

報 文

サンショウ果実由来のポリフェノールについて(第2報)
—ポリフェノールによるタンパク質糖化反応抑制効果に関する研究—

山崎 栄次*

Extraction of antioxidants from *Zanthoxylum piperitum* DC. fruit
-Inhibition of glycation with polyphenols from *Zanthoxylum piperitum* DC. fruit-

by Eiji YAMAZAKI

Two polyphenols were extracted and purified from *Zanthoxy Piperitum* DC. fruit and these scavenging activities toward active oxygen species from glycated protein were estimated by cytochrome *c* method. Glycated protein was prepared between bovine serum albumin and D(-)ribose for 48 hours reaction at 37 °C, and SDS-PAGE indicated that about 30 molecules of D(-)ribose were bind to bovine serum albumin. One of the polyphenol from two exhibited a strong active oxygen species scavenging activity but α -tocopherol, a natural antioxidant and popular in food industry, showed little scavenging activity.

Key words: polyphenol, glycation, radical scavenger and cytochrome *c*.

1. はじめに

糖尿病は中高齢者を中心に患者数が多く、近年では低年齢化が進んでいる。糖尿病の特徴は高血糖状態が持続することであるが、もっとも注目すべきは糖尿病が引き起こす白内障や動脈硬化等の血管障害を代表とする合併症である。合併症の発症は複雑であるが、タンパク質の糖化が主要な原因の一つであることが明らかになっている¹⁾。糖化とはタンパク質の α -アミノ基やリジン残基の ϵ -アミノ基と、ブドウ糖等の還元糖が有するアルデヒド基が非酵素的に結合する反応であり、糖尿病の高血糖状態で促進される。糖化反応の過程でタンパク質は機能が低下し、活性酸素を放出しながら変性・崩壊する。特に糖化の進行とともに放出される活性酸素は、生体成分、組織に大きな影

響を与える²⁻⁶⁾。

血清総タンパク質の約 60%が血清アルブミン(SA)であることから、血液中での主要な糖化タンパク質は SA であると考えられる。SA は疎水性物質を可逆的に結合することができ、特に脂肪酸に対して高い親和性を有し、血液を介した肝臓への脂肪酸運搬が主な機能である。前報⁷⁾でサンショウ果実から高い抗酸化能力を有するポリフェノールを複数抽出することに成功したことを報告した。サンショウ果実由来ポリフェノールの特徴は、親水性から疎水性の物質を幅広く含むことである。本研究では、このサンショウ果実由来のポリフェノールを利用し、糖化タンパク質由来の活性酸素除去能力について検討し、糖尿病合併症予防剤の開発を目的とした。

* 生物食品グループ

2. 材料と実験方法

2. 1 原材料

サンショウ (*Zanthoxylum piperitum* DC.) 果実は紀州産を伊勢粉材株式会社 (三重) から提供された。Bovine serum albumin fatty acid free grade (BSA), cytochrome *c* from horse, Superoxide dismutase from bovine erythrocyte (SOD) は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。D(-)ribose は Sigma co. Ltd. (St. Louis, USA) から購入した。D(L)- α -tocopherol (vitamin E), L(+)-ascorbic acid (vitamin C) は半井テスク株式会社 (京都) から購入した。他の試薬は市販の特級試薬を購入し、特に精製せずに用いた。

2. 2 方法

2. 2. 1 サンショウ果実由来ポリフェノールの分離精製

前報⁷⁾の抽出方法を一部改良した。前報では分取型クロマトグラフィーで最終精製を行ったが、高い純度の試料を得ることは困難であった。ポリフェノールの同定や諸性質の検討を実施するためには、試料の高純度化が必要である。このため高性能なカラムを用い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製を追加した。HPLC は 2690 Alliance 本体、996 フォトダイオードアレイ検出器及び Protein pak 60 カラム (ϕ 7.8 mm \times 300 mm) (それぞれ日本ウォーターズ株式会社 (東京)) を使用し、40 $^{\circ}$ C, 流速 2 ml/min で 30% methanol (10 min), 99% methanol (10-140 min) でグラジエント溶出した。得られた精製分画物を分析型 HPLC で、純度検定を行った。セミマイクロカラム分析は Inertsil c18 カラム (1.5 mm \times 150 mm : ジーエルサイエンス株式会社 (東京)) を使用し、40 $^{\circ}$ C, 流速 0.1 ml/min で 30% methanol (5 min), 99% methanol (5-25 min) でグラジエント溶出した。

