

県産農産物からの有用物質の抽出およびその活用

—レンコンに含まれる脂質代謝改善作用を有する成分の検索—

食品工業部

鶴田裕美 柘植圭介 吉村臣史

小金丸和義

佐賀大学農学部生命機能科学科

柳田晃良 永尾晃治

県内の未利用農産物を新たな機能性食品素材として有効利用する目的の一環として、未利用レンコンの機能性について検討している。以前の研究において、レンコン乾燥粉末が脂肪肝改善効果を有し、ポリフェノールを比較的多く含むことを認めている。そこで、本研究では、レンコンからポリフェノール豊富な分画物（LP）を調製し、レンコンのポリフェノールが肥満モデル動物の脂質代謝に及ぼす影響について検討した。LPを肥満モデルマウスに摂食させた結果、対照群に比べてLP添加食群で肝臓重量および肝臓トリグリセリド濃度の有意な低下が認められた。さらに、LP摂取による脂肪肝改善の機序を調べたところ、肝臓の脂肪酸合成酵素活性の低下が関与していることが示唆された。LPに含まれるポリフェノールの成分分析を行なったところ、カテキンおよびガロカテキンを構成成分としたプロアントシアニジンが主成分であることが認められた。したがって、レンコンの脂質代謝改善作用には、プロアントシアニジンが関与しており、未利用レンコンを機能性ポリフェノールの供給源として利用できる可能性が示唆された。

1. はじめに

佐賀県は、全国5位、九州1位（平成19年度）とレンコンの生産量が多い地域である。その一方で、通常よりも味や外観など品質が劣るために廃棄されるレンコンの量も多いのが現状である。県内では、このような未利用農産物の有効利用法が求められており、我々は、未利用レンコンから有用成分を抽出し、機能性食品素材として有効利用することを目的に研究を行なっている。これまでに、レンコンは、野菜の中でもポリフェノールを多く含み、抗酸化活性や膵リパーゼ阻害活性を有することが認められている¹⁻²⁾。ポリフェノールは、野菜や果物をはじめ植物全般に含まれている成分であり、約4000種類以上存在すると言われている。また、その多種多様な構造の違いによって、様々な生活習慣病の発症予防に寄与する可能性が数多く報告されている³⁾。我々は、以前の研究において、レンコン乾燥粉末の摂取が、肥満・糖尿病モデルマウスの肝臓トリグリセリド濃度を低下させ、脂肪肝を改善することを認めている^{4,5)}。そこで、本研究では、レンコンに含まれる脂質代謝改善作用を有する成分を特定するために、レンコンからポリフェノール豊富な分画物を調製し、肥満・糖尿病モデル動物の脂質代謝に及ぼす影

響を検討した。また、この分画物にどのようなポリフェノールが含まれるか成分分析を行なった。

2. 実験方法

2.1 試料調製

レンコンは、佐賀県農業試験研究センター白石分場で栽培・収穫された「さが白祥」を用いた。可食部を水洗い後、真空凍結乾燥し、高速遠心粉碎機で粉末化した。

2.2 レンコンポリフェノール（LP）分画物の調製

レンコン乾燥粉末を含水アセトンで抽出後、減圧濃縮によって溶媒を除去した。水-ヘキサン分配後、水層をDiaion HP-20（三菱化学製）を充填したカラムクロマトグラフィーに供した。カラムを蒸留水で洗浄後、メタノールにてポリフェノール成分を溶出させた。減圧濃縮によって溶媒を除去したものをLPとした。

2.3 総ポリフェノール量測定

総ポリフェノール量の測定は、Folin-Ciocalteu法⁶⁾を一部改良して行なった。標準物質には、(+)-Catechinを用い、LPの総ポリフェノール量をカテキン当量として算出した。

