

平成15－16年度 江間忠木材・江間忠合板研究助成事業成果概要

1. **研究プロジェクト名** 生物活性を指標とした高機能性バイオ新素材の開発

2. **研究領域** 化学・エネルギー変換

3. **研究代表者氏名** 清水 邦義

所属：九州大学大学院 農学研究院 森林資源科学部門・助手

住所：福岡市東区箱崎 6-10-1 電話：092-642-3002

e-mail:shimizu@agr.kyushu-u.ac.jp

4. **研究組織**

研究会名：若手の会

共同研究者：岸本 崇生 北海道大学大学院農学研究科・助手

橋田 光 森林総合研究所樹木化学領域・研究員

5. **研究概要**

木質バイオマスは、エネルギー・バルク材料・化学原料として期待されている。エネルギー並びにバルク原料として利用する場合には、木質バイオマスの一般的な性質、たとえば、リグニン・セルロースなどの化学的共通性や物理的性質に着目し、技術開発を行うことが望ましい。しかし、高機能性化成品などの化学原料として捉えた場合、木質バイオマス材料個々に含まれる量的・質的に異なる「抽出成分」の多面的で、かつ継続的な機能開発研究が不可欠である。本研究では後者に着目し、つまり、木質バイオマス資源から調製される新素材、特にタンニン、ペクチリンやフラボノイド等の特徴的な抽

出成分に着目し、有用な生理活性を有するかどうかについて検討した。その結果、特に、樹皮の主要な抽出成分である縮合型タンニン類の新たな機能を見出した。結果概要を以下に記す。縮合型タンニンの基本ユニットであるフラバン 3-オールの水酸基パターンが B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量ならびに細胞増殖活性に影響を与えることを見いだした。具体的には、B 環の水酸基がカテコール型の場合には、細胞毒性を示さず、メラニン産生量を抑制し、また、ピロガロール型の場合には、そのプロオキシダント活性ゆえに顕著な細胞毒性を示すことが判明した。また、そのメカニズムは、樹皮タンニン類のプロオキシダント活性ならびに細胞膜相互作用と相関があることが示された。したがって、B 環にカテコールを有するタンニン類を含むスギ、ヒバ、カラマツ、ケブラチヨの樹皮抽出物は、美白化粧品としての応用が期待できる。また、モリシマアカシア、アカシアマングウム、カマバアカシア、マングローブは、そのプロオキシダント活性に由来する抗菌素材への応用が期待される。

以上、本研究により、タンニンやフラボノイドなど抽出成分の構造や性状を考慮し、用いる生理活性に応じた理論的根拠に基づいた高度利用法の開発の可能性が示された。

6. 各論

6・1 はじめに

我が国の製材工場から排出される樹皮の量は、1998 年の調査で約 349 万 m³ / 年と推定され、膨大であるにもかかわらず、未利用率がかなり高く、発生樹皮の 28%が焼却または棄却されていると報告されており、理論的根拠（科学的エビデンス）に基づいた新規利用法の開発が求められている。化学成分的に着目すると、樹皮には縮合型タンニンが多く含まれており、針葉樹、広葉樹どちらにも広く分布している。近年、その生理活性が着目されており、抗菌活性、抗酸化活性、抗癌活性、発ガン抑制活性、抗アレルギー

ギー活性、血圧上昇抑制作用、動脈硬化抑制作用、脂質代謝抑制活性、抗ウイルス活性、メラニン生成抑制活性など、様々な生理活性（多機能性）が報告されている。これらの生理活性は、いずれも活性値のみが報告されており、作用機構については、ほとんど、不明である。

これまで、ある種のポリフェノールは活性酸素（ROS）を消去する antioxidant 活性と ROS を産生する pro-oxidant 活性を有していること、また、強力なタンパク質吸着能を有することが報告されている。活性発現メカニズムの研究が進展しない理由の一つとして、タンニン類の生物活性が幅広く、非特異性であるということが挙げられる。通常、生物活性というのは、ある特定のタンパク質（生体分子）と化学物質の相互作用と考えられていたため、特異的な生理活性発現についての研究の方法論は大きく発展してきているが、樹木タンニン類のような幅広く、かつ緩和な活性についての理論的研究方法は皆無であるというのが現状である。

我々はそのような現状を打破すべく、樹木タンニン類の ROS 産生能・消去能及び、タンパク質吸着能に着目し、それらと生物活性の関係を明らかにすることを目的に研究を行った。特に、我々はメラニン産生能を有する悪性黒色腫細胞である、B16 メラノーマ細胞に及ぼす影響と前立腺ガンや前立腺肥大症といった男性ホルモン依存性の老年性疾患の治療と予防に有効な抗男性ホルモン活性に着目した。

6・2 実験方法

6・2・1 調製方法

10g の樹皮粉に対し 200ml の 70%アセトン水溶液で抽出を行い、これを凍結乾燥して粗抽出物（CE）を得た。6g の CE に対し 600ml の水を加え、100ml の *n*-ヘキサンで 3 回抽出して脱脂処理を行った後、100ml の酢酸エチルで 3 回抽出を行い、抽出物を凍結乾

