

生物機能開発研究所

平成 20 年度プロジェクト成果報告書

テーマ：アンチエイジング効果に着目した新製品の開発を支援する研究拠点の形成

プロジェクトリーダー：永井和夫

目的：

近年，生物科学の進歩は目覚しく，人類は寿命を大幅に伸長させてきた．特に我が国は平均寿命が最も高い水準にあり，言い換えれば高齢者の割合が極めて高い社会といえる．長寿高齢化社会がますます進行してゆくことは疑う余地がなく，そのような情勢でいかに活気ある社会を持続するかは，現代社会の最重要課題といえよう．そこで我々は，抗老化（アンチエイジング）に関する研究を進め，さらに新製品の開発を積極的に支援することで，高齢者の健康水準の低下をできる限り抑制し，長寿高齢化社会でも活気ある社会を維持できるよう努力することを考えた．生物機能開発研究所には，生物（微生物，植物，動物），化学（天然物，有機，高分子），分析（GC, LC, CE, NMR, MS など）を専門とする研究者が在籍し，試料の調達から，機能評価，構造決定までを一貫して行うことができる体制をとっている．これらの研究資源をもとに，『有効成分の抽出・分画方法の開発および分画試料の成分・生理活性データベースの構築』，『アンチエイジング活性検出法の開発と活性成分の探索および同定』，『製品化を目指した安全性評価および機能性向上の方法開発』の3つの領域課題を担当し，アンチエイジング関連の研究を組織的に進める．

課題 1：モデル生物 *Caenorhabditis elegans* を用いた食品成分の安全性および機能性評価システムの開発

担当：三輪錠司

本研究室で開発した線虫バイオセンサーを用いることで，ローズマリーの成分であるカルノシン酸や，わさびの成分であるイソチオシアネート類（Sulforaphane, Allyl isothiocyanate, Benzyl isothiocyanate）は，生体異物代謝酵素のひとつである GST を効果的に発現誘導することがわかった．これらの物質を線虫に摂取させることで，酸化ストレスに対する耐性を付与することから，生物に対して長寿・健康増進効果をもつ成分であることがわかった．

課題 2：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 (HSP) 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 2009, in press)。

本年度はまず、マウス B16 メラノーマ細胞の移植腫瘍を用いて、分子シャペロン誘導因子であるペオニフロリンの抗腫瘍効果の再検討を進めた。ペオニフロリンの継続投与によって、腫瘍の成長と生存率において僅かながら改善が見られ、腫瘍中や周辺組織の Hsp70 の増加も見られた。このことから正常組織より多い腫瘍中の Hsp70 をさらに増加させることで、腫瘍特異的な免疫系が活性化され腫瘍増殖の抑制につながったのではないかと考えられる。

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。

さらにカルベノキソロンをはじめとするシャペロン誘導剤を用いて、変異 p53 タンパク質の機能回復促進効果について研究を進めている。

### 課題 3：破骨細胞分化を阻害する辛夷由来の化合物, Fargesin

担当：禹 濟泰

骨粗鬆症は異常に形成された破骨細胞による過剰な骨吸収により骨重量が減少する代謝疾患である。我々は骨粗鬆症の予防あるいは改善に効果のある機能性食品成分を得るために、破骨細胞の分化を阻害する物質を食素材から探索した。辛夷(コブシ)の蕾を乾燥させたものは漢方薬として用いられている。今回、我々は辛夷より単離した化合物が破骨細胞の分化を阻害することを見出したので報告する。辛夷のメタノール抽出物について、破骨細胞分化抑制活性を指標に各種クロマトグラフィーを用いて活性成分を分離・精製し、NMR などの各種スペクトル解析によりその化合物の同定を行った。その結果、破骨細胞分化阻害活性成分として Fargesin を同定した。Fargesin は破骨細胞の分化誘導因子である RANKL

