

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350168

研究課題名(和文) 食材由来AhRリガンドの特性解明と活性値の食事バランス評価への応用

研究課題名(英文) Characterization of AhR ligands from food materials and application for evaluation of well-balanced diet by their activity value

研究代表者

天倉 吉章 (AMAKURA, Yoshiaki)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：50321857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：各種食品素材(穀類, イモ類, 豆類, 種実類, 野菜類等)60種のエキスを調製し, アリル炭化水素受容体(AhR)活性を評価した。その結果, 検討試料の多くはAhR活性を示し, 特に食事バランスに必須な雑穀, 野菜, ナッツ類等が活性を示した。そこで, 活性の強かったアズキ, クルミについて活性成分を精査した結果, アズキからは14種の化合物, クルミからは29種の化合物を明らかにすることができた。それらの多くは活性を示し, 特にvaloneic acid dilactone methyl ester等の成分に強い活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：The activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) induced by the extracts of 60 food materials, including cereals, tubers and roots, beans, and nuts, was evaluated using a reporter gene assay. Many of the tested samples induced AhR activity; in particular, cereals, vegetables, and nuts, which contribute to a balanced diet, resulted in marked activity. The extracts of walnut and adzuki bean had an especially high AhR activity. To characterize the substances responsible for AhR activation, the constituents of the respective extracts were identified. Fourteen compounds from adzuki bean extract and 29 compounds from walnut extract were isolated and identified. Among these compounds, valoneic acid dilactone methyl ester had notable AhR activation.

研究分野：生薬学, 天然物化学, 食品化学

キーワード：食品 食生活 食事バランス

1. 研究開始当初の背景

食品中のダイオキシン類量をバイオアッセイにより評価する中で、ダイオキシン以外のアрил炭化水素レセプター (AhR) アゴニストの存在を確認し、当初リスク対象として天然 AhR リガンドを検討してきた。AhR は別名ダイオキシンレセプターとも呼ばれ、そのリガンドはいわばダイオキシン様物質であることから健康影響が懸念されたが、食品含有の AhR 活性成分を精査していくと、ワインポリフェノールのレスベラトロールなど、共通してヒトの健康維持に寄与する機能性成分であるという結果を見出している。天然リガンドとダイオキシンの大きな違いは蓄積性がないこと等があげられ、ダイオキシンは近年生じた負の人工産物であることから、AhR は元来、天然リガンド及びその代謝物の受容体として、健康維持に大きな役割を担っているのではないかと考察している。

一方で、天然 AhR に関する報告は少なく、健康維持の従来機能に向けた研究は、国内外を含めてほとんど行われていなかった。2009 年以降、この考察を裏付ける AhR の潜在的機能に関する研究報告が見られるようになった。特に、腸内の AhR の活性化を介した免疫・アレルギー予防作用に関する論文が相次いで報告され、天然 AhR リガンドを不足なく摂取することが腸の免疫系を正常に維持するために不可欠であることが明らかとなり、天然 AhR リガンドは「一種のビタミン」と考察され、腸内がん予防や免疫正常化等、腸内環境改善に大きく寄与する因子であることが示唆されている。また、これまで、野菜等、食材抽出物の AhR 活性を評価しており、多くの食材は AhR 活性を有し、個々の活性に強弱の差があることを確認している。これに着目し、一種のビタミン活性である AhR 活性を食事バランス管理・指導に応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これまで、天然由来の AhR 活性成分の共通特性として、健康維持に寄与する有効成分であることを突き止め、またごく最近、主食食材の米から AhR 活性成分を見出している。さらに、食材の多くは AhR 活性を有し、個々の活性の強弱に差があることも明らかになっている。最近、AhR を介した新規な腸内免疫系正常化作用が解明されたことから、これまでの結果を融合展開させ、本研究では、個々の食材中の AhR 活性成分を明らかにするとともに、AhR 活性を食生活バランスの指標として応用可能かどうか検討する。健康・食生活指導を指向した食事バランス評価へと応用展開の可能性を探り、その基盤となる研究実施を目指す。

