

## 食用菊「もってのほか」成分による 細胞内情報伝達物質 (MAPキナーゼ)活性化作用

Activation of MAPK in PC12 cells by extracts of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 'Mottenohoka'

仁科淳良<sup>1)</sup>・加藤守匡<sup>1)</sup>・柏木佳子<sup>1)</sup>・森田幸雄<sup>2)</sup>・木村博一<sup>3)</sup>  
Atsuyoshi Nishina, Morimasa Kato, Yoshiko Kashiwagi,  
Yukio Morita and Hirokazu Kimura

<sup>1)</sup>米沢女子短期大学健康栄養学科、<sup>2)</sup>東京家政大、<sup>3)</sup>国立感染症研究所

### 1. はじめに

もってのほか(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)は、食用菊の品種の一つで、山形県の特産品である。食用菊は菊の一種でキク科キク属の植物のうち、特に食用として栽培されている菊のことを指す。また、もってのほかには紅もって、早生もって、本もってなどの種類がある。紅もっての収穫時期は9月上旬から9月末頃で、花びらの色が鮮やかで苦みが少なく食べやすい品種である。早生もっての収穫時期は9月下旬から10月上旬で、花びらが筒状になっていてシャキシャキと歯ごたえがあり、少しほろ苦い品種である。本もっての収穫時期は10月中旬から11月上旬で、花びらが長く筒状になっており、シャキシャキとした食感とほのかな甘みがある品種である。もってのほかは一般的な食用菊とは違い、花びらは筒状になっていて調理の際に型崩れしにくいという特徴があり、苦みが少なく、繊維質が豊富で、カロチン、カリウム、カルシウム、リンを多く含んでいる。食べ方としては茹でてお浸しにしたり酢の物や胡桃合え、天ぷらや吸い物に用いられる。また花びらを湯がいたり蒸したりした後に海苔のように薄く四角い形に乾燥させた「菊海苔」「干し菊」「のし菊」などの加工品がある。山形県は食用菊の生産量で全国1位(年間110tうち置賜地方のもってのほかの生産量は4t：山形県農業振興課資料)であり東京都中央卸売市場で扱う食用菊の6割以上は山形産が占めている。



図1 もってのほかの代表的品種

もつてのほかの成分に関しては、古くから検討されており、高橋らは直鎖飽和炭化水素、amyrin、apigenin、遊離脂肪酸の存在を明らかにしている<sup>(1,2)</sup>。もつてのほかの機能に関しては、笠原（山形県衛生研究所）により食用菊に含まれるクロロゲン酸と二種類のイソクロロゲン酸によるコレステロール低下作用や中性脂肪低下作用、もつてのほかの花びらに含まれるヘリアントリオールCとファラジオールによる発がん抑制効果が発表されている<sup>(3)</sup>。また、ポーラ研究室は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・波多野力教授との共同研究により、菊花中のテトラクマロイルスベルミンがヒトの細胞中の生体内解毒物質のひとつであるグルタチオンの生成を高める作用があることを発表している。その他、菊の花びら中の鎮痛作用を持つ抗酸化物質<sup>(4)</sup>、菊に含まれるルテインと抗酸化活性の関係<sup>(5)</sup>、菊に含まれる成分の網羅的研究<sup>(6)</sup>、菊の精油成分の抗菌性<sup>(7,8)</sup>、抗腫瘍活性<sup>(9)</sup>等の研究が行われている。

日本の平均寿命の高まり、社会的ストレスの増加により、神経が不健康になり、うつ等の症状を訴える人が増えている<sup>(10,11)</sup>。図2に日本国内の自殺者数の年次推移を示した

