

パッションフルーツ果皮に存在する降圧成分に関する研究

鎌田靖弘、玉村隆子、市場俊雄、比嘉賢一、安里昌樹、甲田秀一、世嘉良宏¹

本研究開発は、沖縄で今後発展が見込まれる健康食品素材および医薬品素材を提供することを目標としている。今年度は、昨年度に引き続き、降圧作用の可能性のある生物資源として選択されたパッションフルーツの果皮に関し、アンジオテンシン変換酵素阻害活性（以下ACE阻害活性と称する）評価技術を用いて降圧作用成分の分析を行った。その結果、パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質の性質として、分子量1000以下の成分で、親水性が強く、且つ亜鉛とキレート化する物質だと、現段階では推定された。また、パッションフルーツ果皮抽出物は動物試験において血圧降下作用を有し、その作用はACE阻害活性（上記の性質の成分）、エンドセリン産生抑制活性（ルテオリンとその配糖体）およびγ-アミノ酪酸（以下GABAと称する）による神経生理作用などの複合作用による効果であると推察された。

1 はじめに

本研究は昨年度に引き続き、平成16年度地域新生コンソーシアム事業「ゲノム機能解析による沖縄生物資源からの創薬シーズ開発」というテーマで研究を行った。

現在、高血圧症に悩む日本人は約4,000万人にのぼると考えられていることから、高血圧症の病態改善機能およびその予防機能を有する食品素材の市場をターゲットとし、沖縄で今後発展が見込まれる健康食品素材および医薬品素材を提供することを目標としている。

昨年度の結果をまとめると以下の3点である。

- 1) 亜熱帯生物資源304種類の中から、ACE阻害活性を有する素材をパッションフルーツの果皮に選定した。
- 2) パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質の性質は、分子量5000以下の成分で、親水性が強く、且つ亜鉛とキレート化する物質であることが分かった。
- 3) 吸光度計を用いるACE阻害活性評価法を確立することができた。

そこで本研究では、ACE阻害活性評価技術を用いて降圧作用成分の分析を行い、パッションフルーツ果皮抽出物を動物に投与した場合の血圧降下作用点について検討を行った。また、試作品についての有効成分の分析も行った。

2 実験方法

2-1 サンプル調製

パッションフルーツは、果汁、種子および果皮に分離した後、凍結乾燥し粉末にした。図1に示すように、その粉末750gに蒸留水15L加えて、品温70℃、2.5時間で加熱抽出を行った。100%エタノールを同量加えて不純物を沈殿除去後、珪藻土濾過を行った。濾液は分子量

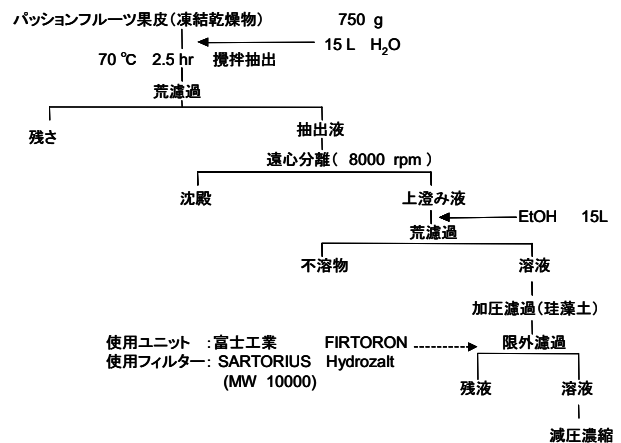


図1 パッションフルーツ果皮抽出物の大量調製法

（以下M.W.と称す）10000の膜（Millipore社）を用いて限外濾過を行い、ロータリーエバポレーターで濃縮乾燥し、ACE阻害物質の部分精製に用いた。

成分分析のためのメタノール抽出物の調製は、乾燥重量で1gの試料を10～20mlの溶媒量とともに混合し、振とう機（TAITEC社、RECIPRO SHAKERSR-2）を用い、振とう数；290回min⁻¹、抽出時間；2時間で振とう抽出を行った。各々得られた抽出液は最終的に0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過し、実験に用いた。

