

平成25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	線虫を用いた希少糖の生物活性探索と NMR を用いた希少糖の物性解析		
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先
	佐藤正資	農学部・教授	TEL
			本人
e-mail	秘書等		
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等
	砂古口博文	連合農学研究科 (D3)	希少糖および希少糖誘導体のバイオアッセイ
	光元 千晶	農学部 (B4)	希少糖および希少糖誘導体のバイオアッセイ
	小橋 美月	農学部 (B4)	希少糖および希少糖誘導体のバイオアッセイ
	尾崎 理沙	農学部 (B4)	希少糖および希少糖誘導体のバイオアッセイ
	北尾亜希子	農学部・実験補佐員	希少糖および希少糖誘導体のバイオアッセイ

平成25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) 希少糖のアンチエイジング活性

摂取カロリーの制限は、様々なモデル動物の寿命を延長することが報告されている。ヒトにおいても、カロリー制限は加齢性疾患の発症を遅らせ、寿命を延長すると考えられている。その詳細な機序は明らかではないが、細胞内エネルギーレベルの低下がインスリン様経路、サーチュイン、AMPKなどの複数のエネルギーセンサーによって媒介され、そのシグナルが抗酸化酵素の発現増強やミトコンドリア機能の保全などを誘導し、その結果、抗老化・寿命延長が起こると考えられている。しかし、栄養のバランスを保ちながらカロリー制限を長期間続けることは困難と苦痛を伴う。そこで、食事と一緒に摂取することでカロリー制限と同様の抗老化効果が得られるカロリー制限模倣物質 (Calorie Restriction Mimetics, CRM) の開発が注目されている。これまで、CRM 候補として、サーチュインを活性化するレスベラトロールなどが報告されているが、効果や毒性に問題があり、薬剤として実用化されたものは無い。我々は、すでに D-フルクトース、D-グルコースそれぞれの C3 エピマーである希少糖 D-プシコースと D-アロースが線虫寿命を延長すること、その機序としてカロリー制限効果の関与が示唆されることを報告している。希少糖とは、自然界にまれにしか存在しない単糖およびその誘導体と定義される。我々は、数多い希少糖を網羅的に合成し、そこから線虫寿命延長活性を指標として CRM 候補を探索することを計画している。しかし、従来の我々の寿命試験法は労力、試料量の点で問題が多く、よりハイスループットな方法の開発が望まれていた。本研究ではその改良を行った。

従来法は2mlの液体培地を入れた3.5cm径culture dishへ線虫成虫10頭を入れ、振とう培養を行い、1日おきに生き残った線虫を新しい培地に移し替えていた。今回、試験容器を96wellプレートに変え、1wellあたり100 μ lの液体培地に線虫一頭を入れ、静置培養し、植え替えは行わないこととした。

従来法においてD-プシコースは28mMで寿命延長が認められていた。今回報告する96wellプレート法においては5-14mMに活性を認め、より低濃度で活性を検出することが可能となった。また、植え替えを行わないため、同時に多数の検体の試験が可能となった。(研究業績2, 4, 5, 6)

(2) 希少糖の抗線虫活性

熱帯から亜熱帯域にかけて広範に寄生虫病が蔓延している。なかでも、消化管寄生線虫(回虫、蟯虫、鉤虫など)の感染者数は全世界で10億人以上と見積られている。しかし、寄生線虫症治療に使用される薬剤は非常に限定されており、薬剤抵抗性線虫の出現が問題視されている。これは家畜の消化管線虫症においても同様である。このような背景から、従来の抗線虫薬とは全く異なる作用モードを持つ薬剤の開発が望まれている。本研究では、単糖を骨格とした創薬リードの探索を目的として、アルドヘキソース異性体全16種(D-, L-アロース, アルトロース, グルコース, マンノース, グロース, イドース, ガラクトース, タロース)及びケトヘキソース異性体全8種(D-, L-プシコース, フルクトース, ソルボース, タガトース)の線虫成長阻害活性を調査した。

線虫 *C. elegans* 第一期幼虫 (L1) を同調培養により得た。試験容器には24ウェルカルチャープレートを用い、各ウェルに試料を含んだ液体培地と、L1幼虫約10頭を入れ、20°Cで静置培養を行った。72時間後、線虫個体の顕微鏡写真を撮影し、その写真を画像解析ソフト (ImageJ) によって処理し、各個体の投影面積を算出した。対照線虫の平均面積値を基準として、線虫の成長を50%阻害する濃度 (IC₅₀値) をプロビット法で計算した。その結果、D-フルクトースのC3エピマーであるD-プシコースが53mMと最も活性が強く、次いでD-ガラクトースのC2エピマーであるD-タロースが197mM、D-グルコースのC3エピマーであるD-アロースが221mMであった。それ以外の異性体については167mM (3% w/v) でもほとんど成長阻害活性は認められなかった。以上から、単糖の立体異性は線虫の成長阻害活性に大きく影響を与えることが明らかになった。(研究業績3)

