

学 位 論 文 要 旨

氏名 リオン チェン ニン アブラハム

題目 沖縄産亜熱帯植物から分離したフラボノイド配糖体の化学特性とそれらの生理活性に関する研究
(Studies on the chemical characteristics of flavonoid glycosides isolated from subtropical plants in Okinawa and their biological activities)

フリーラジカルや活性酸素種は食品の変性を引き起こすのみならず、人体にも酸化障害を起こすことが知られている。これらの分子種による生体内での過剰な酸化反応は、高血糖下における活性カルボニルの形成や生体タンパク質の糖化を通して、2型糖尿病の病態形成にも関与していることが指摘されている。植物性天然抗酸化成分であるフラボノイドやポリフェノールは、食品を長期保存する際に起こりうる酸化防止効果を持つだけでなく、生体においても細胞を酸化損傷から保護する効果を示すことが報告されている。沖縄産植物は抗酸化成分を豊富に含んでおり、それが沖縄県民の健康に貢献していると推論している報告もある。そこで本研究ではオオイタビ (*Ficus pumila* L.) とタウム (*Colocasia esculenta* S.) の2種類の沖縄産植物を実験材料として選び、これらの材料から抗酸化成分を分離・同定した。同定化合物については、抗酸化活性と分子構造との相関を調べた。さらに、オオイタビから得られた化合物のひとつ rutin について、本化合物がタンパク質糖化モデル反応系でアミノ基の糖化や活性カルボニル種(RCS)の形成を抑制できるか否かを研究した。概要は以下の通りである。

オオイタビ及びタウムに含まれている抗酸化成分を、DPPH ラジカル補足活性を指標として分離・精製した。すなわち、乾燥したオオイタビ葉とタウムの葉・茎それぞれをエタノール水及びメタノールで抽出した。この抽出液を C18 固相抽出法で分画し、得られた画分を逆相カラムを用いて MPLC、HPLC で精製した。得られた精製化合物を LC/MS と NMR で同定した結果、オオイタビからは apigenin 6-neohesperidosyl、kaempferol 3-robinobioside、kaempferol 3-rutinoside と rutin の4つフラボノイド配糖体を、タウムからは isoorientin、isoschaftoside、isovitexin、luteolin 7-sophoroside、orientin、schaftoside と vitexin の7つのフラボノイド配糖体を得た。

DPPH ラジカル捕捉法、スーパーオキシドラジカル抑制法と β -カロテン退色法を用いて、単離したフラボノイド配糖体、apigenin、isoquercitrin、kaempferol、luteolin、quercetin と quercitrin の抗酸化活性を測定し、分子構造と抗酸化活性の相関を解析した。その結果、フラボノイド配糖体の抗酸化活性は、アグリコンの B 環の 3 と 3' の OH 基の存在、アグリコンに対する配糖体の結合部位、結合の種類、糖の数及び種類などにより強く影響を受けることが分かった。これら化合物の抗酸化活性は、測定法によって強さの順位が異なることより、化合物間で抗酸化メカニズムが異なることが推測された。

2型糖尿病の特徴は血糖値が高くなることにある。試験管テストで、RCS の形成が高糖濃度と高温度の状況下で顕著に増加することを明らかにした。RCS の形成は、金属と空気存在下でさらに促進されることを示した。この RCS はリジンと反応し、容易に中間 AGEs (終末糖化産物) を生成することが分かった。AGEs は糖尿病の合併症を引き起こす要因の1つであるが、rutin は高糖濃度下において RCS の形成及びリジンの糖化を抑制すること分かった。本研究で用いたオオイタビやタウムには rutin をはじめとするフラボノイド配糖体が豊富に含まれており、これら化合物の作用を通して、これらの植物が健康増進あるいは糖尿病を改善するための食品として利用できる可能性を示唆している。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 LEONG CHENG NING ABRAHAM

題 目 Studies on the chemical characteristics of flavonoid glycosides isolated from subtropical plants in Okinawa and their biological activities
(沖縄産亜熱帯植物から分離したフラボノイド配糖体の化学特性とそれらの生理活性に関する研究)

Free radicals and reactive oxygen species do not only cause denaturation in foods but also cause oxidative damage to the human body. The development of diabetic complications was shown to be related with the excessive oxidation by these molecular species and hyperglycemia, which produced reactive carbonyl species (RCS) and glycation of protein. Natural antioxidants from plants such as flavonoids and polyphenols were found to reduce oxidative damage to food during storage and protecting the human body cells from oxidative damage. Okinawa plants are reported to contain richly in antioxidants, which might be contributed to the development of good health to the Okinawa people. Two Okinawa plants, Ooitabi (*Ficus pumila* L.) and Taumu (*Colocasia esculenta* S.) were selected in this research. The antioxidant components in these plants were investigated and their structural-activity relationship were further evaluated. One of the isolated antioxidant compounds from Ooitabi, rutin, was also investigated for its potential in inhibiting the formation of RCS from glucose autoxidation and glycation of an amine under high glucose concentration.