2-2 パッションフルーツ果皮を用いた乳酸発酵茶のサンプル調製

（株）沖縄発酵化学が試作したパッションフルーツ果皮を用いた乳酸発酵茶中のGABA含量を測定するために、以下のようにサンプル調製を行った。

¹（株）トロピカルテクノセンター

1) 乳酸発酵茶の熱水抽出

乳酸発酵茶 1包 (3.0g) に沸騰水500mlを加えて5分間攪拌抽出し、その後抽出液をロータリーエバポレーターで50mlに濃縮した。抽出物は5%トリクロロ酢酸で除タンパク後、上清を0.02NのHClで3倍に希釈し、実験に供した。

2) 乳酸発酵茶の遊離アミノ酸抽出

遊離アミノ酸測定用試料溶液調製法¹⁾に準じて行った。すなわち、乳酸発酵茶 1包 (3.0g) を75%エタノール20ml加えて80、20分間還流しながら抽出し、濾液を回収した。この操作を3回繰り返して100mlの抽出液を得た。その後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた。除タンパク以降は1)と同様に行い実験に供した。

2 - 3 ACE阻害活性試験

馬尿酸を吸光度計で測定する方法²⁾に準拠して測定した。すなわち、基質として、ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシンを用い608mM塩化ナトリウムを含むホウ酸緩衝液 (pH8.3、50mMホウ酸ナトリウム-200mMホウ酸) に基質濃度が7.6mMとなるように溶解した。ACE (SIGMA社) はウサギ肺由来のものを用い、上記ホウ酸緩衝液に 60×10^3 U/mlとなるように溶解した。ACE阻害活性は、ACE溶液とサンプルを混合し5分間ブレインキュベートした後、基質を添加し30分間反応させた。反応停止液として0.5NHClを500 μ l加え、反応生成物である馬尿酸を抽出するために、酢酸エチルとヘキサンの割合を9:1にした混合溶媒を1200 μ l加えた。その後、有機溶媒層を遠心減圧乾燥 (35、60分) にて乾固させ、蒸留水1000 μ lにて再溶解した後、吸光度計を用いて吸収波長228nmを測定した。ACE阻害率 (%) は、以下のような計算式で求めた。

$$\text{ACE阻害活性(\%)} = 100 - \frac{\text{被検液を添加した場合の馬尿酸生成量}}{\text{コントロールにおける馬尿酸生成量}} \times 100$$

2 - 4 サイズ排除クロマトグラフィーによるACE阻害活性物質の部分精製

パッションフルーツ果皮抽出物中のACE阻害物質の部分精製を行うために、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。条件を以下に示す。

HPLC測定条件

カラム: Asahipak GS310 20G (showa denko社) (内径20mm、全長500mm)、

ポンプ: PU-2086、RI検出器: R410 (Waters社)、記録計: Unicorder U-220 (Pantos社) フラクションコレクター: Retriever (ISCO社)、移動相: 50%メ

タノール、流速: 5 ml/min

2 - 5 ミネラル定性及び定量試験

パッションフルーツ果皮中のミネラル定性試験は、電子線マイクロアナライザー (EPMA-1600; 島津製作所社) を用いて測定した。また定量試験は、ICP発光分析装置 (Optima 4300 DV; Perkin Elmer社) を用いて測定した。

2 - 7 ルテオリンおよびルテオリン配糖体の定量試験

パッションフルーツ果皮抽出物中のルテオリン含量はLC-MS/MSを用いて、以下の条件で測定した。

HPLC測定条件

装置: Alliance 2695 セパレーションモジュール、2996 フォトダイオードアレイ検出器、MassLynxソフトウェア (Waters社) カラム: Symmetry C18、2.1mm(ID) \times 100mm(L)、3.5 μ m (Waters社)、カラム温度: 30、移動相 (グラジエント条件): 0.1%ギ酸含有10%アセトニトリル溶液 (15分) リニア 0.1%ギ酸含有60%アセトニトリル溶液 (35分)、流速: 0.31ml/min、注入量: 5 μ l

