

令和元年6月13日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18704

研究課題名(和文) アセチル化ケルセチンの生理活性増強の原因の解明

研究課題名(英文) Clarifying the mechanism of increased biological activity by acetylated quercetin.

研究代表者

坂尾 こそ枝 (Kozue, Sakao)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・助教

研究者番号：40713285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アセチル化ケルセチンの生理活性がケルセチンの生理活性よりも増強する起因を解明するため、ケルセチンの1～5箇所のヒドロキシル基のアセチル修飾を行い、その合成に成功した。十分量得られた3Ac-Q、4Ac-Q、5Ac-Qを用いて、ヒト大腸がん細胞におけるアポトーシス誘導能および腸管吸収透過性や人工膜透過性、ヒト肝臓がん細胞を用いた代謝産物の違いを測定した結果、アセチル化体は膜透過性を向上させること、また、アセチル基の数ではなく、アセチル化される位置に生理活性増減が寄与すること、アセチル化体の代謝速度は、ケルセチンより遅く、その結果、生体内に長く留まり、効果を発揮する可能性があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然化合物の一部を修飾し、その生理活性を細胞を用いて評価する研究報告例はあまりなく、中でも生理活性増強が何に起因するかについて深く言及している研究報告はほとんど無い。そのため、本研究においてケルセチンのアセチル誘導体がケルセチンより強い活性を示す理由について、明確な科学的見解を提示し一連の生物学的操作の流れを構築したことは学術的に重要な意義を持つと考えている。また本研究で得ることが出来た最大の成果として、アセチル化による生理活性増強がアセチル基の数ではなく、ヒドロキシル基の修飾部位に起因することが解明されたことがあり、他のフラボノール類の生理活性増強のヒントになりうる点でも意義深いと思われる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the reason why the biological activity of acetylated quercetin is enhanced over the biological activity of quercetin, we focus on the number of acetyl groups and their substituted position of quercetin. We successfully synthesized quercetin derivatives which were substituted the 1-5 hydroxyl groups of quercetin with acetyl groups. Treatment of HCT-116 human colon cancer cells with quercetin and its derivatives was found to significantly inhibit cell proliferation in the order of 4Ac-Q, 3Ac-Q, 5Ac-Q, and quercetin. This means that the increase in biological activity of acetylated quercetin is due not only to the number of acetyl groups but also to the substitution position. It was also revealed that the acetylated form improves the membrane permeability and the metabolic rate of the acetylated form is slower than that of quercetin, and may be effective by staying in vivo for a long time.

研究分野：農学

キーワード：ケルセチン アセチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケルセチンは食品中の機能性化合物、特に果物や野菜などに多く存在するフラボノイド系ポリフェノールの代表例であり、近年、ファイトケミカル(植物栄養素)としても注目を集めている化合物の一つである。ファイトケミカルに期待される生理調節機能に深く関わる効果の一つとして優れた抗酸化作用が挙げられており、中でもフェノール性ヒドロキシル基を持つフラボノイドが示す抗酸化作用は、その構造に大きく依存していることが広く知られている。特にラジカルを捕捉するためのB環のカテコール構造、ラジカル捕捉活性を高めるC-3、A-5のヒドロキシル基(-OH)、B環からの不対電子の非局在に必要なC2-3の二重結合、の3つが構造上重要であるとされている。しかし、これらの知見は、類似構造のフラボノイドを用いた比較実験により得られたものであり、ヒドロキシル基の機能評価を直接的に行った報告例がほとんど無かったことから、申請者は先行研究としてケルセチンのB環のヒドロキシル基およびC-3、A-5のヒドロキシル基を含む、4か所のヒドロキシル基を修飾することで、フラボノイドの生理活性とヒドロキシル基の関連性を直接的に解明することに努めてきた。その結果、非常に興味深いことに、メチル基やベンジル基で修飾したケルセチンではアポトーシス誘導能が著しく減少したのに対し、アセチル基で修飾したケルセチンでは逆にケルセチンよりも強い作用が認められるという実証を得た。過去の報告によると、同じフラボノイドである、カテキンでは、B環のヒドロキシル基がアセチル修飾した場合、抗酸化活性が著しく減少したことより、申請者が得た結果は、同じフラボノイドでも構造の違いにより、全く異なる生理活性効果が得られる可能性を示す、非常に興味深いものであると考えた。また、申請者はこれまでに、ケルセチン同様、高い抗酸化能を有し、多種のがん細胞の増殖抑制能を示すことが知られているアブラナ科野菜含有の化合物、イソチオシアネート類を用いた前立腺がん、乳がん細胞に対するプログラム細胞死誘導メカニズムの解明も行ってきており、同じイソチオシアネート類化合物でも構造の一部が異なることで細胞死のメカニズムが大きく変化することを報告してきた。さらに、申請者はアセチル基の修飾数および修飾部位が異なるケルセチンを合成し、その活性を測定した結果、わずかに1個のアセチル基の違いにより活性が異なってくることを見出している。このように申請者の報告も含め、天然由来の化合物はその構造の僅かな違いでさまざまな機能の変化を示すことが知られており、そのことを応用することで、各化合物が有する機能と構造活性相関に科学的根拠を提示する可能性を見出したため本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の主な目的はアセチル化ケルセチンの生理活性増強の起因を解明することである。申請者は先の研究において、ケルセチンのヒドロキシル基をアセチル修飾することで、ヒト由来大腸がん細胞に対するアポトーシス誘導能が増強することを見出した。また、アセチル修飾の数および修飾部位の違いにより乳がん細胞に対するアポトーシス誘導に異なる効果を示すことが一部明らかになった。この結果を踏まえ、本研究ではケルセチンのアセチル修飾がもたらす生理活性増強効果が何に起因するものであるかを 1~5 箇所のヒドロキシル基のアセチル修飾、各アセチル化ケルセチンを大腸がん細胞に処理し、アセチル修飾の数または修飾部位がもたらすアポトーシス誘導能の変化の違い 生体内の膜透過性、吸収率の違い ケルセチンおよび各アセチル化ケルセチンの代謝物を比較検討し、吸収動態の差異について解明することで活性発現の違いを見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

