

日本農芸化学会中四国支部 創立10周年記念

第14回若手シンポジウム

「生物資源化学の新たな展開」

講演要旨集

日時：2012年10月27日（土）13:30より

会場：徳島大学 総合科学部 1号館3階 第一会議室

主催：日本農芸化学会中四国支部

徳島大学 常三島キャンパス 周辺地図



徒歩の場合：

JR 徳島駅より 30 分

バス利用の場合：

徳島駅前より徳島市営バス「島田石橋」行、「商業高校」行外に乗車し、「助任橋」又は「徳島大学前」下車徒歩 5 分

問合せ先：

〒770-8502 徳島市南常三島町 1 - 1
徳島大学 総合科学部

中村 光裕

Phone (FAX) : 088-656-7246

E-mail : mnaka@ias.tokushima-u.ac.jp

キャンパスマップ



日本農芸化学会中四国支部 第14回若手シンポジウム

「生物資源化学の新たな展開」

日時：2012年10月27日（土）13:30より

会場：徳島大学 総合科学部 1号館3階 第一会議室

プログラム

1. 13:30 ~ 14:00 座長 中村光裕
植物フラボノイドの高機能化戦略（筋萎縮予防を中心に）
向井 理恵（徳島大院・HBS 研究部）

2. 14:00 ~ 14:30 座長 向井 理恵
海洋渦鞭毛藻類の有用代謝産物探索
小野寺 健一（高知大・総合研究センター）

休憩 14:30 ~ 14:50

3. 14:50 ~ 15:20 座長 小野寺 健一
ホタル生物発光型、標識材料の創製と実用化
牧 昌次郎（電通大院・情報理工）

4. 15:20 ~ 15:50 座長 牧 昌次郎
ホタル発光系を利用した L-ルシフェリンからホタル D-ルシフェリンの生成
中村 光裕（徳島大院・SAS 研究部）

植物フラボノイドの高機能化戦略

-筋萎縮予防を中心に-

徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学分野

向井 理恵

はじめに

フラボノイドとは植物性食品にみられる代表的なポリフェノールである。これらは植物が産生する二次代謝物の一種で、diphenylpropane 構造 ($C_6-C_3-C_6$) を共通構造とする一連の化合物群である。その種類は 4000 以上にのぼるといわれ、種々の健康増進効果も報告されている。フラボノイドのうち、diphenylpropane 構造に C_5 isoprenoid group (プレニル基)が結合したプレニルフラボノイドがある。これらは、マメ科やクワ科の根・葉・種子に存在することが知られている。また、培養細胞や微生物での生理活性が研究され、強い抗がん・抗腫瘍・抗酸化ならびに抗菌活性を有することが見いだされてきた。これらのことから、フラボノイドにプレニル基を導入することはフラボノイドの高機能化に繋がることが予測される。しかしながら、哺乳動物においてプレニル基の導入がフラボノイドの機能性に与える影響を明らかにした例はない。そこでわれわれは、実験動物におけるプレニルフラボノイドの機能性を評価するとともに、それらの生体吸収および代謝経路を解明することにより、フラボノイドの高機能化におけるプレニル化の有用性を実証することを試みている。本講演ではその研究成果の一端を紹介する。

わが国は超高齢社会に突入し、健やかな老年期を送ることが強い関心をよんでいる。そこで我々は、寝たきりなどで骨格筋が減少する「廃用性筋萎縮」に対してフラボノイドが予防的に利用できないか考えた。しかし、食品因子として経口摂取を考えた場合、作用を有するだけでは不十分であり、生体により多く吸収され、標的組織により多く蓄積することにより作用を発揮することが必要である。プレニルフラボノイドの一種である 8-プレニルナリンゲニン (PN)はホップやビールの含有成分である。また、生体内の酵素や腸内細菌による代謝によってもホップ中の前駆物質から生成することから、ビールのもつ健康維持・増進効果に関与することが示唆される。われわれはナリンゲニン (N)がプレニル基をもつことで、脂溶性が高くなるため消化管細胞を透過しやすくなり、標的組織 (骨格筋)への蓄積量も増えることにより、経口摂取において機能が発現すると予測した。C57BL/6 マウス (7wks, オス)に PN あるいは N を混合した飼料を与えた後に、後肢の坐骨神経切除(SNX)を行うことで廃用性筋萎縮を誘導した。解剖時の骨格筋量を測定したところ、PN は骨格筋の減少を抑えたが、N は効果がなかった。PN の骨格筋組織での蓄積量は N と比較して著しく高

