



分析化学を基盤とした食品機能性研究の先導的展開

東北大学未来科学技術共同研究センター 戦略的食品バイオ未来技術構築プロ
東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻

プロジェクトリーダー・教授 宮澤 陽 夫

私は、生体の加齢・老化・疾病に関わる過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシドとその分解物）の化学と分子機構そして食品機能性研究への応用を、分子・遺伝子・細胞・動物・ヒト介入試験へと分析化学を基盤に展開してきた。私は北海道小樽市で生まれ育った。生家前の小樽築港の岸壁や防波堤で海遊びをし、通学時には我が家の裏山でトマトやキュウリ、イチゴなど“季節のおやつ”をかばんに調達し、山上の学校で友人たちと放課後によく食べた。また、母の手料理が美味しかったこともよく覚えている。“食”に興味を持ちつつ、生命・健康への“食”の大切さを化学的に解き明かしてみたいと漠然と考えるようになっていた。食糧化学専攻の大学院に進み、生体膜脂質の酸素化反応と細胞老化を研究することにした。当時、油脂の酸化劣化は食品シェルフライフや食品衛生の観点からさかんに研究されていた。しかし、生体膜脂質の過酸化については圧倒的な高感度化が求められたにも拘わらず研究の目的に合致する分析法がなかった。また、ヒト体内で非酵素的な脂質過酸化反応が生じるのかも疑問視されていた。そこではじめに血中脂質ヒドロペルオキシドを定量するCL（化学発光）-HPLC法を1987年に開発し、さらにその後LC-MS/MS法を確立した。1988年にヒト血漿にホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）の存在を証明し（図1）、その後の酸素ストレス研究に大きな刺激を与えた。正確な定量に必要な脂質ヒドロペルオキシドの安定な高純度品の合成に成功し、過酸化脂質標品を広く内外研究者に提供してきた。ヒトや動物の加齢老化、高脂

血、動脈硬化、高血糖、癌、認知症での膜脂質過酸化とその分子機構を検討し、食品成分による予防調節機能を検証してきた。多様な食品機能性成分（カロテノイド、キサントフィル、トコフェロール、トコトリエノール、カテキン、ポリフェノール、クルクミン、スルフォラファン、共役脂肪酸、トランス脂肪酸、アザ糖デオキシノジリマイシン、グリセロ糖脂質、セラミド、糖化アミノ脂質）とその代謝物の定量法を新規および改良開発し、これらの多面的な機能性と効能を解明する一方、稲における新規ビタミンE合成酵素の発見、高血糖によるアマドリ型糖化脂質の発見、アルツハイマー病新規血液バイオマーカー microRNA の発見など、“食”による健康増進と疾病予防のための新方法論の確立による食品機能性研究を展開し、特定保健用食品を含む多くの新食品開発に貢献した。以下に私が携わった研究の主な成果を概略する。

1. 過酸化脂質定量のための分析法の開発

世界で最も高感度な単一光電子計数装置を当時の新技術開発事業団の生物フォトンプロジェクトで開発し、ショウジョウバエの寿命とハエ個体から発するフォトン強度（励起酸素分子、今でいう活性酸素）が逆相関することを認めた。この発光子機構を液体クロマトグラフの検出部に適用し、脂質ヒドロペルオキシド（PCOOH）の選択的高感度定量のためのCL-HPLC法を開発した。この米国特許を、カリフォルニア大学バークレイ校医学部のBruce Ames教授グループとの熾烈な競争の末、1990年に得た。海外留学経験はなかったが40歳という若い頃に米

