

## 学位論文要旨

佐野 愛子

生薬や機能性食品、機能性化粧品の機能性原料として利用されている天然素材は、多種多様な代謝産物を含む混合物である。その天然素材中のどの成分が機能を担っているのか、またどれほどの数の成分が含まれているのか明らかになっていないのが現状である。さらに、天然素材は同一の種 (species) であっても、収穫時期や栽培環境などが異なる場合、成分組成も異なる可能性がある。よって天然素材においては、品質評価や品質維持が特に重要である。従来の一般的な天然素材の品質評価は含量の多い成分を指標成分として定め、その成分を定性、定量する手法がとられている。しかし、その指標成分が天然素材の機能性成分であるとは限らない。また、薬効が1つの成分に由来しないことも散見される。これらのことから、天然素材の品質や機能性を評価する場合、従来の一成分に着目した解析手法よりも、多成分を網羅的に解析することで全体像を把握できる手法のほうが良いと考えられる。

そこで、着目したのがメタボロミクスの手法である。「メタボロミクス」とは代謝物 (メタボライト) を網羅的に定性・定量し、生体変化を考察する手法を指し、本研究ではその手法を応用し、多種多様な代謝産物を含む天然素材に適した品質評価方法の検討や特徴的な成分の探索を行った。

本研究は3章で構成され、第1章では、コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性に着目し、活性が高いコーンシルク原料をメタボロミクスの手法で明らかにできるか検討した。第2章では、狭山茶に着目し、メタボロミクスの手法を用いて代表チャ品種「さやまかおり」に特徴的な成分を見出した。併せて、茶樹の老齢化に関与するアミノ酸の同定も行った。第3章では、生薬「サイシン」を研究材料とし、市場品サイシンの含有成分の違いをメタボロミクスの手法を用いて確認した。

第1章では、トウモロコシの花柱及び柱頭であるコーンシルクの glycation 阻害活性に着目して、活性成分の解明とそれを指標としたメタボロミクスによる品質評価方法の確立を行った。まず初めに、コーンシルクを機能性素材原料として扱うためには、品質を担保するための基準となる関与成分の同定を行う必要があるため、水抽出エキスの glycation 阻害活性成分の探索を行った。コーンシルクの水抽出エキスを作成し、限外ろ過後、加水分解反応や各種分析装置を用いて詳細に構造解析した結果、lignocellulose が関与成分であることが明らかとなった。なお、lignocellulose の glycation 阻害活性は、これまでにない新規のものであった。次に、メタボロミクスの手法を応用した短時間で簡便な glycation 阻害活性の判別検討を行った。Lignocellulose の構造決定に大きく貢献した FT-IR スペクトルを用いて市場品コーンシルクの glycation 阻害活性の判別検討を実施した。市場品 10 種類のコーンシルクの glycation 阻害活性情報と FT-IR の分析結果を用いて計算ソフトウェアで PCR (principal component regression) と PLSR (partial least squares regression) 検量モデル (全範囲計算領域) を作成した。その結果、どちらのモデルにおいても、glycation 阻害活性とスペクトルデータに相関が認められた。さらに、計算領域を絞りモデルを作成したところ、相関係数が向上するモデルを作成できた。特に PLSR 検量モデルにおいては、PCR 検量モデルよりも相関係数が向上し、RMSEP (root mean squared error of prediction) の値も小さくなった。これらのことから、コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性を FT-IR スペクトルの統計処理により予測できることを明らかにした。

第2章では、埼玉県西部地域で栽培されている狭山茶に注目し、メタボロミクスの手法を用いて狭山茶代表品種「さやまかおり」に特徴的な成分の探索を行った。併せて、全国の茶産地が直面している茶樹

の老齡化を解決するための改植の目安を科学的に判断する指標成分の探索を行った。まず、「さやまかおり」とチャのスタンダード品種「やぶきた」のチャ葉（新芽）の MeOH 抽出エキスの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定し、積分値を多変量解析（HCA (hierarchical cluster analysis)と PCA (principal component analysis)) に供し、品種間の比較を行った。その結果、両品種間で統計的に差がみられ、「さやまかおり」の  $\delta$  8.02 のシグナル強度は「やぶきた」のそれと比べて有意に高く、両品種を区別するマーカーシグナルであることが明らかとなった。そこで、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル情報を基に分画、精製を行い FAB-MS と NMR の解析結果から、 $\delta$  8.02 のシグナルは kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside の 2' と 6' に由来するものと帰属した。続いて、複数の樹齡の異なる「やぶきた」のチャ葉（新芽）の熱水抽出物を全自動アミノ酸分析機で分析し、検出されたアミノ酸含量を多変量解析（HCA と PCA）に供した。その結果、樹齡別にグループ分けができ、樹齡とアミノ酸含量が相関する傾向が認められた。さらに、theanine や arginine などの複数のアミノ酸の含量が樹齡と相関していることも判明した。なお、これらの結果は未だ報告はなく、新規なものであった。

