

ナスポリフェノール量がラジカル捕捉活性および抗酸化活性に及ぼす影響

竹内 若子・大橋 千浩・木学 量子・角野 史佳・平井菜穂子

Effect of Polyphenol Contents of Eggplant on Radical Scavenging and Antioxidant Activity

Wakako TAKEUCHI, Chihiro OHASHI, Ryoko KIGAKU, Norika SUMINO and Naoko HIRAI

緒 言

近年、高齢社会に伴う健康志向の中、医薬品ではなく食によって糖尿病に代表される生活習慣病の予防や老化の抑制をしたいというニーズが急速に高まりつつある。老化抑制や生活習慣病の予防に対し、どのように対処するかは今や単に一個人の問題ではなく、国民的な重要課題ともなっている。このようなことから研究者に限らず、食品のもつ三次機能（生体調節機能）が興味を中心となってきた。食品中の各成分は、それぞれが生体機能の調節やエネルギー源として寄与していることは言うまでもないが、食品のもつ三次機能の中でも、生体内のラジカルや活性酸素が病気発症の要因であることが解明されて以来、これらラジカルや活性酸素の消去作用ならびに抗酸化作用などを示す生理活性成分（ポリフェノール化合物中心）が多く報告されている植物起源の食材への期待はさらに大きい。

植物性食品中のポリフェノール化合物は、その化学構造上からも多種多様であるが、基本的には植物における二次代謝産物としてL-フェニルアラニンからp-クマル酸を経由して生成され、この生成反応を触媒するL-フェニルアラニンアンモニリアーゼ（PAL）や*t*-cinnamate 4-hydroxylaseの2酵素の性質は、各種の植物より単離されてよく調べられている¹⁾。植物中のポリフェノール成分のうち、クロロゲン酸は植物において普遍的に存在する二次代謝産物の一つであり、コーヒー酸のカルボキシル基とキナ酸の水酸基との間でエステル結合した化合物である。また、植物界に広く分布しているポリフェノールオキシダーゼ（polyphenol oxidase）の*in vivo*における機能やポリフェノール成分の合成への関与については研究者によって意見の分かれる部分^{1,2)}でもあり、未だ明確にはなっていない。最近、話題となった赤ワインやブルーベリー、紫イモ等にみられる食品の天然色素成分としてのポリフェノールであるアントシアニン類の示す様々な生体機能調節作用についても多くの報告がみられる³⁻⁵⁾。そこで本研究では、身近な植物性食品で、日本をはじめ、世界中で広く食用されているナス（*Solanum melongena* L.）のポリフェノール成分に焦点をあて、その機能性について調べてみることにした。ナスの主要なポリフェノール成分は、果実中ではクロロゲン酸（3-Caffeoylquinic acid）やイソクロロゲン酸（3,5-dicaffeoylquinic acid）が、また果皮中ではアントシアニン（主にナスニン）とされている。本研究では、最近関西、関東地区を中心に出回っている「白ナス」を比較の対照として用い、ナスの果皮、果実の両者間における機能性の違いについて*in vitro*におけ

るポリフェノール成分のラジカル捕捉活性や抗酸化性を中心に比較・検討することを目的とした。併せてナス中のポリフェノールオキシダーゼの精製も試みた。

実験材料および方法

1) ナス果実および果皮中のポリフェノール成分抽出溶液の調製

ナス皮を除去した後、皮周辺(帯緑色部)の内部組織から一定量(約2g内外)を小三角フラスコに精秤し、80%メタノール溶液を加えて直ちにホットプレート上で3分間加熱し、酵素を失活化させた。これを氷冷した乳鉢に移して海砂と共に十分磨砕した。このホモジネートをナイロンメッシュで濾過後、80%メタノール溶液で一定量(10ml)とし、遠心分離(9,000rpm, 15分間)後の上清を果実中のポリフェノール成分抽出液とした。一方、果皮(約3g)は0.5%塩酸含有メタノール溶液を加え、一晩放置(4℃)後、定容とした。

