

生体利用性に着目した食機能発現機構に関する分析化学的研究

田中 充 (九州大学大学院 農学研究院)

mitsurut@agr.kyushu-u.ac.jp

食機能 (生体調節作用) に関して、これまでに *in vitro* (試験管レベル) および *in vivo* (動物もしくはヒトレベル) において様々な研究が行われ、ペプチドやポリフェノール類をはじめとする様々な機能性食品成分が報告されている。しかしながら、それらの生体利用性、すなわち、体内吸収後の血液や臓器に存在する当該成分の評価に至った例は極めて少ない。本稿では、機能性食品成分の生体利用性の評価のため、筆者らが構築した独自の分析技術ならびにその活用事例を紹介し、生体利用性に着目した食機能発現機構の重要性について述べたい。

はじめに

食品成分をはじめ経口摂取された成分は、消化管を通過し、腸管より体内吸収されたのち体内循環される。現状の食機能性研究においてもなお、*in vitro* (試験管レベル) での作用を *in vivo* (動物あるいはヒトレベル) での生理作用のメカニズムとして外挿する三段論法的研究が見受けられ、生体内での活性本体の同

定、ならびに作用部位への到達については未解明なものが多い。生体内で分解・代謝を受けるペプチドやポリフェノール等の食品成分の機能性研究においては、そのバイオアベイラビリティの解明、すなわち、体内吸収性および臓器蓄積性等の評価が必須となる (図 1)。非栄養素である食品成分の体内吸収性は低いものも多く、バイオアベイラビリティの評価などの薬理学的エビデンスが圧倒的に不足しているのが現状である。その要因の一つとして、食品成分のバイオアベイラビリティを的確に評価可能な分析系が十分でないことが考えられた。

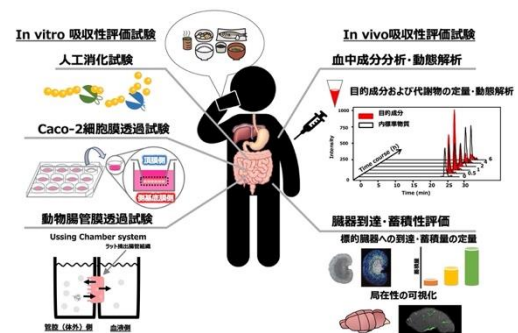


図 1. 食品成分の生体利用性評価のための *in vitro* および *in vivo* 試験項目

機能性ペプチドの体内吸収性評価

これまで明らかとなっているペプチドの生理作用 (高血圧予防、糖尿病予防、脂質代謝改善作用、動脈硬化予防作用など) の多くは、生体内の代謝系を標的としており、生理作用発現に至るには経口摂取された活性ペプチドがそのままの形で体内吸収・組織蓄積する必要がある。実際に体内吸収されたペプチドは、フェムト~数十ピコ mol/mL-plasma レベルで血中に存在するため、それらの定量には、安定同位体標識ペプチドを内標準とした高感度 LC-MS 法を設定する必要がある。筆者らはこれまでに、2,4,6-Trinitrobenzene sulfonate (TNBS) をはじめとする各種誘導体化試薬に着目し、この誘導体化を適用した高感度ペプチド検出のための新たな LC-MS 法を構築した (最大 50 倍の感度向上を達成 : LOD > 1.35 fmol/inj. vol.)。本法を用いることで、動脈硬化予防ペプチドである Trp-His が体内吸収可能であることを明らかにするに至っている (最大血中濃度 28.7 ± 8.9 pmol/mL-plasma, 10 mg/kg B.W.投与) ¹⁾。さらに、逆配列ペプチドである His-Trp の体内吸収量は Trp-His の約 1/50 ($C_{max} = 1.1$ pmol/mL-plasma) であることも明らかにしており、ペプチドの体内吸収性が配列依存的であることを明示した。

また従来は、腸管に存在するペプチドトランスポーターが認識可能なジ・トリペプチドのみが吸収可能と考えられていた。そこで筆者らは、腸管吸収モデルジペプチドである Gly-Sar を基本骨格とした一連のモデルオリゴペプチドを設定し、吸収可能なペプチド鎖長についての体系的な評価を実施し、少なくとも 5 残基までのペプチドが腸管吸収後に循環血に移行可能であること、さらにその吸収経路は、2,3 残基のペプチドはペプチドトランスポーター、それ以上の鎖長のものは細胞間隙輸送（タイトジャンクション）が関与していることを実証した²⁾。

腸管 in situ MALDI-MS イメージング法

MALDI-MS イメージング法は、低分子の食品成分であっても組織中の蓄積や分布を可視化することのできる画期的な手法である。しかしながら、マトリックスの影響による低分子領域でのノイズピークの影響を低減する必要がある。その取組の一つとして、筆者らはキレート作用を有するフィチン酸のマトリックス添加剤として

