

研究成果

<p>テーマ1：吉野クズ・大和マナの機能性評価及び活用技術の開発 サブテーマ1-1：吉野クズの骨粗鬆症予防機能等の評価及び栽培・食品への活用 小テーマ1-1d：クズ機能性成分の探索とメタボリックプロファイリングによる機能性評価</p>
<p>サブテマリーダー（所属、氏名、役職）： 近畿大学大学院農学研究科 教授 河村幸雄 研究従事者（所属、氏名、役職）： 大阪大学大学院工学研究科 助教 岡澤敦司、教授 福崎英一郎 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 准教授 小山智之 （財）奈良県中小企業支援センター 地域結集型共同研究コア研究室 室長 野本享資、 研究員 團迫智子（H18.4～H21.3）、研究員 鷲田和人（H18.7～H22.10）、 技術員 間島いつか（H20.4～H22.10）、技術員 奥田まみ子（H21.4～）</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>・クズの葉は食経験があることから、その機能性に関して研究を行った。血圧上昇に関与する酵素であるアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）の阻害活性、持続性抗酸化活性に注目し、活性物質の究明、活性評価を行った。細胞等によるクズ葉・蔓抽出物の機能性評価を行い、天然物化学的手法を用いて葉・蔓に含まれる機能性成分の同定を行った。メタボリックプロファイリングの基盤技術を開発して品質の異なるクズのクラス分類システムを構築し、代謝物の季節変動ならびに産地間の差異、DNA多型との相関を解析した。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p>・クズの地上部を産業利用化に向けた機能性研究を行った点において独自性・新規性がある。 ・クズ葉の機能性について一定の成果を挙げることができた。不明であったACE阻害活性物質を単離、同定したこと、<i>in vivo</i>でも血圧降下作用を示すことを見出したことは、関連の研究者に興味深い知見を提供できた。また、持続性抗酸化活性試験はまだほとんど用いられておらず、その活性物質を見出したこともインパクトがある。また、これまでにクズのメタボリックプロファイリングは報告例がなく、独自性・新規性を有する。</p> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <p>[フェーズⅠ] クズ葉に含有する成分を精査し、機能性を期待できる成分をピックアップする。</p> <p>[フェーズⅡ] クズ葉のACE阻害活性物質、持続性抗酸化活性物質を明らかにし、活性を評価する。クズの蔓を用いたメタボリック・プロファイリングを行い、骨粗鬆症に有効なイソフラボノイド、フラボノイド、それ以外の主要含有物の同定・定量を行う。メタボリックプロファイリングによってクズの代謝物、DNA多型等の解析を行う。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>ACE阻害活性物質を1種同定した。クズの蔓、葉抽出物を用いたHPLC分析の結果、葉に特徴的な3つの大きなピークについて、構造決定を行った。クズ葉エタノールおよび水抽出物を用いて破骨細胞分化抑制実験を行った。さら骨粗鬆症予防効果を、葉のエタノール抽出物で90日間マウス投与試験を実施した。FT-NIRを用いて、クズ蔓の総イソフラボノイド量予測モデルを構築した。クズ植物体を15都道府県より収集し、挿し木栽培した。合計25系統のクズ葉からゲノムDNAを抽出し、RAPD解析を行った。クズ葉中にα-トコフェロール、ルテインが含まれることを明らかにし、その定量を行った。</p> <p>GC-TOF/MSによる親水性一次代謝物のメタボリックプロファイリングを行いクズの成分の季節変動を解析した。この結果、主要活性成分と考えられるフラボノイド量との相関を示す化合物を数個同定した。さらに、産地・系統の異なるクズのメタボリックプロファイルとDNA多型との相関解析を試みたが相関関係は示されなかった。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <p>・クズ葉の機能性成分を探索し、ACE阻害活性物質として、genistein-apiosylglucosideを、持続性抗酸化活性物質として、phaseolidinおよびhomopisatinを見出した。また、クズ葉の水抽出物が経口投与でマウスのアンジオテンシンⅠ誘導性血圧上昇を低下させることを明らかにした。</p> <p>・クズの蔓、葉破砕物を用いてエタノール抽出を行い、HPLCで分析した。葉の抽出物についてはさらに精製を行い、8つの画分を得た。50%エタノール溶出画分に特徴的な3つのピークが認められたため、それらに分取・精製した後、FT-MS、NMR解析を行った結果、フラボノール配糖体のrobinin、quercetin-3-O-robinobioside、rutinであることがわかった。</p>

