

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560064

研究課題名(和文)アピオス(ホドイモ)が有する抗男性ホルモン機能の解明

研究課題名(英文)Studies on the biological activities of *Apios americana* Medik.

研究代表者

新藤 一敏(Shindo, Kazutoshi)

日本女子大学・家政学部・教授

研究者番号：80350180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアピオス(*Apios americana* Medik, 和名ホドイモ)に新規化合物を含む8種のイソフラボン配糖体(化合物1 - 8)が存在することを初めて明らかとし、それらの化学構造を決定するとともに、生理活性を検討した。その結果、化合物2, 5が男性ホルモン拮抗作用を有するを見出した。しかしイソフラボン配糖体は小腸で、 β -グルコシダーゼ作用でアグリコンとなって血液中に吸収されて生理活性を示すことが報告されているので、次に化合物1 - 8を酵素処理してアグリコンとして(化合物9 - 12)、それらの活性を調べた。その結果、化合物10が強い女性ホルモン様作用を有することを発見した。

研究成果の概要(英文)：We found 8 isoflavone glucosides (compound 1 - 8) in *Apios americana* Medik, and examined their biological activities. We found compound 2 and 5 possess moderate androgen antagonistic activities.

Isoflavone glucosides were reported to be hydrolysed to the corresponding aglycones by β -glucosidase in intestine. Thus, we prepared the aglycones of compounds 1 - 8 (compound 9 - 12) by enzymatic (β -glucosidase) digestion, and examined androgenic and estrogenic activities of compound 9 - 12. As the result, we found compound 10 possess potent estrogen agonistic activity (the potency was about half of genisten).

Next, we checked loss of compound 5 by heat cooking processes (boiled, fried, steamed, and microwave cooked). Since more than 2/3 of compound 5 was lost in any cooking processes, isoflavone compounds were proved to be easily broken by heat treatment.

研究分野：食品化学

キーワード：女性ホルモン様作用 男性ホルモン拮抗作用 イソフラボンアグリコン イソフラボン配糖体

1. 研究開始当初の背景

アピオス (*Apios americana* Medik) はマメ科アピオス属の多年草で、ホドイモ (塊芋) またはアメリカホドイモ (英語では groundnut) とも呼ばれている。主に北アメリカの東部から中部に分布している。アピオスには、ジャガイモと比べて、カルシウムが 30 倍、鉄分が 4 倍、タンパク質は 3 倍、食物繊維は 5 倍含まれており、リン、ナトリウム、カリウムといったミネラルも多く含まれている。100 g 総エネルギーは従来のイモ類の中では最高であり (サツマイモの 1.6 倍、ジャガイモの 2.6 倍)、他のイモ類には含まれないビタミン E も含まれている。このようにアピオスは栄養価が高いため、健康に有益な食用農作物として注目を集めており、日本でも規模は小さいながら、商業栽培が開始されている。しかしながら、アピオスに薬理活性を有する低分子化合物が含有されているという報告はこれまで全く無かった。そこで本年度、当研究室でアピオスに含有される化合物について予備的な分析を実施した結果、Fig. 1 に示す新規化合物を含むイソフラボン配糖体 6 個が含有されていることを初めて見出した。さらにそれらの生物活性を検討したところ、驚くべきことに、これらの化合物が選択的抗アンドロジェン (アンドロゲン) アンタゴニスト活性 [エストロジェン (女性ホルモン) アゴニスト・アンタゴニスト作用は有さない] を有することも判明した。

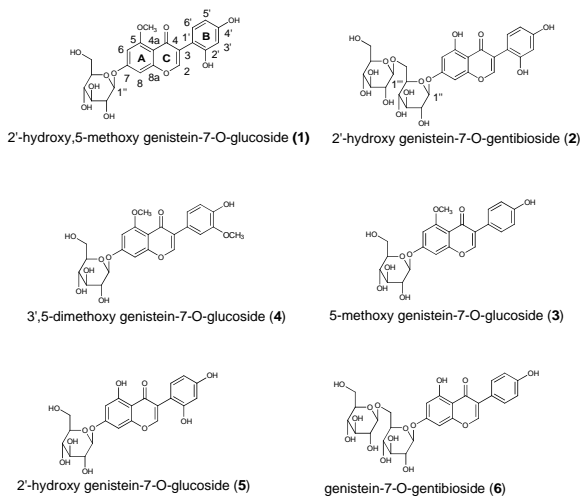


Fig. 1 The structures of isoflavone glucosides

2. 研究の目的

本研究の目的は以下に列記した ~ である。

石川県立大学で栽培されたアピオスに含有されるイソフラボン配糖体をすべて単離・構造解析し、それらの化学的特性を明らかにすると共に、純品化合物の大量調製を行うことを目的とする。

