

森林資源由来の生理活性物質に関する研究 -ポリフェノール化合物の抗酸化活性について-



西山和夫（農学部）

はじめに

昨今、ポリフェノールという言葉が一般にもよく知られるようになってきた。ポリフェノール化合物にはお茶のカテキン類のように疾病の予防に有効であることが明らかにされているものがある。植物には数多くのポリフェノール化合物が存在しており、森林は樹木、草本など、天然ポリフェノール化合物資源の宝庫である。例えば、種々の生理活性が明らかにされているプロアントシアニジンというポリフェノール化合物がブドウの種子から工業的に生産されているが、プロアントシアニジンはスギ、ヒノキ、アカマツなどいくつかの樹木の樹皮に多量に存在している。

植物体においてポリフェノール化合物は葉、茎、果実などが傷ついた時に害虫や菌類の侵入を防ぎ、速やかにその傷を治す働きをしている。また、強い太陽光線や活性酸素から植物体を保護したり、種子の劣化を防止する働きがある。ポリフェノールは植物が過酷な自然環境から自らを保護するための物質のひとつであると考えられる。化学的にはベンゼン環にOH基が2個以上ついた構造をもった化合物であり、還元性や金属キレート作用を示すものが多い。

生活習慣病の発症に活性酸素が関与していることが明らかにされてきている。活性酸素にはスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素などがあり、これらは通常の酸素より反応性の高い分子種である。

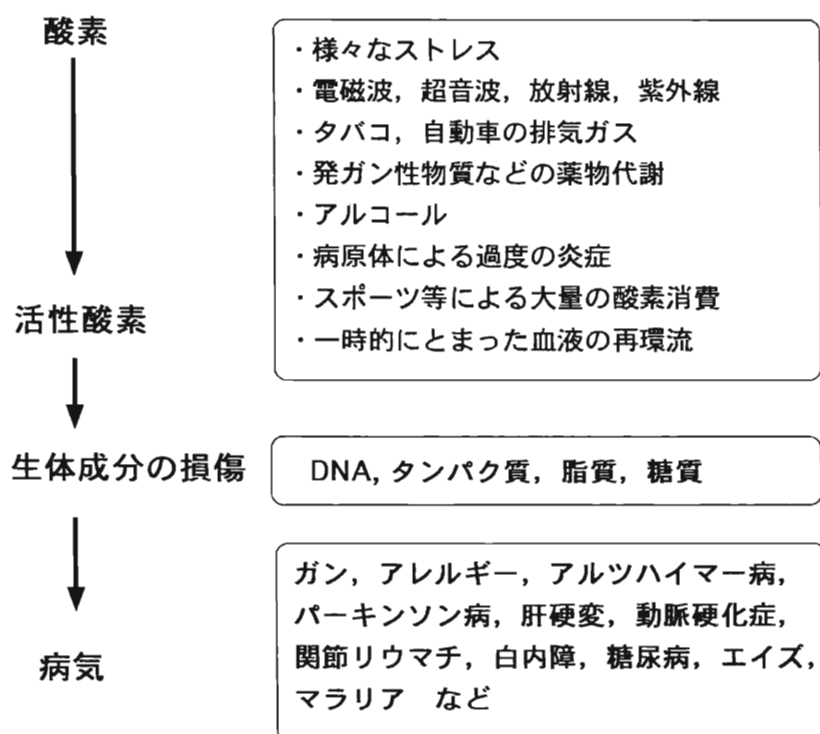


図1 活性酸素と病気

細胞内ではミトコンドリア、ミクロソーム、ペルオキシソーム、核等におけるエネルギー生産や薬物代謝にともなって活性酸素が生成する。好中球やマクロファージ等の白血球は積極的に活性酸素をつくり、生体防御に利用しているが、これらの白血球が生成する活性酸素の攻撃が我々の体におよぶと有害となる。また、発がん物質、放射線、紫外線によっても活性酸素が生成する。我々の体はこれらの活性酸素に対する防御機構をもっているが、この防御機構の能力を越えた活性酸素が生体内で生成するとDNA、タンパク質、脂質などの生体成分に損傷が生じ、いろいろな病気の原因になると考えられている(図1)。ポリフェノール化合物には活性酸素による酸化ストレスを軽減する作用、すなわち抗酸化作用を示すものがあることがすでに明らかにされている。

本研究はポリフェノール化合物の構造および化学的特性と抗酸化活性の関係に関する基礎データを得ることにより森林資源をさらに有効に利用することを目的として行った。

実験方法

二価鉄キレート活性

二価鉄は過酸化水素と直接反応して酸化力の強いヒドロキシルラジカルを生成するので、二価鉄キレート活性をもつ化合物は抗酸化剤となりうる。二価鉄の定量に使用されるバソフェナンスロリンスルホン酸ナトリウム(BPS)は二価鉄と赤色キレートを形成する。ポリフェノール化合物と二価鉄を混合し、BPSを加えるとキレート活性が強いポリフェノール化合物は二価鉄とBPSのキレート形成を阻害するので535nmの吸光度が低下する。今回はこの原理を利用して、pH7.4のHEPES緩衝液中における種々のポリフェノール化合物の二価鉄キレート活性を調べた。結果はポリフェノール化合物を添加していない吸光度からポリフェノールを添加した場合の吸光度を差し引いた値を100倍した数値で表した。

