

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：36102

研究種目：基盤（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590031

研究課題名（和文）キノコ類、地衣類および苔類より糖尿病予防物質の探索

研究課題名（英文）Search for Antidiabetic Principles from Mushrooms, Lichens, and Liverworts

研究代表者

橋本 敏弘 (HASHIMOTO TOSHIHIRO)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：10075955

研究成果の概要（和文）：

最近、中・長鎖遊離脂肪酸の受容体であるGPR120 および GPR40は、血糖値を下げるホルモン「インスリン」の分泌を促進するすい臓内物質G蛋白質共役型受容体 (GPCR)として注目されている。ニンギョウタケモドキ科キノコ類から単離されるGrifolin, Grifolic acid, およびGrifolic acid methyl etherは、GPR120選択的リガンドとして見出された。抗糖尿病作用を示す食用キノコ類ハナビラタケ(*Sparassis crispa*)から単離された不飽和脂肪酸は、GPR40アゴニストおよびGPR120アンタゴニストとして働くことが明らかになった。食用地衣類イワタケ (*Umbilicaria esculenta*)より、強力な α -glucosidase阻害活性を示す4種の新規芳香族化合物の単離を行った。苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)、フタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*)から強力なSGLT2阻害作用を示すビスビベンジル化合物、Marchantins A, B & Eが単離された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, GPR120 and GPR40 are G-Protein coupled receptors (GPCR) whose endogenous ligands are medium- and long-chain free fatty acids, and they are thought to play an important physiological insulin release. Grifolin, grifolic acid and grifolic acid methyl ether from mushrooms belonging to *Albatrellus* were found as the selective GPR120 ligands. Two unsaturated fatty acids from the edible mushroom *Sparassis crispa* showing antidiabetic activity works as GPR40 agonist, and as GPR120 antagonist. Four novel aromatic compounds from the edible lichen *Umbilicaria esculenta* showed the strong α -glucosidase inhibitory activities. Bis(bibenzyls), marchantins A, B and E from the liverworts *Marchantia polymorpha* and *M. paleacea* showed the strong SGLT2 inhibitory activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	1600,000	480,000	2080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生薬・天然物化学

1. 研究開始当初の背景

私共はここ 20 年にわたり、苔類、キノコ類、冬虫夏草、地衣類の薬理活性物質の探索を進め、抗菌、抗かび、抗腫瘍活性などの興味ある生理活性を有する数多くの新規テルペノイドおよび芳香族化合物を単離した。

わが国の糖尿病患者数は、食生活の欧米化などの生活習慣と社会環境の変化に伴って急速に増加している。今後も社会の高齢化にしたがって、糖尿病患者数が増大することが懸念され、副作用の少ない治療薬の開発が全世界で行われている。糖尿病薬の一種である α -グルコシダーゼ阻害物質を、キノコ類、地衣類および苔類から探索する研究は、世界でほとんど行われていなかった。血糖値を下げるホルモン「インスリン」の分泌を促進するすい臓内物質 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が、最近見言い出され、世界中の研究者によりアゴニスト、アンタゴニストの探索が行われている。キノコ類、地衣類および苔類から GPCR アゴニスト、アンタゴニストの探索する研究は、世界で類を見ない。

2. 研究の目的

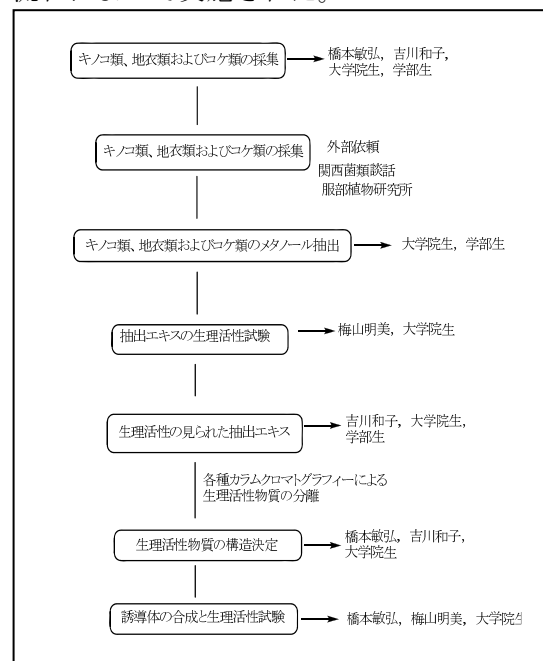
近年、食生活の欧米化による糖尿病の増加が社会問題になっている。糖尿病予防薬として、 α -グルコシダーゼ阻害薬が知られている。また最近、血糖値を下げるホルモン「インスリン」の分泌を促進するすい臓内物質 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) が発見されている。GPCR には、GPR40, GPR120 が知られている。GPR40 は、中・長鎖遊離脂肪酸の受容体で、Insulin の分泌に関与し、また GPR120 は、長鎖遊離脂肪酸の受容体であり、GLP-1 の分泌に関与していることが明らかになっている。また糖尿病の場合、SGLT2 の働きを阻害すれば、尿中ブドウ糖排泄が促進されることが明らかになっている。 α -グルコシダーゼ阻害作用、GPCR 活性化作用、および SGLT2 阻害作用を指

