

生体制御分子探索と機能解析を基盤とする健康科学

研究代表者：長岡 康夫
研究担当者：下家 浩二・松村 吉信・福永 健治

本研究グループの主な目的は生体制御分子の探索とその機能解明に基づく健康維持増進技術の開発である。生体制御分子、すなわち新規の内因性タンパク質、生理活性低分子化合物、機能性生体金属、環境内分泌かく乱物質などを探索し、これらの物質が生体に及ぼす機能を明らかにする。そして、ここで得られた知見を基に、疾病予防、健康阻害要因の除去、健康維持、健康増進、に結びつく新しい方法論の提示を目指す。本研究グループは本年4月に発足1年目を迎えることになる。本報では、4人の研究員が分担する研究の背景とその方法論、そして、得られた結果について概説する。

I. 神経細胞死の防御と神経栄養因子が果たす健康維持への役割

下家 浩二*

本研究は、生命体内の特定の分子機能を解析することによって、健康維持・増進に寄与しうる知見を見出すことを大きな目的としている。ただし、分子機構の解析に至るまでには、細胞レベルでの解析も必要となる。なぜならば、高等生命体は、数多くの細胞群から出来上がった生物で、生命体として見れば、極めて複雑な構成体であり、細胞が引き起こす現象を研究の初期に把握しなければならぬと考えられるからである。

脳内の神経細胞を例に挙げると、外胚葉由来の神経細胞は、同じく外胚葉由来の皮膚の細胞などとは、形態的にも機能的にも明らかに異なった分化した細胞となる。また、脳内では、同じ神経細胞でも形態が異なっている細胞が存在している。さらに、神経細胞で特筆すべきは、他の細胞と、シナプスと呼ばれる狭い隙間を持った接触部分を形成することによって、膜電位の変化を発生させ、伝達し、運動（随意や不随意）や記憶・学習などの生命活動を制御している。従って、脳は、神経突起の数や細胞体の大きさなど、異なった細胞の集団によって形成さ

れていると言える。そして、脳は、グリア細胞と呼ばれる神経細胞以外の細胞の集団も有している。本年度、私が担当した研究は、そのような複雑怪奇な脳神経細胞の現象を把握したうえで、特定分子機能の解析を行った。

上記の通り、ごく僅かの形態的・機能的な例を見ても、脳には、高度に複雑さを含有させる要素が存在していると言えるであろう。そのため、簡単な記憶や学習などでさえも、それらの分子機構に関しては、未だ不明な点を数多く残している。創造性や情緒を表すメカニズムなども不明であり、脳の研究は、脳を有する生命体研究における“最後のフロンティア”とも言われている。

平時における脳内の神経細胞の機能以外に、病理に関する分子機構の解析も進められてきたが、困難を伴ってきた。上記の通り、複雑な要素を含んでいることが大きな理由の一つであるが、特に、神経細胞が死ぬことによって引き起こされる弧発性の脳疾患では、高齢の患者が多いため、原因の特定が困難である。また、神経細胞は、外からの物理的・化学的刺激に対して脆弱であることも解析を困難にしている理由の一つである。そこで、弧発性の研究遂行を先ずは避け、脳における特定の病気に対する原因遺伝子の探索が行われるようになり、これまでに数多くの原因遺伝子が同定されている。

本報では、患者が痴呆を呈するアルツハイマー病や運動障害を呈するパーキンソン病など、神経細胞自身が自己を死に至らしめることによって引き起こされる疾患（神経変性疾患）の原因遺伝子の病理解析や、弧発性疾患の発症機構を明らかにしていった結果、“小胞体ストレス”と呼ばれる小胞体内腔に異常構造タンパク質が蓄積する現象が見出されたことをも加筆する。また、小胞体ストレスによって、神経細胞の死が誘導される細胞内の分子機構についても述べ、上記の知見と神経細胞を保護することが知られる神経栄養因子の作用機構の発見に基づいた健康維持の方策提案の可能性について報告する。

* 化学生命工学部准教授 博士（理学）（生命・生物工学科）

I-1. 不健康な状態：小胞体ストレス (ER stress) と細胞の自殺機構に注目して

我々人間は、発生時期には、脳内で約2倍の神経細胞が作られることが知られている¹⁾。しかし、生後に見られる正常胎児の脳内の神経細胞数は、その半数の1倍である。この現象は、なぜ起こるのか？また、どのような生物学的意味を持つのか？

