



# Studies on suppression mechanism of flavonoid on transformation of an aryl hydrocarbon receptor

Mukai, Rie

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2014-07-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4550

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004550>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 向井 理恵  
博士の専攻分野の名称 博士（農学）  
学 位 記 番 号 博い第 4550 号  
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Studies on suppression mechanism of flavonoid on transformation of an aryl hydrocarbon receptor  
フラボノイドによるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制機構に関する研究

審 査 委 員

主 査 教 授 芦田 均  
教 授 齋藤 尚亮  
教 授 佐々木 満  
准教授 吉田 健一

氏名	向井 理恵		
論文 題目	Studies on suppression mechanism of flavonoid on transformation of an aryl hydrocarbon receptor (フラボノイドによるアリアル炭化水素受容体の形質転換抑制機構に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	芦田 均
	副 査	教授	齋藤 尚亮
	副 査	教授	佐々木 満
	副 査	准教授	吉田 健一

## 要 旨

環境汚染物質であるダイオキシン類は、主に食品を介してヒト体内へ侵入することと、一部の化合物が動物体内で毒性を示すことから、食の安全性確保の観点における社会問題のひとつになっている。ダイオキシン類のうち毒性を示す化合物は、細胞質に存在するアリアル炭化水素受容体 (AhR) に結合して、これを形質転換させることが知られている。形質転換した AhR はパートナータンパク質を解離するとともに核移行し、Arnt タンパク質とヘテロ 2 量体を形成することで転写因子として働く。ダイオキシン類によりこの転写因子の作用が過剰になった場合、細胞内のシグナル伝達の攪乱がおり、発がんのプロモーション作用、免疫毒性、消耗性症候群、催奇形性などのダイオキシン毒性の発現に繋がるといわれている。従って、AhR が関わる形質転換の調節ができればダイオキシン毒性の軽減に繋がると考えられている。

本論文はこれまでに、AhR の DNA 結合活性を抑制するフラボノイドが見出されていることを受け、AhR が関わる形質転換に対するフラボノイドのサブクラスによって作用機構が異なることを明らかにし、さらに、フラボノイドを多く含む食品を摂取した場合の生体での有効性を動物実験で検証した研究成果を集約したものである。本論文は以下に示すように七章と付章から成り立っている。

第一章では、ダイオキシン毒性の発現における AhR の役割や生理的意義を研究背景として整理して論述するとともに、これまでに AhR の形質転換を抑制する天然化合物には、フラボノイド類であるフラボンやフラボノール、カテキンなどが報告されていることを紹介している。なかでもフラボノイドについての抑制効果は多くの論文で示されてきたが、これらの化合物の作用機構解明に関する情報が不十分であることを指摘している。これらの背景を踏まえて、本論文では、フラボノイドについて抑制効果を解明するとともに、それを含有する食用植物抽出物の効果の検証することを目的として掲げている。

第二章では、フラボノイドのサブクラスのうち、AhR の形質転換に対する効果が報告されていないアントシアンについて、そのダイオキシン類の中で最も強い毒性を示す 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) に誘導される AhR の DNA 結合活性抑制効果を評価している。アントシアンは不安定な構造特徴をもつことから、アントシアンの構造維持を高速液体クロマトグラフィーで確認するとともに、効果を検証している。また、生体内代謝物と推定されている化合物についても検討することで、生体内での効果発揮の可能性を示している。これらの結果を取り纏めて、アントシアンは AhR の DNA 結合活性を抑制しないと結論づけている。さらに、この結果と従来の知見とを整理して、フラボノイドが示す DNA 結合活性の抑制効果は、サブクラスごとに作用機構が異なるであろうことを推論している。本章の内容は、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69 (5), 896-903 (2005) に掲載されている。

第二章の結果から提唱した推論であるフラボノイドのサブクラス依存的な抑制効果の違いを明らかにするために、第三章では AhR とフラボノイドとの相互作用について検討している。フラボンとフラボノールのサブクラスに属する化合物は AhR とアゴニストとの結合を他のサブクラスよりも強く阻害することを示している。一方で、AhR の DNA 結合活性を抑制するフラボノイドは、いずれも AhR とパートナータンパク質との複合体に相互作用することを示し、さらに、効果が強いものは化合物と受容体タンパク質との親和性も高いことを明らかにしている。これらのことから、フラボノイドはサブクラスにより AhR に直接作用する場合と、そのパートナータンパク質に作用する場合があることを考察している。本章の内容は、*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359 (3), 822-827 (2007) に掲載されている。

氏名	向井 理恵		
論文 題目	Studies on suppression mechanism of flavonoid on transformation of an aryl hydrocarbon receptor (フラボノイドによるアリアル炭化水素受容体の形質転換抑制機構に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	芦田 均
	副 査	教授	齋藤 尚亮
	副 査	教授	佐々木 満
	副 査	准教授	吉田 健一

