

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580180

研究課題名(和文)プロポリスの機能性解明を目指した化学生物学的研究

研究課題名(英文)Chemical and biological studies on the functions of propolis

研究代表者

熊澤 茂則 (Kumazawa, Shigenori)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10295561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミツバチの生産物であるプロポリスは、健康食品素材として広く利用されている。本研究では、プロポリスの機能性について化学的および生物学的アプローチから解明することを目的とした。特に、韓国済州島産およびソロモン諸島産のプロポリスの成分研究を行い、済州島産プロポリスについては現地における調査も行うことで、起源植物(プロポリスの原料植物)が明日葉であることを明らかにした。ソロモン諸島産プロポリスからは、いくつかの新規プレニルフラボノイドを見出した。さらに、沖縄産プロポリスおよびその構成成分に関する *in vitro* および *in vivo* におけるガン血管新生抑制活性についても評価した。

研究成果の概要(英文)：Propolis is a natural resinous substance collected by honeybees from buds and exudates of certain trees and plants to protect their beehive from enemies. It is used as folk medicine in many regions of the world. In this study, chemical and biological methods were applied to evaluate the functions of propolis. In particular, chemical analyses of the propolis from Jeju (Korea) and the Solomon Islands were carried out, and we determined several new compounds from them. In addition, we searched for antiangiogenic compounds from propolis, the ethanol extracts of Okinawan propolis showed significant antiangiogenic activities *in vitro* and *in vivo* assay systems, and we evaluated the modes of action of antiangiogenic effects of the major component of Okinawan propolis, nymphaeol-A by investigating the inhibition of tube formation, as well as changes in survival signals and apoptotic pathways using human umbilical vein endothelial cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：プロポリス 起源植物 ミツバチ ソロモン諸島 プレニルフラボノイド 血管新生

1. 研究開始当初の背景

プロポリスは、ミツバチが自分の巣の周辺の植物の滲出物などを集めて作った樹脂状物質である。ミツバチは、プロポリスを巣箱の壁や枠、出入口などに塗布して巣の補強や修理、水や冷気の浸入を防御する物理的な用途として、また、雑菌の繁殖を抑える化学的な用途としても利用している。プロポリスの主成分は、樹脂、ろう質、花粉、その他ミネラル類などであるが、実際の組成はミツバチが利用する植物種(起源植物)が地域ごとに異なるため、その植物源に左右される。もともとプロポリスは、抗菌活性やその他の薬理活性が注目され、世界各地で民間伝承薬として用いられてきた。近年、抗菌作用の他に、抗炎症作用や抗腫瘍作用などが報告され、有効成分に関する化学的な研究も行われるようになった。現在は、チンキや錠剤といった健康食品の他、飴や歯磨きなど、プロポリスを用いたさまざまな製品が市販されており、その消費量は健康食品の中でも常に上位を占めている。プロポリスは、このように多く出回っている健康食品であるにもかかわらず、プロポリスを研究対象にしている研究者は国内外でも非常に少ないため、その成分や生理活性等についてはまだ不明な部分が多かった。

研究代表者は、これまでにプロポリスの構成成分、生理活性、成分の体内動態などに関する研究を進めてきた。さらに、化学的な研究だけでなく、生理活性の一つとしてプロポリスのガン血管新生抑制活性研究に着手し、着実な成果を上げてきた。特に、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた *in vitro* ヒト血管新生アッセイ系を確立し、ブラジル産プロポリスとその特徴的な成分であるアルテピリンCが新生血管の管腔形成に対して高い抑制効果を持つことを確認した。また、抗酸化活性と血管新生抑制活性との関連性についても明らかにしてきた。

2. 研究の目的

1の「研究開始当初の背景」にも記載したように、研究代表者はプロポリス研究において数々の実績を上げることができた。しかし、プロポリスを機能性食品として正しく評価するためには、生化学的な面からのより詳しい検証が必要である。そこで、本研究では、まだ研究が進んでいない地域産のプロポリスに関し、成分化学的な研究およびガン血管新生抑制活性を中心とした生理活性研究に注力して研究を進めることとした。そして、プロポリスを機能性食品素材として適切に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロポリスの構成成分の分析

未だ構成成分が解明されていないプロポリスの成分分析を実施した。特に、韓国済州島産で採集されたプロポリスに、他産地には

見られない成分の存在が確認されたため、これらの成分の解明を進めた。また、ソロモン諸島産のプロポリスに関しても、成分研究を実施した。

(2) プロポリスの起源植物の解明

プロポリスの分析化学的な研究とミツバチの行動学的解析とを組み合わせ、韓国済州島産プロポリスの起源植物の解明を試みた。

(3) プロポリスのガン血管新生抑制の解析

沖縄産プロポリス抽出物および沖縄産プロポリスの主要成分であるプレニル化フラボノイドに関して、*in vitro* および *in vivo* におけるガン血管新生抑制作用を調べた。また、分子レベルでの作用メカニズムの解析も行った。

4. 研究成果

(1) プロポリスの構成成分の分析

韓国済州島産プロポリスについて成分研究を実施した。その結果、いくつかの新規化合物を見出すことができた(図1)(雑誌論文5)。また、ソロモン諸島プロポリスからは、新規プレニル化合物を単離、同定することができた(図2)(雑誌論文7, 10)。

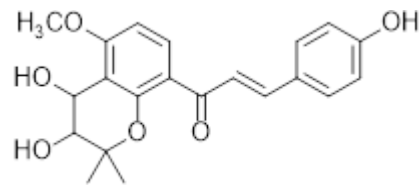


図1. 韓国済州島産プロポリスより同定した新規化合物の例

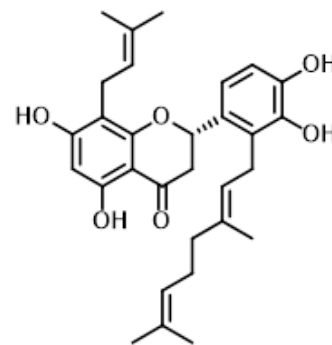


図2. ソロモン諸島産プロポリスより同定した新規化合物の例

(2) プロポリスの起源植物の解明

プロポリスの分析化学的な研究とミツバチの行動学的解析とを組み合わせ、韓国済州島産プロポリスの起源植物の解明を試みた。その結果、起源植物は明日葉であることを明らかにすることができた(雑誌論文8)。済州島のミツバチは明日葉の乳液をプロポリスの材料として利用していた(図3)。



図 3. 明日葉の乳液を採集するミツバチ

(3) プロポリスのガン血管新生抑制の解析
 沖縄産プロポリス抽出物および沖縄産プロポリスの主要成分であるプレニル化フラボノイド Nymphaeol-A に関して、in vitro および in vivo におけるガン血管新生抑制作用を調べた(雑誌論文 2)。また、分子レベルでの作用メカニズムの解析も行った。沖縄産プロポリス抽出物は生存シグナル ERK1/2 を不活性化させ、アポトーシス実行因子 caspase-3、アポトーシス誘導シグナル p38 を活性化することが確認された。さらに ERK1/2 の活性化を制御する上流キナーゼ MEK1/2 が不活性化されていることが示された。また、アポトーシス実行因子 caspase の基質である Lamin A/C、PARP の切断も示された。以上のことから、沖縄産プロポリスは分子レベルでもアポトーシスを誘導していることが示された。また、沖縄産プロポリスは、ERK1/2 や MEK1/2 よりもさらに上流でシグナル伝達を阻害している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Mok-Ryeon Ahn, Sun Wook Kim, Shigenori Kumazawa, Toshiro Ohta: Artepillin C suppresses angiogenesis by inhibiting tube-formation and inducing apoptosis of endothelial cells. *Journal of Food and Nutrition Research*, **1**, 92-96, 2013.
2. Ikumi Tsuchiya, Takahiro Hosoya, Motoko Uchida, Kazuhiro Kunimasa, Toshiro Ohta, Shigenori Kumazawa: Nymphaeol-A isolated from Okinawan propolis suppresses angiogenesis and induces caspase-dependent apoptosis via inactivation of survival signals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Epub 2013 Apr 24.
DOI: 10. 1155/2013/826245
3. Shigenori Kumazawa, Josep Serra Bonvehi, Cristina Torres, Mok-Ryeon Ahn, Francisco Jose Orantes Bermejo: Chemical and functional characterization of propolis collected from East Andalusia (Southern Spain). *Phytochemical Analysis*, **24**, 608-615, 2013.
DOI: 10.1002/pca.2439
4. Su Jin Choi, Kohsuke Shimomura, Shigenori Kumazawa, Mok-Ryeon Ahn: Antioxidant properties and phenolic composition of propolis from diverse geographic regions in Korea. *Food Science and Technology Research*, **19**, 211-222, 2013.
5. Kohsuke Shimomura, Yasumasa Sugiyama, Jun Nakamura, Mok-Ryeon Ahn, Shigenori Kumazawa: Component analysis of propolis collected on Jeju Island, Korea. *Phytochemistry*, **93**(9), 222-229, 2013.
DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.02.018
6. 福本修一, 熊澤茂則: 沖縄のプロポリス研究から生まれた新素材～抗菌・抗酸化機能を有するオオバギポリフェノール. *コスメテックジャパン*, **2**, 464-471, 2012.
7. Saori Inui, Takahiro Hosoya, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Takeshi Ogawa, Hirokazu Kobayashi, Kenichi Shirafuji, Reuben Toli Moli, Ikuo Kozono, Kazuo Shin-ya, Shigenori Kumazawa: Solophenols B-D and solomonin: new prenylated polyphenols isolated from propolis collected from the Solomon Islands and their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 11765-11770, 2012.
DOI: 10.1021/jf303516w
8. Kohsuke Shimomura, Saori Inui, Yasumasa Sugiyama, Miho Kurosawa, Jun Nakamura, Su-Jin Choi, Mok-Ryeon Ahn, Shigenori Kumazawa: Identification of the plant origin of propolis from Jeju Island, Korea, by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76**, 2135-2138, 2012.
9. Ai Hatano, Takashi Nonaka, Megumi Yoshino, Mok-Ryeon Ahn, Shigemitsu Tazawa, Yoko Araki, Shigenori Kumazawa: Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. *Food Science and Technology Research*, **18**, 577-584, 2012.
10. Saori Inui, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Kenichi Shirafuji, Reuben T. Moli, Shigenori Kumazawa: A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Island. *Bioscience, Biotechnology,*

