

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292073

研究課題名(和文) 食事性フラボノイド配糖体の体内代謝物による内因性生体防御機構の活性化

研究課題名(英文) Activation of endogenous defense mechanisms by catabolites of dietary quercetin glycosides

研究代表者

中村 宜督 (NAKAMURA, YOSHIMASA)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：60324381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：タマネギ由来ケルセチン-4'-グルコシド(Q4'G)の腸内細菌叢による異化で生成する代謝物群に着目し、これらの生体防御活性化機構を明らかにすることで、腸内細菌叢による代謝の生理的意義を明確にした。具体的には、主要なQ4'G体内代謝物(DOPAC)は遺伝子発現を介して解毒機能を亢進すること、DOPACと他の代謝物の組合せがより生理活性を高めることを明らかにした。また、DOPACプローブとclick chemistryにより、細胞内で生成したDOPAC修飾タンパク質のタグ化に成功し、DOPACの分子標的として、薬物代謝酵素遺伝子発現に関わるKeap1と芳香族炭化水素受容体(AhR)を同定した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the physiological significance of the major phenolic acid catabolites of quercetin 4'-glucoside (Q4'G) from onion through studies on their activation of endogenous defense mechanisms such as the intracellular antioxidant activity and phase II cytoprotective enzymes. DOPAC significantly inhibited the hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in hepatocytes with the enhanced expression of the phase II enzymes, which was potentiated by the combination with another catabolite of Q4'G. Various DOPAC-labelled intracellular proteins were detected using a novel tag-free DOPAC probe with the click chemistry. A pulldown assay identified Keap1 and aryl hydrocarbon receptor (AhR) as the target proteins for the phase 2 enzyme up-regulation by DOPAC. Additional researches suggested that optimal polyphenol supplementation could confer beneficial effects but high doses elicit adverse effects in an electrophilic reaction-dependent manner.

研究分野：農学

キーワード：ポリフェノール ケルセチン 生体内代謝物 分子標的 DOPAC クリックケミストリー ビオチンラベル化

1. 研究開始当初の背景

ケルセチンは植物界において最もユビキタスに分布しているフラボノイドであるが、近年健康に関する機能性に注目が集まり、最も応用が期待される食品成分である。我々の主要なケルセチン摂取源である様々な野菜には、主に配糖体として存在しており、調理過程でも糖部分の加水分解は殆ど進行しない。従って、食品因子としてケルセチンを評価する場合、ケルセチン配糖体としての吸収代謝を考える必要がある。

摂取された一部のケルセチングルコース配糖体は、小腸において上皮細胞に局在しているナトリウム依存性グルコーストランスポーター (SGLT-1) や乳酸脱水素酵素 (LPH) による加水分解によりアグリコンに変換された後、受動的に吸収される経路で吸収されると考えられている。しかし、タマネギに含まれるケルセチン-4'-グルコシド (Q4'G) の多くは小腸で吸収されず、そのまま大腸に達し、腸内細菌叢により様々なフェノール酸異化物へと変換される。Q4'G の主要なフェノール酸異化物には 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、3-hydroxyphenylacetic acid (OPAC)、protocatechuic acid (PCA)、馬尿酸 (HPA) がラットを用いた実験から同定され、主要臓器での分布、蓄積やヒトでの検出が報告されている。

我々の研究グループはこれまでに、上記代謝物の持つ潜在的な健康機能性を比較検討し、代謝物の中で DOPAC が最も強力なラジカル消去活性を示すことを明らかにしてきた。さらにこの結果を踏まえて、DOPAC の標的分子同定を目指した分子機構研究に必須な新規ラベル化 DOPAC の開発を行い、DOPAC-biotin 及び click chemistry を可能とする DOPAC propargyl ester の合成に成功した。従って、これらの DOPAC プローブを用いて体内代謝物の生理機能を証明できれば、ケルセチンの生体内における機能性発現の分子基盤を得るだけでなく、カテコール型ポリフェノール類に共通した標的分子のターゲティングも可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、野菜摂取の健康維持機能におけるケルセチン配糖体の腸内細菌代謝の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

