

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15766

研究課題名(和文)メタボローム解析ビックデータによる機能性ベース食品全成分評価システムの構築と応用

研究課題名(英文)Studies on the construction and application of a comprehensive evaluation system for food ingredients based on their biological activity using non-targeted metabolite analysis

研究代表者

毛利 晋輔(Mohri, Shinsuke)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：60836625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品の最たる特徴は、多彩な成分の含有であり、この点に食品機能性の更なる発展性が秘められている。しかしながら、これまでの研究は、含有成分の一端に由来するものが主流であり、全体像については、手つかずのままである。本研究では、メタボローム解析を活用し、食品に含まれる成分を機能性ベースで網羅的に評価できるシステムを構築した。構築システムをトマトに適用し、肥満に伴う糖代謝異常改善に寄与し得るアディポネクチン様活性成分の全体像を解明した。また、全体像の俯瞰から重要な機能性成分として複数のカロテノイドを見出し、当該成分のアディポネクチン様活性を詳細に検討することにより、構築システムの有用性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病の増加等により、食品機能性の利用に対する社会的ニーズは、年々高まっている。食品の最たる特徴は、多種多様な成分の含有であり、この特質にこそ、食品機能性利用の更なる発展性が存在する。本研究は、メタボローム解析の活用により、食品に含まれる成分を機能性ベースで網羅的に評価できるシステムを構築し、糖代謝異常改善に寄与し得るアディポネクチン様活性を標的として、概念実証を行ったものである。当該システムは、多彩な食品機能性成分の全体像の解明を可能とする新たな研究手法であることから、食品ゆへの健康効果の利用に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The most important characteristic of food is that it contains a wide variety of ingredients, and this is where the potential for further development of food functions. However, most of the research on food function to date has been derived from one part of the ingredients in foods, and little has been researched on the overview of the ingredients contained. In this study, we constructed a novel comprehensive evaluation system for food ingredients based on their biological activity using non-targeted metabolite analysis. By applying this evaluation system to tomato, we elucidated the overview of the adiponectin-like compounds that can contribute to the ameliorate of glucose metabolism disorder in obesity. In addition, we identified carotenoids as the important functional ingredients from the above-mentioned overview. Furthermore, the usefulness of the novel evaluation system was shown by examining the adiponectin-like activity of the identified carotenoids in detail.

研究分野：食品機能学

キーワード：食品機能性 メタボローム解析 肥満 アディポネクチン 糖代謝異常 筋肉

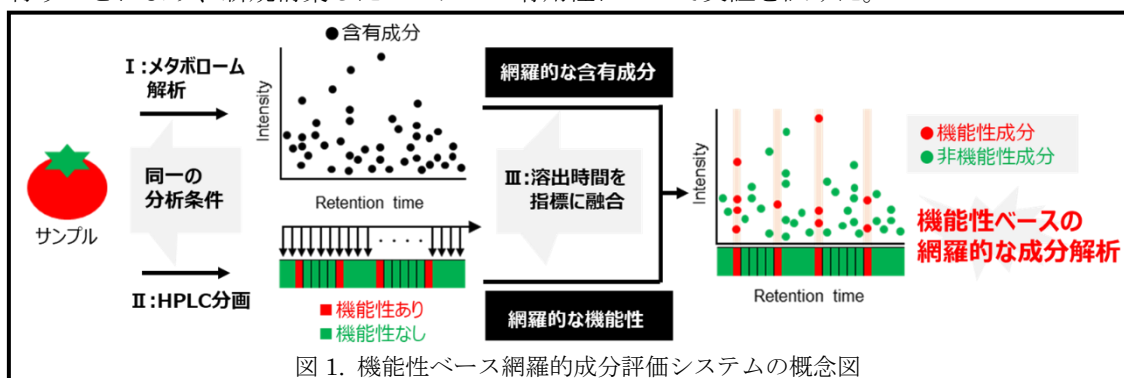
1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の増加等により、食品機能性の活用に対する社会的ニーズは年々高まっている。食品機能性活用の主な特徴として、①日常生活における摂取が可能、②穏やかに生体機能を調節し得る、③多種多様な成分を含有する、の3点が挙げられるが、端的な特徴は③である。①・②とは異なり、多彩な成分の含有は、薬剤・サプリメント等による代替がきかない食品ゆえの特質であり、この点に食品機能性活用の更なる発展性が秘められている。従って、多彩な食品機能性成分の全体像に関する研究が極めて肝要であるが、これまでの研究は、含有成分の一端に由来するものが主流であり、全体像については手つかずのままである。その主因は、食品に含まれる膨大な成分の機能性を精確かつ網羅的に評価できないことにあり、新たな研究手法の構築及びその実証が求められている。

