

氏 名(本籍)	飯 田 哲 郎
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 596 号
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)
学位論文題目	アズキ種子 ( <i>Vigna angularis</i> ) の生理活性物質に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 大久保 一 良 教 授 大 類 洋 教 授 宮 澤 陽 夫

# 論文内容要旨

## 序論

マメ科植物は 600 属 13000 種に及び、食糧としてだけでなく、古くからその生理活性および機能因子の面からも注目されている。マメ類のなかでもアズキは高い抗酸化作用を持つが、あまり詳細な検討がなされていなかった。

一方、既知ダイズサポニンが生体内では、2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP) を伴った形であることが最近明らかになり、アズキでも存在が予想された。そこで、第 I 章では、アズキ種子中 DDMP サポニンの検索と分画を行った。また、DDMP サポニン以外の抗酸化物質の検討も必要だと考えられ、第 II 章では、スーパーオキシド消去能を指標にした分画を試みた。

種子は発芽によって代謝形態が変わり、自己防御システムとして外部に対する抵抗性物質を誘導することが知られている。第 III 章では、DDMP サポニンの発芽における挙動を検討し、活性酸素消去能と比較した。また、吉城らによって提唱されている XYZ 系微弱発光を用い、発芽期の生体防御系を考察した。第 IV 章では、発芽時における微弱発光物質の挙動を、第 V 章では特性を検討した。第 VI 章では、Photon-HPLC システムを用いて微弱発光物質の検出および分画を試みた。

## 第 I 章

種子を 70% エタノールで抽出後、HPLC で分析した (図 1)。アズキには胚軸部に DDMP サポニンが 7 種類、子葉部に 2 種含まれていることがわかり、この内 A から D のピークを示す DDMP サポニンの単離を試みた。

全粒、および胚軸から 70% エタノールで抽出した。濃縮後、ブタノール:水/1:1 で分配し、全粒のブタノール相 (11U) を ODS カラムで分画、精製し A を、胚軸の水相 (11L) を ODS カラムに供し、B、C および D を得た。

核磁気共鳴スペクトルの帰属は、 $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  COSY、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、 $^{13}\text{C}$  NMR、 $^1\text{H}$  NMR を用い、MS スペクトルおよび加水分解後の TLC から糖鎖構造を推定した。以上より子葉サポニン (A) および、胚軸サポニン (B)、(C)、(D) は、図 2 のような構造であることがわかり、それぞれ、Az I、Az II、Az III、Az IV と命名した。

## 第 II 章

アズキの 11L 画分を ODS オープンカラムに供し、0~20%アセトニトリルの直線グラジエントで溶出させた。活性のあった画分を YMC-Pack ODS-AM-323 (溶媒 3%アセトニトリル) を用い精製単離した (So I)。構造解析の結果 So I の構造は図 3 に示すマイナスカテキンのグルコース配糖体であると決定した。

また、一般的な抗酸化物質である没食子酸、カテキン類と So I の SOD 様活性、ヒドロキシルラジカル消去活性、DPPH 消去活性、リノール酸の自動酸化に対する抗酸化性を比較した。その結果、ヒドロキシルラジカルに対する特異性、140 日以上にわたる抗酸化を示し、この特性は C-3 位の糖鎖によるものと考えられた (図 4)。

### 第三章

種子が吸水し、発芽に至る過程で、種々の酸化代謝系が活性化されることが知られている。こうした代謝活性化につれて、活性酸素消去物質である DDMP サポニンがどのような挙動を示すのか検討した。

試料は、暗所 25 度で発芽させ、DDMP サポニン含量は HPLC によって測定した (図 5)。発芽 4 日目の Az II は、初葉および根部で、Az III、Az IV、 $\alpha$ g、 $\beta$ g は、初葉、フックにおいて特異的に局在した。DDMP サポニンは部位局在性を示し、葉や、根などの重要な器官に分布していた。活性酸素消去能と DDMP サポニンの比較では、胚軸において、各消去能 (スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、DPPH、過酸化水素) は、経時的な減少がみられ、DDMP サポニンの減少と相関がみられた (図 6)。子葉においては、Az I は増加傾向を示し、各消去能との相関はみられなかった。このように胚軸および子葉で一致した結果が得られず、DDMP サポニン以外の活性酸素に対する防御系の存在が考えられた。

