

公益社団法人日本農芸化学会中部支部  
第 164 回例会

受賞講演  
および  
シンポジウム  
「生活習慣病とライフスタイルイノベーション」

講演要旨集

日時：平成24年6月30日（土）

会場：信州大学農学部30番講義室

（長野県上伊那郡南箕輪村 8304）

主催：公益社団法人 日本農芸化学会中部支部

共催：信州大学農学部

## 日本農芸化学会中部支部第 164 回例会

日時：平成 24 年 6 月 30 日(土)12:50 より

会場：信州大学農学部(長野県上伊那郡南箕輪村 8304)

参加費：無料

### プログラム

12:50-13:00 支部活動報告

13:00-14:00 平成 24 年度日本農芸化学会奨励賞 受賞講演

13:00 「構造が複雑なシアル酸含有糖鎖および糖脂質の合成化学的研究」

安藤弘宗 (岐阜大学応用生物科学部)

13:30 「微生物発酵法による植物アルカロイド生産とその応用」

南博道 (石川県立大学生物資源工学研究所)

14:00-16:15 シンポジウム

14:00 「肥満遺伝子の同定とその制御」

盧尚建 (東北大学大学院農学研究科)

14:30 「食品成分による糖尿病関連遺伝子の発現制御メカニズム」

山田一哉 (松本大学大学院健康科学研究科)

15:00 休憩

15:15 「食品タンパク質の脱アミド化による機能改善～脱アミド化大豆グロブリン  
によるカルシウム吸収促進・骨粗鬆症予防効果を中心にして～」

熊谷日登美 (日本大学生物資源科学部)

15:45 「生活習慣病・介護予防のための新しい運動処方システム」

能勢博 (信州大学大学院医学系研究科)

16:30-18:00 懇親会 (生協食堂)

# 日本農芸化学会受賞講演

## 講演要旨

# 構造が複雑なシアル酸含有糖鎖および糖脂質の合成化学的研究

岐阜大学応用生物科学部および京都大学物質—細胞統合システム拠点

安藤 弘宗

はじめに

自然は、精緻な技により多様で膨大な分子を産み、それらを絶妙に配剤し、生命の綾を永々と織り続けている。生命現象を分子単位に還元し、分子の構造および化学的、物理的な性質と分子間の関連性から個々の現象を読み解く上で、生体分子の精密な再構築（精密合成）と機能性プローブの創製は極めて重要な役割を担っている。我々が研究対象としている「糖鎖」およびそのタンパク質、脂質複合体である「複合糖質」は、主に糖鎖—タンパク質相互作用を介して細胞表層での分子認識、細胞認識に深く関わっており、細胞と外界の境界線で起こる様々な現象の理解に不可欠な生体分子である。糖鎖はポリオール化合物である単糖を構造単位とするため、単糖の各水酸基が結合の起点となり、核酸やタンパク質には見られない多様な分岐構造を形成する。この糖鎖特有の構造多様性こそが分子レベルでの糖鎖研究を困難にしている主因であり、糖鎖合成化学が重要たる所以と言える。糖鎖合成の本質はよく「グリコシル化と保護基の化学」と単純明快に纏められるが、これらの化学は密接かつ複雑に関連しており、合成ユニットの保護基の兼ね合い（orthogonality）を考慮するだけでは、複雑な糖鎖を合成することはほぼ不可能に近い。我々は、シアル酸を含む糖脂質の一群であるガングリオシドの生物学的意義の解明に向けて、多様かつ複雑な構造を有するシアル酸含有糖鎖およびガングリオシドの強力な合成法の攻究に傾倒してきた。本講演では、その成果を紹介させていただく。

## 1. 複雑なシアル酸含有糖鎖を構築するための有用な合成反応の開発

生体で機能発揮する糖鎖に含まれるシアル酸は、部分的な構造修飾を受けた 50 以上の類縁体をもつ分子多様性に富む酸性九炭糖である。シアル酸の類縁体は動物種、組織臓器間で厳密に使い分けられており、このシアル酸の多様性に対応した合成法の開発は、糖鎖機能の分子レベルの理解の為に欠くことができない。しかし、これまでの手法は一種類のシアル酸（N-アセチルシアル酸）を対象としたものであり、シアル酸多様性への対応が困難である上、グリコシド化反応の効率において改善の余地があった。我々は、C5 位アミノ基に 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) 基を導入したシアル酸供与体が優れた反応性を示すことを発見した。これにより、従来法でのグリコシド化反応の効率改善に成功した。更に、Troc 基の選択的脱保護とその後に随伴する位置選択的 O→N アセチル転位反応を利用した 6 種のシアル酸主要分子種への変換経路を確立した。

シアル酸の類縁体は他のシアル酸とグリコシド結合して多量体を形成し、さらに構造が多様化することが知られている。しかし、C5 位アミド基との水素結合の影響により、シアル酸の水酸基の反応性は低下しているため、グリコシド化反応による二量体の合成は困難を伴って

いた。我々は、ラクタム化でシアル酸を舟形配座に固定し、水酸基とアミド基との水素結合を解消することにより、水酸基の反応性を向上させることに成功し、合成が困難であったシアル酸二量体の効率的合成法を確立した。また、シアル酸ラクタム化が天然型の  $\alpha$  グリコシドに対して特異的に進行することを利用して、クロマトグラフィーでは分離困難な立体異性体混合物から  $\alpha$  グリコシド体のみを簡便に分離する手法も開発した。この手法を応用して、シアル酸四量体の構築にも成功した。

2. 神経突起伸展活性を有する棘皮動物由来シアロ糖鎖合成およびガングリオシドの全合成  
棘皮動物（ヒトデ、ナマコ等）より発見されたガングリオシドには、強力な神経突起伸展活性があることが知られており、近年、神経機能回復薬のリードとして注目されている。それらの糖脂質は哺乳類には見られない複雑なシアル酸二量体、三量体を含む糖鎖を有していることが特徴であるが、合成標品を用いた構造活性相関研究は未着手の状態である。そこで、我々は、上述のシアル酸含有糖鎖合成法を基盤として、3種の新規糖鎖 (HP-s6, HPG-1, HPG-7) の合成、2種のガングリオシド (HLG-2, LLG-3) の全合成を世界で初めて達成した (図1)。さらに、合成した糖鎖を用いて、PC12 細胞に対する神経突起伸展活性を初めて確認した。

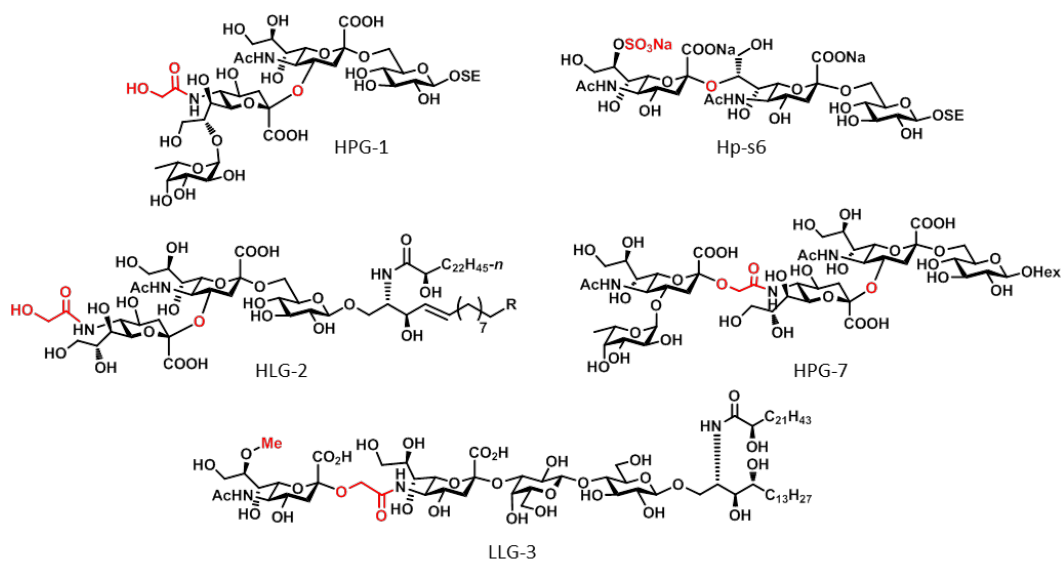


図1. 本研究で合成した棘皮動物由来ガングリオシド

### 3. 哺乳動物の神経系に発現するガングリオシドの合成法の確立

哺乳動物の神経系に特異的に発現しているガングリオシドは微量成分でありながら、神経回路網形成、記憶形成保持、中枢神経疾患、自己免疫性神経疾患に関わる糖脂質成分として注目されている。また、細胞膜マイクロドメインである脂質ラフトの構成分子として、シグナル伝達の制御に関与しており、脂質ラフトの機能解明のためにもガングリオシドの合成は重要な課題である。これらの神経系ガングリオシドの糖鎖は複雑な分岐構造を有しているため、化学合成の難度が高く、神経ガングリオシドと神経機能、神経疾患の研究は進展していないのが現状である。また、従来

