

「食と健康の未来創造研究」令和4年度採択課題報告書

研究課題名

抗酸化および概日時計に効果を発揮する黄色えんどう豆の食品成分探索研究

研究代表者

佐藤綾人（名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・准教授）

研究分担者

吉村崇（名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所/大学院生命農学研究科・主任研究者/教授）

大川妙子（名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授）

研究参加者

Padlom Apirada（名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・博士研究員）

## 1. 背景・目的

老化の原因の一つとして、継続的に受ける酸化ストレスや概日リズムの乱れがある。近年、概日時計がヒトの代謝を制御する一方で、酸化還元に関連する代謝産物が概日時計を制御するといった双方向制御が存在することが明らかとなっている (Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2019)。これら老化の外因を日常的な食で排除、緩和することができれば、現在の先進諸国、そして将来の世界的な高齢化社会に向けて健康で安全な食料システムを提供するだけでなく、若年層に対する予防医学的な期待も高いと考えた。本研究では、食品成分探索研究において汎用される Bioassay-guided fractionation (BaF) の抱える時間、網羅性そして複雑系の解明といった問題点を解決しつつ、黄色えんどう豆に含まれる成分が示す機能性成分の同定と活性の解析を迅速に、かつ確度の高い実効性のある方法論を提案した。そして、未だその機能の多くが謎につつまれている黄色えんどう豆の成分探索研究を以下の4つの項目について研究を進めた。

1. 黄色えんどう豆抽出物ライブラリーの作製
2. 抗酸化能の *in vitro* 評価
3. 細胞を用いた抗酸化能および毒性の評価
4. LCMS を用いた標的物質へのアプローチ

本報告書ではこれらの結果について報告する。

## 2. 結果および考察

### 2-1 黄色えんどう豆抽出物ライブラリーの作製

黄色えんどう豆 1 kg を低温で粉碎し、4 倍量の 90%メタノール水溶液で 4°C、密閉系にて 1 週間、浸漬、抽出を行った\*。得られた抽出溶液から残渣を濾去したのち、減圧下、濃縮、凍結乾燥し黄色えんどう豆の粗抽出物 (黄褐色の固体、64.4 g) を得た。得られた粗抽出物をメタノールに再度溶解 (懸濁し)、そこへ逆相シリカゲル (COSMOSIL® 140C<sub>18</sub>-OPN) を加え、再度、濃縮し、シリカゲル担持抽出物とした。これをドライチャージ法にて逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離をした。溶媒として、水およびメタノールを用い、グラジエント分析、メタノール濃度として 5, 25, 45, 65, 85, 95 および 100%の7つのフラクション (Fr) に分離し、濃縮、凍結乾燥を行うことで7分画 (Fr1~7) を得た。

ついで、第一段階の分離で得られた各フラクション (Fr1~7) を第一段階とほぼ同じ手法を用い、Fr1~7 をそれぞれ 6, 6, 6, 6, 5, 4 および 3つのフラクションへさらに分画した。得られた分画を濃縮、凍結乾燥し、より詳細な計 33 分画を得た。

粗抽出物、第一段階および第二段階の分画で得られた 40 分画を 50%メタノールに溶解し、それぞれ 0.1 および 1 mg/ml の溶液としてライブラリー化した。第3段階の分画も試みたが、一部の分画でその後の試験に必要な量の供給が難しかったため、本研究では二段階の分画にとどめた。

以上の操作によって黄色えんどう豆の抽出物ライブラリーの作製を完了した。

\*抽出の過程で溶存酸素による酸化や試料由来の各種酵素による生物学的代謝の影響を最小化し、不安的な活性本体の同定の可能性を最大化する目的で、抽出容器は密閉し、抽出温度を 4°C (庫内温度) に設定した。また、抽出過程における溶媒の揮発に由来する抽出効率の変化を防ぐために、随時、酸素を除去した冷 90%メタノール水溶液を添加し、抽出を行った。

## 2-1 抗酸化能の in vitro 評価

作製したライブラリーを用いて抗酸化能の評価を行った。ライブラリー画分を 10 倍希釈し 0.01 mg/ml および 0.1 mg/ml の 2 濃度について評価した。抗酸化能は総抗酸化物定量試験とフェノール性物質定量試験で評価した。

総抗酸化物定量アッセイは、ライブラリー画分中の還元性物質によって生じた一価銅イオンが発色試薬 (Bathocuproine) と反応して生ずる錯体の色素を光定量することで、ライブラリー画分 (に含まれるすべての物質) の抗酸化能を総定量する方法である。本アッセイをライブラリー画分に対して実施したところ、Fr2 および Fr3 に高い抗酸化活性を見出すことができた。一方、その他の各分 Fr1, 4~7 では中程度の抗酸化能にとどまった。また、Fr2 および 3 をさらに分画した Fr2-1~2-6、3-1~3-6 では、Fr2-1 および 3-2 にやや高い抗酸化能を見出した。

