

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15486

研究課題名（和文）スーパーフードの有効性と安全性に関する化学的解明

研究課題名（英文）Chemical elucidation of efficacy and safety of health functional food

研究代表者

水野 美麗（Mizuno, Mirei）

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：60766195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：チモキノンは生体内での還元反応によってチモハイドロキノン（THQ）へ還元され、これが活性本体だと予想した。TQとTHQの抗酸化活性を評価したところ、THQの方が抗酸化活性が強かった。一方、THQはCu²⁺存在下において銅結合型活性酸素を発生させ、プロオキシダント効果を引き起こした。次に、化合物と銅の相互作用を紫外可視吸光度計を用いて測定すると、Cu²⁺とTHQの相互作用が確認できた。さらに、化合物のチロシナーゼ阻害作用を確認したところ、THQは阻害作用を示した。我々は、THQが生体における「有害」「有益」の2つの作用を持ち合わせていることを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パラキノン骨格を有するビタミンKやコエンザイムQ10（CoQ10）は、サプリメントとして広く流通している。ブラックミニード含有成分であるチモキノンはパラキノン骨格を有し、抗酸化活性や抗がん作用など多様な生理活性が報告されている。その一方でキノン系化合物が生体内で毒性を示す報告があり、これらは生体へ「薬」および「毒」の2つの作用を持つことが懸念される。サプリメントやスーパーフードは法律の規制が厳しくないため、消費者の判断で自由に服用が可能となり、条件次第では毒性を示す可能性がある。そのため、本研究で得られた知見を元に、正しい情報を消費者に発信することで健康被害を防ぐことが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Thymoquinone (TQ) is reduced to thymohydroquinone (THQ) through a reduction in the body. We predicted that THQ is the active form in the body. First, the antioxidant activity of TQ and THQ was evaluated, THQ was found to have stronger antioxidant activity than TQ. On the other hand, it was found that THQ generated copper-bound reactive oxygen species in the presence of Cu²⁺ to induce pro-oxidant effect. Next, the interaction between the compounds and copper was measured using an ultraviolet-visible spectrophotometer. The interaction between Cu²⁺ and THQ was confirmed. Furthermore, the tyrosinase inhibitory activity of the compounds was measured, THQ exhibited inhibitory effect. It could be demonstrated that THQ is the main form of each activity and has both toxicity and beneficial effects in the body.

研究分野：食品科学

キーワード：機能性食品 活性酸素 抗酸化作用 プロオキシダント効果 銅イオン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、パラキノン骨格を有する化合物の生理活性が注目されている。パラキノン骨格を有する代表的な抗酸化物質にビタミン K やコエンザイム Q10(CoQ10)があげられ、健康増進を目的としたサプリメントが広く流通している。スーパーフードの一種でブラックミンシードに含有されるチモキノン(TQ)も注目されており、中東を拠点に生理作用の解明が進められている。抗酸化活性¹のみならず、抗がん作用²やアルツハイマー型認知症への有用性³など、多様な活性が報告されているが、ほとんどが細胞や動物レベルの活性の発現であり、詳細な機序が明らかとなっていない。

一方、キノン系化合物が生体内での毒性を示すことも報告されている。アセトアミノフェンの酸化代謝物としてパラキノン骨格を有する *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン(NAPQI)が知られている。通常はグルクロン酸抱合及び硫酸抱合によって尿中に排泄されるが、過量摂取時は抱合反応だけでなく CYP による酸化反応が起こり、NAPQI を産生して DNA やタンパクへ付加する。さらにこれは、生体内の還元酵素により活性酸素(ROS)が発生するプロオキシダント効果によって、細胞へ傷害を与える(Figure)。TQ や CoQ10 はスーパーフードや健康食品として嗜好されているが、医薬品と比べて容易に入手することが可能であり、インターネット上などでの誤った情報が多く存在していることが問題となっている。そのため、消費者の独断による大量摂取によって、NAPQI と同様なタンパクへの付加や ROS の発生による生体への傷害が起こる可能性がある。

