

平成24年度特別経費（プロジェクト分）
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

研究組織					
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。					
研究課題名	希少糖基礎研究の新展開				
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先		
	徳田雅明	希少糖研究センター長	TEL	本人	tokuda@med.kagawa-u.ac.jp
			e-mail	秘書等	
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等		
	徳田雅明	希少糖研究センター長	希少糖の理化学的性質に基づく機能性のスクリーニング		
	深田和宏	希少糖研究副センター長	希少糖及びその誘導体の理化学的性質の解析		
	森本兼司	希少糖研究セ・准教授	イズモリング希少糖の多種・中規模量での生産		
	吉原明秀	希少糖研究セ・助教	イズモリング希少糖の多種・中規模量での生産		
	早川 茂	農学部・教授	食品利用に関わる希少糖の理化学的性質と機能性についての研究		
	松原有輝	農学部・学部生	D-グロース生産の効率化についての検討		
	藤原希規	農学部・大学院生 (M2)	希少糖の理化学的性質の検討		

平成24年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

① これまで効率的な生産が困難であった希少ヘキソースの生産と結晶化

昨年度 D-グルコースの結晶を得て X 線結晶解析を試みたが十分な解析には至っていなかった。試料の純度の低さが原因の1つと考えられたため、エタノールを溶媒に用いて再結晶化して精製したところ、より高純度の D-グルコース結晶を得ることができた。この結晶について X 線結晶解析を行ったところ、結晶中の D-グルコースは 4C_1 コンフォメーションで β -D-ピラノース型であった。また、結晶は斜方晶で、空間群は $P2_12_12_1$ に属し、格子定数は $a = 7.0800(3) \text{ \AA}$ 、 $b = 9.8644(3) \text{ \AA}$ 、 $c = 10.6156(4) \text{ \AA}$ であり、単位格子の体積は $V = 741.39(4) \text{ \AA}^3$ であった (それぞれの括弧内は標準偏差)。一方 D-グルコースよりも更に生産困難な L-イドースの単結晶を得るべく実験を進めた。

② デオキシ希少糖類の生産

前年度の成果より、イズモリング中で様々な反応を触媒する酵素や微生物は炭素第1位や第6位がメチル基となっているデオキシ糖に対しても触媒作用を示すことが確認された。そこで本年度は炭素第6位以外の部位がデオキシ化された単糖を用い、新規デオキシ希少糖生産について検討した。2-デオキシ-D-リボースや2-デオキシ-D-グルコースを出発原料として還元反応、酸化反応、エピ化反応を組み合わせ、4-デオキシ-L-リブロース、5-デオキシ-D-フルクトースそして5-デオキシ-D-プシユースの効率的な生産を行った。また、炭素第4位や第5位がデオキシ化されたケトースに対しても各種異性化酵素は作用でき、炭素第4位や炭素第5位がデオキシ化されたアルドースに転換できることを明らかにした。

③ 希少糖の理化学的性質の解明

各種希少糖を結晶化して単結晶を作製する際に必要となる溶解度データの整備を進めた。種々の含水量のエタノール水溶液を溶媒とし、フルクトース (Fru) 及びプシユース (Psi) の溶解度を決定した。また4種のケトヘキソース (Fru、Psi、タガトース、ソルボース) 結晶の溶解熱を 15°C 、 25°C 、 35°C で精密測定し、各々の溶解エンタルピーを求めた。更にグルコースとソルボースの間の異性化反応の平衡定数を求め、両者の熱力学的安定性に関する熱力学量 (生成モルギブズ自由エネルギー) を求めた。

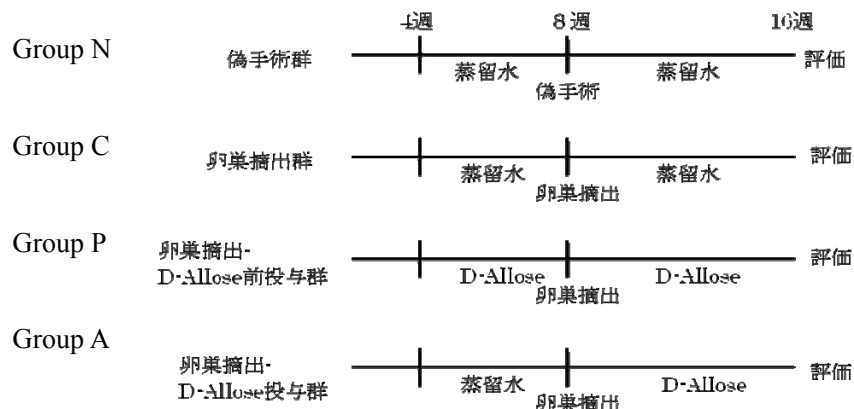
④ 希少糖 D-Allose の破骨細胞分化抑制と骨粗鬆症治療への応用 (in vivo 実験)