実は、多くの生命体では、細胞内に自らを死に至らしめる“自殺機構”が存在する。この“自殺機構”を、“アポトーシス”と呼んでいる。我々人間の脳神経細胞の半数が出生時まで失われている理由は、脳神経細胞がアポトーシスによって死滅したからである。では、生物学的意味であるが、数多くの神経細胞を発生時期にあらかじめ準備しておくことによって、正しく神経突起のネットワークを形成し、正常な脳神経活動を行う神経細胞を選別していると考えられている¹⁾。先入観から、単純に、細胞が死ぬことは、“悪いこと”のように思われる。しかし、アポトーシスは、我々を含めた生命体にとって必要不可欠な現象である。

発生時期と同様に、加齢によって老化が進行した時期の人間の脳内で、健常者の神経細胞が、減少していくことも知られている。以下に述べる神経変性疾患患者の脳内の神経細胞は、さらに(病的に)多くの神経細胞が死滅していることが分かっている。勿論、個人差があり、病的な数についても様々である。この病的な死滅の原因として、“小胞体ストレス (ER stress)”とよばれる細胞内でのストレス負荷が注目されている²⁾。小胞体ストレスとは、細胞内小器官である小胞体の内腔に、異常な構造のタンパク質(本来築かれるべき、機能しうる構造を形成していないタンパク質: unfolded protein)が蓄積することによって起こる細胞のストレスを指す。過剰に小胞体ストレスが負荷されると、異常構造タンパク質が蓄積し続け、その結果、アポトーシスが起こる。この時に起こるアポトーシスを小胞体ストレス誘導型アポトーシスと呼び、上記に述べたアポトーシスと区別している。なぜなら、この場合のアポトーシスは、小胞体ストレスに特異的な細胞内分子機構によって死滅するからである²⁾。

I-2. 小胞体ストレス誘導型アポトーシスによる細胞死の分子機構

近年になり、これまで知られていたアポトーシスと小胞体ストレス誘導型アポトーシスとの間で、細胞を死滅させる細胞内分子機構に大きな違いがあることが分かった。これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構は、アポトーシス実行の刺激を受けた後、細胞内小器官であるミトコンドリアの機能不全が起こり、ミトコンド

リア内からcytochrome cというタンパク質が細胞質内に放出される。その後、cytochrome c、Apaf-1、procaspase-9(不活性化型)、dATPによる複合体(apoptosome)が形成され、プロテアーゼ活性を有するcaspase-9(活性化型)を産生する。次に、このcaspase-9は、procaspase-3(不活性化型)を切断し、caspase-3(活性化型)を産生する。最後に、caspase-3は、ICADとCADの複合体のICADを切断し、DNA切断活性を有するCADを活性化することによって、核内DNAの断片化を引き起こさせる³⁾。以上が、これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構である。

一方、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの場合、その防御と実行の相反する分子機構が同時に働くことが分かった²⁾。まず、小胞体ストレスが負荷されると、細胞内では、小胞体膜に存在している3種のセンサータンパク質(ATF6、Ire1、PERK)によって異常構造タンパク質の産生が感知され、異常構造タンパク質の構造正常化(refolding)や新規タンパク質合成の停止を行うことによって小胞体ストレスの進行が防御される。Refoldingのためには、シャペロンが動員されることになる。小胞体ストレスが惹起した時には、ATF6とIre1の下流の分子(転写因子)によって、主としてGRP78というシャペロンタンパク質が、発現誘導され、小胞体ストレスを緩和していると考えられている。また、PERKが、翻訳に関わるeIF2 α をリン酸化することによって、eIF2 α の機能を阻害し、翻訳抑制によって小胞体ストレスがさらに高まることを防いでいると考えられている。しかし、小胞体ストレス誘導型アポトーシスが起こるような状況では、ATF6、Ire1、PERKを介する防御の能力を超えている。興味深いことに、むしろ、ATF6、Ire1、PERKは、小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起し、実行する方向に働いている。これが、小胞体ストレスに特異的なアポトーシス実行の細胞内分子機構であり、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行に関する細胞内分子機構である^{2,4)}。これまでに数多くの報告でも見られている通り、caspase-12の活性化とCHOP/GADD153の発現上昇が、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行に重要であることがわかる。この事実は、それぞれの遺伝子のノックアウトマウスにおける小胞体ストレス誘導型アポトーシス刺激への抵抗性が増大する報告からも明らかとなっている⁵⁾。

I-3. 神経変性疾患と小胞体ストレスの背景

神経変性疾患と言って、具体的に何を指しているのかが分かる人は意外と少ないと思う。そこで、神経変性疾患について解説する。神経変性疾患とは、中枢神経細胞が、徐々に死滅して起こる疾患を指す。この神経変性疾

