

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05852

研究課題名(和文) デオキシ希少糖の抗線虫活性作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of antinematode activity of deoxy-rare sugars

研究代表者

佐藤 正資 (Sato, Masashi)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：20263890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、デオキシ希少糖 1-deoxy-D-allulose (1d-Alu) が線虫 *Caenorhabditis elegans* の成長を強く阻害することを報告し、1d-Alu が糖代謝に阻害ポイントを持つ抗線虫薬となるとの着想を得た。本研究では、1d-Alu の作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、1d-Alu の合成を行い、1d-Alu 処理線虫抽出物の HPLC 分析を行った。その結果、1d-Alu は線虫体内に取り込まれており、6-リン酸化物と推定されるピークが検出された。以上から、1d-Alu の生物活性は、その代謝産物による糖代謝阻害によって起きると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物活性をもつ希少糖が生体内でどのように代謝され、どのように働くのかについて、現在までほとんど知見がない。糖代謝経路は、原核生物からヒトまで広く遺伝的に保存されているため、人畜への毒性が懸念され、薬剤ターゲットとは考えられてこなかった。しかし、本研究により、糖の取り込みや解糖系をターゲットとした新奇な作用メカニズムをもつ抗線虫薬の開発が実現できれば、熱帯医学、獣医学分野への学術的、社会的な意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We reported that the deoxy-rare sugar 1-deoxy-D-allulose (1d-Alu) strongly inhibits the growth of the nematode *Caenorhabditis elegans*, inspiring the idea that 1d-Alu could be an antinematode drug with an inhibitory point in sugar metabolism. In this study, we aimed to clarify the mechanism of action of 1d-Alu. We synthesized 1d-Alu and performed HPLC analysis of 1d-Alu-treated nematode extracts. As a result, 1d-Alu was incorporated into the nematode body, and peaks presumed to be 6-phosphate was detected. From the above results, it is considered that the biological activity of 1d-Alu is caused by the inhibition of sugar metabolism by its metabolite.

研究分野：Bioorganic chemistry

キーワード：希少糖 抗線虫薬 *Caenorhabditis elegans*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、鉤虫、糞線虫など)の感染者数は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できる薬剤は、benzimidazole系薬剤や ivermectin など数種に限られており、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に深刻である。このような背景から、従来の抗線虫薬とは全く異なる新しい作用メカニズムをもつ薬剤の開発が求められている。

自然界に、ほとんど存在しない単糖異性体を希少糖と呼ぶ。申請者は、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の幼虫を用いた生物試験を用いて、100種以上の希少糖とそれらの誘導体から抗線虫薬候補のスクリーニングを行ってきた。その結果、D-fructose の C3 エピマーである希少ケトヘキソース D-allulose (別名 D-psicose) が成長阻害活性をもつことを報告した。さらに、この D-allulose の C1 位を deoxy 化することにより(1-deoxy-D-allulose, 1d-Alu, 図1)、その活性が約 10 倍向上することを見いだした。一方、6-deoxy-D-allulose は全く活性を示さなかったことから、この活性の発現には 6 位のリン酸化が必須であると推測された。

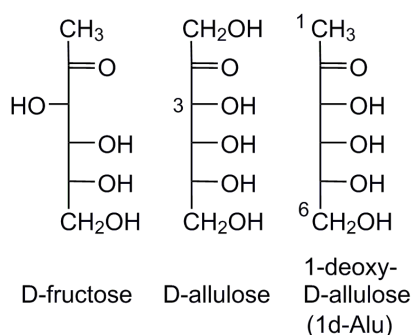


図1 1d-Alu の構造

2. 研究の目的

以上の知見から、1d-Alu は単糖を基本骨格として、糖代謝系に阻害ポイントを持つ抗線虫薬(あるいはリード化合物)となるとの着想を得た。薬剤開発においては、作用メカニズムの解明が必須である。しかし、生物活性をもつ希少糖が線虫体内でどのように代謝され、どのように働くのかについて、現在までほとんど知見がない。本研究では、1d-Alu の阻害メカニズムを明らかにするため、まず、以下の仮説を設定した。すなわち、1d-Alu は線虫細胞内に取り込まれ、糖リン酸化酵素(おそらくヘキソキナーゼ)の作用により 1-deoxy-D-allulose-6-phosphate (1d-Alu-6P)となる。この 1d-Alu-6P が線虫の糖代謝を阻害し、結果として成長阻害が起こる。この仮説を検証するために本研究では、以下の2つの実験を行った。

研究に必要な 1d-Alu および 1d-Alu-6P の合成法を確立する。

1d-Alu 処理線虫の抽出物を HPLC 分析し、1d-Alu が体内に取り込まれ、1d-Alu-6P が生成しているかどうかを確認する。

3. 研究の方法

1d-Alu の合成

本研究に必要な 1d-Alu の合成は以下の 5 工程で行った(図2)。まず、市販の D-ribonolactone

を出発原料とし、(1) 2, 3 位ジオールのアセトナイド化による保護、(2) 5 位ヒドロキシル基の TBDMS 化による保護、(3) CH_3Li による ribonolactone カルボニル基へのメチル基の求核付加、(4) TBAF による脱 TBDMS 基保護、(5) 陽イオン交換樹脂による温和な条件でのアセトナイド基保護である。