法では多段階を経て合成した糖鎖に長鎖脂質を効率的に導入することも困難であり、ガングリオシドという最終構造の目前に脂質導入という難路が待ち受けていた。我々は神経系ガングリオシドの合成に向けて、まずこの脂質導入の低効率を解決することに着手した。ガングリオシドに共通して含まれる脂質であるセラミドは長鎖アルキル基からなる疎水性部位とアミド結合および水酸基からなる親水性部位を有するため、分子間で疎水-疎水結合と水素結合が発生し、高い凝集性を示す。そのため、糖鎖とのグリコシル化は低収率に留っていた。我々は、セラミドと還元末端の単糖残基（グルコース）の保護体を連結させたグルコシルセラミド（Glc-Cer）と、グルコースを除いた糖鎖部分をグリコシル化することでガングリオシド骨格を高収率で構築できることを見出した。また、この時中程度の収率に留まっていたグルコースとセラミドのグリコシル化反応を、グルコースとセラミドの架橋体の分子内グリコシル化反応によって効率化することに成功し、Glc-Cer を脂質導入ユニットとして用いる Glc-Cer カセット法を確立した。神経系ガングリオシドの糖鎖部分の合成では、糖鎖部分に共通するシアル酸分岐三糖の構築が課題であったため、まず、上述した N-Troc シアル酸供与体によるグリコシル化により大量かつ効率的に分岐構築の鍵となるシアリルガラクトース二糖を合成する手法を確立した。次に、この二糖へガラクトサミンを高収率で結合させ分岐三糖中間体とし、さらに三糖受容体、三糖供与体へと効率的に誘導する経路を開発した。

このシアル酸分岐糖鎖構築法と前述の Glc-Cer カセット法を基盤として、我々は、自己免疫神経疾患の発症に関わる脳ガングリオシド X1（分岐七糖含有）X2（分岐八糖含有）、ギランバレー症候群関連ガングリオシド GalNAc-GD1a（分岐七糖含有）の全合成に初めて成功した（図 2）。

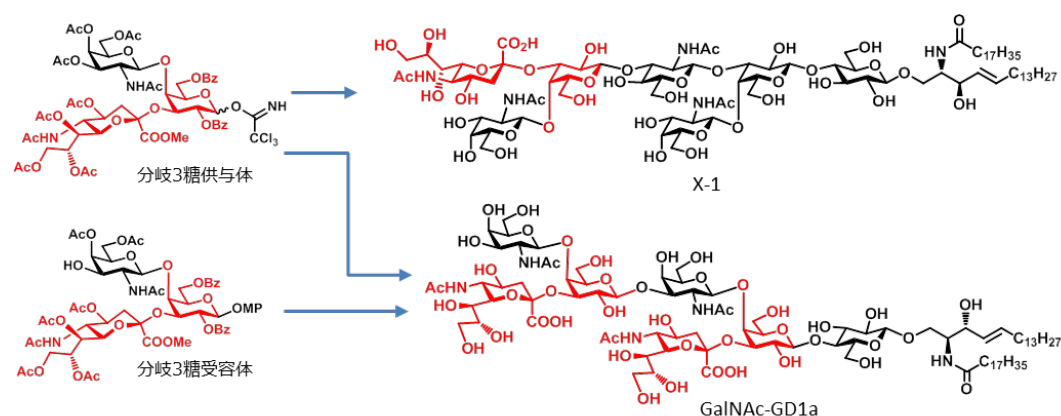


図 2. 本研究で合成した神経系ガングリオシド

おわりに

我々は、「自然界の糖鎖の多様性をどれだけ再構築できるのか」という挑戦を続けてきた。その結果、本稿でご紹介したように複雑な構造を持つシアル酸含有糖鎖ならびにガングリオシドの合成が可能となった。しかし、ガングリオシドだけでも合成不可能な構造が多数存在しており、課題は山積している。「自然は意を以て分子を配する」の前提に立てば、糖鎖の多様性の謎は深まるば

かりである。我々はさらに自然が擁する糖鎖の多様性への合成化学的な挑戦を続けるとともに、実践的な合成法を橋頭堡として糖鎖の意義解明に資する異分野融合研究を展開し、糖鎖の神秘に迫りたいと考えている。

本研究は、岐阜大学応用生物科学部応用生命科学課程生理活性物質学研究室で行われたものです。私を糖鎖の世界に導いていただきました岐阜大学教授故長谷川明先生、そして、この研究の機会と恵まれた研究環境をお与えいただき、学生時代より温かく見守っていただいている岐阜大学教授木曾真先生、石田秀治先生に衷心より感謝申し上げます。また、合成ガングリオシドを使った神経突起伸展実験でご協力を頂いた岐阜大学准教授矢部富雄先生、矢部律子女史に深謝申し上げます。本研究成果は、岐阜大学応用生物科学部生理活性物質学研究室の卒業生、研究員ならびに在校生の不断の努力が実を結んだものです。共に研究ができた倖せに感謝し、昼夜兼行で研究に専心して下さった諸兄諸姉に心よりの敬意と謝意を表します。

#### 略歴

氏名：安藤 弘宗

学位：博士（農学）

平成11年3月 岐阜大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻博士課程 修了  
（指導教官：長谷川 明教授、木曾真教授）

この間、平成8年12月～平成9年10月

Medical College of Virginia Commonwealth University (Research Fellow, Prof. Robert K. Yu)

平成11年4月 科学技術振興事業団 CREST 博士研究員（チームリーダー：中原義昭教授、赴任先：理化学研究所 細胞制御化学研究室（伊藤幸成主任））

平成13年4月 岐阜大学農学部 教務補佐員

平成14年4月 日本学術振興会 特別研究員

平成15年10月 岐阜大学生命科学総合研究支援センター 助手（19年より助教）

平成20年3月 現職

現在に至る

# 微生物発酵法による植物アルカロイド生産とその応用

石川県立大学生物資源工学研究所

南 博道

## はじめに

高等植物は、アルカロイド、テルペノイド、フラボノイド等の様々な有用二次代謝産物を生産する。多様な二次代謝産物のなかでも、アルカロイドは少量で顕著な生理活性を示すため、市販されている医薬品原料として非常に高い需要がある。植物の生産する約 12,000 種類のアルカロイドの中で、イソキノリンアルカロイド (IQA) と呼ばれるグループは、インドールアルカロイドと並んで最も大きな一群を構成しており、モルヒネやコデインをはじめ、多くの薬理的に有用な化合物を含む (図 1)。一般にアルカロイド種は含窒素複素環をもつ天然高分子で、光学活性を有し化学構造が複雑なために、化学合成による大量生産は困難であり、植物体からの抽出が主な生産法である。しかし、アルカロイドは植物体に乾燥重量の数パーセント程度しか含まれていないものも多く、さらに植物体の生育には数ヶ月～数年を要するため、大量に供給する方法が検討されている。

## 1. 微生物におけるイソキノリンアルカロイド生合成システムの構築

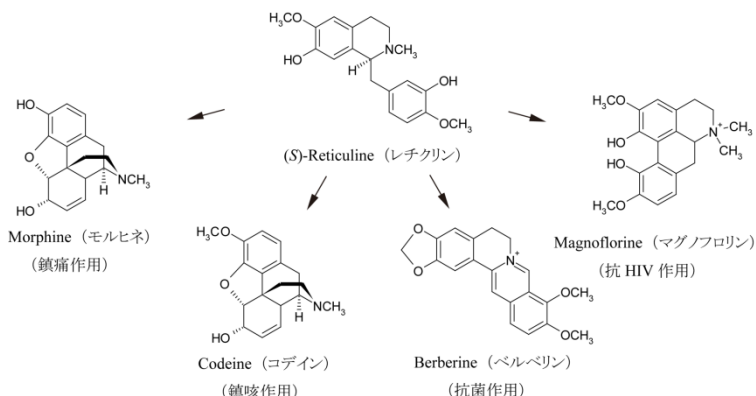


図1 植物の生産する有用イソキノリンアルカロイド

植物抽出に替わる生産方法として、我々は、植物の IQA 生合成酵素と微生物由来のモノアミン酸化酵素 (MAO) を大腸菌内で組み合わせ、ドーパミンを出発物質とした改変型の生合成経路を構築し、レチクリンが合成できることを明らかにした (図 2 a)。レチクリンは、IQA の中間体であるだけでなく、抗細菌剤、抗マラリア

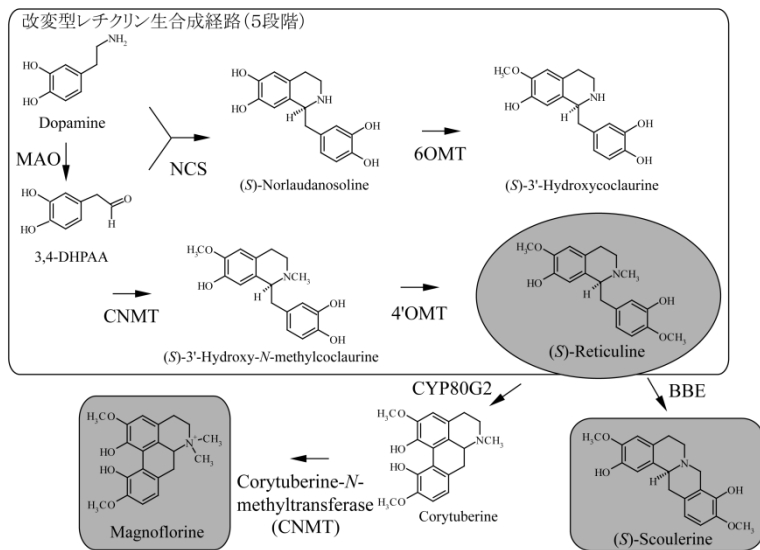
剤、抗がん剤の重要な前駆物質でもある。植物の IQA 生合成においては、チロシンを出発材料とし、norcoclaurine synthase (NCS) によるドーパミンと 4-hydroxyphenylacetaldehyde (4-HPAA) との縮合反応の後、レチクリンが生合成される (図 2 b)。我々が構築した改変型経路では、簡単な基質であるドーパミンのみを材料とし、その MAO による反応産物である 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (3,4-DHPAA) を NCS 反応の基質とすることで、小胞体局在酵素である CYP80B (水酸化反応) を省略した生合成が可能となった。

