

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450156

研究課題名(和文) 抗老化効果をもつカロリー制限模倣物質の探索 - 希少糖とそのデオキシ誘導体から

研究課題名(英文) Exploitation of caloric restriction mimetics from rare sugars and their deoxy 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、多数の希少糖デオキシ誘導体を網羅的に酵素合成し、そこから線虫寿命延長活性を指標として抗老化活性をもつカロリー制限模倣物質(CRM)の候補を探索することである。合成した1-あるいは6-デオキシケトヘキソース、6-デオキシアルドヘキソース異性体を、予備試験としての幼虫成長阻害試験に供した。その結果、ひとつのデオキシ希少糖に強い成長阻害活性を認めた。このデオキシ希少糖は線虫の寿命を延長し、CRMの候補物質となることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to explore calorie restriction mimetics (CRM) from deoxy derivatives of monosaccharides (deoxy rare sugars). We enzymatically synthesized various deoxy rare sugars including 1- and 6-deoxy derivatives of ketohexoses, and 6-deoxy derivatives of aldohexoses. These deoxy rare sugars were subjected to preliminary screening by evaluating growth inhibition activity against the nematode *Caenorhabditis elegans*. As a result, a deoxy rare sugar exerted strong inhibition activity. The deoxy rare sugar also extended *C. elegans* lifespan. These results indicate that the deoxy rare sugar is a candidate CRM.

研究分野：生物活性化学

キーワード：希少糖 カロリー制限模倣物質 抗老化 線虫

1. 研究開始当初の背景

食餌における摂取カロリーの制限は実験動物の寿命を延長することが知られている。ヒトにおいても、カロリー制限は糖尿病、癌、アルツハイマー病など老化に伴う疾患の発症を遅らせ、その結果、寿命を延長すると考えられている。その詳細な分子メカニズムは明らかではないが、細胞内エネルギーレベルの低下がインシュリン様シグナル経路、サーチュイン、TOR (Target of rapamycin)などの複数のエネルギーセンサーによって媒介され、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)などの抗酸化酵素の発現増強やミトコンドリア機能の保全などが誘導される。その結果、寿命延長が起こると考えられている。このように注目を集めるカロリー制限であるが、栄養のバランスを保ちながらカロリー制限を長期間続けることは困難と苦痛を伴う。そこで、食事と一緒に摂取することでカロリー制限と同様の抗老化効果が得られるカロリー制限模倣物質の開発が注目されている。これまで、カロリー制限模倣物質の候補として、サーチュインを活性化するレスベラトロール、TORを阻害するラパマイシンなどが報告されているが、効果や毒性に問題があり、実用化されたものは無い。

希少糖とは、自然界にまれにしか存在しない単糖と定義される。香川大学では、何森らを中心として、今まで非常に高価であった希少糖を、異性化酵素バイオリアクターを用いて簡便に生産する技術を確立した。その結果、ケトヘキソース、アルドヘキソースの D、L-体を含めて全ての立体異性体を生物試験に供給することが可能となり、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 (血糖値抑制、肥満抑制など) が明らかになった。研究代表者である佐藤は、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いて、これらの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、ケトヘキソース立体異性体 8 種 (D、L-フルクトース、プシコース、タガトース、ソルボース) のうち、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。

この結果から、我々は糖代謝抑制効果をもつと考えられる D-プシコースがカロリー制限模倣物質として働き、動物の寿命を延長する効果があるのではないかと考えた。*C. elegans* 成虫を用いて寿命延長試験を行ったところ、D-プシコースを含む培地で培養した成虫の寿命は約 20% 延長した。しかし、D-プシコースによる寿命延長は 28 mM (0.5%) の高濃度が必要であり、そのままでは実用化は難しいと考えられた。そこで、活性向上を期待し、ケトヘキソースおよびアルドヘキソースのデオキシ誘導体からのスクリーニングを行うことを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、自然界にまれにしか存在しない単糖 (希少糖) とそのデオキシ誘導体の立体異性体を酵素的に合成する。その中から、線虫寿命延長活性をスクリーニングの指標として、カロリー制限模倣物質の候補を探索する。

