

動物性食品由来の抗ストレス機能性食品成分の探索

上田 修司

神戸大学農学研究科 助教

緒言

食品に含まれる健康機能性の新たな開発は、農作物ブランドの形成、海外輸出の促進に繋がることから、国産食材の栄養成分の網羅的な解析、さらに得られた各栄養成分の機能性評価に期待が寄せられている。近年、我が国を襲った東日本大震災では、罹災者のストレス増加が招く食欲不振が問題となった。地震の多い我が国では、ストレスに対する心身の抵抗力の向上は特に関心のある課題である。ヒートショック蛋白質 (HSP) は、細胞ストレス (炎症、環境変化、活性酸素など) により変性した蛋白質を修復する分子シャペロンとしての機能を有し、様々なストレス障害から細胞を保護することが知られている (図1)。

HSPファミリーの一種である低分子量ヒートショック蛋白質 (HSPB) は、加齢に伴って蛋白質の発現量が減少し、老化や損傷など細胞ストレスに対する高齢者の生体防護・修復機能に関与する^{1,2)}。そのため、HSPBのシャペロン活性を正しく評価することで細胞ストレスに対する細胞の抵抗能力を推測することができると考えられる。

食肉は、良質な蛋白質を豊富に含み、高齢者の健康機

能効果に期待が寄せられている。例えば、食肉中に含まれる低分子量ペプチド (数残基のアミノ酸からなるペプチド) には、他の食品にはない健康機能的を有することが報告されており、食肉の結合組織に含まれるコラーゲン由来ペプチドは軟骨損傷治癒促進効果が知られており、また、食肉中に多く含まれるイミダゾールペプチドのカルノシンはHSP蛋白質の発現を促進することが報告されている^{3,4)}。

本研究課題では、高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) による牛肉の栄養成分のノンターゲット分析を行い、黒毛和牛種とホルスタイン種のペプチド類の比較検討を行った。また、我々は、これまでに酵素化学的に蛋白質間相互作用をビオチン標識に転化する「近接蛋白質標識法 (BirA)」の開発に従事してきた⁵⁾。本研究では、BirA融合HSPの発現プラスミドを作製し、HSPのシャペロン標的蛋白質の変動を可視化する技術の開発を行い、牛肉に含まれるペプチド類の細胞ストレスに対する抗ストレス機能の測定するための実験系の構築を行った。

実験方法

1. 動物性食品由来の機能性成分の探索

各種牛肉種のサーロイン部位より試料を採取し、内部標準溶液 (DL-Lysine-4,4,5,5-d₄ 2HCl) と共に、メタノール・水・クロロホルム (2.5:1:1) 溶媒で食品成分を抽出し、ろ過液を濃縮乾固後、LC-MSに供した。LC-MS装置には、電場型フーリエ変換質量分析計を備えたLTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher Scientific) を採用し、分子量から化合物を推定し、サンプル群ごとにMSデータを標準化後、ピーク面積値の平均値を算出した。

2. シャペロン活性の可視化技術の構築

哺乳類細胞用BirA-HSPB1発現プラスミドを構築し、HEK293 (ヒト胎児腎臓上皮由来) 細胞株に遺伝子導入を行い、ビオチン (50 μM) 添加24時間後に、細胞を可

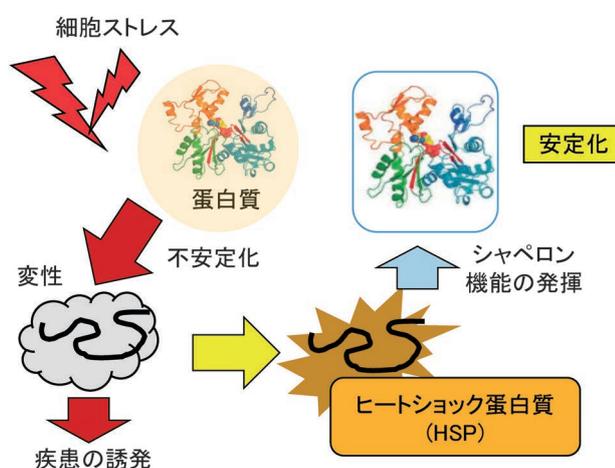


図1 ヒートショックタンパク質のはたらき

溶化し、実験に用いた。BirA-HSPB1によるビオチン化蛋白質は、磁性ストレプトアビジンビーズによって回収・精製し、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを用いたウエスタンブロッティングによってビオチン化蛋白質を検出した。

