

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658119

研究課題名（和文） 分子作用機序に基づく抗炎症性食成分の混合比ラショナルデザイン

研究課題名（英文） Rational design of mixing ratio of food-derived anti-inflammatory factors based on molecular mechanisms.

研究代表者

大東 肇 (OHIGASHI HAJIME)

福井県立大学・生物資源学部・特任教授

研究者番号：80026583

研究成果の概要（和文）：各種 NO 産生抑制化合物をランダムに組合せて isobologram で判定した結果、クルクミン (CUR) とレスベラトロール (RES) が、相乗作用を示すことが判明した。同様に、CUR とルテオリン (LUT) の間にも相乗作用が認められたが、LUT と同様のフラボン系 NO 産生抑制化合物である、クリシン (CHR) やアピゲニン (API) は、CUR との間に相乗作用を示さなかった。また Western 解析から、CUR と LUT、および CUR と RES の間には、LPS による iNOS タンパク質誘導抑制において増強効果が認められた。LUT は CHR や API とは B 環のみが異なっており、B 環のカテコール構造が相乗作用に関与しているものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：From isobolograms of various food-derived NO production-suppressive compounds, Curcumin (CUR) and Resveratrol (RES) showed synergistic effects. While CUR and Luteolin (LUT) also showed synergistic effect, Chrysin (CHR) and Apigenin (API), other flavones with NO production-suppressive activity, did not show synergism with CUR. From Western blot analysis, combination of not only CUR and LUT but also CUR and RES showed enhancement effects in inhibitory rate of LPS-induced iNOS protein production. Because LUT has characteristic catechol moiety in the B-ring, which is not resided in CHR and API, the moiety may be associated in the synergism between LUT and CUR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食細胞、マクロファージ、抗炎症化合物、相乗作用、NO 産生抑制効果

1. 研究開始当初の背景

マクロファージはリポ多糖(LPS)などの刺激によって一酸化窒素(NO)ラジカルを産生するが、慢性炎症局所における NO 過剰産生は各種炎症性疾患の要因となる。これまでに NO 産生を抑制する食由来成分が各種報告されているが、食品は多様な化合物の混合系で

あり、それぞれの分子作用機序も異なる。このような複合系では、作用機構が異なる化合物が相乗効果を発揮すれば高い効力を示すと期待される。

そこで、複数の食素材由来化合物を同時摂取する際に、最も強力な活性を發揮する理想的な組合せと混合比率に関して合理的デザ

インを確立できれば、有益である。

2. 研究の目的

本研究では、食由来 NO 産生抑制成分について、相乗的効果を示す組合せを探索し、見出された組合せについて、その作用機序を構造機能相関などの観点から検討する。そしてどのような化合物の組合せが最も強力な活性を發揮するか、理想的組合せと比率について合理的手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

RAW264 マクロファージ細胞株を LPS で刺激し、24 時間後の培養上清に含まれる亜硝酸イオン濃度を Griess 法で調べ、NO 産生量を測定した。本アッセイ系に複数の食由来化合物を同時添加することで、増強効果を示す化合物を一次選抜した。

その結果得られた候補化合物について、isobologram 法でさらに詳細な検討を加えた。まず食由来化合物を単独添加して NO 産生抑制活性を検討し、各化合物の 50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。次に、2 種類の化合物を同時添加した場合の IC₅₀ を求めて各化合物単独使用時の IC₅₀ に対する比、すなわち相対量を求めた。この結果をグラフにプロットして isobologram (図 1) を作成し、相乗作用の判定を行った。

また iNOS などの各種炎症誘発性タンパク質の発現を Western 解析により調べた。

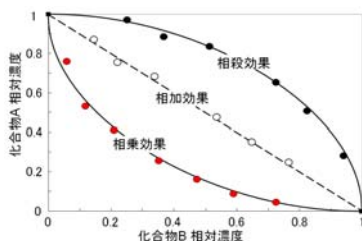


図 1. isobologram による相乗作用判定

4. 研究成果

フラボノイド、テルペノイド、クマリン類、クルクミノイド等をランダムに組合せて一次選抜を行い、クルクミン (CUR) とレスベラトロール (RES) の組合せ等に相乗的作用を見出した。同様に CUR とルテオリン (LUT) 間にも相乗的作用が認められた。

さらに詳しく検証するため、CUR と最も顕著な効果を示した LUT に注目し、類似の作用機序が期待されるフラボン化合物 (アピゲニン (API)、クリシン (CHR)) と共に、CUR との組合せ効果を isobologram 法で詳細に検討した。その結果、CUR に対して LUT は相乗作用を示すものの、CHR は相加作用を、さらに API は相殺作用を示すことが判明した。三者は B 環の OH 基だけが異なるため、LUT のカテコール構造が CUR との相乗作用

に必須であり分子作用機序のカギと考えられた。(図 2)

次に、最適濃度の検討結果をもとに、LUT 3 μ M と CUR 3 μ M にて iNOS タンパク質の誘導抑制効果を Western 解析で評価したところ、LPS による iNOS タンパク質誘導抑制について増強効果が認められた。

