

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15483

研究課題名(和文) 化学プローブを利用したプロアントシアニジンの高感度分析法に関する研究

研究課題名(英文) Study on high-sensitivity analysis of proanthocyanidins using chemical probes

研究代表者

岩岡 裕二 (Iwaoka, Yuji)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：10835416

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)：プロアントシアニジン(PAC)の血中における高感度分析を行うため、PAC-血中タンパク質複合体に着目して電気泳動法による分析を行ったところ、アガロースゲル電気泳動後にニトロブルーテトラゾリウム(NBT)染色する事で、ピーナッツ種皮由来のPAC6量体とラット血中タンパク質の複合体を検出した。また、本法によりPACの単量体である(+)-Catechinを経口投与したラットの血漿中に(+)-Catechin由来とされる成分のバンドを検出した。以上から、PAC-血中タンパク質に着目したPACの新たな高感度検出法の可能性を示す事が出来た。本分析法によりPACの体内動態が明らかとなる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PACはカカオやリンゴなどの食品に含まれ、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などの多様な生物活性を有する成分であると考えられている。カカオやリンゴには高分子のPACオリゴマーが含まれており、これらが生体内において活性へ関与する可能性が示されているが、一方でLC-MSなどを使用した高感度分析による検出感度が極めて低いため、その体内動態は未だ不明な点が多い。未解明なPACオリゴマーの体内動態を明らかにすることで、PACオリゴマーの作用メカニズムの解明への手がかりになると同時に、PACオリゴマーを多く含む食品素材の栄養的価値を示す事ができるため、その学術的意義、社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：We carried out electrophoresis under various conditions focusing on proanthocyanidin (PAC)-blood protein complex to analyze of PAC in blood with high sensitivity. PAC hexamer isolated from peanuts skin-rat blood protein complex could be detected by agarose gel electrophoresis with nitro blue tetrazolium (NBT) staining. The component related to (+)-catechin as a monomer of PAC is possible to be detected by our method in rat plasma after oral administration of (+)-catechin. These results suggested that our method can be available for high-sensitivity analysis method of PAC in blood after oral administration of PAC. It is expected that the pharmacokinetics of PAC is revealed by this method.

研究分野：食品化学，分析化学，天然物化学

キーワード：高感度検出 プロアントシアニジン 化学プローブ プロアントシアニジン-血中タンパク質複合体 アガロースゲル電気泳動 ニトロブルーテトラゾリウム染色

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

ポリフェノール的一种であるタンニンは抗酸化作用や抗動脈硬化作用などの機能が近年報告されているが、一方でその生体利用性については未解明な点が多い。タンニン的一种であるプロアントシアニジン(PAC, 図 1)はリンゴやカカオなどの食品に含まれ、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用など多様な生物活性を有することから、健康維持に有用な機能性成分の一つとして注目されている。特に分子量の大きな PAC オリゴマーやポリマーは極めて難吸収性であるため、大腸の腸内細菌による低分子の代謝物が生体内に吸収されると考えられている(図 1B-①)。一方で、PAC は未代謝の状態のまま体内へ吸収される可能性も考えられる(図 1B-②)。これまでにリンゴ由来の PAC オリゴマーを経口投与後のラット血中から PAC5 量体が検出され、また、ヒト結腸がん由来である Caco-2 細胞において、PAC3 量体が細胞内へ透過することが報告されている。また、PAC の生物活性として、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 に対し、Epicatechin をユニットとする 5 量体以上の PAC オリゴマーが強い抗腫瘍活性を示すことが報告されていることから、申請者は PAC の機能性を論じる上で、未代謝の PAC オリゴマーの吸収性や活性は無視できないと考えた。

PAC オリゴマーの活性メカニズムについては不明な点が多い。その主たる理由として、HPLC-MS 分析などの高感度分析において、PAC オリゴマーは分析カラムでの分離が困難である上、MS における検出感度が極めて低い化合物であり、その生体吸収性を明らかとする有効的な分析法が確立されていない点が挙げられる。従って、PAC オリゴマーを高感度で検出可能な新たな分析法の開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究ではまず、種々の PAC オリゴマーの検出感度の向上が期待できる化学プローブを導入し、MS や HPLC による分析を行う。また、PAC オリゴマーはタンパク質と結合しやすい性質を有する点に着目し、各種 PAC と主要な血中タンパク質であるアルブミンやラット血漿中タンパク質の複合体溶液を調製し、電気泳動による分析を行う。更に電気泳動により(+)-Catechin 経口投与後のラット血漿成分の分析を行う。以上の研究により、PAC オリゴマーの生体利用性を明らかにしうる高感度分析法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ①PAC に対する化学プローブ化の検討

