

ヒト白血病細胞 HL-60 増殖抑制物質の探索、
構造決定と生合成の研究

Structure determination and biosynthetic studies on the
antiproliferative compounds for human leukemia cell HL-60

2019 年 3 月

小山 愛美

Manami Oyama

目次	頁
1. 序論	3
1-1. 健康志向と機能性食品・生薬の利用	3
1-2. 本研究で用いた機能性食品・生薬材料	4
1-3. 生理活性試験について	5
1-3-1. ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 について	5
1-3-2. ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC について	7
1-4. 本研究で用いた試薬・分析器等について	8
1-4-1. 試薬	8
1-4-2. 機器・機材	8
2. ヤマノイモ科 <i>Dioscorea tokoro</i> に含まれる HL-60 増殖抑制活性物質の研究	9
2-1. ヤマノイモ科オニドコロについて	10
2-2. オニドコロの活性物質の単離	14
2-2-1. HL-60 増殖抑制活性試験	14
2-2-2. Methyl protodioscin の単離	15
2-2-3. 化合物 I (Methyl protodioscin) の構造決定	17
2-2-4. エタノール抽出物の確認	17
2-2-5. アセトニトリル抽出による活性化合物 II の単離	20
2-2-6. 化合物 II (Protodioscin) の構造決定	22
2-2-7. 加熱処理による Protodioscin の安定性	25
2-2-8. 生薬・ヒカイ (草薺) 中の Prododioscin の探索	25
2-2-9. HUVEC 増殖抑制活性試験	25
2-3. 結果と考察	27
参考文献	31
3. ヤナギ科 <i>Salix gilgiana</i> の HL-60 増殖抑制物質の研究	33
3-1. ヤナギ科カワヤナギについて	34
3-2. <i>Salix gilgiana</i> 枝の抽出と活性物質の精製	37
3-3. 化合物 I 及び II の構造解析	43
3-4. 化合物 III の構造解析	44
3-4-1. 化合物 III の MTPA エステル誘導体の調製と精製	44
3-4-2. 化合物 III MTPA エステルの単結晶の調製	46
3-4-3. 化合物 III MTPA エステルの構造	48
3-4-4. 化合物 III の NMR スペクトルデータの帰属	51
3-4-5. 化合物 IV、化合物 V、化合物 VI の構造	53

3-5. 結果と考察	57
参考文献	59
4. リンゴ培養植物に含まれる Phloretin 類の生合成に関する研究	60
4-1. 背景	61
4-2. 目的	67
4-3. リンゴ・ポリフェノール生合成の誘導	68
4-3-1. エリシター処理によるポリフェノール生合成の誘導	68
4-3-1-1. 果実への INA 処理	70
4-3-1-2. 培養植物への INA 処理	72
4-4. 新生化合物の単離・構造決定と生成量の経時変化	74
4-5. Phlorizin と Phloretin の標識前駆体による代謝確認	85
4-6. Phloretin 及び Phlorizin の動態と生理機能の考察	93
4-7. 結果と考察	96
4-8. 実験部	99
4-8-1. リンゴ果実と各種エリシター処理	99
4-8-2. リンゴ培養植物の培養と維持	99
4-8-3. リンゴ培養植物の INA 処理	101
4-8-4. リンゴ培養植物及び培地抽出物の調製	101
4-8-5. リンゴ培養植物抽出物の分画と精製 (Phloretin の単離)	101
4-8-6. 化合物 I の質量分析、NMR スペクトルデータの帰属	102
4-8-7. INA 処理 1~7 日間培養と抽出物の調製	102
4-8-8. HPLC による分析	103
4-8-9. [² H _m] Phlorizin の合成	104
4-8-10. [² H _n] Phloretin の合成	105
4-8-11. [² H _m] Phlorizin のリンゴ培養植物取り込み実験	106
4-8-12. [² H _n] Phloretin のリンゴ培養植物取り込み実験	106
4-8-13. LC-MS による重水素標識化合物の検出	106
参考文献	107
5. 総括	110
6. 謝辞	111

1. 序論

1-1. 健康志向と機能性食品・生薬の利用

我が国では、平均寿命が延びて高齢化率が高まる中で、日頃から病気を予防し健康寿命を延ばして、高齢になっても健康な生活を送ることについて関心が高まっている。健康寿命を延ばすための第一歩として、生活習慣病の予防が提唱されている。

また、我が国の死亡原因の1位を占めているがんも、生活習慣が関係する疾病の一つであり、生活習慣病やがんを予防することは医学的にも社会的にも重要となっている。これらの予防には、食事・食生活、身体活動・運動、飲酒・喫煙への配慮が基本であるが、それに加えて機能性食材の利用に関心が高まっている。本研究では、がん抑制の一次スクリーニングとして用いられるヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 への増殖抑制を指標に、有効な食品や生薬材料を探索し、活性物質の化学構造や生合成過程の解明を目指した。HL-60 への増殖抑制は、基本的には細胞毒性活性であるが、これを示す化合物の多くは、抗酸化等の複数の活性を示すものがあるので、初期的な探索指標とした。

本研究の研究材料として3つの植物試料に注目した。食材や生薬としては、民間伝承的に「健康に良い」として用いられてきたオニドコロの塊茎、健康茶としての利用が期待できるカワヤナギの樹枝を取り上げた。また、抗酸化作用が注目され、がん細胞増殖抑制作用も知られているリンゴの生理活性ポリフェノールについて、その生合成の誘導と代謝過程の解明を試みた。

1-2. 本研究で用いた機能性食品・生薬材料

ヤマノイモ科の植物オニドコロ（またはトコロ、学名：*Dioscorea tokoro*）の塊茎は、健康増進や疲労回復に効果があるとされ、岩手や青森など東北地方を中心に食用に供されてきたが、他の地域ではそのような習慣が無いことに着目した。ヤナギ科植物カワヤナギ（学名：*Salix gilgiana*）の枝の乾燥品は、古くから消炎や鎮痛効果があるとされ生薬の原料に用いられてきた。本研究では、これら 2 種類の植物について、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 増殖抑制活性試験を指標に有効成分の解明を目指した。

リンゴは従来から健康に良い食品とされ、食物繊維やビタミン類を豊富に含むためと言われてきたが、近年では抗酸化活性やがん細胞への増殖抑制などを示す生理活性ポリフェノールが注目されている。本研究室でも、脂肪細胞への脂肪蓄積阻害活性を見出しており、このリンゴ・ポリフェノールに着目して、培養植物を用いた実験系の確立とエリシター処理によるポリフェノール生合成の誘導を試みた。また、重水標識体による追跡 (tracer) 実験により、生合成経路の解明を目指した。

1-3. 生理活性試験について

1-3-1. ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 について

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 (図 1) は、急性前骨髄性白血病患者より分離された白血病細胞である。成熟血液細胞になる過程で分化を停止し、体内でも試験管内でも無限に増殖する性質を持っている。HL-60 の分化誘導の過程は生化学的・細胞組織学的手法により詳細に調べることが可能であり、がん抑制効果を調べる上で優れた評価系として知られている。

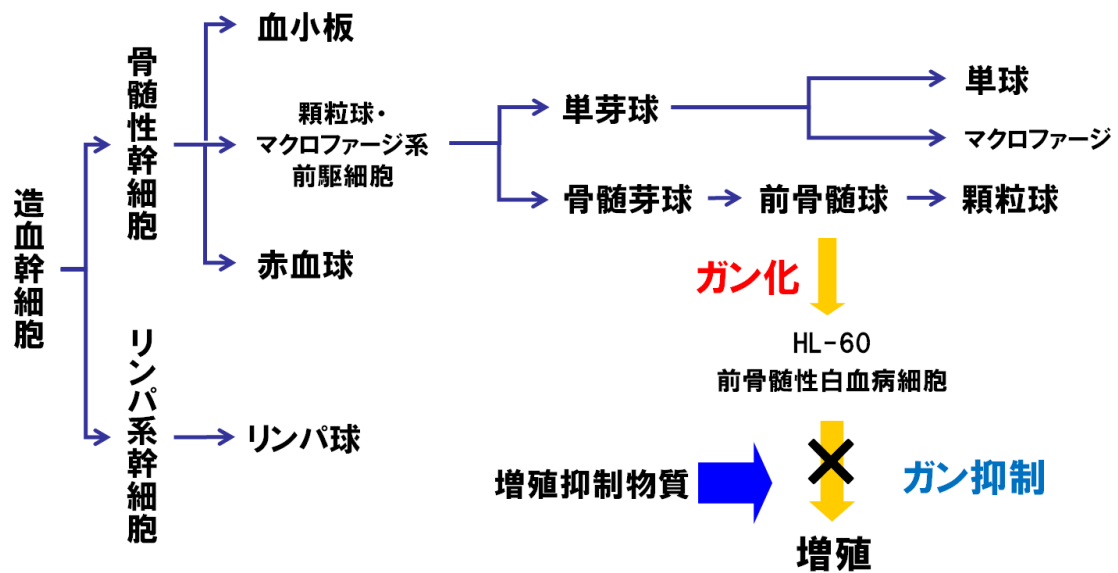


図 1. 各種血液細胞の分化とヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 について

1-3-2. ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC について

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）は、ヒトの臍帯静脈由来の正常細胞由来細胞株であり、細胞毒性試験や血管新生阻害剤の検定にしばしば用いられる。本研究ではがん細胞と正常細胞との増殖抑制を比較し、選択性を評価するために用いた。

1-4. 本研究で用いた試薬・分析機器等について

1-4-1. 試薬等の略号

本実験に使用した試薬の略号はメタノール：MeOH、エタノール：EtOH、アセトニトリル：CH₃CN、無水硫酸ナトリウム：無水 Na₂SO₄、クロロホルム：CHCl₃、酢酸エチル：EtOAc、dimethyl sulfoxide：DMSO、ウシ胎児血清：FBS とした。

1-4-2. 機器・機材・試薬

¹H NMR、¹³C NMR スペクトルは JEOL JNM-ECP600 FT-NMR (600 MHz)、JEOL JNM-ECP400 FT-NMR (400 MHz) で測定した。NMR 測定用の溶媒として CDCl₃ (重クロロホルム)、C₅D₅N (重ピリジン)、C₃D₆O (重アセトン) を用いた。化学シフトの基準値は CDCl₃ (¹H で 7.24、¹³C で 77.2 ppm)、C₅D₅N (¹H で 8.74、¹³C で 150.4 ppm)、C₃D₆O (¹H で 2.05、¹³C で 29.9 ppm) とした。分裂様式を表す (s、d、t、q、m、br) は、それぞれ (singlet、doublet、triplet、quartet、multiplet、broad) を示す。質量分析 (MS) は Thermo Fisher Scientific 社製 EXACTIVE で測定した。液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) は Thermo Fisher Scientific 社製 ACCELA で測定した。

分析用薄層クロマトグラフィー (TLC) には Merck Silica Gel 60 F254 (0.25 mm)、逆相として Merck RP-18 F254s (0.25 mm) を用いた。検出は UV (254 nm) 照射、または発色剤として *p*-アニスアルデヒド溶液 (2.5% *p*-アニスアルデヒド、1% 酢酸、3.4% 硫酸のエタノール溶液) に浸し、ホットプレートで 20 秒間程度加熱した。

Diaion HP20 カラムクロマトグラフィーでは三菱化学社製 Diaion Sepabeads を担体として用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーでは関東化学社製 Silica Gel 60 N (63~210 μm) を担体として用いた。ODS カラムクロマトグラフィーでは Yamamura Chemical Laboratories YMC Gel ODS-A (60~230/70 μm) を担体として用いた。セルロースカラムでは Whatman FIBTOUS Cellulose Powder CF11 を担体として用いた。分取用薄層クロマトグラフィー (PTLC) には Merck Silica Gel 60 F254 (1.0 mm) を用いた。

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 は RPMI-1640 培地 (旭テクノグラス (株)、千葉)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC は EGM[®]-2 培地 (Cell Systems Corporation、USA) にて維持した。増殖抑制活性試験における 48 well マイクロプレート及び 96 well マイクロプレートは Multi Well Plate (Sumitomo Bakelite) を用い、増殖率の定量には Biosource International Inc. の alamar Blue[®] を用いた。マイクロプレートリーダーはモレキュラーデバイスジャパン製 FlexStation3 を使用した。

試薬や溶媒は、和光純薬(株)製を主として用いた。

2. ヤマノイモ科 *Dioscorea tokoro* に含まれる
HL-60 増殖抑制活性物質の研究

2-1. ヤマノイモ科オニドコロについて

ヤマノイモ科植物の多くはつる性の多年草で、茎はよくのびて周囲にまきつき、葉を互生または対生する。世界には約 10 属、650 種ほどあり、主として熱帯に生育し、東アジアの温帯、地中海地方、ピレネー山系にも分布する¹⁾。食用とされる種は 50 程度であるが、その多くはかなり局所的である。アジアを原産とする主要な種は *D. alata* (ダイジョ)、*D. esculenta* (トゲドコロ)、*D. bulbifera* (カシュウイモ)、*D. pentaphylla* (ゴヨウドコロ)、*D. hispida* (ミツバドコロ) で根菜農耕文化の基幹作物となっている。これらの他、*D. opposita* (ナガイモ)、*D. japonica* (ジネンジョまたはヤマノイモ) のように、中国や日本で古くから食用とされている種もある²⁾。

D. tokoro (図 1, 2) の和名はオニドコロまたはトコロで、平地や丘などのやぶや垣根などに生育する多年草であり、北海道、本州、四国、九州に分布する¹⁾。*D. tokoro* の葉は、食用のヤマノイモ (*D. japonica*) と比較して葉の形状は類似しているが、*D. japonica* の塊茎は長さ 150 cm、直径 3 cm の大きさまで成長し、可食部が白色なのに対して、*D. tokoro* の塊茎は、長さ 15 cm、直径 2cm と小さく、可食部が黄色いことなどの特徴があり、区別することができる。*D. tokoro* の塊茎は一般的に苦味が強く、食用に適さないとされているが、岩手や青森を中心に、東北地方では塊茎を蒸したものが健康増進や疲労回復に効果があるとされ、食用に供されてきた。また、塊茎の乾燥品は生薬・ヒカイ (草薺) として滋養強壮、止渴、止瀉に用いられる³⁾。成分として京都府および福岡県で採取された *D. tokoro* から Dioscin、Gracillin⁴⁾⁵⁾、Tokoronin、Yononin⁵⁾⁶⁾ などのサポニン類が報告されている。また、中国で採取された *D. tokoro* からは抽出物を加水分解して得られた Diosgenin、Yamogenin、Tokorogenin⁷⁾ などのサポゲニン類が報告されている。

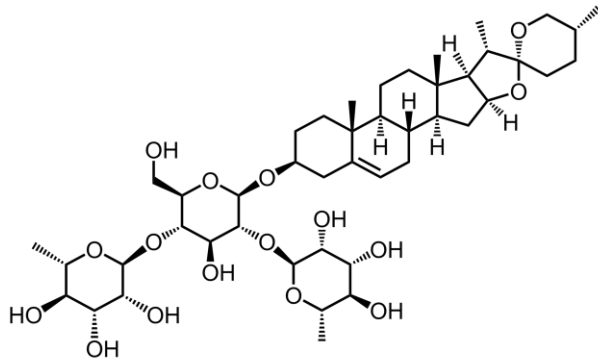
本研究では、東北の一部地域で「健康に良い」として食習慣のあるオニドコロの塊茎について、他県ではほとんど食習慣がないことに着目した。これまでの文献で、オニドコロの効能や活性成分が明らかになっていなかったことから、*D. tokoro* の生理活性成分を探索した。



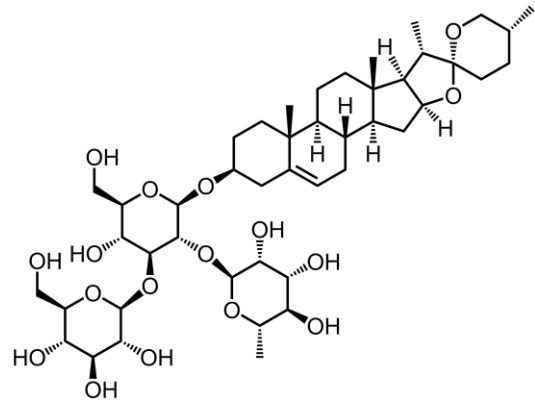
図 1. *D. tokoro* 地上部。2014 年 9 月 26 日岩手県遠野市で採取し、秋田県立大学秋田キャンパスでプランターにて栽培（2016 年 6 月 23 日撮影）。



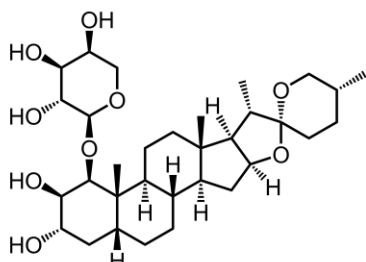
図 2. *D. tokoro* 塊根。2014 年 9 月 26 日岩手県遠野市で採取し -20°C で保管 (2016 年 6 月 23 日撮影)。



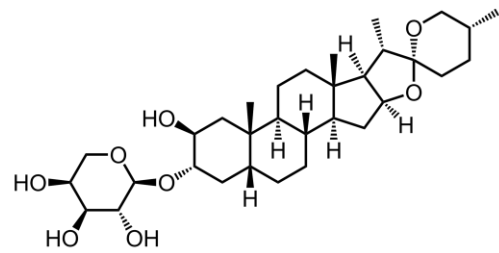
Dioscin
(Aglycone: Diosgenin)



Gracillin
(Aglycone: Diosgenin)

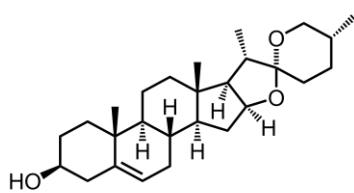


Tokorinin
(Aglycone: Tokorogenin)

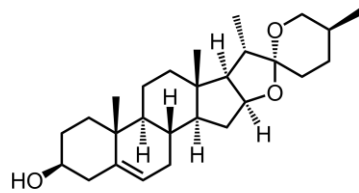


Yononin
(Aglycone: Tokorogenin)

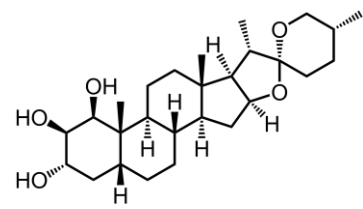
図 3. *D.tokoro* から単離報告のあるサポニン類^{4) 5) 6)}



Diosgenin



Yamogenin



Tokorogenin

図 4. *D.tokoro* から単離報告のあるサポゲニン類⁷⁾

2-2. オニドコロの活性物質の単離

2-2-1. HL-60 増殖抑制活性試験

HL-60 細胞は RPMI-1640 培地に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を加えた培養液で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養、維持した。被験試料の希釈系列に、上記培地を用いて公比 4 倍で 4 種の濃度 (*D. tokoro* 試料は 100、25.0、6.25、1.56 ppm) となるように 48 well マイクロプレートにて調製した。DMSO は 1.2 ~1.3% の濃度で HL-60 細胞を顆粒球へと分化誘導させるため、1% 以下になるよう調製した。96 well マイクロプレートに 1.0×10⁵ cells/ml に調製した HL-60 細胞液を 100 μL ずつ分注し、4 種の濃度に希釈したサンプルを 100 μL ずつ 3 連で分注した。サンプルコントロールとして培地 100 μL とサンプル 100 μL を、細胞液のコントロールとして HL-60 細胞液 100 μL と培地 100 μL を分注した。被試験試料の最終濃度は 50.0、12.5、3.13、0.78 ppm となるよう調製した。また、ブランクには培地のみ 200 μL 分注した。CO₂ インキュベーターで 37 °C、5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した後、生細胞呼吸量を測定する色素 alamar Blue® を 20 μL ずつ添加し、更に 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 570、595 nm を測定し、以下のような評価方法を用いて HL-60 増殖率を求めた (式 1)。

$$\text{増殖率 (\%)} = \left(\frac{[(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{595}) \text{ of sample}] - [(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{595}) \text{ of blank}]}{[(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{595}) \text{ of untreated positive control}] - [(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{595}) \text{ of blank}]} \right) \times 100$$

式 1

2-2-2. Methyl protodioscin の単離

D. tokoro の塊根は岩手県一ノ関市大東町中川の山林にて採取した (2010年2月)。塊根 41.8 g を MeOH 400 mL とともにホモジナイズし、それを減圧濾過して不溶物を除去し、濾液を約 30°C で減圧濃縮した。得られた MeOH 抽出物 3.71 g を EtOAc-H₂O で液-液分配し、水抽出物については凍結乾燥、EtOAc 抽出物については無水 Na₂SO₄ を加えて脱水し、濾過して EtOAc を減圧留去し、濃縮乾固した。その結果、水抽出物 3.30 g、EtOAc 抽出物 0.34 g を得た。

水抽出物 3.30 g を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにて分画した。溶出液は、MeOH と H₂O の混合溶媒とし、6 画分を得た。HL-60 増殖抑制活性のある画分の一部 (50.0 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーで分画した。溶出液は、CH₃CN と H₂O の混合溶媒とし、2 回の分画を行って化合物 1 種を単離し、これを化合物 I とした (図 5)。単離収率は 1.06 mg/g fresh weight で、IC₅₀ 値は構造決定時の質量分析結果から算出したところ 2.5 μM であった。

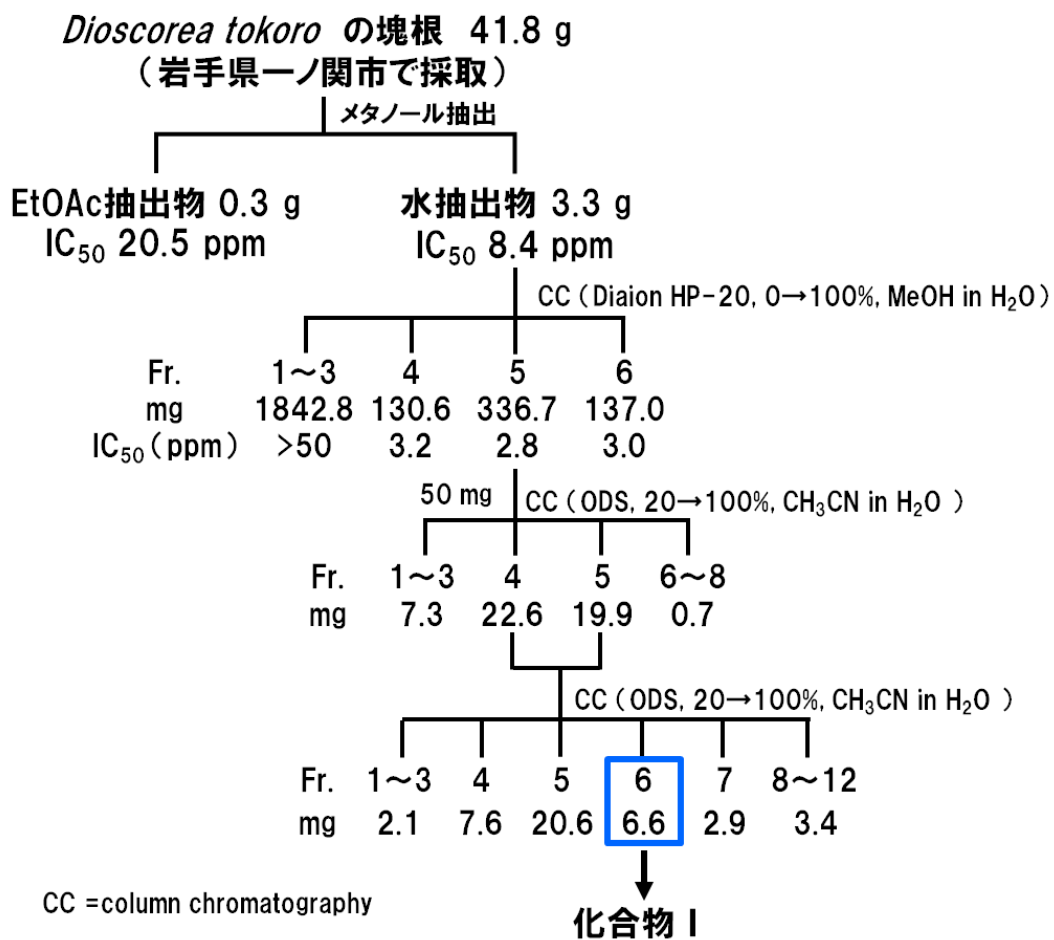


図 5. Methyl protodioscin の単離

2-2-3. 化合物 I (Methyl protodioscin) の構造決定

化合物 I のスペクトルデータと文献値から Methyl protodioscin (図 6) と同定した。

[化合物 I]

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (positive) m/z 1085.5522 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_{52}H_{86}O_{22}Na^+$, 1085.5503. 1H -NMR (600 MHz, pyridine- d_5), δ (ppm) : 0.83 (3H, s, CH_3 -18), 1.01 (3H, d, $J=6.0$ Hz, CH_3 -27), 1.06 (3H, s, CH_3 -19), 1.25 (3H, d, $J=6.6$ Hz, CH_3 -21), 1.65 (3H, d, $J=6.0$ Hz, CH_3 -rha-6 $''$), 1.78 (3H, d, $J=6.6$ Hz, CH_3 -rha-6 $''$), 3.28 (3H, s, OCH_3), 4.87 (1H, d, $J=7.8$ Hz, C-26-glc-1 $'''$), 4.97 (1H, d, $J=6.6$ Hz, glc-1 $'$), 5.87 (1H, br s, rha-1 $'''$), 6.42 (1H, br s, rha-1 $''$), 5.34 (1H, br s, H-6)

