

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08357

研究課題名(和文) 腸内細菌による代謝活性化：クロシン糖部の機能解析

研究課題名(英文) Metabolic Bioactivation by intestinal bacteria : Functional analysis of crocin glycosides

研究代表者

金城 順英 (Kinjo, Junei)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：00161612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：天然薬物や生薬の代表的な有効成分である配糖体は、構造の中に「糖鎖」を持っているが、経口摂取した場合、腸内細菌で代謝分解され、糖以外の部分が吸収される。そのため、糖鎖部は不要と考えられてきたが、配糖体の一つであるサフランの有効成分crocinの神経細胞保護作用に関する研究では、糖鎖部も重要な役割を果たすことが動物実験で明らかになった。

そこで、今回の研究では、crocinの腸内細菌などでの代謝実験を行い、代謝経路を明らかにした。また同時に神経細胞保護作用への糖鎖の影響を調べるため、類似化合物の合成法についても検討し、数種のcrocin類似化合物の合成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で得られた結果より、crocinの代謝経路がより明らかとなった。また、crocinの代謝物の一つであるcrocetinは酸化を受けやすい化合物であるが、腸内細菌などでは代謝されにくいことも明らかとなった。一方、crocin類似化合物の合成法により、類似化合物の神経保護作用についても研究が進み、活性の強い化合物が見出されれば、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患治療薬への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glycosides, which are typical active compounds of natural products and natural medicines, have "sugar moiety" in their structures, but when taken orally, they are metabolized by intestinal bacteria and absorbed by parts other than sugar moiety. Therefore, it has been thought that the sugar moiety is unnecessary. However, in animal experiments, the sugar moiety also plays an important role in the study on the neuroprotective effect of crocin (the active compound of saffron).

Therefore, in this study, we conducted metabolic experiments on crocin with intestinal bacteria and revealed the metabolic pathway. At the same time, in order to investigate the effect of sugar moieties on the neuroprotective effect, a method for synthesizing similar compounds was also investigated, and several types of crocin-like compounds were synthesized.

研究分野：生薬学

キーワード：糖鎖部機能解析 クロシン 腸内細菌による代謝 合成糖鎖配糖体 神経細胞保護作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、動物細胞培養法を応用したフィトケミカルの機能解析を行っている。その一例として、抗腫瘍活性や抗トリパノソーマ活性を持つ化合物などを見出してきた。また、それに加え腸内細菌によるフィトケミカルの代謝物構造解析なども行っている。

そこで今回、活性化化合物の中でもサフランの活性成分である crocin について興味ある知見が得られたので、代謝や神経細胞保護作用について着目し、研究を企図した。

### 2. 研究の目的

糖鎖を有する植物成分、配糖体は天然に広く分布し、生薬や天然薬物の代表的有効成分としてよく知られている。ところが配糖体を経口摂取した場合、配糖体糖鎖が腸内細菌により代謝分解され、非糖部（アグリコン）のみ腸管から吸収される。そのため、従来、真の有効成分として、糖鎖部は不要と考えられてきた。一方、配糖体でもあるサフランの有効成分 crocin の神経細胞保護作用に関する研究において、crocin の非糖部である crocetin が全く活性を示さず、糖鎖部分が重要な役割を果たすことが動物実験（経口）において明らかとなった。すなわち、ある種のパラダイムシフト的知見が得られたことになる。そこで、このような糖鎖のもつ生体内現象を分子レベルで解明するため、crocin 糖部の腸内細菌による代謝および化学的变化に基づく代謝の変化、さらには糖鎖と神経細胞保護作用の関連（構造活性相関）に着目し、本研究を企図した。

### 3. 研究の方法

(1) 腸内細菌による代謝の影響（糖鎖代謝に伴う未知活性物質誕生の可能性）の解明  
腸内細菌を用い、crocin や類似配糖体の代謝経路および代謝物について解析する。

(2) 化学的変換に基づく合成糖鎖配糖体の調整  
Crocin 類似化合物について、糖鎖部分の変換を行い、ライブラリーを構築する。

(3) 合成糖鎖配糖体の代謝と神経細胞保護作用（in vitro）の構造活性相関解析  
合成糖鎖配糖体を(1)と同様に代謝による影響を探る。また、神経細胞保護作用について crocin との相違を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 腸内細菌による代謝の影響の解明

