

ガロタンニンによるアルドース還元酵素の阻害について

澤田英夫^{a)}, 浜武通子^{a)}, 原 明^{a)}, 中山俊裕^{a)}, 出屋敷喜宏^{a)}

岐薬紀要 (1992) 41 : 30-36

要約 : ヒト胎盤およびブタ水晶体と筋肉から精製したアルドース還元酵素に及ぼす加水分解型および縮合型タンニンの阻害を比較した。ガロタンニンは他のタンニンより強くこれらの酵素を阻害し、このうち1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) が最も低い IC₅₀ 値 (60-70 nM) を示した。PGG はアルコール脱水素酵素, アルデヒド還元酵素, カルボニル還元酵素に対して低度の阻害しか示さなかった。PGG によるアルドース還元酵素の阻害様式はカルボニル基質に対して混合型であったが, 活性化剤である硫酸イオン存在下では不拮抗型となった。

索引用語 : タンニン, ガロタンニン, アルドース還元酵素, 阻害機構, 硫酸イオン

Inhibition of Aldose Reductase by Gallotannin

HIDEO SAWADA^{a)}, MICHIKO HAMATAKE^{a)}, AKIRA HARA^{a)},

TOSHIHIRO NAKAYAMA^{a)} and YOSHIHIRO DEYASHIKI^{a)}

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1992) 41 : 30-36

Abstract : The inhibitory effects of various hydrolyzable and condensed tannins for aldose reductases of human placenta, pig lens and pig muscle were examined and compared. Gallotannins inhibited these enzymes much more than other tannins, with 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) showing the lowest IC₅₀ values (60-70 nM). PGG had low inhibitory effect on aldehyde reductase, carbonyl reductase and alcohol dehydrogenase. The inhibition of aldose reductase by PGG was of the mixed type with respect to the carbonyl substrate, but the inhibition was found to be uncompetitive when assaying enzyme activity in the presence of sulfate ions, an activator of the enzyme.

Keyphrases : tannin, gallotannin, aldose reductase, inhibition mechanism, sulfate ion

Aldose reductase (AR, EC 1.1.1.21) は NADPH を補酵素としてグルコースをソルビトールに還元する。高血糖状態においてはソルビトールへの過剰変換がおり、細胞内ソルビトールの蓄積が白内障や腎症などの糖尿病合併症の成因の一つと考えられている¹⁾。糖尿病合併症治療薬の開発を目的として多くの AR 阻害剤が研究されている²⁾。AR の性質は aldo-keto reductase ファミリーの他の酵素と類似している³⁾ので、安全な治療薬としての AR 阻害剤には

a) 岐阜薬科大学生化学教室, 岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1

a) Laboratory of Biochemistry,
Department of Manufacturing Pharmacy,
Gifu Pharmaceutical University,
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 29, 1992

The Annual Proceedings of Gifu
Pharmaceutical University,
ISSN 0434-0094, CODEN : GYDYA 9

標的酵素に対する高い特異性が必要とされる。

先に、タンニン酸がヒト胎盤 AR を強く阻害することを認め、その阻害成分として 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (TGG) と 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (PGG) を同定した⁴⁾。PGG は TGG より強くヒト胎盤 AR を阻害し、その阻害様式は基質に対して非拮抗阻害であった。しかし、最近、芍薬 (*Paeonia lactiflora* PALLAS) から AR 阻害成分として単離された TGG と PGG は、ラット水晶体抽出液中の AR 活性を同程度にかつ拮抗的に阻害することが報告された⁵⁾。両報告におけるガロタンニンの種類による阻害度および阻害様式の違いが、異なる標的酵素または活性測定法を用いたことによるのかを明らかにするため、本研究ではヒト胎盤とブタ組織から精製した AR に対する種々のタンニンの阻害活性と阻害様式を比較した。また、PGG の AR に対する特異性についても検討した。

実験の部

実験材料 Epigallocatechin はフナコシ薬品、ウマ肝 alcohol dehydrogenase は Boehringer Mannheim GmbH より購入した。Geraniin は岐阜薬科大学田中俊弘博士、procyanidin-B-2-3,3'-digallate と procyanidin-B-1 は九州大学西岡五夫博士より供与された標品を使用した。TGG と PGG はタンニン酸から単離した⁴⁾。

