

疾病予防訴求型食品素材としての水産物の 高次利用に関する研究

高橋 是太郎・栗原 秀幸・細川 雅史

(北海道大学大学院水産科学研究科)

1. はじめに

超少子, 超高齢化社会を目前にし, 疾病予防訴求型食品 (プライマリーヘルスケアフード) の開発が急がれている。かかる視点から早急に対策を迫られている疾病はガン, 糖尿病, 動脈硬化の三大疾病である。本研究では糖尿病重篤化予防にかかる食後高血糖の抑制, 並びに動脈硬化の進行軽減に関係が深いとされる「赤血球変形能」を向上させる効果を有する水産物の成分について調べた。

2. 食後高血糖の抑制物質

食後高血糖の抑制物質としてダイエタリーファイバーが知られている。ヒジキをはじめ, 多くの海藻中にはダイエタリーファイバーが豊富に含まれているが, 海藻による顕著な食後高血糖の抑制効果をダイエタリーファイバーのみの効果に帰属させるには無理があった。筆者ら (栗原) は海藻中にはダイエタリーファイバー以外にもヒトの糖消化の最終段階で働く α -グルコシターゼの作用を抑制する物質が多いに違いないと考え, 先ずそのような物質を検索するアッセイ法の確立に取り組んだ。

2.1 α -グルコシターゼ阻害物質の新規アッセイ法

海藻中の α -グルコシターゼ阻害物質を従来法で検索しようとする, 共存する色素によって吸光度の測定が困難になる等の問題が生じる。また, 対象物質の溶解性により測定精度が著しい影響を受ける。このような問題を解決するため, 対象物

質をしみ込ませたペーパーディスクを酵素 (α -グルコシターゼ) 含浸寒天に埋め込み, これを基質含浸寒天に積層することによって α -グルコシターゼ阻害物質を検索できる方法を開発した。すなわち 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 20ml) 及び 0.4mg/ml の α -グルコシターゼ溶液 0.4ml を含む 1.5% 寒天板に対象画分をしみ込ませた直径 8mm のペーパーディスクを埋め込み, その上に同緩衝 10mM/ 及び 5mM *p*-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシドを含む 3.0% 寒天板を積層することによって現れる阻止円の大きさを観察し, 目的物質を検出する方法である (Fig.1)。

2.2 ヒジキ中の α -グルコシターゼ阻害物質

先述のアッセイ法により, ヒジキ中に α -グルコシターゼ阻害物質を見出した。オルシノール硫酸¹⁾ 及びアズール A²⁾ による呈色, 赤外吸収スペクトル, ネガティブ FAB マススペクトル, ガスクロマトグラフィー, プロトン核磁気共鳴スペクトル, カーボン 13 核磁気共鳴スペクトル, 2 次元核磁気共鳴スペクトル解析法により, ヒジキ中の α -グルコシターゼ阻害物質は Fig.2 の 6-スルホ- α -D-キノボピラノシルジアシルグリセロール (SQDG) であると同定した。次いで SQDG の阻害様式について解析し, Fig.3 の Lineweaver-Burk プロット及び Fig.4 の Dixon プロットにより阻害様式は拮抗阻害, K_i 値は $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (酵母の α -グルコシターゼに対し) であることが判明した。

その後, ロットの異なるヒジキから, より拮抗阻害性の強い物質を検出し, 同様の定性試験及び

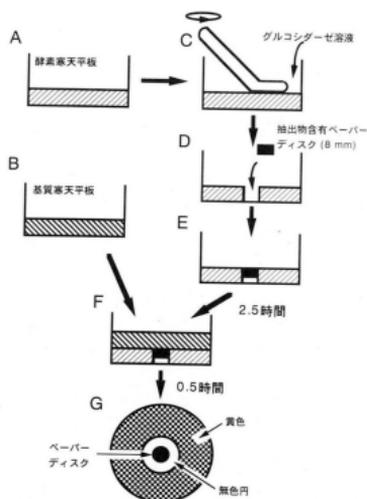


Fig. 1 Procedure of the agar plate method.

A, preparation of the enzyme agar plate by dissolving 1.5% agar in buffer; B, preparation of the substrate agar plate by dissolving 3.0% agar in buffer containing *p*-nitrophenyl D-glucopyranoside; C, addition of glucosidase in buffer and spreading; D, placing paper disk in the hole made with a cork borer; E, preincubation at 25°C for 2.5h; F, placing the substrate agar plate on the enzyme agar plate and incubation at 25°C for 0.5h; G, measurement of diameter of colorless circle against yellow background.

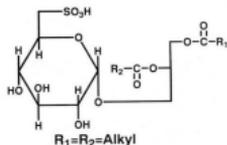


Fig. 2 Structure of sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG)

機器分析の結果により、この物質が6-スルホ- α -D-キノピラノシルモノアシルグリセロール (SQMG) であることを明らかにした。SQDGの阻害性が基質濃度 0.2mM 及び 0.4mM のときにそれぞれ $IC_{50}=7.33\mu M$ 及び $>9.82\mu M$ であったのに対し、SQMGは $IC_{50}=3.46\mu M$ 及び $>4.88\mu M$ を示した。

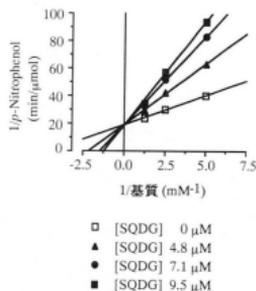


Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of inhibition of SQDG (I) against yeast α -glucosidase. SQDG, sulfoquinovosyl diacylglycerol.

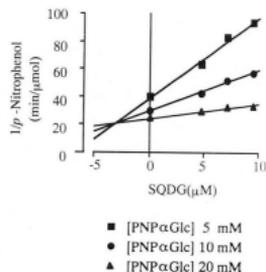


Fig. 4 Dixon plot of inhibition of SQDG (I) against yeast α -glucosidase. SQDG, sulfoquinovosyl diacylglycerol; PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

2.3 ハケサキノコギリヒバ中の α -グルコシターゼ阻害物質

紅藻にはプロモフェノールが豊富に含まれていることは以前から知られている³⁾。筆者ら(栗原)はハケサキノコギリヒバの α -グルコシターゼ阻害作用が新規物質を含むプロモフェノール群によることを先と同様の方法により明らかにした。得られたプロモフェノール同族体 (Fig.5) の α -グルコシターゼ阻害性に対する構造機能相関について検討し、ジベンジルエーテル構造を有するものが特に強い阻害活性を示すこと、及び臭素の置換や水酸基の存在が阻害活性に著しく影響することを明らかにした (Table 1)。

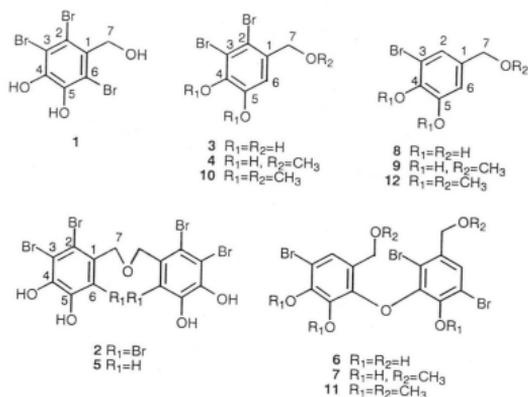


Fig. 5 Structure of bromophenols and their methyl ethers.

Table 1 IC₅₀ values of bromophenolic benzyl and bisbenzyl ethers against rat-intestinal sucrase and maltase

Bromophenol	IC ₅₀ ^a (mM)	
	Sucrase	Maltase
1	4.2	>5.0 (42.3) ^b
2	2.4	3.2
3	2.4	2.5
5	1.0	1.1
6	3.5	3.1
8	3.6	4.8

^a IC₅₀ values were determined by inhibition assay with substrate concentration of 50mM.

^b Inhibition (%) at 5.0mM compound.

