

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700848

研究課題名(和文)食品の非可食部に由来するポリフェノールの脂質代謝調節

研究課題名(英文)Regulation of lipid metabolism by polyphenols derived from non-edible part

研究代表者

田村 倫子 (TAMURA, Tomoko)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：60451845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：食品の非可食部に由来するポリフェノールの脂質代謝調節を調べるため、ラッカセイ種皮から3量体プロアントシアニンepicatechin-(4,6)-epicatechin-(2,0,7,4,8)-catechin(EEC)を単離した。EECのコレステロールミセル不溶化能は2量体のプロシアニンA1よりも高かった。一方、糖質分解酵素阻害作用は、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性は(+)-カテキンとプロシアニンA1に無く、EECは濃度依存的に活性を阻害した。スクラーゼ活性阻害率はEEC>プロシアニンA1>(+)-カテキンであった。以上よりプロアントシアニンは重合度により機能が変化することを認めた。

研究成果の概要(英文)：We identified epicatechin-(4b->6)-epicatechin-(2b->0->7, 4b->8)-catechin (EEC, a proanthocyanidin trimer) in the skin of the peanut (*Arachis hypogaea* L.). EEC showed more potent cholesterol micelle-degrading activity than procyanidin A1 (a dimer) in vitro. The hypercholesterolemia suppressing effect of a peanut skin polyphenol on rats fed high-cholesterol diet in our preceding experiments might thus have been due primarily to a micelle-degrading effect in the intestine. Then we showed peanut skin extracts reduces blood glucose levels in rats administered starch, sucrose or glucose. Then inhibition activities of sugar digestion enzyme by proanthocyanidins from peanut skin were investigated and EEC inhibited  $\alpha$ -amylase activity in a dose-dependent manner, while (+)-catechin and procyanidin A1 did not. These results indicate that procyanidins of different degrees of polymerization will different activities of cholesterol micelle-degrading activity and sugar digestion enzyme.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ポリフェノール プロアントシアニン ラッカセイ種皮 コレステロールミセル 血糖値 糖質分解酵素阻害 重合度

### 1. 研究開始当初の背景

日常の食生活によって未然に疾病を防ぐことを目指した食品の機能性に関する研究は、国際的に大きく発展してきた。食品中には、既知の栄養素のほかに生理・薬理機能を発揮する物質が多数存在する。ポリフェノールは植物の二次代謝産物であり、植物の生体内では紫外線や病原体に対して自己防御物質として機能するが、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 (Scalbert A. et al., *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, pp 287-306, 2005)。従来、食品の機能性についての研究の多くは、食品中から単離した成分の生体内における作用機序や適切な摂取量の検討が主たるものであり、生体内物質と相互作用する際の分子の形状や他の食品成分と結合する場合の構造学的特徴といった、物質化学からのアプローチは少ないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

食品加工の際に廃棄されるラッカセイ種皮から、脂質および糖質の代謝に關与するポリフェノールを単離し、その作用機序を検討することである。これまでにラッカセイ種皮から2量体のプロシアニジン A1 を単離したが、今回は、3 量体以上のプロアントシアニジンの単離同定を目指した。さらに、単離した3 量体プロアントシアニジンを用い、単量体のカテキン、2 量体のプロシアニジン A1 とともに、コレステロールミセルの不溶化能におけるポリフェノールの重合度の差異を明らかにすることを目的とした。糖質代謝とポリフェノールに関しては、糖質を負荷したラットにラッカセイ種皮抽出液を投与して血糖上昇抑制作用を検討するとともに、糖質分解酵素に対する(+)-カテキン、2 量体、3 量体プロアントシアニジンの阻害作用を比較検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)低分子ポリフェノールの分離と構造決定  
ラッカセイ種皮を熱水で抽出し、ラッカセイ種皮抽出液(PSE)を得た。PSE を分画分子量 3,000 のウルトラフィルターで限外濾過し、得られた濾液に含まれる低分子ポリフェノールをゲルクロマトグラフィーおよび中圧液体クロマトグラフィー(MPLC)で分離した。ゲルクロマトグラフィーは TSKgel Toyopearl HW-40F(東ソー製)を用い、メタノールおよび 80%含水アセトン溶液で溶出し、ポリフェノールを吸収波長 280nm で検出した。MPLC は逆相カラムの ODS-AQ(YMC 製)を用い、メタノールおよび 0.1%ギ酸溶液でグラジエント溶出した。単離した低分子ポリフェノールを重メ

タノールに溶解し、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>CNMR、各種 2 次元 NMR によって構造を検討した。総ポリフェノールの定量は Folin-Ciocalteu 法で行い、(+)-catechin 当量として算出した。

