



日本農芸化学会 関東支部 2017年度 第1回 支部例会

受賞講演

講演要旨集

2017年7月1日(土)

東京大学農学部

主催 公益社団法人 日本農芸化学会 関東支部

日本農芸化学会 関東支部 2017年度 第1回 支部例会
プログラム

13:00 開会

<受賞講演>

13:05 2017年度農芸化学技術賞
新規酵素による汎用的ペプチド新製法の開発とアスパルテームの工業生産
吉良 郁夫(味の素 株式会社)

13:35 2017年度農芸化学技術賞
天然吸着剤による茶飲料からのカフェイン除去技術の開発
塩野 貴史(キリン 株式会社)

14:05 2017年度農芸化学奨励賞
機能的食品成分の味覚シグナルが中枢を介して発動する生理作用の解析
成川 真隆(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

14:35 2017年度農芸化学奨励賞
ポリケタイド化合物の分子多様性を生み出す生合成酵素の構造機能研究
宮永 顕正(東京工業大学 理学院)

15:05 休憩

15:30 2017年度農芸化学奨励賞
高効率合成を指向したリグナン及びテルペノイドの合成研究
森 直紀(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

16:00 2017年度農芸化学女性企業研究者賞
きのこ由来レクチンのがん診断への応用
小林(袴田) 夕香(株式会社 J-オイルミルズ)

16:30 2017年度農芸化学女性企業研究者賞
カカオポリフェノールに関する包括的研究
夏目 みどり(株式会社 明治)

17:00 閉会

<懇親会>

17:20 アブルポア ※事前申込制

新規酵素による汎用的ペプチド新製法の開発と
アスパルテームの工業生産

Eat Well, Live Well.

AJINOMOTO®

味の素株式会社

はじめに

1901年、E. Fischer による Gly-Gly の合成が初めて報告されて以来、ペプチド生産技術は飛躍的に発展してきた。不要ペプチド副生を抑制し効率的にペプチド鎖を延長するための保護基の導入技術の確立（1930年代）、必要な縮合エネルギーを得るための活性エステル法等によるカルボキシ成分の活性化方法の確立（1950年代）、固相ペプチド合成法の確立（1963年）等の優れた技術開発によって、ペプチド合成法の基盤技術が確立された。一方、Bergman らによるプロテアーゼを用いるペプチド合成法の発見（1937年）以来、化学合成法で問題となるアミノ酸のラセミ化を回避する方法として酵素法が開発されたが、生成ペプチドが沈殿して系外に除去される特殊な例を除き高い生産性は得られていない。また、我々が本ペプチド新製法を発見した直後に、ATP を要求する ligase を用いたジペプチド生産方法が報告された。優れた方法であるが、生産可能なジペプチドの種類が限定される点、トリペプチド以上のオリゴペプチド生産が不可能な点等、汎用性に乏しいという課題も有している。

このように、汎用性と生産性が高い方法として化学合成法を中心にペプチド合成技術が確立されたが、アミノ酸への保護基の導入・脱離工程が必須であるため、新たなブレイクスルーが求められていた。

1. ペプチド新製法の開発

1-1. 新製法開発の考え方

従来の工業製法の欠点を克服すべく、アミノ酸への保護基の導入と脱離工程の省略、縮合エネルギーとして高価な活性エステルや ATP からの脱却を念頭に、化学合成法と同様に高い生産性と汎用性を有する安価な酵素的新製法の構築を目指した。活性化エステル法に相当する方法として安価なメタノールを縮合エネルギーとする方法、すなわちカルボキシ成分として N-無保護のアミノ酸メチルエステル（アミノ酸-OMe）、アミン成分としては無保護のアミノ酸を基質とする方法を採用した（図1）。このような考えでの報告は極めて少なく、一部のペプチド合成において、カルボキシペプチダーゼ Y（CPase Y）等を用いる方法が特許報告されているのみで、多量の酵素量添加、反応速度の低さ、汎用性の低さ等多くの課題を残していた。

1-2. 新規酵素の探索と新製法の構築

新規酵素の探索において、アミノ酸がアミノ酸-OMe に求核攻撃してペプチドを生成する条件はアルカリ性下と予想されたが、アミノ酸-OMe はアルカリ水溶液中で容易にアミノ酸とメタノールに自発的分解するという基質の不安定性を有するので、基質の自発的分解速度を圧倒的に凌駕するペプチド合成速度（比活性）を有する新規酵素を採取することが必須条件となった。目的酵素を生産する微生物のスクリーニングに用いた系は、輸液成分として有用であるが高価なために需要が拡大できないと

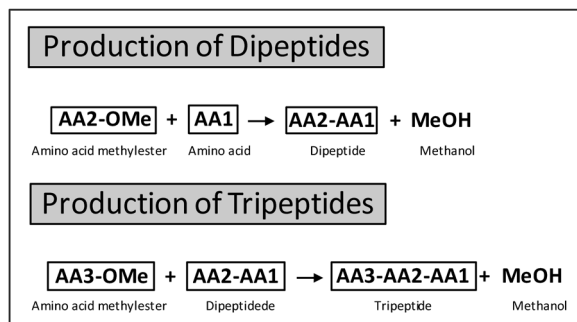


図1. 新規酵素によるペプチド生産様式

いう課題をもつ Ala-Gln に着目し、(Ala-OMe + Gln → Ala-Gln + メタノール) の系を選定した。生成 Ala-Gln を分解する菌体内プロテアーゼ活性を低下させ、ペプチド生成酵素が存在すれば菌体反応で Ala-Gln の蓄積が観察できる系を構築して微生物を広く検索した結果、Ala-Gln を微量生成する微生物は比較的多数見出されたが、高収率、高生産で Ala-Gln を生産する微生物の採取は困難を極めた。スクリーニング条件の変更等により最終的には *Empedobacter brevis* 等の数株の優良株を採取することができた。ペプチド合成の潜在能力を見極めるため、これら選抜株群から単離した精製酵素を用いてペプチド合成能を検討した結果、Ala-Gln の合成収率が 50% を超える酵素群と、10% 以下の酵素群に大別できた。精製酵素の分子量、これらの微生物からの目的酵素をコードする遺伝子の塩基配列決定により、高い合成収率を与える *Empedobacter brevis* 由来の酵素は約 70 kDa のモノマーからなる 2 量体のセリン酵素であった。既存酵素にはアミノ酸配列に高い相同性を示すものがないことより新規な酵素と推察された (amino acid ester acyl transferase と命名)。一方、低い合成収率しか得られない *Bacillus* 属細菌由来等の酵素はプロリンイミノペプチダーゼに高い相同性を示すことより、本酵素群によるペプチド合成はプロテアーゼによる転移反応により触媒され、そのため合成収率が低いものと考えられた。

最優良酵素として選出した *Empedobacter brevis* 由来の精製酵素を用いて、Ala-OMe (100 mM) と Gln (200 mM) からの Ala-Gln 合成反応を検討した結果、極めて短時間の反応で 80% 以上の高い合成収率が得られることが判明した。反応液には少量の Ala 副生が観察されたが、Ala-Ala, Gln-Ala, Ala-Ala-Gln 等のペプチド副生は観察されなかった。Ala-OMe は本反応系において短時間で完全に自発的に加水分解されるので、上記結果は、本酵素が Ala-OMe の自発的分解を圧倒的に凌駕するペプチド合成速度を有していることを示唆している。また、生成 Ala-Gln の分解、Ala, Gln のラセミ化も全く観察されず、目的とした能力をそなえている転移酵素であることが確認された。

本酵素の能力を検証するため、Ala-Gln 生産性を、既知酵素

の中で最も能力の高いと報告されているカルボキシペプチダーゼ Y と比較した結果, CPase Y の Ala-Gln 生産の比活性は, $0.042 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein と極めて微弱であるのに対し, 本酵素の比活性は, $220 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein と極めて高い値を示し, CPase Y の約 5000 倍という圧倒的なペプチド合成能力を示した (分子量当りの比活性は約 6000 倍).

1-3. 新製法の長所

本酵素の利点は, 高収率, 高生産性に加え, Ala-Gln 以外の種々のジペプチド合成に汎用的に応用できる点にある. 本酵素は, カルボキシ成分, アミン成分の双方に広い基質特異性を有しており, 種々のジペプチド生産に利用可能である.

本法の更なる利点は, 上記ジペプチド生産に加え, 鎖長 3 以上のオリゴペプチドの生産も可能な点にある. 本酵素は, N 成分としてジペプチド以上のペプチドも基質として認識でき, 種々のオリゴペプチド生産に応用可能である (図 1). 例えば, Thr-OMe と Gly-Gly, Gly-OMe と Gly-Tyr-Ala からの Thr-Gly-Gly, Gly-Gly-Tyr-Ala 生産収率は, それぞれ 83%, 44% に達する. また, 本酵素は種々の非天然型アミノ酸-OMe, 非天然型アミノ酸も基質として認識できるので, 非天然型アミノ酸を含むジペプチド合成にも応用可能であり, 汎用性に優れた安価なオリゴペプチド新製法として期待される.

2. ペプチド新製法の工業化

2-1. アスパルテームの工業化

アスパルテーム (Asp-Phe- α -OMe) は通常のジペプチドとは異なり, 構成成分の Asp は 2 つのカルボキシ基を有しアミン成分の Phe はメチルエステル化されているため, その製法には工夫が必要であった. まず Asp をメチルエステル化し Asp のジメチルエステル体 (MeO- β -Asp- α -OMe) に変換し, 酵素反応でこの Asp ジメチルエステルに Phe を縮合させて OMe- β -Asp-Phe を生産する. 生成された OMe- β -Asp-Phe のメチルエステルは塩酸酸性化で自発的にアミン成分の Phe のカルボキシ基に転移するとともに, 転移生成した Asp-Phe- α -OMe (アスパルテーム) は難溶性の塩酸塩となって晶析するため, 酵素反応で得られた OMe- β -Asp-Phe は全量アスパルテーム塩酸塩に転移晶析される. 本転移晶析技術は, 味の素(株)の従来の合成法において開発され工業化に大いに貢献した特徴ある技術である (図 2).