2.4 摂食試験

実験動物として、食欲抑制ホルモン受容体の変異によって過食を生じ、肥満・糖尿病を発症する *db/db* マウスを用いた。6週齢 *db/db* 雄マウスを対照群(Control), LP を 0.5%添加した群の 2 群に分けた。AIN-76 組成に準じて調製した食餌を 3 週間摂食させた。表 1 に食餌組成を示す。なお、本動物実験は、佐賀大学動物実験委員会の規則に従い行なった。

2.5 脂質分析方法

摂食期間終了後、9 時間絶食させ、エーテル麻酔下で心臓採血し、常法により血清を分離した。肝臓および脂肪組織(辜丸周辺脂肪組織および腎臓周辺脂肪組織)を摘出後、重量を測定した。血清トリグリセリドおよびコレステロール濃度は、酵素法を用いて測定した。肝臓脂質は、Folch らの方法⁷⁾を用いて抽出した。肝臓トリグリセリド濃度は Fletcher の方法⁸⁾、肝臓コレステロール濃度は酵素法、肝臓リン脂質濃度は Bartlett らの方法⁹⁾で測定した。

2.6 インスリンおよびアディポサイトカインの測定

血清インスリン、アディポネクチンおよび monocyto chemoattractant protein 1 (MCP-1)濃度は、市販の ELISA キットを用いて測定した。

2.7 肝臓の分画および酵素活性測定

肝臓は、氷冷した 6 倍量の緩衝液 (0.25 M Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) でホモジナイズし、4℃, 700×g で 10 分間遠心分離した。上清を 4℃, 10,000×g で 10 分間遠心分離し、ミトコンドリア画分を得た。さらに上清を 4℃, 125,000×g で 60 分間遠心分離し、サイトソール画分およびミクロソーム画分を得た。得られた画分のタンパク濃度は、牛血清アルブミンを標準物質として、Lowry らの方法¹⁰⁾で測定した。

Fatty acid synthase (FAS) 活性は、サイトソール画分

表 1 食餌組成 (%)

Ingredients	Control	LP
Casein	20.0	20.0
Cornstarch	15.0	15.0
Cellulose	5.0	5.0
Mineral mixture*	3.5	3.5
Vitamin mixture*	1.0	1.0
DL-methionine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2
Corn oil	5.0	5.0
Lotus polyphenol	—	0.5
Sucrose	50.0	49.5

*AIN-76

を用い、Kelley らの方法¹¹⁾で測定した。

Carnitine acyltransferase (CPT) 活性は、ミトコンドリア画分を用い、Markwell らの方法¹²⁾で測定した。

2.8 プロアントシニジン定性分析

Takahata らの方法¹³⁾を用い、ブタノール-塩酸法による定性分析を行なった。LP および陽性対照として用いた ProcyanidinB2 を終濃度 0.02 mg/mL になるように調製し、ブタノール-塩酸溶液中で 100℃・30 分間反応後の色調を確認した。

2.9 質量分析装置による成分分析

イオントラップ型エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-IT/MS, 平成 17 年度電源立地地域対策交付金補助備品) は、HCT-ultra (Brucker Daltonics 社) を使用した。50%メタノールに溶解した LP をインフュージョンで注入し、負イオンモードで測定した。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行型質量分析 (MALDI-TOF MS, 平成 21 年度経済産業省 緊急経済対策事業補助備品) は、autoflexIII (Brucker Daltonics 社) を使用し、リフレクターモードおよび正イオンモードで測定した。LP を 50%メタノールに溶解し、マトリックスとして Dihydroxybenzoic acid, イオン化助剤として Sodium trifluoroacetate を用いた。

2.10 統計処理

実験結果は、Student t-test を用いて統計処理を行なった。

3. 結果および考察

3.1 総ポリフェノール量

レンコン乾燥粉末からポリフェノール類の分画を行なった結果、乾燥粉末に対する分画物 LP の収量は 1.6% (w/w) であった。また、LP の総ポリフェノール含量は、90% (カテキン当量) であった。

