

平成 27 年 4 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780143

研究課題名(和文)食品由来硫酸化代謝物の機能性に関する研究

研究課題名(英文)Studies of biological functions of sulfated metabolites from foods

研究代表者

安田 伸 (YASUDA, SHIN)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：10512923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食品などに含まれる機能性分子は、これまで生活習慣病の予防またはリスク低減に重要な因子であると考えられてきたが、近年、食品や薬剤摂取後に体内で生じる代謝物もまた我々の体調を調節する事例が提唱されつつある。本研究では、薬物代謝反応の過程で生じる硫酸化代謝物の生理機能性の有無や新規な生理機能について探索することを目的とした。硫酸化されやすい特性を持つある種のフェノール性化合物とその硫酸体をモデル化合物として使用し、これらの生理機能性について抗酸化能の視点から比較評価を行った。その結果、硫酸体のほうが前駆体よりも強い生理作用を示す場合があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：A part of phenolic constituents of foods have been considered to play an important role on preventing lifestyle-related diseases or lowering disease risks. However, the phenolic compounds such as polyphenols are known to undergo circulation and excretion as their conjugated form after the hepatic and intestinal metabolic transformation in our body. Whether the conjugation of these compounds by sulfation may enhance their physiological functions, remains unclear. The current study aimed to investigate whether a sulfated form of certain phenolic compound could demonstrate any biological functions as a model. Antioxidant analyses revealed that the sulfated metabolite was capable of showing suppressive effect rather than its unconjugated form upon a reactive oxygen generation system in vitro.

研究分野：食品機能科学、食品生化学、薬物代謝科学

キーワード：代謝物 抱合体 硫酸体 生理機能性 フェノール性化合物 ポリフェノール 抗酸化 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が到来したわが国では、食品摂取による健康増進または生活習慣に由来する疾患予防に関する社会的ニーズが増大している。わが国より食品機能科学研究は発展し、文部省（現文部科学省）が推進する「重点領域研究」や「生活者ニーズ対応研究」などの国策も後押しして、「Functional Food」あるいは「Functional Food Chemistry」という言葉が国際語として定着されるまでに至った。

現状では食品中に含まれる種々の構成成分のうち、生理機能性を発揮する因子を生体調節低分子化学物質と捉えたフードケミカルバイオロジーの視点からの研究が盛んに行われている。すなわち食品成分が、生体防御作用の強化、疾病の予防と回復、老化抑制、肥満防止などの体調調節作用を介してわれわれの健康維持に深く寄与するという考え方が一般的である。しかしながら最近の研究では、食品や薬剤摂取後に体内で生じた代謝産物（メタボライト）が直接要因となって体調調節機能を発揮するとも提唱されつつある。

例えば、降圧薬ミノキシジルは硫酸化代謝後の硫酸体が活性本体となり細胞膜チャンネルに作用して血管平滑筋弛緩作用を示すこと、大豆イソフラボンの1つであるダイゼインは一部がエクオールまたはO-デスメチルアンゴレンシンに変換されてより強力な抗酸化作用やエストロゲン作用を示すこと、さらにダイゼイン代謝後の硫酸体が降圧作用およびガン細胞増殖阻害作用などの生理機能性を有することが報告されている。

すなわち、食品成分による生活習慣病予防・リスク低減などの生理機能性の発現メカニズムについては未解明な部分が多く残っており、無数ともいえる「メタボライト」の質と量を計測し、さらに作用機序を精査する研究はその複雑さゆえにまだまだ未開拓の分野である。

我々はこれまでに、クーロアレイ型電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーを用いてイソフラボンおよびその代謝物エクオールを含む化合物群の一斉同時検出法の構築を行い、これらがラット体内では遊離体だけでなくグルクロン酸および硫酸との抱合体として組織特異的分布および体内動態を示すことを明らかにしてきた。本研究で特に着目する硫酸化は細胞質可溶性硫酸転移酵素群によって触媒され、生体内物質の恒常性および外来物質の代謝変換ならびに排泄を担う主要な代謝経路である。本酵素は活性硫酸 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS)上の硫酸基を標的となる基質化合物の水酸基またはアミノ基に転移し、食品由来のポリフェノールやフラボノ