他方、アディポネクチンは、脂肪組織特異的に発現する分泌タンパクであり、AMPK のリン酸化亢進等のシグナル伝達経路を介して、血糖値や中性脂肪値の改善に寄与するアディポカインである(*Nat Med.* 2002;8(11):1288-95.)。アディポネクチンは、肥満時に血中濃度が低下することが報告されており、生活習慣病の治療標的として期待されている(*Diabetes.* 2003;52(7):1779-85.)。また、アディポネクチンの受容体(AdipoR)として、AdipoR1 及び AdipoR2 の2つが同定されており、AdipoR1 は骨格筋、AdipoR2 は肝臓に多く発現していることが知られている。近年、合成低分子化合物ライブラリのスクリーニングにより、AdipoR のアゴニストが発見され、低分子化合物がアディポネクチン様活性を呈し得ることが示された(*Nature.* 2013;503(7477):493-9.)。しかしながら、食品成分に対する報告は、ほとんどない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機能性ベースの網羅的な成分評価システムの構築及びその実証である。近年の分析及びデジタル技術の発展により、サンプルに含まれる全成分の情報を一度の分析で取得できるメタボローム解析が開発された。本研究課題の申請者は、メタボローム解析による食品中の全成分ビッグデータ及びバイオアッセイ系を融合することにより、従来困難であった機能性ベースの網羅的な成分評価システムが構築可能であると考え、これを試みた(図 1.)。また、当該システムにより、アディポネクチン様活性を標的とした食品機能性成分の全体像の解明とともに、全体像の俯瞰から特に重要だと考えられる機能性成分について、より詳細な機能性評価を行うことにより、新規構築したシステムの有用性について実証を試みた。



3. 研究の方法

(1) 機能性ベース網羅的的成分評価システム構築

機能性ベースの網羅的な成分評価システムの構築として、以下①～③の3段階で研究を行った。研究対象の食品としては、世界で最も消費量の多い野菜であり、全ゲノム解析(*Nature.* 2012;485(7400):635-41.)やCRISPR editing(*Nature.* 2017;545(7655):394-395.)等の新たな研究技術が適用されてきたトマトを選択した。①トマト抽出物のメタボローム解析により、含有成分の網羅的解析を行った。具体的には、LC-MSによる成分の超精密質量の測定、解析ソフト(Compound Discoverer)による測定データの解析(溶出時間・ピーク強度・組成式等の取得)及び代謝物データベース(KEGG, PubChem, ChemSpider等)とのリンクにより、含有成分の網羅的な推定を行った。②メタボローム解析と同分析条件により取得したHPLC画分の機能性評価を行った。具体的には、メタボローム解析と同分析条件下、トマト抽出物をHPLCにより分画し、得られたHPLC全画分について、アディポネクチン様活性を評価した。③機能性ベースで網羅的な成分評価を行った。②において機能性を呈したHPLC画分及び①で特定した網羅的成分データを溶出時間を指標として結びつけることにより、トマト含有成分について、アディポネクチン様活性に関する網羅的な成分評価を行った。

