

平成30年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「次世代型植物エストロゲン【グリセオリン】の大規模工業化」

研究開発成果等報告書

令和元年5月

担当局 九州経済産業局

補助事業者 公益財団法人くまもと産業支援財団

目 次

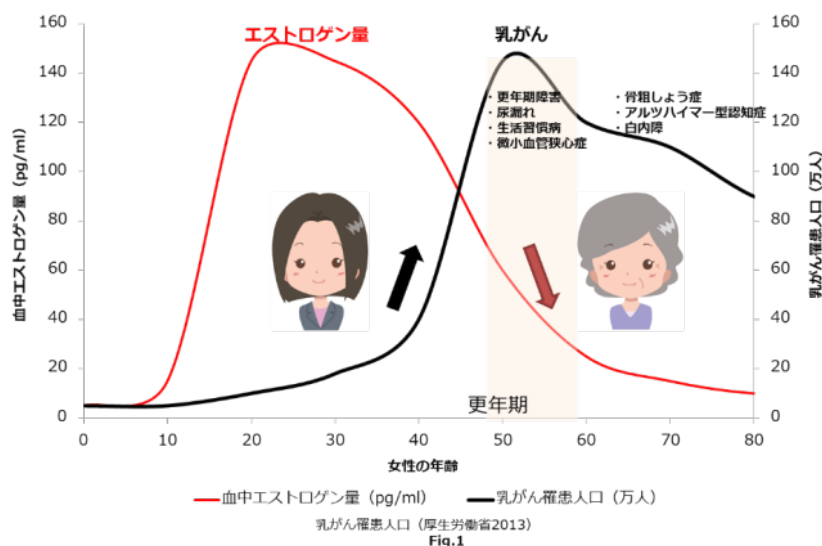
第 1 章	研究開発の概要	
1 - 1	研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1 - 2	研究体制	5
1 - 3	成果概要	5
1 - 4	当該研究開発の連絡窓口	6
第 2 章	本論	
【1】	グリセオリンを含む機能性素材の開発	7
【2】	大豆品種・温度条件・水分条件・エリシターとなる 微生物条件などのパラメーターの最適化	7
	●有効成分を高濃度に含有する抽出方法の検討及び栽培日数の短縮	
	●スケールアップ	
【3】	収量アップさせる生産技術の確立	9
【4】	機能性評価	
【4-1】	腸管吸収性	10
【4-2】	細胞アッセイ	12
	●再発乳がん抑制効果	12
	●褐色脂肪細胞の活性化効果	13
【5】	市場調査・販路開拓	14
最終章	全体総括	15

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

【研究開発の背景】

女性の健康維持に極めて重要な役割を担っている女性ホルモン（エストロゲン）は、30代に入ると分泌の低下が始まり、50代では、20代の1/2にまで減少する。このため、近年、女性の高齢化に伴い女性ホルモンの低下に起因する乳がんや骨粗しょう症等の深刻な疾患が急



増しているなか、女性ホルモンと類似の機能性を持つ大豆イソフラボンの研究が世界的に注目されている。大塚製薬のエクオールに代表されるような「大豆イソフラボン」は、天然素材として大きな注目を浴びており、化粧品、食品及び健康補助食品の原材料として多くの製品に利用され、その市場規模は、国内 300 億円、海外 1,000 億円と推測されている。今回の研究で得られる「グリセオリン類」は、「大豆イソフラボン」よりも機能性が高く、しかも大量に生産できる体制が未だ世の中に存在せず、その市場規模はさらに拡大するものと予測できる。

【研究目的・目標】

「落合式ハイプレッシャー法」とは下記の2つの特許技術を合わせて有用物質を得る方法をいう。

【特許第 5722518 号】 	植物が最も代謝活性を高める発芽直後に、発芽の必須条件である「酸素」「二酸化炭素」「温度」「水分」の調整を行い、環境ストレスを与えて免疫応答能力を最大限に高め、自社開発の発芽装置（写真）で発芽を促進する。
↓	

