

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 6 月 20 日現在

機関番号：34513

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650193

研究課題名（和文） 核酸系うまみ物質の新規生成経路の探索とその利用

研究課題名（英文） Investigation and application of new metabolic pathways involved in the synthesis of inosinate and guanylate

研究代表者

清水 理子（片平 理子）（SHIMIZU RIKO（KATAHIRA RIKO））

神戸松蔭女子学院大学・人間科学部・准教授

研究者番号：70204427

研究成果の概要（和文）：

食べ物のおいしさの要素のひとつである「味」に関する物質のうち、「核酸系うまみ物質」の生成機構について調べた。きのこ類、魚類、野菜類の代表として、シイタケ、アジ、ダイコンの3食品を選び研究試料とした。うまみ物質（イノシン酸とグアニル酸）はプリンヌクレオチドであるので、最初にプリンヌクレオチド代謝経路の概要を明らかにした。次に、うまみ物質が一旦分解された後、再度生成される代謝経路（サルベージ経路）に注目し、この経路に関与する酵素の性質を調べた。最後に、これらの経路が調理・加工・保存条件下で機能する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

New metabolic pathways involved in the synthesis of inosinate and guanylate were investigated. Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*), cultured Japanese jack mackerel (*Trachurus japonicus*) and Japanese radish (*Raphanus sativus*) were chosen as the representatives of mushrooms, fishes and vegetables, respectively. Metabolic profiles of purine ribonucleotides in these foods were examined based on the in situ metabolic fate of radio-labelled precursors and the in vitro activities of enzymes. Inosinate and guanylate were synthesized via salvage pathways in all foods. It was suggested that salvage pathways were operative in these foods under certain conditions of cooking, processing and preservation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	0	1,900,000
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	150,000	3,350,000

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：うまみ・ヌクレオチド・代謝経路・加工・調理

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸や5'-イノシン酸（IMP）、5'

-グアニル酸（GMP）に代表される食品中の「うまみ」成分は、複雑な要素から成り立つ、「食

べ物のおいしさ」のひとつの重要な要因である。近年の研究により、これらのうまみ物質が食物摂取の脳での認知を生じさせ、本格的な消化吸収と代謝調節を開始する引き金となることが報告され（鳥居 2007 日本味と匂い学会誌 14 pp.53-162）、うまみ物質が単なる「味物質」としてのみならず、食品の一次機能発現のトリガーとして重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。更に、うまみを増強させることで汁物の塩分濃度を下げられるため、生活習慣病のひとつである高血圧予防の観点からも、うまみ物質が注目されている。

鰹節は動物性核酸系うまみ物質の代表である IMP を、シイタケは植物性のその GMP をそれぞれ含み、両者は日本料理や中華料理のダシをとる目的で汎用される。鰹節の IMP がヌクレオチド (AMP) の酵素的変換により生成されるのに対し（阿部・福家編 1994 魚の科学 pp.53-54）、シイタケの GMP は、加熱過程での核酸 (RNA) の酵素的分解により生成される（澤田 2003 日本調理科学会誌 36 pp.344-350）と報告されている。

申請者は、これまでに、ジャガイモ植物を対象としてヌクレオチド代謝に関する研究を行い、植物のプリンヌクレオチド代謝経路の詳細（Katahira & Ashihara 2006 *Planta* 225 pp.115-126）や代謝調節機構を報告して来た（Katahira & Ashihara 2006 *Plant Physiol Biochem* 44 pp.551-555）。この中で申請者が明らかにしてきた結果や他の生物で行われてきたヌクレオチド代謝経路についての研究結果を踏まえると、核酸系うまみ物質生成には、これまで重視されてこなかった新たな代謝経路（以下、新規経路）が寄与している可能性、あるいは寄与させることができる可能性が示唆される。

これらの新規経路の存在やうまみ生成への関与を探ることで、食べ物の二次機能（感覚機能、おいしさ）を高める可能性と、うまみの増強を介した減塩による生活習慣病の予防につながる可能性を示すことが期待される。

また、動物性食品と植物性食品との比較により両者の相違を明らかにすることで、核酸・ヌクレオチド代謝の比較生化学研究の発展にも寄与することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに核酸系うまみ物質の生成機構が部分的に明らかにされてきている植物性食品のキノコ類、動物性食品の魚類に加え、核酸系うまみ物質の生成経路には

殆ど注意が払われてこなかった植物性食品の野菜類を研究試料とする。これまでの知見の蓄積とサンプル入手の便宜の点から、具体的には、シイタケ (*Lentinula edodes*)、養殖真アジ (*Trachurus japonicus*)、ダイコン (*Raphanus sativus*) を使用する。

