

生物機能開発研究所
生理活性物質（糖質）プロジェクト
平成 18 年度研究成果報告書

プロジェクトリーダー：大塚健三

目的

本プロジェクトは生理活性物質や機能性多糖を中心に、外部資金獲得のための準備プロジェクトとして、いくつかの実験系を用いて研究を進める。特に分子シャペロン誘導剤、破骨細胞系、線虫を用いたキノコ毒の分子機序、プロテインホスファターゼ活性調節成分、生理活性多糖、植物の持つ利胆、抗菌、抗カビ作用成分、硝酸・亜硝酸イオン低減化に関わる食品成分など、さまざまな観点から、有害物質の低減や作用機構、また疾病予防、病状改善、健康増進に役立つような生理活性物質の探索・発見を目指す。

課題 1. 漢方薬中に含まれる分子シャペロン誘導剤の抗潰瘍、抗腫瘍、抗老化効果 担当 大塚健三

熱ショック蛋白質（HSP）はさまざまな環境ストレスで誘導される。HSP は分子シャペロンとして機能し、細胞内の種々の機能を制御しているだけでなく、タンパク質毒性をもつストレスに対する内因性の防御因子でもある。毒性のない薬剤などでこの分子シャペロンを誘導できれば、生体はさまざまな環境ストレスに対して抵抗性になると考えられている。われわれはすでにシャクヤクの主成分であるペオニフロリンが HSP 誘導能をもつことを明らかにしてきた（Cell Stress & Chaperones 9: 378-389, 2004; Int. J. Hyperthermia 21: 703-711, 2005）。

本年度は、塩酸投与によるマウス胃粘膜障害に対するペオニフロリンの防護効果を中心に研究を進めてきた。ペオニフロリンを腹腔投与するとマウス胃には Hsp70 が誘導され、1 回投与よりも 2 回投与で多くの Hsp70 が誘導された。Hsp70 の誘導はウェスタンブロットおよび組織染色で確認した。塩酸投与によって胃粘膜が障害されるが、あらかじめペオニフロリンを腹腔投与しておく、その障害が軽減された。障害軽減の程度は Hsp70 発現とよく関連していた。また HSPs 誘導阻害剤であるケルセチンにより Hsp70 の誘導を阻害すると、ペオニフロリンによる防護効果も抑制された。これらの結果から、ペオニフロリンによって Hsp70 が誘導され、その結果塩酸による胃粘膜障害が防護されたことを示唆している。

また、マウス B16 メラノーマ細胞の移植腫瘍において対照では 40 日以内にすべてのマウスが死亡したが、ペオニフロリンを 2 日ごとに腹腔投与すると腫瘍の増殖が抑えられ、移植後 40 日でもすべてのマウスがまだ生存していた。これはペオニフロリン投与によって HSPs が誘導され、免疫系が活性化されることにより抗腫瘍効果がみられたものと思われる。

課題 2. 破骨細胞の分化を阻害するネオリグナン類の作用機構の解析 担当 禹 濟泰

骨粗鬆症を予防可能な食品成分を得る目的で、破骨細胞の分化及び機能に作用する

活性物質を植物代謝産物中から探索し、モクレン科オオノキ (*Magnolia obovata*) に含まれているネオリグナン類のホノキオール、マグノロールを見出した。本研究では、両化合物による破骨細胞の初期分化及び成熟破骨細胞の骨格維持破壊の作用機構を明らかにすることを目的として行なった。RAW264 細胞培養系を用いて RANKL によって変動するシグナル分子 (I κ B, p38, JNK, ERK など) の活性化に対するリグナン類の影響をウエスタンブロット法で検討した結果、ホノキオールは、p38 および I κ B のリン酸化および I κ B の分解を抑制した。また、破骨細胞分化において鍵となる転写因子である NFATc1 の発現を抑制した。以上のことから、ホノキオールによる破骨細胞分化の阻害は、p38 および NF κ B の活性化の阻害および NFATc1 の発現抑制によることが明らかとなった。

