

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05934

研究課題名(和文)食品に含まれる様々なcisカロテノイドが持つ有用生物活性の解明

研究課題名(英文)Studies on pharmaceutical activities on cis carotenoids contained in foods.

研究代表者

新藤 一敏 (SHINDO, Kazutoshi)

日本女子大学・家政学部・教授

研究者番号：80350180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食品には様々なall transカロテノイドが含まれており、それらが有用な薬理活性を有することはこれまで多く報告されている。一方、我々は多くの場合食品を加熱して調理して摂取するが、その調理過程でall transカロテノイドの一部がcisカロテノイドに変化することも報告されている。しかし、それらがどのような調理プロセスで生じるか、またそれらがどのような薬理活性を有するかについては、これまでほとんど明らかとなっていない。今回cis lycopenes(研究A)、cis crocetin(研究B)について、上記点を本研究を通して初めて明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康への志向は年々強まっており、我々が日々摂取している成分に新しい薬理活性が見つかることにも大きな注目が集まっている。そこで、我々が日々摂取している食品成分の中に含まれており優れた薬理活性があることが期待されているにも関わらず、薬理活性が不明であった微量成分のうち、一般的にall trans体より吸収効率が高く特に優れた薬理活性が期待されるcisカロテノイドに注目し、これまで同系統化合物の薬理活性評価の壁となっていた詳細な化学構造解析、純品の量的確保、といった点を乗り越えてこれらの点を明らかにすることができた。従って本研究は大きな学術的意義、社会的意義を有していると自負している。

研究成果の概要(英文)：Study A (a research on tomato-related cis carotenoids):For 5Z, 9Z, 13Z-lycopene (hereinafter 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L, respectively), which are mono cis forms of all trans lycopene (hereinafter AE-L), these were reported to be produced by cooking tomatoes. There has been no reports on their pharmacological activities. We have established an efficient method for preparing cis lycopenes (5Z-L, 9Z-L, 13Z-L) by heating AE-L. Using these compounds, we evaluated the pharmacological activities (singlet oxygen scavenging activity, mouse 3T3-L1 differentiation-inducing activity) of them for the first time.
Study B (a research on saffron-related cis carotenoids):Crocetin, tricrossin, and crocin-3, which are the main red pigments contained in saffron. we conducted a simulated cooking experiment and found that crocetin, tricrossin, and crocin-3 change to crocetin and 13 cis-crocetin by strong cooking such as grilling. We also evaluated singlet oxygen quenching activities of these compounds for the first time.

研究分野：食品化学

キーワード：cis lycopenes cis crocetin cooking 102 quenching activity anti-diabetic activity HPLC NMR

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。

1. 研究開始当初の背景

さまざまな食品に含まれる all *trans* カロテノイドが、我々の健康に有用な優れた薬理活性を有することは、これまでに多くの報告がある。加熱等の調理によって、これら all *trans* カロテノイドの一部が *cis* (Z)化するとの報告もこれまでにいくつか報告はある。しかし、これら調理によって生じる *cis* カロテノイドは微量であり、かつ単離する技術が難しいため、これらの薬理活性については、これまで全くと言ってよいほど検討されてきていない。

2. 研究の目的

1. で示した背景を元に、本研究では、all *trans* カロテノイドを多く含む食材を利用原料として、*cis* カロテノイドを効率的に調製し単離する。all *trans* カロテノイド組換え遺伝子大腸菌を利用原料として *cis* カロテノイドを効率的に調製し単離する。の2つの方法で、これまで明らかになっていない *cis* カロテノイドの薬理活性を明らかにすることを旨とするを、科学研究費申請書で提案した。

