



Title	ケルセチン高含有タマネギから単離同定したピネリン酸による核内受容体PPAR α / γ 活性化に関する研究
Author(s)	土居, 幹生
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14385号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14385
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81168
Type	doctoral thesis
File Information	Doi_Mikio.pdf



ケルセチン高含有タマネギから単離同定した
ピネリン酸による核内受容体 **PPAR α / γ** 活性化
に関する研究

北海道大学 大学院農学院
応用生物科学専攻 博士後期課程

土居 幹生

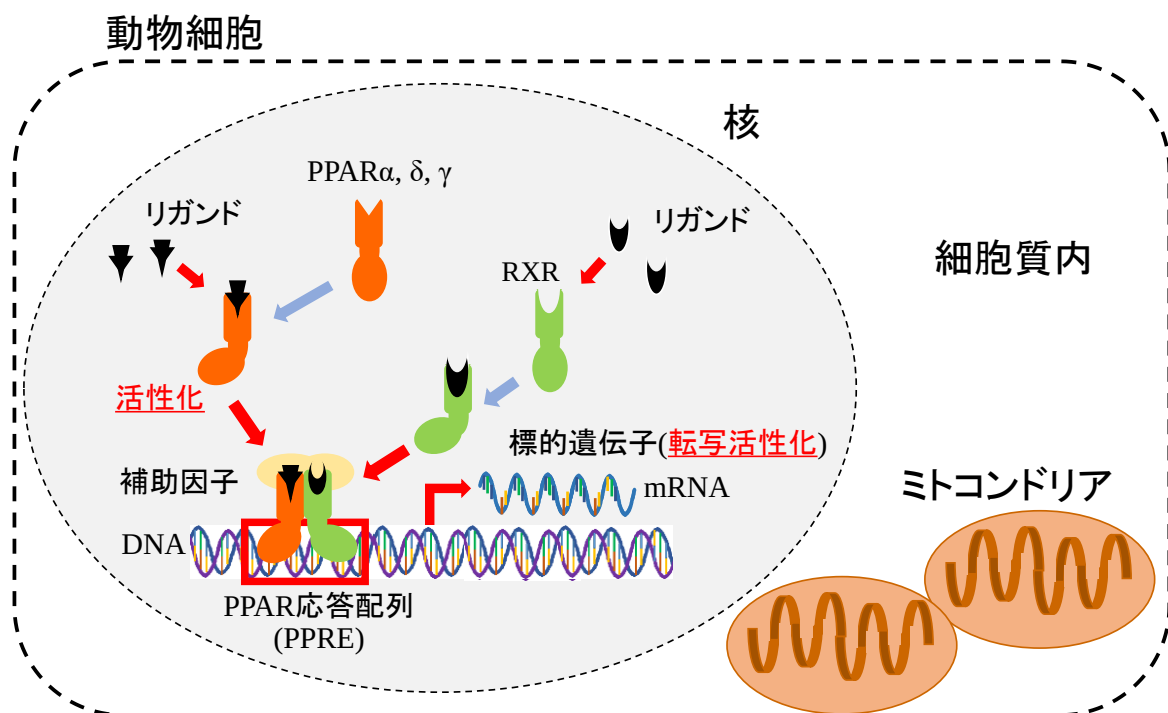
目次

第1章 序論	…1
第2章 本論	…7
2-1 タマネギ抽出物による PPAR (α , δ および γ) 活性化の評価	…7
2-2 PPAR γ を活性化する化合物の単離	…10
2-3 ピネリン酸の構造決定	…14
2-4 ピネリン酸による PPAR γ 活性化の評価	…20
2-5 ピネリン酸による PPAR α 活性化の評価	…22
2-6 他の同定した化合物	…24
第3章 考察	…28
3-1 ピネリン酸の生合成経路と生物活性	…28
3-2 ピネリン酸とその立体異性体における生物活性の比較	…32
第4章 結論	…43
第5章 材料と方法	…44
引用文献	…57
論文目録	…65
謝辞	
付録	

第1章 序論

近年、人々の食生活に対する健康志向の高まりにより、食品の機能性成分に対する注目が集まっている。タマネギは野菜の中でも健康に有益な機能性物質を多く含む野菜の一つである[1]。ケルセチンはタマネギに比較的多く含まれるフラボノールの一種であり、抗酸化作用と抗炎症作用を有することが知られている[2][3]。現在、ケルセチン高含有のタマネギが品種改良により作成され、市場で流通している[4]。この様なケルセチン高含有のタマネギを摂取することで、ヒトの健康に有益な作用を与えるどうかについてコホート試験が行われ、脂質代謝、肥満、肝機能の改善に有益であることが示唆された[5]。

ケルセチン[6]とその配糖体[7]は、ヒトの核内受容体である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) のリガンドとして機能することが知られている[8][9][10]。ヒトの核内受容体は48の遺伝子にコードされ、その一つのPPARは、脂質および糖代謝に関連する遺伝子の発現を調節する転写因子として作用する[8][11][12]。リガンドがPPARに結合し活性化すると、活性化したPPARがDNA上にあるPPAR応答配列 (PPRE) を認識する[8][11]。活性化したPPARは同じ核内受容体の1種である Retinoic acid receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し mRNA の転写を介して、様々な遺伝子の発現を変動させる (Trans-activation) [8][11](図1)。



Trans-activation= (PPAR活性化→転写活性化)⇒PPAR活性化

図 1 リガンドにより活性化した PPAR α , δ , γ は DNA の PPAR 応答配列を認識し RXR とヘテロダイマーを形成することで、脂質代謝や糖代謝に関わる標的遺伝子の転写を活性化する

PPAR は α , δ , γ の 3 つのアイソフォームがあるが、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる活性化の評価では、ケルセチンは PPAR α を強く活性化しすることが報告されている[6]。PPAR α の活性化は、肥満の糖尿病患者の脂肪酸代謝を高め、脂質の蓄積を減らす効果がある[11][13]。一方でケルセチンとその配糖体は PPAR γ をほとんど活性化しないことが知られている[7][10]。PPAR γ は脂肪組織で高度に発現し、脂

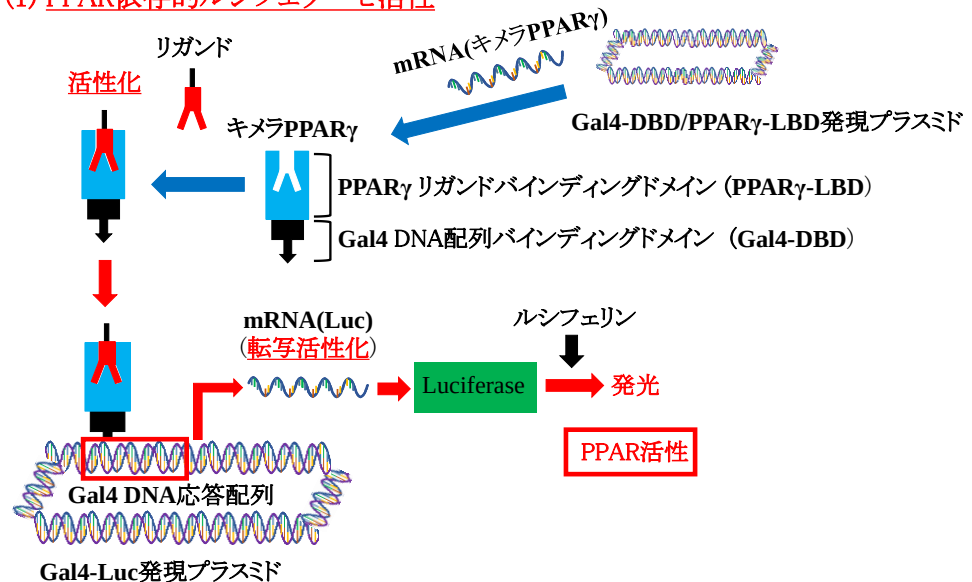
肪生成とインスリン感受性を調整し、2 型糖尿病患者の血糖値を下げるための治療薬の薬剤標的となっている[8] [14]。

本研究では、まずケルセチン高含有タマネギの水抽出液についてルシフェラーゼリガンドアッセイで PPAR の活性化を評価した。その結果、水抽出物は PPAR α と γ を強く活性化することを発見した。ケルセチンとその配糖体化合物は、PPAR γ をほとんど活性化しないことが知られていることから[7] [10]、ケルセチンとその配糖体化合物以外の PPAR γ を活性化するリガンドが含まれていると考えた。そこで本研究では、ケルセチン高含有タマネギの水抽出液から PPAR γ を活性化するリガンドを単離同定することを目的とした。

尚、本研究のルシフェラーゼリガンドアッセイにおいて PPAR の活性化とは、リガンドにより活性化した PPAR がプラスミド DNA の Gal4 DNA 結合ドメインを認識し、標的遺伝子のルシフェラーゼ遺伝子の転写を活性化させる Trans-activation をいう。また本研究の PPAR の活性とは、ルシフェラーゼリガンドアッセイにおいて、PPAR の活性化により翻訳されたルシフェラーゼの酵素活性による発光強度を指す。

ルシフェラーゼリガンドアッセイの概略図を図 2 に示す[15]。

(1) PPAR依存的ルシフェラーゼ活性



(2) PPAR非依存的ルシフェラーゼ活性

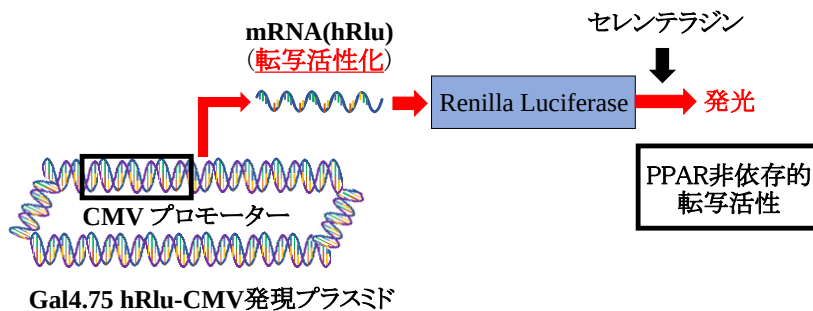


図 2 ルシフェラーゼリガンドアッセイ

In vitro で PPAR の活性化を評価する場合、ヒトの生体内で起こる PPAR と RXR のヘテロダイマーの形成や、補助因子との相互作用など複雑な機構を再現するのは難しい。そこで PPAR の活性化と転写活性を定量的に評価する方法として、キメラ PPAR 遺伝子を導入したプラスミドベクターと、キメラ PPAR に応答する DNA 配列を有しその下流にルシフェラーゼ遺伝子導入したプラスミドベクター、細胞内の恒常的な転写に対応する遺伝子構成的発現ベクターを有しその下流に発光波長の異なるルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミドベクターの3つを同時に動物細胞にトランスフェクションするルシフェラーゼリガンドアッセイ (デュアルルシフェラーゼアッセイ) がある (図2)。本アッセイ方法は、リガンドと PPAR の結合による活性化を評価できる点、PPAR の PPAR 結合ドメイン部分を、Gal4-DNA 結合ドメインに変えたキメラ PPAR を作成し使用することで、RXR とヘテロダイマーを形成することなく、PPAR の転写因子としての機能を発揮できる点で優れている。また Gal4-DNA 結合配列の下流に標的遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を導入することで、PPAR の活性化による転写活性をルシフェラーゼの酵素活性による発光強度として定量化できる (PPAR 依存的ルシフェラーゼ活性)。加えて、動物細胞内の転写活性の内
部標準として、恒常的に発現する遺伝子構成的発現プロモーター (CMV) の下流に発光波長の異なるルシフェラーゼ遺伝子 (ウミホタルルシフェラーゼ)を導入し、動物

細胞に同時にトランスフェクションすることで、動物細胞のコンディションによる転写活性のバラツキを補正することができる（PPAR 非依存的ルシフェラーゼ活性）。本研究におけるアッセイの活性値は、以下の式で表した。

活性値（核内受容体依存的な遺伝子の転写活性）＝

Gal4-Luc (ホタルルシフェラーゼ) 発光値 / hRlu-CMV (ウミシイタケルシフェラーゼ) 発光値

第2章 本論

2-1 タマネギ抽出物による PPAR (α , δ および γ) 活性化の評価

タマネギ水抽出物の核内受容体 PPARs (α , δ および γ) 活性化能を評価するために、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる評価を行った。ルシフェラーゼリガンドアッセイを行った結果、タマネギ水抽出物は PPAR α および PPAR γ を活性化し、また濃度依存的に活性が増加した。一方で PPAR δ の活性化は見られなかった (図 3)。

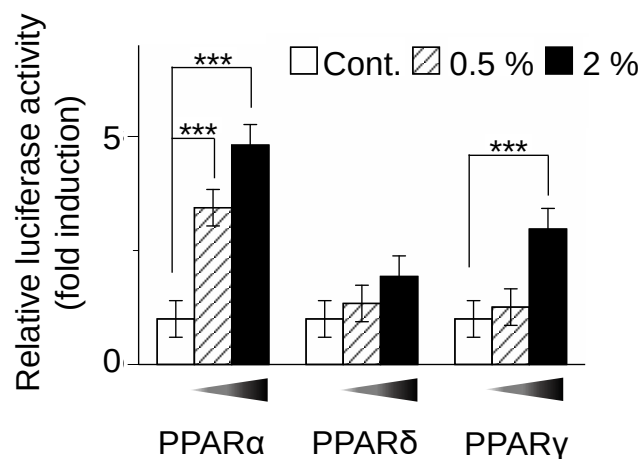


図 3 ケルセチン高含有タマネギの水抽出物における PPAR α 、 δ 、 γ 活性化の評価

ケルセチン高含有タマネギの凍結乾燥サンプル (4 g) を、水 (40 mL)、4°C で 1 日間抽出した。水溶液を濾過して水抽出物 (100%) を得た。発現ベクターをトランスフェクションした CV-1 細胞に、水抽出物を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cont.) (10% (v/v) 水) に対する誘導比で示した。データは (n=3 の平均相対値 $\pm$ 標準偏差 (SD)) で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$

