



## アロニアベリーに含まれる生活習慣病予防にかかわる酵素阻害物質の探索

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2021-03-24<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 小塚, 美由記<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://doi.org/10.24729/00017273">https://doi.org/10.24729/00017273</a>                   |

大阪府立大学大学院  
総合リハビリテーション学研究科  
博士論文

**アロニアベリーに含まれる生活習慣病予防に  
関与する酵素阻害物質の探索**

Isolation and identification of enzyme Inhibitors for  
prevention of lifestyle-related diseases from aronia juice

小塚 美由記

2021 年

## 略語

TBARS: チオバルビツール酸反応性物質

DPP IV: ジペプチジルペプチダーゼ IV

GIP: グルカゴン依存性インスリン分泌性ポリペプチド

GLP-1: グルカゴン様ペプチド-1

MCA: メチルクマリンアミド

PMP: 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾレン

ESI: エレクトロスプレーイオン化

CID: 衝突誘起解離

## 目次

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 第1章 緒言                            | 4  |
| 第2章 ジペプチジルペプチダーゼIV阻害物質の探索および同定    | 11 |
| 第3章 アロニアに含まれる HMG-CoA 還元酵素阻害物質の同定 | 19 |
| まとめ                               | 32 |
| 参考文献                              | 33 |
| 謝辞                                | 46 |

## 第1章 緒言

アロニア属の低木は北米原産の植物で、その果実はチョークベリー、ワイルドグーズベリー、チョークピア、ドッグベリーとして知られている。また、フォレストポタワトミのネイティブアメリカンによって、アロニアを用いた風邪に効果のあるお茶は“mi'ki'mi'nu'n”または“sakwako'mi'nu'n,”と呼ばれており<sup>1,2</sup>、伝統的にネイティブアメリカンの薬として使われてきた。アロニアの果実は、カナダおよびアメリカ先住のインディアンたちの伝統的な食品であり、携帯保存食の一種であるペミカンの調製にも使用されていた。さらに北米の入植者の間では、果実や樹皮は収斂剤として使用されていた<sup>1</sup>。

20世紀に入ると、ソビエト連邦や東欧諸国では、主にジュース、ジャム、ワインなどの大量生産や天然着色料の豊富な供給源として人気が出てきた<sup>3-6</sup>。アロニアは食材としてだけでなく、生薬としても人気があり、特にロシアや東欧諸国では天然の降圧剤や抗動脈硬化剤として使用されている<sup>7,8</sup>。これとは別に、アロニア製剤は、ビタミン剤、痔の治療薬などとして使用されることがある<sup>7,9</sup>。チョークベリーに含まれるアントシアニンの含有量が高いことから、アロニア抽出物の生物活性についての科学的研究が盛んに行われるようになり、最近では、ポリフェノールの化学的予防作用や、高血圧や動脈硬化などの食事関連疾患の症状を緩和する役割が注目されている。<sup>10-13</sup>

### 1.1. アロニアの特徴

アロニア属（バラ科、Maloideae 亜科）には、北米の落葉低木の2種が含まれている。すなわちブラックチョークベリーとして知られる *Aronia melanocarpa* とレッドチョークベリーとして知られる *Aronia arbutifolia* である。*A. melanocarpa* は、高さ90~180cmの低木で、直径6mmほどの紫黒色の果肉があり、梢には8

～14個の果実が群生している。果実は早く熟して落ちる。葉は長さ3～7cmで、光沢があり、赤くはならない。5月に白ピンクの花を咲かせる<sup>6,14</sup>。*A. arbutifolia*には鮮やかな赤色の花序があり、冬になるとその花序が残る。鈍い緑色の葉は早い時期には下の方が灰色で、秋になると赤く染まる<sup>14</sup>。*A. melanocarpa*は、北アメリカ北東部や五大湖周辺から南部のアパラチア山脈の高地まで分布し、山地の湿地帯や禿げ地に自生している。*A. arbutifolia*は、北米東部に広く分布しているが、特に東南部の平野に多く見られ、湿地帯やサバンナ、湿潤な森林地帯に自生している<sup>14,15</sup>。これら2つのかなり異なる種とは別に、3番目の種として論争的になっているのは、パープルチョークベリーと呼ばれる *Aronia prunifolia* である。この種は、*A. melanocarpa* と *A. arbutifolia* の中間種の特徴を持っている。紫黒色の果実と光沢のある若葉があり、成熟すると艶やかになる。*A. prunifolia*の自生域は *A. melanocarpa* に似ているが、*A. arbutifolia* の範囲にも及んでいる。*A. arbutifolia* は一般的に *A. melanocarpa* と *A. arbutifolia* の交配種と考えられており、アポミクシスが交配の安定化に効果的であることから、*A. prunifolia* は原種の分布域全域にまで拡大することができている<sup>14</sup>。また、*A. melanocarpa* は近縁種のロワズ(*Sorbus*)との交配も可能であり、その交配種はロシアでの栽培に適応されている<sup>3</sup>。

なお、本研究ではブラックチョークベリー（すなわち、*A. melanocarpa*）を使用した。そのため、以下、本論文ではブラックチョークベリーを単に「アロニア」と記載した。

## 1.2. 食用農産物としてのアロニア

アロニア果実はジュースやジャム、ワインの原料として、また天然色素の供給源として価値がある<sup>3,4,16,17</sup>。また、19世紀にロシアに持ち込まれてから人気

出てきた植物で、元々は家庭菜園でのベリーの供給源として利用されていた。ソビエト連邦でのアロニアの大規模な商業栽培は1940年代後半に開始され、1984年にはシベリアで17,800ヘクタールに達した<sup>3,5,17</sup>。1986年、効率的な顔料源を得るためにスウェーデンでのアロニアの商業栽培プロジェクトが開始された<sup>3,5</sup>。ポーランド、チェコ、スロバキア、ウクライナでも人気である<sup>7,18</sup>。1976年には旧ソ連からアロニアが日本に導入された<sup>19</sup>。アロニアの栽培は、挿し木や種子伝搬を基本としており、果実の酸味のためか、重篤な病害、害虫、鳥類の問題がなく、比較的問題なく栽培されている<sup>3,6</sup>。アロニアは9月初旬までが果実重量、アントシアニン含量の点で収穫に適している。長期間の栽培はアントシアニンの酸化や果実の褐変を招き、高温での乾燥も好ましくない<sup>27,28</sup>。

アロニアの果肉は酸味と渋みがあるため、生食よりも加工に適している<sup>6</sup>。アントシアニンを多く含むことから、抗酸化作用のある健康ジュースやお茶、コーディアルリキュールの原料として利用されている<sup>20-24</sup>。アロニア果汁を60℃で8時間放置すると、アントシアニン量が30%減少し、抗酸化活性が50%以上失われることが確認されている。これを避けるためには、迅速で保存性の高い乾燥方法を適用する必要がある<sup>25</sup>。製薬業界では、アロニア抽出物はシロップや栄養補助食品の製造に使用されている<sup>27</sup>。ペクチン含有量が高いため、アロニアは低ペクチンの果実と一緒にミックスジャムの製造に有用である<sup>6</sup>。アロニア果実や調合物をジャムに加えることで、味や色、抗酸化特性を向上させることができる<sup>28,29</sup>。アロニア果実は、ブドウ (*Vitis sp.*) やロゼッレ (*Hibiscus sabdariffa*) と比較しても特にアントシアニンの重要な供給源であり、安全で天然の食品着色料として使用することができる<sup>16,26,30</sup>。

### 1.3. アロニアに含まれる成分

ポリフェノール、特にアントシアニンとプロシアニジン、は、アロニア果実に含まれる生物学的に活性な成分の主なグループを構成している。ポリフェノール、特にアントシアニンとプロシアニジン、は、アロニア果実に含まれる生理学的活性を持つ化合物の主要な構成成分である。これらの化合物は、植物の抗酸化特性に関与している。その他のフェノール類には、クロロゲン酸やネオクロロゲン酸（図1）、少量のタンニンが含まれている<sup>31-33</sup>。

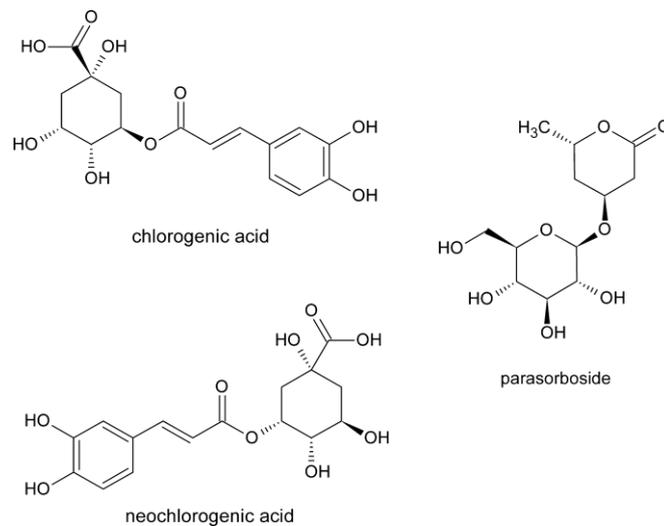


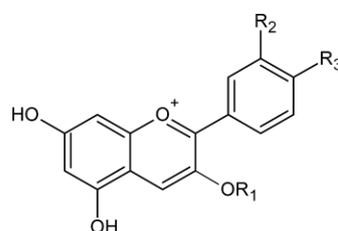
図1 アロニアに含まれる有機酸と配糖体

ポリフェノールの他に糖類（10～18%）、ペクチン（0.6～0.7%）、糖アルコールであるソルビトールやパラソルビン酸の配糖体であるパラソルボシド（図1）が含まれている<sup>27,31,34,35</sup>。リノール酸グリセリドとホスファチジルイノシトールを主成分とする低量の脂肪（新鮮重量0.14%）も報告されている<sup>36</sup>。生鮮な果実の灰分値は分析では、比較的高いKとZnの含有量と、Na、Ca、Mg、およびFeの存在を示した。<sup>37</sup> ミネラル化合物のほか、ビタミンB1、B2、B6、C、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、 $\alpha$ -と $\beta$ -トコフェロール、カロテノイド（ $\beta$ -カロテンと

β-クリプトキサンチンを含む) がアロニア果実から同定された<sup>38,39</sup>。

トリテルペンのうち、アロニア果実には、β-シトステロールとカンペステロールが確認されている<sup>36</sup>。

アロニアに含まれる主なフラバノールはプロシアニジンである。その含有量は乾燥重量で0.66%から5.18%まで様々である<sup>32,40</sup>。また、アロニアに含まれるアントシアニンは、3-O-ガラクトシド、3-O-グルコシド、3-O-アラビノシド、3-O-キシロシドのシアニジン配糖体の混合物である(図2)が、このうちシアニジン3-ガラクトシドが主成分である<sup>32,40,41-45</sup>。ペラルゴニジン誘導体の3-O-ガラクトシドと3-O-アラビノシドも果実から微量に検出されている(図2)<sup>30</sup>。



|                              |                      |                     |                     |
|------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| cyanidin-3-O-galactoside     | R <sub>1</sub> = gal | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH |
| cyanidin-3-O-glucoside       | R <sub>1</sub> = glc | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH |
| cyanidin-3-O-xyloside        | R <sub>1</sub> = xyl | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH |
| cyanidin-3-O-arabinoside     | R <sub>1</sub> = ara | R <sub>2</sub> = OH | R <sub>3</sub> = OH |
| pelargonidin-3-O-arabinoside | R <sub>1</sub> = ara | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OH |
| pelargonidin-3-O-galactoside | R <sub>1</sub> = gal | R <sub>2</sub> = H  | R <sub>3</sub> = OH |