2) ナスポリフェノール成分の定量(Folin-Denis法)

Folin-Denis法⁶⁾に準じ、上記の果実抽出液0.4mlに10%Na₂CO₃溶液0.4ml, 水3.0ml, フォーリン試薬0.2mlを加えて全量4.0mlとし、よく混和後、室温で30分間放置し、700nmにおける吸光度を測定した。別にクロロゲン酸(最終濃度~10μg/ml, 和光純薬製)を標準物質として用い検量線を作成し、これより総ポリフェノール含量(mg%)を算出した。なお、果皮中のアントシアニン量は、デルフィニジン(フナコシ製)の0.5%塩酸含有メタノール溶液を標準物質とし、540nmにおける吸光度をもとに検量線を作成し、これより算出した。

3) 抗酸化能(①~③)の評価

① ロダン鉄法⁷⁾

75%エタノール溶液(4.4ml)に、上記のポリフェノール抽出試料(200μl), 30%チオシアン酸アンモニウム水溶液(200μl)および0.02M FeCl₂-3.5%塩酸溶液(200μl)を加えた。混和後、直ちにボルテックスにて混和3分後の500nmにおける吸光度を測定し、試料無添加のコントロールと比較し、吸光度の増大の抑制を抗酸化活性とみなした。

② TBARS (2-Thiobarbituric acid Reactive Substance)法⁷⁾

リン酸緩衝液(0.2M, pH 7.0) 2ml, ポリフェノール抽出試料1ml, 2.6%リノール酸-エタノール溶液2ml, 蒸留水5mlの混合比で褐色瓶中で混合したものをテスト溶液とし、ポリフェノール抽出液の代わりにエタノールを用いて同様に混合したものをコントロールとして用意し、いずれも37℃で静置・反応させた。テスト、コントロールの各反応液から経時的に1.0mlづつを分取し、TBA法に準じ、535nmでの吸光度の変動を追跡した。その結果、コントロールに対する吸光度の増加抑制を抗酸化能として評価した。

③ DPPHラジカル捕捉活性の測定⁸⁾

500μM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(和光純薬製)-エタノール溶液にポリフェノール抽出溶液を混和し、30℃, 30分間反応(遮光下)させた後、ポリフェノール液の代わりにエタノールを用いたものを対照とし、517nmにおける吸光度を測定した。なお、DPPH溶液は使用直前に調製したものをを用い、一定間隔で時間をずらしながら添加して測定を繰り返し、再現性を確認した。

4) 切断傷害ナス切片中のポリフェノール含量とアスコルビン酸量の経時的変動

コルクボーラーでくり抜いたナス切片をシャーレ内に水で湿したろ紙上に間隔をおいて並べ、乾燥しないようにふたをしたあと、35°Cのインキュベーターで24時間～48時間放置した。ポリフェノール含量は上記のFolin-Denis法で、アスコルビン酸量はヒドラジン比色法にて測定した。

5) ナスポリフェノールオキシダーゼの精製

ナスの果実(果皮は除去)のTris-HCl緩衝液(pH 7.5)抽出液を硫酸分画(40～70%飽和)し、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによりナスポリフェノールオキシダーゼ(以下、PPOと略記)の精製を試みた。その精製酵素を用い、若干の性質について検討した。

結果および考察

1. 総ポリフェノール成分の含量

フォーリン-デニス法によるナス中の総ポリフェノール量は、Fig.1に示したとおり、用いた試料のナス品種間の差はみられたが、いずれも総ポリフェノール量の70～80%が果皮周辺部(帯緑色部)に蓄積していた。これはポリフェノール成分が傷害をうけた組織の保護に関与するのではないかという説⁹⁾を支持する結果とも考えられる。また白ナスは果皮だけでなく、果実中のポリフェノール量も最少であった。

