

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：平成 19～20 年度  
課題番号：19700583  
研究課題名（和文） チオヒダントインの化学構造と抗変異原性との関連および新たな生体調節機能の探索  
研究課題名（英文） Structure-antimutagenic activity relationships of thiohydantoin and search of new physiological activities  
研究代表者  
高橋 朝歌（TAKAHASHI ASAKA）  
長野県短期大学・生活科学科・助手  
研究者番号：90290113

研究成果の概要：200 字程度，専門用語はなるべく用いない

チオヒダントインは，ダイコンやキャベツなどのアブラナ科野菜に特有の辛味成分であるイソチオシアナートとアミノ酸の反応により生成する。チオヒダントインは，イソチオシアナートを添加した加工食品中にも生成し，抗変異原性を示すことから有用な食用成分であるといえる。本研究は，チオヒダントインの抗変異原性と化学構造との関連を明らかにするとともに，チオヒダントインが血中トリグリセライドの上昇抑制作用，抗酸化活性を有することを明らかにした。これらの知見は，今後チオヒダントインの様々な食品機能性を解明していくうえで重要な基礎となるものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	600,000	0	600,000
平成 20 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	210,000	1,510,000

研究分野：食品化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：イソチオシアナート，アミノ酸，チオヒダントイン

#### 1. 研究開始当初の背景

ダイコン，キャベツ，ワサビなどのアブラナ科野菜は，日本国内での生産量・消費量の面から主要な野菜であるが，これらに特有の成分であるグルコシノレートは，細胞が破壊されると酵素ミロシナーゼの作用によってイソチオシアナートと呼ばれる辛味成分に変換される。イソチオシアナートの持つ独特の辛味フレーバーは古くから人々の食生活の中に取り入れられてきたが，近年抗菌性や

発がん抑制効果などの様々な生理機能を持つことが明らかになり，従来のフレーバー物質としての利用に加え，機能性成分としての利用が注目されている。

一方，イソチオシアナートは分子内に -NCS 基を持っており，この炭素原子が強い求電子性を有するという特徴から，化学的にきわめて反応性が高く，水やアルコール，アミン，SH 化合物などと容易に反応して付加化合物を形成する物質であることも知られ

ている。このような化学的特性から、多様の成分が共存する食品を実際に調理・加工する際にはイソチオシアナートが様々な反応を起こしていることが推測される。研究代表者は、人が実際にイソチオシアナートを摂取する段階を考えたときには、イソチオシアナート自身の機能性だけでなく、他の食品成分との相互反応を含めてその生理活性を明らかにすることが重要であると考え、イソチオシアナートの食品成分との反応性に着目した研究を行ってきた。そして、ダイコンの主辛味成分である 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC)の水存在下における分解反応生成物の構造と反応機構の解析を行い、イソチオシアナートだけでなくその分解生成物にも抗菌性や抗変異原性があることを見出した。

この検討を踏まえ、現在はイソチオシアナートとアミノ酸との反応性に焦点をあてて、反応生成物であるチオヒダントインの構造解析と生理活性の検討を行っている。研究代表者はこれまでに、イソチオシアナートはアミノ酸の共存下においてチオヒダントインに変換されること、この変換反応は弱酸性から中性領域でも起こること、アリルイソチオシアナート（ワサビやカラシの主辛味成分）が香料として添加されている加工食品中にチオヒダントインが生成することを明らかにした。また、チオヒダントインの抗変異原性に関してはこれまで全く検討されていなかったが、肉や魚などの加熱食品中に生成するヘテロサイクリックアミンやニトロ化合物の変異原性を強く抑制すること、その作用機構が変異原の代謝活性化の抑制、究極変異原の不活化の 2 つによるものであることを確認した。

## 2. 研究の目的

イソチオシアナートは多くの生理的機能を有する反面、比較的低濃度で細胞毒性を示し、化学的に不安定という問題もある。これまでの検討で、チオヒダントインは、温和な条件下でアミノ酸との反応により生成することに加え、化学的に安定で毒性もなく、抗変異原性を示すことから有用な食用成分であることが明らかになった。研究代表者は、1 で述べたような背景を踏まえ、チオヒダントインの化学構造と抗変異原作用機構との関連について明らかにすること、食後血糖値の上昇抑制作用、血圧降下作用、血中トリグリセライドの上昇抑制作用、抗酸化作用の面から食用成分であるチオヒダントインの有用性を明らかにすることを目的とし、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) チオヒダントインの調製

食品に含まれるイソチオシアナートとして、ワサビやカラシの主辛味成分であるアリルイソチオシアナート (AITC)、MTBITC、ノザワナやカブに多く含まれる 3-ブテニルイソチオシアナート (3BITC) を用い、既報に従ってアミノ酸と反応させチオヒダントインを調製した。得られたチオヒダントインは、HPLC-MS、IR、NMR 分析などの機器分析を行い、構造を確認した。

