

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380080

研究課題名 (和文) 食品由来多硫化アルケニルの生体内挙動とその分子標的に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on the function and metabolism of alk(en)yl polysulfides derived from food.

研究代表者

有賀 豊彦 (ARIGA TOYOHIKO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50096757

研究成果の概要 (和文)：

スルフィドの生体内での挙動の解明と同時に疎水性度など各種スルフィドの物理化学的性質と機能の関係について追究した。様々な側鎖構造の alk(en)yl trisulfide の合成法を確立し、生物学的活性としてヒト大腸がん細胞株 HT-29 の増殖抑制能を測定した。各種 trisulfide の疎水性は octanol/water 分配係数を指標として測定した。合成した 9 種類の trisulfide のうち dipropyl, diallyl, dibutenyl trisulfide は強力な増殖抑制作用を示した。sulfide の疎水性は側鎖の長さ按比例して増加し、増殖抑制、チュブリン重合抑制能は疎水性と parabolic な相関を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Of the compounds contained in or derived from garlic (*Allium sativum* L.), alk(en)yl sulfides are known to be responsible for most of the physiological or nutraceutical functions of garlic. We found that diallyl trisulfide (DATS) is a potent inhibitor of tubulin polymerization and cancer cell growth, and an effective stimulator of the hepatic detoxification system. Here, we synthesized 9 trisulfides having different aliphatic side-chains, and determined their log *P*, a parameter for lipophilicity of un-ionized solutes, and inhibitory activities, IC₅₀ (μM), toward cancer cell growth. The log *P* values of these trisulfides ranged from the lowest, 2.72, for dimethyl trisulfide, to the highest, 7.62, for dipentyl trisulfide. The relationship between the IC₅₀ and log *P* of the 9 trisulfides was parabolic in nature, in which dibutenyl- and dipropyl- compounds, determined to have a log *P* of approximately 5, were located at the minimum point of the parabola, indicating the maximum potency. The reason why DATS, having a log *P* of about 4, was excessively stronger than diethyl trisulfide, with a similar log *P*, is not fully understood; but perhaps it can be explained by a higher reactivity of the diallyl compound in nucleophilic substitution. The compounds with 3-carbon chains were stronger in terms of growth inhibition than the others; but weaker compounds, those with 4- or 5- carbon chains, showed higher activity if a double bond was introduced into them to reduce their log *P* to the effective range. In this study, we confirmed the superiority of trisulfides with 3-carbon chains, e.g., DATS and dipropyl trisulfide (DPTS). In addition, we observed for the first time that dibutenyl trisulfide, a compound not found in garlic, is one of the potent structures among alk(en)yl trisulfides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：栄養化学

1. 研究開始当初の背景

我々はネギ属植物の食品機能性に関して、抗血栓作用、解毒系酵素の誘導作用、がん細胞増殖抑制作用などの諸作用を、分子メカニズムを中心に検討し、報告してきた (*Lancet*, 1:150-1, 1981; *Asian Func. Food, CRC Press*, 433-89, 2005)。その中で、上記の作用の強力な多硫化スルフィドであるジアリルトリスルフィドが細胞骨格タンパクの β チュブリンを酸化的に修飾し、重合を妨げることを見出した (*J Biol Chem*, 280: 41487-93, 2005)。すなわち、チュブリンの脱重合を促進して、がん細胞の増殖 (細胞分裂) を顕著に抑制することに加え、アポトーシスを誘導してがん細胞死をもたらした。この発見は、スルフィドの作用に関して、分子メカニズムの一端を明らかにしているが、一方において、一食物成分が直接生体分子を修飾することの事実を提示し、がん細胞に対しては (正常細胞には全く未知)、細胞の分裂増殖を抑制し、やがて死滅させるという毒物的挙動を取ることに驚かされる。ここにおいて我々は、速やかに解明しなければならない二つの課題を突きつけられたと解釈している。第 1 は、スルフィドの生体内での挙動の解明、すなわち修飾を受けるタンパクなどの分子標的の同定であり、第 2 は、スルフィドの作用と量目の関係を明確にすること、標的タンパク質とスルフィドの反応性、細胞へのスルフィドの作用の構造的な要因である。

