

ポポー果実の香気と抗腫瘍活性について

神山 伸 高橋美咲 滝本なづな 曾根英行

1. はじめに

バンレイシ科は主に熱帯～亜熱帯に分布する植物であり、120属2300種以上が属している。バンレイシ属を中心に一部の果実が食用とされているが、輸送が困難であるため、日本で見るとは少ない。そのうちでももっとも有名なものは南米原産のチェリモヤ（Cherimoya、学名 *Annona cherimola*）であり、白いクリーム状の果実は甘味が強く、世界3大美果の一つとして知られる。果皮は薄く痛みやすいため、国内で見るとは稀であったが、輸送技術の向上による輸入物とともに、国内の温暖地域で栽培されたものが高級果実として流通するようになった。このチェリモヤと甘味の強いバンレイシ（学名 *Annona squamosa*、Sugar apple やシャカトウなどとも呼ばれる）とを交配したアテモヤ（Atemoya、学名 *Annona atemoya*）は、糖度20～25度の強い甘さとともにパイナップル様の芳香と酸味とを併せ持ち、良好な食味であることから近年人気上昇している（図1の写真右）。日本国内でも暖地では栽培可能であり、沖縄県や鹿児島県、和歌山県などで生産されたものが流通している。

これらのバンレイシ属の多くが熱帯～亜熱帯に分布しているのに対し、ポポー属のポポー（Pawpaw、学名 *Asimina triloba*）は北アメリカ東部原産の高木落葉樹であり、耐寒性が強いいため東北地方でも栽培可能である。日本には古く明治30年頃に導入され、昭和初期に珍果としてブームになったもののその後衰退し、現在では幻の果実とも呼ばれている。果肉は橙黄色のクリーム状で甘く、強い芳香があるため熱烈な愛好者もいるが、日持ちがしないため全国流通はしていない（図1の写真左）。山形県や新潟県の一部でも栽培されており、9～10月の収穫時期には果樹園や道の駅、朝市などで販売されている。樹皮や新葉、種子に含まれる成分が殺虫作用を示すため、害虫に強く無農薬栽培が可能であり、栽培は比較的容易である。近年ではひそかに再ブームとなっており、ジェラートやアイスクリームなどの加工物が生産地各県の地

域特産物として販売されている。

バンレイシ科の殺虫成分はポリケチド化合物である脂肪酸アセトゲニン類であり、1982年に東部熱帯アフリカのバンレイシ科植物である *Uvaria accuminata* からウバリシンが報告されて以来¹⁾、400種以上のアセトゲニン類が確認されている。アセトゲニンは炭素数32または34の脂肪酸と類似した構造をしており、末端部分に γ -ラク톤環を持つ。また、分子内に1～3個のテトラヒドロフラン環あるいはテトラヒドロピラン環を含み、水素基やケト基、エポキシド構造、二重・三重結合などの多くの官能基を有することが特徴である。これらはミトコンドリア複合体Iで行われる電子伝達系を阻害することにより、殺虫作用に加え抗マラリア作用や抗腫瘍活性などの生物活性を示す²⁾。特に抗腫瘍作用に関しては、選択的にがん細胞のみ増殖を阻害することが報告されており、海外では多くのアセトゲニン類を含むトゲバンレイシ（Soursop、学名 *Annona muricata*）の抽出物がサプリメントとして販売されている。

前述のようにポポー果実は甘味と強い芳香をもつため、地方特産物としてアイスクリーム等に加工される他、一般家庭等で果実酒に利用されることも多い。このポポーの香気は「バナナとパイナップルを合わせたようなもの」などと評されるが、その大部分がカルボン酸エチルエステルであり³⁾、極めて強い日本酒の「吟醸香」を思わせる香りである。さらに、抗腫瘍活性を示すアセトゲニン類は脂溶性であるため、その抽出においても果実酒は好適なモデルであるものと期待される。ポポーに含まれるアセトゲニンとその生理活性についてはすでに多くの報告がなされているが²⁾、本稿では、県内で栽培されているものの認知度と利用例の乏しいこのポポーの香気成分と抗腫瘍活性に焦点をあてて再評価することにより、通年流通が難しいポポーの果実酒への適用性について考察した。