Trigalloylglucose の調製 タンニン酸水溶液 (125 mg/ml) を 100°C にて 30 分間加熱し、冷後、メタノールで平衡化した Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) カラム (2×80 cm) により分画した。溶出液の 280 nm の吸光度を測定し、TGG が溶出する直前の 280 nm のピーク画分を集め、減圧下に蒸発乾固した。残査をメタノールに溶解し、さらにメタノール中で Sephadex LH-20 の再クロマトグラフィーを繰り返して、高速液体クロマトグラフ分析⁴⁾において均一な標品 (6.2 mg) を得た。¹³C-NMR ((CD₃)₂CO, 270 MHz) δ : 63.9 (C-6), 71.2 (C-4), 73.9 (C-2), 75.6 (C-5), 76.1 (C-3), 93.6 (C-1)。

酵素活性の測定 AR 活性は 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0), 75 μ M NADPH, 10 mM DL-glyceraldehyde および酵素を加えた全量 2.0 ml の標準反応系で測定した。Aldehyde reductase 活性の測定は 10 mM D-glucuronate を基質として上記の反応系で行った。また、carbonyl reductase 活性は、基質に 1 mM 4-nitroacetophenone, 緩衝液として 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて測定した。Alcohol dehydrogenase の還元活性は Deetz ら⁶⁾の方法に準じ、28 mM *N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid-HCl 緩衝液 (pH 7.0), 0.4 mM pentan-1-al, 0.2 mM NADH および酵素を含む全量 2.0 ml の反応系で測定した。各酵素反応は酵素の添加によって開始した。各酵素活性はカルボニル基質の還元に伴う NAD(P)H の酸化速度を 340 nm で測定し、その 1 unit は 25°C で 1 分間に 1 μ mole の NAD(P)H を酸化する酵素量として表した。

阻害剤は 50% メタノール溶液に溶解し、その 50 μ l を上記の標準反応系に添加後、直ちに酵素 (6 munits) を加えて反応を開始した。阻害剤の代わりに 50 μ l の 50% メタノールを添加した対照反応系の酵素活性を 50% 阻害する阻害剤濃度 (IC₅₀) は Chou & Talalay⁷⁾の方法により算出した。なお、タンパク量は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として Lowry ら⁸⁾の方法に従って測定した。

酵素の精製 ヒト胎盤 AR (2.1 units/mg) は Sawada ら⁴⁾の方法に従って精製した。ヒト胎盤 aldehyde reductase は、この AR 精製の DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーの段階で AR から分離溶出した。すなわち、ヒト胎

盤抽出液の40-65%硫酸アンモニウム画分を5 mM 2-mercaptoethanol を含む5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に対して透析後, 同緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel カラムに添加した。吸着したタンパク質を0から0.12 Mまでの NaCl 濃度勾配で溶出した時, aldehyde reductase は AR より高い NaCl 濃度(0.07 M)に分離溶出した。Aldehyde reductase 活性画分を集め, AR の精製法と同様の条件で Matrex Red A, Sephadex G-100 および HA-Ultrogel の各カラムクロマトグラフィーを行い, ポリアクリルアミド電気泳動分析⁹⁾で単一な精製標品 (3.0 units/mg) を得た。ブタ水晶体 AR (1.2 units/mg) は Hara ら¹⁰⁾の方法, ブタ筋肉 AR (1.2 units/mg) は Cromlish & Flynn¹¹⁾の方法, ヒト肝 carbonyl reductase (10.0 units/mg) は Nakayama ら¹²⁾の方法, ブタ肺 carbonyl reductase (2.1 units/mg) は Oritani ら¹³⁾の方法でそれぞれ電気泳動的に単一に精製した。

実験結果

タンニン酸および関連化合物による AR 阻害 ヒト胎盤, ブタ水晶体およびブタ筋肉の AR に対する7種のタンニンおよびその基本骨格をなす catechin と gallic acid の阻害活性を比較した (Table 1)。これら3種の AR はいずれも縮合型タンニンより加水分解型タンニンによって強く阻害された。ガロタンニンでは, galloyl 基の増加にともなって阻害が強くなり, PGG が最も低い IC₅₀ 値を示した。Digalloyl 基を有する geraniin の阻害は弱く, または全く阻害

Table 1 Inhibition of Aldose Reductases from Human Placenta and Pig Tissues by Tannins and Their Related Compounds

Compound	IC ₅₀ (μ g/ml)			Tannin activity ^{a)}
	Human placenta	Pig lens	Pig muscle	
Pentagalloylglucose	0.06	0.07	0.06	1.21
Tetragalloylglucose	0.17	0.10	0.38	1.08
Trigalloylglucose	1.5	0.97	1.4	0.90
Procyanidin-B-2-digallate	5.6	1.5	2.3	0.98
Geraniin	33	nd ^{b)}	nd	1.0
Procyanidin-B-1	>50	>50	38	—
D-(+)-Catechin	>50	37	>50	0.01
Epigallocatechin gallate	>50	>50	>50	0.95
Gallic acid	ni ^{c)}	ni	ni	0.09

a) The values from Okuda et al¹⁴⁾.

b) not determined.

c) not inhibited by the compounds at concentrations up to 100 μ g/ml.

