

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K13508

研究課題名(和文)フキ属山菜の“化学分類”に着目した成分多様性及び健康機能性の統合的理解と応用

研究課題名(英文)The chemical diversity and health functionality of Petasites japonicus focused on "chemotaxonomy"

研究代表者

上杉 祥太 (Uesugi, Shota)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員

研究者番号：30795901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、自生および国産品種のフキ・フキノトウを対象とし、成分多様性と健康機能性の解明に取り組んだ。まず、自生のフキ・フキノトウの成分分析と単離・構造解析により、化学分類を規定するテルペノイドを同定した。それを用いて、国内で流通するフキ・フキノトウ品種の化学分類を整理した。フキ属に特有のテルペノイドが持つ機能性として、petasinの抗肥満作用について解析し、脂質合成関連遺伝子の発現を抑制するという作用機序を明らかにした。さらに、国産フキノトウ品種を対象にポリフェノールとピロリジニアルカロイドの含量を定量し、毒性に関わるピロリジニアルカロイド含量が少ない品種を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

山菜は、文化や地域産業において重要な食資源であるが、機能性については未解明な点が多い。有用な機能性とそれを担う成分を明らかにすることで、高付加価値化・用途拡大に繋がる。特に、本課題では国産品種を対象としており、それぞれの特徴の解明により地域の産業振興に貢献し得る。また、実態が不明な化学分類の解明は、学術的に新規な知見に繋がる可能性を持っている。そして、その成果を成分育種へと応用することで、優れた成分特性を併せ持つ新品種の開発等、新たな視点・方法での山菜の活用法創出に貢献し、我が国独自の食資源である山菜の価値再発見に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the chemical diversity and health functionality of *Petasites japonicus*. Five terpenoids that determine the chemotaxonomy of this plant were identified. Using these compounds as standards, the chemotaxonomy of domestic cultivars were clarified. Petasin, a characteristic terpenoid of *Petasites* sp., inhibited lipid accumulation through suppression of lipid synthesis-related genes expression. Additionally, we found that one of the domestic cultivars has significant low content of pyrrolizidine alkaloids which are related to toxicity.

研究分野：食品機能学

キーワード：フキ属 山菜 成分多様性 健康機能性 化学分類

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、ヒトと同じ真核生物である「遺伝子変異酵母株」を利用した機能性評価系により、独自の岩手県農林水産物抽出物ライブラリーから機能性の探索を行ってきた。その中で山菜に新規な機能性を見出した。岩手県は森林面積が全国2位で、山菜は食文化や地域産業において特に重要な役割を果たしている。また、フキノトウは岩手県では「ぼっけ」とも呼ばれ、春を告げる山菜として親しまれてきた。一方、山菜に関しては、学術的に化学的な成分研究が盛んに行われてきたが、健康機能性研究は少数に留まっている(名取ら, *日本食品保蔵科学会誌*, 2015)。フキ属山菜の活用例としては、‘愛知早生フキ’を原料とした、抗アレルギー作用を持つ機能性素材がある。岩手県八幡平市では、苦味が穏やかなフキノトウ‘マイルドぼっけ’の品種登録・生産振興が行われており、それぞれの品種には機能性や成分の特徴があると考えられる。

これまでの申請者らの研究により、アトピー性皮膚炎に関わる interleukin-2 の産生を抑制する成分として、フキノトウから bakkenolide B の単離同定に成功した。本研究の過程で、フキノトウの収集・成分分析を行い、主成分に多様性があることを知った。これは見た目では判別困難な“化学分類”であると考えられるが、「フキ属山菜にはどのような化学分類が存在するのか?」という根本的な疑問の答えが、学術的に曖昧なままとなっている。また、化学分類に着目した機能性素材の研究開発は、前例が無い。

以上のように、フキ属山菜は食文化にも貢献する、数少ない日本原産の食材であると同時に、機能性成分の探索源として有望である。しかし、成分と機能性について未解明な部分が多い。資源量が豊富なフキ属山菜に新たな価値を創出し、機能性素材として活用するために、成分と機能性に関する知見の統合的な収集は、学術的・文化的・産業的に意義があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、「フキ属山菜には、どのような成分多様性・化学分類が存在するのか?」、「それぞれの国産フキ・フキノトウ品種は、機能性素材として有用な特性を持つのか?」という問いの解決に向け、化学分類の実態を理解した上で、国産品種の化学分類の解明と機能性解析・成分分析により、機能性素材としての適性を検証する。食文化において重要な“山菜”を題材とし、学術的に新規かつ有益な情報を得ることで、健康と地域産業への貢献に繋げることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) フキ・フキノトウの化学分類の実態把握