発芽体水抽出物に過酸化水素を添加し微弱発光を測定すると、活性酸素消去能、特に DPPH ラジカル消去能および過酸化水素消去能と相関がみられ、発芽期に誘導される防御系の検索に微弱発光法が有効であると考えられた。

### 第四章

発芽時における生体防御系を検討するため XYZ 系微弱発光を用いた。この系は、中性条件下、 $H_2O_2$  など活性酸素種 X、没食子酸などヒドロジェンドナーである

Y、MeCHO など反応メデイエーターZ を混合すると、微弱発光する系で、発光過程で活性酸素を消去する生体内活性酸素消去系と考えられる(図 7)。微弱発光強度の測定は、マイクロシリンジに X、Y、Z 種(例えば、X:196 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Y:5 mM 没食子酸、Z:358 mM MeCHO)として各 10 μl ずつ分取し、東北電子の CLD-110 アナライザーにて測定した。

経時的測定においては、Y、Z 種ともに給水後誘導がみられた(図 8)。次に、創傷時などストレス条件下における微弱発光の検討を行った(図 9)。創傷時における Z 種は、創傷部位において発光強度が約 2 倍に、創傷部位から離れた地点においても発光強度の増加がみられた。Y 種は、創傷時に減少する場合があります、消費されていることも推測された。以上の検討から、Y、Z 種は発芽によって増加し、生体防御機構に関わっていることが示唆された。

## 第V章

発芽体 4 日目の水抽出物を用いて、X 種、Y 種、Z 種を変えた場合の発光強度の変化、発光波長の測定、一重項酸素による発光の検出など、発芽時における微弱発光特性を検討した。X 種(各種ペルオキシド)の検討結果、過酸化水素およびメチルエチルケトンペルオキシドで特異性が高かった。Z 種(各種アルデヒドおよび HRP)の検討結果、HRP を Z 種とした場合に発光が強くみられた。Y 種では、将来的に液胞に沈積する加水分解タンニン前駆物質である、没食子酸、その脱炭酸物であるピロガロールなどに強い Y 種的作用がみられ、細胞壁の構成成分となるリグニン方向の Y 種的作用は弱かった。

発芽体 Z 種の発光波長スペクトルは、アズキ、ダイズにおける全ての発芽体部位で 510 nm に極大発光波長を示し、Z 種として HRP を用いた時と一致した(図 10)。発芽体 Y 種では、アズキ根部において極大発光波長 615 nm を示し、Y 種はカテキンガレート骨格を持つと推測された(図 11)。また、XYZ 系微弱発光において、一重項酸素は検出されなかった。

## 第VI章

発芽体中 Y 種および Z 種の検出を行うために、Photon-HPLC システムを構築した(図 12)。アズキ胚軸の水抽出物による Z 種の検出では、HRP と発光ピークが

一致した(図 13)。アズキ胚軸 Z 種は HRP 様ペルオキシダーゼ活性を持ち分子量は約 45000 であることが示唆された。また、ダイズも同様なリテンションタイムに発光を示した。発芽体中 Y 種の検出では、アズキ、ダイズともに 17 分のピークに発光が検出された(図 14)。これらのことから、Y 種および Z 種には、子葉、胚軸などの部位やダイズ、アズキなどの族間で共通していることが示された。

セファデックス G-100 ゲル濾過カラムを用い Y 種の分画を行った。発光ピーク中の糖の比率はグルコース換算で 60%、蛋白質の比率はアルブミン換算で 11%、全ポリフェノール含量は没食子酸換算で 0.17%であった。没食子酸の発光検量線から発光物質含量を求めると全ポリフェノール含量の 2 割であり、この成分が発光に寄与していると考えられた。この物質を尿素で処理すると発光ピークも HPLC ピークも消失することから、Y 種は水素結合により会合し、高分子体を形成していることが推測された。

