

平成 26 年度

酵母による代謝物製造技術を活用した新規機能性食品の開発

株式会社 TOPU バイオ研究所

(1) 研究概要：

食品成分はヒト体内で高い生理活性を有する有用物質へと代謝される場合があり、さまざまな食品成分の代謝物およびその類縁化合物が機能性食品やトクホにつながる可能性を有している。しかしながら、現段階では、それらの化学合成が難しい場合が多く、入手が困難であることから、その生理活性に関する知見は数少ない。本事業では、これまで(株)TOPU バイオ研究所で開発してきた酵母を利用した簡便な代謝物製造技術を駆使した新規機能性食品の開発を目指し、[1]種々の食品成分の代謝物を取得し、それらの抗炎症作用・抗がん作用を評価するとともに[2]すでに有望な生理作用を有するとの知見が得られた代謝物を、より簡便に取得できる系の確立を行った。

(2) 研究の実施内容及び成果

各アプローチに対する研究項目および実施内容を下表に示す。実施内容は当初の計画どおりに行った。

方法	①各代謝物に最適な酵母種の選定	②代謝物の合成および品質確認	③代謝物の生理活性評価	成果
アプローチ[1] 生理活性を有する新規化合物の探索： 種々の食品成分の代謝物を取得し、それらの抗炎症作用や抗がん作用などを評価する	多数のポリフェノール類を中心とした代謝物の取得 (1年目、2年目)		生理活性の評価系確立(1年目) ↓ 合成した代謝物に対する、生理活性評価(2年目)	硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体で新規生理活性を有するものはみられなかったものの、今回取得した多数の代謝物は、研究用標準品として市販可能であり、機能性食品開発に貢献できる。 (達成度：95%)
アプローチ[2] 簡便な有用代謝物の供給： すでに有望な生理活性を有するとの知見がある代謝物について、より簡便に供給できる系を確立する		セサミン代謝物(カテコール、メチル化体)の合成法 簡便な生産系の検討(1年目、2年目) ↓ ナリンゲニン代謝物の合成法 簡便な生産系の検討(2年目)		抗酸化能、抗動脈硬化作用などを有するセサミン代謝物(4種)、抗炎症作用を有するナリンゲニン代謝物(エリオジクチオール)の合成に成功し、有用な機能性食品の効率的な生産法を確立した。 (達成度90%)

アプローチ[1]: 生理活性を有する新規化合物の探索

① 各代謝物製造に最適な酵母分子種の選定

ヒト体内での代謝酵素は多数存在するが、(株)TOPU バイオ研究所では、それらそれぞれの遺伝子を導入した多種の酵母（ヒト以外の動物種の酵素を含めて 50 種類以上）を作製してきた。これらの菌体液を小スケール（200 μL）ずつ分注し、代謝スクリーニング用プレートとして利用した。本プレートを用いることによって、各食品成分について何種類の代謝物が取得可能で、その際にどの酵母を用いるのが最適かという情報を簡便に知ることが可能となる。食品成分として、レスベラトロールやケルセチン、エコールなどのポリフェノール類やビタミン E 関連化合物など多数の食品成分を基質に、各種酵母菌体と反応させて試

験を行った。得られた結果を基に、最適な酵母分子種を判断し、項目②へと進めた。

② 代謝物の合成および品質確認

項目①の結果に基づき、各食品成分について最適な酵母分子種を用いて、スケールを大きくして（100 mL～500 mL）、生産を行った。酵母菌体を含んだ反応液を抽出、精製することによって、目的の代謝物を取得した。今回、生産を行ったうち、①、②の結果の一例を表2に示した。

表2 取得した代謝物（一例）

取得代謝物	最適な分子種	試作時の生産性 (mg/L)
レスベラトロール-3G	mUGT2b1	32
レスベラトロール-3S	hSULT1A1	34
ケルセチン-3'G	hUGT1A1	36
ダイゼイン-7G	hUGT1A9	77
ダイゼイン-4'G	ratUGT1A2	10
ヘスペレチン-3'S	hSULT1A3	192
ヘスペレチン-7S	hSULT2A1	50
S-エコール-G1	rUGT2B1	14
S-エコール-G2	mUGT2B1	7
R-エコール-G1	rUGT2B1	15
R-エコール-G2	hUGT1A10	6

他にも、ビタミンE関連の代謝物、メチル化ポリフェノール類、メチル化ポリフェノール抱合体類など多岐にわたる代謝物の取得に成功した。取得した代謝物について、項目③で生理活性評価を行った。