フキ・フキノトウを岩手県内に自生するコロニーから採集し、抽出物を作製する。これを TLC (薄層クロマトグラフィー) に供して、主成分のパターンで分類する。また、一部のコロニーを対象に、生育段階や部位別(伸びたフキノトウ、フキの葉身)の化学分類も同様に調べる。

### (2) 化学分類を規定する主成分の単離同定

計画(1)で見出した主成分を単離同定する。各種クロマトグラフィー(シリカゲルカラム、逆相 HPLC 等)で精製し、LC-MS や NMR 等の機器分析で同定する。

### (3) 国産品種の化学分類の解明

国内で流通するフキ・フキノトウ品種を収集し、計画(1)、(2)の結果を活用して化学分類を解明する。化学分類の判定は TLC で行う。品種間での主成分の量的差異も解明するため、計画(2)で単離した化合物を標品として HPLC または LC-MS で定量する。

### (4) 国産品種の健康機能性の比較

免疫・代謝調節作用に焦点を当て、特に脂質代謝に対する効果を比較解析する。細胞株としては、マウス脂肪前駆細胞 3T3-F442A を用いる。脂肪滴の蓄積は、Oil Red O 染色により検出する。成熟脂肪細胞マーカーや脂質合成関連遺伝子の遺伝子発現を Real-time PCR、シグナル伝達に関わるタンパク質の発現やリン酸化状態等を western blotting で解析する。

### (5) 国産品種のポリフェノール及びアルカロイドの含量比較

抗酸化作用に関わる総ポリフェノールをフォーリン・チオカルト法、毒性に関わるピロリジジンアルカロイド (petasitenine, neopetasitenine, senkirkine の3種) を LC-MS で定量する。

## 4. 研究成果

### (1) フキ・フキノトウの化学分類の実態把握

岩手県内に自生するフキノトウを採集し、各個体の主たるテルペノイドを調査した。その結果、基本的にはこれまでに特定済みのテルペノイドのいずれかを主成分としていることが改めて確認された。また、そのうち 25 コロニーを選抜し、伸びたフキノトウ、フキ葉身についても同様に調べたところ、同じコロニーでは生育段階や部位が異なっても、主たるテルペノイドは同一で

あることが明らかとなった。

## (2) 化学分類を規定する主成分の単離同定

上記のテルペノイドのうち、1種は bakkenolide B と同定済みであった。その他は、bakkenolide A、petasin 類、fukinone であると推定していた。Bakkenolide A は、市販標品との比較により同定した。Petasin 類と fukinone は市販標品が存在しないため、それぞれ下記の方法で単離精製を行い同定し、標品として取得した (図 1)。

【Petasin 類】フキノトウ加工品 (2470.0 g) を凍結乾燥し、粉碎したものを MeOH で抽出した。酢酸エチル/水による液液分配を行い、酢酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、シリカゲル TLC で分画した。最終的に、逆相 HPLC 分取により、化合物 X (45.0 mg) と Y (62.4 mg) を単離した。ESI-MS スペクトル、UV スペクトル、<sup>13</sup>C NMR の文献値との比較により、X を petasin、Y を isopetasin と同定した。

【Fukinone】フキノトウ (429.9 g) を凍結乾燥し、粉碎したものをヘキサンで抽出した。逆相 HPLC 分取により、化合物 Z (69.5 mg) を単離し、EI-MS スペクトル、UV スペクトルの文献値との比較により、Z を fukinone と同定した。

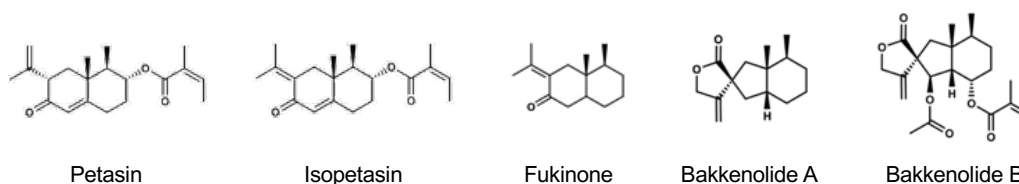


図 1 テルペノイドの化学構造

## (3) 国産品種の化学分類の解明

国内のフキ・フキノトウ品種について、化学分類に関する情報は無い。そこで、国内で流通しているフキ品種 1 種、フキノトウ品種 5 種を入手し、主たるテルペノイドを調査した。計 6 品種には、bakkenolide A、bakkenolide B、petasin 類 (petasin/isopetasin)、fukinone をそれぞれ主成分とするものが存在した。過去の報告において、栽培品種では fukinone 生産型が中心であるとされていたが、品種においてもテルペノイド多様性があることが明らかとなった。

