

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05492

研究課題名(和文) さとうきび搾汁液に含まれる核内受容体PPAR 活性化物質の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the nuclear receptor PPARgamma activator contained in sugarcane juice

研究代表者

松浦 信康 (Matsuura, Nobuyasu)

岡山理科大学・生命科学部・教授

研究者番号：60281250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：サトウキビ搾汁液に含まれる核内受容体PPAR 活性化物質の単離、精製を試みた。精製にあたっては、合成吸着樹脂、逆相クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー等における分離条件の最適化を行うことにより、分離条件を確立した。その結果、100Lのサトウキビ搾汁液より、20mgの活性物質を得ることに成功した。得られた物質についてMSスペクトル、核磁気共鳴スペクトルを測定し、それらのデータを詳細に検討した結果、複数の構造式に絞り込むことに成功した。さらに化学変換を行った化合物について、MSスペクトルフラグメントを解析することにより、活性物質の化学構造を決定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

砂糖原料であるサトウキビ搾汁液より、糖代謝に重要な役割を果たすPPAR 活性化物質を発見したことは、単に生活習慣病予防及び治療に関わる有用の知見のみならず、植物生理学の観点からも有用な知見になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to isolate and purify the nuclear receptor PPAR activator contained in sugarcane juice. For purification, separation conditions were established by optimizing separation conditions for synthetic adsorption resins, reversed-phase chromatography, silica gel chromatography, etc. As a result, they succeeded in obtaining 20mg of active substance from 100L of sugarcane juice. After measuring the MS spectrum and nuclear magnetic resonance spectrum of the obtained substance and examining the data in detail, they succeeded in narrowing down the structure to several structural formulas. Furthermore, by analyzing the MS spectrum fragments of the chemically converted compounds, we succeeded in determining the chemical structure of the active substance.

研究分野：生物有機化学

キーワード：サトウキビ搾汁液 PPAR

## 1. 研究開始当初の背景

近年、莫大な数のサプリメントが市場に存在するが、効果に対する明確なエビデンスが明らかにされているものは皆無に等しいと言わざるをえない。また同様に、様々な食品には効果があると思われるものの、その効果が証明されているものは極めて少ない。食品を安全かつ効果的に利用するには、正確なエビデンスが重要である。そこで本研究では、きび糖（未精製糖）の持つ血糖値上昇抑制活性に着目した。臨床医薬品において血糖上昇抑制活性の作用機序の一つとして、核内受容体 Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) の活性化があげられ、代表的医薬品として Pioglitazone（商品名：アクトス、武田薬品工業）が唯一臨床にて用いられている。また糖尿病を始めとする生活習慣病においては、治療以上に予防が大切であり、医薬品と同様の作用機序（同等の活性でなくても良い）を有する化合物を含有する食品を積極的に摂取することにより、予防効果が期待できる。そこで本研究では、さとうきび搾汁液に含まれる核内受容体 PPAR $\gamma$  活性化物質の解明に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、さとうきび搾汁液に含まれる核内受容体 PPAR $\gamma$  活性化物質を単離精製し、その構造を明らかにすることである。第二の目的は、PPAR $\gamma$  活性化機構を明らかにすることにより、さとうきび搾汁液による血糖値上昇抑制作用のエビデンス、第三の目的は、さとうきびの機能性食品としての利用に向けた活性化化合物の品種間変異及び季節変動の解明である。さとうきびには、約 40 種のフェノール成分の存在が報告されているものの、血糖値上昇抑制活性に関する報告は全くない。またオリゴサッカライドによる血糖値上昇抑制が報告されているものの、そのラットへの投与量は非常に多く、さとうきび搾汁液を飲用した時の量に相当するものではない。

本研究予備実験においては、搾汁液相当濃度において PPAR $\gamma$  活性化が認められたことから、非常に高い活性を有する化合物の存在が期待される。さとうきびにおいてはショ糖以外の利用はなく、未利用成分の新たな活用であり、医薬品開発への応用のみならず、多くの分野における利用が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) サトウキビ搾汁液に含まれる核内受容体 PPAR $\gamma$ 活性化物質の単離精製

