



食品メタボロームへの機能性情報付与による出汁に含まれる抗炎症化合物の探索 および作用機序の解明

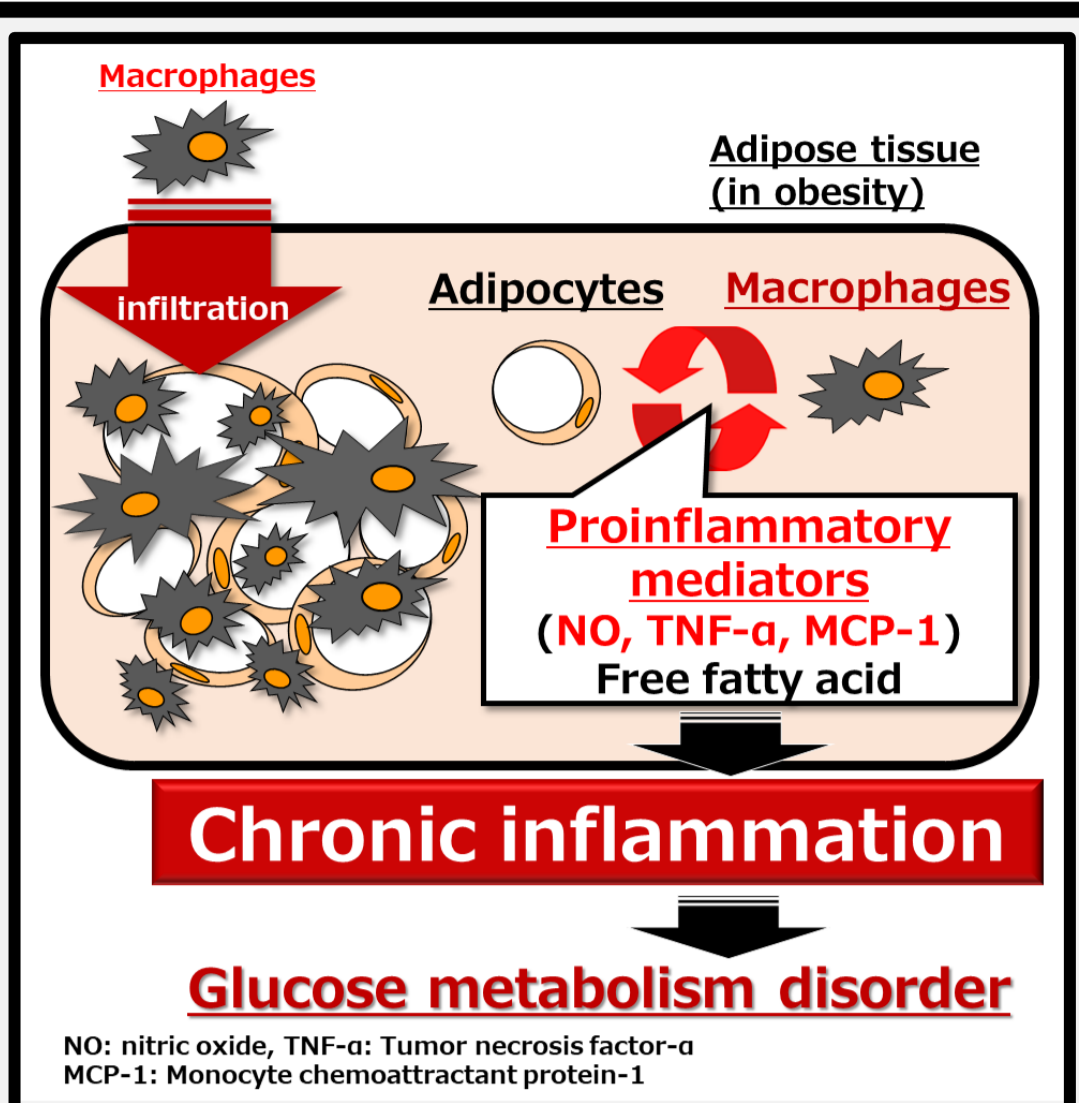
○毛利晋輔¹⁾、真鍋祐樹¹⁾、高橋春弥²⁾、後藤剛²⁾、菅原達也¹⁾
(¹⁾京大院農・応用生物、²⁾京大院農・食品生物)

背景 / 目的

メタボローム解析は、一度の分析で、高精度・高感度に、サンプルに含まれる網羅的な化合物情報（メタボローム）の取得を可能とする手法である。近年、本手法は、病態のバイオマーカーの探索をはじめとして、様々な分野で活用されており、食品を対象としたメタボローム解析も盛んに行われている。しかしながら、これまでの研究では、サンプル間の差分解析による量的変動を指標とした、間接的な活性推定から、目的化合物を探索することが主流であった。

一方、肥満に伴う糖代謝異常の発症メカニズムの1つとして、脂肪組織における慢性炎症が挙げられる。肥満状態の脂肪組織では、浸潤したマクロファージと脂肪細胞が、一酸化窒素 (NO)、腫瘍壊死因子-α (TNF-α) および単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) 等の炎症性メディエータを介して互いに刺激しあうことで慢性炎症が発生している (右図)。そのため、上述の炎症反応を低減し得る抗炎症化合物は、肥満に伴う糖代謝異常の改善に寄与することが期待される。発表者は、メタボローム解析とバイオアッセイ系の融合により、食品メタボロームに機能性情報を付与することで、網羅的かつ直接的に、目的の活性を有する化合物を見出すことが可能な研究法を構築した。