Quercetin 誘導体の合成: 1~5 箇所のヒドロキシル基のアセチル修飾において、1~2 箇所の

アセチル化誘導体は、合成は可能ではあったが、細胞評価を行うにあたり十分な量を得ることが出来なかった。4-(3,7-diacetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromene-2-yl)-1,2-phenylene diacetate (4AcQ-A) は、ピリジン触媒下、Quercetin に対し 4 倍等量の無水酢酸で 10 分間反応させたのち、水を加えることで反応を終了させた。さらにメタノールで再結晶を行い、オープンカラムで単離生成した。2-(3,4-diacetoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromene-3,5,7-triyl triacetate (5AcQ), Triacetate Quercetin (3AcQ-A), Tetra acetate Quercetin (4AcQ-A) については、4AcQ-A の反応条件を元に触媒や無水酢酸の量、時間、温度などを検討することで得た。また、アセチル基修飾の位置が異なる Triacetate Quercetin (3AcQ-B), Tetra acetate Quercetin (4AcQ-B) については 5AcQ および 4AcQ-A のそれぞれをイミダゾールと反応させることで、選択的に 7 位に修飾されたアセチル基を脱アセチル化させることで得た。精製後、FT-IR や 1 次元および 2 次元 NMR 測定による構造決定を行った。細胞増殖抑制能の評価 (Trypan blue assay): 細胞を前培養した後、Quercetin、5AcQ、4AcQ-A、-B、3AcQ -A、-B をそれぞれ処理し、48 時間後生細胞と死細胞の計数を行った。アポトーシス誘導能の評価 (Flow cytometry, Annexin V /PI): 上記と同様にサンプル処理を行い、回収後 Annexin V /PI で二重染色し、Flow cytometry を用いて解析を行った。マルチプレートリーダーを用いた蛍光強度計測も行った。膜透過性評価 (PAMPA): 数違いのアセチル基を持つ Quercetin の人工膜における透過性評価 (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) と、ソフトウェアを用いた透過性予測を行った。腸管吸収透過性試験及び代謝試験: 小腸上皮モデル細胞として Caco-2 細胞を用い、小腸上皮細胞様に分化させるためにトランスウェルのインサート上にて 21 日間の培養を 3 日おきに培地交換することで行った。単層膜の形成については低分子マーカーである Lucifer Yellow を用いて確認した。サンプル処理濃度は、当研究室でヒト結腸がん由来細胞株である HCT-116 細胞のアポトーシス誘導に対して有意な結果を示した 40 μ M で行い、前処理後 HPLC 及び LC-MS にて測定した。肝臓代謝試験: 肝臓代替モデル細胞としてヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞を用い、代謝試験を行う前に 6 日間の培養を 2 日おきに培地交換することでコントロール状態にした。サンプル処理濃度及び HPLC、LC-MS については腸管吸収透過性試験及び代謝試験と同条件で行った。

4. 研究成果

最も合成しやすい 4AcQ-A の合成経路を基本とし、反応条件を検討することで 5AcQ, 3AcQ-A が高収率で得られた。また、位置違いのアセチル基を持つ 4AcQ-B, 3AcQ-B はケルセチンのヒドロキシ基をアセチル修飾するのではなく、既にアセチル化された 5AcQ または 4AcQ-A からそれぞれ 7 位アセチル基を選択的に脱離させることによって目的化合物を得ることが出来た。細胞実験では、Quercetin と合成した 5 種類のアセチル化体を用いてヒト結腸癌細胞 HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} における細胞増殖抑制能とプログラム細胞死の一種であるアポトーシス誘導能を評価した。その結果、アセチル化体はケルセチンよりも強い細胞増殖の抑制とアポトーシスの誘導を引き起こし、その強さは 4AcQ, 3AcQ, 5AcQ の順であった。またウエスタンブロッティングにより細胞周期関連タンパク質の発現を検出した結果、Quercetin や他のアセチル化体と比べ、4AcQ が早い段階で細胞周期停止を引き起こしていることが示唆された。一方、アセチル化ケルセチンはケルセチンが持つ 5 個のヒドロキシ基のうち 4 個のヒドロキシ基がアセチル基に変換されていることから、疎水性の上昇が予想されたことより、アセチル化ケルセチンが小腸上皮細胞膜に対して、受動輸送によってケルセチンよりも多く小腸上皮を通過する可能性を考え、小腸上皮モデル細胞として Caco-2 細胞を用いた腸管吸収透過性試験の結果、Quercetin

とアセチル化ケルセチンでは顕著な違いは見られなかった。しかし、人口膜透過性評価においては、Quercetinは受動拡散による膜透過が低いのに対し、アセチル化体は5AcQ, 4AcQ, 3AcQの順に高い透過性を示した。実測値であるPAMPAによる透過性試験と予測ソフトウェアを用いた同実験での透過性シミュレーションは同じ傾向を示した。これらの結果より、ケルセチンよりも生理活性が高くなるアセチル化体は、膜透過率を増加させていることが明らかになった。しかし、アセチル化体の中では、生理活性は4AcQ-Aが高く、透過性は5AcQが最も高い値を示したことより、透過性以外にも生理活性作用に影響を与える要因があることが示唆された。また、肝臓における代謝はアセチル化ケルセチンを添加したものとケルセチンを添加したものを比較するとアセチル化ケルセチン添加において、代謝産物であるケルセチンの硫酸抱合体への変換割合が特に低いことから代謝安定性の向上が見られた。さらに、アセチル化ケルセチンの中では4AcQおよび5AcQから分解されて生成した1AcQのみが長時間、構造を維持することが明らかになった。このことより、代謝安定性の向上が見られることよりがんの化学的予防という観点において有利に働くことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 第23回日本フードファクター学会学術集会, 庄野 花佳, 侯 徳興, 坂尾こず枝, ヒト大腸がん細胞におけるQuercetinとその誘導体による細胞死誘導とROS産生の作用機序の解明, メルパルク京都, 京都, 2018.9.6~2018.9.9
2. 第23回日本フードファクター学会学術集会, 猿渡春菜子, 侯 徳興, 坂尾こず枝, ヒト肝臓がん細胞におけるケルセチンとその誘導体の細胞死誘導メカニズムの解明, メルパルク京都, 京都, 2018.9.6~2018.9.9
3. 第23回日本フードファクター学会学術集会, 濱元志穂美, 侯 徳興, 坂尾こず枝, ヒト乳がん細胞においてQuercetinのアセチル化はアポトーシス誘導を増強する, メルパルク京都, 京都, 2018.9.6~2018.9.9
4. Food for Health International Conference 2017 (FOHIC2017), Shohei Minami, De-Xing Hou, Kozue Sakao, Differential inhibition effect of colon cancer by quercetin and acetylated quercetin, Changsha Univ., Hunan, China, 2017.10.18~10.21
5. Food for Health International Conference 2017 (FOHIC2017), Rei Takada, De-Xing Hou, Kozue Sakao, Synthesis of quercetin derivatives and determination of their anti-tumor activity in HCT116 human colon carcinoma, Changsha, Hunan, China, 2017.10.18~10.21
6. The 8th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH), Kozue Sakao, De-Xing Hou, Acetylated quercetin enhanced induction of programmed cell death in human colon carcinoma, Quebec convention center, Quebec, Canada, 2017.10.02~10.08
7. Food for Health International Conference 2016(FOHIC2016); Kozue Sakao, Akimi Imamura, Taichi Hara, and De-Xing Hou: Quercetin derivatives induced programmed cell death in HCT116 human colon carcinoma. Kagoshima, Japan. March 21-23, 2016
8. 第21回日本フードファクター学会学術集会, 坂尾こず枝, 侯徳興: アセチル化ケルセチンはヒト乳がん細胞におけるアポトーシス誘導能を増強する, 富山, 2016.11.19~2016.11.20

〔その他〕(計 1 件)

招待講演

1. The 4th Joint Symposium by six University in Japan and Thailand., Kozue Sakao and De-Xing Hou., Clarifying the Mechanism of Increased Biological Activity by Acetylated Quercetin in HCT116 Human Colon Carcinoma., Kagoshima University, 2018.11.8

6. 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

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、研究者個人に帰属されます。