

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25年 5月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580129

研究課題名（和文）

フラボノイド代謝物DOPACをプローブとした生体分子修飾の解析

研究課題名（英文）

Development of a new probe of a flavonoid metabolite, DOPAC, for understanding the biomolecule modification

研究代表者

中村 宜督 (Yoshimasa Nakamura)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：60324381

研究成果の概要（和文）：近年、ケルセチン配糖体代謝物である3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸（DOPAC）をはじめとした、腸内細菌叢による食品成分発酵物とその機能性に注目が集まっている。本研究では、ポリフェノール類の化学的特性を反映した生理活性評価系を確立し、分子機構を詳細に解析することでポリフェノール標的候補分子を同定した。また、ケルセチン代謝物の中で、DOPACが最も強力なラジカル捕捉活性及び第2相薬物代謝酵素誘導活性を示すことを明らかにした。さらに、DOPACの標的分子を明らかにする目的で、DOPAC分子プローブ（DOPACプロパルギルエステル）の合成を行い、「click chemistry」への適応性を証明した。

研究成果の概要（英文）：The interest in fermented products in the large intestine such as a quercetin glucoside metabolite, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), has started to grow rapidly. In this study, we identified several plausible target molecules for polyphenols by understanding the molecular mechanisms underlying biological activities related to their chemical characteristics. We also revealed that DOPAC exhibited radical scavenging and phase II drug metabolizing enzyme-inducing activities more potently than other quercetin metabolites. Furthermore, we developed a new probe (DOPAC propargyl ester) to detect target proteins and confirmed its applicability to “click chemistry”.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学（食品機能）

キーワード：ポリフェノール、ケルセチン、生体内代謝物、分子標的、DOPAC、クリックケミストリー

1. 研究開始当初の背景

緑茶カテキンやケルセチンなどのカテコール型ポリフェノール類は、強力な抗酸化作用を有することから、現在では最も著名な機能性食品成分群として受け入れられている。そ

の一方でカテコール類は、反応性の高い求電子反応性を示すキノンに変換され、タンパク質の求核性アミノ酸残基と選択的に結合することにより、生体防御の活性化や抗がん作用を誘導することが報告されている。ポリフェノール類は消化吸収された後、グルクロン

酸や硫酸との抱合反応によって大部分が代謝されることから、腸内細菌叢異化物やアミノ酸付加型代謝物はあまり注目されてこなかった。しかし、求電子反応性の欠如は生理活性の消失につながるものが、申請者を含めた様々な研究者から最近相次いで報告され、生体内での分子標的を探索する上で極めて重要な指針となりつつあった。

一方、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) は元来ドーパミンの代謝産物として著名な化合物であるが、近年のケルセチン配糖体の代謝に関する研究から、ラット及びヒト腸内細菌叢におけるケルセチン配糖体の主要な代謝産物として同定された。これまでに我々は、DOPAC がタンパク質の求核性アミノ酸残基に結合することを見出し、カテコール型ポリフェノールのサロゲートとしても利用できる可能性を示してきた。未だ解明されていない DOPAC の生理機能を明らかにできれば、最も著名なフラボノイドであるケルセチンが、生体内でどのようにして作用しているのかについて、新しい考察を与えるだけでなく、カテコール型ポリフェノール類に共通した標的分子をターゲットングすることも可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、DOPAC 自体をプローブとして利用することで、生体分子修飾作用とその生理機能への寄与を明らかにすることを目的とした。

具体的には、(1) ポリフェノール類の化学的特性を反映した生理活性評価系を確立し、その分子機構を解析することで標的候補分子を探索する、(2) DOPAC の生理機能評価を、①DOPAC とその他のケルセチン配糖体異化物との活性比較、②親化合物及びその類縁体の生理活性と分子機構を解明する、(3) click chemistry (Huisgen 環化反応) を利用した DOPAC プローブを合成し、その有用性を評価する、の3点について検討した。

3. 研究の方法

生理活性の評価は、主に消化管、肝臓、血球由来の各種培養細胞株を用い、細胞増殖抑制・アポトーシス誘導作用、生体内活性酸素作用、第2相薬物代謝酵素遺伝子の発現誘導作

用など対象に、RT-PCRをはじめとした分子生物学的、生化学手法を駆使して評価した。

DOPACプロパルギルエステル (DPE) は、DOPACとプロパルギルアルコールとのfisherエステル化反応で作製した。また、DPEが求電子反応性を有し、「In situ click chemistry」に利用できるか否かを分析化学的手法により評価した。

4. 研究成果

(1) ポリフェノール類の化学的特性である求電子反応性、活性酸素種生成能に着目し、各性質の標準物質 (イソチオシアネート: ITC 類、光増感剤) による細胞死誘導作用とその分子機構を明らかにした。具体的な成果を以下に示す。

