

薬学総合研究所・食品薬学研究室

1. 研究課題名

「機能性食品素材から生活習慣病予防および改善作用を有する医薬シーズの探索研究」

2. 研究メンバー

森川 敏生 近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・准教授
二宮 清文 近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・助教
吉川 雅之 近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室・客員教授
三宅 荘八郎 ハイテクリサーチセンター・研究支援者
Saowanee Chaipech ハイテクリサーチセンター・RA

3. 研究成果

世界各地で食用に供され、有用な生物活性を有する食品、ハーブ、さらには天然薬物について、その機能を発現する化合物を探索・特定することによりその機能を科学的に評価するとともに、見い出された化合物を医薬シーズとして、がんや生活習慣病をはじめとする難治性疾患の治療のための創薬研究を実施することを目的とし、探索研究を実施している。当研究室では、上述したような機能性食品素材から生活習慣病予防および改善作用についての生物活性評価試験を指標に活性寄与成分を探索し、その化学構造の解析およびその機能解明をおこなっている。

3-1. 血糖上昇抑制作用シーズの探索

3-1-1. タイ天然薬物 *Salacia chinensis*

肥満症，糖尿病，脂質異常症および高血圧などの生活習慣病の併発は，メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）として体系づけられており，その予防や改善には内臓脂肪の量的および質的異常を制御することが重要であると考えられる。我々の研究室では生活習慣病などの改善・治療に寄与する成分の探索研究を実施しており，その一環として種々の天然素材について糖質加水分解酵素である α -グルコシダーゼ阻害活性を作用点とした抗糖尿病シーズの探索研究を実施しており，これまでにデチンムル科 (*Hippocrateaceae*) サラシア (*Salacia*) 属植物に強力な α -グルコシダーゼ阻害活性成分 salacinol (1) および kotalanol (2) などのスルホニウム化合物を見い出している。今回，タイに広く分布する *Salacia chinensis* の幹部に含有されるスルホニウム化合物の詳細な探索を実施した。その結果，*S. chinensis* 幹部の熱水抽出エキス (SCE) から強力な α -グルコシダーゼ阻害活性を有する6種のスルホニ

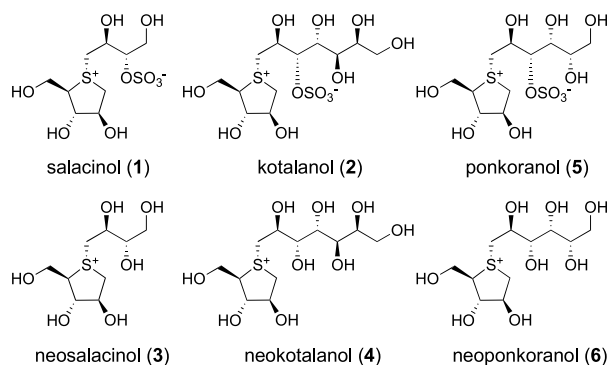


Fig. 1

ウム化合物 (1–6) を単離した (Figure 1).¹⁴⁾ これらスルホニウム化合物 (1–6) の α -グルコシダーゼ阻害活性は、市販経口糖尿病薬である acarbose と同程度の活性を有することが認められている (Table 1). また、これらスルホニウム化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性の阻害様式は、いずれも競合阻害であることが Lineweaver-Burk プロットから明らかとなった (Figure 2 and Table 2).

Table 1. IC_{50} Values of 1–6 for rat small intestinal disaccharidase

Test Samples	Enzyme (Substrate: 37 mM)	
	Maltase IC_{50} (μ g/mL)	Sucrase IC_{50} (μ g/mL)
Salacinol (1)	2.0	0.42
Kotalanol (2)	0.86	0.18
Neosalacinol (3)	5.7	0.65
Neokotalanol (4)	0.54	0.53
Ponkoranol (5)	2.2	0.16
Neoponkoranol (6)	1.6	0.32
Acarbose	1.1	1.0
Voglibose	0.34	0.06