図2 アロニアに存在するアントシアニンの化学構造式

その他にも、アロニア果実と花からフラボノイド化合物が検出されている。アロニアの花からのメタノール抽出物中<sup>46</sup>にフラバノンの1種であるエリオジクチオー-7-O-β-グルクロニドが確認された(図3)。また、アロニアの花傘からは、5種類のフラボノール-ケルセチン誘導体が確認された(図3)<sup>46</sup>。これらのケルセチン配糖体のうち、3-ルチノシド、3-β-ガラクトシド、3-β-グルコシドの3つ

がアロニア果実からも検出されている<sup>32,43</sup>。

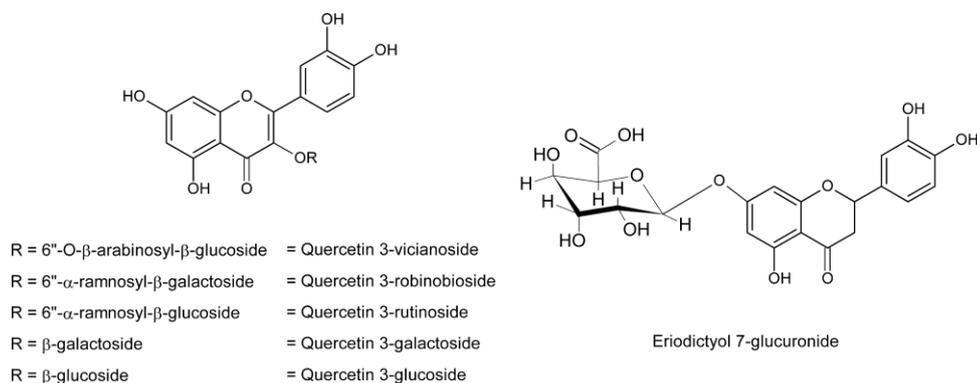


図3 アロニアに含まれるケルセチン配糖体の化学構造式

#### 1.4. アロニアの抗酸化能

ポリフェノール化合物の抗酸化力に関する研究が数多く行われてきた<sup>43,47</sup>。ベリー類の抗酸化能の関する比較研究において、アロニアにはブルーベリーの5倍以上、クランベリーの8倍以上、リンゴンベリーの4倍以上の強い抗酸化活性があることが示された<sup>43</sup>。さらにカシス、アカスグリ、グースベリー、エルダーベリーのような他のベリー類と比較して、アロニアが最も強力な抗酸化能を持つことが明らかとなっている<sup>40</sup>。さらにアロニア果汁は、ホスファチジルコリンの酸化を抑制することが示されており、カシスジュースの約2倍の効果がある。またアロニア果汁には、カシスの場合には観察されなかったα-トコフェロールとの相乗効果を起こすことが判明しており、アロニアが着色料としてだけでなく、食品中のα-トコフェロールや不飽和脂質を保護する効果的な抗酸化剤としても使用できることを示している<sup>48</sup>。

アロニアの抗酸化力は、*in vitro* 実験で実証されただけでなく、多くの *in vivo*

実験においても実証されている。ラットを対象とした実験では、高コレステロール血症誘因食にアロニアエキスを添加したところ、赤血球スーパーオキシドジスムターゼレベルが有意に低下した<sup>41</sup>。同様の実験では、過酸化脂質の混合物を餌に添加すると、ラットの血中のチオバルビツール酸反応性物質（TBARS）濃度が上昇した。TBARS濃度は酸化脂肪と共にアロニア果実抽出物を投与した動物で顕著に低く、アロニアの脂質過酸化抑制効果に対する明確な可能性を示している<sup>50</sup>。実験的に誘導された酸化ストレス（高フルクトース食とストレプトゾトシン注射）を有するラットを対象に実施した別の研究では、アロニア抽出物の摂取は、TBARSのレベルとして測定された肝臓、腎臓、肺の抗酸化状態の顕著な改善につながることを示された<sup>49</sup>。ラットにおけるストレプトゾトシン誘発性酸化ストレスは、腎臓におけるTBARS濃度の上昇によって示されたが、アロニア果汁を添加した食餌の場合には有意に低下した<sup>51</sup>。ヒト臨床試験においてアロニアのアントシアニンを30日間摂取すると、高コレステロール血症患者の血球の酸化状態が顕著に改善された<sup>52</sup>。

### 1.5. アロニア摂取による健康効果

長い間、アロニアは、いわゆる薬用植物としてではなく、一般的な食品の素材として考えられてきた。様々なベリーから得られるアントシアニンを含む天然ポリフェノールが、抗変異原性、脂質低下、心血管疾患のリスクの低減など、いくつかの健康促進機能を示すことが発見されて以来、アロニアの果実や製剤はこれらの特性について広く研究されてきた<sup>53,54-56</sup>。アロニアの薬理活性の多くは、高ポリフェノール含量に起因する抗酸化特性に直接または間接的に関連している。アロニア抽出物は心血管疾患やメタボリックシンドロームの危険因子を有する人々のための栄養補助食品となる可能性がある。

本研究ではアロニア果汁中に存在する健康効果を促進する物質について、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV) および 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA (HMG-CoA) レダクターゼ阻害を指標とした探索を行い、アロニアによる血糖値上昇抑制および高 LDL コレステロール血症低減効果に寄与する成分を同定することを目的とした。

## 第2章 ジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害物質の探索および同定

### 1. はじめに

アロニアベリーには、ラジカル消去活性による抗酸化効果、フェノール化合物による抗突然変異誘発、アントシアニンによる肝保護、カドミウムの毒性と蓄積の減少、心臓保護、軽度の高コレステロール血症改善作用、抗糖尿病効果、結腸癌抑制効果など、さまざまな健康増進作用がある<sup>57</sup>。アロニアジュースは、糖尿病のヒト<sup>58</sup> およびラット<sup>59</sup> の血糖値抑制に有益な効果があることが示されている。ただし、そのメカニズムは不明である。

ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV) (EC 3.4.14.5) は、グルコース依存性インスリン分泌性ポリペプチド (GIP) やグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) などのインクレチンの N 末端領域を切断するセリンペプチダーゼ<sup>60</sup> である。インスリン分泌の減少は、DPP IV によるインクレチンの不活性化によって誘導される<sup>61-64</sup>。DPP IV 阻害剤は、糖尿病患者の血糖値の改善効果が示されており<sup>65</sup>、いくつかの植物で発見されている<sup>66</sup>。

本研究では、アロニアジュースに DPP IV 阻害効果があることを見出した。さらに、アロニアジュースの DPP IV 阻害物質としてシアニジン 3、5-ジグルコシドを同定した。DPP IV は、シアニジンおよびシアニジン 3-グルコシドよりもシアニジン 3、5-ジグルコシドにより強く阻害された。アロニアジュースの抗糖尿病効果は、その 1 つの要因としてシアニジン 3、5-ジグルコシドによる DPP IV 阻害が考えられる。

### 2. 実験材料と方法

#### 2.1. 実験材料

アロニアジュースは有限会社中垣技術士事務所 (大阪) から提供されたものを

使用した。Gly-Pro-MCA は、ペプチド研究所 (大阪) から購入した。DPP IV は、豚の精漿から精製された[4]。Supel Sphere Carbon/NH<sub>2</sub> SPE カートリッジは SUPELCO 社製 (米国)、Inert Sustain C18 カラムは GL サイエンス社(東京)、ACQUITY UPLC M-Class HSS T3 カラムは Waters (米国) から入手した。Cyanidin と cyaniding 3-glucoside は、常磐植物化学研究所(千葉)および EXTRASYNTHESSE 社(フランス)から購入した。Cyanidin 3,5-diglucoside は、Sigmae Aldrich 社(USA) から入手した。他のすべての化学物質は分析グレードであり、和光純薬 (大阪) から購入した。

## 2.2. DPP IV 阻害活性測定法

酵素タンパク質分解活性を、10  $\mu$ l の 10 mM Gly-Pro-MCA、100  $\mu$ l の 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) に 5  $\mu$ l の酵素溶液を混合し、さらに水を加えて合計容量 1 ml とし、30 分間 37°C でインキュベートした後、2 ml の 0.2 M 酢酸を加えて反応を停止した。遊離した AMC を蛍光定量 (励起 380nm, 蛍光 440nm) により測定した。

## 2.3. DPPIV 阻害物質の分離と同定

### ステップ 1 Supel Sphere Carbon / NH<sub>2</sub> SPE クロマトグラフィー

アロニアジュースを、5 ml/h の流速で、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で事前に平衡化した Supel Sphere Carbon/NH<sub>2</sub> SPE カートリッジ (ベッド容量 : 6 ml) に供した。非吸着画分を回収した後、カラムをエタノールで洗浄し、その後、2.0 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。DPP IV 阻害活性を有する画分を次のステップに使用した。

### ステップ 2 逆相カラムクロマトグラフィー

ステップ 1 のサンプル溶液を、0.1% TFA 水溶液で平衡化した InertSustain C18 カラム (4.6 $\times$ 150 mm) に供し、1.0 ml/min の流速で、アセトニトリルの濃度勾配

(0→100%)によって溶出した。得られた各画分を濃縮乾固させ、DPPIV阻害活性を測定し、阻害活性がある画分を次のステップで使用した。

### ステップ3 LC-MS/MS 分析

ステップ2で得られた分画を ACQUITY UPLC M-Class HSS T3 カラム (75  $\mu\text{m}$  x 150 mm) にアプライし、5  $\mu\text{l}/\text{min}$  の流速で分離を行った。MS/MS は、ESI を備えた Xevo G2 QToF (Waters、MA、USA) を使用して行った。MassLynx v4.1 ソフトウェアを、機器のコントロールとデータ収集に使用した。キャピラリー温度は 120°C で、キャピラリー電圧は 3 kV であった。マススペクトルは、ポジティブイオンモードで  $m/z$  100 から 1000 の間で記録した。

## 2.4. 統計分析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表され、統計解析は、分散分析（一元配置分散分析）に続いて、対応のないスチューデント t 検定を使用した。複数のサンプルの比較には、Tukey-Kramer テストを使用した。

## 3. 結果

### 3.1. アロニアジュースの DPP IV 阻害活性

アロニアジュースの DPP IV 阻害効果を調べるために、合成基質 Gly-Pro-MCA に対する DPP IV 活性を調べた。図 1A に示すように、DPP IV 阻害活性はアロニアジュースで観察され、DPP IV 活性の阻害率はコントロールの約 27% であった。

