

ブラッドオレンジに含まれるアントシアニンの機能性評価

2年3組 三好 可眞 2年4組 佐々木美緒
2年4組 宅見 遥 2年4組 藤岡 希羽
指導者 窪地 育哉

1 課題設定の理由

宇和島市は、みかんの産地で有名である。その中でも私たちは生産量が日本一となっているブラッドオレンジに焦点を当てた。ブラッドオレンジは赤黒い果肉を持つことで知られている。その正体はアントシアニンである。アントシアニンとは、果実や花に見られる、植物界において広く存在する色素であり、**図1**に示す基本骨格を持ち、 $R_1 \sim R_7$ に水素や水酸基が入り、その種類は数百にのぼる。津田(2003)は、アントシアニンは、強酸性では、フラビリウム型といわれる構造をとり、赤色を呈し、比較的安定ではあるが、弱酸性、中性領域では、水分子と反応して無色のプソイド塩基に変換し、不安定であることを報告している(**図2**)。吉田(2012)によると、アントシアニンは、金属イオンと錯体を形成して安定化されていることが報告されている。伊藤ら(2013)は、ブラッドオレンジのアントシアニンは、**図1**における

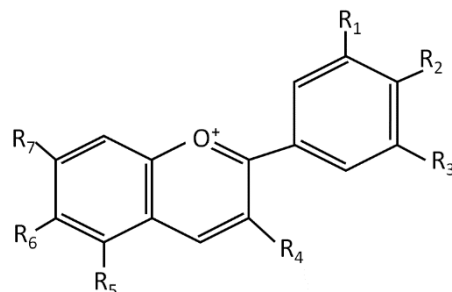


図1 アントシアニンの基本骨格

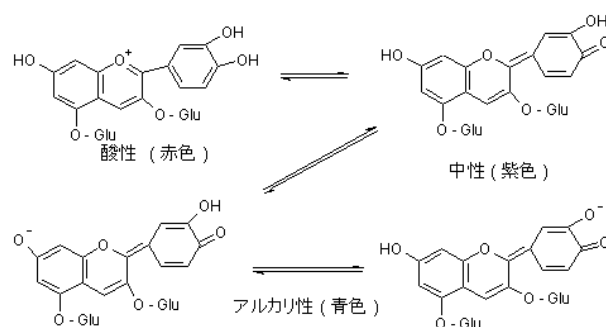


図2 pHによる構造変化

R_4 にグルコースが置換されたシアニジン3グルコシドが多く含まれること、またシアニジン3グルコシドに抗酸化活性があることを報告している。一方、一條ほか(2005)は、活性酸素が病原体感染によって起こる炎症やアレルギー反応を促進する作用を持つことを突き止めた。消費者庁によると、平成17年は3人に1人がアレルギー疾患に罹患していたのに対し、平成23年には2人に1人となっており、アレルギー疾患により医療機関を受診する患者数は、増加傾向であると報告されている。私たちは、ブラッドオレンジのアントシアニンの抗酸化活性に注目し、アレルギー抑制効果があるのではないかと考え、本研究を行った。また、アントシアニンを安定化させるためにpHと金属イオンとの関係にも注目した。

2 仮説

- (1) ブラッドオレンジに含まれるアントシアニンにはアレルギー抑制効果がある。
- (2) ブラッドオレンジに含まれるシアニジン3グルコシドは金属イオンの種類によって、安定の仕方が異なる。

3 研究の方法

- (1) 仮説(1)の検証《IgE産生抑制効果の実験》

【試薬】

コーティング緩衝液：50mmol/L炭酸緩衝液 (pH9.6)，ブロッッキング剤：5%スキムミルク-リン酸緩衝生理食塩水，洗浄剤：0.05%Tween20-PBS (T-PBS)，発色基質：2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)，(ABTS)， H_2O_2 ，酸素反応緩衝液：50mmol/Lクエ

ン酸緩衝液 (ph4.0), 酸素反応停止液: 1.5% シュウ酸水溶液, 抗ヒト IgE 抗体, ヒト IgE: 検量線用標準液 100ng/mL, ビオチン標準抗ヒト IgE 抗体, HRP 標識ストレプトアビジン複合体溶液