PAC の化学プローブ化を行うためには PAC の化学構造に特異的に反応するプローブの選択が必要であった。そこで、PAC の A 環 8 位への選択的な反応性が知られている、4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC)を化学プローブの候補として挙げた。DMAC は酸性条件において、PAC と反応し青色を呈することから、PAC の比色定量法における呈色試薬として使用されている。DMAC は A 環 8 位へ結合することにより分子内の窒素原子上に正電荷が生じることが予想されるため、MS 分析におけるイオン化効率の向上による検出感度の向上を期待した。そこで、(+)-Catechin や PAC2 量体である Procyanidin A1、Procyanidin B3 および当研究室において単離したピーナツ種皮由来 PAC6 量体と DMAC をメタノール-HCl 混合溶媒中で反応させ、生じた反応物を ESI-TOF-MS 分析により確認した。

#### ②電気泳動による PAC-血中タンパク質複合体の分析

PAC などのタンニンタンパク質と結合し、容易に複合体を生じる性質を有することから、生体内で吸収され血中に移行した PAC が血中タンパク質と複合体化していることが予想される。従って、PAC-血中タンパク質の複合体を高感度で検出することができれば PAC の新たな検出法として利用できるのではないかと考えた。まず、ヒトの血中の主要タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)をタンパク質のモデルとし、各種 PAC と反応(pH 7, 37°C, 24 h)させた。また、アルブミンの代わりにラット血漿を各種 PAC と HSA と同条件で反応させた。これらの反応液に対し、SDS-PAGE, Native PAGE およびアガロースゲル電気泳動を行い、電気泳動後のゲルを CBB 染色およびニトロブルーテトラゾリウム(NBT)染色を行い、複合体のバンド検出の確認およびバンドパターンの比較を行った。

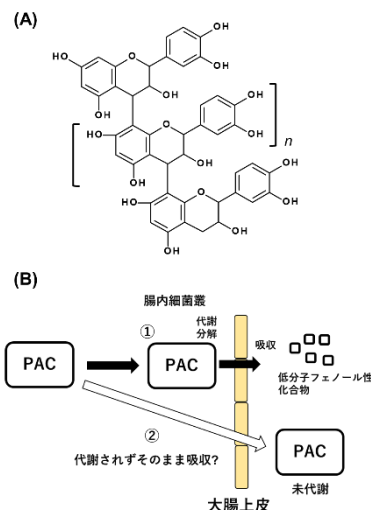


図1. プロアントシアニジン(PAC)の化学構造および予想されるPACの吸収機構  
(A) PACの化学構造、(B) PACの吸収機構の予想

### ③アガロースゲル電気泳動による(+)-Catechin 経口投与後のラット血漿成分の分析

PAC の血中移行性を検討する前の予備検討として、PAC のモノマーである(+)-Catechin を SD ラットに対して、50 mg もしくは 100 mg 経口投与し、6 時間後に採血した血液から調製した血漿について各群 3 匹分を混和し、アガロースゲル電気泳動により分析した。

## 4. 研究成果

### ①PAC への DMAC の導入条件の検討

PAC への特異的な反応が期待される DMAC をプローブ試薬として、(+)-Catechin、Procyanidin A1、Procyanidin B3 およびピーナツ種皮由来 PAC6 量体と反応させ、ESI-TOF-MS 分析を行ったところ、(+)-Catechin、Procyanidin A1 および Procyanidin B3 について、それぞれ DMAC 付加体と予想される分子量のピークを確認した(図 2)。一方で、ピーナツ種皮由来 PAC6 量体については DMAC 付加体と予想されるピークは確認できなかった。以上から、2 量体までの PAC であれば DMAC によるプローブ化が可能である事が示唆された。しかし、食品中に含まれる PAC オリゴマーは数十量体以上の高分子のものも報告されており、DMAC によるプローブ化では適応可能な PAC の種類が限定されると考えられた。また、ピーナツ種皮由来 PAC6 量体に対し、蛍光性のプローブ化試薬である 5-(4,6-Dichlorotriazinyl)aminofluorescein の導入も検討したが、プローブ化が困難であった。

