

平成21年 5月27日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780098  
 研究課題名(和文) アリール炭化水素受容体の食事性リガンドの分子制御機構と体内動態の解明  
 研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms and pharmacokinetics of dietary ligands of an aryl hydrocarbon receptor  
 研究代表者  
 福田 伊津子 (FUKUDA ITSUKO)  
 神戸大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：50418943

研究成果の概要：本研究は、食事性 AhR リガンドであるフラボノイド類のうち、フラボン、フラボノール、フラバノン、カテキンの各サブクラスから数種の化合物を選定し、これらの化合物が AhR の活性化に関わる事象に対する影響と、投与形態がその体内動態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。その結果、1.フラボン、フラボノール、フラバノンに属する化合物は AhR とアゴニストとの結合を競合的に阻害するのに対して、カテキンは阻害しないことが分かった。2.培養肝細胞においてダイオキシン類が誘導する AhR の核内移行に対しては、フラボンとフラボノールに属する化合物がこれを阻害した。3. (-)-エピガロカテキン-3-ガレート(EGCg)のみを投与したときの総 EGCg が 43 nM であったのに対して、GTE を投与したときの総 EGCg が 427 nM であった。同じ動物個体から得た血清を用いてマウス肝腫瘍由来 Hepa-1c1c7 細胞に処理したところ、4. 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシンによって誘導されるシトクローム P450 1A1 の発現を有意に抑制した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	0	2,900,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

研究分野：食品生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アリール炭化水素受容体、フラボノイド、ダイオキシン、カテキン

## 1. 研究開始当初の背景

アリール炭化水素受容体(AhR)は、リガンド活性化型転写因子の一つであり、ダイオキシン類に代表される多環芳香族炭化水素類及びハロゲン化芳香族炭化水素類を外因性リガンドとすることが知られている。リガンド非存在下の AhR は、hsp90、XAP2、p23 と複合体を形成して細胞質内に存在しているが、リガンドが結合すると活性化して核内に移行し複合体構成タンパク質を解離した

後、ARNT とヘテロダイマーを形成し、これがダイオキシン応答遺伝子のプロモーター領域に結合することで転写が開始される。その結果として、第1相酵素であるシトクローム P4501A1 (CYP1A1)、第2相酵素であるグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)、NAD(P)H キノンオキシドレダクターゼ(NQO1)などの薬物代謝酵素などの発現が誘導される。

ダイオキシン類のヒトへの被曝経路の

90%以上が食事由来であることから、ダイオキシン毒性発現の初発段階を担う AhR のリガンドを食品因子から探索し、その作用機構を解明することは、食の安全性確保の点からも重要である。これらの食事性 AhR リガンドの多くはアンタゴニストとして働くことが示されているが、一部のフラボノイドは高濃度ではアゴニストとして働き AhR の活性化を引き起こすことが報告されている。しかし、これらの食事性 AhR リガンドの標的タンパク質および作用部位等の詳細な分子制御機構は明らかにされていない。

エストロゲン受容体(ER)のリガンドであるイソフラボンは、低濃度では内因性リガンドに対してアンタゴニストとして、高濃度ではアゴニストとして働くことが知られている。最近、大豆イソフラボンを濃縮あるいは強化した食品を摂取する場合の安全性が見直され、サプリメントなどのいわゆる健康食品として摂取する場合の上限摂取目安量が定められた。このことは、イソフラボンに限らず、日常の食生活では経験的に安全性が得られている食品因子でも、健康食品として結果的に過剰摂取となった場合には体内で高濃度となり、有害作用が懸念される可能性があることを示唆している。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、食事性 AhR リガンドであるフラボノイド類のサブクラスのうち、フラボン、フラボノール、フラバノン、カテキンに焦点を絞り、これらの AhR 活性化に対する分子制御機構および体内動態を解明することを目的とした。具体的には、(1)AhR 複合体とフラボノイドとの相互作用、と外因性リガンドとの結合、(2)核内における AhR 複合体の構成成分の変化を検討した。また、フラボノイドの体内動態を解明するため、(3)化合物を単回、高用量投与した場合と、フラボノイドを比較的多く含む食品を単回、高用量投与した場合の血漿中化合物を定量し、両者を比較検討した。(4)また、同じ動物個体より得られた血清を Hepa-1c1c7 細胞に処理し、ダイオキシンにより誘導される CYP1A1 発現に及ぼす影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) AhR 複合体とフラボノイドとの相互作用

