

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300278

研究課題名（和文） 抗糖尿病合併症食品の検索、機能性とその機構の解明

研究課題名（英文）

Screening of foods with anti-diabetic-complications function and elucidation of their functionality and mechanism of the function

研究代表者

八木 年晴（YAGI TOSHIHARU）

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：90110759

研究成果の概要（和文）：ビタミン B₆ の仲間であるピリドキサミン (PM) には抗糖尿病合併症機能がある。PM を多く含む食品は抗糖尿病合併症機能が期待される。そこで、まず食品中の PM を定量できる高感度の定量法を開発した。そして、代表的な食品中の含有量を明らかにした。ついで、PM の機能の機構を明らかにするため、ラットに PM を投与して分析をおこない、PM には大量に投与すると糖新生を昂進する作用があることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Pyridoxamine (PM), one of vitamin B₆, has anti-diabetic-complications function. Foods containing a lot of PM, thus, may have this function. At first, a novel determination method of PM in foods has been developed. PM contents in several foods were determined. Then, PM was supplied to mice, and expression levels of genes encoding gluconeogenesis-related proteins. PM increased gluconeogenesis in the mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	6,500,000	1,950,000	8,450,000

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：健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

現在、多数の人々が糖尿病合併症の発症の危険に晒されている。神経障害、網膜症、腎症、血管障害を惹起し、著しく生活の質を低下させる糖尿病合併症の治療法については開発が遅れている。発症までに長期間を要する糖尿病合併症の予防と治療に食事療法は有効である。そこで、食品の中で糖尿病合併症の予防と治療に有効な成分であるピリドキサミンを多く含むものを見出しそれらの

機能性を調べることにした。

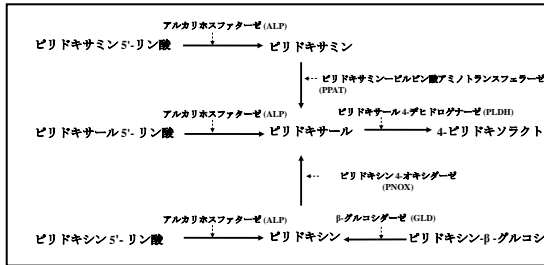
2. 研究の目的

食品中のピリドキサミンとその他のビタミン B₆ 化合物の高感度定量法を開発を第一の目的とした。ビタミン B₆ 化合物の中のピリドキサーール 5'-リン酸には糖尿病性腎症の発症を抑える働きがあることが分かったからである。開発した分析法で各種食品中のこれら化合物の定量をおこなう。さらに、動物実験により、糖尿病合併症に対する有効性を調

べ、その機能のメカニズムを調べることにした。

3. 研究の方法

食品中のピリドキサミンとビタミンB₆化合物を定量的に測定できるように食品の処理法を高圧塩酸加水分解法から酵素処理法に変えた。工程を以下に示した。



開発した分析法により、各種食品の分析を行った。マウスを用いてピリドキサミンを摂食させ、これら食品の有効性とその機能の機構を明らかにすることにした。また、4-ピリドキノラクトン転換-HPLC法の精度を上げるために用いる酵素の基質特異性を改変した。

4. 研究成果

食品中のピリドキサミンとその他のビタミンB₆化合物を高感度で定量できる定量法を開発できた。この方法はピリドキサミン、ピリドキサール 5'-リン酸その他すべてのビタミンB₆化合物を5種類の酵素を用いて特異的に超高蛍光性化合物である4-ピリドキノラクトン (PLA) に転換して、生成したPLAを蛍光HPLCで定量するものである。以下に示したのはピリドキサミンを定量するための酵素反応液組成と処理過程である。

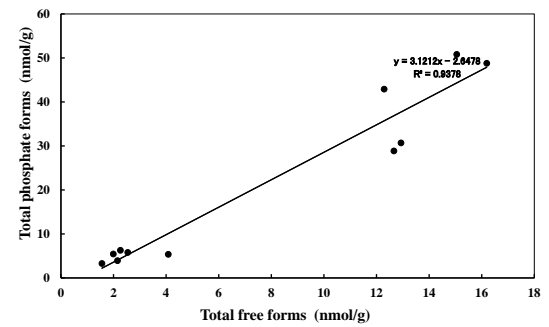
Pyridoxamine (reaction 2)	
	25 mM Tris-HCl (pH 9.0)
	1 mU PLDH
	0.5 mM NAD ⁺
	1 mU PPAT
	2 mM pyruvate
	sample, 5 μL
	↓ 380 μL
	30°C, 1 h
	↓ ← 0.55N HCl, 20 μL
	filtration
	↓
	HPLC (100 μL)