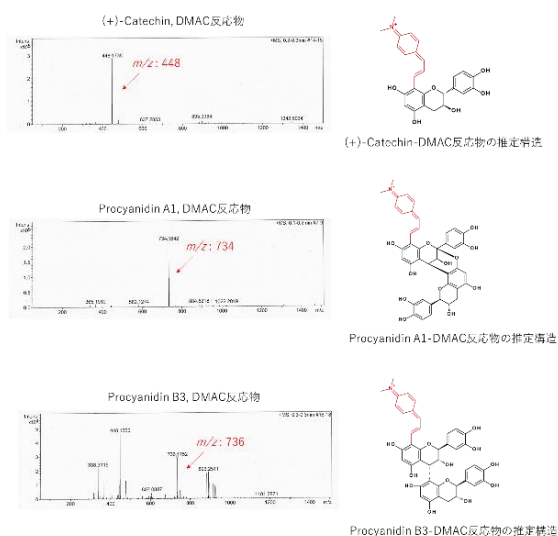


図2. PACとDMACの反応物のESI-TOF-MS分析の結果

### ②電気泳動による PAC-血中タンパク質複合体の分析

①から、現状ではピーナツ種皮由来 PAC6 量体等の PAC オリゴマーへのプローブ化は困難であると考えた。そこで、血中に移行した PAC が血中タンパク質と複合体化する事を予想し、PAC と HSA およびラット血漿の複合体化反応後の液に対して電気泳動による分析を試みた。アガロースゲル電気泳動後の泳動ゲルに対し、ポリフェノールが結合したタンパク質を特異的に染色可能な NBT 染色を行った結果、いずれの反応液においてもピーナツ種皮由来 PAC6 量体自身のバンドよりも移動度の低い高分子のバンドを確認した(図 3A, B)。以上から、血中タンパク質と複合体化したピーナツ種皮由来 PAC6 量体の分析を可能とする電気泳動の条件を見出すことができた。

### ③(+)-Catechin 経口投与後のラット血漿成分の分析

②の条件により(+)-Catechin とラット血漿の複合体化反応(pH 7, 37°C, 24 h)後の液をアガロースゲル電気泳動で分析したところ、(+)-Catechin と血中タンパク質の複合体のバンドを確認した。そこで、PAC の血中移行性を検討する予備検討として、(+)-Catechin 経口投与後のラット血漿をアガロースゲル電気泳動で分析したところ、(+)-Catechin 投与群において、Vehicle 群と移動度が類似したバンドを確認した。また、これらのバンドは(+)-Catechin 投与量依存的に強度が増し、100 mg を投与した際には特に顕著であった。また、(+)-Catechin 100 mg 投与群では他の群には見られないバンドも確認された。以上から、(+)-Catechin 経口投与後のラット血漿において Vehicle 群とは異なる成分の挙動を示すことを見出した。今後、PAC オリゴマー経口投与後のラット血漿成分などを分析し、その体内吸収性を明らかにする必要がある。

