

外94-4

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

カワラケツメイ (Cassia mimosoides L.
var. nomame Makino)中のリパーゼ活性
阻害物質に関する研究

申請者

志村進

SHIMURA SUSUMU

1994年5月

微生物からヒトに至るすべての生物の生命活動は多様な酵素により触媒され維持されている。このような酵素の解明と同時に、その活性を阻害するような物質の探索も行われ、一部は代謝改変剤として医薬への応用がなされている。また酵素の活性部位や反応機構の解明など、酵素化学的研究においても阻害物質の利用は有用な研究手段となる。また本研究の対象とするリパーゼ活性を阻害するような物質があれば、動物での油脂の消化・吸収を抑制することが可能と考えられ、肥満予防という観点からリパーゼ阻害物質の医薬や食品への応用も期待される。

リパーゼの活性を阻害する天然物質についてはいくつかの報告があるが、その多くは基質である水に不溶性油脂と水との界面の修飾など、間接的な阻害であることが知られている。通常リパーゼの活性は水に不溶性油脂を基質とし、不均一な反応系で測定されるが、前述の阻害はこのようなりパーゼに特徴的な反応系に基づくものであり、酵素への直接的な作用ではない。また、天然物からの阻害物質の探索例が多くないのは、従来の活性測定の方法が複雑で多検体の測定が困難であるためと考えられる。

本論文は蛍光測定による簡易で高感度なりパーゼ活性測定法の開発と、これらの測定法を用いた天然物からの活性阻害物質の探索、阻害成分の解明ならびに動物への投与効果に関する研究成果をまとめたものである。

本論文は全8章から成っている。

第1章ではリパーゼの分類と特性に関する概要とその阻害物質の意義を述べ、これまで報告されている阻害物質の阻害機作が主に基質側に作用するものであるのに対し、本研究が対象とする物質は酵素側に作用することを解説している。またこれまでのリパーゼの活性測定法について述べ、既往の測定法は操作が複雑で時間を要し、基質～水界面の修飾等の影響を受けるなど阻害物質探索への応用の問題点があること、また近年、酵素を有機溶媒に可溶化する方法が開発されており、これを用いれば有機溶媒下で基質ならびに酵素が均質な条件での活性測定が可能となり、阻害物質探索への応用の可能性があることを述べている。

第2章では本研究に於けるリパーゼ活性阻害物質探索のために確立した活性測定法について述べている。*Pseudomonas*由来の単一に精製されたリパーゼBとジドデシルグルコシルグルタメートにより溶媒可溶化リパーゼを調製し、基質に蛍光性の4-メチルウンペリフェロンのオレイン酸エステル(4-MU oleate)を用いて、含水有機溶媒下で基質ならびに酵素を溶解させた簡易なりパーゼ活性測定の方法を検討を行った。その結果、生成物として1~10 pmol min⁻¹の範囲で微量の酵素活性を簡易な操作で測定することを可能とした。さらに9-プロモメチルアクリジンによる脂肪酸の蛍光ラベル化反応とHPLC分析を利用して、トリグリセリドを基質に用いた有機溶媒下の活性測定の方法も確立した。また生理条件により近い簡易な活性測定系として、従来の方法に準じ、上記蛍光性基質とブタ臍リパーゼを用いた水系での簡易な活性測定法も開発した。

第3章では前章にて確立した測定法をもとに、天然物より阻害物質を検索した

結果について述べている。まず探索例が少なく、また種々の薬理効果が知られる生薬の水溶性成分について、4-MU oleateとブタ臍リパーゼを用いた水系の活性測定系で探索を行った。83種の生薬について検討した結果、多くの生薬に阻害活性が認められたが、特に緑茶、裏白(以下生薬名)、黄芩、山扁豆、知母、独活、杜仲、南天実、檳榔子、楊梅皮、良姜等の水抽出物に高い阻害効果が認められた。これらの多くはトリオレインを基質に用いた場合も阻害効果を示し、特に楊梅皮、檳榔子、良姜、山扁豆は高い効果を示した。次に生薬や食品など257種の試料のヘキサンならびにテトラヒドロフラン(THF)抽出物について、4-MU oleateと溶媒可溶化リパーゼを用いた含水有機溶媒下での活性測定により探索を行い、有望なものについてはトリオレインを基質に用いた方法でさらに検討した。その結果、小麦のヘキサン抽出物、あまちゃずる、延命草、山扁豆のTHF抽出物に高い阻害効果を認め、これらは水系でのリパーゼ活性も著しく阻害した。有機溶媒下の活性測定系は水系のように基質と水の界面は存在しないためこれらには酵素に直接作用する阻害物質の存在が示唆された。

第4章では第3章にて阻害物質の探索を行った結果より有機溶媒下ならびに水系の活性測定系で高い阻害効果を示した山扁豆(*Cassia mimosoides* L. var. *nomame* Makino)を選定し、阻害成分の解明を行った。本植物の地上部乾燥品を脱脂処理し、このTHF抽出物を酢酸エチル～水系による液々分配法により分画し、この酢酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーならびにHPLCにより精製、有機溶媒下の活性測定で効果を示す緑色成分を単離した。UV、IRおよびNMRスペクトル等により本物質はクロロフィルよりMgとフィトールが外れたフェオホルピドaと同定した。そこで各種クロロフィル関連化合物のリパーゼ活性阻害効果を検討したところ、多くのポルフィリン化合物に阻害作用を認めた。特に銅クロロフィリンは生理的な条件に近い水系の反応系でも高い阻害効果を示し、阻害機作の解明の一つとして、動力学的解析(基質濃度、酵素濃度の影響)ならびに別種のタンパク質添加の影響等について検討を加えた。これらの結果より、阻害作用は酵素との直接作用であり、阻害にはポルフィリン骨格が関与していること、また、化合物がタンパク質の疎水性部位と相互作用している可能性が示唆された。

第5章ではカワラケツメイ中に存在し、前述の緑色色素成分とは別種の阻害成分について検討した。上記植物のTHF抽出物を酢酸エチル～水系による液々分配法、ならびにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、水系の活性測定系で高い効果を示した画分CT-Iを採取した。CT-Iは単一成分ではないがポリフェノール含量は54%、また縮合型タンニン量は95%であり、縮合型タンニンを主体とする成分であることが認められた。しかしブタノール～塩酸法によるプロアントシアニン含量はほとんど認められず、主体とする成分は新しいタイプのタンニン様物質であることが認められた。CT-Iは有機溶媒下の測定では効果を示さず、水系の測定でのみ効果を示すが、阻害効果に対する基質濃度ならびに酵

素濃度の影響から、その作用は基質～水界面の阻害によるものではなく、酵素側に作用していることが示唆された。水系での阻害効果は高く、また同じポリフェノール類であり、リパーゼ阻害作用が報告されているエピガロカテキンガレートと比較してカゼインなどタンパク質の添加によっても阻害活性が影響を受けにくいこと、また熱安定性も高いことが認められた。

第6章では第5章のカワラケツメイ中のポリフェノール類ならびにタンニン成分の解明を目的として、さらに詳細な成分検索を行った。カワラケツメイの全草を各部位に分け、葉ならびに果実より分離操作を繰り返した。いずれも分離過程で特定画分に効果が集中することは認められなかったが、葉からは効果成分としてフラボノイドの1つであるルテオリンを分離、同定した。また主要な阻害成分と見られ、縮合型タンニンと推察される1画分の分子量は1600（アセチル化物、重量平均分子量）であった。果実からは効果成分としてフラバンとカテキンの2量体である3',4',7-trihydroxyflavan-(4 β →8)-catechinとその異性体である3',4',7-trihydroxyflavan-(4 α →8)-catechinを分離、同定した。後者は比較的高い阻害効果を示した。なおこれらの2量体は文献未記載の新規物質であった。また各種フラボノイドの阻害効果を検討し、ルテオリンの他にケンフェロールやクエルセチン、ミリセチン等のフラボノールに阻害効果が認められ、特にケンフェロールは効果が高かった。またクエルシトリンの糖部分にガロイル基の結合したクエルシトリンガレート、大豆のイソフラボンやリコカルコンAおよびBなどに阻害効果を認めた。これらの結果からフラボノイドによるリパーゼの阻害にはC環の二重結合の存在が必須であると推察された。またカテキンの2量体であるプロシアニジンB-1～B-4では下部ユニットが(+)-カテキン型のものは阻害を示し、立体構造が阻害に関係することが推察された。

第7章ではカワラケツメイの阻害成分の食品や医薬への応用化を図るため、より安全で実際的な抽出、分画方法を検討し、ラットへの投与効果を調べた。カワラケツメイ全草（地上部乾燥品）を40%エタノールで抽出し、粗抽出物をDiaion HP20カラムに供し、30～80%エタノール溶出画分を採取することで、光過敏症の原因物質とされるフェオホルピドの混入のない、阻害画分CT-IIを得た。本阻害画分をラードを58%含む高脂肪食に0.5～3.5%添加し、8週間ないし4週間のラットでの飼育試験を行った。その結果、飼料摂取量が同じにもかかわらず、体重増加の抑制と体脂肪（傍脂）沈着の抑制、肝臓重量の抑制が認められ、高脂肪食摂取による肥満を抑制することが認められた。また血中トリグリセリドの低下が自由摂取ならびに絶食後とも認められ、血中中性脂質の改善効果も認められた。これらの効果はCT-IIのリパーゼ阻害効果に基づくものと考えられ、高脂肪食による肥満の抑制への応用が期待された。

第8章は前章までの著者の研究成果をまとめた。