第3章では、生薬「サイシン」のメタボロミクス研究を行った。市場で取り扱われている各生薬メーカーが販売するサイシンの見た目や色味の違いが異なることから、JP18 で指標成分として規定されている asarinin 以外の成分も含め、網羅的に解析を行い含有成分にばらつきがあるのかを確認し、新たな指標成分の探索も併せて行った。市場品7種類のサイシン MeOH 抽出エキスの  $^1\text{H-NMR}$  測定を行い、得られた積分値を多変量解析（HCA と PCA）に供し、品種間の比較を行った。その結果、2つのグループに分かれる結果となった。また、各グループ間で  $\delta$  5.42 のシグナル強度が異なることが明らかとなり、シグナル強度が高かったグループの MeOH 抽出エキスを分画し、NMR と HPLC の結果から  $\delta$  5.42 のシグナルは sucrose の glucose 由来のアノメリックプロトンであることが明らかとなった。

本研究では、「コーンシルク」、「チャ」及び「サイシン」を例にメタボロミクスの手法を応用した品質評価方法の検討を行い、その有用性を明らかにした。多成分系から成る天然素材の品質評価において、従来のような「ある特定の成分に着目する方法」では限界があるため、検出可能な成分を網羅的に解析するメタボロミクスは、この問題を解決できる手段の1つであると考えられる。本手法は、素材の品質評価にとどまらず、様々な分野での活用が期待される。例えば、生薬や野菜の栽培は栽培者の主観的な判断（経験や勘）で行われていることがほとんどであるが、栽培の過程で本手法を用いて生産物の品質チェックができれば客観的な指標に基づく栽培が可能となる。これにより品質や生産性の高い栽培品を、より確実に生産することができると考えられる。本研究の成果が、天然素材の品質評価方法への導入をはじめ、天然素材を扱うその他の分野においてもメタボロミクス手法の活用のきっかけになれば本望である。

# Abstract

Aiko Sano

Natural materials used as functional raw materials for crude drugs, functional foods, and functional cosmetics are composed of a wide variety of metabolites. It is not yet clear which components of these natural materials are responsible for their function and how many are contained. Furthermore, even if the natural materials are from the same species, they may have different compositions according to harvest season and growing environments. Therefore, quality evaluation and control of natural materials are particularly important. In the conventional quality evaluation of natural materials, a component with a high content is usually established for quality control and the compound is qualified and/or quantified for the quality evaluation. However, this indicator component is not necessarily the active component of functional natural materials. In addition, there are cases in which the medicinal effect is not derived from a single component. Therefore, when evaluating the quality and functionality of natural materials, a method that can grasp the overall picture by comprehensively analyzing multiple components is considered better than the conventional analysis method that focuses on a single component.

Therefore, we focused on metabolomics in this study. Metabolomics" refers to a method of comprehensively qualifying and quantifying metabolites (metabolites) and considering biological changes.

In Chapter 1, we focus on the glycation inhibitory activity of corn silk, which is the style of corn, to elucidate the active components and establish a method for quality evaluation by metabolomics. First, we searched for active components of anti-glycation in water extract of corn silk, because it is necessary to identify the involved components as an indicator for quality assurance in order to use corn silk as a functional raw material. By ultrafiltration, hydrolysis, and structure analysis using various spectroscopies, it revealed that lignocellulose was an active component. The glycation inhibitory activity of lignocellulose was never reported. FT-IR spectroscopy was a powerful tool on the structure analysis of lignocellulose. Therefore, I have tried to apply metabolomics method using FT-IR spectra for the evaluation of aqueous corn silk extract showing anti-glycation activity. Principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR) calibration models (full range calculation region) were created using the software specific for FT-IR analysis based on the glycation inhibitory activities of 10 market available corn silks. A correlation between glycation inhibitory activity and spectral data was observed in both models. These results indicate that the glycation inhibitory activity of corn silk aqueous extract can be predicted by statistical processing of FT-IR spectra.