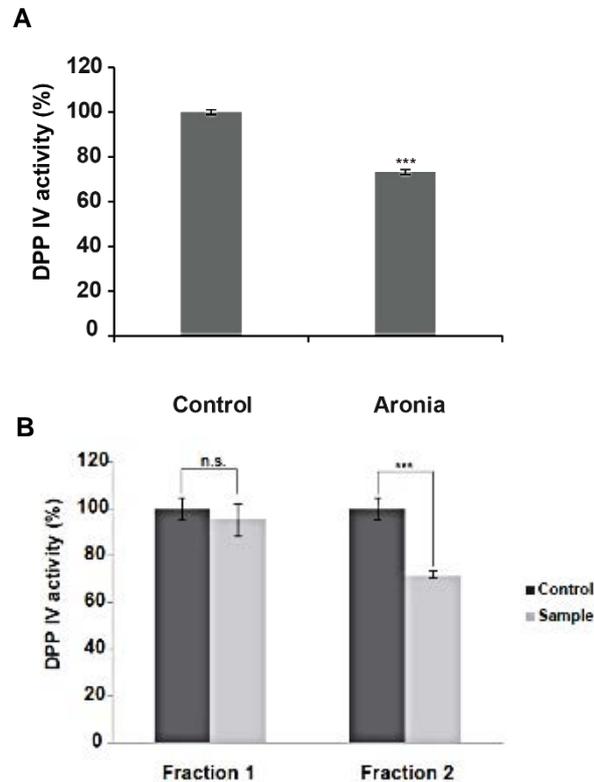


図1 アロニアジュースによる DPP IV の阻害

A. アロニアジュースによる DPP IV 阻害活性は、合成基質 Gly-Pro-MCA を使用して測定した。n=4 \*\*\*p<0.001

B. Spelco column chromatography から得た分画における DPPIV阻害活性は、合成基質 Gly-Pro-MCA を使用して測定した。n=4 \*\*\*p<0.001、n.s.：有意ではない

### 3.2. アロニアジュースからの DPP IV阻害物質の分離

アロニアジュースから DPP IV 阻害物質を分離するために、カラムクロマトグラフィーによりアロニアジュースを分画した。図 1B に示すように、DPP IV 阻害活性は溶出画分で観察されたが、Supel Sphere Carbon/NH<sub>2</sub> SPE カートリッジの非吸着画分では観察されず、DPP IV 活性の減少率は約 28%であった。さらに、DPP IV 阻害活性を持つ画分を逆相カラムクロマトグラフィーで分画し、4 つの画分を得た (図 2A)。図 2B に示すように、DPP IV 阻害活性はフラクション 2 で観察され、DPP IV 活性の阻害率はコントロールの約 81%であった。

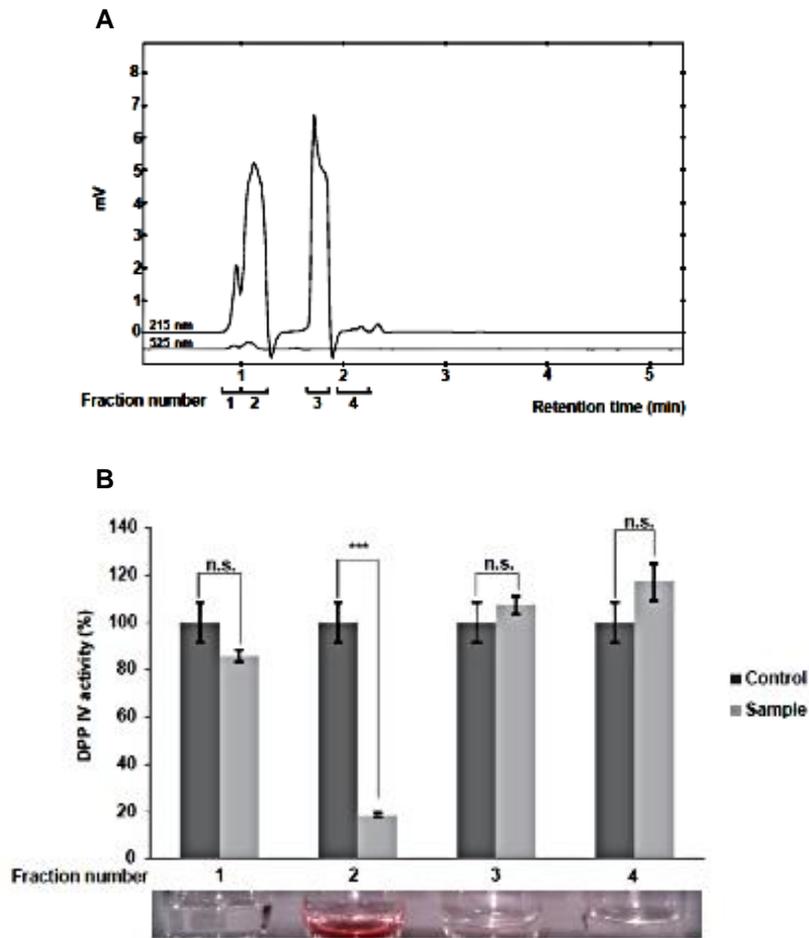


図2 DPP IV阻害画分の分離

A. RP-HPLC を使用した DPP IV 阻害剤の分離。4つの画分が得られた。

B. 画分の酵素活性を測定。画分2に DPP IV に対する阻害活性があり、溶液の色は赤であった。n=4

\*\*\*p<0.001, n.s.: 有意ではない

### 3.3. アロニアの DPP IV阻害物質の同定

DPP IV 阻害物質を同定するために、DPP IV 阻害活性を持つ溶液を UPLC-Xevo G2 Q-Tof にて測定した。図 3A に示すように、メインピークの分子量は 635.74 で、メインピークの MS/MS ピークから m/z 451.56 および 289.38 のフラグメントピークも得られた。m/z 451.56 [M+2H<sup>+</sup>] および 289.38 [M+2H<sup>+</sup>] のピークは、それぞれシアニジン 3-グルコシドおよびシアニジンであると同定されたため、文献<sup>67-69</sup>により、m/z 635.74 [M+2H<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>] および 613.74 [M+2H<sup>+</sup>] のピ

ークはシアニジン 3,5-ジグルコシドであると同定した (図 3B)。

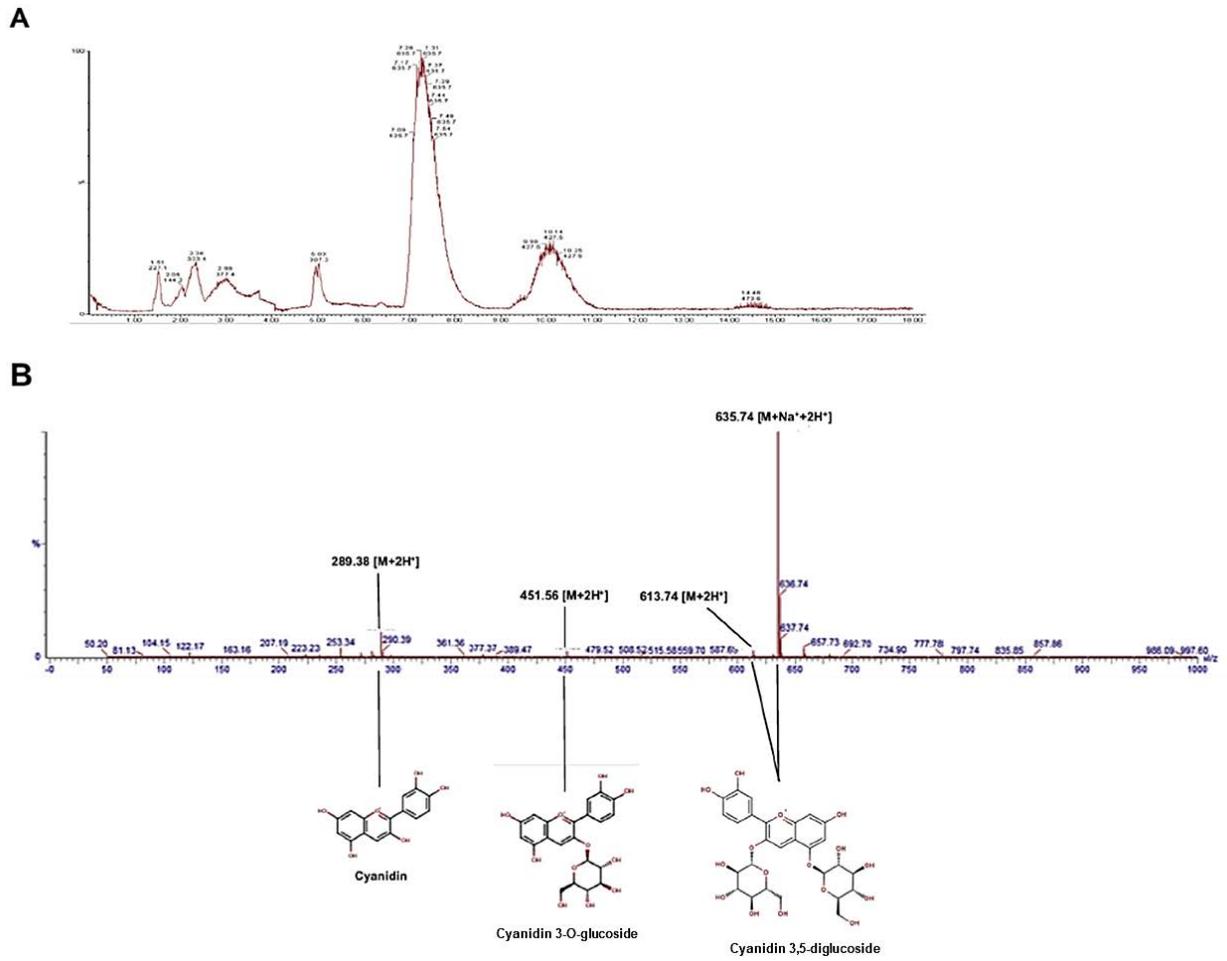


図 3 DPPIV阻害物質の同定

A. DPP IV 阻害活性を持つ画分の LC-MS スペクトル。

B. メインピークの MS/MS スペクトル。シアニジン 3-グルコシドとシアニジンがフラグメントピークで検出され、メインピークはシアニジン 3,5-ジグルコシドであると同定された。

### 3.4. DPP IV 阻害におけるシアニジン 3,5-ジグルコシドの IC<sub>50</sub> 値の測定

DPP IV 酵素活性が市販のシアニジン 3,5-ジグルコシドによって阻害されるかどうかを調べるため、合成基質 Gly-Pro-MCA を使用し、DPP IV 阻害活性を測定した。図 4 に示すように、DPP IV は 0.5 mM シアニジン 3,5-ジグルコシドによって阻害されたが、シアニジンまたはシアニジン 3-グルコシドによっては阻害されなかった。シアニジン 3,5-ジグルコシドの IC<sub>50</sub> 値は 5.5 mM と推定された。

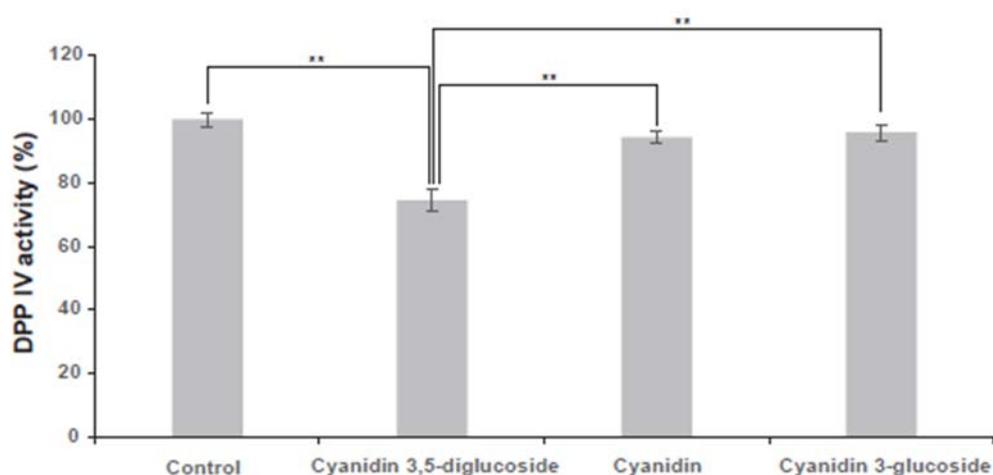


図 4 シアニジン、シアニジン 3-グルコシド、およびシアニジン 3,5-ジグルコシドによる DPP IV 阻害  
DPP IV に対するシアニジン、シアニジン 3-グルコシド、シアニジン 3,5-ジグルコシドの阻害活性を測定した。DPP IV 活性は、シアニジン 3,5-ジグルコシドによって約 25% 阻害されたが、シアニジンまたはシアニジン 3-グルコシドによっては阻害されなかった。n=4 \*\*p<0.01

