

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K02383

研究課題名(和文) 野菜・果実類に存在する新規水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の探索と機能性解析

研究課題名(英文) Functional characterization of novel carotenoids-protein complex with aqueous properties found in vegetables and fruits

研究代表者

安藤 清一 (ANDO, Seiichi)

神戸女子大学・家政学部・教授

研究者番号：80131986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本来脂溶性であるカロテノイドの一部がウンシュウミカン、マスクメロン、カキ、ピワ、ニンジン、パプリカ果肉では水溶性に可溶化される現象を見いだした。本研究課題の素材として最適と判断したパプリカ果肉を生理的食塩水(pH7.4)中でホモジナイズし、遠心分離、硫酸アンモニウム塩析、ゲル濾過に供し、着色した水溶性画分を得た。本着色画分を遠心濃縮し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果、未染色状態で分子量10,000ダルトン付近に着色したバンドを確認することができた。したがって、パプリカ果肉中の脂溶性カロテノイドの一部はタンパク質と複合体を形成し、水溶性に可溶化されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、本来脂溶性であるカロテノイドの一部が、野菜や果実類では特異的タンパク質との相互作用によって水溶性に可溶化される実体を食品化学的に明らかにしたものであり、カロテノイドは脂溶性色素であるという従来の固定概念とは異なる、新たな学術的成果を提示することができた。

今後、脂溶性カロテノイドを水溶性に可溶化する特異的タンパク質の構造や機能の詳細な解析を通じて、野菜や果実類における水溶性化されるカロテノイドの機能性を食品生化学的に明らかにすること、さらに本特異的タンパク質には機能性食品素材としての新たな可能性を期待させる。

研究成果の概要(英文)：Some carotenoids, which are fat-soluble by nature, were found to be soluble in water in the pulp of satsuma mandarin, muskmelon, persimmon, loquat, carrot, and bell pepper. The pulp of the yellowish and reddish bell pepper cultivars was homogenized in 4 vol. of 12mM phosphate buffer (pH7.4) containing 137mM sodium chloride and centrifuged at 20,000xg for 30 min. at 5 °C to obtain the supernatant containing carotenoids. The supernatant was subjected to ammonium sulfate precipitation at 90% saturation and PD-10 desalting column to isolate a colored soluble fraction in 0.1% SDS solution. The colored soluble fraction was concentrated using a Vivaspin Turbo15 with MWCO of 10,000 daltons by centrifuging at 4,000xg for 60 min at 5 °C and subjected to SDS-PAGE, which revealed a colored band around molecular mass of 10,000 daltons in the unstained state. Some fat-soluble carotenoids in the pulp of bell pepper cultivars were thus associated with a specific protein to form a water-soluble complex.

研究分野：食品科学

キーワード：カロテノイド 特異的タンパク質 水溶性 電気泳動 果実類 野菜類

1. 研究開始当初の背景

人々の食生活に及ぼす色の影響は非常に大きく、一般に橙色系の食品は食欲を増進させ、青色系は食欲を減退させる色であることが指摘されている。自然界を彩る色素の一つとしてカロテノイドがあり、身近な例として果実や野菜の黄・橙・赤色、卵黄の黄色、サケの切り身やイクラの赤橙色、加熱したエビ体表の赤色などをあげることができる。カロテノイドは炭化水素系のカロテンと含酸素系のキサントフィルに大別でき、アセトンなどの有機溶媒に可溶性脂溶性色素である(高市:カロテノイド-その多様性と生理活性-, 裳華房 2006)。

普段の食生活において、ヒトはさまざまな植物性食品や動物性食品からカロテノイドを摂取し、血液中には炭化水素系カロテンであるリコペン、 β -カロテン、 α -カロテン、含酸素系キサントフィルであるルテイン、ゼアキサントフェン、 β -クリプトキサントフェンの主要カロテノイド6種が検出される。脂溶性という性質を反映して、これらのカロテノイドは血液中では脂質とタンパク質の複合体であるリポタンパク質によって可溶化され、存在している(Oshima 他: Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2306-2309 (1996))。

動物試験や栄養疫学調査によって、カロテノイドはさまざまな生体調節機能をもつことが明らかとなっている。ニンジンやトマトなどに含まれる β -カロテンやリコペンには、一重項酸素消去活性の他、発がんプロモーション抑制作用、動脈硬化予防作用、抗アレルギー作用、老化遅延作用が報告されている(稲熊:緑黄色野菜に含まれるカロテノイドの役割、*FFI ジャーナル* **212**, 564-570 (2007))。ウンシュウミカンに高濃度に含まれる β -クリプトキサントフェンは、骨粗鬆症や2型糖尿病などの生活習慣病の発症リスク低下に有効であることも指摘されている(杉浦:国産カンキツ類に多い β -クリプトキサントフェンと機能性食品の開発、*化学と生物* **55**, 566-572 (2017))。