同様の反応液を7種類作り、同様の過程で全てのビタミンB₆化合物をPLAに転換してHPLCで定量した。この方法で食品分析した結果の一部を以下に示した。

Topping	PL		PM		PN		Free Total		PNG	
	(nmol/g)	Recovery (%)	(nmol/g)	Recovery (%)	(nmol/g)	Recovery (%)	(nmol/g)	Recovery (%)	(nmol/g)	Recovery (%)
Bonito (half-baked)	11.58 ± 0.39	92	3.47 ± 0.55	83	ND	93	15.05	ND	99	99
Eel (grilled and basted with a sweet sauce)	1.59 ± 0.04	90	0.39 ± 0.04	88	0.56 ± 0.02	90	2.54	ND	95	95
Northern shrimp (raw)	0.74 ± 0.03	98	0.65 ± 0.09	91	0.17 ± 0.14	92	1.56	ND	99	99
Octopus (boiled)	1.28 ± 0.09	100	0.73 ± 0.01	72	0.25 ± 0.19	92	2.26	ND	72	72
Salmon (cultured, raw)	13.39 ± 0.28	94	1.37 ± 0.77	89	1.43 ± 0.34	88	16.19	ND	93	93
Scallop (raw)	1.51 ± 0.09	98	0.48 ± 0.08	89	ND	96	1.99	ND	94	94
Sea bream (cultured, raw)	11.33 ± 0.04	102	1.14 ± 0.34	82	0.46 ± 0.17	94	12.93	ND	84	84
Sea urchin gonads (raw)	3.63 ± 0.07	79	0.45 ± 0.06	93	ND	97	4.08	ND	87	87
Squid (cuttlefish) (raw)	1.37 ± 0.14	95	0.2 ± 0.19	93	0.58 ± 0.09	88	2.15	ND	71	71
Tuna (southern bluefin) (raw)	9.22 ± 0.64	81	1.85 ± 0.08	77	1.22 ± 0.20	81	12.29	ND	85	85
Yellow tail (young, cultured, raw)	11.93 ± 0.19	87	ND	96	0.73 ± 0.44	76	12.66	ND	67	67

The average and SD of three experiments are shown. ND: not detected.

この結果、カツオのたたきが最も大量のピリドキサミンとそのリン酸型を含むことがわかった。カツオのたたきは江戸時代から庶民の栄養源として絶大な人気を誇った。今回の結果はこのことを裏付けるものである。さらに、興味深いことに、下図に示すように、これら食品中のリン酸型ビタミンB₆化合物総量は遊離型のビタミンB₆化合物総量と強い相関性があり、約3倍量となっていた。



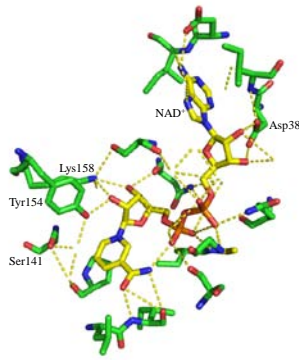
次いで、PMの機能の機構を明らかにするため、ラットにPMを摂食させて分析をおこない、以下のようにPMの大量摂取により、糖新生関連の遺伝子群の発現レベルがかなり変動することが分かった。

Proteins	Fold differences ^a
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.38 ± 0.11 ^b
Pyruvate kinase	1.22 ± 0.11 ^b
Pyruvate dehydrogenase kinase 4	1.10 ± 0.20
Glucose 6-phosphatase	0.88 ± 0.11
Glucocorticoid receptor	0.75 ± 0.05 ^b
Carbohydrate response element-binding protein	0.74 ± 0.02 ^b
Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α	0.66 ± 0.09 ^b

^aFold differences in expression levels of mRNA between the control (1.00) and the pyridoxamine-supplemented mice. ^bSignificantly different from the control.

また、グルコース負荷試験等の結果から、PMには大量に投与すると糖新生を昂進する作用があることがわかった。

さらに、新規定量法の精度を改良するためにはピリドキシリン 4-オキシダーゼの基質特異性を改変して、ピリドキシリン 5'-リン酸に対する反応性を上げることが求められた。そこで、本酵素の活性中心の構造を明らかにするため結晶構造を明らかにした。



ここに示すように活性中心の構造が明らかになったので、現在、レーショナルデザインによって変異酵素を作成しているところである。

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 11 件)

1. H. T. V. Do, K. Toda, T. Saibara, T. Yagi (2012) Abnormality in expression levels of gluconeogenesis-related genes by high-dose supplementation with pyridoxamine in mice, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, in press. 査読あり
2. H. T. V. Do, Y. Ide, A. N. Mugo, T. Yagi (2012) All-enzymatic HPLC method for determination of individual and total contents of vitamin B₆ in foods. *Food and Nutrition Research* **55**, 5409-5416. 査読あり
3. H. T. V. Do, T. Yagi (2012) Individual vitamin B₆ contents in selected Japanese sushi toppings. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **63** (2), 246-249. 査読あり
4. Mugo, A. N., Kobayashi, J., Mikami, B., Ohnishi, K., Yagi T. (2012) Crystallization and preliminary X-ray analysis of pyridoxine 4-oxidase, the first enzyme in pyridoxine degradation pathway I. *Acta Crystallographica. Section F* **68** (1), 66-68. 査読あり
5. 八木年晴 (2011) ビタミン B₆ 測定法の現状と課題 (総説) *ビタミン* **85** (3),

