

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700823

研究課題名(和文)機能化サプリメントを目指した脂質-タンパク質ハイブリッド型キャリアの創成

研究課題名(英文)Creation of hybrid-type carrier from lipid and peptide for functional nutraceuticals

研究代表者

太田 明雄(OHTA, Akio)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号：10324104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：栄養補助食品(NC)の高機能化を目的に、各種NCのキャリアとなり且つそれ自体がNC成分であるカゼインミセルならびにレシチンリポソームのハイブリッド化と、NCキャリアとしての有用性を明らかにする事を目的に研究を行った。NC成分として抗酸化作用を有するポリフェノールの一種であるゲニステインをモデルとして選び、各キャリアへの可溶化量を明らかにし、可溶化されたゲニステインの抗酸化能力の評価を行った。カゼイン系ではゲニステインの抗酸化作用を向上させる相乗効果が認められる一方、リポソーム系は多量のゲニステインを可溶化できることが分かった。両者を同時に用いることで、量質の両面からの機能化の達成が期待される。

研究成果の概要(英文)：Both casein and lecithin are natural food products and also essential nutraceuticals. Furthermore, because of their properties, caseins and liposomes are used to deliver medicines and nutraceuticals. Genistein is one of several known plant-derived isoflavons; is particularly plentiful in soybeans. The antioxidant and phytoestrogen properties of genistein are associated with the prevention of hormone-dependent cancers. In this study, caseinate and liposomes were used as a model casein solution as a material for encapsulating genistein. Peptides generated from the digestion of milk proteins are reported to have antioxidative activities. Then it is expected that genistein will have synergistic effect in antioxidant capacity with caseinate, as it dissolved in the caseinate system. Although there is no synergistic effect in liposome system solubilizing genistein, the phospholipid liposome is able to include tremendously many genistein molecules. These can be complementary to each other.

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：特殊栄養食品 分子集合体 脂質 ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

我が国におけるニュートラシューティカルズ(栄養補助食品:以後 NC と略す)の市場規模は、健康・安全志向の高まりを受けここ数年着実な伸び傾向を回復し、2015年には2兆円にせまるものと予想されている。更に国外に目を向けると、中国、インド、ブラジル、インドネシアなど大きな人口を抱える新興国の発展に伴う消費者の生活水準の高まりにより、購買層が一気に激増することが期待される。このような状況において、サプライヤー側としては差別化を図るために、NC の高付加価値化が一層求められることになる。その高付加価値化の方法に対しては幾つかの方針が考えられる。例えば、複数の栄養成分を複合化させ、一度の服用で多種の栄養成分を取り入れるマルチ化や、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を利用した、必要な組織に必要な成分のみを投与できるような高選択化などが考えられる。そこで本申請研究では申請者の研究分野である分子集合体化学の立場から、それぞれ NC の一つである、カゼインならびにレシチンに着目した。

### 2. 研究の目的

カゼインは乳タンパクの 80%を構成するリンタンパク質であり、プロテインとして、もしくはカルシウム補給の目的として利用されている。またカゼインの大きな特徴は水中で会合してミセルを形成することであり、その内部に疎水性物質を可溶化させることができる。なおそのミセル自体は 20nm 程度の球状であるが、セリン残基に結合したリン酸基のために、カルシウム存在下では、ミセルがリン酸とカルシウムの結合を介して成長し、500nm 程度まで成長する。一方レシチンは生体膜を構成する主要成分であり、レシチン不足は多くの疾患を引き起こす原因となることから、NC としても重要視されている。こちらも水中で分散させると二分子膜構造が綴じたりポソームと呼ばれる小胞体を形成する。この性質を利用してエマルジョンの調製や DDS キャリアとしても利用されている。

