

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05880

研究課題名（和文）シークワサー葉・果皮によるI型アレルギー抑制機構の解明とその有効活用法の検討

研究課題名（英文）Elucidation of type I allergy regulation mechanism by Shekwasher leaf and peel and examination of the effective utilization method

研究代表者

岡本 威明（Okamoto, Takeaki）

愛媛大学・教育学部・教授

研究者番号：20398431

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：RBL-2H3細胞において、シークワサー果皮・葉抽出物はPI3K p85/p55のリン酸化誘導を有意に下方制御した。またシークワサー果皮・葉抽出物は、AktおよびPLC 1のリン酸化誘導を下方制御する傾向がみられ、特にシークワサー葉抽出物はPLC 1のリン酸化誘導を有意に下方制御した。よって、シークワサー果皮・葉抽出物は脱顆粒シグナリングにおけるCa²⁺依存経路とCa²⁺非依存経路の両方を阻害することで、脱顆粒を抑制していることが示唆された。また、シークワサー精油において、レモン精油と比べてリモネンの含有量が9%少ないにもかかわらず、レモン精油と同等のストレス軽減効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未利用資源であるシークワサー葉・果皮抽出物に抗アレルギー効果を見出し、また、シークワサー搾汁残渣から得られる精油に抗ストレス効果を見出したことから、廃棄物削減にもつながりSDGs12番目の目標達成にも寄与するものと考えられる。さらに、シークワサーに多く含有するノビレチンのアレルギー抑制効果をもつ乳タンパク質の一種、ラクトフェリンを見出し、その作用機序においても細胞内シグナリングに着目して解明されたことから、食品成分の機能性を高める新たなペアリングの探索情報としても有効である。

研究成果の概要（英文）：In RBL-2H3 cells, Shekwasha peel/leaf extracts significantly down-regulated the phosphorylation of PI3K p85/p55. Shekwasha peel/leaf extracts also tended to down-regulate the phosphorylation of Akt and PLC 1, and especially Shekwasha leaf extract significantly down-regulated the phosphorylation of PLC 1. These results suggest that Shekwasha peel and leaf extracts suppress degranulation by inhibiting both Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent pathways in degranulation signaling.

In addition, the stress-reducing effect of Shekwasha essential oil was comparable to that of lemon essential oil, despite the 9% lower limonene content in Shekwasha essential oil compared to lemon essential oil.

研究分野：食品免疫学，食品生化学

キーワード：抗アレルギー効果 抗ストレス効果 シークワサー 葉・果皮抽出物 ノビレチン ラクトフェリン 脱顆粒シグナリング リン酸化制御

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南国の特産柑橘であるシークワサーは、主にジュース加工に用いられているが、搾汁効率は50%と非常に低く、搾汁残渣が大量に廃棄されているのが現状である。これまでに我々は、搾汁残渣であるシークワサーの果皮・葉メタノール抽出物に強い抗アレルギー効果を有することを細胞実験系ならびに動物実験系の評価系を用いて見出してきた。

2. 研究の目的

本研究では、シークワサー果皮・葉抽出物によるI型アレルギー抑制機構の解明を細胞内カルシウム濃度ならびに脱顆粒シグナル伝達に關与するタンパク質のリン酸化に着目して検討するとともに、実験動物であるマウスを用いて生体内での効果を確認する。また、果皮・葉抽出物による抗アレルギー効果をさらに高める食品あるいは食品成分の組み合わせ(機能的フードペアリング)を検討する。さらに、シークワサー果皮や搾汁残渣などの未利用資源を有効活用して、マーマレードや精油の作成ならびにその機能性を評価し、新たな機能性食品の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シークワサー葉・果皮の入手に關して

シークワサー葉・果皮サンプルに關しては、愛媛県八幡浜市ならびに高知県安芸市岡宗農園(メリーガーデン)で収集したものをを用いる。

(2) シークワサー葉・果皮中の抗アレルギー成分の同定

高知県産のシークワサー葉・果皮を50 ~ 60 ℃で加熱乾燥後、80%メタノール溶液で抽出し、その抽出溶液を真空凍結乾燥機により粉末化し濃縮する。次いでその濃縮された試料をHPLC法を用いて分析を行った。