## 要 約

アズキ種子には DDMP サポニンが胚軸部に 7 種、子葉部に 2 種存在し、4 種類の構造は、アグリコン soyasapogenol B、糖鎖は GlcA-Glc (Az I)、GlcA-GlcA-Glc (Az II)、GlcA-GlcA-Rha (Az III)、GlcA-Glc-Glc (Az IV) であった。また、アズキ種子中 SOD 様物質 ((-)-catechin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) は、ヒドロキシルラジカル消去能が高く、優れた抗酸化作用を示した。発芽時の DDMP サポニンは、代謝の活発な初葉、根などに分布がみられた。発芽体抽出物の活性酸素消去能から、DDMP サポニン以外の生理活性物質の存在が予想され、微弱発光現象と発芽後に誘導される生体防御系との関連が示唆された。

XYZ 系微弱発光を用い微弱発光挙動を検討した結果、Y および Z 種は発芽後に誘導され、創傷時などストレス条件下には、創傷部位のみならず、非創傷部位の応答反応にも寄与した。微弱発光特性を検討した結果、過酸化水素だけでなく、有機ペルオキシドも X 種として、アルデヒド、HRP などが Z 種として作用した。Y 種としてはリグニン系よりも、タンニン系代謝物を用いた時に強く発光した。

波長測定から、アズキ Z 種はペルオキシダーゼ、Y 種はカテキンガラート骨格を持つと推測され、これらの発光は一重項酸素由来ではないことがわかった。

CL-HPLC システムによる分析から、Z 種、Y 種はアズキおよびダイズで類似して

いた。分画、および各種分析から、Y種は会合により高分子を形成し、わずかに含まれるポリフェノール成分が発光していると考えられた。

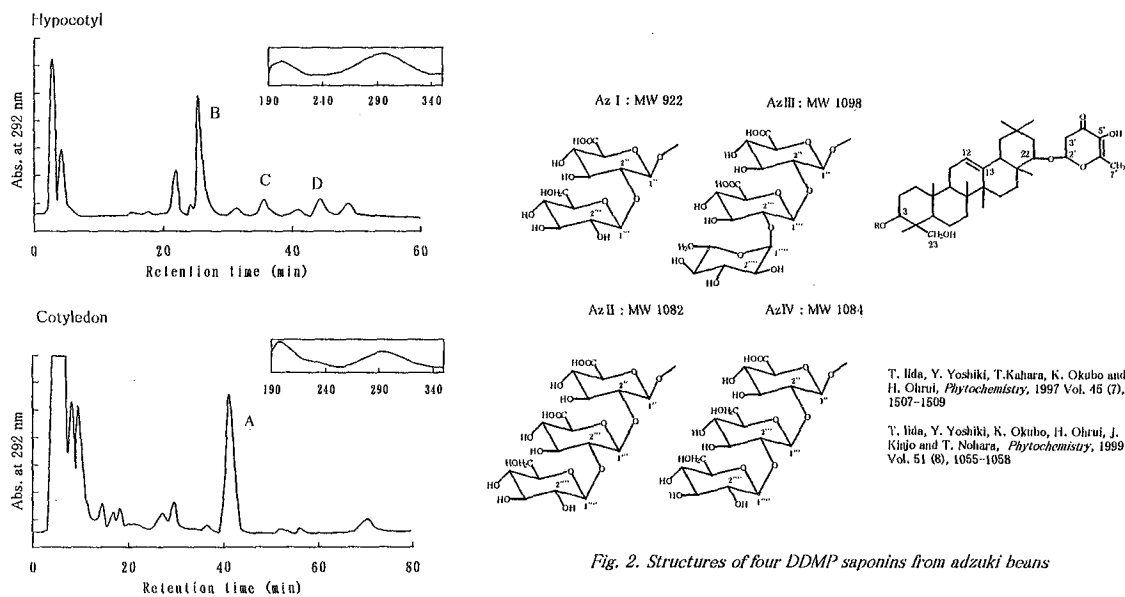


Fig. 2. Structures of four DDMP saponins from adzuki beans

Fig. 1. HPLC patterns of DDMP saponins from cotyledon and hypocotyl of adzuki beans

Column: YMC-Pack ODS-AM-303  
 Mobile phase: EDTA:MeCN:H<sub>2</sub>O:AcOH/1:3800:6200:3 (hypocotyl),  
 1:4000:6000:3 (cotyledon)

