

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05439

研究課題名(和文)食品性植物中のリグナン代謝物の生物活性

研究課題名(英文)Biological activity of lignan metabolite contains in dietary plant

研究代表者

山内 聡 (Yamauchi, Satoshi)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：00243808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が摂取する食品性植物に含まれるsecoisolariciresinol及びlariciresinolの体内代謝化合物であるconidendrinの人の健康に対する活性を明らかにした。conidendrinには、8つの立体異性体が考えられるため、生物活性試験に供するための8個の立体異性体を有機合成化学的に得る合成法を確立した。次に、生物活性試験を行った結果、8つの立体異性体のうち(-)-conidendrinが最も高い脱顆粒抑制効果を立体特異的に示した。作用メカニズムを検討した結果、細胞内での2つのリン酸化経路におけるリン酸化阻害によるカルシウムイオン放出抑制であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機合成化学的に体内代謝化合物の8つ全ての立体異性体の合成法を確立したことにより、(-)-conidendrinの立体特異的な脱顆粒抑制効果を示すことができた。野菜に含まれる化合物には生物活性がなくても、体内代謝で生物活性を有する化合物に変化する事を示した。また、細胞内において(-)-conidendrinがLyn-Syk-LAT pathway とFyn-Gab2-PI3K pathwayでのリン酸化を抑えることにより、カルシウムイオン放出が抑制されるという作用メカニズムも明らかになった。今後、(-)-conidendrinの構造を基にした、新しい抗アレルギー剤開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：All eight stereoisomers of conidendrin, which is a metabolite from secoisolariciresinol and lariciresinol biosynthesized by vegetables, are synthesized to apply to the biological tests for human health. One of the stereoisomers, (-)-conidendrin inhibited degranulation of RBL-2H3 cells.

研究分野：食品科学

キーワード：lignan metabolite organic synthesis

1. 研究開始当初の背景

食品性植物により生合成され食事により摂取される化合物の種類は多く、未だに未知の機能は多いと予想される。食品性植物そのものに含まれる化合物には機能が確認されなくても、食品性植物に含まれる化合物の摂食後に生体内での代謝により機能性化合物への変換もあり得る。本研究では食品性植物に含まれる3大リグナンの一つである *lariciresinol* の生体内代謝産物である *conidendrin* の機能を調べる。3大リグナンの他の二つである *matairesinol* と *secoisolariciresinol* については、それぞれアレルギー抑制活性と脂肪細胞分化抑制活性を有することをすでに見出したが、*lariciresinol* については、ヒトに対する生物活性は観察されなかった。植物中の *lariciresinol* は鏡像異性体の混合物として生合成され、その生体内での代謝物である *conidendrin* の立体構造は未知であることから、本研究では、考えられる8個の立体異性体を合成した後に生物活性を調べる。*lariciresinol* は、*secoisolariciresinol* の抗酸化代謝産物であることが示されていることから *secoisolariciresinol* の新たな機能解明にもつながる。

