

シラカンバ外樹皮からの終末糖化産物(AGEs)形成阻害成分の探索

(北大院農) ○岡田 直己、久間木 孝史、三橋 進也、重富 顕吾、生方 信

【緒言】

現在、糖尿病患者数は年々増加しており、大きな社会問題となっている。糖尿病合併症の原因の一つであるメイラード反応由来の終末糖化産物(AGEs)の形成を阻害する化合物を発見することは、糖尿病合併症に対する新たな予防・治療へと繋がると考えられる(図 1)。

当研究室では、樹皮に含まれる成分の多様性に着目し、北海道に自生する 8 種類(トドマツ・カラマツ・シラカンバ・キハダ・ハルニレ・アズキナシ・ミズナラ・イタヤカエデ)の樹木の外樹皮・内樹皮の抽出成分の組成と AGEs 形成阻害活性との相関性に関する調査を行った。その結果、フェノール含有量と AGEs 形成阻害活性とは正に相関することが示めされた。フラボノイド等のフェノール化合物は抗酸化作用を示し、AGEs 形成阻害活性を持つことが知られている。しかし、シラカンバ外樹皮抽出物のみ、相対的にフェノール含有量は低いにもかかわらず高い AGEs 形成阻害活性を示した¹⁾。

そこで、シラカンバ外樹皮からの AGEs 形成阻害物質の単離・構造決定を目的として本研究を行った。

【実験】

・ AGEs 形成阻害活性の測定

pH 7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液に、BSA(牛血清アルブミン)とグルコースをそれぞれ 800 µg/ml と 0.2 M になるように加えた後、試料を添加し、60 °C で 16 時間インキュベートした。トリクロロ酢酸によりタンパク質を不溶化・遠心し、その沈殿物を pH 10 のリン酸生理食塩水により再溶解した後、蛍光度を励起波長 360 nm・蛍光波長 465 nm で測定した²⁾。また、ポジティブコントロールとして 1 mM のアミノグアニジンを用いた。AGEs 形成阻害活性の計算方法は以下のとおりである。

$$\text{AGEs 形成阻害活性(\%)} = 100 - \frac{\text{蛍光度}_{(\text{試料} + \text{グルコース})} - \text{蛍光度}_{(\text{試料})}}{\text{蛍光度}_{(\text{グルコース})} - \text{蛍光度}_{(\text{グルコースなし})}} \times 100$$

・ フェノール含有量の測定

フェノール含有量は、フェノール性水酸基の還元力を測定する Folin-Ciocalteu 法を用いて行った³⁾。0.25 mg/ml のサンプル溶液に、7.5% Na₂CO₃ 溶液と 10% Folin-Ciocalteu 試薬を加え、40 °C で 30 分間インキュベートした。その後、765 nm に於ける吸光度を測定した。ただし、サンプルのフェノール含有量は、タンニン酸当量(µM)で $y = 53.737x + 0.01$ 、 $R^2 = 0.9768$ の検量線で表した($y =$ タンニン酸当量、 $x =$ 吸光度)。

・ 抽出方法と分離操作

シラカンバ外樹皮を凍結乾燥し、ミキサーにより粉末にした後、4 °C・暗所下で 24 時間、重量比の 0.5 倍体積量(100 g に対し 500 ml)の有機溶媒を用いて抽出を行い、木粉の重量比として 12.9%の収量で抽出物を得た。次に、シリカゲルや LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー等による分離操作を行い、粗精製された活性画分を得た。

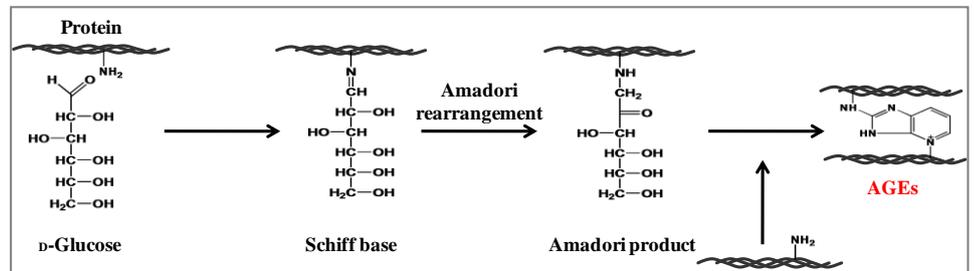


図 1 メイラード反応と AGEs

【結果と考察】

1. 抽出溶媒

植物から抽出物を得る際に用いられる溶媒は、一般的にメタノールが使用されるが、フェノール性化合物はメタノールへの溶解性が高いことが知られている。そのため、溶解性の低い酢酸エチルによる抽出物との比較を行った。その結果、酢酸エチル抽出物はメタノール抽出物よりも AGEs 阻害活性が高く、フェノール含有量が低いことが示された(図 2-1,2)。