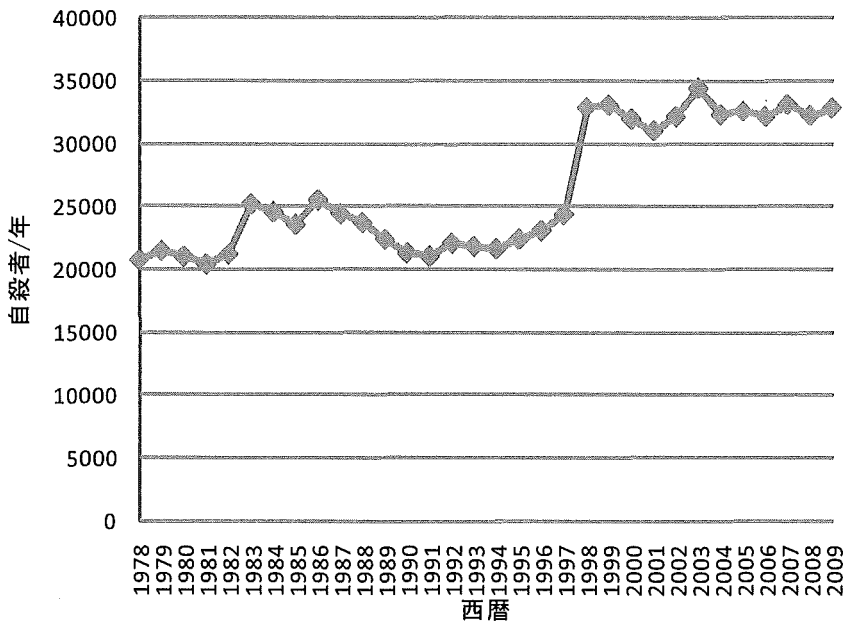


図2 自殺者の年次推移（H22年5月発表 警察庁統計資料より）

最近になって、成人を対象とする健康診断に肥満度が加わったが、ストレスに関する診断項目がないので、社会的ストレスを数値的に把握することは困難である。一般的には自殺者数が社会的ストレスの指標と考えられている。図2より、バブル崩壊後の1997年から1998年にかけて自殺者数は約25,000人から約35,000人へ急激に増加した。以後、自殺者数は高止まっており、社会的ストレスが、バブル崩壊以後減少していないものと推定できる。自殺の動機（図3 [http://www8.cao.go.jp/jisatsutaisaku/whitepaper/w-2010/html/gaiyou/s1\\_07.html](http://www8.cao.go.jp/jisatsutaisaku/whitepaper/w-2010/html/gaiyou/s1_07.html)を改変）で最も多いのは健康問題の一つでもあるうつと推測できる。

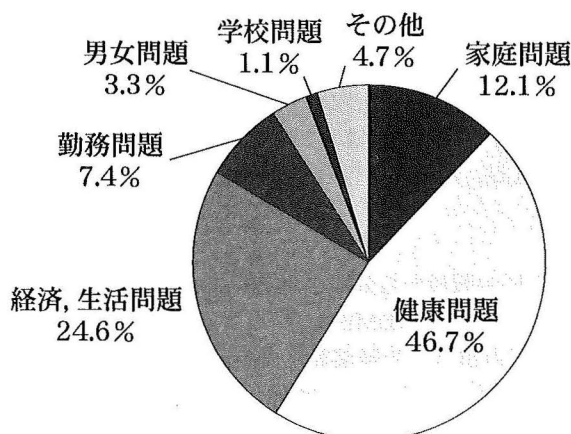


図3 原因・動機別の自殺者の状況

これまで神経や脳を対象とした機能性食品としては精神科領域の症状に対しても改善効果のあるキチン・キトサンを使用した「ヌーススピリッツ」(NOOS corporation)や脳と神経の修復・再生のビタミンB<sub>12</sub>を主成分とする栄養補助食品の「リブラ」(株式会社リブラ)などが出回っている。また、脳機能と関連する健康素材として、ホスファチジルセリン(日油株式会社)、リラックス効果のあるテアニン(三井農林株式会社、太陽化学株式会社)が流通している。一方、マイタケの成分リゾホスファチジルエタノールアミンが神経の分化誘導、神経細胞の生存率向上などの機能を有しているという報告がある<sup>(12)</sup>。しかし、もってのほかなどの菊の成分を起源とした機能性食品はこれまで実用化されていない。

