

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580122

研究課題名（和文） 希少糖エステルライブラリーからの新規な抗線虫薬の探索

研究課題名（英文） Exploration of novel anthelmintics from rare sugars and their ester derivatives

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

研究成果の概要（和文）：

モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、天然にはほとんど存在しない希少糖及びそれらのエステル誘導体の中から新たな抗線虫薬を探すスクリーニングを行った。その結果、アルドヘキソースの一つである D-アロース（D-グルコースの C3 エピマー）に抗線虫活性を認めた。D-アロースを脂肪酸エステル化することによりその活性が上昇すること、脂肪酸エステルの中で 6-*O*-オクタン酸エステルが最も活性が強いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Rare sugars and their ester derivatives were examined for anthelmintic activity against the nematode *Caenorhabditis elegans*. Among the aldohexose stereoisomers, D-allose, the C3 epimer of D-glucose, inhibited the growth of *C. elegans*. We found that fatty acid esters of D-allose surpassed the sugar itself in anthelmintic activity. 6-*O*-octanoyl-D-allose showed the strongest toxicity among the fatty acid esters of D-allose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学，生物生産化学・生物有機化学

キーワード：希少糖・抗線虫薬・*C. elegans*

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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、寄生線虫(回

虫、蟯虫、鉤虫、糸状虫など)の感染者数は全世界で 30 億人以上と見積られている。しかし、寄生線虫症の治療に使用される薬剤は非常に限られており、薬剤抵抗性線虫の出現

が問題視されている。これは家畜の寄生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新しい作用モードを持つ薬剤の開発が望まれている。

(2) 平成 14 年から 19 年にかけて、知的クラスター創生事業（文部科学省）「希少糖を核とした糖質バイオクラスター」研究が産学官連携体制で行われた。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。香川大学の何森は糖異性化酵素バイオリクターを用いて、今まで非常に高価であった希少糖を安価に生産する技術を確認した。それにより、これまでほとんど研究されていなかった希少糖の生物活性（糖尿病抑制、癌細胞増殖抑制、血管新生阻害、植物成長調節作用など）が次々と明らかになった。

(3) 研究代表者は、モデル生物である非寄生性線虫 *C. elegans* を用いて、希少糖の中から新たな抗線虫薬候補を探すスクリーニングを行った。その過程で、ケトヘキソースである D-フルクトースの C-3 エピマーである D-プシコースのみが *C. elegans* 幼虫の成長を抑制することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、希少糖がモデル線虫 *C. elegans* の成長を抑制することを見いだした。本研究では、それをさらに発展させ、希少糖（アルドヘキソース異性体）とそれらを骨格とするエステル誘導体を合成し、ここから新たな抗線虫薬候補の探索をすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) アルドヘキソース異性体の調製

アルドヘキソースの異性体は香川大学希少糖研究センターにおいて、異性化酵素を用いて合成された（図 1）。

### (2) D-アロースのエステル誘導体の合成

アシル化剤として脂肪酸ビニルエステルを用い、有機溶媒中でリパーゼと反応させ、エステル化を行う。この反応により、糖の第一級水酸基を選択的にエステル化できる（図 1）。*C. elegans* 成長抑制活性への炭素鎖長の寄与を明らかにするために、様々な炭素鎖長（C4~C12）を持つ脂肪酸エステルを合成した。

