

機関番号：24403
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580140
 研究課題名（和文） ラカンカ甘味成分の糖尿病改善効果・動脈硬化症予防機能に関する分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Study on molecular mechanisms by which sweet constituents of *Siraitia grosvenori* exert anti-diabetes and anti-arteriosclerosis effects
 研究代表者
 乾 博 (INUI HIROSHI)
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：20193568

研究成果の概要（和文）：漢方薬として知られるラカンカには、その果実に強い甘味物質であるトリテルペノイド配糖体（モグロシドV）が含まれ、肥満者や糖尿病患者向け低カロリー甘味料として市販されている。本研究では、ラカンカの抗糖尿病作用について検討し、インスリン分泌促進活性を見いだした。また、動脈硬化症予防の観点から、コレステロール誘導性酸化ストレスに対する抑制効果を明らかにした。さらに、モグロシドVとそのアグリコンであるモグロールの消化・吸収・体内動態を検討した。

研究成果の概要（英文）：*Siraitia grosvenori*, a traditional Chinese fruit used for a folk medicine, contains mogroside V, one of triterpene glycosides, and has been commercially available as a low-calorie sweetener for over-weight people and diabetic patients. In this study, the anti-diabetic effect of this fruit was examined, and it was found that mogrol, which is the aglycon of mogroside V, stimulated insulin secretion from pancreatic β -cells *in vitro*. From the aspect of anti-arteriosclerosis effect, it was elucidated that the extract of this fruit prevented oxidative stress induced by cholesterol loading in rats. In addition, the digestion, absorption, and disposition of mogroside V and its aglycon were also examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：栄養生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

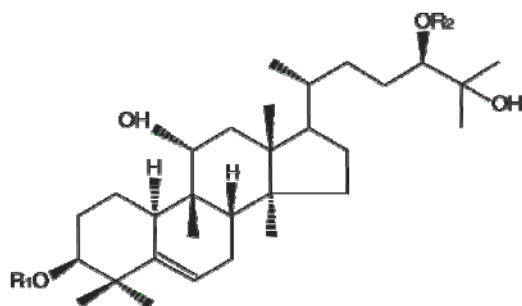
キーワード：ラカンカ、モグロシド、抗糖尿病作用、動脈硬化予防作用、インスリン膵臓 β 細胞、抗酸化作用、体内動態

1. 研究開始当初の背景

ラカンカ（羅漢果：*Siraitia grosvenori* Swingle）は、中国広西チワン族自治区で栽培されるウリ科の植物であり、その果実を乾燥させ煎じたものは古来より民間薬として

利用され、咳止め、気管支炎、胃炎などに効果があるとされてきた。さらに近年の研究で、ラカンカ抽出物に抗腫瘍活性や抗アレルギー作用が報告されている。同時に、このような機能性（薬理作用）に加えて、果実には強

い甘味（ショ糖の 300 倍以上）を呈するトリテルペノイド配糖体の 1 種であるモグロシド類（下図参照：主成分はモグロシド V、アグリコンはモグロール）が含まれており、近年は天然非糖質系低カロリー甘味料として糖尿病患者などに利用されている。



	R1	R2
Mogroside V	Glc $\xrightarrow{6}$ Glc	Glc $\xrightarrow{2}$ Glc \searrow δ Glc
Mogroside IV	Glc $\xrightarrow{6}$ Glc	Glc $\xrightarrow{2}$ Glc
Siamenoside I	Glc	Glc $\xrightarrow{2}$ Glc \searrow δ Glc

このような背景のもと、申請者は、糖尿病や肥満の予防・病態進行抑制の観点から、ラカンカ甘味成分の機能性に関する研究を行ってきた。その結果、ラカンカ甘味成分にマルターゼ阻害活性を見だし、食後の急激な血糖上昇を抑え、糖尿病の増悪化を抑制する可能性を明らかにした (Suzuki *et al. J. Agric. Food Chem.* **53**, 2941-2946 (2005))。さらに、2 型糖尿病モデルである Goto-Kakizaki rat に長期間ラカンカ甘味成分を摂取させたところ、糖負荷時のインスリン分泌作用に改善が見られるとともに、糖尿病の進行に伴う酸化ストレスの上昇が抑制されることを明らかにした (Suzuki *et al. Br. J. Nutr.* **97**, 770-775 (2007))。

2. 研究の目的

本研究は、申請者がこれまでに実施してきたラカンカに関する研究を進展させ、その機能性、特に糖尿病の病態改善、動脈硬化症予防の観点からその分子メカニズムを中心に詳細について解明することを目的とする。具体的には、ラカンカ甘味成分の機能性について次の 3 課題について研究を実施する。