新規酵素として *Empedobacter brevis* から見出されたペプチド生成酵素のアミノ酸配列に相同性を有する酵素ホモログを広く検索し, 更に工業化に適した性質を有する酵素を生産する微生物として *Sphingobacterium* 属に属する細菌を選出した. 更にアスパルテームの効率生産に適した変異型酵素の取得に成功

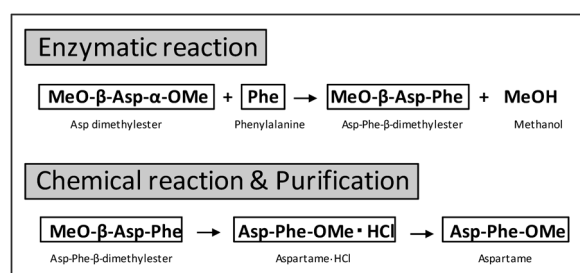


図 2. アスパルテームの生産方法

し, 変異型酵素を高発現させた微生物の培養条件, 本微生物を用いた酵素反応条件を種々検討し, 従来の化学合成法と同等の高生産性, 短時間反応のアスパルテーム生産を達成した. この反応液からのペプチドの効率的精製条件も確立し, 2012年7月にアスパルテームの工業生産を開始した. 現在も順調に稼働している (図 2).

2-1. おわりに

本技術は, 現在, 輸液成分として有用なアラニルグルタミンと高甘味度甘味料として広く利用されているアスパルテームの工業生産に使用されている. アラニルグルタミンはその輸液成分としての有効性は高く評価されているものの, 未だ市場規模は小さい. 一方, アスパルテームは世界規模で年間約 2 万 5 千トンという巨大な市場を形成しており, 味の素(株)のシェアはその 30% 程度を占めている (味の素(株)IR 資料 2016 年). 現在, 味の素(株)で生産するアスパルテーム全量が本技術で工業生産されるに至っている.

(引用文献)

- 1) A Novel and Efficient Enzymatic Method for the Production of Peptides from Unprotected Starting Materials. K. Yokozeki and S. Hara, *J. Biotechnol.*, **115**, 211–220 (2005)
- 2) Gene Cloning and Characterization of α -Amino Acid Ester Acyl Transferase in *Empedobacter brevis* ATCC 14234 and *Sphingobacterium siyangensis* AJ2458; Isao Abe, Seiichi Hara and K. Yokozeki, *BioSci. Biotechnol Biochem.* **75**, 2087–2092 (2011)
- 3) A Powerful New Tool for Peptide Production; Kenzo Yokozeki, *Specialty Chemicals Magazine*, **March**, 42 (2005)
- 4) 新規酵素を用いる工業的ペプチド新製法の開発; 横関健三, バイオサイエンスとインダストリー, **64**, 75–81 (2006)

謝 辞 研究を終始温かく見守ってくださった京都大学名誉教授 山田秀明先生, 京都大学名誉教授 清水昌先生, 東北大学および東京農工大学名誉教授 一島英治先生に心より感謝いたします.

天然吸着剤による茶飲料からの
カフェイン除去技術の開発



- ① キリン株式会社 飲料技術研究所 塩 野 貴 史①
- ② キリンビバレッジ株式会社 湘南工場 河 合 淳一郎②
- ③ キリン株式会社 飲料技術研究所 山 本 研一朗③
- ④ キリン株式会社 飲料技術研究所 四 元 祐 子④

はじめに

カフェインは茶葉やコーヒー豆、カカオ豆などに含まれる天然の食品成分で、緑茶や紅茶、コーヒーなどの嗜好飲料やチョコレートなどの菓子類から日常的に摂取されている。しかし、近年、海外では妊婦のカフェイン摂取量の目安を示している国が出てきており、日本でも厚生労働省が「健康づくりのための睡眠指針2014」の中で就寝前のカフェイン摂取を控えることを推奨するなど、飲用シーンや体質・体調に応じてカフェイン摂取を調節したいというニーズが拡大している。

従来の低カフェイン茶やカフェインレスコーヒーでは、原料処理工程において湯や超臨界二酸化炭素、有機溶剤などで茶葉やコーヒー生豆からカフェインを溶出させる除去方法が主として用いられてきた(図1)。しかしながら、これらの方法ではカフェイン溶出とともに香気やカフェイン以外の呈味成分も失われるため、低カフェインでありながらおいしさも維持された飲料を実現する新たなカフェイン除去技術が望まれていた。

本研究では、茶抽出液からカフェインを選択的に除去する技術を開発することを目的に、天然吸着剤であるモンモリロナイトを選抜し、その吸着特性や汎用性を解析した。さらに、製造条件が茶飲料の品質に及ぼす影響やコーヒーへの応用の可能性についても検討し、その有効性を示した。

1. カフェイン選択的吸着剤の探索

食品添加物として認可されている天然吸着剤の中で、カフェイン吸着能を示した活性炭とモンモリロナイトについて緑茶抽出液中のカフェイン吸着特性を詳細に比較した。その結果、カフェインの除去率が增大するのに伴い、活性炭処理ではカフェインだけでなくカテキン類も減少したのに対し、モンモリロナイト処理ではカテキン類はほとんど減少せず、茶抽出液中のカフェインが選択的に吸着・除去された(図2)。

また、活性炭とモンモリロナイトについてカフェイン溶液と緑茶抽出液におけるカフェイン吸着能を比較したところ、活性炭では緑茶抽出液中のカフェイン吸着量が顕著に低下したのに対し、モンモリロナイトではカフェイン溶液と緑茶抽出液の差異は限定的であった。したがって、モンモリロナイトは活性炭に比べて緑茶抽出液中のカフェイン吸着における選択性が高いことが示された。

2. モンモリロナイトによるカフェイン除去技術の汎用性

モンモリロナイトによる茶抽出液中のカフェイン吸着において、茶種の違いが及ぼす影響を調べた。緑茶、烏龍茶、および紅茶における吸着特性を評価したところ、茶種に依らずカフェイン吸着特性は同様のパターンを示した(図3)。これらの結果から、モンモリロナイトによるカフェイン除去技術は、幅広い茶飲料で活用できることが示唆された。

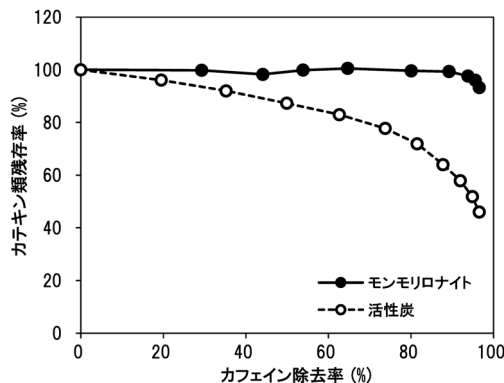


図2 茶抽出液中のカフェイン吸着における選択性

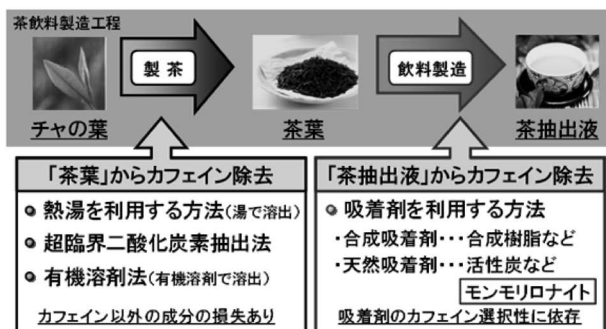


図1 茶におけるカフェイン除去技術

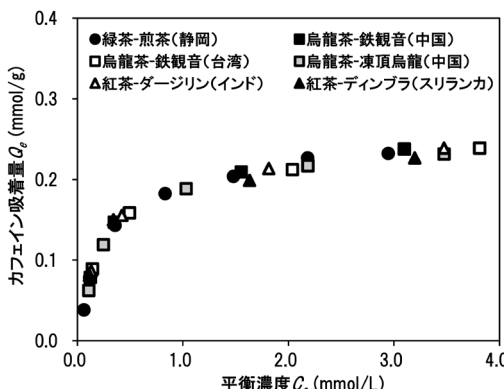


図3 各種茶抽出液におけるカフェイン吸着特性



モンモリロナイト処理後
に調製した緑茶飲料

接触条件

左：pH7.3, 5°C, 60分

右：pH5.8, 35°C, 60分

図4 接触条件の違いが茶飲料の外観に及ぼす影響

3. モンモリロナイトの接触条件が茶飲料品質に及ぼす影響

モンモリロナイトは天然の粘土鉱物であるため、接触条件によってはミネラル類の溶出が懸念された。そこで、茶抽出液との接触条件が及ぼす影響を調べたところ、低い接触pH、あるいは高い接触温度では茶抽出液中のFe濃度が上昇し、それに起因して液色の明度が下がり、茶飲料の外観品質が低下した(図4)。一方、接触pH 4~8および接触温度5~35°Cの範囲では、接触条件に依らずカフェイン吸着量は一定であることも確認した。これらの傾向から、カフェインを低減しつつ茶飲料の外観品質維持は両立可能であり、実用的な飲料製造においてもモンモリロナイトが活用できることが示唆された。

4. コーヒーへの応用

モンモリロナイトによるカフェイン除去技術が、茶飲料だけでなくコーヒーにおいても応用できるかを検証するために、コーヒー抽出液中における活性炭とモンモリロナイトのカフェイン吸着特性を比較した。その結果、茶抽出液中での特性と同様に、活性炭処理ではカフェイン除去率の増大に伴って、コーヒー中の主要なポリフェノールであるクロロゲン酸類も減少した。一方、モンモリロナイト処理ではカフェイン除去率の増大に伴うクロロゲン酸類の顕著な減少は確認されなかった(図5)。したがって、モンモリロナイトにはコーヒー抽出液中においてもカフェインを選択的に吸着・除去できる可能性があることが示唆された。

さらに、コーヒーにおける汎用性を確認するために、コーヒー豆の焙煎度の影響についても検証したところ、焙煎度(L値15~27)に依らずカフェイン吸着特性は同様のパターンを示した(図6)。これらの結果から、モンモリロナイトによるカフェイン除去技術は、茶飲料だけでなく多様な焙煎度のコーヒーにおいても活用できることが示唆された。