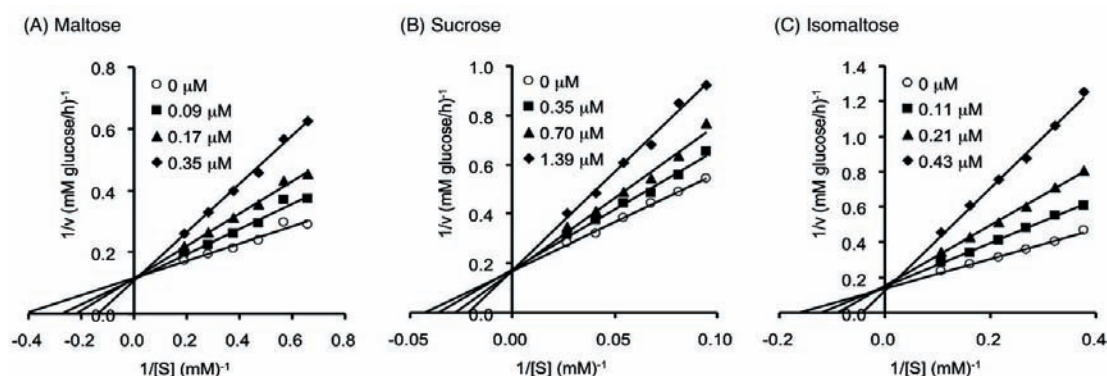


Fig. 2 Lineweaver-Burk plots of the inhibition of rat intestinal (A) maltase, (B) sucrase, and (C) isomaltase activities by neokotalanol (4)

Table 2. K_i Values of 1–4 for rat small intestinal disaccharidase

Substrate K_m (mM)	Maltose 2.6	Sucrose 21.4	Isomaltose 5.2
Salacinol (1)	0.61	0.53	0.54
Kotalanol (2)	0.18	0.19	0.67
Neosalacinol (3)	1.4	1.1	0.32
Neokotalanol (4)	0.19	0.89	0.16
Acarbose	0.17	0.65	104

また、SCE の抗糖尿病作用について、SD 系雄性ラットを用いた α 化デンプン (1 g/kg) 負荷モデルにおける血糖上昇抑制作用を検討した。SCE を 10–300 mg/kg, *p.o.* の用量において α 化デンプンと同時投与した後の血糖値について経時的に測定したところ、投与 30 分後において 30–300 mg/kg の投与群において用量依存的な血糖上昇抑制作用が認められた (Figure 3). また、同様の糖負荷試験について、グルコース (1 g/kg) を投与した際についても検討したところ、SCE 300 mg/kg の投与群においても血糖上昇の抑制作用が認められなかったことから、サラシアの抗糖尿病作用の作用機序として、専ら α -グルコシダーゼ阻害活性によるものであり、その生物活性評価法としては α -グルコシダーゼ阻害活性が妥当であることが示された。また

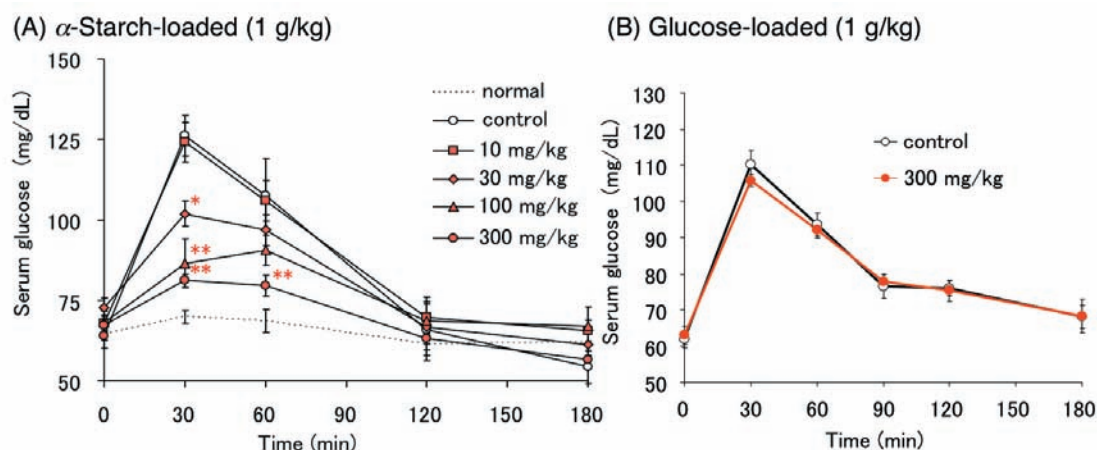
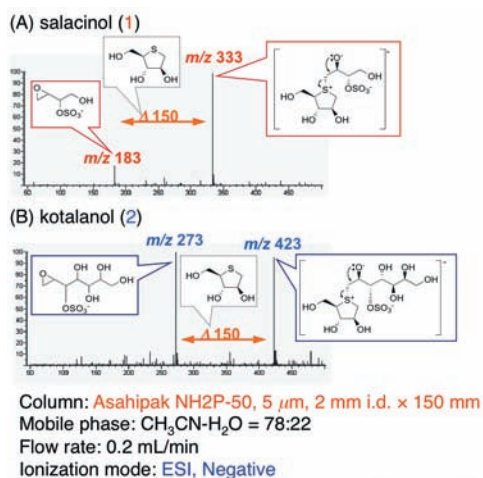


