

生物機能開発研究所 平成 21 年度プロジェクト成果報告書

課題 1：機能性物質の LC/Q-ToFMS/MS による構造解析・同定システムの開発

担当：鈴木 茂

機能性物質を食品等から検索し利用する技術的基盤の構築が待望されている。最近、飛行時間型質量分析計 (ToFMS) を LC/MS に組み込んだ装置 (LC/ToFMS、LC/Q-ToFMS/MS など) の開発が進み、生命科学に関連する物質の定性を行う可能性が急速に広がりつつある。そこで、これまでに開発した LC/Q-ToFMS/MS のスペクトルから元素組成を分析する技術 (S. Suzuki et al, *Rapid Comm. Mass Spec*, 19, 3500-3516(2005)、元素組成演算ソフトウェア MsMsFilter.exe(国立環境研究所)) を発展させ、食品等に含まれる機能性物質の探索するシステム (機能性物質の LC/Q-ToFMS/MS による構造解析・同定システム) を開発することを最終目的として、その達成に向け LC/Q-ToFMS および LC/Q-ToFMS/MS による既知の機能性物質のスクリーニング技術の評価を行い、課題を抽出した。フラボン類の標準物質による LC/Q-ToFMS のスクリーニングおよびスペクトル検索では、 $1\mu\text{M}$ の標準溶液でその元素組成を特定できた。Perl corn 抽出物 (1mg/mL) からは多種のフラボン類の同族体を、また Chinpi 抽出液の画分、Blueberry 抽出液の画分からは多種類の配糖体に相当する元素組成を探索した。

他方、物質探索の主要な部分は研究者の手作業になるため、探索効率が悪く、研究者の解析アルゴリズムをソフトウェアに反映することが、研究発展の重要な要素であることが明確になった。また、LC/Q-ToFMS/MS 装置がないため、必要十分なデータの収集が難しいことも課題である。

課題 2：線虫バイオセンサーを用いた長寿・健康増進効果をもつ物質の探索と評価

担当：三輪錠司

環境汚染物質や食品危害物質などの生体異物 (ゼノバイオティクス) また代謝副産物である活性酸素などは、老化や様々な疾病の原因である。生体異物によって発現が誘導され、生物を防衛する働きをもつシステムのひとつに薬・毒物代謝酵素系 (“ゼノバイオティクス応答系”、あるいは広義に “ストレス応答系”) がある。自身に毒性がなくかつこれら酵素を発現させる物質は、老化や種々の疾病を防ぐ効果が期待できる。従って当該酵素の中でもっとも顕著に発現誘導されるグルタチオン S 転移フェラーゼ (GST) の発現を GFP (緑色蛍光タンパク) で視覚化し、定量化も可能とした「線虫バイオセンサー」は、長寿・健康増進効果をもつ機能性食品成分のスクリーニングに応用できる。このセンサーを用いて、わさびの辛味成分アリルイソチオシアネートは GST を効果的に発現誘導し、農薬などの酸化ストレスに対する抵抗性を付与することが実証でき、長寿・健康増進効果の期待できる機能性食品成分であることを証明した。さらにこの抵抗性付与が、転写因子 SKN-1 を介した GST の発現誘導によることもわかった (Hasegawa et al., 2010, *PLoS ONE*)。現在、野菜や生薬等の天然物由来抽出試料をスクリーニングにかけ、未知の機能性食品成分を探索中である。これまでに数種類の粗抽出物に GST 発現誘導性があることを突き止め、物質同定を目指している。さらに、薬・毒物代謝酵素発現制御経路の全容を解明するため、GST 発現に異常のある変異体を 24 株単離した。4 種類の遺伝子グループに分けることができ、そのうち 2 種類の遺伝子を同定した。これらは薬・毒物代謝酵素系発現制御に重要な働きをもつこともわかった (論文投稿中)。

