

糖化タンパク質生成抑制能の測定法の構築と 機能性に優れた県産食品素材の検索*

山口 佑子**、岸 敦**、小浜 恵子**

多試料の糖尿病予防効果を評価するため、糖尿病合併症の原因の一つである糖化タンパク質 (AGE: Advanced Glycation End Products) の生成抑制効果を測定する ELISA 法を開発した。この測定法を用いて、約 250 種類の県産農産物の AGE 生成抑制能を評価した。また、ラジカル消去能についても DPPH ラジカル消去活性、oxygen radical absorbance capacity (ORAC) を用いて同様に評価した。その結果、高い AGE 生成抑制能やラジカル消去能を持つ農産物が見つかった。

キーワード：ラジカル消去活性、糖化変性、糖尿病

Relative Estimation of Food Functionality of Agricultural Products Harvested in Iwate Prefecture : Application of Novel Assay for Glycosylation Process Inhibit Activity.

YAMAGUCHI Yuko, KISHI Atsushi and KOHAMA Keiko

Advanced glycation end products (AGEs) have been implicated in various disease states in diabetes, and to inhibit protein glycation lead to decrease AGEs is expected to be important for prevention of diabetes development. To measure physiological functional activities which work on AGEs generation inhibitory, we developed new procedure (ELISA system) which is more simple but sensitive and reliable. In this study, about 250 agricultural products were measured by using this method. And radical scavenging activities of these samples were estimated by two methods: DPPH radical scavenging activities and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). As a result, some agricultural products showed strong food functionality.

key words : radical scavenging activity, glycation, diabetes

1 結 言

昨今の食品における消費者のニーズは「健康・安全・安心」に集約されており、今後もこの傾向は高まっていくと考えられている。一方で、県内食品企業では健康機能性に優れた食品や、地域色が強い特産品（地域ブランド）の開発に関心が高まっている。

食品の持つ健康機能性の中でも、過度の酸化ストレスが生活習慣病や老化の原因であることから、抗酸化能（ラジカル消去活性）に対する期待は高く、既報¹⁾ではヤマブドウを試

料としてラジカル消去活性の評価法を検討した。

また、生活習慣病の一つである糖尿病は国民病といわれるほど発症率が高く、糖尿病に関連した機能性食品が開発されている。糖尿病は発症初期段階において血液中の高濃度の糖が生体タンパク質と非酵素的に反応し糖化タンパク質を生成する（非酵素的糖付加反応）。これらはその後の反応過程を経て、非酵素的糖付加反応—後期反応生成物（AGE: Advanced Glycation End Products）となり、生体内で種々の糖尿病の病態（腎臓障害、視力障害、etc）を引き起こす原因となる^{2~3)}。

* 県産素材を利用した機能性食品開発 第1報

** 食品技術部

これら一連の反応では、ラジカルが発生して、AGE生成を加速すると言われており、ラジカル消去能を有するビタミンEやポリフェノール類摂取によるAGEの生成抑制が報告されている。岩手県内の農林水産物の中からAGE抑制能をもつ食品素材を見出せば新たな機能性食品としての活用も可能である。

そこで、本報告では、岩手県内の農林水産物中から高いラジカル消去活性を有するものを検索し、既報¹⁾で構築した測定法を用いて約250種類の食品素材を評価した。また、深刻な糖尿病合併症の原因であるタンパク質の非酵素的糖化反応の抑制効果の測定法を新規に構築し、同様に評価したので報告する。

2 実験方法

2-1 分析試料

今回測定に用いた試料は以下の通りである。試料は、岩手県農業研究センター、岩手県林業技術センターなどを通じて県内より収集した。農産物の種類は大きく6つ(果実類、野菜類、キノコ類、穀類、海産物、その他)に分類した。種類別の試料数は以下の通り。

①果実類(103種類)、②野菜類(60種類)、③キノコ類(24種類)、④穀類(17種類)、⑤海産物(5種類)

