

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：25301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700916

研究課題名(和文) 12/15-リポキシゲナーゼ阻害をターゲットとした食品による動脈硬化症予防の研究

研究課題名(英文) Search of foods inhibiting 12/15-lipoxygenase for prevention of atherosclerosis.

研究代表者

川上 祐生 (Kawakami, Yuki)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：30453202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：LDLの酸化はアテローム性動脈硬化発症の引き金として働くが、この過程に12/15-リポキシゲナーゼが重要な役割を果たしていることが報告されている。本酵素を阻害することができれば、動脈硬化の予防の可能性が期待される。本研究では中国茶の中から新規の酵素阻害成分が見出される可能性のある青山緑水に焦点をあてて、研究を進めた。本酵素の阻害活性を指標として逆相HPLCにより、抽出物に含まれる2種類の化合物を単離した。これらの化合物は、光照射によって相互に変換する新規のモノテルペン配糖体であることが、各種の分光化学的分析の解析結果から明らかとなり、さらにその酵素阻害メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oxidative modification of LDL is one of the critical steps for the development of atherosclerosis. Previous study demonstrated that 12/15-lipoxygenase highly expressed in macrophages is essentially in the process of extracellular LDL oxidation. We evaluated the inhibitory effect of 12 Chinese teas on 12/15-lipoxygenase activity. Tea catechins such as epigallocatechin gallate have been known to exhibit 12/15-lipoxygenase inhibition. Qing Shan Lu Shui, which contains lower catechin levels than the other tested teas, suppressed 12/15-lipoxygenase activity. To identify component(s) that inhibited 12/15-lipoxygenase, we fractionated the extract by reverse-phase HPLC and found fractions containing a potent inhibitory activity. The components in the fractions were isolated and analyzed by electro spray-ionization mass spectrometry, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The results suggested that these compounds were novel monoterpenoid glycosides.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：リポキシゲナーゼ 食品

1. 研究開始当初の背景

日本をはじめとする先進諸国では、高齢化の進行とともに生活習慣病患者が急増している。その中で、動脈硬化が原因で発症する心疾患や脳血管疾患による死亡者数は非常に多く、我が国では死因の第2位と第3位に位置する。しかしながら、その対策としては高脂血症治療薬による予防や、原疾患となる糖尿病や肥満などへの治療が行われているのみで、動脈硬化の進行自体を直接抑制することは非常に難しい。

動脈硬化発症の初期段階における重要な危険因子の1つとして、血液中の低密度リポタンパク質(LDL)の上昇が知られるが、LDLは酸化的な修飾を受け、酸化LDLとなることにより、はじめて動脈硬化を引き起こす原因となる。血管内膜に存在するマクロファージが、スカベンジャー受容体を介して酸化LDLを無制限に取り込み、泡沫細胞化し、粥状動脈硬化巣形成の引き金となる。このLDLが酸化修飾を受ける過程で12/15-リポキシゲナーゼという酵素が重要な働きをすることが知られている。12/15-リポキシゲナーゼは、不飽和脂肪酸に分子状酸素を添加して過酸化脂質を生成する酵素であるが、LDL中のエステル型脂肪酸にも直接酸素を添加することができ、動脈硬化巣に多数集簇しているマクロファージに大量に発現している。Cyrusらは動脈硬化を自然発症する「アポEノックアウトマウス」と「アポEと12/15-リポキシゲナーゼのダブルノックアウトマウス」との動脈硬化病変を比較し、本酵素の欠損により動脈硬化の進行が抑えられることを明らかにしている(*J. Clin. Invest.*, 1999, 103, 1597-1604.)。したがって、12/15-リポキシゲナーゼの働きを制御することができれば、LDLの酸化が抑制され、動脈硬化の発症を予防できることが期待される。

私たちはこれまでの研究で、グアバ葉抽出物が(i)12/15-リポキシゲナーゼを阻害すること、(ii)本酵素を過剰発現させたマウスマクロファージ様細胞によるLDL酸化を抑制すること、(iii)動脈硬化を自然発症するアポEノックアウトマウスの動脈硬化を有意に抑制することを明らかにしてきた(*Food Chem.*, 2012, 131, 1069-1075.)。グアバ葉抽出物などの食品の摂取は、12/15-リポキシゲナーゼの阻害を介して、動脈硬化発症の予防に貢献できることが科学的に明らかになりつつある。

