

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05941

研究課題名（和文）配糖体化合物など天然素材由来機能成分の高効率精製法開発ならびに健康機能性の解析

研究課題名（英文）Development of efficient purification methods and analyses of health-promoting functions for natural functional ingredients.

研究代表者

高橋 正和（Takahashi, Masakazu）

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：80315837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：甘草グリチルリチン（GL）は、抗炎症作用を示すトリテルペノイド配糖体である。甘草粉末よりメタノール抽出物（GL純度8.5%）を調製し、ホウ砂水溶液と希塩酸で処理して高極性不純物を除き（純度31%）、次に低極性不純物をC18固相抽出で除いた（純度40%）後、逆相分取HPLCで完全精製を達成した。しかし、固相抽出で回収率が低下したため、低極性不純物の少ない希アンモニア水抽出物（純度6.7%）を調製し、ホウ砂水溶液と希塩酸で処理することで部分精製標品（純度・回収率70%）を簡便に得ることに成功した。また、-オリザノール（OZ）の部分精製条件を検討し、亜鉛トランスポーター増強活性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然素材から生理活性化合物を単離する際には、多段階カラムクロマトが多用されるが、その多くは莫大な時間を要すると共に収率が低い。このため配糖体などの天然化合物の精製標品には、高価なものや市販入手困難なものも多い。そこで本研究では、開発してきたホウ砂や水-有機混合溶媒を用いた簡便な選択的沈殿法等を駆使して、甘草に含まれるグリチルリチン（GL）（トリテルペノイド配糖体）の簡便精製法開発を試み、カラムクロマトグラフィーを使わずに、純度70%の標品を高い回収率（70%）で取得する方法を開発した。簡便精製法の開発は、希少性の高い天然生理活性化合物を生理活性スクリーニングに供することを可能にする意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Glycyrrhizin (GL) is a triterpenoid saponin with anti-inflammatory activity. Methanol extract of the licorice powder (GL: 8.5% pure) was solubilized in the borax solution and precipitated by dil. HCl to remove the high polar impurities. Then, the fraction (GL: 31% pure) was treated with Sep-Pak C18 column to remove the low polar impurities (GL: 40% purity), and finally purified by preparative RP-HPLC. However, the total recovery rate was reduced to ca.10% of the initial extract by the column purifications. Then, the ammonia water extract of the licorice (GL: 6.7% purity) was prepared to reduce the low polar impurities. Then, the fraction was solubilized in the borax solution and precipitated by dil. HCl to remove the high polar impurities, resulting in the final fraction (GL: 70% purity, 70% recovery) without columns. In addition, purification method concerning gamma-oryzanol (OZ) was achieved by solubility-based purification, and zinc transporter ZIP4-potentiating activity was found.

研究分野：食品科学

キーワード：溶解度分別法 グリチルリチン ホウ酸ナトリウム -オリザノール アセトニトリル 亜鉛トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

必須金属元素である亜鉛には、タンパク質構造因子(例: zinc finger protein)や酵素補因子(例: 金属プロテアーゼ)など多様な生理機能があり、偏食等による亜鉛欠乏は味覚障害、皮膚疾患、免疫不全などの症状を引き起こす。発症予防には食事からの亜鉛摂取が重要であるが、腸管の亜鉛吸収効率は約30%と低い。そこで亜鉛吸収に必須なトランスポーター(ZIP4)に対して発現増強活性を示す食因子を探索した結果、大豆抽出物に顕著な活性が見いだされた。我々はその有効成分を単離し、各種機器分析にて大豆サポニンBb(以下Bb)と同定するとともに、BbによるZIP4増加が細胞内亜鉛濃度を高めることを確認した(Biochem. J., 472, 183-193, 2015)(図1, 2)。このようなZIP4発現増強活性を示す食由来因子は亜鉛吸収効率を向上させ、亜鉛欠乏症の予防に役立つと期待されるが、そのような機能成分はBbが世界初の事例であった。しかし、他の食成分にも類似の化合物の存在があると示唆する知見を我々は得ていた。

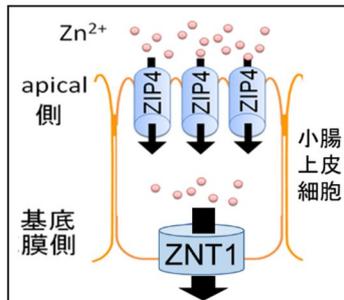


図1. 亜鉛トランスポーターZIP4とZNT1の機能

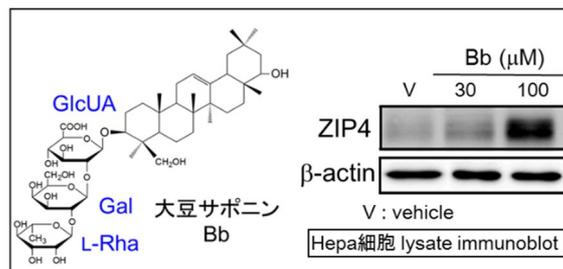


図2. Bbの構造(左)とZIP4発現増強活性(右)

