

樹皮プロアントシアニジンのセルラーゼ阻害活性

光永 徹*, 中田一英*, 阿部 勲*

Inhibitory Activity of Cellulase by the Bark Proanthocyanidins

Tohru Mitsunaga, Kazuhide Nakada, Isao Abe

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514 - 8507

要 旨

樹皮の主要成分であるプロアントシアニジン (PAC) は、樹皮の高い耐腐朽性に関与していると考えられており、樹木生理化学上大変興味深い天然有機化合物である。本研究では、数種の樹皮抽出物中の PAC のタンパク質沈殿能に着目し、木材腐朽過程で重要であるセルラーゼに対する阻害作用について検討した。*Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼ阻害活性を還元糖の定量法と基質の粘度測定法の2つの方法で評価した。その結果、両方法において PAC が高い阻害活性を有することが認められ、その強さは PAC の分子量、酸素化パターンに大きく依存することが示された。さらに、強力な木材腐朽菌であるオオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) の培養濾液中のセルラーゼに対する阻害活性を測定した結果、すべての PAC において *T. reesei* ほどの高い阻害活性は測定されず、エンド型のセルラーゼに対しては阻害性をほとんど有しないことが予想された。

キーワード：プロアントシアニジン, セルラーゼ, 木材腐朽菌, 酵素阻害活性

ABSTRACT

Proanthocyanidins (PAC), contained in the bark, are considered to relate the rotting resistance of the bark, and they are particularly interesting natural organic compounds on the plant physiological chemistry. In this work, the inhibitory activity of cellulase, which is important enzyme during wood rotting process, by PAC extracted from several materials is examined. Inhibitory activity of the cellulase derived from *Trichoderma reesei* was measured by the two methods of the quantitative analysis of reducing sugar (RS) and the measurement of

*三重大学生物資源学部 Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514 - 8507

the viscosity (Mv) of substrate. The high inhibitory activities of PAC were showed in both methods, and its strength was dependent on the molecular weight and hydroxylation patterns of PAC. Not so high inhibitory activity to cellulase in the culture of *Tyromyces palustris*, having a strong wood rotting ability, was showed by the Mv method. Therefore, it was presumed that PAC have little or no inhibition ability for end-type cellulase.

Keywords : Proanthocyanidins, Cellulase, Wood rotting fungi, Enzyme inhibition

1. はじめに

今日、世界的な環境問題とエネルギー資源の問題から、森林資源の保全と有効利用が強く望まれている状況下で、樹皮は森林から伐出されながらもほとんどが未利用であり、国内だけで年間約 560 万トンが廃棄されている(10)。しかしながら、樹皮は 10%から多いもので 50%もの抽出成分を含有していることから、これらの高付加価値的利用法を開発することが樹皮の有効利用につながると考えられる。樹皮抽出物は樹木の二次代謝産物であるが、その大部分を占めるプロアントシアニジン(PAC)は、タンパク質吸着能や金属キレート形成能などの特徴的性質を有している。PACは樹皮に特異的に存在することから、樹皮の高い耐腐朽性に関与していると考えられているが、詳細な報告はなされていない。そこで、樹皮 PAC の高い酵素阻害性が報告(4,5,12,14,15,16)されていることから、本研究では、PACの樹木生理作用に関する基礎知見を得るために、木材腐朽の過程で重要な役割を演じるセルラーゼに対する樹皮 PACの阻害活性について検討した。

2. 実験方法

2. 1 PACの調製

190年生シベリアカラマツ (*Larix* sp.) の外皮 (KO) および内皮 (KI), モリシマアカシア (*Acacia mearnsii*) の樹皮 (A), 市販のケブラチヨ (*Scinopsis lorentzii*) 心材抽出物 (Qu), 市販の柿抽出物 (Ka)(商品名: PANCIL) の 70%アセトン水抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分子量分画を行なった。分画はまずエタノールで溶出後、次に吸着物をメタノールで溶出し、さらに 70%アセトン水で溶出した。メタノール溶出画分および 70%アセトン水溶出画分をそれぞれ ME, AE とした。

2. 2 PACの分析

2. 2. 1 核交換法 (NER)

5ml容ガラスアンプル管に十分に乾燥させた試料 10mgを採取し、そこに核交換試薬(キシレン:フェノール:BF₃フェノール錯塩=10:19:3(v/v))を 500 μl入れ、ガラスアンプル管を溶封した後、超音波を用いて完全に溶解させた。A環の分析では反応温度 80℃にて、B環の分析では 150℃にてそれぞれ 4時間反応させた。反応終了後飽和食塩水 50mlの入った 100ml容分液ロートに反応液を定量的に入れ、酢酸エチル 15mlで 2回抽出した。酢酸エチル抽出液に内部標準物質を含んだ溶液(ジベンジル 3.024mg/