サトウキビ搾汁液 100 L を岡山県瀬戸内市サトウキビ工房東より分譲していただいた。搾汁液を PVPP (Polyvinylpyrrolidone) を 1% 添加し 30 分間攪拌を行うことにより、ポリフェノール成分の除去を行った。その後、合成吸着樹脂 HP-20 カラムクロマトグラフィーを行った。具体的には、HP-20 を 60% MeOH/H<sub>2</sub>O に平衡化したのち、PVPP 処理した搾汁液を添加した。その後、70, 90, 100% MeOH にて順次溶出を行い、活性画分である 90% MeOH 溶出画分について、減圧下濃縮を行った。得られ得たエキスについて、逆相カラムクロマトグラフィー (C18-OPN: Nakarai Tesque 社) を行った。逆相充填剤を 60% MeOH に平衡化したのち、得られたエキス溶液を添加し、70, 80, 100% MeOH にて順次溶出を行い、活性画分として、90% MeOH 溶出画分を得た。得られた画分を減圧下濃縮を行い、さらに逆相高速液体クロマトグラフィーにて活性物質の精製を行った。Column: RP-18 250 x 10 mm (Kanto Chemicals), Solvent: 76% MeOH, Flow rate: 4.726 ml/min., Temperature: 40°C, Detector: 220 nm の条件のもと、60 cycle 分取を行った。その結果、32mg の活性物質を単離精製した。

### (2) 核内受容体 PPAR $\gamma$ 活性評価方法

#### 1. COS-1 細胞の形質転換

COS-1 細胞をトリプシン処理により回収し、1000rpm, 4°C, 3min. 遠心分離後、上清を除去し、2 mL の培地で細胞を分散して 60 mm 培養シャーレ (Corning 社) に  $5 \times 10^5$  cells/well の密度で播いた後、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて 24h. 培養した。形質転換には Effectene Transfection Reagent (QIAGEN 社) を使用した。1.5 mL tube に Buffer EC 150  $\mu$ L, pPPARs-Gal4 0.25  $\mu$ g, pGal4-Luc 1  $\mu$ g, pSEAP-control vector 1  $\mu$ g 最後に Enhancer 18  $\mu$ L を加え、vortex で 1sec. 攪拌した。25°C, 2min. 放置した後、Effectene 25  $\mu$ L 加え、vortex で 10sec. 攪拌し 25°C, 5min. 放置した。この間に、60 mm 培養シャーレの培地を除去し、4 mL 新鮮培地に交換をした。その後、1.5 mL tube に培地 1 mL を加え、2 回のピペッティング後、60 mm 培養シャーレに全量を滴下し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて 16h. 培養した。

#### 2. COS-1 細胞への被検試料添加

形質転換した細胞をトリプシン処理により回収し、1000rpm, 4°C, 3min. 遠心分離後、上清を除去し、8.5 mL の培地に懸濁して 96 multi well white plate (NUNC) に  $0.8 \times 10^4$  cells/well (125  $\mu$ L/well) の密度で播き、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて 1~2h. 培養した。その後、被検試料を 1.25  $\mu$ L/well 添加し、穏やかに攪拌して 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下にて 24h. 培養した。

#### 3. Luciferase 活性測定

被検試料添加から 24h. 後、培地を 25  $\mu$ L/well 回収し、新たな 96 multi well white plate に移した。その後、残りの 100  $\mu$ L/well に、37°C にて融解した luciferase 活性測定用溶液を 100  $\mu$ L/well 添加

し、暗所にて 35min.反応させた後、発光強度を測定した。

#### 4. Secreted alkaline phosphatase (SEAP)活性の測定

回収した培地に、1 x Dillution Buffer 25  $\mu$ L/well を添加し、セロハンテープで蓋をした後、穏やかに攪拌し、65°C, 30min. incubate した。その後、4°Cにて 5min.冷却し、Assay Buffer 90  $\mu$ L/well を添加して穏やかに攪拌した。25°C, 5min.放置し、MUP solution 10  $\mu$ L/well を添加して穏やかに攪拌した。暗所にて 25°C, 60min.反応させた後、4-methylumbelliferone に基づく蛍光強度 (Ex = 360nm, Em = 460nm)を測定した。