Fig. 3 Inhibitory effects of SCE on serum glucose levels in α -starch- and glucose-loaded mice

Figure 2 の結果から、サラシアに含有される活性寄与成分であるスルホニウム化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性の阻害様式はいずれも競合阻害であることから、サラシア属植物抽出エキスの α -グルコシダーゼ阻害活性強度と、スルホニウム化合物の含有量とに相関性があることが予測された。そこで、サラシア属植物抽出エキスを含有するスルホニウム化合物の LCMS を用いた定量分析法を検討した。

含有スルホニウム化合物のうち、側鎖部の 3' 位に硫酸エステル構造を有する salacinal (**1**) および kotalanol (**2**) について、ESI-MS の Negative-mode において Figure 4 に示すスペクトルが観察された。すなわち、それぞれの擬似分子イオンピーク ($M - H$)⁻ として m/z 333 および m/z 423 が良好に検出されるとともに、両化合物に共通の 1-deoxy-4-thio-D-arabinofuranose 構造に相当する Δ 150 が脱離した側鎖部分のフラグメントイオンピーク (m/z 183 および 273) が観測された。また、使用カラムについては、一般に糖質の分析に用いられるアミノ系カラムを用いた。*S. reticulata* 根部の熱水抽出エキスをを用い、各種サラシア属植物に多く含有されている糖アルコール成分である dulcitol [m/z 181 ($M - H$)⁻] とあわせて各成分の分離を確認したところ、化合物 **1** および **2** との分離も良好であった (Figure 5).¹⁾



Column: Asahipak NH2P-50, 5 μ m, 2 mm i.d. \times 150 mm
Mobile phase: CH₃CN-H₂O = 78:22
Flow rate: 0.2 mL/min
Ionization mode: ESI, Negative

Fig. 4 Mass spectra of (A) salacinal (**1**) and (B) kotalanol (**2**)

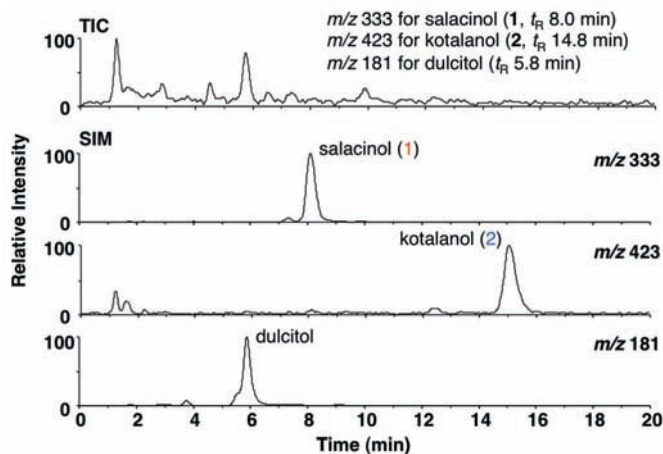
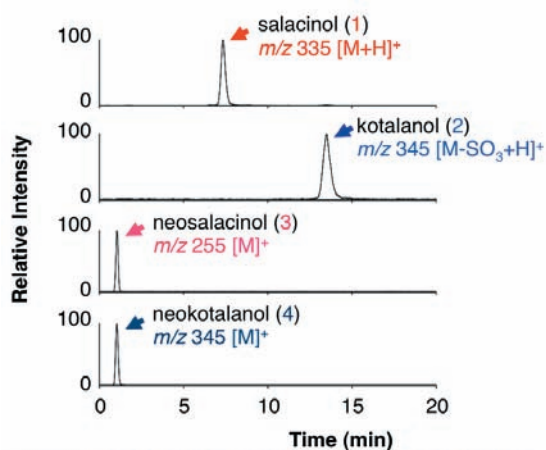


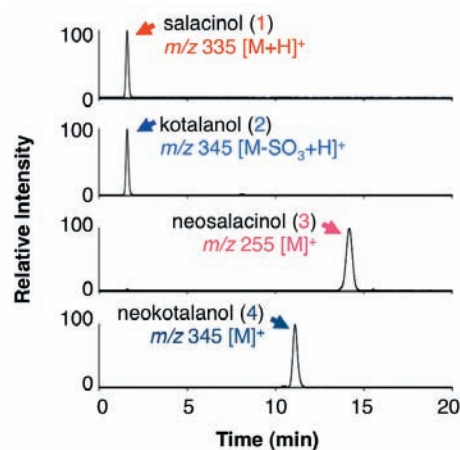
Fig. 5 Typical TIC and SIM chromatograms (negative-ESI-MS) of a water extract from roots of *S. reticulata*