一般に、カロテノイドのような脂溶性成分を摂取する場合、食材を油脂で調理することによって体内吸収が良くなると言われている。脂溶性であるカロテノイドの可溶化には油脂が必須となるが、ニンジンやウンシュウミカンのような野菜や果実類の脂質量は0.5%以下であり、きわめて少ない。また、ニンジンやトマト、ミカンなどの食材を圧搾して調製したビン詰め果汁を放置すると、濃く着色した果肉沈殿物の他に、薄く着色した上澄みを見ることができる(図1)。果肉沈殿物の濃い着色は、可溶化していないカロテノイドに由来すると考えられるが、薄く着色した上澄みでは脂溶性であるカロテノイドがどのように水溶性に可溶化されているか、食品化学的にきわめて興味深い課題を提供する。

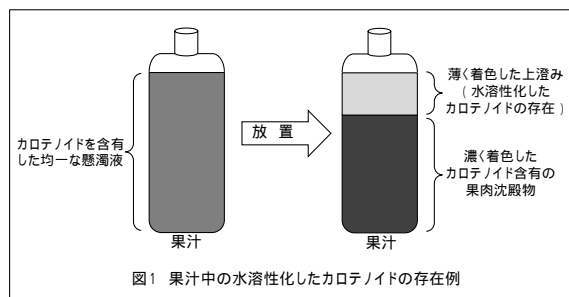


図1 果汁中の水溶性化したカロテノイドの存在例

ニンジンやトマト、ウンシュウミカンのような野菜や果実類において、カロテノイドを水溶性に可溶化させる因子を食品化学的に解明することは、カロテノイドの機能や利用について新たな可能性を期待させ、本研究課題の科学的な核心である。

2. 研究の目的

ニンジンやトマト、ウンシュウミカンのような野菜や果実類では脂質量が少ないこと、またこれら食品の果汁の上澄みが薄く着色していることに注目し、本研究では、本来脂溶性であるカロテノイドを水溶性に可溶化させる因子を食品化学的に解明することを目的とする。

一般に、光合成植物の葉緑体チラコイド膜にはカロテノイドとクロロフィルを含むアンテナ色素タンパク質複合体が存在し、カロテノイドが捕集した光エネルギーを効率的にクロロフィルに移し、生命維持に必要なエネルギーを生産する(高市:カロテノイド-その多様性と生理活性-, 裳華房 2006)。すなわち、ニンジンやトマト、ウンシュウミカンのような野菜や果実類においても、特異的タンパク質との結合によって、本来脂溶性であるカロテノイドが水溶性に可溶化される可能性を指摘することができる。また、果実類の糖質含量は10%程度と比較的高く、糖質との相互作用によって水溶性化したカロテノイドが形成される可能性、さらには水中油滴型乳化を形成する可能性等、本来脂溶性であるカロテノイドを水溶性に可溶化させる因子を挙げることができる。本研究は、水溶性に可溶化されるカロテノイドの存在およびその形成因子を特異的タンパク質との関連性から解明するものであり、カロテノイドは脂溶性色素であるという従来の固定概念とは異なる、新たな学術的成果を見いだすことが期待できる。

ニンジンやトマト、ウンシュウミカンのような野菜や果実類を対象として、水溶性に可溶化されるカロテノイドの存在およびその形成因子を食品化学的に解明するために、本研究では(1)ニンジンやトマト、ウンシュウミカンのような野菜や果実類を対象として、水溶性に可溶化されるカロテノイドの調製方法の確立、(2)水溶性に可溶化されるカロテノイドの形成に関わる因子、(3)カロテノイドを水溶性に可溶化する特異的タンパク質の単離と性状について検討した。

3. 研究の方法

(1) 植物性食品果肉に存在する水溶性に可溶化されるカロテノイドの調製と定量

植物性食品における水溶性カロテノイドの存在を明らかにするために、ウンシュウミカン *Citrus unshiu*、マスクメロン *Cucumis melo*、カキ *Diospyros kaki*、ビワ *Eriobotrya japonica*、ニンジン *Daucus carota* subsp. *sativus*、パプリカ *Capsicum annuum* L. 'grossum' 果肉から、水溶性溶媒（蒸留水、0.9%食塩水、5%ショ糖溶液、0.137M NaCl 含有リン酸緩衝液(pH7.4)）によるカロテノイドの抽出を行った。すなわち、果肉重量の4倍量の各種水溶性溶媒中でホモジナイズし、遠心分離(20,000xg、30分、5℃)によって上清画分と沈殿画分に分離した。

