

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790141

研究課題名（和文） 栗イガの化学的研究に基づく未利用資源の機能開発と応用研究

研究課題名（英文） Polyphenolic constituents from Chestnut needles and their biological activities

研究代表者

好村 守生（YOSHIMURA MORIO）

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：80454891

研究成果の概要（和文）：栗イガの機能開発を目的に成分精査を行い，得られた化合物について抗酸化能評価，チロシナーゼ阻害活性，メラニン産生抑制作用を検討した．成分精査ではイガから 13 種の化合物を単離した他，加水分解性タンニンの酸分解物から ellagic acid 3-*C*-glucoside を得た．メラノーマ細胞を用いたアッセイでは，ellagic acid が強い細胞毒性を示した一方，ellagic acid 3-*C*-glucoside は細胞毒性を認めず，またコントロールの arbutin よりも強いメラニン産生抑制活性を示した．

研究成果の概要（英文）：We examined the polyphenolic constituents in chestnut needles and isolated fourteen phenolics including hydrolyzable tannins and ellagic acid derivative. Also, ellagic acid 3-*C*-glucoside which was derived from hydrolyzable tannins and was not yet isolated from natural resources was obtained. All the isolates showed potent antioxidative activities evaluated by ORAC test and SOD-like activity. Hydrolyzable tannins also exert tyrosinase inhibitory effect meanwhile ellagic acids which are known to have skin-whitening ability showed no activity. Additionally, ellagic acid 3-*C*-glucoside showed potent inhibitory effect against melanogenesis of melanoma B16 cells than the positive control of arbutin with low cytotoxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2012 年度 | 500,000   | 150,000 | 650,000   |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：薬用資源学

キーワード：ポリフェノール，加水分解性タンニン，エラグ酸誘導体

### 1. 研究開始当初の背景

近年，植物性ポリフェノールの化学的研究やそれらの構造の違いに基づく各種生物活性に関する研究が国内外で活発化しており，抗酸化作用をはじめ抗腫瘍，抗菌，抗ウイルス，抗炎症作用，さらには免疫系への関与など，疾病予防や健康への寄与に高い関心が集

まっている．食品や嗜好品に含まれるポリフェノールの生理作用物質としてはフラボノイドやタンニンなどが報告されているが，特にタンニンはその構造の複雑性，不安定性などの理由から未精査な植物も多い．タンニンはその構造的特徴から縮合型タンニンと加水分解性タンニンとに大別され，前者はほと

多くの植物に分布が認められる一方、後者の分布は限定的であり、例えばブナ科、バラ科、フトモモ科などの離弁花植物に含まれることが知られている。また、加水分解性タンニンのうち *C*-配糖体型エラジタンニンはグルコースと非糖部とが C-C 結合を有する特徴的な構造をしており、それらには抗リュウシマニア作用などの特異な活性が報告されている。本研究課題で選択したブナ科のクリ (*Castanea crenata*) の葉や樹皮、果実の渋皮などには当該成分を豊富に含むことが知られていることから、イガにも同様の成分が期待される。

## 2. 研究の目的

クリのイガは雌花の総苞が発達したものであり、非常に硬く鋭いため用途に乏しく、有効活用が見出されていない植物資源である。一方でクリの葉や樹皮、果実の渋皮などには多彩な生理活性が報告されているタンニン類、特に *C*-配糖体型エラジタンニンが豊富に含まれることが知られている。研究代表者らは HPLC による予試験的な検討において、イガの抽出物にも葉や樹皮と同様の成分が含まれることを見出したことから、イガの詳細な成分解明およびその活性評価に基づく機能性植物素材の開発と応用に向けた基礎的研究を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) イガに含まれる高極性成分の探索

イガの粉碎物を含む水アセトンおよび含水アルコールで抽出を行い、得られた各エキスについて抗酸化能評価を行った。その結果、最も強い活性を示した含水アセトン抽出物について、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配抽出を行い、各エキスを得た。それらのうち酢酸エチルエキスおよび *n*-ブタノールエキスについて各種カラムクロマトグラフィー (Diaion HP-20, Toyopearl HW40 など) による分離・精製を繰り返し行うことで単一の化合物を得た。単離した各化合物については NMR やマススペクトルを含む機器分析による詳細な解析を行うことで構造を明らかにするとともに、その構造的特徴によって分類し、各種評価試験に供した。