い値を示した。このことから、ナリングニンのプレニル化は標的組織である骨格筋での蓄積量を増加させることで廃用性筋萎縮の予防において高い機能性を発揮することが明らかとなった。また、この効果のメカニズム解析を行ったところ、PNはタンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼ、Atrogin-1の発現量を低下させることにより骨格筋分解を抑える可能性を示した。このようにプレニル基をフラボノイドに導入することで、生体利用性が変化することが確認され、PNの場合は廃用性筋萎縮抑制効果の上昇につながることを発見した (Mukai *et. al*, PLoS ONE, *In press*)。一方で、血中動態を調べた実験ではPNはNよりも吸収されにくいものの、排出が遅いことが確認された。これは血中への移行量(吸収)が高いことが高機能化に繋がるという我々の仮定とは異なる結果であった。そこで、体内動態の変化の要因について以下の研究を進めた。

フラボノイドの多くは配糖体として消化管に入るが、小腸の粘膜細胞に取り込まれる過程で大半がアグリコンの構造をとる。小腸においてグルクロン酸抱合や硫酸抱合・メチル化などの代謝を受け、血中やリンパを介して生体内を循環し、各組織へ分配される。フラボノイドが蓄積すると報告されている組織・臓器は、脳・肺・心臓・消化管・肝臓・腎臓そして骨格筋や皮膚などであり、蓄積量の大小はあるものの、ほぼ全身に至っている。フラボノイドのなかでもケルセチン(Q)はとくに動物やヒトでの代謝研究が進んでいる。そこで、8-プレニルケルセチン(PQ)を代謝研究のモデル化合物として合成し、研究を進めた。C57BL/6マウスにQあるいはPQを単回ゾンデ投与後、血中濃度変化を測定した。PQ代謝物の血中濃度はQ代謝物よりも有意に低い値であった。Qの一部はO-メチル化体へ変換されたが、PQ投与マウス血中におけるO-メチル化率はQの場合よりも少なかった。次に、腸管からの吸収を評価するため、ヒト結腸腺ガン由来Caco-2細胞を用いた腸管透過モデル実験を行った。PQはQよりも細胞内に多く蓄積したが、その透過量はQと比較して著しく少なかった。したがって、PQの低い血中濃度は小腸での吸収が妨げられるためであると考えられた。一方で、培養細胞への取り込み量や細胞膜を模倣したリポソーム膜との結合量はPQがQよりも多かった。すなわち、プレニル化フラボノイドは摂取後一過性の血中濃度は低いが、血中から組織へは移行しやすいことが推定された。

以上のとおり、プレニル化がフラボノイドの高機能化に繋がる一例を示した。動物体内での高い効果はプレニル化により体内動態や臓器分布が変化することに関連すると思われた。今後も、実験動物に対するプレニルフラボノイドの機能や代謝に関する研究を進めることで、植物資源の高機能化への応用をめざしたい。