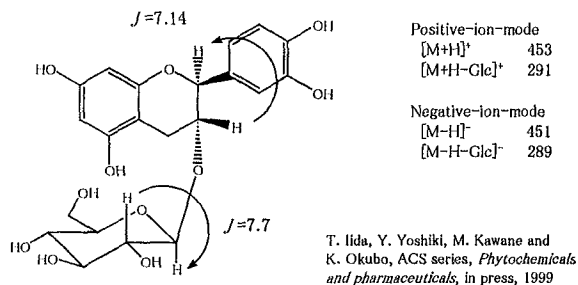


Fig. 3. Structure of (-)-catechin 3-O-β-D-glucopyranoside

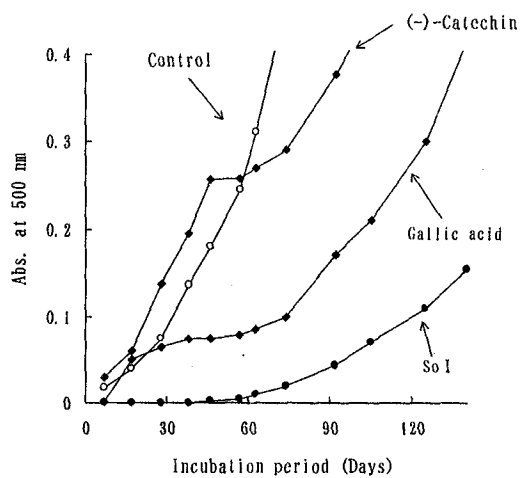


Fig. 4. Antioxidative activity of So I and other compounds

Each sample of 0.1 mM (0.1 ml) was added to a reaction mixture of linoleic acid (0.52%)–ethanol–phosphate buffer (pH 7.0) and incubated at 37°C

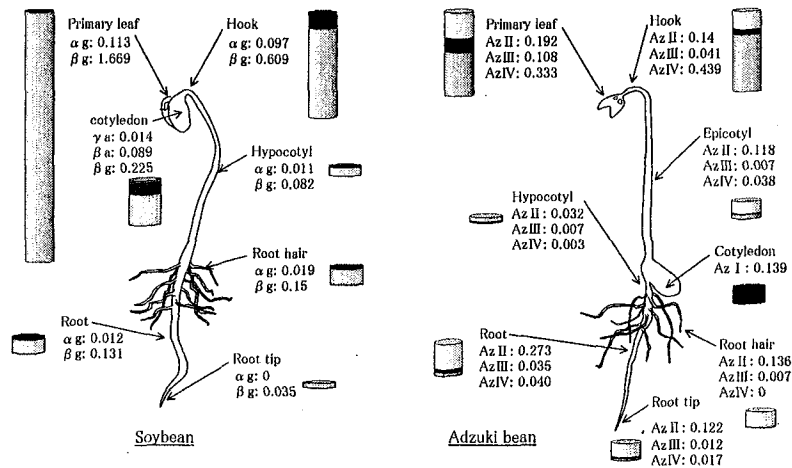


Fig. 5. DDMP saponin contents of various organs from adzuki bean and soybean seedlings

Content (mg/100mg)

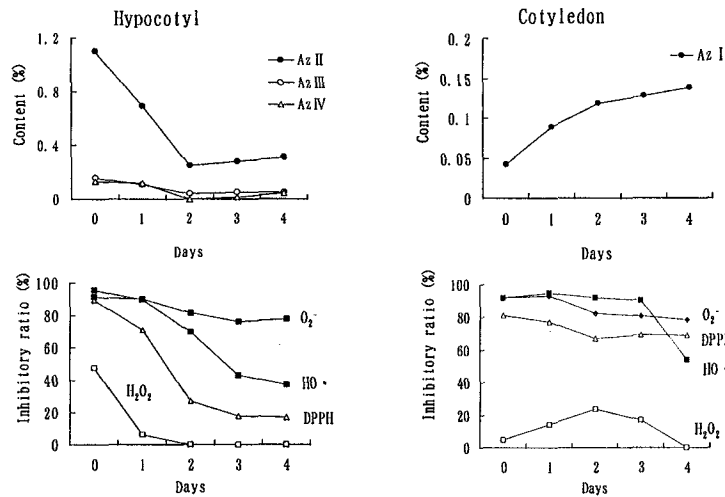


Fig. 6. DDMP saponin contents and radical scavenging activity of adzuki beans during germination