ところで、我々はBbの活性には糖鎖構造が重要であり、糖鎖を切断したアグリコンには活性がないことを見出していた。ZIP4は主に小腸上部(空腸)に発現するため、大豆由来のBb等は腸内細菌によって糖鎖切断を受けずに小腸上皮に作用すると考えられた。

一方、食素材を含む天然素材から生理活性化合物を単離するには、多段階抽出法や多段階カラムクロマト法が多用されるが、その多くは莫大な時間を要すると共に収率が低い。我々は、高価な精製システムの導入を必要としない簡便迅速な精製法の開発に取り組む、水-有機混合溶媒やホウ酸ナトリウム(ホウ砂)水溶液を用いた選択的沈殿法を利用して、B型大豆サポニン類を選択的かつ簡便迅速に得られる手法を開発した。これらの手法によって大幅な時間短縮(数週間以上から数時間~数日へ)が可能となり、さらに糖鎖構造の異なるB型大豆サポニン類を簡便かつ選択的に単離することにも成功した(図3)(Anal. Sci., 31, 85-89, 2015; Anal. Sci., 35, 935-937, 2019)。とりわけホウ砂を用いた方法は、cis-diol 構造を有する配糖体の選択的単離に有効であり、精製が困難な天然物配糖体類の精製への応用も期待された。

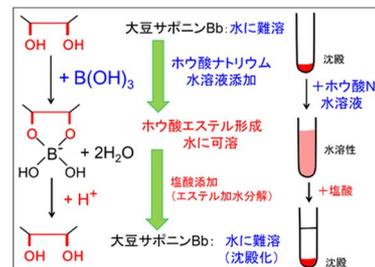


図3. ホウ酸ナトリウムによる選択的沈殿の原理

以上の背景を基に、本研究では 次項「2. 研究の目的」に掲げる各目的に取り組んだ。

2. 研究の目的

(1) 新たな ZIP4 発現増強成分の探索・単離・同定

農産物・食成分を中心に、新たな活性成分の探索と単離同定を目指した。

(2) 選択的沈殿法による効率的精製法の開発

革新的な精製法の開発は、未利用天然資源の有効活用や、希少で解析が遅れている天然生理活性化合物の機能解析を可能にする技術となる。本研究では、水-有機混合溶媒やホウ砂水溶液を利用した選択的沈殿法を利用し、簡便・迅速かつ安価で高効率な大量精製法の開発を狙うとともに、前項(1)で見出された ZIP4 発現増強機能成分の単離・機能解析につなげることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 新たな ZIP4 発現増強成分の探索・単離・同定

各種農産物のアルコール抽出物を Hepa 細胞株のアッセイ系に供して評価した。細胞 lysate を調製して抗 ZIP4 モノクローナル抗体を用いた Western 解析から ZIP4 発現増強効果の評価した(Biochem. J., 2015)。

(2) 新たな簡便精製法の開発 : サイコサポニンの精製

大豆サポニンと同様にトリテルペノイドサポニンの一種である、サイコサポニンの簡便精製法について検討した。まずサイコ(柴胡)粉末から種々の溶媒による抽出を検討し、水-有機混合溶媒による溶解度分別法による簡便精製法を目指した。

(3) 新たな精製法の開発 : ホウ砂を利用したグリチルリチン精製

グリチルリチン (GL) は甘草に含まれる天然配糖体であり、甘味料として有用なほか抗炎症作用など多様な活性が報告されている。GL の糖鎖には、大豆サポニンと同様にグルクロン酸残基が含まれているが、大豆サポニン Bb は 2,3-cis diol 構造を有するのに対して、GA は 2,4-cis diol 構造であるなど糖鎖構造が異なる点も多いが、ホウ砂法を用いて精製法を検討した (図 4)。

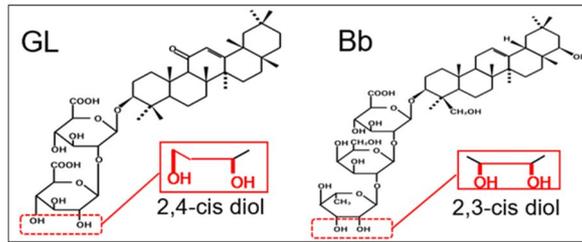


図4. GL と Bb の比較

市販試薬の GL を標準化合物とし、精製標品に含まれる GL 量を逆相 HPLC 解析で確定した。甘草粉末抽出物に含まれる GL 含量を 100% として精製回収率を算出した。また各標品の GL 純度は、GL 含量を各標品の乾燥重量で割って求めた。

