梅酢中のアリルテトラリン化合物の 抗酸化活性および抗変異原性

白坂憲章[§], 野村 毅, 村上哲男, 吉栖 肇

近畿大学農学部・食品栄養学科

Antimutagenetic Activities of Aryltetralin Compound
Comprised in Ume Vinegar

Norifumi Shirasaka[§], Tsuyoshi Nomura, Tetsuo Murakami
and Hajime Yoshizumi

Department of Food and Nutrition, Faculty of
Agriculture, Kinki University, 3327-204
Nakamachi, Nara, Nara 631-8505

The ethyl acetate extracted fraction of Ume vinegar (AT fraction) contained aryltetralin lignan, lyoniresinol. Lyoniresinol showed various antioxidative activities, such as not only suppressing autooxidation of linoleic acid, but also scavenge of DPPH radical and superoxide anion. Purified lyoniresinol and AT fraction suppressed mutagenesis caused by Trp-P-2 and ethylmethane sulfonate. Lyoniresinol indicated remarkable mutagen scavenging activity, which was based on the antioxidative activity, for Trp-P-2. And the existence of antimutagenetic compounds other than lyoniresinol were also suggested from the result of antimutagenetic activity for ethylmethane sulfonate.

(Received, Oct. 22, 2002; Accepted, Dec. 17, 2002)

梅果実はクエン酸などの有機酸が豊富で酸味が強く、またアミグダリンやプルナシンなどのシアン化合物が存在するため生食には適さないが、塩漬けとして梅干しとしたり、アルコールに漬け込み梅酒とするなどして加工によって食用としてきた。その中でも、梅干しは日本の伝統的な食品として現在でも日本人の食生活に欠かせない食材である。

梅干しは漬け込む際に生果実重量の20~25%程度の食塩を用いて漬け込むため、漬け込み工程において果実中の水分が浸透圧によりにじみ出て、漬け込み1週間ほどで果実がつかる程度の液量の梅酢が副生する。この梅酢は家庭において梅干しを漬け込む際にはさほど問題にはならない量であり、生魚の酢締めや生姜の漬け込みに使用したりと家庭内で消費される。しかし、梅干し加工場などにおいて産生する場合の梅酢量は莫大であり、現在は余剰のものは産業廃棄物となるのが現状である。我々は、これまでに梅加工食品である梅酒に抗酸化性があり、その活性を担う成

分の1つとしてアリルテトラリン化合物である(+)-lyoniresinol (Fig. 1)が梅酒中に存在することをすでに報告している¹⁾。垣内ら²⁾の報告にあるように梅果実を高濃度の糖で漬け込む際に高浸透圧で果実成分が果実より水分と共に溶出されるのと同様に、梅干しの漬け込み工程では、高濃度の塩分による高浸透圧で梅果実から水分と共にクエン酸などの有機酸などの有効成分が梅酢にも移行すると考えられる。本研究では、日本の伝統食品である梅干しの加工過程において副産する梅酢の有効利用法開発を目指し、抗酸化成分である(+)-lyoniresinolの梅酢からの単離を試み、さらに梅酢由来の(+)-lyoniresinolの抗酸化活性および抗変異原性を明らかにし、それらと梅酢の機能性との関係について考察した。

1. 実験方法

(1) 使用サンプル

実験に用いた梅酢は、平成11年6月に紀南農業共同組合の梅漬け込み加工場において和歌山県南部産の完熟南高梅3Lサイズのものに梅果実重量の25%の食塩を加え、4ヶ月間漬け込んだつけ込み槽より採取した。

(2) 梅酢からのlyoniresinolの精製

20lの梅酢を等量の酢酸エチルを用いて3回抽出を行った。抽出後の酢酸エチル層は等量の2%炭酸水素ナトリウム溶液を用いて洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水の後、濃縮乾固し酢酸エチル抽出画分(AT画分)1.2gを得た。酢酸エチル画分は梅酒より精製したlyoniresinolを標準物質として、薄層クロマトグラフィー(TLC)のR_f値、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間および抗酸化活性を指標に前報¹⁾と同様に各種カラムクロマトグラフィー(Amberlite XAD-2, Wakogel C-100, HPLC)を用いて精製し、20lの梅酢より10.1mgの精製lyoniresinolを得た。精製lyoniresinolの構造はCD, NMR, Massなどの各種スペクトル分析により確認した。