しなかった。縮合型タンニンでは，procyanidin-B-2-digallate は比較的強く AR を阻害したが，他のタンニンの阻害は低度であった。

タンニンのタンパク結合の指標であるタンニン活性¹⁴⁾と AR 阻害度を比較すると，ガロタンニンではタンニン活性の増加にともなって IC₅₀ 値が低下したが，他のタンニンでは両者間に相関が認められなかった。

PGG の阻害特異性 NADPH または NADH を補酵素としてアルデヒド類を還元する 7 種の酸化還元酵素に対する PGG の影響を調べた (Table 2)。PGG は 3 種の AR をいずれも同程度に強く阻害したが，他の酵素に対しては 1/10 以下の弱い阻害しか示さなかった。また，PGG の AR 阻害作用がその非特異的なタンパク結合によるものかどうかを明らかにするため酵素反応系に 0.05% BSA を添加して PGG の阻害度を測定した。PGG による阻害の特異性は BSA 非添加の場合と類似したが，いずれの酵素に対しても阻害が低下した。同様に TGG によるヒト胎盤 AR の阻害も BSA 添加によって低下し，その IC₅₀ 値は 1.6 μ g/ml となった。

PGG の阻害様式 Table 3 に PGG によるヒト胎盤およびブタ筋肉の AR の阻害様式と阻害定数を要約した。PGG によるヒト胎盤 AR の阻害は基質 pyridine-3-aldehyde に対して混合型，補酵素に対して非拮抗型であった。PGG によるブタ筋肉 AR の阻害も pyridine-3-aldehyde に対して混合型であった。PGG によるヒト胎盤 AR の阻害度は pH 7.0 以上では pH の上昇につれて徐々に低下したが，pH 7.0 と pH 7.5 における PGG の阻害様式は pH 6.0 における結果と同様に基質に対して混合型であった。また，反応系に硫酸アンモニウムを添加すると，ヒト胎盤 AR 活性は約 2 倍に活性化され，pyridine-3-aldehyde に対する K_m 値と V_{max} 値はそれぞれ 143 μ M と 8.75 units/mg となり，非添加の場合の 6 μ M, 3.33 units/mg より高値を示した。この活性化剤存在下における PGG の阻害様式は基質に対して拮抗型，補酵素に対して混合型となり，その K_i 値は硫酸アンモニウム非添加系で得られた値より高くなった。

Table 2 Inhibitory Effect of Pentagalloylglucose on Pyridine Nucleotide-dependent Oxidoreductases

Enzyme	IC ₅₀ (μ M)	
	-BSA	+BSA
Human placental aldose reductase	0.06	0.43
Pig muscle aldose reductase	0.06	0.80
Pig lens aldose reductase	0.07	0.88
Human placental aldehyde reductase	0.74	6.4
Human liver carbonyl reductase	2.5	ni ^{a)}
Horse liver alcohol dehydrogenase	2.5	9.4
Pig lung carbonyl reductase	2.8	ni

a) not inhibited at inhibitor concentration of 100 μ M.

Table 3 Patterns and Constants of Aldose Reductase Inhibition by Pentagalloylglucose

Enzyme from	(NH ₄) ₂ SO ₄	Varied substrate ^{a)}	Inhibition pattern	<i>K</i> _{ii} ^{b)} (nM)	<i>K</i> _{is} ^{b)} (nM)
Human placenta	—	Pyridine-3-aldehyde	Mixed	70	50
Human placenta	—	NADPH	Noncompetitive	30	30
Pig muscle	—	Pyridine-3-aldehyde	Mixed	50	70
Human placenta	+	Pyridine-3-aldehyde	Uncompetitive	180	—
Human placenta	+	NADPH	Mixed	250	70

a) The concentrations of pyridine-3-aldehyde and NADPH were varied from 2 to 50 μ M, and those of the respective fixed substrates were 75 μ M NADPH and 1 mM pyridine-3-aldehyde.

b) The *K*_{ii} (intercept effect) and *K*_{is} (slope effect) values were determined in the absence or presence of 0.1 M (NH₄)₂SO₄.

考 察

PGG と TGG はヒト胎盤⁴⁾とラット水晶体⁵⁾の AR を阻害すると報告されている。本研究では、さらにいくつかのタンニンによる AR 阻害活性を比較し, catechin を基本骨格とする縮合型タンニンよりグルコースを基本骨格とする加水分解型タンニンが強い阻害作用を示すことを明らかにした。このうち最も強く阻害する PGG は AR と基質特異性の類似する aldehyde reductase や carbonyl reductase³⁾ に対して弱い阻害しか示さなかったため、このガロタンニンは AR に特異性の高い阻害剤であることが判明した。また、タンニン活性と AR 阻害度に相関が認められなかったことはガロタンニンによる阻害がその非特異的タンパク結合によるものでないことを示唆する。ガロタンニンでは galloyl 基の置換数が多いほど強く AR を阻害した。しかし, gallic acid は AR を阻害せず, グルコースに digalloyl 基が結合した geraniin による阻害は低度であったため、グルコースの骨格とともに galloyl 基の置換による疎水性の上昇が AR の阻害に重要であると考えられる。

均一に精製したヒトおよびブタ組織の AR に対する PGG と TGG の IC₅₀ 値は Aida ら⁵⁾ によって報告されているラット水晶体 AR を用いて測定された値より 1 オーダー低い。Aida ら⁵⁾ はラット水晶体抽出液を酵素源として用い, その反応系には活性化剤として硫酸アンモニウムを添加している。阻害活性測定系に BSA のような酵素以外のタンパク質を添加することによって, ヒト胎盤とブタ組織 AR に対する PGG と TGG の IC₅₀ 値が 6~12 倍に増大した。これはガロタンニンと BSA の非特異的結合による遊離のガロタンニン濃度の減少に基づくと考えられる。ラット水晶体抽出液には AR 以外のタンパク質が多く含まれているので, 水晶体抽出液を酵素液として阻害活性を測定した場合には同様にガロタンニンによる阻害が低下すると推察される。また, 本研究で反応系への硫酸アンモニウムの添加は PGG の *K*_i 値の上昇を引き起こすことを明らかにした。Aida ら⁵⁾ の報告と本研究との PGG および TGG の IC₅₀ 値にかなりの差異がみられるのは, 標的酵素の精製度の違いならびに活性測定系の違いによるものと思われる。しかしながら, TGG と PGG により同程度に阻害されるラット水晶体 AR⁵⁾ に対して, ヒト胎盤とブタ組織の AR は BSA 存在下においても TGG より PGG によって強く阻害された。ヒトと動物組織の AR 間には合成 AR 阻害剤に対する感受性において大きな差異が認められている¹⁵⁾ ように, ラット水晶体の酵素とブタやヒト組織の酵素間ではガロタンニンに対する感受

性が異なるのかもしれない。

PGGによるヒト胎盤とブタ筋肉ARの阻害様式は、DL-glyceraldehydeを基質に用いた以前の報告⁴⁾と同様に、基質pyridine-3-aldehydeに対して混合型であった。また、PGGは補酵素に対して非拮抗的に阻害した。このことは、ARによるカルボニル化合物の還元反応がordered¹⁶⁾またはrandom¹⁷⁾機構のいずれの場合であっても、PGGは基質および補酵素結合部位と異なる部位に結合することを示している。しかし、ARの活性化剤である硫酸アンモニウム添加時には、PGGの阻害様式は基質に対して拮抗型に変わった。硫酸イオンによる活性化はヒトおよび動物組織のARに共通して認められ¹⁸⁾、硫酸イオンのような多価陰イオンがARの活性部位近傍のbasic centerに結合し、NADPHの結合を弱め、見かけの K_m 値と V_{max} 値を増大させると考えられている¹⁹⁾。実際に、硫酸イオンはヒト胎盤ARの基質に対する K_m と V_{max} 値を高くした。さらに、硫酸イオンはPGGによる阻害様式の変化と K_i 値の増大をもたらすことを認めた。したがって、硫酸イオンのARへの結合が基質と補酵素に対する反応性だけでなく、阻害剤との相互作用にも影響を与えるような酵素構造の変化を引き起こすと考えられる。