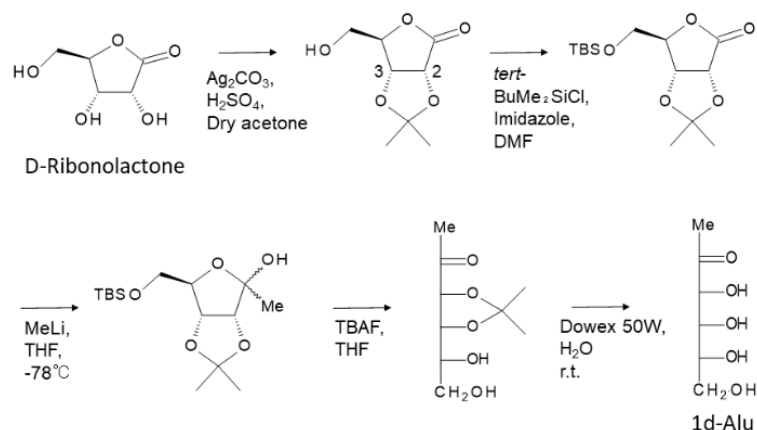


図2 1d-Alu の合成法

1d-Alu-6P の合成

次に 1d-Alu-6P を合成するため、市販の酵母ヘキソキナーゼによる 1d-Alu の 6-リン酸化を検討した。反応条件は、基質である 1d-Alu、リン酸源である ATP、ホスホエノールピルビン酸と MgCl_2 、2-メルカプトエタノールを含む溶液にヘキソキナーゼ、ピルビン酸キナーゼを加え、25 でインキュベートし、3 日おきに反応生成物を HPLC でモニターした（分析条件は と同じ）。

1d-Alu 処理線虫の抽出物を HPLC 分析

C. elegans 第 1 期幼虫約 6000 頭を液体培地 2mL で培養し 2 日後に 1d-Alu を 25mM、50mM となるように添加した。さらにもう 1 日培養し、虫体を回収、ビーズ破碎により虫体抽出液を得た。抽出液は凍結乾燥し、得られた抽出物を 4-アミノ安息香酸エチルエステル (ABEE) により蛍光誘導体化した。その試料を用いて蛍光検出 HPLC 分析を行った。

4. 研究成果

1d-Alu の合成

上記の合成法により、下記に示すような収率で 1d-Alu 合成の各反応を遂行することができた。(1) 84.6%、(2) 75.6% (3) 91.0% (4) 98.0% (5) 63.4%、総収率は 36.2% であった。

1d-Alu-6P の合成

1d-Alu-6P を合成するため、ヘキソキナーゼによる 1d-Alu の 6-リン酸化の条件を検討した。1 週間インキュベートしたところ痕跡量のピークが検出された。(ケトースは ABEE 誘導体化でジアステレオマーが発生するため 2 本のピークが観測される。37.5 分、45.2 分)。分取は不可能な量であったため、このピークを実験 において 1d-Alu-6P の保持時間を比較する標準として使用することとした。

1d-Alu 処理線虫の抽出物を HPLC 分析

方法 で述べたように、1d-Alu 処理線虫抽出物の HPLC 分析を行った。その結果、1d-Alu は線虫体内に取り込まれていることが確認され、また、その代謝産物 1d-Alu-6P のピークも検出された。以上の結果から、1d-Alu の線虫成長阻害活性は、1d-Alu の代謝産物である 1d-Alu-6P による糖代謝阻害によって起きる可能性がある と結論づけられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tebayashi, S., S. Onishi, K. Seo, M. Hiroshima, M. Sato and K. Izumori	4. 巻 56
2. 論文標題 Identification of allitol and D-allulose from <i>Itea virginica</i> as insect growth inhibitors for the control of Mediterranean flour moth, <i>Ephestia kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 357-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-021-00741-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiyama, H., R. C. Yanagita, K. Takemoto, N. Kitaguchi, Y. Uezato, Y. Sugiyama, M. Sato and Y. Kawanami	4. 巻 67
2. 論文標題 Evaluation of the Anti-Proliferative Activity of Rare Aldoexososes against MOLT-4F and DU-145 Human Cancer Cell Line and Structure-Activity Relationship of D-Idose	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 95-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2020_0006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤正資, 吉原明秀, 砂古口博文, 新谷知也, George W. J. Fleet, 何森健
2. 発表標題 希少糖デオキシ誘導体1-deoxy-D-alluloseの線虫成長阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 今井真優, 吉原明秀, 佐藤正資, 深田和宏
2. 発表標題 各種単糖の変旋光挙動に対する温度及び溶媒効果
3. 学会等名 生物物理学会中四国支部大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 石田 雅司, 手林 慎一, 磯田 童奈, 阿部 晴希, 佐藤 正資
2. 発表標題 コセンダングサ由来のオカダンゴムシに対する忌避物質としてのフェルラ酸メチルの同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 今井真優, 吉原明秀, 佐藤正資, 深田和宏
2. 発表標題 D-ブシコースの変旋光と互変異性体含有比率の継時変化
3. 学会等名 日本化学会中四国支部大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山野洋平, 飯田まみ, 佐藤正資
2. 発表標題 希少糖D-ブシコース処理線虫におけるNADH およびNAD+量の変動
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 南野 徹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------