

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450231

研究課題名(和文) ジャトロファに含まれる抗酸化物質の高度利用に関する化学的研究

研究課題名(英文) Chemical research on utilization of antioxidants from *Jatropha curcas*

研究代表者

鈴木 利貞 (Suzuki, Toshisada)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：80346634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジャトロファ搾油カスから1種類のカテコール型リグナン、5種類のネオリグナン類、2種類のセスキネオリグナン類を単離・同定した。2つのカテコール構造を持つ3,3'-ビスデメチルピノレジノール、イソプリンセピン、プリンセピンはトロロックスよりも高い抗酸化活性を示した。メタノール抽出物有機層画分とイソアメリカノール Aは植物油やバイオディーゼルの酸化を抑制した。このことからジャトロファ搾油残渣に含まれる天然抗酸化物質は、ジャトロファバイオディーゼルの酸化防止剤として利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The ethyl acetate soluble fraction of the methanol extract obtained from the defatted seed residue of *Jatropha curcas* had the same potent antioxidant activities as Trolox. From the antioxidant fraction a catechol-type furofuran lignan, (+)-3,3'-bisdemethylpinoresinol; five catechol-type 1,4-benzodioxane neolignans, (-)-isoamericanol A, (+)-americanol A, 9'-O-methylisoamericanol A, 9'-O-methylamericanol A, and isoamericanin A; and two catechol-type sesqueneolignans with furofuran and 1,4-benzodioxane moieties, isoprincepin and princepin were isolated and identified. Potent antioxidant activities of these eight compounds were also confirmed. The ethyl acetate soluble fraction of the methanol extract was found to be more effective than  $\alpha$ -tocopherol by the tests for preventing oxidation of commercial salad oil and *Jatropha* oil and the biodiesel fuels (BDF) derived from the two oils.

研究分野：バイオマス化学

キーワード：ヤトロファ 南洋アブラギリ カテコール リグナン・ネオリグナン 生理活性 バイオディーゼル

## 1. 研究開始当初の背景

近年、石油の枯渇と大気汚染に対する懸念からバイオディーゼルの利用が注目されている。バイオディーゼルは無毒性であり、カーボンニュートラル、再生可能エネルギーに位置づけられ、ドイツ、フランスなどのEU諸国やアメリカでは、ナタネ、ダイズ、ヒマワリ等の未使用の食用油を用いたバイオディーゼルの生産が急増している。一方で、このような食用油からのバイオディーゼルの生産はコストが高いこと、食料と競合することなどから、油糧植物の供給量が限定されている中国、インド、東南アジア地域では、非食用のジャトロファを用いたバイオディーゼルの生産が注目されている。

ジャトロファ(南洋油桐、*Jatropha curcas*)は、中南米原産のトウダイグサ科落葉低木であり、農業に適さないやせた土地や瓦礫地でも生長が早く、乾燥や病気に対する抵抗性が高い。高さ3~8 mまで生長するが、ホルボールエステルなどの有毒成分を含有するために、食用とはならない。その種子の約60%は油脂であることから、バイオディーゼル燃料の生産が可能であり、中国の長江周辺、フィリピン、インドネシア諸国、インドでは既にジャトロファの増産が行われている。これまでに、ジャトロファ種子から生産されるバイオディーゼルの特性、安定性に関する研究や、効率的なバイオディーゼル生産についての研究は多数報告されている。しかし、ジャトロファに含まれる化学成分についての研究は少なく、毒性成分については数報あるが、抗酸化物質についての研究は全く無い。

一般的に、油脂は空气中で非常に酸化しやすいことから、油糧植物は抗酸化物質を大量に生合成し、油脂の自働酸化を防御している。例えば、ダイズやナタネでは、抗酸化物質であるトコフェロール類を多く含んでいる。ゴマ油は比較的酸化に強いことが知られているが、ゴマ種子にはセサミンやセサミノールなどの抗酸化物質が含まれている。ジャトロファ油も酸化安定性が比較的高いことから、高活性な抗酸化物質を含んでいることが十分に予想されるが、これまでにジャトロファに含まれている抗酸化物質についての報告は全く無い。

