

生物機能開発研究所プロジェクト報告

生理活性物質（糖質）プロジェクト

プロジェクトリーダー：大塚健三

本プロジェクトは生理活性物質や機能性多糖を中心に、外部資金獲得のための準備プロジェクトとして、いくつかの実験系を用いて研究を進めてきた。特に分子シャペロン誘導剤、破骨細胞系、ヒアルロナン産生系、生理活性多糖、プロテインホスファターゼ阻害剤、糖代謝改善剤、線虫などの分野・実験系において、疾病予防、病状改善、健康増進に役立つような生理活性物質の探索・発見、およびそれらの作用機構を解明することを目的とする。

課題 1. 漢方薬中に含まれる分子シャペロン誘導剤の抗腫瘍効果

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。HSPs 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た。本年度はペオニフロリン投与によるマウス各臓器での HSPs 誘導能を検討するとともに、抗腫瘍効果についても検討した。ペオニフロリンを経口および腹腔投与すると、ほとんど毒性のない濃度で、脳、胃、心臓、肝臓などに HSPs が誘導された。特に胃においてはペオニフロリン前投与により、塩酸による傷害が軽減されることが判明した。また、マウス B16 メラノーマ細胞の移植腫瘍において対照では 40 日以内にすべてのマウスが死亡したが、ペオニフロリンを 2 日ごとに腹腔投与すると腫瘍の増殖が抑えられ、移植後 40 日でもすべてのマウスがまだ生存していた。これはペオニフロリン投与によって HSPs が誘導され、免疫系が活性化されることにより抗腫瘍効果がみられたものと思われる。

課題 2. 成熟破骨細胞に作用する機能性食品成分、ルテオリン作用機構の解析

担当 禹 濟泰, 永井和夫

骨粗鬆症を予防可能な食品成分を得る目的で、破骨細胞の分化及び機能に作用する活性物質を植物代謝産物中から探索し、ルテオリンに破骨細胞の初期分化を阻害することをみいだした。本研究では、ルテオリンによる破骨細胞の初期分化及び成

熟破骨細胞の骨格維持破壊の作用機構を明らかにすることを目的として行なった。破骨細胞の progenitor 細胞である RAW264 細胞培養系を用いて RANKL によって変動するシグナル分子 (NF- κ B, p38, JNK, ERK など) におけるルテオリンの影響を western blotting 法で検討した結果、ルテオリンは、これらのシグナル分子の活性化には影響を与えなかったが、破骨細胞分化において必須発現転写因子である NFAT の発現を抑制した。ルテオリンによる破骨細胞分化阻害は、NFAT の発現抑制に由来すると結論した。

課題 3. ヒアルロナン産生促進物質のスクリーニングと単離・同定

担当 大石祐一

皮膚においては、免疫系細胞の移動、細胞への栄養物あるいは老廃物の輸送などに関わり、年齢とともに減少するヒアルロナンを促進する物質のスクリーニングを野菜、および果物のメタノール抽出物から行った。スクリーニング系は、正常ヒト皮膚繊維芽細胞を用い、72 時間の³H-グルコサミン処理後、G-75 セファデックスを用いたゲルろ過により、培養上清中のヒアルロナンが存在する高分子画分を回収、その³H量を測定した。本系では、ポジティブコントロールである 10 ng/ml TGF β 添加で (約 1.4 倍) にヒアルロナン量を促進した。約 100 種類のサンプルから検討した結果、ほうれん草 (約 100 倍)、セリ (約 1.3 倍)、インゲン豆 (約 1.25 倍)、アルファルファ (約 1.2 倍)、エノキ茸 (約 1.2 倍) に促進効果があった。

課題 4. 分岐型(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルコピラナンの化学合成と生理活性評価

