

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05861

研究課題名(和文)加熱調理大根に含まれる β -グルクロニダーゼ阻害物質の同定とその生成機構の解明

研究課題名(英文) Identification of beta-glucuronidase inhibitors in boiled radish and elucidation of their formation mechanism.

研究代表者

橋本 啓 (HASHIMOTO, Kei)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10237935

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)：腸内細菌の産生する β -グルクロニダーゼ (β -GUD) の阻害は大腸がんの抑制につながるものと期待されている。本研究では、茹でダイコンに含まれる β -GUD阻害活性成分の解明を進めた。その結果、ダイコンを加熱することにより抑制活性が発現されることを確認し、茹でダイコンメタノール抽出物から活性成分の分離を進め、最終的に逆相HPLCにより、新たに生成された活性成分の一つを単離することができた。その構造を特定することはできなかったが、活性成分はケイ皮酸類が加熱処理により二量体となったものであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ダイコンを茹でることで、生ダイコン中には存在していなかった、大腸がん抑制が期待される成分が生成されることを明らかにしたものである。野菜の摂取の重要性は広く認識されているが、加熱処理により栄養成分が減少してしまう側面が強調されてしまい、加熱処理の有用性については高の減少、食感や消化性の向上を除いてはあまり認識されていない。今回、重量野菜として敬遠されがちなダイコンを加熱することで新たな機能性を見出したことで、ダイコンを再評価することができるとともに、栃木県の伝統食品であるしもつかれに新たな価値を付与し食文化維持にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of β -glucuronidase (β -GUD) produced by intestinal microbiota is expected to inhibit colon cancer. In this study, I have investigated the β -GUD inhibitory activity components in boiled radish. As a result, I confirmed that the inhibitory activity is expressed by heating the radish, proceeded to separate the active components from the methanol extract of boiled radish, and finally isolated one of the newly generated active components by reversed-phase HPLC. Although the structure could not be identified, it was suggested that the active ingredient was a dimer of hydroxycinnamic acids formed by heat treatment.

研究分野：食品科学

キーワード：ダイコン β -グルクロニダーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内に取り込まれた変異原物質や発がん物質は、肝臓において、グルクロン酸などと抱合され、胆汁とともに腸管に移行し、糞便とともに体外へと排出される。しかし、腸内細菌の産生する β -グルクロニダーゼ (β -GUD) は、解毒過程でグルクロン酸抱合された変異原物質や発がん物質を脱抱合・活性化してしまう。そこで、 β -GUD 活性の阻害により大腸がんのリスクを低下できるものと期待されている。これまでに、各種野菜抽出物やファイトケミカルが、 β -GUD 活性に及ぼす影響の検討を進めており、ファイトケミカルの一種である 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-L-alanine が、加熱処理をすると β -GUD 阻害活性を発現することを見出している。そこで、これまで注目されてこなかった「加熱処理により活性化する機能性成分」について検討を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では、ダイコンを加熱処理することにより生成される β -GUD 阻害物質を単離同定する。また、処理温度や時間など活性物質の生成条件を明らかにし、その活性化機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アッセイ試料の調製

ダイコンの先端と葉を切り落とし洗浄後、約 1cm 程度の厚みに切り 100°C で 15 分間茹でた後、凍結乾燥した。ミルサーで粉碎後、乾燥物 1g に対して 70% MeOH を 10ml 加え、攪拌しながら 15 分間抽出した。抽出液はエバポレーターで MeOH を除去し、凍結乾燥した。

(2) 逆相短カラム (Sep-pak C18) による分画

Sep-pak C18 を MeOH で洗浄、精製水でコンディショニング後、茹でダイコン MeOH 抽出物を精製水に溶解させた試料溶液をアプライした。精製水でカラムを洗浄後、順次 10, 50, 70% アセトニトリルで溶出したものを凍結乾燥した。

(3) 大腸菌由来 β -GUD 阻害活性アッセイ

96 穴マイクロプレートの各ウェルに、アッセイ試料溶液、6 units/ml β -GUD 溶液、ブランクとして PB をそれぞれ 50 μ l 添加し 37°C で 10 分間インキュベート後、PB で 0.6 mM に調製した 4-nitrophenil- β -D-glucuronide 溶液を 50 μ l 添加し 405 nm における吸光度を 37°C で測定した。最初の 5 分間の吸光度の変化速度を β -GUD 活性とし、コントロールを基準としてサンプルによる β -GUD 活性の抑制率を算出した。