の有用性を見出している。フィチン酸を加えたマトリックス溶液を用いることで、アルカリ金属類の補足によるクラスターノイズの低減、目的成分の金属付加イオン形成の抑制、ならびに、マトリックス結晶の均質化が達成された³⁾。さらに本 MALDI-MS イメージング法を動脈硬化予防ペプチドである Trp-His とその逆配列ペプチドである His-Trp を Ussing chamber を用いた腸管透過試験に展開し、Trp-His がそのままの形で腸管透過する一方で、His-Trp は腸管組織から検出されず、分解物である His および Trp の顕著な存在を可視化した（図 2）¹⁾。これらの結果は、実際の小腸組織におけるプロテアーゼ耐性が体内吸収性を大きく左右することをイメージングにより直接明示した初めての成果となった。

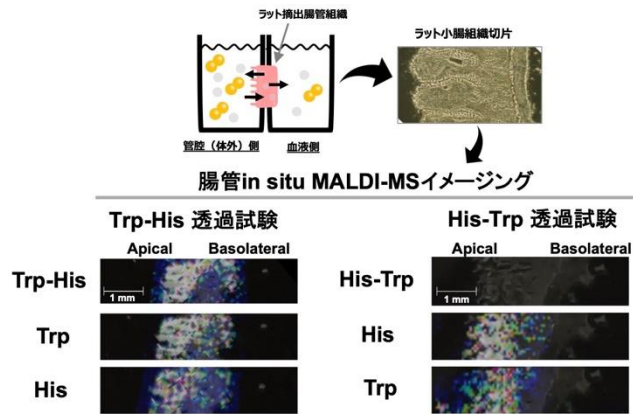


図 2. 低分子ペプチド Trp-His および His-Trp の MALDI-MS イメージングによる腸管吸収動態の可視化

機能性ポリフェノールの体内吸収性評価

ポリフェノール類の MALDI-MS 分析においては、対象化合物が低分子であることに加えて、その中性化学構造が故に、イオン化の起点が無く、イオン化効率が低いことが問題とされてきた。そこで筆者らは、MALDI レーザーの UV 波長のレーザーのエネルギーを効率的に吸収し、そのエネルギーにより塩基を発生する光塩基発生剤である Nifedipine の MALDI-MS マトリックスとしての有用性を見出し、ポリフェノール類の水酸基からの強制的なプロトンの引き抜き反応によるポリフェノール類の高感度検出を達成した⁴⁾。この Nifedipine を用いた MALDI-MS イメージング法により、ポリフェノールの腸管吸収経路および代謝挙動を可視化することのできる新たな評価系を構築するに至っている⁵⁾。本法を用いることで、これまで腸管吸収されないと考えられてきたテアフラビン類（本試験では theaflavin-3'-O-gallate を用いた）が、モノカルボン酸トランスポーターおよび有機アニオントランスポーターを介して腸管組織内に一度取り込まれ、その後 ABC トランスポーターを介して管腔排出されていることを初めて明らかにしている。本知見は、腸管組織内の成分分布の直接把握でしか評価できないことから、本 MS イメージング法は腸管吸収性評価において極めて重要な評価系であると考えられる。

定量 MALDI-MS イメージング法

MALDI-MS イメージング法は、マトリックス噴霧工程における再現性（噴霧量の確保、結晶の均質性）に乏しく、定量性がないことが問題とされていた。したがって筆者らは、マトリックス噴霧量を非破壊的に評価するための蛍光内標準物質を新たに設定することで、定量性の確保に成功している。最適蛍光物質としてローダミン 6G を見出し、当該物質の蛍光強度を指標にマトリックス噴霧量の再現性を確保するとともに、MS イメージングにおける当該物質の MS 検出強度を用いて標準化することで、測定間の再現性の飛躍的向上を達成した（変動係数<5%）⁶⁾。実際、機能性食品成分であるフェルラ酸を経口投与したラット腎臓において、皮質・腎盂などの領域に蓄積したフェルラ酸を定量・可視化するに至っており、約 10 μm の厚みの組織切片から関心領域における体内吸収後の標的食品成分の定量・可視化が可能な方法として確立している。

脳機能改善ペプチド Tyr-Pro の発見

上述の高感度誘導体化 LC-MS 分析および高感度 MALDI-MS イメージング法を駆使し、脳への物質輸送に対するバリア機構である血液脳関門を透過するペプチドのスクリーニングをマウス脳灌流試験において実施している。その結果、Tyr-Pro という

ジペプチドがそのままの形で血液脳関門を介して脳組織に到達・蓄積し、海馬、大脳皮質や視床下部という記憶等を司る領域に局在することを世界で初めて明らかにしている（図3）⁷⁾。さらに、本知見を契機とし、Tyr-Pro をアルツハイマーモデルマウスに対して長期投与することで、記憶障害の改善に有効であることを実証するに至っており⁸⁾、本成果は標的臓器への積極的な機能改善を裏付けるこれまでに無い新たな食機能研究の実績といえる。