- (1) 各食品の生の試料において、¹⁴C 標識した化合物のトレーサー実験から、うまみ物質の生成につながるプリンヌクレオチド代謝経路の概要を明らかにする。
- (2) (1) で示される代謝経路に関与する酵素のうちのいくつかについて、酵素の性質（至適温度、耐熱性等）を明らかにする。
- (3) 調理・加工・貯蔵（乾製品・塩蔵品など）段階でのうまみ生成における、新規経路の関与の有無を推測する。
- (4) (1) (2) (3) の結果を総合して、より多くの IMP・GMP を生成させると予想される加工・貯蔵条件と調理条件で各試料を処理して IMP・GMP 生成量を調べる。うまみ生成への新規経路の関与の有無と、食品による相違を明らかにし、最終的に各食品のうまみを最大限に引き出す加工・調理法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 試料入手

シイタケ、ダイコンは市販品の状態で生物としての活性を保持し、代謝経路の推定が可能であるため、市販品を購入して適宜利用した。真アジは死後の代謝変動が速く、特にヌクレオチド量の変化が顕著であるため、生きた養殖アジを購入時に店頭で活け締めにし、氷冷下で実験室に運搬して1時間以内に実験を開始した。

(2) プリンヌクレオチド代謝経路の把握

¹⁴C 標識したプリンヌクレオシド (アデノシン、グアノシン、イノシン) 及びプリン塩基 (アデニン、グアニン、ヒポキサンチン) を、薄くスライスした食品と共に緩衝液中で一定時間インキュベートした。この間に生成した ¹⁴C 代謝物を、6%過塩素酸で抽出して薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した後、バイオイメージングアナライザー解析 (BAS 解析) した。各標識化合物の実験から得られた結果と (3) に示す酵素の存在の確認結果を統合して、それぞれの食品のプリンヌクレオチド代謝経路を推定した。

- (3) 酵素活性の検出と酵素の性質の調査
各試料から酵素を抽出し、脱塩処理した粗

酵素液を調製した。IMP や GMP 生成に関与する代謝経路の各反応を触媒する酵素の活性は、 ^{14}C ラベルした基質を用い、 ^{14}C ラベルされた生成物量から算出した。両者の分離と検出は、(2)と同様に TLC と BAS 解析によって行った。酵素活性測定前の熱処理や種々の測定条件設定により、酵素の諸性質を調査した。((2)(3)は Katahira & Ashihara 2006 *Planta* 225 pp. 115-126 の方法によった。)

(4) 各試料におけるヌクレオチドプロフィールの把握

各試料からヌクレオチドを 6%過塩素酸溶液で抽出し、イオン交換 HPLC 分析に供し、ヌクレオチドプロフィールを明らかにした。

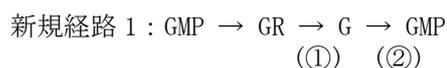
(Ashihara et al. 1987 *Z. Naturforsch* 42C pp. 290-29 の方法によった。)

また、ヌクレオチド抽出残渣中の RNA 量を分光学的方法により定量した。

4. 研究成果

(1) シイタケに関する結果

GMP 生成に関わるプリン代謝経路を中心に調べた。その結果、GMP 生成の主経路と考えられてきた RNA の分解による経路に加え、GMP が phosphatase の作用で分解されて生じるグアノシン (GR) が phosphorylase (①) によりグアニン (G) に分解され、これが guanine phosphoribosyltransferase (以下 GPRT、②) の作用を受けて GMP が再合成されるサルベージ (再利用) 経路が機能していることが明らかとなった。これを流れ図で示すと次の通りになる。(以下同様)



再利用経路のうち、GR から GMP が直接生成される経路の活性は検出されなかった。

また、GR から G への反応は酵素①による反応以外に、植物では nucleosidase によって進むことが報告されている。シイタケでは nucleosidase 活性は検出されなかった。

シイタケを水中で加熱すると、初期段階 (45°C 付近) では、シイタケ中に存在する GTP や GDP の分解によっても GMP が少量生成した。



その後、60°C 以上の温度帯を通過するとき RNA 分解が起こり、GMP が大量に生成された。

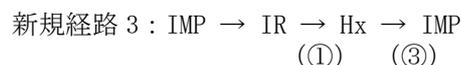
GPRT 活性は 50°C で乾シイタケ加工を行った後も、生と同レベルで残存した。しかし、乾シイタケスライスを ^{14}C -G とインキュベートしただけでは ^{14}C -GMP は生成されず、GMP 生成には GPRT 反応の基質である

5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) を添加する必要があった。

以上の様に、シイタケの GMP 生成は既報通り RNA の分解による経路が主であったが、マイナーな生成経路として新規経路 1・2 の存在を明らかにし、乾燥加工後にも条件によっては新規経路 1 による GMP 生成が可能であることを示した。

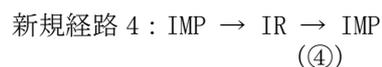
(2) アジに関する結果

IMP 生成に関わるプリン代謝経路を中心に調べた。その結果、IMP 生成の主経路と考えられてきた AMP の脱アミノ反応による経路に加え、IMP が phosphatase や 5'-nucleotidase の作用で分解されて生じるイノシン (IR) が phosphorylase (①) によりヒポキサンチン (Hx) に分解され、これが hypoxanthine phosphoribosyltransferase (以下 HxPRT、③) の作用を受けて IMP が再合成されるサルベージ経路が機能していることが明らかとなった。



