

「食と健康の未来創造研究」令和3年度採択課題 報告書

研究課題名：抗酸化活性を基軸とした黄色えんどう豆の健康維持機能創出

研究代表者：柴田 貴広（名古屋大学大学院生命農学研究科・教授）
（ナノライフシステム研究所、糖鎖生命コア研究所 兼任）

研究分担者：北浦 靖之（名古屋大学大学院生命農学研究科・講師）
大島 健司（名古屋大学大学院生命農学研究科・助教）
服部 浩之（名古屋大学アジアサテライトキャンパス学院・特任助教）

研究の背景・目的：

2050年までに世界人口が100億人に達すると予想される中、供給食糧の増産が求められている。その解決のために動物性食材用の家畜を増加させることは、森林破壊や温室効果ガス排出量の増加、水の汚染などにつながりうる。こうした環境負荷の高い動物性食材の代替として、豆類などの植物性食材が注目されている。豆類の中でも黄色えんどう豆は、近年、植物性タンパク質源としての利用が進み、その生産量が年々増加している。しかしタンパク質や食物繊維以外の成分に関する研究は殆どなされておらず、黄色えんどう豆のもつ機能性に関してはまだ十分に理解されていない。そこで本研究課題では、様々な疾患の予防に効果を示すと考えられている抗酸化活性に焦点をあて、黄色えんどう豆に含まれる抗酸化活性成分の単離・構造決定とともに、培養細胞および動物実験における抗酸化活性の評価を目的とし、以下の3点を課題として設定した。

- (1)黄色えんどう豆に含まれる抗酸化成分の単離・構造決定
- (2)実験動物における抗酸化活性の評価
- (3)培養細胞における抗酸化活性の評価と作用機序解明

結果と考察：

- (1) 黄色えんどう豆に含まれる抗酸化成分の単離・構造決定

黄色えんどう豆および赤色えんどう豆を粉砕し、10倍量のメタノールを用いて一晩振盪抽出した。得られた抽出物について、抗酸化活性を2,2-アゾビス(2-アミノジプロパン)(AAPH)ラジカル捕捉活性およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性の2つの指標で評価した。その結果、黄色えんどう豆および赤色えんどう豆はどちらも同等の抗酸化活性を有することがわかった。さらに黄色えんどう豆抽出物について、逐次抽出を行い、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分および水画分の4つに分画した。これらの画分について抗酸化活性を評価したところ、AAPHラジカル捕捉活性およびSOD様活性は、どちらも酢酸エチル画分とブタノール画分に強く認められ、ヘキサン画分や水画分には弱い活性が認められた。4つの画分のうち、酢酸エチル画分は得られた量がわずかであったた

め、ブタノール画分およびヘキサン画分について、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりそれぞれ 13 画分および 16 画分に分画した。これらの画分について、AAPH ラジカル捕捉活性を評価したところ、いくつかの画分に強い抗酸化活性が認められた。当初予想していたよりも、抗酸化活性を示す画分が多く、抗酸化化合物の同定にまで至っていないが、様々な極性をもつ抗酸化化合物が黄色えんどう豆には含まれている可能性が示唆された。

(2) 実験動物における抗酸化活性の評価

黄色えんどう豆抽出物の経口投与による血中成分に対する影響を調べた結果、黄色えんどう豆抽出物投与群では、コントロールに比べて血中リン酸濃度が有意に低下したが、その他の代謝物に大きな変化は認められなかった。次に、黄色えんどう豆抽出物の酸化ストレスに対する影響を調べた結果、黄色えんどう豆抽出物を投与したマウスで総グルタチオンに対する酸化型グルタチオン比が低下する傾向が見られた。尿中の酸化ストレスマーカー（8-OHdG）濃度については有意な差は認められなかった。さらに NRF2-Luc マウスに亜ヒ酸ナトリウム投与 24 時間後に解剖を行い、肝臓のルシフェラーゼ活性を測定したが、ルシフェラーゼ活性を確認することはできなかった。黄色えんどう豆破砕物 5%含む食餌を 2 週間与えたマウスの盲腸内ビフィズス菌量を解析した結果、エンドウ豆破砕物含有食餌を摂取させたマウスでビフィズス菌が高値を示す傾向がみられた。

