

令和元年6月26日現在

機関番号：24403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07025

研究課題名(和文)クレソンに含まれるグルコシノレートの分子種分析と脂質代謝改善効果の解析

研究課題名(英文) Molecular species analysis of glucosinolates and its derivatives in watercress and these effects on lipid metabolism

研究代表者

中屋 慎 (NAKAYA, Makoto)

大阪府立大学・研究推進機構・客員研究員

研究者番号：90736886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉菜類であるクレソンはさまざまな健康増進効果をもつことが知られているが、そのメカニズムなど科学的根拠が明確には示されていない。我々はクレソンがもつ食品の3次機能(健康機能性)を調べ、クレソンが脂質代謝改善効果を示すことを動物実験により明らかにし、さらにこの改善効果をもたらす機能性成分を調べた。その結果、フェネチルイソチオシアネートおよび1,3-ジフェネチルウレアである可能性が高いことが分かった。特に、1,3-ジフェネチルウレアは、微量でありながら強い改善効果を示したことから、クレソンに含まれる主要かつ新規な機能性成分であると考察している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クレソンに微量しか存在しない1,3-ジフェネチルウレアの定量分析方法を確立し、さらにその脂質代謝改善効果を明らかにした本研究成果は、食品の健康機能性研究の基礎的知見として非常に有用であり、ヒトにおける効果の証明など発展的な研究の礎となる。

また、本研究により得られた健康機能性に関する知見は、科学的根拠に基づくクレソンの利用を促進し、さらなる普及に役立つと考えている。これは、国民の健康寿命の延伸と医療費の削減の一助となる。

研究成果の概要(英文)： Watercress (*Nasturtium officinale*, family Brassicaceae) is a traditional food plant in Europe that has beneficial effects for human health. It improves lipid metabolism but otherwise its functional materials are not well understood. Brassicaceae plants contain glucosinolates and isothiocyanates that are well-known functional materials with many beneficial effects, and dibenzylureas that have recently been found to inhibit human soluble epoxide hydrolase (sEH). To identify the main functional materials for lipid metabolism in watercress, we analyzed these glucosinolates and their derivatives and tested the effects of the derivatives using mice. We found that phenethylisothiocyanate (PE-ITC) and diphenethylurea (PE-UR) in watercress have sEH inhibitory activity, and that PE-UR improves lipid metabolism in mice fed a high-fat and high-sugar diet. We suspect that these are two of the main functional materials contributing to the lipid metabolism improvement effects of watercress.

研究分野：食品分析化学、食品学

キーワード：クレソン グルコシノレート類 イソチオシアネート類 ジベンジルウレア類 脂質代謝改善効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クレソン (Watercress) は中部ヨーロッパ原産のアブラナ科植物である (図 1)。日本では香味野菜として少量食されるのが一般的だが、ヨーロッパ諸国では伝統的に健康増進目的で食されている。Guarrera らが報告したイタリアにおける伝統的な食用植物の健康増進効果に関する総説において、クレソンは強壯作用など 13 項目の効果が挙げられている¹⁾。また、Noia は、果物や野菜について 17 種の必須栄養素の充足率を調べ、クレソンが最も優秀であると報告している²⁾。このように、クレソンは健康増進効果の



図 1. クレソン (*Nasturtium officinale*, Water cress) の外観

高い微量成分と必須栄養素を豊富に含む魅力的な野菜であり、普段の食生活に取り入れることで健康の維持増進に役立つことが期待できる。近年、クレソンが脂質代謝改善効果を示すとの報告がなされたが、詳細な検討はされておらず主因となる機能性成分は分かっていない³⁾。アブラナ科植物にはグルコシノレート類 (GL) が含まれており、GL の代謝物であるイソチ