[Methyl protodioscin] (文献値⁸⁾⁹⁾

1H -NMR (600 MHz, pyridine- d_5), δ (ppm) : 0.78 (3H, s, CH_3 -18), 0.95 (3H, d, $J=6.6$ Hz, CH_3 -27), 1.01 (3H, s, CH_3 -19), 1.15 (3H, d, $J=7.0$ Hz, CH_3 -21), 1.61 (3H, d, $J=6.3$ Hz, CH_3 -rha-6 $''$), 1.75 (3H, d, $J=6.2$ Hz, CH_3 -rha-6 $''$), 3.22 (3H, s, OCH_3), 4.75 (1H, d, $J=7.7$ Hz, C-26-glc-1 $'''$), 4.92 (1H, d, $J=7.2$ Hz, glc-1 $'$), 5.80 (1H, d, $J=0.9$ Hz, rha-1 $'''$), 6.34 (1H, d, $J=0.9$ Hz, rha-1 $''$), 5.29 (1H, br s, H-6)

^{13}C -NMR (150 MHz, pyridine- d_5)

δ (ppm) : 表 1 参照

2-2-4. エタノール抽出物の確認

D. tokoro の塊根 は岩手県遠野市松崎町白岩の山林にて採取した (採取日 2012 年 2 月)。塊根 16.13 g を EtOH 100 mL とともにホモジナイズし、それを減圧濾過して不溶物を除去し、濾液を約 30°C で減圧濃縮した。得られた EtOH 抽出物 (0.93 g) の一部 (50.0 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーで分画した。溶出液は、 CH_3CN と H_2O の混合溶媒とし、fr.1~fr.7 を得た。fr. 4 の質量分析の結果、ESI-HR-MS (positive) m/z 1099.5677 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_{53}H_{88}O_{22}Na^+$, 1099.5659 が検出されたことから Ethyl protodioscin の存在が示された。Methyl protodioscin のピークは検出されなかった。

表 1. ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) Data of Methyl protodioscin

Position	δ _c	δ _c	Position	δ _c	δ _c
Aglycon	実測値	文献値 ^{8) 9)}	Sugar moiety	実測値	文献値 ^{8) 9)}
1	39.1	37.3	3-O-Glc-1'	100.8	100.3
2	30.5	29.9	2'	78.6	78.1
3	79.0	78.3	3'	76.9	77.0
4	40.3	40.0	4'	78.4	77.8
5	141.4	140.6	5'	78.4	77.8
6	122.3	121.7	6'	61.8	61.3
7	32.7	32.1	2'-O-Rha-1''	103.4	102.9
8	32.2	31.5	2''	73.0	72.6
9	50.8	50.1	3''	73.4	72.9
10	37.6	37.0	4''	75.7	73.9
11	21.6	20.9	5''	70.0	70.5
12	38.0	38.5	6''	19.0	18.5
13	41.3	40.6	4'-O-Rha-1'''	102.5	102.1
14	57.1	56.4	2'''	73.1	72.6
15	32.8	32.1	3'''	73.3	72.9
16	81.8	81.2	4'''	75.7	74.2
17	64.7	64.0	5'''	70.9	69.5
18	16.8	16.1	6'''	19.2	18.7
19	19.9	19.3	26-O-Glc-1''''	105.5	105.0
20	41.0	40.3	2''''	75.7	75.2
21	16.8	16.2	3''''	79.1	78.5
22	113.2	112.5	4''''	72.3	71.8
23	30.7	30.6	5''''	79.1	78.5
24	28.7	28.0	6''''	63.4	62.9
25	34.7	34.0			
26	79.7	75.0			
27	17.9	17.2			
OMe	47.8	47.1			

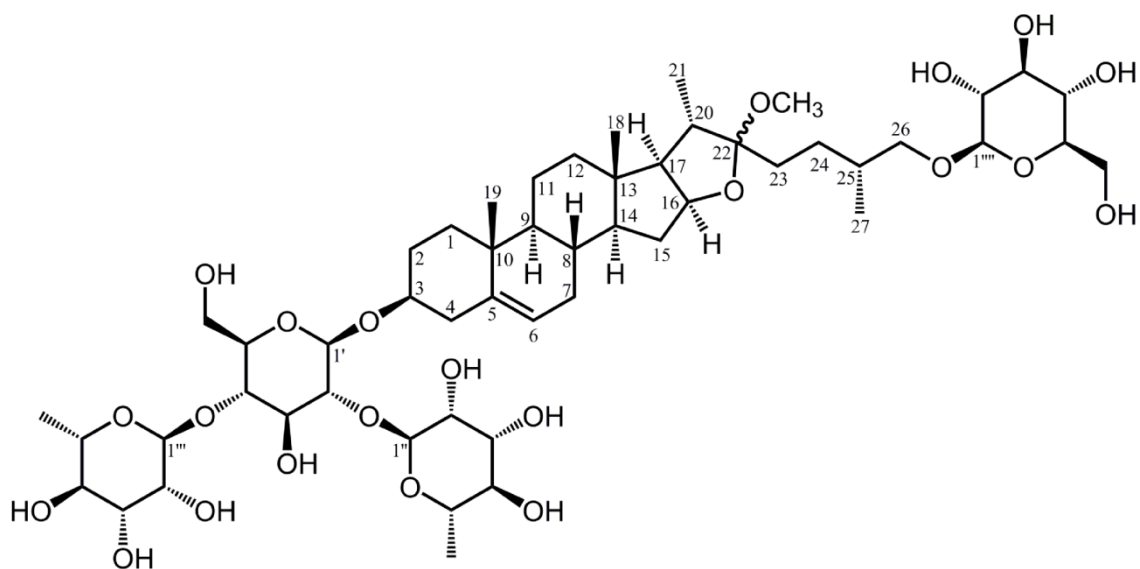


図 6. Methyl protodioscin の構造

2-2-5. アセトニトリル抽出による活性物質の単離

MeOH を使用しない抽出を試みた。*D. tokoro* の塊根は岩手県遠野市松崎町白岩の山林にて採取し (2012 年 2 月)、その 203.8 g を CH₃CN 500 mL とともにホモジナイズし、それを減圧濾過して不溶物を除去し、濾液を約 30°C で減圧濃縮した。得られた CH₃CN 抽出物 3.67 g を EtOAc-H₂O で液-液分配した。水抽出物については凍結乾燥、EtOAc 抽出物については無水 Na₂SO₄ を加えて脱水を行い、濾過して EtOAc を減圧留去し、濃縮乾固した。その結果、水抽出物 3.29 g を、EtOAc 抽出物 0.29 g を得た。

水抽出物 3.29 g を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにて分画した。溶出液は、H₂O と CH₃CN の混合溶媒とし、6 分画を得た。活性が 50 ppm 以下で、かつ精製度が高かった分画の一部 (703.4 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーで精製した。溶出液は、H₂O と CH₃CN の混合溶媒とし、2 回の分画を行い、化合物 1 種を単離し、化合物 II とした (図 7)。単離収率は 1.54 mg/g fresh weight で、IC₅₀ 値は質量分析結果から算出し 5.1 μM であった。

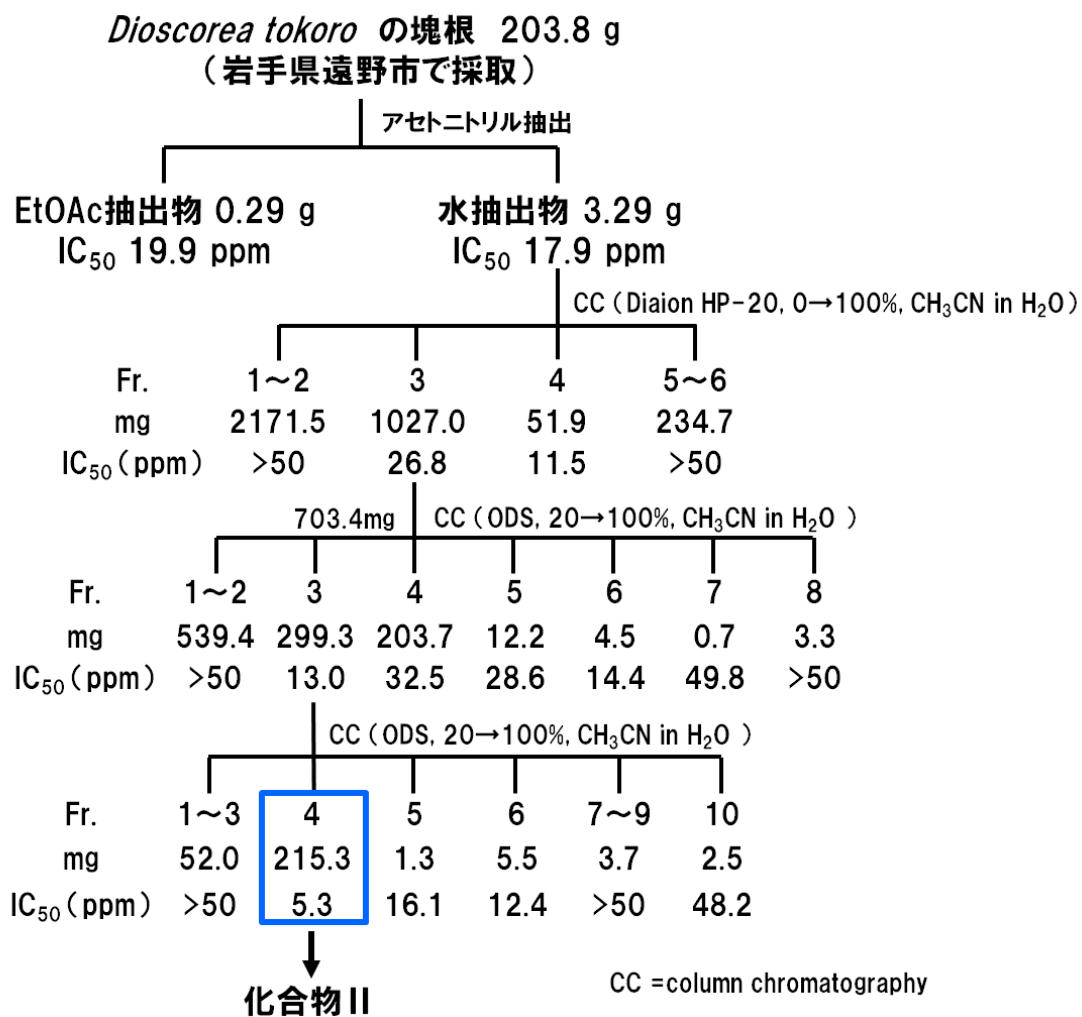


図 7. *D. tokoro* アセトニトリル抽出物の分画と活性物質の精製

2-2-6. 化合物 II (Protodioscin) の構造決定

化合物 II のスペクトルデータと文献値から Protodioscin と同定した (図 8)。

[化合物 II]

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (positive) m/z 1071.5367 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_{51}H_{84}O_{22}Na^+$, 1071.5346. 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5), δ (ppm) : 0.91 (3H, s, CH_3 -18), 1.00 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.07 (3H, s, CH_3 -19), 1.35 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3 -21), 1.64 (3H, d, $J=6.0$ Hz, CH_3 -rha), 1.78 (3H, d, $J=6.0$ Hz, CH_3 -rha), 4.83 (1H, d, $J=8.0$ Hz, C-26-glc-1 $'''$), 4.95 (1H, br d, glc-1 $'$), 5.87 (1H, br s, rha-1 $'''$), 6.41 (1H, br s, rha-1 $''$), 5.33 (1H, br d, H-6)

[Protodioscin] (文献値⁹⁾)

1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5), δ (ppm) : 0.89 (3H, s, CH_3 -18), 0.98 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3 -27), 1.04 (3H, s, CH_3 -19), 1.32 (3H, d, $J=6.5$ Hz, CH_3 -21), 1.60 (3H, d, $J=6.5$ Hz, CH_3 -rha-6 $'''$), 1.74 (3H, d, $J=6.5$ Hz, CH_3 -rha-6 $''$), 4.75 (1H, d, $J=7.8$ Hz, C-26-glc-1 $'''$), 4.92 (1H, d, $J=7.2$ Hz, glc-1 $'$), 5.80 (1H, d, $J=0.9$ Hz, rha-1 $'''$), 6.34 (1H, d, $J=0.9$ Hz, rha-1 $''$), 5.31 (1H, br d, H-6)

^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5)

δ (ppm) : 表 2 参照

表 2. ^{13}C -NMR (pyridine- d_5) Data of Protodioscin

Position	δ_c	δ_c	Position	δ_c	δ_c
Aglycon	実測値	文献値 ⁹⁾	Sugar moiety	実測値	文献値 ⁹⁾
1	38.0	37.5	3-O-Glc-1'	100.8	100.3
2	30.7	30.2	2'	78.6	78.1
3	79.0	78.7	3'	77.4	77.0
4	39.5	39.0	4'	78.5	77.8
5	141.3	140.8	5'	78.3	77.8
6	122.3	121.9	6'	61.8	61.3
7	32.8	32.4	2'-O-Rha-1''	103.4	102.9
8	32.2	31.7	2''	73.0	72.6
9	50.8	50.4	3''	73.3	72.9
10	37.6	37.2	4''	74.4	73.9
11	21.6	21.1	5''	70.0	70.5
12	40.4	40.0	6''	19.0	18.5
13	41.2	40.8	4'-O-Rha-1'''	102.5	102.1
14	57.1	56.6	2'''	72.2	72.6
15	33.0	32.5	3'''	73.2	72.9
16	81.6	81.1	4'''	74.6	74.2
17	64.3	63.9	5'''	70.1	69.5
18	17.0	16.5	6'''	19.1	18.7
19	19.9	19.4	26-O-Glc-1''''	105.4	105.0
20	41.3	42.7	2''''	75.7	75.2
21	17.0	16.5	3''''	79.1	78.5
22	111.2	110.7	4''''	70.9	71.8
23	37.6	37.2	5''''	79.1	78.5
24	28.9	28.4	6''''	63.3	62.9
25	34.8	34.3			
26	75.8	75.2			
27	18.0	17.3			

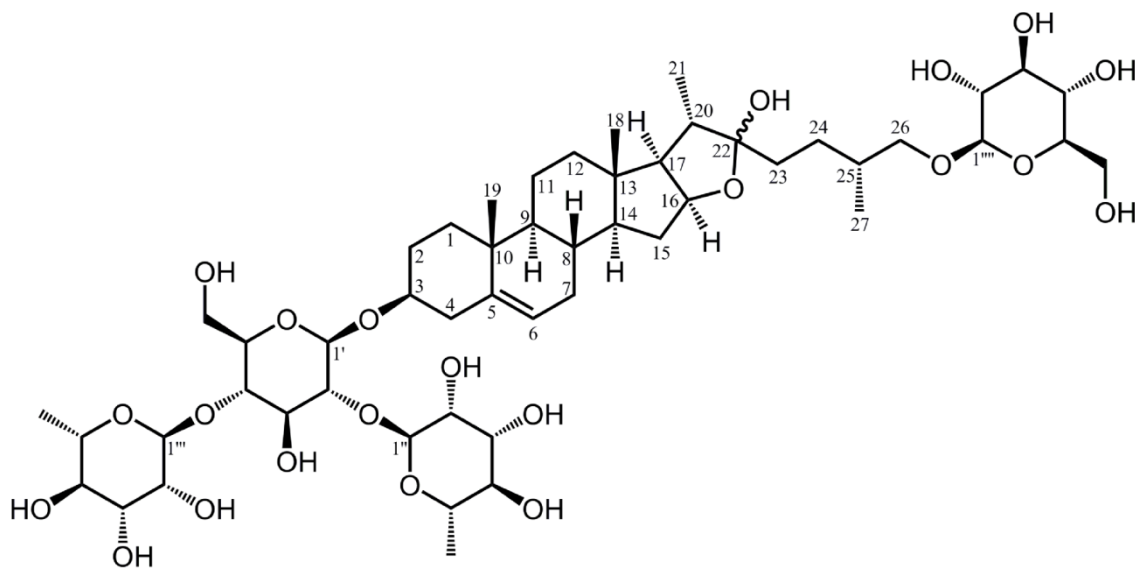


図 8. Protodioscin の構造

2-2-7. 加熱処理による Protodioscin の安定性

オニドコロの塊茎は蒸して食用に供する事から、加熱による有効成分の安定性の検討をした。*D. tokoro* の塊根 1 本 37.27 g を半分にカットし、一方を加熱処理 (19.3 g : 蒸煮 20 分)、もう一方を非加熱処理サンプル (17.9 g) とし、抽出には CH₃CN を用いた。アセトニトリル抽出溶液を ODS short column (CH₃CN 100%) を行った後、LC-MS 分析を行った。MS 条件は、イオン化法 : ESI, negative モードにて測定した。なお、単離した Protodioscin を標品として用いて加熱前後での含有量を定量した。

2-2-8. 生薬・ヒカイ (葎蕪) 中の Prododioscin の探索

生薬・ヒカイ (葎蕪) 10.22 g [ウチダ和漢薬 (東京)] を CH₃CN 100 mL とともにホモジナイズし、それを減圧濾過して不溶物の除去を行い、濾液を約 30°C で減圧濃縮を行い、CH₃CN 抽出物 0.32 g を得た。これを EtOAc-H₂O で液-液分配した。水抽出物については凍結乾燥、EtOAc 抽出物については無水 Na₂SO₄ を加えて脱水を行い、濾過して EtOAc を減圧留去し、濃縮乾固した。その結果、水抽出物 0.23 g、EtOAc 抽出物 0.03 g を得た。質量分析を行ったが、Protodioscin のピークは検出限界以下だった。

2-2-9. HUVEC 増殖抑制活性試験

HL-60 増殖抑制活性を指標に単離した Protodioscin の細胞毒性について評価するため、ヒト正常細胞 [正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)] に対する活性試験を行った。

HUVEC は EGM[®]-2 培地に Cell Boost (10 mL) を加えた培養液で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養、維持した。96 well マイクロプレートに Attachment Factor を塗布し、1.0×10⁵ cells/ml に調製した細胞液を 100 μL ずつ分注し、24 時間培養した。被験試料の希釈系列を、上記培地を用いて公比 4 倍で 4 種の濃度 (100、25.0、6.25、1.56 ppm) となるように 48 well マイクロプレートにて調製した。DMSO は 1% 以下になるよう調製した。細胞の付着を確認し、4 種の濃度に希釈した試料溶液を 100 μL ずつ 3 連で分注した。試料コントロールとして培地 100 μL と試料溶液 100 μL を、細胞液のコントロールとして細胞液 100 μL と培地 100 μL を分注した。被験試料の最終濃度は 50.0、12.5、3.13、0.78 ppm となる。また、ブランクには培地のみ 200 μL 分注した。72 時間培養終了後、生細胞呼吸量を測定する色素 alamar Blue[®] を 20 μL ずつ添加し、更に 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。上清 200 μL を新しい 96 well マイクロプレートに移した後、マイクロプレートリーダー を用いて吸光度 570 nm、

595 nm を測定し、HL-60 と同様の評価方法を用いて増殖率を求めた（式 1）ところ、 IC_{50} 値は 2.4 μ M であった。

2-3. 結果と考察

D. tokoro の MeOH 抽出物 (3.71g) を液-液分配して得られた EtOAc 抽出物 (0.34 g) と水抽出物 (3.30 g) について HL-60 増殖抑制活性試験を行った結果、IC₅₀ 値はそれぞれ 16.4 ppm、11.5 ppm であった。いずれも同程度の活性を示したため、回収量が多い水抽出物を用いて活性試験を指標として分画し、活性物質 1 種を単離した (図 5)。質量分析では ESI-HR-MS (positive) m/z 1085.5522 ([M+Na]⁺) Calcd. for C₅₂H₈₆O₂₂Na⁺, 1085.5503 を示し、NMR データの解析結果を文献値と比較した結果、Methyl protodioscin (図 6) と同定した。なお、単離収率は 1.06 mg/g fresh weight で、IC₅₀ 値は 2.5 μM だった。

しかし、別途 EtOH 抽出物を調製し、分画したフラクションについて質量分析を行った結果、Protodioscin のエチル化体を確認した【Ethyl protodioscin : ESI-HR-MS (positive) m/z 1099.5677 ([M+Na]⁺) Calcd. for C₅₃H₈₈O₂₂Na⁺, 1099.5659】。よって、Methyl protodioscin はメタノール抽出の過程で生じたアーティファクトであると考えられた。

この結果から、溶媒を CH₃CN に変更し、再度抽出と分画・精製を行った。CH₃CN 抽出物から得られた EtOAc 抽出物および水抽出物の IC₅₀ 値はそれぞれ 19.9 ppm、17.9 ppm であった。水抽出物を分画し、活性物質 1 種を単離し (図 7)、NMR データの解析結果を文献値と比較した結果 Protodioscin (図 8) と同定した。なお、単離収率は 1.54 mg/g fresh weight で、IC₅₀ 値は 5.1 μM だった。Protodioscin は *Dioscorea* 属植物では、*D. nipponica* からの単離報告があるが、*D. tokoro* からの単離報告は今回が初めての知見である。

D. tokoro の塊根を原料に含む生薬・ヒカイ (萆薢) の MeOH 抽出物について質量分析を行ったが、*D. tokoro* から単離報告のあるサポニン (Dioscin、Gracillin、Tokoronin、Yononin) は検出されず、また、本研究で単離した Protodioscin も検出されなかった。その原因として、ヒカイには、タチドコロ (*D. gracillima*) などの *Dioscorea* 属植物由来の他の種の植物も含まれており、更に、産地についても国内だけに留まらず、中国や韓国などの様々な産地由来の塊根が使用されているため、含有成分が異なる可能性が考えられた。

Protodioscin の IC₅₀ 値は HL-60 増殖抑制活性試験の結果 5.1 μM だったのに対し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC では、IC₅₀ 値は 2.4 μM であり、どちらも同程度の活性を示した。サポニン類はその親水基と疎水基によりイオノフォアのように細胞膜を破壊することが知られており、HL-60 細胞にも HUVEC にも選択性を示さず作用したと見られる。

Protodioscin の熱安定性を検証するため、*D. tokoro* の加熱処理塊茎と非加熱処理塊茎の抽出物の LC-MS を分析した結果、Protodioscin の含有量は非加熱処理で 0.65

mg/g fresh weight、加熱処理で 0.87 mg/g fresh weight となり、含有量比は加熱処理サンプル/非加熱処理サンプル=1.34 となった。加熱処理をしても含有量が減少していないことから、食用に供する際の加熱処理では分解しないと考えられる。なお、加熱処理した方が、Protodioscin の含有量が大きくなったことについては、加熱によって植物組織が破壊され、非加熱の状態よりも抽出効率が向上した為であると考えている。

また、本研究で用いた岩手県で採集した *D. tokoro* の成分を、文献にある産地の異なる *D. tokoro* から単離された成分と比較して考察した。まず、中国で採集された *D. tokoro* からは、加水分解の結果、Diosgenin、Yamogenin、Tokorogenin などのサポゲニンの単離が報告されている⁷⁾(図 4)。生理活性として、Diosgenin にはメラニン生合成阻害¹⁰⁾、LDL コレステロール上昇抑制¹¹⁾、Yamogenin には抗炎症作用¹²⁾が報告されている(表 2)。国内では、京都府や福岡県で採取された *D. tokoro* から、Dioscin、Gracillin、Tokoronin、Yononin などのサポニンの単離が報告されている(図 3)。生理活性として、Dioscin には抗血栓¹³⁾、抗真菌¹⁴⁾、血糖値上昇抑制¹⁵⁾、Gracillin には抗寄生虫活性¹⁶⁾が報告されている。一方で Protodioscin には、抗血栓¹⁴⁾、LDL コレステロール上昇抑制¹¹⁾が報告されている(表 3)。しかし、質量分析の結果、本研究で用いた岩手県で採集した *D. tokoro* からは、上記に示した4種類のサポニンのうち、Gracillin、Tokoronin、Yononin は検出されず、Dioscin のみが検出された【Dioscin : ESI-HR-MS (positive) m/z 891.4731 ([M+Na]⁺) Calcd. for C₄₅H₇₂O₁₆Na⁺, 891.4713】。

表 3. 国内および中国で採取された *D. tokoro* との成分比較

採集地	化合物名	分子式及び分子量	生理活性
中国	Diosgenin	C ₂₇ H ₄₂ O ₃ : 414	メラニン生合成阻害、 LDL コレステロール上昇抑制
	Yamogenin	C ₂₇ H ₄₂ O ₃ : 414	抗炎症
	Tokorogenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₅ : 448	報告なし（構造決定のみ）
京都府、福岡県	Dioscin	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆ : 868	抗血栓、抗真菌、血糖値上昇抑制
	Gracillin	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇ : 884	抗寄生虫
	Tokoronin	C ₃₂ H ₅₂ O ₉ : 580	報告なし（構造決定のみ）
	Yononin	C ₃₂ H ₅₂ O ₈ : 564	報告なし（構造決定のみ）
岩手県	Dioscin	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆ : 868	抗血栓、抗真菌、血糖値上昇抑制
	Protodioscin	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂ : 1048	抗血栓、LDL コレステロール上昇抑制

他の植物の例を見ると、同じ植物でも、産地によって成分が異なる例が報告されている。例えば、生薬植物の多くは安定した生産量を確保する目的で栽培を検討されることが多いが、栽培品種は野生種に比べて薬理成分が減少する事例や、成分組成が異なるといった事例が報告されている¹⁷⁾。一般的に植物は、土壌成分や気象条件、その他環境ストレスなどによって二次代謝産物が大きく異なってくることが知られている¹⁸⁾。また、同属植物内で発生した交雑種から、低温などの環境条件に対して耐性のあるものが自然淘汰によって生き残り、含有成分に違いが生じた可能性も考えられる。これらの要因で生じた含有成分の違いが食習慣の地域差に繋がり、東北地方で「健康に良い」として食用に供されてきた一因となった可能性がある。

