

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：32714

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700746

研究課題名（和文）食品の“組成成分複雑性”を重視したメタボロミクスによる新しい食品成分分析の確立

研究課題名（英文）Evaluation of food quality by the complexity of composed metabolites.

研究代表者

飯島 陽子 (IIJIMA YOKO)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授

研究者番号：90415456

研究成果の概要（和文）：本研究では、食品の成分多様性の評価に重点を置いた食品成分分析について、質量分析計を用いた方法で行った。植物性食材である様々な野菜について分析を行い、その成分組成について比較解析を行った。すべての野菜のうち、葉野菜のほうが根菜や果実より成分組成が複雑な傾向を示した。葉野菜ではダイコンやホウレンソウが、果実ではピーマンが複雑な成分組成を示していた。各野菜とも、部位による組成の違いが大きく、特にナバナなどは、花序と茎・葉では相当組成が異なっていた。セリ科野菜は、それぞれ特徴的な成分が多い傾向があった。また、野生種と栽培種トマト果実の成分組成の違いについても調べた。野生種トマト果実の違いには、ステロイドアルカロイド類の組成の違いの影響が大きかった。

研究成果の概要（英文）：A large number of compounds are contained in each food, however, most of them have not been identified yet. In this research, I developed a procedure of comprehensive chemical annotation for unknown food compounds using high accuracy LC-MS analysis and applied it to comprehensive compound analysis of vegetables. This non-targeted compound analysis detected 800 compounds at maximum from each vegetable. Moreover, the composition especially in flavonoid was different in the edible part of each vegetable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食品成分・質量分析・メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

現在、健康な食生活を送る上で、多品目の食材を使ったバランスのとれた食事を摂取することが推奨されている。しかし、主要な栄養素以外の食品成分については、個々の食

材に対し特定の成分についてしか明らかになっておらず、各食品の成分情報についてはほとんど分っていないのが現状であった。その最大の理由として、食品を構成する成分が複雑性に富んでおり、食品成分のほとんどが

未知成分であることが挙げられる。また、今までの食品成分分析は、既知成分にのみターゲットを絞った分析手法が主流であったため、食品の成分複雑性の把握、異なる食品間でどれだけ成分組成が似ているのかといった、食品を包括的に捉えることを意識した食品分析手法がなかった。

2. 研究の目的

本研究では、食品がどれだけ成分バラエティに富んでいるのかを意識した食品成分分析方法を確立し、最終的には様々な食品の組み合わせからなる食事について、新しい評価法を目指している。その基礎的研究として、今回、食品の組成成分複雑性を把握、比較するため、高性能質量分析計を用いたメタボロミクス技術を用いることとした。まず全成分をあぶりだし、そこから組成式・推定構造に基づき成分を分離、比較解析を行うこととした。

特に野菜類を中心とした食材における食品成分の網羅的分析・比較解析を行い、各食品の成分バラエティを捉えた新しい成分解析方法を開発することを目的とした。

また多くの野菜のうち、トマトは、最もポピュラーな野菜の1種であり、その育種が進んでいる。特に近年、野生種トマトの有益な形質が継承可能な「分子育種」による新しい品種開発の基礎研究が盛んである。トマト果実に含まれる成分のうち、トマチンなどのステロイドアルカロイドは、ナス科野菜特有の成分で量的にも多く、近年抗ガン作用や動脈硬化抑制作用などの機能性も報告されている。しかしながら、そのステロイドアルカロイドの構造を精査した研究は少なく、特に野生種トマトについての情報はほとんどない。そのため、本研究では、まず組成成分について種間比較を行い、特にステロイドアルカロイド類に着目し、野生種トマト果実の成分情報について明らかにすることにした。

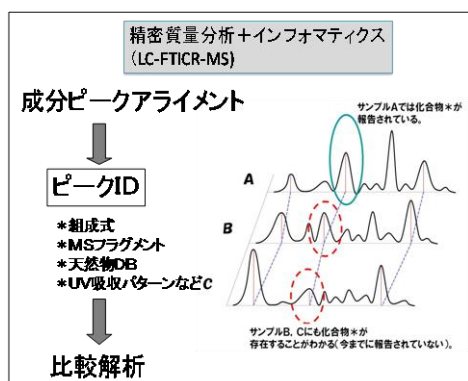


図1. 精密質量分析による成分の網羅的解析の概略

3. 研究の方法

(1) サンプル収集と調製

食品サンプルとして新鮮野菜を使用した。32種の野菜（1種のイチゴ果実を含む）について収集した。それぞれのサンプルは品種、収穫場所が明らかなものにした。それぞれの野菜の可食部について分析対象としたが、葉野菜については、葉部および茎部などの部位による代謝物組成の違いが考えられることから、別々にしたのちサンプルとした。また、トマトサンプル（野生種を含む）については、果肉部をサンプルに用いた。それぞれのサンプルを液体窒素により凍結後、粉碎し、100mgに対し300 μ lの内部標準を含んだメタノールを加え、含まれている食品成分を抽出し、LC-FIICR-MSにて分析を行った。イオン化法は、ESI ポジティブモード、ネガティブモードで分析を行った。比較解析を行うため、分析はすべて同じ条件で行った。また、データの再現性を得るため、それぞれ繰り返し3回以上分析を行った。

(2) データ解析

取得した各サンプルのデータ解析については、代表者が以前所属していた（財）かずさDNA研究所で開発したソフトウェアを用いた。LC-MSで取得するデータは、1データにつき数万のピークが検出される。ここではノイズイオンやオートフラグメントイオン、同位体イオンなどの実際の成分の質量を直接反映しないイオンも含まれる。これらの中から、実際の成分を真に示すイオンをまずスクリーニングした。その後、各イオンからなるクロマトピーク形状を検証し、実際に存在する成分ピークをスクリーニングした。さらに、精密質量値、MS/MSによるフラグメントパターンの類似性により、繰り返しサンプルを比較し、再現性のあるピークについては、食品サンプル由来の成分ピークとして取り扱うこととした。その後、精密質量値から組成式演算を行い、天然物データベース検索（KNAPSAck, KEGG）を行ない、化合物のアノテーションを試みた。

(3) 標準品の分析

糖やアミノ酸などに加え、食品機能性成分データベースに掲載されている食品成分、食品に含まれていると予測される成分のうち、入手可能な成分について（105種）同様にLC-MS分析を行った。

(4) トマト果実組成成分の種間比較とステロイドアルカロイドの同定

野生種として *S.pennellii*, *S.cheesmaniae*, *S.pimpinellifolium*, *S.habrohaeites*, *S.neorickii* の5種、栽培種 *S.lycopersicum* では、Micro-Tom など3種を選び、その果実

をサンプルとして用いた。各果実の果肉をメタノール抽出し、他の野菜サンプルと同様にLC-FTICR-MS (ESI-positive モード) で精密質量分析を行った。また、新規な成分については、各種クロマトグラフィにより単離後、NMRにより構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 各野菜から検出した成分数

LC-FTICR-MS により検出された成分数について、下の図に示した。

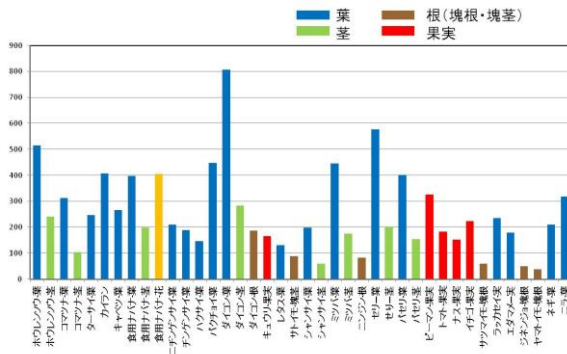


図2. 各野菜抽出物から得られた成分ピーク

全体的にどの野菜においても葉部において成分数が多い傾向を示し、葉野菜において成分多様性が高いことが分かった。その数はいずれも数百であったが、ダイコン葉が最もその成分数が多く、約800であった。特に葉部で特徴的であったのは、フラボノイド化合物が多数検出されたことであり、フラボノイドアグリコンに結合する糖の数や種類によって構造多様性が生じたと考えられた。一方、根野菜の塊根・塊茎部では、成分数が圧倒的に少なく、いずれも数十の成分ピークしかみられなかった。塊根・塊茎は、植物生理学的にはデンプンなどの貯蔵組織であるために、それ以外の成分の生合成が活発に行われていないからではないかと考えられた。