上述とおり、社会的ストレスの増加などによるうつ患者や自殺者の増加が問題視されているが、社会的ストレスが減少する兆しは見られない。社会的ストレスは、病因とは認識されていないので、医薬品によりストレス性うつを予防することは困難である。我々は、上記の現状に鑑み、神経にプラスの作用を及ぼす食品成分の実用化が必要であると認識した。本年度は神経のモデルとして広く用いられている株化されたラット副腎髄質細胞(PC12細胞)のマップキナーゼに対する山形県産物抽出物の作用を探索した。PC12細胞は、細胞膜上に神経成長因子(NGF)受容体(TrkA)を発言しており、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し、これまでに分化シグナルや生存シグナルの解析に広く使用されてきた。また、神経細胞死誘導法の検討(<http://ci.nii.ac.jp/naid/110000130420>)や酸化型アデノシン誘導体による神経細胞保護作用(<http://www.rjkoutori.or.jp/rj/report/report06.html>)の研究などに使用されている<sup>(13-16)</sup>。我々は、先ず、予備実験として山形県産物のPC12細胞に対する作用を測定した。活性成分が神経に有用な作用を示す際に細胞内のMAPキナーゼの活性化が必須であることが分かっている<sup>(17)</sup>。予備実験の結果、数種の山形県産物抽出物のなかで、もってのほかがC12細胞のMAPキナーゼを比較的強く活性化した結果を受け、もってのほかのPC12細胞に対する効果をさらに詳しく検討することとした。

## 2. 実験材料と方法

### 2. 1 実験材料

山形県産地産消費コーディネーターを通して長井市の竹田義一氏が生産したもってのほかを購入して使用した。

## 2. 2 試薬

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) はシグマ社の製品をそのまま用いた。ヘキサソール、クロロホルム、イソプロピルアルコールそしてメタノールは半井科学の製品（特級）、神経成長因子（NGF）はシグマ社製を購入した状態で使用した。その他の試薬は、和光純薬製を購入し、精製等を行わずに使用した。

## 2. 3 PC12細胞

PC12細胞は岐阜薬科大学の古川昭栄教授から分与されたものを使用した。

PC12細胞はダルベッコ改良イーグル培地（DMEM：シグマ社製）に加熱により非働化した馬血清（ギブコ製）10%と牛胎児血清（三光純薬製）5%を添加した溶液中で培養した。活性試験にはDMEMに馬血清1%と牛胎児血清0.5%を添加した溶液（活性試験用培地）を用いた。PC12細胞を $2 \times 10^6$ 個/ml濃度で、コラーゲンコートした6穴マイクロプレートに播種し、37℃、空気95%、二酸化炭素5%のもとで2日間前培養した。培地を除去してPBSで洗浄後、被験サンプルの所定量を活性試験用培地に分散または溶解し、37℃で30分間PC12細胞を被験サンプルで刺激した。氷上でマイクロプレートを3mlの2mM TBS (0.33M NaClと6.25mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>を含有)で洗い、Ripaバッファー (150mM NaCl、2mM EDTA、1% Nonidet P-40 (w/v)、1% sodium deoxycholate (w/v)、0.1% SDS (w/v)、50mM NaF、0.1% aprotinin (w/v)、0.1% leupeptin (w/v)、1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>、1mM PMSF pH8.0)で細胞を溶かした。溶解した細胞をセルスクレーパーで集めて、1.5mlのマイクロチューブに移し、4℃ 15000gで30分間遠心分離した。上清を別のマイクロチューブに移すと同時にタンパク含量をBCAタンパク質量キット（ピアス社）で測定した。

## 2. 4 活性化（リン酸化）したタンパク質の測定法

20 μgのタンパク質を含む上清をSDSサンプルバッファー（インビトロジェン社）と混合し、80℃で5分間反応した。タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、PVDFメンブランにエレクトロブロットにより転写した。PVDFメンブランはハイボンド-P（GEヘルスケア社）を用いた。イムノブロット分析は一次抗体としてリン酸化p44/42ERKモノクローナル抗体（セルシグナルテクノロジー社）、二次抗体としてアルカリホスファターゼ共役抗ウサギIgG（サンタクルズ社）を用いた。発色はAPバッファー (0.1M Tris-HCl NaCl 0.58%, MgCl<sub>2</sub> 0.1% pH9.5) 10mlに7.5% nitro blue tetrazolium (NBT) を45 μlと5% 5-bromo-4-chloro-3-inducyl phosphate-p-touidine (BCIP) を35 μl混合した溶液で行った。

