

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 大西 信太郎
Name
学位論文題目： 植物由来生理活性物質の活用に関する研究
Title of Dissertation
学位論文要約：
Dissertation Summary

古来より農産物の貯蔵は生産とともに重要な農学上の課題であり、貯蔵穀物を害虫の食害から守ることは貯蔵穀物の量の目減りを防ぐのみならず健康に関わる品質を守るために重要である。本研究では世界的に分布するジコナマダラメイガ *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) に対する防除活性を指標とし、高知県で得られた木本植物 26 種及び草本植物 76 種をスクリーニングした。その結果、木本植物コバノズイナ (*Itea virginica* L. (Saxifragales: Iteaceae)) に良好な害虫防除活性を見出し、その葉から *E. kuehniella* の成長阻害活性物質としてアリトール及び D-アルロースを同定し、両物質を有用に活用し得る可能性を考察した。このように植物を工業製品の原料として用いる場合、農作物の植物残渣を活用することができれば、均質で安定した供給が可能となる。植物残渣に含まれる成分の有用性検討を、高知県で多く栽培されるピーマン *Capsicum annuum* に着目し、残渣である葉に多く含まれるフラボノイドであるルテオリンとその配糖体について、破骨細胞の分化抑制効果をヒト細胞において検討し、非細胞毒性量において分化抑制効果が得られることを見出した。さらに、植物残渣である *Capsicum annuum* 葉から効率的にルテオリンを得るための基礎的検討として、47 種の栽培品種についてその含有するルテオリン量を、併存するフラボノイドであるアピゲニン量とともに検討した結果、ルテオリンが品種によらず存在すること、高生産品種を特定でき、将来的に工業生産の材料とする際に重要な知見を得ることができた。

1. コバノズイナ由来の害虫防除技術に関する研究

貯蔵穀物の食害損失を防止するための天然物の使用について、その可能性を検討した。高知県で得られた木本植物 26 種の地上部、及び草本植物 76 種の地上部・地下部から計 178 サンプルを調製し、*E. kuehniella* 幼虫の成長阻害活性を指標としてスクリーニングを実施した。その結果、木本植物 14 サンプル、草本植物 77 サンプル、合計 91 サンプルに成長阻害活性が確認され、これらのうち 5 サンプルに 90%以上の強い阻害活性が見いだされた。木本植物地上部、草本植物地上部および草本植物地下部由来の各試料群において成長阻害活性の偏りは確認できず、ランダムスクリーニングの重要性が確認された (図 1)。

活性が確認された植物の中から、入手が容易な観賞用低灌木であるコバノズイナ (*Itea virginica*) に注目して成長阻害物質の解明を目指した。高知大学物部キャンパス内で栽培した *I. virginica* 葉から抽出物を作製し、成長阻害活性を指標に数段階の精製を経て *E. kuehniella* 幼虫の成長阻害物質としてアリトールと D-アルロースを成長阻害活性物質として同定した。標準物質を用いた用量群間比較試験からアリトールと D-アルロースの EC₅₀ 値はそれぞれ 15.7 及び 30.3 mg/g 餌と算出さ

(様式 5) (Style 5)

れた。また、試験した最高用量である 80 mg/g 餌においてアリトールでは 97.0%の成長阻害活性が、D-アルロースでは 75.2%の成長阻害活性が確認され、貯穀害虫の防除に十分有効な生理活性を示すことが確認された。特に D-アルロースはヒトに対する安全性が確立しており、貯蔵穀物や食品に直接混用可能な貯穀害虫の食害防止剤となり得るものと考えられた。アリトールにおいても同様に安全性に係る検討が行われれば両物質を併用することでより広い作用スペクトルや高い効果が得られる可能性が示され、今後の製品開発が待たれる。

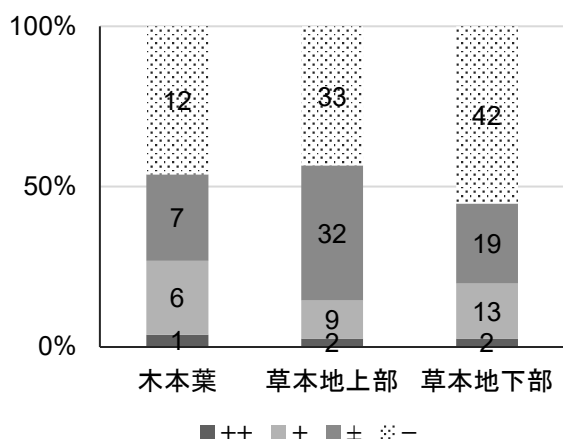


図 1 スクリーニング結果
(*E. kuehniella* 幼虫の成長阻害活性)



