

原著論文

ザクロ由来エラジタンニンオリゴマーの ヒトリコンビナントマルターゼ阻害活性

川上 賀代子¹⁾, 李 鵬²⁾, 裏地 美杉³⁾, 守谷 智恵¹⁾,
畑中 唯史³⁾, 伊東 秀之^{2),4)}, 坪井 誠二¹⁾ *

¹⁾ 就実大学薬学部生化学研究室, ²⁾ 岡山大学大学院医歯薬総合研究科,

³⁾ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所,

⁴⁾ 岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

Inhibitory effect of ellagitannin oligomers from pomegranate on recombinant human maltase-glucoamylase

Kayoko Kawakami¹⁾, Peng Li²⁾, Misugi Uraji³⁾, Chie Moritani¹⁾,
Tadashi Hatanaka³⁾, Hideyuki Ito^{2),4)}, Seiji Tsuboi¹⁾ *

¹⁾ *Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University*

²⁾ *Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University*

³⁾ *Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries, Research Institute for Biological Sciences (RIBS), Okayama*

⁴⁾ *Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University*

(Received 30 October 2015; accepted 16 November 2015)

Abstract: In this study, we reported the inhibitory activities of ellagitannin oligomers from pomegranate against recombinant human maltase-glucoamylase (MGAM). The ellagitannin oligomers from pomegranate showed remarkable inhibitory effect, with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 74-133 μM. These compounds were more potent than acarbose (IC₅₀ value of 170 μM), which was used as the α-glucosidase inhibitor. Their inhibitory activities depended on their degree of polymerization. We further evaluated inhibitory activity against α-glucosidases from rat small intestine and yeast. The ellagitannin oligomers showed the same inhibitory activities as dependence on their degree of polymerization. The Lineweaver-Burk and Dixon plot kinetic analysis of pomegranin A, the most potent inhibitor, showed a noncompetitive inhibition with a *K_i* value of 20 μM. These results suggest that ellagitannin oligomers from pomegranate would be useful for suppressing postprandial hyperglycemia.

Keywords: Pomegranate; Recombinant human maltase-glucoamylase; Ellagitannin oligomer; Pomegranin A

緒言

ザクロ (*Punica granatum* L.) はイランやトルコが原産の果実で、抗酸化作用¹⁾、抗炎症作用²⁾、抗がん作用³⁾、抗菌作用^{2,4)}など様々な機能性があり、その有効成分として、エラグ酸、エラジタンニン、プニカ酸、フラボノイド、アントシアニン、アントシアニン、フラボンなどが報告されている^{5,6)}。以前の研究で、ザクロ果肉にエラジタンニンオリゴマーである eucalbanin B (**1**, dimer) や eucarpanin T₁ (**2**, trimer) だけでなく、tetramer の pomegraniin A (**3**) が含まれていることを明らかにし (Fig. 1)、終末糖化産物形成阻害活性があることを報告した⁷⁾。

糖尿病においては血糖値のコントロールが重要であり、acarbose や miglitol などの α -グルコシダーゼ阻害剤は食物からのグルコースの生成を抑制するため、糖尿病患者の治療に使われている⁸⁾。我々は、ヒトリコンビナントグルコアミラーゼ (MGAM) を用いて α -グルコシダーゼ阻害活性のスクリーニングを行い、ザクロ果実にヒトリコンビナント MGAM 阻害活性があることを明らかにした⁹⁾。

本研究では、新たにザクロから得られたエラジタンニンオリゴマーについてヒトリコンビナント MGAM 阻害活性を調べたので報告する。

方法

エラジタンニンオリゴマーの単離

エラジタンニンオリゴマーは Ito ら⁷⁾の方法を用いて単離した。岡山大学薬学部附属薬用植物園から採取したザクロ果肉 (2 kg) を 70%アセトン水溶液 (3.5 L) で抽出し、ろ過後減圧濃縮した。得られた抽出物 (130 g) を Diaion HP-20 (60×5.4 cm i.d.) を用いて 0%, 10%, 20%, 40%, 100% MeOH で段階溶出した。50%MeOH 画分 (1.27 g) をさらに Toyopeal HW-40 (35×2.2 cm i.d.) に供し、70%MeOH, MeOH / H₂O / アセトン(7:2:1), MeOH / H₂O / アセトン(7:1:2), 70%アセトンで分画を行った。70%MeOH 画分は MCI gel CHP-20P と Sephadex LH-20 を用いてさらに精製を行い、eucalbanin B (**1**) (97 mg, 0.075%) を得た。また、順相 HPLC を用いて精製を行い、MeOH / H₂O / アセトン(7:2:1)画分から eucarpanin T₁ (**2**) (39 mg, 0.03%), MeOH / H₂O / アセトン(7:1:2)画分から pomegraniin A (**3**) (11 mg, 0.0085%) をそれぞれ単離した。

