

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580190

研究課題名(和文) 血糖値上昇抑制成分1-デオキシノジリマイシンの吸収・動態の評価

研究課題名(英文) Mass production of 15N labeled DNJ to evaluate the absorption and excretion of 1-deoxyxynojirimycin

研究代表者

木村 俊之(KIMURA, Toshiyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター生産体系研究領域・主任研究員

研究者番号：70355303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：桑葉は1-デオキシノジリマイシン(DNJ)と呼ばれる食後血糖値上昇抑制成分を含み、糖尿病予防効果が期待される食材である。桑葉DNJが機能性食材として展開されるためには、その安全性を十分に検証する必要がある。本研究では、DNJの吸収、蓄積、代謝、排出バランスを明らかにする目的で、安定同位体¹⁵NでラベルしたDNJの大量生産法を開発し、精製ラベル化DNJを10g得ることに成功した。現在ラベル化DNJを動物への投与を行い、DNJの作用メカニズムと安全性の評価を行っている。

研究成果の概要(英文)：Mulberry leaves have the unique ingredient called 1-deoxyxynojirimycin which suppresses the postprandial blood glucose, so that are considered as the food materials which are expected to prevent diabetes. Sufficient safety assessment of DNJ is necessary to be widely accepted as the functional food material in the market. In this research, we tried to clarify the absorption, distribution, metabolism and excretion of DNJ. We established the mass production method of DNJ by using fermentation technique, followed by succeed to produce 10g of the purified ¹⁵N labeled DNJ. We orally administrated the purified ¹⁵N labeled DNJ to rats, now studying the mechanism analysis and safety evaluation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：吸収・動態 1-デオキシノジリマイシン DNJ ラベル化 発酵生産

1. 研究開始当初の背景

我が国は、成人の5人に1人が糖尿病（もしくはその予備軍）に罹患している状況である。糖尿病は網膜症、腎症、神経障害などの深刻な合併症を引き起こし、著しい生活の質（QOL）の低下を招く他、メタボリック症候群の主要な因子として動脈硬化症の発症へと深く関わる。また、糖尿病の医療費は1兆円を超える状況が続いており、医療財政を逼迫させる原因の一つとなっており、早急な対策が求められている。糖尿病予防には食後の高血糖を抑制することが重要であることが、近年の研究により判明しつつあり、この食後血糖値の急激な上昇を抑制する食素材としてグルコシダーゼ阻害剤（GI）が注目されている。GIは消化管で糖の消化を抑制することで、糖の吸収を穏やかにし、結果、食後の血糖値の上昇を抑制し糖尿病を予防すると期待される。

一方、桑は古来、糖尿病の予防効果を有する食素材として知られ、1976年に強力なGI活性を示す1-デオキシノジリマイシン(DNJ)が単離され、DNJは糖尿病予防効果が期待できる天然食素材として注目されている。これまでの研究でDNJは糖尿病予防に対し有効なエビデンスを得つつあり、世界中でDNJを含む種々の食品が開発されている状況にある。今後DNJを含む食品が展開するためには、すべての機能性食品においてもそうであるように、その安全性と効能発現メカニズムを十分に科学的に検証する必要がある。

2. 研究の目的

桑葉DNJの安全性と効能発現メカニズムの科学的検証を目的とする。これまでに、LC-MS/MSでの血漿濃度解析等を行ってきたが、本法ではDNJの投与量と吸収量のマスバランスが合わなかった。また組織蓄積はLC/MS/MSでは測定ができない。このため、本研究では安定同位体¹⁵Nでラベルした精製DNJの大量調製法を確立し、これを10g以上作成する。さらに、ラットへ投与し、糞、尿、組織からの¹⁵Nの測定によりDNJの吸収、蓄積、排出バランスを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物試験給与のための安定同位体¹⁵Nラベル化DNJの大量調製方針としてDNJ生産が知られる微生物で硫酸を唯一のN源とする合成培地で培養しDNJを精製することにより精製ラベルDNJ10g以上の生産を目指すこととした。

