

トチノミ由来の高分子ポリフェノール成分の化学構造解析と生活習慣病予防作用に関する研究

横田一成・小川智史

目 的

西洋トチノキ種子（トチノミ）は、様々な薬理活性を示すことから、主に医薬品や化粧品の原料として使用されている。しかし、日本産のトチノミについては食品として用いられてきたことから、有効成分の構造解析や機能性についての研究はあまり行われていない。近年、我々の研究グループでは、トチノミの食品機能性を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。その結果、皮剥した天然のトチノミ、および、あく抜き処理した食用トチノミに由来する化学変換産物のサポニン成分の構造を明らかにすることができた（Kimura et al. 2006）。さらに、それらの成分が、血糖値上昇抑制作用、リパーゼ阻害活性を有し、マウスでの脂肪吸収抑制作用、および高脂肪食投与下での体重増加抑制作用などの食品機能性を示すことを確認した（Kimura et al. 2006; Kimura et al. 2008）。

今回の研究では、トチノミを食品として加工する際に廃棄物となっているトチノキ種皮に注目した。それらの有効成分を利用することを目的として、食品機能性を示す成分の単離と構造解析を試みた。今回、トチノキ種皮より、高含量で高分子性のポリフェノール成分を検出したので、種々の機器分析法にかけて、それらの主成分の化学構造の解析を行うことにした。ポリフェノールは広く食品中に見出されており、動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病の予防の観点から、抗酸化作用、抗腫瘍活性、抗アレルギー、糖質、および脂質消化酵素阻害作用など様々な生物活性が報告されている。そこで、本研究では、トチノキ種皮のポリフェノール成分の食品機能性を評価するため、動脈硬化や癌などの発症のファクターとなるフリーラジカルを消去する抗酸化作用にも着目して研究を行った（Ogawa et al. 2008）。

実験方法

トチノキ種皮のポリフェノール成分を熱水抽出し、各種のクロマトグラフィーによる分画と精製を行い、その精製物を、順相および逆相の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析（MALDI-TOF/MS）、そして、エレクトロスプレーイオン化-質量分析（ESI/MS）などの機器分析にかけた。それらの結果に基づいて、ポリフェノール

類の主成分の化学構造を解析した（Ogawa et al. 2008）。トチノキ種皮に由来するポリフェノールのガロイル基の有無を確認する目的では、タンナーゼ処理によるポリフェノールのガロイル基の確認を行った。トチノキ種皮由来のポリフェノールの構成単位を確認には、ポリフェノールをドデカンチオールと反応させてチオール化分解し、それらの分解産物を逆相のHPLCで分離した後、ESI/MSによる構造解析を行った。

トチノキ種皮のポリフェノール成分の食品機能性として抗酸化性を評価した。その場合、分画したポリフェノール成分による1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカルの消去試験に加えて、リノール酸と β -カロチンを含む反応系を用いて加温による酸化での退色反応の阻害を評価する実験系も利用した。

結果と考察

トチノキ種皮の粉碎したものを、蒸留水にて、2時間、加熱還流を行った。抽出液を濾過し、減圧濃縮して、粗抽出物を得た。この抽出物を、Diaion HP-20と逆相のChromatorex ODS 1024Tを用いたカラムクロマトグラフィーにかけて分画し、最後に、Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーにより、エタノール溶出画分であるF1、メタノール溶出画分であるF2、そして、70%アセトン溶出画分であるF3の各成分に分離した。F1、F2、そして、F3を、順相および逆相のHPLCを用いてさらに分析したところ、F1には、主に低分子のポリフェノールが、F2とF3には、主に重合度10以上の重合ポリフェノールが含まれているものと推察された。これらの結果から、F2とF3の主要ポリフェノール成分は、重合ポリフェノールと推察されました。

各成分の分子量の評価のため、MALDI-TOF/MSによる分析を行った。負イオンモードによる解析で、F1は、質量数1000以下のピークを示した。F2とF3では、重合ポリフェノールの一種であるプロアントシアニジンの質量スペクトルを反映する分析パターンが認められた。プロアントシアニジンは、フラバン骨格の3位に水酸基が結合したフラバン-3-オールを構成単位とし、それらが多数、重合した構造をしていると予想された。検出されたピークは、それぞれは、重合体のピークを示しており、F2が重合度19と、F3が重合度23までのスペクトルピー