2. 2. 2 糖化タンパク質の調製

糖化タンパク質を調製するため、タンパク質として BSA, 還元糖として D(-)ribose を用いた。50 mM リン酸緩衝液 (Na) pH 7.4 に BSA と D(-)ribose を終濃度でそれぞれ 40 mg/ml, 500 mM で溶解し、37 $^{\circ}$ C で 48 hours 反応させた。反応液を蒸留水で透析し、未反応の D(-)ribose を除去し凍結乾燥した。D(-)ribose なしで同様の反応を行った物をコントロールとした。また、タンパク質の糖化の程度を SDS-PAGE (タンパク質電気

泳動) によって確認した。

2. 2. 3 cytochrome *c* を用いた活性酸素消去能力の測定⁸⁾

糖化タンパク質から放出される O_2^- を cytochrome *c* 還元法によって測定した。cytochrome *c* は O_2^- によって還元され、吸収波長 550 nm に特徴的な吸収を発現する。cytochrome *c* (1 mg/ml) を 100 μ l, 活性酸素消去物質を 50 μ l, そして糖化タンパク質 (5 mg/ml) 50 μ l を 50 mM リン酸緩衝液 (Na) pH 6.0 に溶解し 40 $^{\circ}$ C で反応させ、550 nm と 540 nm の吸収の差をマイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 (東京)) で経時的に観察した。

3. 結果と考察

3. 1 サンショウ果実由来ポリフェノールの分離精製

従来の手法に分取型 HPLC の操作を加えることで、約 500 分要した分析時間が約 1/7 に短縮でき、また高い純度の物質を得ることができた。分取型 HPLC の操作で得られた 2 つの分画を p7 及び p8 (それぞれ前報図 3 のピーク A 及びピーク 5) とし回収した (図 1)。p7 及び p8 を分析型 HPLC で紫外・可視光吸収に基づいて純度検定を実施した結果、それぞれ 95%, 91% 以上の純度を

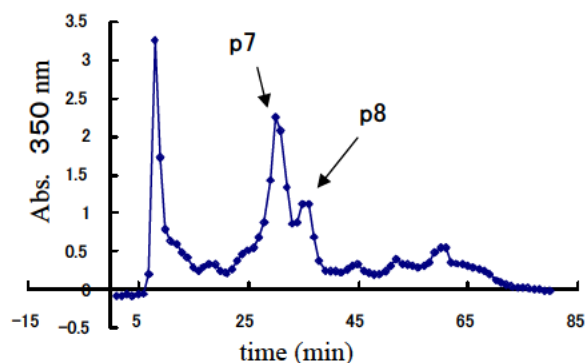


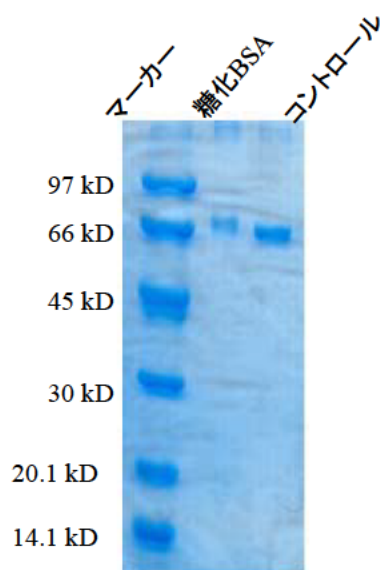
図1 サンショウ果実由来ポリフェノールの精製取
クロマトグラフィーによる精製

得た。さらに質量分析などの機器分析を行ったところ、p7 及び p8 はともにフラボノール配糖体の一種であることが判明した (これら機器分析の詳細は他の学術雑誌に投稿準備中のためここでは記載しない)。この精製された p7 及び p8 を用い、糖化タンパク質由来活性酸素消去能力を測定した。

3. 2 タンパク質の糖化

血清中で最も多量に存在するアルブミンは、血

糖と最も接触する時間が長いことから、主要な糖化タンパクの一つであると認識されている。本研究



究では糖化タンパク質の原料として BSA を用いた。BSA はヒト血清アルブミン (HSA) と比較して安価であり、結果の大部分を HSA の結果として推定できる。また、糖化反応の速度は、一般にタンパク質と還元糖の濃度に依存するが、還元糖の立体構造にも大きく影響を受ける。D(-)ribose は水溶液中で直鎖を形成する割合がブドウ糖よりも高い。このため、直鎖の末端にあるアルデヒド