#### (3)活性物質の化学構造解析

核磁気共鳴スペクトル、MS スペクトルデータを詳細に解析することにより化学構造を決定した。

### 4. 研究成果

#### (1)構造解析

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, COSY, HMQC, HMBC 等の 2 次元 NMR スペクトル、MS スペクトルの解析により 6 つの推定化学構造式を得ることができた。その化学構造としては、炭素 18 個からなる不飽和脂肪酸であり、構造中に  $\gamma$ -hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone 構造を有していることが明らかとなった。C18 炭素鎖中における  $\gamma$ -hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone の位置、向きを明らかにする目的で、メチル化それに引き続くトリメチルシリル化を行い、得られた化合物の MS スペクトルフラグメントについて詳細に検討を行った。その結果、本化合物の構造を図 1 のように決定した。本化合物は、以前トウモロコシより単離された化合物であった (*Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** (6), 1020-1021, 1993)。

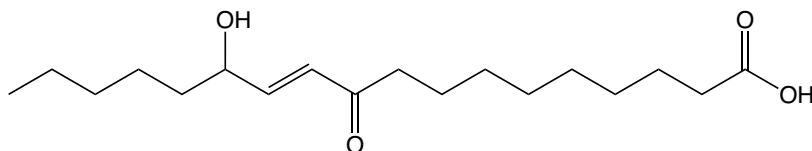


図 1 活性物質の化学構造

#### (2)PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

本化合物の活性構造部位を明らかにする目的で、5 種の C18 飽和および不飽和脂肪酸 5 種 (オレイン酸、リノレイン酸、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸) について構造活性相関を検討した。その結果、今回得られた物質以外の化合物には、全く PPAR $\gamma$ アゴニスト活性は認められなかった。(図 2)

以上の結果から、本化合物中における PPAR $\gamma$ 活性発現に関与する部分構造は、 $\gamma$ -hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone 構造であると推定された。

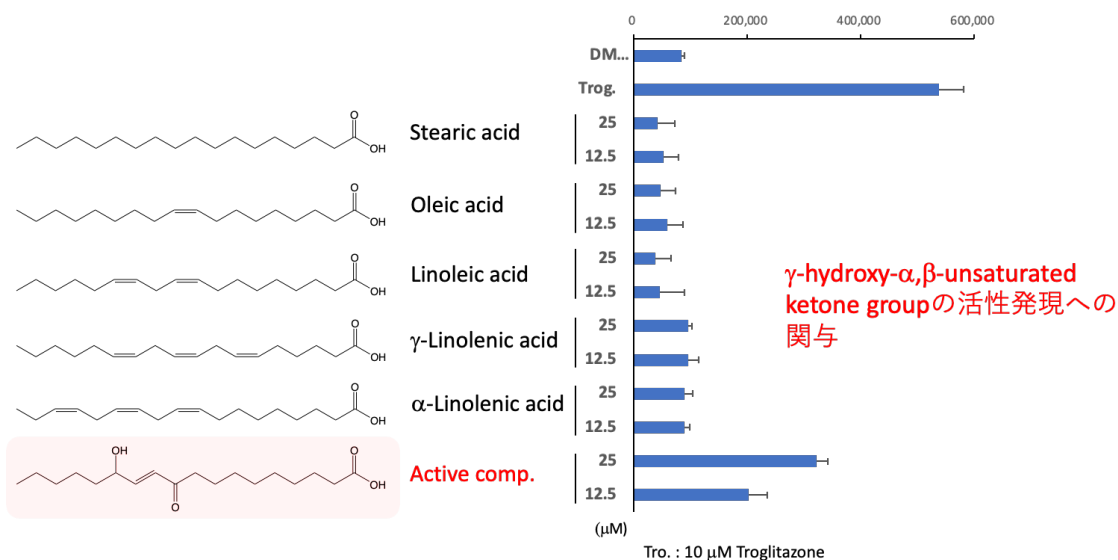


図 2 C18 飽和および不飽和脂肪酸による PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------