## 2. 研究の目的

(1) これまでに私たちは、「ゴマに含まれる抗酸化リグナンであるセサミノールの生合成」、「熱帯産樹木からの新規生物活性物質(抗酸化物質)の探索」、「植物における環境ストレスにおける抗酸化機構」などの抗酸化物質に関する研究を数多く行ってきた。インドネシアでバイオディーゼル生産現場を視察した時に、ジャトロファ種子にも抗酸化物質が含まれているはずであるという着想に至った。予備的実験では、ジャトロファ種子の絞りカスのメタノール抽出物に強い抗酸化活性物質の存在が確認された。この抽出物

を分離・精製した結果、すでにカテコール構造を有するいくつかのネオリグナン類を単離・同定している。単離したこれらのネオリグナンは高い抗酸化活性を有しているが、メタノール抽出画分の活性は数倍高いことから、他にも高い活性を有する化合物が含まれていると考えている。

これらのカテコール型ネオリグナン類の生合成は、コニフェリルアルコールが重合した通常ネオリグナン類が、脱メチル化された物質群とは考えにくいことから、関連する研究者から生合成経路に興味を持たれている。また、高等植物においてこのようなカテコール型リグナンの生合成は比較的珍しく、リグニン生合成とどのように分岐・制御されているのかについても非常に興味深い。さらに、3,3'-bisdemethylpinoresinolは、ゴマに含まれるセサミンの腸内における代謝物質であり、この代謝された構造によって抗酸化作用が発揮されると考えられていることから、ジャトロファに含まれるこれらのカテコール型リグナン類の抗酸化活性とそのメカニズムについて、他分野の研究者からも興味を持たれている。

(2) 本研究は、搾りカス及びジャトロファ油に含まれる抗酸化性物質を単離・同定し、ジャトロファ油の酸化安定性に関与している抗酸化物質を明らかにする。また、予想前駆体であるカフェイルアルコールからの化学合成及び酵素的重合を行う。さらに、天然及び合成により得られたカテコール型リグナン・ネオリグナン類を用いて各種生理活性試験を行い、カテコール型リグナン類の有効利用法を検討することを目的としている。

(3) ジャトロファ種子に含まれる抗酸化物質についての研究はこれまでに全く報告されていないことから、本研究課題は非常に新規性が高い。また、油糧植物ごとに含まれる抗酸化物質の比較や植物における抗酸化メカニズムの解明にも繋がり、学術的意義も非常に高いと言える。さらに、本研究課題は応用利用への研究も期待できる。油糧植物の廃棄物から抗酸化物質を分離・精製して利用することは広く行われており、例えば、脱脂ダイズ、脱脂キャノーラからはトコフェロール類を分離し、食用油の抗酸化剤として利用している。ジャトロファには毒性物質であるホルボールエステルが含まれているため食品等への利用は限定されるが、ジャトロファ搾りカスの廃棄物から分離・精製される抗酸化物質は、バイオディーゼルの安定化剤として有効利用できると考えている。これらの研究成果は、ジャトロファの有効利用促進に繋がり、植物資源を利用した東南アジア諸国の経済的発展に大きく貢献できる可能性があり、社会的意義も大きい研究課題である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗酸化物質の単離・同定

ジャトロファ種子は搾油器により採油し、油と搾りカスに分けた。搾りカスは、ソックスレー抽出器を用いて、ヘキサン、酢酸エチル、メタノールにより逐次抽出を行った。メタノール画分に抗酸化物質が多く含まれていたため、各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行った。各画分の抗酸化活性はDPPHラジカル法、フォーリン・チオカルト法により評価を行った。

#### (2) 化学合成

カフェ酸エチルを無水THF中でDIBAL-Hによって還元し、カフェイルアルコールを得た。これに炭酸銀(アセトン-トルエン中)で脱水素重合させ、カテコール型リグナン類を合成した。

