

氏名	Trisonthi Piyapat
審査委員	主査 田村 啓敏 副査 小川 雅廣 副査 山内 聡 副査 川村 理 副査 島村 智子

論文名 Studies on Bioactive Compounds Found in *Litsea cubeba* Fruits
 (*Litsea cubeba* 果実に含まれる生理機能性物質に関する研究)

審査の結果の要旨

Litsea cubeba は、アジアを中心に伝統的な民間薬として広く使用される食用植物で、種子や樹皮に有用成分がある。また果実には、レモン香気に近い匂いをもつ精油が豊富に含まれ、この植物から取れた精油を May Chang 油と呼び、主成分はシトラールである。中国や台湾では、果実精油は食品や香料産業における原料として、あるいはアロマセラピーの素材として利用され、May Chang 油には、抗うつ、抗ストレス効果や抗不安効果があると言われている。

本研究では、*Litsea cubeba* 果実の有効利用を行うため、各種機能性評価を行い、果実の機能特性を明確にすることを目的とした。論文は6章からなり、2章では果実精油の抗酸化機能性、3章、4章、5章では果実メタノール抽出物の水溶性の高い画分と脂溶性の高い部分の抗発ガン機能成分の単離や構造解析及びその機能特性のメカニズムに関する報告である。研究を通じ機能性の高い新規物質を得る事に成功し、報告したものである。以下簡単に成果を記述する。

2章では、果実精油の抗酸化能を DPPH ラジカル及び β -カロテンを使用した一重項酸素阻害効果により評価した。精油成分のうち微量成分である α -テルピネン(0.07%)とオシメン(0.24%)に高い活性があることが判明した。また、主要成分であるシトラール(ゲラニアルおよびネラール, 73.6%)は中程度の活性があった。しかし、主要成分であるため、全体的には抗酸化能への高い寄与が推定された。

次に3章では、*Litsea cubeba* 果実のメタノール抽出物をアンバーライト XAD-7 カラ

ムにより分画し、80~100%メタノール画分である4B、5A、5Bおよび5C画分はHeLaに対して濃度依存的に細胞死を誘導する活性が高いことを見つけた。特に、細胞増殖阻害活性は48時間後のIC₅₀値が5A画分では4.89 μg/mL及び5B画分では3.26 μg/mLと非常に低濃度で効果がある事が分かった。次に、ガン細胞の効果的な死がアポトーシスとの関係があることをcaspase-3/-7の活性化により証明した。本試験は基質であるZ-DEVD-Rがアポトーシスを起こすとペプチド結合が切れ、蛍光を発するようになることを利用した試験法であるが、アポトーシス細胞の存在は、DAPI染色により明らかにした。caspase-3/-7活性は培養後9および12時間の時点で未処理細胞の17倍も高くなっていた。

4章では、*Litsea cubeba* 果実のメタノール抽出物からHeLa細胞の生存率および増殖阻害活性を指標に活性成分を探索するため、順相カラムクロマトグラフィー及び分取HPLCにより活性成分を単離精製した。その結果、新規ジテルペン(+)-6-(4-hydroxy-4-methyl-2-pentenoyl)-4,6-dimethyl-5-(3-methyl-2-butenyl)-1,3-cyclohexadienecarbaldehyde (cubelinと命名)を世界で初めて有効物質として構造解析することに成功した。cubelinは、アポトーシス細胞死の特徴である核の凝集を引き起こした。その細胞死はcaspase-8およびcaspase-9の両方の活性化を引き起こすため、内因性および外因性アポトーシス誘導を介して、アポトーシスを誘導することが示唆された。

5章では、cubelin以外の抗がん活性の高い成分を明らかにした。機能成分として化合物1から化合物5の5種を単離した。特に化合物4,5の活性は高く、Hela細胞に対してCCK-8試験により、それぞれ0.99 μg/mLと1.43 μg/mLと低濃度で高い活性を示す物質の存在を確認した。これらの物質は分子量情報などから、窒素を含むアルカロイド性の物質であると推測できた。

以上、申請者は、本研究を通じ、*Litsea cubeba* 果実に含まれる種々の活性成分を単離し、強い子宮頸癌に対する抗がん活性を有するcubelinを明らかにした。また、本抗がん活性にはガン細胞のアポトーシス誘導が重要な役割を担っていること、特にミトコンドリアの機能不全である内因性アポトーシスや外因性アポトーシス誘導を介して、アポトーシスを誘導されることが示唆された。

学位論文の公開審査会は平成26年8月2日香川大学農学部で実施され、口頭発表と質疑応答が行なわれた。続いて学位論文審査委員会を開催して本論文の内容を審査した。その結果、食品機能化学や医薬の開発に寄与する重要な知見を得ているなど複数の学問領域にまたがる境界領域分野の研究となっていることから、全員一致して本論文が博士(学術)の学位を授与するに値するものと判定した。