

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780003

研究課題名(和文) 豊富な遺伝資源を活用した機能性成分の探索および生産性に関する遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search of functional components and biosynthetic gene in mulberry using genetic resources.

研究代表者

中西 弘充 (NAKANISHI, Hiromitsu)

信州大学・サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー・助教

研究者番号：90443001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：桑葉に含まれる α -グルコシダーゼ(GL)阻害物質の多様性を調査したところ、1-DNJ はラット由来の GLに対して強い阻害作用を示し、D-AB1は酵母由来の GLに対して強い阻害を示した。国産品種91品種から GL阻害活性と1-DNJおよびD-AB1の相関を調査したところ、酵母由来 GLとラット由来 GLの阻害活性に相関が見られないことから、ファミリーの異なる酵素でヒトへの効果を評価することは難しいと示唆された。窒素肥料の投与における桑葉中 GL阻害物質の変動を調査したところ、施肥後の桑葉試料ではより強い GL阻害活性を示し、1-DNJ量とD-AB1量は増加していた。

研究成果の概要(英文)：The variations of α -glucosidase inhibitor contained in mulberry leaves were investigated, 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) especially inhibited the activity of α -glucosidase derived from rat, and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1) especially inhibited the activity of α -glucosidase derived from yeast. To identify the relationship between the α -glucosidase inhibitory activity and α -glucosidase inhibitor (1-DNJ and D-AB1), 91 mulberry cultivars were examined. There was no correlation in the α -glucosidase inhibitory activity between derived from yeast and rat, so it was suggested that it was difficult to speculate the effect for human using different family enzymes. The fertilizer application of nitrogen compound induced increases in the α -glucosidase inhibitory activity and the amounts of 1-DNJ and D-AB1 of mulberry leaves.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：桑 1-DNJ D-AB1 α -グルコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

桑は絹糸を生産するために蚕の飼料として用いられているが、古くから漢方薬にも利用されており、その潜在価値は高い。信州大学附属農場には400品種以上の桑が栽培され、豊富な遺伝資源を有する。近年、桑に含まれる機能性成分 1-デオキシノジリマイシン (1-DNJ) が α -グルコシダーゼ (α GL) 阻害活性を有し、ヒトが摂取した時に小腸でのマルトースなどの二糖分解を抑制することで、急激な血糖値上昇を抑制する効果があり糖尿病の改善に効果があることが示された。桑には 1-DNJ 以外にも α GL 阻害活性を持つ物質が複数知られているが、1-DNJ が主要物質であることからほとんど調べられていない。

桑がこの α GL 阻害活性を獲得した背景には昆虫に対する食害抵抗性獲得の結果であることが示唆された。昆虫が桑の葉を摂食すると α GL 阻害物質も同時に摂取され、昆虫の腸内で α GL を阻害し、糖の分解が抑制され結果的に生育不良を引き起こす。蚕が桑を食べることができるのは、1-DNJ をはじめとした α GL 阻害物質に阻害されない α GL の遺伝子を、細菌からの水平伝播により蚕が獲得したためである。このような食害抵抗性の獲得は品種により多様性があることが予想されるが、生産地域によっても多様性があることが予想される。信州大学附属農場には全国各地から集められた桑の品種があり、多くの品種を調べることで様々な α GL 阻害物質を知ることができると考えられる。さらに、 α GL 阻害物質の多様性からどのように食害抵抗性を獲得してきたのかを知ることにつながるができる。

本申請では、豊富な遺伝資源を活用した機能性成分の探索と同定を行う。信州大学附属農場が保有する品種で 1-DNJ 含量を調査したところ、品種により 1-DNJ 含量に差があることを明らかにした。また、1-DNJ 含量と α GL 阻害活性を比較したところ、品種間で大きな差があり、1-DNJ 以外の物質が α GL 阻害活性に大きく寄与することが分かった。これより、1-DNJ 含量と α GL 阻害活性に差がある品種を調べることで、新規 α GL 阻害物質を探索することが可能になる。さらに、1-DNJ 含量と比べて 10 倍以上の α GL 阻害活性を有する品種があることから、新規 α GL 阻害物質には 1-DNJ 以上の α GL 阻害活性があることが考えられ、より付加価値の高い物質であることが示唆される。付加価値の高い機能性成分を多く含む品種を見つけられれば、生産性の増加にもつなげることが期待できる。

2. 研究の目的

(1) 桑葉中に含まれる α GL 阻害物質の多様性の探索

桑葉抽出液の α GL 阻害活性および 1-DNJ 含量の季節変動を調べたところ、時期によっては DNJ 含有量だけでは説明できない程の

強い α GL 阻害活性を示すことを明らかにした。また、日本在来桑品種に比べてタイ在来桑品種の方が年間を通して高い α GL 阻害活性を示すことがわかった。これらには 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1) の寄与が考えられたが、品種ごとの桑葉中のイミノ糖の組成については詳細に調べられていない。そこで、桑葉中のイミノ糖類の組成を調査することが、新規の α GL 阻害物質の探索につながると考えた。本研究では日本在来桑品種とタイ在来桑品種に含まれる 1-DNJ と D-AB1 についての組成を調査し、桑品種によるイミノ糖類の組成の多様性を比較、および検証した。

