

セイトカアワダチソウのポリフェノール成分
に関する研究

Studies on the polyphenols in *Solidago altissima* L.

金 海麗

2008

The United Graduate School of Agricultural Science

Kagoshima University

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 野生のセイタカアワダチソウ葉のポリフェノール成分について	
第 1 節 セイタカアワダチソウの葉の成分	
2.1.1. 緒言	13
2.1.2. 材料および方法	13
2.1.3. 結果および考察	15
2.1.4. 摘要	20
第 2 節 葉のポリフェノール類含量の季節変動	
2.2.1. 緒言	32
2.2.2. 材料および方法	33
2.2.3. 結果および考察	34
2.2.4. 摘要	36
第 3 節 各器官（葉、茎、根および花）別および葉の各着生部位別の ポリフェノール類含量の比較	

2.3.1.	緒言	40
2.3.2.	材料および方法	40
2.3.3.	結果および考察	41
2.3.4.	摘要	44

第3章 セイタカアワダチソウの各種組織培養系の確立およびポリフェノール生産

第1節 セイタカアワダチソウの各種組織培養系の確立

3.1.1.	緒言	48
3.1.2.	材料および方法	49
3.1.3.	結果および考察	51
3.1.4.	摘要	53

第2節 毛状根培養系におけるポリフェノール生産

3.2.1.	緒言	57
3.2.2.	材料および方法	57
3.2.3.	結果および考察	58
3.2.4.	摘要	60

第4章 セイタカアワダチソウのポリフェノール類効率的抽出

4.1.	緒言	67
4.2.	材料および方法	67
4.3.	結果および考察	69
4.4.	摘要	70

第 5 章 総合考察	75
要約	81
英文要約	83
謝辞	85
参考文献	86

略語

BA	6-benzylaminopurine
COSY	chemical shift correlated spectroscopy
HMBC	H-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum
HPLC	high performance liquid chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-3-butylic acid
MAFF	The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan
MS	Murashige and Skoog's (Murashige & Skoog's 1962)
1/2MS	one-half strength of the standard Murashige and Skoog's
NMR	nuclear magnetic resonance
rpm	revolution per minute
TBA	tetrabutrylammonium chloride
NMR	nuclear magnetic resonance

UV	ultraviolet
YEB	yeast extract broth

第1章 緒論

セイトカアワダチソウ (*Solidago altissima* L.) はキク科 *Solidago* 属の多年性植物である。地下茎は地中を横走し、茎の高さは若いものでは 10 cm 程度、老齢のものでは直生して 2 m を超える。また、茎の最外層には短毛を有する特徴がある。一般に茎の上部で分枝し、茎頂に大きな円錐花序をつける。花枝には上方に偏った多数の黄色頭花をつけ、開花期は日本において 10 月から 11 月の晩秋である (Fig. 1)。セイトカアワダチソウの花は、花粉症の原因になると言われることもあるが、実際には、この植物の花粉は虫媒で伝播し、重く、風で飛び散ることはないので、花粉症を起こす元にはならない (福田 1982)。

Solidago 属植物のグループ

Solidago 属植物は 3 つのグループにまとめられている (福田 1982)。

・グループ A (Fig. 2-A)

1 本の茎から沢山の花枝を出して、その背部に小さな頭花をつけるものである。その代表的な種に *S. canadensis* があり、日本へ侵入した *S. altissima* L. および *S. gigantean* (var. *leiophylla*) はこのグループに属する。平原や路傍、また樹木の下でもよく生育している。

・グループ B (Fig. 2-B)

主幹から数本に分岐した小枝をつけ、それぞれの枝の先端にだけ花を群生させている。背丈は概して小さく 1 m 前後のものが多い。日照条件のよい平原に

多く分布している。

・グループ C (Fig. 2-C)

主幹の茎からあまり長い小枝を出さず、先端にまとわりつくように花をつけている。この種類は日陰を好み、樹の下に生えている。

以上の 3 つのグループの内部の種間に、またグループの間でも雑種を生じ、さらに変異性を増す状態となっている。また 2 種間だけでなく、生じた雑種とそれぞれの両親の種との交雑による導入雑種を生じている記録もある。

帰化植物セイタカアワダチソウの分布

セイタカアワダチソウの分布は北アメリカ東部地方五大湖周辺から、北はカナダの Nova Scotia、南はアメリカの Florida、Texas、西はロッキー山脈の東側の Oklahoma、Kansas、Minnesota に及んでいる。北緯 25 度から 46 度に至る範囲に分布している (福田 1982)。米国では Golden rod、Yellow weed などと呼ばれ、その広大な自然のなかにあっては全体の中で良く調和しており、人々にも親しまれている草花となっている (福田ら 1971, 浅井 1993)。また、Alabama 地方では、本植物を Alabama 州の州花として土地の人から handsome flowers と称されている。日本と北アメリカ大陸の両方にわたって分布している植物は数多く存在するが、その中で、セイタカアワダチソウなどの *Solidago* 属植物は、北アメリカ大陸から人為的に日本へ渡来したものである (福田 1982)。

明治 30 年 (1897) に日本に導入されたとの記録があり (中川・榎本 1975)、また 1920 ~ 1930 年ごろに採集されたという記録が報告されていることから (市河

1989)、この頃既に野生化していたことが推察される (市河ら 1975, 北村 1976)。1955 (昭和 30 年) 年から 1965 年 (昭和 40 年) にかけて九州全域にわたり、筑豊などの炭鉱地方では炭坑の盛衰ともからんで、土地の人に別名を「閉山草」とも呼ばれてきた。

一般的な野生植物の分布拡大の進化速度は予想以上に緩慢で、自然界の微妙な環境条件の変化に対して慎重にその進化機構を適応させている。それに対して、セイタカアワダチソウは、急激な分布拡大をした。その原因については、原産地北アメリカと日本との気候の類似 (福田 1971)、種子や地下茎による強力な繁殖力 (榎本・中川 1977, 行永ら 1975)、乱開発による裸地の増大などその侵入を許容した都市環境 (猪谷・肱元 1978)、あるいは根茎からの他感物質といった点が考えられる (河津ら 1969)。

***Solidago* 属植物に関する研究**

Solidago 属は約 120 種からなり、キク科でも大きい属の 1 つである。Table 1 に *Solidago* 属植物の成分に関するデータを示した。*S. virgaurea* L. および *S. canadensis* には多種のサポニン類、*S. decurrens* L. にはカフェー酸誘導体類、*S. virgaurea* L. にはフラボノイド類、*S. chlensis* からはセスキテルペン類などが同定されている (Table 1 および Fig. 3)。

Solidago 属の多くは、多様な生理活性成分を含んでいることが知られており、古くから様々な民間薬として利用されてきた。*S. virgaurea* L. は利尿作用 (Guo 1992) や抗炎症作用があり、民間薬として伝統的に使用されている。EL (1992)

によって、ラットに *S. virgaurea* L.を投与することで浮腫が減少するという結果が示され、本植物体の抗炎症作用が認められた。また、Gross et al. (2002) は本植物の癌細胞抑制作用を報告している。*S. chilensis* はブラジルで一般的に薬用作用が認められ、エッセンシャルオイルとして使われているが、Vila et al. (2002) の臨床実験により、本植物の抗菌作用も確認された。その他にも *S. canadensis* 抽出物の酸化防止作用が緑茶、アスコルビン酸よりも高いことが認められた (Mc et al. 2002)。一方、*Solidago* 属のセイタカアワダチソウは今まで殆ど雑草として扱われ、本植物を機能性成分の供給素材として利用する研究は行われていない。

セイタカアワダチソウの成分に関する研究

セイタカアワダチソウは成長が非常に早く、その地下部から他感作用候補物質として、*cis*-dehydromatricaria ester (*cis*-DME) が単離、同定されている (Kobayashi et al. 1980, Bohlmann et al. 1973, Ichihara et al. 1978, Lam et al. 1992)。*Cis*-DME は、セイタカアワダチソウ自身の発芽を抑制し、また他植物種の生育を阻害することが確認され、植生遷移におけるセイタカアワダチソウの優占および衰退の要因のひとつであることが示唆された (Kobayashi 1973, Numata et al. 1973)。最近では、セイタカアワダチソウに含まれる *cis*-DME は、植物体内に高濃度で存在するにもかかわらず、植物体から土壤中へは微量にしか放出しないことが示唆されている (中村ら 1996)。また、Motoo et al. (1999) はセイタカアワダチソウの地下部から多くのポリアセチレン類およびジテルペン類を単離、同定した (Fig. 4)。一方、セイタカアワダチソウの葉の成分に関する研究は少ない。

Solidago 属の植物の多くは様々な機能性成分を含んでいることから、本植物体の機能性成分についても可能性が期待される。

セイタカアワダチソウの組織培養に関する研究

植物バイオテクノロジー分野において、植物機能をうまく使う技術として、組織培養と遺伝子導入があげられる。組織培養は、細胞の遺伝子自体（塩基配列）を能動的には変化させないが、光、温度また培地成分などの生育環境を自由に設定することにより、特に遺伝子のプロモーター領域に未知刺激（シグナル）を与え、結果として遺伝子の発現を制御することができる。それに対して、遺伝子導入は、目的とする遺伝子を新しく付与したり、また導入操作に伴う外来遺伝子の欠損などにより、新規目的形質をよりダイレクトに発現させることが可能である。今まで、キク科 (Flores et al.1988, 1993) およびキキョウ科 (Ishimaru et al. 1991, Tada et al. 1995, Yamanaka et al. 1996) の組織培養によりポリアセチレン類が生産された報告がある。Inoguchi ら (2003) は、*Agrobacterium rhizogenes* により、セイタカアワダチソウの毛状根培養系を確立し、毛状根から *cis*-DME を同定したが、本植物のその他の各種組織培養系における二次代謝成分の詳細な検討は行われていない。特に、組織培養系におけるポリアセチレン類以外の成分については、未知であるのが現状である。

ポリフェノールの効率的抽出法に関する最近の研究

最近、ポリフェノールがタンパク質と結合する性質を利用して、大豆タンパク質がポリフェノール抽出素材として活用される研究が行われている。石丸ら(2001)は、茶カテキン-大豆タンパク質複合体を調製することにより、茶エキスからカテキン類の効率的抽出に成功した。また、その複合体から茶カテキン類の回収にも成功した。また、アントシアニンを含有する野菜、果物および樹木類を材料として調製されるアントシアニン-大豆タンパク質複合体についても報告されている(黄ら 2004)。そこで、セイタカアワダチソウ成分の効率的抽出に関して、大豆タンパク質を利用する方法について検討した。

本研究では、以上に述べた背景の下に、セイタカアワダチソウについて、第2章では、本植物の葉におけるポリフェノール成分の分析およびその成分の季節変動および各器官(葉、茎、根および花)別の成分構成の比較について述べる。第3章では、各種組織培養系(茎葉、カルス、不定根および毛状根)を確立し、各環境条件(光照射およびアスコルビン酸添加)における、毛状根のポリフェノール生産に与える影響について述べる。第4章では、セイタカアワダチソウにおいて生産されるポリフェノール類の効率的抽出法について述べる。



Fig. 1. *S. altissima* L. plants grown in the field.

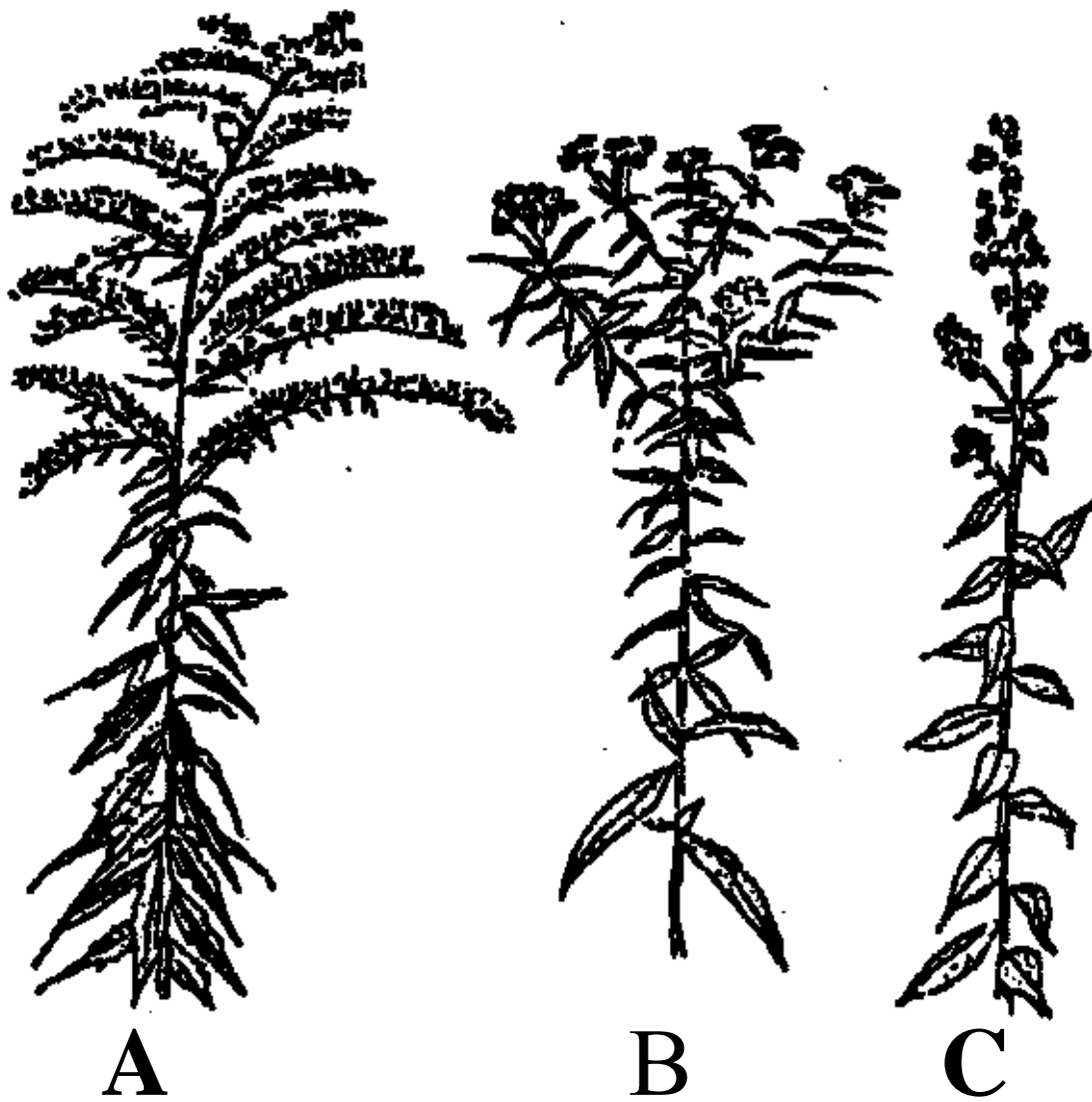


Fig. 2. Three groups of genus *Solidago*. (福田 1982)

Table 1. Chemical principles of genus *Solidago*. (Tao et al. 2006)

Chemical principle	Source	Reference
Leiocarposide	a ,b	Hiller et al. (1979)
2-Methoxybenzy-2,3,6-trimethoxybenzoate	a	Bohlmann et al. (1981)
β -sitosterol	a	Bohlmann et al. (1981)
3, 5-Dimethoxy-4-acetoxycinnamyl angelate	a	Bohlmann et al. (1981)
3-Methoxy-4-acetoxycinnamyl angelate	a	Bohlmann et al. (1981)
2-Methoxybenzyl-2,6-dimethoxybenzoate	a	Bohlmann et al. (1981)
Benzyl-2-hydroxy-6-methoxybenzoate	a	Bohlmann et al. (1981)
Methyl(2E,8Z)-decadien-4, 6-dienoate	a	Bohlmann et al. (1981)
Benzyl-2,6-dimethoxybenzoate	a	Bohlmann et al. (1981)
Methyl(2Z,8Z)-decadien-4, 6-dienoate	a	Bohlmann et al. (1981)
Caffeic acid	a	Bohlmann et al. (1981)
Chlorogenic acid	a,h	Liu et al. (2003)
α -pinene	b,c,f,h	Fujita et al. (1990)
β -myrcene	b,c,f,h	Xia et al. (1999)
Virgaureasaponin 3	b	Bader et al. (1992)
Quercetin-D-glucoside	b	Hiller et al. (1979)
Kaempferol-D-glucoside	b	Hiller et al. (1979)
Kaempferol-3-O-rutinoside	b,g	Hiller et al. (1979)
Limonene	b,c,j	Vila et al. (2001)
β -elemene	b,c	He et al. (1999)
δ -elemene	b,c	He et al. (1999)
Germacrene B	b,c	He et al. (1999)
Germacrene D	b,c	He et al. (1999)
δ -cadinene	a,b	He et al. (1999)
Oleanolic acid	b	Tamas et al. (1988)
Bayogenin	b	Tamas et al. (1988)
Virgaureoside A *	b	Hiller et al. (1985)
Solidagosaponins A *	b	Miyase et al. (1994)
Solidagosaponins B *	b	Miyase et al. (1994)
Solidagosaponins C *	b	Miyase et al. (1994)
Canadensissaponin A *	c	Reznicek et al. (1991)
Canadensissaponin B *	c	Reznicek et al. (1991)
Canadensissaponin C *	c	Reznicek et al. (1991)
Canadensissaponin D *	c	Reznicek et al. (1991)
Bayogeninsaponin A	c	Reznicek et al. (1992)
Bayogeninsaponin B	c	Reznicek et al. (1992)
Bayogeninsaponin C	c	Reznicek et al. (1992)
Bayogeninsaponin D	c	Reznicek et al. (1992)
3-Epi- α -cubebene	c	Kasali et al. (2002)
3-Epi- β -cubebene	c	Kasali et al. (2002)
3 β -(3R-acetoxyhexadecanoyloxy)-lup-20(29)-ene	c	Chaturvedula et al. (2004)
3 β -(3-ketohexadecanoyloxy)-lu-20(29)- ene	c	Chaturvedula et al. (2004)
3 β -(3R-acetoxyhexadecanoyloxy)-29-nor-luan-20-one	c	Chaturvedula et al. (2004)
3 β -(3-hetohexadecanoyloxy)-29-nor-lupan-20-one	c	Chaturvedula et al. (2004)

Chemical principle	Source	Reference
Elongatolide A *	d	Anthonsen et al. (1969)
Elongatolide B *	d	Anthonsen et al. (1969)
Elongatolide C *	d	Anthonsen et al. (1969)
Elongatolide D *	d	Anthonsen et al. (1969)
Elongatolide E *	d	Anthonsen et al. (1969)
Trans-clerodane A *	e	Michael et al. (1999)
Trans-clerodane B *	e	Michael et al. (1999)
Trans-clerodane C *	e	Michael et al. (1999)
Erythrodiol-3-acetate	g	Sung et al. (1999)
α -tocopherol-quinone	g	Sung et al. (1999)
Trans-phytol	g	Sung et al. (1999)
Ent-germacra-4(15),5,10(14)-trien- 1 α -ol	g	Choi et al. (2004)
β -amyrin acetate	g	Choi et al. (2004)
Methyl-3,5-di-O-caffeoyl quinate	g	Choi et al. (2004)
Ent-germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol	g	Choi et al. (2004)
β -dictyopterol	g	Choi et al. (2004)
3,5-Di-O-caffeoyl quinic acid	g	Choi et al. (2004)
Kaempferol	g	Kalembe et al. (2001)
Epi-torilenol	h	Kalembe et al. (2001)
Cis-eudesm-4(10)-en-1-one	h	Kalembe et al. (2001)
Quercetin-3-O- β -D-rutinoside(rutin)	b	Thiem et al. (2001)
Isoschaftoside	i	Thiem et al. (2001)
(+)-18-Tigloyxymannol *	k	Lu et al. (1995)
18-Hydroxyabieta-7,13(14)-diene *	k	Lu et al. (1995)
18-Tigloyoxyabieta-7,13(14)-diene *	k	Lu et al. (1995)
7-Hydroxy-13,15-dihydroxyabieta-8(14)-ene-18-oic acid *	k	Lu et al. (1995)
15-Hydroxydehydroabietic acid *	k	Lu et al. (1995)

a: *Solidago decurrens* L. ; b: *Solidago virgaurea* L. ; c: *Solidago canadensis*; d: *Solidago elongate* Nutt.; e: *Solidago arguta*; f: *Solidago odora* Ait.; g: *Solidago virga-aureavar gigantea*; h: *Solidago gigantea* Ait.; i: *Solidago graminifolia*; j: *Solidago chilensis*; k: *Solidago rugosa* .

*New compound

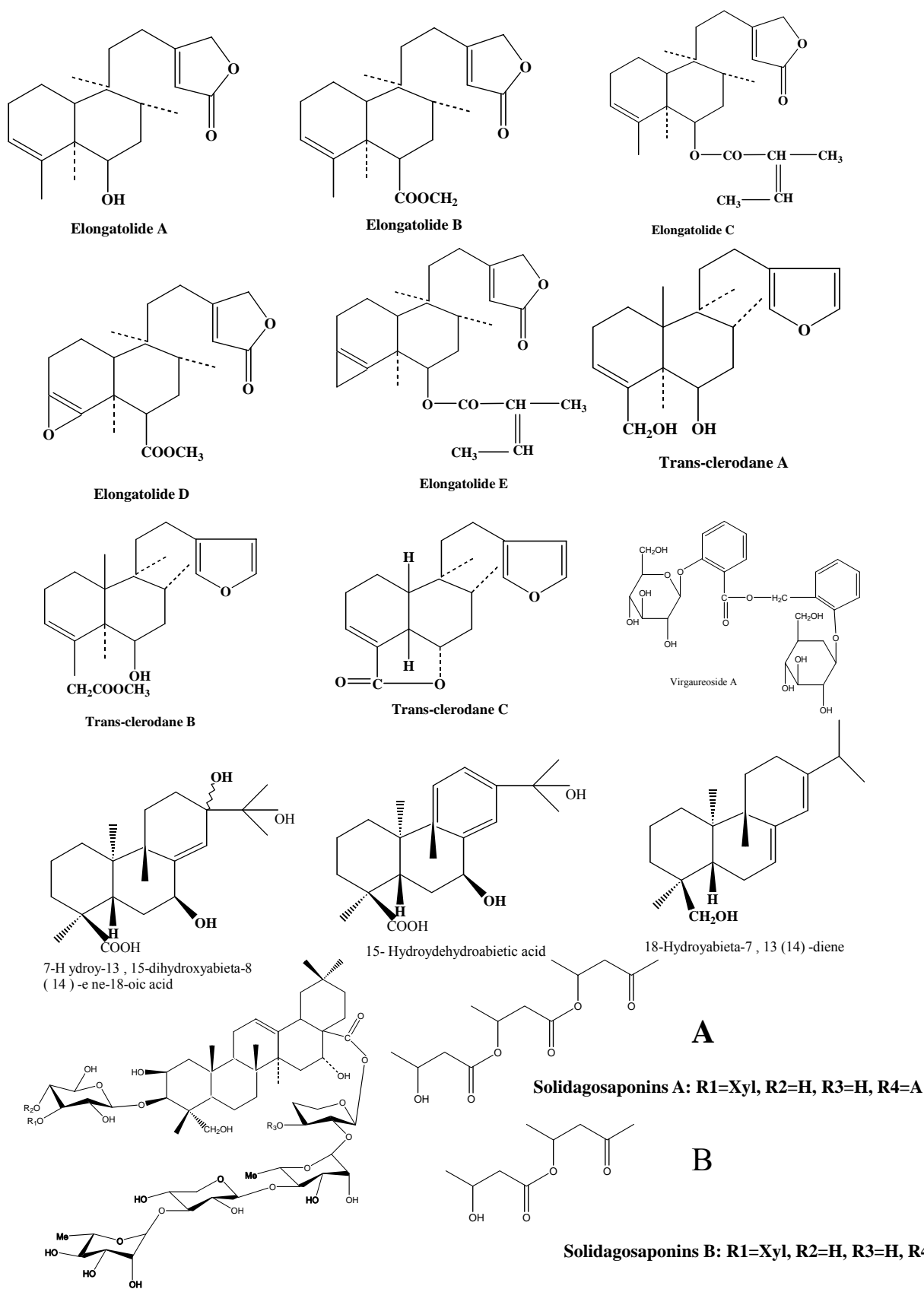
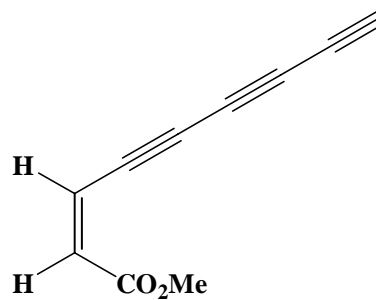
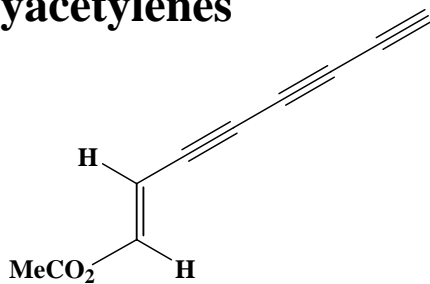