参考文献

1. 大井次三郎, 大橋広好, 山下貴司「エコロン自然シリーズ植物Ⅱ」保育社 p.57 (1996)
2. 石井龍一ほか「作物学事典」朝倉書店 pp. 412-416
3. 水野瑞夫, 田中俊弘「日本薬草全書」新日本法規出版株式会社 p.636 (1995)
4. T. Tsukamoto, T. Kawasaki, T. Yamauchi. Saponins of Japanese *Dioscoreaceae*. VIII. Saponins from the rhizomes of *Dioscorea tokoro* MAKINO. *Yakugaku Zasshi*. Vol. 77, pp. 1225-1229 (1957)
5. T. Kawasaki, T. Yamauchi. Structures of prosapogenin-B and A of dioscin and cooccurrence of B with dioscin in the rhizoma of *Dioscorea tokoro* MAKINO. *Chem. Pharm. Bull.*, Vol. 16, pp. 1070-1075 (1968)
6. T. Kawasaki, T. Yamauchi. Yononin and tokoronin, new steroid saponins in the rhizome of *Dioscorea tokoro* MAKINO. *Yakugaku Zasshi*. Vol. 83, pp. 757-760 (1963)
7. T. S. Yung, W. C. Hua. Steroids. XLVI. Steroid sapogenins. 3. Isolation of steroid sapogenin from rhizomes of *Dioscorea tokoro*. *Yaouxue Xuebao*. Vol. 11, pp. 787-789 (1964)
8. S. Yahara, T. Nakamura, Y. Someya, T. Matsumoto, T. Yamashita, T. Nahara. Steroidal glycosides, indiosides A-E, from *Solanum indicum*. *Phytochemistry*. Vol. 43, pp. 1319-1323 (1996)
9. Z. Yang, F. Bing, K. L. Ping, L. Bin, H. H. Zhi, C. Y. wen, M. B. Ping. Biotransformation of dichotomin by pectinex BE XXL. *Chinese Journal of Natural Medicines*. Vol. 7, pp. 381-389 (2009)
10. L. Jongsung, J. Kwangseon, K. Y. Shik, P. Deokhoon. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life sciences*. Vol. 81, pp. 249-254 (2007)
11. C. C. Kok, G. Stephen A. Functional elements from asparagus for human health. *Acta Horticulturae*. Vol. 776, pp. 219-225 (2008)
12. V. Timea, N. Ghodrattollah, B. Ferenc, H. Gabor, C. Jozsef, G. Zoltan, M. Sandor, E. Istvan. The effect of fenugreek on the gene expression of arachidonic acid metabolizing enzymes. *Phytotherapy research*. Vol. 25, pp. 221-227 (2011)
13. H. Li, W. Huang, Y. wen, G. Gong, Q. Zhao, G. Yu. Anti-thrombotic activity and chemical characterization of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright. *Fitoterapia*. Vol. 81, pp.1147-1156 (2010)
14. S. Imai, T. Murata, S. Fujioka, E. Murata, M. Goto. Crude drugs and oriental

- crude drug preparations by bioassay. XXI. Search for biologically active plant ingredients by means of antimicrobial tests. 3. Antifungal principles of *Dioscorea* species. *Takeda Kenkyusho Nenpo*. Vol. 26, pp. 66-76 (1967)
15. J. J. Ryae, L. J. Seon, L. C. Hee, K. J. Yeon, K. S. Dong, N. D. Hyun. Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. *Archives of Pharmacal Research*. Vol. 29, pp. 348-353 (2006)
16. W. Gaoxue, L. Jun, Z. Liangwei, W. Jianfu, F. Tingting, Z. Zhuang, H. Jing, J. Dongxin, W. Yong, Z. Ming. Application of gracillin in agent for killing ectoparasite of aquatic animals. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*. Patent pp.15 (2009)
17. 佐竹元吉「薬用植物・生薬開発の新展開」シーエムシー出版 pp. 27-28 (2005)
18. 新免輝男「現代植物生理学 4 環境応答」朝倉書店 pp. 128-176 (1991)

3. ヤナギ科 *Salix gilgiana* の
HL-60 増殖抑制活性物質の研究

3-1. ヤナギ科カワヤナギについて

生薬の材料として用いられる植物の中から、健康茶として利用できることを目指して木本植物由来の生薬のメタノール抽出物について HL-60 増殖抑制活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、*Salix gilgiana* に活性が見られたため (IC₅₀ 値：16 ppm)、活性物質を明らかにすることを目的とした。

S. gilgiana (図 1, 2) はヤナギ科の木本で、和名をカワヤナギといい、北海道南部、本州、ウスリー、朝鮮半島、中国東北部に分布する¹⁾。生薬・川柳 (カワヤナギ) は、枝を原料とし、鎮痛、解熱、利尿、収斂薬として煎用する他、打ち身などに外用する。*S. gilgiana* は、Apigenin や Luteolin などのフラボン類の単離が報告²⁾されている他、生理活性として抗炎症作用が報告³⁾されている。

また、ヤナギ科植物は、挿し木による増殖が容易で初期成長が早く、過湿・乾燥条件に対する適応能力に優れるという特徴から、水辺や山地の荒廃地などの緑化に多く用いられている。ヒトの健康維持、改善に役立つ成分が新たに発見されれば、有用な物質を安価に多量に生産できる系として利用できることが期待できる。



図 1. *S. gilgiana* 地上部

<http://arakawashokubutu.life.cocan.jp/ara11yanagika.html>



図 2. *S. gilgiana* 枝と葉

<http://elm3.web.fc2.com/top/ruijisyu-miwakekata-hoka/onoeyanagi-kawayanagi-ta-tiyanagi-nekoyanagi.html>

3-2. *S. gilgiana* 枝の抽出と活性物質の精製

S. gilgiana の枝 (図 2) の乾燥品 [ウチダ和漢薬 (東京)] 450 g をミキサーで MeOH 3L とともにホモジナイズして 2 回抽出した。得られた MeOH 抽出物 (24.2 g) の一部 (14.78 g) について、セルロースカラムクロマトグラフィーにて分画した。溶出液は CHCl₃、EtOAc、acetone、MeOH、H₂O とし、5 分画を得た。CHCl₃、EtOAc、acetone 分画を合わせ (2.94 g)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc)、シリカゲル PTLC (60% EtOAc in hexane) にて精製した結果、2 種類の化合物の混合物 (6.9 mg) が得られ、それぞれ化合物 I と II とした (図 3)。

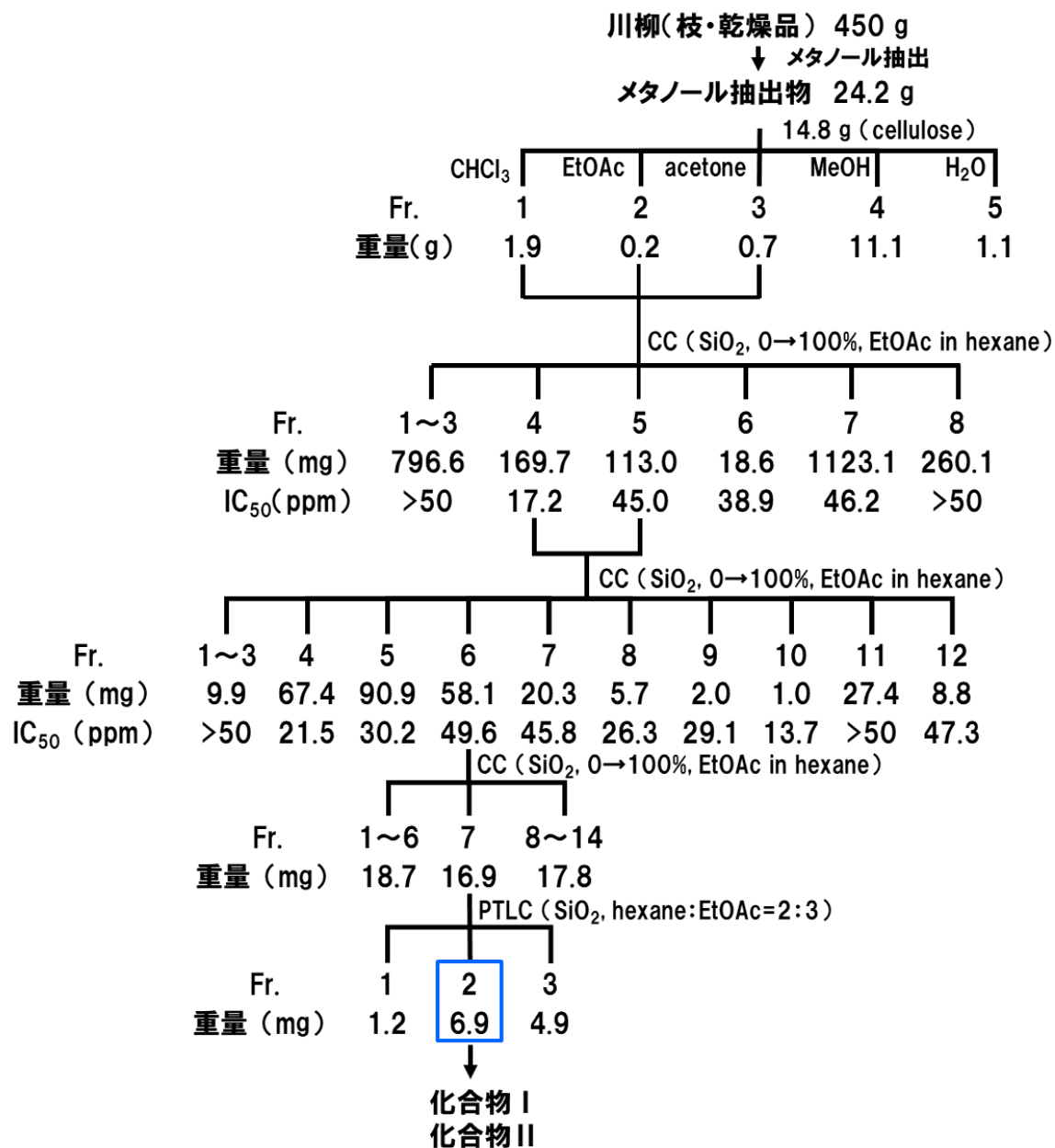


図 3. 化合物 I と化合物 II の精製

S. gilgiana の活性化合物について更に探索するため、スケールアップした。乾燥品 1.0 kg を MeOH 6L でホモジナイズして 2 回抽出し、MeOH 抽出物 (41.7 g) を得た。これを CHCl₃-H₂O にて液-液分配し、CHCl₃ 抽出物 (13.2 g) と H₂O 抽出物 (25.3 g) を得た。CHCl₃ 抽出物 (13.2 g) についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を繰り返した。溶出液は hexane-EtOAc-MeOH の混合溶媒を用いた。得られたフラクション (188.9 mg) を更にシリカゲル PTLC (60% EtOAc in hexane) にて精製した結果、化合物Ⅲ (22.3 mg) を得た (図 4)。

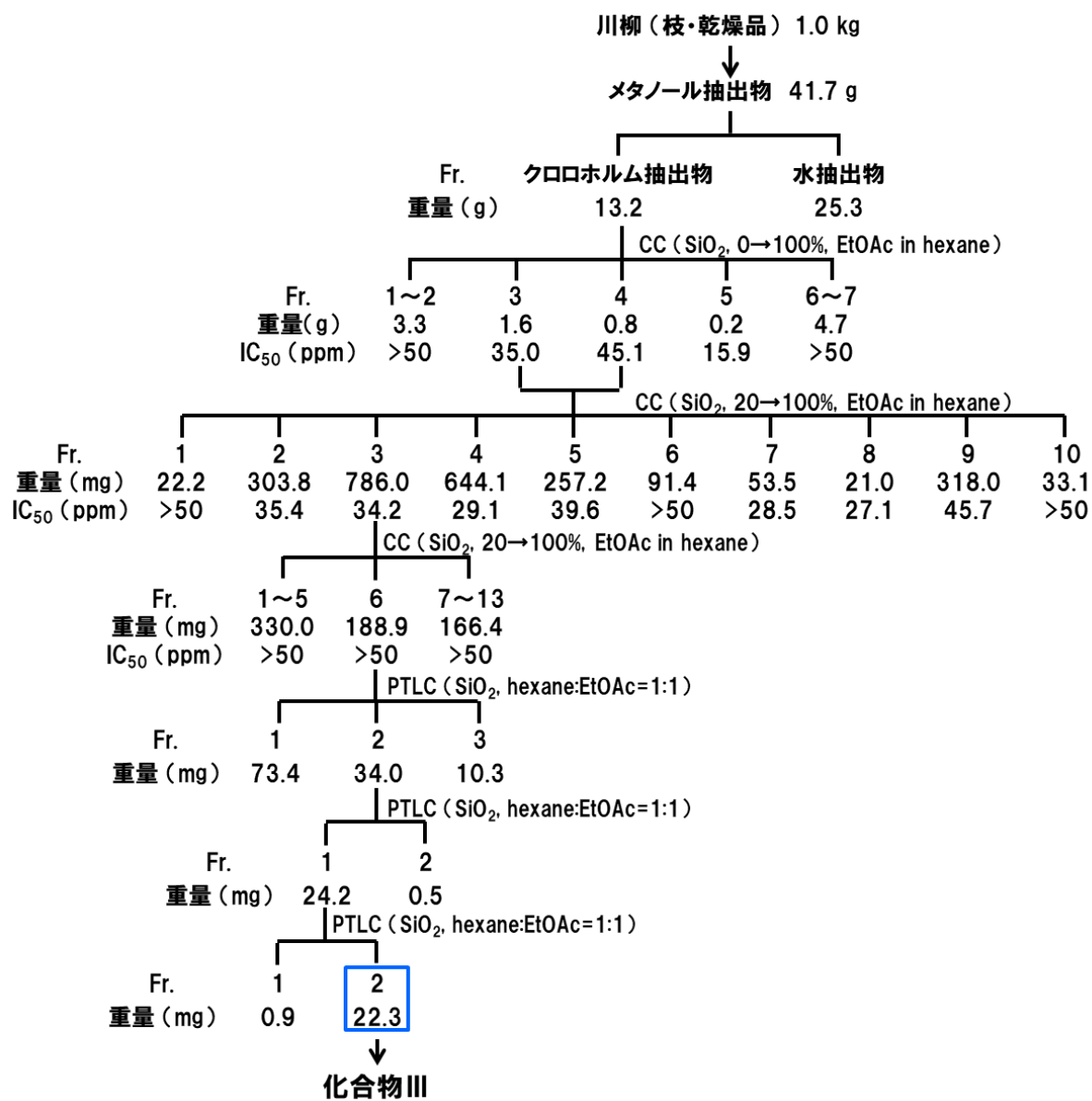


図 4. 化合物IIIの精製

新たに乾燥品 2.0 kg を MeOH 10L で 2 回抽出し、メタノール抽出物 (81.6 g) を得た。前述と同じ方法で液-液分配した後、CHCl₃ 抽出物 (20.5 g) についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc) による分画を繰り返した。この過程で得られたフラクション A (238.9 mg) にて白色結晶が析出したため、濾別し、結晶を化合物IV (41.5 mg) とした。上清は、ODS カラムクロマトグラフィーにて分画した。溶出液は MeOH-H₂O の混合溶媒とした。分画物を更に ODS PTLC (95% MeOH in H₂O) により精製し、化合物V (6.2 mg) を得た。フラクション B は ODS カラムクロマトグラフィー (MeOH-H₂O)、ODS PTLC (95% MeOH in H₂O) にて精製し、2 種類の化合物の混合物 (10.2 mg) を得て、V と VI とした (図 5)。

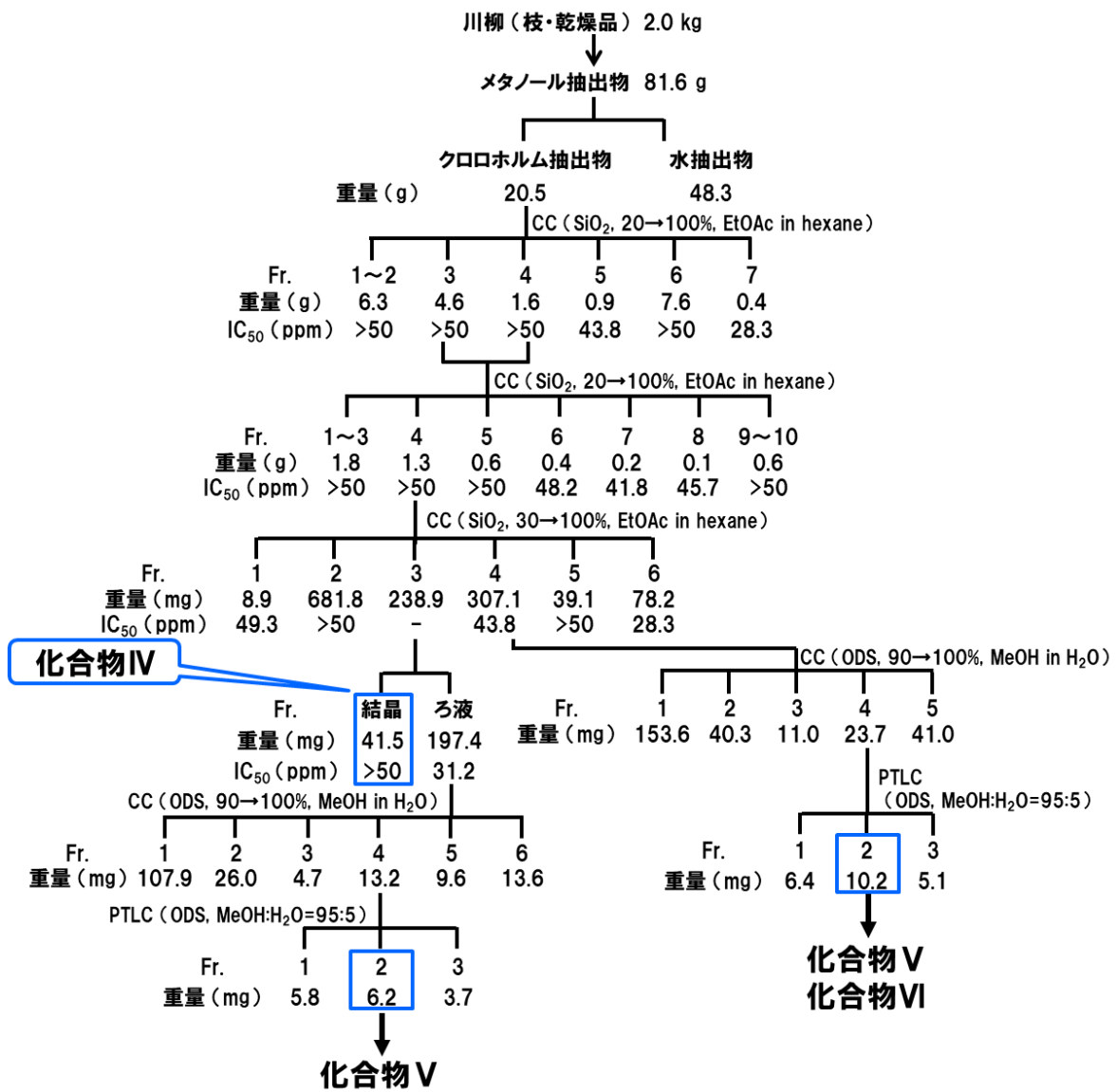


図 5. 化合物IV、化合物V、化合物VIの精製

3-3. 化合物 I 及び II の構造解析

化合物 I 及び II の下記のスเปクトルデータより、これらを 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol と 3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol と同定した (図 10)。

[化合物 I] white solid

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (positive) m/z 161.0576 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_8H_{10}O_2Na^+$, 161.0573. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 2.78 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.81 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 6.76 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.07 (2H, d, $J = 8.8$ Hz)
 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 38.4 (C-1), 64.0 (C-2), 115.6 (C-3 and C-5), 130.3 (C-2 and C-6), 130.5 (C-1), 154.5 (C-4)

[2-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol] (標品)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 2.77 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.79 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 6.74 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.06 (2H, d, $J = 8.8$ Hz)
 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 38.3 (C-1), 62.8 (C-2), 114.9 (C-3 and C-5), 129.3 (C-2 and C-6), 129.5 (C-1), 155.3 (C-4)

[化合物 II] white solid

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (positive) m/z 175.0733 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_9H_{12}O_2Na^+$, 175.0730. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 1.84 (2H, m), 2.62 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.65 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 6.73 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.04 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)
 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 31.3 (C-1), 34.6 (C-2), 62.5 (C-3), 115.4 (C-3 and C-5), 129.7 (C-2 and C-6), 134.0 (C-1), 154.0 (C-4)

[3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol] (標品)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 1.82 (2H, m), 2.60 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.62 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 6.71 (2H, d, $J = 6.4$ Hz), 7.02 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)
 ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 30.7 (C-1), 34.5 (C-2), 60.1 (C-3), 114.9 (C-3 and C-5), 128.9 (C-2 and C-6), 132.1 (C-1), 155.1 (C-4)

3-4. 化合物Ⅲの構造解析

化合物Ⅲ (22.3 mg) について質量分析および NMR による構造解析を試みた。質量分析により、分子量及び分子式を推定 [ESI-HR-MS (positive) m/z 451.3552 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_{29}H_{48}O_2Na^+$, 451.3547] したが、NMR スペクトルにおいてはピークが重複しており、解析が困難であった。そこで X 線解析による構造決定を計画したが、そのままでは単結晶の作製が困難であった。そこで、化合物Ⅲの MTPA エステル誘導体を調製して単結晶を作製し、X 線結晶構造解析にて解析を行った。

3-4-1. 化合物Ⅲの MTPA エステル誘導体の調製と精製

文献⁴⁾の方法に従って、化合物Ⅲ (分子量 428) 8.3 mg (19.4 μmol) に DCC 15.2 mg (73.6 μmol)、(*R*)-MTPA 13.6 mg (54.4 μmol)、DMAP 6.4 mg (52.3 μmol)、無水ジクロロメタン溶液 800 μL を加えた。攪拌しながら室温で 20 時間反応し、得られた生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 9 : 1) とシリカゲル PTLC (hexane : EtOAc = 9 : 1) にて精製し、MTPA エステル (10.8 mg) を得た (図 6)。

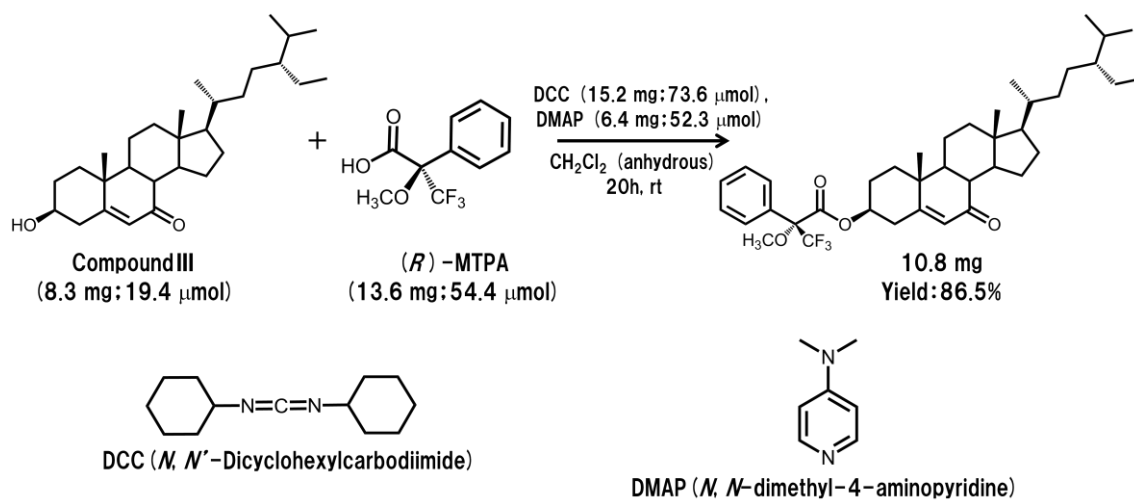


図 6. 化合物Ⅲの MTPA エステルの調製

3-4-2. 化合物Ⅲ MTPA エステルの単結晶の調製

3-4-1. で得られた MTPA エステル (10.8 mg) を少量の MeOH (約 1.0 mL) に溶解した後、バイアル瓶 4 本に分注した。2 本を 4℃、残りの 2 本を-18℃にて、それぞれ二週間、静置した。それぞれの条件で得られた結晶を光学顕微鏡にて観察した結果、-18℃にて静置したサンプルで板状結晶 (図 7) が得られたため、これを X 線結晶構造解析に供した。(X 線結晶構造解析は、岡山大学自然生命科学研究支援センターに依頼した。)

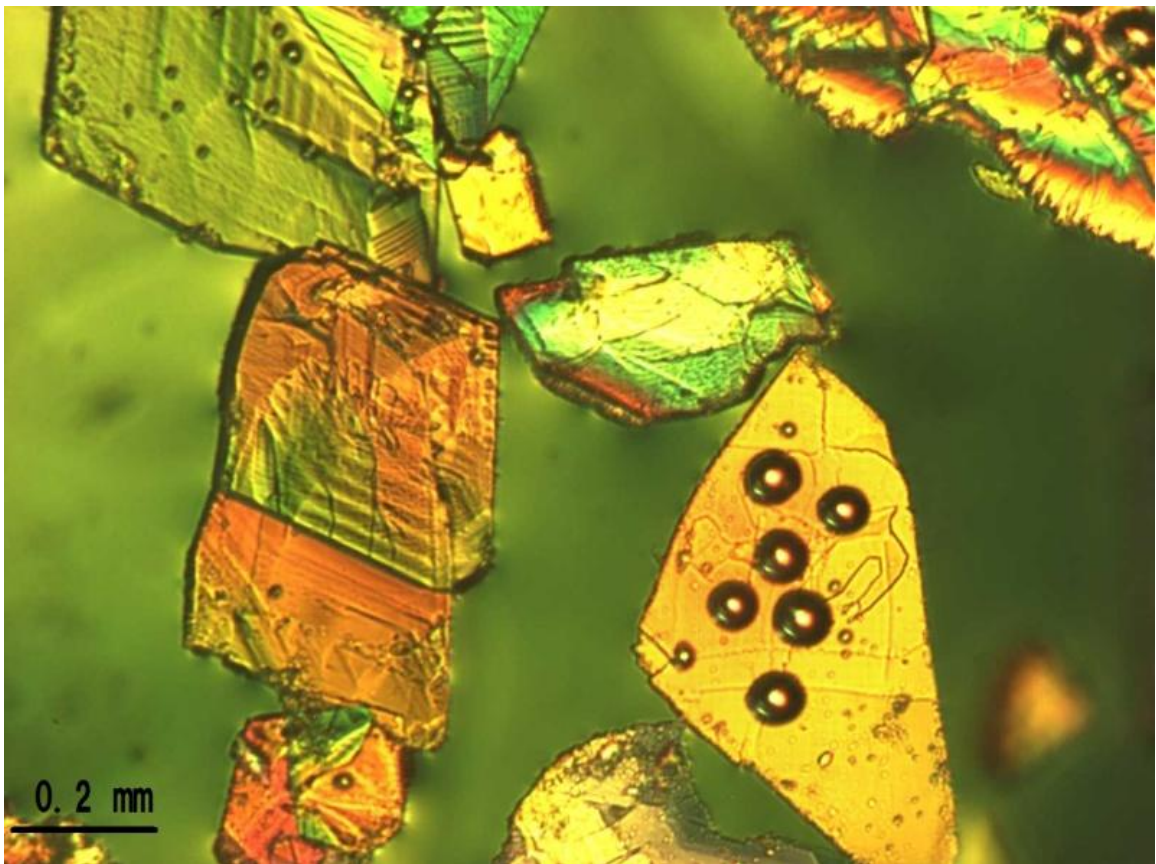


図 7. 化合物Ⅲ MTPA エステル化体の板状結晶

3-4-3. 化合物Ⅲ MTPA エステルの構造

化合物Ⅲの MTPA エステルの X 線結晶構造解析の結果は以下の通りであり、その分子模型および構造を図 8 および 9 に示した。以上より、化合物Ⅲを 7-ketositosterol と同定した。

$C_{39}H_{55}F_3O_4$, MeOH, $M=644.86$, monoclinic, space group P2 (1), $a=12.132$ (7) Å, $\alpha=90^\circ$; $b=8.011$ (4) Å, $\beta=93.172$ (7)° ; $c=36.88$ (2) Å, $\gamma=90^\circ$; $v=3579$ (3) Å³, $Z=4$, $D_{\text{calcd}}=1.197$ mg/m³, crystal size 0.16×0.15×0.07 mm³. Cu K α ($\lambda=0.71075$ Å) , $F(000)=1392$, $T=110$ (2). The final R values were $R_1=0.0551$, and $wR_2=0.1523$, for 16.58 observed reflections [$I>2\sigma(I)$]. The absolute structure parameter was -0.1 (3).