#### (3) 粗酵素実験

カフェ酸エチルを無水THF中でDIBAL-Hによって還元し、カフェイルアルコールを得た。これに西洋ワサビペルオキシダーゼと過酸化水素で脱水素重合させ、カテコール型リグナン類を酵素的に生成した。

#### (4) 抗酸化物質の構造活性相関

単離・同定した抗酸化物質及び合成物質は、同様に抗酸化活性試験を行った。抗酸化物質の官能基と抗酸化能について構造活性相関を評価した。

#### (5) 油脂安定性試験

単離・同定した抗酸化物質をジャトロファ油に添加し、酸化(AV)、過酸化値(POV)、カルボニル値などの品質評価試験を行った。抗酸化物質の油脂安定性に対する評価を行い、バイオディーゼルの安定化剤としての利用方法を検討した。

#### (6) -グルコシダーゼ阻害活性試験

-グルコシダーゼ反応の基質はp-ニトロフェニル -グルコシドを、溶媒は10mMK-Pi緩衝液(pH 7.0)を用いた。阻害活性試験の試料としてジャトロファ種子搾油カス抽出物4画分及び合成した(+)-3,3'-bisdemrthylpinoresinol (1) と(±)-isoamericanol A (2) を用い、ポジティブコントロールは市販(-)-エピカテキンを用いた。基質溶液 200 µL と試料溶液 100 µL をエッペンドルフチューブに入れ、5分間37°Cで予備加熱してから、これに酵素溶液 200 µL を加えて37°Cで10分間インキュベートした。0.1M 炭酸ナトリウムを加えて反応を停止させて、反応液の400nmの吸光度を測定し、-グルコシダーゼ阻害活性率を算出した。

#### (7) 抗癌活性試験

MCF-7細胞に25 µg/ml (±)-イソアメリカ

ノールAを処理し、3日後の効果をイソアメリカノールA添加無しのものと比較した。遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析、フローサイトメトリー分析による細胞周期アレストのチェック、さらにタネル染色によるアポトーシス細胞の検出を行った。またマイクロアレイで選別した細胞周期の特にG2/M期に関連する遺伝子BTG2 (B-cell translocation gene 2)、GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha)、p21 (CDKN1A; cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)、CDK1 (cyclin-dependent kinase 1)並びにcyclin B1とcyclin B2に焦点を絞り、ウエスタンブロット法やリアルタイムPCR法で発現の変化を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗酸化物質の単離・同定

ジャトロファ搾油カスは、ソックスレー抽出器を用いて、ヘキサン、酢酸エチル、メタノールにより逐次抽出を行った。酢酸エチル抽出物とメタノール抽出物は、それぞれ酢酸エチルと水で二層分配し、有機層と水層の画分を得た。これら4画分についてDPPH法とFolin-Ciocalteu法により抗酸化活性試験を行った結果、メタノール抽出物有機層画分にはTroloxと同等の強い活性が認められた。

そこでこの画分に注目し、中圧カラムクロマトグラフィー、TLC、HPLCを用いて分離・精製を行い、化合物1~8を単離・同定した(図1)。

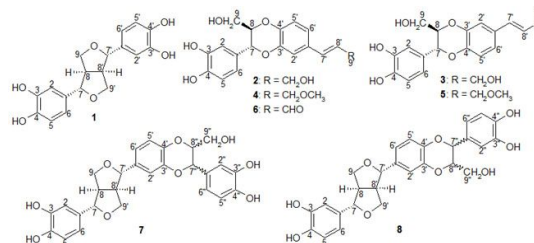


図1. 単離・同定したカテコール型リグナン類

化合物1はカテコール核を有するフロフラン型リグナンの(+)-3,3'-bisdemethylpinoresinol ([α]<sub>D</sub> = +7.08 (c = 0.456, EtOH), (+) 22% e. e.)と同定された。光学活性な1は植物から初めて得られた。このものは以下の点で興味深い成分でもある。すなわち、ゴマ種子中の(+)-sesaminは、摂取したヒトや実験動物の肝臓にて2段階で脱メチレンジオキシ化されて(+)-1となる。ゴマにこれは見出されていない。

