

特集 地域特産作物

V 藍【栽培技術・利用】

タデアイ（藍）葉の新規フラボノイドの同定と
コレステロール生合成阻害作用

島根大学生物資源科学部 横田一成

寿製菓株式会社研究開発部 木村英人、徳山翔太

1. はじめに

タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour) は、東南アジア原産のタデ科の1年草で、日本を始め東アジアにおいて古くから藍染めの染料原料として用いられてきた(図1)。藍染めに関して、伝統的に徳島県のものが有名であるが、島根県にも出雲織りの文化が受け継がれている。タデアイの葉は、二千年にわたって薬用植物として解毒、解熱、消炎、止血などの急性の治療目的で利用されてきた(Iwakiら2002)。また、日本の一部の地方では、タデアイは食用に用いられており、例えば、刺身のツマ以外にも、葉をすりつぶして酢と混ぜたタデ酢は、鮎の臭みを消すために有効である。以上の背景の下に、生薬や健康食品素材の原料としての利用を考えて、タデアイの葉のさらなる有用性を探究してそれら機能性の分子基盤を得ることが重要になっている。近年の研究では、タデアイの機能性に関して、いくつかの生理活性物質がタデアイから単離されている。例えば、抗ガン作用や抗炎症作用を示すトリプタンスリン(Koya-Miyataら2001、Micallefら2002)、抗酸化

図1 タデアイ（藍）(*Polygonum tinctorium* Lour) の葉

作用物質である没食子酸やコーヒー酸のようなポリフェノール化合物(Jangら2012、Kimotoら1999)、抗アレルギー活性のあるインディルビン(Kunikataら2000)などが報告されている。さらに、トリプタンスリン、6-メトキシケンペロール、ケンペロール、および3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンには、ピロリ菌に対する抗菌活性が見出されている(Hashimotoら1999)。一方、3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン-3-O- β -D-グルコピラノシドは、抗血液凝固作用を示すことが示されている(Kohdaら1990)。最近、我々は、タデアイの機能性の再評価の観点から、疾病予防が期待できる抗酸化性成分のポリフェノール類の分析を行っている。タデアイと一般野菜との抗酸化性を比較したところ、過酸化ラジカル消去能やラジカル捕獲能の評価の両方において、タデアイは格段に高い抗酸化性を示した。タデアイにおける高い抗酸化性は、豊富に存在しているポリフェノール類によることを確認している。以前に、タデアイの葉茎よりポリフェノール類を抽出して、超高速液体クロマトグラフィー質量分析計などで分析したところ、コーヒー酸、クロロゲン酸、ケンペロール、ケルセチン、ケルセチン-3-O- β -D-グルクロニドなどを検出した(Kimuraら2014)。しかし、主要成分としてポリフェノール類に相当すると思われる未同定の物質も多く検出された。

心臓発作や脳卒中のような心臓血管病の薬理的な治療法としては、高コレステロール血症を予防もしくは治療するために、コレステロール生合成を阻害するスタチンが一般によく用いられる。最近の研究によると、機能性食品成分として、ある種のフラボノイド類、例えば、ダイゼイン、ナ

リンゲニン、およびルチンは、コレステロール合成の律速酵素である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG)-CoA 還元酵素に対して阻害活性を示し、動物の血中コレステロール濃度を低下することが報告されている。以前に、井上らは、タデアイの葉茎の水抽出物が、高脂肪食によって誘導された高脂血症の動物でのコレステロールや中性脂肪の血中濃度を低下されること報告している (Inoue ら2000)。しかし、その効果を示す物質の本体は、これまで解明されていなかった。

以上のような背景の下に、私共は、タデアイの葉に存在するポリフェノール類を一斉に分離して、個々の成分の化学構造を決定することを試みた。そのために、まず、超高速液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化飛行型質量分析計 (UPLC-ESI-TOF/MS) を用いて分析したところ、多くのフラボノイド関連物質が検出された。他の機器分析法と組み合わせて、最終的に単離した複数のフラボノール配糖体成分を同定することができた。また、HMG-CoA 還元酵素に対する個々の成分の阻害活性を評価した。本報では、これまでに本研究室で行ってきた最近の研究成果について紹介する (Kimura ら2015)。