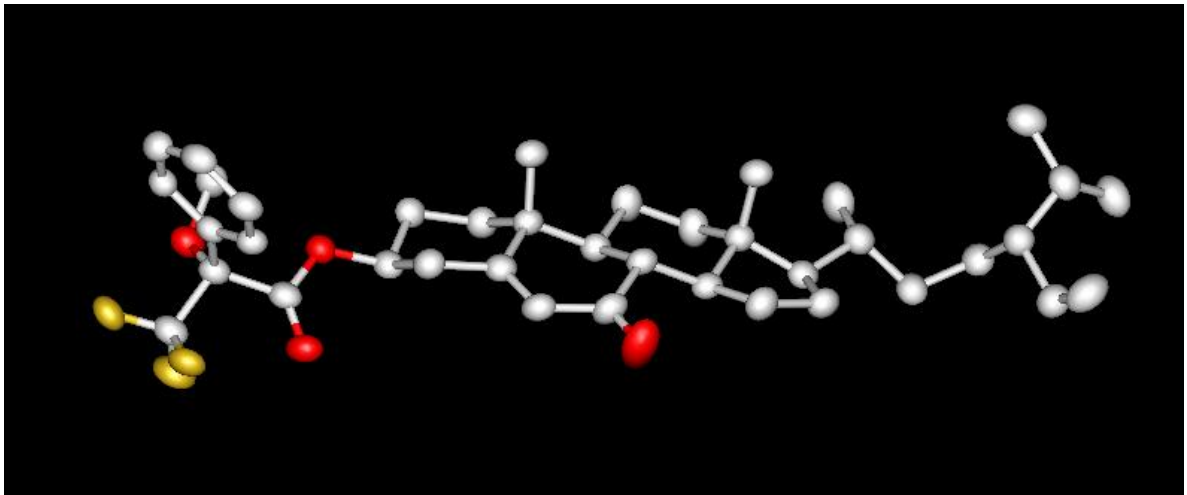


図 8. 化合物Ⅲ MTPA エステルの分子模型

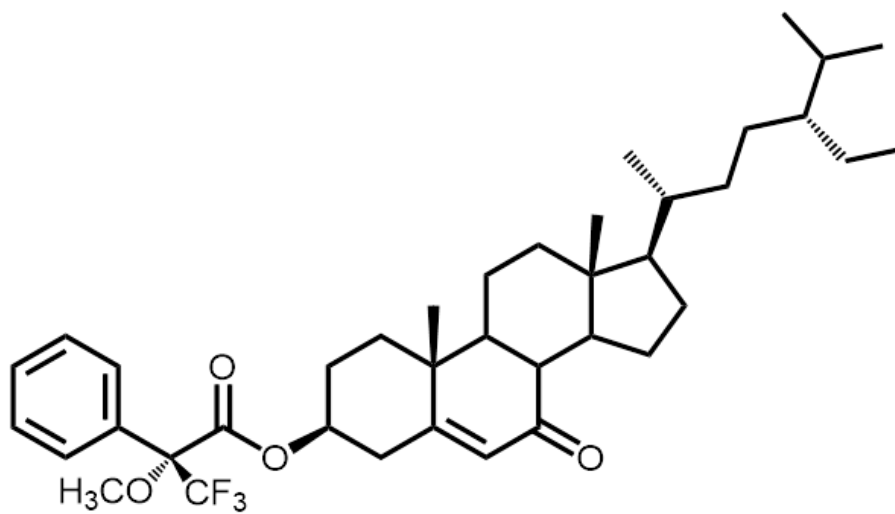


図 9. 化合物Ⅲ MTPA エステルの構造

3-4-4. 化合物Ⅲの NMR スペクトルデータの帰属

化合物Ⅲのスペクトルデータは、7-ketositosterol (図 10) の文献値と一致した。

[化合物Ⅲ]

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (positive) m/z 451.3552 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_{29}H_{48}O_2Na^+$, 451.3547. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 5.67 (1H, br d, H-6), 3.70-3.60 (1H, m, H-3), 2.51-2.30 (3H, m), 2.22 (1H, br t, $J=11.2$ Hz), 2.03-1.80 (6H, m), 1.74-1.40 (6H, m), 1.36-0.98 (15H, m, including 1s (3H, H-19) at 1.18 ppm), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.84 (3H, t, $J=7.0$ Hz, H-29), 0.81 (3H, d, $J=8.0$ Hz, H-26), 0.78 (3H, d, $J=7.6$ Hz, H-27), 0.66 (3H, s, H-18)

[7-ketositosterol] (文献値⁵⁾)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 5.68 (1H, br s, H-6), 3.70-3.60 (1H, m, H-3), 2.55-2.30 (3H, m), 2.20 (1H, br t, $J=9.0$ Hz), 2.10-1.75 (6H, m), 1.75-1.40 (6H, m), 1.40-1.00 (15H, m, including 1s (3H, H-19) at 1.19 ppm), 0.92 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.84 (3H, t, $J=7.4$ Hz, H-29), 0.83 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-18)

^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$)

δ (ppm) : 表 2 参照

表 2. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) data of 7-ketositosterol

Position	化合物Ⅲ (δC)	7-ketositosterol (δC)
	実測値	文献値 ⁵⁾
1	36.52	36.34
2	31.36	31.17
3	70.71	70.48
4	41.98	41.81
5	165.29	165.19
6	126.29	126.08
7	202.58	202.37
8	45.59	45.41
9	50.08	49.92
10	38.46	38.27
11	21.39	21.21
12	38.86	38.69
13	43.27	43.09
14	50.12	49.95
15	26.22	26.07
16	28.75	28.54
17	54.86	54.69
18	12.16	11.96
19	17.49	17.3
20	36.27	36.07
21	19.11	18.91
22	34.1	33.93
23	26.51	26.32
24	45.98	45.8
25	29.27	29.11
26	19.99	19.79
27	19.21	19.03
28	23.21	23.04
29	12.26	11.96

3-4-5. 化合物IV、化合物V、化合物VIの構造

質量分析と NMR の解析と文献との比較により、化合物IV、化合物V、化合物VIはそれぞれ Azelaic acid、7 β -hydroxysitosterol、7 α -hydroxysitosterol と同定した (図 10)。

[CompoundIV] white solid

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (negative) m/z 187.0998 ($[M-H]^+$) Calcd. for $C_9H_{15}O_4^+$, 187.0965. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 2.17 (4H, t, H-2, H-8), 1.46 (4H, m, H-3, H-7), 1.23 (6H, s, H-4, H-5, H-6)
 ^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 174.54 (C-1, C-9), 33.64 (C-2, C-8), 28.48 (C-5), 28.43 (C-4, C-6), 24.46 (C-3, C-7)

[Azelaic acid] (標品)

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 11.91 (1H, br s, H-1) 2.19 (4H, t, H-2, H-8), 1.49 (4H, m, H-3, H-7), 1.40-1.08 (6H, s, H-4, H-5, H-6)
 ^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$), δ (ppm) : 174.42 (C-1, C-9), 33.70 (C-2, C-8), 28.46 (C-5), 28.46 (C-4, C-6), 24.50 (C-3, C-7)

[CompoundV] white solid

ESI-HR-MS (positive) m/z 413.3780($[M-OH]^+$) Calcd. for $C_{29}H_{49}O^+$, 413.3778.
 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 5.27 (1H, br s, H-6), 3.82 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 3.53 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.82 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H-29), 0.80 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.67 (3H, s, H-18)

[7 β -hydroxysitosterol] (文献値⁶⁾)

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 5.27 (1H, br s, H-6), 3.83 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 3.52 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.83 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H-29), 0.81 (3H, d, $J=7.6$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.67 (3H, s, H-18)

[CompoundVI] white solid

ESI-HR-MS (positive) m/z 413.3780($[M-OH]^+$) Calcd. for $C_{29}H_{49}O^+$, 413.3778.
 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 5.58 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-6), 3.82 (1H, br s, H-7), 3.55 (1H, m, H-3), 0.97 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.83 (3H, t,

$J=7.6$ Hz, H-29), 0.81 (3H, d, $J=7.6$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.66 (3H, s, H-18)

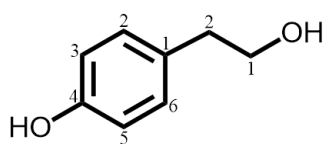
[7 α -hydroxysitosterol] (文献值⁶⁾)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm) : 5.27 (1H, br s, H-6), 3.83 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 3.52 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.83 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H-29), 0.81 (3H, d, $J=7.6$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.67 (3H, s, H-18)

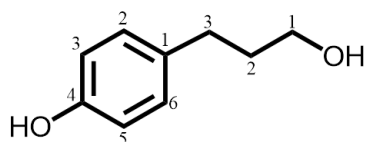
Compound V and VI (CDCl₃) δ (ppm) : 表 3 参照

表 3. ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) data of 7α - and 7β -hydroxysitositerol

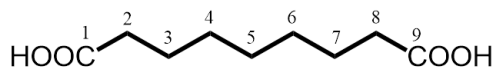
Position	化合物V (δC)	7β -hydroxy- sitositerol (δC)	化合物VI (δC)	7α -hydroxy- sitosterol (δC)
	実測値	文献値 ⁶⁾	実測値	文献値 ⁶⁾
1	37.08	36.96	37.55	37.39
2	31.72	31.58	31.50	31.37
3	71.62	71.43	71.51	71.33
4	41.86	41.73	42.29	42.13
5	143.64	143.47	146.42	146.24
6	125.57	125.46	123.99	123.86
7	73.52	73.35	65.54	65.36
8	41.04	39.57	37.14	37.00
9	48.38	48.29	42.39	42.26
10	36.59	36.44	37.65	37.51
11	21.23	21.09	20.86	20.69
12	39.70	42.94	39.31	39.17
13	43.08	40.93	42.14	42.01
14	56.09	55.98	49.56	49.42
15	26.19	26.38	24.47	24.30
16	28.73	28.53	28.45	28.27
17	55.49	55.41	55.83	55.70
18	11.99	11.81	11.80	11.62
19	19.33	19.14	18.41	18.23
20	36.26	36.09	36.26	36.10
21	19.00	19.03	19.99	19.02
22	34.11	34.00	34.04	33.91
23	26.56	29.19	29.24	29.12
24	45.97	45.88	45.95	45.82
25	29.25	26.17	25.99	25.91
26	19.18	18.83	19.17	18.79
27	20.01	19.79	20.86	19.79
28	23.19	23.08	23.19	23.05
29	12.15	11.97	12.15	11.98



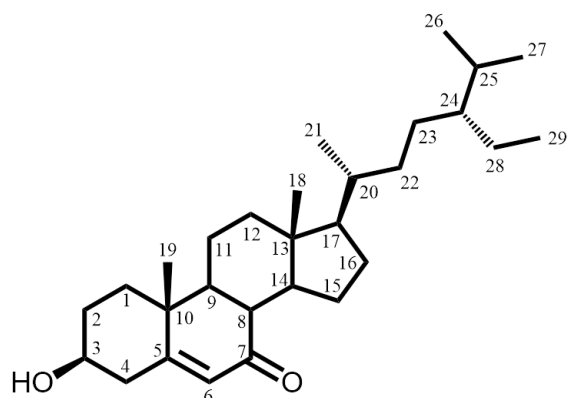
2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol



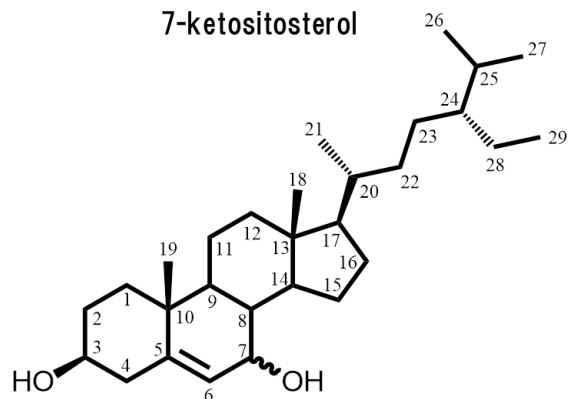
3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol



Azelaic acid



7-ketositosterol



7 α -hydroxysitosterol 及び
7 β -hydroxysitosterol

図 10. *S. gilgiana* から単離した化合物の構造

3-5. 結果と考察

S. gilgiana の枝の乾燥品 450 g から得られた MeOH 抽出物の一部 (14.8 g) について、HL-60 増殖抑制活性を指標にクロマトグラフィー分画を繰り返し行った。

まず IC₅₀ 値が 50 ppm 以上と弱い活性を示す化合物 2 種 (化合物 I、II) が混合物として得られ、¹H NMR の積分値から 1 : 1 の混合比率であることが分かった。NMR データの解析結果を標品と比較し、化合物 I は 2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol、化合物 II は 3-(4-Hydroxyphenyl)-1-propanol と同定した (図 10)。これら化合物 2 種の混合物の状態での活性試験を行った結果、IC₅₀ 値は 107.3 ppm となった。なお、混合物での単離収率と NMR による混合比からそれぞれの化合物の換算収率は 12 µg/g dry weight と算出された。また、それぞれの化合物の市販標品を用いて活性試験を行った結果、IC₅₀ 値は各々 157 ppm (1.04 mM)、108 ppm (0.80 mM) となり、同程度の弱い活性を示した。

次に、乾燥品 1.0 kg から得られた MeOH 抽出物 (41.7 g) を CHCl₃ と H₂O で液-液分配した後、CHCl₃ 抽出物にクロマトグラフィーを繰り返し、活性のある化合物 1 種を単離し、IC₅₀ 値は 19.5 ppm (45.6 µM) だった。これを化合物 III として、質量分析及び NMR にて解析を試みた。NMR データでは、ピークが重複していて解析が困難だったことから X 線結晶構造解析に供するため、単結晶の作製を試みた。クロロホルム、アセトン、ジクロロメタン、クロロホルム : ヘキサン = 1 : 1 の溶媒に溶解して 4°C および 18°C に静置したが、X 線結晶構造解析に必要な直径 0.2 mm 以上の結晶を得ることができなかった。そこで化合物 III の MTPA エステルを合成し、これを用いて単結晶の作製を試みた。その結果、メタノール中にて -18°C、二週間、静置した条件下において、直径 0.2 ~ 0.3 mm の板状結晶を得たため、これを X 線結晶構造解析に供した。MTPA エステルの X 線結晶構造解析から化合物 III を 7-ketositosterol と同定し (図 10)、NMR データは文献値⁵⁾ と一致した。単離収率は 0.02 mg/g dry weight だった。7-ketositosterol の生理活性として、本研究で用いた HL-60 増殖抑制活性が既に報告されている他、ヒト肝がん細胞 SMMC-7721 と正常ヒト肝細胞 HL-7702 を用いた活性試験において、がん選択性を示すとの報告がある⁷⁾。

さらに、*S. gilgiana* の枝の乾燥品 2.0 kg から得られた MeOH 抽出物 (81.6 g) を CHCl₃ と H₂O で液-液分配した後、CHCl₃ 抽出物を繰り返しクロマトグラフィーにて分画した。途中で得られたフラクション A では白色の結晶が析出したため、結晶と上清に分け、活性試験を行ったところ上清は IC₅₀ 値 31.2 ppm と活性を示した。結晶は化合物 IV として質量分析及び NMR にて解析した結果を標品と比較し、Azelaic acid と同定した (図 10)。なお、単離収率は 0.02 mg/g dry weight だった。Azelaic acid は、本研究において 50 ppm の濃度で HL-60 増殖抑制活性は示さなかったが、メラノーマ細胞の増殖抑制活性が報告されている⁸⁾。上清を更に分画した結果、化合物 1 種を単離し、これを化合物 V として、質量分析及び NMR にて解析した結果を文献値と比較し、7β-hydroxysitosterol

と同定した (図 10)。なお、IC₅₀ 値は 13.5 ppm (31.3 μM) だった。さらに、他の分画を解析した結果、7α及び 7β-hydroxysitosterol の混合物であることが示唆された。混合比は ¹H NMR の積分値から α 体 : β 体 = 2 : 1 であることが示唆されたことから、前述で単離した β 体と合わせて、換算収率 7α-hydroxysitosterol 3.4 μg/g dry weight、7β-hydroxysitosterol 4.8 mg/g dry weight となった。なお、7α-hydroxysitosterol の IC₅₀ 値は、換算値で 8.4 μM であった。生理活性として、7α及び 7β-hydroxysitosterol いずれも HL-60 増殖抑制活性が報告されている^{9) 10)}。また、7α-hydroxysitosterol にはヒト結腸がん細胞のアポトーシス誘導¹¹⁾、7β-hydroxysitosterol にはヒト肝がん細胞 SMMC-7721 と正常ヒト肝細胞 HL-7702 を用いた活性試験において、がん選択性を示すとの報告がある⁷⁾。これまでの文献で、*S. gilgiana* はがん細胞に対する増殖抑制活性は知られておらず、本研究において HL-60 増殖抑制活性が見出され、また、単離した Azelaic acid、7-ketositosterol、7α-hydroxysitosterol、7β-hydroxysitosterol いずれの化合物も *S. gilgiana* からの単離は初めての知見である。

本研究において単離した化合物のうち、IC₅₀ 値が 50 ppm 以下の活性を示した化合物は 7-ketositosterol、7β-hydroxysitosterol と、7α-hydroxysitosterol : 7β-hydroxysitosterol = 2 : 1 の混合物であり、いずれもフィトステロールであった。*S. gilgiana* を生薬として加工する際に得られた化合物である可能性を考慮し、試みに、秋田県大潟村の本学フィールド研究センターで採取したヤナギ属植物 4 種 (エゾノキヌヤナギ KKB クローン、エゾノキヌヤナギ HB471 クローン、オノエヤナギ SEN クローン、ホソバコウリュウ FXM クローン) の生の枝を用いてメタノール抽出物を調製し、本研究で得られたフィトステロールと各抽出物をスポットしてシリカゲル TLC にて比較した。その結果、ヤナギ属植物 4 種からはこれら 3 種類のフィトステロールに相当するスポットは確認されなかった。

本研究で用いた *S. gilgiana* (枝) の乾燥品は市販品であり、産地の異なる個体が混在する。一般的に植物は、土壌成分や気象条件、その他物理的ストレスなどによって代謝産物が大きく異なってくるということが知られている¹²⁾。

これまでの文献では、同じヤナギ属植物である *S. caprea* からはトリテルペンの単離が報告¹³⁾されているが、*S. gilgiana* からは、フィトステロール化合物を含む、トリテルペン化合物の単離報告が無いことから、HL-60 に対する活性物質としてフィトステロールが単離されたことは新しい知見である。ヤナギ科植物は挿し木が容易であり、木本植物の中でも初期成長が早い特徴から、緑化に用いられる機会が多い。本研究で明らかになった生理活性成分など、人の健康維持・増進に役立つ物質の利用が実現できれば、有用な植物資源の開発・発見に繋がることが期待できる。

参考文献

1. 石井英美、尾崎均、吉山寛ほか「山溪ハンディ図鑑 3 樹に咲く花 離弁花①」山と溪谷社 (2000 年)
2. M. Mizuno *et al.*, Acylated luteolin glucosides from *Salix gilgiana*. *Phytochemistry*. Vol. 26 (8), pp. 2418-2420 (1987)
3. Young Sil Min *et al.*, The effect of luteolin-7-*O*- β -glucuronopyranoside on gastritis and esophagitis in rats. *Arch Pharm*. Vol. 29 (6), pp. 484-489 (2006)
4. 楠見武徳. 有機合成化学協会誌. Vol. 51 (6), pp. 462-470 (1993)
5. Xin Zhang, Philippe Geoffroy, Michel Miesch, Diane Julien-David, Francis Raul, Dalal Aoude-Werner, Eric Marchioni. Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol: Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *steroids*, Vol.70 (13), pp. 886-895 (2005)
6. Ye-Jin Jung, Ji-Hae Park, Sabina Shrestha, Myoung-Chong Song, Suengmok Cho, Chang-Ho Lee, Daeseok Han, Nam-In Baek. Phytosterols from the Rice (*Oryza sativa*) Bran. *Journal of Applied Biological Chemistry*. Vol. 57 (2), pp.175-178 (2014)
7. Wei-Yan Qi *et al.*, *Fitoterapia*, vol. 84, pp-252-256 (2013)
8. K. Addo-Boadu *et al.*, Azelaic acid decreases the fibrinolytic potential of cultured human melanoma cells in vitro. *Cancer Letters*. Vol. 103, pp. 125-129 (1996)
9. Tan Rui *et al.*, Differentiation inducers: partial synthesis of 7 α - and 7 β -hydroxy- β -sitosterol. *Zhonggou Haiyang Yaowu.*, Vol. 12, pp. 1-2(1993)
10. Wei Yan Qi *et al.*, Cytotoxicity and structure activity relationships of phytosterol from *Phyllanthus emblica*. *Fitoterapia.*, Vol. 84, pp. 252-256(2013)
11. Stamatiki Roussi *et al.*, Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 β -hydroxysitosterol and 7 β -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis.*, Vol. 12, pp. 87-96(2007)
12. 新免輝男「現代植物生理学 4 環境応答」朝倉書店 pp. 128-176 (1991)
13. Mudasir A *et al.*, 9,10-seco-9,19-cyclolanostane triterpene from *Salix caprea* L. (goat willow). *Natural Product Research*, Vol. 27, pp. 171-175 (2013)

4. リンゴ培養植物に含まれる Phloretin 類の 生合成に関する研究

4-1. 背景

リンゴ (*Malus pumila*, 栽培種: *Malus domestica*) はバラ科の植物で、世界中で広く栽培されている果樹である。品種数は、世界では約 15000 種、日本では約 2000 種が報告されている。日本で栽培されている品種では最も「ふじ」が多く、「王林」、「つがる」、「ジョナゴールド」などの品種で全体の約 8 割を占めている。果実は世界では中国、アメリカを中心に年間約 8400 万トンが生産されており、約 4700 万トンが消費されている¹⁾。一方、日本では、青森県、長野県、岩手県などを中心に年間約 82 万トンが生産されており、また、生食用と加工用合わせて年間約 123 万トンが消費されている²⁾。