自然界に希にしか存在しない単糖である希少糖の一種 D-Allose が各種細胞においてチオレドキシニン結合蛋白 (Thioredoxin interacting protein: TXNIP) の発現を著明に誘導し、増殖抑制効果を持つことを報告してきた。さらに一昨年度、D-Allose は骨新生において骨を吸収する役割を持つ破骨細胞の前駆細胞に作用して、破骨細胞分化抑制因子でもある TXNIP を強力に発現し破骨細胞機能を抑制することを見いだし特許を出願した (特願 2010-249075)。

本年度の研究では動物モデルにおいて、D-Allose が破骨細胞の機能を抑制し、その結果骨粗鬆症の予防薬・治療薬として有効かどうかを検討した。

1) 実験モデル

骨粗鬆症モデルマウスを作成し、D-allose を5%含む飲料水を投与する実験系を以下のように立てた。メスの4週齢のマウスを4群に分ける。前投与群には4週齢から D-allose を経口投与した。8週齢でマウスの両側卵巣を摘出し骨粗鬆症モデルを作成する。開腹のみで卵巣の摘出を行わない偽手術群のマウスをコントロールとして設定し、卵巣摘出群との比較に用いた。これらのマウスに D-Allose またはコントロールとしての蒸留水を8週間経口投与した。

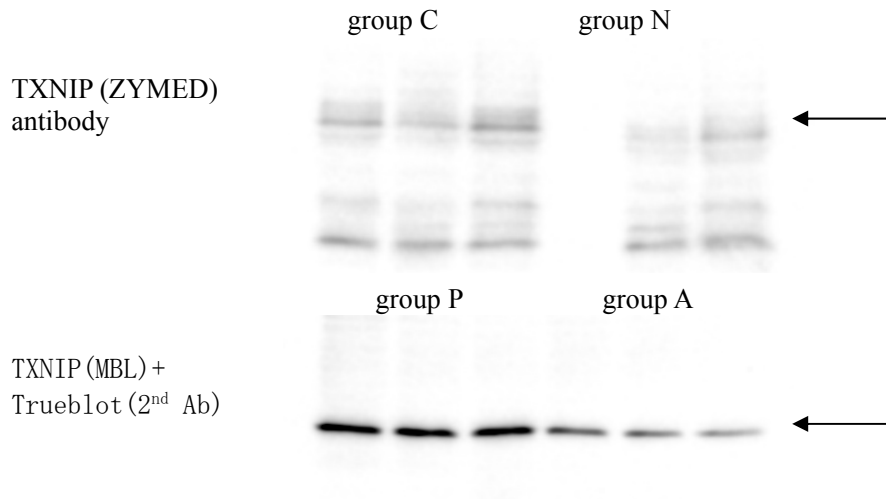


16週齢にて、1) 骨塩定量法、2) 骨形態計測法、3) 尿、血清骨代謝マーカー、4) 骨強度を指標とし、各投与量におけるD-Alloseの骨形成および骨吸収に及ぼす影響を検討した。さらに骨組織のTRAP染色を行い、D-Alloseの破骨細胞分化への影響を検討し、骨粗鬆症発症抑制効果があるかどうかを判定した。同時に組織の抗TXNIP抗体による免疫染色やウエスタンブロット、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行ない、D-AlloseによるTXNIPの過剰発現を確認した。各群6匹ずつを用いた。

