

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07138

研究課題名(和文) 生物活性発現初期段階におけるフラボン類とリン脂質膜との相互作用解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between flavones and phospholipid membranes in the early stage of biological activity expression

研究代表者

植草 義徳 (Uekusa, Yoshinori)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：30753024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイド類のリン脂質膜親和性と生物活性強度の連関を化学的アプローチにより解明することを目的とし、構造活性相関に資する多種多様なフラボノイド類を生薬からの単離あるいは化学合成することで取得した。リン脂質カラムを用いて算出されたこれらフラボノイド類のリン脂質膜親和性は、細胞膜内への蓄積量(取り込み量)と強い相関を示し、化合物の細胞膜内蓄積量を従来法より簡便かつ迅速に評価できることを示した。さらにモデルリン脂質膜とNMR法を駆使することで、フラボノイド二量体であるテアフラビン類のリン脂質膜における構造基盤を解明し、テアフラビン類が呈する生物活性強度の違いを化学的に説明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物の生物活性発現初期機構を個々の分子の物理化学的性質(リン脂質膜親和性)と関連付けて実証している研究は稀であり、本研究課題は先駆的な位置付けであるといえる。また、化合物の細胞膜内蓄積量を簡便に評価することを可能にしたリン脂質カラム分析法の構築や、活性強度の差をリン脂質膜中における化合物の状態分析によって解明した本研究成果は学術的に意義があるといえる。さらに本研究課題によって創出されたフラボノイド類は今後のスクリーニングによって生物活性が見出されることにより、創薬研究のシーズ化合物として利用できること期待される。

研究成果の概要(英文)：A wide variety of flavonoids that contribute to the structure-activity relationships were isolated from crude drugs or chemically synthesized to elucidate the relationship between the affinity of the flavonoids for phospholipid membranes and the intensity of their biological activities. The affinity of these flavonoids was calculated using immobilized artificial membrane columns showed a strong correlation with the amount of accumulation in the cell membrane, indicating that this method can be evaluated the accumulation of compounds in the membrane more easily and quickly than with conventional methods. Furthermore, by using model phospholipid membranes and NMR spectroscopy, we were able to elucidate the structural basis of the flavonoid dimers, theaflavins, in phospholipid membranes and chemically explain the differences in the intensity of the biological activity exhibited by theaflavins.

研究分野：天然物化学, 分析化学, 食品化学

キーワード：フラボノイド類 構造活性相関 フラボン類 フラボノール類 リン脂質膜親和性 NMR 分子間相互作用 リン脂質膜

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生薬は天然資源を利用して我々人類が用いた最初の医薬品であり、現在においても合成医薬品やバイオ医薬品と肩を並べて医薬品の一翼を担っている。これまでに生薬中から多種多様な化学構造を持つフラボノイド類が報告されているが、それら生物活性強度はわずかな化学構造の違いによって大きく左右される場合が多い。フラボノイド類のみならず生物活性を有する化合物は、細胞表面あるいは細胞内の標的となる生体分子と相互作用することで、特徴的な生物活性を発揮すると考えられる。フラボノイド類が細胞内外のタンパク質と相互作用して生物活性を示す現象とその作用機序は膨大な *in vitro* 実験等によって露わになりつつあり、各化合物の活性強度の違いは標的となるタンパク質に対する親和性の違いとして記述される場合が多い。一方、先行研究において緑茶に含まれるフラボノイド類のカテキン類に焦点をあて、化学的なアプローチによりカテキン類の種類(化学構造)の違いによって生物活性強度が異なる事実を細胞膜(リン脂質膜)への親和性の違いから解明した。即ち、『活性成分が生物活性を示す作用機序の第一段階として、まず細胞膜(リン脂質膜)に接触することが重要である』という考えのもと、『カテキン類の種類の違いによって生じる生物活性強度の差は、リン脂質膜に対する親和性の違いが大きく影響しており、親和性の高い分子はリン脂質膜上の受容体や輸送体へのコンタクト、あるいは細胞内に取り込まれる機会が増え、その結果として高い生物活性を示す』ということ提唱し、カテキン類のリン脂質膜親和性と生物活性強度を分子レベルで関連づけた。カテキン類以外のフラボノイド類についても生物活性発現の初期段階はカテキン類と共通の基盤を有していると推測しており、フラボノイド類の種類によって生物活性強度が異なる要因をリン脂質膜との相互作用という観点から説明づけられるのではないかと考えた。しかしながら、実際にカテキン類の解析のみで得られた知見が多様な化学構造を有するフラボノイド類全般に当てはまるのかどうかは不明であり、例えば、どのような化学構造を有するフラボノイド類がリン脂質膜に対して親和性が高いのか、リン脂質膜への親和性と発現する生物活性強度の間に相関性は認められるのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本課題研究ではフラボノイド類のリン脂質膜親和性と生物活性強度の連関を化学的アプローチにより解明することを目的とし、構造活性相関に資する多種多様なフラボノイド類を生薬からの単離あるいは化学合成することで取得し、リン脂質カラムを用いた HPLC 分析や *in vitro* 実験(細胞透過性や抗炎症作用)から得られた結果を統合して系統的に解析することで達成することにした。また、フラボノイド類やその類縁体(二量体)とリン脂質膜との相互作用様式の詳細について分子レベルで明らかにし、特に NMR を用いてリン脂質膜との分子間相互作用における構造的基盤を中心に解析し、フラボノイド類全般の生物活性発現初期段階における作用機序の全容解明に道筋をつけ、生物活性発現機構の本質的理解と生物活性のより高い化合物(“最強”の活性を有するフラボノイド)の創出を目指している。本研究課題は、これまでに展開してきた独創的な研究をさらに拡張させるものであり、さらには創薬における戦略的基盤を提供するものであるといえる。