4. 研究成果

(1) 加熱処理がダイコンの β -GUD 阻害活性に及ぼす影響の検討

まず、ダイコンの加熱処理が β -GUD 阻害活性に及ぼす影響を検討した。ダイコンは上部は甘みが強く先端部は辛味が強いなど部位により特徴が異なることから、部位による β -GUD 阻害活性も同時に比較した。茹でまたは生ダイコン凍結乾燥粉末の β -GUD 抑制活性アッセイを行った結果を図 1 に示した。5 mg/ml における β -GUD 抑制率は、茹でダイコン (上部) FD : 94 %、茹で (中部) FD : 95 %、茹で (下部) FD : 98 %、生 (上部) FD : 46 %、生ダイコン (中部) : 37 %、生 (下部) : 26 % であり、阻害活性は濃度依存的に増加した。 β -GUD を 40 % 抑制する濃度を比較すると、茹でダイコン (上部) : 0.55 mg/ml、生ダイコン (上部) : 4.22 mg/ml であり、茹でダイコンには生ダイコンの約 8 倍強い β -GUD 阻害活性が認められた。また、茹でダイコンについて部位別に活性を比較すると上部や中部に比較して下部に強い阻害活性が認められる傾向であったが大きな違いではなかった。

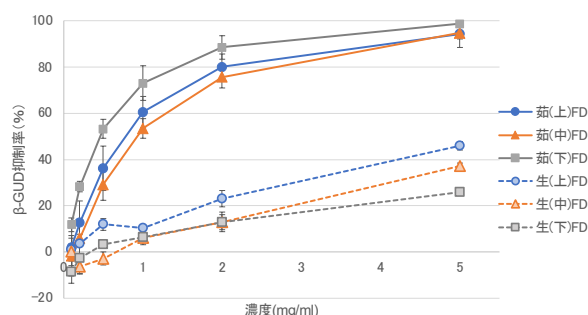


図 1 : 茹でまたは生ダイコン凍結乾燥物が β -GUD 活性に及ぼす影響

(2) 活性成分の単離

本研究で取り扱うダイコンをはじめとするアブラナ科野菜に特有のフレーバー成分である芥子油には、抗菌性、変異原の代謝活性化に関わる酵素の阻害、発がん物質を解毒する酵素の誘導、がん細胞のアポトーシス誘導などさまざまな機能が認められている。しかし、芥子油は、水、

アルコール、アミン、SH 化合物などと容易に反応してしまう不安定な化合物である。実際、大根の主要芥子油であるメチルチオブチル芥子油は加熱により容易に分解し、その分解物に β -GUD 阻害活性は認められなかった。従って、加熱処理した大根において生成された β -GUD 阻害物質は、これまでに注目されて来た機能性成分である芥子油とは異なる成分であり、さらに、加熱処理により初めて活性化される、潜在的な活性成分であると予想された。

そこで、茹でダイコン MeOH 抽出物を Sep-Pak C18 逆相短カラムに吸着させ、精製水で洗浄後、10%、50%、70%アセトニトリルで順次溶出させ得られた各画分について β -GUD 抑制活性のアッセイをした。その結果 50%アセトニトリル溶出画分に MeOH 抽出物の 8 割程度の活性が認められたことから、活性成分の多くがこの画分 (DB50) に存在しているものと考えられた。

そこで DB50 を Develosil C30-UG-5 カラム (ϕ 4.6 \times 150 mm、野村化学) を用いた HPLC により分画し (図 2)、各ピークごとに β -GUD 阻害活性のアッセイをした。その結果、ピーク 12 (P12) 処理により 72%の阻害活性が認められた。他のピークに阻害活性は認められなかった。