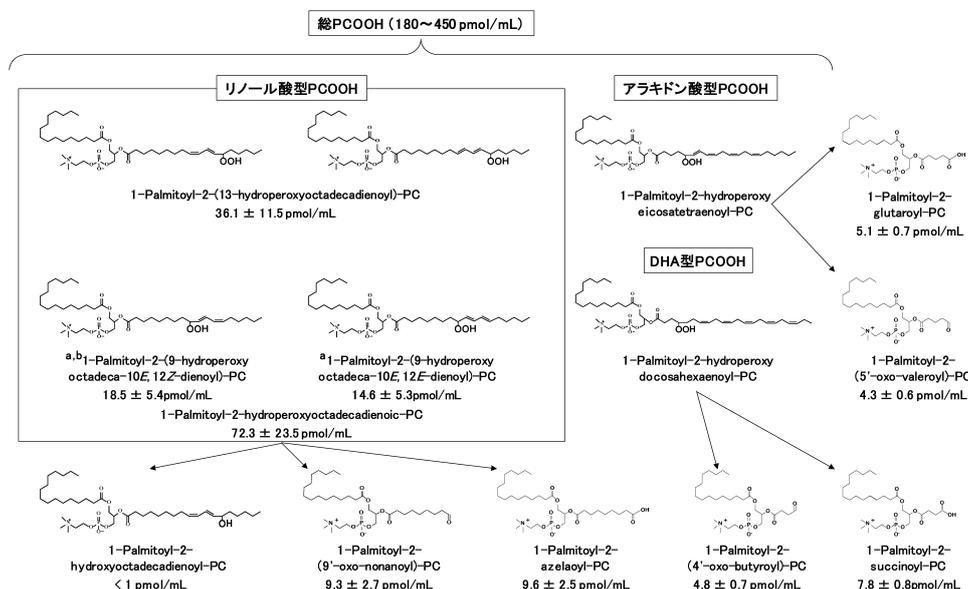


図1 健康者（25±2歳）血漿に確認されたホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH, 180~450 pmol/mL）とその分解物の構造と濃度
aは自動酸化反応（ラジカル酸化）による生成物、bは酵素反応（リポキシゲナーゼ）による生成物。

国の生化学者と論争し勝ち得た経験は、独創的であろうとしたその後の私の研究企画に大きな勇気を与えた。本法は、現在でもヒト血中脂質ヒドロペルオキシドを特異的に検出定量できる唯一の方法論である。

正確な定量値の評価や試料からの添加回収試験に必須な、高純度脂質ヒドロペルオキシド標品の調製法の確立に成功した。ひとつは、光酸化などで調製した粗酸化脂質(ヒドロペルオキシドを30~80%含む)をピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸存在下で2-メトキシプロペン (MxP) と反応させヒドロペルオキシド基を保護し、このMxP付加体を-80℃に保存しつつ、使用時に酸加水分解して脂質ヒドロペルオキシド(純度95%以上)を得、研究に使用する方法である。本法はさらに、多くの標品脂質ヒドロペルオキシド異性体の調製に活用できた。例えば、自動酸化反応でリノール酸ヒドロペルオキシドの高純度異性体を作り、これをMxPで保護し、リゾリン脂質(Lyso-PC)にエステル結合させ、さらに脱保護することにより1-パルミトイル2-ヒドロペルオキシオクタデカジエノイルPCの4異性体(13-OOH-9Z, 11E-dienoyl; 13-OOH-9E, 11E-dienoyl; 9-OOH-10E, 12Z-dienoyl; 9-OOH-10E, 12E-dienoyl)の分離調製に成功した。この技術は多様な不飽和脂肪酸から成る脂質ヒドロペルオキシドそのものの生理作用を、未酸化物、還元生成物、分解物の影響なしに直接評価することを可能にした。生体試料からの過酸化脂質の抽出では従来法では分解が多いため、この分解を回避できる新たな抽出法を構築した。

ヒドロペルオキシド基の発光子反応を逆利用すると抗酸化性の物質を選択的に検出できた。そこで、ポリフェノール類及びフェノール性化合物(カテキン類、テアフラビン、アントシアニン、没食子酸、コーヒー酸、クルクミン)の選択的高感度定量のためのCL-HPLC法を開発した。発光スペクトル分析により上皮細胞内に取り込まれたポリフェノールの構造同定を可能にした。本法により、ヒト体内に移行して血中で抗酸化などの機能性を発揮できるフェノール性成分と、重合ポリフェノールのように体内に移行せずもっぱら消化管内で生理機能を発揮できる成分の検証を可能にした。

また、PCOOH分子種と分解物、皮脂SQOOH(スクアレンヒドロペルオキシド)の定量用にLC-MS/MSによるMRM(multiple reaction monitoring)法を開発した。同定されたヒト額部皮脂SQOOHの6異性体をNMR解析し、一重項酸素酸化が皮脂で生じていることを証明し、これへの食品による抗酸化防御を明らかにした。ヒト血漿には一重項酸素酸化物は存在せず、ラジカル反応と酵素酸化産物のみであることを明らかにした。農産物の極性脂質(グリセロ糖脂質、グリセロリン脂質、セラミド、セレプロシド)の一斉分析とポリフェノール定量用に光散乱検出(ELSD)-HPLC法を確立した。これらにより培養細胞試験、動物試験による分子機構の解明と、食品機能性のヒト介入試験が容易に行えるようになった。