AhR の外因性リガンドである<sup>3</sup>H]3-メチルコランスレン(MC)とAhRとの結合に対して、フラボノイドが阻害効果を示すか否かを既報の方法を改変して検討し、阻害様式を決定した。また、表面プラズモン共鳴装置を用いてラット肝細胞質画分より粗精製したAhR複合体とフラボノイドとの相互作用を検出した。

### (2) 細胞内における AhR 複合体の構成成分

の変化

マウス肝腫瘍由来 Hepa-1c1c7 細胞を用いてダイオキシン類が誘導する AhR 複合体構成成分の変化に対するフラボノイドの効果を明らかにした。

### (3) カテキンの体内動態解明

カテキン単体またはこれを比較的多く含む食品または緑茶を単回、高用量ラットに投与し、投与1時間後の血漿中に含まれる化合物を LC-MS/MS にて定量した。

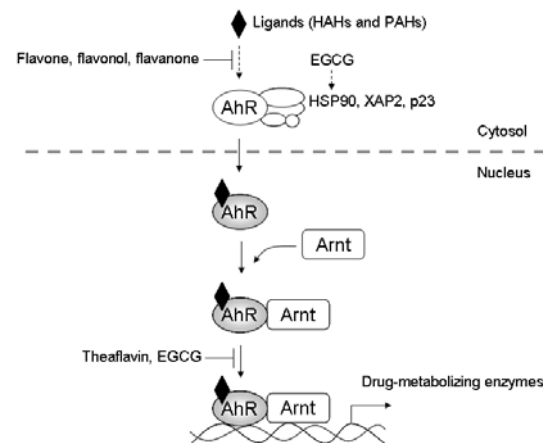
### (4) カテキンが CYP1A1 発現に及ぼす影響

上記(3)と同じ動物個体から得た血清を Hepa-1c1c7 細胞に処理し、2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン(TCDD)によって誘導される CYP1A1 発現に及ぼす影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) AhR 複合体とフラボノイドとの相互作用

フラボノイドは、そのサブクラス、すなわち基本構造に依存してAhRと<sup>3</sup>H]MCとの結合を阻害した。フラボン、フラボノール、フラバノンはその濃度依存的にAhRと<sup>3</sup>H]MCとの結合を阻害したが、カテキンはこれを阻害しなかった。一方、表面プラズモン共鳴試験の結果、フラボン、フラボノール、フラボン、カテキンはAhR複合体と相互作用することがわかった。カテキンはその濃度依存的にAhR複合体と相互作用したことから、AhRのリガンド結合部位とは異なる部位に作用することが示唆された(下図参照)。



### (2) 細胞内における AhR 複合体の構成成分の変化

また Hepa-1c1c7 細胞において TCDD により誘導される AhR の核内移行に対して、フラボンとフラボノールは阻害効果を示したのに対して、フラバノンとカテキンは阻害しなかった。同様に、フラボンとフラボノールは AhR から XAP2 および hsp90 の解離を阻害したのに対して、フラバノンとカテキンは阻害しなかった。

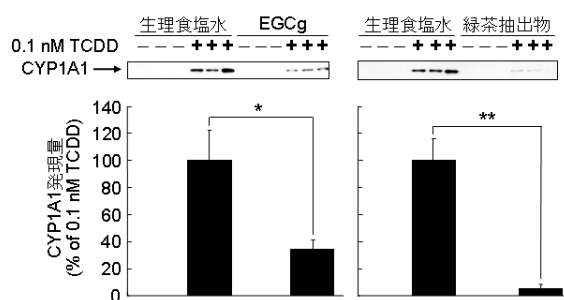
### (3) カテキンの体内動態解明

カテキンの体内動態を検討するため、同量の75 mg EGCg/kg 体重を含む EGCg (75 mg/kg 体重)または緑茶抽出物(454 mg/kg 体重)を経口投与したときの血漿カテキンを定量した。緑茶抽出物を投与後の血中 EGCg 濃度は 426.9 nM であり、EGCg を投与したときのおよそ 10 倍であった。このことは、EGCg は複数の化合物との混合物として投与したときの方が単体で投与したときより吸収率が高くなることを示している。カテキンは体内に吸収された後、メチル化、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、環開裂などの代謝修飾を受けることが報告されている。EGCg とその他のカテキンとの間で複合体を形成するか、これらの代謝修飾に関わる酵素を競合することで、結果的に EGCg の吸収量が増えたことが考えられた。

