

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
研究期間： 2007~2008
課題番号：19700594
研究課題名 (和文) 食事性葉酸の吸収率に関する基礎的研究
研究課題名 (英文) Study on intestinal absorption of food folate
研究代表者
榎原 周平 (EBARA SHUHEI)
兵庫県立大学・環境人間学部・助教
研究者番号： 10372856

研究成果の概要：水溶性ビタミンである葉酸はヒトにとって必須の栄養素であるが、近年、葉酸の摂取量低下と種々の疾病との関連や胎児発育における重要性が報告され注目されている。本研究では、ラットを用いて葉酸化合物の吸収動態について基礎的検討を行った。また、葉酸の吸収に関与しているグルタミン酸カルボキシペプチダーゼに及ぼす食品の影響について検討し、緑茶が本酵素を阻害することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	180,000	2,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：葉酸、腸管吸収、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II

1. 研究開始当初の背景

葉酸は水溶性ビタミンの一つで、巨赤芽球性貧血を予防する因子として発見された。生体内では一炭素単位代謝系を構成し、核酸の合成やアミノ酸代謝に関与し、ヒトにとって必須の生育因子である。近年、葉酸の摂取量低下と、動脈硬化症、神経疾患、ガンの発症と関連のあることが報告されている。また、妊娠を予定している女性が葉酸を摂取することで、胎児の神経管欠損症の発症リスクを低減させることが報告されている。これらのことから、アメリカでは穀類への葉酸の強化

が行われており、最近、葉酸の栄養学的重要性が再認識されている。

2. 研究の目的

食品に含まれる葉酸はほとんどが還元型であり、これに種々の一炭素単位（メチル、メチレン、メテニル）が付加している。さらに、グルタミン酸が数個結合したポリグルタミン酸型として存在しており、グルタミン酸側鎖数は食品により異なる。吸収されるには小腸刷子縁膜に存在するグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ(GCPII)によって、モノ

グルタミン酸型となる必要がある。

食品に含まれる葉酸化合物は多様であり、各食品により生体利用率は異なると考えられる。食品中に多く存在するポリグルタミン酸型葉酸とサプリメントとして使用されているモノグルタミン酸型葉酸では、吸収率の違いが報告されている。また、葉酸の生体利用率に影響する要因として、(a)消化過程における分解、(b)食品マトリックスによる捕捉、(c)食品成分による GCPII の阻害、(d)小腸粘膜の取り込み過程における阻害などが考えられる。

本研究ではラットを用いて食事性葉酸の吸収率に関する検討をおこなった。また、食品による GCPII の阻害に着目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 食事性葉酸の吸収に関する検討

実験動物として、Wistar 系雄性ラット 6 週齢を用いた。開腹後、小腸部位を結紮した。結紮部位に、0.45、4.5、45 nmol/mL のモノグルタミン酸もしくはグルタミン酸が3つ結合したトリグルタミン酸を投与し、経時的に腸管内残存葉酸量、血清葉酸を測定した。

(2) GCPII に及ぼす食品の影響

ブタ小腸から刷子縁膜小胞を調製した。スクラーゼ活性をマーカー酵素として精製度を測定したところ 8.4 倍であった。

食品としてキャベツ、レタス、ホウレン草、トマト、オレンジジュース、緑茶を用いた。4 倍量の Tris 緩衝液 (pH7.0) でホモジナイズ後、沸騰水で抽出した。冷却後、遠心した上清を pH 7.0 とし抽出液とした。

GCPII 活性は、基質としてプテロイルトリグルタミン酸(PG3)を用いて測定した。調製した刷子縁膜小胞を添加後、単位時間当たり減少した PG3 量を HPLC 法で測定した。なお、活性阻害を検討する場合には、活性測定系に食品抽出物を 2-10% 添加した。

4. 研究成果

(1) 葉酸化合物をラット腸管に投与したところ、濃度依存的な吸収率の増加を認めた。また、モノグルタミン酸に比べ、トリグルタミン酸の腸管中の残存葉酸量が多く、吸収が遅延していることが示された。一方、血中濃度に違いは見られなかった。本研究から食事性葉酸の吸収モデルとしての有用性を明らかにした。

(2) GCPII 反応系がミカエリスメンテン型の式で説明できることが示され、PG3 を基質とした時、 K_m 値は 0.99 mM であった。そ

れゆえ、食品による活性阻害を検討する際には、1.0 mM PG3 を用いた。レタス、キャベツは GCPII 活性を阻害しなかった。一方、オレンジジュース、トマト、緑茶では GCPII 活性を阻害した (68.6%, 66.9%, 35.6% of control, respectively) (Table 1)。なお、これらの阻害は濃度依存的であった。

Table 1
ブタ小腸刷子縁膜小胞のGCPII活性に及ぼす食品抽出物の影響

Food extracts	GCPII activity	
	(pmol min ⁻¹ mg protein)	% of control
Control	258 ± 17	—
Cabbage	256 ± 26	99.0
Lettuce	250 ± 4	96.8
Spinach	265 ± 11	102.8
Tomato	173 ± 9 *	66.9
Orange juice	177 ± 35 *	68.6
Green tea	92 ± 4 *	35.6

n = 2-4 trials, * P < 0.05 compared to the control.

緑茶による GCPII 活性への阻害機構を検討したところ、非競争阻害 ($K_i = 9.34$ mL/L) であった (Fig. 1)。本酵素は亜鉛依存性酵素と報告されており、反応系に通常の 10 倍量の亜鉛を添加したが、阻害の回復は見られなかった。

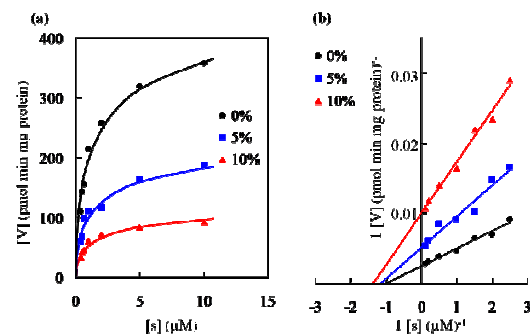


Fig. 1 緑茶によるGCPII活性阻害に関する(a) Michaelis-Menten plot 及び(b) Lineweaver-Burk Plot
Reaction mixtures contained varying amounts of pteroylglutamate (0, 1, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μM) as substrate and green tea extracts (0%, 5%, 10%) were incubated.

本研究において、トマト、オレンジジュース、緑茶抽出物が GCPII 活性を阻害することが示され、緑茶の阻害が最も大きかった。日本において緑茶は、葉酸の含有量と飲用量から、葉酸の摂取基準を満たすのに寄与している食品と考えられている。しかし、GCPII 活性を阻害することにより、生体利用率が低い可能性が示唆された。また、緑茶と同時に摂取した食品に含まれる葉酸の生体利用率を減じている可能性も考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

大串美沙、榎原周平、福井徹、渡邊敏明、「ラット腸管における葉酸化合物の吸収に関する基礎的検討」、日本栄養食糧学会中四国・近畿支部合同大会、2007年11月17日、広島大学

Ebara S, Hayashi C, Ogushi M, Watanabe T, 「Effect of green tea extract on intestinal brush border glutamate carboxypeptidase II」、The 2nd International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors、2008年10月26日～30日、アメリカ、ジョージア大学

榎原周平、林智里、大串美沙、渡邊敏明、「ブタ小腸グルタミン酸カルボキシペプチダーゼに及ぼす食品成分の影響」、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、福岡市マリンメッセ福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎原 周平 (EBARA SHUHEI)

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：10372856

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

