

シソに含まれる青酸配糖体についての天然物化学的研究

2022

赤塚 亮太

目次

緒言	1
第1章 シソに含まれる青酸配糖体のピクリン酸試験紙法による検出と HPLC による定量	
第1節 青酸配糖体のピクリン酸試験紙法による検出	3
第2節 シソに含まれる青酸配糖体の種類について	5
1. セイヨウバクチノキからのプルナシンの単離および検量線の作成	5
2. シソに含まれる青酸配糖体の種類	7
第3節 プルナシンの HPLC による定量	9
1. 栽培品について	9
2. 市場品ソヨウについて	13
第4節 β -グルコシダーゼ活性試験	13
第5節 考察	14
第1章まとめ	18
第2章 シソに含まれるプルナシンの含量の変化と集積部位について	
第1節 栄養生長期の栽培日数とプルナシン含量の変化	19
第2節 生長段階ごとのプルナシン含量の変化	20
第3節 プルナシンの集積部位について	21
第4節 LC-MS 分析	23
第5節 茎と根に多く見られた水溶性化合物について	23
第6節 考察	25
第2章まとめ	28
総括	29
実験の部	32
発表論文目録	45
謝辞	46
引用文献	47

緒 言

青酸配糖体は、約 3000 種類の植物に見出されている天然物である [1]。その生合成の出発物質はアミノ酸であることが示されており、 β -グルコシダーゼ等の加水分解酵素の存在下で加水分解されると糖とカルボニル化合物とシアン化水素 (HCN) を生じる [2]。HCN はミトコンドリアのシトクロム *c* オキシダーゼを阻害し、細胞内呼吸を停止させるため、青酸配糖体は植物の化学的防御物質の一種であると考えられている [1, 2]。しかし、HCN は適量であれば鎮咳作用を示すとされており [3]、第十八改正日本薬局方では、鎮咳作用を期待して用いられる生薬キョウニンで「本品は定量するとき、換算した乾燥物に対し、アミグダリン 2.0 % 以上を含む」と規定されている [4]。一方、青酸配糖体の過剰な摂取は人体には有害であり、例えば、過去にトルコにおいて、3 歳女児がアンズの種子を 8-12 個程度摂食した 1 時間後に 7 回嘔吐し、意識不明となったというシアン化合物による食中毒が発生した [5]。このように、青酸配糖体は量によっては薬効を示したり毒性を示したりするため、植物原料を薬用・食用とするうえでその原料中の青酸配糖体の種類や含量等を把握することは重要である。

生薬は、動植物や鉱物等の天然の産物に乾燥等の簡単な加工を施した薬物である。その歴史は古く、日本では推古天皇の代に遣隋使により医書や本草書がもたらされ、我が国の生薬療法の体系化が始まったと考えられている [6]。現在でも生薬は医薬品市場の中でも大きな一翼を担っており、近年はその使用量は増加傾向にある [7]。生薬は単一の成分として精製された化学薬品とは異なり、多成分系として存在している。その基原は植物であることが多いが、基原植物の種類や栽培・生育環境、採取の時期、加工・保存条件等の違いにより、生薬の成分組成は変動し得ると考えられる。したがって、生薬を医薬品として取り扱う場合、その成分組成・薬効を一定の範囲に収め、安定した品質の生薬を供給することが求められるが、その需要は今後より一層高まると考えられる。

シソ *Perilla frutescens* var. *crispa* は、シソ科シソ属の 1 年性草本であり、日本薬局方収載の生薬ソヨウの基原植物である [8]。葉が緑色のものは香味野菜として食用に、葉の片面または両面が赤色のものは抗菌・鎮咳等を目的に薬用にされている。シソの精油型や色素等の形質は遺伝的に厳密に制御されている [9] ため、どのような系統のシソを基原として使用するかによっても品質の違いが出ると予想される。したがって、ソヨウや香味野菜としてのシソの安定した品質の確保のためには、基原となるシソの栽培・

採取・加工方法や育種・系統維持について検討することは非常に重要である。

シソに含まれる特徴的な成分としては、モノテルペンやフェニルプロパノイド等からなる精油類や、色素成分であるアントシアニン類が知られている [10]。しかし、マンデロニトリルをアグリコンとするプルナシン、サンブニグリン、ユーカリプトシン A 等の青酸配糖体 (図 1) も単離されたという報告もある [11, 12, 13, 14]。

一方、植物から得られる精油は多成分系であり、その香気は、単一な成分によるものではなく、多数の揮発性成分が相互作用して香気として認識されるものである [15]。

シソに含まれることが報告されている青酸配糖体からは、分解により香気を有するベンズアルデヒドや、数 mg 程度であれば鎮咳作用を示すとされている HCN [3] を生じる。また、水蒸気蒸留により得られたシソの精油中にしばしば 0.1–2.4 % 程度ベンズアルデヒドがみられることが報告されている [16]。このため、ソヨウの基原植物であるシソに含まれる青酸配糖体について研究することは、その香気や鎮咳活性等について議論するうえで有用であると考えられる。

しかし、シソ葉から青酸配糖体が単離されたという報告はあるものの、含量等それ以上の詳細な知見はない。本研究は、シソに含まれる青酸配糖体の種類や含量やその変化、集積部位等について天然物化学的な視点から実験を行い、生薬ソヨウや香味野菜としてのシソの安定した品質の確保に資するために、基原となるシソの採取・加工について青酸配糖体を指標に検討したものである。

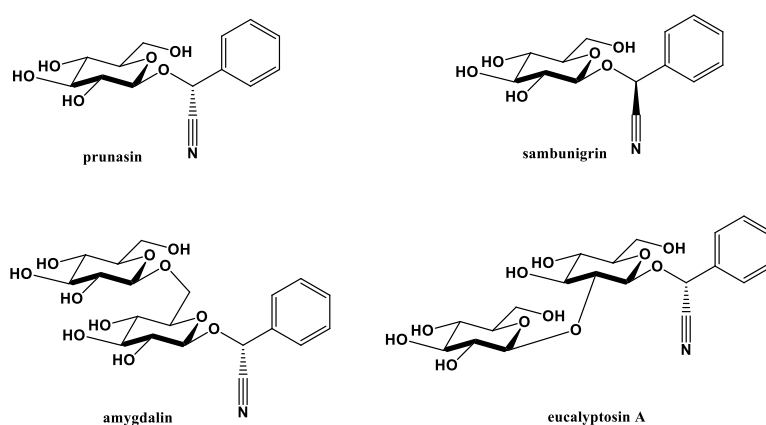


図 1 マンデロニトリルをアグリコンとする青酸配糖体の構造

第1章

シソに含まれる青酸配糖体のピクリン酸試験紙法による検出と HPLCによる定量

本章では、シソ葉に含まれる青酸配糖体の種類と種々の葉の青酸配糖体の含量を明らかにすることを目的に実験を行った。

厚生労働省の「食品、添加物等の規格基準」にて規定されているシアン化合物の定性試験法であるピクリン酸試験紙法 [17] をシソ葉や市場品ソヨウに応用し、シソに含まれるシアン化合物の簡便かつ半定量的に検出した。また、シソに含まれる青酸配糖体の種類を明らかにし、さらにそれらの含量を明らかにするために、セイヨウバクチノキから単離したプルナシンを用いて検量線を作成し、同一条件で栽培した様々なシソの系統の葉や生長・乾燥の程度の葉について HPLC でプルナシンを定量した。

第1節 シソに含まれるシアン化合物のピクリン酸試験紙法による検出

ピクリン酸試験紙法は、青酸配糖体等の化合物を分解し、HCN として検出する定性試験法である。その原理は、試験紙が反応後に黄色から赤色に変化すれば陽性、すなわち試料中にシアン化合物が存在するというものである。先行研究には、試験紙の呈色物質を EtOH で溶出し、吸光度計を用いて定量したもの [18] があるが、本実験では、ピクリン酸試験紙法をシソ葉・市場品ソヨウにも応用し、吸光度計等の専門性の高い分析機器を使用せず、目視でより簡便かつ半定量的に検出することを目的に実験を行った。

まず青酸配糖体濃度と試験紙の呈色の濃さの関係について検討した。青酸配糖体の 1 つであるアミグダリン (図 1) を、任意の濃度となるようにクエン酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解させ、 β -グルコシダーゼと反応させて試験紙の呈色の濃さを比較した。続いて栽培した純系シソ新鮮葉及び市場品ソヨウを、クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中、 β -グルコシダーゼ存在下で同様に反応させた。その結果を、先述のアミグダリンの加水分解反応の結果 (試験紙の呈色の濃さ) と比較し、半定量的にシアン化合物を検出した。

アミグダリン濃度 (クエン酸緩衝液 [pH 5.0] に溶解したもの) とピクリン酸試験紙の呈色の濃さは、0-1.0 mg/mL の範囲でほぼ比例することが判明した。以降は呈色の濃さを「記号」で表し、それぞれ「陽性」、「擬陽性」、「陰性」と表現することとした (図 2)。






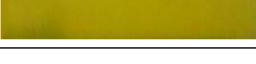




アミグダリンの濃度 (mg/mL)	結果	記号	表現
1.0		++++	陽性
0.10		+++	
0.010		++	
0.0050		+	
0.0010		±	擬陽性
blank (0)		-	陰性

図2 アミグダリン濃度とピクリン酸試験紙の呈色の濃さ

一方、栽培した4種の純系シソ(京都大学大学院薬学研究科にて自家受粉により純系として維持[19])新鮮葉5.0g(新鮮重量[Fresh Weight]以下、“FW”)及び市場品ソヨウ1.5g(乾燥重量[Dry Weight]以下、“DW”)を反応させたときの結果は図3の通りであった。すなわち、純系シソではすべて陽性または擬陽性(+++ - ±)で、系統間でその呈色の濃さには違いがあることが判明した。一方、市場品ソヨウには、陽性のものと陰性のもの両方が存在(++ - -)した。

系統番号	結果	記号
25		±
32		+++
5254		++
5343		+















サンプル番号	結果	記号
1		+
2		±
3		+
4		-
5		-
6		+
7		++
8		±
9		±
10		-
11		±
12		±
13		++
blank		-

図3 純系シソおよび市場品ソヨウのピクリン酸試験紙法の結果

第2節 シソに含まれる青酸配糖体の種類について

1. セイヨウバクチノキからのプルナシンの単離および検量線の作成

シソにはプルナシン等の青酸配糖体が含まれていることが報告されているが、定量には標品が必要である。しかし、試薬として市販されているプルナシンは入手が困難であったため、先行研究でプルナシンを多く含むことが報告されているセイヨウバクチノキ *Prunus laurocerasus* [20] 葉を用い、77.25 g の葉の MeOH エキス (4.01 g のうち約 4 分の 3) から、2.81 mg のプルナシンを、シアノ基が結合してい

る炭素原子のエピマーであるサンプニグリンとの混合物として単離した (以下、「単離物」)。単離物の LC-MS クロマトグラム上には、 $m/z=294$ $[M-H]^-$ を示す 2 つのピークがみられた (図 4)。また、 1H NMR の化学シフト値 [21] 及びシグナルのピーク面積比から、この単離物の組成は、プルナシン:サンプニグリン \approx 5:1 であることが判明した (図 5)。

単離物を用いてプルナシンの検量線を作成したところ、0.00157–0.0606 mg/mL の範囲で $y=6.0 \times 10^6 x + 534.93$ ($R^2=0.997$) (図 6) となり、良好な直線性を示した。ただし、プルナシン濃度が 0.00157 mg/mL 以下では検量線の直線性が成り立たなかったため、この濃度を定量下限としてシソに含まれるプルナシンを定量した。