- and Biochemistry*, **76**, 1038-1040, 2012.
11. 熊澤茂則: 沖縄産プロポリスの起源植物オオバギの発見とその素材化に向けて. 季刊沖縄, **40**, 41-47, 2011.
 12. Rie Ikeda, Masayoshi Yanagisawa, Nobuyuki Takahashi, Teruo Kawada, Shigenori Kumazawa, Noriyuki Yamaotsu, Izumi Nakagome, Shuichi Hirono, Takanori Tsuda: Brazilian propolis-derived components inhibit TNF- α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1810**, 695-703, 2011. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.04.007
- [学会発表](計 23 件)
1. 松井幹奈, 乾沙王里, 細谷孝博, 伊藤健治, 荏原美知勝, 熊澤茂則: パプアニューギニア産プロポリスに含まれる成分に関する研究. 第 4 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2013 年 11 月 30 日.
 2. 乾沙王里, 細谷孝博, 吉積一真, 佐藤一, 熊澤茂則: セネガル産プロポリスに含まれる成分と生理活性に関する研究. 第 4 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2013 年 11 月 30 日.
 3. 乾沙王里, 細谷孝博, 島村裕子, 増田修一, 白藤謙一, Reuben T. Moli, 熊澤茂則: ソロモン諸島産プロポリス由来新規プレニル化合物の単離とその抗菌活性. 第 14 回静岡ライフサイエンスシンポジウム(静岡). 2013 年 3 月 16 日.
 4. 熊澤茂則: 環太平洋プロポリスに含まれるプレニルフラボノイド. 第 5 回レッドックス・ライフイノベーションシンポジウム(川崎). 2013 年 3 月 7~8 日.
 5. 土屋育未, 太田敏郎, 細谷孝博, 牛田素子, 国政和宏, 吉田真奈美, 熊澤茂則: 沖縄産プロポリスに含まれる nymphaeol の血管新生抑制活性に関する研究. 第 85 回日本生化学会大会(福岡). 2012 年 12 月 14~16 日.
 6. 乾沙王里, 細谷孝博, 島村裕子, 増田修一, 白藤謙一, Reuben Toli Moli, 熊澤茂則: ソロモン諸島産プロポリス由来新規プレニル化合物の単離とその抗菌活性. 第 3 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2012 年 12 月 1 日.
 7. 土屋育未, Benhaniifa Mokhtar, 長崎幸夫, 太田敏郎, 細谷孝博, 熊澤茂則: アルジェリア産プロポリスに関する化学的研究. 第 3 回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2012 年 12 月 1 日.
 8. Saori Inui, Takahiro Hosoya, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Kenichi Shirafuji, Reuben Toli Moli, Shigenori Kumazawa: Solophenols and solomonin; new prenylated polyphenols isolated from propolis collected from the Solomon Islands and their antibacterial activity. The 1st international conference on pharma and food (Shizuoka). 2012 年 11 月 15~16 日.
 9. Ikumi Tsuchiya, Toshiro Ohta, Motoko Ushida, Manami Yoshida, Kazuhiro Kunimasa, Takahiro Hosoya, Shigenori Kumazawa: Antiangiogenic activity of prenylflavonoids from Okinawan propolis. The 1st international conference on pharma and food (Shizuoka). 2012 年 11 月 15~16 日.
 10. 乾沙王里, 細谷孝博, 島村裕子, 増田修一, 白藤謙一, Reuben T. Moli, 熊澤茂則: ソロモン諸島産プロポリス由来新規プレニル化合物の単離とその抗菌活性. 日本農芸化学会中部支部第 165 回例会(名古屋). 2012 年 10 月 27 日.
 11. 熊澤茂則: 環太平洋プロポリスの機能成分(沖縄およびソロモン諸島). 環太平洋プロポリス研究会第 1 回講演会(東京). 2012 年 9 月 21 日.
 12. 下村幸佑, 杉山靖正, 安木蓮, 中村純, 熊澤茂則: 化学分析とミツバチの行動学的観察による韓国済州島産プロポリスの起源植物の同定. 第 54 回天然有機化合物討論会(東京). 2012 年 9 月 18~20 日.
 13. 土屋育未, 太田敏郎, 牛田素子, 国政和宏, 吉田真奈美, 熊澤茂則: 沖縄産プロポリスの血管新生抑制作用に関する研究. 日本食品科学工学会第 59 回大会(札幌). 2012 年 8 月 29~31 日.
 14. 下村幸佑, 杉山靖正, 安木蓮, 中村純, 熊澤茂則: ミツバチの行動学的観察と化学分析による韓国済州島産プロポリスの起源植物の同定. 日本農芸化学会 2012 年度大会(京都). 2012 年 3 月 22~26 日.
 15. 土屋育未, 太田敏郎, 牛田素子, 国政和宏, 吉田真奈美, 熊澤茂則: 沖縄産プロポリス中のプレニルフラボノイドの血管新生抑制活性に関する研究. 日本農芸化学会 2012 年度大会(京都). 2012 年 3 月 22~26 日.
 16. 乾沙王里, 島村裕子, 増田修一, 白藤謙一, Reuben T Moli, 熊澤茂則: ソロモン諸島産プロポリスに関する化学的研究. 日本農芸化学会 2012 年度大会(京都). 2012 年 3 月 22~26 日.
 17. 乾沙王里, 島村裕子, 増田修一, 白藤謙一, Reuben T Moli, 熊澤茂則: ソロモン諸島産プロポリスに関する化学的研究. 第 13 回静岡ライフサイエンスシンポジウム(静岡). 2012 年 3 月 17 日.
 18. 池田理恵, 柳沢政由, 高橋信之, 河田照

