

## 次世代アロマ用品の開発

### —香り物質によるプラントコントロール剤—

報告者 大学院総合理工学研究科 物質系工学専攻 教授 宮澤三雄  
学内共同研究者 大学院総合理工学研究科 シニアサイエンティスト 堀部 功  
総合理工学研究科 東大阪モノづくり専攻 M2 木村美菜子  
総合理工学研究科 東大阪モノづくり専攻 M1 高橋俊之  
総合理工学研究科 物質工学専攻 D2 河田純一  
総合理工学研究科 物質工学専攻 D1 坂田一樹  
共同研究企業 株式会社 ミリオナ化粧品、株式会社 ルック  
アットアロマ 株式会社、その他 数社

#### 1. 背景

ヒトは「香り」によって気分がリラックスしたり食欲が増すなどの反応を無意識に起こす。このように我々が今まで自然に身につけてきた「香り」の効用が、近年、科学的に解明され、現在、食品、嗜好品、化粧品などの分野で実用化されている。我々はこの「香り」をひとつの化学物質として捕らえ、その機能性と効用について先導的に研究を行い、「香り」を構成する化合物から種々の生理活性成分を特定し、その本体を解明してきた。そして、この香り成分の中には発がん抑制などヒトに対して非常に強い生理活性機能が発現している事を明らかにしてきた。この機能性発現機構を有効的に利用するならば現在のようヒトが、病気治療の為に薬を経口投与や静脈投与などの攻撃的な方法で体内に取り込むのではなく、近い将来には自然に「香りを嗅ぐ」という動作で鼻や口から香気成分を体内に取り入れるなど体にとってより優しい方法で、病気の予防や治療が可能になるのではないかと期待している。

一方、動植物が放つ揮発性物質(香り物質)の中には、コミュニケーション手段の一つとして生物が利用しているものも少なくない。植物を例にあげると、食害ストレスにより植物から放出された揮発性物質は「天敵を誘引するシグナル」として作用したり、「周りの同種の植物の抵抗性増大を促す植物間コミュニケーション化合物」として働くことが証明されている。この研究事実から、揮発性物質の中にはプラントコントロール剤の基剤となるものがあると考えられる。特に、植物生育促進作用を有す揮発性物質は、化学肥料や化学農薬の代替品として使用できるため、環境保全型農業を進めていく中では非常に貴重な技術であると考えられる。しかしながら、揮発性物質の植物生育促進作用の研究報告は非常に少なく、特に菌類が放つ揮発性物質に関しては、ほとんど明らかとなっていない。

## 2. 目的

本研究では、微生物が産生する”香り”の機能性を科学的に解明し、植物生育促進作用を示す香気物質を利用した全く新しいスタイルのプラントコントロール剤の開発を目指すと共に、香気物質の機能性を応用した環境対応型スポーツ関連製品および次世代認知機能賦活剤の開発を行うことを目的とした。その中でも平成 19 年度においては、微生物が生産する揮発性代謝物の植物成育促進作用について検討する新たな試験系を確立、生育促進活性成分の解明を行った。また、それらの結果を基盤として「香り物質によるプラントコントロール剤（植物生育促進剤）」の開発を行なった。さらに、環境型スポーツ関連製品の開発の一環として、竹の一種である孟宗竹から香り物質の抽出・構造決定を行い、一方、香り物質によるアミロイドβ蛋白の蓄積防止剤（認知機能を高める芳香療法剤）の開発では、植物精油成分であるテルペノイドについてβ-secretase 阻害活性スクリーニング試験の検討も行なった。

## 3. 研究組織

- ・近畿大学理工学部応用化学科生物工学研究室
- ・株式会社 ミリオナ化粧品
- ・株式会社 ルック
- ・アットアロマ 株式会社

## 4. 研究方法

### ①香り物質によるプラントコントロール剤の開発

- 1) 植物生育促進作用検討のための試験系確立及び微生物が産生する揮発性物質での試験。  
(担当：株式会社ミリオナ化粧品、近畿大学理工学部応用化学科生物工学研究室（宮澤教授）)
- 2) 固相マイクロ抽出法(SPME 法)を用いた微生物の揮発性物質の解明。  
(担当：株式会社ミリオナ化粧品、近畿大学理工学部応用化学科生物工学研究室（宮澤教授）)
- 3) 植物生育促進作用の活性成分の探索及び植物生育促進剤の開発。  
(担当：株式会社ミリオナ化粧品、近畿大学理工学部応用化学科生物工学研究室（宮澤教授）)