2. 研究の目的

多硫化物はその instability の故に生体内での反応性が高いことが示唆されている。しかし、確固とした成績は全く示されていない。我々は、三硫化物について最も反応性が高いことを様々な生理活性について明らかにし、trisulfide 構造の重要性を指摘してきた。しかし、trisulfide の側鎖構造と抗がん作用の関係性はほとんど報告されていない。

そこで本研究では、様々な側鎖構造の alk(en)yl trisulfide の合成法を確立するとともにこれらの化合物のヒト大腸がん細胞株 HT-29 に対する増殖抑制活性について検討し、側鎖構造と活性との関連を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) Alk(en)yl trisulfide の合成法と精製法の確立

Trisulfides の合成は bunte salt 法を一部改変して行った。ハロゲン化アルキル、アルケニルとチオ硫酸ナトリウムを反応させ、アルキル、アルケニルの bunte salt を調製した。この

bunte salt を pH 6-7 になるように調製しながら、硫化ナトリウムを反応させ oil 相を得た。これらの oil 相をヘキサンで抽出し、ロータリーエバポレーターによりヘキサンを除去し trisulfides を得た。これらの trisulfides を HPLC に供して、精製した。側鎖が飽和型の dimethyl, diethyl, dipropyl, dibutyl, dipentyl, 側鎖が不飽和型の diallyl, dibutenyl, dipentenyl, 混合型の allyl methyl trisulfide の計 9 種類の trisulfides を bunte salt 法により合成した。収率は trisulfide の側鎖によって異なり、最も高い diallyl で約 90%、最も低い dipentyl で約 20% であった。これらすべての alk(en)yl trisulfides は HPLC により純度 99% 以上に精製することが出来た。以降の実験は 99% 以上に精製した alk(en)yl trisulfide を用いて行った。

(2) Alk(en)yl trisulfides の octanol-water partition coefficients (log P)

①振盪フラスコ法

試験管 (容量 11 mL) に octanol: water = 1: 1, 1: 2, 1: 4 となるように加え、alk(en)yl trisulfide が終濃度 20 mM となるように添加した。20 回/min の速度で 5 分間振盪後、1000 rpm, 25°C, 20 min の条件で遠心し、octanol 相と water 相を分離した。それぞれの相を HPLC で分析し、以下に示した式により log P を算出した。

$$\text{Log } P = \log_{10} \left(\frac{\text{octanol 相の alk(en)yl trisulfide ピークの面積}}{\text{water 相の alk(en)yl trisulfide のピークの面積}} \right)$$

②HPLC 法

Thiourea と alk(en)yl trisulfide の終濃度がそれぞれ 1 mM, 5 mM となるようにアセトニトリルに溶解し、HPLC により分析した。以下に示した式により log k を算出した。振盪フラスコ法で算出した 4 種類の alk(en)yl trisulfides の log P と log k との回帰式を求めた。その回帰式から振盪フラスコでは求められなかった alk(en)yl trisulfide の log P を推定した。

$$\text{Log } k = \log_{10} \left(\frac{\text{trisulfide の retention time} - \text{dead time}}{\text{dead time}} \right)$$

(3) Alk(en)yl trisulfides が HT-29 の増殖に及ぼす影響

HT-29 を 3×10^4 cells/cm² の密度で播種し、48 時間前培養を行った。新鮮な培地に交換し、alk(en)yl trisulfide が終濃度 0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ M となるように dimethyl sulfoxide (DMSO) で希釈し、24 時間培養した。培養後、トリプシンを用いて細胞を回収し、

血球計算盤で細胞数を測定した。各濃度での増殖率はDMSOのみを添加したvehicle群の細胞数を100%として算出した。

4. 研究成果

(1) Alk(en)yl trisulfides の octanol-water partition coefficients (log P)