In Chapter 2, we focused on Sayama tea grown in the western region of Saitama Prefecture and used metabolomics methods to search for characteristic component of Sayamakaori, which is a representative variety of Sayama tea. Furthermore, many tea plantations suffer from aging of their tea trees nationwide. Replanting is thought to be a solution to the problem. Therefore, I searched for indicator components to determine scientifically the optimal timing of replanting. First, <sup>1</sup>H-NMR spectra of MeOH extracts of "Sayamakaori" and "Yabukita," which is a standard variety of tea were measured and the integral values underwent multivariate analysis such as HCA (hierarchical cluster analysis) and PCA (principal component analysis) to compare to the two varieties. These two varieties were located separately on PCA score plot. The loading plot analysis indicated the signal at  $\delta$  8.02 was specific for "Sayamakaori" and could be maker to distinguish these two varieties. The fractionation and purification guided by the signal at  $\delta$

8.02 were conducted to obtain a compound characteristic for "Sayamakaori". The compound was identified to kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside based on the spectroscopic analysis such as NMR and FAB-MS. The signal at  $\delta$  8.02 was attributed to protons at 2' and 6' of this compound. Hot water extracts of several different ages of "Yabukita" leaves (sprouts) were then analyzed using a fully automated amino acid analyzer, and the detected amino acid contents were subjected to multivariate analysis (HCA and PCA). The results showed that these samples could be grouped according to their age and that the amino acid contents tended to correlate with the age of the tea trees. Particularly, the contents of several amino acids, such as theanine and arginine, were found to be correlated with tea tree age. These results have never been reported to my certain knowledge.

In Chapter 3, a metabolomics study of the crude drug "Asiasarum Root" was conducted. Since the appearance and color of Asiasarum Root obtained from the market differ for their manufacturers, we conducted a comprehensive analysis of Asiasarum Root by metabolomics methods to confirm whether their contents vary and also to search for a new indicator component other than asarinin, which is specified as an indicator in JP18. <sup>1</sup>H-NMR spectra of seven MeOH extracts of Asiasarum root were measured and their integral values were subjected to multivariate analysis (HCA and PCA) to compare the constituents among the varieties. The results indicated that these samples were divided into two groups on PCA score plot. The intensity of the signal at  $\delta$  5.42 differed between the two groups. Then, a fractionation of the MeOH extract was performed to obtain a compound with the signal at  $\delta$  5.42. NMR and HPLC analysis indicated that the compound was identified to sucrose and the signal at  $\delta$  5.42 was assigned to anomeric proton of glucose.

In this study, I examined the appropriateness of metabolomics as a method for evaluating the quality of natural materials. As a result, I confirmed the usefulness of this method for quality evaluation of corn silk, tea, and Asiasarum Root. I hope that the results of this research will be applied to the quality assessment of natural materials.

## 論文審査の結果の要旨

医薬品である生薬をはじめ、機能性食品や機能性化粧品の原料として利用される天然素材は、多種多様な成分を含む混合物である。その天然素材中にどれほどの数の成分が含まれているのか、さらには、どの成分がその機能を担っているのかが明らかになっていないケースも多い。また、動植物を基原とする天然素材は同一の種 (species) であっても、収穫時期や栽培環境などが異なる場合、含有成分が異なる可能性がある。よって、天然素材においては、このような特徴を踏まえた品質評価が特に重要である。しかし、一般的に実施される天然素材の品質評価は、含量の多い成分を指標成分として定め、その成分を定性・定量する手法がとられている。よって、その指標成分が天然素材の機能性成分であるとは限らない。また、その機能が一つの成分に起因しないことも散見される。このようなことから、天然素材の品質や機能性を評価する場合、従来の単一成分に着目した解析手法よりも、多成分を網羅的に解析することで含有成分の全体像を把握できる手法のほうが良いと考えられる。

このような背景から、佐野氏は本研究においてメタボロミクス手法に着目した。「メタボロミクス」とは代謝物 (メタボライト) を網羅的に定性・定量し、生体状態を考察する研究手法であるが、このメタボロミクスで代謝物測定に使用される手法を、天然素材の品質評価に応用したのが本研究である。なお、動植物を基原とする天然素材に含まれる成分はその基原の代謝産物であることから、本研究では「メタボロミクス」という文言を使用しているが、「ケモメトリックス」と概念が重なる部分もあると考える。論文は3章から構成され、第1章ではコーンシルク水抽出エキスが示す glycation 阻害活性に着目し、高い活性を示すコーンシルク原料をメタボロミクス手法で見出すことを検討している。第2章では「狭山茶」に着目し、メタボロミクス手法を用いて「狭山茶」に特徴的な成分の探索を実施している。また、併せて茶樹の老齢化に関与するアミノ酸の同定も行っている。第3章では生薬サイシンを研究材料とし、市場品サイシンのメーカーによる含有成分の違いをメタボロミクス手法で確認している。