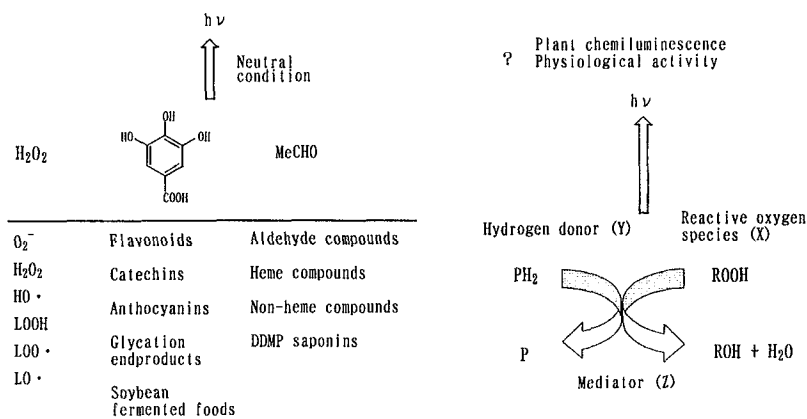


Fig. 7. Integrative diagram of XYZ system



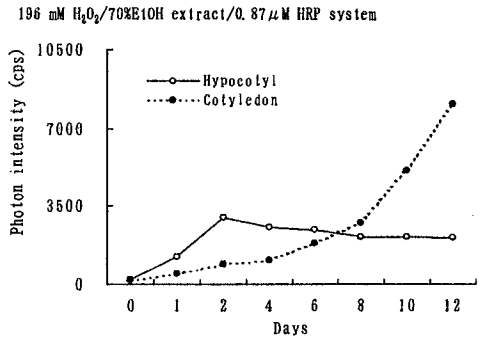
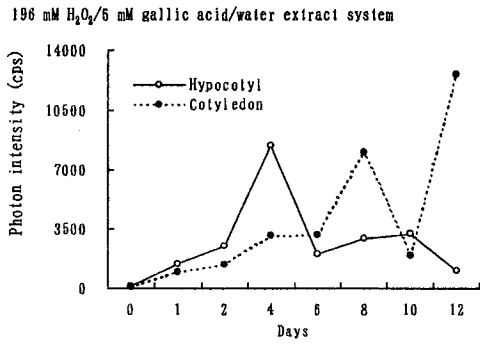


Fig. 8. Photon intensity of extract from adzuki beans during germination

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /gallic acid/ water extract system	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /70%EtOH extract/ HRP system
	Hypocotyl, 2.0 - fold ↑ Cotyledon, 1.9 - fold ↑	— 2.8 - fold ↑
	Hypocotyl, 1.9 - fold ↑ Cotyledon, 0.2 - fold ↓	1.2 - fold ↑ —
	Stem, primary leaf, 1.8 - fold ↑	— 0.64 - fold ↓
	Stem, primary leaf, 3.1 - fold ↑ Root, 2.2 - fold ↑	0.89 - fold ↓ 0.85 - fold ↓

Fig. 9. Effect of wound on chemiluminescence from adzuki bean seedlings

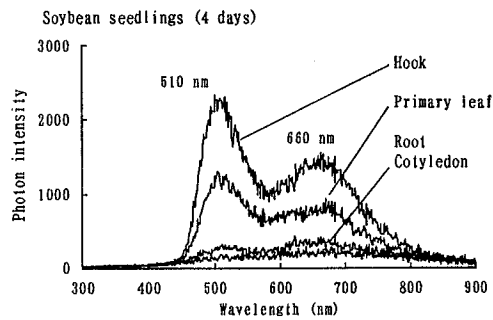
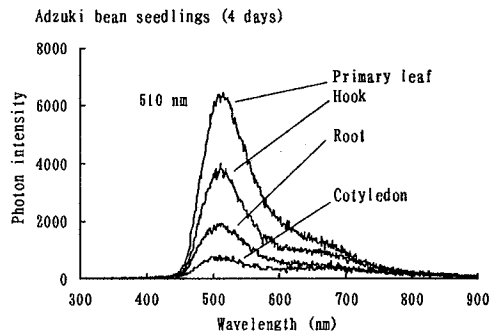