3.2 体重、摂食量および食餌効率

表 2 に体重および摂食量の結果を示す。試験期間中の摂食量は、両群で有意な差はなかった。LP 群の体重増加量は、Control 群に比べて有意に低下した。食餌効率については、有意ではないものの LP 群で低値を示した。

3.3 肝臓および脂肪組織重量

表 3 に肝臓および脂肪組織重量の結果を示す。肝臓重量は、Control 群に比べて、LP 群で有意に低値を示し、約 15%低下した。LP 摂取によって、肝臓の肥大化が抑制されることが示唆された。また、脂肪組織重量は、LP 群で僅かに低値を示したが、有意な差は認められなかった。

表2 体重, 摂食量および摂食効率

	Control	LP
Initial body weight (g)	33.7±0.6	33.7±0.5
Final body weight (g)	37.4±0.6	35.8±1.7
Body weight gain (g)	3.63±0.5	2.05±0.4*
Food intake (g/3 weeks)	109±3	109±1
Food efficiency (g gain/g intake)	0.0336 ±0.0052	0.0189 ±0.0041

Values are expressed as mean±SE (n=6). Asterisk shows significant differences at $p<0.05$.

表3 肝臓および脂肪組織重量

	Control	LP
	(g/100g body weight)	
Liver weight	6.87±0.33	5.83±0.17*
White adipose tissue		
Total	6.92±0.12	6.53±0.25
Epididymal	4.30±0.12	4.10±0.14
Perirenal	2.61±0.06	2.43±0.13

Values are expressed as mean±SE (n=6). Asterisk shows significant differences at $p<0.05$.

3.4 血清脂質濃度

表4に血清脂質濃度を測定した結果を示す。血清トリグリセリド濃度は、両群で有意な差は認められなかった。LP群の血清コレステロール濃度は、Control群に比べてわずかに高値を示したが有意な差はなかった。

3.5 肝臓脂質濃度

図1に肝臓脂質濃度を測定した結果を示す。Control群の肝臓トリグリセリド濃度は、著しい高値を示し、脂肪肝の発症が認められた。LP群のトリグリセリド濃度は、Control群に比べて顕著に62%低値を示し、肝臓への中性脂肪の蓄積を改善していることが認められた。

表4 血清脂質濃度

	Control	LP
	(mg/dL)	
Triglyceride	99.8±9.1	106±14
Cholesterol	166±15	182±10

Values are expressed as mean±SE (n=6).

コレステロール濃度およびリン脂質濃度は、両群で有意な差は認められなかった。また、データには示していないが、肝機能マーカーとして知られる Glutamic pyruvic transaminase および Alkaline phosphatase 活性も Control群に比べてLP群で17%および24%低値を示し、肝機能の改善傾向が認められた。

3.6 インスリンおよびアディポサイトカイン濃度

表5に血清インスリン、アディポネクチンおよびMCP-1濃度を測定した結果を示す。血清インスリン濃度は、Control群と比較して、LP群で有意ではないが約20%低下傾向を示し、肥満に伴うインスリン抵抗性の改善傾向が認められた。肥満や脂肪肝改善に関与するアディポサイトカインの一つであるアディポネクチン濃度は、両群で有意な差は認められなかった。一方、肥満や脂肪肝の発症に関与する炎症性因子であることが知られるMCP-1濃度は、Control群に比べて有意ではないがLP群で約30%低下傾向を示し、LP摂取によるMCP-1の低下が脂肪肝の改善に関与している可能性が考えられた。

3.7 肝臓酵素活性

図2に肝臓の脂肪酸合成系酵素であるFAS活性および脂肪酸のβ酸化に関与するCPT活性を測定した結果を示す。FAS活性は、Control群に比べてLP群で約50%顕著に低下した。脂肪酸の分解系酵素であるCPT活性は、LP群で僅かに上昇する傾向が認められたものの有意な差ではなかった。したがって、LP摂取による肝臓