培地に基質を添加する *in vivo* での生産では、20 時間で 5 mM のドーパミンから培地中に 11 mg/L の (R,S)-レチクリンが生産された。NCS は S 特異的な反応を行うが、改変された大腸菌中でラセミ体のレチクリンが合成された要因としては、植物では NCS 反応の基質となる



ドーパミンは液胞内に蓄積され、その反応が酵素的に制御されているのに対し、大腸菌内においては、ドーパミンと 3,4-DHPAA との非酵素的な縮合が起こったものと考えられた。一方、粗酵素液を用いた *in vitro* での合成では、1 時間の反応で 5 mM のドーパミンから 55 mg/L の (S)-レチクリンが生産された。化学合成では不斉合成が生産の課題となることが多いが、*in vitro* での酵素合成法を用いることで、生物活性において極めて重要な光学活性体を短時間に効率よく生産できることが示された。

#### a) 微生物における改変型生成経路



#### b) 植物のレチクリン生成経路(9段階)

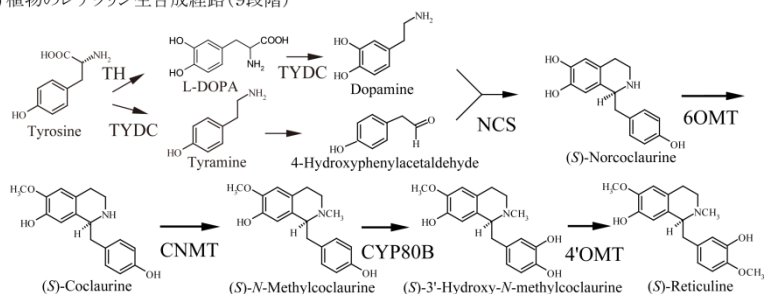


図2 微生物における改変型生成経路 (a) と植物のレチクリン生成経路 (b)

ことで、これらの生合成系の発現が容易となること、また共培養する酵母を任意に変えることで、多様な IQA の生産が可能になることがある。

## 2. 微生物発酵法によるイソキノリンアルカロイド生産

微生物においてもアルカロイド合成が可能であることが示されたが、実用生産には、より安価な基質の利用が不可欠と考えられた。そこで、安価で入手しやすい基質であるグルコースからのレチクリン生産、すなわち微生物発酵法による生産システムの構築を行った。具体的には、i) チロシン生産大腸菌の作製、ii) チロシンからドーパミンまでの人工生合成経路を構築し、ドーパミンからのアルカロイド生産システムに付加することで、生産システムを確立した (図3)。

大腸菌におけるチロシン生産については、多数の試みがなされている。例えば、大腸菌の

さらに、CYP80G2 と CNMT 酵素を導入した酵母との共培養系を用いることにより、抗 HIV 作用およびアテローム動脈硬化症の進行抑制効果が期待されるアポルフィン型アルカロイド (マグノフロリン) を、ドーパミンを基質として72時間の培養で培地中に 7.2 mg/L 合成することにも成功した (図2 a)。一方、プロトベルリン型アルカロイド (スコウレリン) を、スコウレリン生合成酵素 (BBE) を導入した酵母との共培養により、48 時間の培養で培地中に 8.3 mg/L 合成することにも成功している (図2 a)。共培養法の利点は、大腸菌では発現が困難な生合成酵素を酵母で発現させる

芳香族アミノ酸代謝にかかわる遺伝子群全般の発現を制御する DNA 結合型の転写調節因子 (*tyrR* 遺伝子) を欠損させることで、チロシン生産菌が得られる。さらに、シキミ酸合成経路において、フィードバック阻害耐性 (*fbr*) の 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase (*fbr*-DAHPS:*aroG<sup>fbr</sup>*) と mutase/prephenate dehydrogenase (*fbr*-CM/PDH:*tyrA<sup>fbr</sup>*)、および phosphoenolpyruvate (PEP) synthetase (PEPS:*ppsA*) と transketolase (TKT:*tktA*) を大量発現させることで、チロシン生産量が増加する。これらの方法を利用して構築したチロシン高生産大腸菌では、チロシンが培地中に 4.17 g/L 生産された。

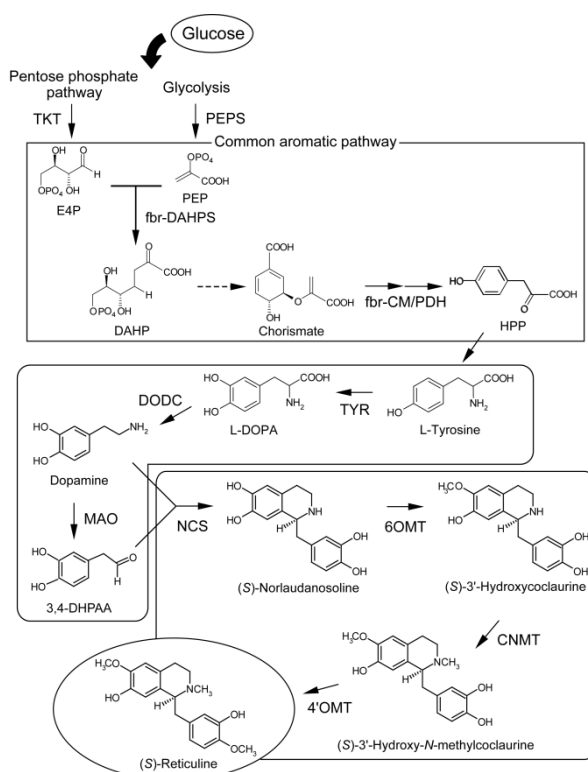


図3 大腸菌におけるグルコースからのレチクリン合成経路

そこで、チロシンからドーパミンまでの生合成経路を微生物由来のチロシナーゼ (TYR) とドーパ脱炭酸酵素 (DODC) で構築した (図3)。TYR によりチロシンからドーパが、DODC によりドーパからドーパミンが生合成される。TYR はドーパへの変換を触媒するだけでなく、さらにドーパをドーパキノンへと変換するためドーパ生産には適さないが、DODC を組み合わせることでドーパミンへの変換に成功した。チロシン生産大腸菌に、*Streptomyces castaneoglobisporus* 由来 TYR および *Pseudomonas putida* strain KT2440 由来 DODC を導入することで、ドーパミンが培地中に 260 mg/L 生産された。

上記のドーパミン生産大腸菌に、ドーパミンからのレチクリン生合成遺伝子 (MAO、NCS、6OMT、CNMT、4' OMT) を導入することで、微生物発酵法によるレチクリン生産システムを確立した。80 時間の培養で、培地中のグルコースから 2.2 mg/L の (S)-レチクリンが生産され

植物の IQA 生合成経路では、チロシンからアミンとアルデヒドが合成され、NCS による縮合反応によりイソキノリン骨格が形成される (図2 b)。この生合成経路において、チロシンからドーパへの反応を触媒するチロシン水酸化酵素 (TH) はテトラヒドロbiopterinを補酵素として必要とする。しかし、大腸菌にはその生合成酵素が存在しないため、新たにその生合成経路を構築する必要があった。さらに、アルカロイド生合成経路におけるチロシン・ドーパ脱炭酸酵素 (TYDC) はドーパだけでなく、チロシンに対しても活性を有しており、ドーパからのドーパミン生産だけでなく、チロシンからチラミンへと生合成経路が流れてしまう可能性があった。また、植物型の生合成経路には未同定の部分もあり、その経路を再構成し、効率よく目的とする IQA を生産することは難しいと考えられ

た(図4)。野生型大腸菌では0.5 mg/Lの生産量であり、チロシンを高生産することにより効率的にレチクリンが生産されることが示された。炭素源としてグリセロールを含む培地を用いて培養した場合には、80時間における(S)-レチクリンの収量は6.2 mg/Lに増大し、これはグルコースを用いた生産量よりも約3倍高かった。さらに、この生産システムに、ドーパからドーパキノンへの酸化活性の低い*Ralstonia solanacearum*由来TYRを導入することで、15 g/Lのグリセロールからのレチクリン合成活性を大幅に向上(46 mg/L)することにも成功している。

ドーパミンからの*in vivo*生産システムではレチクリンがラセミ体として生産されたのに対し、微生物発酵法によるシステムでは、(S)-レチクリンのみが生産された。また、培養中、中間体としてチロシンが蓄積したが、ドーパおよびドーパミンの蓄積は観察されなかった。ドーパミンが蓄積しないことにより、ドーパミンと3,4-DHPAAとが非酵素的に縮合反応を起こすことなく、NCSの触媒作用によりS体特異的なノルラウダノソリンが生成された結果、(S)-レチクリンのみが得られるものと考えられた。微生物発酵法によるレチクリン生産は、