Fig. 10. Emission spectra of Z species from adzuki bean and soybean seedlings

196mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/5mM gallic acid /water extract system

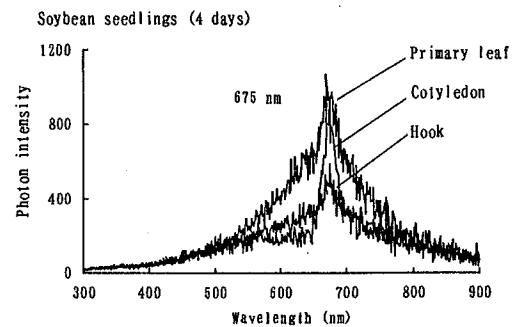
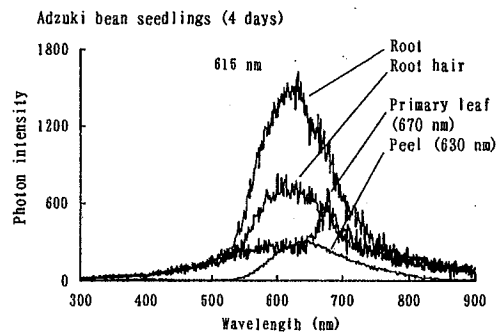


Fig. 11. Emission spectra of Y species from adzuki bean and soybean seedlings

196mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/water extract/358mM MeCHO system

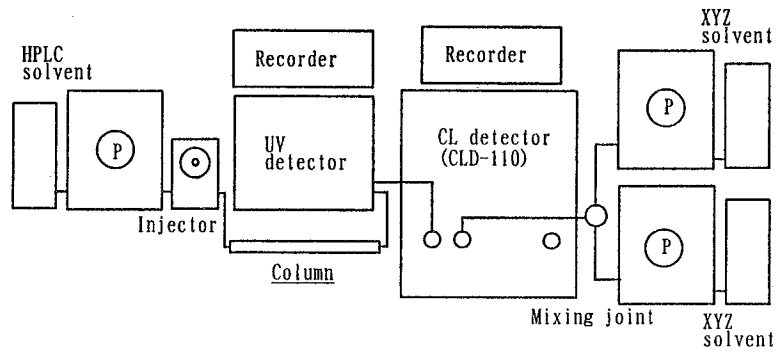


Fig. 12. Photon-HPLC system for the detection of Y or Z compounds

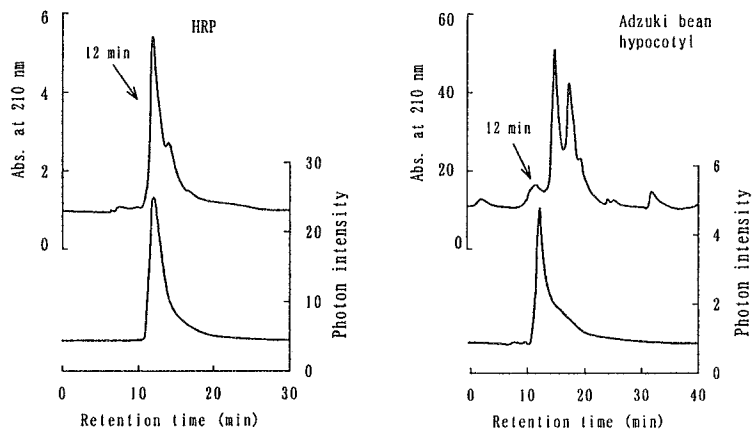


Fig. 13. Photon-HPLC patterns of Z species from adzuki bean seedlings and HRP

HPLC condition: mobile phase, 0.03M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0.15M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; column, Shodex GS-520  
 XY solvent: 196mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 10mM gallic acid

