琉球大学学術リポジトリ

# 亜熱帯・熱帯の食資源の生理活性物質の探索と機能解析－アンギオテンシンI変換酵素阻害－



| メタデータ | 言語: |
| --- | --- |
| | 出版者: 南方資源利用技術研究会 |
| | 公開日: 2014-10-26 |
| | キーワード (Ja): |
| | キーワード (En): |
| | 作成者: 高良, 健作, 亀谷, 有希, 上地, 俊徳, 小西, 照子, 玉城, 一 |
| | メールアドレス: |
| | 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016717 |

# 亜熱帯・熱帯の食資源の生理活性物質の探索と機能解析
## —アンギオテンシンⅠ変換酵素阻害—

○高良健作，亀谷有希，上地俊徳，小西照子，玉城 一
琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科

【目的】

沖縄県内で栽培，収穫された食資源における生理活性物質の探索の一つとして，亜熱帯・熱帯性の野菜および果物のアンギオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害活性を測定したところ，48 種のうち 19 種の野菜や果物に 90%以上の ACE 阻害活性が認められた．特にウリ類とマメ類に ACE 阻害活性が高く，過去の文献において強力な ACE 阻害活性物質として報告されているニコチアナミンの存在が推察された．しかしながらニコチアナミンについては定量法が困難で，食品中の分布や性質について不明な点が多い．そこで本研究では，亜熱帯・熱帯の食資源中のＡＣＥ阻害活性とニコチアナミンについて調べた．

【方法】

(1)　ACE 阻害活性スクリーニング

ACE 阻害活性スクリーニングに用いた野菜や果物は，沖縄本島南部の農産物直売所で購入した．またアセロラは本学農学部附属フィールド科学研究センターより採取した．入手後は直ちに凍結乾燥し，粉末乾燥したものを実験に供した．粉末乾燥試料 0.5g に精製水 20mｌを加えホモジナイズ後，遠心分離した上清を ACE 阻害活性評価に用いた．ACE 阻害活性測定はウサギ肺由来 ACE を用いた常法により行った．

(2)　ニコチアナミンの定量

ACE 阻害活性スクリーニングにより 90%以上の強い阻害活性を示したものについてはニコチアナミンの定量を HPLC/ESIMS によって行った．ニコチアナミンの標品はニガウリから過去の文献を参考にカラムクロマト法により精製した．HPLC の分析条件はカラムを ODS 系に，５mM ペルフルオロオクタン酸/アセトニトリル（7：3）を溶出液とするイオンペア法とし，ニコチアナミンの検出は ESIMS を用い，ポジティブイオンモードによる *m/z* ３０４の分子イオンを抽出して得られるクロマトグラムから面積値を算出した．なおニコチアナミンの面積値は，ニコチアナミン標品を用いてあらかじめ検量線を作成する外部標準法により行った．

【結果】

(1)　沖縄県産の野菜・果物の ACE 阻害活性スクリーニング

収集した 48 種の野菜・果物の凍結乾燥粉末における水抽出物の ACE 阻害活性スクリーニングの結果，19 種に 90%以上の強い ACE 阻害活性が認められた．特にシカクマメ，トウガン，アカゲウリ，ハヤトウリ，ヘチマ，シマカボチャ，ホソバワダン，タカナ，ニラは 95%以上の強力な ACE 阻害活性が認められた．また，エンサイ，フダンソウ，アキノワスレグサ，ニガウリ，ジュウロクササゲ，キュウリ，パパイヤ，パッションフルーツ，アセロラが 90%以上の阻害活性が認められた．一方でウイキョウ，アテモヤ，ドラゴンフルーツ，レタス，シマラッキョウ，アロエベラには阻害活性が 5%以下であった．ACE 阻害活性が 90%以上を示した 19 種はニコチアナミンの定量を試みた．