光学的に活性な(S)-レチクリンを、植物培養細胞の培養または遺伝子組換え植物による生産(通常、数ヶ月から数年程度の期間を要する)よりも速く(2~3日)、生産することが可能である。また、炭素源として用いるグルコースやグリセロールは、ドーパミンなどと比較して格段に安価で入手が容易である。微生物発酵法の確立により、(S)-レチクリンの生産が工業的に実用可能なものになったと考えている。

## おわりに

芳香族アミノ酸を出発材料として多様な植物二次代謝産物が合成されていることを考えると、今回開発した微生物発酵プラットフォームは、

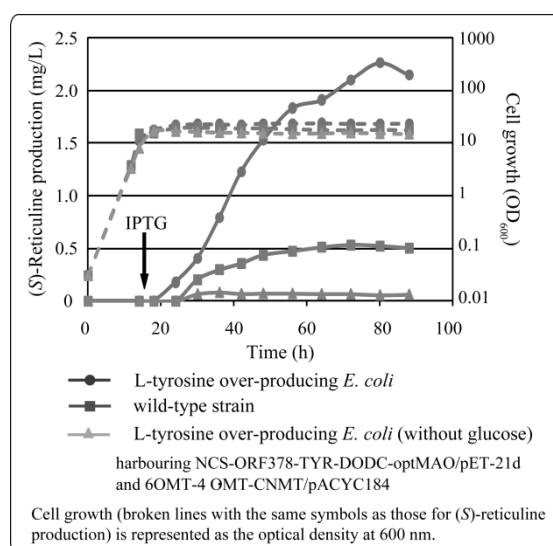


図4 微生物発酵法によるグルコースからのレチクリン生産

植物アルカロイドのみならず、多様な有用物質生産にも応用可能である。効率化された微生物発酵法による有用物質生産は、新たな生物産業の創出に向けた生物機能利用技術開発の基本的な戦略として重要である。特に、医薬的に重要なアルカロイドの微生物発酵法の確立は、需要の高まる医薬品への安定した供給方法になるだけでなく、創薬研究における新たな展開に貢献できるものと期待される。

本研究は、石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物工学研究室において実施したものです。本研究を行う機会を与えて頂き、学生時代からご指導ご鞭撻を賜りました熊谷英彦先生(現 石川県立大学特任教授)に心より御礼申し上げます。また、京都大学において、博士研究員として在籍の機会をいただき、その後も共同研究者としてご指導いただきました京都大学大学院生命科学科教授・佐藤文彦先生に深く感謝いたします。学生時代から長年

にわたり数々の激励と暖かいご助言を賜りました山本憲二先生（現 石川県立大学教授）、鈴木秀之先生（現 京都工芸繊維大学教授）、玉置尚徳先生（現 鹿児島大学准教授）、片山高嶺先生（現 石川県立大学准教授）に感謝いたします。本研究を遂行するにあたっては、中川明博士（石川県立大学）をはじめ、多くの共同研究者ならびに研究室のメンバー、卒業生の皆様のご協力によって成り立っています。この場を借りて、深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました山本憲二先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

#### 略歴

南 博道（みなみ ひろみち）

1973 年生まれ/2003 年京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士課程修了、農学博士/  
現在、石川県立大学生物資源工学研究所・講師

# シンポジウム

「生活習慣病とライフスタイルイノベーション」

## 講演要旨

## 肥満遺伝子の同定とその制御

盧 尚建 （東北大学大学院農学研究科）

脂肪組織は、エネルギー貯蔵器官として、エネルギー過剰時にトリグリセロールを貯蔵し、エネルギー消費が摂取を上回る時それを流通させることにより、エネルギーバランスを調節する役割を持っている。特に、脂肪組織中の成熟脂肪細胞に脂肪が蓄積し、肥大化することによって白色脂肪組織が増大し、過剰な白色脂肪組織の増大は肥満の主な原因である。この肥満はⅡ型糖尿病、心疾患等の疾病が引き起こす危険性と強く結びついている。また、脂肪細胞は重要な分泌器官でもある。脂肪細胞は様々なポリペプチドの内分泌、傍分泌、自己分泌を通して、視床下部、膵臓、筋肉、腎臓などの組織へ作用し、多くの生理学的と病理学的作用を調節している。また、分泌物質によって自身の脂質分解と合成の調節も行っている。例えば、脂肪細胞から分泌されるホルモンであるレプチンは、脳の視床下部へ作用し摂食を調節している。また、アディポネクチンは良好なインスリン感受性の一因であり抗糖尿病作用を持つ。他にも、炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )や脂肪細胞の自己分泌および傍分泌調整因子である Interleukin-6 (IL-6)、動脈硬化の成因に大きく関与すると考えられる血栓形成の促進因子である plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 等の脂肪組織からの分泌が知られている。このような、脂肪細胞から分泌されるホルモン、サイトカイン、その他様々な因子やその受容体の同定及び機能解析への注目は高く、多くの研究者によって研究が進められて来た。

上述の脂肪細胞分泌物質の多くは、脂肪細胞の分化・形成から蓄積の過程(アディポジェネシス)の進行度合いによって合成・分泌量、若しくは合成の有無が左右されている。つまり、成熟脂肪細胞(または前駆脂肪細胞)からのみ分泌される物質や、成熟脂肪細胞の肥大化によって合成分泌量が増加する物質が存在する。前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化には、多くの転写因子が関わっている。代表的なものとして、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ファミリーや、CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) ファミリーが知られている。C/EBP $\beta$  および C/EBP $\delta$  は、PPAR $\gamma$  2、C/EBP $\alpha$  を活性化させ、PPAR $\gamma$  2 が前駆脂肪細胞の分化を引き起こす。

私たちのグループでは以前、脂肪組織において特異的に高く発現するマウス遺伝子を遺伝子発現情報のデータベース (BioGPS : GNF SymAtlas) データベースを用いて同定し、“Adipogenin” と名づけ、脂肪細胞分化過程と脂質代謝における機能解析を進めている。本講演では Adipogenin の機能を中心にこれまでの研究成果を紹介する。

### 1. 脂肪細胞分化形成と蓄積過程における Adipogenin の発現上昇

Adipogenin の mRNA は、脂肪組織で高い発現量を示すこと、3T3-L1 脂肪細胞分化・形成期間中、分化に伴い上方制御されることを報告した。Adipogenin は高脂肪食給餌マウスの皮

下および内臓脂肪組織において mRNA レベルで、普通食給餌マウスのそれに比べて上方制御されていることから、栄養状態により調節を受ける遺伝子であることを明らかにした。さらに、Adipogenin の遺伝子配列とアミノ酸配列は、マウス・ウシ・ヒト・ブタ間で相同性が高いことを確認した。

## 2. Adipogenin 過剰発現が C2C12 筋芽細胞の脂質蓄積能に及ぼす影響

Adipogenin が脂肪細胞の分化および脂質蓄積に与える影響を調べるために、筋組織由来の C2C12 筋芽細胞に adipogenin 遺伝子発現ベクターを導入し、過剰発現による脂質蓄積能と関連遺伝子の発現変化を調べた。

5 日間の分化刺激による脂質蓄積量は、PPAR $\gamma$ 2 の刺激剤である troglitazone 添加有無に関係なく、adipogenin の過剰発現により有意に増加したことが確認された。また、脂肪細胞分化マーカーである PPAR $\gamma$ 2 遺伝子は、troglitazone 添加により発現が誘導されたが、troglitazone 無添加培地により分化刺激された C2C12 筋芽細胞と control ベクター導入 C2C12 そして、adipogenin 過剰発現 C2C12 筋芽細胞では、遺伝子発現が見られなかった。筋細胞分化マーカーである myogenin と MyoD の遺伝子発現は、troglitazone の添加有無や、adipogenin 発現ベクターの導入とは関係なく両方とも遺伝子発現が確認された。

## 3. Adipogenin 遺伝子発現抑制と脂肪細胞分化・脂質蓄積関連遺伝子の発現変動

Adipogenin 遺伝子を抑制することによる脂肪細胞の分化・脂質蓄積を確認し、その時変動する遺伝子の発現を調査することで、adipogenin の詳細な遺伝子発現機構を解明した。Adipogenin の機能と脂肪細胞分化関連遺伝子関係を調べるために、sh-adipogenin ベクターを 3T3-L1 脂肪細胞に導入し、adipogenin 遺伝子発現を抑制した。作成した細胞は、control ベクターが導入された 3T3-L1 前駆脂肪細胞、3T3-L1 前駆脂肪細胞と同時に 8 日間、分化誘導刺激を与えた。脂肪細胞分化誘導後、遺伝子発現プロファイルを解析し、脂肪細胞分化関連遺伝子と adipogenin 遺伝子の関連性を調査した。

Adipogenin の遺伝子発現抑制は、3T3-L1 脂肪前駆細胞の脂質蓄積減少を誘導した。マイクロアレイ分析の結果により得られた発現量が 2 倍以上変動した遺伝子は、全体変動遺伝子の中、約 4 割の遺伝子がアップレギュレーションされ、ダウンレギュレーションされた遺伝子は約 6 割であることが確認された。ダウンレギュレーションされた遺伝子の中、脂肪細胞分化関連因子である PPAR $\gamma$  と Cnrip1 (cannabinoid receptor interacting protein 1) が、control と比べて発現量が減少し、脂肪酸利用と運送に関連する Lpl (Lipoprotein lipase) は、control と比べ発現量が減少した。Adipogenin 遺伝子の発現抑制によりアップレギュレーションされた遺伝子では、炎症性ケモカインと深く関連する Ccl8 (Chemokine ligand 8)、Ccl17 (Chemokine ligand 17)、Cxcl12 (Chemokine ligand 12) などの遺伝子発現量が 2 倍以上増加した。

