

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：74503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871084

研究課題名(和文)未利用柿果皮の脂肪蓄積抑制作用解明と食品への応用

研究課題名(英文)Prevention of fat accumulation by extract from unutilized persimmon peel and application of it to foods

研究代表者

井土 良一 (IZUCHI, Ryoichi)

公益財団法人東洋食品研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20442585

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)：身近な果実である柿には体に良い成分が豊富に含まれている。果皮は、果肉よりもそれらの成分が高濃度で機能性食品素材として期待できるが、干し柿を製造する際にほとんど捨てられている。果皮を有効利用するために、脂肪蓄積抑制作用を示す成分を探索し、トリテルペノイドの一種であるポモル酸と同定した。その抑制作用の機序を調べ、脂質代謝や脂肪細胞分化に關与する因子に作用する可能性を示した。さらに、水とエタノールを用いて、食品に利用可能な高純度のトリテルペノイドを柿果皮から簡単に抽出する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Persimmon, which is a familiar fruit, has abundantly healthy ingredients. Its peel is expected as a functional food material, because ingredients in the peel is higher concentration than that in the pulp. But, the peel is discarded during dry persimmon processing. To utilize the peel effectively, we found a preventive compound for fat accumulation, and identified as pomolic acid, a kind of triterpenoids. We suggested that pomolic acid controls factors associated with lipids metabolism and adipocyte differentiation. Moreover, we developed a simple way to extract high-purity triterpenoids available for foods from persimmon peel, only with water and ethanol.

研究分野：食品科学

キーワード：柿果皮 トリテルペノイド ポモル酸 脂肪蓄積抑制 GPDH活性 トリグリセリド

1. 研究開始当初の背景

カキはほぼ全国で栽培されており、よく知られた果実である。カキ果実はビタミンやミネラル、カロテノイドやポリフェノールなどが非常に豊富に含まれ、カキを食べることによる健康維持効果が期待できる。しかし、その摂取による効能はあまり知られていない。一方で、果皮は、干し柿加工時に排出し、未利用のまま廃棄されている。果皮には果肉よりも高濃度に機能性成分が含まれていることからその有効利用が期待されている。我々は‘平核無’果皮のアセトン抽出物に培養細胞である 3T3-L1 脂肪細胞に対して脂肪蓄積抑制作用があることを予備的な実験で示した。これにより、カキ果皮は抗肥満効果のある食品素材として利用できると考えた。

2. 研究の目的

利用されずに廃棄されている果皮を有効利用するために、3T3-L1 脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制作用に注目した。本研究では、カキ果皮中の関与成分の同定を行い、その作用機序の解明と摂取した時の生体への効果を検証する。また、食品利用する為の加工方法を開発する。この研究により、廃棄物を削減し、カキ果皮の利用価値を高めることや人々の健康維持に役立てることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 関与成分の同定：脂肪蓄積作用を示した‘平核無’アセトン抽出画分から分取液体クロマトグラフィーを用いてさらに成分を分離した。得られた画分から 3T3-L1 脂肪細胞に対して中性脂肪の合成に関与するグリセロール-3-リン酸脱水素酵素の活性値を低下させる画分のみを選抜した。分画を繰り返すことで、脂肪蓄積抑制作用を持つ単一の成分を分離した。次に、分子量を測定する精密質量分析計や分子内の原子の化学結合状態を検出する核磁気共鳴装置を使って構造解析を行い、成分を同定した。さらに、カキ果皮と他の果実果皮について、関与成分の含有量を高速液体クロマトグラフィーにより定量分析した。

(2) 作用機序の解明：単離・精製した脂肪蓄積抑制成分を添加した培地で培養した 3T3-L1 脂肪細胞から mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法を用いて同時に 39000 遺伝子以上の発現を検出した。関与成分の有無による遺伝子発現の変化パターンからどのような作用機序で脂肪蓄積抑制が生じているかを推定した。

(3) 摂取効果の検証：カキ果皮から精製した脂肪蓄積抑制成分を 0.01% (w/w) 混合した飼料(高脂肪、高コレステロール、高フルクトース)を健康なラットに、10 週間自由摂取させた。試験終了後は麻醉下で血清、肝臓、精巣上体白色脂肪組織を採取し、血清の生化学検査、臓器の組織観察によって摂取効果を評価した。

(4) 有効成分の抽出方法の開発：抽出溶媒にエタノールと水およびその他の食品添加物を用いることで、食品利用可能な有効成分含有抽出物の製造方法を開発した。エタノールと水の混合割合および抽出溶媒への水酸化ナトリウムの添加量を変えることによって脂肪蓄積抑制成分がどの程度抽出できるか最適な条件を調査した。