課題 3：健康食品中のアンチエイジング化合物の on-resin 分析法の開発

担当：山本 敦

健康志向の高まりは、食品に過度の期待を抱かせるようになった。医薬品の開発費に比べれば屁でもない「特定保健用食品」に取り組む製薬メーカーや、開発費のかからない「いわゆる健康食品」に取り組む中小食品メーカーなど、こぞって健康志向食品といわれる分野に参画している。中には、グルコサミン類のように宗教的な食材も存在するが、抗酸化剤のように体内で過剰に生成した活性酸素種を消去する効果が明確なものもある。米国では、食品中の抗酸化力をビタミン E 換算した ORAC 値で表記しており、我国でも何らかの統一表記法が望まれている。我々は、選択性を持った抽出剤と選択性を持った発光法

を組み合わせることで、分離の必要の無い、抽出剤上で全ての操作が行える、迅速簡便で、しかも脱溶媒を図った環境調和型の微量分析装置の開発に努め、この方法を「オンレジン分析法」と名づけた。抽出剤に、フェノール構造に対して選択性を発揮する官能基を与え、検出は還元に基づく化学発光を利用すれば、疎水的な抗酸化活性を有する化合物が一括して測定できるものと考えた。今回は予備実験として、ハロゲン化芳香族に対して選択性を持たせた抽出剤を開発し、これに有機リン化合物に選択的なルミノール-H₂O₂化学発光系を組み合わせた「オンレジン分析法」により、双方の構造を有する殺虫剤クロルピリホスがどの程度の選択性と感度を発揮するかで本法を評価した。この成果を元に、フェノール性の抗酸化剤に対する選択的抽出剤の開発に着手したい。

課題 4：骨代謝を調節する天然化合物の探索とその作用解析

担当：禹 濟泰

骨の量と機能は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収(骨破壊)とのバランスによって維持されている。高齢社会の中で患者数が急速に増加している骨粗鬆症は、破骨細胞による過剰な骨吸収によりこの量的バランスが破綻し、骨量が減少する疾患である。破骨細胞の分化、機能および活性化を阻害する物質は骨破壊抑制剤として骨粗鬆症の予防や治療にも応用できると思えられる。そこで、天然由来低分子化合物から破骨細胞分化と機能に作用する物質を探索した結果、沖縄から採取された海洋シアノバクテリア *Lyngbya* sp. から単離・同定された新規マクロライド biselyngbyaside が破骨細胞の前駆細胞の細胞生存率に影響を与えなく、破骨細胞の分化を抑制することを見出した。また biselyngbyaside は成熟破骨細胞の骨格破壊と細胞死を誘導し、骨片上の骨吸収窩の形成を抑制した。破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) による破骨細胞分化シグナルにおける作用を、Western blot 法によって解析した結果、biselyngbyaside は RANKL によって誘導される c-Fos 及び NFATc1 のタンパク質発現を抑制した。

課題 5：水熱プロセスによる食品中のアンチエイジング成分のクリーン抽出技術とその精密計測法の開発

担当：石田康行

有機アルカリ試薬共存下での化学反応場と高分解能ガスクロマトグラフィー (GC) をカップリングした「化学反応場 GC」の構築を通じて、健康食品中に含有される微量のアンチエイジング成分の精密定量を迅速かつ簡便に行える、実用的な分析法を開発した。ここでは、試料として、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸類 (PUFA 類) を多く含有している微生物や魚類などを選択した。それらの生体試料を有機アルカリの一種である水酸化トリメチルスルホニウム (TMSH) 存在下での化学反応場に供することにより、試料中に含まれる一連の脂質成分のエステル結合が、瞬間的に加水分解されると同時にメチルエステル化されることを見出した。これらの反応生成物をオンラインで GC 分析して得られたクロマトグラム上には、熱的に不安定な EPA や DHA を含めとする、一連の脂肪酸成分がそれらのメチル誘導体としてほぼ定量的に検出された。それらのピーク面積を基にして、もとの試料中に含まれる有用 PUFA 類の精密定量を、1) 煩雑な試料前処理を一切用いずに、2) 固体状態の試料をそのまま測定に供して、さらに 3) 30 分以内の比較的短時間のうちに行うことを初めて可能にした。さらに、こうして脂肪酸組成をはっきりと決定できた生体試料を使って、亜臨界水分解法による脂質回収実験も併せて実施し、アンチエイジング作用を有する多価不飽和脂肪酸成分のクリーン抽出を行うことも試みた。