2. 実験方法

2.1 試料

ヒト肺腺がん由来細胞株である A549細胞は独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB細胞バンクより分譲されたものを用いた。ポポー（山形産）は山形県上市市観光果樹

（脚注）〒950-8680 新潟県新潟市東区海老ヶ瀬471

新潟県立大学人間生活学部

かみやま しん（健康栄養学科准教授 kammy@unii.ac.jp）

たかはし みさき（平成28年度健康栄養学科卒業生）

たきもと なづな（健康栄養学科4年生）

そね ひでゆき（健康栄養学科教授 sone@unii.ac.jp）

園「上山フルーツ園」(有限会社観光上山フルーツ園)より取り寄せた。アテモヤ(沖縄産)は株式会社沖縄県物産公社より購入した。

2.2 香気成分の測定

ポポー果肉 1 g を香気捕集瓶 (Clean Pin Hole Septum with Vial, 40ml) に入れ、蓋の下にモノトラップ (MonoTrap RGE18TD、ジーエルサイエンス) を針金で固定し、シェイキングバス (BW201、ヤマト科学) で振盪しつつ 30°C で 60 分間加温することにより香気成分を揮発・吸着させた。その後、GC-MS (GCMS-QP2020、島津製作所) でモノトラップに吸着させた香気を分析した。それぞれのピークに関しては、マススペクトルライブラリのシミラリティ検索により同定した。

2.3 種子成分の抽出

ポポーとアテモヤのそれぞれの果実から種子を取り出して果肉を完全に洗い除いたあと、種皮を除き、フードミルで粉碎した。種子粉碎物 1 g にメタノールを 10 mL 加え、24 時間振盪抽出後、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、沈殿を除去した。さらに 13,000 rpm で 10 分間遠心分離した抽出液を窒素気流下で完全に乾固させ、その重量から回収率を測定した。それぞれの種子抽出物はジメチルスルホキシド (DMSO) に 1 mg/mL となるように溶解して用いた。

2.4 抗腫瘍活性の測定

96 ウェルプレートにウェル当たり 2×10^3 個の A549 細胞を播種し、それぞれの種子抽出物を最終濃度 0、0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$ となるように加えて 4 日間培養したものについて、Dojindo cell counting Kit-8 (同仁化学) を用いて生細胞数を測定することにより、それぞれの細胞増殖阻害効果を測定した。培養は DMEM/Ham's F12 培地にウシ胎児血清 (FBS) を 10% 加えたものを用いて行い、DMSO 濃度は全てが 0.1% となるように調整した。cell counting Kit-8 の測定ではウェル当たり試薬 10 μL を加えてから 1 時間後にプレートリーダー (Vmax、Molecular Devices 社製) で吸光度を測定した (主波長 450 nm, 対照波長 650 nm)。

2.5 細胞死の計測

種子抽出物による細胞死の状態を確認するために、24 ウェルプレートにウェル当たり 1×10^5 個となるように細胞を播種し、それぞれの種子抽出物を 1 $\mu\text{g/mL}$ あるいは 10 $\mu\text{g/mL}$ となるように加えて 24 時間培養した。その細胞の状態を倒立型位相差顕微鏡 (CKX41、オリンパス製) で確認するとともに、Trypan Blue で染色して死細胞・生細胞の割合を計測した。



