

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：23701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20724

研究課題名（和文）糖類似アルカロイドの代謝・臓器分布－糖輸送体の関与と輸送の制御－

研究課題名（英文）Evaluation of metabolism and organ distribution of sugar mimic alkaloids with glucose transporters

研究代表者

高須 蒼生 (TAKASU, Soo)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60908458

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病などへの有効性が期待されているアザ糖の代謝物分析のための分析法の検討、代謝物の解析を進めた。

アザ糖のLC-MS分析法の改善のため、移動相への添加剤（酸やアンモニウム塩）を検討し、アザ糖の立体異性体の分離が可能となった。桑葉中のアザ糖の一種ガラクトピラノシル-DNJ（GAL-DNJ）がDNJへと代謝のされることで吸収性・生理活性が向上することがわかった。また、ガラクトシダーゼにより摂取前にもGAL-DNJの分解を進められ、桑葉のより有効な利用につながることもわかった。一方で、DNJを投与したラットの臓器を分析したが代謝物を検出することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な生理活性が期待されるアザ糖の分析法を検討した。アザ糖の立体異性体の区別がLC-MSにより容易に可能となった。未知の代謝物の解析に有効であると期待される。また、これまでは、NMRにより立体異性体が区別されていたが、本研究によりNMRよりも感度が大幅に高い分析が可能であり、植物などのアザ糖の探索にも有効と考えられる。GAL-DNJの代謝と生理活性の向上との関係を明らかにした。桑葉のより有効な利用に繋がり、糖尿病の予防などへとつながることが来される。さらに、代謝物などの解析に繋がる方法が構築できたため、今後安全性・機能性両面で体内動態からの評価を進めることにもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Aza-sugars, sugar mimetic alkaloids, show potential for the prevention and treatment of diabetes. To analyze deoxynojirimycin (DNJ) and its metabolites, I evaluated high-performance liquid chromatography (HPLC) separation of aza-sugars using various acids and ammonium salts as mobile phase additives. I successfully separated several aza-sugar isomers, which proved to be useful for the analysis of aza-sugar metabolites. 2-O-D-galactopyranosyl-1-deoxynojirimycin (GAL-DNJ) is metabolized to DNJ, enhancing its absorption and bioactivity. I have developed a method to degrade GAL-DNJ to DNJ by galactosidase. This method can enhance the functionality of mulberry leaves. Conversely, we were unable to detect any metabolites in the organs of rats administered DNJ.

研究分野：食品化学、分析化学

キーワード：アザ糖 1-Deoxynojirimycin LC-MS/MS 桑葉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アザ糖は、窒素を有することを特徴とした類似糖の総称である。天然や合成により様々なアザ糖が研究されている。特にアザ糖の一部は糖尿病の治療や予防に有効であることが報告されている。さらにアザ糖は体内へと吸収され、神経保護や抗がん作用などを発揮することも報告されている。このように有用な生理作用を有するアザ糖の利用が期待されている。アザ糖は、天然で桑葉などの植物や一部の微生物により生産されることが報告されており、これらの天然のアザ糖の医薬品や食品としての利用が期待されている。

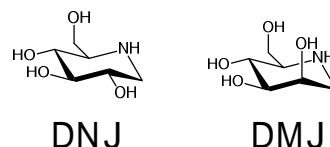


図 1 DNJ、DMJ の構造

アザ糖の生理作用は、糖尿病への確かな効果が報告されていることに加えて、脂質代謝改善や神経保護など多様な報告がある。その一方で、これらの生理作用の作用機序や安全性の評価に重要な体内動態の評価は十分ではない。これまでの研究は、多様なアザ糖の中で、天然に多く存在するデオキシノジリマイシン(DNJ)を中心に研究が進められているが、臓器への移行や輸送、代謝については研究が限られていた。

私は、これまでの研究で、桑葉中の主要なアザ糖(DNJ、ファゴミン、GAL-DNJ)をラットへと投与し、その吸収と臓器分布を報告した。さらに *in vitro* 試験でこれらのアザ糖の輸送と糖輸送体(SGLTやGLUT)の寄与を見出した。さらに詳細なアザ糖の輸送機構や代謝の解明がアザ糖のより有効かつ安全な利用につながると考えた。

2. 研究の目的

これまで、DNJ などのアザ糖の体内動態の解明のために、LC-MS 分析が主に用いられている。アザ糖には、立体異性体をはじめ、様々な種類のものが存在し、それらの生理活性には違いが見られるが、分析対象となっているアザ糖の種類は限られている。例えば、デオキシマンノジリマイシン(DMJ)とDNJなどの異性体を区別して分析することが重要である。