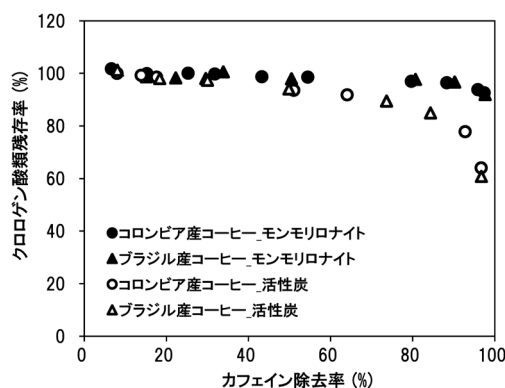


図5 コーヒー中のカフェイン吸着における選択性

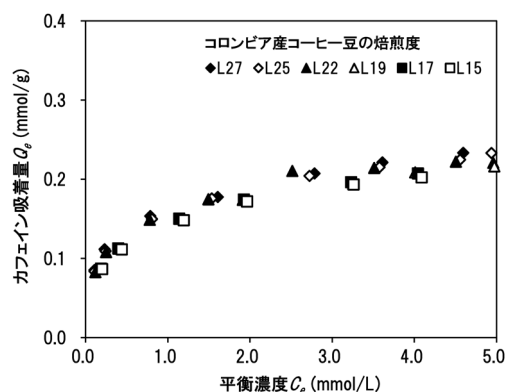


図6 焙煎度違いのコーヒーにおけるカフェイン吸着特性

おわりに

我々は、茶飲料の香味や外観品質は維持したまま抽出液中のカフェインを選択的に吸着・除去する技術を開発した。当該技術は工業化にも成功し、カフェインゼロの緑茶飲料および紅茶飲料として幅広いお客様に飲用していただけるようになった。

現在、カフェイン吸着のメカニズム解明に向けた研究や、吸着剤の改良などの研究を継続している。今後も、お客様に新しい日常を提供できるおいしい飲みもの造りを目指して研究を重ね、食品業界全体の発展に貢献していきたい。

謝辞 本賞にご推薦いただきました日本獣医生命科学大学・西村敏英教授に深謝いたします。また、本研究の推進にあたり、ご助言・ご指導を賜りました京都大学・米田稔教授、松井康人准教授ならびに信州大学・岡田友彦准教授、飯山拓准教授に厚く御礼申し上げます。本研究成果は、キリン株式会社、ならびにキリンビバレッジ株式会社をはじめ、キリングroup各社の多くの関係者の尽力によるものであり、関係の皆様へ感謝いたします。



機能性食品成分の味覚シグナルが中枢を介して発動する生理作用の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 成川 真隆

はじめに

食品の働きは栄養面での一次機能、味や匂いなど嗜好面での二次機能、そして生体調節による疾病予防の面での三次機能に類型化される。生活習慣病の顕在化を背景とし、食品機能学が提唱され、三次機能を強化した機能性食品の確立に繋がった。機能性食品は広く一般に受け入れられ、その市場規模は年々増加している。今後、機能性食品が消費者にさらに受け入れられるためには、二次機能も重視した嗜好性の高い製品であることが不可欠であろう。一方、味や匂いなどの嗜好性シグナルそのものが、生体生理と密接に関わっていることが示唆されている。よって、機能性成分の二次機能もその科学的効果を論じる上で極めて重要であると考えられる。しかし、機能性食品成分の呈味特性に関する評価はこれまでほとんど行われていなかった。

近年、食品の味の受容機構に関して、味覚受容体やシグナル伝達分子の同定が進み、多くの知見が集積してきた。しかし、その詳細な機構については未だ不明な点が残されている。嗜好性の高い食品を提案する上でも味の受容機構の解明は欠くことができないと考えられる。

本研究では機能性食品、あるいはそれが発する生体シグナルについての新たなコンセプトの発信を目指し、機能性食品成分の呈味特性の解析を試みた。同時に味の受容機構についても解析を行った。

1. 機能性食品成分を受容する味覚受容体の同定

これまでに穀物、野菜や果物など様々な食品から機能性成分が同定されている。機能性成分は多くの生理活性を有することから、積極的な摂取が推奨されている。しかし、機能性成分は不快な味を呈することが多く、食品の呈味を低下させる原因となる。したがって、機能性成分の味をコントロールすることが、機能性食品の味を向上するために重要になる。しかし、その味がどのように生じているのかほとんど明らかではなかった。食物の味は味覚受容体を介して生じることから、味覚受容体に注目し、研究を行った。

緑茶は代表的な嗜好性飲料であり、カテキン類やテアニンなどの特有な成分が含まれている。近年、緑茶の健康増進効果や疾病リスク低減効果が報告されているが、その機能のほとんどはこれら成分に由来すると考えられている。機能性成分の呈味特性を解析する上で、茶は有効なモデルになると考え、カテキンとテアニンを受容する味覚受容体の同定を試みた。

カテキンは強い抗酸化能を有し、様々な機能性を発揮するが、苦渋味を呈するため、茶の嗜好性を低下させる原因となる。したがって、カテキンの味を制御することは産業的にも大きな関心が寄せられている。そこで、ヒト苦味受容体 (hTAS2Rs) を発現させた培養細胞を用いて、カテキンに反応する苦味受容体の同定を試みた。25種類存在する苦味受容体を用いて濃度応答関係を評価した結果、hTAS2R14とhTAS2R39がカテキンに

対して応答を示すことが分かった。これら受容体のうち、hTAS2R39の応答プロファイルがヒト官能評価の結果とよく一致したことから、客観的なカテキンの味評価系として、hTAS2R39発現細胞系が有用だと考えられた (図1)。

一方、テアニンは茶で最も豊富に含まれるアミノ酸であり、茶やその近縁種にしか存在しないことから、茶の独特の風味に寄与すると考えられる。官能評価と実験動物を用いた行動学的及び神経生理学的解析を行った結果、テアニンが旨味を中心とした味を呈し、かつ核酸との間で旨味の相乗効果を示すことがわかった。そこで、旨味受容体 (T1R1+T1R3) を用いて、テアニン応答を測定した。その結果、テアニンがT1R1+T1R3を活性化すること、さらに、受容体レベルにおいても核酸との間で相乗応答を示すことを明らかにした。このように、茶の主要な機能性成分であるカテキンとテアニンを受容する味覚受容体を同定することに成功した。このような成果は味のバランスをコントロールする上で重要になると考えられる。

2. 味シグナルを中枢へ伝える伝達機構

食品の味はその価値を決定づける主要な因子であることから、味受容機構の解明は食品を対象とする研究において重要な課題となる。動物が食物の味を正確に感じることができるのは、末梢から中枢へ高度に保持された味情報伝達機構が存在するためである。中枢では末梢からの情報の統合が行われる一方で、味の識別は末梢で行われている。そこで、末梢における味情報伝達に着目し、解析を行った。

酢酸などの有機酸は抗肥満や疲労回復などの効果が知られている機能性素材である。これら有機酸は酸味を呈するが、その酸味シグナルがどのように中枢に伝達されるのか明らかではなかった。4種類存在する味細胞のうち、III型味細胞が酸味を主に受容すると考えられている。味覚神経はIII型味細胞とシナプスを形成するが、他の味細胞とは形成していない。そのため、III型味細胞がシナプスを介して味情報伝達を行うと考えられているが、その詳細には不明な点が多く残されている。こ

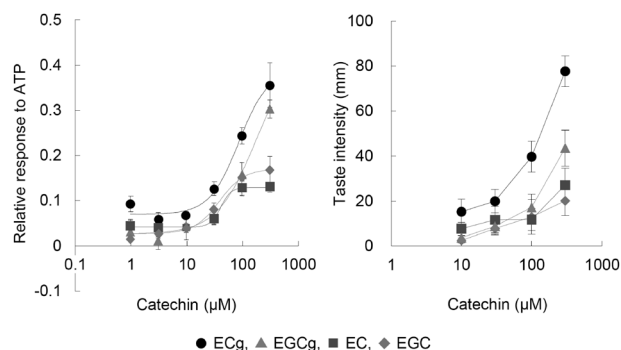


図1 茶カテキンに対する応答の比較
hTAS2R39の応答強度(左)とヒト官能評価結果(右)

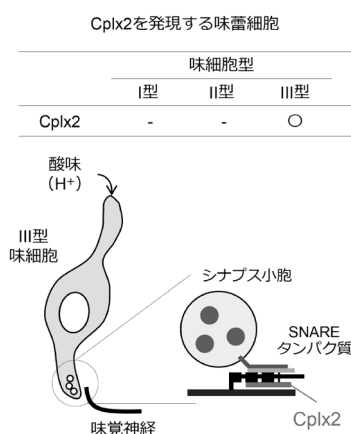


図2 Cplx2の発現と味情報伝達における役割

のシナプス性味情報伝達機構を明らかにするために、味蕾に発現するシナプス関連分子の発現を調査した。その結果、III型味細胞特異的にシナプス関連分子コンプレキシン2 (Cplx2) の発現を確認した(図2)。さらに、CPLX2欠損マウスを用いて、味応答におけるCplx2の役割を検討した。CPLX2欠損マウスでは基本味の中で酸味刺激に対する味覚神経活動のみが有意に低下することを見出した。この傾向は行動学的解析でも同様に観察され、Cplx2が酸味情報伝達に関与することが明らかになった。これらはIII型味細胞が酸味情報伝達に関与すること、また、III型味細胞がシナプスを介して味情報伝達を行うことを強く示唆する結果と言える。

3. 味シグナルの中樞を介した生理作用の解析

機能性食品成分や栄養素から生じる味シグナルは口腔や消化管に存在する化学受容細胞によって受容される。この情報は求心性神経や液性因子を介して脳で認知され、摂食行動やエネルギー代謝などのエネルギー恒常性をコントロールしていると考えられる。しかし、味シグナル自体がどのように生理作用を発揮するのか不明な点が多い。我々の研究グループでは転写調節因子Skn-1aを欠損したマウスは、甘・苦・旨味を感じられない味盲マウスであることを見出し、さらにSkn-1aが消化管刷子細胞の分化も制御していることを明らかにした。したがって、Skn-1a欠損マウスは味シグナルの入力が極めて少ないマウスであると考えられた。よって、Skn-1a欠損マウスは味シグナルが生体生理に与える影響を調べるための強力なツールになりうると考えられた。そこで、Skn-1aの欠損が摂食行動やエネルギー代謝に与える影響を詳細に検討した。Skn-1a欠損マウスでは野生型マウスに比べて、体脂肪の低下を伴う体重減少を示すことがわかった。両者間で摂食量の差は見られなかったが、欠損マウスでは消費エネルギーの増加が観察された。消費エネルギーを上昇させるホルモンのうち、甲状腺ホルモン量に変化は見られなかったが、カテコールアミン分泌量が欠損マウスで有意に増加することを見出した。すなわち、カテコールアミン分泌量が促進することでエネルギー消費量が増加し、体脂肪量が減少することがわかった。この結果は、味シグナルを