(2) アディポネクチン様活性評価に用いるアッセイ系

アディポネクチン様活性を評価するアッセイ系として、主に以下を用いた。マウス由来筋芽細

胞 C2C12 を 2% Horse Serum, 1% Penicillin Streptomycin を含む High Glucose 培地により分化誘導後、分化 5 日目に評価サンプル添加し、AdipoR 下流シグナルの亢進について検討した。また適宜、AdipoR1 siRNA により作製した AdipoR1 ノックダウン C2C12 を用いて、AdipoR 下流シグナルの変動を検討することにより、AdipoR 依存的な活性評価を行った。

AdipoR 下流シグナルとして、AMP-protein kinase (AMPK), Acetyl-CoA carboxylase (ACC), p38 のリン酸化及び Glucose transporter type4 (Glut4), Liver kinase B1 (LKB1) のトランスロケーションをウエスタンブロットティングにより検討した。また、表現型として、3H-deoxy glucose を用いて糖取り込み能を検討した。

4. 研究成果

(1) トマト抽出物のアディポネクチン様活性評価及びメタボローム解析

トマト抽出物の添加は、濃度依存的に C2C12 の AMPK リン酸化を亢進させた。また、この AMPK リン酸化亢進は、AdipoR のノックダウンにより抑制された。以上の結果より、トマトには、アディポネクチン様活性を呈する成分が含まれていることが示された。一方、トマト抽出物のメタボローム解析により、トマト含有成分の網羅的成分推定を行ったところ、carotenoid, sterol lipid, isoprenoid 等の多様な分類に属する全 721 成分を見出した。

(2) トマト抽出物の HPLC 画分におけるアディポネクチン様活性評価

メタボローム解析と同分析条件下、HPLC により分取した (1 fraction/1 min, 計 55 fraction) の添加において、複数の画分は、AMPK リン酸化を亢進させた。また、この AMPK リン酸化亢進の幾つかは、AdipoR のノックダウンにより抑制された。以上の結果より、メタボローム解析において、アディポネクチン様活性を呈する成分が溶出する時間が特定された (図 2.)。

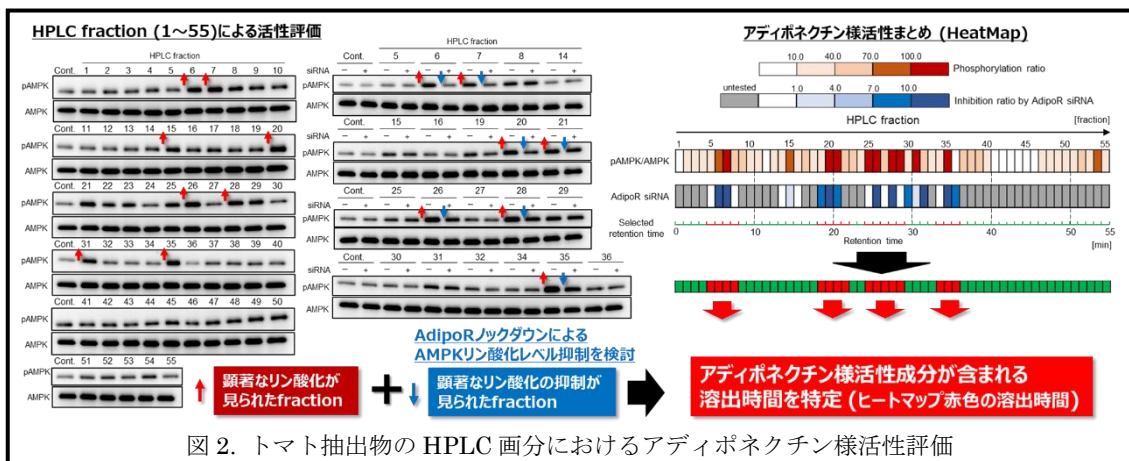


図 2. トマト抽出物の HPLC 画分におけるアディポネクチン様活性評価

(3) 機能性ベース網羅的成分評価システムによるアディポネクチン様活性成分の検討

研究成果 (1) のメタボローム解析により得られた網羅的成分情報と、研究成果 (2) の HPLC 画分における活性情報を組み合わせることにより、トマト含有成分について、機能性ベースの網羅的成分評価を行った。その結果、273 成分をアディポネクチン様活性成分候補として見出した (図 3.)。また、機能性成分全体像の把握として、上記 273 成分について、化学構造による分類を行ったところ、多様な分類に属する成分が含まれていることが明らかになるとともに、carotenoid が最も多数 (60 個) 及び高確率 (56%, Active/Active + Inactive) で含まれることを見出した。