これまでの研究からルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPAR の活性化評価では、ケルセチンによって PPAR α が活性化し高い活性を示すことが報告されている[6]。一方でいくつかの研究では、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPAR γ 活性化の評価では、ケルセチン[10]、ケルセチン-4'-O-グルコシドおよびケルセチン-3,4'-O-ジグルコシドが僅かに PPAR γ を活性化することが報告されている[7]。そこで、本ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPAR γ 活性化の評価において、ケルセチン、ケルセチン-4'-O-グルコシド およびケルセチン-3,4'-O-ジグルコシドが、PPAR γ を活性化するか否かの検討を行った。ポジティブコントロールとして PPAR γ の作動薬であるピオグリタゾンを使用した。

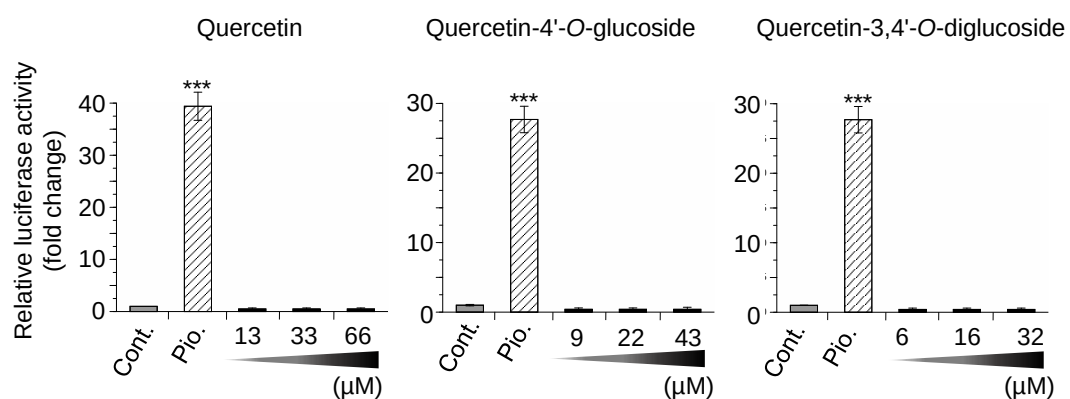


図4 ケルセチン、ケルセチン-4'-O-グルコシド およびケルセチン-3,4'-O-ジグルコシドにおける PPAR γ 活性化の評価

発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞に、ケルセチン、ケルセチン-4'-O-グルコシドおよびケルセチン-3,4'-O-ジグルコシドまたはピオグリタゾン (Pio) (10 μ M) を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cont.) (0.5% (v/v) DMSO) に対する誘導比で示した。データは (n=3 の平均相対値 $\pm$ 標準偏差 (SD)) で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$ 。

その結果、図 4 に示したようにケルセチン、ケルセチン-4'-O-グルコシド およびケルセチン-3,4'-O-ジグルコシドは、PPAR γ の活性化を示さなかった。この結果より、タマネギ水抽出物には、PPAR γ を活性化を示す他の生理活性化合物が含まれていると示唆された。

2-2 PPAR γ を活性化する化合物の単離

タマネギ水抽出物に含まれる PPAR γ を活性化する化合物を単離するために、カラムクロマトグラフィーによる活性化化合物の分離精製を行った。精製スキームを図5に示す。

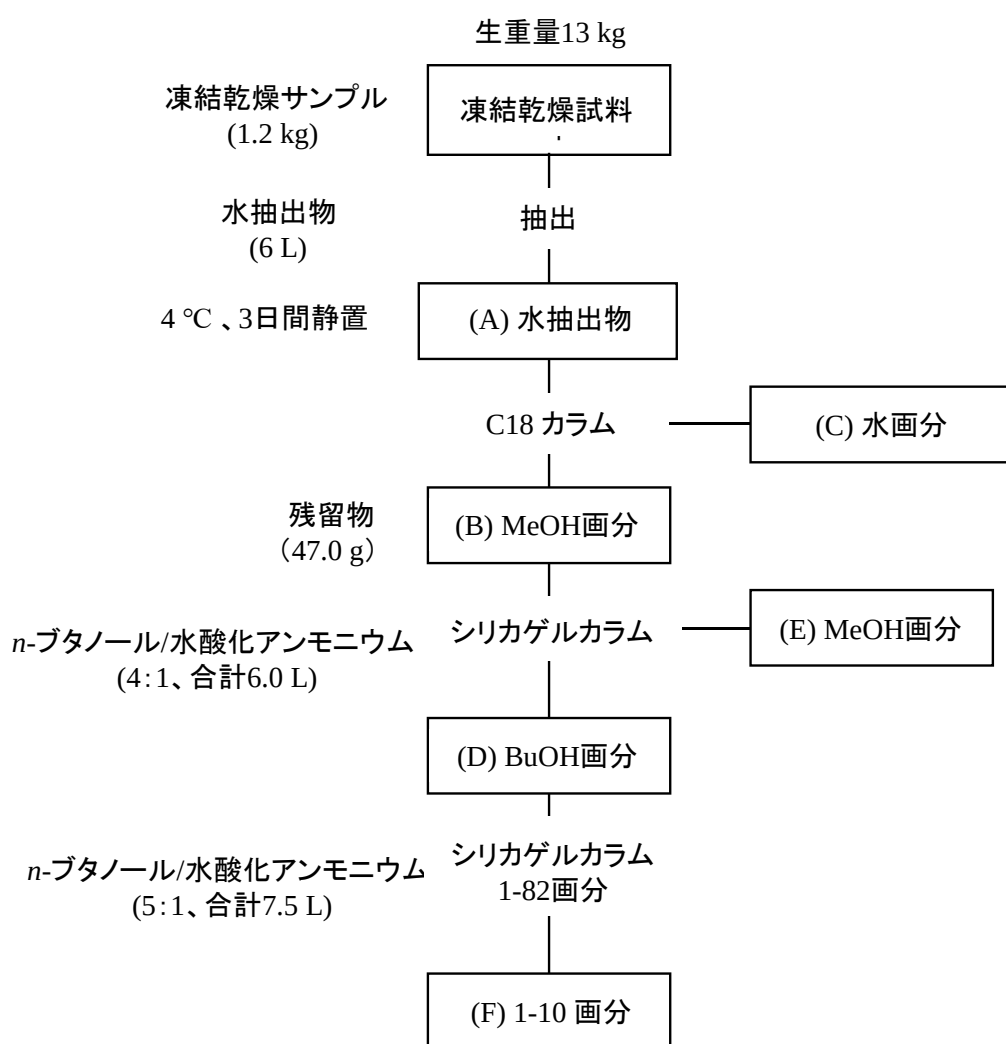


図5 ケルセチン高含有タマネギ水抽出物の分画のフロー図

生重量 13 kg のタマネギをスライスし、大型凍結乾燥機で凍結乾燥した。得られた凍結乾燥サンプル(1.2 kg) を、超純水 (8 L) に浸漬し、4°C で 3 日間静置による抽出を行った。抽出液はガーゼろ過し、得られたろ液をブフナー漏斗でろ過した。ろ液を水抽出物 (6 L) ((A) 水抽出物) (Figure 4A) とした。(A) 水抽出物 (6 L) を C18-COSMOSIL カラムクロマトグラフィーに供し、超純水 ((C) 水画分) で洗浄した。次に、C18-COSMOSIL カラムに吸着した物質をメタノール (MeOH) で溶出し、MeOH 画分を得た ((B) MeOH 画分)。MeOH 画分を濃縮後、残留物 (47.0 g) を *n*-ブタノールに溶解させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-ブタノール (*n*-BuOH) / 水酸化アンモニウム (4 : 1、合計 6.0 L) で溶出した ((D) BuOH フラクション)。次に、シリカゲルカラムに吸着した物質を MeOH ((E) MeOH 画分) で溶出した。ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPAR γ の活性評価では、(B) MeOH (図 5B) および(D) BuOH (図 5D) の画分が PPAR γ を活性化し、高い活性を示した。一方で糖を含む (C) 水画分 (図 5C) とケルセチン-4'-*O*-グルコシド およびケルセチン-3,4'-*O*-ジグルコシドを含むと想定される (E) MeOH 画分は、ほとんど PPAR γ を活性化しなかった。そこで (D) BuOH 画分を濃縮し、残留物 (3.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-BuOH /水酸化アンモニウム (5 : 1、合計

7.5 L) で溶出した。得られた合計 84 の画分を順相シリカゲル TLC プレートにスポットし、*n*-BuOH /28%アンモニア水 (5 : 1) で展開した。

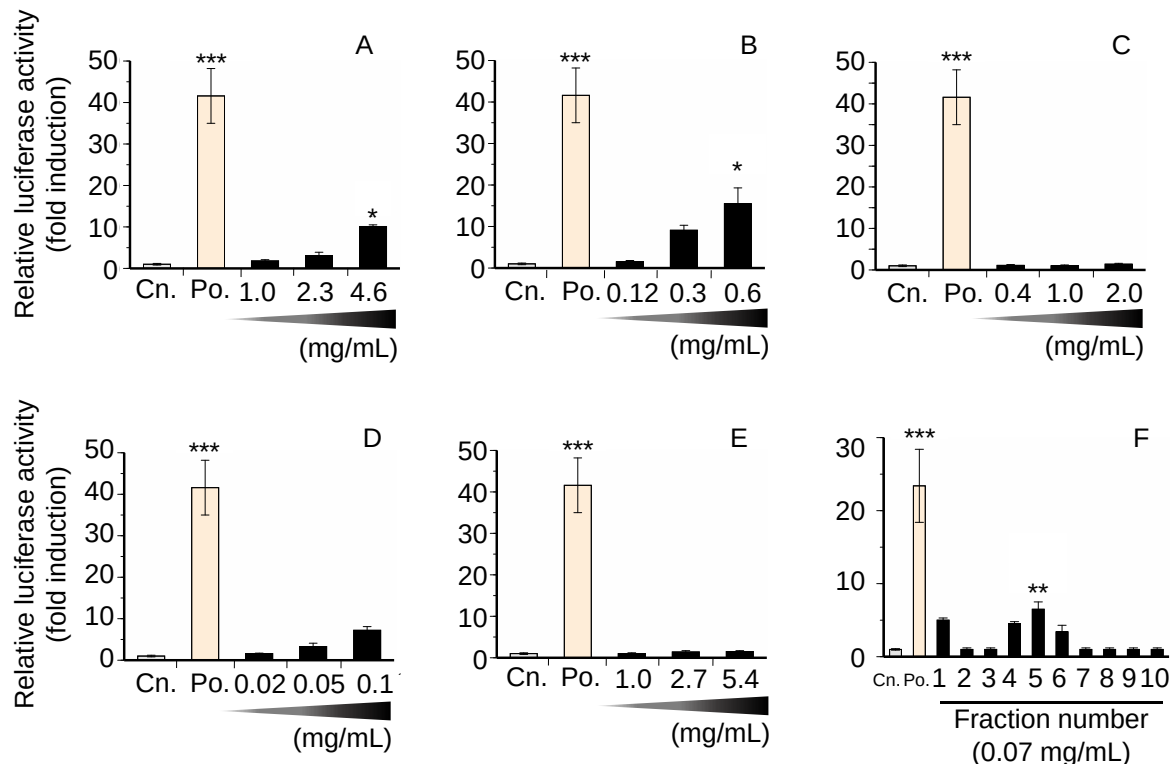


図 6 各画分に対する PPAR γ 活性化の評価

発現プラスミドをトランスランスフェクションした CV-1 細胞に、**A** (A) 水抽出物、**B** (B) メタノール画分 (C18 カラムに吸着された物質)、**C** (C) 水画分 (C18 カラムを通過した物質)、**D** (D) ブタノール画分 (シリカゲルカラムを通過した物質)、**E** (E) メタノール画分 (シリカゲルカラムに吸着した物質)、**F** (F) 統合画分 (1-10) (終濃度 0.07mg / mL)、またはピオグリタゾン (Po.) (10 μ M) を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cn.) (0.5% (v/v) DMSO または 10% (v/v) 水)) に対する誘導比で示した。データは (n =3 の平均相対値 $\pm$ 標準偏差 (SD)) で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$

展開後、TLC プレートに、リンモリブデン酸、バニリン硫酸、ニンヒドリン溶液を用いて呈色した。呈色結果の TLC プロファイルに基づいて、得られた 84 の画分を 10 の画分 (F)10 の画分)、画分 1 から画分 10 に統合した。ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPAR γ の活性化の評価では、Fraction (Frac) 1、Frac4、Frac5、および Frac6 による、PPAR γ の活性化を確認した (図 6F)。精製量が多かった Frac5 (414 mg)に含まれる化合物のプレパラティブ TLC による単離精製を進めた。展開溶媒 CHCl₃/ MeOH /28%アンモニア水 (10 : 1 : 0.1) を使用し、リンモリブデン酸による呈色を指標にシリカゲル (R_f =0.30) を収集し、化合物 **1** (60 mg) を白色固体として得た。

2-3 ピネリン酸の構造決定

化合物 **1** の HRESIMS 分析の結果、 m/z 353 に $[M+Na]^+$ の疑似分子イオンピークが確認され、精密分子量の測定結果からその分子式は $C_{18}H_{34}O_5$ であると決定した。化合物 **1** の化学構造を決定するために ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR による観測を実施し、COSY、HMQC、HMBC 及び NOESY による二次元 NMR による相関を確認した。 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは、 δ_H 2.16 (2H、t、 $J=7.6$) にカルボニル基の α 位のプロトン、1 組のオレフィンの存在を示す 2 つのプロトンのシグナル、 δ_C 180.8 にカルボキシル炭素のシグナルが存在し、不飽和長鎖脂肪酸に特長的な吸収を示した (図 1S)。また δ_H 5.70 (1 H、dd、 $J=15.5$ 、H-10)、5.66 (1 H、dd、 $J=15.6$ 、H-11)、 δ_C 129.7 (C-10)、135.2 (C-11) に二重結合の存在を示すシグナル、 δ_H 1.55 から 0.9 までの脂肪族プロトンを示すシグナルが確認され、推定を支持するものであった (表 1)。 δ_H 4.03 (1 H、ddd、 $J=6.2$ 、H-9)、3.90 (1 H、dd、 $J=5.9$ 、H-12)、および 3.40 (1 H、ddd、 $J=5.7$ 、H-13) に 3 つの水酸基の存在を示すメチンプロトンのシグナルと、 δ_C 22.3 から 37.2 までの 11 個のメチレン炭素のシグナルを確認した。また、C10、C11 間に想定されるオレフィン構造に由来するプロトン間の結合定数値 ($J_{10,11} = 15.6$ Hz) と、H-10 と H-12 の NOESY の相関、H-10 と H-11 との NOESY 相関が観測されないことから (図 14S)、H-10 と H-11 の間の二重結合が *E* 配置であると決定し