イドなどもまた基質となりうる。

さらに、我々はこれまでに硫酸転移酵素について、生化学的および生理学的視点より幅広く研究を実施しており、食品成分ではないもののタバコ煙成分、避妊薬化合物および神経疾患誘発性の酸化型ドーパミンが硫酸化代謝を受けること、内在性のエストロゲンやドーパミン代謝に対し阻害作用を示すことを見出してきた。これらの成果は生理活性物質の活性発現には生体による代謝機構が密接に関わっていることを含意しており、食品成分の生体への活性発現機構を解明するにあたっては、「メタボライト」レベルでの生理機能性評価と代謝変換プロセスによる活性制御機構の解明が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ポリフェノール類や薬剤などのフェノール性化合物は、体内では代謝変換されることが知られる。例えば、フェノール性化合物の一部は第2相薬物代謝反応時に硫酸抱合化される。本研究は、薬物代謝反応の過程で生じる代謝物の生理機能の有無や新規な生理機能について探索することを目的とした。現状では、十分量の食品由来の硫酸化代謝物入手または確保し、多角的に生理機能性を評価することが容易ではない。そこで、硫酸転移酵素の良い基質として知られ、硫酸化されやすい特性を持つ *p*-nitrophenol (*p*-NP)とその硫酸体 (*p*-NPS)をモデル化合物として使用し(図1)、複数の抗酸化活性試験におけるこれらの生理機能性の有無や差異について比較評価を行っていくこととした。

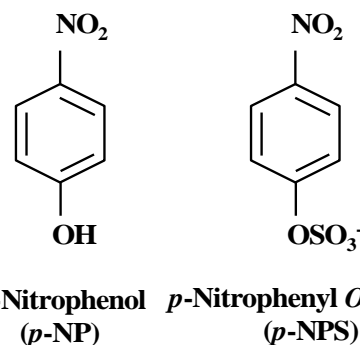


図1. 本研究で活性試験に用いたモデル化合物 *p*-nitrophenol (*p*-NP)とその硫酸体 (*p*-NPS)の化学構造式

3. 研究の方法

(1) NADH を介した活性酸素 (O₂ラジカル) 産生抑制の測定

NADH を介した活性酸素産生抑制の測定は、PMS-NADH 法に基づいて行なった。試料溶液 10 ul に対して 1 mM NBT 20 ul、0.1 mM PMS 20 ul、250 mM KPB b.f. (pH 7.4) 40 ul、

MilliQ 90 ul を混合し、合計 180 ul とした。コントロールおよびブランクにはサンプル溶液の代わりに MilliQ を添加した。また、コントロールおよびブランクにはサンプル溶液の代わりに DMSO を添加した。これらに 2 mM NADH を 20 ul 添加し、10 分間室温で反応させた。その後、200 ul を量り取り、OD 570 nm として吸光度を測定した。

(2) 顆粒球分化 HL-60 細胞由来活性酸素 (O_2^- ラジカル) 産生量の測定

HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞は、FBS を 5% 含有する RPMI 1640 培地を用い、5% CO_2 の存在下 37 °C で継代培養した。細胞を新鮮培地で洗浄後、 1.0×10^6 cells/ml となるように調製し、5% FBS を含む RPMI1640 培地中で 1.25% の DMSO と共に 6 日間培養を行い、本細胞を顆粒球様細胞へと分化誘導させた。

分化誘導前処理後の顆粒球分化 HL-60 細胞をハンクス液で洗浄し、トリパンブルー分染法により生細胞数をカウントした。さらに希釈または遠心して上清除去後に再度ハンクス液に懸濁し、 2.0×10^6 cells/ml となるように細胞を調整した。サンプル 1.25 uL にハンクス液 125 uL を加えて混和させた。その後、上述の HL-60 細胞懸濁液 125 uL を加え転倒混和し、15 分間 37 °C で保温した。20 uM TPA (12-O-テトラデカノイルホルポール 13-アセテート、発ガンプロモーター) 1.25 ul と 20 mg/ml チトクロム-c 12.5 ul の混合溶液を添加してさらに 37 °C で 15 分間反応させた。直後に 5 分間氷水に入れて冷却し、1~2 分間遠心後の上清 200 ul を量り取り、OD 500 nm として吸光度を測定した。

4. 研究成果

活性酸素の一つであるスーパーオキシドアニオンラジカル産生を指標に、試験管レベルで *p*-NP および *p*-NPS の有する抗酸化作用を調べた。その結果、いずれも濃度依存的に活性酸素の産生を抑制したものの、とくに *p*-NPS のほうが *p*-NP よりも強い活性酸素産生抑制作用を示すことを見出した (表 1)。

表 1. *p*-NP と *p*-NPS の活性酸素産生抑制作用抑制率 (%)

処理濃度	抑制率 (%)	
	<i>p</i> -NP	<i>p</i> -NPS
0 uM	0.0±1.1	0.0±1.1
25 uM	-0.2±0.6	18.6±4.8
50 uM	3.8±2.3	21.9±3.7
100 uM	1.2±0.9	38.2±1.8
250 uM	1.7±0.4	70.5±2.8
500 uM	8.4±1.1	82.7±1.0
1,000 uM	9.0±0.3	97.2±0.7

データは平均値±標準偏差 (n=4)

次に細胞レベルでの活性酸素産生に及ぼす影響を調べるため、TPA 誘導のヒト顆粒球様細胞の活性酸素産生に及ぼす *p*-NP および

p-NPS の効果を調べた。その結果、いずれも濃度依存的に細胞の活性酸素産生を軽減させたものの、細胞レベルでは逆に *p*-NP のほうが *p*-NPS よりも強い抑制作用を示した。しかしながら、*p*-NPS ではその効果が完全に消失する訳ではなかったことより、効能の一部が保持されていることを見出した (表 2)。