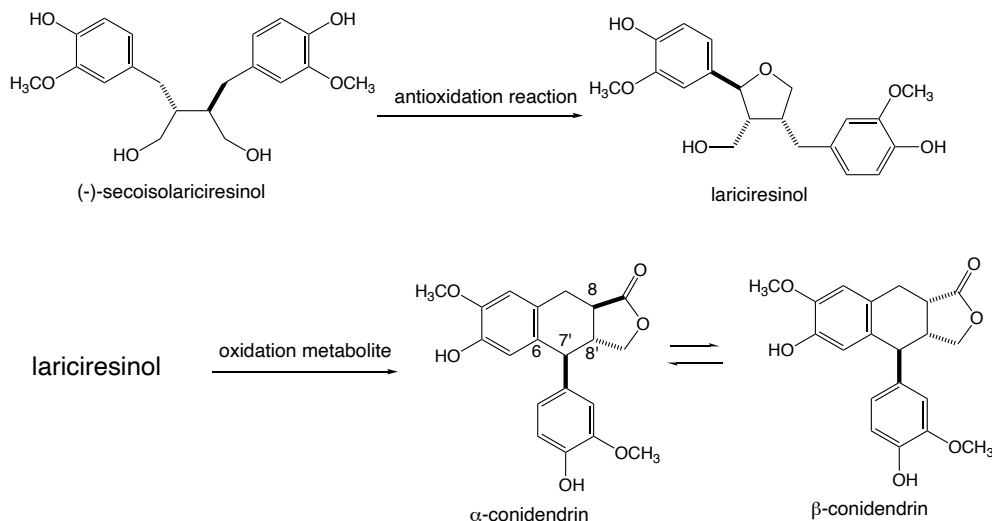


図1. 体内での *conidendrin* への代謝経路

2. 研究の目的

I: これまで合成例のない *conidendrin* の全ての立体異性体 **1-8** (図2) の大量合成方法の確立、II: 未知のヒトへの生物活性検索と立体構造の生物活性への影響、III: 構造活性相関解明、IV: 作用メカニズム解明により、食品の新たな機能解明を目的とした。

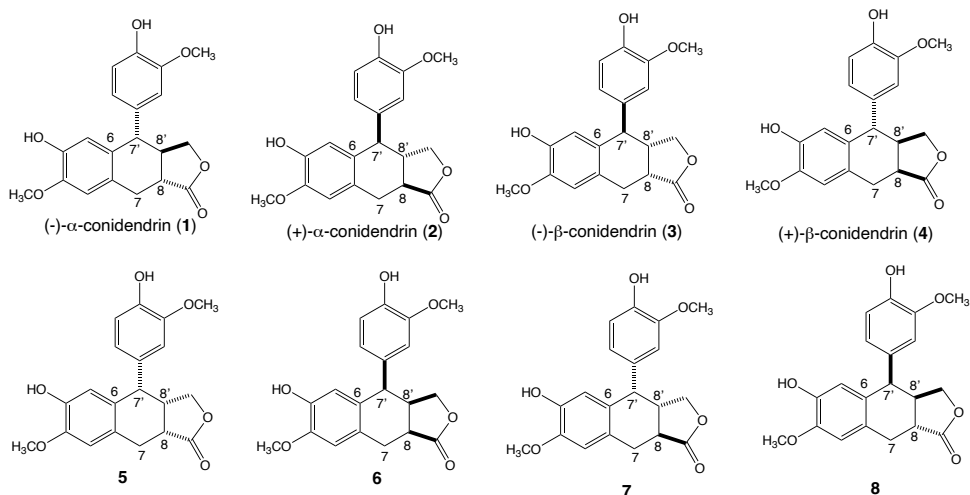


図2. 本研究のターゲットである *conidendrin* の全ての立体異性体

3. 研究の方法

有機合成化学的手法を用いて *conidendrin* の8個の立体異性体の大量合成を試みた。*phenylalanine* から調整可能な、Evansの *anti*-アルドール縮合物で得られる立体構造、また、中間体の異性化を利用して全ての立体の構築を試みた。また、6位と7'位間の結合には、分子内 *Friedel-Crafts* 反応を利用することにした。全ての立体異性体の脱顆粒抑制効果、抗炎症効果、脂肪細胞分化抑制効果を調べた後、最も高い活性を示した立体構造を持つ誘導体の合成を行い、構造と活性との関係を明らかにすることにした。さらに、最も高い活性を示す立体異性体について、マス

ト細胞の脱顆粒反応に対する抑制効果のメカニズムを明らかにするため、細胞内シグナル伝達経路に与える conidendrin の影響を調べる。まず、直接的に脱顆粒を引き起こしているかどうか Ca^{2+} の濃度、PKC の活性化を測定して検討する。次に、脱顆粒反応発現のための、最上位に位置する、マスト細胞の細胞表面に発現している高親和性 IgE 受容体からのシグナルを細胞内に伝達するチロシンキナーゼである Lyn および Fyn キナーゼのリン酸化について調べる。

4. 研究成果

合成：生物活性試験に供するための高い光学純度の conidendrin 立体異性体の、最終生成物 0.1-0.5 g を目指した合成を行った。Evans の *anti* アルドール縮合物 **9** のベンジル水酸基の除去の後、不斉補助基の還元的除去により 1 級アルコール **10** とした。二重結合に対して酸化開裂を行い生じたヘミアセタールを酸化してラクトン **11** を得た。4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde とのアルドール縮合により得られた **12** の還元により triol **13** として位置選択的に一つの水酸基をピバロイル基で保護して **14** とした。HMBC により、保護された水酸基を確認した。次に、camphorsulfonic acid で処理すると、ベンジル水酸基の除去と共にベンジル位にカルボカチオンが発生して、同時に分子内 Fridele-Crafts 反応が起こり、目的物の骨格 **15** が得られた。一級水酸基のセレン化合物 **16** を経た脱離、得られたアルケン **17** への立体選択的のヒドロボレーションにより **15** のエピ化に成功して、**18** に導いた。**15** 及び **18** の一級水酸基のシリル保護、脱ピバロイル化によりそれぞれを **19**、**20** とした。**19** については、一級水酸基の酸化によりアルデヒド **21** とし、**20** については、一級水酸基の酸化によりアルデヒド **22** へ変換した後に、 α 位のエピ化を行って **23** も得た (図 3)。