(2)　ニコチアナミン標品の調製

ニコチアナミンの定量にあたり，まずニコチアナミン標品をニガウリより精製した．新鮮なニ

ガウリの可食部617gをフードプロセッサーにかけて遠心，ろ過により上清を調製し，これをアンバーライトIR-122陽イオン交換樹脂に通液した．水で洗浄後，0.4Mおよび3.0Mアンモニア水で順次溶出したところ，3.0Mアンモニア水溶出画分に強いACE阻害活性が認められた．この画分はさらにセファデックスG-15カラムにより活性画分を分離精製し，最終的に再結晶法により白色結晶38mgを得た．この結晶はNMRスペクトルを測定したところ文献値と良く一致し，またESIMSにおいてニコチアナミンの分子量303に相当する分子ピーク$[M+H]^+$が$m/z$304に認められたことから，本品はニコチアナミンであることを確認し，これを標品として定量に用いた．

(3)　HPLC/ESIMSによるニコチアナミンの定量

先の文献によると，ニコチアナミンの定量法はアミノ酸分析システムによるHPLC法で達成され，その分析時間は50分とある．本研究ではHPLC/ESIMSによる高感度で分析時間の短いハイスループット化に挑戦した．ニコチアナミン標品を用いてODS系カラム（Develosil ODS HG-3, 150 x 2.0 mm）とアセトニトリル/水の溶出液でニコチアナミンを分析したところ，ニコチアナミンはカラムに全く保持しないことが分かった．そこで溶出液に揮発性のあるイオンペア試薬のペルフルオロオクタン酸を５mM 濃度で添加してみたところ，カラムに十分保持することが分かった．さらにアセトニトリルと５mM ペルフルオロオクタン酸水溶液を溶出液とし，その組成比を検討したところ，それぞれが３：７の時に最適であることが分かった．流速0.2ml/minで標品の5μg/mlから200μg/mlの濃度の範囲でニコチアナミンの検量線を作成した結果，相関係数R^2=0.9988の良好な直線関係が得られた．

予備実験にACE阻害活性の高いニガウリ水抽出液を用いてHPLC/ESIMS法でニコチアナミンの定量を試みたところ，再現性が極めて悪いことが分かった．そこで試料の前処理を各種固相抽出カートリッジで試みた．この結果，Waters社のOasis MCXカートリッジを用い1.4%アンモニア水で処理すると良好な結果が得られたため，以下の測定では固相抽出カートリッジによる前処理を行った．

ACE阻害活性スクリーニングで絞った19種の野菜・果物の凍結乾燥粉末の水抽出液についてニコチアナミンの定量を行った結果，乾物100g当たりのニコチアナミンはシカクマメで64±18.5mg，ジュウロクササゲで35.2±2.5mg，ニガウリで28.7±1.2mgなどとなった．

【考察】

ニコチアナミンはまず醤油エタノール処理分画物が高血圧自然発症ラットに対して経口投与で顕著な血圧降下作用を示すことが明らかになって以来，大豆中に存在するニコチアナミンがACE阻害物質の主体であることが明らかとなった．その後，アシタバ，モロヘイヤ，キノコで次々とニコチアナミンが確認され，近年は特に豆類やウリ類に高含有していることが知られ，ニコチアナミンは植物一般に広く存在する物質であることが認識されるようになってきた．本研究でのスクリーニングの結果シカクマメやジュウロクササゲなど熱帯性マメ類やウリ類でニコチアナミンが比較的多く確認することが初めて明らかになった．本化合物のACEに対する$IC_{50}$値は文献値によると0.11μMから0.26μMとされ，今回測定した19種のACE阻害活性のほとんどはニコチアナミンによる阻害活性に由来することが推察された．その一方，強いACE阻害活性が認められたニラにはニコチアナミンが検出されなかったため，他の阻害物質の存在が推察される．しかしながらHPLC/ESIMSによる定量法は本結果からも再現性があまり良くないことが問題で，大きくはESIMS側に起因する夾雑物質による目的成分のイオン化阻害の可能性が考えられる．現在固相抽出カートリッジの再検討を試みている．