振盪フラスコ法により測定したdimethyl, diethyl, diallyl, allyl methylの4種類のalk(en)yl trisulfidesのlog Pはそれぞれ、2.74, 3.84, 3.84, 3.21であった。しかし、その他のalk(en)yl trisulfidesは疎水性が強く、water相には分配されず、ピークは検出されなかった。そのため、それ以上のlog Pを推定できるHPLC法により各種alk(en)yl trisulfidesのlog Pを推定した。その結果、log kとlog Pは相関係数 $R^2 = 0.99$ を示し、両者は高い相関を示した。得られた回帰式を用いて、すべてのalk(en)yl trisulfidesのlog Pを推定した。Log Pは側鎖の炭素鎖長に比例して増加した ($\log P = 1.2C_n + x$)。同一の炭素鎖長であれば、alkyl trisulfideよりもalkenyl trisulfideの方がlog Pは低かった (alkyl's $\log P = \text{alkenyl} \log P + 1.2$)。

(2) Alk(en)yl trisulfides が HT-29 の増殖に及ぼす影響

本研究で試験したすべてのalk(en)yl trisulfidesはHT-29の増殖を抑制した。しかしその活性はtrisulfideの側鎖構造によって異なり IC_{50} は7 μM (dipropyl) ~ 33 μM (dipentyl)の差があった。Alkyl trisulfidesで最も効果が高いのは炭素鎖3のdipropylであった。Alkenyl trisulfidesでは炭素鎖3のdiallylと同程度に炭素鎖長4のdibutenylも効果が高かった。log Pの結果と IC_{50} との結果をプロットすると、 $\log P = 4 \sim 5$ を極小とするparabolicな相関を示した ($R^2 = 0.8679$)。すなわち、trisulfidesの細胞増殖抑制活性はlog Pが高すぎても低すぎても効果が低く、 $\log P = 4 \sim 5$ の間に位置するlog Pを示すalk(en)yl trisulfidesの増殖抑制活性が最も高かった。さらに詳細に検討すると、trisulfideの側鎖の炭素数が4, 5と増加するとlog Pが低値となるalkenyl trisulfideが高い活性を示した。

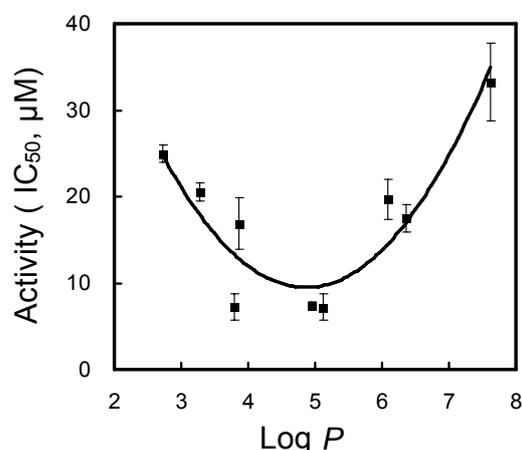


図 1. Alk(en)yl trisulfidesのlog Pと増殖抑制活 (IC₅₀) との関係

Trisulfideのlog Pは抗がん活性と密接に関係することが明らかとなった。

この研究により、今後、log Pを指標としたsulfideの機能評価やtrisulfideをリード化合物とした抗がん剤の開発や機能性食品への応用が期待される。

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 8 件)

