

# 食用菊抽出物の神経栄養因子様作用

若生 豊\*

## 要 約

フラボノイドおよびその配糖体は、様々な食品に含まれるファイトケミカルの代表である。フラボノイドには、消炎作用や抗アレルギー作用、抗腫瘍活性など多くの生理活性が知られているが、近年、抑うつに対する改善作用を示す可能性が示唆されている。ある種のフラボノイドには酸化ストレスによる神経細胞の傷害を防ぐ、神経栄養因子様作用を示すことが明らかにされ、菊花成分（延命楽品種）から単離された acacetin, luteolin などのフラボノイドにも活性が認められている。本研究では、阿房宮品種の成分について神経栄養因子様作用を検討する目的から、キク花弁メタノール抽出物のポリフェノール組成について HPLC 分析、UV スペクトルの検討を行い、さらに in vitro における PC12 細胞を用いた MAPK のリン酸化、神経突起伸長の観察を行なった。

キーワード：食用菊，フラボノイド，抗うつ作用，神経栄養因子

## Extract from Edible Chrysanthemum Flowers Induces Neurite Outgrowth and Erk1/2 phosphorylation in PC12 Cells

Yutaka WAKO \*

### ABSTRACT

Emerging evidence suggests that dietary phytochemicals, in particular flavonoids, may exert beneficial effects in the central nervous system by protecting neurons against stress-induced injury, by neurotrophic action. Recently Nishina showed that flavonoids isolate from methanol extracts of chrysanthemum petals induced phosphorylation of ERK1/2, and neurite outgrowth in PC12 Cells. The active flavonoids compounds in the extract has been estimated with 5,7,3',5'-tetrahydroxy flavanone, luteolin, and acacetin. In this study, we investigated that the potential neurotrophic action of methanol extracts from chrysanthemum petals of "Abohkyu".

**Keywords** : *edible chrysanthemum flower, anti-depression, flavonoid, neurotrophic factor*

## 1. 緒言

ストレス社会、高齢化、さらには近年頻発する大震災などが背景となり、各種の精神的な疾患が増えている。中でも、うつ病の占める割合は高く、このような疾患の増加は社会的に大きな問題となっている。抗うつ薬は選択性の高い薬物が開発され、治療が進展しているが副作用も存在する。一方、代替医療として古くより伝承的に支持されてきた薬や食品が存在するが、これらは一般に、複数の成分がその効果を形成しており作用機構は十分解明されていない。薬は治療対象の標的に特異的に作用するが、生薬などでは作用が病気発症の環境要因改善も含む場合があり、もう一方の治療アプローチとして検討価値のあるテーマと考えられる。

青森県の東南部の地域では古くより食用菊（阿房宮品種）の栽培が盛んである。一般にキク花卉は食用に供されるほか、“菊花”として漢方薬としても利用される。菊花は古くから種々の文献に記載があり、その薬能としては解熱や解毒、鎮痛、消炎作用などがあるとされ、風邪、発熱、頭痛に応用されてきた<sup>1)</sup>。含有成分としては、精油、セスキテルペン、フラボノイドおよびその配糖体が知られている。その他、菊花には抗病原体作用<sup>1)</sup>、抗アレルギー作用<sup>2)</sup>や抗腫瘍活性<sup>3)</sup>などが報告されている。近年、仁科等は菊花成分（延命薬品種）の抗うつ作用を検討し、ルテオリンなど数種のフラボノイドが抗うつ作用を有する可能性を示唆している。今日、抗うつ薬は選択的セロトニン取り込み阻害剤など脳内アミンをコントロールする薬剤が主流となっているが、うつ症の発症機構については脳内モノアミン仮説だけではなく、酸化ストレスなどによる神経細胞新生や機能分化の抑制が重要な要因<sup>4)</sup>となっていることが理解されるようになってきた。成体の脳では新たに神経細胞は作られないと思われていたが、少なくとも海馬歯状回の特定領域では、成体の脳でも神経新生が起こることが近年明らかにされ、継続的な神経新生により脳機能が維持されていると考えられるようになってきている。以上の知見より神経細胞保護効果に着目した抗うつ活性成分の検索がなされている。試験管内における神経細胞の機能分化の検討はPC12細胞が利用されている。PC12細胞は神経冠から発生した副腎髄質褐色細胞様の細胞が、がん化し株細胞として樹立されたものであり、細胞膜上に神経成長因子（NGF）受容体（TrkA）を発現している。培地にNGFを添加すると、増殖を停止し、神経突起を伸長し、交感神経様細胞に分化することから、分化シグナルや生存シグナルの解析に広く使用されている。また、樹状突起伸長の誘導はマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）を介するシグナル伝達系により引き起こされることが明らかにされており、MAPK活性化は神経細胞機能分化の指標として評価することが可能である。仁科等<sup>5)</sup>は延命薬より得られたメタノール抽出物およびこれより単離した

acacetin, luteolinが、神経PC12細胞で神経突起を伸長し、細胞内シグナル伝達路のMAPKカスケードを活性化することを観察し、延命薬の成分に抗うつ効果のある可能性を示唆している。

