ノ ー ト

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol.69, No.6, pp.703~705, 1995]

ゴマリグナン配糖体の
ヒドロキシラジカル消去活性

栗山健一, 無類井建夫
(日清製油(株)研究所)

平成6年11月17日受理

Scavenging of Hydroxy Radicals by Lignan
Glucosides in Germinated Sesame Seeds

Ken-ichi KURIYAMA and Tateo MURUI
*Research Laboratory, THE NISSIN OIL MILLS, Ltd.,
1-3 Chiwaka-cho, Kanagawa-ku, Yokohama 221*

We investigated scavenging of hydroxy radicals by lignan glucosides which are abundant in germinated sesame seeds. Hydroxy radicals were generated by the Fenton reaction and trapped with the nitron trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide. The resultant adduct was detected by electron paramagnetic resonance spectrometry. Five lignan glucosides tested could the scavenge hydroxy radicals. Four lignan glucosides at the concentrations 0.06 or 0.07 $\mu\text{mol/ml}$ scavenged 3.7×10^{-6} spin of hydroxy radicals. The scavenge activity depended upon the concentration.

(Received November 17, 1994)

筆者らは、ゴマ中に特徴的に存在するリグナン配糖体に注目し、先に検討したこれらの分析法⁽¹⁾および加水分解法⁽²⁾を駆使して、ゴマ種子の発芽過程におけるリグナン配糖体の変化を検討した。ゴマは、培養と共にセサミン、セサモリンを速やかに分解し、これと同時にセサミノール-ジ-グルコシドが顕著に増加し、3,7-ジオキシアビスクロオクタン環の一部が開環した新規なリグナンをアグリコンとする配糖体 (Fig.1) を生成することを明らかにした。著者らはこのように発芽過程において新たに生成されるリグナン配糖体の生理的な活性について検討を行ってきた。

略号説明；ヒドロキシラジカル (HR)，電子スピン共鳴 (ESR)，5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO)

近年、ゴマの主要なリグナンであるセサミンが、活性酸素種の一つであるヒドロキシラジカル (HR) に対して消去活性を有することが報告⁽³⁾され、その生体内における抗酸化機能が期待されている。

そこで著者らは、ゴマの発芽過程において増加するリグナン配糖体の HR に対する消去作用を検討した。その結果、セサミノール配糖体および新規リグナン配糖体のいずれにおいても顕著な活性が認められたので報告する。

原料は、中国産白ゴマ種子を、異物などを除き精選して用いた。滅菌したシャーレに滅菌した石灰砂を敷き、ゴマ種子を 1 cm^2 当り 1 粒程度となるよう播種した。蒸留水を噴霧して 37°C の恒温槽中、暗所で培養し、必要に応じて蒸留水を追加した。発芽した種子を蒸留水で洗浄後凍結乾燥した。乾燥物の一部に 10 倍容の 20% 含水メタノールを加えてブレンダーで粉碎後ろ過し、ろ液を減圧下で濃縮乾固して粗配糖体を得た。粗配糖体からのリグナン配糖体の精製方法は、既報⁽¹⁾と同様に行った。

すなわち、粗配糖体をヘキサン、酢酸エチルで洗浄後、メタノールに分散して可溶分を濃縮乾固し、逆相分配クロマトグラフィーに供した。20~50% 含水メタノールで溶出する区分を減圧下で濃縮乾固してリグナン配糖体区分とした。既報⁽¹⁾に示した条件で分取 HPLC に供し、各リグナン配糖体 SG-1~5 を得た (Fig.1)。

HR 消去活性は、電子スピン共鳴装置 (ESR, 日本電子社製) を用い、5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO) によるスピントラップ法で行った。HR は、Fe 存在下の Fenton 反応により過酸化水素から生成させた。0.55 mM ジエチレントリアミン *N*, *N*, *N'*, *N''*, *N''* 五酢酸を含む 0.1 mM 硫酸第 1 鉄溶液 75 μl , 1 mM 過酸化水素溶液 75 μl , 8.8 mM DMPO 溶液 20 μl および各リグナン配糖体水溶液 50 μl を混合後、すぐに ESR で測定した。MgO 中の Mn^{2+} を標準物質として用いた。ESR の測定条件は以下の通り。ESR 装置, JES-RE1X; 磁場, $334.5 \pm 5 \text{ mT}$; 出力, 8 mV; 変調, 100 kHz; 測定温度, 室温; 応答時間, 0.1 s。

Fenton 反応によって生じた HR は DMPO によりスピントラップされ、Fig.2(A) に示した様な 1:2:2:1 の DMPO-OH スピンアダクトのシグナルを与えた。この DMPO-OH スピンアダクトは、リグナン配糖体の