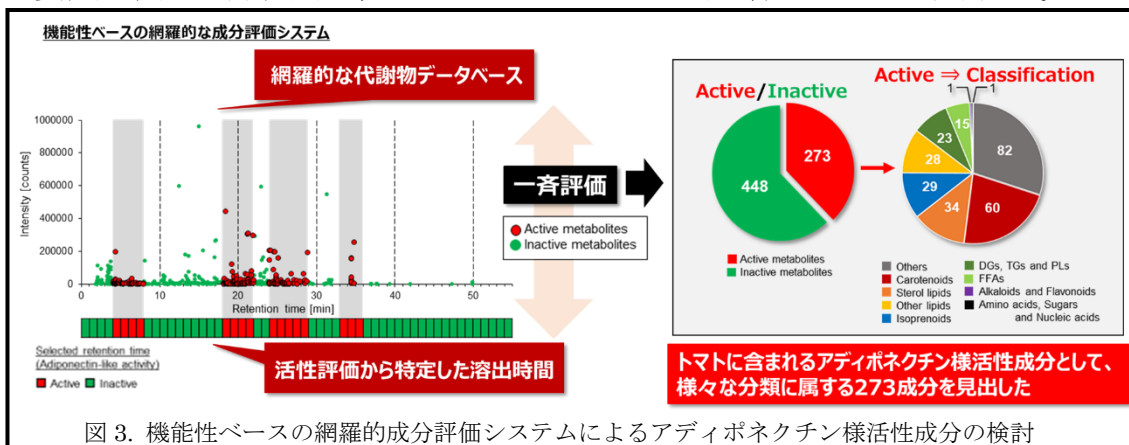


図 3. 機能性ベースの網羅的成分評価システムによるアディポネクチン様活性成分の検討

(4) carotenoid 標品を用いたアディポネクチン様活性成分の同定

研究成果(3)において見出された60個のcarotenoidのうち、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)に登録されている11個のcarotenoid-A~Kを選択した。更に、KEGG登録のある11個のcarotenoidのうち、ピーク強度の高い5個のcarotenoid-C, D, E, H, Iに着目し、標品を用いた検討を行った。上記5個のcarotenoid-C, D, E, H, I標品の全てにおいて、carotenoidの添加は、AMPKリン酸化を亢進させた。また、carotenoid-D, E, H, I標品の溶出時間は、メタボローム解析における溶出時間と一致した(carotenoid-Cは不一致)。以上の結果より、4個のcarotenoidを、トマト由来のアディポネクチン様活性成分として同定した。

