

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23500944

研究課題名(和文) 雑豆由来オリゴ糖鎖の機能性開発と食品への応用

研究課題名(英文) Biological activities of water-soluble free oligosaccharides obtained from edible beans and their applications.

研究代表者

木村 万里子 (KIMURA, Mariko)

神戸女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：00351932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、雑豆(大豆と落花生を除く豆類)の機能性食材としての価値を検討することを目的としている。まず、小豆と手亡(白いんげん豆)から均一性の高い多量の糖ペプチド・オリゴ糖を調製する方法を確立した。次に、調製したオリゴ糖を γ -ポリグルタミン酸にカップリングさせたネオ糖ペプチドを作り、それらの抗原提示細胞の活性化、T細胞分化・生育、サイトカイン産生に及ぼす影響を調べたところ、ヒト単球を活性化することが認められた。さらに、小豆や手亡に含まれる遊離型オリゴ糖の糖組成分析を行うとともに、プレバイオティクス活性を調べた。以上の結果から、小豆や手亡には高い機能性を有するオリゴ糖が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we analyzed functional and structural features of free oligosaccharides prepared from Zatsu mame (defined as edible beans other than soybean and peanut in Japanese) to find out good sources of latent bioactive oligosaccharides.

At first, we prepared several kinds of glycopeptides and oligosaccharide fractions from Adzuki and Tebo by a combination of cation exchange chromatography and gel filtration. Using bean glycopeptides and γ -polyglutamic acid, we developed a novel glyco-polymer bearing several hundreds of oligosaccharides and assayed stimulating activity to antigen presentation cells, T-cell proliferation, and production of cytokines. Prebiotic activities of the bean-oligosaccharides on growth of bifidobacteria and lactobacilli were determined by measuring the number of these bacteria, suggesting that Adzuki and Tebo contain prebio-active oligosaccharides or glycopeptides.

研究分野：食品化学

キーワード：雑豆 オリゴ糖 ペプチド 機能性 プレバイオティクス 低利用資源

1. 研究開始当初の背景

食品に含まれる種々のアレルゲンの多くは糖たんぱく質であり、それら糖鎖の化学構造同定と糖鎖を除去した食品の調製が試みられている。その一方で、申請者らは 1-3 フコースおよび 1-2 キシロースをコア構造に含む植物複合型糖鎖が、ヒト T-細胞の分化・生育を抑制するとともに、Th2 細胞によるインターロイキン 4 (IL-4) 産生を抑制すること、また Th1 細胞によるインターフェロン (IFN-) 産生を促進すること等を報告している。このことは、たんぱく質に結合した糖鎖ではなく、遊離型植物糖鎖がヒト細胞性免疫系に生理作用を及ぼすことを初めて示したものであり、植物性糖タンパク質糖鎖自身が潜在的な薬理活性を有する可能性を示唆するものであった¹⁾。

食物アレルギーの原因となるため、食品衛生法に基づき表示が義務付けられている豆類は大豆と落花生である。それらのアレルゲンたんぱく質には強力な植物複合型糖鎖が結合していることが知られているが、雑豆 (大豆および落花生以外の食用豆類) とアレルギーとの関連性は取りざたされていない。そこで申請者らは、機能性糖鎖をグリコドラッグ開発のリード化合物として利用することを目的として、アレルギー食材の範疇にはない雑豆に注目し、それらに含まれる糖たんぱく質に結合する糖鎖構造解析を開始し、有用な機能性糖鎖のスクリーニングを行った。その結果、いくつかの雑豆糖たんぱく質には、グリコドラッグ開発のリード化合物となりうる抗原性糖鎖 (Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2 (M3FX), Man3Xyl1GlcNAc2 (M3X)) や、マクロファージ・樹状細胞に対する活性化能を有するハイマンノース型糖鎖 (M5-M9) が存在することを見出した。また、雑豆糖たんぱく質に結合する糖鎖の存在量と構造特性は豆の種類によって大きく異なっており、下表に示すような特徴的な構造特性を示した。一連の研

究結果から、小豆、大納言およびとら豆はマクロファージや樹状細胞活性化能を有する構造均一性の高いハイマンノース型糖鎖を多量調製するための有用資源であり、大福豆と紫花豆は抗アレルギー糖鎖薬剤調製のために適した雑豆であることがわかった²⁾。