課題 6：食品関連物質からの抽出および分画方法の確立

担当：堤内 要

本研究では、食品等から既知アンチエイジング効果画分の抽出を進めるとともに、未知のアンチエイジング成分を探索するための粗分画を行った。薬草を含む身近な野菜、果物、穀物などの 28 品目 [ブルーベリー、小豆、大豆、黒ゴマ、白ゴマ、ネギ(白、青)、タマネギ(皮、身)、大根、キャベツ、ブロッコリー(花蕾、茎)、ショウガ、サンショウ、トウガラシ、ハッカ、コウカ、ビワノハ、ソヨウ、モクツウ、キョウニン、トウニン、チンピ、ユズ(果皮、果実)、シイタケ、ハナビラタケ] から 20%

エタノール水溶液抽出を行い、水溶性成分を抽出した後、その残渣をエタノールに浸漬し、脂溶性成分を抽出した。これらの計 56 抽出液を三輪教授や大西教授らに提供し、グルタチオン S 転移酵素 (GST) の発現誘導やプロテインホスファターゼ 2C の酵素活性といったアンチエイジング機能の評価を受けた。その結果、GST の発現誘導では大豆、白ゴマ、トウガラシ、タマネギなどの 20%エタノール水溶液抽出物やその残渣のエタノール抽出物に活性が認められ、プロテインホスファターゼ 2C の酵素活性ではトウガラシ、チンピなどの 20%エタノール水溶液抽出物で活性が認められた。これらの抽出物に関しては、逆相カラム (ODS) にて粗分画を行い、再度活性物質の単離精製を目指した絞込みを行った。

課題 7：脂肪細胞機能の改善に基づいたアンチエイジング食品の開発

担当：津田孝範

脂肪細胞機能の異常、すなわちアディポサイトカインの発現・分泌異常は耐糖能異常や血管障害に関与し、「長寿の質」を低下させる。この背景をもとに、今年度は、脂肪細胞機能を改善する食品因子候補物質の選定と、脂肪細胞の機能改善の指標となる「アディポネクチン」の低下の抑制の観点から、脂肪細胞において肥満に伴う炎症状態を短期間で再現でき、食品因子の探索評価に応用できる系の検討を行った。その結果、数種の食品因子に脂肪細胞機能を改善する可能性を見出した。これらはアディポネクチンの発現低下を抑制する作用を持つと考えられるので、評価法の構築について検討を進めた。その結果、さらに条件の最適化などを必要とするものの、炎症性サイトカインとして腫瘍壊死因子を用いると、理想的にアディポネクチンの発現低下を誘導できることが確認された。今後さらにこの系を確立するための時間、試薬濃度、投与タイミング等の条件を詳細に検討することで、ほぼ 1 年以内に評価系を立ち上げることが可能と考えられる。

課題 8：プロテインホスファターゼ活性を指標にした骨代謝およびエネルギー代謝改善成分の探索と食品中の活性成分の同定

担当：大西素子

プロテインセリン/スレオニンホスファターゼは PPP とマグネシウムイオン要求性の PPM の 2 種類のファミリーに分類されている。このうち PPM ファミリーに属するプロテインホスファターゼ 2C (PP2C) は、脂質代謝の調節、細胞周期やアポトーシスの制御および炎症反応の抑制等に深く関与していることが知られている。PP2C には現在遺伝子の異なる 18 種類のアイソフォームが存在し、生体内でそれぞれ異なる機能を果たしていると考えられている。本研究では PP2C および癌遺伝子として知られる PP2C の活性調節機能を持つ、生薬または食品由来低分子化合物の探索を行なった。

まず、禹から供与された 170 種類の天然低分子化合物を用いて、PP2C の活性調節化合物の探索を行なったところ、PP2C および PP2C を阻害する化合物として baicalein を、PP2C には作用しないが PP2C を阻害する化合物として luteolin を、PP2C は阻害するが、PP2C を活性化する化合物として glabridin を見出した。このうち baicalein は PPP ファミリーに属する PP2A も阻害したため、広くプロテインホスファターゼに対する阻害活性を持つのではないかと推測された。

次に堤内より供与された 26 種類の食品抽出試料から、PP2C 活性調節化合物の探索を行ったところ、キョウニン、チンピ、ハナビラタケおよびコウカのエタノール抽出試料に PP2C 阻害効果を、チンピ、黒ゴマ、ピワノハ、ソヨウ、コウカおよびハッカのエタノール抽出試料に PP2C の阻害効果を見出した。今後これらの試料を分画し、活性成分の同定を目指す。

