

チョウセンゴヨウ(Pinus koraiensis)のカルス培養から得られたメタノール抽出物の抗酸化性

誌名	九州大学農学部学芸雑誌 = Science bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University
ISSN	03686264
著者名	高島,良江 川畑,智晃 田中,泰介
発行元	九州大学農学部
巻/号	53巻1/4号
掲載ページ	p. 45-50
発行年月	1999年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



チョウセンゴヨウ (*Pinus koraiensis*) のカルス培養から得られた メタノール抽出物の抗酸化性

高 島 良 江・川 畑 智 晃・田 中 泰 介
小 坂 尚 弘・坂 井 克 己

九州大学農学部木材化学講座

(1998年3月20日受付, 1998年11月6日受理)

Antioxidant Activity of Methanol Extracts from the Callus Culture of *Pinus koraiensis*

Yoshie TAKASHIMA, Tomoaki KAWABATA, Taisuke TANAKA,
Naohiro KOSAKA and Kokki SAKAI

Wood Chemistry Laboratory, Faculty of Agriculture
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

緒 言

抗酸化性物質は、食品添加物として油脂の酸敗を防ぐ目的や、種々の疾患の原因となる活性酸素種を消去する性質を利用して医薬品として、あるいは光酸化に弱いポリプロピレンなどのプラスチック類の酸化劣化を防ぐ目的で工業的に、様々に用いられている。食品添加物としては、天然起源のビタミンE(トコフェロール類)やビタミンC(アスコルビン酸)および合成品であるBHA(ブチルヒドロキシアニソール)やBHT(ブチルヒドロキシトルエン)が利用されているが、BHAやBHTは肝障害や発癌性など生体に有害な作用を及ぼすことが報告されている(Witchi, 1988; Grice, 1986)。したがって、生体に対して無害で強力な天然起源の抗酸化剤を特に高等植物から単離する研究に対する社会的期待は小さくない。

ところで、樹木抽出成分には抗菌性や抗蟻性、抗チロシナーゼ活性など様々な生理活性をもつものがある。成長の遅い樹木よりも、その培養細胞の方が増殖が容易で、有用な物質を多量に生産することを期待して、有用な生理活性成分を樹木培養細胞に二次代謝成分として生産させる研究も精力的に行われている(坂井, 1991)。ここでは、数種のマツ属とスギのカルスの抽出成分の抗酸化性を比較し、これらが生産される条件について検討し、活性フラクションの分画と、分画物

の抗酸化性発現機構について検討した。

なお、本研究に対して松籟科学技術振興財団の助成を受けた。記して謝意を表明する。

材 料 と 方 法

1. 実験樹種

九州大学農学部(福岡市箱崎)内に植栽されているクロマツ(*Pinus thunbergii* Parl.), ヒメコマツ(*Pinus pentaphylla* Mayr.), チョウセンゴヨウ(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.)およびスギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)を用いた。

2. カルス誘導

既報(Hiraide *et al.*, 1990; Kokubo *et al.*, 1990)にしたがい、若枝の形成層からカルスを誘導し、シヨ糖30g/l, α -ナフチル酢酸1.0ppm, 6-ベンジルアミノプリン0.01ppm, 寒天8g/lを含むMurashige & Skoog (MS)培地上で4週間ごとに継代し、25℃暗黒中で培養を繰り返した。

3. カルス抽出物の分離

継代後4週間経過したカルスを、液体窒素で凍結したのち乳鉢で磨砕し、メタノールにより室温で48時間抽出した。

抽出物に含まれるピノシルピンおよびそのモノメチルエーテルの同定はガスクロマトグラフ質量分析計を用いて行い、定量は既報(Kokubo *et al.*, 1990)

と同様にした。

4. 抗酸化性の測定

a. リノール酸法

蒸留水 (2.2ml), 0.5M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (5.0ml), 1.4% リノール酸/エタノール溶液 (5.0ml), 抽出物試料/メタノール溶液 (0.1ml), 1.87mM 塩化第一鉄水溶液 (0.1ml), 12.5mM アスコルビン酸水溶液 (0.1ml) をこの順に試験管にとり, よく振とう後に40℃でインキュベートした。所定時間ごとにサンプリング (0.2ml) し, これに75%エタノール (9.4 ml), 30%チオシアン酸アンモニウム (0.2ml) と 0.02M 塩化第一鉄/3.5% HCl (0.2ml) を加えてよく攪拌し, 正確に3分後500nm における吸光度を測定した。