豆の名称	主要な糖鎖構造	糖鎖の存在量・構造特性
金時 うずら豆 大福豆 紫花豆	抗原性糖鎖 Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2	糖鎖存在量は多く、高い構造不均一性が見られたものの、いずれも Man9-5GlcNAc2 をほぼ均等に含んでいた。大福豆と紫花豆は 25~30% の抗原性糖鎖を含んでいた。
小豆 大納言 とら豆	ハイマンノース型 Man7-9GlcNAc2	糖鎖存在量は多く、構造均一性が高かった。含有率は、小豆は Man7GlcNAc2、大納言は Man8GlcNAc2、とら豆は Man9GlcNAc2 が多かった。
そら豆 えんどう 白なた豆 ひよこ豆 ささげ	糖鎖存在量は少なく、これまでに報告のない高分子構造糖鎖の存在量が多かった。	

1) Role of major oligosaccharides on Cryj1 in human immunoglobulin E and T cell responses. Okano M, Kimura Y, Kino K, Michigami Y, Sakamoto S, Sugata Y, Maeda M, Matsuda F, Kimura M, Ogawa T and Nishizaki K, *Clin. Exp. Allergy* 34: 770-778 (2004)

2) N-Glycans linked to glycoproteins in Japanese edible beans (Zatsuname): Natural resources for bioactive oligosaccharides. Kimura M, Hara T, Kimura Y, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(1)155-158 (2011)

2. 研究の目的

本研究では、雑豆の機能性食材としての価値について検討することを目的とし、以下の3つの実験を行った。

(1) 雑豆から調製したアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリカン) を食材ポリマーにカップリングさせたネオ糖ペプチドを作製し、それらの細胞性免疫活性 (T-細胞からのサイトカイン分泌制御活性) あるいは抗原提示細胞の活性化能を調べた。

(2) 雑豆に含まれる遊離型オリゴ糖の大量調製方法の確立と構造解析、およびそれらのプレバイオティクス検定を行った。

(3) 植物糖たんぱく質に結合する N-グリカンの構造特性については、多くの報告がなされているが、O-グリカンについての系統的な解析はほとんど行われていない。そこで、雑豆糖たんぱく質にはどのような構造の O-グリカンがどれくらいの割合 (%) で結合して

いるか調べた。

3. 研究の方法

(1) 小豆と手亡(白いんげん豆の一種)由来糖ペプチドと食材ポリマーからなるネオ糖ペプチドの合成と免疫活性検定：小豆と手亡の由来のアセトン脱脂粉末をアクチナーゼ消化した後、陽イオン交換(Dowex 50 x 2)、ConAアフィニティークロマト、順相 HPLC を組み合わせ、均一性の高い糖鎖構造を有する糖ペプチドの大量調製を行った。また、得られたペプチド画分を用い、免疫細胞の賦活化能をサイトカイン分泌を指標として測定した。次いで、調製した糖ペプチドをポリグルタミン酸に多価数カップリングさせたネオ糖ペプチドをつくり、それらの抗原提示細胞の活性化能に及ぼす影響を調べた。

(2) 雑豆に含まれる遊離型オリゴ糖の大量調製法の確立と構造解析、プレバイオティクス検定：3種類の雑豆(小豆、手亡、えんどう)のアセトン脱脂粉末のペプシン消化物に50%になるようにエタノールを加え、可溶性画分にオリゴ糖を回収した。その後、陽イオン交換(Dowex 50 x 2)、陰イオン交換(Dowex 1 x 8)、2種類のゲルろ過(Sephadex G-25, Biogel P-2)を組み合わせた方法でオリゴ糖画分を分離した。次に、各オリゴ糖画分の凍結乾燥物を0.1%含むMRS寒天培地で、ビフィズス菌(*Bifidobacterium longum*)や乳酸菌(*Lactococcus lactis*など)を最長48時間培養し、生菌数の変化や菌体増殖による培地の濁度(吸光度)上昇を指標として増殖促進活性を調べた。さらに、オリゴ糖画分の糖組成分析をABEE(4-アミノ安息香酸エチルエステル)ラベル法により行った。

(3) 雑豆糖たんぱく質に結合するO-グリカンの構造特性解析：小豆と手亡脱脂粉末をペプシンで消化後、50%エタノール沈殿、陽イオン交換(Dowex 50 x 2)および2種類のゲルろ過(Sephadex G-25, Biogel P-2)を組み合わせた手法により、糖ペプチド画分(高分子