116-126. 査読あり

6. Chu, H. N., Kobayashi, J., Mikami, B., Yagi, T. (2011) The crystal structure of SDR-type pyridoxal 4-dehydrogenase of *Mesorhizobium loti*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **75** (2) 388-390. 査読あり
7. Yagi, T., Murayama, R., Do, H. T. V., Ide, Y., Mugo, A. M., Yoshikane, Y. (2010) Development of simultaneous enzymatic assay method for all six individual vitamin B₆ forms and pyridoxine- β -glucoside. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **56** (3), 157-163. 査読あり
8. Chu, H. N., Kobayashi, J., Yoshikane, Y., Mikami, B., Yagi, T. (2010) Crystallization and preliminary X-ray analysis of SDR-type pyridoxal dehydrogenase from *Mesorhizobium loti*. *Acta Crystallographica Section F* **66** (6), 718-720. 査読あり
9. Matsuda, S., Yokochi, N., Yoshikane, Y., Kobayashi, J., Huy, C. N., Baba, S., Kuramitsu, S., (...), Yagi, T. (2009) Crystallization and preliminary X-ray analysis of 4-Pyridoxolactonase from *Mesorhizobium loti*. *Acta Crystal. Sect. F* **65** (9), 886-889、査読あり
10. Kobayashi, J., Yoshida, H., Chu, H. N., Yoshikane, Y., Kamitori, S., Yagi, T. (2009) Crystallization and preliminary X-ray analysis of AAMS amidohydrolase, the final enzyme in degradation pathway i of pyridoxine. *Acta Crystal. Sect. F* **65** (8), 829-831、査読あり
11. Yokochi, N., Yoshikane, Y., Matsumoto, S., Fujisawa, M., Ohnishi, K., Yagi, T. (2009) Gene identification and characterization of 5-formyl-3-hydroxy-2- methylpyridine 4-carboxylic acid 5-dehydrogenase, an NAD⁺-dependent dismutase. *J. Biochem.* **145** (4), 493-503、査読あり

[学会発表] (計 12 件)

1. 八木年晴、岸貴之、井手陽平、Do Thi Viet Huong、牛乳と人乳中の各種ビタミン B₆ 化合物含有量について、日本ビタミン学会第 63 回大会、2011 年 6 月 5 日、安田女子大学

2. Huong Do Thi Viet, Youhei Ide, Ryutaro Murayama, Andrew Njagi Mugo, Toshiharu Yagi. Contents of six natural vitamin B₆ and pyridoxine-β-glucoside in some foods determined by all-enzymatic HPLC method. 日本ビタミン学会第 62 回大会、2010 年 6 月 11 日—12 日、岩手県民情報交流センター
3. 小林 淳、吉金 優、馬場 清喜、三上文三、八木 年晴
ビ タ ミ ン B₆ 分 解 酵 素 4-pyridoxolactonase の X 線結晶構造解析、日本生化学会第 83 回大会、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸ポートアイランド
4. Huy Nhat Chu, Jun Kobayashi, Yu Yoshikane, Toshiharu Yagi, Bunzo Mikami, Crystal structure of SDR-type pyridoxal 4-dehydrogenase from *Mesorhizobium loti* 日本生化学会第 83 回大会、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸ポートアイランド
5. Toshiharu Yagi、All-enzymatic HPLC method for determination of individual and total contents of vitamin B₆ in foods. The first international vitamin conference (Copenhagen)、2010 年 5 月 19-21 日、IDA Conference Center, Copenhagen, Denmark
6. 葛飛、吉金優、八木 年晴
ピリドキシン分解酵素 4-ピリドキシン酸デヒドロゲナーゼの膜トポロジー、農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡
7. 井手陽平、小林 淳、村山隆太郎、吉金優、八木 年晴、PLP、PMP、PNP、PNG の酵素 HPLC 法による定量条件の改良 II、ビタミン学会大会、2009 年 5 月 31 日、亀岡

〔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

八木 年晴 (YAGI TOSHIHARU)
 高知大学・教育研究部自然科学系・教授
 研究者番号：90110759

(2) 研究分担者

戸田 勝巳 (TODA KATSUMI)
 高知大学・教育研究部医療学系・准教授
 研究者番号：40197893

(3) 連携研究者

()

研究者番号：