#### 4. Adipogenin 欠損 (ADIG-KO) マウスにおける脂肪蓄積抑制作用の解析

Adipogenin の詳細な機能を知るために、Adipogenin 遺伝子を欠損させた (ADIG-KO) マウスを用いて体内脂肪蓄積抑制機構を検討した。

ADIG-KO 雄マウスは WT 雄マウスに比べ、4 週齢から 15 週齢まで体重が有意に低かった。一方、6 週から 15 週までの総摂食量は、WT 雄マウスと ADIG-KO 雄マウスに有意な差はなかった。20 週齢時の各組織の重量測定では、ADIG-KO 雄マウスは WT 雄マウスに比べ、皮下脂肪組織と肝臓が有意に減少していた。糖負荷試験では、ADIG-KO 雄マウスは WT 雄マウスに比べ、糖負荷 15 分後に血糖値が有意に上昇していた。しかし、インスリン負荷試験の結果では、ADIG-KO 雄マウスは WT 雄マウスに比べ、インスリン負荷 15 と 30 分後に血糖値が減少する傾向がみられた。また、エネルギー代謝測定では、ADIG-KO 雄マウスの呼吸商は WT 雄マウスに比べて高く、ADIG-KO マウスは糖質をエネルギー源としてより積極的に消費していることが確認された。以上の結果から、ADIG-KO マウスにおいては、グルコースの取込みが異常に促進することにより、脂肪蓄積が抑制すると考えられる。

#### <略歴>

|             |                                      |                                                                                             |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1991 年 2 月  | 韓国                                   | ソウル大学校 農業科学大学 畜産学科 卒業                                                                       |
| 1993 年 2 月  | 韓国                                   | ソウル大学校 農業生命大学大学院修士課程 (動物資源科学専攻) 修了                                                          |
| 1997 年 3 月  | 岩手大学大学院                              | 連合農学研究科 (生物生産科学専攻) 修了                                                                       |
| 1997 年 5 月  | オーストラリア                              | Prince Henry's Institute of Medical Research<br>博士研究員として研究に従事 (～1999 年 9 月)                 |
| 1999 年 10 月 | 信州大学                                 | 助手 (農学部)                                                                                    |
| 2002 年 10 月 | 日本学術振興会                              | 特定国派遣研究員 (オーストラリア、Prince Henry's Institute of Medical Research) (～2002 年 12 月)              |
| 2003 年 12 月 | 信州大学                                 | 助教授 (農学部)                                                                                   |
| 2004 年 6 月  | 日本学術振興会                              | 特定国派遣研究員 (フランス、ニース大学、Institute of Signaling Developmental Biology and Cancer) (～2005 年 8 月) |
| 2008 年 5 月  | 大学教育の国際化加速プログラム (海外先進教育研究実践支援) による派遣 | (アメリカ、North Carolina State University) (～2008 年 10 月)                                       |
| 2009 年 4 月  | 東北大学大学院農学研究科                         | 准教授 (～現在に至る)                                                                                |



## 食品成分による糖尿病関連遺伝子の発現制御メカニズム

山田 一哉（松本大学大学院健康科学研究科）

生活習慣病の発症には遺伝的な素因以外に、食生活や運動習慣等の環境要因が関与している。高炭水化物食や高脂肪食などの高エネルギー食の摂取や運動不足により肥満やインスリン抵抗性が引き起こされ、さらに糖尿病・動脈硬化症などの生活習慣病の発症が惹起される。厚生労働省の国民健康・栄養調査（2007 年版）によると、現代日本では約 2,210 万人の国民が糖尿病患者およびその予備軍とされている。糖尿病のうち約 95%が、インスリン分泌低下や感受性の低下により生じる 2 型糖尿病である。今後も糖尿病患者数は増加することが予測されており、糖尿病の予防は国民の健康の維持・増進のための大きな課題となっている。

一方、食品成分には様々な生理活性を有するものが知られているが、近年注目されているものの一つにポリフェノールがある。ポリフェノールは一般に抗酸化活性を示すことが知られているが、それ以外にも健康・長寿に関わる様々な活性を有することが知られている。たとえば、緑茶ポリフェノールであるカテキンの (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) を含む食餌の摂取により、抗肥満・抗糖尿病・血糖低下効果が生じることが報告されている。また、大豆イソフラボンは、遺伝性肥満性糖尿病発症マウスにおいて、血糖低下やヘモグロビン A1C 値低下などを引き起こし、糖尿病の病態を改善することが知られている。したがって、インスリン非依存的な方法でインスリンシグナル伝達経路を刺激できる食品成分の研究は、糖尿病の予防や治療に有用であると考えられる。

ラット enhancer of split- and hairy-related protein (SHARP) ファミリーは、basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写抑制因子である。SHARP には SHARP-1 と SHARP-2 の 2 つのファミリー遺伝子が存在している。これらの SHARP ファミリータンパク質は、多くの遺伝子の転写制御領域に存在する E box 配列 (5' -CANNTG-3') に結合して転写を制御する。また、SHARP ファミリーは視交叉上核では概日リズムを調節する時計遺伝子の一つとして機能することが報告されている。私どもは、高炭水化物食摂食後に膵β細胞から分泌されたインスリンにより、ラット肝で発現が誘導される転写因子として SHARP-2 を同定した。SHARP-2 を初代培養肝細胞等で過剰発現することにより、インスリンにより転写が抑制される糖新生系酵素のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子のプロモーター活性を低下させて、発現を抑制することも示した。したがって、SHARP-2 がインスリンによる血糖低下に関与する一つの転写因子であると考えている。

私どもは、SHARP-2 遺伝子の発現促進を指標として、様々な食品成分のスクリーニングを行ってきた。現在までに、EGCG がインスリン応答性細胞の高分化型ラット肝癌細胞株である H4IIE 細胞において、PEPCK 遺伝子の発現低下に並行して、SHARP-2 遺伝子の発現を早期に誘導することを報告した。ここでは、ポリフェノールのうち、大豆イソフラボンによる SHARP-2 遺伝子の発現調節メカニズムについて論じることにする。

### ゲニステインによる SHARP-2 遺伝子発現の誘導

ゲニステインやダイゼインなどの大豆イソフラボンは大豆に含まれるポリフェノールである。これらのイソフラボンは女性ホルモンであるエストロゲンとも構造がよく似ており、核内受容体であるエストロゲン受容体に親和性があり、エストロゲン様活性を示すことが知られている。しかし、このような植物エストロゲンとしての作用以外にも、抗酸化作用や他の生理活性を有することも報告されている。

はじめに、大豆イソフラボンが、SHARP-2 遺伝子の発現に影響するかどうかを検討するために、H4IIE 細胞を様々な濃度・時間で大豆イソフラボン処理した。その結果、ゲニステインのみ、インスリンと同様 2 時間と非常に早期に SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。各種のシグナル伝達分子の阻害剤を用いた実験から、この誘導はインスリンによる SHARP-2 遺伝子発現の誘導機構と異なり、Protein kinase C (PKC) 経路のみが関与することが明らかになった。PKC には様々なアイソフォームが存在する。そこで、ゲニステインがどのアイソフォームを活性化するかについて解析した。まず、classical PKC (cPKC) の活性化剤である PMA で H4IIE 細胞を処理したところ、SHARP-2 遺伝子の発現は、ゲニステイン処理と同様 2 時間と非常に早期に誘導された。次に、ゲニステインで処理した H4IIE 細胞から全細胞抽出液を調製し、cPKC のうち PKC  $\alpha$  に対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、ゲニステイン処理後 5 分から 15 分で一過性に活性化型（リン酸化型）PKC  $\alpha$  が誘導された。一方、この間全 PKC  $\alpha$  量に変動は認められなかった。また、ゲニステインによる SHARP-2 mRNA の誘導は、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ II の阻害剤である Actinomycin D で阻害された。したがって、ゲニステインは PKC  $\alpha$  の活性化を介して転写レベルで SHARP-2 遺伝子の発現を誘導すると結論した。

### (S)-Equol による SHARP-2 遺伝子発現の誘導

一方、ダイゼインは、SHARP-2 遺伝子の発現を誘導する活性を示さなかった。30~50% のヒトでは保有する腸内細菌によりダイゼインは (S)-Equol へと代謝される。そこで、(S)-Equol により SHARP-2 遺伝子の発現が誘導されるかどうかを検討するために、様々な濃度・時間で H4IIE 細胞を処理した。興味深いことに、(S)-Equol はインスリンやゲニステインと同様 2 時間と非常に早期に SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。その誘導レベルは、ゲニステインによる誘導よりも高いことが明らかになった。各種のシグナル伝達分子の阻害剤を用いた実験から、この誘導は、インスリンと同様の phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) 経路とゲニステインと同様の PKC 経路が関与することが明らかになった。肝臓では、PI3-K 経路の下流には、atypical PKC  $\lambda$  (aPKC  $\lambda$ ) が存在することが知られている。そこで、次に、aPKC  $\lambda$  がこの誘導に関与するかどうかを検討した。ドミナントネガティブ変異型の aPKC  $\lambda$  を発現するアデノウイルスを感染させたところ、(S)-Equol による SHARP-2 遺伝子の発現誘導は抑制された。加えて、aPKC  $\lambda$  のリン酸化レ

ベルは、EGCG 処理後 1 分で増加し、60 分まで持続すること、この間全 aPKC $\lambda$  タンパク量には変動が認められないことも明らかになった。次に、ゲニステインと同様、(S)-Equol 処理により、PKC $\alpha$  が活性化されるかどうかについて検討した。その結果、(S)-Equol 処理後 5 分から 30 分で一過性に活性化型（リン酸化型） PKC $\alpha$  は誘導されたが、全 PKC $\alpha$  量に変動は認められなかった。したがって、(S)-Equol 処理により、少なくとも aPKC $\lambda$  および PKC $\alpha$  の両者が活性化されることが明らかになった。また、(S)-Equol による SHARP-2 mRNA の誘導は、Actinomycin D およびタンパク質合成の阻害剤である cycloheximide で阻害されたため、何らかのタンパク質の合成を介した転写レベルでの作用であることが示唆された。そこで、(S)-Equol による SHARP-2 遺伝子の転写促進に関与する領域を探索するために、様々なリポータープラスミドを作製した。これらを MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 細胞へトランスフェクションした後、(S)-Equol の存在下、非存在下で培養し、プロモーター活性に対する影響を検討した。その結果、転写開始点上流 4,687 bp から 4,133 bp の領域に (S)-Equol に応答する領域が存在することが明らかになった。したがって、(S)-Equol は、PI3-K 経路を介した aPKC $\lambda$  の活性化と PKC $\alpha$  の活性化を引き起こして、未知の転写因子を活性化して SHARP-2 遺伝子の上流塩基配列に作用し、転写を誘導すると結論した。

以上、大豆イソフラボンが SHARP-2 遺伝子の発現を誘導するメカニズムを明らかにした。しかし、必ずしもインスリンと同じシグナル伝達経路だけを刺激していなかったため、今後とも、インスリンと同様のシグナル伝達経路を刺激できる成分の検索を続ける必要があると思われる。また、同じくインスリンによって発現が誘導される SHARP-1 遺伝子の発現を促進できる食品成分の検索も進める必要があると思われる。

## 略歴

大阪教育大学教育学部卒業、大阪大学大学院医学研究科博士課程修了。博士（医学）。日本学術振興会特別研究員、大阪大学医学部助手、米国 Vanderbilt 大学医学部ポスドクトラルフェロー、福井大学医学部助手・助教授、松本大学人間健康学部教授を経て、2011 年より現職。

## 食品タンパク質の脱アミド化による機能改善

～脱アミド化大豆グロブリンによるカルシウム吸収促進・骨粗鬆症予防効果を中心にして～

熊谷 日登美（日本大学生物資源科学部）

脱アミド化は、アセチル化、スクシニル化、グルコシル化、リン酸化等と並び、タンパク質の機能改善に有効な構造変換法の一つである。タンパク質の脱アミド化では、グルタミンやアスパラギン残基の酸アミド基が、カルボキシル基に変換され、グルタミン酸やアスパラギン酸残基となる。酸アミド基よりカルボキシル基の方が親水性が高いため、タンパク質の脱アミド化により、通常、水・塩溶液に対する溶解性や、起泡性・乳化性が向上する。また、カルボキシル基は解離して陰イオンとなるため、カルシウム等の陽イオンとの結合が可能になる。

タンパク質の脱アミド化法としては、塩酸を用いた方法が最も一般的に用いられている<sup>1)</sup>。しかし、酸による脱アミド化では、ペプチド結合の加水分解が避けられず、加工特性の低下や苦味ペプチドの生成などが起こりやすい。また、酵素による方法では、グルタミナーゼ系酵素<sup>2,3)</sup>あるいはプロテアーゼ系酵素<sup>4)</sup>で脱アミド化が可能であるが、グルタミナーゼ系酵素はグルタミン残基にしか反応しないため、アスパラギンの脱アミド化ができない。また、プロテアーゼ系酵素ではペプチド結合の加水分解も起こり、タンパク質の加工特性が低下する。さらに、酵素は高価なものが多い。ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）や硫酸基を有する陽イオン交換樹脂は、塩酸溶液中での脱アミド化を促進するという報告<sup>5,6)</sup>があるが、塩酸溶液中ではペプチド結合の加水分解も起こる。我々は、カルボキシル基を持つ陽イオン交換樹脂が、中性・弱酸・弱アルカリ性溶液およびエタノール溶液中で、ペプチド結合の加水分解を起こさずに脱アミド化反応を触媒し、その触媒効果は、硫酸基を持つ樹脂よりも高いことを明らかにした<sup>7,8)</sup>。そこで、本脱アミド化法を用いて、食品タンパク質の機能性改善を試みた。

大豆タンパク質はカルシウム吸収効率が悪いことが知られているが、これは、大豆中のフィチン酸がカルシウムと強固に結合し、これを不溶化するためと考えられる。そこで、我々は、大豆グロブリンから、陰イオン交換樹脂を用いてフィチン酸を除去後、カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂により脱アミド化を行った。その結果、得られたフィチン酸除去・脱アミド化大豆グロブリンは、小腸からのカルシウム吸収を促進し、骨形成を促進した<sup>9-11)</sup>。さらに、フィチン酸除去・脱アミド化大豆グロブリンを、骨粗鬆症モデルラットに長期投与を行った場合には、骨粗鬆症の進行が抑制された。従来の脱アミド化法では、ペプチド結合の加水分解によりタンパク質が低分子化するため、ゲル化性は低下する場合が多かったが、本脱アミド化法では、タンパク質を高分子のまま保持することができるため、得られたフィチン酸除去・脱アミド化大豆グロブリンは、保水性が高く、離水のないゲルを形成した<sup>12)</sup>。

小麦は三大アレルゲンの一つで、その主要アレルゲンであるグリアジンのエピトープには、グルタミンの連続配列を含むものが多い。そこで、グリアジンをカルボキシレートタイプ陽

イオン交換樹脂により、エタノール溶液中で脱アミド化を行った。その結果、小麦グリアジンの脱アミド化により、患者血清との反応性が著しく低下した。さらに、この脱アミド化小麦グリアジンをラットに経口胃内投与後、未処理小麦グリアジンを免疫したところ、IgEの上昇が抑制された<sup>13)</sup>。また、得られた脱アミド化小麦グリアジンは、水や塩溶液に対する溶解性が高く、消化管内で速やかに分解された。さらに、脱アミド化により、分子内の親水性-疎水性バランスが改善され、起泡性も向上した<sup>14)</sup>。

カルボキシレートタイプの陽イオン交換樹脂で脱アミド化が起こる理由および脱アミド化の最適条件を調べるため、カルボキシル基を有するチップを装着した分子間相互作用解析装置 (Biacore) を用い、種々の溶媒中で、チップ上のカルボキシル基と大豆グロブリンとの分子間相互作用の測定を行った。その結果、ナトリウム濃度が低い程、また、タンパク質の等電点の近傍において、タンパク質とカルボキシル基との結合が大きくなった。一方、脱アミド化大豆グロブリンでは、チップ上のカルボキシル基との結合はほとんど見られなかった。このことは、タンパク質の酸アミド基が、チップ上のカルボキシル基と結合していたことを示している。チップ上のカルボキシル基との相互作用の強い条件下で、大豆グロブリンをカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂により処理したところ、脱アミド化度が上昇した。

以上のように、カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂は、タンパク質のペプチド結合の加水分解を起こさずに、酸アミド基を加水分解し、カルボキシル基に変換した。この作用は、樹脂上のカルボキシル基が陰イオンに解離した状態であり、かつ、タンパク質中のアミノ基が陽イオンになっている時に起こりやすいと考えられる。脱アミド化した大豆グロブリンは、良好なゲル化性を有するとともに、腸管内でカルシウムの吸収率を高め、骨形成を促進し、骨粗鬆症を抑制した。小麦グリアジンは、脱アミド化により、起泡性が増加するとともに、水や塩溶液に対する溶解性が向上した。また、消化酵素により分解されやすくなるとともに、アレルギー性が低下した。このように、食品タンパク質の脱アミド化により、テクスチャー特性の改善と生体調節機能特性の向上が可能であった。

- 1) Matsudomi, N., Sakai, T., Kato, A., and Kobayashi, K.: Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1251-1256 (1985)
- 2) Hamada, J. S.: Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 719-723 (1992)
- 3) Yong, Y. H., Yamaguchi, S., and Matsumura, Y.: Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 6034-6040 (2006)
- 4) Kato, A., Tanaka, A., Matsudomi, N., and Kobayashi, K.: Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 224-227 (1987)
- 5) Shih, F. F. and Kalmar, A. D.: SDS-catalyzed deamidation of oilseed proteins. *J.*