### (2)コレステロールミセルに及ぼすプロアントシアニジンの影響

コレステロール含有胆汁酸ミセルの調製  
0.5mM コレステロール、0.6mM ホスファチジルコリン、6.6mM タウロコール酸ナトリウム、132mM 塩化ナトリウム、15mM リン酸ナトリウム緩衝液のミセル溶液(pH7.4)を調製し、超音波処理を 30 分間行い、さらに 37 °C で 24 時間保温したものをコレステロール含有胆汁酸ミセル溶液とした。

#### コレステロールミセル溶解性試験

調製したミセル溶液 5 mL に(+)-カテキン、プロシアニジン A1、(1)の方法で PSE から単離同定単離したプロアントシアニジンである epicatechin-(4,6)-epicatechin-(4,8,2'-O-7)-catechin (EEC)100 μL を添加し、37 °C で 1 時間反応させた。反応後、ミセル溶液を 1000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を孔径 0.22 μm のメンブランフィルター Millex GP(ミリポア社)を用いて濾過した。この濾液中に残存するコレステロールをガスクロマトグラフィーで分析し、内部標準にカンペステロールを用いて定量した。

### (3) 血糖上昇抑制作用に及ぼすプロアントシアニジンの影響

#### 糖負荷ラットに対する血糖上昇抑制作用

6 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、PSE (125、250 mg/kg)、分子量 10,000 以下の低分子画分および 10,000 以上の高分子画分 (125 mg/kg) を胃内投与し、10 分後に 40% デンプン、マルトース、スクロース、グルコース溶液(2 g/kg)を投与した。投与 30、60、90、120 分後に尾静脈採血を行った。

#### プロシアニジンの糖質分解酵素阻害作用

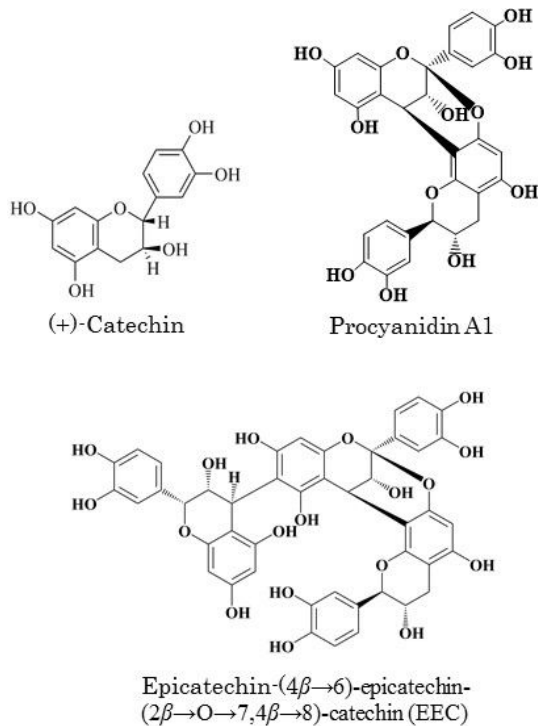
(+)-カテキン、プロシアニジン A1、EEC を、 $\alpha$ -アミラーゼとラット小腸アセトン粉末より作製した酵素溶液に添加し、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼ活性の阻害作用を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)低分子ポリフェノールの分離と構造決定

PSE の分子量 3,000 以下の画分に含まれる低分子ポリフェノールをゲルクロマトグラフィーで分離し、メタノールで溶出されず 80%含水アセトンで溶出された画分から、三量体の epicatechin-(4,6)-epicatechin-(4,8,2'-O-7)-catechin(EEC)を単離・同定

した(図1)。EECは、重メタノール中、-40のNMR測定条件下で、epicatechin-(4-6)-epicatechinのB-type結合に起因する2種類のconformerが1:1の比率で存在することが確認された。なお、乾燥ラッカセイ種皮中



に、(+)-catechinは0.32mg/g、procyanidin A1は7.55mg/g、EECは2.96mg/g含有された。

図1 ラッカセイ種皮由来のポリフェノール

### (2) コレステロールミセル溶解性に及ぼすプロアントシアニジンの影響

(+)-カテキンはコレステロールミセル溶解性に影響を与えなかったが、二量体および三量体プロアントシアニジンはコレステロールミセル溶解性を低下させた。特にEECはより強くコレステロールを不溶化させた(図2)。このことから、単量体の(+)-カテキンではミセルからのコレステロール遊離は起きないが、二量体、三量体のプロアントシアニジンの場合はミセルからのコレステロール遊離が起きるものと考えられ、それには重合度(立体構造)が大きく関与すると推察された。

