

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750027

研究課題名(和文) ラッカセイ種皮プロシアニジンの糖吸収抑制機能および抗菌メカニズムの解析

研究課題名(英文) Hypoglycemic effect and antimicrobial activity of proanthocyanidin oligomers from peanut skin

研究代表者

田村 倫子 (Tamura, Tomoko)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60451845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：非食部として大量廃棄されるラッカセイ種皮から、二量体のプロシアニジンA1、三量体のエピカテキン・エピカテキン・カテキン(EEC)を単離した。EECは糖質分解酵素の活性を阻害し、かつ腸管のグルコーストランスポーターからのグルコース取り込みを阻害したため、これまでの動物実験のデータと合わせ強い血糖上昇抑制作用を持つと示唆した。

その一方で、EECは食中毒菌である*Bacillus cereus*に対し強い抗菌作用を示した。*B. cereus*のトランスクリプトーム解析を行った結果、EECは細胞膜に存在するタンパク質と結合し、細胞壁の生合成を阻害することで*B. cereus*の生育を抑制すると示唆した。

研究成果の概要(英文)：The skin of peanut, *Arachis hypogaea* L., is a rich source of polyphenols. We identified Procyanidin A1 as a dimer and epicatechin-(4-6)-epicatechin-(2-07, 4-8)-catechin (EEC) as a procyanidin trimer from the skin of peanut. EEC showed strong inhibitory activities of α -amylase, maltase, sucrase. EEC also decreased the absorption of glucose from the intestine by inhibition of glucose transport.

On the other hands, EEC has antimicrobial activity, in particular food-borne gram-positive bacteria, *Bacillus cereus*. DNA microarray analysis of *B. cereus* treated with EEC was carried out, with a finding that 597 genes were significantly up-regulated. Analysis of the up-regulated genes suggested that EEC disrupted the normal condition of the cell membrane and wall of *B. cereus* and alter its usual nutritional metabolism. Moreover, treatment of *B. cereus* with EEC inhibited glucose uptake, suggesting that EEC affects the cell-surface adsorption.

研究分野：食品分子機能学

キーワード：ラッカセイ グルコース吸収 抗菌活性 プロシアニジン DNAマイクロアレイ *Bacillus cereus* ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

私たちが生命活動を営む上で、対応すべき外的因子は温度・湿度・明暗・匂い・酸素濃度など多数存在するが、「食品成分」は他の外的因子に比較し取捨選別できる因子である一方で、その機能性や化合物の構造がすべて完全に明らかではなくても必ず摂取することが常である。よって食品は生体に大きな影響を及ぼす外的因子の1つといえる。

ポリフェノールは、動物が摂取した場合抗酸化作用、抗がん作用、血糖上昇抑制作用など多くの生理機能を持つ有益な非栄養素である (Scalbert A. et al., *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, p.287-306, 2005)。しかしこれらの研究の多くは、食品の粗抽出物の生体内における毒性・安全性の検討が主たるものであり、ポリフェノールの重合度の違いにより腸管からの吸収率や生体内物質との結合力に相違を見出すといった検討例は、少ないのが現状である。

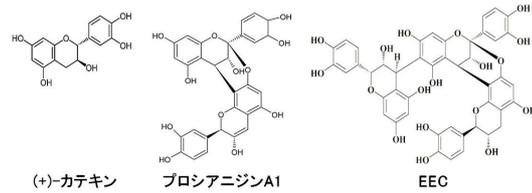
植物において外的環境に応答するために存在するポリフェノールは、樹皮や表皮など非可食部に多く存在する場合が多い。研究代表者はこれまで、食品加工の際に破棄されるラッカセイ (*Arachis hypogaea* L.) の種皮に着目し、これまでに、免疫応答に関わる脱顆粒に対する抑制作用・血中コレステロール低減作用・ラッカセイ種皮から単離同定した2、3量体プロシアニジンのコレステロールミセル不溶化能 (若手 B, H24-25 年度研究課題)・プロシアニジンの重合度の違いによる DPPH ラジカル消去活性の相違などを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食素材の非可食部有効利用の観点から、ラッカセイ種皮ポリフェノールの血糖上昇抑制作用および抗菌作用を検討することである。血糖上昇抑制作用においては、これまでにラッカセイ種皮から単離精製した2量体、3量体プロシアニジンと、単量体のカテキンを用い、糖質分解酵素に対する阻害作用、および糖質の腸管吸収抑制作用について検討する。抗菌作用においては、食中毒菌に対する2量体・3量体プロシアニジンの影響を比較するとともに、プロシアニジンの抗菌メカニズムを DNA マイクロアレイ解析により検討する。

3. 研究の方法

ラッカセイ種皮から単離した、単量体の (+)-カテキン、2量体のプロシアニジン A1、3量体の epicatechin-(4β 6)-epicatechin (4β 8,2β 0 7)-catechin (EEC) を用い、以下の実験を行った。



プロシアニジン A1: epicatechin-(2b →7,4b →8)-catechin
EEC: epicatechin-(4b →6)-epicatechin(4b →8,2b →0→7)-catechin

