

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07773

研究課題名(和文) 希少糖D-アラビノースの抗線虫活性 - 作用機構の解明と誘導体化による活性向上

研究課題名(英文) antinematodal activities of 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：希少糖D-arabinose (D-Ara) は線虫*Caenorhabditis elegans*の成長を強く阻害する。本研究では、その作用メカニズムを明らかにした。線虫粗酵素を用いた酵素阻害実験により、D-arabinose 5-phosphate (D-Ara-5P)は、ペントースリン酸経路のリボースリン酸イソメラーゼ(RPI)を強く阻害し、解糖系のグルコースリン酸イソメラーゼ(GPI)を弱く阻害することを明らかにした。D-Araによる線虫成長阻害は、D-Araの代謝産物D-Ara-5PがRPIとGPIを阻害することで、核酸合成とエネルギー産生が抑制されること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

単糖を抗線虫薬(あるいはそのリード化合物)とした研究例は皆無であり、独創性が高い。本研究により、糖代謝をターゲットとした新規な作用メカニズムをもつ抗線虫薬の開発が期待でき、熱帯医学、獣医学への波及効果が大きいと考えられる。また、本研究で得られる知見から、抗がん剤などの他の薬剤、あるいは糖代謝酵素の機能を解析するツールとしての酵素阻害剤が開発される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the rare sugar, D-arabinose (D-Ara), a stereoisomer of D-ribose, inhibits the growth of the nematode *Caenorhabditis elegans*. However, the underlying mechanism of action is unclear. D-Ara is presumed to be phosphorylated by sugar kinases to yield D-Ara-5-phosphate (D-Ara-5P), which inhibits enzymes involved in sugar metabolism. We focused on two enzymes as targets for D-Ara-5P, i.e. glucose phosphate isomerase (GPI) in glycolysis, and ribose phosphate isomerase (RPI) in the pentose phosphate pathway. D-Ara-5P showed inhibitory activities against both *C. elegans* enzymes, which may account for the D-Ara-mediated growth inhibition.

研究分野：生物有機化学

キーワード：希少糖 D-アラビノース 線虫 *Caenorhabditis elegans*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、消化管寄生線虫(回虫、蟯虫、鉤虫など)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持つ薬剤の開発が望まれている。

(2) 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。香川大学の何森は、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、各種アルドース、ケトースのD、L-体を含めた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(肥満抑制、抗がん活性など)が明らかになった。

(3) 申請者らは、モデル生物である線虫 *C. elegans* の幼虫を用いた成長阻害試験が、簡便な生理活性物質の一次スクリーニング法になることを報告した。この方法を用いて、希少糖のなかから D-psicose や D-allose (それぞれ、D-fructose と D-glucose の C3 エピマー) などの成長阻害活性を報告している。最近、申請者らはアルドペントース異性体全 8 種のうち、希少糖 D-arabinose (D-Ara、D-ribose の C2 エピマー) のみが *C. elegans* の成長を強く抑制することを明らかにした(図1)。その成長阻害活性は、すでに報告した D-psicose や、解糖系阻害剤として知られる 2-deoxy-D-glucose (2-DG) の活性を上回っていた。また、特筆すべきことに D-Ara は、ヒト培養細胞(Huh-7)に対して、比較的高濃度でも無毒であり、線虫への高い選択毒性が予想された(佐藤、未発表)。