また、上記(2)において、これらテルペノイドの標品を取得できたことから、HPLC 分析によりそれぞれの検量線を作成し、フキノトウ 5 品種を対象として、各品種中のテルペノイド含量を定量した。乾燥重量 1 g 当たりには、テルペノイドは 1.2~5.2 mg (0.12~0.52%(w/w)) の範囲で含まれていることがわかった。

## (4) 国産品種の健康機能性の比較

本課題においては、脂質代謝に対する機能性に焦点を当てて研究を実施した。フキ・フキノトウの抽出物には、抗肥満作用があることが複数の論文で報告されている。まず、ポリフェノールの寄与を検証するため、乾燥させたフキノトウのメタノール抽出物とヘキサン抽出物を作製し、総ポリフェノール含量とマウス脂肪前駆細胞 3T3-F442A における脂肪蓄積抑制活性を比較することで、それらの相関を調べた。その結果、総ポリフェノール含量はメタノール抽出物のほうが 4 倍程度多かった一方で、脂肪蓄積抑制活性はヘキサン抽出物のほうが強かった。このことから、総ポリフェノールの多さだけでは活性を説明できず、低極性の活性成分が存在することが示唆された。フキ・フキノトウに多く含まれる低極性成分としては、本課題で注目しているテルペノイドが代表的である。実際、フキ・フキノトウに含まれるテルペノイドである *S*-petasin が、細胞レベルで脂肪蓄積を抑制することが報告されている。しかしながら、文献に記載されているデータによると、フキ・フキノトウに含まれる *S*-petasin の含量は非常に少なく、それだけでは抽出物の活性を説明できないことが判明し、主たる活性成分は他に存在することが強く示唆された。そこで、これら 5 化合物に着目し、脂肪蓄積抑制活性を調べた結果、2  $\mu$ M の濃度で petasin のみが強い活性 ( $IC_{50}=0.95 \mu$ M) を示すことを見出した (図 2)。HPLC で定量を行った結果、上記で用いたフキノトウのヘキサン抽出物 1 g 中には、petasin が 107.82 mg 含まれていた。ヘキサン抽出物による脂肪蓄積抑制活性の  $IC_{50}$  は 3.15  $\mu$ g/mL であり、この中に含まれる petasin の濃度は 1.07  $\mu$ M と算出される。これは、petasin 単独での  $IC_{50}$  と同等 (0.95  $\mu$ M) であることから、細胞レベルでの脂肪蓄積抑制作用を担う成分が petasin であると結論付けた。また、この結果から、主たるテルペノイドとして petasin を含むタイプが優れた抗肥満作用を持つと示唆され、化学分類を理解することで、目的とする機能性を利用可能であることが期待された。

