

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658055

研究課題名(和文)ハスモンヨトウ幼虫を用いた香気物質由来ヒト代謝産物の生産システム構築

研究課題名(英文) Systems construction of production of human metabolism derived from volatile components using *Spodoptera litura*.

研究代表者

宮澤 三雄 (MIYAZAWA, mitsuo)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：40140305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円、(間接経費) 390,000円

研究成果の概要(和文)：植物香気物質(テルペノイド)のヒトによる代謝経路、代謝物を明らかにした。さらには、それらの代謝に関与するP450分子種の特定に成功した。また、ヒトとハスモンヨトウの代謝産物は酷似していることから、ハスモンヨトウ幼虫を用いて、ヒト肝同様のモノテルペン(7種)を基質として代謝研究を検討することで、ヒトと同様の香り物質由来代謝産物の大量生産システムを構築することに成功した。本研究結果から、香り物質由来のヒト代謝産物が安価で、グローバル社会への供給が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated human metabolism of terpenes. Besides, we succeeded in the identification of the P450 species which participated in those metabolism. In addition, we examine a metabolism study as a substrate using *Spodoptera litura* larvae because human metabolism and the metabolism products of *S. litura* closely resemble. Therefore, we succeeded systems construction of production of human metabolism derived from volatile components using *S. litura*. The results suggested that human metabolism products are supplied conveniently to the global society.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：応用昆虫 ハスモンヨトウ 体内動態 テルペノイド

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658055

研究課題名（和文）ハスモンヨトウ幼虫を用いた香気物質由来ヒト代謝産物の生産システム構築

研究課題名（英文）Systems construction of production of human metabolism derived from volatile components using *Spodoptera litura*

研究代表者

宮澤 三雄 (MIYAZAWA, Mitsuo)

研究成果の概要（和文）：植物香気物質（テルペノイド）のヒトによる代謝経路、代謝物を明らかにした。さらには、それらの代謝に関与する P450 分子種の特定に成功した。また、ヒトとハスモンヨトウの代謝産物は酷似していることから、ハスモンヨトウ幼虫を用いて、ヒト肝同様のモノテルペン（7種）を基質として代謝研究を検討することで、ヒトと同様の香り物質由来代謝産物の大量生産システムを構築することに成功した。本研究成果から、香り物質由来のヒト代謝産物が安価で、グローバル社会への供給が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：We investigated human metabolism of terpenes. Besides, we succeeded in the identification of the P450 species which participated in those metabolism. In addition, we examine a metabolism study as a substrate using *Spodoptera litura* larvae because human metabolism and the metabolism products of *S. litura* closely resemble. Therefore, we succeeded systems construction of production of human metabolism derived from volatile components using *S. litura*. The results suggested that human metabolism products are supplied conveniently to the global society.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：応用昆虫・ハスモンヨトウ・体内動態・テルペノイド

### 1. 研究開始当初の背景

「香り分子」に関する報告は感覚的効果を示すものが大半であり、その有効性物質の分子レベルでの体内動態や代謝物の機能性解明に関する物質化学的検証は皆無である。この観点からハスモンヨトウはテルペノイド類の代謝においてヒトと酷似していることを見出した経緯から生体触媒としてはハスモンヨトウを用いて香り物質によるヒト代謝物の生産が可能となると考え、安心・安全で有効な「香り物質」の提供に資する研究と言える。

### 2. 研究の目的

(1) 生体触媒としてハスモンヨトウ幼虫を有効利用した植物香気物質のヒト代謝物を安価に供給できる生産システムの構築

(2) 科学的根拠に基づいた情報を社会に発信し、香り物質とヒト代謝物の機能性解明

### 3. 研究の方法

(1) 香り物質のヒトによる代謝経路、代謝物の探索

①本研究において基質となる香り物質は鎖状のモノテルペンを中心に匂いに関与する物質を用いた。

②様々なモノテルペノイドを *in vitro* の系を用いたヒト肝ミクロソームにより代謝反応を検討した。

③代謝に関与する酵素の特定を行うため、特定の P450 の分子種のみを発現させた発現系 P450 を用いて代謝反応を検討した。

④発現系試験で活性を示した P450 分子種に対して、その特異的阻害剤による阻害試験を行うことで発現性試験の信頼性を高めた。

⑤代謝経路および代謝物の構造を解明した。

(2) 香り物質のハスモンヨトウによる代謝経路、代謝物の探索

①P450 で代謝反応を行った香り物質について

てハスモンヨトウでも代謝反応を行った。4-5 齢のハスモンヨトウ 30-50 匹に経口投与で香り物質（テルペノイド類）を混入した人工飼料を与えその排泄物を回収し代謝物を得た。