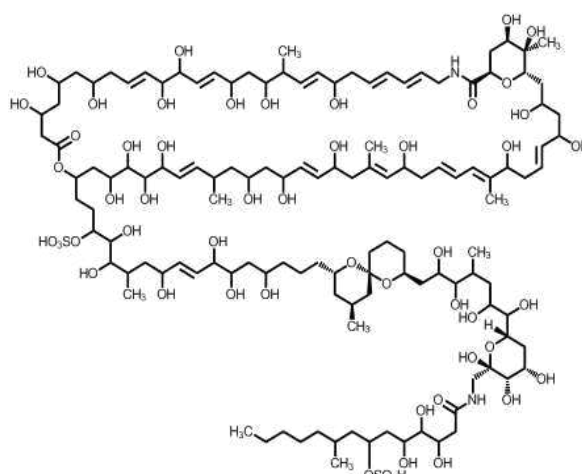
海洋渦鞭毛藻類の有用代謝産物探索

高知大学 総合研究センター 海洋部門, IMT-MEXT

小野寺 健一

海洋渦鞭毛藻類は海洋に生息する顕微鏡サイズの単細胞藻類である。藻類と呼ばれているにも関わらず、保有する鞭毛を用いて遊泳する行動を示すことから植物と動物とのハイブリットな生物になっている。この生物的にも興味深い藻類は多様な生物活性物質を生産していることでも知られ、様々な海洋現象に関与している。多くの海洋食中毒の原因毒は渦鞭毛藻類が生産し、食物連鎖を経由して中毒が発症している。またサンゴやクラゲなど、多様な海洋無脊椎動物と共生する海洋渦鞭毛藻類も存在し、互いに助け合っている。この様に海洋渦鞭毛藻類は種々化学物質を生産し、これを介して厳しい生存環境を生き抜く戦略を立てている。これら海洋渦鞭毛藻類は培養の煩雑さもあってか、その代謝産物研究とその応用研究については他の生物程は進んでいない。この様な理由から私はこの海洋渦鞭毛藻類が有用物質の探索源として有望なのではないかと考え研究を続けている。

これまでに共生種海洋渦鞭毛藻類の一つである *Symbiodinium* 属渦鞭毛藻類からヒトガン細胞の A431、Nakata に対して細胞毒性を示す小分子の zooxanthellactone やラットの血管を収縮させる zooxanthellamide C 類を単離してその構造を明らかにしてきた。このうちの zooxanthellamide C 類は最大で 66 員環もの巨大なマクロラクトンを有し、分子量 2700 程度の大きな分子である (1)。構造的には zooxanthellatoxin 類 (2) に類似する代謝産物であるが、生合成のパターンが異なっている新たな代謝産物である。また、その血管収縮活性においても zooxanthellamide C 類の方が zooxanthellatoxin 類よりも高くなっておりその活性と特異な構造との相関関係に興味もたれる。この特異な分子について化学構造のバリエーションや新規活性を明らかにするために各種海洋無脊椎動物から共生藻類の単



zooxanthellamide C5 の化学構造

離、培養を行い含有代謝産物の分析を行っている。そのなかでシャコガイ由来の共生藻には新規な 2743 の巨大な質量を示す代謝産物を発見した。また zooxanthellatoxin 類が得られたヒラムシ由来の共生渦鞭毛藻株 Y6 から、2860 の新規な質量を示す代謝産物を得ている。現在これらは構造解析中ではあるがこれら構造が明らかになることにより本化合物群の多様性も示されることと考えている。

また培養方法においても改良を行っている。従来方法では多数のフラスコを用いて行うため、時間的にも作業的にも大変であった。現在の方法では一度に 1000 L もの大規模な培養を行える装置を使用している。この装置を使用しての高知県海洋深層水研究所との共同研究を行っている。より効率的な培養技術の構築を現在行っている。培養方法の改良によりこれまでは微量で検出できなかった代謝産物をも探索できるようになるものと考えられ、有用物質探索の為の選択肢が一つ広がったと考えている。

参考文献

- (1) Onodera K., Nakamura H., Oba Y., Ohizumi Y., Ojika M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10406-10411.
- (2) Nakamura H., Asari T., Murai A., Kan Y., Kondo T., Yoshida K., Ohizumi Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 550-551.
- (3) Onodera K., *The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference*, 2012.

