

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05444

研究課題名（和文）クロロフィル分解酵素によるフィトール生成とフィトール特異的な保健機能の解析

研究課題名（英文）Chlorophyllase-catalyzed phytol production during preparation of smoothie and phytol-specific health function

研究代表者

奈良井 朝子（Asako, Narai-Kanayama）

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：00339475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生鮮野菜・果物中のクロロフィル脱フィチル酵素（CLH, PPH）がスムージー加工工程で葉物類のクロロフィルに作用し、フィトールを増加させる可能性について検証を試みた。食材から抽出した粗酵素を用いた解析により、既往の知見と異なる酵素学的性質をもつCLH, PPHの存在を見出したが、葉物野菜との単純混合スムージー調製中にこれらの酵素とクロロフィルの反応によって生成するフィトール量は、動物実験等で生理作用を発揮する程度には到達しないことを明らかにした。また、運動後の動物への経口単回投与試験において、フィトールとその代謝産物であるフィタン酸はスポーツ栄養学的に異なる生理活性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロロフィルの脱フィチル化反応で生成するフィトールについて、有用ならびに有害な生理活性が報告されているにも関わらず、これまで当該反応を触媒する酵素が食品加工工程で働く反応に注目した研究がなかった。本研究は、植物生理学の既往研究で報告されている酵素と異なる性質をもつクロロフィル脱フィチル酵素の存在を一部の青果物に見出した。さらに、当該青果物と葉物野菜で単純混合スムージーを調製しても、生理活性を発揮する量のフィトールは生成しないことを明らかにし、学術的・社会的にも新しい知見を提供するに至った。

研究成果の概要（英文）：This study verified the action of chlorophyll- or pheophytin-dephytylating enzymes from fruits and vegetables during the smoothie preparation. Crude enzymes extracted from the fruits and vegetables, in which a certain amount of phytol was detected, showed chlorophyll-dephytylating activities. The enzymes working under mild acidic conditions were found to exist in some fruits. When such fruits and leafy vegetables were mixed with a blender and the resulting juice was incubated, phytol slightly increased and its content did not reach the level reported to show biological activities in animal studies. In addition, effects of single oral administration of phytol or phytanic acid on exercise-induced glycogen supercompensation in mouse skeletal muscle were investigated. Phytol and phytanic acid showed different results, that is, the former caused glycogen supercompensation, but the latter did not.

研究分野：食品科学、食品生化学

キーワード：phytol phytanic acid chlorophyllase pheophytinase smoothie

## 1. 研究開始当初の背景

近年、新鮮な野菜・果物を生のまま摩砕するスムージー加工とスムージー摂取による健康効果が注目されている。スムージー加工では食材由来の酵素が関わる様々な反応が起こりうるため、我々はこれまであまり注目されることがなかったクロロフィル分解酵素の反応と、その生成物であるフィトールに着目した。

クロロフィルは、植物葉で起こる光合成で光化学反応の集光と電子伝達の駆動を担う色素で、緑色植物に豊富に含まれている。ポルフィリン骨格中心に配位している Mg イオンは酸性条件では脱離し (フェオフィチン化)、植物に内在するクロロフィル分解酵素であるクロロフィラーゼ (chlorophyllase: CLH) またはフェオフィチナーゼ (pheophytinase: PPH) によるフィチル基の脱離 (=フィトール生成) を経てクロロフィリドまたはフェオフォルビドといった分子種へ変換される (図1) [Lafeuille et al. J. Agric. Food Chem. (2014) 62:1926-1935]。