本研究では、阿房宮品種のキク花卉メタノール抽出物についてHPLC分析やUVスペクトルの検討を行い、さらにin vitroにおけるPC12細胞を用いたMAPKのリン酸化、神経突起伸長の観察を行ない、阿房宮品種の成分の神経栄養因子様作用について検討を行った。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 材料

食用キクの阿房宮および延命薬は市販のものを購入し使用した。PC12細胞はDS Pharma Bio-medical(Ohsaka, Japan)より購入した。牛胎仔血清(FBS)および培養液(Dulbecco's modified Eagle's medium ;DMEM)はGibco(Grand Island, NY)より購入した。細胞溶解試薬(RIPA Buffer)、一次抗体(Anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase; ERK-1/2)、二次抗体(Anti-rabbit IgG, AP-linked Antibody)はCell Signaling Technology(Beverly, MA)より購入した。タンパク質定量キット(BCA protein assay kit)はPierce(Lockford, IL)より購入した。抗酸化能測定試薬(SOD Assay Kit-WST)はDojindo(Tabaru, Japan)より購入した。神経成長因子(mouse NGF 2.5S; Grade2)はalomone labs(Jerusalem, Israel)より購入した。

### 2.2 試料の調製とポリフェノール定量

食用キクの阿房宮および延命薬を真空乾燥し、粉碎試料を10容の80%メタノールで加熱抽出し上清を減圧濃縮した。抽出液の乾燥重量を測定し、重量濃度10mg/mlとなるように濃度調整し、分注して使用時まで-80℃で保存した。また、濃度調整した抽出液のポリフェノール含有量をフォリン-デニス法によりルテオリンを標準物質に用い比色定量した。

### 2.3 HPLCによるポリフェノールの分析

HPLC(高速液体クロマトグラフィー)は島津製作所のLC-10を用いた。カラムはODS樹脂のMightosyl RP-18(4.6×250mm, Cica)を用い、流速は0.7 ml/minとした。溶出条件は、メタノール可溶性画分では、0.2%ギ酸を含む水(A液)およびメタノール:アセトニトリル:水混合液(B液)により、最初の30分間はB液濃度を28%に保持して溶出を行なった後、B液濃度を10分間で28%から70%まで上昇させ濃度勾配溶出を行なった。検出は波長220nm~360nm間の紫外吸収をフォトダイオードアレイ検出器(島津製作所)により測定し、各ピークのUVスペクトルを観察した。

## 2.4 スーパーオキシドラジカル消去活性

市販のキット (SOD Assay Kit-WST) を利用し NBT 法のホルマザンを WST-1 ホルマザンに置き換えた改良法に従った。キサンチン - キサンチンオキシダーゼをスーパーオキシド生成系とし, WST-1 ホルマザンのスーパーオキシドによる還元反応で生じる発色を測定した。消去活性 (阻害活率) は, スーパーオキシド生成系に試料を加えた群 (sample), スーパーオキシド生成系のみからなる群 (blank1), キサンチンと試料からなる群 (blank2), キサンチンのみからなる群 (blank3) の各反応系の吸光度測定結果より, 次に示す式に従い求めた。試料は 80% エタノール溶液に溶解し調製した。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

## 2.5 細胞培養と神経栄養因子様作用の検討

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いた。D-MEM に 10% ウマ血清, 5% ウシ血清, 抗生物質 (penicillin / streptomycin) を加えたものを培養液とし, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。p-Erk1/2 活性化の検討および, 樹上突起伸長の観察は次に示す培養操作により行なった。PC12 細胞を  $5 \times 10^4 \sim 10^5$  cells/ml の密度で collagen type IV でコートした 6 穴プレートに播種し, 24 ~ 48h 前培養を行った。その後, 細胞を血清の不足する環境下 (DMEM supplemented with 1% horse serum) で 16 ~ 18 時間培養した。80% エタノール溶液で所定濃度に調製した供試試料, および陽性対照に用いた NGF (50  $\mu$ g/ml) を 30 分間作用させた後, 反応を停止し細胞を回収し p-Erk1/2 の測定に供した。樹上突起伸長の観察では 48 ~ 72h 培養し, 位相差顕微鏡 (phase-contrast microscopy (DP72; Olympus Corp., Tokyo, Japan)) により神経突起の観察を行なった。