患には、特定の遺伝子が原因となる遺伝性と周囲の環境や毎日の食事などに依存する弧発性に分けることが出来る。例えば、アルツハイマー病では、原因遺伝子群として、amyloid precursor protein (APP)、presenilin 1 (PS1)、presenilin 2 (PS2)、危険因子として、apolipoprotein E (ApoE) が知られている^{6,7)}。病理所見として、海馬神経細胞が小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅した後、そこに投射している大脳皮質コリン作動性神経細胞も小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅する。その結果、アルツハイマー病患者は、学習・記憶・行動などの障害を呈し、最終的には死に至る。また、パーキンソン病では、parkinが、若年性の原因遺伝子として同定されている⁸⁾。病理所見として、黒質ドーパミン作動性神経細胞が小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅することが知られている。黒質ドーパミン作動性神経細胞は、運動を調節する線条体に投射していることから、その神経細胞の死滅によって、患者は、無動・固縮・震戦などの随意運動障害を呈する。いずれにしても、神経細胞が小胞体ストレスを受け、その結果、アポトーシスが起ることによって神経細胞が死滅する。細胞内の分子機構としては、ヒトには、caspase-12が発現していないために、caspase-4がその代わりの役割を果たすことによって、既述のように小胞体ストレス誘導型アポトーシスが実行されていると考えられている⁹⁾。

I-4. 小胞体ストレス誘導型アポトーシスと神経栄養因子によるその抑制作用を利用した健康維持の方策提案

この小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することが出来るならば、神経変性疾患が緩和され、不健康状態から脱する可能性がある。私は、神経栄養因子と呼ばれるタンパク質群が、これまで知られているアポトーシスのみならず、小胞体ストレス誘導型アポトーシスをも抑制することを見出してきた¹⁰⁻¹²⁾。

神経栄養因子は、NGF、BDNF、NT-4/5、NT-3などの間でファミリーを形成している¹³⁾。神経細胞膜上には、膜一回貫通型の受容体 (TrkA、TrkB、TrkC) が存在する。これらの受容体もファミリーを形成しており、リガンドである神経栄養因子と特異的に結合する。これらの受容体は、神経栄養因子の結合によって、細胞内側に配置する数個から数十個のチロシン残基が自己リン酸化する。上記の神経栄養因子の作用は、TrkA、TrkB、TrkC内のリン酸化チロシン残基近傍に特定のシグナル伝達タンパク質が、特定のリン酸化チロシン残基に結合することによって実現される。次に、特定のリン酸化チロシン残基に結合したシグナル伝達タンパク質もリン酸化を受け、さらに下流の特定のタンパク質群が結合とり

ン酸化を繰り返し、リン酸化シグナル伝達のカスケード (経路) を形成している。これまでに、Ras/MAPK経路、PI3-K/Akt経路、PLC- γ 経路の少なくとも3つのシグナル伝達経路が見出されている¹³⁾。私は、小脳顆粒細胞を用いた低カリウム刺激によるこれまで知られているアポトーシスや、PC12細胞を用いたMPTP (細胞死誘導剤の一つ) による酸化刺激によるこれまで知られているアポトーシスでは、神経栄養因子添加によって活性化されたPI3-K/Akt経路を介して、神経細胞が、死滅から防御されることを見出してきた^{14,15)}。

さらに、私は、研究室内で実験可能な培養細胞を用いて、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの実行と神経栄養因子による抑制機構を解析するために、糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin (Tm) や小胞体膜上のCa²⁺-ATPase阻害剤である thapsigargin (Tg) を添加する実験系を用いた。両薬剤は、小胞体での正常な構造を有するタンパク質の生合成を阻害することが知られている。既述の通り、小胞体ストレスでは、アポトーシス進行過程で caspase-12 が特異的に活性化される。そこで著者らは、Tm や Tg 添加後に活性化される caspase-12 が、神経栄養因子 (NGF や BDNF) を存在させることによって活性化する PI3-K/Akt 経路を介して抑制され、その結果、小胞体ストレス誘導型アポトーシスが抑制されるのではないかと考えた。そこで、培養大脳皮質神経細胞と PC12 細胞に Tm を添加し、小胞体ストレスを惹起すると同時に、BDNF や NGF をもそれぞれ培養大脳皮質神経細胞や PC12 細胞に添加することによって caspase-12 活性の変動を見る実験を行った。その結果、BDNF と NGF は、有意に caspase-12 の活性化を抑制した^{10,11)}。また、PI3-K の特異的阻害剤である LY294002 を BDNF や NGF と共存させると、caspase-12 の活性化が抑制できないことを見出した。また、BDNF や NGF によって活性化された PI3-K/Akt 経路は、caspase-9 や caspase-3 の活性化も抑制していた^{10,11)}。caspase-12 は、caspase-9 を直接活性化し、さらに下流の caspase-3 を活性化するとする報告が見られている⁴⁾。以上から、培養大脳皮質神経細胞と PC12 細胞では、caspase-12 から開始される小胞体ストレスによるアポトーシス進行は、caspase-9 を活性化した後、caspase-3 を活性化し、細胞を死滅させることが確認された。そして、神経栄養因子は、caspase-12 の活性化を抑制することによって小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制していることが明らかになった。同様の結果は、Tg を添加した後、更に NGF を添加する実験においても同様であった¹²⁾。