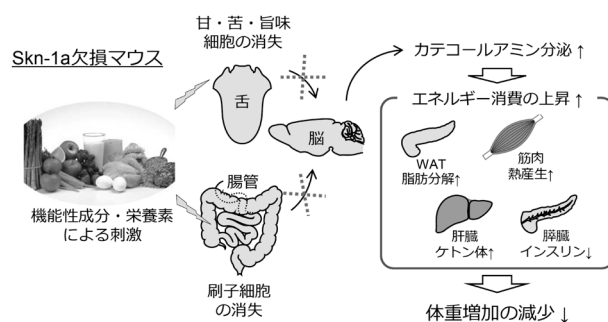


図3 味細胞や刷子細胞を起点としたエネルギー代謝制御機構

受容する味細胞や刷子細胞からの感覚シグナルが起点となり、脳を介したエネルギー代謝を制御する新しい機構の存在を示唆する結果であると考えられる(図3)。

おわりに

本研究では食品の味に着目し、基礎・応用の両面から研究を行ってきた。嗜好性(二次機能)は食品の質の最も端的な属性であるが、それは単にエモーショナルな満足を与えるだけでなく、栄養性(一次機能)さらには生理機能性(三次機能)の調節にも関係する。機能性成分の呈味特性を明らかにする本研究の取り組みは、食品自体の嗜好性を向上させるためだけでなく、機能性成分に嗜好面からの機能も付与するという、食品の持つディメンションを新たに拓く取り組みであると考えられる。また、それら一連の取り組みは味覚受容システムの普遍的な解明にも極めて有効であると考えられる。

謝辞 本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科生物機能開発化学研究室、静岡県立大学食品栄養科学部食品化学研究室及び京都大学大学院農学研究科品質評価学分野で行われたものです。日々ご指導ご鞭撻を賜り、本賞にご推薦いただきました東京大学名誉教授 阿部啓子先生に心より御礼申し上げます。日頃から温かいご指導、ご助言をいただいている東京大学 三坂 巧先生に深く感謝申し上げます。静岡県立大学 渡辺達夫先生(現 HSU)、古旗賢二先生(現 城西大)、守田昭仁先生には研究を始めるきっかけと多くのご指導をいただきました。厚く感謝申し上げます。また、学生時代よりご指導、ご支援いただいている京都大学 故・森 友彦先生、松村康生先生、林由佳子先生、松本晋也先生(現 京都女子大)に厚く御礼申し上げます。本研究成果は多くの皆様の多大なるご支援によるものです。朝倉富子先生、石丸喜朗先生、岡田晋治先生、應本真博士、戸田安香博士、黒川(三木)あずさ博士、牛尼翔太博士、須藤浩三博士、岩崎有作博士、野賀千晶氏をはじめ、ここでお名前を挙げつくせませんが、本研究に携わりましたすべての先生方、卒業生、在学生、共同研究者の方々に深く感謝いたします。最後になりましたが、さまざまな機会にご助言を賜り、ご指導いただきました東京農業大学客員教授 荒井綜一先生に厚く御礼申し上げます。



東京工業大学理学院 宮 永 顕 正

ポリケタイド化合物の分子多様性を生み出す生合成酵素の構造機能研究

はじめに

微生物が生産するポリケタイド化合物は多様な化学構造と生物活性を有しており、医薬品や抗生物質として利用されている。その生合成反応においては、ポリケタイド合成酵素 (PKS) が開始基質となるアシル基に伸張基質を縮合することにより炭素鎖が伸長し、生じたポリケタイド中間体が環化することにより、ポリケタイド化合物の炭素骨格が構築される。PKS が用いる開始基質・伸張基質の違いやポリケタイド中間体の環化様式の違いにより、ポリケタイド骨格の構造多様性が生み出されている。微生物は多様なポリケタイド化合物を生産するために、開始基質の構築や選択に関わる酵素、環化反応に関わる酵素などをそれぞれ進化させてきた。これらポリケタイド生合成に関わる酵素群の機能や構造を明らかにすることができれば、その情報を基に人為的に生合成酵素の改変を行うことにより有用な活性を示す非天然型ポリケタイド化合物の創製など、応用に結びつけることができると考えられる。我々は、ポリケタイド生合成に関わる酵素の構造機能解析に取り組み、多くの重要な知見を得た。以下に研究内容の概要を紹介する。

1. マクロラクタム化合物生合成酵素の構造機能解析

放線菌によって生産されるマクロラクタム化合物は、環状アミド構造を有するポリケタイド化合物であり、独特な抗菌性や抗腫瘍活性を示す。その生合成においては、様々なβ-アミノ酸が開始基質として利用され、構造多様性が生み出されている。

Streptomyces halstedii HC34株が生産する vicenistatin は、20員環マクロラクタム配糖体抗生物質であり、ヒト大腸がん細胞に強い細胞毒性を示す。vicenistatin のポリケタイド骨格には、β-アミノ酸である3-アミノイソブタン酸部位が含まれて

いる (図1)。我々は、この3-アミノイソブタン酸部位の構築機構を明らかにするために、鍵となる酵素群の構造機能解析を行った。まず、vicenistatin 生合成において開始基質を選別する役割をしているアデニル化酵素 VinN の結晶構造解析を行った。VinN と基質である3-メチルアスパラギン酸との複合体構造を決定し、また部位特異的変異解析を行うことにより、アデニル化酵素によるβ-アミノ酸の認識機構を初めて明らかにした。vicenistatin の生合成では、ポリケタイド鎖伸長反応中における非酵素的な環化反応を防ぐため、β-アミノ酸のβ-アミノ基はアラニル化された状態でI型PKSへと受け渡される。その受け渡し反応を触媒するアシル基転移酵素 VinK の結晶構造を決定し、VinK がアラニル化されたジペプチド体のみを基質として選択的に認識する機構を明らかにした。さらに、このアラニル基の除去を担うアミド加水分解酵素 VinJ の構造機能解析を行い、ポリケタイド鎖が十分に伸長した後にアラニル基が除去されることを明らかにした。このように、VinK と VinJ はβ-アミノ基の保護と脱保護のタイミングを制御するための厳密な基質特異性を有することが明らかになった。

また、vicenistatin とは異なるβ-アミノ酸を開始基質部位に有するマクロラクタム化合物の生合成研究を行った。hitachimycin や fluvirucin B₂ の生合成遺伝子クラスターを同定し、生合成経路を明らかにした。これまでに明らかにしたマクロラクタム化合物の生合成酵素群を比較したところ、保護と脱保護に関わる酵素などは高度に保存されており、共通的なβ-アミノ酸運搬機構が示唆された。一方で、β-アミノ酸の選択的認識を担う VinN 型アデニル化酵素のアミノ酸配列には違いが見られ、これにより各生合成経路に特徴的なβ-アミノ酸基質が選択されていると考えられた。

2. ポリケタイド生合成におけるアシルキャリアータンパク質認識機構の解析

ポリケタイド生合成において、アシル基転移酵素は開始基質や伸張基質を適切なアシルキャリアータンパク質 (ACP) へと受け渡すために、ACP を厳密に認識していると考えられている。すなわち、アシル基転移酵素と ACP の間のタンパク質間相互作用は重要であり、ポリケタイド化合物の構成単位となるアシル基の種類を決定付けている。しかし、これらの間のタンパク質間相互作用は一時的で弱く、複合体の構造解析が難しいため、これまでにアシル基転移酵素による ACP の認識機構は不明であった。そこで、我々は、vicenistatin の生合成に関わるアシル基転移酵素 VinK を対象に ACP である VinL との複合体の構造解析を行った。まず、VinK と VinL を混合して結晶化を行ったが、共結晶は得られなかった。そこで、共結晶化に適した安定な複合体を形成させるために1,2-ビスマレイミドエタンを用いたクロスリンク反応を開発した。このクロスリンク反応により調製した VinK と VinL の複合体を用いて結晶化を

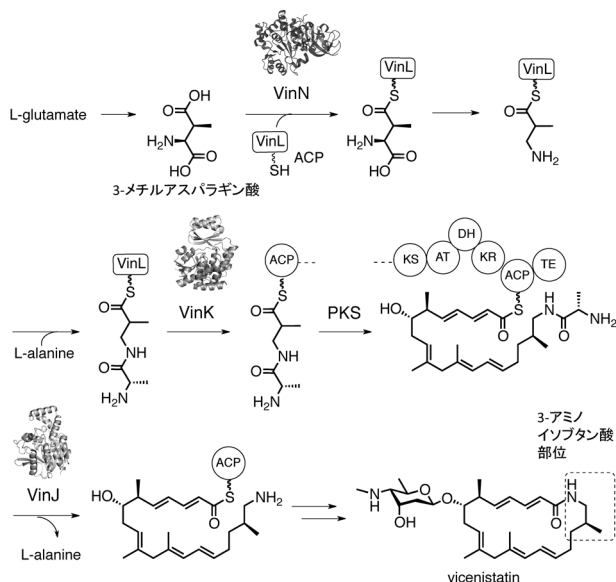


図1 vicenistatin の生合成機構

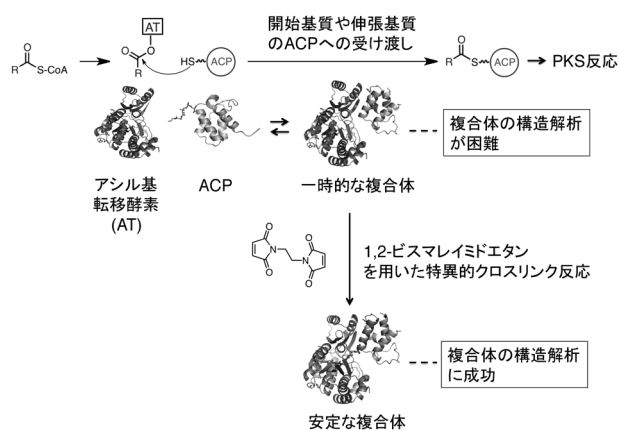


図2 アシル基転移酵素と ACP の複合体の構造解析

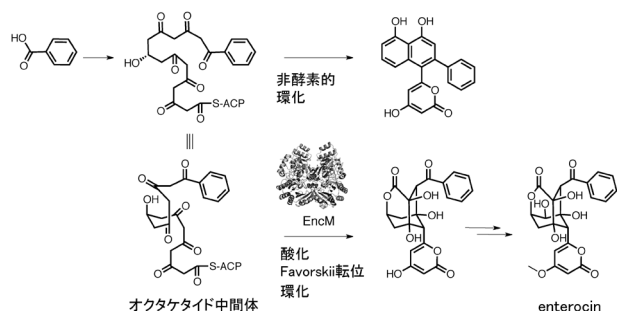


図3 enterocin の生合成機構

行ったところ、共結晶が得られ、VinK と VinL の複合体の結晶構造を決定することに成功した(図2)。これによりアシル基転移酵素による ACP の認識機構が初めて明らかになった。

