

学位論文審査結果の報告書

氏 名

佐藤 完太

生年月日

昭和59年 7月 13日

本籍(国籍)

大阪府

学位の種類

博士(薬学)

学位記番号

第 200 号

学位授与の条件

学位規程第5条該当

(博士の学位)

論文題目

メープルシロップ由来

オリゴ糖の分析に関する研究

学位論文受理日

2024年 2月 14日

学位論文審査終了日

2024年 2月 19日

審査委員

(主査) 長井 紀章

(副主査) 川崎 直人

(副主査) 多賀 淳

指導教員

多賀 淳

論文内容の要旨

本研究では、キャピラリー電気泳動 (CE) と荷電化粒子検出器 (CAD)を用い、メープルシロップに含まれる糖の高性能分析法を模索するとともに、新たに見つかったオリゴ糖の一種に着目し、その機能性について検討した。

第1章では、CEを用いてメープルシロップ中に含まれる糖の分析を行った。CEにおいては、現状、紫外可視吸光検出を行うことが現実的であるため、アルドースの還元末端に 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP)を結合させる誘導体化を採用することで高感度化を図った。また、スクロースを主成分とするメープルシロップでは還元末端にフルクトースが結合することにより誘導体化が困難な糖鎖も存在することが予想されるため、誘導体化前にインベルターゼを用いてフルクトースを脱離させることにより生じたアルドースの還元末端を PMP により修飾してフルクトシルオリゴ糖と予想される糖類の分析を行った。その結果、インベルターゼに親和性を有すると考えられるオリゴ糖を見出した。また、CADを用いた HPLC によりオリゴ糖を分離精製し、精製物の酸加水分解物を HPLC-CAD により分析することで、フルクトースとグルコースからなる二糖であることを明らかにした。加えて、核磁気共鳴 (NMR)スペクトルにより、本オリゴ糖が天然の食品中では非常に珍しいブラストースであると同定した。

第2章では、HPLC-CAD によりメープルシロップ中に含まれるオリゴ糖の最適な分析法の模索を行い、ブシコース、1-ケストースおよびニストースがメープルシロップ中に存在することを確認した。また、入手可能な糖標品では同定できないオリゴ糖の存在を確認したことから、HPLC-CAD により分離精製し、LC-MS/MS ならびに NMR により構造解析を行った。その結果、本オリゴ糖がネオケストースであると同定した。

第3章では、第1章により同定したブラストースに着目し、糖分解酵素の阻害活性について *in vitro* 実験系に検討を行うことで、インベルターゼ、マルターゼおよびイソマルターゼに対して阻害活性を有することを明らかにした。さらに、II型糖尿病モデルラットを用い、ショ糖の負荷実験を行うことで、ブラストースがショ糖投与による血糖値上昇を抑制することを明らかにした。

以上、本研究を通して、大量の同種共存物中から希少な糖類を分析する方法を2つのアプローチから示した。また、メープルシロップ中にブシコース、ブラストース、1-ケストース、ネオケストースおよびニストースが含まれていることを見出し、ブラストースについては糖分解酵素の阻害活性を有することや動物実験においてスクロースに少量添加することで強い糖吸収阻害効果を有すること明らかにした。本知見が、糖尿病患者を始めとする糖質制限を行っている人々の食の質を向上に繋がることを期待する。

論文審査結果の要旨

学位申請者により提出された論文「メープルシロップ由来オリゴ糖の分析に関する研究」は、キャピラリー電気泳動 (CE) と荷電化粒子検出器 (CAD) を用い、メープルシロップに含まれる糖の高性能分析法を模索するとともに、新たに見つかったオリゴ糖の一種に着目し、その機能性について論述したものである。

第 1 章では、CE を用いてメープルシロップ中に含まれる糖の分析を行っている。CE においては、現状、紫外可視吸光検出を行うことが現実的であるため、アルドースの還元末端に 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP) を結合させる誘導体化を採用することで高感度化を図っている。また、スクロースを主成分とするメープルシロップでは還元末端にフルクトースが結合することにより誘導体化が困難な糖鎖も存在することが予想されるため、誘導体化前にインベルターゼを用いてフルクトースを脱離させることにより生じたアルドースの還元末端を PMP により修飾してフルクトシルオリゴ糖と予想される糖類の分析を実施した。その結果、インベルターゼに親和性を有すると考えられるオリゴ糖を見出した。また、CAD を用いた HPLC によりオリゴ糖を分離精製し、精製物の酸加水分解物を HPLC-CAD により分析することで、フルクトースとグルコースからなる二糖であることを明らかにしている。加えて、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルにより、本オリゴ糖が天然の食品中では非常に珍しいブラストースであると同定している。

第 2 章では、HPLC-CAD によりメープルシロップに含まれるオリゴ糖の最適な分析法を模索し、ブシコース、1-ケストースおよびニストースがメープルシロップ中に存在することを確認している。また、市販の糖標品では同定できないオリゴ糖の存在を確認したことから、HPLC-CAD により分離精製し、LC-MS/MS ならびに NMR により構造解析を行っている。これにより、本オリゴ糖がネオケストースであると同定している。

第 3 章では、第 1 章にて同定したブラストースがインベルターゼに親和性を有する可能性が考えられたことから、糖分解酵素の阻害活性について検討を行い、インベルターゼ、マルターゼおよびイソマルターゼに対して阻害活性を有することを明らかにしている。また、II 型糖尿病モデルラットを用いた動物実験により、ブラストースがショ糖投与による血糖値上昇を抑制する効果を有することを明らかにしている。

本論文では、大量の同種共存物中から希少な糖類を分析する方法を CE と CAD を用いた 2 つのアプローチから可能とし、未同定成分については HPLC-CAD により当該成分を分離精製し、LC-MS/MS ならびに NMR により構造解析を行う方法が有効であることを示している。分析対象としたメープルシロップは世界中で多くの人々に長期にわたり食されていることから安全性が高いと考えられる。本研究ではこれらメープルシロップの糖プロファイルを更新し、機能性オリゴ糖の存在を明らかにしたことから、本研究成果の意義は大きいと考えられる。以上のことから、本論文は薬学研究科博士課程における博士論文として相応しいものと認める。

(課程・論文)

博士学位論文最終試験結果の報告書

2024年2月9日

審査委員	主査	長井 紀章
	副主査	川崎 直人
	副主査	多賀 淳
学位申請者氏名	佐藤 完太	
論文題目	メープルシロップ由来オリゴ糖の分析に関する研究	

申請者の博士学位論文に関する最終試験は論文発表の形で、令和5年2月9日に行われた。同日の公聴会における質疑に対する申請者の応答は十分でない部分もあったが、最終試験において補足し、同試験では論文内容及びその周辺知識についても適切な応答ができた。

以上のことから、申請者は最終試験に合格したものと判定する。