

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580142

研究課題名（和文）多機能性生理活性因子であるアマニ由来リグナンの作用機構解明と構造活性相関の検討

研究課題名（英文）Studies on the structure-activity relationship of flaxseed lignan, multifunctional physiologically active substance.

研究代表者

菅原 卓也 (SUGAHARA TAKUYA)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：00263963

研究成果の概要（和文）：アマニが含有するリグナン類の構造と生理活性の関係について、(-)-セコイソラリシレジノール（SECO）に脂肪蓄積抑制効果があり、(-)-マタイレジノール（Mat）に IgE 産生抑制による抗アレルギー効果があることを明らかにした。特に、(-)-SECO については、脂肪細胞への分化は促進するものの、脂肪蓄積を抑制するとともにアディポネクチン産生を促進した。また、糖尿病モデルマウスにおいて、顕著な脂肪肝予防効果を確認した。

研究成果の概要（英文）：One of flaxseed lignans, matairesinol (Mat), especially (-)-Mat suppressed IgE production, and allergy-suppressing effects in allergy model mice. In addition, (-)-secoisolariciresinol (SECO) strongly suppressed lipid accumulation in adipose cells, even though (-)-SECO strongly induced adipogenesis in pre-adipocyte cells. (-)-SECO enhanced adiponectin production in adipocytes. Moreover, (-)-SECO obviously suppressed fatty liver in diabetic model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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：アマニ、セコイソラリシレジノール、マタイレジノール、リグナン、抗アレルギー一、免疫促進、脂肪蓄積抑制、構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

アマ (*Linum usitatissimum*) の種子である亜麻仁(アマニ)は、多価不飽和脂肪酸や食物繊維に富み、欧米では古くから食用として広く受け入れられている。一方、高齢化に伴う健康への自衛手段として健康食品への期待が急速に高まる中、日本においても機能性食

品素材としてアマニに対する注目が近年高まってきている。しかしながら健康食品市場からの注目の度合いに対して、アマニの生理活性に関する学術的な体系化は必ずしも十分ではなく、機能性食品素材として確立するためにはアマニに含まれる成分の生体調節機能や有効性を詳細に解明する必要がある。

本研究では、アマニに含まれるリグナン¹の生理活性に注目する。アマニ 100g 中には、約 1.2g のセコイソラリシレジノール (Secoisolariciresinol ; SECO) やマタイレジノール (Matairesinol ; Mat) というアマニ特有のリグナンが含まれている。アマニに含まれる天然体 SECO は配糖体の状態で存在しており、経口摂取後、腸内細菌により分解を受けて体内に吸収され、悪玉 LDL コレステロール低下作用や動脈硬化抑制作用などの様々な生理作用を示すことが報告されている。しかし、これらの報告はすべて天然体を用いた研究である。SECO は分子中に不斉炭素原子を有していることから光学異性体が存在し、天然には光学異性体の混合物、すなわちラセミ体として存在している。したがって、SECO の生理学的性質を正確に把握するには、それぞれの光学異性体に対する生物有機化学的検討が必須である。これまでに申請者らのグループは、世界に先駆けて SECO の立体選択的合成に成功し、立体構造が生理活性におよぼす影響を解明してきた。本研究では、これまでの研究シーズを基に、それぞれの光学異性体、あるいは誘導体を合成し、種々の生理活性とその作用機構を分子構造と関連させながら詳細に解明する。植物由来の低分子生理活性物質の分子構造、特に立体構造の違いが生理活性に及ぼす影響は十分に解析されているとは言えず、アマニリグナンに着目した本研究は、生物有機化学的な学術面から見ても非常に重要かつ先導的な研究であるとともに、機能性食品への応用展開も十分に期待できる。

2. 研究の目的

本研究の主要な目的、達成目標は以下である。

- (1) 多機能性を有するアマニリグナン SECO の誘導化合物について、生理活性とその作用機構を動物培養細胞系と実験動物で解明する。
- (2) SECO の立体構造と種々の生理活性の構造相関性を解明する。