化合物2はカテコール核と8-0-4'結合を有する1,4-ベンゾジオキササン型ネオリグナンの(-)-isoamericanol A ([α]<sub>D</sub> = -3.89 (c = 0.368, EtOH), (-) 12% e. e.)と同定された。化合物3はカテコール核と8-0-3'結合を有する1,4-ベンゾジオキササン型ネオリグナンの(+)-americanol A ([α]<sub>D</sub> = +21.5 (c = 0.140, EtOH), (+) 18% e. e.)と同定

された。これは2の位置異性体である。化合物4 (0.8mg)は9'-*O*-methylisoamericanol Aと、化合物5 (1.7mg)は9'-*O*-methylamericanol Aと同一とされた。前者4はisoamericanol A (2)の、後者5はamericanol A (3)の9'-*O*-メチルエーテルに相当し、これらのメチル基は試料をMeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>混合溶媒でシリカゲルCCを行った際に2と3に導入されたアーティファクトと思われる。化合物6はisoamericanin Aと同一とされ、isoamericanol A (2)の9'位の桂皮アルコールが桂皮アルデヒドに酸化されたものである。

化合物7と8は共に、カテコール核、フロフラン骨格、及び1,4-ベンゾジオキサン骨格を有する三量体のセスキノリグナン類であり、7はisoamericanol型のisoprincepin (4.6mg)と、8はamericanol型のprincepin (2.1mg)と同一とされた。

## (2) 化学合成

炭酸銀によるカテコール型リグナン類の化学合成を行った。Acetone-toluene (1:2, V/V) 溶媒中での炭酸銀によるカフェイルアルコールの脱水素重合ではisoamericanol Aが選択的に得られ、収率は47.1%であった。溶媒をacetone-toluene (1:2, V/V) からacetoneのみに変えて炭酸銀による重合を行ったところisoamericanol Aが得られ、収率は47.9%となった。また溶媒をMeOHのみに変えて炭酸銀による重合を行ったところ、isoamericanol Aの収率は47.3%となった。しかし収率はそれぞれ0.8%と0.2%と通常のものとはほとんど変わらず、大きく改善されたものではなかった。

これらのカフェイルアルコールの重合において3,3'-bisdemethylpinoresinolの存在は確認できなかったため、セサミンからの合成を試みた。(+)セサミンに、無水ジクロロメタン中-78℃で、三臭化ホウ素BBr<sub>3</sub>/ジクロロメタン溶液を加えて反応させた。後処理ではこの反応液にMeOHを加えて2分間攪拌し、次いで0℃にして水を加え、EtOAcと水による二層分配を行って、(+)-3,3'-bisdemethylpinoresinol (1)を収率12.1%で合成した。

## (3) 粗酵素実験

西洋ワサビペルオキシダーゼと過酸化水素によるカフェイルアルコールの重合では、イソアメリカノールAとアメリカノールAが低収率ながら得られ、イソアメリカノールAの方の収量が多かった。これは、種子搾油カスにおけるイソアメリカノールAとアメリカノールAの収量と対応していることから、カフェイルアルコールの4位脱水素ラジカルの方が、3位脱水素ラジカルよりも広く非局在化して安定なためである。

## (4) 抗酸化物質の構造活性相関

ジャトロファ搾油カスから単離・同一とされたすべてのリグナンとネオリグナン類は、カテコール核を有し(芳香族メトキシル基を有さない)、抗酸化性であることが予想された。実際に2種の抗酸化活性試験(DPPHラジカル消去法とFolin-Ciocalteu法)によって、すべてにポジティブコントロールのtroloxや-tocopherolを上回るか、またはそれらに匹敵する強い活性が認められ、3,3'-bisdemethylpinoresinol (1)及びisoprincepin (7)が最も強く、princepin (8)がそれらに次いだ(Table 1)。