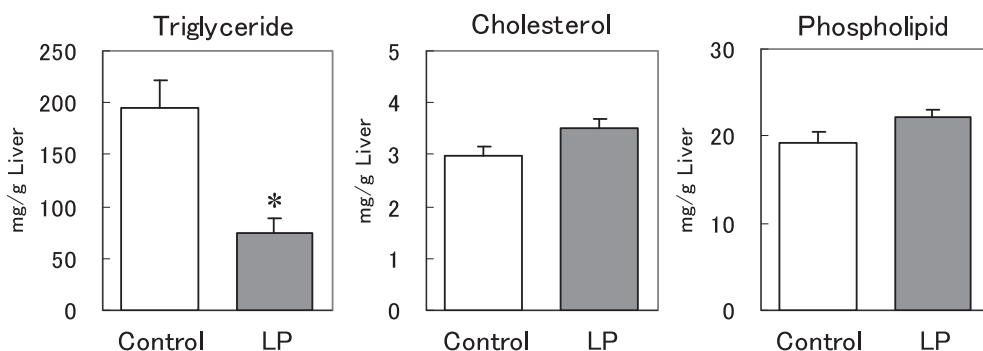


図1 肝臓脂質濃度 (n=6, * $p<0.01$.)

表5 インスリンおよびアディポサイトカイン濃度

	Control	LP
Insulin (ng/mL)	19.0±4.1	15.0±2.4
Adiponectin (µg/mL)	11.3±0.5	10.2±0.8
MCP-1 (pg/mL)	165±25	118±7.5

Values are expressed as mean±SE (n=6).

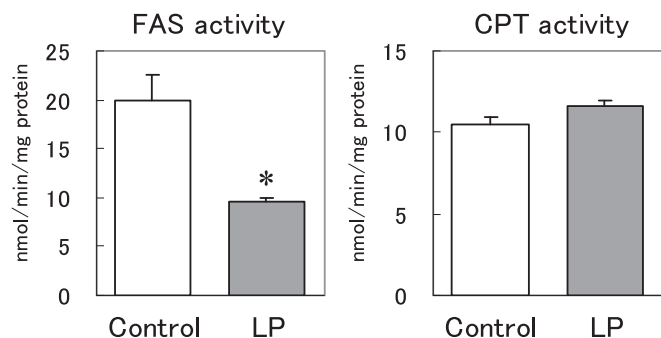


図2 肝臓 FAS および CPT 活性 (n=6, *p<0.01.)

トリグリセリド濃度の低下は、FAS 活性の抑制が強く関与していることが示唆された。

3.8 プロアントシアニジン定性分析

まず、最初に LP に含まれるポリフェノール成分を逆相 HPLC および ESI-IT/MS により分析した。カテキンおよびガロカテキンは同定されたが、大部分については、逆相系カラムで良好に分離できなかったため、プロアントシアニジンなどの重合ポリフェノールが多く存在する可能性が考えられた。そこで、ブタノール-塩酸法によるプロアントシアニジンの定性分析を行なった。プロアントシアニジンは、カテキン類が 2 分子以上結合しており、酸によって C-C 結合が開裂すると赤色のアントシアニジンを生じる。図 3 にプロアントシアニジン定性試験結果を示す。LP を酸分解した結



図3 プロアントシアニジン定性試験結果
(左：ブランク，中央：ProcyanidinB2，右：LP)