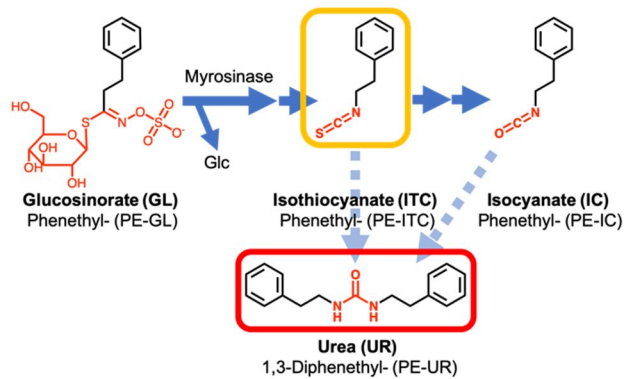


図 2. グルコシノレート類、イソチオシアネート類およびウレア類の構造

オシアネート類 (ITC) は抗腫瘍活性など健康増進効果をもつことが知られている。さらに、近年、可溶性エポキシヒドロラーゼ (sEH) を阻害するウレア類 (UR) がアブラナ科植物より発見されたが機能性など不明な点も多い (図 2)⁴⁾。

2. 研究の目的

クレソンに含まれる GL の誘導体である ITC, UR が脂質代謝改善効果の主因であると仮説をたて検証を行った。まず、クレソンに含まれる GL、ITC および UR の分子種とその含量を明らかにし、さらに、主要な ITC、UR 分子種の脂質代謝改善効果を動物実験により解明することを目的とした。

3. 研究の方法

超臨界二酸化炭素抽出法 (SFE) および HPLC-MS² 法を用いた抽出および定量

一般に、GL およびその誘導体には置換基の異なる分子種が存在する。そこで、HPLC-MS² を用いて、分子種レベルの定量分析が一括して実施できる分析法を確立した。また、クレソンに微量にしか存在しない UR を高効率で抽出するため、SFE を用いた抽出法を開発した。これらを組み合わせて、クレソン粉末に含まれる GL およびその誘導体分子種と含量を定量した。

動物実験によるクレソンおよび ITC、UR の脂質代謝改善効果の検証

主要な分子種であったフェネチルイソチオシアネート (PE-ITC) と 1,3-ジフェネチルウレア (PE-UR) に着目し、まず、これら 2 物質の sEH 阻害活性を測定した。次に、これらの物質が消化管から血中へと移行するかをラットを用いて調べた。さらに、これらの物質およびクレソンを高脂肪高シヨ糖食に添加し、それぞれ C57BL/6J マウス (、7 週齢) に 4 週間摂取させ脂質代謝改善効果を調べた。クレソン粉末の添加量は 2.5% とし、PE-ITC および PE-UR はクレソン粉末における含有相当量をそれぞれ添加した。

4. 研究成果

まず、SFE による高効率抽出法の確立を行なった。モディファイヤーとしてエタノールを加え抽出溶媒の極性を制御することにより、目的物質の選択性と抽出効率を高めることができた。確立した抽出法は従来の有機溶媒抽出法と比較して、必要試料量や抽出時間、作業効率など多くの点で優位性が認められた。次に、GL

およびその誘導体分子種の一括定量分析法を確立した。この一括定量分析法は構造や物理的性質が大きく異なる GL や ITC、UR を 1 回の分析のみで定量分析するもので、類似手法の報告のない新規性の高い分析手法である。確立した抽出法および分析法を用いてクレソン粉末に含まれる GL およびその誘導体を定量分析した結果、フェネチル基(PE)を残基にもつ PE-ITC (33 $\mu\text{mol/g}$) が主要な分子種であることが分かった。また、興味深いことに、2 分子の PE からなる PE-UR が 12 nmol/g 存在することが分かった。これらの結果から、PE-ITC だけでなく PE-UR も脂質代謝改善に寄与する可能性が考えられた。

特徴的な物質であった PE-ITC および PE-UR に着目し、これらの物質がクレソンの脂質代謝改善効果に寄与するかを動物実験により調べた。まず、sEH に対する PE-ITC、PE-UR の作用を *in vitro* において評価したところ、共に阻害活性を示し、特に PE-UR は PE-ITC の 10 倍強い阻害活性を有することが分かった。次に、2 物質をそれぞれ経口摂取した Wistar ラットの末梢血における濃度を継続的に調べたところ、PE-ITC、PE-UR 共に摂取量依存的に血中濃度が上昇したことから、これらの物質は消化管から末梢血へと移行することが分かった。最後に、高脂肪高シヨ糖食摂取 C57BL/6J マウスにクレソン粉末及び PE-ITC、PE-UR をそれぞれ 4 週間自由摂取させ、脂質代謝改善効果を調べた。クレソン摂取群、PE-ITC 摂取群、PE-UR 摂取群は対照群に比べ肝臓重量や 精巣周辺脂肪量が低下したことなどから、PE-ITC、PE-UR は経口摂取により脂質蓄積を抑制することが分かった。体内に蓄積される脂質分子種が変化をさらに詳しく調べるため、二次元 HPLC-UV-CAD/MSn を用いた脂質分子種の網羅的分析法を確立し、現在解析を進めている。また、PE-ITC 摂取群では盲腸内容物重量が他群に比べ著しく少なく、PE-UR とは異なるメカニズムであることが示唆された。以上のように、クレソンに特徴的な物質である PE-ITC および PE-UR は、経口摂取により体内に吸収され sEH 阻害活性を有する物質であり、継続的摂取により脂質蓄積を抑制することを明らかにした。