【特許第 5795676】



上記の方法で発芽を促した「生きている大豆」の免疫応答機能を誘導しておいて、「麹菌による感作」を促すと、大豆中にイソフラボンのダイゼインを母骨格とするプレニル基、メトキシ基、メチル基などのユニークな官能基を備えた「グリセオリン類」が大量にかつ多様に誘導される。大豆のみならず植物種子のフィトケミカルを基にさらに活性の高いユニークな化合物へと多様化させる新技術である。

我々果実堂は、「大豆イソフラボン」を超える素材の開発を目指し、自社技術である「**落合式ハイプレッシャー法**」を用い、発芽過程の大豆種子から、優れたエストロゲン活性を有する「**グリセオリン類**」を誘導することに、世界に先駆けて成功した（「落合式ハイプレッシャー法」：特許第 5722518 号/特許第 5795676 号）。またグリセオリンにおいては、エクオールや従来のイソフラボン類では、獲得する事ができなかった優れた特性と生理活性を有していることが判明した。

本事業においては、「落合式ハイプレッシャー法」によるグリセオリン類製造の大型プラント化を目指し、そのための①生産条件の最適化を行い、②グリセオリン類を高濃度で産生する品種の選定、③短期間で産生させるための培養条件の決定を行い、④これらを組み合わせ大規模生産に向けた最適生産法を開発し、⑤消費者が効果を実感できるグリセオリン類の大規模生産・事業化を目指す。

1 - 2 研究体制

(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

【事業管理機関：補助事業者】

公益財団法人　くまもと産業支援財団		総括研究代表者（PL） 株式会社果実堂　取締役　河野　淳子
【研究実施機関・間接補助事業者】		副総括研究代表者（SL） 国立大学法人　九州大学 大学院農学研究院生命機能科学部門食品分析学 教授　松井　利郎
株式会社果実堂 代表取締役　井出　剛	【アドバイザー】	東海大学　農学部　食品生体調節学研究室 教授　永井　竜児
大豆エナジー株式会社 代表取締役　井出　剛		三井物産株式会社 流通事業部 シニア農業コーディネーター　山本　隆彦
国立大学法人　九州大学 大学院農学研究院　生命機能科学部門　食品分析学 教授　松井　利郎		カゴメ株式会社 執行役員 野菜事業本部 農生産部長　藤井　啓吾
国立研究開発法人　理化学研究所 環境資源科学研究センター　代謝システム研究チーム 研究員　澤田　有司		公益財団法人　がん研究会 がん研究所　がん生物部 部長　斉藤　典子
国立大学法人　熊本大学 発生医学研究所　細胞医学分野 教授　中尾　光善		
国立大学法人　京都大学 大学院農学研究科　食品生物科学専攻　食品分子機能学分野 教授　河田　照雄 准教授　後藤　剛		

1 - 3 成果概要

我々は本事業において自社の特許技術である【落合式ハイプレッシャー法】（特許第 5722518 号／特許第 5795676 号）を用い、『プロモーターボックス』によるスモール試験、及び『100kg 装置』を用いたパイロット試験において、発芽過程の大豆種子から、優れたエストロゲン活性を有する『グリセオリン類』を単離精製することに成功し、更にはグリセオリンの大規模工業化に向けた最適生産方法を開発することに成功した。グリセオリンは、その存在は確認されていたが、天然では極微量でしか存在せず、その合成過程も複雑多岐にわたるため生産工程が難しく、研究用試薬としても、香粧品の原材料としても市販されることはなかったため、事業

完了後には、大規模生産・事業化を実現し、グリセオリンのバルク原料を用いた香粧品の開発、がんを始めとする各種疾患におけるグリセオリンの機能性評価に貢献する研究用試薬の販売を確立していく。

一方、本事業における機能性評価においては、グリセオリン I の再発性乳がんにおける細胞レベルでの増殖抑制効果が認められ、2018 年 10 月に、国立がん研究会がん研究所の齊藤部長の論文「Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA」が Nature の姉妹紙『Scientific Reports』に掲載され、グリセオリン I についてあらたな機能的知見が立証された。今後は、グリセオリン I をはじめとする天然由来の二次代謝化合物を大量に創出し、創薬分野におけるリード化合物ライブラリーとして事業化に繋げていく予定である。