図 2 *Itea virginica*

2. ピーマン由来のフラボノイドの有効利用に関する研究

ピーマン *Capsicum annuum* の葉には農業害虫であるマメハモグリバエ (*Liriomyza trifolii*) に対する抵抗性が存在し、その活性本体がフラボノイドの一種ルテオリン (Lu) の配糖体ルテオリン 7-O-β-アピオシル-(1→2)-O-β-グルコシド (LuGA) であると報告されている¹。LuGA はピーマン葉に多く含まれているものの、栽培後には植物残渣として廃棄される。Lu 及びその配糖体の性質を調べるとともに、効率的な生産のための検討を行った。

Lu は抗酸化作用を有し、生活習慣病予防・改善を目的としたサプリメント等に使用されている。近年、Lu には前駆破骨細胞に対する分化抑制効果が報告され²、破骨細胞の分化が影響する骨粗鬆症や関節リウマチ等への利用の可能性が示唆されているが、当該効果のヒト細胞における確認がなされていない。本研究では Lu 及びその配糖体類のヒト前駆破骨細胞に対する分化抑制効果を検討した。ヒト前駆破骨細胞を分化誘導因子 RANKL 及び M-CSF とともに培養し、被験物質、DMSO 溶媒 (陰性対照)、破骨細胞分化抑制因子 (osteoprotegerin, OPG, 陽性対照) またはケルセチン (天然物の陽性対照) を分化誘導開始時 Day 0 (D0 群) または分化誘導後 Day 4 (D4 群) に処置し MTT アッセイ及び TRACP アッセイを実施、さらに TRACP 染色を行い、吸光分析及び細胞形態学的検討を行った (図 3)。その結果、Lu 及びルテオリン 7-O-β-グルコシド (LuG) においてヒト破骨細胞分化抑制作用がみられ、その EC₅₀ は D0 群ではそれぞれ 16.04 及び 15.98 μM、D4 群ではそれぞれ 25.56 及び 33.08 μM であり、MTT アッセイから得られた細胞毒性量 EC₅₀ より

低かった (表 1)。一方、LuGA は TRACP アッセイにおける EC₅₀ が D0 群では 22.07 μ M と Lu 及び LuG と一貫したものであったが、D4 群では有効性が認められなかった。この理由はさらに検討が必要と考えられた。また本研究ではマウス細胞で見られたケルセチンの分化抑制効果が認められなかったことは、動物種による差異である可能性があり、さらなる検討が必要と考えられた。本研究により Lu 及びその配糖体がヒト細胞においても破骨細胞分化抑制効果を示し得ることを示したことは、今後の実用研究において重要な知見を与えるものと考えられた。

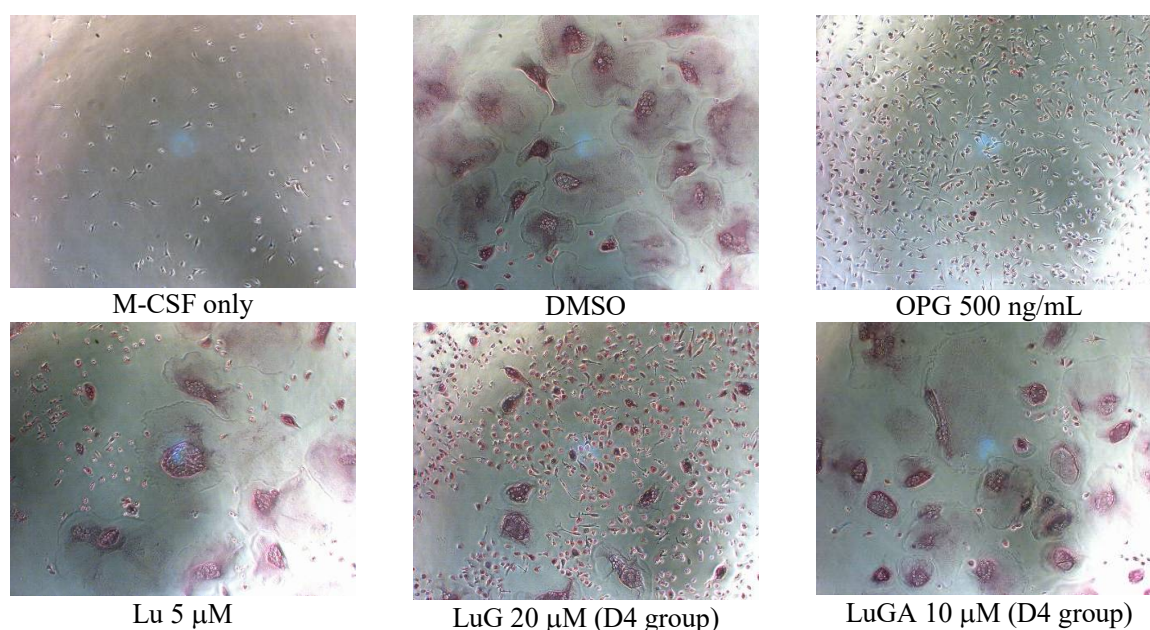


図 3 TRACP 染色

表 1 MTT アッセイ及び TRACP アッセイの結果 (EC₅₀, [μ M])

