

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292075

研究課題名(和文) 機能性フラボノイドープレニル化の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the significance of prenylation on the physiological function of flavonoids

研究代表者

寺尾 純二 (TERAO, Junji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：60093275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイドに対するプレニル基の導入がその機能性に与える影響を構造活性相関の観点から解明することを目的とした。用いたフラボノイドはケルセチン(Q)とそのプレニル化誘導体である6-プレニルケルセチン(6-PQ)、5'-PQ、8-PQである。プレニル基の位置により疎水性は異なること、疎水性が最も高い6-PQが最も効果的にヒト血管内皮細胞へ取り込まれるとともにヘムオキシゲナーゼ-1の誘導を最も強く促進することを明らかにした。Qはフラボノイドの細胞内標的分子と予想されるカベオリン-1の機能調節作用を有することを証明した。プレニル化フラボノイドの標的分子としてのカベオリン-1の重要性が推定された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to evaluate the effect of prenylation on the functionality of flavonoids from the viewpoint of structure-activity relationship. The compounds used were 6-prenylquercetin (6-PQ), 5-PQ and 8-PQ. We found that hydrophobicity is changed depending on the position of prenyl group in the flavonoid structure. 6-PQ with the highest hydrophobicity showed the highest induction of heme oxygenase-1 in accordance with the highest efficiency of cellular uptake in human blood endothelial cells. The result that quercetin modulated the vascular function of caveolin-1 in the cells may indicate that caveolin-1 and caveolae are potential targets for the action of prenylated flavonoids

研究分野：農学

キーワード：食品機能 フラボノイド プレニル化 抗酸化酵素 血管内皮

### 1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは植物が産生する二次代謝産物であり、非栄養食品機能因子として注目されている。クワ科やマメ科などの植物にはプレニル基 $(\text{CH}_2)_n\text{-C}=\text{C}-\text{CH}_2\text{-}$ が結合したフラボノイドが約1000種類存在しており、プレニル化によるフラボノイドの高機能化に関心がもたれている。一方、2008年 Yazaki ら がプレニル化酵素遺伝子のクローニングに成功したことにより、代謝工学によるプレニル化フラボノイドの物質生産が望めるようになった。しかし、プレニル化フラボノイドの生理機能研究は培養細胞を用いた *in vitro* 実験に留まっており、経口摂取を考慮した生体レベルでの機能発現に関する知見はほとんど得られていない。

われわれは代表的な野菜フラボノイドであるケルセチンを中心に、実験動物やヒトを用いた生体利用性の研究および培養細胞・実験動物を用いた生理活性発現機構の研究をこの20年継続している。平成22年-24年度実施した科研費基盤研究(B)において、グルコース付加 やナノ粒子化 がフラボノイドの生体利用性を向上させることや、マクロファージ様細胞から分泌される グルクロニダーゼ活性がケルセチン抱合体代謝物を脱抱合して活性化すること を明らかにした。さらに、中枢神経系を標的とした生理活性発現機構研究において、ケルセチン代謝物が血液脳関門を超えて脳内に蓄積し酸化ストレスを抑制すること をみとめた。これらの研究成果から、生体利用性の向上がフラボノイドの高機能化をめざす有効な戦略になることが推察された。

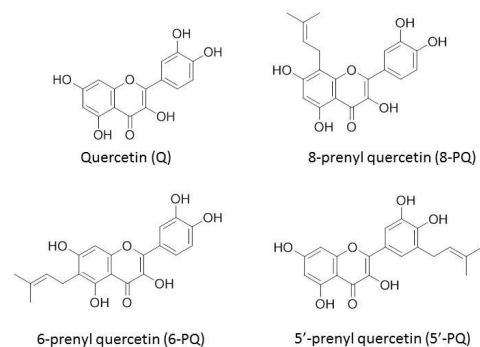
一方、われわれは平成20年-24年度実施したイノベーション創出基礎的研究推進事業「筋肉老化を防ぐ抗ユビキチン化ペプチドおよびフラボノイドの開発」において、筋肉注射したケルセチンが実験動物において廃用性筋萎縮抑制作用を発揮することを報告した。さらに抗筋萎縮に関するフラボノイドの高機能化をめざしてプレニル化フラボノイドに着目し、ホップの主要フラボノイドである8-プレニルナリンゲニン(8-PN)の実験動物への経口摂取がユビキチンリガーゼ発現抑制により強い筋萎縮抑制作用を有することを明らかにした。さらに、プレニル基をもたないナリンゲニン(N)に比べて8-PNは筋肉中に高濃度蓄積したことから、プレニル化は標的組織への蓄積量を増加させることによりフラボノイド自体が有する機能を生体レベルで発現させると考えた。すなわち、生体レベルにおいてもプレニル化はフラボノイドの高機能化をもたらすことが大いに期待された。しかしフラボノイドが機能を発揮する標的部位への蓄積代謝や活性発現機構に対するプレニル化の効果は実証されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、フラボノイド骨格に対するプレニル基の導入がフラボノイドの機能性に与える影響を、構造活性相関の観点から解明することを試みる。一般にフラボノイドは細胞毒性を有するため、食品安全性の観点からもプレニル化による高機能化の詳細なメカニズム解析が必要である。そこで、本研究はフラボノイドの生体利用性に対するプレニル化の影響を分子レベルで評価するとともに、血管を標的としたプレニル化フラボノイドの生理活性発現機構を明らかにし、フラボノイドの生理機能からみたプレニル化の意義を解明することを目的とする。具体的には以下の項目を解明する。