### (2) Ellagic acid 3-*C*-glucoside の調製

イガの成分精査で得られた *C*-配糖体型エラジタンニンである casuarinin について、1N 塩酸中で 6 時間加水分解を行った後、分解物を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィーに供して分離・精製を行い、ellagic acid 3-*C*-glucoside を得た。

### (3) 各種生理活性評価

ポリフェノール類は強い抗酸化活性を有

することが知られており、DPPH ラジカル消去活性測定法などの手法によってその活性が報告されてきた。しかしながら、既存の評価系では生体内に存在しないラジカル種を用い、また単回測定でのアッセイであることから、より生体内条件に近い環境かつ多点測定を行うことで評価する ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法を選択し、抗酸化能評価に用いた。また、異なる機構の評価系として SOD (superoxide dismutase) 様活性の測定も行い、各評価系での活性の差異を観察した。一方、ellagic acid には美白作用があるとされ、イガ由来成分から誘導される特徴成分の ellagic acid 3-*C*-glucoside にも同様の作用が期待されることから、チロシナーゼ阻害活性およびマウス由来メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制試験を行うこととした。

### ① 抗酸化活性

イガの各種有機溶媒 (70%アセトン, 50%エタノール, 80%エタノール, エタノール, 50%メタノール, メタノール) 抽出エキスについて、ORAC 法による抗酸化能評価を行い、最も強い活性を示した抽出エキスについて詳細な成分分析を行った。また、成分分析で得られた各化合物について、ORAC 法による抗酸化能評価に加えて SOD Assay kit-WST (同仁化学研究所) を用いた SOD 様活性の測定を行った。

### ② チロシナーゼ阻害活性

単離した各化合物について、L-DOPA を基質、MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone-hydrazone hydrochloride hydrate) を増感剤としてチロシナーゼ阻害活性の測定を行った。

### ③ メラニン産生抑制試験

Ellagic acid 3-*C*-glucoside について、マウス由来メラノーマ B16 細胞を用いたメラニン産生抑制試験を行った。また、ポジティブコントロールとしては ellagic acid および arbutin を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) イガに含まれる高極性成分の探索

イガの各種有機溶媒抽出エキスのうち、ORAC 法による抗酸化能評価で 70%アセトン抽出エキスに最も強い活性を示したため、当該エキスについて成分精査を行った。

イガ粉碎物 (1.5 kg) を 15 L の 70%アセトンで抽出を行い、ろ過、濃縮後、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール (各 6 L) で順次抽出を行い、各エキスを得た。そのうち酢酸エチルエキス (15.0 g) について Toyopearl HW40, MCI-gel CHP20P, YMC-gel ODS-AQ, Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を繰り返した結果、13 種のポリフェノール類

[gallic acid (1), protocatechuic acid (2), ellagic acid (3), 3,3'-di-*O*-methylellagic acid (4), 3,3',4-tri-*O*-methylellagic acid (5), kaempferol

3-*O*-(6"-*O*-*p*-coumaroyl)-glucoside (6), 1,2,3-tri-*O*-galloylglucose (7), 1,2,3,6-tetra-*O*-galloylglucose (8), 1,3-di-*O*-galloyl-4,6-HHDP glucose (9), tellimagrandin I (10), tellimagrandin II (11), casuarictin (12), casuarinin (13)] を単離し, NMR, マスペクトルを含めた詳細な構造解析から各化合物を同定した. また, 酢酸エチルエキスの主構成成分は ellagic acid および tellimagrandin II であった. さらに, *n*-ブタノールエキス (40 g) について Diaion HP-20 および YMC-gel ODS-AQ カラムクロマトグラフィーを用いて分離, 精製を行った結果, casuarinin (13) (1.2 g) を得た.

### (2) ellagic acid 3-*C*-glucoside の調製

イガの成分精査で得た *C*-配糖体型エラジタンニンの casuarinin (50.8 mg) について, 1N 塩酸 (10 mL) を加え 105°C, 6 時間加水分解を行い, 反応溶液を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィーに供して分離・精製を行った結果, ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) (3.9 mg) を得た.

また, 本化合物の効率的取得方法の検討として, イガの 70%アセトン抽出エキス (4.0 g) について 1N 塩酸中 105°C, 6 時間加熱分解し, 反応液を YMC-gel ODS-AQ および Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーによる分離, 精製を繰り返した結果, ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) (17.3 mg) を得た.

