

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18700

研究課題名(和文)フェノール性硫酸化代謝物の生理機能に関する研究

研究課題名(英文)Study for functionality of sulfo-conjugated phenolic metabolites

研究代表者

安田 伸 (YASUDA, SHIN)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：10512923

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)：第二相薬物代謝反応におけるフェノール性化合物の硫酸化抱合は、活性成分の不活性化に寄与すると通常は考えられている。本研究では1-naphthol (1-Nap)と2-naphthol (2-Nap)およびこれらの硫酸化代謝物の1-naphthyl sulfate (1-NapS)と2-naphthyl sulfate (2-NapS)を硫酸化前後のモデル化合物として使用し、これらのフリーラジカル消去作用について既存の手法を用いて比較検証を試みた。その結果、Nap異性体の硫酸化抱合が常に抗酸化活性を軽減させる訳ではなく、その活性は硫酸化される部位に依存するということが本研究により明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Phase-II conjugation of phenolic compounds is generally thought to result in their inactivation. The current study aimed to investigate whether sulfated form of certain phenolic compound(s) could demonstrate any biological functions as the model. Antioxidative effects of 1-naphthyl sulfate (1-NapS) and 2-naphthyl sulfate (2-NapS), in comparison with their unsulfated counterparts 1-Nap and 2-Nap, using established free radical scavenging assays. The results obtained indicated that sulfate conjugation of the Nap isomers did not always result in the decrease of their antioxidant activity, and the antioxidant activity that remained appeared to depend on the position of sulfation.

研究分野：食品機能科学、食品生化学、薬物代謝化学、健康食品学

キーワード：代謝物 抱合体 硫酸体 生理機能性 フェノール性化合物 ポリフェノール 抗酸化 フリーラジカル

1. 研究開始当初の背景

農学と医薬学の境界領域に位置する食品機能科学は、ポリフェノール等の食品由来生理活性因子が生体リズムの調節を担う低分子化学物質の本体であるとし、生活習慣病予防またはリスク低減を目指した研究分野として発展してきた。第二相薬物代謝反応におけるフェノール性化合物の硫酸化抱合は、活性成分の不活性化に寄与することと通常は考えられている。

近年、食品や薬剤摂取後に体内で生じる代謝物(メタボライト)が直接要因となり体調節機能を発現しうる可能性が提唱されつつあるものの、多岐に亘る代謝物の質と量を計測し、さらには生理活性の有無や差異における詳細な検証は、その複雑さゆえに未だ不明な部分も多く残る。

2. 研究の目的

主に硫酸化代謝物に着目し、フェノール性化合物の「メタボライト」の生理機能を検証することを大きな目標とし、とくに本研究では 1-naphthol (1-Nap) と 2-naphthol (2-Nap) およびこれらの硫酸化代謝物の 1-naphthyl sulfate (1-NapS) と 2-naphthyl sulfate (2-NapS) を硫酸化前後のモデル化合物として使用し、これらのフリーラジカル消去作用について既存の手法を用いて比較検証を試みた。本研究で使用したこれら化合物の化学構造式を **図 1** に示す。

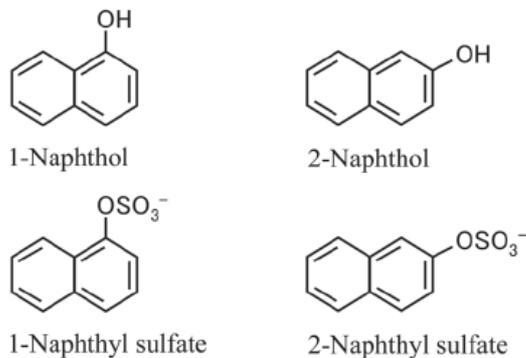


図 1. 本研究で活性試験に用いたモデル化合物 1-naphthol (1-Nap), 2-naphthol (2-Nap) とそれらの硫酸体である 1-naphthyl sulfate (1-NapS) と 2-naphthyl sulfate (2-NapS) の化学構造式

3. 研究の方法

(1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性試験: 0.1 M 酢酸緩衝液中に 1,000 μM までの異なる濃度で試験化合物および 0.5 mM の DPPH ラジカル溶液を加えて反応を開始した。517 nm の吸光度減少を指標

に、試験化合物のラジカル捕捉能について EC_{50} 値を算出して比較評価した。

(2) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) cation (ABTS⁺) ラジカル消去活性試験: メタノール中に予め調製しておいた ABTS-working solution を、終濃度 1,000 μM までの異なる濃度となるように分注しておいた試験化合物に加えて反応を開始した。734 nm の吸光度減少を指標に、試験化合物のラジカル捕捉能について EC_{50} 値を算出して比較評価した。

4. 研究成果

1-Nap はペルオキシラジカルアッセイモデルにおいて反応性を示す抗酸化物質であることが報告されている。Nap 異性体とその硫酸化体の生化学的な作用については包括的に比較調査されていない。そこで、我々はいくつかのフリーラジカル消去活性測定法を用いてこれら硫酸化前後の化合物の潜在的な抗酸化力を調べることにした。1-NapS vs. 1-Nap と 2-NapS vs. 2-Nap の組み合わせで、2種類の異なるフリーラジカルアッセイにおける活性試験を行なった。

図 2A に示すように、1-NapS は非硫酸体である 1-Nap (EC_{50} ; 23.4 μM) よりも弱い DPPH ラジカル消去活性 (EC_{50} ; 172 μM) を示した。対照的に、2-NapS は 2-Nap のとき (EC_{50} ; 22.6 μM) と同等の DPPH ラジカル消去活性 (EC_{50} ; 29.8 μM) を示した (**図 2B**)。

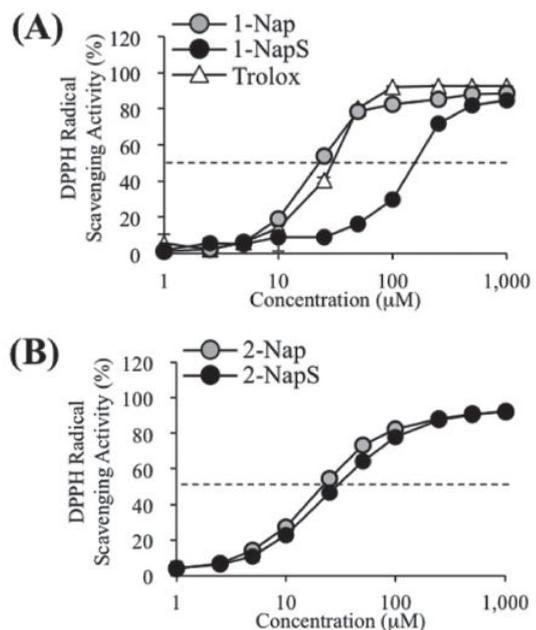


図 2. Nap 異性体とその硫酸体の DPPH ラジカル消去活性試験における抗酸化作用. (n=4)

これら 2 対の Nap 異性体と硫酸体の試験化

合物を用いて、同様の結果が ABTS⁺ラジカル消去活性においても観察された。図 3A に示すように、1-NapS は非硫酸体である 1-Nap (EC₅₀; 11.2 uM) よりも弱い ABTS⁺ラジカル消去活性 (EC₅₀; 75.4 uM) を示した。一方で 2-NapS と 2-Nap は同等の DPPH ラジカル消去活性 (EC₅₀; それぞれ 10.4 uM と 11.2 uM) を示した (図 3B)。

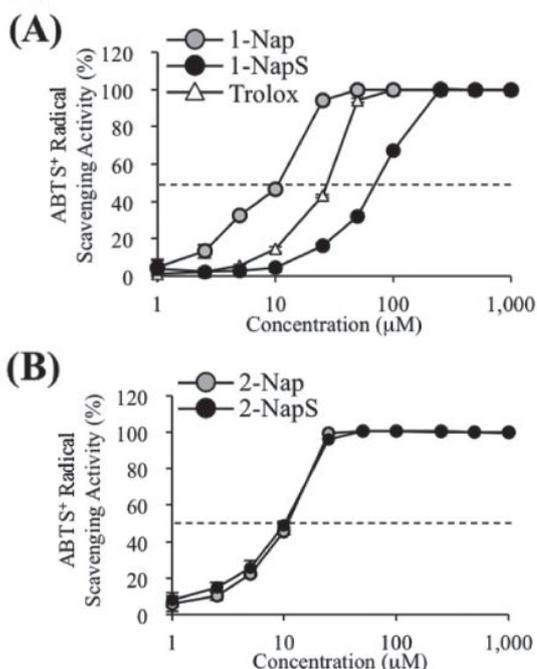


図 3. Nap 異性体とその硫酸体の ABTS⁺ラジカル消去活性試験における抗酸化作用. (n=4)

表 1. 異なるフリーラジカル消去活性試験における Nap 異性体とその硫酸体の EC₅₀ 値と EC₅₀ 値の比率. (n=4)

| | DPPH radical EC ₅₀ (uM) | ABTS ⁺ radical EC ₅₀ (uM) |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1-Nap | 23.4±0.7 | 11.2±0.3 |
| 1-NapS | 172±2 | 75.4±1.1 |
| 2-Nap | 22.6±0.5 | 11.2±0.5 |
| 2-NapS | 29.8±0.4 | 10.4±0.7 |
| Trolox | 31.1±0.8 | 28.4±0.4 |
| Ratio of EC ₅₀ values * | | |
| 1-NapS/1-Nap | 7.35 (0.136) | 6.73 (0.149) |
| 2-NapS/2-Nap | 1.32 (0.758) | 0.929 (1.08) |
| 1-Nap/2-Nap | 1.04 (0.962) | 1.00 (1.00) |

*括弧の値は 'Ratio of EC₅₀ values' の逆数

表 1 は上記の実験で得られた Nap と NapS の異性体および trolox の EC₅₀ 値をまとめたものである。EC₅₀ 値 (またはその逆数) を算出することにより、1-NapS の DPPH ラジカル消去活性および ABTS⁺ラジカル消去活性は 1-Nap よりもそれぞれ 7.35 倍および 6.73 倍弱いものであることが判明した。これらの結果は、硫酸化抱合が不活性化経路に位置すると

いう従来の考え方と一致するものであった。従って、1-NapS のラジカル消去活性は 1-Nap の 0.136-0.149 倍程度であることを意味している。一方で、2-NapS は DPPH ラジカル消去活性および ABTS⁺ラジカル消去活性において比較的 2-Nap と同等の活性を有することを認めた。即ち、2-NapS のラジカル消去活性は 2-Nap の 0.758-1.08 倍程度であることを意味している。これらフリーラジカルに対して 1-Nap および 2-Nap は同等の活性を示していた。

以上のことより、Nap 異性体の硫酸化抱合が常に抗酸化活性を軽減し不活化させる訳ではなく、その活性は硫酸化される部位に依存しうることが本研究により明らかになった。

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 2 件)

Sugahara S, Fukuhara K, Tokunaga Y, Tsutsumi S, Ueda Y, Ono M, Kurogi K, Sakakibara Y, Suiko M, Liu M-C, Yasuda S. (2018.3) Radical scavenging effects of 1-naphthol, 2-naphthol, and their sulfate-conjugates. J Toxicol Sci 43, 213-221.

Sugahara S, Ueda Y, Fukuhara K, Kamamuta Y, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2015.11, Epub2015.10) Antioxidant effects of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical and reducing power assays, especially on different superoxide anion radical generation systems. J Food Sci 80, C2420-C2429.