担当 堤内 要

本課題では β (1 $\rightarrow$ 3) 結合を主鎖にもつ分岐多糖を化学合成し、構造と機能の相関解析を目的として研究を進めている。昨年度までにトリイソブチルアルミニウム-水-アセチルアセトン (1:0.4:0.8) 触媒を用いて 1,3-アンヒドロ-2,4,6-トリ-O-ベンジル- β -D-グルコピラノースと 1,3-アンヒドロ-2,4-ジ-O-ベンジル-6-O-(*p*-メトキシフェニル)- β -D-グルコピラノースとの共重合を行い、グルコース単位の 6 位に部分的に *p*-メトキシフェニル基を有する共重合体を得ている。本年度は硝酸二アンモニウムセリウムを用いて *p*-メトキシフェニル基を選択的に除去し、生じた水酸基に 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- α -D-グルコピラノシルブロミドを反応させて、側鎖にグルコース残基を導入した。最後に液体アンモニア中リチウムを用いて全ての保護基を除去し、目的とする分岐型(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルコピラナンの化学合成を達成した。カイコのフェノール酸化酵素前駆体カスケードを用いた Silkworm Larvae Plasma (SLP) テストでの免疫活性試験も行い、化学合成した(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルコピラナンでも免疫反応を誘導することが確認された。

課題 5. プロテインホスファターゼ 2C に対する特異的阻害剤の探索

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 2C (PP2C) の活性測定には、通常 RI ラベルした基質を用いるが、 ^{32}P の半減期は2週間と短く、また実験場所が限定される等取扱いも煩雑である。そこで本研究では、申請者らがあらかじめ準備した非 RI ホスファターゼアッセイ系を用いて、PP2C α の阻害剤の探索を行った。基質はカゼインをゲルろ過クロマトグラフィーにより調製し、酵素はマウス PP2C α を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現し、精製したものをを用いた。この PP2C α アッセイ系により、微生物培養液の抽出液 2196 種類から PP2C α の活性を阻害または活性化する試料を探索した結果、49 種類の試料が阻害活性を示し、PP2C α を活性化した試料は3種類であった。現在、阻害活性が高かった試料をさらに分画し、活性画分の同定を進めている。

課題 6. コーヒー飲用の抗糖尿病効果の検討

担当 堀尾文彦

コーヒー飲用の 2 型糖尿病抑制効果について、肥満型 2 型糖尿自然発症モデルである KKAY マウスを用いて検討した。無糖コーヒー（ポッカコーポレーション製）を蒸留水で 2 倍希釈した溶液を飲水として KKAY マウス（雄）に 4 週齢から 7 週間自由摂取させた。対照群には蒸留水を与えた。全実験機関を通して、コーヒーの摂取は体重増加に全く影響を与えなかった。実験開始後、2 週目から対照群の血糖値は 400-500 mg/dl を示したが、コーヒー群では 300 mg/dl 以下に有意に抑えられた。この結果は再現性も確認できた。コーヒー群では KKAY の耐糖能異常が改善され、インスリン抵抗性も改善される傾向が見られた。さらに興味あることに、コーヒー摂取は KKAY の高 TG 血症と脂肪肝を改善した。

コーヒー群では血中のアディポネクチン濃度が上昇する傾向が観察されたことより、アディポネクチンの産生上昇がコーヒーの 2 型糖尿病抑制効果に寄与している可能性が推定された。これらのコーヒーの作用は初めて見出されたものであり、今後、他のアディポサイトカインの産生に対するコーヒーの作用を含めて、この抑制効果の機構を明らかにしていきたい。

課題 7. 線虫を用いた漢方系ダイエットサプリメント KGN-7 の効能評価と分子機序の解明

担当 三輪錠司

細胞の ATP 活性の向上および様々な活性酸素種を除去する能力を向上する効果があり、ヒトの老化にともなって発症率の高くなる病気（痴呆、リウマチ、糖尿病、癌など）の症状を改善する臨床例がある、100%天然素材でできた漢方系ダイエットサプリメント KGN ver.7(以下、KGN-7 と略す)について、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下、エレガンスと略す) を使った効能評価を行った。

ヒトにおける KGN-7 の推奨摂取量は 2 袋から 6 袋/日であるため、50 kg (=50 L 培地) のヒトが一日 5 袋を摂取する場合の濃度を $\times 1$ とし、 $\times 0.4$, $\times 0.8$, $\times 1$, $\times 1.6$, $\times 5$, $\times 50$, $\times 500$ および無処理のコントロールの計 8 段階の KGN-7 含有 NGM 培地を作成し、エレガンスの寿命測定をおこなった。 $\times 1.6$ 以下の濃度で培養した場合、KGN-7 を含まないコントロールと比べて差がみられなかったが、 $\times 5$ 以上の濃度になると、全ての濃度で 20% ほど寿命が延びる結果を得た。 KGN-7 は現在丸薬になっており、今回の抽出法が全成分の何割くらいを有効に取り出しているか正確にわからないが、有効な濃度を体内に摂取した場合、エレガンスの寿命で 20% も延びることになり、これをヒトの平均寿命 80 歳で換算するとおよそ 95 歳となる。