2-2 試料抽出液の調製

試料は可食部を凍結乾燥後、粉碎し、10倍量(w/v)の100%エタノールで1時間抽出、または純水で熱水抽出した。この抽出液を濾過し、試料抽出液とした。

2-3 総ポリフェノール含量の測定

キノコ類を除いた各試料の総ポリフェノール量は既報¹⁾に従って測定し、没食子酸相当量として算出した。

2-4 ラジカル消去活性の測定

ラジカル消去活性は原理の異なる以下の方法で測定した。

有色ラジカルであるDPPHの消去活性は、既報¹⁾に従って測定し、没食子酸相当量として算出した。

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)を指標としたラジカル消去活性はCaoらの方法⁴⁾に準じて測定した。20nMのβ-phycoerythrin(75mMリン酸緩衝液pH7.0)を170μl、96穴プレートに分注し、各抽出液を100倍に希釈して10μl添加した。対照として、0.1mMのTroloxを添加した。37℃にて30分間静置後、0.3M AAPHを20μl加え、2分置きに80分間

蛍光プレートリーダー(Fluostar, tecan製)によりラジカルによる蛍光退色の防止作用(Ex:530nm, 検出フィルター:570nm)を測定した。0.1mM Troloxの退色速度を被検液と比較することにより、相対的な抗酸化活性を算出した。

2-5 糖化タンパク質生成抑制能の測定

糖化タンパク質生成抑制能は次のように測定した。

BSA-Fructose溶液(2%BSA、500mM Fructose、15ppm puoelin-200、200mMMP-K buffer(pH7.4))990μlに各抽出液10μlを加え、37℃で3日間インキュベートした。対照としては水溶性のG-Rutin(東洋精糖)を用いた。ControlとBlankには200mMP-K bufferを加え、後者は直ちに-20℃保存した。反応終了した各液を非酵素的糖付加反応一後期反応生成物(AGE:Advanced Glycation End Products)液とした。

AGE固定済マイクロプレート(AGEのプレートへの固定にはZeptoMetrix社IMMUNO TEK ELISA construction systemを使用)に抗AGEモノクローナル抗体-peroxidase(0.1μg/ml)を50μlと各AGE液の100倍希釈液を50μl加え、室温で3時間放置後、0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄した。発色基質(KPL社TMB Microwell Peroxidase Substrate System 50-76-00)を100μl加え約3分間発色させた。1MH3PO4を100μl加え反応を停止させ直ちにマイクロプレートリーダーで450nmにおける吸光度を測定し、10mMG-Rutinの生成抑制率と比較することにより、相対的な生成抑制能を算出した。

3 結果および考察

3-1 試料中の総ポリフェノール含量

図1に、各試料中の総ポリフェノール含量の分布を示した。ほとんどの試料で、エタノール抽出よりも熱水抽出の方が高いポリフェノール抽出率を示していた。熱水抽出物ではピペリカム、アロニア、西洋カンボク、カリン、ガマズミ、フサスグリ、カシスなどに多く含まれていた。エタノール抽出物でも、ほぼ同様の結果であった。既報¹⁾で試料として用いたヤマブドウを含むベリー類には、含量の高いものが多かった。野菜類、穀類では少なかった。

3-2 各測定法によるラジカル消去活性の比較

図2に、各試料のDPPHラジカル消去活性の分布を示した。全体的に、熱水抽出物の方がエタノール抽出物よりも活性が高いが、これは総ポリフェノール含量が高いためと考えられる。約250点のサンプルを測定したが、その中で活性の低

いサンプル (1mg 没食子酸相当量/g 以下) は熱水抽出物で3割、エタノール抽出物で5割を占めており、活性の特に高い (10mg 没食子酸相当量/g 以上) サンプルは、抽出法によらず全体の1割に満たなかった。熱水抽出物では、ピペリカム、アロニア、西洋カンボク、ガマズミ、フサスグリ、カシス、カリン、青シソ、クロカワ、ナメコなどで高い活性を示した。エタノール抽出物では、これらに加えてブルーベリー (ラビットアイ) が高い活性を示した。ベリー類については高い活性を示すものが多く見られた。ベリー類は総ポリフェノール量も総じて高く、これが高いラジカル消去活性に寄与していると考えられる。