3. ポリケタイド生合成における環化反応の解析

ポリケタイド生合成においては、PKS によりポリケタイド中間体が生成された後に、環化反応を行う酵素により様々な環構造を持つ化合物へと作り分けられる。環化酵素の改変により、別の骨格構造を持つ化合物を創出できる可能性があるため、環化反応の機構を理解することは重要である。環化酵素が不安定なポリケタイド中間体をどのように適切に制御して環化反応を行っているかを理解するため、芳香族ポリケタイド化合物の生合成に関わる環化反応に注目して研究を行った。

海洋放線菌 *Streptomyces maritimus* が生産する抗生物質 enterocin は、独特なご状骨格構造を持つポリケタイド化合物である(図3)。その骨格構造形成にフラビン酵素 EncM が関わることが報告されていたが、その詳細な反応機構は不明であった。EncM の結晶構造解析を行った結果、EncM はフラビン活性中心へとつながる細長いトンネルを有していたことから、II 型 PKS 産物であるオクタケタイド中間体を直鎖の状態で結合させ反応を触媒することが示唆された。また、合成基質アナログを用いた解析から、EncM が酸化反応と Favorskii 転位反応を触媒することにより、独特な骨格構造形成へと導いていることを明らかにした。これは酵素的に Favorskii 転位が起こることを示した初めての例である。さらに、EncM の反応を詳細に解析した結果、新規な活性種であるフラビン-N5-オキシド体が反応に関わることも明らかにした。

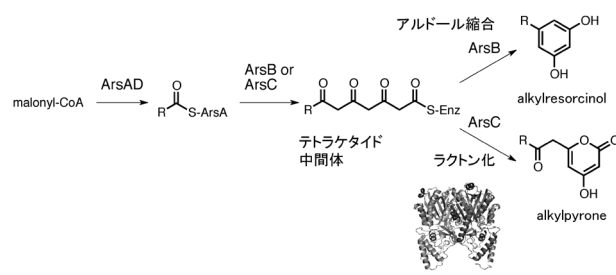


図4 フェノール性脂質の生合成機構

窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* において、III 型 PKS である ArsB と ArsC はそれぞれ異なる環化反応を触媒することにより、フェノール性脂質である alkylresorcinol と alkylpyrone を生産する(図4)。この異なる環化反応の要因を明らかにするため、ArsB と ArsC の結晶構造解析と部位特異的変異解析を行った。その結果、ArsB と ArsC の活性中心近傍に存在する 1 アミノ酸残基が環化反応の様式を制御していることを明らかにすると共に、変異導入によりその活性を入れ替えることにも成功した。また、ArsB と ArsC は、脂肪酸合成酵素 ArsA の ACP ドメインからアシル基を開始基質として直接受け取ることを明らかにした。これは III 型 PKS が ACP に結合した開始基質を利用することを実験的に示した初めての例である。

おわりに

本研究では、ポリケタイド生合成に関わる酵素群について、構造機能解析を行い、これらの酵素の反応機構や基質認識機構を解明してきた。明らかにした結果は、ポリケタイド生合成機構に関する理解を深めただけでなく、非天然型ポリケタイド化合物生産系を構築するための基盤となると考えられる。微生物は新規な反応を触媒する酵素の宝庫であり、今後もこれらの酵素の反応機構の解析に取り組んでいきたいと考えている。

謝辞 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科、カリフォルニア大学サンディエゴ校スクリプス海洋研究所、東京工業大学理学院で行われたものです。研究を行う機会を与えていただき、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学教授・(故)堀之内末治先生、同大学教授・大西康夫先生、静岡県立大学准教授・鮎信学先生、カリフォルニア大学サンディエゴ校教授・Bradley S. Moore 先生、東京工業大学教授・江口正先生、同大学准教授・工藤史貴先生に深甚なる感謝の意を表します。また、酵素学と結晶構造解析の基礎を教えてくださいました東京大学名誉教授・祥雲弘文先生、同教授・若木高善先生、同教授・伏信進矢先生、東京理科大学教授・田口速男先生に心より御礼申し上げます。また、本研究は、多くの方々のご助言、ご協力なくしてはなしえませんでした。ここにすべての方のお名前を挙げることはできませんが、皆様に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・西村敏英先生(日本獣医生命科学大学)に厚く御礼申し上げます。



高効率合成を指向したリグナン及びテルペノイドの合成研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 森 直紀

はじめに

天然物合成は全合成を第一の目標とする学問であるが、実際に合成したサンプルは中間体も含めて、化合物の構造決定、作用機序の解明、構造活性相関などに用いられるため、その役割は多岐に渡る。上記いずれの場合においても十分量の試料合成が必須となるため、合成化学者には短工程かつ高収率である「高効率合成」の開発が強く求められている。筆者は以上の観点から「高効率合成」を強く意識し、以下に示すリグナン類とテルペノイドの合成研究を行った。

1. 新規不斉反応によるリグナン類の合成研究

リグナンとはフェニルフロパノイド二分子がC8位同士で結合した化合物群であり、抗酸化作用を示し健康食品としても販売されているセサミン、誘導体が抗がん剤として利用されているポドフィロトキシンなど生物活性の点からも重要な化合物が多い。他のグループによるこれまでのリグナン類の合成研究はラセミ体合成に関するものが多かったため、筆者は光学活性なリグナン類を合成するための新規不斉反応の開発および天然物合成への応用を研究目的とした(図1)。新規不斉反応の開発にあたっては、けい皮酸誘導体の二量化反応に着目した。すなわち、けい皮酸誘導体に不斉補助基としてL-プロリンを導入した**1**を用いることで、**2**に示したような不斉二量化反応を進行させ、光学活性なビスラクトン**3**を得ようと考えた。実際に、3,4,5-トリメトキシけい皮酸についてはa)の二酸化鉛を用いる条件において高収率(64%)かつ高鏡像体純度(>95% e.e.)で

3が得られることを見出した。一方、3,4-ジメトキシけい皮酸はa)の条件では基質の分解が優先してしましたが、b)の電極酸化の条件を用いることでいずれも80% e.e.以上の鏡像体純度で**3**を得ることに成功した。そして**3**を共通中間体として、フロフランリグナンであるyangambin, sesamin, eudesmin, caruillignan Aとジアリールブタンリグナンであるsauriols A, Bの合成を全て10工程以内の短工程で達成し、本不斉反応の有用性も示すことができた。

2. 生合成経路を模倣した chamobtusin A の合成研究

Chamobtusin Aは2007年にヒノキ科の植物*Chamaecyparis obtusa* cv. tetragonから単離・構造決定されたジテルペンアルコールである。そのユニークな2H-ピロール環構造は合成化学的にもまた生合成的にも非常に興味深い。そこでchamobtusin Aの合成に関しては、生合成経路を模倣した短工程合成に挑むことにした(図2)。Chamobtusin Aはアビエタンジテルペノイド**6**の芳香環が酸化的に開裂しケトアルデヒド**5**となり、アンモニアとの間で**4**のようにイミンを形成した後、分子内アザマイケル付加反応が進行することによって生合成されていると考えた。実際に、この分子内アザマイケル付加反応を鍵反応とする合成経路を考案し、 β -シクロシトラールより調製可能な**7**から13工程でラセミ体合成を、市販の**8**から12工程で光学活性体合成を達成した。本合成により筆者が提唱した生合成仮説の正当性も示すことができたと考えている。

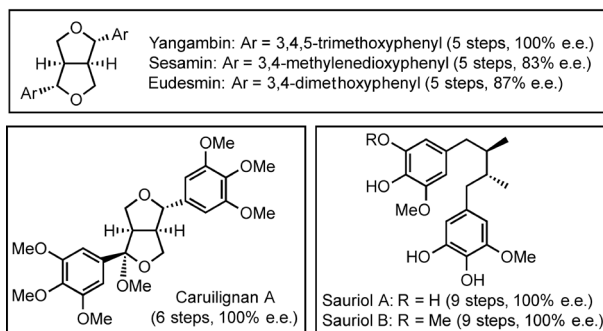
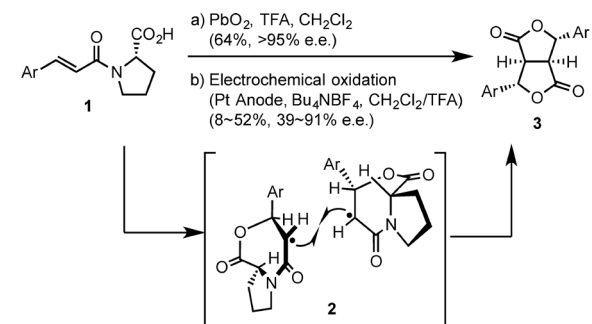


図1. けい皮酸誘導体の新規不斉二量化反応と天然物合成への応用

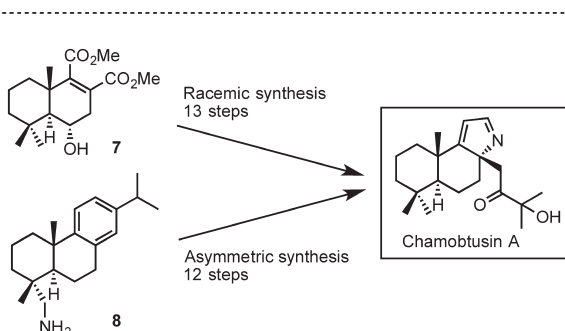
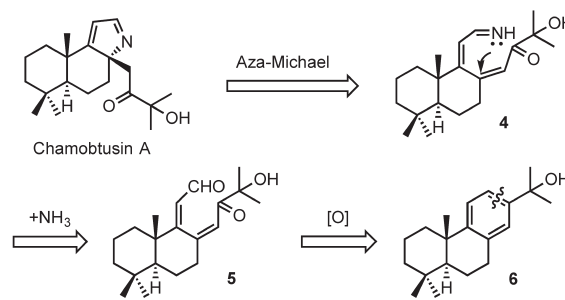