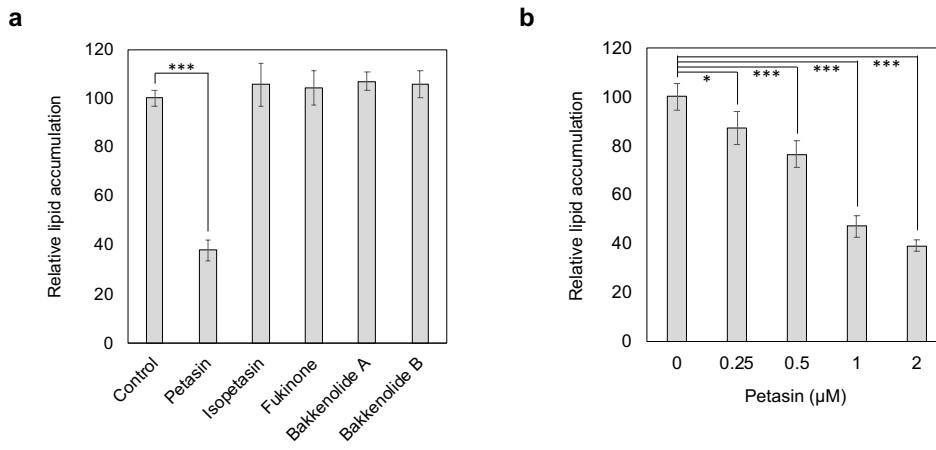


図2 テルペノイドの脂肪蓄積抑制活性  
(a) テルペノイド (2 μM) の活性比較、(b) Petasin の濃度依存性

Petasin の構造活性相関について情報を得ることを目的とし、類縁化合物である isopetasin 並びに petasol との活性比較を行った。2 μM におけるこれら 3 化合物の活性を測定すると、petasin のみが脂肪蓄積を抑制したことから、11-12 位の二重結合と angeloyl エステルの両方を持つことが活性に必須であることが明らかとなった (図 3)。

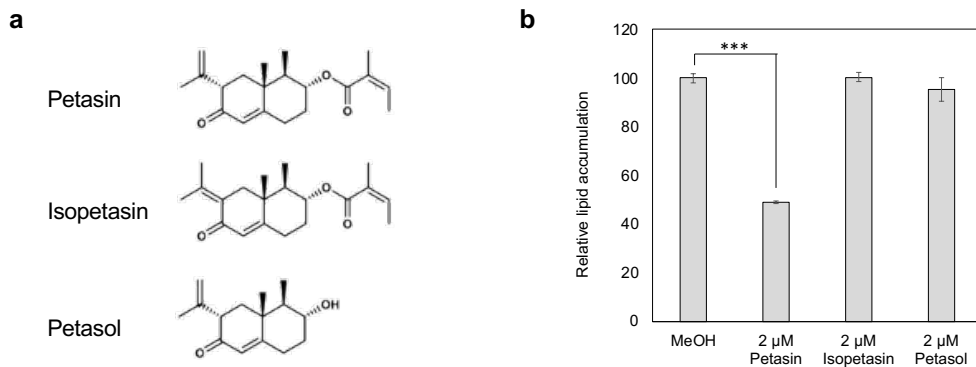


図3 Petasin 類の構造活性相関  
(a) Petasin 類の化学構造、(b) Petasin 類の脂肪蓄積抑制活性比較

脂肪前駆細胞が成熟脂肪細胞に分化すると、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )、adipocyte protein2 (aP2) 等がマーカータンパク質として発現上昇する。Petasin は、脂肪蓄積を抑制するのと同程度の濃度で、これらの mRNA 発現を抑制した。この作用も、3 種の類縁物質のうち petasin のみが示した。脂肪細胞分化においては、多数の因子が関与することから、それを抑制する分子メカニズムも多様である。Petasin は、初期段階における作用のみでは分化を十分に抑制することができず、むしろ後期段階 (insulin 刺激による成熟段階) だけに作用させることで効果的に抑制することが判明した。分化後期段階においては、脂肪酸合成と脂肪滴の肥大化が進行する。前述のように、petasin は動物レベルで AMPK を活性化することが報告されている。AMPK が活性化 (リン酸化) されると、糖代謝や脂質代謝の改善に繋がる。AMPK の活性化を、抗リン酸化 AMPK 抗体を用いた western blotting により評価した結果、petasin のみが明確にリン酸化を促進し、isopetasin と petasol には活性が見られなかった。AMPK は、脂肪細胞分化における脂質合成に寄与し、acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)、fatty acid synthase (FAS)、stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) のような主要因子の発現を調節する。Petasin はこれらの mRNA 発現を抑制したことから、脂質合成を抑えることで脂肪滴の蓄積を減少させるものと考えられた (図 4)。