3. 研究の方法

(1) SECO の生理活性のスクリーニング

アマニリグナン SECO の分子構造と生理活性の相関性解明のため、全 18 種類の誘導体について生理活性のスクリーニングを検討した。特に、現在問題となっているメタボリックシンドロームの予防効果に関して、マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) に対する脂肪細胞分化抑制活性や、善玉のアディポカインであるアディポネクチン産生促進効果を評価した。また、18 種類の SECO 誘導体のヒトハイブリドーマ HB4C5 細胞の抗体産生に及ぼす効果、およびガン細胞に対する細胞傷害性

を検討した。また、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現レベルへの影響、あるいはウエスタンブロッティング法によるタンパク質レベルでのシグナル伝達系の活性化に及ぼす影響を解析することにより、SECO の生理活性の作用メカニズム解明を試みた。

(2) 生体内における SECO の生理作用

培養系において有効性が示された生理活性について、特に、脂肪蓄積抑制効果や抗糖尿病効果についてマウスを用いた経口投与実験により、生体内における生理作用を解明した。

4. 研究成果

(1) SECO の生理活性スクリーニング

SECO はアマニリグナン¹の一種であり、抗酸化作用やエストロゲン様活性を示すことが報告されている。SECO には立体異性体が存在し、天然にはラセミ体として存在している。従って、SECO の生理活性を評価するには立体異性体それぞれを合成により個別に調製したうえで検討する必要がある。そこで、SECO の立体異性体である (+)-SECO、(-)-SECO、および *meso*-SECO を合成し (図 1)、SECO の構造と活性の関連性を様々な観点から検討し

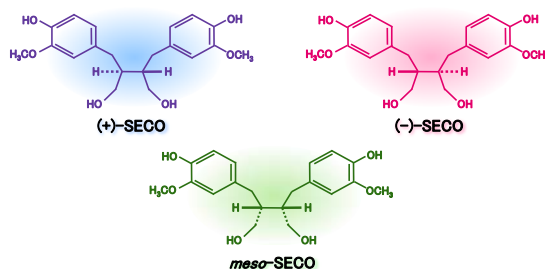


図 1 SECO の光学異性体

た。

まず、SECO の抗酸化作用について検討したところ、(+)-体、(-)-体、*meso*-体全ての SECO 立体異性体において、代表的なゴマリグナンであるセサモールよりも強いスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 様活性を有しており、(+)-SECO はセサモールの約 6 倍、(-)-SECO、*meso*-SECO はそれぞれ約 4.3 倍、3.7 倍の比活性であった。一方、DPPH ラジカル消去活性では、セサモール、およびそれぞれの SECO 異性体に活性の有意差は認められなかった。

ガン細胞に対する傷害活性を検討したところ、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞、およびマウス大腸がん細胞株 Colon-26 細胞の両細胞に対して *meso*-体に弱い細胞傷害活性が認められた。Colon-26 細胞に対する細胞傷害活性を指標として SECO の構造活性相関を検討したところ、天然体である (-)-SECO には細胞毒性はないものの、メトキシ基とフェノール性水酸基の数と位置によって、細胞傷害性を

示す誘導体と、全く細胞傷害性のない誘導体とに明確に分類できた。また、Colon-26 細胞に強く細胞傷害性を示した化合物について、マウス胎児由来正常線維芽細胞 (MEF) に対する細胞障害性を評価した結果、MEF に対しては細胞障害性が低い化合物の存在が確認され、抗ガン活性を有する誘導体が存在することが明らかになった。

一方、(-)-SECO には低濃度において MCF-7 細胞に対する増殖促進効果が確認され、これは SECO のエストロゲン様活性によるのではないかと推察された。そこで、エストロゲン刺激でルシフェラーゼを発現する T47D-KBluc 細胞に対する (-)-SECO の影響を検討した。その結果、(-)-SECO はルシフェラーゼの発現を誘導したことから、(-)-SECO にはエストロゲン活性があることが確認された。さらに、(+)体および *meso* 体 SECO にはエストロゲン活性が認められず、この結果により、エストロゲン様活性をもつ SECO は (-)-SECO のみであるということが証明された。(-)-SECO の 18 種類の誘導化合物 18 種類合成し、MCF-7 細胞に対する増殖促進効果を検討したところ、(-)-SECO の活性が強いことが明らかになった。