### ②環境対応型スポーツ製品の開発

- 1) 孟宗竹に含まれる香り物質の解明。  
(担当：株式会社ルック、近畿大学理工学部応用化学科生物工学研究室（宮澤教授）)

### ③香り物質による認知機能賦活剤の開発

- 1) モノテルペノイド及びセスキテルペノイドについてβ-secretase 阻害活性試験の検討。  
(担当：アットアロマ 株式会社、近畿大学理工学部応用化学科生物工学研究室（宮澤教授）)

5. 研究成果

①香り物質によるプラントコントロール剤の開発

微生物(*Phoma* sp. GS8-3 菌株)が産生する揮発性物質の植物生育促進作用

微生物が産生する揮発性物質による植物生育促進作用を確認する目的で、人工気象機内(25度、12時間光照射)に図1の試験系を確立し、14日後のタバコの生育の検討を行った。

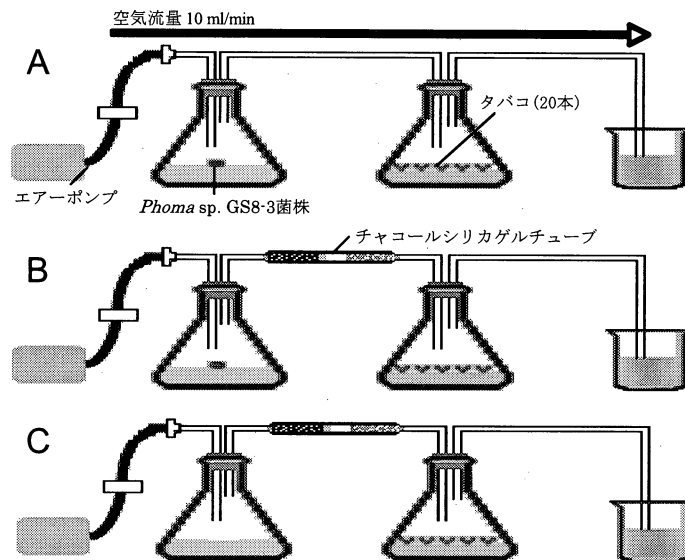


図 1. 微生物の揮発性物質による植物生育促進作用試験

A: 揮発性物質噴霧系 B: 揮発性物質吸着系 C: 未食菌系

Aの揮発性物質噴霧系では、*Phoma* sp. GS8-3 菌株が産生する揮発性物質がエアープンプによりタバコに送られるのに対し、Bでは揮発性物質がチャコールシリカゲルチューブによって吸着されるため、タバコには到達しない揮発性物質吸着系である。また、タバコの発育のコントロール値を測定する目的で、Cの未食菌系でも実験を行なった。その結果、AはBと比較して約 3.8 倍もの成長が確認された(図 2)。この事実から、微生物が産生する揮発性物質には植物生育促進活性物質が含まれていることが示された。次に、この生育促進活性を有す揮発性物質が菌株のどの成長段階で作られているのかを検討する目的で、

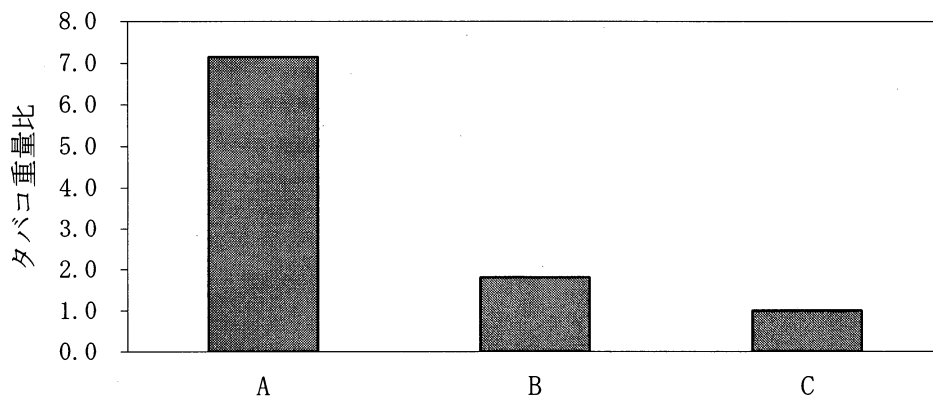


図 2. *Phoma* sp. GS8-3 菌株が放つ揮発性物質による植物生育促進作用

A: 揮発性物質噴霧系 B: 揮発性物質吸着系 C: 未食菌系

菌株の培養初期～培養後期の揮発性物質の生育促進試験を検討した。その結果、菌株の培養初期(1～3 日目)の揮発性物質のみを 14 日間さらしたタバコは、培養中期(4～6 日目)及び培養後期(7～9 日目)の揮発性物質のみをさらし続けたタバコと比較して著しい生育促進効果が見られた。このことから、菌株の培養初期段階に産生される揮発性物質に生育促進活性物質が含まれていると考えられた。