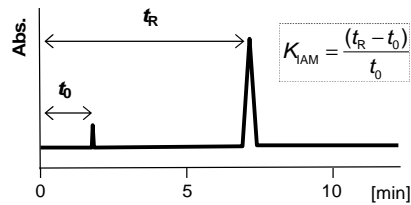
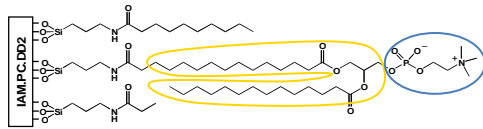
### 3. 研究の方法

#### (1) 構造活性相関に資するフラボノイド類の単離および化学合成

本研究課題で用いるフラボノイド類は、生薬(オウゴン、チンピ、カイカ)から溶媒抽出と各種カラムクロマトグラフィを用いて単離した。これらフラボノイド類や市販品フラボノイド類は、メチル化や脱メチル化、エルブス過硫酸酸化といった合成反応を行い、フラボノイド骨格に酸素置換基を 0 個から 7 個有するフラボノイド類を取得した。

#### (2) フラボノイド類のリン脂質膜親和性評価

フラボノイド類のリン脂質膜親和性は、リン脂質(phosphatidylcholine)分子がカラム担体に結合した immobilized artificial membrane (IAM) カラムを用いて HPLC 分析することで、リン脂質膜親和性( $K_{IAM}$ )を算出することで評価した。また、フラボノイド類について ODS カラムを用いて HPLC 分析し、同様に  $K_{ODS}$  を算出することで疎水性度を評価した。

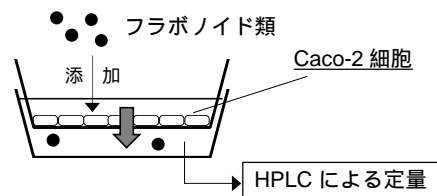


IAM カラムの担体 (左) と HPLC 分析で得られるリン脂質膜親和性 ( $K_{IAM}$ ) (右)

### (3) 生物活性評価 (抗炎症作用) と Caco-2 細胞を用いた細胞膜親和性 (透過性) 試験

フラボノイド類の抗炎症作用は、J774.1 細胞を用いたリポ多糖誘導性 NO 産生量を Griess 法により測定し、コントロールとの比較により抑制率を算出することで評価した。

フラボノイド類の細胞膜透過試験は、ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞を用いて行った。トランスウェルに Caco-2 細胞の単層膜を作製し、各フラボノイド類を管腔側に添加し、基底膜側への透過量、基底膜側から管腔膜側への透過量、そして細胞膜内の蓄積量を HPLC により定量した。



