

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660109

研究課題名(和文) In situメタボロミクスによる機能性食品成分の新しい評価

研究課題名(英文) Investigation of new evaluation approach of functional food factors using in situ metabolomics

研究代表者

財満 信宏 (ZAIMA, Nobuhiro)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：40455572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品に含まれる機能性成分には疾患を予防する効果があることが報告されている。機能性成分の作用機序に関する研究は多く行われているが、摂取した機能性成分が体内の「どこ」に「どのような形」で存在しているのかを評価する手法は十分には確立されていない。機能性成分が体内のどこにどのような形で存在しているのかを明らかにすることは、食品が私たちの体に与える影響のメカニズムを理解するための重要な手がかりとなる。本研究では、質量分析イメージングという技術を利用して、摂取した食品中の機能性成分が体の「どこ」に「どのような形で」分布し、その場で「どのような影響を与えるのか」を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is well known that functional food factors have the preventive effect on the diseases. There are several studies on the action mechanism of the functional food factors. However, the research method to investigate the dynamics of functional food factor remains to be established. Because the information provides important clues to clarify the action mechanism of the functional food factors, we aim to establish the research method to investigate the dynamics of functional food factors using mass spectrometry imaging.

研究分野：食品科学、病態検査学

キーワード：食品科学 質量分析イメージング 代謝物分布

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進展につれて、毎日の食事を通じて疾患発症を予防したいというニーズが高まっている。疾患発症予防機能を有する食品に含まれる成分は、機能性食品成分（機能性成分）と呼ばれ、機能性成分の研究は盛んに行われている。これまでの多くの優れた基礎研究により、食品の持つ機能性や、機能性成分の構造が明らかにされてきた。これらの機能性成分の作用機序を明らかにする際に、「肝臓への影響」、「脳への影響」、「血管への影響」などといった、マクロな観点で臓器への影響を評価することが一般的であった。しかしながら、例えば、血管は内膜、中膜、外膜の三層に分かれ、さらに各々の層には種々の細胞が存在して機能的な組織を構成しており、摂取した機能性成分が血管のどの領域に分布するのかによって、機能性成分が及ぼす影響が全く異なってくるため、臓器レベルのマクロな視点に加え、解析対象領域の「どこ」に機能性成分が存在しているのかを明らかにすることは極めて重要である。また、機能性成分の作用機序を明らかにする研究手法として、食品中に含まれる機能性成分と同一の化合物を細胞に添加してその影響を評価するという手法が用いられることがあるが、摂取した機能性成分は、消化・吸収の過程を通じて代謝されることが多く、組織に到達する際には、食品中に存在する形とは異なった代謝体で存在する可能性も考慮しなければならない。

研究開発当初は、摂取した機能性成分が「どのような代謝体」で、「どこの組織に」到達し、「その場で代謝にどのような影響を及ぼすのか」を統合的に明らかにする手法が十分には確立されていなかった。

2. 研究の目的

項目1で記述したように、摂取した機能性成分が「どこに」、「どのような形」で存在し、「その場でどのような影響を与えるのか」を統合的に明らかにする手法が十分には確立されていなかった。レーザーマイクロダイセクションや *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS)、オートラジオグラフィーなどの複数の技術を組み合わせることによっても知見を得ることは可能であるが、レーザーマイクロダイセクションはあらかじめ採取する場所を決定する必要があるためノンターゲット解析には不向きであり、LC-MS/MS は高感度で特異的な定量解析には適しているが、分子の局在情報を得ることができない。また、オートラジオグラフィーはインタクトな分子と代謝物を区別することができない。そこで、機能性成分の代謝と局在を同時に解析することが可能な質量分

析イメージングによって、上記課題を解決しようと試みた。本研究では、局在情報を伴う代謝変動解析を *in situ* メタボロミクスと定義し、*in situ* メタボロミクスによる新たな機能性成分の評価手法の確立とその有効性を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で使用する機能性成分は、動物への投与が可能なほどの量が確保でき、かつ、質量分析イメージングによる測定が可能である必要がある。このような条件を満たす機能性成分を見出すために、研究項目(1)として、機能性成分のスクリーニングを行った。その後、研究項目(2)として、動物組織切片の解析条件の検討、研究項目(3)として機能性成分を投与した動物を用いて *in situ* メタボロミクスを行った。

(1) 機能性成分のスクリーニング

質量分析イメージングによって機能性成分の測定をするために、機能性成分の標品を用いて、検出条件の検討を行った。質量分析イメージングによる解析のためには、試料をイオン化させることが必要となる。本研究ではマトリックス補佐レーザー脱離イオン化法 (MALDI) によって、試料をイオン化させた。標品を検出するための検討項目は、マトリックスの種類、レーザー光径、レーザー出力、MS/MS 条件などである。標品を用いた条件検討が終了した後、その成分を含む農作物などを用いて、夾雑物が存在する組織切片上でも検出が可能かどうかを評価した。切片上での検出の際に追加で検討した項目は、上記に加えて、切片厚の検討、マトリックスの溶媒の組成検討である。

(2) 動物組織切片の解析条件の検討

動物組織を用いた *in situ* メタボロミクスを行うにあたり、動物組織を測定するための条件検討を行った。本研究で対象とした臓器は、脳、血管、肝臓、筋肉、膵臓、精巣である。これらのうち、脳、血管、肝臓は研究開始前に条件検討を確立していたため、本研究では、論文などを参考にして筋肉、膵臓、精巣の切片の解析法を検討した。

