

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	成 田 優 作
論文題目	Studies on the α -Amylase-inhibitory Effects of Chlorogenic Acids from Green Coffee Beans and Anti-oxidative Effects of Coffee Silverskin (コーヒー生豆由来クロロゲン酸の α - アミラーゼ阻害効果および コーヒーシルバースキンの抗酸化効果に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>世界におけるコーヒー生豆の生産量は年間およそ 700 万トンであり、コーヒーは最も飲用されている飲料の一つである。コーヒー生豆にはクロロゲン酸類 (CGAs) が豊富に含まれており、その含有量は 3.5–14.0% (w/w 乾燥重量) である。最も多く含まれている CGAs は 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) で、その含有量は総 CGAs 量の約 50% である。5-CQA およびその構成成分であるカフェ酸 (CA) とキナ酸 (QA) は糖尿病の予防・治療に有効と考えられる α - アミラーゼ阻害作用を有することが報告されているが、その詳細な阻害機構は明らかにされていない。また、コーヒー生豆を覆う薄皮のコーヒーシルバースキン (CS) は、コーヒー生豆の焙煎過程で生じる主要な副産物である。しかし、有効な利用方法が確立されていないため、産業廃棄物として処理されている。本研究は、コーヒー生豆に関するこのような背景に基づき、CGAs の α - アミラーゼ阻害機構の解析、CGAs を豊富に含むコーヒー生豆抽出物の食後血糖値応答に対する効果の <i>in vivo</i> 評価、抗酸化物質としての CS の有効利用を目的としたものであり、その主な内容は以下のとおりである。</p> <p>1. ブタ膵臓パンクレアチンから α - アミラーゼ (PPA) の 2 種のアイソザイム (PPA-I、PPA-II) を精製し、5-CQA、CA および QA のそれらに対する阻害機構を速度論的に解析した。PPA-I および PPA-II による <i>p</i>-nitrophenyl-α-D-maltoside (G_2-pNP) の加水分解に対する 5-CQA、CA および QA の IC_{50} は各々 0.07–0.08、0.37–0.40、25.3–26.5 mM であった。5-CQA と CA の両アイソザイムに対する阻害様式、阻害物質定数 K_i (酵素 E に対する阻害物質定数) および K_i' (酵素-基質複合体 ES に対する阻害物質定数) を解析した結果、いずれも $K_i > K_i'$ の混合型であることが示された。一方、QA の阻害様式は独特であり、単純なミカエリス - メンテン式での解析は困難であった。阻害物質定数の熱力学的解析より、5-CQA と CA の PPA-I および PPA-II に対する相互作用はいずれも発熱反応であり、エンタルピー駆動型であることが、また、これらの阻害物質は PPA-I と PPA-II の構造や機能の違いを明確には識別しないことが示された。</p> <p>2. コーヒー生豆エキスから 8 種類の CGAs [3-CQA、4-CQA、3-feruloylquinic acid (3-FQA)、4-FQA、5-FQA、3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA)、3,5-diCQA および 4,5-diCQA] を精製し、PPA-I による G_2-pNP の加水分解に対するこれらの精製物の阻害機構を速度論的に解析した。CQAs、FQAs および diCQAs の PPA-I に対する IC_{50} は各々 0.08–0.23、1.09–2.55、0.02–0.03 mM であり、阻害様式はいずれも混合</p>			

型であった。CQAs、FQAs および 3,5-diCQA の阻害物質定数はいずれも $K_i > K_i'$ であり、遊離の PPA-I よりも基質が結合した PPA-I に対して強く結合することが示された。一方、3,4-diCQA と 4,5-diCQA ではともに $K_i < K_i'$ であり、遊離の PPA-I に対してより強く結合することが示された。5-CQA、5-FQA、CA およびフェルラ酸 (FA) の PPA-I 阻害に対する IC_{50} 、 K_i および K_i' の比較から、CA と 5-CQA の CA 部位は PPA-I の同じサブサイトに結合し、5-CQA の QA 部位はこれらとは別のサブサイトに結合することが示唆された。また、FA および 5-FQA の FA 部位は CA と同じサブサイトに結合することが示唆された。さらに、5-FQA、3,5-diCQA および 4,5-diCQA による PPA-I 阻害はいずれも発熱反応であり、エンタルピー駆動型であることが示された。