と低分子画分)を分離した(小豆と手亡2種類ずつ合計4種類)。4種の糖ペプチド画分は、それぞれ0.1 M NaBH₄ / 0.05 M KOH(37 °C)中で30時間反応させ、O-グリカンを遊離させた。各反応液は直ちに酢酸で中和後、AG50-X8 column(H⁺)とBiogel P-2にかけてO-グリカン画分の分離・脱塩を行った。さらに、O-グリカン画分を凍結乾燥後、TLC分析(シリカゲル 60、n-ブタノール/酢酸/水(2/1/1)、ジフェニルアミン)に供して糖組成分析を行った。

4. 研究成果

(1) ハイマンノース型糖鎖を多く含む小豆と大納言からはMan7~9GlcNAc2を、大福豆と紫花豆からは抗原性糖鎖(Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2)を多く含む糖ペプチドを調製した。抗原性糖鎖含有糖ペプチドは、Th1型サイトカインであるIFN- γ 産生を低濃度では促進し、高濃度では抑制することがわかった。一方、Th2型サイトカインであるIL-4とIL-10産生は、低濃度では抑制し、高濃度では促進する結果となった。今回、糖ペプチド画分に含まれるどのような構造の糖鎖が免疫活性に関与しているかについては、明らかにすることができなかった。

得られた糖ペプチドとポリグルタミン酸(PGA)とのネオグリコポリマーの合成については、オリゴ糖鎖の還元末端をアミノ化することで、効率的なPGA-オリゴ糖鎖ポリマー合成法を確立することができた。さらに、PGA-オリゴ糖鎖ポリマーがヒト末梢血単核球上のCD80とCD86の発現を有意に抑制することを見出した。

(2) *Bifidobacterium longum*の生菌数変化を指標として解析を行った結果、図1に示すように、手亡のオリゴ糖画分にLactuloseをのぐ最も高いプレバイオティクス活性が認められ、小豆やえんどう由来のオリゴ糖にも高い増殖作用がみられた。また、乳酸菌の増殖作用については、乳酸菌の種類により各オ

オリゴ糖の資化性に大きな違いが認められた。

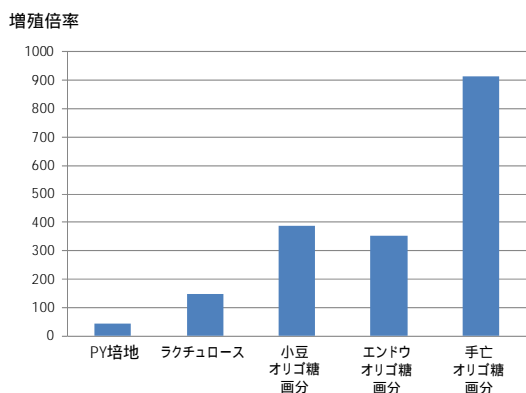


図1 嫌気培養法による *Bifidobacterium longum* の菌数変化
増殖倍率；0時間の生菌数に対する48時間後の生菌数の比、糖添加量；培地の0.1%

糖組成分析の結果から、小豆と手亡の陰イオン交換体非吸着画分にはアラビノースが最も多く含まれ、その他にガラクトース、マンノース、グルコース、N - アセチルグルコサミンが多く含まれていることがわかった。一方、陰イオン交換体吸着画分には、小豆と手亡ともにマンノースが最も多く、次いでアラビノース、N - アセチルグルコサミン、ガラクトースの順に多く含まれていた。

以上の結果から、小豆や手亡のオリゴ糖画分には、アラビナン、アラビノガラクトン、ガラクトン、ガラクトマンナン等の多糖類由来のオリゴ糖が含まれており、これらのオリゴ糖がビフィズス菌増殖活性に関わっている可能性があることがわかった。また、今回、最も高い活性を示した手亡由来のオリゴ糖画分にはフコースやキシロースの存在が認められたことから、植物種子に遍在する抗原性糖鎖 (N-グリカン) が腸内細菌の増殖に関わっている可能性が示唆された。

(3) 小豆と手亡に含まれる糖たんぱく質に結合する O-グリカンの分析結果から、手亡は糖ペプチドの低分子画分に、小豆では高分子画分に2~4糖程度の O-グリカンが多く結合していることが明らかになった。また、O-グリカンの含量(%)は、糖ペプチドの1~13%であった。

以上の一連の研究により、小豆や手亡などの雑豆には高い機能性を有する糖ペプチドやオリゴ糖が多く含まれており、機能性食料として有用な資源であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 7 件)

Maeda M, Takeda N, Kimura M, Kimura Y, Synthesis of a novel glycopolymer carrying multivalent plant antigenic N-glycans.