3. 研究の方法

「研究の目的」で説明したように、当初、本研究は以下の、2つのアプローチで *cis* カロテノイドの調製を提案した。

all *trans* カロテノイドを多く含む食材を利用原料として、*cis* カロテノイドを効率的に調製し単離する。

本アプローチとしては以下の A, B 2つの研究を実施し、優れた研究を得た。

A トマト AE-L の加熱調理により生じる3つの *cis* 体 (5Z-L, 9Z-L, 13Z-L) を、AE-L の高圧処理による化学変化を用いて大量調製 分取 HPLC による各 Z 体の単離精製、構造決定 各 Z 体の生理活性検討、

B サフラン色素である apocarotenoid crocetin 配糖体類 (crocetin, tricrocetin 等) の加熱調理による変化を調べ、*cis* カロテノイドである 13Z-crocetin や crocetin が生成されることを HPLC 分析で解明した。またさらに、これら crocetin 類、crocetin 類の薬理活性はこれまでまったく報告されていなかったが、これらの一重項酸素消去活性について初めて明らかとした。

all *trans* カロテノイドの生合成遺伝子を組み込んだ組換え大腸菌を共同研究先の石川県立大三沢典彦教授より供与いただいていたので、これを培養 単離精製で純品の all *trans* カロテノイドを調製し、これに食品調理類似の化学反応を与えて生じる *cis* カロテノイドを探索 単離精製する提案も申請時に行っていた。の方法としては食品に含まれる希少カロテノイドである canthaxanthin, flisteleaxanthin の *cis* 体を探索する予定であった。しかし残念ながら種々の培地を用いて検討はしたが、これらの組換え大腸菌の希少カロテノイドの生産力価が低すぎたため (1 mg/L 以下)、このアプローチで *cis* カロテノイドを探索する研究の期間内での実施は断念した。

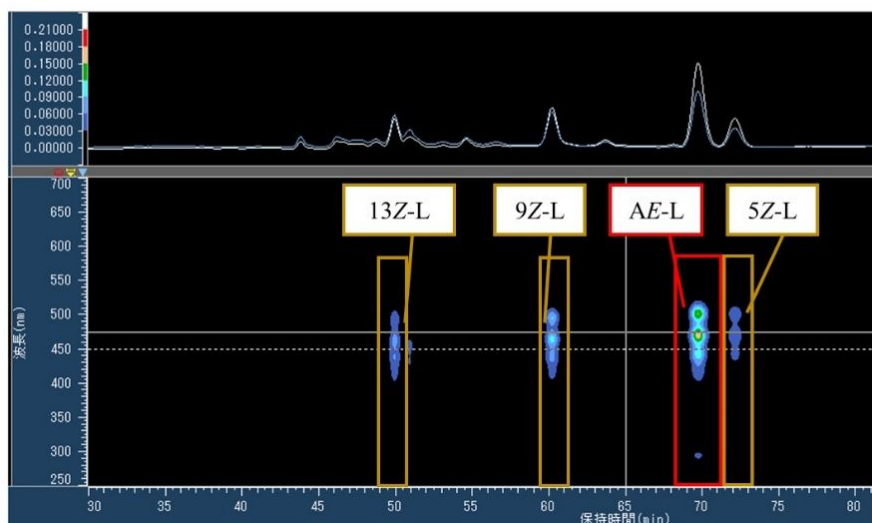
4. 研究成果

研究 A トマト関連の *cis* カロテノイドに関する研究

(1) 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L の調製

AE-L を大量に含むトマトペースト (KAGOME イタリア産) 425 g に CH₂Cl₂ 850 mL を加え、スターラーで 30 分攪拌した。AE-L を含む CH₂Cl₂ 層を 2 L 分液ロートに移し、水 500 mL を加えてよく振った (二相分配)。この CH₂Cl₂ を遮光下濃縮乾固したのち、室温で 5 mL の benzene を加えて AE-L を溶解し、これを 5 で 3 時間静置すると生じる AE-L の結晶 (500 mg) を回収した。AE-L (100 mg) を CH₂Cl₂ 100 mL に溶解し、加圧容器につめた。溶媒上の空気を N₂ で置換した後容器を密閉し 80 のウォーターバスに 30 分間静置した。30 分後の各 *cis* 体の調製状況を Figure 1 に HPLC 分析図として示した。

