

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14816

研究課題名（和文）網羅的成分解析を用いた食品機能における「飲」と「食」の関連性の解明

研究課題名（英文）Elucidating the relationship between drinking and eating in food function using comprehensive ingredient analysis

研究代表者

毛利 晋輔（Mohri, Shinsuke）

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60836625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000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。一方、実際の食事において、食品素材を単独で摂取することは少なく、多彩な成分の組合せが生じている。とりわけ、飲料と食品の混在頻度は高く、食生活における真の食品機能性の理解と活用には、「飲」と「食」の関連性の解明が不可欠である。本研究では、様々な飲料と食品成分の混在時における機能性変化を抗炎症能に着目して検討した。また、上記の検討において、日本の伝統的な調味料である出汁に抗炎症能を見出したことから、出汁に含まれる抗炎症成分を探索し、干し椎茸由来の出汁から9つの抗炎症成分を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病の増加などにより、食品機能性に対する社会的需要は益々高まっている。一方で、日々の食生活では、食品素材を単独で摂取することは少なく、複数の食品が混在した状態における機能性こそが、実際の健康効果を反映し得る。本研究は、特に混在頻度の高い飲料と食品に着目し、実際の食生活における食品機能性を検討したものである。また、上記の検討において、日本食の基盤ともいえる出汁に抗炎症能を見出し、9つの抗炎症成分を特定した。本研究の成果は、現実の食生活に即した複数食品の混在下における食品機能性の解明を試みるとともに、日本食の健康効果の一端について明らかにしたものであり、その学術的および社会的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：The most important characteristic of food is the inclusion of a wide variety of ingredients, and this is where the potential for further development of food function. On the other hand, in the actual diet, foods are rarely consumed alone, resulting in a variety of ingredient combinations. In particular, beverages and foods are frequently mixed, and it is essential to elucidate the relationship between “drinking” and “eating” in order to understand and utilize true food functionality in the diet. In this study, we investigated functional changes when various beverage and food ingredients are mixed, focusing on their anti-inflammatory effects. In the above study, we also found anti-inflammatory effects in dashi, a traditional Japanese seasoning, and searched for anti-inflammatory compounds in dashi, thereby speculating 9 anti-inflammatory compounds in dashi derived from dried shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*).

研究分野：食品機能性

キーワード：食品機能性 食品機能性成分 メタボローム解析 抗炎症 マクロファージ 脂肪細胞 出汁

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日々の食生活から摂取可能である食品機能に対する社会的需要は高い。実際の食生活において、食品素材を単独で摂取することは少なく、多彩な組合せが生じている。つまり、食生活における真の食品機能性を理解・活用するには、複数食品混在時の機能性及び成分変化の解明が重要である。ところが、これまでの研究は、各食品素材に焦点があてられ、複数食品の混在時における機能性及び成分の変化については、ほとんど明らかにされていない。食生活における食品の組合せは、無数に存在するが、飲料と食品の混在頻度は、格段に高い。多くの場合、茶、コーヒー及び出汁などを飲みながら食品を摂取しており、ほとんどの食品が、飲料と混在して摂取される。従って、飲料と食品の関連性に主眼を置いた研究は、複数の食品素材の混在に起因する機能性及び成分の変化を明らかにする出発点として、好適であると考えられる。