ベンゼン 1 ml) を 1 ml 加え、無水硫酸ナトリウムにより冷暗所にて一晚脱水した。酢酸エチル溶液から 500 μ l を採取し、N₂ で留去後 N,O-Bis (trimethylsilyl) acetamide [BSA] を 100 μ l 加え 1 時間室温にて TMS 化し、ガスクロマトグラフィー (GLC) にて定量した。GLC 分析条件は以下に示したとおりである。本体: YANAGIMOTO G-180; カラム: Crosslinked methyl silycone capillary column [Quardrex S2006: 0.25mm ϕ \times 25m]; 初期温度: 130°C; 保持時間: 1min; 昇温速度: 3.0°C/min; 最高温度: 250°C; インジェクション温度: 230°C; キャリアガス: Helium 3.0kg/cm²; メイクアップガス: Helium 1.5kg/cm²; 流速: Helium 1.0kg/cm², Hydrogen 0.5kg/cm²; Air: 0.5kg/cm²; 検出器: FID

Table 1 Phenyl nucleus composition of several proanthocyanidins analyzed by NER method.

Sample	A-ring		B-ring	
	Phl.	Res.	Cat.	Pyr.
A-ME	15.1	49.5	22.1	38.1
-AE	11.3	33.1	17.3	35.6
Qu-ME	5.3	40.6	64.4	2.0
-AE	3.3	43.3	63.6	2.3
KO-ME	20.5	0.5	65.0	2.8
-AE	23.4	0.6	70.3	3.1
KI-ME	21.3	0.1	70.5	1.0
-AE	20.5	0.3	72.3	1.9

* These values are represented by mol % to a unit of flavan-3-ol.

Phl.: phloroglucinol Res.: resorcinol
Cat.: catechol Pyr.: pyrogallol

Sample name: refer to Experimental section.

2. 2. 2 ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)

試料約 1 mg を精留したテトラヒドロフラン (THF) 約 1 ml に溶解させ、シリンジフィルターで濾過し、そのうちの約 100 μ l を THF を溶離液として GPC 分析を行ない分子量分布を得た。重量平均分子量は、phenol, (+)-catechin, procyanidin dimer, polystyrene (Mw = 2200, 9000, 25000) を用いて作成した検量線から JASCO 807-IT Integrator により計算し算出した。GPC 分析条件は以下に示したとおりである。本体: JASCOTRIROTAR; カラム: Shodex KF-802, KF-804 [10mm ϕ \times 250mm]; 溶離液: THF; 流速: 1ml/min; 検出器: UV 280nm; カラム温度: 25°C

2. 3 セルラーゼ阻害活性試験

2. 3. 1 還元糖測定 (RS) 法

セルラーゼは市販 (Worthington biochemical 製) の *Trichoderma reesei* 由来の物を用いた。0.1% セルラーゼ酢酸緩衝液 (pH5.0) 100 μ l に所定濃度の PAC50% アセトン水溶液 100 μ l を加え、40°C で 30 分間振盪する。0.1% カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液を 1 ml 添加し、さらに 40°C で 30 分間振盪後、100°C で 3 分間加熱して反応を停止させた。反応液を遠心分離で沈殿を除去した後、1% の酢酸鉛溶液を 100 μ l 加え未反応の PAC を沈殿させ、よく攪拌し再度遠心分離を行ない上澄みを 0.45 μ m のシリンジフィルターで濾過した後、ジニトロサリチル酸 (DNS) 法 (11) により濾液中の還元糖量をグルコースを用いた検量線から算出し、阻害率を求めた。ブランク試験は、試料を含まない 50% アセトン水溶液 100 μ l を加えた以外は上記の方法に従った。阻害率は次式により算出した。

阻害率 (%) = (a - b) \times 100 / a, a: ブランク試験における生成還元糖量 b: サンプル試験にお

ける生成還元糖量

また、樹皮 PAC 濃度と阻害率の関係をプロットし、 IC_{50} (阻害率 50%に相当する樹皮 PAC の濃度) を算出した。

2. 3. 2 粘度測定 (Mv) 法

0.0025%セルラーゼ酢酸緩衝溶液 (pH = 5.0) 400 μ l に所定濃度の樹皮 PAC50%アセトン水溶液を 400 μ l 添加し、40°C で 30 分間振盪する。1.0%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液を 4 ml 添加し、さらに 40°C で 30 分間振盪後、100°C で 3 分間加熱して反応を停止させた。反応液を 20ml に容量規正し、ウベローデ粘度計 No.1 を用いてこの溶液の $25 \pm 0.05^\circ\text{C}$ での流下時間 (秒) を測定した。流下時間から、次式に従い粘度平均分子量と阻害率を算出した。ブランク試験は、試料を含まない 50%アセトン水溶液 400 μ l を加えた以外は上記の方法に従った。