リンゴは古くから健康に良い食べ物とされてきたが、近年、食品機能性の研究から抗酸化³⁾、抗がん⁴⁾、抗炎症⁵⁾、抗肥満⁶⁾などの報告があり、生活習慣病予防などへの活用が期待されている。リンゴに含まれる成分の中で、これらの機能性に対して主要な活性成分と考えられているのがポリフェノールである。ポリフェノールは、植物が生成する二次代謝産物で、水酸基を持つベンゼン環が多数結合した構造を持つ物質の総称である。果実や花の着色成分であり、リンゴからは約 50 種類が報告されている。リンゴ果実に含まれるポリフェノールの化合物群別の内訳を見ると、Procyanidin 類が 63.8%、Chlorogenic acid が 10.8%、Catechin 類が 9.6%、Phloretin 類が 6.5%、その他が 6.5% である (図 1)⁷⁾。

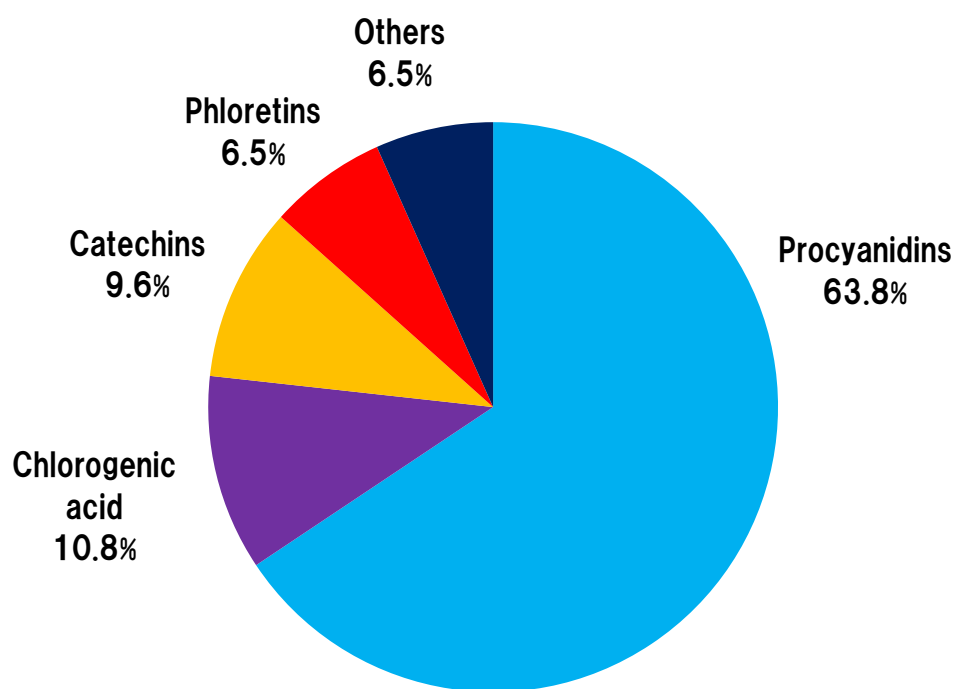
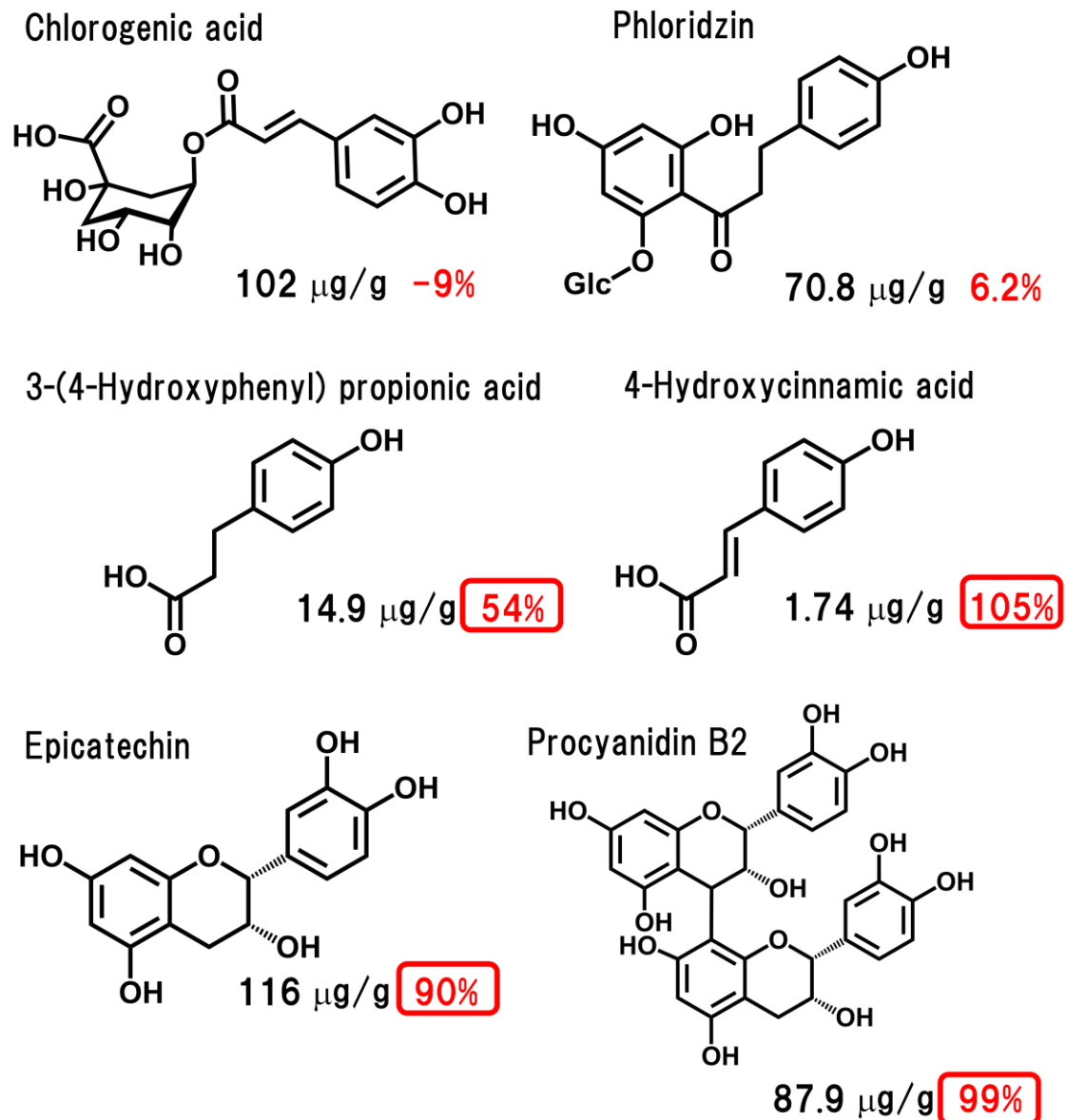


図 1. リンゴ・ポリフェノールの化合物群別の内訳 7)

Procyanidin 類は、フラボノイド類のフラバン-3-オールに属する、Epicatechin あるいは Catechin が縮合したオリゴマーあるいはポリマーである。Procyanidin 類と Catechin 類の生理活性については抗酸化、抗炎症作用が広く一般的に知られている他、抗がん⁸⁾、脂質代謝制御作用⁹⁾などの報告がある。Chlorogenic acid は3-カフェオイルキナ酸とも呼ばれ、コーヒー酸のカルボキシル基がキナ酸3位のヒドロキシ基と脱水縮合した構造を持つ化合物である。生理活性として糖質消化酵素阻害 (α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ阻害)、血糖値上昇抑制¹⁰⁾などの報告がある。Phloretin 類はジヒドロカルコンの一種である。生理活性として抗炎症¹¹⁾、抗菌¹²⁾、抗酸化¹³⁾、抗がん¹⁴⁾などの報告がある。ポリフェノール含有量は、最も主要な成分とされている Procyanidin 類と Catechin 類の含有量を総和すると、生の果実 100 g 当たり 69.59 ~136.01 mg との報告がある⁷⁾。しかし、品種系統によってポリフェノール含有量は大きく異なる。

これまでの当研究室の研究で、野生リンゴであるクラブアップル果実から、Chlorogenic acid、Phlorizin、3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid、4-Hydroxycinnamic acid、Epicatechin、Procyanidin B2 が単離されており、さらに、前駆脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪蓄積阻害率では、Procyanidin B2 をはじめとする化合物で活性が見られた (図 2)¹⁵⁾。



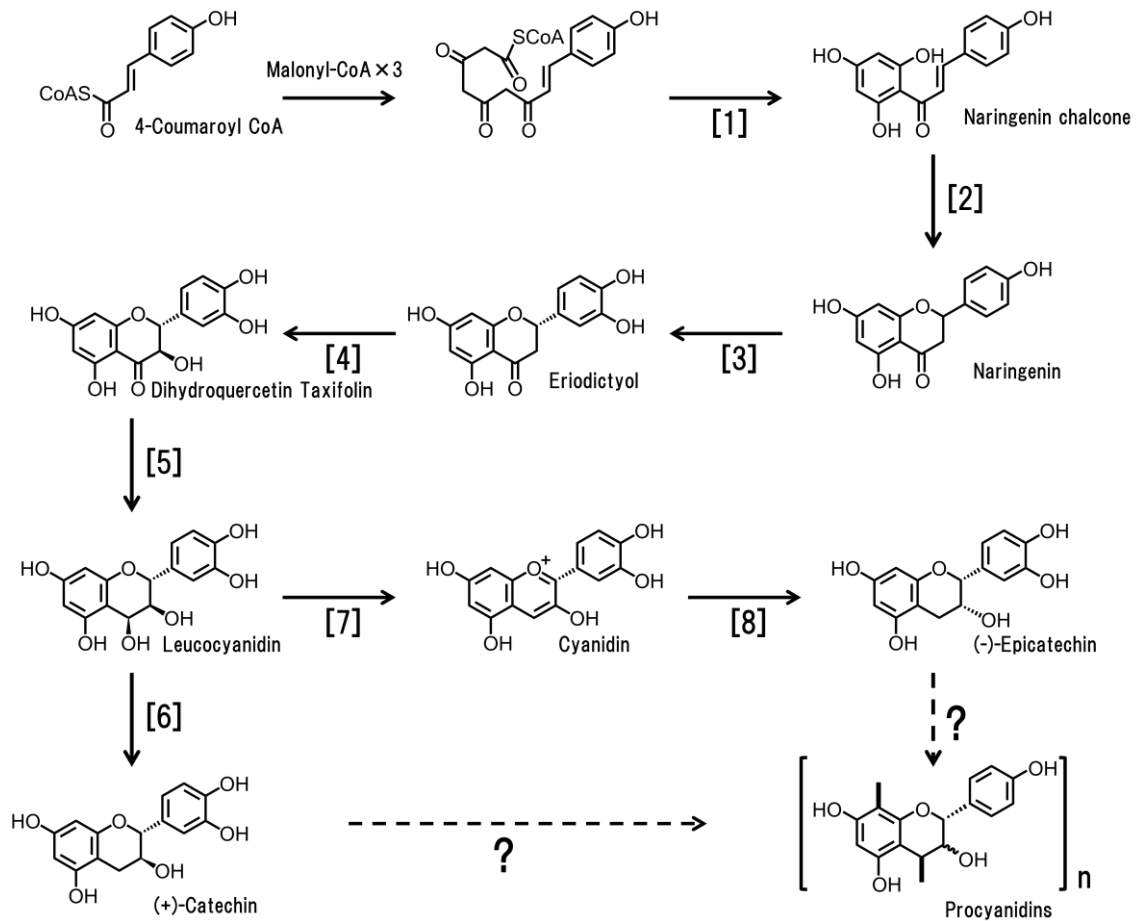
収量 $\mu\text{g/g}$ fresh weight 脂肪蓄積阻害率% (at 100 μM)

 は50% 以上を示したもの

図2. クラブアップルから単離された物質の単離収率及び前駆脂肪細胞 3T3-L1 に対する脂肪蓄積阻害活性¹⁵⁾

様々な生理活性が知られているポリフェノールを豊富に含む品種系統の作出は、機能性リンゴの生産に役立つと考えられる。そこで、リンゴ果実において最も含有率が高い Procyanidin 類の生合成過程 (図 3) に注目すると、まず、4-Coumaroyl-CoA から Chalcone synthase によって Naringenin chalcone が生成され、Chalcone isomerase による環化反応によって Naringenin が生成された後、C 環 3 位に水酸基が付加し、Catechin 類が生成されることが知られている¹⁶⁾。Catechin 類が重合し、オリゴマーもしくはポリマーを形成して Procyanidin 類が生成されると考えられているが、縮合に関わる酵素は見つかっていない。

Procyanidin 類の合成実験では、(+)-Catechin や(-)-Epicatechin などのフラバン-3-オール単位のベンジル位に相当する 4 位に発生させたカチオンに、もう一分子のフラバン-3-オール単体を縮合させてオリゴマー構造を構築されるが¹⁷⁾、反応系には強酸・強塩基や高温条件が設定されており、生体内反応で同様の系が起きているとは考えにくい。その他のポリフェノール類についても図 3 に示された以外の化合物群の生合成は未解明の部分が多い。



[1]Chalcone synthase, [2]Chalcone isomerase, [3]Flavonoid 3'-monooxygenase,
 [4]Flavonone 3-dioxygenase, [5]Dihydrokaempferol 4-reductase, [6]Leucoanthocyanidin reductase,
 [7]Leucocyanidin oxygenase, [8]Anthocyanidin reductase

図 3. リンゴ・ポリフェノールの生合成経路について

4-2. 目的

本研究では、リンゴ果実の主要な健康寄与成分であるリンゴ・ポリフェノールの化合物について、化合物レベルで生合成過程を明らかにすることを目指した。このような知見からは生合成に関与している酵素や酵素遺伝子の解明、健康寄与に関わるポリフェノール化合物豊富なリンゴ品種の創製に結びつくことが期待できる。

化合物レベルでの生合成研究では、実験条件の再現性や微生物の関与を排除するため、培養植物を用い、重元素で標識した化合物による代謝物の追跡 (**tracer**) 実験が有効である。リンゴでは健全な果実・植物体のポリフェノール含量が少ないため、エリシター処理によるポリフェノール類の生合成誘導を行い、生成するポリフェノールの生合成過程について解明することを目指した。

4-3. リンゴ・ポリフェノール生合成の誘導

4-3-1. エリシター処理によるポリフェノール生合成の誘導

果実と培養植物に対するエリシター処理を検討し、二次代謝産物の生成を誘導する条件を探索した。リンゴ実生に酵母抽出物またはリンゴ腐敗菌を感染させると、Phloretin とその配糖体である Phlorizin の生成量が増加する報告¹⁸⁾がある。一方で、Milsana[®]、石灰硫黄剤、ケイ酸カリウム、2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) (図 4) 処理によって Phenylalanine ammonia lyase (PAL) 活性が上昇するとの報告^{19) 20)}があるが、二次代謝産物の特定には至っていない。PAL は、フェニルアラニンを脱アミノ化し桂皮酸を生成する鍵酵素であり、ポリフェノール生成の上流に関与している (表 1)。

表 1. リンゴにおけるエリシター処理の文献例

リンゴ	エリシターに使用した薬剤 または植物病原菌	酵素活性または 検出指標
実生 ¹⁸⁾ (品種: McIntosh, Liberty)	酵母抽出物	Phloretin、Phlorizin の生合成量増加
	<i>Venturia inaequalis</i> (リンゴ腐敗菌)	
葉、実生 ^{19) 20)} (品種: Golden Delicious, <i>Malus domestica</i> Borkh, Rewena)	Milsana [®]	Phenylalanine ammonia lyase (PAL) 活性の上昇
	石灰硫黄剤	
	ケイ酸カリウム	
	2,6-dichloroisonicotinic acid (INA)	

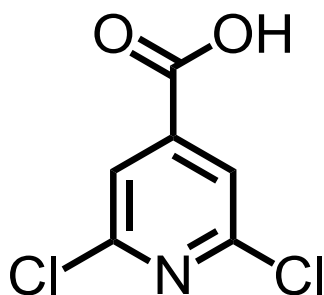


図 4. 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) の構造

4-3-1-1. 果実への INA 処理

リンゴ可食部にポリフェノール生産を誘導できるか、実験を行った (図 5)。リンゴ果実を INA、硫酸銅、Pectinase、Cellulase によって 7 日間処理し、生成物を抽出して TLC にて溶媒コントロール (1% DMSO、0.1% DMSO、0.2 mM リン酸緩衝液) と比較し、新生化合物の有無を確認したが、リンゴ果実抽出物からは、新生化合物が確認できなかった。



図 5. エリシター処理した果実の一例

左：1% DMSO 処理（溶媒コントロール）、右：INA 6.0 mM 処理にて 25°C、3 日間処理した果実

4-3-1-2. 培養植物への INA 処理

リンゴ培養植物を無菌状態で調製し (図 6)、0.6 mM INA にて処理した後、植物体及び培地から得られた抽出物を TLC にて 0.1% DMSO 処理と比較した。TLC により DMSO 処理には Phlorizin が検出され、クロマトグラフィーにより単離し、NMR にて構造を確認した。また、INA 処理においては新生化合物 1 種を確認し、この新生化合物と、プロシアニジン生合成の過程で生成する 4-Hydroxy cinnamic acid、Naringenin、Catechin、Epicatechin および各種プロシアニジン類 (Procyanidin B1、B2、A2) の標品とを TLC にて比較したが、Rf 値および呈色において合致するものが無かった。

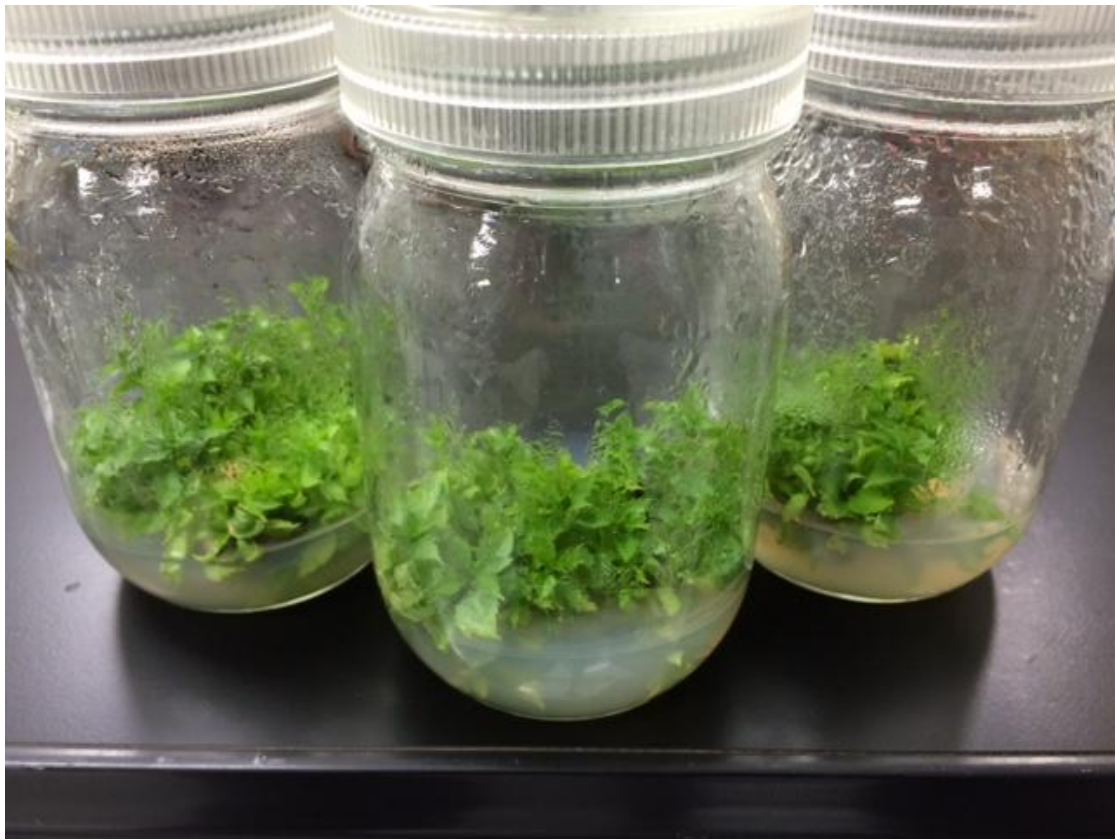


図 6. リンゴ培養植物 (25℃、明期 8 時間、暗期 16 時間にて 1 か月間培養)

4-4. 新生化合物の単離・構造決定と生成量の経時変化

リンゴ培養植物を大量培養して INA 処理し、植物体からメタノール抽出物を調製して各種クロマトグラフィーで精製し、化合物 1 種を単離した (図 7)。質量分析および NMR データを解析し、標品と比較して Phloretin (図 8) と同定した。

次に、INA 処理によるリンゴ培養植物の生育への影響を調べた。INA を溶解する際に用いた DMSO を溶媒コントロール (図 9-A) とし、INA 処理 (図 9-B) と比較した。培養期間 1 日目と 7 日目で培地、及び植物体の変化を観察し、更に、植物体重量を比較した。観察結果は、培養期間 7 日目の 0.1% DMSO 処理では、植物体は緑色、培地は無色だった (図 9-A) のに対して、INA 処理では植物体が褐色に変化し、更に、培地が淡黄色から橙色に変化していた (図 9-B)。植物体が壊死しているかどうか、染色等による確認はしていないが、のちに述べる重水素標識体の取り込み実験においては、標識化合物の取り込みと変換、代謝物の植物体内の残存が確認されていることから、完全に壊死している状態ではないと考えている。植物体重量は、0.1% DMSO 処理で 7 日間培養した植物体は約 1.5 倍に増加していたが、INA 処理では重量の増加が見られなかった (図 10)。

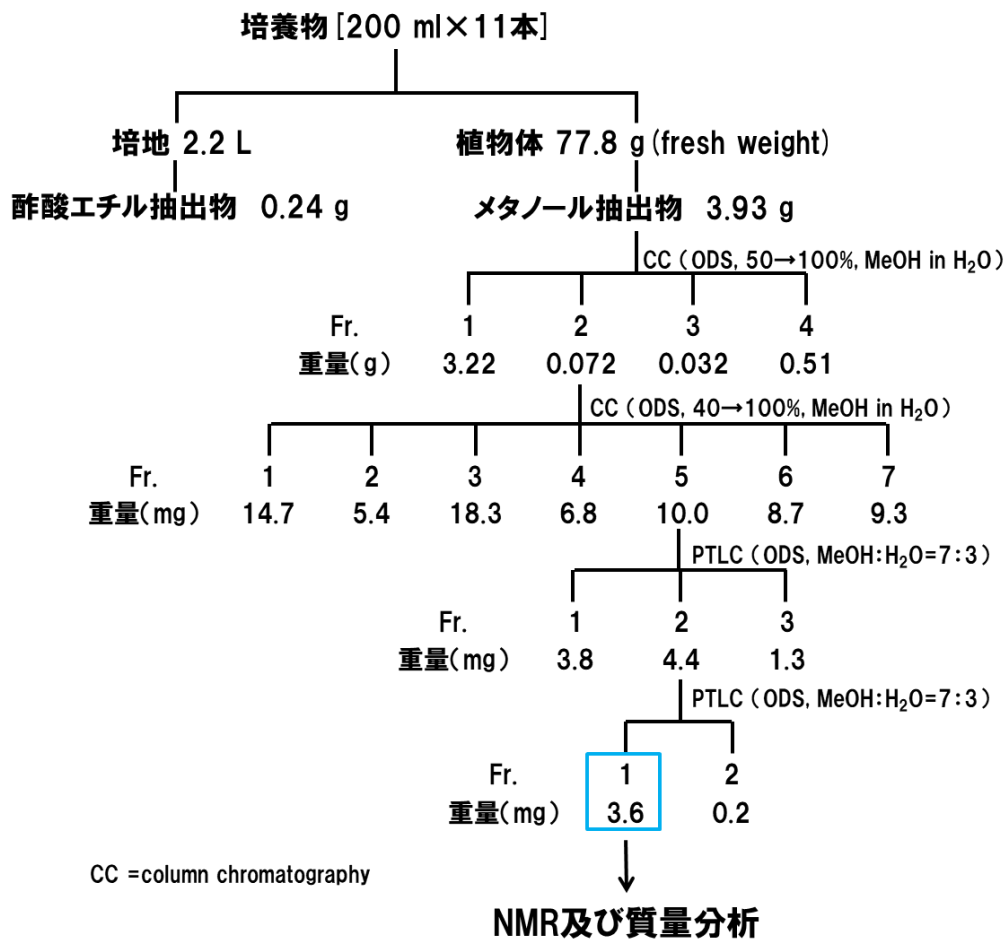


図 7. INA 処理したリンゴ培養植物からの Phloretin の精製

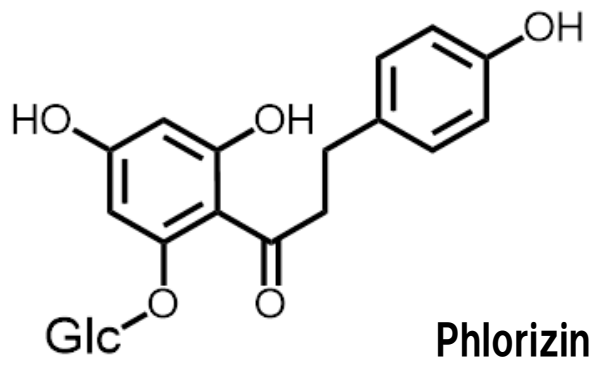
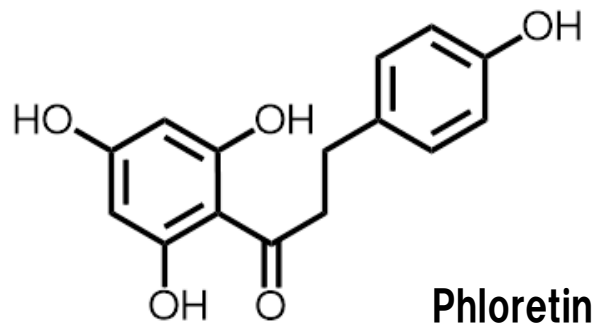