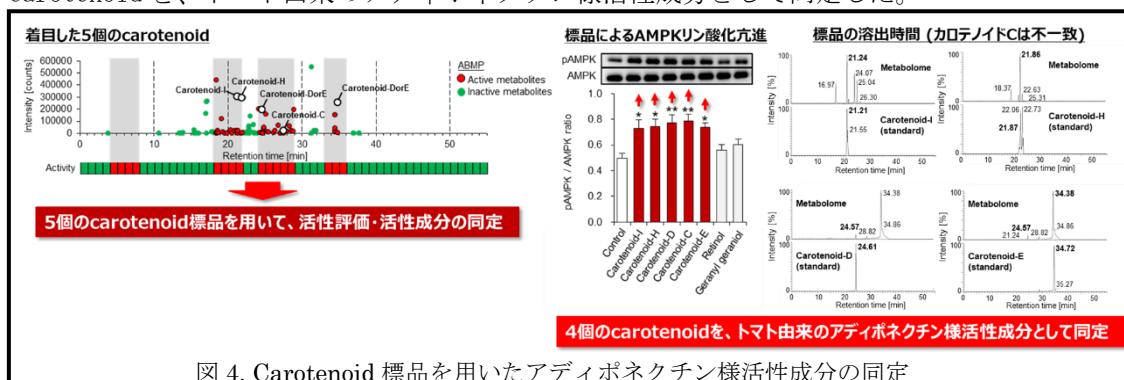


図 4. Carotenoid 標品を用いたアディポネクチン様活性成分の同定

(5) 同定した carotenoid 標品による詳細なアディポネクチン様活性の検討

研究成果(4)において同定した4個のcarotenoidのうち、比較的メジャーな2個のcarotenoid-D, Eに着目し、標品を用いて、より詳細なアディポネクチン様活性を検討した。carotenoid-D, E標品の添加は、AMPKリン酸化を亢進させ、このAMPKリン酸化亢進は、AdipoRノックダウンにより抑制された。AdipoR~AMPK間のシグナル伝達因子であるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK)に関して、STO-609による阻害及びEGTAによるCa²⁺キレートを行うと、carotenoid-D, E標品の添加によるAMPKリン酸化亢進は、抑制された。carotenoid-D, E標品の添加は、アディポネクチンと同様のタイムコースで、AMPK, ACC, p38リン酸化を亢進させた。AMPK下流の表現型として、carotenoid-D, E標品の添加は、糖取り込み能を亢進させ、この糖取り込み能亢進は、AdipoRノックダウンにより抑制された。また、上記carotenoidの添加は、Glut4の細胞膜へのトランスロケーションを促進した。一方、アディポネクチンは、AdipoR~AMPK間のシグナル伝達として、LKB1の核から細胞質へのトランスロケーションを促進することが報告されているが(*J Biol Chem.* 2009;284(33):22426-22435.)、同定したcarotenoid-D, E標品の添加は、上記シグナルに影響を与えなかった。以上の結果より、同定したcarotenoidは、完全にアディポネクチンを模倣しているわけではないが、確かにアディポネクチン様活性を有することが示された。

研究成果(1)~(5)により、本研究課題において構築した新規システムが、食品に含まれる多彩な成分の網羅的な機能性評価に活用可能なことが実証され、食品機能の新たな研究手法になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinsuke Mohri, Haruya Takahashi, Maiko Sakai, Naoko Waki, Shingo Takahashi, Koichi Aizawa, Hiroyuki Suganuma, Takeshi Ara, Tatsuya Sugawara, Daisuke Shibata, Yasuki Matsumura, Tsuyoshi Goto, Teruo Kawada	4. 巻 -
2. 論文標題 Integration of bioassay and non-target metabolite analysis of tomato reveals that β -carotene and lycopene activate the adiponectin signaling pathway, including AMPK phosphorylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0267248	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 毛利晋輔, 高橋春弥, 坂井麻衣子, 脇尚子, 高橋慎吾, 相澤宏一, 菅沼大行, 荒武, 真鍋祐樹, 菅原達也, 松村康生, 柴田大輔, 後藤剛, 河田照雄
2. 発表標題 メタボロミクスによる代謝物一斉評価系を活用したトマトに含まれるアディポネクチン様活性化化合物の探索
3. 学会等名 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 毛利晋輔, 高橋春弥, 坂井麻衣子, 脇尚子, 高橋慎吾, 相澤宏一, 菅沼大行, 荒武, 真鍋祐樹, 菅原達也, 松村康生, 柴田大輔, 後藤剛, 河田照雄
2. 発表標題 メタボローム解析による代謝物一斉評価系を用いたトマトに含まれるアディポネクチン様活性化化合物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Haruya Takahashi, Shinsuke Mohri (Collaborator)
2. 発表標題 Visualization of food function using LC-MS
3. 学会等名 International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Takahashi H, Mohri S, Sakurai N, Ara T, Shibata D, Matsumura Y, Kawada T, Goto T.
2. 発表標題 Establishment of comprehensive assessment of food function system based on mass spectrometry data
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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