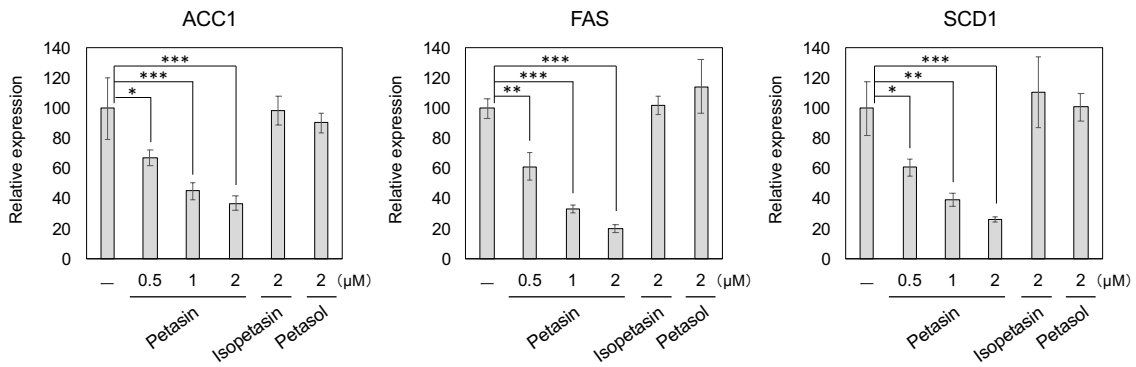


図4 脂質合成関連遺伝子の発現量に対する petasin 類の影響

(5) 国産品種のポリフェノール及びアルカロイドの含量比較

フキ属は、テルペノイドの他に、抗酸化成分ポリフェノール、毒性成分ピロリジジナルカロイドを含むことが特徴とされる。フキノトウ 5 品種を対象として、それらの総量を定量した。総ポリフェノールについては、品種間で有意な差が見られなかった (図 5 左)。ポリフェノールの内訳を LC-MS で予備的に分析したところ、クロロゲン酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸、フキノール酸などの各化合物の含量は品種ごとに大きく異なっていることが示された。したがって、総ポリフェノール含量は同等であっても、品種により組成が異なることから、ポリフェノールにより得られる機能性には差異があるものと推測された。一方、総ピロリジジナルカロイド含量は、品種間で大きな差が認められた (図 5 右)。最も少ない品種 A と最も多い品種 E を比較すると、23.5 倍もの差があった。ピロリジジナルカロイドは、あく抜きを行うことで減らすことができる。しかし同時に、豊富に含まれている水溶性の機能性ポリフェノールも減少することとなり、良い特徴が失われてしまう。そのような観点から、毒性に関わる総ピロリジジナルカロイドが最も少ない一方で、機能性に関わる総ポリフェノールは他の品種と同等に豊富である「品種 A」は、あく抜きの必要性が少なく、豊富なポリフェノールを損失せずに利用できるというユニークな特性を持っていると考えられた。

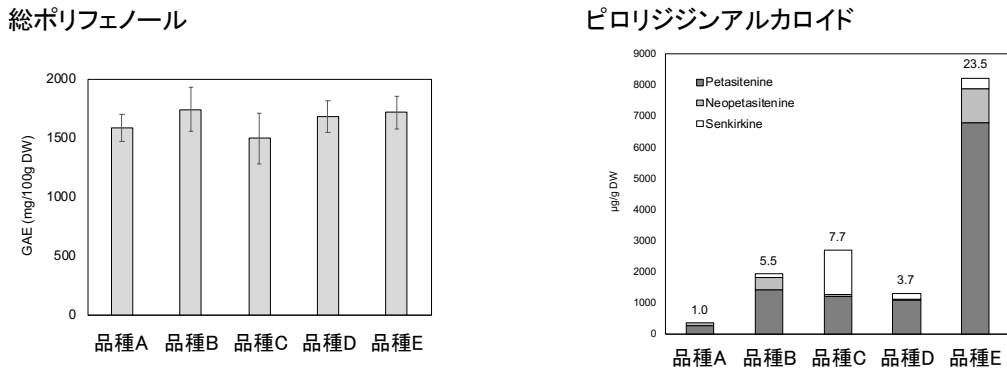


図5 フキノトウ品種のポリフェノール、ピロリジジナルカロイド含量  
 (左) ポリフェノール含量 (Folin-Ciocalteu 法)、  
 (右) ピロリジジナルカロイド含量 (LC-MS)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Uesugi S, Hakozaiki M, Kanno Y, Takahashi H, Kudo Y, Kimura K, Yamada H, Yano A	4. 巻 85
2. 論文標題 A yeast-based screening system identified bakkenolide B contained in <i>Petasites japonicus</i> as an inhibitor of interleukin-2 production in a human T cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2153-2160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab130	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 Sofian FF, Kikuchi N, Koseki T, Kanno Y, Uesugi S, Shiono Y	4. 巻 86
2. 論文標題 Antioxidant p-terphenyl compound, isolated from edible mushroom, <i>Boletopsis leucomelas</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 300-304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab224	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 該当する
1. 著者名 Uesugi S, Hakozaiki M, Kanno Y, Shiraishi A, Suzuki M, Kimura K, Shiono Y, Yano A	4. 巻 157
2. 論文標題 Petasin is the main component responsible for the anti-adipogenic effect of <i>Petasites japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 105130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fitote.2022.105130	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 Sofian FF, Subarnas A, Hakozaiki M, Uesugi S, Koseki T, Shiono Y	4. 巻 158
2. 論文標題 Bidysoxyphenols A-C, dimeric sesquiterpene phenols from the leaves of <i>Dysoxylum parasiticum</i> (Osbeck) Kosterm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 105157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fitote.2022.105157	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 該当する