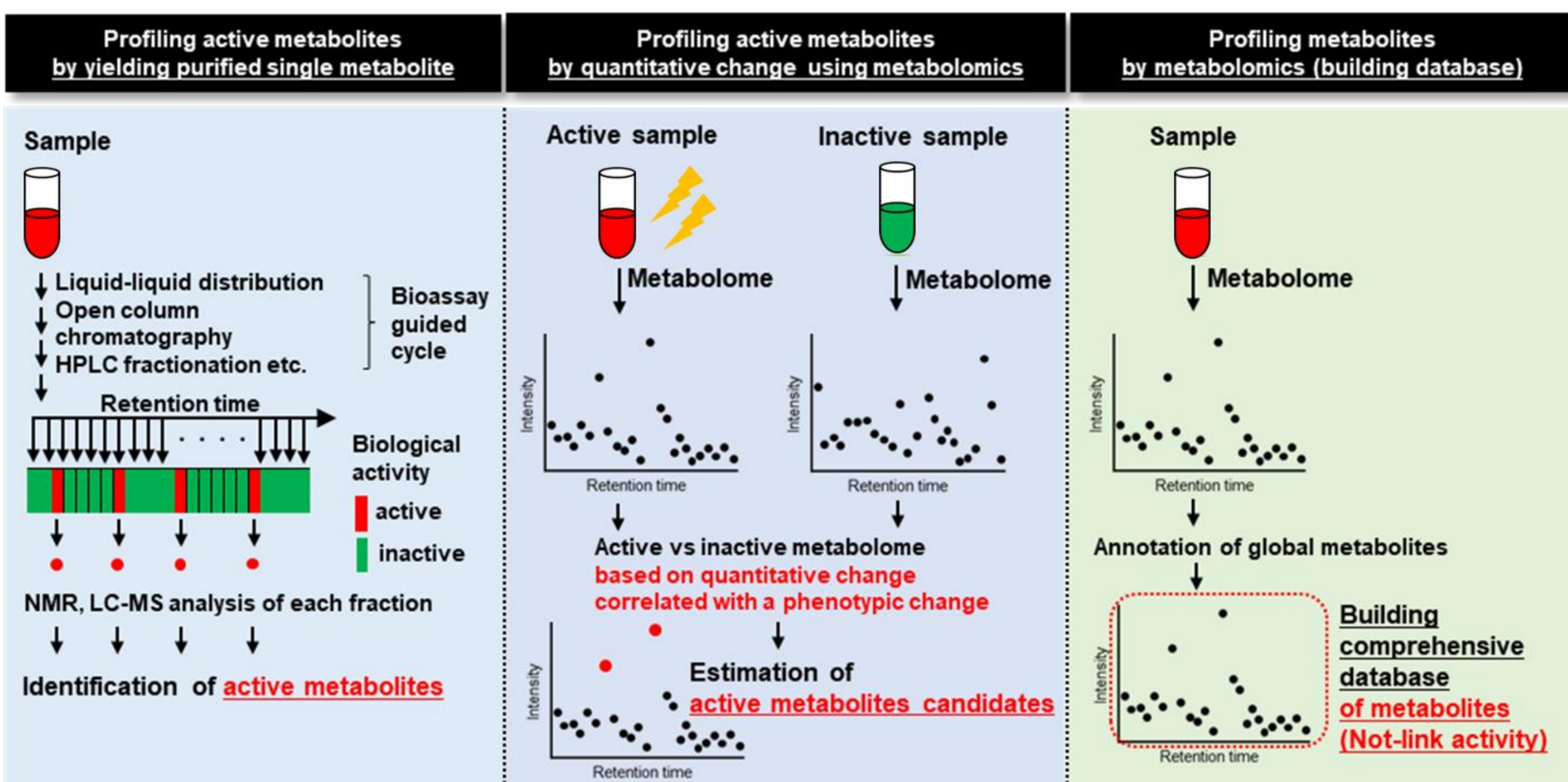
本研究では、上記手法を用いて、日本の伝統的な調味料である出汁に含まれる抗炎症化合物の探索を行うとともに、その作用機序の解明を試みた。



方法 / 結果

1. メタボロームへの機能性情報付与による食品機能性成分のスクリーニング方法

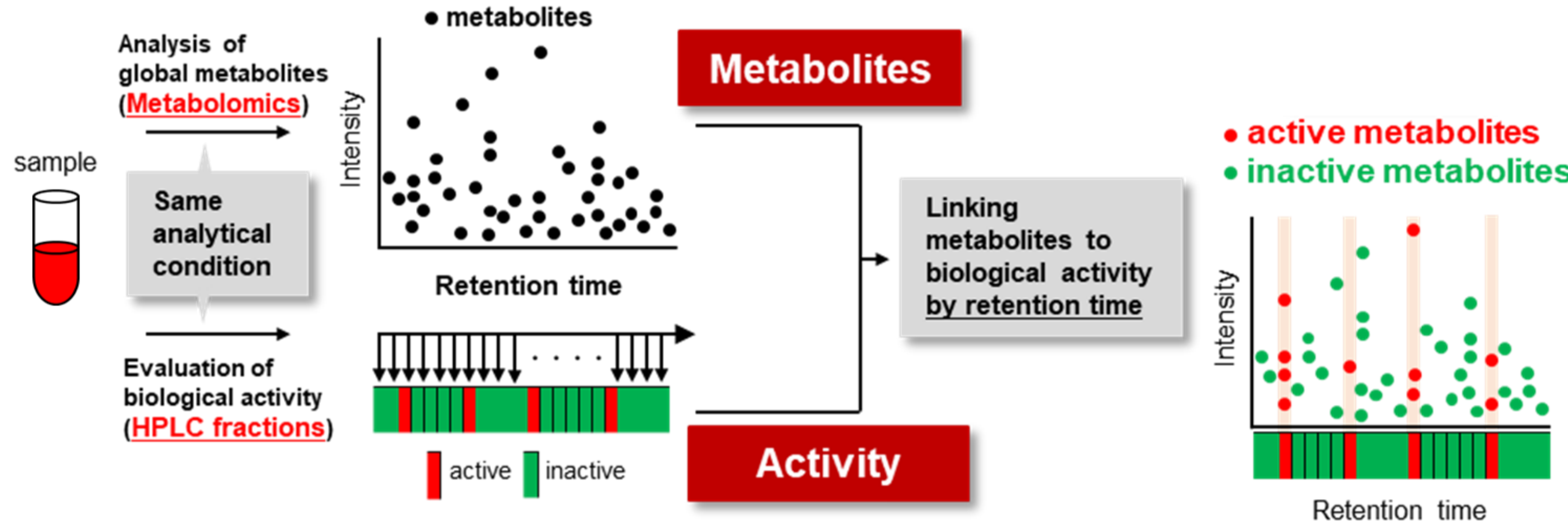
メタボロームへの機能性情報付与 (コンセプト)



Activity-Based Metabolite Profiling (メタボロームへの機能性情報付与)

- Link biological activity to the entire metabolites directly (based on activity of metabolites)
- Link biological activity to the entire metabolites in a single sample
- Handling of the entire metabolites high-throughput

メタボロームへの機能性情報付与 (実験の流れ)