【プロシアニジンの重合度の違いが、糖質分解酵素の阻害に及ぼす影響】

1、2、3量体プロシアニジン を 1~5 mg/mL 用いた。α-アミラーゼ阻害活性は、ブタ肝臓 α-アミラーゼを用い、生成した還元糖を 1% ジニトロサリチル酸で発色させ、540 nm の吸光度を測定することで求めた。マルターゼ、スクラーゼ阻害活性は、ラット小腸アセトン粉末を用い、遊離した還元糖をグルコース CII テストワコーで測定することで求めた。

【プロシアニジンの重合度の違いがグルコース腸管吸収に与える影響】

Caco-2 細胞をトランスウェルの透過性フィルター上に播種し、1 mM グルコース、100 nM [1,2-³H(N)]-2-デオキシ-D-グルコース (2DG)、1、2、3量体プロシアニジン (60 μg/ml) を含む培養液で 15 分培養し、基底膜側の 2DG 量を測定した。

【抗菌スペクトルの測定】

シャーレに作製した培地に、グラム陽性・陰性細菌を塗布した。その後ステンレス製製の円筒 (内径 6 mm、外径 8 mm、高さ 10 mm) 内にラッカセイ種皮抽出物、1、2、3量体プロシアニジン を 0.2 mL ずつ注入し静置培養した。

【*Bacillus cereus* に対する EEC 抗菌活性のメカニズムの解明】

Bacillus cereus 培養液中に水または 0.02 mg/mL の EEC を添加し 30 分培養した。その後 *Bacillus cereus* から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。COGs に基づく濃縮度解析を行い、変動の大きい遺伝子は qRT-PCR に供した。また、¹⁴C-グルコースを用いて EEC による物質の菌体への取込阻害試験を行った。

4. 研究成果

【プロシアニジンの重合度の違いが、糖質分解酵素の阻害、およびグルコース腸管吸収に及ぼす影響】

α -アミラーゼ阻害活性は EEC にのみ認められたが、マルターゼ阻害活性は (+)-カテキン、プロシアニジン A1、EEC のいずれにも同程度認められた (図 1)。スクラーゼ阻害活性は 3 量体の EEC が、プロシアニジン A1 および (+)-カテキンよりも強かった。酵素の種類によりポリフェノールの阻害活性が異なることが示された。

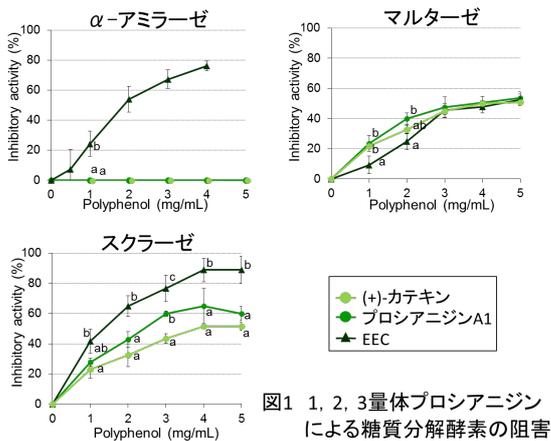


図1 1, 2, 3量体プロシアニジンによる糖質分解酵素の阻害

腸管におけるグルコース透過阻害作用は、いずれのポリフェノールにも認められたが、(+)-カテキンよりも EEC の方が有意に強い阻害作用を示した (図 2)。以上より、3 量体の EEC に、プロシアニジン A1 および (+)-カテキンよりも強い血糖上昇抑制作用がある可能性を示唆した。

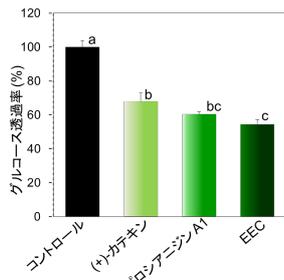


図2 1, 2, 3量体プロシアニジンによるグルコース透過阻害

【抗菌スペクトルの測定】

グラム陽性菌にラッカセイ種皮抽出液による生育阻止が認められた。また *Bacillus cereus* および *Bacillus subtilis* において強い抗菌活性が観察された。プロシアニジン A1 および EEC はともに *Bacillus subtilis* よりも *Bacillus cereus* を強く抗菌した。

【*Bacillus cereus* に対する EEC 抗菌活性のメカニズムの解明】

コントロールに比較し、EEC 添加により fold change が 2 以上かつ $p < 0.05$ で変動した遺伝子数は 1055 であった。このうち EEC 添加に

より発現が up-regulate された遺伝子は 596 遺伝子、down-regulate された遺伝子は 495 遺伝子であった。EEC 添加により発現量が増加した遺伝子 596 個に対して COGs による機能分類を行ったところ、アミノ酸代謝や脂質代謝、防御機能、無機イオンの代謝に關与する遺伝子群が多く含まれていた。また、EEC により up-regulate された上位 50 遺伝子のうち 47% が、以下に示す 4 種の代謝にかかわる遺伝子群であったため、リアルタイム RT-PCR を行った。