MS/MS測定条件

システム: Quattro micro APIタンデムマス検出器ESI SCI仕様 (Waters社)、ソース温度: 110、デゾルベーション温度: 350、ソースガス流量: 600L/hr、デゾルベーションガス流量: 50L/hr、イオン化法: ESI、イオン化モード: (ルテオリン; 陰イオンモード)、(ルテオリン-C-6-グルコシド; 陽イオンモード) ESI条件: キャピラリー電圧2.8kV、コーン電圧: (ルテオリン; 70V)、(ルテオリン-C-6-グルコシド; 30V) コリジョン電圧: (ルテオリン; 34eV)、(ルテオリン-C-6-グルコシド; 28eV) 検出条件: (ルテオリン; m/z285 m/z133) (ルテオリン-C-6-グルコシド; m/z449 m/z329) によるMRM (Multiple Reaction Monitoring)

2 - 8 GABAの定量試験

パッションフルーツ果皮中のGABA含量はアミノ酸アナライザー及びLC-MS/MSを用いて、以下の条件で測定した。

1) アミノ酸アナライザー

パッションフルーツ果皮中のGABA含量は、高速アミノ酸分析計 (L-8800, 日立製作所) を用いて測定した。試料の前処理条件は、サンプル100 μ lに5%トリクロロ酢酸900 μ lを添加後、遠心分離 (10000rpm, 15分) に

より除タンパク処理したものを測定試料とした。

2) LC-MS/MSの測定条件

HPLC測定条件

装置は2 - 7と同一、カラム：Daiso 5-120-ODS-BP (4.6mm(i.d.) × 150mm(L)) (Daiso社)、カラム温度：25、移動相：0.1%ギ酸、流速：1 ml/min、注入量：5 µl

MS/MS測定条件

装置、ソース温度、デゾルベーション温度、ソースガス流量、デゾルベーションガス流量、イオン化法は2 - 7と同条件

イオン化モード：陽イオンモード、ESI条件：キャピラリー電圧2.8kV、

コーン電圧：20V、コリジョン電圧：10eV、検出条件：m/z104 m/z87によるMRM (Multiple Reaction Monitoring)

3 結果と考察

3 - 1 パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質の部分精製とその性質

限外濾過膜で分子量1000以下に分画した後、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、得られた活性フラクションを¹³C-NMRで分析した結果、部分精製物は無機物の可能性が高いことが分かった。

3 - 2 EPMAを用いたミネラル定性試験

3 - 1で分画した活性フラクション中のミネラル定性試験を行った。その結果、表1に示すMg、Ca、Al等のミネラル成分を含有していた。これらのミネラルは、ACE阻害活性を示すことが推測されたので、更に詳細なミネラル分析を行った。

表1 活性フラクションのミネラル組成

ミネラル	K	S	Mg	P	Ca	Na	Al
重量%	38.4	26.9	17.3	12.1	2.21	2.15	1.09

3 - 3 ICPを用いたミネラル定量試験

3 - 2の結果を踏まえて、分画した活性フラクション中のMg、CaおよびAl含量を測定した。その結果、Mg；17.3 µg/mg、Ca；2.0 µg/mg、Al；1.3 µg/mgであった。Fe含量は0.7 µg/mgであり、MnとZn含量は共に0.7 µg/mg以下であった。更にNaおよびK含量は、36.0 µg/mgおよび86.7 µg/mgの含量であった。

3 - 4 各ミネラルのACE阻害活性

含有するミネラル成分の化合物を指標にACE阻害活性を調べた。3 - 3で得られたミネラル含量から、ミネラル化合物とした場合のモル濃度を換算値として計算し、その値を参考にした濃度(測定濃度)でACE阻害活性を調べた。その結果、表2のようにFe、MnおよびZnの測定濃度でのACE阻害活性は、各々70%以上を示したが、換算値の100倍以上の濃度で測定しているため、更なる検討が必要である。その他のミネラル化合物でのACE阻害活性は低い結果となったことから、活性フラクション中のミネラル含量では、ACE阻害活性は弱いと推察された。

