

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02373

研究課題名（和文）インゲン属雑豆の処理条件と含有レクチンの免疫賦活活性との関連と食品への応用

研究課題名（英文）Relationship between Processing Conditions and Immunostimulant Activity of Contained Lectins of Phaseolus vulgaris Beans and Their Application to Foods

研究代表者

畦 五月（Une, Satsuki）

香川大学・教育学部・教授

研究者番号：60169620

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：インゲン属マメを研究対象にして、加熱してもマメ中に残存するレクチンの機能性を検討した。キントキマメ、シロハナマメ、トラマメは加熱後のマメ中にもレクチンの持つ赤血球凝集活性が検出され、これらのレクチンはプロテアーゼに耐性を示した。カラムクロマトグラフィーでレクチンを含む画分を分離し、その画分の機能性（ガン細胞増殖抑制作用、抗炎症作用、ビフィズス菌増殖促進作用等）を測定した。その結果、マメ種によりその強弱の相違はあったものの、生及び加熱後のマメ中のレクチンを含んだ画分にガン細胞増殖抑制作用、抗炎症作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加熱したインゲン属マメのレクチンは耐熱性を示し、ガン細胞増殖抑制作用、抗炎症作用の機能性を有していた。つまり、レクチンの機能性が加熱によって失われることなく、体内にエンドサイトーシスで吸収された後、食薬として作用し、人体に有用な機能性を示す可能性が示唆された。

食生活では、煮豆としてだけではなく、煮豆を砂糖の代替食品としてデザートやすしの具に、調味していない加熱マメはペースト化し易い特性も持つことから、介護食や離乳食への導入が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The functionality of lectins remaining in beans (*Phaseolus* genus) after heating was investigated. Lectins from Kintoki, Shirohana, and Tora bean were found to have hemagglutinating activities after heating (dry and wet heating), and these lectins were protease-resistant. Fractionations showed functional properties: antiproliferative and anti-inflammatory activities.

研究分野：食品機能学

キーワード：レクチン 加熱マメ *Phaseolus vulgaris* ガン細胞増殖抑制作用 抗炎症作用 ビフィズス菌増殖作用

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マメ類は元々含有タンパク質量が他の食品に比較して 20%程度と高い特性を持つ。本研究で扱うレクチンは(糖)タンパク質であり、それ故タンパク質量の高いマメ類に含有量が多い。乾燥マメを加熱処理せずに摂食することはないが、マメ中に含有されるレクチンは消化酵素に耐性を示すために、加熱不十分な状態で摂食した場合に嘔吐・下痢等の消化器症状を示す。軟化のために加熱時間を要する、さらに加熱後もインヒビター類等の非栄養成分の含有も避けられず、マメ類は食材としてネガティブなイメージを抱かれている点も否めない。

しかしながら近年の研究では微量なレクチンによるガン細胞増殖抑制作用やアポトーシス作用が報告され、一部レクチンの臨床投与(微量投与)での有効性が認められている(Seifert et al., Cancer Letters, 2008)。NK 活性などの免疫系細胞に有用な機能性を示すレクチンを含んだマメの種もある(Una ら, J. Food Science, 2018)。

大半の食品は加熱後摂取されるが、加熱後タンパク質が変性した状態でのレクチンの持つ赤血球凝集活性の有無、あるいは存在した場合のレクチンの持つ機能性の研究は管見の限りみられない。その理由として、マメの個体各々の形状(重量、厚み等)が一定せずばらつきが大きい点、そのため加熱条件を一定とし実験を実施した場合でもマメ個々の仕上がりの硬さなどで再現性のある結果は得られにくい点がその理由にあると考えられる。

本研究では、乾燥したマメに着目し、加熱後にあってもマメ中になお残存するレクチンの持つ活性の有無に着目する。マメは一般に湿熱条件下で食用とされる場合が多いが、粉末で加工される場合(パン等への添加)も考慮して、乾熱条件下でのレクチンの持つ活性の有無の検討も必要となる。現在、湿熱と乾熱状態後でもなお食品中に残存するレクチンの生物活性に関する研究はみられない。

