

2009. 11. 5.

江崎グリコ（株）

研究本部 米谷俊

近畿アグリハイテクシンポジウム「生産現場におけるイノベーションに向けて（3）」

酵素的改変による柑橘由来ヘスペリジンの機能性素材としての開発

（1）ヘスペリジンについて

ヘスペリジンは、温州みかんやバレンシアオレンジなどの柑橘類に多く含まれるフラボノイドの一種である。1936年に Szent-Gyorgi が、壊血病に伴って起こる血管透過性を抑制する物質として柑橘類の果皮からヘスペリジンを見出し、ビタミン P (permeability; 透過性) と名付けられた¹⁾。これがフラボノイドの機能性研究の始まりであると思われる。

柑橘類の果実は、漢方薬として用いられるものが多く、「陳皮」、「橙皮」、「枳実」、「枳殻」などが知られている。ヘスペリジンは、この陳皮の有効成分としても知られている。

さらに、ヘスペリジンには、発がん抑制作用、抗炎症作用、血圧低下作用、血清コレステロール低下作用などをはじめ、さまざまな生理活性が報告されており²⁾、今後のさらなる展開が期待されているが、水に難溶性であることなどの理由により、充分には利用されていないのが現状である。

（2）糖転移ヘスペリジン（ α -グルコシルヘスペリジン）について

ヘスペリジンの用途をさらに拡大していくために、糖質関連酵素の技術を用いて、難溶性のヘスペリジンに親水性の糖を付加（糖転移、配糖化）し、可溶化することが考えられた³⁾。一般に、酵素反応において大量の生成物を得るためには、基質となる化合物（この場合はヘスペリジン）を反応溶液中にできるだけ多く溶解させる必要がある。ヘスペリジンは、水や油には難溶性であるが、アルカリには良く溶解する。そこで、アルカリ性でも安定に作用する酵素を開発すれば、ヘスペリジンへの糖転移が可能となると考え、アルカリ耐性の糖転移酵素を検索した。

まず、土壌より pH10 でも生育する微生物を検索し、その中から高い糖転移活性を持つ酵素生産菌 *Bacillus sp.* A2-5a 株が得られた。生産される酵素はサイクロデキストリン合成酵素 (CGTase) であり、至適 pH は 5.5 であったが、pH8~11 のアルカリ域でも活性を高く保持し（図 1）、ヘスペリジン、ジオスミン、ナリンジン、ネオヘスペリジンなど水に難溶性のフラボノイド類をこれらが溶解するアルカリ域で高率で糖転移反応を実施できた⁴⁾。

CGTase は、澱粉を糖の供与体とし、ヘスペリジンを糖の受容体として糖転移反応を起こすため、ヘスペリジンにグルコースが 1 個、2 個、3 個、と付加された一連の配糖体（通常は、グルコースが 1~6 個程度付加される）が生成される。生成したヘスペリジンのモノグルコサイドの構造は、4^G- α -D-monoglucosyl hesperidin (ヘスペリジンモノグルコサイド) であると決定され、一連の配糖体は、転移したグルコースに α -1,4 結合でさらにグルコースが転移したものであった（モノグルコサイドとオリゴグルコサイドの混合物；図 2）⁵⁾。

この糖転移ヘスペリジン（モノグルコサイド、ジグルコサイド）の水に対する溶解性は、ヘスペリジンの約 10,000 倍に向上していた⁵⁾。

1. 食品への利用

糖転移ヘスペリジンの食品への利用については、主として、①紫外線による天然色素の退色抑制⁶⁾、②みかん加工品（缶詰、ジュースなど）中のヘスペリジンの結晶化抑制（可溶化）^{7,8)}、③味質の改善⁹⁾、の 3 つの用途が開発されている。図 3 には、野菜ジュースの官

能評価結果を示しているが、糖転移ヘスペリジン添加区は、無添加区に比べ、青臭みや苦味などが少なく、全体としての嗜好性が高いことを示している。また、紅花の赤色素、カルタミンを可溶化する性質も報告されている¹⁰⁾。ヘスペリジン、カルタミンは共にフラボノイド類であるので、上記の結果から糖転移ヘスペリジンには、難溶性のフラボノイドを可溶化できる可能性が期待されている。