2. こめトコトリエノール(T3)の抗腫瘍、抗血管新生、脂質代謝改善、皮膚保湿、抗アレルギー機能の解明

こめの抗酸化成分で癌を退縮できないものか、研究を続けていた。こめ糠からこめ油製造時の副産物であるスカム油に不飽和ビタミンEであるT3が含まれている。このこめT3は腫瘍細胞に移行し易く、腫瘍細胞からの内皮細胞増殖因子の分泌を抑え、血管内皮細胞の遊走を抑制して管腔形成を抑え、腫瘍に

細胞死を誘発し、ペリサイトを欠如する腫瘍性新生血管形成を阻害して癌を退縮させる抗腫瘍機構を発見した。摂取すると皮下脂肪にも移行し易いため皮膚の保湿、抗アレルギー、抗酸化に優れることを明らかにし、フェーズIVの末期乳がん患者の転移癌(リンパ節、骨転移)が抗癌剤との併用で400 mg/day 1年間のT3摂取でほぼ完全に消失することを確認した。また、T3が脂肪細胞の脂質代謝を改善し抗肥満作用を示すことを明らかにした。T3は高価であるため、多量にT3を生産する株を育種する研究を進め、レトロトランスポゾン変異とRNA干渉を用い、稲カルスにT3増産に有効な新規VE合成酵素(geranylgeranyl reductase II; GGR2と命名)を発見した。これにより“食”による癌予防のためのT3大量生産の道を開いた。

3. 加齢・老化性疾患に対する食品機能成分の効能の証明

ヒトの高脂血、動脈硬化、高血糖における血漿過酸化脂質濃度の高値を明らかにし、食品成分による抗酸化作用、過酸化脂質低下作用、脂質代謝改善作用を明らかにした。血中にPCOOHが増加することによって単球が血管内皮細胞のアクチン重合を介した接着因子ICAM-1への接着を亢進することを明らかにし、血管壁への脂質沈着を過酸化脂質(PCOOH)が強く誘発することを解明した。この時、Rho-family GTPaseが作用してSmall GタンパクのひとつであるRacが活性化されることを確認し、動脈硬化の増悪化にPCOOHが関与することと食品抗酸化成分の有効性を証明した。桑葉に含まれているアザ糖(イミノ糖、デオキシノジリマイシンなど)が一定濃度(6 mg以上)摂取できれば食後の血糖改善に有効であることをヒト介入試験で証明した。アザ糖は消化管の糖消化酵素の活性中心にイオン性に接着して酵素活性を和らげる。この食後血糖を正常化できるアザ糖を納豆菌で大豆から大量生産することに成功した。高血糖者血清に炎症惹起性のアマドリ型糖化リン脂質(deoxy-D-fructosylphosphatidylethanolamine)を発見し、ビタミンB6がこの糖化反応の抑制に有効であることを明らかにした。非炎症性で顕著な脂肪肝形成を伴うトランスジェニックマウスを用い、C型肝炎・肝癌ウイルスのコアタンパクが強烈な遊離基性を有し、膜脂質過酸化と同時にDNA変異を強く誘起する主因であることを証明し、肝炎タンパクが遊離基発生性であることの証明に成功した。アルツハイマー病者の赤血球に酸化脂質の異常蓄積を発見し、これがキサントフィルであるルテイン摂取で有効に除去できることをヒト試験で証明した。さらに、ルテインに富むクロレラの摂取でも赤血球の老化が予防できることをヒト試験で証明した。血漿と脳脊髄液のmicroRNA抽出法を確立し、タンパク合成を抑制するアルツハイマー病マーカーmicroRNAを血漿(miR-34a, miR-146a)と脳脊髄液(miR-29a, miR-29b, miR-34a, miR-125b, miR-146a)に発見し、これを評価基盤にして認知症の早期発見と、食品による認知症の予防さらに進行抑制へと研究を進展させている。

謝辞 今日に至るまで、大変多くの先生方からご指導をいただきました。心より感謝いたします。本研究は、東北大学大学院農学研究科の食糧化学専攻食品学研究室および生物産業創成科学専攻機能分子解析学研究室、さらに東北大学未来科学技術共同研究センターの食品バイオプロジェクトで、在学生、卒業生、多くの共同研究者のご協力によって成し遂げられた成果です。誌面をお借りして厚くお礼申し上げます。