## 2. 5 細胞の形態観察

倒立顕微鏡IX70（オリンパス製）を用い、×100で細胞の形態観察を行った。撮像にはデジタルカメラ（QV-8000：カシオ製）を用いた。

## 2. 6 オープンカラム精製

充填剤としてシリカゲル（ワコーゲルC-200：和光純薬製）を用いたオープンカラムトグラフィ（内径52mm）でMAPK活性化作用を示したクロロホルム抽出物を6つのフラクションに粗分画した。移動相はクロロホルム：メタノール＝100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50（いずれも容積比）を用いた。

## 2. 7 分取液体クロマトグラフィー

オープンカラム精製で活性が認められたクロロホルム：メタノール=70：30溶出物（クロロホルム70%画分）の再精製は次の方法で行った。カラムはDevelosil 60-10（内径20mm×長さ250mm：野村化学製）、移動相はヘキサン：イソプロピルアルコール=97:3（容積比）流速5ml/min、検出には紫外可視検出器（254nm）を用いた。

## 3. 結果

### 3. 1 溶剤分画

溶剤分画のフローを図4に示した。図4に示した方法により、乾燥もってのほか100gからヘキサン抽出物2.5g、クロロホルム抽出物2.4g、メタノール抽出物19.7gが得られた。

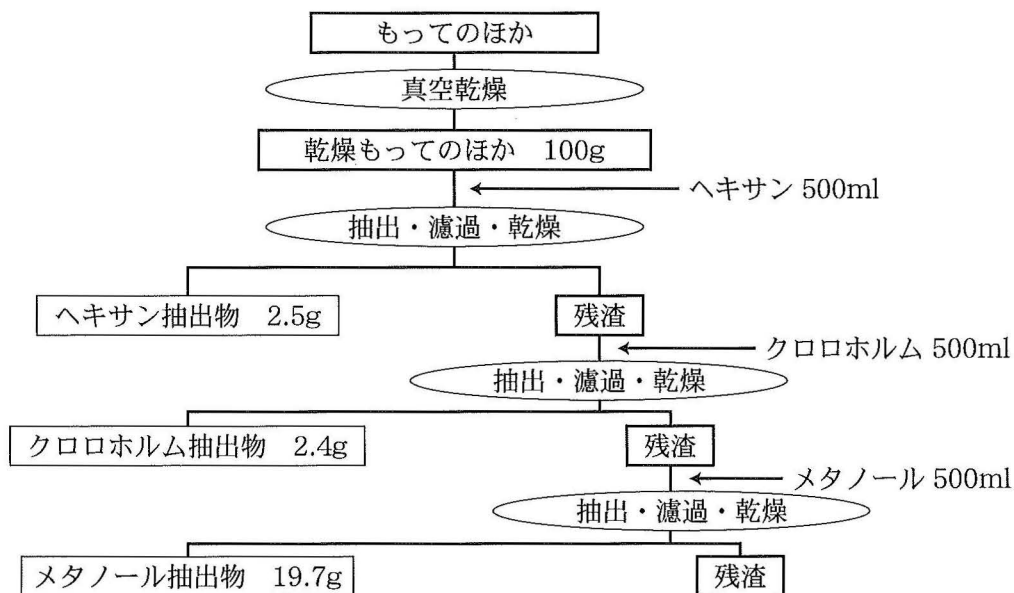


図4 溶剤分画フロー

### 3. 2 溶剤抽出物の細胞毒性

図4の3種の抽出物の細胞毒性を図5に示した。100  $\mu$ g/mlの濃度で、24時間後に有意な細胞毒性は認められなかった。

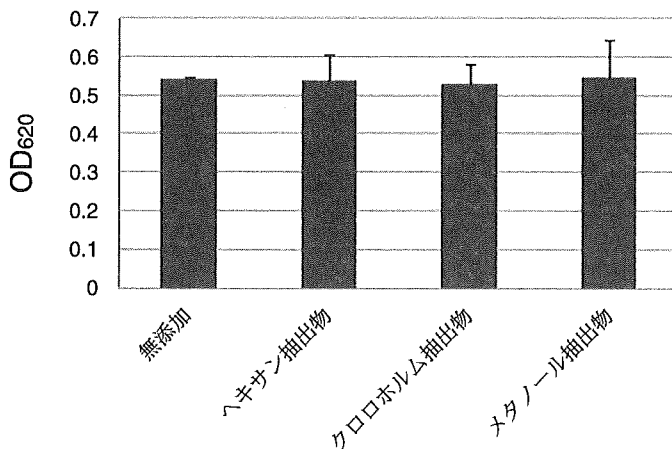