ラジカル消去活性

活性酸素の中でスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルおよび一酸化窒素などはラジカルであり、他の化合物を酸化する力が強い。これらのラジカルに電子や水素原子を供与してラジカル構造を消去するような物質も抗酸化剤となる。ビタミンEやビタミンCなどがこのタイプの抗酸化剤である。安定なフリーラジカルである1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)に電子あるいは水素を供与するとラジカル構造が消失する。ラジカルの検出には一般に電子スピン共鳴スペクトル測定が用いられるが、DPPHラジカルは517nmの光を特異的に吸収し、ラジカル構造が消失した量に比例して吸光度が低下するので、今回は分光光度計でポリフェノール化合物添加による吸光度の減少量を調べた。ラジカル消去活性は、ラジカルの50%を消去するために必要な濃度(μM)の逆数を100倍した数値で表した。

フェントン反応によるヒアルロン酸の分解に対する抑制活性を指標とした抗酸化活性

過酸化水素/二価鉄(フェントン試薬)により生成するヒドロキシルラジカルが高分子ヒアルロン酸を分解すると溶液の粘度が低下する。この系にラジカル消去活性や鉄キレート活性をもった化合物を添加するとヒアルロン酸の分解が抑制されるので、ポリフェノール化合物の粘度低下への影響を調べ、抗酸化活性を評価した。

ガン細胞に選択的な増殖抑制作用

細胞の増殖に対するポリフェノールの影響を正常細胞である無血清マウス胎児細胞と無血清マウス胎児細胞をガン遺伝子で形質転換したガン細胞を用いて比較した。

結果と考察

一つのベンゼン環に水酸基が結合した最も基本的な構造をもったポリフェノール化合物の結果を表1に示した。二価鉄キレート活性とラジカル消去活性ともにピロカテコールとピロガロールが強く、レゾルシノール、フロログルシノール、ヒドロキノン、オルトメトキシフェノールはピロカテコール、ピロガロールよりも弱い活性しか示さなかった。フェントン反応によるヒアルロン酸の分解に対する抑制作用はピロカテコールが最も強く、ピロガロールは抑制せずに促進した。

表1 ポリフェノール化合物のラジカル消去活性、二価鉄キレート活性、抗酸化活性



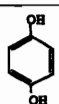

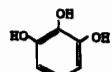
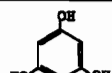
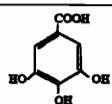
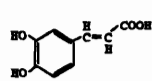
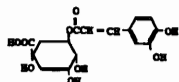
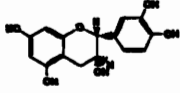
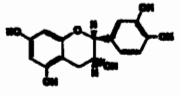
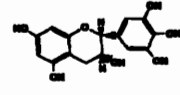
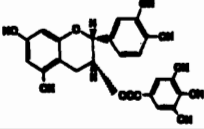
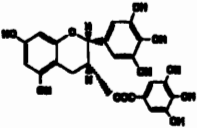
ポリフェノール	構造	ラジカル消去活性	鉄キレート活性	抗酸化活性
ピロカテコール		13	15	43
レゾルシノール		0.4	3	9
ヒドロキノン		6	1	11
オルトメトキシフェノール		5	2	1
ピロガロール		13	35	-44
フロログルシノール		5	3	4
没食子酸		15	37	38
コーヒー酸		13	27	34
クロロゲン酸		8	24	60

表2 カテキン類のラジカル消去活性、二価鉄キレート活性、抗酸化活性

カテキン類	構造	ラジカル消去活性	鉄キレート活性	抗酸化活性
カテキン		17	19	35
エピカテキン		19	14	31
エピガロカテキン		20	35	0
エピカテキンガレート		36	43	75
エピガロカテキンガレート		33	46	82

カテキン類は、ガレート構造をもっているエピカテキンガレートとエピガロカテキンガレートが全ての活性において他の3種類のカテキン類よりも強いことが明らかとなった（表2）。今回調べたポリフェノール化合物ではピロガロールとエピガロカテキンガレートを除いてラジカル消去活性、二価鉄キレート活性と抗酸化活性の間には相関が認められたが、ピロガロールとエピガロカテキンの結果は二価鉄キレート活性とラジカル消去活性が強い化合物が、必ずしも抗酸化的に作用しないことを示唆した。このようにポリフェノール化合物の抗酸化活性は化学構造によって大きく異なり、今回調べた化合物の中では、ガレート構造をもつカテキン類が特に強い抗酸化活性をもっていることが明らかとなった。

次に最も強い抗酸化活性を示したエピガロカテキンガレートの細胞増殖に対する影響を調べた（表3）。

表3 エピガロカテキンガレートのガン細胞選択的増殖阻害

濃度 (μM)	細胞数 $\times 10^6$	
	正常細胞	ガン細胞
0	1.89 (100)	2.98 (100)
0.1	1.79 (95)	2.87 (96)
0.5	2.04 (108)	2.82 (96)
1	1.90 (100)	2.65 (89)
5	2.08 (110)	1.91 (64)
10	1.80 (95)	1.71 (57)

カッコ内の数値はエピガロカテキンガレートを加えなかった場合の細胞数を100とした相対的な細胞数を表している。ガン細胞は正常細胞に比べて約1.5倍の増殖速度を示しているが、エピガロカテキンガレートは添加濃度 $10\mu\text{M}$ において、正常細胞の増殖にはほとんど影響を与えなかったが、ガン細胞の増殖を約半分に抑制しており、ガン細胞に選択的な増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。活性酸素や鉄が細胞の増殖に関与しているということが報告されてきているので、今後、エピガロカテキンガレート以外のポリフェノール化合物についても検討したいと考えている。