(3) シークワサー葉・果皮の脱顆粒抑制メカニズムの解明

シークワサー葉・果皮抽出物ならびにノビレチンの脱顆粒抑制メカニズムをRBL-2H3細胞を用いて、FcεRI受容体シグナル経路に着目して明らかにする。本研究では、葉・果皮抽出物の脱顆粒抑制メカニズムを、Syk、PI3K、PLCγ1、PLCγ2、Aktのリン酸化に焦点をあて、SDS-PAGEならびにWestern Blot法にて検討する。また、RBL-2H3細胞の細胞内Ca²⁺濃度に及ぼすシークワサー葉・果皮抽出物ならびに同定された成分による影響を、カルシウム蛍光プローブ(Fluo4-AM)ならびに蛍光マイクロプレートリーダーを用いて検討する。各種リン酸化タンパク質の検出ならびに細胞内Ca²⁺濃度の測定は、中部大学応用生物学部田中守准教授の協力を得て行った。

(4) ノビレチンとラクトフェリンとの複合効果

ノビレチンとラクトフェリンとの複合効果に關して、RBL-2H3細胞を用いた脱顆粒抑制試験や脱顆粒シグナリング及ぼす影響ならびにマウスを用いたPCA反応試験にて検討した。マウスを用いた実験に關しては、中部大学応用生物学部の田中守准教授の協力を得て行った。

(5) シークワサー精油の調製法

シークワサーの精油においては、愛媛県八幡浜市のシークワサーの実を利用して、水蒸気蒸留法にて調製した。レモンの精油においては、(株)アトリウムより市販品を購入した。各種精油の香気成分に關しては、ガスクロマトグラフィーを用いて測定した。愛媛大学の女子大学生15名を対象として、NIPRO社製の唾液アミラーゼモニターならびにテストストリップを使用することでストレス値を評価した。ストレス負荷に關しては、内田クレペリン検査を活用した。

(6) シークワサーマーマレードの作成

沖縄県産のシークワサー(青切り)を材料として、銅鍋を利用して作成した。

4. 研究成果

(1) 図1に示されるように、シークワサー果皮・葉抽出物は、抗原刺激によるPI3K p55/p85、PLCγ1、Aktのリン酸化誘導を下方制御したが、Syk、PLCγ2のリン酸化誘導には影響を与えなかった。したがって、シークワサー果皮・葉抽出物は、シグナル伝達のCa²⁺依存経路とCa²⁺非依存経路の両方を阻害することで、脱顆粒を抑制することが示唆された。また、本実験で明らかとなったシークワサー果皮・葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御機構は、ノビレチンによるものと似た挙動を示した。シークワサー葉抽出物ならびにノビレチン刺激におけるp-PLCγ1およびp-Akt発現を比較したところ、シークワサー葉抽出物刺激群の方がノビレチン刺激群よりも強く減弱していた。よって、葉抽出物に含まれるノビレチンとタンゲレチンによる相加効果

が推察された。また、葉抽出物中にノビレチン、タンゲレチン以外の脱顆粒抑制効果を有する成分が存在する可能性も示唆された。さらに、シークワサー果皮パウダーの活用を、主食、飲料、おかず、調味料、デザート・おやつとの5つのカテゴリーごとに検討したところ、ココアパン、ドレッシング、チョコレートなどの調理に活用できることが明らかとなり、果皮パウダーの有する苦味・えぐみの緩和には「β-シクロデキストリン」や「酢」の添加が有効であった。一方、葉パウダーに関しては、パン、チョコレート、クッキー、シフォンケーキなどの調理に活用可能であり、香酸柑橘未利用資源の活用範囲の拡大に繋がると期待された。

(2) シークワサー葉・果皮に多く含まれるポリメトキシフラボノイド (PMF) および乳タンパク質との複合による抗アレルギー効果とその抑制機構の解明を目的とした。実験方法は、PMFであるノビレチン (NOB)、タンゲレチン (TNG)、シネンセチン (SNT) および乳タンパク質であるラクトフェリン (LF)、β-ラクトグロブリン (β-LG) をRBL-2H3に作用させ、β-hexosaminidaseを指標とした脱顆粒抑制試験を行った。PMF群および乳タンパク質群のうち、それぞれ最も強い脱顆粒抑制効果がみられた2つの因子の共刺激による脱顆粒抑制試験、また、その作用機序を細胞内Ca²⁺濃度測定ならびにWestern Blot法により検討した。その結果、PMFおよび乳タンパク質単独の脱顆粒抑制試験では、PMF群ではNOB、乳タンパク質群ではLFが最も強く抑制した。次に、NOBおよびLFを用いて共刺激を行ったところ、NOB単独およびLF単独刺激より強い相乗的な脱顆粒抑制効果を示した (図2)。抗原刺激による細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、NOB単独およびLFとの共刺激で抑制され、LF単独では抑制されなかった (図3)。Western Blot分析の結果、NOBとLFの共刺激は、Aktのリン酸化誘導を有意に下方制御した (図4)。よって、RBL-2H3細胞における脱顆粒応答はNOBとLFの共刺激によりカルシウムイオン依存的な経路と非依存的な経路の双方に作用することで相乗的に抑制することが示唆された。

