

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870506

研究課題名(和文)食品含有ポリフェノール類の生体内動態と活性発現メカニズムの解析

研究課題名(英文)Bioavailability and bioactivity of dietary polyphenols.

研究代表者

石坂 朱里(Ishisaka, Akari)

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：30724463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ポリフェノールの中でも野菜や果物等に幅広く含まれるケルセチンに着目し、その生体内動態と活性発現機構の究明を目的とした。まず、ケルセチン摂取後の生体内に存在するアグリコン及び分解物を評価するため、これらを認識する抗体の作製を行った。しかし、得られた抗体はこれらを特異的に認識しなかったことから、免疫化学的手法への適用には至らなかった。一方、ケルセチン代謝物の脱抱合機構について、健常/炎症モデル動物を用いて比較検討した結果、炎症モデルではグルクロニド脱抱合酵素の酵素活性が高いと考えられたことから、代謝物が脱抱合されてアグリコンが生じることで、抗炎症作用の増強につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Quercetin is the major polyphenol included in various fruits and vegetables. To understand the localization and target sites of quercetin underlying the bioactivity in vivo, we planned to develop monoclonal antibodies directed to quercetin aglycone and its degradation product. However, the developed antibodies scarcely recognized the haptens. These results suggested that the antibodies were difficult to available for immunochemical studies. On the other hands, we investigated the deconjugation mechanism of quercetin metabolites in healthy/inflammation animal models. This study suggested that the deconjugation of quercetin metabolites at sites of inflammation was contributed to the anti-inflammatory activity in vivo.

研究分野：食品機能学

キーワード：ポリフェノール フラボノイド ケルセチン 脱抱合 炎症

1. 研究開始当初の背景

ポリフェノールは、植物性食品中に幅広く含まれ、日常的に摂取されており、動脈硬化症、高血圧などの生活習慣病の予防・改善効果が期待されている機能性成分である。ポリフェノールは植物中では主にグルコース配糖体として存在するが、摂取後は、腸内で加水分解により糖が外れてアグリコンとなり吸収される。その後、小腸や肝臓において、解毒酵素群による代謝（抱合化）を受けて、代謝物として血中へ移行する（Terao et al., Food Funct. 2, 11-7, 2011.）。あるいは、大腸まで到達し、腸内細菌による分解を受けた後に吸収される（Jaganath et al., Free Radic. Res. 40, 1035-46, 2006; Keppeler et al., Mol. Nutr. Food Res. 50, 686-95, 2006.）。

近年、我々は、炎症性マクロファージモデル細胞において、代謝物の脱抱合により生じたアグリコンが抗炎症作用を発揮することを明らかにした（Ishisaka et al., PLoS One. 19, e80843, 2013.）。一方、腸内細菌の働きによって生じた分解物も、生体内で抗酸化作用を発揮することが示唆されている。したがって、ポリフェノールの生理作用を研究するうえで、「抱合/脱抱合/腸内細菌による分解」などの構造変換を考慮することが重要である。

従来、ポリフェノールの生体内存在部位の分析手法は、クロマトグラフィなどの化学的手法に限られており、詳細な存在部位の同定は困難であった。そこで、我々はポリフェノールを認識する抗体を作製し、免疫染色などの免疫化学的手法に用いることで、ポリフェノールの生体内動態と生理活性の究明を進めてきた（Ishisaka et al., Arch. Biochem. Biophys. 557, 11-7, 2014.）。このようなポリフェノール解析方法の構築により、新たな知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、ポリフェノールの中でも野菜や果物等に幅広く含まれるケルセチンに着目し、その生体内動態と活性発現機構の解析に取り組んできた。

本研究では、生体内での構造変換により生じることが予想される種々のケルセチン類縁体を認識する抗体の作製を行い、本抗体を免疫化学的手法に用いることで、ポリフェノールの生体内動態を可視化し、活性発現機構の解明につなげることを目的とした。

また、ケルセチンの大部分は、グルクロン酸や硫酸が抱合した代謝物として血中を循環し、アグリコンとしてはほとんど存在しないと考えられている。しかしながら、代謝物はアグリコンに比べて生理活性が弱いことから、ケルセチンの生理機能性を説明するうえで矛盾が生じている。