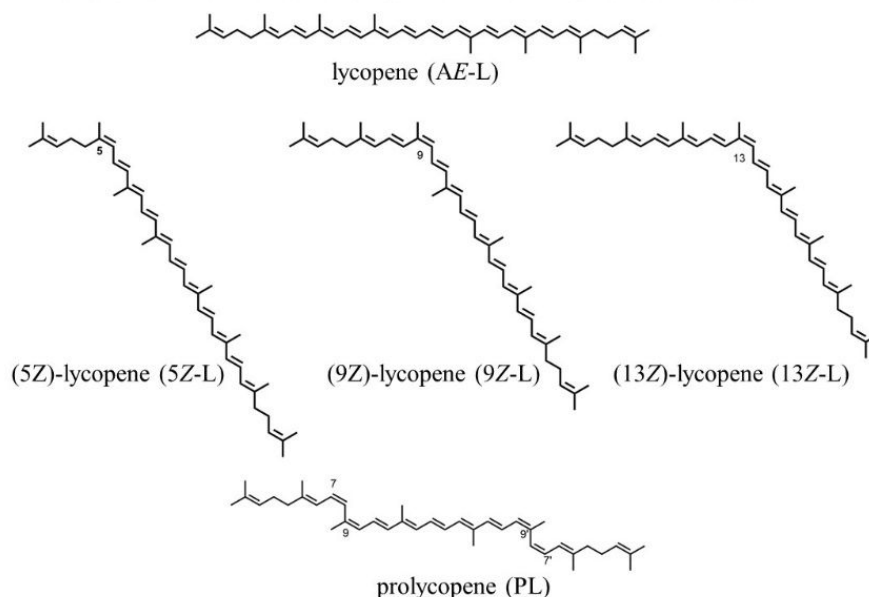
Figure 1. Elution of 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L, and AE-L in preparative HPLC.



5Z-L: (5Z)-lycopene, 9Z-L: (9Z)-lycopene, 13Z-L (13Z)-lycopene, AE-L: all *trans* lycopene

これら各 *cis* 体を分取 HPLC (カラム : Nucleosil 300-5 (10 X 250 mm) 直列 3 本、溶媒 n-hexane:N,N-diisopropylethylamine (100:0.1)、流速 2.0 mL/min) により単離精製し、それぞれの化学構造は各種 NMR 分析により行った。収量は 5Z-L 1.6 mg, 9Z-L 2.0 mg, 13Z-L 1.3 mg であった。各 *cis* lycopene の化学構造を Figure 2 に示す。

Figure 2. Chemical structures of lycopene (AE-L), (5Z)-lycopene (5Z-L), (9Z)-lycopene (9Z-L), (13Z)-lycopene (13Z-L), and prolycopene (PL).



(2) タンジェリン種トマトからの PL の調製

タンジェリン種トマトである桃太郎ゴールド 1 kg をミキサーで攪拌処理してペースト状とした。ここに acetone 800 mL を加えて攪拌し、脱水された沈殿を集めた。沈殿に CH₂Cl₂ 500 mL を加えて含まれる PL を抽出した。CH₂Cl₂ を 50 mL 程度まで濃縮したのちに、分液ロート中の *n*-hexane 300 mL/90% MeOH 300 mL に加えて良く攪拌して二相分配した。PL の含まれる *n*-hexane 層を濃縮乾固したのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (FL60D) に供し、*n*-hexane-CH₂Cl₂ (20:1) の溶媒で展開して PL を純品として得た (2.5 mg)。得られた PL は ¹H NMR, ¹³C NMR スペクトルを測定して化学構造を確認した。PL の化学構造も Fig. 2 に示した。