3. 研究の方法

(1) 食材の AhR 活性の検討：試料として、雑穀・ナッツ類等、各種食材 60 種を用いた。

試料をそれぞれ 80%メタノール中でホモジナイズして過後、ろ液を減圧濃縮し、その後凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物を試料とした。AhR 活性の評価は、レポーター遺伝子アッセイ (ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用したレポーター遺伝子アッセイ) により行った。試料を DMSO に溶解して試料溶液とし、3 段階 (終濃度: 1 ~ 100 µg/mL) の濃度に DMSO で希釈して、96 穴マイクロプレート中の組換え細胞に 1 ウェルずつ暴露し、CO₂ インキュベーターで 20 ~ 24 時間培養した。培養後、培地を取り除き、ウェルを洗浄後、顕微鏡下で細胞の生存を確認し、Lysis 試薬で細胞壁を溶解後、基質としてルシフェリンを加え、ルミノメーターにより発光度 (RLU) を測定した。

(2) 食材中 AhR 活性化成分の分離精製：試料抽出物を分配抽出または各種カラムクロマトグラフィー (Diaion HP-20, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS 等) による分離精製を繰り返し、単離した化合物について、NMR 及び MS スペクトル解析の結果に基づいて、それぞれ構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 食材の AhR 活性：各種食品試料 60 種について AhR 活性を評価した結果、大半の試料において活性の強弱はあるが AhR 活性が認められた。図 1 にデータ (抜粋) を記す。

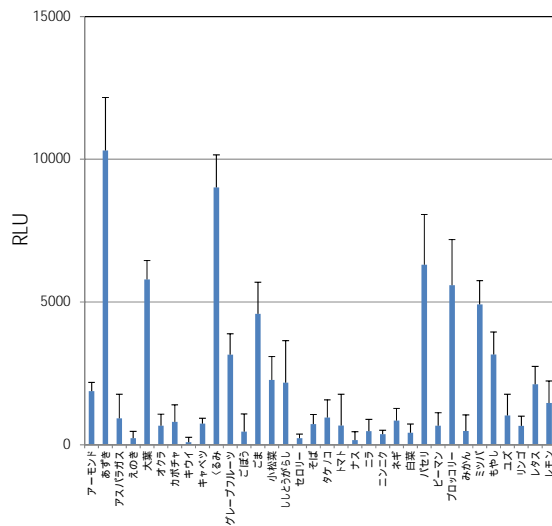


図 1. 食材抽出物の AhR 活性 (100 µg/mL)

活性の高い食材をみると、あずき、くるみ、大葉、ごま、パセリ、ブロッコリー、ミツバ等で、味や食事バランスを整えるとされる素材に活性が認められる傾向があった。そこで、雑穀、ナッツ類で入手できるもの (21 種類) について試料を調製し、AhR 活性を評価した。結果を図 2 に記す。RLU5000 以上の顕著な活性を示すものはないが、検討した約 1/3 が RLU 1000 ~ 2000 であり、弱いながらも活性を示す結果となった。特に、ヘーゼルナッツ、アーモンド、アマランサス、緑米等に比較的

強い活性が認められた。

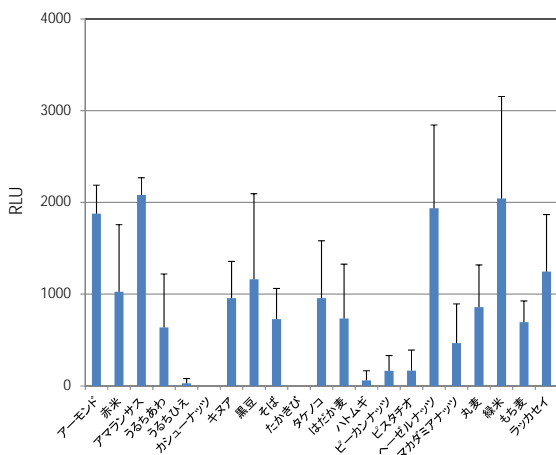


図 2 . 穀類・ナッツ類抽出物の AhR 活性(100 µg/mL)

(2) 食材中 AhR 活性化成分の分離精製：活性の強かったアズキ、クルミについて、活性成分の探索を行った。

アズキ：粉碎したアズキ(2 kg)を70%含水アセトンでホモジナイズし、ろ過、濃縮後、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配を行い、各分画物を得た。それらの中で、*n*-ブタノール分画物について各種カラムクロマトグラフィーにおける分離精製を繰り返し、13種の化合物〔catechin 7-*O*-glucoside (1), taxifolin 7-*O*-glucoside (2), taxifolin 4'-*O*-glucoside (3), epicatechin 7-*O*-glucoside (4), myricetin 3-*O*-rutinoside (5), quercetin 7-*O*-glucoside (6), quercetin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-rhamnoside (7), rutin (8), protocatechuic acid (9), L-tryptophan (10), maltol (11), procyanidin B-1 (12), procyanidin B-3 (13)〕を単離、同定した(図3)。