表2 活性フラクションのミネラル含量がACE阻害活性に及ぼす影響

ミネラル	指標にしたミネラル化合物	換算値(mM)	測定濃度(mM)	ACE阻害率(%)
Mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.128	1.7	13.0
Ca	CaCl ₂	0.027	1.0	6.9
Al	Al ₂ (SO ₄) ₃	0.006	0.4	25.4
Fe	FeCl ₂ ·H ₂ O	0.007	0.7	100.1
Mn	MnSO ₄ ·6H ₂ O	<0.004	0.7	74.6
Zn	ZnCl ₂	<0.002	0.6	101.6
Na	NaCl	0.924	1.7	0.9
K	KCl	1.744	1.0	0.4

3 - 5 パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質の特異性

酵素阻害の特異性を調べるために、亜鉛含有酵素に対するパッションフルーツ果皮中の阻害活性を測定した。すなわち、ACE、カルボキシペプチダーゼA(CPA)及びアルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)に対するパッションフルーツ果皮抽出物の阻害活性を調べた。その結果、図2に示すように、同一サンプル液中のIC₅₀は、各々34.7ppm、330ppm、7500ppmであった。この結果から、パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質は、酵素特異性を有するものと推察された。

パッションフルーツ果皮中にエンドセリン産生抑制作用を有することから、その有効成分としてルテオリン(図3)が考えられた。そこで、パッションフルーツ果皮のメタノール抽出物とルテオリン及びルテオリンC6配糖体の標準物質との比較をLC-MS/MSを用いたクロマトグラムで行った。図4にルテオリン、図5にルテオリンC6配糖体のUV(350nm)およびLC-MS/MSのクロマトグラムを示す。同一リテンションタイムにルテオリン及びルテオリンC6配糖体のピークがあることから、パッションフルーツ果皮中にこれらの物質が存在すると判断した。そこで定量分析をするとルテオリン含量はメ

メタノール抽出物 1g 当たり 19.8 μg となり、果皮凍結乾燥物 1g 当たり に換算すると 3.3 μg となった。またルテオリン C6 配糖体含量は、メタノール抽出物 1g 当たり 40.5 μg となり、果皮凍結乾燥物 1g 当たり に換算する

と 6.8 μg となった。この結果から、パッションフルーツ果皮中のエンドセリン産生抑制作用は、ルテオリンおよびルテオリン C6 配糖体が関与していると示唆された。

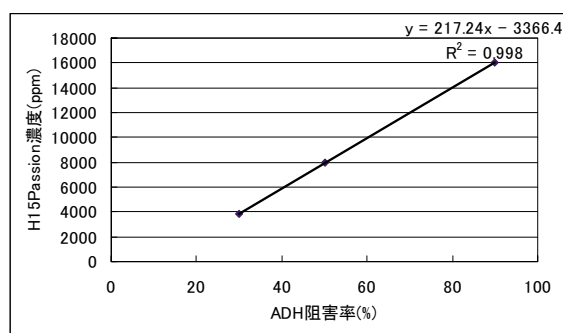
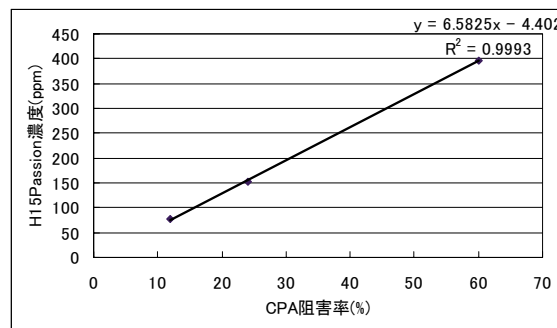
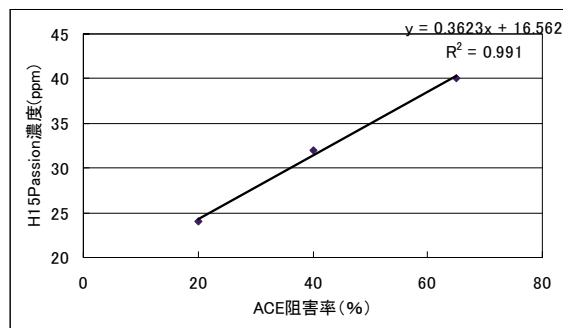