本研究では、ケルセチン代謝物の局所的なアグリコンへの脱抱合が生理活性を発揮するうえで重要であると想定し、生体内における脱抱合機構についても究明することを目的と

した。

3. 研究の方法

(1) 抗ポリフェノールモノクローナル抗体の作製

ポリフェノールを免疫抗原として組み込む際、その生体内存在形態を考慮することが重要である。これまでの研究から、その形態として「アグリコン/抱合体/メチル化体/分解物」が考えられ、さらに、各々について「タンパク質付加体/未付加体（遊離体）」の2種類の存在が示唆される（Awad et al., Chem. Res. Toxicol. 16, 822-31, 2003.）。

本研究では、以下の、の抗体作製方法について検討した。

抗ケルセチンアグリコン抗体の作製

ケルセチンアグリコンは、*in vitro*においてタンパク質チオール基と結合することが報告されている。したがって、生体内でもタンパク質付加体を形成すると想定されることから、本構造を認識するモノクローナル抗体の作製に着手した。

チオール基をもつ 3-メルカプトプロピオン酸 (3MPA) を酸化的にケルセチンに結合し、3MPA のカルボキシル基とキャリアタンパク質であるキーホールリンペットヘモシニアン (KLH) のアミノ基のカルボジイミド結合により抗原 (ケルセチン-3MPA-KLH) とした。マウスに免疫し、抗体価の上昇を確認後に脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ細胞を融合してハイブリドーマを作製した。その後、ハイブリドーマ産生抗体のスクリーニングを行った。

一方、タンパク質に結合せず遊離状態にあるケルセチンアグリコンに対する抗体も作製するため、抗原の合成方法について検討した。まず、ケルセチン水酸基のアセチル化によりケルセチンペンタアセテートを合成後に、*tert*-ブチルクロロアセテートを用いて 7 位への *tert*-ブチルアセテート基の導入を行った。その後、酸加水分解により脱アセチル化することで 7-カルボキシメチルケルセチンを合成し、HPLC での分取およびエバポレータールでの濃縮乾固を行った。

抗ケルセチン分解物抗体の作製

ケルセチンの腸内細菌分解物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) の抗体作製を試みた。DOPAC のカルボキシル基と KLH のアミノ基をカルボジイミド結合したものを抗原とし、上記 同様に検討を進めて、ハイブリドーマ産生抗体をスクリーニングした。

(2) 脱抱合酵素の酵素活性・発現部位の解析およびケルセチンの活性発現機構の究明

先述のとおり、ケルセチンは吸収代謝の過程でグルクロン酸あるいは硫酸抱合体へ変換（代謝）されて生体内を循環した後、速やかに排泄されることが知られている。一方、そ

の一部は炎症部位において脱抱合酵素(β-グルクロニダーゼ、サルファターゼ)により局所的に脱抱合されて、生理活性の強いケルセチンアグリコンになる可能性が示唆されている。本研究では、炎症モデルマウスおよびラットを用いて、その脱抱合機構および脱抱合に伴う活性発現メカニズムについて解析を行った。

マウス臓器ホモジネート中の脱抱合酵素活性の測定

マウスから採取した種々の臓器を用いてホモジネートを調製した。これらホモジネートに、β-グルクロニダーゼの発色基質である 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide sodium salt (X-グルクロニド)あるいはサルファターゼの基質である 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl sulfate sodium salt (X-サルフェイト)をそれぞれ添加し、その脱抱合により生じる青色沈殿物の吸光度を測定した。同様に、これら酵素の蛍光基質である 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide hydrate (MUG)あるいは 4-methylumbelliferyl sulfate potassium salt (MUS)も用いて検討することで、酵素活性を測定した。

リポポリサッカライド (LPS) 炎症誘導マウス臓器中のβ-グルクロニダーゼとケルセチンアグリコンの解析

マウスへの LPS の尾静脈投与およびケルセチンの胃内ゾンデ投与後に臓器を採取し、ホモジネートを調製した。これら臓器ホモジネート中のβ-グルクロニダーゼ発現量をウェスタンブロットにて解析した。さらに、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、臓器中のケルセチンアグリコン量を定量した。