鉄取り込み物質のシデロフォア生合成関連遺伝子；シデロフォアの生合成は鉄不足の環境下において促進されることが知られている。シデロフォア合成最終段階に關与する遺伝子 3 つについて RT-PCR を行ったところ、EEC 添加 10 分後においてそれぞれ 4~5 倍の発現増加が認められた。ポリフェノールと鉄は錯体を形成することを考慮すると、EEC が培地中の鉄と結合し、細胞への鉄の供給が一次的に阻害される可能性が示唆された。

二成分制御系に關連する遺伝子；二成分制御系とは環境変化を感知するセンサータンパク質とセンサーの支配下にあり遺伝子発現制御などの応答を制御するレスポンスタンパク質で成り立つ伝達機構である。*B. Subtilis* においてセンサータンパク質である LiaS によりストレスを感知、レスポンスタンパク質である LiaR が応答し LiaH 遺伝子の発現を増加させることが知られており、これにより生成される LiaH タンパク質は細胞膜の修復などを行う。この LiaH に相同な遺伝子は、EEC 添加 30 分後において LiaI に相同な遺伝子が約 36 倍、LiaH に相同な遺伝子が約 22 倍に発現量増加した。このことから EEC が細胞表面ストレスとして感知され、LiaRS 二成分制御系によるストレス応答が機能するものと考えた。

グリカンの重合や架橋に關与する遺伝子；ペプチドグリカン合成の最終段階であるグリカンの重合において重要な役割を果たす物質にペニシリン結合タンパク質がある。この一種で細胞の伸長に重要な PBP1A は、EEC 添加 10 分後で 8 倍、30 分後で 7 倍に発現が増加した。ポリフェノールとタンパク質は結合しやすいことを考慮すると、EEC は PBP などの細胞膜タンパク質と結合し、細胞壁の生合成を阻害している可能性が示唆された。

緊縮応答時に発現が上昇する ppGpp の生合成に關与する遺伝子；緊縮応答とはアミノ酸欠乏時に細菌が RNA やタンパク質の合成を抑制し、アミノ酸合成を促進する応答である。この応答の仲介物質 ppGpp を生合成する酵素をコードする遺伝子は、EEC 添加 10 分後で 28 倍、30 分後で 31 倍の発現増加が認められた。このことから EEC は細胞膜に存在するトランスポーターと結合し、アミノ酸などの物質の取込を阻害することが考えられた。

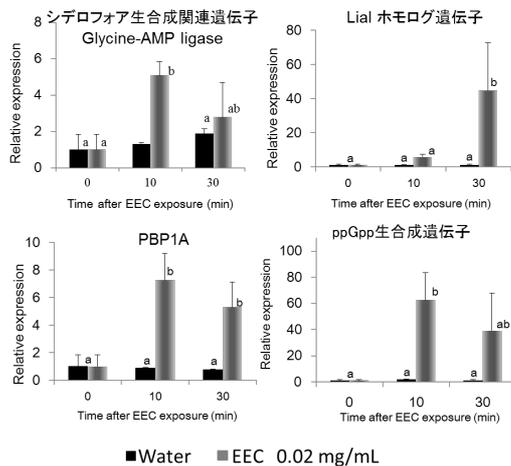


図3 EEC処理による遺伝子発現変動

そこで ^{14}C -グルコースを用いて EEC による物質の菌体への取込阻害試験を行った。その結果、EEC 添加 30 分後にグルコースの取り込みが有意に減少した。以上より、EEC の抗菌メカニズムとして EEC が細胞膜やそこに存在するタンパク質と結合することにより細胞壁合成阻害や物質の取り込み阻害を引き起こすことが示唆された。

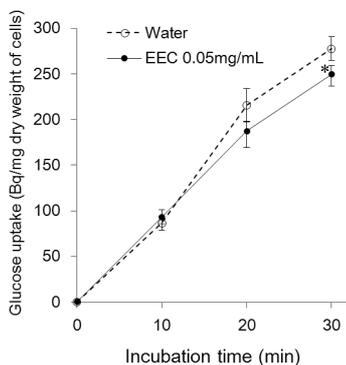


図4 EECによるグルコース取り込み阻害

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Inhibitory Effect of Oligomeric Polyphenols from Peanut-Skin on Sugar Digestion Enzyme and Glucose Transport, *Food Science and Technology Research*, 査読あり, 21, p.111-115, 2015,

Tomoko TAMURA, Megumi OZAWA, Shoko KOBAYASHI, Hirohito WATANABE, Soichi ARAI, Kiyoshi MURA

DOI: 10.3136/fstr.21.111

Bacillus cereus Response to a Proanthocyanidin Trimer, a Transcriptional and Functional Analysis, *Current microbiology*, 査読あり, 73, p.115-123, 2016,

Tomoko TAMURA, Megumi OZAWA, Naoto TANAKA, Soichi ARAI, Kiyoshi MURA,

DOI: 10.1007/s00284-016-1032-x

〔その他〕

ホームページ: <http://www.nodai.ac.jp/safety/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 倫子 (TAMURA Tomoko)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 60451845