2. 研究の目的

インゲン属(*Phaseolus* 属)の豆類(キントキマメ、シロハナマメ、トラマメ、オオフクマメ)を試料として、生と日常食用状態である加熱後も含有されるレクチンを赤血球凝集活性を指標としてカラムクロマトグラフィーにて分画した。この分画試料について、生マメからの分画試料を対照として生物学的性質及び細胞へ与える機能性(ガン細胞増殖抑制作用、抗炎症作用)を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)加熱方法による赤血球凝集活性(HA 活性)の変動について

重量がほぼ一定の誤差範囲にある粒のそろったマメを湿熱加熱(100 の沸騰湯中で漬け水を入れた容器内で加熱)、乾熱加熱(アルミホイルに包み 100 加熱)を施した。その後抽出液の上清液について HA 活性を測定した。

(2)HA 活性の測定方法

インゲン属マメはマウス赤血球に特異性を有するため、2%マウス赤血球を使用したマイクロタイター法により、試料液の倍々希釈で赤血球凝集活性の測定を行い、凝集は肉眼により判定した。

(3)糖及び消化酵素による HA 活性の抑制について

レクチンは糖(単糖あるいは、糖タンパク質など)により凝集阻害を起こすため、数種の糖を選択して凝集阻害活性を検討した。最小凝集濃度の 2 倍濃度のレクチン溶液に各種糖液を添加して、糖液の倍々希釈を行い、マイクロタイター法による凝集阻害活性の有無及び、その阻害濃度を測定した。

人体に摂取した場合のプロテアーゼ耐性を検討するために、消化酵素(ペプシン、トリプシン、キモトリプシン)による凝集阻害活性も HA 活性を指標に測定した。

(4)加熱

加熱処理後にカラムにて分画したレクチンを 60、80、100 で再度加熱後の HA 活性を測定した。

(5)ガン細胞増殖抑制作用について

マウス B16 メラノーマ細胞、マウス骨肉腫由来 LM8 細胞、ヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞、ヒト肝臓ガン Hep G2 細胞、ヒトメラノーマ Colo679 細胞を使用し、レクチン液添加後のガン細胞増殖抑制作用を *in vitro* で MTT 法を用い判定した。

(6)マクロファージによる抗炎症作用について

マウス腹腔内からマクロファージを採取し、レクチンによる刺激群と無刺激群を設定し、それぞれの群の炎症に関与する遺伝子発現抑制率を Real-time qPCR 法にて測定した。測定したサイトカインは、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、COX-2 の 4 種類である。生マメの硫酸分画後の粗抽出物及び、一部マメについては生マメと加熱マメを使用したカラムクロマトグラフィー分画後のカラム画分を試料とした。

(6)THP-1 細胞を用いての TNF- α の測定

ヒト由来単球 THP-1 細胞をホルボール 12 ミリスタート 13 アセタートにて炎症性マクロファージに誘導後、リポポリサッカライドで炎症を誘起させると同時にレクチン液を添加して炎症性サイトカイン TNF- α 量を ELISA 法により測定した。

(7) 腸内細菌によるレクチンの増殖作用

粗抽出段階で有意に増殖作用が確認されたビフィズス菌 2 種を使用して、レクチン添加後の吸光度変化により増殖促進作用を測定した。

(8) アレルギー反応

RBL - 2H3 細胞を使用した脱顆粒抑制試験で評価した。

(8) マメ類の料理の広報活動

予定していた広報活動として料理講習会は、コロナ感染症蔓延のために中止としたが、料理への応用について検討を行った。

4. 研究成果

(1) HA 活性の有無とレクチンを含む画分の分画方法

キントキマメを対照として、シロハナマメ、トラマメ、オオフクマメについて、乾熱と湿熱加熱後の HA 活性を比較した。4 種のマメ中では、キントキマメは最大の HA 活性を示した。キントキマメとシロハナマメでは乾熱と湿熱加熱双方で HA 活性が認められたが、トラマメは乾熱のみに認められた。しかしながら、オオフクマメは生マメでの HA 活性は認められず、乾熱後 HA 活性が検出されるという特異な性質を示した。

キントキマメからのレクチンの分画

生マメからのレクチンは浜口らの方法に従い CM セファロースカラムクロマトグラフィーにより、加熱したマメからのレクチンは DEAE セファロースカラムに負荷後、塩化ナトリウムによるステップワイズ法により分画した。得られた活性のある画分を以下カラム画分と称する。

