



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	フジマツモ科海藻由来ブロモフェノールのグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ阻害特性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	三上, 大輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11333号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55425
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Mikami_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：三 上 大 輔

学 位 論 文 題 目

フジマツモ科海藻由来ブロモフェノールの

グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ阻害特性に関する研究

グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD, EC1.1.1.49)はペントースリン酸経路(PPP)の第一段階で作用し、律速段階の酵素である。G6PD はグルコース6-リン酸(G6P)と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADP⁺)から6-ホスホグルコノ- δ -ラクトン(6PGL)と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADPH)を生成する。6PGL は 6-ホスホグルコノラクトナーゼ(6PGL)により加水分解され 6-ホスホグルコン酸(6PG)となる。6PG は 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ(6PGD)によりリブローズ 5-リン酸(Ru5P)と NADPH を生成する。NADPH は生体内の重要な還元剤で脂肪酸やコレステロールの生合成や、細胞内グルタチオン濃度の調節に利用される。Ru5P はヌクレオチド生合成にも利用される。

G6PD は心不全やⅡ型糖尿病、高血圧、ガン、肥満などの疾患との関係が示唆されている。G6PD 阻害はこれらの疾病治療のターゲットとして期待されている。また、G6PD は生物にとって必須の酵素であるため、G6PD 阻害物質は抗マラリア、抗菌、抗真菌としての利用も期待できる。G6PD 阻害物質が有用な機能を有するにもかかわらず、現在までに阻害物質の報告例は少ない。G6PD 阻害物質としてデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)と 6-アミノニコチンアミド(6AN)が報告されているが、効果を得るためには多量の投与が必要なことや深刻な副作用があるため応用が拒まれている。化合物ライブラリーを用いた G6PD 阻害物質探索の報告はあるが特異性に問題のある化合物が多い。そこで本研究では、多様な生理活性物質を生産する海藻に着目し G6PD 阻害物質の探索を行った。海藻は主にフジマツモ科に属する紅藻を用いて G6PD 阻害物質の探索を行い、ブロモフェノールを単離・構造決定しその阻害特性を明らかにした。

第 1 章では北海道沿岸で採取した海藻の有機溶媒抽出物を調製して G6PD 阻害性を検討した。酵素源として、原核生物である *Leuconostoc mesenteroides* 由来 G6PD (*LmG6PD*) および、ヒト結腸癌由来株化細胞である Caco-2 細胞由来 G6PD (*hG6PD*)を用いてスクリーニングを行った。*hG6PD* は多種の試料を用いるスクリーニングに利用するため、簡便な酵素阻害試験系を確立した。スクリーニングの結果、*LmG6PD* に対して、緑藻抽出物では阻害は認められなかったが、褐藻抽出物では種を問わず広範囲に強い阻害が認められた。紅藻抽出物の多くは顕著な阻害を示さなかったが、フジマツモ科海藻抽出物に *LmG6PD* 阻害が認められた。*hG6PD* は *LmG6PD* と比較して阻害は弱かったが、フジマツモ科海藻抽出物に比較的強い阻害が認められた。阻害の強かった海藻抽出物を TLC 分析に供したところフェノール性化合物が検出された。褐藻抽出物は高分子量フロロタンニンが、フジマツモ科海藻抽出物ではブロモフェノールが阻害物質であると推定した。現在までに天然物から G6PD 阻害物質を探索した報告はなく、本研究で海藻に G6PD 阻害物質が含まれることを明らかにした。

第 2 章では、フジマツモ科海藻から *LmG6PD* 阻害を指標に阻害物質を単離し、構造決定を行った。ウラボソより 1 種、ハケサキノコギリヒバより 2 種、フジマツモより 3 種、モロイトグサより 2 種の計 8 種の G6PD 阻害物質を得た。構造解析の結果いずれの阻害物質もブロモフェノールであった。ブロモフェノールはフジマツモ科に属する海藻に特徴的な成分であり、フジマツモ科海藻は G6PD 阻害物質の有力な供給源であることが明らかとなった。また、構造と G6PD 阻害活性の比較を行うため、4 種類のフェノール性化合物を単離し、構造決定を行った。なお、ハケサキノコギリヒバより得られた 2,3-ジブロモ-4,5-ジヒドロキシベンジル *n*-ブチルエーテルは、本研究で初めて見出されたブロモフェノールである。