LPS 投与マウス血漿中の脱抱合酵素活性と炎症性サイトカインの分析

マウスへの LPS の尾静脈投与およびケルセチンの胃内ゾンデ投与後に採血し、血漿を調製した。これら血漿試料中のβ-グルクロニダーゼおよびサルファターゼの酵素活性を蛍光基質である MUG あるいは MUS を用いて解析した。さらに、炎症性サイトカインの 1 種であるインターロイキン-6 (IL-6) レベルについて、enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) キットを用いて測定することで炎症状態を評価した。

高血圧モデルラットにおけるケルセチンアグリコン存在部位の究明

ヒトやラットを用いた数多くの先行研究において、ケルセチン摂取による高血圧予防・改善効果が報告されている (Galindo et al., PLoS One. 7, e32673, 2012.)。しかしながら、先述のとおり、血中には生理活性の弱い代謝物が多く、活性の強いアグリコンはほぼ存在しない

と考えられる。そこで本研究では、ケルセチンの抗高血圧作用は、代謝物の脱抱合で生じたアグリコンによって発揮されるという仮説を立て、高血圧モデルラット (spontaneously hypertensive rat, SHR) を炎症モデルの 1 種として用いることで検証した。具体的には、SHR にケルセチン-3-グルクロニド (Q3GA) を血中濃度約 10 μM となるように静脈投与 (24 時間毎に 2 回) し、2 回目の投与 2.5 時間後に血圧及び血漿中バイオマーカーの測定と血漿中ケルセチン濃度の定量を行った。なお、血漿中バイオマーカーとして、血管内皮依存性弛緩物質である一酸化窒素 (NO)、DNA の酸化修飾物質である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) および、血圧調節に関わるレニン-アンジオテンシン系においてアンジオテンシンからアンジオテンシンを生成するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) について検討した。

さらに、SHR およびその対照ラットである Wistar Kyoto Rat (WKY) の血漿試料に MUG あるいは MUS を混合し、その蛍光強度を測定することで、血漿中の脱抱合酵素の酵素活性を比較した。

4. 研究成果

(1) 抗ポリフェノールモノクローナル抗体の作製

抗ケルセチンアグリコン抗体の作製方法の検討

ケルセチン-3MPA-KLH を抗原として得られた抗体について、スクリーニングを実施した。その結果、本抗体はウシ血清アルブミン (BSA) を認識せず、ケルセチン-3MPA-BSA を顕著に認識した。しかしながら、酸化的条件下で結合したケルセチン-BSA、およびケルセチンアグリコンはほとんど認識しなかった。したがって、本抗体はケルセチン-3MPA を認識すると示唆されたことから、生体内のケルセチンタンパク質付加体の検出には本抗体の適用が困難であると考えられた。

一方、ケルセチンアグリコンを認識するモノクローナル抗体を作製するため、その抗原作製についても検討した。しかしながら、7-カルボキシメチルケルセチンの安定的な単離が困難であり、抗原完成までに至らなかった。

以上の検討から、免疫染色などの免疫化学的手法に適用できる抗ケルセチンアグリコン抗体の作製には至らなかった。

抗ケルセチン分解物抗体の作製

DOPAC を抗原として得られた抗体についてスクリーニングを実施した結果、本抗体は BSA を認識せず、DOPAC-BSA を顕著に認識した一方、DOPAC はほとんど認識しなかった。したがって、DOPAC とキャリアタンパク質のカルボジイミド結合部位までを認識する抗体が作製されたと示唆された。本抗体についても、生体内の DOPAC の検出には適用困難であると

考えられた。

以上、 の検討から、生体内に存在するケルセチンアグリコンおよびケルセチン分解物を認識する抗体の作製のためには、さらに改良を加えた抗原作製および、抗体産生細胞のスクリーニング方法の最適化が必要であると考えられた。今後、抗原構造の違いにより抗体の特異性がどのように異なるかを明らかにしていくことで、ポリフェノール類の抗体作製方法の確立につなげていくことが重要である。

(2) 脱抱合酵素の酵素活性・発現部位の解析およびケルセチンの活性発現機構の究明

マウス臓器ホモジネート中の脱抱合酵素活性の測定

脱抱合酵素の発色基質および蛍光基質をそれぞれ用いて検討した結果、どちらの手法においても、 β -グルクロニダーゼの酵素活性は種々の臓器ホモジネートでみられ、特に脾臓、胸腺、腸管などの免疫器官で顕著となった。一方、サルファターゼの脱抱合活性は β -グルクロニダーゼと比較すると弱く、いくつかの臓器では検出限界以下となった。

LPS 炎症誘導マウス臓器中の β -グルクロニダーゼとケルセチンアグリコンの解析

LPS 投与マウスの脾臓および胸腺ホモジネートにおいて、コントロールマウス生体試料と比較して、 β -グルクロニダーゼ発現量の増加およびケルセチンアグリコン量の増加がみられた。

LPS 投与マウス血漿中の脱抱合酵素活性と炎症性サイトカインの分析

マウスへの LPS 投与により、血漿中 β -グルクロニダーゼの酵素活性が増加した。この酵素活性の増加は、ケルセチン摂取マウスで抑制される傾向がみられた。一方、血漿中サルファターゼの酵素活性は全群において検出限界以下となった。

血漿中 IL-6 濃度は、LPS 投与で上昇し、ケルセチン摂取によって低下する傾向を示した。したがって、血漿中の β -グルクロニダーゼの酵素活性と IL-6 濃度との間には正の相関がみられると推察された。

以上、 の検討により、脾臓や胸腺などの免疫器官では β -グルクロニダーゼの発現量および酵素活性が高く、それに伴い代謝物が脱抱合されてアグリコンが生じることが示唆された。さらに、炎症時には脱抱合酵素の活性上昇に伴い臓器中のアグリコンの生成量も増加することで、抗炎症作用の増強につながる可能性が示唆された。

高血圧モデルラットにおけるケルセチン代謝物の生理作用と脱抱合機構の究明

高血圧モデルラットである SHR への Q3GA 静脈投与によって、収縮期血圧の低下傾向がみられた。また、血漿中の NO 濃度上昇、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の濃度低下および、血圧上昇に関わる ACE 酵素の活性抑制傾向がみられた。一方、投与 2.5 時間後の血漿中 Q3GA 濃度は数 nM レベルとなり、アグリコンは検出限界以下であった。したがって、ケルセチンが機能性を示すと考えられる血中濃度からは程遠く、高血圧状態での脱抱合機構については依然不明ではあるものの、Q3GA の静脈投与によって炎症が関連する種々のバイオマーカーが変動し、血圧低下につながることを示唆された。

一方、血漿中の β -グルクロニダーゼの酵素活性は、対照ラットである WKY に比べて SHR で高い傾向がみられたのに対し、サルファターゼの酵素活性は両群間でほとんど差が見られなかった。これらの結果から、炎症時にはグルクロン酸抱合体の脱抱合が優先的に起こると示唆された。抱合体の種類によって、その活性発現機構の違いがみられる可能性が示されたことは興味深い。現在、炎症時の脱抱合機構について、さらに詳細な検討を進めている。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

Ishisaka A, Kato Y, Kitamoto N, Terao J, Kawai Y. Deconjugation of quercetin metabolites at sites of inflammation. 7th International Conference on Polyphenol and Health. 2015 年 10 月 27 日 ~ 2015 年 10 月 30 日. Tours, France.

Ishisaka A, Kato Y, Kawai Y, Terao J. Possible deconjugation of quercetin metabolites in brain: anti-inflammatory effects of unconjugated quercetin. International Symposium on Dietary Antioxidants and Oxidative Stress in Health. 2015 年 08 月 30 日 ~ 2015 年 08 月 31 日. 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://food-science6.webnode.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石坂 朱里 (ISHISAKA, Akari)

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：30724463