4. 研究成果

(1) 成分の同定

構造解析により、単離した脂肪蓄積抑制成分はトリテルペノイドの一種のポモル酸であると分かった(図1)。また、カキ果皮には同じトリテルペノイドであるウルソール酸とオレアノール酸も含まれていることが分かった。ウルソール酸やオレアノール酸は多くの生理活性を有することが報告されており、近年注目される天然化合物である。ポモル酸はそれらと比べて強い脂肪蓄積抑制作用を有していることが新たに分かり、ウルソール酸等よりも少量で、同等の生理活性を得られる可能性がある。これにより、食品への添加量を減らし、加工食品の品質への影響を少なくすることが出来ると考えている。

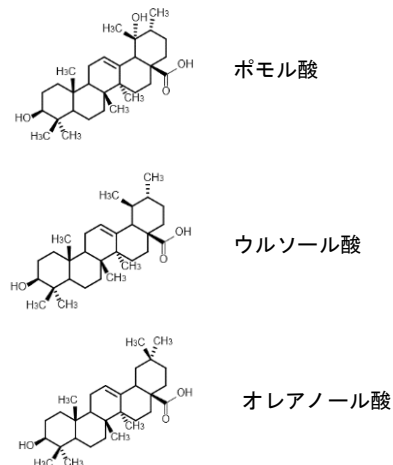


図1 カキ果皮に検出されたトリテルペノイド

(2) 他品種のカキと他品目果実におけるポモル酸含有量の違い

13 品種 15 種類のカキ果皮のポモル酸含有量を調査した結果、たねなしカキとして国内で最も多く生産されている渋カキである‘刀根早生’と‘平核無’の果皮に高含有であることが分かった(図2)。また、果肉部分には検出されなかった。これらの結果から、国内ではポモル酸を多く含んだ多量のカキ果皮が排出されると考えられ、利用価値の高い素材であることを示した。

次に、カキ以外 5 品目の果実果皮におけるポモル酸含有量を調査した結果、カキ果皮に比べてリンゴ果皮に高濃度に含まれていることが分かった(図3)。リンゴはカキよりも国内生産量が多く、ジュースなどの加工品も多

く製造されているため、食品加工残渣の有効利用が期待できる。一方で、カキ果皮は骨粗鬆症、糖尿病などへの効果で多くの知見があるβ-クリプトキサンチンが豊富に含まれており、これとの相乗効果が期待できる点でリンゴとは異なる価値があると考えている。

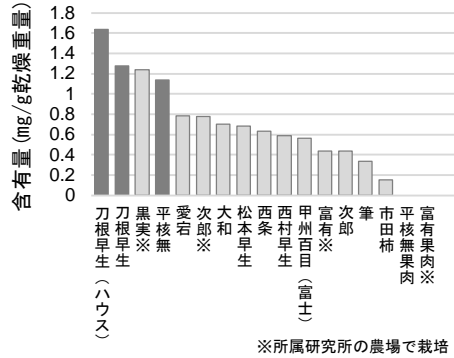


図2 カキ品種間のポモル酸含有量の違い

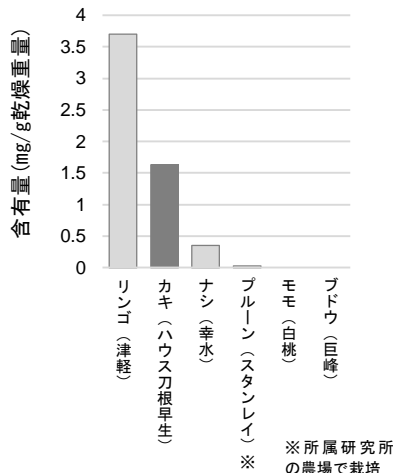


図3 果実の種類による果皮中ポモル酸含有量の違い

(2) 作用機序の解明

網羅的遺伝子発現解析により、ポモル酸で処理された 3T3-L1 脂肪細胞は糖代謝に関わる遺伝子群の発現増加と脂質代謝とコレステロール合成に関わる遺伝子群の発現低下が見られた。さらに詳細な解析を進めた結果、ポモル酸は脂質代謝や脂肪細胞分化を調節している PPAR γ と呼ばれる転写因子の作用を変化させている可能性が示された。PPAR γ は肥満だけではなく、糖尿病改善や抗炎症に関することも知られており、ポモル酸には多くの効果が期待できるかもしれない。