基がタンパク質と反応しやすくなり、結果として糖化反応速度が高くなる。本実験の目的が糖化タンパク質由来の活性酸素消去であるので、糖化反応の遅いブドウ糖ではなく反応機構が同じである D(-)ribose を採用し、作業時間の短縮化を図った。糖化反応において BSA に D(-)ribose が結合し、分子量は増加する。48 時間糖化反応を行った標品について SDS-PAGE で分子量の増加を確認したところ、D(-)ribose がないコントロールに比較して分子量が増加した (図 2)。

分子量マーカーから推定される分子量は 70.9 kDa ($R^2 = 0.99$) であった。D(-)ribose と BSA の分子量をそれぞれ 150 及び 67 kDa とすると、BSA に結合した D(-)ribose は約 30 分子となる。データは示さないが、ブドウ糖と同様の反応を試みたところ、2 週間の反応で約 19 分子の結合であったことから、D(-)ribose を用いることによって反応時間の大幅な短縮が可能であることが実証できた。BSA の糖化のほとんどはリジン残基の ϵ -アミノ基で生じ、BSA にリジン残基は 59 個あるので約半数のリジン残基が糖化されたことがわかった。この糖化タンパク質を用い、サンショウ果実由来ポリフェノールによる活性酸素消去能力の測定を行った。

3. 3 サンショウ果実抽出物による糖化タンパク質由来活性酸素消去能力の測定

p7 及び p8 の糖化タンパク質由来活性酸素消去

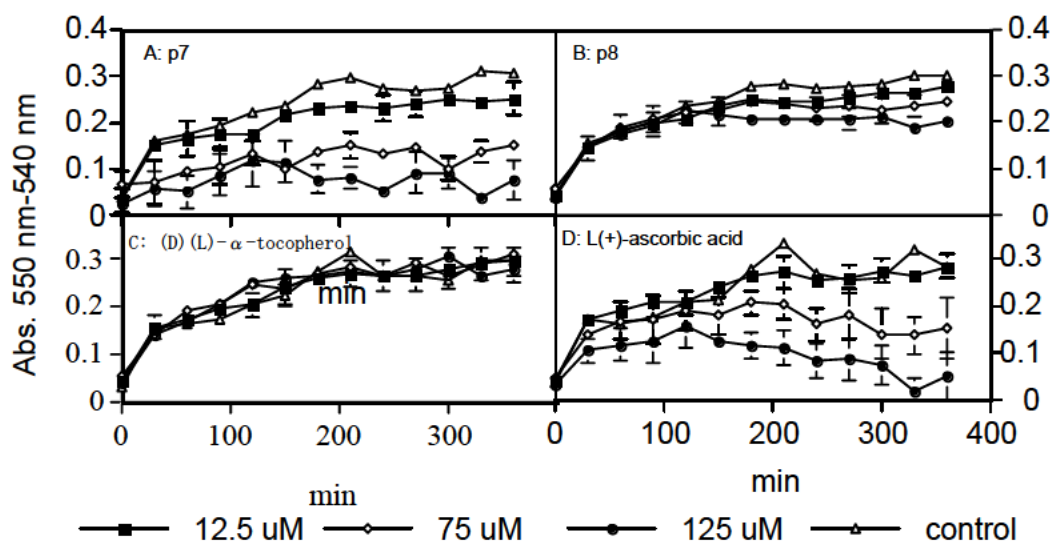


図 3 ポリアチフェノールの糖化タンパク質由来活性酸素消去能力の測定。A: p7, B: p8 の測定。C: (D) (L)- α -tocopherol, (D) (L)(+) ascorbic acid, 結果は 3 回の平均値であり、誤差は標準偏差の率で示す。

能力は cytochrome *c* を用いて測定した。cytochrome *c* は O₂によって還元され、550 nm に特徴的な吸収を発現する。しかし、540 nm の吸収は変動しないので 550 nm と 540 nm の吸光度の差によって O₂の発生量を推定することができる。cytochrome *c* (1 mg/ml) 100 μl を 96 ヶプレートウェルに添加し、p7 と p8 をそれぞれ推定されたフラボノイド配糖体換算で 50, 300, 500 μM 調製し、50 μl を各ウェルに添加した（最終濃度はそれぞれ 12.5, 75, 125 μM）最後に 5 mg/ml に調製した糖化 BSA を 50 μl ずつ添加し反応を開始した。対照として、コントロール BSA（糖化していない BSA）を糖化 BSA の代わりに使用した。また、測定に先立って、ポリフェノールの代わりに 1 mg/ml の SOD を 50 μl 添加し、吸光度の上昇がないことを確認した。これによって糖化タンパク質から放出される活性酸素の大部分が O₂であることがわかった。O₂消去能力を比較するため、天然の強い抗酸化物質である (D)(L)- α -tocopherol 及び L(+)-ascorbic acid を用いた。結果を図 3A ~ D に示す。図 3A は p7 の結果であり濃度依存的に O₂消去能力が高まることが確認された。同様に L(+)-ascorbic acid（図 3D）も消去能力が高いことがわかった。一方、p8（図 3B）の消去能力は p7 や L(+)-ascorbic acid と比較して低く、(D)(L)- α -tocopherol（図 3C）ではほとんど効果がないことがわかった。コントロール（抗酸化物質無添加）が最も高い吸光度を示した 210 分における各抗酸化物質の O₂消去能力（%）を図 4 に示す。p7 (125 μM) は 70% 以上の O₂消去能力を示し、L(+)-ascorbic acid は約 66% であった。一方、p8 及び (D)(L)- α -tocopherol はそれぞれ約 27%、13% であった。