標として、キノコ類、冬虫夏草、地衣類および苔類より、糖尿病予防薬の探索を行う。

3. 研究の方法

四国各地で採集したキノコ類、地衣類および苔類は、エーテル、酢酸エチル、メタノールなどを用いて抽出した。1g 以上得られた抽出エキスは、 α -グルコシダーゼ阻害活性、GPCR 活性化作用および SGLT2 阻害活性を指標として、シリカゲルおよび Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分画し、さらに高速液体クロマトグラフィーにより、活性物質の単離を行った。新規化合物の構造は、高分解能 NMR スペクトルなどにより明らかにした。また新規化合物の誘導体を合成し、構造活性相関についても検討した。日本産冬虫夏草の子実体および培養液より新規抗糖尿病物質の単離についても検討した。

課題研究は、下図の様な担当者の役割の流れによって実施された。

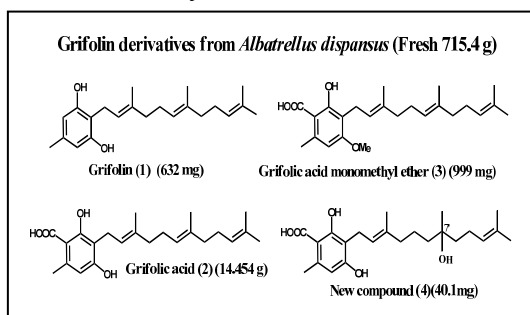


4. 研究成果

1) キノコ類より G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 活性化物質の検索研究

最近、血糖値を下げるホルモン「インスリ

ン」の分泌を促進するすい臓内物質 G 蛋白質質共役型受容体 (GPCR)が注目されている。GPCR には, GPR40, GPR120 が知られている。GPR40 は, 中・長鎖遊離脂肪酸の受容体で, Insulin の分泌に関与し, また GPR120 は, 長鎖遊離脂肪酸の受容体で, GLP-1 の分泌に関与していることが明らかになっている。キノコ類から単離される天然物についてスクリーニングを行ったところ, GPR40 及び GPR120 に特異的に作用する物質を見出した。GPR40 及び GPR120 両受容体遺伝子を, 誘導発現できる T-REx 細胞系に組み込み, 細胞株を樹立した。この細胞をキノコ由来の天然化合物で刺激し, 細胞外シグナル調整キナーゼ (ERK)の活性化を検討した。また同時に, それら化合物の刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇も測定した。両受容体に特異的に結合する化合物の探索研究を, キノコ類を中心に行ったところ, 食用キノコ, ニンギョウタケ (*Albatrellus confluens*)に含まれる Grifolin (1), Grifolic acid (2)およびコウモリタケ (*Albatrellus dispansus*)に含まれる Grifolic acid monomethyl ether(3)が見出された。



特に化合物 3 が, 最も強く GPR120 の ERK の活性化を阻害 (Fig.1)し, 細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少 (Fig.2)したことにより, 選択的 GPR120 アンタゴニストであることが分かった。化合物 2 と 3 は, GPR40 に対してはアゴニスト作用もアンタゴニスト作用も示さなかった。化合物 2 は, GPR120 に対して弱いアゴニスト作用が確認されたため, パーシャ

ルアゴニストとして作用している可能性が考えられた。

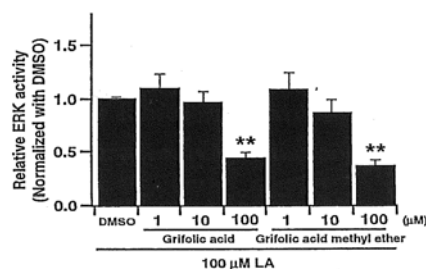


Fig.1 Inhibition effects of 2 and 3 on ERK activation in FLP-in GRP120 cells.

