

先進生命科学研究所紀要

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

2020 Vol.5



東海大学

先進生命科学研究所

Institute of Advanced Biosciences

Tokai University

http://www.u-tokai.ac.jp/about/research/institutions/advanced_biosciences_research/

(Japanese)

<http://www.u-tokai.ac.jp/english/research/list.html>

(English)

東海大学先進生命科学研究so紀要

Vol.5 2020

目次

医薬総合研究部門

「Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づく抗血栓薬の開発」

渡邊伸央^{1,2)}、城所正子^{1,2)}、平山令明²⁾、猪口貞樹^{1,2)}、斉藤 剛^{1,2)}

(¹⁾東海大学医学部救命救急医学、²⁾東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門)

..... 1

「老化抑制因子グリオキサラーゼ 1 の発現量減少に由来する細胞の酸化ストレス抵抗性低下にセレノグルタチオンの添加がもたらす回復効果」

金森審子^{1,2)}

(¹⁾東海大学工学部生命化学科、²⁾東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門)

..... 5

「妊娠ステロイドホルモンによるヒト胎盤由来の絨毛がん株 JEG-3 の増殖と形態の解析」

清水智香¹⁾、亀谷美恵^{1,2)}

(¹⁾東海大学医学部基礎医学系分子生命科学、²⁾東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門)

..... 9

「匂い分析を用いた新規がん診断法の開発」

平林 健一^{1,2)}、関根 嘉香^{2,3)}、戸高 惣史⁴⁾

(¹⁾東海大学医学部基盤診療学系病理診断学、²⁾東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門、³⁾東海大学理学部化学科、⁴⁾AIREX 株式会社)

..... 14

「椎間板変性における IL-17 の役割の解析と新規 IL-17 阻害剤の探索

ーIL-17 関連疾患における IL-17 阻害療法への応用へ向けてー」

酒井大輔^{1,3)}、隅山香織^{2,3)}、平山令明³⁾

(¹⁾東海大学医学部外科学系整形外科、²⁾東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学、³⁾東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門)

..... 18

「抗ウイルス薬モリキシジンの立体構造および SARS-CoV-2 PL^{pro} との相互作用に関する研究」

田中 るみ子¹⁾、平山 令明²⁾

(¹⁾東海大学医学部・基礎医学系、²⁾東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門)

…………… 21

高機能食品研究部門

「焙煎工程を経た熊本県南阿蘇村産キクイモの機能性を活かした食品の開発」

安田伸^{1,2)*}、安田智子¹⁾、本田憲昭¹⁾、小松丸昌子³⁾、松田靖^{1,2)}

(¹⁾東海大学農学部、²⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門、³⁾南阿蘇オーガニック株式会社)

…………… 25

「耐熱性 L-リジン脱水素酵素の大量発現系の構築、結晶化および X 線回折実験」

米田 一成^{1,2,3,4)*}、荒木 朋洋^{1,2,3)}

(¹⁾東海大学農学部、²⁾東海大学大学院農学研究科、³⁾東海大学大学院生物科学研究科、⁴⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門)

…………… 31

「海産食用魚の脂肪酸によるわさびの辛味抑制効果に関する研究」

齋藤 寛^{1,2)}、安達洋貴¹⁾、秋山信彦^{1,2)}、平塚聖一^{1,2)}

(¹⁾東海大学・海洋学部、²⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門)

…………… 36

「異なる海域由来の市販食塩中に含まれるマイクロプラスチックに関する研究」

佐波 来美¹⁾、清水 宗茂^{1,2)}

(¹⁾東海大学海洋学部、²⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門)

…………… 41

「ヒト由来セレブロシドから調製したリポソームの細胞内取込とリポソームを経口摂取した線虫の行動への影響」

山崎 素未¹⁾、山口亮介¹⁾、清水 佳隆^{1,2,3)}、笹川 昇^{1,2,3)}

(¹⁾東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾東海大学工学部生命化学科、³⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門)

…………… 47

「ICR マウスによるヤーコンシロップのプレバイオティクスの評価」

西川奈緒¹⁾、尾崎理菜子²⁾、小林結夏²⁾、田中志歩²⁾、村田達郎³⁾、松田靖³⁾、安田伸^{4,5)}、黒田泰弘^{1,2,5)}

(¹⁾東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾東海大学工学部生命化学科、³⁾東海大学農学部応用植物科学科、⁴⁾東海大学農学部バイオサイエンス学科、⁵⁾東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門)

…………… 51

化粧品研究部門

「メソポーラスシリカナノ粒子を担持させたナノファイバーの創製とにおい分子包接能」

浅羽 建汰¹⁾、坪井 亮¹⁾、伊藤 早也香¹⁾、小倉 正¹⁾、樋口 昌史^{1・3)}、伊藤 建^{3,4)}、小口 真一^{3,4)}、岡村 陽介^{1・3)}*

(¹⁾東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾東海大学工学部応用化学科、³⁾東海大学先進生命科学研究所・化粧品研究部門、⁴⁾東海大学理学部化学科)

..... 55

Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences

Vol.5 2020

CONTENTS

Pharmaceutical Science

Development of anti-thrombosis drugs based on the inhibition of the interaction between PDPN and CLEC-2

Nobuo Watanabe^{1,2)}, Masako Kidokoro^{1,2)}, Noriaki Hirayama²⁾, Sadaki Inokuchi^{1,2)} and Takeshi Saitou^{1,2)}

(¹⁾ Department of Emergency and Critical Care Medicine, Tokai University School of Medicine, ²⁾ Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 1

Addition of selenogluthathione to culture medium of the cells where the expression level of glyoxalase 1 is suppressed can restore the resistance to both glycation and oxidative stress

Akiko Kanamori^{1,2)}

(¹⁾ Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University,

²⁾ Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 5

Proliferative and morphological changes induced by pregnancy-related steroid hormones on JEG-3, a human chorionic carcinoma cell line

Tomoka Shimizu¹⁾ and Yoshie Kametani^{1,2)}

(¹⁾ Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, ²⁾ Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 9

Development of novel diagnostic methods for cancer using odor analysis

Kenichi Hirabayash^{1,2)}, Yoshika Sekine^{2,3)} and Michihito Todaka⁴⁾

(¹⁾ Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University, ²⁾ Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ³⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ⁴⁾ AIREX Inc.)

..... 14

Effects of IL-17A on intervertebral disc degeneration and the investigation of the new small-molecule: IL-17A inhibitor for treating the IL-17 -related disease

Daisuke Sakai^{1,3)}, Kaori Suyama^{2,3)}, and Noriaki Hirayama³⁾

(¹) Division of Orthopaedic Surgery, School of Medicine Tokai University, (²) Division of Cellular Biology and Anatomy, School of Medicine Tokai University, (³) Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 18

Molecular Structure of Antiviral Moroxydine and its Possible Interaction with SARS-CoV-2 PL^{pro}

Rumiko Tanaka¹) and Noriaki Hirayama²)

(¹) Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine,

(²) Division of Pharmaceutical Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 21

High Functional Food Science

Development of a Unique Processed Food using Roasted Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) Cultivated at Kumamoto-Minamiaso in Japan

Shin Yasuda^{1,2})*, Tomoko Yasuda¹), Kensho Honda¹), Masako Komatsumaru³) and Yasushi Matsuda^{1,2})

(¹) School of Agriculture, Tokai University, (²) Division of High Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, (³) Minami-Aso Organic Co., Ltd)

..... 25

Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic L-lysine dehydrogenase

Kazunari Yoneda^{1,2,3,4}) and Tomohiro Araki^{1,2,3})

(¹) School of Agriculture, Tokai University, (²) Graduate School of Agriculture, Tokai University, (³) Graduate School of Bioscience, Tokai University, (⁴) Division of High Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 31

A study of the pungent flavor of WASABI attenuated by fatty acids in raw fish

Hiroshi Saito^{1,2}), Adachi Hirotaka¹), Nobuhiko Akiyama^{1,2}) and Seiichi Hiratsuka^{1,2})

(¹) School of Marine Science and technology, Tokai University, (²) Division of High Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 36

A study of the presence of microplastics in commercial salts from different sea areas

Kurumi Saba¹) and Muneshige Shimizu^{1,2})

(¹) School of Marine Science and Technology, Tokai University, (²) Division of High Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 41

**Liposomes containing cerebroside from *Asterias amurens* endocytosed into Caco-2 cells,
and the liposomes, which were fed into *Caenorhabditis elegans*, did not affect for their motility**

Motomi Yamazaki¹⁾, Ryosuke Yamaguchi¹⁾, Yoshitaka Shimizu^{1,2,3)}, Noboru Sasagawa^{1,2,3)}

(¹⁾ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University,

²⁾ Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University,

³⁾ Division of High Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 47

Assessment of the prebiotics potential of Yacon syrup in ICR mice

Nao Nishikawa¹⁾, Rinako Ozaki²⁾, Yuika Kobayashi²⁾, Shiho Tanaka²⁾, Tatsuro Murata³⁾,
Yasushi Matsuda³⁾, Shin Yasuda^{4,5)} and Yasuhiro Kuroda^{1,2,5)}

(¹⁾ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University, ²⁾

Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University, ³⁾

Department of Plant Science, School of Agriculture, Tokai University,⁴⁾ Department of

Bioscience, School of Agriculture, Tokai University,⁵⁾ Division of High Functional Food
Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

..... 51

Cosmetic Science

**Fabrication of Nanofibers Carrying Mesoporous Silica Nanoparticles and Inclusion Ability of
Odor**

Kenta Asaba¹⁾, Ryo Tsuboi¹⁾, Sayaka Ito¹⁾, Masashi Ogura¹⁾, Masashi Higuchi¹⁻³⁾, Takeru
Ito^{3,4)}, Shinichi Koguchi^{3,4)}, and Yosuke Okamura^{1-3)*}

(¹⁾Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University, ²⁾

Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University, ³⁾ Division of

Cosmetic Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ⁴⁾ Department of
Chemistry, School of Science, Tokai University)

..... 55

Podoplanin と CLEC-2 との相互作用の阻害に基づく抗血栓薬の開発

Development of anti-thrombosis drugs based on the inhibition of the interaction between PDPN and CLEC-2

渡邊 伸央^{1,2)}、城所 正子^{1,2)}、平山 令明²⁾、猪口 貞樹^{1,2)}、斉藤 剛^{1,2)}

東海大学医学部救命救急医学¹⁾、東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門²⁾

Nobuo Watanabe^{1,2)}, Msasako Kidokoro^{1,2)}, Noriaki Hirayama²⁾, Sadaki Inokuchi^{1,2)}, and Takeshi Saitou^{1,2)}

¹⁾Department of Emergency and Critical Care Medicine, School of Medicine, Tokai University

²⁾Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

Podoplanin (PDPN)はガン細胞や炎症時の免疫細胞などにおいて発現亢進し、血小板の CLEC-2 との結合を介して血小板の活性化を惹起する。したがってこの2者の結合を阻害できる化合物は、ガンの転移・浸潤阻害から、ガンや感染症・炎症に伴う血栓症まで防ぐことが期待できる。我々はドッキング・シミュレーションと、実験的な結合阻害活性測定を組み合わせにより、PDPN と CLEC-2 との結合を阻害し得る5化合物を得た。ヒト血小板を用いた凝集阻害実験において、これらの化合物はPDPN 惹起による凝集を特異的に抑制した。またマウス血小板凝集に対しても抑制効果を示した。これらの結果は、我々のヒット化合物がガンや感染症など、PDPN 発現が関与する血栓症の治療薬のリード化合物となる可能性を支持する。

[Abstract]

Inhibition of the interaction between PDPN and CLEC-2 on platelets is expected to prevent platelet aggregation. Using the combination of a molecular docking simulation and an experimental binding-inhibition assay, we have successfully selected 5 inhibitory compounds. In a platelet aggregation assay using human washed platelets stimulated with PDPN-expressing CHO cells, 4 of them demonstrated potent inhibitory activity with IC50 being < 40 μ M. Nevertheless, no inhibitory effect was observed for any of these compounds when stimulated with thrombin or ADP. These results suggest that our hit compounds are promising as a therapeutic agent for thrombosis resulting from PDPN over-expression.

[Key Words]

Tumor metastasis, Thrombosis, Invasion, Platelet aggregation

1. はじめに

Podoplanin (PDPN) は、リンパ管内皮や腎臓 podocyte に恒常的に発現する膜タンパク質である。我々は食道ガン組織における PDPN の発現レベルが、切除手術後の再発・転移・生命予後と強く関連することを見出した[1]。同様の結果は、他の組織のガンにおいても相次いで報告されて、PDPN 発現量はガン細胞における悪性度マーカーとして位置づけられている。PDPN には血小板活性化ドメインがあり、これが血小

板膜上の膜タンパク質である C-type lectin receptor-2 (CLEC-2)に結合してクラスター化させると血小板の活性化が誘導される。活性化血小板から放出される TGF- β 等の生理活性分子は、ガン細胞に作用して上皮間葉転換を誘導しガンの浸潤能を高める [2]。一方、活性化した血小板は凝集し、血液凝固系を活性化させ血栓形成を導く。末期ガン患者では全身の血管に血栓症 [播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation: DIC)あるいは深部静脈血

栓 症 (Venous Thrombo-Embolism: VTE)などのガン関連血栓症が頻発するが、PDPN-CLEC2 結合を介した血小板活性化がこの一因として示唆されている[2]。近年、PDPN は感染症や炎症時のマクロファージや血管内皮細胞でも発現上昇し、ガンの場合と同様に血小板の活性化し血栓症を誘導することが示されている[3, 4]。したがって、PDPN と CLEC-2 との結合を阻害できる化合物は、ガンの転移浸潤防止だけでなく、ガンならびに感染症や炎症に伴う血栓症に対する治療効果が期待できる(図 1)。

そこで我々は *in silico* 化合物ドッキングシミュレーションと、我々が独自に開発した *in vitro* 化合物結合阻害能評価系[5]を組み合わせ、候補化合物の探索に着手した(図 2)。まずドッキング・シミュレーションにより CLEC-2 分子の PDPN 結合部位にはまり込み、PDPN の結合が妨げられる可能性のある化合物を既存の化合物のライブラリーからリストアップした。つぎに上位の化合物を入手し、我々が開発したプルダウン評価系で評価した。この結果、初代ヒット化合物として化合物 B9 を見出した。

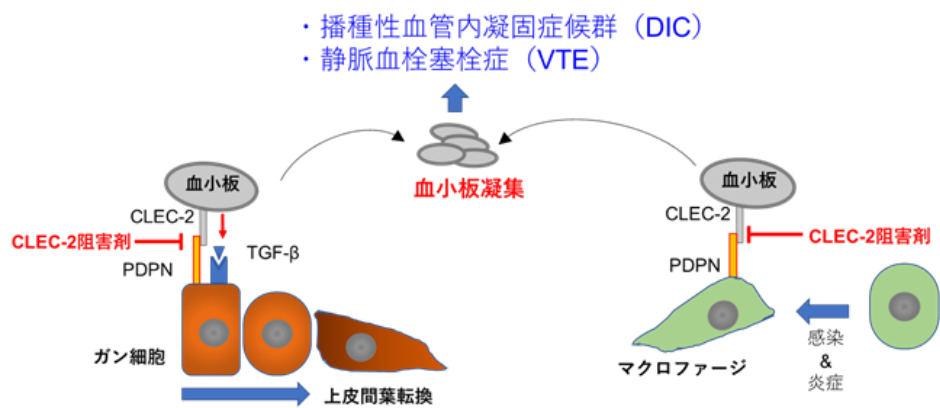


図1 ガン、炎症、感染症におけるPodoplaninによるCLEC-2を介した血小板活性化と血栓症との関係

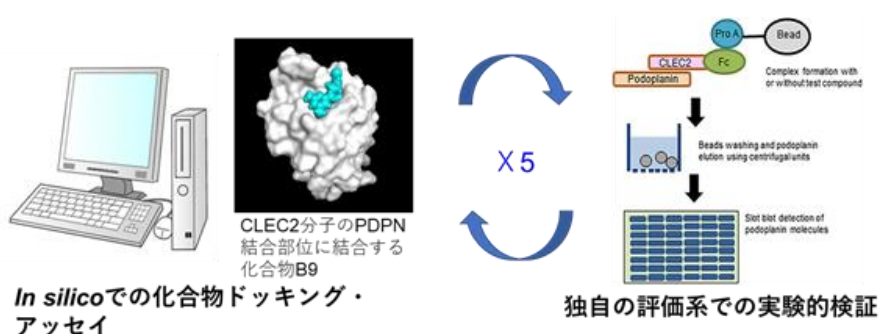


図2 In silicoでの化合物ドッキング・シミュレーションとプルダウン法との組み合わせによる“CLEC-2阻害剤”のスクリーニング

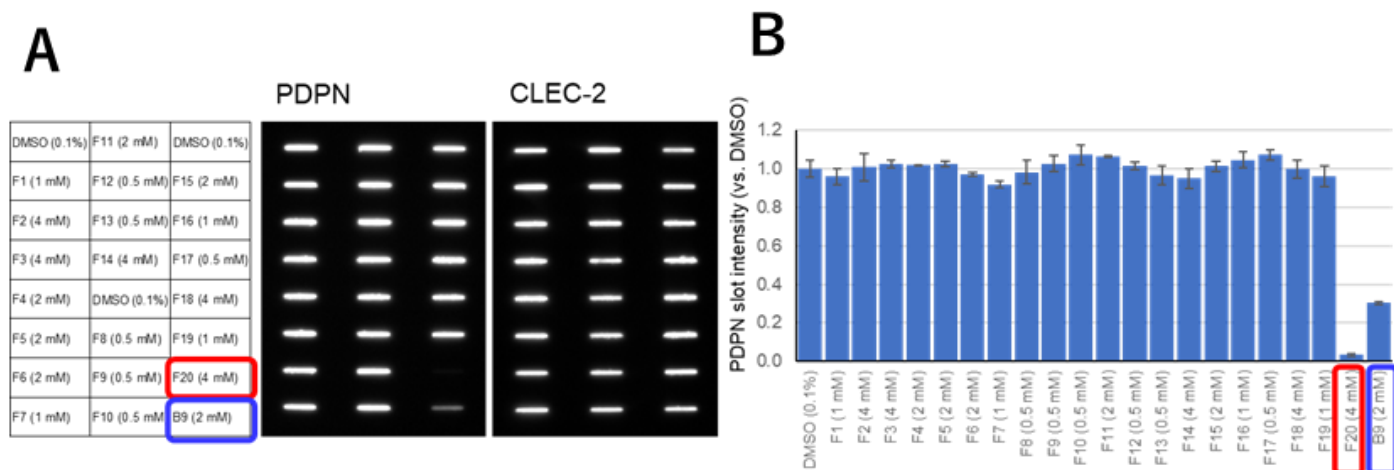


図3 プルダウン-スロットプロット法による“CLEC-2阻害剤”の活性評価

図は候補化合物Fシリーズ(F1~F20)の結果を示す。ポジコンとしてB9も評価した。各化合物存在下でのCLEC-2によるpodoplanin回収量プロット(A)はデンストメーターで定量した(B)。化合物F20(赤枠)に抑制効果が見られた。

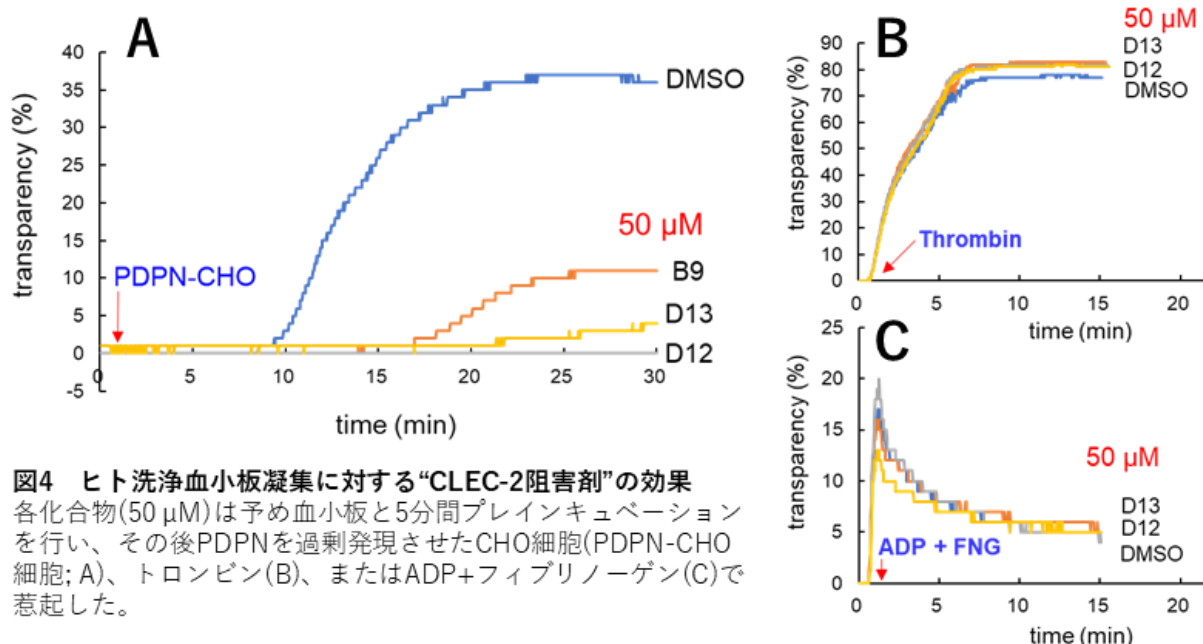


図4 ヒト洗浄血小板凝集に対する“CLEC-2阻害剤”の効果
各化合物(50 μ M)は予め血小板と5分間プレインキュベーションを行い、その後PDPNを過剰発現させたCHO細胞(PDPN-CHO細胞; A)、トロンビン(B)、またはADP+フィブリノーゲン(C)で惹起した。

2. 結果の概要

1) *in silico* $\rightleftharpoons$ *in vitro* 選抜による候補化合物の更なる取得

昨年、“CLEC-2 阻害剤”として化合物 B9 を見出したことを報告した。この化合物の化学構造を、次のラウンドのドッキング・シミュレーションにフィードバックさせ候補化合物を抽出し、同様に実験的検証を行った(図3)。このようなサイクルでこれまで5ラウンドの評価が完了した。この結果、実験的に評価した計94化

合物から5つのヒット化合物(B9, D12, D13, E18, F20)を得た。

2) ヒット化合物のヒト血小板凝集に対する効果

5つの化合物に血小板凝集阻害活性があるかどうか検証した。ヒト洗浄血小板にPDPNを過剰発現させたCHO細胞を添加すると凝集が誘導された。ここにヒット化合物を共存させると、化合物により抑制の程度は異なるが、凝集阻害が見られた(図4A)。しかしトロンビンまたはADP(+フィブリノーゲン)で凝集を惹起した場合には、いずれの化合物にも抑制活性は見られなかった(図4B & C)。以上の結果は、我々のヒット化合物の抗血小板効果はPDPN惹起の場合に特異であることを示唆する。5化合物の効果を表1に示す。

3) ヒット化合物のマウス血小板凝集に対する効果

化合物の今後の臨床開発のためには、マウス等を用

表1 ヒト洗浄血小板凝集に対するIC₅₀ (μ M)

compound	PDPN	thrombin	ADP+fng
B9	40	>>50	nd
D12	8	>>50	>>50
D13	38	>>50	>>50
E18	38	>>50	>>50
F20	>100	>>50	>>50

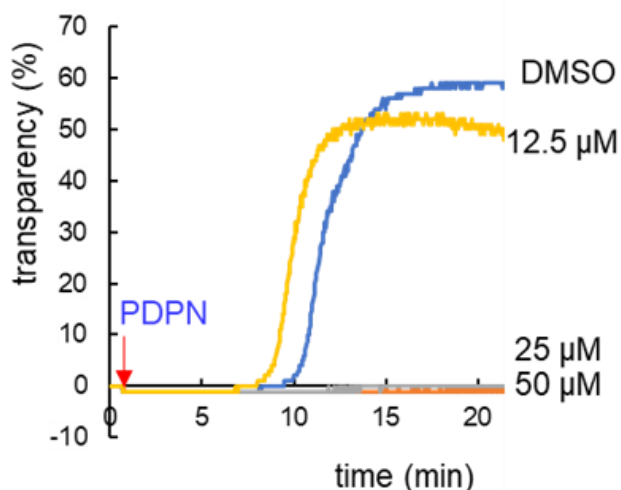


図5 マウス洗浄血小板凝集に対する“CLEC-2阻害剤D12”の濃度依存性
各濃度の化合物D12は予め血小板と5分間プレインキュベーションを行い、その後podoplaninを過剰発現させたCHO細胞(PDPN-CHO細胞で惹起した。

いた非臨床薬効評価が不可欠である。我々の CLEC-2 阻害剤はヒトの CLEC-2 へ結合して機能抑制を果たす。しかしマウスとヒトの CLEC-2 は、アミノ酸残基数は同じであるが、相同性は 90% (207/229) である。そこで化合物が、PDPN 惹起によるマウス血小板凝集を抑制できるか検討したところ、いずれの CLEC-2 阻害剤も、125 μ M においてほぼ完全に抑制した。次に化合物 D12 について抑制の濃度依存性を調べた。この結果、IC₅₀ は 20 μ M 程度で (図 5)、同化合物のヒト血小板に対する阻害濃度より若干高めであった。これより我々の“CLEC-2 阻害剤”の動物モデルでの薬効評価が可能であることが明らかとなった。

3. 展望

本年度の研究によって、我々が見出した“CLEC-2 阻害剤”は PDPN 惹起による血小板凝集に対して特異性をもって抑制できることが明らかになった。さらに、ヒト血小板の場合よりも若干高濃度ではあるが、マウスの血小板凝集に対しても有効であることが判明した。これより我々の“CLEC-2 阻害剤”は今後、マウスを用いた各種の血栓症モデルにおいて薬効評価を実施できる目処が立った。そこで今後は、狭窄による深部静脈血栓モデルならびに細菌性肺炎による肺静脈の血栓モデルに対する化合物の評価を行っていきたいと考えている。

重症 COVID-19 患者では高頻度で血栓症が発生している。COVID-19 患者でサイトカインストームが起こっていることを鑑みると、血栓症に一因にマクロファージ等に発現亢進された PDPN による血小板活性化が関与している可能性も十分にある。今後この分野を注視し、我々の“CLEC-2 阻害剤”の適用の可能性を検討していきたい。

4. 引用文献

- [1] Tanaka M, Kijima H, Shimada H, Makuuchi H, Ozawa S, Inokuchi S. (2015) Expression of PDPN and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol. Med. Rep.*, **12**: 4029-4036.
- [2] Takemoto A, Miyata K, Fujita N (2017) Platelet-activating factor PDPN: from discovery to drug development. *Cancer Metastasis Rev.*, **36**: 225-234.
- [3] Hitchcock JR, Cook CN, Bobat S, et al. (2015)

Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets. *J. Clin. Invest.*, **125**, 4429-46.

[4] Payne H, Ponomaryov T, Watson SP, Brill A. (2017) Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis. *Blood*, **129**, 2013-2020.

[5] Watanabe N, Kidokoro M, Suzuki Y, Tanaka M, Inoue S, Tsukamoto H, Hirayama N, Hsieh PW4, Tseng CP, Nakagawa Y, Inokuchi S (2019) “A pull-down and slot blot-based screening system for inhibitor compounds of the PDPN-CLEC-2 interaction” *PLOS ONE*, **14**(9):e0222331. doi: 10.1371/journal.pone.0222331.

5. 業績

【論文発表】

[1] Watanabe N, Kidokoro M, Tanaka M, Inoue S, Tsuji T, Akatuska H, Okada C, Iida Y, Okada Y, Suzuki Y, Sato T, Yahata T, Hirayama N, Nakagawa Y, Inokuchi S. (2020) PDPN is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial-to-mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells. *Cancer Cell Int.*, **20**:263. doi: 10.1186/s12935-020-01328-2. eCollection 2020.

6. 謝辞

本研究を行うにあたり種々の技術支援くださいました東海大学・生命科学統合支援センターの佐々木亜由美氏、篠崎よし子氏および荻原早苗氏、ならびに東海大学付属病院臨床検査室の宮川加代子氏および和田典子氏に感謝いたします。

老化抑制因子グリオキサラーゼ 1 の発現量減少に由来する細胞の酸化ストレス抵抗性低下に
セレノグルタチオンの添加がもたらす回復効果

Addition of selenogluthathione to culture medium of the cells where the expression level of glyoxalase 1 is suppressed can restore the resistance to both glycation and oxidative stress

金森 審子^{1, 2)}

東海大学工学部生命化学科¹⁾, 東海大学先進生命科学研究so・医薬総合研究部門²⁾

Akiko Kanamori^{1,2)}

¹⁾ Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

²⁾ Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

メチルグリオキサール(MG)は反応性の高いジカルボニル化合物であり、細胞の糖化および酸化ストレスの主な原因物質である。細胞内のMG無毒化機構であるグリオキサラーゼシステムで作用するグリオキサラーゼ1(GLO1)の発現を抑制したところ、MG存在下のみならず、過酸化水素(H₂O₂)存在下での生存率も顕著に低下した。しかし、酸化型セレノグルタチオン(GSeSeG)を培地に添加したところ、生存率が明確に回復した。GLO1は老化抑制因子であり、その発現量や活性の低下によって悪化する疾病の治療にGSeSeGを活用する可能性が期待される。

[Abstract]

Methylglyoxal (MG) is a highly reactive dicarbonyl compound that plays important roles to bring cells glycation and oxidative stress. Glyoxalase1 (GLO1) is a ubiquitous cellular enzyme that contributes on detoxification of MG in glyoxalase system with the use of glutathione (GSH). The cells suppressed their expression levels of GLO1 were established by transfection of the plasmids constructed for stable expression of siRNA against GLO1. Effects of the addition of selenogluthathione into culture medium on recovery of resistance to both glycation and oxidative damage of those stable transfectant cells were analyzed.