Fig. 3. New compounds of genus *Solidago*. (Tao et al. 2006)

Polyacetylenes



diterpenoids

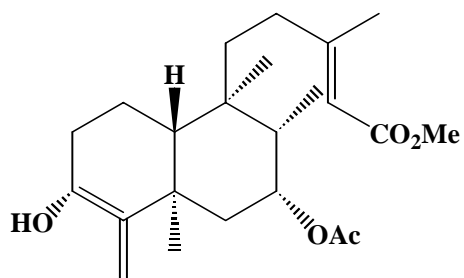
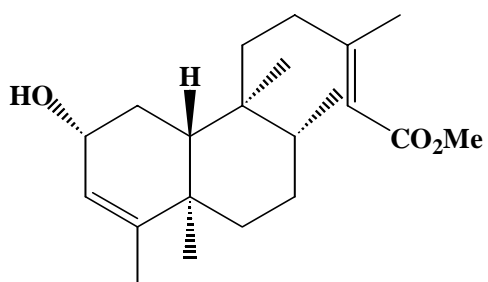
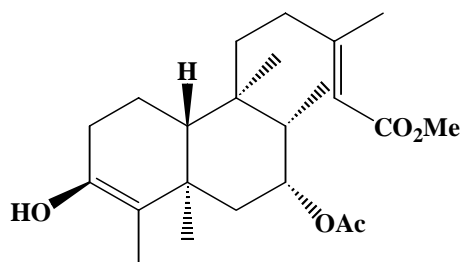
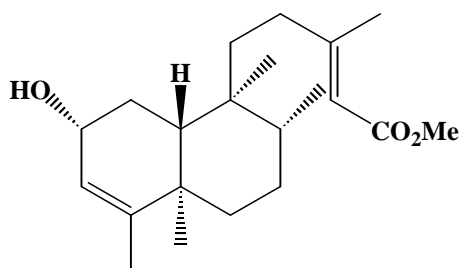
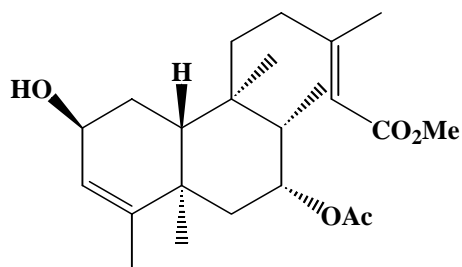
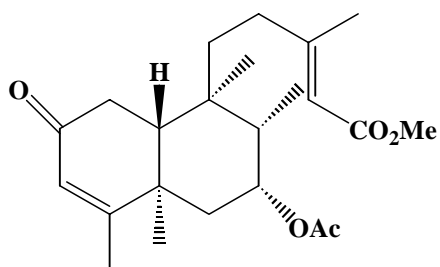


Fig. 4. Polyacetylenes and diterpenoids compounds from rhizomes of *S. altissima* L. (Motoo et al. 1999)

第2章 野生のセイタカアワダチソウ葉のポリフェノール成分 について

第1節 セイタカアワダチソウの葉の成分

2.1.1. 緒言

セイタカアワダチソウ (*Solidago altissima* L.) については、根の成分に関する研究は多く報告されているが、本植物の葉の成分に関しては、未知な部分が多い。このため、本植物は、現在殆ど雑草として扱われている。しかしながら、*Solidago* 属植物の多くは、多様な生理活性成分を含んでいることが知られており民間療法などに利用されてきた。また、最近の研究において多数のポリフェノール類を含む多様な新規化合物が認められた (Table 1)。そこで、セイタカアワダチソウについても新しい機能性素材としての利用を目的に、本植物の葉の二次代謝成分に関する化学的解析を行った。

2.1.2. 材料および方法

実験材料

本実験で用いるセイタカアワダチソウ葉は 2005 年 9 月佐賀大学構内で採取した。

二次代謝物の単離

セイトカアワダチソウの生鮮葉 (2 kg) をビーカーに入れ、60 % MeOH (5 L) を加えて 16 時間、室温下にて抽出した。得られた抽出エキ스는濾紙 (ADVANTEC 2) にて濾過した。残渣は再びビーカーに入れ、90 % MeOH (3 L) にて 16 時間、室温にて再度抽出し、抽出エキ스는同様に濾過した。得られた濾液を混合し、エバポレーターにて減圧濃縮したものを、DIAION HP-20ss カラムクロマトグラフィー (H₂O ~ MeOH) に付し、Fr. 1 から Fr. 3 を得た (Fr. 1、Fr. 2、および Fr. 3)。Fr. 1 を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (60 % MeOH) に付し、三つのフラクション (Fr. 1-1、Fr. 1-2 および Fr. 1-3) を得た。Fr. 1-1 を Preparative C₁₈ 125 (H₂O ~ MeOH)、DIAION HP-20ss カラムクロマトグラフィー (H₂O ~ MeOH)、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (60 % MeOH) に順次付すことにより Sa-6 (53 mg) および Sa-8 (3 mg) を単離した。Fr. 1-2 を Preparative C₁₈ 125 (H₂O ~ MeOH) に付し、二つのフラクション (Fr. 1-2-1 および Fr. 1-2-2) を得た。Fr. 1-2-1 を Sephadex LH-20 (60 % MeOH) および DIAION HP-20ss (H₂O ~ MeOH) カラムクロマトグラフィーに順次付すことにより精製し、Sa-4 (200 mg)、Sa-5 (75 mg) および Sa-7 (20 mg) を単離した。Fr. 1-2-2 を Sephadex LH-20 (60 % MeOH) カラムクロマトグラフィーに付すことにより Sa-9 (69 mg) を単離した。Fr. 1-3 は ODS-G3 カラムクロマトグラフィー (H₂O ~ MeOH) にて精製し、Sa-3 (3 mg) を得た。Fr. 2 は Sephadex LH-20 (60 % MeOH)、DIAION HP-20ss (H₂O ~ MeOH)、および Preparative C₁₈ 125 (H₂O ~ MeOH) カラムクロマトグラフィーに順次付すことにより Sa-1 (62 mg)

および Sa-10 (30 mg) を単離した。Fr. 3 は Preparative C₁₈ 125 (H₂O ~ MeOH)、Sephadex LH-20 (60 % MeOH) カラムクロマトグラフィーに付すことにより Sa-2 (30 mg) を得た。Fr. 4 は Sephadex LH-20 (60 % MeOH) カラムクロマトグラフィーに付すことにより 2 つのフラクション (Fr. 4-1 および Fr. 4-2) を得た。Fr. 4-2 は Fuji-gel (H₂O ~ MeOH) カラムクロマトグラフィーに付し、Fr. 4-2-1、Fr. 4-2-2 および Fr. 4-2-3 に分画した。Fr. 4-2-1 は DIAION HP-20ss (H₂O ~ MeOH)、Preparative C₁₈ 125 (H₂O ~ MeOH) カラムクロマトグラフィーに付すことにより Sa-11 (58 mg) を単離した (Fig. 5)。

TLC 分析

TLC 分析は、シリカゲルプレート (MERCK, シリカゲル 60 F₂₅₄) を用い、展開溶媒はベンゼン-ギ酸エチル-ギ酸の混合液 (1: 7: 1) を用いた。化合物の検出は、254 nm の紫外線の吸収、および、塩化第二鉄、アニスアルデヒド硫酸試薬等による発色により行った。

3.1.2. 結果および考察

既知化合物 (Sa-1 ~ Sa-9)

セイタカアワダチソウの新鮮葉から単離した 11 種の化合物のうち、Sa-1 から Sa-9 の化合物はそれぞれ、¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルデータを文献値と比較することにより、Sa-1 は caffeic acid (Flamini et al. 2001)、Sa-2 は chlorogenic acid (Cheminat et al. 1988, Lin et al. 1999)、Sa-3 は 3-*O*-caffeoylquinic acid (Nakatani

et al. 2000)、 Sa-4 は 4-*O*-caffeoylquinic acid (Nakatani et al. 2000)、 Sa-5 は 3-*O-p*-coumaroylquinic acid (Ossipov et al. 1996)、 Sa-6 は 4-*O-p*-coumaroylquinic acid (Whiting et al. 1975)、 Sa-7 は 3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid (Kwon et al. 2000)、 Sa-8 は 4, 5-dicaffeoylquinic acid (Lin et al. 1999)、 Sa-9 は *trans*-tiliroside (Budzianowski et al. 1995) と同定した (Fig. 6)。Chlorogenic acid は、多様な生理機能が報告されている。抗酸化活性、ラジカル消去活性の他にも抗変異原性 (Yamada et al. 1996, Yoshimoto et al. 2002)、染色体保護作用 (Adraham et al. 1993) 肝機能保護作用 (Basnet et al. 1996, Kapli et al. 1995)、抗ガン活性 (Huang et al. 1998, Mori et al. 1986, Tanaka et al. 2002)、メラニン形成阻害 (下園ら 1996)、抗菌活性 (Zhu et al. 2004) 等の生理機能を有することが確認されている。また、3,5-dicaffeoylquinic acid は発ガン抑制作用 (Kim et al. 2005)、抗エイズ作用 (W E et al. 1996, Brenda et al. 1998)、血糖上昇抑制効果 (Jiang et al. 2000) を有する物質として知られている。藤田ら (1998) また Murayama et al. (2002) は、caffeoyl 基の 2 個のフェノール性 OH 基が過酸化抑制に関与していることに着目し、カフェー酸誘導体類の脂質過酸化抑制機構を調べた結果、caffeoyl 基を 2 個有する 3,5-dicaffeoylquinic acid が caffeoyl 基 1 個の chlorogenic acid などより過酸化抑制効率が大きいことを明らかにしている。本実験で、セイタカアワダチソウから初めてカフェー酸誘導体類を単離したことは、本植物の機能性食品への応用の可能性を示唆するものである。

新規化合物 (Sa-10) の構造解析

新規化合物 Sa-10 は黄色無晶形粉末で、 m/z 727.2095 に $[M + H]^+$ イオンピークを示すことから、Sa-10 の分子式は $C_{32}H_{38}O_{19}$ と推察された。

Sa-10 の 1H -NMR スペクトル (Fig. 7) は、 δ 6.37 (H-6) および 6.69 (H-8) のシグナルにより、メタ-カップリング ($J=2.0$ Hz) した芳香環の存在を示し、また、 δ 6.87 (H-3', H-5') および 8.01 (H-2', H-6') ($J=8.9$ Hz) のシグナルにより、パラ置換した芳香環の存在が示唆された。また、 δ 4.35 (H-1''', $J=1.2$ Hz), δ 5.32 (H-1'', $J=7.3$ Hz) および δ 5.61 (H-1''''', $J=3.7$ Hz) のシグナルは、アノメリック水素と推測された。

^{13}C -NMR スペクトル (Table 2) は、炭素数 15 の aglycone ユニットおよび 3 つの糖の存在を示唆していた。Sa-10 のスペクトルデータは kaempferol trioside (El et al. 2001, El et al. 2002) に類似している化合物であった。さらに、 1H -NMR と ^{13}C -NMR のスペクトルデータから、Sa-10 は rutinose (Park et al. 1995, Zarzuelo et al. 1995, Ito et al. 2000) と apiofuranose (El et al. 2002) が結合している kaempferol 配糖体であると推察された。HMBC 相関関係 (Fig. 8)では、rhamnose の H-1''' と glucose の C-6'' に相関が有意に示されたことより rutinose の存在が示唆された。

Sa-10 は、 1H -NMR スペクトルにより、アノメリック水素シグナル δ 5.61 (H-1''''') の J 値 (3.7Hz) から *O*- β -D-apiofuranose 構造 (El et al. 2002) であることが示唆された。

また、HMBC スペクトルにおいて、apiofuranosyl の H-1''''と C-7 において相関があることから、結合していることが示唆された。 ^{13}C -NMR (Table 2) スペクトルデータにおいて、C-2 (δ 157.3) の値から、glucosyl C-1''が kaempferol の C-3

に結合していることが示唆された。

以上の結果から、Sa-10 は kaempferol 3-*O*-rutinoside 7-*O*- β -D-apiofuranoside (Fig. 10) と決定した。

新規化合物 (Sa-11) の構造解析

Sa-11 は m/z 357.1187 に $[M-H]^-$ イオンピークを示すことから、分子式は $C_{16}H_{22}O_9$ と推察された。

1H -NMR のスペクトル (Fig. 10-A および Table 3) において、芳香環のメタカップリングのシグナル (δ 5.95, 6.17, $J=2.4$ Hz) およびアノメリックのシグナル (δ 5.03, $J=7.9$ Hz) が観察された。

^{13}C -NMR のスペクトル (Fig. 10-B および Table 3) において、芳香環 (δ 95.4, 98.3, 106.8, 162.3, 165.9 および 167.6) の存在と glucose (δ 101.9, 74.8, 78.4, 71.2, 78.7 および 62.5) の存在が確認された。

1H - および ^{13}C -NMR のスペクトル (Fig. 10) により、芳香環の構造は、acylphloroglucinol (Huang et al. 2006, Wollenweber et al. 1998) ものと類似していることが示唆された。

また、 1H - と ^{13}C -NMR (Fig. 10) のスペクトルは、1 個のメチル基 (1H : δ 0.97, $J=7.3$ Hz, 3H; ^{13}C : δ 14.2) 2 個のメチレン (1H : δ 1.69, 3.13, m, 2H; ^{13}C : δ 19.2, 47.2) および 1 個の ケトン (^{13}C : δ 207.5) のシグナルが観察され、これらは化学シフトが butyryl 側鎖がついている aspidinol B (Wollenweber et al. 1998) のものとほとんど一致していた。したがって、Sa-11 は butyryl 側鎖がついている

acylphloroglucinol の配糖体であると推定された。また、butyryl 側鎖がある acylphloroglucinol の存在は COSY (Fig. 11) および HMBC (Fig. 12) のデータからも示唆された。また、Sa-11 の ^1H と ^{13}C -NMR スペクトルにおける、phloroglucinol 環の非対称的な化学シフトの存在は、糖が C-2 位置に結合していることを示している。そのことは HMBC スペクトル (Fig. 12) において、glucose の H-1"と C-2 に相関が認められることから示唆された。

^1H -NMR スペクトルにおけるアノメリック水素シグナルの J 値 (7.9 Hz) から、glucose の C-1"位の配位は、 β -結合していると決定した。以上の結果から、Sa-11 は 2, 4, 6-trihydroxy-1-butyrophenone 2-O- β -D-glucopyranoside (Fig. 13) と決定した。

Acylphloroglucinol はシダ植物に多く含まれていることが知られている。特に *Dryopteris* (Wollenweber et al. 1998, Ito et al. 1997, Ito et al. 2000) と *Diplazium* (Hori et al. 1990)、また、*Hypericum* (Gibbons et al. 2005, Shiu et al. 2006)、*Phyllanthus* (Zhang et al. 2002) および *Eucalyptus* (GhiSa. 1996) などの植物に見出されている。今回 butyryl 側鎖基の結合した acylphloroglucinol 配糖体がキク科植物から分離されたことは初めてであり、キク科に認められたことは非常に興味深い結果となった。

このようにフェノール配糖体が初めてセイタカアワダチソウの葉から単離された。Sa-10 および Sa-11 には抗酸化活性のような機能が期待され、セイタカアワダチソウの新しいポリフェノール資源としての可能性を示している。これらの成分に関する薬用作用が期待される。

2.1.4. 摘要

本実験で、セイタカアワダチソウの新鮮葉から新規化合物 2 種を含む、ポリフェノール類 11 種を同定した。カフェー酸誘導体類を 8 種 (caffeic acid、chlorogenic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O-p*-coumaroylquinic acid、4-*O-p*-coumaroylquinic acid、3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid および 4, 5-dicaffeoylquinic acid)、1 種のフェノール配糖体 (*trans*-tiliroside) と共に 2 種の新規化合物 (kaempferol 3-*O*-rutinoside 7-*O*- β -D-apiofuranoside および 2, 4, 6-trihydroxy-1-butyrophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside) を単離、構造決定した。

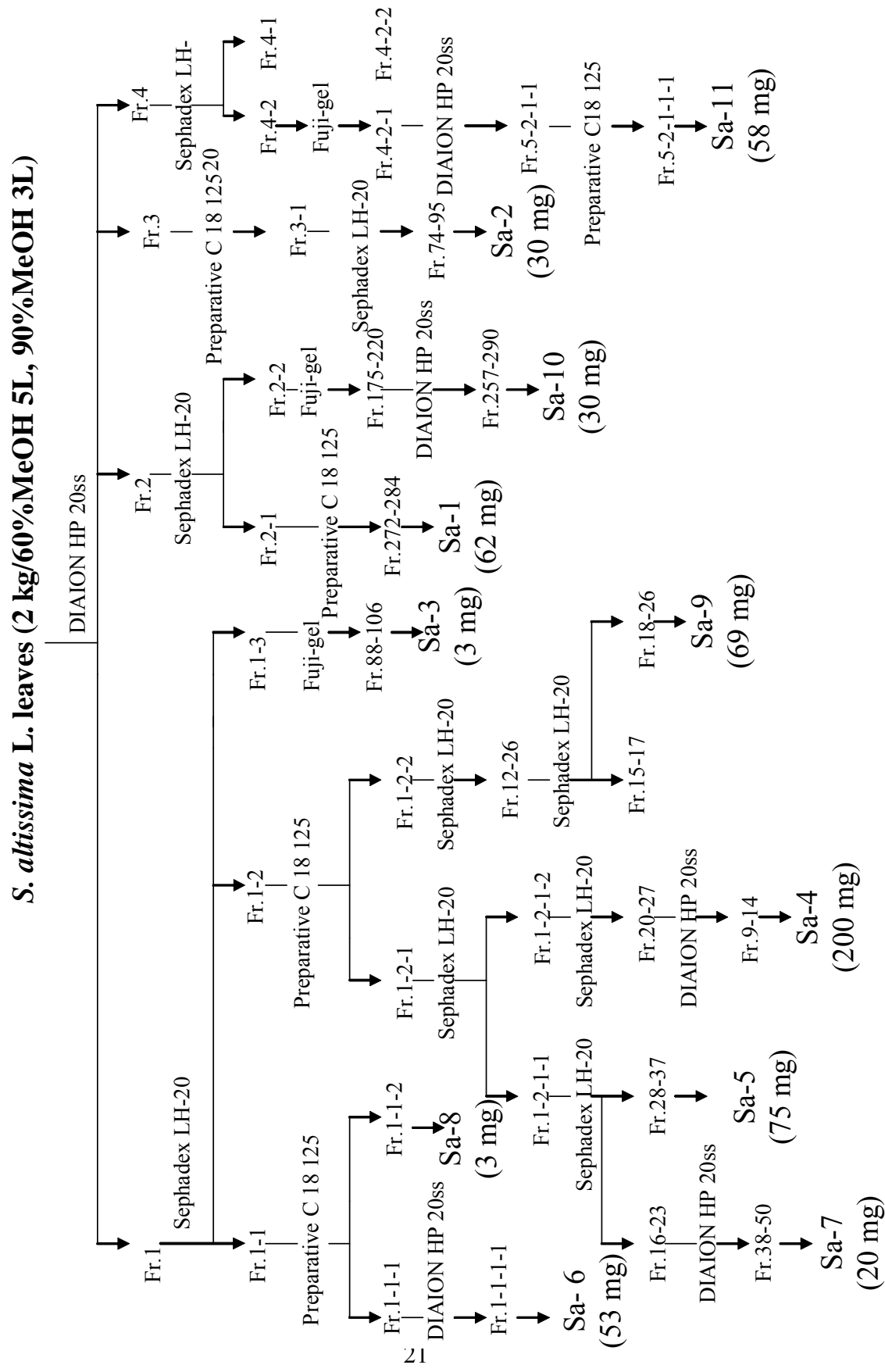
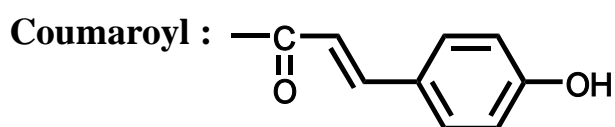
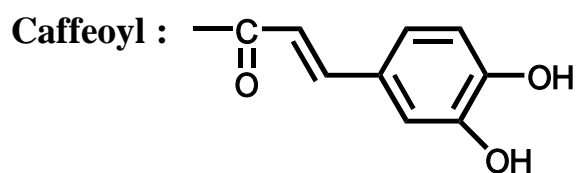
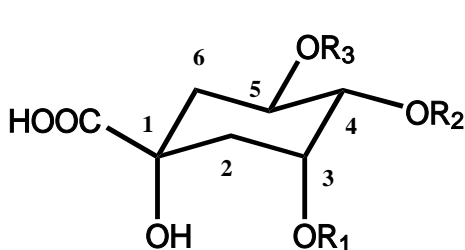


Fig. 5. Isolation of Sa-1 ~ Sa-11 from the leaves of *S. altissima* L.



Sa-3 : R_1 =Caffeoyl , R_2, R_3 =H

Sa-4: R₁, R₃=H, R₂=Caffeoyl

Sa-5: R₁=Coumaroyl , R₂, R₃=H

Sa-6 : R₁, R₃=H, R₂=Coumaroyl

Sa-7 : R₁, R₃=Caffeoyl, R₂=H

Sa-8: R₁=H, R₂, R₃=Caffeoyl

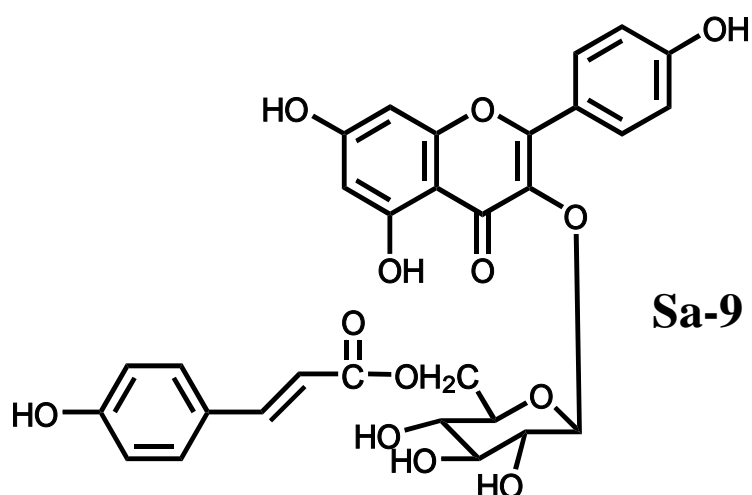


Fig. 6. Structures of Sa-1 ~ Sa-9.

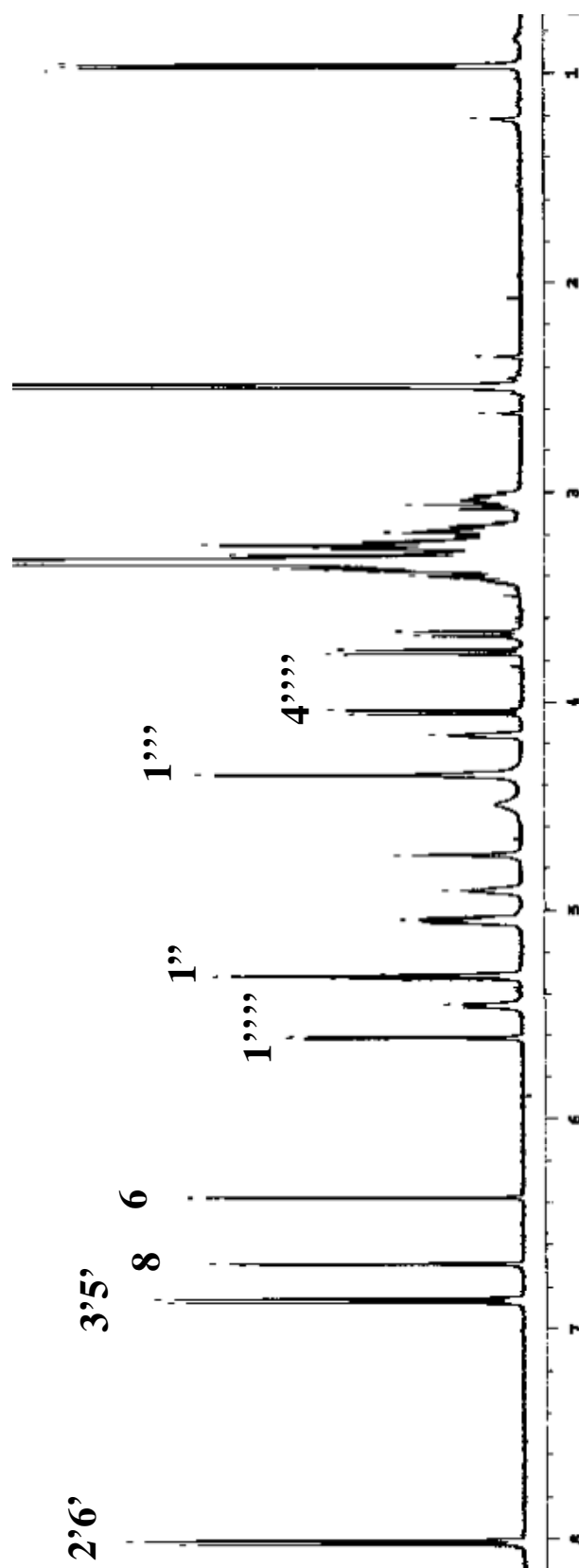


Fig. 7. ^1H -NMR spectral data of Sa-10.