刺激下における RAW264 細胞および骨髄の初期分化活性を濃度依存的に抑制した。また Fargesin は RANKL 刺激による初期の活性化される MAP キナーゼファミリー-p38, ERK, JNK のリン酸と破骨細胞分化に重要な転写因子である NFATc1 の発現を抑制した。辛夷の蕾を乾燥させたものは漢方薬として用いられており、薬理作用として筋弛緩、抗アレルギー作用などが知られているが、今回の研究で初めて破骨細胞分化阻害活性をもつ化合物として単離された。辛夷由来化合物は骨粗鬆症予防健康食品の素材として有用な可能性を持つことが示唆された。

#### 課題 4：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、紫外線や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ことによって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、まず好感度で定量的な解析をするための胞子発芽における胞子成分の生化学的変化や動態、およ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。

胞子の発芽は、L-アラニンに代表される栄養素の刺激による、その耐久性に深く関連する胞子表層の特殊構造（胞子固有の化学構造を持つペプチドグリカンからなるコルテックス層、その外側を覆い主としてリン脂質からなる外膜、およびコートタンパク質層）の自己分解過程であると考えられる。我々は近年、枯草菌胞子表層の機能未知タンパク質 YcsK について、その遺伝子欠損株胞子が発芽をしないこと、および大腸菌に発現した組換え YcsK がリパーゼ様活性を持つこと等を示し、胞子発芽に關与するリパーゼの存在を初めて明らかにしてこれを LipC と命名した（生物機能開発研究所紀要第 8 巻に本件に関する解説を掲載）。現在、LipC の酵素学的性質の検討と共に胞子脂質への作用について検討を進めているとともに、病原性を有するバシラス属細菌に保存されている相同遺伝子産物についても解析を行っている。得られた研究成果については、平成 20 年度におこなわれた第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会や日本農芸化学会 2009 年度大会、および 2008 年度グラム陽性菌のゲノム生物学研究会にて報告している。

#### 課題 5：食品中の GABA 含量増加効果評価系の確立

担当：高村基治

大麦の米飯への混入効果は、これまでビタミンや繊維質強化の点で健康に貢献すること

が確認されている。さらに近年、発芽大麦中に GABA（ガンマーアミノ酪酸）が豊富に生成されることが判ってきた。GABA は高血圧の抑制，中性脂肪の増加制限，精神安定作用などの効果があるとされており，発芽玄米中にその生成が見出されて以来，その炊飯米としての推奨がなされている。

発芽大麦中の GABA 含有量は発芽玄米より，約 25% も多く含まれており，上記のビタミンや繊維質の効果も合わせて期待され，更なる利用が推進されるべきものである。しかし大麦の場合，稲粳と異なって，その粳が胚乳に強く結着している為その脱穀後脱粳・搗精時，回転砥石により「削り取り」を行っている。その結果，発芽に必要な糊粉層や胚芽に損傷を与えている可能性もある。そのため脱粳後の発芽率は極めて悪いものと推定され，これまで検討された報告がない。

一方，発芽後の脱粳では胚乳部分の軟化が進んでおり，上記方法による脱粳時に胚乳が碎片され収率を大変悪くしている。

研究室では粳つき大麦の発芽により，GABA の生成・発現量を確認するとともに一部前もって脱粳された大麦の発芽を試みたところ未脱粳のものは略 100% の発芽率であったのに対し試験品（一部脱粳品）は 60% の発芽率に止まり，またカビの発生が観察された。今後はこのカビの発生をおさえつつ，発芽率の向上を目指す。

#### 課題 6：プロテインホスファターゼ 2C の特異的活性調節成分の探索

担当：大西素子

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。

前年度 本研究では約 1000 種類の天然由来抽出液から，糸状菌の抽出液 360G03 に PP2C に対する強い阻害活性が含まれていることを見出し，分画を行ったが，活性成分を精製するまでには至らなかった。そこで今年度は，理化学研究所から譲渡された 360G03 株を大量に培養し，活性成分の単離を試みた。まず初めに 360G03 株の培養条件を検討するため，培養日数等の条件を変えて採取した培養液から抽出液を調整し，阻害活性を測定した。その結果，今回得られた培養液中には非常に低い阻害活性しか認められず，前年度に見出した阻害成分がほとんど含まれていないことが示唆された。今後，より詳細な培養条件を検討し，阻害成分が生成する条件を決定する。

