

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：42640

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282020

研究課題名(和文) 食用植物由来新規エラジタンニンZeylaniin Aの生活習慣病改善機能

研究課題名(英文) Effect of new ellagitannin, Zeylaniin A, on lifestyle related disease

研究代表者

大塚 譲 (Otsuka, Yuzuru)

戸板女子短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：20135833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナム栄養研究所より入手した食用植物Tramから新規ポリフェノールZeylaniin Aを精製し、細胞に与えると紫外線に抵抗性を示した。遺伝性糖尿病マウスの餌に添加し投与した。血糖値はコントロール群(DC)が304mg/dl、ゼーラニーン群(DZ)が320mg/dlであった。AGE類はIntrada Amino AcidカラムとLC-MS/MSで新定量法を作成した。血液中CELは73-129ng/mL、MG-H1は38-184ng/mLであった。CELの平均値はDC群が101ng/mL、DZ群が104ng/mL、で血糖値、AGE濃度にはZeylaniin A投与の影響は少なかった。

研究成果の概要(英文)：New polyphenol Zeylaniin A was purified from Vietnam edible plant Tram, and analyzed biological function on life style related disease. S.zeylanicum leaf was obtained from Dr. Mai of Vietnam National Nutritional Institute. Purified Zeylaniin A recovered UVA damaged cell. Zeylaniin A was added to animal feed and measured glucose and AGEs. Blood glucose of Zeylaniin A group was 320 mg/dl and showed no difference to control. New method for AGE analysis was developed with new column. Blood CEL was 73-129ng/mL and MG-H1 was 38-184ng/mL, and average of blood CEL of Zeylaniin A group was 104ng/mL. There was no significant difference between Zeylaniin A group and control group.

研究分野：分子栄養学

キーワード：新規ポリフェノール Zeylaniin A Tram ベトナム植物 AGE 抗酸化 LC-MS/MS 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、心筋梗塞、ガンなどの生活習慣病は世界の人口の数十%が抱えており、糖尿病だけでも約5~6%となっている。我が国でも、生活習慣の変化や、高齢化に伴い年々増加している。これらの生活習慣病の予防には野菜の摂取が有効で、特にその抗酸化成分が重要といわれている。ポリフェノールを多く含む食品や飲料の摂取により、糖尿病などの生活習慣病のリスクを減らせることが疫学的研究により明らかにされているが、この要因としてポリフェノールの抗酸化性や糖質分解酵素阻害が示唆されている。そこでこれらの活性を基準とした食品素材の探索が、日本のみならず世界中で行われてきた。例えば、グアバの葉の抽出物はポリフェノールを多く含有し、糖の吸収を抑えることから特定保健用食品として用いられており、機能性食品として大きな市場価値を占めている。

我々はベトナムで食用とされている植物約40種類をスクリーニングにかけ、フトモモ科の *Syzygium zeylanicum* (L.)DC.; (Tram; ベトナムではトラムと呼んでいる)の葉(上図)に強い抗酸化活性と多くのポリフェノールを含んでいることを見出し、カリフォルニア大学デービス校のShibamoto教授と共同研究を行い DPPH ラジカル捕捉活性の他、脂質酸化抑制も非常に強いことを認めた。さらに Tram にはリポキシゲナーゼ阻害活性が認められ抗炎症作用が示唆された[J. Sci. Food. Agric. (2011) 91: 2259-2264]。この Tram は、熱帯地方に多く繁殖しており、ベトナム南部ではこの葉を生で食べる習慣があることから、安全性は高いと推測される。そこで Tram 含有の抗酸化成分を明らかにするため、Tram メタノール抽出液を溶媒分画したところブタノール画分、水画分に強いラジカル消去活性(抗酸化活性)がみられた。このうち、水抽出画分について HP20 カラムクロマトグラフィー、および ODS カラムを用いた分取 HPLC により精製を行い、3種類の抗酸化物質(ピーク 1, 2, 3)を得ることに成功した。そのうち、最も収量の多かったピーク 2 について MS および NMR を用いて構造解析を行った結果、分子量 1720 の新規なエラジタンニン的一种であることを明らかにし、この物質を Zeylaniin A と命名した[J. Agric. Food Chem. (2012)]。Zeylaniin A の DPPH ラジカル消去活性は Trolox 当量で 19.18 molTE/mol と強く、ORAC 活性は 4.37 molTE/mol であった。また、マロンアルデヒドによる脂質過酸化の抑制効果も認められ Zeylaniin A はすべてのアッセイ系において抗酸化作用を発揮した。この値は、最も抗酸化活性の強いポリフェノール類であるケルセチン、ルチンの純品 3~10mmol Trolox eq/g [Oszewska & Michel, Nat Pro Res (2011)] と比較してみても、今までにない強い抗酸化活性を有することは明らかである。従って Zeylaniin A は天然の抗酸化剤として