## 2.6 ウエスタンブロッティング

細胞は氷冷の溶解液 (RIPA Buffer; 0.2 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む) により溶解した。細胞溶解液を 13,750g で 4°C, 30 分間遠心分離し, その上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液のタンパク質含量は市販のキット (BCA protein assay kit, BioRad) を用い, クーマジーブリリアントブルー染色し 595nm の吸光度を測定し行なった。各試料のタンパク質含量が等しくなるように調製し, p-Erk1/2 の分析に供した。細胞抽出液を 12% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後, PVDF 膜に転写した。転写膜をブロッキング液 (Easy block, Ato) に浸し室温で 1 時間振盪してブロックした。1 次抗体 (antiphosphorylated (activated) ERK1/2 anti-bodies) を免疫反応促進緩衝液 (Can get signal solution 1) で

1/2,000 に希釈し, 転写膜を 4°C で一晩インキュベートした後 TBS-T で洗浄 (10 分間振盪, 3 回) した。二次抗体 (Anti-rabbit IgG, AP-linked Anti-body) を免疫反応促進緩衝液 (Can get signal solution 2) で 1/2,000 に希釈し室温で 1 時間静かに振とうした後 TBS-T で洗浄 (10 分間振盪, 3 回) した。発色は転写膜を AP バッファー (1-step NBT/BCIP, Thermo) に浸しその中で行い, 反応時間は発色の程度を目視により決定した。

## 3. 実験結果

### 3.1 食用キクポリフェノールの種間比較

本研究では食用キクの生理機能に関して, 阿房宮および延命薬の二つの品種の比較を行なうことを目的としており, 初めにこれらのポリフェノールの構成成分について検討を行なった。フォリン-デニス法によりルテオリンを標準試料として測定したキク花卉メタノール抽出物に含まれるポリフェノール量は, 阿房宮および延命薬でそれぞれ乾燥重量 1g 当たり 1.57mg および 2.95mg であり, 阿房宮の方が延命薬と比較し約 1.9 倍含有比率が高いことが示された。

次に, HPLC を用い食用キク花卉メタノール抽出物の分析を行い, フォトダイオードアレイ検出器により各分離ピークの波長 220nm ~ 360nm 間の UV スペクトルを観察した。標準試薬の Chlorogenic acid, Apigenin, Luteolin, および Apigenin 7-O- (6''O-malonyl)-glucoside のスペクトルと比較することにより成分の検討を行った。阿房宮および延命薬より得られた抽出物の 350nm で観察されたクロマトグラムを図 1 に示す。また, エリア面積の大きいピークへ流出順に①~⑤の番号を付し, それぞれのピークのスペクトルを図 2 へ示した。阿房宮のクロマトグラムのピーク①は, 保持時間およびスペクトルが以前の検討において質量分析と核磁気共鳴の解析<sup>6) 7)</sup>より推定した 3,5 di-O-caffeoyl quinic acid と一致していることより, 以前推定した化合物と同一化合物であると判断した。ピーク③は, 保持時間およびスペクトルが標準試料の Apigenin 7-O- (6''O-malonyl)-glucoside と一致していることより, 標準試料と同一化合物であると推定した。ピーク⑤は Apigenin と類似したスペクトルを示しているが化合物の推定には至っていない。一方, 延命薬のピーク④は保持時間およびスペクトルが, 標準試料の Luteolin と一致していることより Luteolin であることが強く示唆された。ピーク②は Luteolin と類似したスペクトルを示しているが化合物の推定には至っていない。阿房宮および延命薬抽出物に含まれるポリフェノール類について, クロマトグラムのピークの保持時間より比較すると多くの成分の保持時間はほぼ一致していることから, 共通する成分が多く組成の質的差異は少ないことが示唆されるが, ピークエリアは異なり, 番号を付した特にピークエリアの大きい成

分は一方でのみ際立ったエリアを示しており、量的に大きく異なる特徴的なそれぞれの組成を構成していることが示された。また、多くのピークはフラボノイドの標準物質のスペクトルと類似のスペクトルを示しているが、阿房宮では顕著なピークエリアを示す 3,5 di-O-caffeoyl quinic acid と推定されるクロロゲン酸類のピークが観察された。