(2) 各野菜の構造的多様性の評価

葉野菜の葉部に含まれる食品成分についてさらに相互比較し、個々にしか検出されなかった特徴的な成分について検証した。アブラナ科野菜のうち、パクチョイ、チンゲンサイ、ターサイ、ハクサイは、共通して存在する成分が多かった。これは、これらの野菜が育種系統的に非常に近い関係があるため、見た目は異なっているが、各成分の生成代謝に関与する酵素遺伝子が共通に残存しているからであると考えられる。一方、ミツバ、セリ、パセリ、シャンサイなどセリ科の野菜は組成成分が互いにかなり異なっていることが分かった。

(3) 葉野菜に含まれるフラボノイド

(1)で示した結果において、葉におけるフラボノイドの多様性を考察した。さらに精査するために、MS/MS フラグメントパターンを利用したフラボノイドデータベース検索により、各野菜(葉部)に含まれるフラボノイドを調べた。ホウレンソウでは、spinacetinをアグリコンとする多数の配糖体(spinatoside など)が見出された。既知成分に糖がさらに結合した成分など新規なものも多数検出された。ニラやダイコンでは、ケンフェロールをアグリコンとする多種の配糖体が多く検出された。野菜に含まれるフラボノイドについて、今までにアグリコンについての知見はあるが、食品の成分多様性という点では、食品中で起こる配糖化、アシル化などの様々な修飾反応が寄与することが分かった。

(4) 異種トマト果実における組成成分比較

野生種トマトは、栽培種に比べて見た目も大きく異なる。5種の野生種トマトと3種の栽培種トマトについて検出された成分に基づき階層的クラスタリングを行った。その結果、Micro-tomなどの栽培種間では近く、野生種のうち、*S. pimpinellifolium*が近いプロフィールを示した。主成分分析により、寄与成分について検討したところ、多数のステロイドアルカロイドの組成の違いが種間の判別に寄与していることが分かったので、ステロイドアルカロイドについてスクリーニングを行い、MS/MS フラグメンテーションにより構造精査した。

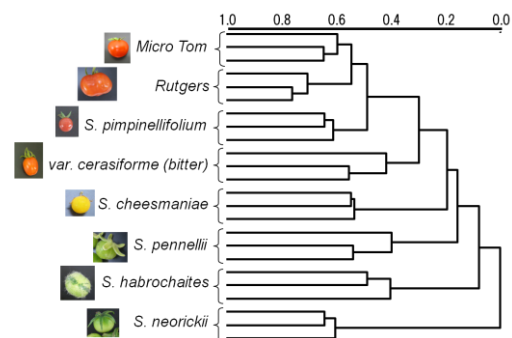


図3. 野生種トマトから検出した成分に基づくクラスタ解析

LC-MSでの解析の結果、全部で124種のステロイドアルカロイドが検出された。各成分の種類や量はサンプルによって大きく異なっていた。総ステロイドアルカロイド量は、野生種トマトのほうが多い傾向を示したが、ステロイドアルカロイドが少ない野生種も

存在した。検出したステロイドアルカロイドピークを用いて主成分分析を行ったところ、tomatine を多く含む群、esculeoside A を含む群、それ以外の独立した2群の計4群に分かれた。