1 - 4 当該研究開発の連絡窓口

企業・団体名	大豆エナジー株式会社
所在地	熊本県熊本市中央区南熊本3-4-13 くまもと大学連携インキュベータ206号室
氏名（ふりがな）	落合 孝次（おちあい こうじ）
所属	
役職	取締役 技術開発部長
電話番号	096-363-8800
FAX番号	096-363-8877
E-mail	ochiai@kajitsudo.co.jp

第2章 本論

【1】グリセオリンを含む機能性素材の開発

本研究においては、特許第 5722518 号及び特許第 5795676 号「落合式ハイプレッシャー法」による発芽感作大豆よりグリセオリンを含む機能性素材の開発を進めてきた。

第一には、研究用試薬の開発としてグリセオリン I～V、及び 8-Prenyl Daidzein、8-Prenyl Genistein 及び 4-Prenyl Coumesterol の 8 種を単離精製することができた。

第二に、サプリメント原料及び香粧品原料を想定したグリセオリン類の製品規格として、グリセオリン類を約 10%含有したバルク原料のパイロットサンプルを確立することができた。

本機能性素材の開発では、理化学研究所のメタボローム解析との共同作業により、麹菌を発芽処理 2 日目にエリシターとして摂取することで、効率的にグリセオリン類が増加することを判明し、発芽感作条件の最適化を図り、高純度グリセオリン且つ大量含有素材の作製に世界で初めて成功する事ができた。

【2】大豆品種・温度条件・水分条件・エリシターとなる微生物条件などのパラメーターの最適化



プロモーターボックス



プロモーターボックス（内部）

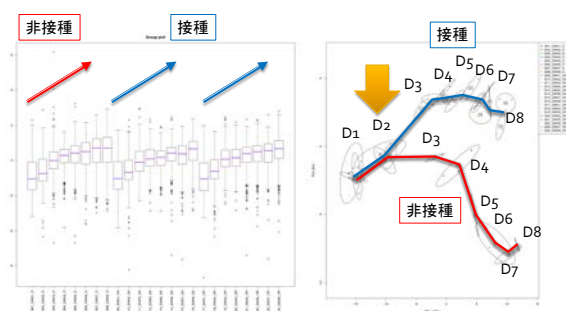
発芽感作大豆より、多様化した二次代謝化合物を一つでも多く見つけ出す為には、より多くの条件検討が必要である。我々は短期間で有効成分を高濃度に含有する栽培条件を確立するため、多様化に関わる条件検討可能なスモールスケールの自動栽培装置『プロモーターボックス』を開発

し、制作した。この結果、最大年間 5,760 検体の条件検討が可能となり、理化学研究所で実施するハイスループット分析に対し、多くの化合物を発見できるようになった。

以下の研究成果は『プロモーターボックス』内で栽培した発芽感作大豆での実績である。

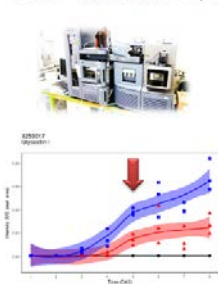
●有効成分を高濃度に含有する抽出方法の検討及び栽培日数の短縮

我々は、『プロモーターボックス』を用いて、種々の試験により発芽感作大豆を作製し、理化学研究所により最新質量分析（LC-QTOF）を用いたメタボローム分析を実施し、各栽培条件で獲得された発芽大豆中の二次代謝化合物の含有量及び多様化した化合物の動向について解析を行った。その結果、発芽前には 12 種類程しか含まれないイソフラボンが 100 を超えるイソフラボン類縁体に多様化する事がわかり、更には本メタボローム解析で存在が明らかとなった二次代謝化合物は 717 にのぼり、うち 486 化合物の分子情報については物質同定まで完了する事ができた。これらの事より、『落合式ハイプレッシャー法』による大豆の発芽感作を実施することにより、二次代謝化合物は想像以上にドラスティックに多様化することが明らかとなった。グリセオリン類の高濃度含抽出方法と栽培日数については、その挙動から麹菌の感作 24 時間で発現が起こり、その後増加し、グリセオリン I 及びその合成経路に関与する多くの有用成分が同調して 5 日前後で効率よく獲得できることが判明したため、グリセオリンを高濃度に抽出する栽培日数を 5 日と確定した。