Table 2. ^{13}C -NMR spectral data of Sa-10 (in DMSO- d_6).

Position	^{13}C (ppm)
<hr/>	
Aglycone	
2	157.3
3	133.6
4	177.6
5	160.9
6	99.4
7	162.6
8	94.6
9	156.1
10	105.6
1'	120.8
2'	131.1
3'	115.2
4'	160.2
5'	115.2
6'	131.1
Glucose	
1''	101.3
2''	74.2
3''	76.4
4''	70.1
5''	75.9
6''	67.0
Rhamnose	
1'''	100.8
2'''	70.6
3'''	70.4
4'''	71.9
5'''	68.3
6'''	17.8
Apiose	
1''''	107.2
2''''	76.2
3''''	78.8
4''''	74.7
5''''	62.0
<hr/>	

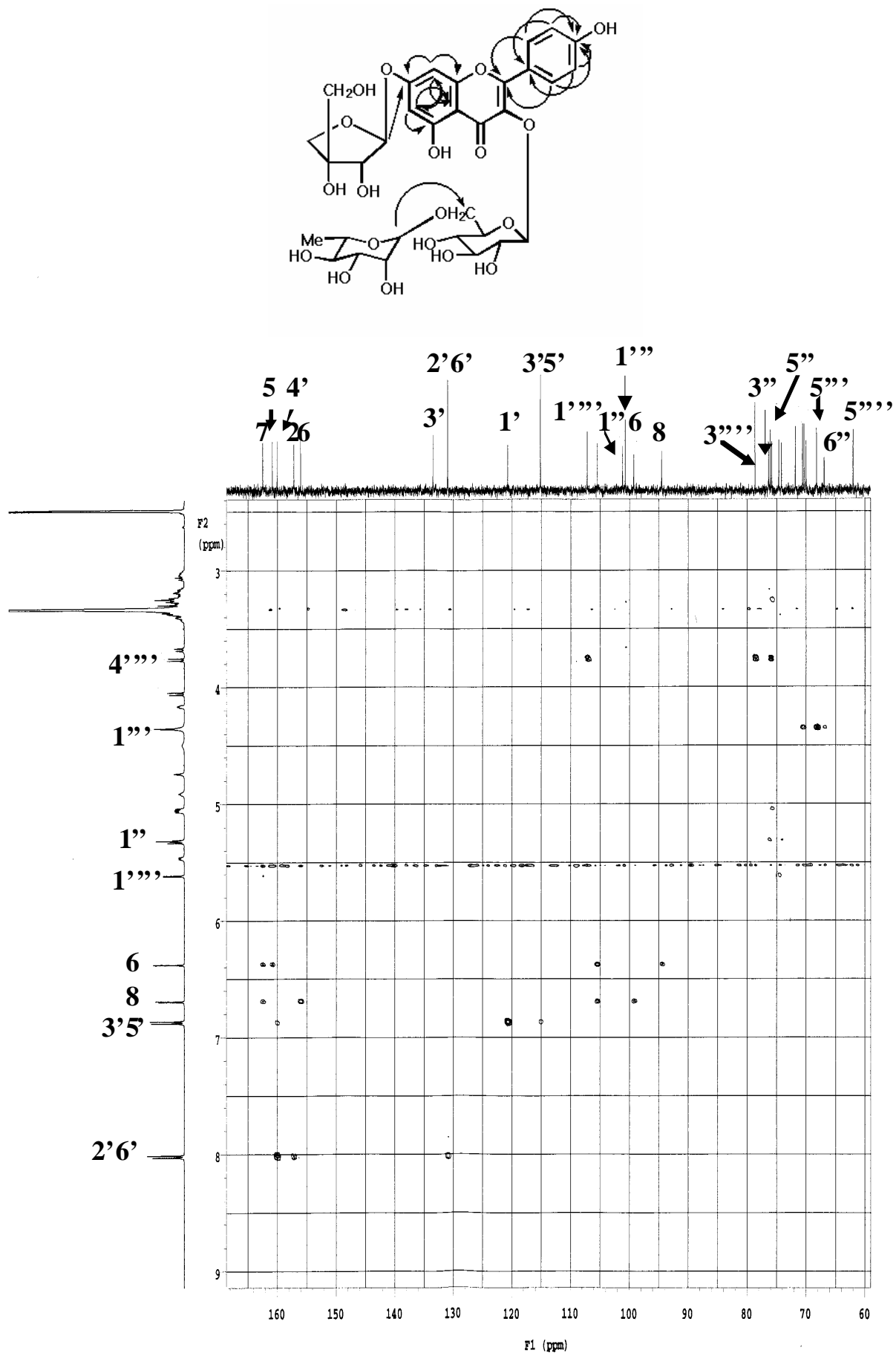


Fig. 8. The HMBC spectral data of Sa-10.

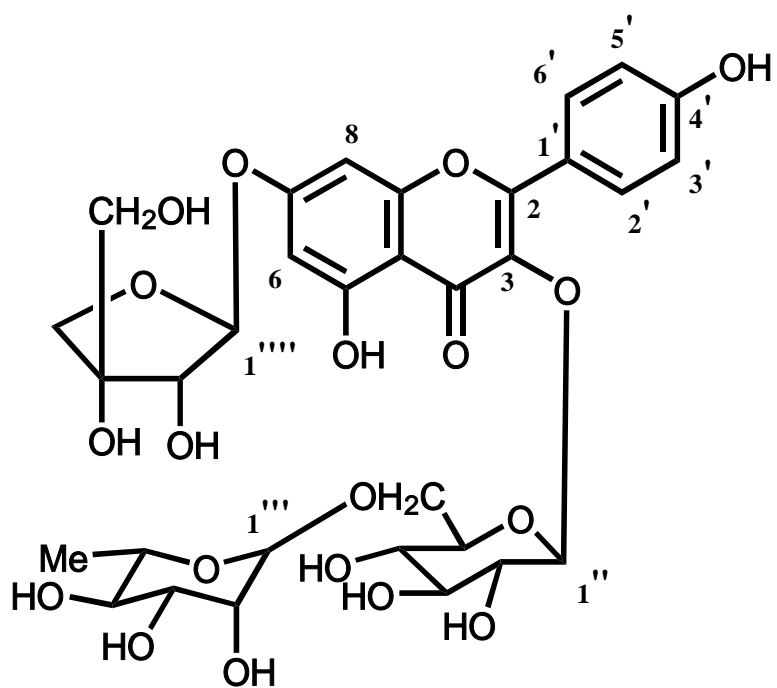


Fig. 9. Structure of Sa-10.

Table 3. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR ¹ spectral data of Sa-11. (in CD_3OD)

Position	δ_{C}	δ_{H}
1	106.8	-
2	162.3	-
3	95.4	6.17(1H, d, J=2.4 Hz)
4	165.9	-
5	98.3	5.95(1H, d, J=2.4 Hz)
6	167.6	-
Butyryl side chain		
1'	207.5	-
2'	47.2	3.13(2H, m)
3'	19.2	1.69(2H, m)
4'	14.2	0.97(3H, t, J=7.3 Hz)
Glucose		
1''	101.9	5.03(1H, d, J=7.9 Hz)
2''	74.8	3.53 (1H, t, J=7.9 Hz)
3''	78.4	3.47 (1H, t, J=7.9 Hz)
4''	71.2	3.40 (1H, t, J=7.9 Hz)
5''	78.7	3.45 (1H, m)
6''	62.5	3.72(1H, dd, J=12.0, 5.5 Hz) 3.91(1H, dd, J=12.0, 2.2 Hz)

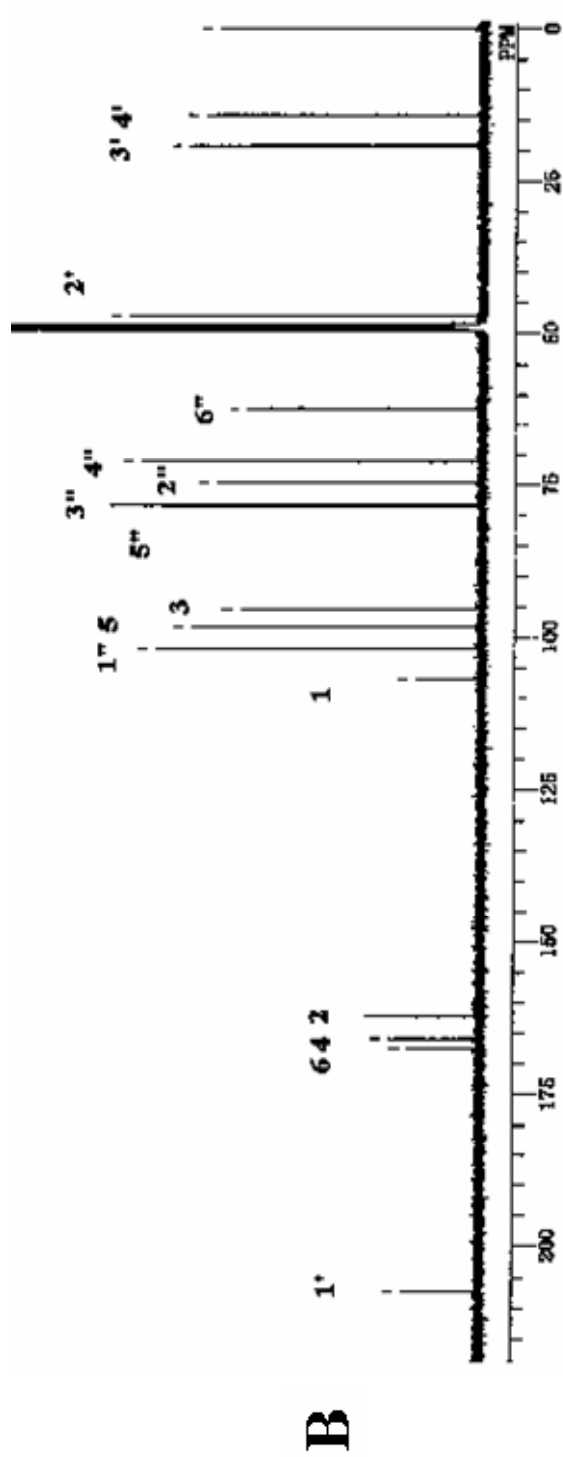
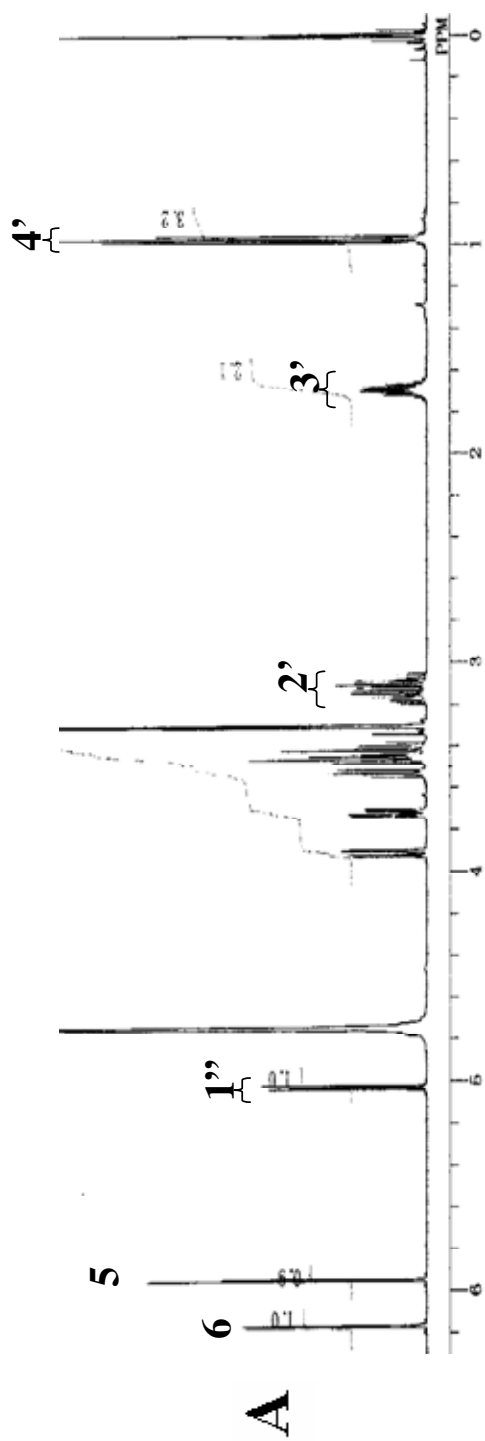


Fig. 10. ^1H -NMR (A) and ^{13}C -NMR (B) spectral data of Sa-11.

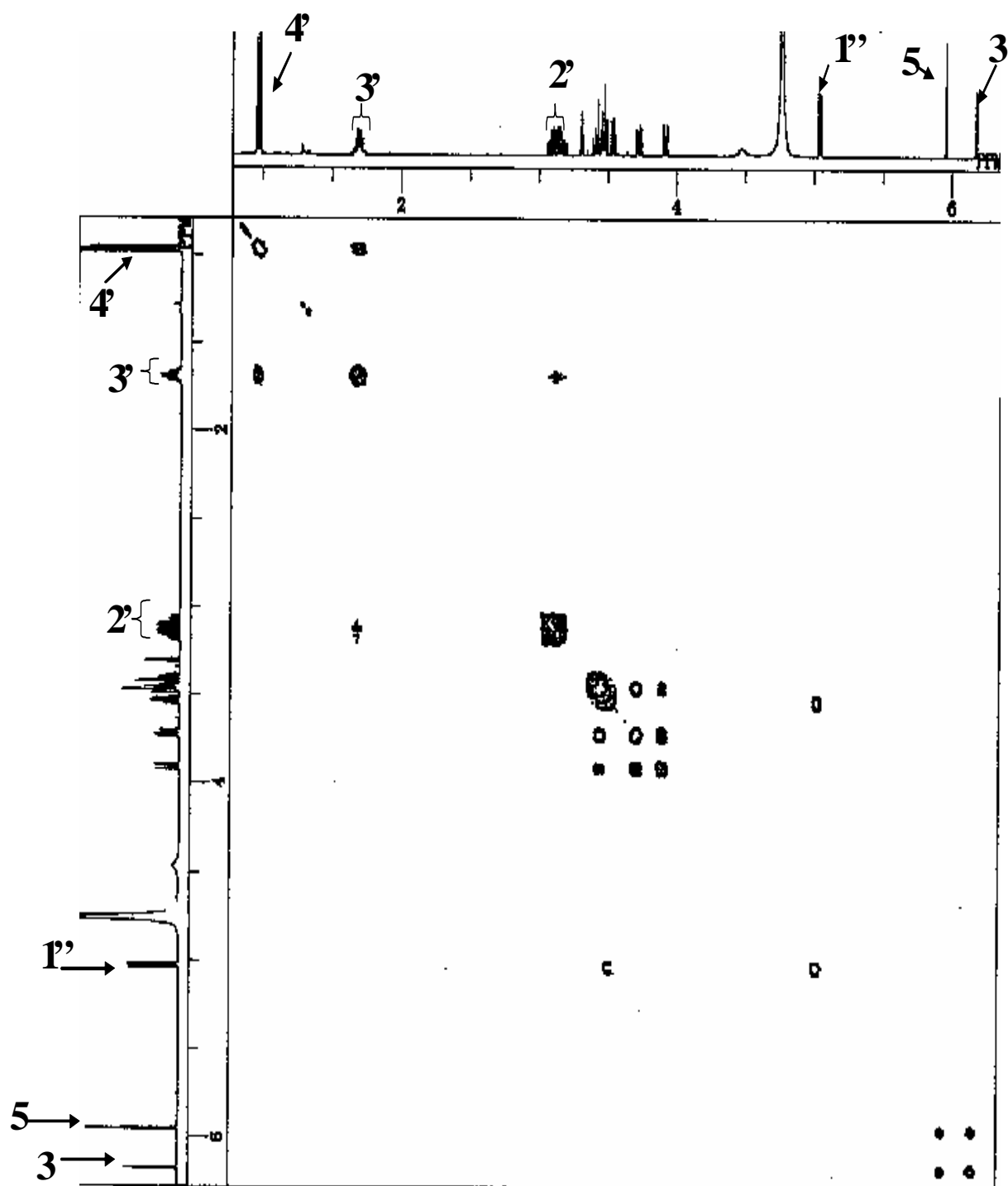


Fig. 11. The COSY spectrum data of Sa-11.

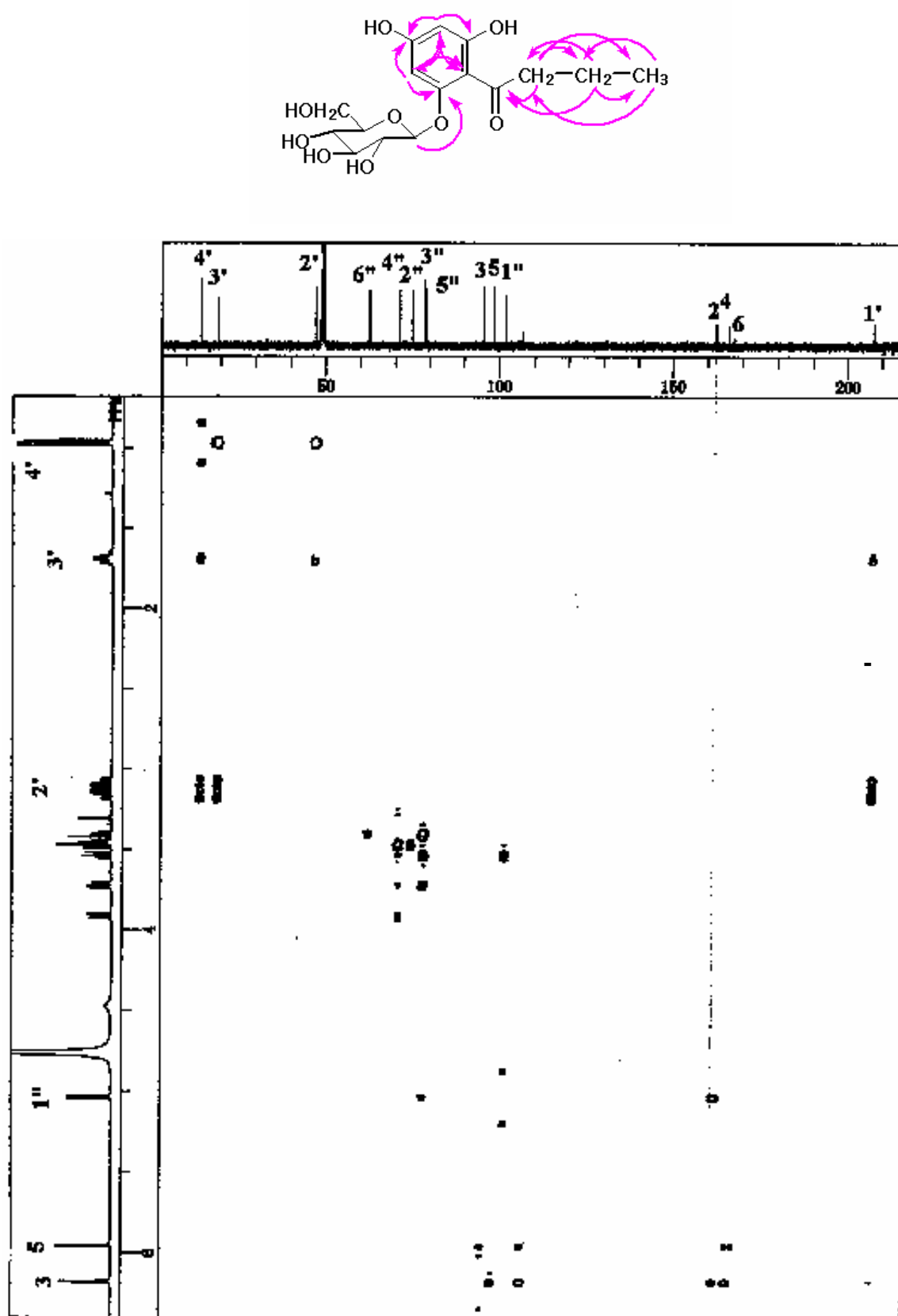


Fig. 12. The HMBC spectrum of Sa-11.

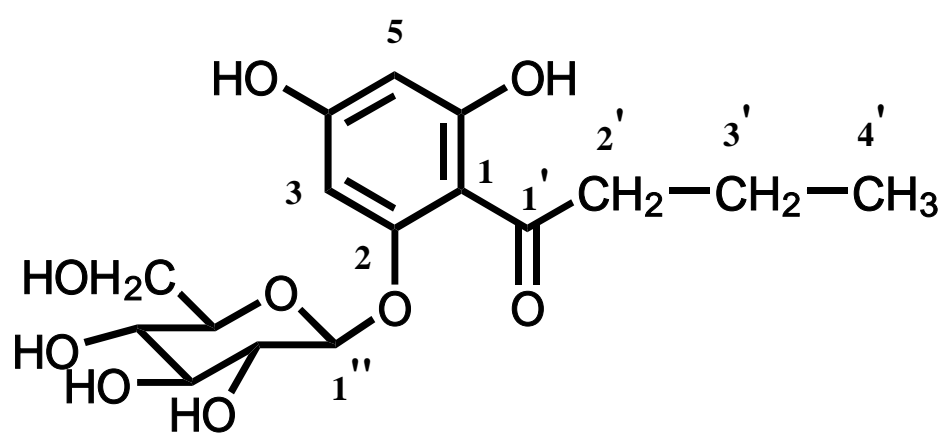


Fig. 13. Structure of Sa-11.

