

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第524号	氏名	佐藤 大介
審査委員会委員		主査氏名	柴田 洋寿 
		副査氏名	石崎 友理 
		副査氏名	谷川 雅人 
論文題目			
Synthesis and evaluation of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol (レスベラトロール、プテロステルベン、ピセアタンノールの配糖体の合成と生理活性評価)			
論文掲載雑誌名			
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry			
論文要旨			
<p>【緒言】スチルベン化合物であるレスベラトロール、プテロステルベン、ピセアタンノールは、抗癌作用やアンチエイジング効果、抗酸化作用などの様々な生理機能を有する。スチルベン化合物の生体有用性を向上させるために、スチルベン類の配糖体を植物細胞を用いて合成し、それぞれの抗酸化活性、抗ヒスタミン活性、及びホスホジエステラーゼ (PDE) 活性試験を行い、生理機能の評価を行った。</p>			
<p>【方法】(1) 単糖体 (<math>\beta</math>-グルコシド) および二糖体 (<math>\beta</math>-マルトシド) の合成: 単糖体は、植物培養細胞 (<i>Phytolacca americana</i>) を液体培地で2日間培養し、細胞部からメタノール抽出後に水と酢酸エチルを用いて分配抽出を行った。二糖体は、レスベラトール 3-<math>\beta</math>-グルコシド、およびレスベラトール 4-<math>\beta</math>-グルコシドをそれぞれシクロデキストリンとシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ反応させた後にブタノールを用いて分配抽出した。構造決定は質量分析、核磁気共鳴スペクトルにより行った。</p>			
<p>(2) 各種生理活性の評価: 抗酸化活性として、2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性試験、腹膜肥満細胞を用いた抗ヒスタミン活性試験で、PDE活性試験を既報の通りに行った。</p>			
<p>【結果】レスベラトール 3-<math>\beta</math>-グルコシド、レスベラトール 4'-<math>\beta</math>-グルコシド、レスベラトール 3-<math>\beta</math>-マルトシド、レスベラトール 4'-<math>\beta</math>-マルトシド、プテロステルベン 4'-<math>\beta</math>-グルコシド、ピセアタンノール 4'-<math>\beta</math>-グルコシドが得られた。合成した配糖体のDPPHラジカル消去活性試験を行った結果、レスベラトール 3-<math>\beta</math>-グルコシド、レスベラトール 3-<math>\beta</math>-マルトシドに活性がみられ、抗ヒスタミン活性試験ではピセアタンノール 4'-<math>\beta</math>-グルコシドが最もヒスタミンの放出を抑えた。PDE活性試験ではプテロステルベン 4'-<math>\beta</math>-グルコシドがPDE活性を強く抑制した。</p>			
<p>【考察】4'-<math>\beta</math>-グルコシド、レスベラトール 3-<math>\beta</math>-グルコシド、レスベラトール 3-<math>\beta</math>-マルトシド、レスベラトール 4'-<math>\beta</math>-マルトシドの合成に成功した。レスベラトールの3位配糖体 (3-<math>\beta</math>-グルコシドと3-<math>\beta</math>-マルトシド) にはDPPHラジカル消去作用があり、ピセアタンノール 4'-<math>\beta</math>-グルコシドは抗ヒスタミン作用を示した。また、プテロステルベン 4'-<math>\beta</math>-グルコシドはPDE阻害作用を示した。</p>			
<p>本研究では、レスベラトールなどのスチルベン類の配糖体の合成に成功し、それらの一部に抗酸化活性、抗ヒスタミン作用、PDE阻害作用を認めることを明らかにし、スチルベン類の薬剤としての臨床応用に有用である可能性が示唆されたが、スチルベン類配糖体がなぜ様々な生理活性を示すのか、また個体における血中濃度や生理作用につき、モデル動物などを用いて検証する必要性などの質問がなされ、今後の検討課題であることが指摘された。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ⑩・論	第524号	氏名	佐藤 大介
審査委員会委員	主査氏名	柴田 洋孝	⑩
	副査氏名	石所 敏理	⑩
	副査氏名	谷川 雅人	⑩
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 合成に用いたプロトタイプ化合物ならびに新規合成化合物の化学的性質（水溶性など）</li> <li>2. プテロスチルベンはレスベラトロールがメチル化された化合物で、脂溶性が増すことにより血中濃度の上昇が観察されている。糖鎖付加により水溶性が増すようだが、今回の糖鎖付加薬物は血中濃度上昇が期待されるのか？</li> <li>3. ピセアタンオールはレスベラトロールの代謝産物であり、体内ではグルクロン酸抱合をうけ、代謝されることが知られているが、今回合成した化合物はそのような代謝に対する影響は検討したのか？</li> <li>4. 細胞を用いて化合物の評価を行っているが、それぞれの化合物の細胞内濃度は検討したのか？また、これら化合物が細胞内に取り込まれる際、特異的なトランスポーターは存在するのか？</li> <li>5. 植物細胞をバイオリクターとして用い、著者らは新規化合物を合成したが、その際、植物細胞には何らかの影響は観察されたか？</li> <li>6. 合成に用いたプロトタイプ化合物はいずれもよく知られたものである。これら化合物を用い、他の修飾に関する検討はこれまで報告されているのか？また、その修飾により、化合物の活性（抗酸化作用、抗アレルギー作用など）にどのような影響が出たのか？</li> <li>7. レスベラトロール、プテロスチルベン、ピセアタンノールの配糖体合成の際の合成効率および合成後の細胞外への放出の有無の確認</li> <li>8. 細胞培養を暗所で行う理由</li> <li>9. 糖の付加される位置について</li> <li>10. レスベラトロール、プテロスチルベン、ピセアタンノールおよびこれらの配糖体の抗酸化の機序</li> <li>11. 糖の付加による親水性の定量評価について</li> <li>12. 糖の付加による親水化による抗ヒスタミン活性およびホスホジエステラーゼ活性の増加との関係</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 佐藤 大介