第1章では、トウモロコシの柱頭であるコーンシルクに関して、活性成分の解明とそれを指標としたメタボロミクス手法による品質評価方法の確立を検討している。コーンシルクを機能性原料として扱うためには、活性成分 (関与成分) の同定とそれを指標とした品質評価法を設定する必要がある。そこで本研究ではまず初めに、コーンシルクが示す glycation 阻害活性の活性成分探索を実施している。活性を示すコーンシルクの水抽出エキスを限外濾過により分画し、得られた活性画分の NMR 及び IR スペクトル解析及び酸加水分解などを行い、活性成分として lignocellulose を見出した。なお、lignocellulose の glycation 阻害活性は、これまでに報告のない新規なものであった。次に、この lignocellulose を指標成分とする分析法の設定を検討した。通常、天然素材の品質評価は HPLC で指標成分を定性・定量する方法が採用されているが、今回の指標成分である lignocellulose は高分子であるため、HPLC による分析が困難であった。そこで、lignocellulose の構造解析で威力を発揮した FTIR スペクトルに着目し、測定したスペクトルデータを多変量解析することで、コーンシルクの品質を評価することを試みた。メーカーの異なる 10 種類の市場品コーンシルクを入手し、それぞれの水抽出エキスを調製後、それらの glycation 阻害活性を評価したところメーカーによって活性が異なっていた。そこで次に、その 10 種類の水抽出エキスの ATR (attenuated total reflection)-FTIR を測定し、取得したスペクトルデータを主成分回帰及び部分的最小二乗回帰分析した。その結果、何れの回帰分析においても glycation 阻害活性とスペクトルデータに相関が認められ、波数領域を絞ることで相関係数は向上し、RMSEP (root mean

squared error of prediction) はより低値を示した。以上のことから glycation 阻害活性を示すコーンシルクを機能性原料とする際に、その品質は ATR-FTIR スペクトルを測定し、そのスペクトルデータを多変量解析することで、高い活性を示すコーンシルク原料を判断することが可能となった。本手法を実際の現場で利用するためには、バリデーションなど更なる検討が必要であるが、FTIR 分析装置は普及率が高く、簡便性と高再現性を示すため、FTIR 分析を行うだけで glycation 阻害活性の高低が判断できることは産業的にも意義深い。なお、FTIR スペクトルを多変量解析し、天然素材の品質を評価する例は少なく、本研究の学術的意義も大きい。

第2章では「さやまかおり」の茶葉を用いたメタボロミクス研究及び「やぶきた」の茶樹の樹齢を判断する指標成分の探索を実施している。本研究ではまず、NMR メタボローム解析の手法を用いて狭山茶の代表品種「さやまかおり」の特徴的な成分の探索を実施した。すなわち、「さやまかおり」及び茶のスタンダード品種「やぶきた」のメタノール抽出エキスを調製し、それらの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルデータを主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及び階層型クラスター分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) したところ、それぞれの品種ごとに分類することが可能であった。そこで、クラス分けに寄与した <sup>1</sup>H-NMR シグナルを PCA loading plot から探索し、そのシグナルを頼りに「さやまかおり」のメタノール抽出エキスを分画・精製したところ、「さやまかおり」に特徴的な成分として kaempferol-3-O $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside を見出した。Kaempferol などのフラボノイドは様々な機能性を示すことから、本研究結果は、「さやまかおり」の差別化、ブランド化に貢献すると考える。つぎに、茶葉に含まれるアミノ酸を網羅的に分析し、老齢化により改植が必要となった茶樹を判断できる指標成分の探索を行った。茶葉中のアミノ酸含量を HCA 及び PCA したところ、「やぶきた」の茶葉 (新芽) は樹齢に応じてグループ分けができ、arginine や theanine など複数のアミノ酸の含量が樹齢と相関することを明らかにした。同時に複数のアミノ酸の含量と樹齢との関係性を示した報告はこれまでになく、本研究結果は新規性を有するものであった。

第3章ではメーカーの異なる生薬サイシンについて、NMR メタボロミクスの手法で網羅的な成分分析を行い、メーカーによる含有成分の違いについて検討した。その結果、市場品サイシン 7 種類は PCA loading plot において、2 つのグループに大別され、このグループ分けには sucrose 含量が影響していることを明らかにした。Sucrose は主に光合成で生合成される物質であり、生育のエネルギー源として利用されるほか、一部は根などの貯蔵器官に貯蔵されることが知られている。よって、日光や土壌といった発育環境の違いが今回のグループ分けの要因の一つと考えられた。一方、サイシンは高極性成分の探索研究があまり実施されていないことを踏まえ、サイシンの高極性成分を中心に成分探索を行い、新規化合物 2 種を含む計 9 種の化合物を単離・精製、構造解析している。市場に流通する生薬の含有成分の違いをメタボロミクスの手法を用いて明らかにする上で、その生薬の含有成分情報には大きな価値がある。今回のサイシンのように成分探索があまり実施されていない生薬については、地道な成分探索を実施し、含有成分リストを作成することは学術的な意義があると考えられる。

以上、本論は「コーンシルク」、「チャ」及び「サイシン」に関して、メタボロミクスの手法を応用した新たな品質評価方法を提案し、その有用性を明らかにした。本研究における実験系の構築、得られたデータの解析と解釈は論理的で妥当なものとして判断できる。よって、本論文は本研究科課程による博士 (薬科学) の学位に値するものと判断する。