【実験操作】

- ① ブラッドオレンジの色素液とメタノールを 1:1 で抽出した溶液を作る。
- ② ヒト脊髄種細胞株の U266 細胞株を増殖し, この細胞に①で抽出した溶液を滴定する。
- ③ 酵素抗体法を用いる。
 コーティング - IgE だけに結合する 1 次抗体を植え, 4°C で 24 時間以上静置する。
 ブロッキング - タンパク質が結合しやすいようにスキムミルクで満たし, 4°C で 12 時間静置する。
 培養上清の反応 - ヒト IgE 標準液を含むサンプルを一次抗体に結合させ, 37°C で 1 時間静置する。
 二次抗体 - ビオチンが付着している二次抗体と一次抗体でサンプルをはさみ, 37°C で 1 時間静置する。
 アビジン処理 - ビオチンに強く反応するタンパク質が含まれる HRP 標識ストレプトアビジン複合体を加える。37°C で 1 時間静置する。
 ABTS 添加-発色基質の ABTS を添加する。室温で 30 分置く。
 酵素反応の停止 - 37°C で 1 時間置く。
 吸光度測定 - 産出された IgE 量を定量する。

(2) 仮説(2)の検証《吸収スペクトルの測定》

- ① pH3、5、7、9、11 の溶液を塩酸とアンモニア水を用いて調整する。
- ② ブラッドオレンジの色素液と①で作成した溶液と目的の金属イオンの硝酸溶液を、1 : 1 : 1 で混ぜる。
- ③ ベースラインを (メタノール : 蒸留水) = (3 : 1) で引く。
- ④ 金属イオンを含まない基準線を (メタノール : 色素液) = (1 : 1) で引く。
- ⑤ 測定する混合液を石英セルに入れ、設置する。
- ⑥ 吸光度計を使って②で作成した溶液の吸光度を測る。

4 結果と考察

(1) 《IgE 産生抑制効果の実験》

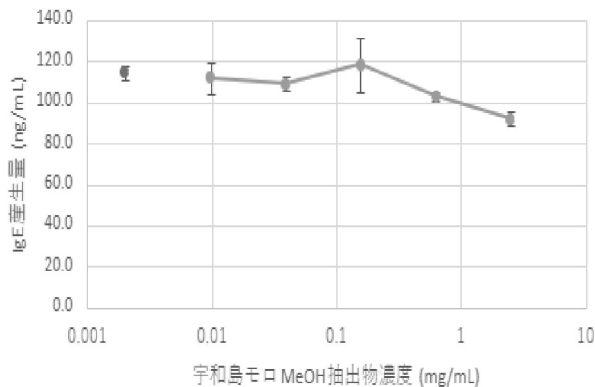


図3 IgE産生抑制効果

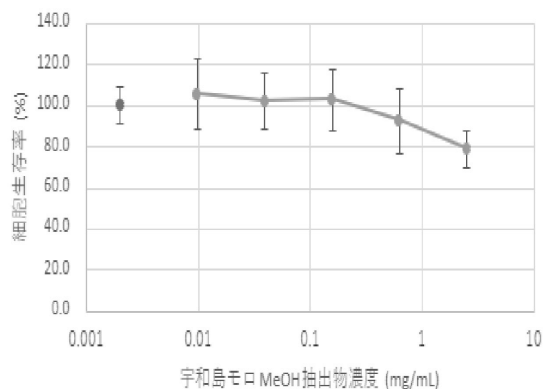


図4 細胞毒性

酵素抗体法の結果を図3および図4に示す。図3より、わずかにIgE産生量の減少がみられるものの、図4より、U266細胞の生存率も減少しており、IgE産生効果が下がっているのは、ブラッドオレンジのアントシアニンが働いたのではなく、IgEを産生する細胞の数が死滅していたためと推察した。アレルギー抑制効果は認められないという結果となった。

(2) 《吸収スペクトルの測定》

pH3のブラッドオレンジ果汁抽出液に各イオンを添加した際の吸収スペクトルを図5に、pH3, 5, 7, 9, 11のブラッドオレンジ果汁に各イオンを添加した溶液についての515nmにおける吸光度を図6に示す。