結 果

1. 動物性食品由来の機能性成分の探索

本研究課題では、LC-MS技術を活用し、ペプチド成分を中心に牛肉の栄養成分のノンターゲット分析を実施した。プロセシングの結果、本研究条件では、322ピークが検出された(図2)。黒毛和牛種とホルスタイン種

のピークパターンの比較では、黒毛和種に特徴的な33ピークを特定した。これらのピークについて成分推定を行った結果、26ピークの分子式が推定された。また、黒毛和種とホルスタイン種間の比較では、21ピークが該当し、19ピークの食品成分の分子式が推定された。これらの結果は、牛肉の低分子ペプチドの成分パターンの違いを示し、黒毛和種とホルスタイン種の特徴を反映している可能性が示唆された(表1)。

2. シャペロン活性の可視化技術の構築

HEK293細胞にBirA-HSPB1発現プラスミドを遺伝子導入したところ、BirA-HSPB1の推定される分子量サイ

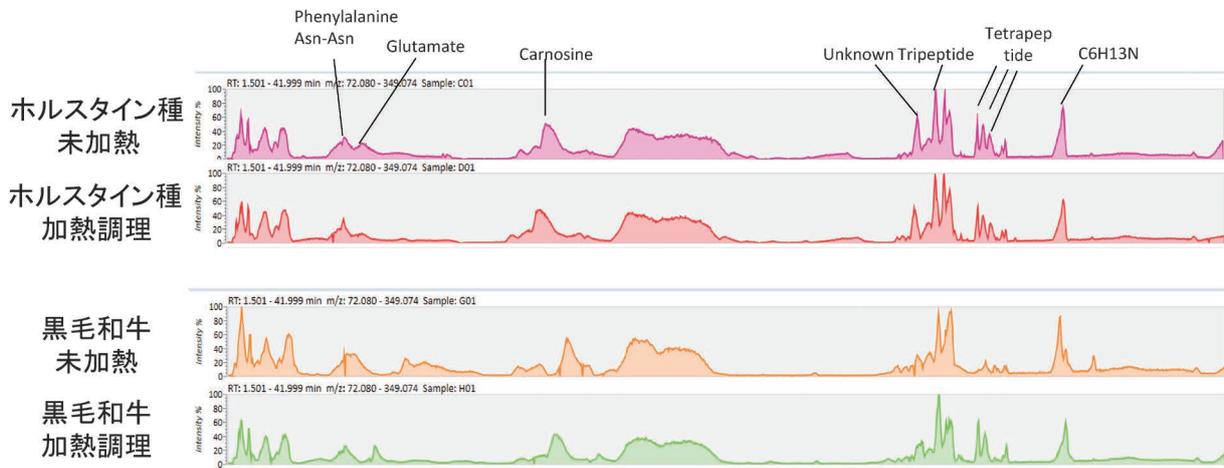
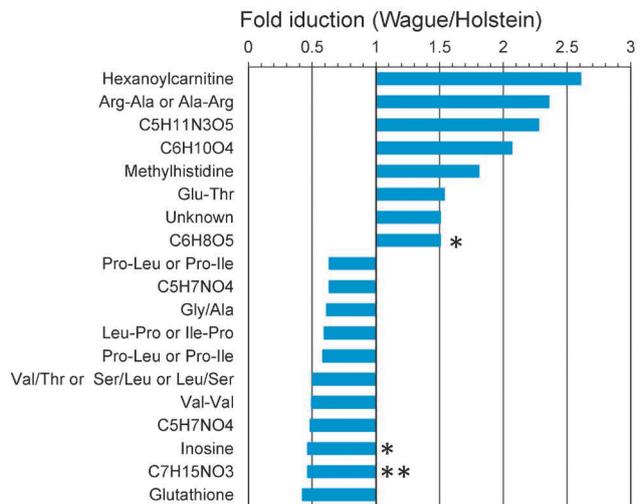


