

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630163

研究課題名(和文) 抗体の交差反応を利用した辛味センサの開発

研究課題名(英文) Development of pungency sensor using cross-reactive antibody

研究代表者

都甲 潔 (Toko, Kiyoshi)

九州大学・システム情報科学研究科(研究院・教授)

研究者番号：50136529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗ホモバニリン酸-ロコガイヘモシアニン抗体と表面プラズモン共鳴(SPR)センサを用いて、トウガラシ果実中の辛味成分であるカプサイシノイドを検出する手法の開発を行った。間接競合法を用いた測定により、3種のカプサイシノイド、すなわち、カプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシンに対する検出限界は、それぞれ、27、35、50 ppbとなった。各種トウガラシ果実からカプサイシノイドの抽出と前処理を行い、測定した結果、辛味の評価指標であるスコヴィル値に対応した応答値が得られた。SPRセンサと抗体の交差反応性を利用して、トウガラシ果実中のカプサイシノイド検出が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Detection method of capsaicinoids such as capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin was developed using anti-homovalic acid-Concholepas concholepas hemocyanin (CCH) polyclonal antibodies and surface plasmon resonance (SPR) sensor with indirect competitive assay method. Extraction procedure of capsaicinoids from Capsicum fruit was also developed. As a result, limits of detection for capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin were 27 ppb, 35 ppb and 50 ppb, respectively. The reduction of responses in SPR measurements with indirect competitive method for recovered samples of sweet peppers such as Bell pepper and Shishitougarashi were not observed. Nine kinds of hot peppers, which have different Scoville heat unit (SHU), were also tested. The reductions of sensor responses for the hot peppers were observed. It was found that the responses of the SPR immunosensor depended on SHU of each hot pepper.

研究分野：感性バイオセンサ

キーワード：抗体 交差反応 辛味 センサ 表面プラズモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

トウガラシやコショウ、ショウガなどに含まれる辛味成分は、食欲増進や発汗作用を促進する効果があるといわれ、注目を集めている。代表的な辛味成分にはトウガラシのカプサイシン、コショウのピペリン、ショウガのジゲロールなどがある。トウガラシの辛味成分は、カプサイシンやジヒドロカプサイシンなどを含めてカプサイシノイドと呼ばれており、トウガラシの辛味成分量の 80%~90%を占めている⁽¹⁾。辛味の指標として、スコヴィル値 (SHU) が用いられており、これはトウガラシなどの抽出物あるいは辛味成分自体を甘味水で希釈したときの辛味を感じなくなる閾値 (境目) に達するまでの希釈倍率である⁽²⁾。このように食品の辛味強度の評価は官能検査により行われるが、辛味は痛みや熱さに似た感覚であり、感覚神経で感知されている。そのため、基本五味 (酸味、甘味、苦味、塩味、うま味) に比べて官能検査員にかかるストレスは非常に大きく、辛味を客観的に評価できる手法が切望されている。

現状の辛味の検出は、ガスクロマトグラフィー質量分析計、逆相高速液体クロマトグラフィーといった分析機器を用いたものが主流である。しかし、これらは対象とする成分毎に測定条件が異なり、また、食品の味として測定することはできない。一方、味そのものを、高感度、簡易でかつ迅速に計測できるセンサに、受容部に脂質高分子膜を用いた味覚センサ (味認識装置) がある。しかしながら、膜電位計測を原理としており、電解質に対する感度は非常に高いものの、非電解質かつ非水溶性のカプサイシノイドなど辛味に関しては感度がなく、情報が得られないのが現状であった。研究を開始するまでに研究代表者らは、抗体を用いたカプサイシン (カプサイシノイド) 検出の可能性を見出した⁽³⁾。

2. 研究の目的

抗体を受容部とした辛味センサの開発を行う。辛味に対する選択性と感度は、辛味物質と類似する構造を持つ低分子とタンパク質をキャリアとして用い合成し、それを免疫原として作製された抗体により得られる。従来、抗体は選択性を高めるために用いられるが、本研究では、意図的に交差反応 (複数の辛味物質に応答) する抗体を用いる。すなわち、辛味受容体 TRPV1 に相当する抗体を用いる。辛味成分とその抗体との反応は、一種の高感度な屈折率計である表面プラズモン共鳴 (SPR) センサにより検出する。辛味としてはトウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドをターゲットとし、トウガラシ果実中のカプサイシノイドの検出を行う。以上より、辛味の客観的な評価方法の実現を目指す。