た。化合物 **1** の平面構造を(10*E*)-9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic acid (図 7) のように推定した。COSY から図 7 に示すプロトン同士の相関が確認され (図 3S)、HMBC から表 1 に示す相関が確認され推定構造と矛盾なく帰属した (図 9S)。

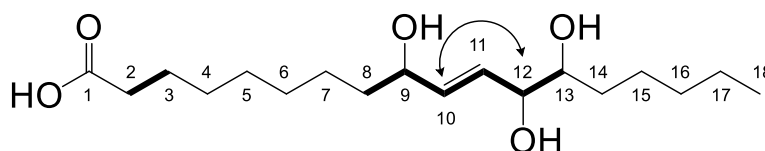


図 7 化合物 **1** に対する COSY (太線) と NOESY (矢印)

推定の平面構造を有する化合物に関しては報告があった[16]。この報告は存在し得る 8 つの化合物をすべて合成し、化学構造について言及したのもであった[16]。

しかしながら、上記報告はアンモニウム塩としての解析であった。そこで、化合物 **1** をメタノールに溶解し、アンモニア水溶液より発生させたアンモニアガスをもちいて、バブリングを施し化合物 **1** アンモニウム塩を調整した。本メタノール溶液を濃縮後、 ^1H 及び ^{13}C -NMR に供した。その結果、報告の (9*S*,12*S*,13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid (ピネリン酸)と ^1H 、 ^{13}C データの良い一致を確認した[16]。よって、化合物 **1** の平面構造を図 7 のように決定した。以降にはタマネギより

単離した化合物 **1** の絶対配置の決定について記述するが、この際は、化合物 **1** のアンモニウム塩を用いた。なお、化合物 **1** の機器分析結果を表 1 に示した。また、化合物 **1** のアンモニウム塩の ^1H 、 ^{13}C データを表 2 に示した。

表 1. 化合物 **1** の NMR スペクトルデータ (500 MHz, CD_3OD)

positon	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC	NOESY
1	180.8, CO			
2	37.0, CH_2	2.16, t (7.6)	1, 3	3
3	25.1, CH_2	1.58, dt (6.7, 6.8)	1, 2	2
4	29.3, CH_2	1.55-1.24, m		
5	29.3, CH_2	1.55-1.24, m		
6	29.2, CH_2	1.55-1.24, m		
7	25.2, CH_2	1.55-1.24, m		
8	37.2, CH_2	1.55-1.48, m	6, 7, 9, 10	9, 10, 11, 12, 13
9	71.6, CH	4.03, ddd (6.2, 5.1, 5.0)	7, 8, 10, 11	8, 10, 11
10	129.7, CH	5.70, dd (15.5, 5.5)	8, 9, 11, 12	8, 9, 12, 13
11	135.2, CH	5.66, dd (15.6, 5.8)	9, 10, 12, 13	8, 9, 12, 13
12	75.1, CH	3.90, dd (5.9, 3.1)	10, 11, 13, 14	8, 10, 11, 13
13	74.4, CH	3.40, ddd (5.7, 5.7, 2.7)	11, 12, 15	8, 10, 11, 12
14	32.2, CH_2	1.55-1.24, m		
15	26.1, CH_2	1.55-1.24, m		
16	31.7, CH_2	1.55-1.24, m		
17	22.3, CH_2	1.55-1.24, m		
18	13.1, CH_3	0.90, t (6.9)	16, 17	

表 2. 化合物 1 アンモニウム塩の NMR スペクトルデータ (500 MHz, CD₃OD)

position	δ_C type	δ_H (J in Hz)	HMBC	NOESY
1	176.1, CO			
2	34.8, CH ₂	2.30, t (7.4)	1, 3	3
3	26.0, CH ₂	1.59, dt (7.0, 7.0)	1, 2	2
4	30.5, CH ₂	1.42-1.28, m		
5	30.3, CH ₂	1.42-1.28, m		
6	30.2, CH ₂	1.42-1.28, m		
7	26.5, CH ₂	1.42-1.28, m		
8	38.3, CH ₂	1.55-1.48, m	6, 7, 9, 10	9, 10, 11, 12, 13
9	73.0, CH	4.04, ddd (6.2, 5.5, 5.9)	7, 8, 10, 11	8, 10, 11
10	131.1, CH	5.70, dd (15.6, 5.4)	8, 9, 11, 12	8, 9, 12, 13
11	136.5, CH	5.68, dd (15.6, 5.6)	9, 10, 12, 13	8, 9, 12, 13
12	76.5, CH	3.89, dd (5.8, 5.1)	10, 11, 13, 14	8, 10, 11, 13
13	75.8, CH	3.40, ddd (5.8, 5.8, 2.7)	11, 12, 15	8, 10, 11, 12
14	33.6, CH ₂	1.42-1.28, m		
15	26.7, CH ₂	1.42-1.28, m		
16	33.1, CH ₂	1.42-1.28, m		
17	23.7, CH ₂	1.42-1.28, m		
18	14.4, CH ₃	0.90, t (7.0)	16, 17	

これまでの報告から(10*E*)-9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic acid のアンモニウム塩の立体異性体の絶対配置と ^1H NMR スペクトルパターンの関係が詳細に報告されている。特に絶対配置の違いによって C-10、C-11 および C-13 位置のプロトンシグナルに特徴的な変化が現れることが知られている[16]。C-12–C-13 diol の位置に注目した場合、シンジオールの H-13 プロトンは、アンチジオールの H-13 プロトンよりも高磁場シフトする (表 3)。化合物 **1** のアンモニウム塩の ^1H NMR スペクトルデータは、上記の立体異性体と ^1H NMR スペクトルパターンの関係から、(9*S*,12*S*,13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid (ピネリン酸) のデータと良く一致すること、また化合物 **1** の比旋光度値 ($[\alpha]_D^{25}$ -8.8 (c 1.0, MeOH)) が、報告されたピネリン酸のデータと一致することから[17]、化合物 **1** の構造は、その絶対配置を含めてピネリン酸として同定した[16] (図 8)。

表 3. 化合物 **1** と(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid の立体異性体における絶対配置と ^1H -NMR スペクトルデータ及び比旋光度の関係

absolute configuration	C10	C11	C13	$[\alpha]_D$
compound 1	5.70	5.68	3.40 ^(HF)	-8.8
(9 <i>S</i> , 12 <i>S</i> , 13 <i>S</i>)	5.73	5.68	3.41 ^(HF)	-8.1
(9 <i>S</i> , 12 <i>R</i> , 13 <i>R</i>)	5.70	5.64	3.40 ^(HF)	+29.8

(HF): H13 プロトンは syn-diol の場合 anti-diol よりも高磁場シフトする。 ^1H -NMR スペクトルデータ及び比旋光度は先行文献を参照[17] [16]。

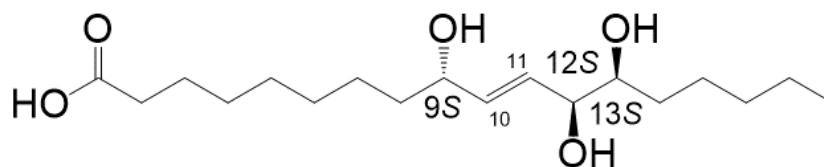


図8 ピネリン酸の化学構造

2-4 ピネリン酸による PPAR γ 活性化の評価

ピネリン酸は免疫作用を増強させるアジュバントの機能を有することが知られ、全合成や *in vivo* での詳細な研究が行われている。しかし、これまでの報告では、ピネリン酸が核内受容体 PPAR のリガンドとして機能し、活性化するという報告はなかった。そこでピネリン酸が核内受容体 PPAR を活性化するか否かを調べるために、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる PPAR γ 活性化の評価を行った。その結果、図 9A に示すようにピネリン酸は PPAR γ を活性化し、また濃度依存的に活性を上昇させ 1000 μ M で非常に高い活性を示した。ピネリン酸添加による PPAR γ の活性化が、PPAR γ 依存的なものであることを確認するために、PPAR γ 選択的阻害剤である T0070907[18]を加え PPAR γ の活性化を評価した。その結果、T0070907 との同時処理では、ピオグリタゾンによる PPAR γ の活性化だけでなく、ピネリン酸による PPAR γ の活性化も有意に阻害された (図 9B)。次にピネリン酸が PPAR γ のリガンド結合領域にどの様に結合するのかを明らかにするために、ピオグリタゾンとの競合試験を行った。その結果、ピオグリタゾンによる PPAR γ の活性化に対して、ピネリン酸は各濃度でピオグリタゾンによる PPAR γ の活性化を阻害しなかった (図 9C)。

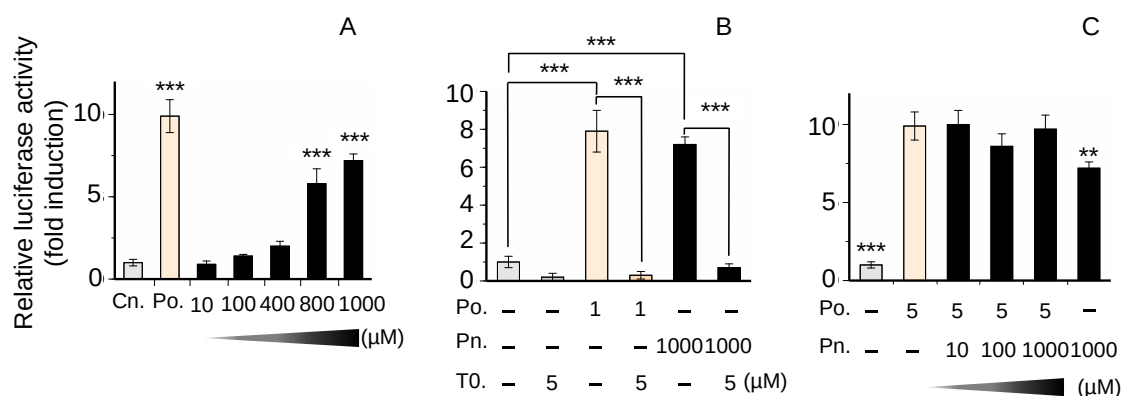


図9 ピネリン酸による PPAR γ 活性化

A 発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞にピネリン酸 (Pn.) (10-1000 μ M) またはピオグリタゾン (Po.) (10 μ M) を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cn.) に対する誘導比で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$. **B** 発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞にピネリン酸 (Pn.) (1000 μ M) またはピオグリタゾン (Po.) (1 μ M)、T0070907 (T00.) (5 μ M) を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cn.) に対する誘導比で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$. **C** 発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞に、5 μ M ピオグリタゾン (Po.) または溶媒 (Cn.) の存在下で、各濃度のピネリン酸 (Pn.) を添加した。結果は対照 (Cn.) に対する誘導比で示した。データは ($n=3$ の平均相対値 $\pm$ 標準偏差 (SD)) で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$.

2-5 ピネリン酸による PPAR α 活性化の評価

次に、ピネリン酸による PPAR α 活性化を、ルシフェラーゼリガンドアッセイを用いて評価した。ピネリン酸は PPAR α を活性化し、また濃度依存的な活性を上昇させ 1000 μ M で非常に高い活性を示した (図 10A)。ピネリン酸添加による PPAR α の活性化が、PPAR α 依存的なものであることを確認するために、PPAR α 選択的阻害剤である GW647130[19]を加え PPAR α の活性化を評価した。その結果、GW647130 との同時処理では、WY14643[20]によって誘導される PPAR α の活性だけでなく、ピネリン酸によって誘導される PPAR α の活性も有意に阻害された (図 10B)。次に、PPAR α のリガンド結合領域のピネリン酸の結合様式を明らかにするために、WY14643 との競合試験を行い、ピネリン酸が競合阻害によって WY14643 による PPAR α の活性化を低下させるか否かを評価した (図 10C)。その結果を図 10C に示す。各濃度のピネリン酸は WY14643 による PPAR α の活性化を低下させることが明らかになった。

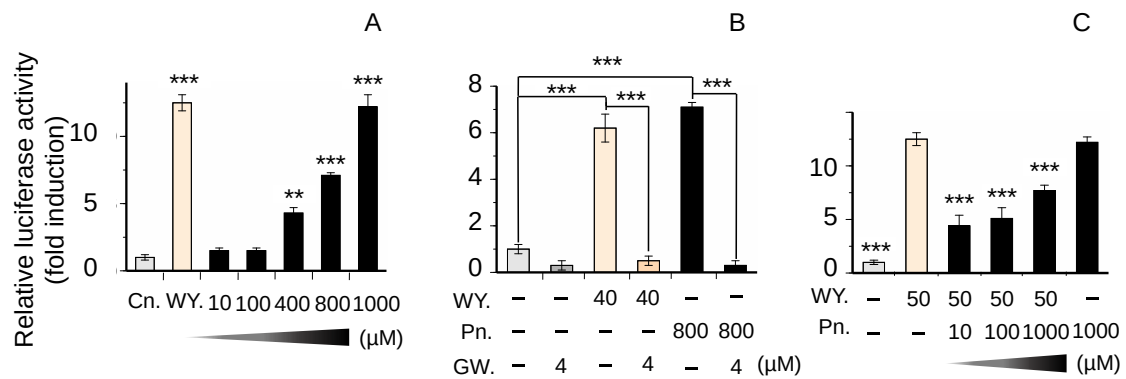


図 10 ピネリン酸による PPAR α 活性化

A 発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞にピネリン酸 (Pn.) (10-1000 μ M) または WY-14643 (WY.) (50 μ M) を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cn.) に対する誘導比で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$ 。 **B** 発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞にピネリン酸 (Pin.) (1000 μ M) または WY-14643 (WY.) (40 μ M) または GW6471 (GW.) (4 μ M) を添加し 48 時間処理した。結果は対照 (Cn.) に対する誘導比で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$ 。 **C** 発現プラスミドをトランスフェクションした CV-1 細胞に、WY-14643 (WY.) 50 μ M または溶媒 (Cn.) の存在下で、各濃度のピネリン酸 (Pn.) を添加した。結果は対照 (Cn.) に対する誘導比で示した。データは (n=3 の平均相対値 $\pm$ 標準偏差 (SD)) で示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、および*** $p < 0.001$ 。

