



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海産生物に含まれる有用生化学資源に関する研究：特に海藻の α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質について
Author(s)	栗原, 秀幸
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	乙第4879号
Issue Date	1995-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3108233
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51297
Type	doctoral thesis
File Information	000000292973.pdf



主 論 文

海産生物に含まれる有用生化学資源に関する研究
—特に海藻の α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質について—

栗 原 秀 幸

平成 7 年

①

北海道大学大学院水産学研究科博士論文

主論文

海産生物に含まれる有用生化学資源に関する研究
—特に海藻の α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質について—

栗原 秀幸

平成 7 年

目次

ページ

謝 辞

第1章 緒 言

1

第2章 海産生物成分の酵素阻害性及び抗菌性物質の検索

20

第1節 供試生物と有機溶媒抽出

20

第2節 グルコシダーゼ阻害性

27

2-1 グルコシダーゼ阻害性試験寒天平板法の確立

27

2-2 結果と考察

32

第3節 チロシナーゼ阻害性試験

37

3-1 チロシナーゼ阻害性試験寒天平板法

37

3-2 結果と考察

37

第4節 抗菌性試験

40

4-1 供試菌

40

4-2 抗菌性試験方法

43

4-3 結果と考察

44

第3章 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害性物質の特性

46

第1節 分析機器およびクロマトグラフィー

46

1-1 使用分析機器

46

1-2 クロマトグラフィー

47

第2節 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質の単離

48

第3節 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aおよび

56

Bの構造決定

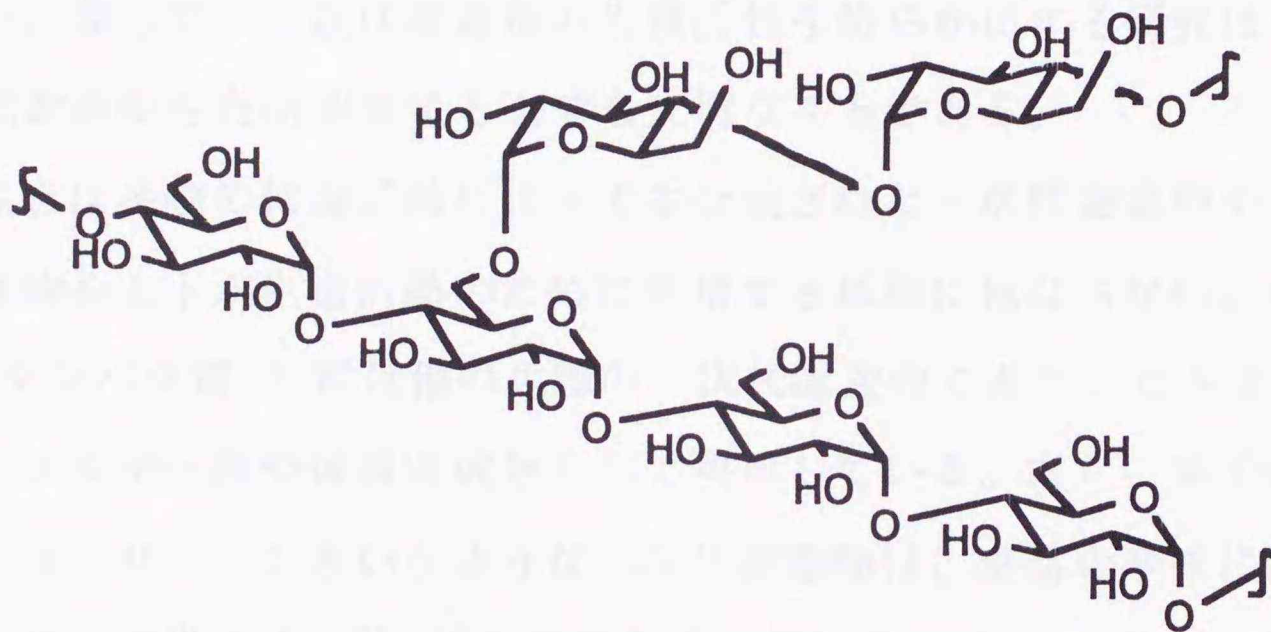
3-1	ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの構造決定	56
3-2	ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの構造決定	85
3-3	α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質SQDGおよび SQMGに関する考察	112
第4章	海藻糖脂質の α -グルコシダーゼ阻害の速度論 的解析	113
第1節	糖脂質スルホキノボシルジアシルグリセリドお よびスルホキノボシルモノアシルグリセリドの α -グルコシダーゼ阻害性	113
1-1	実験方法	113
1-2	ヒジキSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性	114
1-3	市販SQDG標品の α -グルコシダーゼ阻害性	117
1-4	ヒジキSQMGの α -グルコシダーゼ阻害性	120
第2節	SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対する DGDGの抑制効果	123
2-1	フジマツモ糖脂質の特性	123
2-2	フジマツモSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性	126
2-3	SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対する 糖脂質DGDGの抑制効果について	129
2-4	SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対する DGDGの影響に関する考察	140
第5章	総合考察	144
	要約	149

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究する場を与えていただき、有益な御指導、叱咤激励を賜った北海道大学水産学部教授 羽田野 六男先生に深謝致します。拙文を御査読していただき有益な御助言を賜りました北海道大学水産学部教授 西田 清義先生および同助教授 高橋 是太郎先生に感謝致します。本研究全般にあたり研究・議論に協力頂いた北海道大学農学部助教授 川端 潤先生、実験試料を御供与していた抱いた北海道大学水産学部練習船おしよろ丸船長 安間 元教授および乗組員の皆様、海洋科学技術センター 橋本 惇博士、実験用微生物をご供与頂いた北海道大学水産学部教授 絵面 良男先生、同助教授 吉水 守先生、同講師 川合 祐史先生に深謝致します。終始、研究に関する討論や仕事にご助力を賜り、同水産学部助手 細川 雅史先生に感謝致します。本研究は北海道大学水産学部水産食品学科食品化学第1講座および海洋生物資源化学科食品生化学講座で行われたものであり、共同で研究を遂行してくれた服部 真理子氏、秋山 大氏、安藤 淳一氏、佐々木 政昌氏、鈴木 貴之氏、斎木 智子氏、多田 純彦氏に深謝します。他に、新井 信太郎氏、渡川 初代氏、大西 優摩氏、谷端 信孝氏、中野 裕氏、原田 靖子氏他講座の学生諸氏に感謝致します。また、事務的補助をして頂いた講座事務補助員田村 典子さん、佐々木 美帆さんに深く感謝致します。最後に、本研究は家族の励ましがなければ、遂行は出来ませんでした。本研究を妻 八代重と母 とき江に捧げたいと思います。

第1章 緒言

生物は生存のためにさまざまな代謝活動を行い、代謝産物をその生物自身のために利用する。また、その産物は摂食や寄生という形で自己以外の生物にも利用される。¹⁾ たとえば、植物はデンプン(1)を自身のエネルギー源として利用・蓄積しており、一方では、植食動物のエネルギー源にもなっている。このように、「生命活動の原動力は代謝



1

産物にある。」といっても過言ではない。

代謝産物は一次代謝産物と二次代謝産物と呼ばれる二つのグループに分けられる。¹⁾ 一次代謝産物は生命活動に必須であり、生体内に多量に含まれる。たとえば、糖質・炭水化物、 α -アミノ酸・タンパク質、脂質、核酸などがあげられ、主としてエネルギー源、生体構成成分、生命活動の機能、情報を司る物質として生命活動を支えている。これらのうち、糖質・炭水化物を例にとると、エネルギー源として前述のデンプンやグリコーゲンがあり、生体構成成分としてセルロースやキトサンがある。そして情報を司る物質として血液型決定糖脂質糖鎖等が代表的である。^{2,3)}

二次代謝産物とは一次代謝産物やその生合成中間体から生合成されるその他の化合物の総称である。¹⁾ 以前は、これらの二次代謝産物を生きていく上では必要のないものとされていたが、天然物化学、有機化学、生物化学、生理学の進展にともない、二次代謝産物の多くは生物の生理機能制御を司ることが解明されてきた。たとえば、ホルモン、他の生物から自分を守る防御物質、さらには、他の生物に有益なカイロモンと総称される代謝産物がそれに該当する。^{1,4,5)} 食品の香辛料や生薬などの二次代謝産物はヒトに対しても重要な働きを行う化合物が多い。従って、二次代謝産物の生理活性を明らかにする研究はそれらの代謝産物を有効利用する上でも大切なことである。

食品とは生物の代謝活動によって生合成された一次代謝産物や二次代謝産物をヒトが生命活動のために利用する形態に他ならない。炭水化物・タンパク質・脂質は他の生物の一次代謝産物であり、ヒトはそれらをエネルギー源や体構成成分として利用している。また、辛子油配糖体やカプサイシンというような二次代謝産物は、食品の辛味に関与し、食欲を増進する。²⁾ 近年重要な生理機能を示す一次代謝成分が多数見つけられている。タンパク質の消化物に血圧上昇抑制効果を示すペプチド⁶⁾やカルシウム吸収に関与するカゼインホスホペプチド⁶⁾などが発見され、重要な生理機能を担うペプチド部分をタンパク質がもつことが明かとなった。さらに、炭水化物では食物繊維やオリゴ糖が大腸内での腸内発酵を介して生理機能を有し、^{7,8)} 脂質ではドコサヘキサエン酸やイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸がさまざまな生理機能を示している。⁹⁾ このように従来いわれてきたエネルギーや生体構成成分としての一次代謝産物と、生理作用などを司る二次代謝産物とに分けることは、機能性の面からはあまり意味がなくなっている。

食品がヒトに及ぼす機能、すなわち、食品機能は一次から三次機能

にわけられる。⁶⁾ 一次機能とは基本的な食品の栄養機能であり、二次機能は食品の嗜好性に関与する機能であり、三次機能は生体調節機能である。食品に三次機能をもたらす代謝産物を探索することはその機能を理解する上で重要である。そこで本研究では、ヒトにとって有益な他生物の代謝産物を単離し、特性を調べることを目的にした。

ヒトが他生物の代謝産物を利用する場合や自ら必要な代謝産物を合成・変換する場合には酵素が触媒として関与する。本研究では、まず、 α -グルコシダーゼ・ β -グルコシダーゼ・チロシナーゼの3種類の酵素に対する阻害物質を検討した。

α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) はアルコールやフェノールの α -グルコシド配糖体(2)の α -グリコシド結合を加水分解する¹⁰⁾ (Fig. 1-1A)。 α -グルコシダーゼには、グルコースが2分子縮合したマルトース(6)に働くマルターゼ¹¹⁾ (Fig. 1-1B) およびスクロース(7)に働くスクラーゼ¹¹⁾などが含まれる (Fig. 1-1C)。

α -グルコシダーゼはヒト体内で重要な働きを行っており、¹²⁾ 栄養学的には炭水化物消化の最終段階に関与している (Fig. 1-2)。摂取したデンプンは唾液や膵臓アミラーゼの働きにより二糖類マルトースまで分解され小腸に送られる。また、スクロースはそのまま小腸まで達する。そして、それらは小腸腸子縁膜に存在する α -グルコシダーゼにより加水分解され、グルコースなどの単糖類に変換される。¹³⁾ グルコースは吸収され血糖となり、食後高血糖状態を引き起こす。健康なヒトではインスリンの働きにより、正常な血糖値に戻るが、糖尿病患者では食後高血糖状態が長時間続く。¹⁴⁾ 糖尿病患者では食後高血糖を引き起こさせないために、厳密な食事制限で血糖値上昇を抑えるか、インスリン分泌を促すスルホニルウレア剤・インスリン剤が用いられている。¹⁵⁾ しかし、食事制限では毎食のエネルギー計算が必要で忠実

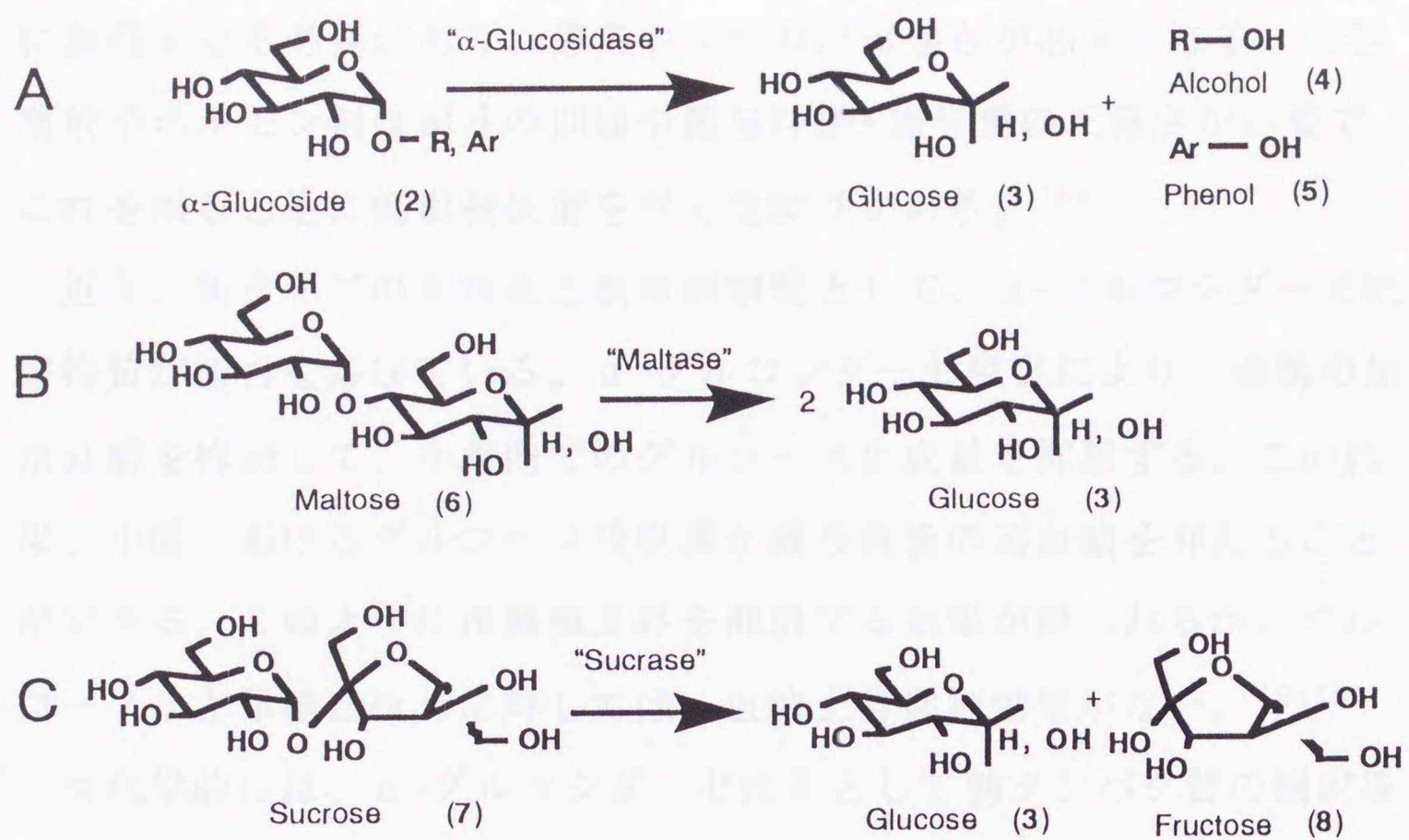


Fig.1-1. α -Glucosidase reactions.

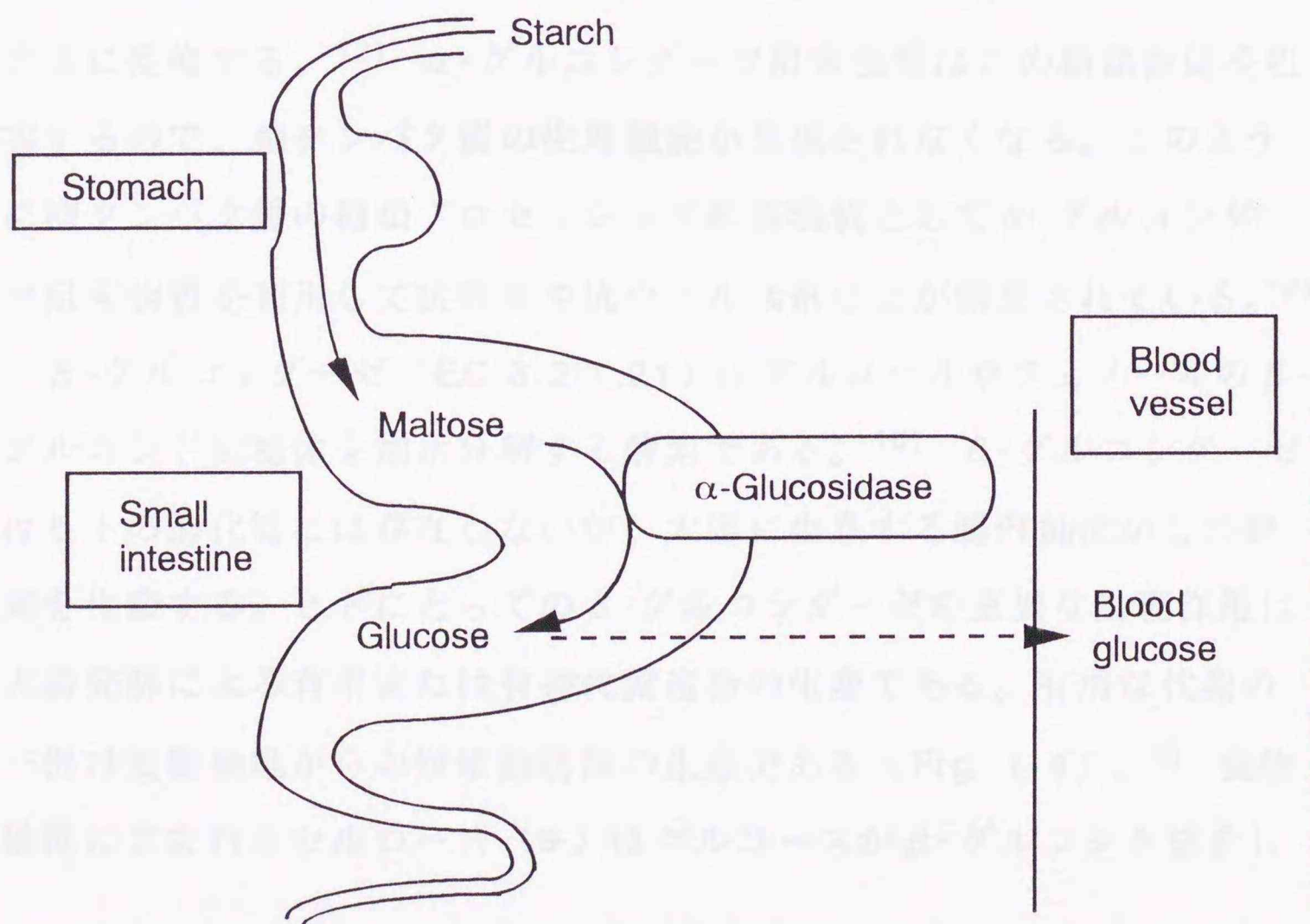


Fig. 1-2 Carbohydrate digestion in the digestive system.

に制限を守る必要があり、患者や家族の忍耐強さが必要になる。化学薬剤やホルモン剤は耐性の問題や施与時期・施与量の正確さが必要で、これを誤ると逆に低血糖状態を招く危険性がある。¹⁵⁾

近年、新タイプの食後高血糖抑制物質として、 α -グルコシダーゼ阻害物質が注目を浴びている。 α -グルコシダーゼ阻害により二糖類の加水分解を抑制して、小腸内でのグルコース生成量を抑制する。この結果、小腸におけるグルコース吸収量が減り食後の高血糖を抑えることができる。このように血糖値上昇を抑制する効果が得られるが、グルコースなど単糖類投与に対しては、血糖上昇抑制効果がない。¹⁶⁻¹⁸⁾

生化学的には、 α -グルコシダーゼは主として糖タンパク質の翻訳後糖鎖プロセッシングに関与している (Fig. 1-3)。¹²⁾ タンパク質が翻訳され糖鎖が付いたあとに、粗面小胞体において α -グルコシダーゼにより糖鎖のグルコース残基が加水分解される。さらに各種グリコシダーゼの働きにより糖鎖は修飾を受け、生理機能を発現する糖タンパク質に変換する。¹²⁾ α -グルコシダーゼ阻害物質はこの糖鎖修飾を阻害するので、糖タンパク質の生理機能が発現されなくなる。このように糖タンパク質の糖鎖プロセッシング阻害物質として α -グルコシダーゼ阻害物質を利用して抗癌剤や抗ウイルス剤などが開発されている。¹²⁾

β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) はアルコールやフェノールの β -グルコシド配糖体を加水分解する酵素である。¹⁰⁾ β -グルコシダーゼはヒトの消化管には存在しないが、大腸に生息する腸内細菌がこの酵素を生産する。ヒトにとっての β -グルコシダーゼの重要な生理作用は大腸発酵による有用または有害代謝産物の生産である。有用な代謝の一例は食物繊維からの短鎖脂肪酸の生産である (Fig. 1-4)。⁸⁾ 食物繊維に含まれるセルロース (9) はグルコースが β -グルコシド結合し

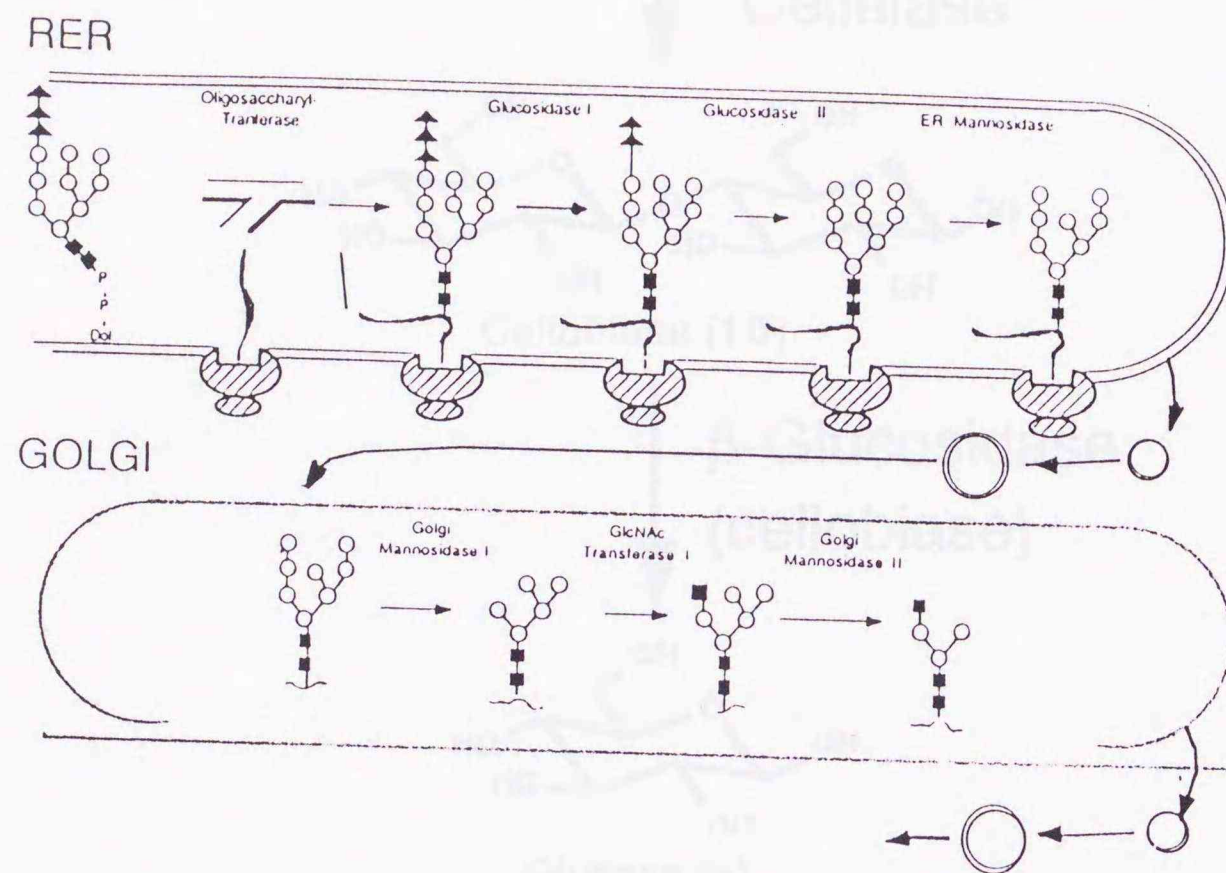


Fig. 1-3 Process of glycoprotein processing.¹²⁾

RER, rough endoplasmic reticulum; GOLGI, Golgi body.

Symbols: triangle, glucose; circle, mannose; square, N-acetylglucosamine.

たポリマーなので、ヒト自身が持つ小腸までの消化酵素では加水分解されない。しかし、大腸の腸内細菌のセルラーゼにより二糖類のセロビオース（10）まで加水分解され、さらに、 β -グルコシダーゼの一種セロビアーゼによりグルコース（3）まで加水分解される。生成したグルコースは発酵基質となり、短鎖脂肪酸などが生成し、大腸機能を改善する。¹⁹⁾ 一方、不利益な面として、外来毒性物質の配糖体を加水

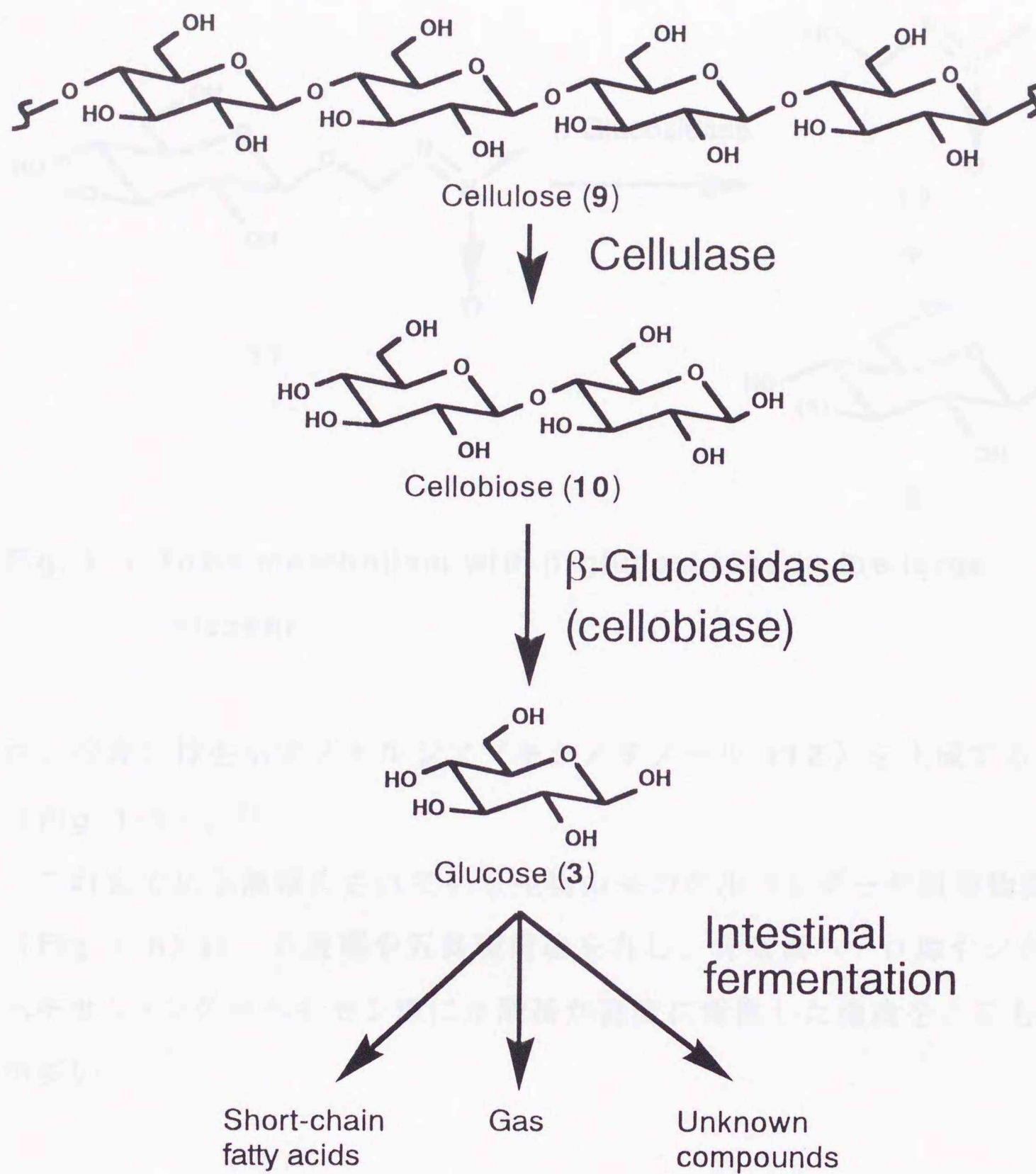


Fig. 1-4. β -Glucosidase reaction in the intestine.

分解して、毒性の発現に関与することが知られている。²⁾ 例えば、ソ
テツに含まれるサイカシン (11) は毒物配糖体で配糖体のまま大腸ま
で到達する。サイカシンは腸内細菌の β -グルコシダーゼで加水分解さ

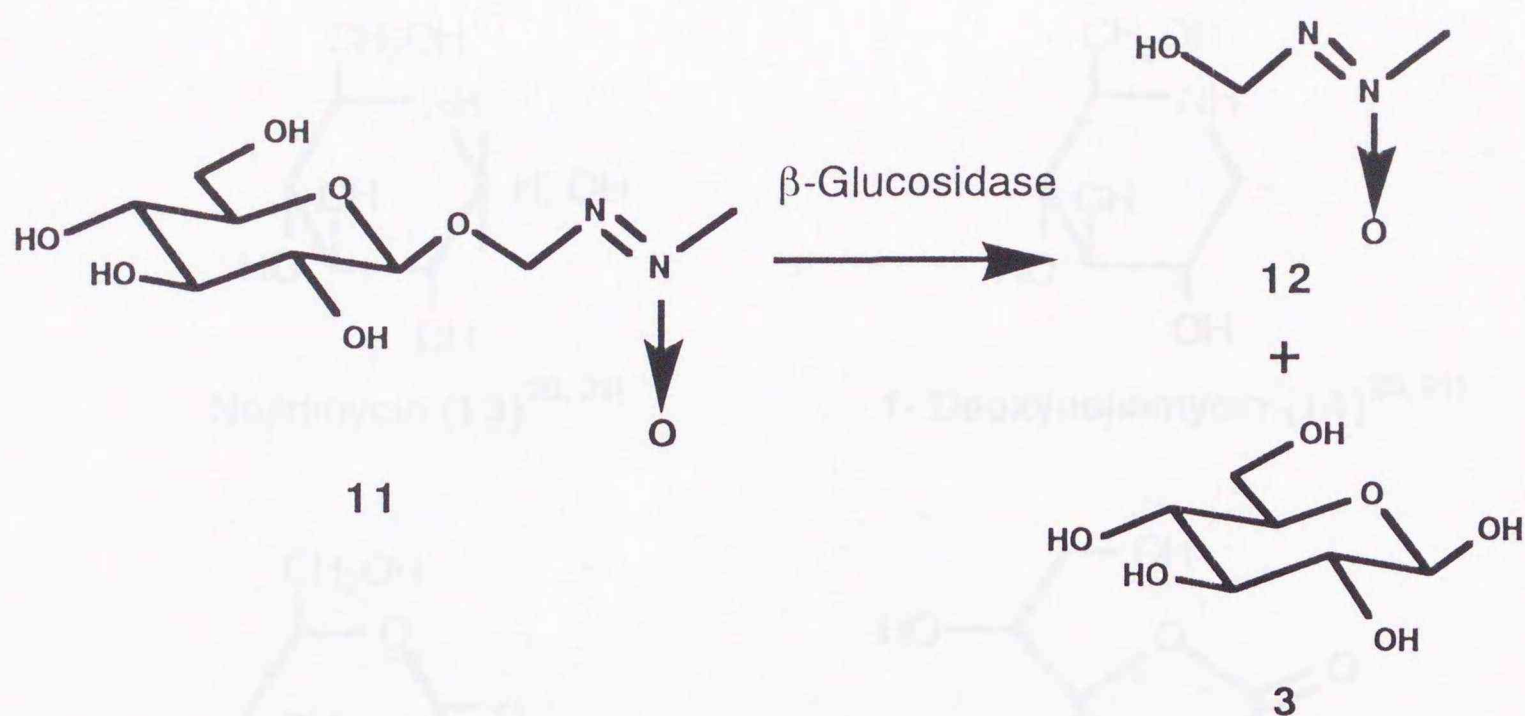
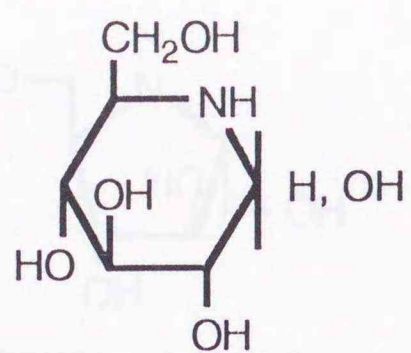


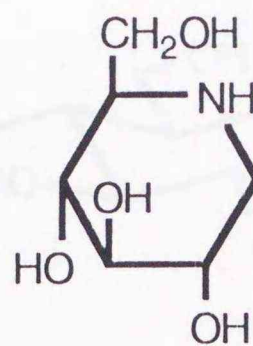
Fig. 1-5. Toxic metabolism with β -glucosidase in the large intestine.

れ、発ガン性を示すメチルジアゾキシメタノール (12) を生成する (Fig. 1-5)。²⁾

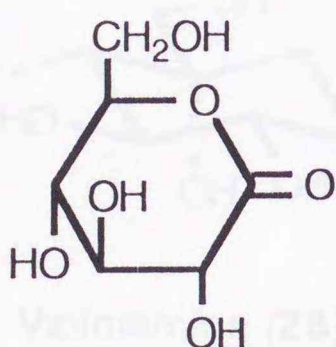
これまでに単離報告されている生物由来のグルコシダーゼ阻害物質 (Fig. 1-6) は、六員環や五員環構造を有し、含窒素ヘテロ環やシクロヘキサン・シクロヘキセン環に水酸基が高度に置換した構造をとるものが多い。



Nojirimycin (**13**)^{20, 21)}



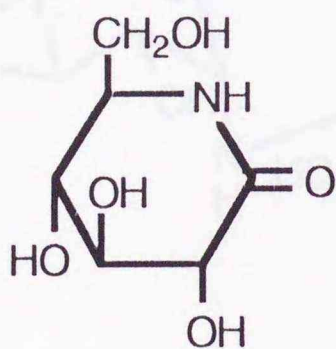
1- Deoxynojirimycin (**14**)^{20, 21)}



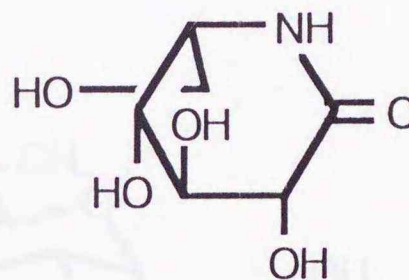
D- Gluconic-δ- lactone (**15**)^{20, 22)}



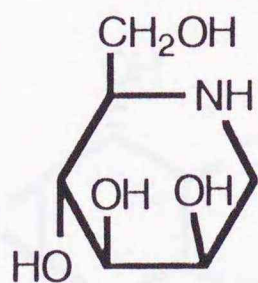
D- Gluconic-γ- lactone (**16**)²²⁾



D- Gluconic-δ- lactam (**17**)²⁰⁾



L- Idonic-δ- lactam (**18**)²⁰⁾

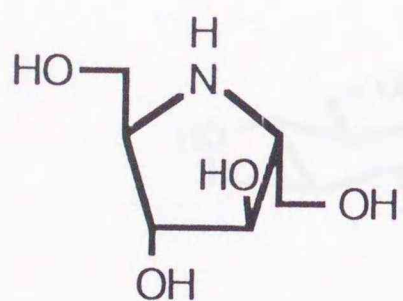


1- Deoxymannojirimycin (**19**)²³⁾

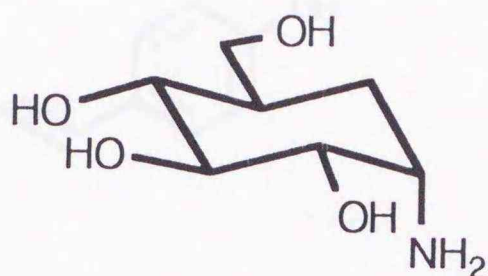


α-Homonojirimycin (**20**)²³⁾

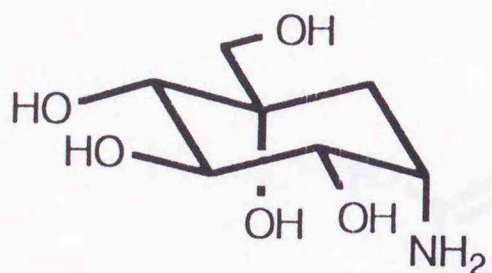
Fig. 1-6. Known glucosidase inhibitors.



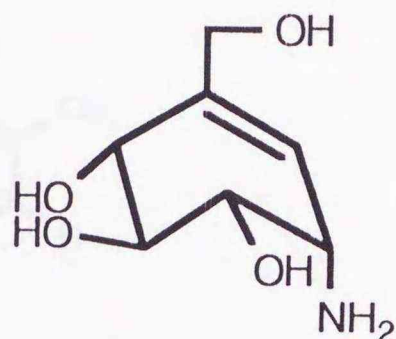
2*R*, 5*R*-Dihydroxymethyl-
3*R*, 4*R*-dihydropyrrolidine (21)²³⁾



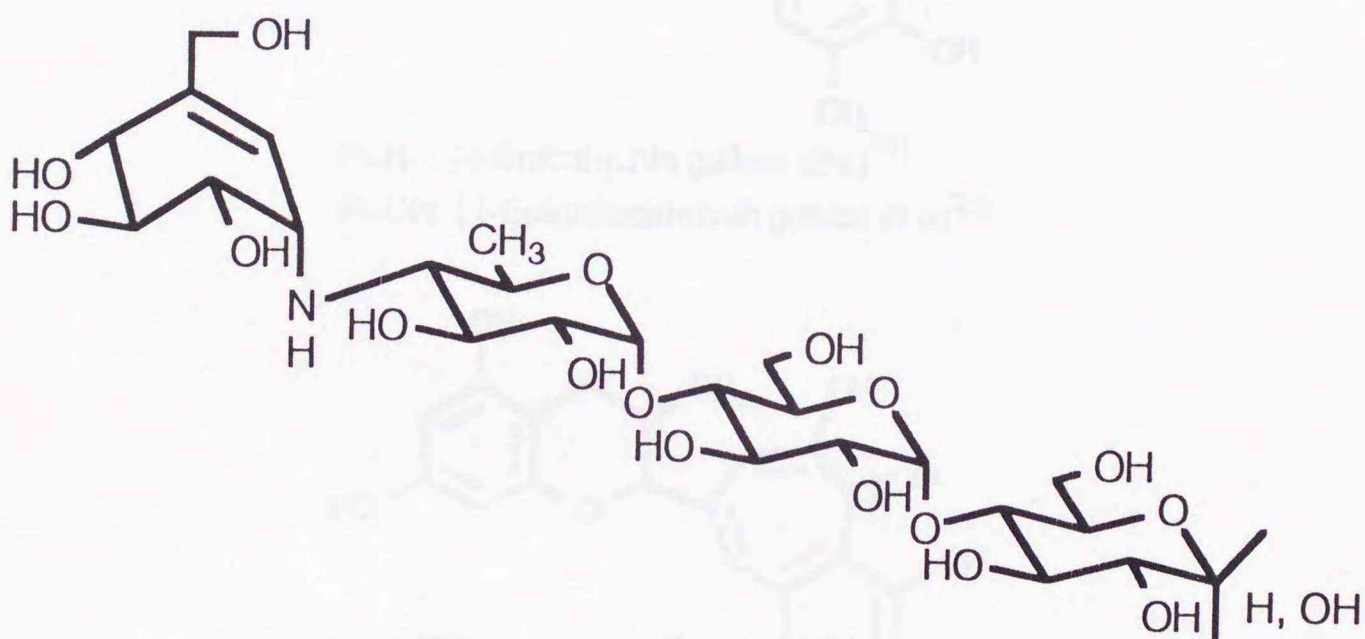
Validamine (22)²⁴⁾



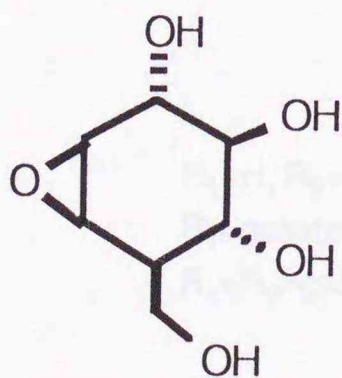
Valiolamine (23)²⁵⁾



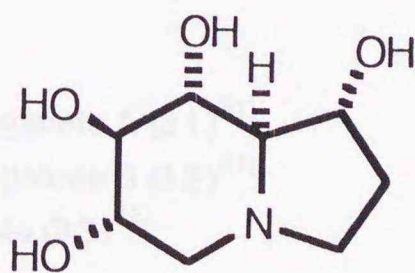
Valienamine (24)²⁶⁾



Acarbose (25)²⁷⁾

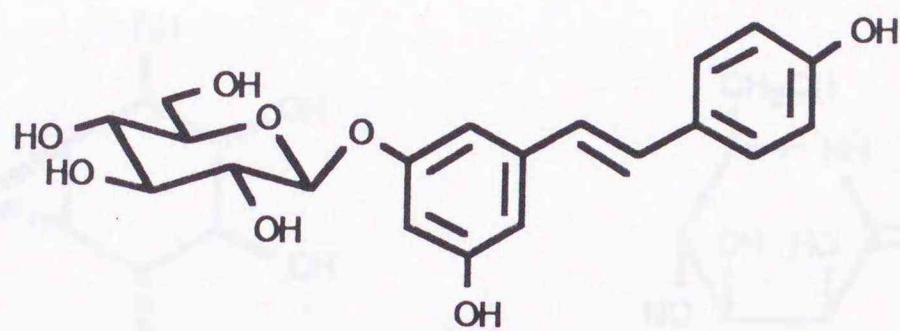


Cyclophellitol (26)²⁸⁾

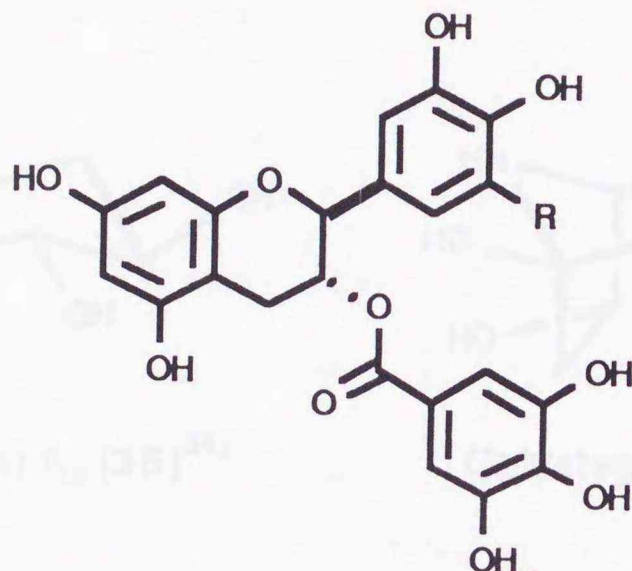


Castanospermine (27)²⁹⁾

(Continued)

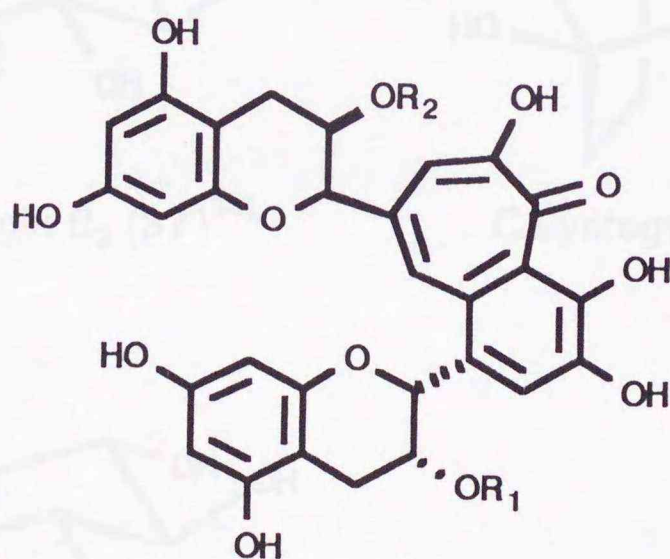


Piceid (28)³⁰⁾



R=H (-)-Epicatechin gallate (29)³¹⁾

R=OH (-)-Epigallocatechin gallate (30)³¹⁾

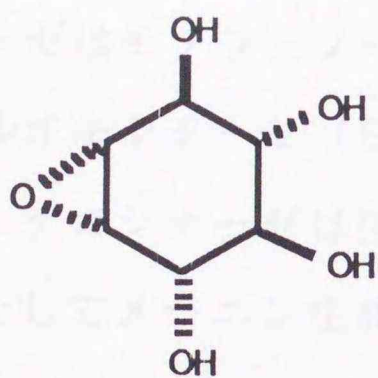


R₁=H, R₂=gallate Theaflavin monogallate A (31)³¹⁾

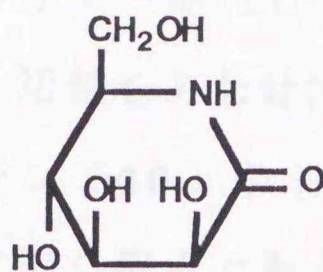
R₁=gallate, R₂=H Theaflavin monogallate B (32)³¹⁾

R₁=R₂=gallate Theaflavin digallate (33)³¹⁾

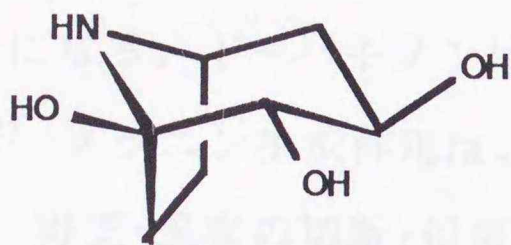
(Continued)



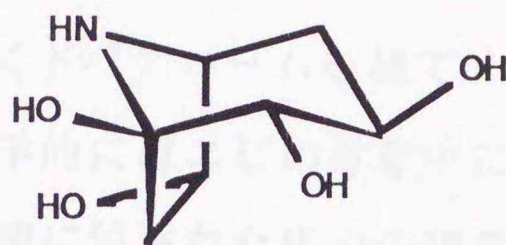
Conduritol B epoxide (34)³²⁾



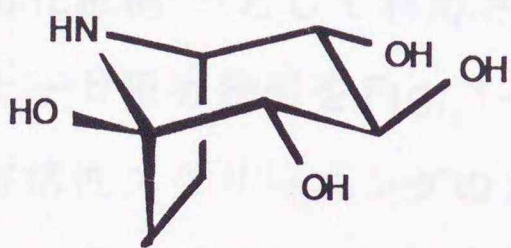
D-Manno-δ-lactam (35)³³⁾



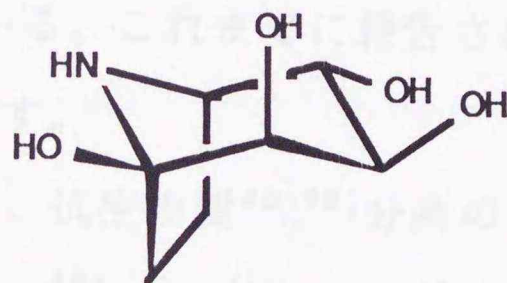
Calystegin A₃ (35)³⁴⁾



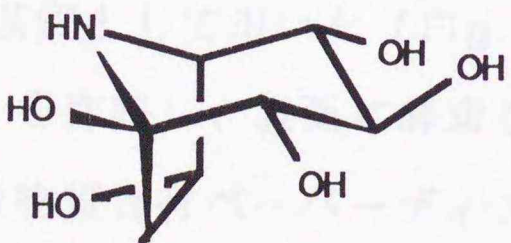
Calystegin B₁ (36)³⁴⁾



Calystegin B₂ (37)³⁴⁾



Calystegin B₃ (38)³⁴⁾



Calystegin C₁ (39)³⁴⁾

(Continued)

チロシナーゼはモノフェノールモノオキシゲナーゼ(EC 1.14.18.1)とカテコールオキシダーゼ(EC 1.10.3.1)活性をあわせ持つ酸化還元酵素である。チロシナーゼは生体内でチロシン(40)やドーパ(41)を出発物質としてメラニン生成過程で最初に働く酵素である(Fig. 1-7)。チロシンはチロシナーゼのモノフェノールモノオキシゲナーゼ作用により酸素が導入されドーパになる。ドーパはチロシナーゼのカテコールオキシダーゼ作用により脱水素されオルトキノンのドーパキノン(42)になる。ドーパキノンはさらにドパクロームを経てメラニンに至る。²⁾メラニン生成作用は、食品学的にはエビの貯蔵中に起こる黒変、³⁹⁾野菜・果実の切断・損傷・病原菌に犯された場合の褐変など貯蔵時の食品劣化に関与し、²⁾また、ヒトのシミ・ソバカスにも関与している。³⁵⁾チロシナーゼ阻害物質によるエビの黒変を抑える試み³⁹⁾や美白作用化粧品³⁵⁾として利用されている。これまでに報告されているチロシナーゼ阻害物質をFig. 1-8に示す。

酵素阻害活性スクリーニングのために、抗生物質⁴⁰⁻⁴⁵⁾分画の指標に使われている寒天平板法の適用を試みた。⁴⁶⁾ α -グルコシダーゼと β -グルコシダーゼ阻害性試験では、それぞれ

-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド(58)とp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド(59)を基質として用いた(Fig. 1-9)。これらの基質を含む「基質寒天平板」を作製し、表面に酵素を塗布した「酵素寒天平板」を作製した。被験物質含有ペーパーディスクを酵素寒天平板に埋め込み被験物質を十分に拡散させたあとに、基質寒天平板を酵素寒天平板の上のせて酵素反応を開始した。酵素反応が進行すると、p-ニトロフェノール(60)が遊離して中性～塩基性の条件下で黄色を呈する。酵素反応が拡散した被験物質により阻害される場合には、p-ニトロフェノールが生成せずに無色のままである。本方法はグルコシダーゼ阻害性試験において初めて視覚的な判別方法として確立された。

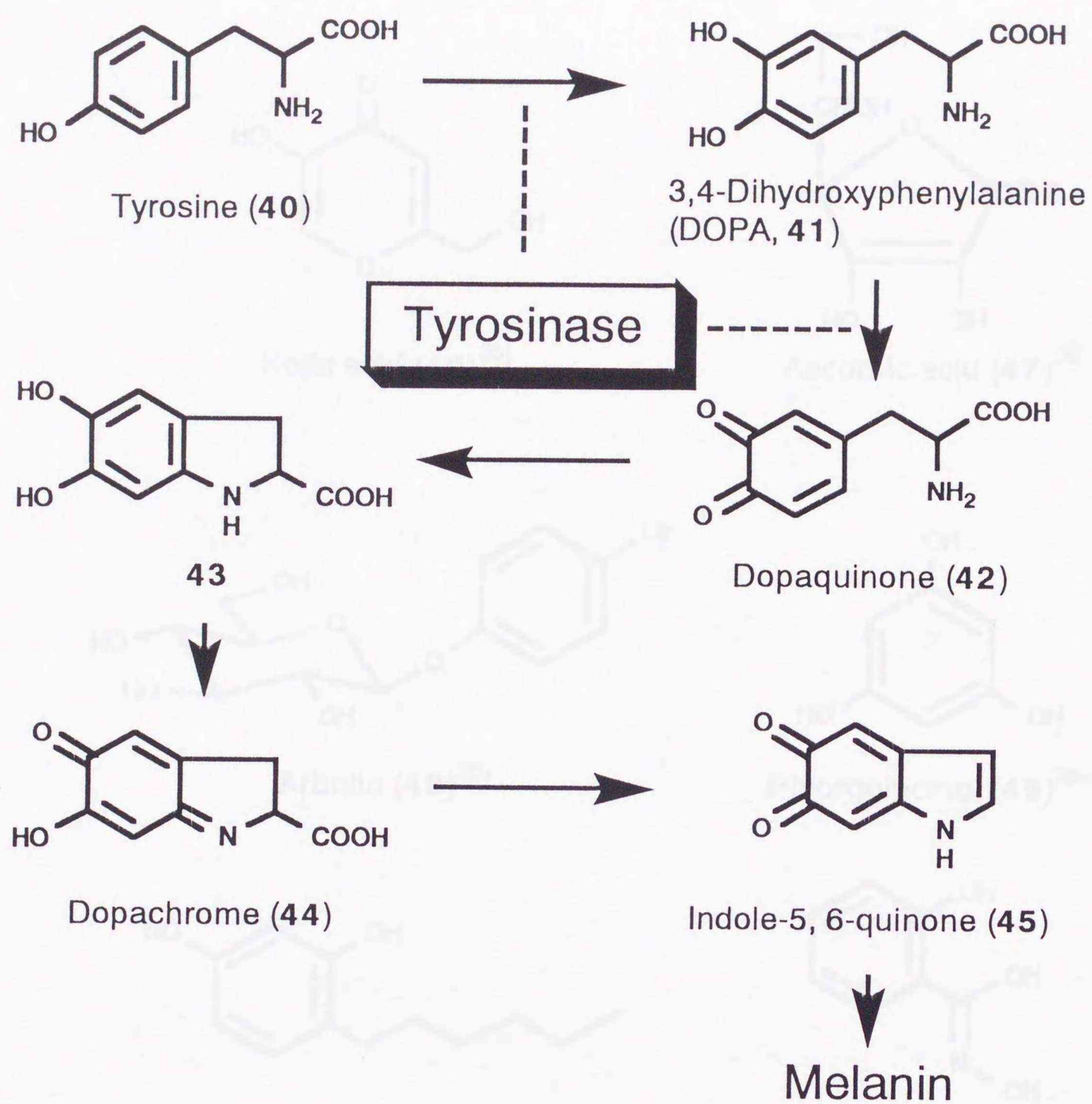
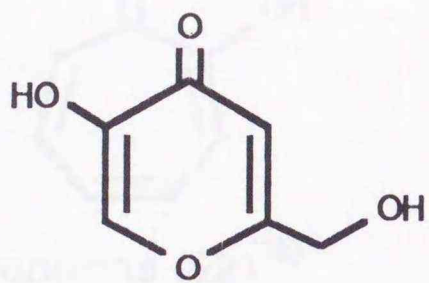
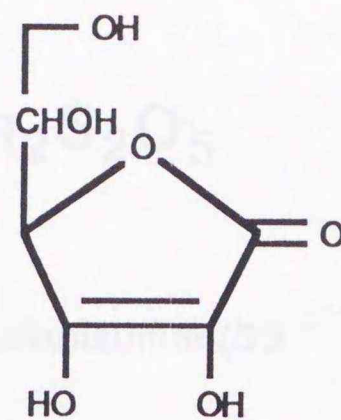


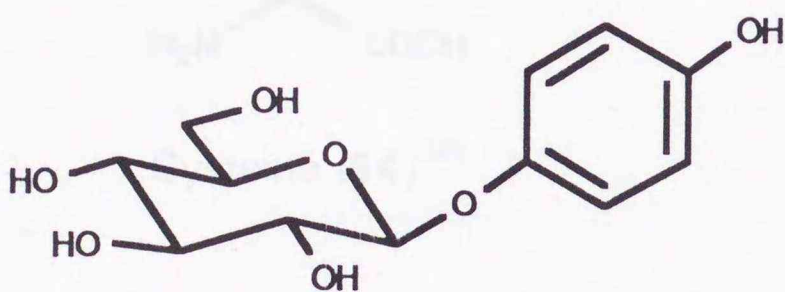
Fig. 1-7. The biosynthetic route of melanins.