(2) 国産桑における α GL 阻害活性の評価

α GL は糖代謝において重要な役割を担っており、糖代謝の異常の 1 つに糖尿病が挙げられる。国内の糖尿病患者及びその予備群は 2,050 万人と推計され、さらに年々増加傾向にありその対策が求められている。桑に含まれる 1-DNJ 及び D-AB1 は α GL 阻害活性を有し、急激な血糖値の上昇を抑えると言われている。これまでの研究で、様々な桑品種の酵母由来 α GL に対する阻害活性が網羅的に調べられてきた。しかし、 α GL には大きく 2 つのファミリーが存在し、ファミリー I には酵母、昆虫、細菌が、ファミリー II には動物、植物、糸状菌が含まれることから、酵母由来の α GL でヒトに対する影響を推定できるのかは、疑問である。そこで、本研究ではラット由来 α GL に対する阻害活性を調べることで、ヒトに対して効果が高いと推定される品種を探索することを目的とした。

(3) 桑葉中 α GL 阻害物質の窒素肥料投与における影響

桑葉には 1-DNJ や D-AB1 などのイミノ糖類が豊富に含まれている。これらのイミノ糖類は、 α GL 阻害活性を有するため、機能性食品分野への応用が期待されている。これまでに、桑葉の α GL 阻害活性が桑品種や気温により変動することを明らかにした。また、桑品種ごとのイミノ糖類の組成についても調査してきた。しかし、桑葉の α GL 阻害物質含有量は実用に供するに充分とは言い難い。桑の栽培条件を工夫することで桑葉 α GL 阻害活性を向上させることができれば、桑葉の産業的な利用価値向上につながると考え、植物栄養素の一つである窒素に着目し、窒素肥料投与による α -GL 阻害活性の影響を調査した。

3. 研究の方法

(1) α GL 阻害活性の測定

露地栽培されている日本在来桑品種と温室栽培されているタイ在来桑品種から最大光葉を採取して試料とした。採取した葉を乾燥・粉末化・抽出・ろ過したものを測定試料とし、使用時の必要に合わせて希釈して用い

た。αGL 反応系は酵母由来 αGL に加え、ラット消化管アセトンパウダーの抽出液を粗酵素として対比して用いた。αGL 活性は基質として p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranoside (pNPG) を用い、酵素を加えたときに遊離した p-Nitrophenyl 量を吸光度で測定し算出した。この反応系に桑葉抽出液を添加による遊離 pNP 量の減少から αGL 阻害活性の測定を行った。桑葉抽出液に含まれる 1-DNJ と D-AB1 の定量は、親水性相互作用クロマトカラム TSKgel Amide-80 カラム(3 μm, 2.0 mm i.d.×150 mm, TOSOH)を備えた液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS) で定量した。

(2) 国産桑における αGL 阻害活性の評価

露地栽培されている日本在来の桑 91 品種から採取した葉を乾燥・粉末化・抽出・ろ過し、桑葉抽出液試料とした。αGL 活性の測定にはラット消化管アセトンパウダーから硫酸分画により精製した酵素、および酵母由来 αGL を用い、基質には pNPG を用いた。また、50%阻害濃度となる αGL 阻害物質を含む桑抽出液の希釈率を IC₅₀ とした。

(3) 窒素肥料投与における影響

温室栽培中のタイ在来品種「Harnng Plalod ♀」と「Chiang Kam ♂」に窒素肥料として尿素を投与し、投与前後における最大光葉を採取して試料とした。αGL 活性の測定にはラット消化管アセトンパウダーから硫酸分画により精製した酵素を用い、基質には pNPG を用いた。桑葉抽出液に含まれるイミノ糖類の定量と質量分析は LC-MS で行い、「Chiang Kam ♂」に関しては、1 分間隔でフラクション分取し、αGL 阻害活性の測定と質量分析を行った。

4. 研究成果

(1) 桑葉中に含まれる αGL 阻害物質の多様性の探索

標準品の 1-DNJ と D-AB1 を用いて、酵母由来とラット消化管由来の αGL それぞれの組み合わせからなる、4 通りの αGL 阻害活性を測定し、1-DNJ および D-AB1 の濃度と αGL 阻害活性の検量線を作成した。D-AB1 は酵母由来の αGL に対してとくに強力な阻害を示した。一方 1-DNJ はとくにラット由来 αGL に対して強い阻害作用を示した。桑葉中の 1-DNJ と D-AB1 の組成を見るために LC-MS による定量分析を行ったところ、1-DNJ は日本在来品種とタイ在来品種とで大きな差は見られなかった。一方 D-AB1 は、タイ在来品種により多く含まれていた(図 1)。このことから、タイ在来品種の高い阻害活性には D-AB1 が寄与していると考えられた。あわせて、品種ごとの桑葉抽出液による αGL 阻害活性を測定した。その結果、日本在来品種に対してタイ在来品種の方が比較的強い阻害活性を示した。また、いずれの αGL を