人類が長年、経口摂取してきた葉物野菜などに由来するクロロフィルとその誘導体は、ヒトの健康に対して抗酸化性、抗変異原性を示す有益な成分と考えられているが、経口摂取したクロロフィルとその誘導体の生体吸収量は極めて少なく、クロロフィル由来の保健機能に関する分子メカニズムは解明されていない。消化管内における生化学的変化や生体吸収性・利用性の全容は未だ明らかではなく [Viera et al. Mol. Nutr. Food Res. (2018) 62:1800562]、食物由来のクロロフィルの殆どは胃酸によってフェオフィチン化するが、フェオフィチンは腸からほとんど吸収されない [Ferruzzi et al. J. Agric. Food Chem. (2001) 49:2082-2089; Motta et al. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. (2007) 8:426-432]。腸管上皮において、薬剤排出トランスポーター ABCG2 の発現・機能が正常でない場合は、クロロフィリドやフェオフォルビドが過剰に吸収され、これが光過敏症の発症原因と考えられているが、消化管内でフィトールを生成する脱フィチル活性を示す酵素は見出されていない [Gandul-Rojas et al. J. Agric. Food Chem. (2009) 57:5306-5314]。

一方で、CLH や PPH によってクロロフィルやフェオフィチンから遊離したフィトールは、吸収後に肝臓で代謝されて生じるフィタン酸 (図2) とともに転写因子 PPAR $\alpha$  のリガンドとして肝臓および褐色脂肪組織を中心に脂質異化を促進することがわかっている [An et al. Mol. Nutr. Food Res. (2018) 62:1700688]。また、マウスにフィトールを単回経口投与した直後には、膵臓からのインシュリン分泌促進ならびに AMPK シグナルや PI-3K/AKT 活性化を介した骨格筋におけるグルコース取込増加が惹起される [Matsuda et al. Food Nutr. Curr. Res. (2018) 1:29-37]。これらの知見は、野菜・果物に期待される保健効果のうち抗肥満、抗糖尿病作用の一端をフィトールが担っている可能性を示すものである。

しかし、野菜・果物だけでなくそれらの加工品に含まれるフィトール含量に関する情報は極めて少ない。欧州に多い遺伝性疾患のレフサム病患者 (代謝異常により血中フィタン酸濃度が上昇し、網膜色素変性症や末梢神経障害などが起こる) にとって好ましくない成分として、フィトールならびにフィタン酸を定量した報告はあるが、乳製品、動物・魚の油脂・肉製品に含まれるフィタン酸量が多い (～数百 mg/100 g 食品) のに対し、フィトールは限られた測定品目 (一部の野菜類を含む) のうち、ドライフルーツやドライペッパー、茶葉に微量含まれるという情報しかなかった [Brown et al. J. Human Nutr. Diet. (1993) 6:295-305]。さらに、CLH, PPH については、植物葉の老化に伴う緑色色素の分解 (退色現象) に関する植物生理学的な研究報告は多いものの、食品加工・調理の分野でその反応がもたらす影響を詳細に調べた例がない。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、野菜・果物中の CLH, PPH について食品科学的な視点で酵素学的性質を追究し、そこで得られた知見を基にフィトール富化スムージーの調製について検証する。これと並行して、経口摂取したフィトールならびにその代謝産物のフィタン酸の生体に及ぼす影響、特にスポーツ栄養の観点から運動後の筋肉における糖・脂質代謝系への影響を比較することを目的とした。すなわち、

- ① 野菜・果物、その加工品に含まれるフィトール量の測定
- ② クロロフィル分解酵素活性が高い食材のスクリーニングと酵素学的性質の解析

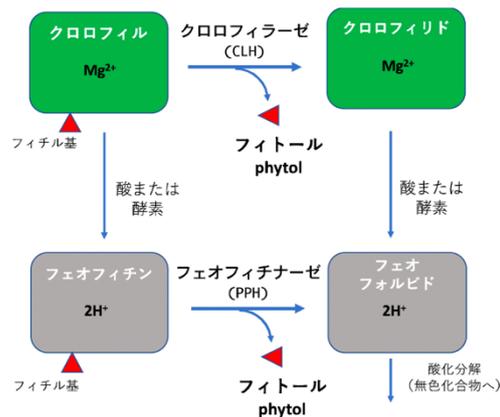


図1 クロロフィル分解に関わる酵素

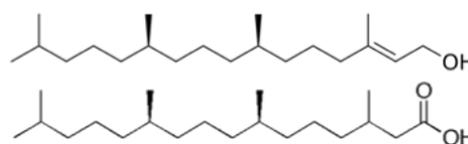


図2 フィトール (上) とフィタン酸 (下)