課題 9：食品成分に含まれる分子シャペロン誘導因子の探索およびその機能解析

担当：大塚健三

熱ショック蛋白質 (HSPs) はさまざまな環境ストレスで誘導される。HSP は分子シャペロンとして機能し、細胞内の種々の機能を制御しているだけでなく、タンパク質毒性をもつストレスに対する内因性の防御因子でもある。毒性のない薬剤などでこの分子シャペロンを誘導できれば、生体はさまざまな環境ストレスに対して抵抗性になると考えられている。われわれはすでにシャクヤクの主成分であるペオ

ニフロリンがHSP 誘導能をもつことを明らかにしてきた (*Cell Stress & Chaperones* 9: 378-389, 2004; *Int. J. Hyperthermia* 21: 703-711, 2005) . また、カルベノキソロンについてもこれまでの報告ではHsp70 しか誘導しないとあったが、われわれの研究では、Hsp70 だけでなく、Hsp90、Hsp40、Hsp27 も誘導することが判明した (*Cell Stress & Chaperones* 14: 535-543, 2009) .

本年度は、カルベノキソロン、ペオニフロリン、サリチル酸ナトリウムなどの分子シャペロン誘導剤が温度感受性変異p53タンパク質 (V143A) の機能を回復させることができるかどうかを検討した . 種々の実験条件で検討したところ、適度に高発現された分子シャペロンは変異p53タンパク質の正しい折りたたみと機能回復を促進することを示唆する結果を得た (*Thermal Medicine* 26: 1-17, 2010) .

また、神経変性疾患の一つである球脊髄性筋萎縮症 (原因遺伝子はアンドロゲン受容体であり、トリプレットリピート病の一つ) のモデルマウスにおいて、ペオニフロリンの継続投与によって、脊髄や筋肉組織ではHSPsが誘導され、病状進行の顕著な抑制がみられた .

課題 10：細菌胞子の発芽を抑制する食品成分の評価法の確立と作用機作の解明

担当：森山龍一

乾燥や熱、紫外線、薬剤に対して強い抵抗性を示す細菌胞子は、食品製造過程で汚染が起きた場合に通常の加熱殺菌で殺滅させることが極めて困難であり、生き残った胞子が食品内やヒトの体内で発芽して栄養増殖を再開すると食品の品質劣化や食中毒などの感染症を引き起こす . 細菌胞子の発芽を抑制する食品成分の評価法の確立や作用機作の解明を行うためには、まず高感度で定量的な解析をするため胞子成分の発芽に伴う生化学的変化や動態、及び発芽メカニズムについての分子論的理解が重要となる .

本年度は、(1)嫌気性ウェルシュ菌胞子の発芽を促進する CO₂ と主要な発芽酵素の活性調節機構との関連について検討した . 発芽酵素を過剰発現した胞子を用いて、CO₂ 由来の bicarbonate が胞子外層に作用して発芽を誘起する一方、CO₂ に起因する pH 低下が胞子内膜に局在して DPA 遊離に関与すると考えられる channel に作用して発芽を誘起することを示唆した (*JBB*, 108, 477-483, 2009) . また、(2) 胞子発芽に関与する新規リパーゼ様酵素であることを初めて明らかにした枯草菌 LipC がリパーゼ B であることを明らかにすると共に、LipC が胞子外膜の分解に関与することで発芽有機物質 L-アラニンの外膜透過に重要な役割を果たしている可能性を示唆した (*BBB*, 74, 24-30, 2010) .