2. 抗酸化能の評価

ロダン鉄法(ペルオキシドにより Fe^{2+} を Fe^{3+} にし、チオシアン酸との結合塩の形で測定)およびTBA法(ペルオキシドそのものでなく、二次的な酸化生成物での測定)の結果はFig.2に示した。ロダン鉄法におけるナス果実の各抽出画分(熱水、95%エタノール、80%メタノールの各抽出液)はいずれも強い抗酸化性が見られた。また、TBA法では果皮(アントシアニン)についてみた結果であるが、さらに長時間にわたり、コントロールとの差は認められず、強い酸化抑制効果を示すことが確認された。ただし、白ナスではほとんどその効果は見られなかった(data not shown)。既にコーヒー豆や果実、茶葉中のクロロゲン酸の $O_2\cdot$ や $\cdot OH$ との反応性に関する報告もあるが、ナス果皮とその果実成分によるDPPHラジカル捕捉活Fig.3-a)および α -Trolox(ビタミンE誘導体)換算量Fig.3-b)についてみた。その結果、米ナス果実では果皮の70%相当のラジカル活性がみられたが、青ナスでは果皮の約40%程度に低下した。また、青ナスの果皮では米ナス果皮のおよそ50%であった。さらに白ナスにおいては、果皮、果実ともにラジカル捕捉活性はほとんど認められなかった。