[Key Words]

methylglyoxal, glyoxalase 1, glutathione, selenogluthathione, oxidative stress

1. はじめに

糖質の過剰摂取が高血糖、肥満、そしてメタボリックシンドロームにつながる危険性についての注意喚起が為されて久しい。高血糖は老化促進物質であるAGEs(Advanced Glycation End-products, 終末糖化産物)の生成促進につながり、「糖化ストレス」の原因となることも無視できない。糖化ストレスは、還元糖とタンパク質のアミノ酸の縮合反応であるメイラード反応が進行して生じ、AGEsばかりでなく、その前駆体であるジカルボニル化合物による弊害も「カルボニルストレス」として報告されている。AGEs 前駆体の中でもメチルグリオキサール(MG)は、活性酸素を無毒化する酵素を不活性化し、細胞に「酸化ストレス」を東海大学先進生命科学研究so紀要 第5巻 2021年3月

もたらすことが報告されている。その結果、酸化ストレスと糖化ストレスが相乗効果的に生体に負の影響を及ぼし、細胞表面の受容体から細胞内の抗酸化酵素まで、多様な機能分子が失活して疾病の原因となる[1]。特に糖尿病患者の血清では高濃度のMGが検出されており、インシュリン受容体を介したシグナル伝達への悪影響が報告されている[2,3]。

他方、細胞内では通常、MGは解糖系においてグルコース代謝の中間産物であるグリセルアルデヒド-3-リン酸を経由して数%の副産物として産生されており、その濃度が一定の値以下になるように厳密に制御されている。細胞質では、MGは主としてグリオキサラーゼシステムによって無毒化される[1, 3, 4]。この経路で

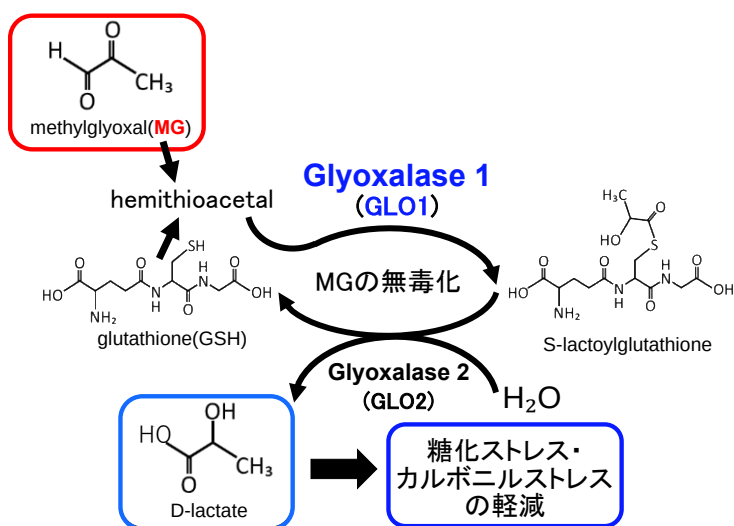


図1 グリオキサラーゼシステムの反応機構
メチルグリオキサールが乳酸へと無毒化される一方、還元型グルタチオンは系の中で再利用される。

は、まず、MG が生体内の主要な抗酸化分子である還元型グルタチオン (GSH) と非酵素的にヘミチオアセタールを形成したのち、グリオキサラーゼ 1 (GLO1) の作用を受けて、中間産物である S-D-ラクトイルグルタチオンが生成される。その後、グリオキサラーゼ 2 (GLO2) の寄与で加水分解され、乳酸として代謝される一方、GSH は再生され、再利用される (図 1)。しかしながら、糖尿病患者では、高血糖症の上に GLO1 の発現量低下や遺伝子多型による活性低下が認められ、健常人よりも酸化ストレスおよび糖化ストレスを受けやすい状況にある [5, 6]。GLO1 は老化抑制因子と呼ばれており、糖尿病モデルマウスやモデル細胞を用いた実験では、人為的な GLO1 の過剰発現により症状が緩和された報告がある [7, 8]。

2. 研究の概要

【先行研究による成果】

先行研究では、GSH の硫黄をセレンに変換したセレンノグルタチオン (還元型 GSeH および酸化型 GSeSeG、図 2) を化学合成し、その反応性について以下の成果を得た [9-12]。GSeH は反応性が高く、容易に標的分子を還元して GSeSeG となるため、全ての実験には安定な GSeSeG 用い、*in vitro* の系では必要に応じてグルタチオンレダクターゼ (GR) を作用させて GSeSeG から生成した GSeH の反応性を解析した。

(1) *in vitro* の系 [9, 10]

(i) グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) は、GSH を利用して過酸化水素 (H_2O_2) を無毒化する。これに対

して GSeH は、GPx 非存在下で迅速に H_2O_2 濃度を低下させた。すなわち、非酵素的反応による GPx 様の活性を示した。

(ii) GSeH は、GLO1 非存在下で、非酵素的反応により、迅速に MG 濃度を低下させた。

(2) 培養細胞を用いた系 [11, 12]

(i) GSeSeG をあらかじめ培地に添加して取り込ませた細胞は、MG 由来の糖化ストレスおよび H_2O_2 由来の酸化ストレスに対する抵抗性が上昇し、生存率が上がった。

(ii) (i) の効果は一定期間持続した。

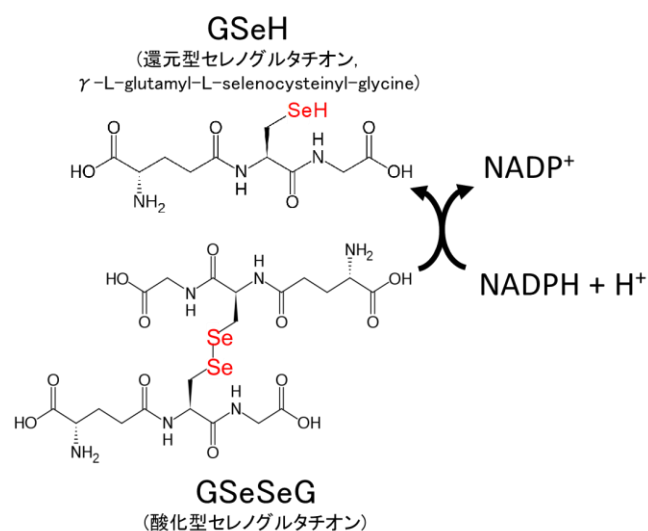


図2 還元型および酸化型セレンノグルタチオンの構造
還元力の高い GSeH は容易に酸化型二量体である GSeSeG となるが、GR の作用を受けて GSeH に戻る。

【結果の概要】

上記の先行研究の成果をもとに、GLO1 の発現量・活性の低下が報告されている糖尿病の治療へ GSeSeG を活用する可能性を模索した。そのため、言わば糖尿病のモデル細胞として、GLO1 の発現抑制用 siRNA を安定発現させた細胞を調製し、MG または H_2O_2 に由来するストレスへの抵抗性の変化と GSeSeG 添加によるダメージ減少への効果を解析した。

まず、ヒト GLO1 標的配列を Takara pBAsiDNA ベクターに挿入して、GLO1 発現抑制用プラスミドを構築した。挿入配列を確認後に培養細胞に遺伝子導入し、siRNA 安定発現細胞を樹立した。得られた GLO1 発現低下細胞を親細胞と比較したところ、MG および H_2O_2 に由来する糖化および酸化ストレスに対する抵抗性が低下し、顕著な生存率の低下が認められた。しかし、あらかじめ GSeSeG を培地に添加した後にストレスを加えた場合は、生存率が上昇した (図 3) [13]。すなわち、細胞に取り

込まれたGSeSeGが細胞質に存在するGRの作用を受けて生じたGSeHにより、MGおよびH₂O₂の無毒化が起こり、生存率が回復したと考えられる。効果は特にH₂O₂によるダメージに対して明確に認められ、1.5μMという低濃度のGSeSeGの添加で一定の値に達した。

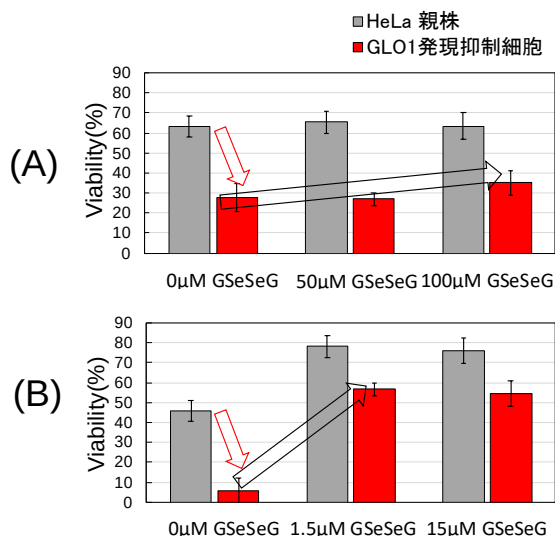


図3 GLO1 発現抑制細胞の糖化および酸化ストレス抵抗性に対する GSeSeG 添加の影響
(A) 2mM MG 処理、(B) 1mM H₂O₂ 処理後の細胞の生存率。各濃度の GSeSeG を培地に添加して取り込ませた後に培地を交換し、各薬剤で処理して生存率を比較した。

3. 展望

本研究の GLO1 発現抑制細胞は、GLO1 発現量低下により、培地中の還元糖由来のメイラード反応や細胞内の解糖系から生成される MG が残存してしまい、H₂O₂の無毒化に必要な GPx を失活させ、酸化スト

レス抵抗性が低下した状態にあると推測される。先行研究から GSeH は GPx 非存在下でも H₂O₂を迅速に還元し、言わばスカベンジャーとして機能することが示唆されており、上記の結果はその裏付けになると考えられる。他方、今回、細胞を培地に希釈した MG または H₂O₂ によって短時間処理して生存率を比較したが、両者の細胞膜透過性の違いも GSeSeG 添加効果の差異の一因であると思われる。すなわち、GSeSeG が細胞内に運ばれて初めて GSeH が生成されるため、GSeSeG の添加は細胞外で細胞表面の分子に悪影響を与える MG を無毒化することはできない。高濃度のグルコースやフルクトースを添加した培地中で長期間培養し、解糖系由来の MG 濃度を高めるなど、生体内環境で細胞内に起こりうる状況を反映させた培養条件での検討を進める予定である。

カルボニルストレスを含めた糖化ストレスおよび酸化ストレスは、相乗効果的に細胞に負の影響をもたらす(図4)。糖尿病患者では、高血糖に起因して、細胞内が GLO1 発現抑制細胞に類似した状況となり、抗酸化作用に携わる酵素類の活性が低下していると推察される。今回、1mM H₂O₂によるダメージに対して1.5μMという低濃度の GSeSeG 添加により、親株の10%程度だった生存率が70%以上まで回復した効果は、抗酸化能が低下して生じる症状の緩和に応用できると考えられる。

GSH と GSeH の違いは、構成アミノ酸であるシステイン(Cys)とセレノシステイン(Sec)の反応性の差に基づく。Sec は GPx をはじめとするレドックス制御に関与する酵素の活性部位に多く見出されており、生体内の中性付近の pH では Sec の方が Cys よりもはるかに

に反応性が高い。細胞質には、通常数 mM のグルタチオンが存在し、特に細胞質では GSH:GSSG の比が 50~100:1 という還元条件下にある。しかし、糖化ストレスや酸化ストレスが高くなると GSH が枯渇しやすくなり、原因物質無毒化の速度が不十分になる。特に GPx が失活している状況では、H₂O₂の無毒化はさらに速度が低下し、悪影響が生じる。セレンは必須微量元素でありながら許容摂取量の範囲が狭いた

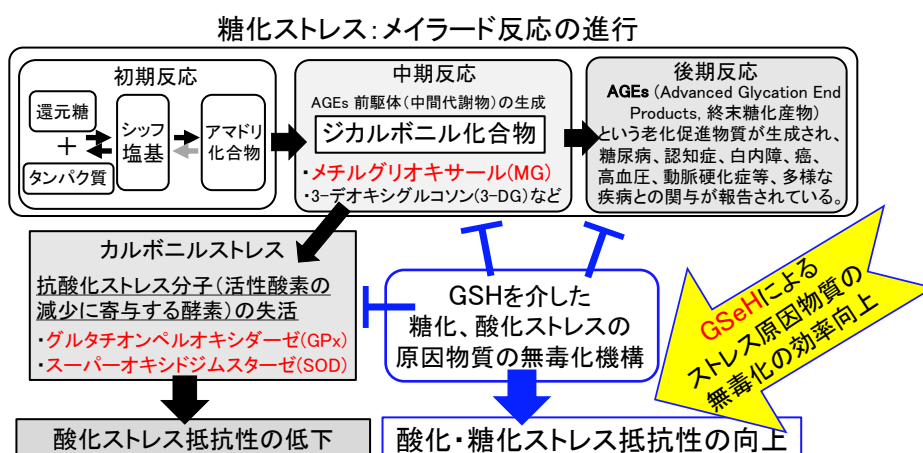


図4 細胞内での糖化ストレス・カルボニルストレス・酸化ストレスの相関性と GSH を介した原因物質の無毒化機構の概要

め扱いに注意を要するが、低濃度の GSeSeG の添加の効果は高い再現性を示している[11-13]。今後、市販の糖尿病モデル細胞の利用をはじめとして、さらに治療への応用の可能性を検討していきたい。

4. 引用文献

- [1] I.Allaman *et.al.*, *Front. Neurosci.*, **9**,23,1(2014)
- [2] X.Kong *et.al.*, *J Diabetes*, **6**, 535(2014)
- [3] S.Domadula *et.al.*, *Cem. Res. Toxicol.*, **28**, 1666 (2015)
- [4] P.J.Thornalley, *Biochem.Soc.Trans.*,**31**(Pt 6), 1343 (2003)
- [5] N.Rabbani *et.al.*, *Semin.Cell.Dev.Biol.*, **22**, 309 (2011).
- [6] R.Peculis *et.al.*, *Gene.*, **515**, 140 (2013).
- [7] O.Brouwers *et.al.*, *J.Biol.Chem.*, **286**, 1374 (2011).
- [8] D.Yao *et.al.*, *Diabetes*, **59**, 249 (2010)
- [9] S. Yoshida, K. Arai, M. Iwaoka, *et.al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 2125-2128 (2011)
- [10] A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **3**, 4-7 (2019)
- [11] A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **2**, 10-13 (2018)
- [12] A. Kanamori, *Bull. Inst. Adv. Biosci.* **4**, 5-8 (2020)
- [13] 金森審子ら、第 39 回日本糖質学会年会要旨集 p. 177 (2020)

5. 業績

【論文発表】

- 1) K.Arai, Y.Sato, I.Nakajima, M.Saito, M.Sasaki, A.Kanamori, M.Iwaoka, Glutathione peroxidase-like functions of 1,2-diselenane-4,5-diol and its amphiphilic derivatives: Switchable catalytic cycles depending on peroxide substrates, *Bioorg. Med. Chem.*, **2021**, 29, 115866.

【学会等発表】

- 1) 金森 審子, 島田いぶき, 岡部 リハナ, 高橋 沙和, 大島 早葵, 熊坂 実優, 下平 伸吾, 岩岡 道夫: グリオキサラーゼ 1 発現量低下による細胞の糖化および酸化ストレス抵抗性の低下とセレノグルタチオンによる回復効果。第93回 日本生化学会大会、2020.9 横浜 (WEB開催)
- 2) 金森 審子, 島田いぶき, 高橋 沙和, 大島 早葵, 下平 伸吾, 岩岡 道夫: 老化抑制遺伝子の発現量減少による細胞の酸化ストレス抵抗性の低下にセレノグルタチオンがもたらす回復効果。生命金属に関する合同年会 ConMetal 2020、2020.11 千葉 (WEB開催)

- 3) 金森 審子, 島田いぶき, 岡部 リハナ, 高橋 沙和, 大島 早葵, 下平 伸吾, 岩岡 道夫: グリオキサラーゼ 1 発現抑制細胞の生存率低下に対するセレノグルタチオンの回復効果。第39回 第39回日本糖質学会年会 2020.11 東京 (誌上開催)

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えてくださり、常に的確で温かなご指導をいただいている平山令明先生、共同研究を行わせていただいている理学部化学科、岩岡道夫先生、荒井堅太先生と下平伸吾さん、本研究を遂行するにあたりご協力いただいた研究室の学生の皆さんに心より感謝いたします。

妊娠ステロイドホルモンによるヒト胎盤由来の絨毛がん株 JEG-3 の増殖と形態の解析

Proliferative and morphological changes induced by pregnancy-related steroid hormones on JEG-3, a human chorionic carcinoma cell line

清水智香¹⁾、亀谷美恵^{1,2)}

¹⁾東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

²⁾東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Tomoka Shimizu¹⁾ and Yoshie Kametani^{1,2)}

¹⁾Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine

²⁾Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

胎盤では、妊娠時関連分子が特有の環境を形成してがんと類似の性質を持つトロフォブラストの増殖や浸潤を調整していると考えられる。本研究ではヒト胎盤由来の絨毛がん細胞株 JEG-3 を用い、妊娠関連ホルモンであるプロゲステロン (P4) とコルチゾール (COR) が細胞増殖と形態に与える影響を解析した。その結果、P4 は高濃度で細胞増殖抑制と形態変化を誘導するのに対して COR は影響を与えないことが明らかとなった。

[Abstract]

Placenta shares common characteristics such as invasion, proliferation, angiogenesis and immune suppression with cancer. Therefore, some important molecules produced during pregnancy might construct a specific environment different from cancer, which regulates the invasion and proliferation of trophoblasts of placenta. In this study, we used a human chorionic carcinoma cell line, JEG-3, to compare the proliferative ability and morphology between progesterone- and glucocorticoid-treatment. As a result, progesterone suppressed the proliferation and induced morphological change, while glucocorticoid did not affect both of the characters.

[Key Words]

human chorionic carcinoma cell line, progesterone, glucocorticoid, proliferative ability, morphology

1.はじめに

がんには、『浸潤』『増殖』『血管新生』『免疫抑制』を行うなどの性質があるが、これらのすべてと共通の性質を持つ唯一の正常臓器は胎盤である。しかし、がんと異なり、妊娠時

には胎盤の細胞であるトロフォブラストは子宮筋層の 2/3 で浸潤を停止し、10 ヶ月間の妊娠ののち、排泄され、がんを形成することはない。その理由は、妊娠時に産生される主要な分子ががんと異なる環境を形成し、トロフ

オブラストの増殖や浸潤を調整しているためと考えられる。

プロゲステロンの産生は妊娠 10 週頃から胎盤の絨毛細胞において開始し、やがて P4 産生の大半を胎盤が支配するようになる。これは、胎盤の Extravillous trophoblast (EVT) に作用して浸潤能を調節することが明らかになっており、胎盤の形成に重要な役割を持っている。また、プロゲステロンの代謝産物である

コルチゾールも妊娠時に産生が亢進される [1]。これらの役割は同等ではないと考えられるが、今まで厳密に比較を行った研究はない。

そこで、本研究ではヒト胎盤由来絨毛がん (JEG-3) にプロゲステロンあるいはコルチゾールを添加して細胞増殖と形態における差が生じるかについて比較解析を行った。

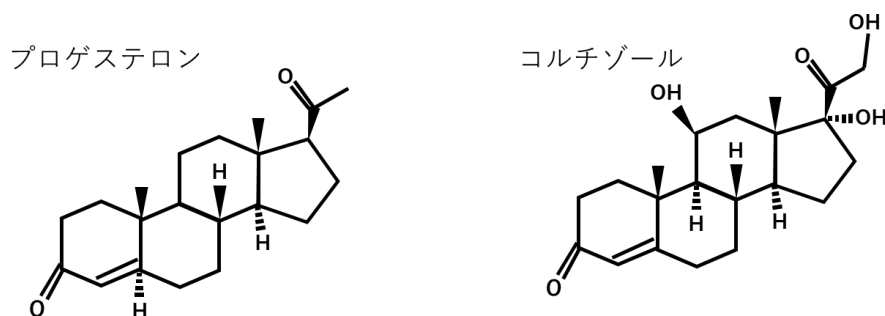


図 1

左がプロゲステロン右がコルチゾールのそれぞれの構造式を示す[2,3]。

2. 実験

1) 培地調製

Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM LG) 培地 (Gibco) に最終濃度が 10% になるように Fetal bovine serum (FBS) (SIGMA) と 100 unit/mL になるようにペニシリン (meiji seika ファルマ株式会社) と 0.1 mg/mL になるようにストレプトマイシン (meiji seika ファルマ株式会社) を添加した培地を用いた。

使用するステロイドとしては Progesterone-water soluble (P4) (SIGMA) と Hydrocortisone (COR) (SIGMA) を用いた。(図 1)

P4 を必要量計り取り 2 mg/mL になるように DMEM LG 10% FBS 培地を添加して転倒混和を行い溶解した。P4 の最終濃度が 200 μ M になるように DMEM LG 10% FBS 培地に添加してターナーテーブルで溶解したのち、Minisart

Syringe Filter pore size: 0.2 μ m (Sartorius) を用いて滅菌した。最終濃度 200 μ M、20 μ M、2 μ M の希釈系列をそれぞれ作製した。同様の方法を用いて COR の添加培地も作製した。

2) 細胞培養

事前に細胞の増殖能を確認した、ヒト胎盤由来絨毛がん細胞株 (JEG-3) を 2.0×10^4 ずつ 48well plate (IWAKI MICRO PLATE With Lid) に播種し、上記の P4、COR 添加培地を添加した。

2 日目～10 日目までの 2 日ごとに細胞を回収し細胞数の計測を行った。

3) 写真撮影

2 日目～10 日目までの 2 日ごとにオールイン

ワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710)を用いて写真撮影を行った。

3. 結果

1)細胞増殖能の解析

播種した日を Day0 として 2 日ごとに細胞数の計測を行うと、細胞数は 200 μ M P4 添加培養を行った細胞は Day2 以降 0 μ M~2 μ M の P4 添加培養と比較して有意に細胞増殖が抑制されていた。また、Day4 以降では、0 μ M~20 μ M の P4 添加培養と比較しても有意に細胞増殖が抑制されていた。20 μ M P4 添加培養では、Day10 で始めて 0 μ M~2 μ M の P4 添加培養と比較して有意に細胞増殖が抑制されていた。

一方、COR 添加培養ではすべての濃度で、Day0~Day10 までに細胞数の大きな差は観察されなかった。(図 2)

これらの事から P4 は濃度依存的に JEG-3 の増殖を抑制する一方 COR は濃度依存的な増殖の抑制を示さないことが明らかとなった。

2)細胞形態の解析

Day0~Day10 まで細胞形態を顕微鏡で観察を行った。図 3 に Day10 の代表的な写真を示した。Day10 で細胞の形態を観察すると 0 μ M

では JEG-3 が well の底面に張り付き、敷石状の形態をしていた。2 μ M,20 μ M の P4 添加培養では 0 μ M と同様の細胞形態が観察されたが 200 μ M の P4 添加培養では JEG-3 が well の底面に張りつかず、丸い形態をしていた。また、0~20 μ M の P4 添加培養と比較して細胞の大きさが縮小していた。

一方、2~200 μ M の COR 添加培養では、0 μ Mと同様の細胞形態が観察された。これらの事から P4 は高濃度で JEG-3 の形態に影響を与えることが示唆された。また、COR は、JEG3 の形態に影響を与えない事が示唆された。

4. 考察

上記の結果から P4 と COR では JEG-3 の細胞増殖と形態における差があると考えられ、抗腫瘍効果では P4 と COR では違う機能をもっていると考ええる。

また、胎盤が浸潤を行う際に P4 が周囲の細胞の増殖抑制を行っているのではないかと考える。これは、細胞が上皮間葉転換を行い、移動が可能となるとき、増殖が停止することと矛盾しない[4]。今後は、P4 による増殖停止と浸潤能の亢進に正の相関があるかを明らかにする必要がある。

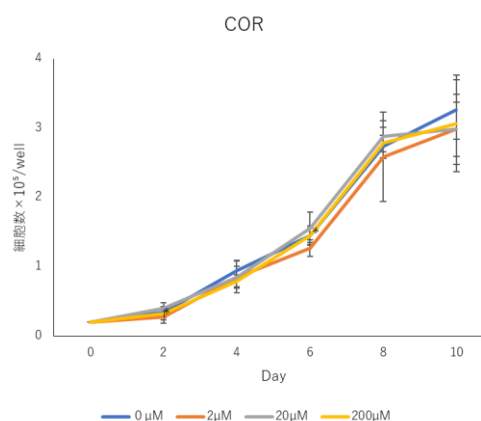
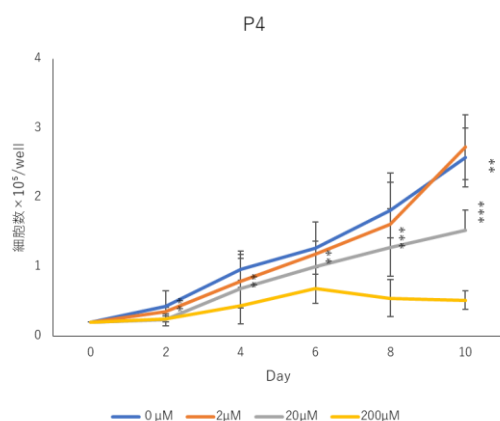


図 2

左のグラフが P4、右のグラフが COR の細胞増殖曲線を示す。横軸に播種した日を Day0 とした経過日数を示す。縦軸は、細胞数を示す。青い線：0 μ M 赤色の線：2 μ M 灰色の線：20 μ M 黄色の線：200 μ M の各最終濃度のステロイドホルモン(P4、COR)を添加して培養を行ったものを示す。標準偏差を縦線で T 検定による有意差を*(*:P<0.05 ** :P<0.01 ***:P<0.005) で示す。

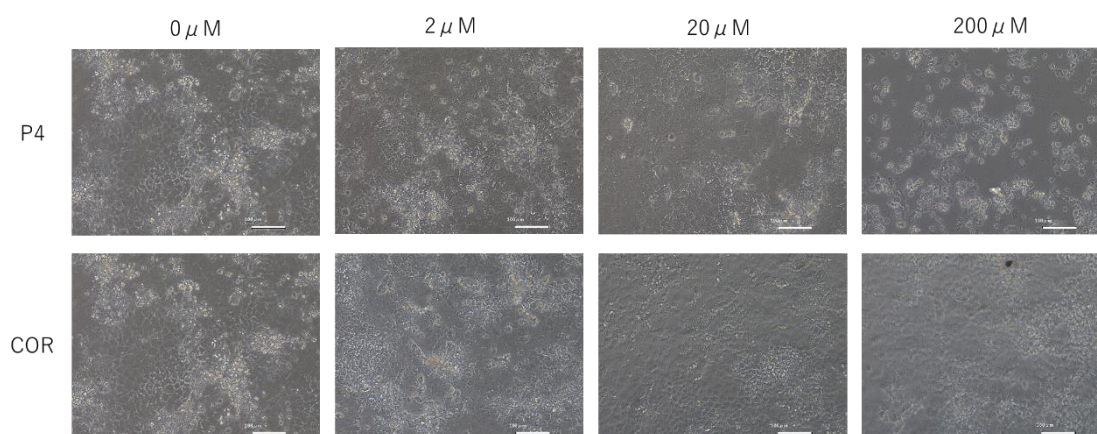


図 3

Day10 での細胞の形態の写真を示す。上段は P4、下段は COR である。

左側から最終濃度 0 μ M、2 μ M、20 μ M、200 μ M のそれぞれのステロイドホルモンを添加して培養を行ったものを示す。

5. 展望

JEG3 の P4 添加培養と COR 添加培養では、細胞増殖と形態における差があることから、P4 と COR によって上皮間葉転換が行われているかについて明らかにする必要があると考える。その為に P4 もしくは COR を添加した細胞と未添加の細胞では E-cadherin や β -カテニンなどの上皮細胞のマーカーや N-cadherin やフィブロネクチンなどの間葉系マーカーの発現[4]に差があるかについて解析をすることにより P4 と COR が上皮間葉転換に関連する分子であるかについて明らかになるだろう。

6. 引用文献

- [1] 「Wikipedia プロゲステロン」
<https://ja.wikipedia.org/wiki/プロゲステロン>

ン(2021 年 2 月 27 日)

- [2] 「Wikipedia コルチゾール」
<https://ja.wikipedia.org/wiki/コルチゾール>
 (2021 年 2 月 27 日)
- [3] Yusuke Ohno, Yoshie Kametani *Relation of Pregnant immunity and steroid hormones. Bulletin of the Institute of Advanced Biosciences*, **3**, 8 (2019).
- [4] 河上 裕 編集, 実験医学 Vol.34, No.12
 がん免疫療法腫瘍免疫学の最新知見から
 治療法のアップデートまで 株式会社
 羊土社. 2016.

7. 業績

- [論文発表]
1. 妊娠 PBMC ヒト化マウスの体液性免疫応

答の構築 亀谷美恵、大野祐介、大島志乃、關敏郎、伊藤亮治 アレルギーの臨床 2020 40(14) 80-81

2.Preparation and characterization of monoclonal antibodies recognizing two CD4 isotypes of Microminipigs Shino Ohshima, Tatsuya Matsubara, Asuka Miyamoto, Atsuko Shigenari, Noriaki Imaeda, Masaki Takasu, Masafumi Tanaka, Takashi Shiina, Shingo Suzuki, Noriaki Hirayama, Hitoshi Kitagawa, Jerzy K. Kulski, Asako Ando, Yoshie Kametani PLOS ONE 2020 in press (IF 2.74)

3. 妊娠免疫機構を利用したヒト化マウス体液性免疫評価システムの確立 亀谷美恵、大野祐介、大島志乃、關敏郎、伊藤亮治 アレルギーの臨床 2020 40(10) 45-46

4. Immunological Evaluation of Co-assembling a Lipidated Peptide Antigen and Lipophilic Adjuvants as Self-adjuvanting Anti-breast Cancer Vaccine Candidates. Taku Aiga; Yoshiyuki Manabe; Keita Ito; Tsung-Che Chang; Kazuya Kabayama; Shino Ohshima; Yoshie Kametani; Hiroto Furukawa; Hiroshi Inaba; Kazunori Matsuura; Koichi Fukase. *Angewandte Chemie International Edition* 2020 in press (IF 11.690)

[学会等発表]

ヒト化マウスを用いた in vivo 特異抗体産生に対するグルコシルチコイドの抑制作用の解析 亀谷美恵、大野祐介、大島志乃、安田敦、大木廉太郎、清水智香、伊藤亮治、津田万里、關敏郎

日本内分泌学会雑誌 96(1): 341-341, 2020.

8. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただきました平山令明先生に心より感謝いたします。

匂い分析を用いた新規がん診断法の開発

Development of novel diagnostic methods for cancer using odor analysis

平林 健一^{1,2)}、関根 嘉香^{2,3)}、戸高 惣史⁴⁾

¹⁾ 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学、²⁾ 東海大学先進生命科学研究科

³⁾ 東海大学理学部化学科、⁴⁾ AIREX 株式会社

Kenichi Hirabayash^{1,2)}, Yoshika Sekine^{2,3)} and Michihito Todaka⁴⁾

¹⁾ Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University

²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

³⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, ⁴⁾ AIREX Inc.