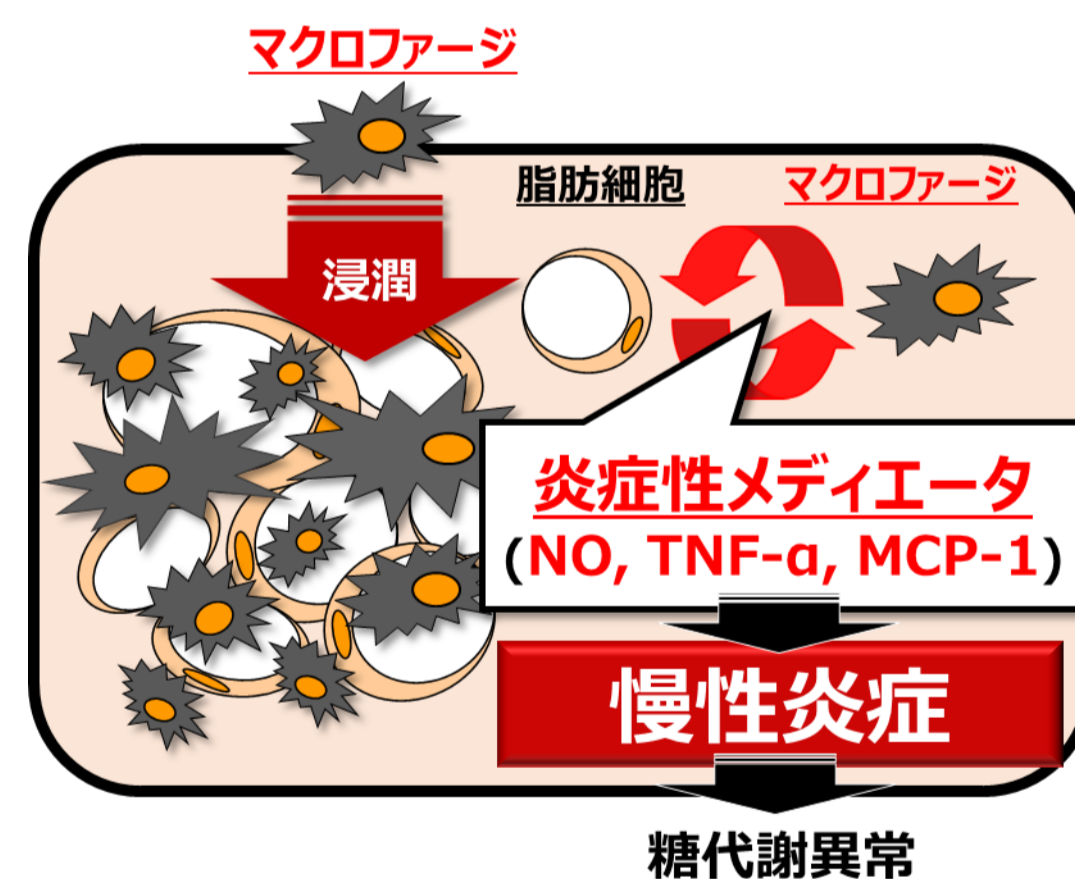


2. 出汁の抗炎症能 (NO, TNF-α, MCP-1産生の抑制能)

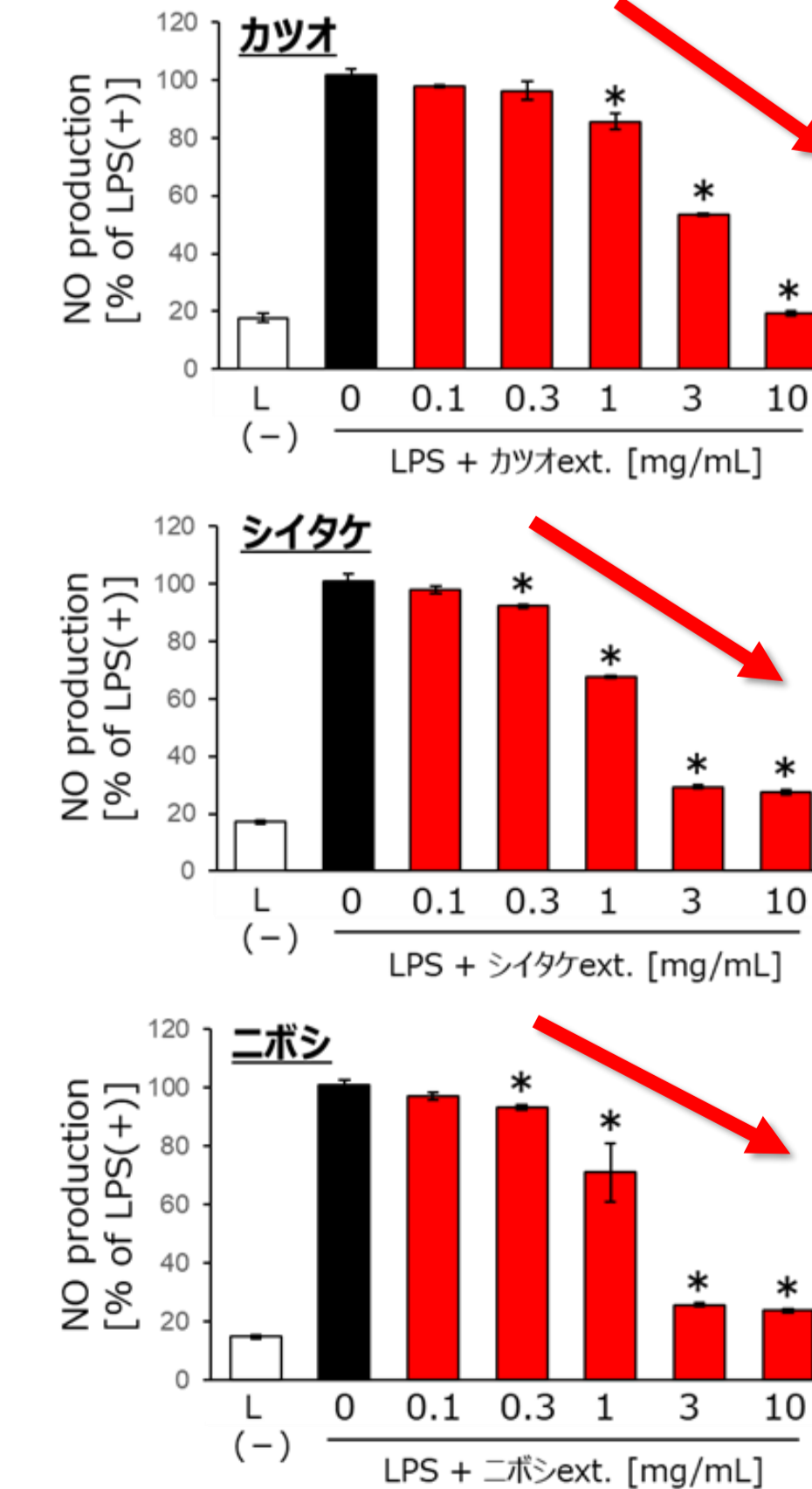
方法 ~抗炎症能の評価~

RAW 264 マウスマクロファージ様細胞
NO (96well plate, 5.0×10⁵ cells/mL)
TNF-α・MCP-1 (12well plate, 5.0×10⁵ cells/mL)
5 hr
LPS (100ng/mL) + 評価sample(出汁)
※LPS: lipopolysaccharide (リボ多糖) ⇒ 炎症反応を惹起
24 hr
評価sample添加による炎症性メディエータ産生の抑制を検討 (NO: Griess法, TNF-α・MCP-1: ELISA法)