### (2) 抗変異原性試験

(1) で得たチオヒダントインの抗変異原性を、サルモネラ菌を用いたエームス法により検討した。チオヒダントインの濃度は、2  $\mu\text{mol/plate}$  から 2 倍希釈系列で 4-5 段階とした。変異原として、ヘテロサイクリックアミン類である IQ (4 ng/plate) およびニトロ化合物である 4-NQO (0.1  $\mu\text{g/plate}$ ) を使用し、チオヒダントインを加えないものをコントロールとした。IQ は、代謝活性化酵素であるシトクロム P450 1A の作用により究極変異原物質へと変換されることから、試験にはこの酵素を含むラット肝ホモジネート上清画分 (S9 mix, 市販品) を用いて検討した。4-NQO は代謝活性化を必要としないので、S9 mix は添加せずに試験を行った。同時に、チオヒダントイン自身の変異原性の有無についても確認した。

### (3) $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性および $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害

$\alpha$ -アミラーゼ活性は、96 穴マイクロプレートに、0.1588 mM G3-CNP (基質) 170  $\mu\text{L}$ , 20 U/mL  $\alpha$ -アミラーゼ (ブタ膵臓由来) 20  $\mu\text{L}$ , チオヒダントイン溶液 10  $\mu\text{L}$  を混合し、37°C 下で 405 nm の吸光度変化を測定した。

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性は、96 穴マイクロプレートに、0.1 mM 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -glucopyranoside (基質) 30  $\mu\text{L}$ , チオヒダントイン溶液 5  $\mu\text{L}$ , リン酸バッファー 60  $\mu\text{L}$  を混合し、37°C で 10 分予備反応後、ラット小腸アセトンパウダーから調製した酵素液 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ含む) 25  $\mu\text{L}$  を加え、蛍光分析を行った (Ex. 365 nm, Em. 450 nm)。

### (4) リパーゼ活性阻害

96 穴マイクロプレートに、0.25 mM 4-methylumbelliferyl oleate (基質) チオヒダントイン溶液 100  $\mu\text{L}$ , チオヒダントイン溶液 2  $\mu\text{L}$ , 50 U/mL リパーゼ (ブタ膵臓由来) 100  $\mu\text{L}$  を混合し、37°C で 30 分反応させた。クエン酸ナトリウムバッファーを加えて反応を停止した後、蛍光分析した (Ex. 365 nm, Em. 450 nm)。

### (5) アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性試験

96 穴マイクロプレートに、チオヒダントイン溶液 2  $\mu\text{L}$ , 50 mU/mL ACE(ウサギ肺由来) 50  $\mu\text{L}$ , Tris-HCl 50  $\mu\text{L}$  を混合し, 37°C で 5 分予備反応後, 2.5 mM N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly (FAPGG, 基質) 100  $\mu\text{L}$  を加えて混合し, 345 nm の吸光度変化を測定した。

#### (6) ラジカル消去活性

ラジカルとして ABTS カチオンラジカル (ABTS<sup>•+</sup>) を用いた。96 穴マイクロプレートにチオヒダントイン溶液 2  $\mu\text{L}$ , あらかじめ 734 nm の吸光度を 0.7 に調整した ABTS<sup>•+</sup> 溶液 200  $\mu\text{L}$  を混合し, 734 nm の吸光度を測定した。

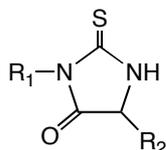
#### (7) チオヒダントインの化学構造と抗変異原作用との関連

既報に従って 1-オクタノール/水系を用いた分配係数試験を行い, 各チオヒダントインの疎水性を検討するとともに, 逆相 HPLC 分析における溶出時間を確認した。これらの結果と (2) - (6) の試験で得られたとの関連を検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) チオヒダントインの調製

AITC より調製したチオヒダントイン (ATH) 20 種, MTBITC より調製したチオヒダントイン (MTBTH) 11 種, 3BITC より調製したチオヒダントイン (3BTH) 13 種をそれぞれの試験に用いた。これらは機器分析で構造を確認した。構造を以下に示す。



R<sub>1</sub>: イソチオシアナートの側鎖構造 (ATH は CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>-, 3BTH は CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, MTBTH は CH<sub>3</sub>SCH=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)

R<sub>2</sub>: アミノ酸の側鎖構造 (Gly なら -H, Ala なら -CH<sub>3</sub> など)

以後, ATH-Ala (AITC とアラニンから調製したチオヒダントイン) のように表記する。

#### (2) 抗変異原性試験

チオヒダントインの抗変異原性を, ヘテロサイクリックアミン類である IQ を用いたエームス試験で検討した。その結果, アミノ酸の側鎖構造に由来する部分 (R<sub>2</sub>) が芳香族あるいは疎水性の高い脂肪族アミノ酸 (Phe, Trp, Leu, Ile) 由来のチオヒダントインに強い抗変異原作用が認められ (1  $\mu\text{mol}/\text{plate}$  でコントロールの 80% 以上を阻害), 以下疎水性の

