

## 学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 砂古口 博文

Name

学位論文題目： 線虫を用いた新規な生物活性希少糖の探索

Title of Dissertation

学位論文要約：

Dissertation Summary

第1章 希少糖の線虫成長阻害活性

### 1. 緒言

単糖は不斉炭素を複数もち、多くの立体異性体が存在する。例えば、アルドヘキソースには16種類、ケトヘキソースには8種類の立体異性体が存在する。これら単糖のうち、自然界に多量に存在するD-glucoseやD-fructoseなどを除いて、それ以外の立体異性体(例えばL-glucoseやL-fructoseなど)は、ごく限られた生物での報告しかないか、あるいは天然での存在が全く報告されていない。

このような「自然界に存在量が少ない単糖およびその誘導体」は国際希少糖学会により希少糖(rare sugar)と定義されている。これらの希少糖は、試薬として非常に高価であり、入手が困難なため、それらの生物活性は、最近までほとんど研究されていなかった。

1992年に香川大学の何森教授は土壤中から分離した微生物からD-tagatoseをD-sorboseに変換する、すなわちケトース3位の水酸基の立体異性を反転させるエピ化酵素、D-tagatose-3-epimerase(DTE)を見出した。この酵素は基質特異性が低く、その他の単糖同士の平衡反応、例えば、D-fructoseとD-psicose、L-tagatoseとL-sorbose、やL-fructoseとL-psicoseなどを変換する触媒能力があることが明らかになった。

何森はこのエピ化酵素DTEを基幹酵素として、希少糖の生産の戦略図、Izumoringを考案し、ヘキソース異性体の網羅的合成方法を確立させた。それはDTEによるケトースのエピ化、Oxidoreductaseによるケトース-ポリオールへの酸化還元、Aldose isomeraseによるケトース-アルドースの異性化、Aldose reductaseによるアルドース-ポリオールの還元、の4つの反応から構成されている。

この合成法を用いることで、比較的安価に、かつ迅速に、まとまった量のヘキソース異性体を手に入れることが可能となった。また、基幹酵素DTEはペントースやデオキシ糖にも作用することが分かり、その結果、現在、生産可能な希少糖は数十種類に及んでいる。このような希少糖の生物活性が、主に香川大学の研究者によって徐々に明らかになっている。代表例は、食後血糖上昇抑制作用、脂肪合成抑制作用、活性酸素消去作用、がん細胞増殖抑制作用、神経保護作用、線虫成長阻害作用、植物成長抑制作用、植物抵抗性誘導、等である。

近年、単糖は生物の体を構成する材料やエネルギー源としてだけでなく、糖鎖として細胞表面に位置し、他の細胞を認識するためのプロセスに関与したり、病原体や異物を認識する機能を有している。すなわち、糖(糖鎖)は炎症、癌、および感染症など多様な疾患の徴候に関与している。そのため、糖模倣薬(glycomimetic drug)と呼ばれる、糖の生理機能を模倣する糖およびその誘導体の開発が注目されている。例としては、タミフルなどの抗インフルエン

## (様式5) (Style5)

ザ薬（ノイラミニダーゼ阻害剤）が挙げられる。希少糖は、これらの糖模倣薬の候補、あるいはその材料として利用できると考えられる。このように、様々な生物活性の存在と応用への展開が期待される希少糖であるが、生物活性の調査された希少糖は、ほとんどD-psicoseとD-alloseに限られている。そこで、本研究ではアルドース、ケトースの立体異性体とそれらの誘導体（すなわち希少糖）の生物活性を網羅的にスクリーニングすることを目的とした。その際、指標とする生物活性はモデル生物である線虫*Caenorhabditis elegans*の成長阻害活性を用いた。

線虫は、分類学上、線形動物門（nematode）に属する動物の総称で、約50万種に分類され、大半の種は、微生物を餌として、非寄生性の生活を営んでいる。その自活性線虫の一種である*C. elegans*は、近年、多細胞生物のモデル生物として、研究が盛んに行われている。モデル生物としての*C. elegans*の優れた利点を列挙すると、自活性線虫であり、寄主を必要としないため培養が容易なこと、体長が約1mmで透明な体を持つため、各器官の観察が容易なこと、生活環が短く約3日で卵から4回の脱皮を経て、抱卵成虫となり、数日のうちに約300個の自家受精卵を産卵すること、全ゲノム情報（約19000の遺伝子を持ち、ヒトでクローン化された約5000の遺伝子のうち74%は非常によく似た遺伝子が*C. elegans*のゲノムにも認められる。）や細胞系譜など生物としての基本的な情報がそろっていること、などが挙げられる。