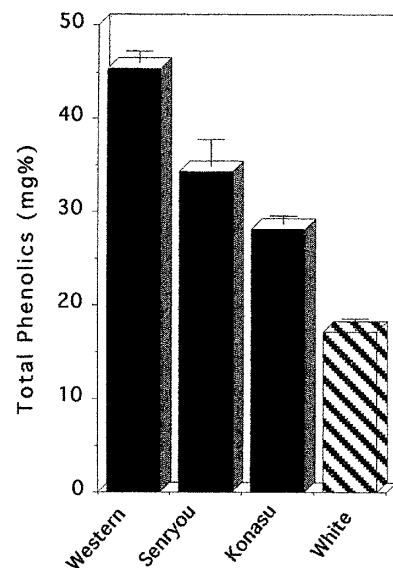


Fig.1 Polyphenol Content in Some Eggplants Sarcocap by Folin-Denis Method

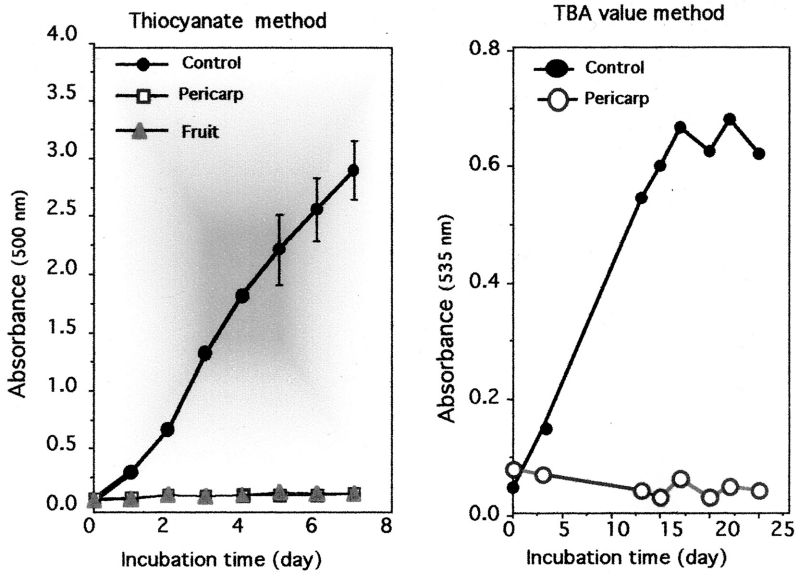


Fig.2 Effect of eggplnt polyphenols on Antioxidant Activity

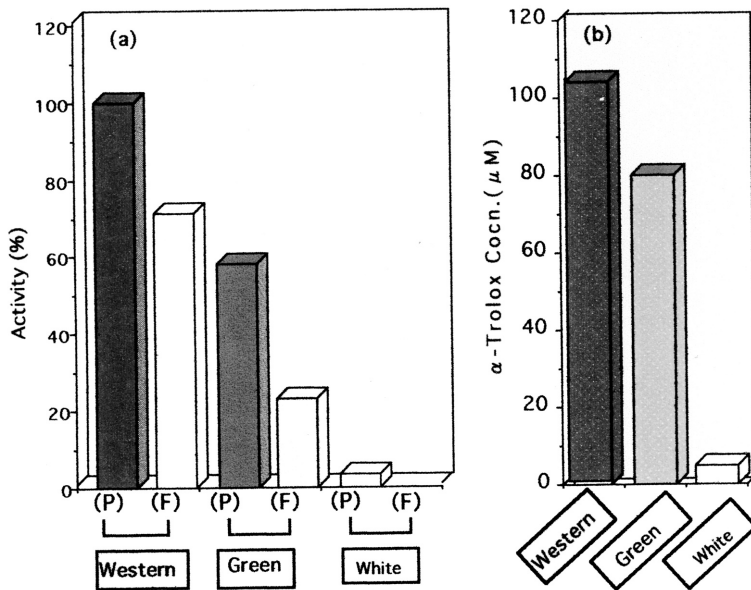


Fig.3 Effect of Eggplant Polyphenols on DPPF radical Scavenging Activity
 P: pericarp, F:Fruit, Westem; as beinasu, Green; as green pericarp eggplant,
 white; as white pericarp eggplant a):Relative activity, b):Trolox conversion quantity

3. 切断傷害ナス切片中のポリフェノール含量とアスコルビン酸量の経時的変動

切断傷害に伴うポリフェノール成分ならびにその生成に関するアスコルビン酸量の変動について調べた。主に果実中の帯緑色部における両者の変動の結果を Fig.4-a), b) に示した。植物学的にナスは、ジャガイモやトマト、タバコ等と同族であり、ジャガイモの切断傷害における経時的な変動については、すでに大羽らによって報告¹⁰⁾ されており、サツマイモの suspension culture に L-アスコルビン酸を添加するとクロロゲン酸やイソクロロゲン酸の合成が増大するという結果報告もある(信州大, 野末博士私信)。

ナスポリフェノール量は切断

24時間後に減少したが、48時間後には切断前よりも増加した。もう一方のアスコルビン酸量は、ポリフェノール量の変動とは逆の傾向を認めたが、ナスでもジャガイモと類似した挙動がみられた。この点については、さらに PPO 活性の変動も含め、さらに詳細に検討したいと考えている。

4. 精製酵素の pI (等電点) および分子量とその性質

クロマトフォーカシング後の PPO 活性画分をとりわけ、等電点電気泳動 (pH3.5~9.5) の結果、メインバンドの等電点 (pI) 約 4.5内外のタンパク質バンドが2本検出された (Fig.5)。また、SDS-PAGE によるタンパク質の精製度を銀染色法で確認した結果、メインバンドの分子量は 43,000であったが、マイナーバンドとして 34,000も検出された。

このメインバンドの活性画分を用いてナス PPO の性質について若干の検討をした。その結果、クロロゲン酸を基質とした時の Km 値は 0.95mM で、クロロゲン酸濃度 1.5 mM 以上で基質阻害がみられた。また、至適 pH は 6.0 (0.1M リン酸 buffer) で最大活性が認められた。一方、DIECA (ジエチルジチオカーバメート), KCN, 2-メルカプトエタノールの PPO 阻害剤の添加による高い活性阻害