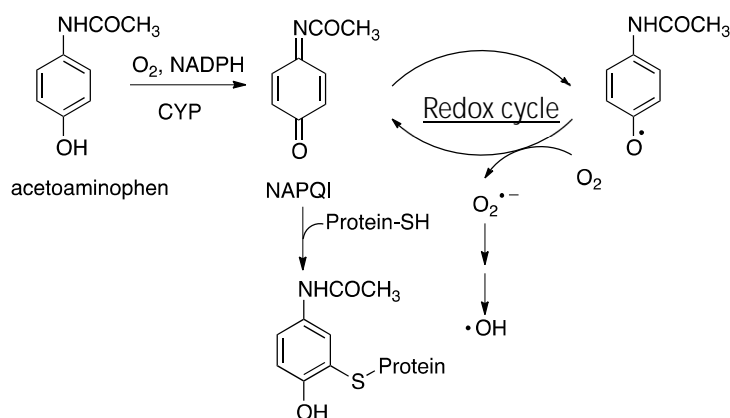


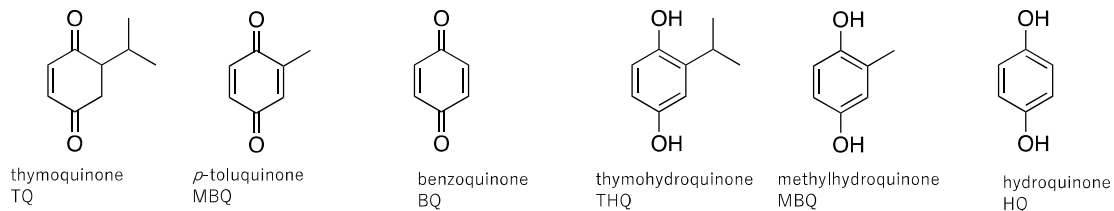
Figure. 過量投与時のアセトアミノフェンの代謝反応

2. 研究の目的

パラキノンは非常に反応性が高く、生体内のタンパクや DNA と容易に付加して毒性を示すことが知られている。一方、サプリメントやスーパーフード中に含有しパラキノン骨格を有する CoQ10 や TQ は、その有効性が謳われている。これらの知見より「薬と毒薬」の二面性を持つことが懸念される。本研究ではパラキノン骨格を有する化合物の生理作用を化学的に評価し、生体内での作用を解明することを目的とする。これらが有する抗酸化作用や DNA・タンパクへの影響を評価し、官能基や濃度など影響因子を推測することで、化合物の生体への影響を明らかにできる。更にこれらの結果を基に、他のパラキノン骨格を有する化合物における生体への影響を予測することが可能となる。

3. 研究の方法

CoQ10 とその還元型である CoQ10-red において、CoQ10-red の方が高い抗酸化活性を示す。我々は、TQ が生体内の還元酵素によって還元されたチモヒドロキノン(THQ)の方が抗酸化活性が高いと予想した。本研究では、以下の 6 種類の化合物を評価に使用した。



- (1) 合成：TQ および CoQ10 を還元反応により、THQ と CoQ10-red の合成を試みた。
- (2) 抗酸化活性：TQ および THQ の抗酸化活性を評価した。代表的な有機ラジカルであるガルピノキシルラジカルを使用し、電子スピン共鳴装置(ESR)を用いて測定した。
- (3) 微量金属存在下における試験化合物のプロオキシダント効果：一部のポリフェノールにおいて、金属イオンとの相互作用によるプロオキシダント効果を引き起こすことが報告されている。^{4, 5} 試験化合物(TQ, THQ)と金属イオン(Cu^{2+} , Fe^{2+})を pBR322DNA に添加し、DNA に酸化的傷害を与えるかアガロースゲル電気泳動法により確認した。
- (4) 化合物と金属の相互作用：化合物(TQ, MBQ, BQ, THQ, MBHQ, BHQ)と金属イオン(Cu^{2+} , Fe^{2+})の相互作用の有無を、紫外可視光吸光度計を用いて測定した。
- (5) メラニン産生に關するチロシナーゼは、酵素中に銅を 2 分子有することが知られている。試験化合物によるチロシナーゼ阻害作用を評価することとした。基質は L-dopa、酵素はマッシュルーム由来チロシナーゼを用いた。L-dopa はチロシナーゼによって dopachrome を経由し、メラニンが産生される。Dopachrome は 475nm に吸収を持つ化合物であるため、dopachrome の産生量を測定し、各化合物の IC_{50} 値を算出した。