そこで、本研究では、DNJをはじめとするアザ糖の代謝物の解析および天然でのアザ糖のスクリーニングを進めるために、立体異性体を含むアザ糖の分離分析法の構築を進める。さらに、それを実際の生体試料へと適用し、代謝物の探索や輸送機構の評価、天然のアザ糖の探索を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アザ糖の代謝物の解析のために、これまでの LC-MS/MS でのアザ糖分析法の改良を目指した。ポイントとして、立体異性体を含む様々なアザ糖の分離の改善、含量が少ない生体内のアザ糖代謝物の LC-MS での感度向上、の二点を目指した。

まず、LC での分離を改善させるために、移動相への添加剤の検討を進めた。従来はギ酸を添加して分析を行っていたが、ギ酸・酢酸に加えて、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウムを濃度、組み合わせを変えて分析した際の分離の変化を比較した。同時にこれらの添加剤の違いによって、MS でのイオン化効率・感度が変化するかを評価した。

(2) これまでに検討した分析法を代謝物の分析へと利用した。私は桑葉中のアザ糖の代謝物として GAL-DNJ が DNJ へと代謝され、吸収や生理活性に変化が生じることを見出している。この代謝についてさらに詳細に評価、活用するために検討を行った。GAL-DNJ から DNJ への分解を想定し、ラットに GAL-DNJ と DNJ または DNJ のみを等モル量投与し、その後の血中の濃度を比較した。また、GAL-DNJ の *in vitro* での代謝・分解の評価のために、ガラクトシダーゼを処理を検討した。また、長期的に DNJ を投与したラットを使用し、臓器中のアザ糖及びその代謝物の解析を試行した。ラットへ 12 週間 DNJ を継続的に摂取させた。その後、臓器を採取した。臓器から DNJ を含むアザ糖を抽出し、LC-MS/MS により DNJ および代謝物の分析を行った。代謝物は、存在が予想されるものを仮定し、分析を行った。

(3) 天然でのアザ糖の探索に本分析法を活用するために、植物葉中のアザ糖の分析を行った。検討した分析法は、立体異性体を高感度に区別可能なため、これまでで難しかった天然中のアザ糖の精密なスクリーニングに有効と期待される。そこで、天然植物中のアザ糖の探索を行った。クワ科植物葉を粉碎後、アザ糖を抽出した。精製と濃縮のために、桑葉からのアザ糖の精製法を参考にイオン交換樹脂(強陽イオン交換樹脂 IR120B、強陰イオン交換樹脂 Dowex 1x2、弱陽イオン交換樹脂 CG50)により、アザ糖を精製した。精製物を構築した LC-MS/MS によりアザ糖の探索・同定を行った。

4. 研究成果

(1) LC での分離挙動の検討の結果、アンモニア塩の有無により分離挙動が大きく変化した。分離の変化には、移動相の pH が関わっていることが示唆された。具体的には、ギ酸添加条件では、DNJ・DMJ が分離できない一方で、アンモニウム塩の添加により、DNJ と DMJ の分離に成功した。また、感度の比較の結果、ギ酸のみ、または炭酸水素アンモニウムのみを移動相に添加した際の感度が最も良かった。これらの感度の変化の理由は異なると考えられ、その詳細の解明は、アザ糖の代謝物の分析へも活用できると考えられる。

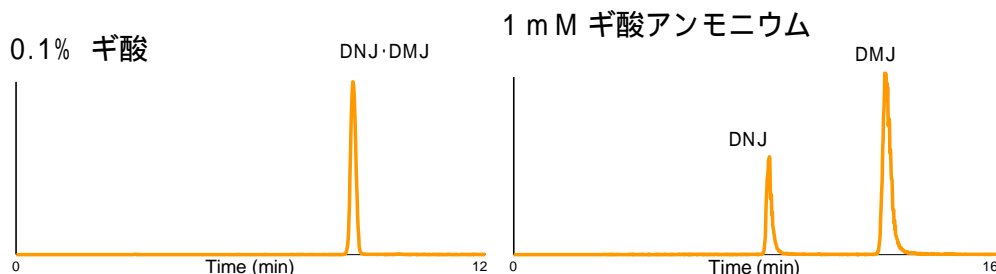


図 2 ギ酸とギ酸アンモニウムによる DNJ と DMJ の分離の違い

(2) 桑葉中のアザ糖の代謝として、GAL-DNJ が代謝され DNJ となる。この代謝による吸収性や生理活性への影響の評価をした。GAL-DNJ が DNJ へと代謝されると想定し、単回投与と試験を実施した結果、DNJ のみの投与で血中のアザ糖濃度が高くなった。GAL-DNJ は DNJ へと代謝されることで、より高い生理活性を発揮することが示唆された。さらに、 α -ガラクトシダーゼによって GAL-DNJ を効率よく分解することに成功した。これらの結果から、この分解処理が桑葉中のアザ糖の中でも含有量の多い GAL-DNJ の生理活性向上に寄与し、桑葉のより有効な利用につながると期待される。