遠心分離前の果肉ホモジネートおよび遠心分離後の上清画分に適量のアセトンを加え、カロテノイドを抽出した。カロテノイド抽出液に *n*-ヘキサン、次いで蒸留水を加え、*n*-ヘキサン層と含水アセトン層に分離後、カロテノイドを含む *n*-ヘキサン層を回収した。ロータリーエバポレーターで *n*-ヘキサンを留去後、カロテノイドをアセトンで可溶化し、350~600nm における吸収スペクトルを測定した。1%カロテノイド溶液の吸光係数を 2,200 と仮定し、極大波長における吸光度からカロテノイド量を計算で求めた。

(2) パプリカ果肉中の水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の単離

-カロテンおよびカプサンチンをそれぞれ多く含有する黄色および赤色のパプリカ果肉を、4倍量の 0.137M NaCl 含有リン酸緩衝液(pH7.4)中でホモジナイズし、遠心分離(20,000xg、30分、5℃)を行い、カロテノイドの存在によって着色した上清画分を得た。これら上清画分を飽和度90%の硫酸アンモニウムで塩析・濃縮後、Thermo Scientific 製 Slide-A-Lyzer G2 透析カセット(分画分子量 10,000)を用いて 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液中で透析した。透析後、0.1%SDS 溶液 25mL で GE Healthcare 製 PD-10 脱塩カラム(排除ベット容量 8.3mL、分別分子量領域 5,000)を平衡化後、着色した試料溶液 2.5mL をカラムに添加し、0.1%SDS 溶液 3.5mL で着色した高分子量画分を溶出した。PD-10 脱塩カラムによるゲル濾過を 10 回繰り返し、水溶性カロテノイド-タンパク質複合体 35mL を集めた。

(3) 限外濾過膜を用いた水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の遠心濃縮

ゲル濾過カラムによる溶出画分 24mL を Sartorius 製 Vivaspin Turbo15 (分画分子量 10,000) に供し、遠心分離(4,000xg、60分、5℃)によって濃縮し、200~600nm における吸収スペクトル、タンパク質量およびカロテノイド量を測定した。タンパク質量は、富士フイルム和光純薬製プロテインアッセイ BCA キットで測定した。

(4) 水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

遠心濃縮した水溶性カロテノイド-タンパク質複合体(タンパク質量として 10 µg 程度)を、Bio-Rad 製ミニプロティアン TGX ブレキャストゲル(ゲル濃度 12%)に供し、100V 定電圧で 70 分間の電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを染色せずに肉眼で着色バンドの移動状況を観察し、さらにクマシーブリリアントブルーR-250 でゲルを染色した。

4. 研究成果

(1) 植物性食品果肉におけるカロテノイドの分布

水溶性溶媒でウンシュウミカン、マスクメロン、カキ、ビワ、ニンジン、パプリカ果肉のホモジネートをそれぞれ調製し、遠心分離によって上清画分を得た。遠心分離前のホモジネートと上清画分のカロテノイド量を測定した結果を表 1 に示す。マスクメロン青色系を除き、果肉 100g 中のカロテノイド量は 1mg を超え、ニンジン赤色系では 13mg 以上であった。マスクメロン青色系を含め、すべての果肉の上清画分にはカロテノイドが存在したが、水溶性に可溶化したカロテノイドの割合は、マスクメロン赤色系で 36~69%、パプリカで 28~55%と高いことが明らかとなった。

植物性食品	ホモジネート全体 (mg)	上清画分 (mg)	水溶性に可溶化したカロテノイドの割合 (%)
ニンジン	黄色系 2.74~4.94	0.331~0.669	9.10~18.2
	赤色系 13.1~17.6	1.08~1.42	6.12~9.52
パプリカ	黄色系 1.90~5.64	1.02~3.10	53.8~54.9
	赤色系 8.28~8.86	2.28~4.64	27.5~52.3
マスクメロン	青色系 0.146~0.220	0.0456~0.0722	31.2~32.8
	赤色系 2.66~3.47	0.958~2.16	36.1~69.1
カキ	1.29	0.253	19.6
ビワ	2.07	0.172	8.31
ウンシュウミカン	3.36~4.70	0.143~0.322	3.81~8.25

他方、ニンジン、カキ、ビワ、ウンシュウミカンの果肉では、水溶性に可溶化したカロテノイドの割合は 20%以下の値であった。水溶性に可溶化されるカロテノイド量の多いパプリカ果肉を用いて、水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の単離を行った。

(2) パプリカ果肉中の水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の単離過程におけるタンパク質の分布

パプリカ果肉ホモジネートを遠心分離した結果、上清画分には黄色系で 2.2~2.5%、赤色系で 2.9~3.2%のタンパク質が可溶化された。分離した上清画分に硫酸アンモニウムを添加して飽和度 90%に調整し、一晩、低温室で攪拌後、遠心分離(20,000xg、30分、5℃)した結果、無色透