IR から Hx への反応は、シイタケと同様に酵素①で進み、nucleosidase 活性は検出されなかった。

再利用経路のうち、IR から IMP が直接生成される経路の活性は非常に低かったものの、検出された。植物体ではヌクレオチドにリン酸基を供与する物質の違いで、kinase 活性と非特異的な phosphotransferase 活性の報告がある。今回調べたアジでは無機リン酸を供与体とする非特異的 nucleoside phosphotransferase (④) 活性が認められた。



アジは乾製品 (干物) としても良く利用される魚であり、干物の加工では塩処理の後、乾燥処理される。アジの抽出粗酵素では、酵素①③は調査した 200mM までの食塩によって殆ど阻害を受けなかった。また、酵素③の耐熱性が高く、至適温度が 60~80°C 付近にあるという特徴が見られた。更に酵素①③は、20% (w/w) 食塩処理 (5°C・30 分)、送風乾燥処理 (27°C・100 分) を順に行い冷蔵 (5°C) すると、4 日後まで活性は消失せず上昇する傾向が認められた。

以上から、アジでは AMP の脱アミノ反応により生じた IMP が 5'-nucleotidase や phosphatase の作用により分解されても、新規経路 3 により IMP を再合成できること、これらの活性は一般的な干物加工後も保持されることを示した。更に酵素③の性質から、新規経路 3 が加熱調理・加工中に活発に働く可能性が示唆された。

(3) ダイコンに関する結果

GMP と IMP 生成に関わるプリン代謝経路を中心に調べた。その結果、GMP と IMP が phosphatase の作用で分解されて生じる GR と IR が、nucleosidase (⑤) により分解され、これが GPRT (②) と HxPRT (③) の作用を受けて GMP と IMP が再合成されるサルベージ経路が機能していることが明らかとなった。

新規経路 5 : GMP → GR → G → GMP
(⑤) (②)

新規経路 6 : IMP → IR → Hx → IMP
(⑤) (③)

シイタケやアジとは異なりヌクレオシドから塩基が生成される反応は、酵素①の phosphorylase ではなく、nucleosidase (酵素⑤) によっていた。

ダイコンの生重量あたりの酵素活性は、シイタケやアジと比べて著しく低かった。IR から ATP をリン酸供与体として IMP を生成する kinase 活性 (⑥) は非常に低いながらも検出されたが、GR から GMP を生成する活性は検出できなかった。

新規経路 7 : IMP → IR → IMP
(⑥)

ダイコンは漬物加工の原料として使われる。塩の影響を調査した酵素②は、200mM までの食塩による阻害をほとんど受けなかった。また、酵素②と③の耐熱性は高くなかったものの、至適温度は 50~70℃ の高温にあった。更に、酵素②は 10% (w/w) 食塩処理 (5℃) を 7 日間継続しても、活性が殆ど消失しなかった。

植物性食品のダイコンで、キノコ類のシイタケのように加熱中の RNA 分解によって GMP が生成される可能性を検討した。¹⁴C 標識化合物を使って微量の物質の変化を捉える方法では、ダイコンの加熱中に RNA 分解によるヌクレオチド生成が認められた。しかし、その量は非常に微量であった。更に、ダイコンに含まれる RNA 量は、生重量あたりでシイタケの 1/10 以下であった。

以上から、ダイコンは GMP や IMP が分解されても、新規経路 5・6 によってこれらを再合成できること、これらの活性は漬物加工中も保持されることが明らかとなった。更に酵素②③の性質から、新規経路 5・6 が加熱調理・加工中に活発に働く可能性が示唆された。しかし、シイタケで見られるような RNA の分解経路によりうまみ物質の GMP を大量に増加させることは、ダイコンに含まれる RNA 量が少ないことから難しいと考えられた。

(4) 今後の課題

本研究では、申請当初の目的 (1) ~ (4)

のうち、(3) までについては、ほぼ達成できた。即ち、本研究で存在を示した新規経路 (サルベージ経路) の酵素の性質を把握し、各食品の代表的な調理・加工・保存条件として想定される条件におけるこれらの経路の関与の可能性を示した。しかし、目的の (4) として新規経路 (サルベージ経路) を利用して、うまみ物質を生成させる具体的方法の提案には至らなかった。

新規経路を利用して分解されたうまみ物質を元のうまみ物質に再合成するには、各酵素反応に必要な基質 (PRPP やリン酸等) が供給されることが条件となる。このため、今後は、種々の調理・加工・貯蔵条件下でこれらの量の変化も把握しながら、うまみ物質を増加させる方法を検討する予定である。

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 件)

[学会発表] (計 1 件)

片平 理子

シイタケ (*Lentinula edodes*) のグアニル酸生成に関与する代謝経路

日本家政学会第 64 回大会 2012. 5. 13

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

清水 理子 (片平 理子) (SHIMIZU RIKO
(KATAHIRA RIKO))

神戸松蔭女子学院大学・人間科学部・准教授

研究者番号：70204427

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：