(3) 一重項酸素消去活性評価

AE-L は優れた一重項酸素消去活性を有することが報告されているが、今回大量に調製できた 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L の一重項酸素消去活性についてはこれまで全く報告がなかった。そこで得られた *cis* lycopenes の一重項酸素消去活性を、メチレンブルーへの光照射によって生じる一重項酸素によるリノール酸の酸化を、これらの物質がどの程度の濃度で抑制するかという実験を用いて評価した。結果を Table 1 に示す。

Table 1. ¹O₂ quenching activities of tested compounds.

compound	all <i>E</i> -L	5Z-L	9Z-L	13Z-L	prolycopene
IC ₅₀ (μM)	4.4 ± 0.36	4.0 ± 1.44	5.3 ± 1.08	6.9 ± 1.67	8.7 ± 0.34

5Z-L: (5Z)-lycopene, 9Z-L: (9Z)-lycopene, 13Z-L (13Z)-lycopene, AE-L: all trans lycopene

PL は AE-L の半分程度であったが、5Z-L, 9Z-L, 13Z-L については AE-L とほぼ同程度の一重項酸素消去活性を有することを初めて明らかにすることができた。

(4) マウス 3T3-L1 細胞分化誘導活性評価

AE-L がマウス 3T3-L1 細胞分化誘導活性 (3T3-L1 細胞に PPAR-γ agonist を作用させると脂肪細胞へと分化する、本分化に伴い細胞外のグルコースを取り込む性質を有する脂肪細胞となるため、生体では血糖値を下げる作用を有することが期待される) を有することは既に報告があった。しかし 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L, PL に同活性があるかについては全く報告が無い。そこで分化を oil red 染色で観測する実験手法を用いて、得られた 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L, PL の 3T3-L1 分化誘導活性を調べた。結果を Figure 3 に示した。

Figure 3. Mouse 3T3-L1 cells differentiation activities of AE-L, 5Z-L, 9Z-L, 13Z-L, and PL.

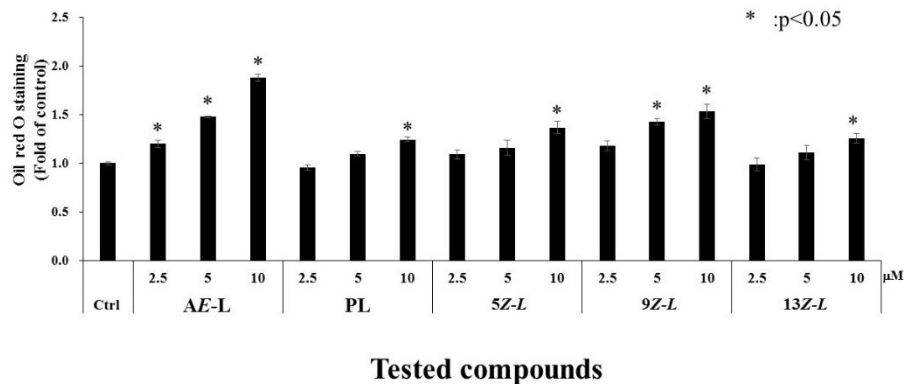


Figure 3 に示したように、若干活性は AE-L より低いものの、5Z-L, 9Z-L, 13Z-L, PL すべてでマウス 3T3-L1 細胞分化誘導活性が観測されることが始めて明らかとなった。

研究 B サフラン関連の cis カロテノイドに関する研究の概要

(1) サフラン色素類の加熱調理による変化の検討

80 mg 分のサフランを未加熱(unheated)(Figure 4 A)、茹で(boiled) (Figure 4 B) (50 mL の沸騰水で 20 分)、炒め(grilled) (Figure 4 C) (7.5 mL オリーブオイルを加えて 180 °C、5 分加熱) したものを CH₂Cl₂-MeOH (1:1), MeOH, 80% MeOH で順次抽出して合一したものを 5 mL MeOH に再溶解して DAD-HPLC 分析した。またさらに実際の調理に非常に近い形で、80 mg のサフランを米とともに 20 分ゆでたものの溶媒抽出物(Figure 4 D)、80 mg のサフランを米と共に 180 °C で 5 分加熱したものの溶媒抽出物(Figure 4 E)についても同様に DAD-HPLC で分析した。これらの結果を Figure 4 に示す。

Fig. 4. HPLC chromatograms of apocarotenoids extracted from the dried pistils of saffron and their cooked materials. A: control (unheated), B: boiled, C: grilled, D: boiled dish, E: grilled dish.