- (1) フラボノイドの細胞膜への親和性に対するプレニル化の影響: 各種フラボノイドがリポソーム膜あるいは培養細胞にとりこまれる量を定量し、疎水性パラメータとの相関を明らかにする。
- (2) フラボノイドの小腸上皮への吸収に対するプレニル化の影響: 各種フラボノイドを小腸上皮モデル細胞に添加し、細胞透過量を比較する。
- (3) フラボノイドの血中および組織への分布に対するプレニル化の影響: 各種フラボノイドをマウスに長期間摂取させ、各組織や血液への蓄積量を比較する。
- (4) フラボノイドの生理機能発現に対するプレニル化の影響: 各種フラボノイドの血管大動脈機能に対する影響をヒト血管内皮細胞モデルを用いて検討する。

### 3. 研究の方法



上図に示したプレニルケルセチンの位置体(8-PQ、6-PQ、5'-PQ)およびケルセチン(Q)を用いて、それぞれの特性を以下に記述する実験方法を用いて比較検討することにより、フラボノイドの生理機能に及ぼすプレニル化の影響をプレニル基の結合位置を含めて明らかにすることを試みた。なお、試料供給量に制限があることが判明したため小腸モデル細胞実験と動物の長期摂取実験は取り

やめ、単回投与実験のみを実施することにした。

実験方法(1) プレニルケルセチン異性体の細胞膜親和性に及ぼすプレニル化の影響

培養細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用い分化誘導後、各フラボノイド検体を添加して一定時間反応させた後、細胞を回収して細胞にとりこまれたフラボノイドを文献の手法に基づいたHPLCで定量した。各フラボノイド検体の疎水性指標である **clogP** を文献の手法に基づいてコンピュータソフトで計算した。

実験方法(2) フラボノイドの腸管吸収に対するプレニル化の影響

C57BL6 マウスに各フラボノイド検体をゾンデで単回投与し、24時間以内で一定時間毎に尾静脈から採血し、遠心分離で得られた血漿中のフラボノイドおよびフラボノイド代謝物を文献の手法を用いてHPLCで定量した。その結果からプレニル化がフラボノイドの消化管粘膜透過性と血中への移行度に与える影響を評価した。

実験方法(3) フラボノイドの生理機能発現に対するプレニル化の影響

HUVEC を分化誘導後、各フラボノイド検体を添加して一定時間反応させた後、細胞を抽出し抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ(HO-1)の発現量および転写因子 Nrf2 の核内移行を RT-PCR やウエスタンブロット等で検討した。

実験方法(4) プレニル化フラボノイドの細胞内標的部位の基礎的検討

プレニル化フラボノイドの標的部位として細胞膜マクロドメインであるカベオラに着目し、カベオラに存在する機能タンパクである caveolin-1(cav-1)の局在性と機能発現に対するフラボノイド添加の影響を検討した。cav-1 の局在性に関しては HUVEC を分化誘導後、ケルセチンを添加して反応させ、密度勾配遠心法を用いて評価した。機能発現に関しては、同様に酸化ストレスによる HUVEC の cav-1 発現上昇および cav-1 リン酸化に対するフラボノイドの影響を RT-PCR やウエスタンブロット等で検討した。

#### 4. 研究成果

当初予定していたマウスへの長期投与実験による血中・組織への分布に対するプレニル化の影響に関しては、各異性体を動物実験に大量調整することが困難であった。そこで、比較的大量に調整できる 8-PQ を用いて18日間の摂取実験(飼料に0.2%のQあるいは8-PQ添加)を実施した。その結果、肝臓と腎臓において8-PQはQよりも高濃度に蓄積することが明らかになった。なおこの結果はすでに論文の一部として報告済みである。