果、エピカテキンの 2 量体である ProcyanidinB2 と同様に赤色を呈し、LP がプロアントシアニジンを含むことが示唆された。

3.9 質量分析

LP に含まれるプロアントシアニジンの ESI-IT/MS 分析結果を図 4 に示す。[M-H]⁻が m/z 289.1 および 305.1 のピークが観測され、モノマーとして (エピ) カテキンおよび (エピ) ガロカテキンが存在することが示唆された。2 量体では m/z 577.1, 593.1 および 609.1 が観測され、3 量体では m/z 865.1, 881.1, 897.1 および 913.1 が観測された。同じ重合度において m/z 16 ごとにピークが得られたことと、m/z 288 および 304 ごとに多量体のピークが観測されたことより、LP のプロアントシアニジンは、(エピ) カテキンあるいは (エピ) ガロカテキンが 1 ヶ所で結合した B タイプのプロアントシアニジンであることが認められた。

また、図 5 に LP の高分子領域について MALDI-TOF MS 分析した結果を示す。ESI-IT/MS 分析と同様の質量差でピークが観測され、本測定条件においては、9 量体程度まで観測することができた。したがって、LP は、(エピ) カテキンおよび (エピ) ガロカテキンから構成され、かつ重合度の異なる多量体のプロアントシアニジンを主成分として含むことが推定された。図 6 に LP に含まれるプロアントシアニジンの推定構造を示す。