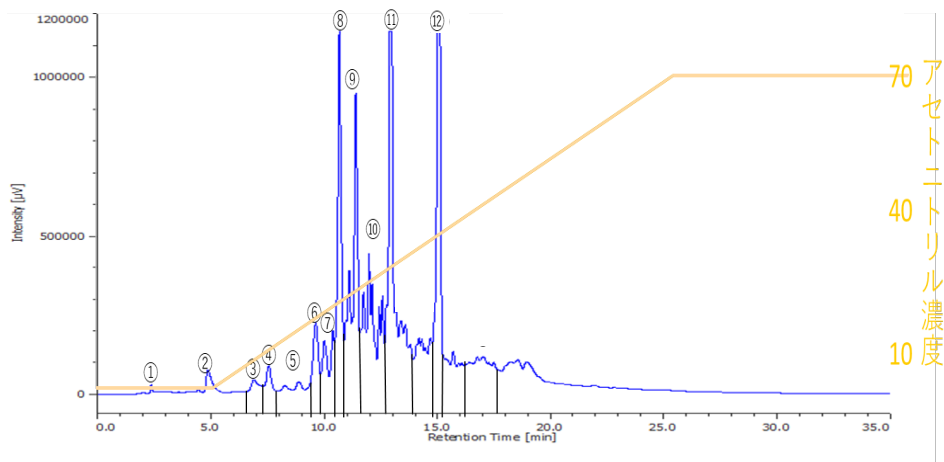


図 2 : DB50 の HPLC による分画

そこで、P12 を分取し β -GUD 阻害活性の濃度依存性を調べた。その結果、濃度依存的な阻害活性は認められたが 500 μ g/mL においても 70%の抑制活性を示すのみであった。

各精製段階における β -GUD 阻害活性を 100 μ g/mL において比較すると、凍結乾燥物では 2%、メタノール抽出物では 6%、DB50 では 32%、P12 では 29%にとどまり、精製段階で活性が失われていることが示された。

P12 の構造を推定すべく LC-MS により分析した結果、分子量は 417 であると考えられた。一方で、生ダイコンについて DB50 と同様な精製処理を行なったものについて HPLC 分析を行うとやはり 15 分付近にピークが認められた。しかしこのピークに β -GUD 抑制活性は認められず、また、LC-MS において分子量 417 ではないことが明らかとなり、溶出時間がほぼ同一であるが、 β -GUD 阻害活性を有さない別の物質であることが明らかとなった。

詳細な検討は今後の課題となっているが、P12 は 290 nm および 330 nm に吸収のピークを有しケイ皮酸類である可能性も考えられ、分子量と合わせるとケイ皮酸類の二量体である可能性が示唆された。

(3) 加熱処理がシナピン酸の β -GUD 阻害活性に及ぼす影響の検討

そこでダイコンに多く含まれているケイ皮酸化合物であるシナピン酸をモデルとして加熱処理がシナピン酸の β -GUD 抑制活性に及ぼす影響を検討した。シナピン酸は加熱処理により二量体を生じることが報告されており、今回の活性物質の良いモデルとなるものと考えられた。

その結果、シナピン酸溶液を 100°C、15 分間加熱処理することにより β -GUD 抑制活性が上昇することが明らかになった (図 3)。

また、加熱処理したシナピン酸を Sep-pak C18 により分画したところ、

30%、50%アセトニトリル溶出画分において高い β -GUD 抑制率 86%、95%を得た。加熱処理シナピ

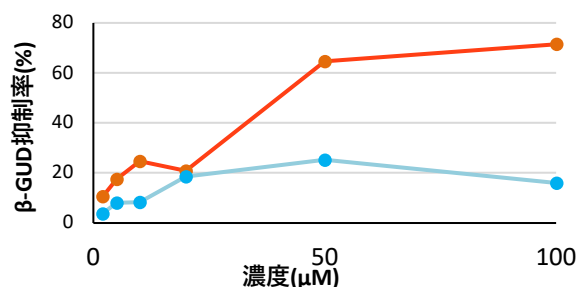


図 3: 加熱処理がシナピン酸の β -GUD 抑制活性に及ぼす影響
赤 : 加熱処理シナピン酸、青 : シナピン酸

ン酸について HPLC による活性成分の分離を試みたが、活性物質を再現性良く得ることはできなかった。この活性物質は不安定で、単離後比較的速やかに活性のない化合物へと遷移していくことが観察された。一方、DB50 においても P11 を単離すると P12 が生成されることが示されており、シナピン酸と同様の反応が進行しているがダイコンの化合物では最終生成物が活性を有したため安定的に活性が認められるものと予想された。今後これらのピークの構造を調べることで活性物質の構造や生成機構が明らかになるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------