また, イガを 1N 塩酸中 105°C で 6 時間加熱分解し, 反応液を分離・精製する手法についての検討も行ったが, 不溶性の沈殿が多量に形成されてしまい, 分離が不可能であった. これらのことから, 本化合物を効率良く得るためには粗精製した casuarinin (13) を分解反応に用い, 反応物をカラムクロマトグラフィーによる精製に供する方法が好ましいと考えられる.

### (3) 各種生理活性評価

#### ① 抗酸化活性

イガを各種有機溶媒 (70%アセトン, 50%エタノール, 80%エタノール, エタノール, 50%メタノール, メタノール) で抽出を行い, 得られた各抽出エキスについて, ORAC 法による抗酸化能評価を行った. その結果 (図 1), 70%アセトン抽出エキスに最も強い活性 [2,544  $\mu\text{mol TE}$  (= Trolox Equivalent)/g] を示したため, 本抽出エキスを成分精査に用いることとした.

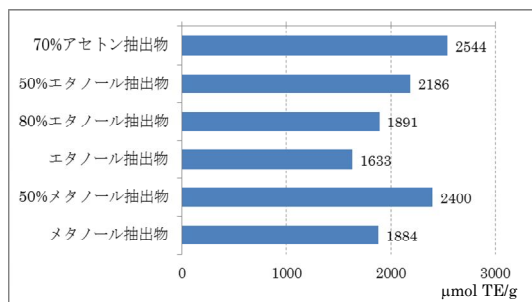


図 1. イガ抽出エキスの ORAC 値

成分精査で単離した 13 種の化合物に加えて, casuarinin の酸加水分解物から得た ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) についても ORAC 法で評価を行った結果 (図 2), protocatechuic acid (2) [32,645  $\mu\text{mol TE/g}$ ], kaempferol

3-*O*-(6"-*O*-*p*-coumaroyl)-glucoside (6) [26,853  $\mu\text{mol TE/g}$ ] に顕著な活性を認めた. また, 各化合物の ORAC 値に分子量を乗じてモル換算した結果 (図 3), いずれの化合物の Trolox より強い活性を示し, 加水分解性タンニン類では Trolox の約 4 倍以上強い活性を示すことが明らかになった. 一方, ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) [12,256  $\mu\text{mol TE/g}$ ] は ellagic acid (3) [9,560  $\mu\text{mol TE/g}$ ] よりも高い ORAC 値を示し, モル濃度比較では約 2 倍の活性を示した.

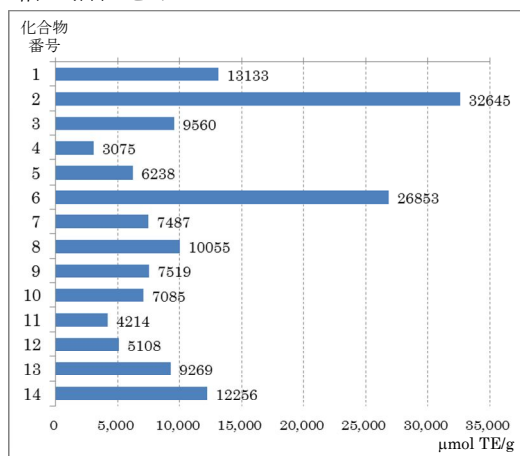


図 2. 各化合物の ORAC 値

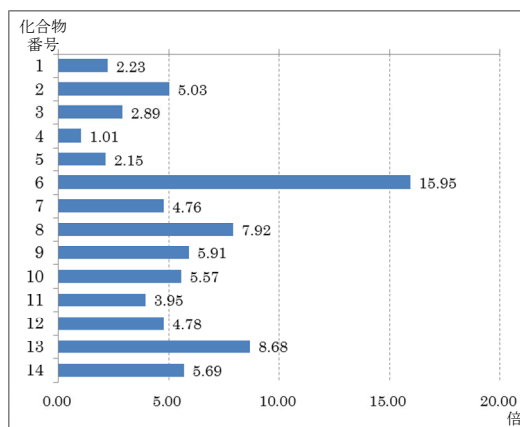


図 3. 各化合物の抗酸化能の Trolox 相当量

SOD 様活性 (図 4) では, ORAC による抗酸化能評価で高い値を示した kaempferol 3-*O*-(6"-*O*-*p*-coumaroyl)-glucoside (6) には強い活性 (IC<sub>50</sub>) を認めず, gallic acid (1) や ellagic acid (3), ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) に強い活性を認めた.