Table 1. Antioxidant activities and total phenol contents of compounds

	DPPH method	Folin-Ciocalteu
	IC <sub>50</sub> (μM)	method (μg/mg)
3,3'-Bisdemethylpinoresinol (1)	16.0	300
Isoamericanol A (2)	19.7	250
Americanol A (3)	18.9	214
9'- <i>O</i> -Methylisoamericanol A (4)	18.3	240
9'- <i>O</i> -Methylamericanol A (5)	29.6	164
Isoamericanin A (6)	24.6	201
Isoprincepin (7)	9.12	301
Princepin (8)	11.7	270
Trolox	21.5	204

## (5) 油脂安定性試験

メタノール抽出物有機層画分を酸化防止剤として用いた油の酸化抑制試験では、サラダ油に対して-tocopherolと同等以上の効果が認められ、ジャトロファ油に対しては-tocopherol以上に酸化を抑制した。さらに、サラダ油由来のBDFとジャトロファ油由来のBDFに対しても-tocopherol以上に酸化を抑制した。従って、このメタノール抽出物有機層画分をジャトロファ油とそのBDFに添加することで、酸化安定性の高い燃料油の実用化が期待できる。

## (6) -グルコシダーゼ阻害活性試験

-グルコシダーゼ阻害活性試験では、(+)-3,3'-bisdemethylpinoresinolと(±)-isoamericanol A並びに搾油カスの酢酸エチル抽出物有機層画分とメタノール抽出物有機層画分に強い活性が認められた。-グルコシダーゼの働きを抑えることで、食後血糖値の急激な上昇を抑制できる。そのため、-グルコシダーゼ阻害剤は、過血糖症状及び過血糖に由来する肥満症、糖尿病などの疾患の改善に有用である。このことから、ジャトロファの抗酸化成分は、糖尿病や肥満の予防・改善に利用することが期待できる。

## (7) 抗癌活性試験

マイクロアレイ解析の結果、イソアメリカノールAで処理した細胞では、細胞周期関連、アポトーシス関連の遺伝子に変化が表れた。しかし、タネルアッセイではイソアメリカノールAによる強いアポトーシス誘導が認められなかった。一方、フローサイトメトリー解析ではイソアメリカノールAによる細胞周期のG2/M期に停止が認められた。このことから、G2/M期関連6因子であるBTG2、GADD45A、

p21、CDK1 並びに cyclin B1 と cyclin B2 のタンパク質や RNA の発現変化を比較した。その結果、マイクロアレイと同様に、イソアメリカノール A によって BTG2、GADD45A および p21 の発現は増加し、また CDK1 並びに cyclin B1 と cyclin B2 が減少することが確認された。

イソアメリカノール A はヒト癌細胞に濃度依存的に増殖を抑える働きがあった。そしてヒト乳癌細胞 (MCF-7) ではイソアメリカノール A の細胞増殖抑制作用機序として、以下の 2 つのメカニズムによる G2/M 期での停止を促す可能性が高いことが分かった: 1) イソアメリカノール A は直接的に G2/M 期を進めるのに必要な CDK1 並びに cyclin B1 と cyclin B2 の発現減少を誘導する; 2) イソアメリカノール A には BTG2、GADD45A、p21 の発現増加により間接的に cyclins B/CDK1 complex 形成を阻害する働きがある。これらの直接的、間接的な cyclins B1 および cyclin B2、並びに CDK1 の働きを阻害することで、G2/M 期を止め、細胞増殖を阻害すると推測される。ジャトロファ種子の抽出物であるイソアメリカノール A による癌細胞抑制の報告は我々が初めてであり、今後、他のカテコール型リグナン類やその誘導体の活性についても調べる必要がある。

#### 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)

[雑誌論文](計 3 件)

Suzuki, T., Eto, K., Kubota, Y., Katayama, T. and Pankasemsuk, T.: Antioxidative catechol lignans/neolignans isolated from defatted kernel of *Jatropha curcas*, Journal of Wood Science, 62 (4), 339-348, 2016. 査読有

Katagi, A., Sui, L., Kamitori, K., Suzuki, T., Katayama, T., Hossain, A., Noguchi, C., Dong, Y., Yamaguchi, F., Tokuda, M.: Inhibitory effect of isoamericanol A from *Jatropha curcas* seeds on the growth of MCF-7 human breast cancer cell line by G2/M cell cycle arrest, Heliyon, 2 (1), e00055, 2015. 査読有