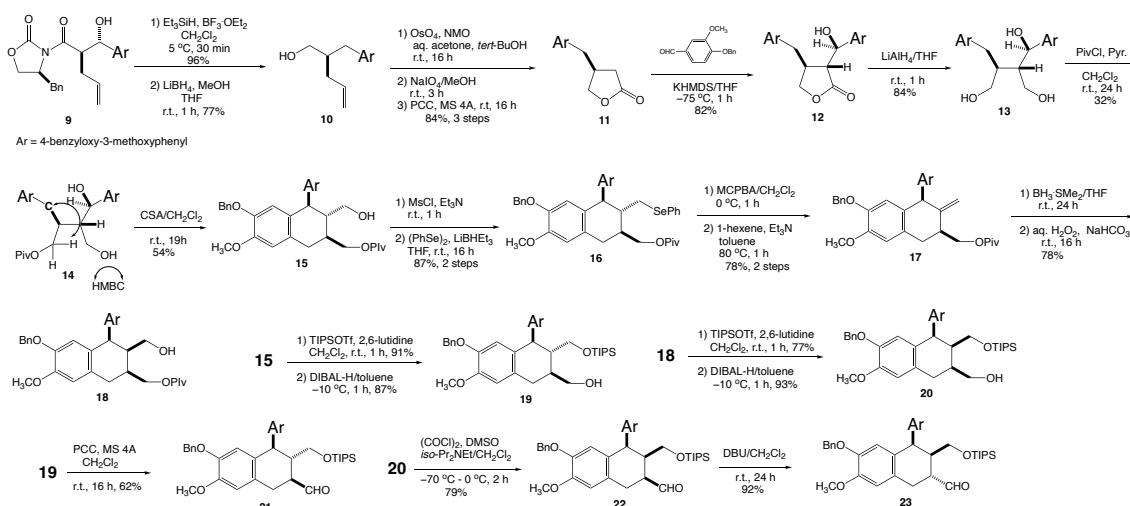


図 3. 重要合成中間体 **21**, **22**, **23** の合成

21 のアルデヒドの酸化、脱シリル化、ラクトン化、フェノール水酸基の保護基であるベンジル基の除去により (+)- α -conidendrin (**2**) を得た。**21** の脱シリル化を最初に行うと、 α 位のエピ化が同時に起きてヘミアセタール **25** が生じ、さらに酸化、脱ベンジル化を行うと (-)- β -conidendrin (**3**) を得ることができた。**22** からはカルボン酸への酸化により **26** とし、さらに同様に立体異性体 **6** へ導いた。**23** に対しては、カルボン酸へ酸化後、同様にカルボン酸 **8** へ導いた。予期せず、**21** の脱シリカの時に起こったエピ化によって、目的とする立体異性体のうち、鏡像異性体の全ての一方を得ることができた。光学純度は、97%ee から 99%ee 以上であり、十分に生物活性試験に用いることが可能なものを 0.3-0.5 g 得ることができた (図 4)。

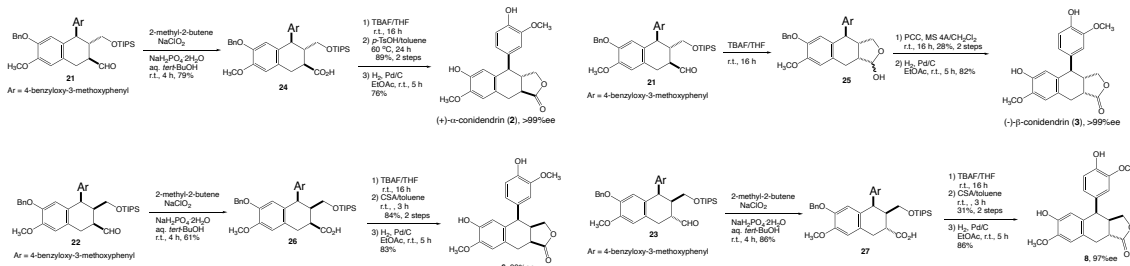


図 4. 立体異性体 **2**, **3**, **5**, **8** への変換

得られた 4 つの立体異性体の鏡像異性体 **1**, **4**, **5**, **7** は、(*R*)-体の Evans の不斉補助基を用いて 0.3-0.5 g 得られることができた。光学純度は 99%ee であった (図 5)。本合成研究によって単一の Evans の *anti*-アルドール縮合物 **9** 及びその鏡像異性体である *anti*-アルドール縮合物 **28** から 8 つ全ての立体異性体を高い光学純度で、生物活性試験に供する量得る合成法を確立した。本合成に用いた出発原料は、phenylalanine から調整したものでグリーンケミカル的に注目されるものであ

り、また、食品中に存在する他のリグナン類及びその生体内代謝物の立体異性体の合成にも適用可能であって、今後、この合成法は食品の機能解明に貢献すると期待される。さらに、リグナン類をリード化合物とした医薬品の開発にも応用可能である。

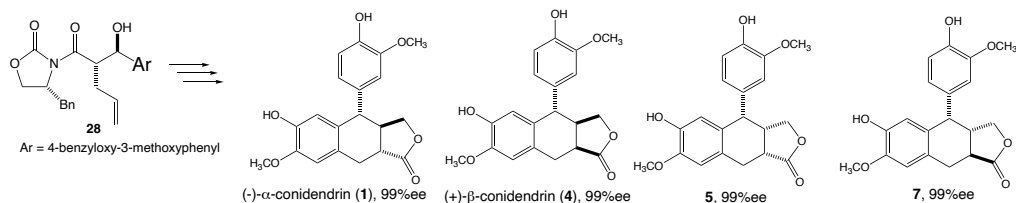


図 5. 鏡像異性体の合成

構造活性相関を行うために、ベンゼン環上の置換基が異なる化合物の合成も試みた。しかし、図 3 中の分子内 Friedel-Crafts 反応を行う時に *o* 位または *p* 位に電子供与基（酸素原子）を持たないと反応が進行しないか収率が悪く、反応条件の検討を試みたが解決しなかった。さらに、パラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応を試みたが、収率の向上が見られず、生物活性試験に供する量が得られなかった。そこで、以前に合成した(-)-matairesinol、(-)-及び(+)-larisiresinol さらに、今回合成によって得られた conidendrin のラクトン環の還元によって得られる cyclolarisiresinol を活性試験に供することにした。