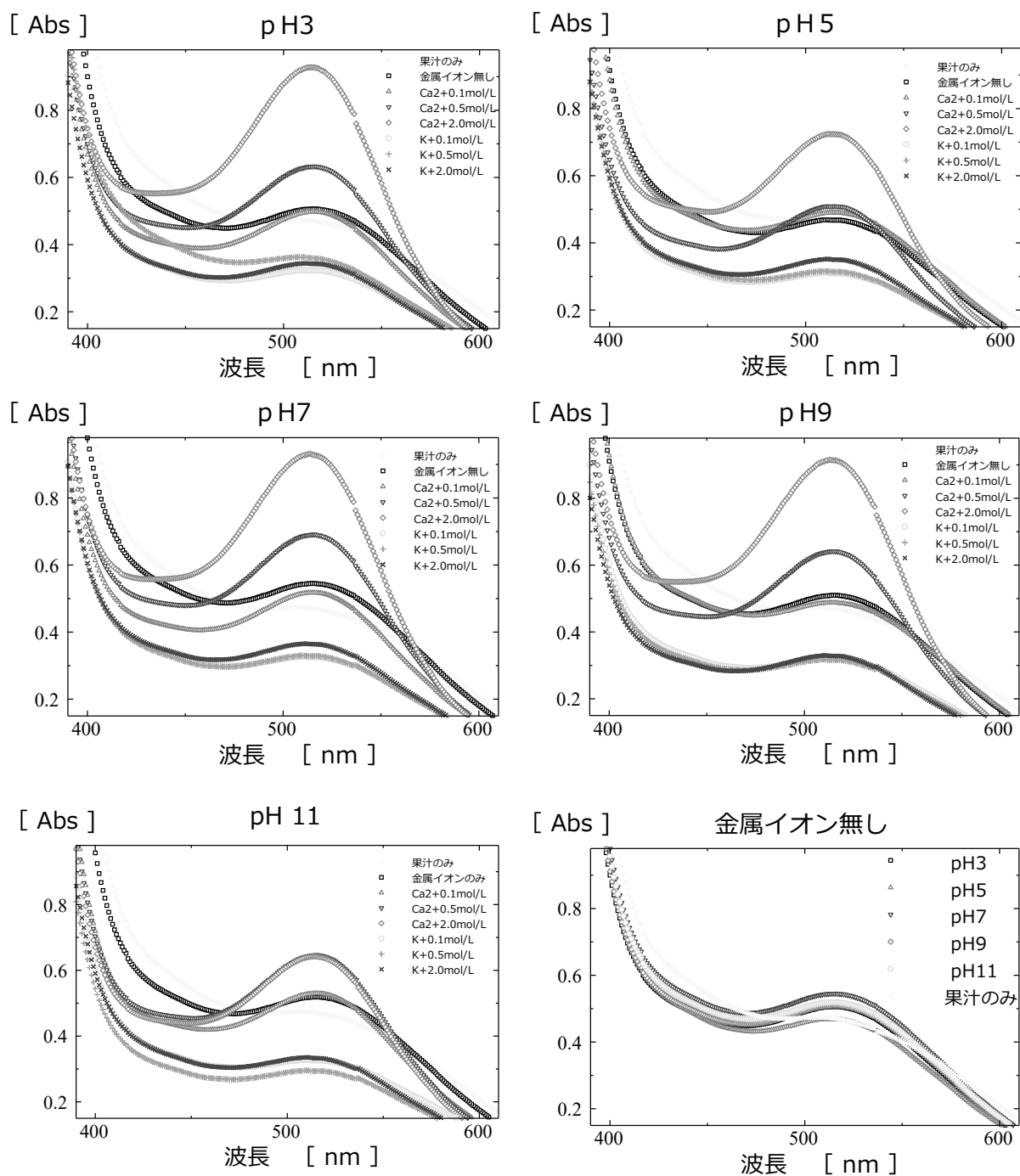


図5 抽出液の吸収スペクトル

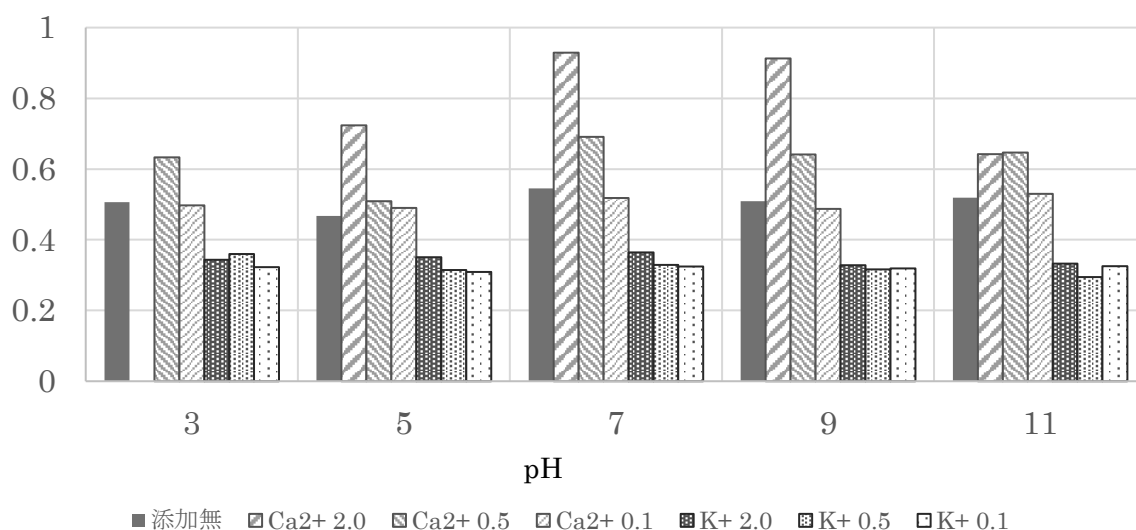


図6 515nmにおける吸光度

515nmにおける吸光度についてまとめた図6によると、イオンを添加しない場合の吸光度は、pHによらずほぼ0.5近くの値を示す。0.1 mol/L, 0.5 mol/L, 2.0 mol/L カリウムイオン添加により吸光度が低下した。また、カリウムイオン濃度による吸光度低下の差は見られないという結果となった。カルシウムイオンの場合は濃度0.1mol/Lのものを加えた場合は吸光度の変化がなかったものの、0.5 mol/L, 2.0 mol/Lのカルシウムイオン添加により吸光度が大きくなるという結果が得られた。イオンとアントシアンとの相互作用が確認できた。

4 まとめと今後の課題

ブラッドオレンジの色素液にはIgE抑制効果がないということが明らかになった。また、カリウムイオンおよびカルシウムイオン添加により、わずかながら色調の変化が見られ、515nmにおける吸光度の変化としても明らかさにされた。今後温度により色調がどう変化するかなどを調べて、アントシアンの安定性について詳細を明らかにしていきたい。

5 謝辞