- (1) インスリン分泌促進作用
- (2) 抗酸化作用
- (3) マルターゼ阻害作用

なお、実際には、「マルターゼ阻害作用」に関する研究は実施しなかった。その代わりに、ラカンカ甘味成分（モグロシド類）の消化・吸収、体内動態について検討した。体内動態を知ることは、甘味料としての安全性の確認とともに、生体内における機能性の分子メカニズムを理解する上でも重要である。

3. 研究の方法

(1) インスリン分泌促進作用

インスリン分泌促進作用は、ラットインスリノーマ細胞株の 1 つである INS-1 培養細胞系を用いて評価した。具体的には、INS-1 細胞を 10% 牛胎児血清含有 RPMI-1640 培地で 3 日間培養した後、培地を Krebs-Ringer bicarbonate buffer に交換し、各種グルコース濃度下でラカンカ甘味配糖体混合物もしくは単離した各種甘味成分（モグロシド類）と 2 時間インキュベートした。この間に培地中に分泌されたインスリン量を ELISA にて測定し、インスリン分泌促進活性を求めた。

(2) 抗酸化作用

6 週齢 Wistar 系オスラットにコレステロール（4%）と胆汁酸（1%）を負荷した高コレステロール食を与え 4 週間飼育した。また、試験群飼料にはラカンカ配糖体混合物を 0.4% 添加した。飼育終了後、各種臓器を採取し、脂質過酸化レベル（TBARS 値）、グルタチオン量、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ活性を測定した。また、血漿中のコレステロール値とクレアチンフォスフォキナーゼ（CPK）を測定した。

(3) 消化・吸収、体内動態

10 週齢の Wistar 系オスラットにモグロシド V（65.5 μmol ）を経口投与し、2 時間後に小腸内容物と門脈血を、また 24 時間後に糞を採取した。次に、モグロール（5 μmol ；アラビアゴム溶液に懸濁）を経口投与し、1 時間後に肝臓、門脈血、課題静脈血を、また 24 時間後には糞と尿を採取した。さらに、モグロール（1 μmol ；10% DMSO 溶液）を静脈投与し、1 時間後と 24 時間後に抹消血を、また 24 時間後には糞と尿を採取した。採取したサンプル中に含まれるモグロシド類やその代謝産物は LC-MS を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) インスリン分泌促進作用

ラットインスリノーマ INS-1 培養細胞系を用いてインスリン分泌活性におよぼすラカンカ甘味配糖体の作用を調べた。その結果、グルコース非存在下で培地中に甘味配糖体混合物を添加すると、その濃度に応じてインスリン分泌量が増加し、50 µg/ml ではコントロール（グルコースも甘味配糖体も添加していない時）の 2.1 倍となり、15 mM のグルコースで刺激した時と同レベルになった。さらに、3 mM グルコース存在下でも検討したところ、甘味配糖体を添加しないとコントロールとほとんど変わらないが、甘味配糖体を 50 µg/ml 添加するとインスリン分泌能はコントロールの約 3.5 倍にまで上昇した。

次に、精製した各種モグロシド類を用いてインスリン分泌活性を測定した。3 mM グルコース存在下で調べたところ、アグリコンであるモグロールを 10 µM で添加したところ、インスリン分泌量が 3.5 倍にまで増加した。モノグルコシド体であるモグロシド IIE にも弱いインシュリン分泌促進活性が見られたが、主要な甘味成分であるモグロシド V、モグロシド IV などには全く活性が見られなかった。

モグロールのインスリン分泌促進作用のメカニズムについて検討した。培地中から Ca²⁺を除くとモグロールによるインスリン分泌促進が観察されなかったため、グルコースによる促進の場合と同様に Ca²⁺シグナルの重要性が示された。

(2) 抗酸化作用

6 週齢のオスラットに高コレステロール食を与えて 4 週間飼育すると、血漿コレステロールレベルが約 4 倍に上昇するとともに、心臓や肝臓の脂質過酸化レベル (TBARS 値) が有意に上昇した。さらに心筋細胞死の指標となる血漿 CPK 活性も大きく上昇していた。高コレステロール食にラカンカ配糖体混合物を添加すると、コレステロール値については全く影響を受けなかったが、心臓、肝臓ともに TBARS 値が有意に低下した。特に、心臓では低コレステロール食のレベルにまで戻っていた。また、高コレステロール食で上昇した血漿 CPK 活性も基の水準にまで低下していた。以上の結果から、ラカンカ甘味配糖体は、コレステロール吸収阻害作用を有していないにもかかわらず、コレステロールレベルの上昇に起因した酸化ストレスを抑制することが明らかになった。

ラカンカ甘味配糖体 (モグロシド類) のアグリコンであるモグロールには、その化学構造から類推して、強い抗酸化作用があるものとは考え難い。おそらく、生体内の抗酸化物質や抗酸化酵素のレベルを調節して、高コレステロール食摂取に起因した酸化ストレス