課題 3. エレガンスを用いた菌蕈 (きのこ) 毒における分子機序の解明 担当 三輪錠司

農業病害線虫の防除法として、現在防除効果・コストの面からも化学農薬によるところが大きい。しかし、環境に与える負荷や、残留農薬が人体へ与える影響等の懸念から、使用が禁止された農薬も少なくない。したがって、化学農薬に替わる有効な防除法の開発が急務である。天敵微生物を用いた生物防除法として現在用いられているもの、もしくは有望視されているものとして、線虫寄生細菌 (*Pasteuria* spp.)、線虫捕食菌 (*Arthrobotrys* spp. や *Monacrosporium* spp.) が挙げられる。これらは世界中でも注目され、防除資材としての探索・研究がなされている。本研究では、実験室での培養が容易であり捕食ターゲットの幅が広く、次世代の生物防除資材として最も有望とされている線虫捕食菌 (*Arthrobotrys* sp.) を材料とし、モデル生物である *Caenorhabditis elegans* (エレガンス) と組み合わせることでその捕捉・捕食の分子メカニズムについて解明を目指す。今回、野外から *Arthrobotrys* sp. を採取し、生育条件および捕捉器の形成条件の検討 (図の矢頭)、エレガンスの捕捉率を調べた。今後、エレガンスの捕食抵抗変異体を分離することで、線虫側からの捕捉・捕食メカニズムを遺伝学的に解明してゆく予定である。



図. *Arthrobotrys* sp. が形成する補足器 (矢頭) により捕捉された線虫。

課題 4. プロテインホスファターゼ 2C の特異的活性調節成分の探索 担当 大西素子

プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) には、それぞれ異なった遺伝子にコードされる少なくとも 12 種類のサブタイプが存在し、これらは、脂質代謝の調節、細胞周期やアポトーシスの制御および炎症反応の抑制等に深く関与していることが知られている。本研究では、癌を初め様々な疾病の治療に有効であろうと予想される PP2C

の特異的な阻害剤および活性化剤を得る目的で、昨年度までに樹立した PP2C α の活性測定系を用いて、放線菌等の微生物培養液の抽出物 854 種類について、阻害および活性化効果の検討を行った。その結果、202F6 および 202G7 の 2 つの試料に PP2C α の高い阻害効果が認められたため、これらの抽出液の分画、精製を行い、活性成分の同定をめざした。

202F6 中の活性成分は、最終的に HPLC 精製後、NMR を測定した結果、脂肪酸の誘導体であることを示唆する結果が得られた。PP2C α は、不飽和脂肪酸により活性化されることが報告されているが、不活性化されるという報告は無い。そこで、鎖長および飽和度の異なる数種類の標準脂肪酸を購入し、PP2C α に対する影響を調べたところ、飽和脂肪酸は活性に影響を与えなかったが、不飽和脂肪酸は報告と同様 PP2C α を活性化する結果が得られた。しかしながら、変性したアラキドン酸は、PP2C α の活性を顕著に阻害したため、202F6 に含まれる阻害成分は何らかの修飾を受けた不飽和脂肪酸である可能性が示唆された。202G7 に含まれる阻害成分については現在検討を進めている。

課題 5. 二糖を側鎖に有する分岐型(1 \rightarrow 3)- β -D-グルコピラナンの化学合成と生理活性評価

担当 堤内 要

我々はこれまで、1,3-アンヒドロ糖誘導体の開環重合を基盤とした分岐型(1 \rightarrow 3)- β -D-グルコピラナンの化学合成を行い、(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンのライブラリー構築とそれらを用いた多糖構造と生理活性との相関解析を目標としている。既に単糖を側鎖に有する分岐多糖の合成には成功したため、本年度は二糖を側鎖に有する分岐多糖の合成を試みた。はじめにゲンチオビオースの導入をしようと二糖の化学合成を進めたが思うように目的物を得ることができなかつたため、目標とする分岐多糖の合成はできなかった。