様々な機能に強い期待が持てる。

Quideau らのポリフェノールに関する総説では、毎日野菜と果物を食べるのが健康長寿につながるがその理由についてはまだはっきりとわかっていないが、多く含まれるポリフェノールが関与していると考えられる。さらにポリフェノール類の生理活性については心臓病や痴呆、ガン、糖尿病等の生活習慣病防止作用があることが多くの研究で明らかにされている。ポリフェノールは抗酸化活性が高いが、重合するとタンパク質と非特異的に結合し、酵素を失活させるとともに、ポリフェノール類は高次の立体構造をとるために特異的に特定の酵素阻害を行うものもある。また、ゲニステインのようにホルモン受容体と特異的に結合し生理活性を示すものもある [S. Quideau et al., Angew. Chem. Int. Ed. (2011), 50, 586-621]。

従って我々が精製した新規抗酸化化合物 Zeylaniin A にもこれらの生理機能を持つことが考えられるが、まだ誰も検討していない。

2. 研究の目的

ベトナムの食用植物 Tram には非常に強い抗酸化活性が認められており、申請者らはその成分を分析し、抗酸化活性の非常に強いポリフェノールを精製し、Zeylaniin A と命名し構造を決定し新規エラジタンニンであることを明らかにした。この Zeylaniin A や未同定の Tram の他の含有物質を生活習慣病予防などに用いるためにはその機能の解明および安全性の確認が必要である。そこで本研究では in vitro アッセイ系や動物実験により抗酸化力、抗紫外線活性等のほか、各種のポリフェノールで認められている糖尿病等の生活習慣病に対する予防作用等を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試料調製および含有化合物の同定

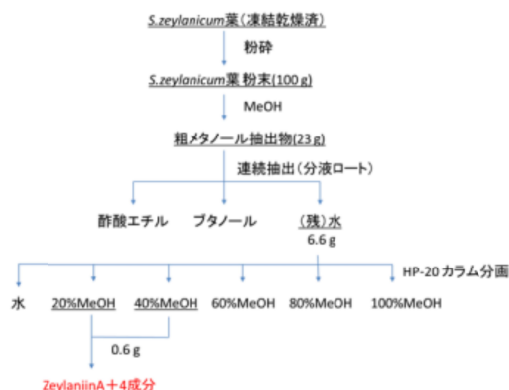
抽出

凍結乾燥した *Syzygium zeylanicum* 葉をフードプロセッサーを用いて細かく粉碎した。その粉末(100 g)を1 Lの MeOH に24時間浸漬した。抽出液のみ回収し、残渣を再び1 Lの MeOH に24時間浸漬させ抽出液を回収した。2つの抽出液を混合し、減圧ろ過装置を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで減圧濃縮し、粗 MeOH 抽出物(23.0 g)を得た。粗 MeOH 抽出物(23.0 g)を蒸留水 500 mL に溶解させた後、酢酸エチル、ブタノール各 500 mL を用いて分液ロートで分画した。その後、抗酸化活性が示されていた残渣の水画分のみを減圧エバポレーターで濃縮し、抽出物を得た。