2-6 他の同定した化合物

タマネギ水抽出物 (A) を TLC にスポットし、*n*-BuOH/水/酢酸 (4:2:1) で展開した。その後 TLC プレートを、バニリン硫酸、ニンヒドリン溶液、ギブス試薬を用いて呈色したところ、バニリン硫酸とギブス試薬に呈色する $R_f = 0.70$ と $R_f = 0.50$ の 2 つのメジャーな化合物を確認した。この 2 つの化合物を単離するために、生重量 3 kg のタマネギをスライスし、大型凍結乾燥機で凍結乾燥した。得られた凍結乾燥サンプル (300 g) を、超純水 (2 L) に浸漬し、4°C で 1 日間静置による抽出を行った。水溶液はガーゼろ過し、得られたろ液をブフナー漏斗でろ過した。ろ液を水抽出物 (2 L) とした。水抽出物 (2 L) を C18-COSMOSIL カラムクロマトグラフィーに供し、超純水で洗浄した。次に、C18-COSMOSIL カラムに吸着した物質をメタノールで溶出し、MeOH 画分を得た。メタノール画分の濃縮物 5 g を使用しシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-BuOH/水/酢酸 (4:2:1) で溶出した。得られた合計 32 の画分を TLC プレートにスポットし、*n*-BuOH/水/酢酸 (4:2:1) で展開した。その後 TLC プレートを、バニリン硫酸、ニンヒドリン溶液、ギブス試薬を用いて呈色し、バニリン硫酸とギブス試薬に呈色する 24 画分 (1.3 g、 $R_f = 0.70$) と 26 画分 (0.4 g、 $R_f = 0.50$) を得た。24 画分に含まれる化合物 2 の HRESIMS 分析の結果、 m/z 465 に $[M+Na]^+$ の疑似分子イオンピークが確認され、精密分子量の測定結果からその分

子式は $C_{21}H_{21}O_{12}$ であると決定した。一方、26 画分に含まれる化合物 **3** の

HRESIMS 分析の結果、 m/z 649 に $[M+Na]^+$ の疑似分子イオンピークが確認され、精密分子量の測定結果からその分子式は $C_{27}H_{30}O_{17}$ であると決定した。化合物 **2** 及び化合物 **3** の化学構造を決定するために ^1H -NMR を測定した (表 5)。

化合物 **2** の ^1H -NMR スペクトルは、 δ_H 12.40 (1 H, br) にフラボノール骨格の存在を示すカルボニル基と水酸基間の水素結合のプロトンシグナル、B 環の 3'、4'位に水酸基があることを示す δ_H 7.79 (1 H, d, $J=1.70$, H-2'), δ_H 7.61 (1 H, d, $J=8.8$, H-6'), δ_H 7.22 (1 H, d, $J=1.5$, H-5') の特徴的なシグナル、 δ_H 4.83 (1 H, d, $J=7.2$, H-1'') にグリコシド結合に伴うアノメリックプロトンのシグナルとカップリング定数から β 型であることを示した。これらの特徴から、化合物 **2** はケルセチン- O - β -グルコシドと推定した。グルコースの結合位置を特定するために、化合物 **2** を pyridine/ Ac_2O 処理でパーアセチル化した。パーアセチル化した化合物 **2** の HRESIMS は、 m/z 823 に $[M+Na]^+$ の疑似分子イオンピークが確認され、精密分子量の測定結果からその分子式は $C_{37}H_{36}O_{20}$ であると決定した。化合物 **2** のパーアセチル化物の ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR による観測を実施し、COSY、HMQC 及び HMBC による二次元 NMR による相関を確認した。 ^1H -NMR スペクトルから、 δ_H 12.40 (1 H, br) のカルボニル基と水酸基間の水素結合のプロトンシグナルの消失を確認し、HMBC の観測

からグリコシド結合が、ケルセチンの 4'位に結合した、ケルセチン-4'-O- β -グルコシドであると特定した (表 5)。以上から化合物 **2** の NMR データとケルセチン-4'-O- β -グルコシドの文献値[21]が良く一致したのでケルセチン-4'-O- β -グルコシドと同定した。

化合物 **3** の ^1H -NMR スペクトルは、 δ_{H} 12.5 (1 H, br) にフラボノール骨格の存在を示すカルボニル基と水酸基間の水素結合のプロトンシグナル、B 環の 3'、4'位に水酸基があることを示す δ_{H} 7.73 (1 H, d, $J=2.2$, H-2'), δ_{H} 7.60 (1, d, $J=2.2$, H-6'), δ_{H} 7.19 (1 H, d, $J=8.7$, H-5') の特徴的なシグナル、 δ_{H} 5.58 (1 H, d, $J=7.6$, H-1'') と δ_{H} 4.85 (1 H, d, $J=7.3$, H-1'') にグリコシド結合に伴うアノメリックプロトンのシグナルとカップリング定数からそれぞれ β 型であることを示した。これらの特徴から、化合物 **3** はケルセチン-O- β -ジグルコシドと推定した。グルコースの結合位置を特定するために、化合物 **3** を pyridine/ Ac_2O 処理でパーアセチル化した。パーアセチル化した化合物 **3** の HRESIMS は、 m/z 1111 に $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の疑似分子イオンピークが確認され、精密分子量の測定結果からその分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{O}_{28}\text{Na}$ はであると決定した。化合物 **3** のパーアセチル化物の ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR による観測を実施し、COSY、HMQC 及び HMBC による二次元 NMR による相関を確認した。 ^1H -NMR スペクトルから、 δ_{H} 12.5 (1 H, br) のカルボニル基と水酸基間の水素結合のプロトン

シグナルの消失を確認し、HMBC の観測からグリコシド結合が、ケルセチンの 4'位と 3 位に結合した、ケルセチン-3,4'-O- β -ジグルコシドであると特定した (表 6)。また化合物 **3** の NMR データとケルセチン-3,4'-O- β -ジグルコシドの文献値により一致がみられた[22] [23]。

第3章 考察

3-1 ピネリン酸の生合成経路と生物活性

ピネリン酸の生合成経路 (図 11) は、植物において多くの詳細な研究がある[24]。

また、ピネリン酸を含む Trihydroxyoctadecenoic acid metabolite of linoleic acid

(TriHOME) は、植物[24]、微生物[25]からヒト細胞[26] [27]にまで広くその存在が確

認されている。植物では、大豆[28] [29]、タマネギ[30]、ジャガイモ[31]、ナタネ

[32]、米[33]、小麦粉[34]の水懸濁液や生地[35]などから単離精製されている[36]。

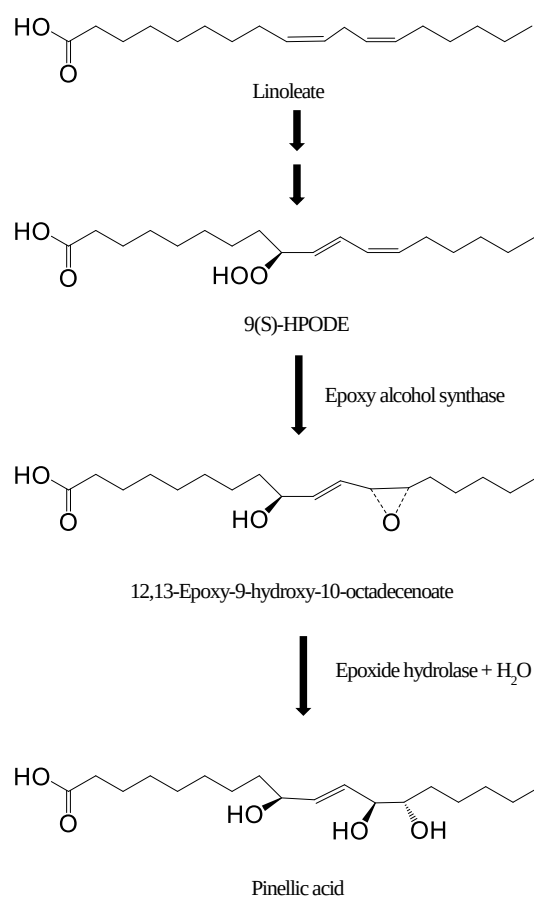


図 11 植物におけるピネリン酸の生合成

微生物においては、*Pseudomonas aeruginosa* がリノール酸を基質として代謝し (10E)-9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic acid やその他の TriHOME を菌体外に生産することが報告されている[25]。ヒト細胞では、ピネリン酸とその他の TriHOME の存在が報告されており、その生合成経路について現在研究が行われている[26]。植物においては、ピネリン酸は、真菌の感染の防御物質として機能することが知られている [37] [38]。

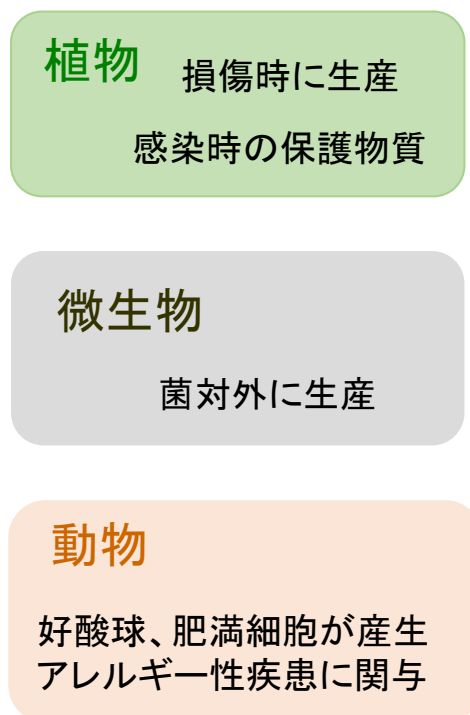


図 12 植物、微生物、動物におけるピネリン酸

ピネリン酸の生物活性に関する研究は、ワクチンの免疫作用を高める免疫賦活化作用（アジュバント作用）について詳細な研究がなされている[39] [40]。構造活性相関を評価するためにピネリン酸とその立体異性体は全合成され、すべての立体異性体についてのアジュバント作用の有無が評価された。しかし、ピネリン酸やその立体異性体がアジュバント活性を誘導する分子レベルでの作用機序は不明である[40]。他のピネリン酸に関する生物活性の研究では、動物実験においてリポ多糖（LPS）により誘導されるプロスタグランジン D₂（PGD₂）産生をピネリン酸が阻害するという報告[41]、動物細胞を用いた試験においてピネリン酸がプロスタグランジン E に類似する血小板凝集阻害の効果を示すとする報告などがある[30]。しかし、それらの作用機序については不明なままである。

本研究では、ピネリン酸が PPAR α と PPAR γ の活性を増加させることを初めて示した。これまで報告されているピネリン酸によるアジュバント活性、PGD₂産生阻害[41]及び血小板凝固阻害の生物活性は、本研究で明らかになった PPAR γ の活性増加によるものであると推測できる。例えば、PPAR γ の作動薬がアジュバント活性を有するという報告がある[43]。報告では、ナノモルレベルの PPAR γ リガンドが B 細胞増殖を増強し、血漿細胞分化および抗体（Ab）産生を有意に刺激することでアジュバント効果が発揮されるとしている[43]。また、ピネリン酸がリポ多糖（LPS）によ

り誘導される PGD_2 を産生阻害する生物活性についても、 $\text{PPAR}\gamma$ の作動薬及び内因性のリガンドが PGD_2 の生産を阻害することが報告されている。 $\text{PPAR}\gamma$ を介したシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現のネガティブフィードバック制御に関する研究 [44] では、内因性 $\text{PPAR}\gamma$ 活性化リガンド (15-デオキシ- $\Delta^{12,14}\text{PGJ}_2$) が COX-2 転写を阻害すること、またそのメカニズムは、 $\text{PPAR}\gamma$ を介して部分的にあるいは直接的に NF- κB の経路を妨害することにより起こり (抗炎症効果) [45] [46]、その結果 COX-2 発現が抑制され PGD_2 の産生を減少させるとしている [44]。ピネリン酸の血小板凝固阻害の作用にいてても、 $\text{PPAR}\gamma$ リガンドが血小板凝固阻害の効果を有することが報告されている [42]。