Kojic acid (46)³⁵⁾



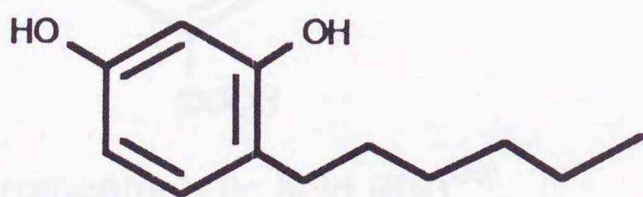
Ascorbic acid (47)³⁵⁾



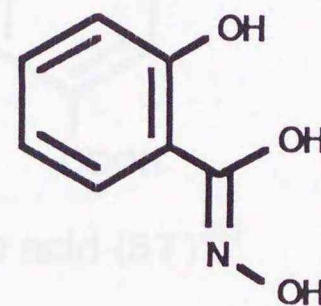
Arbutin (48)³⁵⁾



Phloroglucinol (49)³⁵⁾

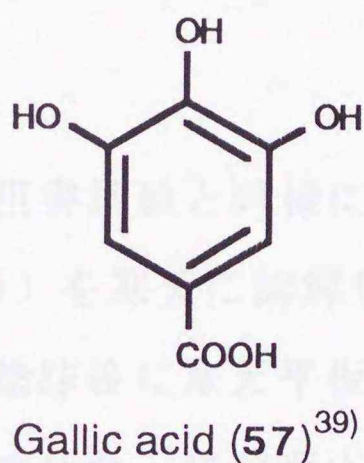
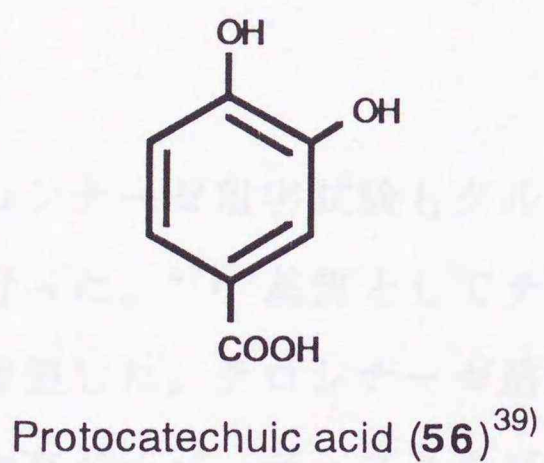
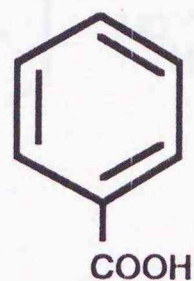
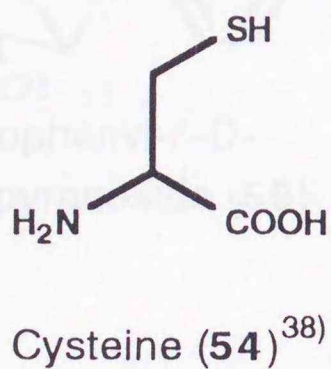
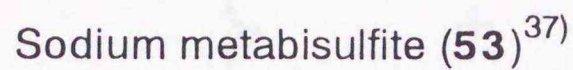
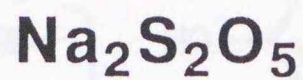
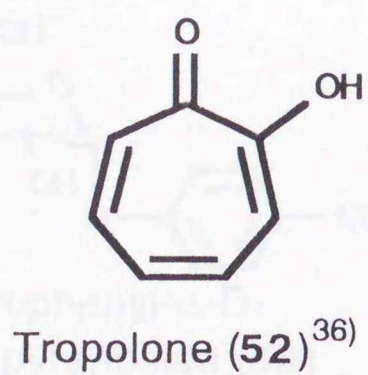


4-Hexylresorcinol (50)³⁶⁾



Salicylhydroxamic acid (51)³⁶⁾

Fig. 1-8. Tyrosinase inhibitors.



(Continued)

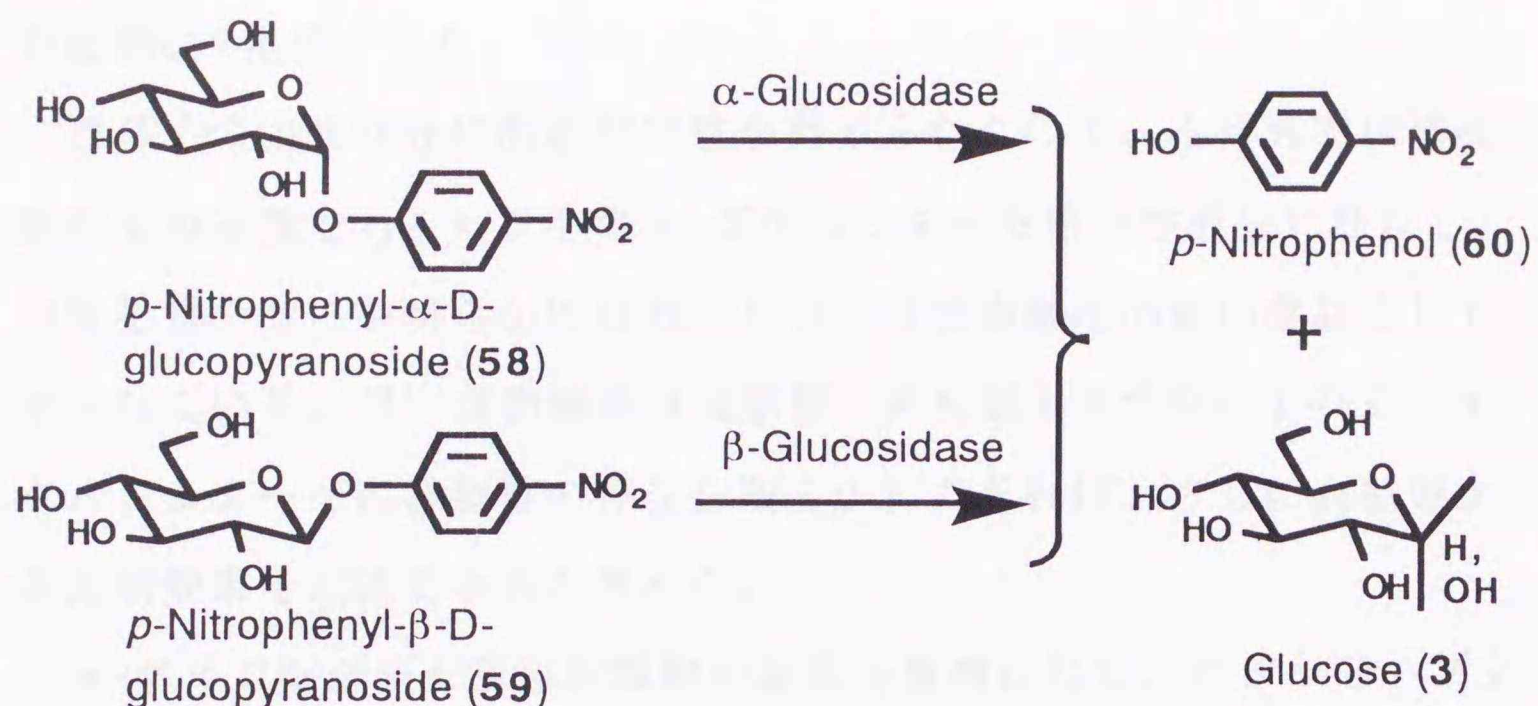


Fig. 1-9. Glucosidase reactions used in the kinetic studies.

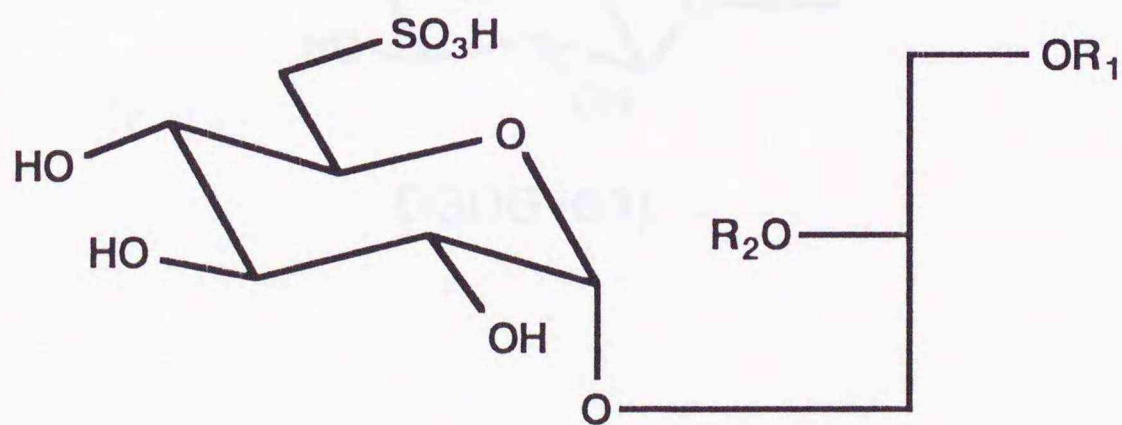
チロシナーゼ阻害試験もグルコシダーゼ阻害試験と同様に寒天平板法で行った。⁴⁷⁾ 基質としてチロシン (40) を寒天に溶解して寒天平板を作製した。チロシナーゼ溶液を表面に塗抹後に寒天平板上に被験物質含有ペーパーディスクを寒天平板上にのせた。酵素反応が進行した場合には黒色を呈し、酵素反応が阻害された場合には無色のままである。さらに、抗菌性試験も培地を含む寒天平板法⁴⁰⁾を用いた。

簡便にスクリーニングが行えるこれらの寒天平板法により供試生物の有機溶媒抽出物で酵素阻害性および抗菌性スクリーニングに供した。なお、本研究での供試生物として道南沿岸の海藻、チュクチ海や相模湾で採集した無脊椎動物、さらに市販されている水産物を対象とした。阻害性スクリーニングの結果、 α -グルコシダーゼ阻害性を示したのは海藻9種類・水生植物1種類・無脊椎動物4種類・市販水産食品4種類であった。 β -グルコシダーゼ阻害性を示したのは海藻7種類・無脊椎動物2種類・市販水産食品5種類であった。チロシナーゼ阻害は海藻3種類・無脊椎動物3種類で認められた。また、抗菌性を示したのは海藻5種類・無

脊椎動物7種類だった。

数多くの生物成分に酵素阻害性が認められたので、本研究では褐藻類の食用海藻であるヒジキの α -グルコシダーゼ阻害性成分に注目し、阻害物質の特性を明らかにした。ヒジキは食物繊維の多い食品として知られている。⁴⁸⁾ 食物繊維は血糖値上昇抑制効果²⁾を示すので、 α -グルコシダーゼ阻害物質の存在を明らかにできれば、さらに血糖値上昇抑制効果を期待できると考えた。

α -グルコシダーゼ阻害性試験の結果を指標にして、ヒジキの n -ブタノール抽出物からシリカゲル・セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーで阻害物質を単離した。阻害物質の構造を機器分析で検討したところ植物の主要な糖脂質である1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)- sn -グリセロール(スルホキノボシルジアシルグリセリド, SQDG, **61**)⁴⁹⁾とそのリゾ体の1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)- sn -グリセロール(スルホキノボシルモノアシルグリセリド, SQMG, **62**)⁵⁰⁾を単離した(Fig. 1-10)。

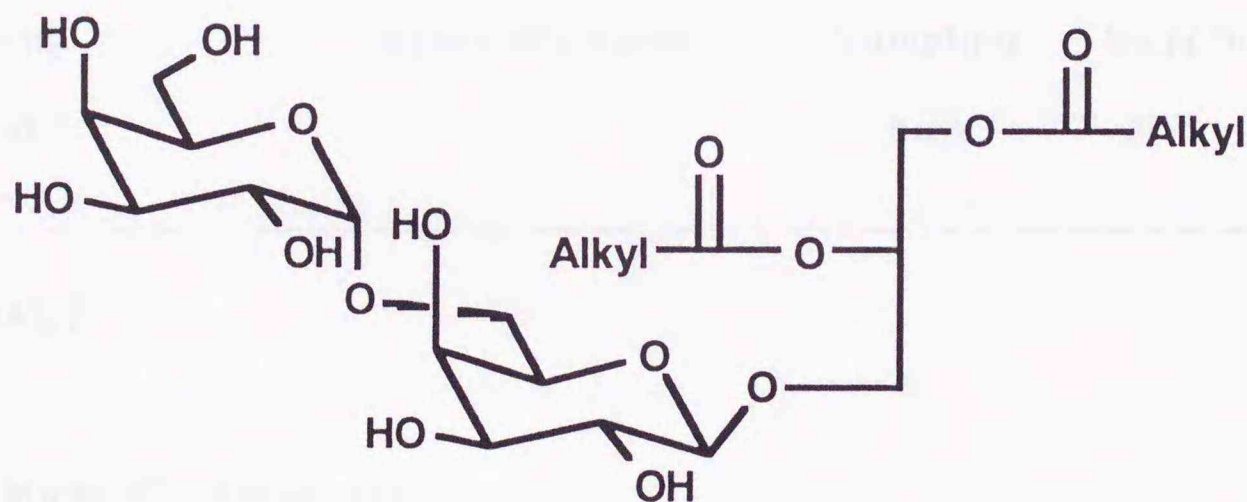


$R_1=R_2=\text{Acyl}$ SQDG (**61**)
 $R_1=\text{Acyl}, R_2=\text{H}$ SQMG (**62**)

Fig. 1-10. α -Glucosidase inhibitors isolated in this study.

速度論的解析から、SQDGは酵母 α -グルコシダーゼに対して拮抗阻害を示し、阻害物質定数 K_i は $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ だった。SQMGは阻害率の比較によりSQDGより阻害活性が強かった。

また、SQDGを単離する過程で粗糖脂質画分でSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性が抑制されることを確認した。その原因を検討したところ、糖脂質の1,2-ジアシル-3-(6- α -D-ガラクトピラノシル- β -D-ガラクトピラノシル)-sn-グリセロール(ジガラクトシルジアシルグリセリド, DGDG, **63**)がSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を抑制することを明らかにした。速度論的解析からDGDGは酵素に働きかけているのではなく、阻害物質のSQDGに働きかけ阻害効果を抑制していることを明らかにした。⁵¹⁾



DGDG (**63**)

本研究では、海産生物成分の有効利用のためにこれまで研究例のある生理活性以外の活性でスクリーニングしたところ、新たな利用方法が期待できる生物抽出成分が得られた。そのうちの α -グルコシダーゼ阻害物質の構造を解析し、既知化合物ではあるがSQDGを単離・同定できた。本研究で明らかにしたSQDGの活性はこれまでに報告例がなく、既知化合物の新たな利用方法を開発できる端緒となった。

第2章 海産生物成分の酵素阻害性及び抗菌性物質の検索

第1節 供試生物と有機溶媒抽出

(1) 供試生物

本研究で酵素阻害性と抗菌性を検討した供試生物は海藻14種類・海産種子植物1種類・海産無脊椎動物7種類・水産食品8種類である (Table 2-1)。

Table 2-1. Organisms and seafoods examined in this study

Organism	Scientific name	Sampling date	Sampling site
Seafood			
【ALGAE】			
Green algae (Chlorophyta)			
Ulvaceae			
1. <i>Bouaonori</i>	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	1991.5.23	Shiriuchi
2. <i>Anaosa</i>	<i>Ulva pertusa</i>	1991.7.29	Toi
Brown algae (Phaeophyta)			
Sargassaceae			
3. <i>Hijiki</i>	<i>Hizikia fusiforme</i>	1992.7.16	Toi
4. <i>Umitorano o</i>	<i>Sargassum thunbergii</i>	1992.7.16	Toi

(continued)

Leathesiaceae

5. *Nebarimo* *Leathesia difformis* 1992.6.16 Shiriuchi

Scytosiphonaceae

6. *Kayamonori* *Scytosiphon lomentarius* 1991.6.11 Toi

Fucaceae

7. *Ezoishige* *Pelvetia wrightii* 1992.7.16 Toi

Punctariaceae

8. *Kitaiwahige* *Myelophycus intestinale* 1994.6.2 Shiriuchi

Red algae (Rhodophyta)

Corallinaceae

9. *Pirihiba* *Corallina pilulifera* 1992.6.16 Shiriuchi

10. *Ezoshikoro* *Calliarthron yessoense* 1992.6.16 Shiriuchi

Gigartinaceae

11. *Ezotsunomata* *Chondrus yendoi* 1991.6.11 Toi

12. *Akabaginnansou* *Rhodoglossum japonicum* 1993.7.3 Toi

Rhodomelaceae

13. *Fujimatsumo* *Rhodomela larix* 1994.6.2 Shiriuchi

Endocladaceae

14. *Fukurofunori* *Gloiopeltis furcata* 1992.7.16 Toi

【SEAGRASS】

Potamogetonaceae

(continued)

15. *Sugamo* *Phyllospadix iwatensis* 1994.6.24 Minamikayabe

【INVERTEBRATES】

16. *Okinotezurumozuru* *Gorgonocephalus caryi* 1991.8 Chukchi Sea

17. *Jiigasekinko* *Psolus squamatus* 1991.8 Chukchi Sea

18. *Akaboya* *Halocynthia aurantium* 1991.8 Chukchi Sea

19. *Enagakushieraboya* *Boltenia ovifera* 1991.8 Chukchi Sea

20. *Giboshimushi* *Balanoglossus* sp. 1991.8 Chukchi Sea

21. *Haorimushi* *Lamellibrachia* sp. 1993.8.19 Sagami Bay

22. *Shiourigai* *Calyptogena soyoae* 1993.8.19 Sagami Bay

【SEAFOODS】

23. *Fresh Wakame* 1994.5.12 Market

24. *Dried Wakame* 1994.9.1 Market

25. *Dried Konbu* 1994.9.5 Market

26. *Dried Hijiki* 1993.2.10 Market

27. *Katsu o kezuribushi* 1994.9.5 Market

28. *Niboshi* 1993.2.10 Market

29. *Shijimi* 1994.5.12 Market

30. *Asari* 1994.5.12 Market

(2) 海産生物の有機溶媒抽出

(2-1) 海藻および無脊椎動物の有機溶媒抽出

海藻は採集後研究室に持ち帰り、直ちに水洗・水切り後、生鮮重を測り、カッターで2~3 cm 長または角に切断した。切断した藻体を有機溶媒（メタノールまたはアセトン）に浸漬し、室温で1週間~1カ月静置・抽出を行った。抽出液を減圧濃縮し、メタノール（アセトン）抽出物を得て、重量を測定した。さらに、メタノール（アセトン）抽出物に水を加え、酢酸エチルと分配した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して酢酸エチル可溶画分を得た。残りの水層に*n*-ブタノールを加え、*n*-ブタノール層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して*n*-ブタノール可溶画分を得た。残った水層（水可溶画分）はそのまま濃縮した。酢酸エチル可溶画分、*n*-ブタノール可溶画分、水可溶画分の重量をそれぞれ測定した。ただし、濃縮が困難な場合（粘稠性物質など）は全体の重量を測定せずに、一部をとり濃縮した。

無脊椎動物はチュクチ海または相模湾で採集・冷凍し、研究室に搬入した。解凍後、種類毎に分別し、重量を測定した。これらの生物体をカッターまたは包丁で細断した。細断した生物体の有機溶媒抽出は海藻の場合と同様に行った。

供試した海藻および無脊椎動物の重量および抽出物や有機溶媒可溶画分の重量をTable 2-2に示す。水産食品のうち、生ワカメは海藻の抽出と同様に行った。

(2-2) 水産食品の抽出

乾燥ワカメはそのまま粉碎後に90%メタノールで抽出し、抽出液を減圧濃縮した。その他の水産食品は調理過程を考慮して、まず蒸留水による煮沸操作を加えた。乾燥コンブはまずハサミで4 cm²に細断し、

Table 2-2. Weights of marine organisms examined and extracts
using organic solvents

Sample	SW ^a	OS ^b	EW ^c	SPF ^d		
	(g)		(g)	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	Water
【ALGAE】						
1. <i>Bouaonori</i>	322	M	5.75	- ^e	-	-
2. <i>Anaosa</i>	350	M	20.64	0.18	-	15.96
3. <i>Hijiki</i>	2460	A	109	4.2	1.6	-
4. <i>Umitoranoo</i>	4500	A	71.0	13.9	-	-
5. <i>Nebarimo</i>	2720	A	97.5	1.0	2.5	-
6. <i>Kayamonori</i>	298	M	6.02	0.70	-	6.5
7. <i>Ezoishige</i>	6100	A	84.5	1.1	-	-
8. <i>Kitaiwahige</i>	1300	M	30.8	2.94	0.36	13
9. <i>Pirihiba</i>	970	A	21.5	2.4	7.6	-
10. <i>Ezoshikoro</i>	1340	A	20.4	2.0	11.6	-
11. <i>Ezotsunomata</i>	200	M	8.34	-	-	-
12. <i>Akabaginnansou</i>	480	A	1.38	0.31	0.61	0.32
13. <i>Fujimatsumo</i>	230	M	10.73	0.37	-	12.21
14. <i>Fukurofunori</i>	550	A	18.8	0.4	-	-
【SEAFOODS】						
23. <i>Fresh Wakame</i>	839	M	32.0	2.74	0.69	21.8

(continued)

【SEAGRASS】

15. <i>Sugamo</i>	410	A	28.2	3.04	6.03	16.4
-------------------	-----	---	------	------	------	------

【INVERTEBRATES】

16. <i>Okinotezurumozuru</i>	5060	A	63.2	6.2	11.2	-
17. <i>Jigasekinko</i>	2010	A	51.7	2.6	10.4	-
18. <i>Akaboya</i>	920	A	19.5	1.6	3.8	-
19. <i>Enagakushieraboya</i>	460	A	15.0	2.0	3.5	-
20. <i>Giboshimushi</i>	2480	A	94.0	0.6	-	-
21. <i>Haorimushi</i>	90	A	4.0	1.34	0.34	1.08
22. <i>Shiourigai</i>	920	A	12.7	0.84	0.99	10.82

^aWeight of fresh matter rinsed with tap water.

^bOrganic solvent used for extraction, M, methanol; A, acetone.

^cWeight of the organic extract concentrated under reduced pressure.

^dWeight of the concentrated solvent fraction obtained with a series of solvent partitioning.

^eNeither obtained nor measured due to viscous properties.

蒸留水を加え、1時間前後煮沸した。煮沸液を室温まで冷却後に煮沸液と残渣にろ別した。残渣を包丁で細断後に、90% メタノールで抽出した。煮沸液はそのまま阻害性試験に用い、乾燥コンブの煮沸液のみは減圧濃縮した。メタノール抽出液をろ過後に減圧濃縮した。供試した水産食品重量および各画分の重量を測定した (Table 2-3)。

Table 2-3. Weights of seafoods examined, and methanol
extracts of the residual seafood matter after boiling

Sample	Sample weight (g) ^a	Distilled water added (ml)	methanol extract ^b (g)
【SEAFOODS】			
24.Dry Wakame	41.3	NB ^c	10.0
25.Dry Konbu	106	2000	32.5 ^d
26.Dry Hijiki	5.2	100	0.16
27.Katsuo kezuribushi	120	550	20
28.Niboshi	5.2	100	0.22
29.Shijimi	528	49.4 ^e	500
30.Asari	581	73.3 ^e	500

^aFresh weight.

^bWeight of the methanol extract of the residual matter after boiling.

^cWithout boiling.

^dWeight of the boiled extractive.

^eWeight of the soft part.

第2節 グルコシダーゼ阻害性

第2章第1節に記載してある生物の有機溶媒可溶成分の酵素阻害活性及び抗菌性を検討した。酵素阻害および抗菌性試験の結果を視覚的に判断できるように、抗生物質スクリーニングに使用されている「寒天平板法」の適用を試みた。

2-1 グルコシダーゼ阻害性試験寒天平板法の確立

グルコシダーゼ活性測定は吸光度法³¹⁾や生成するグルコースの定量²¹⁾により行われてきた。しかし、粗抽出物のグルコシダーゼ阻害性を検討する場合に、抽出物そのものの吸光度が測定の妨害になったり、水溶液条件下で測定するので、抽出物の水への溶解性が問題となってきた。そこで、抗生物質の一次スクリーニングに広く使われているペーパーディスクを使用した寒天平板法をグルコシダーゼ阻害試験に適用した。

α -および β -グルコシダーゼはそれぞれ α -および β -グルコシドを加水分解する酵素であるこれらの酵素の基質として

p-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシドおよび β -D-グルコピラノシドを用いて、酵素反応を行い、*p*-ニトロフェノールを遊離させた (Fig.1-9)。*p*-ニトロフェノールは中性からアルカリ性条件下でフェノラートアニオンに解離し、黄色に呈色することが知られているので、この呈色の変化から酵素活性を求めた。

(1) α -グルコシダーゼ阻害性試験の寒天平板法

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に寒天 300 mg を溶解して寒天平板を作製した。この平板の表面に 5 μ g/ml α -グルコシダー

ゼ (*Saccharomyces cerevisiae* 由来、和光純薬工業 (株)) 溶液を塗抹して酵素寒天平板とした。一方、基質として 5 mM p -ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド (東京化成工業 (株)) 10 ml に寒天 300 mg を溶解させて基質平板を作製した。被験物質を任意濃度になるように有機溶媒または緩衝液に溶解して、マイクロシリンジにより 8 mm 直径のペーパーディスク (東洋濾紙) に 20 μ l しみこませた。酵素寒天平板にコルクボーラーで穴を開け、被験物質含有ペーパーディスクをその穴に入れた。25 $^{\circ}$ C、2.5 時間静置して被験物質を拡散させた。基質寒天平板を酵素寒天平板上に重ね、酵素反応を開始させ、30 分間静置した。酵素反応が進むと、 p -ニトロフェノールが生成し、フェノラートアニオンに解離させて黄色に着色する。酵素反応が進まないときは、ペーパーディスクのまわりに無色円ができる。この無色円の有無と直径を測定して、 α -グルコシダーゼ阻害性を調べた。以上の方法を Fig. 2-1 にまとめた。

(2) β -グルコシダーゼ阻害性試験の寒天平板法

β -グルコシダーゼ阻害性試験の寒天平板法は「(1) α -グルコシダーゼ阻害性試験の寒天平板法」の方法と同様であり、異なる点のみを記載する。緩衝液には 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を使用した。20 μ g/ml β -グルコシダーゼ (アーモンド由来、オリエンタル酵母 (株)) 溶液を塗抹して酵素寒天平板とした。基質として 5 mM p -ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (ナカライテスク (株)) を使用した。酵素反応終了後に、アンモニア蒸気を充満した容器に移し、寒天平板をアルカリ性条件下で p -ニトロフェノールが生成し、フェノラートアニオンに解離させ黄色に着色させ、無色円の有無と直径を測定した。

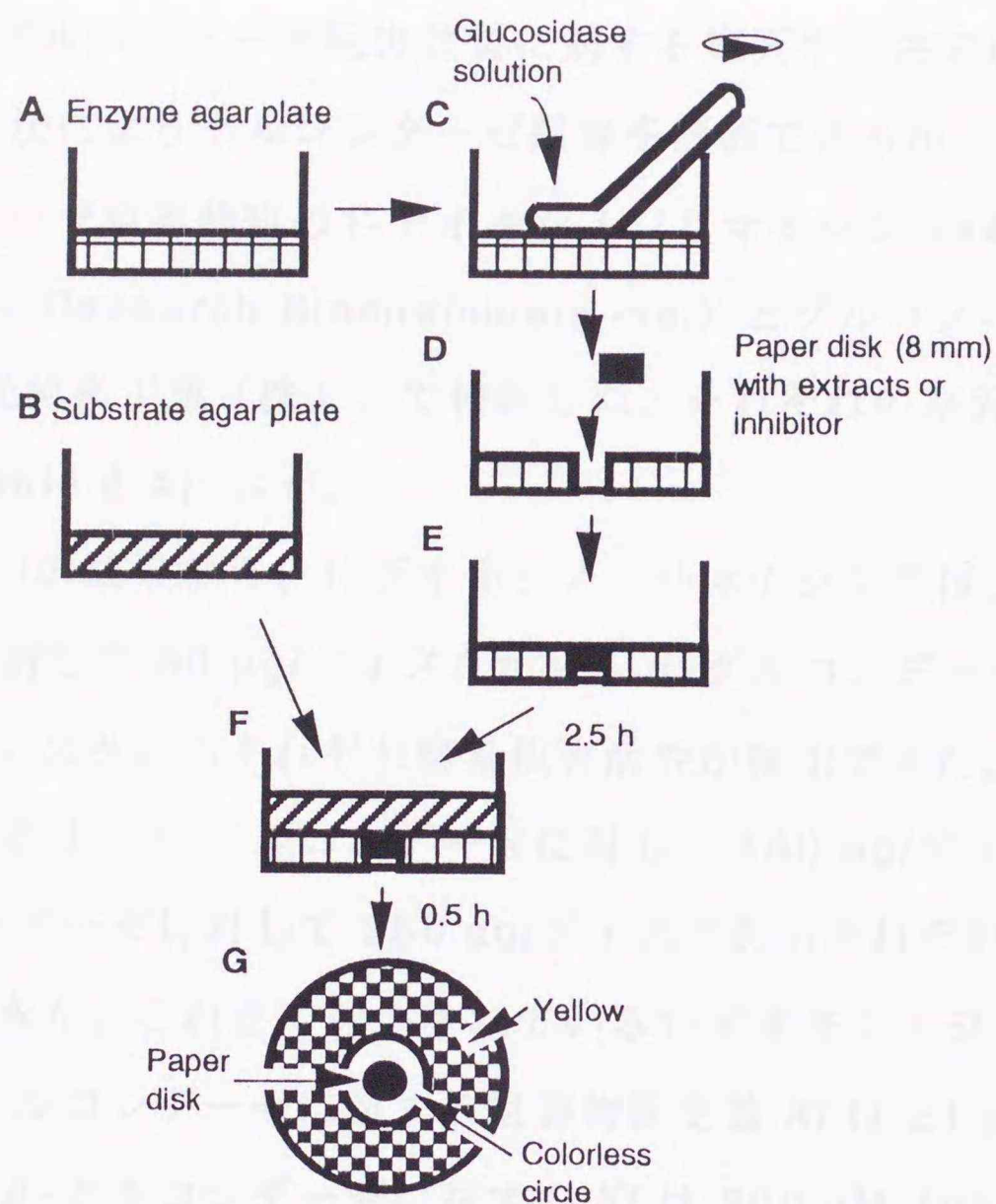


Fig. 2-1. Procedure of glucosidase inhibitory assay using the agar plate method.

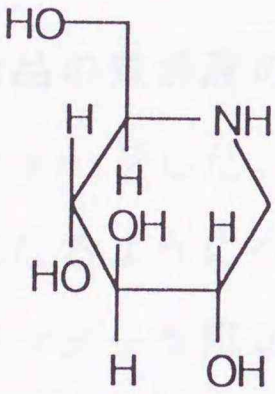
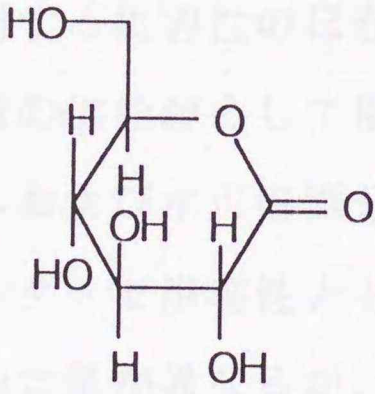
A, Preparation of the enzyme agar plate by dissolving 1.5% agar in buffer; B, preparation of the substrate agar plate by dissolving 3.0% agar in buffer containing *p*-nitrophenyl- $\underline{\underline{D}}$ -glucopyranoside; C, addition of glucosidase in buffer and spreading; D, placing the paper disk in the hole made by a cork borer; E, preincubation at 25 °C for 2.5 h; F, placing the substrate agar plate on the enzyme agar plate and incubation at 25 °C for 0.5 h; G, measurement of diameter of colorless circle against yellow background, and in the case of β -glucosidase, placing the enzyme and substrate agars in a container saturated with ammonia vapor.

(3) 既知グルコシダーゼ阻害物質に対する寒天平板法の適用

寒天平板法によりグルコシダーゼ阻害を評価できるか否かを既知のグルコシダーゼ阻害物質の1-デオキシノジリマイシン (14、Cambridge Research Biochemicals Inc.) とグルコノ- δ -ラクトン (15、和光純薬工業(株)) で検討した。それぞれの寒天平板法の試験結果をTable 2-4に示す。

Table 2-1の結果から、1-デオキシノジリマイシンでは、 α -グルコシダーゼに対して 50 μg /ディスクから、 β -グルコシダーゼに対して 100 μg /ディスクからそれぞれ酵素阻害活性が検出できた。グルコノ- δ -ラクトンでは、 α -グルコシダーゼに対して 500 μg /ディスクから、 β -グルコシダーゼに対して 250 μg /ディスクからそれぞれ酵素阻害活性が検出できた。これまで報告されている1-デオキシノジリマイシンの酵母 α -グルコシダーゼに対する阻害物質定数 K_i は 21 μM (pH 7)、アーモンド β -グルコシダーゼに対する K_i は 300 μM (pH 5) である。⁵²⁾ また、グルコノ- δ -ラクトンのアーモンド β -グルコシダーゼに対する K_i は 200 μM (pH 6.2) である。⁵³⁾ 阻害物質定数と阻害円の直径では単純に比較はできないが、1-デオキシノジリマイシンは β -グルコシダーゼより α -グルコシダーゼに対して強い阻害性を示す点で一致している。このように、寒天平板法はグルコシダーゼ阻害を検出でき、吸光度計のような分析機器を必要としない。しかも、阻害物質の濃度が高くなれば、阻害円の直径も大きくなることが確認できた。ただし、阻害物質の拡散に依存することや生成した *p*-ニトロフェノールの拡散も次第に起こるために定量性は低いと考える。よって、この寒天平板法は生体成分抽出物の一次スクリーニングや阻害物質分画の初期段階に、定性的にまたは半定量的に適用するのが望ましい。

Table 2-4. Inhibitory activities of known glucosidase inhibitors assessed through the novel agar plate method developed in this study

Glucosidase inhibitor	Dose (μg/disk)	Diameter (mm) of inhibitory zone ^a	
		α-Glucosidase	β-Glucosidase
 1-Deoxynojirimycin (14)	500	17	17
	100	14	10.5
	50	11.5	- ^b
	10	-	-
	0	-	-
	0	-	-
 Glucono-δ-lactone (15)	500	12	23
	250	-	16
	125	-	-
	0	-	-
	0	-	-

^a Values are the averages of two measurements.

^b No inhibition.

2-2 結果と考察

一次スクリーニング法として寒天平板法を確立できたので、海産生物抽出物（第2章第1節）のグルコシダーゼ阻害性を検討した。各抽出物が20 mg/ディスクになるように8 mm ペーパーディスクにチャージし、寒天平板法によるグルコシダーゼ阻害性試験に供した（Table 2-5）。

水産食品の煮沸液のうち濃縮していない場合は、煮沸液 20 μ l をそのままチャージした。濃縮した煮沸液やメタノール抽出物は 20 mg/ディスクになるようにペーパーディスクにチャージし、寒天平板法によるグルコシダーゼ阻害性試験に供した（Table 2-6）。

褐藻6種類のすべてが酵母 α -グルコシダーゼおよびアーモンド β -グルコシダーゼに対して阻害性を示した。褐藻成分の α -グルコシダーゼに対する阻害性と β -グルコシダーゼに対する阻害性を比較すると、前者に対する阻害性のほうが強かったので、褐藻は α -グルコシダーゼ阻害物質の供給源として期待できる。同一植物での酢酸エチル、*n*-ブタノールおよび水可溶画分間の比較では、 α -グルコシダーゼおよび β -グルコシダーゼ阻害性ともに共通の傾向がなく、種によって阻害物質の種類や含量が異なるか、同一植物内に複数の阻害物質が存在していると推測する。褐藻抽出物のうち、ヒジキの *n*-ブタノール可溶画分、ウミトラノオの *n*-ブタノール可溶画分およびキタイワヒゲの *n*-ブタノール可溶画分で α -グルコシダーゼに対する阻害性が強かった。

紅藻5種類のうち、3種類が酵母 α -グルコシダーゼに対して、1種類がアーモンド β -グルコシダーゼに対して阻害性を示した。これを褐藻の結果と比較すると阻害性を示す海藻の割合が低く、紅藻にはグルコシダーゼ阻害成分があまり含まれていないことが明らかとなった。

Table 2-5. Glucosidase inhibitory activities of the extracts from marine organisms

Sample	Diameter (mm) of inhibitory zone ^a					
	α -Glucosidase			β -Glucosidase		
	E ^b	B ^b	W ^b	E ^b	B ^b	W ^b
[ALGAE]						
3. <i>Hijiki</i>	19	25	14.5	- ^c	-	12.5
4. <i>Umitorano o</i>	15	20	11.5	-	13.5	17.5
5. <i>Nebarimo</i>	13	15	-	-	13	-
6. <i>Kayamonori</i>	16	14.5	13.5	9.5	-	16
7. <i>Ezoishige</i>	11	NT ^d	16	11	NT	18
8. <i>Kitaiwahige</i>	17.5	25	16	12.5	17	11.5
9. <i>Pirihiba</i>	-	-	NT	-	-	NT
10. <i>Ezoshikoro</i>	9	-	NT	-	-	NT
12. <i>Akabaginnansou</i>	15	-	-	-	-	-
13. <i>Fujimatsumo</i>	19	20	15.5	-	18	19
14. <i>Fukurofunori</i>	-	-	-	-	-	-
[SEAGRASS]						
15. <i>Sugamo</i>	15.5	24.5	-	-	-	-
[INVERTEBRATES]						
16. <i>Okinotezurumozuru</i>	10	24	-	-	-	15

(continued)

17. <i>Jiigasekinko</i>	10.5	14	-	9	-	-
18. <i>Akaboya</i>	11.5	14.5	-	-	-	-
19. <i>Enagakushieraboya</i>	14.5	12.5	NT	-	-	NT
21. <i>Haorimushi</i>	-	-	-	-	-	-
22. <i>Shiourigai</i>	-	-	-	-	-	-
[SEAFOODS]						
23. <i>Fresh wakame</i>	13	-	-	12.5	15.5	14

^aSample was impregnated into a paper disk with dose of 20 mg/disk.

Values are the averages of two measurements.

^bE, ethyl acetate-soluble fraction; B, *n*-butanol-soluble fraction; W, residual water-soluble fraction.

^cNo inhibition.

^dNot tested.

ただし、フジマツモでは α -グルコシダーゼおよび β -グルコシダーゼに強い阻害性を示すことから、褐藻に近い代謝経路が存在すると予想される。供試した紅藻ではフジマツモ成分のみがグルコシダーゼ阻害に有効であった。

海水中に生育する種子植物スガモは酵母 α -グルコシダーゼに対して阻害性を示した。とくに n -ブタノール可溶画分では強い阻害性を示し、 α -グルコシダーゼ阻害成分供給源として有望であった。

北極海に接するチュクチ海で採集した4種類の無脊椎動物はすべて

Table 2-6. Glucosidase inhibitory activities of the constituents of seafoods

Sample	Diameter (mm) of inhibitory zone ^a			
	α -Glucosidase		β -Glucosidase	
	BW ^b	M ^c	BW ^b	M ^c
24. Dry wakame	NT ^d	- ^e	NT	-
25. Dry konbu	-	14.5	-	11.5
26. Dry hijiki	11.5	17	-	-
27. Katsuo kezuribushi	18.5	NT	10	NT
28. Niboshi	-	-	-	-
29. Shijimi	-	-	-	14
30. Asari	-	-	-	13.5

^aValues are the averages of two measurements.

^bSolution (20 μ l) of boiling water was impregnated into a paper disk.

^cMethanol extract was impregnated into a paper disk with dose of 20 mg/disk.

^dNot tested.

^eNo inhibition.

酵母 α -グルコシダーゼに対して阻害性を示した。オキノテズルモズルの *n*-ブタノール可溶画分では α -グルコシダーゼ阻害性が強かった。チュクチ海無脊椎動物のうち2種類はアーモンド β -グルコシダーゼに対して阻害性を示したが、褐藻成分の β -グルコシダーゼ阻害性と比較するとその活性は弱かった。相模湾深海の冷水湧出帯に生育するハオリ

ムシ類とシロウリガイ⁵⁴⁾成分は α -および β -グルコシダーゼ阻害性を示さなかった。

無脊椎動物成分の阻害性は海藻成分のそれと比較すると弱く、採集可能量も少ないのでそのままグルコシダーゼ阻害成分として生物体を利用することはできない。しかし、無脊椎動物では海藻と異なる代謝経路が予想されるので、新たな α -グルコシダーゼ阻害物質を得る可能性が高い。そのまま生物体を利用するよりリード化合物供給源として化学的研究対象としたほうがよい。

水産食品としては生ワカメのみ有機溶媒分画を行った。採集した褐藻とは異なり、市販の生ワカメでは β -グルコシダーゼ阻害のほうが α -グルコシダーゼ阻害より強かった。このことがワカメに特徴的な現象なのか採集からの時間経過によって α -グルコシダーゼ阻害物質が消失したことによるのかは不明である。その他の水産物7種類では蒸留水による煮沸処理を行い煮沸液をそのまま酵素阻害性試験に供した。 α -グルコシダーゼに対する阻害性は乾燥ヒジキとカツオ削り節で確認できた。 β -グルコシダーゼに対する阻害性はカツオ削り節で観察できた。その他の煮沸液ではグルコシダーゼ阻害性は確認できなかった。カツオ削り節煮沸液ではかなり強い阻害性が観察できたが、本実験では1時間煮沸を行った。調理でダシをとるときにこのように長時間煮沸することはないので、ダシをとる程度の短時間の加温時のグルコシダーゼ阻害物質の動態は興味深い。

水産食品の煮沸残渣では乾燥ヒジキで α -グルコシダーゼ阻害性が強かった。今後、水産食品として食後高血糖を抑制する可能性があるかをさらに検討する必要がある。残渣の β -グルコシダーゼ阻害性では、貝類で強く阻害物質の本体がどのような特性をもつのか不明である。

第3節 チロシナーゼ阻害性試験

チロシナーゼ阻害活性試験はペーパーディスクを使用した寒天平板法が海洋細菌のチロシナーゼ阻害性一次スクリーニングに用いられている。⁴⁷⁾ 本実験ではこの寒天平板法により海産生物のチロシナーゼ阻害性をスクリーニングした。

3-1 チロシナーゼ阻害性試験寒天平板法

能勢と幹の方法⁴⁷⁾を参考に、基質として L-チロシンを加えて寒天平板を作製し、酵素反応を行い、生成するメラニンでチロシナーゼ活性をモニターする方法を用いた。

3 mM L-チロシン（和光純薬工業（株））を 20 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）に溶解して、寒天を 2% になるように加え、寒天平板を作製した。200 units/ml チロシナーゼ（マッシュルーム由来、和光純薬工業（株））溶液 0.2 ml を表面に塗抹した。被験物質を任意量チャージできるように有機溶媒または緩衝液に溶解してマイクロシリンジで抗生物質試験用の 8 mm 直径のペーパーディスクにしみこませた。減圧デシケーターで溶媒を留去したペーパーディスクを寒天平板上に置き、25℃、48時間静置して阻害円の有無を確認して、阻害円の直径を測定した。

3-2 結果と考察

寒天平板法による海藻とチュクチ海無脊椎動物のチロシナーゼ阻害試験の結果をTable 2-7に示す。また、相模湾深海生物成分のチロシナーゼ阻害試験の結果をTable 2-8に示す。海藻とチュクチ海無脊椎動物

Table 2-7. Tyrosinase inhibitory activities of the extracts from marine organisms

Sample	Diameter (mm) of inhibitory zone ^a					
	Ethyl acetate-			<i>n</i> -Butanol-		
	soluble fraction			soluble fraction		
	250 ^b	500 ^b	1000 ^b	250 ^b	500 ^b	1000 ^b
[ALGAE]						
3. <i>Hijiki</i>	- ^c	15	17	-	-	-
4. <i>Umitorano o</i>	-	16	18	-	-	-
5. <i>Nebarimo</i>	-	-	13	-	-	-
7. <i>Ezoishige</i>	-	-	-	-	-	-
9. <i>Pirihiba</i>	-	-	-	-	-	-
10. <i>Ezoshikoro</i>	-	-	-	-	-	-
14. <i>Fukurofunori</i>	-	-	-	-	-	-
[INVERTEBRATES]						
16. <i>Okinotezurumozuru</i>	-	-	-	-	-	-
17. <i>Jiigasekinko</i>	-	-	12	-	-	-
18. <i>Akaboya</i>	-	-	-	-	-	-
19. <i>Enagakushieraboya</i>	-	-	-	-	-	-

^a Mean values of two measurements.

^b Dose (μg/disk).

^c No inhibition.