## 4. 考察

アロニア果汁は血糖値を改善する効果があると既に示されているが、そのメカニズムは不明である。GLP-1 と GIP は両方とも、DPP IV によって急速に不活性化される<sup>70</sup>。アロニアジュースには DPP IV 阻害活性があることが判明した。DPP IV 阻害物質は、多くの食品および食品タンパク質加水分解物に含まれてい

ることは既に知られている。DPP IV は薬用植物である *Pterocarpus marsupium* Roxb (マメ科)、糖尿病治療のための生薬である *Fagonia cretica* L (タマゴケ科)、および *Hedera nepalensis* K. Koch (コナラ科) からの抽出物によって阻害される<sup>71,72</sup>。本研究では、新しい DPP IV 阻害剤であるシアニジン 3,5-ジグルコシドを見出した。さらに、シアニジン 3,5-ジグルコシドは、アロニア果汁中に含まれる主要な DPP IV 阻害物質であった。シアニジン、シアニジン-3-グルコシド、マルビジン、ルテオリン、アピゲニン、ケルセチン、ケンフェロール、ヘスペレチン、ナリンゲニン、エリオシトリン、ゲニステイン、レスベラトロール、没食子酸、カフェイン酸はベリーおよび柑橘類の DPP IV 阻害物質であることが報告されている<sup>73</sup>。食品タンパク質加水分解物が DPP IV 阻害に働く例として、アトランティックサーモンの皮、ツナクッキングジュース、米ぬか、ゴータチーズ、および乳タンパク質が知られている<sup>74</sup>。以前の研究では、アロニアジュースには、シアニジン 3-ガラクトシド、シアニジン 3-アラビノシド、シアニジン 3-グルコシド、シアニジン 3-キシロシドなどのアントシアニン配糖体が含まれていることも示されている<sup>75-79</sup>。さらに、シアニジンおよびシアニジン 3-グルコシドは DPP IV 阻害物質であると報告されている<sup>80</sup>。DPP IV 阻害物質であると報告されているシアニジンおよびシアニジン 3-グルコシドよりも、シアニジン 3,5-ジグルコシドにより DPP IV 活性がより強く阻害されることがわかった。我々の結果と以前の研究の結果は、シアニジン 3,5-ジグルコシドがアロニアジュースに存在する新しい DPP IV 阻害物質であることを示唆している。

### 第3章 アロニアに含まれる HMG-CoA 還元酵素阻害物質の同定

#### 1. はじめに

アロニアベリーは高濃度のポリフェノールを含み<sup>81</sup>、糖尿病<sup>82</sup>や高脂血症<sup>83</sup>、高コレステロール血症<sup>84</sup>に対する改善効果が報告されている。

高コレステロール血症は、心血管疾患の主な原因の1つであるアテローム性動脈硬化を引き起こす可能性がある<sup>85</sup>。アロニアベリーを摂取すると、血中 LDL コレステロール濃度を低下させる可能性がある<sup>86</sup>。ただし、コレステロール低減効果のメカニズムは不明である。

HMG-CoA 還元酵素は、肝臓でのコレステロール合成の重要な酵素である<sup>87</sup>。スタチンは、HMG-CoA レダクターゼの活性を強力に阻害することにより、高コレステロール血症を治療するために開発された<sup>88</sup>。多くの植物代謝物も酵素の活性を阻害する。

たとえば、ツボクサ (*Centella asiatica*) に含まれるアジアティック酸<sup>89</sup>、イチジクの1種である *Ficus virens* に存在する n-オクタデカニル-O- $\alpha$ -D-グルコピラノシル (6 $\rightarrow$ 1) -O- $\alpha$ -D-グルコピラノシド<sup>90</sup>、トマトジュース中のリコピン、クロロゲン酸およびナリンゲニン<sup>91</sup>、緑茶のエピガロカテキン-3-ガレート<sup>92</sup>、さらにサボテンの1種である *Opuntia ficus indica* に含まれるイソラムネチンおよびピシジド酸<sup>93</sup>に HMG-CoA 還元酵素作用が報告されている。したがって、アロニアジュースには、HMG-CoA 還元酵素を阻害する二次代謝物が含まれていることが予想される。

本研究では、アロニアジュースから HMG-CoA 還元酵素の阻害物質を見つけるために、ジュースの代謝物を逆相クロマトグラフィーで分離し、酵素に対する有意な阻害活性を持つ2つの画分を得た。これら2つの画分の LC-ESI-MS/MS および MS3 分析と糖分析により、ペチュニジングリコシドアラビノシドおよび

デルフィニジンアラビノシドの存在が強く示唆された。

## 2. 実験材料及び方法

### 2.1. 実験材料

HMG-CoA 還元酵素アッセイキットは、Sigma-Aldrich から購入した。3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾレン (PMP) は、ナカライテスク (京都) から購入した。D-グルコース、D-ガラクトース、L-ラムノース、D-アラビノース、および D-キシロースは東京化成工業 (東京) から入手した。塩化ペチュニジンは常盤植物化学 (千葉) から、またデルフィニジン-3-O-ガラクトシドクロライドは Extrasynthese (リヨン、フランス) から購入した。他のすべての化学物質は分析グレードであり、和光純薬 (大阪) から購入した。

### 2.2. アロニアジュースのクロマトグラフィーによる分離

アロニアジュース (300 mL) を、0.1%ギ酸水溶液 (溶媒 A) で事前に平衡化した Wakogel 50C18 カラム (Wako、ベッド容量 200 mL) に供した。カラムを溶媒 A で洗浄した後、メタノール濃度を段階的に上昇させ (10、20、30、40、50% ; v/v)、カラムから溶出させた。溶出液を回収し、濃縮乾固後、各画分を秤量し、0.1%ギ酸を含む 12.5%または 25%メタノール水溶液で 1~10 mg/mL の濃度になるように溶解した。HMG-CoA 還元酵素阻害活性を測定し、最も活性の高い画分を InertSustain C18 カラム (2.1 mm×150mm、GL Science、東京) を用いてさらに精製した。移動相には、溶媒 A と溶媒 B (0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル-10%水) を用いた。溶出は流速 150  $\mu$ L/min で行い、最初の 5 分間は溶媒 A-溶媒 B (80:20) を用い、その後 25 分間で溶媒 B を 60%にまで増加させ、さらに 1 分後には溶媒 B を 90%とした。370 および 450 nm の吸光度をモニターし、溶出液を収集した。

### 2.3. 液体クロマトグラフィー質量分析

InertSustain C18 カラムでの HPLC によって精製された HMG-CoA 還元酵素阻害物質（2種類）を、MS/MS データに基づいて LC-MS で分析した。画分の一部（5  $\mu$ L）を溶媒 A-溶媒 B（80:20）で平衡化した InertSustain C18 カラム（0.3mm $\times$ 150mm、GL Science）に注入した。溶出は流速 3.0  $\mu$ L/min で行い、溶媒は最初の 56 分間は溶媒 B を 20%で保ち、その後溶媒 B 濃度を 25 分間で 70%に、さらに 5 分間で 90%にまで上昇させた。溶出液を 2 つのフューズドシリカキャピラリーチューブ（内径 20 $\mu$ m）に均等に分割し、そのうちの 1 つをエレクトロスプレーイオン化チップに接続した。スプレー電圧は 2.5kV で、トランスファーチューブの温度は 150 $^{\circ}$ C であった。溶出液のマススペクトルは、ポジティブイオンモードで m/z 150 から 1000 の間で記録した。イオン強度が 1000 を超えるイオンピークは、データに依存して MS / MS 測定にかけられた。シリンジタイプ HPLC ポンプ（HP 711V Micro-Flow Pump、GL Science）およびイオントラップ質量分析計（LCQ Fleet、Thermo Fisher Scientific、MA、USA）を使用した。

### 2.4. HMG-CoA 還元酵素活性

HMG-CoA 還元酵素の阻害活性は、製造元の手順に従って HMG-CoA レダクターゼアッセイキットを使用して測定した。酵素反応は 96 ウェルマイクロプレートを使用して実施した。ウェルにはそれぞれ 100  $\mu$ L 入った中に、基質（HMG-CoA）の添加により反応を開始し、マイクロプレートリーダー（SH-1000lab、Corona Electric、茨城）を使用して 340 nm の吸光度を 2 分ごとに測定した。

### 2.5. HMG-CoA 還元酵素阻害物質の酸加水分解

得られた 2 種類の HMG-CoA 還元酵素阻害物質（300~350  $\mu$ g）を、ガラスバイアル内で 350  $\mu$ L の 2 M HCl で 90 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。インキュベーション後、酢酸エチル（350  $\mu$ L）をバイアルに加えてアグリコンを抽出した。新しい

1.5 mL チューブに移し、真空乾燥させた。

## 2.6. 単糖組成の分析

3-メチル-1-フェニル-5-ピラズレン (PMP) による糖の誘導体化と誘導体の逆相 HPLC は、Liu et al<sup>94</sup>に記載された方法に従って、わずかに変更して実施した。遊離した糖 (2.5 を参照) を含む乾燥水層を 100  $\mu$ L の水で再構成し、溶液の一部 (50  $\mu$ L) を 0.5 M PMP (メタノール溶液) 100  $\mu$ L および 0.6 M NaOH 50  $\mu$ L と混合した。混合物を 70°C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、混合物を 1 M HCl で中和し、次に 500  $\mu$ L のクロロホルムを加えて未反応の PMP を除去した。乾燥した PMP 誘導体を 100  $\mu$ L の水に溶解した。Cosmosil 3C18-EB カラム (2.0 mm ID $\times$ 150 mm、ナカライテスク) を用いた HPLC で PMP 標識糖の分析を実施した。移動相には、溶媒 A (50 mM 酢酸アンモニウム) と溶媒 B (アセトニトリル-水 ; 90:10) を用いた。カラムは溶媒 A-溶媒 B (81:19) で平衡化し、HPLC 開始後 5 分間はこの状態で保った。その後 25 分間で溶媒 B 濃度を 30% に上昇させ、さらに 1 分間 30% で保った後 5 分間で 90% にまで増加させた。なお、流速は 150  $\mu$ L/min、温度は 20°C、PMP 糖の検出は 245 nm の吸光度を測定することで行った。

## 2.7. 統計解析

統計分析は、分散分析 (一元配置分散分析) に続いて、対応のないスチューデントの t 検定を使用して行った。複数のサンプルの比較には、Tuckey-Klamer 検定を使用した。

## 3. 結果

### 3.1. アロニアジュースからの HMG-CoA 還元酵素に対する阻害活性物質の分離

アロニアジュースからの HMG-CoA 還元酵素に対する阻害活性を持つ化合物

の分離、図 1 に示すように、アロニアジュースは HMG-CoA 還元酵素活性を約 57%抑制した。ジュースから、逆相クロマトグラフィーにより、5つの画分が得られた。5つの画分のうち、画分 4 が最も強く酵素を阻害した (63%阻害、図 2)。画分 4 を InertSusutain C18 カラムでさらに HPLC にかかけ、12 の画分を得た (図 3A)。画分 4-8 および 4-10 は、酵素を有意に阻害した (図 3B および 3C)。画分 4-8 および 4-10 の IC50 値は、それぞれ 0.11 および 0.093 mg/mL であった (表 1)。フラクション 4-8 の吸収スペクトルは 276 nm、318 nm および 494 nm に 3つのピークを持ち、フラクション 4-10 の吸収スペクトルは 278 nm および 494 nm に 2つのピークを持ち、約 320 nm にショルダーがあった (図 3D)。

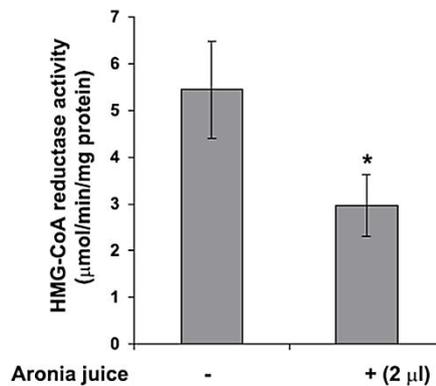


図 1 アロニアジュースによる HMG-CoA 還元酵素阻害  
n=5 \*p<0.05

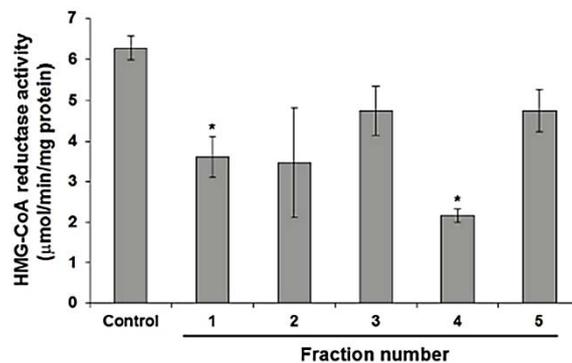


図 2 クロマトグラフィー画分の阻害活性

Cosmosil 50C<sub>18</sub> カラムクロマトグラフィーを使用して得られた各画分 (Wakogel 画分 1-5) を反応混合物に添加し、初速度を測定した。n=5 \*p<0.05

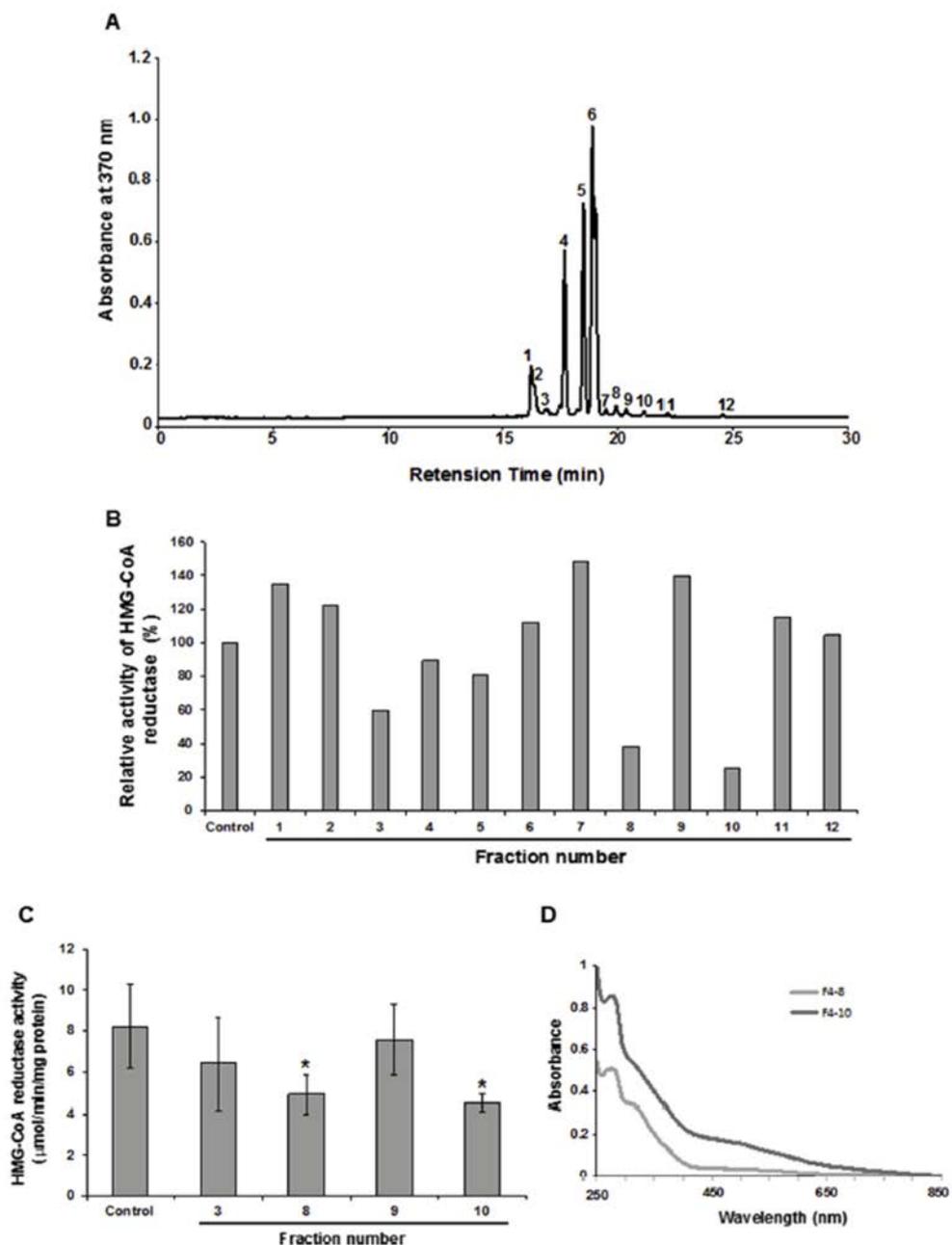


図3 InertSustainC18 カラムでの Wakogel フラクション4 のクロマトグラフィー分離。

(A) Wakogel フラクション4 のクロマトグラム。12 個の溶出ピーク（数字で示されている）が検出され、別々に収集されました（InertSustain フラクション1-12）。(B) HMG-CoA 還元酵素に対する阻害活性をすべての画分についてアッセイした。HMG-CoA 還元酵素活性の平均の95%信頼区間は、フラクション8および10を使用して観察された活性を除いて、90.6~131 (n=10) と計算された。後者の2つの活性は<62.5であり、有意な阻害を示唆している。(C) ピーク画分3、8、9および10の阻害活性の比較。(D) フラクション8および10の吸収スペクトル。各サンプルは、測定前に0.1%ギ酸水溶液で適切に希釈した。n=5 \*p<0.05

### 3.2. 阻害物質の質量分析による特性評価

フラクション4のピーク10をポジティブイオンモードのLC-MSで分析した。トータルイオンクロマトグラムと  $m/z$  611.14 の抽出イオンクロマトグラムをそれぞれ図4Aと4Bに示した。このイオンのMS/MSスペクトルは、 $m/z$ 316.99の強いイオンを示した。294の質量の違いは、 $m/z$ が611.14のイオンからの1つのヘキソースと1つのペントース部分の損失を示唆している。 $m/z$ 317のポジティブイオンを生成できる2つの既知のアグリコンがある。1つはイソラムネチンで、そのプロトン化イオン ( $[M+H]^+$ ) の計算質量は317.07、もう1つはペチュニジンである。ペチュニジンはポジティブイオン性であり、計算された質量 ( $M^+$ ) は317.05である。イソラムネチンは淡黄色の結晶を形成し<sup>103</sup>、その溶液は淡黄色を示す。ピーク10の溶液は強い赤ワイン色を示したため (図3D)、ピーク10にアグリコンとしてイソラムネチンが含まれている可能性は低い。したがって、CIDによって生成されたピーク10アグリコンイオンの  $m/z$ 317のイオン (図6C) とペチュニジンからのイオン (図6D) の質量スペクトルを比較した。ペチュニジンで検出されたフラグメントイオンは、ピーク10で得られた対応するスペクトルでも見つかった。図5に示すように、フラクション4のピーク8には  $m/z$ が435の成分が含まれており、このイオンのCIDは303.00の  $m/z$ の強いフラグメントイオンを生成した。132の質量の差は、 $m/z$ 435のイオンからの1つのペントース部分の損失を示唆している。ピーク8の溶液は、ピーク10の溶液と非常によく似た強い赤ワイン色を示したため、観測されたフラグメントイオンはデルフィニジンである可能性が高く、計算された質量 [ $M^+$ ] は303.05である。したがって、ピーク8成分のESI-MS/MS/MSスペクトルとデルフィニジン-3-O-アラビノシドのESI-MS/MS/MSスペクトルを比較した (図7)。デルフィニジン-3-O-アラビノシドで検出されたフラグメントイオンは、ピーク8で得られた対