(4) 新たな精製法の開発 : オリザノール精製

玄米ヌカ成分に多い生理活性成分 γ -オリザノール (OZ), 植物ステロールやその前駆体のフェラ酸エステルであり、6 種類以上化合物の混合物である。その中でも主要成分は 4 種類以上含まれている (図 5)。

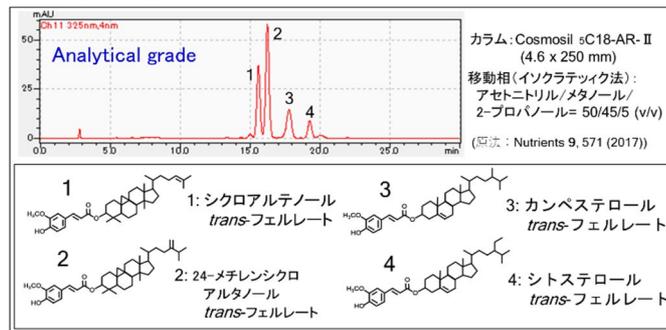


図5. OZの主要分子種と逆相HPLC分析結果

玄米ヌカ由来のOZは、混合物であり、主要な4分子種以外にもマイナーな分子種がある。

OZ は脂質異常症改善作用を示す健康機能成分であるが、分子種ごとの機能解析は進んでいない。

そこで分子種ごとの精製に関して、溶解度分別法により検討した。

4. 研究成果

(1) 新たな ZIP4 発現増強成分の探索・単離・同定

各種農産物の 70% エタノール抽出物について ZIP4 発現増強活性を調べたところ、ソバ殻抽出物に強い活性を見出した。しかし C18 逆相 HPLC (水-アセトニトリル溶出) 分画したところ、活性ピークは広い範囲に広がって検出されることが示された。また、ソバ殻にはフェノール酸類やフラボノイド化合物、プロアントシアニジンポリマー (縮合性タンニン) が含まれていることから、濃縮乾固時に重合物を形成しやすく、単離同定は困難と考えられた。

一方、玄米ヌカ成分である γ -オリザノール (OZ) に ZIP4 発現増強活性が見いだされた (図 6)。

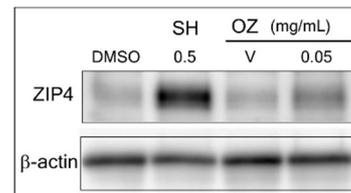


図6. ZIP4発現増強活性の比較
SH(ソイヘルス): 粗精製大豆サポニン

(2) 新たな精製法の検討 : サイコサポニンの精製

大豆サポニンと同様にトリテルペノイドサポニンである、サイコサポニンの精製法について検討した。まずサイコ (柴胡) 粉末から種々の溶媒による抽出を検討した結果、メタノールがもっとも高い抽出効率を示した。サイコサポニンについては、ホウ砂法よりも水-有機混合溶媒による溶解度分別が有効であったため、様々な濃度のアセトン水溶液を用いて詳しく検討した結果、100% アセトンによる処理がサイコサポニンの効率的精製に適していることが示された。また LC-MS による質量解析と標準化合物の溶出時間との比較から、おもにサイコサポニン a, c を含む標品が単離できることが示された。

(3) 新たな精製法の検討 : ホウ砂を利用したグリチルリチン精製

甘草の根に含まれるトリテルペノイド配糖体、グリチルリチン (GL) は、抗炎症作用や抗ウイルス作用など多様な生理活性を示し、漢方薬成分として利用価値が高い。GL は水への溶解性は低いがホウ砂水溶液には容易に溶解し、さらに酸性にすると再沈殿する。これを利用して甘草粉末メタノール抽出物 (画分 A; GL 純度 8.5%) をホウ砂水溶液と希塩酸で処理し、高極性不純物を除いて画分 B (GL 純度 31%, 回収率 94%) を得た。次に画分 B に含まれる低極性不純物を除去するため、Sep-Pak C18 固相抽出にて画分 C (GL 純度 40%, 回収率 35%) を調製後、分取逆相 HPLC にて画分 D (純度 > 90%, 回収率 10%) への精製を達成した。しかし固相抽出とカラム精製は回収率を 10% に低下させるため、甘草粉末の抽出段階で低極性不純物を減らすべく、アンモニア水抽出物 (画分 ; GL 純度 6.7%) を検討した。画分 は低極性不純物が少なく、さらにホウ砂水溶液と希塩酸処理で高極性不純物を除去することにより、カラムを使わずに画分 (GL 純度 70%, 回収率 70%) を簡便に得ることに成功した。