次に、**1** および **2** の脱硫酸エステル体である neosalacinol (**3**) および neokotalanol (**4**) の定量分析について、**1** および **2** の同条件にて分析したところ、全く保持されなかった (Figure 6). そこで、種々条件検討したところ、逆相系カラムを用い、移動相としてイオンペア試薬として undecafluorohexanoic acid を添加したイオンペアクロマトグラフィーMS 分析により良好な保持と分離が観察された (Figure 7).³⁾ 両分析条件における直線性、検出限界および精度について、Table 3 に示す (Table 3).



Column: Asahipak NH2P-50, 5 μ m, 2 mm i.d. \times 150 mm
Mobile phase: CH₃CN-H₂O = 78:22
Flow rate: 0.2 mL/min
Ionization mode: ESI, Positive

Fig. 6 SIM chromatograms of **1**–**4**



Column: Inertsil ODS-3, 5 μ m, 2 mm i.d. \times 150 mm
Mobile phase: 5 mM UFHA-MeOH = 99:1
Flow rate: 0.2 mL/min
Ionization mode: ESI, Positive
UFHA : undecafluorohexanoic acid

Fig. 7 SIM chromatograms of **1**–**4**

Table 3. Linearities, detection and quantitation limits, and precisions of **1**–**4**

Analyte	Regression	Correlation coefficient (R^2)	Detection limit (ng) ^{b)}	Quantitation limit (ng) ^{b)}	Precision (RSD %) ^{c)}	
	Equation ^{a)}				Intra-day	Inter-day
1	$y = 525115x + 34981$	0.9979	0.015	0.050	4.6	6.7
2	$y = 164713x - 10070$	0.9992	0.030	0.10	6.8	8.5
3	$y = 882204x + 111453$	0.9986	0.025	0.075	5.2	3.1
4	$y = 662587x + 91332$	0.9988	0.025	0.075	3.3	1.8

^{a)}In the regression equation, x is concentration of the analyte solution (μ g/mL), and y is peak area of the analyte.

^{b)}Values are amount of the analyte injected on-column.

^{c)}Precision of the analytical method was tested by using a water extract from the stems of *S. chinensis* (SCS-1, $n = 5$).

以上により確立されたの定量分析法を用い、各種サラシア属植物 [*S. chinensis*, 幹部 (SCS-1–13), 根部 (SCR-1), 葉部 (SCL-1) および果実部 (SCF-1), *S. reticulata*, 根部 (SRR-1) および *S. oblonga*, 根部 (SOR-1)] のスルホニウム化合物 (**1**–**4**) 含量を測定した. その結果, 3 種の基原の異なるサラシア属植物の根部について比較すると, *S. reticulata*, *S. oblonga* および *S. chinensis* は, いずれにおいても **1** の含量が最も高く **2**–**4** の含量が低いことが明らかとなりました. また, *S. chinensis* については幹部, 葉部および果実部についても検討したところ, 葉部および果実部にはスルホニウム化合物はほとんど含有しておらず, マルターゼおよびスク

ラーゼ阻害活性についても認められなかったが、一方、幹部については **1** および **4** の含量が高く、**1** よりも **4** の方が多く含まれている検体の方が多く認められた (Table 4).³⁾

Table 4. Contents of **1**—**4** in extracts from stems of *Salacia chinensis* and other parts of *Salacia* species, and their α -glucosidase inhibitory activities

Stems of <i>S. chinensis</i>	Source	Extraction Yield (%)	Content (% from extract)				IC ₅₀ (μ g/ml)	
			1	2	3	4	Maltase	Sucrase
SCS-1	Nakhon Si Thammarat	10.0	0.238	0.069	0.022	0.257	81.1	36.5
SCS-2	Nakhon Si Thammarat	7.8	0.117	0.018	0.065	0.218	97.9	60.6
SCS-3	Nakhon Si Thammarat	9.0	0.022	0.108	— ^a	0.727	31.6	26.7
SCS-4	Nakhon Si Thammarat	9.4	0.239	0.088	0.024	0.273	79.1	42.2
SCS-5	Nakhon Si Thammarat	9.9	0.194	0.072	0.024	0.244	82.4	46.0
SCS-6	Nakhon Si Thammarat	9.3	0.261	0.062	0.036	0.233	58.8	38.3
SCS-7	Nakhon Si Thammarat	13.0	0.174	0.043	0.020	0.185	78.5	51.7
SCS-8	Surat Thani	9.8	0.190	0.075	0.027	0.272	79.5	46.3
SCS-9	Surat Thani	10.1	0.050	0.085	— ^a	0.370	52.4	31.7
SCS-10	Surat Thani	9.7	0.253	0.069	0.028	0.202	66.5	39.4
SCS-11	Songkla	9.5	0.238	0.059	0.028	0.189	76.8	42.6
SCS-12	Krabi	9.7	0.222	0.078	0.025	0.261	76.9	44.8
SCS-13	Trang	4.4	0.018	0.057	— ^a	0.652	36.4	34.1
mean		9.3	0.170	0.068	0.030	0.314	69.1	41.6
SD		1.9	0.089	0.022	0.013	0.174	19.2	8.8