図1. ポポー果実とアテモヤ果実
上から順に、果実外観、果実内部、種子。

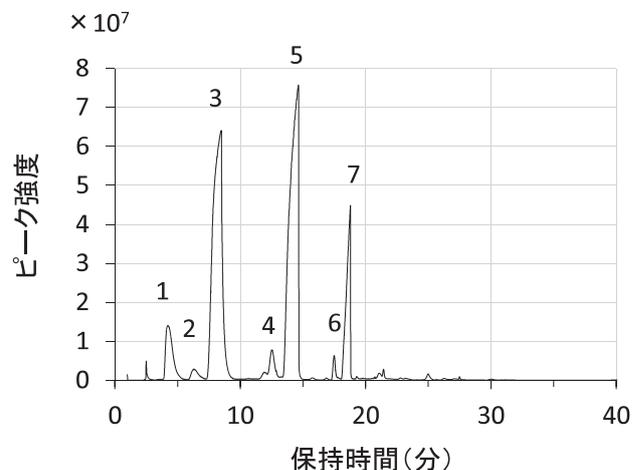


図2. ポポー果実のGC-MSクロマトグラム

1. 酢酸エチル、2. 酪酸メチル、3. 酪酸エチル、4. カプロン酸メチル、5. カプロン酸エチル、6. カプリル酸メチル、7. カプリル酸エチル。

3. 結果と考察

3.1 ポポー果実の香気成分

「はじめに」に記したように、ポポーは特徴的な強いフルーツ香を示すが、これは日本酒における吟醸香であるカプロン酸エチル(ヘキサン酸エチル)の香気と極めて類似している。Shiotaは既に、ポポー果実の揮発成分がカプロン酸エチルを中心とするカルボン酸エチルエステル類であることを報告しているが³⁾、MonoTrapを用いたヘッドスペース法によりポポー完熟果肉から揮発した香気成分についてGC-MSで分析したところ、本実験においてもShiotaの報告と同様、バナナ・パイナップルの香気成分である酪酸エチルに加え、吟醸酒の主要香気成分であるカプロン酸エチルと、発酵酒で見られるカプリル酸エチル(オクタン酸エチル)が高く検出された(図2)。吟醸香の代表的な香りは、リンゴ様の香りであるカプロン酸エチルとバナナ様の香りである酢酸イソアミルであ

るが、ポポーの香り成分ではこのカプロン酸エチルが最も多く検出された。

フルーツ様の香りである吟醸香は酵母によって生成される酢酸エステル類が中心であり、このうち古典的な酢酸イソアミルは低温・嫌気条件下で細胞膜に発現するアルコールアセチルトランスフェラーゼの反応によりアセチルCoAとイソアミルアルコールから生成する^{4, 5)}。一方、その高い芳香により現在の吟醸香の中心となっているカプロン酸エチルは、酵母では脂肪酸合成経路により生成したカプロン酸がエステル化されることにより生成すると考えられており⁶⁻⁸⁾、この香気を産生しやすい酵母の育成が試みられている。酢酸イソアミルはポポーでは検出されなかったが、類似したバナナ様の香気を示す酪酸エチルがカプロン酸エチルとともに高く検出されており、ポポーが吟醸酒と近似した香りを持つことが確認された。

3.2 種子成分の抗腫瘍活性

バンレイシ科の生理活性物質であるアセトゲニンは未熟な果実や果皮、種子、新葉、樹皮等に多く含まれている。アテモヤ種子とポポー種子のメタノール抽出物について、1 µg/mLあるいは10 µg/mLを培地中に添加して1日培養した後の肺腺がん由来A549細胞の状態を図3に示した。10 µg/mLの濃度ではともに底面からはがれた白い細胞が多数確認され、種子抽出物によるアポトーシス誘導が示唆された。この細胞のトリパンブルー染色による生細胞と死細胞の割合を図4に示した。ポポー種子抽出物を添加した場合、1 µg/mLで27.5%、10 µg/mLで90.5%が死細胞であった。アテモヤ抽出物もほぼ同等であり、1 µg/mLで24.0%、10 µg/mLで90.5%の細胞死を示した。また、1 µg/mL以下の低濃度では死細胞の割合は低かったものの、細胞増殖は停止しており、このメタノール抽出物について50%増殖阻害濃度を算定すると、ポポー種子抽出物で0.34 ng/mL、アテモヤ種子抽出物で0.27 ng/mLと、極めて低い濃度で効果を示した。ポポーとアテモヤでは含有しているアセトゲニンが異なるが、その種子メタノール抽出物のA549細胞への増殖阻害活性は同程度であった。