b. ゴースト法

Osawa ら (1987) の方法を少し改変して測定した。ウサギ保存血液20ml から調製した赤血球膜ゴーストを10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁させて, タンパク濃度を2.5mg/ml に調整した。この懸濁液の900 μ l に, 試料のジメチルスルホキシド溶液50 μ l, 40mM *tert*-ブチルヒドロペルオキシド水溶液50 μ l を加えてよく混ぜ合わせたのち, 37℃で振とうしながら30分インキュベートした。その後2.0M トリクロロ酢酸/1.7M HCl 1.0ml と0.67% チオバルビツール酸/水酸化ナトリウム水溶液2.0ml を加えて沸騰水中で10分加熱して発色させた後, 532nm の吸光度を測定した。抗酸化試料を加えない溶液の発色を100% として脂質過酸化率 (%) を算出した。赤血球膜ゴーストは酸化劣化しやすいので, 調製後2日以内に使用した。

5. スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 様活性の測定

和光純薬工業製 SOD テスト用キットを使用した。0.4M キサンチンと0.2M ニトロブルーテトラゾリウムをリン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した発色試液500 μ l を試験管にとって37℃で15分インキュベート後, 試料液50 μ l とキサンチンオキシダーゼ0.049U/ml リン酸緩衝液 (pH 8.0) 500 μ l とを加えた。正確に20分後に, 69mM ドデシル硫酸ナトリウム水溶液500 μ l を加えて発色を終了させ, 560nm の吸光度を測定した。

6. ラジカル捕獲能力の測定

Ratty ら (1988) に準じて, 試験管に0.2M Tris-塩酸塩/0.2M 塩酸緩衝液 (pH 7.4) を2.9ml とり, 10 mM 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH)/

テトラヒドロフラン溶液15 μ l と試料溶液15 μ l を混合後正確に3分後のスペクトルを測定した。

7. 金属錯体形成能力の測定

試料を4 ml の2 mM 硫酸第一鉄水溶液に懸濁させた後, 1 mM テトラメチルムレキシド水溶液を200 μ l 加えた。その後3,000rpm で3分遠心分離し, 上澄みの480nm と530nm における吸光度を測定して A_{480}/A_{530} を求めた。試料と錯塩を形成した2価鉄イオンの量は, 硫酸第一鉄結晶を用いて作製した検量線から求めた。2価鉄イオンの酸化を防ぐため20℃以下で実施した。参照試料としてエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを用いた。

結果と考察

1. 各針葉樹カルス抽出物の抗酸化性

クロマツ (*P. thunbergii*), ヒメコマツ (*P. pentaphylla*), チョウセンゴヨウ (*P. koraiensis*) およびスギ (*C. japonica*) の形成層から誘導した後, 1~3年継代培養を続けたカルスのメタノール抽出物の濃度を5.0mg/ml に調節し, これらについてリノール酸法による抗酸化性を測定した。その結果, 標準的

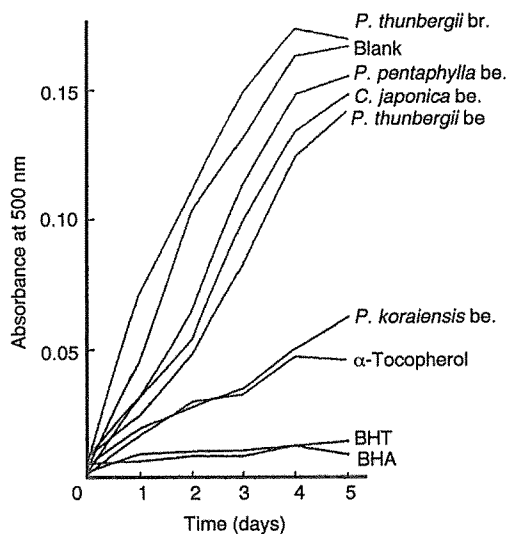


Fig. 1. Antioxidant activities of MeOH extracts from callus cultures of different gymnosperm species. Note: Activities were determined by the linoleic acid method at 40 ppm sample concentration. br and be denote brown and beige calluses, respectively.

Table 1. Contents of pinosylvin (PS) and pinosylvin monomethyl ether (PSM) in the calluses of different pine species.

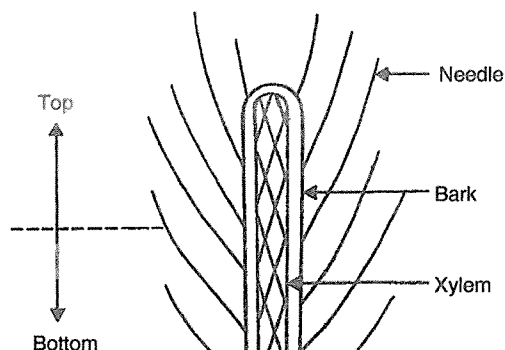
Species	Color of callus	Content (mg/g of callus)	
		PS	PSM
<i>P. thunbergii</i>	Brown	1.73	10.01
	Beige	0.57	2.61
<i>P. pentaphylla</i>	Brown	0.50	2.97
	Beige	0.10	0.30
<i>P. koraiensis</i>	Beige	0.02	0.14

な天然抗酸化物質である α -トコフェロールに匹敵しうる抗酸化性が *P. koraiensis* カルスのメタノール抽出物に確認された (Fig. 1).

P. thunbergii のカルスは培養中にピノシルビンおよびピノシルビンモノメチルエーテルを生合成することができ (Kokubo *et al.*, 1990), *C. japonica* のカルスはかなり多量のカテキンを蓄積し得る (Hiraide *et al.*, 1990) ことが知られている。そこで、マツ属のカルス抽出物が示す抗酸化性はピノシルビンとそのモノメチルエーテルによるのか否かを明らかにするために、その含量を求めた (Table 1)。これらの両化合物を少量しか含まない *P. koraiensis* カルスの抽出物は、両者を多量に含む *P. thunbergii* の褐色カルス抽出物よりはるかに強い活性を示すことから、ピノシルビンとピノシルビンモノメチルエーテルのような低分子量フェノール類はカルス中に生成する程度の量では抗酸化性に殆ど寄与していないと見なした。

2. *P. koraiensis* 樹木新芽における抗酸化物質の存在部位について

淡色の増殖可能なカルスの抽出物に著しい抗酸化性が観察されたことは、比較的若い組織で生産される可能性を示唆している。そこで、*P. koraiensis* の新芽を初夏 (6月21日) に採取して Fig. 2 のように先端部、基部、針葉、皮部、木部に分け、抗酸化性を測定した。皮部に他の部分と比較して強い活性が確認されたが、これは皮部が形成層の生きた細胞に富むためと考えられる。このことは成長点を含む先端部の方が基部よりも強い抗酸化性を示すことから支持される。しかし、同樹種のカルスよりも大きい抗酸化性を示す部位は存在しなかった。したがって、今回カルスに認められた抗酸化性物質は外植体に含まれていたも

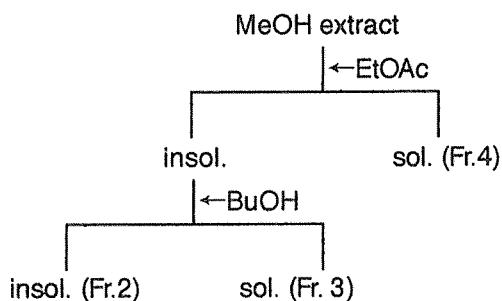
Fig. 2. A young shoot of *P. koraiensis*.

のが持ち込まれたのではなく、カルス自身が *de novo* 合成していることになる。

3. *P. koraiensis* カルスメタノール抽出物の分画と各画分の抗酸化性

メタノール抽出物を Scheme 1 にしたがって分画し、各画分の収量を Table 2 に示す。これらについてリノール酸法及びゴースト法による抗酸化性を測定した。Fig. 3 に示すように Fr.2 (ブタノール不溶部) が最も強い活性を有していた。マツ属に特有なピノシルビン、ピノシルビンモノメチルエーテルあるいは既知のフラボノイドなどは Scheme 1 の分画法では Fr.4 または 3 に分配されるはずであることから、今回強い抗酸化性を示した物質はこれらの既知成分とは異なることが明らかである。この Fr.2 はリノール酸法のみならずゴースト法でも α -トコフェロールより高い活性を示し (Fig. 4)、その収量は絶乾カルス

当たり14%とかなり高取率であった (Table 2)。このフラクションをさらに分画しようと試みたが、活性が分散したため細かい分画を行わず、次にこの画分による抗酸化性発現の機構について調べた。



Scheme 1. Fractionation of the MeOH extract from *P. koraiensis* callus culture.