一方、フェノール性物質の定量は、塩基性条件下でポリフェノールに代表されるフェノール性水酸基を有する化合物がジアゾニウム塩とアゾ色素を形成し、そのアゾ色素を定量することで当該化合物を定量する方法である。本試験において、第一段階で得られた全てのフラクション Fr1 および 4 で黄色えんどう豆粗抽出物と同程度の抗酸化能を見出した。しかしながら、Fr1 および 4 をさらに分画した Fr1~6、4~6 では抗酸化能を見出せなかった。

総抗酸化物定量試験とフェノール性物質定量試験において、抗酸化能を示すフラクションが異なったことは、両試験間で着目する抗酸化物質が異なるためであると考えられる。また、総抗酸化物定量試験において分画によって活性が減弱したのは、着目する抗酸化物質が分離精製の過程で非酵素的な酸化をはじめとした代謝を受けて失活したこと、また分散によるロスが主な原因と考えている。一方で、フェノール性物質定量試験では第一分画の各フラクションよりも第二分画の各フラクションの方が高い抗酸化能を示したことは、分離精製の過程の正しさを示唆しているものと考えている。

## 2-3 細胞を用いた抗酸化能および毒性の評価

細胞を用いた抗酸化能評価は、Nrf2 応答配列 (抗酸化剤応答配列 ARE および親電子性物質応答配列 EpRE) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子を導入した細胞 (U2OS 細胞) を用いた。その結果、低濃度 (0.1 mg/ml) では Fr4~5 で高い抗酸化作用を見出した。一方、その他のフラクション (粗抽出物、Fr1~3, 6~7) では抗酸化能を見出せなかった。一方、高濃度 (1 mg/ml) では抗酸化能を見出せなかった。

並行してライブラリー画分の細胞毒性を Real time-Glo および MTT アッセイにて評価した。その結果、低濃度 (0.1 mg/ml) の分画では細胞増殖に対する影響は観察されなかったが、高濃度の分画では Fr1, 6 および 7 で生細胞数が減少する結果となった。

セルベースの抗酸化能で in vitro と異なる画分から活性が見出されたこととして、Fr4 および 5 の脂溶性の高さに基づく細胞膜透過性の向上が考えられる。一方で、高濃度画分で抗酸化能を見出せなかった一つとして、生細胞の減少が考えられるが、その理由については、現時点で不明である。

## 2-4 LCMS を用いた標的物質へのアプローチ

高速液体クロマトグラフ-質量分析系 (LCMS) を用いて、ライブラリー画分の分析を行った。装置は高速液体クロマトグラフィーとして Acquity UPLC H-Class Plus システム、質量分析計として Xevo TQ-S (ともに Waters) を用いた。溶媒として水とメタノールないしはアセトニトリルを用い、グラジエント分析した。カラム (Acquity UPLC HSS T3, 2.1 x 100 mm)、流速 (0.45 ml/min)、検出温度 ( $40 \pm 5^\circ\text{C}$ )、検出は質量分析装置でポジティブ、ネガティブ両モードで観測した。また、観測後のデータ処理のため、あらかじめ小スケールのポリフェノールライブラリーを作製し、UNIFI 化学情報システムに登録、解析を行なった。

LCMS 分析およびデータ解析の結果、いくつかのフラクション (Fr1, 4 および 7) において O-メチル化フラボン (Acacetin)、フラボノールおよびその O-メチル化誘導体、フラバン-3-オール誘導体 (O-メチル化カテキン類?) およびイソフラボン類の存在が示唆された。今後、標品との保持時間の比較、LCMSMS による分解過程の解析などを通じて、活性本体を同定する予定である。

## 3. まとめ・展望

黄色えんどう豆の機能を分子レベルで解明すべく、これらの抽出物をライブラリー化し抗酸化機能を中心に検証を行った。まず、黄色えんどう豆から成分を抽出、分画し、黄色えんどう豆抽出物ライブラリーを構築した。作製した黄色えんどう豆ライブラリーを用いて、*in vitro* 抗酸化活性測定 (総抗酸化物定量試験およびフェノール性物質定量試験)、セルベース抗酸化活性測定 (Nrf2-CALUX システム) を実施し、いくつかのフラクションに強い抗酸化活性があることを見出した。並行してライブラリーの LCMS 分析と解析によって、そのいくつかがポリフェノール誘導体由来であることが示唆されており、物質面でも大きく標的へ迫りつつある現状である。

物質レベルまで掘り下げた機能の完全な解明には至らなかったものの、短期間で機能 (活性) とそれを誘導する物質群 (いくつかのポリフェノール誘導体) の関連を浮き彫りにできたのも、本研究提案の核となるライブラリー化と網羅的な解析によるところが大きいと考えている。今後の物質レベルでの機能解析解明が期待される。