を抑制しているものと考えられる。そこで、グルタチオン量と SOD、カタラーゼ活性を測定した。その結果、心臓では、高コレステロール食によって減少したグルタチオン量と低下した SOD、カタラーゼ活性は、ラカンカ甘味配糖体摂取によって有意に上昇し、低コレステロール食のレベルにまで回復した。有意差は見られなかったものの同様の結果は、肝臓でも観察された。

以上の結果から、ラカンカ甘味配糖体には高コレステロール食に起因した酸化ストレスを軽減する効果があること、さらにその効果にはグルタチオンや SOD、カタラーゼが関与していることが明らかになった。今後さらなる抗酸化メカニズムの解明が望まれる。

(3) 消化・吸収、体内動態

10 週齢のオスラットにモグロシド V (65.5 µmol) を経口投与し、2 時間後の小腸内容物について調べた。その結果、小腸内容物中には、70%以上がモグロシド V として見いだされた。それ以外に、モグロシド V が部分的に加水分解を受けたモグロシド IV、モグロシド III などが見いだされた。また、極めてわずかであったがアグリコンであるモグロールも検出された。24 時間後の糞中について調べると、モグロール、モグロシド I、モグロシド II (合計で投与量の 65%以上) が主要であった。したがって、摂取されたモグロシド類は消化酵素の作用により部分的に分解された後、さらに大腸内で腸内細菌によって分解され、その多くがジグルコシド、モノグルコシド体もしくはアグリコンとして糞中に排泄されることが示された。次にモグロシド類の体内への取り込みについて、投与 2 時間後の門脈血を調べた。その結果、極めてわずかであったが、モグロールとモグロシド I が検出された。しかし、抹消血や肝臓では検出できなかった。

アグリコンであるモグロール (5 µmol) を経口投与し 1 時間後の血液と肝臓中のモグロール量を測定した。その結果、門脈血中に 4.3 µM、下大静脈血にも 0.65 µM のモグロールが遊離型 (抱合体ではなく) で見いだされた。さらに肝臓には投与量の 0.6%程度のモグロールが存在し、そのうち 30%程度はグルクロン酸もしくは硫酸抱合を受けていた。24 時間後には血液および肝臓中のモグロールは消失した。投与 24 時間に排泄された糞および尿中のモグロール量を調べたところ、糞中には投与量の 3.4%のモグロールが存在したが、尿中には抱合体を含めて全く見いだされなかった。

次に、モグロールの代謝産物について検討した。経口投与 1 時間後の肝臓中の代謝物を LC-MS で分析したところ、モグロール (保持時間 (RT) : 25.5 min、分子量 : 476) に比べ

分子量が2小さいと考えられる代謝物が3種類 (RT: 18.5、22.0、29.5 min) 見いだされた。これらの生成物の合計量はモグロール量の2.5倍であり、またRTが22.0 minのものが主生成物で全体の75%程度を占めていた。これらの生成物は、分子量が2減少していることから、おそらくデヒドロゲナーゼ反応によって3つのうちの1つの2級水酸基がカルボニル基に変換されたものと考えられる、なお、これらの生成物は下大静脈血中にもわずかながら見いだされた。しかし、投与後24時間に排泄された尿中にはこれらの代謝産物はその抱合体を含めて全く検出されなかった、

最後に、モグロール (1 μmol) を静脈投与し、24時間の糞中および尿中への排泄を調べた。その結果、尿中への排泄は代謝産物、抱合体を含めて全く見られなかった。一方、大変興味深いことに、投与量の6%を超えるモグロールが糞中に排泄されていた。なお、投与1時間後の抹消血中にはわずかながらもモグロールが検出されたが、24時間後には検出限度以下になっていた。静脈投与したにもかかわらず糞中へ排泄されていたことから、モグロールは肝臓から胆汁として消化管へ分泌されていることが示された。

以上の結果から、消化管から体内に取り込まれたモグロールは、肝臓でおそらくある種のデヒドロゲナーゼによって部分的に代謝され、胆汁として再度消化管へ分泌され、腸管循環を繰り返した後、最終的に糞中へ排泄されるものと考えられる。

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1件)

- ① Murata, Y., Ogawa, T., Suzuki, Y. A., Yoshikawa, S., Inui, H., Sugiura, M., and Nakano, Y. (2010) Digestion and absorption of *Siraitia grosvenori* triterpenoids in the rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 673-676 (査読あり) .

[学会発表] (計2件)

- ① 恒川直哉、竹内基世、小川貴央、鈴木靖志、吉川慎一、村田雄司、原田直樹、山地亮一、乾博. 羅漢果甘味配糖体の体内動態について. 日本栄養・食糧学会第64回大会. 平成22年5月23日. 徳島
- ② 竹内基世、鈴木靖志、村田雄司、山地亮一、中野長久、乾博. 羅漢果甘味配糖体の抗糖尿病作用. 日本栄養・食糧学会第47回近畿支部大会. 平成20年10月25日。

奈良

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 博 (INUI HIROSHI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20193568

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：