PP2C は癌遺伝子として知られ，その遺伝子欠損マウスは乳癌に抵抗性を示すことが報告されている。PP2C と PP2C は一次構造の相同性が 30% 程度であり，立体構造がかなり異なることが推測される。そこで今年度は PP2C を指標に，抗癌活性を持つ化合物を探索するため，マウス PP2C の組換えタンパク質の発現精製システムを構築した。

#### 課題 7：脂肪細胞機能の制御に関する食品因子の研究

担当：津田孝範

脂肪細胞は、単なる脂肪の貯蔵場所ではなく、種々のアディポサイトカインを分泌する最大の内分泌細胞であることが明らかになっている。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する。一方，我が国の糖尿病患者の増加は深刻な社会問題となっている。本研究では脂肪細胞機能に着目して 2 型糖尿病の予防，抑制作用を有する食品因子を検討した。成熟脂肪細胞を用いた検討の結果，数種の食品因子に脂肪細胞機能を改善する食品因子を見出した。これらの食品因子の安定性，抽出技術の確立が今後の課題として残されている。これらはいずれもアディポネクチンの発現低下を抑制する作用を持つため，2 型糖尿病の抑制効果が期待される。今後更に詳細な解析，動物個体での検証などを進める予定である。

#### 課題 8：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，植物の主要な生体内抗酸化剤であるアスコルビン酸(AsA) やグルタチオン(GSH)が酸化ヌクレオチド蓄積に及ぼす影響について検討した。シロイヌナズナ AtNUDX1 遺伝子破壊株および GSH 生合成酵素の変異により細胞内 GSH 含量が低下した rml1 変異体では，正常条件下における酸化ヌクレオチド(8-oxo-dG)蓄積量はどちらも野生株の約 2.2 倍に増加していた。一方，AsA 生合成酵素の変異もしくは欠失により細胞内 AsA 含量が低下した vtc1 および vtc2 変異体では，8-oxo-dG 量はそれぞれ約 4.9 および 3.8 倍に増加していた。これらのことから，AsA が酸化ヌクレオチド蓄積の防御に主要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 課題 9：有機質量分析法によるプラスチック製の乳幼児用品・玩具から溶出する化学物質の

## 研究

担当：鈴木 茂

乳幼児が玩具，用品などを口にすることで，溶出するおそれのある化学物質を LC/MS，LC/ToFMS により研究した．乳幼児が口にする場合の溶出条件として，温水，温アミラーゼ溶液および温エタノール（油脂まみれの場合を想定）による溶出を行った．18 品目を調査した結果，すべての品目からビスフェノール A（BPA）が検出され，トリプロモフェノール（TBP），テトラプロモビスフェノール A（TBBPA）の一方または両方が一品目を除いて検出された．TBP，TBBPA は臭素系難燃剤またはその合成原料であり，それらが乳幼児用品・玩具に意図的に使用されることはない．このことから，乳幼児用品・玩具にリサイクルされたプラスチックが使用されていることが示唆された．LC/ToFMS を用いた溶出成分の精密質量分析では，可塑剤，ポリマー原料，樹脂，プラスチックレンズ原料，滑剤などが同定された．これらの幾つかは乳幼児玩具には無関係であることから，LC/ToFMS による定性分析結果も，乳幼児用品・玩具にリサイクルプラスチックが使用されている可能性が強く示唆された．