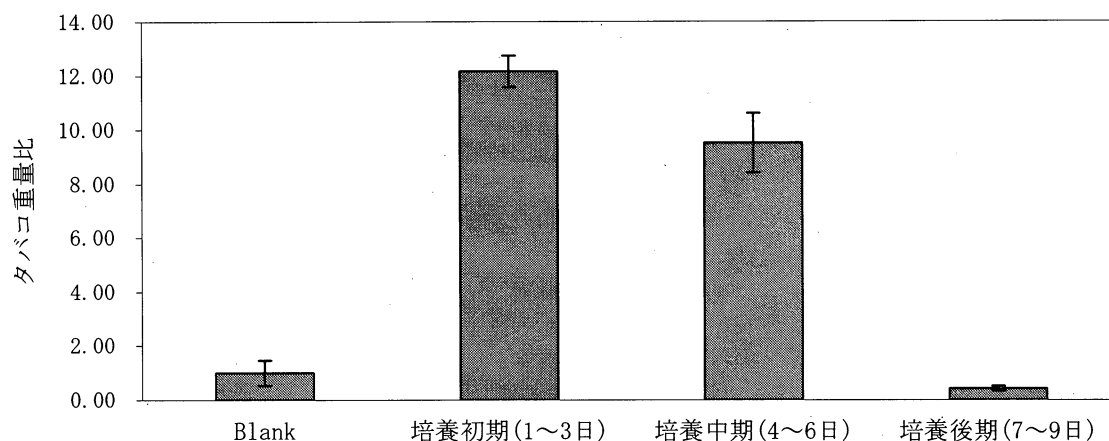


図 3. 、*Phoma sp.* GS8-3 菌株の培養初期～培養後期の揮発成分による生育促進作用

### 固相マイクロ抽出法 (SPME 法) を用いた微生物の揮発性物質の解明

生育促進活性物質を解明するため、固相マイクロ抽出法(SPME 法)を用いて *Phoma sp.* GS8-3 菌株が産生する揮発性物質の解明を行った(表 1)。その結果、*Phoma sp.* GS8-3 菌株

表1. *Phoma sp.* GS8-3菌株が産生する揮発性物質

No.	Compounds	ピーク面積 (%)			
		培養3日目	培養5日目	培養7日目	培養9日目
1	Acetic acid	0.0	13.7	0.0	0.0
2	2-Methylpropanol	28.9	19.8	9.4	17.5
3	3-Hydroxy-2-butanone	0.0	6.0	0.0	0.0
4	Unknown	0.0	0.0	0.0	3.2
5	3-Methylbutanol	62.1	45.9	83.5	59.6
6	Methacrylic acid	7.0	8.8	0.0	7.1
7	Isobutyl acetate	2.0	1.5	0.0	0.0
8	2-Hexanone	0.0	0.0	0.0	2.1
9	Octane	0.0	0.0	0.0	1.9
10	Tiglic acid	0.0	1.6	0.4	1.0
11	1-Hexanol	0.0	0.0	0.0	3.6
12	2-Heptanone	0.0	0.0	0.4	2.3
13	2-Heptanol	0.0	0.0	0.4	0.0
14	4-Methyl-phenol	0.0	0.0	3.2	0.0
15	Phenylethyl alcohol	0.0	2.7	2.7	0.0
Total		100.0	100.0	100.0	100.0

が産生する揮発性物質として、15 成分を GC-MS で検出し、内 14 成分の同定を行なった。最も高い植物生育促進作用を示した培養 3 日目に産生される揮発性物質としては、3-methylbutanol (62.1%)、2-methylpropanol (28.9%)、methacrylic acid (7.0%)、isobutyl acetate (2.0%)が検出され、これら以外の特徴的揮発性物質は検出されなかった。また、これらの成分は培養日数の経過とともに減少していく傾向が見いだされたため、これら 4 種の化合物は *Phoma sp.* GS8-3 菌株の培養初期段階に特異的に産生される揮発性物質であると考えられた。