Caco-2 細胞を用いたフラボノイド類の細胞透過実験

p

### (4) NMR を用いたフラボノイド類およびフラボノイド二量体とリン脂質膜との相互作用解析

リン脂質 (DMPC および DHPC) から構成されるモデル生体膜 (バイセル) を調製した。続いて、フラボノイド類およびフラボノイド二量体 (テアフラビン類) をバイセル共存下および非共存下 (重水中) にて  $^1\text{H}$  NMR、縦緩和時間 ( $T_1$ )、および NOESY を測定し、リン脂質膜中および水溶液中におけるフラボノイド類およびテアフラビン類の状態解析した。さらに取得した NMR データを基に、リン脂質膜との分子間相互作用の構造基盤を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 構造活性相関に資するフラボノイド類の単離および化学合成

フラボノイド骨格の B 環に置換基を持たないフラボン類は、生薬オウゴンを用いて調製した抽出物より単離した。単離したフラボン類や市販品はメチル化反応により対応するメトキシフラボン類を合成した。酸素置換基を複数有するメトキシフラボン類も同様に市販品のメチル化やエルブス過硫酸酸化反応、6,8-dibromo-5,7-dihydroxyflavone を合成中間体とした構造展開などにより取得した。さらに A 環と B 環に酸素置換基を有するメトキシフラボン類およびメトキシフラボノール類、およびそれらヒドロキシ体は、チンピヤカイカといった生薬から抽出・単離した化合物のメチル化や脱メチル化により調製し、最終的に計 61 種 (合成したフラボノイド類は 32 種) のフラボノイド類および二量体 (テアフラビン類) を取得した。これらの中にはこれまでに天然中からの単離や化学合成の報告のないフラボノイド類も含まれており、本研究課題だけでなく、創薬研究のシーズ化合物として利用できると期待される。

### (2) フラボノイド類のリン脂質膜親和性と生物活性 (抗炎症作用) および細胞膜親和性の連関

取得したフラボノイド類について、IAM カラムを用いてリン脂質膜親和性 ( $K_{IAM}$ ) を評価したところ、化合物の疎水性度とリン脂質膜親和性との間に相関が認められたが、一部の化合物においては疎水性度の上昇によりリン脂質膜親和性は低下した。このことから、フラボノイド類のリン脂質膜親和性は、化合物自身の疎水性度のみには支配されているのではなく、リン脂質分子との水素結合は静電的相互作用なども関与していることが示唆された。

次に、フラボノイド類のリポ多糖誘導性 NO 産生抑制活性 (抗炎症作用) を評価し、構造活性相関ならびにリン脂質膜親和性との連関性を検討した。メトキシを有するフラボン誘導体は高い活性を示す傾向が認められたが、置換パターンによる系統的な構造活性相関は認められなかった。この結果は、酸素置換基を多数有するフラボン類は細胞内において異なる様々な段階で抗

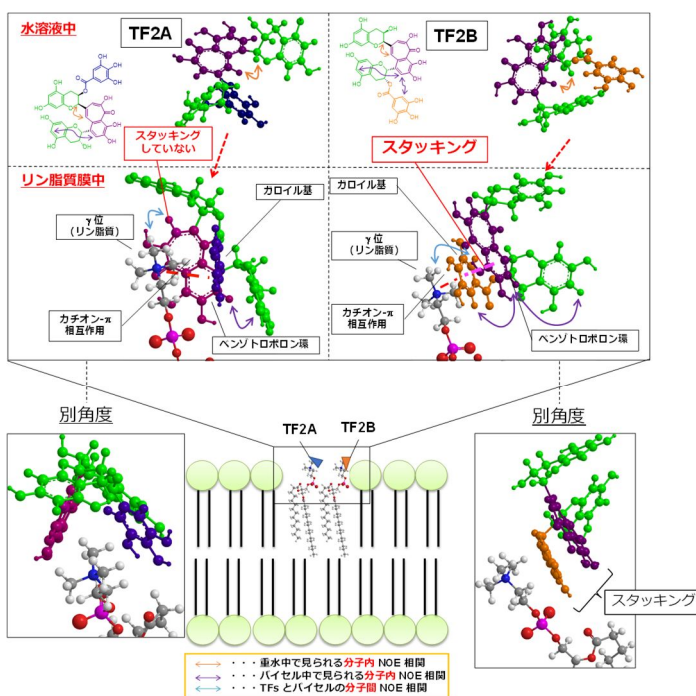
炎症作用に関連する NO 産生シグナル伝達経路を阻害するためと考えられる。一方, A 環に酸素置換基を一つ有するフラボン類にのみ, リン脂質膜親和性と NO 産生抑制活性強度の間に強い相関が認められた。このことから, これらフラボン類は, 細胞表面あるいは細胞内において同じ作用点に作用していることが考えられた。

続いて, 実際の細胞膜に対する親和性を検討するために, A 環に酸素置換基を有するフラボン類について, Caco-2 細胞を用いてフラボノイド類の細胞膜透過量, および細胞膜内への蓄積量を HPLC により定量した。その結果, 細胞膜内への蓄積量(取り込み量)はフラボン類の種類により大きく異なり, その度合いは IAM カラムを用いた分析により得られたリン脂質膜親和性 ( $K_{IAM}$ ) と強い相関を示すことが明らかとなった。したがって, IAM カラム分析法は, 操作が煩雑で結果が得られるまでに時間を要する Caco-2 細胞を用いた評価法と比較して, 化合物の細胞膜内蓄積量を簡便かつ迅速に評価できることが示された。細胞透過試験では, 管腔側から基底膜側への細胞透過は, 一置換体において 5 位, 7 位, 8 位のヒドロキシ基がそれぞれメトキシ基に置換されると細胞透過性が向上するのに対し, 6 位がメトキシ基に置換されると細胞透過性が減少する傾向が認められた。また, 5 位にヒドロキシ基を有するフラボン類は細胞透過がみられない, あるいはごく僅かであった。このことから, 比較的高いリン脂質膜親和性 ( $K_{IAM}$ ) を示すフラボン類は管腔側から基底膜側への透過が起こりにくく, 細胞膜あるいは細胞内に蓄積されることが考えられた。

### (3) フラボノイド類およびフラボノイド二量体とリン脂質膜との分子間相互作用解析

リン脂質膜親和性が高かったフラボノイド類のリン脂質膜中における動的挙動および相互作用様式を明らかにするため, モデルリン脂質膜(バイセル)および NMR を用いた解析を試みた。まず始めに, リン脂質膜親和性が高く, Caco-2 細胞において細胞膜内に多く蓄積されたフラボノイド類をバイセルに相互作用させたが, 化合物自身の疎水性の高さ(極性の低さ)により, これらフラボノイド類を取り込ませたバイセルを調製することができなかった。

一方, 紅茶に含まれるフラボノイド二量体であるテアフラビン類(TF1, TF2A, TF2B, TF3)のうち, TF2A のみがリン脂質二重層のリポソームを顕著に沈殿させることが明らかとなっていたことから, その機序解明を行うことにした。溶液 NMR 法 ( $^1\text{H}$  NMR, 緩和時間 ( $T_1$ ) 測定, NOESY 測定) により, テアフラビン類とリン脂質膜の分子間相互作用を原子レベルで解析したところ, TF2B のベンゾトロポロン環とガロイル基はリン脂質膜中で環平面がスタッキングしていることが示唆された。しかしながら, リポソームの顕著な沈殿を引き起こす TF2A のガロイル基は, TF2B とはガロイル基の結合位置が異なることから, ベンゾトロポロン環までの距離が遠く, ベンゾトロポロン環の環平面上に到達することが困難であることからスタッキングが起こらないことが考えられた。これら環平面の分子内スタッキングがテアフラビン類のリン脂質膜中における安定性に影響を及ぼすと推測しており, スタッキングが生じない TF2A は結果的にリン脂質膜構造を不安定化し, リン脂質の疎水性面の露出などを経て不溶性の沈殿を形成するのではないかと考察している。