用いたときも、1-DNJ と D-AB1 の定量結果から推定される αGL 阻害活性よりも強い阻害を示す品種があった。これは αGL 阻害活性を有する、さらに異なる種類のイミノ糖類が桑葉に含まれていることを示唆している。以上のことからラット由来 αGL で阻害活性を測ることで、ヒトに効果的な αGL 阻害物質の探索が可能になると考えられる。そのため、さらに多くの桑品種に関する組成分析することが望まれた。

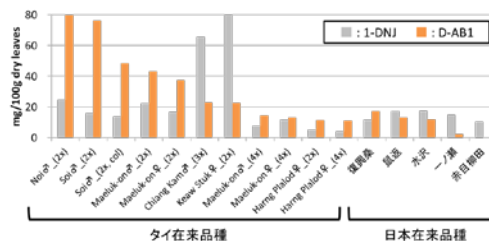


図 1 LC/MS を用いた桑葉中 1-DNJ, D-AB1 の定量

(2) 国産桑における αGL 阻害活性の評価

91 品種の桑葉抽出液について、ラット及び酵母由来の αGL 阻害活性と IC₅₀ を算出した。ラット由来 αGL に対する阻害活性が高い品種と酵母由来 αGL に対する阻害活性が高い品種は大きく異なった。αGL 阻害活性と 1-DNJ 量、D-AB1 量の関係について相関分析を行ったところ、酵母由来 αGL に対する阻害活性と D-AB1 の間で強い相関が見られた。一方で、ラット由来 αGL と 1-DNJ の間では弱い相関が見られ、酵母由来 αGL との間では相関が見られなかった(図 2)。

酵母由来 αGL 阻害活性と D-AB1 量の相関関係から、酵母由来 αGL の阻害活性は D-AB1 量に強く依存することが分かった。また、酵母由来 αGL とラット由来 αGL の阻害活性に相関が見られなかったことから、それぞれの αGL の阻害に有効な物質及びそれを蓄積する品種が異なることが示された。

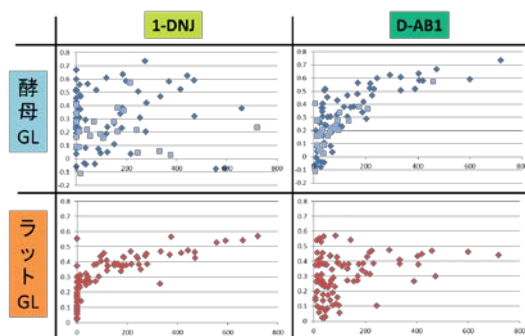


図 2 αGL とイミノ糖類量の相関関係

(3) 桑葉中 αGL 阻害物質の窒素肥料投与における影響

尿素投与前のタイ在来品種の葉(施肥前)と投与後の葉(施肥後)の抽出液を用いて、酵母由来およびラット消化管由来の α-グルコシダーゼに対する αGL 阻害活性を測定し

た。いずれの α GL を用いた場合でも施肥後の葉中には、より強い α GL 阻害活性を検出することができた(図 3)。それぞれの桑葉抽出液を LC-MS で定量分析したところ、1-DNJ と D-AB1 は投与前と投与後で増加していた。施肥前、施肥後についてはフラクション分取し α GL 阻害活性を測定した。いくつかのフラクションで施肥前と施肥後の活性に有意な差がみられた。有意差がみられたフラクションを LC-MS で定性分析したところ、1-DNJ や D-AB1 とは異なる質量電荷比 (m/z) の物質が見つかった。以上の結果から、窒素肥料投与は α GL 阻害活性増加に寄与し、特に D-AB1 量増加に強い影響を示すと考えられた。

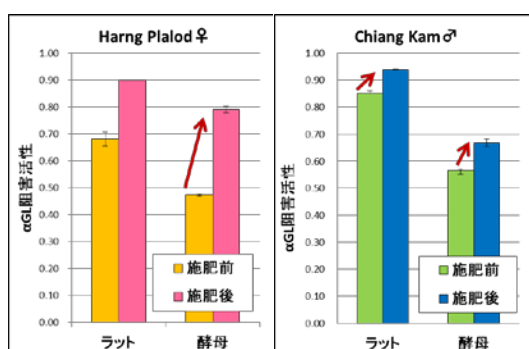


図 3 施肥前後における α GL 阻害活性の変動

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

① 中西弘充・伊藤吹夕・松村哲也・小西繭・松浦俊介・田口悟朗・小西哉、桑葉パウダーを混ぜ込んだかりんとう「くわりんとう」の商品開発、平成 25 年度日本繊維製品消費科学会年次大会、2013 年 6 月 22-23 日、名古屋

② 中西弘充・Youliduzi Ahemaiti・田口悟朗、桑葉を含む加工食品の機能性成分含有量の残存性、日本蚕糸学会支部合同大会、2012 年 11 月 10 日～2012 年 11 月 11 日、上田

③ 中西弘充・大久保薫・小西哉・金勝廉介、桑葉に含まれる α -グルコシダーゼ阻害物質の多様性、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 弘充 (NAKANISHI, Hiromitsu)

信州大学・サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー・助教

研究者番号：90443001