他方、世界中で肥満とそれに伴う糖代謝異常の増加が問題となっているが、肥満に伴う糖代謝異常の発症メカニズムの1つとして、脂肪組織における慢性炎症が挙げられる (*Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 415-45.)。肥満状態の脂肪組織では、浸潤したマクロファージと肥大化した脂肪細胞が、NO、TNF- $\alpha$  及び MCP-1 などの炎症性サイトカインを介して互いに刺激しあうことで慢性炎症が発生し、インスリン抵抗性を引き起こすことが報告されている (*J Clin Invest.* 2003; 112 (12): 1821-30.)。そのため、マクロファージ及び脂肪細胞の炎症反応を抑制する食品ならびに食品成分は、肥満に伴う糖代謝異常の改善に寄与し得る。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、飲料と食品に着目した複数食品混在時に特有の機能性及び成分変化の網羅的解明である。そのため、新規構築した機能性ベースの網羅的成分評価システムを活用し、様々な飲料及び食品の組合せが、食品機能性に与える影響について検討するとともに、機能性変化をもたらす責任因子となる含有成分変化の網羅的解析を試みる。得られた機能性及び成分変化の全体像から、飲料と食品の混在によって新たに創出される機能性及び成分、維持される機能性及び成分、消失する機能性及び成分などについて整理・区分を行い、複数食品混在時における機能性及び成分変化に関する基礎的知見の取得を試みる。また、以上の研究により、実際の食生活に準じる食品機能性及び成分を提示し、日常生活における食品機能性の更なる有効利用を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗炎症能の評価に用いるアッセイ系

##### ①マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた抗炎症能評価

抗炎症能の評価には、リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) 刺激により炎症を惹起したマウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた。RAW264 を  $5 \times 10^5$  cell/mL でプレートに播種後、LPS 100 ng/mL 及び評価サンプルを添加し、インキュベートした。20 時間後、培養上清を回収し、上清中に含まれる NO を Griess 法、TNF- $\alpha$  及び MCP-1 を ELISA 法で測定することにより、評価サンプルの抗炎症能を検討した。

##### ②マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた細胞毒性評価

細胞毒性の評価には、研究方法 (1) ①と同様に LPS 刺激により炎症を惹起した RAW264 を用いた。RAW264 を  $5 \times 10^5$  cell/mL でプレートに播種後、LPS 100 ng/mL 及び評価サンプルを添加し、インキュベートした。20 時間後、CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent をマニュアルに従って添加・検出し、評価サンプルの細胞毒性を検討した。

##### ③マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を用いた抗炎症能の作用機序評価

抗炎症能の作用機序の評価には、研究方法 (1) ①と同様に LPS 刺激により炎症を惹起した RAW264 を用いた。RAW264 を  $5 \times 10^5$  cell/mL でプレートに播種後、LPS 100 ng/mL 及び評価サンプルを添加し、インキュベートした。30 分後、培養上清を除去し、細胞を回収した。回収した細胞における MAPK (ERK、JNK、P38) リン酸化亢進の抑制について、ウエスタンブロッティングを用いて検討することにより、評価サンプルの抗炎症能の作用機序を検討した。

##### ④RAW264 及びマウス繊維芽細胞 3T3-L1 による共培養系を用いた抗炎症能評価

脂肪組織におけるマクロファージと脂肪細胞間の炎症モデルとして、RAW264 とマウス繊維芽細胞 3T3-L1 より分化誘導した肥大化脂肪細胞の共培養系 (接触法) を用いた。分化誘導 21 日目の 3T3-L1 に RAW264 を  $5 \times 10^5$  cell/mL で播種後、評価サンプルを添加し、インキュベート

した。48 時間後、培養上清を回収し、上清中に含まれる NO、TNF- $\alpha$  及び MCP-1 を研究方法 (1) ①と同様の手法で測定することにより、マクロファージと脂肪細胞間の炎症に対する評価サンプルの抗炎症能を検討した。

## (2) 機能性ベース網羅的成分評価システム

機能性ベースの網羅的成分評価は、主に以下 I～III の 3 工程で行った (図 1.)。工程 I では、評価する食品の抽出物を用いて、メタボローム解析を行い、含有する成分を網羅的に解析した。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 (組成式、ピーク強度、溶出時間などの取得)、代謝物データベース (KEGG、PubChem、ChemSpider など) とのリンクによる含有成分の網羅的な推定を行った。工程 II では、メタボローム解析と同じ分析条件により取得した HPLC 画分を用いて、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、評価する食品の抽出物を HPLC により分画し、得られた HPLC 全画分について機能性を評価した。工程 III では、機能性ベースで網羅的に成分評価を行った。具体的には、工程 I で特定した網羅的成分データ及び工程 II で機能性が認められた HPLC 画分データを用いて、溶出時間を指標としたデータの結合により、評価する食品の含有成分について、機能性に基づいた網羅的成分評価を行った。