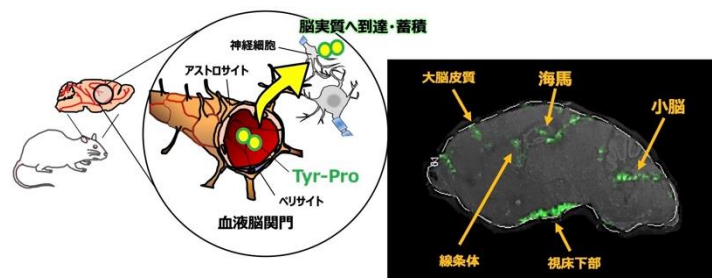


図3. 血液脳関門透過ジペプチド Tyr-Pro のマウス灌流試験（10 min）後の脳組織 MALDI-MS イメージング

独自の分析技術を活用したその他の成果

これまでに構築した高感度・網羅的 MS 法を活用し、効果的な疾病予防のために重要な、バイオマーカーの探索と疾病の早期発見・診断法の開発にも取り組んでおり、「乳がん細胞株において中鎖不飽和脂肪酸が高排出されること」を実証するに至っている⁹⁾。さらに、独自の MS 技術を食品品質評価技術へと展開し、味成分と匂い成分を食品そのままに一斉網羅分析できる新たなカーボンブラック MS 技術を開発している¹⁰⁾。本成果は、これまで不可能とされた「ヒトの感じる味と匂いのマルチモーダルな感覚情報の可視化」を期待させる成果である。

将来展望

上述のバイオアベイラビリティ評価技術のほとんどは、薬理的アプローチを基本とするものであり、薬剤とは異なり、自由な食べ合わせが可能な「食品」を前提とした解析の観点が欠落している。多成分混合系である食品としての摂取、さらには、共存する成分による吸収・代謝への影響などを解析できるさらなる網羅的解析法が求められる。また、機能性タンパク質の様な生理活性本体が不明な食品成分の解析も必要となる。筆者らの研究をはじめ、タンパク質摂取に由来して血中移行するペプチドが明らかになりつつあるが、ピーク検出されているにもかかわらず配

列同定へ至れない多数のシグナルが存在しており、膨大な未知の代謝物の存在が示唆されている。したがって今後も、食機能分野におけるバイオアベイラビリティの評価ならびにそれに伴うメタボロームの解析等が可能なさらなる高度な分析技術を構築し、食科学分野ならびに農学分野における研究発展に貢献したい。

謝辞

本賞の受賞にあたり、公益社団法人日本食品科学工学会ならびに国立大学法人九州大学大学院農学研究院よりご推薦を賜りました。松井利郎会長、中尾実樹研究院長ならびに関係の皆様にご心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、九州大学大学院農学研究院の松井利郎教授より賜りました多大なるご指導とご助言に深く感謝し、衷心より御礼申し上げます。また、本研究を支えてくださいました九州大学大学院農学研究院食品分析学研究室の皆様ならびに九州大学五感応用デバイス研究開発センターの皆様にご厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Tanaka, M., Hong, S. M., Akiyama, S., Hu, Q. Q. & Matsui, T. Visualized absorption of anti-atherosclerotic dipeptide, Trp-His, in Sprague-Dawley rats by LC-MS and MALDI-MS imaging analyses. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 1541–1549 (2015).
- 2) Hong, S.-M., Tanaka, M., Koyanagi, R., Shen, W. & Matsui, T. Structural Design of Oligopeptides for Intestinal Transport Model. *J. Agric. Food Chem.* **64**, (2016).
- 3) Hong, S.-M., Tanaka, M., Yoshii, S., Mine, Y. & Matsui, T. Enhanced visualization of small peptides absorbed in rat small intestine by phytic-acid-aided matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* **85**, 10033–10039 (2013).
- 4) Nguyen, H.-N., Tanaka, M., Komabayashi, G. & Matsui, T. The photobase generator nifedipine as a novel matrix for the detection of polyphenols in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **51**, 938–946 (2016).
- 5) Nguyen, H.-N. *et al.* Novel in situ visualisation of rat intestinal absorption of polyphenols via matrix-assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry imaging. *Sci. Rep.* **9**, 3166 (2019).
- 6) Hahm, T. H., Matsui, T. & Tanaka, M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Tissues via the Formation of Reproducible Matrix Crystals by the Fluorescence-Assisted Spraying Method: A Quantification Approach. *Anal. Chem.* **94**, 1990–1998 (2022).
- 7) Tanaka, M. *et al.* Brain-transportable dipeptides across the blood-brain barrier in mice. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
- 8) Tanaka, M. *et al.* Brain-transportable soy dipeptide, Tyr-Pro, attenuates amyloid β peptide25-35-induced memory impairment in mice. *npj Science of Food* **4**, 1–4 (2020).
- 9) Tanaka, M. *et al.* Identification of characteristic compounds of moderate volatility in breast cancer cell lines. *PLoS One* **15**, e0235442 (2020).
- 10) Tanaka, M. *et al.* Laser Desorption Ionization–Mass Spectrometry with Graphite Carbon Black Nanoparticles for Simultaneous Detection of Taste- and Odor-Active Compounds. *ACS Appl. Nano Mater.* **5**, 2187–2194 (2022).