アピオス (あるいはそのエキス) 及び単離された各化合物純品を用いて、in vitro, in vivo 評価系でそれらの抗アンドロジェン作用を詳細に検討する。

イソフラボン配糖体は小腸で β -glucosidase により糖が外れてアグリコンとなって血液中に移行することが判明したため、イソフラボンアグリコンの活性についても検討を行う。

アピオスは食品であるため、作用検討と並行して、含有されるイソフラボン配糖体を摂取する場合に適した調理法の明確化までを実施する。

よく知られているイソフラボンアグリコンである genistein から、今回我々が見出した希少イソフラボンアグリコンが P450 library を用いた bioconversion により調製できないかについて検討を行う。

3. 研究の方法

イソフラボンに含まれるすべてのイソフラボン配糖体の単離精製には、アピオスメタノール抽出物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60, 20 mm x 300 mm, CH₂Cl₂:MeOH=3:1:0.1 で展開) 及び ODS HPLC 分取 (SenshuPak ODS 20 mm x 250 mm, 15% MeOH で展開) さらに必要に応じて C30 HPLC 分取 (Developsil C30, 15% MeOH) によって実施した。

の実施に伴い、さらに 2 つの新規イソフラボン配糖体 (7, 8) が得られたので、それらを含めて計 8 種のイソフラボン配糖体について、in vitro エストロジェンレセプター、アンドロジェンレセプター結合作用を検討した。アンドロジェンレセプター結合作用が認められた化合物については、LNCap ヒト前立腺癌細胞への PSA 産生促進、誘導活性を検討して、アンタゴニストであるかアゴニストであるかを検討した。さらに LNCap 細胞のアンドロジェン依存的増殖能 (in vitro) に与える影響について検討を行った。

イソフラボンアグリコンを調製するため、アピオス MeOH 抽出物を市販の 1 M の濃度の β -glucosidase と一昼夜インキュベートした。調製されたイソフラボンアグリコンは、C30 HPLC 分取 (Developsil C30, 15% MeOH) により単離を行った。得られた希少イソフラボン 4 種については、in vitro エストロジェンレセプター、アンドロジェンレセプター結合作用、MCF-7 ヒト乳がん細胞に対する増殖促進作用を検討した。また、 α -glucosidase 阻害作用についても検討を行った。

アピオスの非加熱 (生) MeOH 抽出物と、種々の加熱調理後の MeOH 抽出物を調製し、HPLC 分析で、イソフラボン配糖体量の減少を検討した。

今回の研究で見出した希少イソフラボンアグリコンを gensitein から調製できないかについて、共同研究者である石川県立大が保有する P450 組換え大腸菌ライブラリーの菌と genistein を共培養 HPLC 分析することにより検討を行った。

4. 研究成果

アピオス抽出物のうち、さらに水溶性が高い画分に類似の UV 吸収を有する化合物が 2 つ存在することが新たに判明したため、これらの単離精製と構造解析（各種 NMR 解析、HRESI-MS 分析）を行った。その結果、以下に示す化合物 7, 8 を追加して発見することができた。このうち化合物 7 は新規化合物であった。

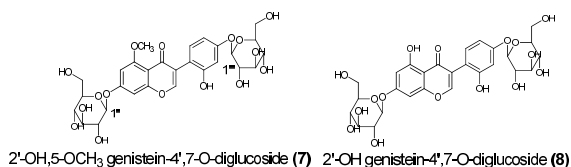


Fig. 2 The structures of isoflavone glucosides

で得られた化合物 1 - 8 についてエストロジェンレセプター、アンドロジェンレセプター結合作用を検討した。結果を Table 1 に示す。

Table 1. Effects of compounds 1 - 8 on binding to the androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER).