- Agric. Food Chem.*, **35**, 672-675 (1987)
- 6) Shih, F. F. : Deamidation of protein in a soy extract by ion exchange resin catalysis, *J. Food Sci.*, **52**, 1529-1531 (1987)
  - 7) Kumagai, H., Ishida, S., Koizumi, A., Sakurai, H., and Kumagai, H. : Preparation of phytate-removed, deamidated soybean globulins by ion exchangers and characterization of their calcium-binding ability, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 172-176 (2002)
  - 8) 熊谷日登美, 則松優子, 橋爪尚子, 櫻井英敏, 熊谷仁: イオン交換樹脂による小麦粉グリアジンの脱アミド化, *日食科工誌*, **48**, 884-890 (2001)
  - 9) Kumagai, H., Koizumi, A., Suda, A., Sato, N., Sakurai, H., and Kumagai, H. : Enhanced calcium absorption in the small intestine by a phytate-removed deamidated soybean globulin preparation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1598-1600 (2004)
  - 10) Kumagai, H., Sato, N., Ikeda, M., Sakurai, H., and Kumagai, H. : Increase in solubility and function to promote calcium absorption of soybean  $\beta$ -conglycinin by deamidation, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, Suppl. 1, 240-242 (2008)
  - 11) Kumagai, H., Koizumi, A., and Kumagai, H. : Promotion of bone formation by phytate-removed deamidated soybean glycinin, *ACS Symposium 993, "Functional Foods and Health"*, Ed. by Shibamoto, T., Kanazawa, K., Shahidi, F., Ho, C.-T., Chapter 36, 419-428 (2008)
  - 12) 嶋崎恵里子, 佐野友子, 熊谷日登美, 櫻井英敏, 熊谷仁: 大豆グロブリンの脱アミド化に伴う親水性の向上とゲル化特性の変化, *日食工誌*, **9**, 67-73 (2008)
  - 13) Kumagai, H., Suda, A., Sakurai, H., Kumagai, H., Arai, S., Inomata, N., and Ikezawa, Z. : Improvement of digestibility, reduction in allergenicity, and induction of oral tolerance of wheat gliadin by deamidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 977-985 (2007)
  - 14) 則松優子, 熊谷日登美, 永井龍一, 櫻井英敏, 熊谷仁: 陽イオン交換樹脂による小麦粉グルテンの脱アミド化およびその機能特性評価, *日食科工誌*, **49**(10), 639-645 (2002)

#### 【略歴】

熊谷 日登美 (くまがい ひとみ)

お茶の水女子大学家政学部食物学科卒業

お茶の水女子大学大学院家政学研究科食物学専攻修士課程修了

東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程修了 (農学博士)

日本大学生物資源科学部 (旧 農獣医学部) 助手, 講師, 准教授を経て現在教授

この間 2000 年 3 月から 1 年間イギリス The University of Nottingham で海外派遣研究員

# 生活習慣病・介護予防のための新しい運動処方システム

能勢 博 （信州大学大学院医学系研究科・スポーツ医科学講座）

## I. はじめに

超高齢社会に突入し、生活習慣病予防、介護予防のための運動処方が注目されている。我が国において 65 歳以上が全国民に占める割合は、2012 年で 24%であったものが 13 年後の 2025 年には 31%に達する。このような超高齢社会の最も大きな問題が高齢者医療費である。実際、2011 年では 65 歳以上の同医療費は 20 兆円であったが、2025 年には 56 兆円に達すると予測され、これは 2009 年度の年間国家予算の 64%に相当する<sup>1)</sup>。

このような国家存亡の危機にあって、2008 年に厚生労働省は特定保健指導制度を発足させ、国民は誰でも 40 歳以上になれば健康診断を受け、そこで問題があれば、生活指導を受けることが義務付けられた。

中高年の生活習慣病予防のためのウォーキングの目標として、「1 日 1 万歩」が推奨されているが、その速度については規定がなく、一般歩行速度が 6 km/ 時間程度と考えれば、体力を向上させるのには運動強度が低すぎるかもしれない。実際、米国スポーツ医学会は、生活指導について、個人の体力に合わせた「個別運動処方」を推奨している。すなわち、まず個人最大体力を測定し、その一定レベル以上の強度の運動を、一定の頻度と期間実施させる。これが生活習慣病の予防・治療に最も効果的であるとしている<sup>2,3)</sup>。

しかし、これを実施するには、専門の施設、スタッフの指導が必要で、このことが、我が国の運動処方が「1 日 1 万歩」というポピュレーションアプローチから脱却できない原因になっている。すなわち、ウォーキングの効果を実感できないために、運動習慣が定着しないと考えられる<sup>4)</sup>。このような状況の中、新しい個別運動指導システムの開発が期待されている。

## II. インターバル速歩トレーニングの効果

我々は過去 16 年間「熟年体育大学」事業を実施し、「インターバル速歩」、「携帯型カロリー計（熟大メイト）」、「e-Health Promotion System」を開発し、大学生、企業従業員、高齢者、要介護者、生活習慣病患者を対象に個別運動処方を実施し、その効果に関して総計 5,000 名のデータベース（DB）を構築した。

インターバル速歩とは、個人の最大体力の 70%以上の 3 分間速歩とそれに続く 40%以下の普通歩き 3 分間を 1 セットとし、>5 セット/日、>4 日/週、の頻度で、>4 ヶ月間を目標として実施させるトレーニング方法である<sup>5,6)</sup>。

最高酸素摂取量を測定するために、まず被験者を対象に体育館で、携帯型カロリー計（熟大メイト）を腰に装着させ、安静、低速、中速、高速のそれぞれ 3 分間ずつ段階的に歩行速度を上げ、最速歩行時の最後の 1 分間のエネルギー消費量を個人の最大体力とする。この方法で決定した最高酸素摂取量は、通常ジムで自転車エルゴメータを用いて測定した値とよく

一致した。

熟大メイトは、歩行中に、その強度が最高酸素摂取量の 70% のレベルになると祝福音が鳴り、さらに速歩と普通歩きの切り替えのタイミングを別のアラーム音で知らせるように設定されている。また、参加者は 2 週間ごとに自宅近くの公民館に行き、熟大メイトに記憶されている歩行データを端末からインターネットを経由してサーバーにデータを転送することができる。その際、折り返しサーバーの **e-Health Promotion System** から返されてくる歩行記録のトレンドグラフに基づいてトレーナーや保健師が個別運動指導を行っている。

Nemoto ら<sup>5)</sup>は、中高年者を対象に、5 ヶ月間のインターバル速歩トレーニングと「1 日 1 万歩」目標の従来の歩行トレーニングの効果を比較した。その結果、インターバル速歩トレーニング群では、膝伸展・屈曲筋力がそれぞれ 13%、17% 増加し、最高酸素摂取量も 10% 増加し、最高・最低血圧もそれぞれ 10mmHg、5mmHg 低下した。一方、従来の歩行トレーニング群ではそれらの変化は小さく、非トレーニング群とあまり変わらなかった。また、最高酸素摂取量と膝伸展筋力との間に高い相関を認めた。このことは、筋力の増加が最高酸素摂取量の増加、血圧の低下に深く関与していることを示唆し、1 日 1 万歩のトレーニングでは運動強度が低すぎて、筋力が増加せず、その結果、最高酸素摂取量の増加、血圧低下が起きないと考えられる。

これまで、最高酸素摂取量と生活習慣病の症状に関係のあることは、過去の疫学研究によって明らかになっている<sup>7,8,9)</sup>。しかし、比較的大きい中高年者の集団を対象に介入研究でこれを検証した研究は極めて少ない。最近、Morikawa ら<sup>6)</sup>は、中高年（平均年齢 66 歳）を対象に、4 か月間のインターバル速歩トレーニングによる体力向上が、生活習慣病指標に与える効果を検証した。生活習慣病指標とは、1) 最高血圧 $\geq 130$  mmHg または最低血圧 $\geq 85$ mmHg、2) 空腹時血糖 $\geq 100$ mg/dl、3) BMI $\geq 25$ kg/m<sup>2</sup>、4) 中性脂肪 $\geq 150$ mg/dl または HDL コレステロール $\leq 40$ mg/dl の 4 項目の診断基準について、1 つ該当すれば 1 点加算、したがって満点は 4 点である。解析にあたり、まず、初期体力に応じて被験者を、最高酸素摂取量にしたがって、低体力、中体力、高体力の 3 群に等分し、まず、トレーニング前の最高酸素摂取量と生活習慣病指標を比較した。次に、それらの値に対するトレーニング効果を比較した。

その結果、男女ともトレーニング前の体力が低い被験者ほど生活習慣病指標が高く、トレーニング後に最高酸素摂取量が増加すると、その増加程度に比例して生活習慣病指標が改善した。すなわち、4 カ月間のトレーニングによって、最高酸素摂取量が 15% 増加すると生活習慣病指標の合計点が 20% 低下した。次に、症状別にみると、男女とも高血圧症の被験者が全体の 60–80%、高血糖が 50–80% と高く、それに、肥満、異常脂質血症が続く。ところが、トレーニング後に体力が 10% 増加すると、それぞれの症状を呈する被験者が、高血圧症で平均 40%、高血糖症で 35%、肥満症で 20% 低下した。以上、トレーニングによる体力向上が、生活習慣病指標のうち、特に、高血圧、高血糖、肥満の症状が改善することを明らかにした。

さらに、心理的な効果についても検討した。700 名余りの中高年者を対象に CES-D (Center for Epidemiologic Studies Depression Scale) を用いて自己うつ評価尺度を調査したその結果、インターバル速歩トレーニング前は、全体の 25% が 60 点満点中 16 点以上の「うつ傾向あり」と判定され、平均値は 22 点であった。しかし、5 ヶ月間のトレーニング後には正常値の 13 点まで低下した。さらに、その低下度は 1 週間あたりの速歩時間に比例した。