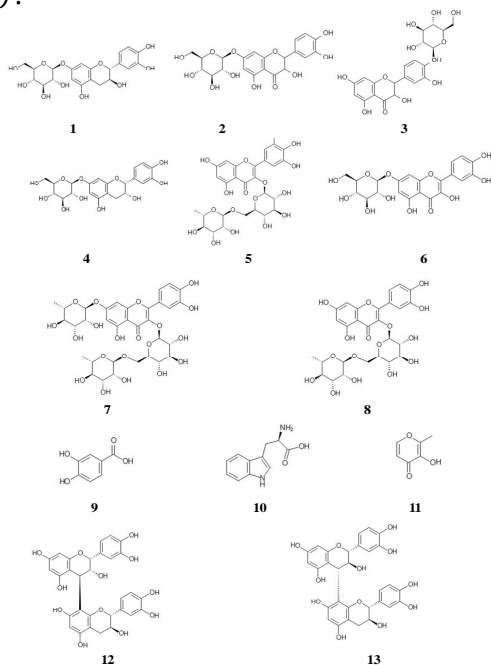


図 3 . アズキ由来成分

単離した化合物について AhR 活性を評価した結果、taxifolin 4'-*O*-glucoside、myricetin 3-*O*-rutinoside、quercetin 7-*O*-glucoside に、ポジティブコントロールとして用いた indole-3-acetic acid (RLU 約 3000) よりも強い AhR 活性が認められた。また、そのほかの化合物についても indole-3-acetic acid と同等 (taxifolin 7-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-rhamnoside, L-tryptophan) または若干弱い (catechin 7-*O*-glucoside, procyanidin B-1, procyanidin B-3) 活性が認められた(図4)。

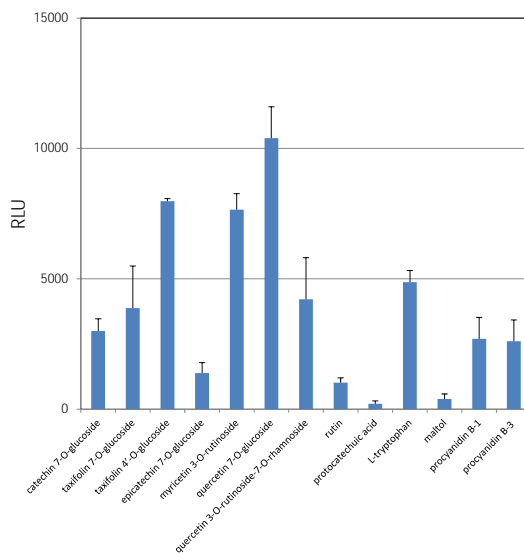


図 4 . アズキ由来成分の AhR 活性 (1 mM)

クルミ：粉碎したクルミ(5 kg)を80%メタノールでホモジナイズし、ろ過後、ろ液減圧濃縮して抽出物を得た。得られた80%メタノール抽出物を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画し、得られた分画物について各種カラムクロマトグラフィーにおける分離精製を繰り返し、29種の化合物〔methyl gallate (1), ellagic acid (2), (+)-catechin (3), dihydrophaseic acid glucoside (4), valoneic acid dilactone (5), valoneic acid dilactone methyl ester (6), ellagic acid 4-*O*-β-D-xyloside (7), pentagalloylglucose (8), 1,2,6-trigalloylglucose (9), strictinin (10), 1,2,4,6-tetragalloylglucose (11), isostrictinin (12), tellimagrandin I (13), tellimagrandin II (14), pterocarinin C (15), pedunculagin (16), casuarictin (17), casuarinin (18), rugosin C (19), rugosin C methyl ester (20), eurostin A (21), blumenol C glucoside (22), byzantinoside B (23), glansreginic acid (24), glansreginic acid 8-*O*-β-D-glucoside (25), glansreginin A (26), glansreginin B (27), platycaryanin A methyl ester (28), 5-hydroxytryptamine (29)〕を単離、同定した(図5)。