一方、グルコースを側鎖に有する分岐多糖の合成も同時に進められ、主鎖の重合度(DP)や分岐密度の異なる試料をいくつか得ることができた。これらの試料を用いてカイコのフェノール酸化酵素前駆体カスケードを用いて Silkworm Larvae Plasma (SLP) テストでの免疫活性試験を行ったところ、側鎖の有無に関係なく、DP=29 の試料のほうが DP=5 のものより高い免疫活性を示した。また、DP = 29 で側鎖の有無が異なる試料を用いた結果を比較すると、グルコース側鎖の有無は鎖長ほど免疫活性に影響を及ぼさないという結果が認められた。興味深いことに、DP= 5 の試料では側鎖のない方の活性が強く、天然の(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンで認められる知見と異なる傾向を示した。

課題 6. *Artemisia* 属植物の機能性成分の検索とその開発研究

担当 南 基泰

Artemisia 属植物の頭花乾燥品(合計 60 検体)を MeOH 中で超音波抽出し、濃縮粗エキスを抗菌活性及び抗酸化活性のアッセイに用いた。抗菌活性は、大腸菌、枯草菌を用いて、培養の際に添加した MeOH エキスが、細菌が持っている酵素 [NAD(P)H : キノン酸化還元酵素] とメナジオンとの酸化還元反応で発生した活性酸素の発光阻害率

で評価した。Cont.として抗生物質である Ampicillin, Polymyxin B, Chloramphenicol, Kanamycin を用いた。一方、抗酸化活性は、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼの系で生成した O^2 を、2-メチル-p-メトキシフェニルエチニルイミダゾピラジノン (MPEC) で発光させ、MeOH エキスを添加した際の発光阻害率で評価した。Cont.として L(+)-Ascorbic acid, (-)-Catechin を用いた。抗菌活性は、Cont. の 4 種類の抗生物質が 45-84% の抑制を示したのに対して、カワラヨモギ MeOH エキスには 10% 濃度添加で、93-96% と非常に強い活性を示す系統があった。また、抗酸化活性は、Cont. では 53% で、約 3% の濃度添加で、ほぼ同レベルの 56-60% の活性が認められた系統があった。これらの活性は、いずれも国内外の地理的もしくは系統間変異であった。抗菌活性の高かった数系統については、圃場レベルで栽培を行い、本年度抗菌活性成分を指標に優良系統の選抜を行った。

課題 7. 硝酸・亜硝酸イオン低減化に関わる食品成分の探索と解析 担当 愛知真木子, 永井和夫

農作物に含まれる硝酸イオンが体内で還元されて亜硝酸イオンとなり、人体に害があることが明らかになってきて、胃ガンや糖尿病の原因となっているという研究結果や疫学調査がある一方、それを否定する研究結果もあり、硝酸イオンの有害性は完全には認められていない。これまでに我々は、緑茶抽出液が当該物質を減少させることを確認しているので、硝酸イオンの有毒性が完全には認められないのは、食品中の成分と反応し、当該物質が無毒化されているためではないかと考えた。そこで申請者らは、硝酸・亜硝酸イオン低減化に関与する食品を探索した。果物や野菜など 115 種から成分を抽出し、亜硝酸低減化活性を測定したところ、サルナシ、キウイおよびパッションフルーツ抽出液が亜硝酸を低減化した。サルナシについては、抽出液を分離し、各画分での亜硝酸低減化活性を測定、その亜硝酸低減化物質の構造を同定中である。

外部資金プロジェクト

1. 健康食品科学寄附研究部門

テーマ 生活習慣病予防・改善機能性食品素材の探索と作用機構の解析

担当 禹 濟泰・米澤貴之・車 炳允・永井和夫

肥満・糖尿病の予防に役立つ食品成分を得るために、脂肪細胞の分化を調節する食品成分を探索し、いくつかの食品の抽出物に脂肪細胞分化を促進する活性があることを見出した。活性成分については現在精製中である。また、活性の見られた食品成分については動物モデルを用いた生体レベルでの作用についても検討中である。

骨粗鬆症予防・改善機能性食品の開発のため、骨吸収を担う破骨細胞および骨形成を担う骨芽細胞の分化を調節する食品成分を探索した。その結果、抗菌作用や美容作用があるといわれているゲットウ（月桃）および緩下剤等に利用されるタデ科の植物のギンギシが破骨細胞の分化を抑制することを見出し、活性成分をそれぞれ単離・同定した。