① crocin をはじめ crocetin の配糖体はマウスにおいて crocetin に代謝され、またはグルクロン酸抱合を受け crocetin glucuronide の形で、血中に取り込まれるという報告がある（*J. Agric. Food. Chem.*, 2005, **53**, 7302-7306）。このように経口摂取された場合、消化管内において代謝を受け吸収されるが、経口摂取時の ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) を考える場合、まずは、消化管内での代謝、続いて肝臓での代謝が行われる。しかし、第2の肝臓と呼ばれるほど代謝酵素に富んだ腸内細菌による代謝研究に関しては、いまだに十分とは言えない。そこで、crocin の腸内細菌による代謝を行い、代謝経路や代謝物に対する検討を行なった。また、さらに代謝研究の一環としてヒト腸内環境を再現するために、human feces を用いて行なった代謝実験についてもあわせて報告する。

② 腸内細菌の細菌株は、理化学研究所微生物系統保存施設(JCM)より購入した通性嫌気性菌 14 種、偏性嫌気性菌 14 種、好気性菌 2 種の計 30 種類を用いた。各細菌株を、GAM 液体培地に播種し 37°C 嫌気状態で 24 時間前培養を行い、その培養液に crocin 含有 GAM 液体培地を加え、さらに 72 時間嫌気状態で培養する、その培養液を固相抽出し、HPLC 分析を行った。

③ HPLC 分析の結果、crocin の代謝により加水分解が行われていると考えられる菌種が 11 種あった。そのうち、crocetin まで代謝された菌種は 9 種類であった。*Bifidobacterium longum* および *Clostridium ramosum* は dicrocetin までの代謝で停止しており、crocetin 生成までには至っていなかった。

Crocin はアグリコンである crocetin に 2 分子の gentiobiose が結合している分子内対称系である。本研究において腸内細菌による代謝は crocetin と gentiobiose 間のエステル結合または gentiobiose 内の glucose 間のグリコシド結合で発生すると考えられる。Crocin から tricrocetin、crocetin-monogentiobioside を経て crocetin へ代謝される経路（経路 1）、crocin から tricrocetin、dicrocetin を経て crocetin に代謝される経路（経路 2）、crocin から gentiobiose を切断し、crocetin-monogentiobioside を経て crocetin に至る経路（経路 3）などが考えられる。24 時間・72 時間の代謝実験の結果の HPLC 分析により、tricrocetin、crocetin-monogentiobioside、crocetin が検出されたことより、*Bifidobacterium breve*、*B. pseudocatenulatum*、*Bacteroides distasonis*、*B. thetaiotaomicron*、*Ruminococcus products* ら 5 種類の腸内細菌は経路 1 を取ると考えられる。次に、tricrocetin、dicrocetin、crocetin が

検出された *Bacteroides fragilis* は経路 2 を辿ると考えられる。また、tricrocin、dicrocin、crocetin-monogentiobioside、crocetin から全てが検出されたことから *Lactobacillus acidophilus*、*Bacteroides ovatus* の 2 種類は経路 1 と経路 2 の両方を辿る複合的な代謝が行われると推測される。そして、crocetin-monogentiobioside、crocetin のみが検出された *Bifidobacterium adolescentis* は経路 3 をとると推測された。(図 1)

#### ④ Human feces による代謝

腸内細菌による代謝の結果を受け、human feces でも代謝を検討した。その結果、crocin は 12 時間程度で完全に代謝されていることがわかり、代謝開始後、1 時間時点で中間代謝物の tricrocin、dicrocin、crocetin-monogentiobioside のそれぞれが検出されている。また 6 時間後には全ての中間代謝物の見かけの生成が停止し、crocetin の生成のみが生じている。以上のことから様々な菌種の代謝が行われ、複合的に代謝物が生成していると考えられる。50 時間ほどで代謝物量の変化が見られなくなり代謝を終了した。以上のことから crocin や代謝中間体である配糖体は複数の代謝経路で速やかに代謝され、crocetin まで短時間で代謝されると推察される。しかも、全ての配糖体は crocetin へと代謝され、その後のさらなる代謝物なども生じていなかった。

⑤ 今回の腸内細菌および human feces による代謝結果より、crocin は腸内において速やかに代謝され、アグリコンである crocetin に変換されることが明らかになった。しかし、その代謝に関与する菌種は一部であり、また菌種により代謝経路に違いがあることも判明した。さらに、二重結合などを持ち、酸化されやすいと考えていた crocetin はさらなる代謝をあまり受けなかった。このことより、crocetin は腸管内において非常に安定性が高いということもわかった。以上のことから、crocin を経口摂取した場合、ヒトの体内に吸収されるのは配糖体の形でなく、crocetin の形であり、かつ非常に速やかに吸収されると推察される。