3. 赤血球変形能向上作用物質

魚油を摂取することにより、血液がさらさらになることは多方面の研究で既に証明されている。これは主に魚油のトリグリセリド中に含まれる高度不飽和脂肪酸によるものである。高度不飽和脂肪酸は経口摂取されると、その一部は最終的に細胞膜のリン脂質に組み込まれ、それによってその生理機能が発現すると考えられている。高度不飽和脂肪酸が赤血球の細胞膜に組み込まれた場合には、赤血球の変形能の向上に寄与することが免疫調査や介入試験によって示されている。

赤血球の変形能の良し悪しは血液粘度に最も大

きく影響する。また、血液粘度の低下は血圧の低下に直結し、血栓の生成リスクも軽減する。

近年、高度不飽和脂肪酸を摂取する場合にはトリグリセリド形態よりもリン脂質形態の方が効果的であることが種々のデータから示唆され始めている。事実、高度不飽和脂肪酸をリン脂質の形態で摂取したときはその半分近くがそのままの分子形態で血中に現れるといわれる⁴⁾。そこで本研究ではヒトの赤血球に直接高度不飽和脂肪酸含有リン脂質を作用させ、その赤血球変形能を向上させる効果について調べた。

3.1 水産物由来リン脂質の赤血球変形能改善効果

本研究では高度不飽和脂肪酸含有リン脂質を含みながらもその利用用途が確立していない河川湖上シロサケ（川ブナ）の筋肉とシラコ及びイカ肝臓の皮を対象として、疾病予防訴求型食品の素材としてのポテンシャルについて検討した。川ブナの精巢、普通肉及びイカ肝臓の皮から Bligh & Dyer 法⁵⁾ に準じて全脂質を抽出し、シリカカートリッジに供することによってリン脂質を精製した。

得られたリン脂質の濃度を 4mg/5ml に調整し、そのうち 0.2ml を濃縮乾燥した後、蒸留水及びジメチルスルホキシド (DMSO) を 1.0ml ずつ加えて超音波懸濁したものをリン脂質懸濁液とした。

赤血球の洗浄用 PBS (phosphate buffered saline) には 10mM Na₂HPO₄, 125mM NaCl を 4°C でリン酸により pH 7.4 に調整したものを用い、反应用 PBS は洗浄用 PBS に 2mM アデノシン, 10mM イノシン, 10mM グルコースとなるように加えたものを用いた。

ヒトの静脈より採血を行い、ヘパリンで凝血を防止した。遠心分離によって buffer coat を除去し、このとき得られた血漿を 4°C で保存して後に測定時に用いた。沈殿している赤血球を洗浄用 PBS で 3 回洗浄し、反应用 PBS に懸濁してヘマトクリット値を 2% に調整した。この赤血球懸濁液 6 ml に対してリン脂質懸濁液を 60ml 加え、37°C で振盪しながら 3 時間インキュベートした後、再び PBS で 3 回洗浄することによって余分なリン脂質を除去、PBS に再懸濁してヘマトクリット値を 10% に調整した。この赤血球懸濁液 0.5ml に前記の血漿 0.2ml を加えてよく混合した後、ニュークリポフィルター (5μ ポア) に 2 回通したものを日立原町電子製の細胞レオロジー測定装置 (Bloody 5A) に供した。

同装置のマイクロチャンネルを通過する速度

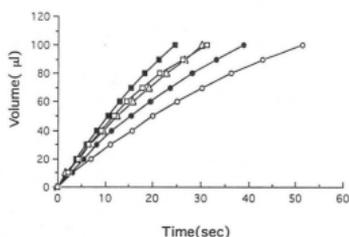


Fig. 6 Flow curves of human erythrocytes treated with phospholipids of salmon testis, salmon muscle, squid liver skin, and soybean for 3 hours obtained through evaluation of deformability with artificial capillary model. ■ salmon testis, □ salmon muscle, △ squid liver skin, ● soybean, ○ control

(単位時間当たりの赤血球懸濁液の液体積) を比較することによって赤血球の変形能を評価した結果、Fig.6のようにすべてのリン脂質処理赤血球で変形能の改善効果がみられた。特にシラコのリン脂質による効果が最も高く、川ブナの筋肉のリン脂質がこれに次いだ。またイカ肝臓の皮から抽出したリン脂質も大豆のリン脂質より明らかに高い効果を示した。

3.2 水産物由来リン脂質の主要分子種

先に得られたリン脂質画分を薄層クロマト-デンシトメトリーに供して脂質クラスの組成分析を行うとともに、主要なリン脂質画分 (バンド) をかきとって単離し、アセチルジグリセリドに誘導して逆層高速液体クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーの併用によって分子種の分析⁶⁾を行った。