本研究の結果、クレソンには、PE-ITC に加え、PE-UR という新規機能性成分が含まれることを見出した。さらに、これらの物質は共に脂質代謝改善効果を有するが、そのメカニズムは異なることが示唆された。作用メカニズムの違いについて、さらに研究を進める計画である。

<引用文献>

- 1) P. M. Guarrera, V. Savo, *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 659-680, 2013.
- 2) J. D. Noia, *Preventing Chronic Disease*, 11, E95 2014.
- 3) A. Hayashi, *et al. Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*, 67, 185-191, 2014.
- 4) Kitamura S, *et al. (2017) PLoS ONE* 12(5): e0176571.

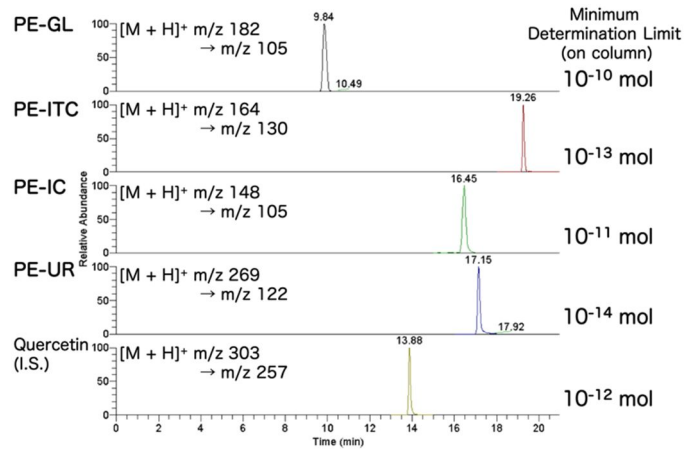


図3. 本研究において確立した GL およびその誘導体分子種の一括定量分析の例 (HPLC-MS² クロマトグラム)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takahashi Ryosuke, Nakaya Makoto, Kotaniguchi Miyako, Shoji Aiko, Kitamura Shinichi, “ Analysis of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and plasmalogen molecular species in food lipids using an improved 2D high-performance liquid chromatography system ” 査読有, Vol.1077-1078, 2018, Pages 35-43, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.01.014>

〔学会発表〕(計2件)

Makoto Nakaya, Miyako Kotaniguchi, Aiko Shoji, Seiko Mizuno, Shinichi Kitamura, “ Quantitative analysis of isothiocyanates and dibenzylureas in watercress ” 査読有, 10th Kyoto International Forum for Environment and Energy (KIFEE) Symposium, OP18, Trondheim, Sep., 2018 (国際学会)

中屋 慎, 小谷口 美也子, 庄條 愛子, 水野 淨子, 北村 進一, 「超臨界二酸化炭素抽出法を用いたクレソンに含まれる機能性成分の分析」日本農芸化学会2018年度大会, 2B10p03, 名古屋, 3月, 2018

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：北村 進一

ローマ字氏名：KITAMURA shinichi

研究協力者氏名：水野 淨子

ローマ字氏名：MIZUNO seiko

研究協力者氏名：庄條 愛子

ローマ字氏名：SHOJO aiko

研究協力者氏名：藤原 永年

ローマ字氏名：FUJIWARA nagatosi

研究協力者氏名：小谷口 美也子

ローマ字氏名：KOTANIGUCHI miyako

研究協力者氏名：高橋 良輔

ローマ字氏名：TAKAHASHI Ryosuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。