応するスペクトルでも見つかった。

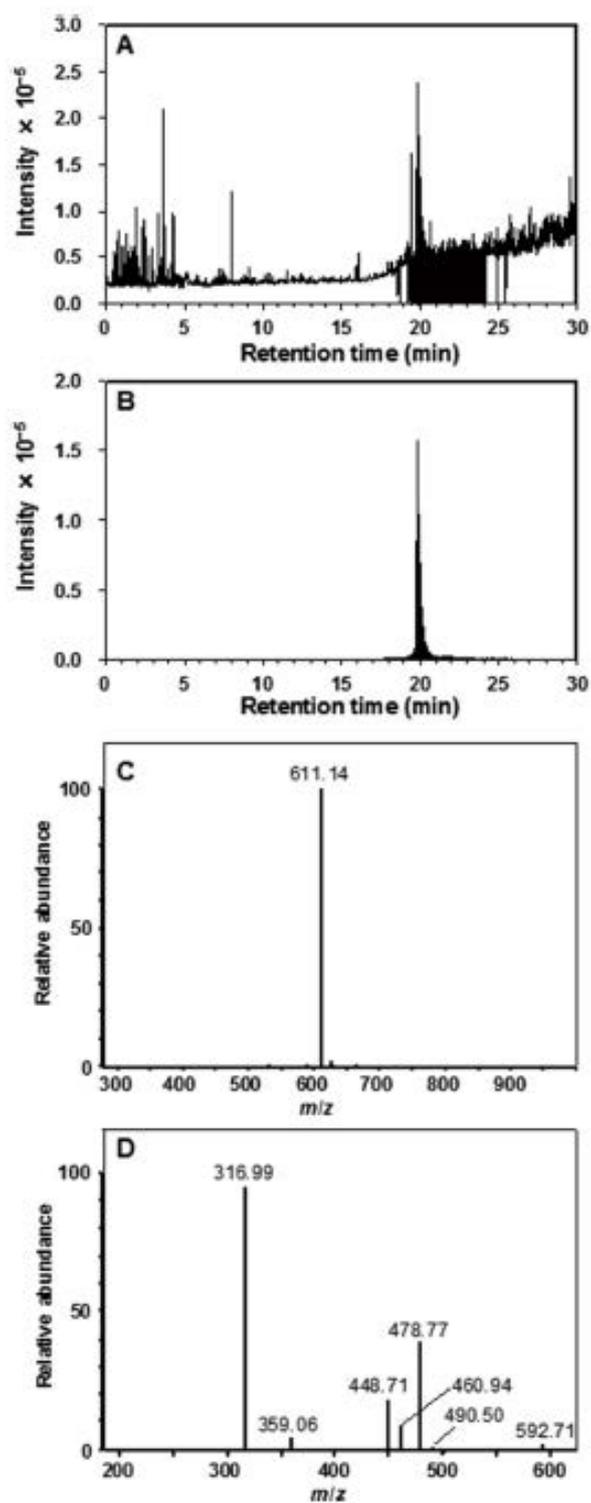


図4 LC-MSによるF2 (InertSustainフラクション10)の特性評価

(A) トータルイオンクロマトグラム (B)  $m/z$  611.14のイオンの抽出イオンクロマトグラム

(C) 20分の保持時間で測定されたマスマスペクトル。(D)  $m/z$  611.14のイオンのMS/MSスペクトル

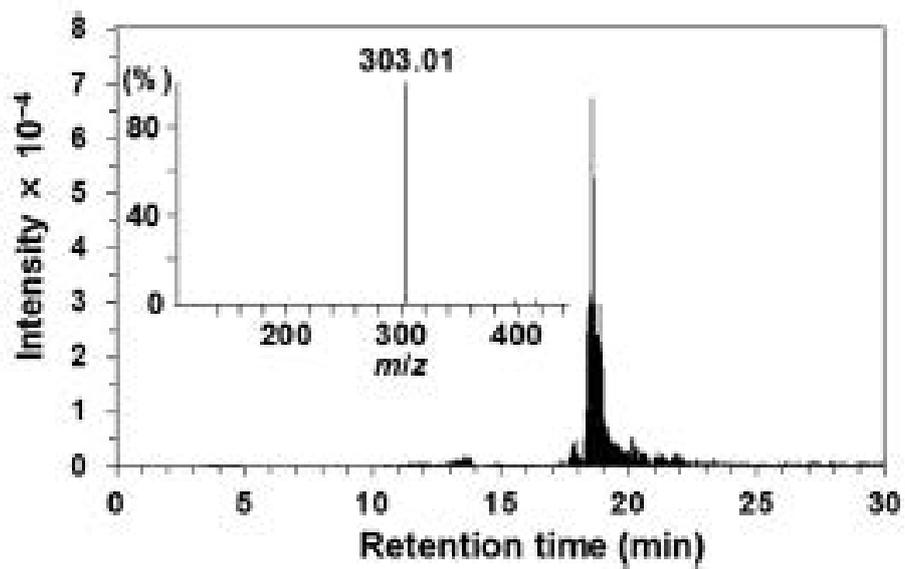


図5 F1の  $m/z$  435.0 を含むイオンのクロマトグラム (InertSustain フラクション 8)  
挿入図は、 $m/z$ 435 のイオンの MS/MS スペクトルを示している。

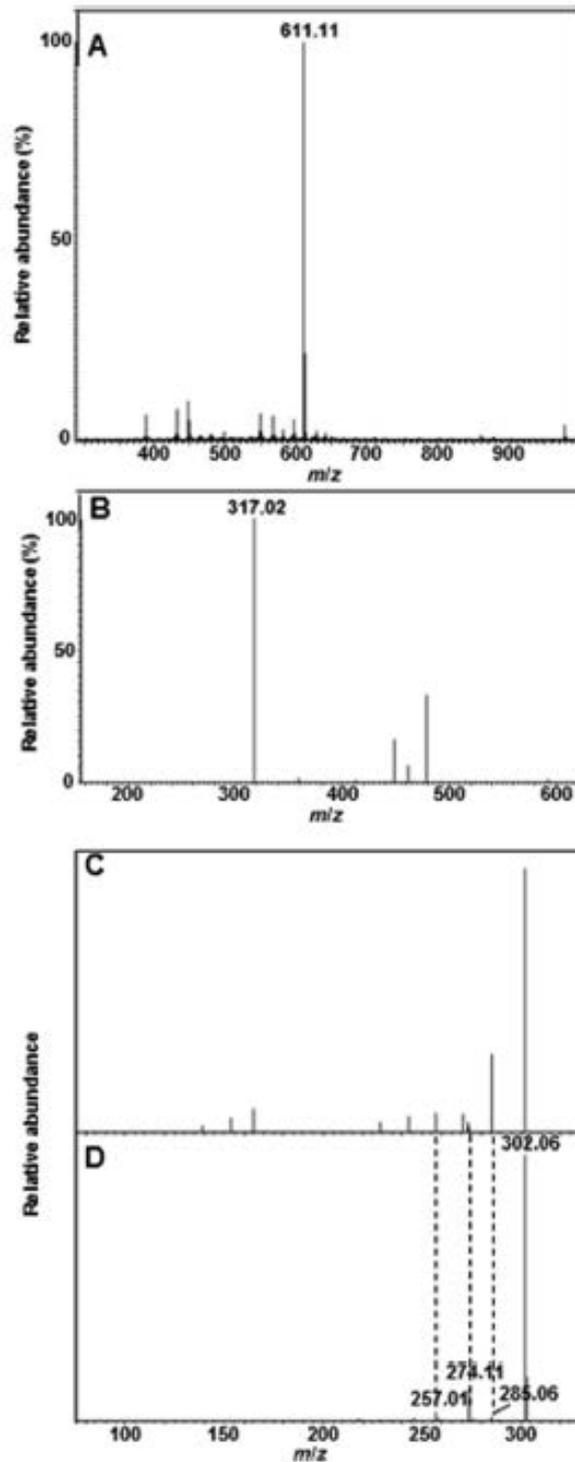


図6 ペクチニジンのESI-MS/MS スペクトルと比較した、F2のESI-CID-MS/MS/MS スペクトル  
 F2で検出されたイオン (m/z611、A) からCIDを使用して得られたプロダクトイオン (m/z317.02、  
 B) をCIDにかけ、Cに示すイオンを生成した。(D) ペクチニジンのESI-MS/MS スペクトル

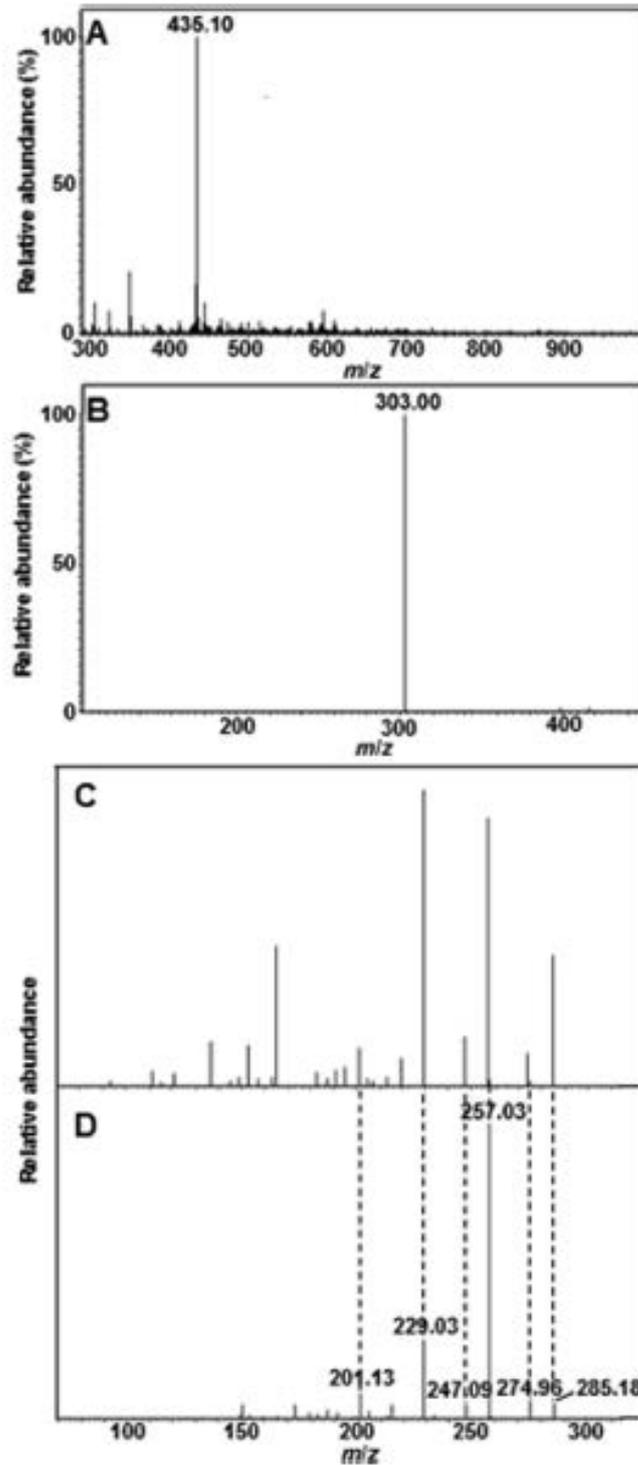


図 7 デルフィニジン 3-O-ガラクトシドの ESI-MS/MS/MS スペクトルと比較した、F1 成分の ESI-CID-MS/MS/MS スペクトル

F1 で検出されたイオン ( $m/z$  435、A) から CID を使用して得られたプロダクトイオン ( $m/z$  303.00、B) を CID にか、C に示すイオンを生成した (D) プロダクトイオン ( $m/z$  303) はデルフィニジン 3-O ガラクトシドイオンの CID により得られた

### 3.3. 阻害物質の糖組成

ピーク 8 および 10 に含まれる糖種を決定するために、これらのサンプルの酸加水分解を行い、遊離した糖を分析した。図 8 に示すように、ピーク 10 には、ヘキソース成分としてグルコースとガラクトースが含まれていた。グルコースの量は、ガラクトースの量の約 2 倍であった。ピーク 8 には、ほぼ同じ量のグルコースとガラクトースが含まれていた。ペントースに関しては、ピーク 8 と 10 の両方にアラビノースのみが含まれていた。