2. 糖転移ヘスペリジンの生体吸収性

糖転移ヘスペリジンの生理活性に研究を始めるに当たり、まず生体への吸収性を確認した。健常成人7名に糖転移ヘスペリジン（3g；ヘスペリジンモノグルコサイド）を経口投与し、経時的に採血し、血清中の糖転移ヘスペリジン量を Mariusz KP らの方法¹¹⁾にしたがって、アグリコンのヘスペレチン量として測定した。

その結果、ヘスペリジン投与群では、ヘスペレチンは、吸収され血中で確認されるまでに約5時間を要したが、糖転移ヘスペリジン投与群では、経口投与後30分程度で血中で検出された。糖転移ヘスペリジンは投与後急速に吸収されること、投与後4～6時間後に吸収の最大ピークを迎え、その後漸減すること、さらに、ヘスペリジンに比べ約3倍の吸収性（AUC（Area Under the Curve）で比較）を示すことが明らかとなった¹²⁾。

3. 糖転移ヘスペリジンの生理活性

上述のようにヘスペリジンには、多くの生理活性が見出されているので、生体吸収性が向上した糖転移ヘスペリジンは、より一層の生理活性が期待できる。そこで、ヘスペリジンで確認されている生理活性を糸口に以下の検討を進めた。

①発がん抑制作用

実験動物にある化学物質を投与すると臓器特異的にがんが発生することが知られており、発がん抑制の研究には、この方法が用いられている。例えば、4-ニトロキノリン 1-オキシサイド（4-NQO）を用いれば口腔がんが、アゾキシメタンでは大腸がんが発生する。

舌扁平上皮がんの誘発は、雄性F344ラットに20ppm 4-NQOを8週間、飲水投与することにより行なった。8週間後より、0.1%糖転移ヘスペリジン（モノグルコサイドとオリゴグルコサイドの混合物）を添加した食餌を与えた。実験開始39週間後に解剖した結果、糖転移ヘスペリジン投与群は、無添加群（4-NQOのみ投与）に比べ、舌腫瘍、舌乳頭腫の発生が有意（以下、危険率5%で有意差がある場合は、有意と記す）に低下していた。この時、細胞増殖のマーカーであるポリアミンの産生が抑制傾向にあり、また、舌粘膜上のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性も増加傾向にあることから、解毒酵素の作用により発がんが抑制される可能性が示唆された¹³⁾。また、同様に、アゾキシメタンを腹腔内注射し大腸がんを発生させた系でも、これまでヘスペリジンで報告されている1/10量（0.1%）で効果を示した¹³⁾。

②血圧低下作用

自然発症高血圧（SHR）ラットにヘスペリジン、または、糖転移ヘスペリジン（30mg/日/Kg体重）を25週間にわたり経口的に投与した。その結果、ヘスペリジン、糖転移ヘスペリジン投与により、血圧、心拍数が減少し、高血圧を改善する作用があることがわかった。一方、コントロールとして用いた正常血圧Wistar-Kyotoラットでは、これらに変化はなく、通常の血圧であれば、それ以上血圧を下げる作用はなく、安全であると考えられた¹⁴⁾。

そこで、ヒトボランティアを用いた研究を実施した。500mg/日の糖転移ヘスペリジン投与した時は、血清コレステロールは全被験者の20%程度しか低下させなかったが、血清

脂質は 45-55%も低下させた。特に、150mg/dL 以上の血清脂質の被験者の血清コレステロール値を有意に低下させた¹⁵⁾。

③骨粗鬆症改善作用

ヘスペリジンには、コレステロール合成の律速酵素である 3-Hydroxy-3-methylglutamyl coenzyme A reductase 阻害を介して肝臓のコレステロール合成を調節することが報告されている¹⁶⁾。同様の作用を持つ医薬品としてスタチン系薬剤が開発されているが、これには骨形成蛋白質の産生を介して骨形成を促進する作用もあることが報告されている¹⁷⁾。そこで、ヘスペリジンにも骨形成促進作用があると考え、骨粗鬆症モデルとして用いられる卵巣摘出マウス (OVX) を用いて糖転移ヘスペリジンの骨量改善効果について検討された。

