

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：12201
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658107
 研究課題名（和文） イソチオシアネート熱分解物によるポリフェノールオキシダーゼ抑制と食品加工への応用
 研究課題名（英文） Polyphenol oxidase inhibition by heat-degraded isothiocyanate and their application to food processing
 研究代表者
 橋本 啓 (HASHIMOTO KEI)
 宇都宮大学・農学部・准教授
 研究者番号：10237935

研究成果の概要（和文）：アリルイソチオシアネート（AITC）には1割程度の弱いポリフェノールオキシダーゼ（PPO）抑制活性しか認められなかったが、AITC 溶液を加熱することにより PPO 抑制活性が発現した。また、ナスのアントシアニン系紫色素であるナスニンの PPO による損失を加熱処理 AITC は完全に抑制し、ナス皮からのナスニンの抽出量を約 2 倍にした。食品加工時に生じる規格外ナス中に含まれるアントシアニンの安定的かつ効率的な回収法につながると期待された。

研究成果の概要（英文）：Allyl isothiocyanate showed only weak inhibitory effect on polyphenol oxidase. However, heat-treated allyl isothiocyanate (hAITC) inhibited polyphenol oxidase. Application to the nasunin extraction from eggplant peels was investigated. During the extraction, nasunin was easily degraded by eggplant polyphenol oxidase. However, the amount of nasunin was approximately doubled by adding the hAITC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品化学

1. 研究開始当初の背景

ダイコンやキャベツなどのアブラナ科野菜は、調理加工により細胞が破壊されると、特有の成分であるグルコシノレートが酵素ミロシナーゼの作用によってイソチオシアネート（ITC）と呼ばれる辛味成分に変換される。ITC は、抗菌性ばかりではなく、近年では、変異原の代謝活性化にかかわる酵素の阻害、発がん物質を解毒する酵素の誘導、がん細胞のアポトーシス誘導などの機能が認められている。しかし、ITC は、水、アルコール、アミン、SH 化合物などと容易に反応してしまう不安定な化合物である。ワサビ風味の調味浅漬やのり佃煮などに、アミノ酸

とイソチオシアネートの付加反応生成物であるチオヒダントイン誘導体の存在を確認した（高橋朝歌、日本食品科学工学会誌、52、610-614、2005）などの報告はあるものの、食品中においてどのような分解生成物が、どの程度生じているのかほとんど解明されていない。

我々は、これまで、ITC の機能性に関する研究を進め、ITC が生体異物の代謝を抑制する酵素である β -グルクロニダーゼ、二糖類を分解し糖の消化吸収に関与する酵素である α -グルコシダーゼ、食品の褐変化に関与する酵素であるポリフェノールオキシダーゼ（PPO）などの酵素活性を抑制することを明

らかにしてきた。ITCによるこれらの酵素抑制活性は、加熱処理により容易に消失した。これは、ITCは水溶液中で容易に分解するという従来の知見と一致する結果であった。ところが、PPO抑制活性に関してはその挙動が異なった。すなわち、ITCによるPPO抑制はあまり強いものではなかったが、加熱処理することにより顕著なPPO抑制活性が認められる様になった。

そこで、本研究では、アリルイソチオシアネート(AITC)加熱分解物に含まれるPPO抑制物質を単離同定し、活性物質の生成条件を明らかにすることとした。これにより、ITCとは異なり熱安定な活性物質が得られ、その生成機構が明らかになるものと期待され、これは、従来はITCの失活ととらえられて来たITC含有食品の加熱調理の意義を明らかにし、新たな発想に基づく加工食品の開発にもつながるものであると期待された。

2. 研究の目的

アブラナ科野菜の辛味成分であるイソチオシアネート(ITC)は、機能性食品成分として期待を寄せられているが、揮発性が高く安定性が低いため調理過程において多くが失われてしまうと考えられ、またその強いフレーバーゆえ、利用困難な側面を持つ。本研究では、ITCは加熱分解によって従来期待されて来た機能性を失ってしまう一方で、例えば条件によってはPPO抑制活性が増強される、との予備的知見に基づき、活性物質を単離同定し、その生成機構を明らかにすることとした。また、ナスのアントシアニン色素であるナスニンがPPOにより容易に褐変してしまうが、本研究で取り扱うPPO抑制物質を抽出操作中に添加することで、PPOを抑制しひいてはナスニンを安定的に精製し、機能性食品色素としての利用性向上を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) AITCとその分解物の分析方法の検討

pH7の緩衝液にジメチルスルホキシド(DMSO)を用いてAITCを溶解した。これを100°Cで15分間加熱処理した。加熱処理によるAITCの消失や、分解物の生成を、ODSカラムを用いた逆相HPLCで分析した。