以上の実験から、神経栄養因子によって活性化される PI3-K/Akt 経路をうまく制御することによって神経変性疾患をうまくコントロール (防御) し、健康を維持する

可能性を示唆することが出来たと考えている。

I-5. おわりに

神経変性疾患の多くは、厚生労働省から難病に指定されている疾患であり、これから多くの研究者が基礎的研究を積み重ねなければならないと考えている。本報では、神経変性疾患の例として、アルツハイマー病とパーキンソン病に関して解説し、防御と言う観点から健康維持の手段を提案した。今後、更なる研究の余地が残されている。私は、世界中で、華々しく原因遺伝子の解析に関する研究が実施され、それらの成果論文を目にする傍ら、遺伝性の患者は、約1から2割である現状を考えると、弧発性を含めた一般的な小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行過程の研究と小胞体ストレス自体の根源を絶ち、健康を維持できる方法を、地道に研究していく必要性を感じている。規模、予算、年数を考慮した本研究体制構築を改めて考える機会でもあるかもしれない。他方、現在の社会は、急速に高齢化が促進し、ますます健康に対する関心が高まってきている。地道な研究成果の必要性と早急に目に見える成果の必要性のはざ間で苦悩しながら研究成果をさらに発展させなければならないと考えている。

参 考 文 献

- 1) R. W. Oppenheim, Annu. Rev. Neurosci., 14, 453-501 (1991)
- 2) R. J. Kaufman, Genes. Dev., 13, 1211-1233 (1999)
- 3) M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, Nature 391, 43-50 (1998)
- 4) N. Morishima, K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata, Y. Yasuhiko, J. Biol. Chem., 277, 34287-34294 (2002)
- 5) T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, et al., Nature 403, 98-103 (2000)
- 6) M.C. Chartier-Harlin, F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, et al., Nature 353, 844-846 (1991)
- 7) T. Katayama, K. Imaizumi, N. Sato, K. Miyoshi, T. Kudo, J. Hitomi, et al., Nature Cell Biol., 1, 479-485 (1999)
- 8) T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, et al., Nature 392, 605-608 (1998)
- 9) J. Hitomi, T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, et al., J. Cell. Biol., 165, 347-56 (2004)
- 10) K. Shimoke, H. Amano, S. Kishi, H. Uchida, M. Kudo, T. Ikeuchi, J. Biochem., 135, 439-446 (2004)
- 11) K. Shimoke, T. Utsumi, S. Kishi, M. Nishimura, H.

Sasaya, M. Kudo, T. Ikeuchi, Brain Res., 1028, 105-111 (2004)

- 12) K. Shimoke, S. Kishi, T. Utsumi, Y. Shimamura, H. Sasaya, T. Oikawa, S. Uesato, T. Ikeuchi, Neurosci. Lett., 389, 124-128 (2005)
- 13) N. Takei, H. Nawa, Seikagaku, 76, 111-123 (2004)
- 14) K. Shimoke, K. Kubo, T. Numakawa, Y. Abiru, Y. Enokido, N. Takei, T. Ikeuchi, H. Hatanaka, Dev. Brain Res., 101, 197-206 (1997)
- 15) K. Shimoke, M. Kudo, T. Ikeuchi, Life Sci., 73, 581-593 (2003)

II. *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株におけるビスフェノールA分解に関与するチトクロームP450およびフェレドキシン遺伝子のクローニングとその遺伝子機能解析

松村 吉信*

Bisphenol A (BPA) は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂などのプラスチック材料として、世界的に生産量および消費量が増加している化合物である。しかし、最近になって、BPAが内分泌攪乱化学物質であると強く示唆されるようになり、実際に、川や海、土壌などの環境中で広く検出されている。現時点では、生態系に影響を及ぼす濃度には至っていないが、埋め立て地など人工廃棄物が集積されている環境では、BPA濃度は非常に高くなっている。このような現状および環境保護の観点から、BPAを含む環境汚染物質除去システムの構築が望まれている。