具体的には、(1) Q4'G の主要なフェノール酸異化物標品や Q4'G 体内代謝物を組合せたカクテルの薬物代謝酵素誘導作用と活性酸素/アルデヒド毒性防御作用を主に培養細胞系にて評価した。(2) ケルセチンアグリコンや緑茶カテキン類が活性化する Nrf2 及び AhR 経路クロストークが関与する薬物代謝酵素システムへの影響を評価した。(3) 既に開発済みの DOPAC プローブを用いたフォワードケミカルジェネティクス的手法を駆使

して、細胞内タンパク質の共有結合修飾の有無を明らかにするだけでなく、(4) DOPAC をはじめとしたフラボノイド標的分子の同定を試みた。(5) 以上に加えて、タンパク質修飾の活性本体である求電子性物質が引き起こす細胞生理作用を評価し、濃度によっては害作用を惹起する可能性について考察した。

3. 研究の方法

細胞生理作用の評価は、主に消化管、肝臓、血球由来の各種培養細胞株を用い、細胞増殖抑制作用、第 2 相薬物代謝酵素及び抗酸化酵素遺伝子の発現誘導作用、薬物代謝酵素活性などを対象に、RT-PCR をはじめとした分子生物学的、生化学手法を駆使して評価した。

DOPAC propargyl ester (DPE) は、DOPAC と propargyl alcohol との fisher エステル化反応で作製した。また、DPE と biotin azide との click chemistry 環化反応により、DOPAC 修飾細胞内タンパク質のタグ化を行うことで、標的分子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) Q4'G 体内代謝物であるフェノール酸異化物の生理活性の評価を行った (一部投稿中)。

代謝物の各種第 2 相薬物代謝酵素遺伝子の発現誘導作用を明らかにした。特にカテコール構造を持つ DOPAC に最も強力な活性を見出し、生理活性において主要な役割を果たす代謝物として同定した。発現誘導の分子機構についても検討し、転写因子 Nrf2 及び AhR の核内移行を観察した。

DOPAC を 24 時間処理した細胞は過酸化水素誘導細胞死に対して抵抗性を示す一方で、Q4'G 体内代謝物を 30 分処理した細胞では効果が認められなかったことから、Q4'G 体内代謝物は遺伝子発現を介して内因性抗酸化機能を亢進することが示唆された。

DOPAC はアセトアルデヒド代謝に関わる aldehyde dehydrogenase 遺伝子発現を誘導し、アルコール毒性に対して保護的に機能する可能性を見出した。

DOPAC と不活性類縁体である OPAC との共処理が DOPAC による解毒酵素発現誘導作用を相乗的に増強することを見出した。

(2) DOPAC propargyl ester (DPE) を用いたフォワードケミカルジェネティクス的手法により、DOPAC の細胞内タンパク質修飾作用を評価した (投稿中)。

DOPAC の thiol 基修飾作用を確認している glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をモデルタンパク質として、DPE の求電子反応による修飾作用を評価し、GAPDH-DPE 付加体を click chemistry による biotin 標識により検出に成功した。

DPE の培養細胞系での有用性を評価した。Hepal1c7 細胞に DPE を処理すると、DPE は

細胞内エステラーゼによって分解を受けず蓄積し、様々な分子量のDPE修飾タンパク質が生成することを確認した。さらに、DPEとDOPACの共処理によりDPE修飾タンパク質の生成が抑制されたことから、本プローブがDOPAC標的タンパク質の探索に有用であることが示唆された。

DOPACがNQO1やHO-1などの第2相薬物代謝酵素だけでなく、CYP1A1などの第1相薬物代謝酵素の遺伝子発現を誘導したことから、それぞれの転写制御に関わる因子であるKeap1とaryl hydrocarbon receptor (AhR)への影響を検討した。DPEとclick chemistryによるbiotin標識とpulldown assayを行った結果、両分子がDOPACにより共有結合修飾を受けることを確認し、各分子が薬物代謝酵素誘導機構に寄与することが示唆された。

(3) 酸化したポリフェノールの求電子反応性と機能性/安全性との関連性について調査した。

各種ポリフェノールの求電子性評価を行い、カテコール構造を有する化合物のみが、phenol oxidaseを介した酸化反応により求電子性物質へと変換されることを明らかにした。また、高用量の皮膚への塗布により生物変換依存的に毒性(炎症増強)作用を示すことを証明した(論文4)。

カテコール構造を持つ抗酸化ポリフェノールとして著名な(-)-epigallocatechin-3-gallateや同様の作用を有するアスコルビン酸の活性酸素生成作用と細胞増殖抑制作用を調査し、光増感剤による抗がん作用を相乗的に増強することを観察した(論文3、5)。

緑茶カテキン類による細胞増殖抑制作用を調査し、過酸化水素依存的経路だけでなく、過酸化水素非依存的経路の存在を指摘し、求電子反応性の寄与を示唆した(論文7)。

緑茶カテキン類は、血圧調節に重要な酵素であるangiotensin変換酵素(ACE)の活性を顕著に阻害するが、カテキン自身の自動酸化により生成する過酸化水素ではなく、酸化したカテキンがACEの活性中心以外の部位に共有結合修飾し、アロステリックに活性を阻害することを明らかにした(投稿中)。

(4) 求電子性化合物の持つ普遍的な生理機能の評価を行い、ポリフェノール類に共通した標的分子候補を同定した。

アブラナ科野菜由来求電子性物質benzyl isothiocyanate (BITC)のカルシウムイオノフォア誘導サイトカイン発現の調節作用とmitogen activated protein kinase (MAPK)経路の寄与(論文8)、BITCのp53変異大腸がん細胞特異的な細胞増殖抑制作用とNF-kappaB経路の活性化の寄与(論文6)。

生理的求電子性物質である次亜ハロゲン酸のDNA修飾作用とアミノ酸類(タウリン、マッシュルーム由来エルゴチオネイン)によ

る化学調節の可能性(論文9、10)などを明らかにした。

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17件)

主なもの(査読あり)

1. Nishino, M., Sakata, M., Murata, Y., Nakamura, Y. Lower photostability of capsanthin dispersed in an aqueous solution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1313-1316 (2013).
2. Nishino, M., Sakata, M., Murata, Y., Nakamura, Y. Effects of emulsifiers on the photostability of lycopene. *Food Sci. Technol. Res.*, **19**, 983-987 (2013).
3. Qi, H., Wu, Q., Abe, N., Saiki, S., Zhu, B., Murata, Y., Nakamura, Y. Ascorbic acid synergistically potentiates phloxine-B induced photocytotoxicity in human acute promyelocytic leukemia cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **28**, 167-173 (2014).
4. Nakamura, Y., Ishii, T., Abe, N., Murata, Y. Thiol modification by bioactivated polyphenols and its potential role in skin inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1067-1070 (2014).
5. Qi, H., Abe, N., Zhu, B., Murata, Y., Nakamura, Y. (-)-Epigallocatechin-3-gallate ameliorates photodynamic therapy responses in an in vitro T lymphocyte model. *Phytother. Res.*, **28**, 1486-1491 (2014).
6. Abe, N., Hou, D.X., Munemasa, S., Murata, Y., Nakamura, Y. Nuclear factor-kappaB sensitizes to benzyl isothiocyanate-induced antiproliferation in p53-deficient colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.*, **5**, e1534 (2014).
7. Tang, Y., Abe, N., Qi, H., Zhu, B., Murata, Y., Nakamura, Y. Tea catechins inhibit cell proliferation through hydrogen peroxide-dependent and -independent pathways in human T lymphocytic leukemia Jurkat cells. *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 1245-1249 (2014).
8. Tang, Y., Abe, N., Yoshimoto, M., Zhu, B., Murata, Y., Nakamura, Y. Benzyl isothiocyanate inhibits IL-13 expression in human basophilic KU812 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 159-163 (2015).
9. Asahi, T., Nakamura, Y., Kato, Y., Osawa, T. Specific role of taurine in the 8-brominated-2'-deoxyguanosine formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **586**, 45-50 (2015).
10. Asahi, T., Wu, X., Shimoda, H., Hisaka, S., Harada, E., Kanno, T., Nakamura, Y., Kato, Y., Osawa, T. A mushroom-derived amino acid, ergothioneine, is a potential inhibitor of