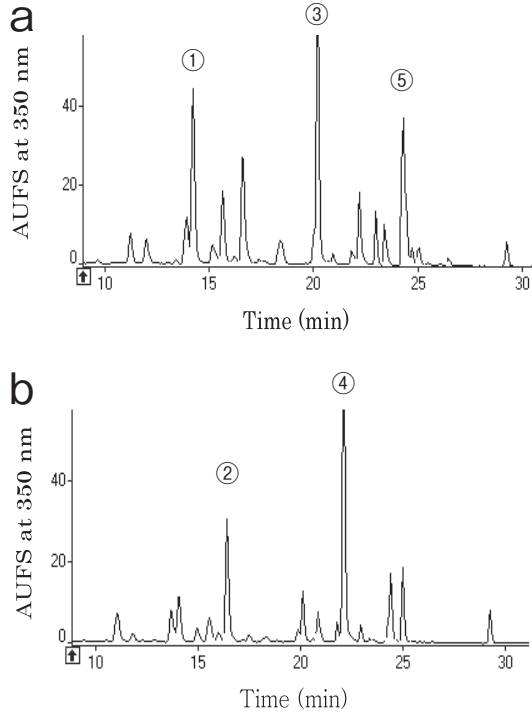


Fig.1 HPLC chromatogram of flavonoids in mhtanol extracts from chrysanthemum petals of "Abohkyu" (a) and "Mottenohoka" (b).  
 ① 3,5 di-O-caffeoyl quinic acid, ② unidentification, ③ Apigenin 7-o-(6"O-malonyl)-glucoside, ④ Luteolin, ⑤ unidentficotion

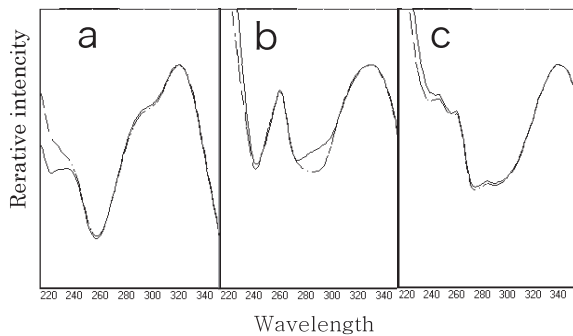


Fig.2 UV spectra of standards (chlorogenic acid, apigenin, luteorin), and the coeluteing lesion peaks (①, ③ and ④) were collected during HPLC analyses using diode array detector. Standards indicated by the solid line ; chlirigenic acid (a), apigenin (b) and luteorin (c). Coeluteing lesion peak indicated by the dashed line ; ① (a), ③ (b) and ④ (c).

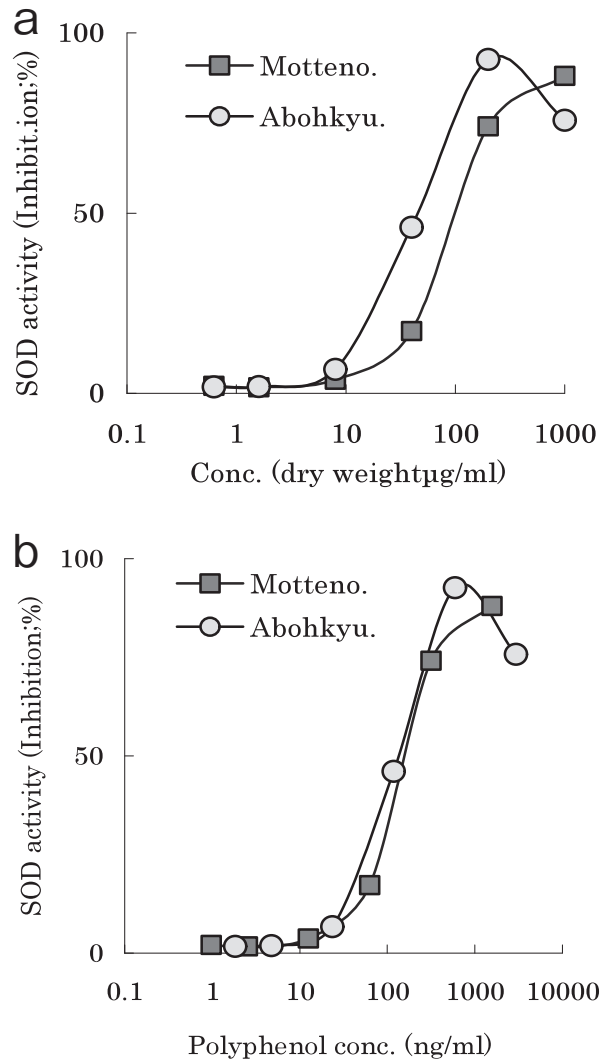


Fig.3 Comparison of superoxide radical scavengnig activity between extracts of chrysanthemum petals from abohkyu and Mottenohoka. Antioxidetive activity was showed agains for the extracts of dry weight (a) and polyphenol content (b).