ポポーはアシミシンやブラタシン^{9,10)}、アテモヤはアンノナシンなど¹¹⁾さまざまな種類のアセトゲニンを含有することが示されている。アンノナシン等のアセトゲニンは強い抗菌性や抗腫瘍活性を持つ一方で、ミトコンドリア機能障害により神経毒性を有することが示唆されている¹²⁾。カリブ海のグアドループ島（フランス領）においては、トゲバンレイシを中心とするバンレイシ科果実の日常的な摂取と非定型パーキンソン症候群発症との関連

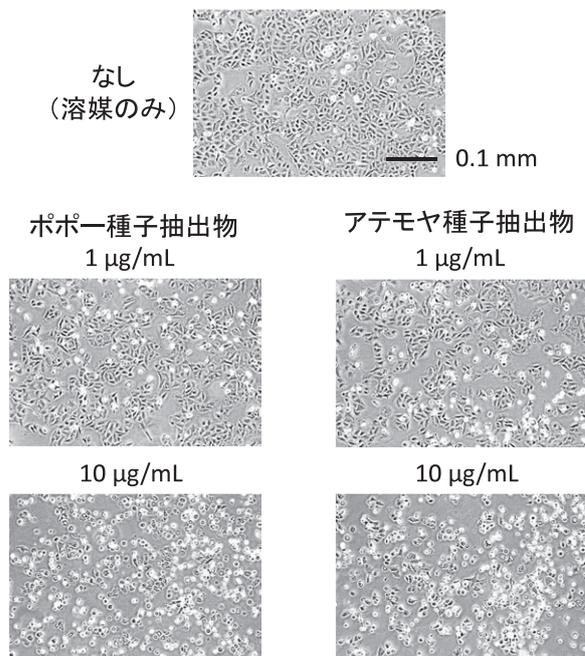


図3. ポポーあるいはアテモヤ種子抽出物を添加したA549細胞

それぞれの種子からのメタノール抽出物を1 µg/mLあるいは10 µg/mLの濃度で培地中に添加し、1日培養したA549細胞の状態を位相差顕微鏡により撮影した。白色に見えるのは底面から剥がれた細胞（死細胞を含む）。

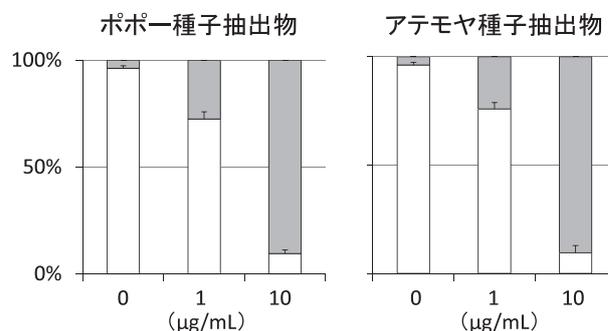


図4. ポポーあるいはアテモヤ種子抽出物を添加したA549細胞の細胞死割合

図3のそれぞれの細胞について、トリパンブルーによる死細胞の染色により細胞死の割合を測定した。白抜き：生細胞、グレー：死細胞。

性が示唆されている¹³⁾。トゲバンレイシは一個あたり平均的に15 mg程度のアンノナシンを含むが、これを年間毎日摂取した場合と同等の量のアンノナシンを1ヶ月間ラットに静脈投与したところ、非定型パーキンソン症候群でみられる神経変性が生じることが報告されている¹⁴⁾。ただし、この地域におけるタウ遺伝子（MAPT）等の多型が影響している可能性もあり¹⁵⁾、バンレイシ果実の摂取とパーキンソン症候群との関連性は明確ではない。ポポー完熟果実もアセトゲニンを含有しているが、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）はポポーの安全性に関して、ケンタッキー州立大