図3に、各試料のORACを指標としたラジカル消去活性の分布を示した。既報¹⁾では蛍光イメージアナライザーを用いたが、今回は蛍光プレートリーダーを用いて定量測定した。DPPHラジカル消去活性の高い試料は、ORACでも高い値を示す傾向が見られた。上記以外の試料で高い活性を示したものは、ナラタケ、バイアム、スピニチ、みず、あまちゃづる等であった。

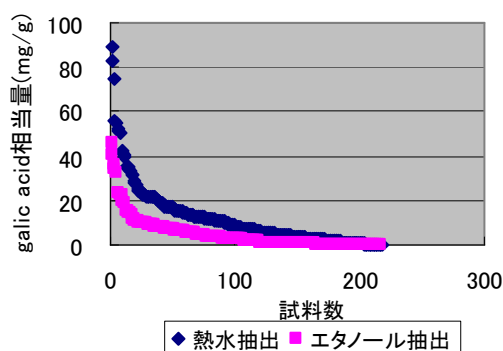


図1 総ポリフェノール含量分布

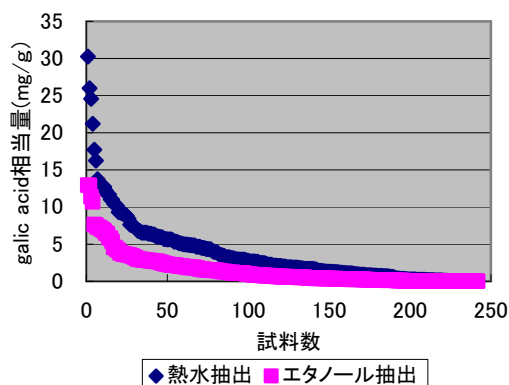


図2 DPPHラジカル消去活性分布 (没食子酸相当)

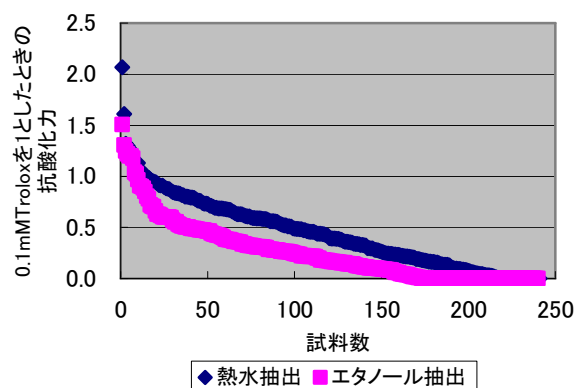


図3 ORAC分布

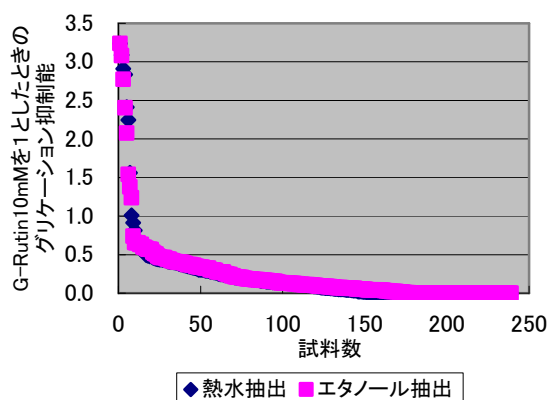


図4 糖化タンパク質 (AGE) 生成抑制能分布

表1 DPPHラジカル消去活性の高い試料のAGE生成抑制能 (熱水抽出物)

作物名	DPPHラジカル消去活性 (gallic acid 相当量)	AGE生成抑制能 (G-Rutin10mMを1とした時のAGE生成抑制率)
ピペリカム	26.0	2.91
アロニア	21.2	0.91
西洋カンボク	17.7	1.01
ガマズミ	16.3	1.56
フサスグリ	13.7	0.18
カシス	13.2	2.41
青シソ	12.8	0.4
カリン	12.7	2.84
ナメコ	11.7	0.0
イチゴ (女峰)	6.6	0.38
リンゴ (さんさ)	5.0	0.81