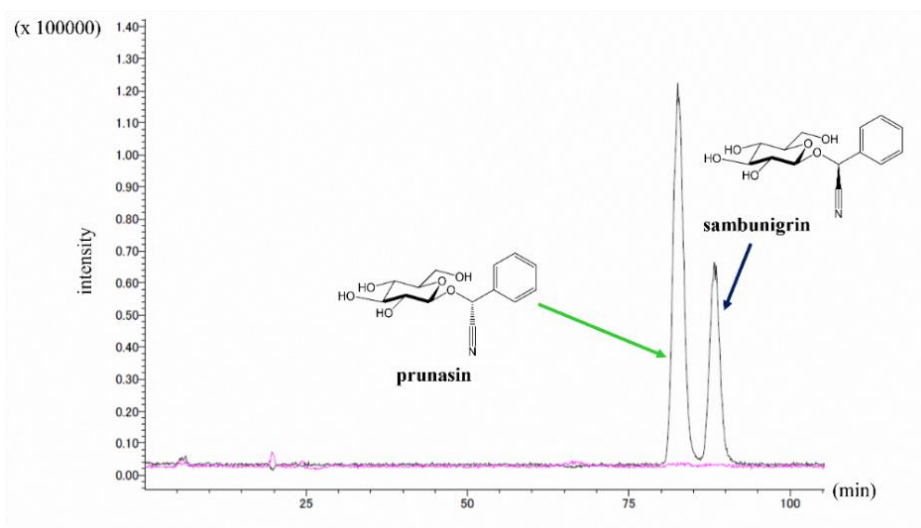


図 4 単離物の LC-MS クロマトグラム

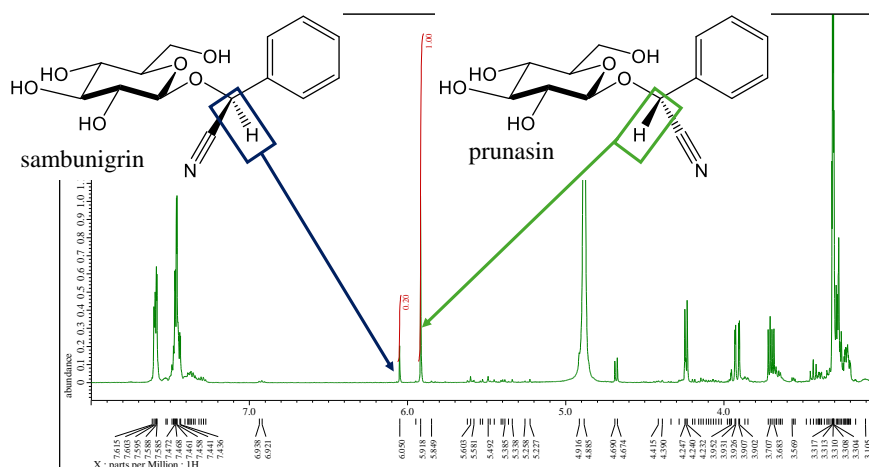


図 5 単離物の 1H NMR データ (500 MHz, in CD_3OD)

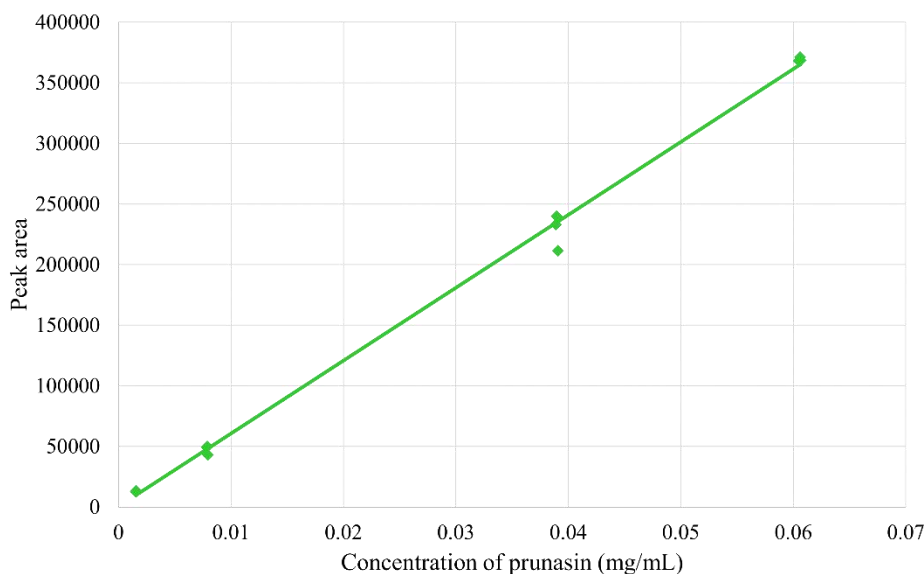


図 6 プルナシンの検量線

2. シソに含まれる青酸配糖体の種類

単離物の $^1\text{H NMR}$ のデータ (プルナシンとサンプニグリンそれぞれの水素原子の積分比) と、単離物およびシソの分析サンプルの HPLC (図 7) 及び LC-MS のデータから、シソに最も多く含まれている青酸配糖体はプルナシンであることが判明し、サンプニグリン及びマンデロニトリルをアグリコンとする diglucoside とみられる化合物 ($m/z=456$ [M-H] $^-$) も検出された。このため、diglucoside とみられる化合物を、No. 32、No. 5254 (系統間のプルナシン含量の比較に用いたもの)、市場品ソヨウ 7、13 の HPLC 分析サンプルの一部を用いて 1.15 mg 単離精製し、その LC-MS/MS (図 8)、 $^1\text{H NMR}$ のデータ (図 9) を文献値 [22, 23] と比較したところ、ユーカリプトシン A であることが判明した。

しかし、プルナシン以外の青酸配糖体は収量が少なく、かつプルナシンに比べて HPLC クロマトグラム上でのピーク面積がはるかに小さかった (約 10 分の 1 以下) ことから、以後の定量分析ではプルナシンについて行うこととした。

本章の実験では、複数の先行研究にて、シソからの単離が別々に報告されている青酸配糖体がすべて検出された。

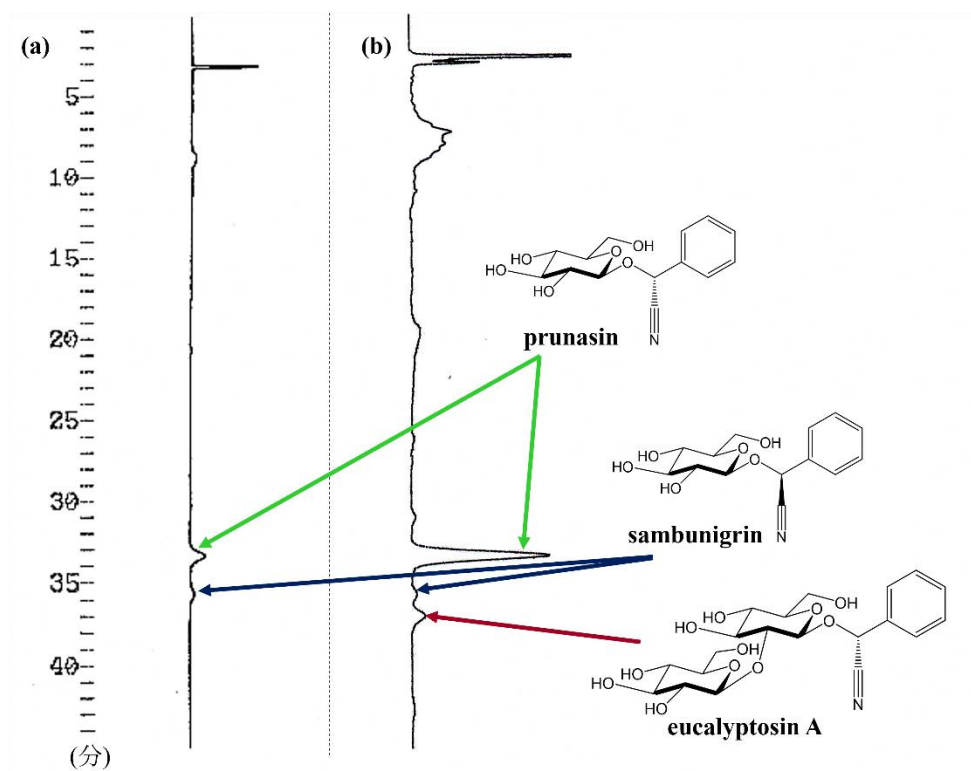


図7 HPLCクロマトグラム

(a) セイヨウバクチノキからの単離物、(b) シソ分析サンプル (No. 32, 新鮮葉、主脈の長さが3-6 cmの分析サンプル)

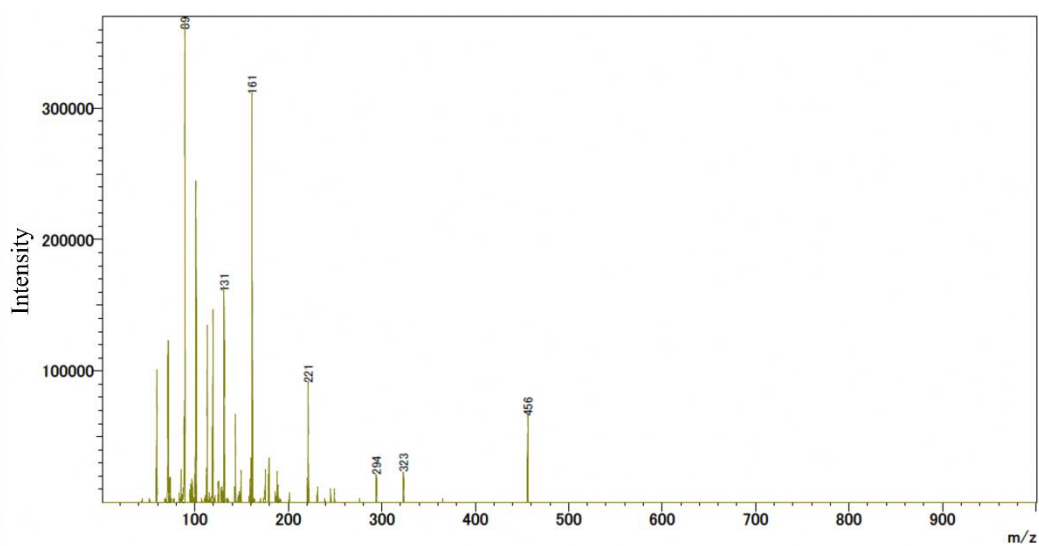


図8 ユーカリプトシン A の LC-MS/MS のデータ

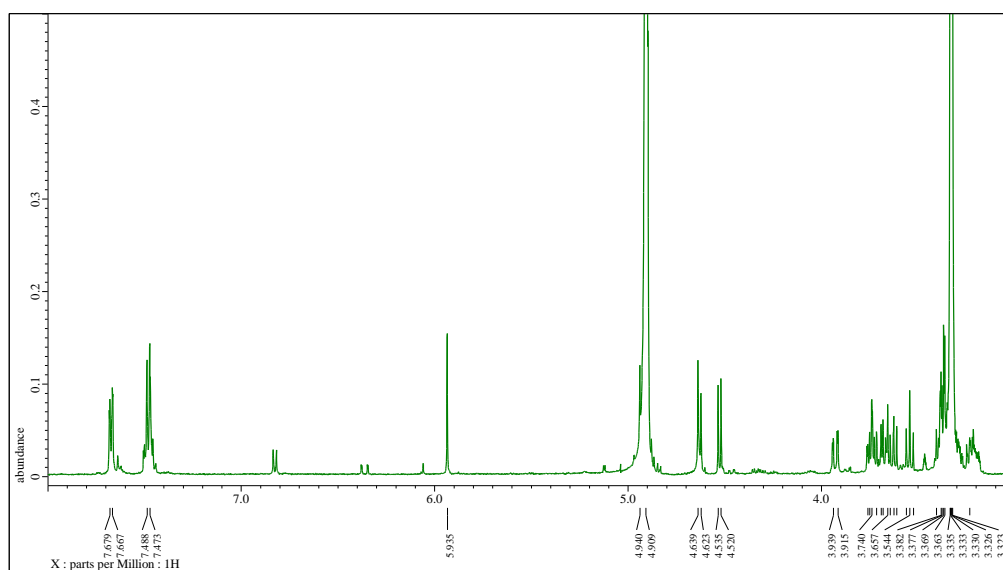


図 9 ユーカリプトシン A の ^1H NMR のデータ (500 MHz, in CD_3OD)

第 3 節 シソに含まれるプルナシンの定量

本節でのサンプル調製には、出発材料を凍結乾燥せずに MeOH で抽出した。続いてその濃縮乾固したエキスを水に懸濁したのち、そのろ液の凍結乾燥物を MeOH 再溶解した。その MeOH 溶液の固相抽出カラムからの流出液を濃縮乾固し、希釈したものを HPLC での分析に供した。

上記のように調製したサンプルを用い、栽培した純系シソの種々の系統や、葉の生長・乾燥の程度について葉 1 g あたりのプルナシン含量を比較し、さらに No. 5254 の様々な葉の生長・乾燥の程度の葉 1 枚あたりのプルナシンの総量を算出した。また、市場品ソヨウについても 1 g あたりのプルナシン含量を比較した。

1. 栽培品について

HPLC による各系統の乾燥葉中のプルナシンの定量の結果、プルナシン含量は No. 32>No. 5254>No. 5343>No. 25 の順に多く (図 10)、少なくとも葉の色や精油型 [24, 25, 26] とは相関はみられなかった。