3. 研究の方法

ターゲット辛味物質群の類似物質を選定し、キャリアタンパク質と結合させ、免疫

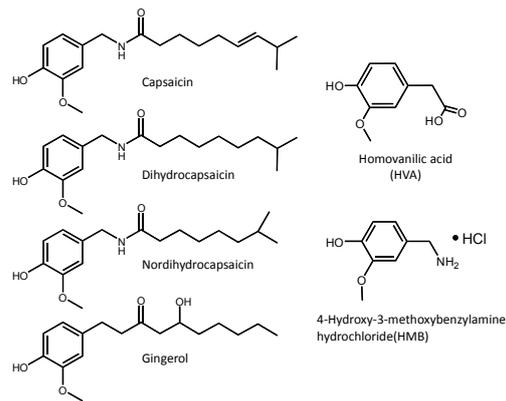


図 1 実験試薬の構造

原を作製する。本研究では、図 1 に示すカプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシンのカプサイシノイドに共通するバニリル基に着目し、バニリル基を認識する抗体を用いる。すなわち、ホモバニリン酸 (HVA) とロコガイヘモシアニン (CCH) を合成し、それを免疫原として得られたウサギ由来のポリクローナル抗体 (抗 HVA-CCH 抗体) を用いた。抗 HVA-CCH 抗体と SPR センサにより、辛味検出を試みる。SPR センサでは、間接競合法により、測定を行う。間接競合法は、図 2 に示すように、抗体とターゲットの物質を混ぜて流した時の抗体結合量 $\Delta\theta_1$ を、抗体のみを流した時の抗体結合量 $\Delta\theta_0$ で割った値を応答値とする。自己組織化単分子膜 (SAM) を用いて電気的に中性で親水性のセンサ表面を作製する。固相抽出カラムの修飾官能基の選定、溶媒極性等条件の最適化を行い、実際のトウガラシサンプルを前処理により抽出する方法を確立する。

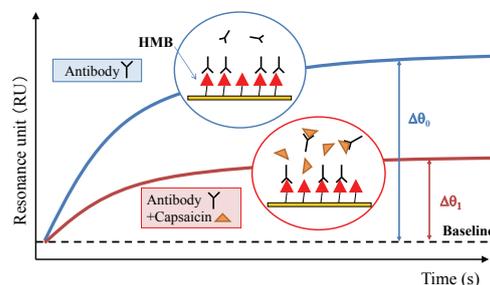


図 2 間接競合法の原理

4. 研究成果

抗 HVA-CCH 抗体と SPR センサを用いたカプサイシノイド検出系の確立を行った。PEG6-COOH aromatic dialkanethiol を用いて SAM を形成し、ホモバニリン酸やカプサイシノイドと共通のバニリル基を持つバニリル

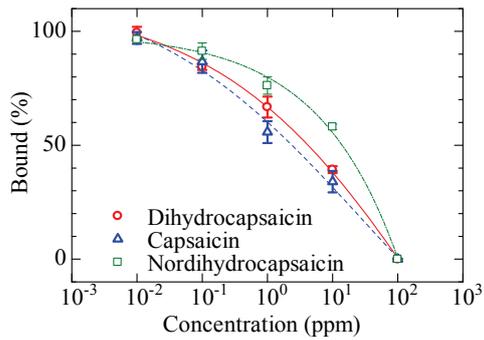


図 3 HMB センサ表面での 3 種のカプサイシノイドに対する応答特性

アミン (HMB) をターゲット (抗原) の類似物質として SAM に固定化した。この部分が抗体結合サイトとなる。間接競合法により、カプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシンの測定を行った。その結果を図 3 に示す。検量線は 3 種とも同様の傾向を示し、検出限界は、標準偏差の 3 倍を考慮し、それぞれ、27 ppb, 35 ppb, 50 ppb となった。また、同様にバニリル基を持つショウガの辛味成分であるジンゲロールについて、図 4 の応答特性が得られた。検出限界は、95 ppb となった。バニリル基に着目して作製した抗体により、異なる辛味成分を同一抗体で検出できることがわかった。しかしながら、ジンゲロールは、SHU がカプサイシンの二百分の一であり、辛味強度が大きく異なる⁽¹⁾。したがって、現状のままでは、カプサイシノイドとジンゲロールが混在するサンプルの辛味強度を測定することは困難である。