## 課題 10：抗加齢化合物の選択的捕集及び離剤の開発研究

担当：山本 敦

我国の自給率四割という現状を改善するには、農業の根本的な見直ししかありえない。農業就業者の約七割が 60 歳以上という、一般社会では既に現役を退いた年代が主役を務めているようでは、農地の集約による大規模農業もままならない。農業をもっと魅力ある職業と認知させるには、生産の効率化、農産物の付加価値化を図る必要がある。最近では、抗酸化剤の抗加齢効果を期待した製品が市場に多く出回るようになってきた。このような農産物を作り出すには、土壌の栄養状態や農産物の成分分析がオンサイトでできるような体制作りが欠かせない。我々は、迅速簡便に、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ている。そこで今回、農産物中の抗酸化剤を迅速に評価するためのオンサイト装置開発の予備実験として、食品中のリボフラビン類（VB<sub>2</sub>）の簡易分析を試みた。方法として、VB<sub>2</sub> を選択的に捕集する、スルホバタイン型の官能基を導入した樹脂を合成し、その保持特性を評価した。その結果、この樹脂はリボフラビンを定量的に捕集するが、FAD や FMN は捕集せず、また分解物であるルミフラビンやルミクロームも捕集しなかった。すなわち、食品抽出液中の VB<sub>2</sub> は酵素処理でリボフラビンに変換した後、この樹脂で精製し、溶出液を蛍光測定することで簡便かつ高感度に測定できた。今後は、吸着させた樹脂から溶出させることなく測定できるような装置を確立し、VE 類の分析に適用していく予定である。

## 課題 11：農産物中の $\gamma$ -アミノ酪酸と代謝関連アミノ酸含有量の相関

担当：和田俊夫

$\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)は血圧降下作用等が期待される物質として注目されている。2007年度に果菜類 11, 葉菜類 12, 茎菜類 2, 根菜類 7, 花菜類 2, 豆類 3, 果実類 7 の計 44 作物について測定した結果, すべての作物に遊離  $\gamma$ -アミノ酪酸は含有し, 含有量は 0.91 (玉葱) ~ 90.1 (ウリ) mg/100g であった。植物体内には GABA の代謝に関連するアミノ酸であるアスパラギン酸, グルタミン酸, グルタミン, アラニンが遊離で存在する。2008 年度は GABA とこの 4 種の関連アミノ酸の濃度比率を調べ, GABA の植物体内での代謝の基礎的データ作成を目的とした。迅速測定のためキャピラリー電気泳動による GABA と関連アミノ酸の同時分析法を検討した。良好な測定条件が得られなかったため, HPLC 法(蛍光検出)で測定したデータを用いて解析した。測定対象とした農作物中の ASP, GLU, GLN, ALA 含有量それぞれの GABA 含有量に対する比率の平均は 1.43, 1.95, 7.96, 0.92 であった。GLN/GABA 比率の 4 分位値(25%値)が 0.89 であったことから, 調査したなかでは GLN 含有量が GABA より高い農作物が多いと言える。一方, GLU/GABA, ALA/GABA 比率の 4 位値(50%)が 0.43, 0.40 であった。このため, GLU, ALA の含有量については GABA より低い農作物が多いと言える。これまでの測定で農作物の生育と GABA 含有量の消長に関連が認められている。このため, 今後は作物を選択し, 栽培を行い, この生育と GABA の消長について検討を行う。

## 課題 12：多様な抽出物の収集と成分および生理活性データベースの構築

担当：堤内 要

生物機能開発研究所で進めるアンチエイジング効果に着目した新規機能性成分の探索研究の一環として, 本研究では『有効成分の抽出・分画方法の開発および分画試料の成分・生理活性データベースの構築』を目指した研究を行った。実際に抽出実験を行った品目は製あん過程で排出される小豆がら(両口屋是清), ハナピラタケ・シイタケ(高蔵寺きのこ産業), アラメ(日本ハム), 粉末緑茶, 漢方薬(モクツウ(アケビ), サンショウ(サンショウ), ハッカ(ハッカ), コウカ(ベニバナ), キョウニン(アンズ), トウニン(モモ), ソヨウ(シソ), チンピ(ウンシュウミカン))の 12 品目である。これらの抽出物のいくつかは, 緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子を導入した C.エレガンスを用いて, 解毒タンパクであるグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)の発現に対する影響を調べる研究に用いた。その結果, 粉末緑茶水抽出物の ODS カラムクロマトグラフィーにおける 10%メタノール水溶液溶出画分が, アクリルアミドによる GST 発現を阻害することを見出した。その他, 通常の抽出実験では解析されない食物繊維についても構成糖の分析を行い, それぞれ