(D)(L)- α -tocopherol は脂溶性の抗酸化物質として知られ、脂質の過酸化の抑制を目的に食品工業で多用されている。食品工業以外でも生体成分の老化防止やガン化の抑制など様々な効果が明らかになっている。しかし、本研究の中で糖化タンパク質由来活性酸素の消去能力が低く、効果が期待できないことが明らかになった。一方、サンショウ果実由来ポリフェノールの p7 は (D)(L)- α -tocopherol にはない糖化タンパク質由来活性酸素消去能力を有することがわかった。今後は、この能力を利用した糖尿病合併症予防を目指すため、

p7 の同定や食品としての安全性などを詳細に検討する予定である。

4. まとめ

ポリフェノールによる糖化反応由来活性酸素の消去能力を調べた。ポリフェノールは前報⁷⁾で報

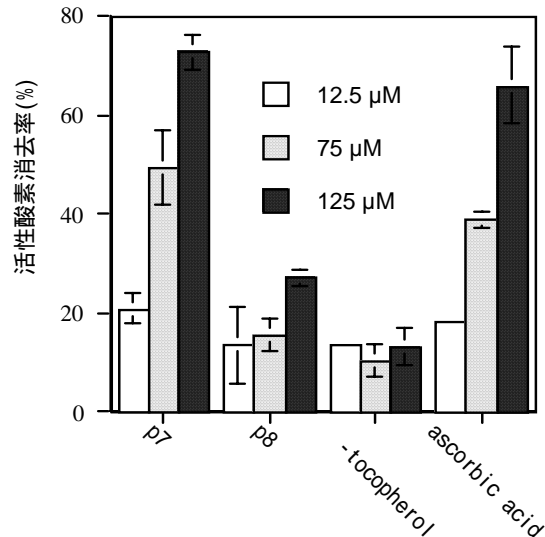


図4 210分におけるp7, p8, (D)(L)- α -tocopherol 及びL(+)-ascorbic acidの活性酸素消去率。結果は3回の測定値の平均値であり、誤差は標準偏差(±)である。

告した精製方法を改良し、精製度を高めた標品を使用した。タンパク質の糖化は牛血清アルブミンと D(-)ribose を用い、糖化の程度を SDS-PAGE によって確認した。48 時間の糖化反応によって約 30 分子の D(-)ribose が結合することがわかった。糖化タンパク質由来活性酸素消去能力を cytochrome *c* 法で確認したところ、天然の強い抗酸化物質であるビタミン E にはほとんど効果がなかったが、サンショウ果実由来ポリフェノールは濃度依存的に効果が確認できた。

本研究の一部は平成 13 年度岡三加藤文化振興財団助成金を受けて実施した事業である。同財団に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Brownlee, M. et al. "Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complication". *N Engl J Med* 318, 1315-1321 (1988).
- 2) Shapiro, R. et al. "Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A". *J Biol*

Chem 255, 3120-3127 (1980).

3) Gonen, G. et al. "Haemoglobin A1 and diabetes mellitus". *Diabetologia* 15, 1-8 (1978).

4) Bailey, A. et al. "Reducible components in the proteins of human erythrocyte membrane".

Biochim Biophys Acta 434, 51-57 (1976).

5) Iberg, N. et al. "Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites". *J Biol Chem* 261, 13542-13545 (1986).

6) Stevens, VJ. et al. "Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins". *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 2918-2922 (1978).

7) 山崎栄次ほか：“山椒果実由来の抗酸化物質について”。平成12年度三重県工業技術総合研究所報告 25, 7-12 (2001).

8) McCord, JM. et al. "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions". The mechanism of the mediation of cytochrome *c* reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem.* 245, 1374-1377 (1970).