



Title	難消化性二糖によるケルセチン配糖体吸収促進機構の解明と血中ケルセチン抱合体の網羅的解析〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	田中, 誠也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13598号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74282
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Seiya_Tanaka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士 （農学）

氏名 田 中 誠 也

学 位 論 文 題 名

難消化性二糖によるケルセチン配糖体吸収促進機構の解明と
血中ケルセチン抱合体の網羅的解析

ケルセチンは、食品中に豊富に含まれるフラボノイドの一種で、タマネギには quercetin-4'-*O*-glucoside、リンゴには quercetin-3-*O*-glucoside のような配糖体の形で存在している。近年、食品成分が持つ疾病予防機能への関心が高まっており、フラボノイドなどの生理活性をもつ機能性食品素材が盛んに研究されている。ケルセチンの生理作用として、抗ガン作用・抗炎症作用・抗動脈硬化作用など多数報告されているが、ケルセチンの生体内利用能（バイオアベイラビリティ）が極めて低いことが問題である。過去の研究で、難消化性二糖の一種 difructose anhydride III (DFAIII)が細胞間経路（タイトジャンクション）を介してケルセチン配糖体の吸収を促進させることが報告されている。そこで、本研究では他の難消化性二糖として、glucose と galactose が α -1,6 結合した melibiose を用いて、ケルセチン配糖体の吸収促進作用を調べることを 1 つ目の目的とした。

ケルセチンが体内に吸収されると、肝臓、小腸、腎臓で硫酸抱合・グルクロン酸抱合、およびメチル化反応を受け、血中では主に抱合体として存在する。近年、抱合体自体が生理作用をもち、その抱合化部位や抱合化の種類により生理作用が異なることが報告されている。本研究では、各ケルセチン抱合体を、従来行われていた酵素による脱抱合処理をせず直接 LC/MS/MS 分析し、吸収後の代謝物組成を網羅的に解析することを二つ目の目的とした。ケルセチンとケルセチン配糖体(quercetin-3-*O*-glucoside, Q3G)は極めて水に難溶であるため、本研究では、水溶性を高めた quercetin-3-*O*-glucoside mixture (Q3GM)を用いた。Q3GM は Q3G に酵素処理により glucose を 1-7 分子結合させた混合物である。

1. 難消化性二糖 melibiose によるケルセチン配糖体吸収促進作用

ケルセチン配糖体吸収における melibiose 添加の影響を調べるために、ラット小腸に易水溶性ケルセチン配糖体 Q3GM および melibiose を投与し、*in situ* 結紮ループ吸収試験を行った。その結果、melibiose 添加群は control 群と比較して、有意に quercetin aglycone やケルセチン抱合体血中濃度が高かった。過去の研究において難消化性二糖の一種 DFAIII は、細胞間経路の吸収を介して血中ケルセチン配糖体(Q3G)の濃度を上昇させたが、本研究で用いた melibiose は、血中の Q3G 濃度には影響せず、quercetin aglycone やケルセチン抱合体の濃度は control 群と比較すると有意に高値を示した。このことは、melibiose が DFAIII とは異なる機構でケルセチンの吸収を促進させることを示唆した。

Melibiose 添加によるケルセチンの吸収促進機構を探るため、管腔内消化を模倣した小腸粘膜ホモジネートを用い、ケルセチン配糖体の加水分解反応における melibiose の影響を調べた。その結果、melibiose が Q3G から quercetin への分解を促進させていることが示唆された。その作用は lactase phlorizin hydrolase (LPH)の基質である lactose や cellobiose により阻害された。このことから LPH が Q3G から quercetin への分解に関わっており、melibiose が LPH の活性を促進させることが示された。過去の研究で報告されているケルセチン吸収促進機構は、ケルセチンの可溶化促進、タイトジャンクションを介した細胞間経路の吸収促進であるが、melibiose は LPH の活性促進という新たな作用機序でケルセチンの吸収を促進させていることを明らかにした。