		Lu	LuG	LuGA
TRACP	D0 添加時	16.04	15.98	22.07
	D4 添加時	25.56	33.08	>100
MTT	D0 添加時	32.46	28.89	26.82
	D4 添加時	66.81	60.1	50.43

ルテオリンは糖化状態によって細胞への作用や毒性が異なることから、*Capsicum annuum* 残渣である葉を用いた Lu の効率的な生産のためには、その性状と含有量をあらかじめ知ることが重要である。*Capsicum annuum* 47 品種の Lu 配糖体及びアピゲニン (Ap) 配糖体の含有量を調べたところ、品種によらずこれらフラボノイド類を含有することが確認でき、LuG, LuGA, アピゲニングルコシド (ApG) 及びアピゲニンアピオシルグルコシド (ApGA) の総量の中央値 (最小値, 最大値) は 9.19 (5.14, 29.09) μ M/g fr.wt であったが、一方品種間における差は大きく、最大の品種と最小の品種の間で総量は約 6 倍の比であった。Lu 配糖体と Ap 配糖体の含有比は全体でおよそ 8:2 であり、Lu が多かったが、41~96%と開きがあり、また 3 品種では Ap 配糖体がやや多かった。これらの中から Lu 蓄積比率と蓄積量が高く、工業生産に適した品種として 3 品種を見出すこと

ができた。見出した品種は現在栽培されていない旧来品種であることから、今後はピーマン生産における品種選定が重要であることが示唆され、ピーマン葉を原料としてフラボノイドを効率的に製造するにあたり重要な所見が得られたものと考えられた。

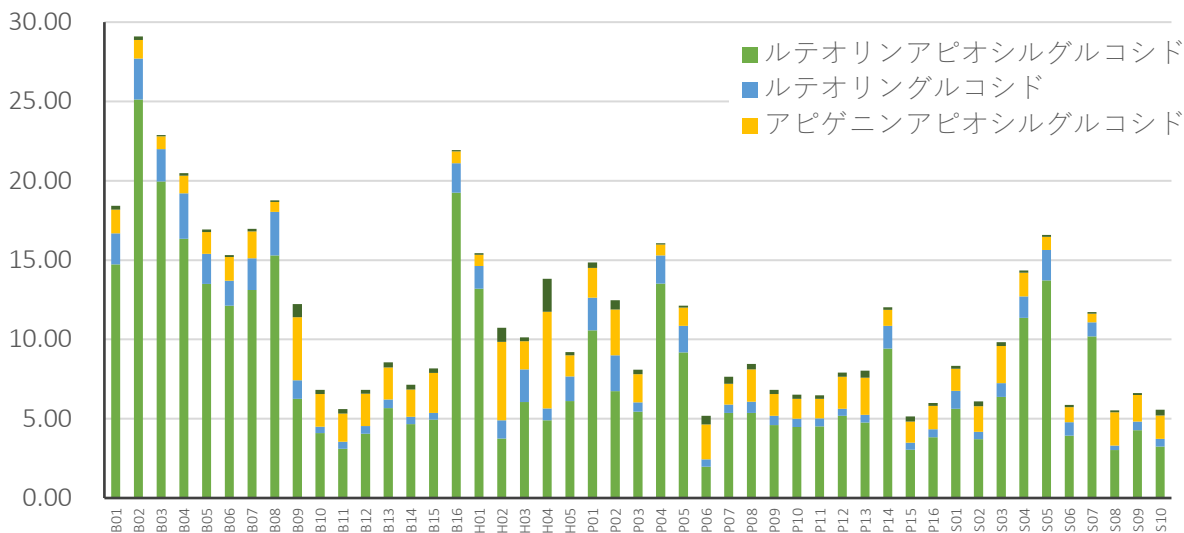


図 4 *Capsicum annuum* 葉の品種別フラボノイド含量

以上、本研究を通じ農業製品の貯蔵に係る課題の解決、及び収穫後に廃棄される植物残渣の有効活用に有益な知見が得られ、今後の製品開発に資することができたものと考えられた。

¹ Takehiro Kashiwagi, Yoh Horibata, Daniel Bisrat Mekuria, Shin-ich Tebayashi, Chul-Sa Kim. Ovipositional Deterrent in the Sweet Pepper, *Capsicum annuum*, at the Mature Stage against *Liriomyza trifolii* (Burgess). *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69:1831-1835.

² Ji-Won Lee, Jae-Yong Ahn, Shin-ichi Hasegawa, Byung-Yoon Cha, Takayuki Yonezawa, Kazuo Nagai, Hwa-Jeong Seo, Won-Bae Jeon, Je-Tae Woo. Inhibitory effect of luteolin on osteoclast differentiation and function. *Cytotechnology* 2009;61:125-134.