図5 もつてのほか粗抽出物の細胞毒性  
添加量100 $\mu$ g/ml 24時間後

### 3. 3 溶剤抽出物のMAPK活性化作用

もつてのほかの溶剤抽出物とその他の山形県産野菜のERK1/2活性化作用を図6に示した。陽性対照にはNGFを用いた。もつてのほかの3種の抽出物と黄菊のクロロホルム抽出物、メタノール抽出物が特にERK2を活性化することがわかった。

今回は、経験的に精製が容易なもつてのほかクロロホルム抽出物から活性成分を精製することとした。

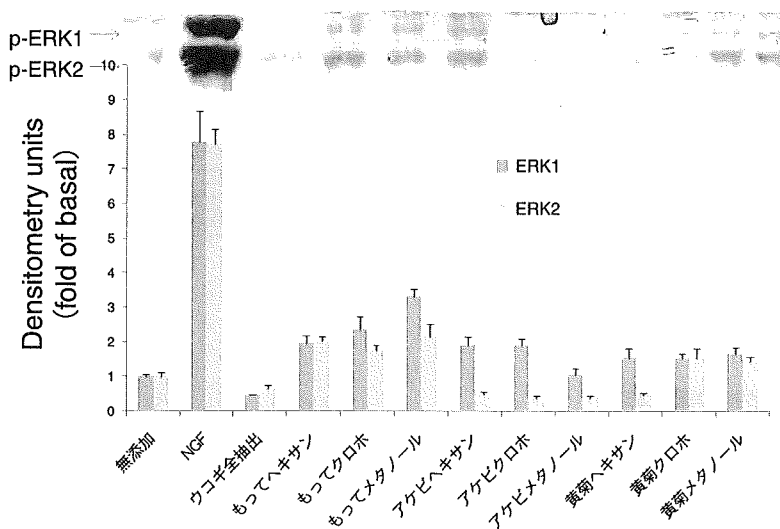


図6 山形県農産物のMAPK活性化作用

### 3. 4 クロロホルム抽出物のオープンカラム精製

オープンカラム精製で得られた画分と収量を表1に示した。また、それぞれの画分のERK1/2に対する活性化作用を図7に示した。

表1 移動相と収量

クロロホルム：メタノール	収量 g/8g
100:0	1.68
90:10	1.17
80:20	2.57
70:30	1.24
60:40	0.33
50:50	1.01

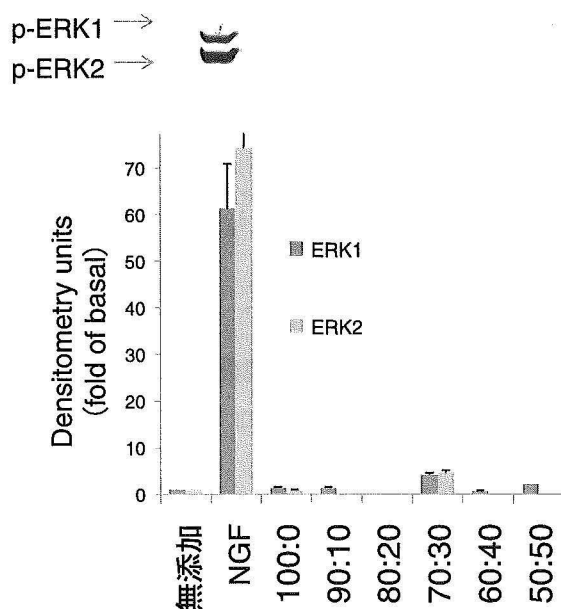


図7 オープンカラム分画物のMAPK活性化

図7からクロロホルム：メタノール=70：30（クロロホルム70%画分）に活性が認められた。

### 3. 5 クロロホルム70%画分再精製

次に分取高速液体クロマトグラフィーを使用してクロロホルム70%画分の精製を行った。得られたクロマトグラムを図8に示した。すなわち、分取によりクロロホルム70%画分を11のフラクションに分けた。1から11のフラクションのうち、顕著なピークが認められたフラクション2、3、5、6、10のERK1/2活性化作用を図9に示した。