図2 パッションフルーツ果皮中におけるACE阻害物質の酵素特異性

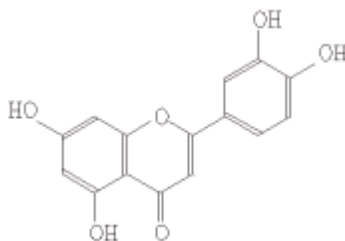
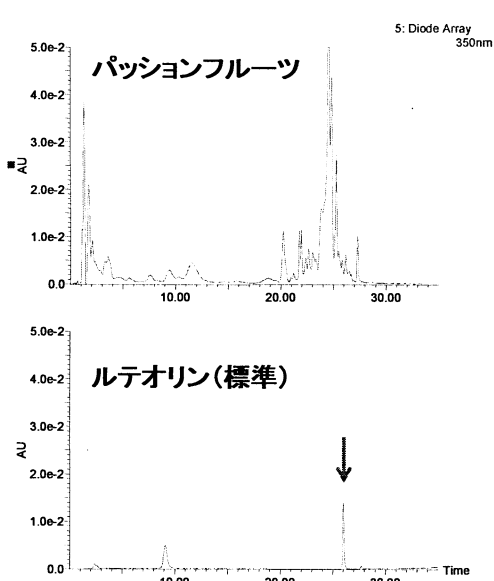


図3 ルテオリンの構造式

UV (350nm)



LC-MS/MS

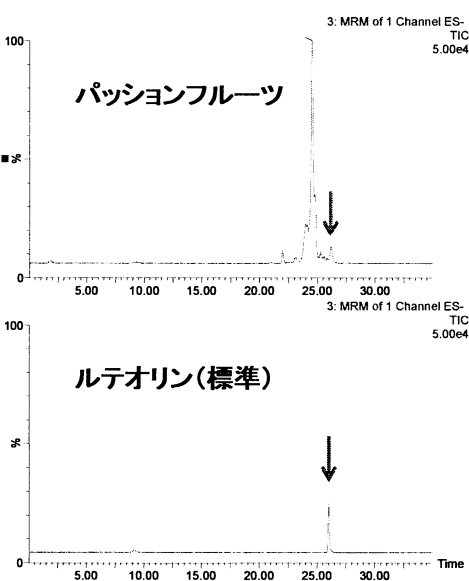
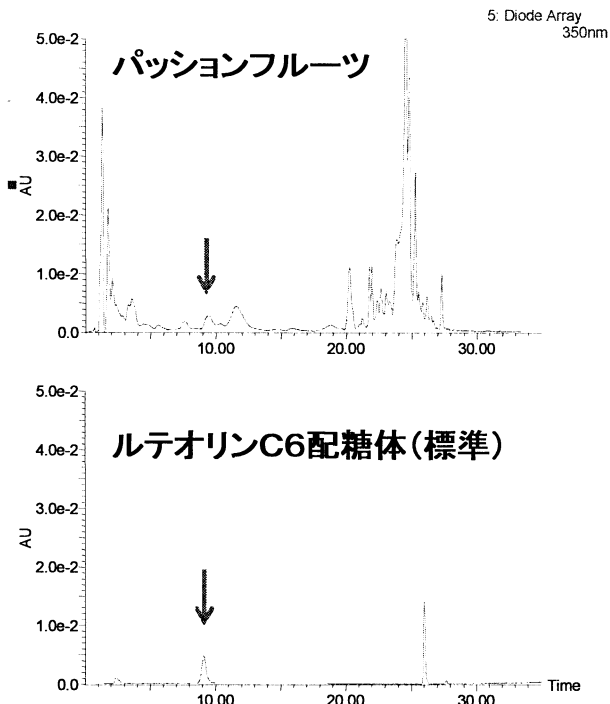