ホタル生物発光型、標識材料の創製と実用化

電気通信大学大学院 情報理工学研究所
牧 昌次郎

ホタル生物発光系の反応経路は古くから提唱¹されており（図1）、生物発光の中では解明も先進的であるが、分子反応機構の詳細となると、現代科学技術をもってしても、複雑であり、未だ不明といわざるを得ない。ホタル生物発光は、ルシフェリンといわれる発光基質とルシフェラーゼという発光酵素が化学反応すること（L-L反応）で生じる光（蛍光）であり、蛍の光と書いて蛍光である。蛍の光はエネルギー変換効率が高く、発熱しない光（冷光）といわれている。反応機構は図1のようであり、ルシフェリン（有機化合物）が酵素（ルシフェラーゼ）内でAMP化され、AMP化体 **2**が酵素内で酸化されてジオキセタノン中間体**3**という高エネルギー中間体となる。これが分解してオキシルシフェリン**4**となるときの分解エネルギーが**4**の励起状態を作る。蛍の光はオキシルシフェリンの励起状態から基底状態に失活する際に発せられるエネルギー放出であるが、天然の発光基質と発光酵素を使用する限り、発光色は昆虫と同じ黄緑色（560nm程度）である。一般的な北米産ホタルの発光酵素を利用する系ではpHにより、発光色が変化することも知られている^{2,3}。ライフサイエンス分野での国際競争に打ち勝つためには、まず可視化技術で先進技術を保有することが課題になる。本研究では、ホタル生物発光系の人為制御を目的に、輝度向上と多色化に向けた技術開発を行った。

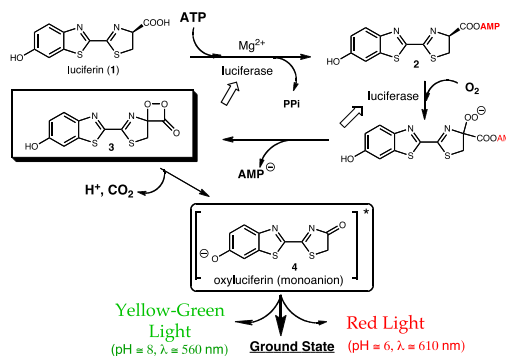


図 1:ホタル生物発光

実用面における輝度は、ある程度測定感度と等価であり、測定機器の性能向上で高感度化は進むと考えられるが、多色化は、材料自体の発光色が変化しなければ、機器で補うことは難しい。すなわち材料で克服しなければ、他分野技術ではクリアできない技術である。そこでまず、発光色変換技術について研究を開始した。最終的には化合物の化学構造で発光色をデザインする技術の創製を目標とした。

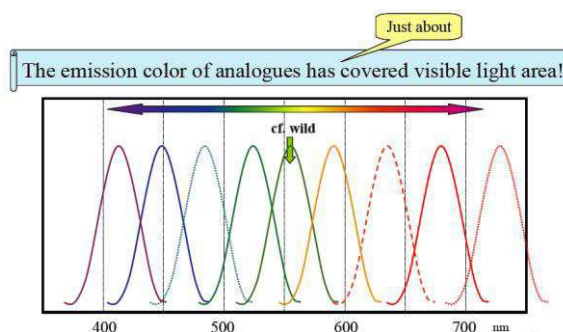


Fig. 2: Analogue provisions

ホタル生物発光系では、生体内反応である故に、間違いが無いように精密な基質—酵素反応が生じるように進化してきているため、僅かでも発光基質の化学構造を変えると発光能が顕著に減退する（光らなくなる）ことは古くから知られていた。そこで、発光基質と発光酵素の構造活性相関をまず、明らかにするため、発光基質類縁体を各種合成し、発光必須部位と可変部位を特定した。一方で、酵素変換による発光色変換の歴史は長く、世界的にも膨大な酵素変異体が作成されており、極最近、ヒカリコメツキムシの酵素変異体と鉄道虫の酵素と天然基質の交叉反応を利用することで、（赤橙、黄、緑:630, 580, 550nm）の材料が製品化されている（Tripluc™ 変換域 80nm）。一方我々は、30種以上の基質による構造活性相関データから、化学構造変換による多色技術と化学構造デザインによる発光波長制御（北米産蛍の酵素に対する）技術を開発し、可視領域をほぼ網羅する発光色⁴を得た（図2）。

ホタル生物発光系はマクロからマイクロまでの様々なシーンで利用されている可視化技術であるが、その多色化と高輝度化は、生体機能応用であるが故に多難を極める。これはまるで、生体機能が人為制御を拒むかのごとくである。生体機能は精密かつ高性能であるが故に、人間の我が儘な要求には剛直である。生体機能応用では、機能解析を行い、制御ポイントを明らかにし、実際に制御でき⁴、利用できるようになるまで洗練して行くことが重要である。単に機能を解明するだけでは、実用性ある技術にはならない。「わかること」と「できること」は明らかに異なっている。欲しい機能を解明し、人為制御できなければ技術にはならない。