$\eta_{sp} = (t - t_0) / t_0$, η_{sp} : 比粘度, t : サンプル試験における流下時間 (秒), t_0 : ブランク試験における流下時間 (秒)

$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{sp} / C)$, $[\eta]$: 固有粘度, C : 基質濃度 (0.05, 0.1, 0.2%)

$[\eta] = K \times (Mv)^a$, Mv : 粘度平均分子量, $K = 0.100 \times 10^{-3}(\text{ml/g})$, $a = 1.40(3)$

阻害率は、反応溶液中で活性が阻害された酵素の割合で表し、あらかじめ求められた酵素量と基質分子量の低下の関係から Mv をもとに活性保持酵素量 b を求めた。

阻害率 = $(a - b) \times 100 / a$, a : 酵素添加量 (μ l), b : 活性保持酵素量 (μ l)

また、樹皮ポリフェノールの濃度と阻害率の関係をプロットし、 Mv 法における IC_{50} 値も求めた。

2. 4 β -glucosidase阻害活性の測定

0.01% β -glucosidase (SIGMA CHEMICAL 製) 水溶液 500 μ l と 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 1 ml の混合液に所定濃度に調製した樹皮 PAC50%アセトン水溶液 200 μ l を添加し、40°C で 30 分間振盪する。0.01 M p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) (SIGMA CHEMICAL CO. 製) 水溶液 750 μ l を添加し、さらに 40°C で 30 分間振盪後、100°C で 3 分間加熱し反応を停止させる。内部標準物質として 8 mg/ml のバニリン酸のメタノール溶液 100 μ l を加え、全量を 10ml に規正する。この反応溶液を HPLC により分析し、生成した p-nitrophenol (PNP) を定量する。ブランク試験は、試料を含まない 50%アセトン水溶液 200 μ l を加えた以外は上記の方法に従った。阻害率は下式に従って算出した。

阻害率 (%) = $(a - b) \times 100 / a$, a : ブランク試験における生成 PNP 量, b : サンプル試験における生成 PNP 量

また、樹皮 PAC の濃度と阻害率の関係をプロットし、 IC_{50} 値も求めた。HPLC の分析条件は以下に示したとおりである。

本体: 日本分光 800 シリーズ; カラム: Develosil ODS-HG5, 4.6mm ϕ \times 250mm; 検出器: UV280nm; 流速: 1 ml/min; 溶離液: MeOH : 0.01%TFA aq. = 10 : 90 ~ 60 : 40 (直線グラジエント 30 分)

2. 5 オオウズラタケ菌体外粗酵素の調製

オオウズラタケを Potato Dextrose Agar (PDA) の固形培地上で一週間前培養し、吉原らの報告 (20) に基づき CMC を唯一の炭素源とした液体培地に移植後、ロータリーシェーカー上で 30°C にて一週間振

盪培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を沈殿除去し、上澄み液を分子サイズ 1K の濾過膜 (FILTRON 製 MINI ULTRASETTE OMEGA MEMBRANE) を用いた限外濾過により粗酵素液を調製した。粗酵素液は、上記の Mv 法にて阻害活性を測定した。

3. 結果と考察

3. 1 樹皮PACの化学構造

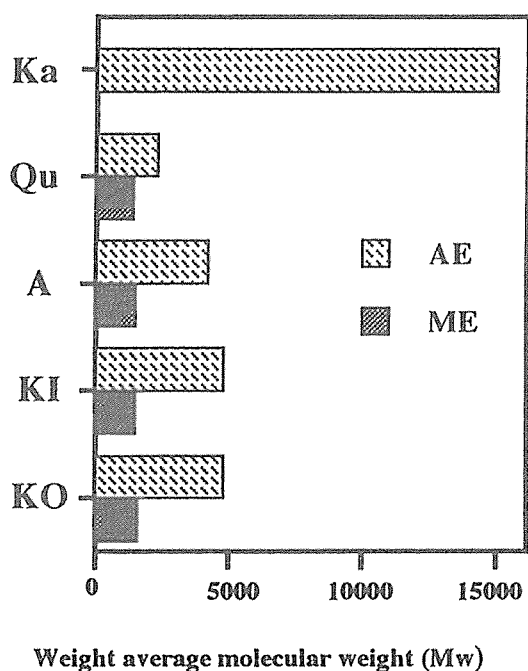


Fig. 1 Molecular weight of proanthocyanidins from several sources

調製された PAC の分子量を GPC により分析した結果、Fig.1 に示したように Ka-AE の重量平均分子量が 15000 と非常に大きい分子量であった。これは、柿の果肉中に発酵過程で蓄積されるアセトアルデヒドと柿 PAC が反応し、分子が架橋したためであろうと予想される (8)。樹皮 PAC の場合 Qu を除いて AE 画分の分子量は 4300 ~ 4800, ME 画分は 1400 ~ 1600 の範囲内にあり、これは flavan-3-ol 1 単位の分子量を 290 (カテキン) とすると、ME 画分は平均で 5 ~ 6 量体および AE 画分は 15 ~ 16 量体から成ることが推測される。またそれらの flavan-3-ol 骨格における酸素化パターンについて核交換法 (1) により分析した。核交換法は、三フッ化ホウ素の存在下で過剰のフェノールと PAC の A 環および B 環を構成するフェニル核が置換反応を起こし、遊離するフェニル核を定量することで PAC を構成するフェニル核の種類および量を把握することが出来る方法である。その結果、Table1 に示した様に KO, KI は A 環からフロログルシノールが、B 環からカテコールが遊離していることから procyanidin(PC) タイプから成る PAC であることが判る。A からは、レゾルシノール、カテコール、ピロガロールが主として遊離しており、prorobinetinidin(PR) と profisetinidin(PF) タイプから成ることが予想される。実際に、A に含まれる PAC 2 ~ 3 量体の NMR 解析から、A の伸長単位は主に PR と PF から成ることが明らかとなっている (2,19)。また、Qu は主に PF タイプの PAC であることが判る。

3. 2 *Trichoderma reesei*由来のセルラーゼに対するPACの阻害作用

PACのRS法によるセルラーゼ阻害率とその IC_{50} の値をFig.2に示す。PACは濃度依存的にセルラーゼの活性を阻害することが認められた。これらの阻害活性は樹種により様々であり、カキ、カラマツ、アカシア、の順で阻害率が高く、メタノール溶出区分のものより70%アセトン水溶出区分のものが高い阻害活性を示した。ここでは表していないが、ケブラチヨは今回行った濃度では阻害率50%を示さず、他の樹皮タンニンに比べセルラーゼ阻害活性は低かった。メタノール溶出区分と70%アセトン水溶出区分との違いは上で述べたように主にその分子量であることから、PACの分子量と阻害活性の相関が予想された。そこで、測定したPACの重量平均分子量と IC_{50} 値をプロットしたところ、Fig.3に示したような明確な相関が見られ、PACの分子量が増加するに従い阻害活性が増加することが判る。また、カラマツにおいて内皮由来のPACよりも分子量が大きい外皮由来の方が高い阻害活性を示す傾向にあった。一般に、外樹皮に存在するPACの方が内樹皮のそれに比べ、大きい分子量を持つことが知られていることから(17)、樹木が、セルラーゼに対する阻害性の強い物質を外側の樹皮に造り、その結果樹体を保護しているのではないかと想像される。また、樹皮PAC成分はその生理活性としてタンパク質吸着能を有することが一般に認められており、その能力は分子量に依存するとされている(7)。今回測定された阻害活性が同様な傾向を示すことから、樹皮PACのセルラーゼ阻害活性はタンパク質吸着能に由来していると考えられる。さらに、これらPACの持つ化学構造と阻害活性の関係について注目すると、ガロイル基を持ち一ユニット当たりのフェノール性水酸基数が最も多いKa-AE(9)で阻害活性が高く、PFタイプからなり一ユニット当たりのフェノール性水酸基数の最も少ないQu-MEで阻害活性が低かった。また、同数のフェノール性水酸基を有していてもその酸素化パターンにより阻害活性に差が見られ、PCタイプのKO, KIで高い阻害率が測定された。PACとタンパク質の吸着作用はPACのフェノール性水酸基とタンパク質の β -プリーツシート上のケトイミド基との水素結合が主体となっていると考えられており(6)、この水素結合能力がPACの酸素化パターンと密接に関係しているのではないかと予想される。

Mv法によるPACのセルラーゼ阻害活性の結果をFig.4に示した。Mv法では、コントロールにおいて添加した酵素量で基質CMCが水とほぼ同様な粘度を示すほど加水分解を受けていることを前提として、試料存在下での粘度低下率から阻害率を算出している。その結果RS法と同様に阻害が見られ、特にAE画分は高い阻害活性を示した。しかしながら、ME画分では試験方法による阻害活性の差が見られ、A-MEではRS法で得られた結果に比べて低い阻害率であった。Mv法では、基質であるCMCの低分子化がより大きく反映されるために、エンド型セルラーゼの活性を主として測定し、一方RS法ではより低分子の還元糖が測定されることにより、エキソ型セルラーゼの活性を測定していると考えられるので、今回用いた試料に関しては分子量の高いAE画分およびカラマツのME画分のPACは、*T. reesei*由来のセルラーゼにおいてエキソ型とエンド型の両セルラーゼ成分を阻害したが、A-ME画分は前者のセルラーゼ成分に対してのみ阻害性を有していると考えられた。