(2) 文献(D. C. Stein *et al.* *Appl Environ Microbiol.* **48** (1984) 280-284)によりDNJ高生産が知られていた*Bacillus subtilis* DSM704株についてDNJの生産とC源の検討を行った。基本合成培地(K₂HPO₄ 14 g/L, KH₂PO₄ 6 g/L, MgSO₄·7H₂O 200 mg/L, (NH₄)₂SO₄

2 g/L, MnSO₄ 1.7mg/L, Fe₂(SO₄)₃ 28 mg/L, ZnCl₂ 7 mg/L, CaCl₂ 150 mg/L)にC源としてグルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ガラクトース、ラクトース、フルクトース、マルトース、マンノース、グリセロール、コハク酸、クエン酸を5%(w/v)添加し、37℃、5日間培養した。培養液は、遠心し菌体を除去した後、終濃度75%(v/v)になるようにエタノールを添加し、遠心し沈殿を除去した上清をDNJ分析に供した。DNJ分析はS. Onose *et al.* *Food Chem.* **138** (2013) 516-523したがってHILIC-MS/MS法により分析を行った。DNJの分析は後述の実験においても同様に行った。

(3) *Bacillus subtilis* DSM704株のDNJ生産性が悪かったため、DNJ生産菌のスクリーニングを行った。DNJ生産は*Bacillus*属と*Streptomyces*属が知られるが、培養と上清からのDNJ精製のしやすさから*Bacillus*属を対象とした。

(4) スクリーニングにより得られた*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7株について種々の条件によるDNJ生産性を検討した。1) C源の種類(グルコース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ガラクトース、ラクトース、フルクトース、マルトース、マンノース) 2) C源N源の濃度(C源0.5-7.5%、N源0.08-1.2%)、3) 培養期間を検討した。

(5) 確定された培養条件を元にDNJの精製試験を行った。培養上清4Lに等量のエタノールを添加し、遠心により沈殿を除去した後、Amberlite IR120Bカラムに供した。カラムを蒸留水で洗浄後、0.5Nアンモニア水で溶出した。溶出画分をDowex 1×2カラムに通し、スルー画分を回収した。

(6) 培地中の硫酸を¹⁵Nラベル化硫酸に変更し20L培養し、(5)で確定したDNJ精製法によりDNJの精製を行った。精製した¹⁵Nラベル化DNJはLC-MS/MSおよびH-NMRにより確認を行った。

4. 研究成果

(1) 微生物によるDNJの発酵生産はこれまでの文献で*Bacillus*属と*Streptomyces*属(Ezure *et al.* *Agric. Biol. Chem.* **49**(1985)1119-1125)の生産に関する報文がある。培養の容易さ精製のしやすさから*Bacillus*属での発酵生産に精製を行うこととした。

(2) *Bacillus subtilis* DSM704株の培養上清中のDNJはグルコース0.4 mg/L、スクロース0 mg/L、ソルビトール0.5 mg/L、マンニトール0 mg/L、ガラクトース0.9 mg/L、ラクトース1.4 mg/L、フルクトース0 mg/L、

マルトース 1.2 mg/L、マンノース 0.8 mg/L、グリセロール 0 mg/L、コハク酸 0 mg/L、クエン酸 0 mg/L であった。Steinらの文献では、グルコース 1000 mg/L、スクロース 1000 mg/L、ソルビトール 1000 mg/L、グリセロール 20 mg/L、コハク酸 2 mg/L、クエン酸 1 mg/L であったが、有機酸では生産しないところは同様であったが、DNJ の生産量、糖の種類による傾向ともに再現性は得られなかった。我々は複数回試験を繰り返したが、いずれも低レベルの DNJ の生産性であったことから、DSM704 株では DNJ 1g/L sup の目標に達するのは厳しいと判断した。