[要旨]

がんの早期発見は患者の生命予後を延ばす上で重要であるが、膵がんなどの難治がんでは早期診断が困難なために進行がんで発見され、治療が困難な場合がある。一方、がん患者から放散する生体ガスには特有の匂いがあることが報告されている。そこで本研究では、ヒト皮膚表面から放散される微量生体ガス（皮膚ガス）に着目し、皮膚ガス中の匂い物質をガスクロマトグラフー質量分析計（GC-MS）により解明することで、がんの早期発見が可能であるかを検討する。今年度は、がん患者から採取した皮膚ガス検体を前年度に開発した溶媒脱離 GC-MS 法により分析したので報告する。

[Abstract]

Early diagnosis for carcinoma is important for extension of prognosis. However, in the incurable carcinoma cases such as pancreatic cancer, almost all patients are discovered in advanced stage because of difficulty of early diagnosis. This study aimed to examine the possibility of early diagnosis for carcinoma on non-invasive basis by investigating trace gases emanating from human skin surface, so-called human skin gas, by passive flux sampler coupled with gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methodology. In this paper, dermal emission fluxes of 76 human skin gases collected from cancer patients were determined by the solvent extraction- GC-MS method and compared with those collected from healthy volunteers.

[Key Words]

Scent substance, Carcinoma, GC-MS, Early diagnosis, Human skin gas, Body odor

1. はじめに

がん患者の検体（尿、呼気、皮膚ガス等）には特有の匂いがあることが報告されている¹⁻³⁾。また、このがん患者の検体に含まれる特有の匂いを対象とした、がん患者を見分ける犬や線虫など生物を用いた診断が報告されている。がん患者を見分ける犬や線虫は、我々ヒトが感じることのできない匂い物質を検知しているものと考えられるが、その匂い物質に関して詳細な検討は十分行われていない。そこで本研究では、がん患者の皮膚ガス検体に含まれる特異的な匂い物質を質量分析器等で分析し、匂い解析を利用したがんの非侵襲

的早期診断方法の開発を目指すことを目的とした。

本報では、東海大学医学部附属病院においてがん患者の皮膚ガス検体を採取し、前年度に開発した溶媒脱離ガスクロマトグラフー質量分析法により76物質の皮膚放散フラックスを定量したので報告する。

2. 結果の概要

本研究では、東海大学医学部附属病院において同意が得られたがん患者から皮膚ガス検体を捕集し、東海大学湘南校舎において匂い物質の化学分析を行った。捕集した検体は施設間の移動を伴うため、匂い物質の

捕集法には、迅速性、簡便性、安定性が求められる。そこで皮膚ガスの捕集には東海大学湘南校舎で開発されたパッシブ・フラックス・サンプラー (PFS) 法⁴⁾を用いた。PFS は分子拡散の原理を利用してガスを捕集する小形デバイスであり、容器状の本体部、捕集材および止め具で構成されている。PFS の開口部側を前腕部にのせて固定する。この時生じるヘッドスペース内を皮膚ガスが分子拡散して捕集材に捕捉される。今回、皮膚ガスの捕集部位は、左右いずれかの前腕部とし (図1)、捕集時間は患者の状態を見ながら1~2時間を目安とした (検体毎に正確な捕集時間を記録)。



図1 PFSによる左前腕部における皮膚ガス捕集

表1 溶媒脱離法におけるGC-MS分析条件

分析機器	GC ; アジレント・テクノロジー社製 7890B MS ; 日本電子社製 Q1050GCMk II
カラム	DB-IMS 0.25 mm I.D. ×30 m df=0.25 μm
カラム温度	50°C(hold 8 min)→120°C(6°C/min) →280°C(20°C/min)→280°C(hold 2 min)
キャリアー	ヘリウム (1.0 mL/min)
検出器	イオン化電流 50 μA, イオン化エネルギー 70 eV, イオン源温度 280°C
注入口	温度 : 280°C
	注入法 : スプリット 35 : 1

皮膚ガス成分の分析にはガスクロマトグラフ-質量分析装置 (GC 装置 ; アジレント・テクノロジー社製 6890N, MS 装置 ; 日本電子社製 Q1000GCMk II) を用いた。2018 年 6 月までは、加熱脱離法を用いて捕集した皮膚ガス成分を GC-MS 装置に導入し、51 成分について定量分析を行い、皮膚ガスパターンによるがんの判別アルゴリズムを開発した⁵⁾。しかしながら、2018 年 7 月以降はヘリウムガスの世界的供給不足により、

溶媒脱離法への切替および分析条件の変更を強いられ、また最新の皮膚ガス研究の動向を考慮して分析対象物質を見直し、溶媒脱離に基づく新たな分析条件を確立した。捕集材からの皮膚ガス成分の脱離には、抽出溶媒としてジクロロメタン 0.5 mL を用い、内部標準物質としてトルエン-d8 を添加して試料を調製し、GC-MS 装置に導入した。GC-MS の分析条件を表1に示す。

今回分析対象としたのは34検体であり、その内訳は、大腸がん1検体、胃がん3検体、膵がん19検体、胆管がん2検体、舌がん・口唇がん3検体、S状結腸がん2検体、食道がん1検体、血液疾患2検体、その他1検体であった。疾病別の症例数が少ないため、現時点では「患者群」として解析した。また比較として健常ボランティア 16 名についても同様に測定した。表2に、患者および健常者の前腕部において観測された皮膚ガス 76 成分の放散フラックスを示す。放散フラックスは、単位時間・単位面積あたりに放散される皮膚ガスの量を表す。皮膚ガスの放散フラックスは、個人差が大きいため、患者群および健常群における第1四分位数 (25 パーセンタイル)、中央値 (50 パーセンタイル) および第3四分位数 (75 パーセンタイル) を示した。

患者群の中央値において最も高い値を示したのは酢酸であった。皮膚ガスの放散経路には、表面反応由来、汗腺由来および血液由来が知られているが、酢酸は汗腺由来の皮膚ガスであり、発汗のバイオマーカー⁶⁾として有用な皮膚ガスである。中央値を単純に比較すると、健常者群の 1/5 程度であり、相対的に発汗量が少ないことがわかる。次いで高い値を示したのはエタノールであった。エタノールは、炭水化物 (糖質) の代謝物であり、また飲酒や消毒用アルコールの使用に伴い、その放散フラックスは著しく増加する。今回患者群において、数千 ng cm⁻² h⁻¹ レベルの値が複数観測され、これらは消毒用アルコールの影響と推定され、入院環境を反映したものと考えられる。次に高い値を示したのはノナナールや酪酸などであり、健常者に比べて高い傾向を示した。

一方、患者群と健常者群の中央値を単純比較すると、既報⁵⁾同様に、全般的に患者群の方が低い値を示す成分が多く見られた。しかしながら、キシレン、トルエン、*p*-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノールなど通常生体内では産生されない化学物質の放散フラックスは、患者群の方が顕著に高かった。これは、経口・吸入曝露により体内に侵入した化学物質が血中に移行

し、体内を循環する過程で血液から直接揮発して放散された外因性化学物質と考えられ、化学物質に対する曝露履歴の指標として利用できる可能性がある。健康者の場合、トルエンの吸入直後から皮膚放散量が増加し、2時間程度で吸入前の水準に減衰する⁷⁾。がん患者の場合、病室室内空気中の化学物質の吸入暴露に起因すると考えられ、これら化学物質の代謝能力が低下しているため、皮膚からの放散したものと考えられる。このように患者群と健康者では、皮膚ガスの放散フラックスには相違があり、皮膚ガスパターンの違いを統計的に解析し、新たな判別アルゴリズムを開発する。

3. 展望

2020年度は新型コロナウイルス感染症の影響により、検体の収集が困難であったが、2021年度は引き続き検体収集および皮膚ガス測定を行い、皮膚ガスパターンに基づく、より精度の高いがんの判別方法を開発する。また、がん患者に特有のバイオマーカーの探索し、がんの早期発見に寄与したい。

4. 引用文献

- [1] Barash O., *et al.*, *Small*, **5**, 2618-2624(2009)
- [2] D'Amico A., *et al.*, *Skin Res. Technol.*, **14**, 226-236 (2008)
- [3] Gendron K.B., *et al.*, *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **137**, 269-273 (2007)
- [4] Sekine Y., *et al.*, *J. Chromatogr. B*, **1092**, 394-401(2018)
- [5] 特願 2020-47021, がんの評価方法, 発明者: 平林健一, 関根嘉香, 川口義明 (2020)
- [6] 関根嘉香ほか, *Fragrance J.*, **2018**(9), 19-25(2018)
- [7] Sekine, Y. *et al.*, *J. Skin and Stem Cell*, **6**(1), e93392(2019)

5. 業績

【論文発表】

- 1) Sekine, Y., Uchiyama, S., Todaka, M., Sakai, Y., Sakiyama, R., Ochi, H., Abe, F., Asai, S., Umezawa, K., Probiotic effect of lactulose on ammonia emanating from human skin surface, *Journal of Japan Association on Odor Environment*, **51**(6), 338-3452 (2020)
- 2) 関根嘉香, 食品摂取による皮膚ガスの変化および体臭抑制の可能性, *食品と開発*, 748 82-85(2020)
- 3) Morimachi M, Hirabayashi K, Takanashi Y,

Kawanishi A, Saika T, Ueyama Y, *et al.* Low expression of DDX5 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2020. In press

- 4) Saika T, Hirabayashi K, Itoh H, Miyajima Y, Serizawa A, Kato N, *et al.* Cancer-associated fibroblasts are a useful cytological finding for diagnosing pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cytopathology*. **31**(4):310-4 (2020).

【招待講演】

- 1) Sekine, Y., Human skin gas and indoor environment, The 16th Conference of the International Society of Indoor Air Quality & Climate (Indoor Air 2020), Seoul, Korea (2020)
- 2) 関根嘉香, 皮膚ガスを生体情報として活用する, サイレントボイスセンシング国際シンポジウム, 金沢 (2020)
- 3) 関根嘉香, いつでもどこでも体のにおいて健康診断, オープンイノベーションセミナー, オンライン (2020)

6. 謝辞

研究分担者である東海大学医学部内科学系血液腫瘍内科学・安藤潔教授、小川吉明教授、川田浩志教授、鬼塚真仁准教授、大間知謙講師、町田真一郎講師、豊崎誠子助教、鈴木利貴央講師、扇屋大輔助教、青山泰之助教、原隆二郎助教、東海大学医学部基盤診療学系病理診断学・中村直哉教授、東海大学医学部内科学系消化器内科学・松嶋成志教授、鈴木孝良教授、川瀧洋平助教、中原史雄助教、川西彩助教、森町将司大学院生、東海大学医学部外科学系口腔外科学・加藤久視講師、東海大学健康学部・石井直明特任教授、東海大学工学部生命化学科・笹川昇教授、東海大学健康学部健康マネジメント学科・安田佳代講師、研究協力者である東海大学医学部基盤診療学系病理診断学・高梨由美実験助手、かわぐち消化器内科・川口義明院長に感謝いたします。

表 2

Table 2 Analytical results on the dermal emission flux of skin gases collected at the forearm of patients and healthy volunteers using passive flux sampler-solvent extraction-GC/MS methodology.

		Dermal emission flux (ng cm ⁻² h ⁻¹)						
		Patinet (n=34)			Healthy volunteer (n=16)			
#	Human skin gas	1st Quartile	Median	3rd Quartile	1st Quartile	Median	3rd Quartile	Patient/Healthy*
1	Ethanol	0.00	15	2767	9.3	12	14	1.2
2	Propanol	1.3	3.0	4.1	3.8	6.0	7.9	0.5
3	Butanol	0.11	0.92	2.94	1.2	1.7	5.6	0.5
4	Pentanol	1.6	3.1	5.0	1.9	2.9	6.3	1.1
5	Hexanol	0.27	0.65	2.4	1.7	2.6	3.6	0.2
6	Heptanol	0.30	1.6	4.6	1.4	2.3	3.1	0.7
7	Octanol	0.55	2.0	6.0	1.7	3.2	5.8	0.6
8	Nonanol	0.31	0.60	1.4	2.8	4.3	6.1	0.1
9	Decanol	0.00	0.09	0.81	2.3	3.4	4.9	0.0
10	2-ethyl-1-hexanol	2.5	6.8	29	0.016	0.021	0.049	327
11	Acetaldehyde	0.00	0.00	3.7	0.91	1.0	1.2	0.0
12	Propanal	0.00	1.0	5.8	3.2	6.6	7.5	0.2
13	Butanal	0.81	2.3	6.4	1.0	1.8	3.3	1.3
14	Valeraldehyde	0.00	1.4	5.2	0.44	0.7	4.8	2.0
15	Isovaleraldehyde	1.93	3.5	5.7	1.2	1.6	3.1	2.2
16	Hexanal	0.74	1.2	5.5	0.61	1.3	2.3	0.9
17	Heptanal	1.44	2.5	5.6	0.59	2.1	3.7	1.2
18	Octanal	0.00	0.83	3.5	0.52	2.0	3.2	0.4
19	Nonanal	1.4	9.5	15	0.94	2.3	4.7	4.0
20	Decanal	2.2	4.9	11	0.69	1.4	3.4	3.6
21	trans -2-Hexenal	0.00	0.00	0.79	0.56	1.4	2.8	0.0
22	trans -2-Nonenal	3.1	6.9	18	0.25	0.49	3.1	14
23	Acetic acid	71	147	195	500	646	805	0.2
24	Propiopic acid	0.57	3.5	13	0.75	1.0	2.0	3.4
25	Butanoic acid	2.10	7.0	9.8	0.45	0.88	2.9	8.0
26	Isovaleric acid	0.16	0.42	1.2	0.28	0.39	0.75	1.1
27	Valeric acid	0.68	1.6	2.8	0.75	1.0	2.3	1.7
28	Hexanoic acid	0.00	2.0	3.0	0.24	0.5	1.6	3.6
29	Heptanoic acid	0.78	1.9	2.7	0.46	1.1	2.8	1.7
30	Octanoic acid	0.46	0.99	4.4	0.40	0.86	1.3	1.1
31	Nonanoic acid	1.24	3.7	7.4	0.94	1.6	5.6	2.3
32	Decanoic acid	1.0	2.1	3.4	0.72	1.0	2.1	2.0
33	Acetone	0.0	3.2	9.1	0.95	1.5	2.1	2.2
34	2-Butanone	2.5	4.3	9.3	0.70	1.1	2.0	4.0
35	2-Pentanone	0.0	1.2	3.6	0.66	0.9	2.0	1.4
36	2-Hexanone	0.0	0.0	2.2	0.64	1.3	2.5	0.0
37	2-Heptanone	0.23	0.65	1.5	0.46	0.9	1.7	0.7
38	2-Octanone	0.42	2.2	4.8	0.34	0.6	1.4	3.8
39	2-Nonanone	1.4	3.6	6.8	0.74	1.0	3.5	3.7
40	2-Decanone	0.61	1.1	2.8	1.1	1.9	3.7	0.6
41	2-Undecanone	1.0	3.3	6.0	1.0	2.2	3.7	1.5
42	2-Dodecanone	0.96	1.7	3.8	1.1	1.7	2.4	1.0
43	2-Tridecanone	0.36	0.90	1.9	0.75	1.6	2.2	0.6
44	2-Tetradecanone	0.17	0.65	1.5	0.65	1.6	3.2	0.4
45	2-Pentadecanone	0.23	0.82	1.3	1.0	2.1	5.1	0.4
46	Diacetyl	1.1	3.3	10.2	0.68	1.8	4.0	1.8
47	Acetoin	0.0	1.8	7.6	2.8	5.8	8.4	0.3
48	6-Methyl-5-hepten-2-one	0.22	1.0	3.2	1.4	2.9	6.1	0.4
49	Ethyl acetate	0.0	0.56	2.2	1.2	1.9	4.3	0.3
50	cis -3-Hexenyl acetate	0.0	0.62	1.2	1.9	3.4	5.7	0.2
51	Butylated hydroxytoluene	0.073	0.25	1.7	0.91	1.6	2.6	0.2
52	Benzaldehyde	0.00	0.94	4.0	1.2	2.7	4.8	0.3
53	Phenol	0.15	0.35	1.2	0.009	0.025	0.11	14.1
54	Toluene	0.0	1.4	5.5	0.009	0.041	0.067	34.6
55	Ethylbenzene	0.00	0.20	3.4	0.010	0.021	0.056	9.2
56	m,p-Xylene	1.12	3.9	15	0.003	0.01	0.032	325
57	o-Xylene	0.0	1.8	6.8	0.010	0.015	0.035	125
58	Styrene	0.0	0.21	1.5	0.011	0.016	0.028	13
59	p-Dichlorobenzene	0.16	1.18	3.8	0.009	0.013	0.018	89
60	Geosmin	0.004	0.037	1.8	0.037	0.070	0.59	0.5
61	Indole	0.03	0.17	0.57	0.10	0.22	0.48	0.8
62	Skatole	0.09	0.14	0.29	0.03	0.12	0.21	1.2
63	α-Pinene	0.58	1.4	3.7	1.6	2.9	3.9	0.5
64	β-Pinene	0.046	0.36	1.1	1.5	2.7	4.5	0.1
65	Limonene	0.0	0.28	1.0	1.3	2.8	3.8	0.1
66	Methyl mercaptan	0.0	0.0	1.6	0.57	1.6	1.9	0.0
67	Ethyl mercaptan	0.036	0.45	1.5	0.31	0.53	0.84	0.8
68	Allyl methyl sulfide	0.0	0.04	0.12	0.3	0.5	1.2	0.1
69	Diallyl disulfide	0.01	0.45	1.3	0.16	0.31	0.66	1.5
70	γ-Hexanolactone	0.0	0.41	1.9	0.57	3.5	6.0	0.1
71	γ-Heptanolactone	0.12	1.4	6.8	1.1	4.0	6.5	0.3
72	γ-Octanolactone	0.00	0.34	0.97	0.89	2.6	4.5	0.1
73	γ-Nonanolactone	0.00	0.45	1.3	0.63	2.1	5.5	0.2
74	γ-Decanolactone	0.06	0.65	1.23	0.48	1.4	4.9	0.5
75	γ-Undecanolactone	0.02	1.1	2.4	0.41	1.2	2.5	0.9
76	Vanillin	0.06	0.27	0.92	0.89	2.6	4.8	0.1

* Simple ratio of median values for each dermalemission flux

椎間板変性における IL-17 の役割の解析と新規 IL-17 阻害剤の探索 ーIL-17 関連疾患における IL-17 阻害療法への応用へ向けてー

Effects of IL-17A on intervertebral disc degeneration and the investigation of the new small-molecule IL-17A inhibitor for treating the IL-17-related disease

酒井 大輔^{1,3)}, 隅山 香織^{2,3)}, 平山 令明³⁾

1) 東海大学医学部外科学系整形外科, 2) 東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学, 3) 東海大学先進生命科学研究所

Daisuke Sakai^{1,3)}, Kaori Suyama^{2,3)}, and Noriaki Hirayama³⁾

1) Division of Orthopaedic Surgery, School of Medicine Tokai University, 2) Division of Cellular Biology and Anatomy, School of Medicine Tokai University, 3) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

インターロイキン 17 (IL-17) family の一つである IL-17A は下流シグナル因子を活性化し、多様な炎症反応に関与する。これまで我々は IL-17A が椎間板変性に関連する因子の発現を促進している事を報告してきた。今回、*in silico* 解析にて IL-17A 受容体と IL-17A の結合を阻害する低分子化合物を探索し、その化合物が椎間板髄核細胞椎間板髄核細胞における椎間板変性促進因子の発現を抑制し、IL-17A 活性阻害剤と成り得る可能性を認めた。

[Abstract]

IL-17A, a member of the interleukin-17 (IL-17) family, which activates many intracellular signaling factors and mediates the induction of some inflammatory cytokines and chemokines. We have previously reported that IL-17A promotes the expression of the factors which lead degeneration of intervertebral discs. In this study, we identified the small-molecule inhibitors that accessed the IL-17A-binding site region of IL-17A receptor by using *in silico* analysis and evaluated one of these compounds (Z92151850) effect. This compound suppressed the expression of disc degeneration-promoting factors in nucleus pulposus cells. These results showed that this small-molecule compound may have the potentiality to be the inhibitor of IL-17A.

[Key Words]

intervertebral disc, Interleukin 17, small-molecule inhibitor

1. はじめに

腰痛は患者の Quality of life (QOL) を下げるのみならず社会生産性を低下させ医療費増加にも深く関与する。厚生労働省による業務上疾病発生状況等調査(休業 4 日以上)では腰痛の件数が最も高く、本邦における腰痛の生涯有病率は約 83%とされ[1]、腰痛の実用的な治療・予防法の開発は、今後さらに進む高齢化社会においても最重要課題のひとつである。

腰痛の主な原因として脊椎椎体の間に存在する椎間板の障害がある。椎間板は中心部の髄核 (NP) とこれを取り巻く線維輪から成る無血管器官であり、衝撃を吸収し脊椎可動性を保持する重要な役割を担う。加齢や物理的外力等の様々な外部からのストレスにより傷害された椎間板においては IL-18、IL-6、TNFα に代表

される多様なサイトカインの上昇や、細胞数・細胞外基質の減少から組織の変性に至り、腰痛・背部痛のみならず、椎間板の神経の圧迫による下肢痛、下肢しびれ等の様々な脊椎疾患の原因となる[2]。

これらに加えて、近年、インターロイキン 17(IL-17)も椎間板傷害・変性において増加するサイトカインとして新たに注目されるようになった[3]。IL-17 family は A~F の 6 つから成り、特に IL-17A は受容体 (IL-17RA) に結合後、下流シグナル因子となる NF-κB や MAPK 経路等を活性化して多様な炎症反応に関与する[4]。

これらの知見から我々は、実際にヒト変性椎間板髄核組織においては IL-17A 発現が正常な椎間板と比較して有意に上昇し、培養椎間板髄核細胞 (NP 細胞)

においては IL-17A が炎症性サイトカインや疼痛誘導因子、細胞外基質変性の促進因子の発現を有意に上昇させることを確認し、報告してきた⁵⁾。さらに我々はインシリコ (*in silico*) 創薬法を用いて、IL-17RA の IL-17A 結合領域に結合可能な立体構造を有し、これらの結合を阻害する作用が予測される低分子化合物、即ち IL-17A 阻害剤候補化合物を市販化合物データベースの中から選出した。候補化合物群の中で結合親和力予測値が上位 20 位以内に位置する化合物の作用を評価した結果、IL-17A による椎間板変性促進因子の一部の発現を有意に抑制する 4 つの化合物群 (STK630921, Z92151850, PB203263256, P2000N-53454) を見出した。前年度まで我々は、これらの 4 つの化合物群の中から STK630921 (STK) を *in vitro* で評価し、STK は椎間板変性を促進する因子の一部の発現を抑制する効果を有することを報告してきた^[5]。

以上の経過に基づき、今年度は IL-17A の NP 細胞に対する作用のさらなる解析、及び IL-17A 阻害剤化合物の一つである Z92151850 (Z9215) の NP 細胞に対する作用の評価を中心に研究を実施した。

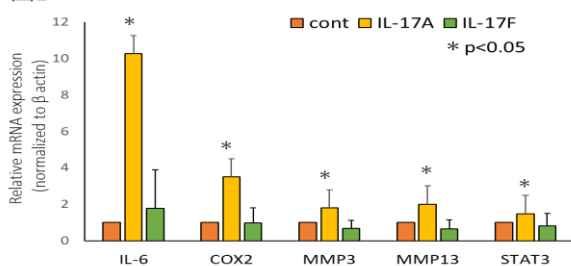
2. 結果の概要

1) 受容体に対する IL-17A 選択的結合性の確認

IL-17 受容体において IL-17A が結合する IL-17RA は IL-17RC と二量体を形成し (図 1)、IL-17RC には IL-17 family である IL-17F が結合する^[6]。IL-17A の受容体に対する選択的結合性を確認するため、ラット NP 細胞に IL-17A あるいは IL-17F を 50ng/ml 投与し、生体内における椎間板の環境と近似した 1% の低酸素条件下で培養し、リアルタイム PCR 法にて評価した。その結果、これまで IL-17A の刺激によって発現が有意に増加することを報告してきた IL-6、COX-2、MMPs、STAT3 の mRNA は、IL-17F の投与下では有意な変化を認めなかった



図2



(n=3, p<0.05) (図 2)。

2) ヒト髄核細胞に対する化合物 Z2151850 の作用

ヒト髄核細胞 NP-26 (CDD-H2710-NP; Articular Engineering) に IL-17A 阻害剤候補化合物 Z92151850 (Z9215) を 50 μ g/ml、IL-17A を 50ng/ml 投与し、生体内における椎間板の環境と近似した 1% の低酸素条件下で培養し、リアルタイム PCR 法で椎間板変性や細胞保護に関与が報告されている因子の発現を評価した。

主に椎間板変性の促進や炎症への関与が報告されている因子である IL-6、TNF α 、IL-1 β 、COX2、MMP3、MMP13、VEGF-A の内、TNF α 、IL-1 β は IL-17A 50ng/ml 投与 24 時間後の時点では有意な発現増加が認められなかったが、IL-6、COX2、MMP3、MMP13、VEGF-A は有意な発現増加を認めた。これらの中では MMP-13 と VEGF-A が Z9215 の投与により発現の有意な低下を示した (n=3, p<0.05) (図 3)。

一方、細胞外からのストレスや炎症から細胞を保護する因子とされている Bcl2 や Nrf2、Keap1 は IL-17A 50ng/ml 投与 24 時間後の時点では有意な増加を認めず、Z9215 の投与によっても有意な変化を呈さなかった (n=3, p<0.05) (図 4)

図3

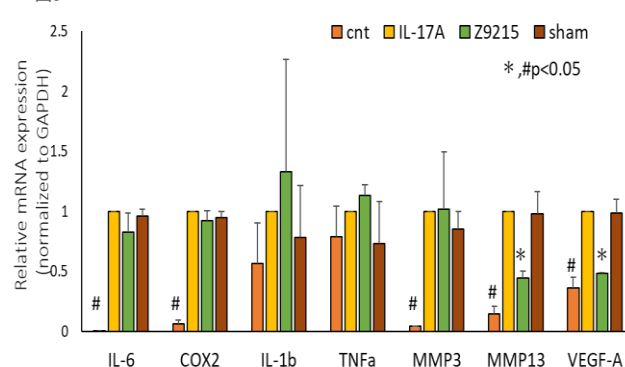
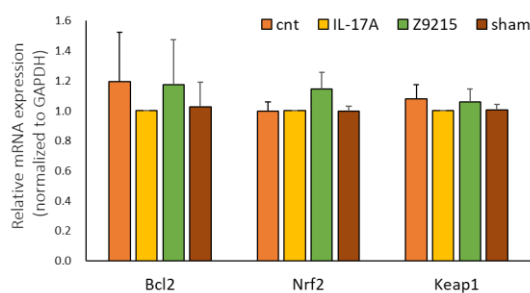


図4



3.

展望

今回、IL-17A 刺激により発現が増加する因子が、IL-17F では有意な変化を示さなかったことから、IL-17 受容体構造の中における IL-17A とその結合部は、椎間板変性治療の標的として妥当であることが確認された。

IL-17A により発現が惹起され、IL-17A 阻害剤候補化合物 Z9215 により発現の低下が認められた MMP13 と VEGF-A は椎間板変性の促進因子として報告されており[7,8]、化合物 Z9215 は IL-17A 阻害作用を有する可能性が示された。

Bcl2 は細胞死に対し抑制的に作用する因子として広く知られており、Keap1-Nrf2 経路は抗酸化作用や抗炎症作用を有する因子であるとともに、椎間板変性に対し抑制的に作用することが報告されている[9]。本実験の条件下ではこれらは有意な発現変化を呈さず、IL-17A の投与条件が影響している可能性、あるいは IL-17A の直接関与の要素が低い可能性が考えられた。

一方、これまでのラット NP 細胞を用いた評価と本研究を比較すると、同じ IL-17A 及び化合物の投与条件下にあってもサンプルごとに測定される数値のばらつき差も拡大する傾向が見られた。ヒトの初代培養 NP 細胞のサイトカインや化合物に対する感受性の格差が大きい可能性が考えられ、IL-17A 阻害剤候補化合物の評価には、より多くのサンプルを用いて多様な実験条件・実験系での多角的な解析が必要である事が示唆された。

4. 引用文献

- [1] 松平他, 日本職業・災害医学会会誌. 63, 329-336, (2015)
- [2] Risbud *et al.*, *Nat Rev Rheumatol.*, **10**, 44-56, (2014)
- [3] Shamji *et al.*, *Arthritis Rheum.* **62**, 1974-1982, (2010)
- [4] Gu *et al.*, *Cytokine*, **64**, 477-485, (2013)
- [5] Suyama *et al.*, *J Cell Mol Med.* **22**, 5539-5551, (2018)
- [6] Iwakura *et al.*, *Immunity* **34**, 149-162, (2011)
- [7] Patel *et al.*, *Spine.* **32**, 2596 - 2603. (2007)
- [8] Haro *et al.*, *J Orthop Res.* **20**, 409-415 (2002)
- [9] Wang *et al.*, *Drug Des Devel Ther.* **14**, 4801-4813, (2020)

抗ウイルス薬モロキシジンの立体構造および SARS-CoV-2 PL^{pro} との相互作用に関する研究

Molecular Structure of Antiviral Moroxydine and its Possible Interaction with SARS-CoV-2 PL^{pro}

田中 るみ子¹⁾、平山 令明²⁾

¹⁾ 東海大学医学部・基礎医学系、²⁾ 東海大学先進生命科学研究所・医薬総合研究部門

Rumiko Tanaka¹⁾ and Noriaki Hirayama²⁾

¹⁾ Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine

²⁾ Division of Pharmaceutical Sciences, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

モロキシジン (MOR: N-(aminoiminomethyl)-4-morpholinecarboximidamide) はインフルエンザ、麻疹および流行性耳下腺炎のような RNA ウイルスによる感染症に効果のある抗ウイルス剤である。MOR が SARS-CoV-2 抑制のためのリパーパス薬として使えるかどうかを *in silico* で検証する目的で、MOR と SARS-CoV-2 のパパイン様プロテアーゼのドッキング計算を行った。シミュレーションには、本研究で決定した MOR の結晶構造と Protein Data Bank から得た SARS-CoV-2 のパパイン様プロテアーゼの結晶構造を用いた。SARS-CoV-2 のパパイン様プロテアーゼに対する MOR の結合親和性が十分に高いことから、計算結果は MOR が抗 SARS-CoV-2 薬として使用できる可能性を示唆した。

[Abstract]

Moroxydine (MOR: N-(aminoiminomethyl)-4-morpholinecarboximidamide) is an antiviral drug which was shown to be active against RNA viruses such as influenza, measles and mumps. The *in silico* docking studies between moroxydine and SARS-CoV-2 papain-like protease have been undertaken in order to explore the possibility of repurposing moroxydine for inhibition of SARS-CoV-2. The crystal structure of MOR determined in this study and that of SARS-CoV-2 papain-like protease from the Protein Data Bank were used in the simulations. The high estimated docking score has indicated that MOR could be repurposed for SARS-CoV-2 treatment.

[Key Words]

antiviral drug, COVID-19, SARS-CoV-2 papain-like protease, moroxydine, docking simulations

1. はじめに

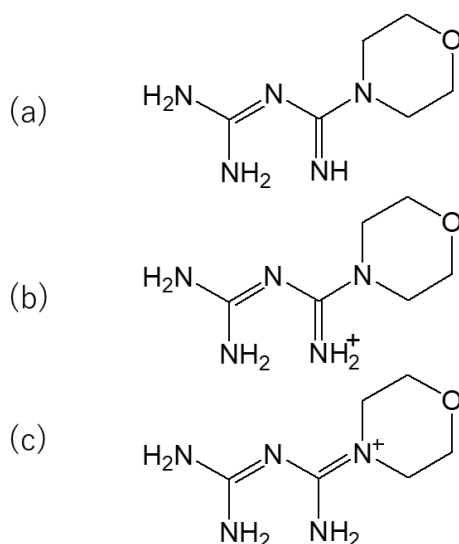
moroxydine (MOR) (Fig.1(a)) は 1950 年代に発見された古い抗ウイルス薬であり、多様な DNA および RNA ウイルスを標的のと考えられている。麻疹、単純ヘルペス、水痘・帯状疱疹および C 型肝炎ウイルスに対して抗ウイルス活性を有し、A 型がインフルエンザ・ウイルスに対しても抗ウイルス活性を有することが知られている[1]。催奇性を疑う報告もある[2]が、moroxydine は概ね安全な医薬分子とされ、畜水産用にも使用されている[3]。

ヒトでの安全性と体内動態が実績によって既に確認されている既存薬から、新たな薬効を見つけ出し、実用化につなげていこうという研究手法をドラッグ・リポジショニングという。新規医薬分子の開発には少なくとも 5 年以上の時間が必要であるが、ドラッグ・リポジショニングの手法を使えば、研究開発期間を大きく短縮できる。SARS-CoV-2 の爆発的な感染拡大により、ドラッグ・リポジショニングによる有効な抗ウイルス分子の発見が期待されている。

SARS-CoV-2 の増殖には複数のタンパク質が関与し

ており、各々が抗ウイルス薬の標的分子になり得る。その 1 つにパピイン様プロテアーゼ(PL^{pro})がある。この標的分子の阻害剤は、宿主の自然免疫防御システムのウイルスによる破壊を抑制し、さらにウイルス複製に必要な非構造タンパク質の成熟過程を直接的に阻害してウイルスの増殖そのものをも抑制することが可能と考えられている。つまり、SARS-CoV-2 PL^{pro}の阻害剤は二重の抗ウイルス機構を有することになり、有効な抗ウイルス剤になり得ると考えられる[4]。そこで、本研究では、SARS-CoV-2 PL^{pro}を標的分子とし、MOR が SARS-CoV-2 PL^{pro}の作用を抑制できるかどうかの可能性をドッキング・シミュレーションにより解析した。

Fig.1. MOR の化学構造



2. 結果の概要

2-1) moroxydine 塩酸塩の単結晶 X 線解析とその構造化学的特徴

MOR 塩酸塩は Prestwick Chemical Ltd. より購入した。無色の単結晶はメタノール/アセトニトリル溶液から得た。リガク電機製 4 軸型 X 線回折計 RAXIS-RAPID を用いて X 線反射データを収集し、直接法により構造解析を行った。解析にはソフトウェア Crystal Structure[5]を用いた。構造は直接法で解いた[6]。結晶学的データを Table 1 に、精密化した座標データデータを Table 2 に示す。

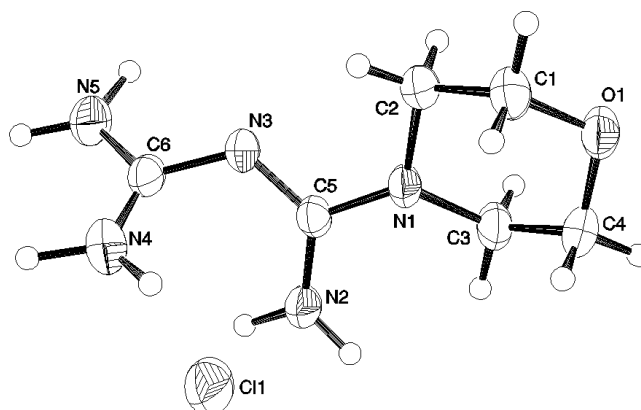
結晶中で MOR は Fig.1(b)のような互変異性体構造を取る。立体構造の ORTEP-III[7]図を Fig.2 に示す。モルフォリン環は椅子型立体配座を取るが、N1 原子周りの 3 個の C-N-C 結合角の和が 357.7°であり、N1 原

子の所で有意に平面的になっている。従って、結晶中では N1 原子は水素結合の受容体にはなっていない。ビグアニド基はモルフォリン環のエカトリアル位に結合する。ビグアニド基は有意に非平面的な立体構造をとる。N1-C5-N3-C6 および C5-N3-C6-N5 ねじれ角は各々 24.3(3)および 34.2(3)°である。

Table 1. 結晶学的データ

Formula: C ₆ H ₁₃ N ₅ O·HCl	No. of observations ($I > 2.00\sigma(I)$) = 1476
Formula weight = 207.67	$\theta_{\max} = 67.93^\circ$ with Cu K α
Crystal system: orthorhombic	$R(I > 2.00\sigma(I)) = 0.056$
Space group: <i>Pbca</i>	$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.001$
$Z = 8$	$(\Delta\rho)_{\max} = 0.48 \text{ e/\AA}^3$
$a = 9.996(1) \text{ \AA}$	$(\Delta\rho)_{\min} = -0.26 \text{ e/\AA}^3$
$b = 10.423(1) \text{ \AA}$	Measurement: Rigaku RAXIS-RAPID
$c = 19.063(3) \text{ \AA}$	Program system: CrystalStructure
$V = 1986.1(4) \text{ \AA}^3$	Structure determination: SIR92
$D_x = 1.389 \text{ g/cm}^3$	Refinement: full-matrix

Fig.2. MOR 塩酸塩の結晶構造



2-2) ドッキング・シミュレーションによる SARS-CoV-2 パピイン様プロテアーゼと moroxydine の相互作用解析

ドッキング・シミュレーションや分子間相互作用の解析には統合化学計算システム MOE[8]を用いた。SARS-CoV-2 PL^{pro}の立体構造の初期構造として、Protein Data Bank[9]で公開されている結晶構造(PDB ID: 6W9C)を採用した。結晶構造に含まれる構造上の問題点の修正や水素原子付加は MOE に搭載されている Protein Preparation 機能を用いて行った。

多くの場合、低分子はタンパク質表面の窪みまたはポケットに結合する。タンパク質分子表面には通常複数のこうした部位が存在し、どの部位を探索対象とするかがまず問題になる。著者らは、医薬分子は特定の

性質を持った窪みに結合する傾向が高く、その傾向を PLB 指数で表現することを提案している [10]。SARS-CoV-2 PL^{pro} 分子表面に存在する凹状部分の PLB 指数を計算すると、2.83 と特に指数の部位が見出された。この部位は、活性部位に存在し、触媒三角形を構成する 3 つのアミノ酸残基 (C111、His272 および Asp302) の近傍にあるので、この部位に低分子化合物が結合すると SARS-CoV-2 PL^{pro} の機能を抑制できると考えられる。そこで、この部位をドッキング・シミュレーションの対象部位とした。

上述の MOR の結晶構造に基づき、可能な互変異性体を発生し、それらをドッキング・シミュレーションに用いた。ドッキング・シミュレーションには、著者らによって開発されたソフトウェア ASEDock[11]を用いた。本研究では、タンパク質のバックボーン原子は固定し、タンパク質中の他の原子と低分子の原子はすべて自由に動かす条件で、構造の最適化を行った。溶媒効果は Born 近似で行い、ポテンシャル関数には Amber 10:EHT[12]を用いた。最適構造の評価を行う関数には GBVI/WSA_dG[13]を用いた。

3. 考察

最も GBVI/WSA_dG 値の低い (-8.57kcal/mol) ドッキング構造を Fig.3 に示す。このドッキング構造に寄与する MOR の化学構造を Fig.1(c)に示す。すなわち、ドッキング計算は、結晶構造中とは異なる互変異性体を取る時に、MOR は SARS-CoV-2 PL^{pro} と最も強く相互作用することを示す。プロトン付加位置の変化により、ビグアニド部分の構造が結晶構造と異なり、N1-C5-N3-C6 および C5-N3-C6-N5 ねじれ角は各々 -29.0 および 150.0°である。

Fig.4 に、結合部位の拡大図を示した。MOR の N5 原子は catalytic triad を構成する C111 の側鎖の S 原子と水素結合する。水素結合はしていないが、H272 側鎖の N1 原子は MOR の N5 原子に接近している (N...N 3.47 Å)。また MOR の N2 および N4 原子は N109 および G271 の主鎖 O 原子と各々水素結合する。これら複数の相互作用により MOR は SARS-CoV-2 PL^{pro} に結合し、基質となるタンパク質の接近を妨害すると期待される。GBVI/WSA_dG 値から予測される IC₅₀ 値は約 0.50 μM であるので、予測値通りであれば、MOR は SARS-CoV-2 PL^{pro} の十分強い阻害剤になる可能性がある。

一方、SARS-CoV-2 PL^{pro} と相互作用場合に MOR が

結晶構造中の互変異性体を取る場合、その GBVI/WSA_dG 値はやや高く (-7.659 kcal/mol) なり、対応する IC₅₀ は 2.34 μM と見積もられる。従って、生体内で MOR がこのような互変異性体を取る場合、その阻害活性はやや下がることが予想される。

MOR は比較的安全な医薬分子であり、その挙動が比較的详细に研究されているので、SARS-CoV-2 治療へのリポジショニングを考える上では、良好な候補化合物の 1 つと考えられる。

Fig.3. SARS-CoV-2 PL^{pro}(リボン・モデル)に結合する MOR (空間充填モデル)

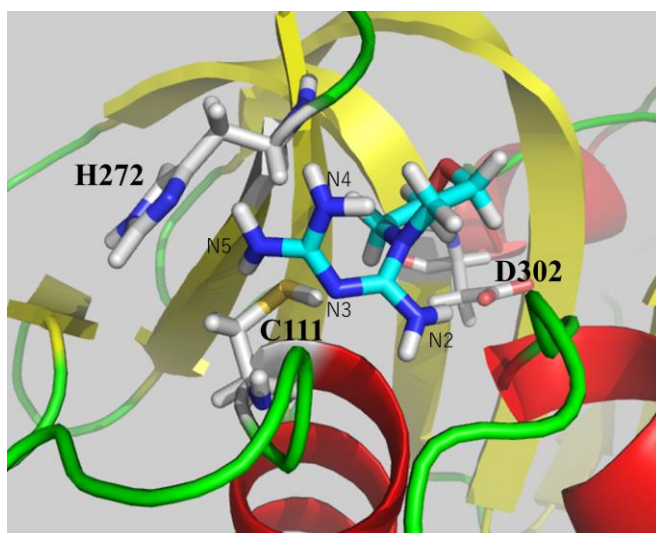


4.引用文献

- [1] X.B.Yu *et al.*, *Antivir.Res.*, **131**, 156 (2016).
- [2] E.A.Czeizel *et al.*, *Int.J.Pharmacol.*, **2**,188 (2006)
- [3] W.Liu *et al.*, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*,**39**, 398 (2016)
- [4] D.Shin, *et al.*, *Nature*, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>
- [5] CrystalStructure, version 3.5.1, 2000-2003 Crystal Structure Analysis Package, Rigaku and Rigaku/MSU.
- [6] A. Altomare *et al.*, *J. Appl.Cryst.*,**27**, 435(1994).

- [7] L. J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.*, **22**, 389 (1997).
 [8] MOE(molecular Operating Environment), 2014.09: Chemical Computing Group: Montreal, Canada (2019).
 [9] F.C.Bernstein *et al.*, *J.Mol.Biol.*, **112**, 535(1977).
 [10] S.Soga *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.*, **47**,400(2007).
 [11] J.Goto *et al.*, *J.Chem.Inf.Model*, **48**, 583(2008).
 [12] D.A.Case *et al.*, AMBER 12,University of California, San Francisco (2012).
 [13] C.R.Corbeil *et al.*, *J.Comput.-Aided Mol.Des.*, **26**, 775 (2012).

Fig. 4. MORが結合する活性部位の拡大図(MORのC原子をシアンで示し、catalytic triadを構成する3残基のC原子を白で示す)



5. その他の業績

【論文発表】

- (1) Watanabe, N.,Kidokoro, M.,Tanaka, M.,Inoue, S.,Tsuji, T.,Akatuska,H.,Okada, C.,Iida, Y.,Okada, Y.,Suzuki, Y.,Sato, T.,Yahata, T.,Hirayama, N.,Nakagawa, Y. & Inokuchi, S. 'Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial-to-mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells,' *Cancer Cell Int.*, **20**, 263 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01328-2>
 (2) Ohshima, S.,Matsubara, T.,Miyamoto, A.,Shigenari, A.,Imaeda, N.,Takasu, M.,Tanaka, M.,Shiina, T.,Suzuki, S.,Hirayama, N.,Kitagawa, H.,Kulski, J.,Ando, A. & Kametani, Y. 'Preparation and characterization of monoclonal antibodies recognizing two CD4 isotypes of

Microminipigs,' *PLOS ONE*,**15**, e0242572 (2020).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242572>

Table 2. 原子パラメーター

atom	x	y	z	B _{eq} (Å ²)
Cl(1)	0.15335(8)	0.30118(9)	0.78416(5)	4.03(2)
O(1)	0.5688(2)	0.0930(2)	0.5774(1)	3.23(5)
N(1)	0.2986(2)	0.0378(3)	0.6042(1)	2.89(6)
N(2)	0.1418(3)	-0.0494(3)	0.6801(1)	3.09(6)
N(3)	0.0762(2)	0.0737(3)	0.5835(1)	3.06(6)
N(4)	-0.0683(3)	0.1570(3)	0.6695(2)	3.77(7)
N(5)	-0.1465(3)	0.0904(3)	0.5622(2)	4.18(8)
C(1)	0.4693(3)	0.1893(3)	0.5684(2)	3.05(7)
C(2)	0.3354(3)	0.1316(3)	0.5502(2)	3.04(7)
C(3)	0.4030(3)	-0.0570(3)	0.6176(2)	3.15(7)
C(4)	0.5336(3)	0.0082(3)	0.6330(2)	3.37(8)
C(5)	0.1700(3)	0.0223(3)	0.6242(1)	2.48(6)
C(6)	-0.0459(3)	0.1057(3)	0.6077(2)	2.93(7)

$$B_{eq} = 8/3 \pi^2 (U_{11}(aa^*)^2 + U_{22}(bb^*)^2 + U_{33}(cc^*)^2 + 2U_{12}(aa^*bb^*)\cos \gamma + 2U_{13}(aa^*cc^*)\cos \beta + 2U_{23}(bb^*cc^*)\cos \alpha)$$

焙煎工程を経た熊本県南阿蘇村産キクイモの機能性を活かした食品の開発

Development of a Unique Processed Food using Roasted Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) Cultivated at Kumamoto-Minamiaso in Japan

安田伸^{1,2)*}、安田智子¹⁾、本田憲昭¹⁾、小松丸昌子³⁾、松田靖^{1,2)}

¹⁾東海大学農学部、²⁾東海大学先進生命科学研究so高機能食品開発部門、³⁾南阿蘇オーガニック株式会社

Shin Yasuda^{1,2)*}, Tomoko Yasuda¹⁾, Kensho Honda¹⁾, Masako Komatsumaru³⁾ and Yasushi Matsuda^{1,2)}

¹⁾School of Agriculture, Tokai University, ²⁾Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, and ³⁾Minami-Aso Organic Co., Ltd.

*連絡先：安田伸（東海大学先進生命科学研究so 高機能食品開発部門）

*Corresponding author: Shin Yasuda (Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

[要旨]

熊本県阿蘇郡南阿蘇村で無農薬栽培されたキクイモを利用した食品開発の一環で、2019年に収穫された塊茎を焙煎し、その乾燥粉末を熱水抽出してイヌリン含量と抗酸化活性の評価を行った。その結果、焙煎後にはキクイモの抗酸化活性と総ポリフェノール（TPC）含量はそれぞれ焙煎前の1.73倍と1.47倍の高い値を認めたものの、焙煎後のイヌリン含量が低減することはなかった。商品化のため甘味料として南阿蘇村産ステビア乾燥粉末を4%添加した焙煎キクイモ試作品では、抗酸化活性とTPCを大幅に向上できた。

[Abstract]

To develop a unique processed food using rural agricultural products, we embarked on using Jerusalem artichoke cultivated organically and harvested at Minamiaso, Aso, Kumamoto, Japan in 2019. After roasting of the tubers of Jerusalem artichoke, inulin content, antioxidant activity, and total polyphenol content (TPC) of the dried powder were determined. Results indicated that antioxidant activity and TPC of the roasted sample following a hot-water extraction were 1.73- and 1.47-times higher than those of unroasted, while the inulin content therein were comparable between before and after roasting. Antioxidant activity and TPC of a test product of roasted Jerusalem artichoke could be fortified with seasoning of 4% Stevia powder from Minamiaso for sweetness.

[Key Words]

Jerusalem artichoke, *Helianthus tuberosus*, inulin, roasting, *Stevia rebaudiana*, polyphenol, antioxidant activity

1. はじめに

キクイモ（英名：Jerusalem artichoke、学名：*Helianthus tuberosus* Linne）は北米原産のキク科の多年生草本で、草丈1-3 mにまで生育し、主にショウガ根のような形状をした塊茎を食用とする[1]。世界中に外来種として分布しており、日本には第2次世界大戦前に食用として導入され帰化植物として自生するようになった[1]。開花期によって早・中・晩生種に区分され、多くは野生化したものであるものの、現在では一部の地域で6次産業化などの特産化を図って栽培も行われている[2]。キクイモはサラダとして生食されるほか、甘味料、ア

ルコール発酵、飴原料、加熱調理、チップス、ピクルス、ピューレならびに粉末状に加工される[1,3]。

イヌリンはフルクトースが鎖状に連なった重合体フルクタンを構成し、通常は末端にグルコースが結合した多糖類の総称である[4,5]。キクイモの塊茎にはイヌリンが多く含まれており、胃腸等の消化管では消化吸収されにくい難消化性の糖質としての利用や、腸内細菌叢の改善を目的とするプレバイオティクスとしての有効利用が期待されている[3]。糖分摂取が規制されている糖尿病患者のための代替食として伝統的に用いられてきたほか、現代では糖尿病リスクの予防または軽

減を目的とした甘味性の機能性食品またはいわゆる健康食品やその素材として利用されている[1]。熊本県内では、主に菊池市近郊や阿蘇郡などでキクイモが地域性ある機能性作物として栽培ならびに食品加工され、市場にて流通している。

地域性のある機能性作物の食品への加工と製品の利用を推進するためには、加熱や調理加工中の農作物中のイヌリン等の機能性成分の安定性や効能などについて個々に調べる必要がある。これまでに我々は、熊本県阿蘇郡南阿蘇村で生産されたキクイモ[6]およびマコモタケ[7]、熊本県産のヤーコン[8,9]などの農産物に注目し、加熱加工処理条件によっては試験管レベルで抗酸化活性などの機能向上を図ることができる可能性を見出してきた。

そこで本研究では、食品開発の一環で2019年に熊本県阿蘇郡南阿蘇村で栽培ならびに収穫されたキクイモの塊茎を焙煎し、その乾燥粉末中のイヌリン含量、抗酸化活性、ポリフェノール含量の測定を行うこととした。さらに、菊芋加工食品の商品化のために、甘味料として南阿蘇村産のステビア（英名：candy leaf, sweet leaf または sugar leaf、学名：Stevia rebaudiana Bertoni）乾燥粉末を添加した焙煎キクイモの試作品についても比較評価を行うこととした。

2. 結果の概要

1) 試料の調製

材料には、熊本県阿蘇郡南阿蘇村で定植ではなく継続的に無農薬栽培され、2019年12月に収穫されたキクイモ塊茎をスライスし乾燥チップ後に100メッシュ粉碎した乾燥粉末（Figure 1A）、約6kgの同キクイモを最高温度130℃になるまで1時間加熱を行った焙煎後の乾燥粉末（Figure 1B）、これに南阿蘇村で栽培され2019年に収穫されたステビアの乾燥粉末を4%となるように調味した試作品（Figure 1C）の計3種類を用いた。これらは、南阿蘇オーガニック株式会社（熊本県阿蘇郡南阿蘇村）より提供された。



Figure 1. Jerusalem artichoke samples used in this study.

筆者らの前報に基づき[6]、それぞれの乾燥粉末0.4gを5mlのMilliQ水とともに80℃で20分間熱水抽出し、室温まで冷却後に、4,000 rpm (2,620 xg)、15℃で20分間遠心後の上清を回収した。残渣を同条件で熱水により2回再抽出し、合計3回分の抽出後の遠心上清を混合した。再度、同条件で遠心後の上清を抽出液の原液として1mlずつマイクロチューブに分注し、実験に使用するまでの間、-20℃で冷凍保存した。

2) 薄層クロマトグラフィー（TLC）によるキクイモ中のイヌリンとフルクトースの検出

TLCによるキクイモ抽出液中のイヌリンおよびフルクトースの検出は、既報に従った[10,11]。キクイモ熱水抽出液2μlをシリカゲル60F₂₅₄アルミニウムTLCプレート（メルク、105554）上にスポットし、ブタノール：イソプロパノール：水：酢酸（7:5:4:2, v/v）から成る展開溶媒で分離を行った。分離後の糖類はアニリン：ジフェニルアミン：リン酸：アセトン（1:1:5:50, v/v）（ジフェニルアミンのみ w/v）から成る還元糖検出溶液をスプレーし、さらに85℃で約10分間加熱して発色させた。次項に従って調製された酸加水分解後のキクイモサンプルは、遠心エバポレーターで乾固後に、50倍濃縮液となるよう再び溶解して使用した。

図中のlanes 1-4はそれぞれスクロース、フルクトース、グルコースの単糖とチョコレート由来イヌリンの標準を表す（Figure 2）。本条件ではチョコレート由来のイヌリン（lane 4）は高分子多糖が多いためか、TLC上で単糖側に位置する低分子性の糖類を検出することはできなかった。一方、図中のlanes 5, 7, 9の四角の点線で囲った箇所には、サイズの異なるオリゴ糖や多糖類がラダー状に同程度で検出できた。このことは、焙煎前のキクイモ中に含まれるイヌリンが（lane 5）、焙煎後も安定して存在していること（lane 7）、焙煎前と同程度のイヌリンがステビアを添加した試作品においても認められることを示している（lane 9）。これらのキクイモサンプルを酸加水分解した際には、ラダー状のスポットは消失し、構成単糖であるフルクトースに相当する位置（点線の丸）付近に新たなスポットが確認できた（lanes 6, 8 and 10）。イヌリンはフルクトースが鎖状に連なった重合体フルクタンを構成し、通常は末端にグルコースが結合した多糖類の総称である[4,5]。キクイモ、チョコレートおよびダリアなどのキク科植物、ニンニク、アスパラガス根などにはイヌリンが多く含まれているものの、重合化の程度は異なる。

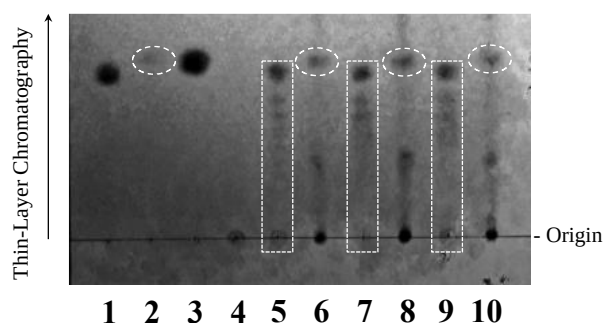


Figure 2. Thin-layer chromatogram of the hot-water extracts of Jerusalem artichoke samples used in this study. Lanes 1 to 4 correspond to 20 μ g of standards (2 μ l of 10 mg/ml); sucrose, fructose, glucose, and inulin from chicory, respectively. Other lanes are the extracts (2 μ l) from unroasted sample before (lane 5) and after acid hydrolysis (lane 6), roasted sample before (lane 7) and after acid hydrolysis (lane 8), and test product (roasted and supplemented with 4% Stevia) before (lane 9) and after acid hydrolysis (lane 10). Dotted circle indicates the position of free fructose. Ladder-like pattern appeared in the dotted rectangle indicates the presence of oligo- or polysaccharides with diverse sizes.

2) イヌリン含量の測定

抽出液中のイヌリン含量は過ヨウ素酸消費量測定法に基づき[12,13]、著者らの前報に従ってフルクトース相当量として分光学的に定量した[6]。サンプル 7.5 μ l を、485 μ l のアッセイ溶液 (10 mM の過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) 5 μ l、20 mM のクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 250 μ l と MilliQ 水 230 μ l) とともにマイクロチューブ内にて室温で混和させ、5 分間静置した。その後、100 mM のヨウ化カリウム (KI) 15 μ l を添加して混和させ、さらに 5 分間静置した。そのうち 200 μ l を 96 ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダー (SH-1000Lab、コロナ電気、茨城) を用いて 350 nm における吸光度を測定した。遊離型のフルクトース含量は上述の方法で測定を行い、総フルクトース含量については、次に述べる酸加水分解処理後のサンプルを用いた。即ち、抽出液 20 μ l と 0.339 M (1.05%) 塩酸 (HCl) 980 μ l を混合し、50 倍に希釈された条件下でヒートブロックドライバスを用いて 80°C で 45 分間加熱した。室温まで冷却した後に総フルクトース含量を測定した。本法は、還元糖と過ヨウ素酸との酸化反応によるものである[14]。フルクトースと過ヨウ素酸との反応がグルコースよりも早いことを利用し、反応後に残存する過ヨウ素酸を過剰量のヨウ化カリウムと反応させ、生じた水溶液中のヨウ素を 350 nm で測定することによって、フルクトース含量を間接的に定量できる。イヌリン含量は次式

により算出した。即ち、 $I = k(F_{\text{tot}} - F_f)$ 、 I はイヌリン含量、 F_{tot} は総フルクトース含量、 F_f はフリーフルクトース含量、 $k = 0.995$ は加水分解時の脱水を考慮した補正係数を表す[12]。

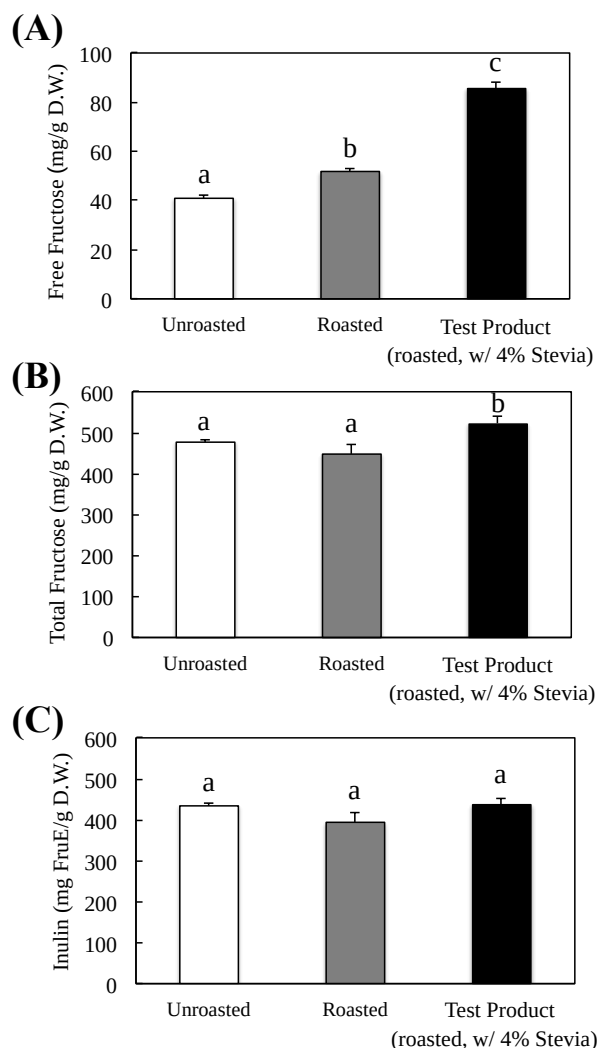


Figure 3. Amounts of free (A) and total fructose (B), and inulin (C) in Jerusalem artichoke samples used in this study. Data shown represent mean $\pm$ S.D. from three experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at $P < 0.05$, using the Tukey-Kramer test for multiple comparisons with ANOVA. FruE; fructose equivalent, D.W.; dry weight.