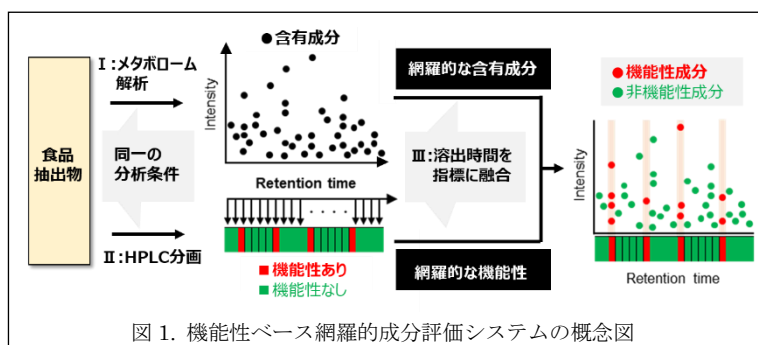


図 1. 機能性ベース網羅的成分評価システムの概念図

## 4. 研究成果

### (1) 飲料と食品の混在における抗炎症能の変化

飲料として、緑茶、コーヒー及び出汁など、食品として、ゲニステイン、スルフォラファン及び  $\beta$ -カロテンなど、様々なサンプルを用いて、混在時における抗炎症能の変化を検討した。しかしながら、混在時の抗炎症能は、各飲料および各食品の相加的な値を示し、混在による抗炎症能の変化は見出されなかった。今後、飲料と食品の探索範囲及び機能性指標を拡大するとともに、加熱処理といった調理手順を加えるなど、混在に起因する機能性変化及びそれに伴う成分変化について、更なる検討が必要である。

### (2) 出汁の抗炎症能

研究成果 (1) の検討において、出汁 (昆布、鰹節、干し椎茸、煮干し) が抗炎症能を呈することを見出した。日本の伝統的な調味料であるとともに摂取頻度の高い出汁の機能性は、研究意義が高いと考え、機能性ベースの網羅的成分評価システム (研究方法 (2)) を用いて、出汁に含まれる抗炎症成分の探索を行った。LPS 刺激した RAW264 に 4 種の出汁抽出物をそれぞれ添加し、NO、TNF- $\alpha$  及び MCP-1 の産生抑制を検討したところ、4 種の出汁は各指標の産生を抑制し、抗炎症能を示した。また、4 種の出汁抽出物のうち、干し椎茸由来出汁が最も高い抗炎症能を示した。最も高い抗炎症能を示した干し椎茸由来出汁は、濃度依存的に NO、TNF- $\alpha$  及び MCP-1 の産生を抑制するとともに、当該濃度において細胞毒性を示さなかった。

### (3) メタボローム解析を用いた干し椎茸由来出汁に含まれる成分の網羅的解析

最も高い抗炎症能を示した干し椎茸由来出汁に含まれる成分について、メタボローム解析による網羅的な解析を行った。その結果、干し椎茸由来出汁の含有成分として、アミノ酸、ペプチド及びフラボノイドなど、様々な化学構造的分類に属する全 352 成分を特定した。

### (4) 干し椎茸由来出汁の HPLC 画分における抗炎症能

研究成果 (3) で用いたメタボローム解析と同分析条件下、干し椎茸由来出汁を HPLC により分画し、得られた全 HPLC 画分 (全 40 画分) の抗炎症能を検討した。LPS 刺激した RAW264 に各 HPLC 画分をそれぞれ添加し、NO の産生抑制を検討したところ、多数の HPLC 画分が NO 産生を抑制し、抗炎症能を示した。また、2 つの画分 (Fr. 4 及び Fr. 10) が特に高い抗炎症能を示した。

### (5) 機能性ベースの網羅的成分評価システムによる抗炎症成分の探索

研究方法 (2) に従い、研究成果 (3) のメタボローム解析により得られた網羅的成分データと、研究成果 (4) の HPLC 画分における抗炎症能データを溶出時間を指標に組み合わせることによ

り、干し椎茸由来出汁に含まれる抗炎症成分を探索した。その結果、特に高い抗炎症能を示した2つのHPLC画分(Fr. 4及びFr. 10)から、抗炎症成分候補として、それぞれ14成分(Fr. 4)及び18成分(Fr. 10)を特定した。LPS刺激したRAW264に特定した上記32成分の標品を添加し、NO産生抑制を検討したところ、それぞれ6成分(Fr. 4)及び3成分(Fr. 10)がNO産生を抑制し、抗炎症能を示した。また、上記9成分の標品は、LPS刺激したRAW264において、濃度依存的にNO、TNF- $\alpha$ 及びMCP-1の産生を抑制するとともに、当該濃度において細胞毒性を示さなかった。

#### (6) 干し椎茸出汁及び含有成分の抗炎症能作用機序

干し椎茸由来出汁及び研究成果(5)で特定した9成分の抗炎症能について、その作用機序を検討した。先行研究において、マクロファージと脂肪細胞間の炎症に、MAPK(ERK、JNK、P38)のリン酸化亢進が関与していることが報告されている(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2062-2068.)。そこで、研究方法(1)③に従い実験を行ったところ、干し椎茸由来出汁は、濃度依存的にMAPKのリン酸化亢進を抑制した。また、特定した9成分の標品のうち4成分も、同様の傾向を示した。

#### (7) マクロファージと脂肪細胞間の炎症における干し椎茸由来出汁及び含有成分の抗炎症能

脂肪組織の炎症を模倣したマクロファージと脂肪細胞の共培養系における干し椎茸由来出汁及び研究成果(5)で特定した9成分の抗炎症能を検討した。研究方法(1)④に従い実験を行ったところ、干し椎茸由来出汁は、濃度依存的に共培養系のNO、TNF- $\alpha$ 及びMCP-1の産生を抑制し、抗炎症能を示した。また、特定した9成分の標品のうち7成分も、共培養系において抗炎症能を示した。

研究計画当初の目標は、十分に達成されなかったが、研究成果(2)～(7)により、出汁の抗炎症能を見出すとともに、干し椎茸由来出汁に含有される多彩な抗炎症成分を明らかにした。加えて、干し椎茸由来出汁及び含有する抗炎症成分は、肥満に伴う糖代謝異常の発症メカニズムの1つであるマクロファージと脂肪細胞間における炎症に対しても抗炎症能を示すことを見出した。現在、研究成果の社会還元に向け、以上の研究成果について、論文投稿の準備中である。今後、日本の伝統的な調味料である出汁ならびに出汁を基盤とする和食の機能性について、更なる有効活用が期待される。

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 $\beta$ -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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 毛利晋輔、真鍋祐樹、高橋春弥、後藤剛、向英里、菅原達也
2. 発表標題 マクロファージと脂肪細胞の間で生じる炎症を標的とした出汁に含まれる抗炎症成分の探索
3. 学会等名 日本食品分析学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 毛利晋輔、真鍋祐樹、高橋春弥、後藤剛、菅原達也
2. 発表標題 食品メタボロームへの機能性情報付与による出汁に含まれる抗炎症化合物の探索および作用機序の解明
3. 学会等名 日本食品分析学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 毛利晋輔、真鍋祐樹、高橋春弥、後藤剛、菅原達也
2. 発表標題 抗炎症作用に注目した出汁に含まれる食品機能成分の評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会関西支部大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 毛利晋輔、真鍋祐樹、高橋春弥、後藤剛、菅原達也
2. 発表標題 メタボローム解析を利用した活性ベース代謝物プロファイリング法の構築及び出汁に含まれる抗炎症化合物の探索
3. 学会等名 日本微量栄養素学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 毛利晋輔、真鍋祐樹、高橋春弥、後藤剛、菅原達也
2. 発表標題 メタボロミクスによる代謝物一斉評価法を用いた 鰹出汁に含まれる抗炎症成分の探索
3. 学会等名 日本水産学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------