## 論 文 題 目

Synthesis and evaluation of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol(レスベラトロール、プテロスチルベン、ピセアタンノールの配糖体の合成と生理活性評価)

## 要 旨

【緒言】 スチルベン化合物であるレスベラトロール、プテロスチルベン、ピセアタンノールは、抗癌作用やアンチエイジング効果、抗酸化作用などの様々な生理機能を有することが報告されている。配糖化は物質の水溶性や安定性、有用性を向上させる化学反応である。本研究では植物培養細胞を生体触媒として用いたスチルベン類の配糖体を合成し、それぞれの抗酸化活性、抗ヒスタミン活性、及びホスホジエステラーゼ (PDE)活性試験を行い、生理機能の評価を行った。

【方法】 単糖体 ( $\beta$ -グルコシド) の合成は次のように行った。植物培養細胞(*Phytolacca americana*) 25 gを液体培地で2日間培養した後に基質を 15 mg 投与し、2日間培養した。培養後に細胞部と培地部に濾別し、細胞部をホモジナイズした後にメタノールを用いて静置抽出した。抽出後に水と酢酸エチルを用いて分配抽出を行い、酢酸エチル層を脱水処理し減圧濃縮した後にメタノールを用いてサンプリングした。二糖体 ( $\beta$ -マルトシド) は次のように合成した。リン酸緩衝液(50 mM、pH 5.6)にレスベラトロール 3- $\beta$ -グルコシド、レスベラトロール 4'- $\beta$ -グルコシドをそれぞれ 0.1 mmol ずつ、 $\alpha$ -シクロデキストリンを 0.5 mmol、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(CGTase)を、

300 units 加えた。40°C、24 時間反応させた後に水とブタノールを用いて分配抽出し減圧濃縮後にメタノールを用いてサンプリングした。構造決定は質量分析、核磁気共鳴スペクトルにより行った。

2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去活性試験では、サンプルの希釈系列を作成し、サンプル溶液に DPPH(終濃度 0.075 mM)を加えて反応させた後に 517nm における吸光度を測定し、その値をもとに IC<sub>50</sub> を算出した。抗ヒスタミン活性試験では腹膜肥満細胞(10<sup>4</sup>細胞数/mL)にサンプル(1 μM)を加えてインキュベートしたのち、compound48/80 (0.35 μg/mL)を添加してヒスタミンの放出量を求め、その値をもとにヒスタミン放出抑制率を算出した。PDE 活性試験ではサンプルの希釈系列を作成し、反応溶液にサンプルを加えた後、PDE を 100 mU 加え、37°C、60 分間反応させた。BIOMOL Green を加えて 30 分間室温に置いた後に 620 nm の吸光度を測定し PDE 抑制率を求めた。

【結果】植物培養細胞(*P. americana*)と CGTase を用いた合成により、レスベラトロール 3-β-グルコシド、レスベラトロール 4'-β-グルコシド、レスベラトロール 3-β-マルトシド、レスベラトロール 4'-β-マルトシド、プテロスチルベン 4'-β-グルコシド、ピセアタンノール 4'-β-グルコシドが得られた。合成した配糖体の DPPH ラジカル消去活性試験を行った結果、レスベラトロール 3-β-グルコシド、レスベラトロール 3-β-マルトシドに活性がみられ、抗ヒスタミン活性試験ではピセアタンノール 4'-β-グルコシドが最もヒスタミンの放出を抑えた。PDE 活性試験ではプテロスチルベン 4'-β-グルコシドが PDE 活性を強く抑制した。

【考察】植物培養細胞(*P. americana*)によりレスベラトロール、プテロスチルベン、ピセアタンノールは配糖化され、それぞれの 4'-β-グルコシドが得られた。その際に、レスベラトロールについてのみ 3-β-グルコシドも得られた。さらに CGTase を用いた配糖化により、新規物質であるレスベラトロール 3-β-マルトシド、レスベラトロール 4'-β-マルトシドが得られた。レスベラトロールの 3 位配糖体(3-β-グルコシドと 3-β-マルトシド)には DPPH ラジカル消去作用があり、ピセアタンノール 4'-β-グルコシドは抗ヒスタミン作用を示した。また、プテロスチルベン 4'-β-グルコシドは PDE 活性に対する高い抑制作用を示した。スチルベン配糖体が抗ヒスタミン作用、PDE 阻害作用を持つことを明らかにしたのは本研究が初めてである。