ヒトリコンビナント MGAM 阻害活性の測定

ヒトリコンビナント MGAM は、ヒト小腸 MGAM の N 末端ドメインの遺伝子¹⁰⁾をメタノール資化性酵母用分泌型発現ベクター (pPICZ α) に挿入し、*Pichia pastoris* KM71H を形質転換して作

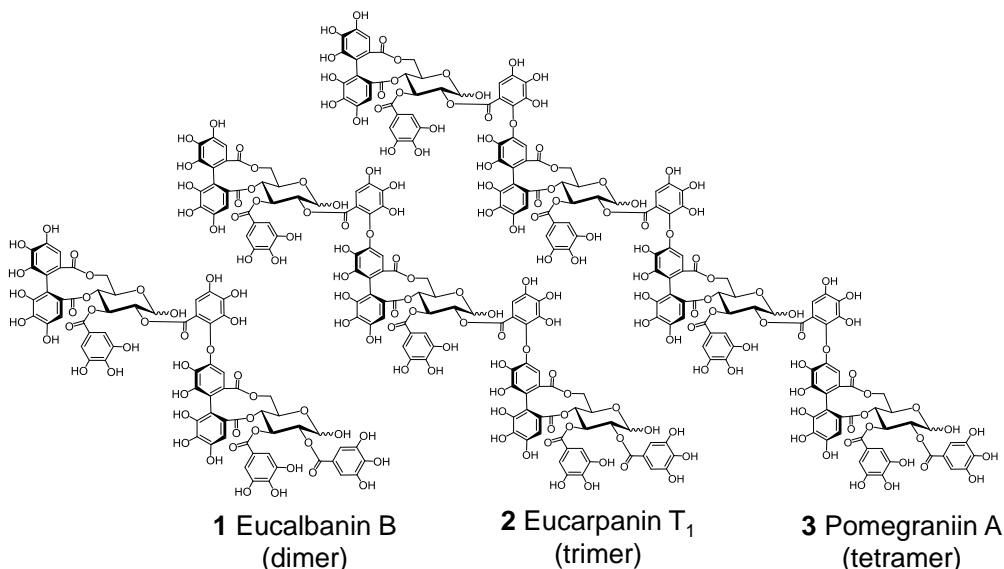


Figure 1 Chemical structures of Eucalbanin B (**1**), Eucarpanin T₁ (**2**) and Pomegraniin A (**3**).

Table 1 The recombinant human MGAM and α -glucosidase from rat intestine and yeast inhibitory activities.

	IC ₅₀ (μ M)		IC ₅₀ (nM)
	Origin	human	rat
	enzyme	MGAM	maltase
Eucalbanin B (1)		133 \pm 11	170 \pm 11
Eucarpanin T ₁ (2)		86 \pm 3	115 \pm 2
Pomegraniin A (3)		74 \pm 2	110 \pm 2
			75 \pm 3

The data were expressed as the mean \pm SD (n=3).

製した⁹⁾. この酵母を培養して得られた培養上清を硫酸沈殿後、透析して酵素の精製を行った. 阻害活性の評価はマルトースを基質とした. DMSOに溶解した試料とマルトースを 37°C, 5 分間ブレインキュベートし, ヒトリコンビナント MGAM を加えて反応を開始させた. 37°C, 30 分間反応を行い, 99°Cで 5 分間加温した後, 遊離したグルコースをグルコース CII テストワコー (和光純薬) で測定した. 試料の代わりに DMSO のみを添加した時のグルコース量をコントロール (100%) として 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した. なお, 本実験は岡山県生物科学研究所遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行った.

ラット小腸由来 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

ラット小腸由来のマルターゼ阻害活性の測定は Dahlqvist の方法を改変して行った¹¹⁾. 100 mg ラット小腸アセトンパウダー (シグマアルドリッチ) を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (1 mL, pH6.8) を用いてホモジナイズし, 遠心分離 (2,000 \times g, 30 min) して上清を酵素液とした. 阻害活性の評価はマルトースを基質とし, DMSO に溶解した試料を添加して, 37°C, 30 分間反応を行った. 99°C で 5 分間加温した後, 遊離したグルコースをグルコース CII テストワコーで測定した. 試料の代わりに DMSO のみを添加した時のグルコース量をコントロール (100%) として IC₅₀ を算出した.

酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

酵母 (オリエンタル酵母) 由来のマルターゼ阻害活性の測定はマルトースを基質とし, DMSO に溶解した試料を添加して, 37°C, 30 分間反応を行った. 99°C で 5 分間加温した後, 遊離したグル

コースをグルコース CII テストワコーで測定した. 試料の代わりに DMSO のみを添加した時のグルコース量をコントロール (100%) として IC₅₀ を算出した.

結果・考察

ヒトリコンビナント MGAM 阻害活性測定はマルトースを基質として行った. ザクロ由来のエラジタンニンオリゴマーの IC₅₀ を Table 1 に示した. 重合度が上がると阻害活性が高いことが分かり, tetramer である pomegraniin A (3) の IC₅₀ は 74 μ M と最も阻害活性が高かった. α -グルコシダーゼの阻害剤として知られている acarbose のヒトリコンビナント MGAM 阻害活性は 170 μ M であり⁹⁾, エラジタンニンオリゴマーは acarbose よりも強い阻害活性をもつことが明らかとなった. これまでに, エラジタンニンの α -グルコシダーゼ阻害は, galloyl 基の数に比例する¹²⁾, また, プロアントシアニジンの α -グルコシダーゼ阻害活性は重合度と galloyl 基の数に比例するという報告がある¹³⁾. よって, エラジタンニンオリゴマーの阻害活性の強度は, 重合度と galloyl 基の数に起因すると考えられた.

さらに, ラット小腸由来と酵母由来の α -グルコシダーゼ阻害活性について調べた (Table 1). エラジタンニンオリゴマーの α -グルコシダーゼ阻害活性はヒトリコンビナント MGAM 阻害活性と同様に, 重合度に応じて阻害活性が強くなることが示唆された. これまでに, 200種類以上のエラジタンニンオリゴマーの報告があるが, 特に tetramer 以上のエラジタンニンの機能性については報告が少ない^{7, 14)}. 今回, エラジタンニン

tetramer である **3** に強い α -グルコシダーゼ阻害活性があることを初めて明らかにした。

今回調べたエラジタンニンオリゴマーの中で最も強くヒトリコンビナント MGAM 阻害活性を示した **3** による阻害様式を調べるため、ヒトリコンビナント MGAM を各濃度のマルトースと **3** 存在下もしくは非存在下で反応させ Lineweaver-Burk plot を行った。Fig. 2 に示すように、**3** はヒトリコンビナント MGAM を非拮抗的に阻害することが明らかとなった。また、Dixon plot からその阻害定数 (K_i) は 20 μM であった。

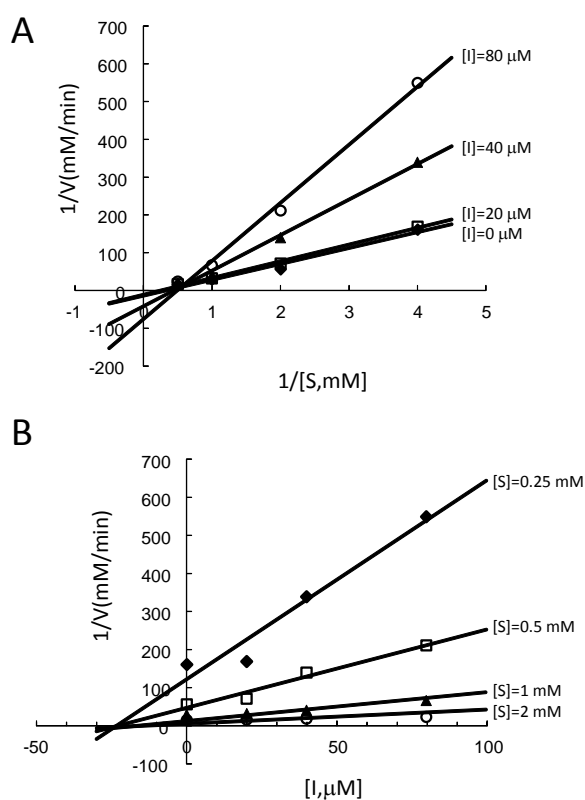


Figure 2 (A) Lineweaver–Burk plot of the effect of pomegranin A (**3**) on the rate of maltose digestion by recombinant human MGAM. Maltose (substrate : S) was used at final concentrations of 0.25, 0.5, 1, or 2 mM. Pomegranin A (inhibitor : I) was added at final concentrations of 0 (\blacklozenge), 20 (\square), 40 (\blacktriangle), or 80 μM (\circ). (B) Dixon plot of the effect of pomegranin A on the rate of maltose digestion by MGAM. Maltose was used at final concentrations of 0.25 (\blacklozenge), 0.5 (\square), 1 (\blacktriangle), or 2 mM (\circ). Pomegranin A was added at final concentrations of 0, 20, 40, or 80 μM .

以上の結果より、ザクロ由来のエラジタンニンオリゴマーはヒトリコンビナント MGAM 阻害活性があり、その阻害活性は重合度と galloyl 基の数に起因することが示唆された。最も阻害活性の強いエラジタンニンオリゴマーは **3** であり、その IC_{50} は 74 μM 、阻害様式は非拮抗阻害であった。ザクロ果肉には以前に報告したヒトリコンビナント MGAM 阻害活性をもつ oenothien B も含まれており⁹⁾、ザクロが食後血糖値のコントロールに有効である可能性が示唆された。また、**3** には今回報告した α -グルコシダーゼ阻害活性だけでなく、終末糖化産物形成阻害活性を有することも報告した⁷⁾。終末糖化産物は糖尿病合併症の発症と進展に深く関わっていることが分かっている¹⁵⁾。よって、ザクロは糖尿病の予防や改善に複合的に役立つと考えられるが、エラジタンニンオリゴマーの吸収代謝に関する研究は少なく、動物試験や臨床試験など、さらなる研究が必要である。

引用文献

- 1) Noda Y., Kaneyuki T., Mori A. and Packer L.: Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin. *J. Agri. Food Chem.* **50**, 166-171 (2002).
- 2) Ismail T., Sestili P. and Akhtar S.: Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J. Ethnopharmacol.* **143**, 397-405 (2012).
- 3) Adhami V. M., Siddiqui I. A., Syed D. N., Lall R. K. and Mukhtar H.: Oral infusion of pomegranate fruit extract inhibits prostate carcinogenesis in the TRAMP model. *Carcinogenesis.* **33**, 644-651 (2011).
- 4) Al-Zoreky N. S.: Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 244-248 (2009).
- 5) Jurenka J. S.: Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern.*

- Med. Rev.* **13**, 128-144 (2008).
- 6) Rahimi H., Arastoo M. and Ostad S.: A Comprehensive Review of *Punica granatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. *Iran J. Pharm. Res.* **11**, 385-400 (2012).
- 7) Ito H., Li P., Koreishi M., Nagatomo A., Nishida N. and Yoshida T.: Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products. *Food Chem.* **152**, 323-330 (2014).
- 8) Asano N.: Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiol.* **13**, 93R-104R (2003).
- 9) Kawakami K., Li P., Uraji M., Hatanaka T. and Ito H.: Inhibitory Effects of Pomegranate Extracts on Recombinant Human Maltase-Glucoamylase. *J. Food Science.* **79**, H1848-H1853 (2014).
- 10) Rossi E. J., Sim L., Kuntz D. A., Hahn D., Johnston B. D., Ghavami A., Szczepina M. G., Kumar N. S., Sterchi E. E., Nichols B. L., Pinto B. M. and Rose D. R.: Inhibition of recombinant human maltase glucoamylase by salacinol and derivatives. *FEBS J.* **273**, 2673-2683 (2006).
- 11) Dahlqvist A.: Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* **7**, 18-25 (1964).
- 12) Toda M., Kawabata J. and Kasai T.: Inhibitory effects of ellagi- and gallotannins on rat intestinal alpha-glucosidase complexes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 542-547 (2001).
- 13) Q L., Chen J., Li T., Liu C., Zhai Y., McClements D. J. and Liu J.: Separation and characterization of polyphenolics from underutilized byproducts of fruit production (*Choerospondias axillaris* peels): inhibitory activity of proanthocyanidins against glycolysis enzymes. *Food Funct.* Advance Article, (2015).
- 14) Tsai Y., Aoki T., Maruta H., Abe H., Sakagami H., Hatano T., Okuda T. and Tanuma S.: Mouse mammary tumor virus gene expression is suppressed by oligomeric ellagitannins, novel inhibitors of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **267**, 14436-14442 (1992).
- 15) Yan S., Ramasamy R. and Schmidt A.: Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 285-293 (2008).