第2節 葉のポリフェノール類含量の季節変動

2.2.1. 緒言

近年では活性酸素が各種の疾病に関与していることが知られてきており、体内抗酸化物質 (Wang et al. 1999) としてのポリフェノールの効果が注目されている。また、これらのポリフェノール成分の生理機能に関する研究の進展により、抗血圧上昇作用 (Mishima et al. 2005)、精神安定作用 (Hiroji et al. 2004)、ラジカル捕捉活性 (Yoshimoto et al. 2004)、抗変異原活性 (Yoshimoto et al. 2002)、血糖値上昇抑制 (Xie et al. 2005)、尿酸量低下活性 (Nguyen et al. 2005)、抗菌作用 (堀ら 2006) など、様々な作用が認められている。

また、植物の多くは季節によりその成分含量が変わり、一般的にポリフェノール類は新葉に多く含まれているが、成長につれ、減少が認められる (Balsa et al. 1979, Forrest et al. 1969)。第1節では、野生のセイタカアワダチソウ新鮮葉からカフェー酸誘導体 (8 種) とフェノール配糖体 (3 種) のポリフェノール類の単離および構造決定について述べた。そこで、本節では、同定した多様なポリフェノール類含量の季節変動について述べる。これらポリフェノールのような機能性成分の季節変動を把握することにより、植物から有用成分を抽出するための適切な時期を明らかにすることもできる。

2.2.2. 材料および方法

研究試料

2007 年、3 月から 11 月にかけて、佐賀大学の構内に自生するセイタカアワダチソウ (3 個体) を毎月同じ場所で採集した。採集した植物の葉をすべて材料として供試した。

HPLC の分析

凍結乾燥した葉を、磨碎後 120 mg 秤量し、サンプル管に入れ、メタノール (10 ml) を加え、30 分間超音波処理し、成分を抽出した。そのメタノール抽出液を Millex LH フィルター (0.45 μ m) にて濾過し、25 倍に希釈した濾液を HPLC 分析用の試料とした。HPLC 条件として以下 2 法 (A および B) を用いた。

(分析法 A)

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm \times 250 mm)、カラム温度: 40 、移動相: A; 1 mM TBA (pH 2.9、酢酸にて調整)、B; CH₃CN、A: B = 1: 0 (0 min ~ 20 min) から 4: 1 (20 min ~ 35 min)、4: 1 から 1: 0 (45 min ~ 60 min)、流速: 1 ml/min、検出: 280 nm (UV)。溶出時間 (min): Sa-1 (16.56)、Sa-2 (15.60)、Sa-3 (17.03)、Sa-4 (16.10)、Sa-5 (16.07)、Sa-6 (19.97)、Sa-7 (26.30)、Sa-8 (28.98)、Sa-9 (20.90)、Sa-10 (40.67)、Sa-11 (25.23)。HPLC スペクトルを Fig. 14-A に示した。

(分析法 B)

カラム: Tskgel-ODS80Ts (4.6 mm \times 250 mm)、カラム温度: 40 、移動相: A; 1 mM TBA (pH 2.9、酢酸にて調整)、B; CH₃CN、A: B = 4: 1 から 1: 9 (35 min)、流速:

0.6 ml/min、検出: 280 nm (UV)、溶出時間 (min): Sa-1 (16.24)、Sa-2 (14.93)、Sa-3 (11.67)、Sa-4 (19.29)、Sa-5 (17.12)、Sa-6 (21.23)、Sa-7 (24.13)、Sa-8 (25.67)、Sa-9 (27.16)、Sa-10 (20.16)、Sa-11 (23.19)。HPLC スペクトルを Fig. 14-B に示した。

Sa-4 および Sa-5 は、分析法 A では分離しないので、分析法 B にて定量を行った。それ以外の化合物は、すべて分析法 A にて定量を行った。定量は、ピーク面積を用いた絶対検量線法により行い、各サンプルにつき 3 検体の平均値を求めた。なお、本実験で用いた水はすべてイオン交換水を用いた。

2.2.3. 結果および考察

セイタカアワダチソウ葉のポリフェノール類含量の季節変動

セイタカアワダチソウ葉に含まれるカフェー酸誘導体 (Sa-1 ~ Sa-8) およびフェノール配糖体類 (Sa-9 ~ Sa-11) の季節変動を Fig. 15-A および Fig. 15-B に示した。本植物葉の主成分は Sa-2 と Sa-7 であり、Sa-2 の含量は、3 月、4 月、5 月において、それぞれ 37.1 mg/g、34.3 mg/g、37.7 mg/g と高い値を示した。6 月は 16.2 mg/g と著しく低下し、5 月における含量と比較して半分以下に減少した。その後は、徐々に減少していく傾向を示した。それに対して、Sa-7 の 3 月における含量は Sa-2 と比較し、15.5 mg/g と低い値を示したが、5 月から 7 月にかけて増加する傾向が認められ、それぞれ 5 月は 26.7 mg/g、6 月は 19.3 mg/g、7 月は 24.5 mg/g であった。8 月においては、12.7 mg/g と 7 月のそれと比較して半減した。その後、Sa-7 の含量は徐々に減少していく傾向を示した。

このように春季の若い時期において、Sa-2 の含量が高く、成長期においては、

Sa-7 が増える理由としては、季節変動と植物体の成長に伴い、caffeoyl 基が Sa-2 のキナ酸に結合することが考えられる。

また、フェノール配糖体類 (Sa-9 ~ Sa-11) は Sa-2 および Sa-7 と比較すると含量が低く、春季である 3 月において、Sa-9 が 0.18 mg/g、Sa-10 が 0.02 mg/g、Sa-11 が 0.26 mg/g であった。これに対し 6 月においては、Sa-9 が 0.58 mg/g、Sa-10 が 0.74 mg/g、Sa-11 が 0.77 mg/g と最高値を示した。夏季である 7 月においては、Sa-9 および Sa-10 は急速に減少したが、Sa-11 は、7 月から 11 月にかけて徐々に減少する傾向が認められた。

1 個体あたりに含まれるポリフェノール類量の季節変動

セイタカアワダチソウの 1 個体あたりの葉に含まれるカフェー酸誘導体 (Sa-1 ~ Sa-8) およびフェノール配糖体類 (Sa-9 ~ Sa-11) の季節変動を Fig. 16-A および Fig. 16-B に示した。1 個体あたりに含まれる Sa-2 の量は、5 月において、最高値 (88.3 mg) が認められた。また、Sa-7 については、7 月において、最高値 (100.3 mg) が認められた。葉における Sa-7 の含量は、5 月で最高値 (Fig. 15) を示したのに対し、1 個体あたりに含まれる量は 7 月で最高値を示した。その理由としては、セイタカアワダチソウの生育が、5 月以降に急速に増加し、7 月が生育の最盛期であることが考えられる。他の成分に関しても、生育が良好な 7 月および 8 月において、1 個体あたりの量は高い値を示した。

1 個体あたりの葉に含まれるフェノール配糖体類 (Sa-9 ~ Sa-11) の量は Sa-2 および Sa-7 と比較すると著しく低い、Sa-9 および Sa-10 は 3 月から 6 月にか

けて、徐々に増加し、6月で最高値 (Sa-9: 1.4 mg および Sa-10: 1.8 mg) を示した後、7月から10月にかけて、徐々に低下した。また、Sa-11 は、7月 (2.9 mg) および8月 (2.4 mg) において、高い値を示し、9月以後は著しく減少した。

フェノール配糖体類の1個体あたりの量が7月および8月が高い値を示した要因としては、セイタカアワダチソウの生育がこの時期に良好であることが挙げられる。

セイタカアワダチソウは現在殆ど雑草として扱われているが、本実験の検討により、機能性成分としてポリフェノール類の資源植物としての可能性が示唆された。ポリフェノールの季節変動が明らかになったことより、その採集時期に関する有用なデータが得られた。

2.2.4. 摘要

今回同定したセイタカアワダチソウ葉のポリフェノール含量および1個体あたりの生産量に関する季節変動を調べた。セイタカアワダチソウの主成分はSa-2とSa-7であり、Sa-2の含量は春季において高い値を示したが、Sa-7の含量は夏季において高い値を示した。Sa-2は1個体あたりの量においては、5月で最高値を示し、Sa-7の1個体あたりの量においては、7月で最高値を示し、セイタカアワダチソウの成長に伴って、その含量の増加傾向が認められた。フェノール配糖体類は、含量は低いですが、1個体あたりの生産量は夏季で最高値を示した。

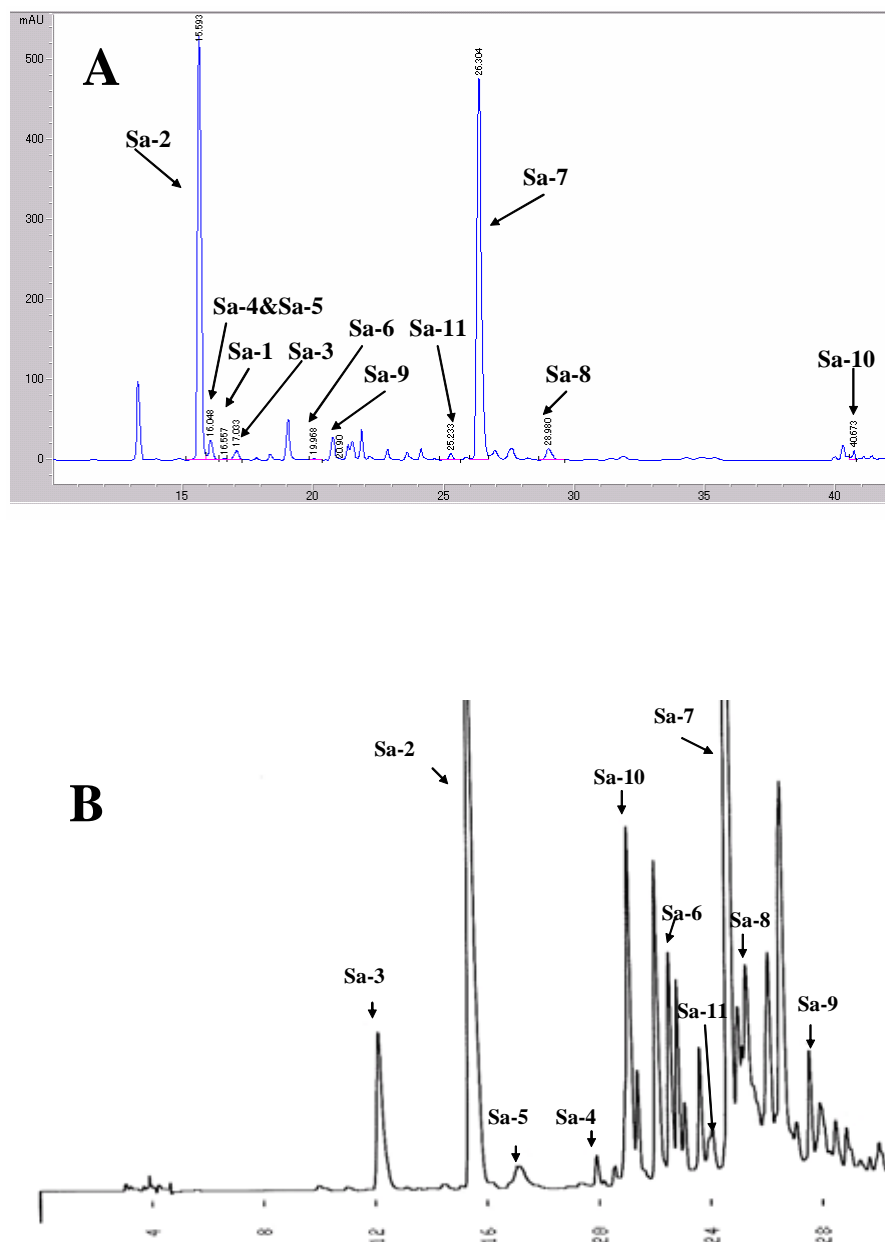


Fig. 14. HPLC chromatograms of MeOH extracts of
S. altissima L. (Jun. 2007)

A: method A

B: method

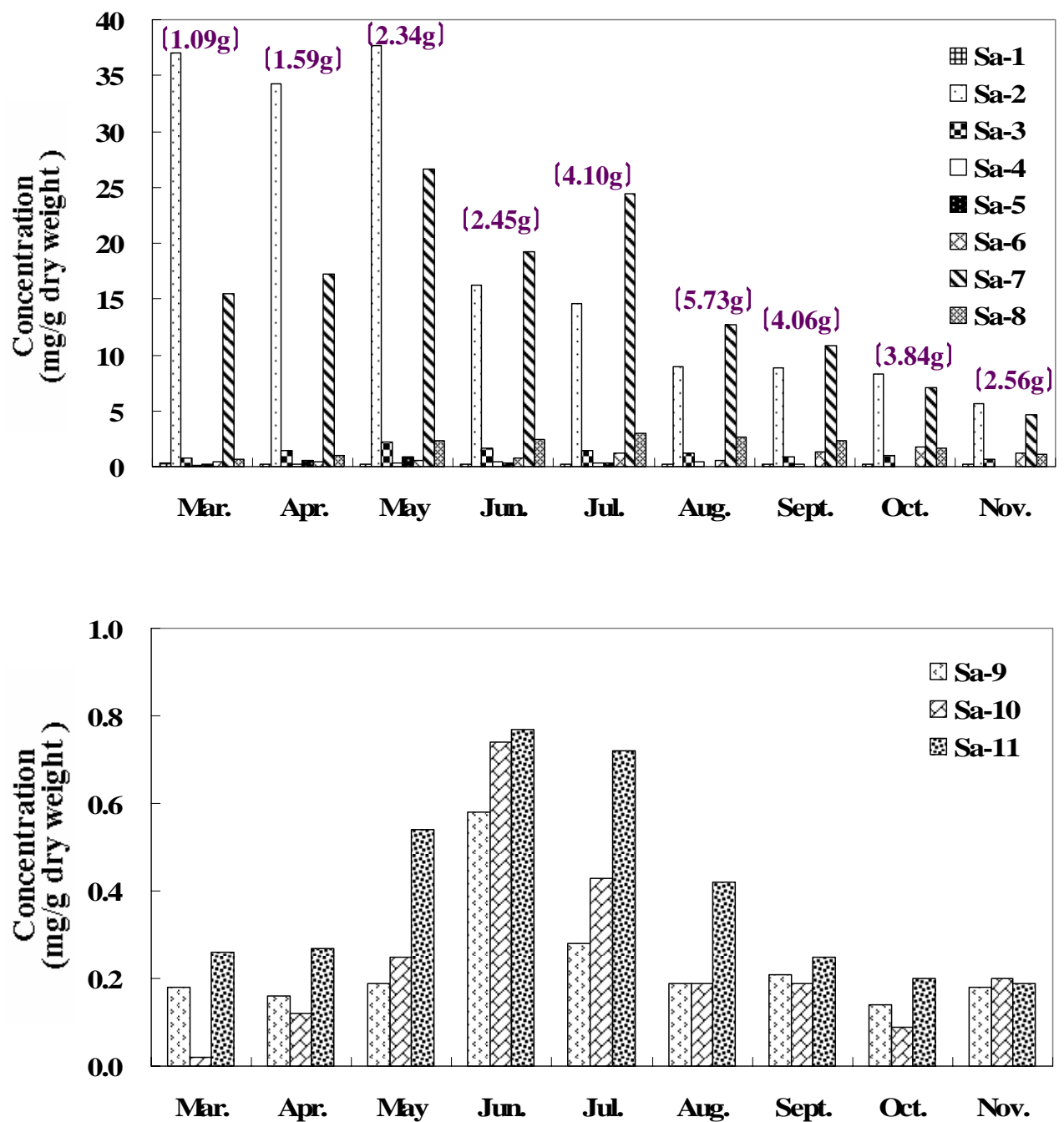


Fig. 15. Seasonal change (Mar. ~ Oct.) of polyphenols concentration in *S. altissima* L. leaves.

A : Sa-1 ~ Sa-8

B : Sa-9 ~ Sa-11

Values in the brackes show the dry weight (g/plant).

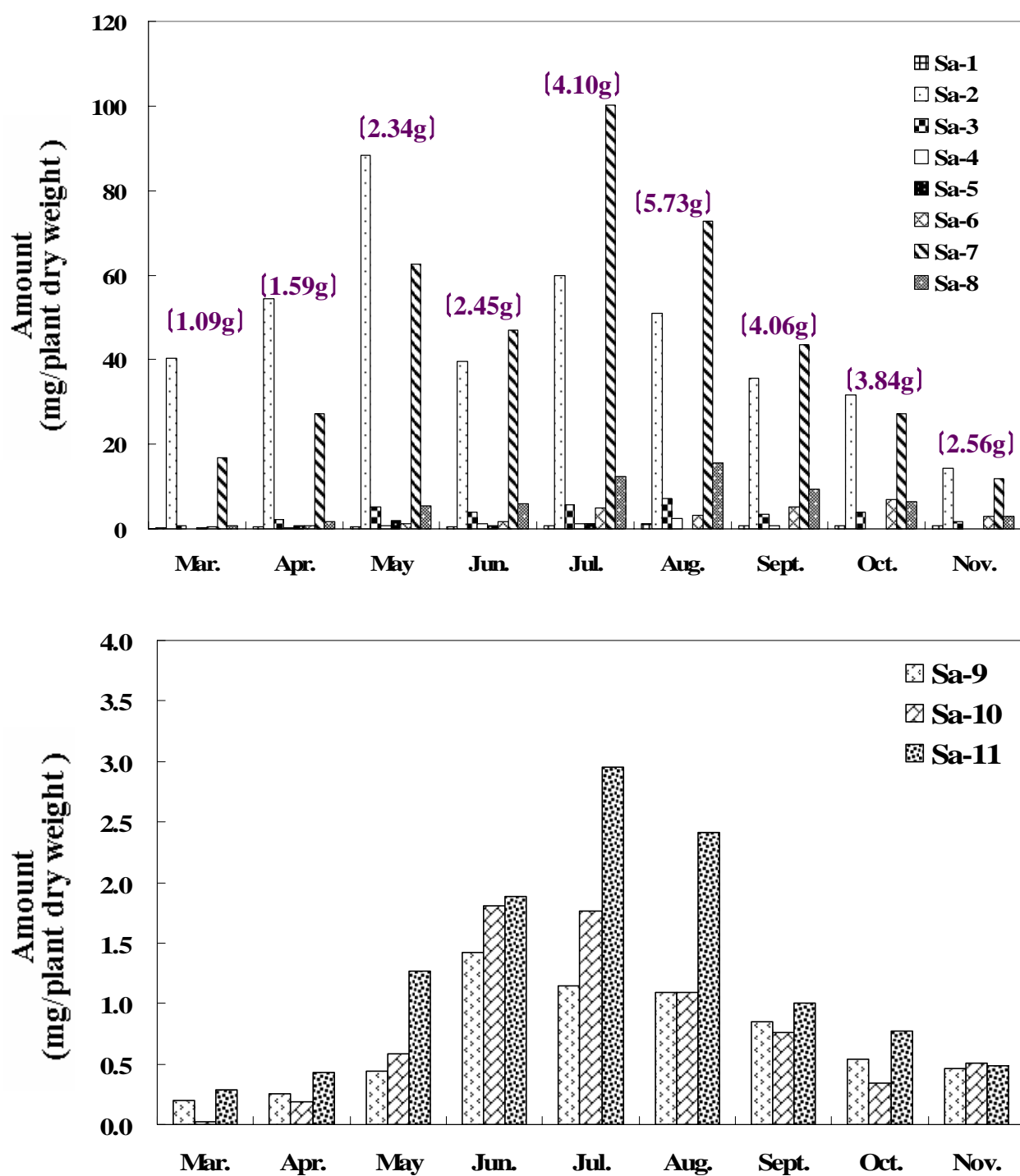


Fig. 16. Seasonal change (Mar. ~ Oct.) of polyphenols amount in *S. altissima* L. leaves.

A : Sa-1 ~ Sa-8

B : Sa-9 ~ Sa-11

Values in the brackes show the dry weight (g/flask).

第3節 各器官（葉、茎、根および花）別および葉の各着生部位別の

ポリフェノール類含量の比較

2.3.1. 緒言

Solidago 属植物の多くは、多種の機能性成分が含まれており、最近、Marie et al. (2008) は *S. canadensis* の花部から多くのポリフェノール類を単離した。また *S. canadensis* の花部をアメリカ原住民達が古くから鎮痛剤 (Rousseau 1945)、火傷および潰瘍治療 (Arnason et al. 1981) や解熱剤 (Smith 1933) として伝統的に使用している。セイトカアワダチソウは *S. canadensis* と同じグループ(Fig. 2)に属し、花部の機能性素材としての利用が期待される。そこで、本節では、セイトカアワダチソウの各器官（葉、茎、根および花）別のポリフェノール類含量を比較検討した。

また、前節で、セイトカアワダチソウ葉のポリフェノール類含量における季節変動について述べたが、葉の主成分 (Sa-2 および Sa-7) の含量は7月および8月において高含量を示したが、開花期の10月になると、著しい低下傾向が認められた。そこで、生育良好な8月と主成分が激減する10月における各着生部位（上部、中部および下部）別のポリフェノール類含量を比較検討した。

2.3.2. 材料および方法

各器官（根、茎、葉および花）の試料

2007 年 10 月、佐賀大学構内で植物体 3 本を採集し、根、茎、葉および花を切り分けた。茎および根については、切断後、凍結乾燥した。葉および花はそのまま凍結乾燥した。

着生部位別の葉の試料

2007 年 8 月および 10 月、佐賀大学構内で植物体を 3 本採集した。採集した植物体の地上茎部の長さは、8 月では平均 90 cm (± 5 cm)、10 月では平均 60 cm (± 5 cm) であった。各植物体の葉の着生部を上部、中部および下部に 3 等分 (8 月の検体は 30 cm ずつ、10 月の検体は 20 cm ずつ) した。上部から調製した葉を上部葉、中部から調製した葉を中部葉、下部から調製した葉を下部葉とし、それぞれ凍結乾燥を行った。

HPLC 分析

第 2 章第 2 節の 2.2.2.と同様の条件で行った。

2.3.3. 結果および考察

各器官のカフェー酸誘導体含量の比較

各器官 (根、茎、葉および花) 別のカフェー酸誘導体類 (Sa-1 ~ Sa-8) の含量およびフェノール配糖体類 (Sa-9 ~ Sa-11) の含量の比較を Fig. 17-A および Fig. 17-B に示した。今回調べる 4 つの器官 (根、茎、葉および花) の主成分においては Sa-2 および Sa-7 の含量は高く、Sa-2 の葉部における含量は 4.4 mg/g であり、

茎部における含量は葉部の含量より僅かに多い 5.9 mg/g であり、根部における含量は 2.6 mg/g であり、葉部の約半分であった。それに対して、花部においては、葉部における含量の 1.7 倍 (7.7 mg/g) が認められた。また、Sa-7 の含量は葉部において 5.2 mg/g、茎部および根部ではそれぞれ 2.7 mg/g、3.1 mg/g の値を示したが、花部においては、17.3 mg/g と他器官と比較して顕著に高く、葉部における含量の約 3.3 倍であった。他のカフェー酸誘導体類の含量は、Sa-2 および Sa-7 のそれと比較すると非常に低い値であった。

フェノール配糖体類 (Sa-9 ~ Sa-11) の含量は、Sa-2 および Sa-7 と比較すると低い値であったが、花部における Sa-9 の含量は 1.1 mg/g であり、葉部、茎部および根部よりも顕著に高い値を示した。植物の花部におけるポリフェノール含量は葉部より多いという報告が多い。栗の花部におけるポリフェノール含量は葉部の 3 倍 (Joao et al. 2008)、また、*Crataegus* のフラボノイド含量においても、花部は葉部のそれと比較して、高い含量が認められている (Wieland et al. 2008)。今回分析した各器官の成分含量においても、類似した傾向を示した。これらの結果からセイタカアワダチソウの花部は、カフェー酸誘導体である Sa-2 および Sa-7、またフェノール誘導体である Sa-9 および Sa-11 の高含量素材であることが明らかになった。本植物と同じグループに属している *S. canadensis* はその花部をアメリカ原住民達が民間薬として伝統に使用しているので、セイタカアワダチソウの花部もその機能性素材として利用の可能性が考えられる。

葉の着生部位別のポリフェノール含量の比較

8月に採集した植物体の葉の各着生部位（上部、中部、下部）別のカフェー酸誘導体類（Sa-1～Sa-8）およびフェノール配糖体類（Sa-9～Sa-11）の比較を Fig. 18-A および Fig. 18-B に示した。

葉の主成分の一つである Sa-2 の含量は上部葉で 9.5 mg/g、中部葉で 8.9 mg/g また、下部葉で 8.3 mg/g であり、着生部位による大きな差が認められなかった。それに対して、もう一つの主成分である Sa-7 の含量については、上部葉（16.2 mg/g）、中部葉（11.6 mg/g）、また下部葉（8.5 mg/g）と下部に向かうに従って減少傾向が認められたが、Sa-2 と比較すると高含量であった。他のカフェー酸誘導体類は上部葉、中部葉および下部葉における含量は大差が認められなかった。

一方、フェノール配糖体類の含量は Sa-2 と Sa-7 のそれと比較して著しく低い値を示した。これらの含量は上部、中部、下部の順で減少傾向が認められた。本植物の上部葉におけるポリフェノールの生産が示唆された。

10月に採集した植物体の葉の各着生部位（上部、中部、下部）別のカフェー酸誘導体類（Sa-1～Sa-8）およびフェノール配糖体類（Sa-9～Sa-11）の比較を Fig. 19-A および Fig. 19-B に示した。10月における葉の着生部位（上部、中部、下部）別のカフェー酸誘導体類の含量は 8月のそれと類似したパターンであり、Sa-2 の含量は上部葉（10.2 mg/g）で最も高く、また、Sa-7 も上部葉（9.7 mg/g）で最高値を示した。

フェノール配糖体類についても 8月のそれと同様に上部葉において高含量が認められた。葉におけるこれらポリフェノール含量について、8月から10月にかけて全体的に減少しているが、着生部位別の含量パターンが類似していた。

2.3.4. 摘要

開花期（10 月）の各器官（葉、茎、根および花）別のポリフェノール含量を調べた。Sa-2 の含量に関しては、葉部と茎部においては、大きな差は認められなかったが、花部においては、葉部の約 2 倍の含量を示した。Sa-7 に関しては、花部における含量が葉のその約 3 倍の高含量を示した。フェノール配糖体類に関しても花部に多く含まれることが確認された。特に Sa-9 の花部における含量は葉のその約 9 倍の値を示した。8 月と 10 月の葉の着生部位（上部、中部および下部）別のポリフェノール含量について調査したところ、両方とも上部葉において、ポリフェノール含量が高い傾向が認められた。

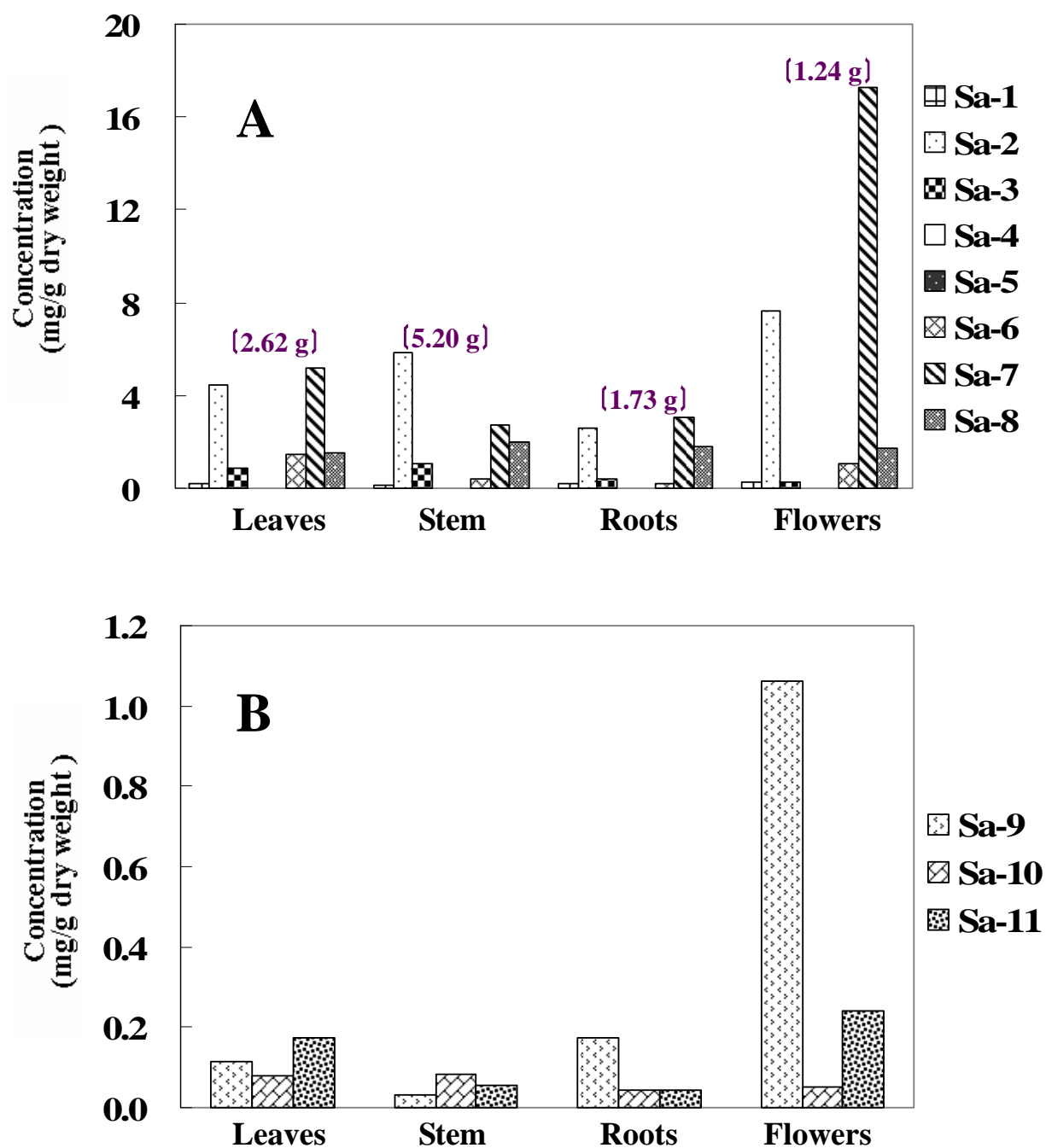


Fig. 17. Polyphenols concentration in various tissues of *S. altissima* L. *in vivo* plants in October.