(1) ケルセチンの細胞膜親和性に及ぼすプレニル化の影響

予備的な実験として胎児腎細胞 HEK293 細

胞を用いたプレニルケルセチンの取り込み実験を行ったところ、 $Q < 8\text{-PQ} < 5\text{-PQ} < 6\text{-PQ}$  の順に取り込み量が増加した。さらに HUVEC においてもこの順番は変わらなかったことから、細胞の種類に関わらず6位へのプレニル基の導入が最も細胞内への移行を促進することが明らかになった。一方、3種のプレニルケルセチン異性体の **clogP** は同一値であるが、疎水性クロマトグラフィーの溶出順から示された疎水性は  $Q < 8\text{-PQ} < 5\text{-PQ} < 6\text{-PQ}$  の順であり、このことは、プレニル基による細胞への取り込みの相違は疎水性の強さに起因することを示す。すなわち、疎水性が最も高い 6-PQ がもっとも細胞膜との親和性が高いことが示された。

(2) フラボノイドの腸管吸収に対するプレニル化の影響

マウスに各プレニル化ケルセチンを 50mg/kg 体重で単回投与すると、3種の PQ ともに最大血漿濃度は Q の場合の報告値より低い値であった。すなわち、単回投与においてプレニル化はケルセチンの生体吸収性を下げることが示された。すでにわれわれは小腸上皮細胞モデルを用いて、プレニル化は小腸上皮細胞への取り込みを加速させるが、細胞から血中への排出は遅延させることを明らかにした。すなわち、プレニル化によりケルセチンの腸管吸収速度は遅くなるのが、今回確認された。

(3) フラボノイドの生理機能発現に対するプレニル化の影響

10 $\mu$ M の各 PQ で HUVEC を 3 時間処理すると、いずれの PQ でも HO-1 発現量が上昇した(図1)とくに 6-PQ による上昇が著しく、この理由のひとつとして、6-PQ の高い疎水性による細胞への効果的な取り込みが考えられた。HO-1 の発現上昇には転写因子である Nrf2

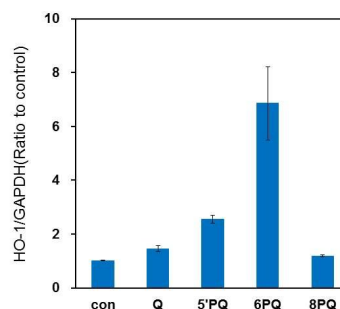


図-1 QおよびPQによるHUVECのHO-1発現誘導能の比較

の核内移行による核内量の増加が考えられる。そこでウエスタンブロットにより、核画分に存在する Nrf2 を検出したところ、6-PQ 添加により明らかに Nrf2 の核内量が増加することがみとめられた。Nrf2 の標的部位である Antioxidant Response Element (ARE) に結合する Bach1 は 6-PQ の添加により核外移行が誘導された。なお、ARE に応答する抗酸化

酵素遺伝子のうちで、NQO-1 および GPx は 6-PQ 添加では発現上昇せず、HO-1 遺伝子発現のみが上昇した。以上の結果から、細胞へ取り込まれやすい 6-PQ は効果的に Nrf2 や Bach1 システムに作用することにより、HO-1 遺伝子発現を選択的に上昇させることが考えられた。

#### (4) プレニル化フラボノイドの細胞内標的部位の基礎的検討

6-PQ は高い疎水性を有することから、血管内皮細胞における 6-PQ の直接的な標的部位を細胞膜脂質と想定し、細胞内情報伝達系のプラットフォームである膜マイクロドメイン(カベオラ)に着目した。酸化 LDL はカベオラに局在するタンパク質 cav-1 の発現上昇を介して内皮細胞の単球接着因子(ICAM-1, VCAM-1)の発現を上昇させることにより、動脈硬化発症の引き金を弾くことが示唆されている。そこで、酸化 LDL に HUVEC を暴露すると同時に Q を添加した場合の 12 時間後の cav-1 発現量を検討した結果、10 $\mu$ M の Q 添加で有意に cav-1 生成を抑えることが明らかになった(図 2)。さらに、過酸化水素を用いた酸化ストレスによる HUVEC の cav-1 のリン酸化誘導は Q の前処理で抑えられる