②ハスモンヨトウとヒトとの代謝物が同様であることを確認した後、大量生産のシステムを構築に着手した。同様でない場合はより多くの香り物質をシトクロム P450 で代謝反応を検討した。

(3) ハスモンヨトウによるヒト代謝産物の大量生産システムの構築

香り物質の添加濃度を変化させ、最もよい代謝効率を選定した。その条件で4-5 齢のはスモンヨトウ 1000 匹程度に経口投与でテルペノイド類を混入したエサを与え、排泄物から抽出により代謝物を得た。

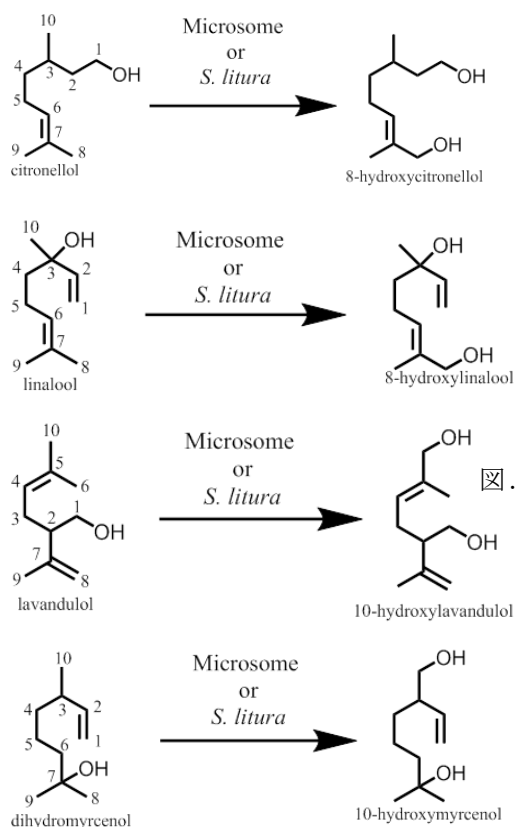
#### 4. 研究成果

(1) ヒト肝ミクロソームによる香り物質の代謝および分子種決定

様々な植物等に含有する香り物質の nerol, geraniol, および myrtenol を基質としヒト肝ミクロソームの代謝実験を行い、その代謝に関与する P450 分子種の決定および代謝物の構造を明らかにした。しかしながら、ハスモンヨトウと同様の代謝物が得られなかったため、鎖状のモノテルペンである citronellol, linalool, lavandulol および dihydromyrcenol に対して同様の試験を実施し各代謝物の構造、代謝に関与する分子種を明らかにした。

(2) ハスモンヨトウによる香り物質の代謝および代謝物の大量生産システムの構築

結果(1)に示した7種のテルペノイドに対してハスモンヨトウで代謝を行った。その結果、4種の鎖状モノテルペン (citronellol, linalool, lavandulol および dihydromyrcenol) においてヒトの代謝物と同様の物質を確認することに成功した。この結果を踏まえて、ハスモンヨトウによるヒト代謝物の大量生産システム構築に着手した。Citronellol, linalool, および lavandulol ではハスモンヨトウを用いることで50%以上と比較的高い収率でヒト同様の代謝物を得ることに成功した。Citronellol は8位の末端メチルに一原子酸素導入が進行した 8-hydroxycitronellol (72%), linalool は 8-hydroxylinalool (92%), lavandulol が 10-hydroxylavandulol (52%), dihydromyrcenol は 10-hydroxymyrcenol (26%)であることを明らかにした。



Biotransformation of monoterpenes by microsome or *S. litura*

表. Metabolism of monoterpenes by P450 or *S. litura*

compounds	metabolite	CYP	yield ( <i>S. litura</i> )
citronellol	8-hydroxycitronellol	1A2	72%
linalool	8-hydroxylinalool	2B6	92%
lavandulol	10-hydroxylavandulol	-	52%
dihydromyrcenol	10-hydroxymyrcenol	-	26%

#### 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 12 件)

- 1) Yusei Kashima, Satoshi Nakaya, Mitsuo Miyazawa, Volatile components with aroma properties of Indian heral medicine *Pavonia odorata*-used in Ayurveda, *J. Oleo Sci.*, 査読有, 63, 2014, 149-158.
- 2) Atsushi Usami, Toshiro Ono, Yusei Kashima, Hiroshi Nakahashi, Shinsuke Marumoto, Sota Nosaka, Shogo Watanabe, Mitsuo Miyazawa, Comparison of agitake (*Pleurotus eryngii* var. *ferulae*) volatile componets with characteristic odors extracted by hydrodistillation and solvent-assisted flavor evaporation, *J. Oleo Sci.*, 査読有, 63,