今後、KGN-7 が生物個体の一生に与える影響への評価、つまり成長、産卵(生殖能力)、化学走性(嗅・味覚の識別能)、運動能力、ATP 量の変化および SOD 活性変化を測定し、寿命の質(Quality of Life)からの評価もおこなう予定である。

新環境プロジェクト

プロジェクトリーダー：谷山鉄郎

課題：東海丘陵要素植物群落の保全生態学的研究—保全・修復とその管理に関する研究

担当：谷山鉄郎・寺井久慈・南基泰・愛知真木子・上野薫

中部大学恵那キャンパスは、シデコブシ、シラタマホシクサ、ミカワバイケイソウ、ミミカキグサなど東海丘陵要素植物に含まれる希少種・絶滅危惧種が生育する貴重な里山生態系である。しかし、2002 年にその一部がスケートリンク建設のために開発された。そこで、キャンパス内の動植物生態系を精査し、東海丘陵要素植物群の保全・修復と管理を図り、生物多様性の保全を目指すために 2003 年度に本プロジェクトを立ち上げた。

課題 1：恵那キャンパス内の植生と種多様性について

中部大学恵那キャンパスに自生するハルリンドウ (*Gentiana thunbergii*) に認められた葉緑体 DNA のハプロタイプについて

担当：南 基泰

中部大学恵那キャンパスにはいくつかの土岐砂礫層湿地があり、東海丘陵要素植物及びハルリンドウが数多くの集団を形成し自生している。本研究では、東海丘陵要素植物と生育地を共にすることの多いハルリンドウの遺伝的多様性について、分子生態学的手法を用いて評価した。中部大学恵那キャンパス 8 集団の葉緑体 DNA の *trnST* の塩基配列を決定した。その結果、5 つのハプロタイプ(以下、I-V 型)が確認された。中部大学恵那キャンパス内のトリムコースなど比較的自然度が高い場所では I-V 型が混在した集団が確認された。一方、グラウンド法面など人為的攪乱が大きかった場所では I 型もしくは II 型の単一の遺伝的構成であることが明らかとなった。以上

のことから、同じキャンパス内であっても人為的攪乱が大きい場所では、集団内の遺伝的多様性が低下してしまうことが示唆された。

課題 2：恵那キャンパスの湿地と溪流における水質の季節変化

担当：寺井久慈・岡田直己・後藤寛章・林愛

恵那キャンパス内の湿地(13 箇所)と溪流(10 箇所)を中心に 28 地点の水質調査を毎月実施し、pH、EC(電気伝導度)、陰イオン、陽イオン、溶存態有機物(DOC) について季節変化を調べた。2004 年は台風が多く雨量が多かったのに比して 2005 年は雨量が少なかったために、キャンパス内最大の湿地 3 の上部で 4 月～10 月は 8 月を除いて渇水状態となっていたが、表層水が存在した 6 回の平均 pH(5.3 ± 0.4) は昨年同様に全地点中最も低い特徴を示した。その他の地点では pH と EC で顕著な季節変化はなく、pH ではゴルフ地区 (6.1)、北地区(6.2)が西地区 (6.6) より低く、EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$) ではゴルフ地区 (34.2) > 東地区 (21.5) > 西地区 (17.5) > 北地区 (13.3) の順に低くなっている。DOC では湿地や湿地が多い東地区で春から夏に高くなり、溪流や溪流が主体の北・西地区で秋に高くなる傾向が認められた。DOC 濃度(mg/l) の年間平均値は湿地 (3.1) が沢 (1.9) より高く、地区別では東 (2.8) > 西 (2.4) > ゴルフ場 (2.1) > 北 (1.9) の順となっていた。イオン分析ではゴルフ場で Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- の濃度が極めて高く、人為的影響が示唆された。北地区と西地区を比較して年間を通じて K^+ と Ca^{++} 濃度が西地区で高く、 NO_3^- 濃度は北地区で高いという違いが認められ、pH や EC の違いとも合わせて北斜面と西斜面における樹種や樹齢のちがいが示唆された。