学の問い合わせに対して「食品として長い歴史があり、現在のところポポーの摂取が安全ではないことを示すいかなるエビデンスもない」と回答している²⁾。

4.まとめ

以上のことから、ポポーの香気は果実酒として好適であることと、種子成分のアルコール抽出物が高い抗腫瘍活性を持つことが確認された。ポポーは栽培が容易であり、県内を含む一部地域で古くから栽培されているが、独特の風味を持ち、種子が多く食べにくいなどの理由から広く認知されるには至らず、現在ではほとんど流通していない。実際、新潟県立大学の学生数人でポポー果実の風味を評価した場合でも、香りは好まれたものの、食味に関しては好き嫌いが分かれる傾向がみられた。ポポーの香気が吟醸香と極めて類似していることから、一般的な果実酒のみならず、日本酒と組み合わせた果実酒の開発により、新しい地域特産物となる可能性がある。

また、アセトゲニン¹⁾は脂溶性であり、アルコール類でも抽出可能であることから、機能性の上からも果実酒は好適であるものと考えられる。ただし、本研究で示した抗腫瘍活性は種子破砕物のアルコール抽出物全体についてであり、アセトゲニンの作用とは限らないことに注意が必要である。さらに、ポポー果実は食品として安全とされているものの、種子を含む果実酒として用いた場合については検討されていないことから、果実酒そのものに含まれるアセトゲニン量についても測定する必要があるものと考えられる。今後の研究で、ポポーを用いた果実酒の特性と機能性が明らかにされることにより、新潟県におけるポポーの有効活用が望まれる。

謝 辞

GC-MSによる分析にあたっては、新潟県農業総合研究所食品研究センターの渡辺聡先生と西脇俊和先生にご協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Tempesta MS, Kriek GR, Bates RB. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J Org Chem* 1982; 47: 3151-3.
- 2) McLaughlin JL. Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *J Nat Prod* 2008; 71: 1311-21.
- 3) Shiota H. Volatile components of pawpaw fruit (*Asimina triloba* Dunal). *J Agric Food Chem* 1991; 39: 1631-5.
- 4) Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A. et al. Molecular

cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2786-92.

- 5) 藤井敏雄. 酢酸エステルの生成とアルコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子. *日本醸造協会誌* 1995; 90: 912-8.
- 6) Stoops JK, Wakil SJ. The yeast fatty acid synthetase. Structure-function relationship and the role of the active cysteine-SH and pantetheine-SH. *J Biol Chem* 1981; 256: 8364-70.
- 7) 秋田修. 香気生成酵母の育種について. *日本醸造協会誌* 1992; 87: 621-5.
- 8) 堤浩子. 清酒酵母の香気生成の研究. *生物工学会誌* 2011; 89: 717-9.
- 9) Rupprecht JK, Chang CJ, Cassady JM. et al. Asimicin, a new cytotoxic and pesticidal acetogenin from the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Heterocycles* 1986; 24: 1197-201.
- 10) Zhao G, Hui Y, Rupprecht JK. et al. Additional bioactive compounds and trilobacin, a novel highly cytotoxic acetogenin, from the bark of *Asimina triloba*. *J Nat Prod* 1992; 55: 347-56.
- 11) Chang FR, Chen JL, Lin CY. et al. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. *Phytochemistry* 1999; 51: 883-9.
- 12) Lannuzel A, Michel PP, Caparros-Lefebvre D. et al. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord* 2002; 17: 84-90.
- 13) Caparros-Lefebvre D, Elbaz A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Caribbean Parkinsonism Study Group. Lancet* 1999; 354: 281-6.
- 14) Champy P, Höglinger GU, Féger J. et al. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem* 2004; 88: 63-9.
- 15) Camuzat A, Romana M, Dürr A. et al. The PSP-associated MAPT H1 subhaplotype in Guadeloupean atypical parkinsonism. *Mov Disord* 2008; 23: 2384-91.