2. タデアイ葉のフラボノイド類の一斉分離と単離成分の同定

タデアイ葉より80%メタノールを用いて得たフラボノイド類を含む全抽出物を、逆相のオクタデシルシリルシリカゲルのカラムを装着したUPLC-ESI-TOF/MS^Eの分析に用いた。まず、質量分析計に装備されている紫外吸収検出器を利用して340 nm の波長で検出したところ、フラボノイド類に相当すると思われる11個のピークが検出された (図2)。それらの紫外吸収ピークは、負イオンを検出する質量分析での全イオンのクロマトグラムのピークと一致した。ピークこれまでに知

られているフラボノイド配糖体のアグリコン部分の化学構造の情報を基に、検出する質量イオンを指定する標的 MS 分析を実行した。ピーク**1-3**は、典型的なフラボノールであるケルセチンの負イオンの m/z 301を示した。同様に、**4**と**6**のピークは、 m/z 285のイオンの検出から別のフラボノールであるケンペロールの誘導体であると考えられた。ピーク**5**は、イソラムネチンに相当するイオンの m/z 315を示した。そして、ピーク**7-11**では、アグリコン部分の3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンの存在を反映する m/z 313の負イオンが確認された。

さらに、酸やアルカリによる化学分解と他の機器分析法である¹H-核磁気共鳴装置 (¹H-NMR)、¹³C-NMR、2次元 NMR、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)、紫外可視分光計、旋光計、融点測定装置などの測定結果と既知の文献情報も参考にして、最終的にピーク**1-6**の化学構造を同定した (Kimura ら2015)。化合物**1**は、以前に我々がタデアイで報告しているもの (Kimura ら2014) と同じケルセチン-3-O-β-D-グルクロニドと確認された。化合物**2,4,5**は、それぞれ、ケルセチン-3-O-β-D-グルコピラノシド (イソケルシトリン)、ケンペロール-3-O-β-D-グルコピラノシド (アストラガリン)、イソラムネチン-3-O-β-D-グルコピラノシドであった。化合物**4**の分析結果は、タデアイで以前に報告されているものと一致した (Kohda ら1990)。化合物**2**と**5**は、タデアイでは報告されていないが他の植物で確認されている (Sakakibara ら2003、Lee ら2005)。化合物**3**と**6**については、アルカリ分解、質量分析でのフラグメントイオンの検出結果、さらに NMR の解析デー

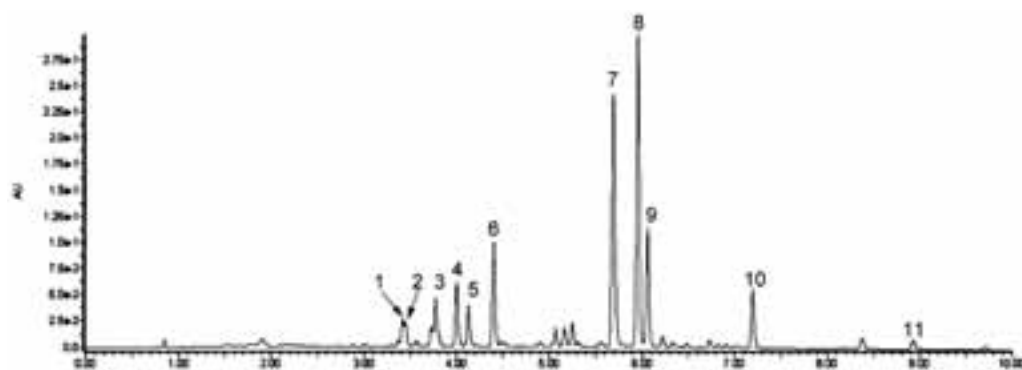


図2 超高速液体クロマトグラフィーによるタデアイ葉の全抽出物の一斉分離と340 nm の波長での検出

タにより、HMG基がフラボノイド配糖体の糖の部分に結合していることが明らかになった。化合物**3**は、他の文献 (Iwashina ら2004) と比較してケルセチン-3-O-[6"-O-(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル)- β -D-グルコピラノシド]と決定された。また、化合物**6**は、他の植物で報告されて