現在標識材料は、生体内深部可視化に向けて、長波長化がホットトピックである。現状、ホタル生物発光系では、市販品では、我々が有する670~680nmのアカルミネ™が現状では世界最長⁴であるが、700nm望ましくは750nm程度の長波長化に期待がかかる。高輝度⁵かつ長波長である発光材料の創製は、ライフサイエンス分野を支える可視化技術として、世界的な競争の最前線であることは間違いない。我が国からライフサイエンス分野の基盤技術を世界に向けて提案すべく、産官学を交えた国際競争は続く。

References

- 1 Seliger, M. H. and McElroy, W. D., Arch. Biochem. Biophys., **1960**, 88, 136-141.
- 2 Branchini, B. R., Rollins, C. B., Photochem. Photobiol. **1989**, 50, 679-684.
- 3 White, E. H. and Roswell, D. F., Photochem. Photobiol. **1991**, 53, 131-136.
- 4 WO2009/096197, WO2010/106896, 特願2011-182224
- 5 WO2007/116687

ホタル発光系を利用したL-ルシフェリンから

ホタル D-ルシフェリンの生成

徳島大学総合科学部 中村 光裕

ホタルの発光反応（ルシフェリン＝ルシフェラーゼ反応）の基質である D-ルシフェリンは D-システインから容易に合成できる。しかし、システインは蛋白質を構成する α -アミノ酸の一つであり、通常は L 体として存在している。L-システインからは光学異性体である L-ルシフェリンが合成できるが、L-ルシフェリンは、発光基質にならないだけでなく生物発光反応を阻害する。また、ホタルルシフェラーゼは長鎖脂肪酸やデヒドロルシフェリンを補酵素 A (CoA) 化することが知られている (Fig. 1)。

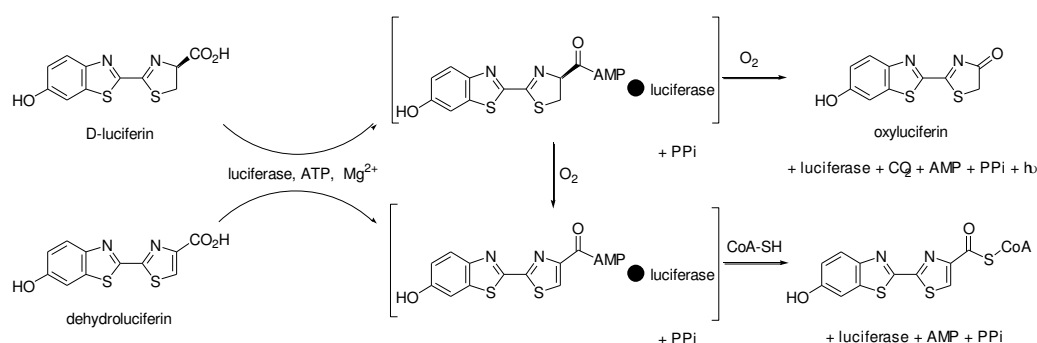


Fig. 1. Scheme for firefly bioluminescence (above) and dehydroluciferyl-CoA synthesis (below) by firefly luciferase.

今回、光学異性体である L-ルシフェリンに関して、ルシフェラーゼに対する作用を調べた。その結果 L-ルシフェリンがルシフェラーゼの作用で ATP、Mg²⁺、CoA 存在下、ルシフェリル-CoA に変換されることを確認した。D-ルシフェリンは CoA 化されることはなく、L-ルシフェリンは発光基質とはならない。また、D 型の発光、L 型の CoA 化反応は、お互いの鏡像体が阻害し合う事を確認した。ホタルルシフェラーゼは、ルシフェリンのキラルを認識し、それぞれ別の酵素反応を行い、さらにエナンチオマー同士で互いの活性を阻害し合っていることが分かった。