課題 3．生態環境要因と植物体における硝酸イオン濃度の調査と研究

担当 愛知真木子・安藤憲亮・伊藤康晴・加藤知恵・河原由布子・近藤香苗・高橋秀明・坪内咲実・上野 薫・南 基泰・永井 和夫

2 年間にわたり、植物が生育する基盤となる土壌水および湧水の化学的性質 (pH, 電気伝導度, 硝酸・亜硝酸イオン濃度) を、モウセンゴケ属植物が自生する地域を中心に測定すると共に、植物中に含まれる硝酸・亜硝酸イオン含量を測定した。さらに本年度は、モウセンゴケ(Dr.)とトウカイコモウセンゴケ(Dt.)を 0~15mM の異なる硝酸イオン濃度で栽培したところ、Dt.では生育に変化が見られなかったのに対し、Dr.では 5mM でやや生育が悪くなり、15mM では枯死したが、栽培条件が同じ Dt.と Dr.の細胞内硝酸・亜硝酸イオン濃度に差はなかったので、Dt.は高硝酸イオン濃度あるいは高塩濃度に耐性である可能性が示唆された。この結果は、土壌水および湧水の化学的性質の調査の結果、Dr.の生育地の電気伝導度、硝酸イオン濃度は $36\text{--}56\mu\text{S}/\text{cm}$ および $0.83\text{--}1.86\mu\text{M}$ であったのに対して、Dt.の生育地は $19\text{--}153\mu\text{S}/\text{cm}$ および 0.2 以下- $86.54\mu\text{M}$ と高い値を示した結果と合致している。すなわち、Dt.は Dr.より幅広い水質環境に適応していると推察される。

課題 4. 恵那キャンパスにおけるモセイゴク属植物の生育土壌環境

担当 上野 薫・安藤憲亮・加藤知恵・愛知真木子・南 基泰

恵那キャンパス内のモセイゴク属植物の自生地と非自生地について、土壌 pH (H₂O)、土壌 EC1:5、土壌水分状態を測定しこれらの自生地土壌環境の把握を試みた。その結果、土壌 pH (H₂O) は、モセイゴク自生地で pH5.30~6.17、トウカイモセイゴク自生地で pH5.27 となっており、トウカイモセイゴクがより酸性の土壌に自生している傾向にあった。土壌 EC1:5 は、モセイゴク自生地で 2.9~7.8 μ S/cm、トウカイモセイゴク自生地で 8.4 μ S/cm であり、トウカイモセイゴクがわずかに値の高い土壌に自生している傾向がみられた。モセイゴク自生地と非自生地の土壌 EC を比較すると、非自生地 (6.4~10.5 μ S/cm) は自生地よりも値が高い傾向にあった。また、モセイゴクが自生する典型的な湿地 1 箇所内での自生地・非自生地における土壌水分状態の連続観測 (2005 年 5~11 月) から、モセイゴク自生地は pF0.7~1.2 の範囲で安定した高湿潤状態、非自生地は pF0.7~3.0 以上の変動幅の大きな高乾燥状態であることが分かった。以上のような生育土壌環境の種特異性を明らかにするためには、観測点数を増やし他地域との比較を行うことが必要である。

外部資金プロジェクト

1. 健康食品科学寄付研究部門

「成熟破骨細胞に作用する機能性食品成分、ルテオリン作用機構の解析」

担当：米澤貴之、永井和夫、禹 済泰

骨粗鬆症を予防可能な食品成分を得る目的で、破骨細胞の分化及び機能に作用する活性物質を植物代謝産物中から探索し、ルテオリンに破骨細胞の初期分化を阻害することをみいだした。本研究では、ルテオリンによる破骨細胞の初期分化及び成熟破骨細胞の骨格維持破壊の作用機構を明らかにすることを目的として行なった。破骨細胞の progenitor 細胞である RAW264 細胞培養系を用いて RANKL によって変動するシグナル分子 (NF- κ B, p38, JNK, ERK など) におけるルテオリンの影響を western blotting 法で検討した結果、ルテオリンは、これらのシグナル分子の活性化には影響を与えなかったが、破骨細胞分化において必須発現転写因子である NFAT の発現を抑制した。ルテオリンによる破骨細胞分化阻害は、NFAT の発現抑制に由来すると結論した。