6つのフラクションのうちフラクション5にERK1/2活性化作用が認められた。

今後、再精製を行って活性成分を単離する必要がある。

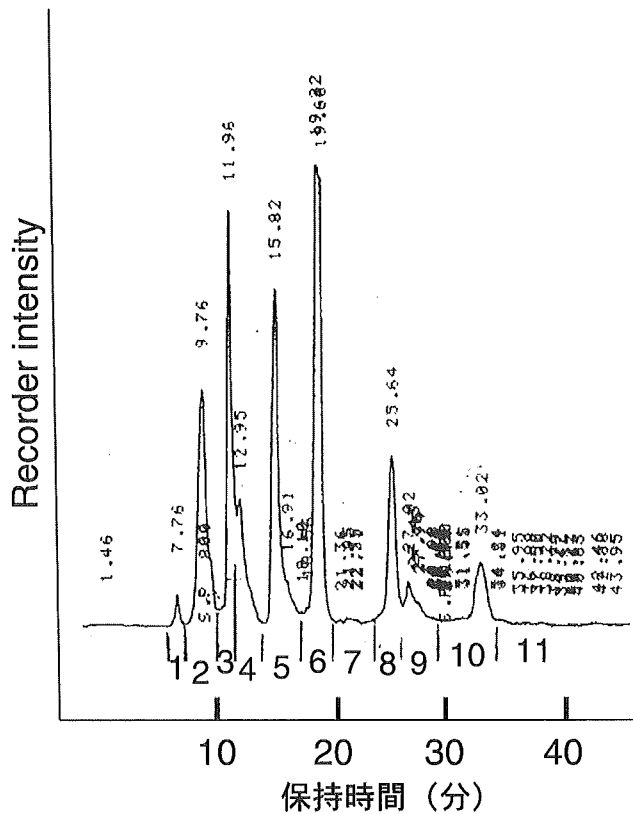


図8 分取時のクロマトグラム

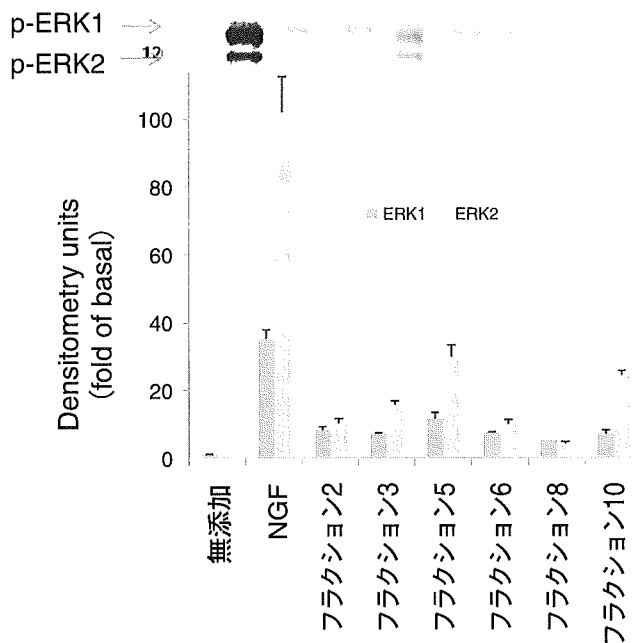


図9 各フラクションのMAPK活性化作用



### 3. 6 フラクシオン5の神経栄養作用

PC12細胞の培地にフラクシオン5を添加したときの形態変化を光学顕微鏡で観察した。フラクシオン5またはNGFを添加して24時間後の状態を図10に示した。無添加区(図10B)では、24時間後に細胞の増殖が認められたのに対し、NGF添加区(図10C)では細胞の増殖が止まり、神経突起の伸長が認められた。一方フラクシオン5添加区(図10D)では、細胞増殖が止まり、NGF程の長さではないが弱い突起伸長が認められた。以上の結果からフラクシオン5が微弱ではあるが神経栄養作用を有すると判断した。