4 . 研究成果

- (1) 合成：TQ の還元反応による THQ の合成は、既に合成方法が報告されていた⁶ため問題なく合成に成功した。CoQ10 も同様の方法で CoQ10-red の合成を試みたが、得ることができなかった。
- (2) 抗酸化活性：ガルピノキシルラジカルに対して、THQ の方が TQ よりも抗酸化活性が高いことが明らかとなった。
- (3) 微量金属存在下における試験化合物のプロオキシダント効果：THQ は Cu^{2+} 存在下、DNA に酸化的損傷を与えた。 Fe^{2+} と THQ を共存させた場合、THQ の有無によらず DNA に酸化的損傷を与えた。これは Fe^{2+} が DNA に直接相互作用している可能性が考えられる。つぎにこの可能性を防ぐため、EDTA に Fe^{2+} をキレートさせて同様の実験を試みた。その結果、キレートさせない場合と比較して強力に DNA の酸化的損傷が進行することがわかった。つぎに、これらの DNA 損傷が活性酸素由来かどうか、反応系にラジカル消去剤を添加した。その結果、THQ と Cu^{2+} による DNA 切断は銅結合型活性酸素によるもの、THQ と Fe^{2+} に関してはヒドロキシルラジカルによる酸化的損傷であることがわかった。
- (4) 化合物と金属の相互作用：いずれの化合物も Fe^{2+} においては相互作用が見られなかった。 Cu^{2+} の場合、ヒドロキノン骨格を有する化合物においてスペクトルの変化が確認された。THQ, MBHQ, HQ の順に変化が大きかったことより、THQ が Cu^{2+} と最も相互作用が強いことが示唆される。
- (5) THQ, MBHQ, HQ が銅との相互作用を示すことより、酵素中に銅を 2 分子有するチロシナーゼに着目し、これら化合物のチロシナーゼ阻害作用を確認した。その結果、THQ が最も阻害活性が強く、ついで MBHQ であった。HQ の阻害作用は非常に弱いことがわかった。

本研究結果より、TQの抗酸化作用は、生体内の還元反応によりTHQへ変換され、抗酸化活性を示していると考えられる。THQは銅との相互作用によってDNAに酸化的傷害を与える「有害な作用」と、チロシナーゼ阻害作用によるメラニン産生抑制や抗酸化活性など「有益な作用」の2つの面を持ち合わせていることを明らかにできた。