- 雄, 熊澤茂則, 山乙教之, 中込泉, 広野修一, 津田孝範: ブラジル産プロポリスに含まれる2種の桂皮酸誘導体は、異なる機構を介してアディポネクチンの発現低下を抑制する. 第2回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2011年11月26日.
19. 乾沙王里, 島村裕子, 増田修一, 白藤謙一, Reuben T Moli, 熊澤茂則: ソロモン諸島産プロポリスに関する化学的研究. 第2回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2011年11月26日.
20. 土屋育未, 太田敏郎, 牛田素子, 国政和宏, 吉田真奈美, 熊澤茂則: 沖縄産プロポリスの血管新生抑制活性成分に関する研究. 第2回岐阜薬科大学機能性健康食品(蜂産品)研究講演会(岐阜). 2011年11月26日.
21. Rie Ikeda, Masayoshi Yanagisawa, Nobuyuki Takahashi, Teruo Kawada, Shigenori Kumazawa, Noriyuki Yamaotsu, Izumi Nakagome, Shuichi Hirono, and Takanori Tsuda: Brazilian propolis-derived components inhibit TNF- α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. The 2011 annual meeting of the International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF) (Sapporo). 2011年11月14~17日.
22. 下村幸佑, 杉山靖正, 中村純, 安木蓮, 熊澤茂則: 化学分析とミツバチの行動学的観察による韓国済州島産プロポリスの起源植物の解明. 2011年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会(京都). 2011年10月1~2日.
23. 熊澤茂則: 沖縄産プロポリスの起源植物オオバギの発見とその素材化に向けた研究. フーズサイエンスセミナー(静岡). 2011年7月19日.

〔図書〕(計2件)

1. Shigenori Kumazawa: *Macaranga tanarius*, plant origin of the propolis collected in Okinawa, Japan, in "Beneficial Effects of Propolis on Human Health and Chronic Diseases volume 1", Tahira Farooqui and Akhlaq A. Farooqui ed., Nova Publishers, inc., pp153-159, 2013.
2. 熊澤茂則: プロポリス. 「抗ストレス食品の開発と展望」, 横越英彦編, シーエムシー出版, pp199-203, 2011.

〔産業財産権〕
特になし

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊澤 茂則 (KUMAZAWA, Shigenori)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号: 10295561

(2) 研究分担者

杉山 靖正 (SUGIYAMA, Yasumasa)
鹿児島大学・水産学部・准教授
研究者番号: 90347386

太田 敏郎 (OHTA, Toshiro)
静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究院・助教
研究者番号: 40285193

中村 純 (NAKAMURA, Jun)
玉川大学・ミツバチ科学研究センター・教授
研究者番号: 30256002

(3) 連携研究者

なし