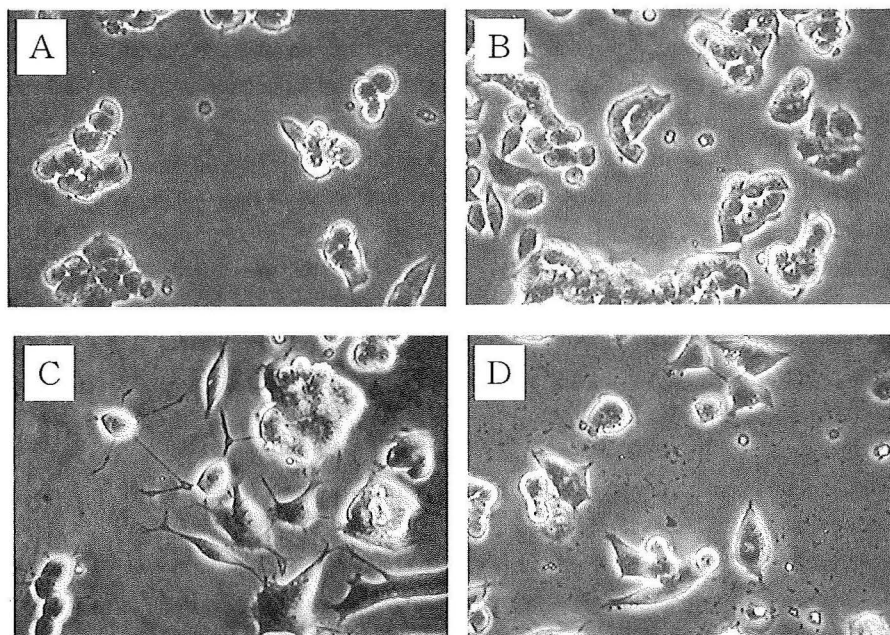


図10 フラクシオン5添加後の形態変化

A : 被験物添加時、 B : 無添加24時間後  
C : NGF添加24時間後、 C : フラクシオン5添加24時間後

### 4. まとめ

今後、我国の高齢化がいつそう深刻になることは確実である。また、流通のグローバル化、食料やエネルギーの自給率の低下にともない全世界の不安定化要因が日本国内経済に与える影響が大きくなっている。すなわち、日本国民に対する社会的ストレスが早期に減少するとは考えにくい。

今回我々は、山形県特産の食用菊「もってのほか」中の成分が微弱ながら神経栄養作用を示すことを明らかにした。今後、もってのほかのいかなる成分が神経栄養作用を示すか明らかにし、さらに動物実験でもってのほかを摂取することにより神経の不健康に対するもってのほかの効果を示したい。すなわち、もってのほかを日常的に摂取することにより高齢化や社会ストレスが原因の神経の不健康を予防することが本研究の最終目標である。また、機能性研究の結果、山形県産のもってのほかの付加価値を挙げることによる地域貢献を目指したい。