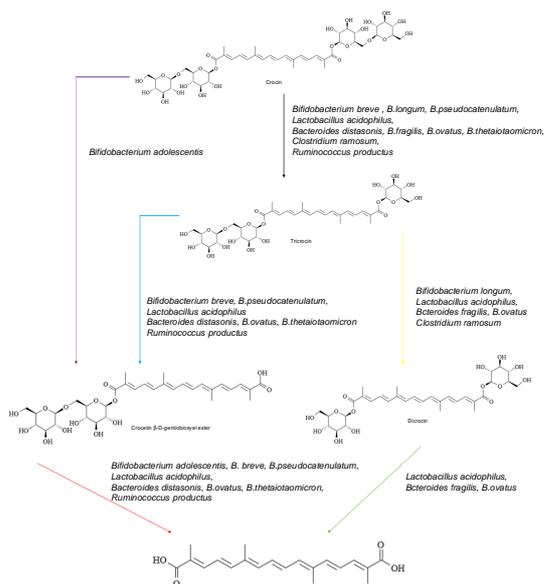


図1 Crocin代謝経路

#### (2) 化学的変換に基づく合成糖鎖配糖体の調整

① まず、crocin の合成を行い、それを応用し糖鎖部のバリエーションを検討する。また、サンシシより crocin の単離を試み、この crocin を原料とし、構造変換を検討した。

② crocin の合成として gentiobiose を誘導体化し、crocetin との結合を検討した。まず、糖供与体として glucose をアセチル化し、チオグリコシド体を合成した。一方、糖受容体として glucose をベンジル化、6 位の選択的アセチル化、脱アセチル化を行い、目的物を合成した。次に、グリコシル化を行い、1-6β 結合のジサッカライドを作成し、脱ベンジル化を行い、gentiobiose を合成した。その後、誘導体化し、crocetin とのカップリング反応を行なった。続けて crocin 様化合物の脱保護を行なった。この際に、保護基がエステル系の場合、保護基のエステル結合と crocetin - gentiobiose の結合部位であるエステル結合を区別して脱保護させることが難しく、目的物が TLC でのトレース量しか得られなかった。そこで、保護基を他のものも検討したが、十分な結果が得られなかった。(図 2)

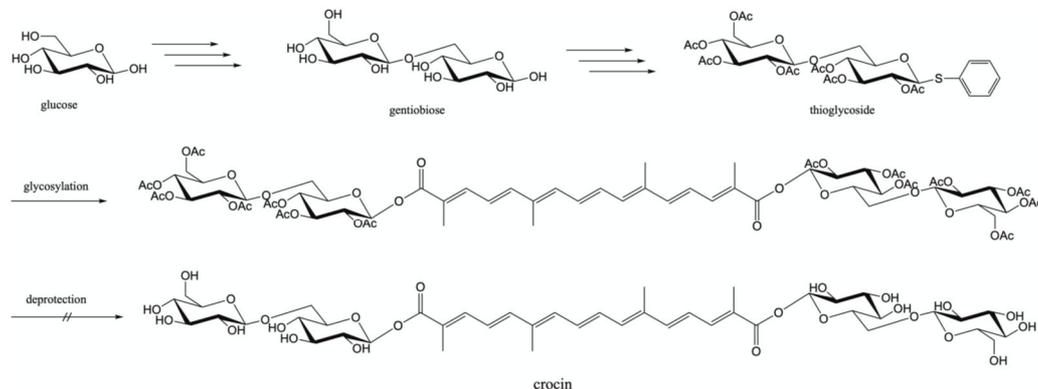


図2 Crocin 合成経路

また、選択性の検討として酵素による反応も試みたが、アグリコンである crocetin の溶解度の低さがネックとなり、満足する結果が得られなかった。crocetin の溶解度が反応溶媒に十分に溶けないことも踏まえて、crocetin 類似化合物の合成として、crocetin のかわりに直鎖状脂肪酸である 1,16-hexadecanedioic acid を用いて反応条件の詳細な検討を行なった。保護基と脱保護の反応試薬の検討を行なった結果、PMB 基を用いた方法で、低収率ながら目的物を単離することができた。

③糖の保護・脱保護は工程を数多く踏むこともあり、収率の低下が否めない。別のアプローチとして、crocetin の誘導体化を試みた。既報 (*Helvetica Chimica Acta.*, 1980, **63**, 277-283) を参考にし、crocetin を DMSO 中、

1,1'-carbonyldiimidazole と反応させ、イミダゾール体を高収率で得た。続けて、pyridine 中、NaH を用いて無保護の glucose と反応させることにより、crocetin-diglucoside を合成した。このとき副生成物として、crocetin-monoglucoside も確認できた。(図3)