### 3.2 食用キク抽出物の抗酸化活性

神経栄養因子様作用の発現には、抗酸化活性や抗炎症効果が関与すると考えられていることから、キク花卉メタノール抽出物についてスーパーオキシドラジカル消去活性（ラジカル産生阻害率）の測定を行なった。阿房宮および延命楽より得られた抽出物のラジカル産生阻害率を反応液 1ml 当たり 320ng ~ 1mg の濃度範囲で測定し、その結果を重量濃度（図 3.a）とポリフェノール量に換算した値（図 3.b）に従って示した。活性（阻害率）はいずれも 8 μg/ml 以上の濃度で現れ、200 μg/ml 程度迄の濃度範囲で増大した。なお、阿房宮の 1mg/ml で活性が減少するのは、試料の色素が反応の発色測定に誤差を与えた結果である。重量濃度当たりの比較では、阿房宮の方が延命楽に比較して高い値を示したが、ポリフェノール量換算量に対する活性は両者で差は認められ

ず、両者のポリフェノール組成の構成比率の違いによる抗酸化活性に違いは無いことが示された。

### 3.3 食用キク抽出物による MAPK 活性化

今日、脳機能の維持においては、継続的な神経新生や機能分化が必要と理解されている。樹状突起伸張は神経細胞の分化を示す現象であり、この現象の発現には MAPK の活性化が必須であることが明らかにされている。従って、本研究では食用キクの神経栄養因子様作用を検討する目的から、PC12 細胞における樹状突起伸張を観察すると共に MAPK の活性化作用の検討を行なった。

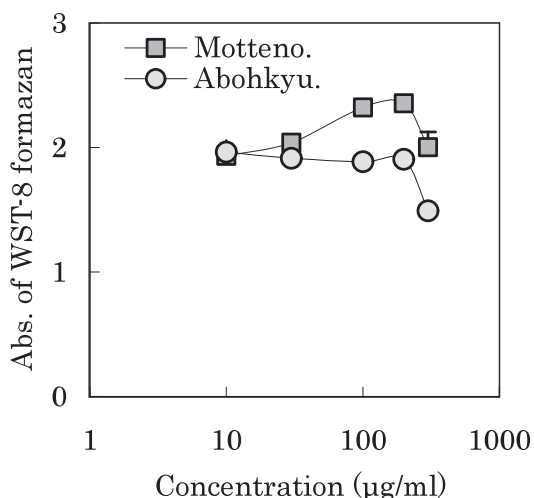


Fig.4 Cytotoxicity of the extract of chrysanthemum petal extract against for PC 12 cell.  $10^5$  cells / ml of PC 12 was cultured for 24 h with extracts of chrysanthemum petals from Abohkyu and Mottenohoka. Cell density was evaluated by the method described in experimental method.

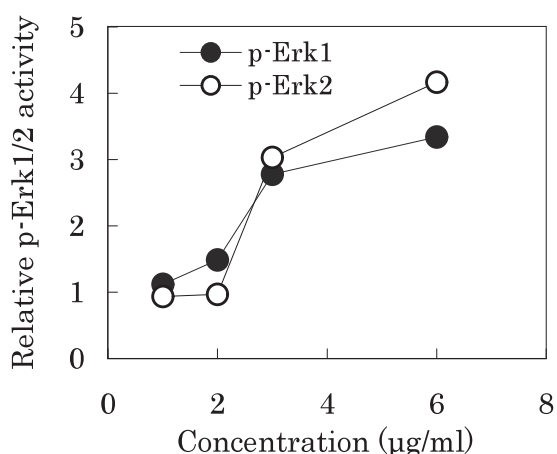


Fig.5 Activation of p-Erk1/2 in PC 12 cell as a function of luteolin concentration. Relative kinase activity was calculated by normalizing kinase activity from stimulated cells to the untreated control cells. The detailed experimental conditions were described in experimental method.

はじめに PC12 細胞をキク抽出物で刺激する際、実験が成立する濃度範囲を明らかにする目的で食用キク抽出物の PC12 細胞に対する細胞毒性を検討した。PC12 細胞をキク抽出物を 300µg/ml の濃度まで段階的に変化させて調製した培養液で 24h 培養したときの cell viability の結果を図 4 に示した。阿房宮および延命楽共に 200µg/ml の濃度までは非添加の対照と比べ cell viability が