A : Sa-1 ~ Sa-8

B : Sa-9 ~ Sa-11

Values in the brackes show the dry weight (g/flask).

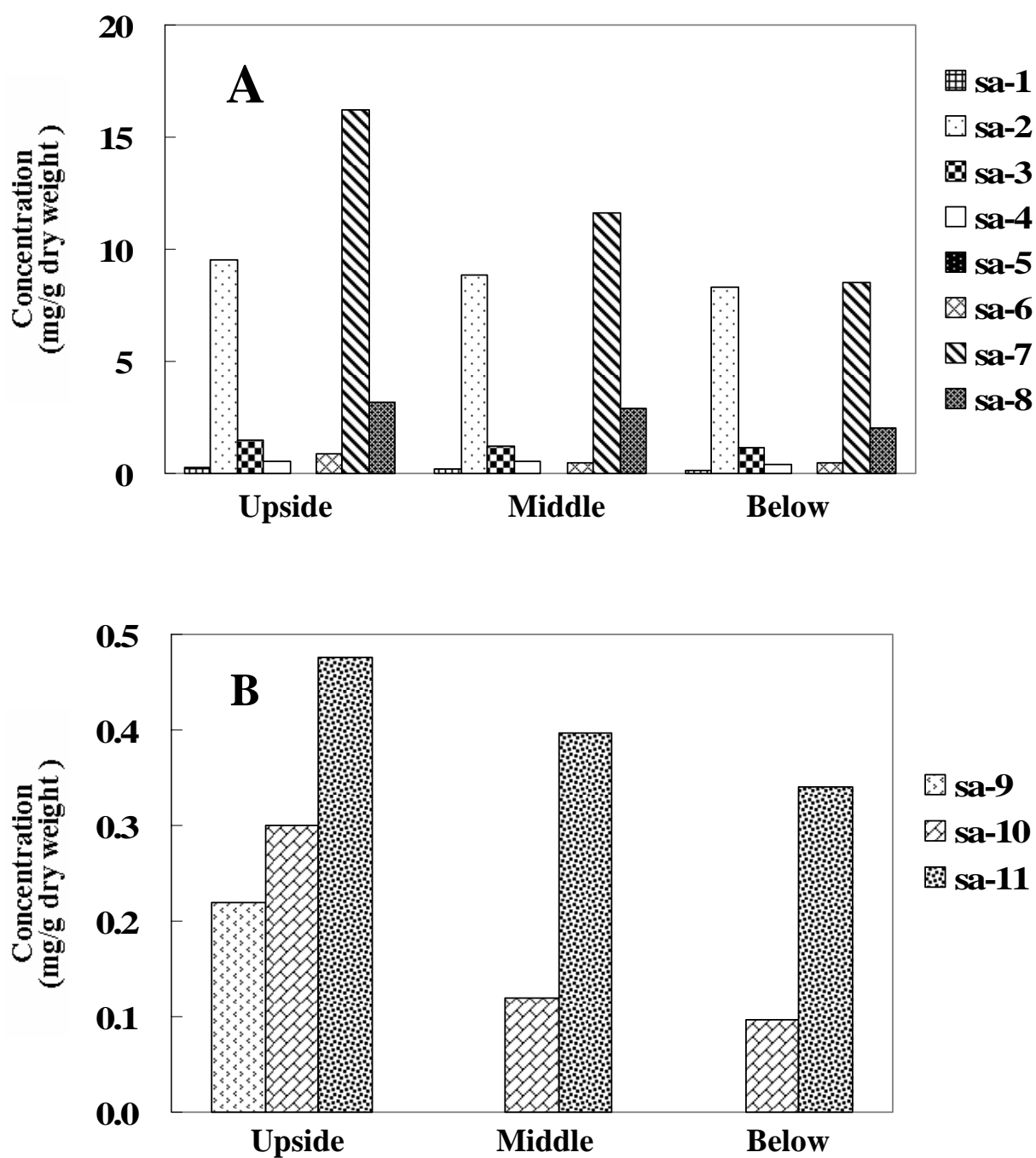


Fig. 18. Polyphenols concentration in *S. altissima* L. leaves (upside, middle and below position) harvested in August.

A : Sa-1 ~ Sa-8

B : Sa-9 ~ Sa-11

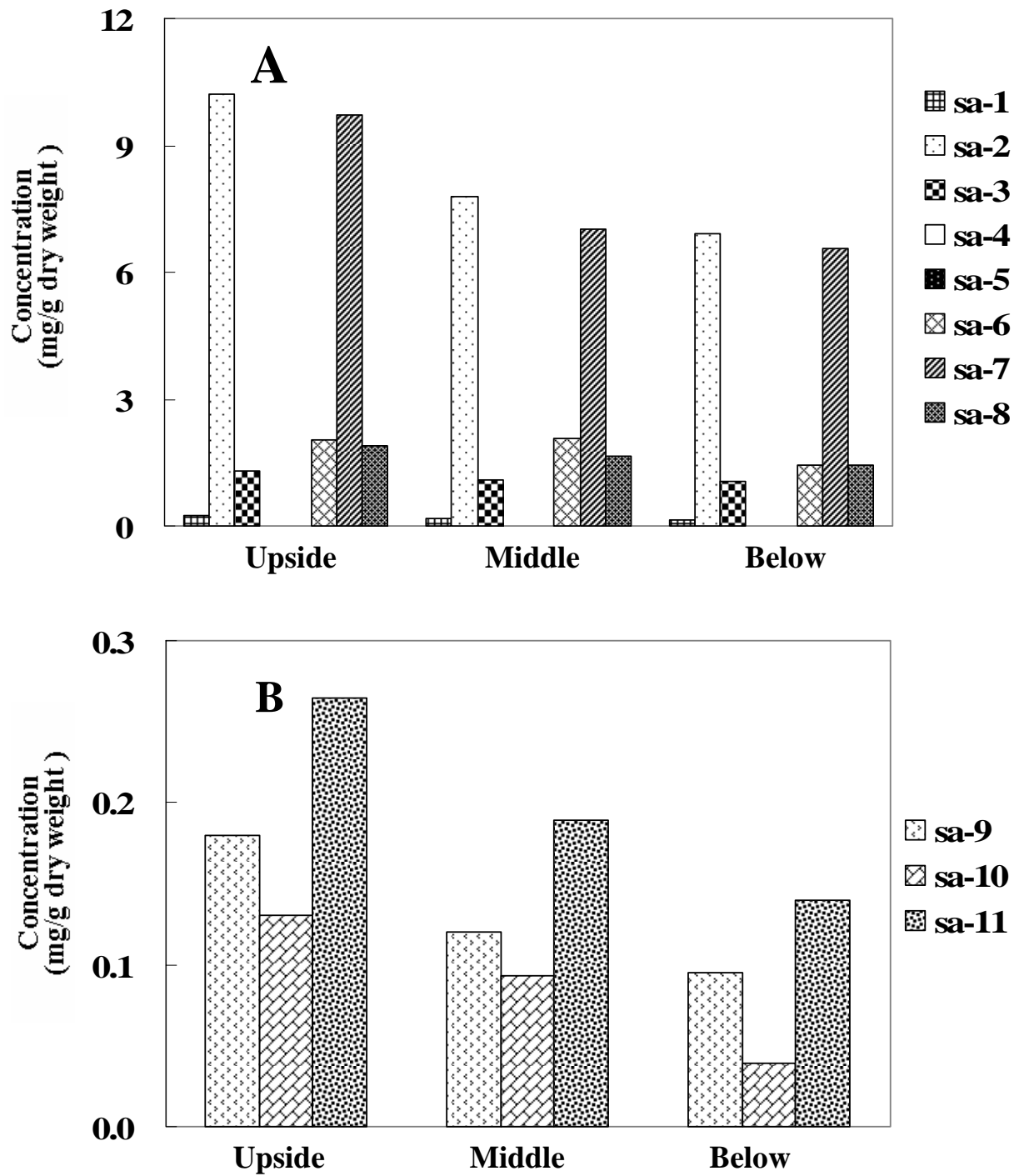


Fig. 19. Polyphenols concentration in *S. altissima* L. leaves (upside, middle and below position) harvested it in October.

A : Sa-1 ~ Sa-8

B : Sa-9 ~ Sa-11

第3章 セイタカアワダチソウの各組織培養系の確立および

ポリフェノール生産

第1節 セイタカアワダチソウの各組織培養系の確立

3.1.1. 緒言

植物を機能性食品や医薬素材として利用する理由の一つとして、その植物が生産する有用二次代謝成分が挙げられる。植物二次代謝物質の中でも特にポリフェノール類は、強い抗酸化活性を示すことから、活性酸素に起因する癌、動脈硬化、糖尿病などさまざまな慢性疾患に対する予防効果が期待される。

一般に、植物から二次代謝産物の供給は、栽培や野生株の採取により行われることから、季節、場所、栽培条件、採集する植物体の部位違いによってその生産性と含有量は均一ではない場合が多い。また、植物の二次代謝産物は、構造が複雑で人工合成による工業化が困難または不可能なものも多い。一方、植物組織培養技術は、分化した植物の一部の組織や細胞を無菌的に試験管内などで培養増殖させる技術であり、これら有用物質の生産に適している。この技術は 1) 地域、季節および天候の制約を受けることが無く、一定環境下での細胞の増殖と供給ができる。2) 細胞の大量培養が可能であるため、大量の有用物質を生産できる。3) 薬用植物は生育の遅いものも多いが、培養細胞の生育速度は比較的速く、その生産効率も高い。4) 環境の制御が可能なので、代謝を調節し、

選択的に特定の二次代謝産物を蓄積できるため、生産性の向上も可能であるといった利点がある。これらの利点を積極的に活用して、植物組織・細胞培養技術により、生理活性作用の高いポリフェノール類をセイタカアワダチソウの各培養組織から効率的に生産する方法について調査した。本節では、セイタカアワダチソウの茎葉培養系、カルス培養系、不定根培養系および毛状根培養系の確立およびそれら各種培養系におけるポリフェノール生産量について述べる。

3.1.2 材料および方法

無菌植物体培養系の作出

2004 年 5 月、佐賀大学構内に自生するセイタカアワダチソウの茎葉部 (約 1 cm) を切り取り、3 % NaOCl 水溶液にて殺菌 (10 min) 後、1/2 MS 固型培地上 (Murashige et al. 1962) に無菌的に移植した。25℃、照明下 (約 3000 lux、16 時間/日) にて培養することにより、茎葉培養系を確立した。茎葉培養体は、上記条件下にて、2 ヶ月ごとに継代培養した。

不定根培養系の作出

無菌植物体の葉切片を、1 mg/L IAA 添加 1/2 MS 固型培地上に置床し、暗所にて 2 ヶ月間培養することにより、不定根を誘導した。不定根は 1 mg/L IBA 添加 1/2 MS 液体培地に移植し、25℃、暗所にて旋回培養 (90 rpm) を行い、2 ヶ月ごとに継代した。

毛状根培養系の作出

無菌植物体の茎切片に、予め YEB 固型培地 (Vervliet et al. 1975) 上にて継代培養した *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724 菌を塗布することにより、感染処理を施し、毛状根を誘導した。毛状根は、claforan (0.25 g/L) 添加 1/2 MS 培地上にて 2 週間、25℃、暗所にて培養することにより除菌した後、ホルモン無添加 1/2 MS 固型培地に移植し、25℃、暗所にて 2 ヶ月ごとに継代培養した。

カルス培養系の作出

DH シャーレ (90 mm) 上に作成した 2,4-D (1 mg/L) および BA (0.1 mg/L) 添加の 1/2 MS 固型培地 (25 ml) に、セイタカアワダチソウの無菌植物体の葉切片をシャーレ当たり 1~5 個置床し、25℃、暗所条件下にて培養することにより、カルスを確立した。誘導したカルスを上記の固型培地上に移植し、継体培養を行うことによりカルス培養系を確立した。

HPLC 分析

凍結乾燥した無菌植物体 (茎葉部または根部)、不定根、毛状根またはカルスを磨砕後 20 mg 秤量し、サンプル管に入れ、MeOH (2 ml) を加え、暗所にて室温下、16 時間抽出した。その MeOH 抽出液を Millex LH フィルター (0.45 µm) にて濾過し、その濾液 (5 µl) を HPLC にて分析した。

HPLC 条件は以下の様である

カラム: CAPCELL PAK C18 ACR (4.6 mm I.D. × 250 mm) (資生堂株式会社)、カラ

△温度: 40℃、移動相: A; 1 mM TBA (pH 2.9、酢酸にて調整) B; CH₃CN、A: B=4: 1 から 1: 9 (35 min)、流速: 0.6 ml/min、検出: 270 nm (UV)。溶出時間 (min): Sa-2 (14.2)、Sa-7 (24.5)。定量はピーク面積を用いた絶対検量線法により行い、各サンプルにつき 3 検体の平均値で表した。

3.1.3. 結果および考察

各種培養系の確立

各種培養系の確立の方法は Fig. 20 に示した。本植物の毛状根培養系は、Inoguchi et al. (2003) が確立し、その成分について報告しているが、他の成分については解析されてない。カルス培養系および不定根培養系の確立は今回の例が初めてである。今回確立したセイタカアワダチソウの各種培養系において、茎葉培養系は、植物の増殖維持だけでなく、遺伝子導入やアレロパシー物質の試験素材としての利用も期待される。またこれら各種根培養系は、セイタカアワダチソウの二次代謝成分、特にポリフェノール類の解析、また効率的生産についても検討した。

各種培養系のポリフェノール成分の比較

Fig. 21 に茎葉培養植物体の茎葉部、根部、カルス、不定根および毛状根 (すべて 7 週間培養物) の MeOH 抽出物の HPLC プロフィールを示している。それらの二次代謝成分構成は、分析した 5 種の素材すべて類似しており、Sa-7 (茎葉部: 5.6 mg/g 乾燥重量あたり、根部: 5.8 mg/g 乾燥重量あたり、カルス: 4.8 mg/g 乾燥

重量あたり、不定根: 11.2 mg/g 乾燥重量あたり、毛状根: 12.7 mg/g 乾燥重量あたり) や Sa-2 等のカフェー酸誘導体類が高含量で認められた。また、すべての HPLC プロフィールにおいて、溶出時間 30 ~ 35 分付近にピークが認められた。これらの化合物はその UV スペクトルの吸収極大値 (252.9 nm、267.1 nm および 282.4 nm) からポリアセチレン類と推察された。毛状根においてポリアセチレン類の生産が認められたことは、Inoguchi et al. (2003) の結果を支持するものである。特に今回、生理活性作用が多く、抗酸化活性が強い Sa-7 が主成分で認められたことは非常に興味深い。野生のセイタカアワダチソウの茎葉部また根部の成分パターン (Fig. 14) は、培養系のそれらと比較して複雑 (多成分が存在) であることからこれらカフェー酸誘導体の単離には組織培養系素材が適していると思われる。

Sa-2 等のカフェー酸誘導体類は、植物界に広く分布しており、植物由来の機能性ポリフェノール成分の重要なグループとして認知されている (Clifford et al. 1999, Manachi et al. 2004)。キナ酸を母核としたカフェー酸やクマル酸のエステル誘導体類は、果実 (Moller et al. 1983)、茶 (Nishitani et al. 2004)、花卉 (Clifford et al. 2006) や花粉 (Ohmoto et al. 1998) など多くの植物素材のさまざまな部位に分布しており、植物にとって重要な防御成分として機能している。セイタカアワダチソウ組織培養系から、特にこれらの生理活性が期待されるカフェー酸エステル誘導体が高含量で同定されたことは非常に興味深い。

各種培養系におけるポリフェノール類の含量

今回確立した各種培養系におけるポリフェノール類含量を Fig. 22 に示した。各種培養系における Sa-2 および Sa-7 の含量は、野生植物体のその約半分であった。各種培養系における Sa-7 の含量は、不定根において 2.4 % と最も高く、茎葉部では 0.9 %、カルスでは 0.5 %、毛状根では 1.9 % であった。Sa-2 の含量は茎葉培養体において 2.5 % と最も高く、カルスでは 0.2 %、不定根では 1.1 %、毛状根では 1.0 % を示した。茎葉培養体、不定根、毛状根におけるポリフェノール類の含量がカルスのそれよりも多い理由として、組織化に伴う含量の増加が考えられる。毛状根のような器官において、高いポリフェノールの生産は、多くの薬用植物の組織培養系でも確認された (Ishimaru et al. 1995)。今回セイタカアワダチソウの組織培養は、野生の植物体も同様に高い生産性が認められ、ポリフェノールの素材として有用性が示された。

3.1.4. 摘要

セイタカアワダチソウの各種培養系（茎葉培養、カルス培養、不定根培養および毛状根培養）を確立した。各種組織培養系における主な二次代謝成分として、カフェー酸誘導体（Sa-2 および Sa-7）を同定した。これらの構成パターンが単純なことからポリフェノール類の抽出素材としても有用であると思われる。

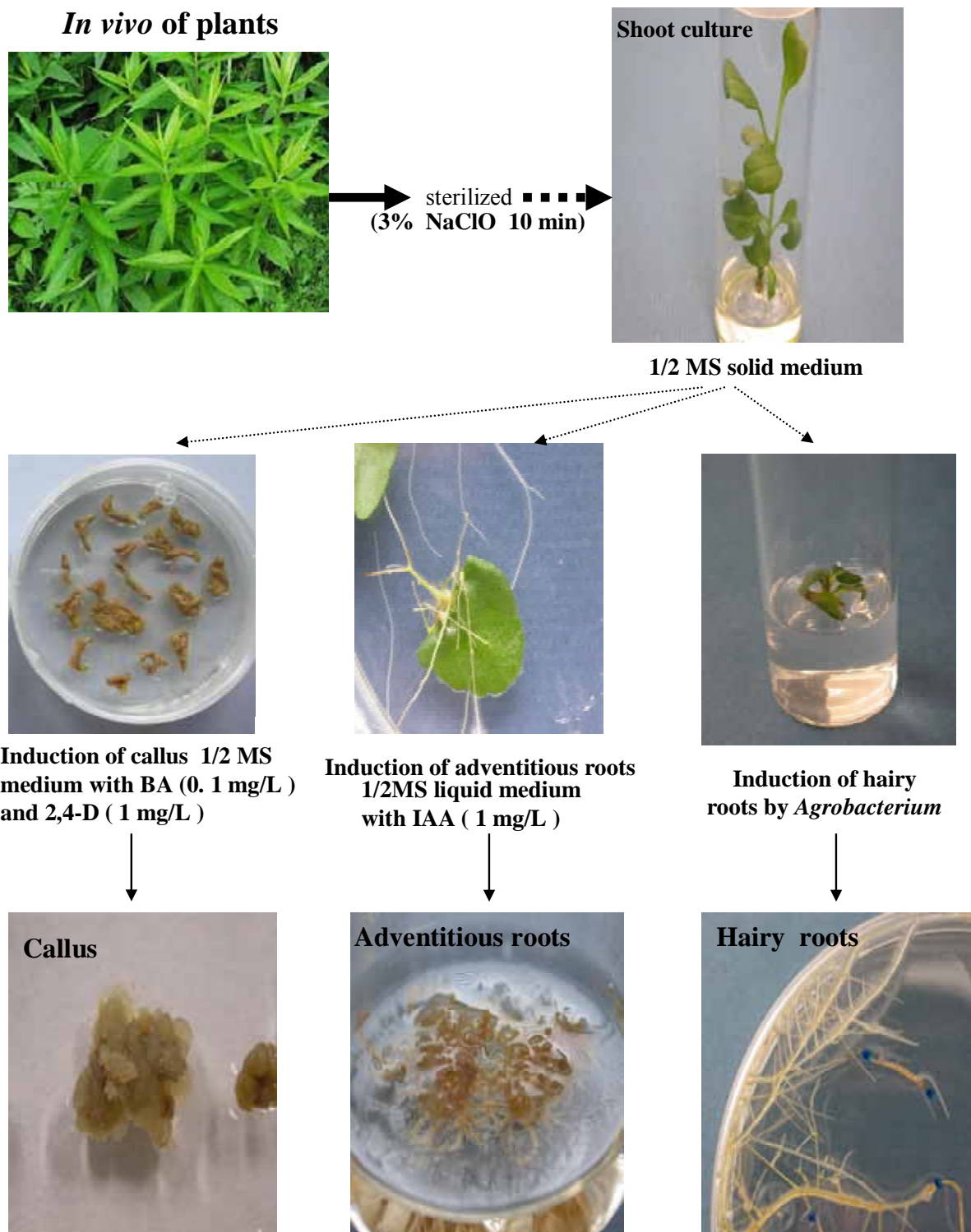


Fig. 20. Establishment of various tissue cultures of *S. altissima* L.