Compound	AR	ER
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
1	>400	>400
2	280	>400
3	>400	>400
4	>400	>400
5	160	>400
6	>400	>400
7	>400	>400
8	>400	>400
flutamide	39	>400
genistein	270	0.75
daidzein	>400	26

Table 1 に示すように、化合物 1 - 8 はアンドロジェンレセプターに結合する能力を有することが判明したため、次にヒト前立腺癌細胞 LNCap 細胞の PSA 産生に与える影響を検討した。結果を Table 2 に示す。

Table 2. Effects of compounds 1 - 8 on DHT-induced PSA expression.

Compound	IC ₅₀ (μM)
1	>50
2	20
3	>50
4	>50
5	18
6	>50
7	>50
8	>50
Flutamide	2.3

Table 2 に示すように、化合物 2, 5 については、アンドロジェンアンタゴニスト作用を有することが明らかとなった。そこで化合物 2,

5 については、LNCap 細胞のアンドロジェン添加による細胞増殖促進作用を有するか否かについて検討した。残念ながら、両化合物共に、LNCap 細胞のアンドロジェン依存的な増殖促進作用をキャンセルはしなかった（データ示さず）。

イソフラボンアグリコンについては、まずアピオス MeOH 抽出物の b-glucosidase 処理を行ったのち、C30 HPLC 分取（Developsil C30-UG-5 (10 x 250 mm) 30% CH₃CN）により希少イソフラボンアグリコン 4 種を単離精製し、NMR 解析により、その構造を確認した。単離できた 4 種のイソフラボンアグリコン（化合物 9 - 12）の構造を Fig. 3 に示す。

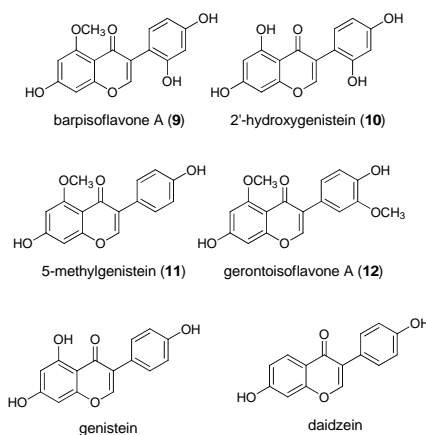


Figure 3. Structures of isoflavones (9 - 12) prepared from *Apros americana* Medik

得られた化合物 9 - 12 について、エストロジェンレセプター、アンドロジェンレセプターへの結合能力を検討した。結果を Table 3 に示す。

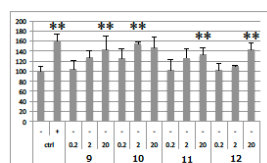
Table 3. Estrogen receptor (ER) and androgen receptor (AR) binding activities of 9 - 12 (IC₅₀ μM).

compound	ER	AR
9	87.5	>200
10	5.0	>200
11	161	>200
12	>200	>200
genistein	0.75	>200
daidzein	26	>200

予想外であったことに、糖が外れたイソフラボンアグリコンでは、アンドロジェンレセプターに対する結合能力が消失し、変わってエストロジェンレセプターに対する結合能があることが判明した。そこで、これらの化合物がヒト乳がん細胞 MCF-7 のエストロジェンに関わる増殖促進作用に対する影響を検討した。結果を Figure 4 に示す。

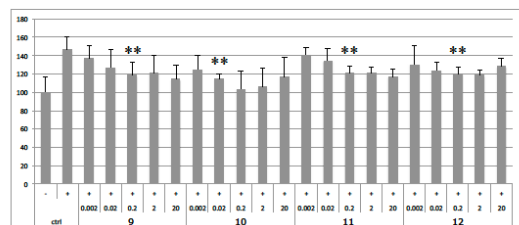
Figure 4 から明らかのように、化合物 9 - 12 はダイズに含有される genistein、daidzein 同様にエストロジェンパーシャルアゴニストとしての作用を有することが始めて明らかとなった。特に化合物 10 の作用は強く、daidzein よりは強く、genistein と比較して

ER agonistic activities of 9-12



** : p < 0.01 when compared with ctrl (Estradiol-)

ER antagonistic activities of 1-4.



** : p < 0.01 when compared with ctrl (Estradiol+)

Figure 4 ER agonistic (2A) and antagonistic (2B) activities of 9-12 on MCF-7 cells.