私たちは、グアバ葉抽出物よりも効果的に12/15-リポキシゲナーゼを制御できる食品の検討を進める過程で、中国茶の可能性に興味を持った。茶カテキンについては、Yamamotoらにより12/15-リポキシゲナーゼを含めた各種リポキシゲナーゼに対する阻害効果が報告されている(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338, 122-127.)。

2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化発症の直接的な原因となる酸化LDLの生成に関わる12/15-リポキシゲナーゼの働きを制御できる食品由来の活性成分を中国茶を材料に探索し、同定する。今回は、「茶カテキンをほとんど含まない中国茶」に焦点を当てて研究を進める。酵素阻害効果が認められた中国茶葉の抽出物、あるいはそれに含まれる活性成分の動脈硬化予防作用とその作用機構の解明を目指す。さらに、その活性成分をリード化合物として構造的に類似した化合物を検索し、それらについても12/15-リポキシゲナーゼに対する影響を検討し、化学構造と阻害効果の関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 中国茶抽出物の調製

12種類の中国茶葉1gに、50%エタノールを20ml加えて一定時間振とう抽出を行った。各抽出液を濃縮乾固し、10mg/mlの50%エタノール抽出溶液を作製した。

(2) 酵素活性測定

12/15-リポキシゲナーゼは、12/15-リポキシゲナーゼ発現マウスマクロファージ由来J774A.1細胞のサイトゾルから硫酸分画により部分精製酵素を得た。同様の方法により、血小板型12-リポキシゲナーゼはヒト血小板、5-リポキシゲナーゼはラット好塩基球由来RBL細胞から各酵素源を得た。12/15-リポキシゲナーゼ反応は、種々の濃度の50%エタノール抽出溶液などの存在下で、アラキドン酸と30分で5分間反応させることにより行った。血小板型12-リポキシゲナーゼは37で30分間、5-リポキシゲナーゼは24で5分間反応させた。これらの反応生成物はグルタチオンペルオキシダーゼで還元後、逆相HPLCにて分析し、反応生成物の量から酵素活性を測定した。

シクロオキシゲナーゼ-1およびシクロオキシゲナーゼ-2は、これらの酵素を発現させたヒト大腸癌細胞COLO320DMの膜画分を可溶化させることにより、可溶化酵素を調製した。シクロオキシゲナーゼ反応は、種々の濃度の50%エタノール抽出溶液などの存在下で、アラキドン酸と24で5分間反応させることにより行った。これらの反応生成物は逆相HPLCにて分析し、反応生成物の量から酵素活性を測定した。

(3) 活性成分の分画

50%エタノール抽出物をメタノール30%から100%のリニアグラジエントを用いた逆相HPLCにて2分間ごとに30画分分画した。また、これらの中から阻害が確認された画分を再度47%メタノールを用いた逆相HPLCにて分析し、確認できた各ピークを分取した。

4. 研究成果

(1) 12/15-リポキシゲナーゼを阻害する中

国茶の探索

12 種類の中国茶葉の 50%エタノール抽出液存在下で 12/15-リポキシゲナーゼ活性を測定したところ、ほとんどの中国茶の 50%抽出液が 12/15-リポキシゲナーゼを阻害したが、その 50%阻害濃度 IC_{50} は 2 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上と広範囲に渡っていた。そこで IC_{50} が 20 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった茶の中で 12/15-リポキシゲナーゼを阻害する活性成分であることが既に知られているカテキンの含有量が最も少ない青山緑水に着目して、12/15-リポキシゲナーゼを阻害する新規の活性成分の発見に向けて実験を進めた。この青山緑水の 50%エタノール抽出物の 12/15-リポキシゲナーゼに対する IC_{50} は 19.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。