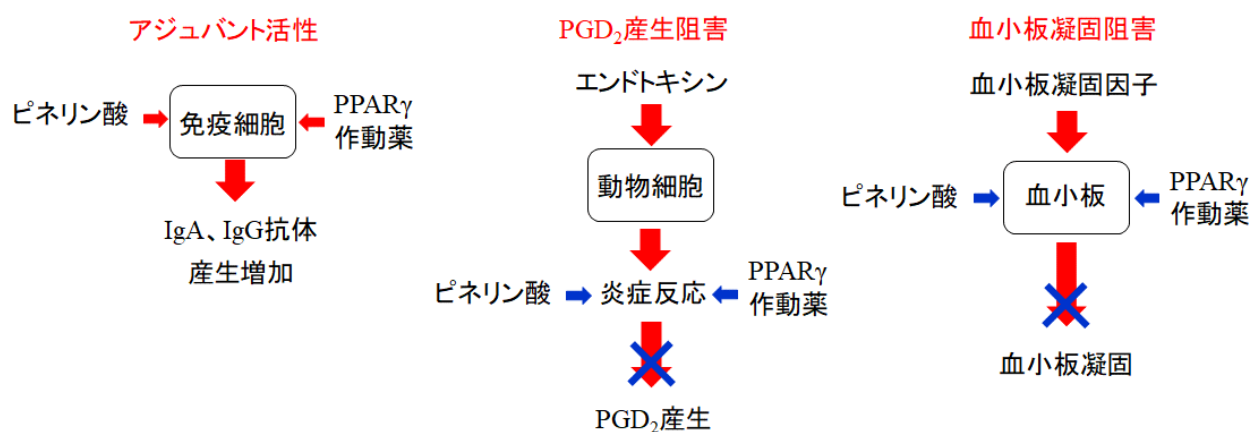


図 13. ピネリン酸と $\text{PPAR}\gamma$ 作動薬の生物活性の比較

ピネリン酸に関する図 13 に示した生物活性の全ての報告は、ピネリン酸が $\text{PPAR}\gamma$ 活性を有するとすればすべて説明がつく。

3-2 ピネリン酸とその立体異性体における生物活性の比較

PPAR のリガンド結合領域は、特徴的な Y 字の広い空間を有していることが知られている[47]。リガンドとなる化合物も、ケルセチンをはじめリノール酸、15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ など構造的に多様な物質であることが知られている。以下に PPAR γ のリガンド結合領域断面の模式図を示す (図 13)。

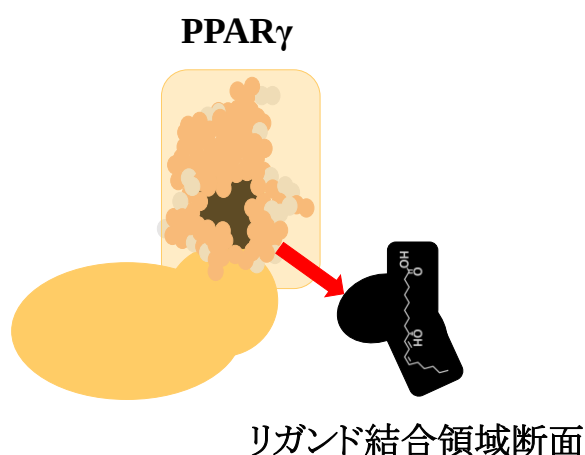
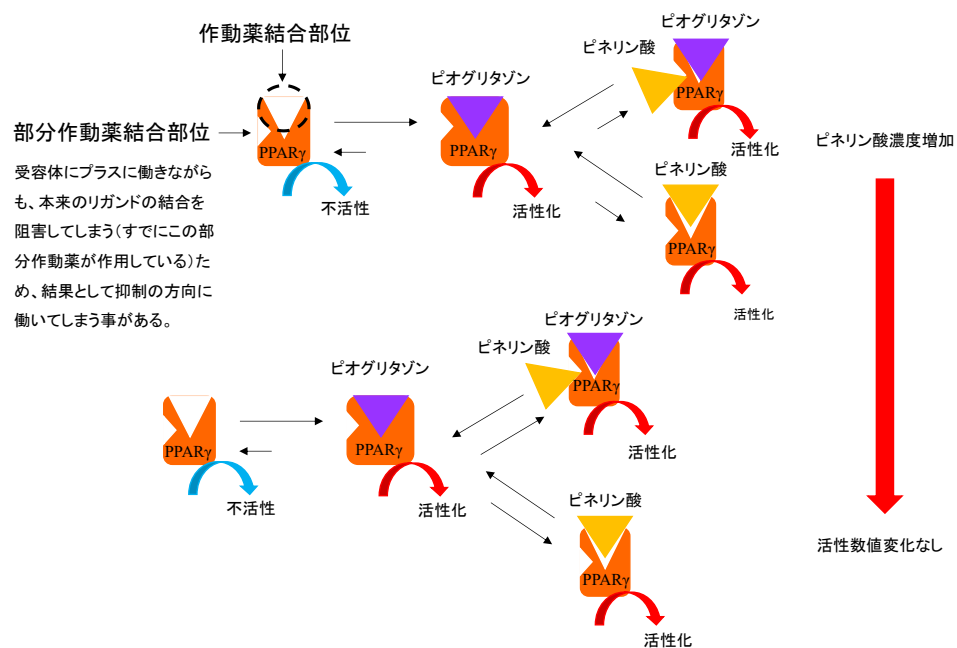


図 14 PPAR γ リガンド結合領域の立体構造断面の模式図 ([47]を一部修正)

PPAR γ 作動薬であるピオグリタゾンとピネリン酸の競合試験では、ピオグリタゾンによる PPAR γ の活性はピネリン酸の濃度が増加しても低下しなかった。この結果は、ピネリン酸が PPAR γ 作動薬であるピオグリタゾンを競合阻害しないことを示している。



他方、PPAR α 作動薬である WY14643 とピネリン酸が共存する場合、WY14643 の PPAR α 活性はピネリン酸の各濃度で活性が低下した。この結果は、PPAR α 作動薬である WY14643[20]とピネリン酸は、異なる結合領域を占めるためにピネリン酸が WY14643 と PPAR α の結合を阻害し、活性が低下していると考えられる。

図 16 W14643 とピネリン酸の競合試験

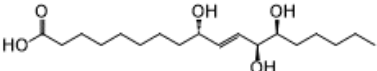
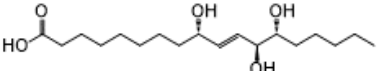
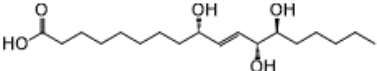
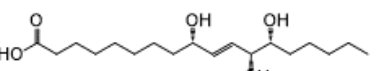
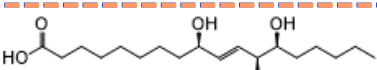
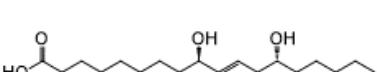
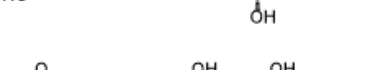
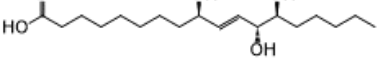
実際にピネリン酸が PPAR α または PPAR γ を活性化し、その PPAR α または PPAR γ が PPAR 応答配列を認識して、標的遺伝子の転写を調節するか否かについては、肝臓や脂肪細胞を用いた細胞レベルでの検証が必要である。

9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid は 3 つの不斉炭素を持っているため、8 つの立体異性体を有している

(10E)-9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic acid

アジュバント活性の強さ

3つの不斉炭素を有する

IgG産生	
	2.0 倍
	1.3 倍
	1.9 倍
	1.4 倍
	1.0 倍
	1.4 倍
	1.0 倍
	1.0 倍

ピネリン酸以外の立体異性体についても、PPAR α 及び PPAR γ を活性化するか阻害するか興味のあるところである。

図 17 9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic acid の立体異性体とアジュバント活性比較

報告では、それぞれの立体異性体によりアジュバント活性が異なること、特に立体異性体の中でも (9*S*,12*S*,13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid (ピネリン酸) のアジュバント活性が高いことが報告されている[16]。興味深いことに C9 の水素元素の配置が *S* であることがアジュバント活性を発揮するためには重要であった。また C13 の水素元素の配置が *S* である立体異性体は、C13 の水素元素の配置が *R* である立体異性体より高いアジュバント活性を示した[16]。9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic acid の C9 と C13 における *S* 又は *R* 立体異性体とアジュバント活性の分子的なメカニズムは不明であるが、図 16 に示す様な構造と活性の関係が報告されている[16]。

一方で 9-hydroxyoctadeca-10,12-dienoic acid (9-HODE) と 13-hydroxyoctadeca-9,11-dienoic acid (13-HODE) の水酸基を有する C9 と C13 における立体配置と PPAR γ 活性の間にも、構造と活性の違いがあることが報告されている[15]。興味深いことに、C9 (*S*) と C13 (*S*) 立体配置を有する HODE の PPAR γ 活性は、C9 (*R*) と C13 (*R*) 立体配置を有する HODE の PPAR γ 活性よりも高い活性を示すことが報告されている[15](図 17, 図 18)。

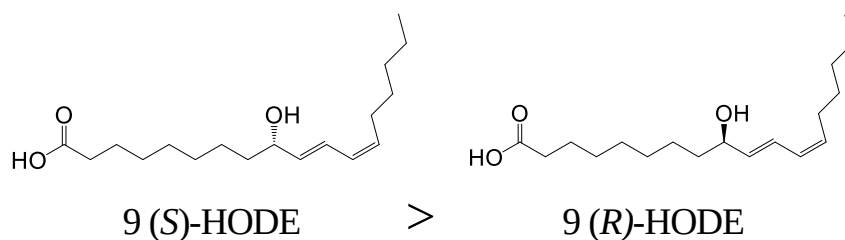


図 18 9 (*S*)-HODE と 9 (*R*)-HODE における PPAR γ 活性の比較

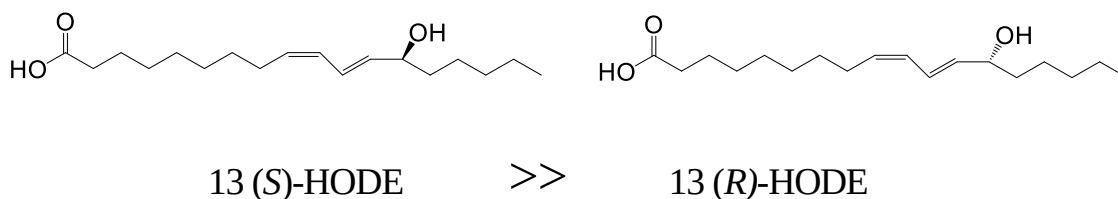


図 19 13 (S)-HODE と 13 (R)-HODE における PPAR γ 活性の比較

9-HODE と 13-HODE における立体配置と PPAR γ 活性のこのような違いは、9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid の立体配置と PPAR γ 活性との間においても存在する可能性がある。上記の推定は trihydroxyoctadec-10-enoic acid の C9 (S) と C13 (S) の立体異性体のアジュバント活性が他の立体異性体よりも高いことから、強く示唆される。特に trihydroxyoctadec-10-enoic acid の立体異性体の内、C9 (R) の立体異性体はアジュバント活性をほとんど示さないこと、C13 (R)の活性が低いことから、C9 (R) や C13 (R) の立体異性体は、PPAR γ の活性を阻害するのかもしれない。

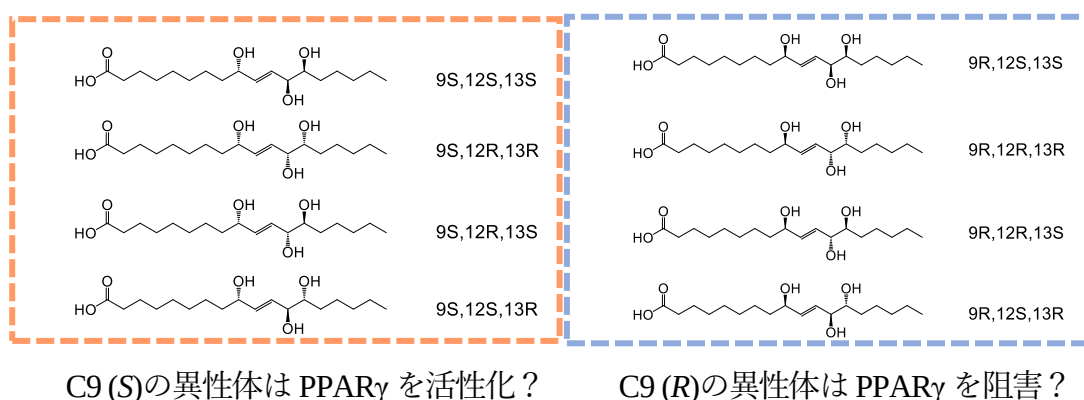


図 20 Trihydroxyoctadec-10-enoic acid の C9 (S)と C9 (R)の生物学的な機能の仮説

動物の免疫系において PPAR α または PPAR γ 作動薬は、NF- κ B を直接或いは間接的に機能低下させることで抗炎症作用を発揮することが知られている[44] [45] [48]。

逆に免疫系において PPAR γ 阻害剤は炎症作用を増強することが知られている[48] [49]。

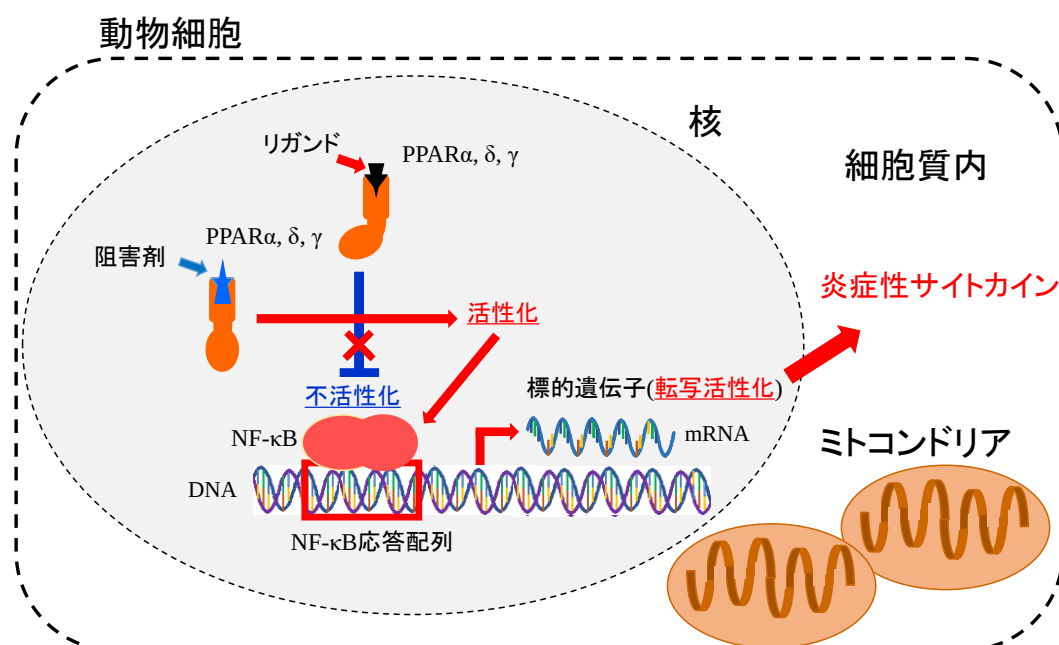


図 21 PPAR γ リガンドによる NF- κ B 抑制と PPAR γ 阻害剤による NF- κ B 活性化[49]

