

氏名	中島 清花		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博甲第	5986	号
学位授与の日付	平成31年 3月25日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科	農生命科学 専攻	
	(学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Dietary flavonoids and their colonic catabolites as cytoprotective antioxidants against oxidative stress (酸化ストレスに対する細胞保護的抗酸化物質としての食事性フラボノイドとその腸内代謝物)		
論文審査委員	教授 田村 隆	教授 中村 宜督	教授 村田 芳行 教授 木村 吉伸
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>植物性食品に遍在するフラボノイドは様々な健康増進作用を示すことが報告されているが、その作用メカニズムは未だに完全には解明されていない。本研究では、ケルセチン配糖体の腸内代謝物及びオーロンの抗酸化作用を評価し、その作用機作を解析した。</p> <p>ケルセチン配糖体は腸内細菌叢によっていくつかの異化代謝物へと変換された後体内へと吸収されることが知られている。そこで、主要な代謝物の DPPH ラジカル捕捉活性及び SOD 様活性を比較したところ、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) が最も強力な活性を示した。DOPAC は Hepa1c1c7 細胞の第二相薬物代謝酵素群の遺伝子発現を有意に増強したことから、過酸化水素誘導細胞死に対する DOPAC の影響を評価したところ、過酸化水素処理に先立った 24 時間の DOPAC 処理は過酸化水素誘導細胞死を有意に抑制した。これらの結果より、DOPAC は第二相薬物代謝酵素の発現を増強することで、細胞内の抗酸化作用を増強させることが示唆された。次に、DOPAC の細胞内標的タンパク質の同定を行うために、copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC) を利用したタグフリープローブの開発を行った。DOPAC と 2-propyn-1-ol を縮合させ、DOPAC propargyl ester (DPE) を得た。DPE を処理した細胞から得られたライセートにビオチンアジドを加えて CuAAC 反応を行い、SDS-PAGE に供したサンプルをストレプトアビジン標識 HRP で検出したところ、複数の DPE 修飾タンパク質が検出された。そこで Keap1 抗体及び aryl hydrocarbon receptor (AhR) 抗体と DPE を用いて pull-down アッセイを行ったところ、DPE と Keap1 及び AhR の結合が確認された。以上の結果より、DOPAC は Keap1 と AhR の直接的な修飾を介した第二相薬物代謝酵素の発現誘導により、細胞内抗酸化作用を増強することが示唆された。</p> <p>代表的なオーロンであるオーレウシジン (AU) は、フロログルシノールを出発物質とした 4 段階の反応により合成し、総収量 1.4% で得ることに成功した。次に過酸化水素誘導細胞死への AU の影響を MTT アッセイにより評価したところ、AU の 16 時間前処理は過酸化水素誘導細胞死を有意に抑制した。また AU は Hepa1c1c7 細胞において第二相薬物代謝酵素の遺伝子発現を有意に増強した。これらの結果より、AU は第二相薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導することで、細胞に抗酸化力を賦与することが示唆された。</p> <p>本研究は食事性フラボノイドの生体内での抗酸化メカニズムを明らかにすることで、その健康増進作用の科学的根拠を新たに提供するものであると考えている。</p>			

## 論文審査結果の要旨

植物性食品に遍在するフラボノイドは様々な健康増進作用を示すことが報告されているが、その作用メカニズムは未だに完全には解明されていない。本研究では、ケルセチン配糖体の腸内代謝物及びオーロンの抗酸化作用を評価し、その作用メカニズムを独自のプローブを開発し、解析した。

ケルセチン配糖体は腸内細菌叢によっていくつかの異化代謝物へと変換される。そこで主要な代謝物の*in vitro*抗酸化活性を比較したところ、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) が最も強力な活性を示した。DOPACは第二相薬物代謝酵素群の遺伝子発現を増強するだけでなく、過酸化水素誘導細胞死を有意に抑制した。続いて、DOPACのクリックケミストリーを利用したタグフリープローブの開発を行い、DOPAC propargyl ester (DPE) を得た。そこでDPEを用いたpull-downアッセイを行ったところ、第二相薬物代謝酵素の発現誘導に関わる因子であるKeap1及びAhRとDPEとの結合が確認された。以上の結果より、DOPACはKeap1とAhRの直接的な修飾を介した第二相薬物代謝酵素の発現誘導により、細胞内抗酸化作用を増強することが示唆された。

さらに、代表的なオーロンであるオーレウシジン (AU) を、フロログルシノールを出発物質とした4段階の反応で合成することに成功した。AUは過酸化水素誘導細胞死を有意に抑制し、第二相薬物代謝酵素の遺伝子発現も有意に増強した。これらの結果より、AUは第二相薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導することで、細胞に抗酸化力を賦与することが示唆された。

本研究成果は、食品由来フラボノイド類による細胞保護作用の亢進について、その科学的な根拠を提供すると共に、その詳細な分子メカニズムを解明した。また、今後の研究の進展により、食品成分のもつ機能性・安全性への科学的理解に大きく貢献することが期待される。従って、本研究内容は、学術的な価値のみならず、実用に結びつく技術の礎となるものであり、本審査委員会は、本論文が博士（学術）の学位論文に値するものと判断した。