(2) 12/15-リポキシゲナーゼを阻害する活性成分の探索

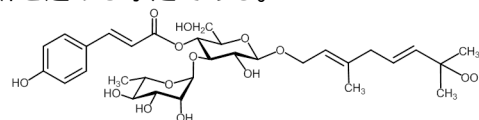
青山緑水の 50%エタノール抽出物を 30% から 100%メタノールのリニアグラジエントの溶媒を用いた逆相 HPLC で分画し、2 ml ずつ分取した。各画分存在下で、12/15-リポキシゲナーゼと反応させたところ、24-26 分の溶出画分で比較的強い阻害が確認された。

12/15-リポキシゲナーゼ酵素活性阻害のあった 24-26 分の溶出画分をメタノール：水：酢酸 = 47 : 53 : 0.01 を用いた逆相 HPLC で分析し、各ピークを分取し。確認されたピークの存在下で 12/15-リポキシゲナーゼと反応させたところ、31 分 (ピーク 1)、33 分 (ピーク 2)、36 分 (ピーク 3) に溶出するピークが 12/15-リポキシゲナーゼを阻害することが確認された。これら阻害が見られたピークは 12/15-リポキシゲナーゼを阻害する成分として既に知られているカテキン類とは吸収極大および溶出時間が異なることから青山緑水には 12/15-リポキシゲナーゼを阻害する活性成分として示唆されていた既知成分以外にも本酵素を阻害する成分が含まれていることが示唆された。これらピークの 12/15-リポキシゲナーゼ阻害の IC_{50} はそれぞれ 1.1 $\mu\text{g/ml}$ 、2.7 $\mu\text{g/ml}$ 、3.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。

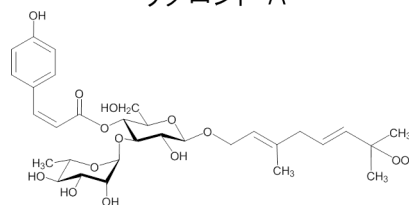
(3) 活性成分の構造解析

本酵素を阻害するピークに含まれる化合物について、各種 2 次元 NMR および高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析を行った。その結果、ピーク 1 に含まれる化合物は (2*E*,5*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyl-*O*-(α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 3')-(4 \rightarrow)-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside であり、ピーク 3 に含まれる化合物は (2*E*,5*E*)-7-hydroperoxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyl-*O*-(α -L-rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 3')-(4 \rightarrow)-*O*-*cis*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside であった。両化合物は光照射により相互に変換する新規のモノテルペン配糖体であり、それぞれリグロシド A およびリグロシド B と命名した。また、ピーク 2 には複数の化合物が含まれて

おり、今後これらの化合物についても構造解析を進める予定である。



リグロシド A



リグロシド B

(4) 酵素阻害特異性

12/15-リポキシゲナーゼを阻害する新規成分であるリグロシド A について酵素の阻害特異性を検討したところ、シクロオキシゲナーゼ-1 ならびにシクロオキシゲナーゼ-2 を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} はそれぞれ 16.8 $\mu\text{g/ml}$ 、10.8 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方、血小板型 12-リポキシゲナーゼおよび 5-リポキシゲナーゼはほとんど阻害しなかった。

(5) 酵素阻害メカニズムの解析

リグロシド A は構造内にヒドロペルオキシ基を持つが、これを還元した化合物は、12/15-リポキシゲナーゼ活性の阻害効果は認められなかった。また、青山緑水中に含まれているモノテルペン部分にヒドロペルオキシ基もヒドロキシ基も持たないクーディングシド A (モノテルペン部分以外はリグロシド A と同じ構造をもつ化合物) もまた、12/15-リポキシゲナーゼ活性を阻害しなかった。このことから、リグロシド A が持つヒドロペルオキシ基が 12/15-リポキシゲナーゼの阻害に強く関与している可能性が示唆され、リグロシドによる本酵素の阻害メカニズムの一端を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hideyuki Ito, Akemi Otsuki, Hitomi Mori, Peng Li, Mai Kinoshita, Yuki Kawakami, Hideaki Tsuji, Ding Zhi Fang, Yoshitaka Takahashi, Two New Monoterpene Glycosides with Inhibitory Effects on Leukocyte-type 12-Lipoxygenase Activity from Qing Shan Lu Shui Tea, *Molecules*, 2013, 18, 4257-4266.
doi: 10.3390/molecules18044257.