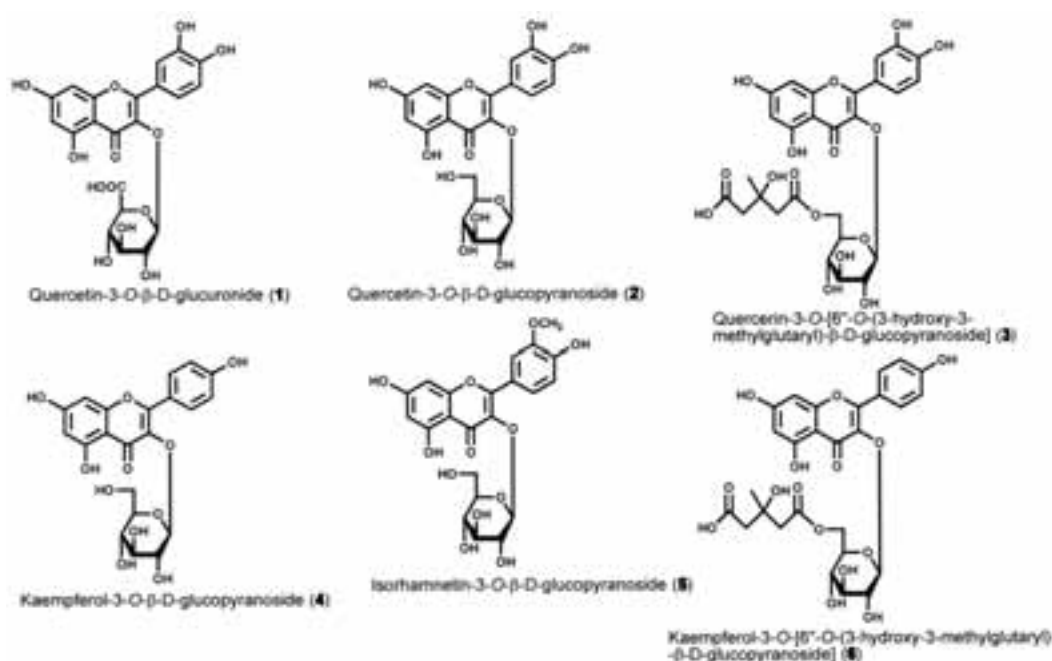


図3 同定された化合物1-6の化学構造

いる文献 (Jung ら1993) の NMR データと一致することから、ケンペロール-3-O-[6"-O-(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル)- β -D-グルコピラノシド]と同定された。このように、化合物**1-6**は、いずれもフラボノール配糖体であることが分かった (図3)。

3. 3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンをアグリコンとするフラボノール配糖体の構造決定

全抽出物を DIAION HP-20カラムクロマトグラフィーにかけて100%メタノールで溶出する画分に、化合物**7-11**は回収された。その画分を酸加水分解した後、UPLC-ESI-TOF/MS^Eで分析すると、化合物**11**のピークのみが検出された。このことから、化合物**7-10**は、化合物**11**をアグリコンとするフラボノイド関連の配糖体と推定された。質量分析や他の分光学的手法による解析の結果、化合物**11**は、フラボノール配糖体のアグリコンに相当する3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンと確認された。次に、既報の分光学的な解析結果と比較して、化合物**7**は、3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン-3-O- β -D-グルコピラノシドと同定された。化合物**7**の酸加水分解産物をトリメチルシリル