緑茶抽出物投与群では、緑茶抽出物に含まれる(-)-エピガロカテキン(EGC)と(-)-エピカテキン(EC)は比較的lowかったにも関わらず、これらの血中総濃度がそれぞれ 3.4 と 1.7 μM であり、EGCg より吸収されやすいことが示唆された。EGCg は主に胆汁と共に排泄されるが、EGC と EC は尿及び胆汁の両方に排泄されることが報告されていることから、EGCg のバイオアベイラビリティは EGC や EC と比較して低いことが考えられる。興味深いことに、EGCg 投与後に血中に(-)-ガロカテキン (GC) と EGC がわずかながら見出され、EGCg が GC と EGC に転化したことが示唆された。

#### (4) カテキンが CYP1A1 発現に及ぼす影響

血漿中カテキンを定量した動物と同じ個体から血清を調製し、Hepa-1c1c7 細胞に作用させて CYP1A1 の発現レベルに及ぼす影響を検討した (下図参照)。生理食塩水を投与したラットから得た血清を細胞に作用させたとき、TCDD により CYP1A1 の発現が顕著に誘導されたのに対して、EGCg 及び緑茶抽出物を投与したラットから得た血清を細胞に作用させることでその誘導レベルはそれぞれ 34%及び7%にまで有意に抑制された。これらの結果は、体内のカテキン濃度が上昇することで、カテキンによる CYP1A1 の発現抑制効果が強められたことを示唆している。



#### 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)

[雑誌論文] (計 6 件)

[1] Itsuko Fukuda, Miki Tsutsui, Iwao Sakane, and Hitoshi Ashida.

Suppression of cytochrome P450 1A1 expression induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells treated with serum of

(-)-epigallocatechin-3-gallate- and green tea extract-administered rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press (2009). 査読有

[2] Hitoshi Ashida, Shin Nishiumi, and Itsuko Fukuda. An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4, 1429-1447 (2008). 査読有

[3] Itsuko Fukuda, Atsushi Kaneko, Shin Nishiumi, Masaya Kawase, Rika Nishikiori, Nobuhide Fujitake, and Hitoshi Ashida. Structure-activity relationships of anthraquinones on the suppression of DNA-binding activity of the aryl hydrocarbon receptor induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 296-300 (2009). 査読有

[4] Rie Mukai, Itsuko Fukuda, Shin Nishiumi, Midori Natsume, Naomi Osakabe, Ken-ichi Yoshida, and Hitoshi Ashida. Cacao polyphenol extract suppresses transformation of an aryl hydrocarbon receptor in C57BL/6 mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10399-10405 (2008). 査読有

[5] Shin Nishiumi, Norio Yamamoto, Rie Kodoi, Itsuko Fukuda, Ken-ichi Yoshida, and Hitoshi Ashida. Antagonistic and agonistic effects of indigoids on the transformation of an aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 470, 187-199 (2008). 査読有

[6] Itsuko Fukuda, Rie Mukai, Masaya Kawase, Ken-ichi Yoshida, and Hitoshi

Ashida. Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and its antagonists, flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 822-827 (2007). 査読有

〔学会発表〕 (計 5 件)

[1] 福田伊津子, 向井理恵, 芦田均. 芳香族炭化水素類によるアリール炭化水素受容体の活性化に対するカテキンの作用. 日本栄養・食糧学会第 47 回近畿支部大会, 奈良, 2008 年 10 月 25 日.

[2] 福田伊津子, 筒井美妃, 坂根巖, 芦田均. カテキンがシトクローム P4501A1 発現に及ぼす影響. 第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 坂戸, 2008 年 5 月 2-4 日.

[3] 向井理恵, 西海信, 白井康仁, 齋藤尚亮, 福田伊津子, 吉田健一, 芦田均. アリール炭化水素受容体の核移行に及ぼすフラボノイドの効果と細胞への吸収. 日本農芸化学会 2008 年度大会, 名古屋, 2008 年 3 月 26-29 日.

[4] 木根原匡希, 福田伊津子, 吉田健一, 芦田均. ダイオキシンによる AhR 活性化は AhR 複合体の構成因子の共発現により促進される. 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2007 年 12 月 11-15 日.

[5] Itsuko Fukuda, Rie Mukai, Masaya Kawase, Ken-ichi Yoshida, and Hitoshi Ashida. (-)-Epigallocatechin gallate interacts with an aryl hydrocarbon receptor complex. The 3rd International Conference on O-CHA(Tea) Culture and Science, Shizuoka, Japan, Nov 2-4, 2007.

〔図書〕 (計 2 件)

[1] 福田伊津子, 芦田均. 茶の事典. 朝倉書店, 印刷中.

[2] Itsuko Fukuda and Hitoshi Ashida. Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention. American Chemical Society, pp. 369-374, (2008).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 伊津子 (FUKUDA ITSUKO)  
神戸大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：50418943

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者