2. ケルセチン抱合化反応における腸の寄与とその組織特異性解析

生理的条件下、腸におけるケルセチンの抱合化反応を評価するため、覚醒下ラットに Q3GM を経口投与後、経時的に門脈血と中心静脈血を同時に採取し、血中代謝物の解析を行った。門脈血から中心静脈血中濃度を差し引いた値 Porto-venous difference (P-V difference) は、腸における抱合化と吸収強度を表す。算出した P-V difference は、グルクロン酸抱合体が硫酸抱合体やメチル化体と比較すると、有意に高かった。このことは腸上皮細胞における抱合化は、グルクロン酸抱合が主要であることを示している。また腸におけるグルクロン酸抱合体の位置選択性は 7-→3'-→3-→4'-O-glucuronide であった。一方、硫酸抱合体の位置選択性は、腸とその他の組織でほぼ同様であり、投与後 30 分では 3'-→4'-O-sulfate であったのに対し、投与後 240 分では 4'-→3'-O-sulfate となった。このことは、血中から 3'-sulfate が排泄されやすいこと、もしくは 4'-sulfate が排泄されづらいことを示唆した。

さらに抱合化酵素を含む S9 protein を用いた *in vitro* 試験により、小腸・肝臓・腎臓中のグルクロン酸抱合、硫酸抱合の位置選択性を確認した。グルクロン酸抱合については、各組織で選択性の違いは観察されず、7-, 3'-が大勢を占め、3-, 4'-glucuronide はわずかであった。また、硫酸抱合については、小腸と肝臓では 3'-sulfate が大勢を占めたが、腎臓では 7- or 3'-sulfate が高い比率で生成された。またどの組織においても 4'-sulfate の生成率は低かった。これらの結果より、ラット *in vivo* 試験において、ケルセチン配糖体投与 240 分後で観測された 4'-sulfate の高い存在率は、各組織における抱合化の位置選択性では説明できず、生成した抱合体の胆汁や尿中への排泄率が、抱合化部位により異なる可能性が示唆された。

3. ケルセチン配糖体摂食ラットにおける血中ケルセチン抱合体の網羅的解析

水溶性ケルセチン配糖体 Q3GM を摂食させたラットの血漿を、ケルセチン関連物に特異的な UV370 nm の波長で分析したところ、二つの主要な代謝物が検出された。そこで血漿からこれら二つの代謝物を分取精製し、両代謝物について抱合化部位も含めた化合物同定を行った。二つの代謝物はそれぞれ quercetin-7-O-glucuronide-4'-sulfate (QGS) と isorhamnetin-7-O-glucuronide-4'-sulfate (MQGS) であると同定し、これら単離物を血中濃度測定のための標準品とした。これら2つの多抱合体に加え、組み換え酵母により作成された各種ケルセチン抱合体の標準品(富山県立大学、生城らより提供)を用いて、ケルセチン抱合体の網羅的定量解析を行った。本試験では、Q3GM を摂食させたラットの尾静脈血を摂食開始後 1, 3, 12 日目に採取し、得られた血漿中の全ケルセチン抱合体を LC/MS/MS で解析した。その結果、23 種のケルセチン抱合体ピークを検出し、そのうち標準品が得られている 16 種を定量した。血中の QGS と MQGS は 1 日目から 12 日目にかけて常に主要な代謝物であり、これら二つの多抱合体の合計は、血中ケルセチン代謝物総量の 80% 以上を占めた。このことからケルセチン配糖体摂取後の血中ケルセチン代謝物は、ほとんどが QGS, MQGS のようなヘテロ多抱合体であり、これらは投与後 24 時間以内という極めて早いタイミングで生成され、血中に高い濃度で維持されることが明らかとなった。その抱合化部位はグルクロン酸抱合が 7 位、硫酸抱合が 4' 位と限定的であった。しかし、なぜ QGS や MQGS のような多抱合体が血中に多量に存在するか、また、その抱合化部位が極めて限定的である理由は不明で、さらなる研究が必要である。血中の主要な代謝物である QGS や MQGS の生理作用も調べていく必要がある。

以上より、難消化性二糖 melibiose は、これまで報告されていない LPH によるケルセチン配糖体の加水分解促進という作用機序により、ケルセチンの吸収を促進させることを明らかにした。また、吸収後に体内でおこる抱合化については、*in vivo*, *in vitro* 試験により、腸ではグルクロン酸抱合が主要であり、メチル化や硫酸抱合は肝臓や腎臓等の組織で主に起こることを明らかにした。さらに血中ケルセチン代謝物の網羅的分析法を確立し、ケルセチン配糖体摂取後には、QGS や MQGS のような限定されたヘテロ多抱合体が主要な代謝物となり、血中に高濃度で長期間維持されることを見出した。