

学位論文題名

消化器に作用する天然由来成分に関する研究

学位論文内容の要旨

ヒトの健康の維持にとって、消化器の機能が精密に制御され正しく機能することは必須なことである。しかしながら、消化器の制御機能は食の質的・量的異常、ある種の微生物の感染などの外的因子に対して完璧に対応することはできず、そのために種々の疾患が発症・進展する場合がある。このような疾患の代表的な例として脂質異常、*Helicobacter pylori*(*H.pylori*)持続感染症が挙げられる。

脂質異常は、現代の動物性脂肪摂取過多の食生活においてエネルギー摂取過多の情報が消化器から中枢神経系に満腹シグナルとして適切に伝達されないことによって起こる疾患であり、リポ蛋白の過剰産生とリポ蛋白の血中からのクリアランス不足が生じる。*H.pylori* 持続感染症は、胃の異物排除機能が *H.pylori* に対しては十分に機能しないことを原因とする。消化器の機能を修飾する物質は、恒常性維持のため消化器が十分対応できていないことを原因とする疾患に対する有用な治療薬・予防食品になる可能性が高い。本研究では、この考え方にに基づき脂質異常と *H.pylori* 感染症の2つの疾患を対象とし、疾患の発症に関与する消化器機能を修飾する物質の効率的な探索方法を設定し、天然物を対象とし探索をおこなった。得られた物質については *in vitro* と *in vivo* での機能性の評価をおこなった。

1. 脂肪吸収機構を抑制するε-polylysine の作用

食事より摂取される脂肪の吸収過程において膵リパーゼは必須な役割を担っている。膵リパーゼ活性を阻害する物質は脂肪の吸収を抑制し、それにより脂質異常の改善効果が期待できる。著者は、従来の研究結果から消化管内非分解性の塩基性高分子は消化管内で膵リパーゼを効果的に阻害することにより脂質異常改善作用を示すと考え、ε-polylysine (ε-pL) の検討を行った。

(1) ε-pL のリパーゼ阻害作用 (*in vitro*)

ε-pL は消化管内におけるタンパク加水分解酵素による分解を受けずに 10μg/mL 以上の濃度において濃度依存的に膵リパーゼ阻害活性を示した。ε-pL の膵リパーゼ阻害作用は基質エマルションの破壊活性を介した間接的な阻害であった。ε-pL は胆汁酸塩を含む脂質エマルションを最も強く破壊したことから、ε-pL の標的分子は胆汁酸であることが示唆された。

(2) ε-pL の食後高脂血症抑制作用(*in vivo*)

ε-pL は、脂肪乳液摂取後のラットの血漿中性脂肪上昇に対して 15mg/kg 以上の経口投与により有意に抑制した。ε-pL 15, 25, 100mg/kg 投与後の血漿中性脂肪 AUC 値は対照群の 15%以下であった($p < 0.05$ vs Control)。ε-pL はヒトにおいても食後高脂血症抑制作用を示した。空腹時血清中性脂肪値が 110-250mg/dL の境界域高中性脂肪血症者(男性 8 名)に対して、ε-pL 400mg および 800mg 経口投与により高脂肪含有スープ(脂肪 40g 含有)摂取後の中性脂肪上昇が有意に抑制された。ε-pL 400mg, 800mg 摂取後の血漿中性脂肪 AUC 値は対照群のそれぞれ 73%と 76%であった(400mg のみ $p < 0.05$ vs. Control)。

2. 肝における脂肪のクリアランスを上昇させる成分の探索

Apolipoprotein E (apo E) は VLDL, ILD, LDL, chylomicron-remnant などの apo E 含有リポタンパクの肝臓における受容体を介した取り込みにおいて中心的な役割を担っている。よって apo E の産生促進物質は肝におけるリポタンパクのクリアランスを上昇させる活性が期待できる。そ

ここでヒト肝がん細胞株 Hep G2 を用いて apo E 分泌上昇物質のスクリーニング系を設定し、微生物培養菌体メタノール抽出物 2000 点を対象としスクリーニングをおこなった。

(1) N-4909 の単離および立体配置の決定

Hep G2 細胞において apo E 分泌を濃度依存的に抑制し albumin 分泌を 20%以上抑制しない微生物菌体抽出物を 1 点選択し、活性成分を単離した。N-4909 と命名した活性成分は *Bacillus* sp. A1238 の産生する ACAT 阻害活性複合体 isohalobacillin の 1 成分であった。N-4909 の立体配置の内、3-oxy-13-methyltetradecanoyl 基は未決定であったので、Mosher 法により 3 位の絶対配置を R と決定した。

(2) N-4909 の生物活性

N-4909 は、0.2-5.0 μ g/mL において Hep G2 細胞からの apo E 分泌を濃度依存的に上昇させた。また、apo B100 の分泌抑制作用と apo A1 の分泌上昇作用も同時に示した。N-4909 の脂質異常症改善作用をラットのコレステロール、コール酸負荷モデルで検討した。N-4909 25-100mg/kg 経口投与はラット血漿中の総コレステロール値を有意に低下させ ($p<0.05$ vs Control)、HDL コレステロール値を有意に上昇させた ($p<0.05$ vs Control)。N-4909 の脂質低下作用に apo E 上昇が関与していることを証明するために、N-4909 投与ラット血漿の apo E を SDS-PAGE により検討したが、リポタンパク中の apo E の上昇は観察されず、*in vivo* における N-4909 の脂質異常改善作用における apo E の関与は明確には証明されなかった。

3. 胃粘膜の *H.pylori* 排除機能を修飾する天然由来成分の探索

H.pylori の菌体外膜上に局在する urease は胃粘膜 mucin に対する接着因子として機能する。宿主の胃のぜん動運動による管腔からの排除作用に対して *H.pylori* が抵抗性を示す要因の 1 つとして、urease-mucin 接着が寄与していると考えられる。従来の研究により dextransulfate, フコイダンなど酸性高分子が urease-mucin 結合を抑制することが明らかになっているが、加工食品中に普遍的に存在する食品タンパク由来メイラード反応物も同様に酸性高分子と考えられることから、食品タンパク由来メイラード反応物(melanoidin)の urease-mucin 結合阻害作用と抗 *H.pylori* 活性の検討を行った。

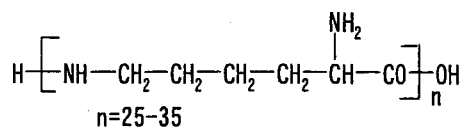
(1) Melanoidin の urease-mucin 接着阻害作用 (*in vitro*)

代表的食品タンパクである casein, lactoglobulin, 7S-globulin と glucose または lactose より melanoidin を調製した。また、市販のイングリッシュマフィン皮部分より melanoidin を精製した。これらは全て urease-mucin 結合を 10 μ g/mL 以上の濃度において濃度依存的に阻害した。一方、原料タンパクと糖は全て活性を示さなかった。また、casein と lactose より調製した melanoidin (melanoidin I) の酵素分解物および glycyl-glucose より調製した melanoidin も活性を示さなかった。Melanoidin の urease-mucin 接着阻害必要条件として高分子であることが再確認された。

(2) Melanoidin I の抗 *H.pylori* 活性 (*in vivo*)

Melanoidin I は、*H.pylori* を経口感染させたヘアレスマウス (NS:Hr/ICR) に 10 週間 0.25-2.5% 混餌投与により胃内菌数を有意に減少させた ($p<0.05$ vs Control)。また、melanoidin I は、*H.pylori* 感染スナネズミに 6 週間 2.5%混餌投与により *H.pylori* で惹起される胃粘膜傷害の進行を有意に抑制した ($p<0.05$ vs Control)。さらに、melanoidin I は無症候性の *H.pylori* 感染者 (14 名) において、1 日 3g を 8 週間摂取により胃内菌数の指標である UBT 値と HpSA 値を摂取前に比べてそれぞれ 31%と 38%低下させた。HpSA 低下は統計的に有意であった ($p<0.05$)。

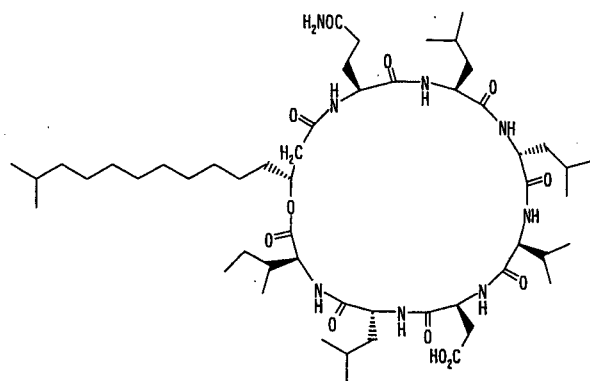
本研究を通して、消化器の恒常性維持機能が十分に働かないことを原因とする疾患に対しては、消化器に作用しその役割を補う (修飾する) というアプローチは十分有効であることが明らかになったと考える。本論文で報告した 3 つの成分は既知物質であるが、生体調節機能に関する報告は今回が初めてである。本論文の成果が脂質異常、*H.pylori* 感染症に対する予防・治療の分野における進歩に寄与することが期待される。



ε-Polylysine: *Streptomyces albulus* 産生物質

Melanoidin I :

Casein と lactose 間の Maillard 反応生成物
(イングリッシュマフィン中に存在)



N-4909: *Bacillus* NO. 4691 菌体成分

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 端 潤
副 査 教 授 原 博
副 査 助 教 加 藤 英 介

学 位 論 文 題 名

消化器に作用する天然由来成分に関する研究

本論文は和文 94 頁、図 30、表 13、引用文献 94 からなり、参考論文 3 編が付されている。ヒトの健康の維持にとって、消化器の機能が精密に制御され正しく機能することは必須なことである。しかしながら、消化器の制御機能は食の質的・量的異常、ある種の微生物の感染などの外的因子に対して完璧に対応することはできず、そのために種々の疾患が発症・進展する場合がある。このような疾患の代表的な例として脂質異常、*Helicobacter pylori* 持続感染症が挙げられる。消化器の機能を修飾する物質は、恒常性維持のため消化器が十分対応できていないことを原因とする疾患に対する有用な治療薬・予防食品になる可能性が高い。本研究では、この考え方にに基づき上記の 2 つの疾患を対象とし、疾患の発症に関与する消化器機能を修飾する物質の効率的な探索方法を設定して天然物を対象に探索をおこない、得られた物質について *in vitro* と *in vivo* で機能性の評価をおこなった。

1. 脂肪吸収機構を抑制する ϵ -polylysine の作用

膵リパーゼ活性を阻害する物質は脂肪の吸収を抑制し、それにより脂質異常の改善効果が期待できる。消化管内非分解性の塩基性高分子は膵リパーゼを効果的に阻害することにより脂質異常改善作用を示すと考え、 ϵ -polylysine (ϵ -pL) の検討を行った。

(1) ϵ -pL のリパーゼ阻害作用 (*in vitro*)

ϵ -pL は消化管内におけるタンパク加水分解酵素による分解を受けずに 10 μ g/mL 以上の濃度において濃度依存的に膵リパーゼ阻害活性を示した。 ϵ -pL の膵リパーゼ阻害作用は基質エマルションの破壊活性を介した間接的な阻害であり、その標的分子は胆汁酸であることが示唆された。

(2) ϵ -pL の食後高脂血症抑制作用 (*in vivo*)

ϵ -pL は、脂肪乳液摂取後のラットの血漿中性脂肪上昇に対して 15 mg/kg 以上の経口投与により有意に抑制した。また、ヒトにおいても空腹時血清中性脂肪値が 110-250 mg/dL の境界域高中性脂肪血症者に対して、400 mg 経口投与により高脂肪含有スープ摂取後の中性脂肪上昇が有意に抑制された。

2. 肝における脂肪のクリアランスを上昇させる成分の探索

ヒト肝がん細胞株 Hep G2 を用いて apo E 分泌上昇物質のスクリーニング系を設定し、微生物培養菌体メタノール抽出物 2000 点から活性成分を得、その機能評価を行なった。

(1) N-4909 の単離および立体配置の決定

Hep G2 細胞において apo E 分泌を濃度依存的に抑制し albumin 分泌を 20%以上抑制しない微生物菌体抽出物から活性成分 N-4909 を単離した。本物質は既知化合物であるが、オキシ酸部の絶対配置が未決定であったため、Mosher 法により R と決定した。

(2) N-4909 の生物活性

N-4909 は、0.2-5.0 $\mu\text{g/mL}$ において Hep G2 細胞からの apo E 分泌を濃度依存的に上昇させた。また、apo B100 の分泌抑制作用と apo A1 の分泌上昇作用も同時に示した。N-4909 25-100 mg/kg 経口投与はラット血漿中の総コレステロール値を有意に低下させ、HDL コレステロール値を有意に上昇させた。

3. 胃粘膜の *H. pylori* 排除機能を修飾する天然由来成分の探索

H. pylori の菌体外膜上に局在する urease は胃粘膜 mucin に対する接着因子として機能する。酸性高分子が urease-mucin 結合を抑制することから、食品タンパク由来メイラード反応物 (melanoidin) の urease-mucin 結合阻害作用と抗 *H. pylori* 活性の検討を行った。

(1) Melanoidin の urease-mucin 接着阻害作用 (*in vitro*)

代表的食品タンパクである casein, lactoglobulin, 7S-globulin と glucose または lactose より melanoidin を調製した。また、市販のイングリッシュマフィン皮部分より melanoidin を精製した。これらは全て urease-mucin 結合を 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において濃度依存的に阻害した。その接着阻害必要条件として高分子であることが再確認された。

(2) Melanoidin I の抗 *H. pylori* 活性 (*in vivo*)

Melanoidin I は、*H. pylori* を経口感染させたヘアレスマウスに 10 週間 0.25-2.5%混餌投与により胃内菌数を有意に減少させた。また、無症候性の *H. pylori* 感染者において、1 日 3g を 8 週間摂取により胃内菌数の指標である UBT 値と HpSA 値を有意に低下させた。

本研究を通して、消化器の恒常性維持機能が十分に働かないことを原因とする疾患に対しては、消化器に作用しその役割を補うというアプローチは十分有効であることが明らかになった。この成果が脂質異常、*H. pylori* 感染症に対する予防・治療の分野における進歩に寄与することが期待される。

よって審査員一同は、平本 茂が博士（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。