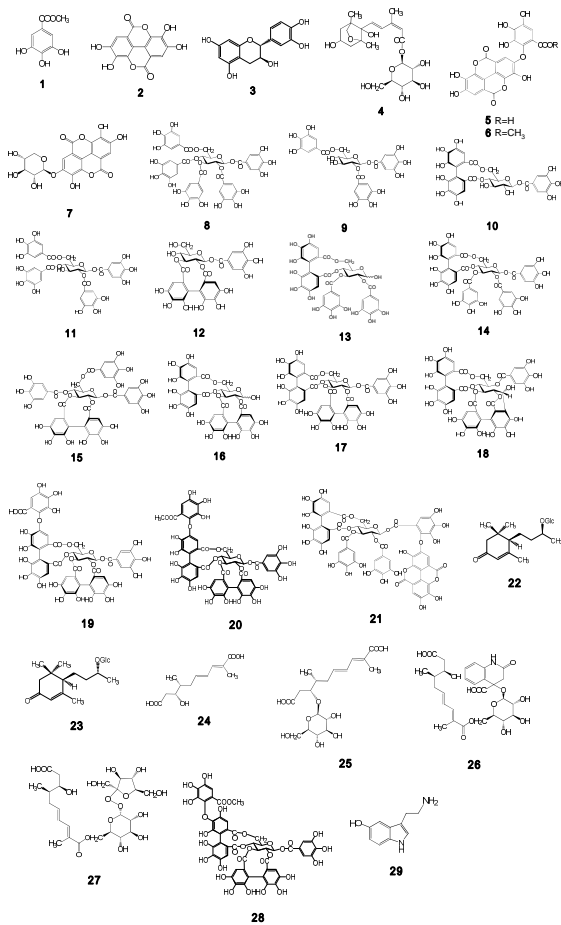


図 5 . クルミ由来成分

単離した化合物について AhR 活性を評価した (図 6). その結果, 特に valoneic acid dilactone methyl ester, ellagic acid が顕著な活性を示した. その他, strictinin, isostrictinin, pentagalloylglucose, 1,2,4,6-tetragalloylglucose, casuarictin, rugosin C といったグルコースの 1 位に galloyl 基が結合した加水分解性タンニンに活性が強い傾向が見られた.

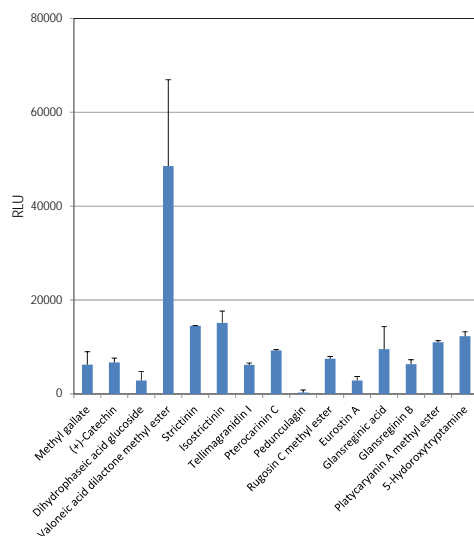


図 6 . クルミ由来成分の AhR 活性 (100 mM)

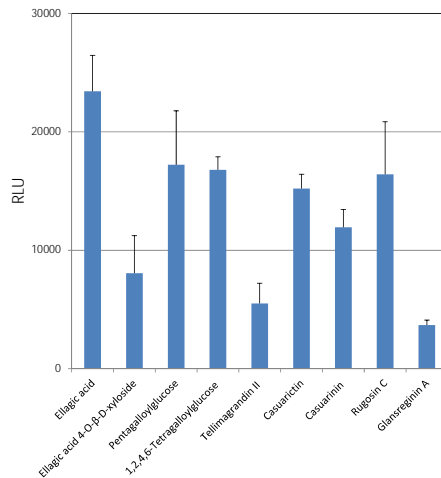


図 6 . (続き) クルミ由来成分の AhR 活性 (50 mM)

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 3 件)

山田梨愛, 半田洋士, 中村昌文, 好村守生, 伊東秀之, 天倉吉章, クルミ特徴成分の解析と生理活性, 日本薬学会第 137 年会, 仙台国際センター・東北大学川内地区 (仙台), 2017 年 3 月 24 ~ 27 日 .

山田梨愛, 好村守生, 半田洋士, 中村昌文, 天倉吉章, 穀類・ナッツ類の AhR 活性とクルミの活性成分の探索, 日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜 (横浜) 2016 年 3 月 26 ~ 29 日 .

天倉吉章, タンニン研究を基盤とした “ キーとなる ” 天然ポリフェノールの解析, 日本生薬学会第 61 回年会, 福岡大学 (福岡), 2014 年 9 月 13, 14 日 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

天倉 吉章 (AMAKURA Yoshiaki)
 松山大学・薬学部・教授
 研究者番号 : 5 0 3 2 1 8 5 7