表 2. *p*-NP と *p*-NPS の顆粒球様細胞由来活性酸素に及ぼす産生抑制作用

処理濃度	活性酸素産生量 (%)	
	<i>p</i> -NP	<i>p</i> -NPS
0 uM	100.0±4.1	100.0±2.5
500 uM	69.6±8.1	88.6±2.5
1,000 uM	52.9±1.5	84.5±0.6
2,000 uM	35.1±1.3	76.1±1.5
3,000 uM	15.4±1.0	68.0±1.5

データは平均値±標準偏差 (n=4)

以上より、フェノール性化合物によっては硫酸化代謝されることで生理活性が正または負に調節され、代謝物にも活性の一部が保持される可能性を見出した。しかしながら、現時点では十分量の食品由来硫酸化代謝物を確保するのが未だ困難であり、代謝物の合成法や精製法の確立の面から、今後も継続した研究を展開する必要がある。

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 0 件) 該当なし

[学会発表](計 11 件)

福原久美子, 菅原進太郎, 小野政輝, 井越敬司, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**, 1-Naphthol とその硫酸化代謝物 1-naphthyl sulfate の抗酸化能の比較評価。平成 26 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会。(熊本県立大学、熊本市) 2014 年 10 月 12 日。

Sugahara, S., Takeuchi, R., Ono, M., Igoshi, K., Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Liu, M.-C., **Yasuda, S.** Inhibitory effect of *p*-nitrophenyl *O*-sulfate on the O_2^- radical production. In poster session, 12th International Symposium on Cytochrome P450. P450 Biodiversity and Biotechnology. (Kyoto International Community House, Kyoto, Japan), Sep. 24-28, 2014.

Yasuda, S. Japan's Functional Food Trend in 21st Century. In Seminar: Thai Health Food Industry Leveraging to World Class Market. Hosted by Faculty of Agro-Industry, KMITL. (Pullman Bangkok King Power Hotel, Bangkok, Thailand), Aug. 30, 2014. Invited speaker. (招待講演)

菅原進太郎, 竹内良, 小野政輝, 井越敬司, 黒木勝久, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. *p*-Nitrophenol とその硫酸化代謝物による活性酸素産生抑制作用. 2014年度(第18回)生物機能研究会(大分県、九州地区国立大学九重共同研修所(九大山の家))2014年7月12-13日.

菅原進太郎, 竹内良, 小野政輝, 井越敬司, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. *p*-Nitrophenol 硫酸体の superoxide anion radical 産生抑制機構. 第51回化学関連支部合同九州大会(福岡県北九州市、北九州国際会議場イベントホール)2014年6月28日.

Sugahara, S., Takeuchi, R., Ono, M., Igoshi, K., **Yasuda, S.** Mechanism of the suppression by *p*-nitrophenol *O*-sulfate on the reactive oxygen generation systems. In poster session, 17th Asian Agricultural Symposium (Tokai University, Kumamoto, Japan), Dec. 7, 2013.

菅原進太郎, 竹内良, 小野政輝, 井越敬司, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. フェノール性化合物硫酸体モデルの機能に関する研究. 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 日本ビタミン学会近畿・中四国・九州沖縄地区 2013年度合同広島大会.(広島市、県立広島大学)2013年9月6日.

竹内良, 菅原進太郎, 小野政輝, 井越敬司, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. *p*-ニトロカテコールとその硫酸体の抗酸化能. 第50回化学関連支部合同九州大会(北九州市、北九州国際会議場・AIMビル3階展示場)2013年7月6日.

菅原進太郎, 河本佳奈江, 竹内良, 小野政輝, 井越敬司, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. *p*-ニトロフェノール硫酸体の superoxide dismutase 様活性. 第50回化学関連支部合同九州大会(北九州市、北九州国際会議場・AIMビル3階展示場)2013年7月6日.

菅原進太郎, 竹内良, 小野政輝, 井越敬司, 榊原陽一, 水光正仁, **安田伸**. *p*-Nitrophenol 硫酸抱合体の O₂⁻ radical 産生系に及ぼす影響. 2013年度 P450、UGT、SULT 研究会(宮崎、フェニックス・シーガイア・リゾート内コテージヒムカ)2013年6月1日.

菅原進太郎, 河本佳奈江, 榊原陽一, 水光正仁, 小野政輝, 井越敬司, **安田伸**. *p*-ニトロフェノール硫酸体の抗酸化機能に関する研究. 平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会.(鹿児島, 鹿児島大学郡元キャンパス)2012年9月29日

〔図書〕(計 0 件)該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)該当なし

取得状況(計 0 件)該当なし

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 伸 (YASUDA SHIN)
東海大学・農学部・准教授
研究者番号: 10512923

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし