

ま え が き

食品総合研究所は、食料自給率の向上、地域農業・食品産業の活性化、健康的で安全・安心な食生活の維持・増進、食品廃棄物の減少と環境負荷低減など、わが国の抱えている問題解決のための研究に精力を傾けている。具体的には、革新的な食品製造技術の開発、食品機能性成分の分子レベルでの作用機構の解明、偽装表示防止のための判別・検知技術の開発、有害生物・化学物質の検出・制御技術の開発のための研究を行っている。

食品に係る技術のほとんどは基礎的な研究成果や既存の先端技術の組み合わせにより成り立っており、食品研究は華々しい先端科学技術そのものではない地味な研究分野である。しかし、技術革新の必要性は他産業分野と変わりはなく、絶えざる技術開発が求められている。そのためには、最新の科学知識と技術を取り入れることを怠ってはならない。食品研究の大きな助けとなるのが、進展著しいバイオテクノロジーであり、食品総合研究所における研究にも最新のバイオテクノロジーの成果が活用されている。

例えば、食品総合研究所は、最新の DNA 解析技術を活用することにより、遺伝子組換え農産物の検出・定量技術や農産物の品種判別技術を確立した。開発した技術は農林水産消費安全技術センターなどの検査機関に移転され、検査に必要な試薬は企業からキットとして市販されている。それ以外にも、味の認識機構、食品成分の体内動態や分子認識、有用物質の生産技術、有害微生物・物質の迅速検出などに係る研究において、バイオテクノロジー・ライフサイエンスを活用した多くの成果をあげている。

食糧 48 号では、バイオテクノロジーを活用したトピックス的な研究について解説する。食品に係る研究者や技術者だけでなく、食に関心をお持ちの多くの方々にも広く活用して戴くとともに、現在の食総研の活動について少しでもご理解戴ければ幸いである。

平成 22 年 3 月

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
所 長 林 徹

I 味を受け取る仕組みに関わる分子の同定とその利用による味評価系の開発

1. はじめに

食事はヒトの生命活動に必要な栄養素を摂取するために必要不可欠なものであるが、それだけに留まらず、精神的充足感をもたらすなど生活の質を決定づける要因の一つでもある。また、「味」は本来、口腔内に含んだものが摂取すべき物か否かを判断するために存在しているが、基本的に食べられるものだけが手に入る現代においては、食品の消費の鍵を握る嗜好性を司る重要な要因として位置づけられている。そこで、嗜好性の高い食品を開発するために人工甘味料を始めとする新規味物質の開発や、どのような食品成分の組み合わせが嗜好性を高める味を創出するかについての研究開発が長年行われてきた。これらの過程で味を評価する方法の主流はヒトの感覚を用いた官能評価である。官能評価はヒトの嗜好性を加味して食品丸ごとを評価できる優れた方法であるが、人を媒介として用いるため、必要とする人材や試料の確保などに問題点がある方法でもある。そこで、筆者らは官能評価法を補完する味の評価法の創出を目的として、人が味を受容する分子的な仕組みを培養細胞に再現することにより味を評価する方法を開発し、その利用による新規味物質探索を試みた。具体的には、独自に味覚 DNA チップを開発して味を受け取る器官である味蕾に発現する遺伝子の網羅的取得の試み、および甘味・うま味受容体発現細胞の作製とその利用による味覚増強物質探索を行ったので、その概要を紹介する。

2. 「味」とは何なのか？

味の話の誤解のないようにするのは難しい。その原因の一つは、味の話に関わる言葉の定義がまちまちであることである。そこで、まず、味覚研究で使用される言葉の定義と一般の認識の差について紹介したい。

2.1 「味」、「味覚」言葉の定義について

「味覚」といえばもちろん五感の中の一つを示す感覚である、という定義は科学に携わる方々でなくとも理解できると思われる。しかしながら、「視覚」「嗅覚」など他の感覚と異なり、「味覚」は科学用語の範疇を超えて使用されている。例えば「味覚の秋」「味覚狩り」「郷土の味覚」などで「美味しい農産物」「おいしさ」を指す言葉として利用されているのを頻繁に目にするのではないだろうか。一方、私たちが普段「味」という言葉を使うのは食べ物や飲み物を口の中に入れた時の印象であることが多いのではないかと推察する。例えば「味見」とは読んで字のごとく、口に入れた食品の質を味覚を使って評価しているかと思っている方が多いかと

思われる。しかし、味見をする時に使っている感覚は味覚だけではない。私たちが口に食べ物を入れると味（味覚）、香り（嗅覚）、食感（触覚）、温度（触覚）など様々な感覚がほぼ同時に生じてくる。つまり、私たちが口に入れた食品の質を吟味している時には味覚以外の感覚からの情報が既に入っている、あるいは混在している状態にあり、純粹に味覚からの情報だけを感じている状況はほとんど皆無である。味を扱う研究者、食品開発者はこのような背景を踏まえて語句を使用していく必要があるだろう。

2.2 定義づけられている味「基本味」

「味」に関して科学的にきちんと定義づけされているのが「基本味」である。基本味の概念は「赤」「青」「緑」の組み合わせで色を作り出せるように、味についても特定の要素を混ぜるだけで全ての味を作り出せないかという試みから産まれた定義づけである。基本味は、味蕾という舌を中心とする口腔内にある味を受容する器官によって受容され互いに明確に区別できる味と定義付けされている。この定義に合致するのは現在のところ、甘味、苦味、酸味、塩味、うま味の5つの味である。その他の「味」例えば辛味は、他の味とは明確に区別される味ではあるが、味細胞を介さず味蕾の近傍にある神経の自由終末によって受容されるため基本味ではない。また、うま味の取り扱いには注意を要する。うま味は基本味として1980年頃から国際的に認識され始めた最後の基本味であり、学術用語で「umami」と表記される。umamiの定義は「グルタミン酸が呈し、イノシン酸、グアニル酸などの核酸で増強される味」であり、その他の味を含んでいないがこのことは意外に知られていない。一方、食品添加物を扱う方々の指し示す「旨味」には貝の味であるコハク酸などの有機酸などを始めとする「おいしさ」を呈する味一般が含まれることが多い。このように、使用する人により幅がある原因は「うま味」という言葉は元々「うまい味」すなわち嗜好性を意味する言葉であるため、日本人は学術的な「umami」と嗜好性の表現である「旨味」を混同して使用していることにある。また、グルタミン酸が呈する味「うま味」と、コハク酸を始めとする嗜好性の高い物質の「旨味」にどのような相関があるかについては、科学的にはほとんど解明されていないのが現状である。基本味の受容体については塩味以外は明らかになってきており、うま味についても受容体T1r1/T1r3がグルタミン酸を中心とするアミノ酸を受容し、その応答はイノシン酸やグアニル酸により増強されることからうま味受容体であるとされている¹⁾。このような分子レベルの研究を取り入れるならば、単に「うま味」というよりは受容体「T1r1/T1r3を介する味」のように受容体分子の種類で味を分類する方が厳密な定義付けを可能にするかもしれない。

基本味以外の味としては、「辛味」以外には「えぐ味」、「渋味」などの味がある。また、「こく」など人によって認識が異なる味や「厚み」「広がり」「えもいえない

おいしさ」など、「風味」とも言われ「味」であるかどうかが明確でない要素も存在している。本稿では、基本味の発生する仕組みを中心に話を進めるが、基本味以外の味受容についても分子レベルでの研究が進んでおり、辛味など味質によっては本稿で紹介する様な細胞を用いた味の評価法を展開することが可能である。

2.3 味物質が味として認識されるまでの道筋

さて、味物質と味覚受容機構の話始める前に、まず味物質が口腔内に入ってから味として認識されるにいたるまでの経路について紹介をしたい。食べ物の中の味を呈する物質、味物質は舌を中心とする口腔内に点在する味蕾という器官の中の味細胞に結合する（図1, 2）。味蕾は数十個の細長い味細胞と球状の基底細胞から構成される。味細胞はその組織学的形状から3種類に分類され、さらに甘味を受容する細胞、苦味を受容する細胞というように味感受性により細分化される。味細胞には味覚受容体が存在し、味物質と結合するとその情報が細胞内に伝達されて細胞が興奮し、味神経に味を受容した信号が伝えられるというのが、味覚受容伝達機構の初期段階である。その後、味神経に伝えられた情報は次々と神経間に伝達され、大脳の味覚野で味と認識される（図2）。その伝達経路の過程で味質間、嗅覚など他の感覚などとの相互作用が起こり、最終的な脳における味としての認識へと至る。

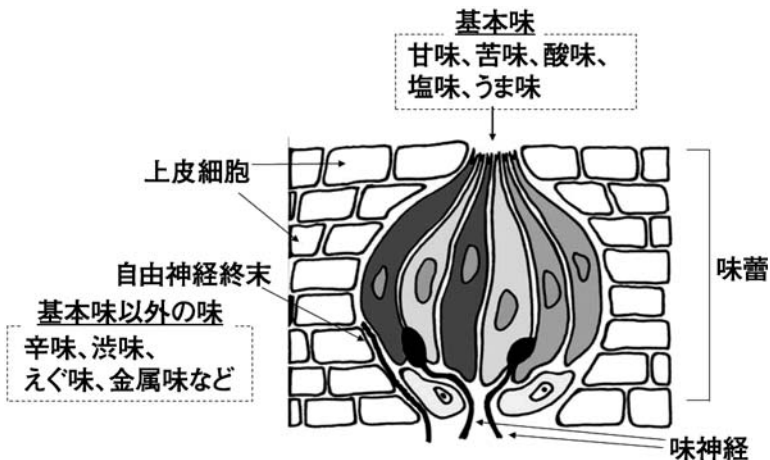


図1 味を受容する器官である味蕾の模式図

基本味は味蕾の頭頂部にある味孔で受容される。味神経は味蕾を構成する味細胞とシナプス結合して味細胞からの情報を伝達するが、自由神経終末はそれ自体が刺激を受容する。

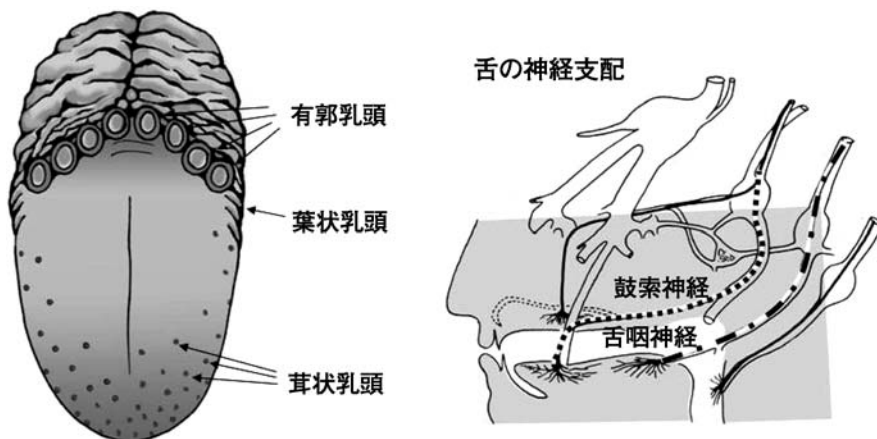


図 2 舌と舌の神経支配の模式図

味蕾は舌の有郭、葉状、茸状乳頭中に存在する。また、舌の基部（有郭乳頭、葉状乳頭）は舌咽神経に支配され、先端（茸状乳頭）は鼓索神経に支配されている。これらの神経を介して味覚情報は孤束核を経由し、大脳の味覚野に伝達される。

3. なぜ分子を利用した味の評価法が必要なのか

味を受け取る仕組みが研究される以前から、新しい味物質は食経験や偶然から発見されてきた。食経験を元に同定された味物質として代表的なのはうま味物質グルタミン酸ナトリウムである。グルタミン酸ナトリウムは今から約 100 年前、東京大学の池田菊苗博士が、湯豆腐の出汁の美味しさの原因物質を同定したいと考え、約 30 kg もの昆布の出汁から「うま味物質」として見出した。同様の手法を用いて、その後、鰹節からうま味を引き立てるイノシン酸が見出されている。これらのうま味関連物質と同様に甘味物質も見出されている。低カロリー飲料に使用されているステビオシドはステビアという植物から抽出することにより見出されたものである。一方、近年よく使用されているアスパルテーム、アセサルファム K などの人工甘味料は、実験中に指を舐めたなど偶然によって発見されている。

以上の味物質の発見は食経験であれ偶然であれ、実際に口に入れて味を評価することだけで、物質の選抜を行っていることになる。その一方で、医薬品開発など生体を制御する物質の探索は作用点となる分子機構の解明とその利用により大規模に展開されている。そこで、筆者らは味物質の開発も医薬品開発のような方法を取れないかと考えた。医薬品開発では、ある特定の生理現象を制御することを目的に、しばしば、その現象を担う分子を標的に物質開発が行われる（図 3）。その中で、対象とする現象が起こる分子機構をまず明らかにし、標的とする分子

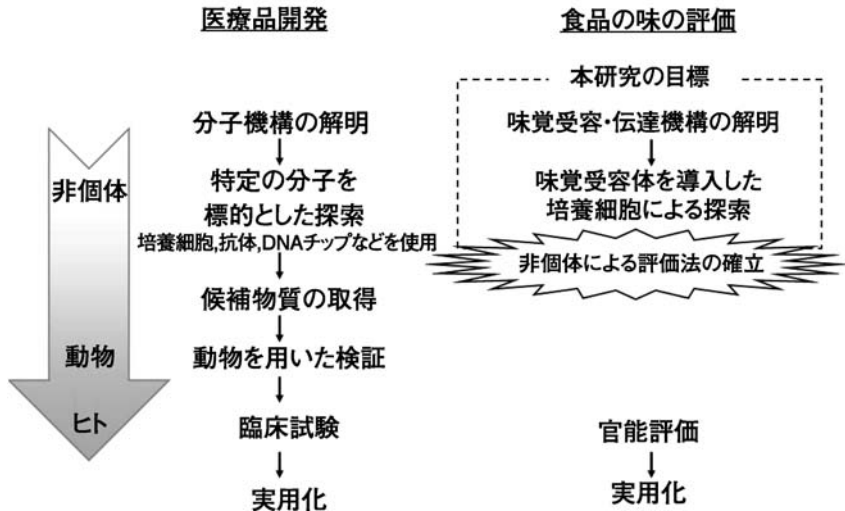


図 3 味覚受容・伝達機構を利用した食品の呈味性評価系の概念図
物質探索を例にとり、筆者らが目指した医薬品開発の方法を応用した食品の味の評価系開発の概略を示した。

を設定し、その分子に作用する物質を培養細胞や抗体、DNAチップなどのツールを用いて探索するのが、開発の第一段階、すなわち候補物質の絞り込みである。候補物質はその後、マウスなどの動物を用いた検討、最終的にはヒトによる臨床試験を経て実用化への運びとなる。一方、官能評価を主流とする味物質評価をこのスキームに当てはめてみるとどうであろう。あまたある物質に対していきなり臨床試験を行うようなものではないだろうか。そこで、味物質の探索についても味を受容する仕組みを明らかにしてその仕組みを培養細胞に再現することができれば、味物質の探索において候補物質の絞り込みに利用できると考えた。

以上を踏まえ、本稿で紹介する内容は大きく二つである。一つは味覚DNAチップとその利用による味蕾特異的分子の取得とその機能解析であり、もう一つは味覚受容体の利用による味評価系の開発とその利用による新規味物質探索である。

4. 味覚受容関連遺伝子の単離と同定

4.1 味覚DNAチップの作製と利用による味蕾特異的発現候補遺伝子の取得

筆者らはまず、味を受容する仕組み、すなわち味覚受容関連遺伝子の同定を試みた。筆者らが味覚の研究を始めた当初(1999年)は、基本味(甘・苦・酸・塩・うま味)の受容体は一つも明らかにされていなかった。そこで、筆者らはマウスの味感受性の差の原因遺伝子の解明とマウスの味受容器である味蕾に特異的に発

現している遺伝子の網羅的探索の二つの方法を行うことで味覚受容関連遺伝子を取得しようと考えた。まず、マウスの甘味感受性の差の原因遺伝子座である Sac 遺伝子座の近傍に味細胞特異的に発現する G タンパク質共役型受容体 T1r1, T1r2 が位置することを手がかりとして、2001 年に Sac 遺伝子座に位置する G タンパク質共役型受容体 T1r3 を発見した²⁾。その一方で T1r3 の同定に併行して cDNA マイクロアレイを用いた味蕾特異的に発現する遺伝子の網羅的探索を試みた。cDNA マイクロアレイ法とは、数千から数万の遺伝子 (cDNA) をスライドガラスなどの上に固定化した DNA チップを用いて特定の組織におけるそれら遺伝子の発現を検出する方法である。現在では、生体に発現している mRNA のほとんどを網羅するマイクロアレイが市販され、汎用されるようになったが、研究を始めた当初は、マイクロアレイに固定されている遺伝子の種類は限られており、脳などの主要な組織に発現している遺伝子を取り扱うものしか市販されていなかった。当然舌のわずかな部分を占める味蕾に対する DNA チップは存在しない。そこで、独自に cDNA マイクロアレイを作製して味蕾特異的に発現する遺伝子の網羅的な取得を行った³⁾。

4.2 遺伝子発現様式の解析による取得遺伝子の機能予測

味蕾特異的遺伝子候補として選抜した遺伝子については組織発現様式の解析を行って味蕾や舌上皮における発現を解析した。マウス有郭乳頭の切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法を行ったところ、発現量が低いため味蕾における発現を確認できない遺伝子や味蕾だけでなく上皮にも発現が確認される遺伝子などが複数確認された。最終的には味蕾特異的に発現する遺伝子を 37 種類得ることに成功した (図 4)。

取得した味蕾特異的に発現する遺伝子に関して組織発現様式の解析を行い機能の予測を行った。味蕾特異的に発現する遺伝子は、味蕾全体に発現する遺伝子と、特定の味細胞に発現する遺伝子に分類される。味蕾は多様な細胞から構成され、受容体の発現など細胞ごとに遺伝子発現様式が異なることが知られていることから、特定の味細胞に発現する遺伝子に関しては、既知の味覚関連遺伝子との共発現様式を調べることによりその機能を予測することが出来る。また、近年は、ほとんどの遺伝子が何らかの遺伝子情報を有していることから、バイオインフォマティクスを利用した遺伝子機能の予測も重要であり、両者を融合させた機能解析を行っていくのが効果的である (図 5)。

そこで、まず、取得遺伝子の内、特定の味細胞に発現する遺伝子について、二重標識 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて既知の味覚関連遺伝子との共発現様式を解析した。その結果、甘味・うま味受容体 T1r3 と共発現して甘味あるいはうま味に関与することが予想される遺伝子 $G\alpha 14$ 、甘味・苦味・うま味情報伝達に共通して関与する Trpm5⁵⁾ と共発現する遺伝子 FXYD6, Jaw1 など

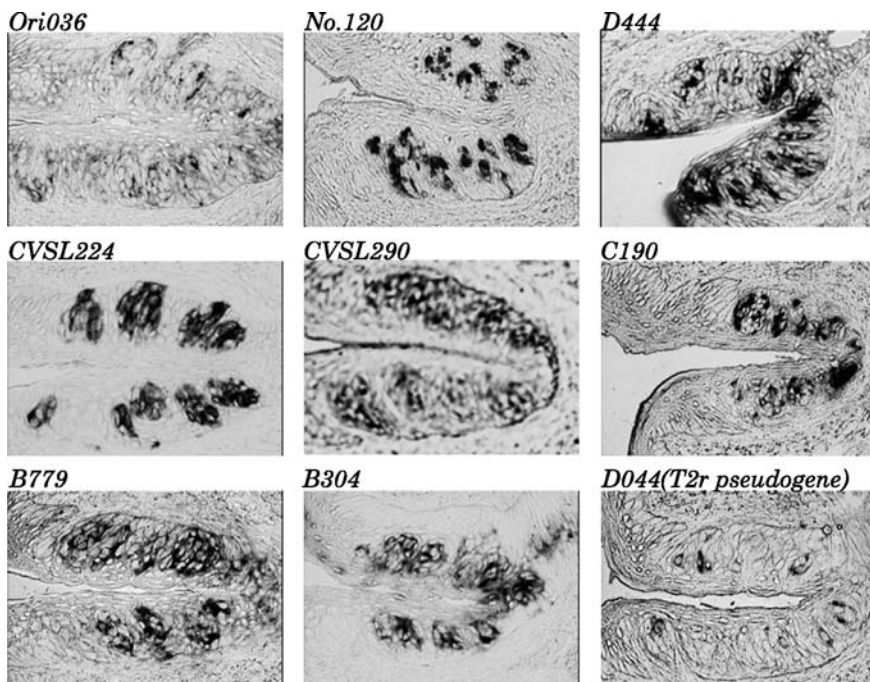


図 4 味覚 DNA チップを利用して取得した味蕾特異的遺伝子の例
取得した遺伝子についてマウス舌有郭乳頭上皮の味蕾における発現様式を示す。黒く染色されている箇所が遺伝子が発現している細胞を示す。各写真左上の記号は著者らが暫定的に付けた遺伝子番号である。

見出した。また、これらのカテゴリーに属さず、どの遺伝子とも部分的に共発現する遺伝子も複数見出している。これらの遺伝子の機能予測を行うには新たな味細胞のマーカーとなる遺伝子の知見が必要である。

4.3 取得遺伝子の機能解析

取得遺伝子に関しては、さらに詳細な遺伝子発現様式の解析、他の分子との相互作用の解析などを現在も進めており、味覚情報伝達に重要だと考えられる分子を複数見出している。

一つは味覚受容体と結合する可能性がある G タンパク質 $G\alpha14$ である⁶⁾。 $G\alpha14$ は口腔内の部位により発現に差があり、舌の奥の有郭乳頭、側部の葉状乳頭では甘味、うま味受容体ファミリー $T1rs$ と共発現し、特に、甘味受容体 $T1r2/T1r3$ とほぼ発現が重なる。一方、舌の先端に点在する茸状乳頭、軟口蓋の味蕾には発

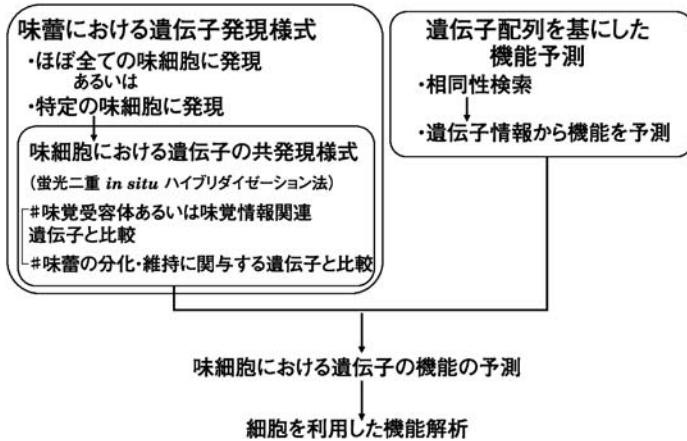


図 5 味蕾特異的発現遺伝子の機能予測および機能解析の概略

現が観察されない。よって、舌の奥で甘味受容に関与する可能性を筆者らは期待しており、その生物学的意義とともに現在検討中である。

もう一つは細胞内のナトリウム、カリウム濃度制御に重要な役割を持つポンプ Na, K-ATPase のレギュレーター FXYP6 である。筆者らは、FXYP6 と共に機能する Na, K-ATPase のサブタイプを探した結果、Na, K ATPase α サブユニット $\alpha 1$ と β サブユニット $\beta 1$ が FXYP6 と共発現することを見出した。これらはいずれも甘味、苦味、うま味受容体と同じ細胞に存在していることから、甘味、苦味、うま味情報伝達には、その他の味の情報伝達とは異なるナトリウム、カリウム濃度制御系があると考えており、ナトリウム、カリウムの細胞内イオン動態が甘味、苦味、うま味の強さなどに影響する可能性も視野に入れて今後の研究展開を図っている。

5. 味覚受容体を利用した食品成分の呈味性評価系の開発

5.1 培養細胞を用いた味応答の測定方法について

筆者らは味覚受容体関連遺伝子の探索と併行して、味覚受容体分子の食品開発への応用を試みた。すなわち、味覚受容体を発現している培養細胞を作製し、食品成分の添加刺激の結果得られた応答を解析することで食品成分の呈味性を評価することを計画した。味覚受容体を用いた呈味性の解析は国内外で広く行われるようになってきており、その大部分が培養細胞であるヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を用いている。HEK293 細胞はそのままでは味刺激に対して応答しないが、味覚受容体などの分子を導入することにより、味覚刺激に対して細胞内カルシウム

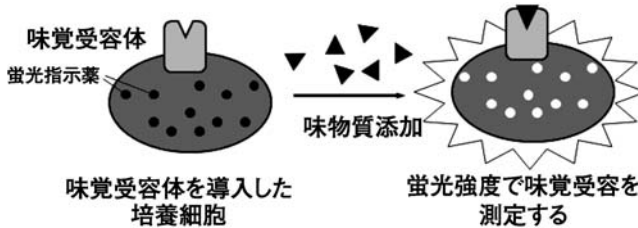


図 6 受容体を培養細胞に発現させて味覚応答測定する方法のイメージ図

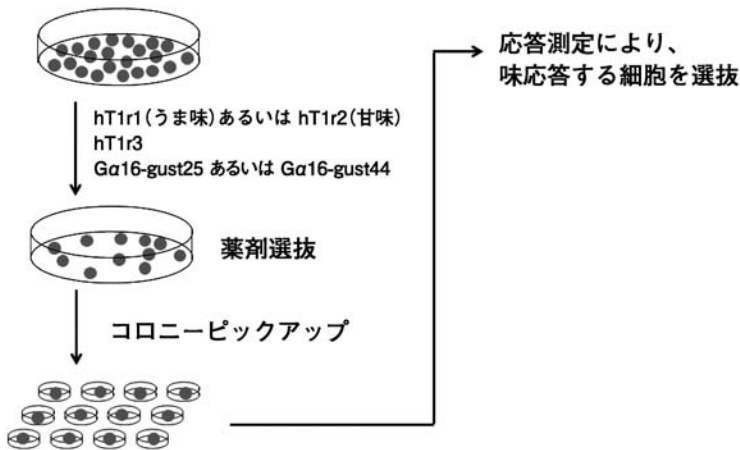


図 7 味覚受容体を恒常的に発現する細胞作製の概略図

ムイオン濃度が上昇するというかたちで応答するようになる。そして、作製した培養細胞内にカルシウムイオンの蛍光指示薬を導入し細胞内カルシウムイオンの濃度変化による蛍光量の変化を測定するカルシウムイメージング法によって味応答を観察することができる（図 6）。

5.2 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞の作製

このような方法を用いて食品成分の呈味性を評価することを目的に、まず、筆者らが 2001 年に同定した甘味・うま味受容体 T1r3 を利用して、うま味受容体 (T1r1/T1r3) および甘味受容体 (T1r2/T1r3)⁷⁾ を恒常的に発現する細胞の作製を行った。手順を図 7 に示す。味覚受容体の発現プラスミドを構築し、細胞内に導入したのち、発現プラスミドに対応した薬剤選抜を行った。培養細胞は種類が同じであっても、細胞による応答能の違いが頻繁に観察される。そこで、薬剤選抜

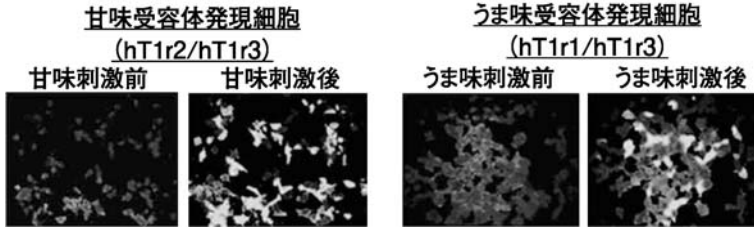


図 8 作製した甘味あるいはうま味受容体を恒常的に発現する細胞
図はそれぞれ味刺激前後の細胞応答強度を示す。白色になるほど細胞応答が強い。

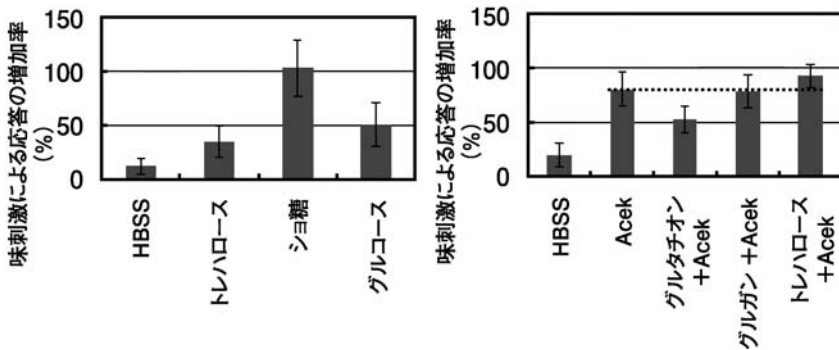


図 9 食品成分に対する甘味受容体発現細胞の応答

左: 糖に対する応答解析例

右: 人工甘味料アセサルファム K に食品成分を添加した場合の甘味応答強度変化の解析例

後の培養細胞を数十種類単離して味覚応答を測定し、応答能の高い細胞を呈味性評価に用いる細胞とした。現在、甘味受容体発現細胞とうま味受容体発現細胞を保有している (図 8)。

5.3 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞の利用による食品成分の評価

筆者らは作製した甘味受容体を恒常的に発現する細胞を用いて、様々な食品成分の評価を開始している。その中の一つは糖の甘味度評価である (図 9)。筆者らの保有する甘味受容体発現細胞は 50 mM (1.7% (w/v)) のショ糖に対して強い応答を観察することが可能である。そこで、同じ 50 mM の糖 (グルコース, トレハロース) について応答強度を測定, 比較してみた。その結果, 甘味強度はショ糖 >> グルコース > トレハロースであり, 官能評価と呼応することが示された。また, 食品中の他の成分が甘味応答にもたらす影響についても検討を開始してい

る。今のところ、甘味応答に明瞭な影響を与える食品成分を見出すには至っていないが、今後他の成分に関する解析と官能評価との相関について検討していきたいと考えている。

5.4 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞の利用による呈味増強物質の探索

味覚受容体を発現する培養細胞は呈味性の評価に有効であるが、微妙な味の差を明らかにするのが難しいこと、味の強さと時間の関係性を評価できないこと、自家蛍光や細胞傷害性を有するサンプルを評価できないといった制限があることが短所である。一方、培養細胞を用いた評価法の長所は膨大な試料を比較的短時間で評価できることと、評価に必要なサンプルの量が少なく済むこと、評価に関わる人が少人数で済むことである。これらを考慮すると、味覚受容体発現細胞がもっとも効力を発揮するのが新規味物質を探索するためのツールとしての利用であろう。そこで、新規味物質の探索を試みることにし、まず最初に探索系の構築を検討した。実験室レベルの装置を探索という産業側に一歩踏み込んだシステムへ発展させるためには、細胞応答測定効率化を図る必要が生じた。それまでの細胞応答測定は、1枚のシャーレに播種した細胞に対して一つの味物質を灌流刺激し、顕微鏡を用いて蛍光量の変化を測定していた。そこで、幅 $500\mu\text{m}$ 以下の微少な流路を作製し、その流路を顕微鏡の視野内に8本集積させることで一度に8個の試料を灌流して連続的に評価できるセルチップを開発した（図10）。その結果、流路に播種した細胞に連続16回の灌流刺激を行うことができ、96ウェルプレートに分注した試料を連続的に評価することが可能になった。また、微少な流

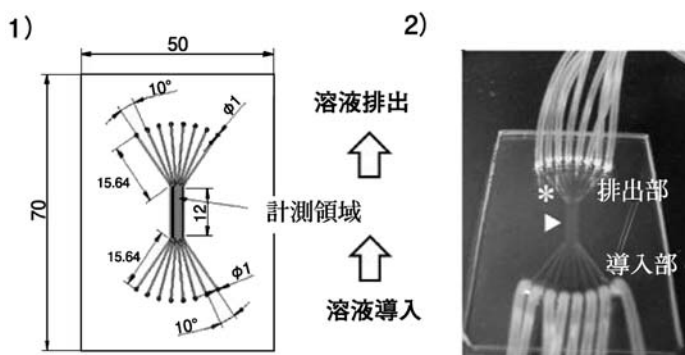


図 10 開発した多検体微量試料を連続的・並行的に評価できるセルチップ

- 1) プロトタイプセルチップの設計図
- 2) プロトタイプセルチップ。実際に探索に使用したセルチップはチューブが直接接続されていない。

解決すべき問題点：探索の効率性

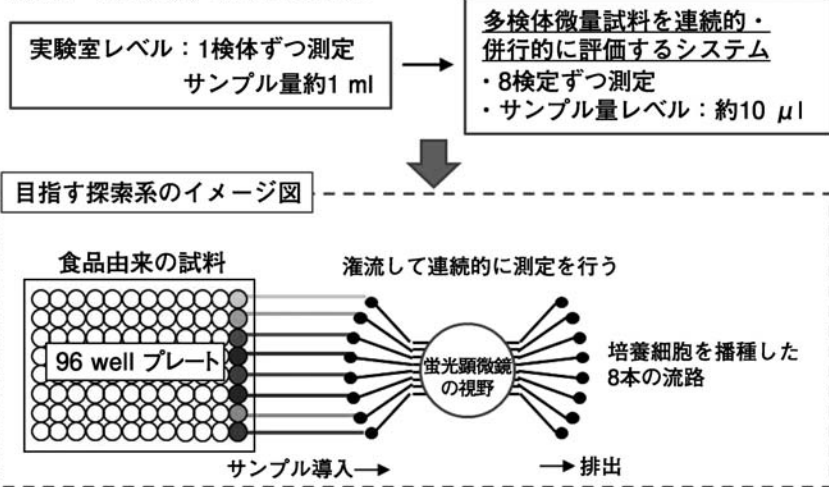


図 11 目指す探索系のイメージ図

路を利用することで、評価する試料の量はわずか数 μ l で済むことも明らかになった。そこで、このセルチップを組み込んだ呈味物質探索装置を利用して呈味増強物質の探索を行うこととした（図 11）。

探索のターゲットとする味としてうま味を選択した。うま味は食品に心地よい味を付加することが知られ、うま味物質やうま味増強物質が食品に多用されている。代表的なうま味物質としてグルタミン酸ナトリウム、うま味増強物質としてイノシン酸ナトリウムが知られているが、何れもナトリウム塩である。ナトリウム塩の過剰摂取は高血圧を始めとした生活習慣病の発症への関与が示唆されており適正な摂取が呼びかけられているが、我が国では過剰摂取になっている。そこで、ヒトうま味受容体 hT1r1/hT1r3 を利用した系を開発しナトリウム塩ではないうま味増強物質を探索することとした。探索源としては「日本発」の研究であることを意識し、地域特産品を中心に食品を収集して食品成分ライブラリを作製した。そして、ヒトうま味受容体 hT1r1/hT1r3 を発現させた培養細胞を組み込んだ呈味物質探索装置を利用してうま味増強物質の探索を行った。その結果、今までにその効果を知られていないうま味増強物質を複数同定することに成功した。現在、同定した物質の諸性質を検討中である。

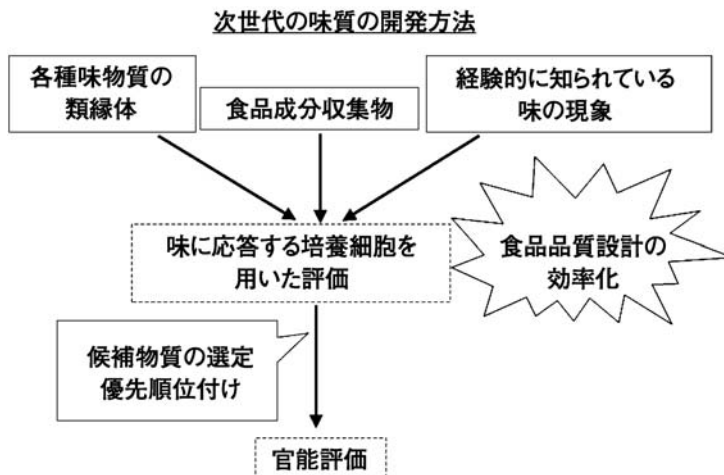


図 12 味覚受容体を発現する細胞を利用した味質の開発方法の概念図

6. おわりに

以上の研究によって、味覚受容関連遺伝子の探索・同定という基礎研究を、食品成分からの呈味増強物質の探索・同定といった応用研究へと展開した。本研究では、うま味に照準を絞った研究を行ったが、同様の手法は他の味にも適用可能である。今後、本研究の成果を多数の味の評価に応用していくことにより、本法が官能評価を補完する次世代型の味覚評価法として利用されていくことが期待される（図 12）。また、本研究では膨大な食品成分を効率よく評価する方法にも成功した。よって、食品成分の機能評価という観点からも新たな評価のアプローチを示すことができたのではないかと考えている。

（食品機能研究領域 食認知科学ユニット 日下部 裕子）

参考文献

- 1) Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J. and Zuker, C. S. : An amino-acid taste receptor. *Nature*, **416**, 199–202 (2002)
- 2) Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. and Hino, A. : Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 236–242 (2001)
- 3) 進藤洋一郎, 日下部裕子, 日野明寛, 「味覚研究への DNA チップの応用」日本味と匂学会誌, **10**, 103–108 (2003)

- 4) Dulac, C. : Cloning of genes from single neurons. *Curr Top Dev Biol*, **36**, 245–258 (1998)
- 5) Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S. and Ryba, N.J. : Coding of sweet, bitter, and umami tastes : different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293–301 (2003)
- 6) Shindo, Y., Miura, H., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Ninomiya, Y., Hino, A., Kanda, T. and Kusakabe, Y. : G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 504–508 (2008)
- 7) Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J. and Zuker, C.S. : Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381–390 (2001)

Ⅱ 受容体機能の解析と再構築による 分子認識素子の開発

1. はじめに

生活習慣病の代表である動脈硬化性疾患は、日本人の死因の 30% を占め、ガンと並ぶ大きな要因となっている。さらに、近年の急速な高齢化や生活習慣の変化による発症予備軍の増大が指摘され、有効な予防対策の確立は必須である。動脈硬化症は、食生活と密接な関係があり、食生活の改善は重要な予防法の一つとされている。動脈硬化の危険因子として、悪玉コレステロールとして知られる酸化 LDL (Low Density Lipoprotein : 低密度リポタンパク質) があげられるが、酸化 LDL とは、酸化修飾などを受けた LDL 分子の総称であり、酸化修飾により生じる変性 LDL* の分子形態は多種多様であり、修飾の程度も異なった不均一な分子集団である (図 1)¹⁾。

*生体内で酸化修飾などの結果生じるのは酸化 LDL のみではなくマロンジアルデヒド化 LDL 等の酸化 LDL 以外の修飾物が報告されており、広義には modified (修飾) LDL という用語を用いる方が適切である。Modified LDL は、denature (変性) している訳ではないが、他の和文の総説等においては、修飾 LDL ではなく変性 LDL と記されることが多い。よって、本稿においても、変性 LDL の名称を用いる。

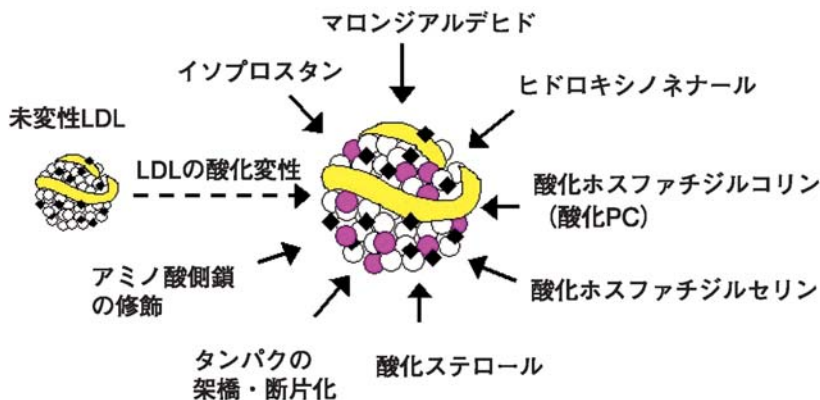


図 1 変性 LDL の多様性 (引用文献 1 より)

一方、生体内にはスカベンジャー受容体 (SR) と名付けられた受容体ファミリーが存在する。SR は、酸化 LDL などの変性 LDL を認識し取り込む機能を有しており、動脈硬化の初期過程に関与する受容体として注目されている。SR はマクロファージなどに発現していることが知られていたが、動脈硬化症と密接な関係にある血管内皮細胞から変性 LDL を認識する受容体として始めてクローニングされたのが、C-type lectin like Oxidized LDL receptor : LOX-1 であった²⁾。LOX-1 が酸化 LDL を始めとする変性 LDL を認識し取り込むことにより生じるシグナルが、動脈硬化発症に向かう機能不全を血管内皮細胞に生じさせると考えられている。LOX-1 は動脈硬化症発症制御の一つの標的として、最近注目を集めており、種々の観点から多くの論文が発表されるようになってきているが、発見当時は、他の SR と全く構造を異にする SR であり、研究の手掛かりとなるような知見も少なく、研究グループ数も限られていた。

一方、筆者らは、受容体等の膜タンパク質の機能解析とその活用に興味を持ち研究を進め、LOX-1 発見前から内皮細胞由来の SR の研究にも着手していた。他のグループによって最初にクローニングされた LOX-1 は、ウシ血管内皮細胞由来であるが、筆者らはヒト血管内皮細胞からクローニングした human LOX-1 (hLOX-1) を研究対象とし、リガンド認識機構、高次構造、リガンド取り込み機構など、新たな知見を報告して来た。

そこで本稿では、LOX-1 を中心とした受容体機能の解析とその利用、並びに、今後の展開に関して解説する。

2. リガンド認識に必須な構造

hLOX-1 は、273 アミノ酸からなり、細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域の 3 つの領域から構成されている一回膜貫通型の膜タンパク質である (図 2)。132 アミノ酸からなる細胞内領域は、ネック領域と C タイプレクチン様領域 (CTLD) の 2 つから構成されている。ウシ血管内皮細胞由来 LOX-1 は多様な構造の変性 LDL 分子種を始めとして、老化赤血球、アポトーシス細胞、細菌なども認識対象とするマルチリガンド受容体であることが報告されていた。一方、hLOX-1 は、クローニング直後の分子であったため、リガンド認識に重要な構造に関しても何ら知見がない状態であった。そこで、筆者らは、まず、hLOX-1 のリガンド認識に必須な構造について解析を行った。リガンド認識に直接関わるのは細胞外領域であるので、この領域に常法に従い、欠損変異、部位特異的変異を導入し、リガンド認識に必須の部位や配列を解析した。解析は、変性 LDL 取り込み能を欠く細胞に、野生型 LOX-1、変異 LOX-1 を強制発現させ、蛍光標識を導入した変性 LDL 取り込み能を観察することにより評価した。

その結果、(1)C 末端の 7 アミノ酸残基が hLOX-1 のフォールディング (正しい立体構造を形成すること) やソーティング (タンパク質が翻訳後、細胞内小器官

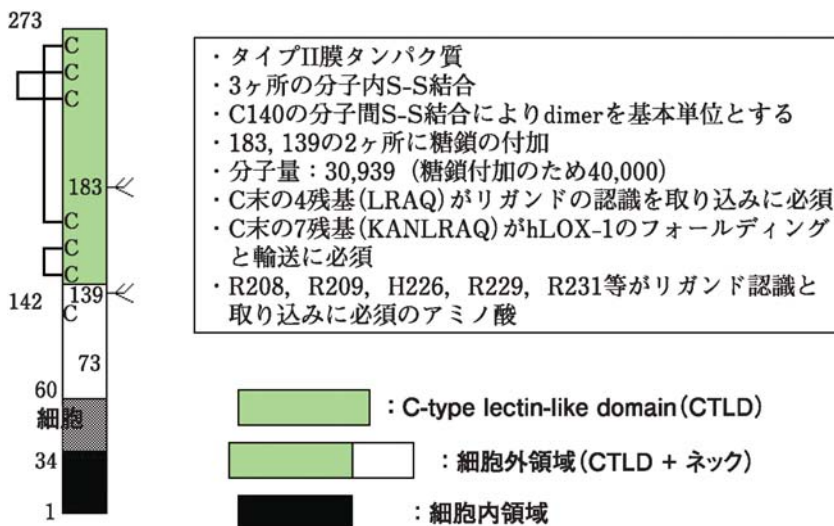


図 2 LOX-1 の構造

を経て機能すべき場所に輸送されること)に必須であること, (2)R208 (208 番目の R : アルギニンを意味する), R209, H226, R229, R231, F228, Y238 がリガンド認識に必須のアミノ酸残基であること等が明らかとなった^{3,4)}。また, 糖鎖の付加が予想される配列が 3 箇所あるが, N183, N139 には実際に糖鎖が付加されていることが確認された (図 2)。しかし, 糖鎖欠損変異においても変性 LDL 結合能は維持されていることが示され, 変性 LDL の認識には糖鎖は関与していないことが示された。また, ネック領域には, 1 箇所のシステイン残基 (C140) が存在するが, この C140 を介して LOX-1 は分子間 S-S 結合を形成しており, 細胞上における LOX-1 の基本単位はダイマーであることを明らかにした⁵⁾。しかし, この C140 に変異を導入し, ダイマー形成能を失った LOX-1 も正常に変性 LDL を認識することから, 分子間 S-S 結合の形成によるダイマー形成は LOX-1 のリガンド認識に必須ではないと当初考えられたが, 現在では, LOX-1 の安定化に分子間 S-S 結合が重要であることが明らかにされている。

上述の解析途上において, CTLD, 並びにダイマー形成に必要な C140 を含むネック領域の一部を付加した CTLD 14 の大量調製に成功した (後述)。そこで, リガンド認識領域の高次構造解析にも着手した。CTLD, 並びに CTLD14 の両者の結晶化に成功し, ダイマーを形成することにより, 2 分子の CTLD が, 変性 LDL を認識するのに必須な位置関係を取ることを明らかにすると共に, W150 が 2 分子の配向に重要なアミノ酸残基であることが確認された。また, CTLD ダイマーの分子表面には, 変異の導入により認識能を失うことが明らかになっていた

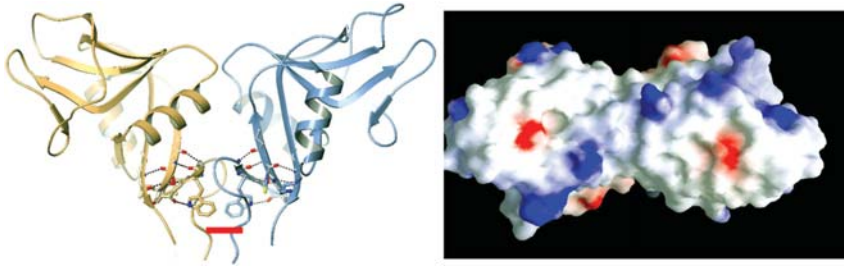


図 3 ダイマーを形成した CTLD14 の構造：左図の赤線が分子間 S-S 結合を、右図の青色が Arg Spine を示す（引用文献 6 より）

Arg (R) 残基が規則正しく並んでいることも示された（図 3）⁶⁾。この塩基性残基の並ぶ構造（Arg spine）は、LDL が酸化修飾の結果帯びる負の電荷と相互作用し、LOX-1 による変性 LDL 認識に大きく寄与していると考えられている。

3. LOX-1 機能単位の解明

LOX-1 がダイマーを基本単位として細胞膜上に存在すること、並びに、ダイマー構造を取ることで、変性 LDL 認識に重要な規則的な Arg Spine が形成されることが高次構造解析、細胞生物学的解析、及び、生化学的解析から明らかとなった。しかし、LOX-1 ダイマーに対して、変性 LDL 分子の大きさは巨大であり（Arg Spine の形成する領域が 70 Å であるのに対して、変性 LDL の半径は 250 Å）、ダイマーがどのようにして変性 LDL を捕捉し、細胞内へ取り込むのかという疑問が残っていた。既に、当時筆者らは、細胞上で LOX-1 がダイマーより大きなオリゴマーを形成して存在することを示唆するデータを得ていたことから、結晶構造発表時においては、ダイマーを形成した LOX-1 が、クラスターを形成することにより巨大な変性 LDL を認識し、取り込むという仮説を提唱した（図 4、5）⁶⁾。

また、筆者らは、LOX-1 発現細胞による変性 LDL 認識能の解析過程で、LOX-1 発現量に依存した認識・取り込みを示す一群の細胞集団がある一方で、LOX-1 が発現しているにも関わらず、変性 LDL 取り込み能を欠いている細胞集団があることを発見した。この現象をさらに詳細に解析していくと、細胞当たりの LOX-1 発現量が一定量を超えると、LOX-1 発現量と変性 LDL 取り込み量に相関が現れることが明らかになった（図 6）。そこで、この閾値を挟んだ LOX-1 を発現している安定発現株を樹立し、LOX-1 の発現状態と認識能の関連を詳細に解析することとした。当時は、目的とする発現量のクローンを効率的にスクリーニングする手法や機器は開発されていなかったため、筆者らは、LOX-1 に融合した蛍光

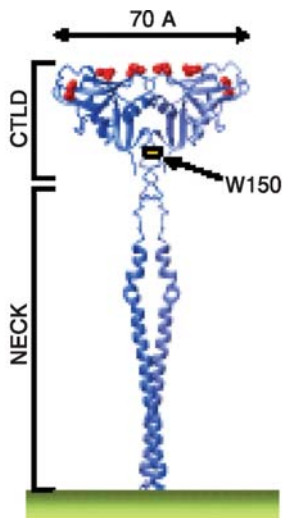


図 4 LOX-1 が、基本単位であるダイマーを細胞膜上で形成している様子。赤い点は Arg 残基（引用文献 6 より）

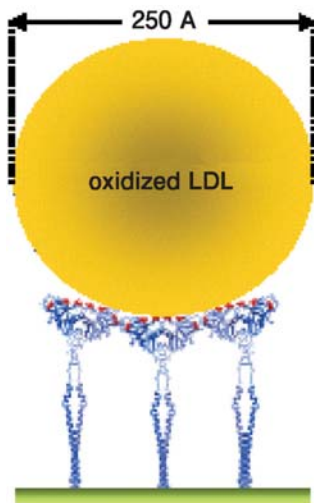


図 5 LOX-1 が機能単位であるオリゴマーを形成し、酸化 LDL を認識している様子（引用文献 6 より）

タンパク質の蛍光強度を指標に、求める発現量のクローンを的確に選抜する手法として、スクリーニングの早期（各コロニーは 8 細胞～32 細胞程度）にコロニーの蛍光を蛍光顕微鏡でチェックし、適切な発現量のコロニーをクローン化する方法を確立した⁷⁾。この手法により、LOX-1 発現量が閾値以下の安定発現株（Under Threshold : UT 株）と閾値以上の安定発現株（Threshold : T 株）を樹立した。上記の両細胞集団を比較したところ、T 株においては、LOX-1 が細胞膜上の特定の領域にクラスターを形成していることなどが認められた。さらに、変性 LDL 取り込み能を示す T 株においてのみ、ヘキサマー以上の会合体を形成した LOX-1 の存在が確認され、LOX-1 はクラスターを形成することにより巨大分子である変性 LDL を認識し取り込むことが実験的に示された。以上の結果から、LOX-1 はダイマーを基本単位として細胞膜上に存在するが、機能単位はダイマーが 3 分子以上会合したヘキサマー以上のオリゴマーであることが明らかになった。ここに、結晶構造解析の結果から提案された仮説が実験的に証明されたこととなった⁸⁾。

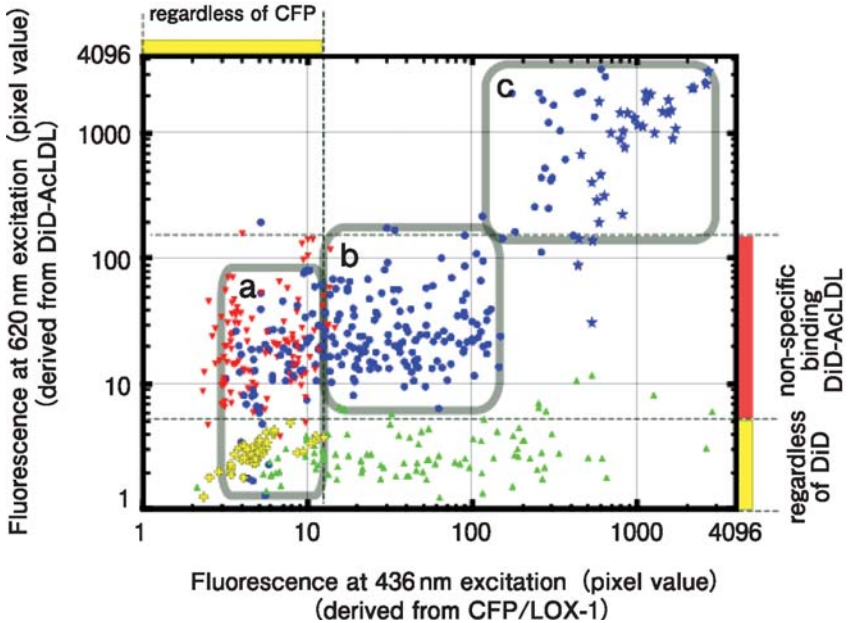


図 6 LOX-1 の発現量と変性 LDL 取り込み量の相関

LOX-1 は蛍光タンパク質である CFP との融合タンパク質として発現、変性 LDL は蛍光色素である DiD によって標識されている。横軸が LOX-1 の発現量を、縦軸が取り込まれた変性 LDL の量を示している。

領域 a：非特異的な蛍光；領域 b：LOX-1 の発現量が閾値以下でリガンド結合能が発揮できない；領域 c：LOX-1 発現量が閾値を越え LOX-1 発現量とリガンド結合量に相関がある（引用文献 8 より）。

4. リガンド認識能の再構築

冒頭に述べたように、変性 LDL は、動脈硬化発症のリスクとして知られているが、その分子形態は多様である。従来、酸化 LDL の定量方法として、① 酸化 LDL 中の特定の分子を検出する抗体を利用した手法、② 特定の分子の化学分析法などが行われているが、全ての分子種を捕捉しているという確実な保証はない。また、①の手法では、使用する抗体によって結果が異なり、さらに、これらの抗体が確実に動脈硬化発症に関わる分子種を捉えているかについても曖昧な点が多い。一方、LOX-1 は、全ての変性 LDL 分子種を認識可能なマルチ認識能を有している。さらに、LOX-1 のリガンド認識に必須な構造を解析する過程で、糖鎖を欠いた CTLD のみでもリガンド認識能を保持していることが示された。そこで、マルチ認識能を維持した LOX-1 認識領域を再構築することにより、変性 LDL 分子種を広く捕捉可能な認識素子の開発が可能になると考え、LOX-1 認識

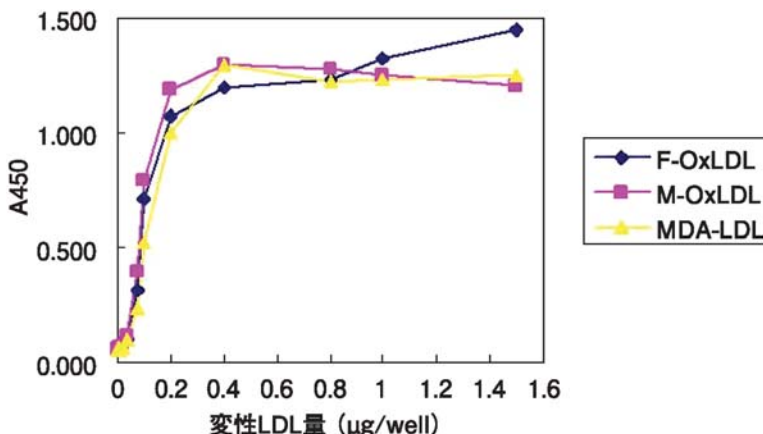


図 7 再構築 LOX-1 による構造の異なる変性 LDL の認識

修飾の種類の異なる 3 種類の変性 LDL (F-OxLDL : 完全酸化 LDL, M-OxLDL : 初期酸化 LDL, MDA-LDL : マロンジアルデヒド化 LDL) を再構築 LOX-1 は認識可能である。横軸が変性 LDL 量, 縦軸は認識の強さを示す。

能の再構築を試みた。

その結果, 大腸菌を宿主として大量発現させた際に菌体内に蓄積される凝集物(封入体)を筆者らが開発した再生手法(CA 法と命名)によりリフォールディング(正しい構造に巻き戻すこと)することにより⁹⁾, 簡便に再構築が行えることが明らかになった。再構築受容体は, マルチ認識能を有しており, 変性 LDL 認識素子として活用できることが確認された(図 7)¹⁰⁾。結晶構造解析時には, 古典的な希釈透析法によるリフォールディングを行ったが, これは CA 法に用いる界面活性剤の持込などが結晶化に影響したことによる。希釈透析法は, 膨大な手間と時間を要する手法であり, 認識素子の実用化を視野に入れた場合, 他の手法が望ましい。CA 法の適用により, 簡便に大量の認識素子を提供するという問題が解決された。また, 開発された認識素子を ELISA 法における抗体分子の代わりに, マイクロプレートリーダーなどの広く普及している機器による測定に用いることにより, 容易に変性 LDL を検出するシステムの開発が可能なが示された。この検出システムにより, 変性 LDL 生成抑制を指標にした, 食品や食生活の動脈硬化発症抑制効果の評価などが可能になる他, 診断技術への活用が期待される。

また, 大腸菌内で発現させる際に, N 末端にビオチン化タグなどを付加することにより, リガンド認識に重要な C 末側の構造に影響を与えずに, 固相へ容易に固定化可能なことも示されたことから, 受容体チップなどとして活用する際に有効であると思われる(図 8)¹¹⁾。

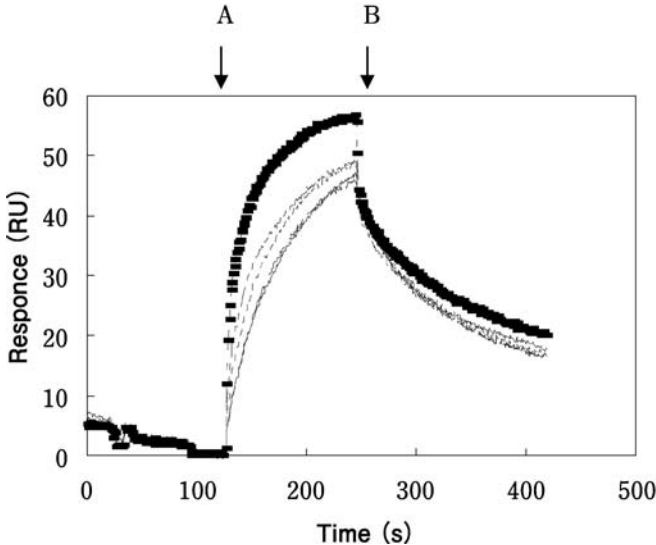


図 8 表面プラズモン共鳴による再構築 LOX-1 と変性 LDL との相互作用の様子を示すセンサーグラム。再構築 LOX-1 をチップ上に固定化し、酸化 LDL 溶液を A で添加し、B で洗浄を行った結果。変性 LDL として OxLDL を使用。濃度は、 $10^{-10} \sim 10^{-8}$ M の範囲で行った（引用文献 11 より）。

5. LOX-1 に取り込まれた変性 LDL の細胞内挙動の解析

LOX-1 に認識され取り込まれた変性 LDL は、細胞内小胞輸送系により輸送され、最終的にはリソソームに運ばれて分解されると予想される。変性を受けていない通常の LDL は、細胞内小胞輸送経路のモデルとして活発に研究が行われ、LDL 受容体の細胞内挙動共々、多くの知見が蓄積されてきているが、LOX-1、並びに認識され取り込まれた変性 LDL がリソソームに至る細胞内輸送経路は全く不明である。一般に、リガンドが受容体に結合することによりシグナル伝達が生じ、遺伝子の活性化、タンパク質分子の発現が引き起こされ、細胞機能が変化することは良く知られている。近年はこれに加え、取り込まれたリガンドやリガンドと共に取り込まれた受容体分子が、細胞内輸送途上でシグナルの消長を起こすことが細胞の機能変化誘導に極めて重要であると考えられており、時空的解析の重要性が広く認識されている¹²⁾。

筆者らは、取り込まれた変性 LDL が、未変性の LDL と全く異なった動きを示すことに研究の早期に気がつき、変性 LDL は、LDL とは異なった細胞内装置を介した小胞輸送経路を経ると考え、その詳細解析に着手した。近年、蛍光タンパ

ク質の活用による生細胞を対象にしたタイムラプス計測技術が、多くの情報をもたらすようになっている。これは、顕微鏡光学系などハード面の発展に負うところが大きいが、細胞などの生物試料を供する手法が追いついていかず、その機能を十分に活かしていないのも事実である。そこで研究を進めるに当たり、生細胞の機能を維持したまま高分解能での細胞観察を可能にする手法の開発を行った。その結果、細胞のダメージを最小限に抑える顕微鏡用プレパレート作製手法の開発に成功すると同時に^{13,14)}、この手法を発展させ、長時間に渡る生細胞反応の観察を可能とする観察用チャンバーの開発にも成功した¹⁵⁾。

多面的な生化学的解析に加え、これらの装置を活用することにより、LOX-1は、細胞膜上の特殊なドメインに局在し、クラスターを形成していることが明らかとなった。さらに、LOX-1と共に細胞内に取り込まれた変性LDLは、未変性のLDLとは全く別の輸送系に入り、動脈硬化症に結びつく機能変化を細胞に引き起こすことを見出した。また、変性LDLの乗り物である小胞は、輸送速度も通常の輸送小胞と異なることが確認された(図9、発表準備中)。これらの知見は、細胞生物学における新知見として興味を持たれている。さらに、LOX-1によって認識される分子が、生体において動脈硬化発症に結びつく特殊な分子であることも示しており、LOX-1機能を再構築した認識素子による検出・評価系の重要性を裏付ける基礎的知見にもなっている。

6. 糖尿病血管障害に関わる受容体への応用

動脈硬化症と並び、食生活に密接な関係のある生活習慣病に、糖尿病性血管障害(糖尿病性腎症、網膜症、神経症が3大合併症として知られている)があるが、この発症・亢進因子である後期糖化反応生成物(Advanced Glycation End Products: AGEs)も変性LDL同様に多様な分子種の集合体である。生体内には、このAGEsを認識する受容体(Receptor for AGEs: RAGE)が存在し、LOX-1同様のマルチ認識能を有している。LOX-1を対象に進めた受容体のマルチ認識能の再構築という考え方をRAGEにも適用したところ、AGEsに対する認識素子の創出と検出・評価系の開発に成功した¹⁶⁻¹⁸⁾。

LOX-1の細胞外領域がCTLDとネックという2つの領域からなる単純な構造であるのに対し、RAGEの細胞外領域は、3つのイムノグロブリン様構造(V, C1, C2)からなる(図10)。認識素子として再構築する上で、認識に必要な構造単位を絞り込むことが必須であった。特にRAGEの場合、再構築された分子が安定性を欠くという大きな問題があった。当初、ドメイン間に存在するリンカーに相当する配列が不安定さに寄与すると考えたが、ドメイン内に存在するプロテアーゼ感受性部位の関与も極めて大きいことが明らかになった。一方、RAGEは多様なリガンドを認識するが、糖尿病血管障害に関係するリガンドであるAGEsの認識には、基本的にはVドメインのみで十分であることが示された。そこで、AGEs

細胞膜直下に留まっている変性 LDL

リソソームに集積した変性 LDL

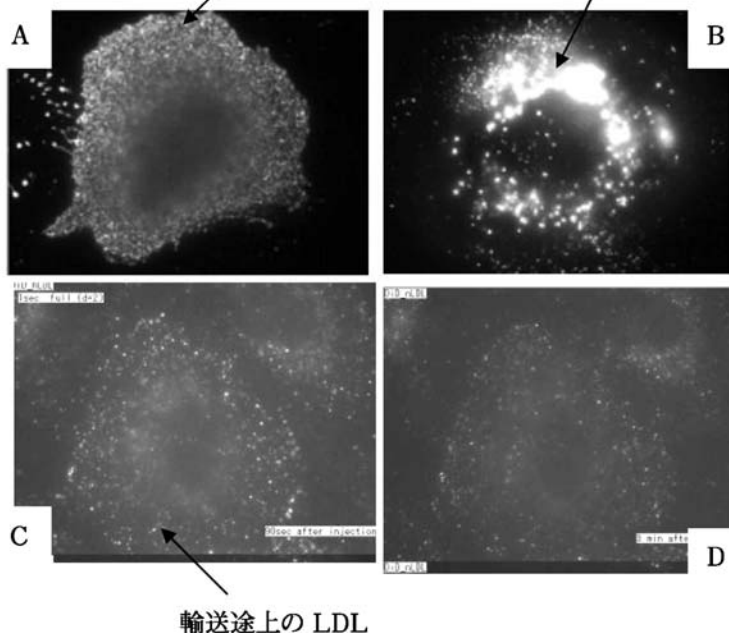


図 9 LOX-1 により取り込まれた変性 LDL の細胞内挙動

A : LOX-1 による変性 LDL 取り込み開始後 90 秒後の細胞像。多くの変性 LDL (白い点) が、細胞膜直下に留まっている。B : 取り込み開始後 10 分後。リソソームへの変性 LDL の集積が顕著になる。C : 未変性の LDL 取り込み開始 90 秒後の細胞像。既にリソソーム領域まで輸送された LDL が認められる。D : 取り込み開始 3 分後。大半の LDL の輸送が完了している。

の認識能に絞る、安定な機能単位の作出に努めたところ、RAGE 143 が、条件を満足する認識素子として機能することが明らかとなった⁽¹⁹⁾。RAGE 143 は、V ドメインに C1 とのリンカー配列、並びに C1 ドメインの一部 (分子内 S-S 結合を形成する C144 の直前までの 20 アミノ酸残基) を付加した構造をしている (図 10)。V ドメインのみを発現させることは困難であったが、この 20 アミノ酸の付加により、発現が可能となった。さらに RAGE 143 は、プロテアーゼ感受性部位である R114, R116 を含むにも関わらず、プロテアーゼ耐性、並びに保存中の安定性が増大していた。この結果は、LOX-1 を対象に開発された手法が RAGE にも基本的にも有効であり、今後、マルチ認識能を持つ多くのタイプの受容体にも展開可能であることを示唆している。

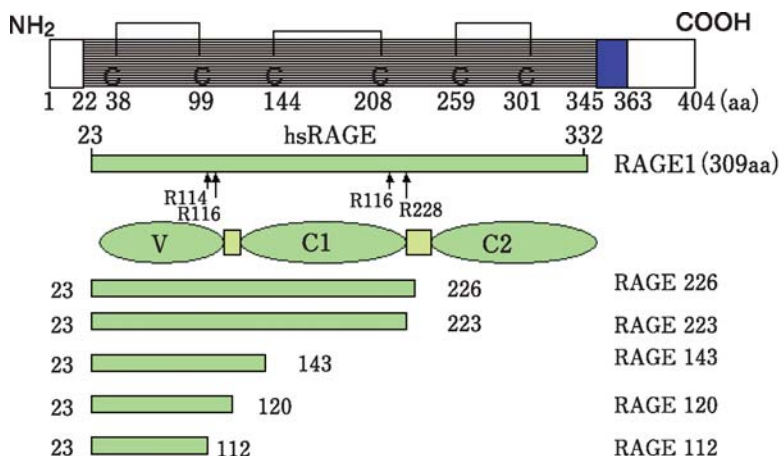


図 10 RAGE の構造と AGEs 認識に必要な最小領域

↑: プロテアーゼ感受性部位を示す。RAGE143 が安定性、認識能共に優れた認識素子であることが確認された。

7. 今後の展開

動脈硬化症、及び、糖尿病血管障害は、発症予備軍の増大から大きな社会問題になっており、食生活を通しての発症・亢進の抑制は、重要な課題である。研究の過程で開発された認識素子は、安定性の向上、比色定量などの特殊機器を必要としない検出・評価技術として完成度を高めることで、変性 LDL や AGEs の生成抑制効果、受容体に対する認識阻害効果などを指標にした、食品による発症抑制効果を簡便に評価する技術への活用が可能である。これらの技術の活用により、食生活の向上に資する科学的根拠に基づいた情報の提供、食品開発に必要な基盤的知見の蓄積がなされ、食品開発研究に貢献できることを期待している。また、認識素子は、発症予備軍に対する発症リスク評価、食生活改善効果の評価など、診断分野における活用も予想される。

今後は、細胞内小胞輸送を中心とした細胞内現象の詳細な解析をさらに進めることにより、LOX-1 や RAGE に認識される分子が引き起こす現象に関する知見を蓄積することが必要であり、また認識素子を用いた検出系の実用分野における有効性の検証が重要と考えている。

8. おわりに

変性 LDL が動脈硬化の危険因子であると言われて久しい。現在、この変性 LDL 原因説に基づいた動脈硬化発症機構が広く受け入れられており、LOX-1 はその初期の段階に関与する重要な分子だと考えられている。本稿では、この流れ

の中で進められた研究を LOX-1 の機能解析と再構築を中心に解説した。

しかし、変性 LDL は動脈硬化巣が形成された結果として血中に漏れ出しているのではないかと、なぜ生体が動脈硬化という異常を起こすための受容体を最初から持っているのか等、変性 LDL 原因説には多くの疑問があることが指摘されている。LOX-1 が変性 LDL を認識するためには、発現量が増大し細胞膜上でクラスターを形成することが必須であるが、LOX-1 がヘキサマー以上のクラスターを形成すること自体が異常な現象であり、クラスターを形成していない LOX-1 は、生体の恒常性を維持するための本来の役割を担っている可能性も高い。今後は、変性 LDL 上の特定の分子も含めて、LOX-1 の内在性リガンドとして機能する真の構造が生体内に存在するのか、LOX-1 のクラスター形成は如何に制御されているのか等、新たな視点からの解析にも取り組み、認識素子の活用により得られる評価結果が、生体内の反応を反映した意義ある結果であるかも見極めたいと考えている。

(謝辞) 本研究を推進するに当たり、多くの研究者にご助力頂いた。特に、高次構造解析は、生物工学研究所(当時)の楯真一教授(現:広島大学)、大木出博士(現:奈良先端大学助教)との共同研究成果である。また、本研究は、農林水産省「パイオニア特別研究」、「バイオデザイン計画」、「信頼機能プロジェクト」、科学技術振興機構「革新技術開発研究事業」、「シーズ発掘試験」、及び、日本学術振興会「科学研究費補助金」の助成を受けて進められたものである。

(食品バイオテクノロジー研究領域 機能分子設計ユニット 町田 幸子)

引用文献など

- 1) 板部洋之, **動脈硬化** 28, 63-68 (2007)
- 2) Sawamura T., et al., *Nature* 386, 73-77 (1997)
- 3) Shi, X., (et al.) and Machida S., *J. Cell Sci.*, 114, 1273-1282 (2001)
- 4) Shi, X., (et al.) and Machida S., *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 4, 292-298 (2001)
- 5) Xie Q., (et al.) and Machida S., *DNA and Cell Biol.*, 23, 111-117 (2004)
- 6) Ohki I., (et al.) Machida S., Morikawa S., and Tate S., *Structure*, 13, 905-917 (2005)
- 7) 松永 茂, 町田幸子, **化学と生物**, 45, 731-734 (2007)
- 8) Matsunaga S., (et al.) and Machida S., *Exp. Cell Res.*, 313, 1203-1214 (2007)
- 9) Machida S., et al., *FEBS lett.*, 486, 131 (2000)
- 10) 町田幸子 他, **特願** 2008-251868 (2008)
- 11) Xie Q., (et al.) and Machida S., *Protein Expression and Purification*, 32, 68-

74 (2003)

- 12) Guiliemo G.M., et al., *Nature Cell Biol.*, 5, 410-421 (2003)
- 13) 町田幸子 他, 特許第 4366495 (2009)
- 14) Matsunaga S., (et al.,) and Machida S., *Biotechniques*, 46, 225-227 (2009)
- 15) 町田幸子 他, 特願 2006-320922 (2006)
- 16) 町田幸子 他, 特願 2006-81807 (2006)
- 17) 町田幸子 他, 特願 2006-81808 (2006)
- 18) Kumano M., (et al.,) and Machida S., *J. Biochem.*, 143, 229-236 (2008)
- 19) Kumano M., (et al.,) and Machida S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336, 130-134 (2009)

Ⅲ DNA マイクロアレイと酵母細胞を用いたかび毒の 毒性評価法及び DNA マイクロアレイを用いた かび類の網羅的検出法の開発

1. はじめに

かび毒とはかび（糸状菌類）の産生する二次代謝産物で、ヒトあるいは家畜、魚類など高等動物に対して急性もしくは慢性的な生理的あるいは病理的障害を与える物質群に与えられた総称である。

食品への混入率が高いかび毒はリスク管理措置の対象として国内外を問わず議論および調査されており、かび毒の毒性評価は、アフラトキシンなど特に急性毒性や発がん性の強いものを中心に、動物実験を通して行われている。現在行われている実験動物を用いた主な毒性影響試験としては、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖毒性試験、催奇形性試験などがある。さらに、変異原性試験ではサルモネラ等を用いた微生物試験が行われる事が多い。

単回投与毒性試験では、大量の実験動物を使うにも関わらず、得られるデータはLD₅₀（投与された動物の50%が死亡する量）だけであるとして、動物愛護の観点から問題視され、今後この試験方法は縮小・廃止の方向へ向かわざるをえないと思われる。

かび毒の毒性に関しては、高濃度で摂取した場合の急性毒性はもとより、低濃度での長期曝露による慢性的な健康被害や胎児期に母体がかび毒に曝露された時の胎児への発生毒性や催奇形性などへの懸念が増大している。反復投与毒性試験、生殖毒性試験、催奇形性試験などでは、いずれも実験動物の長期間の飼育、観察が必要であり、生殖や催奇形性試験にいたっては、1個体に留まらない何世代にも渡った試験が必要であるため、経費及び飼育場所等の問題が大きい。さらに、かび毒は誘導体を含め、その種類は現在知られているだけで300種類を越え、その全てについて動物を使つての毒性評価を行うことは、不可能に近い。なぜなら、前述のように実験動物に関する福祉の概念が世界的にますます増大しており、その審査も厳密になっているからである。各国行政でも動物実験代替法の具体的な方策を打ち出しており、我が国でも2005年国立医薬品食品衛生研究所の中に日本動物代替法検証センターが設立されている。また、こうした動きを法律で明文化した動物愛護法が2005年に改正され、科学的利用に供する場合の方法の項に、いままであった苦痛の軽減のほかに、使用数の削減、および動物を用いない他の方法を用いることが記載されている。

そこで我々は、最小限の動物実験で最大限のかび毒の毒性評価を行うため、まず、真核微生物である酵母の遺伝子を用いて、大まかな毒性評価を実施出来る方

法を開発したので紹介したい。

また、DNA マイクロアレイは、特定の DNA を有している生物の網羅的検出にも有効であり、ここでは、食品中に含まれる有害なかびについて、検出する方法についても紹介する。

2. 食品中に含まれる主要なかび毒

かび毒の中でも最も有名かつ有害であるものとしては、アフラトキシン群が第一にあげられる。アフラトキシンとは、 B_1 , B_2 , G_1 , G_2 を始めとする 10 数種の関連物質の総称であり、熱帯から亜熱帯地域にかけて *Aspergillus flavus* などのかびにより産生され、紫外線の照射により強い蛍光を発することが特徴的である。熱に強く、通常調理などに用いられる加熱状態では、分解されずに残留する割合が高い。アフラトキシンは、1960 年にイギリスで七面鳥が大量死した際の分析中に発見された。人に対する急性中毒の例としては、1974 年にインドで肝炎のために 106 名が死亡した事件やケニアでの急性中毒事件などがある。日本では検疫所の検査や自治体の衛生研究所などのモニタリング調査により厳重な監視が行われている¹⁻³⁾。

また、ある種類の植物病原菌は作物に病気を起こすだけではなく、人や家畜に健康被害を及ぼすかび毒を産生する。麦類に赤かび病を起こす *Fusarium graminearum* はかび毒を産生する代表的な植物病原菌である。本病原菌の産生する毒素で最も有名なものはデオキシニバレノール (DON) とニバレノール (NIV) というトリコセン系のかび毒である。図 1 に DON と NIV の構造式を示した。

DON には、アフラトキシンのような明確な発がん性は知られていないが、悪心、嘔吐、腹痛、めまい、下痢、頭痛等の諸症状を伴う中毒症を引き起こす急性毒性があることは昔からよく知られていた。現在問題になっているのは、こうした高濃度の汚染によるものだけではなく、より低濃度の汚染でも、長期間摂取していると成長抑制、体重低下や免疫力低下等ヒトの体に影響を及ぼすような長期毒性である。

このような背景から、FAO (国際連合食糧農業機関) と WHO (世界保健機関) によって設立されたコーデックス委員会では、国際的な政府間機関の間で DON

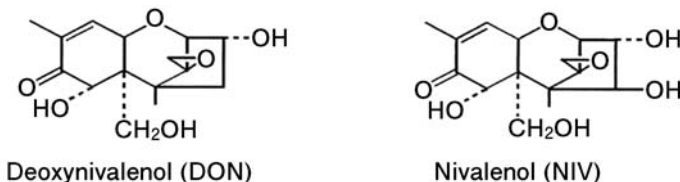


図 1 DON と NIV の構造式

の基準値策定について議論され、我が国でも厚生労働省が2002年にまずDONに関する暫定基準値を1.1 ppm（小麦原粒）に設定した。これにより、現場においては、基準値を越えた場合には自主的に出荷を停止することとなるため、生産者にとっては単なる減収以上の大きな経済的打撃を受けることになり、事態は深刻さを増している。本州、特に西日本ではNIVを産生する赤かび病菌も多く分布していると言われ、今後、NIVも規制に含めるべきかどうか議論されて行く事が予想される。なお、赤かび病に関係のあるかび毒にはDONやNIV以外にも、T-2トキシン等、トリコテセン系のかび毒が知られている。1931～47年、旧ソビエト連邦では、ほ場で越冬させた穀類により中毒事故が発生しており、T-2トキシンが原因と推定されている。我が国でも、T-2トキシンを含むトリコテセン類のかび毒の健康被害が1940～50年代に発生している^{4,5)}。

ゼアラレノンも同様に麦類やトウモロコシに寄生した*Fusarium graminearum*などが産生する。作用機序としては、エストロジェンのアゴニストとして作用し、肝臓、消化管粘膜、赤血球あるいは消化管微生物によって代謝され、 α -ゼアラレノールおよび β -ゼアラレノールとなり、それぞれはさらに代謝されて α および β -ゼアララノールとなる。この代謝反応は動物種によって大きく異なる。家畜の中では豚の感受性が高いため、飼料に含まれることが許容されるゼアラレノンの最大値が1.0 ppmと暫定的に定められている（2002年、農水省畜産部飼料課長通知）。未成熟豚の外陰部の肥大、性成熟豚の発情間隔の延長、妊娠豚の死流産などが見られ、流産や卵巣周期と無関係な発情兆候などがみられることがあり、今後人への影響も含めて十分な監視が必要なかび毒である^{6,7)}。

パツリンは、ペニシリウム属（アオカビ類）*Penicillium expansum*等によって作られるかび毒である。一般に腐敗したリンゴで見られ、リンゴ製品のパツリンの量は製品の品質の基準として用いられる^{8,9)}。コーデックス委員会では、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （=0.050 mg/kg ）の最大基準値が設定されるとともに、りんご果汁及びりんご果汁を原材料とする飲料のパツリン汚染防止及び削減のための行動規範が採択されている。これを受けて、わが国では、食品衛生法（食品、添加物等の規格基準）が平成15年11月26日に改正され、「りんご果汁（濃縮果汁含む）及び原料用りんご果汁」に「0.05 ppm」と基準値が設定された。図2にパツリンの構造式を示した。

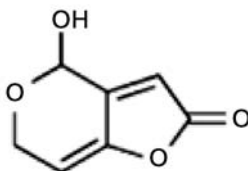


図2 パツリンの構造式

3. DNA マイクロアレイと酵母を用いたかび毒の毒性評価

20 世紀末に開発された DNA マイクロアレイ技術は、網羅的な遺伝子発現解析を可能にした。その結果、少数の遺伝子発現解析による微視的な視点の生物反応の研究から、ほぼすべての発現遺伝子の解析を通した、よりグローバルな視点での研究が可能になった。DNA マイクロアレイでは、目的遺伝子の増減をプローブとのハイブリダイゼーションの有無とその量で検出する。基本は調べたい遺伝子（群）と相補性のある配列の一部をスライドやメンブラン上にスポットし、それに対してサンプルの蛍光標識した mRNA (cDNA) をハイブリダイズさせ、シグナルの有無・増減を検出器で検出する方法である。蛍光標識の方法としては、解析したい研究材料や状態により、単色法と 2 色法のどちらかが選択される。単色法は、図 3 のように特定遺伝子の経時的発現量の変化などを解析する場合に有効な手段である。

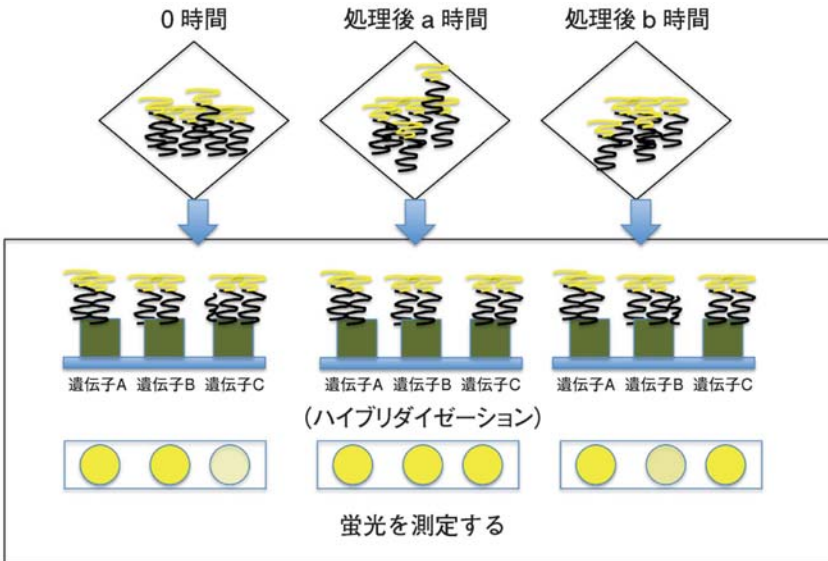


図 3 単色法による DNA マイクロアレイを用いた発現解析

この場合、遺伝子 A に対し、遺伝子 B では 0 時間から b 時間までにその発現量は減少し、遺伝子 C ではその逆に時間の経過とともに、発現量が増加しているのがわかる。

一方 2 色法 (図 4) では、解析したい遺伝子配列と相補な配列 (プローブ) をアレイ基盤上に配置し、そこへ別々の色素で蛍光標識したサンプルの mRNA

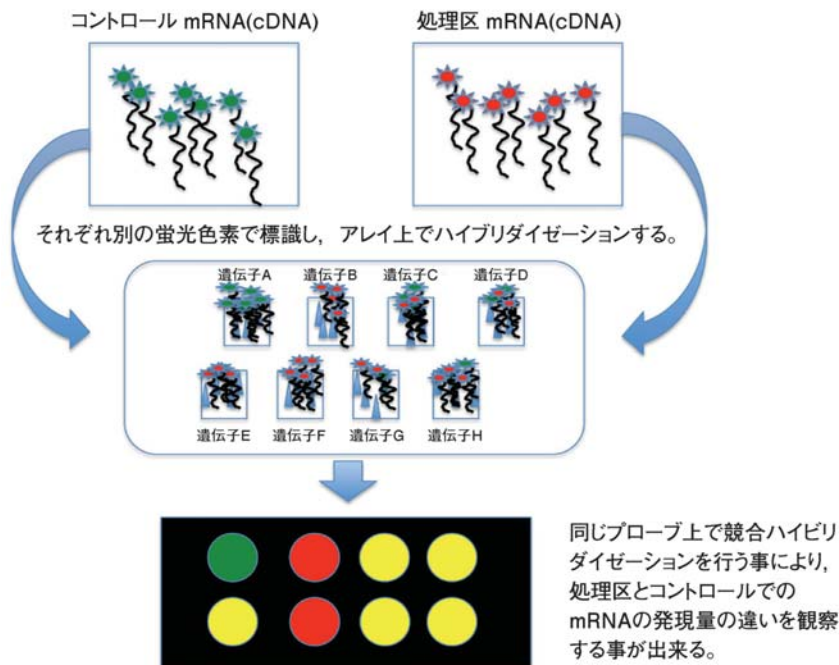


図 4 2 色法による DNA マイクロアレイでの発現解析

(cDNA) とコントロールの mRNA (cDNA) をハイブリダイゼーションさせる。コントロールと比べて mRNA 発現量の変化が見られる遺伝子については、蛍光強度の増減と色調の変化の形で検出することが出来、遺伝子発現の量的変化とともに質的变化も同時に捕らえることが出来る。

また、DNA マイクロアレイの作成方法にも数種類の方法があるが、紙面の都合上割愛させていただきたい。

当研究ユニットでは、かび毒に関する毒性試験を取り巻く背景から、動物試験の前段階での一次スクリーニングを視野に入れ、酵母細胞を用いた DNA マイクロアレイによるかび毒の毒性解明を試みてきた。パンや酒等、発酵を必要とされる食品に用いられる酵母細胞は、一般に増殖が早く（倍加速度 2 時間程度）広く自然界に分布している微生物である。さらに、酵母細胞は、単細胞ではあるが真核生物であり、生きる為のすべての機能を一つの細胞の中に有している。また、約 6,000 種ある遺伝子のすべての 1 次配列が明らかにされており、生物種の中では群を抜いてその遺伝子の機能情報が充実している。遺伝子の機能情報はかび毒の毒性を解析する上で重要であり、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解

析に非常に適した生物種であると考えている。さらに特筆すべきは、上記のように食品等に昔から使われており、その安全性が確立していることから、特段の注意なく使える点で優れている事である。

本研究では 6,037 種類の酵母遺伝子発現解析が可能な ORF (Open Reading Frame) 型 DNA マイクロアレイ (DNA chip research Inc., Yokokawa Japan) 及びオリゴプローブ型 DNA マイクロアレイ (3D-Gene Yeast OligoChip 6K, Toray Industries Inc., Tokyo Japan) を用いた。3D-Gene Yeast Oligo Chip 6K は黒い樹脂製の柱状構造の上端面にプローブを固定し、さらにこの柱状構造を利用して、柱間にビーズを転がすことにより、溶液中のターゲットとプローブ DNA の反応促進を行い、感度をあげる事を可能にしている方法である。

4. 暴露量の決定と暴露方法

まず、DNA マイクロアレイでかび毒の毒性を解析する為には、酵母にかび毒を曝露しなければならない。暴露量の決定方法には様々な方法があるが、当研究ユニットでは、再現性のある mRNA の変化を捉える為には、その毒物により酵母細胞に明らかな障害が出る量が必要であると考えている。この明らかな障害が出るということにも、研究者によって様々な基準が用いられ、単一の基準が決め

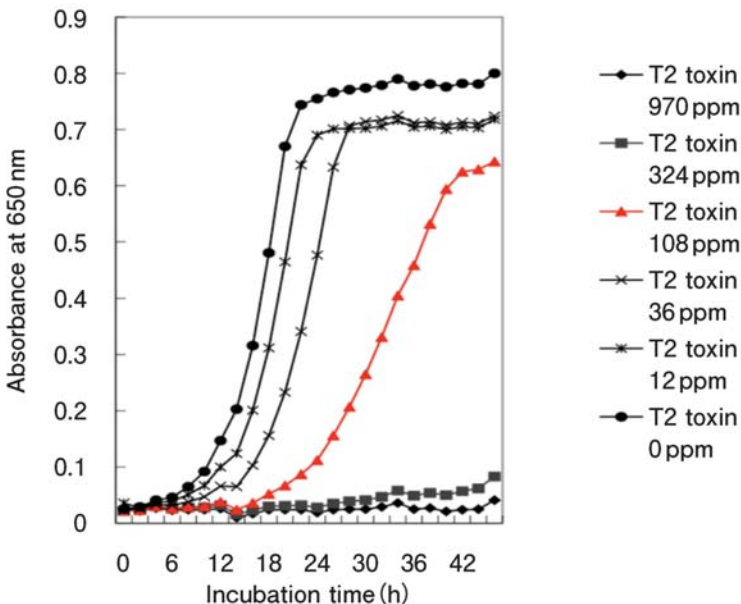


図 5 T-2 トキシン曝露時の増殖曲線の変化

られているという事ではない。一般に、障害を受けた酵母細胞は回復時に生育速度を弱めて修復を優先する。逆に言うと、生育速度が遅くなるということは、何らかの障害を受けて、その修復をしていると考えられ、その時に誘導されている遺伝子群が受けた障害の影響を反映すると考える事が出来る。

以下に T-2 トキシンの添加量に対する、酵母の増殖曲線の変化を示した (図 5)。この図からもわかるように、添加したかび毒の量によって増殖曲線が異なってくる。我々の実験では、一定の基準をもうけるという意味で、増殖曲線に影響を与えない曝露量と全く酵母が増殖しない曝露量の中間の濃度 (IC_{50}) を用いている。図 5 の増殖曲線では、108 ppm に相当する量である。

曝露量が決定したら、対数増殖期の酵母細胞にかび毒を添加し、2 時間培養を継続したのち、酵母細胞を集菌して mRNA を抽出する。曝露群の mRNA を赤色の蛍光で、被曝露群の mRNA を緑色の蛍光でそれぞれ標識し、DNA マイクロアレイに同時に添加する。各遺伝子に対応したプローブとイゼーションにより、プローブに結合した各遺伝子の量を蛍光色素の量で測定する。これにより、約 6,000 種類の遺伝子それぞれについて、曝露群と被曝露群の発現量の差異を評価することが可能になる。

5. パツリンと T-2 トキシンの毒性評価例

パツリンの毒性は、動物実験において、消化管の充血、出血、潰瘍等の症状が観察されている。一方 T-2 トキシンはフザリウムトキシンと呼ばれるトリコテセン系のかび毒の一種であり、動物では、骨髄、胃腸管の粘膜上皮、皮膚、生殖細胞等の細胞分裂が盛んな組織において、特に強く毒性を発揮する。また、細胞膜の構造や機能に影響を与えたり、細胞内のミトコンドリアの呼吸を阻害したり、ある種の酵素を不活化したりといった多くの作用を持っていることが知られている¹⁰⁾。

5.1 パツリンまたは T-2 トキシンによって発現が変動する遺伝子の特徴

MIPS (Munich International Center for Protein Sequences, <http://mips.gsf.de/projects/>) データベース (2008 年 12 月時点で 6,130 遺伝子掲載) を利用して、パツリンによって発現が変動する遺伝子について、機能別に解析を試みた¹¹⁾。遺伝子の選択は、コントロールに比べて、2 倍以上誘導された遺伝子、あるいは半分以下に抑制された遺伝子を用いている。図 6 には、パツリンと T-2 トキシンそれぞれを曝露した時に変動する遺伝子を機能別に分類したものを載せている。T-2 トキシン曝露では、metabolism, energy, cellular communication, cell rescuer そして development カテゴリーで顕著な遺伝子発現の誘導が見られ、パツリン曝露においては、protein fate, cell rescuer カテゴリーにおいて、顕著な誘導が観察された。

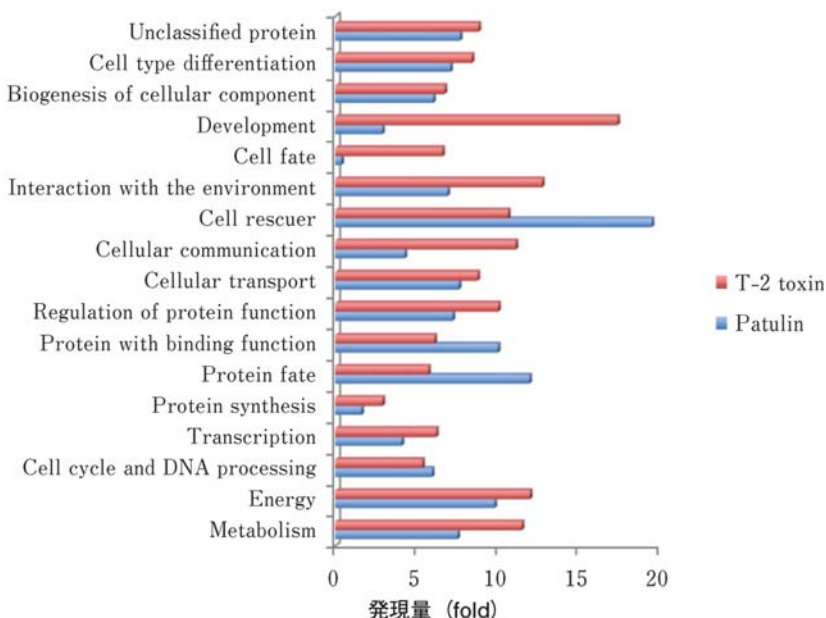


図 6 パツリンと T-2 トキシン曝露後の酵母細胞の遺伝子群の発現量の変動
(コントロールに比べて, 2 倍以上発現している遺伝子群のみ抜粋)

このように, 曝露した物質によって, 酵母細胞の反応は異なる。次に, それぞれのかび毒により変動する遺伝子の特徴とそこから推測される毒性について述べる。

5.2 パツリンにより発現量が変動する遺伝子の特徴

表 1 にパツリン曝露により高発現した遺伝子のうち, protein fate カテゴリーに含まれるものを記載した。最も発現が誘導されている遺伝子は DDI1 であり, UBC5, UMP1, ATG1, NLP4 と続く。このカテゴリーの遺伝子発現が誘導されているということは, タンパク質の分解, 代謝が進んでいるということを意味し, 実際にプロテアソーム系の遺伝子発現が多く誘導されている。特に DDI1 はアルキル化により DNA がダメージを受けた際に高発現が見られる遺伝子であり, ubiquitin-associated domain を有する遺伝子であることは注目に値する。また, 表 2 にパツリン曝露で高発現する遺伝子群のうち, 酸化ストレス及びメチオニン代謝に関する遺伝子を掲載した。GTT2 (glutathione S-transferase), TRX2 (Thioredoxin II), TSA2 (thiol peroxidase) など, 酸化ストレスだけではなく SH 化合物との関わりを持つ遺伝子が多く発現誘導されていた。同時にシステイ

表 1 パツリンによって発現誘導される遺伝子例 (抜粋)

PROTEIN FATE			
SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YER143W	14.8	DD1	DNA Damage Inducible
YDR059C	7.8	UBC5	Ubiquitin-Conjugating
YBR173C	6.6	UMP1	Ubiquitin-Mediated Proteolysis
YBR170C	5.0	NPL4	Nuclear Protein Localization
YMR174C	4.7	PAI3	Proteinase A Inhibitor
YKL103C	4.2	LAP4	Leucine Amino Peptidases
OXIDATIVE STRESS			
SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YLL060C	14.2	GTT2	Glutathione Transferase
YOL151W	9.3	GRE2	Stress Responsive Genes
YKL086W	5.3	SRX1	Sulfiredoxin
YPL223C	4.7	GRE1	Stress Responsive Genes
YGR209C	4.4	TRX2	Thioredoxin Isoenzyme
YDR453C	4.0	TSA2	Thioredoxin Peroxidase
METHIONINE METABOLISM			
SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YLR303W	11.9	MET17	Methionine and Cysteine Synthase 3'-Phosphoadenylsulfate
YPR167C	8.9	MET16	Reductase
YJR010W	6.4	MET3	ATP Sulfurylase
YIR017C	3.0	MET28	Basic Leucine Zipper
YFR030W	2.8	MET10	Assimilatory Sulfite Reductase
YNL277W	2.6	MET2	L-Homoserine-O-Acetyltransferase

表 2 パツリン曝露により発現誘導される DNA 修復関連遺伝子群

SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YDL059C	5.7	RAD59	Repair of double-strand breaks in DNA
YGL163C	5.3	RAD54	Recombinational repair of double-strand breaks in DNA
YER142C	3.9	MAG1	Protecting DNA against alkylating agents
YAR007C	3.4	RFA1	Replication Factor A
YEL037C	2.8	RAD23	Protein with ubiquitin-like N terminus, recognizes and binds damaged DNA

ン合成関連遺伝子である MET3 (sulfate adenylyl transferase), MET17 (Methionine and cysteine synthase), MET16 (3-phosphoadenylyl sulfate reductase) 等が高発現し、システインから合成されるグルタチオンが増加して、そのグルタチオンによる解毒作用が誘導されていると考えられた。データには示していないが、高濃度のグルタチオン添加により、パツリンの毒性が緩和されることから¹¹⁾、パツリンの解毒に S-化合物が関与していると考えられる。

さらに、表 2 に示すように、組み替え DNA 修復に関する遺伝子 (RAD59, 52, 54 RFA1) 等がパツリン曝露により高度に発現している。組み替え DNA 修復が変異を起こしやすい修復であることから、パツリンには変異原性の疑いがあることを否定する事が出来ない。パツリンがリンゴジュースに混入しやすいこと、リンゴジュースが離乳期の子供に最初に与えられるジュースの一つとして好まれる事を考慮すると、今後パツリンの変異原性については、少量、長期に渡る摂取も含めて、さらなる詳細な検討が必要であると言える。

5.3 T-2 トキシンによって変動する遺伝子の特徴

トリコテセン系のマイコトキシンである T-2 トキシン曝露では、糖新生関連遺伝子 (SIP4 等) や物質の移動に関連する遺伝子 (HXT11, 9, 12, PHO89 等) が多く発現誘導され、これらの結果から T-2 トキシンが酵母の膜構造に重大なダメージを与えているのがわかる (表 3)。

さらに、FUS3 (mitogen-activated protein kinase gene) 等、細胞増殖停止に関連する遺伝子が高度に発現誘導され、これは妊娠マウスで mitogen-activated protein kinase gene pathway が誘導されるのと非常に類似したパターンを示している¹⁰⁾。

表 3 T-2 トキシンによって誘導された遺伝子群 (抜粋)

SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	DESCRIPTION
YJL089W	15.7	SIP4	Interacts with SNF1 protein kinase
YOL156W	15.7	HXT11	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity
YJL219W	12.8	HXT9	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity
YOL052C-A	12.0	DDR2	Heat shock protein DDRA2
YHR137W	11.4	ARO9	Aromatic amino acid aminotransferase II
YIL170W	10.7	HXT12	Strong similarity to sugar transport proteins
YFL058W	9.4	THI5	Ppyrimidine biosynthesis protein
YBL016W	8.4	FUS3	Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)
YBR296C	8.2	PHO89	Na ⁺ /phosphate co-transporter

表 4 T-2 トキシン曝露により発現誘導される DNA 修復関連遺伝子群

SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YGL163C	1.0	RAD54	Recombinational repair of double-strand breaks in DNA
YDL059C	0.9	RAD59	Repair of double-strand breaks in DNA
YER142C	0.5	MAG1	Protecting DNA against alkylating agents
YAR007C	0.4	RFA1	Replication Factor A
YEL037C	0.5	RAD23	Protein with ubiquitin-like N terminus, recognizes and binds damaged DNA

さらに、表 4 に示したように、T-2 トキシン曝露では組み替え修復関連遺伝子 (RAD54 等) や除去修復関連遺伝子 (RAD 23 等) はほとんど発現誘導されていない。このことから、パツリンとは異なり、T-2 トキシンには強い変異原性はないものと考えられた。

6. マイコトキシンの毒性を酵母遺伝子マイクロアレイで解析する際の問題点

以上のように、酵母細胞の DNA マイクロアレイを用いて、その毒性を解析した 2 例を示した。この 2 つのかび毒は酵母細胞の増殖を比較的低濃度で阻害し、反復実験での再現性も納得の出来るものであった。

しかしながら、基本的に酵母はかび毒の毒性に対して耐性であり、著しい毒性の現れないかび毒の方が多かった。そこで、1 遺伝子破壊株プールより選抜した変異株について、かび毒に感受性株の選抜を行うとともに、かび毒の毒性 (取り込み) を増強するような界面活性剤についても検討をおこなっている。数種の変異株では、かび毒に対し感受性が高く、また、0.01% 程度の SDS がさらにかび毒の取り込みを促進させることがわかって来た。現在このような変異株 + 界面活性剤を用いて、多種類のかび毒について DNA マイクロアレイを用いて毒性の解明を行っている¹³⁾。

7. DNA マイクロアレイを用いた、かび類の検出及び同定

現在、食品安全行政の体系は、発生した事故への後追的な対策を主とするものではなく、予想されるあるいは可能性のあるハザードに対する予防的措置に重点を置いている。特に有害微生物が引き起こすハザードに対する対策には、一次生産段階でのハザードの量の把握と同時に流通期間中のハザードの増加等を考慮しなければいけない。食中毒菌等の微生物等をいち早く検出する技術としては、ATP 測定法や PCR 法を用いた検出方法など、様々な方法が開発され、現在キット化されて安価に販売されている。しかしながら、かび毒のような有害な化学物質を生産するかび類の検出・同定には、未だに専門知識が必要とされる平板培養

後の形態観察や一部分の DNA 配列解析からの同定などが行われ、数日を要しながらも実際には正確な判断が出来ない場合も多いのが現実である。

現在ではかび毒そのものの検査には、化学的測定法や免疫学的測定法などが使われ、その結果として汚染食品などの除去が実施されている。しかしながら、かび類の生育特性上、食中毒菌等とは異なり、水ぬれした部分など食品の一部に限定して生育している場合があり、適切なサンプリングが容易ではないことが散見される。また、化学物質そのものは増幅出来ないために、存在している微量のかび毒（生産かび）を見逃し、その後の流通過程でかびが増殖することにより重大な被害をもたらす可能性も指摘されている。また、地球温暖化など環境の変化により、今まで汚染がないとされてきた作物に、新たなかび毒を生産するかびが寄生する可能性が十分に考えられる。この場合、特定のかび毒による汚染があると予測して行う化学的測定法や免疫学的測定法では汚染の検出が不可能である。このような状況を鑑みた場合、今後はかび毒量の検査そのものの微量化を図るだけでなく、かび毒生産かびそのものを網羅的に検出・定量する方が、より現実的に予防という観点に立った食品安全行政に寄与できる方法であると考えられる。

7.1 本研究課題の特徴

- ① 測定対象がかびの DNA であるために増幅することが可能で、極微量のかびに汚染されていても検出することが出来る。
- ② 2 色法を採用することによる標準かびとの競合交雑により、検出だけでなく定量が可能になるため、貯蔵・流通時の増殖・汚染拡大予測が可能である。
- ③ エアレーション等胞子の収集法に工夫を加えることにより、かびの生育特性上問題となるまだら汚染にも対応出来、より精度が向上する。

7.2 プローブの設計

以下に 2 種類のかび (*Aspergillus flavus* と *Fusarium graminearum*) を同時に検出・定量する為のマイクロアレイのプローブの設計方法を示した (図 7)。

両者のリボゾーム領域及び ITS 領域のゲノム配列を比較し、一致しない部分について、出来るだけ多くのプローブを設計して、マイクロアレイ基盤上に搭載する。

DNA の増幅は共通配列よりプライマーを設計し、その共通プライマーを用いて行うこととする。

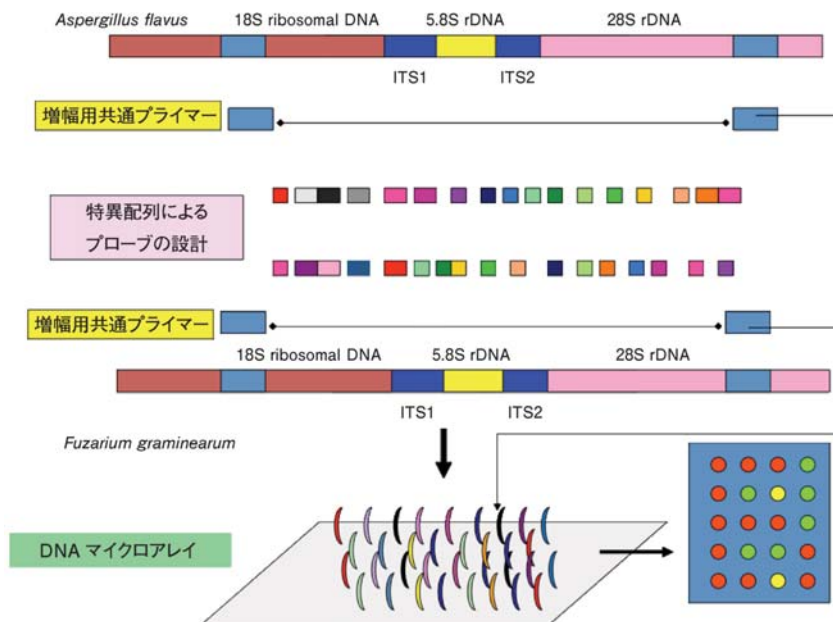


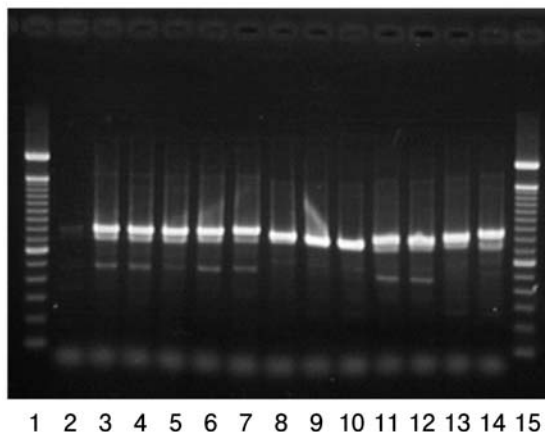
図 7 かび類検出用プローブ及び増幅用共通プライマーの設計図

7.3 増幅条件の決定

本法のターゲットが食品であるため、DNA の抽出時に、PCR 反応を阻害するような物質が入り込み、増幅効率が落ちる現象が観察された。そこで、かびの DNA の増幅法は LATE (Linear-After-The-Exponential)-PCR 法を応用した。本方法は、2 種類のプライマーの濃度を変化させ、PCR 反応中において、2 段階反応を行わせようというものである。まず、第 1 段階では、従来の遺伝子増幅反応を用いて 2 本鎖 DNA を生成させ、その後の第 2 段階で濃度の濃いプライマーによる片方鎖だけの増幅反応を行うものである。この 2 段階反応の結果として、2 本鎖 DNA と片方鎖だけが増幅された 1 本鎖 DNA の混合物が蓄積する。マイクロアレイ上でのプローブと DNA の交雑は、2 本鎖に比べて 1 本鎖の方が格段にその反応性がよいので、従来法に比べて約 1000 倍程度の感度の上昇が期待できる。

図 8 は実際に 13 種類のかびについて、LATE-PCR 法を用いて増幅し、その後制限酵素で 2 重鎖を切断して電気泳動を行ったもので、1 種類のプライマーセットで、すべてのかびについて 1 本鎖が合成されているのがわかる。

図 9 は同じ量の *F. tricinctum* と *A. flavus* の DNA をそれぞれ cy3, cy5 で蛍



LANE	SAMPLE
1	100 pb ladder
2	<i>A. clavatus</i>
3	<i>A. parasiticus</i>
4	<i>A. oryzae</i>
5	<i>A. ochraceus</i>
6	<i>A. flavus</i>
7	<i>A. terreus</i>
8	<i>F. tricinctum</i>
9	<i>F. sporotrichioides</i>
10	<i>Gibberella zeae</i> = <i>F. graminearum</i>
11	<i>P. viridicatum</i>
12	<i>P. purpurogenum</i>
13	<i>C. purpurea</i>
14	<i>T. viride</i>
15	100 pb ladder

図 8 LATE-PCR 法で増幅したかび類 DNA の例

光ラベルし、図 7 で設計したような DNA マイクロアレイ上でハイブリダイズしたものである。

この結果は、2 種類のかびの配列の違いをはっきり表している。これらの情報から、DNA マイクロアレイを用いてかびの検出ができるものと考え、この成果をもとに特許を出願した¹⁴⁾。

7.4 問題点と展望

本研究で設計したマイクロアレイは、近縁種を明確に分離出来ないという問題点があり、また、食品中からかびの DNA をいかに完全に近い状態で抽出するか

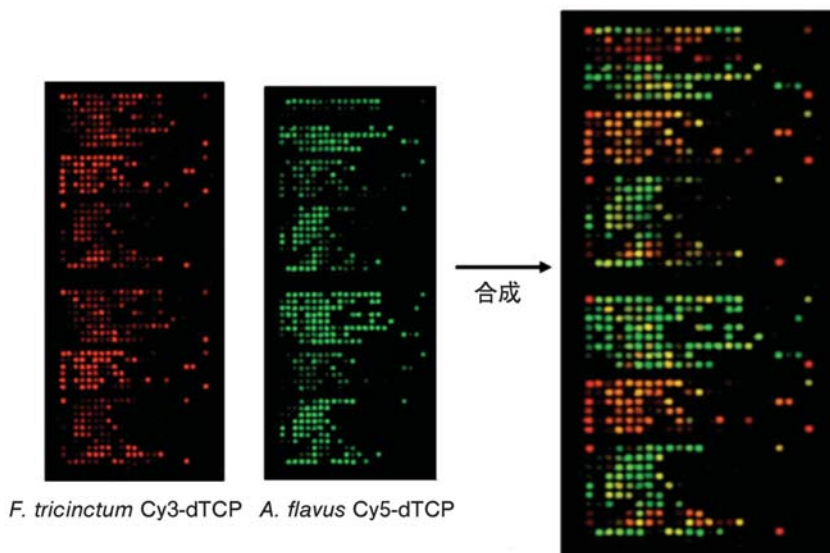


図 9 Microarray from LATE-PCR hybridized with different strains.

という点に問題が残っている。プローブの改良等本研究のさらなる発展により、かび毒生産かび汚染というハザードを今までよりさらに緻密に検出する事が出来るようになり、予防的観点を含むより安全な食品を国民に提供できるものと考えている。

(微生物利用研究領域 微生物評価ユニット 岩橋 由美子)

参考文献

- 1) Incidence of seed-borne fungi and aflatoxins in Sudanese lentil seeds, S. A.F. El-Nagerabi, A.E. Elshafie, Mycopathologia 149, 151-156 (2000)
- 2) Seed borne fungi and mycotoxins associated with some legume seeds in Egypt, E.M. Embaby, M.M. Abdel-Galil, Journal of Applied Science Research 2, 1064-1071 (2006)
- 3) Free fatty acid accumulation and quality loss of stored soybean seeds invaded by *Aspergillus rubber*, O.D. Dhingra, E.S.G. Mizubuti, I.T. Napoleao and G. Jham, Seed Science and Technology 29, 193-203 (2001)
- 4) Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites, G. S. Eriksen, H. Pettersson, T.

- Lundh, Food and Chemical Toxicology, 42, 619-624 (2004)
- 5) Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials, G. Avataggiato, R. Havenaar, A. Visconti, Food and Chemical Toxicology, 42, 817-824 (2004)
 - 6) Zearalenone production by *Fusarium* species isolated from soybeans, G. Vaamonde, G. Scarmato, N. Bonera, International Journal of Food Microbiology, 4, 129-133 (1987)
 - 7) Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E, L. Ghédira-Chékir, K. Maaroufi, A. Zakhama, F. Ellouz, S. Dhoub, E.E. Creppy, H. Bacha, Chemico-Biological Interactions, 113, 15-25 (1998)
 - 8) Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey. T. Yurdun, G.Z. Omurtag, O. Ersoy, J. Food Prot., 64, 1851-1853 (2001)
 - 9) Development of liquid chromatography electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: investigation of its contamination levels on Japan. R. Ito, H. Yamazaki, K. Inoue, Y. Yoshimura, M. Kawaguchi, H. Nakazawa, J. Agric. Food Chem., 52, 7467-7468 (2004)
 - 10) Microarray analysis of T-2 toxin-induced liver, placenta and fetal liver lesions in pregnant rats, S. Sehata, N. Kiyosawa, F. Atsumi, K. Ito, T. Yamoto, M. Teranishi, K. Uetsuka, H. Nakayama, K. Doi, Microarray analysis of T-2 toxin-induced liver, placenta and fetal liver lesions in pregnant rats. Exp. Toxicol. Pathol., 57, 15-28 (2005)
 - 11) Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. Y. Iwahashi, H. Hosoda, J. Park, J. Lee, Y. Suzuki, E. Kitagawa, S. Murata, N. Jwa, M. Gu, H. Iwahashi, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1936-1942 (2006)
 - 12) Analysis of mechanisms of T-2 toxin toxicity using Yeast DNA microarrays, Y. Iwahashi, E. Kitagawa, H. Iwahashi, International Journal of Molecular Sciences, 9, 2585-2600 (2008)
 - 13) Mycotoxin toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* differs depending on gene mutations, T. Suzuki, S. Sirisattha, K. Mori, Y. Iwahashi. Food Science and Technology Research, 15, 453-458 (2009)
 - 14) **かびの検出方法, それに用いるマイクロアレイ及び検出用キット** 岩橋由美子, 細田 浩, 岩橋 均, 北河恵美 (特開 2006-179396)

IV 微生物が生産する高機能オリゴ糖・ サイクロデキストラン (CI) の 発見から実用化に至るまで

1. はじめに

オリゴ糖は、単糖が2個から数個（20個程度までを指すこともある）重合した糖質である。ビフィズス菌増殖因子、抗う蝕性、非う蝕性、低カロリー、さわやかな甘味など、様々な優れた機能性を有するものも多い。何種類かのオリゴ糖は工業的に酵素生産され菓子や飲料に用いられている。

オリゴ糖には直鎖構造のものと、環状構造のものがある。直鎖構造のオリゴ糖は低カロリー・甘味料、整腸作用、保湿作用などの有用な性質をもつものが多い。デンプンから工業生産されるイソマルトオリゴ糖（ α -1,6結合から成るイソマルトースとイソマルトトリオース、および α -1,6と α -1,4結合から成るパノースの混合物）はおなかの調子を整える作用がある。グルコース2分子が α -1,1結合したトレハロースには、さわやかな甘みや食味改善効果、保湿効果があり、加工食品などに利用されている。これら直鎖オリゴ糖で実用化されているものはほとんど2糖あるいは3糖の低分子のものである。

一方、環状オリゴ糖は環状構造の内側に種々の物質を取り込み、包接体を作る機能が知られている。サイクロデキストリン (CD)¹⁾、サイクロフルクタン (CF)²⁾、サイクロアルタナン (CTS)³⁾ などが知られているが、現在産業的に広く利用されている環状オリゴ糖はCDのみで、 α -CD、 β -CD、 γ -CD（順に α -1,4結合したグルコース分子6, 7, 8個から成る）の3種類がある。

著者らの研究グループは1993年の発見から現在に至るまで、環状オリゴ糖の一種であるサイクロデキストラン (CI)⁴⁾の研究開発を行ってきた。CIはCDと同様グルコースが環状に連結した構造であるが、結合様式がCDは α -1,4結合なのに対してCIは α -1,6結合である点が異なる。発見当初の目的はCDでは包接できない難溶性物質を包接する新規の環状オリゴ糖を検索することであり、水溶性グルカンであるデキストランを炭素源とした培地を用いて新規オリゴ糖を蓄積する菌株をスクリーニングした。その結果、小熊らにより、*Bacillus circulans* T-3040株が取得された⁴⁾。本菌株はデキストランを含む培地で培養すると、7~9個のグルコースが α -1,6結合のみで環状に連結したサイクロデキストラン、順にサイクロイソマルトヘプタオース (CI-7)、サイクロイソマルトオクタオース (CI-8)、サイクロイソマルトノナオース (CI-9) を菌体外に生産する⁴⁾。後にグルコース10個以上が重合した高分子のCIも生産されることが明らかになり⁵⁾、現在のところCI-7~CI-17までの11種類のCIが構造決定されている⁶⁾。構成しているグルコー

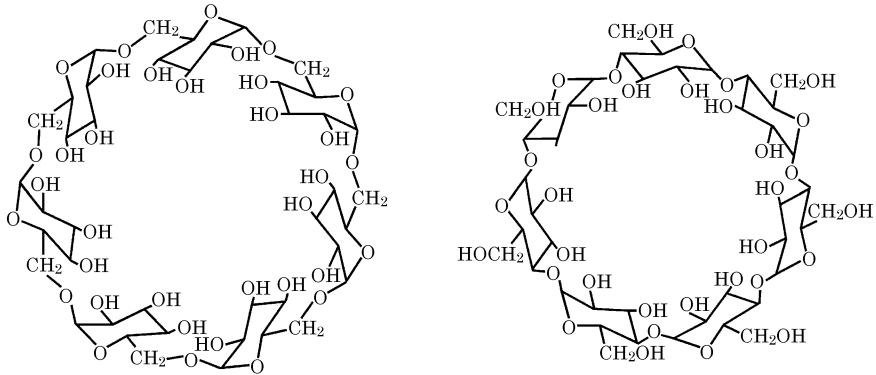


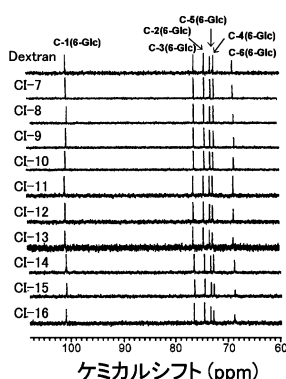
図 1 サイクロデキストラン CI-7 (左) とサイクロデキストリン β -CD (右) の構造

ス分子の数は、CI では 7 個以上と CD と比較して重合度が高い。図 1 にグルコース 7 個から成る CI-7 と、同じく 7 個のグルコースから成る β -CD の構造を示す。CI と CD は結合様式が異なり、同じ数のグルコース分子のものでも環の口径が CI のほうが大きい。また、CI は CD に比して極めて水溶性が高く、CI のみがう蝕菌のグルカン合成酵素を阻害して歯垢の形成を防ぐ作用を持つ⁷⁾。CI の歯垢形成阻害作用は、ショ糖の存在下でも発揮されるという特徴がある。この特徴を利用して、CI を加えて歯垢をできにくくした黒糖甘味料が 2008 年に製造・販売されるに至った。また、当初から目的としていた包接剤としての機能としては、イソマルトデカオース (CI-10) 以上の高分子の CI に強い包接能が見いだされ、現在、包接剤としての実用化に向けて研究開発中である。

2. サイクロデキストランの発見

デキストランを原料として環状オリゴ糖を生成する菌をスクリーニングするために、ブルーデキストラン 2000 (アマシャム・バイオサイエンス社製) を炭素源として加えた固体培地に土壌抽出物などを塗抹し、ハローを形成する (ブルーデキストランの分解によりハローが生じる) デキストラン資化性菌を選抜した。選抜した菌を、デキストラン 40 (アマシャム・バイオサイエンス社製) を含む培地で液体培養し、培養液を、Amide-80 カラム (Tosoh 社製) を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。現れたオリゴ糖ピークは、すべての α -1,6 結合を分解するエンド型デキストラナーゼ処理によって消失したが、 α -1,3 グルカナーゼや α -アミラーゼでは分解されなかったことから、本オリゴ糖は α -1,6 グルコシド結合より成ると推定できた。また、エキソ型グルカナーゼでは分解せず、末端構造を持たないことが推測できた⁴⁾。次に、各オリゴ糖ピークを集めて

A



B

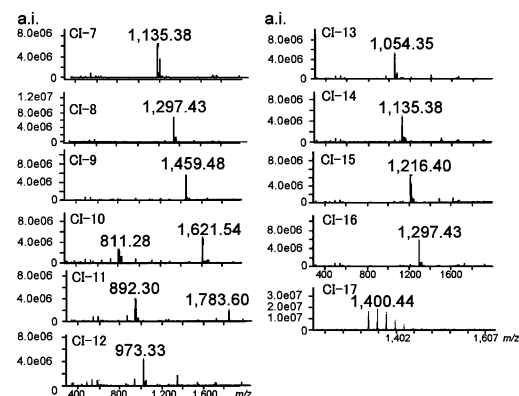


図 2 サイクロデキストラン CI-7～17 の ^{13}C NMR 分析 (A) と質量分析 (B)

^{13}C NMR 分析, 質量分析などで CI-7～17 の構造決定を行った。 ^{13}C NMR 分析結果を図 2A に, 質量分析結果を図 2B に示す。図 2A より, CI-7～CI-16 はいずれも基質のデキストランと同じ α -1,6 グルコシド結合を示すシグナルのみ検出されているのがわかる。図 2B では, CI-7, 8, 9, 10, 11 については $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオン, CI-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 については $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ イオン, CI-17 については $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ イオンが観察できた。質量分析結果から CI-7～17 の推定分子量は順に 1134, 1296, 1458, 1620, 1782, 1944, 2106, 2268, 2430, 2592, 2754, 2916 となり, 同じ重合度のグルコースから成る直鎖のイソマルトオリゴ糖と比較すると水 1 分子小さい値で, CI が還元末端を持たないことが示唆された。A, B 両者により, CI-7～16 は, α -1,6 グルコシド結合をもつ環状オリゴ糖であることが確認された。

CI-17 については NMR 分析出来るだけの十分な量のサンプルが得られなかったが, 酵素消化試験結果および分子量から推測すると CI であると推測できる。

最初に CI 生産菌として分離された菌は *Bacillus circulans* T-3040 株であった⁴⁾。その後, *B. circulans* U-155 株⁸⁾, *Bacillus* sp. 330K 株⁶⁾, 同 350K 株⁶⁾, 同 360K 株⁶⁾, 同 860K 株⁶⁾, *Paenibacillus* sp. 591K 株⁶⁾, 同 598K 株⁶⁾ の合計 8 株が発見された。これらの菌株はすべてデキストランを炭素源として培養したときに菌体外液中に CI を蓄積したが, 生産する CI 鎖長の組成に違いが見られた (図 3)。*B. circulans* T-3040 株は CI-7, CI-8 および CI-9 を主として生産するが, このうち CI-8 を最も多く生産する⁹⁾。*Paenibacillus* sp. 598K 株も CI-7, CI-8 および CI-9 を主として生産するが, CI-7 を最も多く生産する。これに対して, *Bacillus* sp. 330K 株は CI-8 と CI-10, CI-11, CI-12 の生産量が多く, 同 350K 株, 同 360K 株,

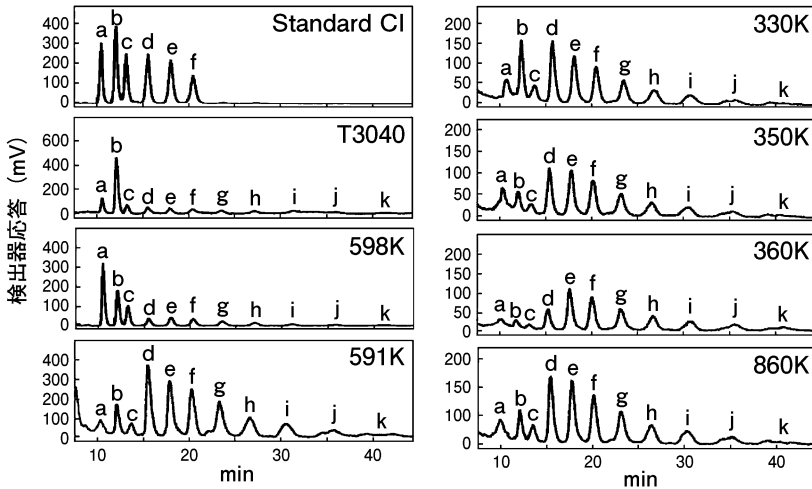


図 3 CI 生産菌がデキストランを含んだ培養液中に生産するサイクロデキストランの HPLC 分析

a : CI-7 b : CI-8 c : CI-9 d : CI-10 e : CI-11 f : CI-12 g : CI-13 h : CI-14 i : CI-15
j : CI-16 k : CI-17

同 860K 株, *Paenibacillus* sp. 591K 株は CI-7 と CI-8, および CI-9 の生産量よりも, CI-10, CI-11, CI-12 を多く生産する菌株であった⁶⁾。菌株の種類によって生産する CI の分子量分布が異なる原因は, それぞれの菌株が持つ CI 合成酵素 (cyclodisomaltooligosaccharide glucanotransferase, CITase)⁹⁾ の違いによるものであると予測している。

3. サイクロデキストランの性質と機能

3.1 サイクロデキストランの一般的物性

CI は図 1 に示すように環状構造であるため末端基を持たず, 従って還元性がなく, 加熱, 酸・アルカリにも強い安定な糖質である。また, 水溶性が極めて高く, 温度や分子量に依らず等量以下の水に溶解する。これは, α -CD, β -CD, γ -CD の水溶性が常温で順に 14.5%, 1.85%, 23.2% である¹⁰⁾ のに比べて非常に高い値である。この性質は, CD よりも高濃度での利用を可能にするため, CD では可溶化できない難水溶性の物質を可溶化・安定化できる可能性を期待させる。また, CI は糖質ではあるがほとんど無味無臭であり, 高濃度で使用しても味や風味を損なうことなく, 有効に異味・異臭をマスキングできると考えられる。

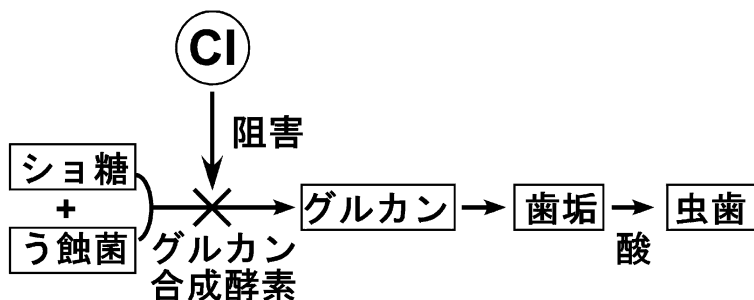


図 4 う蝕の形成とサイクロデキストランの作用点

3.2 サイクロデキストランの抗プラーク活性

図 4 に示すように、*Streptococcus mutans* や *S. sobrinus* などのヒトう蝕菌は、グルカン合成酵素の作用で、ショ糖から非水溶性粘着性のグルカンを作る。歯の表面に固着した不溶性グルカンに菌が付着増殖し、歯垢（プラーク）を形成する。付着したう蝕菌は乳酸を生成して歯の表面のエナメル質を脱灰し、虫歯が形成される。CI はグルカン合成酵素の働きを強く阻害することによって、歯垢の原因となるグルカンの形成を抑制する作用（抗プラーク活性）がある⁷⁾。

小林ら⁷⁾による *S. mutans* 菌の酵素を用いた *in vitro* の試験では、同じくグルカン合成酵素阻害があるとされるパラチノースが 50 mM の濃度で不溶性グルカンの形成を約 7% しか阻害しなかったのに対し、CI-8 は 5 mM で約 75% 阻害した。さらに、福島、今井ら¹¹⁾により、ショ糖の濃度 0.1%～10% で、0.1% (0.88 mM) 濃度以上の CI-7 により顕著に人工プラーク形成が抑制されると報告された。様々な分子量の CI 混合物を用いた場合でも、CI-7 と同程度の人工プラーク形成抑制が観察され、さらに 0.02% 程度まで濃度を下げても抑制効果が確認できた（今井ら、未発表データ）。また、ラットを用いた動物試験においても 0.1% 濃度の CI を添加したう蝕誘発食（56% ショ糖含有）で飼育した *S. mutans* 感染ラットは CI 無添加飼料で飼育した同ラットのう蝕スコアより有意に低いという結果も報告されている¹¹⁾。分子量の違いによって CI のグルカン合成阻害作用に変化がみられるかどうか、CI-7～CI-12 について *S. mutans* グルカン合成酵素の活性を pH 5.5 および pH 7.0 の条件で測定した。少なくとも CI-7 から CI-12 までは分子量にかかわらず、いずれの pH においてもほとんど同じ強さのグルカン合成阻害作用が検出できた⁵⁾（図 5）。なぜ分子量が異なってもグルカン合成酵素阻害強度は同じなのか理由はまだ解明されていないが、CI がフレキシビリティーの高い構造であるために重合度が高くてもグルカン合成酵素の活性中心に結合することができるか、あるいはグルカン合成酵素の触媒部位が大きな分子を受け入れるフレキ

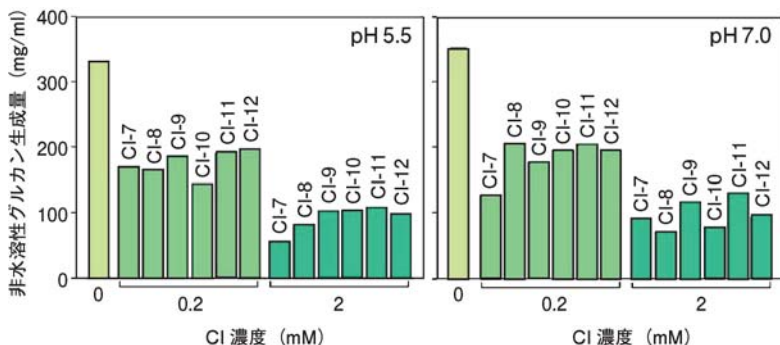


図 5 CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12 による *Streptococcus mutans* 由来グルカン合成酵素の阻害

シビリティーがあることが予測できる。

以上のように CI はショ糖の存在下でもグルカン合成を強く阻害する作用があり、ラットでは実際にう蝕スコアが有意に下がった¹¹⁾。CI は代替甘味料として食品に利用されている非う蝕性の糖類とは異なり甘味はないが、砂糖が存在しても歯垢をできにくくするという優れた特徴がある。この特徴を利用した食品として、最近 CI を添加した黒糖甘味料が実用化され、現在は精製糖や菓子などへの応用も検討されている。

3.3 サイクロデキストランの包接能

CI は CD 同様分子内部が疎水性になっていると考えられ、また、分子モデルから同じグルコース重合度の CD に比べて口径が大きく厚みが薄く、CD よりも分子のフレキシビリティーが非常に高いことが予想されている。CI は高いフレキシビリティーを持った構造であることが原因か、CD と比較すると包接作用は概ね弱いと言われており、CI-7, CI-8, CI-9 を用いた試験では、これまでのところ、CD をしのぐ包接性は見いだされていない⁸⁾。そこで、CI-10 以上の高分子の CI についても包接能を検定するため、CI-7 から CI-12 までの 6 種類の CI について、室温における 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での 0.032 mM ピクトリアブルー色素の変化を測定した。通常条件ではピクトリアブルー色素はリン酸緩衝液中では不安定で、すみやかに褪色する。そこで、CI (CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12)、および、対照としてグルコース (Glu)、またはサイクロデキストリン (α -CD, β -CD, γ -CD) を各 1.2 mM 添加して褪色による吸光度の低下を測定した。図 6 は 25°C で保温し、620 nm における吸光度を経時的に測定した結果を示す。無添加、グルコース添加、 α -CD 添加ではほぼ完全に青色が褪色し、吸光度が 0.3

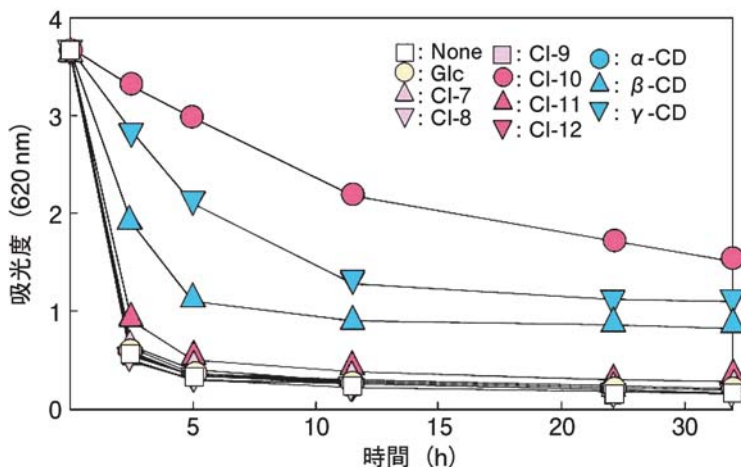


図 6 サイクロデキストランによるビクトリアブルー色素の安定化

以下に低下した。対照的に、グルコース 10 個から成る CI-10 を添加すると褪色が著しく遅れ、22 時間保温後も吸光度の低下は 50% 程度とその安定化効果は β -CD、 γ -CD よりも顕著であった⁵⁾。CI はある特定の重合度で強い包接能を持つサイクロアミロース (17～数百個のグルコースが環状につながった環状 α -1,4-グルカン)¹²⁾ のような性質を有する可能性も考えられる。CI-10 は強い包接能を持つ高水溶性環状オリゴ糖としての応用が期待されている。また、ビクトリアブルーの場合は CI-10 が最も強い包接性を示したが、水溶性の低いイソフラボン的一种であるダイゼインやゲステインについては、CI-11 および CI-12 に強い可溶化能が確認できた。CI も CD 同様、ゲスト分子の種類によって包接できる CI の種類が異なると考えられるので、さらに詳細にゲスト分子と CI 分子の関係を調べていく必要がある。一方、CI に側鎖を付加することで分子のフレキシビリティを低下させると包接能が高まったとの報告もある⁸⁾。

3.4 サイクロデキストランの安全性

CI はグルコースのみから成る単純な構造であり、同じように α -1,6 グルコシド結合から成る糖質であるデキストランおよびイソマルトオリゴ糖は既に天然物として安全性が認知されている。CI も化学構造から類推すると有害性はないと推測されるが、環状構造であるため新規物質と見なされ、食品として利用するためには安全性を立証する必要がある。

様々な分子量の CI を含んだ CI 混合物について、まず、ラットを用いて急性毒性試験、亜急性毒性試験を行った結果、CI にこれらの毒性は認められなかった。

加えて、細菌における変異原性も認められなかった。ついで 20 才以上 65 才未満の健常男女による CI 混合物のヒト安全性試験を行った。1 日 2 g または 4 g を 1 ヶ月間摂取し、身長、体重、血圧/脈拍、問診、血液学検査（9 項目）、生化学検査（26 項目）、特殊検査（3 項目）、尿検査（8 項目）などを行った結果、異常は認められなかった。

さらに、デキストランやイソマルトオリゴ糖が天然物であることから CI も天然物ではないかと予測し、古くから食品として用いられてきた黒糖から CI の検出を試みた¹³⁾。黒糖を活性炭カラム、ODS C₁₈ カラム等で処理して多糖、単糖、ショ糖などを取り除き、エキソ型グルカナーゼ処理によって直鎖のオリゴ糖を分解除去した後に残存する環状オリゴ糖を、Amide-80 カラム（Tosoh 社製）を用いて HPLC で分離した。図 7 に示すように CI-7、CI-8、CI-9、CI-10、CI-11、CI-12 と全く同じリテンションタイムに溶出するピークが黒糖抽出成分に観察された。これらのピークはエンド型デキストラナーゼによってすべての α -1,6 結合を

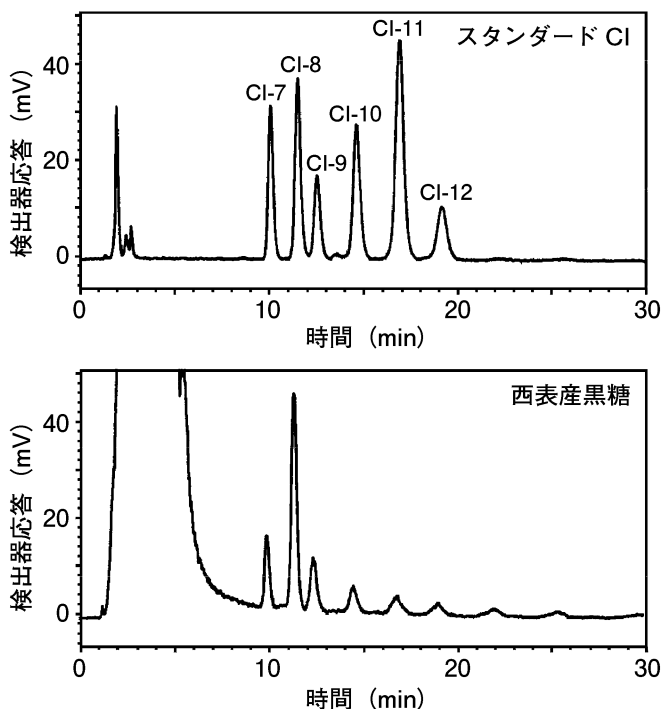


図 7 黒糖（西表島産）中におけるサイクロデキストランの HPLC による検出

分解すると消失したが、 α -1,3 グルカナーゼ、 α -アミラーゼ、エキソ型グルカナーゼでは分解されず、CI の酵素消化試験と全く同じ結果となり、本オリゴ糖は α -1,6 グルコシド結合より成る環状糖である CI と示唆された。また、これらのピークについて質量分析した結果、CI-7、CI-8、および CI-9 と同じ分子量を示すシグナルが確認でき（図 8）、CI は黒糖中に存在する天然物であることが示唆された¹³⁾。

以上の結果から、CI は食用として安全性が確認された天然のオリゴ糖であると考えられる。

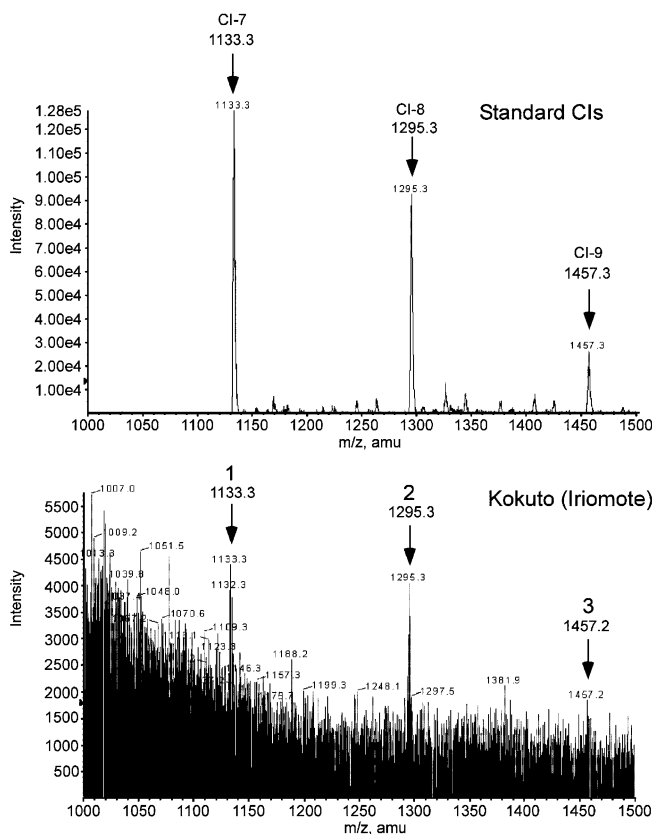


図 8 黒糖（西表島産）中におけるサイクロデキストラン（CI-7, 8, 9）の質量分析

4. サイクロデキストランの実用化技術開発

4.1 サイクロデキストランの生合成

CI はう蝕の原因となる歯垢の形成を強く阻害する作用を持つが、興味深いことに、CI の原料デキストランは、う蝕の原因といわれているショ糖から酵素合成される。代表的な CI の生合成経路を図 9 に示す。まず、*Leuconostoc* 属菌などが生産するデキストラン合成酵素（デキストランスクラーゼ）が、ショ糖を分解してフルクトースを遊離するとともに、グルコース部分を転移して α -1,6 結合鎖を主鎖とする多糖デキストランを合成する¹⁴⁾。ついで、デキストランの α -1,6 直鎖部分に *Bacillus* 属菌などが生産する CITase が作用し、分子内転移反応で環状糖 CI が合成される⁹⁾。このように、ショ糖を原料として、2 種類の菌株由来の 2 種類の酵素の作用で CI は生合成される。また、最近、デンプンを原料とした CI 合成経路も存在することが示唆され、この生合成経路の解明に向けて研究を進めている。

4.2 原料ショ糖のコスト低減とデキストラン高生産菌の取得

デキストランは、製糖工場においてはパイプを詰まらせるという問題を引き起こすが、製品としてのデキストランの場合は、ショ糖から生産されるため、デンプン、セルロースなどと比較して高価な多糖であると一般に認識されている。CI を食品として利用する場合には、その原料として高価な精製糖を用いることはコスト的に現実的でない。そこで、甘蔗汁や廃糖蜜など、ショ糖を含む安価な原料から、良好に CI 生産に適したデキストランを生産する菌株をスクリーニングした。

CITase はデキストランの α -1,6 直鎖部分からのみ CI を合成することができ、分岐構造が存在するとそこで反応が停止すると考えられる。そこで CI を効率良く生産するためには、 α -1,6 結合の割合の高いデキストランを生産することが必要である。代表的なデキストラン工業生産株 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL

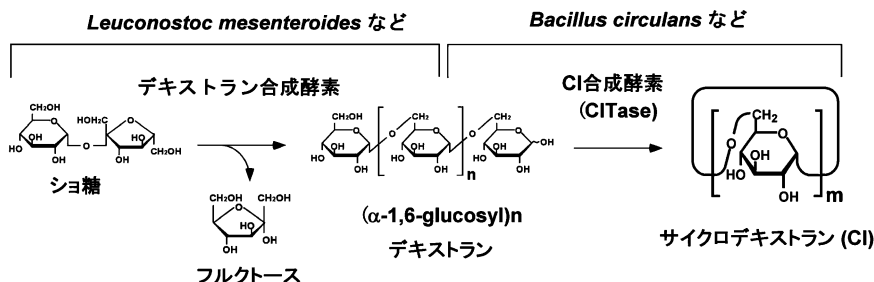


図 9 サイクロデキストランの生合成経路

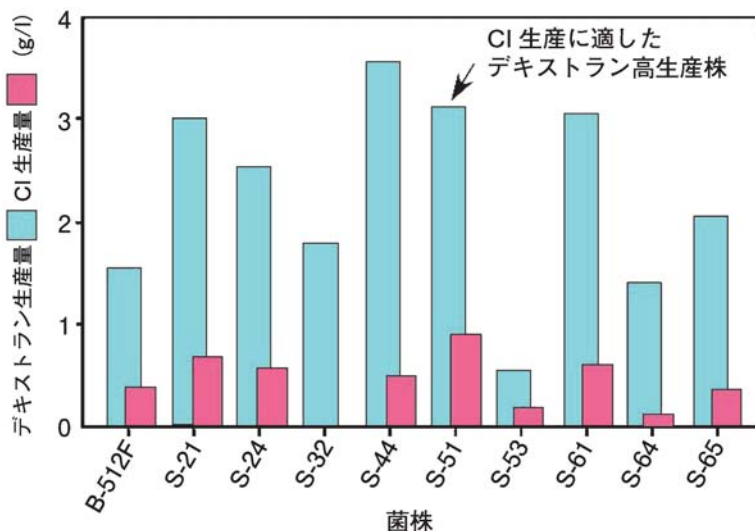


図 10 分離したデキストラン生産株が生産するデキストラン生産量と生産されたデキストランからの CI 転換量（ただし CI 生産量は CI-7+CI-8+CI-9 の合計で示す。）

B-512F 株¹⁴⁾ は、 α -1,6 結合を 95% 含むデキストランを生産するため、CI 生産に適したデキストランを作る菌株の一つであると考えられるが、我々はさらに優秀なデキストラン高生産菌株を取得するためスクリーニングを行った。デキストラン生産菌は製糖工場内に多く生息するため、製糖工場ラインから菌をスクリーニングした。ショ糖を 2% 含む培地で培養して生産されたデキストランを比較した結果、図 10 に示すように、*L. mesenteroides* NRRL B-512F 株よりも生産量が多く、しかも CI への転換効率の高いデキストランを生産する菌株、*Leuconostoc* sp. S-51 株を得ることができた¹⁵⁾。S-51 株が生産するデキストラン合成酵素は 1 種類であり、B-512F 株の酵素と同様、主として α -1,6 結合から成るデキストランを合成する。しかも B-512F 株の酵素よりも至適温度が 5℃、温度安定性は 10℃ 高く、pH 安定性も酸性側、アルカリ性側共に 0.5 ずつ広いという生産性、安定性ともに優れた性質を持っている¹⁵⁾。さらに S-51 株は原料をサトウキビ汁に替えて培養した場合も、精製ショ糖を用いた場合と同様非常に良好に α -1,6 結合の割合の多いデキストランを生産した。

4.3 サイクロデキストラン高生産変異株の取得

CI の実用化において最も大きな問題は、デキストランを CI に転換する菌株の

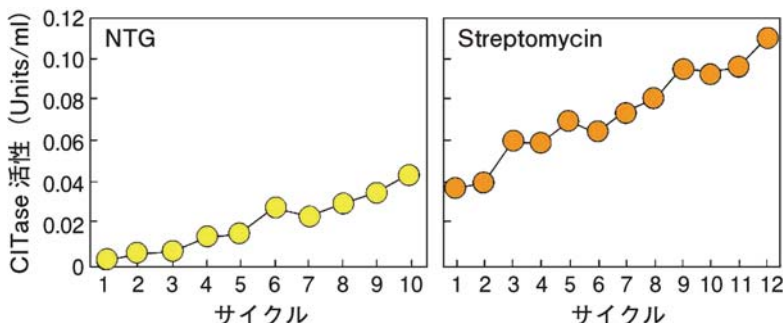


図 11 ニトロソグアニジン（左）およびストレプトマイシン（右）耐性菌選抜によるサイクロデキストラン合成酵素高生産変異株の取得

CITase 活性が極めて低いことであった。すでに CITase 遺伝子が 3 種類クローニングされ、DNA 塩基配列も明らかになっていることから^{8,16,17)}、遺伝子組み換え技術を用いて CITase タンパクを大量生産することは可能である。しかし、遺伝子組み換え技術を用いる際には規制が多く、食品産業など中小の企業が多い分野での導入には困難が伴う。そこで、最初に発見され、現在最も研究が進んでいる *B. circulans* T-3040 株をもとに、ニトロソグアニジン耐性株を選抜し、図 11 左に示すように CITase 活性が野生株の 44 倍に高まった変異株を取得した¹⁸⁾。さらに、越智ら¹⁹⁾ のリボゾーム工学（ストレプトマイシン等の抗生物質を添加し、リボゾームの変異を誘発することによって転写機能が改変され、有用機能が活性化されることを利用した育種法）を用いてストレプトマイシン耐性株を取得した菌株を得ることによって活性を高め、図 11 右に示すように CITase 活性が野生株の 110 倍上昇した変異株を取得することができた。現在、リボゾーム工学的手法を応用して 2 重、3 重変異株の取得を試み、より高い CITase 活性を示す変異株の育種を目指している。

4.4 サイクロデキストランの試作と CI 製品の機能

以上の技術を応用して、CI を良好に生産することが可能となったが、実際に生産される CI は、低分子から高分子まで幅広く、加えて副産物としてイソマルトオリゴ糖、および未反応のデキストランなども残存する。CI を分子量ごとに分離精製するためには副産物の分解とクロマト分離が必要になり、食品として利用するには極めてコストがかかる。そこで、未精製の状態で CI としての機能がどの程度存在するかを確認することとした。

様々な精製度の CI サンプルを試作し、それらのグルカン形成阻害活性を測定することにより、歯垢形成阻害剤として使用するためにはどの程度の純度が必要

表 1 CI サンプルに含まれる糖質成分割合 (%)

CI サンプル	CI-7～9	CI-10～12	IG-2～7	高分子成分
サンプル A	11.9	23.0	0.3	13.4
サンプル B	15.7	28.3	0.9	22.8
サンプル C	16.0	23.4	1.8	18.4
サンプル D	13.2	16.8	3.0	0.7
サンプル E	10.0	10.7	2.9	0.4

IG : イソマルトオリゴ糖

であるかを検討した²⁰⁾。調製した 5 種類の CI サンプルについて、CI (CI-7～CI-9 の低分子 CI、および CI-10～CI-12 の高分子 CI)、低分子のイソマルトオリゴ糖 (IG-2～IG-7)、高分子成分 (高分子イソマルトオリゴ糖およびデキストラン) の全重量に対する割合を表 1 に示した²⁰⁾。

まず、粗 CI サンプルの水溶性については、サンプル C は精製した CI と同等の極めて高い水溶性を示した。他のサンプルはいずれも、精製 CI よりは若干劣るものの、温度に拘わらず 100% (W/V) 程度溶解し、高い水溶性は保たれていた。

粗 CI サンプルのグルカン合成阻害作用に対する不純物の作用についても検討した。表 1 に示すようにイソマルトースなどの低分子のイソマルトオリゴ糖がいずれのサンプルにもわずかに含まれているが、これらは CI 同様グルカン形成阻害活性が確認されている。サンプル A, B, C に著量含まれている高分子のイソマルトオリゴ糖や未反応のデキストランについては、う蝕菌のグルカン合成を促進する可能性が懸念される。そこで、これら粗 CI サンプルについて、う蝕菌 *S. mutans* および *S. sobrinus* 由来のグルカン合成酵素による不溶性グルカンの合成阻害試験を行った (図 12)。対照として無添加 (粉糖のみ) およびウーロン茶エキスマ粉末 (丸善製薬株式会社より恵与、ポリフェノール 50% 以上) についても測定した。粗 CI サンプルおよびウーロン茶エキスは、有効成分 (CI またはポリフェノール) が 0.5% になるよう調整し、粉糖 1% 濃度で 37℃ 1 晩または粉糖 30% 濃度で 37℃ 8 日間反応を行い、阻害剤無添加で生成した不溶性グルカン量をそれぞれ 100 とした相対値を図 12 に示した。いずれの粗 CI サンプル、いずれの条件においても、粗 CI サンプルはポリフェノールよりも有効に不溶性グルカンの生成を抑制した。低分子の CI 成分の割合が高く、高分子成分の割合が低いサンプルに、より強いグルカン合成阻害作用が認められる傾向があり、特にサンプル E が、*S. mutans* 酵素、*S. sobrinus* 酵素とも顕著に強い阻害活性を示した。多少のイソマルトオリゴ糖および高分子成分の混入や、その他の不純物はグルカン合成阻害効果に大きな影響を与えないことがわかった²⁰⁾。

粗 CI サンプルの包接性に関しては、前記同様にビクトリアブルーを指標として青色の褪色による吸光度の低下を測定した。用いた粗 CI サンプルは、CI 成分が

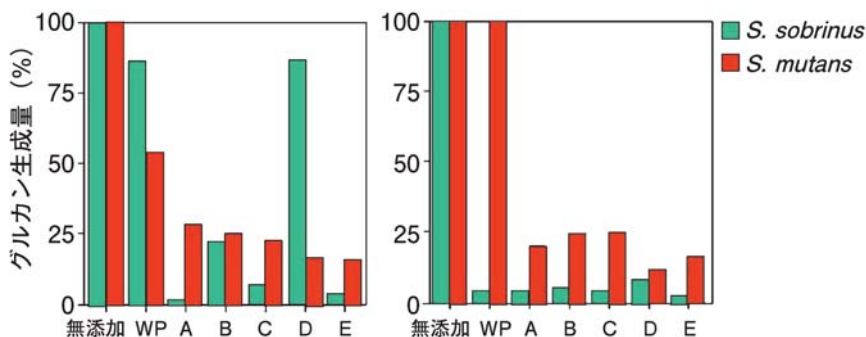


図 12 サイクロデキストラン試作品 (A~E) およびウーロン茶ポリフェノール (WP) による *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans* 由来グルカン合成酵素阻害

左: 粉糖 1% 濃度で 37°C 1 晩反応 右: 粉糖 30% 濃度で 37°C 8 日間反応

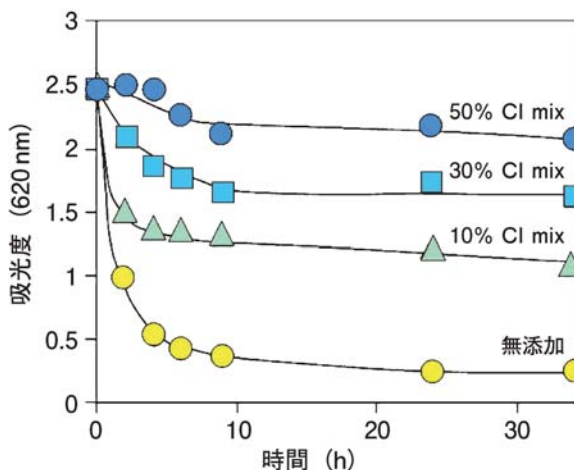


図 13 粗 CI サンプル (CI mix) によるビクトリアブルー色素の安定化

CI-7~CI-12 の合計として 14.4% (w/w) 含んだ CI mix であり, これには CI-10 は 1.4% (w/w) 含まれている。CI mix 10%, 30% 並びに 50% (w/v) の濃度での安定化能を試験したが, これらの試験液中の CI 成分濃度はそれぞれ, 1.44%, 4.32%, 7.2% であり, このうちの CI-10 濃度は, それぞれ 0.14% (0.86 mM), 0.42% (2.58 mM), 0.7% (4.32 mM) 相当である。図 13 に示すように, 粗 CI サンプルはビクトリアブルー色素の褪色を非常に有効に抑制した。高純度の CI を用

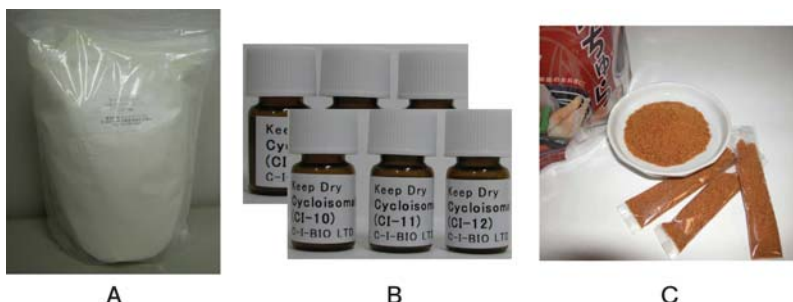


図 14 市販されているサイクロデキストラン製品（株式会社シー・アイ・バイオ 提供）

- A：サイクロデキストラン混合物。（ショ糖を原料としてサイクロデキストランを合成した後、フルクトースを除去し、脱塩した CI 粗製品。）
 B：高純度サイクロデキストラン。（CI-7、CI-8、CI-9、CI-10、CI-11、CI-12 をそれぞれ分離精製した試験研究用 CI 製品。）
 C：加工黒糖。（黒糖に製品 A を添加し、顆粒状に加工した黒糖スティックシュガー。）

いた前記の実験結果（図 6）と比較すると、10%の粗 CI サンプルを加えた反応で、CI-10 含量が図 6 の場合の 7 割の濃度にもかかわらず 22 時間後の吸光度低下がほぼ 50% と、1.2 mM の純品の CI-10 を加えた場合と同等の効果を示した²¹⁾。粗 CI サンプルに含まれる CI-10 以外の成分でピクトリアブルー色素に対し包接作用のある成分が含まれている可能性、または、CI-10 の包接作用を増強する成分が含まれている可能性も考えられるため、今後検証していく必要がある。

なお、CI を加えると β -CD の水溶性が増加する現象が観察された。また、抗癌剤パクリタキセルについては、CI または CD の添加で水溶性がやや増すが、CI と CD を同時に添加すると、単独の場合よりもさらに可溶化効果が上がる傾向がみられた。 β -CD の水溶性増強、パクリタキセルの可溶化、およびダイゼインやゲニステインなど難水溶性のイソフラボンの可溶化についても粗 CI サンプルを用いた場合にも純品の CI 同様の包接作用が認められた（未発表）。

以上、CI を包接剤として食品、化成品、医薬品などの用途に利用できる可能性を期待させる知見が得られており、現在引き続き CI の包接に関する研究・開発を進めているところである。

5. おわりに

表 1 に示した CI サンプル E を改良し、より高濃度の CI 成分を含み、不純物を少なくしたものが 2008 年に製品化された。この CI 製品を添加した甘味料も製作され、本製品のブランク合成阻害作用の確認を経て、これも 2009 年から市販が開

始された。また、高度に精製した CI-7, CI-8, CI-9, CI-10, CI-11, CI-12 までが試薬として 2009 年から販売されている。これらの CI 製品を図 14 に示す。

サイクロデキストランの用途については、砂糖の存在下でもグルカンの合成阻害作用を強く示す CI の性質を利用した甘味料が実用化した⁹⁾が、包接剤としてはまだ課題を残している。不純物を完全に除去していない安価な CI 混合物にも包接性が認められているが、高濃度で使用すると不純物のために製品の物性を損なってしまう可能性がある。純度の高い CI は物性を損なわず高濃度で使用できると考えられるが、製造にコストがかかり現段階では価格が非常に高く、実用化には至っていない。今後さらにこれらの問題の解決に向けて CI の製造法開発を進め、様々な食品への応用法を開発していきたい。

(微生物利用研究領域発酵細菌ユニット 舟根 和美)

引用文献

- 1) EB. Tilden and CS. Hudson, J. Am. Chem. Soc., **63**, 2900-2902 (1939).
- 2) M. Kawamura, T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura and K. Mizutani, Carbohydr. Res., **192**, 83-90 (1989).
- 3) G.L. Côté and P. Biely. Eur. J. Biochem. **226**, 641-648 (1994).
- 4) T. Oguma, T. Horiuchi and M. Kobayashi, Biosci. Biochem. Biotechnol., **57**, 1225-1227 (1993).
- 5) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, T. Miyagi, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, Y.M. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi, J. Biotechnol., **130**, 188-192 (2007).
- 6) K. Funane, K. Terasawa, Y. Mizuno, H. Ono, S. Gibu, T. Tokashiki, Y. Kawabata, Y.M. Kim, A. Kimura and M. Kobayashi, Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 3277-3280 (2008).
- 7) M. Kobayashi, K. Funane, T. Oguma, Biosci. Biochem. Biotechnol., **59**, 1861-1865 (1995).
- 8) T. Oguma and H. Kawamoto, Trends Glycosci. Glycotechnol., **15**, 91-99 (2003).
- 9) T. Oguma, K. Tobe and M. Kobayashi, FEBS. Lett., **345**, 135-138 (1994).
- 10) 北畑寿美雄, “糖質の科学”, 新家 龍, 南浦能至, 北畑寿美雄, 大西正健編, 朝倉書店, 2000, pp. 79-81.
- 11) 福島和雄, 今井奨, GTF 阻害剤, う蝕細菌の分子生物学, クインテッセンス出版社, p 210-225 (1997).
- 12) T. Takaha, M. Yanase H. Takata, S. Okada and S.M. Smith, J. Biol. Chem., **271**, 2902-2908 (1996).

- 13) 渡嘉敷唯章, 金城健作, 舟根和美, 伊藤 汎, J. Appl. Glycosci., **54**, 27-30 (2007).
- 14) E.J. Hehre, Adv. Enzymol., **11**, 297-337 (1951).
- 15) K. Funane, T. Matsuo, H. Ono, T. Ishii, S. Gibu, T. Tokashiki and Kobayashi, M., J. Appl. Glycosci., **50**, 379-382 (2003).
- 16) T. Oguma, T. Kurokawa, K. Tobe and M. Kobayashi, J. Appl. Glycosci., **42**, 415-419 (1995).
- 17) 舟根和美, 寺澤和恵, 宮城 赳, 宮城貞夫, 公開特許公報, 特許公開 2007-189905 (2007.8.2).
- 18) 川端康之, 北尾悟, 舟根和美, 渡嘉敷唯章, 儀部茂八, 宮城貞夫, 食品・臨床栄養, **1**, 43-48 (2006).
- 19) K. Ochi, S. Okamoto, Y. Tozawa, T. Inaoka, T. Hosaka, J. Xu and K. Kurokawa, Adv. Appl. Microbiol., **56**, 155-184 (2004).
- 20) 舟根和美, 食品工業, **49**, 29-37 (2006).
- 21) 舟根和美, FFI ジャーナル, **213**, 1001-1008 (2008).

V 薬剤耐性変異の導入による翻訳装置および転写酵素の改変と微生物機能の高度利用化

1. はじめに

微生物は多彩な機能を有しており、その能力を余すことなく引き出してやるのが、微生物機能の高度利用化において重要である。我々は、リボゾームタンパク質の S12 変異により放線菌の抗生物質生産能が著しく活性化されることを、約 15 年前に見いだした (図 1)¹⁾。リボゾームは、細胞内において mRNA からタンパク質を合成する翻訳過程に関与する細胞内小器官であるが、我々は以上の発見を機に、「リボゾームを操作することにより、微生物の有用機能を活性化できる可能性がある」という着想を得、それをもとに研究を進めてきた。その中では、リボゾームを作用部位とする抗生物質 (タンパク質合成阻害剤) を利用した簡易なリボゾーム改良法 (薬剤耐性選抜法) を確立した。その結果、リボゾームを改変して微生物機能を活性化することを基礎とした「リボゾーム工学」を確立できた²⁾。さらに、遺伝情報の転写を司る酵素、RNA ポリメラーゼを改変することによっても微生物機能の活性化が可能であることを見いだした。そして、「リボゾーム工学」と同様、RNA ポリメラーゼを作用部位とした抗生物質を用い、当該抗生物質に対する耐性菌の選抜による改変技術 (転写工学) を開発することに成功した^{3,4)}。本技法によって得られた改変型 (変異型) リボゾームまたは RNA ポリメ

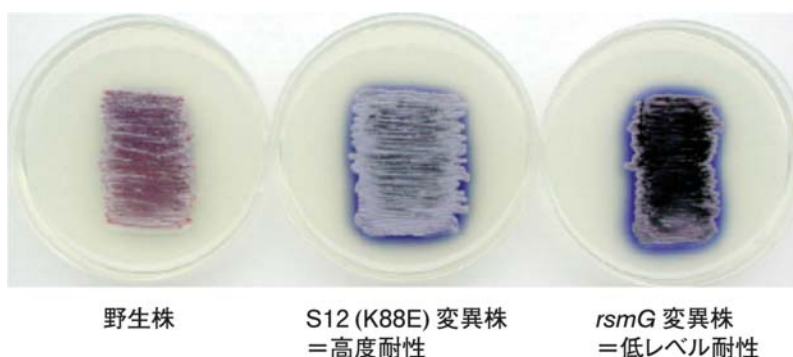


図 1 ストレプトマイシン耐性変異の導入による抗生物質生産の活性化

放線菌 *Streptomyces coelicolor* にストレプトマイシン耐性変異 (S12 変異あるいは *rsmG* 変異) を導入することにより青色抗生物質 (アクチノロージン) の過剰生産が誘発される。

ラーゼがどのようなメカニズムによって微生物機能を活性化させるのかについても解析し、そのメカニズムの解明に成功した^{5,6)}。本稿では、薬剤耐性選抜法の概要（図2）及び微生物機能の活性化メカニズムについて紹介するとともに、最近、明らかにした「低レベルストレプトマイシン耐性菌の耐性機構」について概説する。なお、本手法は放線菌を中心に開発を進め、本稿でも放線菌を中心に詳細を記載するが、我々が調べた範囲のバクテリアすべてについて適用可能であることが確認されている。

2. 薬剤耐性選抜法によるリボソームの改変

一般的に用いられている抗菌剤の中には、タンパク質合成阻害剤、すなわちリボソーム攻撃性の薬剤が多数存在する。こうした抗菌剤に対して耐性を示す変異株を単離した場合、高い確率で、リボソーム構成成分（タンパク質あるいはRNA）の変異を見いだすことが出来る。即ち、薬剤耐性株を選択する事により改変型のリボソームを持つ株を効率的にスクリーニング出来るのである。我々は、放線菌の二次代謝に着目して、リボソームの改変に適した薬剤の選択を行った。具体的には、放線菌 *Streptomyces lividans* および *Streptomyces coelicolor* A3 (2) における青色二次代謝産物である「アクチノロージン」の生産をモデルとし、その活性化（生産性の増大）に適したリボソーム変異導入法の確立を行った。本物質の生産は目視で簡単に判別できるため、効率的なスクリーニング成功の鍵となった。種々の抗生物質を検討した結果、二次代謝の顕著な活性化に有効な変異を付与する薬剤の一つとして、抗結核薬として有名なストレプトマイシンが見いだされた⁷⁾。本稿の冒頭で述べた本手法開発の契機となった最初の発見も、偶然使用していた株がストレプトマイシン耐性変異株であったことによった。対象とする菌から高度ストレプトマイシン耐性変異株（最小発育阻止濃度の10倍以上の薬剤濃度で生育可能）を取得すると、その大半はリボソームタンパク質 S12 に様々な変異が生じていることが確認され、中でも、88番目のリジンがグルタミン酸に変化した K88E 変異がアクチノロージン生産の活性化に特に有効であることが明らかとなった^{1,8)}。一方、興味深いことに、高濃度ではなく低濃度のストレプトマイシンで高頻度に得られる低レベルストレプトマイシン耐性変異株（最小発育阻止濃度の3倍程度の薬剤濃度で生育可能）においても顕著なアクチノロージン生産が検出された。低レベルストレプトマイシン耐性を付与する遺伝子変異はこれまでに明らかにされておらず、その同定は難渋を極めたが、最近になって、*rsmG* 変異がその実体であることを確定した。これについては後述する。

二次代謝の活性化には、ストレプトマイシン以外に、同じくリボソームを標的とする薬剤であるゲンタミシン、ジェネティシン、パロモマイシン、リンコマイシン、フシジン酸あるいはチオストレプトンが有効である（図3）。したがって、リボソームの改変（耐性変異の導入）による微生物機能の活性化は、ストレプト

マイシン耐性に特有なものではなく、これらの薬剤に共通に見られる現象である。これらの耐性変異の内、パロモマイシン耐性変異が S12 変異（ストレプトマイシン耐性とは異なるアミノ酸残基の変化）であることは判明しているが⁹⁾、その他は不明であり、その実体解明は今後の課題である。

3. 薬剤耐性選抜法による RNA ポリメラーゼの改変

転写酵素である RNA ポリメラーゼの改変も微生物機能の活性化に有効であることを、転写阻害剤であるリファンピシンを用いて明らかにした^{3,4)}。バクテリアの RNA ポリメラーゼは α 、 β 、 β' および σ の各サブユニットからなる多量体酵素であるが、得られたリファンピシン耐性変異株においては、 β サブユニットをコードする遺伝子 *rpoB* 上に種々の変異が見つかり、中でも 2 種類の変異、H437 Y 及び R440C がアクチノロージン生産を著しく活性化することを明らかにした。さらに、*rpoB* 変異はリボゾーム変異と相乗作用を示すことが確認され（図 2）、このことから、種々の抗生物質耐性変異を逐次的に付与していくことによって、微生物機能を飛躍的に活性化できることが明らかとなった。

4. 微生物機能活性化のメカニズム

リボゾーム変異や RNA ポリメラーゼ変異がどのように微生物機能の活性化に繋がっているかについて、これまでに分かっていることを簡単に記しておくこととする。① 微生物機能活性化に有効な S12 変異およびその他のリボゾーム変異を有する株では、生育後期においてもタンパク質合成活性が低下しない（図 4）、という特異な性質が明らかにされている（野生株では同時期にはタンパク質合成活性は急激に低下する）。抗生物質あるいは酵素などの生産は培養後期に見られることが多く、この時期にタンパク質合成能が保持されていることが、微生物機能活性化の主要因であることは間違いない（図 5）^{5,6)}。② 低レベルストレプトマイシン耐性変異（*rsmG* 変異）を有する放線菌変異株においては、S-アデノシルメチオニン（SAM）合成酵素遺伝子の発現が著しく上昇しており、それに伴って細胞内の SAM レベルが有意に高くなっている¹⁰⁾。SAM は抗生物質生産を誘導するシグナル物質であると考えられており、その細胞内レベルの上昇により抗生物質の過剰生産が起こる。③ 微生物機能の活性化能を有する変異型 RNA ポリメラーゼは、遺伝子の発現パターンを劇的に変化させることが観察されている（未発表）。したがって、目的遺伝子（例えば二次代謝遺伝子）を効率的に転写する変異型 RNA ポリメラーゼをスクリーニングしていることになる。微生物機能の活性化については以上のような知見が得られているが、リボゾーム変異及び RNA ポリメラーゼ変異による微生物機能活性化には数多くの因子が複雑に関係すると予想されることから、活性化の全容解明は今後の課題である。

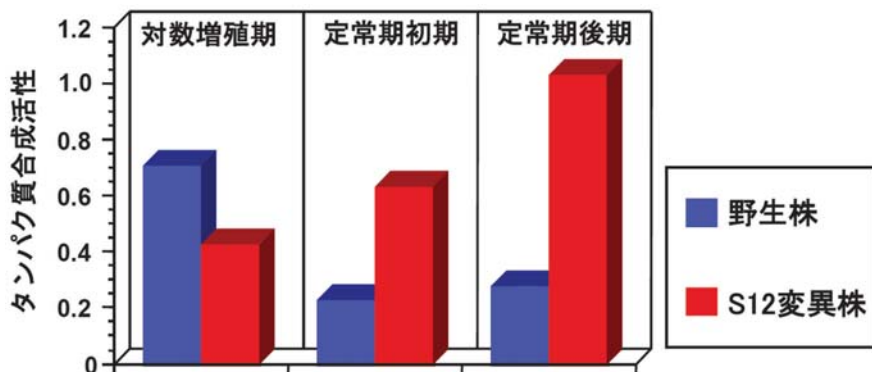


図 4 野生株および S12 株におけるタンパク質合成活性の経時変化
S12 変異株では定常期においても高いタンパク質合成活性が保持されている。

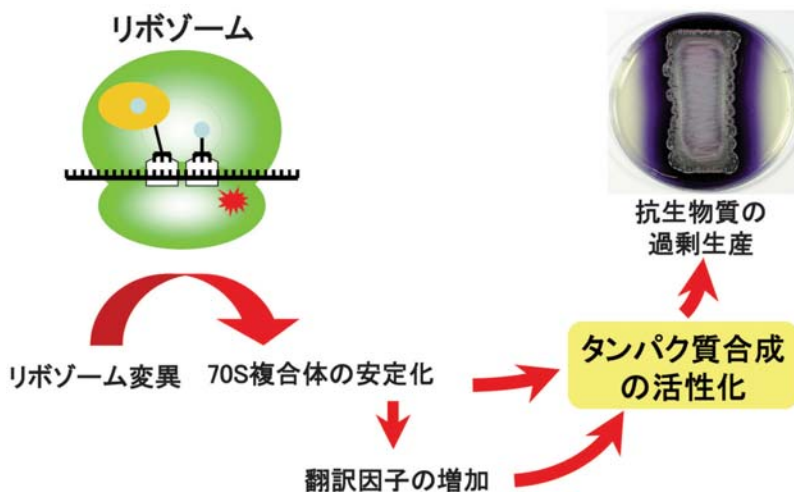


図 5 リボゾーム変異による抗生物質生産活性化のメカニズム

5. 薬剤耐性選抜法の活用例

5.1 新規生理活性物質探索への利用

近年、微生物由来の新規生理活性物質の発見は減少してきており、一部では「微生物の限界」といったことがささやかれているのも事実である。しかしながら、ここ 10 年間の間に蓄積されてきたゲノム情報から判断すると、新規有用物質

の探索という分野における微生物の高いポテンシャルは明らかである。

抗生物質を始めとし、多くの有用物質の生産を担う放線菌が工業上最も重要な微生物の一つであることは疑いの余地もない。2002～2003 年に 2 種類の放線菌 (*S. coelicolor* A (3) 2 及び *Streptomyces avermitilis*) の全ゲノム配列が相次いで報告された^{11,12)}。放線菌のゲノムサイズは 8 Mb 超とバクテリアとしては異常に大きく、そこから読みとれる情報は本菌群の多彩な潜在能力を示すものであり、未知の物質生産の可能性を十分感じさせるものである。例えば、これらの菌には二次代謝産物(抗生物質)の生合成に関与していると考えられる遺伝子クラスターが *S. coelicolor* では 22, *S. avermitilis* では 30 クラスターと、予想以上に多く存在することが明らかとなっている。これらの二次代謝遺伝子クラスターの中には通常の培養条件下では発現していないものも少なからずあり、それらの効率的な発現により、新規有用化合物の発見も十分期待できると思われる。したがって、これら通常の条件では発現していない「潜在遺伝子」を活性化するのにわれわれが開発した薬剤耐性選抜法が有効であると予想された。

5. 1. 1 抗生物質の探索

保坂らは、土壌から分離された *Streptomyces* 属細菌の中から通常の培養条件では抗菌物質を生産しない菌株を選択した¹³⁾。これらの放線菌から薬剤耐性選抜法により多数の変異株を取得したところ、新たに抗菌物質生産能を獲得した株が高頻度で出現することを見いだした。また、この潜在的な抗生物質生産能の活性化には、RNA ポリメラーゼの改変およびリボゾーム改変のいずれもが有効であることも明らかにした。さらには、これらの活性化株の一つからは、新規イオノフォア系抗生物質の単離及び構造決定に成功し、「ピペリダマイシン」と命名した(図 6)。本物質は 4 分子のオルニチンを含む環状ペプチドであり、これまでに例のないユニークな骨格を有していた¹³⁾。以上の成果は、RNA ポリメラーゼの改変およびリボゾーム改変を用いた本技術が、新たな抗生物質の発見に有用であることを証明し、画期的な成果として社会的に認められるに至っている。

5. 1. 2 新規なスクリーニング系の開発

上記の例は、実際の物質生産を指標にするスクリーニング系で薬剤耐性選抜法を活用したものであるが、この方法では簡便でハイスループットなアッセイ系が必要となり、適用範囲が限定されるという問題がある。そこで、遺伝子レベルで目的の微生物機能を検出し、さらにはそれらの発現の有無を迅速に判定できる技術の開発を試みた(未発表)。これらの技術を開発するにあたって我々がターゲットとしたのは、エリスロマイシンなどの抗生物質を始めとする有用物質の宝庫であるポリケタイド化合物である。ポリケタイドの生合成においては、ポリケタイド生合成酵素(PKS)が鍵酵素であるため、PKS 遺伝子を PCR 法により検出す

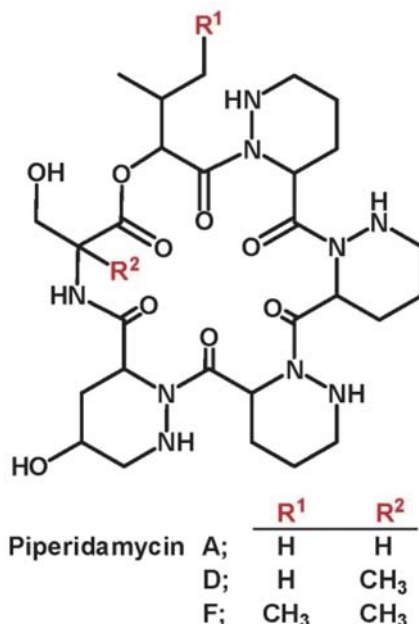


図 6 ピペリダマイシンの構造

ることとした。プライマーの配列を工夫することにより PKS 遺伝子の存在を高感度に検出できると共に、その増幅パターンから新規物質の生産を予測できるシステムの構築に成功した。さらには、RT-PCR 法（逆転写 PCR 法）を応用することにより、目的とする PKS 遺伝子の発現を高感度に検出できる技術確立した（図 7）。構築したシステムの有効性を検討するため、土壌より分離した放線菌を対象としたスクリーニングを行った。最初に PKS 遺伝子を有する菌株をスクリーニング、次にその増幅パターンから新規化合物生産の可能性の高い菌株を選抜した。これらの株から薬剤耐性選抜法により変異株を取得し、PKS 遺伝子発現の有無および強度を RT-PCR 法により判定した。PKS 遺伝子発現活性化の一例を図 8 に示した。この株では、リボゾームの改変（ストレプトマイシン耐性変異の導入）により、PKS 遺伝子の発現が顕著に活性化された。現在までに、新規ポリケタイド化合物の生産が期待される株を多数取得しており、幾つかの化合物については単離・構造決定が進行中である。

5.2 微生物育種への利用

薬剤耐性選抜法の利用としては微生物育種への応用が最も直接的であり、野生

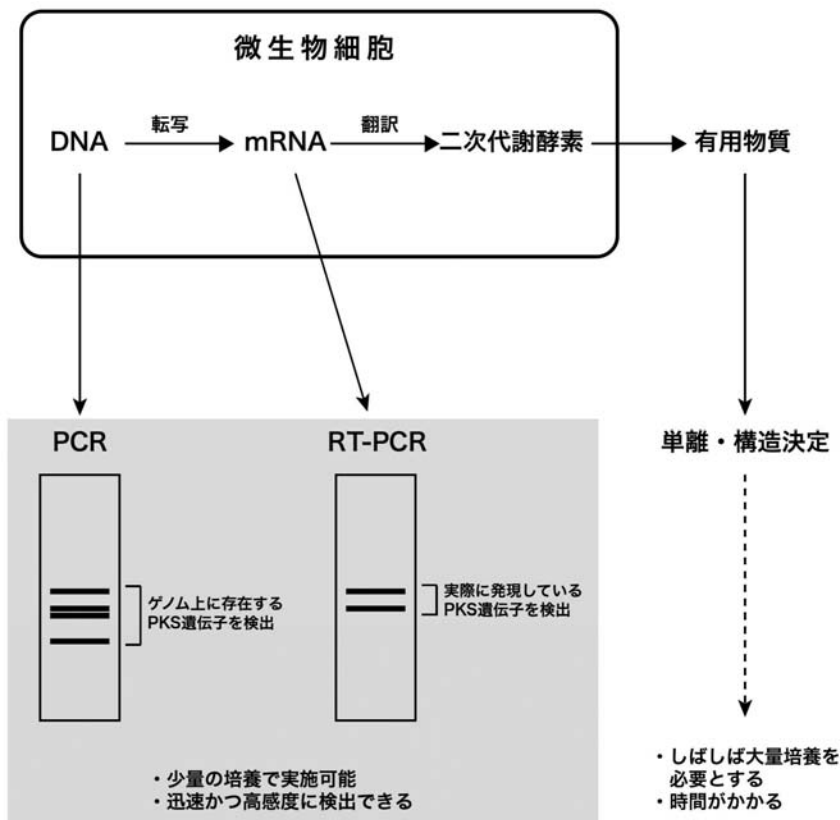


図 7 RT-PCR 法による新規物質スクリーニング系

株を対象とした初期育種から、高度に育種された工業株にまで広く適用可能である。初期育種の場合には、目的とする生理活性物質を薬理試験に供する、あるいは目的酵素の有用性をパイロット反応で検証するといった際に、それらを必要な量だけ供給するために行われる。したがって、いかに短期間で達成できるかが重要なファクターとなってくる。一方、工業株の育種においては、目的とする物質の生産量が重要なものとして、生育などが極端に低下しないことなど様々なファクターを加味しなければならない、何年にもわたる長丁場になることもまれではない。一方、本手法による育種の基本ストラテジーは以下の通りであり、手法が簡便で直接的であるため、迅速な育種が可能である。① 対象とする菌株から各種薬剤（リボゾーム攻撃性の薬剤およびリファンピシン）に対する耐性株を取得する。② 適当なスクリーニングにより目的とする性質を有する変異株を選別す

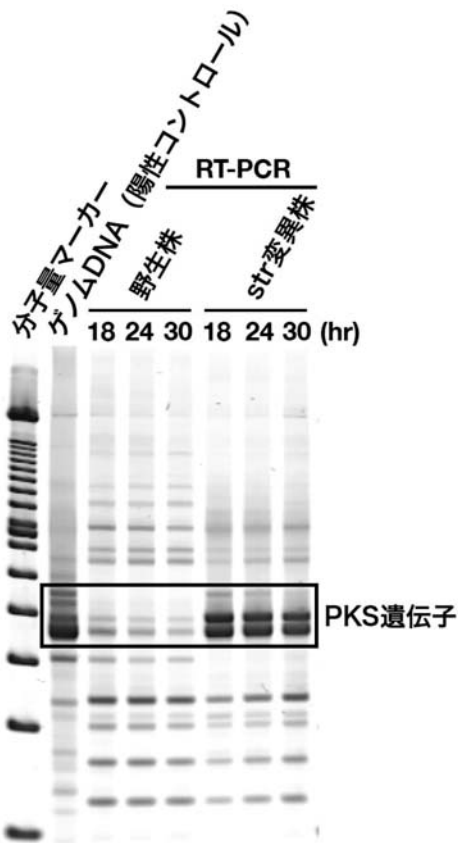


図 8 PKS 遺伝子の検出およびストレプトマイシン耐性 (*str*) 変異の導入による遺伝子発現の活性化

る。③ 必要に応じて異なる種類の薬剤耐性変異を逐次的に付与，目標とするレベルの育種を達成する。このステップにより効率的な微生物育種が可能となる。

王らは，8種類の薬剤耐性変異の逐次的導入（ストレプトマイシン耐性変異→ゲンタミシン耐性変異→リファンピシン耐性変異→パロモマイシン耐性変異→ジェネティシン耐性変異→フシジン酸耐性変異→チオストレプトン耐性変異→リンコマイシン耐性変異）により，*S. coelicolor* のアクチノロージン生産を 170 倍（9 mg/l→1.6 g/l）に増強することに成功した¹⁴⁾。ここで使用された薬剤は，転写阻害剤であるリファンピシンを除いて全てリボゾーム攻撃性の薬剤であり，この

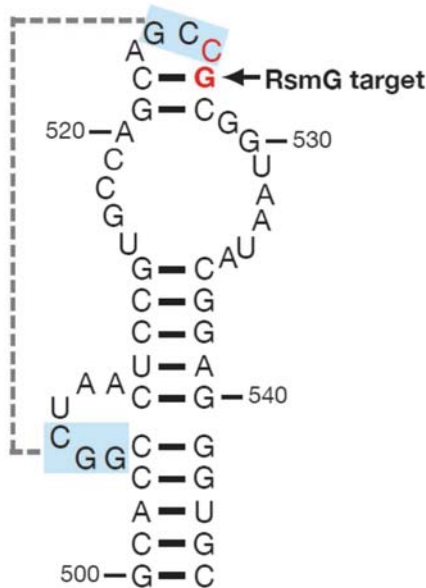


図 9 16S rRNA において高度に保存された 530 ループの構造および RsmG タンパク質の標的部位

赤色で示した塩基はストレプトマイシンと直接結合することが示されている。破線で結んだ部分は塩基対を形成する。

育種に要した期間はわずか 8 ヶ月であった。最終的に得られた株は多少生育が低下していたものの孢子形成能も保持しており、実用に充分耐えられるものであることが確認できた。

一方、田中らは、低レベルストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* 変異) および高度ストレプトマイシン耐性変異 (S12 変異) の導入によるアクチノマイシン生産菌の育種について報告した¹⁵⁾。彼らは、放線菌 *Streptomyces antibioticus* にこれら 2 種類の変異を逐次的に付与することにより、野生株にくらべて 10 倍以上のアクチノマイシン生産を達成している。

上記の例は、野生株を対象にした初期育種の好例であるが、本手法を実用菌株に応用した例として、動物用抗生物質「サリノマイシン」の工業生産株 (*Streptomyces albus*) の育種について以下に述べる。為広らは、現在使用されている工業株に対して、ストレプトマイシン耐性およびゲンタミシン耐性変異、さらにはリファンピシン耐性変異を逐次的に導入することにより、そのサリノマイシン生産性を倍増 (10 g/L から 20 g/L に増加) することに成功した¹⁶⁾。野生株においてそ

の物質生産力を2倍に増強することはたやすいが、高度に育種された工業株での2倍アップは大変に困難であり、それを達成した意義は極めて大きい上、育種操作に要した期間はわずか3ヶ月であった。

本手法は抗生物質だけではなく、酵素生産にも適用可能であり、これまでに、枯草菌のアミラーゼおよびプロテアーゼの生産性向上にも有効であることが確認された¹⁷⁾。さらに、最近、食総研の越智・舟根らのグループは、抗う蝕活性を有するオリゴ糖であるサイクロデキストランの生産性向上を目的とし、本オリゴ糖合成酵素生産菌（工業株を使用）のさらなる育種を試みており、非常に良好な結果を得ている（未発表）。

6. 未知の薬剤耐性変異の実体解明とその意義

これまでに述べたように、薬剤耐性選抜法に使用するリボゾーム攻撃性の薬剤の種類は多岐にわたっている。また、得られる耐性菌も、高度耐性から低レベル耐性まで様々である。高度薬剤耐性に関与する変異の多くは、これまでの研究により明らかにされている。一方、低レベルの薬剤耐性変異の実体については不明のケースも多い。我々は、これらの変異の多くはこれまでに知られていない新規なものであると予想しており、その実体（変異遺伝子）解明は、実用面のみならず学問的にも非常に重要であると考えている。しかしながら、これらの低レベル耐性変異は、選択培地上での判別が難しく、このことが古典的な遺伝解析（既知の遺伝マーカーとの連鎖解析）による変異同定を困難にしている主因である。近年、ゲノム解析技術の進歩は目を見張るばかりであり、「100ドルでヒトゲノムを解析」等の謳い文句も近々達成されるであろう。これらの技術革新は、微生物のゲノム解析においても非常に有効なツールを提供しており、既に全ゲノム情報が明らかにされている株であれば、そこから得られた変異株の変異点（遺伝子）を同定することは比較的安価（～50万円）かつ短期間（～1ヶ月）で出来るようになってきている。我々は、これまでに、未知の変異を有する薬剤耐性株の解析を試み、いくつかのケースでは変異遺伝子を決定することが出来た。「残念ながら現時点において完璧な方法は存在せず、全ゲノム情報を用いた解析によっても変異が見つかからないリスクはかなり（～50%）ある」以下において、低レベルストレプトマイシン耐性変異の解析について述べる。

6.1 低レベルストレプトマイシン耐性変異の実体解明

薬剤耐性選抜法において、ストレプトマイシンは代表的な使用薬剤であるが、微生物機能の活性化に有効な高度ストレプトマイシン耐性（S12変異）の出現頻度は非常に低く、 10^{-10} ～ 10^{-11} である（栄養要求変異などの出現頻度は 10^{-7} ～ 10^{-8} 程度である）。一方、低レベルストレプトマイシン耐性は、 10^{-5} ～ 10^{-6} の高い頻度で得られ、この変異も放線菌の抗生物質生産の活性化に有効なことは早くか

ら知られていた (図 1)⁸⁾。放線菌 *S. coelicolor* を用いたその後の解析により、本変異株の性質について以下のことが明らかにされた¹⁰⁾。① SAM 合成酵素遺伝子 (*metK* 遺伝子) の発現が野生株に比較して著しく上昇している。② それに伴い細胞内の SAM 濃度も上昇しており、このことが抗生物質過剰生産の主な要因である。本変異株は、このように非常に興味深い形質を示すが、古典的な遺伝学ではその変異の同定には至らなかった。そこで我々は、新しい変異探索の方法である CGS (Comparative Genome Sequencing) の利用を試みた。詳細については割愛するが、本解析手法は DNA マイクロアレイの変法である¹⁸⁾。この方法により、*S. coelicolor* から得られた低レベルストレプトマイシン耐性変異株を解析したところ、後に *rsmG* と命名される遺伝子に変異が検出された¹⁹⁾。我々が分離・保存していた、低レベルストレプトマイシン耐性変異/抗生物質過剰生産の形質を示す *S. coelicolor* の変異株 (7 株) について調べたところ、全ての株で *rsmG* 変異が確認され、本遺伝子の機能欠損により、上記の形質を獲得することが予想された。このことは、実際に *rsmG* 欠失株を作製することにより直接証明した¹⁹⁾。

次に、*rsmG* 遺伝子の機能について解明を試みた²⁰⁾。本遺伝子によってコードされるタンパク質は、そのアミノ酸配列から、一種のメチル化酵素であると考えられた。上述の様に、本遺伝子の欠損はリボゾーム攻撃性の薬剤であるストレプトマイシンに対する耐性を付与することから、RsmG タンパク質の基質は何らかのリボゾーム構成因子であると予想された。

精製 RsmG タンパク質およびリボゾームを用いた生化学的解析の結果、本メチル化酵素の基質は、リボゾームの 30S サブユニットの構成因子である 16S rRNA であることを見いだした。最終的に、本酵素が 16S rRNA の 627 番目のグアノシン (G627) を 7-メチルグアノシンへと変換する酵素であることを解明した (図 9)^{20, 21)}。これらの結果から、本遺伝子を 16S rRNA 修飾酵素の命名則にしたがって *rsmG* (rRNA small subunit methyltransferase G) と命名した。G627 は全てのバクテリアの 16S rRNA において保存されており、ストレプトマイシンと直接結合するヌクレオチドの一つであることが明らかにされている²²⁾。*rsmG* 変異によりそのメチル化が消失することにより、ストレプトマイシンに対するリボゾームの親和性が低下、結果として本薬剤に対する耐性が付与されるものと考えられる。なお、*rsmG* 変異による *metK* 遺伝子の発現上昇のメカニズムについては現在解析中である。

6.2 *rsmG* 変異解明の社会的意義

ストレプトマイシンは、古くは結核治療の臨床現場で繁用された。その結果、多くの結核菌が本薬剤に対する耐性を獲得し、現在では第一選択枝の治療薬では無くなった。しかしながら、依然として重要な薬剤の一つであることは間違いない。ストレプトマイシンは 1944 年に発見されているが²³⁾、その 2 年後には耐性菌

の報告がなされている²⁴⁾。また、ストレプトマイシン耐性変異には高度耐性および低レベル耐性の2種類が存在することが知られていた。高度耐性がS12変異の結果であることは1960年代には明らかにされている²⁵⁾。さらに、結核菌では、16S rRNA遺伝子(*rrs*)の変異によっても高度ストレプトマイシン耐性を獲得することが、1990年代に解明されている²⁶⁾。一方、低レベル耐性の実体に関しては60年間不明のままであった。実際に臨床から分離されたストレプトマイシン耐性結核菌を解析しても、S12変異あるいは*rrs*変異を持たない株が数多く(～50%)見つかっている²⁷⁾。我々は、これら変異未知の臨床分離結核菌には*rsmG*変異株が少なからず含まれているのではないかと予想し、薬剤耐性結核菌のエキスパートである北海道大学の鈴木定彦教授と共同研究を開始した。その結果、予想通り多くの臨床分離耐性株において*rsmG*変異を見いだすことに成功した²⁰⁾。結果として、60年来のミステリーに終止符を打つことになり、薬剤耐性結核菌の診断および治療にも貢献するという、社会的に非常にインパクトのある成果となった。

以上のように、未知の薬剤耐性変異の同定は、微生物機能活性化のメカニズム解明の点から重要であるのみならず、時として予想外の波及効果をもたらすこともあり、着実に進展させる必要がある。

7. おわりに

薬剤耐性選抜法は、タンパク質合成装置であるリボゾームあるいは遺伝子の転写を司る酵素であるRNAポリメラーゼを変異によって望ましい形質に改変し、それを微生物機能の活性化に利用する技術である。有効な変異が得られる可能性の高い薬剤については本稿で述べたとおりである。本手法の特徴は、なんといってもその簡便さにある。即ち、対象とするバクテリアから薬剤耐性株を分離し、目的とする性質を示す株をスクリーニングすればよいのである。

もう一つの特徴は、本手法の実施にはゲノム情報などは必要なく、土壌から分離した菌株にも直ちに適用可能な点である。現在、ゲノム情報を活用した微生物育種が盛んに行われているが、その中では遺伝子組み換え技術が用いられることも多い。カルタヘナ法などの法規制を考えると、それらの育種株をオープンな環境で利用することには高いハードルが存在する。本手法は、組換え生物を作製するわけではないのでこの点では非常に有利であると言える。今後、本手法がゲノム育種を補完する重要な育種法として、更に発展・利用されることを願う。

(食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能解析ユニット 岡本 晋)

引用文献

- 1) Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., and Ochi, K. (1996) Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal pro-

- tein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **178** : 7276–7284.
- 2) Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., and Kurosawa, K. (2004) Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol* **56** : 155–184.
 - 3) Hu, H., and Ochi, K. (2001) Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol* **67** : 1885–1892.
 - 4) Hu, H., Zhang, Q., and Ochi, K. (2002) Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding RNA polymerase β -subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **184** : 3984–3991.
 - 5) Okamoto-Hosoya, Y., Hosaka, T., and Ochi, K. (2003) An aberrant protein synthesis activity linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* **149** : 3299–3309.
 - 6) Hosaka, T., Xu, J., and Ochi, K. (2006) Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant. *Mol Microbiol* **61** : 883–897.
 - 7) Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H., and Ochi, K. (1998) Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **42** : 2041–2047.
 - 8) Hesketh, A., and Ochi, K. (1997) A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3 (2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *J Antibiot* **50** : 532–535.
 - 9) Okamoto-Hosoya, Y., Sato, T., and Ochi, K. (2000) Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Antibiot* **53** : 1424–1427.
 - 10) Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K. (2003) Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **185** : 601–609.
 - 11) Bentley, S.D. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417** : 141–147.
 - 12) Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sasaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003) Complete genome sequence

and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21** : 526–531.

- 13) Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A., and Ochi, K. (2009) Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol* **27** : 462–464.
- 14) Wang, G., Hosaka, T., and Ochi, K. (2008) Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol* **74** : 2834–2840.
- 15) Tanaka, Y., Komatsu, M., Okamoto, S., Tokuyama, S., Kaji, A., Ikeda, H., and Ochi K. (2009) Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* **75** : 4919–4922.
- 16) Tamehiro, N., Hosaka, T., Xu, J., Hu, H., Otake, N., and Ochi, K. (2003) Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. *Appl Environ Microbiol* **69** : 6412–6417.
- 17) Kurosawa, K., Hosaka, T., Tamehiro, N., Inaoka, T., and Ochi, K. (2006) Improvement of α -amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. *Appl Environ Microbiol* **72** : 71–77.
- 18) Albert, T.J., Dailidienė, D., Dailide, G., Norton, J.E., Kalia, A., Richmond, T.A., Molla, M., Singh, J., Green, R.D., and Berg, D.E. (2005) Mutation discovery in bacterial genomes : metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nat Methods* **2** : 951–953.
- 19) Nishimura, K., Hosaka, T., Tokuyama, S., Okamoto, S., and Ochi, K. (2007) Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **189** : 3876–3883.
- 20) Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., and Ochi, K. (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* **63** : 1096–1106.
- 21) Nishimura, K., Johansen, S.K., Inaoka, T., Hosaka, T., Tokuyama, S., Tahara, Y., Okamoto, S., Kawamura, F., Douthwaite, S., and Ochi, K. (2007) Identification of the RsmG methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis* *rsmG* mutants. *J Bacteriol* **189** : 6068–6073.

- 22) Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature* **407** : 340–348.
- 23) Schatz, A., and Waksman, S.A. (1944) Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Bio Med* **57** : 244–248.
- 24) Klein, M., and Kimmelman, L.J. (1946) The role of spontaneous variants in the acquisition of streptomycin resistance by the shigellae. *J Bacteriol* **52** : 471–479.
- 25) Ozaki, M., Mizushima, S., and Nomura, M. (1969) Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E. coli*. *Nature* **222** : 333–339.
- 26) Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, E., and Böttger, E.C. (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : alterations of the ribosomal protein S12 and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* **9** : 1239–1246.
- 27) Gillespie, S.H. (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* **46** : 267–274.

VI カロテノイドの吸収と体内動態

1. はじめに

カロテノイドは食品に黄色～赤色の美しい色彩を与える脂溶性色素であり、また、カロテノイドに由来する低分子成分は食品のフレーバーに寄与しているなど、極めて重要な食品成分である。ほとんどのカロテノイドは、炭素数 40 の炭化水素骨格に長鎖の共役結合をもつ分子（図 1）であり、そのため、高い疎水性、可視領域での光吸収や抗酸化性などの特徴をもつ。微生物や植物によって生合成され、自然界には 750 種類もの多様なカロテノイドが存在している。光合成生物ではアンテナ色素として光エネルギー捕集や光障害防御などの生理的役割を担っている。動物では鳥類の羽毛や魚類の体色などの標識色素として機能している。また、カロテノイド由来の低分子物質は接合菌類のトリスポリン酸、植物のアブシジン酸、動物のレチノイン酸などのホルモン様物質として多様な生理現象に深く関わっている。このようにカロテノイドは、古細菌から哺乳動物にいたる多様な生物に分布し、地質学的にも古い時代から生物に利用されてきた物質である。

食品として摂取されたカロテノイドの一部は、体内でビタミン A に変換され視覚、形態形成、成長、生殖、免疫応答などの複雑な生理現象において重要な役割を担っている。また、カロテノイドは長鎖の共役二重結合をもつため、ラジカ

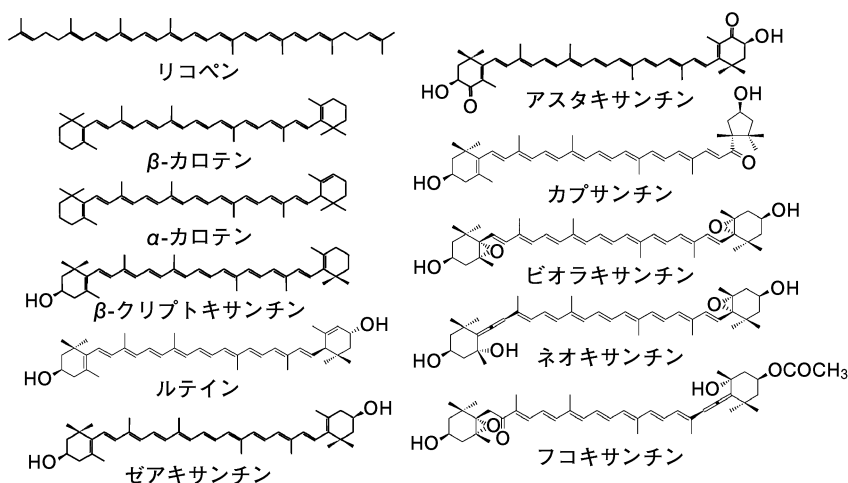


図 1 食品に含まれる代表的カロテノイド
（左側に示すものはヒト血漿に検出される主要なカロテノイド）

ル捕捉や一重項酸素の物理的消去などの抗酸化活性をもち、脂溶性抗酸化物質として酸化ストレスに関わる疾病の予防に寄与していると考えられている。ヒトは食品から様々なカロテノイドを摂取しているが、個々のカロテノイドが抗腫瘍作用、免疫増強作用、抗肥満作用などの特異な生物活性をもつことが報告され、ヒトの健康維持に役立つものと期待されている。

このようなカロテノイドの生物活性をヒトの健康維持のために利用するには、その作用機構を明確にするとともに、食品からの吸収と体内動態を明らかにしておく必要がある。摂取したカロテノイドもしくは代謝産物が標的組織に到達する効率（生体利用性）は、消化管内での可溶化、腸管吸収効率、体内での代謝等に依存する。したがって、食品カロテノイドを効率的に利用するためには、生体利用性に影響するさまざまな要因を明らかにする必要がある。本稿では、カロテノイドの腸管吸収及び代謝変換に関して、我々の研究成果を中心に紹介する。

2. カロテノイドの腸管吸収

カロテノイドの腸管吸収は油脂やビタミンEなどの脂溶性食品成分と比較して著しく低く、食品を摂取してからカロテノイドが小腸から吸収されるまでにはさまざまな要因が影響する¹⁾。カロテノイドは疎水性が高く常温で固体の物質であるため、単独では水に溶解あるいは分散することはない。そのため、小腸から吸収されるまでに、消化管内で両親媒性物質の働きで十分に可溶化され、小腸上皮細胞から吸収可能な状態にならなければならない。この可溶化の過程が腸管吸収の1つの律速段階となっている。食品中のカロテノイドのうち小腸によって吸収可能な可溶化状態になる割合はバイオアクセシビリティ（Bioaccessibility）と呼ばれ、食品カロテノイドの吸収性の1つの指標とされている。さらに、可溶化されたカロテノイドがすべて小腸上皮細胞から吸収されるわけではなく、カロテノイドの構造やミセル構成成分によって細胞への吸収の程度が異なる。このように、食品として摂取したカロテノイドの腸管吸収は、消化管内での可溶化と小腸上皮細胞への吸収の二つの過程に大きく分けることができる（図2）。

<消化管内でのカロテノイドの可溶化>

食品を摂取すると、まず、食品マトリックスからカロテノイドが遊離する。野菜では固い細胞壁のためカロテノイドが遊離し難く、果実などと比較して吸収されにくい。加熱加工・調理は、固い細胞壁などの構造を破壊することによって食品マトリックスからのカロテノイドの遊離を促進する。遊離したカロテノイドは、次の段階で消化管内で十分に分散されなければならない。胆汁として分泌されるリン脂質や胆汁酸はカロテノイドの分散を促進する。また、摂取された油脂はカロテノイドを溶解することによって、消化管内でカロテノイドを分散しやすくする。一方、油脂の摂取は胆汁の分泌を促進することによっても分散を促進す

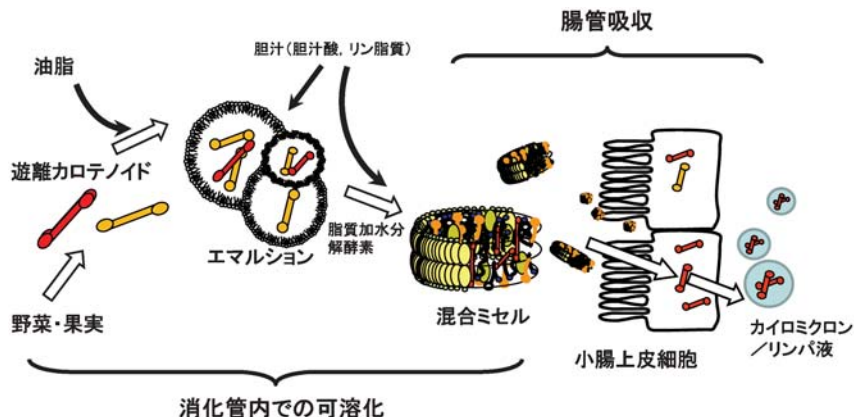


図 2 カロテノイドの可溶化と腸管吸収

るものと考えられる。消化が進行するに伴い分散されたカロテノイドは、小腸管腔内に生成する混合ミセルに可溶化される。混合ミセルは、油脂の消化産物である遊離脂肪酸やモノアシルグリセロール及び胆汁の成分である胆汁酸、リン脂質、コレステロール等から構成される。混合ミセルは、外周を胆汁酸が取り囲んだ円盤状のミセルであり、内部に脂質加水分解物や脂溶性物質が可溶化した微細な分子集合体（粒径 4～60 nm）である。このような混合ミセルに可溶化されたカロテノイドのみが小腸上皮細胞に吸収されるものと考えられる。このように、食品カロテノイドのバイオアクセシビリティは、食品マトリックス、調理・加工、油脂の共存等によって変動するが、カロテノイドの構造によってもバイオアクセシビリティは異なる。野菜に含まれるカロテノイドを調べた結果では、疎水性の高い β -カロテンやリコペンなどではバイオアクセシビリティが低く、水酸基などをもつやや疎水性の弱いルテインなどのキサントフィルでは高いと報告されている²⁾。疎水性のものほど、水系への分散性が低いことに起因しているものと考えられる。

＜小腸上皮細胞によるカロテノイドの取り込み＞

上述したように混合ミセルに可溶化されたカロテノイドの一部が小腸上皮細胞へ吸収される。従来から、カロテノイドは単純拡散によって細胞へ移行するものと考えられてきた。我々は、ヒト腸管モデル細胞 Caco-2 を用いて、混合ミセルに溶解した 10 種類の食品カロテノイドの細胞への取り込みを調べてみた。その結果、可溶化状態が全く同一の状態では、疎水性の高いカロテノイドほど細胞へ取り込まれやすいことを見出した（図 3）³⁾。このことは、疎水性の高い物質ほど細

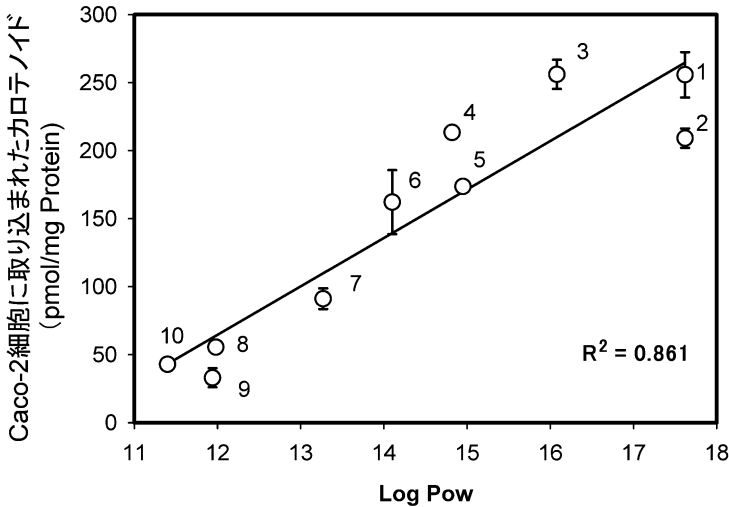


図 3 Caco-2 細胞によるカロテノイドの取り込みと 1-オクタノール/水分配係数 (Pow) との相関

1, β -carotene ; 2, α -carotene ; 3, β -cryptoxanthin ; 4, lutein ; 5, zeaxanthin ; 6, canthaxanthin ; 7, astaxanthin ; 8, violaxanthin ; 9, neoxanthin ; 10, fucoxanthin

胞膜の脂質二重層を透過しやすいという一般則に良く一致し、単純拡散を支持するものであった。一方、最近、クラス B スカベンジャーレセプタータイプ 1 (SR-BI) のようなレセプターがカロテノイドの細胞への取り込みに関与していることが報告されている⁴⁾。しかし、レセプターの機能を阻害しても取り込みは完全には抑制されないので、実際は、単純拡散とレセプターが関与する取り込みの両者が機能しているものと推察されるが、結論は今後の研究を待たねばならない。カロテノイドの吸収は動物種によって著しく異なり個体差も大きいことが知られているが、その原因がレセプターを介する吸収にある可能性が考えられる。レセプターの発現量やカロテノイドに対する特異性が種によって異なっていることや同一種であっても遺伝子多型によってレセプターの活性が異なっていることが吸収の差をもたらすのかもしれない。

小腸上皮細胞によるカロテノイド取り込みは、その化学構造のほかに、カロテノイドを可溶化する混合ミセルの構成成分によっても大きく影響を受ける。物理的にミセルとして可溶化されていれば、濃度に依存して細胞へ取り込まれるという単純なものではないことに留意する必要がある。我々は、ミセルに可溶化したカロテノイドのヒト腸管モデル細胞である Caco-2 細胞への取り込みを調べたと