- 2014, 83-92.
- 3) Megumi Iwasa, Toshiki Iwasaki, Toshirou Ono, Mitsuo Miyazawa, Chemical composition and major odor-active compounds of essential oil from *Pinellia Tuber* (dried rhizome of *Pinellia ternata*) as Crude Drug, *J. Oleo Sci.*, 査読有, 63, 2014, 127-135.
  - 4) Yusei Kashima, Mitsuo Miyazawa, Synthesis, antioxidant capacity, and structure-activity relationships of tri-*O*-methylnorbergenin analogues on tyrosinase inhibition, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, 23, 2013, 6580-6584.
  - 5) Atsuhiko Nakamura, Mitsuo Miyazawa, Evaluation of volatiles from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *heterophylla* Using GC-Olfactometry, GC-MS and GC-pulsed flame photometric detector, *J. Oleo Sci.*, 査読有, 62, 2013, 645-655.
  - 6) Atsuhiko Nakamura, Toshirou Ono, Nobuo Yagi, Mitsuo Miyazawa, Volatile compounds with characteristic aroma of boiled sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cv Ayamurasaki, *I. batatas* L. cv Beniazuma and *I. batatas* L. cv Simon 1), *J. Essent. Oil Res.*, 査読有, 25, 2013, 497-505.
  - 7) Toshiyuki Takahashi, Mitsuo Miyazawa, Biotransformation of serotonin derivatives by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*), *Nat. Prod. Res.*, 査読有, 27, 2013, 592-596.
  - 8) Nobuo Yagi, Hiroshi Nakahashi, Tomohiro Kobayashi, Mitsuo Miyazawa, Characteristic chemical components of the essential oil from white kwao krua (*Pueraria mirifica*), *J. Oleo Sci.*, 査読有, 62, 2013, 175-179.
  - 9) Mitsuo Miyazawa, Machi Nomura, Shinsuke Marumoto, Kiyoshige Mori, Characteristic odor components of essential oil from *Scutellaria laeteviolacea*, *J. Oleo Sci.*, 査読有, 62, 2013, 51-56.
  - 10) Yusei Kashima, Mitsuo Miyazawa, Synthesis and biological evaluation of bergenin analogues as mushroom tyrosinase inhibitors, *Arch. Pharm. Res.*, 査読有, 35, 2012, 1533-1541.
  - 11) Mitsuo Miyazawa, Tsukasa Nagata, Hiroshi Nakahashi, Toshiyuki Takahashi, Characteristic odor components of essential oil from *Caesalpinia decapetala*, *J. Essent. Oil Res.*, 査読

有, 24, 2012, 441-446.

- 12) Atsunori Msuda, Kiyoshige Mori, Mitsuo Miyazawa, Comparative analysis of volatile compounds from corms of *Crocus sativus* and *C. vernus*, *Chem. Nat. Comp.*, 査読有, 48, 2012, 319-321.

[学会発表] (計 7件)

- 1) 清水 良祐、伊東星都、宮澤三雄、ヒト肝ミクロソーム中のシトクロム P450 による 4-thujanol の変換、香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、平成 25 年 10 月 5~7 日、埼玉。
- 2) 宇佐見 享嗣、野阪 創太、宮澤 三雄、生体触媒としてハスモンヨトウを用いた camphorquinone の生物変換、香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、平成 25 年 10 月 5~7 日、埼玉。
- 3) 本岡 良太、宇佐見 享嗣、宮澤 三雄、生体触媒としてハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) を用いた Lime oxide T の生物変換、香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、平成 25 年 10 月 5~7 日、埼玉。
- 4) 伊東星都、宮澤三雄、ヒト肝ミクロソーム中のシトクロム P450 による geraniol の変換、香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、平成 24 年 10 月 27~29 日、鹿児島。
- 5) 宮澤三雄、精油構成分子のヒト体内動態と機能性発現、香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、平成 24 年 10 月 27~29 日、鹿児島。
- 6) 神足 悟史、宮澤 三雄、生体触媒としてハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) を用いた 4-thujanol の生物変換、平成 24 年 10 月 27~29 日、鹿児島。
- 7) 宇佐見 享嗣、神足 悟史、堀部 功、宮澤 三雄、生体触媒としてハスモンヨトウを用いた (+)-および (-)-camphene の生物変換、平成 24 年 10 月 27~29 日、鹿児島。

[図書] (計 1件)

宮澤三雄 (監修・著者)、日経 BP、アロマのある空間、2012、167

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮澤三雄 (MIYAZAWA Mitsuo)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号: 40140305