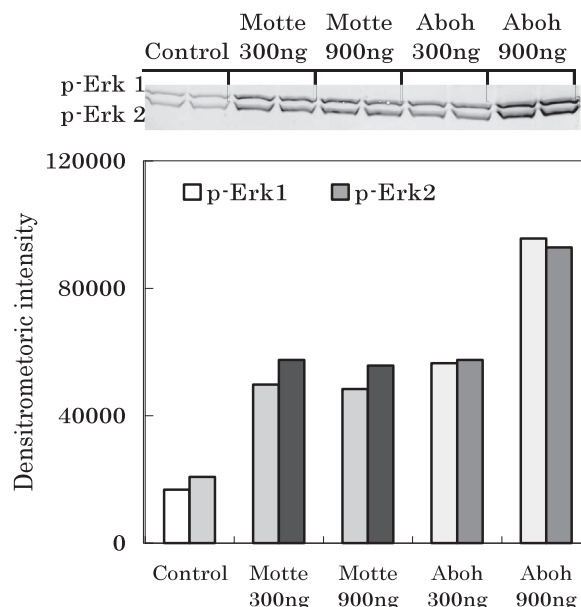


Fig.6 Activation of p-Erk1/2 stimulated with extract of chrysanthemum petal from Abohkyu and Mottenohoka. Serum-starved PC12 cells were stimulated with extract from chrysanthemum petal at indicated concentration. Phosphorylated levels of ERK1/2 were detected with specific antibodies using western blot analysis as described in Methods. The graph represents the quantification results from analysis of densitometric intensity.

Data represent the mean of two individual experimental method.

低下することは無く、この範囲では細胞の成長にほとんど影響はないことが示された。300µg/ml の濃度では 200µg/ml の濃度の cell viability より顕著な低下が認められ細胞の活動に影響の現れていることが示された。

今回、MAPK の活性化の検討には、シグナル伝達路のひとつの経路の構成酵素である Erk1/2 を取り上げ、この酵素のリン酸化を分析することにより行った。試料で PC12 細胞を 30 分間刺激し、リン酸化された Erk1/2 (p-Erk1/2) をウエスタンブロッティングにより転写膜上に分離し、2次抗体のアルカリフォスファターゼと NBT/BCIP の反応により発色した結果を図 6 の上へ示した。発色したシグナルをデジタルカメラで取り込み、画像解析システム (EDAS 290, Kodak) により Erk1/2 のリン酸化を数値化し評価した。

リン酸化の相対強度は試料を添加していない群と試料添加群の結果の比率で表し、表 1 に示した。陽性対象として NGF (50ng/ml) を用いた。NGF の刺激により

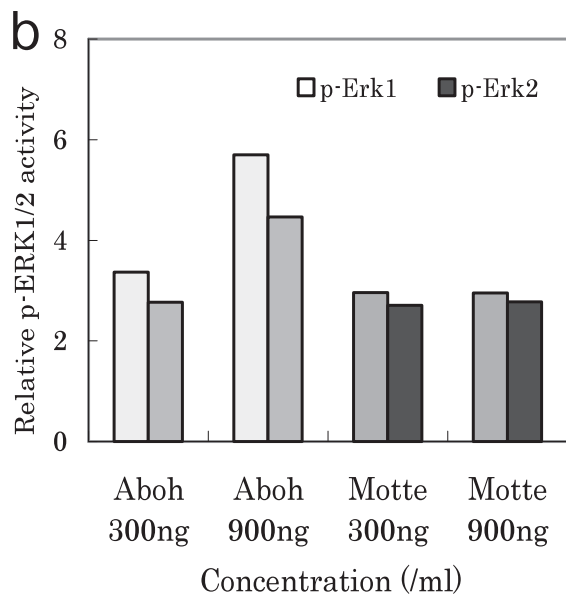
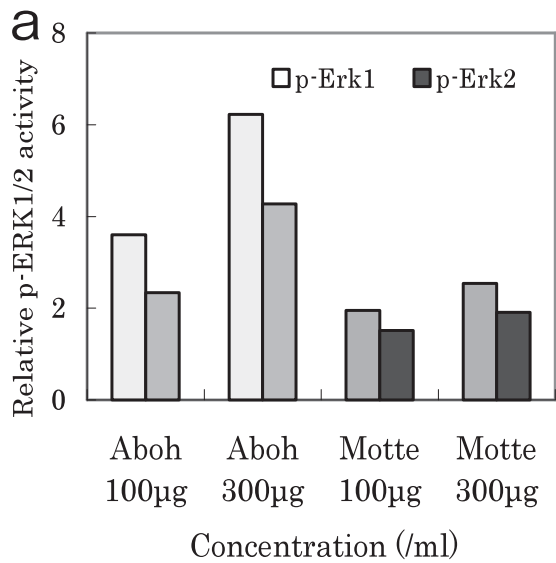


Fig.7 Activation of p-Erk1/2 stimulated with extract of chrysanthemum petal from Abohkyu and Mottenohoka. Relative p-ERK1/2 activity was showed agains for the extracts of dry weight (a) and polyphenol content(b).