図 8. Phloretin と Phlorizin の構造

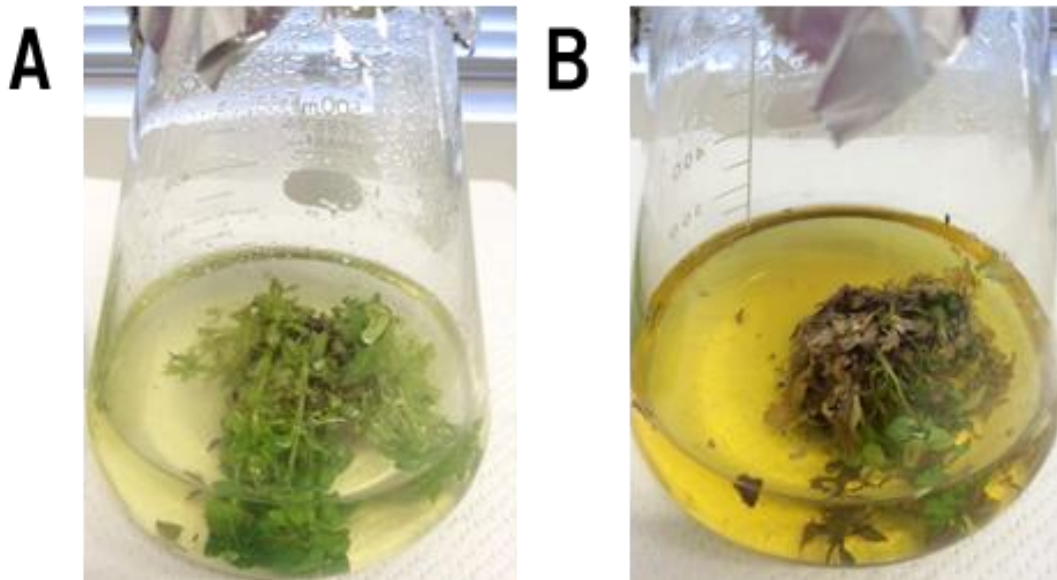


図 9. リンゴ培養植物培養 7 日目の比較 (A : 0.1% DMSO 処理 B : 0.6 mM INA 処理)

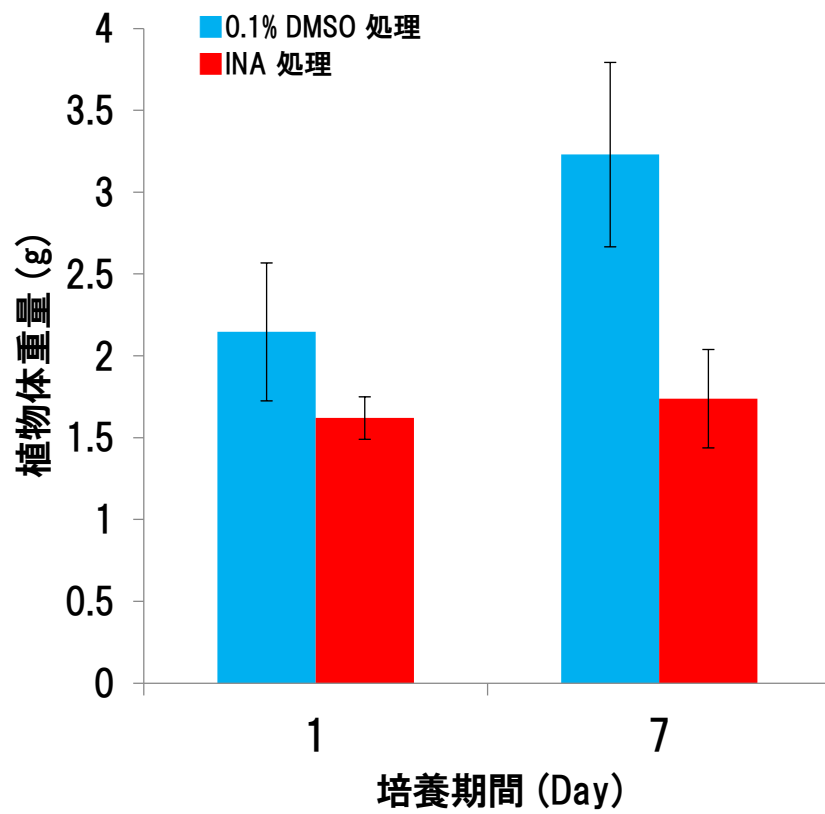


図 10. INA 処理及び 0.1% DMSO 処理における培養 1 日目と 7 日目の植物体重量

リンゴ培養植物中には Phlorizin が内在しており、INA 処理により Phloretin が新生したことが示唆されたので、これらの量的変動を HPLC により定量した。

まず、INA 処理下での培養植物の生育実験から、無処理と 0.1% DMSO 処理では植物体と同じ程度に成長し、代謝産物にも違いが無かったため、以後、0.1% DMSO 処理を健全状態とみなし INA 処理区との比較に用いた。

0.1% DMSO 処理及び INA 処理の植物体及び培地それぞれを 7 日間毎日抽出し、Phloretin と Phlorizin 量の経日変化を HPLC にて測定した。測定した化合物量を植物重量 (g) あたりで表示した。培地中の化合物も植物由来であることから植物 g 当たりで表示した。

まず Phlorizin は、0.1% DMSO 処理の植物体中で培養 1 日目から約 2 mg / 植物 g で検出され、その後 7 日間に大きな変化は無かった。培地中には 7 日間のどの日においても検出されなかった (図 11-A)。一方 INA 処理では、植物体、培地いずれからも検出され、植物体中の Phlorizin 含有量は植物体 1 g 当たり約 2 mg で 7 日間大きな変化は無かったが、培地中では 1~3 日目では約 4 mg と大きく増加し、その後 4~7 日目では約 1 mg だった (図 11-B)。INA 処理では植物体表面の褐変や培地の濁りが観察されたので、生成した代謝物が培地中に流出したり、培地中の物質が細胞表面を自由に透過したりする可能性が考えられた。そこで、フラスコ全体で表示し図 12 に示した。ここでは 0.1% DMSO 処理において Phlorizin 含有量は 7 日間に大きな変化が無かったのに対し、INA 処理では培地中に多量に検出され、1~3 日目においては全体量も増加していたことから、INA 処理により Phlorizin 生成量が増加したことが示唆された。なお、INA 処理 4~7 日目において Phlorizin の全体量が 0.1% DMSO 処理と比べてほぼ変わらない理由については、Phlorizin が 4 日目以降から分解されたか、もしくは他の物質に代謝された可能性が考えられた。

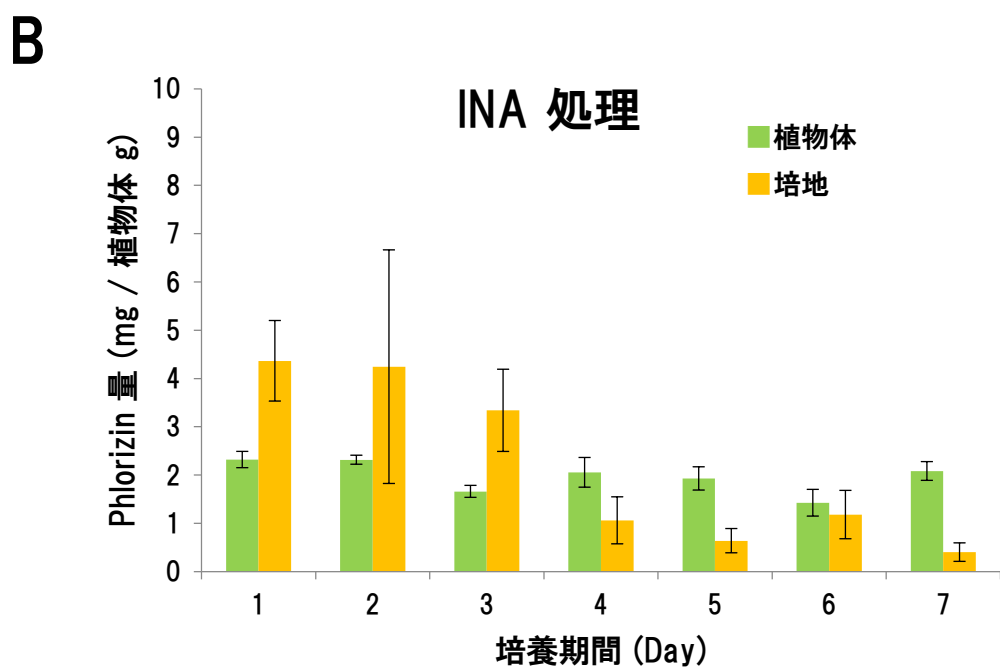
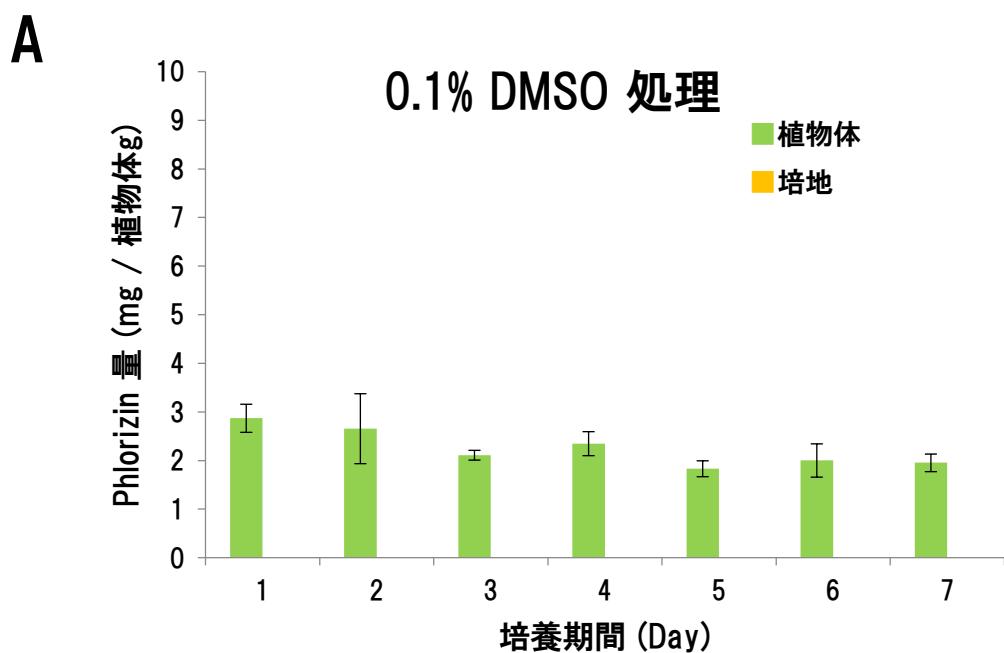


図 11. DMSO および INA の処理における Phlorizin 量の変化
0.1% DMSO (A) および INA (B) 処理における植物体と培地の Phlorizin 量の変化
(植物 g 当たり)

系全体のPhlorizin 含有量

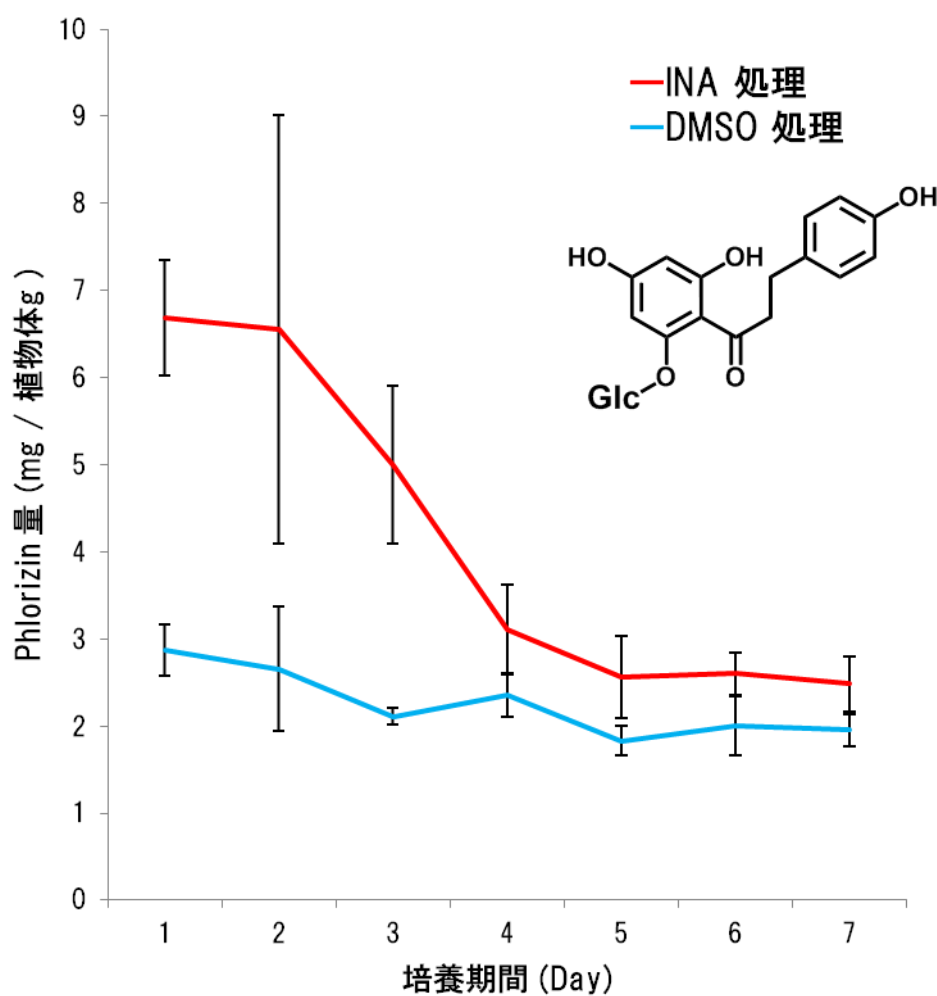


図 12. 0.1% DMSO 処理と INA 処理における Phlorizin 量の変化 (フラスコ内全量 / 植物 g)

次に Phloretin は、0.1% DMSO 処理の植物体及び培地中いずれも検出されなかったが、INA 処理では、植物体中においてマイクログラムレベル、培地中にはミリグラムレベルで検出され、培地中の含有量は植物体 1g 当たりに換算すると最小で 0.5 mg、最大で 2.9 mg だった(図 13)。植物体中の量は 1000 分の 1 オーダーに過ぎないため、このグラフはフラスコ全体の Phloretin 量の議論でも使用できる(図 14)。

0.1% DMSO 処理においては植物体、培地中いずれも Phloretin が検出されなかった一方で、INA 処理では検出されたことから、INA 処理によって Phloretin が新生したことが示唆された。植物体中ではマイクログラムレベル、培地中ではミリグラムレベルで、培地中に多くの Phloretin が検出されたことから、植物体中で生成した後、培地中に溶出しているか、もしくは培地と植物体の接触面(植物体の表面)にて生成している可能性が考えられる。

以上の結果から INA 処理により Phloretin と Phlorizin が増加していることが示されたので、その由来と両化合物の相互変換の様子を知るために重水素標識前駆体の調製と代謝実験を計画した。

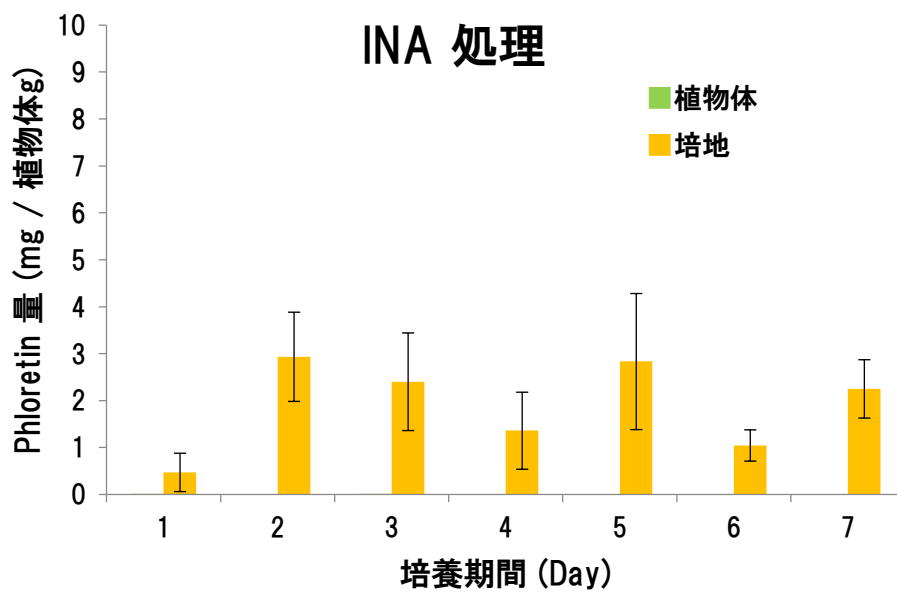


図 13. INA 処理による Phloretin 量の変化 (植物体 1g 当たり)

注) Phloretin は植物体においてマイクログラムレベルで検出されたことから、グラフ中に表示されていない。

系全体の Phloretin 含有量

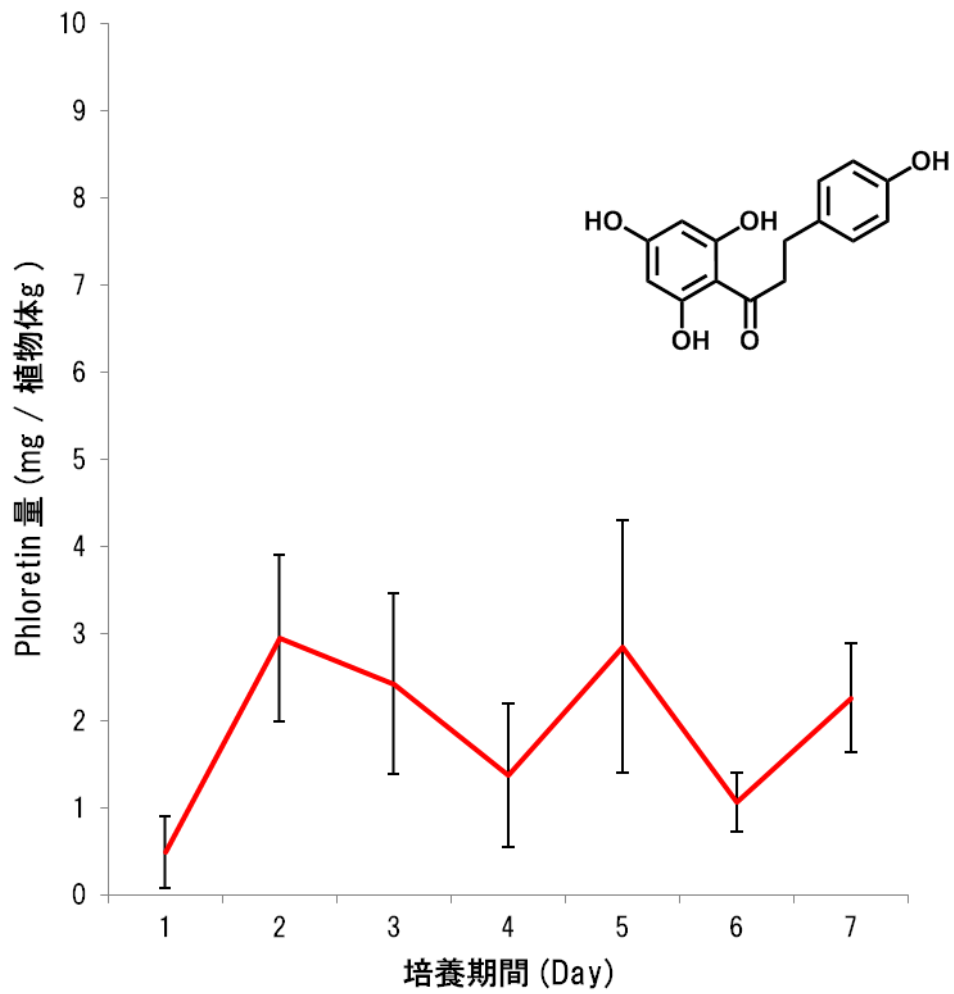


図 14. INA 処理による Phloretin 量の変化 (フラスコ内全量 / 植物 g)

4-5. Phlorizin と Phloretin の標識前駆体による代謝確認

Phlorizin 及び Phloretin の重水素標識体 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin および $[^2\text{H}_n]$ Phloretin を調製し、リンゴ培養植物への取り込み実験を行った。ここで、 m と n は、化学合成して質量分析により解析した1分子当たりの ^2H の標識数であり、Phlorizin では $m=5, 6, 7$ 、Phloretin では $n=2, 3, 4$ の混合物であった。また、標識化合物をリンゴ培養植物に投与した後、回収して得られた代謝物をそれぞれ $[^2\text{H}_x]$ Phloretin、 $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin とし、 x と y の値は回収代謝物の質量分析により解析して求めた。

Phlorizin 及び Phloretin の重水素標識体の調製は、重水中の ^2H を重水素源とし、Pd/C 存在下、 H_2 で処理して行った。 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin は Phlorizin を出発原料とし、1行程、収率59%で、 $[^2\text{H}_n]$ Phloretin は Phloretin を出発原料とし、1行程、収率25%で調製した(図15)。(なお、この合成反応は本学常盤野准教授に依頼した。)

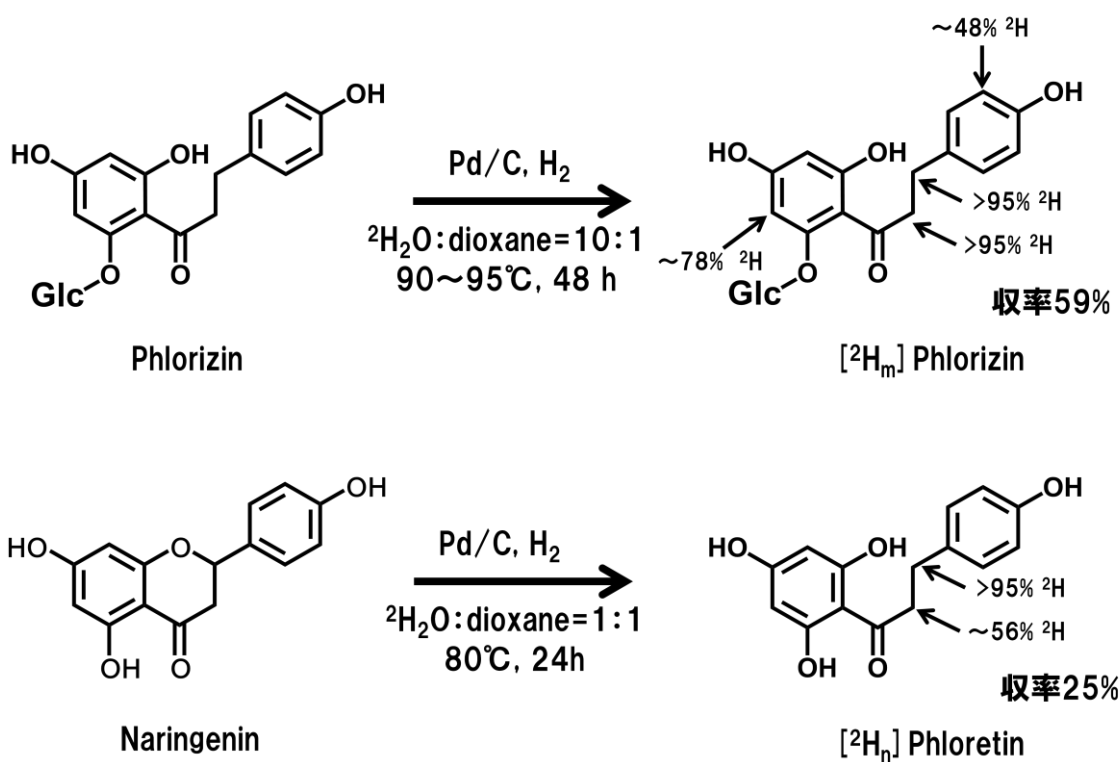


図 15. 重水素標識体 Phlorizin 及び Phloretin の合成

まず、 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin の取り込み実験を行った。 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin を DMSO とともに添加した DMSO 処理と、 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin を INA とともに添加した INA 処理を作製し、7 日間培養した。標識化合物は培地に添加し、植物体を抽出して得られた Phloretin と Phlorizin を LC-MS で測定し、重水素化率を定量した。

$[^2\text{H}_m]$ Phlorizin 投与時 7 日後の植物体からは、DMSO 処理、INA 処理いずれも、 $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin が検出された。回収化合物中の $[^1\text{H}]$ Phlorizin を内在性 Phlorizin として、100% に換算した時、植物体中で $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin が占める割合は DMSO 処理では 26%、INA 処理では 18% だった (図 16)。

$[^2\text{H}_m]$ Phlorizin と DMSO を投与した DMSO 処理では、Phloretin は検出されなかったが、INA とともに投与した INA 処理では Phloretin が新生しており、INA 処理により新生しているが、 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin 以外の前駆体から変換された $[^1\text{H}]$ Phloretin を 100% とした時、 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin に由来すると考えられる $[^2\text{H}_x]$ Phloretin が 40% と算出された (図 17)。

この結果から考察すると、健全状態 (DMSO 処理) の培養植物は培地中に投与した Phlorizin を体内に取り込んで蓄積し (図 18-A)、INA 処理では、投与した Phlorizin は体内に取り込まれ蓄積された後に、一部が Phloretin へと加水分解され、その残りが標識 Phlorizin (18%) と考えられる (図 18-B)。