Glycoconjugate Journal, 32(5), 2015, 193, DOI: 10.1007/s10719-015-9596-4, 査読有

Maeda M, Tanaka T, Kimura M, Kimura Y, Large-scale preparation of glycopeptides harboring the TF-antigen unit from royal jelly. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78(2), 2014, 276-278, DOI:10.1080/09168451, 査読有

Maeda M, Takeda N, Mano A, Yamanishi M, Kimura M, Kimura Y, Large-scale preparation of Asn-glycopeptide carrying structurally homologous antigenic N-Glycan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol.77(6), 2013, 1269-1274, DOI:10.1271/bbb.130076, 査読有

Yoshie T, Maeda M, Kimura M, Uchida M, Hama Y, Kimura Y, Structural features of N-glycans of seaweed glycoproteins: Predominant occurrence of high-mannose type N-glycans in marine plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(10), 1996-1998, 2012, DOI: 10.1271/bbb.120463, 査読有

Kimura M, Hara T, Kimura Y, N-Glycans linked to glycoproteins in Japanese edible beans (Zatsu-mame): Natural resources for bioactive oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75(1), 2011, 155-158, DOI:10.1271/ bbb.100594, 査読有

Yoshiie T, Maeda M, Kimura M, Kimura Y, Structural features and Immunological

activity of N-glycans of seaweed glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* 28(5), 2011, 361, DOI:10.1007/s10719-011-9334-5, 査読有

Okamoto N, Maeda M, Kimura M, Kimura Y, Changes of substrate specificity of plant ENGase(Endo-Os) by site-directed mutagenesis. *Glycoconjugate Journal* 28(5), 2011, 306, DOI:10.1007/s10719-011-9334-5, 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

赤松美由紀、木村万里子、長澤治子、小豆および白いんげん豆に含まれるオリゴ糖の乳酸菌増殖活性とその構造解析、日本家政学会第 68 回大会、2016 年 5 月 29 日、金城学院大学(愛知県 名古屋市)

Kimura M, Nagasawa H, Hotta H, Iwata E, Akamatsu M, Structural features and biological activity of water-soluble free oligosaccharides obtained from edible beans. 12th Asian Congress of Nutrition, May 14-18, 2015, Pacifico Yokohama (Yokohama, Kanagawa)

Synthesis of a novel glycopolymer carrying multivalent plant antigenic N-glycans. Maeda M, Takeda N, Kimura M, Kimura Y, 23rd International Symposium of Glycoconjugate, September 15-20, 2015, Split, Croatia

Kimura M, Maeda M, Kimura Y, Structural features and biological activity of oligosaccharides linked to storage glycoproteins in edible beans. 26 International Carbohydrate Symposium July 22-27, 2012, Madrid, Spain

Yoshiie T, Maeda M, Kimura M, Kimura Y, Structural features and immunological activity of N-glycans of seaweed glycoproteins. XXI International Symposium on

Glycoconjugates, August 21-26, 2011, Vienna, Austria

Okamoto N, Maeda M, Kimura M, Kimura Y, Changes of substrate specificity of plant ENGase(Endo-Os) by site-directed mutagenesis. XXI International Symposium on Glycoconjugates, August 21-26, 2011, Vienna, Austria

〔図書〕(計 3 件)

木村万里子、土江節子、食事療法のための基本の生化学&栄養学「水溶性ビタミン」、糖尿病ケア 7月号、メディカ出版、2015、49-53

田地陽一、深津(佐々木)佳世子、木村万里子、他5名、栄養科学イラストレイテッド 基礎栄養学、羊土社、2012、38-67

田地陽一、深津(佐々木)佳世子、木村万里子、他5名、栄養科学イラストレイテッド 演習版 基礎栄養学ノート、羊土社、2012、34-61

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 万里子 (KIMURA, Mariko)
神戸女子大学・家政学部・准教授
研究者番号：00351932

(2) 研究協力者

長澤 治子 (NAGASAWA, Haruko)
神戸女子大学・家政学部・教授
研究者番号：50164413

前田 恵 (MAEDA, Megumi)
岡山大学・自然科学研究科・助教
研究者番号：20434988