ヒトハイブリドーマ細胞株の抗体産生に及ぼす効果を検討することにより、免疫細胞に対する効果を検討した。その結果、(-)-SECO の抗体産生促進活性にはベンゼン環上のフェノール性水酸基とメトキシ基の数と位置が大きな影響を及ぼすことが明らかになったものの、(-)-SECO よりも強く抗体産生を促進する誘導化合物は認められず、活性を持たない誘導化合物も存在することが明らかになった。

次に、3T3-L1 前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導、脂肪蓄積、およびアディポネクチン発現に対する影響を検討した。その結果、(-)-SECO は、脂肪蓄積抑制効果があることが明らかとなった (図 2)。また、(-)-SECO は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ 発現を上方制御することから、脂肪細胞への分化誘導を促進していることが明らかになった。さらに、mRNA レベル、およびタンパク質レベルでアディポネクチン発現量を上方制御し、アディポネクチン産生量は約 1.6 倍促進された。これに対して、(+)-SECO と *meso*-SECO はアディポネクチン

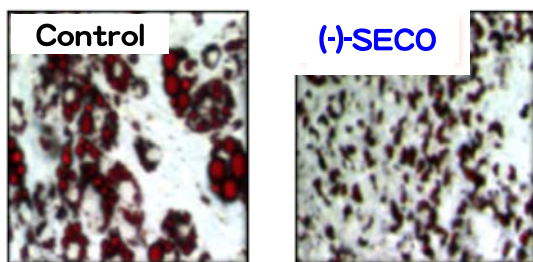


図 2 (-)-SECO の脂肪蓄積抑制効果

mRNA 発現およびタンパク質産生に抑制的に作用した。これらのことから、(-)-SECO は前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導を促進するもの、脂肪蓄積には抑制的に働き、動脈硬化の抑制やインスリン抵抗性を改善する作用を持つアディポネクチン産生を促進させる働きがあることが確認された。

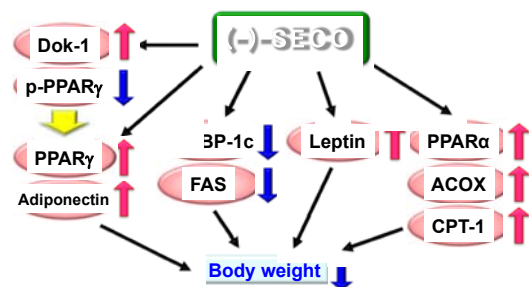
以上のことから、SECO の構造が及ぼす生理活性に光学異性体間、およびその誘導化合物間で差異が認められ、SECO の正確な生理活性の評価にはそれぞれの異性体について評価する必要性が示された。

(2) SECO の脂肪蓄積抑制効果の作用メカニズムの解明

(-)-SECO に強い脂肪細胞分化促進作用と脂肪蓄積抑制効果があることが確認されたことから、(-)-SECO の脂肪細胞に及ぼす効果について、その作用メカニズムの解明を試みた。

3T3-L1 前駆脂肪細胞において、(-)-SECO の刺激後数時間で Dok-1、及び PPAR γ 遺伝子発現が上昇した。このことから、(-)-SECO は脂肪細胞分化の惹起に関与し、脂肪細胞への分化を誘導しながらも、脂質の合成は抑制していることが明らかとなった。

高脂肪食給餌下において、(-)-SECO 経口投与がマウス生体に及ぼす影響を検討した。(-)-SECO を 5.80 mg/kg/day 投与した群において、有意に体重増加が抑制され、体内の脂肪細胞量は抑制傾向にあった。また、血中のアディポネクチン量は、5.80 mg/kg/day 投与群で有意に増加した。肝臓中の脂肪酸合成に関与する FAS 及び、SREBP-1c 発現量が有意に抑制された (図 3)。また、脂肪の代謝に関わる PPAR α 、ACOX、CPT-1 の発現上昇、食欲抑制に関与する血中レプチン濃度の上昇作用が認められた (図 3)。



脂肪細胞への分化誘導を促進しつつ、脂肪の代謝を亢進、脂肪合成を抑制することで、脂肪細胞の大型化を防いでいる。

図 3 (-)-SECO の作用メカニズム

SECO は腸内細菌によりエンテロジール (END)、およびエンテロラクトン (ENL) へと代謝され、腸管から吸収される。一部は SECO のまま吸収される。そこで、高脂肪食摂餌下において、マウス皮下に (-)-SECO、(-)-END、(-)-ENL を投与し、その効果を検討した。そ

の結果、(-)-SECO は体重増加を有意に抑制した。また、(-)-SECO、および (-)-END 投与で骨格筋と肝臓において β 酸化に関与する遺伝子発現の上昇が認められた。また、(-)-END の 0.12 mg/kg/day 投与では血中アディポネクチン量は有意に上昇した。以上の結果から、(-)-SECO の経口摂取による脂質代謝改善効果は、(-)-SECO そのもの、および腸内細菌による代謝物である (-)-END による効果であることが推察された。

糖尿病モデルマウスである KK-Ay オスマウスに高脂肪食給餌下において (-)-SECO を経口投与すると、有意ではないものの体重増加の抑制作用、血糖値の抑制効果が認められた。また、強力な脂肪肝抑制の所見が認められ、有意ではないものの肝臓、および血中中性脂肪値の抑制が認められた。肝臓における PPAR α 遺伝子発現、およびアディポネクチン遺伝子発現が優位に促進されることが明らかになった。さらに、脾臓細胞における IL-1 β 産生が優位に抑制されていることから、炎症反応の抑制効果が抗糖尿病効果に繋がっている可能性があるのではないかと推測された。

(3) (-)-Mat の生体内における免疫系に及ぼす影響

SECO の類縁リグナンであるマタイレジノール (Mat) の生理機能効果について検討した。Mat には抗酸化作用、抗ガン活性などがあることが報告されている。SECO と同様、腸内細菌の作用により動物リグナンである END や ENL に代謝されて腸管から吸収される。また、Mat にも立体異性体として (-) 体と (+) 体が存在する。それぞれの Mat 異性体を合成により作出し、SOD 様活性、および DPPH ラジカル消去活性により抗酸化効果を評価したところ、(-)-Mat は (+)-Mat と比較して抗酸化作用が強いことが明らかになった。

そこで、(-)-Mat の種々の生理効果のスクリーニングを試みた。(-)-Mat を 50% エタノールに溶解し、メス BALB/c マウス (6 週齢) にそれぞれ 200 μ g、20 μ g、2 μ g/body で 10 日間連続経口投与した。(-)-Mat 投与中は毎日体重測定を行い、投与終了後、血液を回収して血中の抗体濃度を酵素抗体法により測定した。また、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板からリンパ球を回収し、2 日間培養したのち培養上清中の抗体量を測定した。さらに脾臓リンパ球内での種々の免疫タンパク質の遺伝子発現に及ぼす (-)-Mat 経口投与の影響を検討した。その結果、(-)-Mat の経口投与は脾臓リンパ球の IgG、および IgM 産生を促進する傾向にあり、腸間膜リンパ節リンパ球、およびパイエル板リンパ球の IgA、IgG 産生を有意に促進したことから、腸管免疫系を刺激する効果があることが推察された。ま

た、血中の IgA、および IgM レベルを上昇させる傾向があることが明らかになった。さらに、脾臓リンパ球における TNF- α 、および IFN- γ の遺伝子発現量が上昇していた。免疫促進効果が認められた一方で、アレルギーに関与する IgE の血中レベルが有意に低下しており、アレルギー抑制効果も期待できることが明らかになった (図 4)。以上のことから、(-)-Mat には経口摂取による免疫促進活性やアレルギー抑制活性があることが示唆された。