(3) 機能性成分を投与した動物を用いた *in situ* メタボロミクス

研究項目(1)と(2)の結果をもとに、動物に投与する機能性成分を決定し、*in situ* メタボロミクスを行った。*In situ* メタボロミクスの主な検討項目は、機能性成分の投与量、投与回数、投与後から臓器を回収するまでの時間である。回収した臓器は切片化し、MALDI

型質量分析装置で切片上に存在する代謝物の分析を行った。

4. 研究成果

(1) 機能性成分のスクリーニング

機能性成分の検出

機能性成分標品を用いて、検出条件を検討し、MS/MS データの取得、ライブラリー化を行った。

コメ胚乳中のリゾホスファチジルコリンの分布

コメ切片を用いて、機能性成分の検出条件の検討を行っている際に予想外の結果として、コメ胚乳中におけるリゾホスファチジルコリン(LPC)の特徴的な分布を見出した。LPCはリン脂質の一種であり、グリセロール骨格に結合する脂肪酸の種類によって様々な分子種が存在する。コメ胚乳においては、パルミチン酸(飽和脂肪酸の一種)、ステアリン酸(飽和脂肪酸の一種)、オレイン酸(不飽和脂肪酸の一種)、リノール酸(不飽和脂肪酸の一種)が主に結合している脂肪酸である。質量分析イメージングによって、各脂肪酸が結合したLPCの分布を可視化した結果、パルミチン酸が結合したLPCは胚乳に一樣に存在するのにに対し、リノール酸が結合したLPCはコメの腹側、オレイン酸が結合したLPCは背側、ステアリン酸が結合したLPCは中央部にそれぞれ多く存在した。脂肪酸の違いによるLPCの特徴的な分布は、高品質な日本酒の製造という観点から興味深い知見である。コメは日本酒の原料であり、コメの精米歩合が低くなる(コメを削る領域を広くする)につれて、日本酒の品質が向上することが古くから知られているが、不飽和脂肪酸は日本酒の品質を低下させる可能性が示唆されている。質量分析イメージングによるLPCの分布を観察した結果、リノール酸やオレイン酸などの不飽和脂肪酸が結合したLPCは、吟醸酒や大吟醸酒の製造に必要とされる50~60%の精米歩合で多くが除去されていることが分かった。米の精米歩合が低くなるにつれて日本酒の品質が向上する理由について、これまでは、日本酒の品質低下の原因となるタンパク質、中性脂肪やビタミンなどが米の外層部に存在し、精米によってこれらを除去することが可能になるためであると説明されてきたが、不飽和脂肪酸を結合したLPCの分布の観点からも日本酒の品質向上の理由が説明できる可能性がある。LPCの分布と日本酒の品質の関係については現時点では推測の域を出ないが、今後の研究課題として興味深い。

(2) 動物組織切片の解析条件の検討

筋肉、膵臓、精巣の切片の解析法を検討し、測定するための条件を確立した。

(3) 機能性成分を投与した動物を用いた in situメタボロミクス

エイコサペンタエン酸(EPA)を投与した動物の脳、肝臓、膵臓におけるEPAの動態分布を可視化した結果、脳においてEPAは検出されなかった。肝臓においては全域に検出された。膵臓においては、膵臓実質ではなく、膵臓中に存在する脂肪細胞の領域で強く検出された。EPAは遊離脂肪酸の形ではなく、ホスファチジルコリンに取り込まれた形で存在していた。精巣、血管においてもEPAの存在は確認されたが、その分布については今後の検討を必要とする。また、EPAの投与により特徴的に変動する血清成分を発見し、EPAの動態と関連する可能性があることを視覚的に見出した。この知見に関しては、現在論文として投稿中である。この成果はin situメタボロミクスが有効であることを実証する成果であり、今後、食品の機能性を評価するための新たなツールとしての活用が期待される。

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)

久後 裕菜、山本 彩実、森山 達哉、財満 信宏、質量分析イメージング法による脂質の可視化、オレオサイエンス、査読無(招待) in press

久後 裕菜、山本 彩実、森山 達哉、財満 信宏、イメージング質量分析の食品科学への応用、Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan、査読無(招待)、2016、11-15 DOI: <http://doi.org/10.5702/massspec.S16-03>

Zaima, N., Yoshimura, Y., Kawamura, Y., Moriyama, T., Distribution of lysophosphatidylcholine in eddosperm of *Oryza sativa* rice, Rapid Commun. Mass Spectrom, 査読有、2014、1515-1520 DOI:10.1002/rcm.6927.

[学会発表](計7件)

Zaima, N., Yoshimura, Y., Kawamura, Y., Moriyama, T., Distribution of metabolites in eddosperm of *Oryza sativa* rice, 106th AOCs Annual Meeting, 2015年5月3-6日、Rosen Shingle Creek Orlando, Florida(USA)

財満 信宏、イメージングマススペクト

ロメトリーの原理と分析事例、第 45 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2014 年 11 月 29 日、中部大学（愛知県・春日井市）

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリーによる食品機能研究、第 59 回食品新素材研究会、2014 年 9 月 14 日、京都テルサ（京都・京都市）

財満 信宏、イメージング質量分析の食品科学への応用、第 41 回 BMS コンファレンス、2014 年 7 月 19 日、能登ロイヤルホテル（石川県・羽咋郡）

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリーによるスフィンゴ脂質の可視化、日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム、2014 年 3 月 30 日、明治大学（神奈川県・川崎市）

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリー、第 12 回ホスファチジルセリン研究会、2013 年 11 月 8 日、東京海洋大学（東京都・港区）

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリーによる機能性食品成分の可視化、第 8 回メタボロームシンポジウム、2013 年 10 月 8 日、九州大学（福岡県・福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

財満 信宏（ZAIMA, Nobuhiro）

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：40455572