焙煎前のキクイモ中のフリーフルクトースと総フルクトース含量を測定した結果、乾燥重量 1 g あたりそれぞれ 40.9 mg と 477 mg が含まれていた (Figure 3)。これらの値をもとに、乾燥重量 1 g あたり 434 mg のイヌリン含量が算出された。焙煎後のキクイモ中のフリーフルクトース含量 (51.8 mg/g D.W.) は、焙煎前のものより 1.27 倍ほどの微増を示したが、総フルクトース (448 mg/g D.W.) およびイヌリン含量 (394 mg/g D.W.) とともに焙煎前後で有意な差は認められなかった。本焙

煎条件はキクイモ中のイヌリン含量に影響を及ぼさないことを意味している。一方、4%のステビアで調味した焙煎キクイモの試作品では、フリーフルクトース (85.3 mg/g D.W.) および総フルクトース含量 (524 mg/g D.W.) においてわずかに高い値が得られたものの、イヌリン含量 (436 mg/g D.W.) では有意な差は認められなかった。

本研究で得られたキクイモ中のイヌリン含量は、乾燥重量あたり 43.4%に相当し、著者らが以前報告した際の 49.8%と同程度であった[6]。これらの値は、北海道産のキクイモで認められた約 60%および[15]、タイ産のキクイモ 10 種類で認められた 63.0-74.9%よりやや低い値であった[12]。佐賀県産の白色種と紫色種の外皮を除いたキクイモ塊茎を用いたイヌリンの分析では、それぞれ 51.4%と 54.8%が得られており、そこでは紫色種でやや高い値が報告されている[16]。本研究で用いた南阿蘇村産のキクイモは白色種であった。また、キクイモ中のイヌリンの抽出には、1:16 の固液比とともに 76℃で 90 分間の熱水抽出が適しているとの報告もある[17]。本研究では 1:12.5 の固液比とともに 80℃で 20 分間の熱水抽出を 3 回繰り返しており、キクイモ粉末よりイヌリンを回収するための抽出条件としては概ね妥当であると推察された。

3) 抗酸化力の測定

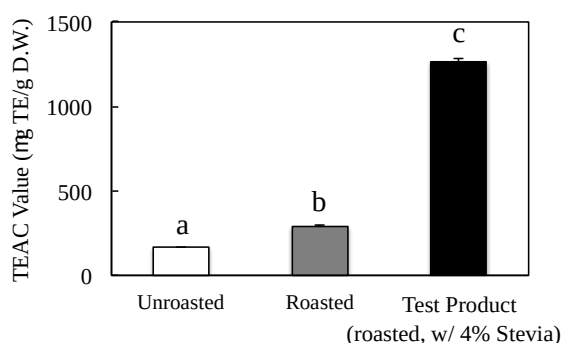


Figure 4. Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Jerusalem artichoke samples used in this study. Data shown represent mean $\pm$ S.D. from three experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at $P < 0.05$, using the Tukey-Kramer test for multiple comparisons with ANOVA. DPPH radical scavenging assay was performed to obtain TEAC values with Trolox as the standard sample. TE; Trolox equivalent, D.W.; dry weight.

既報に従って [6,18]、化成品ラジカル種の 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルに対する消去活性を測定した。このとき、Trolox を標準抗酸化

剤の陽性対照として使用し、サンプルの抗酸化力を TEAC 値 (Trolox equivalent antioxidant capacity, Trolox 相当の抗酸化力の換算値) として算出した。その結果、焙煎前のキクイモには、乾燥重量 1 g あたり 167 μg (= 0.668 μmol) の TE 値で示される抗酸化活性が得られた (Figure 4)。焙煎後のキクイモの抗酸化活性は 289 μg (= 1.16 μmol) と、焙煎前よりも 1.73 倍ほど有意に高い値が認められた。さらに、4%のステビアで調味した焙煎キクイモの試作品では、1,265 μg (= 5.05 μmol) と大幅な抗酸化活性の向上が認められた。

4) 総ポリフェノール含量の測定

抽出液中の総ポリフェノール含量はフォーリンチオカルト法に基づき、既報に従ってクロロゲン酸相当量として測定した[6,18]。その結果、焙煎前のキクイモには、乾燥重量 1 g あたり 5.33 mg の総ポリフェノールが含まれていた (Figure 5)。焙煎後のキクイモの総ポリフェノール含量は 7.82 mg と、焙煎前よりも 1.47 倍ほど有意に高い値が認められた。さらに、4%のステビアで調味した焙煎キクイモの試作品では、20.2 mg と大幅なポリフェノール含量の増加が認められた。

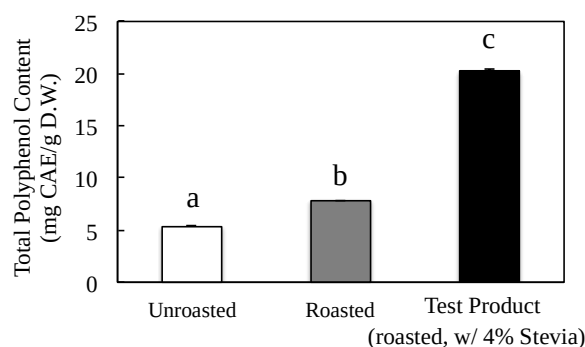


Figure 5. Amount of total polyphenol in Jerusalem artichoke samples used in this study. Data shown represent mean $\pm$ S.D. from three experiments. Values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at $P < 0.05$, using the Tukey-Kramer test for multiple comparisons with ANOVA. CAE; chlorogenic acid equivalent, D.W.; dry weight.

これまでに、佐賀県産のキクイモ粉末中のイヌリン含量が 160℃以上の焙煎によって減少することが報告されており、加熱によるイヌリンの分解とカラメル化反応による可能性が示されている[19]。とくに 180℃以上では、加熱時間依存的に急激なイヌリン含量の減少が報告されている。一方、北海道産のキクイモを焙煎すると 170℃まではイヌリン含量に変化は無く、190℃で 30 分間処理までは DPPH ラジカルに対する抗酸化活

性とポリフェノール含量がともに上昇する[15]。我々の結果もまたこれを支持するものであった。佐賀県産のククイモ塊茎を用いた総ポリフェノール含量と DPPH ラジカルに対する抗酸化活性では、とくに外皮部分で高い値が得られ、白色種よりも紫色種で高い値が示されている[16]。

イヌリンは水溶性の難消化性食物繊維であると同時に、低カロリーの甘味材として利用される[4]。ゲル化を引き起こす性質を有しており、チーズ、ミルク、ヨーグルトやアイスクリームなどの乳製品のほか、パン、ビスケット、シリアルや肉製品にも添加物として利用できる[4]。さらにイヌリンは腎機能の診断に利用されるほか、腸管内での細菌叢の改善効果や直腸ガンに対する予防効果が期待されている[5]。一方で、水溶性食物繊維であるイヌリンによる腸内環境改善作用と 2 型糖尿病やそのリスク軽減作用が動物実験でも実証されているものの[20]、ヒトへの効果については未だ議論の余地がある[21]。歴史的に日本に食用として導入され帰化植物として自生するようになったククイモは、現状では野生種として国内に広く分布している。そのため、その土地の気候風土や環境に適応した特性を示すものも存在する可能性がある。本研究で用いた南阿蘇村産のククイモが他の地域のククイモと比べてどのような栽培特性や機能的特性を有しているかについて比較調査を続けていくこともまた興味深い。細胞レベル、さらには実験動物やヒトに対する同ククイモの保健機能について更なる検証が望まれる。

一方、ステビアは南米原産のクク科ステビア属の多年草で、天然由来の甘味料ステビオール配糖体の供給源として知られる[22]。甘味成分のステビオシドには砂糖の約 150 倍、レバウディオシドには砂糖の 300-350 倍の甘味があり、ハーブティーや各種食品工業分野でノンカロリー甘味料として幅広く使用されるため、肥満治療食や糖尿病食にも利用される[22]。ステビア葉部にはクロロゲン酸を始めとするポリフェノール類が含まれており、抗酸化活性、抗糖尿病作用、抗菌作用、抗炎症作用および抗腫瘍作用などが報告されている[23]。ステビアの抗糖尿病作用がラットを用いた実験で検証されており[24]、パン製造時に糖分の代わりにステビアエキスを添加した事例では、抗酸化活性やアミラーゼ阻害およびグルコシダーゼ阻害作用が認められている[25]。

ククイモを用いた製品開発の事例では、北海道産のククイモ酢の開発[3]、北海道産のククイモの焙煎加工

[15]、富山県産のククイモの粉末化と飲料開発[26]などが報告されている。本研究では、4%の南阿蘇村産ステビアで調味した焙煎ククイモの試作品において、イヌリン含量を損なうことなく、抗酸化活性とポリフェノール含量の大幅な向上を認めた。したがって、ククイモの有効成分であるイヌリンにステビア由来ポリフェノールの機能を大きく付与した風味と味わいあるククイモ粉末食品を得ることができた。

3. 展望

以上より、熊本県阿蘇郡南阿蘇村で無農薬栽培されたククイモとステビアを利用した食品開発の一環で、ククイモの塊茎を焙煎した結果、イヌリン含量を損なうことなく、抗酸化活性と総ポリフェノール含量はそれぞれ 1.73 倍と 1.47 倍も向上することを明らかにした。さらに、ステビア乾燥粉末を 4%調味した焙煎ククイモの試作品では、甘味とともに抗酸化活性と総ポリフェノール含量を大幅に増加させることができた。熊本県南阿蘇村の農業の活性化に貢献し、ククイモ由来のイヌリンの保健機能に注目した食品開発を行うためにも、加工処理条件の詳細な検証や、各工程における成分分析、抗酸化活性以外の血糖上昇抑制作用などの機能的評価を実施していく必要がある。

4. 引用文献

- [1] 佐竹元吉ら編, 健康・機能性食品の起源植物事典, 中央法規出版株式会社, 東京, pp.188 (2016)
- [2] 農研機構作物研究所作物見本園: ククイモ, (2011) http://www.naro.affrc.go.jp/archive/nics/mihonen/crops/ka_gyou/015016.html (2020.7.25 アクセス)
- [3] 本堂正明ら, 北海道立食品加工センター報告, 6, 37-41 (2005)
- [4] M.A. Mensink, et al., *Carbohydr Polym*, **130**, 405-419 (2015)
- [5] M.A. Mensink, et al., *Carbohydr Polym*, **134**, 418-428 (2015)
- [6] 安田伸ら, 東海大学先進生命科学研究so紀要, 3, 26-30 (2019)
- [7] 安田伸ら, 東海大学先進生命科学研究so紀要, 4, 28-32 (2020)
- [8] 上田裕人ら, 東海大学先進生命科学研究so紀要, 2, 29-34 (2018)
- [9] Y. Ueda, et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, **83**, 2288-2297 (2019)

- [10] W. Lingyun, *et al.*, *J Food Eng*, **79**, 1087-1093 (2007)
- [11] N. Terkman, *et al.*, *Int J Food Sci Technol*, **51**, 1997-2008 (2016)
- [12] A. Saengkanuk, *et al.*, *Eur Food Res Technol.*, **233**, 609-616 (2011)
- [13] D. Puangbut, *et al.*, *Int J Plant Prod*, **9**, 1735-8043 (2015)
- [14] M. Granda, *et al.*, *CIENCIA*, **7**, 277-282 (1999)
- [15] 石黒浩二と横田聡, *日本食品科学工学会誌*, **65**, 7-14 (2018)
- [16] 安田みどりら, *西九州大学健康栄養学部紀要*, **3**, 1-8 (2017)
- [17] I.A. Rubel, *et al.*, *Food Res Int*, **103**, 226-233 (2018)
- [18] S. Sugahara, *et al.*, *J Food Sci*, **80**, C2420-C2429 (2015)
- [19] 安田みどりら, *西九州大学健康福祉学部紀要*, **5**, 1-7 (2019)
- [20] Q. Zhang, *et al.*, *PeerJ*, **6**:e4446 (2018) doi: 10.7717/peerj.4446
- [21] M. Rao, *et al.*, *J Diab Res*, 5101423 (2019) doi: 10.1155/2019/5101423
- [22] 佐竹元吉ら編, *健康・機能性食品の起源植物事典*, 中央法規出版株式会社, 東京, pp.388 (2016)
- [23] K.Z. Myint, *et al.*, *J Food Sci*, **85**, 240-248 (2020)
- [24] N. Shivanna, *et al.*, *J Diab Comp*, **27**, 103-113 (2013)
- [25] J.C., Ruiz-Ruiz, *et al.*, *J Food Sci Technol*, **52**, 7894-7903 (2015)
- [26] 横井健二と今井修, *富山県食品研究所研究報告*, **6**, 15-23 (2008)

5. 業績

【論文発表】

【学会等発表】

該当なし

6. 謝辞

本研究の一部は、東海大学先進生命科学研究所プロジェクト研究の資金援助により実施されています。

耐熱性 L-リジン脱水素酵素の大量発現系の構築、結晶化およびX線回折実験

Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of thermophilic L-lysine dehydrogenase

米田 一成^{1,2,3,4*}、荒木 朋洋^{1,2,3}

¹東海大学農学部、²東海大学大学院農学研究科、³東海大学大学院生物科学研究科、⁴東海大学先進生命科学研究所

Kazunari Yoneda^{1,2,3,4} and Tomohiro Araki^{1,2,3}

¹School of Agriculture, Tokai University, ²Graduate School of Agriculture, Tokai University, ³Graduate School of Bioscience, Tokai University, ⁴Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

*連絡先: 米田一成 (東海大学先進生命科学研究所) e-mail: kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp

*Corresponding author: Kazunari Yoneda (Institute of Advanced Biosciences, Tokai University)

[要旨]

耐熱性 L-リジン脱水素酵素 (LysDH) 遺伝子の機能、構造解析を目的に遺伝子クローニングを行った。100°C 付近に最適生育温度を有す超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 LysDH のホモログ遺伝子を検索したところ、*Geobacillus stearothermophilus*、*Bacillus smithii*、*Agrobacterium tumefaciens* の 3 種の LysDH を見出した。これらの LysDH をコードする遺伝子をクローニングした後、タンパク質発現用ベクターにライゲーションし、大腸菌を用いて LysDH 遺伝子の発現を行った。その結果、*G. stearothermophilus*、*B. smithii* 由来 LysDH では活性を有す酵素の大量調製が可能であった。酵素の結晶が得られたため、X線回折実験を行ったところ、3 ~ 6 Å 程度の低分解能データの測定が可能であった。*A. tumefaciens* 由来 LysDH は活性確認、発現および、精製に成功した。

[Abstract]

Gene cloning was performed to analyze the function and structure of the thermostable L-lysine dehydrogenase (LysDH) gene. We searched for homologous genes of LysDH from the hyperthermophilic bacterium *Pyrococcus horikoshii*, which has an optimum growth temperature around 100°C, and found three types of LysDH, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus smithii*, and *Agrobacterium tumefaciens*. After cloning these LysDH-encoding genes, they were ligated to a protein expression vector, and the LysDH gene was expressed using *E. coli*. As a result, *G. stearothermophilus* and *B. smithii* LysDH could be prepared in large quantities with active enzymes. Since an enzyme crystal was obtained, an X-ray diffraction experiment was conducted, but only low-resolution data of about 3 to 6 Å could be measured. LysDH from *A. tumefaciens* could be confirmed for activity, expressed, and purified, but a LysDH crystal could not be obtained.

[Key Words]

L-lysine dehydrogenase, Enzyme expression and purification, Crystallization

1. はじめに

今日までに様々なアミノ酸脱水素酵素が多く、生物種において確認されている。これらいくつかの酵素は、食品中や環境中のアミノ酸、2-オキソ酸の定量分析に用いられている。また、L-アミノ酸やそのアナログは、医薬中間体の原料となるキラル化合物の合成に役立つ。アミノ酸脱水素酵素の中でも L-グルタミン酸、L-アラニン、L-ロイシン、L-フェニルアラニンなどを基

質とする酵素については、機能や構造に関する豊富な情報があるが、L-リジン脱水素酵素 (LysDH) の機能や構造についての報告例は非常に少ない。

LysDH は補酵素 NAD(P)⁺ 依存的に L-リジンの ε 位の酸化的脱アミノを触媒する酵素 (EC 1.4.1.18) である。この反応生成物は L-2-アミノアジピン酸-6-セミアルデヒドであり、この物質は非酵素的に環化し Δ¹-ピペリدين-6-カルボン酸に変換される (図 1)。これまでに我々

は 100°C 付近に最適生育温度を有す超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* で LysDH の機能解析と結晶構造 (PDB ID: 3ABI) を明らかにしてきたが、未だに基質認識機構などの詳細は不明なままである[1]。また、中等度好熱菌である *Geobacillus stearothermophilus* と常温菌である *Agrobacterium tumefaciens* 由来の LysDH が精製され酵素化学的機能が報告されているが、立体構造は未だに不明である [2,3]。この酵素は L-リジンの α 位のアミノ基ではなく、 ϵ 位のアミノ基の脱アミノ反応を行うため (図 1)、これまでに良く研究されているアミノ酸の α 位を脱水素するアミノ酸脱水素酵素である L-グルタミン酸脱水素酵素や L-アラニン脱水素酵素などの多くのアミノ酸脱水素酵素とは異なる種類の反応を触媒する。この反応を触媒する LysDH の応用としては、L-リジンの分析のためのバイオセンサー (LysDH を電極に固定化し、センサー化する) などへの応用が期待されるが、多くの酵素は安定性の低さから実用化には至っていない。一方、好熱菌由来の酵素は、100°C でも安定であるだけでなく、長期間の保存における高い安定性や有機溶媒の共存化での高い安定性など、様々な条件下において優れた安定性を有するため、バイオセンサーや有用物質生産用の触媒素子とし高い有用性が期待できる。一般的に、酵素は立体特異性、基質特異性といった特徴を有し、化学合成のように環境に有害な有機溶媒下の反応でなく温和な条件で反応が進むために産業、医薬の分野で広く利用されている。しかし、酵素の多くは、触媒寿命が短く、酸化還元反応においては NAD^+ などのピリジンヌクレオチド、C-C などが生じる合成酵素反応においては ATP などの高エネルギーリン化合物といった高価な補酵素が必要でありコスト的な問題が生じる。本研究で着目した耐熱性 LysDH の機能・構造の解析を行うことにより、酵素の弱点である触媒寿命の点で大きな改善策の 1 つとなる。安定性の高い耐熱性 LysDH は、高収率、高光学純度な L-ピペコリン酸 (合成医薬品の原料として非常に有用なアミノ酸) の合成にも応用利用が可能であると考えられる。そこで、本研究では *P. horikoshii* LysDH ホモログ遺伝子である *G. stearothermophilus* LysDH (GT50_11655)、*Bacillus smithii* LysDH (BSM4216_3155)、*A. tumefaciens* LysDH (Atu0946) の大量発現系の構築を行うと共に、酵素を応用利用するための基礎的研究として酵素の精製と結晶化を行った。

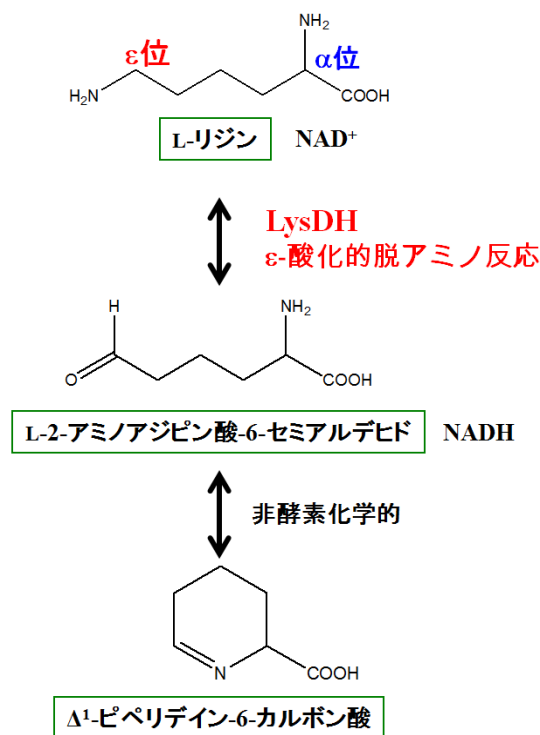


図 1. LysDH が触媒する脱水素反応

2. 結果の概要

1) *G. stearothermophilus* 由来 LysDH の発現、精製、結晶化、X 線回折実験

LysDH の結晶構造解析には、大量の酵素が必要となるので、クローニングを行うことで、目的タンパク質を大量に発現させた。*G. stearothermophilus* 由来 LysDH は 5'末端に *Nde* I サイトを付加したフォワードプライマー (5'-cgccatagaaagtgcctgctgtggagcg-3') および、3'末端に *Bam* HI サイトを付加したリバープライマー (5'-gggacccctcagctatgaaccgtccgcttct-3) を使用し PCR により遺伝子を増幅した。PCR の鋳型 DNA には文献[2] のプラスミド DNA を用いた。増幅した遺伝子は pET15b ベクターにライゲーションを行った。BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL (Agilent Technologies) を形質転換した後に得られたコロニーを白金耳で掻き取り、50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有の 100 ml LB 液体培地に植菌し、20°C で 16 時間培養を行った。その後 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM になるように加えて 37°C で 4 時間培養を行うことで LysDH の発現誘導を行った。培養後の菌体を遠心分離により回収し、菌体をソニケーションすることにより細胞破碎を行った。その後の遠心上清を粗酵素溶液とした。LysDH の精製には Talon コバルトアフィニティカラムを用い、溶出には 0.3 M イミダゾールを用

いて酵素を単一に精製した (図 2)。精製後の酵素は 10 mM リン酸バッファー (pH 7.0) で透析を行い、6.8 mg/ml に濃縮を行った後、結晶化スクリーニングを行った。その結果、42% PEG300, 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 4.2) の条件で図 3 のような結晶が得られたため、高エネルギー加速器研究機構 (KEK、筑波) の AR-NE3A ビームラインにおいて LysDH 結晶の X 線回折実験を行ったが、6 Å 程度の低分解能データしか測定することができなかった。また、*G. stearothermophilus* LysDH の触媒残基と予測される H181A 変異体を *Dpn* I 法により作製し、NAD⁺ および、基質アナログである 6-アミノ-n-カプロン酸と共結晶化後 X 線回折実験を行ったが、分解能は改善されなかった。

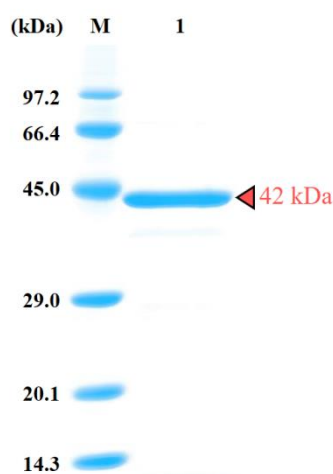


図 2. SDS-PAGE による *G. stearothermophilus* 由来 LysDH の発現、精製の確認。M ; 分子量マーカー、1 ; 精製酵素 (42 kDa)。矢印は精製後の LysDH を示している。

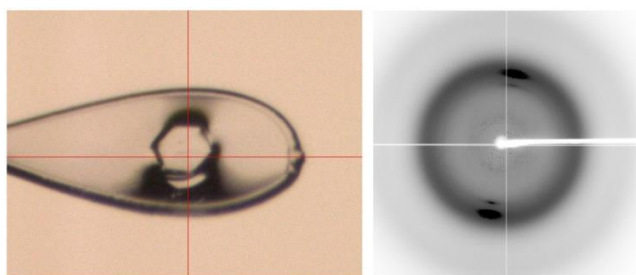


図 3. *G. stearothermophilus* 由来 LysDH の結晶および X 線回折像

2) *B. smithii* 由来 LysDH の発現、精製、結晶化、X 線回折実験

B. smithii 由来 LysDH は 5' 末端に *Nde* I サイトを付加した フォワード プライマー (5'-catatgaaagcttagtgtaggagcaggt-3') および、3' 末端に

Xho I サイトを付加した リバース プライマー (5'-ctcgagatgcacttttcctaataa-3') を使用し PCR により遺伝子を増幅した。オリゴヌクレオチドプライマーは株式会社ファスマックより購入した。*B. smithii* 菌株 (NBRC No. 15311) [4] を独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター (NBRC) より購入し、ゲノム DNA を抽出・精製後、PCR の鋳型 DNA として使用した。増幅した遺伝子は pET22b ベクターにライゲーションを行った。*G. stearothermophilus* 由来 LysDH と同様の方法で発現・精製を行った (図 4)。LysDH 活性の確認には基質である L-リジン、補酵素 NAD⁺、PMS 還元型 (1-methoxy phenazine methosulfate) および、テトラゾリウム塩 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を用いた紫色のホルマザン色素の生成を視覚的に確認できる活性染色法を用いた。その結果、基質 L-リジン存在下でのみ紫色のホルマザンが形成されており、基質アナログである 6-アミノ-n-カプロン酸や基質(-)では反応が起こらないことを確認した (図 5)。さらに、PPSQ-51A プロテインシーケンサー (Shimadzu) を使用し、N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、¹MKALVLGAGLMGKEA¹⁵ であり、予測された N 末端のアミノ酸配列であることを確認した。精製酵素を 11.3 mg/ml まで濃縮し、結晶化を行ったところ、40% PEG400, 0.1 M CHES buffer (pH 9.5) の条件で図 6 のような結晶が得られたため、高エネルギー加速器研究機構 (KEK、筑波) の AR-NW12A ビームラインにおいて LysDH 結晶の X 線回折実験を行ったが、3 Å 以下の低分解能データしか得ることができなかった (図 6)。

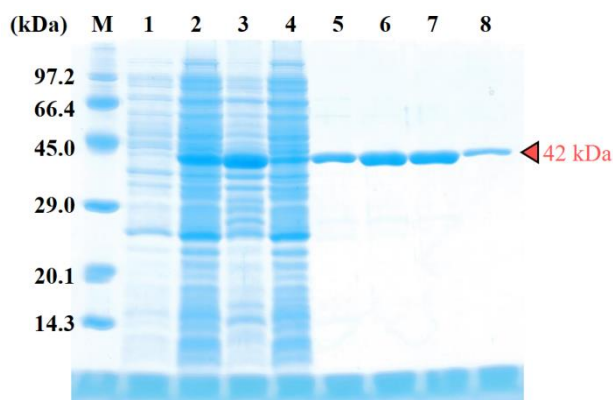


図 4. SDS-PAGE による *B. smithii* 由来 LysDH の発現、精製の確認。M ; 分子量マーカー、1 ; IPTG(-)、2 ; 酵素、3 ; 沈殿画分、4 ; Talon スルー、5~8 ; Talon 溶出画分 (42 kDa)。矢印は精製後の LysDH を示している。

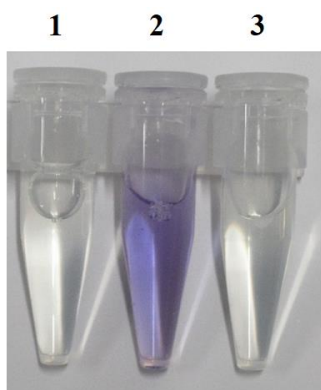


図 5. *B. smithii* 由来 LysDH の活性染色。1 ; L-リジン(-)、2 ; L-リジン(+), 3 ; 6-アミノ-n-カプロン酸(+).

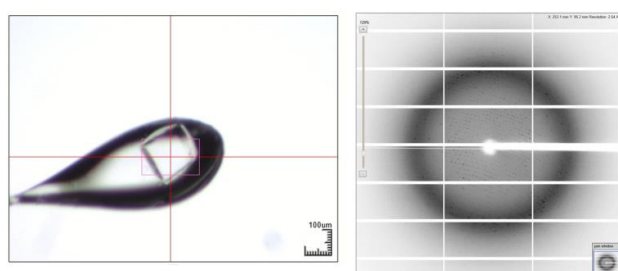


図 6. *B. smithii* 由来 LysDH の結晶および X 線回折像

3) *A. tumefaciens* 由来 LysDH の発現、精製、結晶化

A. tumefaciens 由来 LysDH のアミノ酸残基をコードする遺伝子を Biomatik 社に依頼し合成した。また、人工合成遺伝子は大腸菌のコドンに最適化を行うと共に、5'末端に *Nco* I サイトを、3'末端に *Bam* HI サイトを付加した。合成した遺伝子は pET32a ベクターにライゲーションを行った。すなわち、人工合成遺伝子 (pBluescriptISK(+)/LysDH) を *Nco* I、*Bam* HI で処理し、アガロースゲル電気泳動した後、LysDH 遺伝子のバンドを切り出して抽出、精製し、少量の TE バッファーに溶解した。pET32a ベクターも同じ制限酵素で処理し、16°C、16 時間インキュベートし LysDH 遺伝子とライゲーションを行った。LysDH の発現・精製は上記と同様の方法で行った。pET32a ベクターを用いた場合、チオレドキシントグ (Trx タグ; 可溶性タグ) が LysDH の N 末端に融合しているため、精製後にチオレドキシントグを切断する必要がある。チオレドキシントグの切断にはプロテアーゼであるトロンビン (牛血漿由来; ナカライテスク) 10 U を加え、4°C、16 時間反応させ切断後、Benzamidine FF (GE Healthcare) を使用してトロンビンの除去を行い、再度 Talon カラムをスルーさせることでチオレドキシントグを除去し、LysDH を精製し

た (図 7)。その後精製酵素を用いて LysDH の活性染色を行った (図 8)。精製酵素を 4.7 mg/ml まで濃縮し、結晶化を行ったが、現在までに結晶は得られていない。

その他に耐熱性 LysDH ホモログ遺伝子として、*Pyrobaculum aerophilum* (PAE1554), *Pyrobaculum neutrophilum* (Tneu_0647), *Thermoplasma acidophilum* (Ta0681), *Thermoplasma volcanium* (TVG1335287), *Pyrococcus* sp. NA2 (PNA2_0280), *Thermococcus kodakarensis* (TK0875), *Pyrobaculum caldifontis* (Pcal_0527), *Aeropyrum pernix* (APE_0193.1) を見出すと共に、これらの酵素の結晶構造解析を目的としてクローニングおよび、発現を行った。しかしながら、タンパク質の発現が認められない、もしくは、封入体として発現する酵素であり、封入体をリフォールディングしても活性が検出できないことを明らかにした。

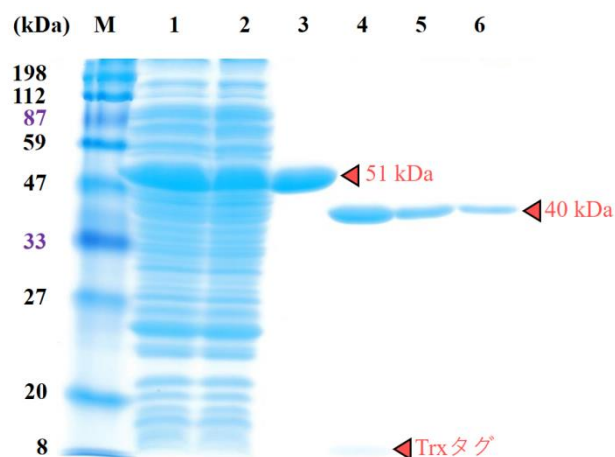


図 7. SDS-PAGE による *A. tumefaciens* 由来 LysDH の発現、精製の確認。M ; 分子量マーカー、1 ; 素酵素、2 ; Talon スルー、3 ; Talon 溶出画分 (51 kDa; 融合タンパク質)、4 ; トロンビン切断後、5 ; Benzamidine FF スルー、6 ; Talon スルー (40 kDa; LysDH)。

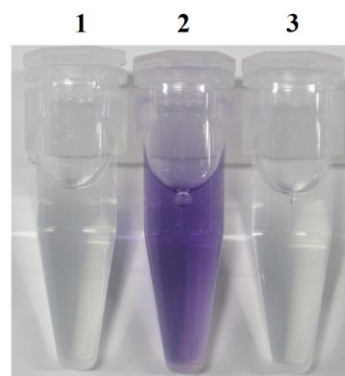


図 8. *A. tumefaciens* 由来 LysDH の活性染色。1 ; L-リジン(-)、2 ; L-リジン(+), 3 ; 6-アミノ-n-カプロン酸(+).