燥して酢酸エチル抽出物 (EtOAc) を得た。水可溶部を Sephadex LH-20 カラムに通し、50%メタノール水溶液で糖成分等を溶出、除去した後、50%アセトン水溶液で溶出を行い、溶出物を凍結乾燥して高分子タンニン画分 (P) を得た。

6・2・2 B16メラノーマ細胞の抑制

B16メラノーマ細胞は細胞密度を 1.0×10^5 cells / ml の濃度に調製し 24well プレートに 1ml ずつ播種した。24 時間後、998 μ l の EMEM 培地で培地交換し、2 μ l のサンプルを添加した。その 48 時間後、同様の培地交換を行った。さらに 24 時間後、培地を除去し PBS で細胞接着面を洗浄した後、1N の NaOH 1ml で細胞を溶解し、プレートリーダー (Bio-Tek, USA) で 405nm の吸光度を測定し、メラニン量の指標とした。(n=3)

なお、メラニン生成抑制効果は、コントロールに対する%で表示した。Student t-test を行い、統計処理した。

6・2・3 細胞毒性の評価

B16メラノーマ細胞を 24 well plate に 1.0×10^5 cells / ml の濃度で播種した。24 時間後、998 μ l の EMEM 培地で培地交換し、2 μ l のサンプル DMSO 溶液 (最終濃度 100 μ g/ml) を添加した。その 48 時間後、同様の培地交換を行った。さらに 24 時間培養した後、培地を除去しトリプシン処理により細胞を剥離させ、血球計算盤を用いて細胞数をカウントした。

6・3 結果及び考察

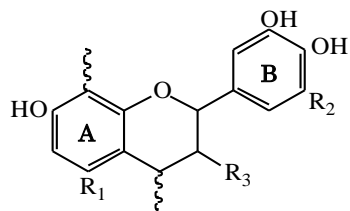
樹木タンニン類の化学的特徴

タンニン画分の ^{13}C -NMR 分析から、それぞれ *A. me*, *A. ma* は Prorobinetinidin、*S. ro*

は Procyanidin と Prodelphinidin、*L. le*, *C. jp*, *T. do* は Procyanidin、*S. lo* は Profisetinidin、*S. ca* は Prodelphinidin Gallate を基本骨格とする縮合型タンニンであることが示唆され、それぞれのこれまでに報告されている基本骨格と一致することが確認された (Table 1)。また、*C. sa* は加水分解型タンニン (エラグタンニン) であることが報告されている。分子量に関しては、全体の傾向として EtOAc 画分 < Polymer 画分であった (Table 2)。

Table 1 樹木タンニン類の基本構成成分

樹種	主な構成成分
ヒバ (<i>Taujopsis dolabrata</i>)	PC
スギ (<i>Taujopsis dolabrata</i>)	PC
エゾヤナギ (<i>Salix rorida</i>)	PC/PD
カラマツ (<i>Larix leptolepis</i>)	PC
ケブラチヨ (<i>Schinopsis lorentzii</i>)	PF
モリシマアカシア (<i>Acacia mearnsii</i>)	PR
アカシアマンギウム (<i>Acacia mangium</i>)	PR
カマバアカシア (<i>Acacia auriculiformis</i>)	PR
マングローブ (<i>Sonneratia caseoralis</i>)	PD or PD gallate
チェストナット (<i>Castanea sativa</i>)	Ellagitannin



PC : Procyanidin
 PF : Profisetinidin
 PR : Prorobinetinidin
 PD : Prodelphinidin
 PD Gallate
 Galloyl

R1 : OH, R2 : H, R3 : OH
 R1 : H, R2 : H, R3 : OH
 R1 : H, R2 : OH, R3 : OH
 R1 : OH, R2 : OH, R3 : OH
 R1 : OH, R2 : OH, R3 : o-

Table 2 樹木タンニン類アセチル化物の平均分子量

	EtOAc			Polymer		
	Mn	Mw	Mw/Mn	Mn	Mw	Mw/Mn
<i>A. ma</i>	1300	1900	1.5	2500	3100	1.2
<i>A. au</i>	950	1800	1.9	3500	5800	1.6
<i>A. me</i>	1300	1800	1.4	2100	3200	1.5
<i>S. lo</i>	950	1400	1.5	2100	2800	1.3
<i>S. ro</i>	1100	2400	2.1	3000	5500	1.9
<i>C. ja</i>	660	1900	2.8	2800	11300	4.0
<i>L. le</i>	680	1400	2.1	3900	14900	3.8
<i>T. do</i>	970	1500	1.6	2600	4900	1.9
<i>S. ca</i>	350	700	2.0	3300	6600	2.0
<i>C. sa</i>	420	840	2.0	2300	3400	1.5

Mn : 数平均分子量

Mw : 重量平均分子量

メラニン生成抑制活性

樹木タンニン類がB16メラノーマ細胞に及ぼす生理活性を3つのグループに分類した。まず、細胞毒性の強いA-type、細胞毒性が少なくメラニン生成抑制効果の高いB-type、そしてB16メラノーマ細胞に対して影響を与えないC-typeとした(A-type: MTT<70% B-type: MTT>70% melanin<70% C-type: MTT>70%, melanin>70%)。結果を、Table 3に示す。

強い細胞毒性を示したのは、B環にピロガロール骨格を多く有するアカシア属3種、*S. ca*由来のタンニン類と、加水分解型タンニンである*C. sa*であった。これらの構造上の特徴として、分子内にピロガロールを多く有するという共通点を見出した。また、細胞毒性の発現には、A環の水酸化パターンは、あまり関与していないことが考えられる。強い細胞毒性を示したサンプルのうちで、*T. do*のみが構造的長が異なる。*T. do*はB環がカテコールであるPCを基本骨格としている。B16メラノーマ細胞に*T. do*のサンプルを添加すると、明らかな細胞形態の変化が観察され、細胞が肥大していた (date not

shown)。これらの形態変化は、他のどのサンプルにおいても観察されなかった。測定

Table 3 樹木タンニン類が B16 メラノーマ細胞に及ぼす影響

(最終濃度 50 μ g/ml)

Scientific name	Melanin 量	MTT 活性	分類 type
<i>A. me</i> (CE)	26.1	29.8	A
<i>A. me</i> (EtOAc)	43.6	47.9	A
<i>A. me</i> (P)	25.2	33.6	A
<i>A. ma</i> (CE)	44.8	67.5	A
<i>A. ma</i> (EtOAc)	22.6	33.7	A
<i>A. ma</i> (P)	41.7	50.4	A
<i>S. ro</i> (CE)	60.8	111.2	B
<i>S. ro</i> (EtOAc)	87.5	140.7	C
<i>S. ro</i> (P)	33.2	48.8	A
<i>L. le</i> (CE)	33.5	103	B
<i>L. le</i> (EtOAc)	32.4	108.7	B
<i>L. le</i> (P)	36.5	130.6	B
<i>C. jp</i> (CE)	24.3	32.9	A
<i>C. jp</i> (EtOAc)	23	105.2	B
<i>C. jp</i> (P)	65.1	109.1	B
<i>T. do</i> (CE)	23.1	52.2	A
<i>T. do</i> (EtOAc)	28.9	70.9	B
<i>T. do</i> (P)	41.9	111.5	B
<i>S. ca</i> (CE)	31.5	40.4	A
<i>S. ca</i> (EtOAc)	22.3	2.4	A
<i>S. ca</i> (P)	48.8	63.6	A
<i>C. sa</i> (CE)	19.3	0	A
<i>C. sa</i> (EtOAc)	21.5	7.0	A
<i>C. sa</i> (P)	24.3	7.7	A

時に、細胞を観察すると、コンフルエントになっており確かに細胞が生存していることを確認した。つまり、細胞は生きているが、肥大しているためコンフルエントの状態になっても他のサンプルに比べ細胞数が少なくなり、細胞毒性が強いように観察されているのではないかと考えられる。

つまり、アカシア属 3 種と *S. ca*、*C. sa* 由来のタンニン類の細胞毒性と *T. do* 由来のタ

ンニン類の細胞毒性は、異なるメカニズムで発現しているのではないかと推察される。

高いメラニン生成抑制効果を示したのは、B 環がカテコールである PC、PF タイプの樹木タンニン類であった。分子量については、比較的高分子量の樹木タンニン類でメラニン生成抑制効果が観察された。このことから、樹木タンニン類が B16 メラノーマ細胞に及ぼす影響には、B 環の水酸化パターンが大きく関与していることが推察された。

終わりに

樹木樹皮の有効利用を目指し、それらに多く含まれるタンニン類の多機能性生理活性発現機構について検討してきた。

その結果、タンニンの構成フラバン単位の B 環がピロガロール骨格の場合には、高い細胞毒性を示し、また、カテコール骨格の場合には、メラニン生成抑制効果を示すことを見出した。B 環がピロガロール骨格の樹木タンニン類においても、顕著なメラニン生成抑制効果を示したことから、メラニン生成抑制効果に B 環カテコール構造が必ずしも重要な構造ではないことが判明した。

超高齢化社会を迎えるにあたり、今後ますます増加傾向にある高齢性男性ホルモン依存性疾患である前立腺肥大症に有効な素材の探索を行った。その結果、樹皮から抽出したタンニン類は顕著な 5α -リダクターゼの抑制効果を有することを見出した (data not shown)。

今後、さらに、化学構造と生理活性の関連についての知見が蓄積することにより、タンニンなど抽出成分の構造や性状を考慮した、必要な生理活性に応じた理論的根拠に基づいた高度利用法の開発を期待したい。