カプサイシノイドの検出が SPR センサにより可能となったため、次にトウガラシ果実からカプサイシノイドを抽出する方法を検討した。まず、カプサイシノイドを含まない甘味種を含む 4 種のトウガラシ果実から抽出した実サンプルの測定を試みた。トウガラシ果実を凍結乾燥し、ミキサーで粉碎した。トウガラシ粉末をエタノールに浸漬し、カプサイシノイドの抽出を行った。サンプルを 0.2

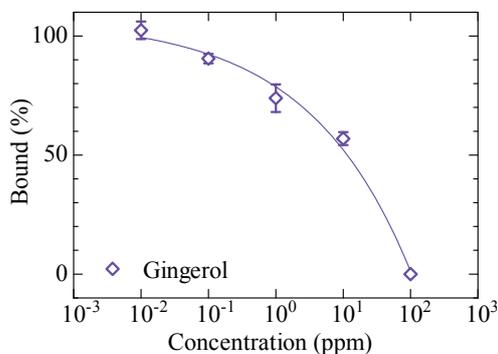


図 4 HMB センサ表面でのジンゲロールに対する応答特性

μm シリンジフィルタを通過させて、間接競合測定を試みたところ、どのトウガラシサンプルも抗体流通時の抗体結合量よりも、トウガラシサンプル・抗体混合溶液流通時の抗体結合量が高くなった。センサ表面に用いた SAM はオリゴエチレングリコール鎖を有しており、ある程度高濃度のタンパク質でも非特異的な吸着を抑制できる。しかしながら、トウガラシ種に関係なく、抗体流通時の結合量よりも増えるということから、夾雑物の影響による非特異吸着の可能性が考えられた。

そこで、高橋らの手法を参考にオクタデシル基を有する C18 遠心タイプの固相抽出スピナラムで、前処理を行った⁽⁴⁾。その後、間接競合法で測定した結果を図 5 に示す。カプサイシノイドを含まないピーマン、シントウガラシはおよそ抗体結合率が約 100%となり、サヤトウガラシ、シマトウガラシは、80%前後の抗体結合量を示した。サヤトウガラシお

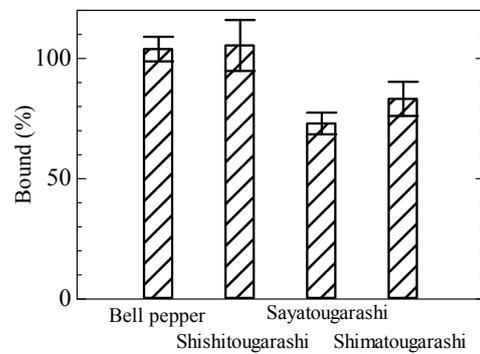


図 5 回収したサンプルの間接競合法による測定結果 (抗体結合率)

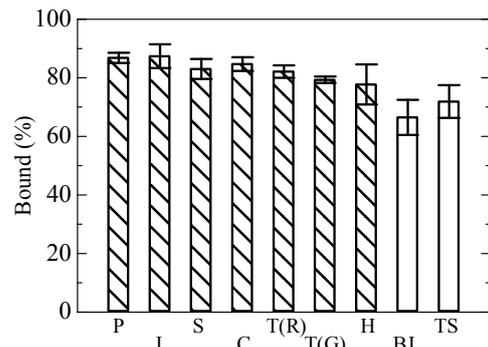


図 6 回収したサンプルの間接競合法による測定結果 (抗体結合率). P: ポプラーノ, J: ハラペーニョ, S: セラーノ, C: カイエソペッパー, T(R): 鷹の爪(赤唐), T(G): 鷹の爪(青唐), H: ハバネロ レッドサビナ, BJ: ブート・ジョロキア, TS: トリニダード・スコピオン・ブッチ・テイラー.