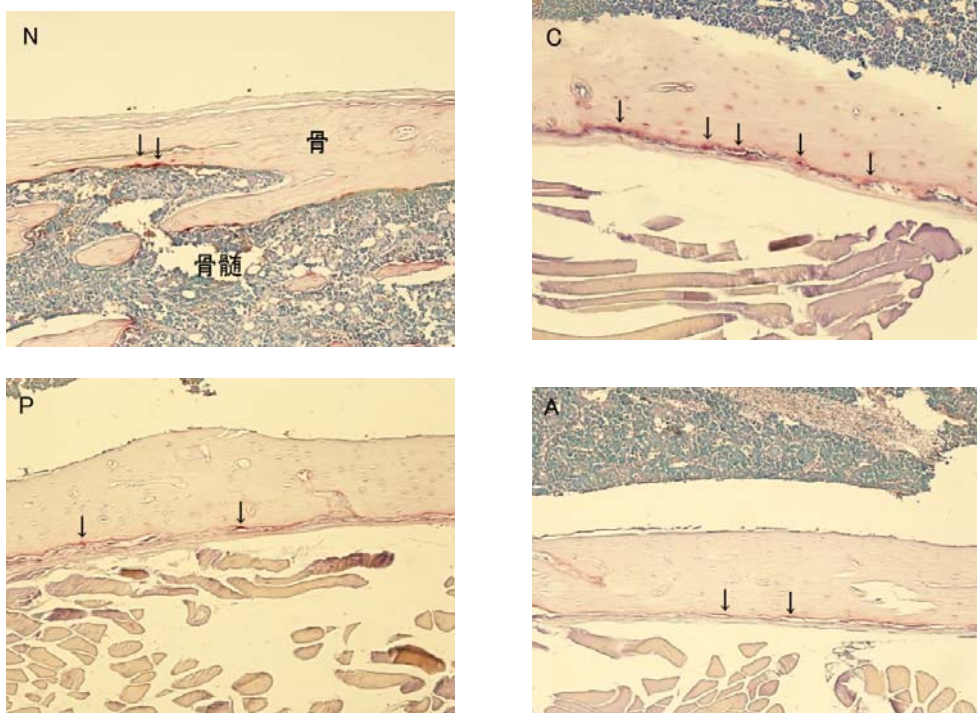
2) 結果

Western blotによるTXNIPの解析

D-alloseの投与により、特に前投与群でTXNIPの発現が見られた。それに比べて、対照群(Group CおよびN)での発現は少なかった。D-alloseの投与により、TXNIP発現が起こり、その結果破骨細胞の分化を抑制する可能性が示された。(下図)



D-Alloseの破骨細胞分化への影響



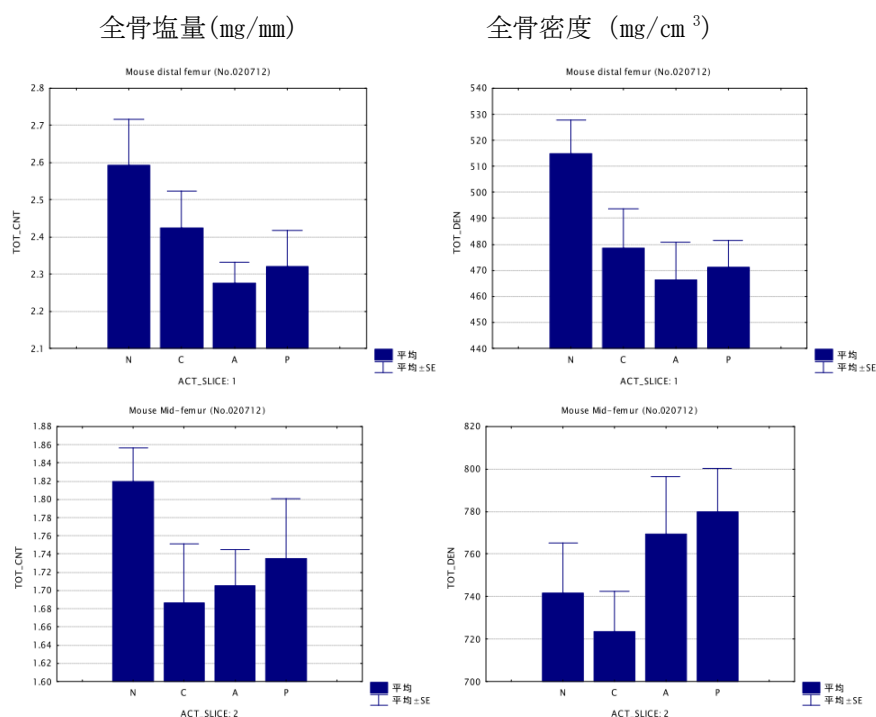
D-Alloseの破骨細胞分化に対する影響を調べるため、各グループのマウスから大腿骨を取り出し、脱灰後にパラフィン切片を作成した。この切片を用いて破骨細胞特異的のマーカーである酒石酸耐性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、破骨細胞への分化度を解析した。破骨細胞は赤紫色