3. 研究の方法

(1) デオキシ-ケトヘキソース異性体の酵素的合成

この合成法の特徴は、以下の 3 つの反応を組み合わせることである (図 1) (i) 還元反応 (ラネーニッケル触媒)、(ii) ポリオールの位置選択的酸化反応 (*Enterobacter* 由来デヒドロゲナーゼ)、(iii) ケトース 3 位の位置選択的エピ化 (D-タガトース-3-エピメラーゼ)。出発原料 L-ラムノース (1) を (i) の反応によりポリオール (2) に還元した。次に (ii) により 2 の 2 位を位置選択的に酸化し 6-デオキシ-L-フルクトース (3) を得た。(iii) により 3 の 3 位を位置選択的にエピ化し 6-デオキシ-L-プシコース (4) を得た。さらに 4 を (i) で還元し、生じたジアステレオマーの一方をキラルクロマトグラフィーにより分離する。得られた 6-デオキシ-L-アリトール (5) を (ii) により 1-デオキシ-D-プシコース (6) へ、さらに (iii) によりエピ化し 1-デオキシ-D-フルクトース (7) を得た。この一連の反応で 4 種類のデオキシ-ケトヘキソースを合成した。

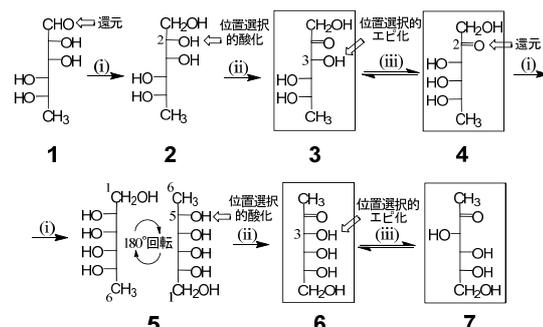


図 1 デオキシ-ケトヘキソースの合成法

4 を還元した際に生成するもう一方のジアステレオマーからは 1-デオキシ-L-タガトースと 1-デオキシ-L-ソルボースが合成できた。

6-デオキシ-アルドヘキソースは、合成した 6-デオキシ-ケトヘキソースを微生物由来イソメラーゼによって立体選択的に異性化することで得た。

(2) デオキシ-ケトヘキソース異性体の生物活性

(a) *C. elegans* 幼虫を用いた予備試験

試験容器は 24well-セルカルチャープレートを用いた。被験糖と餌の大腸菌を溶解した

液体培地を 1well あたり 200 μ L 加え、そこに幼虫約 20 頭を入れた。20 で 3 日間培養後、線虫個体の顕微鏡写真を撮影し、画像処理ソフトを用いて体側面の面積を計測した。試料を含まない培地で培養した対照線虫の面積を 100% として、線虫の成長を % で表した。

(b) *C.elegans* 成虫を用いた寿命延長試験

以下の方法で寿命延長試験を行った。試験容器は 96well セルカルチャープレートを用いる。被験糖と餌の大腸菌を溶解した液体培地を 1well あたり 100 μ L 加え、そこに成虫 1 頭を入れる。餌のみの対照区と試料区、それぞれ約 100 頭で試験を開始する。20 で培養し、1-2 日おきに成虫の生死を顕微鏡下で観察した。得られた結果から、生存曲線を作成し、Log-rank 法により寿命延長の有意差を判定した。

4. 研究成果

(1) デオキシ-ケトヘキソース異性体の酵素的合成

上記の方法で、計 30 種のアルドヘキソース、ケトヘキソースのデオキシ誘導体、ポリオール異性体を合成した。

(2) デオキシ-ケトヘキソース異性体の生物活性

(a) *C.elegans* 幼虫を用いた予備試験

合成した単糖誘導体の寿命延長活性を行う前に予備試験を行った。その中で 1-デオキシ-D-ブシコースのみが顕著な成長阻害活性を示した。それ以外の単糖誘導体には活性が見られなかった。結果のうち、1-デオキシケトヘキソース 8 種の結果のみ図 3 に示す。