- ①Iitsuka Y, Tanaka Y, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T. Relationship between lipophilicity and inhibitory activity against cancer cell growth of 9 kinds of alk(en)yl trisulfides with different side -chains. *Oncology Research*. 2010; 19: 575-82. (査読有)
- ②Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T. Diallyl trisulfide protects rats from carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Nutr*. 2009; 139(12):2252-6. (査読有)
- ③Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, Origuchi K, Matsufuji H, Seki T, Ariga T. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 73 (9): 1948-55. (査読有)
- ④Koizumi K, Iwasaki Y, Narukawa M, Iitsuka Y, Fukao T, Seki T, Ariga T, Watanabe T. Diallyl sulfides in garlic activate both TRPA1 and TRPV1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382(3):545-8. (査読有)
- ⑤Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Iwashita Y, Seki T, Ariga T. Thermostability of allicin as determined by chemical and biological assays. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72 (11) : 2877-83. (査読有)
- ⑥Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Seki T, Hasegawa I, Ariga T. Alkenyl group is responsible for the disruption of microtubule network formation in human colon cancer cell line HT-29 cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29(7):1400-6. (査読有)
- ⑦Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Kumagai H, Seki T, Ariga T. Biological and chemical stability of garlic (*Allium sativum* L.)-derived allicin. *J Agric Food Chem* 2008; 56(11): 4229-35. (査読有)
- ⑧Seki T, Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T. Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17 (S1): 249-252. (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

- ①田中理江、稲田 薫、細野 崇、細野友美、杉原明日香、有徳菜々子、寫本麻衣子、飯塚裕司、関 泰一郎、有賀豊彦 ニンニク由来香氣成分ジアリルトリスルフィドが誘導する各種白血病細胞株のアポトーシスについて 第 23 回日本香辛料研究会学術講演会 (金沢 2008 年 11 月 14 日)、講演要旨集、p14-15
- ②藤澤 浩之、折口佳奈、須磨 薫、田川 篤、渡部和浩、関 泰一郎、有賀 豊彦 ニンニク由来allicinの生物学的、化学的安定性に関する研究 第 23 回日本香辛料研究会学術講演会 (金沢 2008 年 11 月 14 日)、講演要旨集、p16-17
- ③ T. Seki, T. Ariga Food Function of Garlic: anticancer and antithrombotic effect of organosulfur components derived from garlic. *International Symposium at Korean Society of Food Science and Nutrition*. October 14, 2008, Jeju (Invited Speaker).
- ④小泉 佳名子、岩崎有作、成川 真隆、飯塚裕司、細野 (深尾) 友美、関 泰一郎、有賀 豊彦、渡辺 達夫 ニンニク成分DAS、DADS、DATSはTRPA1 とTRPV1 を活性化させる 日本農芸化学会 2009 年度大会 (名古屋) / 日本農芸化学会要旨集、p63 (2009 年 3 月 28 日)
- ⑤飯塚 裕司、井谷 明日香、稲田 薫、田中 理江、寫本 麻衣子、田中 友紀、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 ネギ属植物に含まれるsulfide類の構造と機能の違いについて 日本農芸化学会 2009 年度大会 (名古屋) / 日本農芸化学会要旨集、p210 (2009 年 3 月 29 日)