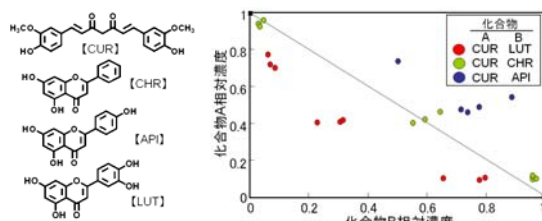


図 2. isobologram による CUR と flavone 化合物間の相乗作用解析

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 9 件)

(1) Murakami A., Furukawa I., Miyamoto S., Tanaka T., Ohigashi H., Curcumin combined with turmerones, essential oil components of turmeric, abolishes inflammation-associated mouse colon carcinogenesis., BioFactors, 査読有, Vol.39, No.2, 2013, 221-232

DOI: 10.1002/biof.1054.

(2) Kawabata K., Sugiyama Y., Sakano T., and Ohigashi H., Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by *Bifidobacterium adolescentis*: Prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin., BioFactors, 査読有, 2013, in press

DOI: 10.1002/biof.1081.

(3) 高橋正和、橋本直哉、小林恭一、大東肇、福井県伝統野菜木田チリメンシソの抗アレルギー作用の検討、福井県立大学論集、査読有、第 40 号、2013、83-87

(4) Sawada K., Kawabata K., Yamashita T., Kawasaki K., Yamamoto N., and Ashida H., Ameliorative effects of polyunsaturated fatty acids against palmitic acid-induced insulin resistance in L6 skeletal muscle cells., Lipids Health Dis., 査読有, Vol.11, 2012, 36

DOI: 10.1186/1476-511X-11-36.

(5) Nakamura T., Tokushima T., Kawabata

K., Yamamoto N., Miyamoto M., and Ashida H., Absorption and metabolism of 4-hydroxyderricin and xanthoangelol after oral administration of *Angelica keiskei* (Ashitaba) extract in mice., Arch. Biochem. Biophys., 査読有, Vol.521, No.1-2, 2012, 71-76
DOI: 10.1016/j.abb.2012.03.013.

(6) Mukai R., Kawabata K., Otsuka S., Ishisaka A., Kawai Y., Ji Z.S., Tsuboi H., and Terao J., Effect of quercetin and its glucuronide metabolite upon 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage in Neuro-2a cells., Free Radic. Res., 査読有, Vol.46, No.8, 2012, 1019-1028
DOI: 10.3109/10715762.2012.673720.

(7) Hirai N., Iwami K., Horiuchi M., Kano K., Todoroki Y., and Ohigashi H., Electrolytic reduction of abscisic acid methyl ester and its free acid., Phytochemistry, 査読有, Vol.80, 2012, 89-98
DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.04.010.

(8) Takahashi M., Sugiyama Y., Kawabata K., Takahashi Y., Irie K., Murakami A., Kubo, Y., Kobayashi K., and Ohigashi H., 1,2-Di-*O*- α -linolenoyl-3-*O*- β -galactosyl-*sn*-glycerol as a superoxide generation inhibitor from *Perilla frutescens* var. *crispa*., Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, Vol.75, No.11, 2011, 2240-2242
DOI: 10.1271/bbb.110414

(9) Shin J.W., Ohnishi K., Murakami A., Lee J.S., Kundu J.K., Na H.K., Ohigashi H., and Surh Y.J., Zerumbone induces heme oxygenase-1 expression in mouse skin and cultured murine epidermal cells through activation of Nrf2., Cancer Prev. Res., 査読有, Vol.4, No.6, 2011, 860-870
DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0354.

[学会発表] (計 20 件)

(1) 上前知之、川畑球一、高橋正和、大東 肇、マクロファージのNO産生における食由来化合物の相乗的抑制効果の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台市

(2) 高橋正和、大倉克摩、橋本彩子、永尾雅哉、神戸大朋、入江一浩、大東 肇、亜鉛トランスポーターZIP4 の発現を促進する大

豆由来成分の単離・同定、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台市

(3) 坂野太研、川畑球一、大東 肇、ケルセチンによるビフィズス菌の抗炎症活性増強効果、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台市

(4) Ohkura K., Sugiyama Y., Kawabata K., Takahashi M., and Ohigashi H., Post-transcriptional suppression mechanisms of inducible nitric oxide synthase in RAW264 cells by 3-*O*-*p*-coumaroylaliphitic acid from *Zizyphus jujuba*., International Society for Nutraceuticals & Functional Foods (ISNFF2012) 2012 Annual Conference & Exhibition, 2012.12.4, Kailua-Kona, USA

(5) Takahashi M., Nakamura S., Sugiyama Y., Kubo Y., Kobayashi K., Murakami A., Irie K., Kawabata K., and Ohigashi H., Purification, identification, and seasonal quantification analyses of nitric oxide generation inhibitory compounds in *Spinacia oleracea*., International Society for Nutraceuticals & Functional Foods (ISNFF2012) 2012 Annual Conference & Exhibition, 2012.12.5, Kailua-Kona, USA