(TMS)化して、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)で分析したところ、標準品のグルコースのTMS化誘導体と一致した。次に、化合物**8**をアルカリ加水分解した後の生成物をUPLC-ESI-TOF/MS^Eで分析すると化合物**7**に一致したピークが認められた。また、糖に結合しているアシル基については、アルカリ加水分解後のTMS誘導化した成分のGC-MS分析によりHMG基が結合していることが確認された。HMG基の糖への結合様式は、2次元NMRなどで解析して、化合物**8**は、3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン-3-O-[6"-O-(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル)- β -D-グルコピラノシド]と同定された。さらに、化合物**9**は、種々の機器分析の結果、3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン-3-O-[6"-O-(アセチル)- β -D-グルコピラノシド]と決定された。そして、化合物**10**については、酸加水分解の生成物をTMS化して得た誘導体をGC-MSにより分析したところ、標準品のグルクロン酸のTMS誘導体に一致するMSデータが得られた。種々の機器分析の結果と合わせて、化合物**10**は、3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン-3-O-[6"-O-(アセチル)- β -D-グルクロニド]と同定された。上記の化合物の詳細な分析法や結果について

は、我々の最近の文献 (Kimura ら 2015) を参照されたい。以上のように決定されたフラボノイド類のうち、化合物**8-10**は、タデアイでも他の植物でも報告のない新規のフラボノール配糖体であることが判明した。同定された化合物**7-11**の化学構造を図4に示す。