動物における PPAR γ を活性化し抗炎症作用を示す内在性リガンドとして脂肪酸誘導体が知られているが[45] [46]、PPAR γ の活性化を阻害する炎症作用を示す内在性のリガンドについてはほとんど研究がなされていない。

リノール酸代謝産物由来の炎症性のオキシリピンとして、微生物が産生するロイコトキシン (9,10-Epoxy-12-octadecenoic acid) [50]、ロイコトキシン-ジオール (methyl (12Z)-9,10-dihydroxyoctadec-12-enoate) [51]、植物由来の 11-ヒドロキシ-9E-オクタデセ

ン酸 ((*Z*)-11-Hydroxy-9-octadecenoic acid) [52]、12-ヒドロキシ-10*E*-オクタデセン酸
 ((*E*)-10-Hydroxy-12-octadecenoic acid) [52] および 12-ヒドロキシ-10*Z*-オクタデセン酸
 ((*Z*)-10-Hydroxy-12-octadecenoic acid) が知られている[52] (図 21)。

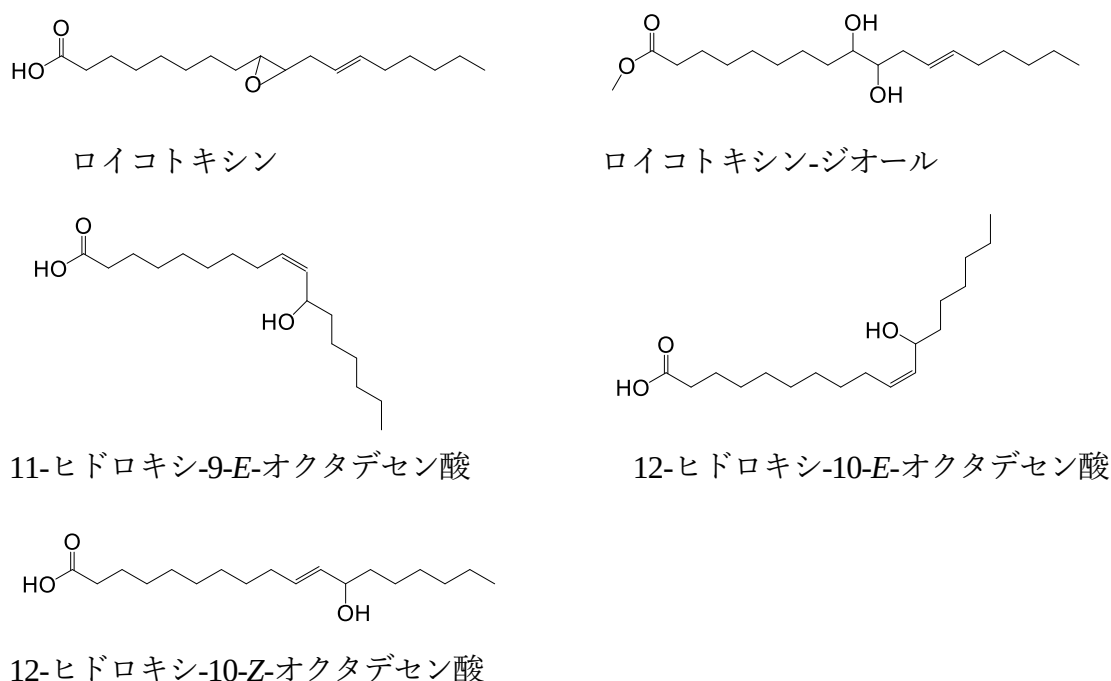
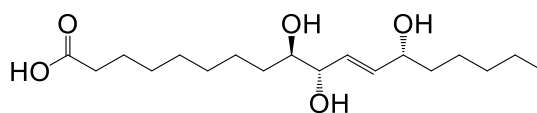


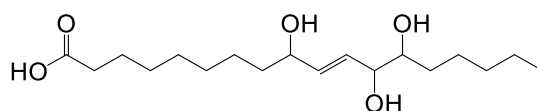
図 22 炎症性オキシリピンの化学構造

残念なことに、立体異性体を含むこれらのオキシリピンが PPAR の阻害剤として機能することについては調査されていない。その他、これらのオキシリピンに由来する炎症作用が、オキシリピンが PPAR の阻害剤として機能し、NF-κB を活性化することで生じているのかは不明である[49]。これらのオキシリピンと比べ TriHOMEs は、動物体内での機能や意義についてほとんど特徴付けが行われていない。近年の報告では、アトピー性皮膚炎の患者で(9*R*,10*S*,13*R*)-(11*E*)-9,10,13-trihydroxyoctadec-11-

enoic acid や 9,12,13-trihydroxyoctadec-10*E*-enoic acid が健常人よりも有意に多く検出されたとの報告がある[27] (図 22)。



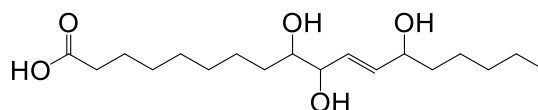
(9*R*,10*S*,13*R*)-(11*E*)-9,10,13-trihydroxyoctadec-11-enoic acid



9,12,13-trihydroxyoctadec-10*E*-enoic acid

図 23 アトピー性皮膚炎の患者で検出される TriHOME[27]

また気管支喘息の患者で、9,10,13-trihydroxyoctadec-11*E*-enoic acid が検出されている(図 23)。



9, 10, 13-trihydroxyoctadec-11*E*-enoic acid

図 24 喘息の患者で検出される TriHOME[53]

2つの炎症性の疾患と TriHOMEs との関わりについては明らかになっていないが、炎症作用に関与しているのではないかと推測されている[53] [54]。

近年、動物での TriHOMEs の生合成についての報告がなされ、ピネリン酸を含めた TriHOMEs の立体異性体特異的な生合成が、アレルギー反応を抑制する好酸球やヒスタミンを含む顆粒を放出しアレルギー反応を引き起こす肥満細胞で行われている

ることが明らかになった。興味深いことに培養液にリノール酸を添加したところ好酸球は、TriHOME を生成しそのほとんどはピネリン酸を含む C13 (S) の配置を有する脂肪酸誘導体であった[26]。対照的に、肥満細胞では培養液にリノール酸を添加したところ TriHOME を生成し、アトピー性皮膚炎の患者で頻繁に検出される (9R,10S,13R)-(11E)-9,10,13-trihydroxyoctadec-11enoic acid[27]を含む主に C13 (R) の配置を有する脂肪酸誘導体であった[26] (図 24)。

好酸球

(マスト細胞などのヒスタミンに集まりアレルギー反応を抑制する)

マスト細胞

(ヒスタミンを含む顆粒を放出しアレルギー反応を引き起こす)

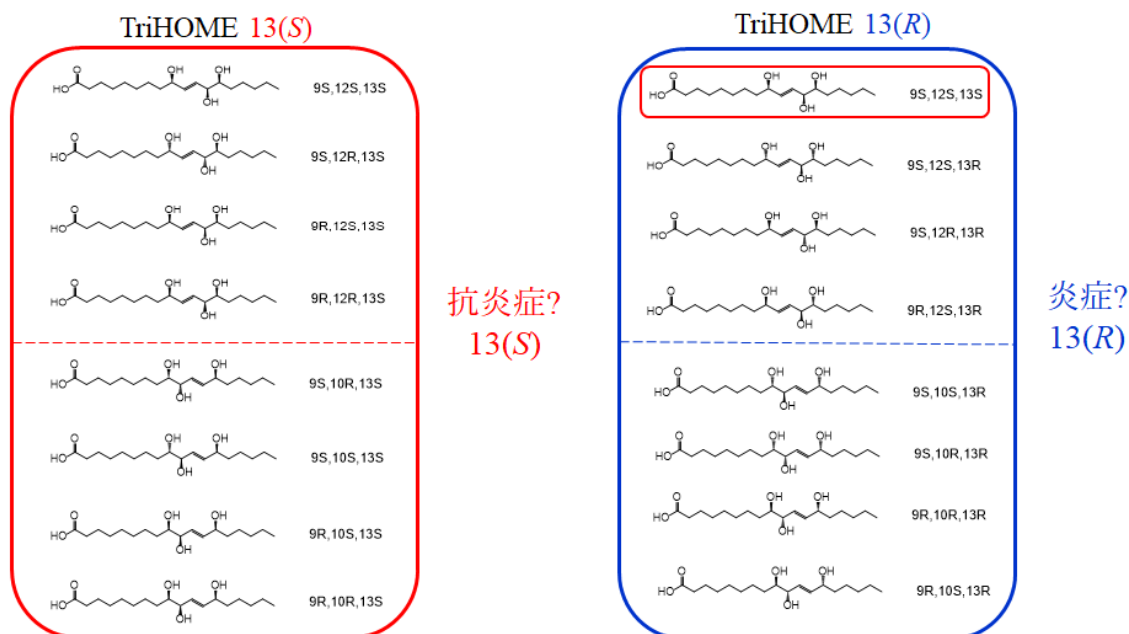


図 25 好酸球と肥満細胞で産生されるオキシリピンの立体異性体の特徴

これらの TriHOME がどのようにアレルギーに関与しているかは不明であるが、本研究でピネリン酸が PPAR α/γ を活性化することから、好酸球で生成されているピネ

リン酸を含めた C13(S) の TriHOME は PPAR γ を活性化し抗炎症作用に参与しているのかもしれない[45]。また好酸球が産生するピネリン酸は、好酸球自体の PPAR γ も活性化すると考えられる[55]。これとは対照的に、肥満細胞によって産生される 13(R) の TriHOME は、PPAR γ の阻害剤として機能することで炎症作用を有するかもしれない[49]。今後、好酸球および肥満細胞が生成する TriHOME の立体異性体を含めた各オキシリピンの PPAR α/γ 作動薬または阻害剤としての機能を評価する必要があると考えられる[49] (図 25)。

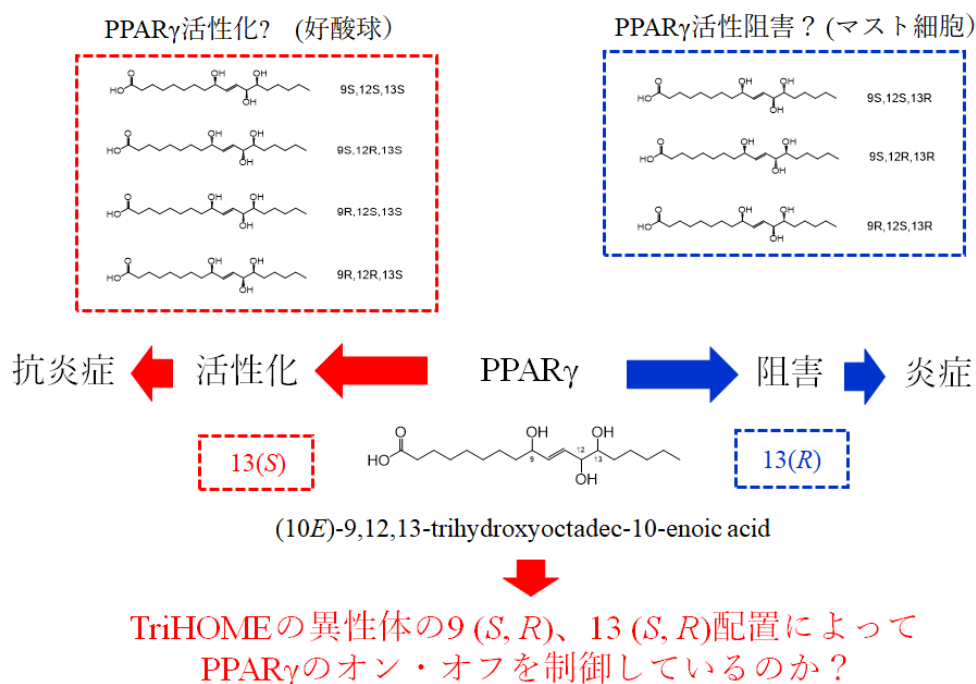


図 26 TriHOME の 9(S,R)、13(S,R)による PPAR γ のオン・オフ制御?