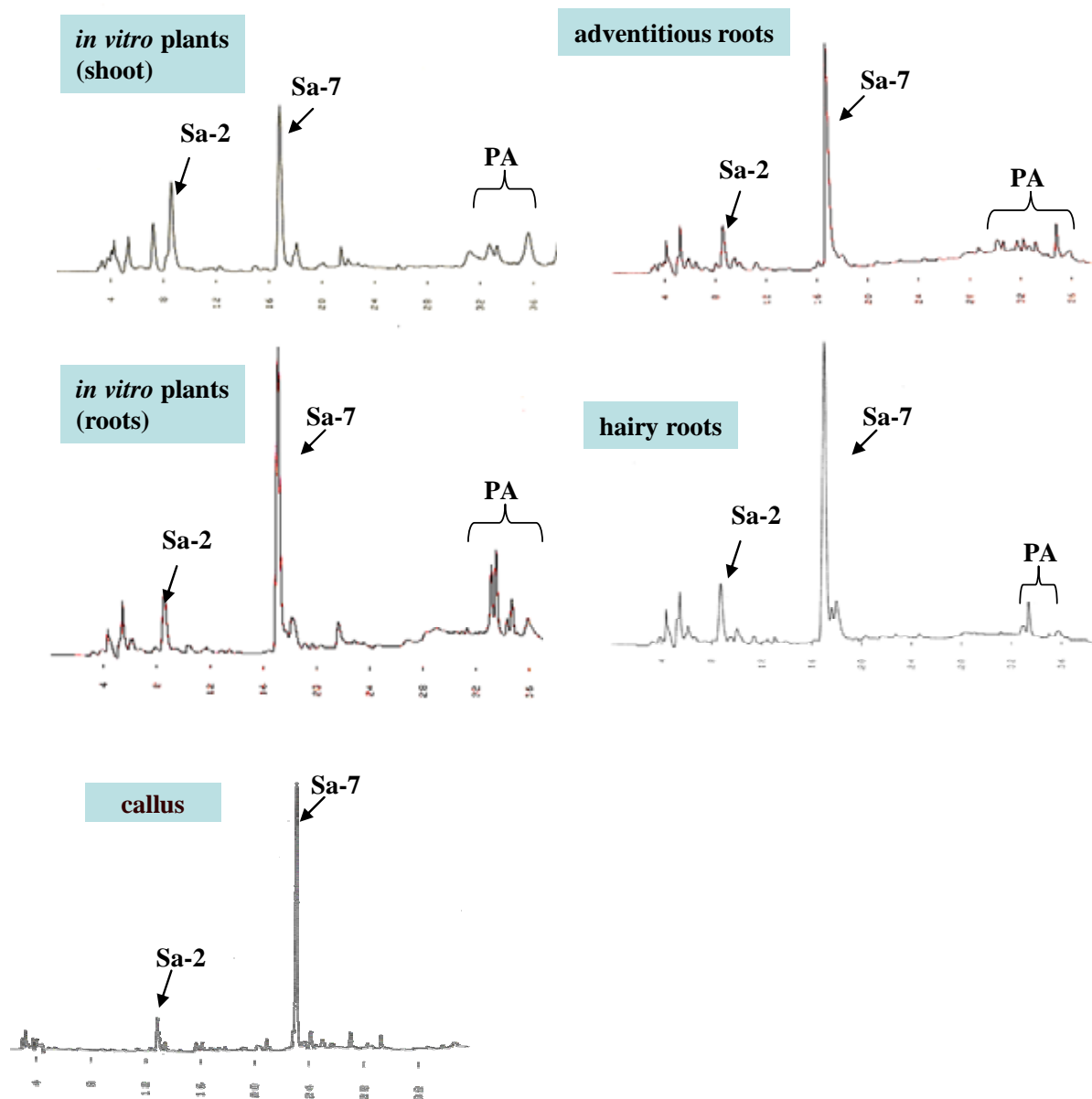


Fig. 21. HPLC profiles of *S. altissima* L.

PA: polyacetylenes (not identified)

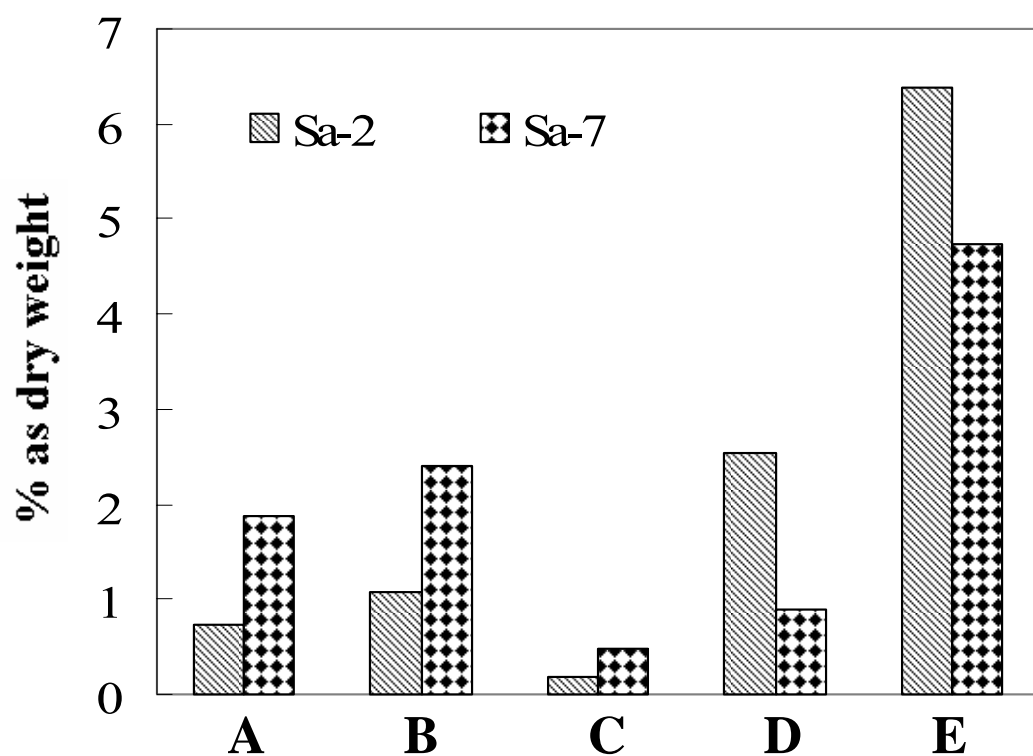


Fig. 22. Concentration of Sa-2 and Sa-7 in various tissues of *S. altissima* L.

A: hairy roots

B: adventitious roots

C: callus

D: *in vitro* plants (shoot)

E: *in vivo* plants (leaves)

第2節 毛状根培養系におけるポリフェノール生産

3.2.1. 緒言

第1節では、セイタカアワダチソウの各種組織培養系の確立およびそのポリフェノール類について述べた。特に毛状根および不定根のような根培養系は、カフェー酸誘導体類 (Sa-2 および Sa-7) の生産性に優れていることが明らかになった。今回確立したセイタカアワダチソウの毛状根は不定根と比較すると、生育が良好であり、また、ホルモン無添加培地で増殖が可能であることから、有用な二次代謝成分の生産系として優れている。本節では、セイタカアワダチソウの毛状根を用いたポリフェノール類の効率的生産条件について検討した。

3.2.2. 材料および方法

毛状根培養の経時実験

毛状根を、1/2 MS または Gamborg B5 (B5) 液体培地 (Gamborg et al. 1968) (50 ml/100 ml フラスコ) に移植し (0.3 g、新鮮重量)、暗所にて、25℃、8 週間巡回培養 (90 rpm) を行った。1 週間ごとに毛状根を収穫し、その生育量の測定、また、HPLC 分析による成分含量の調査を行った。各週 3 検体の平均値を求め、測定値とした。

照明下および暗所下における培養

1/2 MS 液体培地にて 4 週間培養した毛状根を、1/2 MS 液体培地 (50 ml/100 ml

フラスコ) に移植し (0.3 g、新鮮重量)、照明下および暗所下にて 25℃、8 週間
旋回培養 (90 rpm) を行った。1 週間ごとに毛状根を収穫し、その生育量の測定、
また、HPLC 分析による成分含量の調査を行った。各週 3 検体の平均値を求め、
測定値とした。

アスコルビン酸添加培地における培養

毛状根 (0.3 g、新鮮重量) をアスコルビン酸 (20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80
mg/L また 100 mg/L) 添加 1/2 MS 液体培地 (50 ml/100 ml フラスコ) に移植し、
25℃、照明下および暗所下にて 4 週間旋回培養 (90 rpm) した。培養した毛状
根は 4 週間後に収穫し、生育量 (乾燥重量) の測定および HPLC 分析による成
分含量の調査を行った。

3.2.3. 結果および考察

毛状根の生育および成分含量の経時変化

セイタカアワダチソウ毛状根の生育およびポリフェノール生産量の経時変化
を Fig. 23-A および Fig. 23-B に示した。毛状根は、ホルモン無添加の培養培地で
活発な増殖が認められることから、多くの薬用植物等の二次代謝物生産系とし
て利用されている (Ishimaru 1995, Bajaj et al. 1999)。セイタカアワダチソウ毛状
根培養においても、1/2 MS および B5 両液体培地において良好な生育が認められ、
7 週目には 1 フラスコあたりの最高の乾燥重量 (1/2 MS 培地: 0.52 g/flask、B5
培地: 0.52 g/flask) を示した。また、ポリフェノール類の生産に関しても、Sa-7

の高含量での生産 (1/2 MS 培地: 6.0 mg/flask、B5 培地: 6.4 mg/flask、ともに 7 週目) が認められた。従って、セイタカアワダチソウの毛状根は、特に Sa-7 の生産素材として優れていると思われる。現在殆ど雑草として扱われ、その成分の利用がほとんどされていないセイタカアワダチソウにおいても、毛状根培養系はひとつの重要な選択素材と思われる。

光照射の効果

照明下および暗所下にて 4 週間培養した毛状根の写真を Fig. 24 に示し、これら毛状根の HPLC プロフィールを Fig. 25 に示した。毛状根は照明下で培養したほうが暗所下より生育が良いことが観察された。

照明下および暗所下で培養した毛状根の生育量、ポリフェノール生産量およびポリフェノール乾燥重量当たりの含量を Fig. 26-A、Fig. 26-B および Fig. 26-C に示した。組織培養系を利用した照明下におけるポリフェノールの生産増加報告が多い。森ら (2006) はゴマノハグサ科の植物から誘導した毛状根を照明下で培養することにより生育が良好で、ポリフェノール含量も増加することを示した。また、Ishimaru et al. (1994) は、ナンキンハゼから誘導したカルスを照明下にて培養することにより暗所下より効率的にポリフェノール類の生産ができることを報告している。本実験でのセイタカアワダチソウの毛状根は、照明下また暗所下とも 3 週目から生育量は増加したが、照明下で培養したほうが暗所下よりも良好であった (Fig. 26-A)。また、Sa-2 および Sa-7 の生産量については、照明下また暗所下とも 4 週目から、特に Sa-7 の増加傾向が認められた (Fig. 26-B)。

これらの成分の生産量の増加は毛状根の生育量の増加に連携していると思われる。Sa-2 および Sa-7 の両成分の生産量は、照明下の方が暗所下より高い値を示した。Sa-2 の生産量の最大値は、照明下においては、7 週目 (5.9 mg/g)、暗所下においては 8 週目 (3.3 mg/g) に認められた。また、Sa-7 の生産量の最大値は照明下 (16.3 mg/g) および暗所下 (8.6 mg/g) はともに 8 週目に認められた。また、Sa-7 の照明下における含量 (3 % 乾燥重量あたり) は、茎葉培養植物体における含量 (0.9 %) の約 3 倍であった (Fig. 26-C)。

アスコルビン酸添加の効果

アスコルビン酸添加培地における毛状根のポリフェノール生産について Fig. 27 に示した。培地にアスコルビン酸を添加することにより、Sa-2 および Sa-7 の生産量が増加する傾向が認められた。特に、アスコルビン酸 40 mg/L 添加条件において、照明下で、Sa-2 は 1.6 倍、Sa-7 は 1.4 倍の増加が認められた。野末の実験において、サツマイモの懸濁培養にアスコルビン酸を添加することによりクロロゲン酸やイソクロロゲン酸の合成が増加する結果が報告されている (竹内ら 2004)。セイタカアワダチソウの毛状根培養においても、カフェー酸誘導体の生産にアスコルビン酸添加効果があることが分かった。

3.2.4. 摘要

セイタカアワダチソウの毛状根培養の経時実験を行い、その生育量およびポリフェノール生産量について調査した。1/2 MS および B5 培地における培養では、

7週目に生育量およびポリフェノール生産の最高値を示した。光照射実験においては、暗所下での培養に比べて、照明下のほうが、毛状根の生育並びにポリフェノール生産量が良好であった。このことは、光照射により、ポリフェノール類の効率的生産の可能性を示すものである。また、アスコルビン酸の培地への添加により、毛状根の生育およびポリフェノール生産の増加が認められた。特にアスコルビン酸 (40 mg/L) 添加により毛状根におけるポリフェノール生産の最高値を示した。以上のように毛状根培養系において、光照射やアスコルビン酸添加などの条件の設定を行うことにより、セイタカアワダチソウのポリフェノールの効率的生産が期待される。

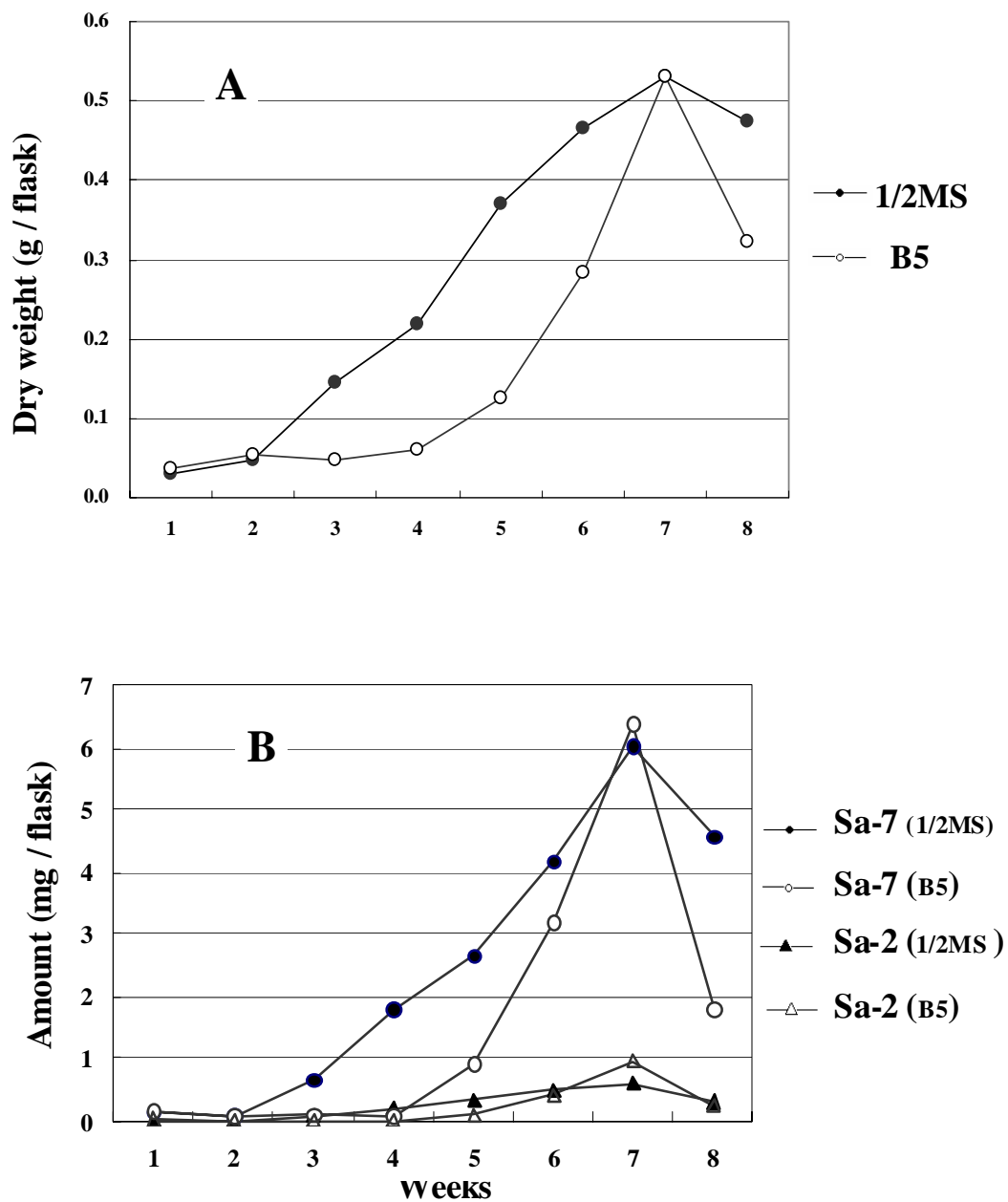


Fig. 23. Growth (A) and polyphenols production (B) of *S. altissima* L. hairy roots cultures.

(Dark)



(Light)

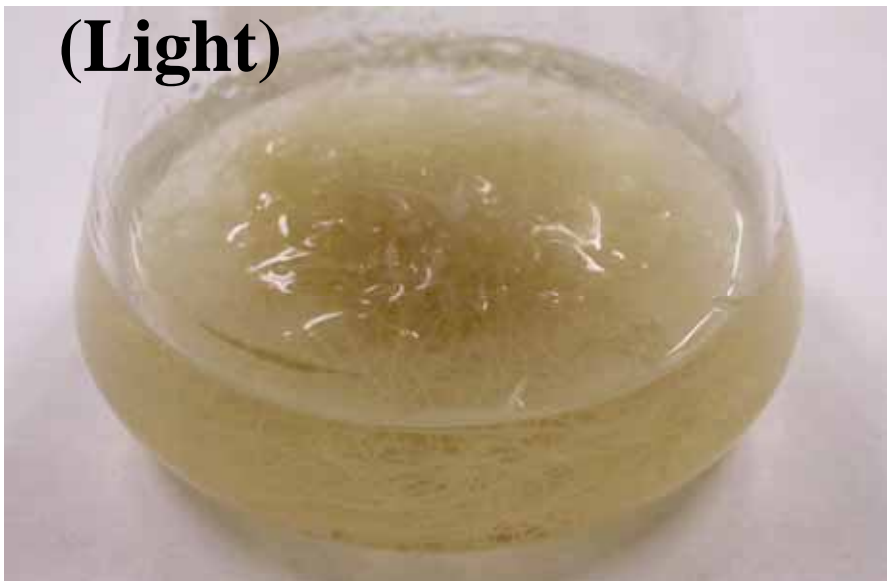


Fig. 24. *S. altissima* L. hairy roots cultured 1/2MS liquid medium for 4weeks.

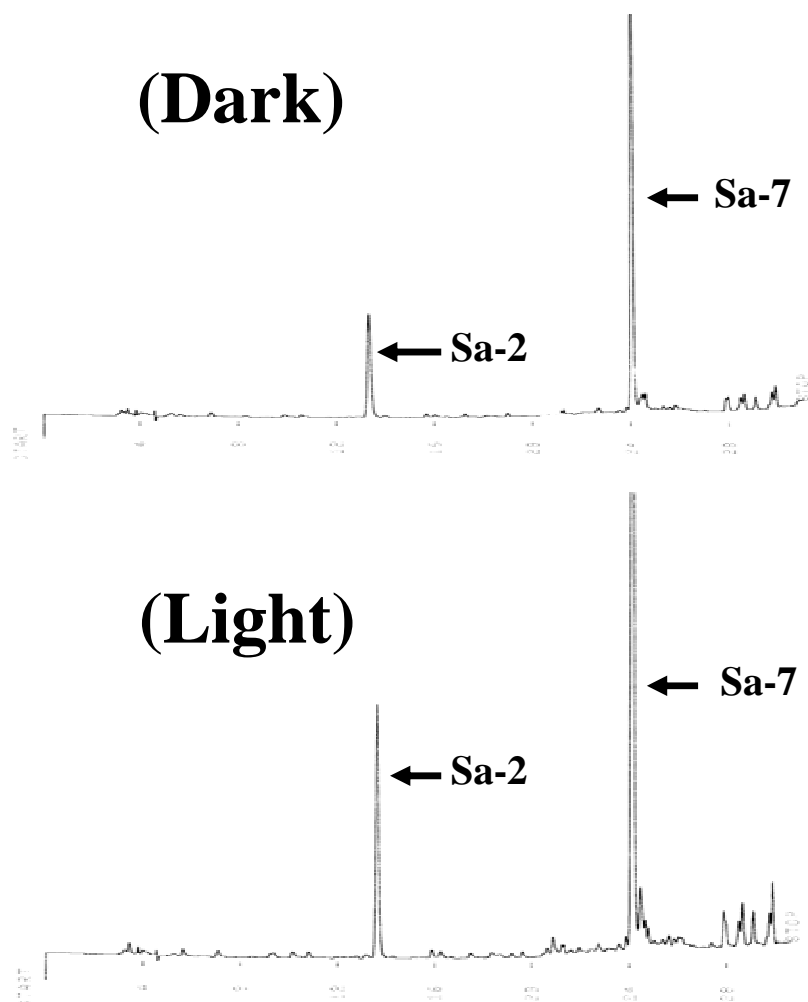


Fig. 25. HPLC profiles of MeOH extracts for *S. latissima* L. hairy roots cultured in dark or light.

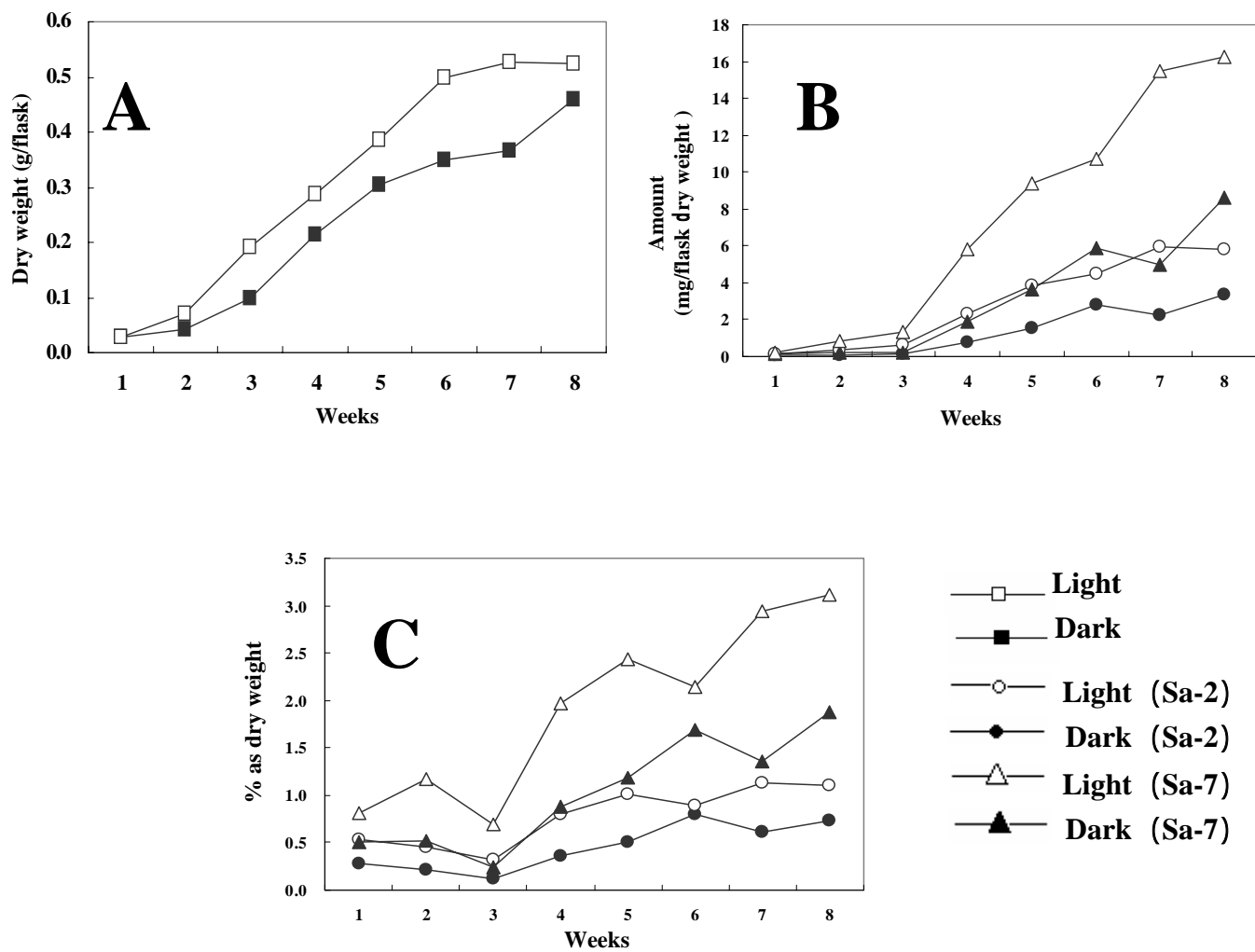


Fig. 26. Growth and polyphenols production of *S. altissima* L. hairy roots cultures in the light or dark.