図2. Chamobtusin A の推定生合成経路と実際の合成

3. 昆虫摂食阻害物質 azadirachtin の合成研究

Azadirachtin は 1968 年にインドセンダンの種子から単離されたトリテルペノイドであり、強力な昆虫摂食阻害・成長阻害活性を示す。本化合物は 7 個の 4 級炭素を含む 16 個の連続する不斉炭素を有し、酸素官能基によって高度に酸化された極めて複雑な構造の天然物である。これまで世界中の多くの著名な天然物合成化学者が全合成に挑戦してきたにもかかわらず、成功に至ったのは 2007 年の Ley らのグループのみであった。そこで azadirachtin の合成に関しては純粋な意味での全合成への挑戦、すなわち超難関天然物を如何に美しく効率的に合成するかという課題のもと合成研究に取り組んだ (図 3)。Azadirachtin の合成において最も困難とされるのが非常に混み合った C8-C14 結合の構築である。他のグループは Claisen 転位やラジカル反応を利用して分子内で C8-C14 結合を構築しているのに対し、筆者はあらかじめ C8-C14 結合に相当する結合をアレンとして導入しておき、タンデム型ラジカル環化反応により全炭素骨格を構築する (11→12) という独創的な合成法を考案した。

左側ユニットとなる **9** の合成においては、当初はピロンとジエノフィルのエンド選択的 Diels-Alder 反応による骨格構築を計画したが、予想に反してエキソ付加体が優先して得られた。そこで、Diels-Alder 反応-脱炭酸-Claisen 転位を用いる新たなアプローチを用いて基本骨格を構築し、続いてシクロヘキセノン環の酸化的開裂とアルドール反応による再閉環により正しい立体化学を有する A 環部を構築した。最終的に、既知化合物より 18 工程で **9** を光学活性体として合成することに成功した。右側ユニットとなる **10** の合成は文献既知の光学活性なシクロペンテン誘導体より開始し、酢酸エチルとのアルドール反応、オゾン酸化による環拡大などを含む 18 工程の変換により合成を達成した。左右ユニット **9** と **10** から 2 工程で **11** を得た後、鍵反応であるタンデム型ラジカル環化反応を行ったところ、期待通り azadirachtin の全炭素骨格を有する **12** を得ることができた。さらに **12** に対し、C 環部の 5 員環ヘミアセタール構造の構築などを行うことで Ley らの合成中間体 **13** へと導くことに成功した。**13** から 9 工程で azadirachtin への変換が可能であるため、ここに azadirachtin の形式不斉合成を達成することができた。筆者が行った azadirachtin の合成は 39 工程であり、これまでに唯一報告されている Ley らの 62 工程の合成と比べても非常に効率的な合成を達成できたものと考えている。

おわりに

以上述べてきたように、筆者は「高効率合成」を指向して、光学活性なリグナン類と 2 種のテルペノイド (chamobtusin A と azadirachtin) の合成研究を行った。いずれの合成においても、工程数、総収率は他の合成例と比べて遥かに優れたものになっており、目標とした「高効率合成」を達成できたものと考えている。最近では、天然物合成は円熟期を迎え容易になりつ

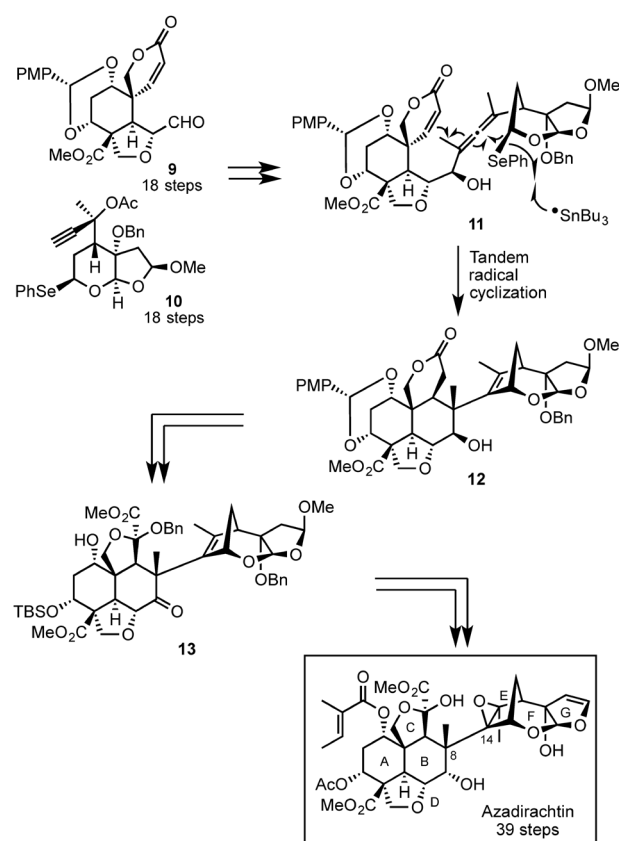
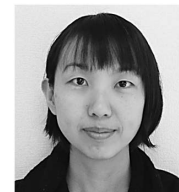


図 3. Azadirachtin の合成

つあるという意見がある一方で、重要な生物活性を有するにもかかわらず複雑な構造のため合成が制限されている天然物が未だに多く存在するのこともまた事実である。今後もそのような魅力的な天然物の効率的な全合成に挑み、合成した化合物を通して化学、生物学の分野に貢献していきたいと考えている。

謝辞 本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻有機化学研究室で行われたものであります。先ず始めに、本研究の機会を与えてくださり、卒論配属から現在に至るまでご指導ご鞭撻を賜りました渡邊秀典先生 (東京大学教授) に心より感謝いたします。本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言を賜りました森 謙治先生 (東京大学名誉教授)、北原 武先生 (東京大学名誉教授)、石神 健先生 (東京大学准教授) に深く感謝いたします。また、本研究の発展にご協力いただいた共同研究者である伊藤大輔博士 (Azadirachtin の合成研究)、古田亜希子博士 (リグナン類の合成研究)、葛谷一馬氏 (Chamobtusin A の合成研究) に心より御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・西村敏英先生に厚く御礼申し上げます。



きのこ由来レクチンのがん診断への応用

株式会社 J-オイルミルズ 小林(袴田)夕香

はじめに

糖鎖研究は近年目をみはる進展を遂げてきました。基礎研究では多くの糖鎖の機能や役割が解明され、その知見や成果が医療分野に応用されるようになりつつあります^{1,2)}。現在、市販されているレクチンは約20~30種類であるが³⁾、2003年からのNEDOプロジェクトなどを経て、100種以上の有用なレクチンからなる「レクチンライブラリー」の構築した。その中の有用なレクチンは、癌診断への応用開発を進めた。

1. レクチンライブラリーの構築

2003-05年度には、NEDOプロジェクト「糖鎖エンジニアリング・糖鎖構造解析」に参画し、糖鎖とレクチンの相互作用を網羅的に調べる「ヘクト・バイ・ヘクト(100糖鎖×100レクチン)プロジェクト」への非市販レクチンの供給という役割を担った。その中で、必要とするレクチンをより選択的に探索する手法として、従来の赤血球凝集だけでなく、酵素で加工した赤血球を使う手法、水晶共振子マイクロバランス(QCM)などの機器を使う方法などを開発した。また実際に、それらの手法を組み合わせ、約1,000種の植物、動物、菌類の抽出液から新規レクチンの探索を試み、結果として3年間のNEDOプロジェクトの間に、59種類の新規レクチンを供給し、(独)産業技術総合研究所と共同でそれらの詳細な糖結合特異性の解析を行った。NEDOプロジェクト終了後も、さらに探索手法を開発・改良し、新たにキャピラリー電気泳動装置を使用して、糖鎖と結合する新規で有用なレクチンの探索をおこない、レクチンを精製し、特異性を評価し、レクチンライブラリーとして構築した。

2. 新規有用レクチンの発見

フコース糖鎖の修飾は、癌や炎症に関与していると言われており、 α 1-2, α 1-3, α 1-4, α 1-6など、その結合様式ごとに識別できるレクチンの需要は高い⁴⁾。現在、レンズマメレクチンを使った肝臓がんのマーカータンパク質である α -フェトプロテインの糖鎖変化を検出する手法が、肝臓癌の早期診断や予後判定に使用されている(AFP-L3%)^{5,6)}。

α 1-6フコース特異的レクチンとして有用なスギタケレクチン(*Pholiota squarrosa* lectin)を上記に記載したレクチンライブラリー構築の中で発見し、PhoSLと命名した。電気泳動、MALDI-TOF MS、N-末端アミノ酸配列分析の結果から、PhoSLはサブユニット分子量約4500、等電点pI 4.0の新規タンパク質であり、そのN末端アミノ酸配列はNH₂-APVPVTKLVCDGDTYKCTAYLDFGDGRWVAQWDTNVFHTG-OHであった。フロントアルフィニティークロマトグラフィー(FAC)による126種の糖鎖との糖結合性評価では、N型糖鎖の α 1-6フコース糖にのみ結合し、 α 1-2, 1-3, 1-4のような他のフコース糖鎖には結合しなかった(図1)。さらに、PhoSLは腫瘍マーカーである α -フェトプロテイン(AFP)のフコシル化されたAFP(AFP-L3)にのみ結合し、フコシル化されていないAFP(AFP-L1)には結合しなかった。レクチンのpH安定性はpH 2.0~11.0の間、温度安定性は0~100℃の間で安定であった(図2)⁷⁾。

3. 肝臓癌診断キットの開発と臨床応用

原発性肝臓癌(以下HCC)におけるAFP-L3分画の測定はAFPやPIVKA-IIなどと同様に、HCCの診断や治療効果の判定、再発の早期発見に役立っている。スギタケレクチン(PhoSL)