Table 2-8. Tyrosinase inhibitory activities of the extracts from deep-sea organisms

Sample	Diameter (mm) of inhibitory zone ^a					
	5 mg/disk ^b			10 mg/disk ^b		
	E ^c	B ^c	W ^c	E ^c	B ^c	W ^c
21. <i>Haorimushi</i>	13	13.5	- ^d	15	17	-
22. <i>Shiourigai</i>	14.5	-	-	18	-	-

^a Mean values of two measurements.

^b Dose.

^c E, ethyl acetate-soluble fraction; B, *n*-Butanol-soluble fraction; W, residual water-soluble fraction.

^d No inhibition.

では、チロシナーゼ阻害性は褐藻のヒジキ、ウミトラノオ、ネバリモおよびジイガセキンコの酢酸エチル可溶成分で確認できた。500 μ g/ディスクという少量で阻害活性が観察できたヒジキ、ウミトラノオの褐藻酢酸エチル可溶画分はチロシナーゼ阻害物質供給源として有望である。

相模湾深海生物成分のチロシナーゼ阻害性試験の結果、ハオリムシ、シロウリガイ両者の酢酸エチル可溶画分およびハオリムシの*n*-ブタノール可溶画分でチロシナーゼ阻害活性が観察できた。しかし、ディスクあたりの投与量が10倍であるにもかかわらず、ヒジキ、ウミトラノオのチロシナーゼ阻害性試験結果とはほぼ同程度の阻害活性しか示さなかった。深海生物成分ではチロシナーゼ阻害活性が弱い、チュクチ

海産無脊椎動物は阻害性を示さなかったことから、特異な代謝系が存在している可能性があり興味深い。

第4節 抗菌性試験

海産生物の抗菌性スクリーニングを行った。これまでに海産生物に抗菌性に関する研究は数多く行われている。⁵⁵⁻⁶⁰⁾しかし、魚病細菌に対する抗菌性試験の報告は少ないので、魚病細菌を中心に抗菌性をスクリーニングした。

4-1 供試菌

抗菌性試験に用いた微生物をTable 2-9に示す。

Table 2-9. Micro organisms examined

Micro organism	Abbreviation	Japanese name
<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	As	<i>Sakeka-sessobyō-kin</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	Pf	<i>Syudomonasusho-kin</i>
<i>Vibrio anguillarum</i> NC Mb 6	Va	<i>Biburiobyō-kin</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	S	<i>Buri-rensakyukinsho-kin</i>
<i>Escherichia coli</i> O-26	Ec	<i>Daichō-kin</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ao	<i>Nihon koji-kabi</i>

4-2 抗菌性試験方法

(1) 菌の保存培養

Aeromonas salmonicida、*Pseudomonas fluorescens* および *Escherichia coli* 用には、Tryptic soy broth (Difco Laboratories) を 3.0 g/100 mℓ の蒸留水に溶解して、1.2% 濃度になるように寒天を加え斜面培地を作製した。

Vibrio anguillarum 用には、Tryptic soy broth を 3.0 g/100 mℓ および塩化ナトリウムを 0.5% 濃度になるように蒸留水に溶解して、1.2% 濃度になるように寒天を加え斜面培地を作製した。

Streptococcus sp. 用には、Brain heart infusion (Difco Laboratories) を 3.7 g/100 mℓ の蒸留水に溶解して、1.2% 濃度になるように寒天を加え斜面培地を作製した。

Aspergillus oryzae 用には、Potato dextrose agar (Difco Laboratories) を 3.9 g/100 mℓ の蒸留水に溶解して斜面培地を作製した。

それぞれの培地に菌を一白金耳植え継いだあとに 25℃ で培養した。

(2) 抗菌性試験前培養

細菌の場合は各保存培地から寒天を除き、25℃ で 24 時間液体培養した。*A. oryzae* の場合は斜面培地に 48 時間培養した。

(3) 抗菌性試験

抗菌性試験は寒天平板法で行った。直径 9 cm の滅菌シャーレの寒天平板培地を作製した。液体培養液 0.25 mℓ を滅菌ピペットで寒天平板上に移し、コンラージ棒で表面塗抹した。*A. oryzae* の場合は培養した斜面培地に滅菌水を加え白金耳で培養菌体をこすった。菌懸濁液

0.25 ml を滅菌ピペットで寒天平板上に移し、コンラージ棒で表面塗抹した。

濃度既知の海産生物抽出物の有機溶媒溶液を調製し、その20 μ l をシリンジで直径 8 mm の抗生物質試験用ペーパーディスクにチャージした。あわせて、溶媒のみのブランクを用意し、ペーパーディスクを減圧デシケーターに入れ、溶媒を留去した。

寒天平板上にペーパーディスクを置き、25℃で24時間 (*A. oryzae* の場合は48時間) 培養した。抗菌性を示したペーパーディスクのまわりの阻止円の直径を測定した。

4-3 結果と考察

海産生物成分の抗菌性試験の結果をTable 2-10に示す。供試した海藻10種類のうち抗菌性を示したのは5種類であった。2菌株以上の微生物に抗菌性を示したのはアナアオサ、ウミトラノオ及びフジマツモだけであり、強い抗菌性を示す海藻は少なかった。各微生物に対しては、*As*や*Va*に対して抗菌性を示す海藻は4種類あり、*P. fluorescens* および*E. coli* に対して抗菌性を示す海藻はそれぞれ2種類および1種類であり、供試した海藻成分は抗菌性スペクトルが狭かった。長期間繁茂しているウミトラノオやフジマツモで他の海藻より抗菌性が強く、抗菌性物質の供給源として有望だが、既にフジマツモから抗菌性ブロモフェノール⁵²⁾が得られているので、新規化合物の存在する可能性は低いと予想される。

チュクチ海産の無脊椎動物成分では供試した5種類すべての動物で抗菌性が確認できた。これらの動物成分の抗菌性スペクトルは海藻に比べて広く、供試した5菌株のうち、4菌株に抗菌性を示す動物が3種類、3菌株に抗菌性を示す動物が2種類あった。海藻ではあまり抗菌性の現

Table 2-10. Antimicrobial activities of the extracts from marine organisms

Sample	Diameter (mm) of inhibitory zone ^a							
	Extract ^b	Dose ^c	As ^d	Pf ^d	Va ^d	S ^d	Ec ^d	Ao ^d
[ALGAE]								
1. <i>Bouaonori</i>	M	10 ⁻¹	- ^e	-	-	-	-	NT ^f
2. <i>Anaosa</i>	M	10 ⁻¹	13	11.5	12	-	-	NT
3. <i>Hijiki</i>	A	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	NT
4. <i>Umitorano o</i>	A	10 ⁻¹	13	10.5	10	-	-	NT
5. <i>Nebarimo</i>	A	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	NT
6. <i>Kayamonori</i>	M	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	NT
7. <i>Ezoishige</i>	A	10 ⁻¹	11	-	-	-	-	NT
9. <i>Pirihiba</i>	M	10 ⁻¹	-	-	-	-	11.5	NT
11. <i>Ezotsunomata</i>	M	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	NT
13. <i>Fujimatsumo</i>	M	10 ⁻¹	11	-	23	12.5	-	NT
[INVERTEBRATES]								
16. <i>Okinotezurumozuru</i>	A	10 ⁻¹	10.5	-	11.5	9.5	11	NT
17. <i>Jiigasekinko</i>	A	10 ⁻¹	-	-	9	12	8.5	NT
18. <i>Akaboya</i>	A	10 ⁻¹	10	-	9	10	-	NT
19. <i>Enagakushieraboya</i>	A	10 ⁻¹	10	8.5	-	12	10.5	NT
20. <i>Giboshimushi</i>	A	10 ⁻¹	11	-	9	11	10.5	NT

(continued)

21. <i>Haorimushi</i>	E	5	13	19	10.5	NT	-	8.5
		10	20.5	18	11	NT	-	11
	B	5	11	-	-	NT	-	-
		10	11	-	-	NT	-	-
	W	5	-	-	-	NT	-	-
		10	-	-	-	NT	-	-
22. <i>Shiourigai</i>	E	5	13.5	15	10.5	NT	-	8.5
		10	18	18	10.5	NT	-	10
	B	5	12.5	-	-	NT	-	-
		10	11	-	-	NT	-	-
	W	5	-	-	-	NT	-	-
		10	-	-	-	NT	-	-

^a Mean values of two measurements.

^b M, methanol extract; A, acetone extract; E, ethyl acetate-soluble fraction of the organic solvent extract; B, *n*-butanol-soluble fraction of the organic solvent extract; W, residual water-soluble fraction of the organic solvent extract.

^c 10-1, solvent was added to the extract of a proportion of 1 ml/10 g fresh weight; 5, 5 mg/disk; 10, 10 mg/disk.

^d As, *Aeromonas salmonicida*; Pf, *Pseudomonas fluorescens*; Va, *Vibrio anguillarum*; S, *Streptococcus* sp.; Ec, *Escherichia coli*; Ao, *Aspergillus oryzae*.

^e No inhibition.

^f Not tested.

れなかった *E. coli* に対しても阻害性を示す動物が多かった。チュクチ海産生物なので成分研究例が少なく、新規化合物が存在する可能性が高い。生物自体は多量に採集できないが、抗菌性物質のリード化合物としての研究が期待できる。

相模湾深海生物のハオリムシ、シロウリガイともに、*A. salmonicida* に対して酢酸エチル可溶画分および *n*-ブタノール可溶画分が、*P. fluorescens*、*V. anguillarum*、*E. coli* および *A. oryzae* に対して酢酸エチル可溶画分がそれぞれ抗菌性を示した。各画分の阻害円直径はハオリムシとシロウリガイ間ではほぼ同じ値を示した。これらの生物は深海の冷水湧出口付近に生息し、そこから出てくる硫黄化合物をエネルギー源としており共生微生物の存在が示唆または確認されている。⁵⁴⁾ 同一地区からこれらの生物は採集されているので、共生細菌は同一種類であると予想され、これらの生物が示す抗菌活性の本体化合物は共生細菌が生産している可能性が高い。これら特殊環境で生息している生物代謝産物は新規な構造を有している場合が多く今後の研究対象として重要である。

第3章 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害性物質の特性

第2章第1節において、 α -グルコシダーゼに阻害性を示す海藻が多く、その中には食用に利用されている海藻も含まれていた。 α -グルコシダーゼ阻害により食後高血糖抑制効果が期待できるので、 α -グルコシダーゼ阻害物質を含む食用海藻は糖尿病患者用の病態対応食品として利用できる。

ヒジキは食物繊維を多量に含み、小腸でのグルコースの吸収を緩慢化させることも知られている。²⁾ α -グルコシダーゼ阻害成分をヒジキから単離して、その栄養学的効果が明らかになれば、小腸内での急激なグルコースの消化・吸収抑制に対して協力作用を行っている可能性が考えられる。そこで、ヒジキの α -グルコシダーゼ阻害成分を検討した。

第1節 分析機器およびクロマトグラフィー

1-1 使用分析機器

本研究で使用した分析機器は以下の通りである。

(1) 赤外吸光光度計 (IR)

Perkin-Elmer System 2000 FT-IR Spectrophotometer

Perkin-Elmer

(2) 紫外可視吸光光度計 (UV-VIS)

HITACHI U-2000 Spectrophotometer

日立製作所(株)

(3) 質量分析計 (MS)

高速原子衝突マスペクトル (FAB-MS)

JEOL JMS-DX-300 Mass Spectrometer 日本電子(株)

(4) 核磁気共鳴分光計 (NMR)

BRUKER AM-500 NMR Spectrometer Bruker

JEOL JNM-FX90Q NMR Spectrometer 日本電子(株)

(5) 旋光計

JASCO DIP-370 Digital Polarimeter 日本分光(株)

1-2 クロマトグラフィー

(1) カラムクロマトグラフィー

シリカゲル Wakogel C-100 和光純薬工業(株)

セファデックス LH-20 Sephadex LH-20 Pharmacia

(2) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層クロマトグラム (Kieselgel 60 F₂₅₄, E. Merck) 上のスポットの検出には、糖呈色試薬のオルシノール-硫酸、⁶¹⁾ 含硫化合物検出のためのアズール A⁶²⁾ を用いた。TLC板のスケッチにはスポットを実線で示し、色調はその都度示した。

(3) ガスクロマトグラフィー (GC)

ガスクロマトグラフィーの測定条件を Table 3-1 に示す。

Table 3-1. The gas chromatographic condition under this study

Instrument:	HITACHI 163 Gas Chromatograph
Data processor:	HITACHI D-2500 Chromato-integrator
Column:	G-300 polyethylene glycol 20M coated capillary column, (1.2 mm i.d.×length 40m, film thickness 0.5 mm), Chemical Inspection and Testing Institute, Japan
Carrier gas:	He
Flow rate:	5 ml/min
Column temperature:	200 °C
Injector temperature:	250 °C
Detector:	FID

第2節 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質の単離

本章で使用したヒジキは食用に利用されている形態を考慮して、市販の乾燥ヒジキを用いた。1994年8月に三重県伊勢産の乾燥ヒジキ 300 gを入手した。

ヒジキから α -グルコシダーゼ阻害性物質を分画する際に第2章第1節に記載の寒天平板法の結果を指標にして阻害物質を分画した。

乾燥ヒジキ 300 g をフーズミル（岩谷産業株式会社）で粉碎し、80% メタノール 5 ℓ を加えて、2 週間室温で抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮した。残渣をさらに 1 週間室温で再抽出・減圧濃縮後に、抽出物をあわせ、30 g のメタノール抽出物を得た。抽出物を酢酸エチル

と水で溶媒分画し、酢酸エチル可溶画分を得た。水層に *n*-ブタノールを加え溶媒分画し、*n*-ブタノール可溶画分を得た。酢酸エチルおよび *n*-ブタノール可溶画分はそれぞれ無水硫酸ナトリウムで乾燥・減圧濃縮した。水層はそのまま濃縮して、水可溶画分を得た (Table 3-2)。

試料量を酢酸エチル可溶画分で 25 mg/ペーパーディスク、*n*-ブタノール可溶画分および水可溶画分で 12.5 mg/ペーパーディスクとし、寒天平板法阻害性試験に供した (Table 3-2)。

各有機溶媒可溶画分の α -グルコシダーゼ阻害性試験の結果、いずれの画分も α -グルコシダーゼ阻害性を示し、*n*-ブタノール画分で最も強い阻害性を示したので、この画分から阻害物質を精製した。

ヒジキの *n*-ブタノール可溶画分 3.3 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー 500 g (ϕ 6.0 cm $\times$ h 37.5 cm) に供した。クロマトグラフィーで分画した画分 (Table 3-3) を TLC で分析した (Fig. 3-1)。さらに、各画分を寒天平板法による α -グルコシダーゼ阻害性試験に供した (Table 3-4)。

α -グルコシダーゼ阻害性試験の結果、H1-8 および 9 画分に阻害活性が認められ、他の画分には存在しないオルシノール (特級、和光純薬工業 (株)) - 硫酸 および アズール A (ナカライテスク (株)) 呈色試薬に陽性なスポット (A) および (B) が存在した。H1-8 および 9 画分をあわせ、H1-8-9 画分 (2.24 g) とした。

H1-8-9 画分をさらにセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーで H2-1 ~ 30 画分に分画し (Table 3-5)、各画分を TLC で分析した (Fig. 3-2)。H2-1 ~ 6 および H2-24 ~ 30 画分には呈色スポットを確認できなかったが、H2-11 ~ 16 画分にオルシノール-硫酸 および アズール A の呈色試薬いずれにも呈色したスポット (A) および (B) を認めた。これらをまとめて H2-11-16 画分 (804.6 mg) とした。

Table 3-2. Yields and inhibitory activities of each organic solvent-soluble fraction against α -glucosidase

Fraction	Yield ^a (g)	Dose (mg/disk)	Diameter (mm) of the inhibitory zone ^b
Ethyl acetate	5.6	25	19
<i>n</i> -Butanol	3.3	12.5	25.5
Water	19.5	12.5	14.5

^aYields of dried matter obtained from a series of solvent partitioning of methanol extracts from *hijiki*.

^bMean values of two measurements.

Table 3-3. Silica gel chromatography of the *n*-butanol-soluble fraction obtained from *hijiki*

Fraction	Eluent	Volume
H1-1~2	CHCl ₃	500 ml x2
H1-3~4	CHCl ₃ : methanol (9:1)	500 ml x2
H1-5~6	CHCl ₃ : methanol (3:1)	500 ml x2
H1-7~10	CHCl ₃ : methanol (1:1)	500 ml x4
H1-11~14	Methanol	500 ml x4

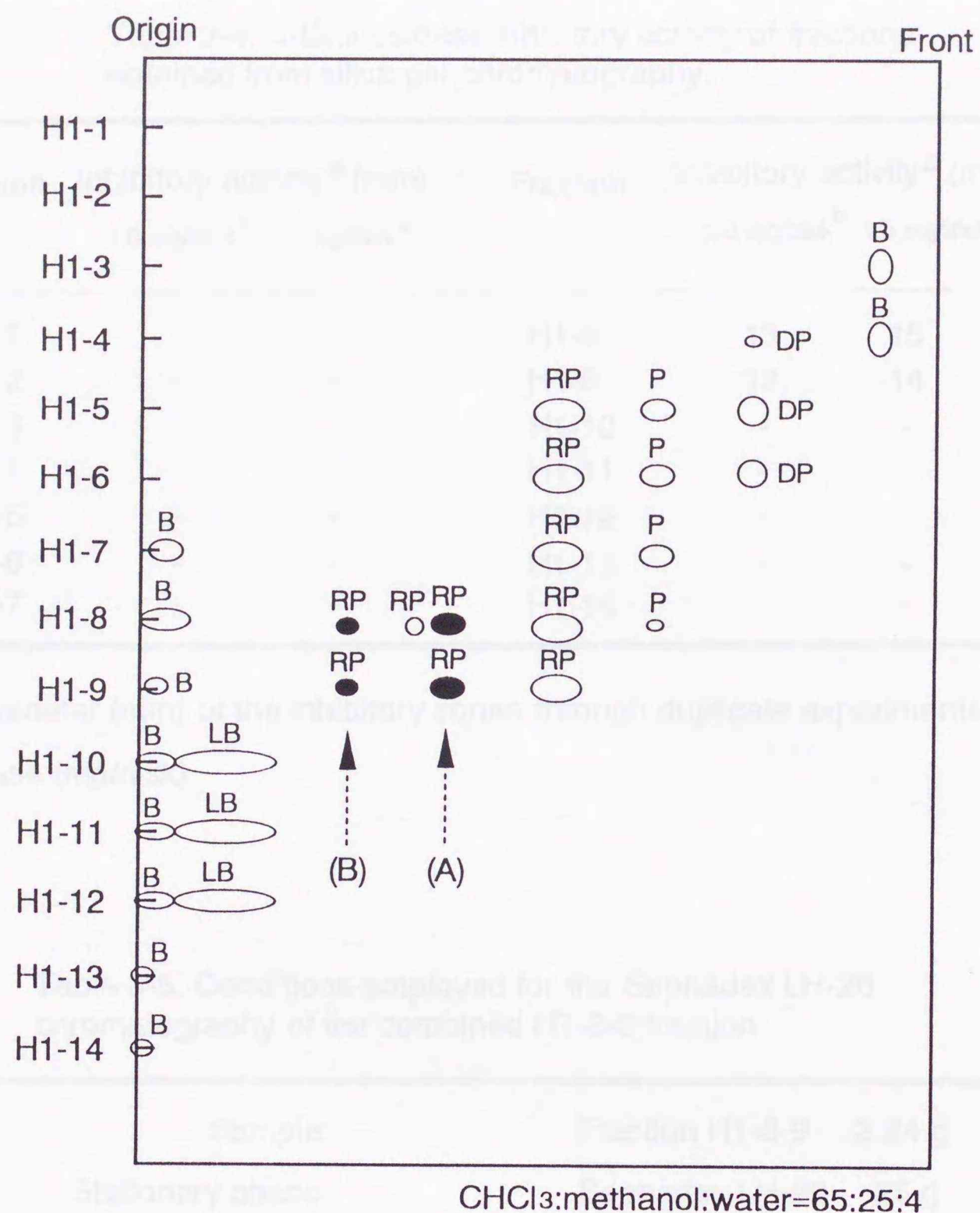


Fig. 3-1. Thin layer chromatogram of the fractions obtained from silica gel column chromatography of *n*-butanol-soluble fraction.

○, Visualized using the orcinol-sulfuric acid reagent: G, green; DP, dark purple; P, purple; RP, red purple; B, blue; LB, light blue. ●, Positive for the azure A reagent.

Table 3-4. α -Glucosidase inhibitory activity of fractions obtained from silica gel chromatography.

Fraction	Inhibitory activity ^a (mm)		Fraction	Inhibitory activity ^a (mm)	
	1.0 mg/disk ^b	1.5 mg/disk ^b		1.0 mg/disk ^b	1.5 mg/disk ^b
H1-1	-	-	H1-8	13	15
H1-2	-	-	H1-9	13	14
H1-3	-	-	H1-10	-	-
H1-4	-	-	H1-11	-	-
H1-5	-	-	H1-12	-	-
H1-6	-	-	H1-13	-	-
H1-7	-	-	H1-14	-	-

^a Diameter (mm) of the inhibitory zones through duplicate experiments.

^b Dose (mg/disk)

Table 3-5. Conditions employed for the Sephadex LH-20 chromatography of the combined H1-8-9 fraction

Sample:	Fraction H1-8-9	2.24 g
Stationary phase:	Sephadex LH-20	25 g (ϕ 2.0 cm $\times$ h 17 cm)
Eluting solvent:	Methanol	
Flow rate:	1 ml/min	
Fraction volume:	5 ml	

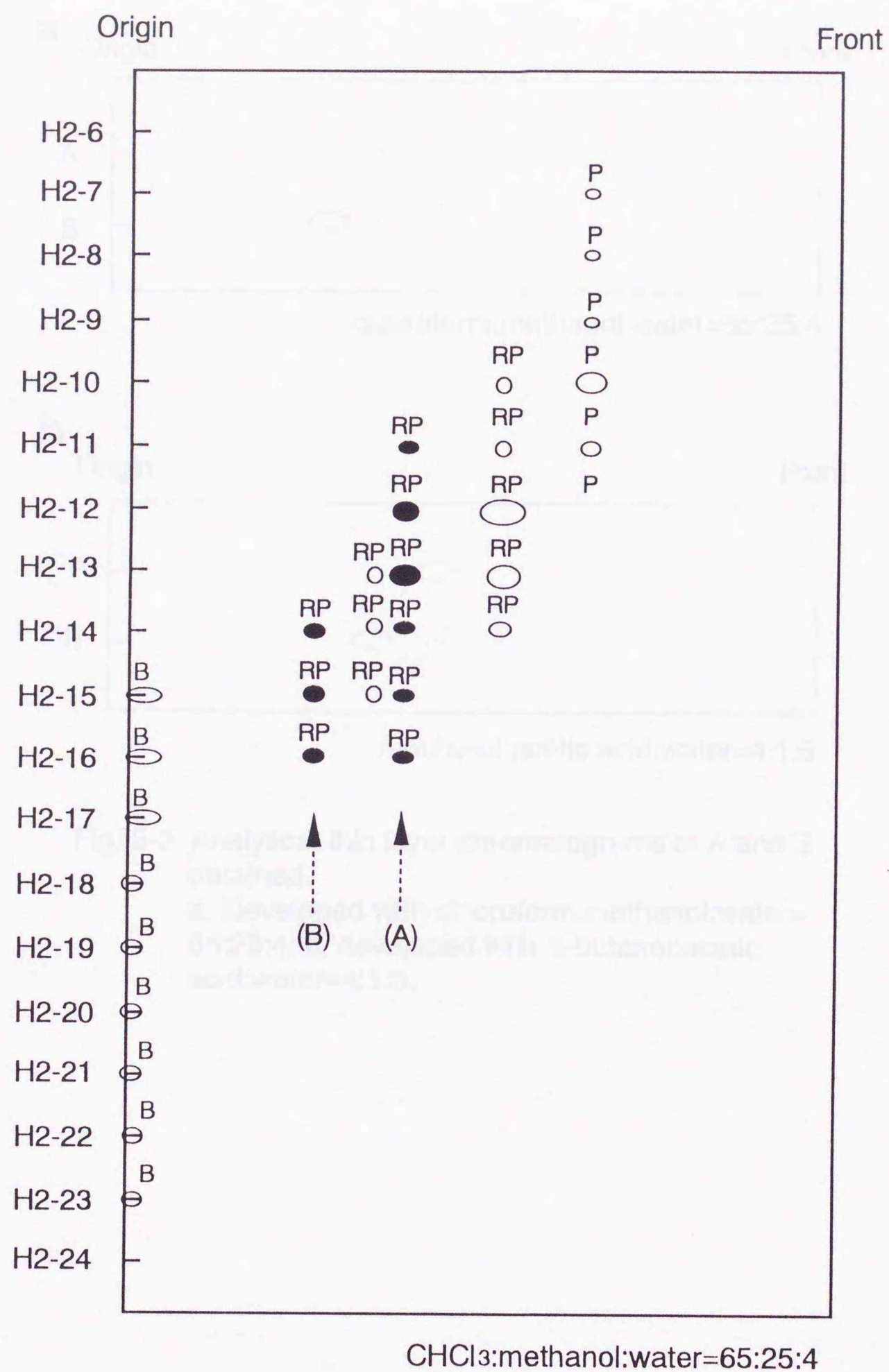


Fig. 3-2. Thin layer chromatogram of the fractions obtained from Sephadex LH-20 column chromatography.

○, Visualized using the orcinol-sulfuric acid reagent: P, purple; RP, red purple; B, blue. ●, Positive for the azure A reagent.

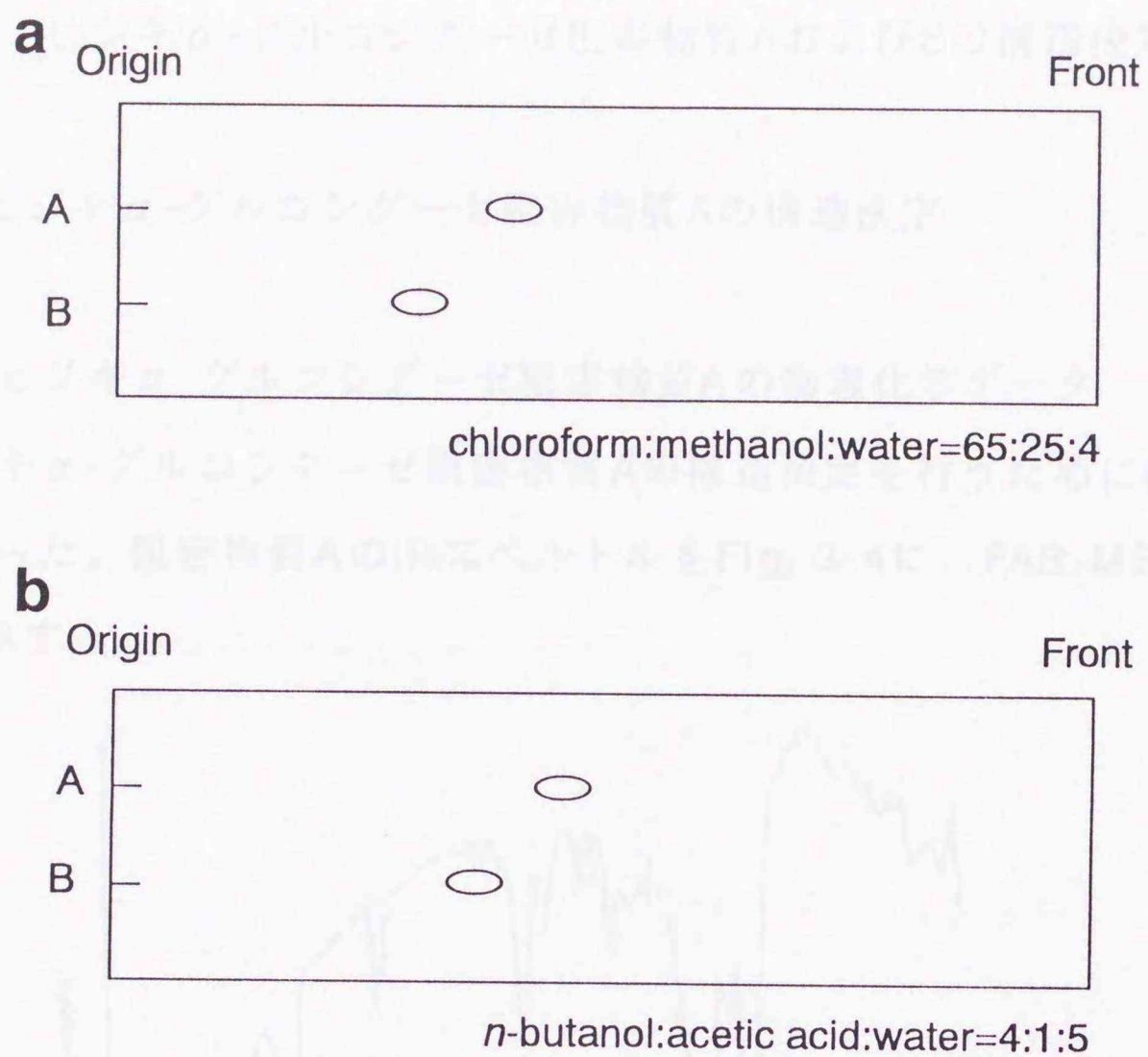


Fig. 3-3. Analytical thin layer chromatograms of A and B obtained.

a, Developed with chloroform:methanol:water=65:25:4; b, developed with *n*-butanol:acetic acid:water=4:1:5.

第3節 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質AおよびBの構造決定

3-1 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの構造決定

(1) ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの物理化学データ

ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの構造決定を行うために機器分析を行った。阻害物質AのIRスペクトルをFig. 3-4に、FAB-MSをFig. 3-5に示す。

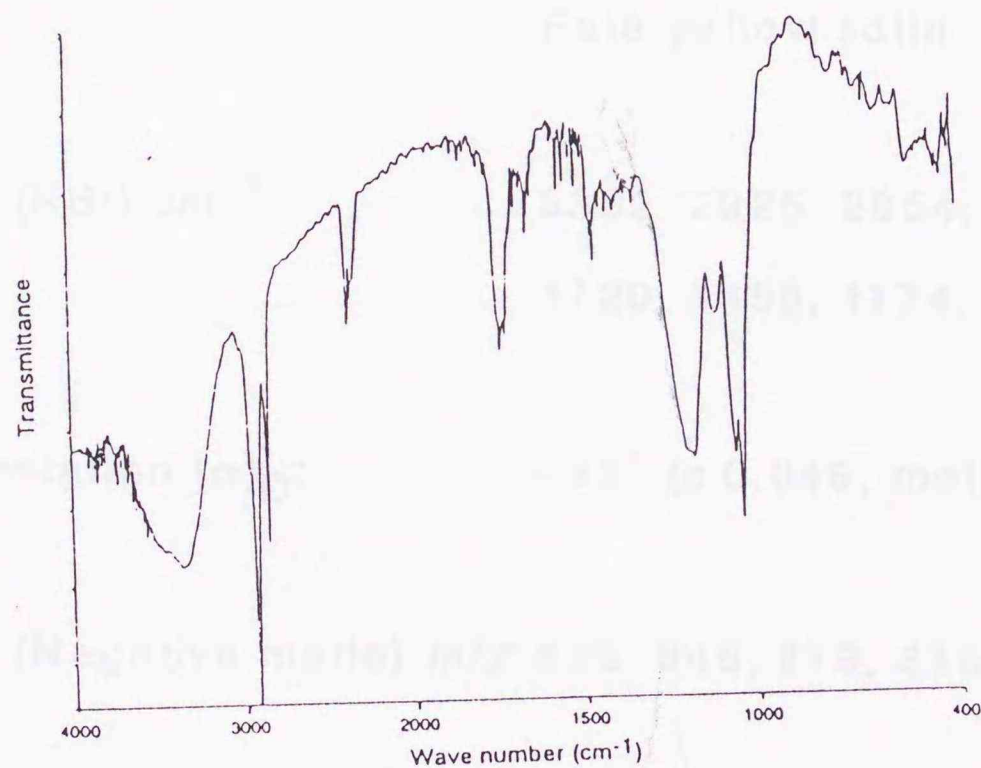


Fig. 3-4. IR spectrum of inhibitor A.

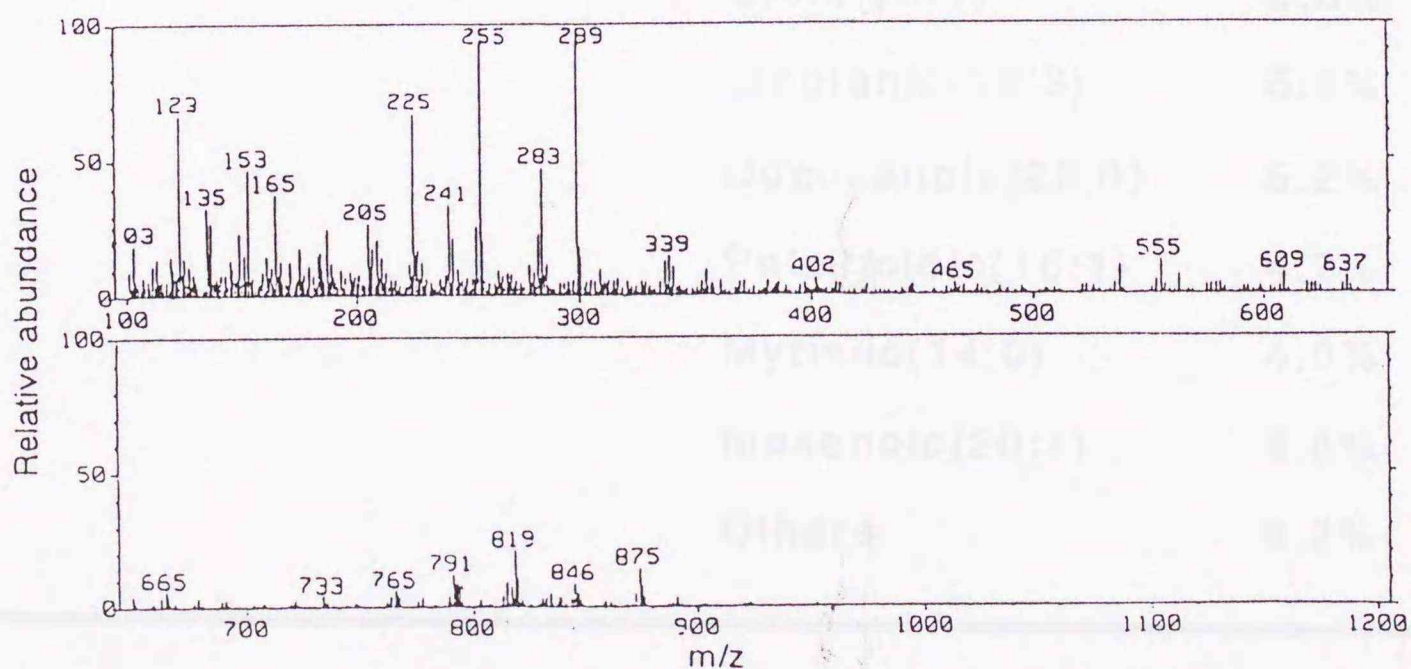


Fig. 3-5. Fast atom bombardment mass spectrum of inhibitor A.

阻害物質Aを 2 N-水酸化ナトリウム／メタノールによりメタノリシスしたところ、脂肪酸メチルエステル混合物が得られたので、この脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーによって求めた。阻害物質Aの機器分析データおよび物理化学的性質をTable 3-6に示す。

Table 3-6. Physicochemical properties of inhibitor A

Pale yellow solid		
IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} :	3362, 2925, 2854, 2366, 1735, 1720, 1458, 1174, 1035.	
Optical rotation $[\alpha]_D$:	+33° (c 0.045, methanol)	
FAB-MS (Negative mode) m/z :	875, 846, 819, 815, 765.	
GC:	Palmitic(16:0)	56.6%
	Oleic(18:1)	9.6%
	Linolenic(18:3)	6.9%
	Docosanoic(22:0)	5.2%
	Palmitoleic(16:1)	4.7%
	Myristic(14:0)	4.0%
	Icosenoic(20:1)	3.8%
	Others	9.2%

阻害物質AのIRスペクトルでは、 3362 cm^{-1} のブロードなO-H伸縮ピーク、 2925 cm^{-1} の飽和のC-H伸縮ピーク、 1735 cm^{-1} 、 1720 cm^{-1} のC=O伸縮ピーク、 1174 cm^{-1} 、 1035 cm^{-1} のスルホン酸塩ピーク⁶³⁾が認められた。旋光度はプラスの旋光性を示した。FAB-MSでは複数のイオンピークが検出された。イオンピーク間の差は29、27、4および50マスユニットであり、阻害物質Aはメタノリシスにより脂肪酸メチルエステル混合物を与えることから、分子種の異なる脂質誘導体の混合物と推定した。GCにより脂肪酸組成を調べた結果、パルミチン酸が56.6%と高く、他の脂肪酸は10%以下だった。

(2) ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの1次元NMRスペクトル

ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの ^1H -NMRスペクトル (Fig. 3-6) と ^{13}C -NMRスペクトル (Fig. 3-7) を測定した。 ^1H -NMRスペクトルから、0.89 ppmにアルキル末端メチルプロトン、1.28 ppmに巨大なアルキルメチレンプロトン、1.59~2.81 ppmにエステルの α および β 位プロトンや二重結合のアリル位プロトン、5.36 ppmにオレフィンプロトンの存在が明らかとなった。これらのシグナルは脂質の脂肪酸残基部分に由来する。 ^{13}C -NMRスペクトルでもアルキル末端メチルカーボン、アルキルメチレンカーボン、エステルカーボン、アリル位カーボン、オレフィンカーボンが確認できた。

残りの12種類のプロトンシグナルおよび9種類のカーボンシグナルはそのケミカルシフトからヘテロ原子に隣接するメチレンおよびメチンシグナルであると推定できた。

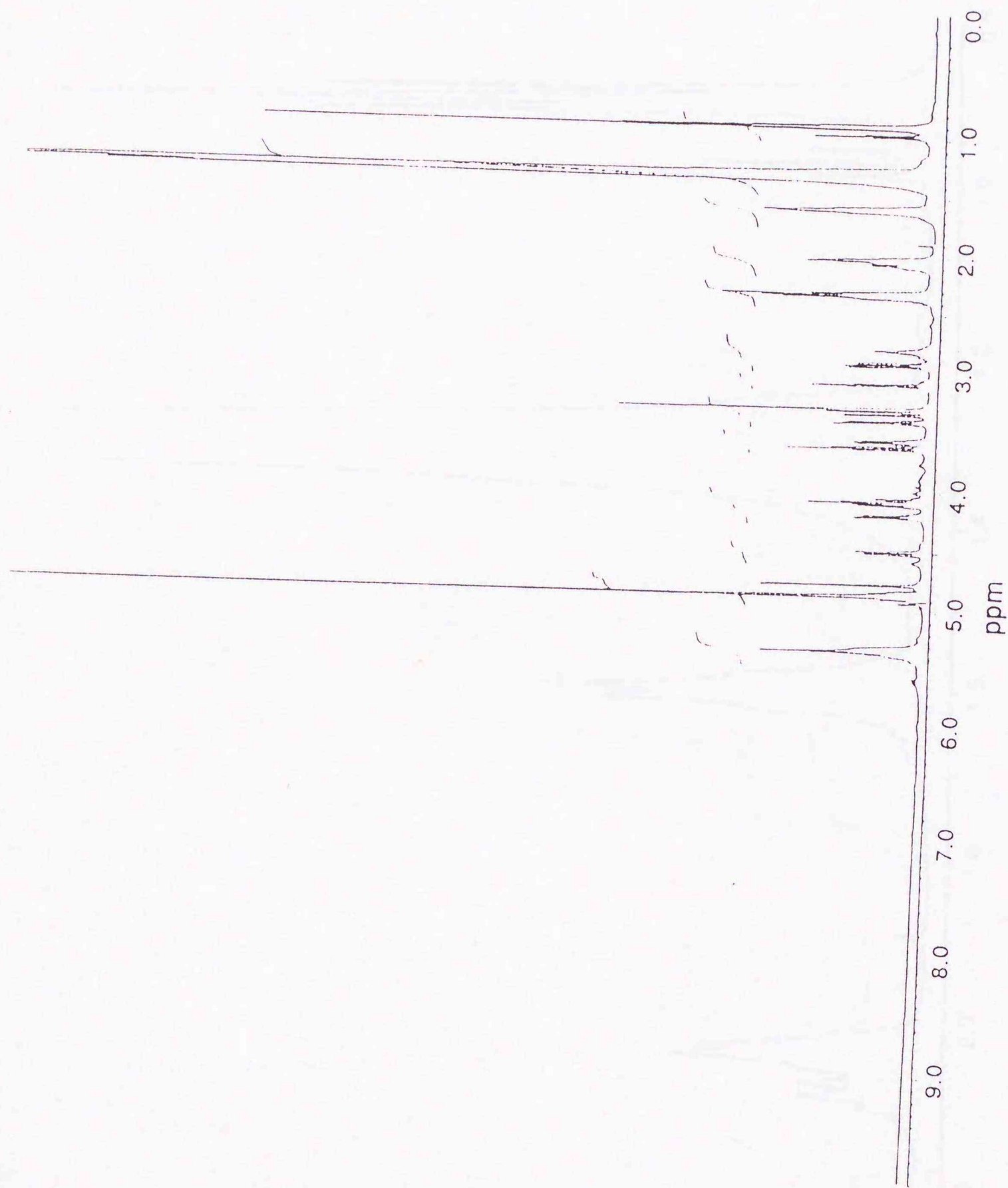


Fig. 3-6a. ^1H -NMR spectrum of inhibitor A.

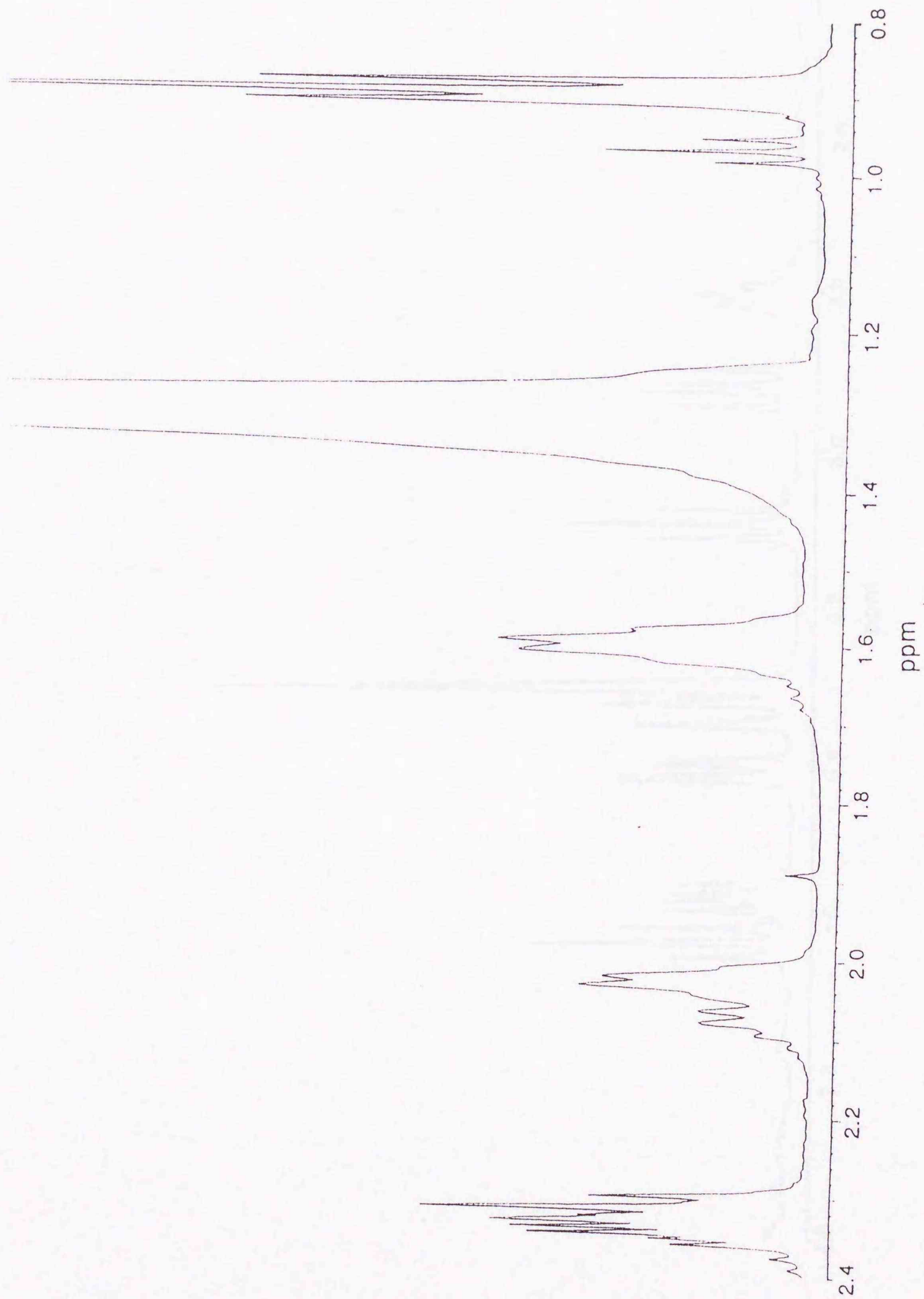


Fig. 3-6b. Expansion of ^1H -NMR spectrum of inhibitor A.

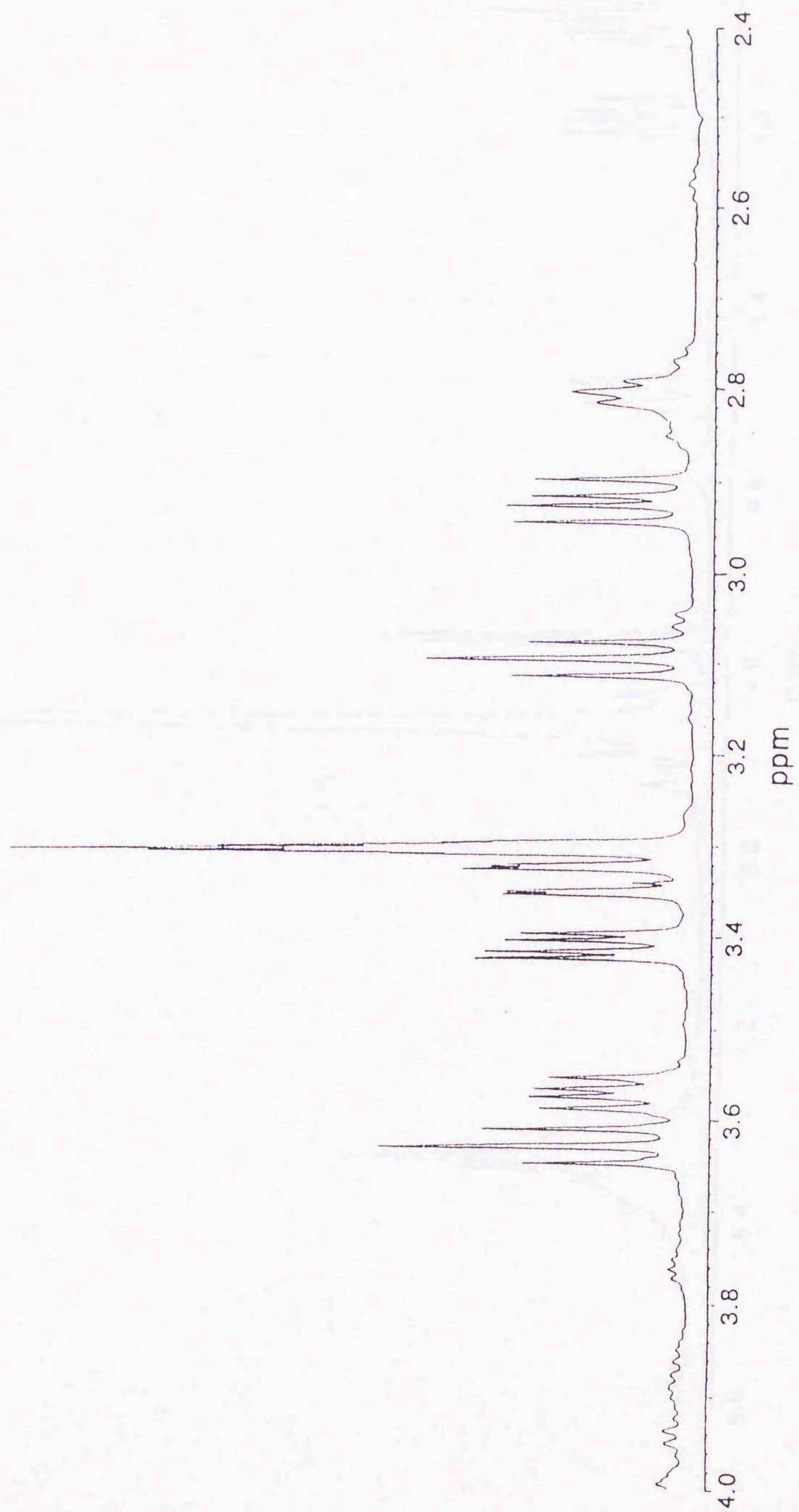


Fig. 3-6c. Expansion of ^1H -NMR spectrum of inhibitor A.

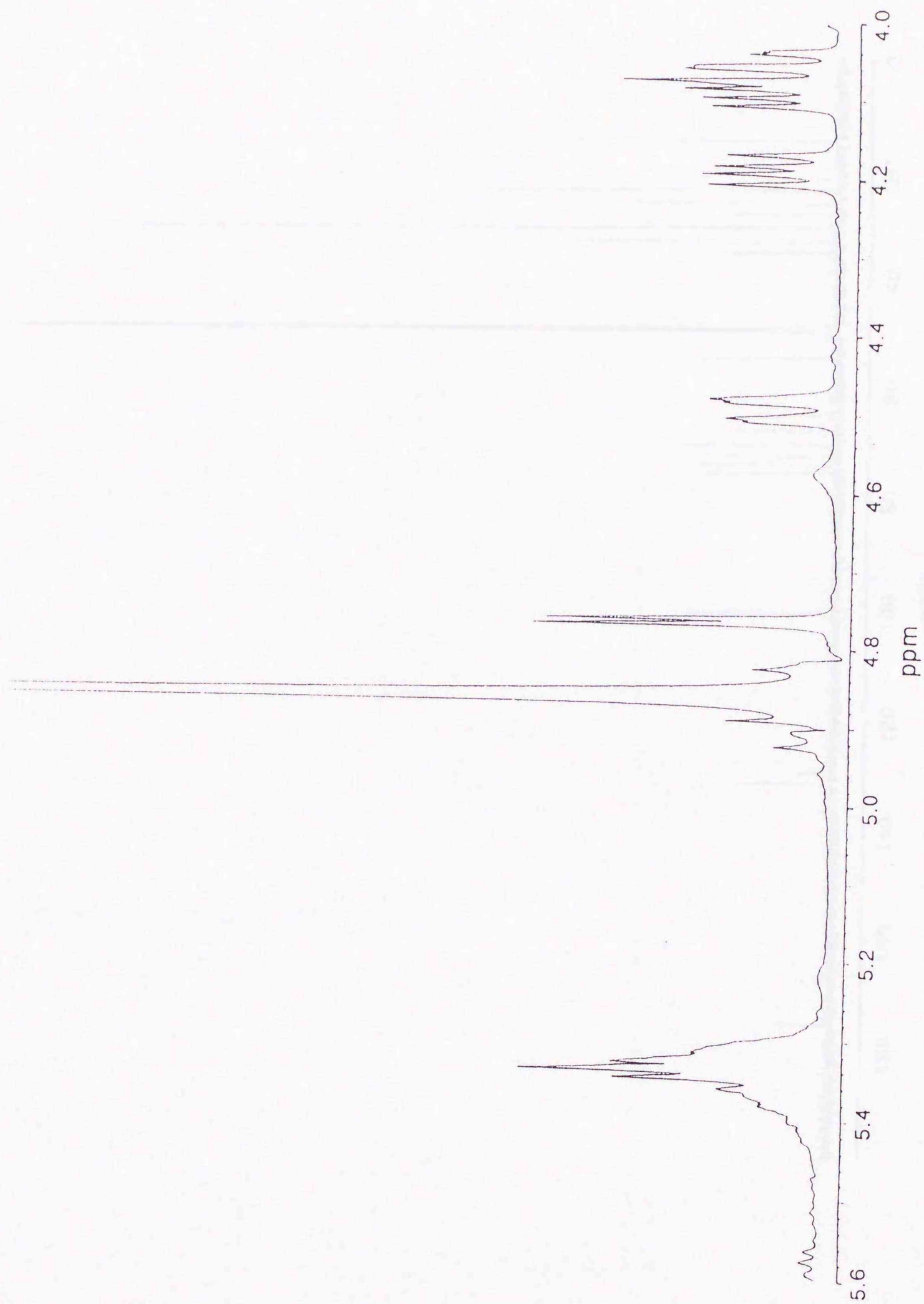


Fig. 3-6d. Expansion of ^1H -NMR spectrum of inhibitor A.

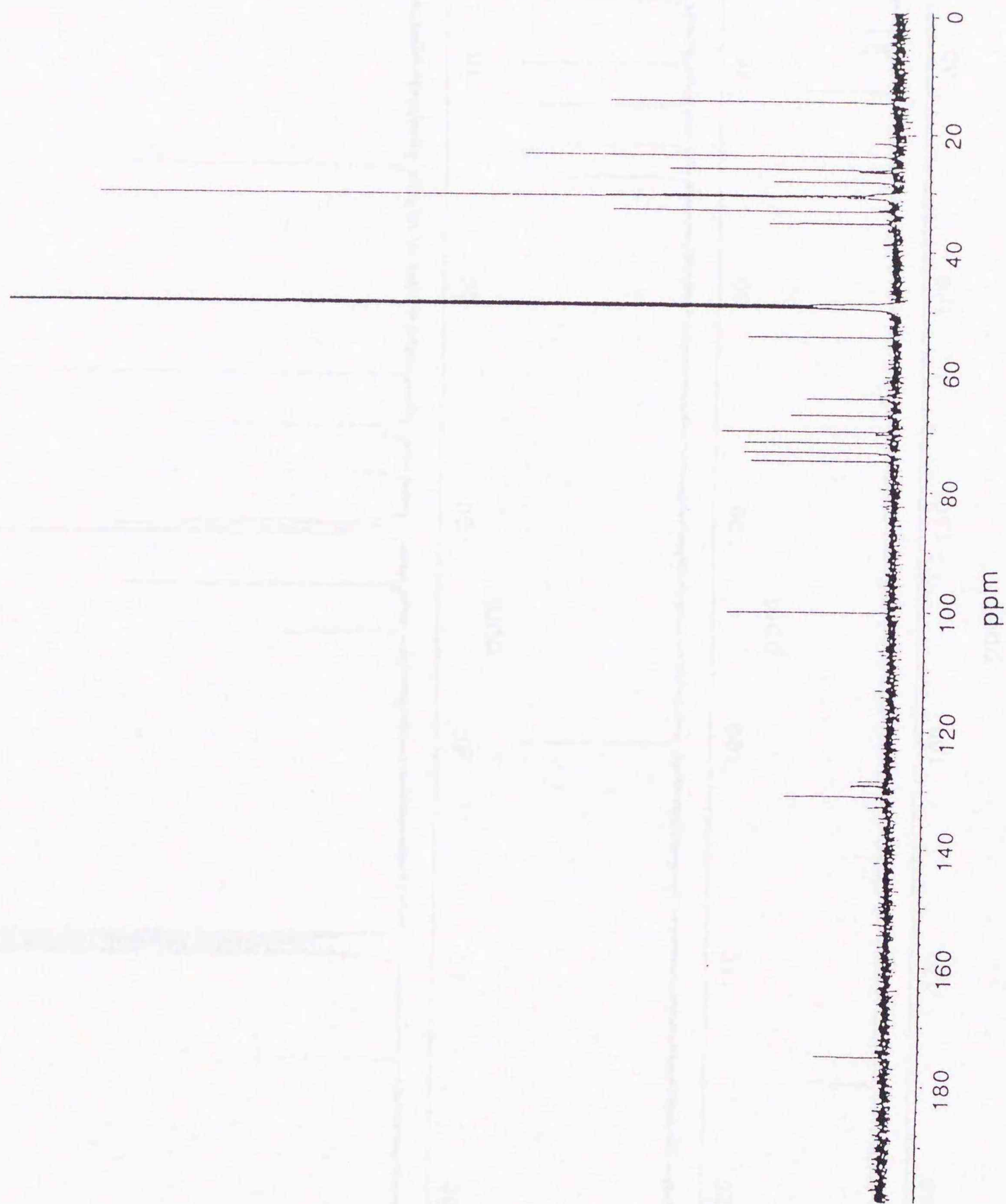


Fig. 3-7a. ^{13}C -NMR spectrum of inhibitor A.

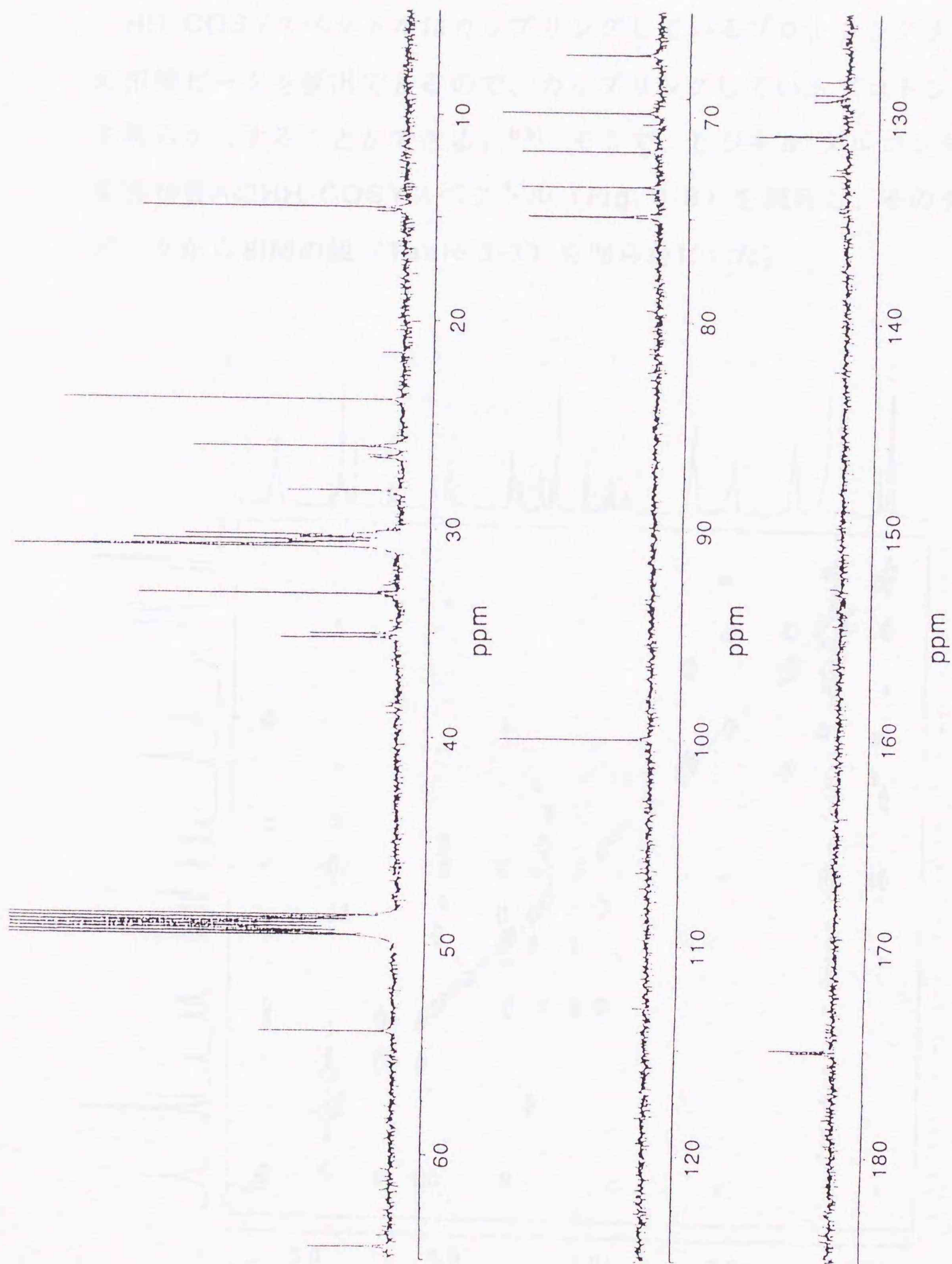


Fig. 3-7b. Expansion of ^{13}C -NMR spectrum of inhibitor A.

(3) ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの2次元NMRスペクトル

HH-COSYスペクトルはカップリングしているプロトンシグナル間の相関ピークを検出できるので、カップリングしているプロトンの組を明らかにすることができる。⁶³⁾ そこで、ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質AのHH-COSYスペクトル (Fig. 3-8) を測定し、そのクロスピークから相関の組 (Table 3-7) を明らかにした。

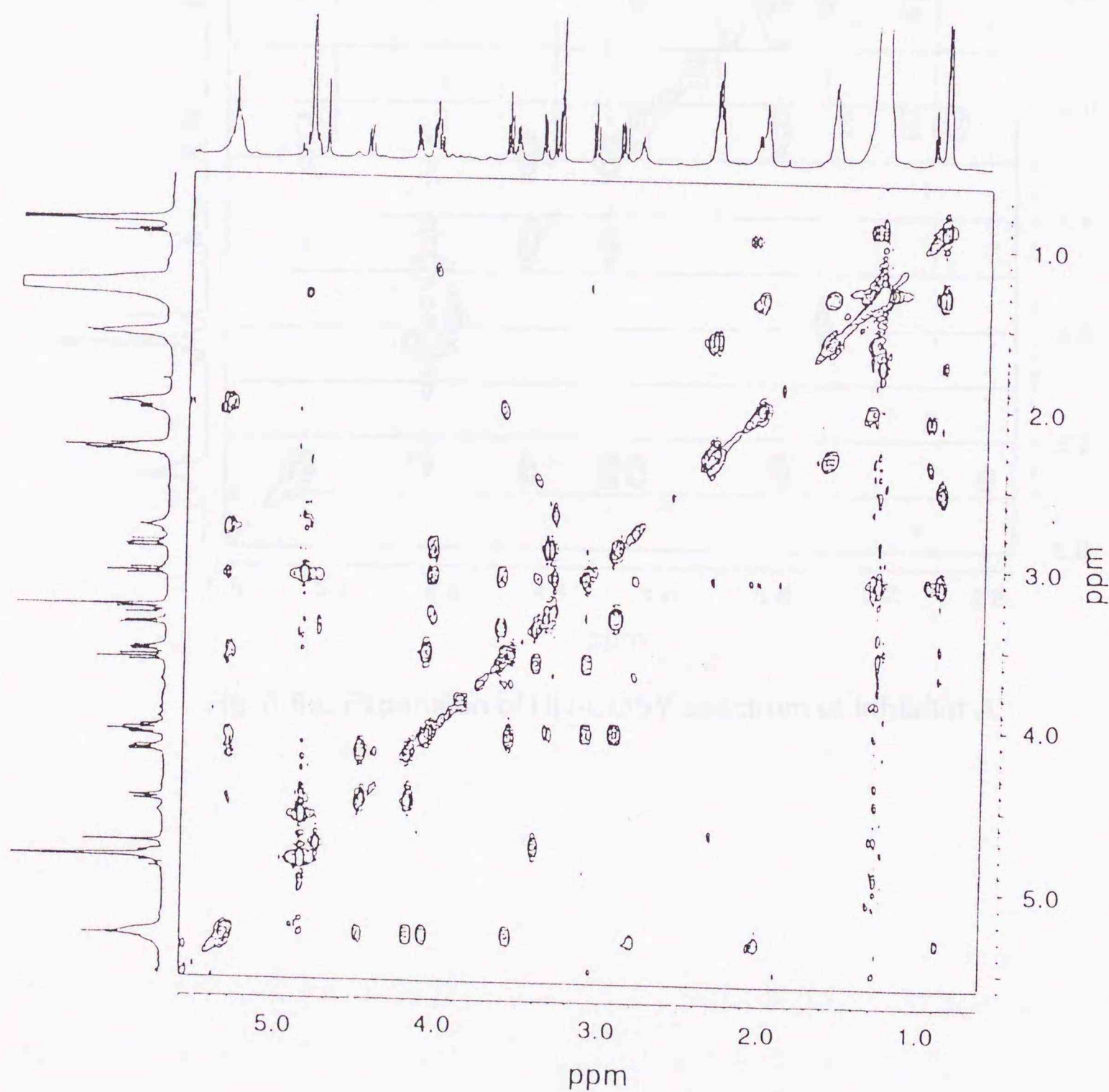


Fig. 3-8a. HH-COSY spectrum of inhibitor A.

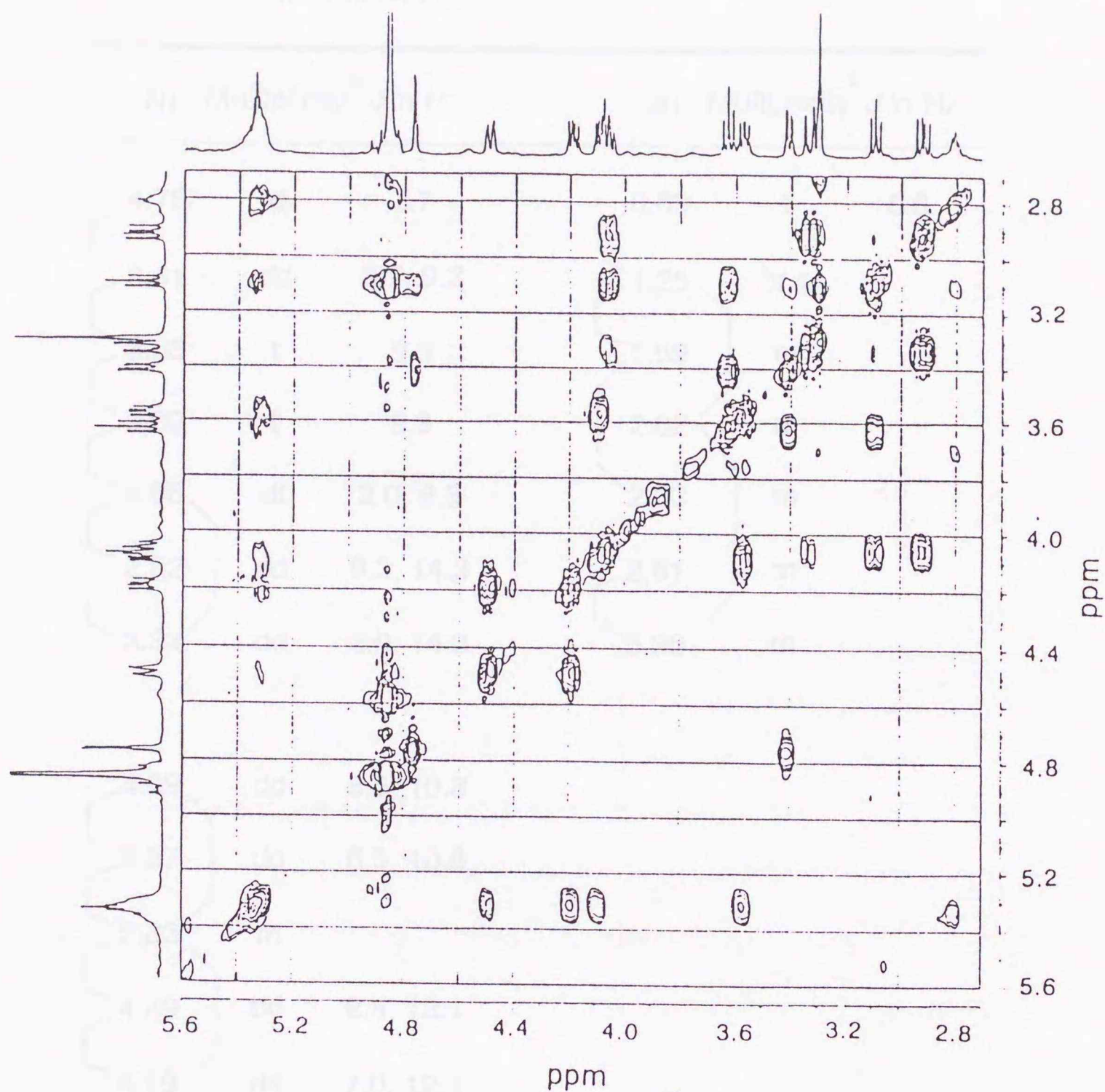


Fig. 3-8b. Expansion of HH-COSY spectrum of inhibitor A.

Table 3-7. Correlations disclosed in cosideration of HH-COSY
of inhibitor A

δ_H	Multiplicity ^a	J in Hz	δ_H	Multiplicity ^a	J in Hz
4.76	d	3.7	0.89	t	6.8
3.41	dd	3.7, 9.3	1.28	br.s	
3.63	t	9.3	1.59	m	
3.09	t	9.3	2.02	m	
4.06	dt	2.0, 9.3	2.33	m	
2.92	dd	9.3, 14.3	2.81	m	
3.33	dd	2.0, 14.3	5.36	m	
4.09	dd	5.5, 10.8			
3.57	dd	6.3, 10.8			
5.33	m				
4.49	dd	2.4, 12.1			
4.19	dd	7.0, 12.1			

^a br.s, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets;
t, triplet; dt, doublet of triplets; m, multiplet.

HH-COSYスペクトルの結果から、4.76～2.92 ppmに酸素が置換した7つの連続するプロトンのグループ、3.57～4.49 ppmに酸素が置換した5つの連続するプロトンのグループおよび0.89～5.36 ppmにアルキルおよびアルケンに由来するプロトンのグループに分けることができた。0.89～5.36 ppmのグループでは、1.59 ppmのプロトンは1.28

および2.33 ppmのプロトンと相関がみられることやそれらのケミカルシフトから、2.33 ppmおよび1.59 ppmのプロトンをそれぞれエステルの α および β 位のプロトンと帰属した。5.36 ppmのプロトンをそのケミカルシフトからオレフィンプロトンと帰属した。5.36 ppmのプロトンにカップリングしている2.02 ppmおよび2.81 ppmのシグナルは、それぞれモノエン構造のアリル位プロトンおよび1,4-ペンタジエン構造の3位プロトンと帰属できた。⁶⁴⁾

HMQCスペクトルは異種核間カップリング ($1J_{CH}$)、すなわち、直接つながったH-C相関をプロトン核側で観察する方法である。⁶⁵⁾ ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質AのHMQCスペクトルを測定し (Fig. 3-9)、H-C相関の組 (Table 3-8) を明らかにした。

54.2、67.1および64.3 ppmのカーボンはそれぞれ非等価メチレンである。67.1、71.7および64.3 ppmのカーボンはそれらのケミカルシフトからメチレン-メチン-メチレンとつながるグリセロール骨格のシグナルと同定した。炭素6個とプロトン7個のもう一つのグループにはそれらのケミカルシフトからヘテロ原子が置換しており、そのグループを六炭糖と推定した。 δ_C 100.0および δ_H 4.76のシグナルは他のシグナルより低磁場側にあり、糖のアノマー位のシグナルと帰属した。アノマー位を1位としたときに、2位から5位までのプロトン間の結合定数9.3 Hzだった。この値は6員環がイス型立体配座をとっているときのアキシャル-アキシャルプロトンカップリングに特徴的であり、糖をグルコピラノース型と推定した。アノマー位のケミカルシフトおよび結合定数 (3.7 Hz) から、立体配置を α 配置と決定した。⁶⁶⁾ そこで、メチル- α -D-グルコピラノシドのケミカルシフト⁶⁶⁾と比較したところ

(Table 3-9)、6位のプロトンおよびカーボンシグナルでケミカルシフトが異なり、阻害物質Aでシグナルが高磁場シフトしていた。アズー

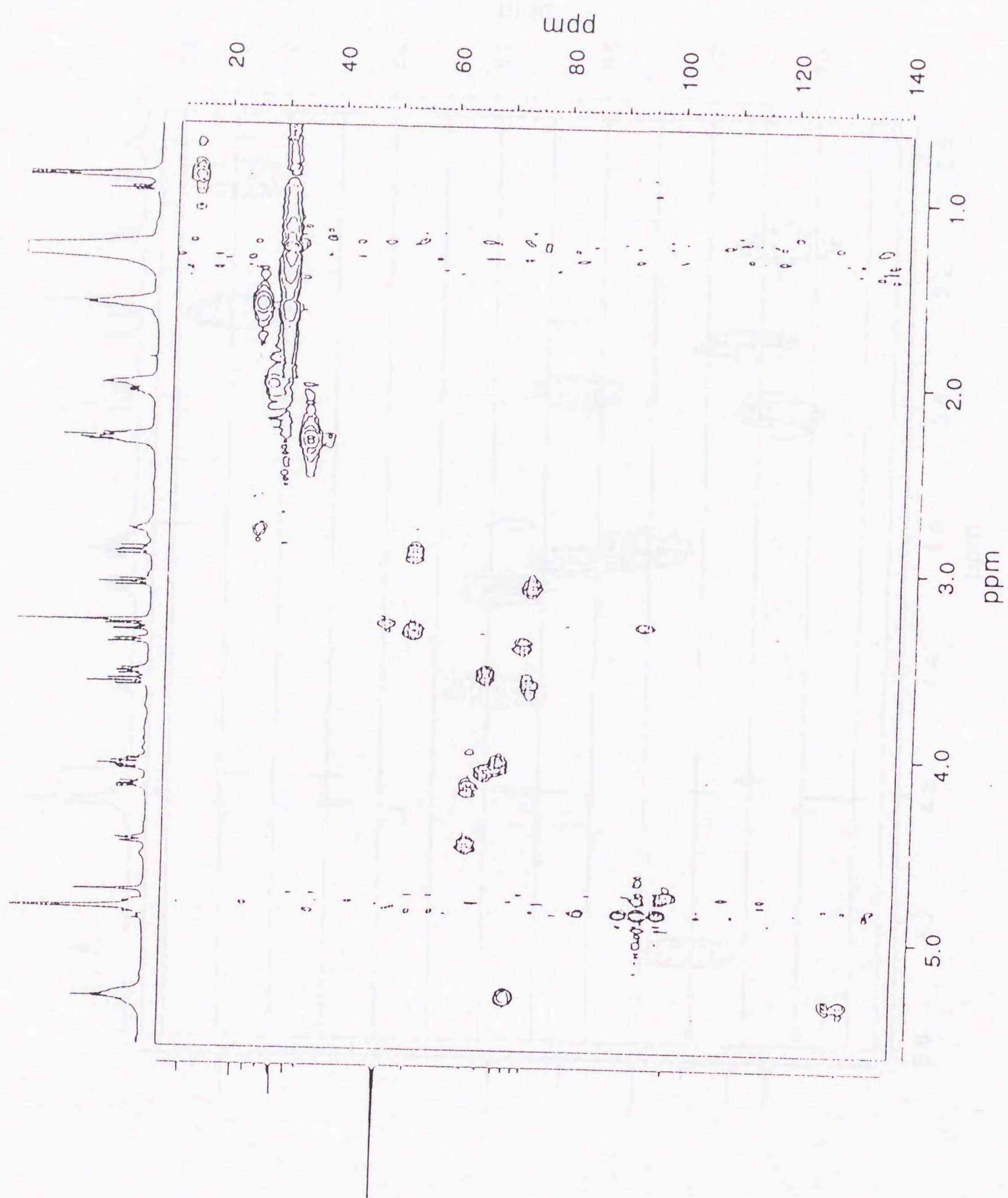


Fig. 3-9a. HMQC spectrum of inhibitor A.

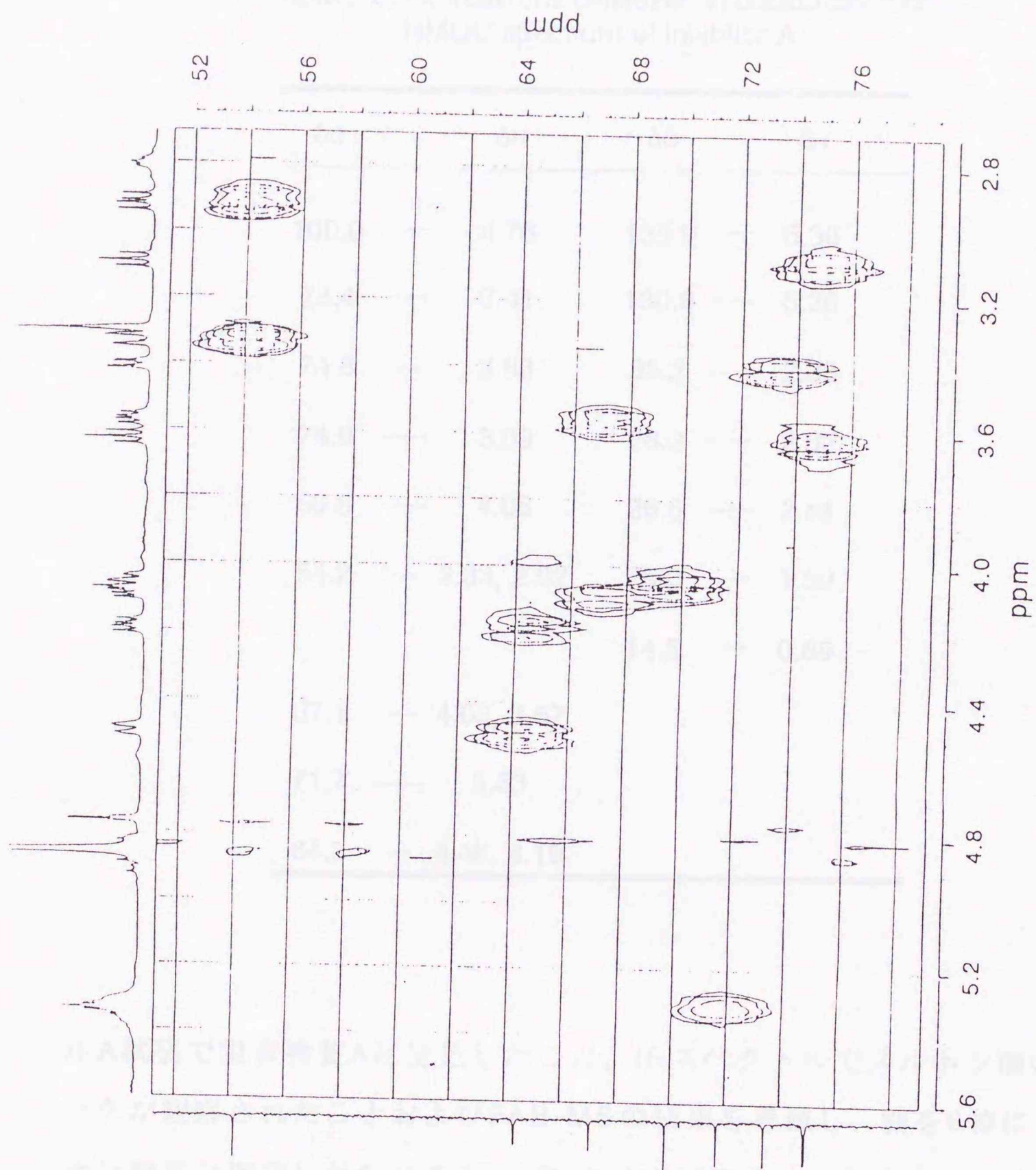


Fig. 3-9b. Expansion of HMQC spectrum of inhibitor A.

Table 3-8. Correlations disclosed in cosideration of
HMQC spectrum of inhibitor A

δC		δH	δC		δH
100.0	—	4.76	130.9	—	5.36
73.4	—	3.41	130.8	—	5.36
74.8	—	3.63	35.2	—	2.33
74.9	—	3.09	28.2	—	2.02
69.8	—	4.06	26.6	—	2.81
54.2	—	3.33, 2.92	26.0	—	1.59
			14.5	—	0.89
67.1	—	4.09, 3.57			
71.7	—	5.33			
64.3	—	4.49, 4.19			

ルA試薬で阻害物質Aは呈色したこと、IRスペクトルでスルホン酸のピークが観察されたことおよびFAB-MSの結果を考慮し、糖を6位にスルホン酸基が置換した6-スルホ- α -D-キノボピラノースと決定した。

以上の結果より、阻害物質Aの部分構造として、脂肪酸残基、グリセロール骨格および6-スルホ- α -D-キノボピラノースの存在が明らかとなった。

Table 3-9. Comparison of NMR data of the sugar moiety between inhibitor A and methyl- α -D-glucopyranoside.

	Inhibitor A			Methyl- α -D-glucopyranoside ⁶⁶⁾			$\delta_{CB} - \delta_{CA}$	$\delta_{HB} - \delta_{HA}$
	δ_{CA}	δ_{HA}	$J(\text{Hz})$	δ_{CB}	δ_{HB}	$J(\text{Hz})$		
1	100.0	4.76	d 3.7	100.0	4.80	d 3.8	0.0	+ 0.04
2	73.4	3.41	dd 3.7	72.2	3.65	dd 3.8	- 1.2	+ 0.24
			9.3			10.0		
3	74.8	3.63	t 9.3	74.1	3.68	dd 10.0	- 0.7	+ 0.05
						8.8		
4	74.9	3.09	t 9.3	70.6	3.40	dd 8.8	- 4.3	+ 0.31
						9.8		
5	69.8	4.06	dt 9.3	72.5	3.65	ddd 9.8	+ 2.7	- 0.41
			2.0			2.2		
						5.4		
6	54.2	3.33	dd 2.0	61.6	3.85	dd 2.2	+ 7.4	+ 0.52
			14.3			12.3		
		2.92	dd 9.3		3.75	dd 5.4		+ 0.83
			14.3			12.3		

HMBCスペクトルは異種核間ロングレンジカップリング ($2J_{CH}$ or $3J_{CH}$)、すなわち、2本ないし3本の結合を介したH-C相関をプロトン核側で観察する方法である。⁶⁵⁾ ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質AのHMBCスペクトル (Fig. 3-10) を測定し、相関の組 (Table 3-10)

を明らかにした。その結果から3つの部分構造、脂肪酸残基、グリセロール骨格および6-スルホ- α -D-キノボピラノースのつながりを調べた。

各部分構造内でのHMBC相関ピークはそれぞれの構造を支持している。部分構造間の相関ピークの δ_c 175.1- δ_H 4.19および δ_c 174.9- δ_H 5.33は、それぞれ脂肪酸残基のエステルカーボンとグリセロール骨格の一方のメチレンプロトンおよびメチンプロトンとの相関だった。また、 δ_c 100.0- δ_H 4.09、 δ_c 100.0- δ_H 3.57および δ_c 67.1- δ_H 4.76は、糖のアノマー位カーボンとグリセロール骨格のもう一方のメチレンプロトン間でみられた。これらの結果 (Fig. 3-11) から、グリセロール骨格の1位および2位に脂肪酸残基が置換して、3位に糖が置換した糖脂質と決定した。

各種機器分析のデータから、阻害物質Aの平面構造を1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)グリセロール (SQDG, **61**) と同定した。ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Aの ^1H -NMRデータの帰属をFig. 3-12に、 ^{13}C -NMRデータの帰属をFig. 3-13に示す。また、同定したSQDGは既知化合物なので、Johnsら⁶⁷⁾およびTsukamotoら⁶⁸⁾の報告しているNMRデータと比較 (Table 3-11) した。 ^1H -NMRおよび ^{13}C -NMRデータともに文献値とよく一致したので、この構造を支持している。

阻害物質Aの旋光度 $[\alpha]_D$ は $+33^\circ$ (c 0.045, メタノール)であり、Gustafson⁶⁹⁾らの報告の $[\alpha]_D$ は $+55.5^\circ$ (c 0.98, メタノール)と符号が同じなので、阻害物質Aの絶対配置を1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロールと決定した。

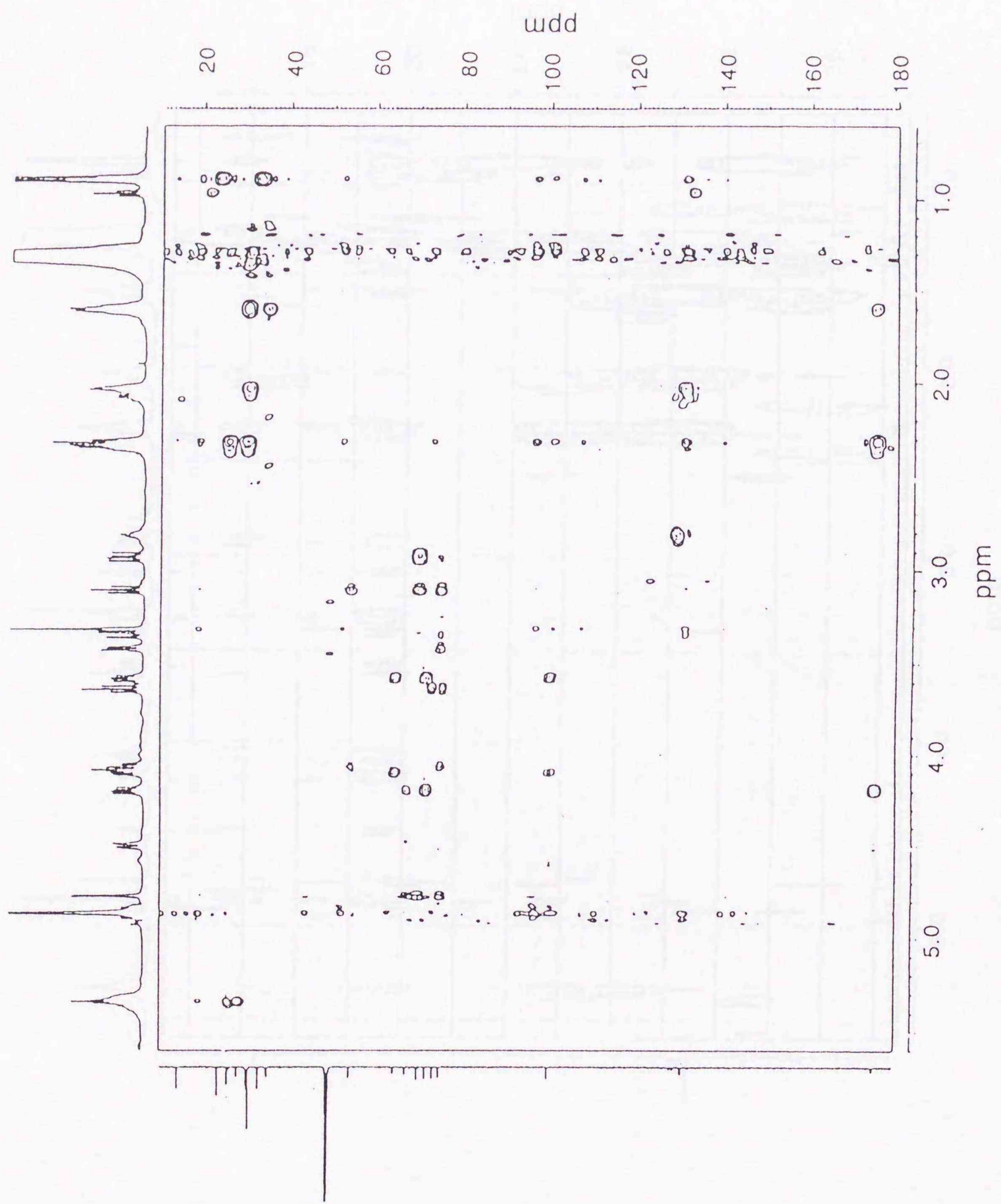


Fig. 3-10a. HMBC spectrum of inhibitor A.

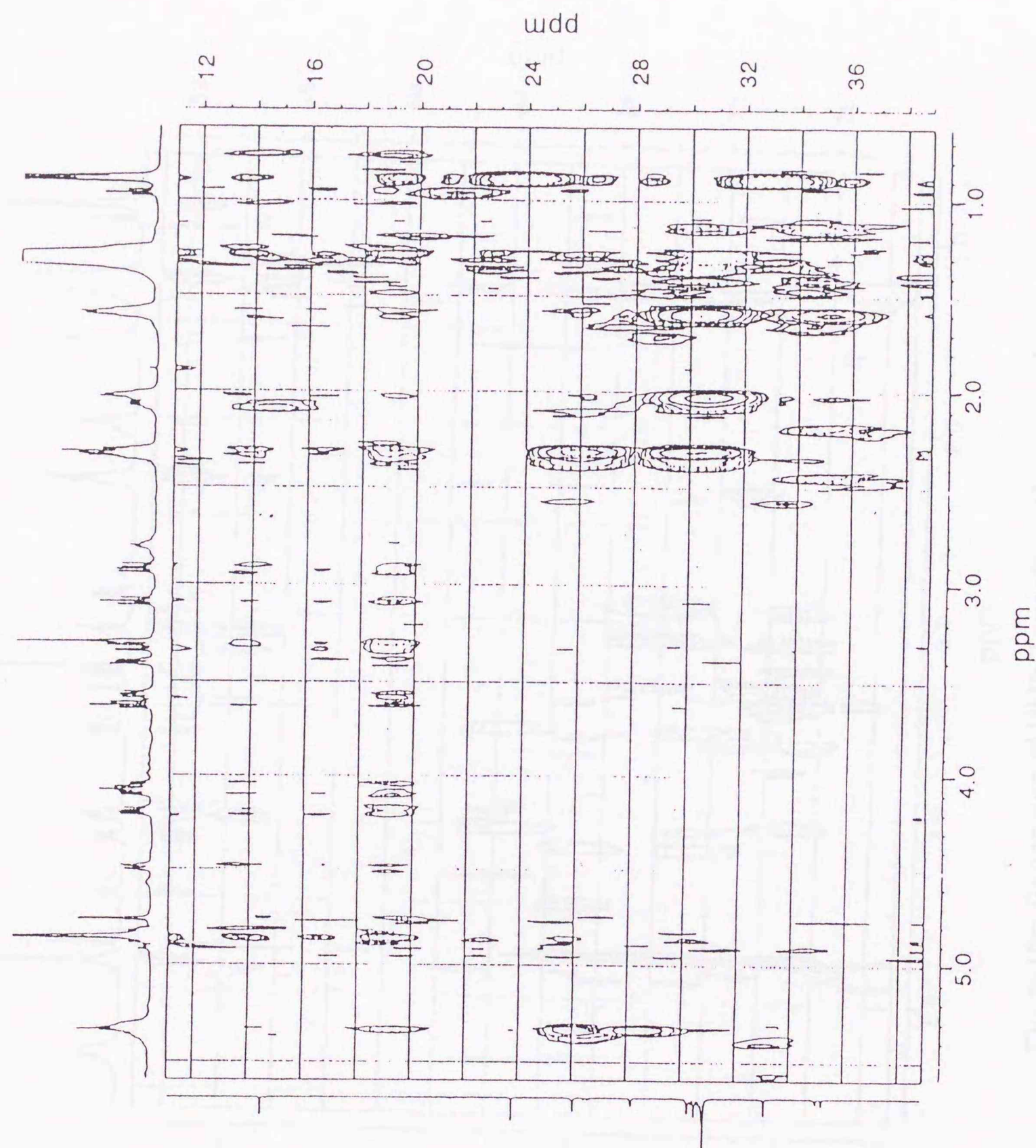


Fig. 3-10b. Expansion of HMBC spectrum of inhibitor A.

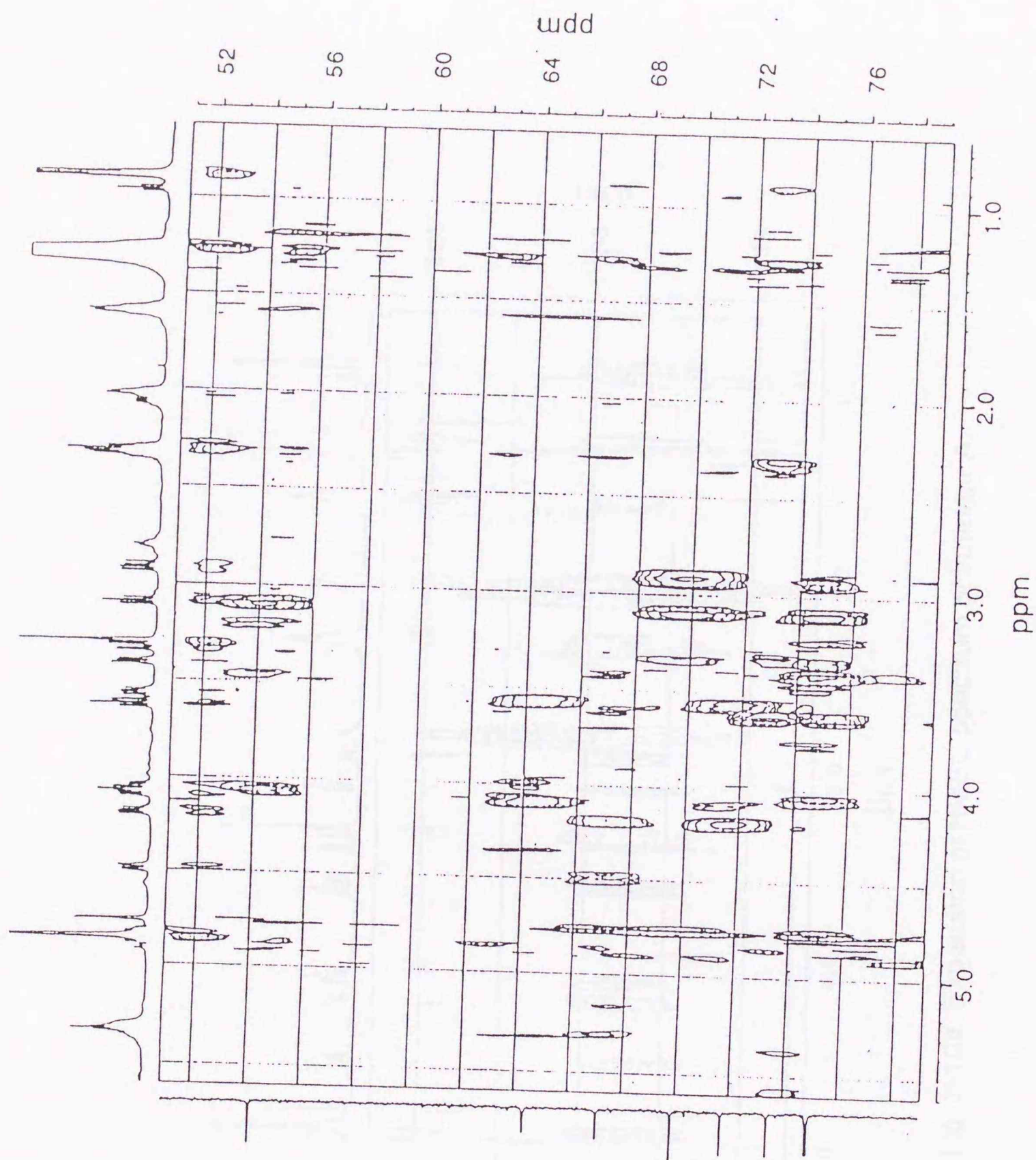


Fig. 3-10c. Expansion of HMBC spectrum of inhibitor A.

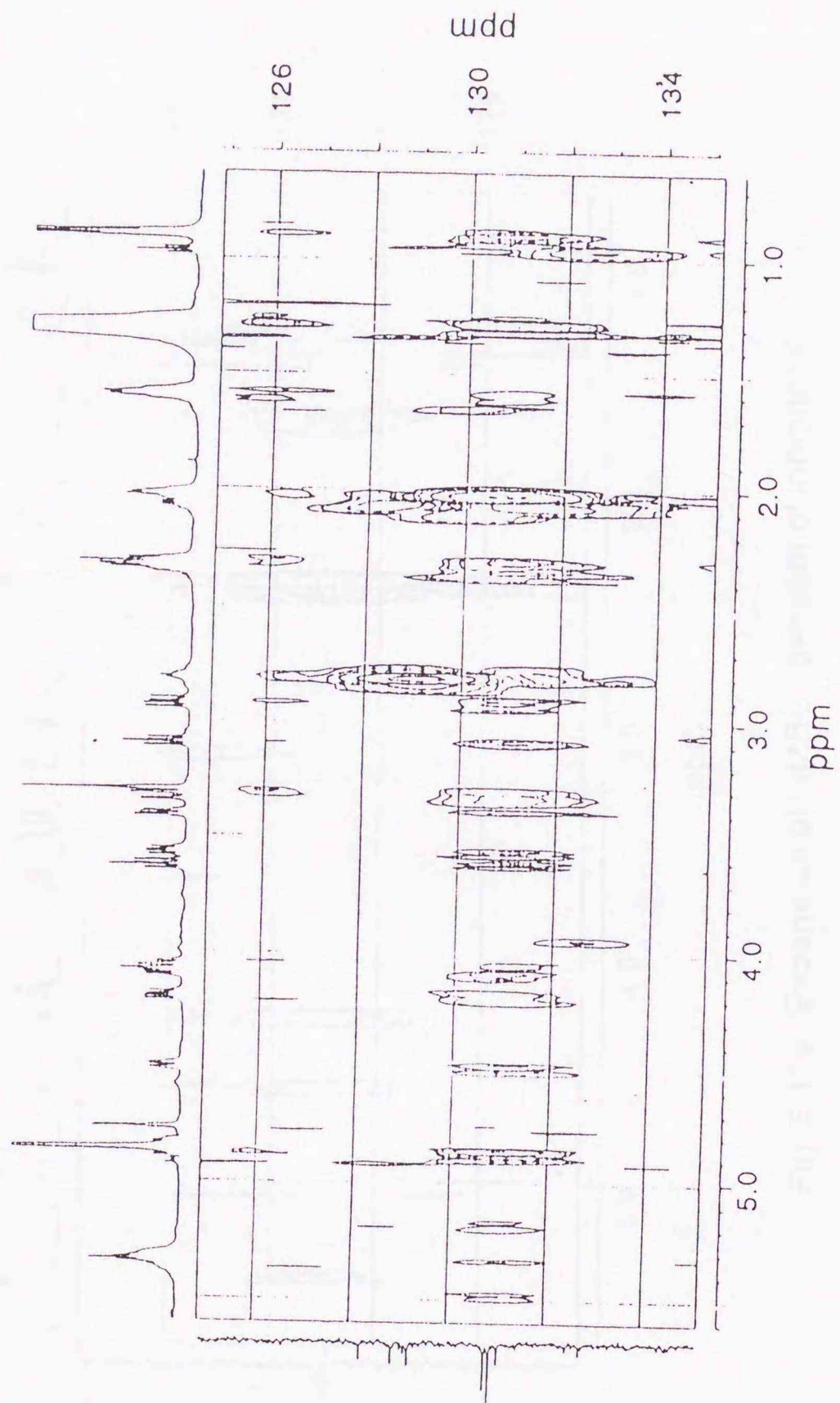


Fig. 3-10d. Expansion of HMBC spectrum of inhibitor A.

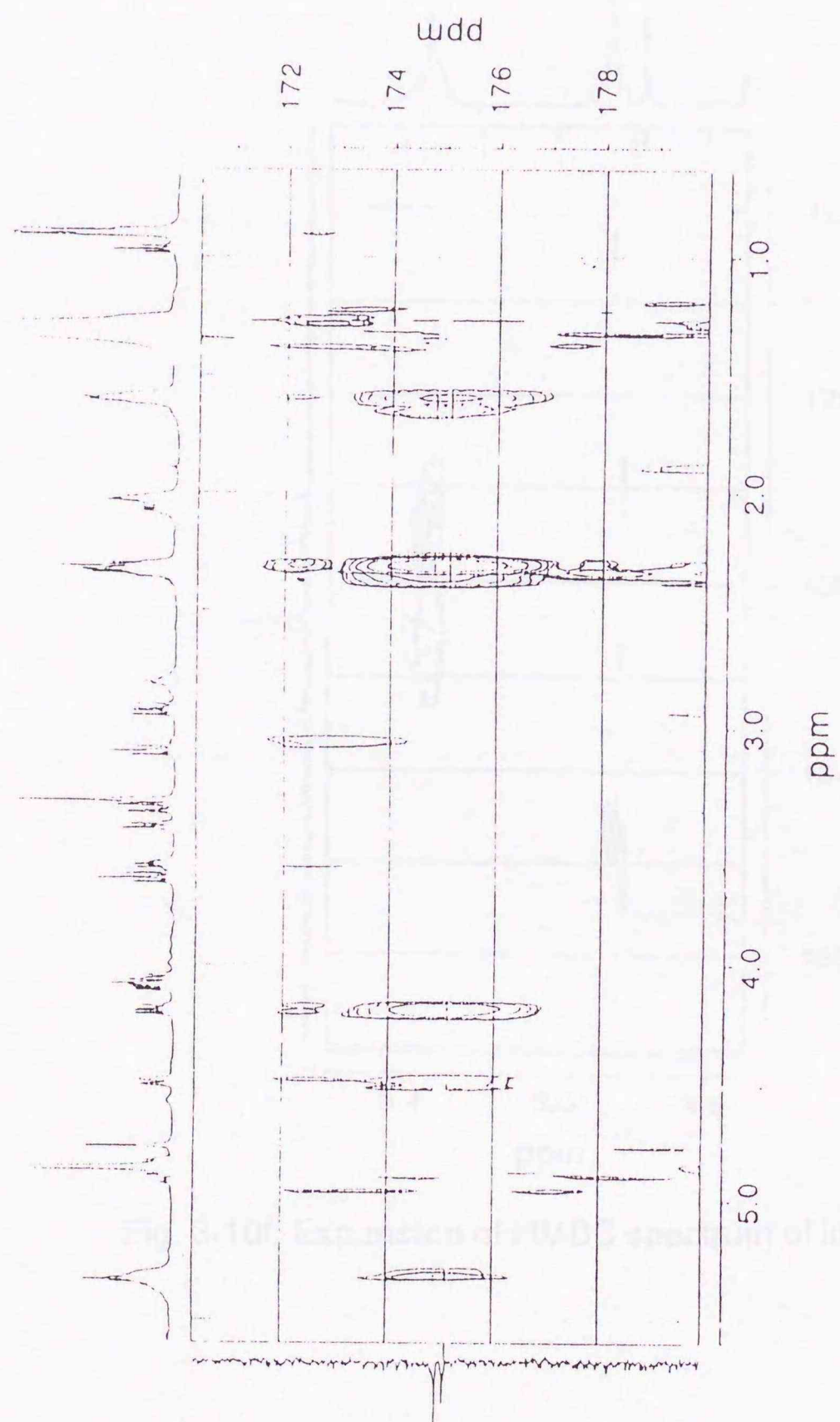


Fig. 3-10e. Expansion of HMBC spectrum of inhibitor A.

Table 3-10. Correlation of peaks in expansion of HMBC spectrum of inhibitor A.

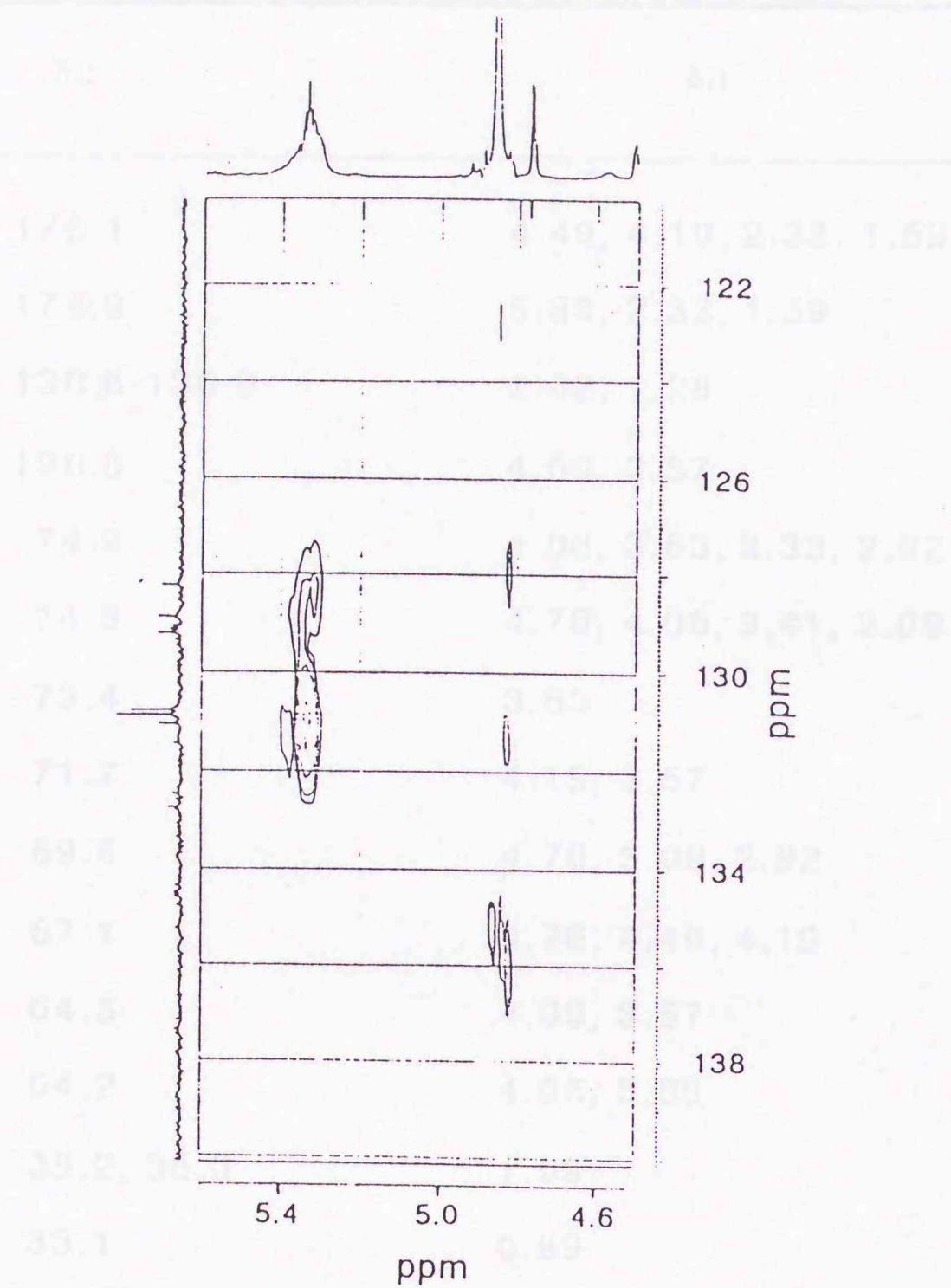


Fig. 3-10f. Expansion of HMBC spectrum of inhibitor A.

Table 3-10. Correlations disclosed in consideration of HMBC spectrum of inhibitor A

δ_C	δ_H
175.1	4.49, 4.19, 2.33, 1.59
174.9	5.33, 2.33, 1.59
130.8-130.9	2.02, 1.28
100.0	4.09, 3.57
74.9	4.06, 3.63, 3.33, 2.92
74.8	4.76, 4.06, 3.41, 3.09
73.4	3.63
71.7	4.19, 3.57
69.8	4.76, 3.09, 2.92
67.1	4.76, 4.49, 4.19
64.3	4.09, 3.57
54.2	4.06, 3.09
35.2, 35.0	1.59
33.1	0.89
30.0-31.0	2.33, 2.02, 1.59, 1.28
26.0	2.33, 1.28
23.8	0.89
14.5	1.28

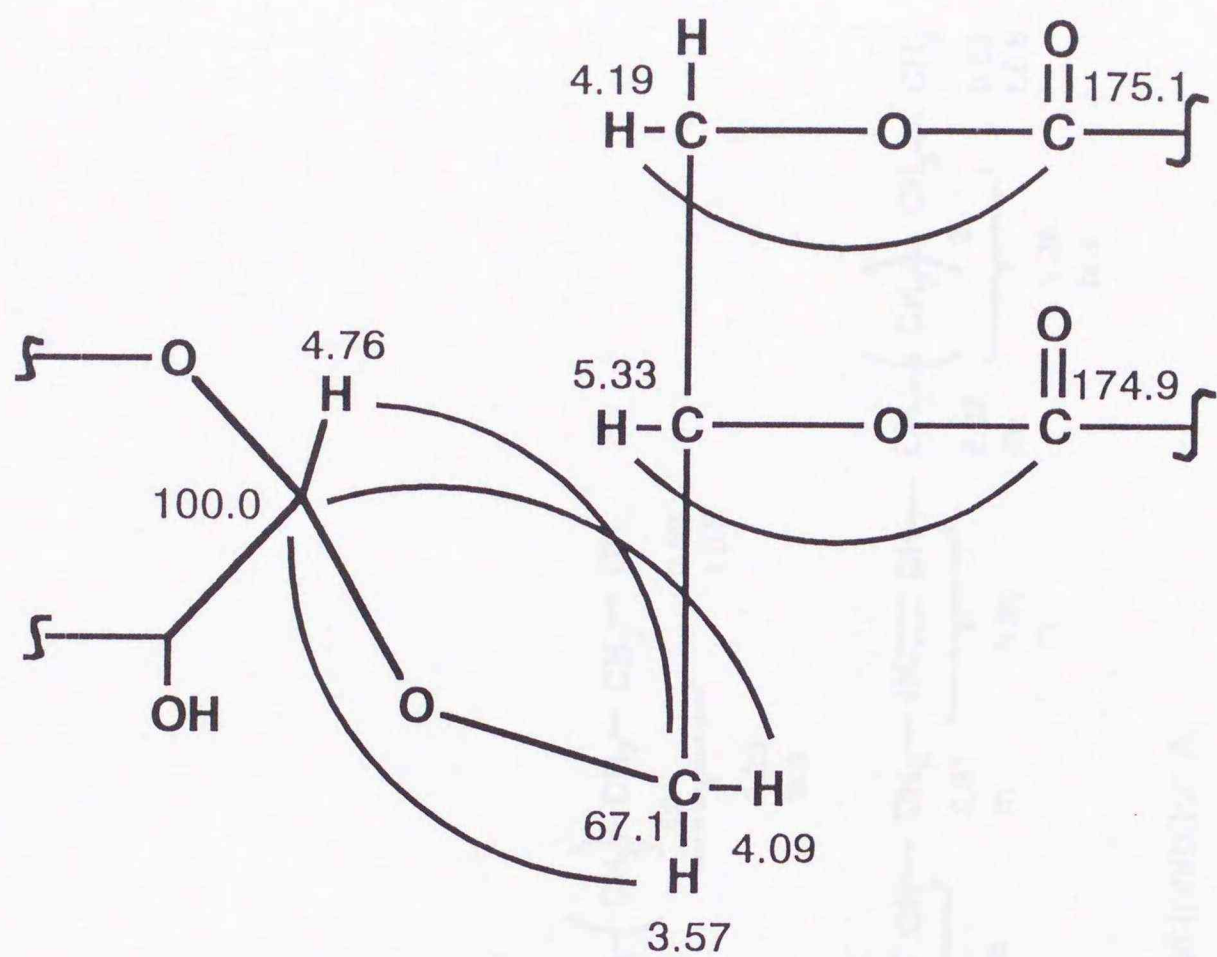


Fig. 3-11. HMBC correlations of inhibitor A.

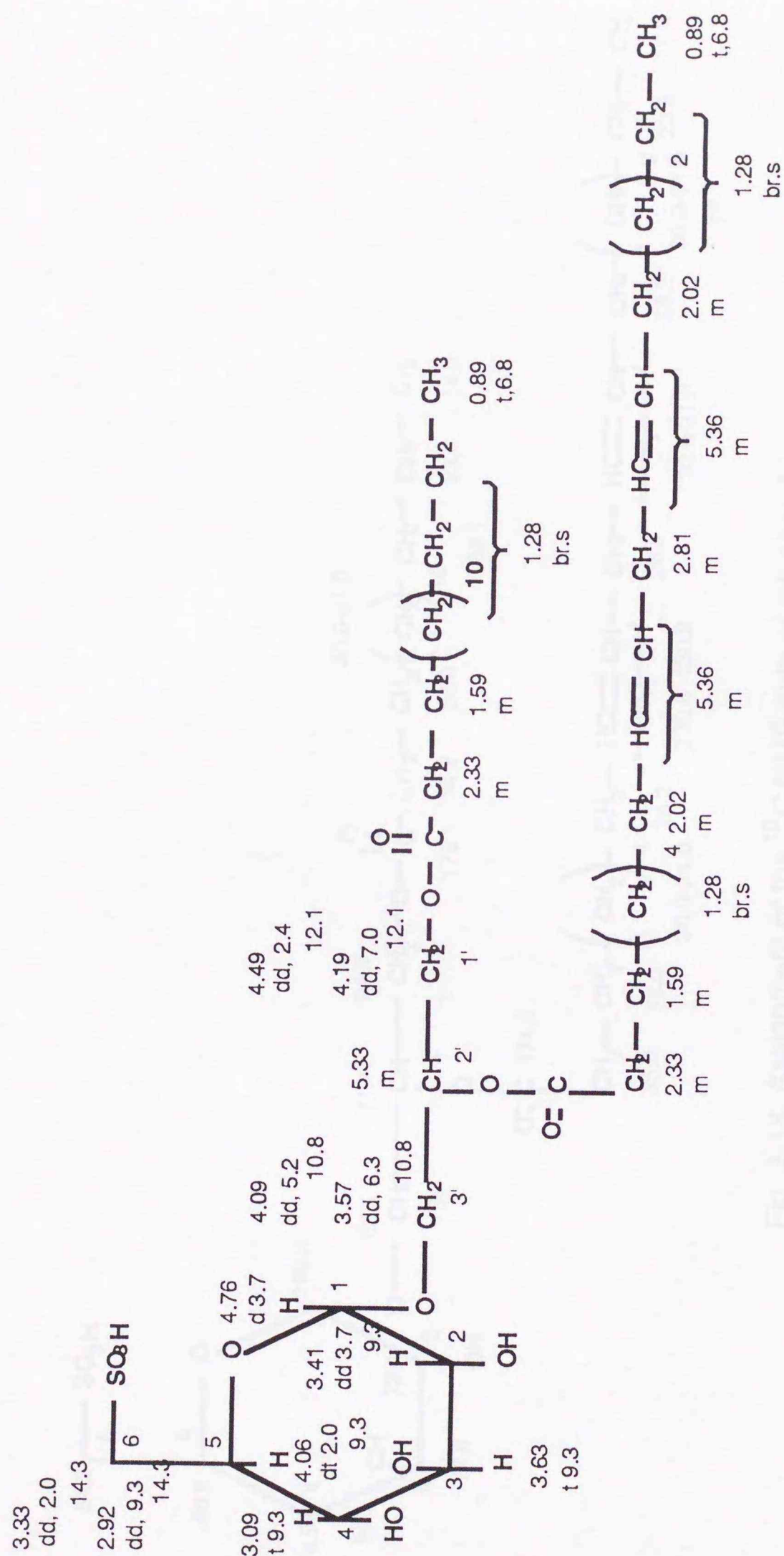


Fig. 3-12. Assignment of the ^1H NMR data of inhibitor A.

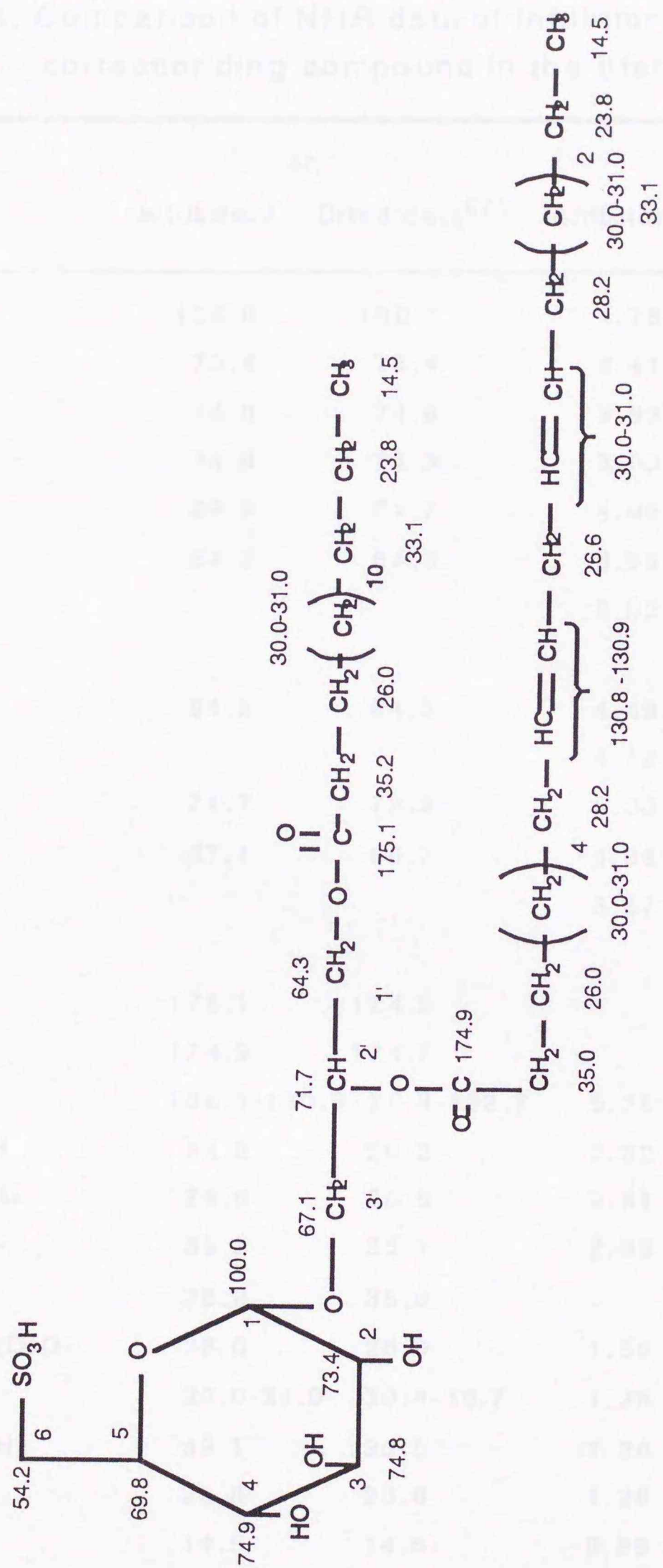


Fig. 3-13. Assignment of the ^{13}C NMR data of inhibitor A.

Table 3-11. Comparison of NMR data of inhibitor A and the corresponding compound in the literatures

Position	δC		δH	
	Inhibitor A	Cited data ⁶⁷⁾	Inhibitor A	Cited data ⁶⁸⁾
1	100.0	100.1	4.76	4.75
2	73.4	73.4	3.41	3.40
3	74.8	74.9	3.63	3.61
4	74.9	74.9	3.09	3.07
5	69.8	71.7	4.06	4.07
6	54.2	54.3	3.33	3.33
			2.92	2.92
1'	64.3	64.2	4.49	4.48
			4.19	4.18
2'	71.7	72.3	5.33	5.30
3'	67.1	69.7	4.09	4.08
			3.57	3.56
C=O	175.1	174.9		
	174.9	174.7		
-CH=CH-	130.8-130.9	128.8-132.7	5.36	5.32
-CH ₂ -CH=CH-	28.2	28.2	2.02	2.02
=CH-CH ₂ -CH=	26.6	26.6	2.81	-
-CH ₂ -C(O)O-	35.2	35.1	2.33	2.34
	35.0	35.0		
-CH ₂ -CH ₂ -C(O)O-	26.0	26.0	1.59	1.59
-CH ₂ -	30.0-31.0	30.4-30.7	1.28	1.28
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	33.1	33.0	1.28	1.28
-CH ₂ -CH ₃	23.8	23.6	1.28	1.28
-CH ₃	14.5	14.5	0.89	0.91

3-2 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの構造決定

(1) ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの物理化学データ

前節でヒジキの α -グルコシダーゼ阻害物質Aをグリセロ糖脂質の SQDGと決定した。さらに、TLC上で阻害物質Aと類似の呈色特性を持つもう一つのヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの存在が認められたのでその構造決定を行った。阻害物質BのIRスペクトル (Fig. 3-14)、FAB-MS (Fig. 3-15) を測定し、阻害物質Bの機器分析データおよび物理化学的性質 (Table 3-12) を明らかにした。

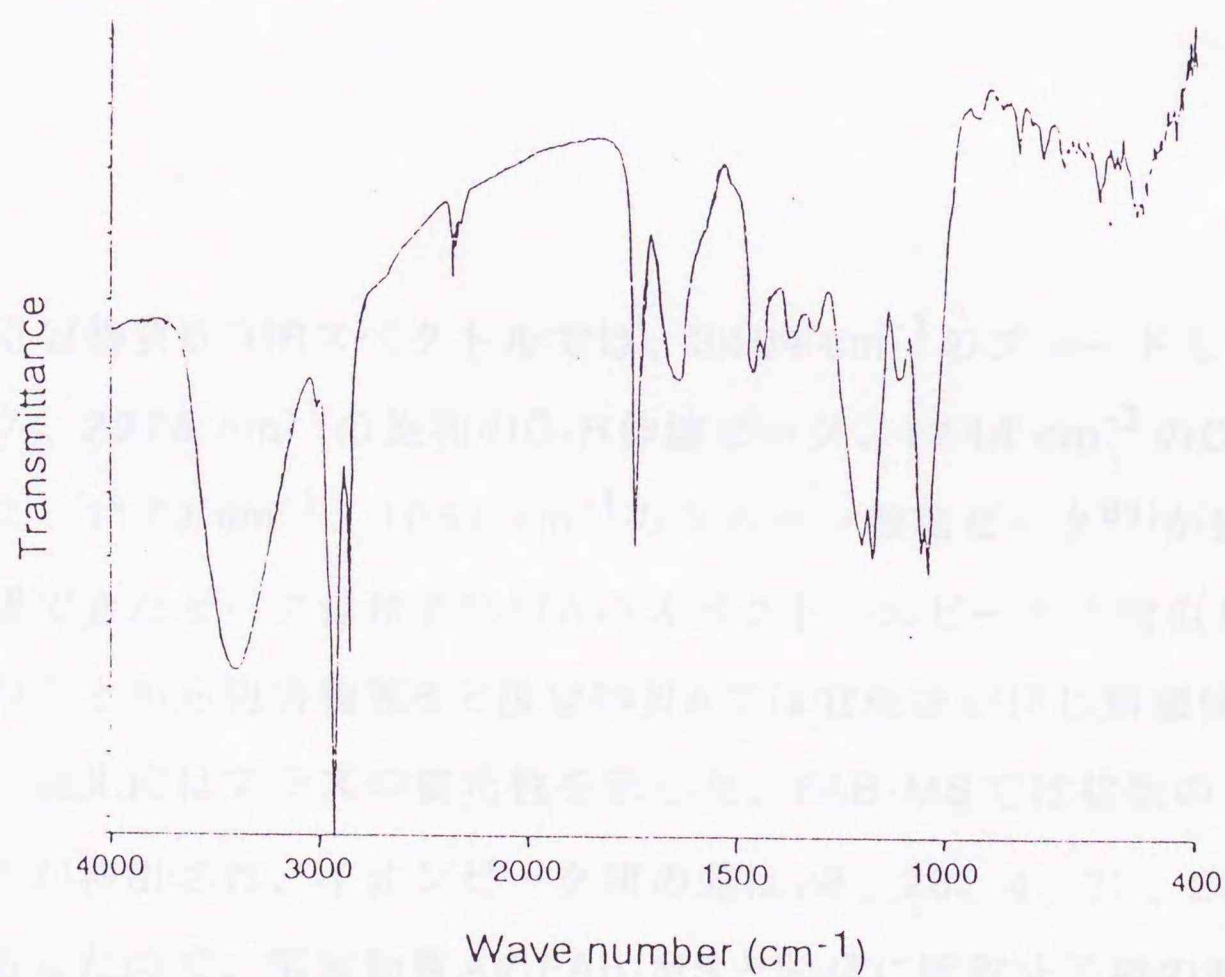


Fig. 3-14. IR spectrum of inhibitor B.

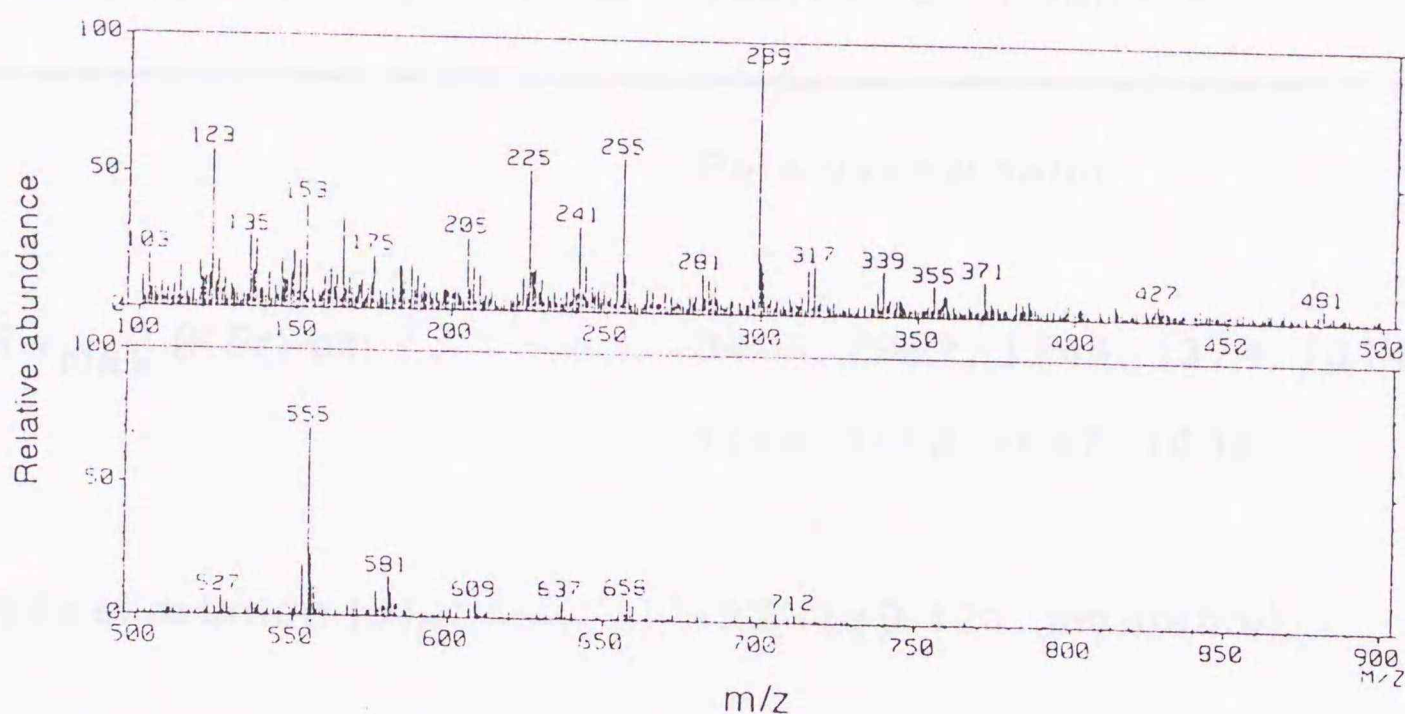


Fig. 3-15. Fast atom bombardment mass spectrum of inhibitor B.

阻害物質BのIRスペクトルでは、 3404 cm^{-1} のブロードなO-H伸縮ピーク、 2928 cm^{-1} の飽和のC-H伸縮ピーク、 1744 cm^{-1} のC=O伸縮ピーク、 1173 cm^{-1} 、 1057 cm^{-1} のスルホン酸塩ピーク⁶³⁾が検出され、確認できたピークは阻害物質Aのスペクトルのピークと類似していた。このことから阻害物質Bと阻害物質Aでは官能基が同じ類縁体と推定した。旋光度はプラスの旋光性を示した。FAB-MSでは複数のイオンピークが検出され、イオンピーク間の差は28、28、4、22、2および26であったので、阻害物質AのFAB-MSと同様に脂質分子種の混合物と推定した。阻害物質BのFAB-MSは阻害物質Aのスペクトルと比較して、230～240マスユニット小さい値となっており、ほぼ脂肪酸残基1個分に相当する。阻害物質Bのメタノリシスにより生成した脂肪酸メチルエステル混合物のGC分析から脂肪酸組成を調べた結果、パルミチン酸の組成比が高く（41.7%）、他の脂肪酸は10%以下であった。阻害物質

Table 3-12. Physicochemical properties of inhibitor B

	Pale yellow solid	
IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} :	3404, 2927, 1744, 1374, 1314, 1198, 1173, 1057, 1038.	
Optical rotation $[\alpha]_D$:	+22° (c 0.121, methanol)	
FAB-MS (Negative mode) m/z :	637, 609, 581, 577, 555, 553, 527.	
GC:	Palmitic(16:0)	41.7%
	Oleic(18:1)	8.5%
	Palmitoleic(16:1)	7.5%
	Linolenic(18:3)	6.6%
	Myristic(14:0)	4.7%
	Docosenoic(22:1)	3.4%
	Icosenoic(20:1)	3.0%
	Docosanoic(22:0)	2.5%
	Linoleic(18:2)	2.5%
	Others	19.6%

Bの構成脂肪酸組成は阻害物質Aと同様に飽和酸やモノエン脂肪酸が多かった。両阻害物質の物理化学データには共通点が多く、阻害物質Bも糖脂質と推定した。

(2) ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの1次元NMRスペクトル

ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの ^1H -NMRスペクトル (Fig. 3-16)、 ^{13}C -NMR 完全デカップリングおよびDEPTスペクトル (Fig. 3-17) を測定した。 ^{13}C -NMR DEPTスペクトルはカーボンの種類、すなわち、メチル、メチレン、メチンおよび四級炭素を区別できる。⁶⁵⁾

^1H -NMRスペクトルでは、阻害物質Aと類似のスペクトルパターンを与え、0.89 ppmにアルキル末端メチルプロトン、1.28 ppmに巨大なアルキルメチレンプロトン、1.59~2.81 ppmにエステルの α および β 位プロトンや二重結合のアリル位プロトン、5.3~5.4 ppmにオレフィンプロトンなどが検出された。 ^{13}C -NMRスペクトルでもアルキル末端メチルカーボン、アルキルメチレンカーボン、エステルカーボン、アリル位カーボン、オレフィンカーボンが確認できた。これらのシグナルは脂質の脂肪酸残基部分に由来する。

残りの12種類のプロトンシグナルおよび9種類のカーボンシグナルはそのケミカルシフトからヘテロ原子に隣接するメチレンおよびメチンシグナルであると推定できた。これらのシグナルは阻害物質Aのシグナルと類似のケミカルシフトや結合定数を示す。

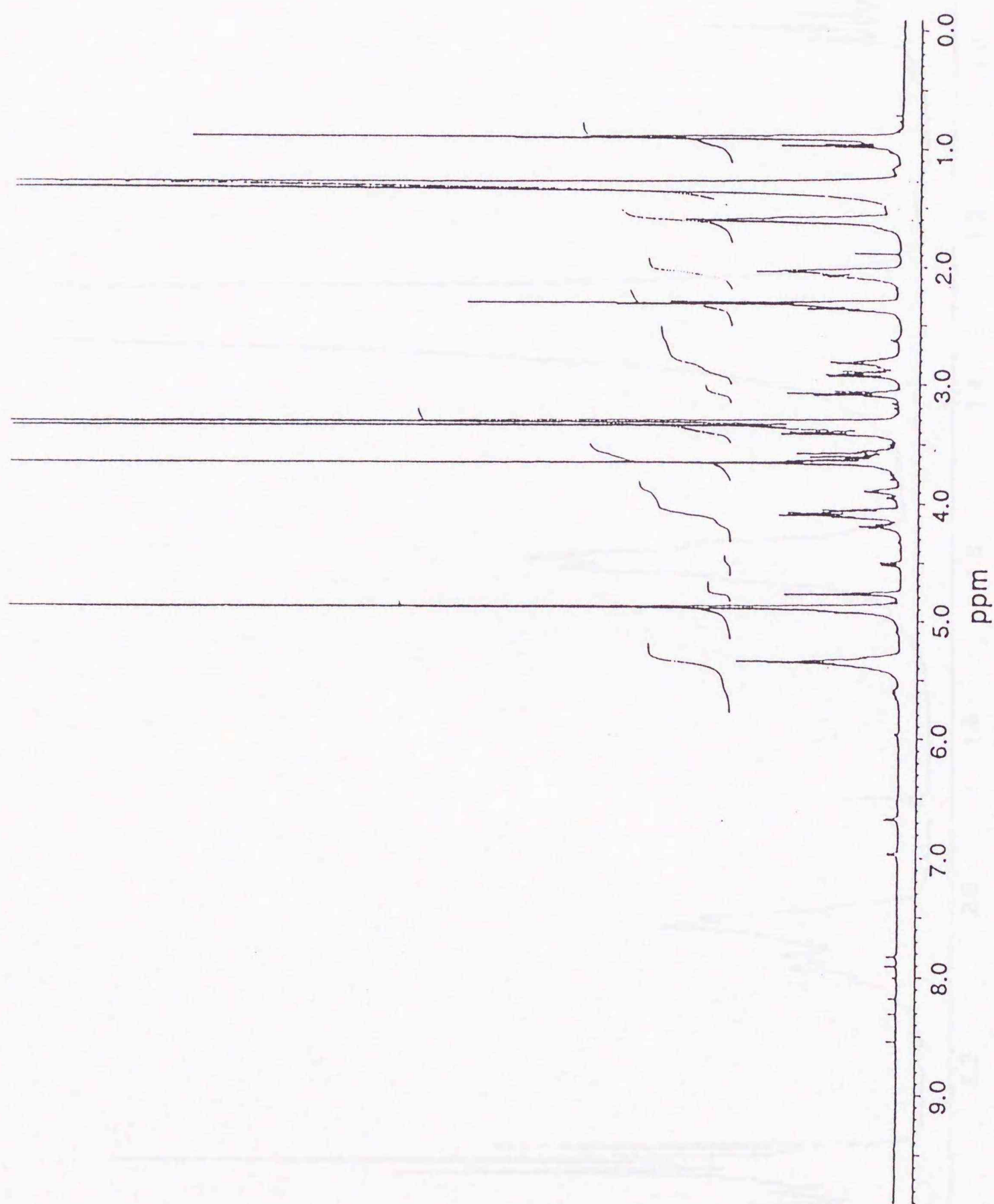


Fig. 3-16a. ^1H -NMR spectrum of inhibitor B.

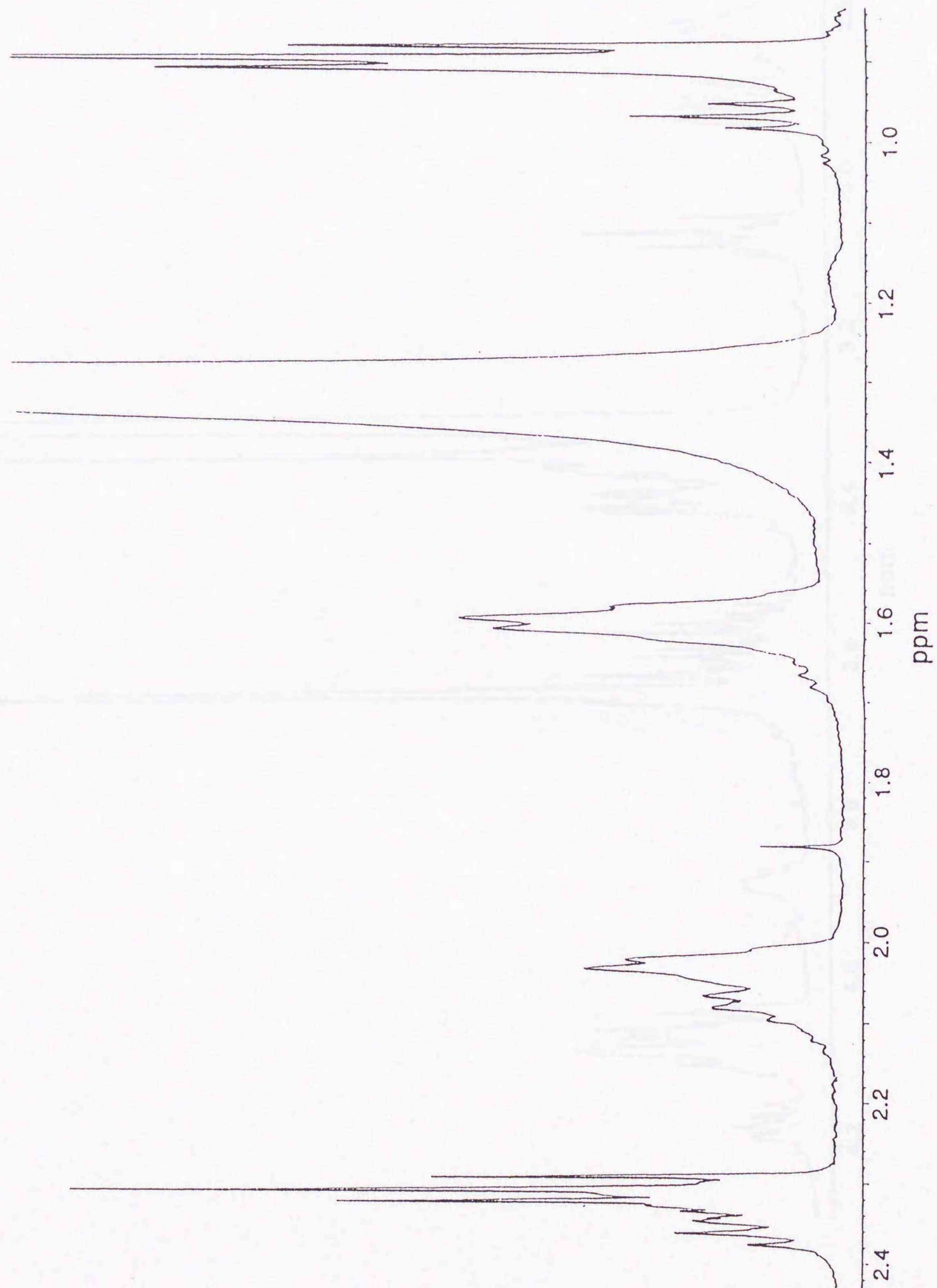


Fig. 3-16b. Expansion of ^1H -NMR spectrum of inhibitor B.

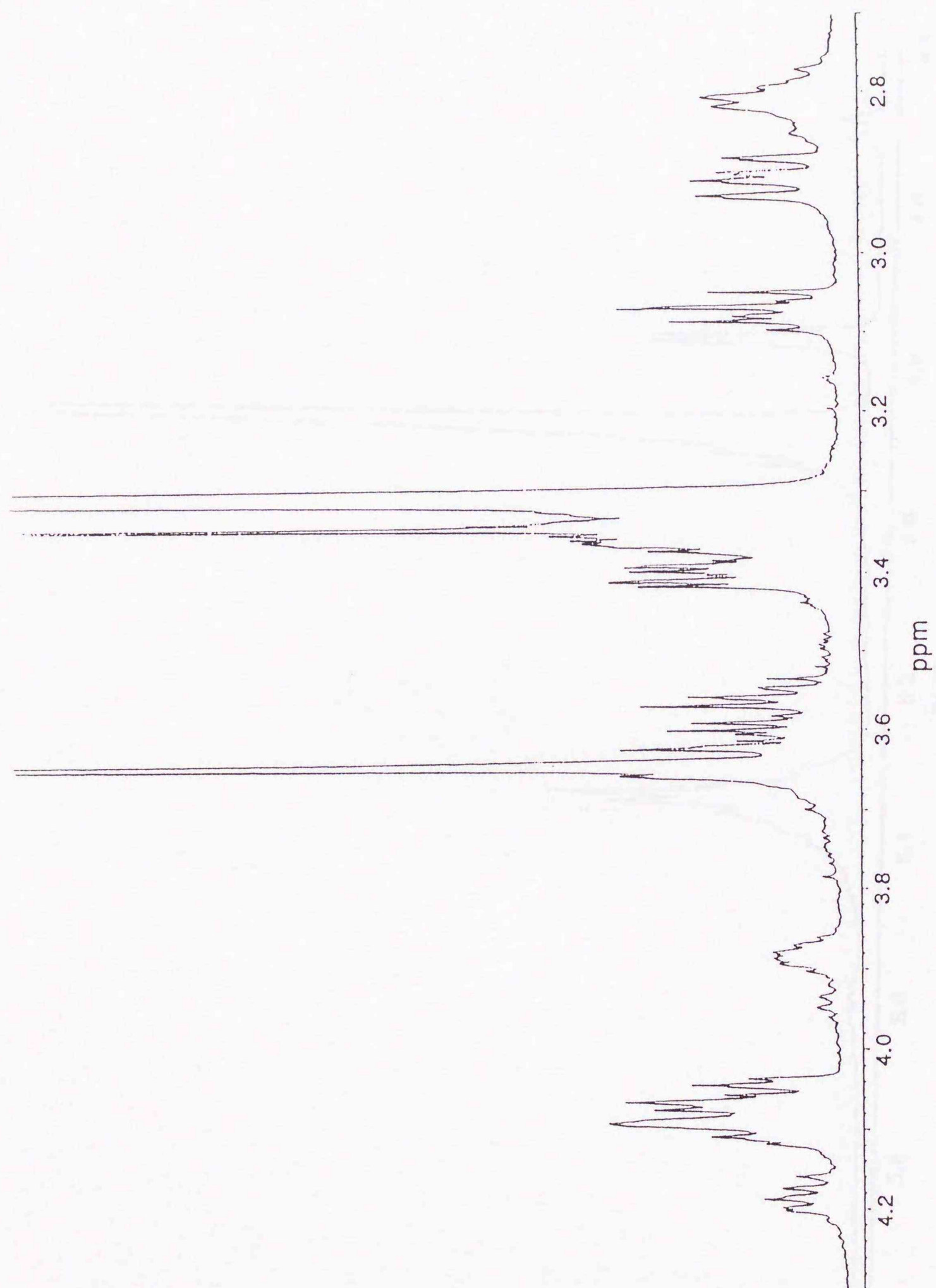


Fig. 3-16c. Expansion of ^1H -NMR spectrum of inhibitor B.

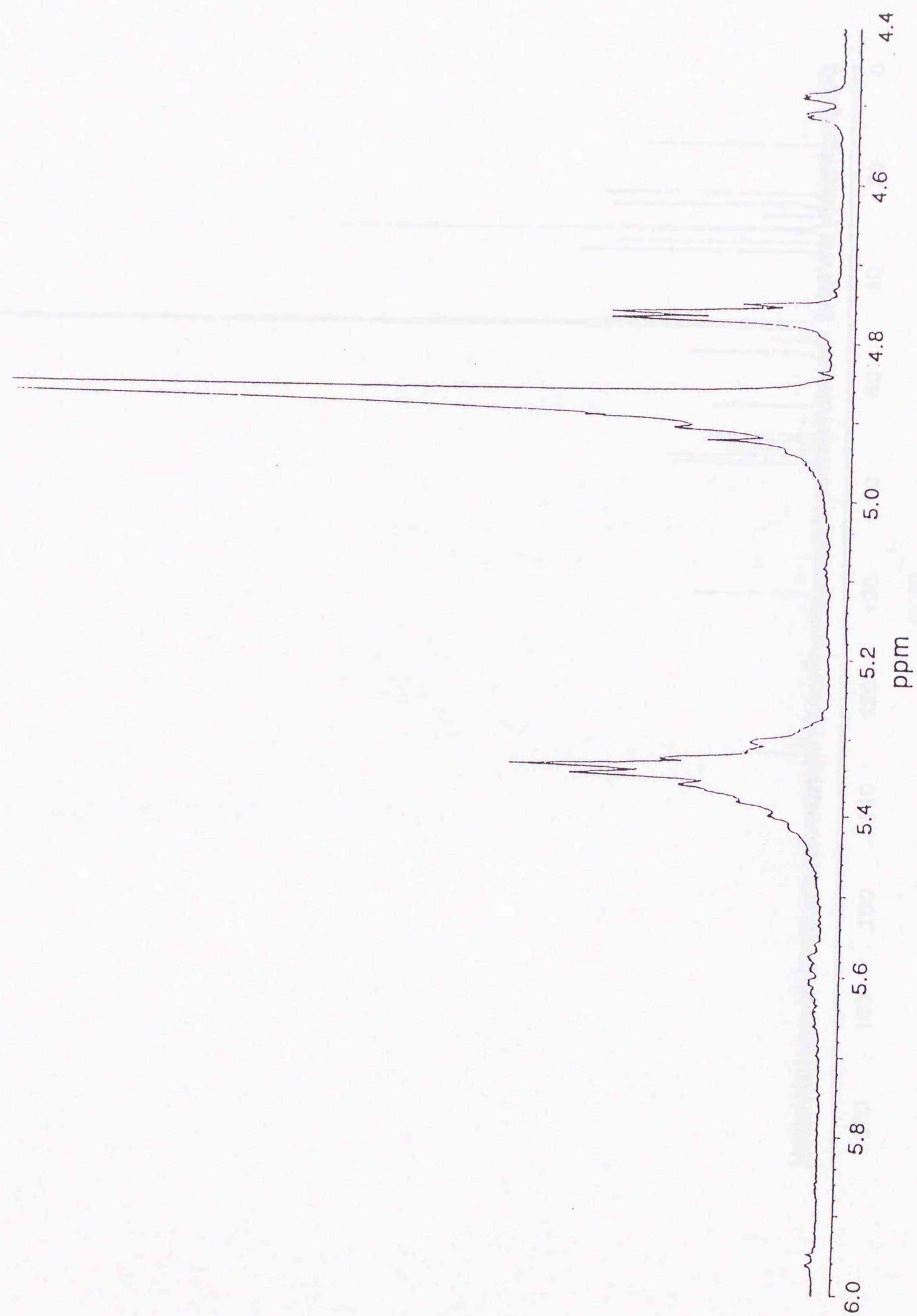


Fig. 3-16d. Expansion of ^1H -NMR spectrum of inhibitor B.

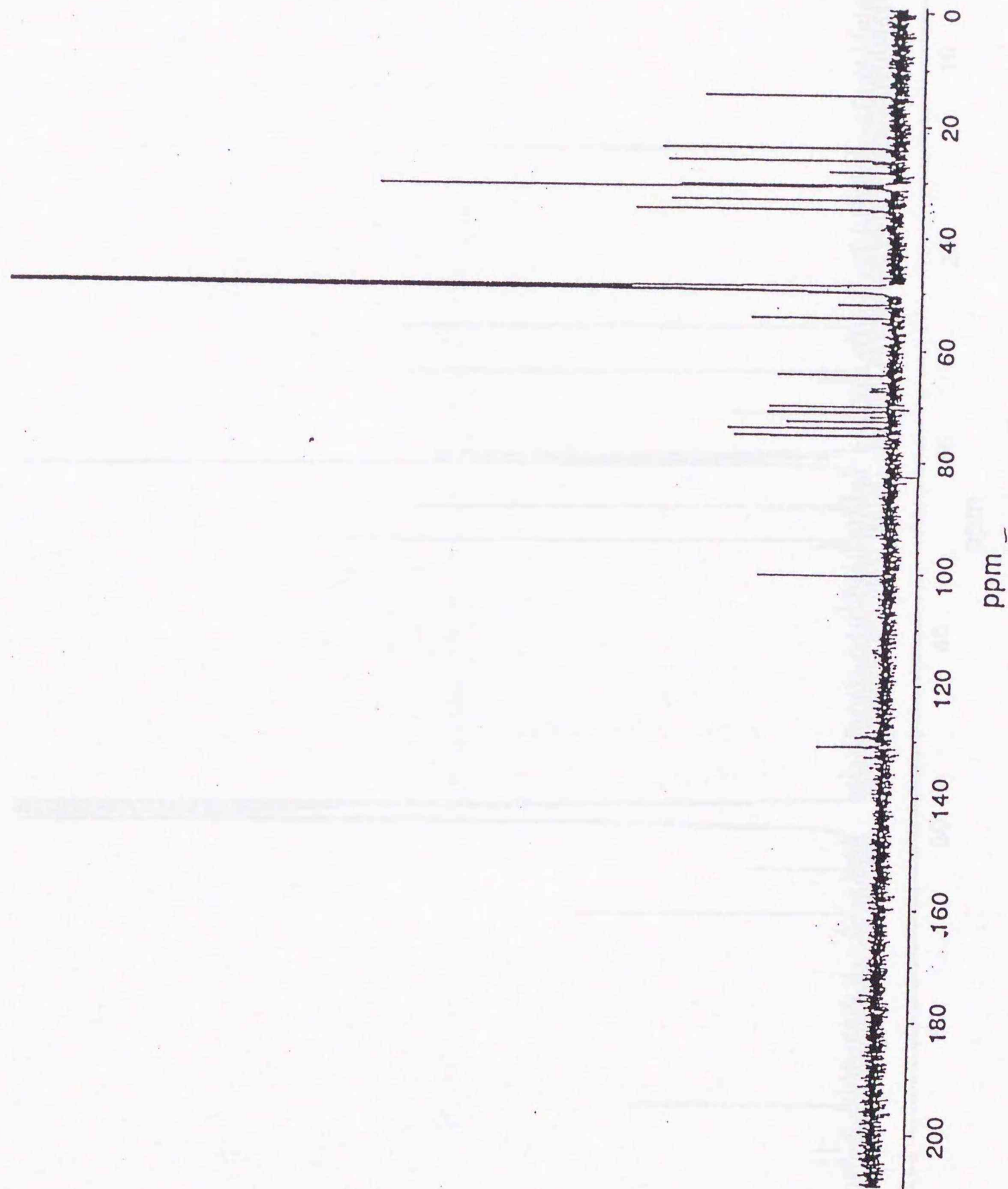


Fig. 3-17a. ^{13}C -NMR spectrum of inhibitor B.