明の上清画分と着色した沈殿画分を得た。飽和度 90%の硫酸アンモニウム処理によって、可溶性タンパク質の 90%以上が上清画分に回収除去され、水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の濃縮にきわめて有効な操作であることが判明した。

次いで、この着色した沈殿画分を 0.1%SDS 溶液で可溶化し、0.1%SDS 溶液中で透析後、PD-10 脱塩カラムによるゲル濾過に供した結果、77%以上の着色タンパク質が 0.1%SDS 溶液で溶出された(表 2)。

パプリカ果肉	20,000×g	90%硫酸アンモニウム		PD-10脱塩カラム
	上清画分	上清画分	沈殿画分	溶出画分
黄色系	2202~2548	2050~2302	152~246	117~229
赤色系	2862~3161	2669~2933	193~228	135~187

(3) 限外濾過膜による水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の遠心濃縮および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PD-10 脱塩カラム溶出画分を分画分子量 10,000 の限外濾過膜を用いた遠心濃縮により、黄色系で 10.7~12.6 倍、赤色系で 6.2~10.6 倍程度に濃縮することができた。両濃縮物を 0.1%SDS 溶液で希釈後、200~600nm における吸収スペクトルを測定した結果、黄色系では 382~479nm に 5 個の極大吸収、赤色系では 478nm に 1 個の極大吸収を確認した(図 2)。水溶性カロテノイド-タンパク質複合体におけるカロテノイド量とタンパク質量の測定結果から、タンパク質 1mg 当たりのカロテノイド量は、黄色系で 0.00422~0.0130mg、赤色系で 0.0389~0.0694mg となり、黄色系に比べて、赤色系ではカロテノイドの割合が高い複合体を形成することが示された。

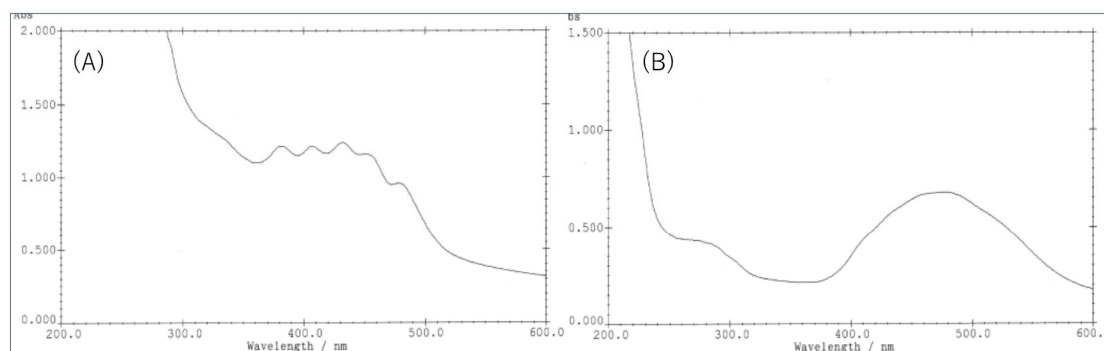


図 2 パプリカ果肉から調製した水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の吸収スペクトル (0.1% SDS 溶液) (A) 黄色系、タンパク質濃度 0.42mg/mL, (B) 赤色系、タンパク質濃度 0.075mg/mL.

遠心濃縮した水溶性カロテノイド-タンパク質複合体(タンパク質量として 10 μg 程度)を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、電気泳動終了後、分子量 10,000 ダルトン付近と濃縮ゲルの上端に着色したバンドを肉眼で確認した(図 3)。また、電気泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー-R-250 で染色した結果、分子量 10,000 ダルトン付近にバンドを確認した。濃縮ゲルの上端の着色については十分な解析ができなかったが、少なくとも分子量 10,000 ダルトン付近のタンパク質が水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の形成に関与していることが示唆された。

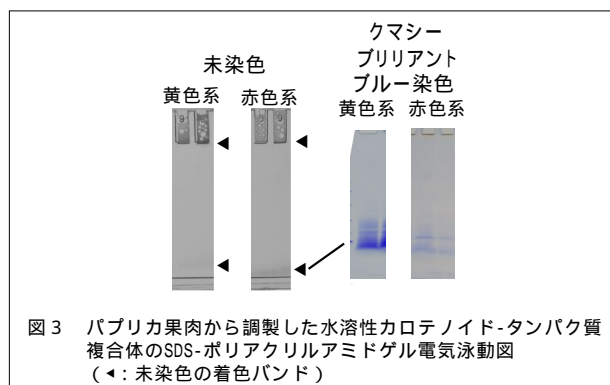


図 3 パプリカ果肉から調製した水溶性カロテノイド-タンパク質複合体の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (◀: 未染色の着色バンド)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------