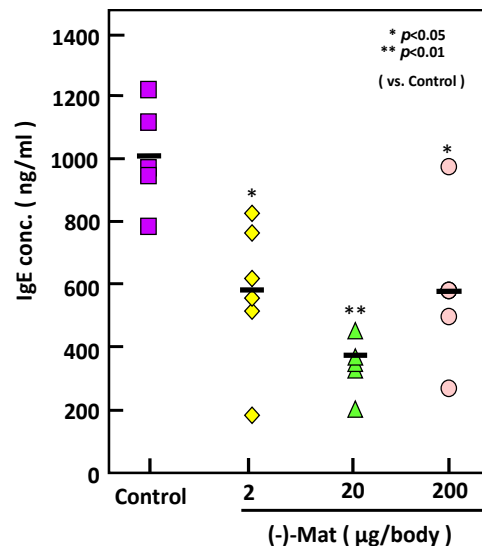


図 4 (-)-Mat の生体内における IgE 産生抑制効果

(4) (-)-Mat のアレルギー抑制効果

(-)-Mat にアレルギー抑制効果が期待できることが明らかになったことから、アレルギーモデルマウスに対する (-)-Mat の経口投与の影響を検討した。卵白アルブミン (OVA) の腹腔内投与でアレルギーを誘発したマウスに対して (-)-Mat を経口投与したところ、血中 IgE レベルが有意に低下した。一方、脾臓リンパ球の各種抗体、TNF- α 、TGF- β 1 遺伝子発現の上昇、パイエル板リンパ球、および脾臓リンパ球の抗体産生活性の有意な促進が認められた。(-)-Mat の経口投与によりリンパ球が活性化されていたことから、腸間膜リンパ節とパイエル板のリンパ球についてリンパ球集団を解析したところ、B 細胞の比率が上昇し、体液性免疫応答が優位になっている可能性が示唆された。一方、これまでの検討から Mat、および ENL ともに培養系においてはリンパ球の抗体産生を促進しなかったことから、(-)-Mat は抗体産生細胞 (形質細胞) をターゲットとして作用しているのではなく、生体内において B 細胞を活性化し、免疫系を促進しているのではないかと推察された。

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 10 件)

- (1) S. Tominaga, K. Nishi, S. Nishimoto, Y. Nakashima, K. Akiyama, S. Yamauchi and T. Sugahara, (-)-Secoisolariciresinol attenuates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice., *Food Funct.*, 3, 76-82, 2012. **査読有**
- (2) M. Yamawaki, K. Nishi, S. Nishimoto, S. Yamauchi, K. Akiyama, T. Kishida, M. Maruyama, H. Nishiwaki and T. Sugahara, Immunomodulatory effect of (-)-matairesinol in vivo and ex vivo., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 859-863, 2011. **査読有**
- (3) K. Masuda, H. Nishiwaki, K. Akiyama, S. Yamauchi, M. Maruyama, T. Sugahara and T. Kishida, Antifungal activity of morinol B derivatives of tetrahydropyran sesquilignan., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2071-2076, 2010. **査読有**
- (4) S. Kawahara, I. Iwata, E. Fujita, M. Yamawaki, H. Nishiwaki, T. Sugahara, S. Yamauchi, K. Akiyama and T. Kishida, IgE suppressive activity of (-)-matairesinol and structure-activity relationship., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1878-1883, 2010. **査読有**
- (5) K. Ogura, T. Sugahara, M. Maruyama, K. Akiyama and S. Yamauchi, Improved syntheses of morinol C and D by employing Mizoroki-Heck 4 reaction and their cytotoxic and antimicrobial activities., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1641-1644, 2010. **査読有**
- (6) Y. Kawaguchi, S. Yamauchi, K. Masuda, H. Nishiwaki, K. Akiyama, M. Maruyama, T. Sugahara, T. Kishida and Y. Koba, Antimicrobial activity of stereoisomers of butane type of lignans., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1806-1810, 2009. **査読有**
- (7) T. Nakato, S. Yamauchi, R. Tago, K. Akiyama, M. Maruyama, T. Sugahara, T. Kishida and Y. Koba, Syntheses and antimicrobial activity of tetrasubstituted tetrahydrofuran lignan stereoisomers., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1608-1617, 2009. **査読有**