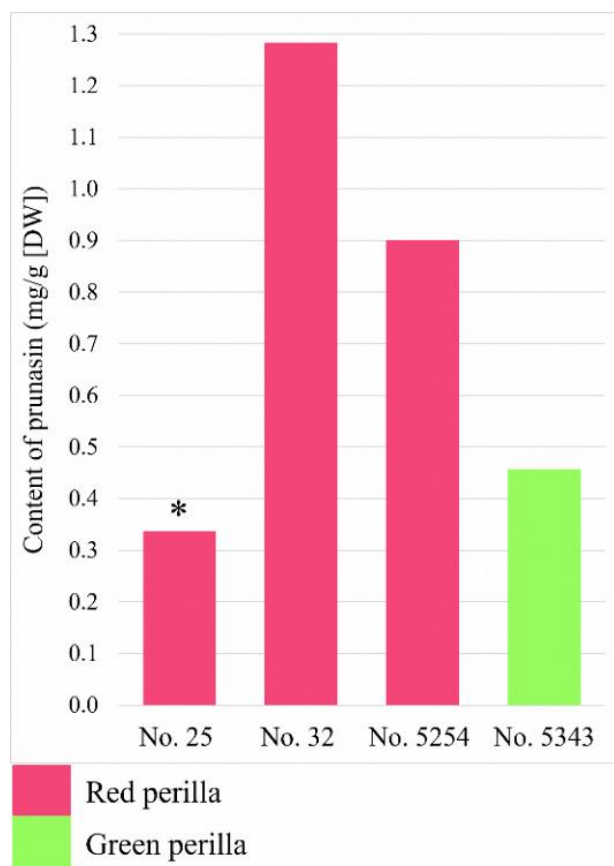


図 10 4種の純系シソ葉のプルナシン含量 (DW : Dry Weight)
 検量線の定量下限を下回ったものには、「*」を付して表した。

また、同一の系統・主脈の長さのシソ葉の、単位質量あたりのプルナシン含量について、新鮮葉 (乾燥重量に変換したもの) と乾燥葉では、新鮮葉に多いということが判明した (図 11)。

さらに、若い葉 (主脈の長さ : <3 cm, 3-6 cm) と、成熟した葉 (主脈の長さ : 6 cm 以上) では、若い葉にプルナシンが多い傾向にあることが判明した (図 11)。このような傾向は、*Eucalyptus cladocalyx* [27] や *Phaseolus lunatus* [28] でも観察されている。

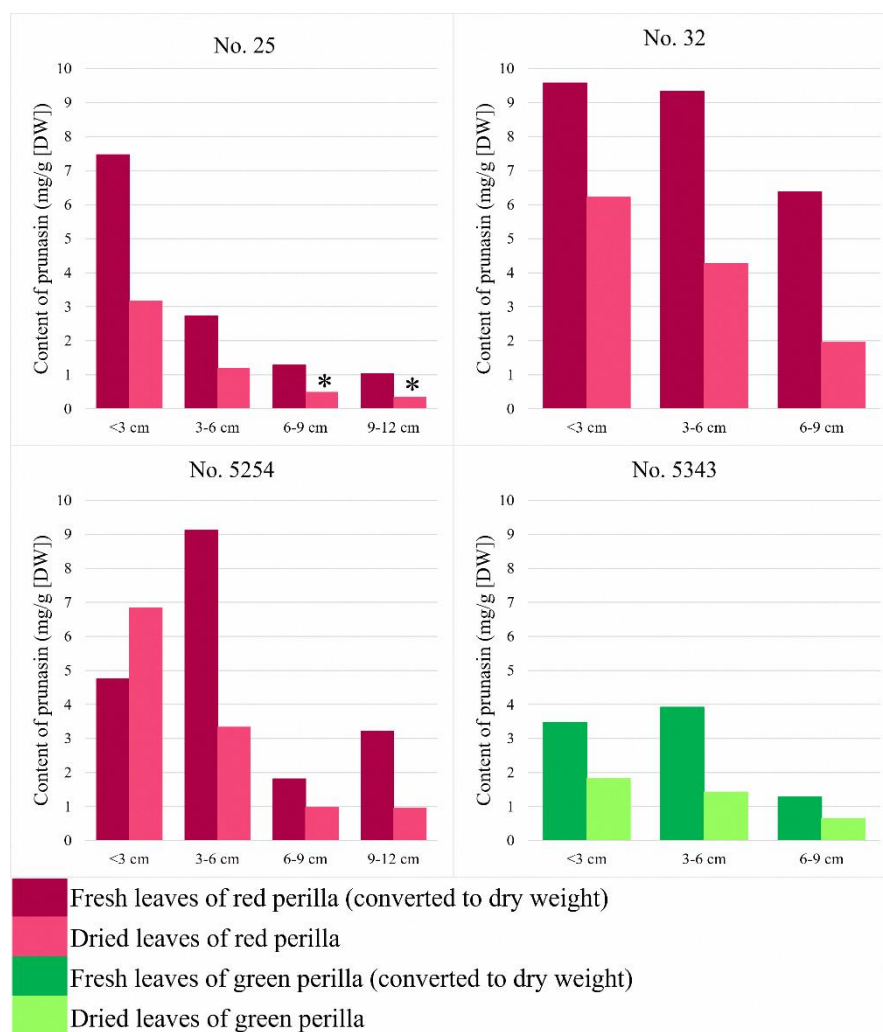


図 11 純系シソの主脈の長さごとの新鮮葉及び乾燥葉のプルナシン含量 (mg/g [DW])

検量線の定量下限を下回ったものには、「*」を付して表した。

一方、No. 5254 葉 1 枚あたりのプルナシン含量は表 1 の通りであった。すなわち、若い葉には少なく、十分に展開した葉に多いというものであった。同様の例としては、*E. cladocalyx* の葉 1 枚あたりのシアン化合物含量は Fully-expanded leaf > Old leaf > Young leaf の順に高い [27] というものがある。

表 1 No. 5254 葉 1 枚あたりのプルナシン含量

主脈の長さ (cm) (<i>n</i> =葉の枚数)	新鮮葉 1 枚の平均質量 (g/leaf [FW])	新鮮葉 1 枚の平均質量 あたりのプルナシン含量 (mg/leaf [FW])	乾燥葉 1 枚の平均質量 (g/leaf [DW])	乾燥葉 1 枚の平均質量 あたりのプルナシン含量 (mg/leaf [DW])
<3 (<i>n</i> =23)	0.217	0.022	0.003	0.021
3-6 (<i>n</i> =10)	0.092	0.173	0.014	0.047
6-9 (<i>n</i> =5)	0.294	0.118	0.048	0.047
9-12 (<i>n</i> =5)	0.754	0.549	0.126	0.120

n, 葉の枚数; FW, fresh weight; DW, dry weight.

2. 市場品ソヨウについて

市場品ソヨウについては、検体番号 4 を除くすべてからプルナシンが検出され、含量としては 0.3–1.2 mg/g (DW) のものが多く見られた (図 12)。

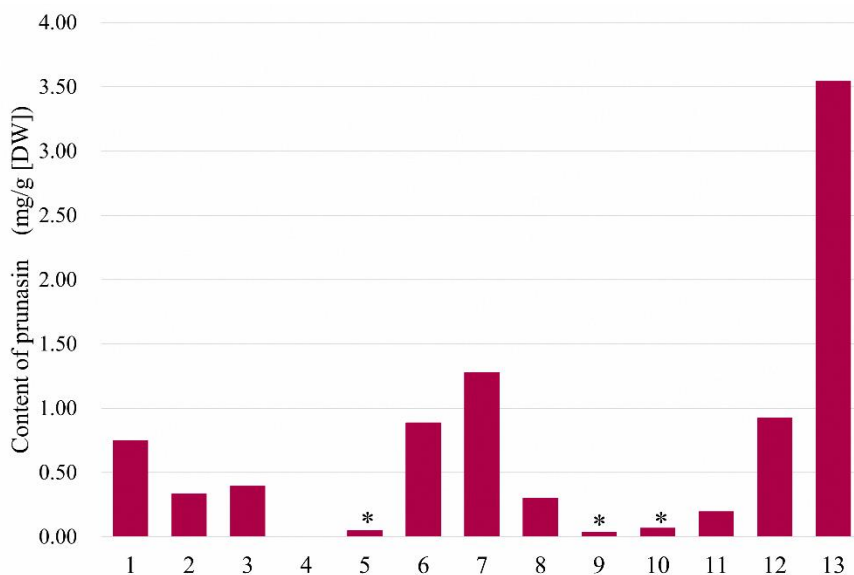


図 12 市場品ソヨウのプルナシン含量

第 4 節 β-グルコシダーゼ活性

シソの新鮮葉と乾燥葉では、乾燥葉で単位質量あたりのプルナシン含量が低かったことから、乾燥中にプルナシンが分解された可能性が考えられた。その要因の 1 つとして、分解酵素である β-グルコシダーゼによる可能性が考えられたため、シソ葉中の β-グルコシダーゼの存在を確認するためにその活性試験を行った。

まず初めに β-グルコシダーゼの基質である *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドの、β-グルコシダーゼによる分解産物である *p*-ニトロフェノールの検量線を、紫外可視吸光度計を用いて作成した。続いてシソ葉から抽出した β-グルコシダーゼ溶液を *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドと反応させ、生じた *p*-ニトロフェノールを定量することにより活性を算出した。

p-ニトロフェノールの検量線は、0.0030–0.020 mg/mL の範囲で $y=49.245 x + 0.0222$ ($R^2 = 0.9985$) となり、良好な直線性を示した (図 13)。

この検量線を用いて No. 32 新鮮葉の β -グルコシダーゼ活性を算出したところ、4.17 U/g (FW) であり、シソ葉に β -グルコシダーゼが存在していることが確認された。

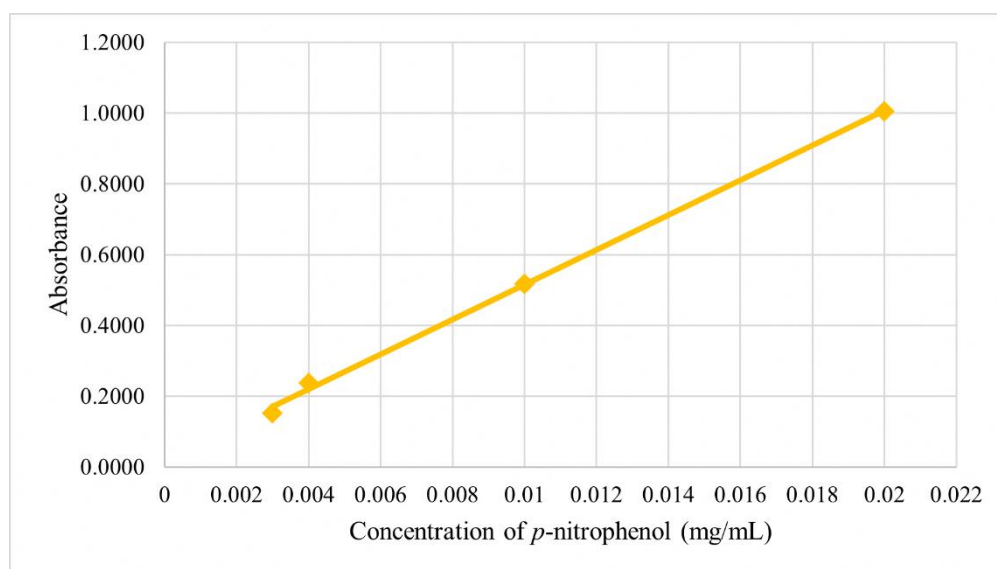


図 13 *p*-ニトロフェノールの検量線

第 5 節 考察

シソに含まれるシアン化合物のピクリン酸試験紙法による検出

アミグダリン濃度と呈色の濃さは概ね比例していたことから、本試験法は、定性試験としてのほか、アミグダリンによる試験紙の呈色の濃さと比較することで、簡易的な半定量試験法としても応用できる可能性が示された。

純系シソについては、すべての系統で陽性または擬陽性であったが、呈色の濃さには違いがみられた。このことから、本実験で栽培したすべての系統には青酸配糖体が含まれていることが示唆され、それぞれ含量が異なることが予想された。その要因の 1 つとしては、系統間の差によるという可能性が考えられた。一方、市場品ソヨウでは、陽性のもの

と陰性のもの両方が存在した。これは、市場品ソヨウのシアン化合物の含量にはばらつきがあり、シアン化合物が含まれていない、または本試験法での検出限界を下回ったものが存在したことを示している。

本試験法は、吸光度計や HPLC 等の専門性の高い分析機器類を使用せず、水浴や電子天秤といった簡易な設備で行うことが可能であり、使用する試薬・器具類も安価で入手しやすいという特徴がある。また、有機溶媒や重金属イオンを使用しないため、比較的環境にやさしい試験法でもある。さらに、短時間のうちに同時に多量のサンプルを処理することができ、その結果も試験終了と同時に出すことが可能である。

以上のことから、本試験法はシアン化合物含量を指標とした簡便な薬用植物の育種選抜・スクリーニング等に利用できる可能性が示された。

シソの分析サンプルに含まれるプルナシンの定量

【栽培品について】

栽培したシソ系統間のプルナシン含量は系統間で異なり、その序列はピクリン酸試験紙法での試験紙の呈色の濃さの順に一致した。このため、本研究で適用したピクリン酸試験紙法が半定量試験法としても応用できることが改めて確認された。