(3) 抗酸化活性の評価

抗酸化活性としてDPPHラジカル消去能およびスーパーオキシド消去能を測定した。

DPPHラジカル消去活性³⁾は、DPPHラジカルの減少に伴う吸光度の減少から以下のようにして算出した。すなわち75%エタノール2mlと試料50μlを混ぜ、これに0.5mM 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.5mlを加えてよく混和し、混和直後(A₀)と30分後(A₃₀)に517nmの吸光度を測定した。この際ブランクとして試料の代わりにエタノールを添加したものを、コントロールとしてα-トコフェロールを40ppm添加したものを同時に測定した。ラジカル消去能の評価は以下の式によって算出した。

$$\text{ラジカル消去能(\%)} = \frac{A_0 - A_{30}}{A_0} \times 100$$

スーパーオキシド消去活性⁴⁾はキサンチン-キサンチンオキシダーゼの系により発生するスーパーオキシド(O₂⁻)

〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

[§] 連絡先 (Corresponding author), sirasaka@nara.kindai.ac.jp

とニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の反応により生成するジホルマザンの量が試料の添加によりblankより減少することを利用して以下のようにして算出した。すなわち、試料溶液 $20\mu\text{l}$ を反応液 (50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.3), 0.1 mM キサンチン, 0.1 mM EDTA, 0.025 mM NBT) $960\mu\text{l}$ とよく混合した後, 1U/ml のキサンチンオキシダーゼ溶液 $20\mu\text{l}$ を加え, 20 分間反応後, blank (S_0) と試料を添加したもの (S_{20}) の 560 nm の吸光度を測定した。この際blankとして試料の代わりにエタノールを添加したものを同時に測定した。スーパーオキシド消去能の評価は以下の式によって算出した。

$$\text{スーパーオキシド消去能(\%)} = \frac{S_0 - S_{20}}{S_0} \times 100$$

(4) 抗変異原性の評価

抗変異原性は *Salmonella typhimurium* TA100 を指示菌として用いた Ames 試験⁹⁾ により検討した。すなわち、あらかじめニュートリエントブロス溶液で 37°C , 16 時間振とう培養した *Salmonella typhimurium* TA100 を、直接変異原物質としてエチルメタンスルホン酸 (EMS) を、ま

た活性発現に薬物代謝酵素 (s-9mix) による代謝活性化を要する間接変異原物質である Trp-P-2 を用い変異誘導を行い、それにサンプルを加えたものに軟寒天を加え混合し、プレートに重層した。48 時間後にプレート上に生じた復帰変異コロニー数を測定した。自然突然変異による復帰コロニー数 (Negative), 変異原により誘発させた復帰コロニー数 (Positive), 試料添加時の変異原により誘発されたコロニー数 (Sample) より以下の計算法で行った。

$$\text{復帰変異率(\%)} = \frac{\text{Sample-Negative}}{\text{Positive-Negative}} \times 100$$

また、試料を各変異原とあらかじめ作用させてから復帰変異率を求める消変異原活性ならびに、*Salmonella typhimurium* TA100 を各変異原で処理したのち試料とともに培養し復帰変異率を求める生物学的抗変異原活性についても同様に検討した。

2. 実験結果及び考察

(1) 梅酢由来アリルテトラリン化合物 lyoniresinol の抗酸化活性

前報において、lyoniresinol がリノール酸自動酸化抑制において α -トコフェロールと同等にリノール酸の酸化を抑制することを報告した。本報においては、さらに DPPH ラジカル消去活性およびスーパーオキシド消去活性について評価した。

DPPH ラジカル消去活性については lyoniresinol 25 ppm の添加で、約 80% のラジカルを消去し、50 ppm の添加で 90% 以上消去し、 α -トコフェロールとほぼ同等の消去活性を示した (Fig. 2a)。また、スーパーオキシド消去活性においては 10 ppm の添加で約 65% を消去し、40 ppm の添加では 80% 以上のスーパーオキシドの消去が認められた (Fig. 2b)。

前報においては lyoniresinol が α -トコフェロールと同

Fig. 1 The chemical structure of (+)-lyoniresinol

Fig. 2 DPPH scavenging activities (a) and superoxide dismutase like activities of lyoniresinol obtained from ume vinegar

Antioxidative activity was assayed by the method described in Materials and Methods section. Blank, measure without antioxidants; Toc, α -tocopherol (50 ppm).