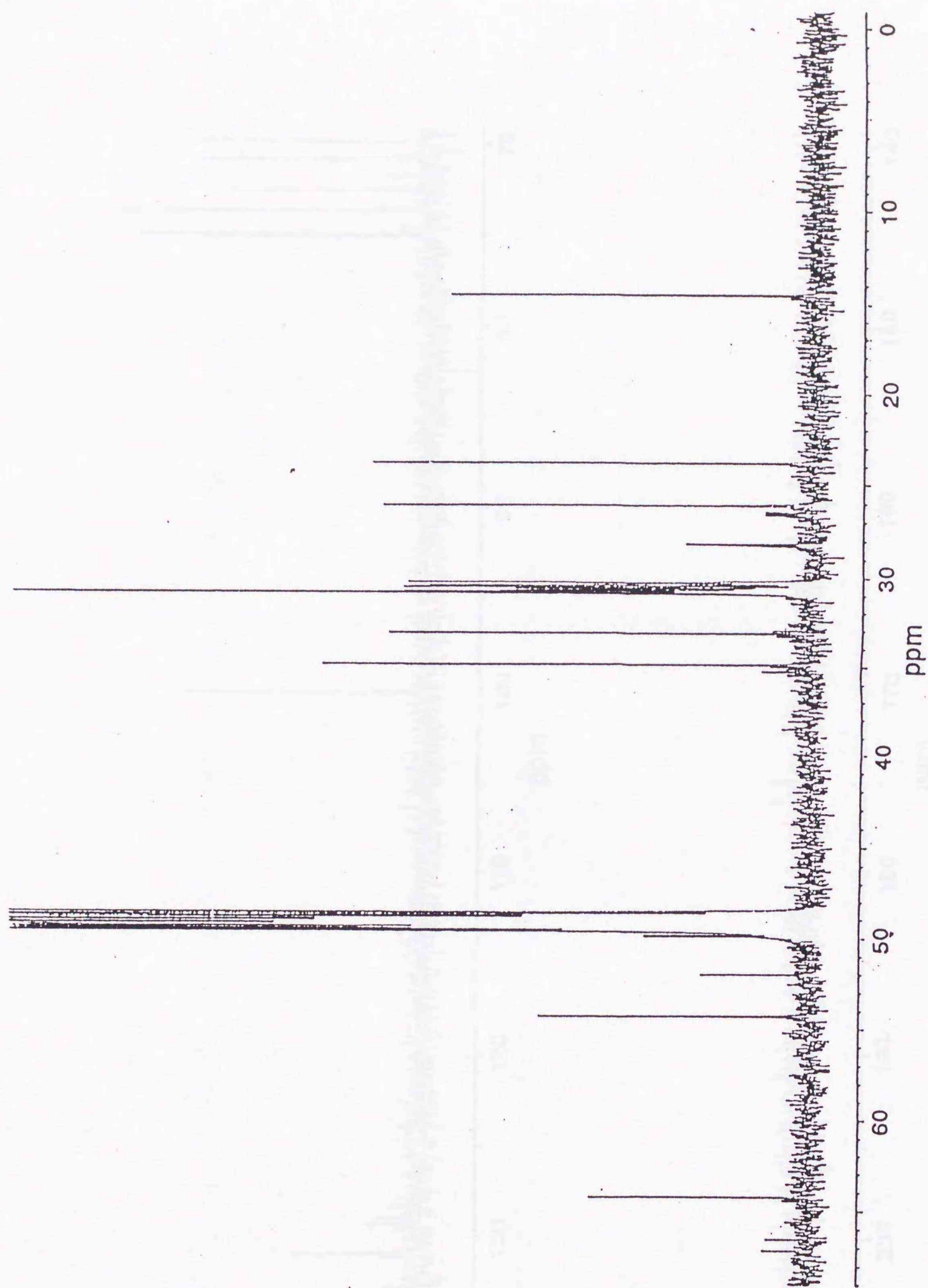


Fig. 3-17b. Expansion of ^{13}C -NMR spectrum of inhibitor B.

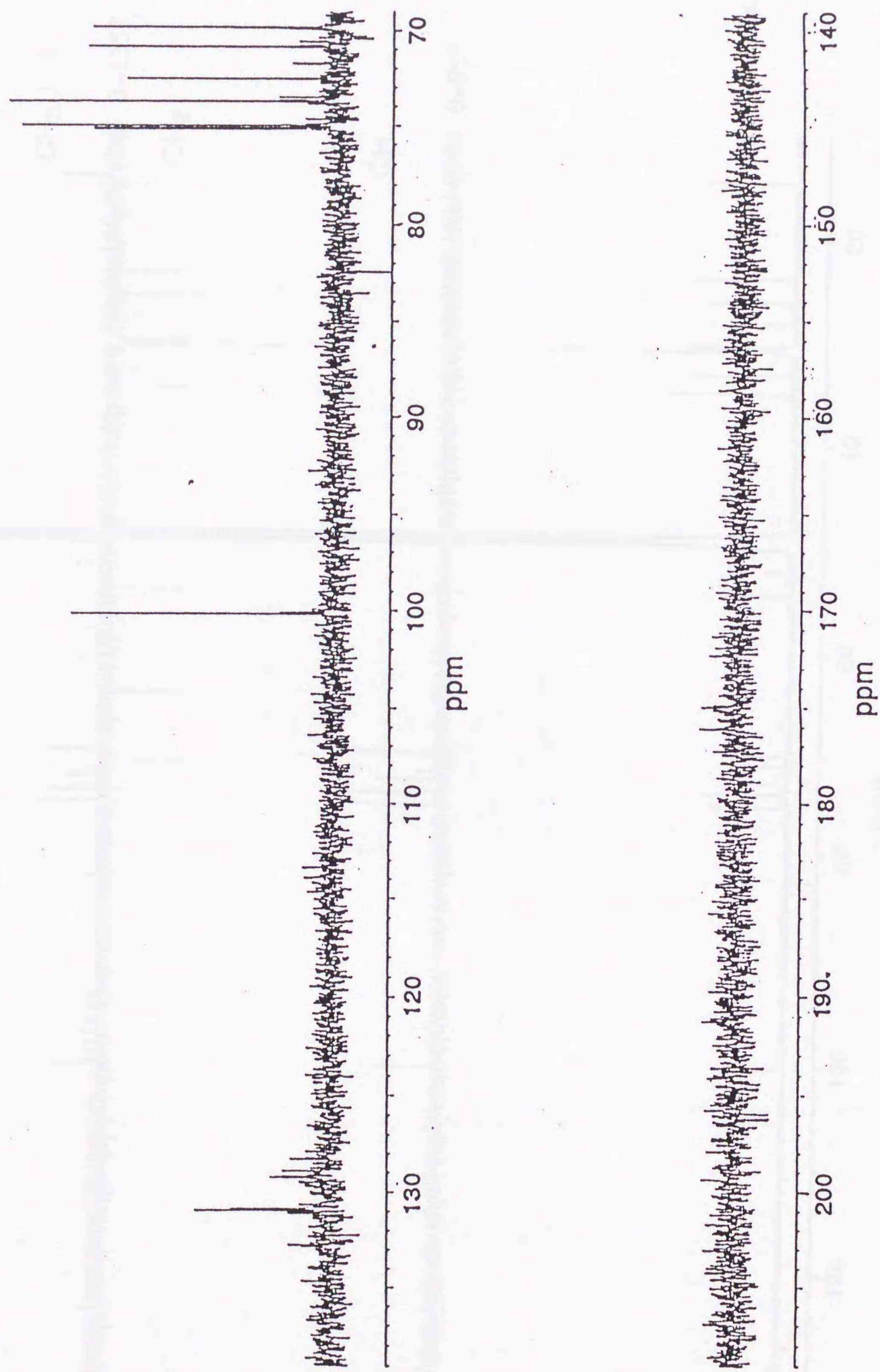


Fig. 3-17c. Expansion of ^{13}C -NMR spectrum of inhibitor B.

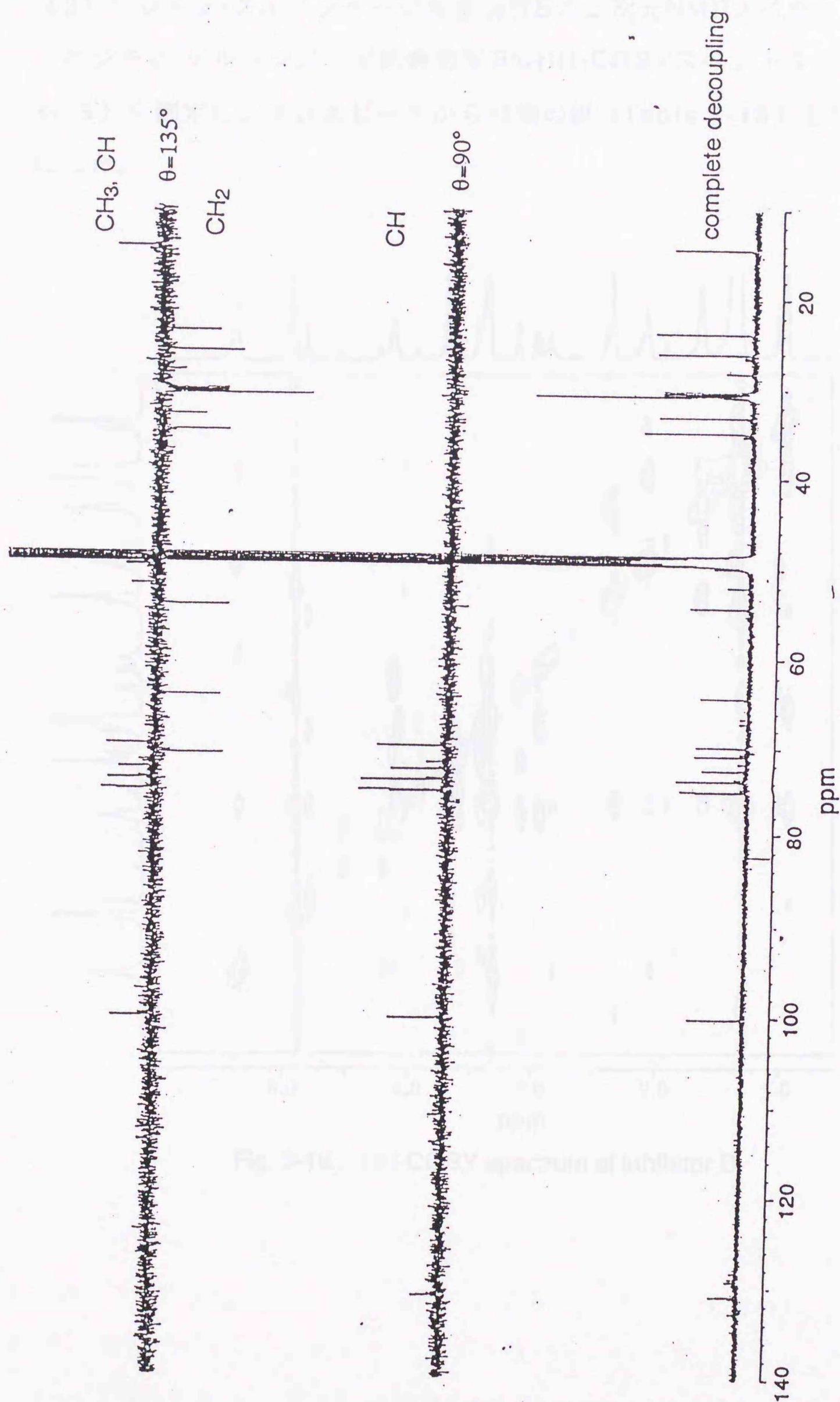


Fig. 3-17d. DEPT spectrum of inhibitor B.

(3) ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの2次元NMRスペクトル
 ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質BのHH-COSYスペクトル (Fig. 3-18) を測定し、クロスピークから相関の組 (Table 3-13) を明らかにした。

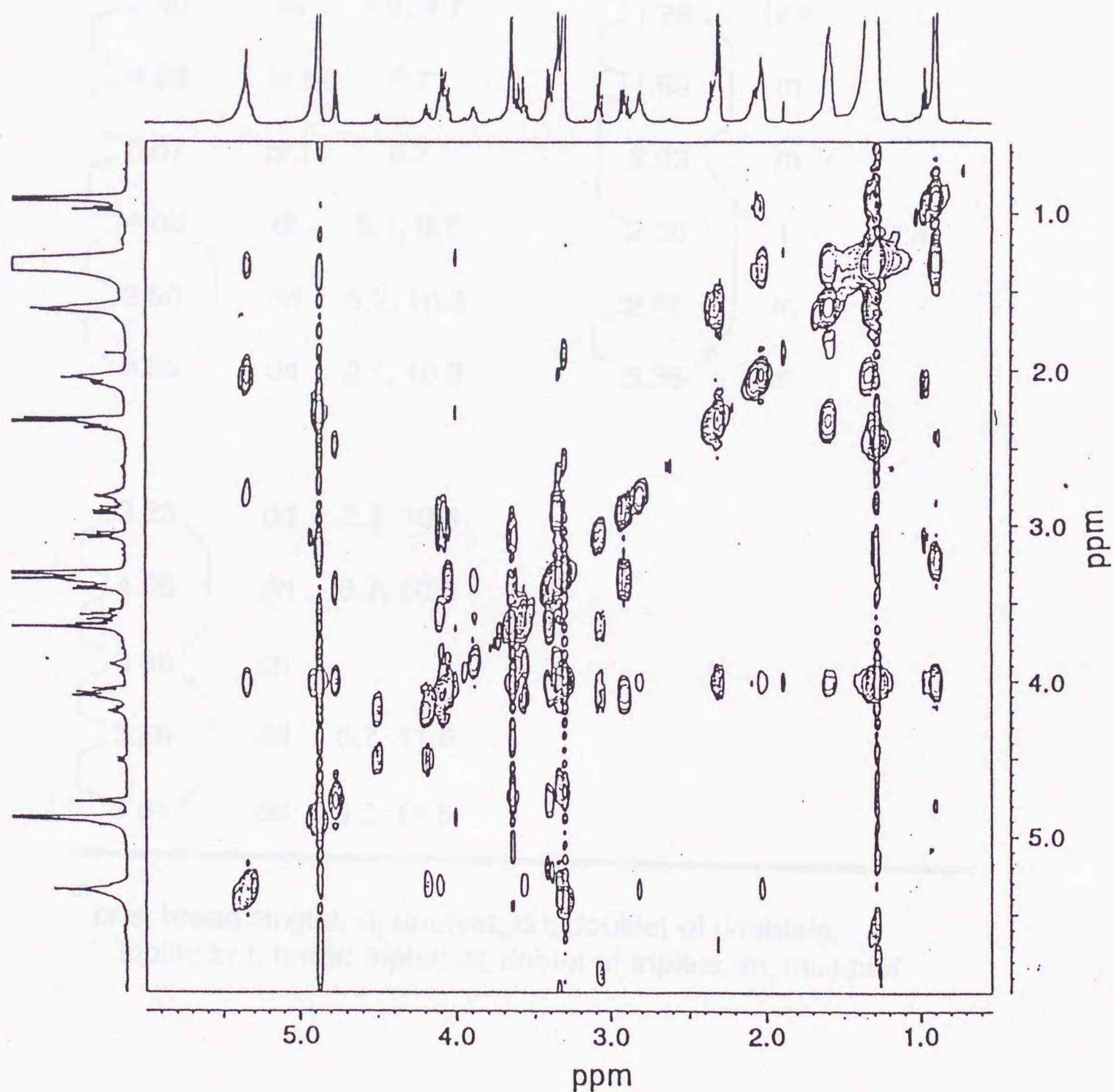


Fig. 3-18. HH-COSY spectrum of inhibitor B.

Table 3-13. Correlations disclosed in consideration of HH-COSY of inhibitor B

δ_H	Multiplicity ^a	J in Hz	δ_H	Multiplicity ^a	J in Hz
4.77	d	3.9	0.89	t	6.8
3.40	dd	3.9, 9.7	1.28	br.s	
3.64	br.t	9.7	1.59	m	
3.07	br.t	9.7	2.03	m	
4.09	dt	2.1, 9.7	2.30	t	7.4
2.90	dd	9.2, 10.3	2.81	m	
3.35	dd	2.1, 10.3	5.36	m	
3.35	dd	2.1, 10.3			
4.05	dd	3.7, 10.3			
3.88	m				
3.55	dd	5.7, 11.5			
3.61	dd	9.2, 11.5			

^a

br.s, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; br.t, broad triplet; dt, doublet of triplets; m, multiplet.

HH-COSYスペクトルの結果から、2.90～4.77 ppmに酸素が置換した7つの連続するプロトンのグループ、3.35～4.05 ppmに酸素が置換した5つの連続するプロトンのグループおよび0.89～5.36 ppmにアルキルおよびアルケンに由来するプロトンのグループに分けることができる。これらのグループは阻害物質Aの3つのグループと類似している。

0.89~5.36 ppmのグループは脂肪酸残基に特徴的なシグナルを示し、4.77~2.90 ppmのグループは阻害物質Aで考察したように6-スルホ- α -D-キノボピラノースに特徴的なシグナルである。3.35~4.05 ppmのグループはカップリングパターンからグリセロール部分と推定できるが、ケミカルシフトが阻害物質Aのグリセロール部分と異なる。よって、阻害物質Bはグリセロ糖脂質であり、阻害物質Aとグリセロール部分の構造が異なると推定した。

ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bをグリセロ糖脂質と確認するために、HMQCスペクトルを測定してH-C相関を調べた。ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質BのHMQCスペクトル (Fig. 3-19) を測定し、クロスピークから相関の組 (Table 3-14) を明らかにした。54.2、70.8 および64.2 ppmのカーボンはそれぞれ非等価メチレンである。70.8、72.5 および64.2 ppmの3つのカーボンのグループは、それらのケミカルシフトおよびDEPTスペクトルから、メチレン-メチン-メチレンとつながるグリセロール骨格のシグナルと同定した。グリセロール骨格のプロトンシグナルのケミカルシフト値が阻害物質AとBで比較するとグリセロール骨格の2位で異なるので、阻害物質Bではグリセロールの2位で置換様式が異なると推定できる。炭素6個とプロトン7個のもう一つのグループのケミカルシフト、カップリング定数および2次元NMRスペクトルのデータを阻害物質Aのデータと比較したところ類似性が高いので、そのグループを6-スルホ- α -D-キノボピラノースと決定した。

以上の結果より、阻害物質Bの部分構造を脂肪酸残基、グリセロール骨格および6-スルホ- α -D-キノボピラノースと決定した。

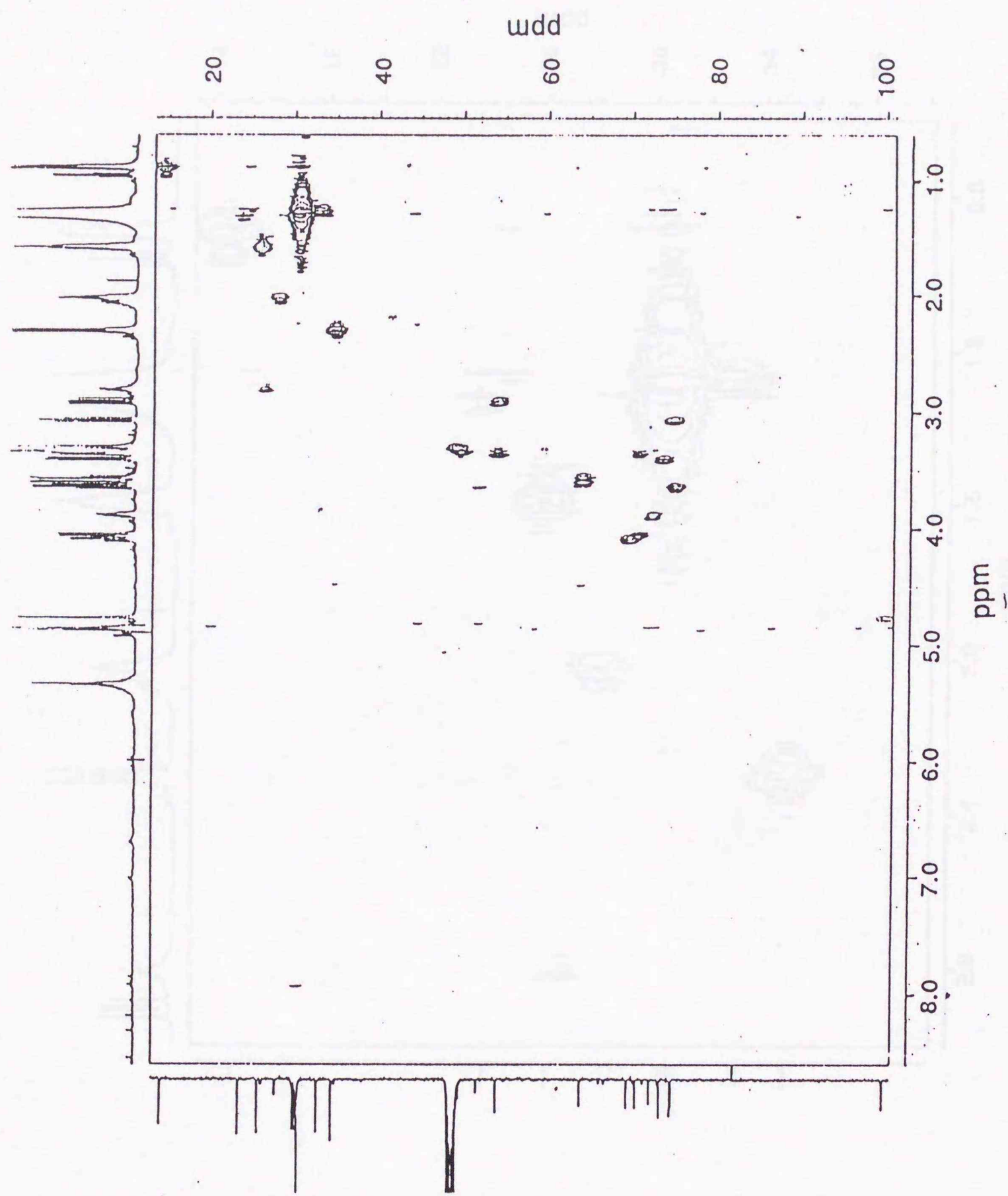


Fig. 3-19a. HMQC spectrum of inhibitor B.

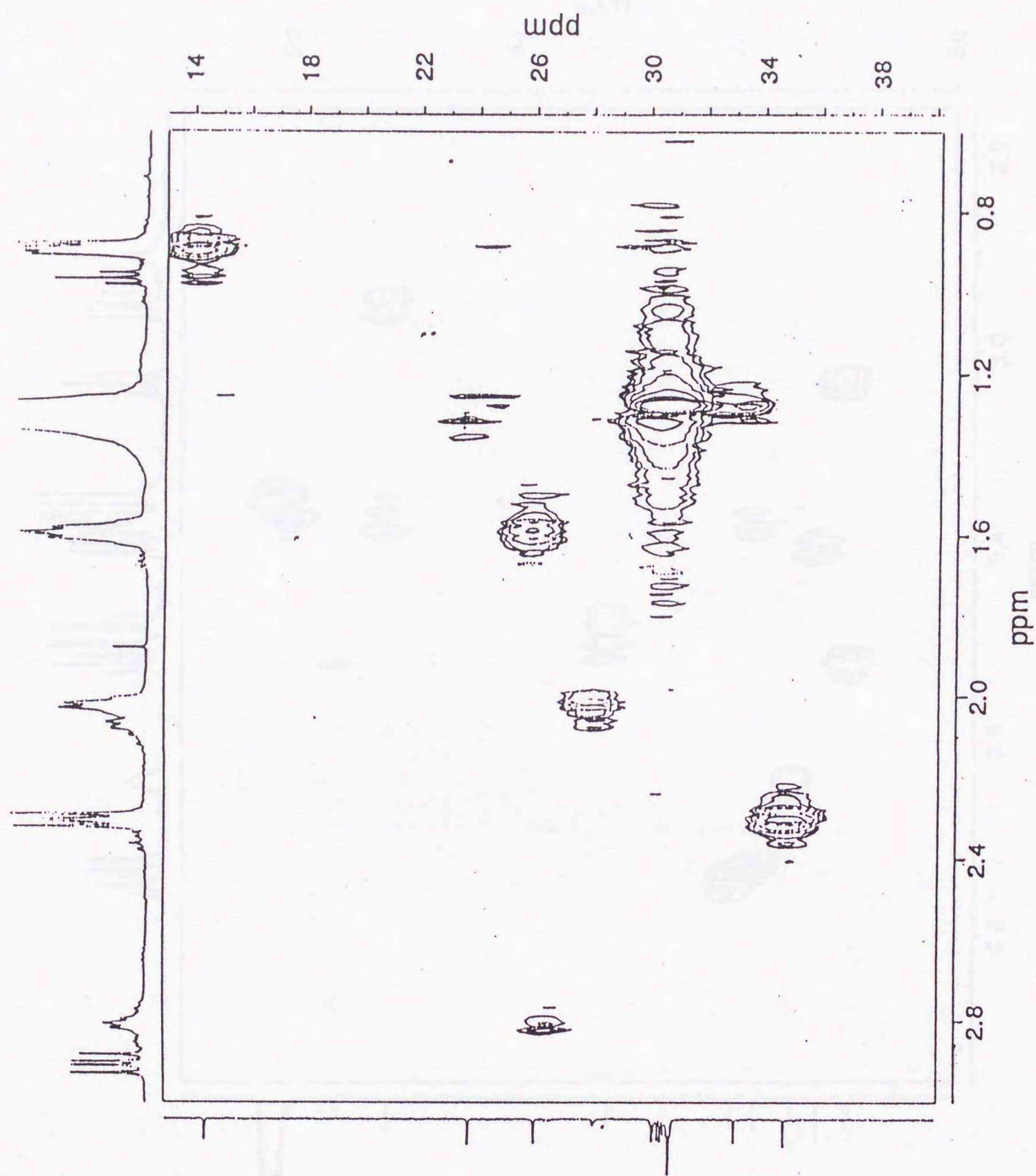


Fig. 3-19b. Expansion of HMQC spectrum of inhibitor B.

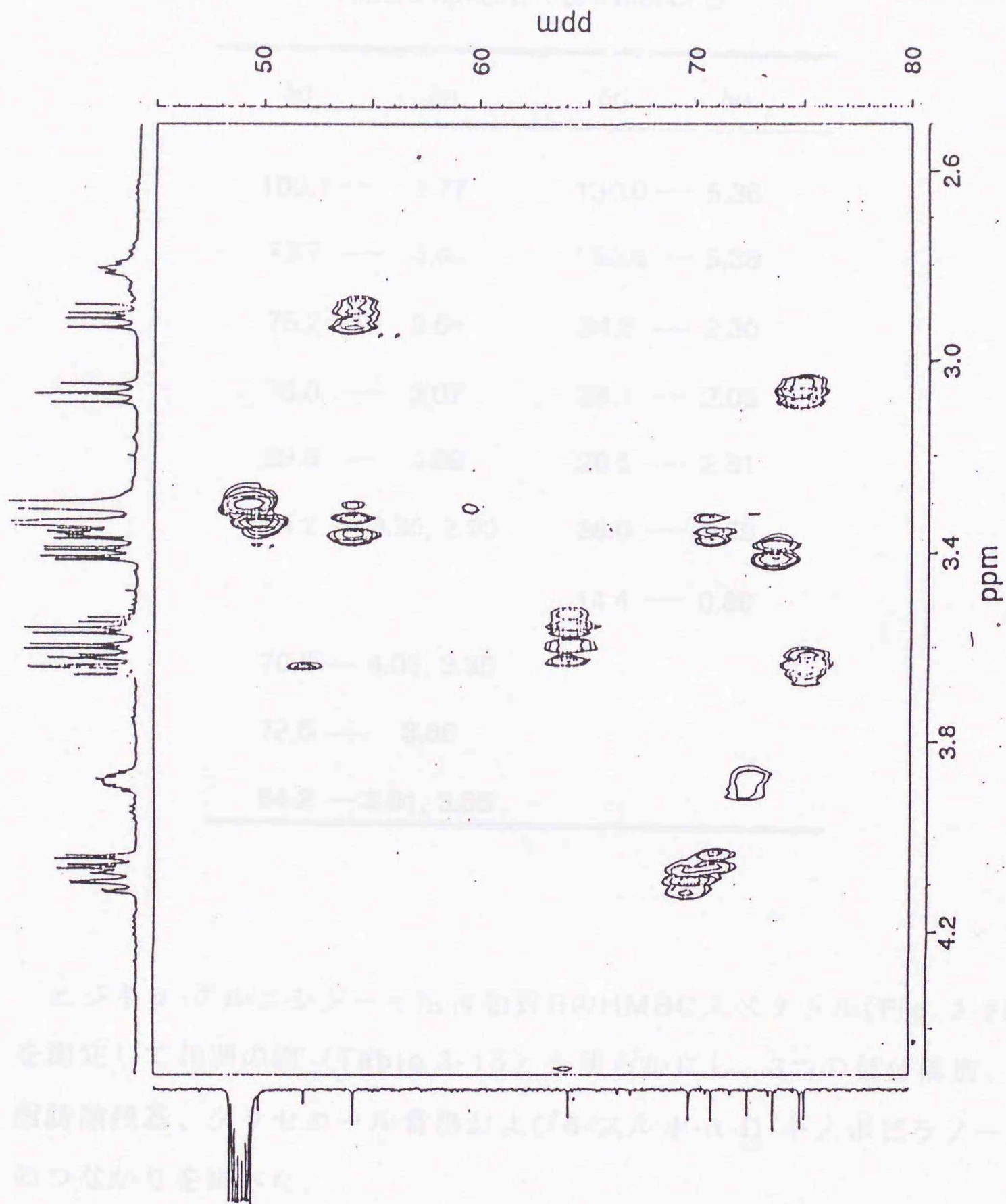


Fig. 3-19c. Expansion of HMQC spectrum of inhibitor B.

Table 3-14. Correlations disclosed in cosideration of
HMQC spectrum of inhibitor B

δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
100.1	— 4.77	130.9	— 5.36
73.7	— 3.40	130.8	— 5.36
75.2	— 3.64	34.8	— 2.30
75.0	— 3.07	28.1	— 2.03
69.8	— 4.09	26.5	— 2.81
54.2	— 3.35, 2.90	26.0	— 1.59
		14.4	— 0.89
70.8	— 4.05, 3.35		
72.5	— 3.88		
64.2	— 3.61, 3.55		

ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質BのHMBCスペクトル(Fig. 3-20)を測定して相関の組 (Table 3-15) を明らかにし、3つの部分構造、脂肪酸残基、グリセロール骨格および6-スルホ- α -D-キノボピラノースのつながりを調べた。

各部分構造内でのHMBC相関ピークはそれぞれの構造を支持している。部分構造間の相関ピークの δ_C 174.9- δ_H 3.61は、脂肪酸残基のエステルカーボンとグリセロール骨格の一方のメチレンプロトンとの相関だった。また、 δ_C 100.1- δ_H 3.35および δ_C 67.1- δ_H 4.76はアノマー位のシグナルとグリセロール骨格のもう一方のメチレン間でみられた。これらのHMBCスペクトルの結果 (Fig. 3-21) から、グリセロール

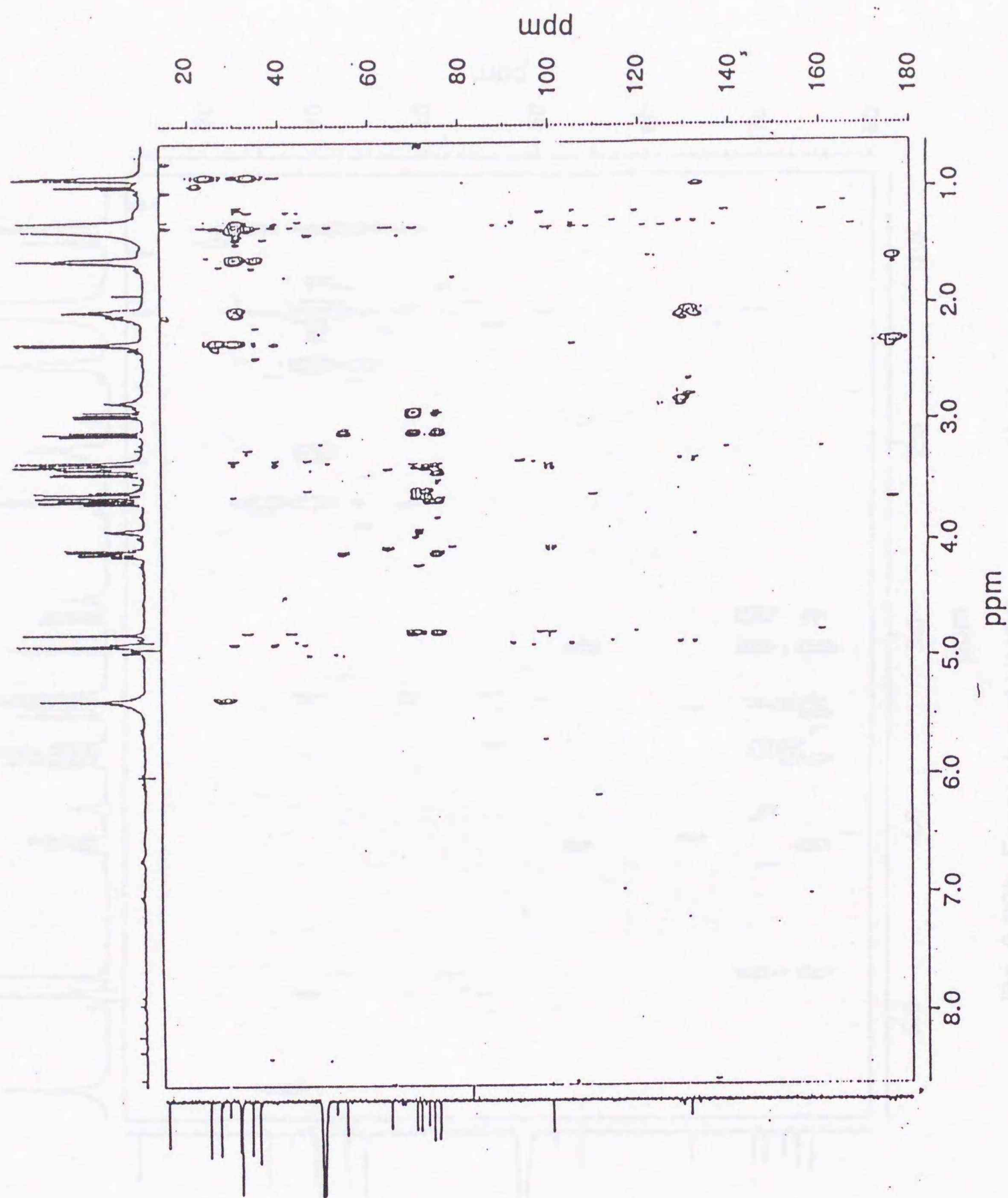


Fig. 3-20a. HMBC spectrum of inhibitor B.

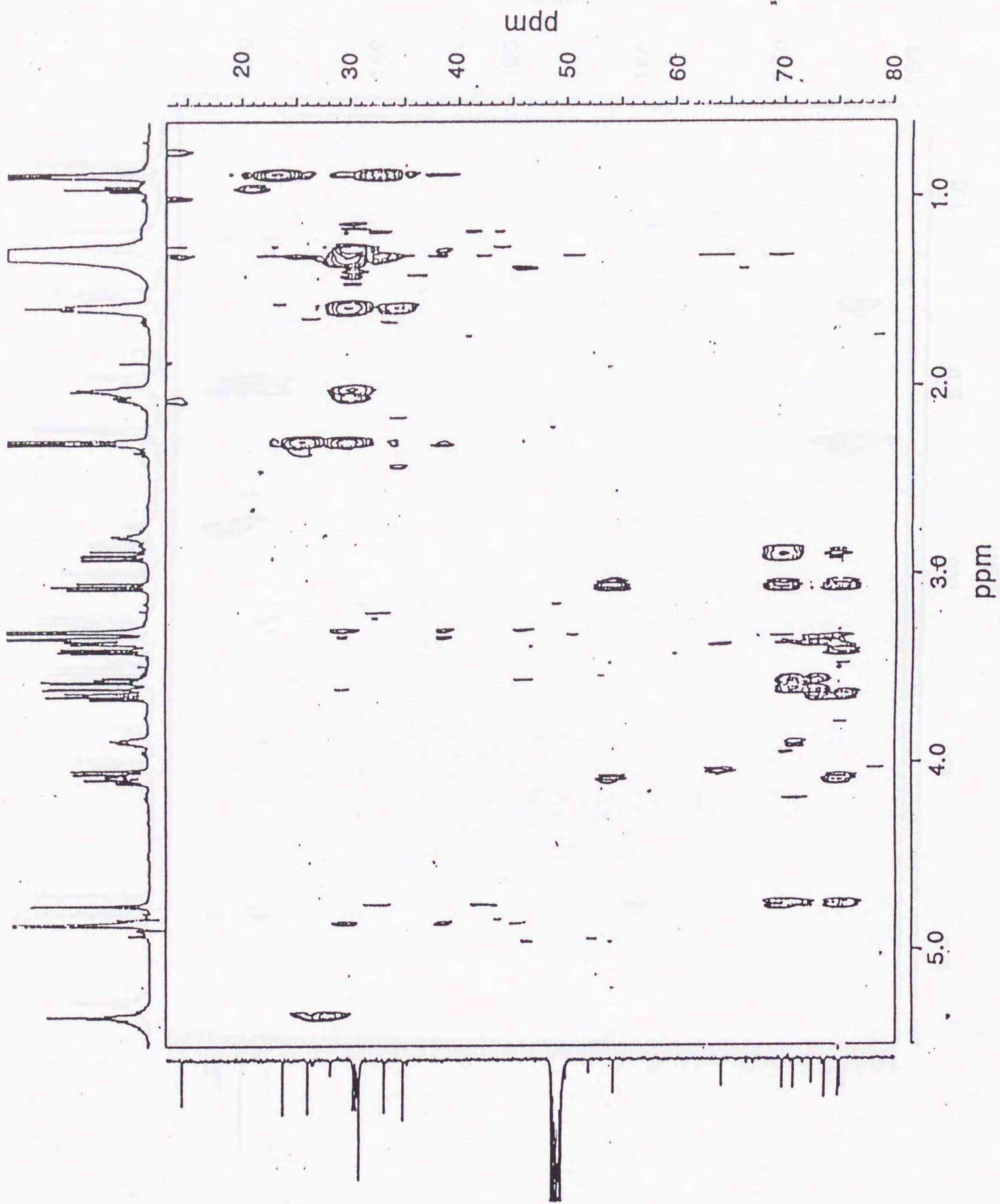


Fig. 3-20b. Expansion of HMB spectrum of inhibitor B.

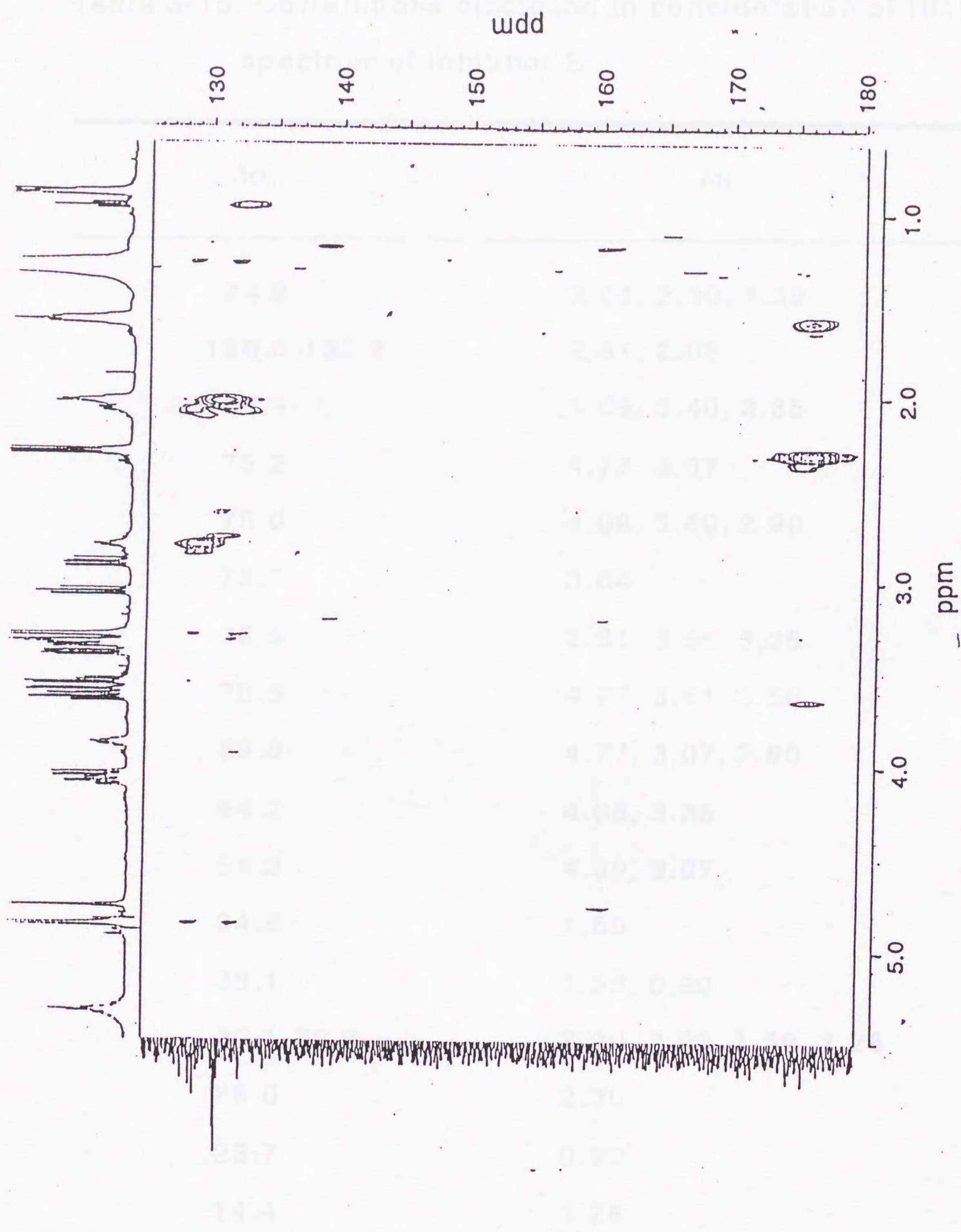


Fig. 3-20c. Expansion of HMBC spectrum of inhibitor B.

Table 3-15. Correlations disclosed in consideration of HMBC spectrum of inhibitor B

δ_C	δ_H
174.9	3.61, 2.30, 1.59
130.8-130.9	2.81, 2.03
100.1	4.09, 3.40, 3.35
75.2	4.77, 3.07
75.0	4.09, 3.40, 2.90
73.7	3.64
72.5	3.61, 3.55, 3.35
70.8	4.77, 3.61, 3.55
69.8	4.77, 3.07, 2.90
64.2	4.05, 3.35
54.2	4.09, 3.07
34.8	1.59
33.1	1.28, 0.89
30.1-30.9	2.30, 2.03, 1.59, 1.28
26.0	2.30
23.7	0.89
14.4	1.28

骨格の1位に脂肪酸残基が置換し、3位に糖が置換した糖脂質であることが明らかとなった。

各種機器分析のデータから、阻害物質Bの平面構造を1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)グリセロール (SQMG, 62) と同定した。ヒジキ α -グルコシダーゼ阻害物質Bの ^1H -NMRデータの帰属をFig. 3-22に、 ^{13}C -NMRデータの帰属をFig. 3-23に示す。阻害物質AとBのNMRデータの比較をTable 3-16に示す。

阻害物質Bの旋光度 $[\alpha]_D$ は $+22^\circ$ (c 0.121, methanol)だった。この値は阻害物質Aと符号が同じなので、阻害物質Bの絶対配置は1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロールと決定した。

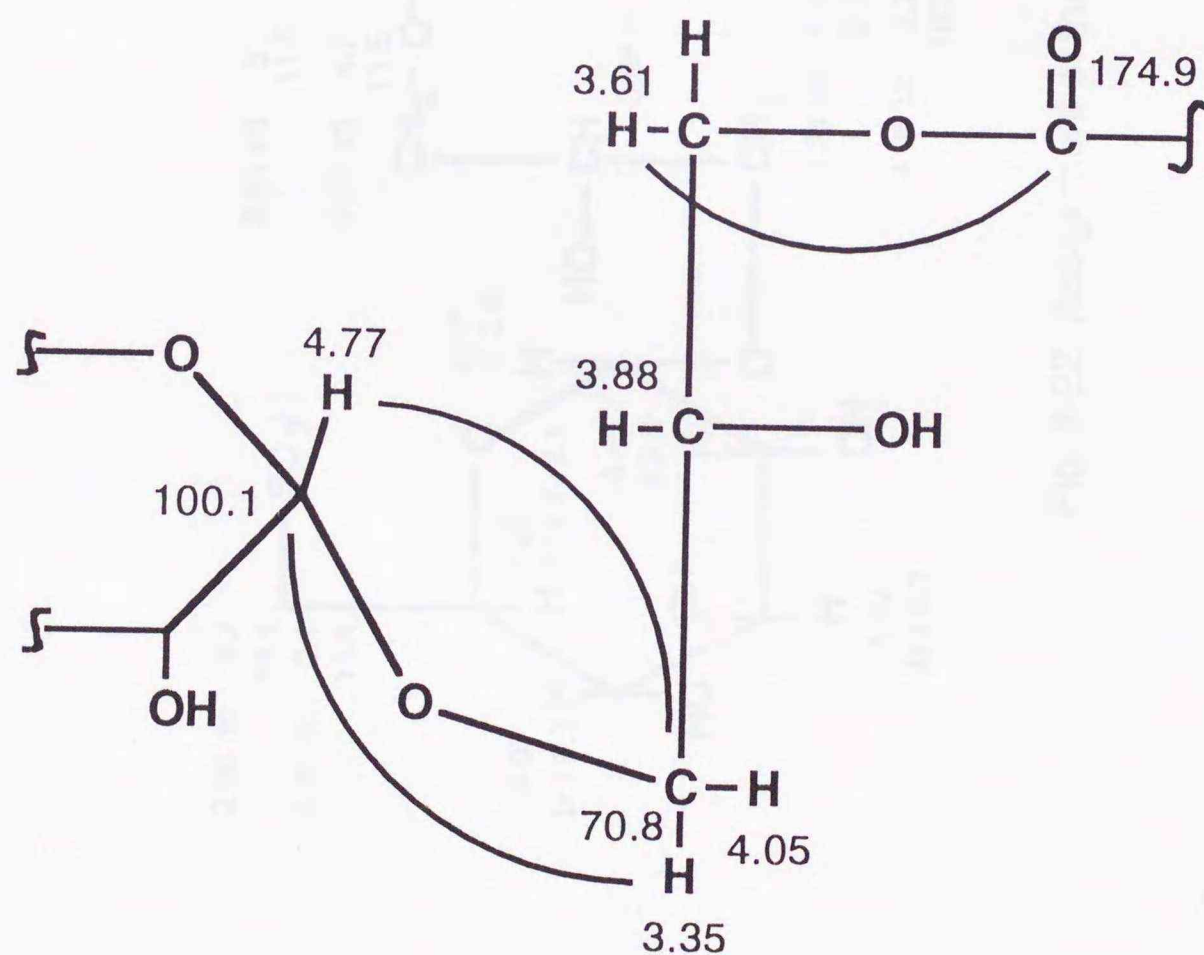


Fig. 3-21. HMBC correlations of inhibitor B.

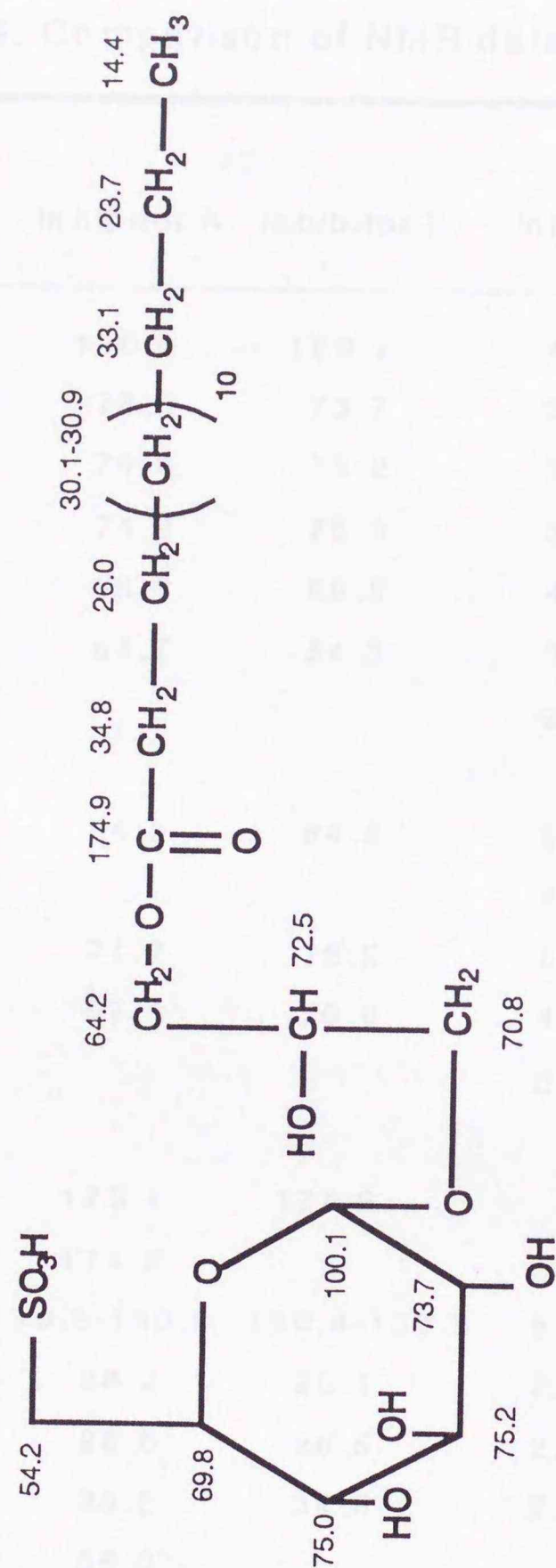


Fig. 3-23. Assignment of the ^{13}C NMR data of inhibitor B.

Table 3-16. Comparison of NMR data of inhibitors A and B

Position	δC		δH	
	Inhibitor A	Inhibitor B	Inhibitor A	Inhibitor B
1	100.0	100.1	4.76	4.77
2	73.4	73.7	3.41	3.40
3	74.8	75.2	3.63	3.64
4	74.9	75.0	3.09	3.07
5	69.8	69.8	4.06	4.09
6	54.2	54.3	3.33	3.35
			2.92	2.90
1'	64.3	64.2	4.49	3.61
			4.19	3.55
2'	71.7	72.5	5.33	3.88
3'	67.1	70.8	4.09	4.05
			3.57	3.35
C=O	175.1	174.9		
	174.9			
-CH=CH-	130.8-130.9	130.8-130.9	5.36	5.36
-CH ₂ -CH=CH-	28.2	28.1	2.02	2.03
=CH-CH ₂ -CH=	26.6	26.5	2.81	2.81
-CH ₂ -C(O)O-	35.2	34.8	2.33	2.30
	35.0			
-CH ₂ -CH ₂ -C(O)O-	26.0	26.0	1.59	1.59
-CH ₂ -	30.0-31.0	30.1-30.9	1.28	1.28
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	33.1	33.1	1.28	1.28
-CH ₂ -CH ₃	23.8	23.7	1.28	1.28
-CH ₃	14.5	14.4	0.89	0.89

3-3 α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質SQDGおよびSQMGに関する

考察

食用海藻の乾燥ヒジキに含まれる α -グルコシダーゼ阻害性物質を検索したところ、植物や微生物の主要な糖脂質⁷⁰⁾の1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロール (SQDG) とそのリゾ体の1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロール (SQMG) を得た。これらはスルホン酸基を有する新しいタイプの α -グルコシダーゼ阻害性物質であり、各種生物由来の α -グルコシダーゼや他の糖質加水分解酵素に対してどのような阻害選択性があるか興味深い。

SQDGは光合成組織のプラスチドに多く含まれている⁷⁰⁾が、光合成におけるSQDGの役割はわかっていない。一方、SQDGの生物活性がしだいに明らかにされており、腹足類に対する摂食刺激作用、⁷¹⁾ イガイ類の忌避作用、⁷²⁾ ホヤ幼生の変態のプロモーター活性、⁶⁸⁾ 抗腫瘍活性、⁷³⁾ HIVに対する抗ウィルス活性⁶⁹⁾が確認されている。SQMGでは溶血性⁷⁴⁾が知られている。これらの生物活性の起こるメカニズムは不明であるが、抗ウィルス性や抗腫瘍性の場合には糖蛋白質の糖鎖プロセッシング過程を α -グルコシダーゼ阻害物質が攪乱していると推定される。

第4章 海藻糖脂質の α -グルコシダーゼ阻害の速度論的解析

第1節 糖脂質スルホキノボシルジアシルグリセリドおよびスルホキノボシルモノアシルグリセリドの α -グルコシダーゼ阻害性

1-1 実験方法

α -グルコシダーゼ阻害性の速度論的解析には第3章第1節および第2節で単離したヒジキのスルホキノボシルジアシルグリセリド (SQDG) およびスルホキノボシルモノアシルグリセリド (SQMG) を使用した。比較のために plant leaf 由来の市販 SQDG (LIPID PRODUCTS) および紅藻のフジマツモから SQDG を単離して使用した。

α -グルコシダーゼ阻害糖脂質を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に所定濃度になるように溶解して阻害物質溶液とした。 p -ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド (東京化成工業 (株)) を 5, 10 および 20 mM になるように 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して基質溶液とした。さらに、5 μ g/ml (0.525 unit/ml) の濃度になるように α -グルコシダーゼ (*Saccharomyces cerevisiae* 由来、和光純薬工業 (株)) を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して酵素溶液とした。ただし、1 unit は 1 分間に 1 μ mol の p -ニトロフェノールを遊離する酵素活性とした。

阻害物質溶液 0.1 ml、基質溶液 0.1 ml および 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.2 ml を試験管に加え、混合後に 37°C、5 分間恒温水槽でプレインキュベートした。酵素溶液 0.1 ml を加え、37°C、2 分間恒温水槽で酵素反応を行った。0.25 M 炭酸ナトリウム水溶液 1.5

mℓ を添加して反応を止め、400 nmで遊離した *p*-ニトロフェノールアニオンの吸光度を測定した。*p*-ニトロフェノール（和光純薬工業（株））の検量線を用いて、吸光度から遊離した *p*-ニトロフェノール量を算出した。

1-2 ヒジキSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性

ヒジキより得たSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性試験測定に先立ち、SQDGの平均分子量を計算した。ヒジキSQDGは脂質分子種混合物であったので、ガスクロマトグラフィーで求めた脂肪酸組成(Table 3-6)からその他の分を差し引いて百分率を再計算し、ヒジキSQDGの平均分子量を 814 と算出した。測定に用いたSQDGの酵素反応系内濃度を 0, 4.91, 7.37, 9.82 μM 、基質酵素反応系内濃度を 0.2, 0.4, 0.8 mM とした。 α -グルコシダーゼ阻害性試験を行った結果 (Table 4-1) から Lineweaver-Burkプロット⁷⁵⁾ (Fig. 4-1)、Dixonプロット⁷⁵⁾ (Fig. 4-2) を導いた。

Lineweaver-Burkプロットでは、各阻害物質濃度の直線が縦軸上で交点を結んだので、ヒジキSQDGの酵母 α -グルコシダーゼに対する阻害様式は拮抗阻害であった。⁷⁵⁾ Dixonプロットの交点の値からヒジキSQDGの阻害物質定数 K_i を $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ と求めた。既知 α -グルコシダーゼ阻害物質のカスタノスペルミン (27) の K_i 値はリソソーム α -グルコシダーゼに対して $0.1 \mu\text{M}$ だった。酵素源が違うので一概に比較はできないが、SQDGは中程度の阻害性を示すと考えられる。なお、酵素反応前後でのSQDGのスポットをTLCで確認すると変化がないので、SQDGは酵素による加水分解を受けていなかった。

Table 4-1. Inhibitory activity of *hijiki* SQDG against yeast α -glucosidase

SQDG (μ M)	Substrate ^a					
	0.2 mM		0.4 mM		0.8 mM	
	PNP ^b (nmol)	Inhibition ^c (%)	PNP (nmol)	Inhibition (%)	PNP (nmol)	Inhibition (%)
0	50.1	-	66.1	-	82.1	-
4.91	31.7	36.7	47.5	28.7	68.1	17.1
7.37	24.2	51.7	38.4	42.3	61.2	25.5
9.82	21.4	57.3	35.0	47.4	59.1	28.0

^aSubstrate, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

^bPNP, *p*-nitrophenol liberated after α -glucosidase reaction.

^cInhibition (%) = {(control PNP - PNP with an inhibitor) / control PNP} $\times$ 100

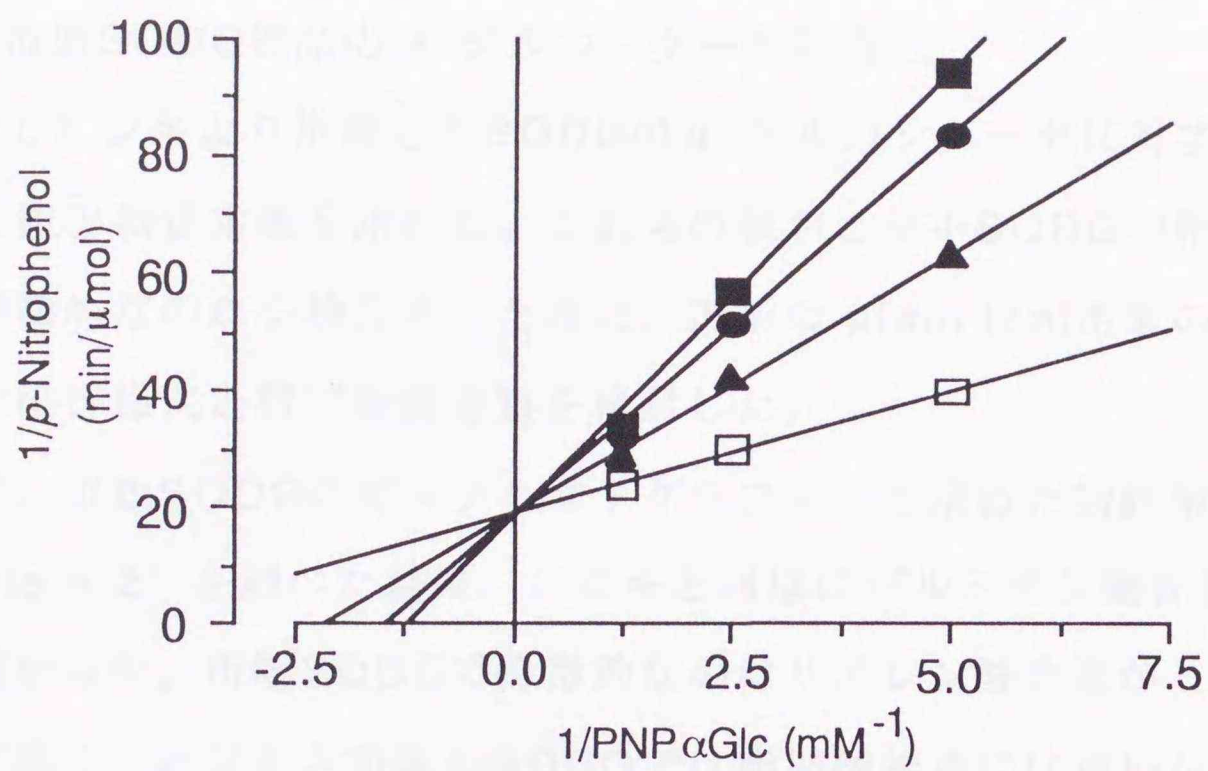


Fig. 4-1. Lineweaver-Burk plots of inhibition of *hijiki* SQDG against yeast α -glucosidase.

PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

□, [SQDG] 0 μ M; ▲, [SQDG] 4.91 μ M;

●, [SQDG] 7.37 μ M; ■, 9.82 μ M.

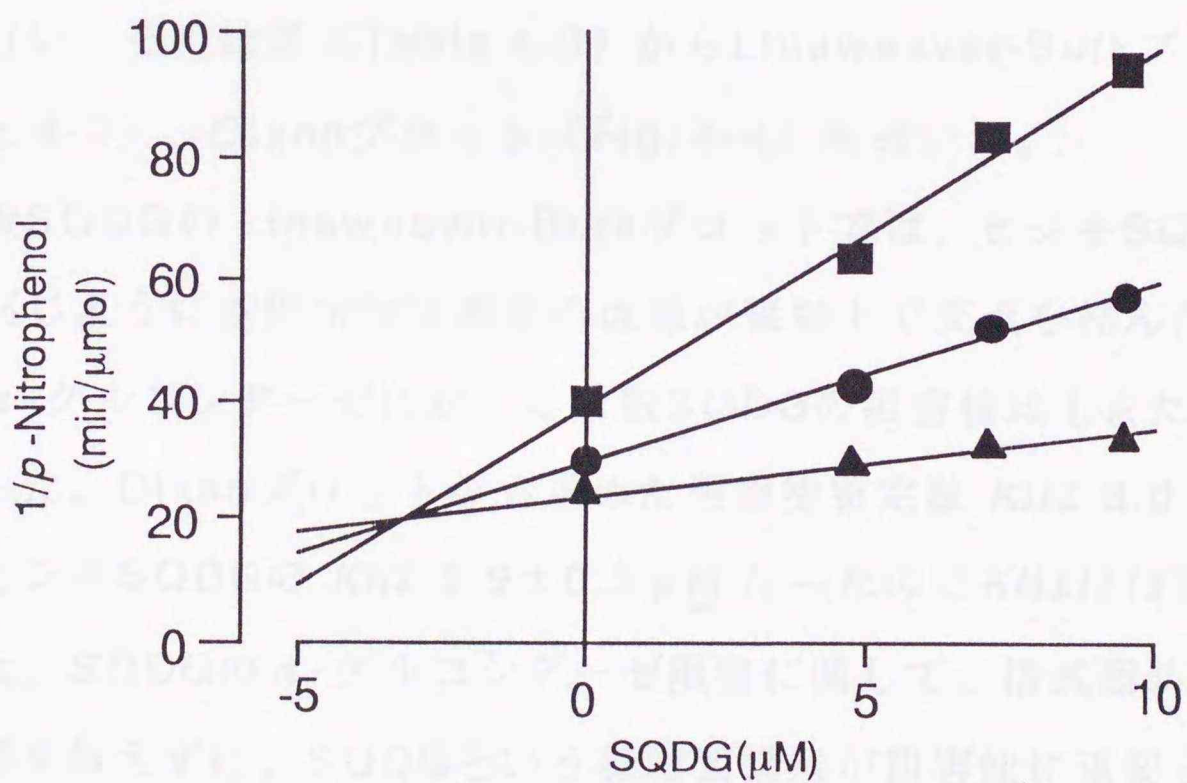


Fig. 4-2. Dixon plots of inhibition of *hijiki* SQDG against yeast α -glucosidase.

PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

■, [PNP α Glc] 0.2 mM; ●, [PNP α Glc] 0.4 mM;

▲, [PNP α Glc] 0.8 mM.

1-3 市販SQDG標品の α -グルコシダーゼ阻害性

1-2でヒジキより単離したSQDGの α -グルコシダーゼに対する阻害様式と阻害物質定数を求めた。これらの値がヒジキSQDGの脂質分子種に特徴的なのかを検討するために、市販の plant leaf由来のSQDG標品で阻害様式と阻害物質定数を検討した。

まず、市販SQDGのガスクロマトグラフィーで求めた脂肪酸組成 (Table 4-2) を調べた結果、ヒジキと同様にパルミチン酸含量がもっとも高かった。市販SQDGで特徴的なのはリノレン酸含量がヒジキに比べて高く、ヒジキと市販のSQDGでは脂肪酸組成には違いがみられた。市販SQDGの脂肪酸組成からその他の分を差し引いて百分率を再計算し、その平均分子量を 816 と算出した。

市販SQDGの酵素反応系内濃度を 0, 2.45, 4.90, 7.36 μM 、基質酵素反応系内濃度を 0.2, 0.4, 0.8 mM とし、 α -グルコシダーゼ阻害性試験を行い、その結果 (Table 4-3) から Lineweaver-Burk プロット (Fig. 4-3)、Dixon プロット (Fig. 4-4) を導いた。

市販SQDGの Lineweaver-Burk プロットでは、ヒジキSQDGの場合と同じように各阻害物質濃度の直線が縦軸上で交点を結んだので、酵母 α -グルコシダーゼに対する市販SQDGの阻害様式もまた拮抗阻害であった。Dixon プロットから求めた阻害物質定数 K_i は 3.0 μM だった。ヒジキSQDGの K_i は $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ だったので K_i はほぼ同じ値を示した。SQDGの α -グルコシダーゼ阻害に関して、構成脂肪酸はあまり影響を与えずに、SQDGという糖脂質構造が阻害性に重要と推定できる。さらに、阻害様式が拮抗阻害ということも考えあわせると、スルホキノボシド構造が阻害活性部位と考えられる。

Table 4-2. Fatty acid composition of purchased SQDG

Fatty acid	Composition (%)
Palmitic (16:0)	45.7
Linolenic (18:3)	41.8
Linoleic (18:2)	4.4
Palmitoleic (16:1)	2.1
Others	6.0

Table 4-3. Inhibitory activity of purchased SQDG against yeast α -glucosidase

	Substrate ^a					
	0.2 mM		0.4 mM		0.8 mM	
SQDG (μ M)	PNP ^b (nmol)	Inhibition ^c (%)	PNP (nmol)	Inhibition (%)	PNP (nmol)	Inhibition (%)
0	63.2	-	75.7	-	101	-
2.45	57.8	8.5	71.4	5.7	96.8	4.1
4.90	52.0	17.7	63.2	16.5	89.5	11.3
7.36	42.3	33.1	59.3	21.7	82.1	18.6
9.81	25.7	59.3	34.3	54.7	70.3	30.3

^aSubstrate, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.^bPNP, *p*-nitrophenol liberated after α -glucosidase reaction.^cInhibition (%) = {(control PNP-PNP with an inhibitor)/control PNP} $\times$ 100

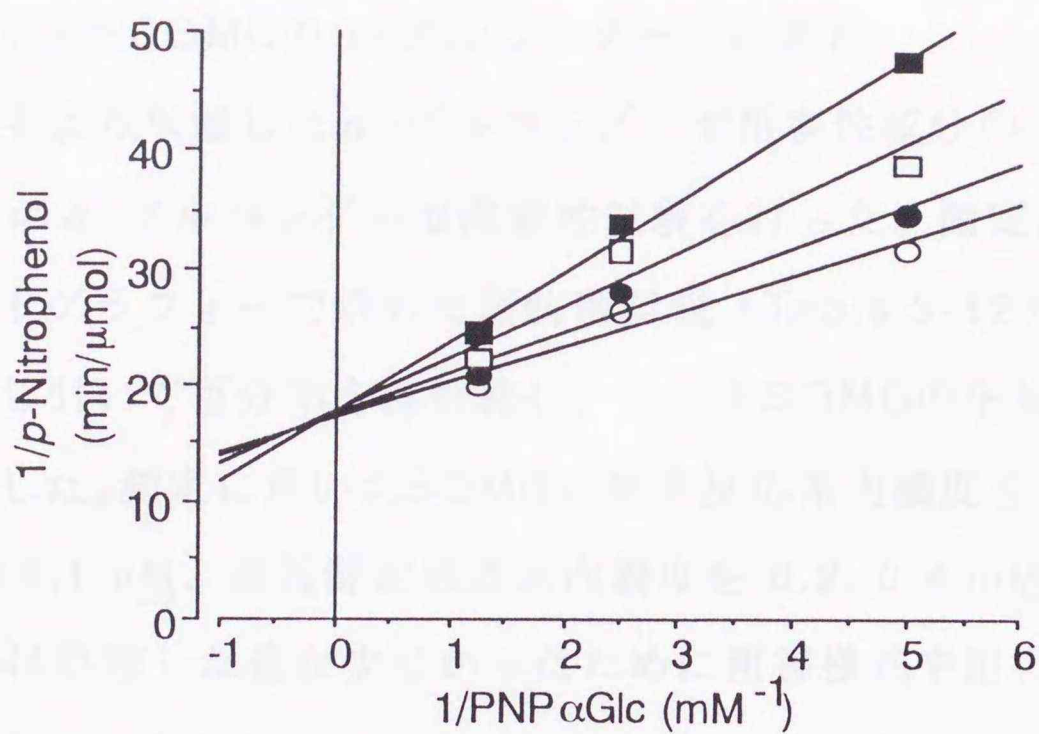


Fig. 4-3. Lineweaver-Burk plots of inhibition of purchased SQDG against yeast α -glucosidase.
 PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.
 o, [SQDG] 0 μ M; ●, [SQDG] 2.45 μ M;
 □, [SQDG] 4.90 μ M; ■, 7.36 μ M.

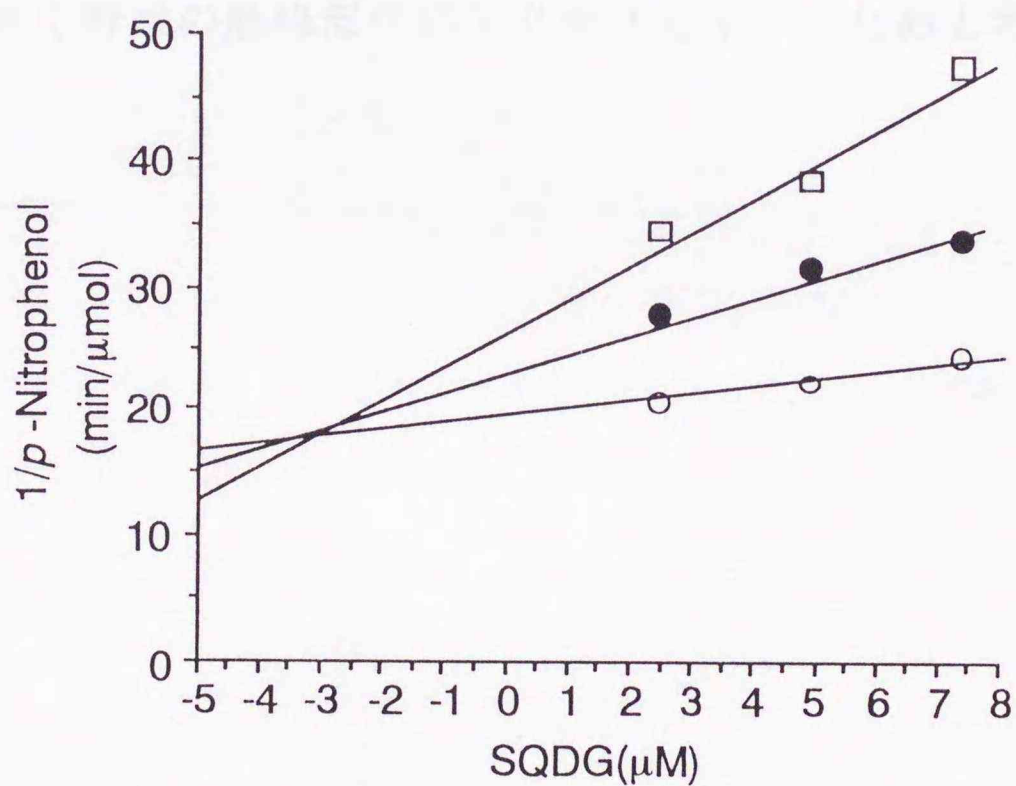


Fig. 4-4. Dixon plots of inhibition of purchased SQDG against yeast α -glucosidase.
 PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.
 □, [PNP α Glc] 0.2 mM; ●, [PNP α Glc] 0.4 mM;
 ○, [PNP α Glc] 0.8 mM.

1-4 ヒジキSQMGの α -グルコシダーゼ阻害性

ヒジキより単離した α -グルコシダーゼ阻害性成分のうちもう一方のSQMGの α -グルコシダーゼ阻害性試験を行った。測定に先立ち、ガスクロマトグラフィーで求めた脂肪酸組成 (Table 3-12) からその他の分を差し引いて百分率を再計算し、ヒジキSQMGの平均分子量を 563 と算出した。測定に用いたSQMGの酵素反応系内濃度を 0, 3.52, 7.04, 10.6, 14.1 μM 、基質酵素反応系内濃度を 0.2, 0.4 mM とした。SQMGは単離した量が少なかったために阻害様式や阻害物質定数を求めることができなかった。そこで、SQMGの酵母 α -グルコシダーゼ阻害性試験の結果 (Table 4-4) から、SQMGとSQDGの α -グルコシダーゼ阻害率 (Fig. 4-5) を比較した。同濃度でSQMGのほうが阻害率が高かったのも、その理由をモノアシル体のほうがジアシル体より親水性が高く酵素の触媒部位にアクセスしやすいためと考えた。

Table 4-4. Inhibitory activity of *hijiki* SQMG against yeast α -glucosidase

SQMG (μ <u>M</u>)	Substrate ^a			
	0.2 <u>mM</u>		0.4 <u>mM</u>	
	PNP ^b (nmol)	Inhibition ^c (%)	PNP (nmol)	Inhibition (%)
0	52.8	-	75.2	-
3.52	24.9	52.8	42.7	43.2
7.04	11.5	78.2	25.3	66.4
10.6	5.05	90.4	13.4	82.2
14.1	2.68	94.9	8.06	89.3

^aSubstrate, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

^bPNP, *p*-nitrophenol liberated after α -glucosidase reaction.

^cInhibition (%) = {(control PNP-PNP with an inhibitor)/control PNP} $\times$ 100

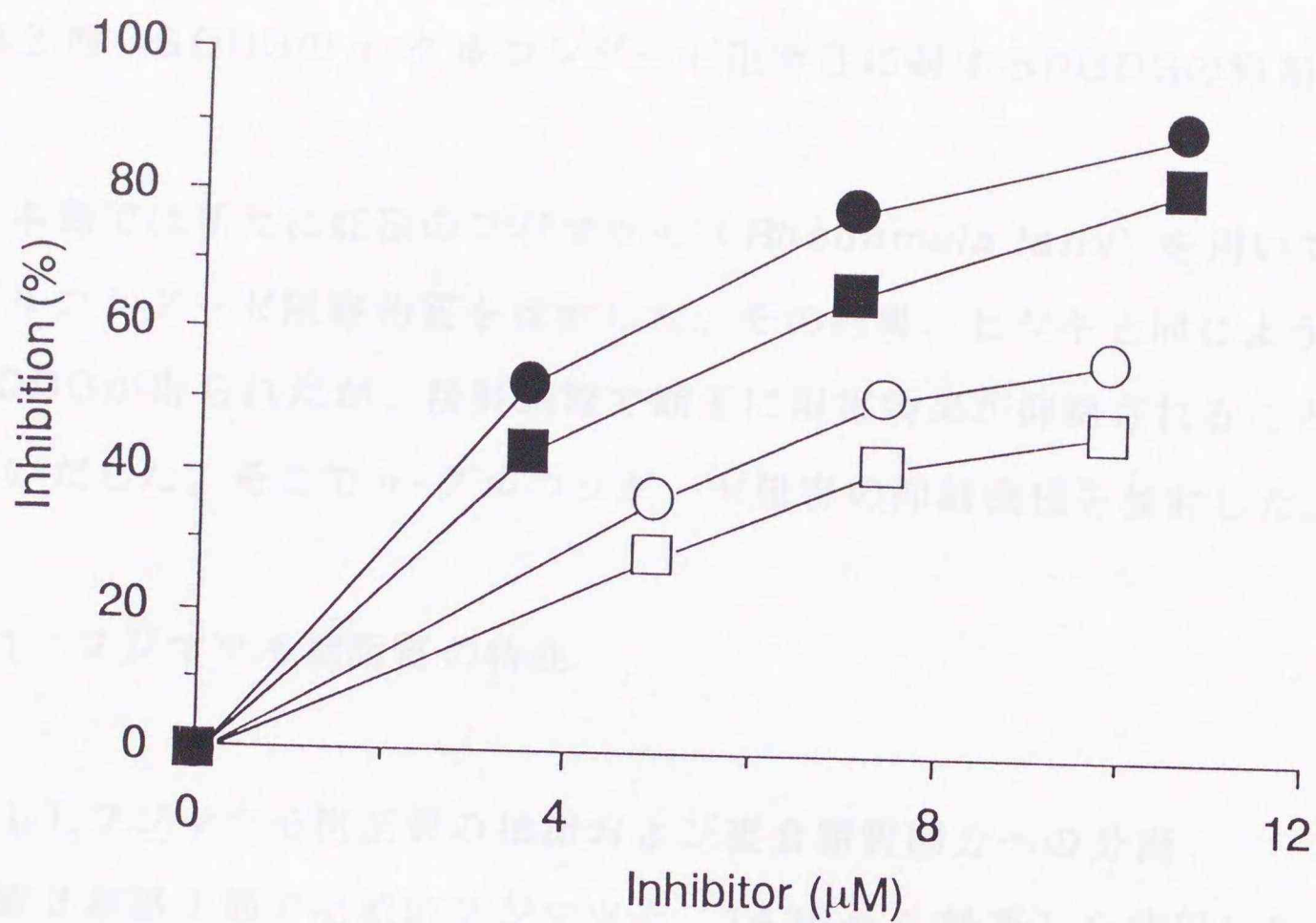


Fig. 4-5. Inhibition (%) of hijiki SQDG and SQMG against yeast α -glucosidase.

Symbols are as follows: ●, SQMG, final substrate concentration [S] 0.2 mM; ■, SQMG, [S] 0.4 mM; ○, SQDG, [S] 0.2 mM; □, SQDG, [S] 0.4 mM.

第2節 SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対するDGDGの抑制効果

本節では新たに紅藻のフジマツモ (*Rhodomela larix*) を用いて α -グルコシダーゼ阻害物質を探索した。その結果、ヒジキと同じようにSQDGが得られたが、精製過程で顕著に阻害効果が抑制されることを見いだした。そこで α -グルコシダーゼ阻害の抑制機構を検討した。

2-1 フジマツモ糖脂質の特性

(1) フジマツモ粗脂質の抽出および複合脂質画分への分画

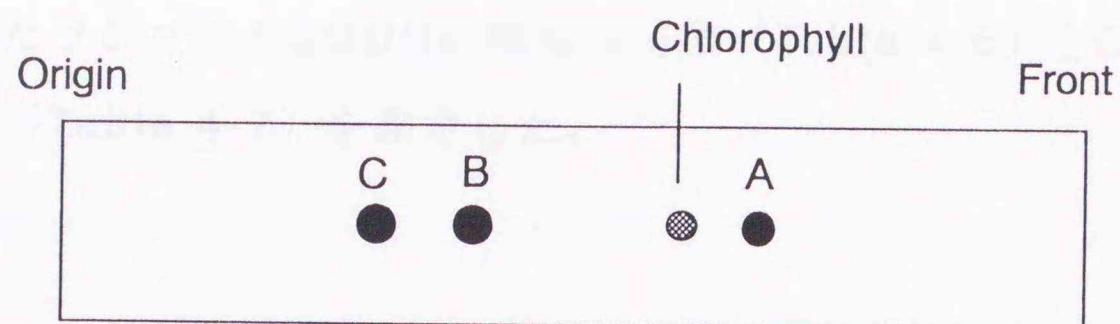
第2章第1節で記載のフジマツモ (1430 g 生鮮重) を使用した。

液体窒素で凍結後に乳鉢で粉碎し、クロロホルム：メタノール=1:2 (v/v) の混液 3 ℓ を加えホモジナイズした。減圧濾過により得た濾液にクロロホルム 2 ℓ と水 0.6 ℓ を加えて、分液漏斗で二層に分配した。下層を無水硫酸ナトリウムで脱水後に溶媒を留去した。最終的に得られた粗脂質重量は 5.63 g だった。

複合脂質画分を得るために粗脂質のうち 312 mg を Sep-Pak silica (Waters) に供した。クロロホルムで単純脂質を溶出し、メタノールで複合脂質画分を溶出した。得られた単純脂質画分重量は 134 mg (43.0%) で、複合脂質画分重量は 170 mg (54.6%) だった。

(2) 脂質クラスの精製および脂肪酸組成

フジマツモ複合脂質の特性を明らかにするために、複合脂質画分の一部を分析 TLC (Fig. 4-6) に供した。リンを検出できるディトマー試薬に呈色するスポットはなかったが、オルシノール-硫酸試薬に呈色するスポット A、B および C が観察できた。スポット C はアズール A 試薬にも呈色した。呈色試薬に対するレスポンスとそれらの R_f 値から、



Chloroform:methanol:water=65:25:4

Fig. 4-6. Thin layer chromatogram of the *fujimatsumo* complex lipid fraction.

Spots are visualized with orcinol-sulfuric acid.

スポット A、Bおよび Cをそれぞれモノガラクトシルジアシルグリセリド (MGDG, **64**)、ジガラクトシルジアシルグリセリド (DGDG, **63**) およびスルホキノボシルジアシルグリセリド (SQDG, **61**) と同定した。これらの糖脂質を複合脂質画分から TLCで分取した (Table 4-5)。

Table 4-5. Glycolipids isolated from *fujimatsumo*

Glycolipid	Percentage in the glycolipid fraction	Percentage in the total lipid fraction
MGDG	13	7.1
DGDG	31	16
SQDG	42	22

単離したフジマツモSQDGの構成脂肪酸 (Table 4-6) とDGDGの構成脂肪酸 (Table 4-7) を測定した。

Table 4-6. Fatty acid composition of *fujimatsumo* SQDG^a

Fatty acid	Composition (%)	Fatty acid	Composition (%)
16:0	42.7	14:0	5.7
18:1	11.4	19:1	3.7
16:1	9.0	18:3	3.2
22:2	5.9	20:5	3.2

^aFatty acids of less than 3% content are rejected.

Table 4-7. Fatty acid composition of *fujimatsumo* DGDG^a

Fatty acid	Composition (%)	Fatty acid	Composition (%)
16:0	27.2	18:3	7.1
20:4	15.2	18:1	6.2
22:0	10.0	14:0	5.7
16:1	7.3	18:2	4.7

^aFatty acids of less than 3% content are rejected.

フジマツモから抽出した脂質の約半分は複合脂質であり、複合脂質のほとんどが糖脂質で、リン脂質は TLC で検出できなかった。動物組織の複合脂質は一般的にリン脂質含量が高い。⁷⁶⁾ 陸上植物では複合脂質中ではグリセロ糖脂質が多いが、ホスファチジルグリセロールなどのリン脂質も検出される。⁷⁶⁾ しかし、フジマツモはリン脂質をほとんど含まないので、糖脂質供給源として有望である。フジマツモ SQDG と DGDG の主要な構成脂肪酸はともにパルミチン酸であり、これは植物糖脂質の一般的傾向と同じであった。その他の脂肪酸では、SQDG では飽和酸やモノエン酸が多く、DGDG ではアラキドン酸やドコサン酸が多かった。構成脂肪酸のこれらの特徴は藻類の糖脂質の特徴に一致する。⁷⁶⁾

2-2 フジマツモ SQDG の α -グルコシダーゼ阻害性

(1) 実験方法

α -グルコシダーゼ活性測定法は第4章第1節と同じ方法で行った。フジマツモ SQDG の構成脂肪酸から平均分子量を 817 と算出した。

(2) 結果および考察

フジマツモ SQDG の酵母 α -グルコシダーゼに対する阻害試験

(Table 4-8) から Lineweaver-Burk プロット (Fig. 4-7)、Dixon プロット (Fig. 4-8) を導いた。

Lineweaver-Burk プロットによりフジマツモ SQDG の阻害機構を検討した結果、ヒジキ SQDG や市販 SQDG 標品と同様に拮抗阻害を示した。Dixon プロットにより求めた阻害物質定数 K_i はフジマツモ SQDG で $2.50 \pm 0.83 \mu\text{M}$ だった。 K_i 値はヒジキ SQDG ($2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$) や

Table 4-8. Inhibitory activity of *fujimatsumo* SQDG against yeast α -glucosidase

	Substrate ^a					
	0.2 mM		0.4 mM		0.8 mM	
SQDG (μ M)	PNP ^b (nmol/min)	Inhibition ^c (%)	PNP (nmol/min)	Inhibition (%)	PNP (nmol/min)	Inhibition (%)
0	34.8	-	45.9	-	51.3	-
2.40	25.1	27.9	37.3	18.7	45.1	12.1
4.79	15.9	54.3	30.0	34.6	33.8	34.1
9.58	11.5	67.0	22.2	51.6	27.5	46.4

^aSubstrate, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

^bPNP, *p*-nitrophenol liberated after α -glucosidase reaction.

^cInhibition (%) = {(control PNP-PNP with an inhibitor)/control PNP} $\times$ 100

市販SQDG標品 (3.0 μ M) の値に比べて、低い値となっている。しかし、データ数が少ないため統計的に有意差があるかは不明である。3種類の植物由来SQDGの α -グルコシダーゼに対する阻害性に大きな差は認められなかったので、阻害活性への脂肪酸残基の違いはあまり影響がなく、糖部分が重要であると推測した。

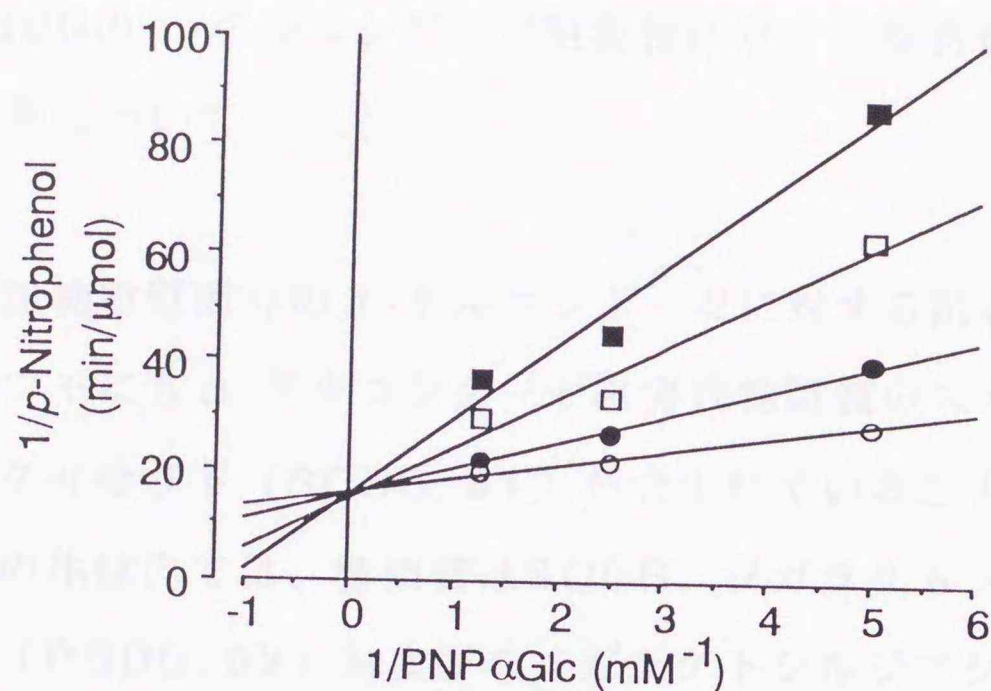


Fig. 4-7. Lineweaver-Burk plots of inhibition of *fujimatsumo* SQDG against yeast α -glucosidase.

PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

○, [SQDG] 0 μ M; ●, [SQDG] 2.40 μ M;

□, [SQDG] 4.79 μ M; ■, 9.58 μ M.

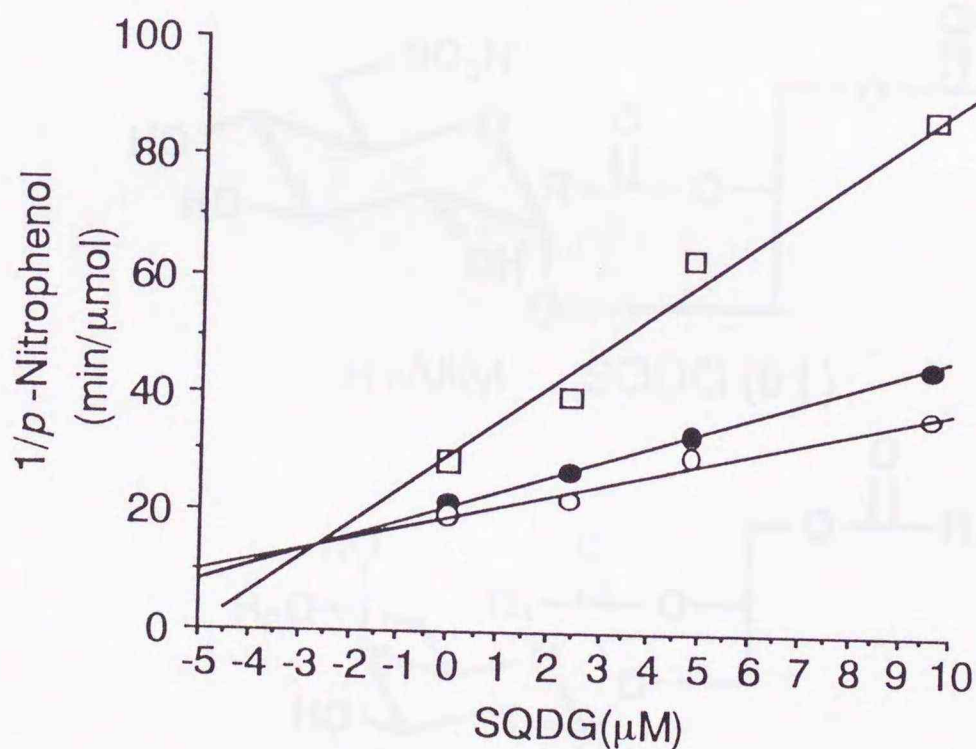


Fig. 4-8. Dixon plots of inhibition of *fujimatsumo* SQDG against yeast α -glucosidase.

PNP α Glc, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.

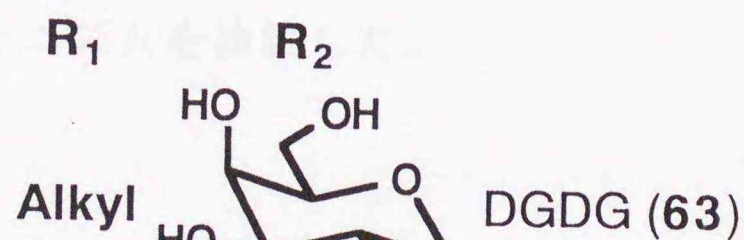
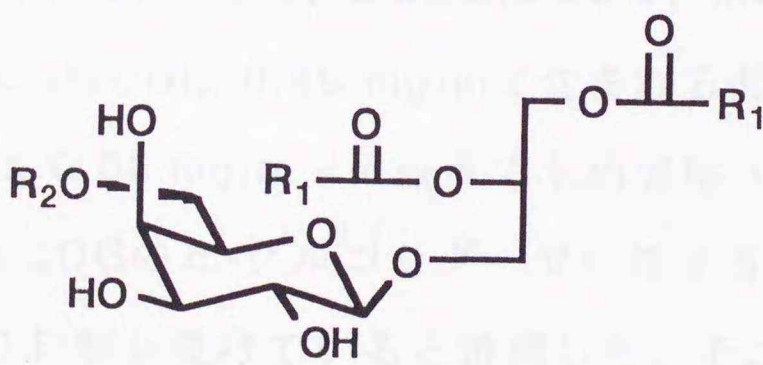
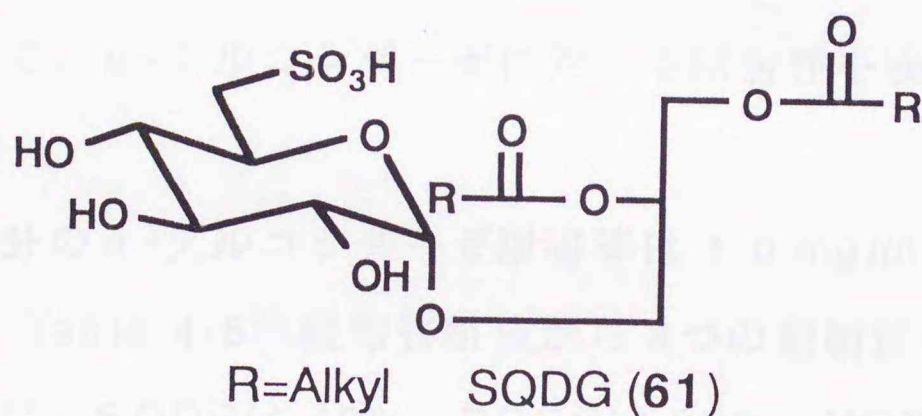
□, [PNP α Glc] 0.2 mM; ●, [PNP α Glc] 0.4 mM;

○, [PNP α Glc] 0.8 mM.

2-3 SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対する糖脂質DGDGの抑制効果について

(1) 総糖脂質画分の α -グルコシダーゼに対する阻害性

フジマツモにも α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質のスルホキノボシルジアシルグリセリド (SQDG, **61**) が含まれていることを明らかにした。藻類の生体内では、糖脂質はSQDG、ジガラクトシルジアシルグリセリド (DGDG, **63**) およびモノガラクトシルジアシルグリセリド (MGDG, **64**) の混合物として存在している。そこで、これら3つの糖脂質混合物がどのような α -グルコシダーゼ阻害性を示すかを検討した。



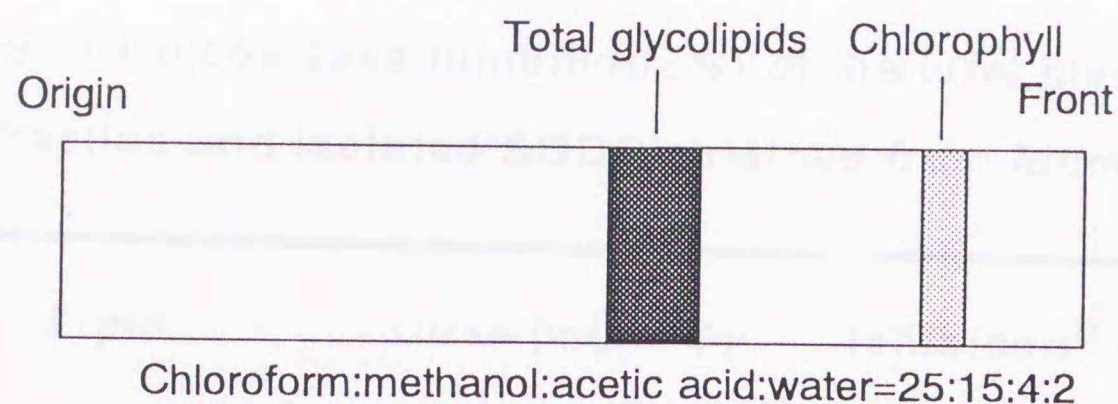


Fig. 4-9. Preparative thin layer chromatogram of the *fujimatsumo* complex lipid fraction.

フジマツモ複合脂質画分（第4章第4節）を分取 TLC（Fig. 4-9）に供した。この展開溶媒では3種類の糖脂質SQDG、DGDGおよびMGDGが一つのバンドとなりクロロフィル成分と分離できた。このバンドを分取して、 α -グルコシダーゼに対する阻害性を検討した（Table 4-9）。

総糖脂質画分の α -グルコシダーゼ阻害率は1.0 mg/mℓの濃度で6.1%だった。Table 4-5の糖脂質組成から3つの糖脂質の合計を100%とした場合に、SQDGは49%、DGDGは36%、MGDGは15%となり、総糖脂質画分にSQDGは0.49 mg/mℓ含まれる計算になる。一方、単離したSQDGでは0.05 mg/mℓの濃度でも阻害率18.7%を示した。これらの結果からSQDGの α -グルコシダーゼに対する阻害性は他の共存する糖脂質により抑制を受けていると推測した。そこで、このような現象の起こるメカニズムを検討した。

Table 4-9. α -Glucosidase inhibition (%) of the total glycolipid fraction and isolated SQDG obtained from *fujimatsumo*^a

Lipid	Dose (mg/m ℓ)	Inhibition ^b (%)
Total glycolipid	1.0	6.1
SQDG	0.05	18.7
	0.1	34.6
	0.2	51.6

^a Assays were carried out under the condition described in Section 1, Chapter 4. Final substrate concentration was 0.4 mM.

^b Inhibition (%) = $\{(v_0 - v)/v_0\} \times 100$

v_0 , velocity without glycolipid(s)

v , velocity with glycolipid(s).

(2) SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対する他のグリセロ糖脂質の影響

(2-1) 実験方法

まず、Table 4-6の脂肪酸組成の結果から、フジマツモDGDGの平均分子量を 935と算出した。

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.1 m ℓ 、10 mM p -ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド 0.1 m ℓ 、SQDG溶液 0.1 m ℓ およびDGDG溶液 0.1 m ℓ を試験管に加え、37°C、5分間ブレインキューベ-

ションをした。5 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ (0.5 unit/m ℓ) α -グルコシダーゼ溶液 0.1 m ℓ を加えて、2分間反応を行った。0.25 M 炭酸ナトリウム水溶液を加え反応を停止した。400 nmで反応液の吸光度を測定し、検量線により生成した

-ニトロフェノール量を求めた。

(2-2) 結果と考察

SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対するDGDGの影響を調べるために、SQDGおよびDGDGが入っていないときの反応速度を1とした相対速度を求めることにした。

SQDGおよびDGDGが入っていないときの反応速度 v_0 は、酵素濃度が一定のとき、ミカエリス-メンテンの式⁷⁵⁾に従い、式(1)のようになる。

$$v_0 = \frac{V_{\max} \times S}{S + K_m} \quad (1)$$

ただし、 $V_{\max}$: 最大速度

S : 終基質濃度

K_m : ミカエリス定数

SQDGが入ったときの反応速度 v_1 は拮抗阻害の速度式⁷⁵⁾に従い、式(2)のようになる。

$$v_1 = \frac{V_{\max} \times S}{S + K_m(1 + [SQDG]/K_i)} \quad (2)$$

ただし、 K_i : 阻害物質定数

式(2)を式(1)で割り、相対速度 v_1/v_0 を求めると、式(3)のようになる。

$$v_1/v_0 = \frac{S + K_m}{S + K_m(1 + [SQDG]/K_i)} \quad (3)$$

式(3)から、もし v_1 がDGDGによる影響を受けず、SQDGの濃度が一定条件下で、DGDG濃度に関係なく相対速度 v_1/v_0 が一定になることがわかる。そこで、SQDGおよびDGDGを各濃度にとったときの相対速度を測定した (Table 4-10)。

Table 4-10. Relative velocity (v_1/v_0) determined by measurement of α -glucosidase reaction with or without SQDG and DGDG

		Relative velocity (v_1/v_0)				
[D GDG] (μ M)		[S QDG] (μ M)				
		0	4.79	9.58	14.4	19.2
0			0.679	0.575	0.456	0.406
0.419			0.810	0.635	0.536	0.466
0.836			0.873	0.717	0.600	0.507
1.26			0.910	0.751	0.622	0.515
1.68			0.914	0.796	0.657	0.552
4.19	1.01					
8.36	1.01					

相対速度測定の結果、SQDGの濃度が同じ条件でDGDG濃度が増加するにつれて v_1/v_0 も増加した。すなわち、DGDGがSQDGの α -グルコシダーゼ阻害効果を抑制していることが明らかとなった。この理由として以下の2つの仮説が考えられる。

- (1) DGDGが α -グルコシダーゼを活性化している。
- (2) DGDGが直接SQDGに働きかけ、SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を弱めている。

(1) が正しい場合には、DGDGのみを酵素反応系に加えた場合に、相対速度は1より大きくなるはずである。しかし、Table 4-25の結果のように、SQDG濃度が $0 \mu\text{M}$ でDGDG濃度が 4.19 、 $8.36 \mu\text{M}$ 入っている条件で、相対速度は1のままだった。DGDGは α -グルコシダーゼを活性化も阻害もしないことが明かとなった。そこで、(2) のDGDGが直接SQDGに影響を与えていることを速度論的に解析した。

DGDGが直接SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を抑制していると仮定して、DGDG濃度により0から1まで変化する抑制に関わる変数AをSQDG濃度に乗じた。すなわち、DGDGとSQDGの両者が存在した場合の速度 v_2 は式(4)のようになる。

$$v_2 = \frac{V_{\max} \times S}{S + K_m(1 + [\text{SQDG}]/K_i \times A)} \quad (4)$$

ただし、A：阻害抑制に関わる変数 ($0 < A < 1$)

式(4)を式(1)で割ると、相対速度 v_2/v_0 は式(5)のようになる。

$$v_2/v_0 = \frac{S + K_m}{S + K_m(1 + [S \text{ QDG}]/K_i \times A)} \quad (5)$$

式(5)の両辺の逆数をとると、

$$v_0/v_2 = 1 + \frac{[S \text{ QDG}] \times K_m}{(S + K_m) \times K_i} \times A \quad (6)$$

となる。同様に式(3)の両辺の逆数をとると、

$$v_0/v_1 = 1 + \frac{[S \text{ QDG}] \times K_m}{(S + K_m) \times K_i} \quad (7)$$

となる。式(7)を式(6)に代入すると、

$$v_0/v_2 = 1 + (v_0/v_1 - 1) \times A \quad (8)$$

となる。式(8)を変形すると、

$$A = (v_0/v_2 - 1) / (v_0/v_1 - 1) \quad (9)$$

ただし、 v_0 : SQDGおよびDGDGともに入っていないときの反応速度

v_1 : SQDGのみ入っているときの反応速度

v_2 : SQDGおよびDGDGともに入っているときの反応速度

となる。すなわち、酵素濃度、基質濃度およびSQDG濃度が同じ場合にAは反応速度 v_0 、 v_1 および v_2 から導くことができる。

各種SQDGおよびDGDG濃度におけるAの値を測定し (Table 4-11)、

A vs. DGDG (Fig. 4-10) 、 1/A vs. DGDG (Fig. 4-11) をプロットした。

Table 4-11. A values determined by measurement of α -glucosidase reaction

[DGDG] (μ M)	A value ^a			
	[SQDG] (μ M)			
	4.79	9.58	14.4	19.2
0	1.00	1.00	1.00	1.00
0.419	0.621	0.758	0.763	0.758
0.836	0.383	0.518	0.588	0.641
1.26	0.260	0.437	0.535	0.621
1.68	0.248	0.337	0.459	0.535

^a $A = (v_0/v_2 - 1)/(v_0/v_1 - 1)$,

v_0 , velocity under the condition without SQDG and DGDG; v_1 , velocity under the condition with SQDG; v_2 , velocity under the condition with SQDG and DGDG.