3-3 糖化タンパク質生成抑制活性

糖化タンパク質 (AGE) 生成抑制活性は、既報¹⁾では蛍光強度測定法を用いて評価したが、今回は競合的ELISA法を用

いた。この方法では、試料が蛍光性を有する場合や逆に蛍光を阻害する効果を有する場合でも測定結果に影響が出ないため、蛍光強度測定法よりも優れた手法といえる。また、多試料を同時に測定可能なため、不特定多数の試料からのランダムスクリーニングや、糖化抑制効果を有する試料(植物など)からの有効成分の精製に伴う分画サンプルの効果測定などに極めて有効であると考えられる。

図4に、各試料の糖化タンパク質生成抑制能の分布を示した。ラジカル消去活性の結果とは異なり、抽出法による分布の差は見られなかった。また、データは示していないが、総ポリフェノール量とAGE生成抑制能に相関は認められなかった。以上の事よりAGE生成抑制効果を持つ成分には、ポリフェノール類以外の物も含まれていると推測される。

対照として用いた抗酸化性を有するG-ルチンは糖尿病の病態として体内に蓄積する糖化タンパク質の生成を *in vivo* で抑制すると報告されている⁵⁾。10mM G-ルチンよりも高い抑制活性を示した試料は、熱水抽出物ではピペリカム、カリン、カシス、ガマズミ、西洋カンボク、エタノール抽出物ではカシス、カリン、アロニア、ブルーベリー(ラビットアイ)、グーズベリーなどであった。

AGE生成過程の一部では、ラジカル消去により生成反応を阻害すると言われている。そのため、ラジカル消去活性の高いサンプルは高いAGE生成抑制能が期待できる。表1にDPPHラジカル消去活性の比較的高いサンプルのAGE生成抑制能を示した。AGE生成抑制能の高い試料は、ラジカル消去活性も高い傾向にあった。しかし、フサスグリやナメコのようにその逆は当てはまらないものもあった。また、リンゴ(さんさ)のように、ラジカル消去活性は別段高いわけではないが、高いAGE生成抑制能を示すものも見られた。このようなサン

プルはAGE生成抑制に有効な成分を明らかにするという点からも非常に興味深く、今後さらに検討をすすめる予定である。

4 結 言

岩手県内の農林水産物の有効利用のため、約250種の食品素材の機能性を評価した。1次スクリーニングとして、DPPHラジカル消去活性、oxygen radical absorbance capacity (ORAC)、糖化タンパク質生成抑制能について評価し、どの評価法でも高い活性を持つ食品素材が見つかった。今後は、培養細胞を利用した評価系を用いて2次スクリーニングを行い、機能性に優れた食品の開発を進める予定である。

また、本研究の成果の一部をH16年3月末に行われた盛岡地方特産小果樹検討会において報告した。

本研究を行うにあたり試料を提供していただいた、林業技術センター、農業研究センター、県北農業研究所、(株)長根商店の皆様にご感謝いたします。

文 献

- 1) 小浜恵子、岸敦、米倉裕一、大澤純也、澤井秀幸、長澤孝志：岩手県工業技術センター研究報告，10，77-80 (2003)
- 2) Takeda, M., Ku, Y., Suzuki, Y. and Kuroda, Y.: Hepato-Gastroenterology 49. 928-931 (2002)
- 3) McLennan, S. V., Martell, S. K. Y. and Yue, D. K.: DIABETES 51, 2612-2618 (2002)
- 4) Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A. H. B., Wang, H.: Clin. Chem., 41, 1738 (1995)
- 5) Nagasawa, T., Tabata, N., Ito, Y., Aiba, Y., Nishizawa, N. and Kitts, D. D.: Mol. Cell. Biochem., 252, 141-147 (2003)