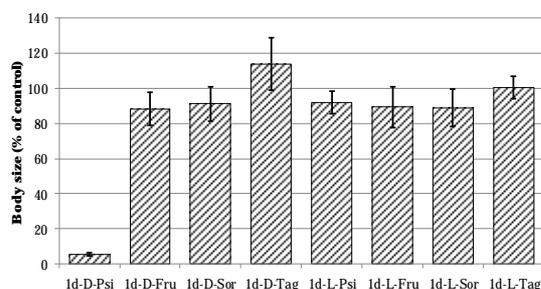


図 2 1-デオキシケトヘキソースの成長阻害活性

(b) *C.elegans* 成虫を用いた寿命延長試験

予備試験で選抜された 1-デオキシ-D-ブシコースの寿命試験を行った。処理濃度は 5mM, 10mM で試験を行った。その結果、生存中間値は、対象区 19 日、5mM 処理区

19 日、10mM 22 日となり、対照線虫の寿命と比較して 10mM 処理線虫に有意な延長が認められた (図 3)。

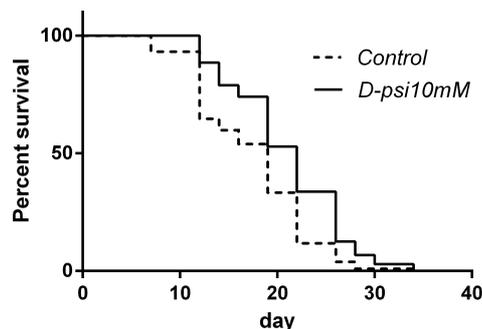


図 3 1-デオキシ-D-ブシコース処理線虫の寿命曲線

これらの結果から、1-デオキシ-D-ブシコースは D-ブシコースの約 1/2 の濃度で寿命延長活性を示すことが明らかになった。このことから、1-デオキシ化した D-ブシコースは、D-ブシコースそのものより低容量でカロリー制限 (抗老化) 効果をもつ可能性が示唆された。

以上、本研究により D-ブシコースより効果的な CRM の候補物質をデオキシ誘導体から探索することができた。

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)

Sakoguchi H, Yoshihara A, Shintani T, Okuma K, Izumori K, Sato M. Growth inhibitory effect of D-arabinose against the nematode *Caenorhabditis elegans*: Discovery of a novel bioactive monosaccharide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26: 726-729.

Sakoguchi H, Yoshihara A, Izumori K, Sato M. Screening of biologically active monosaccharides: growth inhibitory effects of D-allose, D-talose, and L-idose against the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016; 80: 1058-1061.

[学会発表](計 6 件)

佐藤正資, 砂古口博文, 吉原明秀, 新谷知也, 大隈一裕, 何森 健. 化学合成培地中の D-ブシコースの線虫寿命延長活性. 日本農芸化学会 2016 年度大会; 2016 年 3 月; 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市).

砂古口博文，吉原明秀，新谷知也，大隈一裕，何森 健，佐藤正資. aldohexose 異性体の線虫成長阻害活性メカニズム. 日本農芸化学会 2016 年度大会; 2016 年 3 月; 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

砂古口博文，吉原明秀，新谷知也，大隈一裕，何森 健，佐藤正資. デオキシ-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 2015 年度大会; 2015 年 3 月; 岡山大学(岡山県・岡山市).

Sato M, Sakoguchi H, Shintani T, Okuma K, Izumori K. Lifespan-extending effect of the rare sugar D-psicose on *Caenorhabditis elegans*. The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting; 2014 年 7 月; Nara, Japan.

佐藤正資，砂古口博文，新谷知也，大隈一裕，何森 健. 希少糖からの抗老化物質の探索 - 線虫寿命試験法の改良. 日本農芸化学会中四国支部第 38 回講演会; 2014 年 1 月; 香川大学(香川県・三木町).

佐藤正資，砂古口博文，新谷知也，大隈一裕，何森 健. 希少糖 D-プシコースの *C.elegans* 寿命延長効果. 第 36 回日本分子生物学会年会; 2013 年 12 月; 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/?research=%E4%BD%90%E8%97%A4%E6%AD%A3%E8%B3%87%E3%80%80%EF%BC%88%E7%94%9F%E7%89%A9%E6%B4%BB%E6%80%A7%E5%A4%A9%E7%84%B6%E7%89%A9%E5%8C%96%E5%AD%A6%EF%BC%89>

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

吉原 明秀 (YOSHIHARA AKIHIDE)

香川大学・農学部・助教

研究者番号: 40548765