4. *P. koraiensis* カルス抽出物の抗酸化性発現機構

抗酸化剤の活性発現機構には、活性酸素種の消去、ラジカル捕獲および金属錯体形成の3種があるといわれている (並木満夫, 1990)。ここでは活性酸素種消去能力の一つとしてSOD様活性を測定し、さらにラジカル捕獲能力および鉄イオンと複合体を形成する能力を測定して、*P. koraiensis* カルス抽出物の抗酸化性発現機構について考察した。なお、予備実験の結果 Fr.2 の水溶性部と水不溶の残渣とは活性発現

Table 2. Yields of extractive fractions from *P. koraiensis* callus cultures.

Fractions	Yield (% of callus)
MeOH extract	33.1
BuOH insol. (Fr.2)	14.0
BuOH sol. (Fr.3)	4.3
EtOAc sol. (Fr.4)	12.7

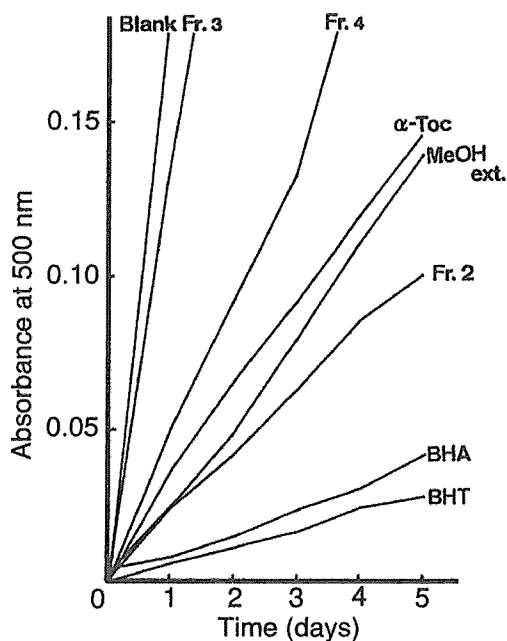


Fig. 3. Antioxidant activities of extracts from the *P. koraiensis* callus cultures.

Note: Activities were determined by the linoleic acid method at 40 ppm sample concentration.

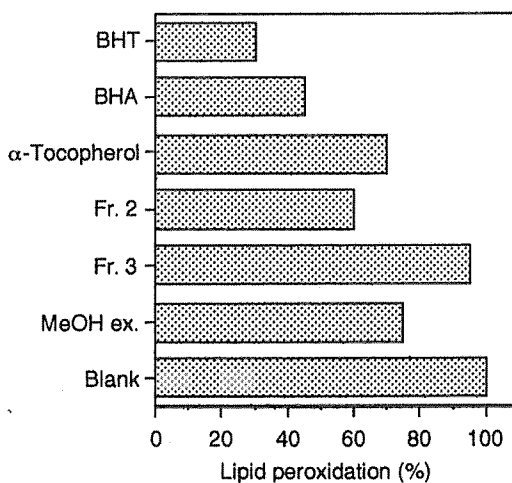


Fig. 4. Antioxidant activities of extracts from the *P. koraiensis* callus cultures.

Note: Activities were determined by the ghost method.

Table 3. Ability of extractives to form complexes with ferrous ion.

Sample	Fe ²⁺ complexes formed (mmol/g)
Water sol. of Fr.2	2.4
Water insol. of Fr.2	1.3
EDTA · 2Na*	0.4

*EDTA · 2Na was used as a positive control.

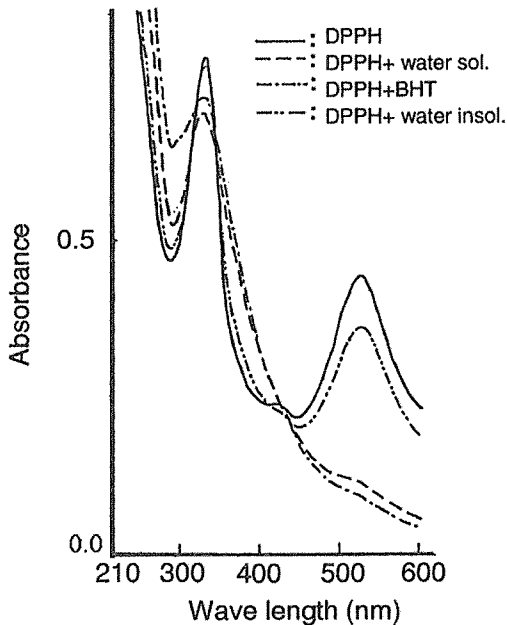


Fig. 5. The radical scavenging ability of antioxidant substances in *P. koraiensis* callus culture.