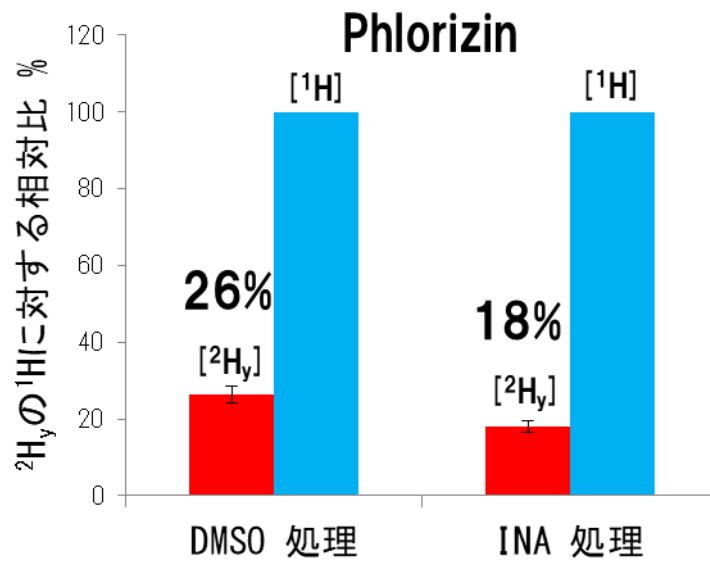


図 16. [²H_m] Phlorizin 投与時の Phlorizin の重水素化率 (植物体中)

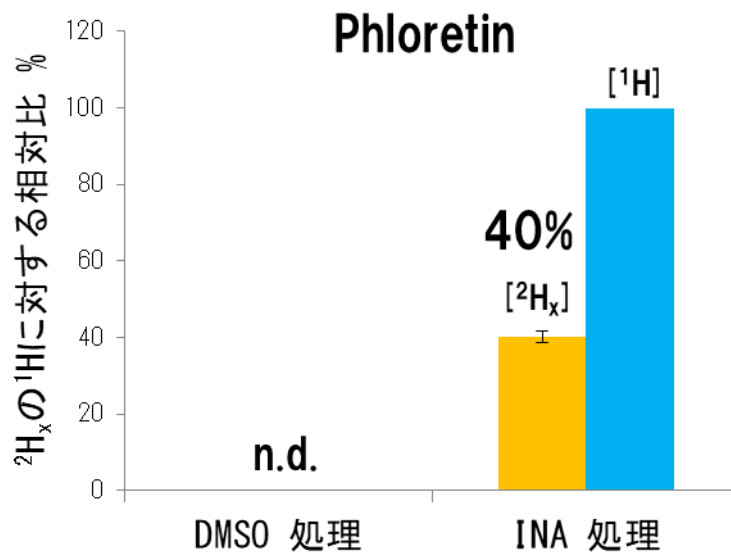
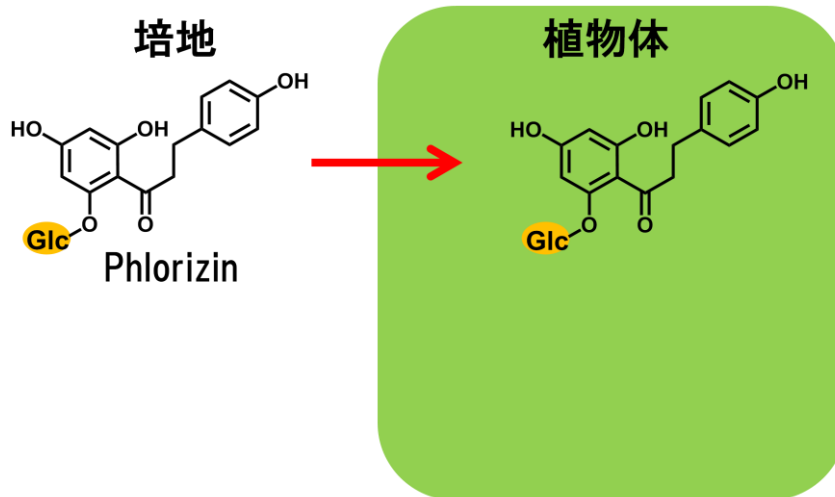
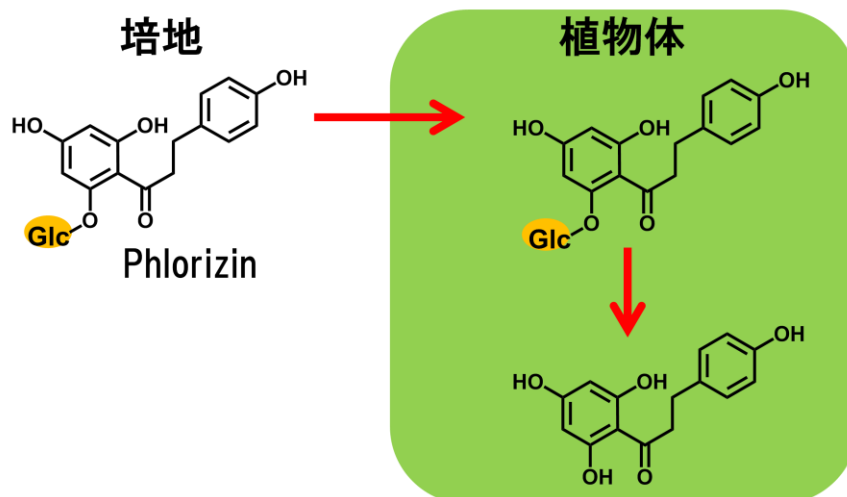


図 17. [²H_m] Phlorizin 投与時の Phloretin の重水素化率 (植物体中)

A**DMSO 処理**

INA 処理無しでも、Phlorizin は培地から植物体に移動した。

B**INA 処理**

INA 処理でも、Phlorizin は培地から植物体に移動し、
その一部はPhloretin に変換され、一部はそのまま検出された。

図 18. $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin 投与時の代謝実験結果 (模式図)

DMSO 処理における Phlorizin の代謝 (A)、INA 処理における Phlorizin と Phloretin の代謝 (B)

次に、 $[^2\text{H}_n]$ Phloretin も $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin と同様の方法で取り込み実験を行った。植物体抽出物から得られた Phloretin と Phlorizin を LC-MS で測定し、重水素化率を定量した結果、Phlorizin は、回収化合物中の $[^1\text{H}]$ Phlorizin を 100% とした時、 $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin が占める割合は、DMSO 処理では 17%、INA 処理では 6% であった (図 19)。培地に $[^2\text{H}_n]$ Phloretin と DMSO を投与した DMSO 処理では植物体に Phloretin は検出されなかったが、INA 処理では新生した Phloretin の 26% が重水素化体であった (図 20)。

この結果から考察すると、まず、健常状態 (DMSO 処理) では、培地中に投与した Phloretin は植物体内に取り込まれなかったようにも見えるが、 $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin が 17% あったことから、取り込まれたものほとんどが全て配糖体化され、Phlorizin に変換されて蓄積して $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin として検出されたと考えられる (図 21-A)。一方 INA 処理では、投与した Phloretin が植物体内に取り込まれるが、一部が配糖体化して $[^2\text{H}_y]$ Phlorizin として検出され (6%)、一部がそのまま蓄積している (26%) と考えられる (図 21-B)。

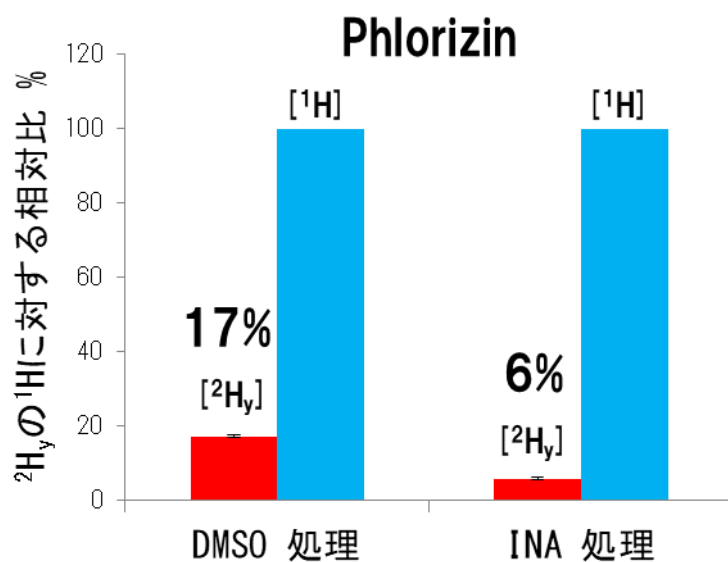


図 19. $^{2}\text{H}_n$ Phloretin 投与時の Phlorizin の重水素化率 (植物体中)

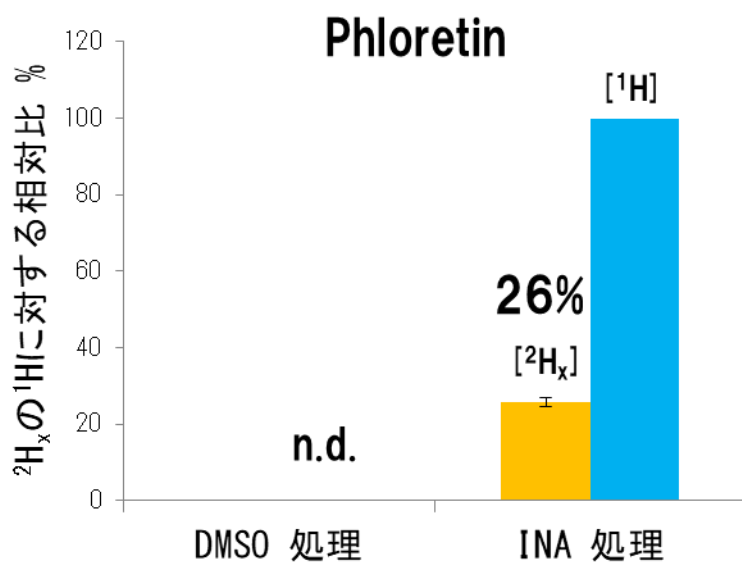
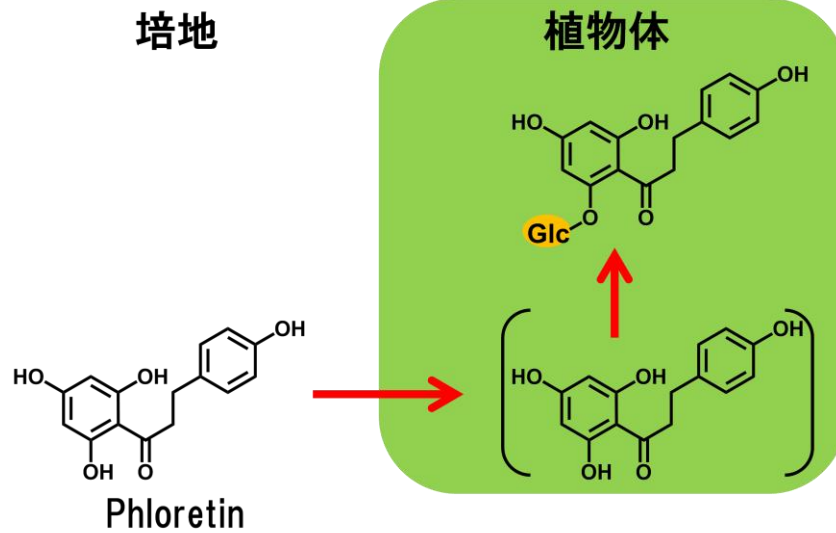


図 20. $^{2}\text{H}_n$ Phloretin 投与時の Phloretin の重水素化率 (植物体中)

A

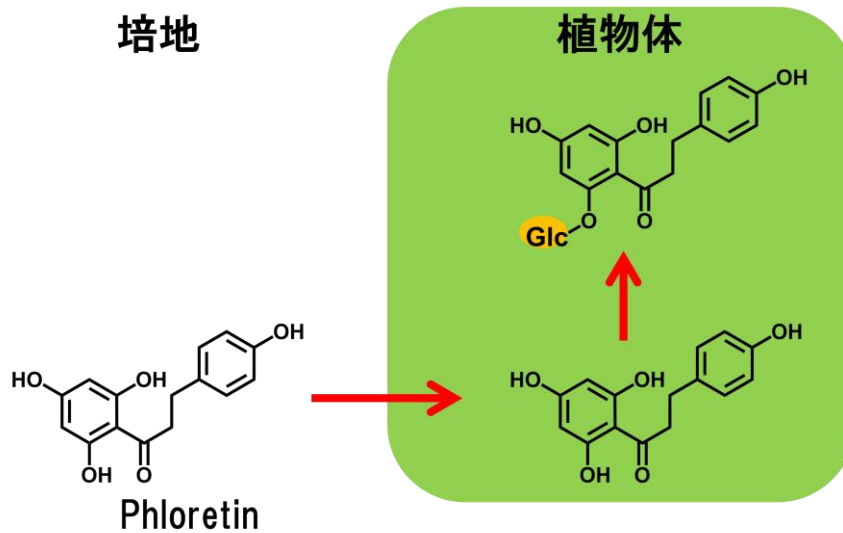
DMSO 処理



INA 処理無しでも、Phloretin は培地から植物体に移動し、
全てPhlorizin に変換された。

B

INA 処理



INA 処理した時、Phloretin は培地から植物体に移動し、
一部はPhlorizin に変換され、一部はPhloretin のまま留まっていた。

図 21. $[^2\text{H}_n]$ Phloretin 投与時の代謝実験結果 (模式図)

DMSO 処理における Phlorizin と Phloretin の代謝 (A)、INA 処理における Phlorizin と Phloretin の代謝 (B)

4-6. Phloretin 及び Phlorizin の動態と生理機能の考察

重水素標識体を用いない定量分析より、Phloretin、Phlorizin は INA 処理では両者とも植物体から培地へ移行していた (図 22-①)。

重水素標識体の取り込み実験では Phloretin、Phlorizin が両者とも健常状態、INA 処理に関わらず培地から植物体内に移行していた (図 22-②)。

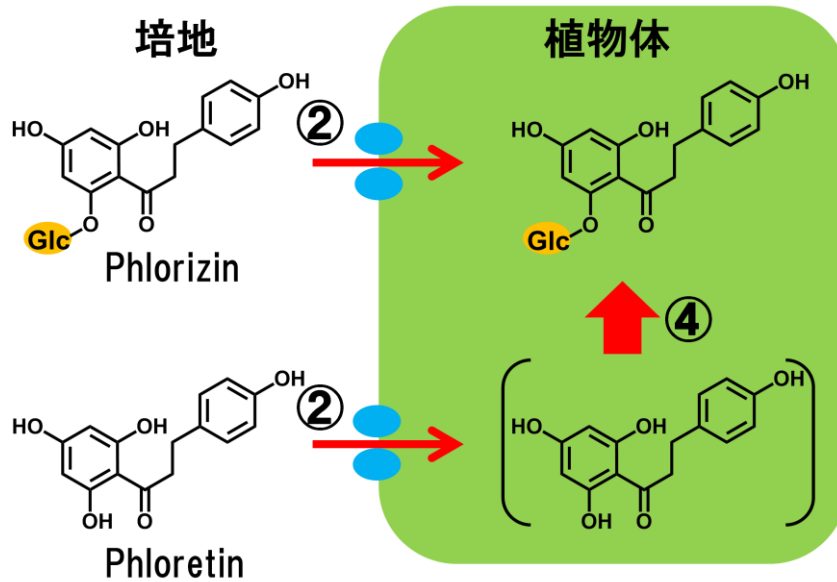
植物体内における Phloretin と Phlorizin の生成については、重水素標識体の取り込み実験から、健常状態では、Phloretin から Phlorizin への配糖体化が起こる一方で、INA 処理では配糖体化と同時に、Phlorizin から Phloretin への加水分解が起きていることを示していた (図 22-③)。Phloretin と Phlorizin のどちらが先に生合成されるかについてはこれまで不明であったが、本研究で用いた培養植物においては、健常状態では培地から植物体に取り込まれた重水素標識体 Phloretin が全て Phlorizin に変換されていたことを見出し (図 22-④)、代謝経路として Phloretin から Phlorizin への配糖体化が優先的であると考えている。

一般的に植物には異物修飾機構 (または異物代謝機構) と呼ばれる反応機構が備わっており、例えば、外部からアルコールが与えられると配糖体化して液胞内に貯蓄、もしくは排出される。シロイヌナズナの幼植物にナフトールを投与した例では、マロニルグルコシド化されると細胞内に貯蓄されるが、メトキシ体や配糖体になると細胞外に放出されている²¹⁾。しかし今回の実験では、Phloretin には水酸基が 4 個あるにも関わらず、2' 位水酸基が特異的に配糖体化された Phlorizin 以外には配糖体が検出されなかった (TLC、データ未掲載)。よって、この実験条件下で Phloretin の配糖体化に基質特異性がみられることから、投与された Phloretin は、既に植物体内に存在する Phloretin と Phlorizin の生合成過程に取り込まれた可能性が高いと考えている。しかし、異物修飾機構の関与については、今後も引き続き検討が必要と考えている。

この 2 種の化合物について、文献を基に生理活性について比較したところ、Phloretin には抗炎症²²⁾、抗菌²³⁾、抗酸化作用²⁴⁾、HL-60 をはじめとするがん細胞に対する高い増殖抑制活性^{25) 26)}が報告されており、総合して見ると、配糖体である Phlorizin は生理活性が弱い、Phloretin は高い生理活性を有することが分かる (表 2)。

植物体が健常状態にある時は Phlorizin として蓄積しているが、細胞表面が何らかのストレスに曝されると、Phlorizin を加水分解して、生理活性の高い Phloretin を蓄積することによって生体防御の機能を高めていることが考えられる。

DMSO 処理 (健常状態)



INA 処理 (誘導条件下)

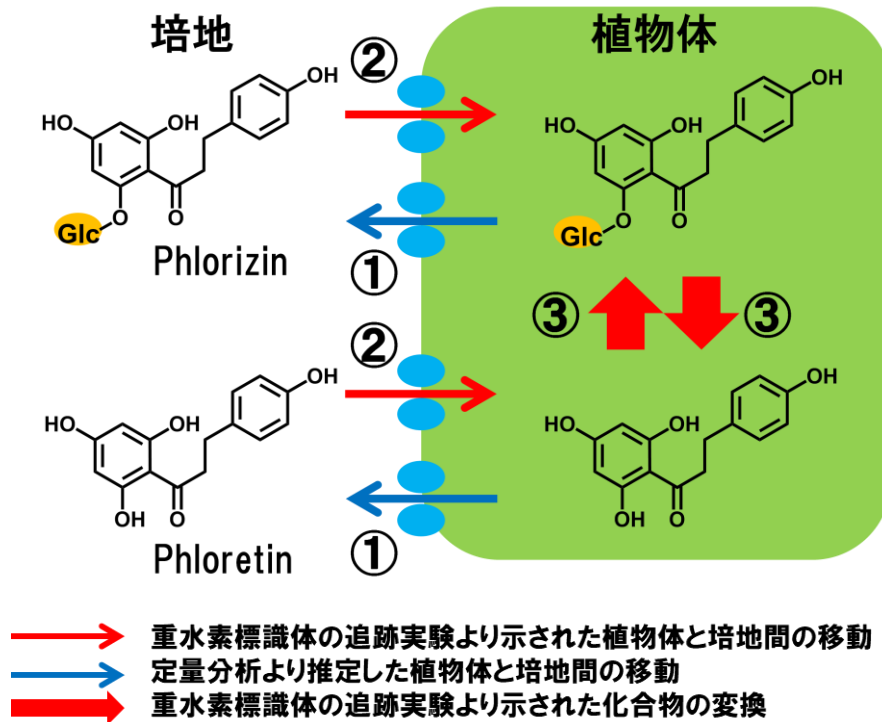


図 22. 培地—植物体間における Phloretin と Phlorizin の移動と変換 (模式図)

①～④は本文を参照

表 2. Phloretin 及び Phlorizin の活性と比較

活性	Phloretin	Phlorizin
抗炎症 (NO, PGEs, IL-6, TNF- α , iNOS, COX-2) ²²⁾	高い発現抑制	活性無し (TNF- α のみ弱い抑制)
抗菌 (グラム陽性、陰性 14 種) ²³⁾	高い活性	活性無し
抗酸化 (DPPH ラジカル除去能) ²⁴⁾	IC ₅₀ =179.47 mg/mL	IC ₅₀ =866.80 mg/mL
増殖抑制活性 (HL-60, A549, Be17402, HepG2, HT-29) ^{25) 26)}	高い活性	活性無し (HepG2 のみ弱い活性)

4-7. 結果と考察

リンゴ・ポリフェノールの生合成経路の詳細を明らかにすることを目指し、まず実験系の確立に着手した。リンゴ培養植物を調製し、二次代謝産物の生合成を誘導する条件を検討した。当初、可食部である果実を用いて各種エリシター条件を検討したが、本研究で用いた条件では二次代謝産物の誘導に至らなかったため、培養植物におけるエリシター処理を検討した。無菌的にリンゴ培養植物体を調製し、文献から、培養植物において PAL 活性の上昇^{19) 20)} が報告されていた INA を用いてエリシター処理を行ったところ、Phloretin が新生することを見出した。培養植物には Phloretin 配糖体の Phlorizin が内在していたことから、INA 処理した時の Phloretin と Phlorizin の量がどのように変化しているか、24 時間ごとに 7 日間にわたって定量し比較した。その結果、培養 1 日目から Phloretin が新生し Phlorizin も増加することを見出した。特に、培養期間 1~3 日目において Phlorizin 量が 0.1% DMSO 処理の約 2 倍に増大することが明らかになった。また、0.1% DMSO 処理では、培地中に Phloretin 及び Phlorizin がなかった一方で、INA 処理では両化合物を検出したことから、INA 処理によって生成した化合物が培地中に溶出したことが示唆された。

重水素化標識前駆体の取り込み実験から、まず、Phlorizin も Phloretin も健全状態と INA 処理した培養植物の表面を通過できることが分かった。また、INA 処理で新生する Phloretin は Phlorizin を前駆体の一つとしていること、Phloretin は植物体に取り込まれた後、Phlorizin に変換されるが、健全状態ではほぼ全量に変換され(非常に速い反応)、INA 処理では、健全状態より遅いか、あるいは Phlorizin の加水分解も起きていたことが考えられた。

これまでの文献では、酵素遺伝子解析と組換え実験によって、Phloretin と Phlorizin は 4-Coumaroyl CoA から生成した 4-Hydroxydihydrocinnamoyl CoA から Chalcone synthase を経て Phloretin が生成した後、配糖体化されて Phlorizin が生成することが示されている^{27) 28)}。これまでの当研究室の研究でも、クラブアップルから 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid が単離されており、図 23 の実線で示された経路を裏付けている。しかし、Chalcone synthase は Naringenin chalcone の生成にも関与しているので、Naringenin chalcone から直接還元されて Phloretin が生成する可能性もあり、今後の検討が必要と考えている。本研究では INA 処理下での Phloretin と Phlorizin の相互変換の一部を物質レベルで明らかにした。

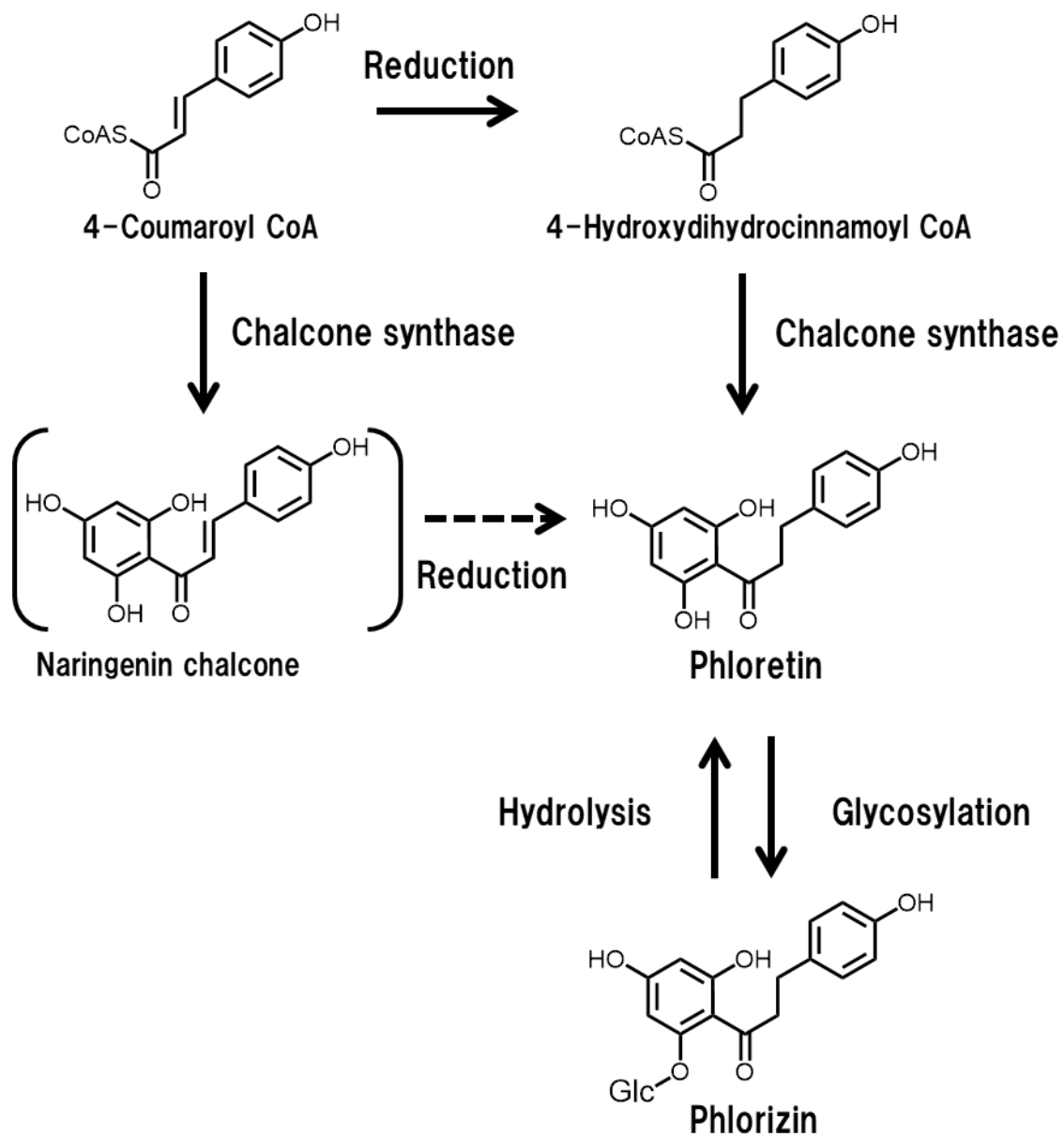


図 23. Phloretin と Phlorizin の生成

これまでの文献から Phloretin と Phlorizin の各種 *in vitro* 生理活性試験の結果を比較すると、配糖体である Phlorizin よりも Phloretin の方が活性が高い傾向がある(表 2) ことが分かる。植物体にストレスが無い状態では、生理活性の弱い Phlorizin として体内に蓄積している一方で、何らかのストレスが加わると Phloretin を生成して、生体防御の機能を高めていることが考えられる。