シロハナマメからのレクチンの分画

生及び加熱（乾熱と湿熱）処理マメは、チオグロブリン-セファロースアフィニティークロマトグラフィーにより分画した。

トラマメからのレクチンの分画

林らの方法に従い、DEAE A-50 セファデックスカラムに生あるいは乾熱マメを負荷して塩化ナトリウムによるステップワイズ法により画分した。

(2) 加熱による HA 活性への影響

キントキマメは湿熱・乾熱双方で活性が認められた。生マメから分画したレクチンでは 80 10 分で 50%の活性が失活する結果を考えると、マメ中の他成分に保護された形となり HA 活性がマメ中に検出されたと推察された。

シロハナの生及び加熱後のカラム画分双方において、60 30 分までは HA 活性は安定であったが、80 30 分では全ての画分の活性が失活した。

トラマメの生及び乾熱後のカラム画分試料は、80 30 分の加熱でも活性は低下せず、100 分で失活した。しかし加熱後のカラム画分試料の一部には 100 分でも失活しない画分が認められた。

(3) 生及び加熱したマメからカラム分画した試料によるガン細胞増殖抑制作用

ガン細胞増殖抑制作用は、マメの種類、ガン細胞の種類により異なり、各マメがそれぞれ異なった特異性を示した。生マメからのカラム画分に抑制作用が存在した場合には、加熱後のカラム画分にも同作用が存在する傾向が認められた。その場合には、加熱マメからのカラム画分の方が抑制作用が弱体化していた。つまり加熱によるレクチンの変性（構造変化）がその理由と推察された。

キントキマメの生及び加熱後のカラム画分は、マウス B16 メラノーマ細胞、同 LM8 細胞において有意に増殖抑制作用が認められ、ヒト HeLa 細胞には、生マメからのカラム画分のみが有意に増殖抑制作用を示した。生のキントキマメレクチンが有意な増殖抑制作用を示すとの報告 (Chan et al. PLoS One, 2012) があるヒト肝臓 Hep G2 細胞に対する抑制作用は、加熱処理マメからのカラム画分では確認されなかった。その生マメでの増殖抑制作用も既報 (Chan et al.) と比較し低値であった。ヒトメラノーマ Colo679 細胞に対して、生のカラム画分と一部の加熱のカラム画分で有意な低下がみられた。マ

シロハナマメは、マウス B16 細胞、マウス LM8 細胞、ヒト HaLa 細胞、ヒト HepG2 細胞に特異的に作用したが、特にマウス B16 細胞とヒト HeLa 細胞の増殖抑制作用が強力であった。

トラマメはマウス B16 細胞、ヒト HeLa 細胞に有意に抑制作用を示した。トラマメのカラム画分の増殖抑制作用の傾向は、キントキマメレクチンの抑制作用の傾向と類似していた。

(4) マウス腹腔内から採取したマクロファージを使用する抗炎症抑制作用

粗抽出段階での抗炎症作用

マメ抽出液の硫酸分画後の凍結乾燥品について、マウス腹腔内から採取したマクロファージを使用し炎症性サイトカインの出現を測定した。

マメの種類によりサイトカイン毎の抗炎症作用に差がみられたが、IL-6 と IL-1 は 3 種類のマメ共通に有意に抑制作用を示した。使用試料は生マメからの粗抽出段階の試料であり、レクチン、あるいはレクチン以外の成分による、あるいはレクチンと他の成分との相乗作用により抗

炎症作用が誘発されている可能性も示唆された。

表 生マメから水抽出後硫酸分画したレクチン画分の各種サイトカインへの影響

種類(生マメ・クルード)	TNF- α	IL-6	IL-1	COX-2
キントキマメ	***	**	**	
シロハナマメ	***	**	***	**
トラマメ		***	**	**

***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05

キントキマメにおける生及び加熱したマメからカラム分画したレクチンによるサイトカインへの影響

生キントキマメからのカラム分画は、上述の4種類のサイトカインについて抗炎症作用を示したものの有意差は示さなかった。加熱マメからのカラム分画は、カラム分画ごとにサイトカインの種類やその有意差に相違が認められたが、抗炎症作用は存在し、生マメより強力な抗炎症作用を示した画分も存在した。

THP-1細胞を使用してのシロハナマメの生及び加熱マメからのカラム分画の抗炎症作用

TNF- α 測定において生及び加熱マメからのカラム分画双方に抗炎症作用を確認されなかった。一方、生トラマメからの一部のカラム分画に有意な抗炎症作用が確認された。