また、同一の系統・主脈の長さの新鮮葉と乾燥葉のプルナシン含量を比較したときの結果から、乾燥の過程でプルナシンが分解された可能性が考えられた。

さらに、いずれの系統でも、葉の単位質量あたりのプルナシン含量は、若い葉に多いという傾向がみられた。植物体内での防御物質の分布は個体内で均一ではないが、その分布は、防御物質を生合成するための「コスト」と、その部位が防御されることによる利点との兼ね合いから決定される、と説明している最適防御仮説 [29] がある。この仮説に照らし合わせて考えると、シソでは、その個体の将来性・生殖のためには若い葉を優先的に保護しようとするが、そのために若い葉に防御物質であるプルナシンが高濃度に蓄積されたと

いう可能性が考えられた。

しかし、葉 1 枚あたりのプルナシンの含量は、若い葉 (主脈の長さが <3 cm の葉) では少なく、十分に展開した 9-12 cm の葉で多いという結果となった。

以上を考え合わせると、シソでは、葉が若い段階では、元来高濃度にプルナシンが蓄えられており、葉の生長に伴ってさらにプルナシンが蓄積されてゆくと考えられた。しかし、葉の生長に対してその蓄積は遅いため、結果として葉のプルナシンの総量は十分に展開した葉で多くなるという可能性が考えられた。

【市場品ソヨウについて】

プルナシン含量は 0.3-1.2 mg/g (DW) であるものが多く見られた。青酸配糖体の分解産物である HCN は、適量 (数 mg 程度と考えられている) であれば鎮咳作用を示すと考えられている [3]。キョウニンには鎮咳作用を期待して用いられる生薬であるが、日本薬局方の基準を満たしたものの 1 g からは数 mg 程度の HCN が発生すると考えられる。本章の実験で用いた市場品ソヨウ 1 g から生じると予想される HCN 量は市場品キョウニンから生じる HCN よりも少ないことが予想された。このため、漢方処方でソヨウに期待される薬効は鎮咳作用だけではないが、鎮咳作用のみについて考えると、キョウニンに期待されるものよりも弱いと考えられた。一方、ヒトへの HCN の致死量は、0.5-3.5 mg/kg (BW [Body Weight]) 程度 (LD₅₀ は 4.21 mg/kg [BW]; ラット) であるとされているため [30]、例えば体重 60 kg のヒトへの致死量は 30-210 mg 程度となる。漢方処方で用いられるソヨウの 1 日量は 1-3 g 程度である [31] が、市場品ソヨウ 1 日量から発生すると予想される HCN 量は、0.03-0.1 mg 程度と致死量よりもはるかに小さいため、少なくともシアン化合物による毒性という観点からは安全性に問題はないと考えられた。

β-グルコシダーゼ活性試験

シソ葉 (No. 32) の β-グルコシダーゼの活性は 4.17 U/g (FW) であり、β-グルコシダーゼ

の存在が確認された。

一方、*Lotus japonicus* 葉にみられる 2 種の β -グルコシダーゼ (LjBGD2, LjBGD4) の混合物の活性は、 3.78×10^{-3} U/g (基質：*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド) であり、その葉に存在する青酸配糖体であるリナマリン、ロタウストラリンを加水分解することが示されている [31]。

このことから、新鮮葉よりも乾燥葉のプルナシン含量が少なかったのは、乾燥の過程でシソ葉に存在する β -グルコシダーゼによりプルナシンが加水分解されたためであるということが可能性の 1 つとして考えられた。

第1章まとめ

本研究では、シソ葉に含まれる青酸配糖体について定性・定量し、次のようなことを明らかにした。

ピクリン酸試験紙法を応用し、シソ葉中のシアン化合物を簡便かつ半定量的に検出することを可能にした。シソに含まれるシアン化合物含量は系統ごとに異なっていることが判明した。

シソに含まれる主な青酸配糖体はプルナシンであり、葉の単位質量あたりのプルナシン含量は乾燥葉よりも新鮮葉に多い傾向にあった。これは、乾燥中に葉の β -グルコシダーゼによりプルナシンが分解されたということが可能性の1つとして考えられた。

第2章

シソに含まれるプルナシンの含量の変化と集積部位について

前章ではシソの葉に含まれる青酸配糖体のうちプルナシンが他の青酸配糖体に比べてはるかに多いことを明らかにし、さらに系統や葉の生長・乾燥の程度ごとのプルナシン含量を明らかにした。しかし、シソの葉に含まれるプルナシン含量の変化や部位ごとの含量の差異については不明であった。本章では、それらのことを明らかにするために、様々な条件で純系シソ属植物を栽培し、その凍結乾燥した植物体について HPLC でプルナシンを定量した。

第1節 栄養生長期の栽培日数とプルナシン含量の変化

本実験では、人工気象室にて栄養成長期を維持した純系シソを用い、栄養成長期での栽培日数と葉に含まれるプルナシン含量の変化について検討した。

プルナシン含量は、No. 6 を除き、概ね栽培日数が長くなるにつれ増加していく傾向にあることが判明した (図 14)。このような傾向は、*E. camphora* でも観察されている [22]。

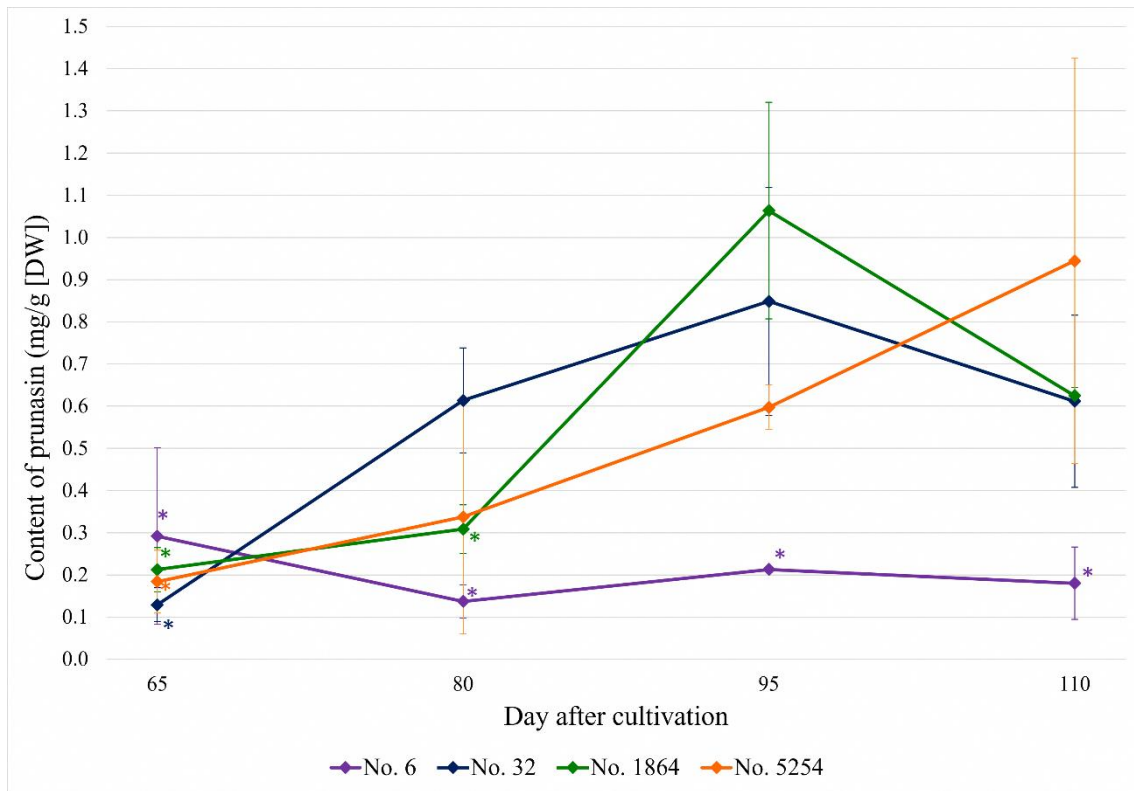


図 14 栄養生長期での各種シソ・エゴマの栽培日数とプルナシン含量

各系統共に $n=3$ 、平均値に \pm 標準誤差を付して表した。サンプル中のプルナシン濃度の平均が検量線の定量下限を下回ったものには、グラフ中に「*」を付して表した。

第 2 節 生長段階ごとのプルナシン含量の変化

No. 32、No. 5254 の純系シソを京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園の屋外圃場 (以下、「屋外」) にて栽培したときの生長段階は表 2 の通りであった。また、それぞれの生長段階ごとの葉のプルナシン含量は、図 15 の通りであった。すなわち、夏期の栄養生長期には含量が多く、一旦含量が低下した後、花芽を形成し始める時期にかけてプルナシン含量が増加し、開花後は穏やかに含量が低下してゆくということが判明した。

表2 屋外で栽培したシソの栽培開始後の日数と生長段階

採取日 (2020年)	8/3	8/18	9/2	9/16	10/3	10/16	10/30
栽培開始後の日数	75	90	105	119	136	149	163
生長段階	栄養生長期			花芽形成 開始	開花中	開花終了	落葉開始

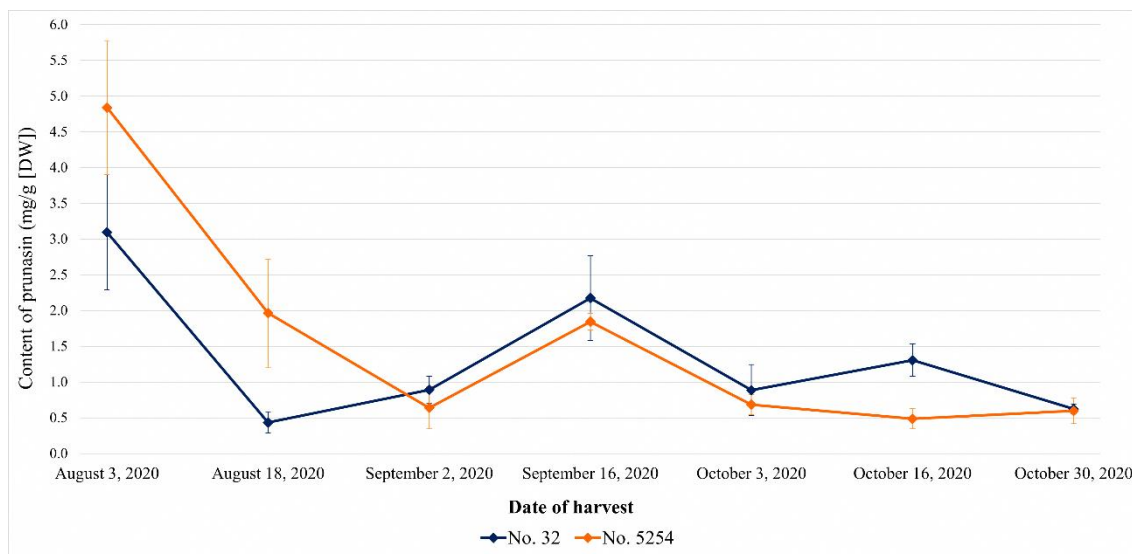


図15 屋外にて栽培した純系シソ葉の生長段階ごとのプルナシン含量の変化

各系統共に $n=3$ 、定量値の平均値に \pm 標準誤差を付して表した。

第3節 プルナシンの集積部位について

本実験では、屋外で栽培したシソについて開花期と落葉後にそれぞれ全草を採取し、その各部位のプルナシンを定量した。

開花期の各部位のプルナシン含量は、図16(a)に示す通り、花等の生殖器官よりも栄養器官である葉に多いことが判明した。このようにシアン化合物(青酸配糖体を β -グルコシダーゼで分解し、HCNとして定量したもの)の含量が生殖器官よりも葉に多い例は、*E. cladocalyx* [27] や *Ph. slunatus* [28] 等で観察されている。また、生殖器官に着目すると、果実を除き成熟するにしたがってプルナシン含量が増加することが判明した。これは、*Pr. dulcis* や *Pr. avium* L. の花芽が休眠打破後から開花直前までプルナシン含量が増加したとい

う例 [33] や、前述の *P. lunatus* の例 [28] に類似している。さらに、未熟な果実と花等の組織では、花等の組織にプルナシンが多いことが判明した。この傾向は、*E. camphora* [22], *E. cladocalyx* [27], *L. japonicus* [34], *Polyscias australiana* [35] 等、多くの植物にみられるものである。

一方、落葉後の各部位のプルナシン含量は、図 16 (b) に示す通りとなった。すなわち、分果からは全く検出されず、分果以外のプルナシン含量は開花期よりも極めて少ないものであった。