### 5. 謝辞

卒業研究を通して本研究を遂行した菅野絵莉香氏、吉田明日美氏に感謝いたします。

## 参考文献

1. M. Takahashi, and T. Sato, [Studies on the components of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. var. *sinense* Makino forma *esculentum* Makino. II. Components of one of brands "Mottenohoka" (author's transl)]. *Yakugaku Zasshi* **99** (1979) 90-1.
2. M. Takahashi, T. Sato, and T. Miyoshi, [Studies on the components of the petals of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. var. *sinense* Makino forma *esculentum* Makino (author's transl)]. *Yakugaku Zasshi* **95** (1975) 618-20.
3. Y. Kasahara, K. Yasukawa, S. Kitanaka, M.T. Khan, and F.J. Evans, Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytother Res* **16** (2002) 217-22.
4. S. Faizi, A. Dar, H. Siddiqi, S. Naqvi, A. Naz, S. Bano, and Lubna, Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula*. *Pharm Biol* **49** (5) (2011) 516-25.
5. S. Bhattacharyya, S. Datta, B. Mallick, P. Dhar, and S. Ghosh, Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula* L.) extracts. *J Agric Food Chem* **58** 8259-64.
6. H. Bano, S.W. Ahmed, I. Azhar, M.S. Ali, and N. Alam, Chemical constituents of *Tagetes patula* L. *Pak J Pharm Sci* **15** (2002) 1-12.
7. C. Romagnoli, R. Bruni, E. Andreotti, M.K. Rai, C.B. Vicentini, and D. Mares, Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* **225** (2005) 57-65.
8. D. Mares, B. Tosi, F. Poli, E. Andreotti, and C. Romagnoli, Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiol Res* **159** (2004) 295-304.
9. A.A. Khizhazi, [The therapeutic and prophylactic anti-ulcerogenic action of marigold (*Tagetes patula* L.) and sea buckthorn (*Hippophae*) oils in neurogenic ulcerative lesions caused by immobilization, noise and vibration]. *Lik Sprava* (1998) 172-6.
10. T. Kawamura, T. Shioiri, K. Takahashi, V. Ozdemir, and T. Someya, Survival rate and causes of mortality in the elderly with depression: a 15-year prospective study of a Japanese community sample, the Matsunoyama-Niigata suicide prevention project. *J Investig Med* **55** (2007) 106-14.
11. M. Nakao, and T. Takeuchi, The suicide epidemic in Japan and strategies of depression screening for its prevention. *Bull World Health Organ* **84** (2006) 492-3.
12. A. Nishina, H. Kimura, A. Sekiguchi, R.H. Fukumoto, S. Nakajima, and S. Furukawa, Lysophosphatidylethanolamine in *Grifola frondosa* as a neurotrophic activator via activation of MAPK. *J Lipid Res* **47** (2006) 1434-43.
13. K. Asakura, A. Ueda, N. Kawamura, M. Ueda, T. Mihara, and T. Mutoh, Clioquinol inhibits NGF-induced Trk autophosphorylation and neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res* **1301** (2009) 110-5.
14. P.G. Lee, and P.H. Koo, Rat alpha(2)-macroglobulin inhibits NGF-promoted neurite outgrowth, Trk phosphorylation, and gene expression of pheochromocytoma PC12 cells. *J Neurosci Res* **57** (1999) 872-83.
15. D.M. Loeb, and L.A. Greene, Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF

- uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. *J Neurosci* **13** (1993) 2919-29.
16. D.M. Loeb, J. Maragos, D. Martin-Zanca, M.V. Chao, L.F. Parada, and L.A. Greene, The *trk* proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* **66** (1991) 961-6.
17. M. Fukuda, Y. Gotoh, T. Tachibana, K. Dell, S. Hattori, Y. Yoneda, and E. Nishida, Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene* **11** (1995) 239-44.
18. D.B. Pereira, A.P. Carvalho, and C.B. Duarte, Non-specific effects of the MEK inhibitors PD098,059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology* **42** (2002) 9-19.
19. E. Sakabe, N. Tanaka, N. Shimozono, T. Gojobori, and S. Fujiwara, Effects of U0126 and fibroblast growth factor on gene expression profile in *Ciona intestinalis* embryos as revealed by microarray analysis. *Dev Growth Differ* **48** (2006) 391-400.

## 要旨

高齢化、社会ストレスの増加により神経が不健康な人が増えている。我々は神経栄養作用を有する食品を探索するために、山形県産物抽出物のMAPK活性化作用を測定し、もってのほか抽出物が有望であることを明らかにした。次にMAPK活性化作用が認められた、もってのほかクロロホルム抽出物を精製した。精製物にはPC12細胞のMAPKを活性化するとともに、微弱ではあるがPC12細胞の神経分化を誘導した。

精製物による神経分化作用がMAPK阻害剤により観測されなくなったことから、もってのほかの成分は、MAPKを活性化を通してPC12細胞の神経分化を誘導していると判断した。

## Summery

Persons with damaged nerve are increasing by increase in aging and social stress.

First, we measured MAPK activation by extracts of special products of Yamagata prefecture in PC12 cells and it was clarified that *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 'mottenohoka' extract contain active components. Next, mottenohoka chloroform extract was refined. MAPK of PC12 cells was phospholyrated and nerve differentiation was induced by some fractions from mottenohoka.

Because neurite outgrowth in PC12 cells was inhibited by down regulation of ERK1/2 phosphorylation, it was presumed that mottemohoka component promoted nerve differentiation vie activation of ERK1/2.