図4 パッションフルーツ果皮のメタノール抽出物とルテオリン(標準)のクロマトグラム

UV(350nm)



LC-MS/MS

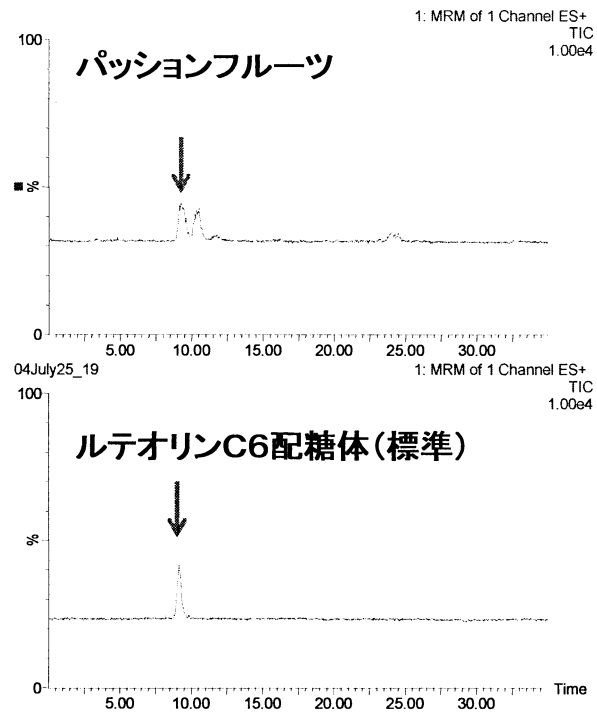


図5 パッションフルーツ果皮のメタノール抽出物とルテオリンC6配糖体(標準)のクロマトグラム

3 - 7 パッションフルーツ果皮及びクミスクチン抽出物中のGABA含量

パッションフルーツ果皮中に血圧降下作用を有することから、その有効成分の1つとしてGABA(図6)が考えられた。

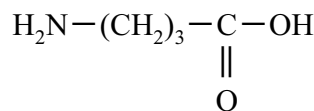


図6 GABAの構造式

そこで、パッションフルーツ果皮のメタノール抽出物中のGABA含量をLC-MS/MSを用いて測定した。図7に示したLC-MS/MSのクロマトグラムは、同一リテンションタイムにGABAのピークがあることから、パッションフルーツ果皮中にGABAが存在すると判断した。そこで定量分析をするとメタノール抽出物1g当たりのGABA含量は2.4mgとなり、果皮凍結乾燥物1g当たりに換算すると410μgとなった。またクミスクチンにも含有していた。GABAは神経系を介した作用で血圧上昇抑制作用を有することが報告されている³⁾。この結果から、パッションフルーツ果皮中の血圧降下作用にGABAが関与していることが明らかになった。