1. 著者名 Sofian FF, Subarnas A, Hakozaki M, Uesugi S, Koseki T, Shiono Y	4. 巻 50
2. 論文標題 Tridysoxyphenols A and B, two new trimeric sesquiterpene phenols from <i>Dysoxylum parasiticum</i> leaves	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 134-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2022.06.004	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 該当する

1. 著者名 Uesugi S, Hakozaki M, Kanno Y, Takahashi Y, Shindo K, Kimura K, Yano A	4. 巻 86
2. 論文標題 Anti-melanogenic effect of furanoeremophilanes identified from edible wild plants belonging to the genus <i>Cacalia</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1462-1466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac124	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 上杉祥太、箱崎真友佳、菅野裕子、白石朗子、鈴木瑞季、木村賢一、塩野義人、矢野明
2. 発表標題 フキ・フキノトウに含まれる脂肪蓄積抑制成分petasinの同定と作用機序解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第156回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junpei Abe, Hiroyuki Koshino, Kazuyoshi Oikawa, Yuka Miura, Shota Uesugi, Masayuki Shirai, Ken-ichi Kimura
2. 発表標題 Elucidation of a partial polymer structure of Kuji amber
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Yoshida, Yusuke Okawa, Takuya Oyama, Nozomu Shimoda, Shota Uesugi, Hiroshi Takagi, Yoshiaki Ito, Ken-ichi Kimura
2. 発表標題 Analysis of functional mechanism and target molecules of ricinoleic acid derived from castor oil
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Yoshida, Shota Uesugi, Tetsuaki Kawamura, Ken-ichi Kimura, Dawei Hu, Shuang Xia, Naoki Toyooka, Masao Ohnishi, Hideki Kawashima
2. 発表標題 Bioactive properties of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in eukaryotic cells
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ferry Ferdiansyah Sofian, Anas Subarnas, Mayuka Hakozaki, Shota Uesugi, Takuya Koseki, Yoshihito Shiono
2. 発表標題 Undescribed dimeric- and trimeric-sesquiterpene phenols and a bicoumarin derivative isolated from the leaves of <i>Dysoxylum caulostachyum</i> Miq., a primate-consumed plant
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上杉祥太、箱崎真友佳、菅野裕子、高橋優太、新藤一敏、木村賢一、矢野明
2. 発表標題 Cacalia属山菜に含まれるメラニン産生抑制物質の同定
3. 学会等名 令和4年度日本農芸化学会北海道・東北支部合同支部会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 上杉祥太
2. 発表標題 農林水産物に含まれる機能性成分の理解と活用に向けた基礎・応用研究
3. 学会等名 2022年度日本農芸化学会東北支部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野真生、濱遥香、上杉祥太、結城彩花、矢野明、下芋坪之典、今村聖祐、井戸篤史、都木靖彰、浦和寛
2. 発表標題 ウニの消化管および生殖巣中の $\beta$ -カロテンと $\beta$ -エキネノンの定量および相関分析
3. 学会等名 令和4年度日本水産増殖学会第20回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上杉祥太、杉山育美、箱崎真友佳、菅野裕子、丹場晴也、木村賢一、松沢卓生、佐塚泰之、矢野明
2. 発表標題 焙煎漆種子熱水抽出物(漆茶)の血圧上昇抑制作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上杉祥太、箱崎真友佳、菅野裕子、丹場晴也、木村賢一、矢野明
2. 発表標題 フキ・フキノトウにおける新規ケモタイプの発見と主成分による抗ヒスタミン薬抵抗性克服戦略
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野明、結城彩花、菅野裕子、白石朗子、上杉祥太
2. 発表標題 甘茶に含まれるウイルス-受容体結合阻害成分
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Uskhubayar Narandulam、上杉祥太、木村賢一
2. 発表標題 3,6-Epideoxy-1,10-bisaboladiene(EDBD)とスルファサラジンは乳がん細胞に相乗的に細胞死を誘導する
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人岩手生物工学研究センター 健康機能研究チーム <a href="https://bioresources.ibrc.or.jp/">https://bioresources.ibrc.or.jp/</a>
---

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