ここで、D-ルシフェリンメチルエステルは、エピマー化しやすいことが分かった。その結果から、ルシフェリル-CoA はエピマー化しやすいと考えられた。そのため L-ルシフェリンを CoA 化し、エピマー化したルシフェリル-CoA に加水分解酵素を作用させることで、L 体だけでなく D 体のルシフェリンも得られると考えられる (Fig. 2)。実際に反応系に豚肝臓エステラーゼ

を加えて、ホタルルシフェラーゼを用いて CoA 化したルシフェリンの加水分解を行い、L-ルシフェリンから D-ルシフェリンが得られることを確認した。すなわち、光学異性体 L-ルシフェリンが発光酵素ルシフェラーゼの作用のもと、酵素的に発光基質 D-ルシフェリンに変換されたことになる。また、今回新しく開発した L-ルシフェリンから酵素的に発光させるメカニズムを用いたところ、ホタルルシフェラーゼ量に応じて発光量が増減したことから、ホタルルシフェラーゼの定量に用いることが出来ることが分かった。

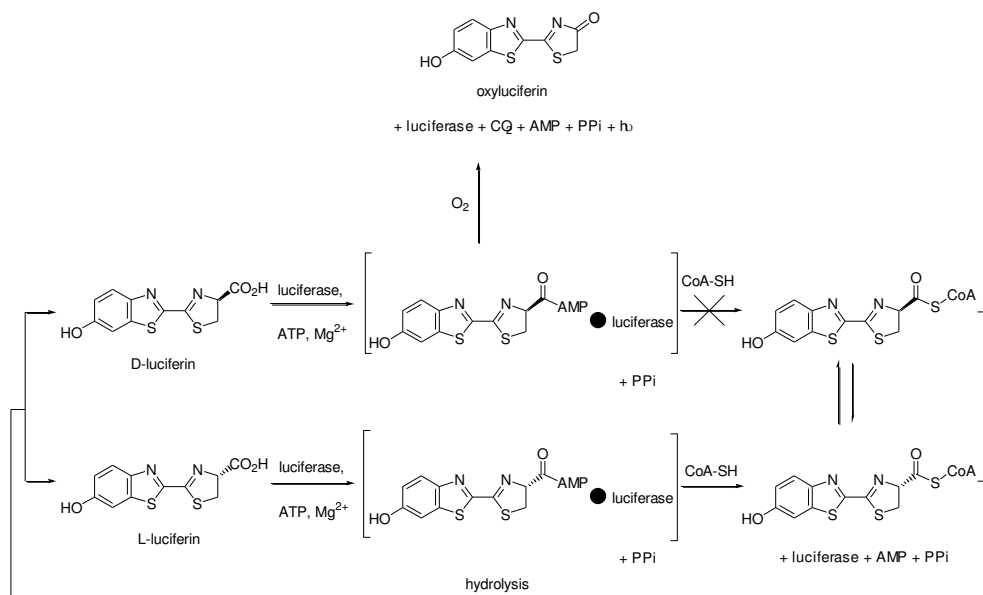


Fig. 2. Proposed mechanism for the production of D-luciferin from L-luciferin via luciferyl-CoA.

最後に、ホタルの D-ルシフェリン生合成において、L-ルシフェリンを経て D-ルシフェリンを生合成しているかを確認した。ホタルから抽出した粗蛋白質を用いてその活性の有無を確認した。その結果、L-ルシフェリンが効率よく D 体に変換されることを確認できた。このとき補因子として ATP、Mg²⁺、CoA が必要であった。さらに、ヘイケボタルの幼虫から成虫にかけて生育段階ごとにルシフェリンのキラルカラムを用いた分析の結果、全てのサンプルに L-ルシフェリンが存在していた。また、ホタルの蛹と成虫の体内に存在するシステインのキラルカラムを用いた分析の結果、D-システインの存在は確認できなかった。これらの結果も L-ルシフェリンが D-ルシフェリンの生合成中間体の可能性を示唆している。以上のことから、ホタルは L-システインから L-ルシフェリンを合成し、この立体を反転させて D-ルシフェリンを合成していると考えられる。