① 光増感剤の暗所での抗酸化特性を明らかにした (論文1)。また、光増感剤の前骨髄性白血病細胞 HL-60 での光細胞毒性が、細胞外での過酸化水素生成に依存し、ミエロペルオキシダーゼによる活性種 (次亜ハロゲン酸) の生成と c-Jun-N-terminal kinase (JNK) の活性化を介することを見出した (論文4)。

② 光増感剤の T リンパ球性白血病細胞におけるアポトーシスの誘導には、細胞内活性酸素種の生成、JNK 経路の活性化とともに、インターフェロン- γ のパラクライン/オートクライン効果が関与することを明らかにした (論文12)。

③ 食品由来求電子剤 ITC 類の正常細胞に対する毒性が細胞内外のグルタチオン濃度を調節することにより制御が可能であること (論文8)、また、 α -トコフェロールが ITC による細胞内活性酸素種生成を抑制するにも関わらず、アポトーシス誘導を増強することを明らかにした (論文9)。

④ 活性酸素種/酸化ストレスマーカーとして、血管内皮細胞におけるシステインスルフィン酸 (論文5)、皮膚組織におけるハロゲン化チロシン (論文10) を同定し、さらにそれぞれの血管新生、皮膚老化への寄与を明らかにした。

以上の研究から同定された分子は、ポリフェノール類によっても誘導、修飾されうる可能性を強く示唆している。

- (2) 各種フラボノイドの化学的、生物学特性を解析することで、新たなポリフェノール標的候補分子を同定した。
- ① ルテオリンはがん抑制遺伝子 p53 による抗がん物質耐性作用を改善することを明らかにした (論文 11)。
- ② 緑茶カテキン類の酸化に対する不安定性と求電子反応性との相関を *in vitro* で証明し (論文 2)、胃がん細胞株 AZ521 細胞における細胞増殖抑制作用のエピガロカテキン-3-ガレート分子標的として DEAD-box RNA ヘリカーゼ p68 を同定した (論文 3)。
- (3) ケルセチン配糖体代謝物の中で、DOPAC が最も強力なラジカル捕捉活性、過酸化水素産生活性を示した。さらに、DOPAC は HL-60 細胞に対して有意にアポトーシスを誘導するとともに、肝細胞において第 2 相薬物代謝酵素の一つであるグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性を増強した。以上の結果から、DOPAC はケルセチン配糖体の生理機能を担う代謝物であることが示唆された (投稿中)。
- (4) 酸触媒を用いた Fischer エステル化法により、末端にアルキン基を有する DOPAC プロパルギルエステル (DPE) の合成に成功した。DPE の *In situ click chemistry* (Huisgen 環化反応) への応用は、ドラーゲンドルフ試薬による定性反応にて、タンパク質修飾作用はモデルタンパク質であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの遊離 SH 基量の減少と DPE 修飾タンパク質のピオチンラベル化により証明した。さらに、DPE が親化合物の DOPAC と同様の生理活性を有すること、DPE がタンパク質修飾作用を有することをそれぞれ細胞レベルでも確認し、DPE が DOPAC の標的分子を探索するツールとして有用であることを証明した (投稿準備中)。

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 16 件)

主なもの (和文以外は査読あり)