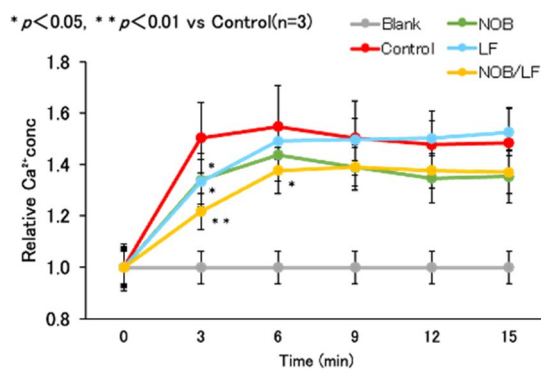


図3 細胞内Ca²⁺濃度に及ぼすノビレチンとラクトフェリンの複合効果

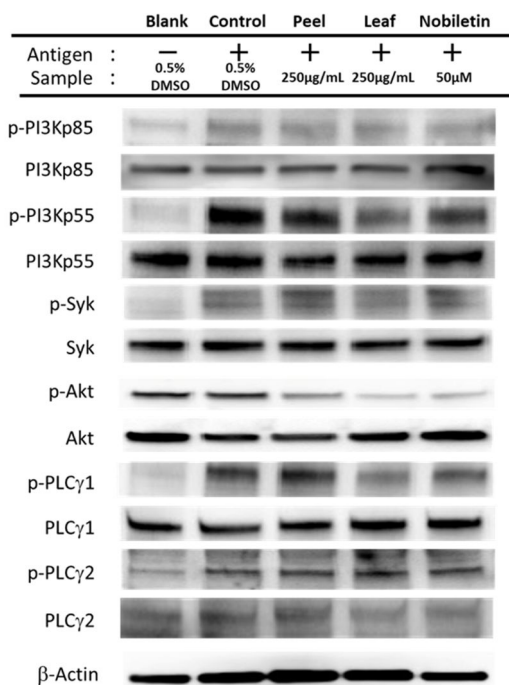


図1 シークワサー果皮・葉抽出物による各種キナーゼのリン酸化制御

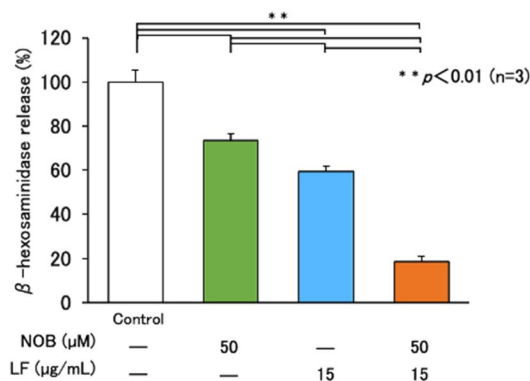


図2 RBL-2H3の脱顆粒に及ぼすノビレチンとラクトフェリンの複合効果

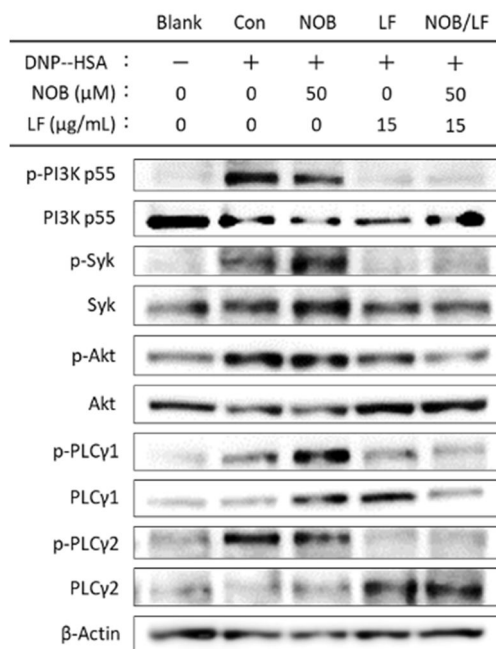


図4 ノビレチンとラクトフェリンによる各種キナーゼのリン酸化制御

(3) シークワサー精油の香りにストレス軽減効果があるのかについて、ヒトにおける唾液

アミラーゼ活性を評価することで検討した。その結果、被験者にクレペリン検査を実施することで、安静時と比べ有意にストレス値が増加し、その後、レモン精油を嗅ぐことにより有意にストレス値が減少した。本傾向は、シークワーサー精油においてもレモン精油と同様に認められた。また、各種精油の香気成分の分析により、レモン精油においては、リモネン 66.5%、サビネン 13.3%、 γ -テルピネン 7.4%が主成分として検出され、一方、シークワーサー精油においては、リモネン 57.5%、 γ -テルピネン 24.2%、リナロール 3.1%が主成分として検出された。シークワーサー精油において、レモン精油と比べてリモネンの含有量が 9%少ないにもかかわらず、レモン精油と同等のストレス軽減効果を示したのは、シークワーサー精油に多く含有する γ -テルピネンが、リモネンによる抗ストレス効果を増強したのではないかと推察された。また、シークワーサー精油独特のスパイシーな香りは、 γ -テルピネンならびにリナロールによるものではないかと推察された。さらに、日常生活におけるシークワーサー精油の活用方法としては、マスクに精油を噴霧させて装着する方法や、ディフューザーを活用して学校の保健室などに設置するなどの方法が効果的であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoshi Okano, Yuriko Kiyokane, Sengo Kobayashi & Takeaki Okamoto	4. 巻 37
2. 論文標題 Effects of heat treatment of various pure metals on osteoblast cell activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Research	6. 最初と最後の頁 2614-2622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1557/s43578-022-00691-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 岡本威明	4. 巻 297
2. 論文標題 【解説】新たな機能性食品素材を使った食品開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊 食品工場長	6. 最初と最後の頁 22, 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡本威明, 野口綾花	4. 巻 1
2. 論文標題 鶏卵乳化性原理の理解度を高める授業の構築と実践	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 愛媛大学教育学部附属科学教育研究センター紀要	6. 最初と最後の頁 15, 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takeaki Okamoto, Kaho Miyake, Mamoru Tanaka
2. 発表標題 Degranulation of RBL-2H3 cells synergistically inhibited by the combination of nobiletin and lactoferrin
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本威明, 高尾里菜子, 國分美由紀
2. 発表標題 シークワサー精油の香りによる抗ストレス効果
3. 学会等名 生物機能研究会2022
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeaki Okamoto, Kaho Miyake, Mamoru Tanaka
2. 発表標題 Degranulation of RBL-2H3 cells synergistically inhibited by the combination of nobiletin and lactoferrin