(4) 新たな精製法の開発 : オリザノール精製

OZ は植物ステロールやその前駆体のフェルラ酸エステルであり、主要 4 分子種以上からなる混合物である (図 4 : HPLC 溶出時間の早いものから oz1 ~ 4)。我々は主要 4 成分 (oz1 ~ 4) を含む米ヌカ由来 OZ 標品について、アセトニトリル(AN)への溶解性を検討した。30 mg の OZ 標品を 10 mL の AN に混合すると約 70%のみ溶解して無色溶液を生じ、上澄みに水酸化テトラブチルアンモニウムを加えるとフェルラ酸のプロトン解離に伴って黄色に変化した。上澄みに純水を加えて回収した沈殿は、oz1 含量が増加し oz3 と oz4 は顕著に減少していた。この操作を繰返して oz1 と oz2 のみの OZ 試料の調製に成功した。

(5) ZIP4 発現増強活性の確認

前述の通り大豆サポニンが亜鉛トランスポーターZIP4 発現増強活性を示すことから、ZIP4 発現量と細胞内の亜鉛調節量の調節機構について解析した。また初期分泌経路における酵素分子の亜鉛メタレーションと活性化プロセスにおいて、特定の亜鉛トランスポーターが必須な生理機能を示す事例について解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Shino Nagamatsu, Yukina Nishito, Hana Yuasa, Nao Yamamoto, Taiki Komori, Takuya Suzuki, Hiroyuki Yasui, Taiho Kambe | 4. 巻 12(1) |
| 2. 論文標題 Sophisticated expression responses of ZNT1 and MT in response to changes in the expression of ZIPs | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 7334 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10925-2 | 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 - |
| 1. 著者名 高橋正和、三浦孝太郎 | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 お米の機能性・利用性に関する研究開発 福井県産米の可能性をひろげる | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 FOOD Style 21 | 6. 最初と最後の頁 23-26 |
| 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 無 |
| 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 Taiho Kambe, Takumi Wagatsuma | 4. 巻 4(4) |
| 2. 論文標題 Metalation and activation of Zn ²⁺ enzymes via early secretory pathway-resident ZNT proteins | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biophys Rev. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0176048 | 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 神戸大朋 | 4. 巻 76 |
| 2. 論文標題 亜鉛トランスポーターの解析から亜鉛の生理機能を探る | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 日本栄養・食糧学会誌 | 6. 最初と最後の頁 207-216 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4327/jsnfs.76.207 | 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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋正和, 山内遥菜, 大川楓佳, 本多峻資, 神戸大朋, 片野 肇 |
| 2. 発表標題 農産物由来標品を用いたZIP4トランスポーター発現増強成分の探索ならびに活性成分精製の検討 |
| 3. 学会等名 日本食品科学工学会第69回大会（2022年度大会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 本多峻資、定永麻里、片野 肇、高橋正和 |
| 2. 発表標題 溶解度分別法に基づくグリチルリチン簡便精製法の検討 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（広島大会） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masakazu Takahashi, Haruna Yamauchi, Fuka Okawa, Masatoshi Sugimoto, Yoshito Kubo, Taiho Kambe, Hajime Katano |
| 2. 発表標題 Identification of ZIP4 Protein Enhancing Compounds in Agricultural Food Resources |
| 3. 学会等名 The 33rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (Fuchu) (JAACT2020) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋 正和、上田 奈穂、片野 肇 |
| 2. 発表標題 溶解度分別法に基づくサイコサポニン単離法の検討 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本多峻資, 西野蛭汰, 福田悠作, 片野 肇, 高橋正和 |
| 2. 発表標題 溶解度分別法に基づくグリチルリチンの簡便精製法の検討 |
| 3. 学会等名 日本食品科学工学会 第70回大会 (京都) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本多峻資, 西野蛭汰, 福田悠作, 片野 肇, 高橋正和 |
| 2. 発表標題 溶解度分別法に基づくグリチルリチンの簡便精製法の開発 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 (三重) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 本多 峻資、西野蛭汰、福田悠作、片野 肇、高橋正和 |
| 2. 発表標題 溶解度分別法を利用したグリチルリチン精製法の開発 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 (東京) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上田 陽菜, 高橋 正和, 西野 蛭汰, 福田 悠作, 植松 宏平, 片野 肇 |
| 2. 発表標題 -オリザノールのアセトニトリルへの溶解性 |
| 3. 学会等名 2023年度日本化学会近畿支部 北陸地区講演会・研究発表会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Taiho Kambe, Masakazu Takahashi | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Elsevier. | 5. 総ページ数 10 |
| 3. 書名 “Biological functions of soyasaponins: The potential use to improve zinc nutrition” in “Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention” (2nd edition)(Victor R Preedy & Ronald Ross Watson Eds.) | |

〔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 | 片野 肇 (Katano Hajime) (50264685) | 福井県立大学・生物資源学部・教授 (23401) | |
| 研究分担者 | 神戸 大朋 (Kambe Taiho) (90303875) | 京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301) | |

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 |
|---------|---------|