3. 展望

G. stearothermophilus および *B. smithii* 由来 LysDH は結晶化に成功したが、高分解能な反射データが得られておらず、今後結晶構造解析を行うために高品質な結晶を作製していく予定である。

4. 引用文献

- [1] K. Yoneda, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **285**, 8444-8453 (2010).
- [2] M. Heydari, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 937-942 (2004).
- [3] H. Misono, *et al.*, *J. Biochem.*, **105**, 1002-1008 (1989).
- [4] E.F. Bosma, *et al.*, *Stand. Genomic Sci.*, **11**, Article 52 (2016).

5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、貴重なご意見や様々な支援を頂きました大阪工業大学工学部生命工学科 大島敏久教授、香川大学農学部応用生物科学科 櫻庭春彦教授に感謝いたします。また、X 線回折実験を行うにあたり、高エネルギー加速器研究機構のビームラインスタッフの皆様に感謝します。本研究課題に関する放射光実験は、放射光共同利用実験採択課題番号 2020G502 で実施されたものです。

海産食用魚の脂肪酸によるわさびの辛味抑制効果に関する研究

A study of the pungent flavor of WASABI attenuated by fatty acids in raw fish

齋藤 寛¹⁾²⁾、安達洋貴¹⁾、秋山信彦¹⁾²⁾、平塚聖一¹⁾²⁾

¹⁾ 東海大学・海洋学部, ²⁾ 東海大学先進生命科学研究所・高機能性食品研究部門

Hiroshi Saito^{1,2)}, Adachi Hirotaka¹⁾, Nobuhiko Akiyama^{1,2)} and Seiichi Hiratsuka^{1,2)}

¹⁾School of Marine Science and technology, Tokai University

²⁾Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

わさび (*Eutrema japonicum*) は AITC (allyl isothiocyanate) 由来の辛味成分を持つが、魚の脂肪酸とも作用し、AITC の揮発性が抑えられるとされている。本研究では、魚の脂質量および脂肪酸組成によって使用するわさびの量の変化を明らかにすることを目的とした。AITC は魚の脂肪酸の二重結合部位に作用し辛味が抑制されるため、脂質量が多いほど使用するわさびの量が多くなった。また、総脂肪酸量が同程度の場合では、DHA や EPA のように二重結合の多い高度不飽和脂肪酸が多い魚ほど、使用するわさびの量が多くなった。

[Abstract]

WASABI (*Eutrema japonicum*) contains a pungent aromatic compound called allyl isothiocyanate (AITC). Flavor effect of AITC is controlled by the interaction with double bond of fatty acids in raw fish. In this study, we tried to determine the appropriate amount of WASABI required to give sufficient flavor effect to several raw fishes which have different amount and different types of fatty acids. The flavor effect of AITC is strongly attenuated when it is used for raw fish with a large quantity of fatty acids. In particular, polyunsaturated fatty acids like DHA and EPA showed the stronger attenuation effect. Therefore, the raw fish with a larger quantity of polyunsaturated fatty acids needs more amount of WASABI in order to give an adequate pungent flavor.

[Key Words]

WASABI, allyl isothiocyanate (AITC), flavor effect, polyunsaturated fatty acid, raw fish

1. はじめに

わさび (*Eutrema japonicum* 以下本わさびと略称) はアブラナ科 (*Brassicaceae*) に属し、独特の強い刺激性のある香味を持つことから、香辛料として世界的にも認知度が高い日本原産の植物である。薬効として芳香健胃、食欲増進、殺菌や鎮痛作用などが知られている¹⁾。成分としては、アブラナ科の植物が多く含むカラシ油配糖体の1種であるシニグリンが含まれており、これがすりおろされる過程で酵素に触れると本わさびの辛味成分であるアリルイソチオシアネート (Allyl isothiocyanate: 以下 AITC と略称) を生じる。本わさびは江戸時代以降に寿司などに薬味として用いられ、日本原産の植物であり日本人特有の辛味嗜好性を構成している可能性も考

えられる^{2),3)}。

わさびの辛味成分とされる AITC は $N=C=S$ を持つ化合物の総称であるイソチオシアネートにアリル基が結合したアレンであり、揮発性が高く比較的不安定な成分である^{4),5)}。わさびを食べた際は、AITC が揮発し辛味を感じるが、魚の持つ脂肪酸の二重結合部位に AITC が作用すると揮発が抑制され、わさびの辛味が感じにくくなると思われるので、脂肪酸つまり脂質が多い魚ほどわさびの量を増やしている可能性がある。また魚の脂肪酸量と脂肪酸組成は魚種、生息地、餌、季節など様々な要因によって違いがある。AITC が二重結合のひとつひとつに作用するなら二重結合の多い DHA や EPA は辛味を抑制する効果が高い可能性が考えられる。このことより、総脂質量が同じ魚でも脂肪

酸組成が異なる場合、「脂肪酸の種類によってわさびの辛味への抑制効果は変わるのではないか？」という疑問が浮かぶ。脂肪酸の種類ごとにわさびの辛味抑制効果が異なるなら、単に脂の量でわさびの量を変えるのではなく、魚種や産地などを考慮する必要があると思われる。

本研究では、魚の脂質量および脂肪酸組成によるわさびの量の変化を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2-1 わさびの評価について

本研究では主に①脂肪酸量が多いほど AITC によるわさびの辛味抑制効果が高くなるのか、②脂肪酸の種類によって AITC によるわさびの辛味抑制効果が変化するか、の 2 点について明確にするために実験を行った。

実験対象 1 個体に対して 1 人 3 切れ食べた。1 切れ目は最も合いそうな量を感じて食べて、辛さが適正でなかった場合は 2 切れ目でわさびを減らす、または増やして調整した。3 切れ目はわさびの量が最も適正に調整されているとして普段と比較したわさびの量や、辛味が抑制されていたかどうか、魚の脂の多さを記録した。3 を基準値として設定した。

使用したわさびは「S&B の本生本わさび」を用いた。この商品は日本原産のわさびを 100% 使用しており、チューブ状で安価であり、わさびの量を調整しやすいようにした。なお、本わさびは醤油に溶かさず使用した。

2-2 養殖サーモンと養殖ブリ個体の評価

表 2-1 に示した天然魚と養殖魚の脂肪酸比率を見ると、養殖魚はリノール酸やオレイン酸等脂肪酸の比率が高いことが分かる^{6)~10)}。このリノール酸やオレイン酸等二重結合の少ない脂肪酸が AITC にどのような影響を与えるか調べるため、養殖サーモンと養殖ブリで評価を行った。

使用した魚はサーモン A、B およびブリ A、B とし、サーモン A が清水魚市場で購入した養殖トラウトサーモン（産地不明）、サーモン B がスーパー（しずてつストア）で購入した養殖のふくいサーモン（ブランド化されているトラウトサーモン）、ブリ A が同じくスーパー（しずてつストア）で購入した養殖の豊後ブリ（大分県のブランドブリ）、ブリ B がスーパー（タイヨー三保店）で購入した愛媛県産養殖ブリであり、全て 11 月 30 日に購入した。

表 2-1 天然魚と養殖魚の脂肪酸比率

	脂肪酸量 (%)	養殖さけ類	養殖ブリ	まぐろ類	いわし類	天然ぶり類
オレイン酸	18:1n-9	32~42	23	12~25	0	0
リノール酸	18:2n-6	13~16	7	1~2	1	1~2
DHA	22:6n-3	4~8	9	14~29	8~19	14~22
EPA	20:5n-3	2~3	4	3~7	8~12	6~7

2-3 ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析

抽出した脂質をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー(GC)による分析を行った。メチルエステル化は、三フッ化ホウ素メタノールを用いる方法にて行った。これらをタッチミキサーで攪拌後、100℃に設定したウォーターバス内で 15 分間加熱した。空気中で放冷した後、三フッ化ホウ素メタノール溶液 2.0mL を加え、さらに 100℃で 20 秒間加熱した。放冷後、ヘキサン 1.0mL および飽和 NaCl 水溶液 3.0mL を加えタッチミキサーで各 10 秒攪拌を行った。試験管内で分離したヘキサン層を 0.6mL 採取し、ガスクロマトグラフィー分析に用いた。

3. 結果

3-1 養殖サーモンと養殖ブリの評価結果

サーモン A では 1 切れ目の感じた辛味の強さが 2.25 ± 0.43 と少し低く、2 切れ目でわさびの量を 3.75 ± 0.43 と増やして辛味の強さは 3.25 ± 0.43 に調整していた。脂の多さが 4.25 ± 0.43 と多く、普段と比較したわさびの量も 3.5 ± 0.50 と少し多いが、辛味抑制効果は 2.75 ± 0.83 で少し低く、相性の良さは 3.75 ± 1.64 とばらつきが大きくなった。

サーモン B では 1 切れ目の感じた辛味の強さは 4 ± 0 と 4 個体の中で最も高く、2 切れ目でわさびの量を 2.5 ± 0.50 と減らして感じた辛味の強さを 3.25 ± 0.43 とサーモン A と同じ値まで調整していた。脂の多さが 2 ± 0 で普段と比較したわさびの量は 2.25 ± 0.43 、辛味抑制効果が 2.25 ± 0.43 、相性の良さが 2.5 ± 0.50 とどれも 4 個体の中で最も低い値になり、ばらつきもそれほど大きくなかった。

ブリ A では 1 切れ目の感じた辛味の強さが 1.75 ± 0.43 とサーモン 2 個体より低く、2 切れ目でわさびの量を 4.25 ± 0.43 とかなり増やしたが、それでも感じた辛味の強さは 2.75 ± 0.43 と少し低い値になった。脂の多さは 4.25 ± 0.43 でサーモン A と同じ値だが、普段と比較したわさびの量は 4.25 ± 0.43 でサーモン A よりも 0.75 大きい値になった。辛味抑制効果もサーモン 2 個

体より高い 4 ± 0.70 になり、相性の良さは 4.75 ± 0.43 で4個体の中で最も高い値になった。

ブリ B では1切れ目の感じた辛味の強さが 1.5 ± 0.50 と4個体の中で最も低い値になり、2切れ目でわさびの量を 4.5 ± 0.50 とブリ A よりも増やしたが、感じた辛味の強さはブリ A よりも低い 2.5 ± 0.50 になった。脂の多さは4個体の中で最も高い 4.75 ± 0.43 で、普段と比較したわさびの量も最も高い 4.5 ± 0.50 を示した。しかし辛味抑制効果はブリ A と同じ 4 ± 0.70 であり、相性の良さは 4.5 ± 0.50 とブリ A よりも低い値になった。

表 3-1 サーモン2種とブリ2種の官能評価結果

12月1日 22歳男性57歳60歳74歳女性	サーモンA	サーモンB	ブリA	ブリB
	平均±標準偏差			
1切れ目 感じた辛味の強さ	2.25 ± 0.43	4 ± 0	1.75 ± 0.43	1.5 ± 0.50
2切れ目 感じた辛味の強さ	3.25 ± 0.43	3.25 ± 0.43	2.75 ± 0.43	2.5 ± 0.50
調整したわさびの量	3.75 ± 0.43	2.5 ± 0.50	4.25 ± 0.43	4.5 ± 0.50
3切れ目 普段と比較したわさびの量	3.5 ± 0.50	2.25 ± 0.43	4.25 ± 0.43	4.5 ± 0.50
辛味抑制効果	2.75 ± 0.83	2.25 ± 0.43	4 ± 0.70	4 ± 0.70
脂の多さ	4.25 ± 0.43	2 ± 0	4.25 ± 0.43	4.75 ± 0.43
相性の良さ	3.75 ± 1.64	2.5 ± 0.50	4.75 ± 0.43	4.5 ± 0.50

3-2 脂肪酸分析結果

サーモン B のみ脂質量が8.9gで最も低く、サーモン A (平均)は13.9g、ブリ A (平均)は16.8g、ブリ B が19.5gとなった。脂質量とはコレステロールやグリセリンと脂肪酸を含む総量であり脂肪酸総量とは異なる。

各種飽和脂肪酸では全体的にサーモンよりブリの方が含有割合は高い傾向にあるが、ステアリン酸(18:0)のみサーモン B が4.7%と最も高い値になった。アラキジン酸(20:0)とベヘン酸(22:0)のみサーモンの方が値は大きいとその差は0.5%以下であまり変わらなかった。

一価不飽和脂肪酸ではオレイン酸(18:1n-9)においてブリよりサーモンの方が約8%高く、パルミトレイン酸(16:1n-7)ではブリよりサーモンが約2%、イコセン酸(20:1n-11)ではサーモンよりブリが約1.5%多くみられた。その他一価不飽和脂肪酸ではサーモンとブリの含有割合の差が約1%以下でそれほど違いはみられなかった。

多価不飽和脂肪酸ではリノール酸(18:2n-6)において約7.5%サーモンの方が高くその差は2倍ほどであつた。

αリノレン酸(18:3n-3)はサーモン A のみ含有割合が6.1%と高く、ブリとの差は4.8%で4~6倍ほど、サーモン A とは3.3%の差で2倍以上の違いがみられた。EPA (イコサペンタエン酸(20:5n-3))ではサーモン A の方がサーモン B より約0.8%高いが、ブリ A 及び B で5.0~5.5%とサーモン A より約2.5%高く、その差は約2倍であつた。ドコサペンタエン酸(22:5n-3)ではサーモンが1.0~1.3%含んでいるのに対して、ブリは2.1~2.5%と約2倍多かった。ドコサヘキサエン酸(22:6n-3)ではサーモン A が最も低く4.3%、サーモン B が次いで7.3%となり、ブリ B で8.7%、ブリ A は最も高い10.2%になった(表3-2)。

4. 考察

普段と比較したわさびの量はサーモン A で 3.25 ± 0.50 、ブリ A で 4.25 ± 0.43 になり、辛味抑制効果はサーモン A が 2.75 ± 0.83 、ブリ A が 4 ± 0 である。また、結果3-2で両者の差が大きかった脂肪酸を表4-1に示した。わさびの辛味成分 AITC は揮発性が高いと同時に比較的不安定な物質であり、魚の持つ脂肪酸の二重結合部位に作用して揮発が抑えられ辛味が感じにくくなると仮定すると、二重結合を持たない飽和脂肪酸で双方に差はあるが、わさびの辛味には影響していないと考えられる。一価不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸(16:1n-7)はブリ A の方が3.2%多いが、オレイン酸(18:1n-9)はサーモン A の方が13.0%多く、多価不飽和脂肪酸のうち、リノール酸(18:2n-6)及び二重結合が3つのαリノレン酸(18:3n-3)はサーモン A の方が6.6%、4.9%多く、二重結合が5つのEPA(20:5n-3)及びドコサペンタエン酸(22:5n-3)はブリ A の方が5.1%、2.4%多く、二重結合が6つのDHA(22:6n-3)もブリ B の方が5.9%多い。EPAやDHA、ドコサペンタエン酸は高度不飽和脂肪酸と呼ばれ特に二重結合が多い脂肪酸である。高度不飽和脂肪酸は全てブリ A の方が多く含まれ(計9.4%)、それ以外の一価及び多価不飽和脂肪酸量はサーモン A の方が全体的に多い(計約20%)こと、普段と比較したわさびの量

表 3-2 養殖サーモン 2 個体と養殖ブリ 2 個体のガスクロマトグラフィー分析結果

(%)		サーモンA			サーモンB			ブリA			ブリB		
		1	2	平均	2	1	2	平均	1	2	平均		
脂質		12.3	15.4	13.9	8.9	17.0	16.5	16.8	17.1	21.8	19.5		
ミリスチン酸	14:0	2.1	2.1	2.1	1.9	3.5	3.6	3.6	3.3	3.4	3.4		
ペンタデカン酸	15:0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
パルミチン酸	16:0	9.8	9.8	9.8	15.3	16.5	16.4	16.4	20.1	19.4	19.7		
ステアリン酸	18:0	2.7	2.7	2.7	4.7	3.4	3.4	3.4	4.0	4.0	4.0		
アラキジン酸	20:0	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0		
ベヘン酸	22:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
パルミトレイン酸	16:1n-7	2.5	2.5	2.5	3.5	5.7	5.8	5.7	5.4	4.9	5.1		
ヘプタデセン酸	17:1n-8	0.3	0.3	0.3	0.8	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.5		
オレイン酸	18:1n-9	37.4	38.5	38.0	31.3	25.0	25.0	25.0	27.2	28.0	27.6		
オクタデセン酸	18:1n-7	4.2	2.8	3.5	2.6	3.0	3.0	3.0	2.9	2.7	2.8		
イコセン酸	20:1n-11	0.3	0.3	0.3	0.5	2.1	2.1	2.1	1.7	1.8	1.7		
イコセン酸	20:1n-9	2.6	2.6	2.6	1.9	2.3	2.3	2.3	1.8	1.8	1.8		
ドコセン酸	22:1n-11	1.4	1.5	1.4	0.8	2.4	2.4	2.4	1.9	1.9	1.9		
ドコセン酸	22:1n-9	0.8	0.8	0.8	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3		
ヘキサデカジエン酸	16:2n-4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7		
リノール酸	18:2n-6	14.7	15.1	14.9	15.8	8.3	8.2	8.3	7.5	7.5	7.5		
αリノレン酸	18:3n-3	6.1	6.0	6.1	2.8	1.5	1.5	1.5	1.1	1.1	1.1		
ステアリドン酸	18:4n-3	0.8	0.6	0.7	0.5	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1		
イコサジエン酸	20:2n-6	1.0	1.0	1.0	1.2	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3		
イコサトリエン酸	20:3n-6	0.3	0.3	0.3	0.5	0.2	0.2	0.2	0.3	0.0	0.2		
イコサトリエン酸	20:3n-3	0.5	0.5	0.5	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
アラキドン酸	20:4n-6	0.3	0.3	0.3	0.6	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7		
イコサテトラエン酸	20:4n-3	0.8	0.8	0.8	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7		
イコサペンタエン酸	20:5n-3	2.8	2.6	2.7	1.9	5.0	5.1	5.1	5.3	5.5	5.4		
ドコサテトラエン酸	22:4n-6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.3	0.4	0.3	0.4		
ドコサペンタエン酸	22:5n-6	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3		
ドコサペンタエン酸	22:5n-3	1.3	1.3	1.3	1.0	2.3	2.5	2.4	2.1	2.2	2.1		
ドコサヘキサエン酸	22:6n-3	4.3	4.3	4.3	7.3	10.3	10.2	10.2	8.7	8.6	8.7		
未同定		1.6	1.9	1.8	2.7	2.6	2.8	2.7	1.7	2.2	2.0		
飽和脂肪酸		15.1	15.2	15.2	22.4	23.8	23.6	23.7	27.4	26.8	27.1		
一価不飽和脂肪酸		49.5	49.3	49.4	41.7	41.5	41.5	41.5	41.7	42.0	41.8		
多価不飽和脂肪酸		33.8	33.5	33.7	33.2	32.1	31.9	32.0	29.2	29.0	29.1		
n-3		16.6	16.2	16.4	14.3	20.9	21.0	21.0	19.0	19.2	19.1		
n-6		16.8	17.0	16.9	18.5	10.5	10.1	10.3	9.5	9.1	9.3		
n-3/n-6		0.99	0.95	0.97	0.77	2.00	2.07	2.04	1.99	2.11	2.05		

の値及び辛味抑制効果の値がブリ A の方が大きい（どちらも 1.0 以上）こと、総脂肪酸量は両者でほぼ変わらないことより、高度不飽和脂肪酸はわさびの辛味成分 AITC に特に作用し、辛味を抑制する効果が強いことが分かった。つまり、AITC は魚の脂肪酸の二重結合に作用し、辛味が抑制されることが検証できた。

以上の事より、総脂肪酸量約 20 g 以上の脂がかなり多い魚には脂肪酸組成に関わらずわさびを多く付けて食べても辛味は感じにくく、総脂肪酸量約 10 g 以下の脂ののっていない魚ではわさびの量を増減させるのは困難であり、総脂肪酸量約 10~20 g の養殖トラウトサーモンや養殖ブリ等、ある程度脂ののった魚は高度不飽和脂肪酸が多いほどわさびを多く付けて食べても

辛味は感じにくいことが分かった。脂ののっていない魚にわさびを付けすぎると辛味が際立つので、若者のわさび離れを抑制するなら、脂ののった魚でわさびを食べてみると、わさび嫌いを減らせるかもしれない。

今後は各種脂肪酸と AITC を直接混ぜ合わせて、揮発性効果の実験をする必要がある。それにより、脂肪酸の二重結合の数と抑制効果の関係を明らかに出来ると考える。

表 4-1 サーモン A とブリ B の脂肪酸組成

(%)		サーモンA			ブリA		
		1	2	平均	1	2	平均
脂質		12.3	15.4	13.9	17.0	16.5	16.8
ミリスチン酸	14:0	2.1	2.1	2.1	3.5	3.6	3.6
パルミチン酸	16:0	9.8	9.8	9.8	16.5	16.4	16.4
ステアリン酸	18:0	2.7	2.7	2.7	3.4	3.4	3.4
パルミトレイン酸	16:1n-7	2.5	2.5	2.5	5.7	5.8	5.7
オレイン酸	18:1n-9	37.4	38.5	38.0	25.0	25.0	25.0
リノール酸	18:2n-6	14.7	15.1	14.9	8.3	8.2	8.3
αリノレン酸	18:3n-3	6.1	6.0	6.1	1.5	1.5	1.5
イコサペンタエン酸	20:5n-3	2.8	2.6	2.7	5.0	5.1	5.1
ドコサペンタエン酸	22:5n-3	1.3	1.3	1.3	2.3	2.5	2.4
ドコサヘキサエン酸	22:6n-3	4.3	4.3	4.3	10.3	10.2	10.2

5. 参考文献

- 1) 矢作忠弘(2010). メタボに効くわさび フェルマシア, vol46 No.8, p795.
- 2) 山根京子 小林恵子 清水祐美(2018). 日本の若者におけるワサビと辛味の嗜好性に関するアンケート調査結果 園芸学会雑誌, 17 (2), p219-229.
- 3) 荒井恵美子 佐藤吉朗 長尾慶(2016). ところみ調整剤添加食品の香りフレーバーリリース (第 2 報) わさびの風味を保持する最適添加量の検討 日本調理科学会誌, Vol.49, No.3, p223-231.
- 4) Romanowski F, Klenk H(2005). Thiocyanates and Isothiocyanates Organic ウルマンの産業科学百科事典.
- 5) 永田雅靖 (1995) . Studies on Inhibitory Mechanisms of Allyl Isothiocyanate on Browning and Ethylene Production of Shredded Cabbage 博士(農学), 第 002 号.
- 6) 品川純兵 金丸素久 桑原宏 深田陽久(2018). 飼料脂肪酸組成がブリ筋肉中ドコサヘキサエン酸量に及ぼす効果 水産増殖, 66 (1) , p61-69.
- 7) 伊藤明 増渕敦子 直井美穂 有信哲哉 秦満夫 廣田才之(1995). 養殖ギンザケと天然ギンザケの部位別総脂質の脂肪酸組成の比較 栄養学雑誌, Vol.53 No.2, p135-139.
- 8) 深田陽久(2019). ブリ養殖における季節に合わせた餌の開発 ブリ類養殖振興勉強会.
- 9) 中山祐輔 高嶋康晴(2017). 脂肪酸分析によるブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの養殖判別法の検討 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, Vol.40, p1-8.
- 10) 日本食品成分データベース 文部科学省 foodb.mext.go.jp

6. 業績

【論文発表】

- 1) 鈴木崇史・鈴木優太・秋山信彦、カワハギ育成用飼料原料としての廃棄焼きノリの有効性、水産増殖 68 (2), 147-154.

【学会等発表】

- 1) 深川紗唯・佐藤詩恩・樫村真大・秋山信彦、カワハギの歯の脱落周期と歯胚の形態、令和 3 年度日本水産学会春季大会、2021 年 3 月
- 2) 鈴木優太・大河原遊・松原圭史・森井俊三・阿部正美・グレドル・イアン・西川正純・片山亜優・西谷豪・安木隆裕・木村理久・加賀大貴・秋山信彦、マダコ用開放型シェルタの利用率と成長に伴う間隙幅の選択性の変化、令和 3 年度日本水産学会春季大会、2021 年 3 月
- 3) 黒澤陽充、片山亜優、菅野萌美、阿部正美、森井俊三、松原圭史、秋山信彦、グレドル・イアン、西谷豪・西川正純、マダコ稚ダコ期における人工餌料開発、令和 3 年度日本水産学会春季大会、2021 年 3 月

7. 謝辞

本稿を書く機会を与えてくださり、いつも温かな叱咤激励をいただいている平山令明先生に感謝申し上げます。

異なる海域由来の市販食塩中に含まれるマイクロプラスチックに関する研究

A study of the presence of microplastics in commercial salts from different sea areas

佐波 来美¹⁾、清水 宗茂^{1,2)}

1) 東海大学海洋学部, 2) 東海大学先進生命科学研究所・高機能食品研究部門

Kurumi Saba¹⁾ and Muneshige Shimizu^{1,2)}

1) School of Marine Science and Technology, Tokai University

2) Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

マイクロプラスチック (MP) に起因する汚染が世界中で深刻化する中、我々が日常的に摂取する食材や食品中にも MP が存在することが明らかとなっている。本研究では、異なる海域から作製された市販食塩を用いて、大きさ 100 μm 以上の MP が存在するのかを明らかにすることを目的とした。その結果、中国海域由来の食塩から、繊維状のアクリロニトリルスチレン樹脂と推定される物質が検出された。また、日本海域由来の食塩には MP は検出されなかったが、紙や綿等の物質は存在することが明らかとなった。

[Abstract]

Microplastics (MPs) pollution is drawing worldwide attention, and many studies have clarified that MPs are contained in various commercial foods and ingredients. The aim of this study is to investigate the presence of MPs larger than 100 μm in commercial salts derived from different sea water. We observed the fiber made of acrylonitrile-styrene copolymer may be contained in commercial salt from China. Although we did not detect the presence of MPs, certain materials such as paper or cotton were observed in all commercial salts from Japan.