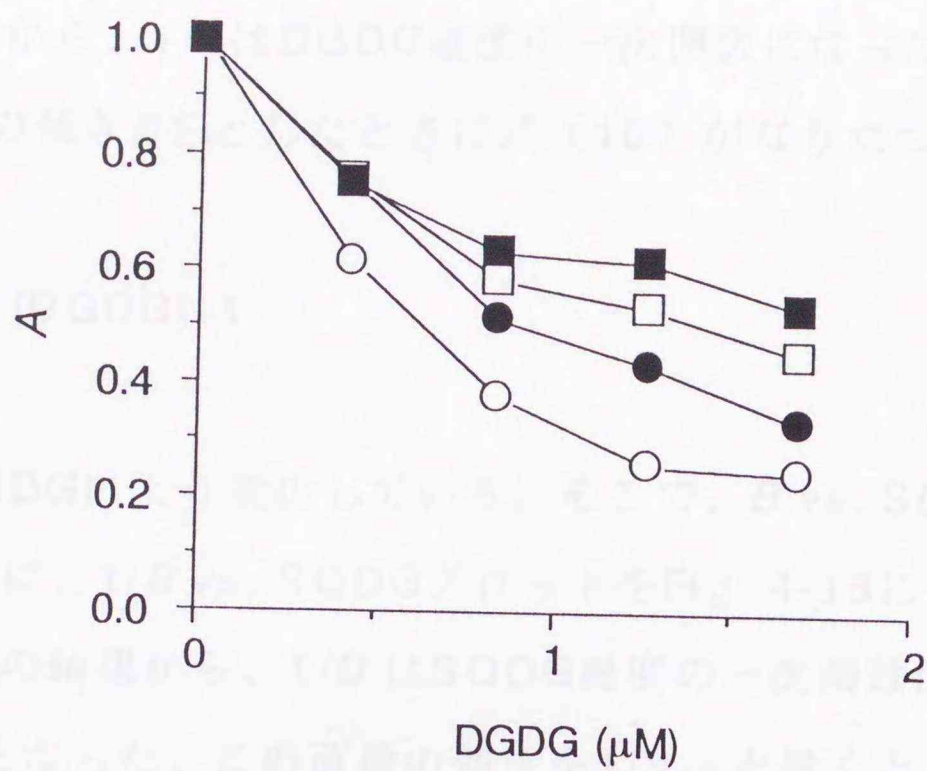


Fig. 4-10. A versus DGDG plot.

■, SQDG 19.2 μM ; □, SQDG 14.4 μM ; ●, SQDG 9.58 μM ; ○, SQDG 4.79 μM .

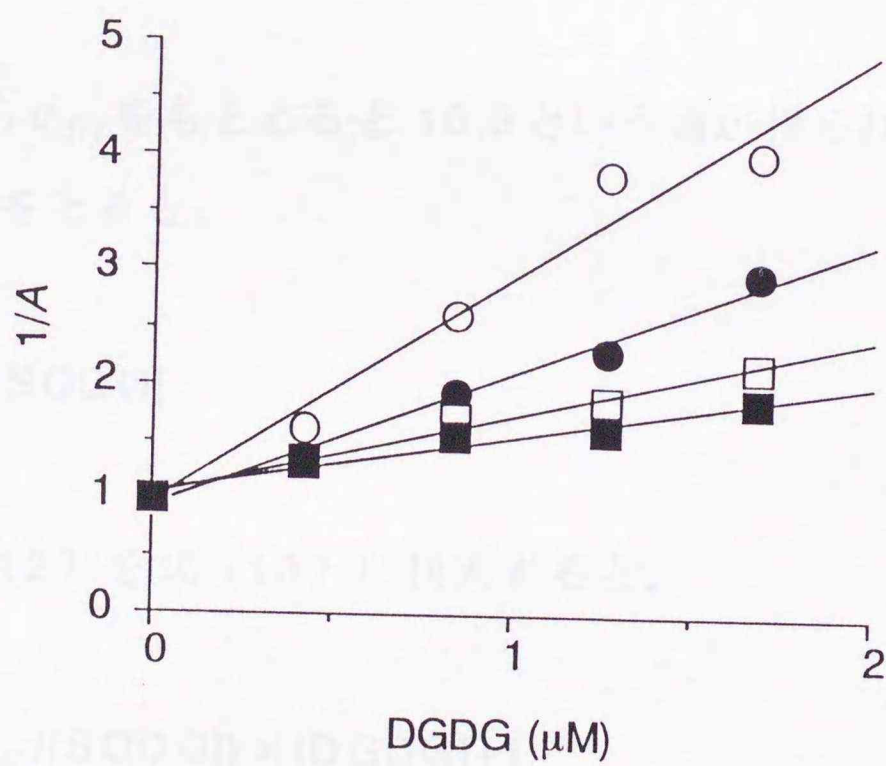


Fig. 4-11. $1/A$ versus DGDG plot.

■, SQDG 19.2 μM ; □, SQDG 14.4 μM ; ●, SQDG 9.58 μM ; ○, SQDG 4.79 μM .

Fig. 4-11から、 $1/A$ はDGDG濃度の一次関数になっていることがわかる。直線の傾き B をとしたときに式(10)がなりたつ。

$$1/A = B [DGDG] + 1 \quad (10)$$

傾き B はSQDGにより変化している。そこで、 B vs. SQDGプロットをFig. 4-12に、 $1/B$ vs. SQDGプロットをFig. 4-13にそれぞれ示す。

Fig. 4-12の結果から、 $1/B$ はSQDG濃度の一次関数になっていることが明らかとなった。この直線の傾きを $1/c_{dil}$ と置くと、式(11)がなりたつ。

$$1/B = [SQDG]/c_{dil} \quad (11)$$

Fig. 4-36から c_{dil} をもとめると10.3という値が得られた。式(11)の両辺の逆数をとると、

$$B = c_{dil}/[SQDG] \quad (12)$$

となる。式(12)を式(10)に代入すると、

$$1/A = (c_{dil}/[SQDG]) \times [DGDG] + 1 \quad (13)$$

となり、式(13)を変形すると、

$$A = [SQDG]/([SQDG] + c_{dil} \times [DGDG]) \quad (14)$$

が得られた。

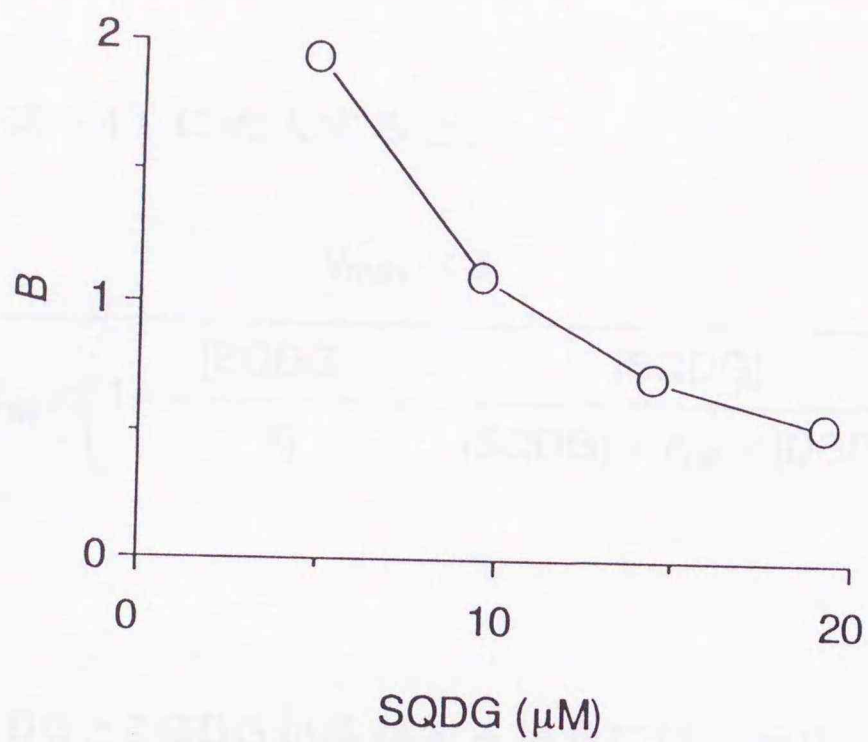


Fig. 4-12. B versus SQDG plot.

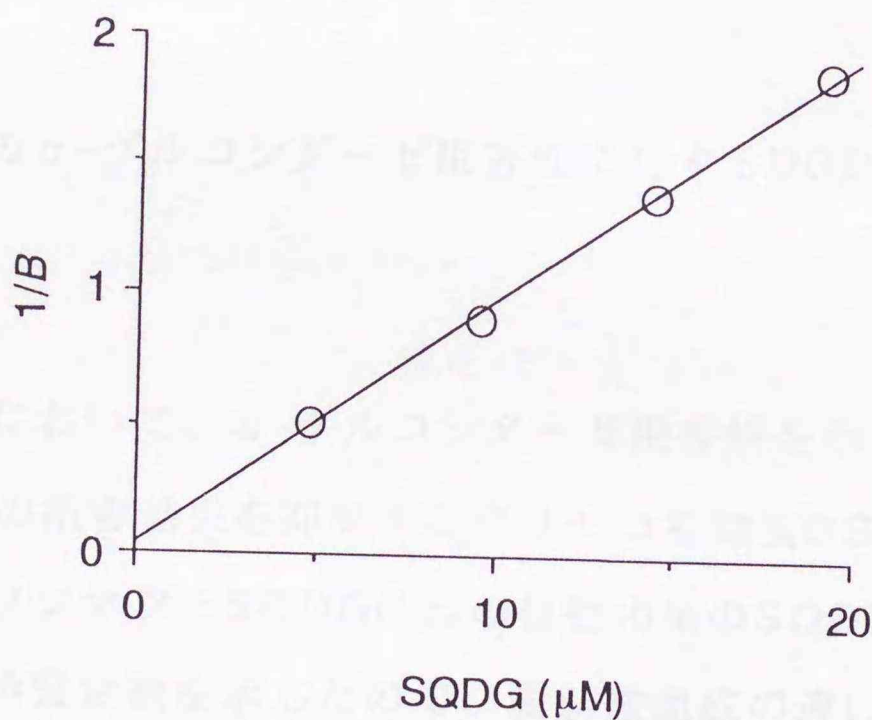


Fig. 4-13. $1/B$ versus SQDG plot.

ここで A は、 $c_{dil}=1$ ならば、SQDG の「モル分率」を表している。
 しかし、本研究においては $c_{dil}=10.3$ であり、DGDG 1 分子あたり
 SQDG 10.3 分子分に換算した「分率」で、SQDG の本来持っているモ
 ルあたりの α -グルコシダーゼ阻害活性を希釈している。すなわち
 DGDG 1 分子が SQDG 10.3 分子に相当する相殺効果を発揮していると

考えられる。

式(14)を式(4)に代入すると、

$$v_2 = \frac{V_{\max} \times S}{S + K_m \times \left(1 + \frac{[\text{SQDG}]}{K_i} \times \frac{[\text{SQDG}]}{[\text{SQDG}] + c_{dil} \times [\text{DGDG}]} \right)} \quad (15)$$

となる。

すなわちSQDGとDGDGが共存する場合には、反応速度式のミカエリス定数に、SQDGの拮抗阻害に関わる項とDGDGの「希釈」に関わる項が加わることになる。

2-4 SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対するDGDGの影響に関する考察

フジマツモにおいて、 α -グルコシダーゼ阻害性を示すグリセロ糖脂質SQDGとその阻害効果を抑制するグリセロ糖脂質DGDGの存在を明らかにした。フジマツモSQDGは他の植物由来のSQDGと同じ阻害様式および阻害物質定数を示したので、脂肪酸組成の違いは α -グルコシダーゼ阻害性にあまり影響がないことを示している。また、拮抗阻害を示すことで阻害に重要な部位は6-スルホ- α -D-キノボピラノシド構造であった。

DGDGをSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性試験に添加し、速度論的に α -グルコシダーゼ阻害の抑制効果を解析したところ、糖脂質混合物におけるSQDGの「分率」により阻害活性が希釈されていた。この「分率」は単純なモル分率ではなく、DGDG 1分子がSQDG 10.3分子に相当する分率である。そこで、DGDGがSQDGの α -グルコシダーゼ阻害

性を抑制するメカニズムを推測した。推測の上で考慮したのは、第1に SQDGはDGDGにより希釈を受けていることである。DGDG単独では α -グルコシダーゼ反応を活性化も阻害もしないため、SQDGが反応溶液中で単純な「溶液」状態で存在しているならば、SQDGの阻害だけを考慮した反応速度式に従うはずである。しかし、測定結果は速度式に従わなかったので、SQDGは反応系内で溶液状態で存在していないと考えた。第2にDGDGが α -グルコシダーゼ阻害性を示さないSQDGの「疑似化合物」として希釈効果を示しているなら、単純なモル分率で希釈されるはずである。しかし、DGDG 1分子がSQDG 10.3分子に相当する分率で希釈効果を示している。よって、DGDG 1分子が存在するだけで、近傍のSQDG分子 10.3 個に影響を与えていることになる。これらを考慮した抑制メカニズムの推測をFig. 4-14に示す。

SQDG分子は親水性の糖部分と疎水性の脂肪酸側鎖をもっている。そこで、酵素反応の緩衝液中では会合してミセル構造を形成していると考えた (Fig. 4-14 (A))。同様にDGDGがさらに加わっても、混合ミセルの状態では会合して存在している (Fig. 4-14 (B)) と仮定した。SQDGの糖部位は α -グルコシドの6位水酸基がスルホン酸基に置換しただけの構造なので α -グルコシダーゼの活性部位にアクセスしやすい。しかも、ミセル構造をとっていてもスルホキノボース部分は外側を向いているために、SQDGの α -グルコシダーゼ阻害に重要なスルホキノボース部位はミセル表面に存在しているので、阻害物質が溶液状態にある時の拮抗阻害反応速度式に従うと考えた (Fig. 4-14 (C))。一方、DGDGでは糖部分にガラクトースが2分子置換している。

DGDGとSQDGの混合ミセルでは、ミセル表面のスルホキノボースの中にガラクトースが突き出た構造をとっている。ガラクトースは酵素の基質になり得ないために、酵素反応場の近傍に位置するSQDGは酵素の活性部位に近付くことができない。よって、DGDG分子の近傍に

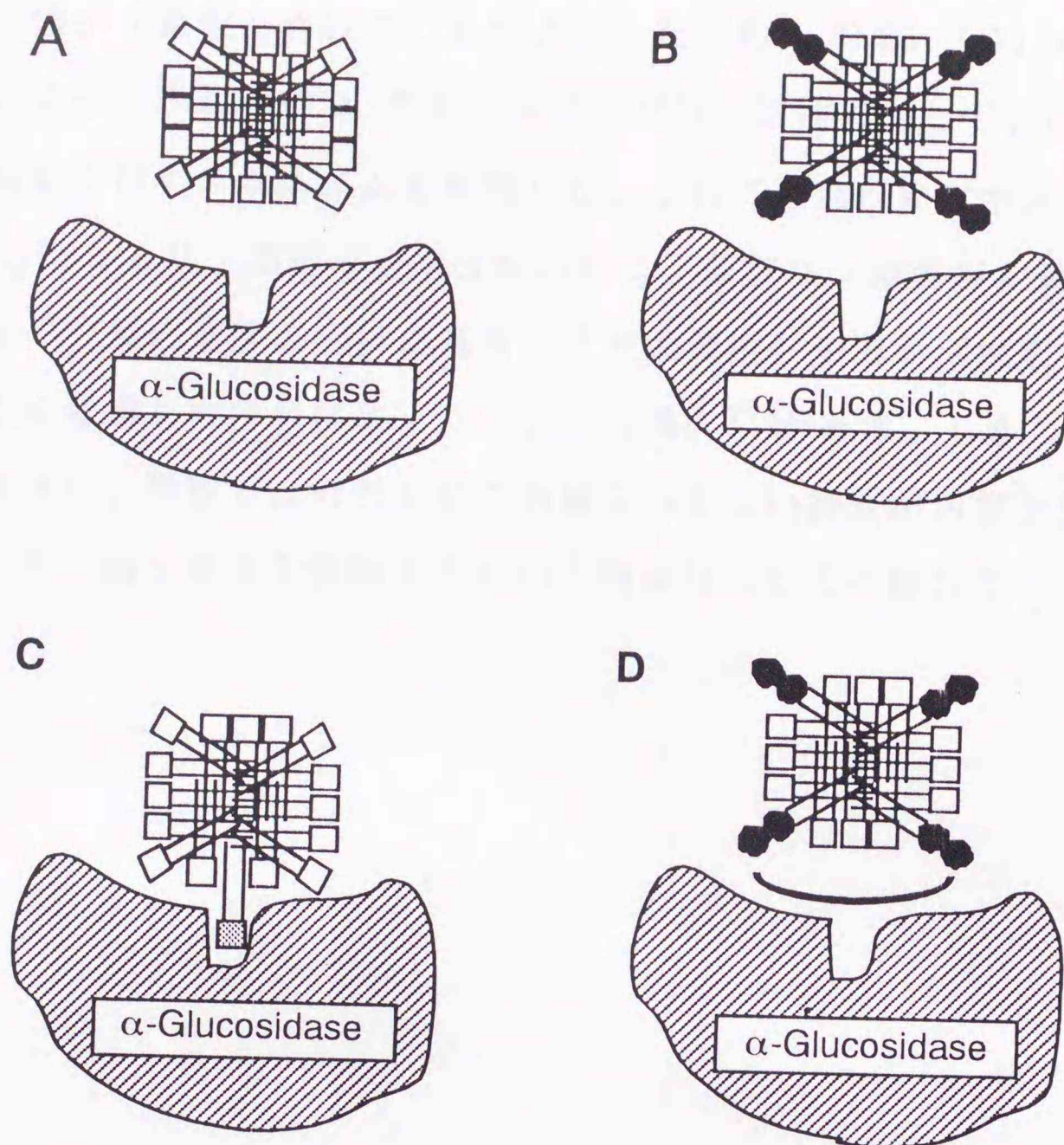


Fig. 4-14. Speculation on suppressing activity of DGDG against α -glucosidase inhibition of SQDG.

A and C, glycolipid added is only SQDG; B and D, glycolipids added are both SQDG and DGDG. A, SQDG () in the reaction mixture has a micelle structure; B, DGDG () and SQDG in the reaction mixture have a mixed micelle structure; C, one () of SQDG molecules has easy access to the active site of α -glucosidase, and inhibits α -glucosidase reaction; D, the "head" of DGDG disturbs access of SQDG to the active site of α -glucosidase.

存在するSQDGは酵素阻害性を発揮できず、反応系に存在しているSQDG濃度から予想される酵素阻害活性を示さない。このようにして

阻害活性が「希釈」されてしまうと考えた (Fig. 4-14 (D))。

このようにSQDGの α -グルコシダーゼ阻害活性に対して、DGDGが抑制効果を示すメカニズムを推測した。これに似た現象はホスホリパーゼA₂によるリン脂質の加水分解の際に、基質リン脂質がミセル構造をとるので反応速度の解析に基質の「表面濃度」や界面活性剤とのモル分率を考慮しなければならない、との報告⁷⁷⁾がある。しかし、本研究のように、単独では酵素反応に影響を与えない物質が阻害物質に影響を与え、阻害効果を抑制するという現象は初めての報告である。

第5章 総 合 考 察

本研究において海産生物に含まれる有用生化学資源として α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼおよびチロシナーゼ阻害性物質の検索を行った。このためにまず、簡便な酵素阻害性試験方法を確立した。

すなわち、酵素阻害性および抗菌性はすべて寒天平板法により視覚的に判断できるように検討した。チロシナーゼ阻害性および抗菌性を検出するためには、寒天平板法が既に確立されているが、グルコシダーゼの阻害性検出には寒天平板法による方法は確立されていない。そこで、本研究では寒天平板法によるグルコシダーゼ阻害性試験法を確立した。グルコシダーゼ反応は基質に

-ニトロフェニルグルコピラノシドを用いると数分のオーダーで反応が進んでしまうために、阻害物質が寒天平板を拡散する前に酵素反応が進んでしまい、阻害性をモニターできない。そこで、これを解決するために、寒天平板を2枚使用した。1枚には酵素溶液を表面に塗り、ペーパーディスクの直径の穴を開け、そこに被験物質含有ペーパーディスクを埋めた。この状態では基質が存在しないので、酵素反応は進まず、阻害成分が寒天平板上および中を拡散して酵素と阻害物質の相互作用が起きる。一方、基質化合物を含有した基質寒天平板を別途作製し、これを酵素を塗った寒天平板に重ねあわせて酵素反応を開始する方法を開発した。既知阻害物質1-デオキシノジリマイシンおよびグルコノ- δ -ラクトンでグルコシダーゼ阻害を寒天平板法で確認したところ阻害物質の量に応じて酵素反応阻害円が確認できた。このようにして酵素反応の開始を遅らせることにより酵素阻害をモニターできるようになった。

寒天平板法により酵素阻害性および抗菌性をスクリーニングした結果、 α -グルコシダーゼ阻害性を示したのは海藻9種類、水生植物1種類、無脊椎動物4種類、水産食品で4種類だった。 β -グルコシダーゼに対し

ては海藻7種類、無脊椎動物2種類、水産食品で5種類が阻害性を示した。チロシナーゼ阻害は海藻3種類、無脊椎動物3種類で認められた。また、抗菌性を示したのは海藻5種類、無脊椎動物7種類だった。

α -グルコシダーゼ阻害は海藻の多くの種類で観察できた。これらの海藻には植物に普遍的に存在する糖脂質スルホキノボシルジアシルグリセリド (SQDG) およびそのリゾ体のスルホキノボシルモノアシルグリセリド (SQMG) が存在し、これらが α -グルコシダーゼ阻害性を示すと考えられる。また、植物中には α -グルコシダーゼを阻害する化合物としてポリフェノールの存在も知られている。³¹⁾ そして海藻の中にはポリフェノールを含む種類もあること^{68, 79)}から、このポリフェノールも α -グルコシダーゼの阻害性に寄与している可能性がある。今後、これらポリフェノール類の酵素阻害性に関する研究も必要であろう。糖尿病患者が食後高血糖を抑制する食品として、海藻の利用を図るためには*in vivo*でこれらの海藻において α -グルコシダーゼ (マルターゼやスクラーゼ) 阻害性の有無、阻害性の損失のない調理法、あるいは食品として摂取量の設定値を検討しなければならない。

β -グルコシダーゼ阻害は褐藻および市販の貝類で検出できた。 β -グルコシダーゼ阻害物質の本体はわからないが、その阻害性を示す生物と α -グルコシダーゼ阻害性を示す生物が異なる傾向がみられるので、阻害物質の化合物特性が異なると判断できる。 β -グルコシダーゼ阻害は腸内細菌との関わりが深いので、褐藻や貝類の摂取が大腸内菌叢にどのような影響を及ぼすかを検討しなければならない。

チロシナーゼ阻害は褐藻と無脊椎動物において検出されたことから、褐藻はエビ類の黒変防止に利用できる。また、無脊椎動物類からはチロシナーゼ阻害物質を単離し、その化粧品への適用の可能性がある。特に深海産の無脊椎動物では他の生物と異なる代謝系の存在が予想されるので、新規化合物を単離する可能性が高い。

抗菌性は無脊椎動物成分で多く観察できた。無脊椎動物すべての種類で、複数の微生物に対して抗菌性を示した。海藻類に含まれる抗菌性成分は既に研究されてきているが、⁵⁶⁾ 本研究に供試した無脊椎動物の抗菌性物質に関する研究は皆無に等しく、検討が待たれる。

α -グルコシダーゼ阻害性成分をヒジキから単離したところ、植物の主要な複合脂質であるSQDGおよびそのリゾ体のSQMGを得た。

SQDGは酵母 α -グルコシダーゼに対して拮抗阻害を示したのは、分子内の糖がグルコースの6位水酸基がスルホン酸基に置換した類似構造をとっているためと考える。また、阻害物質定数から既知 α -グルコシダーゼ阻害物質のアカルボース(25)²⁷⁾とほぼ同程度の阻害活性を持つことが明らかとなった。

SQDGは構造内にスルホン酸基をもつスルホキノボースを有する。植物体内での分布も特異で、葉緑体などの光合成に関連のある組織に分布している⁷⁰⁾が、光合成組織でのSQDGの働きは未だ解明されていない。この特異な性質を持つSQDGの生物活性として、腹足類に対する摂食刺激作用、⁷¹⁾ イガイ類の忌避作用、⁷²⁾ ホヤ幼生の変態のプロモーター活性、⁶⁸⁾ 抗腫瘍活性、⁷³⁾ HIVに対する抗ウィルス活性⁶⁹⁾が報告されている。しかし、酵素レベルでの機能性(α -グルコシダーゼ阻害など)に関しては本研究が初めての報告であり、今後、様々な酵素の活性に対する影響などの検討が待たれる。また、SQMGに関しては溶血性⁷⁴⁾成分として報告され、ウニの殻中に検出された報告⁷⁹⁾もあるが、酵素レベルでの活性については本研究が初めての報告になる。

SQDGおよびSQMGはその構造内にスルホン酸基を持つ脂質であり、親水性が高い。SQMGは脂質抽出法であるBligh-Dyer法で抽出してもクロロホルム層に分配されずにメタノール-水層に分配されることから、定量的抽出法は現在のところ確立できない。今後、SQDGおよびSQMGなどの糖脂質を有効利用する上で定量的分析法および分取法の

確立が望まれる。

α -グルコシダーゼ阻害性を植物糖脂質としてSQDGが得られたが、フジマツモからSQDGを単離する過程で、総糖脂質画分の α -グルコシダーゼに対する阻害活性が予想される値より小さくなるという事実を見いだした。SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を抑制する成分として、植物の主要な糖脂質であるジガラクトシルジグリセリド(DGDG)を得た。DGDGの阻害抑制効果を速度論的に検討したところ、DGDGが直接酵素に影響を及ぼしているのではなく、阻害物質SQDGと会合して、SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を弱めていることが確認できた。

このような阻害抑制効果が成り立つ要因として3つあげることができる。第1に、阻害物質(SQDG)および阻害抑制物質(DGDG)はともに糖脂質で分子内に親水性基と疎水性基を持ち、水溶液中では会合している。第2に、阻害物質(SQDG)の α -グルコシダーゼ阻害性に関与する部位は親水性基のスルホキノボースである。第3に、阻害物質の阻害に重要な親水性基(SQDGの場合、単糖構造のスルホキノボース)より阻害抑制物質の親水性基(DGDGの場合、二糖構造のジガラクトース)のほうがかさ高い構造をしている。

これらの要因が揃ったときに、阻害に重要な部位のスルホキノボースは糖脂質会合体(ミセルと考えられる)表面に拘束され、近傍に存在するジガラクトースにより酵素活性部位へのアクセスが妨げられる。本研究結果よりこのような仮説を考えた。

近年、水溶性生理活性物質のホスファチジル化がさかんに行われている。⁸⁰⁾ ホスファチジル化水溶性生理活性物質を生体へ利用する際には、生体膜脂質との相互作用などを考慮すべきである。

本研究では α -グルコシダーゼ阻害物質SQDGおよび阻害抑制物質DGDGの生体内での活性、とくに、食品として摂取した場合の生体内動態については検討していないが、最近、*in vitro*でのヒト十二指腸内

容物、腩液および腩脂質分解酵素を使った糖脂質SQDG、DGDGおよびMGDGの加水分解実験が行われている。⁸¹⁾ その報告によるとどの脂質も加水分解されたが、その分解速度は各脂質で異なっていた。SQDGが加水分解を受けて、リゾ体の2-アシル体およびジデアシル体が生成するときに、それら加水分解物の α -グルコシダーゼ阻害活性がどのように変化する興味深い。また、SQDGとDGDGのリゾ体との会合性の検討や会合が起こるとすると、SQDGやSQMGのもつ α -グルコシダーゼ阻害能が抑制されるのかについても明らかにしなければならない。もし、生体内でSQDGの加水分解速度がDGDGの加水分解速度より遅ければ、SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性に対するDGDGの抑制が時間とともに消失する経時変化が考えられる。それを利用すれば、リパーゼ活性のない場所では α -グルコシダーゼ阻害性は抑えられ、リパーゼ活性のある場所では先にDGDGが消失することになりSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を発現させることも期待できる。この加水分解速度の差を利用できれば、 α -グルコシダーゼ阻害物質に対してのドラッグデリバリーシステムの開発も可能と考えられ、ヒトの消化酵素に対して応用研究を行うことは重要である。

要 約

本研究により以下のことを明らかにした。

(1) 海産生物成分の α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼおよびチロシナーゼの酵素阻害作用と抗菌性試験を視覚的に判定するために「寒天平板法」を確立し、これを利用して多くの海産生物成分について上記の酵素作用阻害活性および抗菌性を有することが確認できた。

(2) 乾燥ヒジキから α -グルコシダーゼ阻害物質として 1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロール (SQDG) および 1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロール (SQMG) を単離し、化学構造の決定により同定した。さらに、SQDGの酵母 α -グルコシダーゼ活性に対する阻害様式は拮抗阻害であり、阻害物質定数は $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ だった。さらに、SQMGとSQDGの酵母 α -グルコシダーゼに対する阻害率の比較によりSQMGのほうが阻害性が強いことがわかった。

(3) SQDGの α -グルコシダーゼ阻害性はDGDGによって抑制された。速度論的解析によると、この結果はDGDGが酵素に作用しているためではなく、SQDGと会合するためであることが明らかとなった。

引用文献

- 1) K. B. G. Torsell : 天然物化学 (野副重男, 三川 潮), 講談社サイエンティフィック, 東京, 1984, pp. 1-404.
- 2) 並木満夫, 中村良, 川岸舜朗, 渡邊乾二 共編: 現代の食品化学, 第2版, 三共出版, 東京, 1992, pp. 1-286.
- 3) 小川智也, 楠本正一編: 化学増刊122 糖—その多様性を探る, 化学同人, 京都, 1992, pp. 1-188.
- 4) J. B. Harborne : 化学生態学 (高橋英一, 深海 浩), 文永堂, 東京, 1981, pp. 1-303.
- 5) 水谷純也: 高等植物における防御機構. 農化誌, **62**, 983-985 (1988).
- 6) 藤巻正生監修: 食品機能-機能性食品創製への基盤, 学会出版センター, 東京, 1988, pp. 1-520.
- 7) 佐山晃司: オリゴ糖と腸内菌叢, 合同シンポジウム 健康と腸内発酵要旨集, 札幌, pp. 11-12 (1995).
- 8) 原博: 大腸発酵の栄養生理, 合同シンポジウム 健康と腸内発酵要旨集, 札幌, pp. 8-10 (1995).
- 9) 例えば、藤本健四郎編: 水産学シリーズ96 水産脂質—その特性と生理活性, 恒星社厚生閣, 1993, pp. 1-141.
- 10) 今堀和友, 山川民夫監修: 生化学辞典, 第1版, 東京化学同人, 東京, 1984, pp. 1-1532.
- 11) 合田敏尚: 小腸二糖類水解酵素の食事要因による調節機構. 栄食誌, **47**, 81-92 (1994).

- 12) B. Winchester and W. J. Fleet: Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists. *Glycobiology*, **2**, 199-210 (1992).
- 13) D. Miller and R. K. Crane: The digestive function of the epithelium of the small intestine. II. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 293-298 (1961).
- 14) 入谷信子, 梶本五郎, 米田圭作, 萩原一成, 福田満, 宮川金二郎: 栄養化学, 二訂版, 化学同人, 京都, 1986, pp. 1-156.
- 15) 羽倉稜子責任編集: エキスパートナース1993・12特別臨時増刊号 ナース必携 糖尿病ケアマニュアル, 照林社, 東京, 1993, pp. 1-226.
- 16) 馬場茂明, H. Bischoff, 土井邦紘, 福井巖, J. M. Amatruda: NIDDMの薬物療法の新展開— α -グルコシダーゼインヒビターを中心に—. *Therapeutic Research*, **14**, 4127-4139 (1993).
- 17) 丸浜喜亮: 新しい糖尿病薬Acarbose. 医薬ジャーナル, **18**, 1167-1171 (1982).
- 18) 姫井孟: ボグリボース. 臨床と薬物治療, **13**, 1055-1057 (1994).
- 19) 鈴木裕一, 石川誠, 矢島高二: 大腸発酵と腸管機能, 「食品の生体調節機能」(千葉英雄監修), 第1版, 学会出版センター, 東京, 1992, pp. 226-233.
- 20) T. Niwa, S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze, and T. Niida: "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 966-968 (1970).

- 21) D. D. Schmidt, W. Frommer, L. Müller, and E. Trusheit: Glucosidase-Inhibitoren aus Bazillen. *Naturwissenschaften*, **66**, 584-585 (1979) (in German).
- 22) G. A. Levvy, A. J. Hay, and J. Conchie: Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration—4. Inhibitors of mannosidase and glucosidase. *Biochem. J.*, **91**, 378-384 (1964).
- 23) M. Kitaoka, K. Ichikawa, Y. Sakurai, Y. Matsushita, Y. Iijima, T. Akiyama, and M. Boriboon: α -Glucosidase inhibitors isolated from crude drugs. *Ann. Rep. Sankyo Res. Lab.*, **45**, 99-104 (1993).
- 24) S. Horii, T. Iwasawa, E. Mizuta, and Y. Kameda: Studies on validamycins, new antibiotics. VI Validamine, hydroxyvalidamine and validatol, new cyclitols. *J. Antibiot.*, **24**, 59-63 (1971).
- 25) Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, M. Takeuchi, T. Yamaguchi, and K. Matsui: Valiolamine, a new α -glucosidase inhibiting aminocyclitol produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.*, **37**, 1301-1307 (1984).
- 26) Y. Kameda and S. Horii: The unsaturated cyclitol part of the new antibiotics, the validamycins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1746 (1972).
- 27) D. D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, and E. Truscheit: α -Glucosidase inhibitors. *Naturwissenschaften*, **64**, 535-536 (1977).
- 28) S. Atsumi, K. Umezawa, H. Iinuma, H. Naganawa, H. Nakamura, Y. Iitaka, and T. Takeuchi: Production, isolation and structure determination of a novel β -glucosidase

- inhibitor, cyclophellitol, from *Phellinus* sp. *J. Antibiot.*, **43**, 49-53 (1990).
- 29) L. D. Hohenschutz, E. A. Bell, P. J. Jewess, D. P. Leworthy, R. J. Pryce, E. Arnold, and J. Clardy: Castanospermine, a 1,6,7,8-tetrahydroxyoctahydroindolizine alkaloid, from seeds of *Castanospermum australe*. *Phytochemistry*, **20**, 811-814 (1981).
- 30) A. S. Shawl: Piceid, a stilbene glucoside from the rhizomes of *Iris hookeriana*. *Indian J. Pharm. Sci.*, 197-198 (1993).
- 31) M. Honda and Y. Hara: Inhibition of rat small intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 123-124 (1993).
- 32) G. Legler: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus glykosidspaltender Enzyme, III—Markierung des aktiven Zentrums einer β -Glucosidase aus *Aspergillus wentii* mit [^{14}C]Condurit-B-epoxid. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 767-774 (1968).
- 33) C. Imada and Y. Okami: Characteristics of marine actinomycete isolated from a deep-sea sediment and production of β -glucosidase inhibitor. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 109-113 (1995).
- 34) N. Asano, A. Kato, K. Oseki, H. Kizu, and K. Matsui: Calystegins of *Physalis alkekengi* var. *francheti* (Solanaceae)—Structure determination and their glycosidase inhibitory activities. *Eur. J. Biochem.*, **229**, 369-376 (1995).
- 35) 泉田仁：海洋生物由来の酵素阻害物質。月刊フードケミカル, **7**(8), 42-46 (1991).

- 36) R. M. Dawley and W. H. Flurkey: 4-Hexylresorcinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J. Food Sci.*, **58**, 609-610, 670 (1993).
- 37) E. Valero, R. Varón, and F. García-Carmona: Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 904-908 (1992).
- 38) F. C. Richard, P. M. Goupy, J. J. Nicolas, J.-M. Lacombe, and A. A. Pavia: Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 841-847 (1991).
- 39) A. J. McEvily, R. Iyengar, and S. Otwell: Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. 4-Hexylresorcinol controls enzymatic browning in shrimp and has potential for application in a variety of other foods and beverages. *Food Technol.*, **45** (9), 80-86 (1991).
- 40) K. Suzuki, T. Shimizu, J. Kawabata, and J. Mizutani: New 3,5,4'-trihydroxystilbene (resveratrol) oligomers from *Carex fedia* Nees var. *miyabei* (Franchet) T. Koyama (Cyperaceae). *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1003-1008 (1987).
- 41) J. Kawabata, S. Ichikawa, H. Kurihara, and J. Mizutani: A unique tetrastilbene from *Carex kobomugi* Ohwi (Cyperaceae). *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3785-3788 (1989).
- 42) H. Kurihara, J. Kawabata, and S. Ichikawa, and J. Mizutani: (-)- ϵ -Viniferin and related oligostilbenes from *Carex pumila* Thunb. (Cyperaceae). *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1097-1099 (1990).

- 43) J. Kawabata, M. Mishima, H. Kurihara, and J. Mizutani:
Kobophenol B, a tetrastilbene from *Carex pumila*.
Phytochemistry, **30**, 645-647 (1991).
- 44) H. Kurihara, J. Kawabata, S. Ichikawa, M. Mishima, and J.
Mizutani: Oligostilbenes from *Carex kobomugi*.
Phytochemistry, **30**, 649-653 (1991).
- 45) H. Kurihara, J. Kawabata, and M. Hatano: Geraniin, a
hydrolyzable tannin from *Nymphaea tetragona* Georgi
(Nymphaeaceae). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1570-1571
(1993).
- 46) H. Kurihara, M. Sasaki, and M. Hatano: A new screening
method for glucosidase inhibitors and its application to algal
extracts. *Fisheries Sci.*, **60**, 759-761 (1994).
- 47) 能勢泰祐, 幹渉: 酵素阻害物質の探索法, 「水産学シリーズ89
海洋生理活性物質研究法」(神谷久男, 幹渉編), 恒星社厚生閣,
東京, 1992, pp. 87-95.
- 48) 大石圭一編: シリーズ《食品の科学》海藻の科学, 第1版, 朝倉
書店, 東京, 1993, pp. 1-201.
- 49) H. Kurihara, J. Ando, M. Hatano, and J. Kawabata:
Sulfoquinovosyldiacylglycerol as an α -glucosidase inhibitor.
Bioorg. Med. Chem. Lett., **5**, 1241-1244 (1995).
- 50) H. Kurihara, J. Ando, J. Kawabata, and M. Hatano:
Sulfolipids as α -glucosidase inhibitors. *Fisheries Sci.*, 投稿中
(1995).
- 51) H. Kurihara, S. Tada, K. Takahashi, and M. Hatano: 投稿準備
中.

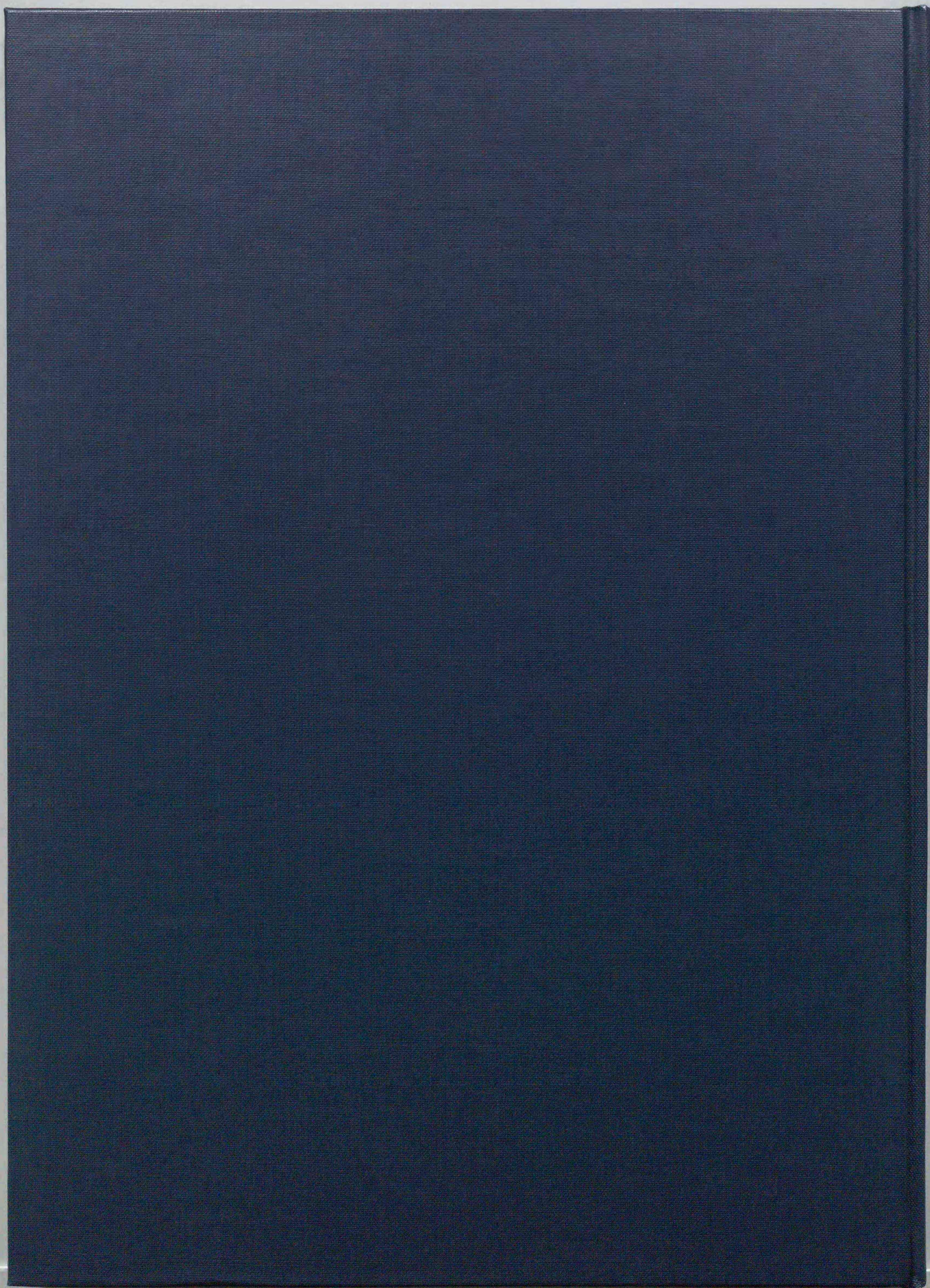
- 52) A. Berger, K. Dax, G. Gradnig, V. Grassberger, A. E. Stütz, M. Ungerank, G. Legler, and E. Bause: Synthesis and biological activity of C-6 modified derivatives of the glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 27-32 (1992).
- 53) M. P. Dale, H. E. Ensley, K. Kern, K. A. R. Sastry, and L. D. Byers: Reversible inhibitors of β -glucosidase. *Biochemistry*, **24**, 3530-3539 (1985).
- 54) J. Hashimoto, S. Ohta, T. Tanaka, H. Hotta, S. Matsuzawa, and H. Sakai: Deep-sea communities dominated by the giant clam, *Calyptogena soyae*, along the slope foot of Hatsushima Island, Sagami Bay, central Japan. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, **71**, 179-192 (1989).
- 55) 岡見吉郎：海洋微生物の生産する抗生物質，「水産学シリーズ27 海洋の生化学資源」（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1979，pp. 66-79.
- 56) 蔵田一哉：海藻の抗生物質，「水産学シリーズ27 海洋の生化学資源」（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1979，pp. 80-103.
- 57) 伏谷伸宏：海産無脊椎動物の抗生物質，「水産学シリーズ27 海洋の生化学資源」（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1979，pp. 104-121.
- 58) 神谷久男：無脊椎動物の高分子生理活性物質，「水産学シリーズ65 海産有用生理活性物質」（安元健，神谷久男編），恒星社厚生閣，東京，1987，pp. 9-20.
- 59) 伏谷伸宏：無脊椎動物の抗菌・抗腫瘍物質，「水産学シリーズ65 海産有用生理活性物質」（安元健，神谷久男編），恒星社厚生閣，東京，1987，pp. 32-45.

- 60) 奥谷康一：微生物の生理活性物質，「水産学シリーズ65 海産有用生理活性物質」（安元健，神谷久男編），恒星社厚生閣，東京，1987，pp. 46-57.
- 61) 鈴木郁生，斎藤行生，豊田正武：薄層クロマトグラフィーの実際，第2版，廣川書店，東京，1990，pp. 1-457.
- 62) 日本生化学会編：新生化学実験講座4 脂質Ⅲ 糖脂質，第1版，東京化学同人，東京，1990，pp. 1-502.
- 63) R. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morrill: 有機化合物のスペクトルによる同定法—MS, IR, NMR, UVの併用—（荒木峻，益子洋一郎，山本修），第5版，東京化学同人，東京，1992，pp. 1-384.
- 64) M. Aursand, J. R. Rainuzzo, and H. Grasdalen: Quantitative high-resolution ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance of $\omega 3$ fatty acids from white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 971-981 (1993).
- 65) 佐々木喜男編：実例を中心とした高分解能核磁気共鳴入門，第2版，廣川書店，東京，1991，pp. 1-229.
- 66) 泉邦彦：ガラクトース系単糖のNMRスペクトル，蛋白質 核酸 酵素，**29**，282-293 (1984).
- 67) S. R. Johns, D. R. Leslie, R. I. Willing, and D. G. Bishop: Studies on chloroplast membranes. III. ^{13}C chemical shifts and longitudinal relaxation times of 1,2-diacyl-3-(6-sulpho- α -quinovosyl)-*sn*-glycerol. *Aust. J. Chem.*, **31**, 65-72 (1978).
- 68) S. Tsukamoto, H. Hirota, H. Kato, and N. Fusetani: Phlorotannins and sulfoquinovosyl diacylglycerols: promoters of larval metamorphosis in Ascidians, isolated from the brown

- alga *Sargassum thunbergii*. *Fisheries Sci.*, **60**, 319-321 (1994).
- 69) K. R. Gustafson, J. H. Cardellina II, R. W. Fuller, O. S. Weislow, R. F. Kiser, K. M. Snader, G. M. L. Patterson, and M. R. Boyd: AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1254-1258 (1989).
- 70) 渋谷勲：スルホリピド。蛋白質 核酸 酵素, **11**, 95-102 (1966).
- 71) K. Sakata, T. Sakura, and K. Ina: Algal phagostimulants for marine herbivorous gastropods. *J. Chem. Ecol.*, **14**, 1405-1416 (1988).
- 72) M. Katsuoka, C. Ogura, H. Etoh, K. Sakata, and K. Ina: Galactosyl- and sulfoquinovosyldiacylglycerols isolated from the brown algae, *Undaria pinnatifida* and *Costaria costata* as repellents of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3043-3044 (1990).
- 73) H. Shirahashi, N. Murakami, M. Watanabe, A. Nagatsu, J. Sakakibara, H. Tokuda, H. Nishio, and A. Iwashima: Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1664-1666 (1993).
- 74) N. Fusetani and Y. Hashimoto: Structures of two water soluble hemolysins isolated from the green alga *Ulva pertusa*. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2021-2025 (1975).
- 75) 大西正健：酵素反応速度論実験入門，「生物化学実験法 21」（瓜谷郁三，駒野徹，志村憲助，中村道徳，船津勝），第1版，学会出版センター，東京，1987，pp. 1-218.
- 76) 鹿山光編：総合脂質科学，第1版，恒星社厚生閣，東京，1989，

pp. 1-904.

- 77) M. H. Gelb, M. K. Jain, and O. Berg: Interfacial enzymology of phospholipase A₂. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 1335-1342 (1992).
- 78) 日本化学会編：化学総説25 海洋天然物化学，学会出版センター，東京，1979，pp. 1-287.
- 79) I. Kitagawa, Y. Hamamoto, and M. Kobayashi: Sulfonoglycolipid from the sea urchin *Anthocidaris crassispina* A. Agassiz. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1934-1937 (1979).
- 80) 例えば、A. Nagao, N. Ishida, and J. Terao: Synthesis of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid by phospholipase D. *Lipids*, **26**, 390-394 (1991).
- 81) L. Andersson, C. Bratt, K. C. Arnoldsson, B. Herslöf, N. U. Olsson, B. Sternby, and Å. Nilsson: Hydrolysis of galactolipids by human pancreatic lipolytic enzymes and duodenal contents. *J. Lipid Res.*, **36**, 1392-1400 (1995).

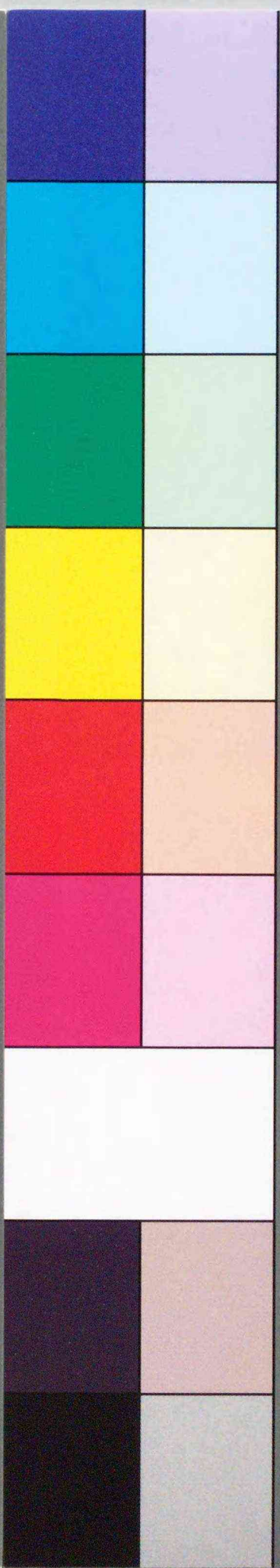


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

