

クローブタンニン類の小腸 α -グルコシダーゼ阻害活性の分子機構

学位論文内容の要旨

近年我が国では、食生活の欧米化や生活習慣の変化が肥満や糖尿病などの生活習慣病の増加につながっていることから、食物と健康の関係に対して多くの関心が寄せられている。また食品の研究分野においても、食品がもつ嗜好性・栄養性に加えて生体に摂取された時にどのような機能性を現すかについて注目が集まっている。

人が摂取している主なエネルギー源である炭水化物（糖質）の消化吸収には、小腸粘膜上の α -グルコシダーゼによる単糖への水解が不可欠である。したがって本酵素の活性の抑制は糖質の消化吸収を低下させることにより食後の急激な血糖値の上昇を遅延させ、糖尿病や肥満の予防につながる可能性をもっている。この観点から、現在我が国では α -グルコシダーゼ阻害薬が臨床的治療に利用されている。これらの薬剤を使用した場合には強い副作用がみられることもあり投与方法にはかなりの注意が必要とされている。一方、食品由来の温和な阻害物質は、通常の食品の形態で摂取でき副作用の少ない穏やかな効果が期待される。本研究では食品の新たな機能性解明の一環として、小腸 α -グルコシダーゼの阻害物質を探索し、単離・同定するとともに阻害活性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

1. クローブ (*Syzygium aromaticum*) 中の活性物質単離および α -グルコシダーゼ阻害活性試験

ラット小腸アセトンパウダーより調製した粗酵素溶液を使用し、我が国で市販される香辛料 36 種について、マルトース水解阻害活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、クローブ蕾の 50%メタノール抽出物に阻害活性が認められ、活性物質としてエラグタンニン 2 種、casuarictin (1-O-galloyl-2,3-O,4,6-O-bis-(S)-HHDP- β -D-glucose) および eugeniin (1,2,3-tri-O-galloyl-4,6-O-(S)-HHDP- β -D-glucose) を単離・同定した。これら 2 種の化合物は構造が類似しており、異なる点は、eugeniin ではグルコースの 2,3 位が遊離のガロイルエステルなのに対し、casuarictin ではガロイル基が 2 分子カップリングしたヘキサヒドロキシジフェノイル (HHDP) エステルとなっている点である。マルトース水解阻害試験 (被験物質 0.2 mM) の結果、eugeniin (阻害率 54%) の方が casuarictin (同 42%) よりも高い阻害活性を示したことから、分子中の遊離ガロイル基の数が阻害活性に関係しているのではないかと考えられた。一方、スクロース水解阻害試験では全体的にマルトース水解阻害試験よりも低い値を示した。

さらに、小腸上皮細胞のモデル系としてヒト結腸癌由来の株化細胞である Caco-2 を用いた阻害試験の結果においても、ラット小腸粗酵素溶液と同様のことが確認された。

2. ガロタンニン類の α -グルコシダーゼ阻害活性の構造活性相関

分子内のガロイル基の数と酵素阻害活性との関係についてさらに知見を得るため、D-グルコース骨格に異なる数のガロイルエステル基を導入した類縁体、1-MGG (遊離ガロイル 1 残基)、2,3-DGG (2 残基)、1,2,3-TGG (3 残基)、PGG (5 残基) を合成し、ラット小腸粗酵素に対して単離した化合物と合成類縁体の阻害活性を比較した。その結果、マルトース水解阻害試験では分子内に遊離ガロイル基の数が多いほどより高い阻害活性を示し、ガロイル基 2 個がカップリングして HHDP 基になると阻害活性は低下することが示された。またスクロース水解阻害試験においても PGG が最も高い阻害活性を示し、全体的にマルトース水解阻害活性よりも低い値だった。

次に、ガロイル基の数のみが阻害活性に影響を与えているのかどうかを明らかにするため、1-MGG を反応液中で PGG の遊離ガロイル当量と同じ濃度 (5 倍濃度) にして反応させたところ、反応液中に遊離ガロイル基が同当量含まれていたとしても PGG の方が 1-MGG よりも明らかに強い阻害活性を示した。このことから、同じ分子内に複数の遊離ガロイル基が結合しているというポリガロイル構造が高い阻害活性には重要であることが分かった。

3. α -グルコシダーゼ複合体類に対する阻害活性比較

本研究でのラット小腸 α -グルコシダーゼ阻害活性はスクロースよりもマルトースを基質とした場合により強く発現された。小腸刷子縁膜上に存在する α -グルコシダーゼは、スクラーゼとイソマルターゼ (S-I)、マルターゼとグルコアミラーゼ (M-G) がそれぞれ複合体を形成している。マルトースは両複合体により分解されるが、スクロースは S-I 複合体にのみ分解される。そこで、これら 2 種類の複合体を粗酵素溶液より分離精製し、それぞれの複合体に対する阻害活性を測定した。両複合体に対して同じマルトースを基質にした阻害試験の結果、一連のタンニン類は S-I 複合体よりも M-G 複合体に対して大きな阻害作用を及ぼすことがわかった。

タンニン-タンパクの会合はタンニン分子中の疎水性部分とタンパクとの相互作用によること、また同じ分子内に共存する遊離ガロイル基同士は、溶媒中で近づき平面並行的に重なり合う π - π スタッキング構造をとることで疎水性が高まることが報告されている。このことより、タンニン分子内で隣接したガロイル基が酵素タンパクの疎水部分を挟み込むように作用し、そのコンホメーションを変化させることで阻害活性が引き起こされている可能性が考えられた。

4. 阻害物質と酵素タンパクの親和性解析

酵素阻害活性には阻害物質と酵素タンパクとの疎水相互作用が深く関係していることが示唆されたので、次に、タンニン分子と酵素タンパク分子との親和性を観察するため SPR (表面プラズモン共鳴) および NMR (DOSY) の応用について検討した。その結果、SPR 分析ではラット小腸 α -グルコシダーゼ複合体類に対し、クローブより単離した eugenin と合成 PGG が他のガロイル基数の少ない合成類縁体よりも高いレスポンスを示すという酵素阻害活性と同様の傾向が観察され、

SPR 分析で得られた親和性の大きさと阻害活性の高さにはある程度の相関性があることが示された。また、DOSY 測定では、モデルタンパクを使用した予備実験の結果よりタンニン類と酵素タンパクの親和性を評価することが可能であり、DOSY 分析は SPR 分析と同様に分子間相互作用測定に有効な方法であることが示唆された。

以上のことから、クローブ抽出液は糖尿病や肥満で問題となっている糖質の急激な吸収を妨げる可能性が期待でき、有用な機能性食品素材となりうる可能性をもつことがわかった。また、分子構造とタンパクの親和性について特異性は低いと理解されてきたタンニン類について、特定の分子構造の重要性を明らかにする結果が得られた。

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 教 授 木 村 淳 夫

副 査 助 教 授 川 端 潤

学 位 論 文 題 名

クローブタンニン類の小腸

α -グルコシダーゼ阻害活性の分子機構

人が摂取している主なエネルギー源である炭水化物（糖質）の消化吸収には、小腸粘膜上の α -グルコシダーゼによる単糖への水解が不可欠である。したがって本酵素の抑制は糖質の消化吸収を低下させることにより食後の急激な血糖値の上昇を遅延させ、糖尿病や肥満の予防につながる可能性をもっている。この観点から、現在我が国では α -グルコシダーゼ阻害薬が臨床的治療に利用されている。これらの薬剤を使用した場合には強い副作用がみられることもあり投与方法にはかなりの注意が必要とされている。一方、食品由来の温和な阻害物質は、通常の食品の形態で摂取でき副作用の少ない穏やかな効果が期待される。本研究では食品の新たな機能性解明の一環として、クローブより単離した小腸 α -グルコシダーゼ阻害物質について、その作用機構を明らかにすることを目的とした。

1. クローブ中の活性物質単離および α -グルコシダーゼ阻害活性試験

クローブ (*Syzygium aromaticum*) 蕾の 50%メタノール抽出物よりラット小腸 α -グルコシダーゼ阻害物質としてエラグタンニン 2 種、casuarictin (1-*O*-galloyl-2,3-*O*-,4,6-*O*-bis-(*S*)-HHDP- β -D-glucose) および eugeniin (1,2,3-tri-*O*-galloyl-4,6-*O*-(*S*)-HHDP- β -D-glucose) を単離・同定した。これら 2 種の化合物は構造が類似しており、異なる点は、eugeniin では D-グルコースの 2,3 位が遊離のガロイルエステルなのに対し、casuarictin ではガロイル基が 2 分子カップリングしたヘキサヒドロキシジフェノイル (HHDP) エステルとなっている点である。ラット小腸粗酵素溶液を使用したマルトース水解阻害試験（被験物質 1 mM）の結果、eugeniin（阻害率 54%）の方が casuarictin（同 42%）よりも高い阻害活性を示したことから、分子中の遊離ガロイル基の数が阻害活性に関係しているのではないかと考えられた。さらに、小腸上皮細胞のモデル株化細胞である Caco-2 を用いた阻害試験の結果においても、ラット小腸粗酵素溶液と同様のことが確認された。

2. ガロタンニン類の α -グルコシダーゼ阻害活性の構造活性相関

D-グルコース骨格に異なる数のガロイルエステル基を導入した類縁体、1-MGG (遊離ガロイル 1 残基)、2,3-DGG (2 残基)、1,2,3-TGG (3 残基)、PGG (5 残基) を合成し構造活性相関試験を行った。その結果、マルトース水解阻害試験では分子内に遊離ガロイル基の数が多いほどより高い阻害活性を示し、ガロイル基 2 個がカップリングして HHDP 基になると阻害活性は低下することが示された。またスクロース水解阻害試験においても PGG が最も高い阻害活性を示し、全体的にマルトース水解阻害活性よりも低い値だった。さらに、1-MGG を反応液中で PGG の遊離ガロイル当量と同じ濃度 (5 倍濃度) にして反応させたところ、反応液中に遊離ガロイル基が同当量含まれていたとしても PGG の方が 1-MGG よりも明らかに強い阻害活性を示したことから、同じ分子内に複数の遊離ガロイル基が結合しているというポリガロイル構造が高い阻害活性には重要であることが分かった。

3. α -グルコシダーゼ複合体類に対する阻害活性比較

本研究でのラット小腸 α -グルコシダーゼ阻害活性はスクロースよりもマルトースを基質とした場合により強く発現された。小腸刷子縁膜上に存在する α -グルコシダーゼは、スクラーゼとイソマルターゼ (S-I)、マルターゼとグルコアミラーゼ (M-G) がそれぞれ複合体を形成している。マルトースは両複合体により分解されるが、スクロースは S-I 複合体にのみ分解される。そこで、これら 2 種類の複合体を粗酵素溶液より分離精製し、それぞれの複合体に対する阻害活性を測定した。両複合体に対して同じマルトースを基質にした阻害試験の結果、一連のタンニン類は S-I 複合体よりも M-G 複合体に対して大きな阻害作用を及ぼすことがわかった。

4. 阻害物質と酵素タンパクの親和性解析

酵素阻害活性には阻害物質と酵素タンパクとの疎水相互作用が深く関係していることが示唆されたので、次に、タンニン分子と酵素タンパク分子との親和性を観察するため SPR (表面プラズモン共鳴) および NMR (DOSY) の応用について検討した。その結果、SPR 分析ではラット小腸 α -グルコシダーゼ複合体類に対し、eugenin と合成 PGG が他のガロイル基数の少ない合成類縁体よりも高いレスポンスを示すという酵素阻害活性と同様の傾向が観察され、SPR 分析で得られた親和性の大きさと阻害活性の高さにはある程度の相関性があることが示された。また、DOSY 測定では、モデルタンパクを使用した予備実験の結果よりタンニン類と酵素タンパクの親和性を評価することが可能であり、DOSY 分析は SPR 分析と同様に分子間相互作用測定に有効な方法であることが示唆された。

以上のことから、クローブ抽出液は糖尿病や肥満で問題となっている糖質の急激な吸収を妨げる可能性が期待でき、有用な機能性食品素材となりうる可能性をもつことがわかった。また、分子構造とタンパクの親和性について特異性は低いと理解されてきたタンニン類について、特定の分子構造の重要性を明らかにする結果が得られた。

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