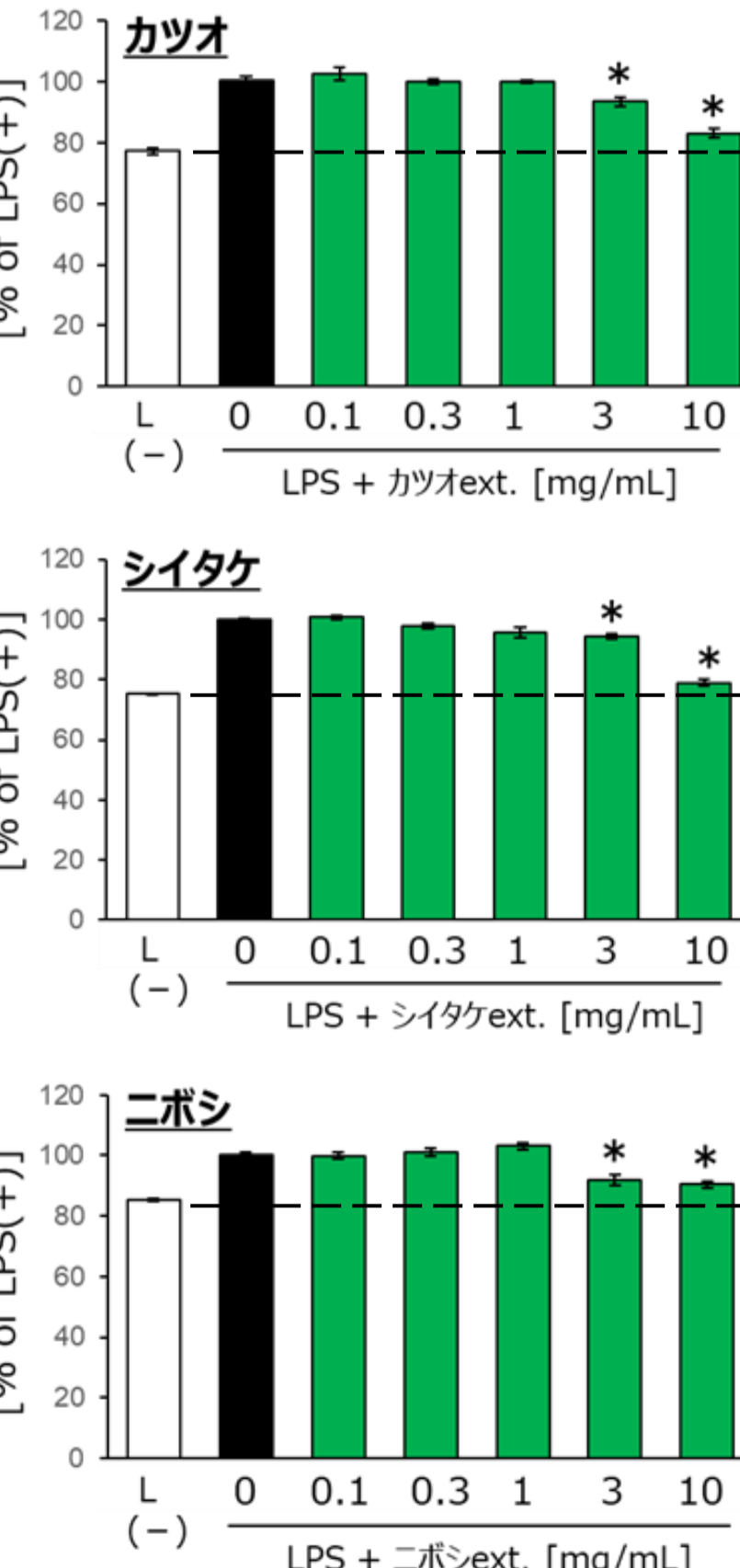
肥満に伴う糖代謝異常の発症メカニズム



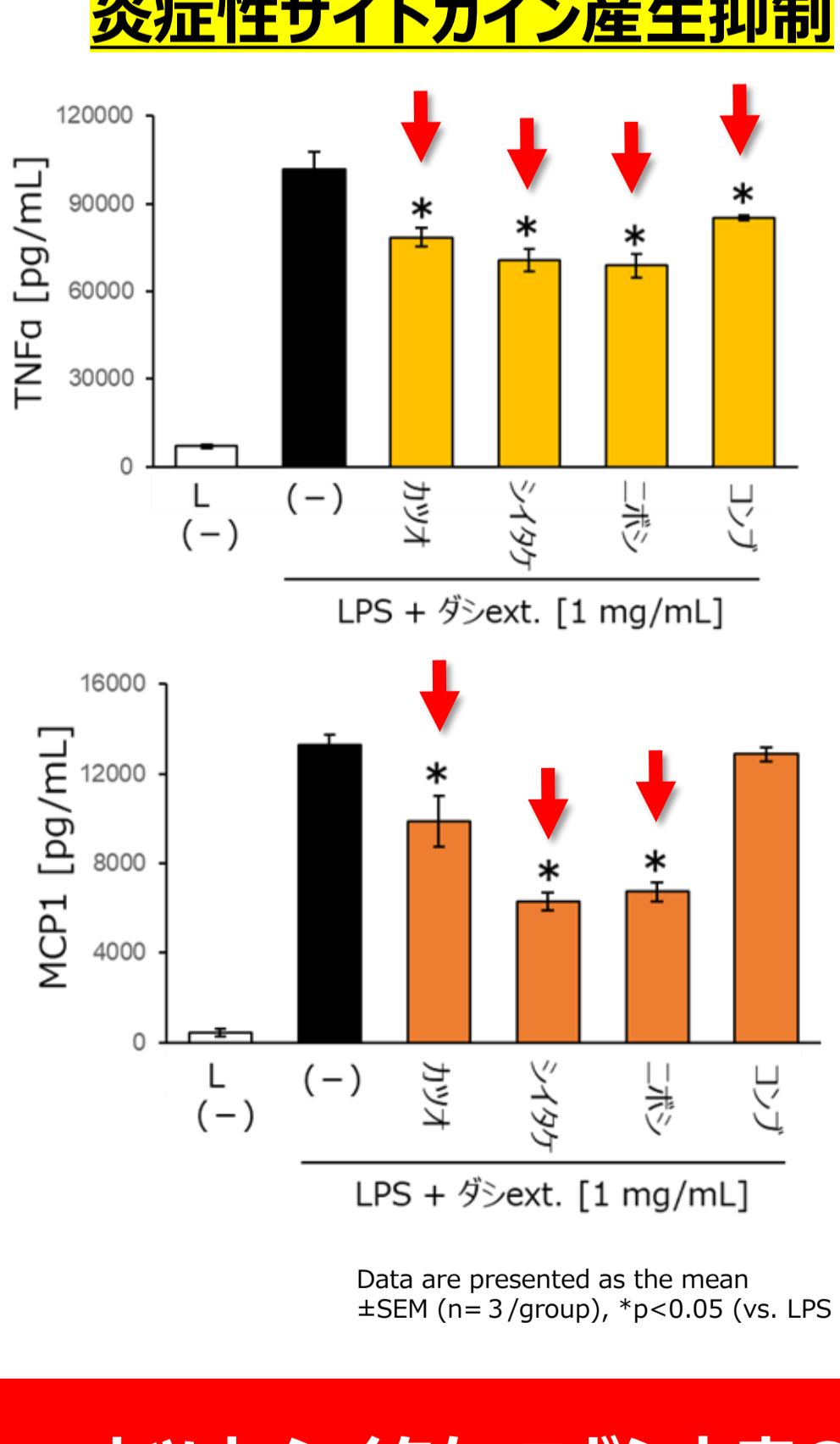
出汁によるNO産生抑制



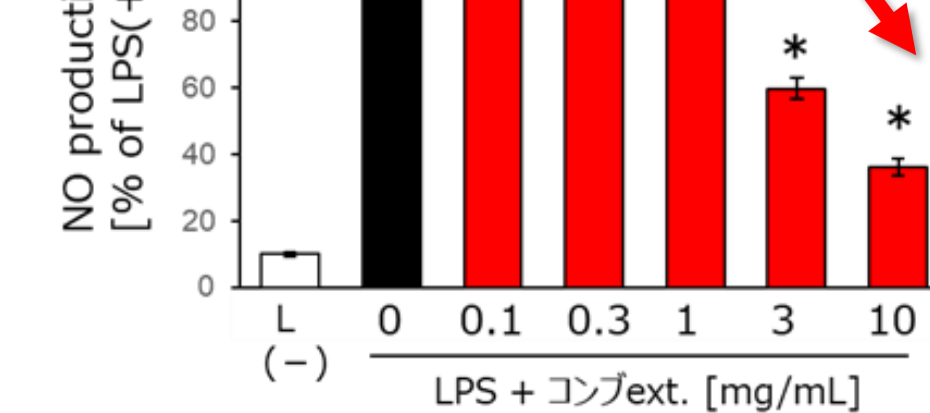
出汁による細胞毒性



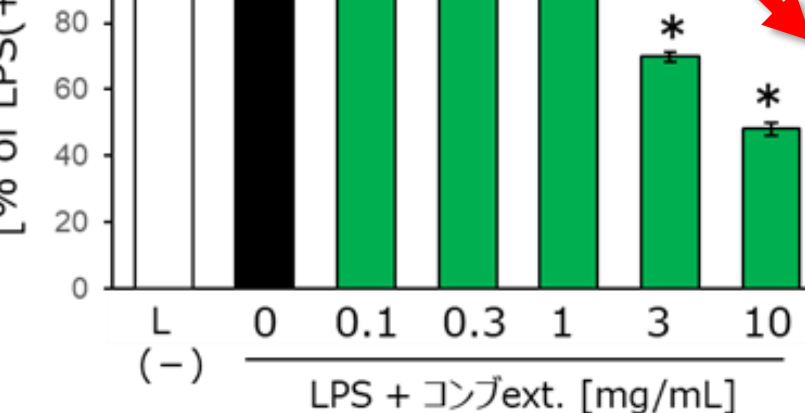
出汁による炎症性サイトカイン産生抑制