(3) ラットへの投与効果

健康なラットにポモル酸を 0.01% となるように添加した飼料を 10 週間自由摂取させた結果、肝機能マーカーの一つである血清 ALT と脂質代謝と関連のある血清総ケトン体が低下傾向を示した。ポモル酸には、肝機能を保護する効果と、抗肥満に対する効果は未解明だが、脂肪酸代謝を亢進させる可能性を示し

た。

(4) 食品利用可能な抽出物の製造方法の開発
トリテルペノイドはアセトンやメタノール等の有機溶剤で容易に抽出可能であるが、溶媒の除去、さらに純度を向上させるための分離工程には特殊な設備が必要となる。また、食品に利用する際は安全性の面から有機溶剤の使用は避ける必要がある。食品に利用可能で容易に高純度のトリテルペノイドを製造する方法を開発するために、抽出溶媒に水とエタノールのみを使用した抽出方法を検討した。ウルソール酸、オレアノール酸はカルボキシル基を有しており、アルカリ性条件下で含水エタノールへの溶解性を向上させることが既に特許文献等で報告されている。そこで、水酸化ナトリウム (NaOH) を加えた含水エタノールを使用したところ、トリテルペノイド抽出不可能なエタノール濃度 (30%以下) でも抽出可能になった (図4)。NaOH 濃度は 0.5% 以上で抽出効率が最大となり、40、50%エタノールでは抽出液中へのカロテノイドの混入を防止出来た (図4、5)。また、抽出液を塩酸等で中和することにより、トリテルペノイドを 50%以上含む高純度な沈殿物を得ることができ、特殊な設備を必要とせずに簡単に純度の高い有効成分の回収が可能な技術を開発した。

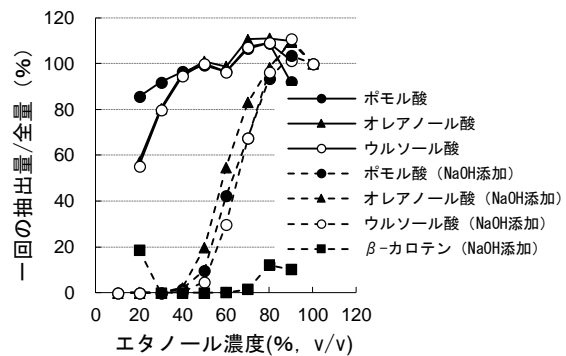


図4 1%NaOH 添加の有無とエタノール濃度の違いによるトリテルペノイドとカロテノイド抽出量

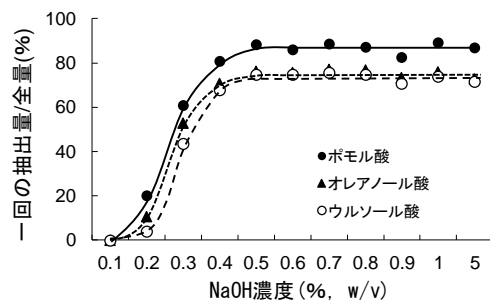


図5 カキ果皮から 25%エタノール抽出時の NaOH 濃度とトリテルペノイド抽出効率の関係

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 5 件）

- ①井土 良一、甲木 孝弘、豊田 集、石島 智子、岡田 晋治、3T3-L1 脂肪細胞に対するポモル酸の脂肪蓄積抑制機構の解明、農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28～30 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
- ②甲木 孝弘、井土 良一、ポモル酸の 3T3-L1 脂肪細胞に対する効果、農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28～30 日 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
- ③井土 良一、カキ果皮抽出物の効能と有効成分の探索、公益財団法人わかやま振興財団・第 13 回農産物有用化合物活用研究会、2015 年 11 月 12 日、フォルテワジマ 4 階小ホール（和歌山県和歌山市）
- ④井土 良一、カキ果皮の有効利用－脂肪蓄積抑制成分の探索－、日本缶詰びん詰レトルト食品協会・第 64 回技術大会、2015 年 11 月 5～6 日、メトロポリタン盛岡 NEW WING（岩手県盛岡市）
- ⑤井土 良一、カキ果皮に含まれる脂肪蓄積抑制成分の探索、日本食品科学工学会・第 61 回大会、2014 年 8 月 28～30 日、中村学園大学（福岡県福岡市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：GPDH 活性抑制剤

発明者：井土 良一

権利者：公益財団法人東洋食品研究所

種類：特許

番号：特願 2014-066971、特開 2015-189691

出願年月日：平成 26 年 3 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shokuken.or.jp/report/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井土 良一 (IZUCHI, Ryoichi)

公益財団法人東洋食品研究所・研究員

研究者番号：20442585

(2) 研究協力者

中井 雄治 (NAKAI, Yuji)

岡田 晋治 (OKADA, Shinji)