これまでにBPAを完全に分解する生物は細菌に属する生物種のみで見つかっている。このため、BPA分解菌の利用がBPA除去システムに有効であると考えられている。また、BPA分解菌として、グラム陰性菌のMV1株やWH1株、*Sphingomonas* sp. FJ-4株、我々の研究で単離した*S. bisphenolicum* AO1株¹⁾などが報告されている。これらの細菌によるBPA代謝として2経路が報告されているが、BPA分解に関与する酵素群に関する報告は全くなかった。我々はAO1株より、チトクロームP450およびフェレドキシンを精製し、これらに関与したチトクロームP450モノオキシゲナーゼ系がBPA分解の初期反応であるBPAの水酸化を触媒することを見だし、本酵素が細菌で確認されているBPA分解の2代謝経路のどちらにも関与していることをこれまでの分解産物の構造解析により明らかにしている²⁾。

細菌のチトクロームP450は、特定の電子伝達系と協調し、広範囲にわたる生体異物のヒドロキシル化、エポキ

* 化学生命工学部専任講師 博士(工学)(生命・生物工学科)

シ化、スルホ酸化と脱アルキルを引き起こす酵素として知られている。これら生体異物の中には、医薬品や香水、発癌性物質、殺虫剤、環境汚染物質が含まれている。たとえば、*Streptomyces griseus*のチトクロムP450_{soy}は、ベンゼンやピフェニル、クロロベンゼン、アニリン、ナフタレンなどの環境汚染物質の水酸化や脱アルキル化を触媒することが報告されている。このような結果は、チトクロムP450活性を保持している微生物が環境汚染のバイオレメディエーションに利用できることを示している。また、一部のチトクロムP450は医薬品などのファインケミカルの合成にも利用されている。このようにチトクロムP450の工学的利用法は数多く考案されているものの、野生株におけるチトクロムP450生産は非常に低いため、チトクロムP450の基質特異性や反応特異性などの酵素化学的な分析は詳細に行われていない。また、チトクロムP450保持細菌細胞の遺伝子発現制御系の解析もあまり行われていないため、遺伝子工学的手法を用いたチトクロムP450大量発現系の構築も困難な状況である。

そこで、本研究において、我々はAO1株のBPA分解に関与するチトクロムP450であるP450_{bisd}とフェレドキシンであるFd_{bisd}を構造遺伝子のクローンとその塩基配列決定および遺伝情報解析を試みた。さらに、これらの遺伝子を大腸菌細胞に導入し、P450_{bisd}とFd_{bisd}の大量発現系の構築ならびにBPA分解能を有する大腸菌の創製を試みた。

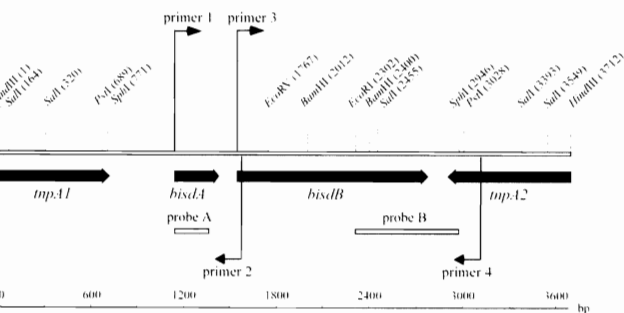


図1. クローニングした**bisdAB**およびその周辺領域の制限酵素地図

primer1-4およびprobeA-Bは本断片のクローニングに用いたPCRプライマーおよびサザンハイブリダイゼーションプローブである。

Sphingomonas bisphenolicum AO1株におけるBPA分解の初期反応に関わるフェレドキシン (Fd_{bisd}) およびチトクロムP450 (P450_{bisd}) の構造遺伝子である**bisdA**および**bisdB**は約3.7kbのHindIII断片にコードされており、二つのトランスポザゼ遺伝子 (*tnpA1*と*tnpA2*) に挟まれていた (図1)。これら構造遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列からFd_{bisd} およびP450_{bisd}のタンパク質構造解析を行った結果、Fd_{bisd} はputidaredoxin-

typeの[2Fe-2S] クラスターを持っていることが明らかとなった。また、P450_{bisd}は、一般的なチトクロムP450が保持している酸素結合部位やヘム結合部位を持っているものの、これまでに報告されているチトクロムP450のタンパク質の一次構造とは相同性が低く、新しいタイプのチトクロムP450であると予想された。**bisdA**および**bisdB**の片方あるいは両方を大腸菌細胞に導入した結果、**bisdB**組換え体でビスフェノールAの分解活性が確認された。しかし、生産されたほとんどのタンパク質は不溶性の封入体として存在していた。さらに、ビスフェノールA分解能を失った自然突然変異株AO1L株を取得し、その遺伝子構造を解析した結果、少なくとも**bisdAB**遺伝子の欠失が明らかとなった。この結果は、AO1株ではP450_{bisd}がビスフェノールA分解の初期反応を触媒する唯一の酵素であることを示している。本研究は、BAP分解の初期反応に関わるチトクロムP450モノオキシゲナーゼ構造遺伝子をクローニングした最初の報告であるが、最終目的である本酵素の大量発現には至っていない。今後、遺伝子発現系の詳細な解析が必要であると考えられる。また、本酵素遺伝子が非常に不安定であることも同時に明らかとなり、AO1株の工学的利用に向けて本遺伝子の安定化に向けた研究も必要である。今後の研究の進展が期待される。

参 考 文 献

- 1) Oshiman, K., Tsutsumi, Y., Nishida, T., Matsumura Y., *Biodegradation* 18, 247-255 (2007).
- 2) Sasaki, M., Akahira, A., Oshiman, K., Tsuchido, T., Matsumura, Y., *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8024-8030 (2005).

Ⅲ. 魚肉タンパク質の健康機能性

福永 健治* 細見 亮太** 吉田 宗弘***

【はじめに】

水産物に特徴的なイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) といったn-3系高度不飽和脂肪酸 (n-3PUFA) は、血清中性脂肪 (TG) 減少、血小板凝集抑制などの健康機能性を有することが知られている¹⁾。しかしn-3PUFAは、付加的に摂取した場合、動脈硬化発症の危険因子である血清低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-Chol) に対する低下作用はなく、むしろ上昇を招き、血清総コレステロール (T-Chol)

* 化学生命工学部准教授 水産学博士 (生命・生物工学科)

** 関西大学大学院 工学研究科 ライフマテリアルデザイン専攻 博士前期課程

*** 化学生命工学部教授 農学博士 医学博士 (生命・生物工学科)

低下作用もほとんどない²⁾。それにもかかわらず栄養学の研究者、臨床家ですら、EPAやDHAにLDL-Chol、T-Chol低下作用があると信じている場合がある。これは、魚介類をそのまま摂取した場合に、LDL-C、T-Cholが低下することから、魚肉摂取による有益性発現=EPA、DHAの効果と拡大解釈し、生じた誤解に他ならない。そこで、本研究では、脂質を除いた魚肉の主成分であるタンパク質に着目し、血清脂質改善作用を明らかにすることを目的にラットを用いて検討した。

【実験方法】

実験動物としてWistar系雄ラットを用いた。給餌試験に供する魚肉タンパク質は、イワシ肉脱脂物を調製し用いた。マイワシ可食部(筋肉)を細切し、十分に水洗し、ついでアセトン、エタノール、n-ヘキサン順に溶媒を加えて脱脂した。その後、減圧濾過で溶媒を留去、乾燥し、魚肉タンパク質とした。その組成を表1に示す。試験餌料は、標準餌料AIN93Gのタンパク質、脂質、その他各栄養成分が等量となるように調製した。試験餌料は、標準餌料のタンパク質原であるミルクカゼインを魚肉タンパク質に置換(20%、50%)し、それぞれの実験群(n=7)を魚肉20及び魚肉50群として28日間給餌、飼育した。

表1 イワシタンパク質の一般成分組成 (mg/g)

水分	5.1
灰分	6.6
粗タンパク質	84.1
粗脂肪	0.6
中性脂肪	0.02
コレステロール	0.03

飼育期間終了後、常法に従って採血し、血清、肝臓及び白色脂肪組織を得た。血清の総脂質(T-Lipid)、総タンパク質(T-Protein)、T-Chol、LDL-Chol、HDL-Chol)、TG、肝機能指標GOT、GPTをオリンパスAU5431自動分析計によって測定した。

【結果及び考察】

飼育実験期間を通して、各群間に餌料摂取量、摂水量に差はみられなかった。また、体重の増加及び解剖時の体重にも各群間に差はみられず、成長に及ぼす魚肉タンパク質の影響はない。また、解剖時肝臓重量及び白色脂肪細胞重量に各群間に有意な差はみられなかったが、魚肉50群では、対照群と比較して肝臓重量及び白色脂肪組織重量の減少傾向がみられた。つぎに血清脂質成分に及ぼす試験餌料の影響を表2に示した。