The separation of antioxidants from Ooitabi and Taumu were based on their DPPH radical scavenging activities. Ooitabi and Taumu were extracted with aqueous ethanol and methanol, respectively. The extracts of these plants were fractionated using C18 solid phase extraction followed by a series of separation using reversed phase MPLC and HPLC. All isolated compounds were identified with LC/MS and NMR spectroscopies. Four flavonoid glycosides had been isolated and identified from Ooitabi, which were apigenin 6-neohesperidosyl, kaempferol 3-robinobioside, kaempferol 3-rutinoside and rutin. As for Taumu, seven flavonoid glycosides were also isolated and identified as isoorientin, isoschaftoside, isovitexin, luteolin 7-sophoroside, orientin, schaftoside and vitexin.

The structural-activity relationship of these flavonoid glycosides were evaluated with comparison to apigenin, isoquercitrin, kaempferol, luteolin, quercetin and quercitrin using DPPH radical scavenging, superoxide radical inhibitory and β -carotene bleaching assays. It was found that not only the presence of hydroxyl groups in position 3 and 3' of the aglycone had an effect on the antioxidant activities but also the glycosylation characteristics such as the glycosidic bonding position, bonding type, the number of glycosides and the type of glycosides. Analysis on the ranking of the antioxidant activities of these compounds in these three assays showed that they have different mechanisms of actions.

Hyperglycemic is an important characteristic of diabetes mellitus. The formation of RCS was found to increase under high sugar concentration and high temperature. The presence of air and metal ions such as Cu^{2+} and Fe^{2+} were found to promote its formation. RCS was found to react readily with lysine to form intermediate advanced glycation end products (AGEs), one of the contributing factors of diabetic complications. Rutin as one of the strong flavonoid antioxidant was shown to inhibit the formation of RCS as well as the glycation of lysine under high glucose concentration. The results of this study suggested that the flavonoid glycosides in Ooitabi and Taumu as antioxidants have potential in inhibiting the formation of intermediate AGEs. Hence, these Okinawa plants can be used as a part of dietary management for diabetes patients and health promotion.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	リヨン チェン ニン アブラハム
審査委員	主査 琉球大学 教授 田幸 正邦
	副査 琉球大学 准教授 玉城 一
	副査 鹿児島大学 准教授 花城 勲
	副査 琉球大学 教授 多和田真吉
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	
題 目	Studies on the chemical characteristics of flavonoid glycosides isolated from subtropical plants in Okinawa and their biological activities (沖縄産亜熱帯植物から分離したフラボノイド配糖体の化学特性とそれらの生理活性に関する研究)
<p>沖縄県は我が国で唯一亜熱帯に位置し、多様な生物資源が自生している。県民は古くから、これら生物資源を有効に利用して食文化を創造し、長寿県を確立したと考えられている。特に、近年、多くの亜熱帯生物資源に高い抗酸化活性を有する化合物が分離・同定され、これらが健康・長寿に大きく貢献する可能性が示唆されるようになった。</p> <p>活性酸素は食品の変性を引き起こすのみならず、人体で酸素呼吸に伴い自然発生するほか、生体内外のさまざまなストレス、化学物質等の摂取によっても発生する。生活習慣病と言われる糖尿病、高血圧および癌に活性酸素が関わっている事が明らかになりつつある。従って、活性酸素を消去する抗酸化物質の適度な摂取は疾病を予防するものとして注目を集めている。フラボノイドやポリフェノール類は、食品を長期保存する際に起こる酸化を防止する成分であるだけでなく、生体でも細胞内の活性酸素を消去して酸化損傷から保護する効果を持つことが考えられている。沖縄産亜熱帯植物は抗酸化成分を豊富に含んでおり、それらが沖縄県民の健康生活の向上に大きく貢献している事が考えられるようになった。</p> <p>本研究で使用したオウイタビ (<i>Ficus pumila</i> L.) は古くから糖尿および高血圧を抑制する植物として使用されているものである。また、田芋 (<i>Colocasia esculenta</i> S) は古くから食素材</p>	