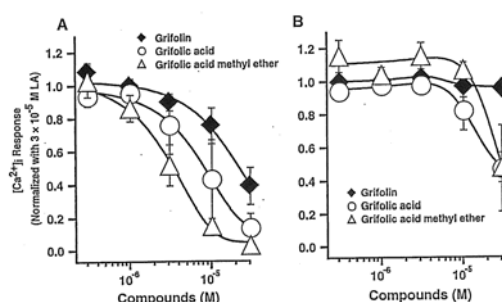


Fig.2 Inhibition curves of $[Ca^{2+}]_i$ response induced by LA with 1-3 in FLP-in GR120 (A) and T-Rex GPR40 cells (B).

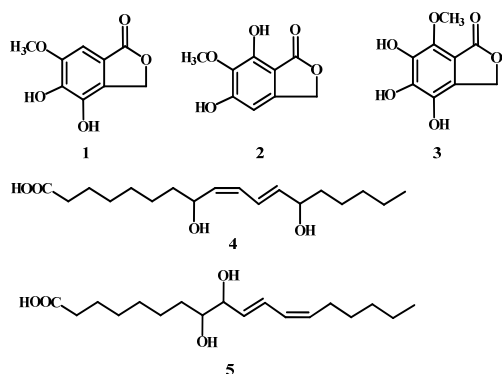
In vivo テストのために, 大量の 1~3 の単離を行った。2011 年, 岐阜県中津川市で採集したコウモリタケ (Fresh 715.4g) のメタノール抽出エキスについて, シリカゲルカラムクロマトを繰り返し行い, Grifolin (1)(632 mg), Grifolic acid (2)(14.454g), Grifolic acid monomethyl ether (3)(999 mg), 新規化合物 (4)(40.1mg)を単離した。また 2011 年, 岐阜県中津川市で採集したコウモリタケ (Fresh 5.60 kg) のメタノール抽出エキスのシリカゲルカラムクロマトを繰り返し行い, Grifolin (1)(17.22 g), Neogrifolin (5)(11.92g)を単離した。構造活性相関を明らかにするため誘導体 (6~8)を用いる GPR40, GPR120 に対する活性試験について検討したが, これら化合物には生理活性は見られなかった。活性には, 芳香環にサリチル酸部分が重要であることが明らかになった。

Grifolic acid (2)および Grifolic acid monomethyl ether(3)の GPR120 に対する生理活性メカニズムを解明するために,

Université de Bourgogne 大学の Naim A. KHAN 教授との共同研究を開始した。

ハラケシメジや霊芝などのいくつかのキノコにおいては、I型およびII型糖尿病に対する有用性が動物実験レベルにおいて見出されている。そこで食用キノコのアナヒラタケ (*Sparassis crispa*) について、糖尿病モデル動物を用いて糖尿病の有用性に対する有用性を検討した。ストレプトゾトシン (STZ) をラットに静脈投与し、1週間後の採血にて血糖値が 300mg/dL 以上を呈したものを I 型糖尿病モデルラットとして使用した。対象として STZ を投与しないラットも使用した。これらのラットを、血糖値を指標として群分けし、アナヒラタケ (SC) を混餌投与 (1000mg/kg/day) した。下図に示すように Normal (STZ 非投与) 群では、SC 投与は血糖値に影響を与えないが、STZ 投与群においては、アナヒラタケ (SC) の投与は血糖値の上昇を有意に抑制することが示された。

食用キノコ、アナヒラタケ (*Sparassis crispa*) をメタノールで抽出、その酢酸エチルエキスをシリカゲルカラムクロマトにより精製し、3 種の新規イソベンゾフラン化合物 (1~3) および 2 種の不飽和脂肪酸 (4, 5) など 11 種の化合物が単離された。