カツオ



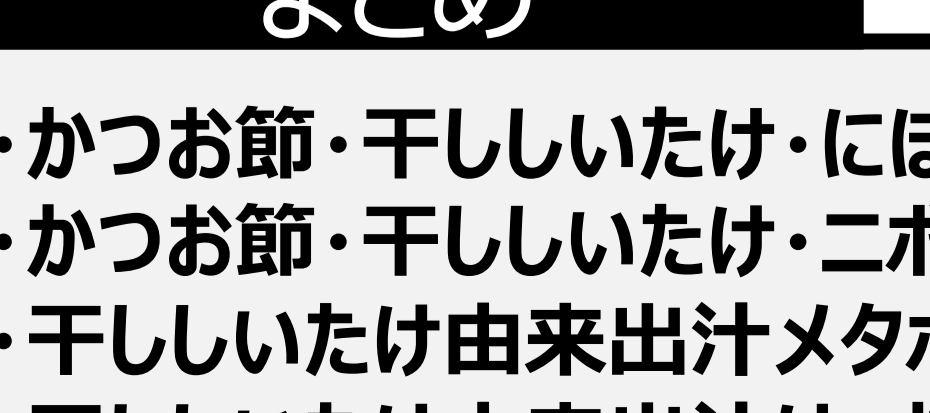
シイタケ



ニボシ



コンブ



3. 出汁のメタボローム解析およびHPLC画分における抗炎症能

方法 ~メタボローム解析・HPLC画分の分析条件~

移動相A: 100%水 (+0.1%酢酸)
移動相B: 100%アセトニトリル
流速: 0.2mL/min
カラム: InertSustain AQ-C18 (2.1x150mm)
分取: 1Fr./min

