

2020年度 独創的研究助成費 実績報告書

2021年 3月 31日

報告者	学科名 栄養学科	職名 助教	氏名 岩岡 裕二	
研究課題	電気泳動を利用したプロアントシアニジンの高感度検出法の確立			
研究組織	氏名	所属・職	専門分野	役割分担
	代表 岩岡 裕二	保健福祉学部栄養学科・助教	食品化学	研究統括
	分担者 伊東 秀之	保健福祉学部栄養学科・教授	食品化学	研究分担
研究実績の概要	<p>カカオやブドウなどに豊富に含まれるプロアントシアニジン(PAC)は抗酸化作用や抗腫瘍作用など多様な生理作用を有する機能性成分の一種である。PACは(+)-CatechinなどのFlavan 3-ol構造よりなる化合物であり、特に高分子のPACは体内において極めて難吸収性のため、その生体利用性は非常に低いとされている。しかし、リンゴなどに含まれる高分子のPACは肥満予防効果などの機能性を有するなど、高分子のPAC特有の生理作用の存在がこれまでに示唆されている。すなわち、PACの生体内挙動を明らかにすることはその生理機能を理解する上で重要な研究課題であると考えられる。</p> <p>一方でPACはその化学的特性より微量成分の分析に有効的なHPLC-MS分析などにおいて検出感度が著しく低い。そこで、申請者らはタンパク質とPACがタンパク質と複合体を形成する性質に着目し、電気泳動法による血中タンパク質とPACの複合体の高感度分析法の検討を行った。</p> <p><u>SDS-PAGEおよびNative PAGEによる血中タンパク質とPAC複合体の分析</u></p> <p>血中に最も多く含まれるタンパク質であるアルブミンとPACの複合体の分析を行った。ヒト由来血清アルブミン(HSA、終濃度50 mg/mL)とPAC標準品(各終濃度250 µg/mL)を生理条件下に近い37°C、pH 7の条件下でインキュベートした後、各サンプルをSDS-PAGEもしくはNative PAGEに供し、泳動後のゲルをタンパク質の染色法の一つであるCBB染色またはポリフェノール特異的な染色法であるNBT染色により染色してバンドの確認を行った。その結果、以下の図に示すようにNBT染色によりSDS-PAGEおよびNative PAGE後の泳動ゲル上においてピーナッツ由来のPAC6量体(PAC hexamer)とHSAをインキュベート後のサンプルから高分子のバンド(レーン⑨、赤枠)を検出した。これはPAC hexamerとHSAの複合体であると考えられた。また、各PAC標準品(レーン②、④、⑥および⑧)単独でも化合物由来のバンドを確認できた。</p>			

※ 次ページに続く

更に PAC hexamer 以外の PAC 標準品である(+)-Catechin、(-)-Epigallocatechin gallate および Procyanidin B2 に着目した場合、Native PAGE においては各 PAC の添加により、HSA 標準品(レーン①)には見られない新たなバンドを検出したが、それらは PAC hexamer を添加した場合に検出されたバンドと異なる移動度を示した(レーン③、⑤および⑦)。一方で SDS-PAGE においては各 PAC 標準品を HSA のインキュベート後のサンプルにおいて HSA 標準品との差は見られなかった。CBB 染色では SDS-PAGE および Native PAGE においていずれも PAC 添加による HSA のバンドパターンの変化は見られなかった。以上から SDS-PAGE もしくは Native PAGE 後に NBT 染色を行うことで、PAC hexamer と HSA の反応により生じた PAC hexamer と HSA の複合体を検出する条件を見出した。

今後はラット等の実験動物に PAC を投与し、投与後の血液を電気泳動により分析することで PAC とアルブミンの複合体の形成を確認し、この結果を踏まえて PAC の生体への吸収性を評価していく予定である。

研究実績
の概要

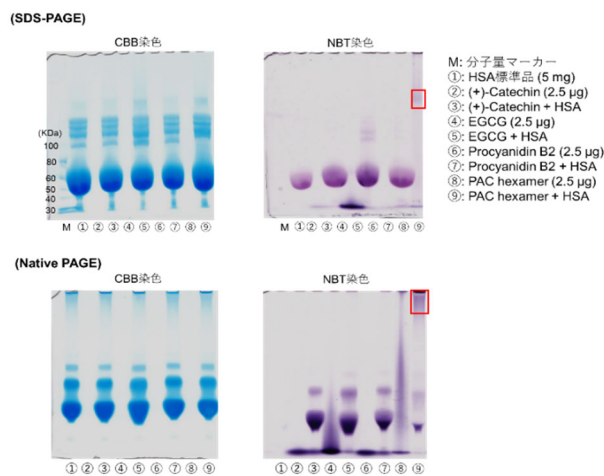


図. SDS-PAGE、Native PAGEの結果

成果資料目録

なし