栄養状態を示す総タンパク質に変化はみられなかった。一方、総脂質は魚肉50群で有意に減少した。TGは

表2 魚肉タンパク質の血清脂質成分に及ぼす影響

	対照群	魚肉20群	魚肉50群
T-Protein	5.5±0.4	5.5±0.2	5.4±0.2
T-Lipid	268.9±24.0	258.0±21.7	232.0±33.6*
TG	59.5±4.4	58.8±6.8	57.4±8.7
T-Chol	75.5±2.9	69.2±3.1*	58.1±3.2*
HDL-Chol	45.8±4.4	47.3±3.5	53.1±4.3*
LDL-Chol	4.7±0.3	6.3±0.3*	5.5±0.2*
GOT	79.8±8.2	76.7±3.1	82.9±9.2
GPT	42.8±7.4	43.2±3.8	43.7±6.3

* 対照群に対しp<0.05で有意差あり

各群間に差はみられなかった。魚油に特徴的なEPAやDHAを含む脂質を実験動物あるいはヒトに投与するとTGの減少がみられる²⁾が、魚肉タンパク質の給餌によってはTGには影響を与えないことが分かった。PLについても同様に各群間に変化は見られなかった。つぎにコレステロール代謝に関連する血清成分に及ぼす影響を検討したところ、T-Cholは、魚肉20群及び魚肉50群でともに有意に減少した。以上から、血清総脂質の減少は、コレステロールの減少によるものと考えられる。減少割合は魚肉50群で高く、魚肉給餌量に依存的であることが分かった。さらに、動脈硬化症の促進因子であるLDL-Chol、抑制因子であるHDL-Cholに及ぼす影響を検討したところ、給餌量依存的にLDL-Cholの減少、HDL-Cholの増加がみられた。魚油に特徴的なEPAやDHAを含む脂質を実験動物あるいはヒトに投与するとキロミクロンの代謝亢進にともなうLDL-Cholの増加がみられ³⁾、HDL-Cholには影響を与えない^{3,4)}ことから、魚介類摂取による血清コレステロール指標の改善作用は、魚油の機能ではなく、魚肉タンパク質の機能であることが示された。

肝機能指標である血清GOT及びGPTについて検討したところ、有意ではないが、魚肉タンパク質の給餌によってともに低下がみられた。これは、コレステロール代謝改善にともなう肝機能の改善⁵⁾であると考えられる。

本研究から、魚介類摂取によってもたらされる血清コレステロールの改善作用は、魚油ではなく、魚肉タンパク質によることが明確に示された。食品の一成分に強い生理活性がみられる場合、他の成分は往々にして見逃されてしまうことが多い。これまでほとんど注目されなかった魚肉タンパク質の健康機能性について、明らかにしていくことが、水産物の健康機能性を究明する上で重要であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) J. Dyerberg, H. O. Bang, N. Hjorne, lipids in Greenland Eskimos. Am. J. Clin. Nutr., 28, 958-966 (1975).

- 2) H. Yoshida et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 60, 1293-1298 (1996).
- 3) T. Kanayasu et al. Lipids, 26,271-276 (1991).
- 4) C. M. Albert et al. N. Engl. J. Med. 346, 1113-1118 (2002).
- 5) Shukla A et al, Br J Nutr. 2006.96 (4) : 674-682.

Ⅳ. 糖尿病合併症予防薬の開発研究の基盤形成

長岡 康夫*

わが国で癌が死亡原因の一位になって久しく、最近では治療のみならず予防的観点での対策の重要性が指摘されている。また、糖尿病は生活習慣病の中でも罹患率が高く、「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病の可能性が否定できない人」を合わせると、わが国で1,600万人に達すると言われている。糖尿病の場合、その合併症が主な問題であり、その予防法の確立が求められている。このように、がんと糖尿病合併症予防活性物質の探索は、多くの人々の健康維持増進に寄与することが期待される。そこで本研究項目ではこの二つを対象とした予防薬の探索に重点を置くことにした。

がん予防薬としては、発がんプロモーター抑制物質の探索を行う。発がんプロモーター抑制物質とは発がん2段階説、即ち発がんが第一段階のイニシエーションと第二段階のプロモーションによって引き起こされるという説における、第二段階の進行を抑制する物質のことである。活性はEBV-TPAによるマウス皮膚2段階発がん抑制試験で評価する。

糖尿病合併症の予防薬としては糖化最終生成物(AGE)産生阻害剤の探索を行う。糖尿病合併症の多くが、生体タンパク質や脂質と患者の血中還元糖との不可逆的化学反应によるAGE産生との深い関わりがあることが明らかにされてきた。したがって、AGE産生阻害物質が糖尿病合併症の予防薬になり得るのである。活性はin vitroの系でAGEの一種であるCMLの産生抑制を指標に評価する。