課題 11：乳酸菌の生物学的機能を利用した、高齢者に優しい日本型発酵食肉製品の加工技術

担当：根岸晴夫

超高齢社会を迎えた日本では、生活習慣病などの病気を未然に予防し QOL を高める食生活が求められている . そのためには適正カロリーと食肉のような良質タンパク質の摂取が栄養学的に重要である . 本研究では、中高年や高齢者にも手軽に摂食可能なソフトジャーキーを提供するために、乳酸菌を利用した加工技術について検討中である . 今年度は、乳業で汎用される乳酸菌を豚肉に接種して発酵させた非加熱乾燥食肉製品の新規加工技術を開発するために、豚肉中の微生物に及ぼす乳酸菌接種の影響を調べた . 製品は肉を乳酸菌カルチャーに浸漬して 2~24 時間培養後に調味し、 a_w が 0.87 未満に達するまで 20 で乾燥させた . 5 種類のヨーグルトカルチャーに豚肉を浸漬して、37、43 で 2~24 時間培養した場合には、何れの製品からも大腸菌群は検出されなかった . さらに *Lb. bulgaricus* と *Stc. thermophilus* 混合カルチャーに同様に豚肉を浸漬し、10~43 で 2~8 時間培養した場合にも同様に、大腸菌群は陰性となり、乳酸菌が 10⁶~10⁷ cfu/g レベルで生残することを確認した . また 10⁵ cfu/g レベルの *E. coli* 汚染肉を 5、25、及び 43 で培養した場合には、供試乳酸菌の至適温度 43 で 7 時間の培養条件のみ、pH は 7 時間後に 4.2 付近に達し、製品から完全に *E. coli* は検出されなくなった . 以上から乳酸菌接種によって有害菌の生育抑制効果が確認され、特に乳酸菌の至適温度で培養したときにその効果が高まるということが明らかになった .

課題 12：抗酸化能および酸化ストレスを指標とした食品の機能性評価および向上

担当：吉村和也

植物は主要な食糧資源であるため、その代謝や環境ストレス耐性の理解は、食品の機能性や生産性向上に大きく貢献できると考えられる。種々の環境ストレスにより生体内で生じる活性酸素は、DNA やその基質であるヌクレオチドを酸化し、突然変異を誘発する。活性酸素種によるゲノム DNA 酸化損傷を防ぐために、動物は細胞質、核およびミトコンドリアに複数の酸化ヌクレオチドプール浄化酵素を局在させている。一方、高等植物シロイヌナズナでは、細胞質に局在する AtNUDX1 のみが酸化ヌクレオチド浄化に機能している。そのため、植物は他生物種とは異なる酸化ヌクレオチド蓄積防御機構を発達させている可能性がある。そこで本研究では、植物細胞の各オルガネラゲノムへの酸化ヌクレオチド蓄積の影響を明らかにするために、ヒトの酸化ヌクレオチド浄化酵素(hMTH1)を細胞質、ミトコンドリアおよび葉緑体で強制発現させたシロイヌナズナ形質転換体(cyt-, mit-および chl-hMTH1)の解析を行った。cyt-, mit-および chl-hMTH1 株における種々の環境ストレスに対する耐性能を評価した結果、mit-および chl-MTH1 株ではコントロール株と比較して高温 (44 °C)、パラコート(4 μM) および強光 (800 μmol/m²/s) ストレスに対する耐性能の向上が認められた。ゲノム DNA 中に蓄積した酸化ヌクレオチド量(8-oxo-dG)量を測定した結果、正常条件下において、コントロール株と比較してすべての hMTH1 発現株では 8-oxo-dG 量が減少していた。さらに、パラコート処理によりコントロール株における 8-oxo-dG 量は増加したが、細胞質および葉緑体 MTH1 発現株では顕著に抑制されていた。以上より、各オルガネラでの酸化ヌクレオチド浄化能の強化により、植物の酸化ストレス耐性能が向上することが明らかになった。

課題 13：発芽大麦の GABA 蓄積量

担当：高村基治

食用の大麦であり、麦飯や麦茶の原料となっている六条大麦は食物繊維やポリフェノール、ビタミン、ミネラルを豊富に含んでおり、日本では古くから日常食として活用されている。さらに近年、この大麦の発芽時に脳や脊髄で「抑制性の神経伝達物質」として働き、肝臓や腎臓の働きを高め、血圧上昇抑制や中性脂肪の増加制限、抗ストレス作用を持つとされる GABA (γ-アミノ酪酸) が高いレベルで生成されてくることが判ってきた。