[Key Words]

microplastic, commercial salt, microscope, FT-IR

1. はじめに

プラスチックの生産およびその使用量は高い有用性から増加しており、年間生産量は世界全体で約 3.8 億トンにのぼる[1]。プラスチックは自然分解されずに半永久的に残るといった特徴があることから、ポイ捨てやゴミ処理施設へ輸送される過程で環境中に出てしまった使用済プラスチックは、雨で流され最終的に海に流れ着く。プラスチックごみのなかでも大きさが 5mm 以下の微小プラスチックはマイクロプラスチック (MP) と呼ばれ、環境に対する影響の観点から特に問題視されている[2]。

MP は、「一次 MP」と「二次 MP」の2種類に分類される。一次 MP は、洗剤・歯磨き粉といったスクラブ剤などに利用される微小なプラスチックのことで、主に家庭の排水溝などから下水処理を通り、海へと流出される。一方、二次 MP は、街などで捨てられたビニール袋やペットボトル、タバコのフィルターといった

プラスチック製品が側溝などから川を伝って海へ流出し、紫外線による劣化や波の作用などにより破碎されて、マイクロサイズになったもののことを指す。

MP 粒子による環境汚染は、ヒトが日常的に摂取する食材や食品にも影響が及んでいる[3]。近年では、分析技術の向上とともに、貝[4-6]や魚[7-9]などにも MP が存在する報告が認められるようになった。

そのなか、調味料等として広く使用している食塩については、中国の海水を用いて作製した食塩からは、食塩 1kg あたり 550-681 個の MP が検出されたとの報告[10]やスペイン産の食塩中には食塩 1kg あたり 50-280 個の MP が存在したとの報告[11] などがある。一方で、日本海域で採取した海水を用いて製造した食塩に関する情報については、人工顔料のフタロシアニン粒子が検出されたとの報告[12]に限られており、日本海域での海水を用いて作製した食塩に関する情報は極めて少ない。

そこで本研究では、国内の3海域の海水を含めた市販食塩5種を用いて、平均粒径または繊維長が100 μ m以上のMPの存在について明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

1) 供試試料

日本海域のうち、採取地の異なる3種類の市販食塩（「海の精（海の精社製、採取地：伊豆大島）」、「食塩（国産）（塩事業センター社製、採取地：徳島県）」、「栗國の塩（沖縄海塩研究所社製、採取地：沖縄県）」を各500g購入した。

さらに、比較検討をするため、採取地が海外の市販食塩2種（「あらしお（あらしお社製、採取地：メキシコおよびオーストラリア）」および「食塩（中国産）（神戸物産社製、採取地：中国山東省）」を各500g購入した。なお、各食塩の製法については、表1に記した。

供試試料	製法
海の精	海水を天日濃縮 →濃縮海水を平釜で結晶化
食塩 (国産)	海水をイオン膜濃縮 →立釜（密閉した釜）で結晶化
栗國の塩	海水を天日濃縮 →濃縮海水を平釜で結晶化
あらしお	天日し結晶化→水で溶解 →平釜で結晶化
食塩 (中国産)	海水を天日塩田で結晶化

表1 供試試料の種類および製法

2) 供試試料からの微小物質の回収および計測

供試試料30gを500mlビーカーに精秤後、超純水を350ml添加し、ガラス製攪拌子を用いて200rpmにて、室温下で1時間攪拌した。攪拌後、すべての溶液を減圧ろ過に供し、ポリテトラフルオロエチレン

(polytetrafluoroethylene : PTFE) メンブレン

(Omnipore, Merck社製)上に口径5 μ m以上の微小物質を回収した。メンブレンを培養用滅菌済シャーレ（アズノール滅菌シャーレ, AS ONE社製）に移し、メンブレンをテープにて固定後、クリーンベンチ内にて乾燥させた（図1）。

乾燥後、実体顕微鏡（STZ-161-TLED, 島津理化社製）および顕微鏡用USBカメラ（SCORP-ON Direct USB, GOKO

カメラ社製）を用いて、メンブレン全体を撮影した。撮影したデジタル画像をもとに、ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて、平均粒径100 μ m以上の粒子数および繊維長100 μ m以上の繊維数を計測した。なお、平均粒径は、粒子の長軸径および短軸径を計測後、各数値の和を半分に除することで算出した。各供試試料からの微小物質の回収は、n=3にて実施した。

3) 回収物質のFT-IR解析

臭化カリウム粉末（和光純薬社製）に、2)にて計測した個々の回収物質を混合し、ハンドプレスを用いて加圧することで測定用サンプルを作製した。

測定サンプルをフーリエ変換赤外分光分析（FT-IR）装置（FT/IR 4700ST, 日本分光社製、（図2））のステージにセット後、600~4000 cm^{-1} の測定領域にて、透過法により測定した。各検体における吸収スペクトルをもとに、FT-IRソフトウェアのライブラリを用いることで、回収物質の種類を推定した。

なお、本解析は2)にて検出された平均粒径または繊維長が100 μ m以上であったすべての回収物質について実施した。

4) 測定値の統計解析

粒子数および繊維数については、各供試試料について平均値±標準偏差（standard deviation : SD）を求めた。さらに、供試試料間における比較のため、一元配置分散分析を行い、Bonferroni法による多重比較を行った。また、測定により得られた平均粒径および繊維長は、供試試料ごとにそれぞれ100 μ m間隔と2000 μ m間隔（1000 μ m以下は除く）にて構成比を算出し、円グラフにまとめた。これらの統計学的解析には、Microsoft Excelを用い、両側検定で5%を統計学的有意水準とした。



図1 乾燥後のPTFEメンブレン



図2 フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) 装置

3. 結果および考察

5 種の市販食塩について、平均粒径または繊維長が 100 μm 以上の物質数を測定した結果を図 3 に示した。海水の採取地が国内外を問わず、すべての市販食塩において粒子および繊維が検出された。粒子数については、食塩 30 g あたり「栗国の塩」が平均 4.7 個で最も多く検出されたのに対し、「食塩 (国産)」は平均 1.3 個で最少であった。なお、供試試料ごとによるばらつきが大きく、供試試料間における有意差は認められなかった。

一方、繊維数では、すべての食塩において粒子数に比べて 2 倍以上多く検出された。繊維数が最も多かったのは、「海の精」で平均 20.0 個であり、その他 4 種は同程度であった (「食塩 (国産)」: 平均 12.3 個、「栗国の塩」: 平均 11.7 個、「あらしお」平均 15.3 個、「食塩 (中国産)」: 平均 12.3 個)。粒子数と同様、検体によるばらつきが大きく、群間差は認められなかった。

海外産の食塩中に存在する MP の総説[3]によると、同一検体においても、食塩 1kg 中に微小粒子が検出される場合とされない場合が報告されており、本試験も標準偏差が大きく類似した傾向が伺えた。そのため、食塩中に存在する微小物質数に関して、精度を高めた分析をする必要がある場合には、分析に供する検体数や採取する食塩量を増やすなどの改良が必要と思われた。

また、「食塩 (中国産)」1kg あたりの粒子数と繊維数の合計はおおよそ 500 個であり、採取海域は不明であるが同じ中国産食塩の総数 (550–681 個) [10] と比べて、同程度であることが確認された。しかしながら、本実験では平均粒径または繊維長が 100 μm 以上という条件における結果であることから、100 μm 未満の物質の存在は明らかにできていない。そのため、未測定 of 微小物質については、顕微 FT-IR を用いた分析法などを用いるなど、更なる検討が必要と思われた。

なお、食塩を添加せず超純水のみを用いて、微小物質の回収を行ったところ、粒子数は 0.3 ± 0.5 個 (平均

$\pm \text{SD}$)、繊維数は 1.0 ± 0.8 個 (平均 $\pm \text{SD}$) ($n=3$) のみ検出された。これより、本実験を通じて、大きさが 100 μm 以上の物質が混入する可能性は極めて低いものと考えられ、粒子および繊維のいずれも、供試試料中に含有しているものと考えられた。

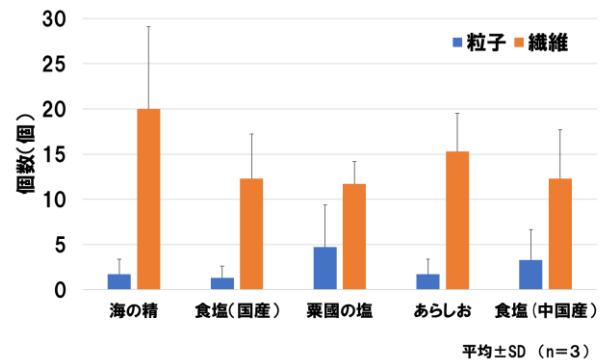


図3 市販食塩から検出された粒子数と繊維数

各市販食塩に存在した粒子について、それらの粒径分布を図 4 に示した。その結果、すべての市販食塩において、平均粒径が 100~300 μm の粒子が半数以上を占めており、平均粒径が 500 μm 以上の物質を検出した市販食塩は、「食塩 (国産)」と「食塩 (中国産)」に限られた。

Karami らは、さまざまな海域由来の市販食塩に存在した微小物質について、粒径分布にまとめたところ、粒径の範囲は 200~1000 μm であり、なかでも平均粒径 600~700 μm の割合が半数程度を占めたことを報告している[12]。本研究では、供試試料により分布が異なるものの、平均粒径が 300 μm 以下である物質が多くを占めており、Karami らの報告とは異なる傾向を示した。微小物質の存在は、海水だけでなく食塩の製造法なども大きく影響することから、更なる知見を獲得することにより、より詳細な状況が把握できると思われた。

図 5 では、回収された微小粒子の代表的な形状例を示した。最も多く認められた形状は楕円形であったが、それ以外の形 (円形、三角形、四角形) も存在していた。食塩中に存在する微小物質に関する報告においても、粒子の形状はさまざまであり、これは二次 MP などが形成される過程の違いに起因するものと考えられた。

図 6 にて、各供試試料に存在した繊維について、それらの繊維長分布を示した。その結果、すべての食塩において繊維長が 1000 μm 未満の割合が半数以上を占めた。また、繊維長は 100 μm から 9500 μm まで幅広く存在しており、最長の繊維は「栗国の塩」にて検出された。

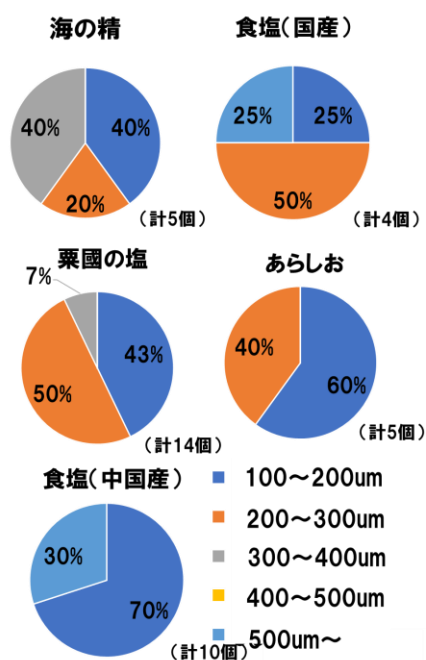


図4 市販食塩に存在した粒径分布

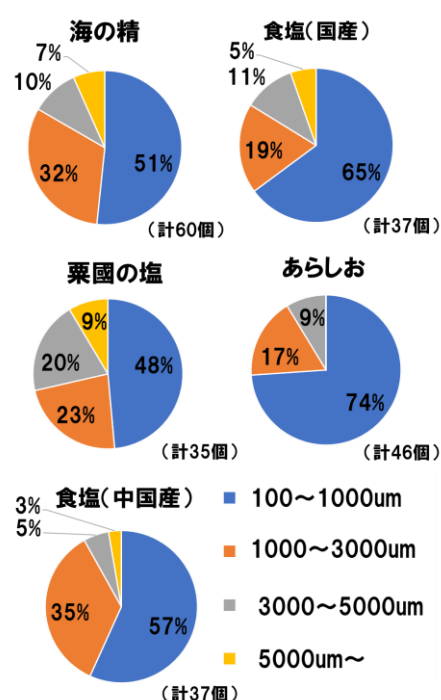


図6 市販食塩に存在した繊維長分布

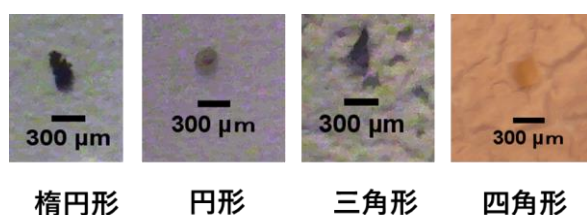


図5 市販食塩に存在した粒径の形状例

Kosuth ら[13]は、食塩中に存在した繊維長は 100～5000um であったことを報告しており、最長の 9500um を除くと本試験の結果に類似した傾向が認められた。また、繊維幅は数um～20um 程度の物質が多く認められ、直線上ではなく屈曲やねじれを有した形状がほとんどであった。

回収した微小物質について、FT-IR による分析を行ったところ、紙、綿、木粉・木片、アクリロニトリルスチレン (AS) 樹脂に大別された。図 7 において、大別された 4 物質について、それぞれの吸収スペクトルを示した。紙や綿は、構成成分のほとんどがセルロースから構成されるのに対し、木粉や木片はセルロース・ヘミセルロース・リグニンの 3 成分から成る。これらは、エーテルや水酸基由来の吸収スペクトル等から推定でき、紙と綿の違いは、回収物質の形状等から判別できた。また、AS 樹脂はアクリロニトリルとスチレンの共重合体であることから、これらを構成する CH₂や

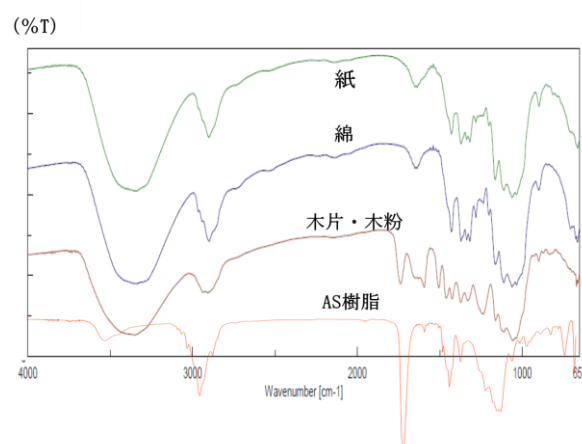


図7 4物質における吸収スペクトル

ベンゼン環由来の吸収スペクトルをもとに、ライブラリー検索より推定した。

表 2 にて、市販食塩中に存在した物質について一覧にまとめた。その結果、紙については、「海の精」と「栗国の塩」を除くすべての食塩について存在が認められた。なかでも「あらしお」は 3 個、「食塩 (国産)」では 2 個が検出され、「食塩 (中国産)」の 1 個を含め、500um 以上の長さを有していた。一方、綿においては、すべての市販食塩にて 1 つずつが検出され、その繊維長は 173～9227um までさまざまであった。木粉・木片については、「海の精」、「食塩 (国産)」、「食塩 (中国産)」では検出されなかったのに対して、「栗国の塩」では 2 個、「あらしお」では 1 個の存在が確認された。

紙や綿、木粉・木片はいずれもセルロースを含む物質であり、懸念されたMPとは異なる。これらは、本実験にて明らかにされた存在量では、人体に有害な影響を及ぼす物質ではないものの、国内産を含む、すべての市販食塩に綿などの物質が存在することは、新たな知見であった。これらの微小物質が混入する要因として、採取した海水または製造過程が想定される。「食塩（国産）」は、イオン膜濃縮と立釜による閉鎖系での製造のため、製造工程で微小物質が混入した可能性は低いと考えられた。一方で、その他4種類の食塩の場合、天日工程が含まれており、採取した海水だけでなく、製造工程を通じて微小物質が混入した可能性も想定された。台湾産の食塩には、紙と綿が検出されたとの報告[14]があり、本実験結果と共通していた。今後、紙や綿などの微小物質がどのような過程で混入するのか、明らかにしてゆくことが期待される。

表2の最下段において、「食塩（中国産）」にのみ存在が認められたAS樹脂について、撮影画像とともに記した。検出されたAS樹脂は繊維状であり、長さは377umであった。一般に、AS樹脂は家電製品（扇風機の羽、冷蔵庫トレイ、ジュース部品、透明製品のハウジングなど）、自動車部品（メーターカバー、ランプレンズなど）や雑貨（化粧品容器、歯ブラシ、ライターなど）に使用されていることから、環境中に投棄されたこれらの製品が紫外線や波力など物理的作用によって細片化することで混入した可能性が考えられた。

市販食塩中に含まれるMPに関する情報をまとめた総説では、プラスチックポリマーとして、ポリエチレンやポリプロピレンがその多くを占めたこと[3]が報告されているが、今回用いた市販食塩からは、それらは検出されなかった。

本実験では、微小物質の推定をFT-IRにより実施したため、サンプル作製が可能な大きさが100um以上の物質に限定した内容であった。一方、顕微FT-IR等を用いることで、100um未満のさらに微小な物質について検討した報告も散見されるようになった。今後、本実験で用いた供試試料においても、100um未満の微小物質まで測定範囲を広げることで、「食塩（中国産）」以外の市販食塩にもMPが存在する可能性が想定される。

2018年になるが、東京湾をはじめ日本内湾に生息するカタクチイワシなどの魚類の消化管中にMPが存在したとの報告[9]が認められた。MPによる海洋汚染は現在も深刻度を増していることから、日本海域で採取した

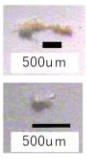
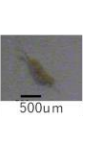
	海の精	食塩 (国産)	栗國 の塩	あらしお	食塩 (中国産)
紙	×		×		
綿					
木粉・木片	×	×			×
アクリロニトリル・ スチレン(AS)樹脂	×	×	×	×	

表2 市販食塩に存在した物質一覧

海水から作製した食塩にも、MPが存在する可能性は否定できない。我々が日常的に摂取する食品や食材が、安全で安心できるものであるためにも、目視では認識不可能な微小MPの存在に対して、さらなる研究が期待される。

4. 引用文献

- [1] R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made, *Law. Sci. Adv.*, 3 (7), 1700782 (2017)
- [2] 三小田憲史、西口大貴, 水環境汚染の評価のに向けた海洋マイクロプラスチックの分析、分析化学、68 (11), 853-857 (2019)
- [3] J. Kwon, J. Kim, T. Pham *et.al.* Microplastics in food: a review on analytical methods and challenges, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17, 6710, DOI: 10.3390/ijerph17186710 (2020)
- [4] J. Li, D. Yang, L. Li *et al.* Microplastics in commercial bivalves from China, *Environ. Pollut.*, 207, 190-195 (2015)
- [5] C. Avio, S. Gorbi, M. Milan *et al.* Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels, *Environ. Pollut.*, 198, 211-222 (2015)
- [6] J. Li, C. Green, A. Reynolds *et al.* Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom, *Environ. Pollut.*, 241, 35-44 (2018)
- [7] C. M. Rockman, A. Tahir, S. L. Williams *et al.* Anthropogenic debris in seafood: plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human

composition, *Sci. Rep.*, 5, 14340 (2015)

[8] L. Cheng, C. Lui, L. Fok Microplastic contamination of wild and captive flathead gray mullet (*Mugil cephalus*), *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15, 597 (2018)

[9] 牛島大志、田中周平、鈴木裕識ら：日本内湾および琵琶湖における摂食方法別に見た魚類消化管中のマイクロプラスチックの存在実態。水環境学会誌、41, 107-113 (2018)

[10] D. Yang, H. Shi, L. Li *et al.* Microplastic pollution in table salts from China, *Environ. Sci. Technol.*, 49, 13622-13627 (2015)

[11] M. Iniguez, J. Conesa, A. Fullana, Microplastics in Spanish table salt, *Sci. Rep.*, 17, 7, 8620 (2017)

[12] A. Karami, A. Golieskardi, C. K. Choo *et al.* The presence of microplastics in commercial salts from different countries, *Sci. Rep.*, 7, 46173 (2017)

[13] M. Kosuth, S. A. Mason, E. V. Wattenberg. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt, *PLOS One*, 13(4), e0194970 (2018)

[14] H. Lee, A. Kunz, W. J. Shim *et al.* Microplastic contamination of table salts from Taiwan, including a global review, *Sci. Rep.*, 12, 9(1), 10145 (2019)

5. 業績

【論文発表】

- 1) M. Shimizu, K. Sakuma. Nutritional approaches for attenuating muscle atrophy. *Muscular Atrophy, Intech Open*, DOI: 10.5772/intechopen.94009 (2020)
- 2) M. Iwasaki, M. Murakami, Y. Ijiri, M. Shimizu, J. Yamamoto. Are all wines made from various grape varieties beneficial in the prevention of myocardial infarction and stroke? *Future Sci. OA.*, <https://www.future-science.com/doi/10.2144/foa-20-20-0098> (2020)

【学会等発表】

- 1) 大野歩、赤池大地、増島広斗、清水宗茂：鯨肉の酸化能に関する研究。第74回 日本栄養・食糧学会大会、2020.5 仙台
- 2) 山本順一郎、井尻吉信、清水宗茂、広田鉄磨、村上正裕：コロナ肺炎患者に併発する血栓症の防止に抗血栓野菜・果物品種は有効か？ 超異分野学会 関西フォーラム 2020、2020.6 大阪

- 3) 清水宗茂：筋萎縮予防に向けた栄養学的アプローチについて。日本食品科学工学会中部支部、2020.12 静岡

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、MP分析に関するご助言をいただきました、国立研究法人海洋研究開発機構・土屋様および生田様、FT-IR分析にて協力いただきました、静岡県工業技術研究所の吉岡様に深く感謝申し上げます。

ヒトデ由来セレブロシドから調製したリポソームの細胞内取込と リポソームを経口摂取した線虫の行動への影響

Liposomes containing cerebroside from *Asterias amurensis* endocytosed into Caco-2 cells, and the liposomes, which were fed into *Caenorhabditis elegans*, did not affect for their motility

山崎 素未¹⁾、山口亮介¹⁾、清水 佳隆^{1,2,3)}、笹川 昇^{1,2,3)}

¹⁾ 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾ 東海大学工学部生命化学科、³⁾ 東海大学先進生命科学研究科

Motomi Yamazaki¹⁾, Ryosuke Yamaguchi¹⁾, Yoshitaka Shimizu^{1,2,3)}, Noboru Sasagawa^{1,2,3)}

¹⁾ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University

²⁾ Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

³⁾ Division of Functional Food Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

セレブロシドは多彩な生理的機能を持つことが知られており、食品分野では植物由来のセレブロシドが機能性食品の原料として注目されている。一方、ヒトデは水産副生物として毎年大量に廃棄処分されているが、その内臓や卵巣には高い含有量でセレブロシドが含まれており、セレブロシドの産業的な供給原料として有望である。我々は、ヒトデ由来セレブロシドの消化管吸収とその生理的意義を解析すること目的に、セレブロシドからリポソームを調製して、小腸上皮モデルとして利用されている Caco-2 細胞へのリポソームの取込を観察した。また、リポソームを経口的に摂取させた線虫に行動異常が起こるかどうかを検討した。その結果、セレブロシドから調製したリポソームは効率的に Caco-2 細胞内に導入され、リポソームを投与した線虫にも行動異常を引き起こさないことが確認された。

[Abstract]

Cerebrosides show many physiological functions in human. Therefore, cerebroside is focused on the additives for some nutritionally functional foods, and these are crucial contents for the production of functional food materials. Since starfish *Asterias amurensis* contains a high proportion of cerebroside in its intestinal organ and ovary, starfish cerebroside is expected as crucial industrial materials for production of cosmetics and functional foods. The purpose of our study is investigating the ability of the endocytosis of the liposomes containing cerebroside from *A. amurensis* into digestive tracts, and the physiological significance of their endocytosis. We investigated the levels of endocytosis of the liposomes from *A. amurensis* cerebroside into human colon carcinoma cells (Caco-2 cells) as the small intestine epithelial model, and the motility of *Caenorhabditis elegans*, that were freely fed the liposomes containing cerebroside. We found that the Caco-2 cells endocytosed the liposomes. Especially, the liposomes did not affect for the motility of *C. elegans*.

[Key Words]

Liposome, Cerebroside, Glucosylceramide, Starfish *Asterias amurensis*, Caco-2 Cell Line, *C. elegans*

1. はじめに

セレブロシドはスフィンゴ糖脂質の一種であり、セラミドに単糖が結合した構造を持つ。単糖がグルコースのものをグルコシルセラミド (GlcCer) といい、動植物の細胞膜に普遍的に存在している。近年、セレブロシドは生体内で多様な生理的機能を持つことが明らかにされており、セレブロシドを経口投与することで、アトピー性皮

膚炎の緩和、がん悪液質の緩和、大腸癌の抑制作用などを示すことが実験的に明らかにされている (1, 2)。そのため、様々な植物由来のセレブロシドが食品分野でサプリメントとして利用されているが、原料中のセレブロシド含量が低く、高純度品を得るためには製造コストが大きくなり、セレブロシドの利用や応用範囲の拡大への障害となっている。

キヒトデ (*Asterias amurensis*) は北海道沿岸部で生息数が多く、ホタテ養殖に甚大な被害を与えており、毎年1万トン以上が駆除され、埋め立てや焼却処分されている害獣であるが、その内臓や卵巣にはセブレロシドが豊富に含まれていることが知られており、セブレロシドの有望な供給源として注目されている (3,4)。

これまでに、我々は産業利用可能な手法を用いて、ヒトデの内臓からセブレロシドを高純度に精製する方法を確立している (5)。また、難水溶性で適応範囲が限られるセブレロシドのハンドリングを向上させるため、水分散可能なリポソーム剤型で利用することを検討してきた。一般に、セブレロシドの含量が80%を超える組成比率でリポソームを調製することは困難であるとされているが、ヒトデ由来のセブレロシドを原料として用いることで、極めて高い含量であってもリポソームの調製が可能であることを明らかにしている (6)。セブレロシドのリポソーム化は食品領域への展開に道を拓くものであるが、ヒトデ由来のセブレロシドを食品として利用する場合、消化管吸収を含めた生体への影響を知ることが重要である。そのために我々は小腸上皮モデルのCaco-2細胞や線虫 *C. elegans* を用いた検討を展開している。

ヒトの結腸癌細胞からクローン化されたCaco-2細胞は、一般的な培養条件下で小腸上皮様細胞に分化する。腸管側と血漿側を区別する極性を持った細胞層を形成し、タイトジャンクションや各種のトランスポーターを発現するため、小腸における物質吸収などの腸管機能の検討に汎用的に用いられている (7)。

線虫 *C. elegans* は遺伝学・行動学・発生学・神経生理学などのモデルとして広く知られている生物である。世代交代が早く、一個体の寿命を比較的容易に観察することが可能なこともあり、寿命とそれに関する遺伝子の機能の探求など「生きた試験管」として線虫 *C. elegans* を用いることが出来る (8)。

これまでに我々はヒトデ由来セブレロシドをリポソームの状態で見せ、線虫が経口摂取でリポソームを取り込むことを観察した (6)。今回我々は、Caco-2細胞に対してヒトデ由来セブレロシドから調製したリポソーム(以下、ヒトデ由来GlcCer-Lipoと呼称)を作用させて細胞への取り込みを観察すると共に、このヒトデ由来GlcCer-Lipoを与えた線虫 *C. elegans* に行動変化が生じるか否かについて検討を行った。

2. 実験

1) ヒトデ由来 GlcCer-Lipo の調製

キヒトデから単離されたセブレロシド (GlcCer) とジパルミトイルホスファチジルグリセロールナトリウム (DPPG・Na) から、脂質膜組成比を GlcCer : DPPG=20 : 1 (w/w) とし、セブレロシドリポソーム (GlcCer-Lipo) をバンガム法によって調製した。ナシ型フラスコにエタノールに溶解した GlcCer と DPPG を加え入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去することで脂質フィルムを形成させた。このフラスコに 10%トレハロース (w/v) を加え入れ、ボルテックスミキサーで激しく振盪することで水和懸濁した。さらに、エクストルーダーを用いた加圧濾過により孔径 400 nm および 80 nm のポリカーボネート膜に順次通過させることでヒトデ由来 GlcCer-Lipo を整粒した。

2) ヒトデ由来 GlcCer-Lipo に対する蛍光標識

培養細胞による取込と蛍光顕微鏡観察の用途のために用いた GlcCer-Lipo は GlcCer : DPPG : GlcSphBODIPY =20 : 1 (20 : 1 : 0.05) の組成比率で蛍光標識し、1)と同様の方法でリポソームの調製を行った。

3) Caco-2 細胞によるヒトデ由来 GlcCer-Lipo の取込

Caco-2 細胞 (1x10⁵) をコラーゲンコートした φ 35 mm ディッシュに播種し、10% FBS 加 DMEM 培地中で2日間培養した。培地で希釈した蛍光標識ヒトデ由来 GlcCer-Lipo を GlcCer 濃度として 800 μg/mL で添加し、37°C、5% CO₂ インキュベーター下で経時的に共焦点蛍光顕微鏡 FV1000-D (Olympus) にて 12.5 μs/pixel、512×512 pixels、60×水深レンズ (NA1.20)、Excitation レーザー 488 nm スキャンレーザーパワー 1.0% で撮影を行った。

4) 線虫 *C. elegans* の維持および同調培養

線虫 *C. elegans* は野生型 N2 株を用いた。常法に従い NGM-Lite 寒天培地に大腸菌 OP50 株を塗布して線虫を維持した。これら線虫 *C. elegans* が成虫となり、寒天培地上で十分な数まで増殖した時を見計らい、培地表面を S-basal 緩衝液で洗うことによって寒天培地表面に生息する線虫 *C. elegans* を回収した。回収した線虫を 15 mL 遠心チューブに移し、200×g という弱い遠心力での遠心と上清交換を数度行うことによって線虫を洗浄した後、線虫に対して次亜塩素酸および水酸化ナトリウム処理を施すことで線虫の溶解処理を行った。この処理によって線虫は溶解・死滅するが、卵は溶解せずに生き残る。このようにして得られた卵を新たな NGM-Lite 寒天培地に移

し、維持することによって、発生段階が揃った線虫を同調培養することが出来る。このようにして調製した線虫を更なる実験に用いた。

5) ヒトデ由来 GlcCer-Lipo が線虫 *C. elegans* の行動に与える影響の観察

同調培養した線虫が成虫になった時を見計らって培地表面を M9 緩衝液で洗い、寒天培地表面に生息する線虫を回収した。これに対してヒトデ由来 GlcCer-Lipo (GlcCer : DPPG・Na=20 : 1 (w/w)) を GlcCer 終濃度 1.5 mg/mL となるように加え、その状態で 1 時間放置した。このような処理を施した線虫を寒天培地に移し、更に 1 時間放置した。1 時間後、この寒天培地から線虫を取り除き、寒天培地上に残された軌跡を撮影した後、Image J で計測することによって線虫の移動距離を算出した。この実験の対照として、ヒトデ由来 GlcCer-Lipo の代わりに分散媒である 10%トレハロースのみを加え、同様の処理を行った線虫を用いた。

3. 結果と考察

1) Caco-2 細胞に対するヒトデ由来 GlcCer-Lipo の取り込み

腸管モデル細胞である Caco-2 細胞に蛍光標識したヒトデ由来 GlcCer-Lipo を作用させ、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、作用直後 1 分間という極めて短時間で細胞質全体に蛍光が観察された (図 1)。作用後 10 分間あるいは 200 分間以降の時点でもほとんど変化は見られず、細胞室内全体に蛍光が観察され、ヒトデ由来 GlcCer-Lipo は非常に効率的に細胞内に導入されることが明らかとなった。

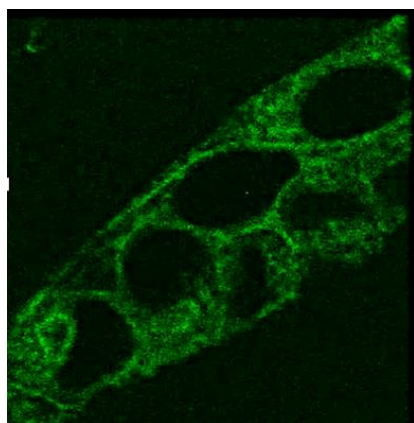


図 1 Caco-2 細胞によるヒトデ由来 GlcCer-Lipo 取込の蛍光顕微鏡解析像。緑色はリボソームマーカーとして加えた BODIPY の蛍光。

2) GlcCer-Lipo が線虫 *C. elegans* の行動に与える影響の観察

ヒトデ由来 GlcCer-Lipo を投与した線虫では、投与群・対照群ともに、10 匹の線虫に関して培地表面での移動距離を数値化した (表 1)。また、これらの結果について平均と標準偏差を算出し、グラフ化したものを図 2 に示す。これらの結果から、ヒトデ由来 GlcCer-Lipo 投与群と対照群の間で差異は無く、t 検定の結果からも有意差は認められなかった。以上のことから明らかなように、本検討の条件下ではリポソーム化したセブレロシドは線虫の行動に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

表 1. ヒトデ由来 GlcCer-Lipo を投与した線虫 *C. elegans* の移動量の測定結果

対照		GlcCer-Lipo	
No.	移動量 (mm)	No.	移動量 (mm)
C1	37.2	G1	52.8
C2	29.9	G2	4.9
C3	51.7	G3	41.4
C4	80.2	G4	46.5
C5	62.7	G5	57.3
C6	62.5	G6	42.4
C7	32.9	G7	55.2
C8	92.6	G8	85.4
C9	48.3	G9	78.2
C10	59.7	G10	104.8
対照群 平均	55.8	投与群 平均	56.9

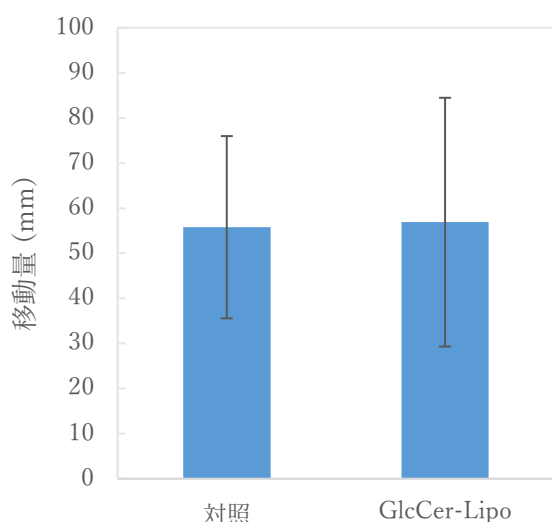


図2 ヒトデ由来 GlcCer-Lipo に曝露した線虫 *C. elegans* の移動量の測定結果に対する解析。エラーバーは標準偏差を表す。

先に述べたように、本研究では Caco-2 細胞に対してセレブロシドの終濃度 $800 \mu\text{g/mL}$ で実験を行った。結果には示していないが、Caco-2 細胞の場合、 $80 \sim 800 \mu\text{g/mL}$ の範囲で十分な細胞内取込を確認している。これに対して、今回、線虫に投与した終濃度 1.5 mg/mL は十分に高濃度である。線虫に投与する試薬の種類や濃度によっては線虫の行動が変化し、麻痺などの行動異常が起こる場合があり本来の目的を達成できない。本研究の結果、十分に高濃度のセレブロシドを投与しても線虫の行動に影響しないことが確認された。

我々はこれまでに、リポソーム化したセレブロシドが線虫に経口摂取され、線虫の体内に取り込まれることを示している (6)。これらのことを踏まえ、今回用いたヒトデ由来 GlcCer-Lipo 濃度をひとつの指標として、セレブロシドが生体に与える影響やそのメカニズムの解析を進めていきたいと考えている。

4. 引用文献

- [1] Du L, Li ZJ, Xu J, Wang JF, Xue Y, Xue CH, Takahashi K, Wang YM., The anti-tumor activities of cerebroside derived from sea cucumber *Acaudina molpadioides* and starfish *Asterias amurensis* *in vitro* and *in vivo*., *J Oleo Sci.*, **61**(6):321-30 (2012).
- [2] Jingjing Duan, Tatsuya Sugawara, Mayumi Hirose, Kazuhiko Aida, Shota Sakai, Aoi Fujii, Takashi Hirata, Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis, *Experimental Dermatology*, **21**, 448-452 (2012).