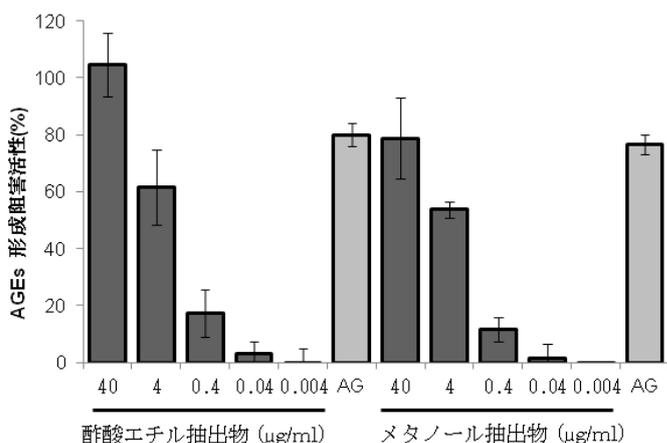


図 2-1 抽出溶媒による AGEs 形成阻害活性の差異

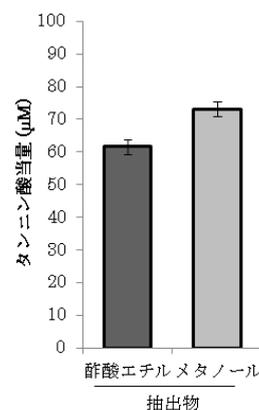


図 2-2 フェノール性化合物含有量

2. カラムクロマトグラフィーによる活性物質の分離

酢酸エチルによる抽出により得られた 12.9 g の抽出物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₃Cl-MeOH) を用いて、一次分離を行った。その結果、シラカンバ外樹皮の主成分であるベチュリンを多く含む fr. 13-14 には AGEs 形成阻害活性は確認されなかった。一方、fr. 15-17 はフェノール量が極めて少ないにもかかわらず、高い AGEs 形成阻害活性を示した(図 3-1,2)。そのため、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分離操作を行った結果、AGEs 形成阻害活性を示す 35.8 mg の画分が得られた。得られた活性画分から HPLC を用いた分離や結晶化等による活性物質の単離・精製を検討中である。

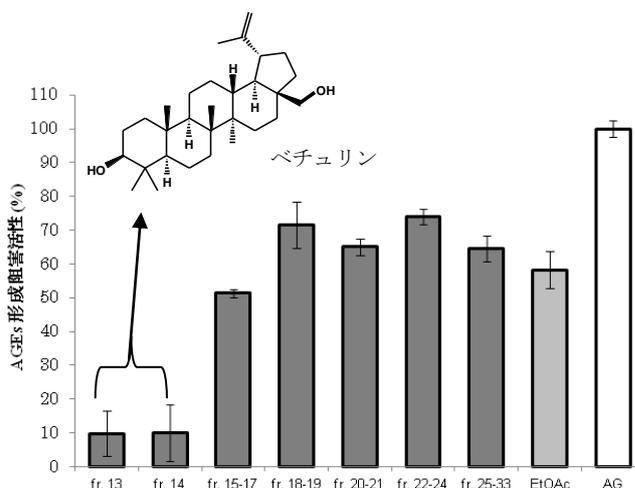


図 3-1 シリカゲルカラムによる分離(AGEs 形成阻害活性)

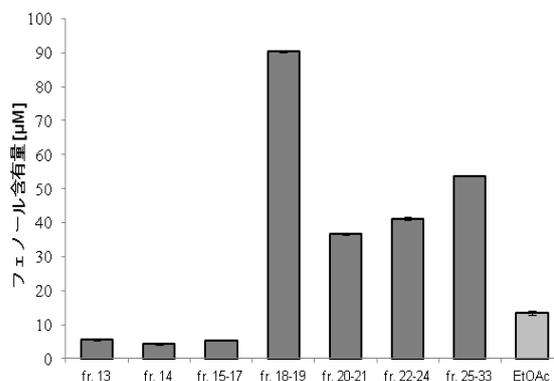


図 3-2 シリカゲルカラムによる分離(フェノール含有量)

参考文献

- 1) 久間木ら：樹皮のフェノール性抽出成分と AGEs 形成阻害活性との相関に関する研究. 第 63 回 日本木材学会大会要旨集, 2013.
- 2) Nobuyasu Matsuura, Tadashi Aradate, Chihiro Sasaki, Hiroyuki Kojima, Mitsuharu Ohara, Junichi Hasegawa, and Makoto Ubukata; Screening system for the maillard reaction inhibitor from natural product extracts; *Journal of Health Science*; 2002, 48 (6), 520-526.
- 3) Mbaebie BO, Edeoga HO and Afolay AJ; Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq; *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 2012, 118-124