このように、分子集合体を形成するような NC をキャリアとして用いることができれば、上述の NC のマルチ化と高選択可化の双方を同時に達成することが可能となる。もちろんカゼインやレシチンは既に薬物等のキャリアとして多方面で利用されているが、このような NC のキャリアとしての観点からの応用例は少ない。特にカゼインミセルに関しては、可溶化量や可溶化環境の解明など、そもそも可溶化に関する定量的な物理化学的研究例は少なく、早急に取り組むべき必要がある。そこで本研究では、まずカゼインミセルならびにレシチンリポソームにおける各種 NC の可溶化能

と可溶化された NC の機能性を、定量的にかつ系統的に解明することを目指した。更にリポソームにカゼインミセルを集積させ、本研究題目にある「脂質-タンパク質ハイブリッド型キャリア」の調製方法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

カゼインおよびレシチンのサンプルとして、牛乳由来カゼインナトリウム(Sigma-Aldrich)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC, 日油コートソーム MC-6060)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC, 日油コートソーム MC-8181)をそれぞれ利用した。NC サンプルとして抗酸化作用が期待されるポリフェノールの一種であるゲニスチン(東京化成)を選んだ。全てのサンプルは 1mM リン酸緩衝液(pH=7.4)を用いて調製した。なおカゼインの分子量は 100kD とした。

カゼインサンプルについては、カゼインミセルの臨界面濃度の決定、ゲニスチンの可溶化量の測定、およびゲニスチンの可溶化に伴う会合体の特性および形態の変化の観点から検討した。DPPC リポソームは薄膜法を用いて、マルチラメラリポソームとして準備した。ゲニスチンの可溶化実験については、カゼイン系、リポソーム系について以下のような方法により実施した。カゼイン系ではカゼインミセルと 48 時間の可溶化平衡の後、不溶のゲニスチンをフィルターで別して、可溶化画分を HPLC にて定量した。リポソーム系では DPPC とゲニスチンの混合薄膜を緩衝液にて分散させた後、超音波処理によりリポソームを微細化してリポソームに取り込まれなかったゲニスチンを取り除き、吸光度測定によって可溶化されたゲニスチンを定量した。

可溶化されたゲニスチンの抗酸化能力の定量には、ラジカル化した ABTS 試薬[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)]のラジカル消去能の観点から検討を行った。ABTS ラジカルの定量は 732nm での吸光度を利用した。各試料での 50%阻害

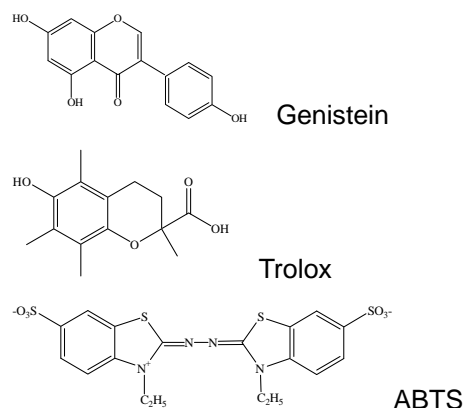


図 1. 使用した化合物の化学構造

濃度 (IC50) を決定し、TEAC 値 (trolox equivalents antioxidant capacity) を用いて比較検討を行った。なお図 1 に使用した物質の化学構造を示した。

#### 4. 研究成果

カゼインナトリウムへのゲニステインの可溶化量を HPLC 測定により決定した。図 2 に示したように、ゲニステインの可溶化量はカゼイン濃度の増加と共に上昇したが、臨界会合濃度(0.8 μM)付近でその増加率が減少した。このグラフでは臨界会合濃度を挟んで 2 本の直線を引く事ができるが、これらの傾きより臨界会合濃度以下ではカゼイン 1 分子あたり 10 分子程度のゲニステインが、臨界会合濃度以降では 2 分子程度のゲニステインがそれぞれ可溶化される事がわかった。このことより、ゲニステインはカゼインの表面に可溶化され、カゼインがミセルを形成すると 1 分子あたりの有効表面積が減少する結果、その可溶化量が減少したことが示唆される。