近年、ガロタンニンの生理活性として癌細胞の抑制作用²⁰⁾、抗ウイルス作用²¹⁾および*in vivo*における尿素窒素量低下作用²²⁾が報告されている。さらに、*in vitro*においてガロタンニンは脂質過酸化の抑制作用²³⁾を示す。糖尿病合併症の発症過程には脂質過酸化の亢進も重要であることが報告されている²⁴⁾ので、脂質過酸化抑制作用と合わせ、本研究で明らかにしたPGGの比較的特異的なARの阻害作用は、PGGまたはこれを含有する生薬の糖尿病合併症治療剤としての有用性を示唆し、今後*in vivo*におけるPGGの糖尿病合併症治療薬としての評価研究が期待される。

引用文献

- 1) J.H. Kinoshita, *Invest. Ophthalmol.*, **13**, 713 (1974) ; K.H. Gabbay, *N. Eng. J. Med.*, **299**, 831 (1973) ; P.F. Kador, J.H. Kinoshita, *Am. J. Med.*, **79**, 8 (1985).
- 2) P.F. Kador, W.G. Robison, J.H. Kinoshita, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 691 (1984) ; D. Dvornik, "Aldose reductase inhibition", McGraw-Hill New York, 1987 ; P. Raskin, J. Rosenstock, *Am. J. Med.*, **83**, 298 (1987).
- 3) T.G. Flynn, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2705 (1982) ; M.M. O'Brien, P.J. Schofield, M.R. Edwards, *J. Neurochem.*, **39**, 810 (1982) ; D.A. Carper, G. Wistow, C. Nishimura, C. Graham, K. Watanabe, Y. Fujii, H. Hayaishi, O. Hayashi, *Exp. Eye Res.*, **49**, 377 (1989).
- 4) H. Sawada, M. Hamatake, A. Hara, M. Nakagawa, T. Nakayama, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1662 (1989).
- 5) K. Aida, M. Towada, H. Shindo, T. Onaya, H. Sasaki, H. Nishimura, M. Chin, H. Mitsuhashi, *Planta Medica*, **55**, 22 (1989).
- 6) J.S. Deetz, C.A. Luehr, B.L. Vallee, *Biochemistry*, **23**, 6822 (1984).
- 7) T.C. Chou, P. Talalay, *Eur. J. Biochem.*, **115**, 207 (1981).
- 8) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 9) U.K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 10) A. Hara, T. Harada, M. Nakagawa, K. Matsuura, T. Nakayama, H. Sawada, *Biochem. J.*, **264**, 403 (1989).
- 11) J.A. Cromlish, T.G. Flynn, *J. Biol. Chem.*, **258**, 583 (1983).
- 12) T. Nakayama, A. Hara, K. Yashiro, H. Sawada, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 107 (1985).

- 13) H. Oritani, A. Hara, T. Nakayama, Y. Deyashiki, H. Sawada, K. Matsuura, M. Bunai, I. Ohya, *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 107 (1992).
- 14) T. Okuda, K. Mori, T. Hatano, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 424 (1985).
- 15) P.F. Kador, J.H. Kinoshita, W.H. Tung, L.T. Chylack, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **19**, 980 (1980).
- 16) B. Wermuth, H. Burgisser, K. Bohren, J.P. von Wartburg, *Eur. J. Biochem.*, **127**, 279(1982) ; G.H. Sheys, C.C. Doughty, *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 523 (1971).
- 17) A. Bhatnagar, B. Das, S.R. Gavva, P.F. Cook, S.K. Srivastava, *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 264(1988).
- 18) B. Wermuth, J.P. von Wartburg, *Methods Enzymol.*, **89**, 181(1982) ; T. Hastein, W. Velle, *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 1 (1960).
- 19) S. Hayman, J.H. Kinoshita, *J. Biol. Chem.*, **240**, 877(1965) ; C.C. Doughty, S.M. Conrad, *Biochim. Biophys. Acta*, **708**, 358 (1982).
- 20) H. Mukhtar, M. Das, W.A. Khan, Z.Y. Wang, D.P. Bik, D.R. Bickers, *Cancer Res.*, **48**, 2361 (1988).
- 21) M. Takechi, Y. Tanaka, M. Takehara, G. Nonaka, I. Nishioka, *Phytochemistry*, **24**, 2245 (1985).
- 22) S. Shibutani, T. Nagasawa, H. Okuda, G. Nonaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 874 (1981).
- 23) T. Okuda, Y. Kimura, T. Yoshida, T. Hatano, H. Okuda, S. Arichi, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1625(1983).
- 24) M.O. Creighton, J.R. Trevithick, *Exp. Eye. Res.*, **29**, 689 (1979).