

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：32625

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00824

研究課題名(和文) 高い抗酸化能を有するムクナのアルツハイマー型認知症に対する予防効果の検証

研究課題名(英文) Preventive effect of Mucuna beans on Alzheimer's disease

研究代表者

小西 史子(Fumiko, Konishi)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：50170288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ムクナ抽出物は蛍光色素チオフラビンTを用いたアミロイド 及びタウタンパク質の凝集阻害試験において、濃度依存的にアミロイド 及びタウタンパク質の凝集を有意に阻害した。ムクナ粉末を含む飼料を老化促進モデルマウスSAMP8に投与して20週後、ムクナ摂取群は対照群よりY字迷路の成功進入回数が多い傾向を示した。受動的回避反応試験では、飼育14週までムクナ群の方が反応潜時が長く、ムクナ投与は記憶能力に好ましい影響を及ぼすと考えられた。またムクナ粉末の投与は、脳内のタウタンパク質リン酸化の増加を抑制することが示唆された。ムクナを用いて味噌及び中華麺を開発し、これらの食品が高い抗酸化性を有することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでムクナの機能性に関して、抗酸化能が高いことは知られていた。しかし、アルツハイマー病に対する機能については殆ど知られていなかった。この研究の結果、試験管内でムクナがアミロイド、タウタンパク質の凝集を阻害すること、動物実験でタウタンパク質のリン酸化を抑制することが示唆されたことは、ムクナのアルツハイマー病予防に関する機能性の解明に寄与することが考えられる。また、ムクナを用いて抗酸化性の高い味噌と中華麺を開発できたことは、ムクナの普及に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Our study was conducted to investigate the preventive effect of Mucuna on Alzheimer's disease and prepare new products using Mucuna. Mucuna extracts dose-dependently inhibited amyloid aggregation as well as tau aggregation in vitro. SAMP8 mice received control diet (control mice) or diet containing Mucuna (Mucuna mice). The number of entries of the Mucuna mice was tended to be higher than that of control mice at 20 weeks in Y-maze test. Avoidance time of the Mucuna mice was longer compared with that of the control mice until 14 weeks in the passive avoidance test. Three xTg mice were fed to determine the levels of sarkosyl-insoluble tau. There were no significant differences in the levels of sarkosyl-insoluble tau in hippocampus between the Mucuna mice and the control mice. However, in striatum and cerebral cortex, the levels of sarkosyl-insoluble tau were significantly reduced in the Mucuna mice. We prepared Mucuna beans miso and chinese noodles, they had high antioxidant activities.

研究分野：調理学

キーワード：タウタンパク質 リン酸化タウタンパク質 ムクナ豆

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2015年、政府は2025年には認知症患者は約700万人(高齢者の約5人に1人)に増加する見込みを発表した。認知症の介護には、多大な労力と医療費を要することから、大きな社会問題に発展している。認知症のなかでもアルツハイマー型認知症は発症までに5~10年の時間を要するといわれ、その原因も有効な治療法も未だ明確にされていない。

したがって予防法及び病態の改善方法の開発は、わが国における喫緊の課題であるといえる。

アルツハイマー病の病理学的特徴は、脳内に凝集したアミロイド から成る老人斑、高度にリン酸化されたタウタンパク質の凝集体から成る神経原繊維変化が観察されることである。しかし、神経細胞に対する毒性を示すのは、沈着したアミロイド やタウタンパク質の凝集体よりむしろ、アミロイド、リン酸化タウのオリゴマーであることが知られている。したがって、オリゴマー形成阻害物質及びそれを含む食品の探索は、アルツハイマー病予防及び治療に有益であると考えられる。これまでにオリゴマー形成阻害物質の一つとして、ドーパミンの前駆体であるL-3,4-Dihydroxy-phenylalanine (以下、L-DOPA)は、in vitroでアミロイド 及びタウタンパク質の凝集を阻害することが報告されている。また、L-DOPAのようにカテコール骨格を有する物質は、in vivoでもアミロイド のオリゴマー形成及び、タウタンパク質のリン酸化を抑制することが示唆されている。

### 2. 研究の目的

ムクナ (*Mucuna pruriens*) は、和名を八升豆といい、種子には乾燥重量当たり3-9%のL-DOPAが含まれている。

我々はH23~H25の基盤研究Cにおいて、パーキンソン病モデルラットにムクナ粉末添加飼料を投与すると、パーキンソン病モデルラット特有の病態が改善されることを明らかにした。これにはムクナに含まれるドーパミン前駆物質であるL-DOPAの直接的作用に加え、ムクナの持つ高い抗酸化能が大きく関与していた。

パーキンソン病患者の40%は認知症を併発することから、ムクナが認知症の予防に対しても有効性を示すのではないかと考え、それを検証することを目的とした。また、ムクナの抗酸化能を生かした調理加工食品を開発し、アルツハイマー病予防に資することも目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験1: ムクナによるアミロイド 及びタウタンパク質の凝集阻害

蛍光色素チオフラビンTを用いて、ムクナ抽出物(0.4Mリン酸緩衝液pH4.0で抽出)のアミロイド 及びタウタンパク質の凝集阻害作用を調べた。

#### (2) 実験2: 動物実験

##### 1) Y字迷路(自発的交替行動)試験、及びStep-Through(受動的回避反応)試験

実験動物として、12週令雄性的老化促進モデルマウス(SAMP8)を20週令まで市販固形飼料で飼育した後、SAMP8を2群に分け、AIN76標準飼料を投与する対照群、AIN76標準飼料にムクナ粉末を体重1kg当たり120mg(L-DOPAとして6mg)添加して投与するムクナ群とした。試験試料投与開始週からY字迷路(自発的交替行動)試験、及びStep-Through(受動的回避反応)試験を毎週実施した。

##### 2) ムクナ投与によるリン酸化タウの抑制効果

老化促進モデルマウス(SAMP8)を用いた実験: 老化促進モデルマウス(SAMP8、雄、11週齢)を、対照群、ムクナ粉末低投与群、ムクナ粉末高投与群の3群に分けた。ムクナ粉末低投与群には、ムクナ粉末を12mg/体重kgに調製した飼料を、ムクナ粉末高投与群には、ムクナ粉末を120mg/体重kgに調製した飼料を投与した。それぞれの飼料におけるL-DOPA含量は、0.6mg/体重kg及び6mg/体重kgである。飼育期間は、11週齢から40週齢までである。飼育後、脳を取り出し、N-PER試薬を用いてタンパク質を抽出、遠心後、上清を用いて、ウェスタンブロッティングを行い、タウタンパク質のリン酸化の程度を調べた。リン酸化タウ抗体としてT181, S262, S199を用いた。

認知症モデルマウス3xTgマウスを用いた実験: 3xTgマウス(4週齢、雌)を対照群、ムクナ粉末投与群の2群に分けた。ムクナ粉末投与群の飼料におけるL-DOPA含量は、2mg/体重kgとした。飼育期間は4週齢から62週齢(15か月齢)である。飼育後、脳を取り出し、矢状縫合方向に2等分し、片方は線条体、大脳皮質、海馬に分け、それぞれTBS緩衝液でホモジナイズし、遠心後、サルコシル不溶性リン酸化タウを抽出し、ウェスタンブロッティングを行った。

リン酸化タウ抗体として、AT8を用いた。もう片方は免疫組織化学染色に供するために4%パラフォルムアルデヒド固定液にて固定し、パラフィン包埋後、切片を作り、リン酸化タウ抗体AT8を用いて、脳におけるリン酸化タウの凝集を観察した。

#### (3) 実験3: ムクナを用いて調理加工品を開発した。

#### 4. 研究成果

- (1) ムクナによるアミロイド 及びタウタンパク質の凝集阻害：ムクナ抽出物は、濃度依存的にアミロイド 及びタウタンパク質の凝集を有意に阻害した。
- (2) Y 字迷路（自発的交替行動）試験、及び Step-Through（受動的回避反応）試験  
Y 字迷路試験  
試験期間中ムクナを摂取したムクナ群は、摂取しなかった対照群に比べ進入成功回数が多くなる傾向が観察された。  
Step-Through 試験  
本実験では、最大反応潜時を 3 分とした。実験開始から 14 週目迄はムクナ群が対照群より反応潜時は長かった。しかし、16 週目以降 PC 群も最大反応潜時に到達し、差が認められなかった。  
、の結果より、SAMP8 マウスにおいてムクナ群は対照群よりも自発的交替行動試験（Y 字迷路）及び受動的回避反応試験の成績が良好であったことから、ムクナ投与は記憶能力に好ましい影響を及ぼすことが示唆された。
- (3) ムクナ投与によるリン酸化タウの抑制効果：SAMP8 マウスではタウタンパク質のセリン 262, スレオニン 181 のリン酸化の程度には、群間で有意な差は認められなかった。しかし対照群に比べ、ムクナ粉末高投与群においてタウタンパク質セリン 199 におけるリン酸化が有意に抑制されていた。3xTg マウスではウェスタンブロッティングの結果、ムクナ粉末投与群の線条体、大脳皮質において、サルコシル不溶性タウタンパク質が有意に減少していた。しかし、海馬では 2 群間に有意差は認められなかった。これらの結果から、ムクナ粉末の投与は、老化によるタウタンパク質リン酸化の増加を抑制することが示唆された。免疫組織化学染色の結果は、現在、分析中である。
- (4) 以下の加工品が開発された。
  - 1) ムクナ味噌：大豆或いはムクナ 100 に米麹 170 の割合で味噌を調製し、抗酸化能の変化を調べ、官能評価を行った。  
その結果、発酵中、大豆味噌も抗酸化能が増加したが、ムクナ味噌は大豆味噌に比べ、ORAC 法では 1.7 倍、DPPH 法では 4.5 倍と高い抗酸化活性を示した。また、官能評価では、ムクナ味噌は大豆味噌に比べ、有意に甘く、総合評価も有意に高い結果であった。
  - 2) ムクナ中華麺：ムクナ粉を小麦粉に 10% あるいは 20% 置換し、重曹を添加した中華麺を調製した。加熱後の L-DOPA 残存量は、10% 置換では 0 g、20% 置換では約 0.03 g/(100g 試料)まで減少した。調製した麺は、加熱後、ORAC 法及び DPPH 法でも高い抗酸化能を有していた。
  - 3) ムクナ煮豆ペースト・ハンバーグ：ムクナを煮熟してペーストを作り、ターメリック或いはローズマリーを添加したペーストを調製した。このペーストはムクナ煮豆ペーストより、高い抗酸化性とアミロイド 凝集阻害活性を示した。さらにムクナ煮豆ペーストと牛挽肉を同重量ずつ混合し、白胡椒、ナツメグ各 0.1%、ローズマリー 0.2% を添加したハンバーグを調製した。官能評価の結果、風味、味のバランスがよいと判定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 郡山貴子、飯島久美子、小西史子、佐藤瑤子、香西みどり	4. 巻 50
2. 論文標題 ムクナ豆味噌の調製および調製過程における抗酸化活性の変化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本調理科学会誌	6. 最初と最後の頁 174-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 郡山貴子、飯島久美子、江原瑞樹、小西史子、香西みどり	4. 巻 71
2. 論文標題 ムクナ豆を用いた調理品におけるL-DOPAの消長に及ぼす重曹添加の影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本家政学会誌	6. 最初と最後の頁 392-400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯島久美子、江原瑞樹、郡山貴子、佐藤瑤子、小西史子、香西みどり
2. 発表標題 重曹添加が八升豆粉末を用いた麺に及ぼす影響
3. 学会等名 日本調理科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	香西 みどり  (Kasai Midori)  (10262354)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授    (12611)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	古庄 律  (Furusho Tadasu)  (50238680)	東京農業大学・国際食料情報学部・教授     (32658)	