OVX マウス (8 週齢) にヘスペリジン 0.5%、または、糖転移ヘスペリジンを 0.7% 配合した食餌を投与した (投与量は、ヘスペリジン量として同等になるように調整した)。コントロールとして、偽手術群 (卵巣は摘出しない) と 17β -エストラジオール (女性ホルモンの一種) $0.03\ \mu\text{g}/\text{日}$ を経口投与した群 (ポジティブコントロール) を用いた。飼育 4 週後に解剖し、大腿骨の骨密度を二重 X 線吸収法 (DXA 法) により測定したところ、偽手術群 (骨密度 $40.9 \pm 0.8\ \text{mg}/\text{cm}^2$) に比べ、卵巣摘出マウス群 ($34.9 \pm 0.3\ \text{mg}/\text{cm}^2$) は、大腿骨の骨密度が有意に減少していたが、ヘスペリジン ($38.7 \pm 0.6\ \text{mg}/\text{cm}^2$) あるいは糖転移ヘスペリジン ($39.1 \pm 1.2\ \text{mg}/\text{cm}^2$) を投与した卵巣摘出マウス群では、骨密度の減少が抑えられること、 17β -エストラジオール投与群 ($43.3 \pm 2.5\ \text{mg}/\text{cm}^2$) では、偽手術群と有意な差はなかったことが明らかとなった¹⁸⁾。この結果は、CT スキャンにおいても確認されており、食品成分による骨粗鬆症の改善が期待できる。

④冷え性改善作用

冷え性は、近年、女性を中心に増加しており、女性の半数以上が冷え性であると言われているが、西洋医学的には疾病として扱われないため、十分な研究や治療がなされていないのが現状である。ヘスペリジンは、古くから末梢血管強化作用が知られているので、生体への吸収が著しく改善された糖転移ヘスペリジンを用い、血流を良くして冷え性を改善する研究が進められた。

20-30 代の冷え性を自覚する健常者女性 10 名を被験者として、試験飲料 (糖転移ヘスペリジン 250mg 含有、100mL) とプラセボ飲料 (同量の水) を経口的に投与した。30 分間安静の後、左手に 15°C 1 分間、冷水に浸す冷却負荷をかけ、左手先の表面温度、血流量、血管幅を経時的に測定した。その結果、冷却負荷直後の体表面温度は、プラセボ群では 40 分経っても回復しなかったが、糖転移ヘスペリジン投与群では、20 分程度でほぼ冷却負荷前の温度に回復した (図 4)。また、摂取前の体表面温度を 100 とした時の体表面温度回復率は、糖転移ヘスペリジン投与時の方が有意に高くなった。非侵襲的に測定した血流量と血管幅においても、糖転移ヘスペリジン投与時の方が有意に高くなった。すなわち、糖転移ヘスペリジンは、血管幅を拡張し、血流量を増大させることで、手先の表面温度を上昇させ、冷え性を改善すると推定された¹⁹⁾。さらに、糖転移ヘスペリジンを摂取させて測定した心拍変動性の解析から、血管の拡張には自律神経 (副交感神経が交感神経に比べ優位になる) が関与していることが示唆されている^{20, 21)}。

⑤リウマチ症状改善作用

日本では、リウマチ患者は約 70 万人と報告されているが、多関節症状を訴える人々 (いわゆる予備軍) を含めるとその数は、200-300 万人にもものぼると試算されている。リウマチは、自己免疫疾患と考えられているが、その原因は不明であるため、現在のところ、根本

的な治療法は確立されていない。

II型コラーゲンで感作すると、ヒトのリウマチ症状に類似したモデルマウスを作ることができる。このモデルマウスは、古くから用いられているが、糖転移ヘスペリジンを経口摂取させると、その症状が緩和されることが明らかとなった（手足の腫れの改善、炎症性サイトカインの産生抑制（TNF- α ；リウマチなど炎症の際に上昇する。最近のリウマチ治療薬には、TNF- α の抗体があり、TNF- α の働きを抑制することで症状を著しく改善できる）など）。そこで、リウマチ患者からボランティアを募り（n=20）、二重盲検法を用い、糖転移ヘスペリジン3gを3ヶ月間経口摂取させた（プラセボとして、デキストリンを3g摂取させた）。その後、1ヶ月ごとに担当医が診断を行い、アメリカリウマチ学会の判定基準（ACR20）²²⁾により治療効果を判定した。その結果、患者自身の評価、医師の診断共に糖転移ヘスペリジン投与群で症状改善効果が見られ（図5）、ACR20の判定では糖転移ヘスペリジン投与群の1/3で有効であった¹²⁾ので、今後の拡大試験の結果が期待できる。