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayaka Yokoyama, Kaho Miyake, Mayumi Nagashima, Akiko Watanabe, Takeaki Okamoto, Mamoru Tanaka
2. 発表標題 Effect of Nigella sativa L. on degranulation in mast cells and immunoglobulin production in mouse spleen lymphocytes
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本威明, 河本優月
2. 発表標題 大学生アスリートにおける鉄強化ゼリー摂取による血中ヘモグロビン量に与える影響
3. 学会等名 日本家政学会 第74回大会 (オンライン)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sengo Kobayashi, Satoshi Okano, Takeaki Okamoto
2. 発表標題 Control of osteoblast behavior by metallic microstructure
3. 学会等名 Materials Science, Engineering & Technology International Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅香穂, 岡本威明, 横山さや香, 田中守
2. 発表標題 機能性成分の複合によるI型アレルギー抑制効果
3. 学会等名 第5回 ノビレチン研究会学術研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本威明、田中守
2. 発表標題 ノビレチンの抗アレルギー効果を調節する食品成分の探索
3. 学会等名 第4回ノビレチン研究会学術研究会(オンライン)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅香穂、横山さや香、岡本威明、太田鈴乃、田中守、香西はな
2. 発表標題 ノビレチンおよびラクトフェリンによる抗アレルギー効果
3. 学会等名 愛知県栄養士会研究大会2020(誌面発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本威明, 柏木愛梨, 田中守
2. 発表標題 シークワサー果皮および葉抽出物による脱顆粒シグナリング制御の解明
3. 学会等名 日本家政学会 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本威明
2. 発表標題 シークワサー果皮・葉抽出物のI型アレルギー抑制機構の解明およびその有効活用法の検討
3. 学会等名 第1回東洋食品研究所研究成果発表会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本威明, 柏木愛梨, 田中守
2. 発表標題 シークワサー葉・果皮抽出物による抗アレルギー効果
3. 学会等名 第3回ノビレチン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本威明
2. 発表標題 香酸柑橘葉の抗アレルギー活性とその活用法の提案
3. 学会等名 第8回あしなが予防医学研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡本威明ら	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 496
3. 書名 食品免疫学事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

新たな機能性食品素材の発掘とその魅力を毎日の食卓へ（愛媛大学最先端研究紹介 infinity） https://www.ehime-u.ac.jp/data_study/data_study-146008/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅原 卓也 (Sugahara Takuya) (00263963)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	
研究分担者	田中 守 (Tanaka Mamoru) (00612350)	中部大学・応用生物学部・准教授 (33910)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------