

機関番号 : 43601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21700745

研究課題名 (和文) チオヒダントインの機能性と構造の関連及び調理・加工への応用に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Structure and function of thiohydantoin derived from isothiocyanates and amino acids, and application to food processing

研究代表者

高橋 朝歌 (TAKAHASHI ASAKA)

長野県短期大学・生活科学科・助手

研究者番号 : 90290113

研究成果の概要 (和文) :

本研究は、食品成分であるチオヒダントインの機能性と化学構造との関連、調理加工への応用をふまえたチオヒダントインの安定性を解明することを目的とした。チオヒダントインは、薬物代謝酵素活性阻害、リパーゼ活性阻害、血圧降下作用を有し、アミノ酸の側鎖構造に由来する部分構造により活性に違いがあることが明らかになった。また、アミノ酸の側鎖構造に由来する部分構造が同じであるとき、イソチオシアナート由来の部分構造の疎水性が活性の強さに影響を与えることが示された。各種 pH 条件下での安定性を検討した結果、チオヒダントインは pH3~5 の酸性領域において安定であることが示された。

研究成果の概要 (英文) :

3,5-Disubstituted 2-thiohydantoin, which were prepared by the reaction of allyl isothiocyanate(AITC), 3-butenyl isothiocyanate(3BITC), and 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(MTBITC) with various amino acids, were assayed for their inhibitory effect on the cytochrome P450 1A (CYP1A) activity, pancreatic lipase activity, and angiotensin I converting enzyme activity. Among the forty-three 3,5-disubstituted 2-thiohydantoin, those derived from the aromatic amino acids (Phe, Tyr and Trp) and relatively hydrophobic aliphatic amino acids (Val, Leu, Ile, and Met) showed a dose-dependent inhibition of CYP1A activity. Some thiohydantoin inhibited the pancreatic lipase activity. It was found that the inhibitory effect on the CYP1A activity and the pancreatic lipase activity of the 3,5-disubstituted 2-thiohydantoin depend on their substituents at the 3 and/or 5 positions. Only ATH-His prepared from AITC and L-histidine inhibited the angiotensin I converting enzyme activity among the forty-three 3,5-disubstituted 2-thiohydantoin. A study of the effect of pH on the stability showed that 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoin were more stable in the acidic pH when compared with a basic pH.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野 : 食品化学

科研費の分科・細目 : 生活科学・食生活学

キーワード : チオヒダントイン, 生理活性, 食品加工

1. 研究開始当初の背景

ダイコン, キャベツ, ワサビなどのアブラ

ナ科野菜は、日本国内での生産量・消費量の面から主要な野菜であるが、これらに特有の成分であるグルコシノレートは、細胞が破壊されると酵素ミロシナーゼの作用によってイソチオシアナートと呼ばれる辛味成分に変換される。イソチオシアナートの持つ独特の辛味フレーバーは古くから人々の食生活の中に取り入れられてきたが、近年抗菌性や発がん抑制効果などの様々な生理機能を持つことが明らかになり、従来のフレーバー物質としての利用に加え、機能性成分としての利用が注目されている。

一方、イソチオシアナートは分子内に-NCS 基を持っており、この炭素原子が強い求電子性を有するという特徴から、化学的にきわめて反応性が高く、水やアルコール、アミン、SH 化合物などと容易に反応して付加化合物を形成する物質であることも知られている。このような化学的特性から、多様な成分が共存する食品を実際に調理・加工する際にはイソチオシアナートが様々な反応を起こしていることが推測される。研究代表者は、人が実際にイソチオシアナートを摂取する段階を考えたときには、イソチオシアナート自身の機能性だけでなく、他の食品成分との相互反応を含めてその生理活性を明らかにすることが重要であると考え、イソチオシアナートの食品成分との反応性に着目した研究を行ってきた。そして、ダイコンイソチオシアナートの水存在下における分解反応生成物の構造と反応機構の解析を行い、イソチオシアナートだけでなくその分解生成物にも抗菌性や抗変異原性があることを見出した。

この検討を踏まえ、現在はイソチオシアナートとアミノ酸との反応性に焦点をあてて、反応生成物であるチオヒダントインの構造解析と生理活性の検討を行っている。これまでの研究で明らかになったことは以下の通りである。

- ①イソチオシアナートはアミノ酸の共存下においてチオヒダントインに変換され、この変換反応は弱酸性から中性領域でも起こること (Takahashi et al., *J. Agric. Food Chem.*, 1998)。
- ②アリルイソチオシアナート (ワサビやカラシの主辛味成分) が香料として添加されている加工食品中にチオヒダントインが生成すること (高橋ら, 食科工, 2005)
- ③チオヒダントインは、肉や魚などの加熱食品中に生成するヘテロサイクリックアミンやニトロ化合物の変異原性を強く抑制すること (Takahashi et al., *Environ. Mutagen Res.*, 2004), また、その作用機構は変異原の代謝活性化の抑制、究極変異原の不活化の 2 つによるものであること (Takahashi et al., *Food*

Chem. Toxicol., 2005)。

④抗変異原性の強さや作用機構は、アミノ酸の側鎖に由来する部分の構造により異なること。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、現在はチオヒダントインの抗変異原性以外の生理活性についても検討中である。イソチオシアナートは多くの生理的機能を有する反面、比較的低濃度で細胞毒性を示し、化学的に不安定という問題もある。これまでの検討で、チオヒダントインは、温和な条件下でアミノ酸との反応により生成することに加え、毒性もなく、抗変異原性を示すことから有用な食用成分であることが明らかになった。本研究は、これまでに得た知見をもとに、チオヒダントインの機能性を化学構造の面から明らかにすることに加え、調理・加工への応用をふまえた各種条件下での安定性を解明することを目的とした。これらの知見は、チオヒダントインの食品成分としての有用性を明らかにするうえで重要であるだけでなく、生体機能性成分であるイソチオシアナートの食品中あるいは生体内における動態解析にとっても意義あるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)チオヒダントインの調製

食品に含まれるイソチオシアナートとして、アリルイソチオシアナート(AITC)、ダイコンの主辛味成分である 4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアナート (MTBITC)、ノゾワナやカブに多く含まれる 3-ブテニルイソチオシアナート (3BITC) を用い、既報に従ってアミノ酸と反応させチオヒダントインを調製した。得られたチオヒダントインは、HPLC-MS, IR, NMR 分析などの機器分析を行い、構造を確認した。

(2)CYP1A 活性に対する影響

96 穴ディープウェルプレートに、0.1M リン酸カリウムバッファー 440 μL , エトキシレゾルフィン溶液 1 μL , チオヒダントイン溶液 5 μL , ラット肝ホモジネート上清画分 (S9) 4 μL (S9 タンパクとして 150 μg) を混合して 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間予備反応を行ったところに NADPH 溶液 50 μL を加えて反応を開始した。この反応溶液における DMSO の最終濃度は 1.2%, 各試薬の最終の濃度は ER が 0.2~2.5 μM , チオヒダントインが 0~250 μM , NADPH が 0.5 mM となるようにした。37 $^{\circ}\text{C}$ で 8 分間反応後、冷メタノール 750 μL を加えて反応を停止させ、プレートを遠沈した (3000 \times g, 10 分)。上清を 96 穴黒色マイクロプレートに移し、蛍光分析した (Ex. 535 nm, Em. 590 nm)。

(3) 腓リパーゼ活性阻害

96 穴マイクロプレートに、0.25 mM 4-methylumbelliferyl oleate (基質) 100 μ L, チオヒダントイン溶液 2 μ L, 50 U/mL リパーゼ (ブタ膵臓由来) 100 μ L を混合し、37°C で 30 分反応させた。クエン酸ナトリウムバッファを加えて反応を停止した後、蛍光分析した (Ex. 365 nm, Em. 450 nm)。

(4) アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性試験

96 穴マイクロプレートに、チオヒダントイン溶液 2 μ L, 50 mU/mL ACE (ウサギ肺由来) 50 μ L, Tris-HCl 50 μ L を混合し、37°C で 5 分予備反応後、2.5 mM N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly (FAPGG, 基質) 100 μ L を加えて混合し、マイクロプレートリーダーで 345 nm の吸光度変化を測定した。

また、上記の反応液を反応開始後 30, 60 分に冷メタノール 50 μ L を加えて反応を停止し、以下の条件で HPLC 分析に供した。

装置: Agilent 1100 システム (Agilent Technologies)

カラム: Mightysil RP-18 (ϕ 3 \times 150 mm, 関東化学)

移動相: アセトニトリル/酢酸アンモニウムバッファ (25 mM, pH 5.85)

グラジエント条件: アセトニトリル濃度 0 ~ 1 分 15%, 1 ~ 15 分で 60% まで上昇, 15 ~ 17 分 60% で保持

流速: 0.5 ml/min

カラム温度: 40 °C

検出波長: 305 nm

(5) 各種 pH 条件下におけるチオヒダントインの安定性

この試験では、ATH-Gly, ATH-Val, ATH-Phe, ATH-Lys, ATH-Glu を用いた。DMSO に溶解したチオヒダントイン (0.1 mg/mL) 100 μ L と pH 3~9 に調整した 0.1 M リン酸バッファ 1.9 mL を混合し、4 °C で 0~240 時間静置し、経時的に一部を取って HPLC 分析で残存量を測定した。

装置: 日立 L-7110

カラム: Mightysil RP-18 (ϕ 3 \times 150 mm, 関東化学)

移動相: アセトニトリル/10 mM リン酸 (1 : 1)

流速: 0.8 ml/min

カラム温度: 40 °C

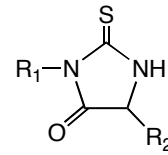
検出波長: 270 nm

4. 研究成果

(1) チオヒダントインの調製

AITC, 3BITC, MTBITC と各種アミノ酸から調製したチオヒダントイン (ATH, 3BTH, MTBTH, 構造を下に示した) は機器分析で構

造を確認した。



R₁: イソチオシアナートの側鎖構造 (ATH は CH₂=CHCH₂-, 3BTH は CH₂=CHCH₂CH₂-, MTBTH は CH₃SCH=CHCH₂CH₂-)

R₂: アミノ酸の側鎖構造 (Gly なら -H, Ala なら -CH₃ など)

以下のチオヒダントインをそれぞれの試験に用いた。

ATH-Asp, ATH-Glu, ATH-Asn, ATH-Gln,

ATH-Gly, ATH-Ala, ATH-Val, ATH-Leu,

ATH-Ile, ATH-Met, ATH-Phe, ATH-Tyr,

ATH-Trp, ATH-His, ATH-Arg, ATH-Lys,

ATH-Thr, ATH-Ser, ATH-Pro

3BTH-Asp, 3BTH-Glu, 3BTH-Asn, 3BTH-Gln,

3BTH-Gly, 3BTH-Ala, 3BTH-Val, 3BTH-Leu,

3BTH-Ile, 3BTH-Met, 3BTH-Phe, 3BTH-Tyr,

3BTH-Trp

MTBTH-Asp, MTBTH-Glu, MTBTH-Gly,

MTBTH-Ala, MTBTH-Ile, MTBTH-Tyr,

MTBTH-Met, MTBTH-Val, MTBTH-Leu,

MTBTH-Phe, MTBTH-Trp,

(2) CYP1A 活性に対する影響

これまでの研究で、チオヒダントインの抗変異原性作用機構が変異原の代謝活性化酵素 (CYP1A) の阻害であることが明らかになっていることから、この酵素反応に特異的な基質であるエトキシレゾルフィンを用いて検討した。試験した 19 種の ATH-a.a のうち、Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Met, His, Pro, Ser 由来の ATH に濃度依存性の阻害活性が認められた。これらのチオヒダントインは、終濃度 250 μ M において、チオヒダントインを含まないコントロールの活性を 23~82% 阻害した。特に、ATH-Trp, ATH-Ser はそれぞれコントロールの活性の 78, 82% を阻害した。Asp, Glu, Asn, Gln, Gly, Lys, Arg, Thr 由来の ATH には阻害作用が認められなかった。

3BTH-a.a (13 種) および MTBTH-a.a (11 種) についても試験を行ったが、ATH-a.a と同様 Tyr, Met, Ile, Val, Leu, Phe, Trp 由来のチオヒダントインに濃度依存的な阻害活性が認められ、Asp, Glu, Asn, Gln 由来のチオヒダントインには活性が見られなかった。Gly と Ala は、MTBTH のみ阻害活性を示し、ATH および 3BTH は阻害活性を示さなかった。ATH-a.a の終濃度 250 μ M における阻害活性の強さは、Pro, Tyr < Met, Val < His, Leu < Phe, Ile < Trp, Ser で、3BTH-a.a と MTBTH-a.a においても Tyr < Met, Ile < Val < Leu < Phe, Trp となった。

これらの結果から、CYP1A の阻害活性はアミノ酸の側鎖構造に由来する R₂の違いにより異なっており、脂肪族あるいは芳香族アミノ酸に由来する R₂を持つチオヒダントインに阻害活性が見られ、酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸に由来するチオヒダントインは阻害活性を持たないことが示された。また、阻害活性を示したチオヒダントインについて、R₂が同じであるとき、その活性の強さは ATH-a.a<3BTH-a.a<MTBTH-a.a となり、イソチオシアナートの側鎖構造に由来する R₁の疎水性が酵素阻害活性に影響することが示された。

(3) 腸リパーゼ活性阻害

ATH-a.a 19 種、3BTH-a.a 13 種および MTBTH-a.a 11 種について検討した結果、チオヒダントインはリパーゼ阻害活性を示した。特に MTBTH-Leu, MTBTH-Phe, MTBTH-Trp に強い阻害活性が認められ、IC₅₀ 値はそれぞれ、121, 124.5, 125.7 μM であった。チオヒダントインの終濃度 250 μM での活性を比較すると、アミノ酸の側鎖構造に由来する R₂が同じであるとき、阻害の強さは ATH-a.a<3BTH-a.a<MTBTH-a.a となり、イソチオシアナートに由来する部分構造 (R₁) の疎水性が活性に影響していることが示唆された。チオヒダントインの HPLC 分析およびオクタノールを用いる分配係数試験から得られた疎水性パラメータと比較すると、チオヒダントイン分子全体の疎水性と阻害活性との間に明確な相関は見られなかった。

(4) アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性試験

この試験で用いた基質である FAPGG は、ACE により FAP に変換されるが、いずれも 345 nm 付近に吸収を持つため、マイクロプレートリーダーで吸光度変化を観察する方法では結果の分かりづらいものがあった。そこで HPLC により FAPGG を分析し、ACE 阻害活性を検討した。ATH, 3BTH, MTBTH の試験を改めて行った結果、ATH-His のみが ACE 阻害活性を示した。チオヒダントインを含まないコントロールにおいて FAPGG の変換が約 40% 起きたのに比較して、ATH-His は終濃度 250 μM において FAP への変換が 7% となり、ACE を阻害することが示された。同時に試験した典型的な ACE 阻害剤であるカプトプリルは、終濃度 5 nM において FAP への変換率が 2% であった。その他のチオヒダントインは、コントロールの変換率と同程度またはそれ以上に FAP への変換が起きており、ACE 阻害活性は認められなかった。

(5) 各種 pH 条件下におけるチオヒダントインの安定性

DMSO に溶解したチオヒダントインの各種 pH の緩衝液中における安定性を検討した。5 種類の ATH を用いて継時的に HPLC 分析で残存率を測定した結果、時間経過とともに ATH の残存率は低下したが、ATH-Gly, ATH-Val, ATH-Phe は pH 3~5 の酸性領域において 240 時間後でも 90% 以上の残存率を示した。pH 6~9 は酸性領域に比べると残存率が低下したが、この領域でも 240 時間後の残存率は 70~90% であった。ATH-Glu は pH 3~5 では 240 時間後でも 70~90% 残存していたが、pH 6~9 では pH の増大とともに残存率も低下し、pH 6~8 では 240 時間後の残存率は 17~33%、pH 9 では 192 時間後に残存率が 0 となった。ATH-Lys はいずれの pH 領域においても 240 時間後の残存率は 70~90% であった。

これらの結果から、チオヒダントインはアミノ酸の側鎖構造に由来する R₂により残存率に違いが見られるものの、pH 3~5 の酸性領域において安定していることが明らかになった。イソチオシアナートに由来する R₁のちがいは安定性の比較、各種温度条件下での安定性の解明は今後の課題として残された。

以上、本研究において、チオヒダントインの機能性と化学構造との関連、ならびに各種 pH におけるチオヒダントインの安定性について明らかになった。これらの知見は、チオヒダントインの食品成分としての有用性を示すとともに、生体機能性成分であるイソチオシアナートの食品中あるいは生体内における動態解析にとっても意義あるものと考えられる。また、チオヒダントインが酸性領域で安定であることは、食品の調理や加工への応用を考える上で重要な知見であると考えられる。

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 1 件)

- ① Takahashi, A., Matsuoka, H., Watanabe, E., Shinagawa, A., Ozawa, Y., Yamada, Y., and Uda, Y., Quantitative analysis of yellow pigment in Takuan-zuke and their ABTS radical cation scavenging activity., *Food Sci. Tech. Res.*, 15 (3), pp337-342 (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 内山洋平, 塩野絵美, 松本久美子, 小宮千香子, 関口昭博, 木村紀久, 高橋仁恵, 高橋朝歌, 松岡寛樹, 乾燥ストレス下におけるダイコン品質成分の消長, 日本食品科学工学会第 57 回大会 (東京都)
- ② 山田剛史, 斎藤美香, 堀江卓矢, 木村紀之, 高橋仁恵, 高橋朝歌, 松岡寛樹, 塩蔵ダイ

コンの黄色色素発現と光退色技術に関する研究, 日本食品科学工学会第 57 回大会
(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 朝歌 (TAKAHASHI ASAKA)
長野県短期大学・生活科学科・助手
研究者番号: 90290113

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

松岡 寛樹 (MATSUOKA HIROKI)
高崎健康福祉大・教授
研究者番号: 20299837