図2 LC-MSによる牛肉の機能性成分の探索

SS-C18カラムによる低分子ペプチドの質量分析チャート。国産の乳用牛であるホルスタイン種と黒毛和牛の加熱調理済みと未加熱調理試料の比較分析。

表1 LC-MSにより同定した化合物の黒毛和牛種とホルスタイン種の成分比較

Molecular formula	Predicted compound name	Ratio		p-value
		kago/hol	kago/hol	
1	Hexanoylcarnitine	2.61	0.06	
2	Arg-Ala or Ala-Arg	2.36	0.213	
3	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₅	2.28	0.278	
4	C ₈ H ₁₀ O ₄	2.07	0.216	
5	Methylhistidine	1.81	0.266	
6	Glu-Thr	1.54	0.367	
7	C ₆ H ₈ O ₅	1.51	0.053	
8	Unknown	1.51	0.44	
9	C ₅ H ₇ NO ₄	0.63	0.116	
10	Pro-Leu or Pro-Ile	0.63	0.396	
11	Gly/Ala	0.61	0.322	
12	Leu-Pro or Ile-Pro	0.59	0.377	
13	Pro-Leu or Pro-Ile	0.58	0.385	
14	Val/Thr or Ser/Leu or Leu/Ser	0.5	0.27	
15	Val-Val	0.49	0.346	
16	C ₈ H ₇ NO ₄	0.48	0.149	
17	C ₇ H ₁₂ NO ₃	0.46	0.009	
18	Inosine	0.46	0.045	
19	Glutathione	0.42	0.246	



牛肉に含まれるペプチド成分の比率に違いがあることが示唆される。n=6, **p<0.01, *p<0.01 (Tukey's test)

ズで蛋白質の発現が確認され、ビオチン添加依存的に BirA-HSPB1 による蛋白質のビオチン化蛋白質の増加を確認した (A)。HSPB1 のシャペロン活性の視覚的な検出に向け、BirA-HSPB1 を発現した細胞を蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡下で観察したところ、BirA-HSPB1 による蛋白質のビオチン化の可視化を確認した (B)。また、BirA-HSPB1 の細胞内局在は、内在性の HSPB1 蛋白質と差がないことも確認された。さらに、BirA-HSPB1 を発現した細胞の可溶化液を調製し、磁性ストレプトアビ

ジンビースによって回収・精製後、ビオチン化蛋白質を検出したところ、HSPB1 のシャペロン標的の分子と考えられる複数の蛋白質を確認された (C)。以上の結果より、BirA を用いることで HSPB1 のシャペロン活性を標的蛋白質のビオチン化を検討することで可視化ができる可能性が示唆された。

考 察

国産牛肉の栄養成分抽出液より、多数のジペプチドおよびイミダゾールペプチド類が検出された。イミダゾールペプチドは、カルノシンやアンセリンなど様々な栄養・機能性が広く知られていることから、今回の抗ストレス機能とも強く結びつくことが期待される。今後、更に本可視化技術を発展させ、牛肉中に含まれるペプチド成分の HSPB1 のシャペロン機能に対する影響を検討し、高齢者の胃粘膜細胞障害の細胞保護機能の向上に繋がる動物性食品の新たな健康機能性の開発に繋げて参りたい。

要 約

ヒートショック蛋白質 (HSP) は、蛋白質変性を修復する「分子シャペロン」として機能し、胃粘膜障害の治療に関わる。しかし、従来のシャペロン活性の測定法は、操作が難しく、HSP の機能を活かした健康機能性食品の開発にまで至っていない。本研究では、BirA 融