	Species	Part	Extraction Yield (%)	Content (% from extract)				IC ₅₀ (μ g/ml)	
				1	2	3	4	Maltase	Sucrase
SCR-1	<i>S. chinensis</i>	Root	17.3	0.205	0.037	0.006	0.020	154.8	55.9
SCL-1	<i>S. chinensis</i>	Leaf	13.5	0.032	0.034	— ^a	0.003	> 500	> 200
SCF-1	<i>S. chinensis</i>	Fruit	57.0	0.015	0.013	— ^a	— ^a	> 500	> 200
SRR-1	<i>S. reticulata</i>	Root	11.1	0.562	0.086	0.020	0.074	89.4	36.6
SOR-1	<i>S. oblonga</i>	Root	19.7	0.172	0.064	0.012	0.052	162.1	59.8

^aBelow quantitation limit.

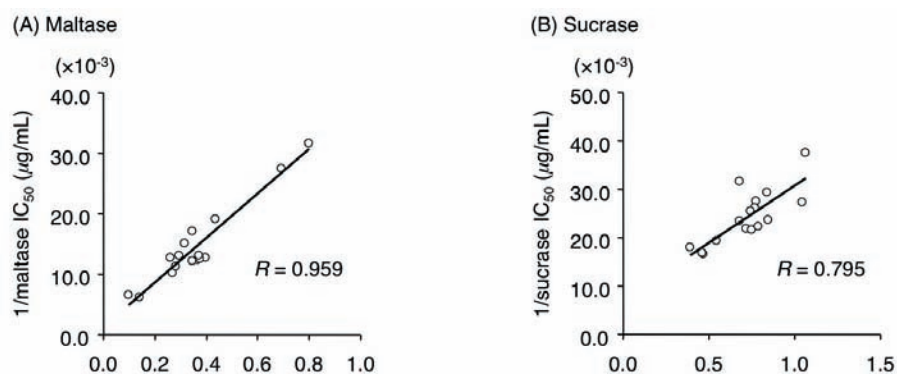


Fig. 8 Correlations between α -glucosidase inhibitory activities and total content of four sulfoniums

Total contents (%) of the four sulfoniums are presented in values reduced to the content of **4**, calculated based on the ration of IC₅₀ values (μ g/mL) of **1**—**4** against (A) maltase or (B) sucrase

以上の各種サラシア属植物由来抽出エキスのスルホニウム化合物 (1-4) 含量とマルターゼおよびスクラーゼ阻害活性強度 ($1/IC_{50}$) との相関性を Figure 8 にプロットした。その結果、いずれのグラフにおいても良好な相関 (マルターゼ $R = 0.959$, スクラーゼ $R = 0.795$) が得られたことから、本定量分析法がサラシア属植物の原料素材や抽出エキスの抗糖尿病作用における品質評価手法として有用であることが示された。

引用文献

- 1) Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Yoshikawa M.: Quantitative determination of potent α -glucosidase inhibitors, salacinol and kotalanol, in *Salacia* species using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 770-773 (2010).
- 2) Muraoka O., Xie W., Osaki S., Kagawa A., Tanabe G., Amer M. F. A., Minematsu T., Morikawa T., Yoshikawa M.: Characteristic alkaline catalyzed degradation of kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor isolated from Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata*, leading to anhydroheptitols: another structural proof. *Tetrahedron*, **66**, 3717-3722 (2010)
- 3) Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M.: Quantitative analysis of neosalacinol and neokotalanol, another two potent α -glucosidase inhibitors from *Salacia* species, by LC-MS with ion pair chromatography. *J. Nat. Med.*, **65**, 142-148 (2011).
- 4) Xie W., Tanabe G., Akaki J., Morikawa T., Ninomiya K., Minematsu T., Yoshikawa M., Wu X., Muraoka O.: Isolation, structure identification and SAR studies on thiosugar sulfonium salts, neosalaprinol and neoponkoranol, as potent α -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2015-2022 (2011).