等のリノール酸自動酸化抑制効果を有し、80 ppm 程度の濃度で十分な脂質酸化抑制効果を持つことを報告したが、今回の検討では、さらに低い濃度においてラジカルやスーパーオキシドを消去しうる抗酸化活性を有することが示された。

(2) 梅酢由来アリルテトラリン化合物 lyoniresinol の抗変異原性

EMS と Trp-P-2 を用いた抗変異原性試験において、lyoniresinol, AT 画分が供試菌に対して抗菌作用を示さない濃度範囲で抗変異原性を検討したところ、共に復帰変異抑制効果を示した。特に lyoniresinol は Trp-P-2 を用いた抗変異原性試験において、濃度依存的に強い復帰変異の抑制を示した (Fig. 3)。変異原物質ごとにみると、EMS に対する抗変異原性は AT 画分と lyoniresinol がほぼ同程度の抗変異原性を示しており、lyoniresinol を 1% 程度しか含有しない AT 画分の抗変異原性は lyoniresinol 以外の物質にも由来していることが示唆された。一方、Trp-P-2 に対する抗変異原性については lyoniresinol の 50% 抑制濃度 (IC_{50}) が約 6 ppm であるのに対して AT 画分の IC_{50} は約 600 ppm と約 100 倍量の AT 画分が必要であり、AT 画分が持つ活性の多くの部分を lyoniresinol が担っていることが示された。以上の結果より、AT 画分の抗変異原性は lyoniresinol 単一の抗変異原性によるのではなく梅酢中に存在する複数の抗変異原物質による作用であることが示唆された。

さらに lyoniresinol の抗変異原活性の作用機序を検討したところ、肝臓 cytochrome P-450 による酸化活性化が必要な Trp-P-2 に対しては濃度依存的に消変異原効果が認められたが、顕著な生物学的抗変異原効果は認められなかった (Fig. 4)。このことは lyoniresinol の抗変異原活性の機序には、lyoniresinol の抗酸化活性が関与している可能性を示唆している。一方、直接変異原である EMS に対して lyoniresinol は弱い抗変異原性は認められるものの、顕著な消変異原性は認められず、EMS を不活性化する機能はないことが示された。また EMS に対する抗変異原性

を有する、lyoniresinol 以外の成分の存在を示すデータ (未発表) もあり、今後関与する成分の単離精製および構造決定をさらに進める必要があるものと考えられた。

以上梅由来の抗酸化物質である lyoniresinol および lyoniresinol を含有する AT 画分に抗変異原活性があることを示した。梅酢に含有される lyoniresinol の量は数 ppm と非常に微量だが、今回の結果では lyoniresinol は 10 ppm 弱の濃度でも有意な変異原性の抑制が認められており lyoniresinol 含有の梅加工食品を習慣的に摂取することにより変異抑制効果を期待できる可能性があると考えられた。また、今回検討を加えた梅酢は梅干し加工において大量に産出しており (和歌山県で 30 000 t 程度)、梅酢より抗酸化・抗変異原活性を有する成分を調製して利用することは梅酢の有効利用の端緒を開くものと考えられ、

Fig. 3 Antimutagenetic activities of AT fraction and lyoniresinol obtained from Ume vinegar

Antimutagenetic activities were assayed by the method described in Materials and Methods section. □, AT fraction+EMS; ○, AT fraction+Trp-P-2; ■, Lyoniresinol+EMS; ●, Lyoniresinol+Trp-P-2.

Fig. 4 Effect of lyoniresinol on recovery rate by Trp-P-2 (a) and EMS (b)

Lyoniresinol was preincubated with each mutagen (■) or was incubated with mutagen-treated cells (▲).

lyoniresinol だけでなく, lyoniresinol を抗酸化性および抗変異原性成分として含む AT 画分を利用した機能性食品の開発も期待される。

3. 要 約

梅干しの製造工程において副生する梅酢の有効利用法を開発することを目的とし, 梅酢から抗酸化性アリルテトラリン化合物 lyoniresinol と lyoniresinol を主要な成分とする AT 画分を調製し, 抗変異原活性について検討した。

梅酢より単離した lyoniresinol は, リノール酸自動酸化抑制だけでなく, DPPH ラジカル消去活性, スーパーオキシド消去活性などの抗酸化活性も示した。

lyoniresinol および AT 画分はともに Trp-P-2, EMS による変異を抑制し, 特に抗酸化活性が機序と考えられる Trp-P-2 に対する変異抑制効果を強く示した。また, EMS

に対する変異抑制効果から AT 画分中に lyoniresinol 以外に関与する成分の存在が示唆された。

文 献

- 1) 白坂憲章, 暮松亜紀, 金銅信之, 金銅俊二, 飯田雅弘, 長谷川豪宏, 村上哲男, 吉栖 肇, 食科工, **46**, 792 (1999).
- 2) 垣内典夫, 石川和子, 森口早苗, 京谷英寿, 吉田雅夫, 日食工誌, **32**, 669 (1985).
- 3) 寺沢なお子, 山崎 希, 福井優美子, 食科工, **48**, 99 (2001).
- 4) 谷口直之監修, 活性酸素実験プロトコール, (秀潤社, 東京), (1994).
- 5) Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E., *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975).

(平成 14 年 10 月 22 日受付, 平成 14 年 12 月 17 日受理)