### 植物生育促進作用の活性成分の探索及び植物生育促進剤の開発

*Phoma sp.* GS8-3 菌株の培養初期段階に産生される揮発性物質であった 3-methylbutanol、2-methylpropanol、methacrylic acid 及び isobutyl acetate について植物生育促進作用の検討を行った (表 2)。その結果、4 種の揮発性物質の全てで濃度依存的な結果を見いだすことはできなかったが、 $1.8 \times 10^{-2}$ – $1.8 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  の濃度において比較的優位な生育を確認することができた。次に、それらの相乗効果の有無を確認する目的で、*Phoma sp.* GS8-3 菌株の培養初期段階で産生されていた割合をもとに混合溶液 (3-methylbutanol:2-methylpropanol:methacrylic acid:isobutyl acetate = 30:60:7:3)を調製し生育促進試験を行った。その結果、混合溶液は  $1.8 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  の時にコントロール値と比較して 1.4 倍と高い生育促進作用を有していることが明らかとなった。このことにより、今回見いだした香り物質の植物生育促進作用は、微生物が産生するいくつかの揮発性物質の相乗効果によって高い促進作用を示していることが明らかとなった。

表2. *Phoma sp.* GS8-3菌株が産生する揮発性物質の植物生育促進作用

Compounds	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )				
	$1.8 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-2}$	1.8	$1.8 \times 10^2$
2-Methylpropanol	1.0	1.2	0.9	0.9	0.9
3-Methylbutanol	1.0	1.2	1.0	0.9	bleaching
Methacrylic acid	1.3	1.1	1.2	0.8	bleaching
Isobutyl acetate	1.2	1.0	0.9	0.8	0.9
Mixture <sup>a)</sup>	1.0	1.4	0.7	0.9	bleaching

It showed fresh weight of treatment with control ratio as fresh weight 1 of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  control.

<sup>a)</sup>Mixture: 2-methylpropanol:3-methylbutanol:methacrylic acid:isobutyl acetate =30:60:7:3.

最後に、今回調製した植物生育促進剤の有効使用濃度を確認する目的で、混合溶液についてさらに詳細な生育促進試験を行った(図 4)。その結果、 $0.018 \text{ ng}/\text{cm}^3$ – $1.8 \text{ ng}/\text{cm}^3$ において有意な促進効果を見いだすことができ、 $0.18 \text{ ng}/\text{cm}^3$ で最も高い生育促進作用を示すことを明らかとした。尚、これらの研究成果については、現在特許申請中である (平成 20 年 1 月 11 日出願、特願 2008-3885)。

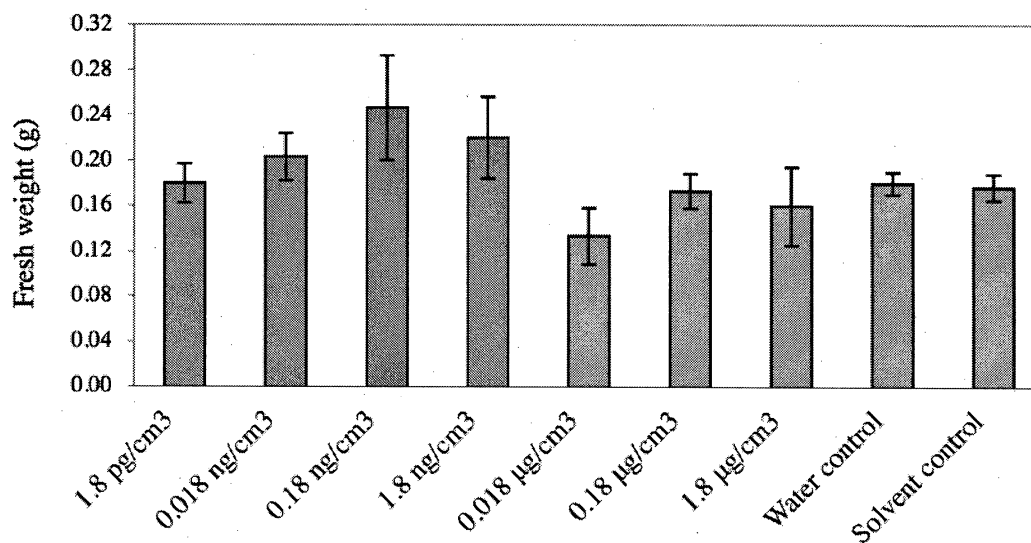


図 4. 植物生育促進剤による生育促進作用

## ②環境対応型スポーツ製品の開発

### 孟宗竹に含まれる香り物質の解明

孟宗竹(*Phyllostachys pubscence*)は中国、朝鮮半島、日本等に分布する竹の一種であり、日本で最も広く見られる竹である。現在、日本の竹林の約 65%を占める孟宗竹は、美観竹林管理等の観点から年間で約 16 万 t 伐採、廃棄されている。そこで本研究は、これら孟宗竹に含まれる化学成分の新たな機能性を探索及びスポーツ製品への応用を行なうことにより、天然資源の有効活用及び環境対応型スポーツ製品の開発を目指した。孟宗竹の香り物質については、連続水蒸気蒸留