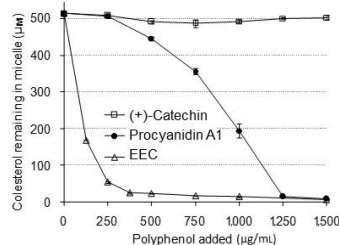


図2 プロアントシアニジン類のミセル不溶化

### (3) 血糖上昇抑制作用に及ぼすプロアントシアニジンの影響

糖負荷ラットに対する血糖上昇抑制作用

ラットにデンプン、マルトース、スクロースのいずれの糖を投与した場合も、投与後30分で血糖値は最大になった。糖とともにPSEを投与すると、血糖値の急激な上昇が緩和され、血糖上昇抑制作用が認められた。PSEを低分子画分と高分子画分に分画すると、低分子画分よりも高分子画分の方が血糖上昇を強く抑制した。

ポリフェノールによる血糖上昇抑制作用については、糖質分解酵素の活性を阻害し、多糖類の分解を阻害する作用、グルコーストランスポーターあるいはフルクトーストランスポーターを経由する糖の透過を阻害する作用などが明らかにされている(Hanhineva K, et.al., *Int. J. Mol. Sci.* 11, pp1365-1402, 2010)。本実験においては、ラットに単糖・多糖のいずれを投与した場合も血糖上昇が抑制されたことから、ポリフェノールによる糖質分解酵素阻害と糖の透過阻害のどちらの可能性も考えられた。そこでまずプロアントシアニジンの糖質分解酵素阻害作用を検討した。

プロアントシアニジンの糖質分解酵素阻害作用

-アミラーゼ阻害活性は5 mg/mLまでの濃度においては(+)-カテキンおよびプロシアニジン A1 には見られなかったが3量体のEECにのみ認められた(図3)。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。スクラーゼ阻害活性はEECがプロシアニジン A1 および(+)-カテキンよりも強かった。

以上から、ラッカセイ種皮に含まれるプロアントシアニジンが血糖上昇抑制作用を有すると共に、プロアントシアニジンの重合度の違いにより、糖質分解酵素の阻害活性が異なることを見出した。

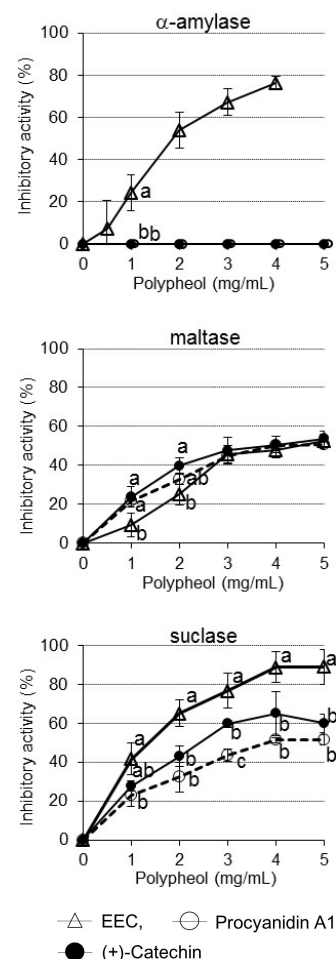


図3 糖質分解酵素の阻害活性

以上のように、食品加工の際に廃棄されるラッカセイ種皮に含まれるポリフェノールの機能性を、*in vivo* における実験で明らかにするとともに、ポリフェノールの構造と機能性の関係について新たな知見を得た。

荒井 綜一 (ARAI Soichi)  
東京農業大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：20011934

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Tomoko Tamura, Naoko Inoue, Megumi Ozawa, Akiko Shimizu-Ibuka, Soichi Arai, Naoki Abe, Hiroyuki Koshino, and Kiyoshi Mura, Peanut-Skin Polyphenols, Procyanidin A1 and Epicatechin-(4 $\beta$ →6)-epicatechin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-catechin, Exert Cholesterol Micelle-Degrading Activity *in Vitro*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 77, 1306-1309  
Doi:10.1271/bbb.121023

〔学会発表〕(計5件)

海老澤隆史、小澤恵実、田村倫子、村清司、荒井綜一「ラッカセイ種皮プロアントシアニジンの抗酸化活性」日本食品科学工学会、2013年8月30日、実践女子学園

〔図書〕(計1件)

大石裕一、服部一夫、田村倫子、他『食べ物と健康 食品学』光生館、2013年3月、pp.201-218

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nodai.ac.jp/safety/original/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・助教  
研究者番号：60451845

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

村 清司 (MURA Kiyoshi)  
東京農業大学 応用生物科学部・教授  
研究者番号：40112883

阿部 尚樹 (ABE Naoki)  
東京農業大学 応用生物科学部・教授  
研究者番号：70291581