名	菅原大輔
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第838号
学位授与の日付	平成16年9月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Identification of a protective CD4 ⁺ T-cell epitope in the p15 ^{gag} of Friend murine leukemia virus and the role of the MA protein targeting to the plasma membrane for its immunogenicity (マウスレトロウイルス MA 蛋白の感染防御に有効な構造要件の検討)
論文審査委員 (主査)	教授 宮澤正顯
(副主査)	教授 下村嘉一
(副主査)	教授 義江修