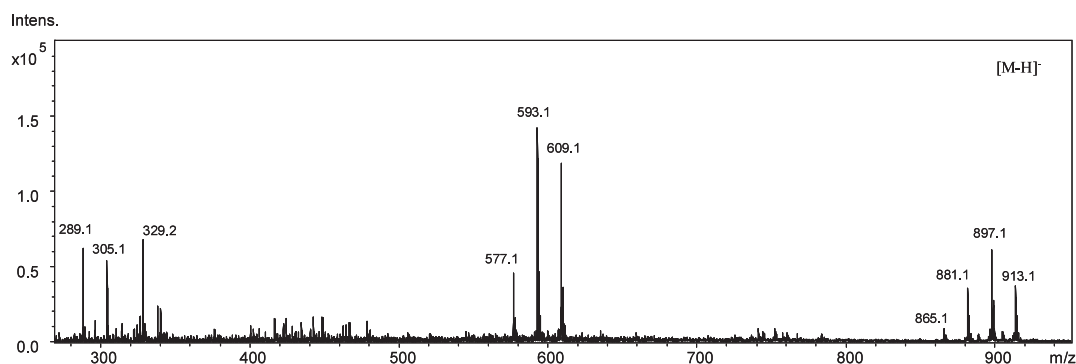


図4 LP の ESI-IT/MS 分析結果

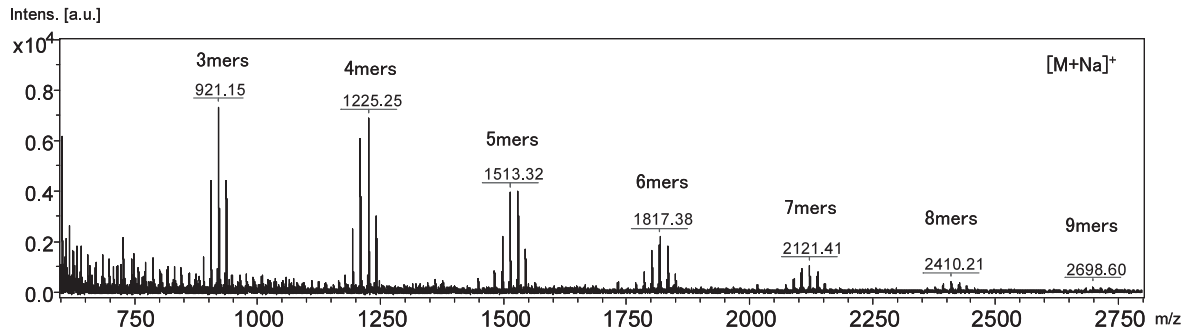


図 5 LP の MALDI-TOF MS 分析結果

4. おわりに

近年、日本人の 3 大死亡原因とされるガン・心臓病・脳卒中のうち、心臓病と脳卒中は、肥満や脂質代謝異常が引き金であると言われている。2005 年にはメタボリックシンドロームの診断基準も設定され、抗肥満効果を示す食品由来の機能性成分の研究が盛んに行なわれている。なかでも、ポリフェノールは、果物や野菜に普遍的に存在している成分であり、近年、その機能が注目されている。特に、緑茶に含まれるエピガロカテキンガレートは、脂質代謝改善作用が数多く報告されており、特定保健用食品としても認定されている¹⁴⁻¹⁶。今回、レンコンで認められたプロアントシアニジンは、リンゴ、ブドウ種子、ライチ、ピーナツ渋皮およびカカオ等に含まれることが認められており、これらのプロアントシアニジン類の摂取が、肥満・耐糖能異常を改善することも、動物実験において報告されている¹⁷⁻²¹。プロアントシアニジンは、カテキン類が 2 量

体以上結合した構造をしており、中には 20 量体以上の高分子が存在することも報告されている²²⁻²³。これまでに、プロアントシアニジンは、膵リパーゼ阻害活性を有し、消化管における脂質吸収抑制がプロアントシアニジンの脂質代謝改善作用に寄与していることが示唆されている²⁴。しかし、3 量体以下のプロアントシアニジンは、抱合体あるいは、インタクトな状態で血中に吸収されることも報告されている²⁵⁻²⁷。プロアントシアニジンの脂質代謝改善作用が、脂質吸収抑制のみならず脂質合成系に直接作用しているか否か詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている。

また、リンゴやブドウ種子のプロアントシアニジンは、カテキンあるいはエピカテキンの重合体が多いのに対して、レンコンのプロアントシアニジンは、(エピ)カテキン以外に(エピ)ガロカテキンの存在割合が非常に高いことが認められた。重合度の違いのみならず、プロアントシアニジンの構成単位の違いが脂質代謝に及ぼす影響についても未解明なままであり、今後の検討課題であると言える。本研究により、レンコンに含まれる脂質代謝改善に関与する成分が明らかとなり、今後、廃棄されている未利用なレンコンを機能性ポリフェノールの供給源として有効活用できる可能性が認められた。

最後に、本研究にあたり試料提供および御助言を賜りました佐賀県農業試験研究センター白石分場に深謝致します。また、動物実験を行なうにあたり、御協力頂きました佐賀大学農学部生命機能科学科食品栄養化学研究室の松元いちこ氏、甲斐俊一氏に感謝致します。

なお、本研究の一部は、独立行政法人科学技術振興機構「地域イノベーション創出総合支援事業・平成 21 年度シーズ発掘試験」において実施されました。独立行政法人科学技術振興機構 産学連携事業本部に厚く御礼申し上げます。