（3）今後の展望

以上の結果をまとめると、図6のようになる。ヘスペリジン自身には、既にビタミンP作用（血管の透過性を抑制する）、発がん抑制作用などが確認されているが、これに糖転移酵素を作用させ、糖転移ヘスペリジン配糖体に変換すると、生体吸収性が向上し、これまで知られていた生理活性に加え、味質改善作用、血流改善作用、リウマチ症状改善作用などの新しい生理活性が見出されるようになった。

糖転移反応やサイクロデキストリン合成酵素などは、古くから知られており、これらを利用して生理活性（抗齶蝕作用、ビフィダス増殖作用など）を持つオリゴ糖が製造され、実用化されている。本稿で述べたようなアルカリ域での糖転移反応のように少し新しい発想を加えることで、これまで充分には利用されていなかったヘスペリジンにも新しい生理活性や用途が見出され、さらなる利用の道が開けてきたと考えられる。

<参考文献>

- 1) Rusznyák St and Szent-Györgyi A. *Nature*, **138**, 27(1936)
- 2) Gang A *et al.* *Phytother. Res.*, **15**, 655-669(2001)
- 3) 米谷俊、西村隆久、日本食品科学工学会誌、**52**, 95-101(2005)
- 4) Kometani T *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 517-520(1994)
- 5) Kometani T *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1990-1994(1994)
- 6) Kometani T *et al.*, *J. Jpn. Soc. Food Technol.*, **42**, 376-382 (1995)
- 7) 西村隆久ら、日本食品科学工学会誌、**45**, 186-191 (1998)
- 8) 西村隆久ら、日本食品科学工学会誌、**46**, 389-394 (1999)
- 9) 米谷俊ら、月刊フードケミカル (3月号)、58~65 (2000)
- 10) Kometani T *et al.*, *Food Sci. Tech. Res.*, **5**, 265-270(1999)
- 11) Mariusz KP and Terao J. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4313-4317(1998)
- 12) Kometani T *et al.*, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **30**, 117-134(2008)
- 13) Tanaka T *et al.* in: *Carcinogenesis and Modification of Carcinogenesis*. Ed. by Tanaka T and Tsuda H, p.213-227, Research Signpost (2005)
- 14) Ohtsuki K *et al.* *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 420-422(2002)
- 15) Miwa Y *et al.* *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 211-218(2004)
- 16) Bok SH *et al.* *J. Nutr.*, **129**, 1182-1185(1999)
- 17) Mundy G *et al.* *Science*, **286**, 1946-1949(1999)
- 18) Chiba H *et al.* *J. Nutr.*, **133**, 1892-1897(2003)
- 19) 吉谷佳代ら、日本栄養・食糧学会誌、**61**, 233-239(2008)
- 20) 古川育代ら、日本食品科学工学会第55回大会講演要旨集、p.143
- 21) Shen J *et al.* *Neuroscience Letters*, **461**, 30-35(2009)
- 22) Felson DT *et al.* *Arthr. Rheum.*, **36**, 729-740(1993)

Legend to Figures

図1 好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. A2-5a 株の産生するサイクロデキストリン合成酵素の pH-活性曲線