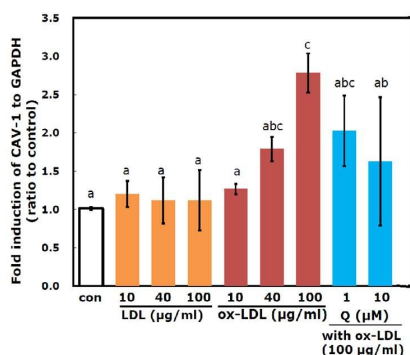


図-2 酸化LDL(OX-LDL)誘導によるCAV-1発現に対するQ添加の効果

ことも確認された。cav-1 のリン酸化は血管内皮細胞の透過性亢進に作用することが示唆されている。以上の結果から、Q は内皮細胞の機能に関わるカベオリンの cav-1 タンパクの機能調節作用を発揮することにより、抗動脈硬化に働くことが考えられる。今回の研究ではカベオラに対する PQ の局在性とその作用発現までの研究を遂行することはできなかったが、プレニルフラボノイドの標的部位としての膜マイクロドメイン(カベオラ)に注目すべきであり、今後のさらなる研究により、この点を明らかにしたい。

#### <引用文献>

- Sasaki et al. *Plant Physiol.* 146:1075-1084:2008  
 Murota et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 501:91-97:2010  
 Takumi et al. *Food Func.* 3:389-398:2012  
 Kawai et al. *J. Biol. Chem.* 283:9424-9434:2008;

- Mukai et al. *Free Radic. Res.* 46:1019-1028:2012  
 Ishisaka et al. *Free Radic. Biol. Med.* 51:1329-1336:2011  
 Mukai et al. *J. Nat. Prod.* 73:1708-1710:2010  
 Mukai et al. *PLoS ONE* 7:45048:2012  
 Shirai et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1015-1021:2002  
 Bandaruk et al. *J. Agr. Food Chem.* 60:10270-10277:2012  
 Moon et al. *Free Radic. Biol. Med.* 2001:30:1274-1285:2001  
 Nakamura et al. *Chem. Phys. Lipids* 174:17-23:2013.  
 Mukai et al. *J. Nutr.* 143:1558-1564:2013.

#### 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5件)

- Mukai R., Matsui N, Fujikura Y, Matsumoto N, Hou D-X, Kanzaki N, Shibata H, Horikawa M, Iwasa K, Hirasaka K, Nikawa T, Terao J. Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 査読有 Vol.31, 2016, 67-76  
 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.02.001.  
 Kamada C., Mukai R., Kondo A., Sato S., Terao J. Effect of quercetin and its metabolite on caveolin-1 expression induced by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in endothelial cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 査読有 Vol.58, 2016, 193-201.  
 DOI:10.3164/jcbrn.16-2

向井理恵, 寺尾純二, プレニルフラボノイドの生体利用性 *化学と生物* 査読無 53巻,2015、71-73.

[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kagakutoseibutsu/53/2/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kagakutoseibutsu/53/2/_contents/-char/ja/)  
Terao J., Mukai R. Prenylation modulates the bioavailability and bioaccumulation of dietary flavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 査読有 Vol.559. 2014,12-16.

DOI: 10.1016/j.abb.2014.04.002.

Mukai R., Terao J. Role of dietary flavonoids in oxidative stress and prevention of muscle atrophy. *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.* 査読無 Vol.2. 2013, 385-392  
 DOI:10.7600/jpfs.2.385

##### [学会発表](計4件)

鎌田智英実 近藤あかり 向井理恵 寺尾純二 Caveolin-1発現に対するケルセ

チンおよび ケルセチン の効果  
ビタミンE研究会 2016年1月9日 香  
川県高松市高松市民会館

Kondo A., Kamada C., Mukai R., Terao J.,  
Effect of quercetin on hydrogen  
peroxide-induced phosphorylation of  
caveolin-1 endothelial cells The 6<sup>th</sup>  
International Conference on Food Factors  
2015年11月24日 Seoul, Korea, Coex

Shono H, Saito H, SA と S, Kawamura T,  
Nemoto H., Terao J., Mukai R. A signal  
transduction pathway in prenylquercetin-  
induced heme oxygenase-1 expression in  
vascular endothelium cells. The 6<sup>th</sup>  
International Conference on Food Factors  
2015年11月24日 Seoul, Korea, Coex

近藤あかり 鎌田智英実 向井理恵 寺  
尾純二 血管内皮細胞における酸化スト  
レス誘導の caveolin-1 リン酸化に対す  
るケルセチンおよびその代謝物の効果  
日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本  
支部合同大会 2015年9月17日 愛媛県  
松山市 愛媛大学

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

寺尾 純二 (TERAO, Junji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：60093275

### (2)研究分担者

向井 理恵 (MUKAI, Rie)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：90547978