に染色される (図内矢印)。図に示すように、N グループに比べ、C グループでは赤紫色の細胞数が増加している。それに対して D-Allose 投与 (A および P) グループでは C グループほどは増加していない。このことから卵巣摘出後も D-Allose 投与によって破骨細胞分化の抑制が起こることが示唆された。

骨塩定量・骨強度の定量

骨に対する D-Allose の効果を peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) を使い検討した。各グループのマウスの大腿骨を摘出し、アルコールで保存した。大腿骨遠位部 (海綿骨が多い; グラフ上段) と骨幹部 (皮質骨が多い; 下段) について骨塩量、骨強度を測定した。

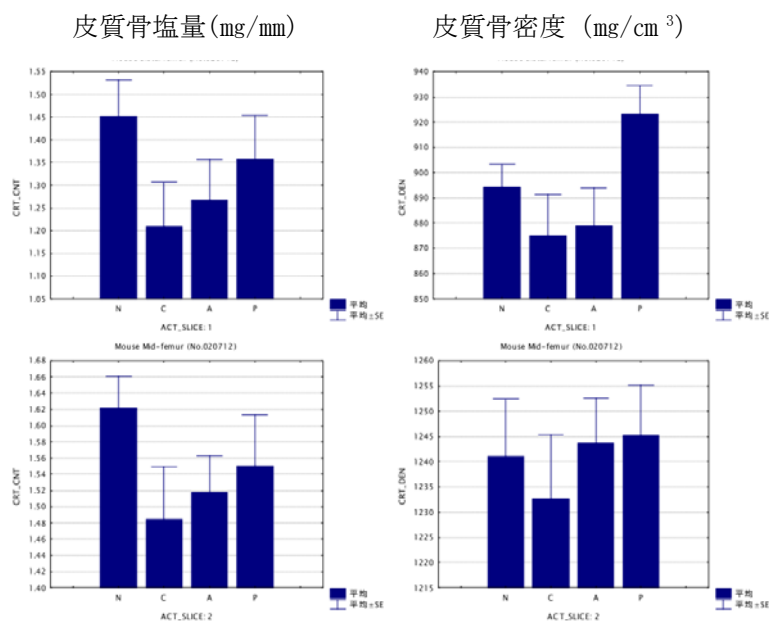
1 全骨塩量・全骨密度



全骨塩量は N グループに比べ、C グループ (卵巣摘出) にて遠位部で 66%、骨幹部で 40% に減少した。D-Allose 投与によって遠位部ではさらに骨塩量が減少 (A グループ 36%、P グループ 43%) したが、骨幹部では軽度増加が認められた。

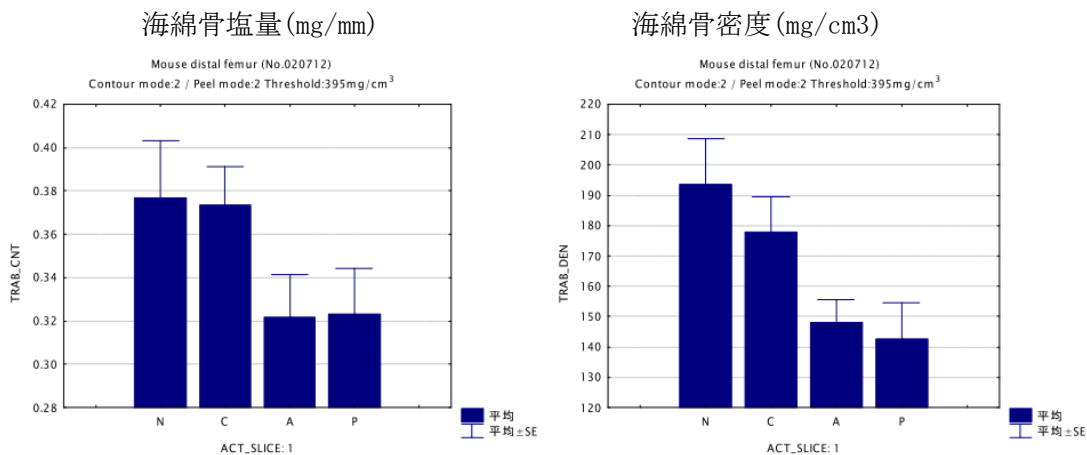
2 皮質骨塩量・骨密度

皮質の骨塩量は卵巣摘出により減少した (遠位部 40%、骨幹部 38%)。D-Allose 投与にて減少した骨塩量は増加が認められた (遠位部: A グループ 46%、P グループ 77%; 骨幹部: A グループ 53%、P グループ 67%)。皮質の骨密度は C グループで遠位部 54%、骨幹部 67% に低下したが、D-Allose により遠位部 (A グループ 65%、P グループ 165%)、骨幹部 (A グループ 109%、P グループ 116%) と共に C グループより大幅に増加した。



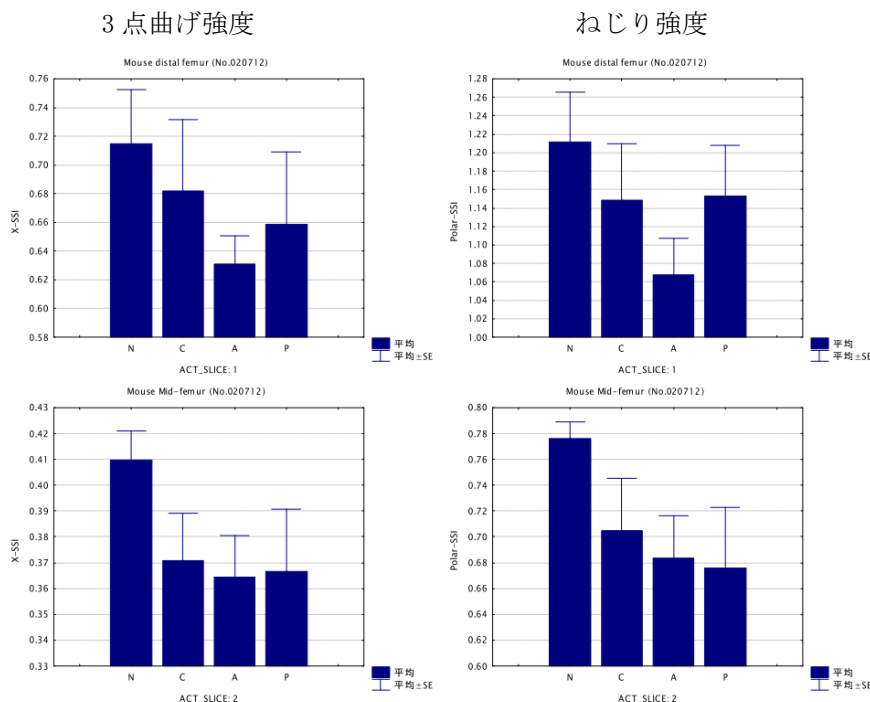
3 海綿骨塩量、骨密度

海綿骨の骨塩量はCグループで98%に減少したが、D-Alloseによりさらに減少（Aグループ43%、Pグループ44%）した。海綿骨の骨密度はCグループで77%、D-Allose投与でAグループ38%、Pグループ31%とさらに減少した



4 3点曲げ強度、ねじり強度

3点曲げ強度はCグループにて低下した（遠位部77%、骨幹部52%）。D-Allose投与により、遠位部、骨幹部ともに減少した（遠位部：Aグループ38%、Pグループ59%；骨幹部：Aグループ42%、Pグループ45%）。ねじり強度はCグループにて低下（遠位部71%、骨幹部59%）し、D-Allose投与により遠位部（Aグループ30%、Cグループ71%）、骨幹部（Aグループ47%、Cグループ42%）となった。



これらの結果は学会発表3において発表した。

⑤ 希少糖 D-プシコースを用いた澱粉ゲル食品の特性（早川 茂）

希少糖の1つであるD-プシコース (Psi) はノンカロリーであり、砂糖の70%の甘味を有している還元糖である。Psiは血糖値上昇抑制作用、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、抗肥満作用などの生理機能を有していることが報告されている。一方スクロース (Suc) は様々な食品に用いられる二糖であり、甘味の付加や保水性・保存性を高める働きを有している。本研究では和菓子に用いられることの多い澱粉に着目し、ワラビもちを作製する際にSucの