のグルコース，ガラクトース，マンノース，キシロース，アラビノースの割合を調べた．

#### 課題 13：水熱法によるバイオウエイストからの有価物質の回収とその精密構造解析

担当：石田康行

本年度の研究では，高温高压水を媒体に用いた水熱法により，廃棄樹皮中に含まれる縮合型タンニンを高効率にクリーン抽出することを目的とした．さらに，得られた縮合型タンニンの構造解析を，反応熱分解ガスクロマトグラフィー（反応熱分解 GC）とマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）により総合的に行うことも試みた．ここでは，試料として，縮合型タンニン含有量が約 17 wt%であるアカシア属の表皮部を用いた．まず，水熱プロセスに関する様々なパラメータを検討した結果，120 および 0.5 MPa における水熱操作により，樹皮試料に含有されるタンニン成分をわずか 10 分で高効率に回収することができた．そこで，有機アルカリ共存下での反応熱分解 GC により，タンニン分子に含まれるペンダント基であり，その含有量が生理活性の程度に大きく影響することが知られている，ガロイル基に注目してタンニン試料の測定を行った．その結果，得られたクロマトグラム上には，ガロイル基から反応熱分解を経て生じた，3,4,5-トリメトキシ安息香酸メチルが明瞭に観測され，このピーク面積から当該基の含有量を精密定量することができた．次に，MALDI-MS により，主に分子量に関する情報に注目して，タンニン試料の分析を行ったところ，得られた質量スペクトル上には，縮合型タンニンの重合体が，それらのセシウム付加体として約 8 量体まで明瞭に観測され，水熱プロセスに際して，高分子量のタンニン成分を高効率に回収できたことが明らかになった．

#### 課題 14：硝酸・亜硝酸イオン低減化に関わる食品成分探索法の開発

担当：愛知真木子

水道水や農作物に含まれる硝酸イオンは体内で還元されて亜硝酸イオンとなり，乳児ではメトヘモグロビン血症を引き起こし，成人では亜硝酸がアミン類と化合してニトロソアミンとなりガンや糖尿病の原因となる．我々はこれまでの研究で，農作物中の硝酸イオン含量は，その栽培方法によって様々であるが葉菜類では EU における規制値の 2 倍（7,000mg/kg）を超過するものもあること，下ゆでにより硝酸イオン含量を半分程度まで除去できることを示してきた（生物機能開発研究所紀要 2007．7：37-41）．本研究では，食品中の成分から硝酸・亜硝酸イオンを低減化する物質を探索する方法を確立するとともに，低減化活性を有する食品成分を探索した．亜硝酸は酸性で一酸化窒素となるので，中性の緩衝液を用い，亜硝酸の減少率を測定すると共に，食品成分の濃度に依存した亜硝酸低減

化能についても確認し、3種類の天然物に低減化活性があると判断した。

課題15：アンチエイジング成分含有食材のデータベース構築

担当 和田俊夫

-アミノ酪酸（GABA）は血圧降下作用等が期待される物質として注目されている。2007年度に果菜類11、葉菜類12、茎菜類2、根菜類7、花菜類2、豆類3、果実類7の計44作物について測定した結果、すべての作物に遊離 -アミノ酪酸は含有し、含有量は0.91（玉葱）～90.1（ウリ）mg/100gであった。植物体内にはGABAの代謝に関連するアミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アラニンが遊離で存在する。2008年度はGABAとこの4種の関連アミノ酸の濃度比率を調べ、GABAの植物体内での代謝の基礎的データ作成を目的とした。迅速測定のためキャピラリー電気泳動によるGABAと関連アミノ酸の同時分析法を検討した。良好な測定条件が得られなかったため、HPLC法（蛍光検出）で測定したデータを用いて解析した。測定対象とした農作物中のASP、GLU、GLN、ALA含有量それぞれのGABA含有量に対する比率の平均は1.43、1.95、7.96、0.92であった。GLN/GABA比率の4分位値（25%値）が0.89であったことから、調査したなかではGLN含有量がGABAより高い農作物が多いと言える。一方、GLU/GABA、ALA/GABA比率の4位値（50%）が0.43、0.40であった。このため、GLU、ALAの含有量についてはGABAより低い農作物が多いと言える。これまでの測定で農作物の生育とGABA含有量の消長に関連が認められている。このため、今後は作物を選択し、栽培を行い、この生育とGABAの消長について検討を行う。