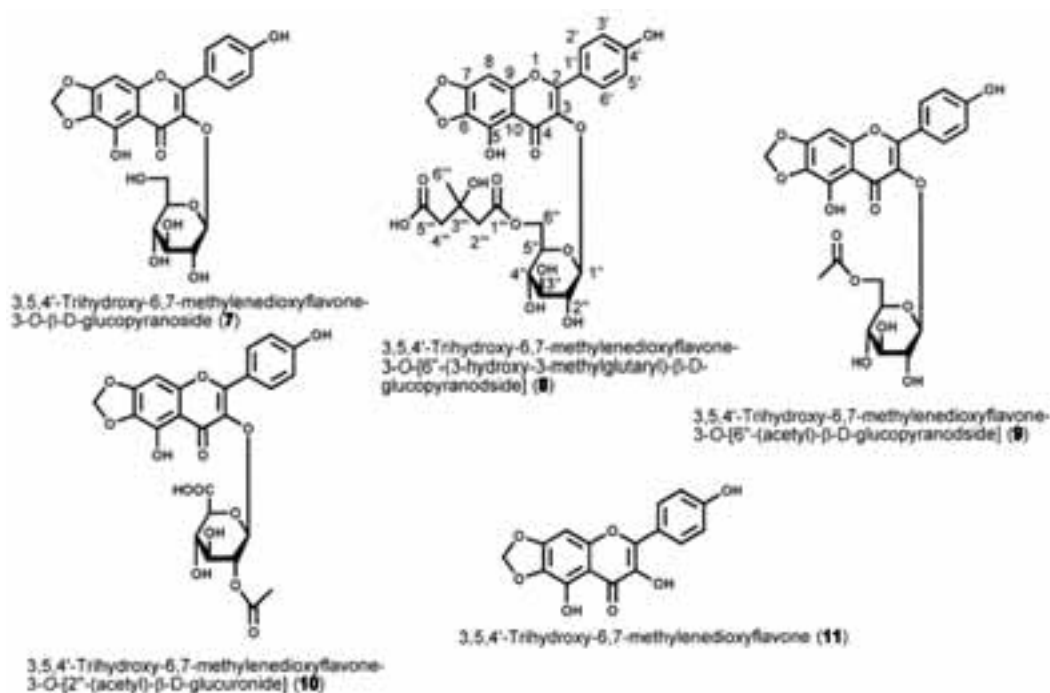


図4 同定された化合物7-11の化学構造

4. HMG-CoA

還元酵素に対するフラボノール配糖体の阻害効果

今回の研究で、HMG 基を有するフラボノール配糖体の同定に至ったことから、同定した化合物が、コレステロール生合成経路の律速酵素である HMG-CoA に対する阻害活性を示すことが想定された。タデアイ葉に由来するポリフェノールの全抽出物に HMG-CoA 還元酵素に対する阻害活性が認められたので、さらに DIAION HP-20 のカラムクロマトグラフィーで分画したところ、最も強力な阻害活性は、100% メタノールで溶出する画分に認められた。その画分には、量的に豊富なフラボノイド成分として化合物**7-11**が含まれていた。単離した成分について、HMG-CoA 還元酵素活性を調べたところ、いずれの化合物も濃度依存的な阻害活性を示した。化合物**7, 9, 10**が示す50% 阻害活性の濃度は、それぞれ151, 177, 188 μM であった。化合物**8**は、200 μM の濃度において60% のレベルまで酵素活性を阻害した。アグリコンの化合物**11**は、50 μM の濃度までは、濃度依存的に阻害を示し、他の配糖体に比べてより強い阻害活性を示した。しかし、それよりも高い濃度では、測定系において不溶化するため、それ以上の阻害効果は検討していない。今回、調べた化合物には、これまでに阻害活性の報告されている比較対照の

ロバスタチン (Bok ら2000) とほぼ同等の阻害活性が認められた。以前の研究で、ルチン (Falé ら 2013) には、HMG-CoA 還元酵素活性の阻害活性が報告されているが、今回の我々の測定系では、有意な阻害活性は認められなかった。

今回の研究の結果、タデアイ葉に由来する主要成分の3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンをアグリコンとするフラボノール配糖体は、HMG-CoA 還元酵素に対して阻害活性を示すことが確認された。HMG 基を有する化合物**8**の阻害活性は、HMG 基を持たない他の化合物に比較して強いものではなく、むしろ弱い傾向であった。このことから、エステル結合した HMG 基の存在は、フラボノール類の阻害活性の発現に関係ないものと考えられた。生体内の血中コレステロール濃度が高い場合、動脈硬化の危険性が高まり、心筋梗塞や脳卒中のような致命的な病気につながることは周知のとおりである。この場合、コレステロール生合成の律速酵素の HMG-CoA 還元酵素の阻害が有効であるが、日常の食事による疾病予防の観点から、本酵素を阻害できるフラボノイド類を豊富に含むタデアイの葉は、有用な健康食品素材と考えられる (図5)。今後の課題として、動物実験やヒトでの有効性を検証することが必要となるし、他の健康機能にも興味を持たれる。

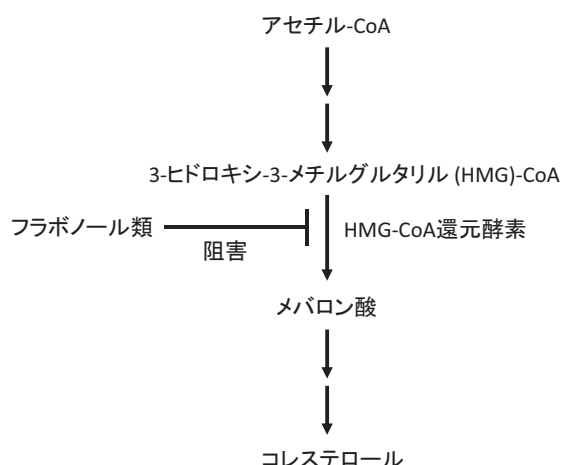


図5 タデアイのフラボノール類による HMG-CoA 還元酵素の阻害

5. 結論

タデアイ葉には、ポリフェノール類としてフラボノール配糖体が豊富に含まれていることが明らかになった。UPLC-ESI-TOF/MS^E、NMR、さらに種々の機器分析により、11種類のフラボノール関連物質を同定した。そのうち、主要成分は、3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンをアグリコンとするフラボノール配糖体であった。そして、その中で3種類の化合物**8**, **9**, **10**は、今までに他の植物でも報告のない新規のものと確認された。単離した成分は、いずれもコレステロール生合成の律速酵素の HMG-CoA 還元酵素を濃度依存的に阻害する活性を示した。このことより、タデアイ葉に由来するフラボノイド類は、コレステロール生合成を阻害することで生体内のコレステロールを低減する有用な機能性食品因子となる可能性が示唆された。