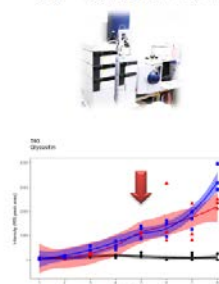


主成分解析法によるイソフラボン骨格の多様化の確認

ワイドターゲット解析 LC-QqQ-MS



非ターゲット解析 LC-QTOF-MS



ワイルドターゲット解析及び非ターゲット解析

●スケールアップ

『プロモーターボックス』でのスモール栽培により得られた発芽感作大豆の栽培条件により、スケールアップのためのパイロット栽培ができる栽培チャンバーを設置し、10～100kg の大豆を用いた発芽感作大豆の試験を実現し、グリセオリンの大量生産に向けた更なる条件検討を実施した。



パイロット試験用 100kg 装置

【3】収量アップさせる生産技術の確立

100kg 装置を用いて、実際にグリセオリン発現量を 5 倍に増大させる環境設定を行った。その結果、事業開始初年度に 20kg の発芽感作大豆から得られたグリセオリン I は 185 mgであったが、温度・水温・麹菌の摂取方法等の諸条件検討を繰り返した事により、事業終了時には同 20kg からの最終収量は 2,500 mgと約 13.5 倍の収量を実現した。尚、『プロモーターボックス』で検討した基本条件、及びスケールアップ時のパラメータ最適化で得られる製造方法のノウハウは、新たな特許技術戦略と成り得る為、正林国際特許商標事務所での調査を実施するとともに事業終了後には新たに製法特許を取得予定である。

グリセオリン I の発現量

Glyceolin I	H 28年度	H 30年度
栽培量 (kg)	20	20
収 量 (mg)	185	2,500



発芽大豆の感作状況

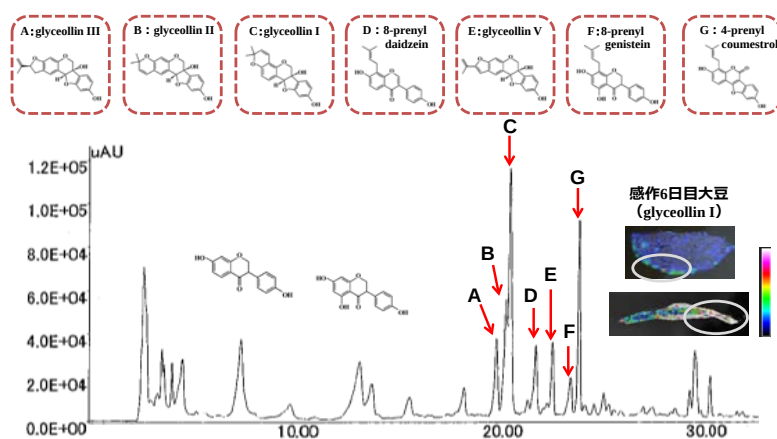
【4】機能性評価

本事業において得られたグリセオリンについては、推進委員の九州大学、熊本大学及び京都大学において、その機能性について様々な機能性評価を実施した。

九州大学：九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食品分析学 松井 利郎教授

* NMR 構造解析によるグリセオリン類構造同定

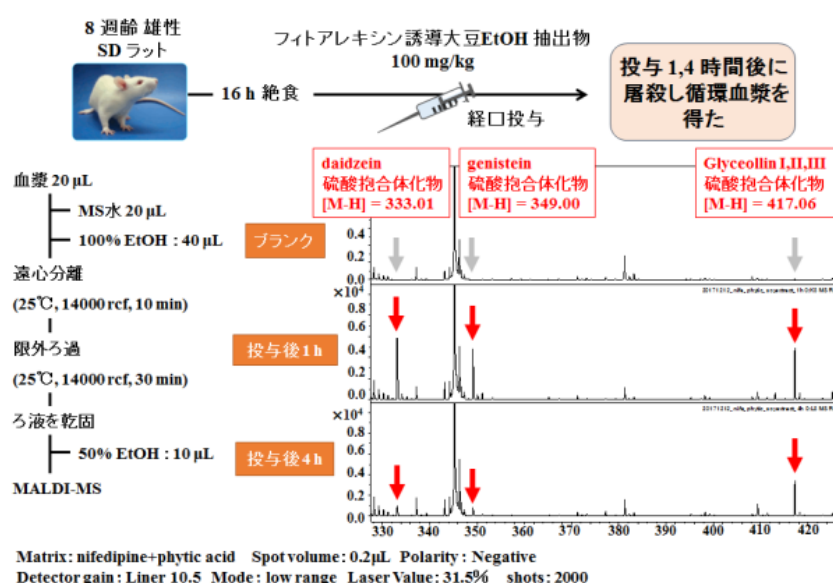
発芽感作大豆から産生された 7 種のグリセオリン類の化学構造を決定した。さらに、グリセオリン類が大豆外皮および発芽部分で局所的に産生されることを明らかにした。



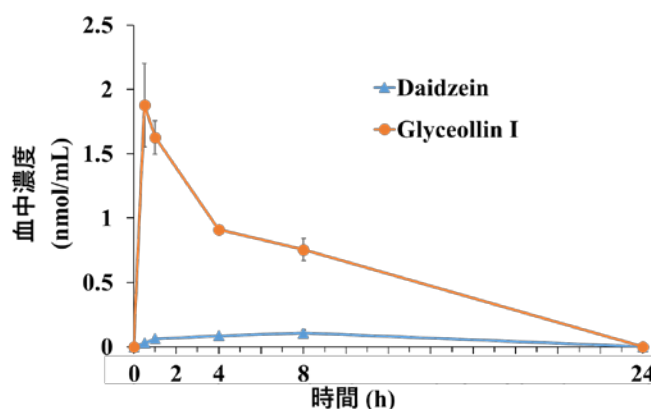
NMR による構造解析

【4-1】腸管吸収性

グリセオリン I、II、III におけるラットでの腸管吸収性を確認したところ、肝臓で分解されることがなく、血中に移行することが確認できた。また、吸収性については、ダイゼインとグリセオリン I での腸管吸収性の比較において、それらの総吸収量としてグリセオリン I がダイゼインの 14 倍以上であることを明らかにした。このことから従来の「大豆イソフラボン」の 1 種であるダイゼインよりグリセオリン I の腸管吸収性ははるかに高いことは、血中移行による食品としての有効性を期待できるものである。



ラットにおけるグリセオリン類の腸管吸収試験



ダイゼイン及びグリセオリン I の血中濃度推移

【4-2】細胞アッセイ

●再発乳がん抑制効果

熊本大学発生医学研究所細胞医学分野／中尾 光善教授

国立がん研究所がんセンターがん生物部／斉藤 典子部長（アドバイザーとして知見を頂く）

グリセオリン I は、高いエストロゲン様活性を有し再発性乳がんの増殖抑制効果を示すことが明らかとなったため、その働きに関する機序を明らかにし、グリセオリン類の有用性を評価した。

【実施内容】 ESR1 遺伝子確認試験

【成果】大豆から抽出・精製したグリセオリン I が、エレノア RNA、ESR1 の転写を阻害し、再発乳がんモデル細胞の増殖を抑制した。また、グリセオリン I の作用機序はエストロゲンと異なり、エストロゲン受容体を介さずに細胞死（アポトーシス）を誘導する新規な機序で、新たな乳がん治療薬の開発につながる可能性を示した。グリセオリン I については、再発性乳がんの細胞レベルでの抑制がみられ、一定の効果があることが判明した。グリセオリン I は、効果的に治療抵抗性乳がん細胞の増殖を抑え、また、正常線維芽細胞よりも強く抵抗性乳がん細胞の増殖を阻害し、細胞死（アポトーシス）を誘導した。一方で、グリセオリン I は、エストロゲンと異なり ER を介さずにエレノアを阻害することを見出した。構造解析を進めたところ、グリセオリン I は ER のアミノ酸（404 番目のフェニルアラニン残基）に立体障害を起こすことが示唆され、これらの結果から、①グリセオリン I が有する治療抵抗性乳がん細胞の増殖抑制作用は新しい機序であること、また、②ポリフェノールが細胞死を誘導する際には ER の介在と非介在の様式があること、さらに、③抵抗性乳がん細胞は適切なポリフェノール処理が引き金となって細胞死が誘導される脆弱な性質があることが示された。この新たに見出されたグリセオリン I の作用機序が、内分泌療法抵抗性乳がんの新たな治療薬を開発する契機につながることを期待される。

【実施内容】 エレノア制御の確認試験

【成果】グリセオリン I、Ⅲ、プレニルゲニステイン、プレニルダイジンについても *Eleanor* 合成阻害作用を評価した。グリセオリン I については、モデル細胞レベルで再発性乳がん増殖阻害効果とともにエレノア制御と細胞死効果が確認できた。

●褐色脂肪細胞の活性化効果

京都大学大学院農学研究科食品分子機能学分野／河田 照雄教授

褐色脂肪細胞は高い熱産生能を有し、その活性調節は肥満に対する新たな予防・治療標的として期待されている。肥満時の脂肪組織ではマクロファージの浸潤が亢進し、慢性炎症が引き起こされている。肥満時には褐色脂肪細胞の活性低下が示唆されており、その原因の一つとして、脂肪組織の慢性的な炎症状態が挙げられている。本サブテーマでは発芽大豆に多く含まれるイソフラボン代謝産物の抗炎症作用について、従来のイソフラボンと比較検討を行った。

マウスより単離した骨髄由来細胞をマウス線維芽細胞 L929 由来の培養上清存在下で骨髄由来マクロファージへと分化誘導し、インターフェロン γ およびリポ多糖刺激によって産生される炎症性メディエーター（一酸化窒素、TNF- α 、MCP1）量を指標として抗炎症活性を評価した。Daizein, Genistein を 5 μ M 添加した際には、いずれの炎症性メディエーター産生量にも差が認められなかったが、5 μ M 8-Prenyl-Daizein 添加によって、NO、MCP1 産生量が有意に抑制された。さらに、5 μ M 8-Prenyl-Genistein 添加時には、NO、MCP1 に加え、TNF- α の産生抑制も認められた。これらの結果より、プレニル基の付加がイソフラボンの抗炎症活性を高めることが明らかになるとともに、8-Prenyl-Genistein は 8-Prenyl-Daizein に比して、より強い抗炎症活性を有することが明らかとなった。8-Prenyl-Daizein, 8-Prenyl-Genistein の炎症性メディエーター産生抑制作用は種々の炎症性メディエーター遺伝子発現の抑制を伴っており、8-Prenyl-Daizein, 8-Prenyl-Genistein の抗炎症活性は、炎症性メディエーターの遺伝子発現誘導抑制に起因していることが示唆された。また、8-Prenyl-Daizein や 8-Prenyl-Genistein は抗炎症効果および褐色脂肪細胞機能亢進作用を有する核内受容体型転写因子である PPARs の活性化作用を有することも認められ、イソフラボン代謝産物の抗炎症をはじめとする生理活性に PPARs の活性化が寄与するものと推察された。

【まとめ】本サブテーマでは、発芽大豆に多く含まれるイソフラボン代謝産物が、褐色脂肪細胞活性化に与える影響について検討を行った。イソフラボン代謝産物は褐色脂肪細胞機能亢進作用を有する核内転写因子、PPARs の活性化作用を示すことが見出された。また、イソフラボン代謝産物は褐色脂肪細胞機能を低下させる炎症状態を従来のイソフラボンに比して強く軽減させることが明らかとなった。以上の結果より、イソフラボン代謝産物は褐色脂肪細胞機能の活性化作

用を有する可能性がある食品由来成分であることを見出した。

【5】市場調査・販路開拓

事業 2 年目からは、アドバイザーらの助言により、食品・香粧品及び創薬分野でのグリセオリン類のバルク原料としての可能性を調査してきた。展示会等の間接的なアプローチではなく、大手食品メーカー、介護老人用食品メーカー、香粧品原料メーカー等、アドバイザーの紹介による多くの企業との直接面談によりグリセオリンを紹介してきた。なかでも、香粧品原料としては、抗菌活性を有する天然素材のニーズがあり、抗菌活性部材としての可能性が示唆された。100%純度の精製物ではなく、今回成果物として得られたクルードな半精製品（10%グリセオリン含有）でも充分部材として対応可能であることも判明している。今後は大手化粧品製造メーカー等との共同開発を通じて、香粧品原料として製品化を目指す予定である。

一方、本事業で精製・獲得したグリセオリンの 8 種（グリセオリン I ～ V、8-Prenyl-Daidzein、8-Prenyl-Genistein 及び 4-Prenyl-Coumestrol）については、富士フィルム和光純薬株式会社を通じて研究用試薬として販売していく予定である。これらの研究用試薬については、①再発性乳がん②前立腺がん③糖尿病④骨粗しょう症⑤アルツハイマー症等の多くの疾患に対する研究市場に貢献できるものとする。



10%グリセオリン含有バルク素材



純度 90%以上単離精製化合物

（グリセオリン I ～ V、8-Prenyl-Daidzein,
8-Prenyl-Genistein, 4-Prenyl-Coumestrol）

本事業におけるグリセオリン類成果物

最終章 全体総括

我々は本事業において、自社の特許技術である【落合式ハイプレッシャー法】（特許第 5722518 号／特許第 5795676 号）を用いて発芽過程の大豆種子から、次世代型植物エストロゲンの【グリセオリン】を高濃度且つ大量に精製する栽培環境を整備し、大豆イソフラボンに代わるグリセオリンの大規模工業化について最適生産方法を確認することができた。グリセオリン類は、その存在は確認されていたが、天然では極微量でしか存在せず、その合成過程も複雑多岐にわたるため生産工程が難しく、現在まで世の中には出回っていなかった。

今回の事業では、理化学研究所の澤田研究員が LC-QTOF を用いたメタボローム解析を実施し、複数の栽培条件の中から、発芽 2 日目の麹菌感作により栽培 5 日前後でグリセオリンを効率よく獲得できることを確認した。その結果、単離精製したグリセオリン 8 種（グリセオリン I～V、8-Prenyl-Daidzein、8-Prenyl-Genistein 及び 4-Prenyl-Coumestrol）及びグリセオリン 10% 以上高含有バルク素材を獲得することができ、それらのグリセオリン類を用いた機能性評価についても一定の知見が得られた。

九州大学の松井教授は、グリセオリン類の構造決定、局在部位の確定、更にはラットの腸管吸収試験においてダイゼインよりグリセオリン I の総吸収量が 14 倍以上であることを解明した。京都大学の河田教授、後藤准教授は、グリセオリンの褐色脂肪細胞機能の活性化作用を有する事を確認した。更には、熊本大学の中尾教授、アドバイザーであるがん研究所の斉藤部長は、特にグリセオリン I の再発性乳がん細胞における細胞レベルでの増殖抑制効果を確認し、その成果について 2018 年 10 月に Nature の姉妹紙『Scientific Reports』に論文「Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA」が掲載された。

今後我々は、グリセオリンの機能性評価の知見を基に、グリセオリンのバルク原料を用いた香粧品の開発、がんを始めとする各種疾患におけるグリセオリンの機能性評価に貢献する研究用試薬の販売を進めていくとともに、『プロモーターボックス』での条件検討で得られた栽培方法からグリセオリン類の大規模生産体制を確立し、早期産業化を目指す予定である。