A: growth (g/flask)

B: amount (mg/flask)

C: concentration (% as dry weight)

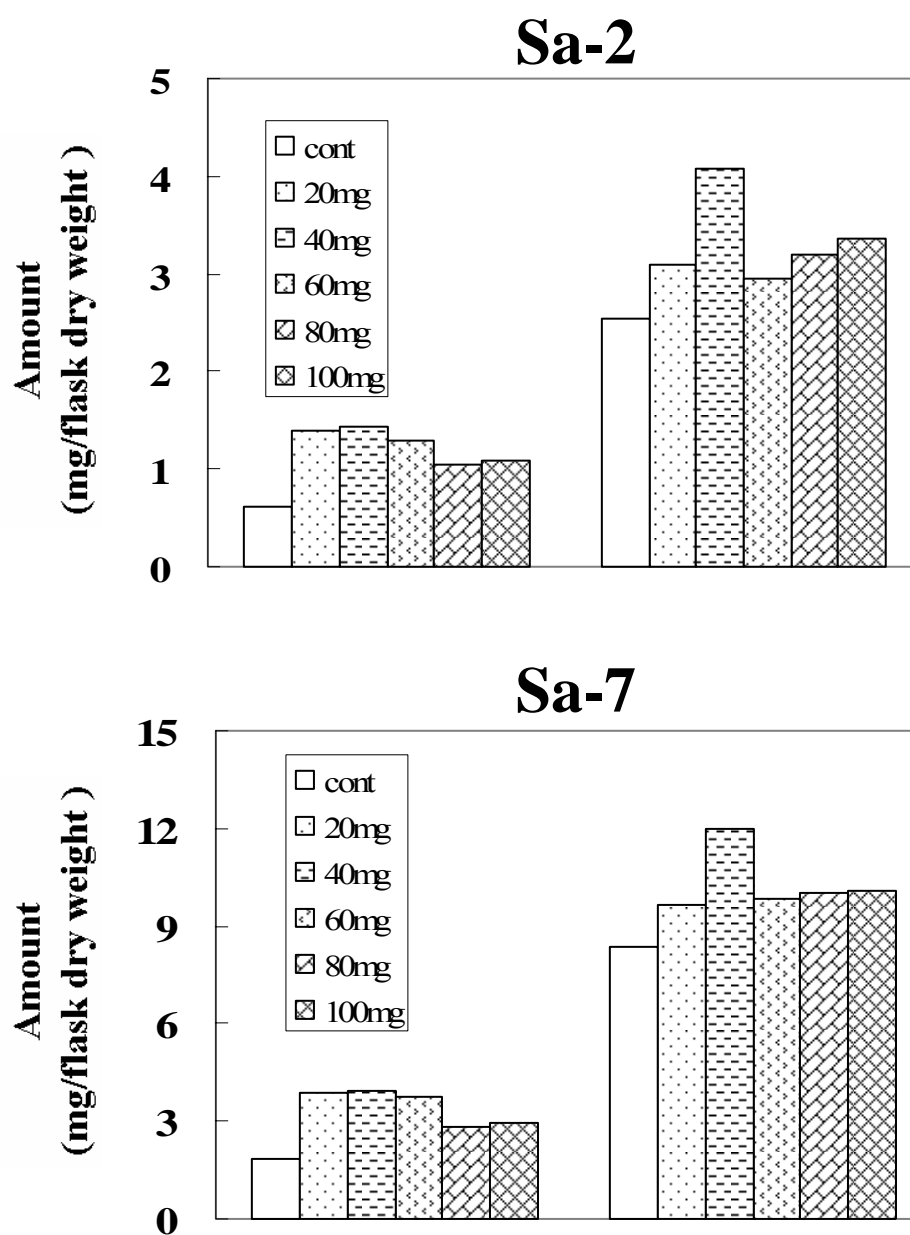


Fig. 27. The amount of polyphenols of *S. altissima* L. hairy roots cultured in 1/2MS liquid medium supplemented with ascorbic acid (20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L) in the dark or light condition.

第4章 セイタカアワダチソウのポリフェノール類効率的抽出

4.1. 緒言

現在、植物から目的化合物を抽出する場合、MeOH や EtOH また CHCl₃ などの有機溶媒を使用することが多く、環境やヒトの健康へのマイナスな面が挙げられる。そこで、有機溶媒を用いない植物における成分の抽出法が求められる。

最近、ポリフェノール類はタンパク質や金属などと結合する性質を利用し、植物タンパク質を用いてポリフェノール類を抽出する研究が行われている。現在までに、オートクレーブして得られる変性大豆タンパク質やテンペなどの大豆発酵食品のタンパク質を利用して、植物ポリフェノール類を効率的に分離する方法が報告されている (石丸ら 2001、牛島ら 2001、黄ら 2004)。その中で、大豆タンパク質を利用して、お茶中のカテキン類の抽出、または野菜や果物などに含まれるアントシアニン類の抽出に成功している。そこで、セイタカアワダチソウからポリフェノール類の効率的抽出法を目的に、大豆タンパク質を利用する方法について検討した。

4.2. 材料および方法

大豆タンパク質を利用したポリフェノール類の抽出

茶カテキン類の効率的抽出法として報告された石丸らの方法 (石丸ら 2001) に準じて行った。すなわち、市販の脱脂大豆 (理研農産、福岡) に 10 倍量の水を加え、オートクレーブ (121℃、15 分) し、放冷後、2 重のミラクロス

(Calbiochem) にて濾過し、変性ダイズタンパク質抽出液を得た。また、凍結乾燥したセイタカアワダチソウの葉 (*in vivo* の植物体から採集、2005 年 2 月) また毛状根 (1/2 MS 液体培地にて暗所、4 週間培養)、それぞれ 3 g (乾燥重量) を MeOH (60 ml) で抽出し、濾紙 (ADVANTEC 2) にて濾過した。得られたそれぞれの濾液に水を等量混合し、エバポレーターにて濃縮することにより、セイタカアワダチソウ抽出液 (葉また毛状根由来、それぞれ 75 ml) を得た。上記方法にて得られた変性ダイズタンパク質抽出液 (150 ml) とセイタカアワダチソウ抽出液を混合し、混合液の pH をアスコルビン酸にて 4.5 に調整することにより大豆タンパク質を沈澱させた。沈澱の生成した混合液は、遠心分離 (TOMY MX-300、6500 rpm、10 分、25℃) を行い、上清液と沈澱に分離した。沈澱部は水で 2 回洗浄した後、凍結乾燥し、ポリフェノール・ダイズタンパク質複合体とした (Fig. 28)。セイタカアワダチソウ抽出液、上清液およびポリフェノール-ダイズタンパク質複合体の 50 %アセトン抽出液を HPLC 分析に用いた。

HPLC 分析

セイタカアワダチソウ抽出液、上清液およびポリフェノール-ダイズタンパク質複合体の 50 %水性アセトン抽出液 (20 mg 複合体/2 ml) は、Millex LH フィルター (0.45 µm) にて濾過し、濾液 (10 µl) を HPLC 分析した。HPLC の条件は第 3 章の第 1 節と同様である。

4.3. 結果および考察

セイタカアワダチソウ植物の抽出液および毛状根の MeOH 抽出液には Sa-2 および Sa-7 が認められた (Fig. 29 および Fig. 30)。変性大豆タンパク質の抽出液との混合により得られた上清液では、どちらもこれらポリフェノール成分が減少しており、大豆タンパク質がポリフェノールと結合し、沈澱を精製したことが示唆された。特に Sa-2 がどちらの上清液においても検出されないことから Sa-2 のタンパク質への結合性が非常に強いことが分かった。Sa-2 および Sa-7 の抽出液 (植物体および毛状根) およびそれらから得られた上清液の含量は Fig. 31 に示した。沈澱として得られた複合体の収量は葉由来複合体 (乾燥重量) が 1.2 g、また毛状根由来複合体 (乾燥重量) が 1.4 g であった。複合体からのポリフェノール類のアセトン抽出による回収については、Fig. 29 およ Fig. 30 に示すように Sa-7 のみの抽出が認められた。Sa-7 については、葉抽出液中の 45.3 % また毛状根抽出液中の 65.6 % が沈澱に吸着して、複合体となり、アセトン抽出により、複合体から 10 % 以上 (最初の葉また毛状根抽出液中の含量との割合として、それぞれ 10.7 %、また 33.6 %) が回収できた (Fig. 31)。Sa-2 および Sa-7 のようなカフェー酸の効率的抽出素材として大豆タンパク質が有効であることが明らかになった。得られる大豆タンパク質との複合体は新しい機能性食品素材としても期待される。Sa-2 については、大豆タンパク質との結合性が非常に高く、複合体からの分離が難しいことが分かった。

大豆中には約 35 % の大豆タンパク質が含まれ、この植物性タンパク質は、栄養源としての利用だけでなく、降コレステロール効果や抗肥満効果などの機能

性が注目されている（横山ら 2000、福島ら 2001）。また、ポリフェノール類には抗酸化活性作用、 血圧上昇の抑制作用などが認められており（五十嵐ら 2000、大澤ら 2001）、今回調製したセイタカアワダチソウ由来ポリフェノール・大豆タンパク質複合体は、両成分の機能性の相乗効果も期待される。

4.4. 摘要

大豆タンパク質を利用することにより、セイタカアワダチソウからカフェー酸誘導体類（Sa-2 および Sa-7）の効率的抽出に成功した。Sa-2 は大豆タンパク質との結合性が強く、植物抽出液中の 100 %が吸着され、複合体から有機溶媒に抽出分離はできなかった。Sa-7 は植物抽出液の約 50 %が大豆タンパク質と吸着し、得られた複合体からは、有機溶媒の抽出によりその 10 %以上が回収できることが明らかになった。本実験で得られたセイタカアワダチソウ由来のポリフェノール・大豆タンパク質複合体は新しい機能性食品素材としても期待される。



**Fig. 28. Polyphenols-soybean protein complexes from
S. altissima L. and soybean protein.**



Fig. 29. HPLC profiles of polyphenols from *S. altissima* L. *in vivo* shoots.



Fig. 30. HPLC profiles of polyphenol from *S. altissima* L. hairy roots.

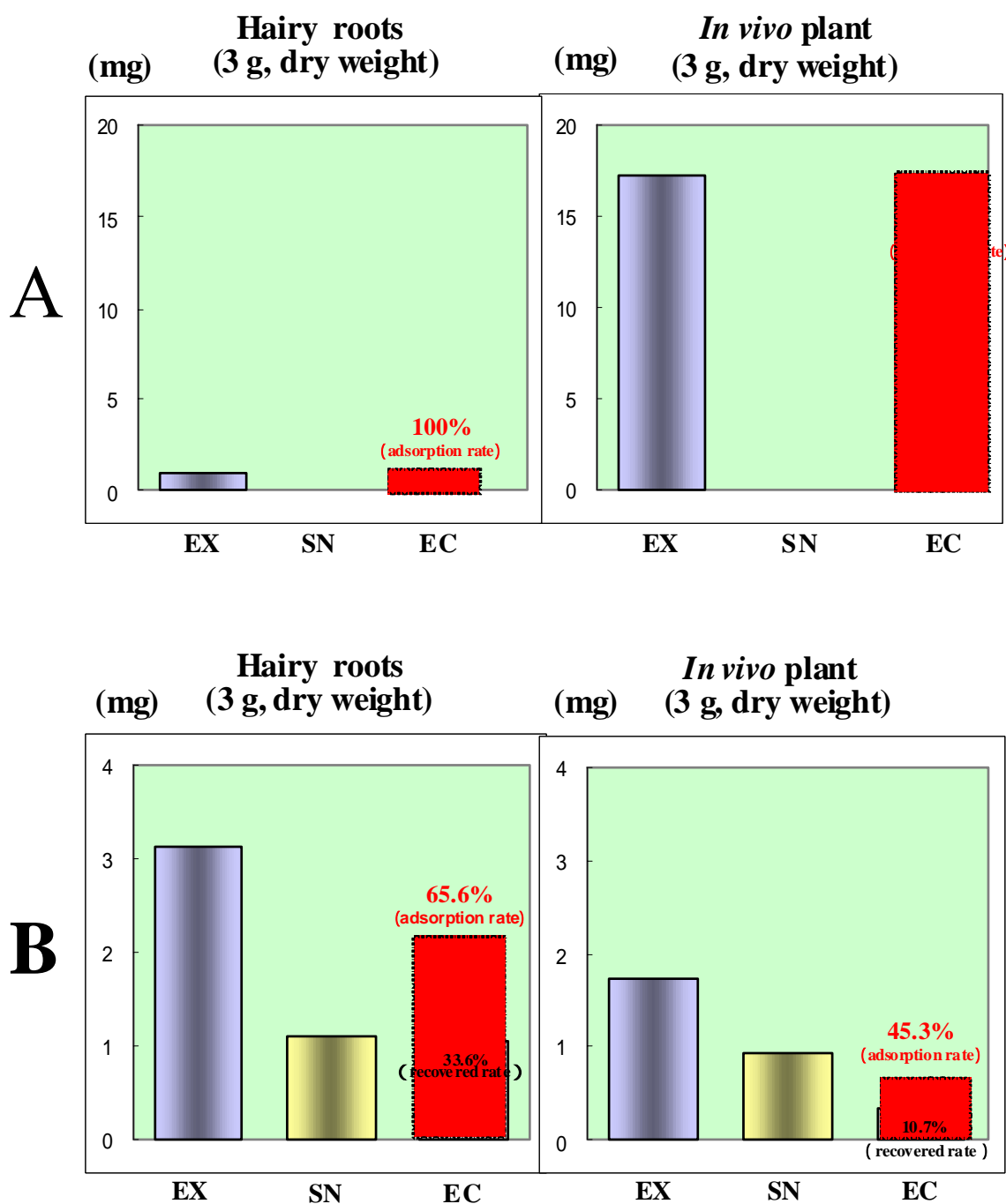


Fig. 31. The amounts of Sa-2 and Sa-7 (mg) in various extracts.

EX: extract SN: supernatant EC: extract of complex

A: Sa-2

B: Sa-7

第5章 総合考察

キク科 *Solidago* 属植物の多くは、多様な生理活性成分を含んでおり (Table 1)、古くから薬用、また食用の機能性素材として供されている。しかし、セイタカアワダチソウ (*S. altissima* L.) に関しては、その二次代謝成分の解析が十分ではなく、機能性素材として応用する研究は行われていない。

現在までのセイタカアワダチソウ二次代謝成分に関する研究においては、その根の成分として、ポリアセチレン類やジテルペン類 (Fig. 4) が報告されている。また、Inoguchi ら (2003) は、セイタカアワダチソウの組織培養系である毛状根におけるポリアセチレン生産について報告している。しかし、本植物のその他の各種組織培養系における二次代謝成分の詳細な検討は未だ行われていない。特に、ポリアセチレン類やジテルペン類以外のセイタカアワダチソウ成分については未知である。そこで、本研究では、セイタカアワダチソウの二次代謝成分の解析と本植物の機能性素材としての利用を目的に、セイタカアワダチソウ葉の成分について精査し、未知成分の同定、構造決定を試みた。また、各種組織培養系を確立し、得られた各種培養系における二次代謝成分の生産、並びに、効率的抽出法について検討した。

セイタカアワダチソウの葉のポリフェノール成分について

セイタカアワダチソウの新鮮葉から新規化合物 2 種を含む、ポリフェノール類を 11 種同定した。それらの化合物のうち、8 種 (Sa-1 ~ Sa-8) がカフェー酸誘導

体、3 種 (Sa-9 ~ Sa-11) がフェノール配糖体であった。既知物質として、カフェー酸誘導体類の Sa-1 は caffeic acid、Sa-2 は chlorogenic acid、Sa-3 は 3-*O*-caffeoylquinic acid、Sa-4 は 4-*O*-caffeoylquinic acid、Sa-5 は 3-*O*-*p*-coumaroylquinic acid、Sa-6 は 4-*O*-*p*-coumaroylquinic acid、Sa-7 は 3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid、Sa-8 は 4, 5-dicaffeoylquinic acid であり、フェノール配糖体の Sa-9 は *trans*-tiliroside と同定した。二種の新規化合物は各種機器分析の解析により、Sa-10 は kaempferol 3-*O*-rutinoside 7-*O*- β -D-apiofuranoside、また、Sa-11 は 2, 4, 6-trihydroxy-1-butyrophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside と構造決定した。今回セイタカアワダチソウからカフェー酸誘導体類を初めて同定したことは非常に興味深いものである。カフェー酸誘導体類は強い抗酸化作用を始めとする薬用活性が認められており、セイタカアワダチソウの薬用資源としての可能性を初めて示したものである。また、Sa-9 ~ Sa-11 のようなフェノール配糖体類も初めてセイタカアワダチソウの葉から同定されたことは、これらのフェノール配糖体類の生理活性利用も期待される。さらに、今回単離構造決定した acylphloroglucinol 配糖体 (Sa-11) はシダ植物に多く含まれていることが知られているが、キク科植物において同定されたことは初めてであり、非常に興味深い結果となった。

今回同定したセイタカアワダチソウ葉のポリフェノール含量および 1 個体あたりの生産量に関する季節変動を調べた。セイタカアワダチソウの主成分は Sa-2 と Sa-7 であり、Sa-2 の含量は春季において高い値を示したが、Sa-7 の含量は夏季において高い値を示した。Sa-2 は 1 個体あたりの量においては、5 月で最

高値を示し、Sa-7 の 1 個体あたりの量においては、7 月で最高値を示した。セイトカアワダチソウの成長に伴って、Sa-7 の含量の増加傾向が認められた。フェノール配糖体類は含量は低いが、1 個体あたりの生産量は夏季で最高値を示した。セイトカアワダチソウ葉から機能性成分の抽出を試みる際、その採集適期を知ることが、非常に重要である。今回の結果に基づき、ポリフェノール類の含量を目安とした場合、カフェー酸誘導体類は 5 月 (Sa-2) と 7 月 (Sa-7)、フェノール配糖体類は 6 月から 8 月が採集時期として適当であることが分かった。

セイトカアワダチソウの開花期 (10 月) の各器官 (葉、茎、根および花) 別のポリフェノール含量を調べた。Sa-2 の含量に関しては、葉部と茎部においては、大きな差は認められなかったが、花部においては、葉部の約 2 倍の含量を示した。Sa-7 に関しては、花部における含量が葉部のその約 3 倍の高含量を示した。フェノール配糖体類に関しても花部に多く含まれることが確認された。特に Sa-9 の花部における含量は葉部のその約 9 倍の値を示した。植物の花部におけるポリフェノール含量は葉部より多いという報告が多い。栗の花部におけるポリフェノール含量は葉部の 3 倍 (Joao et al. 2008)、また、*Crataegus* のフラボノイド含量においても、花部は葉部のそれと比較して、高い含量が認められている (Wieland et al. 2008)。今回分析した各器官の成分含量においても、類似した傾向を示した。従って、本植物の花部はポリフェノール類の抽出素材として非常に適していると考えられる。

8 月と 10 月の葉の着生部位 (上部葉、中部葉および下部葉) 別のポリフェノール含量について調査したところ、両方とも若い葉である上部葉において、ポ

リフェノール含量が高い傾向が認められた。ポリフェノール類を含有する植物の多くは、上部葉の方がポリフェノール含量が高いという報告がある。カキ葉 (松尾ら 1981)、茶葉 (岩浅ら 1977)、綿 (Feeny et al. 1968) およびカシの葉 (Howell 1976) などは、上部葉の方において、ポリフェノール含量が多いと報告されている。セイタカアワダチソウの葉においても、上部葉において高いポリフェノール含量を示した。

セイタカアワダチソウの組織培養系について

セイタカアワダチソウの各種培養系 (茎葉培養、カルス培養、不定根培養および毛状根培養) を確立した。各種組織培養系における主な二次代謝成分として、カフェー酸誘導体 (Sa-2 および Sa-7) を同定した。各種組織培養系におけるこれらの化合物の構成パターンが比較的単純なことからこれらの培養素材はポリフェノール類の抽出素材としても有用であると思われる。

また、毛状根培養の経時実験を行い、生育量およびポリフェノール生産量について調査した。1/2 MS および B5 培地における培養では、7 週目に生育量およびポリフェノール生産量が最高値を示した。光照射実験においては、暗所下での培養に比べて、照明下のほうが、毛状根の生育並びにポリフェノール生産量が良好であった。このことは、光照射により、ポリフェノール類の効率的生産の可能性を示すものである。組織培養系を利用した照明下におけるポリフェノール類の生産の増加に関する報告も多い。ゴマノハグサ科の植物から誘導した毛状根 (森ら 2006)、また、ナンキンハゼから誘導したカルス (Ishimaru et al. 1994)

は照明下にて培養することにより暗所下より効率的にポリフェノール類の生産が認められている。

また、今回セイタカアワダチソウの毛状根培養において、アスコルビン酸を培地へ添加することにより、毛状根の生育およびポリフェノール生産の増加が認められた。特にアスコルビン酸 40 mg/L の添加により、毛状根におけるポリフェノール生産量の最高値を示した。サツマイモの懸濁培養系にアスコルビン酸を添加することによりクロロゲン酸やイソクロロゲン酸の合成が増加する結果が報告されている（竹内ら 2004）。

セイタカアワダチソウの毛状根培養においても、光照射やアスコルビン酸添加など処理によりセイタカアワダチソウのポリフェノール類の効率的生産が期待される。

セイタカアワダチソウのポリフェノール類の効率的抽出について

大豆タンパク質を利用することにより、セイタカアワダチソウからカフェー酸誘導体類（Sa-2 および Sa-7）の効率的抽出に成功した。Sa-2 は大豆タンパク質との結合性が強く、植物抽出液中の 100 % が吸着された。得られたセイタカアワダチソウ由来ポリフェノール・大豆タンパク質の複合体から、Sa-2 は有機溶媒に抽出分離はできなかった。Sa-7 は植物抽出液の約 50 % が大豆タンパク質に吸着した。Sa-7 は吸着した複合体から有機溶媒の抽出によりその 10 % 以上が回収できた。本実験で得られたセイタカアワダチソウ由来のポリフェノール・大豆タンパク質複合体は新しい機能性食品素材としても期待される。さらに、花部

には葉より多くのポリフェノール類が含まれているので、セイトカアワダチソウの花由来ポリフェノール類と大豆タンパク質の複合体の利用も期待される。

本研究により、セイトカアワダチソウの未知の二次代謝成分であるポリフェノール類を初めて単離、構造決定した。また、セイトカアワダチソウのポリフェノール含量の季節変動および、各器官（葉、茎、根および花）別のポリフェノール構成について明らかにしたことにより、セイトカアワダチソウのポリフェノール素材としての利用が図られる。セイトカアワダチソウの各種培養系を初めて確立し、ポリフェノール類の効率的生産素材としての有用性を示した。最後に、ポリフェノール類・大豆タンパク質の複合体の調製の成功は、食品分野におけるセイトカアワダチソウの有効利用を可能にするものである。

要約

セイタカアワダチソウ (*Solidago altissima* L.) は、北アメリカ原産のキク科 *Solidago* 属の多年生草本であり、その根の成分として、ポリアセチレン類やジテルペン類が報告されている。他の成分に関する研究は少なく、本植物は現在、雑草として扱われている。本研究において、セイタカアワダチソウの未知の化学成分の解析と新しい機能性素材としての利用を目的に、二次代謝成分に関する化学的解析を行った。また、本植物の各種培養系を確立すると共に、その二次代謝成分であるポリフェノール類の生産制御について検討した。さらに、本植物体をポリフェノール資源として利用することを研究の一環として、ポリフェノール類の効率的抽出法を開発した。

この研究で得られた知見は以下の通りである。1) 逆相カラムクロマトグラフィーを駆使することにより、カフェー酸誘導体類を 8 種 (caffeic acid、chlorogenic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-*p*-coumaroylquinic acid、4-*O*-*p*-coumaroylquinic acid、3, 5-di-*O*-caffeoylquinic acid および 4, 5-dicaffeoylquinic acid)、1 種のフェノール配糖体 (*trans*-tiliroside) 共に 2 種の新規化合物 (kaempferol 3-*O*-rutinoside 7-*O*- β -D-apiofuranoside および 2, 4, 6-trihydroxy-1-butyrophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside) を単離、構造決定した。2) 本植物体の葉部におけるポリフェノール成分含量および構成パターンの季節変動について明らかにした。3) 各器官 (葉、茎、根および花) 別および各着生部位別の葉におけるポリフェノール成分の構成パターンおよび含量について明ら

かにした。4) 本植物体の茎葉培養系、カルス培養系、不定根培養系および毛状根培養系を確立し、各種培養系におけるポリフェノール含量について明らかにした。5) 毛状根培養系において、光照射およびアスコルビン酸添加により、ポリフェノール類の生産量増加に成功した。6) 大豆タンパク質を利用して、大豆タンパク質・ポリフェノール複合体を調製することにより、本植物体のポリフェノール類の効率的抽出法を確立した。

本研究により、セイタカアワダチソウに多様なポリフェノール類が高含量で含まれていることを初めて明らかにした。特に、新規フェノール配糖体類は今回初めてキク科から単離された。また、各種培養系の確立に成功し、ポリフェノールの生産制御の可能性を初めて示した。さらに、本研究で調製した大豆タンパク質・ポリフェノール複合体は、食品分野における新しい素材として期待される。

以上、本研究は、セイタカアワダチソウの新しいポリフェノール資源としての有用性と実用性を示したものである。

Summary

Solidago altissima L. (Compositae) is a perennial herb originated from North America. Some polyacetylene and diterpenes were isolated from the roots of this plant. The studies on the other phytochemicals of this plants have not been done so much. In this research, in order to clarify the unknown chemical compounds of this plant and to utilize this plant as a new functional chemical, analysis of the second metabolites was carried out. In addition, various tissue cultures of this plant were established, and the factors which regulate the production of secondly metabolism, especially polyphenol production were also investigated. As a part of the studies on the utilization of this plant as a polyphenol resource, an efficient extraction method of polyphenol from this plant was also developed.

