

論文の内容の要旨

論文題目「生活習慣病の進行と関連する修飾アミノ酸の生成を制御する天然物の探索とその培養条件の検討」

学位申請者 富永 悠幹

キーワード：生活習慣病、終末糖化産物、フェノール性化合物、*Drosera tokaiensis*、LED

糖尿病や動脈硬化をはじめとする生活習慣病の発症・進展に伴って生体内ではグルコースを始めとした還元糖とタンパク質のアミノ基が非酵素的に反応するメイラード反応が進行する。本反応後期において終末糖化産物である Advanced glycation end-products (AGEs) が生成すると骨格タンパク質の変性や酵素の活性低下が進行することから、生活習慣病増悪の要因となる可能性が報告されている。したがって、AGEs の生成を抑制することで生活習慣病の発症の予防および進展の遅延が期待される。これまでに AGEs の生成抑制化合物としてアミノグアニジン (AG) が報告されているが、生体で十分な効果が認められないことや重篤な副作用が報告されていることから開発は中止されている。以上のことから本研究では、(1) AG よりも効果が高く、かつ病態の発症前より摂取が可能な食品由来の AGEs 生成抑制化合物の探索を行った。また、抗糖化、抗酸化などの機能性を有する天然物を安定的に供給する方法の一つとして組織培養が挙げられる。これまでの植物の組織培養において、光源として白色蛍光灯が用いられていたのに対し、近年、耐久性や発光時に生じる熱が低温であることに加え、波長の選択制など蛍光灯よりも利点が多い、Light Emitting Diode (LED) へ移行しつつある。植物の培養における LED の効果は、様々な植物で研究がなされており、植物の収量増加や植物が生産する二次代謝産物の生産性向上などの報告がある。しかしながら、植物に対する LED の効果は、植物の種によって異なることから目的の植物に適した光条件を検討する必要がある。したがって、(2) AGEs 生成抑制効果を有する *Drosera tokaiensis* の組織培養時における光照射条件を変えて、活性成分並びに AGEs 生成抑制効果の変動を評価した。

(1) 食品由来 AGEs 生成抑制化合物の探索：AGEs はメイラード反応の後期反応における酸化、脱水縮合によって生成される反応系に加え、グルコースが自己酸化することで生成されるグリオキサールとタンパク質からも生成される。そこで本研究では、酸化反応から生成される AGEs に着目し、抗酸化並びに抗炎症効果が報告されている天然物 14 種からメタノールで粗抽出物を調製し、ribose と gelatin の反応系に添加して 7 日間反応させ、AGEs 構造である N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) 及び N^ω-

(carboxymethyl)arginine (CMA) の生成抑制効果をモノクローナル抗 AGEs 抗体を用いた Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) で評価した。その結果、食虫植物に分類され、ヨーロッパにおいて気管支感染症の治療における伝統的な薬として利用されてきた歴史を有する *Drosera* 属に高い抑制効果が認められた。この *Drosera* 属のうち日本固有の種であり高い抗炎症効果が報告されている *Drosera tokaiensis* (DT) に着目し、Diaion HP-20 による精製を行った後に High Performance Liquid Chromatography (HPLC) で活性成分を単離した。得られた画分を Nuclear Magnetic Resonance (NMR) で構造解析を行った。その結果、CMA および CML の生成抑制化合物として ellagic acid, myricitrine, 3,3'-di-O-methylellagic acid 4'-glucoside, quercimelin が同定された。また、これらフェノール性化合物による抑制効果は、メイラード反応の中間体であるグリオキサール由来の CMA 生成を抑制しなかったことから、グリオキサール由来 AGEs の生成を抑制する AG とは異なり、メイラード反応の後期反応における酸化反応や糖の自己酸化を抑制することによるものだと考えられた。本研究は、*in vitro* による評価であるが、AGEs 生成抑制効果で特に高い活性を示した ellagic acid は、糖尿病ラットにおいて CML 蓄積改善効果等が報告されていることから DT についても生体で同様な効果が期待される。

- (2) 光照射条件による活性成分の変動：培養時に照射する光条件の変化に伴った二次代謝産物の含量及び抗糖化能を検討するために、DT の培養に照射する光源を白色蛍光灯及び赤、緑、青を基調とした LED 光源を用いて単色もしくは複合色 (赤/緑、赤/青、緑/青、赤/緑/青) 条件下で DT の培養を行った。その後、得られた植物体からメタノールで粗抽出物を調整し、DT に含まれる 2 次代謝産物として ellagic acid、myricitrine、quercimelin に焦点を当て HPLC にて定量した。AGEs 生成抑制効果については、モノクローナル抗 CML もしくはモノクローナル抗 CMA 抗体を用いた ELISA 法で評価を行った。その結果、ellagic acid の含量が LED 照射条件下において色調に関係なく増加したのに対して myricitrine、quercimelin は単色光で培養することによってその含量が減少することが明らかとなった。しかしながら、赤/青もしくは赤/緑/青などの光を複合させた一部の条件下では myricitrine および quercimelin の含量減少が蛍光灯培養と同等まで回復することが明らかとなった。植物で生産されるフェノール性化合物は、フェニルアラニンやチロシンから様々な酵素によって生合成されることから LED は、ellagic acid の生合成に関与する DT 組織培養中の酵素を活性化し、myricitrine や quercimelin などのフラボノイドの生合成に関与する酵素を抑制することができると推察された。一方で、AGEs 生成抑制効果の検討では、蛍光灯培養と同等かそれ以上の CMA および CML 生成抑制効果を示した。特に、赤色光で培養することによって CML を効果的に抑制することが明らかとなった。以上のことから、LED は蛍光灯よりも費用対効果が高く、環境にも優しいため、DT 組織培養には蛍光灯の代わりに赤色を基調とした LED を使用することが推奨される。