水画分のカラム分画

抽出で得られた水画分(6.6 g)を蒸留水 200 mL に溶解し、150 mm×30 mm ダイヤイオ

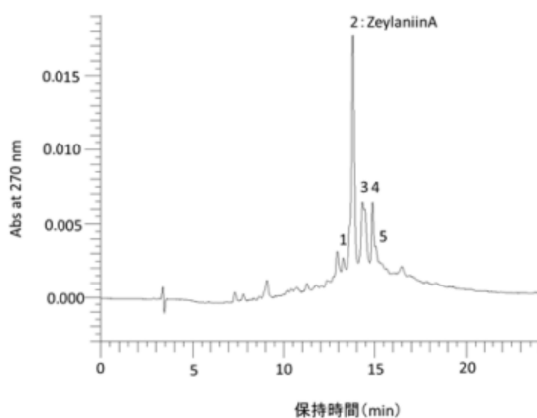
ン HP-20 (三菱化学株式会社)でのカラムクロマトグラフィーに供した。HP-20 カラムに溶解させた水画分をロードし、吸着させた。



その後、0, 20, 40, 60, 80, 100%MeOH各 300 mL で順に溶出させ、画分毎に回収した。

ODS カラムを用いた HPLC 分析

水画分の HP-20 カラム分画で得られた 0~100%MeOH 画分抽出物少量を蒸留水に溶解させ、HPLC で分析を行った。そのうち、



Zeylanin A 及び未同定の 4 成分を含む画分 (20-40% MeOH 画分)を回収し、減圧エバポレーターで濃縮した。凍結乾燥した粉末試料を動物試験に用いた。水画分、ブタノール画分について HPLC 分析を行い、含有化合物の単離・同定を行った。

(2) 培養細胞による抗酸化活性、抗紫外線活性の検討

NB1RGB 細胞を 24well プレートに播種し同時に 5, 25, 50 μ M の Zeylanin A を 24 時間作用させた後に培地を除き UVA を照射し、その後照射前の培地に戻し培養した。24 時間後の細胞生存率及び DNA の断片化をそれぞれ MTT assay、電気泳動で、2 時間後及び 12 時間後の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した。

(3) 動物実験

飼育

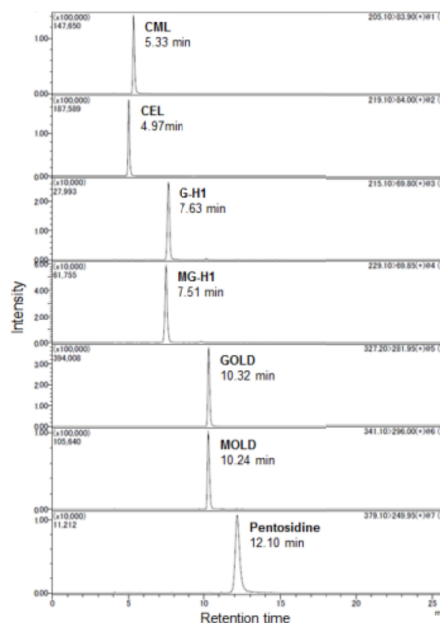
日本クレア (株) より KK-Ay/TaJcl 種 10 週令のオスのマウス 13 匹を購入し、7 匹をコントロール群、6 匹をゼーラニン群とし、それぞれ 6 連のケージに 1 匹ずつ入れ、1 月

26 日~2 月 5 日の 11 日間飼育した。飼育室は、温度 17、湿度 55%、水温 9 で、照明は 6 時~20 時に点灯するように設定をした。エサは日本クレア (株) の放射線滅菌試料 CE-2(粉末)を購入し、コントロール群にはそのまま与え、ゼーラニン群には上記の粉末試料に 0.1%Zeylanin A を混ぜたものを与えた。

飼育時には、体重と食べたエサの量、尿糖(エームス尿検査試験紙:ヘマコンピスティックを使用)を測定し、記録した。11 日目の 2 月 5 日の午後に解剖を行い、血糖値(テルモ:メディセーフミニ使用)の測定、血液、肝臓、膵臓の摘出を行い、ドライアイス(-79 度)で急速冷凍したのち-20 度で保存し、後日それぞれの分析を行った。

AGE の測定

Advanced Glycation End Products (AGEs) の測定は LC-MS/MS を用いて行った。質量分析装置は QTRAP5500 (AB SCIEX 社製)を用いた。AGEs 7 種 (CML, CEL, G-H1, MG-H1, GOLD, MOLD, Pentosidine) の標品を用いて、LC-MS/MS による MRM 条件の最適化および分離カラムの選別を行った。開発した LC-MS/MS による定量法を用いて、分析方法の妥当性を検討するとともに、正常マウスおよび糖尿病マウスなどの血清試料の分析を行った。