約8倍リン酸化が促進されることが確認された(表1)。さらにリン酸化の促進が知られている luteolin を 1µg/ml ~ 6µg/ml の濃度で刺激した結果(図4), p-Erk1/2 のリン酸化は luteolin の濃度が増加するのに従い大きくなること示され, ウェスタンブロッティングのシグナル強度には定量性は無いとされるものの, 定性的な強度の変化を観察する事が可能であることが示された。

阿房宮種および延命楽種の抽出物で刺激した際の Erk1/2 のリン酸化の結果を図6に示した。いずれも無添加の対照と比べ顕著にリン酸化が促進していることが示され, 特にポリフェノール換算量 300ng/ml で阿房宮

Table 1 Effect of extracts from chrysanthemum petals on the phosphorylation of the Erk1/2

Stimulator	Concentration (weight/ml)	Relative activity	
		p-Erk1	p-Erk2
NGF	50 ng	8.02	7.13
Luteolin	1µg	1.12	0.93
	2µg	1.49	0.97
	3µg	2.78	3.03
	6µg	3.34	4.17
Extract (dry weight)			
Mottenohoka	100µg	1.95	1.51
	300µg	2.54	1.91
Abohkyu	100µg	3.60	2.34
	300µg	6.23	4.27
Extract (polyphenol)			
Mottenohoka	300ng	2.96	2.71
	900µg	2.95	2.78
Abohkyu	300ng	3.37	2.77
	900µg	5.70	4.46

Serum-starved PC12 cells were stimulated with extracts from chrysanthemum petal and standard reagents at indicated concentration. Phosphorylated levels of ERK1/2 were detected with specific antibodies using western blot analysis as described in Methods. Relative kinase activity was calculated by normalizing kinase activity from stimulated cells to the untreated control cells. The results presented are the mean of two experiments.

種で刺激した群が高い値を示した。リン酸化を相対強度で整理し, 刺激したキク抽出物の重量濃度(図7.a)とポリフェノール量に換算した値(図7.b)に対して表した結果を, 図7および表1に示した。重量濃度当たりのリン酸化活性は 100µg/ml, 300µg/ml のいずれも延命楽種に比べ阿房宮種の方が高かったが, ポリフェノール量に換算した値で比較したリン酸化活性は 300ng/ml の濃度では延命楽種と阿房宮種にほとんど差は認められなかった。また, リン酸化は試料濃度の高い方が高い値を示したが, ポリフェノール換算量について表した延命楽種のリン酸化相対強度については 300µg/ml と 900µg/ml の間にほとんど差は認められず, 再度検討が必要と考えられる。以上の結果より, キク抽出物刺激による Erk1/2 のリン酸化は, ポリフェノール換算量あたりで比較した場合, 延命楽種と阿房宮種の間ほとんど差は無いことが示唆され, 両者のポリフェノール組成の構成比率の違いによるリン酸化活性の違いは無い可能性が示唆された。

### 3.4 PC12 細胞の樹状突起伸長

阿房宮種および延命楽種の抽出物で刺激し 24h 培養後の PC12 細胞における樹状突起伸張を位相差顕微鏡で観察した(図8)。図8bには陽性対照の NGF で刺激し

た結果を示し、c および d へは阿房宮種および延命楽種の抽出物をポリフェノール換算量で 300ng/ml の濃度で刺激した結果を示し、a は無添加の対照区を示した。

a の無添加区では、24 時間後に細胞の増殖が認められたのに対し、b の NGF 添加区では細胞の増殖が止まり、神経突起の伸長が認められた。c および d の阿房宮

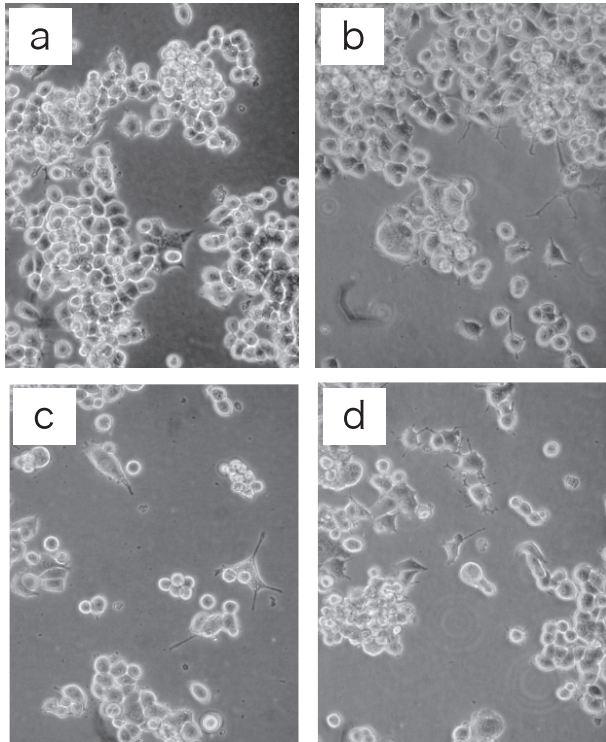


Fig.8 Induction of neurite outgrowth in PC12 cells stimulated with extracts of chrysanthemum petal from Abohkyu and Mottenohoka.