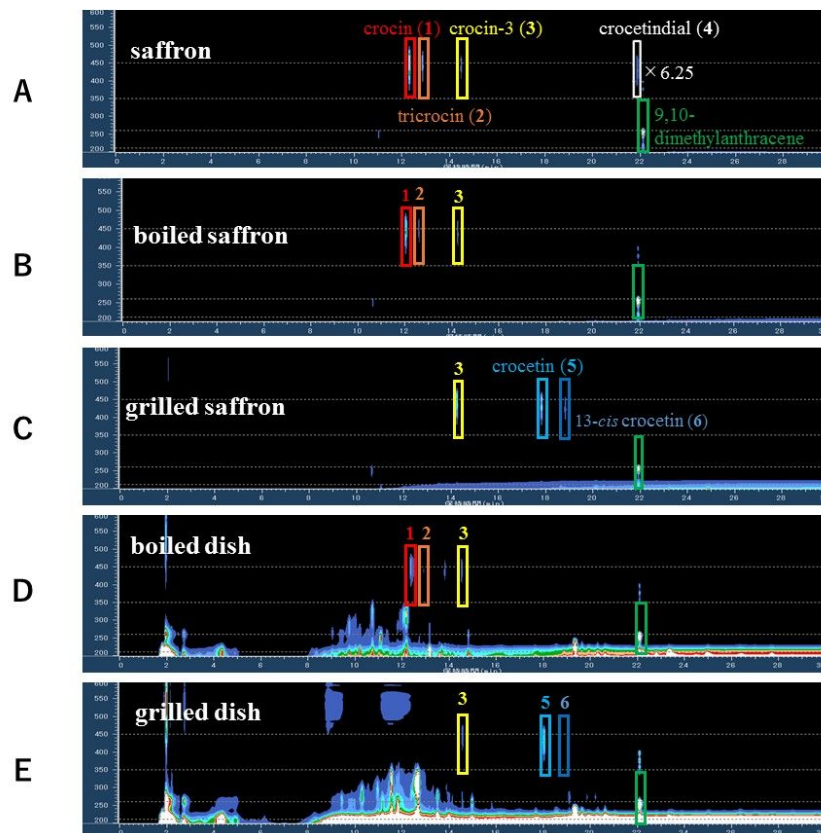
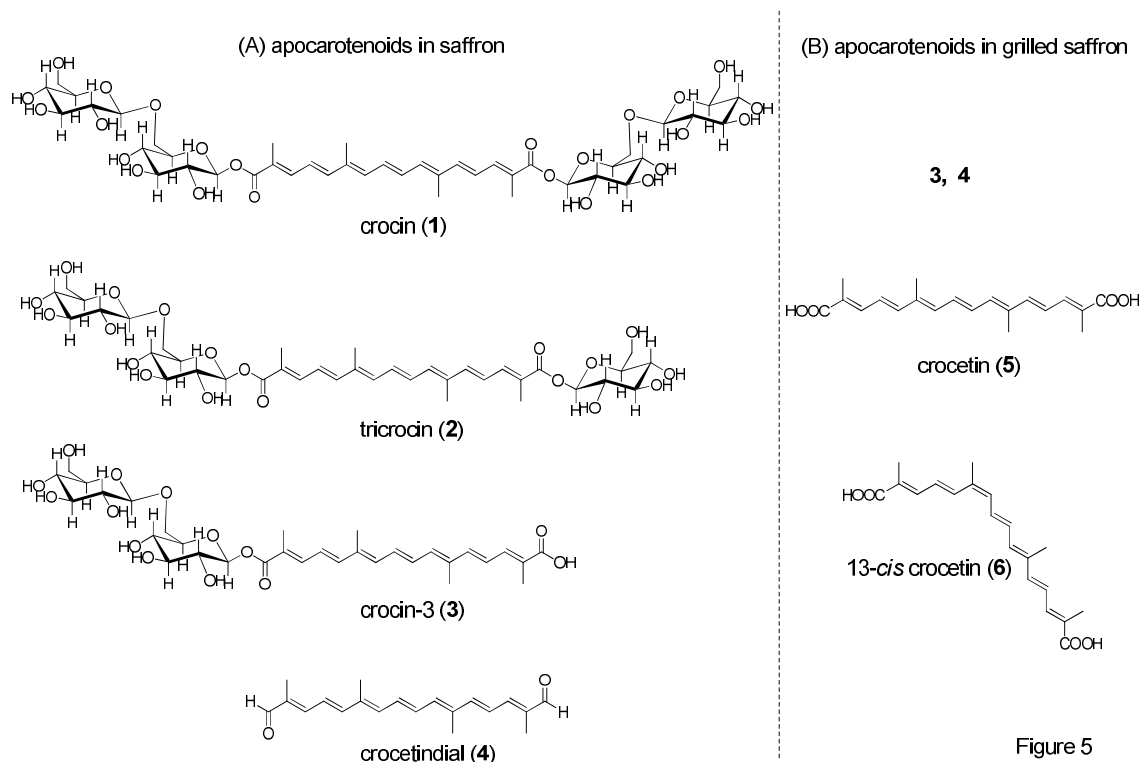