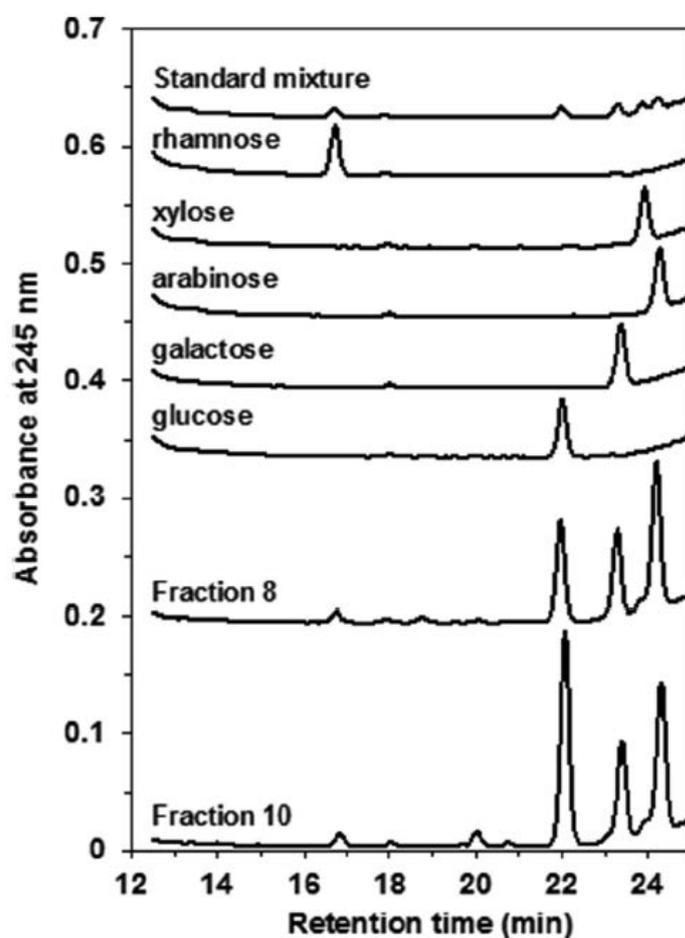


図 8 単糖標品の PMP 誘導体とピークフラクション 8 および 10 から遊離した糖の HPLC プロファイル

#### 4. 考察

本研究では、アロニアジュースが HMG-CoA 還元酵素活性を阻害することが分かった。以前の研究では、アロニアジュースの投与により、ヒトおよびマウスの血中 LDL コレステロール値が低下することが示された<sup>95,96</sup>。これらの結果および本研究の結果は、アロニアジュースの特定の化合物が HMG-CoA 還元酵素活性の阻害を介して高コレステロール血症を改善することを示している。画分 4-10 は、LC-MS 分析で質量 611 および 317-Da ポリフェノール部分の単一イオンを示した。Tian et al.によるベリー植物中のフェノール化合物の最近の包括的なプロファイリングは、アロニアベリーにイソラムネチンヘキサシド-ペントシドおよびイソラムネチン-ペントシド-ヘキサシドが存在することを明らかにした<sup>97</sup>。これらは、ESI で m/z が 611 の  $[M + H]^+$ イオンと、317 のプロトン化フラグメントイオンを生成する。しかし、図 3D に示すように、ピーク 10 の溶液は、イソラムネチンのわずかに黄色の色とは異なり、強いワインレッド色を示した。さらに、ペチュニジンで検出されたフラグメントイオンは、ピーク 10 でも検出された (図 6)。糖組成分析により、ピーク 10 にはヘキソース成分としてグルコースまたはガラクトースが含まれ、ペントースとしてアラビノースが含まれることが明らかになった (図 8)。したがって、ジュースから精製された HMG-CoA 還元酵素阻害物質 (図 3A のピーク 10) は、おそらくペチュニジン-グリコシド-アラビノシドであるが、阻害物質の正確な化学構造は不明である。ペチュニジン配糖体は、マメ科 (*Pueraria lobata*)<sup>98</sup> およびトマト (*Solanum lycopersicum*)<sup>99</sup> に含まれている。ペチュニジン配糖体を含む赤ブドウジュースは、HepG2 細胞の LDL 受容体活性を制御した<sup>100</sup>。画分 4-8 には多くの化合物が含まれており、それらのほとんどを特定できなかった。しかし、1つの化合物 (図 5) はデルフィニジン-アラビノシドであると推定された。デルフィニジン 3-O-アラビノシド

は、ブルーベリー (*Vaccinium ashei*) ワイン搾りかすに含まれている<sup>101</sup>。

結論として、アロニアジュースは、HMG-CoA 還元酵素活性を阻害し、画分の LC-ESI-MS / MS 分析は、HMG-CoA 還元酵素阻害物質としてのペチュニジン-グリコシド-アラビノシドおよびデルフィニジン-アラビノシドの存在を示した。アロニア果汁の HMG-CoA レダクターゼ阻害物質によるコレステロール低減効果のメカニズムは、今後の研究で肥満モデルを使用した検討が求められる。

## まとめ

本研究において、アロニア果汁中に DPP IV および HMG-CoA 還元酵素の阻害物質が含まれることが明らかとなり、その物質はそれぞれシアニジン 3,5-ジグルコシドおよびペチュニジン-グリコシド-アラビノシド、デルフィニジン-アラビノシドと同定された。これらの結果はアロニア果汁中の酵素阻害物質が活性阻害を介したインクレチンの分解抑制によるインスリン分泌促進あるいは肝臓中のコレステロール合成抑制にによる肝臓への LDL コレステロールの取り込み促進により血糖値上昇抑制および血中 LDL コレステロール濃度上昇抑制効果を引き起こす可能性を示唆している。

## 参考文献

1. Smith HH (1933) Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians. Bull Pub Museum City Milwaukee. 7:75.
2. Erichsen-Brown C (1989) Medicinal and Other Uses of North American Plants: A Historical Survey with Special Reference to the Eastern Indian Tribes. Courier Dover Publications, Mineola, NY, pp 162.
3. Jeppsson N (2000) The effect of cultivar and cracking on fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and hybrids between chokeberry and rowan (*Sorbus*). *Gartenbauwissenschaft* 65:93–98.
4. Jeppsson N (2000) The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking.' *Sci Hort Amsterdam* 83:127–137.
5. Hovmalm Persson HA, Jeppsson N, Bartish IV, Nybom H (2004) RAPD analysis of diploid and tetraploid populations of *Aronia* points to different reproductive strategies within the genus. *Hereditas* 141:301–312.
6. Scott RW, Skirvin RM (2007) Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Minchx.): a semi-edible fruit with no pests. *J Am Pomol Soc* 61:135–137.
7. Jaroniewski W (1998) *Aronia czarnoowocowa w lecznictwie i dietetyce*. *Wiad Zielar* 40:20.
8. Domarew CA, Holt RR, Goodman-Snitkoff G (2002) A study of Russian phytomedicine and commonly used herbal remedies. *J Herb Pharmacother* 2:31–48.
9. Sarwa A, Ciołkowska-Paluch G (1990) *Aronia czarnoowocowa*. *Wiad Zielar* 9:22–23.
10. Kaˆhkoˆnen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric*

Food Chem 47:3954–3962.

11. Zdunczyk Z, Frejnagel S, Wroblewska M, Jus'kiewicz J, Oszmian'ski J, Estrella I (2002) Biological activity of polyphenol extracts from different plant sources. Food Res Int 35:183–186.

12. Kong J, Chia L, Goh N, Chia T, Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64:923–933.

13. Wang L, Stoner GD (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Lett 269:281–290.

14. Hardin JW (1973) The enigmatic chokeberries (Aronia, Rosaceae). J Torrey Bot Club 100:178–184.

15. Rossell IM, Kesgen JM (2003) The distribution and fruiting of red and black chokeberry (*Aronia arbutifolia* and *Aronia melanocarpa*) in a Southern Appalachian fen. J Torrey Bot Soc 130:202–205.

16. Bridle P, Timberlake CF (1997) Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. Food Chem 58:103–109.

17. Kask K (1987) Large-fruited black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). Fruit Varieties J 41:47.

18. Niedworok J, Gostkowska E (1999) Włas'ciwos'ci farmakologiczne aronii czarnoowocowej. Wiad Zielar 5:6–7.

19. Tanaka T, Tanaka A (2001) Chemical components and characteristics of black chokeberry. J Jpn Soc Food Sci 48:606–610.

20. Balcerek M, Szopa JS (2002) Optimization of the technology of aronia spirit production—part 1: selection of the fermentation conditions [in German]. Dtsch Lebensm Rundsch 98:326–331.

21. McKay SA (2004) Demand increasing for Aronia and elderberry in North America. *N Y Berry News* 11:4–6.
22. Bermudez-Soto MJ, Tomas-Barberan FA (2004) Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *Eur Food Res Technol* 219:133–141.
23. Balcerek M, Szopa JS (2005) Optimization of the technology of aronia spirit production—part 2: influence of the fermentation conditions on the aroma compounds [in German]. *Dtsch Lebensm Rundsch* 101:16–19.
24. Gonzalez-Molina E, Moreno DA, Garcia-Viguera C (2008) Aronia-enriched lemon juice: a new highly antioxidant beverage. *J Agric Food Chem* 23:11327–11333.
25. Kasparaviciene G, Briedis V (2003) Stability and antioxidant activity of black currant and black Aronia berry juices [in Lithuanian]. *Medicina (Kaunas)* 39(Suppl 2):65–69.
26. Oszmian'ski J (2002) Stabilization and application of anthocyanin chokeberry dye to colouring of beverages [in Polish]. *Acta Sci Pol* 1:37–45.
27. Wolski T, Kalisz O, Prasał M, Rolski A (2007) Black chokeberry—Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot—the rich source of antioxidants[in Polish]. *Post Fitoter* 3:145–154.
28. Kmiecik W, Lisiewska Z, Jaworska G (2001) Effect of Aronia berry honey syrup used for sweetening jams on their quality. *Nahrung* 45:273–279.
29. Wojdyło A, Oszmian'ski J, Bober I (2008) The effect of addition of chokeberry, flowering quince fruits and rhubarb juice to strawberry jams on their polyphenol content, antioxidant activity and colour. *Eur Food Res Technol* 227:1043–1051.
30. Plocharski W, Zbroszczyk J, Lenartowicz W (1989) Aronia fruit(Aronia melanocarpa, Elliot) as a natural source of anthocyanin colourants. 2. The stability of the color of Aronia

juices and extracts. *Fruit Sci Rep (Skierniewice)* 16:41–50.

31. Niedworok J, Brzozowski F (2001) The investigation of a biological and phytotherapeutical properties of the *Aronia melanocarpa* E anthocyanins [in Polish]. *Post Fitoter* 1:20–24.

32. Oszmian'ski J, Wojdyło A (2005) *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol* 221:809–813.

33. Matilla P, Hellstrom J, Torronen R (2006) Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem* 54:7193–7199.

34. Weinges K, Schick H, Schilling G, Irngartinger H, Oeser T (1998) Composition of an anthocyan concentrate from *Aronia melanocarpa* Elliot—X-ray analysis of tetraacetyl parasorboside. *Eur J Org Chem* 1:189–192.

35. Kulling SE, Rawel HM (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—a review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 74:1625–1634.

36. Zlatanov MD (1999) Lipid composition of Bulgarian chokeberry, black currants and rose hip seed oil. *J Sci Food Agric* 79:1620–1624.

37. Ognik K, Rusinek E, Sembratowicz I, Truchlinski J (2006) Contents of heavy metals, nitrate (V), and nitrate (III) in fruits of elderberry and black chokeberry depending on harvest site and vegetation period [in Polish]. *Rocz Panstw Zakl Hig* 57:235–241.

38. Stralsjo L, Ahlin H, Witthoft CM, Jastrebova J (2003) Folate determination in Swedish berries by radioprotein-binding assay (RPBA) and high performance liquid chromatography (HPLC). *Eur Food Res Technol* 216:264–269.

39. Razungles A, Oszmian'ski J, Sapis JC (1989) Determination of carotenoids in fruit of *Rosa* sp. (*Rosa canina* and *Rosa rugosa*) and of chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *J Food Sci* 54:774–775.

40. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S (2004) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 52:7846–7856.
41. Oszmian'ski J, Sapis JC (1988) Anthocyanins in fruits of Aronia melanocarpa (chokeberry). *J Food Sci* 53:1241–1242.
42. Strigl AW, Leitner E, Pfannhauser W (1995) Qualitative und quantitative analyse der anthocyane in schwarzen apfelbeeren (Aronia melanocarpa Michx. Ell.) mittels TLC, HPLC und UV=VISspektometric. *Z Lebensm Unters Forsch* 201:266–268.
43. Zheng W, Wang SY (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *J Agric Food Chem* 51:502–509.
44. Nakajima J, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K (2004) LC=PDA=ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J Biomed Botecnol* 5:241–247.
45. Jakobek L, Šeruga M, Medvidovic'-Kosanovic' M, Novak I (2007) Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Dtsch Lebensm Rundsch* 103:58–64.
46. Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH (2005) Flavonoids from black chokeberries, Aronia melanocarpa. *J Food Compos Anal* 18:61–68.
47. Heinonen M (2007) Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Mol Nutr Food Res* 51:684–691.
48. Graversen HB (2008) Antioxidant synergism between fruit juice and a-tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (Aronia melanocarpa) and high ascorbic blackcurrant (Ribes nigrum). *Eur Food Res Technol* 226:737–743.