機構が異なると思われたので、以後の実験ではこれらを区別して検討した。

SOD 様活性においては、キサンチンオキシダーゼの作用により生成したスーパーオキシドアニオンによるニトロブルーテトラゾリウムの還元（ジホルマザンの生成）に由来する発色の抑制が期待されるが、本実験では水溶部および残渣を用いてもほとんど抑制されなかった。このことから、これらの両画分には SOD 様活性を持つ物質は存在しないと結論した。

Fig. 5 に示すようにラジカル捕獲能力の測定においては、水溶部は 530nm 付近の DPPH による吸収を強く抑制した。その程度は、ラジカル捕獲により抗

酸化製を発現するとされている BHT に匹敵するものであった。一方、残渣画分は微弱なラジカル捕獲能力を示したにすぎない。金属錯体形成能力の測定結果を Table 3 に示す。水溶部も残渣画分もエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムに匹敵する鉄錯体形成能力を示した。

これらの結果から、*P. koraiensis* カルス抽出物に含まれる抗酸化性物質の主体は、脂質の自動酸化を触媒する鉄などの重金属を錯体にして不活性化することにより、抗酸化性を発現しているものと考えられる。その内でも水溶部は BHT と同程度のラジカル捕獲能力を持ち、この機構によっても抗酸化性を発現すると思われる。両画分とも SOD 様活性は認められなかったが、スーパーオキシドアニオン以外の活性種についても検討しなければ活性酸素種の消去能力については必ずしも結論を下せないであろう。

要 約

マツ属 3 種及びスギの形成層から誘導・培養したカルの抽出成分が示す抗酸化性について、リノール酸法及びゴースト法により検討した。チョウセンゴウのカルス抽出物は標準的な天然抗酸化物質である α -トコフェロールに匹敵する抗酸化性を示したが、その活性はピノシルビン類のような既知の低分子フェノール類によるものではなく、比較的親水性の物質によると推定された。抗酸化性の発現機構について検討したところ、チョウセンゴウのカルス抽出物は脂質の自動酸化を触媒する鉄などの重金属を錯体にして不活性化し、一部はラジカル捕獲機構により抗酸化性を発現しているものと考えられ、SOD 様活性は示さなかった。

文 献

- Grice, H. C. 1986 Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food Chem. Toxicol.*, 24: 1127-1130
- Hiraide, M., K. Sakai, M. Hasuo, S. Yokomachi and H. Imamura 1990 Secondary metabolites in cell cultures of woody plants I. Nutrient factors affecting accumulation of catechin in *Cryptomeria japonica* callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi*, 36: 573-578
- Kokubo, R., K. Sakai and H. Imamura 1990 Secondary metabolites in cell cultures of woody plants II. Formation of pinosylvin

- and its monomethyl ether in *Pinus thunbergii* callus. *Mokuzai Gakkaishi*, 36: 1084-1088
- 並木満夫・松下雪郎 編 1990 食品の品質と成分間反応, 講談社, 57-67頁
- Osawa, T., A. Ide, J. D. Su and M. Namiki 1987 Inhibition of Lipid Peroxidation by Ellagic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 35: 808-812
- Ratty, A. K., J. Sunamoto and N. P. Das 1988 Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochem. Pharm.*, 37: 989-995
- 坂井克己 1991 木材の科学と利用技術Ⅱ 3. 樹木抽出成分の利用, 日本木材学会研究分科会報告書, 90-97頁
- Witchi, H. P. 1988 Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from perspective of effects on forestmarch and esophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.*, 26: 717-723

Summary

Antioxidant activities were estimated with methanol extracts of callus cultures derived from cambial parts of *Pinus thunbergii* Parl., *Pinus pentaphylla* Mayr., *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. and *Cryptomeria japonica* D. Don. The extract from *P. koraiensis* callus cells exhibited the most intensive activity comparable with that of α -tocopherol, a typical natural antioxidant, when assayed by the linoleic acid method and the ghost method. The antioxidant activity of hydrophilic fractions of the extract is likely to be accounted for by their ability of the complex formation with iron and other heavy metals which catalyze lipid autoxidation. The radical scavenging mechanism may contribute, at least in part, to the antioxidant activity shown by the extracts from *P. koraiensis* callus. However, they did not show the SOD mimic activity.