SG-2 ; R1 = Glc-Glc-Glc
SG-4 ; R1 = Glc-Glc

SG-1 ; R2 = Glc-Glc-Glc
SG-3 ; R2 = Glc-Glc

SG-5 ; R3 = Glc-Glc

Fig.1 Structures of Lignan Glucosides in Germinated Sesame

Fig.2 Scavenging of Hydroxy Radical by Lignan Glucosides

(A), ESR spectra were recorded after mixing 50 μ l water with 75 μ l of 0.1 mM Fe^{2+} , 75 μ l of 1 mM H_2O_2 and 20 μ l of 8.8 mM DMPO; (B), as for (A) but with 0.01 μ mol SG-3; (C), as for (A) but with 0.03 μ mol SG-3; (D), as for (A) but with 0.05 μ mol SG-3. ESR conditions are described in the text.

添加濃度の増加に伴い減少した。Fig.2 (B~D) に SG-3 の添加濃度によるシグナルの減少を示した。Fig.3 に SG1~5 の添加濃度と DMPO-OH スピンアダクトのスピンの関係を示したが、SG-5 を除き、発芽において生成または増加するリグナン配糖体は、ほぼ同濃度 (0.2~0.3 μ mol/ml) の添加により HR のスピンの 90%

Fig.3 Scavenging Activity of Lignan Glucosides on Hydroxy Radical

Treatment and other details are the same as for Fig.2. ESR conditions are described in the text.

Table I. Scavenging Effects of Lignan Glucosides in Germinated Sesame on Hydroxy Radical

	Spin($\times 10^{-6}$)	Conc. ($\mu\text{mol/ml}$) at ID 50
Blank	7.42	—
SG-1	3.7	0.06
SG-2	3.7	0.06
SG-3	3.7	0.06
SG-4	3.7	0.07
SG-5	3.7	0.30

Analytical conditions for scavenging activity are described in the text. Conc. of lignan glucosides at ID 50 were calculated from Fig. 2.

程度を消去した。SG-5 は、その他のリグナン配糖体に比べ活性が低かった。対照に対して、半分のスピン量を消去するリグナン配糖体の濃度 (ID 50 値) を Table I にまとめた。

これらの結果から、リグナン配糖体は HR に対する比較的強い消去活性が存在し、その添加濃度に依存し HR を消去することを示した。

以上、ゴマの発芽体より得たリグナン配糖体類の HR に対する消去能を明らかにした。HR は、脂質や糖、アミノ酸、DNA 等のほとんど全ての生体成分に対して非常に高い反応性を有しており⁽⁴⁾、例えば膜脂質から水素原子を引き抜き、直接的に脂質過酸化反応を開始させることが可能であるとされている⁽⁵⁾。従って HR を消去する活性を有するリグナン配糖体は、それ自身が生体内脂質過酸化を予防する直接的因子として有用であると考えられる。

浅見らは、ゴマ油中に存在する脂溶性リグナンであ

るセサミンが HR に対する消去活性を有し、生体内抗酸化性物質であることを示唆している⁽³⁾。従って、ゴマは、脂質の酸化予防の仕組みとして、トコフェロールやアスコルビン酸等の既知の抗酸化物質の他に、油脂を多量に保存する種子の状態では、油溶性のセサミンを多量に含有し、水分を多量に吸収する発芽時では、速やかにセサミンから、より極性の高いリグナン配糖体を多量に生成および蓄積することを示しており非常に興味深い。今後さらにこれらリグナン配糖体の生理作用に関して検討を深めたい。

また著者らは、ゴマ発芽物の含水メタノール抽出物中にスーパーオキシドを消去する活性が存在することも確認した(未発表)。この活性は発芽前では存在せず、また既知のリグナン類およびリグナン配糖体やイソフラボン類以外の成分によるものと推測している。今後この活性物質に関しても明らかにしたい。

本研究において、ESR 測定に御協力頂きました日本電子(株)応用研究センター ESR 応用研究室の増水章季氏に深く感謝いたします。

- (1) 栗山健一, 土屋欣也, 無類井健夫: 農化, **67**, 1693—1700 (1993)
- (2) 栗山健一, 無類井健夫: 農化, **67**, 1701—1705 (1993)
- (3) 浅見純生, 秋元健吾, 阿部圭一, 赤松剛, 小西恭子, 清水昌, 菅野道廣, 山田秀明: 1993 年度日本農化学会大会講演要旨集, **67**, 1993, p501.
- (4) B. Halliwell and M.C. Gutteridge: *Biochem. J.*, **219**, 1-14 (1984).
- (5) K.L. Fong, P.B. McCay, and J.L. Poyer: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792—7797 (1973).