参考文献

- (1) Mansour, M. A.; Nagi, M. N.; El-Khatib, A. S.; Al-Bekairi, A. M. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem. Funct.* **2002**, *20* (2), 143-151. DOI: 10.1002/cbf.968.
- (2) Gali-Muhtasib, H.; Diab-Assaf, M.; Boltze, C.; Al-Hmaira, J.; Hartig, R.; Roessner, A.; Schneider-Stock, R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int. J. Oncol.* **2004**, *25* (4), 857-866.
- (3) Alasmari, F.; Alotaibi, F. M.; Al-Qahtani, W. S.; AlAsmari, A. F.; Alqahtani, F. Therapeutic Effects of Thymoquinone on Alzheimer's Disease through Modulating Amyloid-beta Neurotoxicity and Neuro-inflammatory Cytokine Levels. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2023**, *22* (5), 736-744. DOI: 10.2174/1871527321666220418125057.
- (4) Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Gajewski, E.; Dizdaroglu, M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J* **1991**, *273* (3), 601-604. DOI: 10.1042/bj2730601.
- (5) Perron, N. R.; Brumaghim, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* **2009**, *53* (2), 75-100. DOI: 10.1007/s12013-009-9043-x.
- (6) Johnson-Ajinwo, O. R.; Li, W. W. Stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry for quantification of thymoquinone in black cumin seed oil. *J. Agric. Food. Chem.* **2014**, *62* (24), 5466-5471. DOI: 10.1021/jf500357x.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mizuno Mirei, Fukuhara Kiyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Antioxidant and Prooxidant Effects of Thymoquinone and Its Hydroquinone Metabolite	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1389 ~ 1393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00199	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 -
1. 著者名 Fukuhara Kiyoshi, Nakanishi Ikuo, Imai Kohei, Mizuno Mirei, Matsumoto Ken-ichiro, Ohno Akiko	4. 巻 12
2. 論文標題 DTPA-Bound Planar Catechin with Potent Antioxidant Activity Triggered by Fe ³⁺ Coordination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12020225	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 -
1. 著者名 福原 潔、水野 美麗	4. 巻 81
2. 論文標題 天然抗酸化物質をファーマコフォアとした生活習慣病予防・治療薬の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 402 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14930/jshowaunivsoc.81.402	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 -
1. 著者名 Sawada Naoko, Obama Takashi, Mizuno Mirei, Fukuhara Kiyoshi, Iwamoto Sanju, Aiuchi Toshihiro, Makiyama Tomohiko, Itabe Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Transfer and Enzyme-Mediated Metabolism of Oxidized Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine between Low- and High-Density Lipoproteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9111045	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 -

1. 著者名 Mizuno Mirei, Mori Kazunori, Tsuchiya Keisuke, Takaki Takashi, Misawa Takashi, Demizu Yosuke, Shibamura Motoko, Fukuhara Kiyoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Design, Synthesis, and Biological Activity of Conformationally Restricted Analogues of Silibinin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 23164 ~ 23174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c02936	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 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 水野美麗、福原潔
2. 発表標題 A を創薬標的とした新規カテキン-カプサイシン誘導体の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水野美麗、福原潔
2. 発表標題 キノン構造を有する機能性化合物の抗酸化作用とプロオキシダント効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福原潔、森一憲、沖山佳生、三澤隆史、水野美麗、出水庸介、柴沼質子、大野彰子
2. 発表標題 アミロイド の神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Mizuno, K. Mori, K. Tsuchiya, M. Shibamura, K. Fukuhara
2. 発表標題 Functional improvement of silibinin analogues with constrained 3D structures
3. 学会等名 13th AMFC International Medicinal Chemistry symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyoshi Fukuhara, Kazunori Mori, Yoshio Okiyama, Takashi Misawa, Mirei Mizuno, Yosuke Demizu, Motoko Shibamura, Akiko Ohno
2. 発表標題 Rationally designed peptide modulators of amyloid- toxicity in Alzheimer 's disease
3. 学会等名 13th AMFC International Medicinal Chemistry symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野美麗、森一憲、土屋主輔、高木孝士、三澤隆史、出水庸介、柴沼質子、 福原潔
2. 発表標題 シリビニンの高機能化を目指した創薬研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福原潔、中西郁夫、大久保敬、水野美麗、松本謙一郎、大野彰子
2. 発表標題 C-メチルフィセチンのラジカル消去活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原大貴、高見正道、畔津祐季、唐川亜希子、茶谷昌宏、水野美麗、福原潔、坂井信裕
2. 発表標題 平面型カテキン [planar catechin : PCat] の骨量増加作用
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福原潔、沖山佳生、三澤隆史、水野美麗、出水庸介、柴沼質子、大野彰子
2. 発表標題 アミロイド の神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発
3. 学会等名 第36回日本酸化ストレス学会関東支部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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