よびシマトウガラシで見られた抗体の結合量の減少は、抗体とカプサイシノイドが結合し、センサ表面のHMBに結合できない抗体があったためと考えられる。

次にSHUの異なるトウガラシを9種用意し、カプサイシノイドの抽出、測定を行った。カラムへの吸着時のMilliQ水添加量を検討し、回収効率の最も高かった300 µLに変更した。トリニダード・スコピオンおよびブート・ジョロキアについては、他のトウガラシ果実と同じ十分の一希釈では、混合溶液流通時に抗体の結合量が得られなかった。カプサイシノイドが高濃度となり遊離の抗体が大幅に減少したためと考えられる。そこで、固相抽出カラムから回収後、四十分の一希釈し、測定を行った。その結果を図6に示す。左からSHUの低い種類の順に示している。抗体結合量が低いほど、カプサイシノイド含有量が高いと考えられ、概ねSHUを反映した結果が得られた。SPRセンサと抗体の交差反応性を利用して、トウガラシ果実中のカプサイシノイド検出が可能となった。

<引用文献>

- (1) 岩井和夫, 渡辺達夫: 改訂増補トウガラシ辛味の科学, 幸書房(2008)
- (2) W. L. Scoville: "Note on capsicums," Journal of the American Pharmaceutical Association, vol. 1, pp. 453-454, (1912)
- (3) S. Nakamura, R. Yatabe, T. Onodera, and K. Toko: "Sensitive detection of capsaicinoids using a surface plasmon resonance sensor with anti-homovanillic acid polyclonal antibodies," Biosensors, vol. 3, pp. 374-384 (2013)
- (4) 高橋 京子, 西銘 杏, 柿沼 美玲, 小坂橋 淑恵, 菅谷 明日香, 谷藤 福子, 宮本 朋子: 沖縄産調味料コーレーグースの辛味成分と香気成分, 日本食品科学工学会誌, Vol.55, No.4 pp.129-136 (2008)

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. 小野寺 武, 田 勝熙, 矢田部 壘, 都甲 潔: “表面プラズモン共鳴免疫センサを用いたトウガラシ果実中のカプサイシノイド検出”, 電気学会論文誌 E, Vol. 136, No. 6, pp. 218-223 (2016) DOI: 10.1541/ieejsmas.136.218

[学会発表] (計 2 件)

1. 小野寺 武, 田 勝熙, 矢田部 壘, 都甲 潔: “表面プラズモン共鳴免疫センサを用いたトウガラシ果実中のカプサイシノイド検出”, 第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム

論文集, 30am2-PS-086 (5 ページ, 2015 年 10 月 30 日ポスター発表, 新潟) 査読有り

2. 小野寺 武, 田 勝熙, 矢田部 壘, 都甲 潔: “SPR 免疫センサを用いたトウガラシ果実中のカプサイシノイド検出”, 電気学会研究会資料 センサ・マイクロマシン部門総合研究会 (ケミカルセンサ研究会), CHS-15-19, pp. 81-85 (2015. 7. 3) 口頭発表

[その他]

1. 優秀ポスター賞, 小野寺 武, 田勝熙, 矢田部 壘, 都甲 潔: “表面プラズモン共鳴免疫センサを用いたトウガラシ果実中のカプサイシノイド検出”, 第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム(2015年10月30日ポスター発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都甲 潔 (TOKO, Kiyoshi)

九州大学・大学院システム情報科学研究
院・教授

研究者番号: 5 0 1 3 6 5 2 9

(2) 研究分担者

小野寺 武 (ONODERA, Takeshi)

九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発セン
ター・准教授

研究者番号: 5 0 3 3 6 0 6 2

(3) 連携研究者

田原 祐助 (TAHARA, Yusuke)

九州大学・大学院システム情報科学研究
院・助教

研究者番号: 8 0 5 8 5 9 2 7