表3. 孟宗竹の茎部に含まれる香り物質

No.	Compounds	ピーク面積 (%)	No.	Compounds	ピーク面積 (%)
1	Pentanol	0.5	21	Isobutanoic acid	0.9
2	Hexanal	1.6	22	Biphenyl	2.0
3	Acetic acid	2.0	23	α-Guaiene	1.6
4	Hexanol	3.0	24	Geranyl acetone	1.7
5	1-Octen-3-ol	0.5	25	Unknown	1.5
6	6-Methyl-5-hepten-2-one	1.1	26	Unknown	0.5
7	2-Pentyl furan	1.2	27	E-Nerolidol	15.5
8	2-Ethylhexanol	0.5	28	epi-α-Bisabolol	0.7
9	Phenylacetaldehyde	7.7	29	2E, 6E-Farnesol	2.0
10	2-Octenal	0.4	30	Tetradecanoic acid	1.3
11	Nonanal	1.1	31	14-Pentadecanolide	1.2
12	2E-Nonenal	1.3	32	6, 10, 14-Trimethyl-2-pentadecanone	1.1
13	Decanal	0.8	33	Pentadecanoic acid	1.7
14	2E-Decenal	0.4	34	Heptadecanal	1.4
15	Indole	13.4	35	Palmitic acid	20.3
16	2-Methylnaphthalene	1.2	36	Linoleic acid	2.7
17	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.8	37	2, 3-Dimethyl-2-hexadecenoic acid	0.7
18	2E, 4E-Decadienal	1.9	38	7, 9-Dimethyl hexadecane	0.7
19	Eugenol	0.7	39	Heptacosane	1.6
20	Nonanoic acid	0.9		Total	100.0

法を用いて抽出した揮発性油の GC-MS 測定により検討した。その結果、孟宗竹の茎部の香り物質として 39 成分の検出を行ない、内 37 成分の同定を行なった。主成分として脂肪酸である palmitic acid、セスキテルペノイドである *E*-nerolidol 及び含窒素化合物である indole が検出され、それぞれ揮発性油中に 20.3%、15.5%、13.4%含有されていた。

### ③香り物質による認知機能賦活剤の開発

#### モノテルペノイド及びセスキテルペノイドについてβ-secretase 阻害活性試験の検討

人口の高齢化に伴い老人性認知症の患者数は増加の一途を辿り、日本では現在 180 万人と推測されており大きな社会問題である。現在、認知症に対する研究は精力的に行われているが、病態成立の中核をなす神経細胞死の抑制・防止を可能とする根本的治療薬は未だ開発されていない。認知症は、脳内アセチルコリン量の脳内低下が直接的な原因であると考えられている。従って、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害活性を発現する成分を用いて、脳内アセチルコリン量を高めることができれば、症状改善が期待できる。また昨今、AChE 活性の低下には、患者の脳内に沈着する老人斑の主成分アミロイドβ蛋白質の切断が関与し、一方、アミロイドβ蛋白質生成にはβ-secretase (BACE1)が深く関与している事が判明した。β-secretase 阻害活性を示す成分を用いて、このアミロイドβ蛋白質生成を抑制すれば、症状改善の可能性があると考えられている。そこで本研究は、香り物質であるモノテルペノイド及びセスキテルペノイドについてβ-secretase 阻害活性試験を行い、香り物質による認知機能賦活剤の開発を目指した。

40 種類のモノテルペノイド及び 22 種類のセスキテルペノイドについて、LanthaScreen™ TR-FRET BACE1 Assay (invitrogen 社) を用いたβ-secretase 阻害活性検討の結果、一部の化合物において高い活性を見いだすことに成功した。

#### 6. 今後の展開

- 1) 本年度に開発した香り物質による植物生育促進剤の最終製品化を行う。
- 2) 製品をビニールハウス等でテスト的に使用し、効果の評価を行う。
- 3) 孟宗竹に含まれる化学成分の機能性を応用した環境対応型スポーツ関連製品の開発。
- 4) 痴呆症の原因のひとつといわれるアミロイドタンパクの脳内への蓄積を予防する植物精油の検討および次世代認知機能賦活剤の開発。