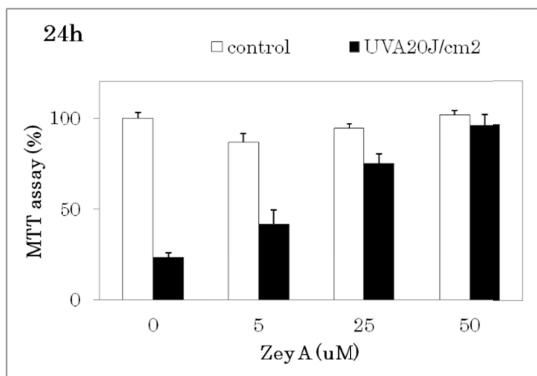
4. 研究成果

(1) 培養細胞における Zeylanin A の抗紫外線活性

UVA 照射 0h 後ではすべての群で UVA 照射により細胞生存率が有意に低下した。しかし Zeylanin A を添加していない群と比べ、Zeylanin A を 50 μ M 添加した群では UVA 照射時の細胞生存率が有意に上昇した。

UVA 照射 24h 後では Zeylanin A を添加し

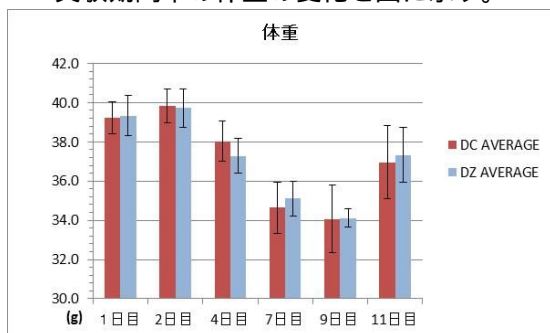
ていない群及び 5uM、25uM 添加群では UVA 照射により細胞生存率が有意に低下したが、50uM 添加群では UVA を照射していない群と同等の細胞生存率となった。また、Zeylanin A を添加していない群と比べ、Zeylanin A を添加したすべての群で UVA 照射時の細胞生存率が有意に上昇した。



(2) 動物実験による Zeylanin A の抗糖尿病活性

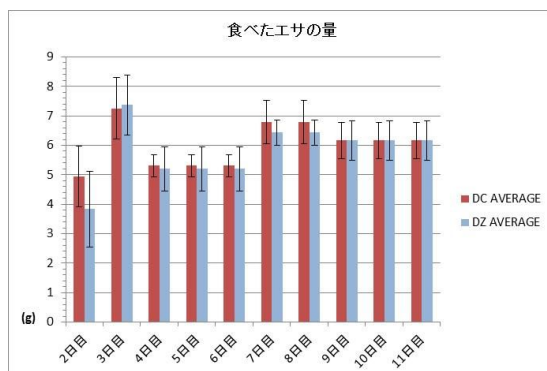
体重の変化

実験期間中の体重の変化を図に示す。



5日目6日目にエサの補充ができなかったため、4日目から7日目の間で体重が大きく減少してしまった。しかしながら Zeylanin A 添加飼料群 (DZ) と無添加群 (DC) の2群間には有意差はなかった。

エサの摂取量の変化



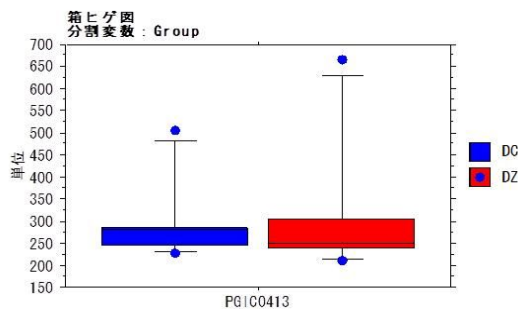
飼育期間中のエサの摂取量を測定した。間にエサの補充ができない日を挟む場合は、前

日に与えるエサの量を増やして飼育をした。エサの摂取量に大きな変化はなく比較的一定であり、2群の間に摂取量の差はなかった。

血糖値

解剖時の随時血糖について測定した。平均値はコントロール群 304mg/dl、ゼーラニーン群 320mg/dl であり、2群に大きな差はなかった。

血糖値

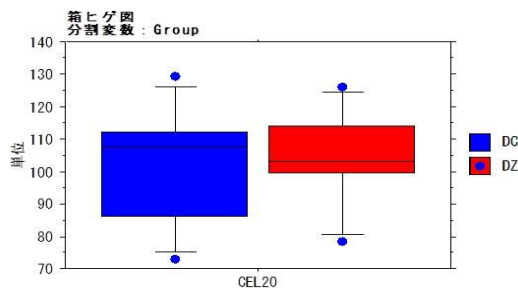


AGE 類の測定

分離カラムに Intrada Amino Acid (Imtakt社製)を用いて、適切な MRM 条件を組み合わせることにより、イオンペア試薬を用いずに高感度で簡便な LC-MS/MS 定量法を構築することが出来た。標準添加法および安定同位体による内部標準法による検量線を作成した結果、0-20 ng/mL の範囲で良好な感度および直線性 ($R^2 > 0.99$) を示した。この方法により、解剖時に採取した血液から AGE を測定した。

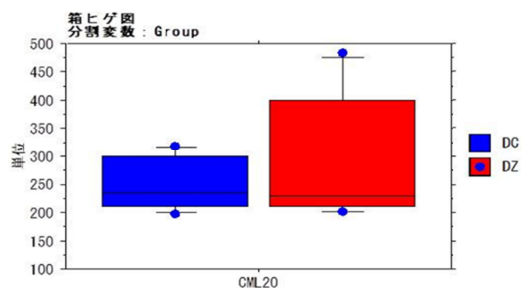
カルボキシエチルリジン (CEL)

CEL はメチルグリオキサールとリジンが反応してできると推定されている、メイラード



反応生成物の一つで、Advanced Glycation End Products (AGE) の一種である。加齢により増加することから糖尿病マーカーになると期待されている。

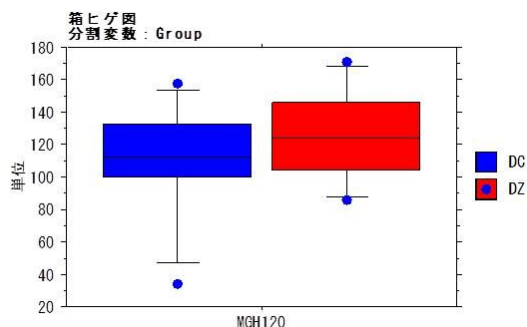
カルボキシメチルリジン (CML)



CML はグリオキサールとリジンが反応してできると推定されている、メイラード反応生成物の一つで、Advanced Glycation End Products (AGE)の一種である。加齢により増加することから糖尿病マーカーになると期待されている。

Methylglyoxal derived hydroimidazolone (MG-H1)

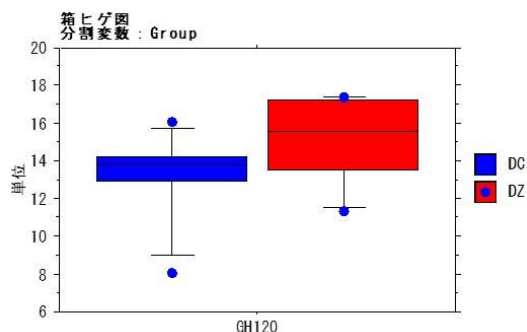
MG-H1 はトリオ スリン酸から生成するメチルグリオキサールと反応してできる AGE の一



種で AGE の中でも主要なもののひとつである。糖尿病ラットで上昇するという報告がある (Chenら、Physiological Report 2015 他)。

Glyoxal derived hydroimidazolone (G-H1)

GH1 はグリオキサール由来の AGE の一種で、糖尿病との関連が調べられているが含有量は低い。

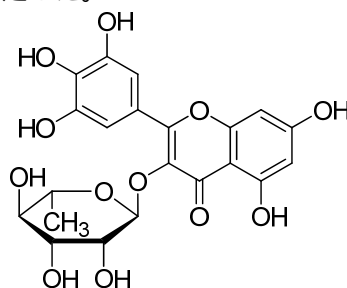


AGEs のうち測定できたのは上記の CEL, CML, MG-H1, G-H1 の 4 種類であった。その他の AGE は検出感度以下の濃度であった。それぞれ個体差はあったものの、両群の平均値を比較するとどれも有意差は出なかった。

今回の実験で大きな差が見られなかった原因は、解剖前に絶食にしなかったために、直前まで摂取していたエサの影響が出た可能性が考えられる。今後は、エサの分析と飼育方法の見直しが必要である。

(3) TRAM 中の新たな抗酸化物質の探索
TRAM のブタノール画分より抗酸化性の高

い物質を精製し構造を決めたところ myricitrin と判明した(下図)。また、水分に含まれる Zeylanin A 以外の成分についても構造解析を行ったところ、bergenin を同定した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Nomi Y, Masuzaki R, Terasawa N, Takenaka M, Ono H, Otsuka Y, *et al.* Formation mechanism and characterization of diacyl-dipyrrolones, the Maillard-type yellow pigments. Food Funct. 2013; 4(7):1067-75.

2. Sone Y, Hirasawa R, Ichi I, Ishikawa T, Kodama S, Sone H, Otsuka Y, *et al.* Efficacy of Habitual Exercise for Improving Lipid Profiles Depends on the PPRA Genotype in Japanese Males. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2014; 60(1):66-70.

3. Yamaguchi K, Homma T, Nomi Y, Otsuka Y. Characterisation of Maillard reaction products derived from LEKFD--a pentapeptide found in beta-lactoglobulin sequence, glycosylated with glucose--by tandem mass spectrometry, molecular orbital calculations and gel filtration chromatography coupled with continuous photodiode array. Food Chem. 2014; 145: 892-902.

4. Shimizu Y, Miyakura R, Otsuka Y. Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 inhibits extrinsic apoptosis and reduces caspase-8 activity in H2O2-induced human HUC-F2 fibroblasts. Redox Rep. 2015; 20(2):81-8.

[学会発表](計 9 件)

「オーファンレセプターNR4A3 は酸化ストレス応答転写因子でサイクリンEの転写調節を行う」山田元子、高橋美鶴、清水友里、藤田宏美、曾根保子、能見祐理、上田悦子、大塚讓
日本分子生物学会 2014年(横浜)

「メイラード反応生成物のLC/MS/MSによる分析と体内動態の解析」重森美里、能見祐理、上田悦子、大塚讓 他、日本分子生物学会 2014年(横浜)

“Orphan receptor NR4A3 is oxidative stress responsible transcription factor and controls cyclin E” Yuzuru Otsuka, Motoko Yamada, Etsuko Ueta, Hiromi Fujita, Mituru Takahashi, Yuri Shimizu, Yuri Nomi, アジア栄養学会議 2015(横浜)

「LC-MS/MSによる食品中のメイラード反応産物の分析」小野澤真理子、重森美里、能見祐理、松井芳光、山本祐司、本間清一、大塚讓 他 日本農芸化学会 2015年(岡山)

“Simultaneous quantification of advanced glycation endproducts without ion-pair reagents by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human serum”
Yuri NOMI, Etsuko UETA, Tsuyoshi OHKURA, Kazuhiro YAMAMOTO, and Yuzuru OTSUKA
日本分子生物学会 2015年(神戸)

他

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

NCBI Gene Expression Omnibus data
base:Series GSE83369
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE83369>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚讓 (OTSUKA, Yuzuru)
戸板女子短期大学・食物栄養科・教授
研究者番号：20135833

(2) 研究分担者

新藤一敏 (SHINDO, Kazutoshi)
日本女子大学・家政学部・教授
研究者番号：80350180

上田悦子 (UETA, Etsuko)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：40335526

能見祐理 (NOMI, Yuri)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号：20614887

山口敬子 (YAMAGUCHI, Keiko)
日本女子大学・家政学部・助教
研究者番号：00440074

(3) 連携研究者

三原瞳 (MIHARA, Hitomi)
戸板女子短期大学・食物栄養科・助手
研究者番号：20774631

(4) 研究協力者

柴本崇行 (SHIBAMOTO, Takayuki)
Distinguished Professor, Department of
Environmental Toxicology, University of
California, Davis,