(5)ピフィズス菌増殖作用

シロハナマメとトラマメの生及び加熱のカラム分画について、2種類のピフィズス菌増殖作用について検討した結果、増殖作用はいずれの画分にも確認されなかった。

(6)アレルギー誘発反応

生キントキマメからのカラム分画のアレルギー誘発反応は確認されなかった。

(7)食品への応用例

スープの作成 パンへの添加(小麦粉の代替として粉末マメの添加) 砂糖で味付けした煮豆を砂糖の代替としての調味料替わりにデザートや飲み物に添加 煮豆を独立した食材として扱う(香川県や徳島県の郷土料理として以下が現在も伝承されている(ばらずしに煮豆を入れる、煮豆をかき揚げてんぶらとする) 茹でマメをサラダ用やスープ用の食材とする(食物繊維が豊富に含有される上にペースト状化しやすい特性を生かして介護食や離乳食に利用する)。

(8)まとめ

4種のインゲン属マメを丸のまま加熱後のレクチンの生物活性を生マメを対照として検討した。加熱後にもマメ中にはレクチンが残存していた。その活性強度は、乾熱か湿熱かの加熱条件や、マメの種類により相違した。生及び加熱後のマメからレクチンをクロマトグラフィーにて分画後、その生物活性を測定した。

マメ3種はプロテアーゼに対して、生及び加熱後のカラム分画双方で耐性を示した。つまりこれらのマメからのレクチンは体内にエンドサイトーシスで吸収され、何等かの機能性を果たす可能性が示唆された。体内へ吸収されなかったレクチンは腸内細菌と接触するが、使用したピフィズス菌の増殖作用は確認されなかった。

糖鎖に対して特異性を示すレクチンは、ある特定のガン細胞に対して増殖抑制作用を示す性質を持つ。そこで、生マメから分画したレクチンのみならず、加熱したマメから分画したレクチンについてもガン細胞増殖抑制作用を測定した。生マメからのカラム分画はガン細胞増殖抑制を有意に示したマメが多く存在したが、加熱マメからのカラム分画は生マメからのカラム分画よりその増殖抑制作用が弱体化していた。しかしながら、増殖抑制作用は加熱したマメであっても保持されていた。

マメからのカラム分画(粗抽出画分及び、キントキマメでは生と加熱のカラム分画双方)に炎症性サイトカインの発現抑制作用が認められる画分が多く存在した。以上の結果から加熱したマメを食品として摂取した場合に、ガンを含めた炎症性疾患への効果を示す食薬としての機能性をインゲンマメ属のマメは有する可能性が示唆された。

参考文献: 1) Seifert et al. (2008), Cancer Letters. 264, 218-228, 2) Une et al. (2018), J. Food Sci., 83(3), 837-843. 3) Hamaguchi et al. (1977), J. Nutri. Vitaminol. 23, 525-534. 4) 林ら(1985), 日本家政誌, 36, 840-844. 5) Chan et al. (2012). PLOS ONE, 7, e38961

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村彩郁, 山本勇, 畦五月, 木村万里子
2. 発表標題 湿式・乾式加熱による豆類の赤血球凝集活性変化および粗精製レクチンのピフィズス菌増殖への影響
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畦五月, 野中紘士, 中田理恵子
2. 発表標題 加熱調理したサトイモからのレクチンの細胞に与える影響
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畦五月, 秋山純一, 野中紘士, 中田理恵子
2. 発表標題 加熱した白花豆からのレクチンの精製とその性質
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畦五月, 秋山純一, 野中紘士, 森秀治, 豊村隆男, 渡邊政博, 中田理恵子
2. 発表標題 加熱調理したサトイモレクチンが免疫機能に与える影響
3. 学会等名 日本家政学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畦 五月, 秋山純一
2. 発表標題 加熱調理したキントキマメレクチンの性質と各種ガン細胞への影響
3. 学会等名 日本調理科学会
4. 発表年 2019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	木村 万里子 (Kimura Maruko) (00351932)	神戸女子大学・家政学部・教授 (34511)	
研究分担者	中田 理恵子 (Nakata Rieko) (90198119)	奈良女子大学・生活環境科学系・准教授 (14602)	
研究分担者	秋山 純一 (Akiyama Jyunichi) (00309600)	吉備国際大学・保健医療福祉学部・准教授 (35308)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------