### III. おわりに

運動生理学の国際拠点の一つであるコペンハーゲン大学の Pedersen<sup>10)</sup>は不活動が糖尿病、循環器疾患などの生活習慣病が基礎にあるとしている。すなわち、不活動は、内臓脂肪の増加、内臓脂肪へのマクロファージの浸潤、全身の慢性炎症、インスリン抵抗性、動脈硬化、神経変質、癌細胞増殖という一連の病態と関連し、その結果、糖尿病、循環器疾患、うつ病、認知症、大腸がん、乳がんといった一見別々の症状の疾患を引き起こす。しかし、基本となる病因は不活動であって、彼らはこれらの疾患を一括して不活動症候群 (diseasome of physical inactivity) と呼んでいる。さらに、不活動症候群が生活共同体で集団発生することから一種の「伝染病」と考えることができ、その予防・治療のためにコミュニティベースの運動処方システムによる疫学的な予防体制の整備が重要であることを主張している。我々は、「熟大メイト」、「インターバル速歩」、「e-HealthPromotion System」を用いることで、コミュニティベースの「個別運動指導」を可能にした。

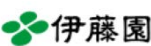
### IV. 参考文献

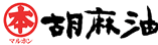
- 1) 厚生労働省(1999):国民の健康と福祉に関する報告:社会保障と国民生活(1998-1999)
- 2) Armstrong LE, et al.(2006). ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. 7<sup>th</sup> ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins, 133-173.
- 3) Pedersen BK and Saltin B (2006) Scand. J. Med. Sci. Sports 16 (suppl 1): 3-63.
- 4) Nemoto K, et al (2007). Mayo Clin. Proc. 82 (7): 803-811.
- 5) 酒井秋男 他 (2000):信州医学雑誌 48:89-96
- 6) Morikawa M et al (2009): British J. of Sports Medicine,45:216-224, 2011.
- 7) Blair SN (1984) JAMA 252, 487-490.
- 8) Sawada SS et al. (2003) Diabetes Care 26, 2918-2922.
- 9) Lee S et al. (2005) Diabetes Care 28, 895-901.
- 10) Pedersen BK (2009) J. Physiol. (Lond.) 587: 5559-5568.

「略歴」

1979 年 京都府立医科大学医学部医学科・卒業  
1979 年 京都府立医科大学・助手・第一生理学教室・勤務  
1985 年 米国・Yale 大学医学部・John B. Pierce 研究所へ博士研究員として  
留学.  
1988 年 帰国  
1993 年 京都府立医科大学・助教授昇任・第一生理学教室・勤務  
1995 年 信州大学医学部附属加齢適応研究センター・スポーツ医学分野・教授  
2003 年 信州大学大学院医学研究科・加齢適応医科学系（独立専攻）・  
個体機能学部門・スポーツ医科学分野・教授に配置換え  
2004 年 NPO 法人熟年体育大学リサーチセンター・理事長就任  
2006 年 厚生労働省「運動所要量・運動指針の策定検討会」委員就任  
2012 年 信州大学大学院医学研究科・疾患予防医科学系専攻・  
個体機能学部門・スポーツ医科学講座・教授に配置換え  
現在に至る。

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

|                                                                                     |                      |                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | アサヒビール（株）名古屋工場       | <a href="http://www.asahibeer.co.jp/">http://www.asahibeer.co.jp/</a>                                     |
|    | 旭松食品（株）食品研究所         | <a href="http://www.asahimatsu.co.jp/">http://www.asahimatsu.co.jp/</a>                                   |
|    | アステラス製薬（株）CSR 部      | <a href="http://www.astellas.com/jp/">http://www.astellas.com/jp/</a>                                     |
|    | 天野エンザイム（株）岐阜研究所      | <a href="http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/index.html">http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/index.html</a>     |
|    | イチビキ（株）研究開発部         | <a href="http://www.ichibiki.co.jp/">http://www.ichibiki.co.jp/</a>                                       |
|    | （株）伊藤園中央研究所          | <a href="http://www.itoen.co.jp/">http://www.itoen.co.jp/</a>                                             |
|    | 伊藤忠製糖（株）             | <a href="http://www.itochu-sugar.com/">http://www.itochu-sugar.com/</a>                                   |
|    | 伊那食品工業株式会社 伊那食品工業(株) | <a href="http://www.kantenpp.co.jp/">http://www.kantenpp.co.jp/</a>                                       |
|   | 科研製薬（株）生産技術研究所       | <a href="http://www.kaken.co.jp/">http://www.kaken.co.jp/</a>                                             |
|  | 加藤化学（株）              | <a href="http://www.katokagaku.co.jp/">http://www.katokagaku.co.jp/</a>                                   |
|  | カネハツ食品（株）技術部         | <a href="http://www.kanehatsu.co.jp/">http://www.kanehatsu.co.jp/</a>                                     |
|  | （株）岐阜セラツク製造所         | <a href="http://www.gifushellac.co.jp/">http://www.gifushellac.co.jp/</a>                                 |
|  | キリンビール（株）名古屋工場       | <a href="http://www.kirin.co.jp/">http://www.kirin.co.jp/</a>                                             |
|  | 金印（株）                | <a href="http://www.kinjirushi.co.jp/">http://www.kinjirushi.co.jp/</a>                                   |
|  | サンエイ糖化（株）            | <a href="http://www.sanei-toka.co.jp/">http://www.sanei-toka.co.jp/</a>                                   |
|  | サンジルシ醸造（株）           | <a href="http://www.san-j.co.jp/">http://www.san-j.co.jp/</a>                                             |
|  | （株）三和化学研究所三重研究所      | <a href="http://www.skk-net.com/">http://www.skk-net.com/</a>                                             |
|  | （株）J-オイルミルズ          | <a href="http://www.j-oil.com/">http://www.j-oil.com/</a>                                                 |
|  | 敷島スターチ（株）            | <a href="http://www.shikishima-starch.co.jp/index.html">http://www.shikishima-starch.co.jp/index.html</a> |
|  | 敷島製パン(株) 研究部         | <a href="http://www.pasconet.co.jp/">http://www.pasconet.co.jp/</a>                                       |

|                                                                                     |                   |                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | (株) 真誠 企画開発部      | <a href="http://www.shinsei-ip.ne.jp/">http://www.shinsei-ip.ne.jp/</a>                                     |
|    | 新日本化学工業 (株)       | <a href="http://www.e-snc.co.jp/">http://www.e-snc.co.jp/</a>                                               |
|    | 太陽化学 (株) 研究所      | <a href="http://www.taiyokagaku.com/">http://www.taiyokagaku.com/</a>                                       |
|    | 大和製罐 (株) 清水研究所    | <a href="http://www.daiwa-can.co.jp/">http://www.daiwa-can.co.jp/</a>                                       |
|    | 竹本油脂 (株) 情報調査室    | <a href="http://www.takemoto.co.jp/">http://www.takemoto.co.jp/</a>                                         |
|    | 辻製油 (株)           | <a href="http://www.tsuji-seiyu.co.jp/">http://www.tsuji-seiyu.co.jp/</a>                                   |
|    | デザイナーフーズ (株)      | <a href="http://www.designerfoods.net/">http://www.designerfoods.net/</a>                                   |
|    | 東海漬物 (株) 漬物機能研究所  | <a href="http://www.kyuchan.co.jp/">http://www.kyuchan.co.jp/</a>                                           |
|    | 東海物産 (株) 食品研究所    | <a href="http://www.tokaibsn.co.jp/">http://www.tokaibsn.co.jp/</a>                                         |
|  | (株) 東洋発酵          | <a href="http://www.toyohakko.com/">http://www.toyohakko.com/</a>                                           |
|  | 東洋紡績 (株) 敦賀バイオ研究所 | <a href="http://www.toyobo.co.jp/">http://www.toyobo.co.jp/</a>                                             |
|  | 中日本氷糖 (株)         | <a href="http://www.nakahyo.co.jp/">http://www.nakahyo.co.jp/</a>                                           |
|  | 名古屋製酪 (株)         | <a href="http://www.sujahta.co.jp/">http://www.sujahta.co.jp/</a>                                           |
|  | (株) ニッポンジーン       | <a href="http://www.nippongene.com/">http://www.nippongene.com/</a>                                         |
|  | 日本食品化工 (株) 研究所    | <a href="http://www.nisshoku.co.jp/">http://www.nisshoku.co.jp/</a>                                         |
|  | フジ日本精糖 (株)        | <a href="http://www.fnsugar.co.jp/">http://www.fnsugar.co.jp/</a>                                           |
|  | 物産フードサイエンス (株)    | <a href="http://www.bfsci.co.jp/">http://www.bfsci.co.jp/</a>                                               |
|  | (株) ポッカコーポレーション   | <a href="http://www.pokka.co.jp/">http://www.pokka.co.jp/</a>                                               |
|  | 三井農林 (株) 食品総合研究所  | <a href="http://www.mitsui-norin.co.jp/">http://www.mitsui-norin.co.jp/</a>                                 |
|  | (株) ミツカングループ本社    | <a href="http://www.mizkan.co.jp/company/">http://www.mizkan.co.jp/company/</a>                             |
|  | 名糖産業 (株)          | <a href="http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/index.html">http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/index.html</a> |



盛田（株）小鈴谷工場

<http://www.moritakk.com/>



ヤマモリ（株）

<http://www.yamamori.co.jp/>



養命酒製造（株）中央研究所

<http://www.yomeishu.co.jp/>