

学 位 論 文 題 名

Studies on Structure and Function of
Alpha-Glucosidase Inhibitors in Roselle Tea

（ロゼル・ティー中の α -グルコシダーゼ阻害物質の
構造と機能に関する研究）

学位論文内容の要旨

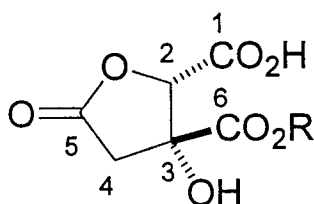
近年、種々の起源より α -グルコシダーゼ阻害物質が単離されている。消化管中の α -グルコシダーゼ活性の阻害はグルコース吸収を低下させ、その結果として食後の血糖値上昇の抑制につながるので、これらの阻害物質の利用は非インスリン依存性糖尿病患者の治療に有効である。本研究はこういった観点から、日本、インドネシア、タイ産の植物性食品中から、小腸 α -グルコシダーゼの阻害物質を探索した。

その結果、ロゼル・ティー (*Hibiscus sabdariffa*) の 50%メタノール抽出物が、ブタ膵臓 α -アミラーゼ (PPA) およびラット小腸スクラーゼに高い阻害活性を示すことを見出した。抽出物中の活性物質として、50%メタノール抽出物からハイビスカス酸 6-メチルエステル、アセトン抽出物からハイビスカス酸が単離された。これらの化合物と構造的に類似しているクエン酸、L-酒石酸、マレイン酸、コハク酸およびハイビスカス酸の 1-メチルエステル、ジメチルエステルを購入あるいは調製して、PPA 阻害活性の比較を行なった。このうち、クエン酸の活性が最も強く ($IC_{50} = 0.9$ mM)、次いでハイビスカス酸 (1.1 mM)、L-酒石酸 (1.2 mM)、マレイン酸 (2.1 mM)、コハク酸 (2.5 mM)、ハイビスカス酸 1-メチルエステル (2.6 mM)、ハイビスカス酸 6-メチルエステル (3.2 mM) の順であった。ハイビスカス酸ジメチルエステルとクエン酸トリメチルエステルは PPA の阻害活性を示さなかった。以上の結果、PPA 阻害活性には遊離カルボキシ基の数に関係していると結論された。これら活性なジカルボン酸やトリカルボン酸では、その酸性が単に阻害活性に寄与している可能性が考えられた。クエン酸とハイビスカス酸の IC_{50} 濃度溶液の pH はそれぞれ、5.1 および 4.8 であったが、PPA 活性の pH 依存性を調べた結果、pH 3.5 以上では酵素活性の低下はみられなかったため、これらの酸による PPA 阻害性は溶液の酸性度によるものではないことが示された。

ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 は、 α -グルコシダーゼ活性などヒト小腸上皮にみられる形態的および機能的特性を発現しているため、最近薬物の吸収や α -グルコシダーゼ阻害効

果の研究に広く用いられてきている。そこで、次にセルカルチャーインサート上に単層培養 28 日後の Caco-2 培養液に PPA を添加して、ヒトのデンプン消化モデル系を確立し、クエン酸、ハイビスカス酸およびそれらのエステル類の阻害効果を調べた。クエン酸やハイビスカス酸モノメチルエステル類は、阻害活性を示したが、その基質デンプンからグルコース生成反応に対する IC_{50} 濃度は、それぞれの化合物の臨界濃度、すなわちこの複合酵素系の pH 感受性試験から求めた活性に影響のない最小 pH より pH を低下させない最高濃度、より高かったため、その活性は酸性による影響であると見積られた。健康なヒトの腸内環境は恒常性が保たれているため、極端な pH 変化は起こりにくく、このような単なる酸性の影響による阻害活性は機能し得ないと考えられる。しかしながら、ハイビスカス酸の場合は $IC_{50} = 3.8 \text{ mM}$ を示し、この濃度は臨界濃度 (5 mM) よりも明らかに低かった。したがって、ハイビスカス酸の Caco-2-PPA デンプン消化モデル系阻害活性は単なる酸性度によるものではないことがわかった。

今回確立した Caco-2 膜酵素と PPA をリンクさせた反応系は、たとえば陽性対照として市販の α -グルコシダーゼ阻害物質アカルボースを用いると、非常に低濃度でデンプンからのグルコース生成の阻害が確認できたため、 α -アミラーゼとスクラーゼによるヒト小腸内デンプン消化系の阻害検定モデルとしてはすぐれた方法と考えられる。