一部または全部を Psi に置き換えた場合の効果を調べた。また甘藷澱粉と本蕨粉の 2 種類を用い、それぞれの特性についても調べた。

Suc のみを使用したワラビもちをコントロール (ct) とし、Suc の 30% (psi30)、50% (psi50)、100% (psi100) を Psi に置き換えた 4 種類のサンプルを作製して実験に用いた。

DSC 測定からは、Psi を添加した澱粉溶液は Suc を添加したものより低い温度で糊化し、糊化に必要な熱量は多くなることが示された。

物性測定の結果は Psi を添加した澱粉ゲルは柔らかく歯切れの良いものとなることを示した。また、4℃で保存しても硬くなりやすく、より柔らかな状態で保存された (図 1)。しかし澱粉の老化には糊化後の保存温度が大きく影響しており、比較的高い温度で保存した場合は澱粉が老化し難く、D-プシコースを用いたことで見られる効果はほとんどなかった。

ワラビもち作製後の一般細菌数については、1 日目までは ct と psi50 で殆ど差はないが、2 日目から ct では菌数が増加するが、D-プシコースを加えると保存期間を通して菌数はあまり増加せず 3 日目でも ct の 1 日目程度であった (図 2)。

以上より、ワラビもちに用いる Suc を Psi に置き換えることは澱粉の老化と細菌増殖による品質劣化を遅らせ、ワラビもちの保存性を高めるなど様々な効果が見られた。

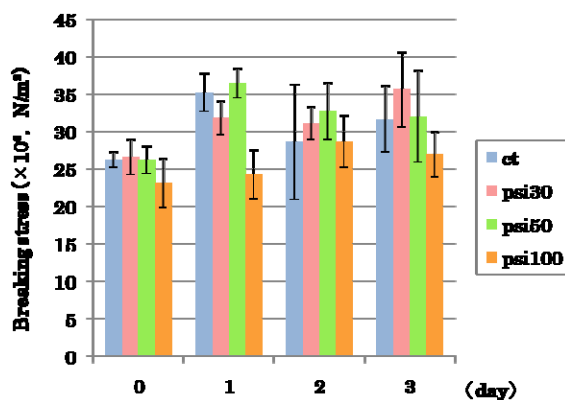


図 1. 砂糖の一部を D-プシコースに置換して作製したワラビもちの低温貯蔵 (4℃) 中における硬さ (破断強度) の変化

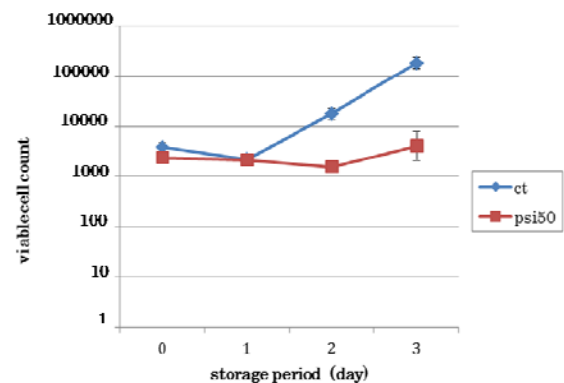


図 2. 砂糖の半量を D-プシコースに置換して作製したワラビもちの貯蔵 (15℃) 中における一般細菌数の変化

今後の研究計画

平成24年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

- ① L-イドースの精製および結晶化を実施する。得られた結晶の X 線構造解析を実施する。
- ② 複数の新規デオキシ希少糖を生産するとともに、未だ結晶化されていないデオキシ希少糖試料の結晶化を試みる。
- ③ 各種希少糖類の含水エタノール中への溶解度データの整備を進めると共に、得られた溶解度データを活用して X 線構造解析用の希少糖単結晶の作製を行う。また、グルコース-イドース間の異性化反応の平衡定数を求め、未だ得られていないイドースの熱力学的安定性データ（生成モルギブズ自由エネルギー）を見積もる。
- ④ D-プシコースについては、肥満のメカニズム解明を継続して行う。D-プシコース以外にもその誘導体や他の希少糖も用いてより有効な糖を探すことも並行して行いたい。D-アロースについては、骨粗鬆症への影響についてメカニズム解明を進める。特に D-アロースの使用量について検討を進め、安全かつ最も有効な量を決定する。D-プシコースおよび D-アロースを用いることで、希少糖の抗老化作用について、長寿因子としても知られている Sirt1 の発現を中心に解析を計画する。
- ⑤ 希少糖を含む異性化糖シロップ（レアシュガースウィート）を用い、豆乳入りヨーグルトの作製を試みる。また、レアシュガースウィートを用いて発酵醸造酢（オリーブ酢）を作製できるかどうかについて発酵方法など基礎的検討を行う。

特記すべき事項

本研究に関する受賞（学生対象の賞も含む）・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください（ささいなことでもかまいません）。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

1. NHK テレビ「サイエンス Zero」で希少糖に関して放映 2013年2月24日

研究業績

本研究に関連した、平成24年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

[1] 査読がある原著論文

1. Miyawaki Y, Ueki M, Ueno M, Asaga T, Tokuda M, Shirakami G*, D-allose ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Tohoku J Exp Med.* **228**(3):215-21. (2012).
2. Hossain A, Yamaguchi F, Matsunaga T, Hirata Y, Kamitori K, Dong Y, Sui L, Tsukamoto I, Ueno M, Tokuda M*, Rare sugar D-psicose protects pancreas β -islets and thus improves insulin resistance in OLETF rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **425**(4):717-23. (2012).
3. Yamaguchi F, Umeda Y, Shimamoto S, Tsuchiya M, Tokumitsu H, Tokuda M, Kobayashi R*, S100 proteins modulate protein phosphatase 5 function: a link between CA²⁺ signal transduction and protein dephosphorylation. *J Biol Chem.* **287**(17):13787-98. (2012).
4. Yamada K, Noguchi C, Kamitori K, Dong Y, Hirata Y, Hossain MA, Tsukamoto I, Tokuda M, Yamaguchi F*, Rare sugar D-allose strongly induces thioredoxin-interacting protein and inhibits osteoclast differentiation in Raw264 cells. *Nutr Res.* **32**(2):116-23. (2012).
5. Miyashita T, Akiyama K, Inamoto R, Matsubara A, Nakagawa T, Yamaguchi F, Tokuda M, Mori N*, Presence of FX_{YD6} in the endolymphatic sac epithelia. *Neurosci Lett.* **513**(1):47-50. (2012).
6. Morimoto K*, Shimonishi T, Miyake S, Takata G, Izumori K.: Preparation of D-glucose from disaccharide lactitol using microbial and chemical methods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**(2):253-258. (2013).
7. Morimoto K, Terami Y, Maeda Y, Yoshihara A, Takata G*, Izumori K. Cloning and characterization of the l-ribose isomerase gene from *Cellulomonas parahominis* MB426. *J. Biosci. Bioeng.* **115**(4): 377-381. (2013).
8. Araújo N, Jenkinson SF, Martínez RF, Glawar AF, Wormald MR, Butters TD, Nakagawa S, Adachi I, Kato A*, Yoshihara A, Akimitsu K, Izumori K, Fleet GW*: Synthesis from d-Altrose of (5R,6R,7R,8S)-5,7-Dihydroxy-8-hydroxymethylconidine and 2,4-Dideoxy-2,4-imino-d-glucitol, Azetidine Analogues of Swainsonine and 1,4-Dideoxy-1,4-imino-d-mannitol. *Org. Lett.* **14**(16):4174-4177. (2012).
9. Lenagh-Snow GM, Jenkinson SF, Newberry SJ, Kato A, Nakagawa S, Adachi I, Wormald MR, Yoshihara A, Morimoto K, Akimitsu K, Izumori K, Fleet GW*: Eight stereoisomers of homonojirimycin from D-mannose. *Org. Lett.*; **14**(8):2050-3. (2012).
10. Kazuhiro Fukada*, Masakazu Okamitsu, Masashi Sato: Evaluation of Acyclic Form Content and Molar Absorption Coefficient of Carbonyl Group of Ketoheoses in Aqueous Solution. *Chem. Lett.*, **41**(12), 1686-1688 (2012).

[2] 著書

なし

[3] 招待講演

1. 徳田雅明：—新世代の甘味料—希少糖の開発と生理機能（夢の糖『希少糖』で世界を健康に！）
キヲニスクラブ講演会 2012年11月1日 ホテルクレメント高松（高松市）
2. 産学官連携が産んだ希少糖の実用化展開 —抗糖尿病・抗肥満効果を中心に— 第66回日本栄養・食糧学会大会 平成24年5月19日 東北大学川内北キャンパス（仙台市）
3. 徳田雅明：—新世代の甘味料—希少糖の開発と生理機能～D-プシコースとD-アロースの生理機能～
食品ニューテクノロジー研究会 2012年10月5日 TKP 東京駅ビジネスセンター（東京）

[4] 学会発表(○は発表者)

1. ○Akram Hossain, Fuminori Yamaguchi, Li Sui, Yuko Hirata, Kazuyo Kamitori, Youyi Dong, Ikuko Tsukamoto, Tetsuo Iida, Yukiyasu Toyoda, Masaaki Tokuda: Rare sugar D-psicose prevents diabetes development and excess fat accumulation in type 2 diabetes OLETF rats, 第90回日本生理学会大会、東京、2013年3月
2. ○神鳥和代、山口文徳、董有毅、ホセインアクラム、平田祐子、片木絢子、野口知里、久岡雅弘、徳田雅明 Regulation of thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression by p44/p42 MAPK-p90RSK pathway 第90回日本生理学会大会、東京、2013年3月
3. ○野口知里; 山田佳奈; 山口文徳; 神鳥和代; 董有毅、平田祐子、ホセインアクラム、塚本郁子、徳田雅明 希少糖 D-allose による TXNIP の発現誘導は破骨細胞分化を抑制する 第90回日本生理学会大会、東京、2013年3月
4. ○Kazuyo Kamitori, Fuminori Yamaguchi, Youyi Dong, Akram Hossain, Yuko Hirata, Masaaki Tokuda, Regulation of thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression by p44/p42 MAPK-p90RSK pathway 第85回日本生化学会大会 福岡、2013年12月
5. ○Hossain Akram; 平田祐子; 神鳥和代; 董有毅; 山口文徳; 飯田哲郎; 豊田行康; 徳田雅明, Long-term feeding D-psicose uniquely maintained blood sugar levels on T2DM OLETF rats. 第33回日本肥満学会 京都
6. ○吉原 明秀、百地 歩、W. J. フリート ジョージ、何森 健「微生物反応および酵素反応を用いた5-デオキシ-ヘキソースの生産」『日本農芸化学会』講演要旨集 Page852、仙台(2013)
7. ○Sirinan Shompoosang, Kenji Morimoto, Akihide Yoshihara, George W. J. Fleet, Ken Izumori 「Production of 6-deoxy-aldohehexoses from L-rhamnose by enzymatic reactions」『日本生物工学会』講演要旨集 Page120、神戸(2012)
8. ○寺見優司、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎「微生物反応および酵素反応を用いた D-プシコースから D-タロースの生産」『日本生物工学会』講演要旨集 Page120、神戸(2012)
9. ○森本兼司、高田悟郎、小林秀明、吉原明秀 「*Bacillus* sp. K44 株の希少糖に対する反応性と代謝経路の解明」『日本生物工学会』講演要旨集 Page120、神戸(2012)
10. ○上地敬子、深井善範、吉原明秀、森本兼司、高田悟郎「微生物反応および酵素反応を用いた D-プシコースから D-タロースの生産」『日本生物工学会』講演要旨集 Page121、神戸(2012)
11. ○Yuji Terami, Akihide Yoshihara, Kenji Morimoto, Goro Takata 「Characterization of L-ribose isomerase from *Cellulomonas parahominis* MB426 and production of various rare sugars using this enzyme」『第4回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム 2012』講演要旨集 Page85、香川(2012)
12. ○Keiko Uechi, Akihide Yoshihara, Kenji Morimoto, Goro Takata 「Gene cloning and characterization of novel D-Tagatose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti tonoi*」『第4回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム 2012』講演要旨集 Page90、香川(2012)
13. ○Sirinan Shompoosang, Kenji Morimoto, Akihide Yoshihara, George W. J. Fleet, Ken Izumori 「Production of 6-Deoxy-altrose and 6-Deoxy-allose from L-Rhamnose by Enzymatic Reactions」『第4回香川大学・チェンマイ大学合同シンポジウム 2012』講演要旨集 Page91、香川(2012)
14. ○藤原希規、深田和宏：各種 D-ヘキソース類の熱力学的性質に関する検討。日本化学会西日本大会、佐賀（佐賀大学）、2012年11月
15. ○深田和宏、藤原希規：二成分混合単糖溶液系における溶解平衡。日本化学会 第93春季年会、草津（立命館大学）、2013年3月

[5] 産業財産権（特許等）

なし

[6] その他（プロシーディング、査読がない論文、投稿記事等）

なし