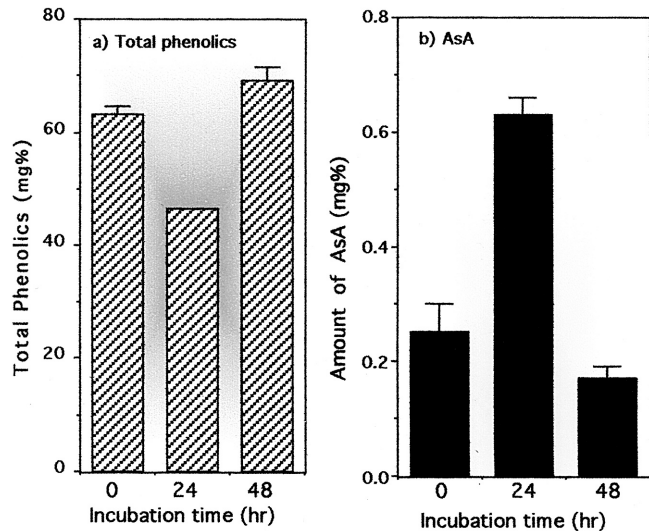


Fig.4 Changes in Polyphenol and Ascorbic acid Contents in Eggplant disks during Incubation

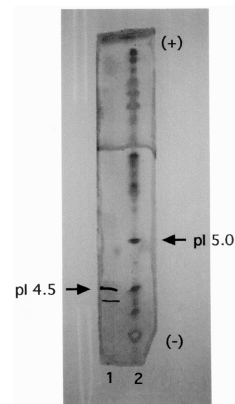


Fig.5 IEF-gel Electrophoresis of partial purified PPO from eggplant
lane1:purified PPO from eggplant, lane2:pI markers

が見られ、 Cu^{2+} などの金属イオンを含有することが示唆され、2-メルカプトエタノールによっても阻害を受けることから活性にはジスルフィド結合の関与も考えられた。また0.5 Mの食塩濃度において90%近い活性阻害も観察された。

謝 辞

本研究の遂行にあたっては、平成14年度名古屋女子大学 食物栄養学科、卒論生の大橋千浩、木学量子、角野史佳、平井菜穂子各位による共同の成果であることを記し、感謝の意を表します。また、本報告の一部は、2003年度日本農芸化学会大会(2003年4月2日、東京)において発表した。

文 献

- 1) Gross, G. G.: in Biosynthesis & Biodegradation of Wood Components, (Higuchi, T., ed) pp 229, Academic Press, New York (1985)
- 2) Vaughn, K.C. and Duke, S.O.: *Physiol Plant* 60, 106-112 (1984)
- 3) Sato, M., Yokotsuka, K. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 1800-1805 (1997)
- 4) 五十嵐喜治: 日本食品科学工学会第49回大会, 講演要旨集 p23-24, (2002)
- 5) 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫編: 「アントシアニン-食品の色と健康-」, p127-128, 建帛社 (2000)
- 6) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編: 「食品機能研究法」 p320-322, 光琳, (2000)
- 7) 中村 良, 川岸舜朗編: 「食品分析学」, p220-221, 文永堂出版, (1991)
- 8) 藤田修三, 山田和彦編: 「食品学実験書」, p146-147, 医歯薬出版, (2002)
- 9) Bolwell, G.P. and Butt, V. S.: *Pytochem.*, 22, 37 (1983)
- 10) 大羽和子; 家政誌, 41, 715-721 (1990)

Summary

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity and anti-oxidizing activity of eggplant polyphenol compounds were examined in comparison with white eggplant.

Purification of the polyphenol oxidase in the eggplant was also tried.

70-80% of total polyphenols in eggplant accumulated at the pericarp peripheral part. Approximately 70% of scavenging activity of the skin of eggplant was recognized in the sarcocarp. In white eggplant, not only polyphenol content of the skin but also that of the sarcocarp was remarkably little. Therefore, as a result of the measurement of radical scavenging activity, both activities could hardly be recognized.

As a result of the chromatofocusing with a pH gradient of polybuffer (pH 7.4~4.0), major active protein band (43 kDa) was eluted. When chlorogenic acid was used as a substrate, the purified enzyme showed optimum pH 6.0, Km value 0.95mM and the substrate inhibition (at over 1.5mM) was also recognized. Addition of DIECA, KCN and 2-mercaptoethanol brought remarkable active inhibition.