- [3] A. K. M. AzadShahl, M. Kinoshita, H. Kurihara, M. Ohnishi, K. Takahashi, Glycosylceramides Obtain from the Starfish *Asterias amurensis* Lütken, *Journal of Oleo Science*, **57**(9):477-84 (2008).
- [4] R. Yamaguchi, Y. Kanie, O. Kanie, Y. Shimizu, A unique structural distribution pattern discovered for the cerebroside from starfish *Asterias amurensis*, *Carbohydrate Research*, **473**:115-122 (2019).
- [5] 清水佳隆、島田真美、山口亮介：セレブロシドの製造方法及びセレブロシド精製キット、特願 2017-106924.
- [6] 山崎素未、笹川昇、清水佳隆：ヒトデ由来セレブロシドのリポソーム製剤化と線虫への投与、東海大学先進生命科学研究紀要, Vol. 4, 50-53 (2020).
- [7] van Breemen RB, Li Y., Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **1**(2):175-85 (2005).
- [8] 小原雄治：線虫：1000 細胞のシンフォニー、共立出版 (1997).

5. 本研究に関連する業績

【論文発表】

該当無し

【学会発表】

- 1) 宮下宙、千葉朋希、清水佳隆：ビタミンC 封入リポソームを経口投与したマウスにおける小腸パイエル板の遺伝子発現解析、第 93 回日本生化学会大会、2020 年.
- 2) 高橋祐太、清水佳隆：キヒトデ由来 GlcCer から調製されたリポソームのがん細胞による取り込みの評価、第 39 回日本糖質学会年会、2020 年 11 月.
- 3) 宮下宙、千葉朋希、清水佳隆：ビタミンC 封入リポソームの経口投与がパイエル板の遺伝子発現に及ぼす影響、第 39 回日本糖質学会年会、2020 年 11 月.

6. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただいた平山令明先生に感謝申し上げます。また、本研究の一部は東海大学先進生命研究所プロジェクトの資金援助により実施されたものであり、ここに記して感謝いたします。

ICR マウスによるヤーコンシロップのプレバイオティクスの評価

Assessment of the prebiotics potential of Yacon syrup in ICR mice

西川奈緒¹⁾、尾崎理菜子²⁾、小林結夏²⁾、田中志歩²⁾、村田達郎³⁾、松田靖³⁾、安田伸^{4,5)}、黒田泰弘^{1, 2, 5)}

¹⁾ 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾ 東海大学工学部生命化学科、³⁾ 東海大学農学部応用植物科学科、

⁴⁾ 東海大学農学部バイオサイエンス学科、⁵⁾ 東海大学先進生命科学研究所

Nao Nishikawa ¹⁾, Rinako Ozaki ²⁾, Yuika Kobayashi ²⁾, Shiho Tanaka ²⁾, Tatsuro Murata ³⁾, Yasushi Matsuda³⁾, Shin Yasuda ^{4,5)} and

Yasuhiro Kuroda ^{1,2,5)}

¹⁾ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University

²⁾ Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

³⁾ Department of Plant Science, School of Agriculture, Tokai University

⁴⁾ Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University

⁵⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

フラクトオリゴ糖はスクロース分子のフラクトースにフラクトースが β 2,1グリコシド結合した多糖類であり、腸内細菌によって資化され整腸作用など多くの機能性を有することから、特定保健用食品に指定されている。これまでに我々は、フラクトオリゴ糖を含む植物であるヤーコンの塊根を原料としたヤーコンシロップを作製し、収穫直後のヤーコンから作製したシロップにはフラクトオリゴ糖が高濃度に含まれていることを明らかにした。本研究では、ヤーコンシロップのプレバイオティクス効果を評価するために、シロップを経口投与したマウスの各種生体試料を分析した。その結果、ヤーコンシロップは腸管内において選択的な酪酸の産生を誘導し、食餌中のカルシウム吸収を促進することが明らかになった。またシロップ摂取群において糞便中のIgA量が増加する傾向を示したことから、本研究で用いたヤーコンシロップは粘膜免疫系の活性化を有することが示唆された。

[Abstract]

Fructooligosaccharides are polysaccharide that fructose residues bound to sucrose through beta2-1 bonds, and are particularly useful as prebiotics such as population change in the intestinal microbiota. We have shown that yacon syrup prepared from yacon tuberous roots immediately after harvest contains a large amount of fructooligosaccharides. In order to assess the prebiotic effect of yacon syrup, we analyzed the various biological samples of mice orally administered with syrup. We revealed that yacon syrup induced selective production of butyric acid in colon tract, and promoted the absorption effect of calcium in the diet. In addition, fecal IgA in the syrup intake group tended to increase, suggesting that yacon syrup has activation of mucosal immune system.

[Key Words]

Yacon syrup, Fructooligosaccharides, Short-chain fatty acid, Prebiotics

1. はじめに

ヤーコンは南米アンデス高地原産のキク科の多年生草本であり、多品種のヤーコンが日本各地で栽培されている。ヤーコンの塊根にはフラクトオリゴ糖やフェノール性化合物などの生理機能を有する機能性成分が含まれて

おり、健康食品としても注目されている[1]。これまでに我々は、ヤーコン塊根に含まれるフラクトオリゴ糖を効率良く摂取するために、フラクトオリゴ糖高含有ヤーコンシロップの製造法を検討し、収穫直後のSY206品種から作製したシロップが最もフラクトオリゴ糖を含んでい

ることを明らかにした。フラクトオリゴ糖とはキク科植物に多く含まれる難消化性糖質であり、スクロース分子のフラクトースにフラクトースが β 2,1 グリコシド結合したイヌリン型のフルクタンである[2,3]。フラクトオリゴ糖の中でも 1-ケーストースとニストースは *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属など特定の腸内細菌によって選択的に資化されることにより[4,5]、結腸腫瘍の抑制作用、カルシウムやマグネシウムなどのミネラル吸収促進作用、パイエル板における IgA 産生促進作用、血清インスリン濃度の減少などの生理機能を有することが報告されている[6,7,8,9]。また最近では、腸内細菌の代謝産物である酪酸が制御性 T 細胞への分化を誘導しマウスにおける大腸炎の発症を抑制するメカニズムが明らかにされた[10]。これらの報告は、フラクトオリゴ糖が腸内細菌による短鎖脂肪酸の産生を促進することで生体に対して様々な生理機能を発揮させる可能性を示している。

そこで本研究では、フラクトオリゴ糖高含有ヤーコンシロップを ICR マウスに経口投与し、糞便や盲腸内容物などの生体試料に含まれる標的成分を分析することで、シロップ摂取による生体への機能性を評価した。

2. 結果の概要

1) 糞便および盲腸内容物中に含まれる短鎖脂肪酸量と水分量の測定

5 週齢 ICR マウス(各群 n=5,6)に品種 SY206 から作製したヤーコンシロップ(グルコール換算:1.14g/kg)を 1 日 1 回経口投与し、4 週間後に糞便および盲腸内容物を個体ごとに採取した。糞便と盲腸内容物を超純水でホモジナイズし、その遠心上清中の脂肪酸を 2-ニトロフェニルヒドラジンで標識した。長鎖脂肪酸を除去した後、短鎖脂肪酸をジエチルエーテルで抽出精製し、乾燥後にメタノールで溶解し ODS カラム(Wakosil-II 3C18 HG)を使用した逆相 HPLC で定量分析した(移動相:アセトニトリル/メタノール/水(25/10/65,v/v/v), pH5 adjusted by HCl, 流速:0.8mL/min)。その結果、糞便についてはコントロール群と比較してシロップ投与群の糞便 1g あたりの酪酸含有量が有意に増加していた(Fig.1)が、盲腸内容物については各短鎖脂肪酸の含有量に変化がみられなかった(date not shown)。また糞便と盲腸内容物中の短鎖脂肪酸の総含有量を比較した結果、コントロール群、シロップ投与群ともに盲腸内容物の方が有意に増加していた(Fig.2)。

次に採取した糞便および盲腸内容物の凍結乾燥前後の重量を測定して水分率を算出した結果、糞便が 62.9%、

盲腸内容物が 80.5%と盲腸内容物の方が有意に増加していた(p<0.01)。

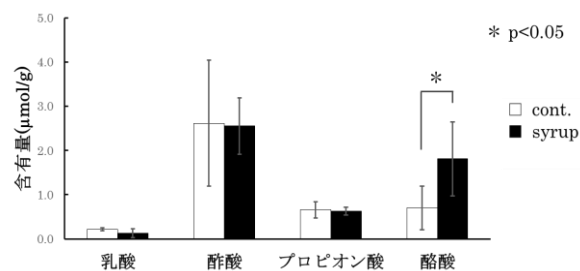


Fig.1.糞便中の各短鎖脂肪酸含有量

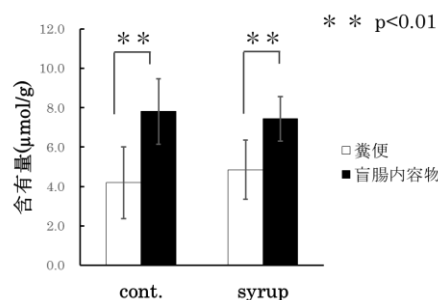


Fig.2.糞便および盲腸内容物の短鎖脂肪酸総含有量

2) 糞便 pH 測定と糞便、尿および血清中カルシウム濃度測定

5 週齢 ICR マウス(各群 n=5,6)に品種 SY206 から作製したヤーコンシロップ(グルコール換算:1.14g/kg)を 1 日 1 回経口投与し、さらに飼料 100g 中に 1.07g のカルシウムを含む飼料を自由摂取させた。4 週間後に糞便、尿、血清を個体ごとに採取した。糞便ホモジナイズ上清、尿および血清中のカルシウム濃度をクロロホスホナヅⅢとのキレート錯体形成による比色定量法で測定した結果、糞便および尿中カルシウム濃度はコントロール群と比較してシロップ投与群のほうが有意に低下していた。一方、血清についてはカルシウム濃度に変化がみられなかった(Fig.3)。

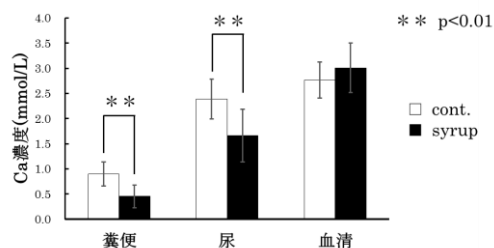


Fig.3.糞便、尿および血清中カルシウム濃度

さらに糞便ホモジナイズ上清の水素イオン濃度(pH)をコンパクト pH メータにて測定した結果、コントロール群と比較してシロップ投与群の pH が有意に低下していた(Fig.4)。

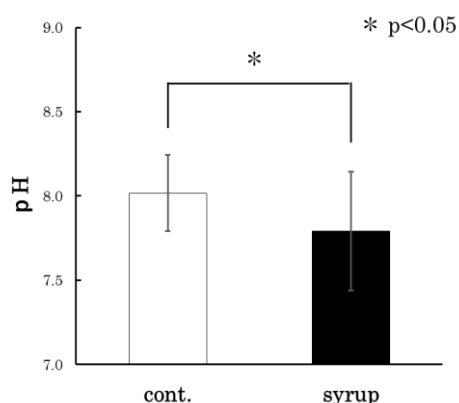


Fig.4.糞便上清 pH

3) 糞便および盲腸内容物中 IgA 量測定

5 週齢 ICR マウス(各群 n=5,6)に品種 SY206 から作製したヤーコンシロップ(グルコース換算: 1.14g/kg)を 1 日 1 回経口投与し、4 週間後に糞便および盲腸内容物を個体ごとに採取した。糞便と盲腸内容物を超純水でホモジナイズし、その遠心上清(5×10^3 dil.)を用い ELISA 法により IgA 量を測定した。その結果、糞便と盲腸内容物ともにコントロール群と比較してシロップ投与群の IgA 量は増加傾向を示した(data not shown)。

3. 考察

糞便と盲腸内容物中の各種短鎖脂肪酸を定量分析した結果、糞便中の酪酸含有量が有意に増加していたことから、ヤーコンシロップが大腸内の酪酸を産生する腸内細菌の増殖もしくは代謝を選択的に促進している可能性が示唆された(Fig.1)。また、糞便と盲腸内容物の 1g あたりの短鎖脂肪酸総含有量を比較すると、コントロール群、シロップ投与群ともに盲腸内容物の短鎖脂肪酸総含有量が有意に増加していた(Fig.2)。この原因として短鎖脂肪酸の溶解性が関係していると考え、次に糞便と盲腸内容物の水分率を測定し、比較した。その結果、両群において盲腸内容物の水分率の方が糞便よりも有意に高い値を示した。したがって、水溶性である短鎖脂肪酸は水分率の高い盲腸内容物に溶解しやすいため、糞便よりも盲腸内容物に多く含まれていたと考えられた。

糞便と尿のカルシウム濃度についてコントロール群とシロップ投与群を比較すると、ともにシロップ投与群のほうが有意に低下していた(Fig.3)。さらに糞便ホモジ

イズ上清の pH を測定した結果、コントロール群と比較してシロップ投与群では有意に低下していた(Fig.4)。これらの結果は、ヤーコンシロップの摂取により大腸内の総脂肪酸量が増加することで pH が低下し、それによりカルシウムの溶解性が高まり、吸収が促進されたことを示唆している。また血清のカルシウム濃度はシロップ投与の有無に関係なく一定であった。これは生体の恒常性によるものであると考えられる。今後、カルシウムの骨形成や骨吸収も測定する必要がある。

糞便と盲腸内容物中の IgA 量を測定した結果、ともにコントロール群と比較してシロップ投与群の IgA 量は増加傾向を示したことから、ヤーコンシロップは腸管免疫系に作用して分泌型 IgA の産生を促進していると考えられた。すなわち、シロップに含まれるフラクトオリゴ糖をエネルギー源として大腸内の特定の細菌によって産生された酪酸が大腸から吸収され、血中に移行し小腸や大腸内のリンパ組織の免疫細胞を活性化することで分泌型 IgA の産生量が増加したと考えられる。これはヤーコンシロップが腸内細菌を介して粘膜免疫系の活性化能を有していることを示唆している。

今後はパイエル板や腸間膜リンパ節など腸管免疫への影響を解析することで、ヤーコンシロップが粘膜免疫系に及ぼすプレバイオティクス効果を評価する予定である。

4. 参考文献

- [1] Campos D. *et al.*, *Food Chemistry*, **135**, 1592-1599, (2012)
- [2] Goto K. *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2346-2347, (1995)
- [3] Campbell J. M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3076-3082 (1997)
- [4] Hidaka H. *et al.*, *Bifidobacteria and Microflora*, **5**, 37-50 (1986)
- [5] Kaplan H. *et al.*, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **69**, 2217-2222 (2003)
- [6] Pierre F. *et al.*, *Cancer Res.*, **57**, 225-228 (1997)
- [7] Ohta A. *et al.*, *J. Nutr.*, **125**, 2417-2424 (1995)
- [8] Hosono A. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 758-764 (2003)
- [9] Tochio T. *et al.*, *PLoS One*, **11**, e0166850 (2016)
- [10] Furusawa Y *et al.*, *Nature*, **504**, 446-450, (2013)

5. 謝辞

本稿を書く機会を与えていただいた平山令明先生

に感謝申し上げます。

6. その他の業績

【学会等発表】

- 1) 西川奈緒、尾崎理菜子、小林結夏、松田靖、村田達郎、安田伸、黒田泰弘：ヤーコンシロップ投与マウスの糞便および盲腸内容物に含まれる短鎖脂肪酸の定量分析 第 93 回 日本生化学会大会、2020.9 横浜

メソポーラスシリカナノ粒子を担持させたナノファイバーの創製とにおい分子包接能

Fabrication of Nanofibers Carrying Mesoporous Silica Nanoparticles and Inclusion Ability of Odor Molecules

浅羽 建汰¹⁾、坪井 亮¹⁾、伊藤 早也香¹⁾、小倉 正¹⁾、樋口 昌史¹⁻³⁾、伊藤 建^{3,4)}、小口 真一^{3,4)}、岡村 陽介^{1-3)*}

¹⁾ 東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻、²⁾ 東海大学工学部応用化学科、

³⁾ 東海大学先進生命科学研究科・化粧品部門、⁴⁾ 東海大学理学部化学科

Kenta Asaba¹⁾, Ryo Tsuboi¹⁾, Sayaka Ito¹⁾, Masashi Ogura¹⁾, Masashi Higuchi¹⁻³⁾, Takeru Ito^{3,4)}, Shinichi Koguchi^{3,4)},
and Yosuke Okamura^{1-3)*}

¹⁾ Course of Applied Science, Graduate School of Engineering, Tokai University, ²⁾ Department of Applied Chemistry, School of Engineering, Tokai University, ³⁾ Division of Cosmetic Science, Institute of Advanced Biosciences, Tokai University, ⁴⁾ Department of Chemistry, School of Science, Tokai University

[要旨]

本研究では、メソポーラスシリカナノ粒子を担持したポリビニルアルコール (PVA) からなるナノファイバーを調製し、におい分子包接能を検証した。PVA 水溶液の電界紡糸・架橋操作を経て、350 nm 程度の繊維径をもつナノファイバーを調製した。得られた PVA ナノファイバー表面にメソポーラスシリカナノ粒子を担持させた。におい分子モデルとして *trans*-2-ノネナールを選定しその包接能を評価したところ、PVA ナノファイバー単独でも *trans*-2-ノネナールを十分吸着できることが明らかになったが、メソポーラスシリカ粒子を担持させた効果は発揮されなかった。

[Abstract]

We herein propose electrospun nanofibers composed of poly(vinyl alcohol) carrying mesoporous silica nanoparticles and evaluate their inclusion ability of odor molecules. In fact, mesoporous silica nanoparticles were adsorbed to the surface of the cross-linked nanofibers with diameter of *ca.* 350 nm. In case of control (nanofibers without mesoporous silica nanoparticles), their inclusion ability of *trans*-2-nonenal, which is an odor molecule model, was sufficient. Unfortunately, the ability was inhibited by introduction of mesoporous silica nanoparticles to the cross-linked nanofibers.

[Key Words]

nanofiber, mesoporous silica nanoparticle, odor molecules, *trans*-2- nonenal

1. はじめに

におい分子は揮発性の低分子有機化合物であり、世の中には数十万種存在する^[1]。嗅覚受容体が発見されて以来、これまで数多くの受容体が同定されている^[2]。嗅覚が退化しているヒトでも約 1 万種のにおい分子を嗅ぎ分けられるとされ^[3]、その濃度が pM-nM レベルであっても嗅覚受容体を介して高感度に検知される^[3]。従って、においがそのヒトの第一印象を決定するといっても過言ではない。最近、体臭などの不快なにおいを消し、好みの香りを皮膚につけて個性を演出する消臭剤が市場を賑わしている。具体的には、加齢臭や汗臭 (*trans*-2-ノネナール、脂肪酸化合物) を標的とし、物理吸着法 (環状オリゴ糖^[4]、多孔質無機材料^[5])、化学吸着法 (金属微粒子^[6])、生物学的手法 (抗菌性銀ナノ粒子^[7]等) にて消臭する。しかし、いずれ

東海大学先進生命科学研究科紀要 第 5 巻 2021 年 3 月

も液状・粉末状であり皮膚に塗布したり噴霧する用法のため、有効成分は汗等で流れてしまうほか、におい分子は揮発性のため消臭・芳香能の持続性が不足している課題が残されている。最近、加齢臭 (*trans*-2-ノネナール) の発生部位はうなじ・額・上腕部に限定されていることが報告され^[8]、全身に消臭剤を施す必要はないと考えられる。

電界紡糸法によって紡糸される高分子ナノファイバーは調製法が簡便であり、繊維の細さ故の高い比表面積を活かした環境・医療分野への応用が期待されている^[9]。他方、メソポーラスシリカナノ粒子は、二酸化ケイ素からなる均一なメソ孔 (2-50 nm) を有する粒子であり、同じく高い比表面積を有していることから、ガスやイオンの吸着が可能な材料として注目されている^[10]。

本研究では、メソポーラスシリカナノ粒子を担持したポリビニルアルコール (PVA) からなるナノファイバーを調製し、におい分子包接能を付与した新規消臭剤としての可能性を検証することを目的とした。

2. 結果の概要

1) メソポーラスシリカナノ粒子の合成

既報^[10, 11]に倣い、有機テンプレートとしてドデシルアミン (DDA) をエタノール (EtOH) に溶解させた後、蒸留水 (H₂O) を加えて攪拌した。この溶液にシリカ原料であるオルトケイ酸テトラプロピル (TPOS) を添加して攪拌し反応させた (25°C, 18 h)。この時、モル比は TPOS : DDA : EtOH : H₂O = 1 : 0.8 : 130 : 120 とした。合成後、遠心分離にて沈殿物を回収し乾燥させた (60°C, 24 h)。得られた合成物を焼成 (700°C, 5 h) した。得られたメソポーラスシリカナノ粒子を走型査電子顕微鏡 (FE-SEM S-4800, 日立ハイテクノロジーズ社製) にて観察したところ、粒子径 270 ± 48 nm の球状粒子であることを確認した (図 1 (a))。

2) メソポーラスシリカナノ粒子担持 PVA ナノファイバーの調製

シリコンウェハ (30 × 30 mm²) 上に犠牲膜となる水溶液を滴下後、スピンコーター (MS-A 100, ミカサ社製) を用いてスピンコート (4000 rpm, 60 s) した。電界紡糸法 (NANON-03, メック社製) を用いた。PVA 水溶液 (重合度: 1500, 10 wt%) をシリンジ (ノズル径 27G) に注入し、上述したシリコンウェハをターゲットとして 1 分間紡糸した (ノズル-ターゲット間距離: 200 mm, 溶液送り速度 1.0 mL/h, 印加電圧 30 kV)。得られた PVA ナノファイバーを熱プレス機 (AH-2003, アズワン社製) を用いて熱プレス (80°C, 40 MPa, 5 min) した。次いで、プラスチック容器に PVA ナノファイバーを入れた後、直接触れないようにグルタルアルデヒド水溶液 (25%, 350 μ L, 酸性雰囲気下) を静置して密閉し、気相中で架橋 (r.t., 24 h) し、PVA ナノファイバーを不溶化させた。1) で得たメソポーラスシリカナノ粒子のメタノール分散液 (2.5 mg/mL, 10 mL, 酸性条件下) を遠心分離 (1000 rpm, 10 min) した後、その上清 (0.6 mL) をナノファイバー上に滴下、ホットプレート上 (60°C) で溶液を瞬時に除去した。その後、蒸留水中にてナノファイバーを剥離した後、0.1 M グリシン水溶液で 2 時間洗浄して、残存するアルデヒド基を失活させた。

得られた PVA ナノファイバーを水中に浸漬させたところ、基板と同サイズで透明性の高いファイバーが回収で

きたことから、グルタルアルデヒドによる架橋は十分であり、不溶化に成功したといえる。また、電子顕微鏡観察したところ、ファイバー径は約 350 nm と算出され、メソポーラスシリカナノ粒子はファイバーに確実に吸着していた (図 1 (b))。

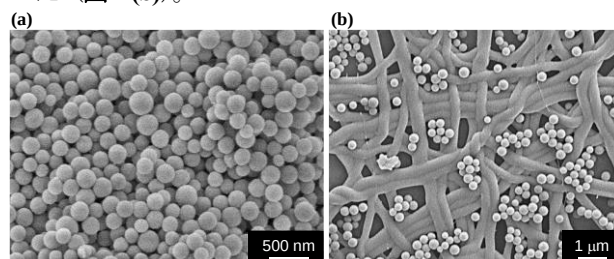


図 1 (a) メソポーラスシリカナノ粒子の電子顕微鏡写真、(b) 電界紡糸法にて調製したメソポーラスシリカナノ粒子担持 PVA ナノファイバーの電子顕微鏡写真。

3) におい分子包接能評価

trans-2-ノネナールをにおい分子モデルとした。2) で得たナノファイバーを、*trans*-2-ノネナール (200 μ L) と共に密閉容器中に密封し、静置 (r.t., 2 h) した。次いで、ナノファイバーを重水素化ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆, 700 μ L) に浸漬させて *trans*-2-ノネナールを抽出した後、内部標準としてベンジルアルコール (10% in DMSO-*d*₆, 10 μ L) を加え、核磁気共鳴分析 (¹H-NMR, AVANCE 500, ブルカー社製) に供した。

9.5 ppm 付近に *trans*-2-ノネナール由来の 1 位プロトンのピークが確認された。そこで、内部標準であるベンジルアルコール由来のメチレン基のプロトン (4.5 ppm 付近) との積分値の比から、ナノファイバーの単位重量当たりに対する *trans*-2-ノネナールの吸着量を算出した。その結果、PVA ナノファイバー (メソポーラスシリカナノ粒子未担持体) では 189.6 ± 68.8 nmol/mg となり、*trans*-2-ノネナールを十分吸着していた。他方、メソポーラスシリカナノ粒子を担持させた PVA ナノファイバーでは 89.6 ± 54.2 nmol/mg となり、残念ながらメソポーラスシリカナノ粒子未担持体を下回った。今回、シリカナノ粒子の高い比表面積を利用することで物理吸着能を向上させることを期待したものの、メソ孔は親水性であり、疎水性の *trans*-2-ノネナールとの相性が悪く阻害されたものと考えられる。

3. 展望

メソポーラスシリカナノ粒子を担持させた PVA ナノファイバーの調製に成功した。PVA ナノファイバー単独でも *trans*-2-ノネナールを十分吸着できることが明らかになったが、残念ながらメソポーラスシリカ粒子を担持させた効果は発揮されなかった。今後、シリカ粒子の表面

修飾を施し、効率的にメソ孔を活用する新たな戦略を進める計画である。

4. 引用文献

- [1] 東原 和成. 現代化学 **9**, 23 (2014).
- [2] Touhara, K. *et al. Neuroscience* **254**, 45 (2013).
- [3] Kaupp, U.B. *et al. Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188 (2010).
- [4] Lopodota, A. *et al. Int. J. Cosmet. Sci.* **37**, 438 (2015).
- [5] Mumpton, F.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 463 (1999).
- [6] Baxter, P.M. *et al. Int. J. Cosmet. Sci.* **5**, 85 (1983).
- [7] Nakane, T. *et al. Int. J. Cosmet. Sci.* **28**, 299 (2006).
- [8] K. Kimura *et al. J. Chromatogr. B.* **1028**, 181 (2016).
- [9] S. Thakkar *et al. Eur. J. Pharm. Sci.* **107**, 148 (2017).
- [10] 白鳥 裕子他. *J. Ceram. Soc. Jpn.* **110**, 304 (2002).
- [11] S. Kroekkiat 他. 東海大学先進生命科学研究所紀要 **2**, 59 (2018).

5. その他の業績

【学会等発表】

- 1) 浅羽 建汰, 坪井 亮, K. Sitthirat, 伊藤 早也香, 樋口 昌史, 岡村 陽介. 皮膚貼付型ナノファイバーの創製とにおい分子包接特性. 第 69 回高分子学会年次大会 (2020.5.27-29, 福岡国際会議場, 予稿集発行)

6. 謝辞

本研究の一部は、先進生命科学研究所の助成（課題番号：2016-C1）、日本学術振興会科学研究費基盤研究(C) (17K01392)により行われた。記して謝意を表する。

東海大学

先進生命科学研究所 紀要編集委員会

委員長	平山 令明	先進生命科学研究所	教授
委員	齋藤 寛	先進生命科学研究所	教授
委員	岡村 陽介	先進生命科学研究所	教授

本紀要の全ての掲載情報は、著作権者の許諾なしに、著作物の全部または一部を無断で複写複製（コピー）することは、著作権法上での例外を除き、禁じられています。

東海大学先進生命科学研究所紀要

2021 年 3 月 31 日 発行

発行者 東海大学先進生命科学研究所

住所 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

電話 0463-58-1211（代表）