*In vitro* で得られた食品成分の有効性を確認するためには、動物個体での評価が不可欠である。第五章ではフラボノールの一種であるケンフェロール、あるいはこれを含む組成物としてのイチヨウ葉抽出物を経口投与した動物において、AhR のアゴニストであるメチルコラズレンが誘導する AhR の DNA 結合活性が抑制されることを明らかにしている。また、ケンフェロールの効果ターゲット臓器へ取り込まれることで発揮されているか否かを確認するため、フラボノイドの排泄に関わる薬物トランスポーターの阻害剤であるベラパミルを予め投与した群を設けて実験を行っている。抽出した肝臓に TCDD を作用させた *ex vivo* 試験を行ったところ、ケンフェロール単独投与群から抽出した肝臓よりも、ベラパミル前投与群の肝臓内では TCDD による AhR の DNA 結合活性の上昇率が低い結果を得ている。この抑制効果の上昇について培養細胞を用いて検証し、ベラパミルを作用させた場合には、細胞内のケンフェロール量が増え、AhR 形質転換抑制効果が強まることを明らかにしている。ケンフェロールの排泄阻害により抑制効果が高まることから、標的細胞におけるフラボノイドの存在量を増やす工夫により効果を増強することが可能であると議論している。これらのことは、食品として経口摂取したフラボノイドが生体内でも効果を示すという点で意義がある。本章に関する成果は、*Biochemical and Biophysical Research Communications* に投稿予定である。

第六章では、フラボノイドのうち、*in vitro* 試験で比較的弱い効果を示したカテキンとその重合体であるプロシアニジンを含む食品組成物であるカカオポリフェノール抽出物を摂取させたマウスにおいて、AhR の形質転換抑制効果を評価している。また、このときカカオポリフェノール抽出物は肝臓内で AhR/Arnt の 2 量体形成を阻害することで DNA 結合活性を抑制するという作用機構を明らかにしている。さらに、腸管透過モデル細胞を用いた実験から、カカオポリフェノール抽出物は腸管を透過することで、抑制効果が上昇するという結果を得ており、実際に推定代謝物が抑制効果を示すことも示している。このように、フラボノイドを含む食品を摂取したとき、吸収されて代謝を受けた化合物が生体内で AhR の形質転換を抑制することを動物個体レベルで実証した有用な知見である。本章の内容は、*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (21), 10399-10405 (2008) に掲載されている。

第七章では、第二章から第六章までの得られた実験結果について、従来の知見と比較しながら総合的な考察を加えるとともに、研究成果の取り纏めをおこなっている。

付章では、フラボノイドの細胞内での局在について検証している。細胞に取り込まれたフラボノールアグリコンの蛍光を蛍光顕微鏡で捉え、その細胞内局在が核であることを明らかにしている。このことは、フラボノールアグリコンが細胞内に取り込まれるだけでなく、アグリコンとして核内に存在することを可視的に示した最初の報告である。付章に関する成果は *Cytotechnology* に投稿中である。

上述のように、筆者は本論文において、①フラボノイドのサブクラスのひとつであるアントシアンに AhR の DNA 結合活性抑制効果がないことを見出した。また、②フラボノイドの作用機構はそのサブクラスによって異なる事を解明した。次に、③フラボノイドが生体内で効果を発揮することを明らかにし、標的臓器へのフラボノイド量が効果の発揮に重要であることを提唱した。さらに、④フラボノイドを含む食品を摂取した場合に、吸収・代謝を受けた化合物も抑制効果を発揮する可能性を見出した。

これらのことから、本研究は、植物性食品広範に含まれるフラボノイドについて、その AhR に対する作用機構の解明を研究したものであり、食品成分の新規機能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の向井理恵は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。

## 論文内容の要旨

氏 名 向井 理恵

専 攻 生命機構科学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on suppression mechanism of flavonoid on transformation of an aryl hydrocarbon receptor

(フラボノイドによるアリール炭化水素受容体の形質転換抑制機構に関する研究)

指導教員 芦田 均

環境汚染物質であるダイオキシン類は、食品を介してヒト体内へ侵入することから社会問題のひとつになっている。ダイオキシン類は、細胞質に存在するアリール炭化水素受容体 (AhR) に結合して、これを形質転換させる。形質転換した AhR はパートナータンパク質を解離するとともに核移行し、核内で Arnt タンパク質とヘテロ 2 量体を形成することで転写因子として働く。この結果、細胞内のシグナル伝達経路が過剰に促進されることにより、様々なダイオキシン毒性の発現に繋がることが知られている。従って、AhR が関わる形質転換の調節ができればダイオキシン毒性の軽減に繋がると考えられている。これまでに、AhR の DNA 結合活性を抑制する多種多様な化合物が主に植物成分から見出されており、われわれが摂取可能な植物性食品由来の成分についても AhR の形質転換を調節する機能を有することが予想される。これらの知見について取りまとめ、第一章とした。本博士論文は、フラボノイドに着目し、AhR の形質転換抑制機構の解明を目的として纏めた。

フラボノイドは基本骨格によって 6 種に分類されており、そのうち 5 種類、フラボン、フラボノール、フラバノン、カテキンおよびイソフラボン、については AhR の形質転換の抑制効果に関する知見が報告されている。そこで第二章では、効果に関する報告がなされていないサブクラスであるアントシアンについて、ダイオキシン類の中で最も強い毒性を示す 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) に誘導される AhR の DNA 結合活性抑制効果を評価した。アントシアンは不安定な構造特徴をもつことから、アントシアンの構造維持を高速液体クロマトグラフィーで確認するとともに、効果を検証した。また、生体内代謝物として報告されている化合物についても検討することで、生体内での効果発揮の可能性についても明らかにした。その結果検討に用いたアントシアン 20 種類とその代謝物はいずれも抑制効果を示さなかった。この結果と従来の知見とを整理して、フラボノイドは、そのサブクラスごとに DNA 結合活性抑制効果の程度に違いがあることを見出した。

上述の研究結果で得られたフラボノイドのサブクラスによる抑制効果の違いを明らかにするために、AhR とフラボノイドとの相互作用について第三章で検討した。フラボンとフラボノールに属する化合物は AhR とアゴニストとの結合を他のサブクラスよりも強く阻害することを見出した。一方で、抑制効果を示すフラボノイドはいずれも AhR とパートナータンパク質との複合体に相互作用することを明らかとし、さらに効果が強いものは親和性も高いことを明らかにした。このことから、フラボノイドの効果は AhR あるいはそのパートナー分子に作用することで発揮していることを示唆した。

第四章では、フラボノイドが AhR の形質転換に及ぼす影響をマウス肝腫瘍由来 Hepa-1c1c7 細胞を用いて、分子生物学的にタンパク質レベルで検討した。抑制効果が高いサブクラスであるフラボンあるいはフラボノールに属する化合物は、パートナータンパク質の解離と核移行を抑制し AhR を不活性化状態に維持していることが判った。一方、抑制効果が弱いサブクラスであるフラバノンあるいはカテキンに属する化合物は、AhR の核移行は許すものの、DNA 結合活性を発揮するために必要なリン酸化を抑制することが判った。このように、フラボノイドのサブクラスによる抑制機構の違いを明らかにした。また、この章においてカテキンがリン酸化を抑制する原因の 1 つに Mitogen-activated protein kinase である ERK1/2 のリン酸化レベルの減少が関わっていることを初めて明らかにした。

*In vitro* で得られた食品成分の有効性を確認するためには、動物個体での評価が不可欠であるが、フラボノイドを用いて試験された報告がない。そこで、第五章では C57BL/6 マウスにフラボノール的一种であるケンフェロールを経口投与し、その効果を検証した。その結果実験動物体内で AhR のアゴニストであるメチルコランスレン(MC)が誘導する AhR の DNA 結合活性が抑制されることを明らかとした。また、ケンフェロールの効果がターゲット臓器へ取り込まれることで発揮されているか否かを確認するため、フラボノイドの排泄に関わるトランスポーターの活性を抑制するベラパミルを予め投与した実験群を作製した。摘出した肝臓に TCDD を作用させた *ex-vivo* 試験を行なったところ、ケンフェロール単独投与群肝臓よりも、ベラパミル前投与群の肝臓の方が TCDD による AhR の DNA 結合活性の上昇率が低かった。また、この抑制効果の上昇について、培養細胞を用いて確認を行なった。ベラパミルを前処理した細胞において、細胞内のケンフェロール量が増え、AhR の形質転換抑制効果が強まった。このことから、ケンフェロールの排泄阻害により、抑制効果が高まり、つまりターゲット細胞への取り込みが効果を発揮するために必要である事を解明した。

日常生活において、フラボノイドは食品に含まれた混合物として摂取している。そこで、第六章ではカテキンを含む混合物であるカカオポリフェノール抽出物(CPE)を摂取させたマウスにおいて、AhR の形質転換抑制効果を確認した。CPE は肝臓内で AhR/Arnt の 2 量体形成を阻害することで DNA 結合活性を抑制した。腸管透過モデル細胞を用いた実験から、CPE は腸管を透過することで、抑制効果が上昇することが分かった。これらのことから、フラボノイドを含む食品を摂取し、含有成分が吸収や代謝を受けた場合においても AhR の形質転換を抑制することを動物個体レベルで実証した。

このようにフラボノイドは食品として摂取した場合にも生体内で AhR の形質転換を抑制することを明らかとした。また、この効果はフラボノイドのサブクラスによって抑制メカニズムが異なることについても明らかにした。これらの結果と過去の報告とを取りまとめて第七章とした。

フラボノイドの細胞内での局在について検証した報告は少ない。付章では、フラボノイドの細胞内での局在を検出する方法について検討した。フラボノールのアグリコンとその配糖体を作用させた Hepa-1c1c7 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、アグリコンのみ細胞内での蛍光が認められた。フラボノール以外のサブクラスに属するアグリコンについては、細胞内での蛍光の放出が見られなかった。核染色を行った細胞を用いると、フラボノールの局在は核であることが判明した。このことから、蛍光顕微鏡がフラボノールアグリコンの細胞内局在を明らかにするために有効な方法であること明らかにした。