ハイビスカス酸 (R=H)
ハイビスカス酸6-メチルエステル (R=Me)

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 西 隆 則

副 査 教 授 青 山 頼 孝

副 査 助 教 授 川 端 潤

学 位 論 文 題 名

Studies on Structure and Function of Alpha-Glucosidase Inhibitors in Roselle Tea

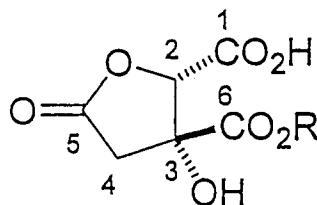
(ロゼル・ティー中の α -グルコシダーゼ阻害物質の
構造と機能に関する研究)

本論文は序章と終章を含めて7章より構成され、図47、表47、チャート13、引用文献68を含む総頁数130の英文論文である。他に参考論文7編が添えられている。

糖代謝異常（糖尿病）、肥満、高血圧、高脂血症（高中性脂肪）の4因子を同時に有する病態は狭心症や心筋梗塞の罹病率が極めて高く、且つ死亡率も高いことからこれ等4症状は「死の四重奏」と呼ばれている。その一つで増加している糖尿病の予防治療を目的として、食後高血糖の抑制が期待される α -グルコシダーゼ阻害物質が種々の起源より探索されている。本研究はその一環として、1)タイ、インドネシア、日本の植物性食品素材中の α -グルコシダーゼ阻害物質の探索、2)ヒト α -グルコシダーゼ阻害物質の効率的な探索のためのヒトのデンプン消化モデル系の確立、を目的としたものである。

1)ロゼル・ティー (*Hibiscus sabdariffa*) よりハイビスカス酸の単離

タイの植物性食品素材26種始め多数のインドネシア、日本の素材の α -グルコシダーゼ阻害作用を検討した結果、膵臓アミラーゼ、小腸スクラーゼに対して特に強い阻害活性を有するロゼル・ティーの活性成分を各種クロマトグラフィーを組み合わせて単離し、その構造をハイビスカス酸と同



ハイビスカス酸 (R=H)

ハイビスカス酸6-メチルエステル (R=Me)

定した。クエン酸等構造類似の各種モデル化合物を用いて膵臓アミラーゼに対する阻害活

性を検討した結果、阻害活性には遊離カルボキシ基の数に関与することが判明した。しかし、 IC_{50} を示すハイビスカス酸濃度でのpHは4.8であり、一方膵臓アミラーゼはpH 3.5でも阻害されないことから、ハイビスカス酸の膵臓アミラーゼ阻害活性は溶液の酸性度によるものではないことが示された。

2) ヒトのデンプン消化モデル系の確立

デンプンは膵臓アミラーゼと小腸上皮細胞膜酵素 α -グルコシダーゼにより単糖のグルコースにまで加水分解され小腸から吸収される。 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定には膵臓アミラーゼ、小腸膜 α -グルコシダーゼに対する作用を別々に測定しているため、分泌酵素である膵臓アミラーゼと小腸膜酵素の α -グルコシダーゼを同時に測定するモデル系を確立した。

ヒト結腸ガン由来細胞株Caco-2は小腸上皮細胞に見られる形態的、機能的特徴を発現しており、薬物等の吸収モデルとして利用されている。又、膜酵素 α -グルコシダーゼを発現しているため、その阻害活性の研究にも用いられている。細胞培養インサート上で20日間培養したCaco-2単層のアピカル（頂端）側にヒト膵臓アミラーゼ代替として市販ブタ膵臓アミラーゼを加えて澱粉消化モデル系とした。この系を用いてハイビスカス酸とクエン酸等構造類似の各種モデル化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性を検討した結果、ハイビスカス酸では IC_{50} は3.8mMであり、臨界濃度（活性に影響のない最低pH以下にまでpHを低下させない最高濃度）5mMより低いことから、上記1)におけると同様、このモデル系においてもハイビスカス酸の阻害活性は単に酸性度によるものではないことが判明した。今回確立したCaco-2と膵臓アミラーゼをリンクさせたモデル系は、陽性対照として α -グルコシダーゼ阻害物質のアカルボースの阻害活性を測定すると非常に低濃度で阻害活性が検出されたことから、ヒト小腸内デンプン消化系の阻害検定モデルとして優れた方法であると考えられる。

よって審査員一同は、Chanida Hansawasdiが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。