本研究に御指導・御助言をいただきました愛媛大学大学院農学研究科生命機能学専攻助教の石田萌子先生、近畿中国四国農業研究協議会の石田史朗様に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- ・伊藤史朗、石川英樹、清水篤、菊池毅洋、毛利幸喜、森重陽子、石川祐子. ブラッドオレンジ'タロッコ'果肉中のアントシアニンおよびフラボノイド含量が水溶性酸素ラジカル吸収能(H-ORAC)に及ぼす影響. 近畿中国四国農業研究=Kinki Chugoku Shikoku agricultural research. 2013, vol. 22, p. 43-49.
- ・津田孝範. 高機能性食品因子, アントシアニン類の新しい生理的意義に関する基盤研究. 日本栄養・食糧学懐紙. 2003, vol. 53, no. 1, p35-43
- ・愛媛県立松山南高等学校色素班. 糖によるアントシアニンの安定化とアレルギー抑制効果の研究
- ・厚生労働省健康局がん・疾病対策課.” アレルギー疾患の現状等”. 厚生労働省. 2016. , (参照 2024-01-24).
- ・日本分析化学専門学校.” すぐできる！なるほど★ザ★化学実験室”. 日本分析化学実験室. 2021. , (参照 2024-01-24).
- ・一條秀憲、佐藤雅裕,” 活性酸素が炎症・アレルギー反応を活性化する新たな仕組みの発見— 感染防御（自然免疫システム）における新たな細胞内分子機構—”. 科学技術振興機構. 2005. (参照 2024-01-24).