以上の結果から、黄色えんどう豆抽出物には酸化ストレス誘導性の酸化型グルタチオン量を低下させる傾向がみられたが、酸化マーカーを抑える効果は認められなかった。また、黄色えんどう豆破砕物を摂取させたマウスの盲腸内でビフィズス菌が増加する傾向が認められたことから、黄色えんどう豆抽出物の一時的な摂取では、*in vivo* での抗酸化活性は弱いものの、2 週間程度持続して摂取することにより、腸内細菌変化を介した健康増進作用の可能性が示唆された。

(3) 培養細胞における抗酸化活性の評価と作用機序解明

腸管上皮細胞である Caco-2 細胞を用いて黄色えんどう豆の抗酸化活性を評価した。まずコントロールと比較して有意に生細胞量が減少する酸化ストレス誘導剤の最小濃度を、亜ヒ酸ナトリウムが 20 μ M、マレイン酸ジエチルが 1 mM、 H_2O_2 が 0.5 mM と決定し、この濃度で酸化ストレスを誘導することとした。黄色えんどう豆抽出物の抗酸化活性を評価するため、各酸化ストレス誘導剤と共に黄色えんどう豆抽出物を添加しその後の細胞生存率を測定したところ、 H_2O_2 とマレイン酸ジエチルそれぞれ単体の添加時に比べ、黄色えんどう豆抽出物を同時添加することで細胞生存率が有意に改善した。細胞内外で H_2O_2 は、二価の鉄イオン依存的なフェントン反応によりヒドロキシラジカルに変換される。ヒドロキシラジカルによって酸化された不飽和脂肪酸は、フェロトーシスという細胞死を誘導する。細胞内に存在する H_2O_2 は、グルタチオンペルオキシダーゼにより還元型グルタチオンと反応して水分子に変換されることで、反応性が抑制される。マレイン酸ジエチルは還元型グル

タチオンをアルキル化することで不活性化し、細胞内の活性酸素種抑制を阻害する。黄色えんどう豆抽出物は H_2O_2 だけでなくマレイン酸ジエチルによる細胞毒性を抑制したことから、直接活性酸素種を減少させるだけでなく、間接的に還元型グルタチオン量を増加させている可能性も考えられる。一方、黄色えんどう豆抽出物は亜ヒ酸ナトリウムの細胞毒性を回復させることはできなかった。亜ヒ酸ナトリウムは細胞内の活性酸素種を増加させる一方、 H_2O_2 やマレイン酸ジエチルでは見られない FAK の阻害を引き起こす。実際、亜ヒ酸ナトリウムで処理をした Caco-2 細胞のみ細胞間接着が失われており、酸化ストレス以外のシグナルが誘導されていると考えられる。そのため、亜ヒ酸ナトリウムによる細胞毒性は H_2O_2 やマレイン酸ジエチルと異なり、黄色えんどう豆抽出物では阻害できない機構によるものと考えられる。

Caco-2 細胞の培地に黄色えんどう豆抽出物 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し 4 時間培養した時、生細胞量がコントロールと比較して有意に増加していた。そこで黄色えんどう豆抽出物が細胞増殖に与える影響を評価したところ、黄色えんどう豆抽出物を添加することにより細胞増殖が促進されていた。黄色えんどう豆抽出物添加後 24 時間では、投与濃度依存的に細胞増殖が促進されていた。黄色えんどう豆抽出物を 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加し 72 時間まで培養すると、細胞増殖がコントロールと比べて減少していた。72 時間後の時点の生細胞量はコントロール以下であるため、細胞が増えすぎて培地中の養分が枯渇した可能性は低いと思われるが、72 時間の黄色えんどう豆抽出物処理で細胞増殖率が減少した理由は現時点で不明である。

以上から、黄色えんどう豆抽出物は Caco-2 細胞の酸化ストレスを軽減させ、細胞増殖を促進させることを明らかにした。

まとめと今後の展望：

本研究課題では、黄色えんどう豆の健康維持機能を明らかにするべく、抗酸化活性を中心に解析を行った。培養細胞を用いた実験から、黄色えんどう豆抽出物の酸化ストレス抑制作用が見出されたが、黄色えんどう豆のどのような成分が抗酸化性を示すのかはまだ明らかになっていない。今後さらに成分分析を進め、黄色えんどう豆の機能性成分を明らかにする必要がある。興味深いことに、動物実験の結果から抗酸化作用以外の作用も見出されており、これは黄色えんどう豆が高い機能性を有する食品である可能性を示す結果であると捉えている。このことから今後、*in vivo* でのマルチオミクス解析などの網羅的解析を行うことにより、黄色えんどう豆が有する健康維持機能を解明することができるものと期待される。