〔学会発表〕(計 10 件)

菅原進太郎, 福原久美子, 徳永祐希, 堤秀平, 上田裕人, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸. 1-Naphthol と 2-Naphthol のフリーラジカル消去能における硫酸抱合化の影響. 平成 29 年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会. Aam13, 講演要旨集 p29. (長崎県立大学シーボルト校, 長崎県西彼杵郡長与町). 2017 年 10 月 29 日.

堤秀平, 菅原進太郎, 徳永祐希, 志水隼輔, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, 安田伸. Tryptophan 由来の代謝物 Indoxyl および Indoxyl Sulfate の抗酸化活性の評価. 平成 29 年

度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会. Aam11, 講演要旨集 p27. (長崎県立大学シーボルト校、長崎県西彼杵郡長与町). 2017年10月29日.

徳永祐希, 菅原進太郎, 堤秀平, 大川瑛梨子, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. 解熱鎮痛薬 Acetaminophen 由来代謝物の強力な 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性: 類似化合物間での比較評価. 平成 29 年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会. Aam12, 講演要旨集 p28. (長崎県立大学シーボルト校、長崎県西彼杵郡長与町). 2017年10月29日.

堤秀平, 菅原進太郎, 徳永祐希, 志水隼輔, 木下英樹, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. Tryptophan 由来の尿毒症物質 indoxyl sulfate とその関連代謝物の抗酸化活性の評価. 第 23 回フードサイエンスフォーラム学術集会. P-9, 講演要旨集 p42. (ヒムカルーム / コテージヒムカ、宮崎県宮崎市) 2017年9月9日~10日. 最優秀ポスター賞受賞

Yasuda, S. Antioxidant effects of herbal tea leaves from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical assays. In division A: Food Chemistry, Nutrition, and Analysis. The 19th Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC2017) – Innovative Food Science and Technology for Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society. Hosted by Faculty of Agro-Industry, KMITL, KMUTNB, and KUMTT. Bangkok International Trade & Exhibition Center (BITEC), Bangkok, Thailand, June 15, 2017. Invited speaker.

Sugahara S., Ono M., Igoshi K., **Yasuda S.** Inhibitory effect of 4-methylumbelliferyl sulfate on superoxide anion radical generation assays. The First International Conference on Hybridized Agriculture. (Sojo University, Kumamoto, Japan), P22-12, Abstracts p47. Oct. 22, 2016.

徳永祐希, 菅原進太郎, 大川瑛梨子, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. 解熱鎮痛薬 acetaminophen 由来代謝物の活性酸素消去作用. 日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会, A-a8, 講演要旨集 p10 (長崎県長崎市、長崎大学文京キャンパス) 2016年9月16日.

菅原進太郎, 福原久美子, 小野政輝, 井越敬司, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. 1-または 2-naphthol とその硫酸体の抗酸化作用および細胞毒性の比較評価. 2016 年度 (第 20 回) 生物機能研究会 (宮崎県宮崎市、フェニックス・シーガイア・リゾート コテージ・ヒムカ) 2016年7月2日

徳永祐希, 菅原進太郎, 大川瑛梨子, 小野政輝, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. 解熱鎮痛薬 acetaminophen 由来の代謝物による酸化バランス調節作用. 2016 年度 (第 20 回) 生物機能研究会 演題番号 2, 講演要旨集 p11 (宮崎県宮崎市、フェニックス・シーガイア・リゾート コテージ・ヒムカ) 2016年7月2日

菅原進太郎, 小野政輝, 井越敬司, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. 4-Methylumbelliferone とその硫酸化代謝物による活性酸素産生抑制作用. 2015 年度 (第 19 回) 生物機能研究会 (佐賀県佐賀市、佐賀大学) 2015年7月4日

〔図書〕(計 0 件) 該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件) 該当なし

○取得状況 (計 0 件) 該当なし

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田伸 (YASUDA, Shin)
東海大学・農学部・准教授
研究者番号: 10512923

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者 該当なし