PACの β -glucosidaseに対する阻害活性をFig.5に示す。 β -glucosidase阻害剤であるconduiritol- β -epoxide(C- β -E)は非常に高い阻害活性を示したが、用いたPACはいずれも50%程度の阻害率を示すに止まった。反応系において、樹皮PACと β -glucosidaseの複合物と思われる白色沈殿が確認されたにも関わらず低い阻害率しか示さないことから、樹皮PACは β -glucosidaseに対しては全くか殆ど阻害活性を示さないことが予想できる。

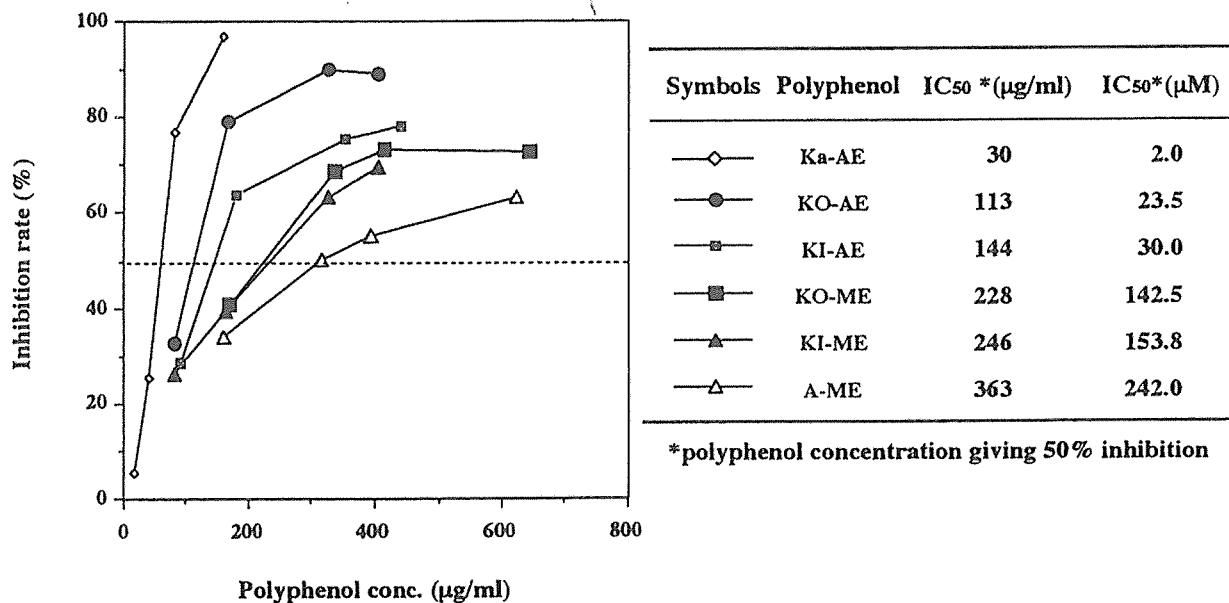


Fig.2 Inhibitory effects of natural polyphenols on cellulase determined by the RS method

Note ; inhibition rate = (a-b) · 100/a

a: (the amount of reducing sugars in blank)

b: (the amount of reducing sugars in sample)