1. Qi, H., Kawagishi, M., Yoshimoto, M., Takano, H., Zhu, B., Shimoishi, Y., Tada, M., Murata, Y., Nakamura, Y. Artificial food colorants inhibit superoxide production in differentiated HL-60 cells. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74(8)**, 1725-1728. DOI: 10.1271/bbb.100314
2. Mori, T., Ishii, T., Akagawa, M., Nakamura, Y., Nakayama, T. Covalent binding of tea catechins to protein thiols: Relationship between oxidation stability and electrophilic reactivity. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74(12)**, 2451-2456. DOI: 10.1271/bbb.100509
3. Tanaka, T., Ishii, T., Mizuno, D., Mori, T., Yamaji, R., Nakamura, Y., Kumazawa, S., Nakayama, T., Akagawa, M. (-)-Epigallo-catechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD box RNA helicase p68. (2011) *Free Radical Biol. Med.*, **50(10)**, 1324-1335. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.024
4. Qi, H., Takano, H., Kato, Y., Wu, Q., Ogata, C., Zhu, B., Murata, Y., Nakamura, Y. Hydrogen peroxide-dependent photocytotoxicity by phloxine B, a xanthene food colorant. (2011) *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.*, **1810(7)**, 704-712. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.04.010
5. Kaplan, N., Urao, N., Furuta, E., Kim, S.J., Razvi, M., Nakamura, Y., McKinney, R.D., Poole, L.B., Fukai, T., Ushio-Fukai, M. Localized cysteine sulfenic acid formation by vascular endothelial growth factor: Role in endothelial cell migration and angiogenesis. (2011) *Free Radical Res.*, **45(10)**, 1124-1135. DOI: 10.3109/10715762.2011.602073
6. 中村宜督. バイオメディア: 3週間前に摂取した野菜の履歴が血中に. (2011) *生物工程*, **89(4)**, 206. URL: https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8904/8904_biomed_3.pdf
7. 中村宜督. イソチオシアネートとがん予防. (2011) *Functional Food*, **4(4)**, 321-327. URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/40018846306>
8. Abe, N., Okuhira, M., Tsutsui, C., Shimoishi, Y., Murata, Y., Nakamura, Y. Cytotoxicity of benzyl isothiocyanate in normal renal proximal tubular cells and its modulation by glutathione. (2012) *J. Agric. Food Chem.*, **60(7)**, 1887-1892. URL: 10.1021/jf2052042
9. Abe, N., Shimizu, T., Miyoshi, N., Murata, Y., Nakamura, Y. α -Tocopherol sensitizes human leukemia HL-60 cells to apoptosis induced by benzyl isothiocyanate. (2012)

- Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76(2)**, 381-383.
URL: 10.1271/bbb.110665
10. Ishitsuka, Y., Maniwa, F., Koide, C., **Kato, Y., Nakamura, Y.**, Osawa, T., Tanioka, M., Miyachi, Y. Increased halogenated tyrosine levels are useful markers of human skin ageing, reflecting proteins denatured by past skin inflammation. (2012) *Clin. Exp. Dermatol.*, **37(3)**, 252-258.
DOI: 10.1111/j.1365-2230.2011.04215.x.
 11. Sakai, R., Yokobe, S., Abe, N., Miyoshi, N., Murata, Y., **Nakamura, Y.** Luteolin overcomes resistance to benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells. (2012) *J. Food Drug Anal.*, **20(Suppl.)**, 389-393.
DOI: 10.6227/jfda
 12. Qi, H., Zhu, B., Abe, N., Shin, Y., Murata, Y., **Nakamura, Y.** Involvement of intracellular oxidative stress-sensitive pathway in phloxine B-induced photocytotoxicity in human T lymphocytic leukemia cells. (2012) *Food Chem. Toxicol.*, **50(6)**, 1841-1847.
DOI: 10.1016/j.fct.2012.03.011
 13. Miyoshi, N., Yonemochi, T., Tomono, S., Fukutomi, R., **Nakamura, Y.**, Ohshima, H. Development and application of a method for identification of isothiocyanate-targeted molecules in colon cancer cells. (2012) *Anal. Biochem.*, **429(2)**, 124-131.
DOI: 10.1016/j.ab.2012.07.018

[学会発表] (計30件)

主なもの

1. ○**中村宜督**:食品に含まれる求電子性物—イソチオシアネートの機能性とその化学—:日本農芸化学会関西支部第465回講演会ミニシンポジウム『食品成分と健康:生体応答の分子メカニズム』(堺, 2010.7.3)
2. ○**中村宜督**, 筒井千春, 村田芳行, **加藤陽二**:ベンジルイソチオシアネート代謝物のアポトーシス誘導作用:日本農芸化学会大会(京都, 2011.3.27)
3. ○**Yoshimasa Nakamura**: Overcoming resistance to isothiocyanate in colon cancer cells:2011 International Conference on Food Factors: ICoFF 2011 (Taipei, 2011.11.22)
4. ○**中村宜督**:アブラナ科野菜の機能性:イソチオシアネートの化学:福山大学グリーンサイエンス研究センター「環境健康科学の研究拠点の形成」第2回公開講演会(福山, 2012.1.6)
5. ○山口佑也, 齋木俊也, 村田芳行, **中村宜督**:ケルセチン配糖体体内代謝産物分子プローブの合成:第32回日本農芸化学会

- 中四国支部講演会(鳥取, 2012.1.21)
6. ○齋木俊也, 山口佑也, 村田芳行, **中村宜督**:ケルセチン配糖体体内代謝物の分子プローブ合成:第17回日本フードファクター学会(JSoFF)学術集会・第9回日本カテキン学会総会 合同大会(静岡, 2012.11.10)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 宜督 (NAKAMURA YOSHIMASA)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
研究者番号: 60324381

(2) 研究分担者

加藤陽二 (KATO YOJI)
兵庫県立大学・環境人間学部・教授
研究者番号: 30305693