その結果、リン脂質クラスでは川ブナ筋肉リン脂質の約85%がホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) で占められており、シラコでは両者の合計が約90%も占めていた。一方、イカ肝臓の皮ではこれらの合計が約63%にとどまったが、一般に含量が低いとされるホスファチジルセリンまたはホスファチジル

イノシトールが19%に及んでいた。主要な分子種はシラコ PC で (16:0, 20:5) と (18:1, 20:5) が約35%, 同 PE では約27%を占めていた。一方 (16:0, 22:6) と (18:1, 22:6) の合計はシラコ PC で約20%, 同 PE で約13%を占め、先の EPA 含有分子種に次いでいた。その他多くの種類の分子種が少量ずつ含まれていた。

おわりに

食糧基盤は農業、畜産業、水産業により支えられている。しかし、我国は何れも輸入品に極めて大きく依存し、このことが世界の食糧を日本ヘシフトさせて、他の貧しい国々の人々の食糧事情を圧迫している。その一方で、我が国は水産物の輸入額が極めて高いにも拘らず、若い世代のみならず中年世代においても日常的な n-3 系脂肪酸の摂取不足と n-6 脂肪酸の摂取過多をきたしている。これは云うまでもなく、近年のライフスタイルの変化とそれに伴う嗜好の変化によるところが大きい。我が国は四方が海に囲まれているにも拘らず水産業の活気は落ち込む一方である。本研究でその一端を示したように、我が国で獲れる低利用もしくは未利用の水産物とその廃棄部分には疾

病予防訴求型食品の素材と成り得る成分が豊富に含まれている。それらの機能を骨太な研究によって明らかにし、それらの成分または組織を現代の日本人が好む食品に組み入れていく努力をすることは、国民医療費の軽減のみならず、健全な労働人口の確保の上でも国家基盤そのものに影響するほど重要である。

謝 辞

本研究に対し多大の御助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Svennerholm, L.: *J. Neurochem.*, **1**, 42 (1956).
- 2) Iida, N., Toida, T., Kushi, Y., Honda, S., Fedman, P., Svennerholm, L., and Ishizuka, I.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 5957 (1989).
- 3) Kurata, K., Taniguchi, K., Takashima, K., Hayaishi, I., and Suzuki, M.: *Phytochemistry*, **45**, 485 (1997).
- 4) 原健次: 生理活性脂質の生化学と応用, p.90. 幸書房 (1993).
- 5) Bligh, E. G., and Dyer, W. J.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
- 6) Takahashi, K.: Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ., **32**, 245 (1985).

Utilization of marine products as highly health benefit food materials

Koretaro Takahashi, Hideyuki Kurihara and Masashi Hosokawa
(Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

1. Alpha-glucosidase inhibitors are health benefit components for modernized nations. We developed a novel screening method for α -glucosidase inhibitors by using agar plates. And then applied it to screen α -glucosidase inhibitors from nine kinds of algal species. Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) isolated from the edible brown alga *Hizikia fusiformis* inhibited yeast α -glucosidase. Kinetic evaluation disclosed that SQDG has a competitive inhibition and a K_i value of $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ against yeast α -glucosidase. From the other *Hizikia fusiformis* purchased on different day, another α -glucosidase inhibitor, the sulfoquinovosylmonoacylglycerol (SQMG), was discovered. SQMG showed IC_{50} values of 3.46 and $4.88 \mu\text{M}$ under 0.2 and 0.4mM substrate concentrations, respectively, while SQDG showed 7.33 and $>9.82 \mu\text{M}$ under the same conditions.
2. Inhibitory potencies against α -glucosidase activities were compared among bromophenols obtained from extracts of Rhodomelaceae red algae. Inhibitory potencies of the bromophenols increased with the increasing degree of bromo-substitution per benzene ring and the decreasing degree of methyl-substitution.
3. The deformability of phospholipid-treated erythrocytes were compared by passing the erythrocyte suspension through an artificial capillary model. Salmon testis phospholipid showed the best effect on increasing the deformability of human erythrocytes followed by that of salmon muscle, squid liver skin, and soybean. Increase in deformability of erythrocytes contributes to the decrease in viscosity of the brood. Therefore, phospholipids from marine sources might be more health beneficial than that from soybean.