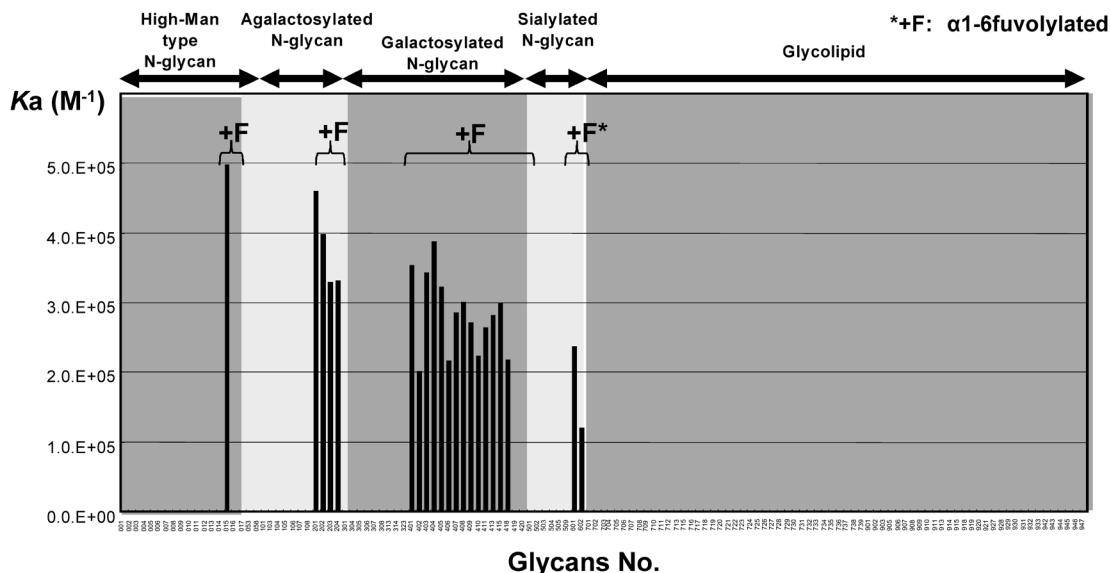


図1 PhoSLの糖鎖結合特異性

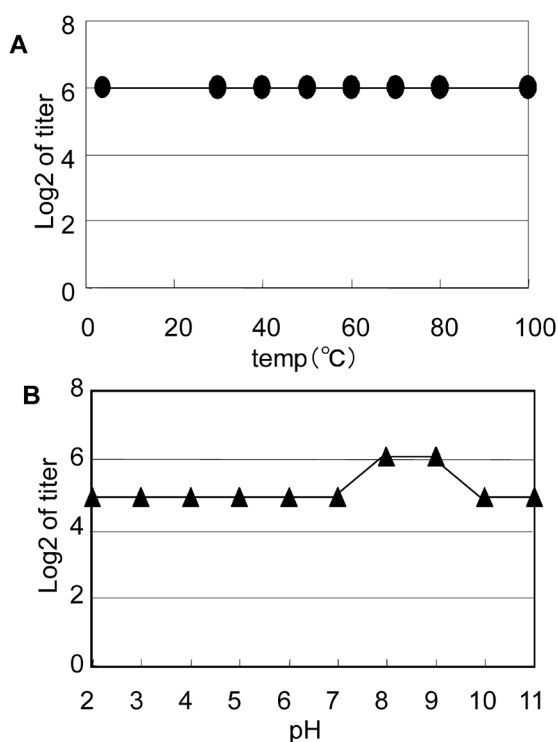


図2 PhoSLの安定性
(A. 温度安定性 B. pH安定性)

は上記に記載した通り、特異性・選択性が高く、安定性に優れていたことより、酵素免疫測定 (ELISA) 法に PhoSL を利用し、新しいフコシル化 AFP (AFP-L3) キットとして系を構築し、臨床の有用性を評価した。

対象は慢性肝疾患患者 50 例 (慢性肝炎・肝硬変 22 例, HCC 28 例) 並びに健常者 87 例を用いた。患者並びに健常者の血清中のフコシル化 AFP を新規に開発したフコシル化 AFP (AFP-L3) キットを用いて測定した。また、HCC 患者の癌組織部位を PhoSL 組織染色法を用いて癌細胞の発現を観察した。HCC 患者 28 例中担癌状態 14 例においては、AFP 陽性率 7 例 (50%), PIVKA-II 陽性は 8 例 (57%), 通常の AFP-L3 は 6 例 (42%) であったのに比べ、フコシル化 AFP の陽性率は 9 例 (64%) で最も優れていた。またフコシル化 AFP はいずれの腫瘍マーカーとも相関は示さなかった。免疫組織染色では、HCC 患者由来の癌組織部位はレクチン染色されている症例があり、この患者の血清フコシル化 AFP 値は高かった。臨床試験の結果、PhoSL を利用したフコシル化 AFP の測定は、既知の腫瘍マーカーと異なった性能を示し HCC 患者の診断、治療効果の判定に有用なものになると考えられた⁸⁾。

4. 大腸癌診断への応用

大腸癌は多段階発癌の代表例であり、発癌から転移に至るそれぞれの過程において APC, K-ras, p53, DCC などの癌遺伝子/癌抑制遺伝子の異常が明らかとされており、様々な研究により悪性化を規定する分子の同定が進められている⁹⁾。

大腸癌組織におけるヒドロキサンタケレクチン (AAL) と PhoSL を用いた免疫染色を症例 139 例でおこなった。AAL は α 1-3/1-4/1-6 結合のフコースを認識し、PhoSL は α 1-6 結合のフコースをより特異的に認識する。この 2 種類のレクチンを使い、その染色レベルを比較することによりフコシル化の結合様式の違いを知ることができる。

正常組織の中の実質細胞は、AAL, PhoSL でわずかに褐色に染まる。その染色レベルを「弱陽性 (分類 1)」と定義した。この染色レベルを基準として、癌部が全体的に強く褐色に染まっているものを「強陽性」として「分類 3」に、強陽性よりも薄いが全体的に褐色に染まっているものを「陽性」として「分類 2」に、全く染まらなかったものを「陰性」として「分類 0」と評価した。染色結果を各組織の臨床背景に基づいて比較検討を行った。免疫組織学的検討の結果、正常に比べて原発癌では、全てのフコースが増加していたが、転移癌ではコアフコースのみが低下していた。このように、大腸癌の組織染色においては、原発癌と転移癌の組織表面上のフコシル化の違いを実証することができ、大腸癌診断の有用なツールであることが期待された。

おわりに

α 1-6 フコースの糖鎖変化は癌化に共通した糖鎖変化であることから、多くの種類のがん診断に応用できることを立証した。スギタケレクチン (PhoSL) はがんの基礎研究やがん化のメカニズム解明等の研究において有用なツールとなることが期待できる。レクチンの医療応用例はまだ多くはないが、今後、基礎研究が進進し「疾病マーカーとなる糖タンパク質」や「疾病に伴う糖鎖変化」が発見されるようになれば、それらを選択的に検出するレクチンを使った診断薬等が可能となるだろう。

謝辞

本研究は (株) J-オイルミルズにておこなわれたものです。本研究室において実験を一緒におこなっていただきました研究員の方々、終始ご指導いただきました研究所のみなさま、知財戦略部のみなさまに感謝致します。これまで適切にご指導を頂きました、静岡大学農学部河岸洋和教授、(独)産業技術総合研究所平林淳首席研究員、大阪大学医学部三善英知教授、石川町内科クリニック渡會伸治先生、並びに、ご指導いただきました多くの共同研究先の諸先生方に厚く御礼申し上げます。また、日々の研究を支えて頂きました (株) J-オイルミルズの数多くの方々に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 小林夕香, 河岸洋和, 糖鎖を認識する高分子: レクチン, BIO INDUSTRY, Vol. 27 (2): p 6-11 (2010).
- 小林夕香, 日本農芸化学会中部支部主催 第 163 回若手シンポジウム, 糖鎖に着目した疾患に寄与できる「レクチンライブラリー」の開発 (2011).
- Kobayashi Y, Tateno H, Ogawa H, Yamamoto K, Hirabayashi J., Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. Methods Mol Biol. 1200: p 555-77. (2014).
- Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T, Biological function of fucosylation in cancer biology. J Biochem. Vol. 143(6): p 725-9 (2008).
- Taketa K, Endo Y, et al.: Cancer Res., 53, 5419-5423 (1993).
- 横山和則, 黒澤竜雄, 渡辺光雄, マイクロフリュイディスク技術を用いた全自動免疫蛍光測定装置 ミュータスワコー i30, 生物試料分析 Vol. 33, No 3 (2010).
- Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, Moriwaki K, Miyoshi E, Hirabayashi J, Kawagishi H, A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*. J Biol Chem. Vol. 287 (41): p 33973-82 (2012).
- 渡會伸治, 松井弘斗, 小林夕香, 西藤桂子, 上野 泰, 癌治療学会原発性肝癌患者における新しいフコシル化 AFP の測定意義と臨床病理学的検討. 第 69 回日本消化器外科学会総会 (2013).
- Voutsadakis IA. Pathogenesis of colorectal carcinoma and therapeutic implications: the roles of the ubiquitin-proteasome system and Cox-2. J Cell Mol Med. Vol. 11(2): p 252-85 (2007).



カカオポリフェノールに関する包括的研究

株式会社 明治 夏目みどり

はじめに

カカオ豆は、チョコレートやココアの原料として、アフリカ、中南米、東南アジアの熱帯雨林地域において生産されている。生のカカオ豆を発酵・乾燥させた後、生産工場にて焙焼・磨砕されカカオマスが調製される。このカカオマスに砂糖、ミルク等を加え成型したものがチョコレートであり、油分を一部除いたものがココアである。チョコレートは1797年より日本で食されてきた嗜好食品で、2014年には国内の菓子販売金額が和生菓子を抜きトップになり、身近な食品の1つになっている。我々の研究グループでは、当社の主要商品であるチョコレートの原料であるカカオ豆に含まれるポリフェノールに着目し研究を進め、カカオポリフェノールの構造をはじめ吸収代謝、それらが有する抗酸化作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗動脈硬化作用や抗がん作用など多彩な生理機能を明らかにしてきた。以下、これまで行ってきた研究概要についてお示しする。

1. カカオに含まれるポリフェノール成分とその活性

1-1. 成分および抗酸化活性

はじめに、カカオに含まれるポリフェノールの構造を明らかにした。カカオマスを脱脂、70%アセトンで抽出、定法により精製し構造決定をした。フラボノイドである(-)-epicatechin, (+)-catechin, (-)-epicatechinの重合体である2量体のprocyanidin B2, procyanidin B5, 3量体のprocyanidin C1, 4量体のcinnamtannin A2が主要成分であることが確認された(図1)。

