

氏名	Robert YAWADIO NSIMBA		
学位の種類	博士（学術）		
学位記番号	第 5358 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者		
学位論文名	Screening and Evaluation of Antioxidative Compounds from <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. and <i>Amaranthus</i> spp. and Their Collagenase Inhibitory Effectiveness (キノアおよびアマランサス種子からの抗酸化物質の検索と評価およびコラゲナーゼ阻害効果)		
論文審査委員	主査 教授 小西洋太郎	副査 教授 曾根良昭	
	副査 教授 西川禎一	副査 准教授 菊崎泰枝	

## 論文内容の要旨

穀物は人間が最も多く摂取する食品である。しかし、我々が毎日食する米や小麦のような主要穀物は通常、精白されている。精白工程で、ビタミンやミネラルなどの栄養素のみならず、食物繊維やポリフェノールなどの抗酸化物質が失われてしまう。そこで健康志向の強い近年、玄米のような全穀粒 (Whole grain) に、とりわけ栄養価の高いアマランサスやキノアのような雑穀に注目が集まっている。

本研究はヒユ科植物アマランサスとアカザ科植物キノア種子から、抗酸化物質のスクリーニング、精製・単離、構造解析を行うとともに、*in vitro* における抗酸化活性、そして新たな生理機能として、皮膚の損傷、老化に關与するコラゲナーゼ阻害活性について言及した。

第 1 章は本研究の背景と目的について、すなわち食糧源としてのアマランサスやキノアの重要性について触れ、植物由来の生理活性物質、特に本論文の対象となる ecdysteroid (昆虫の脱皮ホルモンとして知られているが、植物にも存在している。しかし、その生物学的機能についての研究は少ない。) およびフラボノイドの化学、分布、生合成経路、および生物学的機能についての知見について概説している。

第 2 章では、3 種のアマランサスおよび 2 種のキノア種子の抗酸化活性の評価方法と結果について述べている。まず、種子粉末のエタノール抽出物について、総フェノール化合物の定量を行い、原理の異なる 3 つの抗酸化活性測定法、すなわち FRAP 法、 $\beta$ -Carotene Bleaching 法、フリーラジカル捕捉活性法 [DPPH (1, 1, -diphenyl-2-picrylhydrazyl) 法] を用いて抗酸化活性を測定した。その結果、5 種の試料とも十分な抗酸化活性がみられ、抗酸化機能食材として期待できることがわかった。しかし、3 つの方法で測定したそれぞれの抗酸化活性と総フェノール含量との間に有意な相関はみられないことから、フェノール化合物以外の抗酸化物質の存在が示唆された。そこで次に、5 試料について極性の異なる種々の溶媒を用いて分画を行ったところ、酢酸エチル抽出画分およびブタノール抽出画分に強い抗酸化活性がみられた。

第 3 章では、前章で明らかにしたように、キノア種子において抗酸化活性が比較的強かった酢酸エチル抽出画分とブタノール抽出画分に着目し、数種のフラボノイドおよび ecdysteroid を精製・単離し、構造解析した。また、それらの機能性を評価するために抗酸化活性 (DPPH ラジカル捕捉能)、鉄イオンキレート (捕捉) 活性、コラゲナーゼ阻害活性を調べた。

粉末試料から得た 80%メタノール抽出物を水に溶解後、順次ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールで分配した。ブタノール抽出画分のアセトン可溶部について、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、TLC、ODS カラムを用いた HPLC を用いて精製した。単離した ecdysteroid は UV,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 2D-COSY (two-dimensional correlation spectroscopy), HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiple bond correlation), MALDI-TOF mass spectrometry を用いて解析し、3 種の新規 ecdysteroid (20, 26-dihydroxy-28-methyl

ecdysone; 20,26-dihydroxy-24(28)-dihydro ecdysone; 20-hydroxyecdysone 22-glycolate)をふくむ計8種類のecdysteroidを同定した。これらはいずれも合成抗酸化剤BHAよりも3-8倍強いDPPHフリーラジカル捕捉活性 ( $IC_{50} = 3.2-8.8 \mu\text{g/ml}$ ) と鉄イオンキレート活性 ( $IC_{50} = 20-38 \mu\text{g/ml}$ ) を示した。またコラゲナーゼ活性を濃度依存的に阻害 ( $IC_{50} = 28-50 \mu\text{g/ml}$ ) した。そのメカニズムは、コラゲナーゼの触媒活性に必須の鉄イオンをecdysteroidが捕捉することによると考えられる。しかし、ecdysteroid自身はコラーゲンを分解しないことがSDS-ゲル電気泳動法によって確かめられた。また、単離した2種のフラボノイド配糖体についても抗酸化活性およびコラゲナーゼ阻害効果がみられた。しかし、ecdysteroidよりも弱かった。

## 論文審査の結果の要旨

酸化ストレスは老化を進めるファクターであり、アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患、がん、皮膚傷害の主なリスクファクターでもある。酸化ストレスは細胞内の活性酸素種 (ROS) 濃度と生体が有する酸化防御キャパシティのバランスで決まり、前者が勝ると多くの生体分子に損傷を与えることになる。哺乳動物においては、ROS代謝酵素群、抗酸化活性を有するタンパク質、低分子抗酸化物質などから構成される酸化防御システムを有している。しかし加齢によって酸化防御システム機能が低下すると、ROSによる酸化反応が進み、種々の疾病を引き起こす。それらを防止する一策として、食品からの日常的な抗酸化物質の供給が重視されている。

本論文の新規性として、これまであまり利用されてこなかった食材に新たな機能性をみいだした点があげられる。すなわち、アマランサスやキノア種子のエタノール抽出物について、原理の異なる3種の抗酸化活性測定法 (FRAP法、 $\beta$ -Carotene Bleaching法、DPPHフリーラジカル捕捉活性法) でスクリーニングした結果、これらの雑穀に強い抗酸化活性が認められ、抗酸化ストレス食材としての有効性を提唱した。さらにこの実験で得られた重要なことは、用いる測定方法によって抗酸化活性の強さが異なることであり、植物試料の抗酸化能を評価する際の留意点としてとりあげている。

本論文ではさらに、キノア種子から新規化合物をふくむ8種類のecdysteroidを精製・単離し、種々の機器分析により化学構造を決定している。*In vitro*実験において、それらのecdysteroidは、皮膚の老化や紫外線による皮膚損傷に関与するコラゲナーゼ酵素活性を濃度依存的に阻害することを示した。同時に鉄イオンキレート (捕捉) 活性を濃度依存的に阻害することを認めた。しかし、ecdysteroid自身はコラーゲンを分解しないことを確認している。

これらの結果は、いくつかの課題を残しつつも、キノア種子由来のecdysteroidが種々の疾病のリスクとなる酸化ストレスの防止、皮膚損傷の修復や皮膚老化の防止に有効であることの可能性を指摘しており、今後の展開が期待され高く評価できる。

以上の審査結果により、本論文を博士 (学術) の学位を授与するに値するものと認めた。