- ⑥田中 理江、稲田 薫、細野 友美、細野 崇、飯塚 裕司、寫本 麻衣子、田中 友紀、井谷 明日香、荻原 淳、関 泰一郎、有賀 豊彦 ガーリック由来香氣成分Diallyl trisulfideの分子標的の解析 日本農芸化学会 2009 年度大会 (名古屋) / 日本農芸化学会要旨集、p228 (2009 年 3 月 29 日)
- ⑦稲田 薫、田中 理江、飯塚 裕司、寫本 麻衣子、細野 友美、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 Diallyl trisulfide(DATS)によるヒト白血病細胞株のアポトーシス誘導機構 日本農芸化学会 2009 年度大会 (名古屋) / 日本農芸化学会要旨集、p213 (2009 年 3 月 29 日)
- ⑧寫本麻衣子、稲田薫、田中理江、細野 崇、細野友美、杉原明日香、有徳菜々子、飯塚裕司、関泰一郎、有賀豊彦 ガーリック由来香氣成分diallyl trisulfide による白血病細胞株のアポトーシス誘導 第 63 回 日本栄養・食糧学会大会 (長崎 2009 年 5 月 21 日) p147
- ⑨飯塚裕司、井谷明日香、稲田薫、田中理江、寫本麻衣子、田中友紀、細野 崇、関泰一郎、有賀豊彦 ネギ属植物由来sulfideおよびその類縁化合物の構造と機能 第 63 回 日本栄養・食糧学会大会 (長崎 2009 年 5 月 21 日) p148
- ⑩乾 文明、間宮知崇、西野真実、関 泰一郎、有賀豊彦 高脂肪食負荷ラットへのガーリックオイル添加給餌は生体内脂肪蓄積を抑制し、肥満を抑制する 第 63 回 日本栄養・食糧学会大会 (長崎 2009 年 5 月 21 日) p159
- ⑪渡部 和浩、折口 佳奈、須磨 薫、池上 雄星、藤澤 浩之、関 泰一郎、有賀 豊彦 ニンニク由来アリシンの抗菌活性とSH化合物による活性阻害について 第 24 回日本香辛料研究会学術講演会 (大阪 2009 年 11 月 20 日)、講演要旨集、p16-17
- ⑫田中 友紀、稲田 薫、田中 理江、寫本麻衣子、飯塚裕司、須田 峻、関口 雄亮、関 泰一郎、有賀 豊彦 ガーリック由来香氣成分diallyl trisulfideによるヒト白血病細胞株のアポトーシス誘導とその機構について 第 24 回日本香辛料研究会学術講演会 (大阪 2009 年 11 月 20 日)、講演要旨集、p32-33
- ⑬乾 文明、間宮 知崇、西野 真実、関 泰一郎、有賀 豊彦 ガーリックオイル添加食給餌が高脂肪食負荷モデルラットに与える影響 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) / 日本農芸化学会要旨集、p98 (2010 年 3 月 28 日)
- ⑭須田 峻、関口 雄亮、稲田 薫、田中 友紀、飯塚 裕司、寫本 麻衣子、関 泰一郎、有賀 豊彦 Diallyl trisulfideのマウスへの投与による抗腫瘍作用評価 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) / 日本農芸化学会要旨集、p183 (2010 年 3 月 29 日)
- ⑮寫本 麻衣子、稲田 薫、田中 理江、杉原 明日香、飯塚 裕司、田中 友紀、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 ガーリック由来香氣成分diallyl trisulfideによる各種白血病細胞株のアポトーシス誘導について 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) / 日本農芸化学会要旨集、p183 (2010 年 3 月 29 日)
- ⑯飯塚 裕司、寫本 麻衣子、田中 友紀、須田 峻、関口 雄亮、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 Alk(en)yl trisulfideの側鎖構造と抗がん活性との関係について 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) / 日本農芸化学会要旨集、p183 (2010 年 3 月 29 日)
- ⑰田中 友紀、稲田 薫、関口雄亮、飯塚 裕司、寫本 麻衣子、須田 峻、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 ヒト白血病細胞に対するガーリック由来香氣成分diallyl trisulfideの抗がん作用について 64 回 日本

栄養・食糧学会大会（徳島 2010 年 5 月 23 日） p207

- ⑱ 田中 友紀、飯塚 裕司、須田 峻、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 Alk(en)yl trisulfide の側鎖構造と大腸がん細胞株の増殖抑制活性との関係について 第 25 回日本香辛料研究会学術講演会（静岡 2010 年 11 月 13 日）、講演要旨集、p27-28

〔図書〕（計 2 件）

- ① Seki T, Hosono T, Ariga T. Allium: Garlic and Onion (IV. Biological Functionality of Herbs and Spices) The Basics of Functional Foods. DEStech Publications, Inc., Lancaster, PA, USA. 2011 in press.
- ② 関 泰一郎、細野 崇、有賀豊彦 ニンニクの機能 スパイス・ハーブの機能性と最新応用技術（中谷延二監修）シー・エムシー出版（東京）, 2010

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有賀 豊彦 (ARIGA TOYOHICO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50096757

(2) 研究分担者

関 泰一郎 (SEKI TAIICHIRO)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20187834

細野 崇 (HOSONO TAKASHI)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：80445741