次にゲニステインの可溶化に伴うカゼインミセルの形状を AFM ならびに cryo-TEM により観察を行った。図 3 にカゼインミセルの形態像、高さプロファイル、および位相像をそれぞれゲニステインの有無に関して示した。形態像と高さプロファイルより、ゲニステインの結合により、若干のミセルサイズの増大が確認できる。更に位相像については、ゲニステイン有無の違いが顕著に現れている。位相像は対象物の表面特性、特に柔軟性を反映していると考えられているが、ゲニステインの有無により、位相像の明暗が反転している事が分かる。これはミセル表面にゲニステインが結合した結果、カゼインミセル表面が剛直に変化した事を示しているものと考えられる。一方 cryo-TEM 画像においても、AFM の高さプロファイルと同程度のサイズのみセルが観測され、TEM 像でもゲニステインの可溶化に伴う若干のミセルサイズの増加が確認された。

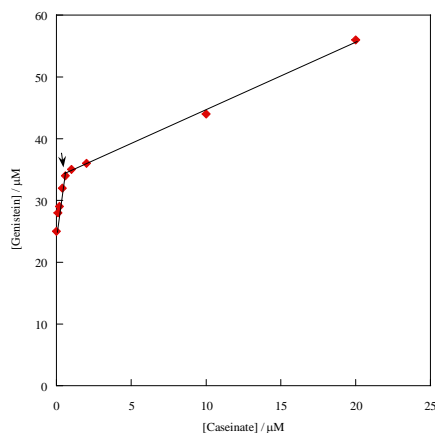


図 2 . Solubility of genistein against caseinate concentration. Slope of the graph changes at 0.83 μM.

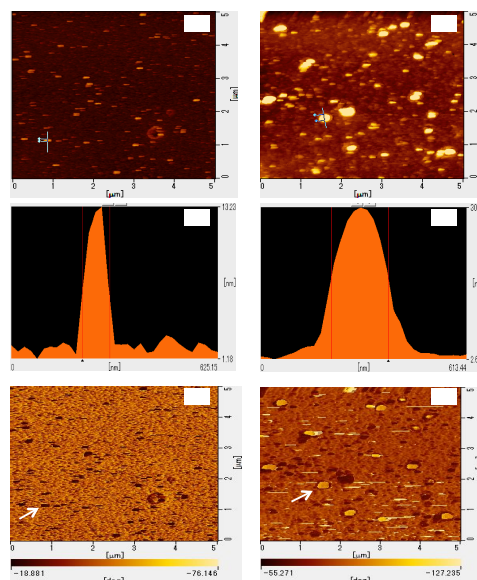


図 3 . Atomic force microscope images of sub-micelle of caseinate (A,C, and E) and sub-micelle caseinate with genistein (B,D and F). A and B are structure images, C and D show sub-micelle height indecaded in the structure images. While E and F are phase images of sub-micelle. The white arrow point to the sub-micelle. Samples were 2 μM of caseinate with/without 0.5 mM of genistein in 1 mM of phosphate buffer at pH=7.4.

次に DPPC リポソームへのゲニステインの可溶化量の検討を行った。リポソームに可溶化されなかったゲニステインを除去したりポソーム懸濁液をエタノールに溶解させ、260nm 付近に現れるゲニステインの吸光度より可溶化量を見積もったところ、リポソームを形成する DPPC1 分子あたり 8 分子程度のゲニステインが可溶化される事が分かった。この量はカゼインの可溶化量と比較すると非常に大きく、キャリアの質量あたりで比較するならば、カゼインよりも千倍程度多くのゲニステインを DPPC リポソームは可溶化できるといえる。

このようにカゼインミセル、DPPC リポソームに可溶化されたゲニステインの抗酸化能

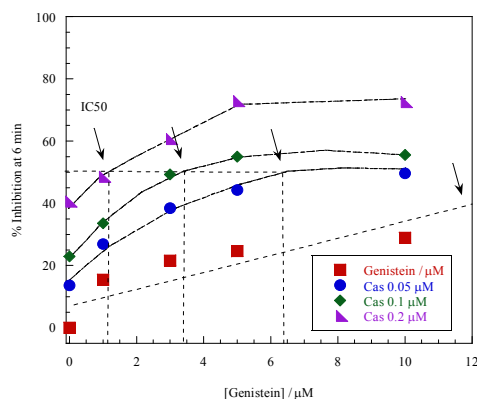


図 4 . Estimation of the value of concentration of inhibition at 50% (IC50) for various caseinate system with genistein.