弱い脂肪族アミノ酸 (Ala, Gly), 酸性アミノ酸 (Glu, Asp) および塩基性アミノ酸の順であった。この傾向は, イソチオシアナートに由来する部分構造 (R<sub>1</sub>) が変わっても同様に見られ, R<sub>2</sub> の構造が抗変異原作用に影響することが示された。また, R<sub>2</sub> が同じであるとき, 抗変異原作用は ATH < 3BTH < MTBTH となり, R<sub>1</sub> の疎水性と抗変異原性に関連があることが示された。

逆相 HPLC 分析の溶出時間は疎水性をほぼ反映することから, チオヒダントインの HPLC 分析における溶出時間とエームス試験の結果との関連を検討したが, はっきりとした相関は得られず, チオヒダントイン分子全体の疎水性よりもむしろ, R<sub>1</sub> や R<sub>2</sub> の構造が抗変異原性に大きく影響することが示唆された。

また, チオヒダントインは, ニトロ化合物である 4-NQO に対しても抗変異原性を示した。IQ のときと同様に, HPLC 分析における溶出時間とエームス試験の結果との関連を検討したが, チオヒダントイン分子全体の疎水性と抗変異原性の間に明確な関連は見られなかった。また, IQ のときに見られたような R<sub>1</sub> の疎水性と抗変異原性との間にも明確な関連は見られなかった。チオヒダントインの種類によってはサルモネラ菌の成育阻害を示すものがあった。

研究代表者は以前, チオヒダントインの抗変異原作用機構が変異原の代謝活性化の抑制, 究極変異原の不活化の 2 つによるものであることを明らかにした。本研究により, これらの作用機構は R<sub>2</sub> の構造により異なることが示唆されたことから, R<sub>1</sub> の構造を変えたチオヒダントインを調製し, これらの構造 (疎水性やその他の分子構造因子, 物理的パラメータ) と作用機構との関連についてさらに検討することが課題として残された。

#### (3) 食後血糖値の上昇抑制作用

$\alpha$ -アミラーゼおよび  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害試験を行ったところ, いずれのチオヒダントインにも阻害活性は認められなかった。

#### (4) 血中トリグリセライドの上昇抑制作用

リパーゼ活性阻害試験を行った結果, ATH-Thr, MTBTH-Leu, MTBTH-Phe, MTBTH-Trp に強い阻害活性が認められ, IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ, 80.2, 121, 124.5, 125.7  $\mu\text{M}$  であった。終濃度 250  $\mu\text{M}$  での活性を比較すると, アミノ酸の側鎖構造に由来する R<sub>2</sub> が同じであるとき, イソチオシアナートに由来する部分構造 (R<sub>1</sub>) の疎水性と酵素阻害の強さは比例した。チオヒダントインの HPLC 分析およびオクタノールを用いる分配係数試験から得られた疎水性パラメータと比較すると,

チオヒダントイン分子全体の疎水性と酵素阻害はとの間にはっきりした相関は見られなかった。

#### (5) 血圧降下作用

ACE 活性阻害試験を行ったところ、ATH-Thr, ATH-His に終濃度 250  $\mu\text{M}$  でコントロールの 50% 程度の阻害活性が認められた。MTBTH には阻害活性が認められなかった。基質である FAPGG とその代謝産物である FAP はいずれも 345 nm 付近に吸収を持つため、吸光度変化を観察する今回の方法では結果の分かりづらいものがあった。HPLC を用いるなど分析方法を検討することが今後の課題として残されたが、典型的な ACE 阻害剤であるカプトプリルと比較すると、チオヒダントインの ACE 阻害活性は弱いものであることが示唆された。

#### (6) 抗酸化活性

ABTS ラジカル消去活性試験を行ったところ、Gly, Glu, Tyr, Trp から調製したチオヒダントインに特に強いラジカル消去活性が認められた。IC<sub>50</sub> 値を比較すると、イソチオシアナート由来の部分構造 (R<sub>1</sub>) が変わっても活性はあまり大きく変化していないことから、リパーゼ阻害には、アミノ酸の側鎖構造に由来する部分 (R<sub>2</sub>) が大きく影響を与えていることが示唆された。チオヒダントインの HPLC 分析およびオクタノールを用いる分配係数試験から得られた疎水性パラメータと比較すると、チオヒダントイン分子全体の疎水性と阻害活性との間にはっきりとした相関は認められなかった。

以上、本研究において、チオヒダントインの抗変異原性と化学構造との関連、ならびにチオヒダントインの血中とリグリセライドの上昇抑制作用、抗酸化作用といった新たな生理機能が明らかになった。これらの知見は、チオヒダントインの食品成分としての有用性を示すとともに、生体機能性成分であるイソチオシアナートの食品中あるいは生体内における動態解析にとっても意義あるものと考えられる。今後は、他のイソチオシアナート由来のチオヒダントインを調製し、それぞれの生理活性と複数の分子構造因子や物理的パラメータを求めるなどして、生理機能と化学構造との関連を詳細に検討していく必要がある。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 朝歌 (TAKAHASHI ASAKA)  
長野県短期大学・生活科学科・助手  
研究者番号：90290113

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

松岡 寛樹 (MATSUOKA HIROKI)  
高崎健康福祉大・准教授  
研究者番号：20299837