- ・クズ葉エタノール抽出物および水抽出物を用いて破骨細胞分化抑制実験を行ったところ、両抽出物に破骨細胞の分化抑制効果が認められた。約30kgのクズ葉から得られた約790gのフラボノイド精製画分を用いて90日間マウス投与試験を実施したが、大量投与でしか有意な骨粗鬆症改善効果は認められなかった。
- ・クズ蔓中総イソフラボノイド予測モデルを構築するために、平成18年度、19年度に収集したクズ蔓季節別サンプルについてFT-NIR測定を行い、HPLC分析によって算出した総イソフラボノイド量を指標にPLS解析を行い、予測モデルを構築した。評価用のクズ蔓サンプルを用いて、モデルの評価を行った結果、精度のよい予測結果が得られた。
- ・全国サンプルを用いたメタボリックプロファイリングを行うために、北海道、宮城、千葉、静岡、石川、福井、愛知、滋賀、京都、島根、広島、山口、徳島、福岡、鹿児島県の15都道府県からクズを採集し、奈良県内のクズと合わせて全25系統の葉からゲノムDNAを抽出し、RAPD解析を行ったところ、多型と考えられるバンドパターンが得られた。
- ・クズ葉エタノール抽出物について、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 活性試験を行ったところ、ラジカル捕捉活性を有し、クズ葉抽出物が抗酸化機能を有することが示された。エタノール抽出物をさらにヘキサンで抽出し、4画分を得た。得られた画分に含まれる成分を精製し、構造を決定したところ、 α -トコフェロール、ルテインであった。クズ葉中に含まれる α -トコフェロール、ルテインは、それぞれ新鮮重100gあたり、26mg、11mg含まれることがわかった。文献値などと比較した結果、ケールや大麦若葉など青汁素材よりこれらの含有量が多いことがわかった。

特許件数：3件 論文数：1件 口頭発表件数：1件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

これまでクズ葉抽出物のACE阻害活性は知られていたが、その活性成分および動物試験での効果は不明であった。本研究で明らかにしたクズ葉のACE阻害活性物質、*in vivo*での血圧降下作用の証明の報告は初めてである。メタボリックプロファイリングによる食品成分評価は多くの報告があるが、クズ蔓・葉における機能性研究は独創性が高い。

2 実用化に向けた波及効果

クズ葉は大量投与でしか骨粗鬆症予防効果が認められなかったものの、 α -トコフェロール、ルテインが一般に使用される大麦、ケールなどの青汁素材より多く含まれており、機能性食品原材料として高いポテンシャルを持っている。メタボリックプロファイリングによる機能性評価は簡便で迅速な予測技術であり、今後、多様な原料について予測モデルを構築することが可能である。

残された課題と対応方針について

クズ葉の水抽出物の長期投与におけるマウスの血圧に対する効果を評価する必要がある。クズ葉の季節別および部位別サンプルの抽出物でACE阻害活性を評価し、もっとも活性の高いサンプル用いて*in vivo*の試験を行うことで、より低濃度で活性を示す可能性がある。

DNAの多型とメタボリックプロファイルとの相関解析に関する方法論を検討するとともに、メタボリックプロファイリングを優良品種の選定に活用する方法についても検討を行う必要がある。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	小計	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度	小計	
人件費	150	11,034	12,053	12,761	12,186	7,305	55,489	876	2,415	3,940	3,450	3,860	5,280	19,821	75,310
設備費	13,278	14,003	16,452	9,497	5,834	5,193	64,257	428	1,462	2,011	1,846	731	923	7,401	71,658
その他 研究費*	3,612	12,171	8,513	11,494	20,335	4,522	60,647	0	0	0	75	100	0	175	60,822
旅費	53	457	547	433	208	76	1,774	0	0	0	0	0	0	0	1,774
その他	20	1,605	1,982	1,825	1,850	1,929	9,211	0	0	0	0	0	0	0	9,211
小計	17,113	39,270	39,547	36,010	40,413	19,025	191,378	1,304	3,877	5,951	5,371	4,691	6,203	27,397	218,775

代表的な設備名と仕様【既存（事業開始前）の設備含む】

J S T負担による設備：ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析装置（LECO社製Pegasus IV型）、熱分析分解システム（フロンティア・ラボ社製PC制御ダブルショット・パロライザー PY-2020iD、フロンティア・ラボ社製マイクロジェット・クライオトラップ PY-1030E）、飛行時間型精密質量測定装置（ウォータース社製LCT-Premier TYPE MB）

地域負担による設備：GC-MS