③ 代謝物の生理活性評価

抗炎症作用評価系として、マウス由来マクロファージ（RAW264.7細胞）を用いた炎症性サイトカインIL-6、IL-10の発現抑制を指標とする系を立ち上げた。項目②で取得した代謝物の生理活性評価を行った。今回取得した代謝物のみでなく、その基質についても同時に試験した。その結果、取得した硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体の代謝物の中には生理作用が認められたものもあったが、基質に比べてその作用は弱く、培養細胞中で脱抱合化されることで生理活性がみられている可能性が高い。

アプローチ[2]: 簡便な有用代謝物供給系

すでに、有用性が示されている代謝物として、下記の代謝物を選択し、効率よく簡便に供給する系について検討を行った。

- ・セサミンモノカテコール (SC1) : 抗酸化作用、血管弛緩作用（抗動脈硬化）
神経細胞分化誘導（→アルツハイマー病への治療の可能性）
- ・セサミンモノカテコールメチル化体 (SC1-m) : 抗酸化作用、抗動脈硬化作用
- ・エリオジクチオール : 抗炎症作用

SC1 およびエリオジクチオール : アプローチ[1]-①、②と同様の方法で、生産を行った。最終的に、SC1についてはセサミンを基質としてhCYP2C19発現酵母で、エリオジクチオールについては、ナリングエンを基質としてCYP1A2発現酵母で反応させることで代謝物を得た。各代謝物の生産性はSC1 : 8 mg/L、エリオジクチオール : 2 mg/Lであった。

SC1m : セサミンは、セサミン→SC1→SC1-mの順に代謝されていくため、これまでの手法では、いったん酵母菌体とセサミンを反応させて、抽出、精製によってSC1を取得した後

に、取得した SC1 を再度酵母菌体と反応させるという煩雑な工程が必要であった。より簡便な生産法を検討し、結果、hCYP2C19 発現酵母とメチル化酵素 (COMT) 発現酵母菌体を混合させた反応液にセサミンを添加するだけで、SC1-m が生産可能であることを明らかにした。図 3 に代謝物取得時の HPLC 分析結果を示す。各菌体を混合させるだけで 2 段階目の代謝物を取得することができる本方法は従来の弊社の方法の半分以下の時間で目的の SC1-m を取得することができ、効率的である。代謝物の生産性は 15 mg/L であった。

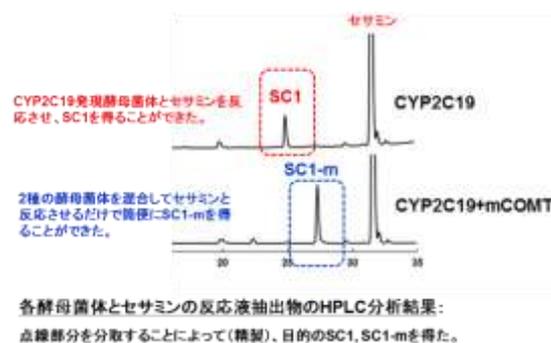


図 3 SC1-m の簡便な生産法

全体としての成果

今回、ポリフェノール類やビタミン E 関連化合物を基質とし、多数の代謝物を取得することに成功した。それらの生理活性を調べたところ、硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体は、基質と比べて高い生理活性がみられなかったが、一方で、水酸化体やメチル化体の中で基質よりも高い生理作用を有する代謝物を生産することができた。具体的には、ゴマ中の成分であるセサミンを基質とし、セサミンよりも高い抗酸化活性を有するセサミンカテコール、高い抗動脈硬化作用を有するセサミンカテコールメチル化体を得ることができた。他にも、抗炎症作用の高いエリオジクチオールの取得にも成功している。本事業で取得した多数の代謝物は、機能性食品の開発を行う上で研究用標品として有用であるとともに、高い生理活性を有した数種の代謝物については、それ自身が機能性食品として応用できる可能性がある。また、ビタミン E 関連化合物の代謝物については、体内のビタミン E 濃度を知るバイオマーカーとしての期待もできる。

(3) 現状における課題、問題点

今回多数の代謝物取得に成功したが、代謝物によっては生産性が低く、その場合、反応スケールを大きくすることで生産量増大に対応した。実際には、目的代謝物の種類により最適な反応条件 (pH や添加物質など) が異なるが、高効率かつ低コストで生産を行うためには、最適な条件を化合物構造式などから簡便に予測できることが好ましい。

(4) 今後の目標と展開

今回取得に成功した多数の代謝物のほとんどは市販されておらず、機能性食品の研究・開発を行うための有用化合物として弊社から提供を行う。特に、ニーズがあるものについては、今後、生産時の最適条件や精製条件を検討して高効率な生産系を確立し、より低コストでの提供を目指すことで、今後も、機能性食品開発に貢献を行っていく。