片山健至, 鈴木利貞: バイオディーゼル燃料用植物ジャトロファに含まれる抗酸化成分, 化学工業, 66 (3), 177-182, 2015. 査読無

[学会発表](計 9 件)

Katagi, A., Sui, L., Kamitori, K., Suzuki, T., Katayama, T., Hossain, A., Noguchi, C., Dong, Y., Yamaguchi, F., Tokuda, M.: イソアメリカノール A の MCF-7 ヒト乳癌細胞に対する細胞増殖抑制効果のメカニズムは G2/M 期アレストによる, 第 67

回日本木材学会, 2017 年 3 月, 九州大学 (福岡県・福岡市)

Katagi, A., Sui, L., Kamitori, K., Suzuki, T., Katayama, T., Hossain, A., Noguchi, C., Dong, Y., Yamaguchi, F., Tokuda, M.: Isoamericanol A from *Jatropha curcas* seed extract shows anti-cancer activity on human breast cancer cell MCF-7 by induction of G2/M stage cell cycle arrest with prolonged treatment and disruption of regular spindle formation with short-term treatment, The 61st Lignin Symposium, 2016 年 10 月, 京都大学 (京都市・宇治市)

Katagi, A., Sui, L., Kamitori, K., Suzuki, T., Katayama, T., Hossain, A., Noguchi, C., Dong, Y., Yamaguchi, F., Tokuda, M.: Isoamericanol A from *Jatropha curcas* seed extract shows anti-cancer activity by cycle arrest at G2/M in the human breast cancer cell MCF-7, The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 200, 2016 年 3 月, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

Katagi, A., Sui, L., Kamitori, K., Suzuki, T., Katayama, T., Hossain, A., Noguchi, C., Dong, Y., Yamaguchi, F., Tokuda, M.: Anti-carcinogenic effects of isoamericanol A from *Jatropha curcas* seeds on the human breast cancer cell, MCF-7 by cell cycle arrest, 8th FAOPS Congress, 2015 年 11 月, バンコク (タイ)

片木絢子, 隋麗, 神鳥和代, 鈴木利貞, 片山健至, 野口知里, 山口文徳, アクラムホセイン, 徳田雅明: ジャトロファの種からの抽出物であるイソアメリカノール A は MCF-7 ヒト乳癌細胞を G2/M 期で停止することで増殖抑制作用を示す, 第 67 回日本生理学会中国四国地方会, 2015 年 10 月, 米子コンベンションセンター (鳥取県・米子市)

Katagi, A., Sui, L., Kamitori, K., Suzuki, T., Katayama, T., Noguchi, C., Yamaguchi, F., Akram, H., Tokuda, M.: ジャトロファ抽出物産物の一つ、イソアメリカノールによるヒト乳がん細胞の抗がん作用, 第 92 回日本生理学大会, 2015 年 3 月, 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)

Suzuki, T., Katayama, T., Pankasemsuk, T.: Catechol-type lignan/neolignans isolated as antioxidants from the defatted seed residue of *Jatropha curcas*, IAWPS 2015 (International Symposium on Wood Science and Technology 2015), 47, 2015 年 3 月, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

Katayama, T., Suzuki, T., Pankasemsuk, T.: Catechol-type lignan/nnolignans isolated as antioxidants from the defatted seed residue of *Jatropha curcas*, a shrub for biodiesel fuel production , International Conference on Polyphenols , T3.12, 2014 年 9 月, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

片山健至, 鈴木利貞: バイオディーゼル燃料用植物ジャトロファ由来のバイオマスの有効利用、抗酸化成分等の生物活性成分の探索, 第 81 回紙パルプ研究発表会, 61-66, 2014 年 6 月, 東京大学 (東京都・文京区)

〔その他〕

ホームページ等

香川大学農学部

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 利貞 (SUZUKI TOSHISADA)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号: 80346634

### (2) 研究分担者

片山 健至 (KATAYAMA TAKESHI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号: 00152687