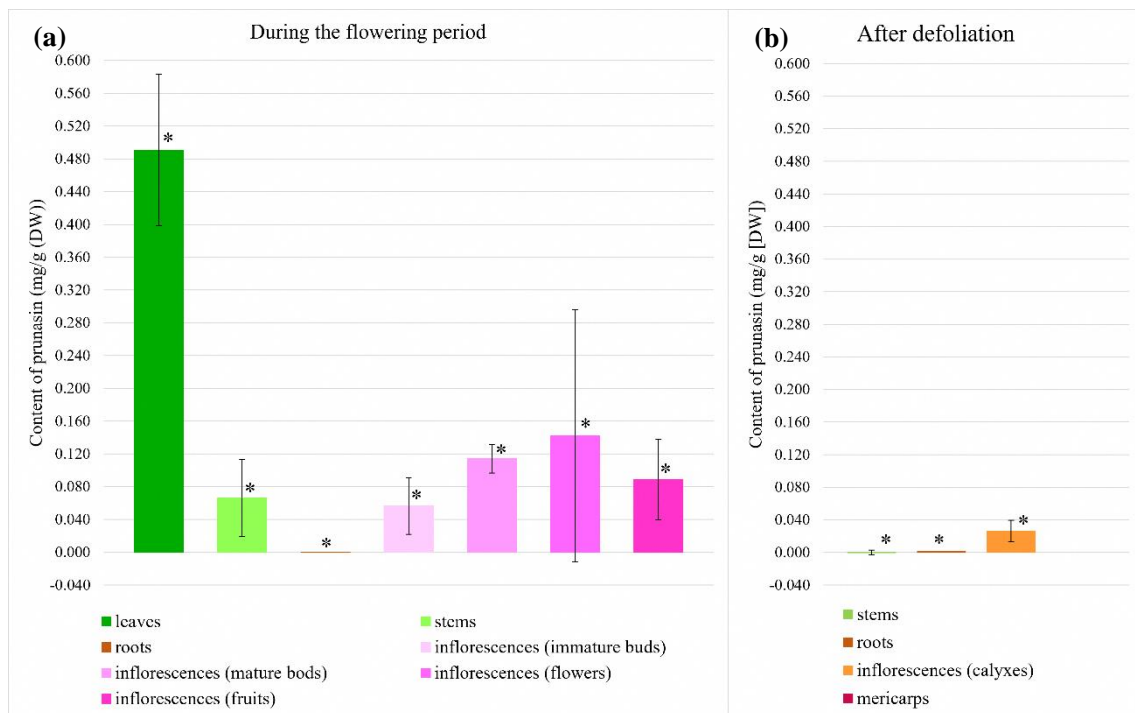


図 16 No. 5254 の部位別のプルナシン含量; (a) 開花期、(b) 落葉後

各部位のサンプル中のプルナシンの濃度の平均が検量線の定量下限を下回ったものはグラフ中に「*」を付して表した。(a); 根を除く各部位: $n=3$ 、根: $n=1$, (b); 茎・花穂(萼): $n=2$, 根: $n=1$. (n ; プルナシンが含まれていた部位数)、定量値の平均に \pm 標準誤差を付して表した。

第4節 LC-MS 分析

前章の実験では、シソ葉を凍結乾燥せずに用い、さらにサンプル調製の過程で水に懸濁する過程が存在した。しかし、本章の実験では植物体を凍結乾燥してから用い、水に懸濁することなくサンプルを調製した。

本章第 1-3 節にて HPLC 分析に使用したサンプルについて、LC-MS でも分析したところ、 $m/z=294$, $[M-H]^-$ のプルナシンのピーク及び $m/z=456$, $[M-H]^-$ のユーカリプトシン A のピークが検出されたが、前章で検出されていたサンプニグリンのピークはほとんど検出されず、前章と本章では検出された青酸配糖体の種類が一致しなかった (図 17)。

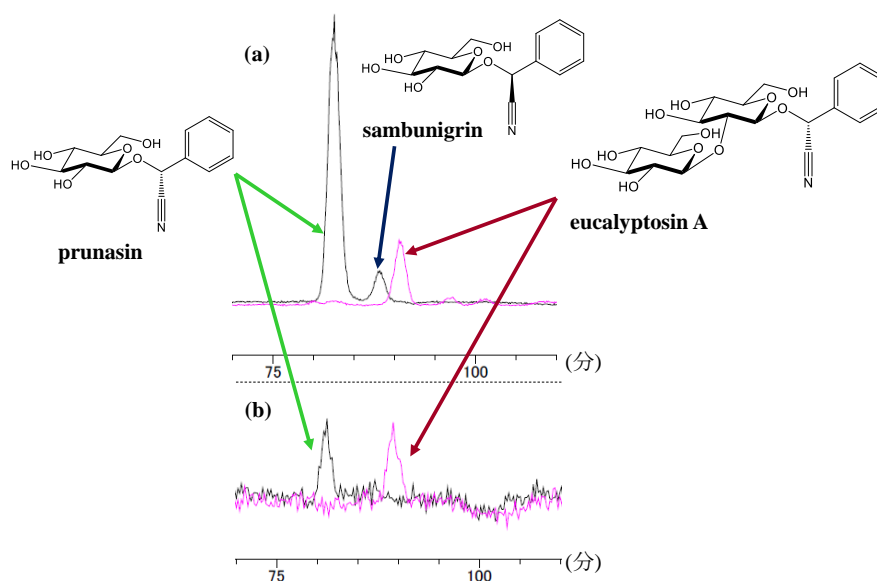


図 17 LC-MS 分析のクロマトグラム

(a) 前章での実験結果 (出発物質を凍結乾燥させずに調製した分析サンプル)、(b) 本章での実験結果 (出発物質を凍結乾燥してから調製したサンプル)

第5節 茎と根に多く見られた水溶性化合物について

シソ根・茎の分析サンプルからは、HPLC クロマトグラム上で保持時間 35.7–35.8 分 (図

18) にピークが検出されたが、それ以外の部位の分析サンプルからはほとんど検出されなかった (図 18)。そこで、茎・根に見られたピークに相当する化合物の構造を明らかにするために、茎 (100.0 g [DW]) 及び根 (5.0 g [DW]) の MeOH エキスから 1.59 mg を単離し、¹H NMR を測定して文献値 [36] と照合した。その結果、この化合物はエリゲシド C であることが判明した。

本化合物はキク科 *Erigeron hreviscapus* [37] や、マメ科 *Bryophyllum pinnatum* [37] 等からも単離されているが、シソ属植物から単離されたのは初の例であり、シソ科植物からの単離は *Dracocephalum heterophyllum* での例 [39] に続いて本例が 2 例目であった。

また、この分離操作の過程で、ロスマリン酸も上記の茎・根の MeOH エキスから 2.65 mg 単離した。これは、¹H NMR のデータが文献値 [40] とほぼ同じ値であったためそのように同定した。エリゲシド C、ロスマリン酸の ¹H NMR のデータは次の通りであった。

エリゲシド C

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 3.28-3.72 (6H, m), 3.75 (6H, s), 4.95 (1H, d, *J*=3.5), 6.41 (2H, s)

ロスマリン酸

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 2.90-3.11 (2H, m), 5.09 (1H, dd, *J*=10.0, 3.0), 6.27 (1H, d, *J*=16.0), 6.62 (1H, dd, *J*=8.0, 1.5), 6.67 (1H, d, *J*=8.0), 6.75-6.76 (2H, m), 6.92 (1H, dd, *J*=8.3, 2.0), 7.02 (1H, d, *J*=1.5), 7.5 (1H, d, *J*=16.0)

これらの化合物の構造式は、図 19 に示す通りである。

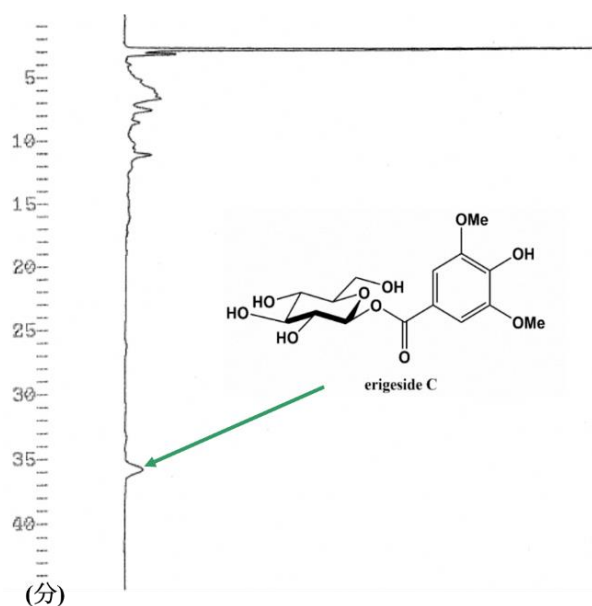


図 18 エリゲシド C の HPLC クロマトグラム (No. 5254 [落葉後] 茎の分析サンプル)

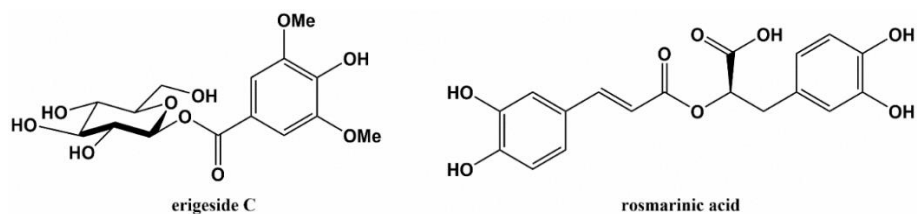


図 19 エリゲシド C・ロスマリン酸の構造

第 6 節 考察

栄養生長期の栽培日数とプルナシン含量の変化

人工気象室で栽培した場合、栄養生長期では、栽培日数にほぼ比例してプルナシン含量が増大していく傾向にあった。このことから、生育に伴ってプルナシンが蓄積されてゆくという可能性が考えられた。

屋外栽培時のプルナシン含量の変化

屋外栽培時の葉のプルナシン含量の変化は、図 14 の通りであった。これは、夏期の栄養

生長期には植物体の体積は増大するが、体積の増大に比べてプルナシンの蓄積が遅いためと考えられた。その後は花芽を形成する時期にかけてプルナシンの生合成が活性化されたと考えられた。また、花芽を形成した後の時期には穏やかに葉のプルナシン含量が減少していった。花芽を形成した後は新たな葉が展開されず、植物体全体の質量が大きく変化しないことを考慮すると、葉のプルナシンは消失したことが考えられた。

プルナシンの集積部位について

開花期において、シソ植物体内のプルナシン含量は部位ごとに異なっており、生殖器官である花等の組織よりも栄養器官である葉に多いことが判明した。このことを最適防御仮説 [28] に照らし合わせて考えると、開花期においては、シソでも *E. cladocalyx* や *P. lunatus* と同様に栄養組織である葉を優先的に防御しようとしている、という可能性が考えられた。一方、生殖器官に着目すると、果実よりも花等の組織にプルナシン含量が多いことが判明した。一般に蕾や花等の組織は物理的強度が比較的脆弱で、わずかな刺激でも組織が損傷し、細胞内の青酸配糖体と β -グルコシダーゼ等の分解酵素が逸脱・反応して有毒な HCN が放出される可能性がある。生殖器官内での防御物質の分布について、花等の組織が HCN により防御されるという利益と、それに伴う花粉媒介者の訪問の減少という損失は二律背反の関係にあるとされており、これらの兼ね合いから分布が決定されると考えられている [28]。また、*P. lunatus* での研究から、その組織の物理的強度が増加するにつれ、組織内のシアン化合物含量が減少する、すなわち防御手段が化学的なものから物理的なものへと移行していくことが示唆されている [28]。一般に、蕾や花等の組織が果実へと成熟するにしたがって物理的強度は増大するとされている [27]。したがって、以上を考え合わせると、シソでも生殖器官の成熟に伴う物理的強度の増大にしたがってプルナシン含量が低下していったという可能性が考えられた。

一方、落葉後の各部位のプルナシン含量は、開花期よりも少ないものであった。これは

開花期において最もプルナシン含量が多かった葉が落葉したためと考えられた。

シソ根・茎に多く見られた水溶性化合物について

エリゲシド C のアグリコンは、フェノール酸誘導体のシリング酸である。シリング酸はアントシアニンであるマルビジンまたはその配糖体の分解産物であると考えられている [41]。一方、シソ葉にもマルビジン及びその配糖体が含まれている [42] ため、エリゲシド C は、マルビジンまたはその配糖体が代謝されて生じ、さらに配糖化されて蓄積したものと考えられた。

生薬ソヨウの基原として用いられるシソの葉は赤色であるが、その色素はアントシアニン類である。先述の通りエリゲシド C のアグリコンはマルビジン誘導体の分解産物と考えられているため、ソヨウの品質について色素 (マルビジン誘導体) 量の変化という観点から評価するために役立つ可能性があるが、そのことは今後検討する必要があると考えられる。

第2章 まとめ

本章の研究では、種々のシソ属植物のプルナシン含量の変化や集積部位について検討し、次のようなことを明らかにした。

人工気象室で栽培した場合、栄養生長期ではその栽培日数が長くなるにつれてプルナシン含量が多くなる傾向にあることが判明した。

屋外で栽培した場合、シソ葉のプルナシン含量は、夏期の栄養生長期には含量が多いが、一旦含量が低下した後、花芽を形成する時期にかけてプルナシン含量が増加し、開花後は穏やかに含量が低下してゆくということが判明した。

プルナシンの集積部位については、開花期には花などの生殖器官よりも栄養器官である葉に多かった。しかし、落葉後にはいずれの部位にもほとんど見られず、開花後から落葉後にかけて落葉等によりプルナシンが消失したという可能性が考えられた。

総 括

本研究では、天然物化学・定量分析化学的実験手法を用い、シソに含まれる青酸配糖体について研究を行った。以下に各章の結果をまとめ、さらに考察を加える。

第1章

シソ葉のプルナシン含量は、系統ごとに違いがあり、乾燥葉よりも新鮮葉に多い傾向にあることを明らかにした。このことは、生薬ソヨウの基原であるシソや、香味野菜としてのシソの育種選抜、葉の加工について新たな知見を与えるものと考えられる。

第2章

栄養生長期では栽培日数が長くなるにつれてプルナシン含量が多くなる傾向にあることを明らかにした。また、屋外でシソを栽培した際には、夏期の栄養生長期にはプルナシン含量が多いが、一旦含量が低下した後、花芽を形成し始める時期にかけてプルナシン含量が増加し、開花後は穏やかに含量が低下してゆくことが明らかになった。このことは、シソ葉の採取の時期を検討するうえで有用な知見を与える可能性を示した。

生薬や漢方薬等の天然由来の薬物を医薬品としてその品質を管理しようとすることは、含まれる成分の多様性や天然物特有の品質のばらつき大きさゆえに非常に困難を伴うものである。そのため、多くの先進国では天然物由来製品は医薬品として扱われないことが多いが、我が国では生薬等を医薬品として扱い、化学薬品と同一の法規制の下で運用している。こうした運用を可能にしているのは、生薬それぞれについて多くの経験値と、高度な天然物化学的研究により支持されているためである。生薬等の天然物医薬品の品質保証・品質評価について議論する際には、有効成分やその組成についての考察だけではな

く、成分については網羅的に、さらに生薬の形態や基原植物の栽培、生薬の流通についての知見を含む総合的な理解が必要である。また、生薬ソヨウの定量指標成分としては、精油類の1つであるペリルアルデヒドが規定されているが、ソヨウの品質評価のためには、ペリルアルデヒド以外にも含まれる成分について情報を収集し、考察することが必要である。

一方、シソに含まれる青酸配糖体についての先行研究例は少なく、特に青酸配糖体の種類や含量について一定の知見は存在しなかったが、遺伝的背景が明らかな純系シソ・エゴマを用いることでそのあらましを明らかにした。

本研究では、シソに含まれる青酸配糖体の種類、含量やその変化、集積部位等について天然物化学・定量分析化学的な実験を行い、シソに元来含まれている青酸配糖体を指標に、揮発しやすい香気成分、特にベンズアルデヒドについて考察するという独自の視点から、八新の1つであるソヨウの品質を評価した。また、青酸配糖体は量によっては毒性を示したり薬効を示したりする両面性を持ったものであるが、その両面から生薬ソヨウの安全性・品質を評価した。

シソは、生薬ソヨウの基原であり、また香味野菜としても利用される植物である。さらに、生薬は、化学薬品とは異なり、香気も重要な品質評価の指標となるが、その香気は無数の揮発性成分の集合体であり、それらの相互作用により香気として認識されるものである。以上を考え合わせると、プルナシン等の青酸配糖体から生じると考えられるベンズアルデヒドは、シソの香味に影響を与えていると考えられる。したがって、シソに含まれるプルナシンの含量について評価することは、ベンズアルデヒドを指標としてシソの香気を評価する1つの手法になり得ると考えられる。

以上のことを踏まえると、本研究の成果は、生薬ソヨウや香味野菜としてのシソの安定

した品質確保や品質評価のために、その基原となるシソの採取・加工に有用な情報を与えることが期待される。

実験の部

第1章

【植物材料】

本章での実験に用いた4種の純系シソは表3に示す通りであり、これらの純系シソは、すべて京都大学大学院薬学研究科にて自家受粉により純系として維持されていたものであった [19]。これらを人工気象室 (LPH-1P-NPC-S×3, 株式会社日本医化器械製作所) にて栽培した。

栽培条件は以下のようなものであった。

室温 : 22.0 °C

湿度 : 75 %

点灯時刻 : 4 : 00–20 : 00

表3 本章の実験で使用した純系シソ (*Perilla frutescens* var. *crispa*)

系統番号	葉の色	精油型
25	赤	フェニルプロパノイド型 [24]
32	赤	ペリルアルデヒド型 [25]
5254	赤	シトラール型 [24]
5343	緑	ペリルアルデヒド型 [26]

また、市場品サンプルは、表4に示す13検体を実験に使用した。これらは、複数の企業から提供されたものであった。

表4 本章の実験で使用した市場品ソヨウ

検体番号	入手年(月)	採取地
1	2017.10	河北省
2	2016.7	河北省
3	2016.1	河北省
4	2018.1	河北省
5	2015.9	河北省
6	2017	香川県
7	2018	中国
8	2018.1	広東省
9	2012.9	河北省
10	2016.7	河北省
11	2018.2	河北省
12	2018.2	河北省
13	2018.2	河北省

プルナシンの単離に用いたセイヨウバクチノキの葉は、京都大学大学院薬学研究科の敷地内に植栽されている木から採取した。この木は、伊藤美千穂博士により同定されたものであった。

【試薬】

Wako gel C₃₀₀、ピクリン酸、Na₂CO₃ は和光純薬株式会社(現・富士フイルム和光純薬株式会社)から購入した。特級酢酸エチル (EtOAc)、HPLC 用 H₂O、HPLC 用または特級 MeOH、無水クエン酸、水酸化ナトリウム(クエン酸緩衝液調製用)、L-酒石酸はナカライテスク株式会社から購入した。アーモンド由来 β-グルコシダーゼ (3040 U/g)、アミグダリン、*p*-ニトロフェノール、*p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドは東京化成工業株式会社から購入した。CD₃OD (¹H NMR 測定用) は関東化学株式会社および富士フイルム和光純

薬株式会社から購入した。LS-MS 用 H₂O, MeOH は富士フィルム和光から購入した。

【ピクリン酸試験紙法】

弱塩基性下にあるピクリン酸塩は、HCN と反応すると、黄色から赤色に変化する (図 20) [18]。この原理を用いたシアン化合物の定性試験法として、厚生労働省の「食品、添加物等の規格基準」にて規定されているピクリン酸試験紙法 [17] がある。これを栽培したシソや市場品ソヨウにも応用し、青酸配糖体を HCN として検出した。

ピクリン酸試験紙は、ピクリン酸飽和水溶液を、ろ紙 (Filter Paper 400 mm×400 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) に塗布したあと室温で風乾し、40 mm×7 mm に細断して作製した。

まず、シアン化合物濃度と呈色の濃さについて検討するため、入手が容易であった青酸配糖体であるアミグダリンをクエン酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解させ、クエン酸緩衝液に溶解したアーモンド由来 β-グルコシダーゼ 0.3 mL (ca. 100 U) を添加した。10% 炭酸ナトリウム水溶液で湿らせたピクリン酸試験紙をサンプル溶液 (20 mL) のヘッドスペース部に吊るし、30 °C で 3 時間反応させた後、サンプル溶液に L-酒石酸 0.80 g を加え、55 °C で 1 時間反応させた。反応終了後、ピクリン酸試験紙の呈色の濃さを目視で判断した。

シソをサンプルとして用いる際には、純系シソは新鮮葉 5.0 g (それぞれの系統 4 株からまとめて採取した) を、市場品ソヨウは 1.5 g をクエン酸緩衝液中で粉碎し、十分に攪拌して用いた。

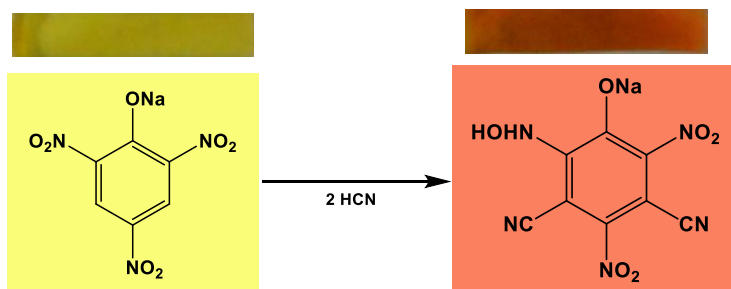


図 20 ピクリン酸試験紙法の反応の原理

【セイヨウバクチノキからのプルナシンの単離】

プルナシンは、プルナシンが多く含まれていることが報告されているセイヨウバクチノキの葉 [20] から単離・精製して用いた。

セイヨウバクチノキの新鮮葉 77.25 g を、775 mL の MeOH で 24 時間×3 回室温で抽出し、この抽出液を濃縮乾固した。これを等量の H₂O と EtOAc で液-液分配し、水面分をろ過して濃縮乾固した。これを MeOH に溶解させ、固相抽出カラム (Bond Elut Jr-C18, 500mg, 100/pk (アジレント・テクノロジー株式会社) と前処理フィルター (GL クロマトディスク水系/非水系兼用 13P, 0.45 μm [ジールサイエンス株式会社]) に 2 回通すことにより夾雑物を除去してから濃縮乾固し、4.01 g のエキスを得た。このエキスの約 4 分の 3 をオープンカラムで 2 回分取した。移動相は EtOAc-MeOH-H₂O (20:5:4)、充填剤は Wako gel C₃₀₀ であった。オープンカラムによる分取物について、HPLC で 3 回精製した。

精製に用いた装置は Intelligent Pump UI-22-410S 送液ポンプ (株式会社フロム)、S-3210 UV 検出器 (株式会社 相馬光学)、PG-32S デガッサー (株式会社フロム) であった。その他の条件は、以下に示す通りであった。

ガードカラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II guard column, 20.0 mm i.d. × 20 mm

(ナカライテスク株式会社)

カラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II column, 20.0 mm i.d. × 250 mm

(ナカライテスク株式会社)

移動相 : MeOH-H₂O (18 : 82) (イソクラティック)

流速 : 5.0 mL/min または 12.194 mL/min

検出波長 : 262 nm

精製した化合物について、JNM-ECA 500KP (500MHz, 日本電子株式会社) を用いて ¹H NMR を測定し、データを Delta NMR Software (日本電子株式会社) にて解析した。

【ユーカリプトシン A の単離】

No. 32、No. 5254 (系統間のプルナシン含量の比較に用いたもの)、市場品ソヨウ 7、13 の HPLC 分析サンプルの一部を MeOH に懸濁し、遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 20 °C) した後、上清を前処理フィルターに通して HPLC での分取に供した。さらにそれぞれのサンプルからのフラクションを統合して再度 HPLC で精製した。

精製に用いた HPLC の装置は、Intelligent Pump UI-22-410S 送液ポンプ (株式会社フロム)、S-3210 UV 検出器 (株式会社相馬光学)、PG-32S デガッサー (株式会社フロム) であり、その他の条件は以下の通りであった。

ガードカラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II guard column, 10.0 mm i.d.×20 mm

(ナカライテスク株式会社)

カラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II column, 10.0 mm i.d.×250 mm

(ナカライテスク株式会社)

移動相 : MeOH-H₂O (14 : 86) (イソクラティック)

流速 : 4.0 mL/min

検出波長 : 210 nm

精製した化合物について、¹H NMR および LC-MS/MS のパターンを測定した。

LC-MS 分析に用いた装置は、送液ユニットは LC-30AD、オートサンプラーは SIL-30AC、カラムオーブンは CTO-30A、吸光度検出器は SPD-M30A で構成される LC 部の Nexera X2 UHPLC と、MS 部の LCMS-8050 (株式会社島津製作所) を使用し、イオン化は ESI で行った。その他の分析条件については、次の通りであった。

ガードカラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II guard column, 4.6 mm i.d.×10 mm

(ナカライテスク株式会社)

カラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II column, 4.6 mm i.d.×250 mm

(ナカライテスク株式会社)

移動相: MeOH-H₂O (14 : 86) (イソクラティック)

流速 : 0.4 mL/min

カラム温度: 30 °C

注入量: 5 µL

ESI: ネガティブモード

コリジョンガス : アルゴン

ネブライザーガス : 3 L/min

ヒーティングガス・ドライガス : 10 L/min

インターフェイス温度 : 300 °C

コリジョンエネルギー : 25 eV

分析で得られたデータは Labsolutions Ver. 5.97 software (株式会社島津製作所) を用いて解析した。

【シソに含まれる青酸配糖体の同定】

まず、セイヨウバクチノキからの単離物の LC-MS 分析で単離物の分子量を測定し、さらに ¹H NMR データから、プルナシンとサンブニグリンの化学シフト値及びそれぞれの積分比から両化合物の存在比を確認した。続いてこの単離物およびシソ分析サンプルの HPLC クロマトグラム上での両化合物の保持時間とピーク面積比を確認した後 LC-MS にてシソサンプル中の青酸配糖体の分子量を確認することによりシソに含まれる青酸配糖体の種類を同定した。

HPLC 分析に用いた装置は、L-7100 送液ポンプ、L-7300 カラムオーブン、L-7420 UV 検出器 (株式会社日立製作所)、デガッサーは ERC-3215α (株式会社イーアールシー [現・IDEX Health & Science 株式会社]) であった。その他の測定条件は以下の通りであった。

ガードカラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II guard column, 4.6 mm i.d.×10 mm

(ナカライテスク株式会社)

カラム : COSMOSIL 5C₁₈ MS II column, 4.6 mm i.d.×250 mm

(ナカライテスク株式会社)

移動相 : MeOH-H₂O (14 : 86) (イソクラティック)

流速 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 30 °C

検出波長 : 210 nm

注入量 : 5 μL

また、LC-MS の分析条件は、コリジョンエネルギーが 35 eV であったことを除き、「【ユーカリプトシン A の単離・同定】」でのものに同じであった。

【各種シソ・市場品ソヨウの採取・加工】

主脈の長さにより 3 cm ごとに分類し (<3 cm, 3-6 cm, 6-9 cm, 9-12 cm)、対生する一對のうち一方は、4 株からまとめて新鮮葉 3.0 g を採取して細断してすぐに全量を分析に供した。もう一方は 4 株からまとめて新鮮葉 (3.0 g) として採取後、室温で乾燥させ、液体窒素下で粉碎後に乾燥させてから全量を分析に用いた。残りのすべての葉は、シソ系統間の青酸配糖体含量の比較のために、主脈の長さに関係なく室温で乾燥させ、液体窒素下で粉碎し乾燥させたものから 0.9 g を分析に用いた。これらの純系シソ葉は、播種後 222-233 日後に柄を含めて採取した。

市場品ソヨウは、液体窒素下で粉碎後さらに乾燥させ、0.9 g を分析に用いた。

また、No. 5254 を用いて葉 1 枚あたりのプルナシンの総量を算出するためには、主脈の長さを 3 cm ごとに分類し、柄を含めて新鮮葉として複数枚採取し、質量を測定した。さらに、これらを室温で乾燥させてから質量を測定した。そのときの新鮮葉または乾燥葉の質

量 (g) を、採取した葉の枚数で除し、新鮮葉または乾燥葉 1 枚あたりの平均質量を (g/leaf) として表した。この値に No. 5254 の葉 1 g あたりのプルナシン含量を掛け合わせ、葉 1 枚あたりのプルナシン総量 (mg/leaf) とした。

【各種シソ・市場品ソヨウの分析サンプルの調製及びプルナシンの定量】

出発物質の質量 (g) の 20 倍量の MeOH (mL) で 24 時間×3 回、室温で 150 rpm で攪拌抽出し、ろ紙でろ過した。このろ液を濃縮乾固し、蒸留水に懸濁した後のろ液を凍結乾燥して MeOH に溶解した。そのろ液を C₁₈ 固相抽出カラムに通し、流出液を濃縮乾固させてからデシケーターで乾燥させた。これを 1.0 mg/mL となるように MeOH に溶解し、前処理フィルターに通して分析に供した。

純系シソ並びに市場品ソヨウ 1 g あたりのプルナシン含量は、セイヨウバクチノキからの単離物による検量線を用いて HPLC により定量した。分析条件は、「【シソに含まれる青酸配糖体の同定】」に記したものに同じであった。

【β-グルコシダーゼ活性試験】

p-ニトロフェニル β-D-グルコピラノシドを β-グルコシダーゼの基質として用い、その加水分解産物である *p*-ニトロフェノールの検量線を作成した。

人工気象室にて栽培した No. 32 の柄を含む新鮮葉 1.0 g を、氷冷下でクエン酸緩衝液 (15 mL, pH 5.0) を加えてすりつぶし、1 時間抽出した。その上清を遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 20 °C) し、さらにその上清を β-グルコシダーゼ溶液とした。

試験時には、β-グルコシダーゼ溶液 0.5 mL を、クエン酸緩衝液に溶かした 0.300 mg/mL の *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド溶液 2.5 mL に添加し、30 °C で 30 分間反応させた。その後、 6.0×10^{-2} mg/mL の Na₂CO₃ 液 2.5 mL を添加して反応を終了させ、反応終了後の溶液について 420 nm で吸光度を測定した。

吸光度の測定に用いた装置は、島津紫外可視分光光度計 UV-1800 (株式会社島津製作所) であった。

第2章

【植物材料】

本章での実験に用いたシソ・エゴマは表5の通りであり、これらはすべて京都大学大学院薬学研究科にて自家受粉により純系として維持されていたものであった [19]。これらを人工気象室または屋外にて栽培した。人工気象室 (LPH-1P-NPC-S×3, 株式会社日本医化器械製作所) での栽培条件は以下の通りであった。

室温 : 26.0 °C

湿度 : 60 % (0 : 00–4 : 00, 20 : 00–23 : 00), 75 % (4 : 00–20 : 00)

点灯時刻 : 1 : 00–2 : 00, 4 : 00–20 : 00

本章の実験では、これらの純系シソは各実験で3株ずつ用いたが ($n=3$)、純系であるため、同一栽培条件下・栽培日数の同一系統内の個体間では成分含量の差は無視できるものとして実験した。

表5 本章の実験で使用したシソ・エゴマ

系統番号	学名	葉の色	精油型
6	<i>P. frutescens</i> var. <i>crispa</i>	赤	ペリラケトン型 [43]
32	<i>P. frutescens</i> var. <i>crispa</i>	赤	ペリルアルデヒド型 [25]
1864	<i>P. frutescens</i> var. <i>frutescens</i>	緑	ペリレン型 [44]
5254	<i>P. frutescens</i> var. <i>crispa</i>	赤	シトラール型 [24]

【試薬】

特級 *n*-hexane, HPLC 用 H₂O, MeOH はナカライテスク株式会社から購入した。特級 *n*-BuOH, LS-MS 用 H₂O, MeOH、¹H NMR 測定用 CD₃OD、D₂O は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

【各種シソ属植物の栽培と採取】

栄養生長期の栽培日数とプルナシン含量の変化の検討のためには、表 5 の 4 種の系統のシソ・エゴマを人工気象室にて栽培し、栽培開始から 65, 80, 95, 110 日後に主脈の長さが 3–6 cm の葉を採取した。

生長段階ごとのシソ葉のプルナシン含量の変化についての検討のためには、No. 32, No. 5254 を、屋外にて栽培し、栽培開始 (2020 年 5 月 20 日) から 75, 90, 105, 119, 136, 149, 163 日後に主脈の長さが 3–6cm の葉を採取した。

プルナシンの集積部位についての検討のためには、まず、屋外にて栽培した No. 5254 の全草を開花期に採取し、葉、茎、根、花芽、蕾、花、果実に分類した。さらに、屋外で栽培した No. 5254 について落葉後に全草を採取し、それぞれを茎、根、萼、分果に分類した。

ただし、すべて葉は柄を含み、花芽、蕾、花、果実、萼は花穂として採取した。

【分析サンプルの調製】

採取したシソ植物体の凍結乾燥したものを液体窒素下で粉碎し、乾燥させた。このうち 0.020 g を 5 mL の MeOH で 24 時間×3 回室温で抽出し、遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 20 °C) 後に上清を分取した。この上清を C₁₈ 固相抽出カラムに通し、流出液を濃縮乾固した。これを乾燥させ、MeOH で 1.0 mg/mL となるように希釈し、前処理フィルターに通してから HPLC 分析に供した。

HPLC 定量分析の条件や、プルナシンの検量線は前章のものと同じであった。

【LC-MS 分析】

コリジョンエネルギーが 25 eV であったことを除き、分析条件は前章での実験と同じであった。

【エリゲシド C・ロスマリン酸の単離】

屋外で栽培した落葉後の No. 5254 の根の凍結乾燥物の粉末 5.0 g を 100 mL の MeOH で 24 時間×3 回、室温にて攪拌抽出し、濃縮乾固した。これを 100 mL の蒸留水に懸濁し、等量の *n*-hexane で 2 回、飽水 *n*-BuOH で 1 回液-液分配を行った。このうち水層を凍結乾燥し、乾固物を適量の MeOH に懸濁させて遠心分離 (3000 rpm, 3 分間, 20 °C) を 2 回行い、上清を前処理フィルターに通して HPLC での分取に供した。

また、屋外で栽培した開花期の No. 5254 の茎の凍結乾燥物の粉末 100.0 g を 1500 mL の MeOH で 24 時間×3 回、室温にて攪拌抽出し、濃縮乾固した。これを蒸留水 150 mL に懸濁し、等量の *n*-hexane を加えて 7 回液-液分配を行い、水層を凍結乾燥した。この乾固物に適量の MeOH を加え、そのろ液を濃縮したものを遠心分離 (3000 rpm, 3 分間, 20 °C) を 2 回行って上清を前処理フィルターに通してから HPLC での分取に供した。

これら根・茎由来のフラクションを統合してさらに HPLC で精製し、¹H NMR を測定した。

分取・精製時の HPLC の条件は、前章の「【ユーカリプトシン A の単離・同定】」でのものに同じであった。

単離した化合物の ¹H NMR のスペクトルは図 21, 22 の通りであった。

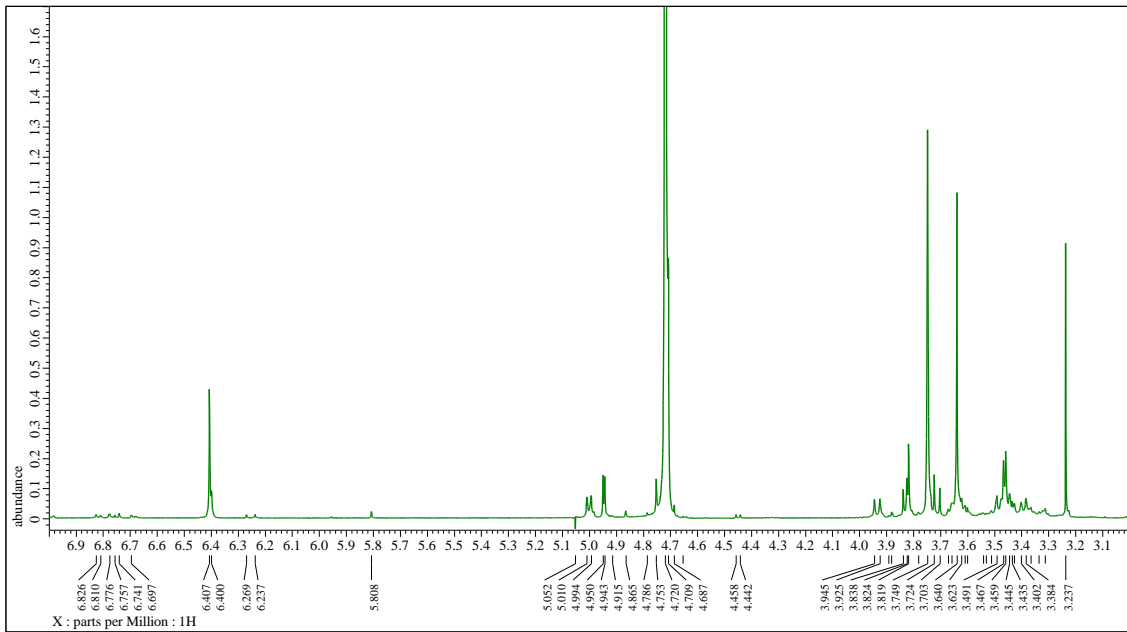


図 21 エリゲシド C の ^1H NMR スペクトル (in D_2O , 500MHz)

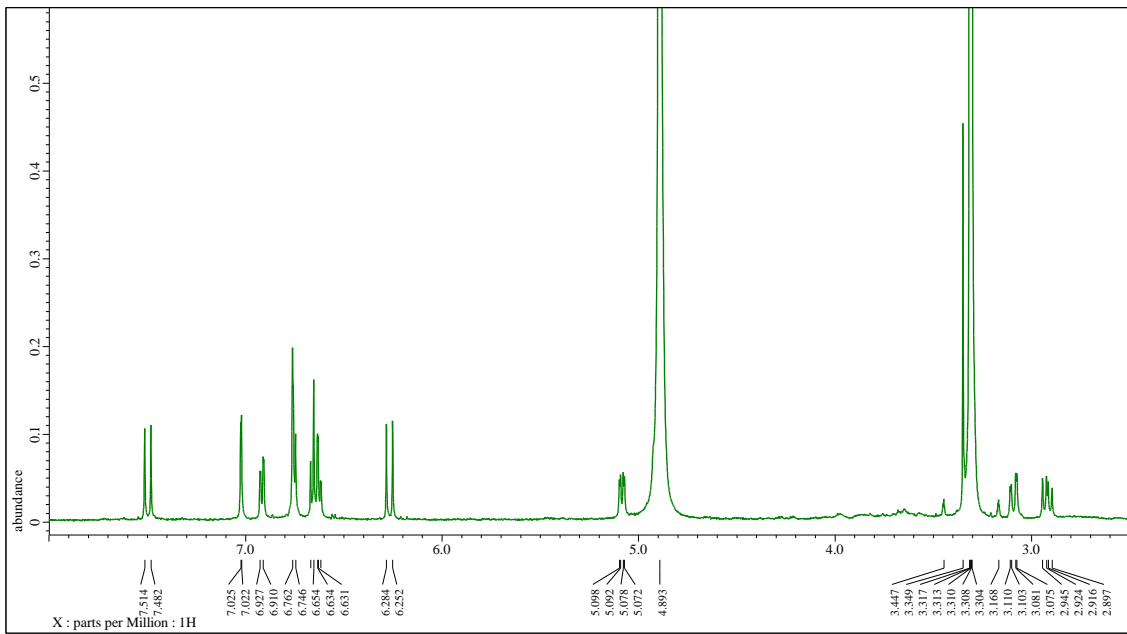


図 22 ロスマリン酸の ^1H NMR スペクトル (in CD_3OD , 500MHz)

発表論文目録

Content and distribution of prunasin in *Perilla frutescens*.

Ryota Akatsuka and Michiho Ito

Journal of Natural Medicines (2023) 77, 207–218

<https://doi.org/10.1007/s11418-022-01654-x>.

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 伊藤美千穂 准教授 (現・国立医薬品食品衛生研究所生薬部長) に深甚なる感謝の意を表します。

御多忙の中、本論文の審査をして頂きました、主査・京都大学化学研究所 二木史朗 教授、副査・京都大学大学院薬学研究科 高倉喜信 教授、京都大学大学院薬学研究科 高須清誠 教授に謹んで感謝の意を表します。

市場品ソヨウのサンプルを御提供頂きました、株式会社前忠、株式会社栃本天海堂、小太郎漢方製薬株式会社、三国株式会社、日本粉末薬品株式会社に厚く御礼申し上げます。

実験用植物の栽培に御協力頂きました、京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園 木田定美 氏、小林よしみ 氏に深謝致します。

また、本論文の著作に御理解と御協力を頂きました、山形県衛生研究所 水田克巳 所長、長岡由香 研究主幹 (兼) 理化学部長をはじめとする職員の皆様に心より感謝致します。

学部生時代に薬用植物学・天然物化学に興味を持ち、研究する契機を与えて下さいました、東京薬科大学薬学部医療薬物薬学科 一柳幸生 准教授 (現・教授)、蓮田知代 助教、朴炫宣 嘱託助手 (現・大阪大谷大学薬学部薬学科講師) に深く感謝致します。

研究を行う中で、終始温かく励まして下さり、また様々な御助言を頂きました、京都大学大学院薬学研究科 旧・薬品資源学分野の卒業生・当時の在学生の皆様に感謝致します。

如何なる場合でも常に励まして頂きました、友人知人の皆様に感謝致します。最後に、あらゆる面から支えて頂き、さらに研究に専念できるような環境を与えて下さった、両親、祖父、亡祖母をはじめとする全ての親族の皆様に深く感謝致します。

引用文献

- [1] Gleadow, R.M., Møller, B.M., 2014. Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annu Rev Plant Biol.* 65, 155–185. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-04002>.
- [2] Yulvianti, M., Zidorn, C., 2021. Chemical diversity of plant cyanogenic glycosides: an overview of reported natural products. *Molecules* 26, 719. <https://doi.org/10.3390/molecules26030719>.
- [3] 布目, 慎勇., 2011. 生薬の有用性散策 (1) 求められる整合性と総合判断 -桃仁と杏仁の問題-. *東京生薬協会会報* 450, 10–16.
- [4] 厚生労働省., 第十八改正日本薬局方, 1915.
- [5] Akil, M., Kaya, A., Aktar, F., 2013. Acute cyanide intoxication due to apricot seed ingestion. *The Journal of Emergency Medicine* 44, e285–e286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2012.05.041>.
- [6] 世良田, 和幸., 2004. 漢方医学と西洋医学. *昭和医学会雑誌* 64, 2–4. <https://doi.org/10.14930/jsma1939.64.2>
- [7] 山本, 豊., 黄, 秀文., 佐々木, 博., 武田, 修己., 樋口, 剛央., 向田, 有希., 森, 祐悟., 山口, 能宏., 白鳥, 誠., 2019. 日本における原料生薬の使用量に関する調査報告. *生薬学雑誌* 73, 16–35. https://doi.org/10.24684/jspharm.73.1_16.
- [8] 厚生労働省., 第十八改正日本薬局方, 1984–1985.
- [9] 本多, 義昭., 1996. シソ精油成分の遺伝制御機構. *ファルマシア* 30, 9–15. https://doi.org/10.14894/faruawpsj.30.5_486.
- [10] 佐竹, 元吉., 黒柳, 正典., 正山, 征洋., 和仁, 皓明., 2016. 健康・機構性食品の基原植物事典 -薬食区分(非医): 写真で見る形態と食経験-. 中央法規出版株式会社. 345.

- [11] Aritomi, M., Kumori, T., Kawasaki, T., 1985. Cyanogenic glycosides in leaves of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Phytochemistry* 24, 2438–2439. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83060-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83060-5).
- [12] Aritomi, M., 1988. Cyanogenesis and practical use as food-colorant of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *J. Home Econ. Jpn.* 39, 817–822. <https://doi.org/10.11428/jhej1987.39.817>.
- [13] Fujita, T., Terato, K., Nakayama, M., 1996. Two jasmonoid glucosides and a phenylvaleric acid glucoside from *perilla frutescens*. *Biosci Biotech Biochem* 60, 732–735. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.732>.
- [14] Mizushima, Y., Takahashi, N., Ogawa, A., Tsurugaya, K., Koshino, H., Takemura, M., Yoshida, S., Matsukage, A., Sugawara, F., Sakaguchi, K., 1999. The cyanogenic glycoside, prunasin (D-mandelonitrile-beta-D-glucoside), is a novel inhibitor of DNA polymerase β . *J. Biochem.* 126, 430-436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022468>.
- [15] 長谷川香料株式会社., 2013. 講談社., 香料の科学. 209–210.
- [16] Ito, M., Toyoda, M., Honda, G., 1999. Chemical composition of the essential oil of *Perilla frutescens*. *Natural Medicines* 53, 32–36.
- [17] 厚生労働省., 「食品、添加物等の規格基準」. https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=78334000&dataType=0&pageNo=61. (2021年9月29日閲覧).
- [18] Oshima, H., Ueno, E., Saito, I., Matsumoto, H., 2003. Quantitative determination of cyanide in foods by spectrophotometry using picric acid test strips. *Japan J. Food Eng.* 10, 96–100. https://doi.org/10.18891/jjfc.10.2_96.
- [19] Ito, M., Honda, G., 2007. Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry* 68, 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.006>
- [20] Sendker, J., Ellendorff, T., Hölzenbein, A., 2016. Occurrence of benzoic acid esters as putative

- catabolites of prunasin in senescent Leaves of *Prunus laurocerasus* J. Nat. Prod. 79, 1724–1729. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01090>.
- [21] Vo, H.Q., Nguyen, P.H., Zhao, B.T., Thi, Y.N., Nguyen, D.H., Kim, W.I., Seo, U.M., Woo, M.H., 2014. Bioactive constituents from the *n*-butanolic fraction of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus*. Nat Prod Sci 20, 274–280.
- [22] Neilson, E.H., Goodger, J.Q., Motawia, M.S., Bjarnholt, N., Frisch, T., Olsen, C.E., Møller, B.L., Woodrow, I.E., 2011. Phenylalanine derived cyanogenic diglucosides from *Eucalyptus camphora* and their abundances in relation to ontogeny and tissue type. Phytochemistry 72, 2325–2334. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.022>.
- [23] Syah, Y.M., Ghisalberti, E.L., 1996. Biologically active cyanogenetic, iridoid and lignan glycosides from *Eremophila maculata*. Fitoterapia 67, 447–451.
- [24] Ito, M., Toyoda, M., Yuba, A., Honda, G., 1999. Genetic analysis of nothoapiol in *Perilla frutescens*. Biol Pharm Bull 22, 598–601. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.598>.
- [25] Sato-Masumoto, N., Ito, M., 2014. Two types of alcohol dehydrogenase from *Perilla* can form citral and perillaldehyde. Phytochemistry 104, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.019>.
- [26] Makino, T., Ono, T., Muso, E., Honda, G., 1998. Inhibitory effect of *Perilla frutescens* and its phenolic constituents on cultured murine mesangial cell proliferation. Planta Med 64, 541–545. [10.1055/s-2006-957510](https://doi.org/10.1055/s-2006-957510).
- [27] Gleadow, R.M., Woodrow, I.E., 2000. Temporal and spatial variation in cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalyx*. Tree Physiol. 20, 591-598. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.9.591>.
- [28] Godschalx, L.A., Stady, L., Watzig, B., Ballhorn, J.D., 2016. Is protection against florivory consistent with the optimal defense hypothesis? BMC Plant Biol. 16, 32. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0719-2>.

- [29] Stamp, N., 2003 Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q. Rev. Biol.* 78, 23–55.
<https://doi.org/10.1086/367580>.
- [30] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain., 2016. Acute health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in raw apricot kernels and products derived from raw apricot kernels. *EFSA J.* 14, 4424. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4424>.
- [31] 竹谷, 孝一., 木内, 文之., 小松, かつ子., 2019. 南江堂. パートナー生薬学. 81–104.
- [32] Morant, A.V., Bjarnholt, N., Kragh, M.E., Kjærgaard, C.H., Jørgensen, K., Paquette, S.M., Piotrowski, M., Imberty, A., Olsen, C.E., Møller, B.L., Bak, S., 2008. The β -glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicas*. *Plant Biol* 147, 1072–1091. <https://doi.org/10.1104/pp.107.109512>.
- [33] Cueto, J. D., Ionescu, I. A., Pičmanová, M., Gericke, O., Motawia, M. S., Olsen, C. E., Campoy, J. A., Dicenta, F., Møller, B. L., Sánchez-Pérez, R., 2017. Cyanogenic Glucosides and derivatives in almond and sweet cherry flower buds from dormancy to flowering. *Front. Plant Sci.* 8, 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00800>.
- [34] Lai, D., Pičmanová, M., Hachem, M. A., Motawia, M. S., Olsen, C. E., Møller, B. L., Rook, F., Takos A, M., 2015. *Lotus japonicus* flowers are defended by a cyanogenic β -glucosidase with highly restricted expression to essential reproductive organs. *Plant Mol. Biol.* 89, 21–34.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11103-015-0348-4>.
- [35] Miller, R.E., Tuck, K.L., 2013. The rare cyanogen proteacin, and dhurrin, from foliage of *Polyscias australiana*, a tropical Araliaceae. *Phytochemistry* 93, 210–215.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.004>.
- [36] Pedras, M. S. C., Zheng, Q. A., 2010. Metabolic responses of *Theellungiella halophila/salsuginea* to biotic and abiotic stresses: Metabolite profiles and quantitative analyses. *Phytochemistry* 71, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.008>.

- [37] Yue, J., Lin, Z., Wang, D., Sun, H., 1994 A sesquiterpene and other constituents from *Erigeron breviscapus*. *Phytochemistry* 36, 717–719. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89803-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89803-9).
- [38] Fürer, K., Raith, M., Brenneisen, R., Mennet, M., Simões-Wüst, A. P., von Mandach, U., Hamburger, M., Potterat, O., 2013. Two new flavonol glycosides and a metabolite profile of *Bryophyllum pinnatum*, a phytotherapeutic used in obstetrics and gynaecology. *Planta Med* 79, 1565-1571. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1350808>.
- [39] Bao-jing, N., Zhu-kun, M., Zhi-xin, L., Lan-ju, J. Hong-fa, S., 2013. Chemical constituents from *Dracocephalum heterophyllum*. *Zhongcaoyao*. 44, 147–152.
- [40] Ha, T.J., Lee, J.H., Lee, M.H., Lee, B.W., Kwon, H.S., Park, C.H., Shim, K.B., Kim, H.T., Beak, I.Y., Jang, D.S., 2012. Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chem.* 135, 1397–1403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.104>.
- [41] Lopes, P., Richard, T., Saucier, C., Pierre-Louis Teissedre, Monti, J. P., Glories, Y., 2007. Anthocyanone A: a quinone methide derivative resulting from malvidin 3-*O*-glucoside degradation. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2698–2704. <https://doi.org/10.1021/jf062875o>.
- [42] Jiang, T., Guo, K., Liu, L., Tian, W., Xie, X., Wen, S., Wen, C., 2020. Integrated transcriptomic and metabolomic data reveal the flavonoid biosynthesis metabolic pathway in *Perilla frutescens* (L.) leaves. *Sci. Rep.* 10, 16207. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73274-y>.
- [43] Hosoi, M., Ito, M., Yagura, T., Adams, R.P., Honda, G., 2004. cDNA Isolation and functional expression of myrcene synthase from *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 27, 1979–1985. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1979>.
- [44] Nishizawa, A., Honda, G., Tabata, M., 1990. Genetic control of perillene accumulation in *Perilla frutescens*. *Phytochemistry* 29, 2873–2875. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)87094-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)87094-B).