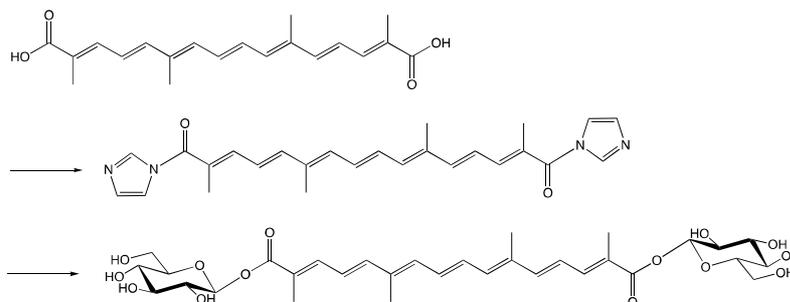


図3 Crocetin diglucoside 合成経路

Crocetin は DMSO には溶解するので、イミダゾール体を調製する際には、溶解度が問題にならず、イミダゾール体はクロロホルム・アセトンなど様々な溶媒に溶解するので、反応溶媒の検討も容易となった。しかしながら、crocetin の二重結合などは不安定な部分もあり、副生物として、二重結合が酸化されたと考えられる化合物も確認された。この反応では、イミダゾール体を調整した後、ろ過などの簡単な操作で次の反応に用いるため、カラムクロマトグラフィーによる目的物の単離などを行っていない。その点でも、副生成物が多くなってしまわないかと考え、イミダゾール体の安定性とのバランスを考慮し、実験方法を再考する余地がある。

また、同様の方法で糖鎖を変え、反応を行ったところ galactose では反応が進まなかった。一方、xylose では目的物が確認できたことから糖種による反応性の違いも示唆された。今回、イミダゾール体との反応の際に pyridine を溶媒として用いたが、それらへの溶解度への差が一つの要因ではないかと考える。実際水などへの溶解度には温度により差異はあるが 2 倍程度 glucose の方が大きい溶解性を持つ。また、当然のことながら 4 位のエピマーであるため立体構造による影響も考えられる。今後は溶解度や反応試薬などの検討も行い、収率の改善を行う。

④今回の化学的変換に基づく合成糖鎖配糖体の結果として、少数であるが目的物の合成を行えた。当初予定していた糖鎖を誘導体化する方法では、crocetin の溶解性の問題や脱保護時の条件検討不足もあり収率が悪く、満足する結果は得られなかった。そこで、crocetin の誘導体化を試みたところ、一定の結果を得られたと考える。Crocetin を誘導体化することにより、糖部の多段階の保護・脱保護を省略でき、crocetin 自体の溶解性も向上した。小スケールでの検討段階であるが、glucose や xylose などの crocetin 配糖体の合成に成功したので、活性試験に用いる純度を確保できる様にスケールアップしていく予定である。

### (3) 合成糖鎖配糖体の代謝と神経細胞保護作用 (in vitro) の構造活性相関解析

上述した様に、(2)合成糖鎖配糖体の調整が予定通り進まず、報告できるほどの実験を実施できていない。最近の研究では crocin がやはり脳保護に作用しているという報告もある (*Frontiers in Pharmacology*, 2019, **10**, 440)。今回合成した配糖体について、あわせて代謝や神経細胞保護作用に対する構造活性相関について検討していく予定である。

(4) 本研究の成果として、crocetin の代謝についての知見を得た。Crocetin は腸内細菌などにより代謝を受け crocetin となり、体内に吸収されると考えられ、通常状態では経口摂取された場合はこのような体内動態になると考える。しかし、他のグループの報告などを踏まえると、脳に傷害を受けている場合は crocin の形で脳に分布するとされており、今回の腸内細菌での代謝との関係性が新たな脳腸相関の知見ではないかと考える。また、crocetin が腸内環境においては意外なほどに安定しているという結果も想定外のものであった。Crocetin に代謝後、速やかに吸収されるという報告もあるが、腸内で安定であれば、そのままゆっくりと吸収され、持続的に薬効を示すことも可能ではないかと考える。そうすれば新しい観点からの創薬シードに crocetin もなるのではないだろうか。

合成糖鎖配糖体では、合成方法の検討の結果、新規配糖体の生成を確認した。現在は少数しか crocin 類似配糖体を合成できなかったが、反応の汎用性が向上すればより多くの配糖体が合成できると考え、さらなる構造活性相関を明らかにすることができると考える。その結果、糖鎖部や神経保護作用のメカニズムの解明に役立つのではないだろうか。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土橋良太, 大久保成土朗, 中野大輔, 大川雅史, 金城順英
2. 発表標題 腸内細菌による代謝研究(15) ヒト腸内細菌によるクロシンの代謝研究
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土橋 良太 (Tsuchihashi Ryota)  (00369026)	福岡大学・薬学部・講師  (37111)	
研究分担者	中野 大輔 (Nakano Daisuke)  (30509641)	福岡大学・薬学部・助教  (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------