も 1/2 程度の作用であった。

Genisiten, daidzein には α -glucosidase 阻害作用が報告されている (血糖値抑制作用が期待される)。そこで次に化合物 9-12 の α -glucosidase 阻害作用を検討した。結果を Table 4 に示す。

Table 4. α -glucosidase inhibitory activities of 9-12 (IC_{50} μ M).

compound	
9	>100
10	11
11	13
12	>100
genistein	8.1
daidzein	26

化合物 9-12 のうち、10, 11 は α -glucosidase 阻害作用を示し、それらは daidzein より強く、genistein よりやや弱い程度であった。

さらに genisitein, daidzein には抗酸化作用も報告されているので、それらについてもラット脳脂質過酸化抑制活性で検討した。結果を Table 5 に示す。

Table 5. Antioxidant activities of 9-12 (IC_{50} μ M).

compound	
9	97
10	30
11	110
12	53
genistein	44
daidzein	60

化合物 9-12 は genistein, daidzein と同程度の抗酸化活性を有することを初めて明らかとすることができた。

今回アピオスに存在することが初めて明

かとなったイソフラボン配糖体化合物 5 のトータル量が、加熱調理によってどのように変化するかについて検討した。結果を Figure 5 に示す。

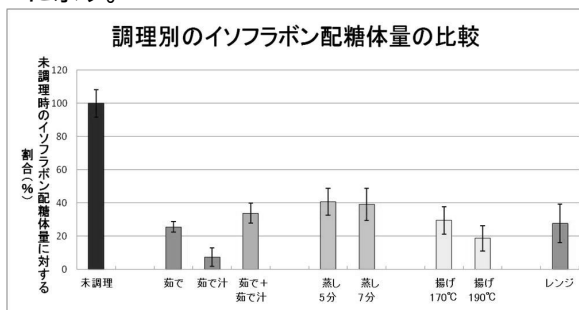


Figure 5. Change of compound 5 amount through heat cooking

化合物 5 は調理時の温度が高いほど、また時間が長いほど減少することが明らかとなった。もっとも穏やかな加熱調理である蒸しでも、60%程度が失われていた (化合物 5 以外も同様の減少傾向であった)。

希少イソフラボンアグリコンである化合物 10 (2'-hydroxy genistein) は、もっとも genistein に近い生理活性を保持していたが、この化合物はイソフラボン骨格の B 環の 2' 位が水酸化された化合物であり、この置換パターンは大変珍しいものであった。また 2' 位に OH 基を導入する酵素は P450 であると推定されたため、石川県立大が保持する種々の P450 組換え大腸菌と genistein を共培養して、化合物 10 が得られないか検討を行った。Genistein に OH 基を導入できる P450 は見出されたが、変換化合物は化合物 10 では無かった (HPLC 重ねうち分析で一致せず、データ示さず)。

[結論]

本研究により、アピオスから新規化合物を含むイソフラボン配糖体 8 種 (化合物 1-8) を単離し、その生理活性を検討したところ、化合物 2, 5 が穏やかなアンドロジェンアゴニスト作用を有することを初めて明らかにすることができた。

またイソフラボン配糖体は小腸でアグリコンに変換されて腸から吸収されるため、主に我々にとって有用な生理活性物質となるのはイソフラボンアグリコンであると考え、それらの生理活性を検討した結果、化合物 10 が、genistein の 1/2 程度のエストロジェンアゴニスト活性を有することを初めて明らかにすることができた。

以上の総合結論として、アピオスはダイズに次いでエストロジェン作用を有するイソフラボン摂取源であることを初めて明らかにすることができた。

また、加熱調理によってイソフラボン配糖体の多くが失われることも初めて明らかにすることができた。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 市毛茉莉奈、福田絵梨奈、三井田早希、八反順一郎、三沢典彦、齋藤駿、藤巻貴宏、井本正哉、新藤一敏、アピオス (*Apios americana* Medik) に含有される新規イソフラボン配糖体及びそれらの抗男性ホルモン作用、2013 年度日本栄養食糧学会、5 月 26 日、名古屋。

2. 国府田美菜、兼田春奈、大川奈々、齋藤駿、井本正哉、新藤一敏、アピオスに含まれるイソフラボン配糖体のアグリコンに関する生理活性検討、2014 年度日本栄養食糧学会、5 月 31 日、札幌。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

三沢典彦 (MISAWA norihiko)
石川県立大学・生物資源工学研究所・教授
研究者番号：30393466