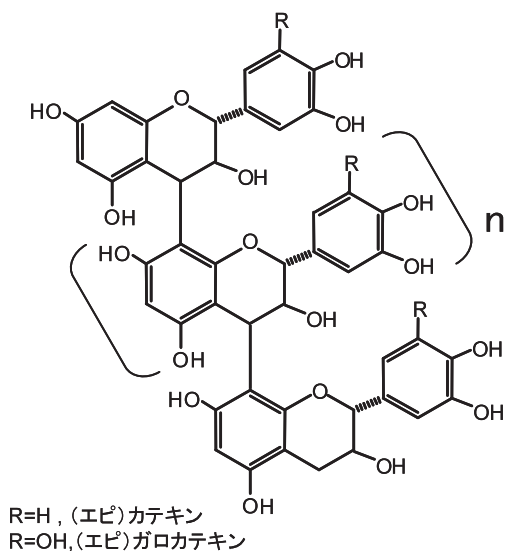


図 6 LP に含まれるプロアントシアニジンの推定構造

参考文献

- 1) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 江口良寿, 小金丸和義 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **15**, 36-38 (2006)
- 2) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉 : 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日食工誌, **41**, 611-618 (1994)
- 3) 西川研次郎監修, 食品機能性の科学 ポリフェノールの健康効果, 産業技術サービスセンター, 299-371 (2008)
- 4) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 柳田晃良, 永尾晃治 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **16**, 51-53 (2007)
- 5) 鶴田裕美, 野村沙織, 城内文吾, 小金丸和義, 永尾晃治, 柳田晃良 : レンコン摂取が肥満・糖尿病マウスの病態発症に及ぼす影響, 日本農芸化学会要旨集, p.134 (2009)
- 6) Sun T, Tang J, Powers J. R. : Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *J. Agric. Food Chem.*, **53** (1): 42-48 (2005).
- 7) Folch J, Lees M, and Sloane-Stanley G H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957)
- 8) Fletcher, M. J. : A colorimetric assay methods for estimating serum triglyceride. *Clin. Chim. Acta*, **22**, 393-397 (1968)
- 9) Bartlett, G. R. : Colorimetric assay methods for free and phosphorylated griceric acids. *J. Biol. Chem.*, **234**, 469-471 (1959)
- 10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. : Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
- 11) Kelley DS, Nelson GJ, Hunt JE. : Effect of prior nutritional sratus on the activity of lipogenetic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes.: *Biochem. J.*, **235**, 87-90 (1986)
- 12) Markwell MA, McGroarty EJ, Bieber LL, Tolbert NE. : The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammarian liver and kidney. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426-3432 (1973)
- 13) Takahata Y, Ohnishi-Kameyama M, Furuta S, Takahashi M, Suda I. : Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5843-5847 (2001)
- 14) Ikeda I, Hamamoto R, Uzu K, Imaizumi K, Nagao K, Yanagita T, Suzuki Y, Kobayashi M, Kakuda T. : Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1049-1053 (2005)
- 15) Cabrera C, Artacho R, Giménez R. : Beneficial effects of green tea - a review. *J Am Coll Nutr.*, **25**, 79-99 (2006)
- 16) Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira SR, Elste V, Weber P. : TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann. Nutr. Metab.*, **49**, 54-63 (2005)
- 17) Yanagida A, Kanda T, Takahashi T, Kamimura A, Hamazono T, Honda S.J. : Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatogr. A.*, **890**, 251-259 (2000)
- 18) Osada K, Funayama M, Fuchi S, Sami M, Ohta Y, Kanda T, Ikeda M. : Effects of dietary procyanidins and tea polyphenols on adiposetissue mass and fatty acid metabolism in rats on a high fat diet. *J. Oleo Sci.*, **55**, 79-89 (2006)
- 19) Nakamura Y, Tonogai Y. : Effects of grape seed polyphenols on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in normal and hypercholesterolemic rats. *J. Health Sci.*, **48**, 570-578 (2002)
- 20) 三浦健人, 北館健太郎 : 新世代のポリフェノール “Oligonol (オリゴノール)” の機能. 日本補完代替医療学会誌, **5**, 163-171 (2008)
- 21) Verstraeten SV, Hammerstone JF, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. : Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5041-5048 (2005)
- 22) Reed JD, Krueger CG, Vestling MM. : MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry*, **66**, 2248-2263 (2005)
- 23) 小川智史, 木村英人, 新見愛, 地阪光生, 勝部拓矢, 横田一成 : トチノキ種皮ポリフェノール成分の糖質消化酵素に対する阻害作用, **56**, 95-102 (2009)
- 24) Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. : Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *J Agric Food Chem.*, **55**, 4604-4609 (2007)
- 25) Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M : Procyanidin B1 is detected in human serum

- after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract.
Biosci. Biotechno. Biochem., **67**, 1140-1143 (2003)
- 26) Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C,
Remesy C, Scalbert A. : Metabolism of dietary
procyanidins in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 837-844
(2003)
- 27) 菅原哲也, 野内義之, 植松恒美, 海老名太 : 山形
県工業技術センター報告書, **39**, 59-62 (2007)