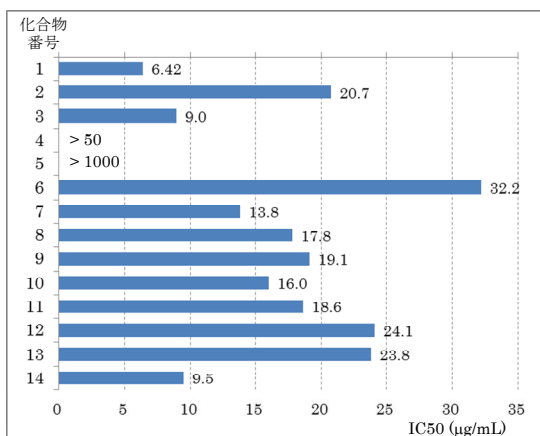


図 4. 各化合物の SOD 様活性

## ② チロシナーゼ阻害活性

チロシナーゼ阻害活性の測定を行った結果 (図 5), 加水分解性タンニンに強い活性を認め, 特に 1,2,3,6-tetra-*O*-galloylglucose (8) および tellimagrandin II (11) の活性は顕著であった. 一方, gallic acid (1) および ellagic acid 類 (化合物 3, 4, 5, 14) は活性を示さなかった. gallic acid に活性を認めず, gallic acid とグルコースとがエステル結合した化合物群が強い活性を示したことは, 化学構造上, 非常に興味深い.

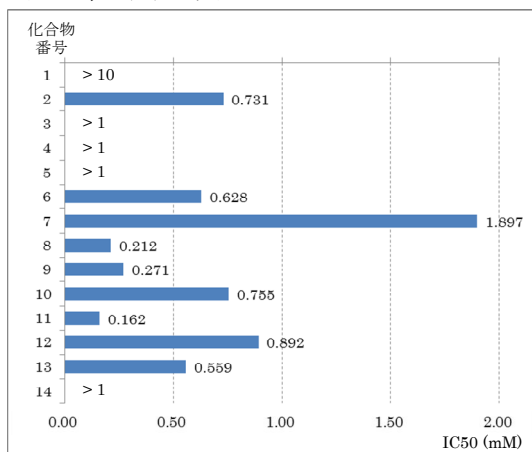
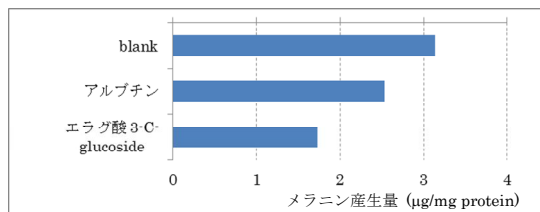


図 5. 各化合物のチロシナーゼ阻害活性

## ③メラニン産生抑制試験

マウスメラノーマ B16 細胞を用いて, メラニン産生抑制試験を行った. 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/well の濃度で 12-well マイクロプレートに播種し, D-MEM+10% FBS+2 mM グルタミン培地で 96 時間培養した. 培養開始から 24, 72 時間後にサンプルを添加 (終濃度 100 µg/mL) し, 96 時間後に細胞を回収してメラニン量および総蛋白量の定量を行った.

ポジティブコントロールとしては arbutin および ellagic acid (3) を用い, 得られたメラニン量を総蛋白量で除することで蛋白量 (mg) あたりのメラニン産生量を算出した (図 6). その結果, arbutin および ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) では blank と比較して有意にメラニン産生量の抑制が認められ, ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) は arbutin よりも強い活性を示した. また, ellagic acid (3) では強い細胞毒性が観察されたが, ellagic acid 3-*C*-glucoside (14) では細胞毒性は認められなかった.



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① 発表者: 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志

発表題名: Polyphenolic constituents of *Castanea crenata* needles

学会名: Bioactive Okayama 2012

発表年月日: 2012 年 9 月 14 日

発表場所: 岡山大学 (岡山)

② 発表者: 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志

発表題名: 栗イガに含まれるポリフェノール成分

学会名: 日本薬学会 第 132 年会

発表年月日: 2012 年 3 月 30 日

発表場所: 北海道大学 (札幌)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

好村 守生 (YOSHIMURA MORIO)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号: 80454891