〔学会発表〕(計 13 件)

Yuki Kawakami, Akemi Otsuki, Mai Kinoshita, Yoshiko Mori, Makiko Suzuki, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Masumi Kimoto, Hideaki Tsuji, Hiromi Yamashita,

Hideyuki Ito, Ding Zhi Fang, Yoshitaka Takahashi, Inhibitory effect of tea extracts on leukocyte-type 12-lipoxygenase activity, The First Okayama Prefectural University International Workshop with Nanchang University on Foods and Nutritional Sciences, Soja, Japan, March 26-27, 2014
川上祐生、大槻朱美、木下麻衣、森香子、山本登志子、辻英明、伊東秀之、FANG Ding Zhi、高橋吉孝「ヒドロペルオキシ基を持つ新規モノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼの阻害」(日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第 21 回年会、仙台、2014 年 3 月 15 日)
Yuki Kawakami, Akemi Otsuki, Yoshiko Mori, Hideyuki Ito, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Hideaki Tsuji, Ding Zhi Fang, Yoshitaka Takahashi 「Inhibitory effect of Qing Shan Lu Shui Tea on leukocyte-type 12-lipoxygenase activity」(ISNFF2013, Taipei, Taiwan, 2013 年 11 月 5-9 日)
大槻朱美、森香子、森ひとみ、李鵬、川上祐生、山本登志子、辻英明、伊東秀之、方定志、高橋吉孝、中国茶に含まれる白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害成分の解析、第 86 回日本生化学会、横浜、2013 年 9 月 11-13 日
川上祐生、大槻朱美、森香子、伊東秀之、山本登志子、辻英明、Ding Zhi Fang、高橋吉孝、新規モノテルペン配糖体による白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害、日本油化学会 第 52 回年会、仙台、2013 年 9 月 3-5 日
大槻朱美、森香子、木下麻衣、勝原加奈子、森ひとみ、李鵬、川上祐生、山本登志子、辻英明、伊東秀之、Ding Zhi Fang、高橋吉孝、白血球型 12-リポキシゲナーゼを阻害する新規化合物の解明、おかもバイオアクティブ研究会 第 42 回シンポジウム、岡山、2013 年 6 月 15 日
川上祐生、山本登志子、高橋吉孝、伊東秀之、リポキシゲナーゼ阻害による動脈硬化症予防を目指した研究、岡山県立大学 OPU フォーラム 2013、総社、2013 年 5 月 29 日
川上祐生、大槻朱美、平野詩織、木下麻衣、山本登志子、辻英明、木本眞順美、山下広美、伊東秀之、Ding Zhi Fang、高橋吉孝、白血球型 12-リポキシゲナーゼに対する中国茶葉抽出物の阻害効果、日本農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013 年 3 月 24 日~28 日
川上祐生、高橋吉孝、リポキシゲナーゼ阻害をターゲットにした生活習慣病予防に関する研究、第 8 回県立研究機関協議会研究交流発表会、赤磐、2013 年 1 月 24 日
川上祐生、大槻朱美、平野詩織、木下麻衣、下田一花、山本登志子、辻英明、木

本眞順美、伊東秀之、Ding Zhi Fang、高橋吉孝、中国茶に含まれる白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害成分の解析、第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月 14 日~16 日
伊東秀之、大槻朱美、川上祐生、辻英明、Ding Zhi Fang、高橋吉孝、白血球型 12-リポキシゲナーゼ阻害作用を有する青山緑水の成分研究、第 45 回 日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、松山、2012 年 11 月 18 日
Akemi Otsuki, Shiori Hirano, Mai Kinoshita, Ichika Shimoda, Yuki Kawakami, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Hideaki Tsuji, Hideyuki Ito, Ding Zhi Fang, Yoshitaka Takahashi, Inhibitory effect of Chinese tea on leukocyte-type 12-lipoxygenase activity, Bioactive Okayama 2012, Okayama, 2012 年 9 月 13 日
川上祐生、山本登志子、辻英明、高橋吉孝「生活習慣病予防を目指したリポキシゲナーゼ阻害食品の探索、OPU フォーラム 2012、総社、2012 年 5 月 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 祐生 (KAWAKAMI, Yuki)

研究者番号 : 3 0 4 5 3 2 0 2