以上の知見から、D-Ara は人畜への毒性が低い新規な抗線虫薬、あるいはそのリード化合物になるという着想に至った。

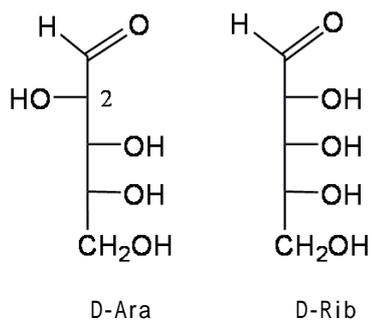


図1 D-arabinose (D-Ara) の Fischer 投影式

(4) 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。*C. elegans* 代謝系における D-Ara の阻害ポイントを明らかにするために、糖代謝系を構成する各種の単糖(D-glucose、D-fructose、D-ribose など)を D-Ara と同時投与し、成長阻害回復実験を行った。その結果、D-ribose あるいは D-fructose の投与により、その阻害活性を打ち消すことができた。この結果から、D-Ara 処理を行った線虫体内では糖代謝に関わる酵素の阻害が起き、その結果、線虫の成長抑制が起こると推測された。具体的には、体内で D-arabinose-5-phosphate (D-Ara-5P) となり、ペントースリン酸経路の ribose-5-phosphate isomerase (RPI) と解糖系の glucose-6-phosphate isomerase (GPI) が阻害される可能性があると考えた。

2. 研究の目的

希少糖が線虫体内でどのようにその生理活性を発現しているのか、現在まで全く知見がない。

そこで、本研究では、この仮説を検証するため、阻害剤として使用する D-Ara-5P の合成を行い、D-Ara-5P が、線虫から抽出した RPI、 GPI に対して阻害活性を有するか確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) D-Ara-5P の合成：D-Ara を基質として hexokinase (HXK)、 pyruvate kinase (PK)、 phosphoenolpyruvic acid、 ATP を反応させ D-Ara-5P を合成した。3 日おきに HXK、 PK を加え、生成物の D-Ara-5P を HPLC でモニターしながら 10 日間反応させた。

(2) RPI 阻害実験：線虫抽出液を精製せずに粗酵素液として使用した。基質として D-ribose-5-phosphate (D-Rib-5P)、 阻害剤として D-Ara-5P をトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 中に加え、 30 で 6 分間プレインキュベートした。最後に線虫粗酵素液を加え、 12 分間反応させた。生成した D-ribulose-5-phosphate (D-Ribu-5P) を HPLC で分析し、得られた面積値から IC_{50} 値と K_i 値を算出した。

(3) GPI 阻害実験：基質として D-fructose-6-phosphate、 阻害剤として D-Ara-5P をトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中に加え、 $NADP^+$ 、 $MgCl_2$ 、 glucose 6-phosphate dehydrogenase を加えた後、 30 で 6 分間プレインキュベートした。最後に粗酵素液を加え、 340nm における 12 分後の吸光度を記録し、NADPH の生成量から IC_{50} 値を算出した。(2)(3)両実験ともに 6-phosphogluconic acid (6-PG) をポジティブコントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) D-Ara-5P の合成：反応液の HPLC 分析の結果、 HXK による反応率は 10 日目で 55.9%であった。この酵素反応液を除タンパクし、 DOWEX 1×2、 Sephadex G-10 を用いたカラムクロマトグラフィーで精製して D-Ara-5P の結晶を得た。DOWEX 1×2、 Sephadex G-10 の精製を通した D-Ara-5P の回収率は 64.4%であった。全工程での収率は 35.6%となった。

(2) RPI 阻害実験：D-Ara-5P の濃度を変え、RPI 阻害実験を行った結果を図 2 に示す。RPI 阻害実験における D-Ara-5P の IC_{50} 値は 0.95mM、 K_i 値は 0.29mM、 6-PG の IC_{50} 値は 3.82 mM、 K_i 値は 1.20mM と算出された。また、Lineweaver-Burk plot から阻害様式は競合阻害であるとわかった。

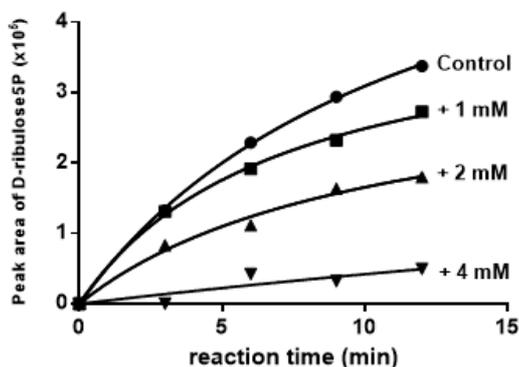


図 2 RPI 阻害実験の結果 (D-Ribu-5P 生成量 vs 反応時間; 基質 D-Rib-5P, 1mM; , D-Ara-5P 1mM; , D-Ara-5P 2mM; , D-Ara-5P 4mM)

(3) GPI 阻害実験：GPI 阻害実験における D-Ara-5P の IC_{50} 値は 4.04 mM、 6-PG の IC_{50} 値は 1.65

mM と算出された。

(4) 結論：以上の実験から、D-Ara-5P は *C. elegans* の RPI を強く阻害し、GPI を弱く阻害することが明らかになった。この結果から、D-Ara による線虫成長抑制活性は、D-Ara の代謝産物 D-Ara-5P により RPI と GPI が阻害され、それによって核酸合成とエネルギー産生が抑制されることによって起きると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshihara, A.; Sakoguchi, H.; Shintani, T.; Fleet, G. W. J.; Izumori, K.; Sato, M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Growth inhibition by 1-deoxy-d-allulose, a novel bioactive deoxy sugar, screened using <i>Caenorhabditis elegans</i> assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2483-2486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.07.017	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 該当する

1. 著者名 Shintani, T.; Sakoguchi, H.; Yoshihara, A.; Izumori, K.; Sato, M.	4. 巻 66
2. 論文標題 D-Allose, a Stereoisomer of D-Glucose, Extends the Lifespan of <i>Caenorhabditis elegans</i> via Sirtuin and Insulin Signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 139-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2019_0010	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 Sakoguchi, H.; Shintani, T.; Ishiyama, H.; Yanagita, R. C.; Kawanami, Y.; Sato, M.	4. 巻 83
2. 論文標題 Nematocidal activity of 6-O-octanoyl- and 6-O-octyl-d-allose against larvae of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2194-2197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1648206	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13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sato, M., ; Shintani, T.
2. 発表標題 Effects of Rare Sugars on <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Koyama, M.; Shintani, T.; Sato, M.
2. 発表標題 Growth-inhibitory effect of the rare sugar D-arabinose against the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> , and its mechanism of action
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小山麻理子; 新谷知也; 佐藤正資
2. 発表標題 希少糖D-アラビノースの線虫成長阻害メカニズムの解明 - 糖代謝酵素に対する阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Koyama, T. Shintani, M. Sato
2. 発表標題 Growth-inhibitory effect of the rare sugar D-arabinose against the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> , and its mechanism of action
3. 学会等名 The 7th Joint Symposium Chiang Mai University and Kagawa University Chiang Mai (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 M. Sato, M. Koyama, T. Shintani
2. 発表標題 Growth-inhibitory effect of D-arabinose against the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> : Discovery of a novel bioactive monosaccharide
3. 学会等名 The 7th Joint Symposium Chiang Mai University and Kagawa University Chiang Mai (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小山麻理子, 新谷知也, 佐藤正資
2. 発表標題 希少糖D-アラビノース生理活性メカニズムの解明 - 解糖系酵素への阻害活性,
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会広島大
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小山麻理子, 新谷知也, 佐藤正資
2. 発表標題 希少糖D-アラビノースの線虫成長阻害メカニズムの解明 - 糖代謝酵素に対する阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部大会島根大
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 小山麻理子, 新谷知也, 佐藤正資
2. 発表標題 希少糖D-アラビノースの線虫成長阻害メカニズムの解明 - 糖代謝酵素に対する阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会東京農大
4. 発表年 2018年～2019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
研究 分担 者	吉原 明秀 (Yoshihara Akihide) (40548765)	香川大学・農学部・准教授 (16201)	