として県民の食卓を潤しているものである。本研究では、これら2種類の植物の葉または茎から抗酸化物質を分離・同定して分子構造と抗酸化活性の相関について調べている。また、オウイタビから分離したrutinがタンパク質糖化モデル反応系で、アミノ基の糖化や活性カルボニルの形成を抑制する事を調べている。概要は以下の通りである。

乾燥オウイタビ葉および田芋葉または茎から50%エタノールおよびメタノールで抽出した画分からDPPHラジカル補足活性を指標にC18固相抽出法で分画し、得られた画分を、逆相カラムを用いてMPLCおよびHPLCで精製した。得られた精製物からLC/MSとNMRでオウイタビからapigenin、6-neohesperidosyl、kaempferol 3-robinobioside、kaempferol 3-rutinosideおよびrutinを、また、田芋からisoorientin、isoschaftoside、isovitexin、luteolin 7-sophoroside、orientin、schaftosideおよびvitexin等のフラボノイド配糖体を同定した。

DPPHラジカル捕捉法、スーパーオキシドラジカル法および β -カロテン退色法を用いて単離したフラボノイド配糖体、apigenin、isoquercitrin、kaempferol、luteolin、quercetinおよびquercitrinの抗酸化活性を測定し、分子構造と活性との相関を解析した。その結果、フラボノイド配糖体の抗酸化活性は、アグリコンのB環の3と3'のOH基の存在、アグリコンと糖の結合部位、結合糖の種類および数等によって影響されることが分かった。これら化合物の抗酸化活性は、測定法によって強さの順位が異なることから化合物間で抗酸化機構が異なる事が推察された。

2型糖尿病の特徴は血糖値が高くなることにある。試験管テストで、RCSの形成が高糖濃度と高温条件下で顕著に増加する事を明らかにした。RCSの形成は、金属と空気の存在下でさらに促進されることが分かった。このRCSはリジンと反応し、容易に中間AGEs（終末糖化産物）を生成することが分かった。AGEsは糖尿病の合併症を引き起こす要因の1つであるが、rutinは高糖濃度下においてRCSの形成およびリジンの糖化を抑制する事が分かった。本研究で用いたオウイタビと田芋にはrutinをはじめとするフラボノイド配糖体が多量含まれている。これらの植物が食品として利用できる可能性が示唆された。

以上のように、本研究はオウイタビ葉および田芋の葉又は茎から多くのフラボノイド配糖体を分離・同定し、その中のrutinがRCSの形成およびリジンの糖化を抑制する事を明らかにしたもので、食品として利用出来る事を示唆するものである。従って、本論文は学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	リヨン チェン ニン アブラハム
審査委員	主査 琉球 大学 教 授 田幸 正邦
	副査 琉球 大学 准教授 玉城 一
	副査 鹿児島大学 准教授 花城 勲
	副査 琉球 大学 教 授 多和田真吉
	副査 鹿児島大学 教 授 八木 史郎
審査協力者	
実施年月日	平成22年 1月25日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査および副査4名は、平成22年1月25日(月)の公開審査会において、学位申請者に対して学位論文について説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要なかつ十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	リヨン チェン ニン アブラハム
<p>[質問1] グルコースからのグリオキサールの生成について、種々温度を変えて反応させてタイムコースをとった実験で、最も穏やかな条件の37℃でもグリオキサールの生成反応が進行し、すぐにプラトーに達しているように見えるけど、他の温度条件下でも反応はプラトーになるのか。反応がプラトーになるといのはどう解釈するのか。生理的条件下ではどの程度グリオキサールが生ずると推定されるか。</p> <p>[回答1] グラフを拡大すると実際にはプラトーではなく、まだ僅かに生成量が増加し続けている。文献データによると、AGEs の形成は37℃では、プラトーに達するまで1ヵ月以上かかることが報告されている。AGEs やその中間体のグリオキサールは、非酵素的反応によって生成すると考えられている。本研究においてもこれらの反応が非酵素的に進むと仮定して実験を行っている。そこで本実験では、生理条件よりも高い温度で反応させグリオキサールの生成量を調べた。高温下では反応が加速されたものと推定している。</p> <p>[質問2] 80℃での反応は、単に 37℃でおこるような反応が加速されたと解釈するよりも、全く違う反応が生じていると考えた方がいいのではないか。</p> <p>[回答2] 指摘いただいた通りだと思う。生理条件下でどの程度出来るか調べるための実験系を検討する必要がある。</p> <p>[質問3] 食品として摂取したポリフェノール類が、体内でのAGEsやその中間体の生成を抑制すると仮定して実験を行っている。そう考えると、それ相応の量のポリフェノールが体内に吸収される必要がある。実際にはポリフェノールは僅かしか生体に吸収されない。これらAGEs 関連の化合物の体内存在量はどのくらいなのか。</p> <p>[回答3] 果物中のポリフェノールの体内吸収についてはいくつかの研究例がある。AGEs 関連化合物の体内での濃度については、その定量法が確立しておらず、把握されていない。</p> <p>[質問4] フラボノイドは吸収されたとしても低いレベルであり、すぐに代謝される。本実験では、ルチンを 0.1mM とか 0.2mM のレベルで用いている。モデル的には、この濃度では確かに AGEs 関連化合物の生成を抑制しているが、生理条件にちかい濃度での実験も行う必要があるのではないか。</p> <p>[回答4] ご指摘いただいた通りだと思う。この研究では、まず抑制のモデル系を構築することを目的とした。</p> <p>[質問5] この研究では、オオイタビや田芋が、糖尿病やその合併症を抑制する食品機能があるのではないかと推測している。これらの植物はα-グルコシダーゼ抑制活性を示すとの文献報告もあるのではないか。もしあるならば、論文にもまずそのことを記述し、加えてグリオキサール等の AGEs 関連化合物の生成も抑制するというのを記述すべきではないか。</p>	

[回答5] 論文にそのことを加えたい。

[質問6] グルコースが大量に存在し、そこにアミノ酸があるとこれらはお互いに反応し、シッフ塩基を形成し、さらに多くの反応を経て AGEs が形成される。そこにアミンを加えればアミノ酸の糖化を競争的に抑制できるのではないか。事実医薬として市販されている抗糖化剤のほとんどはこれらのアミン類が使われている。

[回答6] ご指摘の通り現在のところ糖化抑制剤としてアミノグアニジンが最も多く使われている。

[質問7] この研究では、アミン類ではなく、ルチンやケルセチンなどの抗酸化活性を持つ化合物を、糖化を抑えるために用いている。グルコースのオートオキシデーションにともなって活性酸素が発生するが、この活性酸素が複雑な反応をおこしてタンパク質の糖化を促進する。ここで用いているフラボノイド類はこれらの活性酸素を消去し、結果として糖化を抑制すると考えていいのか。

[回答7] ご指摘の通り。

[質問8] 脳は人間にとって最も大切な臓器であり、脳の糖化を防ぐのはとても重要なことである。ケルセチンは血液脳関門を通り抜けて脳に作用すると思うが、ルチンのような配糖体の形では脳に作用することができないのではないか。

[回答8] 文献によるとルチンは消化管で代謝を受け、糖の部分が分解されてケルセチンとして吸収されることが報告されている。脳への作用を確認するには *in vivo* での研究が必要と考える。

[質問9] 植物には普通メキシフラボノイドが含まれている。この研究で使った植物中にはメキシフラボノイドは含まれていたか。

[回答9] ここでは、メキシフラボノイドは確認できなかった。

[質問10] オオイタビからは、4種類の配糖体を単離しているが、これ以外の糖を持った配糖体は存在するのか。

[回答10] ここで述べた方法で単離された配糖体はこの4種類だけであった。

[質問11] この研究の中では、AGEs は生体内で非酵素的に生成されると仮定して実験しているが、生体内糖化に酵素が関わっているとの報告はあるか。あるいは糖化タンパクから糖の部分を加水分解するのに関与する酵素があることをしめした報告はあるか。

[回答11] これらの反応に酵素が関わっているかについてはよくわからない。ほとんどの研究において、AGEs は非酵素的に生成すると考えられている。

[質問12] AGEs 中間体のモデル反応としてリジンとグリオキサールを反応させて TLC プレートにスポットし、蛍光スポットを観察しているが、TLC を展開したら何種類のスポットを与えるのか。

[回答12] TLC プレートをいろんな極性の溶媒を使って展開しても蛍光スポットは原点に留まったまま移動しなかった。展開すると蛍光スポット以外に黄色のスポットが現れた。