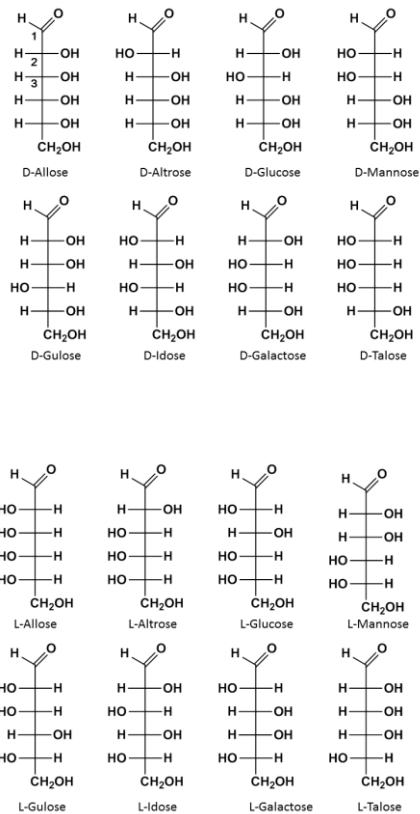


図 1 アルドヘキソース異性体

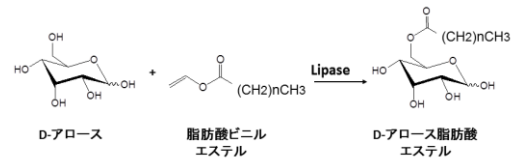


図 2 アロース脂肪酸エステルの合成法

### (3) *C. elegans* によるバイオアッセイ

培養容器に 24 ウェルプレートを用い、各ウェルに試料を含んだ液体培地と、同調培養により得た孵化直後の *C. elegans* 幼虫を約 10 頭入れ、20°C で 72 時間、静置培養を行った。アルドヘキソースについては以下の方法で成長阻害活性を評価した。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。また、脂肪酸エステル毒性の評価は、顕微鏡下で線虫の生死を判定し、50%致死濃度(LC50値)をプロビット法により計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) アルドヘキソース異性体の成長阻害活性

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, タロース計 16 種の糖の成長阻害活性を調べた。その結果, D-アロース, D-タロース, L-イドースに成長阻害活性を認め, IC50 値はそれぞれ 200mM, 281mM, 121mM となった。それ以外の異性体には成長阻害活性は, ほとんど認められなかった。

##### (2) D-アロースエステル誘導体の殺線虫活性

(1)の結果と糖の調製のしやすさを考慮して, D-アロースについてさらに誘導体化を行い, 殺線虫活性を調べることにした。

D-アロースの 6-O-オクタン酸エステル (D-A11-C8), 6-O-デカン酸エステル (D-A11-C10), 6-O-ドデカン酸エステル (D-A11-C12), 対照として D-グルコースの 6-O-オクタン酸エステル (D-G1c-C8) について殺線虫活性を調べた (表 1)。D-A11-C8 と D-A11-C12 の LC50 値はそれぞれ, 204  $\mu$ M, 343  $\mu$ M となり, D-アロースが成長阻害活性を現した濃度の約 1/1000 で殺線虫活性があることが判明した。脂肪酸そのもの (オクタン酸 C8, デカン酸 C10, ドデカン酸 C12) についても試験を行い, 炭素鎖が長くなるにつれ活性が強まるという結果を得た (LC50 値はそれぞれ 3478  $\mu$ M, 812  $\mu$ M, 227  $\mu$ M)。D-A11-C10, D-A11-C6, D-A11-C4 と D-G1c-C8 は殺線虫活性を認めなかった。

オクタン酸 (C8) と D-G1c C8 に活性がないことから D-A11 C8 の活性は D-Allose と脂肪酸の相乗効果が考えられた。ドデカン酸 (C12) には強い殺線虫活性があったことから, D-A11 C12 の活性は加水分解された脂肪酸の寄与が大きいと考えられた。

表1 D-アロース脂肪酸エステルと脂肪酸の殺線虫活性 (LC<sub>50</sub>)

D-A11 C8	204 $\mu$ M
D-A11 C10	>1250 $\mu$ M
D-A11 C12	343 $\mu$ M
-----	
D-Glc C8	>1250 $\mu$ M
-----	
C8	3478 $\mu$ M
C10	812 $\mu$ M
C12	227 $\mu$ M

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①砂古口博文, 佐藤正資, 自活性線虫を用いた化学物質のバイオアッセイ法に関する研究 (II) 香川県環境保健研究センター所報, 査読無, 11, 31-34 (2012).

②砂古口博文, 佐藤正資, 自活性線虫を用いた化学物質のバイオアッセイ法に関する研究 (I) 香川県環境保健研究センター所報, 査読無, 10, 29-32 (2011).

[学会発表] (計 3 件)

①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異性体の線虫成長阻害活性, 日本農芸化学会中四国支部講演会, 2013. 6. 8, 松江.

②砂古口博文, 川浪康弘, 何森健, 佐藤正資, 希少糖とそれらの脂肪酸エステル誘導体の抗線虫活性, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012. 3. 25, 京都.

③T. Yamasaki, M. Sato, D-Psicose inhibits the growth of L1 stage *Caenorhabditis elegans*: a possible inhibition mechanism, 3rd International Conference on Drug Discovery and Therapy, 2011. 2. 7, Dubai, UAE.

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

川浪 康弘 (KAWANAMI YASUHIRO)  
香川大学・農学部・教授  
研究者番号：30169742