前述のように、Satoらは、すでにケトヘキソース全8異性体のなかでD-psicoseのみ*C. elegans*に対して線虫成長阻害作用がもつことを報告している。そこで本研究は、未だその生物活性がほとんど明らかとなっていないその他の希少糖とそれらの誘導体について、*C. elegans*を用いて抗線虫活性（成長阻害活性と殺線虫活性）を指標として、網羅的に一次スクリーニングを実施した。具体的には、Satoらの報告した方法から、バイオアッセイ方法を改良し、また、50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）を算出することにより生物活性の強さを定量化し、各異性体間で活性の比較を試みた。得られた結果から、希少糖の成長阻害作用メカニズムについて考察を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 実験材料

本研究で使用した自活性線虫は、原則として、野生株である*Caenorhabditis elegans* N2株を使用した。

線虫の飼育に関する試薬及びプロトコルは、原則として、Brennerの方法に従った。

今回、使用した希少糖については、原則として香川大学希少糖研究センターから提供のあったものを用いたが、それでも入手が困難だったものや逆に入手が容易なものは市販の試薬を用いた。また、詳細な検討が必要となり、希少糖研究センターからの提供量では不足したものについても市販の試薬を用いた。これらの被験物質を以下に示す。

#### ○アルドヘキソース

D-allose, D-altrose, D-glucose, D-mannose, D-gulose, D-idose, D-galactose, D-talose, L-allose, L-altrose, L-glucose, L-mannose, L-gulose, L-idose, L-galactose, L-talose。

#### ○ケトヘキソース

D-psicose, D-fructose, D-sorbose, D-tagatose, L-psicose, L-fructose, L-sorbose, L-tagatose。

#### ○アルドペントース

D-ribose, D-arabinose, D-xylose, D-lyxose, L-ribose, L-arabinose, L-xylose, L-lyxose。

#### ○ケトペントース

D-xylulose, D-ribulose。

#### ○アルドテトロース

(様式 5) (Style5)

D-erythrose, D-threose, L-erythrose, L-threose。

○デオキシ糖

1-deoxy-D-psicose, 1-deoxy-D-fructose, 1-deoxy-D-sorbose, 1-deoxy-D-tagatose, 1-deoxy-L-psicose, 1-deoxy-L-fructose, 1-deoxy-L-sorbose, 1-deoxy-L-tagatose, 5-deoxy-D-psicose, 6-deoxy-D-psicose, 6-deoxy-L-psicose, 6-deoxy-D-allose, 6-deoxy-D-glucose, 6-deoxy-L-allose, 6-deoxy-L-sorbose, 6-deoxy-D-fructose, 6-deoxy-D-tagatose, 6-deoxy-D-altrose, 1-deoxy-D-talitol, 2-deoxy-D-glucose, L-fucose (6-deoxy-L-galactose)。

○ポリオール (糖アルコール)

D-mannitol, D-sorbitol, L-mannitol, allitol, galactitol, D-arabitol, L-arabitol, ribitol, xylitol。

○アミノ糖

N-acetyl-D-glucosamine, D-glucosamine hydrochloride, D-glucamine, D-galactosamine hydrochloride, N-methyl-D-glucamine, N-acetyl-D-mannosamine monohydrate。

○その他の物質

Acarbose, 3-O-methyl-D-glucose, パインファイバーW (難消化性デキストリン), methyl  $\beta$ -D-arabinopyranoside, metformin hydrochloride, D-mannoheptose, 3-bromopyruvic acid。

希少糖の脂肪酸エステル化物については、香川大学農学部の川浪教授より提供のあったものを用いた。

(2) 線虫成長阻害活性スクリーニング試験

培養容器として、細胞培養用のポリスチレン製 24 ウェルマルチプレートを使用し、*C. elegans* の L1 幼虫、大腸菌 *Escherichia coli* OP50 株 1g-wet/35mL in S 培地を 20  $\mu$ L、最終濃度が 0mM(control), 42mM, 83mM, 167mM (分子量が不明な物質は、0%, 0.75%, 1.5%, 3%とした) となるよう所定量の希少糖を加え、全量を 200  $\mu$ L に調製し、20°C で静置培養を行った。72 時間経過後、麻酔剤としてアジ化ナトリウムを加え、顕微鏡撮影を行い、電子データファイル化した。これを、画像解析ソフト ImageJ を用いて、面積値を求め、比較を実施した。

(3) 線虫成長阻害活性詳細試験

(2) で顕著な影響が見られた物質については、さらに詳細試験として、試験濃度を調整し、プロビット法で成長 50% 阻害濃度 ; IC<sub>50</sub> の算定を行った。

(4) 完全合成培地における線虫成長阻害活性試験

希少糖による線虫成長阻害活性発現のメカニズムにおいて、希少糖が直接、*C. elegans* に作用して、線虫成長阻害活性を発現しているのではなく、培地中に共存する餌として与えた大腸菌によって希少糖が何らかの代謝を受け、その二次代謝産物が *C. elegans* に線虫成長阻害活性という形でもって、影響を与えているのではないかという議論が存在する。

そこで、その議論に決着をつけるため、大腸菌が存在しない環境、すなわち、完全合成培地 (*C. elegans* maintenance medium ; CeMM 培地) 中において、顕著な影響が見られた物質のうち、一部について、詳細試験を行った。

試験方法は、(3) と同様な方法とし、1 ウェルにつき、L1 幼虫、D-glucose 18  $\mu$ mol または 酢酸カリウム 10  $\mu$ mol, アンピシリン 40  $\mu$ g, 2 倍濃度 CeMM 培地を 100  $\mu$ L 加え、超純水で全量を 200  $\mu$ L とし、20°C で静置培養した。人工培地では、その成長速度が大腸菌を使用した

## (様式 5) (Style5)

場合に比べて非常に遅いため、control 区で次世代の L1 幼虫の孵化を確認できた時を終点とした。

### (5) -1 *C. elegans* の変異体を用いた希少糖の線虫成長阻害活性のメカニズムの探索

数種類の *C. elegans* の変異体を用いて、線虫成長阻害活性のあった希少糖等でアッセイを行い、その結果から考察を行った。

### (5) -2 線虫成長阻害活性の回復試験

線虫成長阻害活性のあった各種希少糖ともに線虫成長阻害活性を回復させられる可能性の考えられる D-glucose や D-fructose, D-ribose などの単糖やヘキソキナーゼ阻害剤である D-mannoheptose, N-acetyl-D-glucosamine や 3-bromopyruvic acid を共存させ、線虫に与える影響を見た。

## 3. 結果及び考察

D-psicose 以外にも、いくつかの希少糖に線虫成長阻害活性があることが明らかとなり、特に、D-arabinose, 2-deoxy-D-glucose 等には、D-psicose を上回る強い線虫成長阻害活性があることが認められた。また、一部の D-allose 脂肪酸エステル化物等には致死性の活性が認められた。試料量に制限があったため線虫成長阻害活性のあった希少糖すべてで詳細な試験が実施できたわけではないが、概ね、完全培地 (CeMM 培地) におけるアッセイでも通常の大腸菌存在下におけるアッセイと同等な結果が得られたことから、大腸菌による二次代謝産物が線虫成長阻害活性を引き起こしている可能性は否定できた。

今回、使用した変異体のうち、AMPK (AMP activated protein kinase) を欠損している RB754 株では野生型の N2 株の約 5 倍、D-psicose の活性が上がったが、その他の変異体では差がなかった。その他、活性のあった希少糖について RB754 株でアッセイを行うと、D-psicose と同じく 5 倍程度活性が高くなったもの、2 倍程度活性が高くなったもの、等様々なタイプに分かれた。

線虫成長阻害活性の回復試験において、D-psicose などにおける結果から、少なくとも、D-psicose は、細胞の外で糖の取り込みを阻害することにより線虫成長阻害活性を発現しているのではなく、細胞に取り込まれてリン酸化することをトリガーに線虫成長阻害活性を発現していることが示唆された。

## 第 2 章 希少糖脂肪酸エステルの殺線虫活性

### 1. 諸言

現在、世界各地で植物寄生性線虫や動物寄生性線虫の被害が発生している。寄生性線虫への有効な薬剤は限られており、耐性線虫の出現問題もあり、新たな作用機作を持つ薬剤の開発が求められている。第 1 章において、D-allose 脂肪酸エステル化物の活性は、線虫成長阻害活性ではなく、線虫に対して、致死性の活性があることが明らかとなったため、これは、新たな殺線虫剤への道が開けるのではないかと考え、その殺線虫活性を詳細に調べ、そのメカニズムの考察を行った。

### 2. 実験方法

#### (1) 実験材料

希少糖の脂肪酸エステル化物は、香川大学農学部の川浪教授より提供のあったもののほか、川浪教授の方法により調製したものを用いた。その他、遊離の脂肪酸は、市販の試薬を用いた。

## (様式5) (Style5)

### (2) 半数致死濃度 ; $LC_{50}$ の算定

第1章の(2)(3)と同様な方法でアッセイを行った。アッセイセット時に供試L1幼虫の数を数え、72時間経過後、生存している虫の数を数えた。プロビット法で半数致死濃度 ;  $LC_{50}$  を算定した。

### 3. 結果及び考察

遊離の脂肪酸は、炭素数が増えるにしたがって、活性が強まるという結果を得た。D-alloseの脂肪酸エステルについてはC8エステル及びC12エステルにのみ殺線虫活性を認めた。C4エステル、C6エステル、C10エステル及びD-glucoseのC8エステルでは活性を認めなかった。

また、エステル誘導体と対応する脂肪酸の活性を比較すると、D-alloseのC8エステルの活性は、オクタン酸の活性よりも明らかに高いこと、D-alloseのC10エステル及びD-glucoseのC8エステルで活性を認めなかったことから、線虫の体内で加水分解されず、エステル化物のまま致死性の効果を発現しているものと考えられ、糖の3位の水酸基の立体配置も重要なファクターを占めていると考えられた。