(2) PPO活性にAITCやその分解物が及ぼす影響

酵素としてマッシュルーム由来PPOを用い、基質として3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(DOPA)を用いた。(1)で調製したAITCやその分解物の溶液をアッセイ試料として用いた。試料に、PPOとDOPAを加え、生じたDOPAの酸化物を492nmにおける吸光度を測定することにより定量し、PPO活性を測定し、アッ

セイ試料がその活性に及ぼす影響を検討した。

(4) AITC熱分解物(hAITC)によるPPO阻害様式の解明

hAITCや酵素の濃度を変えてPPO抑制活性のアッセイを行い、測定結果をLineweaver-Burkプロットを用いた解析を行い、阻害の様式(競合的なものであるかなど)を検討した。

(5) 活性物質の単離同定

hAITCをSep-Pak C18に吸着させ、0、5、20、50、100%アセトニトリルで順次溶出した。各画分は凍結乾燥後PBに溶解してPPO抑制活性のアッセイに供した。活性画分については、C30カラムを用いた逆相HPLCにより分取した。

単離された活性成分は、凍結乾燥後、重水：重メタノール=1：1の溶液に溶解し、¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-EIMSなどの機器分析に供した。

(6) ナスニン皮からのナスニン抽出の際のナスニンの安定性にhAITCが及ぼす影響の検討

ナス果菜からピーラーを用いてナス皮を剥離し、得られたナス皮に4倍量(v/w)の0.1% hAITCを含む0.5%酢酸あるいは0.5%酢酸を加え、4°Cで一晩抽出した。抽出液はSep-Pak C18による固相抽出を行った後Develosil C30-UG-5を用いたHPLCによりナスニンを定量した。

4. 研究成果

(1) 加熱処理がAITCのPPO抑制活性に及ぼす影響の検討

AITCのPPO抑制活性を調べたところ、20μMでも約1割程度の弱い抑制活性しか認められなかった。そこで、AITC溶液をアルミブロックヒーターを用いて100°Cで加熱処理をし、加熱処理がAITCのPPO抑制活性に及ぼす影響を調べたところ、15分間まで経時的に抑制活性は約70%にまで上昇し、以降ほぼ一定の活性を保っていた。

処理温度がhAITCの活性に及ぼす影響を検討したところ、40°Cから100°Cまで、処理温度を上昇させるにつれ、PPO抑制活性も処理温度依存的に上昇した。

(2) hAITCによるPPO抑制活性の濃度依存性の検討

AITC溶液を100°C、15分間加熱処理することにより調製されたhAITCを用いて、hAITCのPPO抑制活性の濃度依存性を検討した。その結果、50μMまでの範囲で抑制活性は濃度依存的に上昇した。IC₅₀は約15μMであった。

(3) hAITC による PPO 抑制活性のカイネティクスの検討

10 μM および 20 μM hAITC についてさまざまな基質濃度 (DOPA 濃度) でアッセイを行い、得られた結果について Lineweaver-Burk プロットにより阻害様式を検討した。その結果、hAITC による PPO 阻害は混合型非拮抗阻害であると考えられた。

(4) PPO 抑制物質の単離同定

hAITC を Develosil C30-UG5 を用いた逆相 HPLC により分析したところ、AITC のピークは数%程度に低下していたことから、ほとんどの AITC は 100°C、15 分間の加熱処理により分解されていることが確認された。

そこで、hAITC を Sep-Pak C18 にアプライし、0~100%アセトニトリルで順次溶出し、各画分について PPO 抑制活性を調べた。その結果、抑制活性は、精製水あるいは 5%アセトニトリルで溶出される画分に認められた。そこで、それらの画分を HPLC により分画し分取し、さらに活性のピークの同定を薦めた。4 分に溶出するピーク 2 に PPO 抑制活性が認められた。

そこでピーク 2 を精製し $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HR-EIMS などの機器分析により構造の推定を進めた。その結果、部分構造として、 CH_2 、 CH_2 、 CH 、 $-\text{CH}_2-\text{X}-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $=\text{C}=\text{S}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}-\text{O}-$ を持つものと予想され、これまでのところ、活性物質は、4-(ヒドロキシメタン)-チアゾリジン-2-チオンであるものと推定されている。