次に、多段階 MS/MS により各 GA の部分構造を推定していくと、構造上、5-6 位の炭素間の二重結合の有無のみが異なる成分ペアが2ペア存在することが分かった。また、アグリコンが同じでも糖の種類が異なるものも多く、トマチンと同様な lycotetraose のみ結合したものは全体の 58%にとどまり、それ以外は3糖類、5糖類が結合したステロイドアルカロイドが存在した。また、MS/MS でも判別できない光学異性体も多く存在し、トマト果実に含まれるステロイドアルカロイドは非常に構造が複雑であることが分かった。

さらに、野生種トマトで量的に多かったステロイドアルカロイドについて、5種を単離し、NMR により構造決定を行った。これらはいずれも tomatine の修飾体であることが分かり、その中には新規のステロイドアルカロイドも含まれていた。

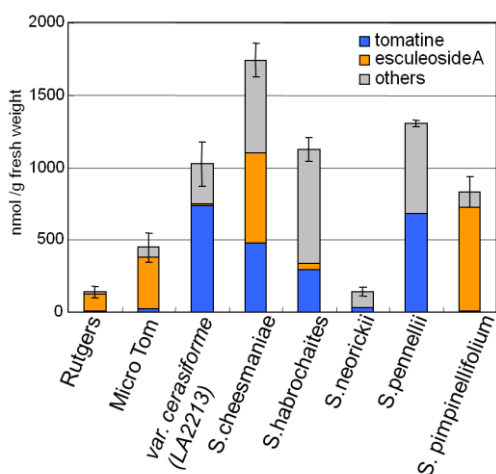


図4. 野生種トマトに含まれるステロイドアルカロイドの量と種類

今後は、これらの得られたデータをまとめたのち、(財)かずさDNA研究所より全て公開する予定である。

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3件)

① GLYCOALKALOID METABOLISM1 Is Required for Steroidal Alkaloid Glycosylation and Prevention of Phytotoxicity in Tomato., Itkin M, Rogachev I, Alkan N, Rosenberg T, Malitsky

S, Masini L, Meir S, Iijima Y, Aoki K, de Vos R, Prusky D, Burdman S, Beekwilder J, Aharoni A., Plant Cell., 23, 4507-4525 (2011) 査読有

②食品を網羅的に分析するー食品の網羅的質量分析から見えてくるものー, 飯島陽子, PFI ジャーナル, 216, 242-246 (2011)査読無

③Metabolic Alterations in Organic Acids and γ -Aminobutyric Acid in Developing Tomato (Solanum lycopersicum L.) Fruits., Yin YG, Tominaga T, Iijima Y, Aoki K.,

Shibata D., Ashihara H., Nishimura S., Ezura H., Matsukura C., Plant Cell. Physiol., 1300-1314 (2010) 査読有

[学会発表] (計6件)

① 質量分析を用いた食品中の低分子成分の網羅的解析, 飯島陽子, シンポジウム「お茶の機能性と文化 最近の話題」(平成23年10月15日, お茶の水女子大学)

② 質量分析計による検出成分多様性からみた野菜食材の評価, 飯島陽子, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 青木考, 第65回日本栄養・食糧学会(平成23年5月15日, お茶の水女子大学)

③ LC-FTICR-MS を用いた野菜フラボノイドの一斉比較分析, 飯島陽子, 秋元奈弓, 櫻井望, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 青木考, 日本農芸化学会2011大会(平成23年3月, 京都震災のため中止だが, 学会は成立)

④ 食品を網羅的に分析するー食品の網羅的質量分析から見えてくるものー, 飯島陽子, 第26回食品化学シンポジウム(平成22年11月30日滝野川会館)

⑤ 精密質量分析を用いたメタボローム解析による食品の”組成成分複雑性”の評価, 飯島陽子, 第5回メタボロームシンポジウム(平成22年9月10日, 慶応大学鶴岡)

⑥ 野生トマト果実におけるグリコアルカロイドプロファイルの種間比較, 飯島陽子, 佐々木亮介, 竹中真紀子, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 青木考, 第28回日本植物細胞分子生物学会(平成22年9月7日, 東北大学)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 陽子 (IIJIMA YOKO)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授
研究者番号: 90415456

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 研究連携者

該当なし