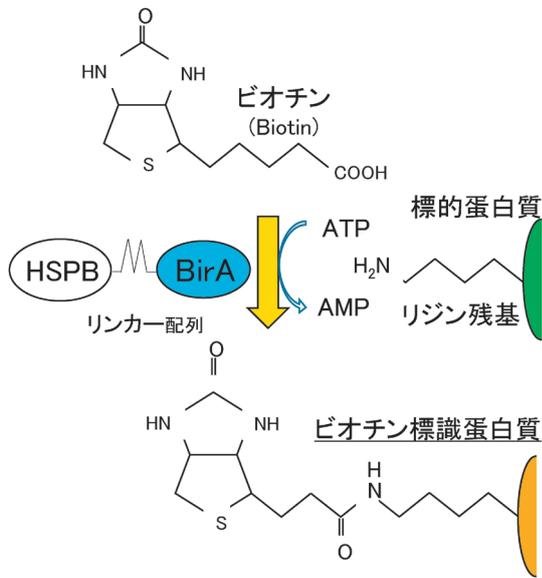


図3 BirAによる近接蛋白質標識法の原理

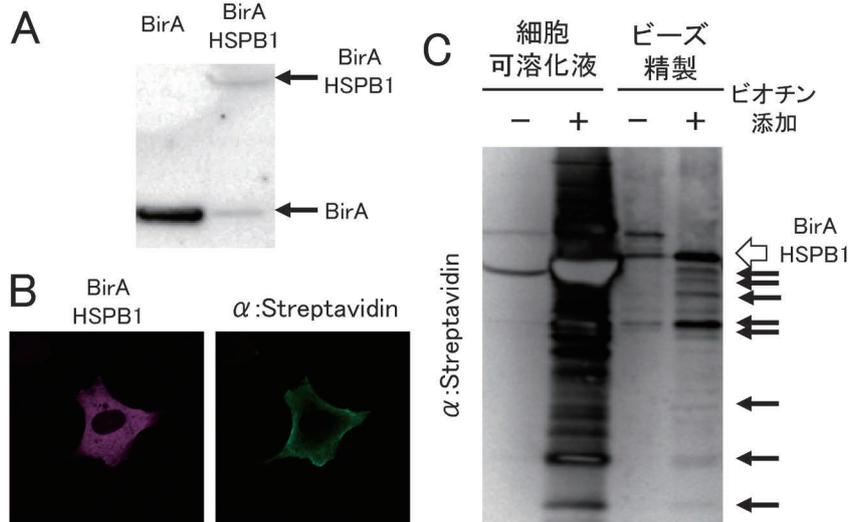


図4 BirA-HSPB1 を用いたシャペロン標的蛋白質の可視化技術

(A) BirA と BirA-HSPB1 蛋白質の発現確認。(B) BirA-HSPB1 の細胞内局在確認と蛍光標識ストレプトアビジンによるビオチン化蛋白質の可視化。(C) 細胞内における BirA-HSPB1 によるシャペロン標識蛋白質の検出。矢印が示すように BirA-HSPB1 により細胞中の多数がビオチン標識されたことを示す。

合HSPの発現プラスミドを作製し、シャペロン活性を近接蛋白質標識法による可視化技術の開発を行った。今後、国産牛肉中のペプチド類の健康機能性の開発に活かされると期待される。

謝 辞

本研究課題に対して助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様には心より感謝申

上げます。

文 献

- 1) S. K. Calderwood: *Gerontology*, **55**, 550–558, 2009.
- 2) S. Ueda, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1867–1875, 2015.
- 3) T. Nishimura, et al.: *Food Sci. Technol. Int.*, **4**, 241.
- 4) 平成27年度国産食肉等新需要創出緊急対策事業報告書
- 5) S. Ueda, et al.: *PLOS ONE*, **25**, 10(3), 2015.