[学会発表] (計 15 件)

- (1) T. Sugahara, S. Tominaga, S. Yamauchi, S. Nishimoto and K. Nishi, Effect of flaxseed lignan on lipid accumulation in adipocytes., International Conference on Food Factors (ICoFF) 2011, Abstract P1-377 (Nov. 20-23, 2011, Taipei, Taiwan)
- (2) 富山千聖, 西脇寿, 西甲介, 菅原卓也, 山内聡, ブタノール型セコシクロリグナンの合成と培養細胞に対する活性, 2011年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 要旨集 p. 81 (2011年9月16-17日 宮崎)
- (3) T. Sugahara, Anti-cancer effect of lectin from red sea alga., The 2nd International Symposium on Temulawak, Abstract p. 43 (May 25-27, 2011, Bogor Indonesia)
- (4) 富山千聖, 西脇寿, 山脇愛実, 菅原卓也, 山内聡, 細胞毒性報告のあるセコシクロリグナンの全立体異性体の合成と細胞に対する活性, 日本農芸化学会 2011年度大会, 要旨集 p. 184 (2011年3月25-28日 京都)
- (5) T. Sugahara, S. Tominaga, S. Yamauchi, M. Maruyama, K. Akiyama and S. Nishimoto, Effect of secoisolariciresinol on adipogenesis., The 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2010), Abstract CD P-F.56 (September 14-18, 2010, Rimini, Italy)
- (6) T. Sugahara, K. Nishi and S. Nishimoto, Evaluation of food functions by animal cell culture and experimental animals., Gadjah Mada-Ehime Network (GEN) 2010, Abstract p. 42 (August 7, 2010, Bali, Indonesia)
- (7) 河原沙耶, 岩田一平, 山内聡, 菅原卓也, 藤田絵里子, 山脇愛美, 岸田太郎, 秋山浩一, (-)マタイレジノールの構造と細胞毒性活性、IgE抗体産生抑制活性との関係, 日本農芸化学会 2010年度大会, 要旨集 p. 147 (2010年3月27-30日 東京)
- (8) 富永詩央里, 西本壮吾, 山内聡, 丸山雅史, 秋山浩一, 菅原卓也, Secoisolariciresinol の高脂肪食餌性肥満に与える影響, 日本農芸化学会 2010年度大会, 要旨集 p. 49 (2010年3月27-30日 東京)
- (9) 升田健太, 山内聡, 西脇寿, 秋山浩一, 菅原卓也, (-)-morinol B の 7 位のベンゼン環上の置換基が抗かび活性に与える影響, 日本農芸化学会 2010年度大会, 要旨集 p. 8 (2010年3月27-30日 東京)
- (10) T. Sugahara, Studies on the immunoregulatory functions of orange.,

Seminar National 2009 Developing local-resource-based technology, (December 2, 2009, Yogyakarta, Indonesia)

- (11) 山脇愛実, 菅原卓也, 山内聡, 西本壮吾, 岸田太郎, 秋山浩一, 丸山雅史, 西脇寿, (-)-Matairesinol の免疫調節活性に関する研究, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部、および日本食品科学工学会西日本支部 2009 年度合同沖縄大会, 要旨集 p. 60 (2009 年 10 月 30-31 日 沖縄)

[図書] (計 1 件)

- (1) S. Tominaga, T. Sugahara, S. Nishimoto, M. Yamawaki, Y. Nakashima, T. Kishida, K. Akiyama, M. Maruyama and S. Yamauchi, The effect of secoisolariciresinol on 3T3-L1 adipocytes and the relationship between molecular structure and the activity., Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Vol. 16, 345-351, 2010.

[その他]

ホームページ

<http://web-amb.agr.ehime-u.ac.jp>

(愛媛大学農学部動物細胞工学教育分野)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 卓也 (SUGAHARA TAKUYA)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：00263963

(2) 研究分担者

山内 聡 (YAMAUCHI SATOSHI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：00243808