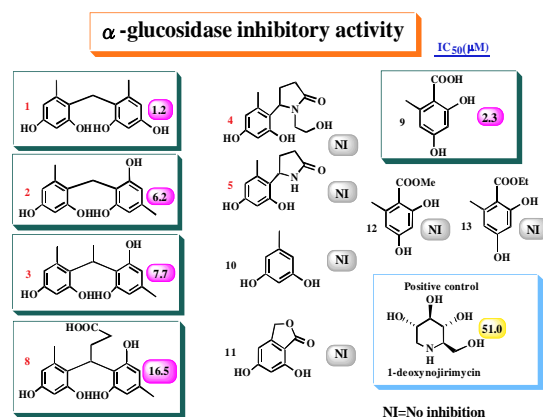
アナヒラタケから単離された不飽和脂肪酸 (4, 5) が GPR40 に対してアゴニストとして作用し、GPR120 に対してはアンタゴニストとして作用していることが見出された。

2) 食用地衣類イワタケより α -グルコシダーゼ阻害物質の単離と構造決定

糖尿病予防薬である α -グルコシダーゼ阻害薬は、糖質の分解、吸収を阻害もしくは遅延し、食事の後の血糖の急激な上昇を抑制する薬物である。 α -グルコシダーゼ阻害薬の検索を、食用キノコ類、食用地衣類の抽出エキスについて行った。最も強い阻害活性を示した食用地衣類イワタケ (*Umbilicaria esculenta*) から α -グルコシダーゼ阻害活性物質の単離を行った。

2010~2011 年 9 月~10 月徳島県で採取したイワタケ(乾燥 0.8 kg)を 70% EtOH で抽出し、酢酸エチル可溶画分(33.4g)を順相、逆相カラムで分離精製を繰り返し行い、8 種の新規芳香族化合物 (1~8) および 5 種の既知化合物 (9~13) を単離した。

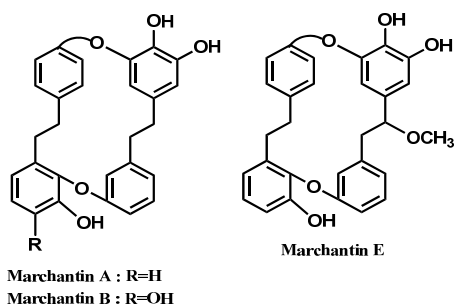
Dahlqvist の方法を一部改良した 3,5-ジニトロサリチル酸法(DNS)を用いて α -グリコシダーゼ阻害活性試験を行った。イワタケより単離された化合物について α -glucosidase 阻害活性を行ったところ、新規化合物 1, 2, 3 及び 8 と既知化合物 9 に positive control の 1-deoxynojirimycin(DNJ)と比較して約 5-50 倍の活性を示した。



最も阻害活性の強かった新規化合物 1 については本学の研究室との共同研究で全合成も行い、*in vivo* 試験について検討中である。

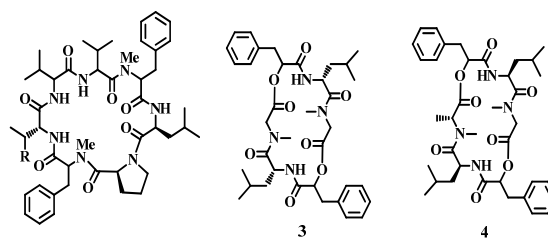
3) 苔類より抗糖尿病作用物質の検索

新しい糖尿病治療薬として、SGLT2 阻害薬の研究開発が世界的に活発に行われている。糖尿病の場合、この SGLT2 の働きを阻害すれば尿中ブドウ糖排泄が促進され、インスリンを介さない新しい作用で高血糖状態が改善される。SGLT2 阻害活性を調べたところゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*), フタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*)に強い阻害活性が見られた。両苔類の SGLT2 阻害物質の単離を行い、大量に単離された Marchantins A, B & E が強い SGLT2 阻害活性を有することを明らかにした。

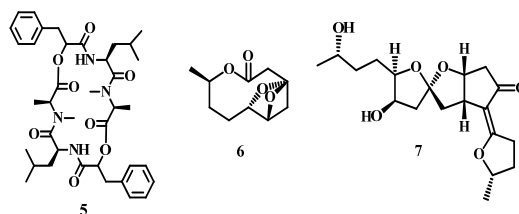


4) 冬虫夏草より抗糖尿病作用物質の検索

日本で民間薬的に使用されている冬虫夏草の一種であるオオセミタケ (*Ophiocordyceps heteropoda*)のメタノールエキスより、新規環状ペプチドheteropodamides A (1), B (2)を単離した。冬虫夏草菌 *Cordyceps cardinalis* NBRC103832をポテトスクロース培地で約2ヶ月間静置培養し、培地上の菌体をメタノールとクロロホルムで抽出後、抽出エキスより、3種の新規環状デプシペプチド (3~5)を単離した。同様に冬虫夏草菌 *Cordyceps* sp. NBRC 106954 の培養抽出物より、10員環マクロライドを含む8種の新規化合物 (6, 7など)を単離した。単離された新規化合物に対する抗糖尿病活性については、現在検討中です。