生物活性試験：ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞を用いて脱顆粒抑制効果を調べた。立体異性体 5-8 は細胞毒性が強かった。このことから、conidendrin (CON)構造の 7',8'位間 (図 2) が相対的に *cis* 体の時に細胞毒性が高いことが分かった。細胞毒性がなかった 7',8' -*trans* 体である、(-)-, (+)-α-conidendrin (CON) (1, 2)、(-)-, (+)-β-conidendrin (CON) (3, 4)について活性を調べた。(-)-, (+)-α-CON、(-)-, (+)-β-CON の全てが優位に脱顆粒抑制効果を示した。特に、(-)-β-CON は 500 μM で他の立体異性体の約 2 倍の抑制活性を示し、50 μM でも他の立体異性体よりも優位に抑制活性を示した。このことから、立体特異的に(-)-β-CON の立体構造が抑制活性に重要であることが分かった (図 6)。

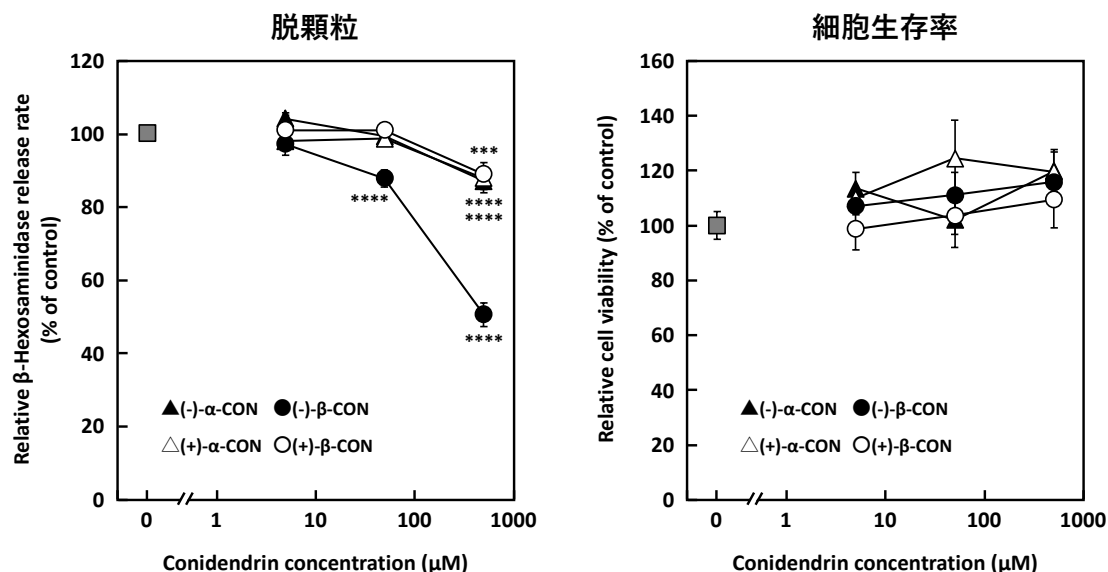


図 6. (-)-, (+)-α-conidendrin、(-)-, (+)-β-conidendrin の脱顆粒抑制効果

次に、RAW264.7 細胞を用いた抗炎症効果を検討した。(+) - α - conidendrin にのみ 100 μM において TNF-α 産生、および IL-6 産生の有意な抑制 (コントロールの約 50%) が認められた。細胞毒性は観察されなかった。しかし、10 μM では活性は確認されなかった。さらに、3T3-L1 細胞の分化期間中サンプルを用いた成熟脂肪細胞への分化に及ぼす影響を評価した。その結果、(-)-α-conidendrin、(+)-β-conidendrin が、1 μM、10 μM でコントロールに対して約 25%の細胞内油滴の減少を示した。以上の結果から、最も高い活性が確認された脱顆粒抑制効果の作用メカニズムを、立体特異的に最も高い活性を示した(-)-β-conidendrin を用いて検討することにした。

CON が脱顆粒を抑制する作用機構を明らかにするため、細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、抗原誘導性の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が(-)-β-CON により抑制された (図 7)。一方、抗原刺激によるシグナル伝達を介さず細胞内 Ca²⁺流入を誘導するタブシガルギン誘導性の脱顆粒は(-)-β-CON によって有意に抑制されたものの、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇への影響はわずかであった。これらのことから、(-)-β-CON は、Ca²⁺依存経路だけでなく非依存経路にも作用することで脱顆粒を抑制していることが示唆された (図 7)。

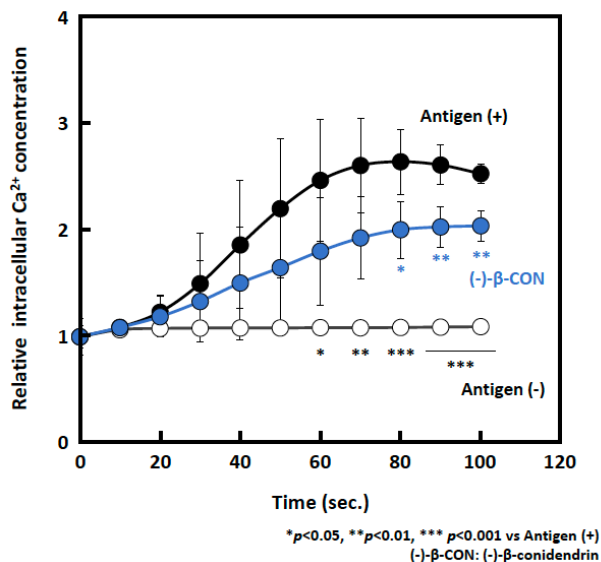


図7. 細胞内カルシウム濃度

次に、抗原 (antigen)が細胞に侵入後に細胞内シグナルである Lyn-Syk-LAT pathway と Fyn-Gab2-PI3K pathway に対する(-)β-CON の効果を検討した。まず、Lyn-Syk-LAT pathway に対する効果を調べるために、Syk 及び PLCγ1 に対するリン酸化を調べた。その結果、抗原のみの場合に比べて (-)β-CON が存在すると、Syk 及び PLCγ1 のリン酸化は、それぞれ約 30%及び 50%程度であった。さらに、Fyn-Gab2-PI3K pathway に対する効果を調べるために PI3K 及び Akt へのリン酸化を調べると、抗原のみの場合に比べて(-)β-CON が存在すると、PI3K 及び Akt へのリン酸化はそれぞれ約 50%及び 30%程度に抑制された。このことから、(-)β-CON は、細胞内シグナルの Lyn-Syk-LAT pathway 及び Fyn-Gab2-PI3K pathway の両方におけるリン酸化を下方制御し、その結果、Ca²⁺の