(3) 合成培地における種々の *Bacillus* 属の培養試験から、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 株が良好な生産性を示した。本菌株は、バンクより入手可能なこと、全ゲノム解析が終了しており今後の研究展開にも対応できることから本菌株を使用することとした。

(4) *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 の培養上清中の DNJ はグルコース 123.7 mg/L、スクロース 88.5 mg/L、ソルビトール 176.0 mg/L、ガラクトース 503.3 mg/L、ラクトース 1023.4 mg/L、フルクトース 62.2 mg/L、マルトース 210.2 mg/L、マンノース 244.3 mg/L であった。ラクトース、ガラクトースが最も生産性が高く DNJ の生産にカタボライトプレッションによる制御が行われていることが示唆された。*Bacillus* 属の DNJ 生合成に関しては Lorraine らが生合成にかかる遺伝子群を示しているが (F. Lorraine *et al.* *Chem. Bio. Chem.* 12 (2011) 2147-2150) これに相当する遺伝子群は DSM7 株にもそれに相当する遺伝子群は存在し、その上流域にはカタボライトプレッションにかかると想定されるモチーフが見出された。

培養条件を種々検討した結果、ラクトース濃度 0.2%、硫酸濃度、培養期間 5 日間で安定して培養上清あたり 1 g/L 以上の DNJ の生産を達成した (図 1)。

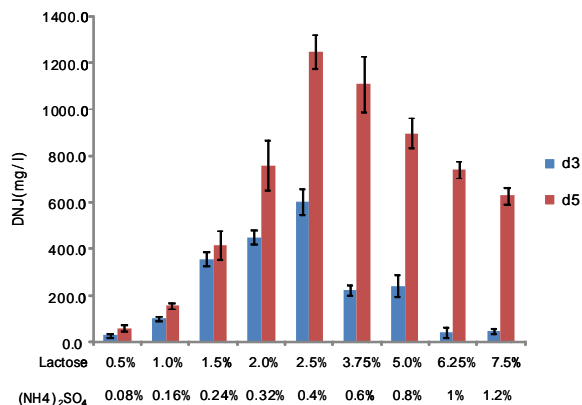


図 1 CN 比固定(6.25:1) における *B. amyloliquefaciens*(DSM7) の DNJ 生産(3 日 & 5 日)

(5) 4L 培養における DNJ 大量精製における DNJ の精製を表 1 に示す。培養上清における DNJ 濃度は 1.8 g/L であり、Amberlite IR120B における回収率は 59.5% であり、次いで Dowex 1×2 処理を行った結果 DNJ は 3.9 g 得られ、回収率は 52.2% であった。

表 1 大量培養における DNJ の精製表

	DNJ conc. (μg/mL)	vol.(mL)	DNJ(mg)	yield
培養上清	1862.0	4000	7456.0	100
amberlite IR120B 吸着	3100.0	1430	4433.0	59.5
Dowex1x2 スルー	2640.0	1475	3894.0	52.2

(6) 培地中の硫酸を ¹⁵N 硫酸に置換し 20L の培養を行い DNJ の精製を行った。精製 DNJ は 10g 以上得られ、LC-MS/MS で分析したところ通常 DNJ は MRM ペア (m/z 164/69) で検出されるが、(m/z165/70) で検出された (図 2)。このことから、DNJ は ¹⁵N ラベル化体であることを確認できた。また、H-NMR で供したところ、夾雑物は見られずほぼ純粋であることが判明した。

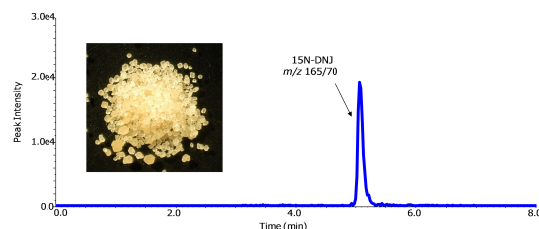


図 2 ¹⁵N ラベル化 DNJ の LC-MS/MS クロマトグラム

カラム: TSKgelAmide-80(2.0×100mm; 粒子径 3μm) カラム温度: 40、流速: 0.2mL/min 移動相: アセトニトリル/水(0.1%ギ酸含む)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

S.E., T. Kimura, K. Nakagawa, T. Miyazawa, T. Tsuduki *et al.*, 1-deoxynojirimycin attenuates high glucose-accelerated senescence in human umbilical vein endothelial cells. *Exp. Gerontol.*, 査読有り, 55C (2014) 63-69 DOI: 10.1016/j.exger.2014.03.025

T. Tsuduki, T. Kimura, K. Nakagawa, T. Miyazawa *et al.*, Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. *Food Chem.*, 査読有り, 139 (2013) 16-23 DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.025

S. Onose, K. Nakagawa, T. Kimura, K. Yamagishi, T. Miyazawa *et al.*,

Production of the α -glycosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from *Bacillus* species. *Food Chem.*, 査読有り, **138** (2013) 516-523
DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.012

[学会発表](計9件)

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 山岸 賢治, 木村 俊之, 宮澤 陽夫ら, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 による食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養, 日本農芸化学会平成 26 年度大会, 2014/3/28, 明治大学(神奈川県川崎市)

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 山岸 賢治, 木村 俊之, 宮澤 陽夫ら, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 によるアザ糖 1-デオキシノジリマイシンの生産, 日本油化学会第 52 回年会, 2013/9/4, 東北大学(宮城県仙台市)

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 山岸 賢治, 木村 俊之, 宮澤 陽夫ら, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 によるアザ糖 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養, 第 67 回日本栄養・食糧学会, 2013/5/25, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 木村 俊之, 山岸 賢治, 宮澤 陽夫ら, 食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの枯草菌等による高生産培養, 日本農芸化学会平成 25 年度大会, 2013/3/25, 東北大学(宮城県仙台市)

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 木村 俊之, 山岸 賢治, 宮澤 陽夫ら, 食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養, 日本農芸化学会東北支部 第 147 回大会, 2012/10/5, 弘前大学(青森県弘前市)

S. Onose, K. Nakagawa, T. Kimura, T. Miyazawa *et al.*, Effect of mulberry 1-deoxynojirimycin on postprandial glycemic control, 11th Maillard reaction symposium, 2012/9/18, Nancy France

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 木村 俊之, 山岸 賢治, 宮澤 陽夫ら, 枯草菌等による食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの生産, 日本食品科学工学会 第 59 回大会, 2012/8/30, 藤女子大学(北海道札幌市)

小野瀬 晋司, 仲川 清隆, 木村 俊之, 山岸 賢治, 宮澤 陽夫ら, 微生物による食後高血糖改善成分 1-デオキシノジリマイシンの生産, 第 66 回栄養・食糧学会, 2012/5/19, 東北大学(宮城県仙台市)

S. Onose, K. Nakagawa, T. Miyazawa *et al.*,

Preparation of mulberry 1-deoxynojirimycin-entrapped microsphere for a prolonged hypoglycemic effect, 14th International Conference on Surface and Colloid Science (IACIS2012), 2012/5/15, Sendai Japan

[図書](計1件)

T. Kimura, Intech, Development of mulberry leaf extract food for suppressing postprandial blood glucose elevation. In Hypoglycemia, E. C. Rigobelo (Ed), (2011) 25-36

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 俊之 (KIMURA, Toshiyuki)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター生産体系研究領域・主任研究員
研究者番号: 7 0 3 5 5 3 0 3

(2) 研究分担者

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 8 0 3 6 1 1 4 5

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA, Teruo)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 2 0 1 5 7 6 3 9

山岸 賢治 (YAMAGISHI, Kenji)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター環境保全型農業研究領域・主任研究員
研究者番号: 8 0 3 5 5 3 0 4
(平成 25 年度まで)