1: R=CH₂CH₃ heteropodamide A
2: R=CH₃ heteropodamide B



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 23 件)

- ① Yoshikawa, K.; Ito, T.; Iseki, K.; Baba, C.; Imagawa, H.; Yagi, Y.; Morita, H.; Asakawa, Y.; Kawano, S.; Hashimoto, T., Phenanthrene Derivatives from *Cymbidium* Great Flower Marie Laurencin and Their Biological Activities, *Journal of Natural Products*, 査読有, Vol. 75, **2012**, 605-609.
- ② Iwai, Y., Murakami, K., Gomi, Y., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Okuno, Y., Ishikawa, T., Hatakeyama, D., Echigo, N., and Kuzuhara, Anti-influenza activity of marchantins, macrocyclic bisbibenzyls contained in liverworts, *PLoS One*, 査読有, Vol. 6, **2011**, 19825.
- ③ Yoshikawa, K., Kokudo, N., Hashimoto, T., Yamamoto, K., Inose, T., and Kimura, T., Novel phthalide compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), hanabiratakelide A-C, exhibiting anti-cancer related activity, *Biol. Pharm. Bull.* 査読有, Vol. 33, **2010**, 1355-1359.

[学会発表] (計 45 件)

- ① 冬虫夏草菌 *Beauveria brongniartii* NBRC 104339の培養抽出物より得られた新規10員環化合物の構造, ○ 林明香, 梅山明美,

Aleksandra Grudniewska, 加藤雅之, 清水美名, 岡本育子, 末永みどり, 伴さやか, 熊田俊夫, 橋本敏弘, 日本薬学会第133春期年会 (横浜), 2013. 3.28-30.

- ② イボタケ科キノコ, ボタンイボタケより得られる新規p-Terphenyl化合物, ○橋本敏弘, 山崎さやか, 吉川和子, 梅山明美, 田中正己, 末永みどり, 浅川義範, 日本薬学会第133春期年会 (横浜), 2013. 3.28-30.
- ③ 食用キノコ, シロナメツムタケの NGF 産生促進作用物質の検索, 吉川和子, 加藤啓子, 井ノ瀬利明, 木村 隆, 福山愛保, ○橋本敏弘, 第4回食品化学シンポジウム (東京), 2011.10.28-29.
- ④ 冬虫夏草 *Ophiocordyceps heteropoda* および 海洋微生物 *Photobacterium* sp. の新規環状ペプチドの単離と構造, ○梅山明美, 岡田みのり, 中村由佳里, 末永みどり, 中野真代, 今川洋, 橋本敏弘, 熊田俊夫, 足立恭子, 奥直也, 川端兆隆, 志津里芳一, 石山亜紀, 乙黒一彦, 大村智, 第53回天然物化学討論会 (大阪), 2011.9.27-29.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計5件)

名称: ハナビラタケの抗糖尿病作用

発明者: 吉川和子, 橋本敏弘, 平澤明, 辻本豪三, 山本恭介, 井ノ瀬利明, 木村隆

権利者: (株) ユニチカ

種類: 特許

番号: JP 2010-059106

出願年月日: 2010年3月18日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計3件)

名称: FXR活性化を介したコレステロールホメオスタシス関連遺伝子転写活性調製剤

発明者: 井上和秀, 早川堯夫, 浅川義範, 橋本敏弘

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許

番号: 特許第4825977号

出願年月日: 2011年11月3日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/~shouyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 敏弘 (HASHIMOTO TOSHIHIRO)

徳島文理大学薬学部・教授

研究者番号: 10075955

(2) 研究分担者

梅山 明美 (UMEYAMA AKEMI)

徳島文理大学薬学部・准教授

研究者番号: 40160329

吉川 和子 (YOSHIKAWA KAZUKO)

徳島文理大学薬学部・講師

研究者番号: 40166921

(3) 連携研究者

(1) 平澤 明 (HIRASAWA AKIRA)

京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野・准教授

(2) Naim A. KHAN Professor

Université de Bourgogne