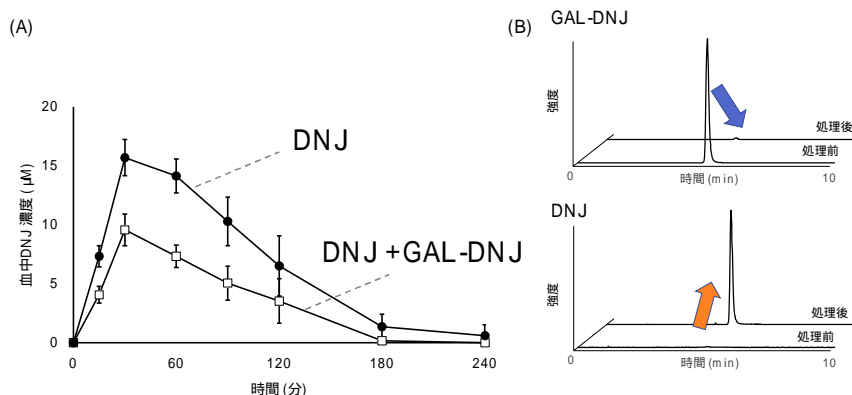


図 3 (A) DNJ と GAL-DNJ 投与後の血中アザ糖濃度の推移、DNJ : GAL-DNJ = 1 : 1、または DNJ : GAL-DNJ = 2 : 0 をラットへと投与し、血しょうを分析した。

(B) GAL-DNJ のガラクトシダーゼ処理により、DNJ が生成した。

さらに、臓器中の代謝物の探索のために、アザ糖とその代謝物の解析を行った。しかし、DNJ が存在していることを確認できた一方で、代謝物と見られるピークを検出することはできなかった。非投与群と比較しても顕著な違いは見られなかった。代謝物がより多いと予想される血中や尿中の代謝物の探索を検討している。

(3) アザ糖を豊富に含む桑葉と同じクワ科の植物葉の分析を行った。その結果、植物葉中に **DMJ** が存在していることが明らかとなった。これまでに当該植物中に **DMJ** を含むアザ糖が存在していたことは報告されてなく、初めてアザ糖が存在することを明らかにした。立体異性体の区別のために、主に **NMR** により植物中のアザ糖が同定されてきた。本分析法は **NMR** と比べて極めて感度が良く、微量のアザ糖の存在の探索・同定にも有効であることが示された。同様に他の植物中にもアザ糖が存在する可能性が示唆されており、それらの探索やアザ糖が植物中に存在することの役割などの解明につながると期待される。

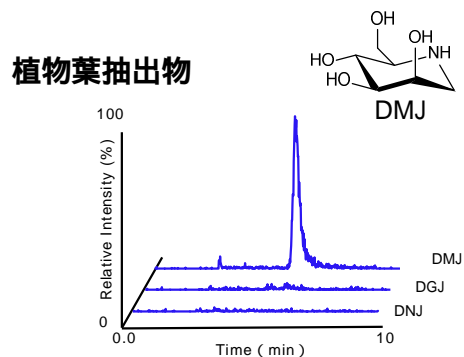


図 4 植物葉中のアザ糖の分析

本研究では、アザ糖の分析法の改善と実際の動物や植物サンプルの分析を実施した。これまでよりも精度の高い分析が可能となり、アザ糖の代謝や天然植物中のアザ糖の解析で有効な可能性が見出された。しかし、生体内でアザ糖がどのように代謝されるかやその輸送機構と臓器取り込みの関係については、評価が進められなかった。ここまでに検討した分析法は、今後のアザ糖の体内動態研究を進める上で有用であり、本研究を基盤とすることで、アザ糖の研究を進め、アザ糖のより有効かつ安全な利用に繋がると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takasu Soo, Parida Isabella Supardi, Kojima Yoshihiro, Kimura Toshiyuki, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Evaluation and development of a novel pre-treatment method for mulberry leaves to enhance their bioactivity <i>via</i> enzymatic degradation of GAL-DNJ to DNJ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 12250 ~ 12255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1fo02307a	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高須蒼生, 近添礼佳, 中溝莉緒, Parida Isabella Supardi, 須藤圭一, 鈴木誠一郎, 江坂幸宏, 木村俊之, 仲川清隆
2. 発表標題 親水性相互作用クロマトグラフィーによる植物中のイミノ糖の分離特性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中溝莉緒, 高須蒼生, パリダ イザベラ スパルディ, 伊藤隼哉, 鈴木誠一郎, 須藤圭一, 江坂幸宏, 木村俊之, 仲川清隆
2. 発表標題 LC - MS/MSによるクワ科植物葉中のアザ糖の探索と同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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