表 1 . IC50 values of AOX materials in various caseinate systems

	IC50 / $\mu\text{M}$
Trolox	8.8
Gen in EtOH	2.3
Gen + Cas 0 $\mu\text{M}$	24.0
Gen + Cas 0.05 $\mu\text{M}$	6.4
Gen + Cas 0.1 $\mu\text{M}$	3.4
Gen + Cas 0.2 $\mu\text{M}$	1.2

力を検討するために、ABTS アッセイを利用した。ラジカル化された ABTS は比較的安定に存在する事ができ、700nm 付近に吸収帯を持っているが、ゲニステインによってラジカルが除去されると、この吸光度が低下する。本実験においても ABTS ラジカルとゲニステインサンプルを混合すると、700nm 付近の吸光度は時間と共に減少した。今回の実験では混合後 6 分後の吸光度を利用して、ゲニステインのラジカル消去率を見積もった。図 4 に、カゼイン系に対して混合後 6 分後のラジカル消去率を、ゲニステインの濃度に対して示した。このグラフより、各系における IC50 値を算出し、表 1 にまとめた。参考値として Trolox および、エタノール溶液中でのゲニステインの IC50 値も同時に示した。

IC50 値は低いほど少量の抗酸化物質によってラジカルを除去できる事を示している。ゲニステインは溶かす溶媒によって IC50 値が影響を受ける事が分かる。これは疎水性の高いゲニステインが水溶媒中ではある種の会合体を形成してしまい、ABTS ラジカルと効率的に接触ができない事を示しているものと思われる。逆にエタノール溶液中ではゲニステインは単分散状態で存在することが可能となり、各ゲニステイン分子が効率的にラジカル消去を行う事ができると考えられる。一方カゼインに可溶化されたゲニステインの IC50 値は大きく低下し、カゼイン濃度の増加と共に更に IC50 値が低下している事が分かる。これはカゼイン分子自体のラジカル消去能力に加え、カゼイン分子がゲニステインに対してラジカル消去能を発揮できる場を

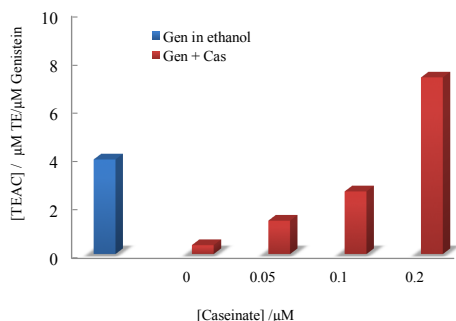


図 5 . TEAC values of genistein in various media.

表 2 . IC50 values of genistein materials in various liposome systems

	IC50 / $\mu\text{M}$
Gen in DPPC 0.10mM	3.00
Gen in DPPC 0.14mM	3.20
Gen in DPPC 0.25mM	3.20
Gen in DPPC 0.30mM	3.20
Gen in DOPC 0.10mM	2.35
Gen in DOPC 0.14mM	2.36
Gen in DOPC 0.25mM	2.38
Gen in DOPC 0.30mM	2.40

提供しているためではないかと考えられる。つまりゲニステインはカゼインに可溶化させる事でラジカル消去能の相乗効果が期待されるといえる。このことは Trolox を基準とした TEAC 値を算出する事でより直感的な理解が可能となる。図 5 にゲニステインのモル濃度あたりの TEAC 値を各系に対して示した。図から明らかなようにカゼイン分子に可溶化させる事で著しい抗酸化能力の向上が確認できる。