Phase-contrast image of PC12 cells on 48h after stimulate with : no additions to the culture medium (a) ; 50 ng/ml NGF (b) ; 300ng/ml, as a polyphenol content, extracts of chrysanthemum petal from Abohkyu (c) and Mottenohoka (d).

種および延命楽種の抽出物添加区においても突起伸長が認められた。以上の形態観察の結果より、阿房宮種および延命楽種の抽出物は神経栄養作用を示すことが示唆された。

#### 4. 考察

現在、うつ病の薬物治療では脳内モノアミン仮説に基づく、選択的セロトニン取り込み阻害剤などが主流になっている。一方、疾病の成立には酸化ストレスなどによる神経細胞の損傷や新生・機能分化の抑制などが大きくかかわっており、神経細胞の保護は治療の重要な観点となってきた。フラボノイドは細胞周期の停止、アポトーシス誘導、遺伝子発現などの様々な細胞機能を調節することが明らかとなってきたが、近年、ケルセチン、

ゲニステインなどのフラボノイドが損傷神経の神経突起伸長を促し、神経修復を促進する可能が示唆されている<sup>8)</sup>。仁科等は菊花成分（延命楽品種）の抗うつ作用を検討し、単離した acacetin, luteolin など数種のフラボノイドに神経栄養因子様作用を認めた。五十嵐等<sup>9)</sup>は食用キクのフラボノイドの種間比較を行い組成やラジカル消去活性が異なることを報告している。そこで本研究では、阿房宮品種の成分について神経栄養因子様作用を検討する目的から、キク花卉メタノール抽出物のポリフェノール組成について HPLC 分析や UV スペクトルの検討を行い、さらに in vitro における PC12 細胞を用いた MAPK のリン酸化、神経突起伸長の観察を行なった。その結果、阿房宮品種と延命楽品種ではポリフェノール組成が大きく異なっていることが分かったが、スーパーオキシドアニオン消去活性にはポリフェノール量当たりの比較では差は認められなかった（図 3）。細胞の機能分化の検討には PC12 細胞が利用されており、樹状突起伸長の誘導は MAPK を介するシグナル伝達系により引き起こされることより、MAPK 活性化は神経細胞機能分化の指標として評価することが可能である。本研究ではシグナル伝達路のひとつの経路の構成酵素である Erk1/2 を取り上げ、この酵素のリン酸化を検討した。細胞の刺激に用いた試料の濃度をポリフェノール量に換算した値で比較した Erk1/2 のリン酸化活性は、延命楽種と阿房宮種の間にはほとんど差は無いことが示唆され、両者のポリフェノール組成の構成比率の違いによる、リン酸化活性の違いは無い可能性が示唆された。しかし、ポリフェノール含有量は阿房宮種の方が多く、重量当たりでは阿房宮種の方がリン酸化活性は高い結果となった（図 7、表 1）。

食事より日常的に比較的多くの量を摂取しているフラボノイドが神経栄養因子様作用を示すことが明らかにされつつあり、今回の検討においては、食用菊のフラボノイドについても特定種の特定化合物だけではなく、多くのフラボノイド化合物が活性を示す可能性が示された。うつ病治療においては今後、損傷神経の修復や神経新生の促進について、さらに検討されて行く必要があると推察され、その際食事として摂取されるフラボノイドを有効に利用することは重要と考えられる。

#### 参 考 文 献

- 1) 上海科学技術出版社, 小学館編, 中薬大辞典, 1 (小学館), 408-412 (2002).
- 2) M.,Ukiya, T.,Akihisa, et al : *J. Agric, Food Chem.*, 49, 3187-3197 (2001) .
- 3) M.,Miyazawa, M.,Hisama, : *Biosci.Biotechnol.Biochem.* , 67, 2091-2099 (2003) .
- 4) Nestler EJ, Barrot M, et al: *Neuron*, 34, 13-25 (2002) .
- 5) 仁科淳良, 加藤守臣, 他 : 山形県立米沢短期大学紀要,

- 47, 39- (2011) .
- 6) 若生豊, 谷川晶彦: 八戸工業大学異分野融合研究所紀要, 2, 43-49 (2006).
  - 7) M. Kodama, H. Wada, *et al.* *Phytochemistry* 47, 371-372 (1998) .
  - 8) 丸中良典, 新里直美, 他: 大豆たん白質研究, 12, 129-133 (2009)
  - 9) 菅原哲也, 五十嵐喜治: 食品科学工学会誌, 11, 600-604 (2009) .