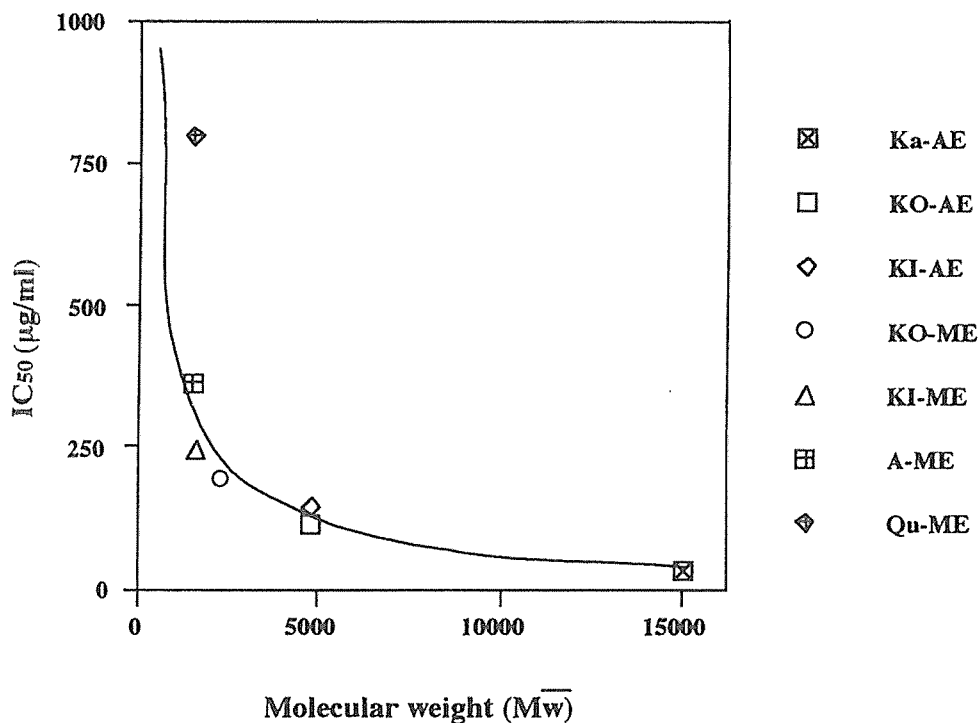


Fig. 3 Relationship between molecular weight and the IC₅₀ value of proanthocyanidins estimated by the RS method

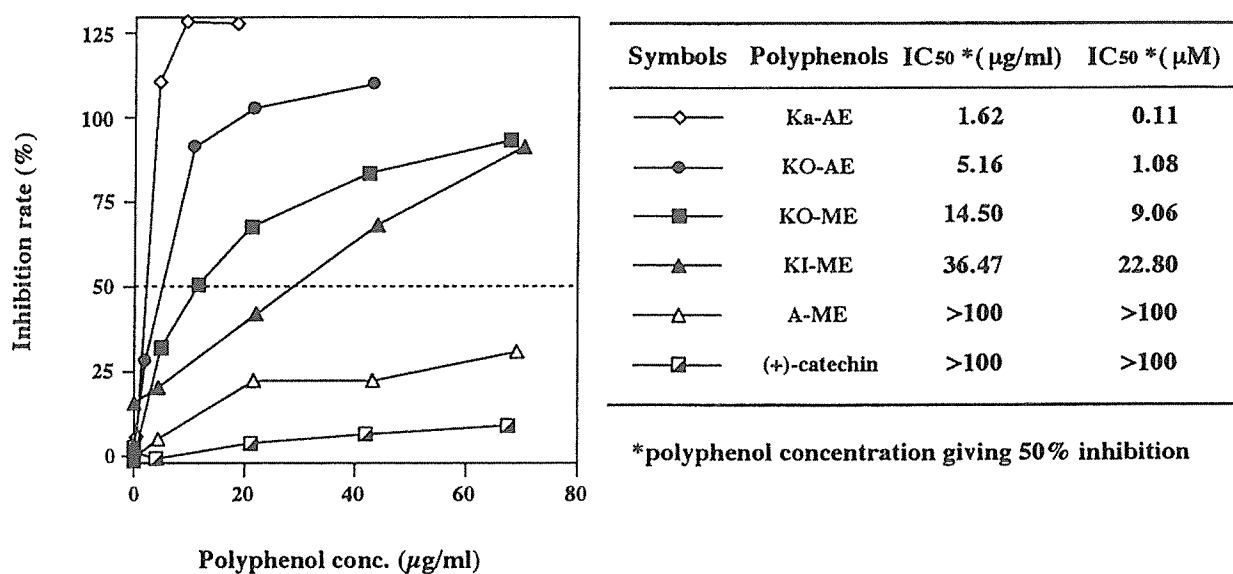


Fig. 4 Inhibitory effects of natural polyphenols on cellulase determined by the Mv method

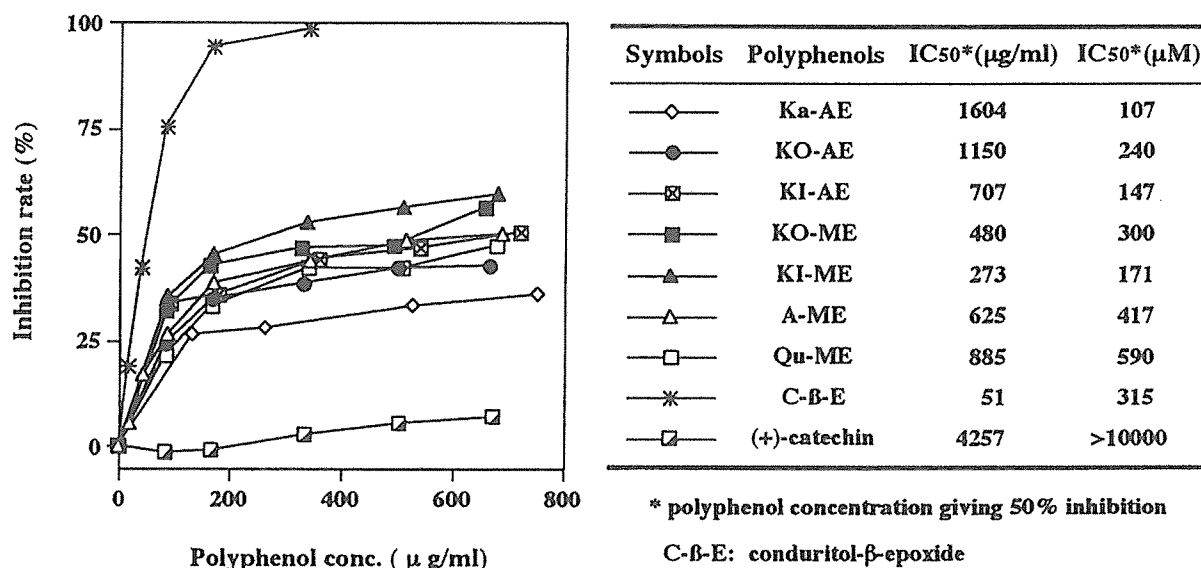


Fig. 5 Inhibitory effects of proanthocyanidins on β-glucosidase

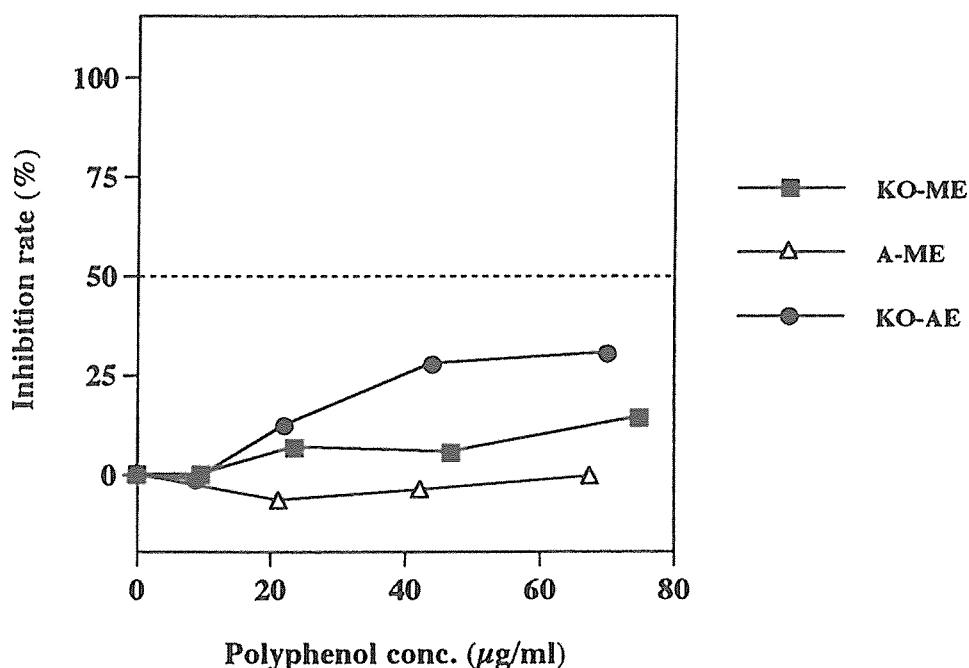


Fig. 6 Inhibitory effects of proanthocyanidins on cellulase from *T. palustris*

3. 3 *Tyromyces palustris*由来のセルラーゼに対する樹皮PACの阻害活性

T. palustris の培養濾液の CMC 粘度低下に対する PAC の阻害活性を Mv 法により測定し、結果を Fig.6 に示した。分子量の高い AE 画分においても *T. reesei* 由来のセルラーゼに対するような高い阻害は測定されず、*T. palustris* 由来のセルラーゼに対して樹皮 PAC はほとんど阻害活性を示さないことが予想された。この原因として、① *T. reesei* 由来のセルラーゼはエキソグルカナーゼを主体とし、エンド型および β -glucosidase の存在も認められているが (13)、褐色腐朽菌に属する *T. palustris* はエキソグルカナーゼを欠いていることが一般に認められている (18) ことから、PAC はエキソグルカナーゼに対しては阻害作用を示すが、エンドグルカナーゼに対しては殆どその作用を示さないと考えられる。② 培養濾液中に存在するセルラーゼ以外のタンパク質と PAC の吸着力が強いためにセルラーゼとの相互作用が減少したのではないかと予想される。

4. 結 論

各種 PAC の *T. reesei* 由来のセルラーゼに対する阻害活性を RS 法、Mv 法によって測定した。その結果、高い分子量を持つ AE 画分およびカラマツ ME 画分は両方法において高い阻害活性が認められたが、A-ME 画分は RS 法のみで阻害活性が認められたことより、A-ME 画分の PAC はエキソセルラーゼに対して優先的な阻害活性を有していると考えられた。また、阻害活性は PAC の分子量が増加するに従い大きくなり、酸素化パターンとも深く関係していた。また、 β -glucosidase に対する阻害活性は殆ど認め

られなかった。

高い木材腐朽能を有する *T.palustris* の粗酵素溶液中のセルラーゼに対する阻害活性をM_v法によって測定した結果、*T.reesei* のセルラーゼに対してみられたような高い阻害率は測定されなかった。その原因として、*T.palustris* のセルラーゼに対して樹皮 PAC が阻害活性を有していないことと、粗酵素溶液中にセルラーゼ以外のタンパク質が高濃度に存在するためにセルラーゼと相互作用する PAC 分子が少なくなり、その結果、樹皮 PAC が酵素活性を阻害するほどの作用を与えられなかったことが考えられた。したがって、*T.palustris* のセルラーゼ阻害性を明確にするためには、粗酵素溶液からセルラーゼ成分を精製、あるいは粗分画する必要があると思われる。

引用文献

- (1) 阿部 勲, 船岡正光, 児玉 亮 (1987) 縮合型タンニンの構成フェノール核について, 木材学会誌, Vol.33 (7), 582 - 588.
- (2) Botha, J. J., Ferreira, D., Roux, D. G. (1981) Synthesis of Condensed Tannins. Part 4. Direct Biomimetic Approach to [4,6]-and[4,8]-Biflavanoids., J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1235 - 1245.
- (3) Brandrup, J., Immergut, E. H. (1989) Polymer Handbook, VII 31 - 32, Wiley-Interscience Publication.
- (4) Goldstein, J.L., Swain, T. (1965) The Inhibition of Enzymes by Tannins, Phytochemistry, Vol.4, 185 - 192.
- (5) Hamada, S., Kontani, M., Hosono, H., Ono, H., Tanaka, T., Ooshima, T., Mitsunaga, T., and Abe, I. (1996) Peroxidase-catalyzed generation of catechin oligomers that inhibit glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*, FEMS Microbiology Letters, 143, 35 - 40.
- (6) Haslam, E. (1989) Plant Polyphenols, p167 - 176, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge.
- (7) Haslam, E. (1974) Polyphenol-protein interactions, Biochem. J., 139, 285 - 288
- (8) 松尾友明 (1993) 柿タンニンの化学特性と収穫後の脱渋機構, 新素材としての高分子タンニンの利用と化学 講演要旨集, 1 - 6.
- (9) 松尾友明, 伊藤三郎 (1977) カキタンニンをめぐって, 化学と生物, 15 (11), 732 - 736.
- (10) 松山将壮, 倉谷幸作, 伊藤貴文 (1983) 木材工業における残廃材の排出と処理に関する実態調査, 木材工業, Vol.38, 492 - 496.
- (11) Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, Vol.31, 426 - 428.
- (12) Mitsunaga, T., Abe, I., Kontani, M., Ono, H., Tanaka, T. (1997) Inhibitory Effects of Bark Proanthocyanidins on the Activities of Glucosyltransferases of *Streptococcus Sobrinus*, J. Wood Chem. and Tech. in press.
- (13) 村尾沢夫, 荒井基夫, 阪本礼一郎 (1987) セルラーゼ, p89 - 107, 講談社, 東京.

- (14) Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T. and Hamada, S. (1993) Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci, *Appl. Environ. Microbiol.* 59(4), 968 – 973.
- (15) Nakane, H., and Ono, K. (1990) Differential Inhibitory Effects of Some Catechin Derivatives on the Activities of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Cellular Dooxyribonucleic and Ribonucleic Acid Polymerases, *Biochemistry*, 29, 2841 – 2845.
- (16) Ooshima, T., Minami, T., Hamada, S. (1993) Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci, *Caries Res*, Vol.27, 124 – 129.
- (17) 鮫島正浩, 善本知孝 (1982) スギおよびカラマツ樹皮中でのフラバノール類の蓄積ならびにその構造上の変化, 東京大学農学部演習林報告 No.72, 17 – 28.
- (18) 高橋旨象 (1993) 褐色腐朽菌の生物学, 木材保存, Vol.19, 143 – 151.
- (19) Viviers, P. M., Botha, J. J., Ferreira, D., Roux, D. G. (1983) Synthesis of Condensed Tannins. Part 7. Angular [4,6:4,8] -Prorobinetinidin Triflavanoids from Black Wattle (*Mimosa*) Bark Extract, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 17 – 22.
- (20) 吉原一年, 赤松 勲, 上嶋 洋, 藤井利郎 (1985) リグニン分解能の強力な白色腐朽菌のスクリーニング, 紙パ技協誌 39 (7), 681 – 690.

Received September 5, 1997