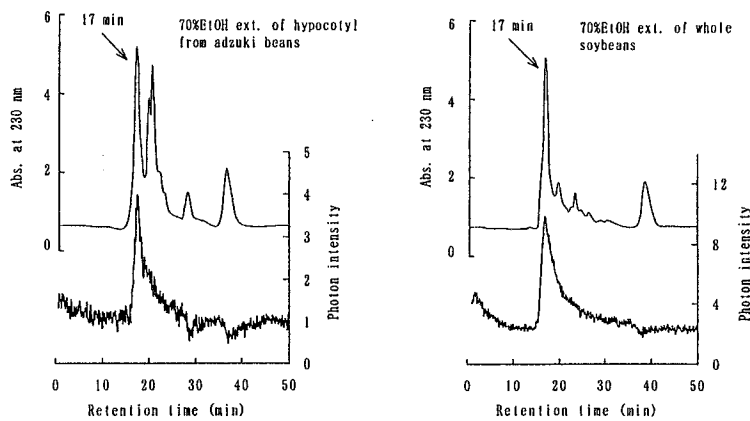


Fig. 14. Photon-HPLC patterns of Y species from adzuki bean and soybean seedlings

HPLC condition: mobile phase, 0.03M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0.15M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; column, Shodex GS-520  
 XZ solvent: 0.49M  $\text{H}_2\text{O}_2$  and sat.  $\text{KHCO}_3$  in 0.89M MeCHO

## 論文審査結果要旨

マメ科植物は600属13000種におよび、食糧資源としてだけでなく、古くからその生理活性および機能因子の面からも注目されている。マメ類のなかでもアズキは高い抗酸化作用を持つが、あまり詳細な検討がなされていなかった。そこで、第I章では、アズキサポニンの検索、分画、単離を行い、核磁気共鳴共鳴スペクトル、MSスペクトル、糖鎖構造から4種類の新規サポニンを発見し、Az I, Az II, Az IIIおよびAz IVと命名した。アズキは日常の食品素材であり、その機能性を解明していく上での基本的成分であることから、その発見は重要である。第II章では、さらにアズキの抗酸化成分の検索を行い、分画、単離を行い、機器分析で構造解析を行い、新規物質である(-)-catechin3-O- $\beta$ -glucopyranosideを発見し、So Iと命名した。さらにそのSOD様活性、ヒドロキシルラジカル消去活性、DPPH消去活性、リノール酸自動酸化に対する抗酸化性を測定し、没食子酸、カテキン類と比較し、C-3位の糖鎖によるものと考えた。第III章では、DDMPサポニンの発芽における分布を調べた。その結果、発芽4日目のAz IIは初葉および根部で、Az III, Az IV,  $\alpha$ g,  $\beta$ gは初葉とフックに特異的に極在していることを明らかにした。重要器官部位極在性は生体防御におけるDDMPサポニンの重要な役割を示唆している。さらに、発芽期に誘導される防御系の検索に微弱発光法が有効であることを明らかにした。第IV章では、XYZ系活性酸素消去発光法により発芽時における生体防御系を検討した。Xは活性酸素種、YはハイドロジェンドナーおよびZはメデイエーターである臨時におけるZ種は、創傷部位において発光強度が約2倍に、創傷部位から離れた地点においても発光強度の増加がみられ、Y種は創傷時に消費減少する傾向がみられ、YZ生体防御系を明らかにした第V章では、発芽体における活性酸素消去発光特性を検討した。その結果、X種ではHOOHとmethylethylketoneOOHで、Z種ではHRPで、Y種では没食子酸とピロガロールでそれぞれ特異性の高いことを明らかにした。また、発芽体Z種の発光波長スペクトルは510nmに、Y種では615nmにそれぞれ極大発光波長がみられた。さらに、XYZ系活性酸素消去発光では、一重項酸素に由来する発光は検出されなかった。第VI章では、発芽体Y, Z種の検出、定量および単離のためのPhoton-HPLCシステムを構築した。

以上の結果は、機能性食品素材としての活用だけでなく、植物生体防御機能解明に新たな展開を与えることとなり、博士(農学)の学位を授与するに値すると判定した。