グラジエント

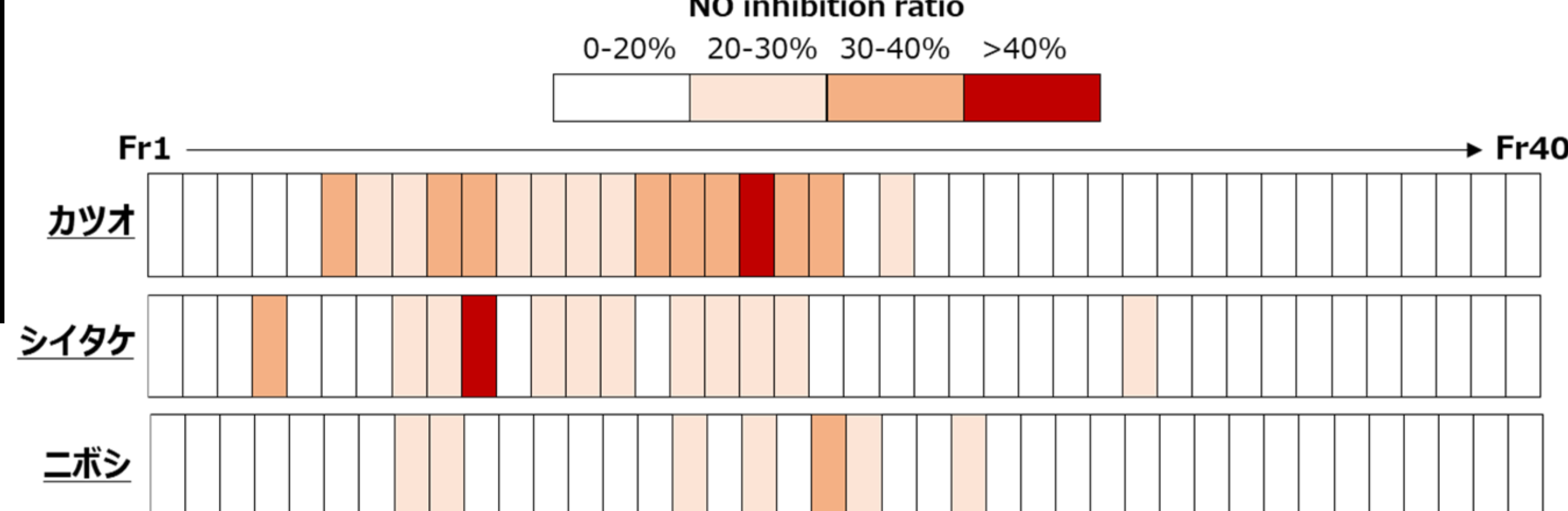
Time (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
3	98	2
30	2	98
35	2	98
35.1	98	2
40	98	2

出汁のメタボローム解析による含有化合物の推定

カツオ: 362化合物、シイタケ: 352化合物、ニボシ: 346化合物

出汁のHPLC画分による抗炎症能 (NO産生の抑制)

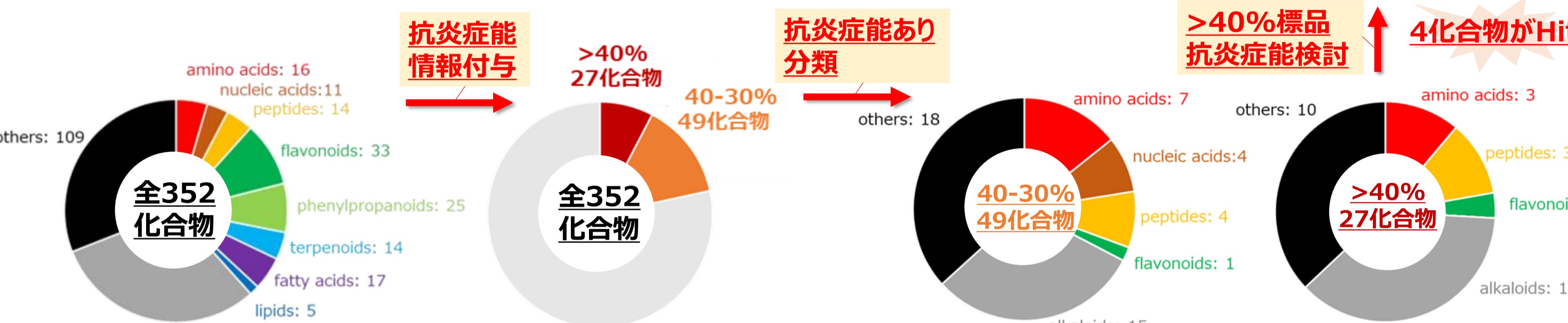
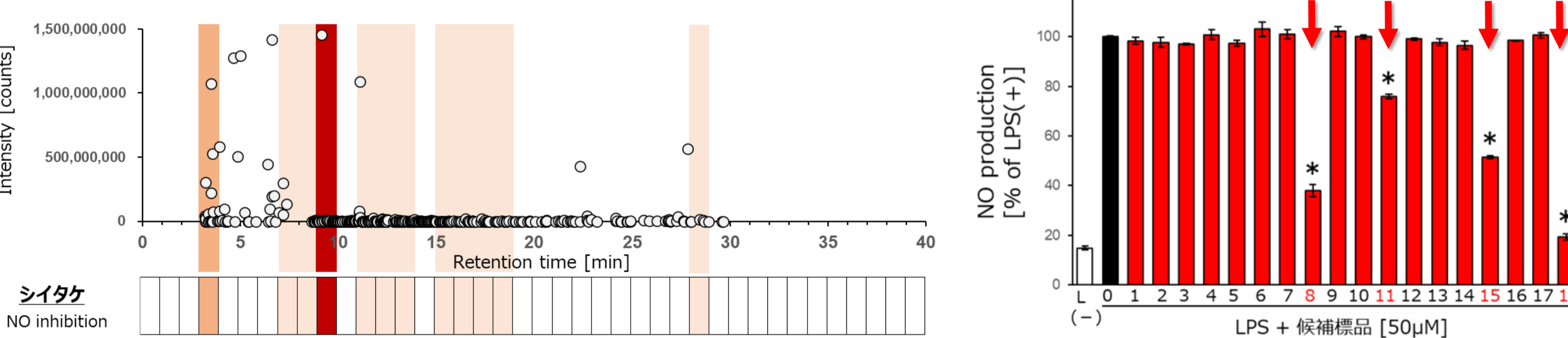
>20%のNO産生抑制
カツオ: 16/40画分、シイタケ: 12/40画分、ニボシ: 7/40画分



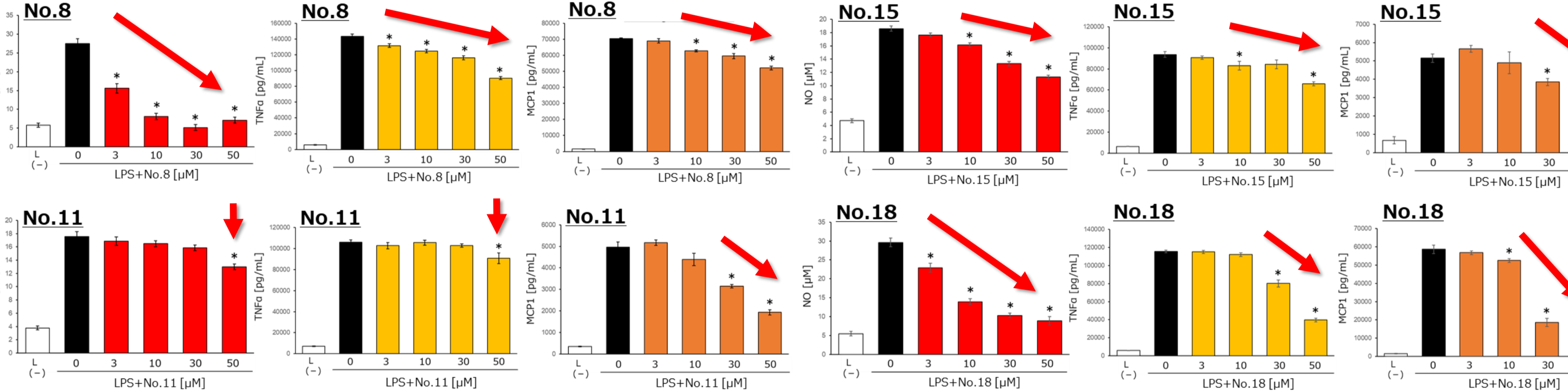
⇒ 3種の出汁が有する抗炎症能は、少数の化合物ではなく、多数の化合物に起因することが示唆された

