



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

氏名 田中誠也

審査担当者	主査	特任教授	原 博
	副査	教 授	木村淳夫
	副査	講 師	比良 徹

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

本論文は、和文 96 頁、図 37、表 8、5 章からなり、参考論文 3 編が添えられている。

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。ケルセチンは、食品中に豊富に含まれるフラボノイドの一種で、抗ガン作用・抗炎症作用・抗動脈硬化作用など、多数の生理作用が報告されている。しかし、ケルセチンの生体内利用能（バイオアベイラビリティ）は極めて低く、これらの生理作用を発揮することができない。食品成分により、ケルセチン配糖体の吸収を促進させることができれば、ケルセチンの生体内利用能を増強させることが可能となる。また、ケルセチンが体内に吸収されると、肝臓や小腸により薬物代謝の第二相反応である抱合化やメチル化を受け、体内では主に抱合体やメチル化体として存在する。最近の報告で、抱合体の種類や抱合化部位により、生理作用が異なることが報告されている。本研究では、LC/MS/MSを用いて、ケルセチン配糖体摂取後の血中ケルセチン抱合体の種類や位置を別々に定量し、血中ケルセチン抱合体を網羅的に分析することを目的とした。

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

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、ケルセチン配糖体吸収におけるmelibiose添加の影響を調べた。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の血中濃度が高かった。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の濃度を上昇させたが、本研究で用いたmelibioseは、血中の配糖体濃度には影響せず、quercetin aglyconeやケルセチン抱合体の濃度を上昇させたことから、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が示唆された。さらに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て、ケルセチン配糖体の加水分解反応におけるmelibioseの影響を調べたところ、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。本研究は、melibiose

による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

ケルセチンは肝臓や小腸で抱合化をうけ、血中では主に抱合体として存在する。フラボノイドの主要な代謝部位は肝臓であるが、腸上皮細胞においても抱合化されることが報告されている。しかし、*in vivo*においてケルセチンの抱合化が腸においてどれくらい起こっているかは明らかにされていない。本研究では覚醒下ラットという生理的条件下で、腸におけるケルセチンの抱合化反応を評価した。ラットにケルセチン配糖体を経口投与後、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た。さらに抱合化酵素を含むS9protein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。

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

ケルセチンは体内に吸収されると主に抱合体として血中に存在する。抱合体の分析法としては、脱抱合処理により抱合体総量として定量する手法が広く用いられてきた。しかし、この手法では抱合体の種類や位置を調べることができない。本研究では、LC/MS/MSを用いて抱合体を脱抱合せずに直接測定する手法を検討した。

水溶性ケルセチン配糖体Q3GMを摂食後、1, 3, 12日目のラット尾静脈採取し、得られた血漿中の全ケルセチン抱合体をLC/MS/MSで網羅的に解析した。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。1日目から12日目にかけて2つの主要な代謝物が存在し、それはグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体がともに結合したヘテロ抱合体であり、quercetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate (QGS)とisorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate(MQGS)であると同定された。QGSとMQGS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。

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。

よって、審査員一同は、田中 誠也が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。