(5) 野菜中の活性物質

キャベツには AITC が含まれている。そこでゆでキャベツ抽出物を調製し、逆相 HPLC を用いて同様に分析した結果、活性物質と溶出時間の一致するピークが認められたことから、hAITC は加熱調理した野菜にも存在するものと考えられた。

AITC 以外にも、ベンジル芥子油、フェニル芥子油など他の芥子油類も、AITC に比べその程度は弱いものの、加熱により PPO 抑制活性が発現した。以上の結果から、同様の活性物質が芥子油を特異成分とするアブラナ科野菜の調理加工食品に広く存在する事が期待された。

(6) ナス皮からのナスニン抽出における収量に hAITC が及ぼす影響の検討

ナスに含まれるアントシアニン系の色素であるナスニンは、特に水溶液中などで、非常に不安定で、しかもナスにも含まれている PPO による褐変も起こり、食品への応用が困難な色素である。そこでナスニンの PPO による損失に hAITC 処理が及ぼす影響を検

討した。ナスニンはナス皮から 0.5%酢酸を用いて抽出されるが、その際に、抽出液に 0.1% hAITC を添加したところ、ナスニンの抽出量が約 2 倍になった。一般に PPO 活性は酸性条件下ではかなり低下しているが、ナス皮からのナスニンの抽出は一晩かけて行うため、PPO 活性がわずかに残っているだけで、ナスニンの酸化が促進されているものと考えられた。マッシュルーム由来の PPO を用いたモデル実験ではあるが、hAITC は、0.5%酢酸条件下における PPO によるナスニンの低下をほぼ完全に抑制した。以上の結果から、hAITC は、ナス PPO を抑制し、ナスニンの酸化分解を抑制することで、ナスニンの抽出効率を大幅に上昇させることができたものと考えられた。本結果は、食品加工時に生じる規格外ナス中に含まれるアントシアニンの安定的かつ効率的な回収法にもつながり、さらには、各種加工食品への利用の促進が可能であると考えられた。

ITC は、がん予防効果など様々な機能性が期待されているが、その活性は、ITC の高い反応性、すなわちタンパク質の非特異的な修飾などによるものと推定されており、従って、この非特異性が、有用酵素の阻害などのネガティブな作用をもたらす恐れも指摘されている。本研究は、そのような非特異的な反応を既に起こし、これまでは機能性を失ってしまったものであると見なされていた反応生成物に新たな機能性を見いだしたものであると位置づけることができよう。

本研究で用いた AITC はワサビフレーバーとして様々な加工食品にすでに広く利用されている。さらに、がん予防などの機能性が期待されている。しかし、フレーバー成分として利用することで美味しい食品を加工していこうとする際にはその揮発性や不安定性のために最終製品やあるいは保存中にフレーバーを保つことが問題となる加工食品も多くある。一方で、がん予防効果などを期待して機能性を強化した食品を開発しようとなると、かえってその強い刺激の辛さがネックとなり、十分に機能性を発揮できると考えられる濃度にまで含量を上げることが難しくなっている。本研究では、ITC の水存在化での加熱分解物を利用することで、このような、不安定性や強すぎる刺激といった短所を補いつつ新しい機能性を付加した、食品の開発に寄与するものと期待される。

PPO は野菜や果物の褐変化にも関与しその品質の劣化をもたらしている。ナスニンを始めとするアントシアニン系の色素はクロロフィルの緑色以外をほとんどカバーできるほどその色調が豊富であるが、非常に不安定で、ほとんどの野菜に存在している PPO による褐変化も起こり、食品への応用がしにくい

場合もある。本研究で見いだされた PPO 抑制物質をアントシアニン抽出の際に用いる手法により、各種アントシアニン色素の食品への利用性向上が進むばかりではなく、食品加工時に生じる廃棄物や、規格外の野菜に含まれるアントシアニンの安定的かつ効率的な回収法にもつながるものと期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ①橋本 啓、萩原めぐみ、渋江佳子、宇田 靖、
イソチオシアネート熱分解物によるポリフェノールオキシダーゼ活性の抑制、日本食品科学工学会、2012 年 8 月 31 日、藤女子大学
- ②橋本 啓、萩原めぐみ、渋江佳子、宇田 靖、
イソチオシアネート熱分解物によるポリフェノールオキシダーゼ活性の抑制、日本農芸化学会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 啓 (HASHIMOTO KEI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：1 0 2 3 7 9 3 5

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし