

学 位 論 文 題 名

Studies on Maillard reaction inhibitors from culture broth  
of *Paecilomyces* sp.

(*Paecilomyces* sp. 培養液からのMaillard反応阻害剤に関する研究)

学位論文内容の要旨

The Maillard reaction, also referred to as nonenzymatic glycation, was characterized in 1912 by a French scientist, Louis Camille Maillard. It's a complex series of reactions that involve glucose and other reducing sugars reacting with amino groups presented in amino acids and proteins. The reaction occurs also in the human bodies, giving a multitude of end-products known as advanced glycation end-products (AGEs). The formation of AGEs accounts largely for the increase in collagen cross-linking that accompanies normal aging and occurs at an accelerated rate in diabetes.

This study tried to screen for Maillard reaction inhibitors produced by *Paecilomyces* sp. 3193B, and to offer a potential strategy as therapeutics for diverse diseases such as diabetic complication, cardiovascular disease, and Alzheimer's disease.

**1. Cultivation and isolation of active compounds from the broth of *Paecilomyces* sp. 3193B**

*Paecilomyces* sp. 3193B was cultured statically in 100mL-test tubes for 14 days to afford 18 liters of broth. The obtained broth was extracted by hexane, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol sequentially, out of which ethyl acetate and *n*-butanol extracts possessed activity against AGEs formation. Subsequently, the bioassay-guided chromatographic fractionation was performed by using column chromatography over high porous polymer HP20, Sephadex gel LH-20, silica gel etc. followed by preparative thin-layer chromatography, preparative high performance liquid chromatography or recrystallization to give five active compounds from the active extracts of ethyl acetate and *n*-butanol. Their structures were investigated by spectroscopic methods (MS, UV, IR, 1D NMR and 2D NMR).

**2. Development of a new RNase A-MGO assay system which could be used for screening and assay for AGEs inhibitors**

By revising a former procedure for rapid screening of Maillard reaction, a new assay was constructed for evaluation of an early stage of the Maillard reaction. In brief, the modeling for crosslinking of proteins was constructed using 1 mg mL<sup>-1</sup> RNase A with 100 mM methyl glyoxal (MGO) in 20 mM phosphate buffer (pH 7.2), and the reaction mixture was allowed to proceed at 37°C for 24 h with or without inhibitor. After dilution, this reaction mixture was transferred into a 1.5 mL tube to be incubated with tRNA in 60 mM phosphate buffer (pH 8.0). The reaction was arrested after incubation for 20 min at 37°C by using stopping reagent (22 mM lanthanum chloride in 1.2 M perchloric acid). Subsequently 0.2 mL of the solution was diluted with distilled water and the absorption of acid soluble transfer ribonucleotides was measured at 260 nm by spectrophotometer. The protection activity of compound was calculated by absorbance of degraded tRNA by RNase A, which survived in the MGO mediated inactivation.

### **3. Investigation of hesperidin derivatives and their stereoisomers against AGEs formation**

Hesperidin and hesperetin were separated by chiral chromatography and the inhibitory effects of 1:1 mixture of (2*S*)- and (2*R*)-hesperidin (1), (2*S*)-hesperidin (2), (2*R*)-hesperidin (3), 1:1 mixture of (*S*)- and (*R*)-hesperetin (4), (*S*)-hesperetin (5), (*R*)-hesperetin (6), and monoglucosyl hesperidin (7) [1:1 mixture of (2*S*)-glucosyl hesperidin (8) and (2*R*)-glucosyl hesperidin (9)] at a concentration of 1 mM on protein glycation reaction have been revealed using the newly constructed RNase A-MGO assay for the early stage and the bovine serum albumin (BSA)-glucose assay for the late stage of Maillard reaction. This study has demonstrated that hesperidin and its derivatives possessed relatively strong activity against formation of AGEs. (*S*)-hesperetin (5) possessed the highest inhibitory rate up to 57.4% in BSA-glucose assay, 38.2% in RNase A-MGO assay.

### **4. Investigation of identified compounds against AGEs formation**

Out of the five identified compounds, (-)-mitrubin was the one with best activity against formation of AGEs in both lysozyme-ribose assay and BSA-glucose assay and bear comparison with that of aminoguanidine and showed a dose dependent tendency. *O*-demethylsilvaticol, palmitic acid and palmitoleic acid containing hydroperoxides also showed in different extent inhibitory activity respectively in these two assay systems.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	生方	信
副査	教授	川端	潤
副査	特任講師	三橋	進也
副査	助教	重富	顕吾

## 学位論文題名

### Studies on Maillard reaction inhibitors from culture broth of *Paecilomyces* sp.

(*Paecilomyces* sp. 培養液からのMaillard反応阻害剤に関する研究)

本論文は、英文 91 頁、図 26、表 7、4 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

非酵素的糖化反応とも呼ばれる Maillard 反応は、1912 年フランスの化学者 Louis Camille Maillard により、その詳細が明らかにされた。本反応はアミノ酸およびタンパク質中に存在するアミノ基とグルコースなどの還元糖との反応を含む一連の複雑な反応である。Maillard 反応はヒトの体内でも進行し、終末糖化産物(advanced glycation endproducts:AGEs)と呼ばれる修飾タンパク質を蓄積させる。AGEs の蓄積は老化に伴うコラーゲン架橋の増加の主要な原因であり、糖尿病合併症の進展にも関与していると考えられている。当研究室に於ける真菌培養液のスクリーニングにより、*Paecilomyces* sp. 3193B 株の培養抽出物が Maillard 反応阻害活性を示すことが判明していた。本研究の目的は、*Paecilomyces* sp. 3193B 株の生産する Maillard 反応阻害剤を単離・構造決定し、糖尿病合併症、動脈硬化、およびアルツハイマー病などに対する治療法の開発の手掛かりを提供することにある。

#### 1) *Paecilomyces* sp. 3193B 株の培養液からの活性物質の選別と単離同定

*Paecilomyces* sp. 3193B 株の 100mL 試験管中での 14 日間の培養を経て、18L の培養液を得た。得られた培養液をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルおよび *n*-ブタノールで順次抽出し、酢酸エチル抽出物および *n*-ブタノール抽出物が AGEs 形成阻害活性を示すことが判明した。続いて、これらの抽出物から、バイオアッセイを指標として、ダイヤイオン HP20、セファデックス LH20、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等のクロマト分離、再結晶法によりヘスペリジンを含む五種類の活性化合物を得た。これらの化合物の構造は MS, UV, IR, 1D NMR および 2D NMR 等の分光法により決定された。

#### 2) AGEs 阻害剤の探索と生物検定に利用できる RNase A-MGO アッセイ系の開発

Maillard 反応の迅速なスクリーニングに使われる既存の方法を改良することにより、Maillard 反応の初期段階の評価のための新しいアッセイ系が構築された。まず、20 mM のリン酸バッファー(pH 7.2)中 100 mM のメチルグリオキサル(MGO)と 1mg mL<sup>-1</sup>の RNase A を用いて、タンパク質の架橋のモデルを構築し、阻害剤存在下および非存在下 37 °C、24 時間の条件で反応を行った。希釈後、反応混液を 1.5 mL チューブに移し、60 mM リン酸バッファー(pH 8.0)中、tRNA と反応を行った。37 °C、20 分間の反応後、1.2 M 過塩素酸中に 22 mM 塩化ランタンを含む反応停止液により、反応を停止した。次に、0.2 mL の反応溶液を純水で希釈し、酸可溶性リボヌクレオチドの 260 nm での紫外吸収を分光器で測定した。化合物の保護効果は、MGO による不活性化を免れた RNase A による分解した tRNA の紫外吸収により計算された。

### 3) ヘスペリジン誘導体とその立体異性体の AGEs 形成阻害活性に関する研究

ヘスペリジンとヘスペリチンの立体異性体を、それぞれキラルクロマトグラフィーにより分離し、(2*S*)-及び(2*R*)-ヘスペリジンの 1:1 混合物(1)、(2*S*)-ヘスペリジン(2)、(2*R*)-ヘスペリジン(3)、(2*S*)-及び(2*R*)-ヘスペリチンの 1:1 混合物(4)、(2*S*)-ヘスペリチン(5)、(2*R*)-ヘスペリチン(6)、並びにモノグルコシドヘスペリジン(7) [(2*S*)-グルコシドヘスペリジン(8)と(2*R*)-グルコシドヘスペリジン(9)の 1:1 混合物]の 1mM でのタンパク質糖化反応に対する阻害活性を、Maillard 反応の初期段階に対応するモデルとして開発した RNase A-MGO アッセイと、後期反応に対応するモデルであるウシ血清アルブミン(BSA)-グルコースアッセイを用いて明らかにした。本研究により、ヘスペリジンとその誘導体が AGEs 形成に対して比較的強い阻害活性を持っていることが初めて明らかになった。RNase A-MGO アッセイと BSA-グルコースアッセイに於いて、(2*S*)-ヘスペリチン(5)が最も高い阻害率を示した。

### 4) 単離した化合物の AGEs 形成阻害活性に関する研究

単離同定した 5 種の化合物(図 1)のうち、(-)-ミトルブリンがリゾチウム-リボースアッセイと BSA-グルコースアッセイに於いてアミノグアニジンに匹敵する優れた AGEs 形成阻害活性を示した。O-デメチルシルバチコール、並びにヒドロペルオキシドを含むパルミトレイン酸も両アッセイ系で異なる阻害活性を示した。これらの化合物が AGEs 阻害活性を有する事は初めての報告であり、AGE 形成阻害に於ける(-)-ミトルブリンの役割の評価に関するさらなる研究が期待される。

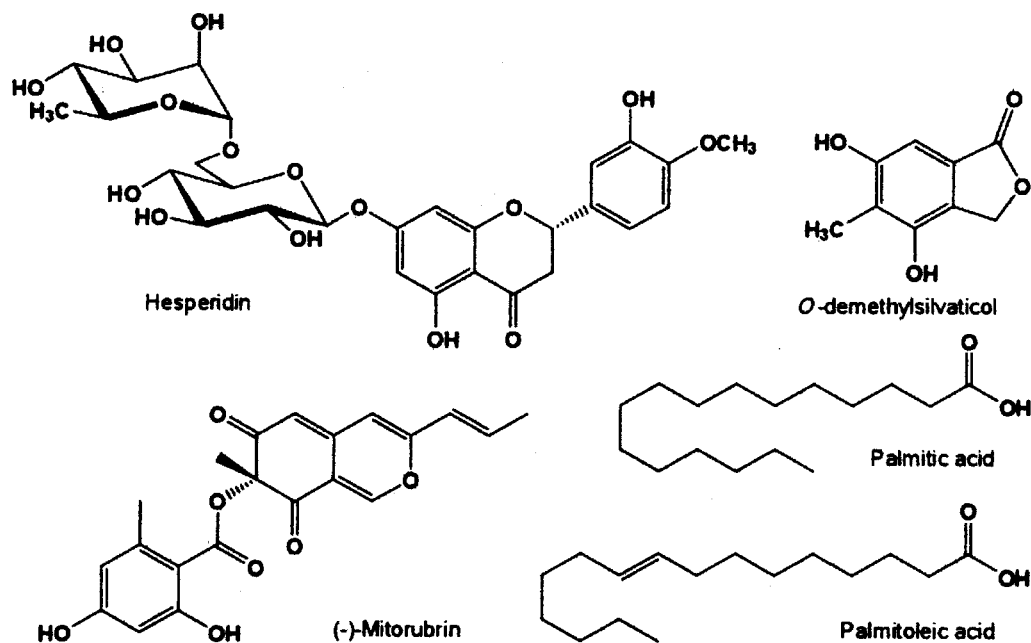


図 1. 単離化合物の構造

これらの研究結果のうち、原著論文一報が学術雑誌に受理された (*Pharmaceutical Biology*, 2012; Early Online: 1-5, 2012 年 5 月 12 日受理, DOI: 10.3109/13880209.2012.694106)。現在、もう一報の原著論文を執筆中である。

よって、審査員一同は、李 大馨が博士(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。