今後は、Phloretin 及び Phlorizin の生成に関与すると考えられる還元酵素、配糖体化酵素の特定が課題と考えている。また、今回見出した培養植物への INA 処理の実験系では、Naringenin などの環化した化合物は見つかっていないが、エリシターの種類を変えることで Naringenin が得られれば Procyanidin 類の生合成も誘導できることが予想される。この条件を明らかに出来れば、より生理活性の高い化合物を効率良く生成する条件の解明に役立つと考えられる。本研究で得られた知見を基盤として、様々な生理活性が知られているリンゴ・ポリフェノールの生合成について明らかにし、機能性成分を多く含む品種の作出などに役立てたいと考えている。

4-8. 実験部

4-8-1. リンゴ果実と各種エリシター処理

品種はフジ、王林を用いた。熟した果実の表面を流水にて1分洗浄後、縦4等分にし、種子を除き、約3 mm幅に切り、流水で1時間洗浄した。ろ紙を敷いたバットの上に、果実が重なり合わないように並べてラップをかけ、25°C、20h プレインキュベートした。エリシター処理には、INA、硫酸銅、Pectinase、Cellulase の4種類を用いた。INA 処理では、INA 600 mM / DMSO 溶液を終濃度 0.6 mM、6.0 mM になるよう蒸留水にて希釈し、それぞれ 200 mL ずつ調製して果実に塗布した後、25°C、7日間インキュベートした。硫酸銅、Pectinase、Cellulase 処理では、各終濃度 5.0 mM、2.0 mg / mL、2.0 mg / mL になるよう 0.2 M リン酸バッファー (pH 5.0) にて希釈し、それぞれ 200 mL ずつ調製して果実に塗布した後、硫酸銅処理は 25°C、酵素処理は 37°C にて3日間インキュベートした。溶媒コントロールとして 0.1% DMSO 処理、1% DMSO 処理、0.2 mM リン酸バッファー処理区を設定した。

表 3. エリシター処理に用いた酵素または薬剤と培養条件

酵素または薬剤	濃度	培養条件
2, 6-dichloroisonicotinic acid (INA)	0.6 mM, 6.0 mM	25°C、7日間
硫酸銅	5.0 mM	25°C、3日間
Pectinase	2.0 mg / mL	37°C、3日間
Cellulase	2.0 mg / mL	37°C、3日間

4-8-2. リンゴ培養植物の培養と維持

品種は Starking delicious を用いた。培地は 1001 培地 (表 3) を用いた。寒天培地の作製は、表 3 の Agar 以外の成分を Milli-Q 水 800 mL に混合し、1.0 M NaOH 水溶液を添加して pH 5.7 に調整、Milli-Q 水で 1.0 L とした。その後 Agar を添加して、100°C に熱して Agar を溶解させた。これを 450 mL 容マヨネーズ瓶に 80 mL ずつ分注し、オートクレーブした。培養植物は径 3.0 cm、高さ 5.0 cm 程度の大きさになるまで 4 週間~1 か月培養した後、継代作業を行って植物体を維持した。培養条件は 25°C、明期 16 h、暗期 8 h とした。

表 4. リンゴ培養植物の培養に用いた培地の組成

	成分	mg / L
MS 培地	KNO ₃	1900
	NH ₄ NO ₃	1650
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
	Na ₂ -EDTA	37.3
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
	H ₃ BO ₃	6.2
	KI	0.83
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
ビタミン	Thiamine-HCl	10.0
	Nicotinic acid	1.0
	Pyridoxine	1.0
	myo-Inositol	100
植物ホルモン	Indole-3-butyric acid	0.10
	6-Benzylaminopurine	1.0
その他	シヨ糖	30000
	Agar	6500

4-8-3. リンゴ培養植物の INA 処理

実験 2 にて用いた培地組成のうち、Agar を除いた各試薬を混合し、液体培地を調製した。これを、500 mL 容三角フラスコに 200 mL ずつ分注し、オートクレーブした。そこに、INA 600 mM / DMSO 溶液を 200 μ L 添加し、終濃度を 0.6 mM とした。寒天培地上にて 1 ヶ月間培養したリンゴ培養植物（径 3cm、高さ 5 cm）を 1 株ずつ取り出し、滅菌水で洗浄して培地を取り除いた後、調製した液体培地に移植し、7 日間、25 $^{\circ}$ C、明期 16 h、暗期 8 h とし、160 rpm. にて振とう培養した。溶媒コントロールとして 0.1% DMSO 処理区を設定した。

4-8-4. リンゴ培養植物及び培地抽出物の調製

7 日間 INA 処理したリンゴ培養植物（200 mL \times 11 本）を培地と植物体に分け、培地 2.2 L は NaCl を添加して飽和状態にし、EtOAc との間で液-液分配した。その結果、EtOAc 抽出物 0.24 g を得た。植物体 77.8 g は直径 0.5 cm 程度の大きさに切断した後、メタノールに 12 h 浸漬し、ろ過し、ろ液を濃縮・乾固して、MeOH 抽出物 3.93 g を得た。

4-8-5. リンゴ培養植物抽出物の分画と精製（Phloretin の単離）

実験 4 にて INA 処理した培養植物の植物体から得られた MeOH 抽出物 3.93 g を ODS カラムクロマトグラフィー-100g にて分画した。溶出液は H₂O : MeOH = 50 : 50 \rightarrow 40 : 60 \rightarrow 30 : 70 \rightarrow 0 : 100 各 400 mL とし、各々減圧濃縮を行い、4 画分を得た。新生化合物を含む fr. 2 (0.072 g) を ODS カラムクロマトグラフィー-5 g にて分画した。溶出液は H₂O / MeOH で MeOH を 60% から 100% まで段階的に増やし、7 画分を得た。新生化合物を含む fr. 2-5 (10.0 mg) を更に 2 回の ODS PTLC H₂O / MeOH で分画し、単離した。

4-8-6. 化合物 I の質量分析、NMR スペクトルデータの帰属

[化合物 I] white solid

質量分析 (MS) : ESI-HR-MS (positive) m/z 297.0738 ($[M+Na]^+$) Calcd. for $C_{15}H_{14}O_5Na^+$, 297.0733. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 2.74 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H- $\beta \times 2$), 3.20 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H- $\alpha \times 2$), 5.79 (2H, s, H-3', H-5'), 6.64 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, H-6), 7.01 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3, H-5), 9.15 (1H, s, OH-4)
 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 204.2 (C=O), 45.5 (C- α), 29.4 (C- β), 131.6 (C-1), 129.2 (C-2), 115.1 (C-3), 155.4 (C-4), 115.1 (C-5), 129.2 (C-6), 103.7 (C-1'), 164.3 (C-2'), 94.6 (C-3'), 164.7 (C-4'), 94.6 (C-5'), 164.3 (C-6')

[Phloretin] (標品)

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 2.75 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H- $\beta \times 2$), 3.20 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H- $\alpha \times 2$), 5.79 (2H, s, H-3', H-5'), 6.65 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, H-6), 7.01 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, H-5), 9.14 (1H, s, OH-4), 10.36 (1H, s, OH-4'), 12.24 (2H, s, OH-2', OH-6')
 ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm) : 204.2 (C=O), 45.5 (C- α), 29.4 (C- β), 131.6 (C-1), 129.2 (C-2), 115.1 (C-3), 155.4 (C-4), 115.1 (C-5), 129.2 (C-6), 103.7 (C-1'), 164.2 (C-2'), 94.6 (C-3'), 164.6 (C-4'), 94.6 (C-5'), 164.2 (C-6')

4-8-7. INA 処理 1~7 日間培養と抽出物の調製

寒天培地にて 1 ヶ月間培養したリンゴ実生 (径 3.0 cm、高さ 5.0 cm) 1 株を、ハサミで 2~3 分割し、径 1.0 cm、高さ 3.0 cm に成形した。100 mL 容三角フラスコに 50 mL の液体培地を分注し、そこに成形した培養植物を移植した。実験 3 と同様に INA 0.6 mM にて処理し、7 日間、それぞれ 3 反復で培養した。また、溶媒コントロールとして DMSO 0.1% 処理で 7 日間、無処理で 7 日間、それぞれ 3 反復で培養した。植物体は、直径 0.5 cm 程度の大きさに切断した後、MeOH に 12 h 浸漬、ろ過した後、ろ液を濃縮・乾固して、MeOH 抽出物を調製した後、水と $CHCl_3$ で液-液分配し、水抽出物は凍結乾燥、 $CHCl_3$ 抽出物は減圧濃縮した。培地は、培地と $CHCl_3$ との間で液-液分配し、水抽出物は凍結乾燥、 $CHCl_3$ 抽出物は減圧濃縮した。

4-8-8. HPLC による分析

実験 7 で得られた各種抽出物を HPLC にて分析した。植物体 CHCl_3 抽出物は、 MeOH に溶解して 1000 ppm に調製した後、Sep-pak にて処理し、終濃度 100 ppm に調製した。植物体水抽出物は、 $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 60 : 40$ に溶解して 10000 ppm に調製した後、Sep-pak にて処理し、終濃度 1000 ppm に調製した。培地 CHCl_3 抽出物は、 MeOH に溶解して 1000 ppm に調製した後、Sep-pak にて処理し、終濃度 100 ppm に調製した。培地水抽出物は H_2O 10mL に溶解し、その内 100 μL を 5 倍希釈し、Sep-pak にて処理し、10 mL にメスアップした。分析条件は表 5 に示した。

表 5. HPLC 条件

装置	日本分光		
カラム	Inertsil ODS-3 (4.6 ×150 mm)		
流速	1.0 ml / min		
温度	35°C		
移動相	A 液 : MeOH	B 液 : 0.5% 酢酸水溶液	
注入量	10 μl		
	時間(分)	A%	B%
	0	20	80
	20	100	0
	30	100	0
	35	20	80
溶出法	グラジエント		

4-8-9. [²H_m] Phlorizin の合成

Phlorizin 500 mg を dioxane 1.0 mL、D₂O 10.0 mL に溶解し、10% Pd / C 100 mg を添加、水素雰囲気下、90~95°C、48 h 反応させた。反応液を減圧濃縮した後、MeOH : H₂O = 50 : 50 10mL に溶解し、TFA 100 μL を添加して 48 h、室温にて処理した。これを減圧濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ODS, 10% MeOH→50% MeOH) にて精製し、重水素標識された Phlorizin を 295 mg 得た。質量分析の結果、[¹H] 体 : [²H₅] 体 : [²H₆] 体 : [²H₇] 体 = 0 : 71 : 100 : 46 であった。

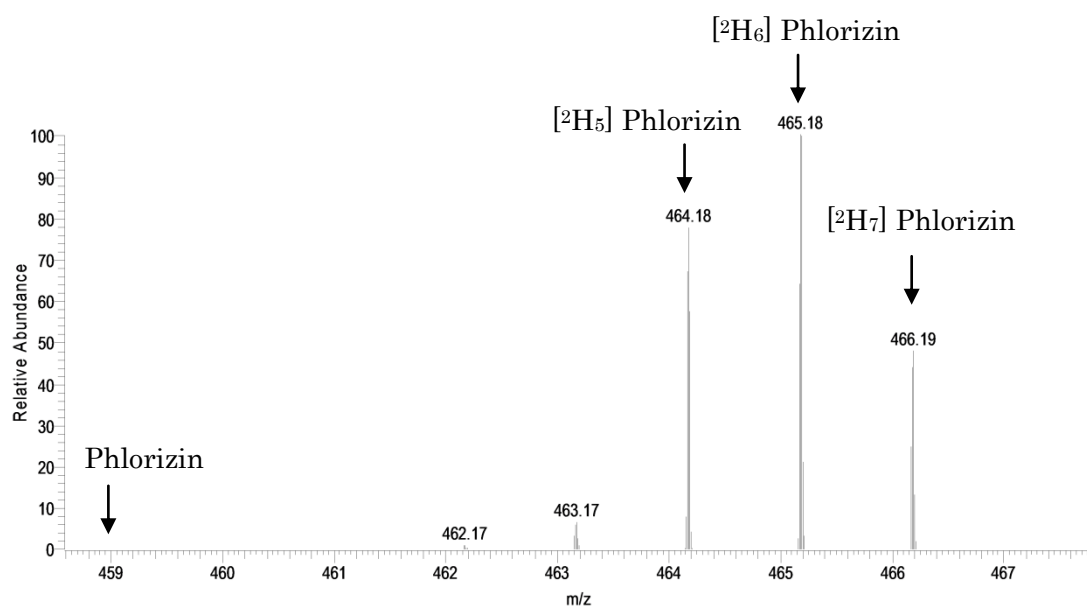


図 24. [²H_m] Phlorizin の質量分析結果

4-8-10. [$^2\text{H}_n$] Phloretin の合成

Naringenin 272 mg を dioxane 5.0 mL、 D_2O 5.0 mL に溶解し、10% Pd / C 2.0 mg を添加、水素雰囲気下、 80°C 、24 h 反応させた。反応液を減圧濃縮した後、 $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 50 : 50$ 10 mL に溶解し、TFA 100 μL を添加して 48 h、室温にて処理した。これを減圧濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO_2 , $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 100 : 0 \rightarrow 95 : 5$) にて精製し、重水素標識された Phloretin を 69.2 mg 得た。質量分析の結果、 $[\text{H}]$ 体 : $[\text{H}_2]$ 体 : $[\text{H}_3]$ 体 : $[\text{H}_4]$ 体 = 0.1 : 56 : 100 : 48 であった。

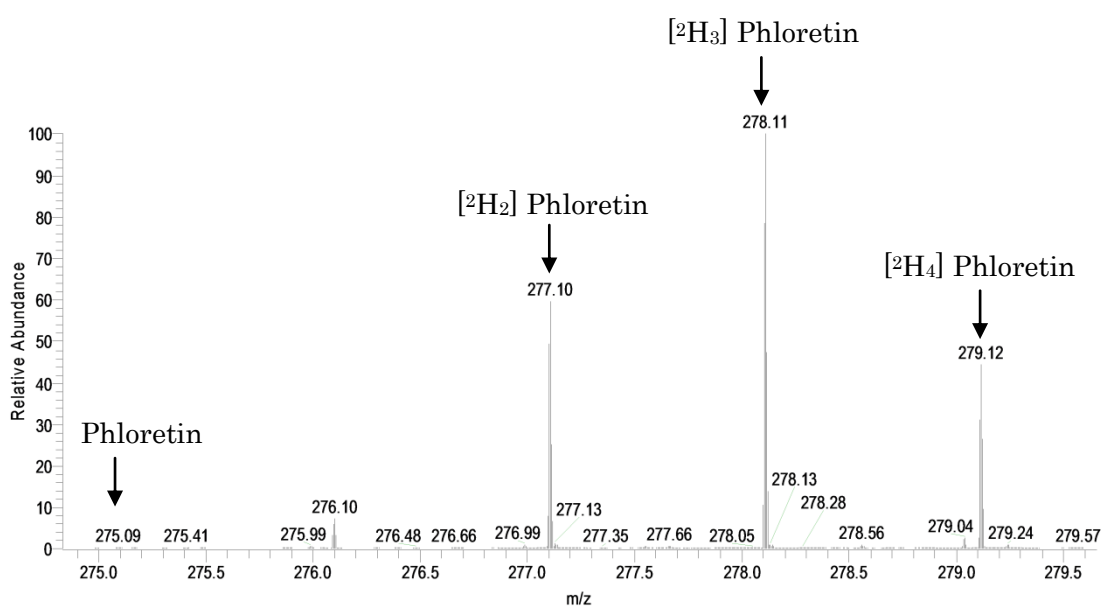


図 25. [$^2\text{H}_n$] Phloretin の質量分析結果

4-8-11. [²H_m] Phlorizin のリンゴ培養植物取り込み実験

リンゴ培養植物（径 3.0 cm、高さ 5.0 cm）に、実験 8 で合成した [²H_m] Phlorizin 10mg / DMSO 100 μL を添加し、そこに INA 600 mM / DMSO 溶液を 200 μL 添加し、INA の終濃度が 0.6 mM となる条件で 7 日間、3 反復で培養した。溶媒コントロールとして DMSO 0.15% 処理区を設定した。植物体を直径 0.5 cm 程度の大きさに切断し、MeOH に 12 h 浸漬し、ろ過した後、ろ液を濃縮・乾固して、MeOH 抽出物を調製した後、水と CHCl₃ で液-液分配し、水抽出物と CHCl₃ 抽出物を得た。

4-8-12. [²H_n] Phloretin のリンゴ培養植物取り込み実験

リンゴ実生に、実験 9 で合成した [²H_n] Phloretin 10mg / DMSO 100 μL を添加し、INA 0.6 mM または DMSO 0.15% 処理条件下で 7 日間、3 反復で培養した。植物体抽出物の調製は実験 11 と同様の方法で行った。

4-8-13. LC-MS による重水素標識化合物の検出

実験 11 及び 12 で得られた植物体 CHCl₃、及び水抽出物をそれぞれ MeOH、MeOH : H₂O = 60 : 40 に溶解し、10 ppm に調製した。これらのサンプルについて LC-MS 分析を行い、[²H_m] Phlorizin、[²H_n] Phloretin と、[²H_x]Phloretin 及び [²H_y]Phlorizin を分析した。LC 条件は表 5 に示した。MS 条件はイオン化法 : ESI, positive, SIM モードにて測定した。

表 6. LC 条件

装置	Thermo Scientific Exactive, SHIMADZU UFLC LC-20 AD		
カラム	Inertsil ODS-3 (2.1 mm×5.0 mm)		
流速	200 μl / min		
温度	室温		
移動相	A 液 : MeOH	B 液 : 0.5% 酢酸水溶液	
注入量	10 μl		
	時間(分)	A%	B%
	0	20	80
	20	100	0
	25	100	0
	26	20	80
溶出法	グラジエント		

参考文献

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations
<http://www.fao.org/home/en/> 2017年10月20日参照
2. 農林水産省食糧需給表 <http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/> 2017年10月20日参照
3. Ying Xu *et al.*, Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 23, pp. 379-388 (2016)
4. Loic Le Marchand *et al.*, Intake of Flavonoids and Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 92 (2), pp. 154-160 (2000)
5. Shalika Rana *et al.*, Phenolic constituents from apple tree leaves and their *in vitro* biological activity. *Industrial Crops and Products*. Vol. 90, pp. 118-125 (2016)
6. Zhe-Rong Xu *et al.*, Apple Polyphenols Decrease Atherosclerosis and Hepatic Steatosis in ApoE^{-/-} Mice through the ROS/MAPK/NF- κ B Pathway. *Nutrients*. Vol 7, pp. 7085-7105 (2015)
7. Toshihiko Shoji and Tomisato Miura. Apple Polyphenols in Cancer Prevention. *Polyphenols in Human Health and Disease*. pp. 1373-1383 (2014)
8. Tomisato Miura *et al.*, Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis*. Vol.29 (3), pp.585-593 (2008)
9. Griselda M *et al.*, Modulating the expression of genes associated with hepatic lipid metabolism, lipoperoxidation and inflammation by cocoa, cocoa extract and cocoa flavanols related to hepatic steatosis induced by a hypercaloric diet. *Food Research International*. Vol. 89, pp. 937-945 (2016)
10. Emi Tateishi *et al.*, Effect of a hot water extract from Coffee beans on the postprandial blood glucose concentration in rats. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. Vol. 62 (6), pp. 323-327 (2004)
11. W. T. Chang *et al.*, Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry*, Vol. 134, pp. 972-979 (2012)
12. D. Barreca *et al.*, Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry*, Vol. 160, pp. 292-297 (2014)
13. Y. Sun *et al.*, Preparative isolation, quantification and antioxidant activity of

- dihydrochalcones from Sweet Tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.). *Journal of Chromatography B*, Vol. 1002, pp. 372-378 (2015)
14. X. Qin *et al.*, Dihydrochalcone Compounds Isolated from Crabapple Leaves Showed Anticancer Effects on Human Cancer Cell Lines. *Molecules*, Vol. 20, pp. 21193-21203 (2015)
 15. 岡田真理子、秋田県立大学大学院、修士論文 (2007)
 16. 西條了康、フラボノイドの代謝マップ、茶業研究報告、114 巻、pp. 79-88 (2012)
 17. 齊藤安貴子、中島範行、プロアントシアニジンの立体選択的合成研究とその生物活性、有機合成化学協会誌、63 巻 (10) 、 pp. 26-38 (2006)
 18. G. Hrazdina. Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (Liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry*. Vol. 64, pp. 485-492 (2003)
 19. S. Michalek *et al.*, Stimulation of Phenylpropanoid Biosynthesis in Apple (*Malus domestica* Borkh.) by Abiotic Elicitors. *European Journal of Horticultural Science.*, Vol.70 (3), pp. 116-120 (2005)
 20. T. Strissel *et al.*, Stimulation of the phenylpropanoid biosynthesis by plant activators in apple leaves. *Acta Horticulturae*. Vol. 732, pp. 549-554 (2007)
 21. 田口 悟朗、植物の異物修飾機構を応用した配糖体生産への取り組み、生物工程、89 巻 (11) 、 pp.643-645 (2011)
 22. B. Young Choi. Biochemical Basis of Anti-Cancer-Effects of Phloretin—A Natural Dihydrochalcone. *Molecules*. Vol. 24 (2), 276 (2019)
 23. D.Barreca *et al.*, Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry*. Vol. 160, pp-292-297 (2014)
 24. Y. Sun *et al.*, Preparative isolation, quantification and antioxidant activity of dihydrochalcones from Sweet Tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.). *Journal of Chromatography B*. Vol. 1002, pp. 372-378 (2015)
 25. K. Masuko *et al.*, Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL-60 human leukemia cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Vol. 63 (4), pp. 719-725 (1999)
 26. X. Qin *et al.*, Dihydrochalcone Compounds Isolated from Crabapple Leaves Showed Anticancer Effects on Human Cancer Cell Lines. *Molecules*. Vol. 20, pp. 21193-21203 (2015)
 27. C. Gosch *et al.*, Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Science*. Vol. 176, pp. 223-231 (2009)
 28. H. Jugde *et al.*, Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase

that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *The FEBS Journal*. Vol. 275, pp. 3804-3814 (2008)

5. 総括

HL-60 増殖抑制活性を指標として *D. tokoro* からは Protodioscin、*S. gilgiana* からは 7-ketositosterol、7 β -hydroxysitosterol、7 α -hydroxysitosterol を活性成分として単離した。また、抗がん、抗酸化作用など様々な生理活性が報告されているリンゴ・ポリフェノールの生合成に着目し、リンゴ培養植物において Phloretin と Phlorizin の生合成について化合物レベルで追跡し、エリシター処理下での両化合物の相互変換を詳細に明らかにし、植物のストレス応答上の意義について考察した。

今後は、本研究で得られた知見をヒトの健康に役立てられるよう検討していきたい。

謝辞

本研究は、著者が秋田県立大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源科学専攻に在学中、主に同大学応用生物科学科 吉澤結子教授のご指導のもとに行った。本論文をまとめるにあたり、吉澤結子教授、主査の水野幸一准教授、副査の田母神繁教授、常盤野哲生准教授に暖かく激励、ご指導いただき、心から感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、同大学 アグリビジネス学科 吉田康徳教授には、*D. tokoro* の研究においてご助言をいただいた。同大学 生物生産科学科 日高伸教授には、*S. gilgiana* の研究において、ヤナギ科植物のご提供とご助言をいただいた。また、X線結晶構造解析において、岡山大学自然生命科学研究支援センター 技術専門職員 太田弘道先生に解析を依頼し、ご助言をいただいた。岩手大学農学部 小森貞男教授には、リンゴ培養植物の研究において、リンゴ培養植物のご提供とご助言をいただいた。秋田県立大学の先生方をはじめ、多くの先生方に多大なるご協力とご指導をいただき、深く感謝申し上げます。

また、植物機能科学グループの研究室で共に活動してきた諸先輩方、後輩、同期、また、勤務先であるバイオテクノロジーセンターの皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、日頃より応援してくださった恩師、友人、家族に深く感謝申し上げます。

本研究は、多くの方々の支えがなければ成し得なかった。改めて、心から深く感謝申し上げます。