参考文献

- Bok, S-H., W. Y. Shin, K-H. Bae, T-S. Jeong, Y-K. Kwon, Y. B. Park, M-S Choi. 2000. Effects of naringin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol fed rats. *Nutr. Res.* 20: 1007-1015.
- Falé, P. L., C. Ferreira, F. Maruzzella, M. Helena Florêncio, F. N. Frazão, M.L. Serralheiro. 2013. Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 150: 718-723.
- Hashimoto, T., H. Aga, H. Chaen, S. Fukuda, M. Kurimoto. 1999. Isolation and identification of anti-helicobacter pylori compounds from *Polygonum tinctorium* Lour. *Nat. Med.* 53: 27-31.
- Inoue, S., S. Takayama, S. Ushio, K. Iwaki, K. Ohashi, N. Masaki, S. Fukuda, M. Ikeda, M. Kurimoto. 2000. Improvement of high fat diet-induced hyperlipidemia by *Polygonum tinctorium* Lour. *Nat. Med.* 54: 261-264.
- Iwaki, K., M. Kurimoto, Cancer preventive effects of the indigo plant, *Polygonum tinctorium*. 2002. *Recent Res. Devel. Cancer* 4: 429-437.
- Iwashina, T., Y. Omori, J. Kitajima, S. Akiyama, T. Suzuki, H., Ohba. 2004. Flavonoids in translucent bracts of the Himalayan *Rheum nobile* (*Polygonaceae*) as ultraviolet shields. *J. Plant. Res.* 117: 101-107.
- Jang, H. G., B.G. Heo, Y.S. Park, J. Namiesnik, D. Barasch, E. Katrich, K. Vearasilp, S. Trakhtenberg, S. Gorinstein. 2012. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait) plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167: 1986-2004.
- Jung, K. Y., J. C. Do, K. H. Son. 1993. Kaempferol 3-O-[6''-O-(3-hydroxy-3-methyl glutaroyl) glucoside] from leaves of *Polygala japonica*. *Phytochemistry* 34: 1196-1197.
- Kimoto, T., S. Koya, K. Hino, Y. Yamamoto, H. Aga, T. Hashimoto, N. Masaki, T. Hanaya, M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Arai, M. Ikeda, S. Fukuda, M. Kurimoto. 1999. Protection by Indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.) against renal oxidative damage in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Nat. Med.* 53: 291-296.
- Kimura, H., T. Ishihara, M. Michida, S. Ogawa, T. Akihiro, K. Yokota. 2014. Identification and quantitative analysis of polyphenolic compounds from indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour). *Nat. Prod. Res.* 7: 492-495.
- Kimura, H., S. Tokuyama, T. Ishihara, S. Ogawa. 2015. Identification of new flavonol O-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108: 102-112.
- Kohda, H., A. Niwa, Y. Nakamoto, O. Takeda. 1990. Flavonoid glucosides from *Polygonum tinctorium*. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 523-524.
- Koya-Miyata, S., T. Kimoto, M. J. Micallef, K. Hino, M. Taniguchi, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. 2001. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crude ethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour. *Anticancer Res.* 21: 3295-3300.
- Kunikata, T., T. Takefuji, H. Aga, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. 2000. Indirbin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *Eur. J. Pharmacol.* 410: 93-100.
- Lee, Y. S., S. Lee, H. S. Lee, B-K. Kim, K. Ohuchi, K. H. Shin. 2005. Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in Streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 916-918.
- Micallef, M. J., K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M. Ikeda, K. Hino, M. Kurimoto. 2002. The natural plant product tryptanthrin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2: 565-578.
- Sakakibara, H., Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* 51: 571-581.