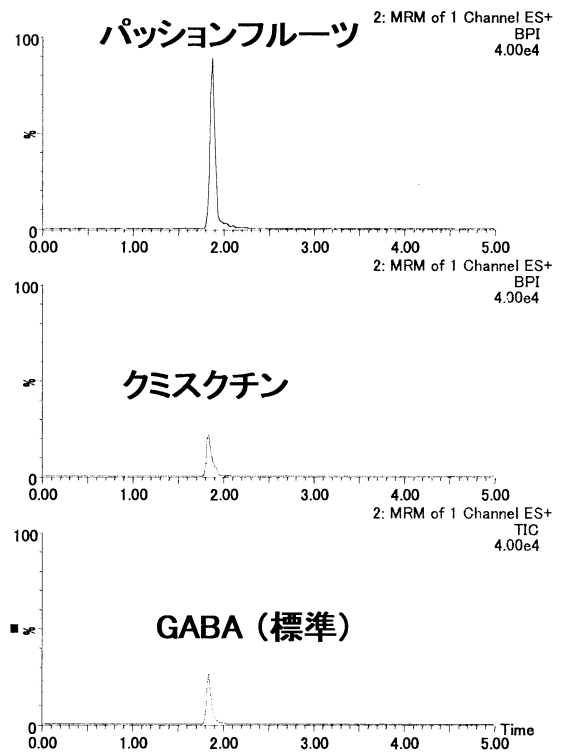


図7 パッションフルーツ果皮及びクミスクチンのメタノール抽出物とGABA(標準)のLC-MS/MSのクロマトグラム

3 - 8 パッションフルーツ果皮を用いた試作品中のGABA含量

(株)沖縄発酵化学がパッションフルーツ果皮を用いて乳酸発酵茶を試作した。そこで、乳酸発酵茶中のGABA含量を、アミノ酸アナライザーおよびLC-MS/MSを用いて測定した。図8に示したアミノ酸アナライザーにおける乳酸発酵茶中のアミノ酸組成クロマトグラムでは、GABAのピークが確認されており、表3に示すようにGABA含量はお茶中にも含有することが分かった。

また、パッションフルーツ果皮の100%メタノール抽出液中のGABA含量は、LC-MS/MSのデータで20.5 $\mu\text{g/ml}$ となったのに対し、今回の乳酸発酵茶の100%メタノール抽出液中のGABA含量は77.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。

この結果から、発酵することによってGABA含量は約3.8倍に増加していることが明らかとなった。

2) パッションフルーツ果皮抽出物は血压降下作用を有し、その作用はACE阻害活性(上記の性質の成分)、エンドセリン産生抑制活性(ルテオリンとその配糖体)およびGABAによる神経生理作用などの複合作用による効果であると推察された。

参考文献

- 1) 中村良監修、日本食品科学工学会編、新食品分析法、499-504 (1996)
- 2) 鎌田靖弘、照屋亮、市場俊雄、蓋盛直哉、世嘉良宏斗、上地若菜、沖縄県工業技術センター研究報告第6号、35-41(2004)
- 3) 福渡靖、佐藤信紘、河盛隆造、渡辺嘉朗、吉田勝美、劉影、松田和也、藤井明、鶴澤昌好、佐藤良二、東方医学、17、1-7 (2001)

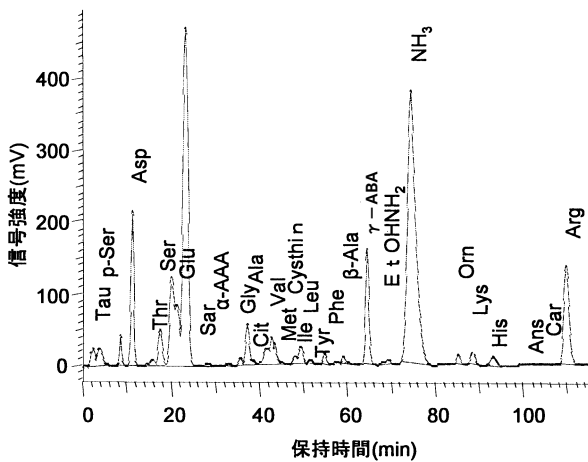


図8 乳酸発酵茶中のアミノ酸組成を示すクロマトグラム

表3 パッションフルーツを用いた試作品中のGABA含量 ($\mu\text{g/ml}$)

	アミノ酸アナライザー	LC-MS/MS
乳酸発酵茶	72.9	25.6
75%エタノール抽出液	79.4	150.3

4 まとめ

1) 亜熱帯生物資源304種類の中から、ACE阻害活性を有する素材としてパッションフルーツの果皮を選定した。パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質の性質として、分子量1000以下の成分で、親水性が強く、且つ亜鉛とキレート化する物質だと、推定された。

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。