糖転移ヘスペリジンの生成には、糖転移反応 (transglycosylation) を利用。

図2 α -グリコシルヘスペリジンの構造

α -グリコシルヘスペリジン；モノグルコサイド

α -グリコシルヘスペリジン；モノグルコサイドとオリゴグルコサイドの混合物

図3 α -グリコシルヘスペリジンの味質改善効果

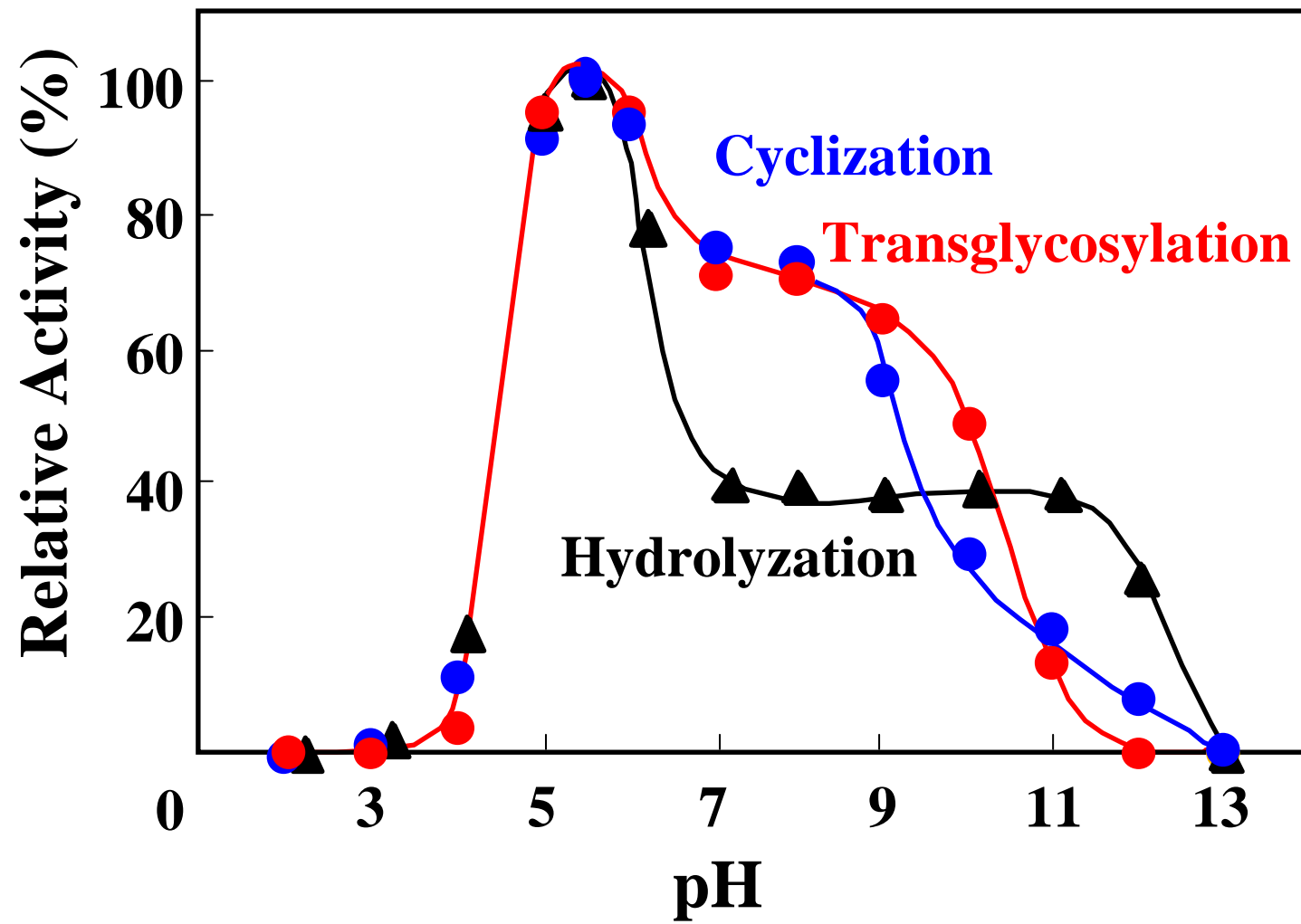
α -グリコシルヘスペリジンを添加した野菜ジュースと無添加の野菜ジュースを各年代の被験者にブラインドで提示し、その嗜好性を調査した (Hsp-G； α -グリコシルヘスペリジン)。

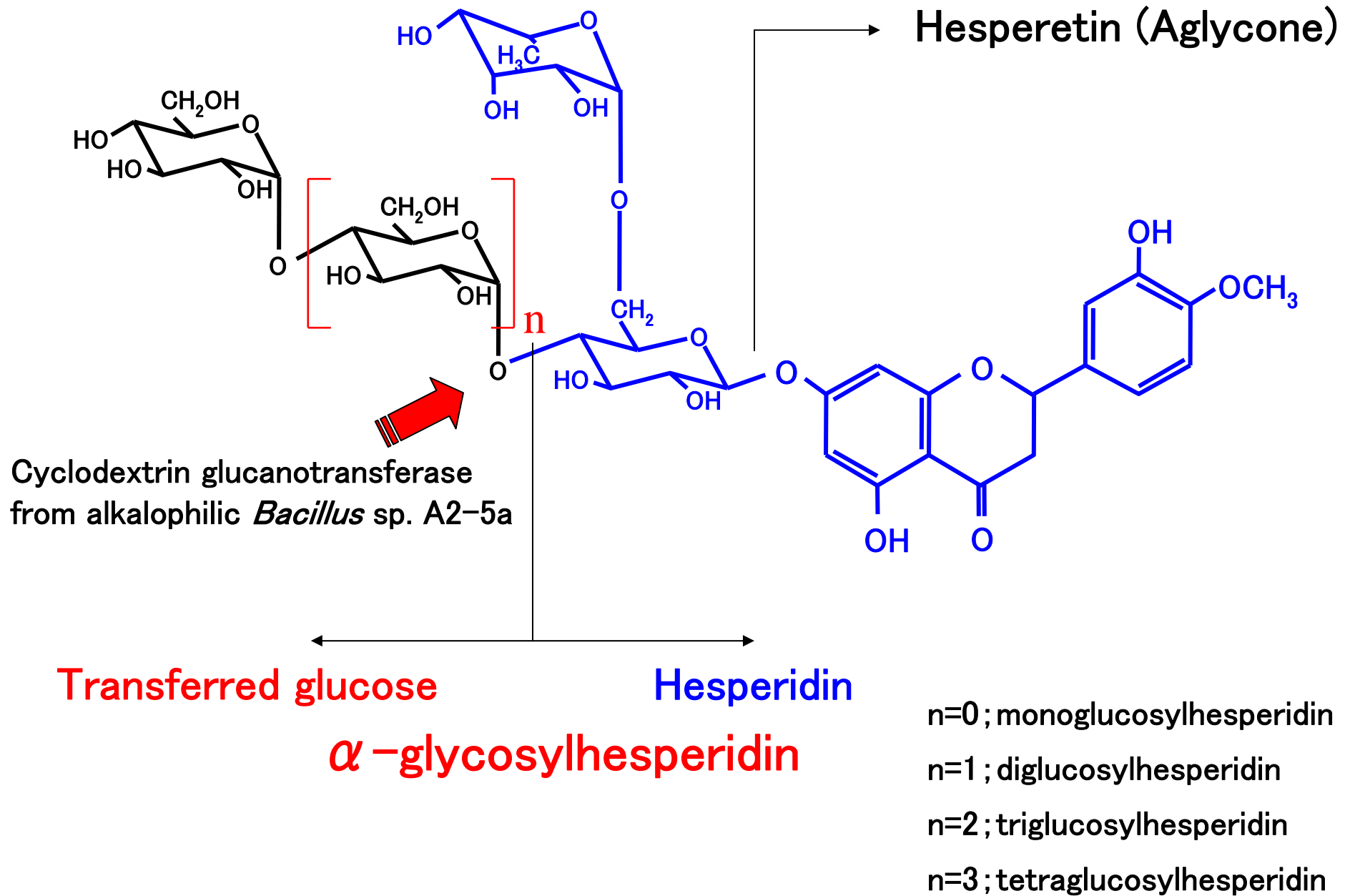
図4 α -グリコシルヘスペリジンの血流改善効果

図5 α -グリコシルヘスペリジンのリウマチ症状改善効果

α -グリコシルヘスペリジン投与群とプラセボ群で、リウマチ症状改善効果を患者自身、医師がそれぞれ Visual Analog Scale (VAS) 法で比較した。

図6 まとめ；ヘスペリジンおよび α -グリコシルヘスペリジンの機能性





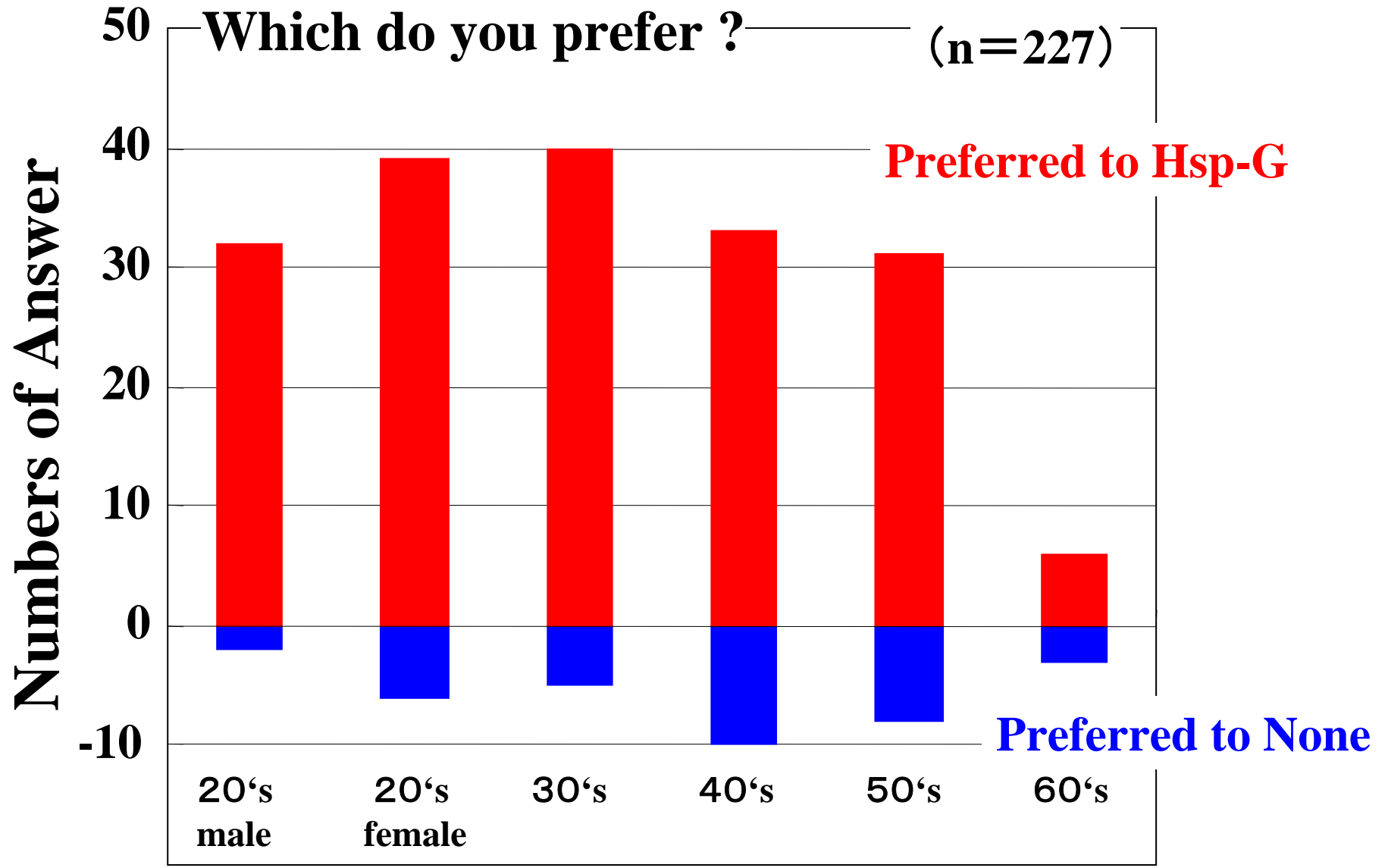
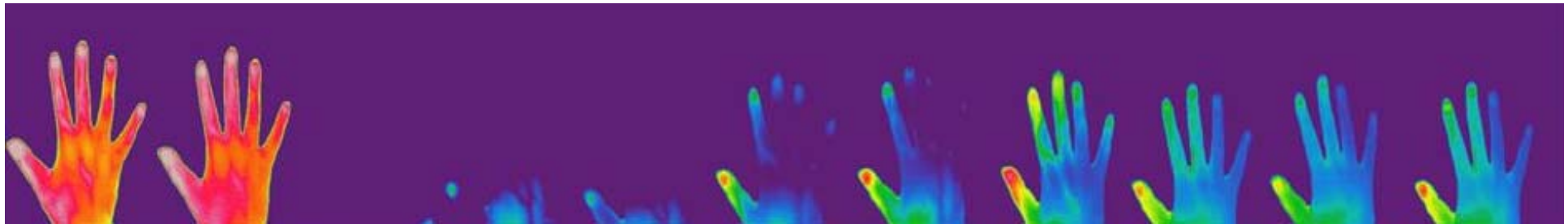


図4

Placebo



α -glucosylhesperidin (Hsp-G)



before

↑
cold loading

10

Time after cold loading (min)

20

30

40

Doctor's assessment

Patient's assessment

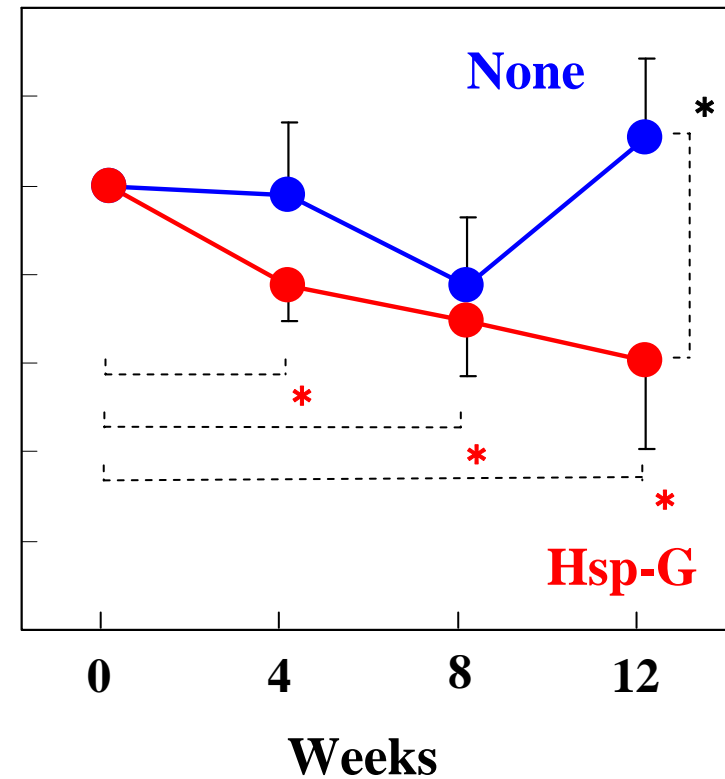
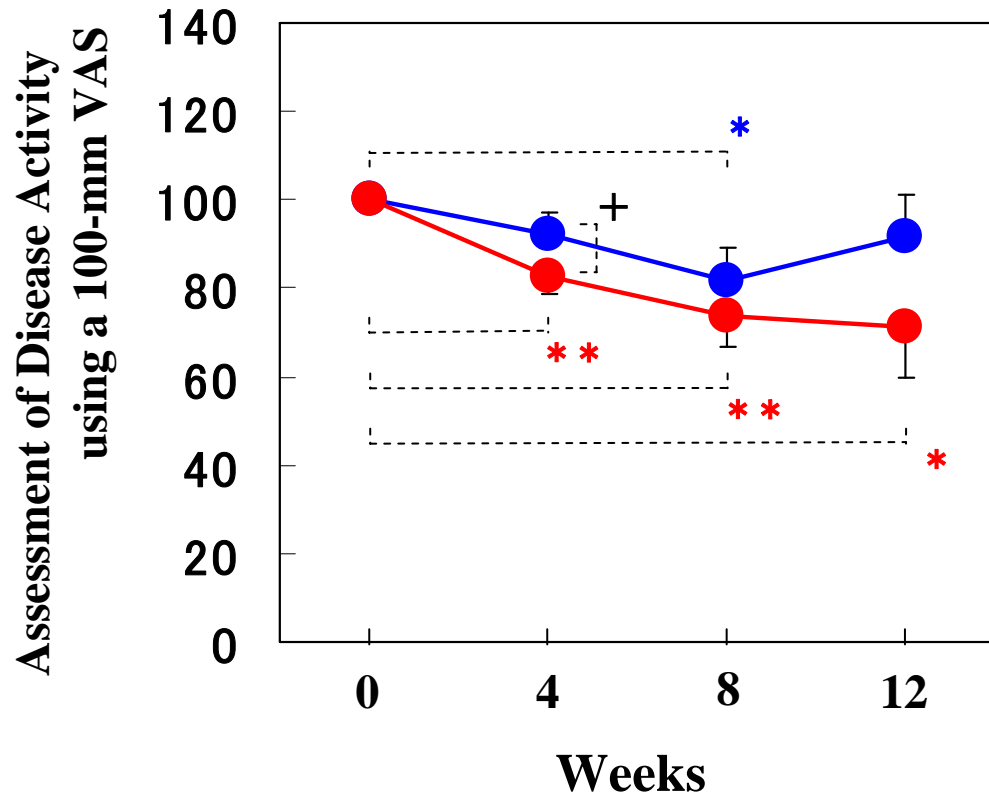


図6