クが確認された。一般に、プロアントシアニジンのフラバン-3-オール同士の結合に関して、C環の4位とA環の8位が1本の結合で縮合したものが多く、この縮合様式を持つプロアントシアニジンはBタイプと呼ばれる。一方、フラバン-3-オールのC-C結合に加えて、さらにA環の水酸基がC環の2位に結合した化学構造を有するプロアントシアニジンはAタイプといわれる。今回の質量スペクトルの主ピークの質量差を見ると、Bタイプの結合を反映した質量差288とAタイプの結合に基づく質量差286が確認され、トチノキ種皮のプロアントシアニジンは、Aタイプの結合を多く含むと推察された。また、主ピークとともに、質量差16のスペクトルピークが確認され、水酸基数の異なる構成単位が含まれていると考えられた。

構成単位であるフラバン-3-オールの結合様式を確認するため、ドデカンチオールによるチオール分解試験を行った。プロアントシアニジンは、酸性条件下、1-ドデカンチオールによるチオール加水分解により、フラバン-3-オール同士の結合が切れ、このようなドデシルスルフィド誘導体を形成し、また、末端はフラバン-3-オールを生じる。また、Bタイプのインターフラバン結合は、この反応で加水分解されるが、Aタイプの結合は分解されないことが知られている。今回の調製成分のF2とF3について、メタノール溶媒中にて塩酸酸性条件下、1-ドデカンチオールを加え、チオール加水分解し、生じたドデシルスルフィド誘導体を逆相のLC-ESI/MSにより分析した。その結果、3つの主な溶出ピーク、すなわち、溶出順にI, II, IIIが確認された。それぞれのピークにおいて、質量数1063、質量数777、および質量数491の分子イオンピークが検出された。以上より、Iは(+)-カテキン、もしくは(-)-エピカテキンを構成単位とするAタイプのインターフラバン結合を2つ有するトリマー、IIはAタイプの結合を1つ有するダイマー、そして、IIIはモノマーのドデシルスルフィド誘導体であることが確認された。従って、今回の試料は、AタイプとBタイプのインターフラバン結合が混在するプロアントシアニジン類であることがわかった。

次に、トチノキ種皮から調製したポリフェノール成分の抗酸化作用を検討した。ポリフェノールは、複数のフェノール性水酸基を持つ構造をしているため抗酸化作用を示し、その効果に関する研究も多く行われている。近年では、ポリフェノールの摂取による血清の抗酸化活性の上昇作用、例えば、血中の低密度リポタンパク質(LDL)の酸化抑制作用などが報告されている。そこで、トチノ

キ種皮由来のポリフェノールの抗酸化作用に関して、DPPHラジカル消去試験によりラジカル補足作用を調べるとともに、多価不飽和脂肪酸の過酸化による β -カロチン退色試験による反応系でも抗酸化能を評価した。DPPHラジカル消去試験の結果、トチノキ種皮由来のポリフェノール成分の消去活性の強さは $F2 > F3 > F1$ となり、ポリフェノール含有量が多い程、強い活性を示した。ポリフェノールのモノマーあたりの強度は、 $F3 > F2 > F1$ という順に強く、重合度が高くなるほど、抗酸化作用が強くなった。また、対照物質のポリフェノールにおいては、フェノール性水酸基が多く存在する物質ほど抗酸化活性が強くなる傾向が観察された。また、 β -カロチン退色試験による評価では、トチノキ種皮ポリフェノールのF1, F2およびF3の抗酸化力を調べたところ、ポリフェノール含有量の多いものほど強く、また、ポリフェノールあたりの強さは、重合度の大きい順に強くなった。特に、F2とF3には、強い抗酸化作用が確認された。

本研究のまとめをまとめると、トチノキ種皮のポリフェノールの主成分は、高重合のプロアントシアニジンであり、通常Bタイプのインターフラバン結合に加えてAタイプの結合を多数、有することが明らかになった。本研究において、トチノキ種皮ポリフェノールにおいても抗酸化性が確認され、潜在的に生活習慣病を予防することが期待できる有用な機能性食品素材と考えられた。

引用文献

- Kimura H., Ogawa S., Jisaka M., Kimura Y., and Katsube T., Yokota, K. (2006) Identification of novel saponins from edible seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME) after treatment with wooden ashes and their nutraceutical activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41: 1657-1665.
- Kimura H., Ogawa S., Katsube T., Jisaka M., and Yokota, K. (2008) Antiobese effects of novel saponins from edible seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME) after treatment with wood ashes. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 4783-4788.
- Ogawa S., Kimura H., Niimi A., Katsube T., Jisaka M., and Yokota K. (2008) Fractionation and structural characterization of polyphenolic antioxidants from seed shells of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). *J. Agric. Food Chem.*, 56: 12046-12051.