- ③ フィトール生成量を増やす食材の組み合わせやスムージー加工条件の検討そして、
- ④ フィトールとその代謝産物であるフィタン酸の生理活性の比較を実施した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 食材

ホウレンソウの葉、トマトの果肉、グリーンキウイの果肉、レモン、ネーブルオレンジ、グレープフルーツ（白、赤）、温州ミカン（果皮と果肉を材料とし、スーパーで市販されているものを当日または前日に購入して使用した。また、加工飲料として、スムージー加工を強調している市販製品2種、トマトのみを原料とした市販ジュース1種、複数種類の野菜を混合した市販ジュース7種を用いた。

#### 2) フィトール量測定

乳鉢の中で、食材10または15gをアセトン（10または15mL）にて磨砕し、これにアセトンの1/5量のヘキサンを混合し、遠心分離後のヘキサン相を回収した。残渣にヘキサンを加えてヘキサン相を回収することを2回繰り返す、ヘキサン相はまとめて減圧乾固した。ホウレンソウの葉については、最初のアセトンによる磨砕工程で、CLHによるクロロフィル分解が促進されることが懸念されたため、クロロホルム-メタノール（2:1）混液による脂溶性成分の抽出をおこなった。乾固後の試料はアセトン（1または2mL）で再溶解し、HPLCによるフィトール分析に供した。標品のフィトールの分析で作成した検量線を用いて定量をおこなった。

#### 3) 食材からの粗酵素抽出とCLH, PPH活性の測定

ホウレンソウ、グリーンキウイは冷えた蒸留水、柑橘系果実の果肉には1% Triton X-100を加えた冷えた蒸留水を加えてミキサーで磨砕し、ガーゼ濾過をおこなった。濾液を冷却遠心分離して得た上清を脱脂綿濾過し、これに65%飽和濃度の硫酸アンモニウムを溶かして一晩低温に静置した。塩析した粗タンパク質を冷却遠心分離で沈殿させ、これを少量の蒸留水に懸濁した濃縮液を酵素活性測定に用いた。反応pHを調整するためのクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液、粗酵素溶液、Triton X-100（最終濃度0.5%）を混合して氷冷したところへ、クロロフィルaまたはフェオフィチンaのアセトン溶液（5mg/mL）を1/9量添加し、所定温度にて酵素反応をおこなった。反応液は等量のアセトンを添加して氷冷後、フィトールを速やかにヘキサンに抽出し、HPLCによるフィトール分析に供した。

#### 4) 動物実験

全ての動物実験は日本獣医生命科学大学の規則に則って実施した。

6週齢ICR雄マウスを1週間環境順化させた後、非運動（baseline群）、運動直後（0分）群、グルコース4mg/g BW投与（Cont）群、グルコース+フィトール0.20mg/g BWまたはフィタン酸0.21mg/g BW投与（PhyまたはPA）群とし、Cont群、Phy群、PA群に運動後の回復時間60分、120分群を追加した群に群分けをした（n=5,6）。全群に3日間のトレッドミル走行運動（25m/分、10分）を練習させ、4日目に4時間絶食後、baseline群の組織（肝臓、前脛骨筋、腓腹筋）を摘出するとともに心臓採血をした。それ以外の群には、トレッドミル走行運動（25m/分、90分）をさせ、0分群は終了直後に、Cont群、Phy群、PA群は、それぞれの投与液を経口投与後に、回復時間経過ごとに3種混合麻酔下にて組織および血液を得た。その後、フェノール硫酸法を用いて、組織中のグリコーゲン量を測定した。また、キットを用いて血糖値および血中遊離脂肪酸（NEFA）値を測定した。測定値は、群ごとにスミルノフ・グラブス検定をおこない棄却判定した。その後、複数群間の比較は多重検定、2群間比較はt検定をおこない、1%および5%以下の危険率で有意差を判定した。

### 4. 研究成果

本研究では、2. 研究の目的で示した①～④について以下の成果を得ることができた。

- ① フィトールは、ホウレンソウ葉に0.4~1.5 mg/100 g FW、グリーンキウイ果肉に0.2~0.5 mg/100 g FW含まれ、トマト果肉は不検出であった。柑橘系果実は果皮と果肉に分けて分析したところ、果肉で検出できたのはレモン（0.4 mg/100 g FW、n=3の平均値）とグレープフルーツ（白と赤：0.18と0.03 mg/100 g FW、それぞれn=3の平均値）で、果皮はレモンにのみ検出され、果肉より高値を示した（59.9 mg/100 g FW、n=3の平均値）。市販の野菜・果物の加工飲料は時期を変えて3回購入し、フィトールの抽出・分析をおこなった。各試料で3回の分析値に大きなばらつきが見られ、測定試料全体では不検出から0.45 mg/100 mLまでフィトール量に幅があった。トマトを主原料とするジュースでは少なく、野菜と果物を混合したジュースには、フィトールが0.2 mg/100 mL以上含まれるものが複数認められた。青果物を原料とする市販飲料は、原料の磨砕処理前または処理中に殺菌や抽出効率向上を目的とした加熱によりクロロフィル分解酵素が失活し、また、調製時の加水で希釈が起こることから、フィトール濃度の著増が起こりにくいと考えられた。
- ② フィトールが検出されたホウレンソウ葉、グリーンキウイ果肉にはクロロフィル分解酵素が存在すると予想し、硫酸塩析法で粗タンパク質を抽出し、これを粗酵素としてクロロフィル

a またはフェオフィチン a と反応させ、遊離するフィトール量を HPLC 分析することで CLH, PPH の活性を測定した。レモン果皮由来の CLH について既往の研究報告はあるが [Azoulay Shemer et al., Plant Physiol. (2008)148:108-118]、食用・酵素源として実用的に十分な量が見込めないことから、本研究では果肉の方から粗酵素を抽出した。

pH 3 から 8 で調べた CLH 活性について、ホウレンソウとグリーンキウイは中性から弱アルカリ性で高い活性を示した。レモンの至適 pH は 4 から 5 で、同様の pH 域で PPH 活性が著しく高かった。食品加工の現場において、弱アルカリ性になる原料は少なく、さらに、これまで弱酸性域において活性を示す CLH, PPH の知見は乏しいため、レモン果肉由来の CLH, PPH は大変興味深い性質を有すると言える。温度依存性・安定性については、ホウレンソウとグリーンキウイの CLH は pH 7、レモンの CLH は pH 4 で調べた結果、前者より後者は熱安定性が低いことが確認された。

- ③ 粗酵素レベルで CLH 活性が検出されたホウレンソウ葉は、それ自体の磨砕物を、粗酵素中 CLH の至適条件のとおり弱アルカリ性でインキュベーションするとフィトールが顕著に増加した。

グリーンキウイとレモンの果肉はそれらの搾汁液とクロロフィル供給源となるホウレンソウ葉の磨砕物（ここではブランチング処理で内在性酵素が失活している冷凍ホウレンソウを使用）との混合試料について、酵素的にフィトールが増加するかどうか調べた。その結果、グリーンキウイでは粗酵素で検出された CLH と異なる性質（作用可能な pH, 温度）をもつ酵素によるフィトール増加が確認された。粗酵素で検出できなかった当酵素は、硫酸によって活性が阻害されることも明らかにした。今後さらにその酵素学的性質を解析する。レモンは CLH, PPH 活性測定系で用いられる界面活性剤 (Triton X-100) が共存する条件では著しくフィトールが増加した。食品に添加可能な乳化剤のうち、キラヤサポニン、卵黄レシチン、Tween 20 を選び、Triton X-100 に代わる効果を確認したが、顕著な効果は認められなかった。

- ④ フィトールやフィタン酸の摂取が、マウス組織中のグリコーゲン超回復能に及ぼす効果をそれぞれ明確にした。すなわち、フィトールは腓腹筋のグリコーゲン超回復を誘導する傾向があったが、フィタン酸はどの組織にもグリコーゲン超回復が認められなかったものの、運動後の血糖値上昇抑制と血中遊離脂肪酸値上昇が確認された。

ウェスタンブロッティングを用いて関連シグナル伝達因子を解析した結果、フィトールでは、腓腹筋中のインスリン非依存的経路の活性化による糖取り込み促進が起きていることが示唆された。一方、フィタン酸では、肝臓においてインスリン依存的経路の活性化とグリコーゲン合成酵素の活性化（脱リン酸化）が確認された。フィタン酸でグリコーゲン回復が見られなかった原因として、これに拮抗するグリコーゲン分解促進シグナルの存在が考えられた。血中遊離脂肪酸値が上昇したことから、フィタン酸によるエピネフリン分泌促進を介した脂肪細胞内の脂肪分解の関与を予想し、血中エピネフリン量の測定を検討している。

本研究は、生鮮野菜・果物中の CLH, PPH がスムージー加工工程で葉物類のクロロフィルに作用し、フィトールを増加させる可能性について検証を試みた。食材から抽出した粗酵素を用いた解析により、既往の知見と異なる酵素学的性質をもつ（至適 pH が弱酸性域を示す）CLH, PPH の存在を見出したが、葉物野菜との単純混合スムージー調製中にこれらの酵素とクロロフィルの反応によって生成するフィトール量は、動物実験等で生理作用を発揮する程度には到達しないことを明らかにした。今後、調査対象の食材を増やすとともに、共存成分の CLH, PPH に対する促進・阻害作用について解析し、フィトール富化スムージーの調製条件を探索する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Narai Kanayama Asako, Yokosaka Shin ichi, Seo Yuji, Mikami Kouji, Yoshino Takayuki, Matsuda Hiroko	4. 巻 88
2. 論文標題 Evidence of increases of phytol and chlorophyllide by enzymatic dephytylation of chlorophylls in smoothie made from spinach leaves	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1750-3841.16588	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奈良井 朝子、妹尾 勇志、大久保 憲吾、横坂 伸一、松田 寛子
2. 発表標題 柑橘果実に含まれるクロロフィル分解酵素の特性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横坂 伸一、浅田 ゆり、松田 寛子、奈良井 朝子
2. 発表標題 ハウレンソウとグリーンキウイに含まれるフィトール生成酵素のスムージー加工を想定した特性解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 寛子、藤田 浩幸、木村 竜也、横坂 伸一、長田 あずさ、奈良井 朝子
2. 発表標題 植物由来成分フィトールがマウス骨格筋および肝臓のグリコーゲン超回復へ与える影響
3. 学会等名 日本体力医学会 第76回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横坂 伸一、浅田 ゆり、妹尾 勇志、三上 輝志、松田 寛子、奈良井 朝子
2. 発表標題 ホウレンソウとグリーンキウイのスムージー調製時に起こるクロロフィル分解酵素によるフィトール増加
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈良井 朝子、齋藤 悠、妹尾 勇志、大久保 憲吾、松田 寛子
2. 発表標題 オレンジと葉物野菜の磨砕試料混合系におけるフィトール生成
3. 学会等名 日本食品科学工学会 令和6年度関東支部大会
4. 発表年 2024年

〔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
研究分担者	松田 寛子  (Hiroko Matsuda)  (80709733)	日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・講師   (32669)	

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
---------	---------