最後にリポソームに可溶化されたゲニステインの抗酸化能力についても同様に検討を行った。リン脂質として DPPC および DOPC を用いた調製したリポソームにゲニステインを可溶化させ、ABTS ラジカル消去率から IC50 値を同様に算出した。その結果を表 2 に幾つかのリン脂質濃度に対して示した。表の結果から明らかなように、カゼイン系とは異なり、IC50 値はキャリアのリポソーム濃度には殆ど影響を受けていない事が分かった。その傾向は今回使用した二つのリン脂質に対して共通であった。またその IC50 値はエタノール中のゲニステインの値と類似しており、リポソーム系では相乗効果は発揮できないものの、可溶化されたゲニステインは有効にラジカル消去を行う事ができるものと考えられる。更に DPPC リポソーム中ならびに DOPC リポソーム中でのゲニステインの TEAC 値の平均を算出したところ、それぞれ 2.80 (DPPC) 3.72 (DOPC) であった。なおエタノール中のゲニステインの TEAC 値は 3.91 である。この結果より、ゲル状態の比較的強固な二分子膜を形成する DPPC リポソーム中よりも、比較的柔軟性の高い液相状態の二分子膜状態にある DOPC リポソーム中の方がより高い抗酸化作用を示し、DOPC 中ではほぼエタノール溶液中のゲニステインに匹敵していることわかる。おそらく柔軟性の高い二分子膜の方がより ABTS ラジカルとの衝突に有利であるものと思われる。

このようにそれ自体が NC 成分であり、且つキャリアとして利用可能な、カゼイン系とリポソーム系について、抗酸化作用を有する NC

であるゲニステインの可溶化能力とその抗酸化能力を検討したところ、それぞれに特徴がある事が分かった。カゼイン系はゲニステインを大量に可溶化させる事には不得手であるが、ゲニステインを可溶化させる事で抗酸化能力の著しい相乗効果が期待される。一方リポソーム系は、可溶化能力の相乗効果は期待できないが、抗酸化作用を有するポリフェノール化合物を大量に可溶化させる事が可能である。言い換えると、カゼイン系では抗酸化能力の質的向上が可能であり、一方リポソーム系では量で補うことが可能であるということになる。このようにそれぞれの特徴を生かすことで、必要な機能を NC に付加する事ができる。また今回は抗酸化作用を示すゲニステインを NC のモデル系として選び、検討を行ったが、系によってカゼインとリポソームの働きが異なる場合も考えられる。今回はカゼインとリポソームのハイブリッド化の十分な検討までは至らなかったが、これらのハイブリッド化によって、様々な用途に柔軟に対応する事が可能となるため、引き続き検討を行う必要がある。

#### 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 1 件)

ANJANI Gemala, OHTA Akio, YASUHARA Kazuma, ASAKAWA Tsuyoshi, Solubilization of Genistein by Caseinate Micellar System. Journal of Oleo Science 63(4) 413-422, (2014) (査読有) <http://dx.doi.org/10.5650/jos.ess13198>

〔学会発表〕(計 3 件)

Anjani Gemala, 太田明雄, 浅川毅 Antioxidation Capacity of Genistein in Caseinate System 日本化学会近畿支部平成 25 年度北陸地区講演会と研究発表会 2013 年 11 月 22 日

山本隼也, 太田明雄, 浅川毅 カルシウムイオンを介したリン脂質ベシクルへのカゼインの集積 日本化学会近畿支部平成 25 年度北陸地区講演会と研究発表会 2013 年 11 月 22 日

ANJANI Gemala, OHTA Akio, ASAKAWA Tsuyoshi, Solubilization of Genistein by Caseinate Micellar System. World Congress on Oleo Science 2012 2012 年 10 月 3 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

太田 明雄 (OHTA AKIO)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号: 10324104

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし