



Studies on application of Phosphoryl Oligosaccharides as functional food material

戸尾, 健二

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2004-09-17

(Date of Publication)

2010-08-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2777

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002777>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 3 1 6 】

氏 名・（本 籍） 戸尾 健二 （北海道）

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

学 位 記 番 号 博ろ第67号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の 日 付 平成16年9月17日

【 学位論文題目 】

Studies on Application of Phosphoryl
Oligosaccharides as Functional Food Material
(リン酸化オリゴ糖の機能性食品素材として
の応用に関する研究)

審 査 委 員

主 査 教 授 安田 武司

教 授 南森 隆司

教 授 杉本 幸裕

(戸尾健二、No.1)

バレイショ澱粉中のアミロペクチンには、他の澱粉と比較して多くのリン酸基が結合していることが知られている。リン酸化オリゴ糖 (POs) はバレイショ澱粉をアミラーゼ処理することによって得られる新規なオリゴ糖である。バレイショ澱粉の糖化工程で生じる廃液を調査した結果、POs が多く含まれていることが明らかになり、工業レベルで得られることが分かった。POs は、結合リン酸基を1個有する重合度3~5のオリゴ糖と、結合リン酸基を2個有する重合度4~8のオリゴ糖から構成されている混合物である。リン酸基はグルコース残基のC-3位またはC-6位に結合し、その比率は約3:7である。リン酸基には様々なミネラルをイオン結合させることができるため、ミネラル供給素材として食品への利用が期待されるものである。

人体のカルシウムは体重の1.5~2% (約1kg) を占め、そのうち99%が骨や歯の構成に利用されており、残りの1%が各種酵素の活性発現、筋収縮および情報伝達など生命活動にとって重要な役割を果たしている。しかし最新 (平成14年度) の国民栄養調査によると、実際の1日のカルシウム摂取量は平均546mgであり、依然として所要量の600~700mgを下回る状況が続いている。カルシウムの摂取不足は骨粗鬆症や高血圧などの重大な疾病を引き起こすことが知られており、社会的問題となっている。摂取したカルシウムが吸収されるためには腸管内で溶解していることが必要である。しかし腸管内のような中性から微アルカリ性のpHではカルシウムは無機リンと結合して不溶性の塩を形成しやすくなるため、摂取したカルシウムの吸収率は一般に10~50%程度と考えられている。そのためカルシウムの吸収性を促進する物質の開発や吸収性にすぐれたカルシウム製剤の開発が現在も続けられており、カゼインホスホペプチド (CPP) やクエン酸-リンゴ酸-カルシウム (CCM) などが食品に利用されている。

一方、う蝕 (むし歯) に関する予防歯科学の発展に伴い、歯の表面のエナメル質に穴が開く前のう蝕 (初期う蝕) は回復しうることが明らかになってきた。エナメル質はリン酸とカルシウムを構成成分とするハイドロキシアパタイトでできており、その表面では「脱灰」と「再石灰化」が毎日の食事や間食のたびに繰り返されている。脱灰とはエナメル質のハイドロキシアパタイトが酸によって唾液中に溶出する現象であり、再石灰化とは脱灰部位に唾液中のカルシウムとリン酸が供給されハイドロキシアパタイトが再形成される現象のことである。

他方、酸性ホスファターゼ (EC 3.1.3.2) は動物、植物および微生物に広く分布しており、種々のリン酸モノエステルを加水分解する。POsのリン酸基の結合位置と機能の関係を調べるために、結合位置の異なるリン酸基に対して特異性の高いホスファターゼの研究は有用であると考えられる。

このような背景の中、本研究では、まずPOsの結合リン酸基に高い基質特異

(戸尾健二、No.2)

性を有する *Aspergillus niger* 由来酸性ホスファターゼを自然界から分離し、本酵素がC-3位リン酸結合型POsを大量調製する際に有用であることを示した。次に、高水溶性カルシウム素材の開発の観点から、リン酸基にカルシウムを結合させたリン酸化オリゴ糖カルシウム (phosphoryl oligosaccharides of calcium; POs-Ca[®]) を作成し、POs-Caの生体利用性についてラットを用いた動物実験により検討した。さらに、POs-Caの食品への応用として、POs-Caを配合したチューインガムの初期う蝕に対する再石灰化効果を検討した。

第1章では、まず、自然界から分離した *Aspergillus niger* 由来の新規な菌体内酸性ホスファターゼを精製して諸性質を明らかにした。本酵素はPOsの結合リン酸基のうち6位リン酸基に特異的に作用し、3位リン酸基に対してはほとんど作用を示さなかった。本酵素の分子量はSDS-PAGEで66kDa、ゲル濾過法で260kDaで4量体と考えられた。反応の至適pHは2.0、至適温度は60℃であった。続いてこの作用特異性の違いについて反応速度論的に解析を行った。POsから重合度が等しく、リン酸基の結合位置のみ3位または6位と異なる2つの基質 (3'-phosphoryl maltotriose および 6'-phosphoryl maltotriose) を精製した。これらを用いて検討した結果、両基質に対する本酵素の K_m 値は約14mMで同等であったが、6'-phosphoryl maltotriose に対する k_{cat} 値は3'-phosphoryl maltotriose の約3倍であった。このことから、本酵素はC-3位リン酸結合型POsの大量調製およびその性質の解明に有用であることが示唆された。

第2章では、POs-Caについて、カルシウム源としての溶解性、人工胃液による消化性、ラットにおける *in vivo* での消化性および生体利用性について明らかにした。POs-Caの溶解性は水溶性カルシウムの塩化カルシウムと同程度に高かった。POs-Caは人工胃液では全く水解されなかった。ラットにPOs-Caを経口投与した場合の血糖値は、対照糖質 (グルコースおよびマルトオリゴ糖) と比較して、投与15分後において有意に低値であったが全体的には対照群と同様な応答を示した。POs-Ca群の血中カルシウム値は投与後15-30分にかけて有意に上昇し、POs-Ca由来カルシウムの吸収が考えられた。以上の結果より、経口摂取したPOs-Caは小腸における消化吸収性がマルトオリゴ糖と同様に高いオリゴ糖であることが示唆された。次に、ラット空腸結紮ループ法および出納試験によりPOs-Ca由来カルシウムの吸収率を検討した。空腸ループ法によるPOs-Caのカルシウム吸収性は水溶性カルシウム (塩化カルシウムと乳酸カルシウム) と同程度であったが、不溶性カルシウム (リン酸水素カルシウムと炭酸カルシウム) に対しては有意に高かった。さらにPOs-Caと乳清カルシウム由来のカルシウム比率を1:1に混合した試料溶液のカルシウム吸収率は、乳清カルシウム単独より有意に高かった。これらの結果から、POs-Caは腸管吸収性の高い優れた水溶性カルシウム源であることが示された。続いて、POs-Caを10%含む精製飼

(戸尾健二、No.3)

料を用いて出納試験を実施した。15 日間の飼育期間中、POs-Ca 食群のラットは順調な生育を示し、体重増加量や飼料摂取量は対照食群と同等で、POs-Ca 食群のラットにおいて下痢の発生は全く観察されなかった。カルシウム吸収率に 2 群間での差は見られなかったが、POs-Ca 食群で血中トリグリセリド値の有意な低下が観察された。

第 3 章では、POs-Ca を配合したチューインガムの再石灰化促進効果を *in vitro* の唾液浸漬試験により明らかにした。これまで、チューインガムによる再石灰化試験は脱灰歯片を埋入した装置を被験者の口腔内に装着し、1~2 週間ガムを咀嚼する方法が開発されている。この方法は口腔内環境を忠実に反映しているが被験者の負担が大きく、歯科医師による管理が必要になる。う蝕予防は特に子供に重要であり、口腔内環境を反映しつつ子供にも負担の軽い試験系の開発が望まれていた。そこでガム咀嚼時の唾液をすべて回収し、その中に初期う蝕と同じ状態で脱灰させた歯片を浸漬する試験系 (Human Saliva Immersing(HSI)試験法)を開発し、子供を対象とした試験を実施した。各被験者 (男児 9 名、女児 13 名; 平均 10 歳) から、POs-Ca を 2.5% 配合したシュガーレスガム (POs-Ca(+)) ガム) および POs-Ca を含まないシュガーレスガム (POs-Ca(-)) ガム) をそれぞれ 1 日に 1 粒ずつ 10 分間咀嚼した時の唾液を全て回収した。回収唾液に脱灰した牛歯エナメル質歯片を 37℃で 40 分間浸漬した。ガムの咀嚼と浸漬処理は 1 種類につき 4 日間連続で実施した。処理後の歯片のマイクロラジオグラフィーからミネラル濃度分布を評価した。その結果、POs-Ca(+)ガム群の脱灰深度は男児・女児どちらも POs-Ca(-)ガム群に対して有意に減少し、脱灰部位におけるエナメル質の回復が確認された。以上の結果により、POs-Ca(+)ガムを毎日利用することは子供においても初期う蝕の再石灰を強く促進し、う蝕予防に有効であることが実証された。すでに POs-Ca(+)ガムは厚生労働省から特定保健用食品の表示許可を取得し、全国で発売されている。

現在、日本では 1 年間に澱粉原料用に約 110 万トンのバレイショが生産され、約 23 万トンのバレイショ澱粉が製造されている。バレイショ澱粉はぶどう糖や果糖ぶどう糖液糖などの糖化製品あるいは水産練り製品の製造に広く利用されている。この糖化工程で生じる廃液から従来廃棄されていた POs を回収し、その機能性を明らかにするとともに実際の食品への応用に結びつけたことは、バイオマスの資源化および環境負荷の軽減に加え、人々の QOL の向上にも役立つものであると考えられる。

(別紙 1)

論文審査の結果の要旨

氏名	戸尾 健二		
論文 題目	Studies on Application of Phosphoryl Oligosaccharides as Functional Food Material (リン酸化オリゴ糖の機能性食品素材としての応用に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	安 田 武 司
	副 査	教 授	南 森 隆 司
	副 査	教 授	杉 本 幸 裕
	副 査		
	副 査		
要 旨			
バレイショ澱粉中のアミロペクチンには、他の澱粉と比較して多くのリン酸基が結合している。リン酸化オリゴ糖 (POs) はバレイショ澱粉をアミラーゼ処理して得られる新規なオリゴ糖である。バレイショ澱粉の糖化工程で生じる廃液には、POs が多く含まれていることが明らかになり、工業レベルで得られることが分かった。POs は、結合リン酸基を 1 個有する重合度 3~5 のオリゴ糖と、結合リン酸基を 2 個有する重合度 4~8 のオリゴ糖から構成されている混合物である。リン酸基はグルコース残基の C-3 位または C-6 位に結合している。リン酸基には様々なミネラルをイオン結合させることができるため、ミネラル供給素材として食品への利用が期待される。カルシウムは人間の生命活動にとって重要な役割を持つが、最新の国民栄養調査によると、摂取量は所要量を下回っている。摂取したカルシウムの吸収率は低く、吸収性を促進する物質の開発や吸収性にすぐれた製剤の開発が現在も続けられている。一方、う蝕 (むし歯) に関する予防歯科学の発展に伴い、歯の表面のエナメル質に穴が開く前のう蝕 (初期う蝕) は回復しうることが明らかになってきた。エナメル質はリン酸とカルシウムを構成成分とするハイドロキシアパタイトでできており、その表面では「脱灰」と「再石灰化」が毎日の食事や間食のたびに繰り返されている。このような背景の中、本研究では、まず複合体である POs の結合リン酸基に高い基質特異性を有する <i>Aspergillus niger</i> 由来酸性ホスファターゼによる、C-3 位リン酸結合型 POs を大量調製への利用について、また、高水溶性カルシウム素材の開発の観点から、リン酸基にカルシウムを結合させたリン酸化オリゴ糖カルシウム (phosphoryl oligosaccharides of calcium; POs-Ca[®]) を作成し、POs-Ca の生体利用性についてラットを用いた動物実験により検討した。さらに、POs-Ca の食品への応用として、POs-Ca を配合したチューインガムの初期う蝕に対する再石灰化効果を検討している。 第 1 章では、POs は、リン酸基をグルコース残基の C-3 位または C-6 位に結合しているものの複合体でありその分離法を検討している。<i>Aspergillus niger</i> 由来の新規な菌体内酸性ホスファターゼを精製して諸性質を調べたところ本酵素は POs の結合リン酸基のうち 6 位リン酸基に特異的に作用し、3 位リン酸基に対してはほとんど作用を示さなかった。本酵素の分子量は SDS-PAGE で 66kDa、ゲル濾過法で 260kDa で 4 量体と考えられた。反応の至適 pH は 2.0、至適温度は 60℃であった。続いてこの作用特異性の違いについて反応速度論的に解析を行った。POs から重合度が等しく、リン酸基の結合位置のみ 3 位または 6 位と異なる 2 つの基質 (3rd-phosphoryl maltotriose および 6th-phosphoryl maltotriose) を精製し検討した結果、両基質に対する本酵素の K_m 値は約 14mM で同等であったが、6th-phosphoryl maltotriose に対する k_{cat} 値は 3rd-phosphoryl maltotriose の約 3 倍であった。このことから、本酵素は C-3 位リン酸結合型 POs の大量調製に有用であることが示された。			

氏名	戸尾 健二
第 2 章では、POs-Ca について、カルシウム源としての溶解性、人工胃液による消化性、ラットにおける <i>in vivo</i> での消化性および生体利用性について調べている。POs-Ca の溶解性は水溶性カルシウムの塩化カルシウムと同程度に高かった。POs-Ca は人工胃液では全く水解されなかった。ラットに POs-Ca を経口投与した場合の血糖値は、対照糖質（グルコースおよびマルトオリゴ糖）と比較して、投与 15 分後において有意に低値であったが全体的には対照群と同様な応答を示した。POs-Ca 群の血中カルシウム値は投与後 15-30 分にかけて有意に上昇し、POs-Ca 由来カルシウムの吸収が考えられた。以上から、経口摂取した POs-Ca は小腸における消化吸収性がマルトオリゴ糖と同様に高いことが示唆された。次に、ラット空腸結紮ループ法および出納試験により POs-Ca 由来カルシウムの吸収率を検討した。POs-Ca のカルシウム吸収性は水溶性カルシウム（塩化カルシウムと乳酸カルシウム）と同程度であったが、不溶性カルシウム（リン酸水素カルシウムと炭酸カルシウム）に対しては有意に高かった。さらに POs-Ca と乳清カルシウム由来のカルシウム比率を 1:1 に混合した試料溶液のカルシウム吸収率は、乳清カルシウム単独より有意に高かった。これらの結果から、POs-Ca は腸管吸収性の高い優れた水溶性カルシウム源であることが示された。続いて、POs-Ca を 10%含む精製飼料を用いて出納試験を実施した。15 日間の飼育期間中、POs-Ca 食群のラットは順調な生育を示し、体重増加量や飼料摂取量は対照食群と同等で、POs-Ca 食群のラットにおいて下痢の発生は全く観察されなかった。カルシウム吸収率に 2 群間での差は見られなかったが、POs-Ca 食群で血中トリグリセリド値の有意な低下が観察された。 第 3 章では、POs-Ca を配合したチューインガムの再石灰化促進効果を <i>in vitro</i> の唾液浸漬試験により明らかにしている。う蝕予防は特に子供に重要であり、口腔内環境を反映しつつ子供にも負担の軽い試験系として、ガム咀嚼時の唾液をすべて回収し、その中に初期う蝕と同じ状態に脱灰させた歯片を浸漬する試験系（Human Saliva Immersing (HSI) 試験法）を開発し、子供を対象とした試験を実施した。各被験者（男児 9 名、女児 13 名；平均 10 歳）から、POs-Ca を 2.5%配合したシュガーレスガム（POs-Ca(+)ガム）および POs-Ca を含まないシュガーレスガム（POs-Ca(-)ガム）をそれぞれ 1 日に 1 粒ずつ 10 分間咀嚼した時の唾液を全て回収した。回収唾液に脱灰した牛歯エナメル質歯片を 37℃で 40 分間浸漬した。ガムの咀嚼と浸漬処理は 1 種類につき 4 日間連続で実施した。処理後の歯片のマイクロラジオグラフィーからミネラル濃度分布を評価した。その結果、POs-Ca(+)ガム群の脱灰深度は男児・女児どちらも POs-Ca(-)ガム群に対して有意に減少し、脱灰部位におけるエナメル質の回復が確認された。以上の結果により、POs-Ca(+)ガムを毎日利用することは子供においても初期う蝕の再石灰を強く促進し、う蝕予防に有効であることが実証された。すでに POs-Ca(+)ガムは厚生労働省から特定保健用食品の表示許可を取得し、全国で発売されている。 本研究は、バレイシヨ澱粉製造過程の廃液から回収される複合体であるリン酸化オリゴ糖の分離精製に有効な酵素を見いだした。また、リン酸化オリゴ糖カルシウムの栄養源としての機能性の解析と配合したチューインガムの初期う蝕に対する再石灰化効果を研究し、リン酸化オリゴ糖の機能性食品素材としての開発研究を行い、植物バイオマスの資源化と食品機能開発研究の発展に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者戸尾健二は博士（農学）の学位を得る資格があると認める。	
・特記事項	厚生労働省 特定保健用食品
・特許登録数	6 件
・発表論文数	13 編