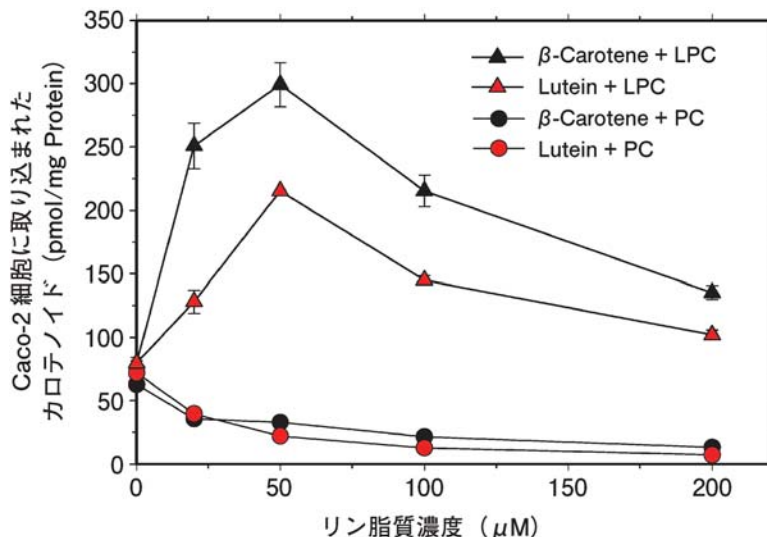


図 4 Caco-2 細胞によるカロテノイド取り込みに対するリン脂質の影響
PC, ホスファチジルコリン ; LPC, リゾホスファチジルコリン

ころ、ミセルを調製するために用いる合成界面活性物質によって、著しく取り込み量が異なっていた。したがって、小腸でのカロテノイドの吸収特性をモデル系で調べるためには、生理的可溶化状態を再現することが必須であることが分かった。そこで、できるだけ生理的な組成に近い混合ミセルを用いてカロテノイドの取り込みを調べてみた。混合ミセルを構成するリン脂質については、ホスファチジルコリンがCaco-2細胞によるカロテノイドの取り込みを濃度依存的に抑制し、逆に、リゾホスファチジルコリンは促進する³⁾という予期しない現象を見出した(図4)。これらのリン脂質の効果は脂肪酸残基の鎖長に依存することから、親水性-疎水性バランス(HLB)が重要な因子となっているものと考えられた⁵⁾。すなわち、極性の高いリゾホスファチジルコリンは、細胞膜の脂質二重層の構造を乱すことによって透過性を高めている可能性が考えられた。一方、ホスファチジルコリンは長鎖アシル基を2分子もち疎水性が高いためカロテノイドとの親和性が高く、細胞側へカロテノイドを渡しにくいものと考えられた。リン脂質のこのような作用は、生理的意味をもっていると考えられる。すなわち、胆汁から分泌されたホスファチジルコリンがカロテノイドの分散を促進する重要な働きを担うが、ミセル中に残存するとカロテノイドの小腸上皮細胞への吸収を抑制することになる。しかし、消化酵素によってホスファチジルコリンが加水分解されるとこの吸収の抑制は回避され、生成したリゾホスファチジルコリンが吸収を促進す

る。このようにして、脂溶性の物質を効果的に吸収する役割をリン脂質が担っていると考えられる。ミセルの構成成分がカロテノイドの透過性に大きく影響することが明らかになり、食品由来の脂質成分がカロテノイドの可溶化の他に細胞透過にも影響することが十分に考えられる。ホスファチジルエタノールアミンなどの他のリン脂質は、ホスファチジルコリンとは異なり透過を促進することも見出している⁶⁾。現在、このようにミセルを構成する成分がカロテノイドの腸管上皮細胞への取り込みに与える影響を調べているが、カロテノイドのみならず、脂溶性ビタミン類や水に溶解しにくい機能性物質の腸管吸収を調節する技術につながるものと期待している。

<小腸上皮細胞からリンパ液へのカロテノイドの分泌>

混合ミセルから小腸上皮細胞に取り込まれたカロテノイドは、細胞内でトリアシルグリセロールを主成分とするカイロミクロンに組み込まれてリンパ液中へ分泌される。この段階まできて、カロテノイドが体内に吸収されたことになる。小腸では活発に上皮細胞が増殖し古くなった細胞は消化管管腔へ脱落しているのので、小腸上皮細胞に取り込まれたとしても細胞が脱落すれば体内に吸収されたことにはならない。カイロミクロンへのカロテノイドの組み込みは、上皮細胞内の脂質代謝と密接に関係しているので、摂取した油脂によって影響を受ける可能性が十分に考えられる。この点に関する研究は進んでおらず、今後の課題である。

<カロテノイド腸管吸収の選択性>

すでに述べたように、カロテノイドの吸収・蓄積は動物種間で著しく異なる。たとえば、ラットではほとんどカロテノイドの蓄積は見られず、ウシやウマなどではカロテン類は蓄積されるがキサントフィル類は蓄積されない。ヒトでは、カロテン類とキサントフィル類の両方が蓄積される。このような種間差は消化管内における可溶化能力、腸管吸収における選択性、体内動態等における何らかの相違に起因すると考えられるが、原因は全く分かっていない。腸管吸収における選択性に関して、興味深い一例を以下に紹介する。ヒトは食品から様々なカロテノイドを摂取しているが組織に見出されるカロテノイドは、ルテイン及びそれより極性の低い β -クリプトキサンチン、 β -カロテン、 α -カロテン、リコペンにほぼ限定されている。たとえば、緑葉野菜にはネオキサンチンやビオラキサンチンなどの極性の高いキサントフィルが含まれるが、通常の食事をとっているヒトの血漿にはこれらのキサントフィルは検出されない。特に、ネオキサンチンはアレン結合を含むカロテノイドで抗腫瘍作用があり、これらの高極性キサントフィルがヒトにどの程度吸収されるかが注目される。我々は、ほうれん草のヒト摂取試験を行い、ほうれん草に含まれるネオキサンチンの吸収について調べた⁷⁾。健康人5名に一週間、昼食時にほうれん草(200 g 新鮮重; 8.6 mg β -カロテン, 13.4 mg ル

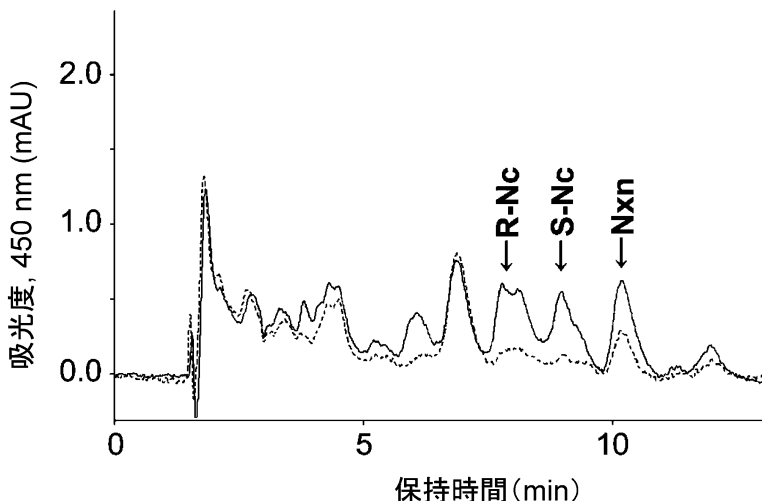


図 5 ホウレン草摂取後のヒト血漿抽出物の HPLC プロファイル
 実線、ホウレン草摂取後；破線、摂取前；R-Nc, (8'R)-Neochrome；S-Nc, (8'S)-
 Neochrome；Nxn, Neoxanthin

テイン, 6.5 mg ビオラキサンチン, 3.0 mg ネオキサンチンを含む)を油で炒めたものを摂取してもらい、一夜絶食後採血し血漿カロテノイドを分析した。ほうれん草摂取によって、 β -カロテン及びルテイン濃度は有意に増加したが、ネオキサンチン及びネオクローム（胃酸によってネオキサンチンから生成する）は、わずかに増加したものの定量限界以下であった（図 5）。同様にビオラキサンチン及びその胃酸との反応産物も定量限界以下であった。このことから、ネオキサンチンやビオラキサンチンは腸管からほとんど吸収されない、あるいは、吸収されても速やかに代謝されて血液から消失することが考えられた。ほうれん草を摂取してから 5 時間後に採血しても微量しか検出されなかったのも、後者の可能性は低い。また、ほうれん草からのネオキサンチンの可溶化に問題があることも考えられたが、ほうれん草の *in vitro* 消化試験を行うとルテインと同等の可溶化率であった。ルテインは吸収するが、ネオキサンチンやビオラキサンチンは吸収しないという選択性がヒトの腸管には備わっている可能性が考えられる。一方、マウスでの精製カロテノイドの吸収を調べるいくつかの独立した実験（実験条件はほぼ同じ）を行ったが、ネオキサンチン⁸⁾はルテインや β -カロテン⁹⁾と同じ程度に吸収されることを見出している。このことは、ヒトには選択性があるが、マウスにはないことを示唆している。腸管吸収が単純拡散のみにしたがうと考えるところのような選択性は説明できないが、取り込みに関与するレセプターの特異性や何

らかの管腔側への排泄機構などによって選択的吸収が行われているとすれば考えやすい。このような選択的吸収機構がヒトに備わっているとすれば、その生理的な合目的性があるかもしれない。今のところ推測の域を出ないが、たとえば、網膜の光障害を抑制するために必要なルテインは吸収するが、それより極性の高い不要なキサントフィルは生体異物として排除するようなことが考えられる。今後、腸管吸収におけるカロテノイドの選択性が解明されれば、様々な食品カロテノイドを機能性成分として利用する上で合理的な取捨選択が可能になり、吸収を高める方法も見出すことができると考える。また、各哺乳動物の選択性に合目的性があると仮定すれば、選択されたカロテノイドの生理的機能の重要性が裏付けられると考える。

3. キサントフィルの酸化的代謝

小腸から体内に取り込まれたカロテノイドの動態については不明点が多い。プロビタミン A カロテノイドのビタミン A への変換については詳細な研究が行われてきた。しかし、それ以外のカロテノイドの代謝変換については、代謝産物と推定されるものがヒト組織に見出されているだけで、その代謝変換反応に関わる酵素系はほとんど未解明である。各組織への分布にはカロテノイドの種類や蓄積量に特徴がみられるもの、組織への移行のメカニズムについては網膜でのレセプターの関与以外にはあまりよく知られていない。さらに、どのような代謝産物として体外へ排泄されるかは全く不明である。ここでは、まず、キサントフィルの水酸基に関わる酸化的代謝について紹介し、ついで、カロテノイドの炭素骨格の開裂代謝と低分子開裂産物の代謝について述べる。

魚類や鳥類についてはカロテノイド代謝産物に関する研究が進んでおり、魚類においては、水酸基の導入、そのカルボニル基への酸化などの酸化的代謝経路や逆方向の炭化水素への還元的代謝経路が提唱されている。一方、鳥類においては酸化的代謝産物のみが検出されている。ヒトでは、khachik 等が血漿及び組織のカロテノイドを詳細に分析し、代謝産物として推定されるものを 8 種類検出している。特にルテインの代謝産物として、3'-ヒドロキシ- β 、 ϵ -カロテン-3'-オン、3'-ヒドロキシ- ϵ 、 ϵ -カロテン-3-オンや ϵ 、 ϵ -カロテン-3、3'-ジオンを検出している。これらは、水酸基の酸化及び二重結合の移動によって生成することが示唆されている（図 6）。また、食品には存在しないカロテノイドとして 4、4'-ジメトキシ- β -カロテンをヒトに投与した研究では、ヒトの血漿に脱メチル化産物やその脱水素産物であるカンタキサントニンが検出され、水酸基の酸化的代謝が示唆されている。さらに、カプサンチンを摂取をしたヒト血漿には二級の水酸基がカルボニル基へ酸化されたカプサントニンが検出されている。これらの結果は、ヒト体内においてキサントフィルの二級の水酸基をカルボニル基へ酸化する代謝が起きていることを強く示唆している。

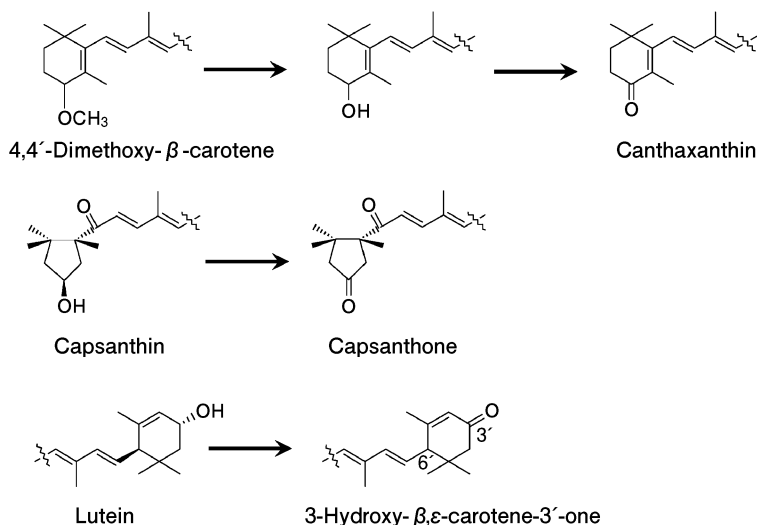


図 6 ヒト血漿中に検出されるキサントフィル代謝産物

我々はマウスヘフコキシサンチン投与しその代謝産物を調べた¹⁰⁾。フコキシサンチンは昆布やワカメなどの褐藻類の主要なカロテノイドであり、抗腫瘍作用や抗肥満作用を示すキサントフィルとして注目されている。フコキシサンチンは消化管内で脱アセチル化されフコキシサンチノールとなって吸収される。血漿中にはフコキシサンチンは検出されずフコキシサンチノールが検出される。さらにもうひとつの代謝産物が検出された。マウス肝臓ホモジネートとフコキシサンチノールをインキュベーションすることによってこの代謝産物を調製し、分離・精製ののち構造を決定した。その結果アマローシアキササンチン A と同定され、フコキシサンチノールからエポキシ基の開環を伴う 3 位の水酸基の酸化によって生成するものと考えられた。この代謝変換は肝臓ミクロソームの NAD 依存性の脱水素酵素によって触媒されることが分かった (図 7)。また、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞とフコキシサンチノールをインキュベーションするとアマローシアキササンチン A が生成し、ヒトもマウスと同様の代謝能力をもつと考えられた。原索動物のホヤやニワトリなどでもアマローシアキササンチン A が検出されることから、動物に広く存在する代謝活性と考えられた。このような脱水素酵素が、ヒト血漿に検出されたルテインやカプサンチンの代謝産物生成に関わっているものと考えられる。ヒト血漿中のカロテノイドの一般分析では、これらの代謝産物の分離分析が困難なこともあって、これまで、ほとんど注意が払われてこなかった。しかし、上述したように、哺乳動物において、キサントフィルの酸化的代謝が活発に起きていることが

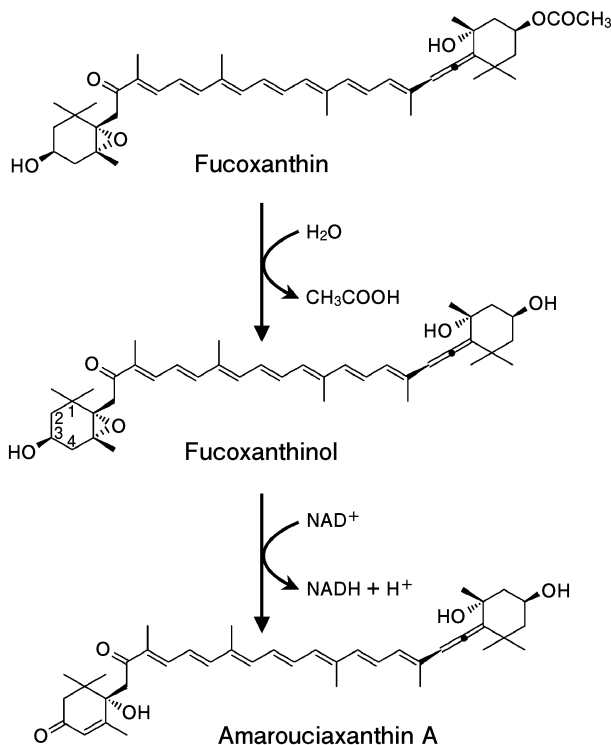


図 7 マウスにおけるフコキサンチンの代謝経路

考えられ、これらの代謝産物の抗酸化性や生物活性にも注目する価値があると考ええる。

4. カロテノイド炭素骨格の開裂代謝

哺乳動物でのカロテノイド代謝において、酵素と遺伝子レベルで明らかにされている唯一のものがビタミン A の生成である。すなわち、小腸上皮細胞に取り込まれた β -カロテンは分子中央の 15, 15' 位二重結合でオキシゲナーゼ (BCO1) によって特異的に酸化開裂され 2 分子のレチナールを生成する (図 8)^{11,12)}。動物にビタミン A を供給する生理的に重要な代謝反応である。小腸で生成したレチナールは、レチノールへ還元され脂肪酸エステルとなる。さらに、カイロミクロンに組み込まれてリンパ液中に放出され、最終的に肝臓に取り込まれレチノール脂肪酸エステルとして貯蔵される。必要に応じて肝臓から血液中にレチノールが分泌され全身にビタミン A が供給されている。本酵素は小腸以外にも肝臓など

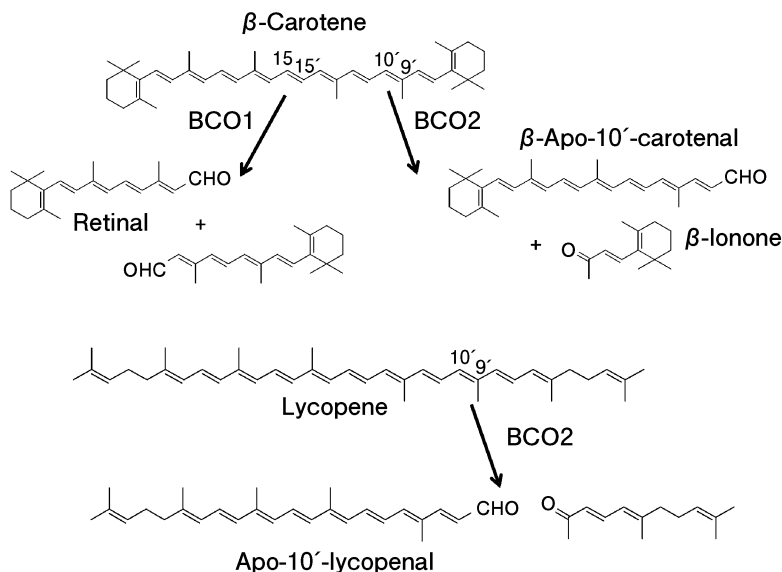


図 8 オキシゲナーゼによるカロテノイドの酸化的開裂

の組織¹³⁾に発現しており、血流から供給されるビタミン A とは別に組織に蓄積されたプロビタミン A から直接ビタミン A を生成する役割をもっている可能性が考えられる。一方、最近、この酵素の遺伝子と塩基配列が類似する遺伝子がマウスに見出された。大腸菌に発現させたところ、カロテノイドの分子中央でなく、9', 10' 位の二重結合を特異的に開裂する酵素 (BCO2) であることが分かった¹⁴⁾。中央開裂酵素はカロテノイドの少なくとも片側にβ-イオン環をもつもの (プロビタミン A) が基質となるが、後者の酵素はβ-カロテン以外にリコペンも開裂する特徴を持っている (図8)。残念ながら、in vivo でこの酵素が機能している証拠はまだ見つかっていない。このように、カロテノイドの共役二重結合の特定の位置で酸化開裂し低分子のカルボニル化合物を生成させる酵素は、微生物、植物、動物等に広く分布している。たとえば、植物には、ネオキサンチンの9', 10' 位の二重結合を酸化開裂し植物ホルモンの1つであるアブシジン酸の前駆体を生成する酵素が存在する。脊椎動物における中央開裂酵素は核内レセプターのリガンドであるレチノイン酸の前駆体 (レチナール) を生成する。アブシジン酸とレチノイン酸は、それぞれ植物と動物でカロテノイドから生成する生理活性物質であり好対照となっている。このように、生物はカロテノイドから遺伝子発現を調節する種々の低分子化合物を生成しているのである。したがって、哺乳動物で新たに見出された9', 10' 位の二重結合を特異的に開裂する酵素が実際に機能して

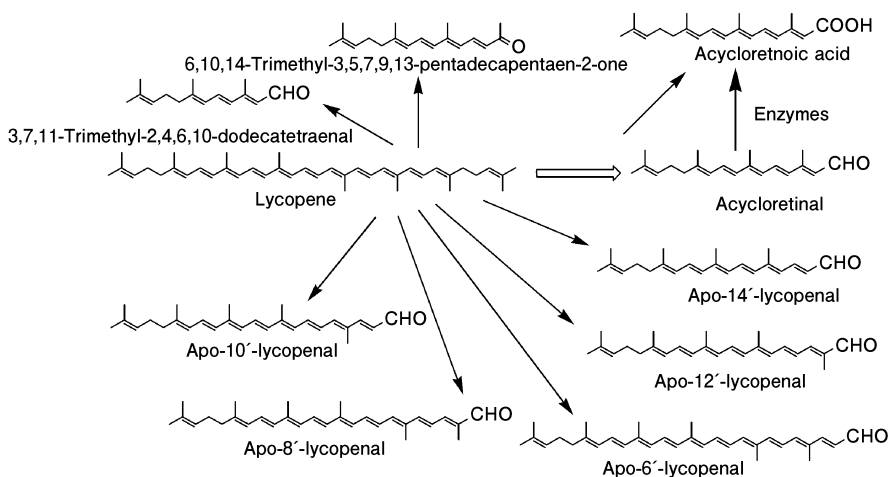


図 9 リコペンの自動酸化によって生成する開裂産物

いるとすれば、開裂産物が何らかの重要な生理的役割を担っている可能性が十分に考えられよう。

このような酸化開裂酵素の働きで生成する低分子化合物は、化学的な酸化反応によって生体系でも容易に生成すると考えられる。カロテノイドはペルオキシラジカルと反応し共役安定化した付加物を生成することによってラジカル捕捉活性を示す。また、一重項酸素を物理的に消去することによっても抗酸化性を示す。しかし、同時に活性酸素と反応し様々な酸化物を生成するが、これらの中にはジオキセタンを経由する共役二重結合の酸化的開裂によって生成するカルボニル化合物が含まれる。 β -カロテンからは自動酸化によって β -アポ-カロテナールやレチナールが生成することが報告されている。我々は、トルエン、Tween40 水溶液やリポソームに可溶化させたリコペンを自動酸化させると鎖長の異なる種々のアポリコペナールが生成することを明らかにしている（図 9）。酵素による開裂反応では特定の位置で二重結合が開裂されるが、開裂位置に特異性は見られない。リコペンの分子中央で開裂すると、非環式レチナールが生成する。これらのアルデヒドは反応性が高いため、生体中ではアミノ化合物と反応したり速やかに代謝されることが考えられる。実際、非環式レチナールを肝臓ホモジネートとインキュベーションすると、非環式レチノイン酸へ変換された。アポリコペナールも生体中でアポリコペン酸に代謝されるものとする。このような低分子の開裂産物の中には、非環式レチノイン酸のようにレチノイン酸と構造が類似したものが含まれるので、カロテノイド開裂産物が何らかの生物活性を発現する可能性がある。

このような炭素骨格の開裂反応産物が生体組織中に実際に検出されている。た

例えば、アスタキサンチンを摂取したヒト血漿に、アスタキサンチンの 9', 10' 位の二重結合で開裂して生成したと考えられる代謝産物が検出されている。ヒト黄斑ホモジネートには、ルテインあるいはゼアキサンチンの酸化に由来すると考えられる 3-ヒドロキシ- β -イオノン (9, 10 位での開裂産物) と 3-ヒドロキシ-14'-アポカロテナール (13', 14' 位での開裂) などが検出されている。¹⁴C- β -カロテンを投与したヒト血漿には、 β -アポ-8'-カロテナールが検出されている。¹⁴C-リコペンを投与したラット肝臓には、アポ-8'-リコペナールとアポ-12'-リコペナールが検出されている。これらのことは、開裂酵素による反応産物か化学的酸化産物かは不明であるが、確かに動物組織中でカロテノイド開裂反応が起きていることを強く示唆している。

上述した反応によりカロテノイドから生成した低分子のカルボニル化合物はどのように代謝されていくのであろうか。 β -アポカロテナールについては、 β -アポカロテノイン酸へ酸化された後、脂肪酸の β 酸化系で順次酸化され、 β 位にメチル基をもつレチノイン酸で停止し、結果としてレチノイン酸 (炭素数 20) が生成する経路が考えられている。我々は、食用色素であるクチナシ色素あるいはサフラン色素の主成分であるクロセチンの吸収を調べた。クロセチンは炭素数 20 のジカルボン酸でアポカロテノイドの 1 つである。マウスにクロセチンを投与すると、素早く吸収され血漿中にはクロセチン、そのモノグルクロニド及びジグルクロニドが出現する (図 10)¹⁵⁾。一方、レチノイン酸はグルクロン酸抱合体として体外へ排泄されることが知られている。したがって、炭素数 20 程度の鎖長のジカルボン酸やモノカルボン酸になると、グルクロン酸抱合体として体外へ排泄される可能性が考えられる。以上のことから、カロテノイド骨格の開裂反応により低分子カルボニル化合物が生成し、グルクロン酸抱合体として体外へ排泄されるという経路がカロテノイドの消失動態の 1 つとなっていてと考えられる。

5. おわりに

カロテノイドは、食品機能性成分として早くから注目され長期間にわたるヒト介入試験も行われた物質であり、数多くの生物活性が報告されている。しかし、上述したように、ヒトが摂取したあとの体内動態については大部分が未だにブラックボックスのままである。カロテノイドの生物活性発現機構を明らかにし、また、機能性成分として安全に効率良く利用していくためには、今後さらに体内動態を明らかにすることが望まれる。

(食品素材科学研究領域 脂質素材ユニット 長尾 昭彦)

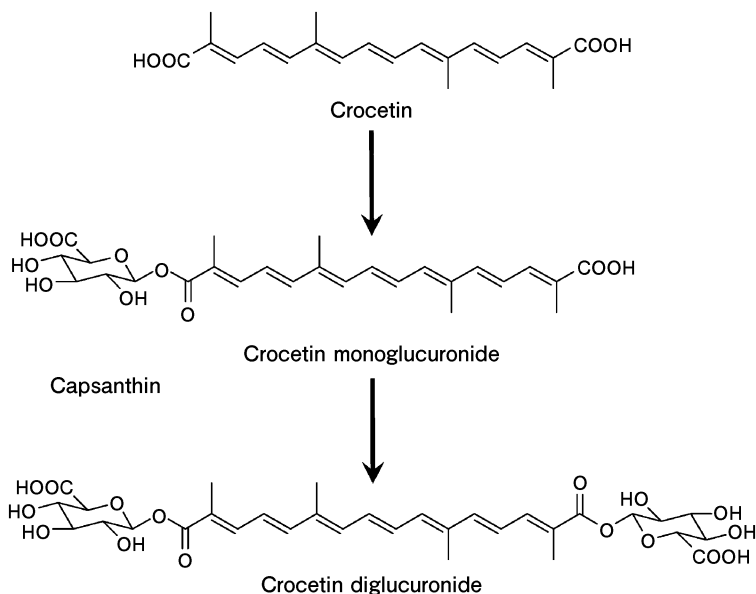


図 10 マウスにおけるクロセチンの代謝産物

文 献

- 1) Yonekura, L., Nagao, A. (2007) Intestinal absorption of dietary carotenoids, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 : 107-115.
- 2) Ryan, L., O'Connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2008) Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables, *Plant Food Hum. Nutr.* 63 : 127-133.
- 3) Sugawara, T., Kushiro, M., Zhang, H., Nara, E., Ono, H., Nagao, A. (2001) Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells, *J. Nutr.* 131 : 2921-2927.
- 4) van Bennekum, A., Werder, M., Thuahna, S.T., Han, C.H., Duong, P., Williams, D.L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M.C., Hauser, H. (2005) Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol, *Biochemistry* 44 : 4517-4525.
- 5) Yonekura, L., Tsuzuki, W., Nagao, A. (2006) Acyl moieties modulate the effects of phospholipids on beta-carotene uptake by Caco-2 cells, *Lipids* 41 : 629-636.

- 6) Kotake-Nara, E., Yonekura, L., Nagao, A. (2010) Effects of glycerophospholipid classes on β -carotene uptake by human intestinal Caco-2 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 : 209–211.
- 7) Asai, A., Yonekura, L., Nagao, A. (2008) Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans, *Br. J. Nutr.* 100 : 273–277.
- 8) Asai, A., Terasaki, M., Nagao, A. (2004) An epoxide-furanoid rearrangement of spinach neoxanthin occurs in the gastrointestinal tract of mice and in vitro : formation and cytostatic activity of neochrome stereoisomers, *J. Nutr.* 134 : 2237–2243.
- 9) Baskaran, V., Sugawara, T., Nagao, A. (2003) Phospholipids affect the intestinal absorption of carotenoids in mice, *Lipids* 38 : 705–711.
- 10) Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., Nagao, A. (2004) Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells : formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites, *Drug Metab. Dispos.* 32 : 205–211.
- 11) Nagao, A., Olson, J.A. (1994) Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene, *Faseb J.* 8 : 968–973.
- 12) Nagao, A., During, A., Hoshino, C., Terao, J., Olson, J.A. (1996) Stoichiometric conversion of all trans-beta-carotene to retinal by pig intestinal extract, *Arch. Biochem. Biophys.* 328 : 57–63.
- 13) During, A., Nagao, A., Hoshino, C., Terao, J. (1996) Assay of beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 241 : 199–205.
- 14) Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K., Lederer, M.O., Breithaupt, D. E., von Lintig, J. (2001) Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A, *J. Biol. Chem.* 276 : 14110–14116.
- 15) Asai, A., Nakano, T., Takahashi, M., Nagao, A. (2005) Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice, *J. Agric. Food. Chem.* 53 : 7302–7306.