3. CGAs を40% (w/w 乾燥重量) 含む脱カフェインコーヒー生豆抽出物 (EDGC B) を調製し、SD ラットとヒトの食後血糖値応答に対する EDGCB の効果を *in vivo* で評価した。SD ラットに 500 mg/kg body weight の EDGCB および 2 g/kg body weight のスクロース、マルトース、可溶性デンプンまたはグルコースをそれぞれ経口投与したところ、いずれも EDGCB 摂取群はコントロール群と比較して投与 30 分後の血糖値が有意に抑制された。41 人 (男性 22 名、女性 19 名) の健康な成人を対象とする臨床試験において、おにぎり (200 g) と EDGCB (300 mg) 摂取群はコントロール群と比較して食後 30 分の血糖値が有意に抑制され、特に、食後血糖応答の大きい被験者のほうが効果が大きかった。

4. 様々な温度で水抽出した CS 抽出物の抗酸化活性について評価した。CS 水抽出物の抗酸化活性は 25–270°C で抽出温度依存的に増加した。270°C で処理した CS 水抽出物が最も高い抗酸化活性を示し、CS 抽出物 1 g あたりの DPPH ラジカル消去能および親水性活性酸素吸収能 (H-ORAC) はそれぞれ 379 および 2629 $\mu\text{mol TE}$ (トロロックス当量) であった。25–270°C で水抽出した CS 水抽出物中のフェノール成分量とタンパク質量は、CS 水抽出物の DPPH および H-ORAC 値と高い相関性を示した。CS 1 g から 25–270°C で水抽出された全糖、還元糖、5-HMF、タンパク質およびフェノール量は、それぞれ 180、180、210、210、210°C で処理したとき最大値を示した。25–270°C で抽出されるカフェインの量は処理温度に依存せず一定であった。5-CQA は 210°C 以上で処理した CS 水抽出物には検出されなかった。亜臨界水処理は CS から抗酸化物質を産生するのに有効であることが示された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、コーヒー生豆の CGAs による PPA 阻害機構の解析、40% CGAs を含有する EDGCB のラットおよびヒトの食後血糖値応答に対する効果の評価、および CS 抽出物の抗酸化活性の評価を行ったものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 5-CQA の PPA-I および PPA-II に対する阻害機構を速度論的に調べた。この阻害には CA と QA の両方が相乗的に関与するが、CA の関与が大きいこと、5-CQA と CA の阻害様式は、酵素 (E) 単独よりも ES 複合体の方に強く結合するタイプの混合型であり、この阻害反応はエンタルピー駆動型の発熱反応であること、また、これらの阻害物質は PPA-I と PPA-II の構造や機能の違いを明確には識別しないことを明らかにした。

2. コーヒー生豆に含まれる 8 種類の CGAs の PPA-I に対する阻害機構を速度論的に調べた。CQAs、FQAs および 3,5-diCQA は遊離の PPA-I よりも基質が結合した PPA-I に対して強く結合するが、3,4-diCQA と 4,5-diCQA は遊離の PPA-I の方により強く結合すること、また、CA と 5-CQA の CA 部分、FA と 5-FQA の FA 部分はともに PPA の同じサブサイトに結合するが、5-CQA および 5-FQA の QA 部分はこれらとは別のサブサイトに結合する可能性が高いことを明らかにした。

3. CGAs を 40% 含む EDGCB のラットおよびヒトの食後血糖値応答への効果を *in vivo* で調べ、EDGCB はグルコース、スクロース、マルトースまたは可溶性デンプンを投与した SD ラットおよびおにぎり摂取後のヒトの食後血糖値上昇を抑制する効果を持つことを明らかにした。

4. CS 水抽出物の抗酸化活性を DPPH ラジカル消去能および H-ORAC を指標に用いて調べ、CS 水抽出物の抗酸化活性は抽出温度依存的に増加することをみだし、亜臨界水処理は CS から抗酸化物質を産生するのに効果的であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、コーヒー生豆の CGAs による PPA 阻害の分子機構を明らかにしたことに加え、EDGCB がラットおよびヒトの食後血糖値上昇を抑制すること、また CS 亜臨界水抽出物が高い抗酸化活性を持つことを明らかにしたものであり、酵素化学、食品工学、食品分子機能学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 25 年 1 月 17 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降