4. 干しいたけ由来出汁メタボロームへの機能性情報付与による抗炎症化合物の網羅的スクリーニング

シイタケ出汁メタボロームへの抗炎症能情報付与



Hit化合物標品における抗炎症能



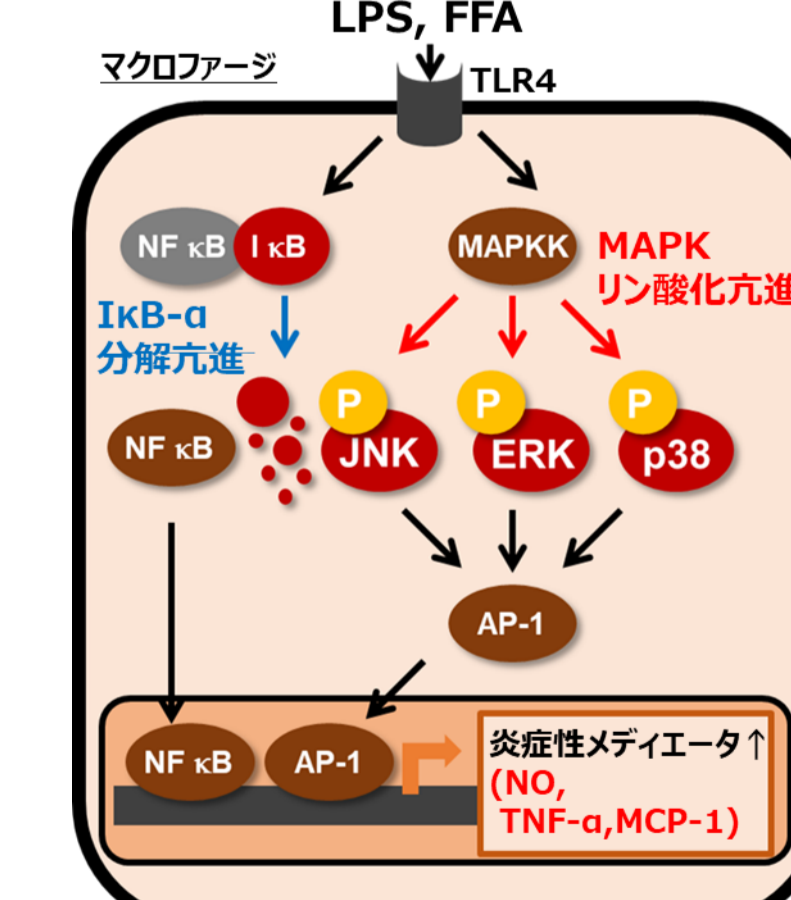
⇒ シイタケ出汁メタボロームへの機能性情報付与による網羅的スクリーニングは、4つの抗炎症化合物を見出した
⇒ シイタケ出汁から見出された4つの化合物の標品は、抗炎症能を示した

5. 干しいたけ由来出汁・Hit化合物における抗炎症能の作用機序の解明

方法 ~抗炎症能の作用機序解明~

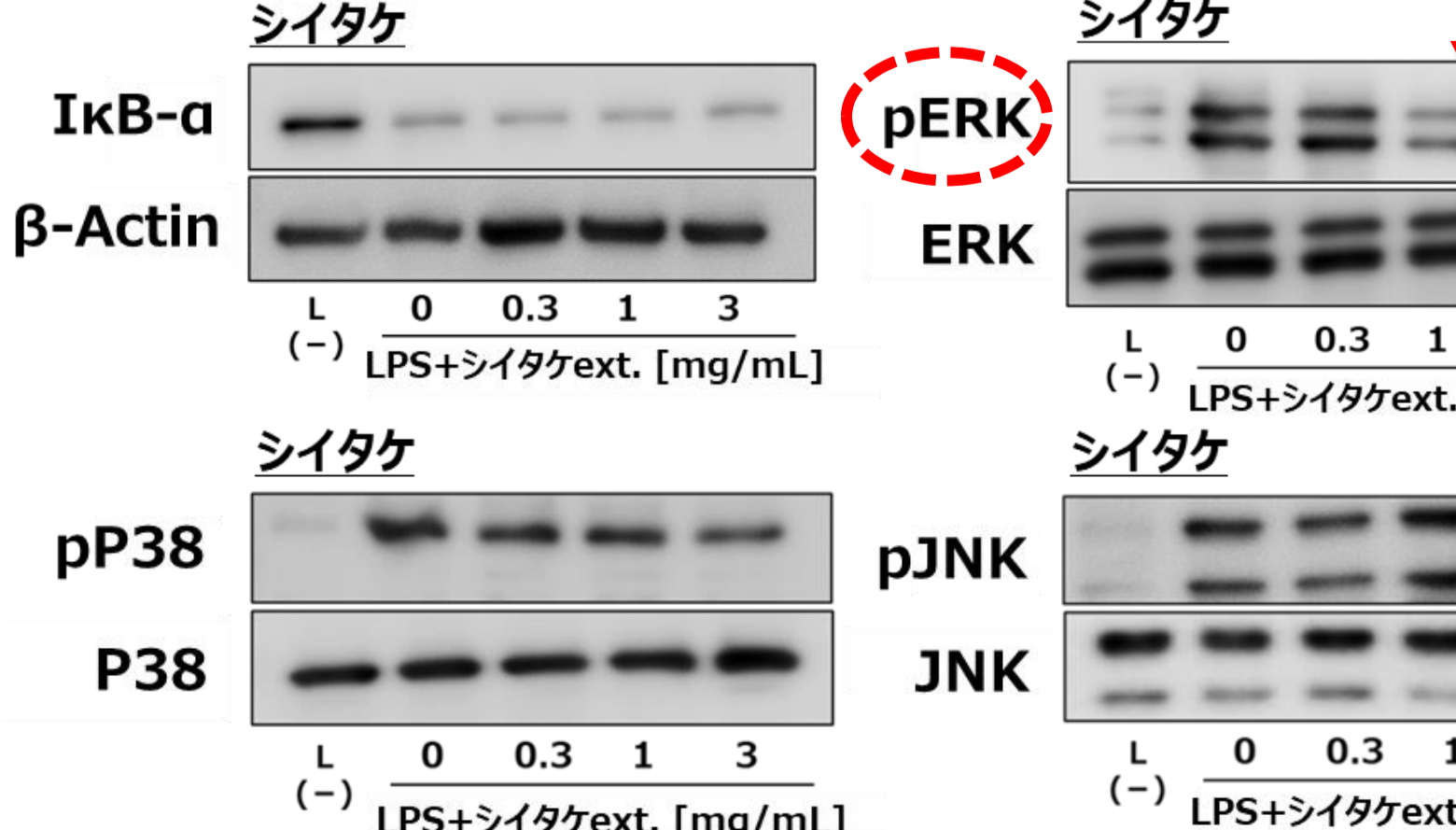
RAW 264 マウスマクロファージ様細胞
12 well plate (5.0×10⁵ cells/mL)
5 hr
LPS (100ng/mL) + 評価sample(出汁/化合物標品)
※LPS: lipopolysaccharide (リボ多糖) ⇒ 炎症反応を惹起
0.5 hr
評価sample添加によるMAPKリン酸化の抑制・IκB-α分解の抑制を検討 (ウエスタンブロッティング)

