

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15783

研究課題名(和文) -オリザノールの活用増進に向けた生体における吸収代謝・植物での生合成経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the in vivo absorption and metabolism of g-oryzanol (OZ) and the biosynthetic pathway of OZ in plants

研究代表者

伊藤 隼哉 (Junya, Ito)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：50781647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：-オリザノール(OZ)の生体における吸収代謝や植物での生合成経路の解明に向け、(1)OZの活性本体の解明を目指した生体における吸収代謝機構の解明、(2)-大麦に存在するトリテルペンアルコール(TTA)型OZ分子種の構造決定と分布の評価、(2)-米や大麦におけるOZの生合成経路の解明、これらの課題に取り組んだ。(1)を通じ、OZは分子種毎に体内での吸収代謝や存在形態が異なることを明らかにした。(2)-により、従来米のみに存在すると考えられていたTTA型OZやが種々の大麦品種に存在すること、(2)-により、生合成経路の推定に有用なカフェ酸を骨格に有するOZ様化合物の存在を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究には、質量分析をはじめとした高度な分析技術によるOZやOZの代謝物・前駆体の詳細な解析が必須であり、申請者はこれまでにこのような解析手法の構築や活用に重点的に取り組んできた。これらの独創的な研究によって、優れた機能性を有するOZの吸収代謝や活性本体、作用機序の理解を真に深めるとともに、世界的にも不明な米や大麦等における生合成経路の解明を目指す。これらの成果は、OZを通じた健康実現の基盤創造へ繋がり、その社会的意義と波及性は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the in vivo absorption and metabolism of -oryzanol (OZ) and the biosynthetic pathway of OZ in plants, we conducted (1) elucidation of the absorption and metabolism of OZ in vivo aiming at clarifying the active form/metabolite of OZ, (2)-(1) structural determination and evaluation of the distribution of triterpene alcohol (TTA)-type OZ molecular species in barley, and (2)-(2) elucidation of the biosynthetic pathway of OZ in rice and barley. From (1), we identified that the absorption and metabolism of OZ differ among OZ molecular species, hence different OZ molecular species existed in vivo in different forms. In (2)-(1), we revealed that TTA-type OZ, previously considered to exist only in rice, also existed in various barley varieties. In (2)-(2), we demonstrated the existence of OZ-like compounds that possess caffeic acid as a backbone, which were useful to estimate the biosynthetic pathway of OZ.

研究分野：食品機能学

キーワード：-オリザノール 吸収代謝 生合成 LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

機能性成分の研究を進める上で、生体内における機能性成分の吸収と代謝機構の理解は極めて重要である。そのため、申請者は、質量分析をはじめとした種々の分析技術を基盤に、高感度・高選択的な分析手法を開発し、機能性成分の吸収と代謝機構を評価するとともにその活性本体が何であるのかを理解することを研究戦略とし、米に特徴的に含まれ、抗酸化をはじめとした様々な機能性を有す γ -オリザノール (OZ) の機能性や吸収代謝機構を検証してきた。OZ の機能性研究に取り組む中で、質量分析を用いて OZ を分子種レベルで解析できる高感度・高選択的な分析法を構築し、OZ を摂取させたマウスの血液や臓器を解析した。その結果、従来「OZ は摂取された後に体内ですみやかにフェルラ酸 (FA) へと分解される」と考えられてきたにもかかわらず、OZ が顕著に検出された。同時に、「OZ の示す機能性は分解物である FA によるものである」とする学説に対し、申請者は「OZ そのものも機能性を示す」のではないかと考えるに至った。さらに、同分析法を用いて種々の食品を解析する中で、米にのみ含まれると考えられていたトリテルペンアルコール (TTA) 型 OZ (詳細は後述) である 24MCA-FA が大麦にも存在する可能性を見出した。この発見は、大麦における OZ の生合成経路やその制御を解き明かすカギになるのではないかと考えた。

本研究の成果は、OZ の代謝特性や生合成経路を明確にすることで、生体においてはその健康機能に関する新たな知見をもたらし、疾病予防に役立つ。供給源となる植物体では米や大麦をはじめとした食品の新機能発見に繋がり、その存在意義をも明らかにできることから、社会的意義と波及性は極めて大きい。

2. 研究の目的

上述のように、OZ の吸収代謝に関しては、摂取後に体内ですみやかに FA へと分解されると考えられてきた。この従来の学説に対し、応募者は最近、マウスにおいて OZ がそのままの形で体内に吸収され、一部はそのままの形で血中や臓器中に存在することを見出した。本研究では、OZ の機能性に関わる活性本体が OZ であるのか、あるいは、OZ の分解物や代謝物であるのか、を明らかにするために、これまでに明らかとなっていない OZ 分子種ごとの吸収代謝に着目し、

(1) OZ の活性本体の解明を目指した生体における吸収代謝機構の解明、に取り組んだ。

他方、化学構造の観点から、OZ は FA のエステル縮合物であり「トリテルペンアルコール (TTA) 型 OZ」と、「植物ステロール (PS) 型 OZ」に大別される (図 1)。OZ は米の他に種々の穀類に含まれているが、その分子種ごとの分布は特徴的であり、TTA 型 OZ は米に特有の分子種と考えられていた。その中で、上述の吸収代謝機構の検証において、米を与えていないマウスの血中にも TTA 型 OZ が存在するという非常に興味深い知見を得た。申請者はこの発見から、「米以外にも TTA 型 OZ を含む食品 (穀類) が存在するのではないかと」という仮説を持ち、大麦に TTA 型 OZ が存在する可能性を見出した。そこで、大麦における TTA 型 OZ の存在やいまだ未解明の OZ の生合成経路の解明を目的とし、(2) -①大麦に存在する TTA 型 OZ 分子種の構造決定と分布の評価、(2) -②米や大麦における OZ の生合成経路の解明、これらに取り組んだ。

これらの解明・実現に向けて、申請者がこれまでに取り組んできた質量分析を駆使した化合物の詳細な解析技術を基盤にし、OZ の生体における吸収代謝や活性本体、米や大麦といった植物体における OZ の生合成経路の解明を目的に本研究を実施する。

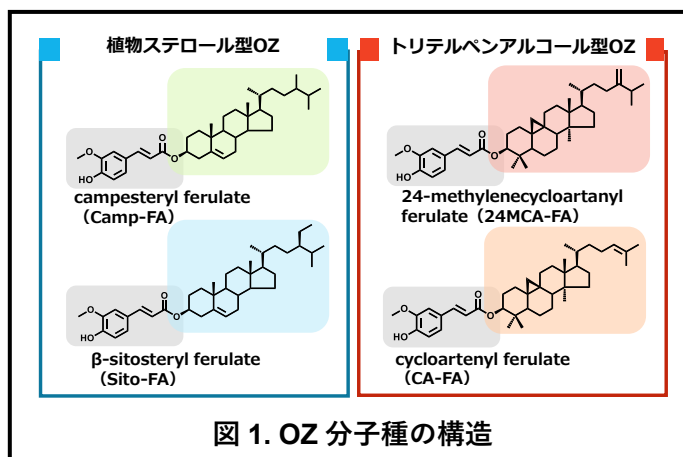


図 1. OZ 分子種の構造

3. 研究の方法

(1) OZ の活性本体の解明を目指した生体における吸収代謝機構の解明

米糠に含まれる主要な OZ 分子種 (TTA 型 OZ: 24-methylenecycloartanyl ferulate (24MCA-FA)、cycloartenyl ferulate (CA-FA)、PS 型 OZ: campesteryl ferulate (Camp-FA)、 β -sitosteryl ferulate (Sito-FA)) に着目し、分子種ごとの吸収代謝を評価した。24MCA-FA は米糠から単離し、CA-FA は市販品を用いた。Camp-FA および Sito-FA は、FA のフェノール性水酸基をシリル保護した後に campesterol および β -sitosterol と縮合、シリル基の脱保護を経て合成した。SD ラット (雄性、12

週齢)に各 OZ 分子種を単回投与 (300 $\mu\text{mol/kg}$ B.W.) し、経時的に尾静脈から採血して LC-MS/MS に供した。続いて、消化酵素としてパンクレアチンとコレステロールエステラーゼを用い、その分解作用を OZ 分子種毎に *in vitro* で評価した。

(2) -①大麦に存在する TTA 型 OZ 分子種の構造決定と分布の評価

大麦糠からヘキサンで脂質を抽出し、得られた脂質を固相抽出と HPLC により精製し、24MCAFA 様画分を調製した。調製した画分を高解能 MS による HPLC-MS/MS と各種 NMR データ、X 線構造解析によって構造を推定した。

(2) -②米や大麦における OZ の生合成経路の解明

(2) -①に取り組む中で、大麦糠のヘキサン抽出物に OZ 様の新規ピーク (OZ-X) を確認した。本化合物の解析が OZ の生合成経路の解明の一助となることを着想し、固相抽出と HPLC による精製により OZ-X 画分を調製した。調製した画分を高解能 MS による HPLC-MS/MS と各種 NMR データによって構造を推定した。

4. 研究成果

(1) OZ の活性本体の解明を目指した生体における吸収代謝機構の解明

各投与群のいずれの血漿中からも OZ がそのままの形で検出され、投与後 6-9 時間まで経時的に増加した。対照的に、血漿中の FA (および FA 代謝物) は、TTA 型 OZ (24MCA-FA および CA-FA) 投与群ではほとんど増加しない一方で、PS 型 OZ (Camp-FA および Sito-FA) 投与群では投与後 1-6 時間まで経時的に増加した。*in vitro* 試験では、PS 型 OZ である Camp-FA と Sito-FA でのみ消化酵素による分解が確認された。即ち、OZ は分子種毎に体内での存在形態が異なることが明らかになり (図 2)、その理由として消化酵素との感受性に違いがあることが考えられた。本研究により、OZ は分子種毎 (PS 型 OZ と TTA 型 OZ) で体内の存在形態が全く異なり、生理機能発現機構が異なることが示唆された。

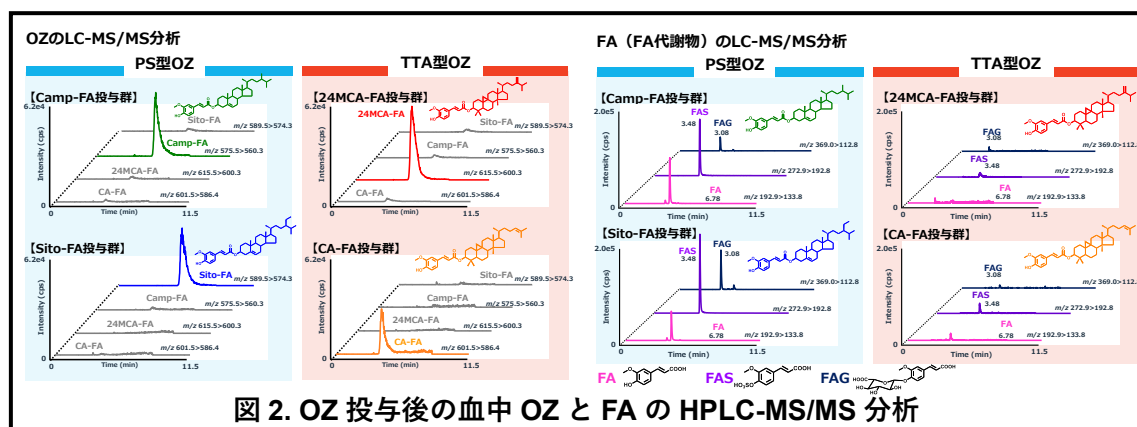


図 2. OZ 投与後の血中 OZ と FA の HPLC-MS/MS 分析

(2) -①大麦に存在する TTA 型 OZ 分子種の構造決定と分布の評価

大麦糠から得られた 24MCAFA 様画分は、HPLC-MS/MS 分析において標品の 24MCA-FA と同様の溶出時間と同じフラグメントイオンを示すピークが検出され、NMR と X 線構造解析のデータからも 24MCA-FA であることが確認された。さらに様々な品種の大麦について解析を実施し、本研究で測定したすべてのサンプルに 24MCA-FA が含まれていること、さらに糠部分に多くの 24MCA-FA が含まれていることを明らかにした (図 3)。本研究により、米以外の食品 (大麦) における TTA 型 OZ の存在を明らかにした。

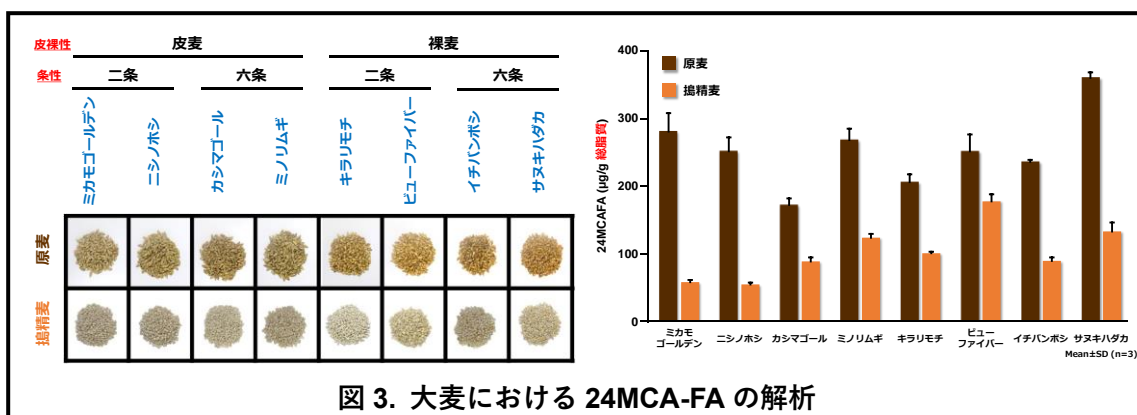
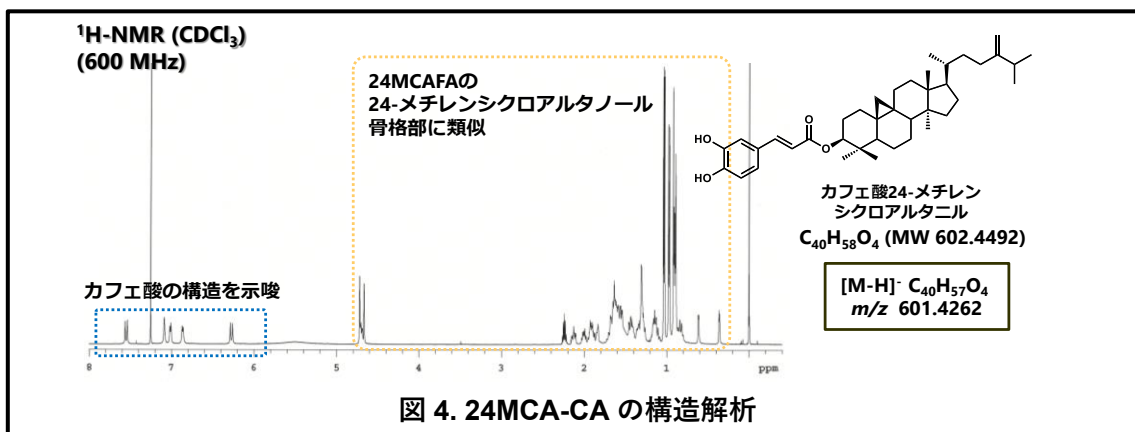


図 3. 大麦における 24MCA-FA の解析

(2) -②米や大麦における OZ の生合成経路の解明

大麦糠から得られた OZ-X 画分は、高分解能 MS にて脱プロトン分子イオンの m/z 601.4262 が検出され、分子式は $C_{40}H_{58}O_4$ と推定された。さらに、 1H NMR、 ^{13}C NMR、HSQC、HMBC の各種スペクトルと NOE 相関の解析により、本化合物はカフェ酸と 24-メチレンシクロアルタノールのエステル縮合物であり、TTA を骨格内に有する化合物 (24MCA-CA) の存在が明らかとなった (図 4)。本化合物は、上述の種々の大麦サンプルからも検出され、米からも検出されることを確認した。植物体におけるカフェ酸とこれまでに 24MCA-CA についての存在はほとんど知られておらず、米や大麦以外で OZ である 24MCA-FA が検出されない一方で、同じ 24-メチレンシクロアルタノール骨格を有する 24MCA-CA が検出されたことは、生合成経路の推定に重要であると考えられる。さらに現在は、OZ の前駆体と考えられる PS や TTA の分析法を構築し、生合成経路のさらなる解明に取り組んでいる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kokumai Takumi, Ito Junya, Kobayashi Eri, Shimizu Naoki, Hashimoto Hiroyuki, Eitsuka Takahiro, Miyazawa Teruo, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparison of Blood Profiles of -Oryzanol and Ferulic Acid in Rats after Oral Intake of - Oryzanol	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1174 ~ 1174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11051174	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 -

1. 著者名 Ito Junya, Sawada Kazue, Ogura Yusuke, Xinyi Fan, Rahmania Halida, Mohri Tomoyo, Kohyama Noriko, Kwon Eunsang, Eitsuka Takahiro, Hashimoto Hiroyuki, Kuwahara Shigefumi, Miyazawa Teruo, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Definitive evidence of the presence of 24-methylenecycloartanyl ferulate and 24- methylenecycloartanyl caffeate in barley	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12572 ~ 12572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48985-6	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤隼哉, 國米匠, 橋本博之, 永塚貴弘, 宮澤陽夫, 仲川清隆
2. 発表標題 ラットにおける -オリザノールの吸収と代謝
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junya Ito, Eri Kobayashi, Naoki Shimizu, Takumi Kokumai, Shunji Kato, Kazue Sawada, Hiroyuki Hashimoto, Takahiro Eitsuka, Teruo Miyazawa, Kiyotaka Nakagawa
2. 発表標題 Evaluation of -Oryzanol Accumulation and Lipid Metabolism of Mouse Following A Long-Term Administration of -Oryzanol
3. 学会等名 Asian Congress of Nutrition 2019 (ACN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤隼哉, 澤田一恵, 仲川清隆
2. 発表標題 大麦における米特有 -オリザノール分子種の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林雪子, 伊藤隼哉, 國米匠, 前田鋭, 橋本博之, 仲川清隆
2. 発表標題 -オリザノールは分子種によって生体での吸収代謝が異なるのか
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤隼哉, 國米匠, 林雪子, 橋本博之, 仲川清隆
2. 発表標題 -オリザノールおよびフェルラ酸の吸収代謝の評価
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林雪子, 伊藤隼哉, 國米匠, 前田鋭, 橋本博之, 仲川清隆
2. 発表標題 -オリザノールの血漿中での存在形態は分子種により異なるのか
3. 学会等名 日本油化学会第59回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤隼哉, 永塚貴弘, 仲川清隆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 100
3. 書名 アグリバイオ	

〔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
---------	---------