Figure 4 に示した DAD-HPLC で検出された各カロテノイドについては、それぞれサフランあるいはサフラン加熱物を材料として、これらから各種クロマトグラフィーを用いて単離精製し、HR-ESI-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR スペクトルを測定して構造を同定した。同定した各化合物の構造を

Figure 5 に示す。



本分析によって、サフラン中の apocarotenoid 配糖体である crocin、tricrocin、crocin-3 は弱い加熱調理である「茹で」では変化はほとんど受けないものの、強い加熱調理である「炒め」では糖の加水分解、carotenoid 部分の *cis* 化 (13Z化) が起きることを初めて明らかとすることができた。

(2) Crocin, tricrocin, crocin-3, crocetindial, crocetin, 13-*cis* crocetin の一重項酸素消去活性

サフランに含まれる apocarotenoid 類についてはその薬理活性はこれまで全く報告が無かったので、これらの一重項酸素消去活性を測定した。結果を Table 2 に示す。

Table 2. $^1\text{O}_2$ quenching activities of tested compounds.

apocarotenoid	IC ₅₀ (μM)
crocin (1)	48±0.4
tricrocin (2)	46±3.5
crocin-3 (3)	64±9.1
crocetindial (4)	24±1.9
crocetin (5)	54±7.4
13- <i>cis</i> crocetin (6)	54±8.5

試験したいずれの化合物も同程度の穏やかな一重項酸素消去活性を有することを初めて明らかにすることができた。

< 引用文献 >

Hirayama O, Nakamura K, Hamada S, Kobayashi Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* (1994) 29:149–50.

Ilavenil, S., Kim, D.H., Arasu, M.V., Srigopalram, S., Sivanesan, R., Choi, K.C., 2015. Phenyllactic acid from *Lactobacillus plantarum* promotes adipogenic activity in 3T3-L1 adipocyte via up-regulation of PPAR-γ2. *Molecules* 20, 15359–15373.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakemi Yuka, Sato Kana, Hara Kurumi, Honda Masaki, Shindo Kazutoshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Biological Activities of <i>Z</i> -Lycopenes Contained in Food	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1509 ~ 1516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess20163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 酒見裕香、佐藤加奈、原久瑠美、本田真己、新藤一敏
2. 発表標題 食品に含まれるcis lycopenesの生理活性に関する研究
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------