Novel findings obtained in this research were as follows: 1) Eight caffeic acid derivatives (caffeic acid, chlorogenic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O-p*-coumaroylquinic acid, 4-*O-p*-coumaroylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid), a phenolic glucoside (*trans*-tiliroside), and two new compounds (kaempferol 3-*O*-rutinoside 7-*O*- β -D-apiofuranoside and 2,4, 6-trihydroxy-1-butyrophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside) were isolated using reversed-phase chromatographies. 2) The seasonal changes of polyphenol contents and the pattern of polyphenol constituent in the leaves of this plant, were clarified. 3) The polyphenol pattern and contents in

various organs (leaves, stem, roots and flowers) and in the leaves grown in different position of the plant (upside, middle and below position), were also analyze. 4) Various cultures (shoot culture, callus culture, adventitious roots and hairy roots) of *S. altissima* L. were established, and the contents of polyphenols in these cultures were also investigated. 5) In increase of the polyphenol of the yields in the hairy roots was succeeded by illumination and addition of ascorbic acid in the medium. 6) The efficient extraction method of polyphenols from this plant was established by preparation of soybean protein-polyphenols complex.

In this research, it was elucidated that high contents of various polyphenols were contained in *S. altissima* L. for the first time. The new phenolic glucosides obtained were also considered to be useful chemical compounds for the chemitaxonomy. In addition, for the fist time various cultures of this plant were successful established, and the possibility of the regulation of polyphenol biosynthesis was shown. Moreover, the soybean protein-polyphenols complexes prepared in this study are expected as new function food materials were also prepared.

By this result, *S. altissima* L. was shown an useful resource of plant polyphenols.

謝辞

本研究の企画、遂行並びに投稿論文と本論の作成に当たり、終始御懇篤な指導を戴いた佐賀大学農学部応用生物科学科・石丸幹二准教授に心より深甚の謝意を表します。

本研究の遂行並びに本論文の作成に当たり長い間ご指導を戴きました佐賀大学農学部生命機能科学科・柳田晃良教授には心から深く御礼を申し述べます。

鹿児島大学農学部・橋本文雄准教授には本論文の御指導と御校閲の労を戴き、心より深甚の謝意を表します。

また数々の御教示並びに本論文の御校閲の労を戴いた鹿児島大学農学部・坂田祐介教授に心より深甚の謝意を表します。

ご多忙の中、学位審査をして戴いた佐賀大学農学部生命機能科学科・濱洋一郎准教授に心から深く御礼を申し述べます。

共同研究者として多くのご協力戴きました福岡大学の薬学部・藤岡稔大教授、福岡大学の薬学部・吉田都助教、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・河野功教授、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・田中隆准教授に心から厚く御礼申し上げます。また、データの分析に関して多く御協力を戴いた佐賀県衛生薬業センターの淵野良子様、志岐寿子様、原口那津美様、中山秀幸様に対して、厚く御礼を申し上げます。

最後に、様々な形で協力して下さった佐賀大学農学部応用生物学科生物資源開発学講座植物代謝解析学研究室の諸氏はこの場をお借りして深謝致します。

参考文献

- Adraham S.K., L Sarma and P.C. Kesavan (1993) Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and β -carotene against γ -radiation-induced *in vitro* chromosomal damage. *Mutation Res.* 303: 109-112.
- Anthonsen T, McIrrindle R. (1969) The constitution of diterpenoids from *Solidago elongata* Nutt. *Acta. Chem. Scand.* 23 (3): 1068-1070.
- 浅井康宏 (1993) 緑の侵入者たちー帰化植物のはなし. 朝日新聞社. 294.
- Bader G, Wray V, Hiller K (1992) Virgaur easaponin 3, a 3, 28-bisdesmosidic triterpenoid saponin from *Solidago virgaurea*. *Phytochemistry* 31 (2): 621-623.
- Bajaj Y.P.S., Ishimaru K., (1999) Genetic transformation of medicinal plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 45. *Transgenic Medicinal Plants*: 1-29.
- Balsa C., Alibert G, Brulfert J., Queiroz O. and Boudet A.M. (1979) Photoperiodic control of phenolic metabokism in *Kalanchoe Vlofeldiana*. *Phytochemistry* 18: 1159-1163.
- Basnet P., Matsushige K., Hase S., Kadota and T. Namba (1996) Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective acitivity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1479-1794.
- Bohlmann F, Chen ZL, Schuster A. (1981) Aromatic esters from *Solidago drcurrrens* . *Phytochemistry* 20: 2601-2602.
- Bohlmann R., Burkhardt T., and Zdero, C. (1973) Naturally occurring acetylenes.

London Academic Press: 547.

- Brenda McDougall, Peter J. King Bor, Wen Wu, Zdenek Hostomsky, Manfred G. Reinecke, and W. Edward Robinson, Jr. (1998) Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 Integrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1): 140-146.
- Budzianowski J, Skrzypczak L (1995) Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. *Phytochemistry* 38: 997-1001.
- Chaturvedula VS, Zhou BN, Gao Z, et al. (2004) New lupanetriterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase-beta. *Bioorg Med. Chem.* 12 (23): 6271-6275.
- Cheminat A, Zawatzky R, Becker H, Brouillard R (1988) Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structures and biological activity. *Phytochemistry* 27: 2787-2794.
- Choi SZ, Choi SU, Lee KR. (2004) Phytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virga-aureavar. gigantea*. *Arch. Pharm. Res.* 27 (2): 164-168.
- Clifford M. N. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 79: 362-372.
- Clifford M. N., Wu W., Kuhnert N. (2006) The chlorogenic acids of *Hemerocallis*. *Food Chemistry* 95: 574-578.
- El-Sayed NH, Omara NM, Yousef AK, Farag AM, Mabry TJ (2001) Kaempferol triosides from *Reseda muricata*. *Phytochemistry* 57: 575-578.

- El-Sayed NH, Wojcinska M, Drost-Karbowska K, Matlawska I, Williams J, Mabry TJ (2002) Kaempferol trioside from *Silphium perfoliatum*. *Phytochemistry* 60: 835-838.
- EL-Ghazaly M (1992) Anti-inflammatory activity of *Solidago virgaurea* L. *Arzneimittelforschung*, 42 (3): 333-335.
- Feeny, P.P. Bostock, H. (1968) Seasonal change in the tannin content of oak leaves. *Phytochemistry* 7: 871-880.
- Flamini G, Antognoli E, Morelli I (2001) Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* 57: 559-564.
- Flores H. E., Dai Y. R., Cuello J. L., Maldonado-Mendoza I. E., and Loyola-Vargas V. M., Green roots (1993) Photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant Physiol.* 101: 367-371.
- Flores H. E., Pickard J. J., and Hoy M. W., (1988) Production of polyacetylenes and thiophenes in heterotrophic and photosynthetic root cultures of Asteraceae. 233-254.
- Forrest G.I. and Bendall D.S. (1969) The distribution of polyphenols in the tea plant (*Camellia sinensis* L.) *Biochem. J.* 113: 741-755.
- 藤田勇三郎・上原郁恵・森本泰子・中嶋真由美・波多野力・奥田拓男 (1998) タンニン及びフラボノイドによる自動酸化抑制機構ヨモギ類のカフェータンニン類によるリポキシゲナーゼ依存脂質過酸化抑制機構．*薬学雑誌* 108 (2): 129-135.
- Fujita, Shinichi (1990) Components of the essential oils of *Solidago virgaurea* L.

Nippon Nogei Kagaku Kaishi 64 (11): 1729-1732.

福島男児 (2001) 大豆タンパク質の科学. 食の科学 283: 52-56

福田一郎 (1971) 外国における帰化植物. 遺伝 25: 23-28

福田一郎 (1982) 帰化植物セイタカアワダチソウおよびその近縁種の分布構造.

Received January (12): 675-688.

福田一郎. 1971a セイタカアワダチソウとその原生地. 植物と自然 5 (9): 21-22

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res* 50: 151-158

Ghisalberti EL (1996) Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species.

Phytochemistry 41: 7-22

Gibbons S, Moser E, Hausmann S, Stavri M, Smith E, Clennett (2005) An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. *Phytochemistry* 66: 1472-1475.

Gross SC, Goodarzi G, Watabe M (2002) Antineoplastic activity of *Solidago virgaurea* on prostatic tumor cells in an SCID mouse model. *Nutr Cancer* 43 (1): 76-81.

Guo XZ. Dictionary of Toxic Chinese Materia Medica. (1992) Tianjin science and technology translation and publishing. *Company-January*

He W, Wen GY. (1999) The constituents of the essential oil from *Solidago canadensis*. *Chin Bull Bot* 16(2): 178-180.

Hiller K, Dube G, Zeigan D. (1985) Virgaureosid A-a new bisdesmoside phenol glycoside from *Solidago virgaurea* L. *Pharmazie* 40 (11): 795-796.

- Hiller K, Gil-Rjong R, Franke P. (1979) A saponin from *Solidago decurrens*. *Pharmazie* 34: 360-361.
- Hiller K, Gil-Rjong R, Ot to A. (1979) Flavonoids of *Solidago virgaurea* L. A .Gray. *Pharmazie* 34: 571-572.
- Hiroji Ina, henji Ymada, Kosai Matsumoto, Toshio Miyazaki. (2004) Effects of Benzyl Glucoside and Chlorogenic acid from prunus mume on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and catecholamine levels in plasma of experimental menopausal model rats. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (1): 136-137.
- Hori K, Satake T, Saiki Y, Murakami T (1990) Chemical and chemotaxonomical studies of Filices. LXXIX. An acylphloroglucinol glycoside from *Diplazium nippinicum* TAGAWA. *YAKUGAKU ZASSHI* 110: 315-320.
- 堀 友花・畑井 朝子 (2006) 小豆のポリフェノールの抗菌作用とタンパク質凝集との関係, 函館短期大学紀要 32: 21-28.
- Howell. C.R., Bell, A.A. Stipanovic, R.D. (1976) Effect of aging on flavonoid content and resistance of cotton leaves to *Verticillium* wilt. *Physiol. Plant Pathol* 8: 181-188
- Huang M.T., Smart R.C., Wong C.Q., and Conney A.H (1998) Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48: 5941-5946.
- Huang S, Fujioka T, Yoshida M, Ishimaru K (2006) A new chalcone glycoside from *Sapium sebiferum*. *J Nat Med* 61: 339-341.

黄 素梅, 田中章江, 石丸幹二 (2004) アントシアニン - 大豆タンパク質複合体の調製とその機能性評価. 食科工 51: 18-22.

市河三次 (1989) セイタカアワダチソウ. 堀田満編. 植物生活誌. 平凡社. 249: 88-97.

市河三次・富田任・佐藤良暢 (1975) 花粉アレルギーと抗原植物. 黎明書房: 109-145.

Ichihara K., Kawai T., and Noda M., (1978) Polyacetylenes of *Solidago altissima* L. *Agric. Biol. Chem.* 42: 427-431.

五十嵐喜治 (2000) 食品素材成分としてのアントシアニンの生理機能. *FFI Journal* 187: 17-29.

Inoguchi M., Ogawa S., Furukawa S., Kondo H (2003) Production of an allelopathic polyacetylene in hairy root cultures of goldenrod (*Solidago altissima* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 863-868.

猪谷富雄・肱元茂善 (1978) セイタカアワダチソウの生態に関する研究 雑草研究: 23.

石丸幹二, 野中源一郎 (2001) 大豆タンパクによる茶カテキン類の分離法. 食科工 48: 664-670.

Ishimaru K., Shimomura K. (1995) Phenolics in root cultures of medicinal plants. *Structure and Chemistry* 17: 421-449.

Ishimaru K., Yonemitsu H., and Shimomura K., (1991) Lobetyolin and lobetyol from hairy root culture of *Lobelia inflata*. *Phytochemistry* 30: 2255-2258.

- Ishimaru, K., Arakawa, H., Neera, S. (1994) XXVI *Sapium sebiferum* (Chinese Tallow):
in vitro culture and the production of tannins and other phenolic compounds. *Y.P.S. Bajaj* 28: 426-444.
- Islam, M. S., M. Yoshimoto, S. Yahara, S. Okuno, K. Ishiguro and O. Yamakawa.
 (2002) Identification and characterization of foliar phenolic composition in
 sweet-potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3718-3722.
- Ito H, Muranaka T, Mori K, Jin Z X, Yoshida T. (1997) Dryofragin and aspidin PB,
 piscicidal components from *Dryopteris fragrans*. *Chem. Pharm. Bull.* 45:
 1720-1722.
- Ito H, Muranaka T, Mori K, Jin Z X, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T (2000)
 Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans* and their
 anti-tumor promoting activity. *Chem. Pharm. Bull.* 48: 1190-1195.
- Ito H, Nishitani E, Konoshima T, Takasaki M, Kozuka M, Yoshida T (2000) Flavonoid
 and benzophenone glycosides from *Coleogyne ramosissima*. *Phytochemistry* 54:
 695-700.
- 岩浅潔 (1977) チャにおけるカテキン合成に関する研究. 茶業試験場研究報告
 13: 101-126.
- Jiang Y., Kusama K., Satoh K., Takayama F., Watanabe S. and Sakagami H (2000)
Phytomedicine 7 (6): 483.
- Joao C.M. Barreira, Isabel C.F.R. Ferreira, M. Beatriz P.P. Oliveira, Jose Alberto Pereira
 (2008) Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and

- fruit. *Food Chemistry* 107: 1106-1113
- Kalembe, Danuta, Ma rschall. (2001) Constituents of the essential oil of *Solidago gigantea* Ait. (giant goldenrod). *Flavour Fragrance J* 16 (1): 19-26.
- Kapli, A., I. B. Koul and O. P. Suri. (1995) Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *Anthocephalus cadamba*. *Phytother. Res.* 9: 189-193.
- Kasali AA , Ekundayo O, Paul C, et al. (2002) Epi-Cubebanes from *Solidago canadensis* . *Phytochemistry* 59 (8): 805-810.
- Kapli, A., I. B. Koul and O.p. Suri. (1995) Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *Anthocephalus cadamba*. *Phytother.Res.* 9: 189-193.
- 河津一義・中村彰夫・西野親正・小清水孝一・三井哲夫 (1969) セイタカアワダチソウの根中の植物成長抑制物質. 日本農芸科学. 一般講演要旨: 130.
- Kim SS, Park RY, Jeon HJ, Kwon YS, Chun W. (2005) Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytother Res* 19 (3): 243-245.
- 北村四郎 (1976) セイタカアワダチソウ. 世界の植物 2: 54-56.
- Kobayashi A, S. Morimoto, Y. Shibata, K. Yamashita and M. Numata (1980). *J. Chem. Ecology* 6 (1): 119-131.
- Kobayashi K., Numata M. (1973) C-10-polyacetylenes as allelopathic substances in dominants in early stages of secondary succession. *J. Chem. Ecol* 6: 119-131.
- 小谷真由美・藤田晃人・田中敏郎 (1999) ヒト好塩基球細胞およびマウスにおける柿の葉抽出物のアレルギー抑制効果 日本栄養・食糧学会誌 52: 147-151 .

- Kwon HC, Jung CM, Shin CG, Lee JK, Choi SU, Kim SY, Lee KR (2000) A new caffeoyl quinic acid from *Aster scaber* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *Chem. Pharm. Bull* 48: 1796-1798.
- Lam J., Christensen L. P., Farch T., and homasen T., (1992) Acetylenes from the roots of *Solidago* species. *Phytochemistry* 31: 4159-4161.
- L.Bravo, Polyphenols: Chemistry. (1998) Dietary Sources. Metabolism, and Nutritional Significance. *Nur. Rev.* 56: 317-333.
- Lin LC, Kuo YC, Chou CJ (1999) Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*. *J. Nat. Prod.* 62: 405-408.
- Lu T, Vargas D, Franzblau SG (1995) Diterpenes from *Solidago rugosa*. *Phytochemistry* 38 (2): 451-456.
- Inoguchi Masahiko, Ogawa Satoshi, Furukawa Sanae, and Kondo Hirokiyo (2003) Production of an allelopathic polyacetylene in hairy root cultures of goldenrld (*Solidago altissima* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(4): 863-868.
- 松尾友明・川添裕子・伊藤三郎 (1981) カキ葉、ガク、幼果に含まれるポリフェノールの経時的変化. 鹿大農学術報告 31: 1-9.
- McCune LM, Johns T. (2002) Antioxidant activity in medicinal plants as sociated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *J Ethnopharmacol* 82 (2-3): 197-205.
- Michael J. (1999) Constituents of the essential oil of *Solidago odora* Ait. *Economic Botany* 53 (3): 281-283.

- Mishima S., Yoshida C., Akino S., Sakamoto T (2005) Antihypertensive effects of Brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull* 28: 1909-1914.
- Miyase T, Inose Y, Ueno A. (1994) Studies on the Constituents of *Solidago virgaurea* L. □. Structures of *Solidago saponins* XXI-XXIX. *ChemPharm Bull* 42 (3): 617-624.
- Moller B., Herrmann K. (1983) Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in *stone* and *pome* fruit. *Phytochemistry* 22 : 477-481.
- Mori H., T. Tanaka, H. Shima, T. Kuniyasu and M. Tkahashi (1986) Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer lett.* 30: 49-54.
- Motoo Tori, Akiko Katto, Masakazu Sono (1999) Nine new cicerodane diterpenoids from *rhizomes* of *Solidago altissima*. *Phytochemistry* 52: 487-493.
- 森曉美・藤岡稔大・吉田都 (2006) *Hemiphragma heterophyllum* の組織培養と二次代謝物生産. 日本食品化学学会誌 13 : 29-34.
- Mullin, C.A., A. A. Alfatafta, J. L. Harman, S. L. Everett and A. A. A. Serino (1991) Feeding and toxic effects of folral sesquiterpene lactones, diterpenes, and phenolics from sunflower (*Helianthus annuus* L.) on western corn rootworm. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2293-2299.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

- 村田容常 (2001)、フェノール類と食品の品質に関する化学的・生化学的研究. 日食科工誌: 1-7.
- 中川恭二浪・榎本敬 (1975) セイタカアワダチソウ (*Solidago altissima* L.) の日本における分布. 農学研究 55: 67-78.
- 中村直紀・根本正之 (1996) セイタカアワダチソウの *cis-dehydromatricaria* ester 含有量および放出量 雑草研究 41 (4): 359-361.
- Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T (2000) Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 5512-5516.
- 榎本敬・中川恭二浪 (1977) セイタカアワダチソウに関する生態学的研究. 第 1 報 稀子および地下茎からの成長. 雑草研究 22: 202-208.
- Nishitani E., Sagesaka Y. M. (2004) Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis* 17: 675-685.
- Nguyen M. T. T., Awale S., Tezuka Y., Shi L., Zaidi S. F. H., Ueda J., Tran Q. L., Murakami Y., Matsumoto K., Kodama S (2005) Hypouricemic effects of acacetin and 4, 5-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 2231-2234.
- Numata M., A. Kobayashi and N. Ohga (1973) Fundamental Studies in the Characteristics of Urban Ecosystems 59-64.

- Numata M., A. Kobayashi and N. Ohga. (1974) Studies in Urban Ecosystems: 22-25.
- Ohmoto T., Yamaguchi K. (1988) Constituents of pollen. XV. Constituents of *Biota orientalis* (L.) *Chem. Pharm. Bull* 36: 807-809.
- 大澤俊彦 (2001) ポリフェノール , 特にアントシアニンの機能性. *FFI Journal* 192: 4-10.
- Ossipov V, Nurmi K, Lojonen J, Haukioja E, Pihlaja K (1996) High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *Journal of Chromatography* 721: 59-68.
- Park JC, Lee JH, Choi JS (1995) A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *Phytochemistry* 39: 261-262.
- Reznicek G , Jurenitsch J, Freiler M, et al . (1992) Isolation and structure elucidation of further saponins from *Solidago canadensis* . *Planta Med* 58 (1): 94-98.
- Reznicek G, Jurenitsch J, Plasun M. (1991) Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* 30 (5): 1629-1633.
- Rousseau J. (1945) “Études ethnobotaniques québécoises: Le folklore botanique de Caughnawaga,” Contributions de l’Institut botanique de l’Université de Montréal, 55, Les Presses de l’Université de Montréal, Montréal, Canada, 7-72.
- Shiu WKP, Gibbons S (2006) An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum beanii*. *Phytochemistry* 67: 2568-2572.
- 下園英俊・小堀真珠子・新本洋士 (1996) サツマイモ抽出物におけるマウスメラノ

- ーマ細胞のメラニン生成抑制. 日本食品化学工学会誌. 43: 313-317.
- Sung JH , Lee JO, Son JK, et al. (1999) Cytotoxic constituents from *Solidago virgaurea* var. *gigantea* MIQ. *Arch Pharmacol Res.* 22 (6): 633-637.
- Smith H. H. (1933) “Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians,” Bulletin of the Public Museum of the City of Milwaukee 7, Milwaukee, United States: 53.
- Tada H., Shimomura K., and Ishimaru K., (1995) Polyacetylenes in *Platycodon grandiflorum* hairy root and *Campanulaceous* plants. *J. Plant Physiol* 145: 7-10.
- 竹内若子・大橋千浩・木学量子・角野史佳・平井菜穂子 (2004) ナスポリフェノール量がラジカル捕捉活性および抗酸化活性に及ぼす影響 名古屋女子大学紀要 第 50 号: 53 ~ 58.
- Tamas M, Rosea M. (1988) Saponins from species of *Solidago* growing in Romania. *Farmacia* 36 (3): 167-171.
- Tanaka T., T. Kojima, T. Kawamoro, A. Wang, M. Suzuki, K. Okamoto and H Tohru Murayama, H. Yada, M. Kobori, H. Shinmoto and T. Tsushida (2002) Evaluation of Three Antioxidants and their Identification and Radical Scavenging Activities in Edible Chrysanthemums. 園学雑 71 (2): 236-242.
- Thiem B. Wesolowska M. (2001) Phenolic compounds in two *Solidago* species from *in vitro* culture. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58 (4): 277-281.
- Tomas-Barberan, F.A., J. Loaiza-Velarde, A. Bonfanti and M.E. Saltveit (1997) Early wound and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 399-404.

- 牛島和幸・野澤高陽・田中章江・野中源一郎・石丸幹二 (2001) テンペタンパク質による茶カテキン類の分離法. 食科工. 48: 913-917.
- Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Van Montagu M., Schell J. (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. *J. Gen. Virol* 26: 33-48.
- Vila R, Mundina M, Tomi F, et al. (2002) Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Med.* 68 (2): 164-167.
- Wang H., Nair M. G., Strasburg G. M., Booren A. M., Gray J. I. (1999) Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food Chem* 47: 840-844.
- Wang H., Nair M. G., Strasburg G. M., Booren A. M., Gray J. I. (1999) Novel antioxidant compounds from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Nat. Prod* 62: 86-88.
- WE Robinson, MG Reinecke, S Abdel-Malek, Q. Jia, and SA Chow. (1996) Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (13): 6326-6331.
- Whiting GC, Coggins RA (1975) 4-*p*-coumarylquinic acid in apple fruits. *Phytochemistry* 14: 593.
- Wieland Peschel, Christine Bohr, Andreas Plescher (2008) Variability of total flavonoids in *Crataegus* Factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. *Fitoterapia* 79: 6-20.
- Wollenweber E, Stevens J F, Ivanic M, Deinzer M L (1998) Acylphloroglucinols and flavonoid aglycones produced by external glands on the leaves of two *Dryopteris*

- ferns and *Currantia robertiana*. *Phytochemistry* 48: 931-939.
- Xie H., Wang T., Matsuda H., Morikawa T., Yoshikawa M., Tani T (2005) Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XV. Inhibitory effect on aldose reductase and structures of saussureosides A and B from *saussurea medusa*. *Chem. Pharm. Bull* 53: 1416-1422.
- Xia WX, He W, Wen GY. (1999) The constituents of the essential oil from *Solidago canadensis*. *Chin Bull Bot* 16 (2): 178-180.
- Yamada, J. and Y. Tomita. (1996) Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci. Biotech. Biochem* 60: 328-329.
- Yamanaka M., Ishibashi K., Shimomura K., and Ishimaru K., (1996) Polyacetylene glucosides in hairy root cultures of *Lobelia cardinalis*. *Phytochemistry* 41: 183-185.
- 横山・荒木秀雄 (2000) 大豆の生理機能と利用食品について. 食品工業 30 号: 36-45.
- Yoshimoto M., K-Azuma R., Fujii M., Hou D-X., Ikeda K., Yoshidome T., Osako M. (2004) Phenolic composition and radical scavenging activity of sweetpotato-derived shochu distillery by-products treated with koji. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 2477-2483.
- Yoshimoto M., Yahara S., Okuno S., Islam M. S., Ishiguro K., Yamakawa O. (2002) Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 66:

2336-2341.

行永寿二郎・井手欽也・伊藤幹二・嶋田資久 (1975) セイタカアワダチソウの生態に関する2.3の観察asulamによる防除. 雑草研究 19: 46-50.

Zarzuelo A, Gamez JM, Utrilla P, Jimenez J, Jimenez I (1995) Luteolin 5-rutinoside from *Salvia lavandulifolia* ssp. *Oxyodon*. *Phytochemistry* 40: 1321-1322.

Zhang YJ, Abe T, Tanaka T, Yang CR, Kouno I (2002) Two new acylated flavanone glycosides from the leaves and branches of *Phyllanthus emblica*. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 841-843.

Zhu X., H. Zhang and R. Lo (2004) Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7272-7278.

Zidorn, C. and H. Stuppner (2001). Chemosystematics of taxa from the Leontodon section *opporinia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 827-837.