炎症反応の主なシグナル伝達経路

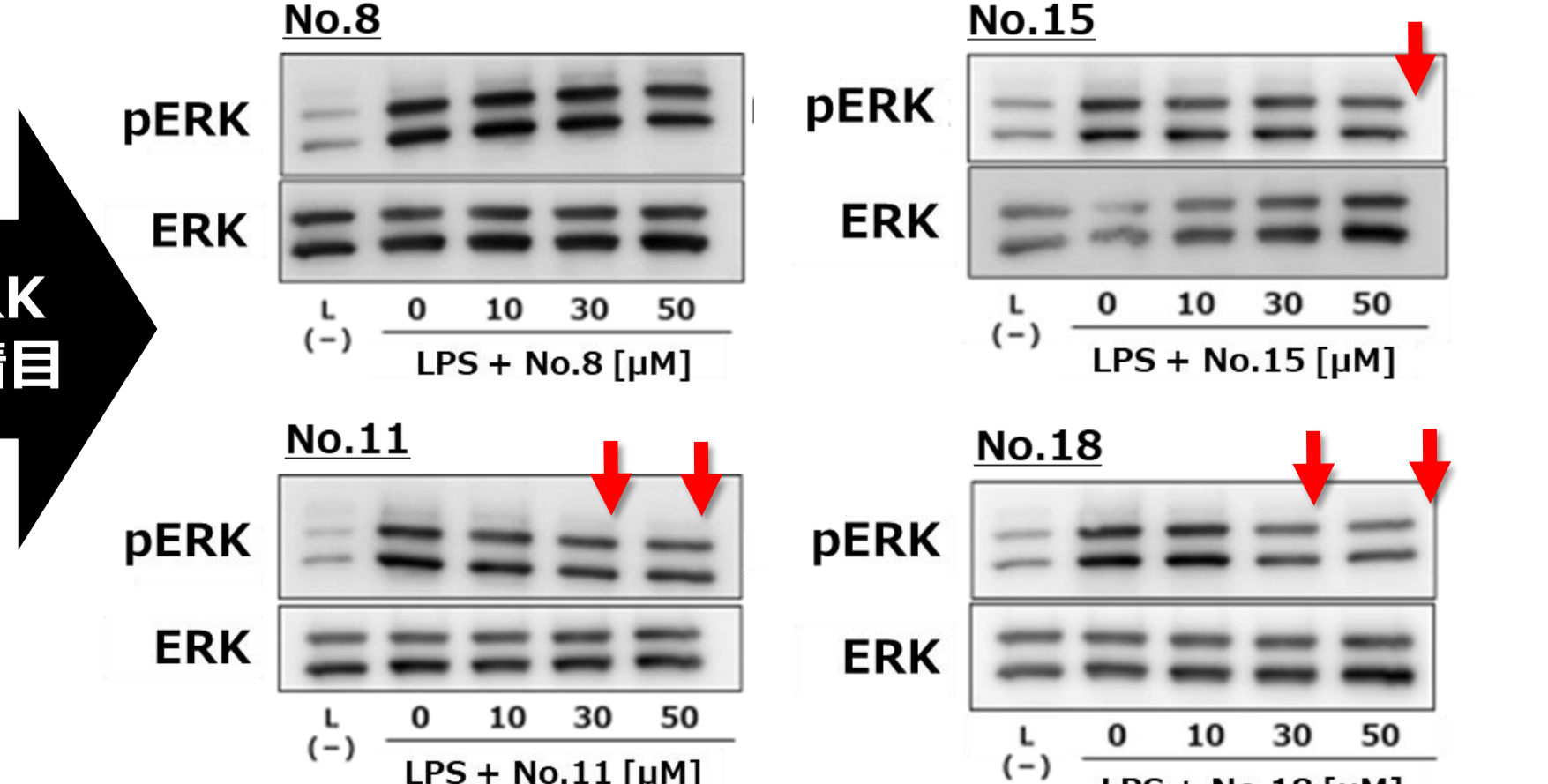


⇒ シイタケ出汁は、抗炎症能の作用機序として、ERKリン酸化亢進を抑制した
⇒ 3種のHit化合物は、シイタケ出汁と同様に、ERKリン酸化亢進を抑制した。

シイタケ出汁における抗炎症能の作用機序の解明



Hit化合物における抗炎症能の作用機序の解明 (ERK)



まとめ

- かつお節・干しいたけ・にぼし由来の出汁は、抗炎症能を示した
- かつお節・干しいたけ・ニボシ由来の出汁が有する抗炎症能は、少数の化合物ではなく、多数の化合物に起因することが示唆された
- 干しいたけ由来出汁メタボロームへの機能性情報付与による網羅的スクリーニングは、4つの抗炎症化合物を見出した。また、4つの取得化合物の標品は、抗炎症能を示した
- 干しいたけ由来出汁は、抗炎症能の作用機序の1つとして、ERKリン酸化亢進を抑制した。また、3つの取得化合物の標品も、ERKリン酸化亢進を抑制した

略語

NO: Nitric oxide, TNF-α: Tumor necrosis factor-α, MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1, LPS: Lipopolysaccharide, MAPKK: Mitogen-activated protein kinase kinase, JNK: c-Jun N-terminal kinase, ERK: Extracellular single-regulated kinase