細胞内への流入が阻害され、脱顆粒が抑制されることが明らかになった (図8)。

(-)β-conidendrinの作用メカニズム

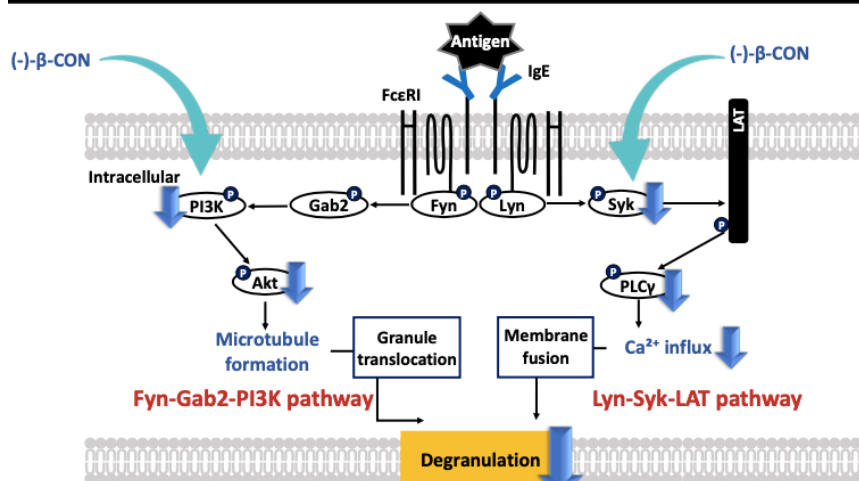


図8. 作用メカニズム

図1に示したように本研究は、secoisolariciresinol から lariciresinol を経て生体内で生成する代謝化合物の活性研究である (図1)。そこで、構造活性相関研究として、secoisolariciresinol の両鏡像異性体、(-), (+)-seco、lariciresinol の両鏡像異性体、(-), (+)-Lar、さらに、(+)-α-conidendrin 及び(-)β-conidendrin のジオールへの還元代謝産物である(7'R,8S,8'S)-CLar 及び (7'R,8R,8'S)-CLar を合成して活性を比較した。さらに、ラクトン構造及び6,7'位間の結合の重要性を評価するために6,7'位間が開裂した(-)-matairesinol, (-)-Mat も合成して脱顆粒抑制活性を調べた。(-), (+)-seco、(-), (+)-Lar、(7'R,8S,8'S)-CLar 及び (7'R,8R,8'S)-CLar の活性は、いずれも(-)β-conidendrin よりも大きく低下した。このことから、ラクトン環の重要性が示唆された。また、(-)-Mat の活性は(-)β-conidendrin とほぼ同程度の活性を示したことから、(-)β-conidendrin の6,7'位間の結合は重要ではなく、ラクトン環構造は重要であると予想された。しかし、Mat については今後、立体構造と活性との関係を十分に検討する必要がある。

細胞レベルで最も高い脱顆粒抑制活性を示した(-)β-conidendrin をマウスに、5 mg/Kg または 20 mg/Kg ミネラルオイル懸濁状態で1日に1回7日間経口投与した。その後、受動皮膚アナフィラキシーを誘導し(-)β-conidendrin の効果を調べたが、その効果は確認されなかった。

本研究では、食品性植物に含まれるリグナン類の一つである secoisolariciresinol とその代謝経路上の代謝化合物の人の健康に対する生物活性を調べ、(-)β-conidendrin に最も高い脱顆粒抑制活性を見出した。有機合成化学的手法を用いて全ての立体異性体を得ることができたため、その活性が立体特異的であることを示した。また、合成により得た他の構造との比較から、ラクトン構造の重要性を示した。作用メカニズムは、Lyn-Syk-LAT pathway 及び Fyn-Gab2-PI3K pathway のリン酸化を下方制御であった。食品性植物に含まれる化合物には活性はないが、その体内代謝物に活性を見出した。動物実験では活性は確認されなかったが、本研究で得られた情報を基に、(-)β-conidendrin 構造をリード構造として誘導体を合成することによって、抗アレルギー活性を持つ新たな医薬品の開発につながると期待される。有機合成化学的手法を用いることによって、食品科学での新たな発見に繋がったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田萌子、松原依莉彩、西甲介、山内聡、菅原卓也
2. 発表標題 (-)- -conidendrin及びその立体異性体の脱顆粒抑制効果に関する研究
3. 学会等名 第34回動物細胞工学会JAACT2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果をJ. Agric. Food Chem. へ投稿中

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	菅原 卓也 (Sugahara Takuya) (00263963)	愛媛大学・農学研究科・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------