テアフラビン類とリン脂質膜との相互作用モデル図

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kiuchi, F., Uekusa, Y., Narukawa, Y.	4. 巻 76
2. 論文標題 Oxidation of methylpogonone A on the surface of TLC plate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 504-508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-022-01604-7	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 Castillo, U. G., Komatsu, A., Martinez, M. L., Menjivar, J., Nunez, M. J., Uekusa, Y., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Nakajima-Shimada, J.	4. 巻 76
2. 論文標題 Anti-trypanosome screening of Salvadoran flora	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 259-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-021-01562-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Christy, M. P., Uekusa, Y., Gerwick, L., Gerwick W. H.	4. 巻 84
2. 論文標題 Natural products with potential to treat RNA virus pathogens including SARS-CoV-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 161-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.0c00968	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 Okoshi, K., Uekusa, Y., Narukawa, Y., Kiuchi, F.	4. 巻 75
2. 論文標題 Solubility enhancement of berberine-baicalin complex by the constituents of Gardenia Fruit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 76-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-020-01446-1	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 Morita, T., Akiyoshi, T., Sato, R., Uekusa, Y., Katayama, K., Yajima, K., Imaoka, A., Sugimoto, Y., Kiuchi, F., Ohtani, H	4. 巻 68
2. 論文標題 Citrus fruit-derived flavanone glycoside narirutin is a novel potent inhibitor of organic anion-transporting polypeptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 14182-14191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c06132	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 Yamada, K., Yamaguchi, Y., Uekusa, Y., Aoki, K., Shimada, I., Yamaguchi, T., Kato, K.	4. 巻 749
2. 論文標題 Solid-state 17O NMR analysis of synthetically 17O-enriched D-glucosamine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 137455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cplett.2020.137455	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 Shibata, S., Sugiyama, T., Uekusa, Y., Masui, R., Narukawa, Y., Kiuchi, F.	4. 巻 74
2. 論文標題 Five new 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives from agarwood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 561-570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-020-01410-z	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 Katagiri, R., Uekusa, Y., Narukawa, Y., Kiuchi, F.	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis of methylpogonone A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 803-808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-20-14231	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 Shirakawa, R., Ishikawa, S., Takahashi, M., Ueno, Y., Uekusa, Y., Narukawa, Y., Sugai, T., Kiuchi, F.	4. 巻 73
2. 論文標題 Preparation of menisdaurigenin and related compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 236-2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1235-5	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 谷岡ちはる, 植草義徳, 遠周直人, 木内文之, 菊地晴久
2. 発表標題 Baicalinとberberine類縁体の中で生じる化合物間相互作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳瀟逸, 植草義徳, 中山勉, 木内文之, 菊地晴久
2. 発表標題 NMRを用いたテアフラビン類によるリポソーム凝集作用の解明
3. 学会等名 第17回日本カテキン学会年次学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳瀟逸, 植草義徳, 中山勉, 木内文之, 菊地晴久
2. 発表標題 テアフラビン類とリン脂質膜との分子間相互作用解析
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠周直人, 植草義徳, 木内文之
2. 発表標題 Caco-2細胞を用いたフラボン類の細胞透過性とリン脂質膜親和性及び抗炎症作用の連関
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳瀟逸, 植草義徳, 中山勉, 木内文之
2. 発表標題 NMRを用いたテアフラビン類とリン脂質膜との相互作用解析 (第2報)
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤隼, 植草義徳, 成川佑次, 木内文之
2. 発表標題 チャ由来Benzotropolone骨格を有する化合物のキサンチンオキシダーゼ阻害活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳瀟逸, 植草義徳, 中山勉, 木内文之
2. 発表標題 NMRを用いたテアフラビン類とリン脂質膜との相互作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 森田時生, 秋好建志, 矢島広大, 今岡鮎子, 植草義徳, 木内文之, 片山和浩, 杉本芳一, 大谷壽一
2. 発表標題 かんきつ果汁中の新規OATP2B1阻害成分の探索とその阻害活性の定量的評価
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uekusa, Y., Tsutsumi, R., Nakamoto, K., and Kiuchi, F.
2. 発表標題 Structural analysis of the complex of baicalin and berberine in aqueous solution
3. 学会等名 American Society of Pharmacognosy 2019 Annual Meeting (ASP2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okoshi, K., Uekusa, Y., Narukawa, Y., and Kiuchi, F.
2. 発表標題 Solubility-enhancement of berberine-baicalin complex by crocins", American Society of Pharmacognosy 2019 Annual Meeting (ASP2019),
3. 学会等名 American Society of Pharmacognosy 2019 Annual Meeting (ASP2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 公益社団法人 日本分析化学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 糖質分析 「6.4 NMRによる糖鎖 - タンパク質相互作用の解析」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾研究者情報データベース  
[https://k-ris.keio.ac.jp/html/100012932\\_ja.html](https://k-ris.keio.ac.jp/html/100012932_ja.html)

慶應義塾大学薬学部天然医薬資源学講座  
<https://www.keio-nm.jp>

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	木内 文之  (Kiuchi Fumiyuki)  (60161402)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授    (32612)	

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
---------	---------