本研究は GABA を含有する発芽大麦を商品化している(株)豊橋糧食工業の依頼にもとづいて発芽大麦の脱粒処理最終商品の収率向上を目指しているが、今年度についてはまず、発芽段階での生成～蓄積される GABA 含量について、発芽条件の模索から GABA 抽出、GC (ガスクロマトグラフィー) 法による GABA 定量を行い、発芽伸長度と蓄積 GABA 量との相関をみた。大麦の発芽伸長度 2 mm ~ 20 mm の生育段階での GABA 蓄積量は無発芽大麦、0mg / 100g(素材) ~ 発芽大麦、13mg / 100 g (素材) という結果を得た。又この中で GABA 蓄積量は発芽伸長が約 10 mm 程度のものが最高値を示し、発芽伸長が 10 mm を越すに従い、減少に転じた。更にこの 13mg / 100 g (素材) の GABA 量は試料ロットの違いはあるものの現在の市販品、8.1mg / 100 g (素材) を上回る蓄積結果を得た。今年度は製品収率向上の検討に入る予定である。

課題 14：硝酸・亜硝酸イオン低減化機能評価システムの構築と低減化機能の評価

-食品の硝酸イオン、亜硝酸イオン分析評価および簡便化技術の開発-

担当：愛知真木子

野菜は各種のビタミン、ミネラルの源として欠くことができない食品であるが、我々が摂取する硝酸イオンの 80% が野菜由来である。野菜中の硝酸イオンは、口腔内微生物により亜硝酸イオンとなり、NO を経て N-ニトロソアミンを生成する。ニトロソアミンは、変異原性を持ち、ガンを誘発するため、EU 諸国では、野菜中の硝酸イオン濃度に規制が設けられている。高齢化社会となり、可能な限り多くの変異原物質を除外していくことが、より健康に長寿を全うするために必要である。

そこで本研究では、ハウレンソウの硝酸・亜硝酸イオン(以下：硝酸イオン)分析評価および簡便化技術の開発を行った。野菜中の硝酸イオン含量を抽出する簡便法として、インターネット上では、「試料の任意の部分を取り取り物理的に破碎する」という方法が紹介されているが、野菜は部位毎に硝酸イオン含量が大きく異なることが明らかになっており、個体すべてを試料としなければ、正確な硝酸イオ

ン含量を測定することはできない．これまでに，硝酸イオンを簡便かつ大量に抽出することを可能にする「オートクレーブ法」を開発したので，これを用いて，個体全体を分析した値と葉身の様々な部位や葉柄部 1g 程度の部分をそれぞれ分析し比較した．その結果，葉の様々な部位の硝酸イオン濃度を分析することにより，ある特定の部位の硝酸イオン含量から個体全体の硝酸イオン濃度を推定することが可能となることを明らかにした．今後は，各種食品，廃棄物など抽出物の亜硝酸低減化能評価：各種食品，天然物，廃棄物などの抽出物や合成化合物と亜硝酸を混合し亜硝酸量を低下させる物質を探索する．

課題 15：農産物の γ -アミノ酪酸生成能の簡易測定

担当：和田俊夫

非タンパク質態のアミノ酸の一種である γ -アミノ酪酸 (GABA) は動物、植物に広く分布し、農作物、発酵食品、発芽玄米など多くの食材にも含有する．また、発酵食品中には GABA を生産する乳酸菌も見られている．2007 年度に HPLC 法 (OPA 誘導化) による迅速測定法で、44 種の農作物 (主に野菜) の GABA を測定した．全てに含有を認め、その含有量は 0.91 ~ 90.1mg/100g と野菜の種類及び生育ステージにより大きく異なった．GABA は、近年、血圧降下作用等が期待される生理活性物質としても注目される．この機能性に注目し、GABA を富化させた食品も開発され、市販されている．GABA の富化法は主にグルタミン酸 (Glu) をグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) により GABA へ変換させるものである．そこで、本研究では特定食材へ GAD 活性の高い農作物を添加することにより、食材中の遊離 Glu を農作物中の GAD で GABA に変換させることにより GABA を富化させた食品を簡易に調製することをめざす．本年は農作物中 GAD の GABA 生成能をスクリーニングするための簡易測定法を検討した．はじめに、トマトの GABA 生成能の測定を試みた．豆乳を富化用食材とし、トマトを添加後、GABA の増加有無を確認した．トマトでは GABA の増加は認められず、現在、他の農作物での検討を進めている．