(3) 定量¹³C-NMRの手法を用いた希少糖の物性解析 (農学部深田グループと共同で実施)

定量¹³C-NMRの手法を用いることで、6-デオキシ-L-プシコースと1-デオキシ-D-タガトースの水溶液中における分子構造と構造安定性について解析した。ヘキソースは一般的に水溶液中で、5種類の互変異性体 (α -フラノース, α -ピラノース, β -フラノース, β -ピラノース, 鎖状アルデヒド) として存在している。¹³C-NMR測定において緩和時間とパルス幅を改良し、定量性を向上させた測定を行い、これらの存在比を¹³C-NMRシグナルの面積値から定量した。また、温度を変化させたとき (15-50°C) のこれらの存在比を測定し、それらの構造安定性を解析した。

今後の展望

本事業期間内（平成22－25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。図を挿入してもかまいません。

（1）希少糖のアンチエイジング活性

本事業期間内に得られた研究成果により、D-プシコースとD-アロースの線虫寿命延長活性とその作用メカニズムの一部が明らかになった。また、ハイスループットなバイオアッセイ系を確立することができた。今後はこの成果をさらに発展させて、さらに、様々な希少糖のアンチエイジング活性の探索、および培養細胞また実験動物での希少糖アンチエイジング効果の検証を行っていく予定である。本研究の成果は、抗老化食品（カロリー制限模倣物質）開発に繋がると考えられ、また、その作用メカニズムから、抗肥満、抗糖尿病などの代謝病治療薬に発展する可能性がある。

（2）希少糖の抗線虫活性

本研究によって、炭素数4から6までの約三十種類の希少糖（デオキシ希少糖を含む）の抗線虫活性（幼虫成長阻害活性）が明らかになった。この成果をさらに発展させて、今後は希少糖抗線虫活性の構造活性相関研究を含めた生物有機化学研究に繋げていく予定である。この成果から、抗線虫薬だけではなく、糖代謝酵素の機能を解析するツールとしての酵素阻害剤の開発に繋がる可能性がある。

（3）定量¹³C-NMRの手法を用いた希少糖の物性解析

本研究によって、定量¹³C-NMRの手法を確立することが出来た。この手法を用いて、従来の方法では定量分析が困難であった生体試料中成分の分析が可能になると考えられる。

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。

該当なし

研究業績

本研究に関連した,平成25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. Piyatida P., Kimura F., Sato M., Kato-Noguchi H. (2013). Isolation of β -sitosterol from *Hibiscus sabdariffa* L. Allelopathy J. 32 (2): 289-300.

[2] 著書

なし

[3] 招待講演

なし

[4] 学会発表(○は発表者)

2. ○佐藤正資, 砂古口博文, 新谷知也, 大隈一裕, 何森 健, 希少糖 D-プシコースの線虫寿命延長活性とその作用メカニズム, 日本農芸化学会中四国支部第36回講演会, 2013年6月, 島根大学.

3. ○砂古口博文, 吉原明秀, 森本兼司, 何森 健, 佐藤正資, アルド及びケトヘキソース全異性体の線虫成長阻害活性, 日本農芸化学会中四国支部第36回講演会, 2013年6月, 島根大学.

4. ○Sato, M., Sakoguchi, H., Shintani, T., Okuma, K., and Izumori, K. The rare sugar D-psicose extends *Caenorhabditis elegans* lifespan by increasing oxidative stress resistance, 19th International *C. elegans* Meeting 2013, 2013年7月, LA, USA.

5. ○佐藤正資, 砂古口博文, 新谷知也, 大隈一裕, 何森 健, 希少糖 D-プシコースの *C.elegans* 寿命延長効果, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月, 神戸.

6. ○佐藤正資, 砂古口博文, 新谷知也, 大隈一裕, 何森 健, 希少糖からのカロリー制限模倣物質の探索—線虫寿命試験法の改良—, 日本農芸化学会2013年度大会, 2014年3月, 東京.

[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)

7. 新谷知也, 大隈一裕, 砂古口博文, 佐藤正資(2013). カロリー制限模倣物質としての希少糖 D-プシコース及び D-アロースー抗メタボリックシンドローム効果からアンチエイジング効果へ, 日本醸造協会誌, 108(8): 565-574.