生体内タンパク質の糖化と成人病

メイラード反応は非酵素的なタンパク質の還元糖による不可逆的修飾であり、当初は食品の着色との関連で研究されてきた。近年、このメイラード反応が生体内のタンパク質に対して起き、糖化後期生成物(advanced glycation end-products: AGE)と呼ばれる化合物群が生成することが知られるようになった。(図1)

この反応ではタンパク質のリジン側鎖やアルギニン側鎖のアミノ基が還元糖のアルデヒドに縮合することによりシッフ塩基を形成し、その後、アマドリ転移反応、不

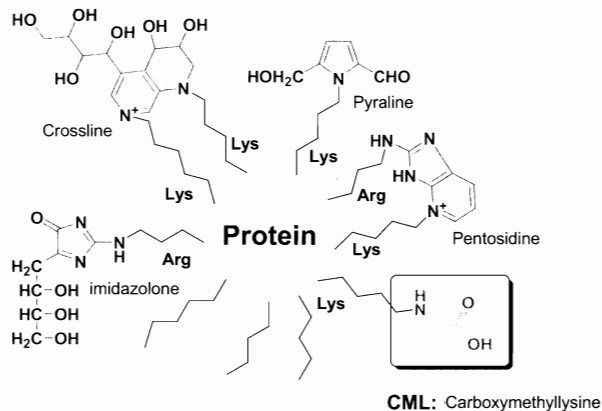
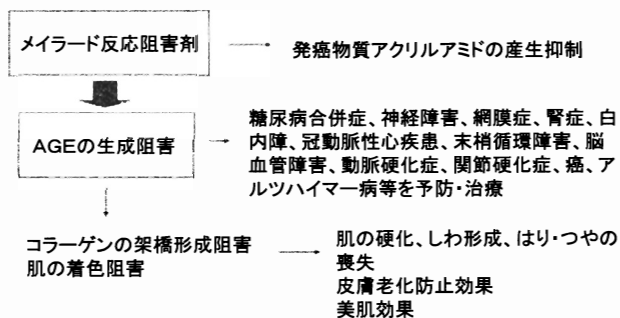


図1. 様々な生体内産生AGE

可逆的な酸化、脱水、転移反応等を繰り返すことにより、最終産物(AGE)に変化することが知られている。^{1,2)} このAGEの蓄積が糖尿病合併症や動脈硬化などの加齢関係疾患で有意に増加することが明らかになっており、これらの疾患の原因のひとつとして注目されている。また、AGEは皮膚のコラーゲンに架橋構造を作り皺の原因になるとも言われている。したがって、AGEの産生を抑制する阻害剤は、関連した疾病の予防作用、食品の着色や有害化合物の生成抑制作用、皮膚の老化抑制作用などが期待されるため、医薬品・健康食品、化粧品などへの応用が考えられる。(図2)

メイラード反応阻害剤に期待される活性



医薬品、化粧品、皮膚外用剤、飲食物、嗜好物、機能的食品として応用が期待できる。

図2. メイラード反応阻害剤の想定される用途

私は、AGE産生のモデル反応とLC-MSによるAGEの定量を組み合わせた、簡便な評価系を構築した。この評価系により、既存のAGE産生阻害剤である、アミノグアニジンを基質の0.1当量加え、評価したところ、40%のAGE産生阻害率を示した。このことから本反応系が阻害剤の探索に利用できることが示された。次に、本反応系を用いて、食品廃棄物の抽出物の活性を調べた。活性測定にはカテキン換算で基質の0.1当量に相当する量を用いた。10日目のAGE産生阻害率から、そば殻水抽

* 化学生命工学部准教授 博士(薬学)(生命・生物工学科)

出物とあんかす水抽出物に非常に高いBoc-CML形成阻害活性があり、その値は既知のAGE阻害剤であるアミノグアニジンの約1.5倍、(+)-カテキンとほぼ同等の高いAGE産生阻害活性が認められた。

以上の結果から、食品廃棄物の抽出物に高いAGE阻害活性を有することが明らかになった。特にそばがら水抽出エキスとあんかすエキスは、既存のAGE産生阻害剤や天然の抗酸化剤でAGE阻害剤として知られている、

(+)-catechinよりも強い活性を有することがあきらかとなり、今後の展開が期待される。

参 考 文 献

- 1) Glomb M.A., Monnier V.M., *J. Biol. Chem.* 270, 10017-10026 (1995).
- 2) Wells-Knecht K.J., Zyzak D.V., Litchfield J.E., Thorpe S.R., Baynes J.W., *Biochemistry* 34, 3702-3709 (1995).