次いで、市販のチョコレートやココア中のポリフェノール量を定量分析した。チョコレートやココア中には多くのポリフェノールが含まれていることが確認された。また、チョコレートとココアのポリフェノールの成分の組成比は、異なることが分かった。ココアは、一般にその製造工程中でアルカリゼーションを行なう、そのアルカリによりポリフェノールが分解され、チョコレートとは組成比が異なると推察された。

単離した成分について、その活性を評価した。カカオ豆から

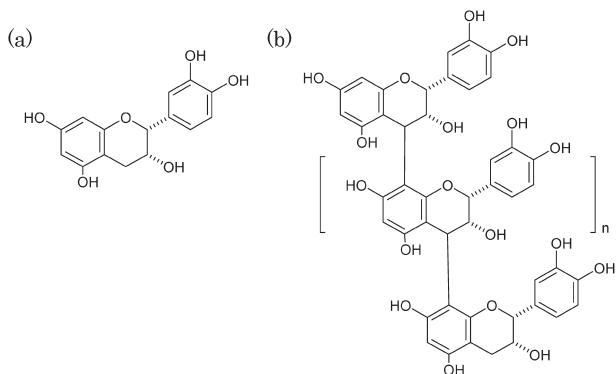


図1 カカオポリフェノールの構造
(a) (-)-epicatechin, (b) procyanidin類

単離した(-)-epicatechinならびにその重合体であるプロシアニジン類の銅イオンを酸化開始剤に用いた際のヒトLDLの酸化抵抗性について調べた。その効果は、銅イオンによって惹起された場合(+)-catechin>procyanidin B2≥(-)-epicatechin≥procyanidin C1>cinnamtannin A2, の順位で活性が認められた。成分によって効果に差はあるものの、いずれの成分にもLDLの酸化を抑制する作用があることが確認された。他にも、赤血球膜酸化抑制や superoxide radical 消去、ニトロチロシン生成抑制を明らかとした。これらの結果が、生活習慣病に対する研究へとつながっていった。

2. カカオポリフェノールの吸収代謝

カカオポリフェノールの生理機能を明らかにするためには、これら成分の吸収代謝について明らかにする必要がある。そのためカカオポリフェノールの主要成分であるエピカテキンの吸収代謝についてラットおよびヒトで評価した。ラットおよびヒトにココアあるいはチョコレートを摂取させ、血中のエピカテキンおよびエピカテキン代謝物の分析を行った。その結果、エピカテキンはラットおよびヒトで摂取後速やかに吸収され、1時間から2時間で最大血中濃度となり、尿中へと排泄されることを確認した。血中では、グルクロン酸や硫酸基で抱合体化された代謝物で存在することを見出した。また尿中の代謝物を定量し、摂取量の30~50%が吸収されることを明らかにした。さらにエピカテキンをラットおよびヒトに摂取させ、尿中から代謝物を精製単離しNMR等を用い、構造を確認した。ラットおよびヒト尿中から得られた代謝物の構造式を示す(図2)。

興味深いことに、ラットとヒトではグルクロン酸抱合体の結合位置が異なることがわかった。これら代謝物のアゾ化合物お

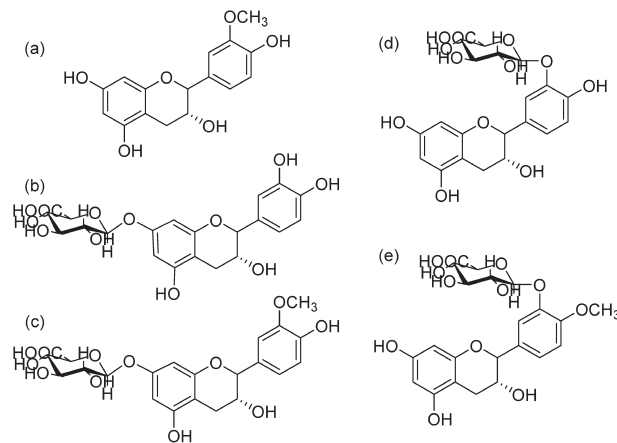


図2 Epicatechinの代謝物の構造
(a) 3'-O-methyl(-)-epicatechin (rat)
(b) (-)-epicatechin-7-O-glucuronide (rat)
(c) 3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-O-glucuronide (rat)
(d) (-)-epicatechin-3'-O-glucuronide (human)
(e) 4'-O-methyl(-)-epicatechin-3'-O-glucuronide (human)

よび銅イオンによるヒト LDL の酸化抵抗性を評価したところ、エピカテキンの B 環のヒドロキシル基が抱合体化あるいはメチル化されると、本来エピカテキンが持つ抗酸化活性が減弱した。抗酸化活性という視点では、カテコール構造が重要であることがわかった。吸収代謝、および代謝物の活性を測定することで、体内でのエピカテキンの働きを推察する手がかりとなった。

3. 動物モデルを用いた抗がん作用、動脈硬化、糖代謝への効果

3-1. 抗がん作用

カカオポリフェノールの抗がん作用については、ヘテロサイクリックアミンに対する抗変異原作用、DNA 酸化障害抑制作用といった作用、さらにはマウス皮膚 2 段階発癌試験による抗プロモーション作用がある。またヘテロサイクリックアミンの一種である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) による乳腺発がんモデルにおいて、カカオポリフェノールの投与が乳腺腫瘍生成に抑制的な作用を示すこと、F344 系雄性ラットを用い、多剤のイニシエーターによる多臓器発がん試験において生存期間を有意に延長させることを報告した。

3-2. 抗動脈硬化作用

脳心血管系疾患は日本人の死因上位の疾患である。その原因である動脈硬化の予防作用について評価を行った。コレステロールを負荷したウサギにカカオポリフェノール含有餌を摂取させると、血中 LDL の酸化抵抗性の増加が認められた。さらに Apo-E 欠損マウスを用いた実験では、カカオポリフェノール摂取が病理学的評価により動脈硬化病変を抑制することや大動脈弓においてコレステロールの結晶の増加が抑制されたことを明らかにした。同時に、病変部位での接着因子の発現抑制や、dityrosine などの修飾タンパク質の発現抑制を確認した。その他、肝細胞 HepG2 を用いた評価では、カカオポリフェノールの各成分が ApoA1 タンパク質の増加促進作用や LDL Receptor の発現低下作用を示すことを見出し、カカオポリフェノールがコレステロール代謝に与える影響の作用メカニズムを明らかにした。カカオポリフェノールが動脈硬化を抑制する働きがあることが推察され、臨床試験へとつながった。

3-3. 糖代謝への作用

糖尿病の罹患率が世界中で増加していること、加えて糖代謝異常は動脈硬化発症の一要因であることから、糖尿病予防を目的として糖代謝への作用についてカカオポリフェノールの評価を行った。Streptozotocin で膵臓機能を低下させ糖尿病を発症させたラットでは、コントロール群に比較し、カカオポリフェノール群で血糖値、尿糖値が有意に低いことが確認され、さらに白内障について評価した結果、その白濁が抑制されていることが確認された。またカカオポリフェノールには、筋肉細胞での Glut4 の誘導やインクレチンの誘導効果が認められることが分かった。カカオポリフェノールの摂取により、糖代謝異常や糖代謝異常によって生じる QOL 低下が抑制される可能性が示唆された。

4. 高カカオポリフェノールココアならびに高カカオチョコレートによる臨床試験

動物実験の結果からココアやチョコレートをを用いた臨床試験を行い、その健康効果について評価を進めた。

4-1. ココアによる脂質代謝に関する臨床試験

動物実験によってカカオポリフェノールの LDL 酸化抑制作用等が明らかになったことから臨床試験での評価を行なうことにした。健康な日本人の男女 160 名を 4 群に分け、カカオポリフェノールを含まないプラセボココアと濃度の異なる 3 種類のココアを、それぞれ 4 週間摂取させた。その結果ポリフェノールを含むココアを摂取させた被験者では、LDL-コレステロール濃度の低下、HDL-コレステロールの上昇、LDL-コレステロールの酸化抵抗性の上昇が認められた。また摂取前の LDL-コレステロールが 125 mg/dL 以上の被験者ではそれらの結果が顕著になることが分かった。これらの結果よりカカオポリフェノールは動脈硬化発症を予防する可能性を示した。

4-2. チョコレートによる生活習慣病に関する大規模臨床試験

高カカオチョコレートを用いた生活習慣病への影響について、健康な日本人男女 347 名を対象に評価を行った。その結果、血圧低下作用、HDL コレステロールの上昇、酸化マーカーである 8-OHdG の低下、炎症マーカーである hs-CRP の低下が認められた。これら結果から高カカオチョコレートを摂取することで、動脈硬化進展を抑制する方向で働く可能性を見出した。

おわりに

カカオポリフェノールは、*in vitro* ならびに動物実験により抗酸化活性、糖代謝、脂質代謝改善作用、動脈硬化抑制作用などを有することが認められた。さらに臨床試験ではカカオポリフェノールを多く含むココアやチョコレートを摂取することで、脂質代謝改善や血圧の低下作用などが認められた。海外の疫学研究においてカカオ製品を摂取することで心疾患の発症率が低いことが報告されている。これらの結果を併せて考えるとカカオ製品の摂取により動脈硬化発症を遅延させる働きがあることが推察される。心疾患の死亡者数が増えている日本で、おいしく健康に良いカカオ製品を提供することで、心疾患発症を予防する一助になればと考えている。

謝 辞 本研究のご指導をいただきました名古屋大学大学院(現 愛知学院大学)大澤俊彦教授、徳島大学大学院(現 甲南大学)寺尾純二教授、岡山大学大学院吉田隆志名誉教授、波多野力教授、お茶の水女子大学(現 東洋大学)近藤和雄教授、神戸大学大学院芦田均教授に感謝いたします。また、本研究は、明治製菓株式会社並びに株式会社 明治にて、中村哲夫、滝沢登志雄、越阪部奈緒美(現 芝浦工業大学教授)、馬場星吾、染谷恵、三本木千秋、草野亜紀子、佐々木和恵、武藤裕子、福田久美子、伊藤裕之、山地健人、大柴幸男など多くの先輩方、同僚とで行った研究です。関係者の皆様に、この場を借りまして御礼申し上げます。

JSBBA KANTO

日本農芸化学会関東支部2017年度第1回支部例会 講演要旨集
2017年7月1日 発行
発行者 公益社団法人 日本農芸化学会 関東支部

連絡先

〒113-8657

東京都文京区弥生1-1-1

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻
浅見 忠男