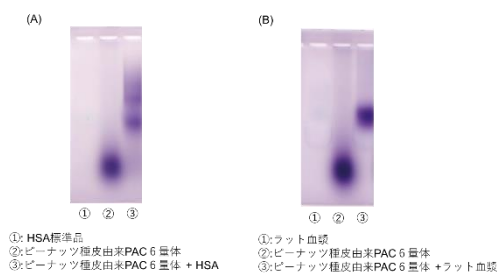


図3. HSAおよびラット血漿とピーナツ種皮由来PAC6量体の反応液のアガロースゲル電気泳動の結果

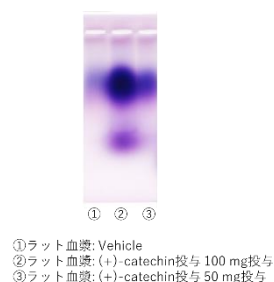


図4. (+)-Catechin経口投与後のラット血漿成分のアガロースゲル電気泳動の結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koga Takeru, Ito Hideyuki, Iwaoka Yuji, Noshita Toshiro, Tai Akihiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Neurite Outgrowth-Promoting Compounds from the Petals of <i>Paeonia lactiflora</i> in PC12 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7670 ~ 7670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27227670	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 Tai Akihiro, Koga Takeru, Shiki Nanako, Ito Hideyuki, Iwaoka Yuji	4. 巻 16
2. 論文標題 Degranulation Inhibitors from Petals of <i>Coreopsis grandiflora</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Records of Natural Products	6. 最初と最後の頁 645 ~ 650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25135/rnp.319.2202.2351	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 IWAOKA Yuji, FUKUSHIMA Misaki, ITO Hideyuki, KOGA Takeru, KAWAHARA Naoaki, TAI Akihiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Synthesis of ascorbic acid derivatives with different types of C8 straight acyl chain and their neurite outgrowth-enhancing activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 236 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.68.236	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 Iwaoka Yuji, Fukushima Misaki, Ito Hideyuki, Tai Akihiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Highly efficient and low-cost process for synthesis of 2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-6-O-(2-propylpentanoyl)-L-ascorbic acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Process Biochemistry	6. 最初と最後の頁 71 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.procbio.2021.09.004	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 Iwaoka Yuji, Suzuki Shoichi, Kato Nana, Hayakawa Chisa, Kawabe Satoko, Ganeko Natsuki, Uemura Tomohiro, Ito Hideyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Characterization and Identification of Bioactive Polyphenols in the Trapabispinosa Roxb. Pericarp Extract	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5802 ~ 5802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26195802	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 Miura Kaori, Matsuno Hiroaki, Iwaoka Yuji, Ito Hideyuki, Tai Akihiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Antiallergic Activity of 6-Deoxy-2-O-methyl-6-(N-hexadecanoyl)amino-L-ascorbic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4684 ~ 4684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26154684	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 Doi Natsumi, Togari Hiro, Minagi Kenji, Iwaoka Yuji, Tai Akihiro, Nakaoji Koichi, Hamada Kazuhiko, Tatsuka Masaaki	4. 巻 122
2. 論文標題 2-O-Octadecylascorbic acid represses RhoGDI expression and ameliorates DNA damage induced abnormal spindle orientations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 739 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29908	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 早川智紗, 岩岡裕二, 上村知広, 伊東秀之
2. 発表標題 トウヒシに含まれる機能性ポリフェノール成分の探索
3. 学会等名 おかやまバイオアクティブ研究会第61回シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早川智紗, 岩岡裕二, 上村知広, 伊東秀之
2. 発表標題 トウモロコシ果皮に含まれる新規エラジタンニンの構造
3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植盛晴菜, 岩岡裕二, 田原恒, 伊東 秀之
2. 発表標題 アルミニウム耐性樹木ユーカリに含まれるタンニンの化学構造解明
3. 学会等名 おかもやまバイオアクティブ研究会第60回シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩岡裕二
2. 発表標題 食品由来の機能性成分を対象とした化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第35回若手研究者シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田井章博, 三浦香織, 松野弘明, 岩岡裕二, 伊東秀之
2. 発表標題 6-バルミトイルアスコルビン酸誘導体の抗アレルギー作用
3. 学会等名 第163回ビタミンC研究委員会(日本ビタミン学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川夏菜乃, 新實祐理, 森 彩夏, 岩岡裕二, 伊東 秀之
2. 発表標題 エラジタンニン代謝物uroolithin Aの抱合体の構造
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会(第57回講演会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川夏菜乃, 新實祐理, 森 彩夏, 岩岡裕二, 伊東 秀之
2. 発表標題 エラジタンニン代謝物Uroolithin Aの体内動態
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松智子, 内藤淳子, 西岡満智子, 西田典永, 高橋 円, 田淵朱莉, 三宅加奈子, 岩岡裕二, 伊東秀之
2. 発表標題 ユーグレナ・グラシリスE0D-1株の摂取が若年女性の整腸作用に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上祐生, 神崎真由香, 桐岡佐妃, 津嘉山 泉, 岩岡裕二, 伊東秀之, 山本登志子, 高橋吉孝
2. 発表標題 チェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉抽出物による5-リポキシゲナーゼ阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西原好美、西野耕平、岩岡裕二、丸田隆典、小川貴央、重岡 成、田井章博、澤 嘉弘、石川孝博
2. 発表標題 アフィニティー樹脂によるシロイヌナズナアスコルビン酸結合タンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
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