第 3 章 第 1~2 節では、フジマツモ科海藻より単離したブロモフェノールおよびそれらの関連フェノール性化合物の構造と G6PD 阻害性について検討した。酵素源は *LmG6PD* および *hG6PD* に加えて、真核生物 *Saccharomyces cerevisiae* (パン酵母)由来 G6PD (*ScG6PD*)を用いた。*LmG6PD* と *ScG6PD* では阻害特性に差異があり興味深い知見が得られた。*LmG6PD* および *ScG6PD* に共通してハロゲン化フェノール単量体よりも二量体で強い阻害が認められた。また、ジフェノールではフェノール性水酸基がオルト位に置換することやハロゲン置換数の増加が G6PD 阻害を強める傾向が認められた。*LmG6PD* および *ScG6PD* に対して、ジベンジルエーテル型とジアリールメタン型ブロモフェノール二量

体が強い阻害を示したが、*LmG6PD* に対してジベンジルエーテル型二量体がジアリールメタン型二量体よりも強い阻害を示し、*ScG6PD* に対してはジアリールメタン型二量体がジベンジルエーテル型二量体よりも強い阻害を示した。これは、2 つの芳香環の距離が異なることや芳香環を架橋する部分にヘテロ原子が含まれることが理由と考えた。ヒドロキシメチル基を持つブロモフェノール二量体では、ヒドロキシメチル基が置換されると *G6PD* 阻害に影響を与えることも明らかとなった。3-ブロモ-2-(2,3-ジブロモ-4,5-ジヒドロキシベンジル)-4,5-ジヒドロキシベンジルメチルエーテルは *LmG6PD* よりも *ScG6PD* を強く阻害し IC_{50} 値には約 160 倍の差があった。したがって *ScG6PD* に対する特異的阻害物質と結論付けた。一方で、*hG6PD* に対しては、本研究で得たいずれのブロモフェノールも顕著な阻害は示さなかった。*hG6PD* は細胞溶解物を酵素源として用いたため *G6PD* 以外にも多種類のタンパク質が存在する。ブロモフェノールが *G6PD* 以外のタンパク質と相互作用するかヒト由来酵素に対する阻害が弱いと考えた。

第 3 章第 3 節では、ブロモフェノール類の α -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)阻害性と *Caco-2* 細胞に対する細胞毒性を検討した。 α -グルコシダーゼはヒトの腸管で二糖類を加水分解しグルコースを遊離させる。 α -グルコシダーゼにはマルトースに作用するマルターゼや、スクロースに作用するスクラーゼなどがある。 α -グルコシダーゼ阻害剤は血糖値の急激な上昇を抑制するため糖尿病予防につながる。ヒト(*Caco-2*)由来酵素はラット由来酵素で報告されている阻害性と異なり、ヒドロキシメチル基を持つブロモフェノールが比較的強い阻害を示したため、哺乳類由来でも生物種で酵素の基質特異性が異なると示唆された。ブロモフェノールのマルターゼ阻害はポジティブコントロールとして用いた 1-デオキシノジリマイシンよりも非常に弱かったが、食用海藻にも含まれるため医薬のように顕著な効果はなくとも日常的にブロモフェノールを含む海藻を食事にとり入れることで血糖値上昇抑制効果があると考えられる。細胞毒性評価に用いたブロモフェノールでは 2,3-ジブロモ-4,5-ジヒドロキシベンジルアルコールが最も強い細胞毒性を示した。ヒドロキシメチル基にグリセリンを結合させたブロモフェノールは遊離水酸基やメチルエーテル体のブロモフェノールと比べて細胞毒性が弱まることが分かった。グリセリンのように嵩高く極性の高い官能基の存在が毒性を弱め生体に対して穏和に作用する可能性がある。

本研究の成果により、海藻の健康性機能について *G6PD* に対する阻害性の視点から理解を深めることができた。このことは未利用の海藻や商品価値を失った海藻の利用への端緒を開く一助になるものである。