- inflammation-related DNA halogenation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 313-317 (2016).
11. 宮澤紀子, 阿部雅子, 木村典代, 松岡寛樹, 田中進, 森光康次郎, 中村宜督, 綾部園子, 小澤好夫. アブラナ科野菜漬物(カブ, ハクサイ)のイソチオシアネート生成に関する塩化ナトリウム (NaCl) およびアスコルビン酸の影響. *日本調理科学会誌*, **49**, 138-146 (2016).
 12. Nakamura, Y. Plant polyphenols as a double-edged sword in health promotion: Lessons from the experimental models using simple phenolic acids. *Agri-Biosci. Monogr.*, in press (2016).

〔学会発表〕(計 40 件)

主なもの

1. 中村宜督, アブラナ科野菜の健康機能とその分子機構、特別講演：『食品成分による健康保持』：第 46 回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会(山口)、2013 年 11 月 16 日。
2. 齋木俊也, 桑鶴祥子, 芦田均, 村田芳行, 中村宜督, 枸杞子抽出物が第 2 相薬物代謝酵素遺伝子群に与える影響、第 38 回日本農芸化学会中四国支部講演会(三木、香川)、2014 年 1 月 25 日。
3. 中村宜督, 食品に含まれる抗酸化物質の機能性と安全性-基礎研究の視点から-, 健康食品管理士会中国支部研修会 市民公開講座(岡山)、2014 年 7 月 12 日。
4. 平川実保, 木田真衣, 石坂朱里, 北元憲利, 中村宜督, 加藤陽二, アミノリン脂質に対するイソチオシアネート付加修飾の検出定量、第 19 回日本フードファクター学会 (JSoFF) 学術集会(鹿児島)、2014 年 11 月 8 日。
5. 中村宜督, フラボノイド配糖体代謝物による生体防御機構の活性化、第 8 回 Antioxidant Unit (AOU) 研究会(東京)、2014 年 11 月 26 日。
6. S. Nakashima, Z. Liu, Y. Yamaguchi, S. Saiki, Y. Murata, Y. Nakamura, A novel tag-free probe for targeting molecules interacted with flavonoid catabolites, 7th International Conference on Polyphenols and Health (Tours), 2015.10.29.
7. N. Abe, D.-X. Hou, S. Munemasa, Y. Murata, Y. Nakamura, Nuclear factor-kappaB as a potential target for antiproliferation induced by benzyl isothiocyanate in p53-deficient colorectal cancer cells. 6th International Conference on Food Factors (Seoul), 2015.11.23.
8. N. Suga, A. Ishisaka, N. Kitamoto, A. Murakami, Y. Nakamura, Y. Kato, Effect of quinone derived from 5-Hydroxytryptamine on expression of genes in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 6th International

Conference on Food Factors (Seoul), 2015.11.23.

9. N. Abe, D.-X. Hou, S. Munemasa, Y. Murata, Y. Nakamura, The regulating role of nuclear factor-kappaB in benzyl isothiocyanate-induced antiproliferation in p53-deficient colorectal cancer cells. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Honolulu), 2015.12.18.
10. 中島清花, 劉哲, 山口佑也, 齋木俊也, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督, ケルセチン配糖体代謝物の新規タグフリープローブの開発、2016 年度日本農芸化学会大会(札幌)、2016 年 3 月 28 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：

<http://yossan24okayama.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 宜督 (NAKAMURA YOSHIMASA)
岡山大学・大学院環境生命科学研究所・教授
研究者番号：60324381

(2)研究分担者

加藤 陽二 (KATO YOJI)
兵庫県立大学・環境人間学部・教授
研究者番号：30305693