49. Jurgon'ski A, Jus'kiewicz J, Zdun'czyk Z (2008) Ingestion of black chokeberry fruit extracts leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant Food Hum Nutr* 4:176–182.
50. Frejnagel SS, Zdun'czyk Z (2008) Chokeberry polyphenols reduce prooxidative influence of oxidized fats in rat diets. *Pol J Vet Sci* 11:125–132.
51. Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Galunska B, Chervenkov T, Gerova D, Ivanova D (2006) Influence of *Aronia melanocarpa* fruit juice on the process of lipid peroxidation in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Ovidius Univ Ann Med Sci Pharm* 4:1–11.
52. Kowalczyk E, Fijałkowski P, Kura M, Krzesin'ski P, Błaszczuk J, Kowalski J, S' migielski J, Rutkowski M, Kopff M (2005) The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolaemia [in Polish]. *Pol Merkur Lekarski* 19:651–653.
53. Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A (2006) Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)* 48:11–17.
54. Kowalczyk E, Kopff A, Niedworok J, Kopff M, Jankowski A (2002) Anthocyanins—an adjunct to cardiovascular therapy? *Kard Pol* 57:332–336.
55. Bagchi D, Roy S, Patel V, He G, Khanna S, Ojha N, Phillips C, Ghosh S, Bagchi M, Sen CK (2006) Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Mol Cell Biochem* 281:197–209.
56. Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res* 51:675–683.
57. E.S. Kulling, M.H. Rawel (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - a review on

- the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* 74:1625e1634.
58. M. Badescu, O. Badulescu, L. Badescu, M. Ciocoiu (2015) Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. *Pharm. Biol* 53:533e539.
59. S. Valcheva-Kuzmanova, K. Kuzmanov, S. Tancheva, A. Belcheva (2007) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol* 29:101e105.
60. I. Ohkubo, K. Huang, Y. Ochiai, M. Takagaki, K. Kani (1994) Dipeptidyl peptidase IV from porcine seminal plasma: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence, *J. Biochem* 116:1182e1186.
61. T.J. Kieffer, C.H.S. McIntosh, R.A. Pederson (1995) Degradation of glucosedependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136:3585e3596.
62. L. Pridal, C.F. Deacon, O. Kirk, J.V. Christensen, R.D. Carr, J.J. Holst (1996) Glucagonlike peptide-1(7-37) has a larger volume of distribution than glucagon-like peptide-1(7-36) amide in dogs and is degraded more quickly in vitro by dog plasma. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet* 21:51e59.
63. R. Mentlein (1999) Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)erole in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept* 85:9e24.
64. L.L. Baggio, D.J. Drucker, *Biology of incretins* (2007) GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131e2157.
65. J. Zhong, Q. Gong, A. Goud, S. Srinivasamaharaj, S. Rajagopalan (2015) Recent advances in dipeptidyl-peptidase-4 inhibition therapy: lessons from the bench and clinical trials. *J. Diabetes Res.* 606031.

66. J.L. Ríos, F. Francini, G.R. Schinella (2015) Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Planta Med.* 1.
67. K. Schütz, M. Persike, R. Carle, A. Schieber (2006) Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC/DAD-ESI-MS<sup>n</sup>, *Anal. Bioanal. Chem.* 384:1511e1517.
68. J.Y. Choi, S.J. Lee, S.J. Lee, S. Park, J.H. Lee, J.H. Shim, A.M. Abd El-Aty, J.S. Jin, E.D. Jeong, W.S. Lee, S.C. Shin (2010) Analysis and tentative structure elucidation of new anthocyanins in fruit peel of *Vitis coignetiae* Pulliat (meoru) using LC-MS/MS: contribution to the overall antioxidant activity. *J. Sep. Sci.* 33:1192e1197.
69. J.S. Barnes, K.A. Schug (2011) Structural characterization of cyaniding-3,5-diglucoside and pelargonidin-3,5-diglucoside anthocyanins: multidimensional fragmentation pathways using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 308:71e80.
70. S. Cernea, I. Raz (2011) Therapy in the early stage: incretins. *Diabetes Care* 34:S264eS271.
71. J. Kosaraju, A. Dubala, S. Chinni, R.B. Khatwal, M.N. Satish Kumar, D. Basavan (2014) A molecular connection of *Pterocarpus marsupium*, *Eugenia jambolana* and *Gymnema sylvestre* with dipeptidyl peptidase-4 in the treatment of diabetes. *Pharm. Biol.* 52:268e271.
72. S. Saleem, L. Jafri, I.U. Haq, L. Chee Chang, D. Calderwood, B.D. Green, B. Mirza, (2014) Plants *Fagonia cretica* L. and *Hedera nepalensis* K. Koch contain natural compounds with potent dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity, *J. Ethnopharmacol.* 1156:26e36.
73. J. Fan, M.H. Johnson, M.A. Lila, G. Yousef, E.G. de Mejia (2013) Berry and citrus

phenolic compounds inhibit dipeptidyl peptidase IV: implications in diabete management, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013:479505.

74. R. Fontoura, D.J. Daroit, A.P. Correa, S.M. Meira, M. Mosquera, A. Brandelli (2014) Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proc. Nutr. Soc.* 73:34e46.

75. W. Zheng, S.Y. Wang (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries, *J. Agric. Food Chem.* 51:502e509.

76. X. Wu, L. Gu, R.L. Prior, S. McKay (2004) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 52:7846e7856.

77. N. Ryszawa, A. Kawczynska-Drozd, J. Pryjma, M. Czesnikiewicz-Guzik, T. Adamek-Guzik, M. Naruszewicz, R. Korbut, T.J. Guzik. (2006) Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *J. Physiol. Pharmacol.* 57:611e626.

78. A. Jurgonski, J. Juskiwicz, Z. Zdunczyk (2008) Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia, *Plant Foods Hum. Nutr.* 63:176e182.

79. M. Brčunlich, R. Slimestad, H. Wangensteen, C. Brede, K.E. Malterud, H. Barsett, (2013) Extracts, anthocyanins and procyanidins from Aronia melanocarpa as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* 5:663e678.

80. D. Rugina, Z. Diaconeasa, C. Coman, A. Bunea, C. Socaciu, A. Pintea, (2015) Chokeberry anthocyanin extract as pancreatic b-cell protectors in two models of induced oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015:429075.

81. Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M., & Novak, I. (2007) Antioxidant activity and polyphenols of aronia in comparison to other berry species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72:301–306.
82. Yamane, T., Kozuka, M., Konda, D., Nakano, Y., Nakagaki, T., Ohkubo, I., et al. (2016). Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 31:106–112.
83. Valcheva-Kuzmanova, S., Kuzmanov, K., Mihova, V., Krasnaliev, I., Borisova, P., & Belcheva, A. (2007) Antihyperlipidemic effect of Aronia melanocarpa fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods for Human Nutrition* 62:19–24.
84. Duchnowicz, P., Nowicka, A., Koter-Michalak, M., & Broncel, M. (2012) In vivo influence of extract from Aronia melanocarpa on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Medical Science Monitor* 18:CR569–574.
85. Lu, H., & Daugherty, A. (2015) Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35:485–491.
86. Ryszawa, N., Kawczyńska-Drózd, A., Pryjma, J., Czesnikiewicz-Guzik, M., AdamekGuzik, T., Naruszewicz, M., et al. (2006) Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *Journal of Physiology & Pharmacology* 57:611–626.
87. Nicolau, G., Shefer, S., Salen, G., & Mosbach, E. H. (1974) Determination of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity in man. *The Journal of Lipid Research* 15:94–98.
88. Endo, A. (1988) Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klinische Wochenschrift* 66:421–427.

89. Ramachandran, V., Saravanan, R., & Senthilraja, P. (2014) Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of asiatic acid in diabetic rats, role of HMG CoA: In vivo and in silico approaches. *Phytomedicine* 21:225–232.
90. Iqbal, D., Khan, M. S., Khan, M. S., Ahmad, S., Hussain, M. S., & Ali, M. (2015) Bioactivity guided fractionation and hypolipidemic property of a novel HMG-CoA reductase inhibitor from *Ficus virens* Ait. *Lipids in Health and Disease* 14, 15.
91. Navarro-González, I., Pérez-Sánchez, H., Martín-Pozuelo, G., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2014) The inhibitory effects of bioactive compounds of tomato juice binding to hepatic HMGCR: In vivo study and molecular modelling. *PloS One* 9:e83968.
92. Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Spina, M., Tran, C. N., Falconi, M., Eleuteri, A. M., et al. (2011) Epigallocatechin-3-gallate potently inhibits the in vitro activity of hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase. *The Journal of Lipid Research* 52:897–907.
93. Ressaissi, A., Attia, N., Falé, P. L., Pacheco, R., Victor, B. L., Machuqueiro, M., et al. (2017) Isorhamnetin derivatives and piscidic acid for hypercholesterolemia: Cholesterol permeability, HMG-CoA reductase inhibition, and docking studies. *Archives of Pharmacal Research* 40:1278–1286.
94. Liu, J., Zhou, L., He, Z., Gao, N., Shang, F., Xu, J., et al. (2018) Structural analysis and biological activity of a highly regular glycosaminoglycan from *Achatina fulica*. *Carbohydrate Polymers* 181:433–441.
95. Xie, L., Vance, T., Kim, B., Lee, S. G., Caceres, C., Wang, Y., et al. (2017) Aronia berry polyphenol consumption reduces plasma total and low-density lipoprotein cholesterol in former smokers without lowering biomarkers of inflammation and oxidative stress: A randomized controlled trial. *Nutrition Research* 37:67–77.
96. Yamane, T., Kozuka, M., Yamamoto, Y., Nakano, Y., Nakagaki, T., Ohkubo, I., et al.

- (2016) Effectiveness of aronia berries for reduction of mild fibrosis and gene expression analysis in livers from mice fed a high-fat diet with aronia berries. *Funct Food Health Dis* 6:144–157.
97. Tian, Y. Liimatainen, J., Alanne, A. L., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., Kallio, H., & Yang, B. (2017) Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry* 220:266–281.
98. Tatsuzawa, F., Tanikawa, N., & Nakayama, M. (2017) Red-purple flower color and delphinidin-type pigments in the flowers of *Pueraria lobata* (Leguminosae). *Phytochemistry* 137:52–56.
99. Ooe, E., Ogawa, K., Horiuchi, T., Tada, H., Murase, H., Tsuruma, K., et al. (2016) Analysis and characterization of anthocyanins and carotenoids in Japanese blue tomato. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 80:341–349.
100. Dávalos, A., Fernández-Hernando, C., Cerrato, F., Martínez-Botas, J., Gómez-Coronado, D., Gómez-Cordovés, C., et al. (2006) Red grape juice polyphenols alter cholesterol homeostasis and increase LDL-receptor activity in human cells in vitro. *Journal of Nutrition* 136:1766–1773.
101. He, B., Zhang, L.-L., Yue, X.-Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.-L., et al. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry* 204:70–76.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くの方々にご支援いただきました。特に、貴重なご指導とご助言を賜りました、大阪府立大学地域保健学域総合リハビリテーション研究科乾博先生、竹中重雄先生、神谷重樹先生、また市立三笠総合病院の大久保岩男先生、琉球大学理学部の石田哲夫先生に深く感謝申し上げます。また、実験の実施からデータまとめ、論文執筆に当たり、適切な助言を賜り、終始懇切丁寧に指導くださった大阪府立大学生命環境科学研究科山根拓也先生に深く謝意を表します。本当にありがとうございました。