(6) Takahashi M., Sugiyama Y., Nakamura S., Hashimoto N., Kubo Y., Kobayashi K., Kawabata K., and Ohigashi H., Identification and molecular analyses of galactoglycerolipids from edible plants as radical generation inhibitory compounds in activated phagocytes., The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), 2012.11.30, Nagoya

(7) 上前知之、杉山友太、川畑球一、高橋正和、大東 肇、相乗作用を示す食素材由来 NO産生抑制化合物の探索・評価、日本フードファクター学会 (JSoFF) 第 17 回 JSoFF・第 9 回日本カテキン学会合同大会 2012、2012 年 11 月 10 日、静岡市

(8) 川畑球一、坂野太研、大東 肇、フラボノールによるビフィズス菌の抗炎症活性増強効果、日本フードファクター学会 (JSoFF) 第 17 回 JSoFF・第 9 回日本カテキン学会合同大会 2012、2012 年 11 月 10 日、静岡市

(9) 上前知之、杉山友太、川畑球一、高橋

正和、大東 肇、食素材由来のNO産生抑制化合物における相乗作用に関する研究、日本農芸化学会中部支部第 166 回例会、2012 年 11 月 2 日、福井市

(10) 大倉克摩、高橋正和、橋本彩子、永尾雅哉、神戸大朋、大東 肇、亜鉛トランスポーターZIP4 の発現を促進する大豆由来成分の単離・解析、日本農芸化学会中部支部第 165 回例会、2012 年 10 月 27 日、名古屋市

(11) 大東 肇、ヒトが食べるくすり、チンパンジーがたべるくすり、杉山産業化学研究所第 74 回公開講演会、2012 年 5 月 25 日、藤沢市

(12) 高橋正和、杉山友太、高橋 有、川畑球一、村上 明、入江一浩、久保義人、小林恭一、大東 肇、木田チリメンシソ単離したガラクトグリセロ脂質は食細胞において O_2^- およびNOの産生を阻害する、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都市

(13) 川畑球一、奥村真由、宮下美希、杉山友太、高橋正和、大東 肇、クマリン類の抗炎症作用における分子機序の類似性とアルキルオキシ基の寄与、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都市

(14) 高橋正和、食細胞のラジカル産生を抑制する農作物由来化合物の研究、ARENA第 50 回定期セミナー、2012 年 2 月 27 日、つくば市

(15) Takahashi M., Sugiyama Y., Takahashi Y., Kawabata K., Irie K., and Ohigashi H., Monogalactosyldilinolenoylglycerol purified from *Perilla frutescens* var. *crispa* inhibits O_2^- generation in HL-60 cells, 2011 International Conference on Food Factors (ICoFF2011), 2011. 11. 21, Taipei, China

(16) Kawabata K. and Ohigashi H., Actions of enterobacteria to anti-inflammatory activity of flavanols., 2011 International Conference on Food Factors (ICoFF2011), 2011. 11. 21, Taipei, China

(17) Sugiyama Y., Takahashi M., Kawabata K., Irie K., and Ohigashi H., Identification of nitric oxide generation-inhibitors of *Zizyphus jujuba*, and analysis of the molecular mechanisms, 2011 International Conference on Food Factors (ICoFF2011), 2011. 11. 21, Taipei, China

(18) 高橋正和、杉山友太、高橋 有、川畑球一、小林恭一、大東 肇、木田チリメンシソに含まれる 1,2-di- O - α -linolenoyl-3- O - β -galactosyl-sn-glycerolは食細胞に対してスーパーオキシドおよびNO産生阻害活性を示す、北陸合同バイオシンポジウム、2011 年 11 月 11 日、黒部市

(19) 中村志織、高橋正和、川畑球一、大東 肇、福井県産ホウレンソウのNO産生抑制成分とその活性、北陸合同バイオシンポジウム、2011 年 11 月 11 日、黒部市

(20) 奥村真由、川畑球一、杉山友太、高橋正和、大東 肇、クマリン類の抗炎症作用における分子機序およびその類型化、北陸合同バイオシンポジウム、2011 年 11 月 11 日、黒部市

〔図書〕(計 2 件)

(1) 食による生活習慣病の予防：学術界のこれからの責務. 大東 肇, 日本予防医学会雑誌, 6, 3-6, 2011

(2) がん予防と機能性食品. 大東 肇, Functional Food, 14(4), 316-320, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大東 肇 (OHIGASHI HAJIME)
福井県立大学・生物資源学部・特任教授
研究者番号：8 0 0 2 6 5 8 3

(2) 研究分担者

高橋正和 (TAKAHASHI MASAKAZU)
福井県立大学・生物資源学部・准教授
研究者番号：8 0 3 1 5 8 3 7
川畑球一 (KAWABATA KYUICHI)
福井県立大学・生物資源学部・助教
研究者番号：6 0 4 5 2 6 4 5

(3) 連携研究者

()

研究者番号：