好酸球と肥満細胞における、この様なオキシリピンと PPAR の活性化又は阻害に関する研究は、炎症と抗炎症[45] [46]の制御機構の解明につながり、喘息などのアレルギー性疾患に対する治療方法の確立に役立つ可能性がある[53] [56] [57]。特に、喘息患者に処方されている、ピネリン酸を有効成分とする漢方薬「小青竜湯」の作用機序の解明につながると考えられる[58]。

第4 結論

本研究では、ルシフェラーゼリガンドアッセイによる核内受容体 PPAR γ の活性評価を指標としたカラムクロマトグラフィーにより、ケルセチン高含有のタマネギ水抽出画分からピネリン酸を単離同定し、ピネリン酸が PPAR α 及び PPAR γ を活性化することを初めて明らかにした。本結果は TriHOME が PPAR α 及び PPAR γ を活性化することを初めて示したものである。また総合考察から、ピネリン酸はアレルギー性疾患の治療に有用な化合物であることを示唆した。

第5章 材料と方法

<一般事項>

旋光度は、P-2200 旋光計 (JASCO, Tokyo, Japan) で測定した。高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析 (HRESIMS) のデータは、Thermo Scientific Q Exactive 機器装置 (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, U.S.) で取得した。NMR スペクトル (Bruker, Massachusetts, U.S.)、 ^1H は 500 MHz 及び ^{13}C は 125 MHz の測定条件で行った。カラムクロマトグラフィーには、Wakogel 60N シリカゲル (FUJIFILM Wako, Tokyo, Japan) を使用して実施した。逆相オープンカラムクロマトグラフィーは、COSMOSIL 75C18-OPN カラム (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を使用して実施した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は、プレコートされたシリカゲル 60 F254 プレート (厚さ 0.2 mm、Merck, Darmstadt, Germany) で実施した。

<試料>

ケルセチン高含有タマネギ品種「サラサラレッド」は、北海道栗山町で栽培されたものを使用した。タマネギの皮を剥き先端と根の部分除去した可食部を電動スライサーで 2 mm 程度の厚みにスライスした。スライスしたタマネ

ギを大型凍結乾燥機（RLE II -205, KYOWAC, Tokyo, Japan）に入れ、24 時間乾燥し凍結乾燥試料を得た。

<抽出と化合物 1 の単離精製>

PPAR γ の活性を示す画分及び物質は、以下に示す手順で分離精製し特定した（図 3）。可食部 13 kg（生重量）のタマネギに由来する凍結乾燥試料（1.2 kg）を、超純水（8 L）で 4°C で 3 日間静置して抽出した。水溶液をガーゼとろ紙でろ過し、水抽出物（6 L）((A)水抽出物) を得た（図 3）。水抽出物（6L）を、担体をブフナー漏斗に充填した C18-COSMOSIL カラムクロマトグラフィー（600 g, 20×8cm）に供し、水 ((C) 水画分) で洗浄した。次に、C18-COSMOSIL カラムに吸着した物質をメタノール（MeOH）で溶出した((B) MeOH 画分)。MeOH 画分は濃縮後、残留物（47.0 g）を、担体をブフナー漏斗に充填したシリカゲルカラムクロマトグラフィー（800 g, 20×10 cm）に供し、*n*-ブタノール（*n*-BuOH）/水酸化アンモニウム（4：1、合計 6.0 L ）(D) BuOH 画分) で溶出した。次に、シリカゲルカラムに吸着した物質を MeOH で溶出した((E) MeOH画分)。得られた (B) MeOH 画分（図 3）および (D) BuOH 画分（図 3）は、濃度依存的に PPAR γ を活性化した（図 4B-E）。得られ

た *n*-BuOH 画分を濃縮した後、残留物 (3.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (6×60cm) に供し、*n*-BuOH /水酸化アンモニウム (5 : 1、合計 7.5 L) で溶出した。得られた合計 84 の画分を TLC プレートにスポットし、*n*-BuOH /水酸化アンモニウム (5 : 1) の混合溶媒を用いて展開した。これらの TLC プレートに展開された化合物の呈色は、リンモリブデン酸、バニリン酸/ドロクロル酸、ニンヒドリンを用いた。得られた合計 84 の画分を、上記の TLC プロファイルに基づいて、10 の画分、画分 1~10 に統合した。Fraction (Frac) 1、Frac4、Frac 5、および Frac 6 に含まれる化合物が PPAR γ を強力に活性化した (図 4F)。活性化化合物の単離が見込まれた Frac5 (414 mg) を CHCl₃ / MeOH /水酸化アンモニウム (10 : 1 : 0.1) の混合溶媒を用いた分取 TLC に供した。リンモリブデンを用いて呈色し着色の確認された化合物 (R_f = 0.30) を含むシリカゲル収集し、化合物 1 (60 mg) を純粋な形の白色固体として得た。

<化合物 1 の機器分析データ>

HRESIMS : m/z 353 [M+Na]⁺、精密質量分析 : C₁₈H₃₄O₅、 $[\alpha]_D^{25}$ -4.3 (c 1.0、MeOH)、¹H-NMR、¹³C-NMR、COSY、HMQC、HMBC 及び NOESY のスペクトルデータは表 1.に示した。

<化合物 1 のアンモニウム塩への変換>

化合物 1 を 10 mg 取り 20 mL のナスフラスコに加え氷上で冷却した。28%アンモニア水を 200 mL の三角フラスコに加え、先端にシリンジの針を付けたシリコンチューブをガラス管付のシリコン栓に接続して三角フラスコの口を塞いだ。三角フラスコをウォーターバスで温めることでアンモニアガスを発生させた。シリンジの先端を 20 mL のナスフラスコに入れアンモニアと化合物 1 を反応させ化合物 1 のアンモニウム塩を生成した。化合物 1 のアンモニウム塩は、メタノールによく溶解した。

<化合物 1 のアンモニウム塩の機器分析データ>

$[\alpha]_D^{25}$ -8.8 (c 1.0, MeOH)、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、COSY、HMQC、HMBC 及び NOESY のスペクトルデータは表 2.に示した。

<ケルセチン配糖体の単離>

生重量 3 kg のタマネギをスライスし、大型凍結乾燥機で凍結乾燥した。得られた凍結乾燥サンプル(300 g) を、超純水 (2 L) に浸漬し、4°C で 1 日間静置による抽出を行った。水溶液はガーゼろ過し、得られたろ液をブフナー漏斗でろ

過した。このろ液を水抽出物 (2 L) とした。水抽出物 (2 L) を C18-COSMOSIL カラムクロマトグラフィーに供し、超純水で洗浄した。次に、C18-COSMOSIL カラムに吸着した物質をメタノール (MeOH) で溶出し、MeOH 画分を得た。MeOH 画分の濃縮物 5 g を使用しシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-ブタノール (*n*-BuOH) /水/酢酸 (4:2:1) で溶出した。得られた合計 32 の画分を TLC プレートにスポットし、*n*-BuOH /水/酢酸 (4:2:1) で展開した。その後 TLC プレートを、バニリン硫酸、ニンヒドリン溶液、ギブス試薬を用いて呈色し、バニリン硫酸とギブス試薬に呈色する 24 画分 ($R_f = 0.70$) に主に含まれる化合物 **2** と 26 画分 (0.4 g, $R_f = 0.50$) に主に含まれる化合物 **3** を得た。

<化合物 **2** の機器分析データ>

HRESIMS : m/z 465 $[M+Na]^+$ 、精密質量分析 : $C_{21}H_{21}O_{12}$ 、 ^1H -NMR のスペクトルデータは表 4.に示した。

<化合物 **3** の機器分析データ>

HRESIMS : m/z 649 $[M+Na]^+$ 、精密質量分析 : $C_{27}H_{30}O_{17}$ 、 ^1H -NMR のスペクトルデータは表 4.に示した。

表 4. 化合物 2 と化合物 3 の ^1H -NMR スペクトルデータ (500 MHz, DMSO- d_6)

positon	化合物2 δ_{H} (J in Hz)	化合物3 δ_{H} (J in Hz)
Aglycone		
5 (OH)	12.40, br	12.50, br
6	6.17, d, (1.5)	6.18, d, (1.9)
8	6.42, d, (1.4)	6.41, d, (1.8)
2'	7.79, d, (1.7)	7.73, d, (2.2)
5'	7.22, d, (8.6)	7.19, d, (8.7)
6'	7.61, d, (8.8)	7.60, d, (2.2)
4'-O- β -glucoside		
1''	4.83, d, (7.2)	4.85, d, (7.3)
2''	3.16, m	3.38, m
3''	3.36, m	3.35, m
4''	3.42, m	3.21, m
5''	3.50, m	3.39, m
6A''	3.71, m	3.71, d, (12.0)
6B''	3.18, m	3.57, d, (11.1)
3-O- β -glucoside		
1'''		5.58, d, (7.6)
2'''		3.19, m
3'''		3.21, m
4'''		3.08, m
5'''		3.15, m
6A'''		3.48, m
6B'''		3.35, m

<化合物 **2** 及び化合物 **3** のアセチル化>

化合物 **2** (2 mg)及び化合物 **3** (2 mg)をそれぞれ 20 mL の試験管に取り、2mL ピリジンと 2mL 無水酢酸をそれぞれ加えた。60°Cのヒートブロックで 60 分加熱し、反応後 4mL 水を加え反応を停止した。2 倍量のクロロフォルムで反応溶液に添加し、抽出、濃縮した。

<化合物 **2** のパーアセチル化物の機器分析データ>

$^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及び HMBC のスペクトルデータは表 5.に示した。

<化合物 **3** のパーアセチル化物の機器分析データ>

$^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及び HMBC のスペクトルデータは表 6.に示した。

表 5. パーアセチル化した化合物 2 の NMR スペクトルデータ (500 MHz,

CDCl₃)

positon	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	HMBC
Aglycone			
2	154.0, C		
3	133.7, COAc		
4	170.4, CO		
5	156.8, COAc		
6	108.9, CH	7.32, d, (2.2)	5, 7, 8, 10
7	154.0, COAc		
8	113.8, CH		6, 7, 9, 10
9	150.4, C	6.86, d, (2.2)	
10	115.0, C		
1'	123.6, C		
2'	124.4, CH	7.54, d, (2.2)	1', 3', 4', 6', 2
3'	140.0, COAc		
4'	150.6, COGlu		
5'	114.7, CH	7.13, d, (8.6)	1', 3', 4'
6'	128.8, CH	7.69, d, (2.1)	1', 2', 3', 4', 2
4'-O- β -glucoside			
1''	98.2, AglOCHO	5.18, d, (7.6)	4'
2''		5.34, m	
3''		5.34, m	
4''		5.18, m	
5''		3.88, m	
6A''		4.30, m	
6B''		4.20, m	

表 6. パーアセチル化した化合物 3 の NMR スペクトルデータ (500 MHz, CDCl₃)

positon	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	HMBC
Aglycone			
2	154.4, C		
3	136.3, COGlu		
4	170.5, CO		
5	156.4, COAc		
6	108.9, CH	7.29, d, (2.2)	5, 7, 8, 10
7	153.9, COAc		
8	113.4, CH		6, 7, 9, 10
9	150.1, C	6.83, d, (2.9)	
10	114.9, C		
1'	125.1, C		
2'	124.0, CH	7.71, d, (2.2)	1', 3', 4', 6', 2
3'	139.6, COAc		
4'	150.2, COGlu		
5'	114.5, CH	7.12, d, (8.9)	1', 3', 4'
6'	128.2, CH	7.96, d, (2.2)	1', 2', 3', 4', 2
4'-O- β -glucoside			
1''	98.4, AglOCHO	5.20, d, (7.3)	4'
2''			
3''			
4''			
5''			
6A''			
6B''			
3-O- β -glucoside			
1'''	98.6, AglOCHO	5.60, d, (8.0)	3
2'''		5.14, m	
3'''		5.30, m	
4'''		5.07, m	
5'''		3.60, m	
6A'''		4.02, m	
6B'''		3.99, m	

<化学物質および材料>

T0070907 と GW6471 は Cayman Chemicals (Ann Arbor, U.S.) から購入し、他のすべての化学物質は Merck (Darmstadt, Germany) と FUJIFILM Wako (Osaka, Japan) から購入した。

<ルシフェラーゼリガンドアッセイ>

アフリカミドリザル腎由来細胞株 CV-1 を 2×10^5 cells/well となるよう、6 well plate に播種し、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (10% ウシ胎児血清 (FBS)) 中で、庫内温度 37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で 1 日培養した。Gal4 の DNA 結合ドメイン (Gal4-DBD) と核内受容体のリガンド結合ドメイン (NR-LBD) のキメラタンパク質発現プラスミド、Gal4 DNA 応答配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミド (pGal4-Luc) 及び内部標準用としてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子上流に遺伝子構成的発現プロモーター (CMV) を連結した内部標準プラスミド (pGL4.75hRluc-CMV) を重量比 1:0.9:0.1 の割合で混合し、Opti-MEM に 10 μ g/ml (総 DNA

量)の濃度で溶解した。同時に遺伝子導入試薬 (X-tremeGENE HP; Roche) を 1/43 量添加し、15 分間静置後、本混合液を 200 μ l ずつ各ウェルに添加し、6 時間培養することによって遺伝子を導入した。各核内受容体のアッセイに使用したプラスミドを表 8 に示した。

表 7 使用プラスミド

核内受容体	プラスミド		
	キメラタンパク	内部標準	レポーター
PPAR α	pGal4DBD/PPAR α LBD	pGL4.75hRluc- CMV	pGal4-Luc
PPAR δ	pGal4DBD/PPAR δ LBD	pGL4.75hRluc- CMV	pGal4-Luc
PPAR γ	pGal4DBD/PPAR γ LBD	pGL4.75hRluc- CMV	pGal4-Luc

遺伝子導入細胞をトリプシンにより分散し、96 well plate に 2.0 x 10⁴ cells/well となるよう再度播種した。この際、培養液を phenol red 不含の DMEM 培地 (10%活性炭処理済 FBS) に交換した。1 時間後に、各濃度の被験物質を含む上記と同様の DMEM 培地をそれぞれのウェルへ添加した。陰性コントロール (溶媒コントロール) としては最終濃度 0.5% DMSO、2.5% EtOH または 10%水を用いた。

各サンプルにおける試験濃度は、事前の CV-1 細胞に対する細胞毒性試験により、細胞毒性を示さない最も高い濃度から順次希釈することで設定した。ただし、その最も高い濃度が前回までの抽出物での試験濃度よりも高くなった場合は、前回の抽出物を用いて試験を行った際の最も高い濃度を基準にして順次希釈し試験濃度を設定した。

CO₂ インキュベーター中で 48 時間培養後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて細胞を洗浄し、デュアルルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を用いて、細胞を溶解した後にルシフェリンを含む基質溶液を加え、プレートリーダー (Luminescencer、AB-2350EX、ATTO) にてホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ活性を各々測定した。以上の操作は、1 サンプル (陽性、陰性コントロールを含む) につき 3 ウェルを用いて実施し、3 ウェルの平均値をデータとして採用した。リガンド活性は、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性の比率 (Fluc / Rluc) で示した。

なお、本実験の精度管理に用いた陽性コントロール (アゴニスト) は、以下の通りである ; PPAR α ; 100 μ M WY14643、PPAR δ ; 1.0 μ M GW501516、PPAR γ ; 1.0 μ M ピオグリダゾン。また、PPAR α と PPAR γ のアンタゴニストとして、各々 GW6471 と T0070907 を使用した。水抽出物と水画分を除いて、試料は DMSO で希釈したが、ピネリン酸はエタノールで希釈した。

<統計分析>

データは、(n=3 の平均相対値 $\pm$ 標準偏差 (SD))で示した。統計的有意性は分散分析 (One-way ANOVA) を実施し、その後有意差が見られた場合はボンフェローニ検定を実施した。 $p < 0.05$ 未満の p 値は統計的に有意であるとした。解析には EZR version 1.41 を使用した。

引用文献

1. Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B. Onions-a global benefit to health. *Phytother Res* 2002; 16: 603-615
2. Dabeek WM, Marra MV. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients* 2019; 11: 2288
3. Lesjak M, Beara I, Simin N, Pintać D, Majkić T, Bekvalac K, Orčić D, Mimica-Dukić N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods* 2018; 40: 68-75
4. Okamoto D, Noguchi Y, Muro T, Morishita M. Genetic variation of quercetin glucoside content in onion (*Allium cepa* L.). *J Jpn Soc Hortic Sci* 2006; 75: 100-108
5. Nishimura M, Muro T, Kobori M, Nishihira J. Effect of Daily Ingestion of Quercetin-Rich Onion Powder for 12 Weeks on Visceral Fat: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study. *Nutrients* 2019; 12: 91
6. Kim B, Choi YE, Kim HS. *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha and suppression of inflammatory cytokines. *Phytother Res* 2014; 28: 1359-1366
7. Christensen KB, Petersen RK, Kristiansen K, Christensen LP. Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. *Phytother Res* 2010; 24 Suppl 2: S129-132
8. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688
9. Nabavi SF, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: you are what you eat! *Food Chem* 2015; 179: 305-310
10. Wilkinson AS, Monteith GR, Shaw PN, Lin CN, Gidley MJ, Roberts-Thomson SJ. Effects of the mango components mangiferin and quercetin and the putative mangiferin metabolite norathyriol on the transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 3037-3042

11. Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 131-141
12. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43: 527-550
13. Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH, Lee MO. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 220: 51-58
14. Spiegelman BM. PPAR-gamma: Adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 47: 507-514
15. Umeno A, Sakashita M, Sugino S, Murotomi K, Okuzawa T, Morita N, Tomii K, Tsuchiya Y, Yamasaki K, Horie M, Takahara K, Yoshida Y. Comprehensive analysis of PPARgamma agonist activities of stereo-, regio-, and enantio-isomers of hydroxyoctadecadienoic acids. *Biosci Rep* 2020; 40: BSR20193767
16. Shirahata T, Sunazuka T, Yoshida K, Yamamoto D, Harigaya Y, Kuwajima I, Nagai T, Kiyohara H, Yamada H, Ōmura S. Total synthesis, elucidation of absolute stereochemistry, and adjuvant activity of trihydroxy fatty acids. *Tetrahedron* 2006; 62: 9483-9496
17. Shirahata T, Sunazuka T, Yoshida K, Yamamoto D, Harigaya Y, Nagai T, Kiyohara H, Yamada H, Kuwajima I, Omura S. Total synthesis and adjuvant activity of all stereoisomers of pinellic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 937-941
18. Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, Chen JL, Li Y. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* 2002; 277: 19649-19657
19. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR alpha. *Nature* 2002; 415: 813-817
20. Bernardes A, Souza PC, Muniz JR, Ricci CG, Ayers SD, Parekh

- NM, Godoy AS, Trivella DB, Reinach P, Webb P, Skaf MS, Polikarpov I. Molecular mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation by WY14643: a new mode of ligand recognition and receptor stabilization. *J Mol Biol* 2013; 425: 2878-2893
21. Ahmed AF, Al-Yousef HM, Al-Qahtani JH, Al-Said MS. A hepatonephro-protective phenolic-rich extract from red onion (*Allium cepa* L.) peels. *Pak J Pharm Sci* 2017; 30: 1971-1979
 22. Slimestad R, Fossen T, Vagen IM. Onions: A source of unique dietary flavonoids. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10067-10080
 23. Fossen T, Pedersen AT, Andersen ØM. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 1998; 47: 281-285
 24. Hamberg M, Olsson U. Efficient and specific conversion of 9-lipoxygenase hydroperoxides in the beetroot. Formation of pinellic acid. *Lipids* 2011; 46: 873-878
 25. Kim H, Jang YS, Hou CT. Effect of metal ions on the production of isomeric 9,10,13 (9,12,13)-trihydroxy-11*E* (10*E*)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Enzyme Microb Technol* 2002; 30: 752-757
 26. Fuchs D, Tang X, Johnsson AK, Dahlen SE, Hamberg M, Wheelock CE. Eosinophils synthesize trihydroxyoctadecenoic acids (TriHOMEs) via a 15-lipoxygenase dependent process. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2020; 1865: 158611
 27. Chiba T, Nakahara T, Kohda F, Ichiki T, Manabe M, Furue M. Measurement of trihydroxy-linoleic acids in stratum corneum by tape-stripping: Possible biomarker of barrier function in atopic dermatitis. *PLoS One* 2019; 14: e0210013
 28. Moll C, Biermann U, Grosch W. Occurrence and formation of bitter-tasting trihydroxy fatty acids in soybeans. *J Agric Food Chem* 1979; 27: 239-243
 29. Sessa DJ, Gardner HW, Kleiman R, Weisleder D. Oxygenated fatty acid constituents of soybean phosphatidylcholines. *Lipids* 1977; 12: 613-619
 30. Üstünes L, Claeys M, Laekeman G, Herman AG, Vlietinck AJ, Özer A. Isolation and identification of two isomeric trihydroxy octadecenoic acids with prostaglandin E-like activity from onion

- bulbs (*Allium cepa*). Prostaglandins 1985; 29: 847-865
31. Hamberg M. An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. Lipids 1999; 34: 1131-1142
 32. Walters DR, Cowley T, Weber H, Nashaat NI. Changes in oxylipins in compatible and incompatible interactions between oilseed rape and the downy mildew pathogen *Peronospora parasitica*. Physiological and Molecular Plant Pathology 2005; 67: 268-273
 33. Ohta H, Shida K, Peng YL, Furusawa I, Shishiyama J, Aibara S, Morita Y. The Occurrence of Lipid Hydroperoxide-Decomposing Activities in Rice and the Relationship of Such Activities to the Formation of Antifungal Substances. Plant Cell Physiol 1990; 31: 1117-1122
 34. Hamberg M, Hamberg G. Peroxygenase-catalyzed fatty acid epoxidation in cereal seeds - Sequential oxidation of linoleic acid into 9(S),12(S),13(S)-trihydroxy-10(E)-octadecenoic acid. Plant Physiol 1996; 110: 807-815
 35. Graveland A. Enzymatic oxidations of linoleic acid and glycerol-1-monolinoleate in doughs and flour-water suspensions. J Am Oil Chem Soc 1970; 47: 352-361
 36. Masui H, Kondo T, Kojima M. An antifungal compound, 9,12,13-trihydroxy-(E)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. Phytochemistry 1989; 28: 2613-2615
 37. Kato T, Yamaguchi Y, Abe N, Uyehara T, Namai T, Kodama M, Shiobara Y. Structure and synthesis of unsaturated trihydroxy c18 fatty: Acids in rice plants suffering from rice blast disease. Tetrahedron Letters 1985; 26: 2357-2360
 38. Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerre-Tugaye MT, Rosahl S, Castresana C, Hamberg M, Fournier J. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. Plant Physiol 2005; 139: 1902-1913
 39. Nagai T, Kiyohara H, Munakata K, Shirahata T, Sunazuka T, Harigaya Y, Yamada H. Pinellic acid from the tuber of *Pinellia ternata* Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza

- vaccine. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 1183-1193
40. Nagai T, Shimizu Y, Shirahata T, Sunazuka T, Kiyohara H, Omura S, Yamada H. Oral adjuvant activity for nasal influenza vaccines caused by combination of two trihydroxy fatty acid stereoisomers from the tuber of *Pinellia ternata*. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 655-661
 41. Choi HG, Park YM, Lu Y, Chang HW, Na M, Lee SH. Inhibition of prostaglandin D₂ production by trihydroxy fatty acids isolated from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *Phytother Res* 2013; 27: 1376-1380
 42. Moraes LA, Spyridon M, Kaiser WJ, Jones CI, Sage T, Atherton RE, Gibbins JM. Non-genomic effects of PPARgamma ligands: inhibition of GPVI-stimulated platelet activation. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 577-587
 43. Garcia-Bates TM, Bagloli CJ, Bernard MP, Murant TI, Simpson-Haidaris PJ, Phipps RP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands enhance human B cell antibody production and differentiation. *J Immunol* 2009; 183: 6903-6912
 44. Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000; 275: 28028-28032
 45. Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC, Staels B. Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 977-986
 46. Korbecki J, Bobinski R, Dutka M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflammation Research* 2019; 68: 443-458
 47. 白木 琢. 生体内代謝をモニターする転写システム：核内受容体 PPAR γ による転写を介した代謝ネットワーク間のクロストーク. *生化学* 2013; 85: 749-761
 48. Scirpo R, Fiorotto R, Villani A, Amenduni M, Spirli C, Strazzabosco M. Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma limits NF-kappaB-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology* 2015; 62: 1551-1562
 49. Zhang Y, Cui Y, Wang XL, Shang X, Qi ZG, Xue J, Zhao X, Deng

- M, Xie ML. PPARalpha/gamma agonists and antagonists differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats. *Cytokine* 2015; 75: 127-135
50. Moghaddam MF, Grant DF, Cheek JM, Greene JF, Williamson KC, Hammock BD. Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. *Nat Med* 1997; 3: 562-566
 51. Zheng J, Plopper CG, Lakritz J, Storms DH, Hammock BD. Leukotoxin-diol - A putative toxic mediator involved in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 434-438
 52. Wang XH, Liu JQ, Chen S, Yin Y, Liu Y, Zhang C. Hydroxy-octadecenoic acids instead of phorbol esters are responsible for the *Jatropha curcas* kernel cake's toxicity. *Commun Biol* 2020; 3: 228
 53. Nording ML, Yang J, Hegedus CM, Bhushan A, Kenyon NJ, Davis CE, Hammock BD. Endogenous Levels of Five Fatty Acid Metabolites in Exhaled Breath Condensate to Monitor Asthma by High-Performance Liquid Chromatography: Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *IEEE Sens J* 2010; 10: 123-130
 54. Levan SR, Stamnes KA, Lin DL, Panzer AR, Fukui E, McCauley K, Fujimura KE, McKean M, Ownby DR, Zoratti EM, Boushey HA, Cabana MD, Johnson CC, Lynch SV. Elevated faecal 12,13-diHOME concentration in neonates at high risk for asthma is produced by gut bacteria and impedes immune tolerance. *Nat Microbiol* 2019; 4: 1851-1861
 55. Ueki S, Matsuwaki Y, Kayaba H, Oyamada H, Kanda A, Usami A, Saito N, Chihara J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates eosinophil functions: a new therapeutic target for allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134 Suppl 1: 30-36
 56. Woerly G, Honda K, Loyens M, Papin JP, Auwerx J, Staels B, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med* 2003; 198: 411-421
 57. Kytikova OY, Perelman JM, Novgorodtseva TP, Denisenko YK, Kolosov VP, Antonyuk MV, Gvozdenko TA. Peroxisome

Proliferator-Activated Receptors as a Therapeutic Target in Asthma.
PPAR Res 2020; 2020: 8906968

58. Nagai T, Arai Y, Emori M, Nunome SY, Yabe T, Takeda T, Yamada H. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. Int Immunopharmacol 2004; 4: 1353-1365

論文目録

【参考文献】

Pinellic acid isolated from quercetin-rich onions has a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma (PPAR- α/γ) transactivation activity.

Mikio Doi, Naoki Morita, Mami Sakashita, Tsugumi Okuzawa, Satoru Ohgiya, Daisaku Okamoto, Kenichi Sato, Yukiya Ito, Hideyuki Matsuura, Yasuyuki Hashidoko

Planta Medica, in press

謝辞

本論文の取りまとめに際し、懇切なるご指導とご校閲をいただいた北海道大学大学院農学研究院教授 松浦英幸先生、教授 橋本誠先生、講師 崎浜靖子先生、助教 北岡直樹先生、国立研究開発法人 産業技術総合研究所 総括研究主幹 森田直樹先生に心から感謝の意を表します。また生態化学生物学研究室の皆様にも感謝致します。

研究を進めるにあたり、核内受容体アッセイのご指導及びご支援を頂きました奥澤亜美先生、主任研究員 坂下真実先生、北海道センター所長 扇谷悟先生に心より感謝申し上げます。機器分析でご助言ご指導頂いた北海道大学農学部 GC-MS & NMR 室 福士江里博士、高田祐輔先生、北海道大学グローバルファシリティセンター廣瀬知弘先生、株式会社エコニクスリサーチラボ 舟木由衣先生に心より感謝申し上げます。試料の加工凍結乾燥のご支援を頂いた地方独立行政法人北海道立総合研究機構食品加工研究センター 専門研究員 富永一哉先生に感謝申し上げます。サラサラレッドのご提供と本研究を後押しして頂いた株式会社植物育種研究所 代表取締役 岡本大作博士、経済産業省地域イノベーション創出研究開発事業「北方系高機能作物を活用した新規健康食品の開

発」に関わりサラサラレッドの生物活性について一緒に評価研究を行ったノーステック財団 研究開発支援部部長 伊藤征也先生、核内受容体について私にご教授下さった佐藤謙一博士に心より感謝申し上げます。

社会人から博士課程の学生になることに理解を示してくれ3年間支援してくれた妻の玲菜に心から感謝致します。また学ぶ機会を与えてくれた娘の詩織に感謝します。博士課程への進学にご助言ご指導頂きました藤森嶺先生に感謝申し上げます。

北海道大学農学部で学ぶ機会を与えて頂き、最後まで研究者としての信念と姿勢をご教授頂きました北海道大学大学院農学研究院教授 橋床泰之先生に心より感謝申し上げます。私の様な学生を受入れて頂いたこと、他の学生と同様に厳しくご指導頂けたことに感謝致します。ありがとうございました。

本研究の一部は、経済産業省地域イノベーション創出研究開発事業と公益財団法人 栗林育英学術財団研究助成（個人研究の部）の支援により行われました。ここに感謝申し上げます。

付録

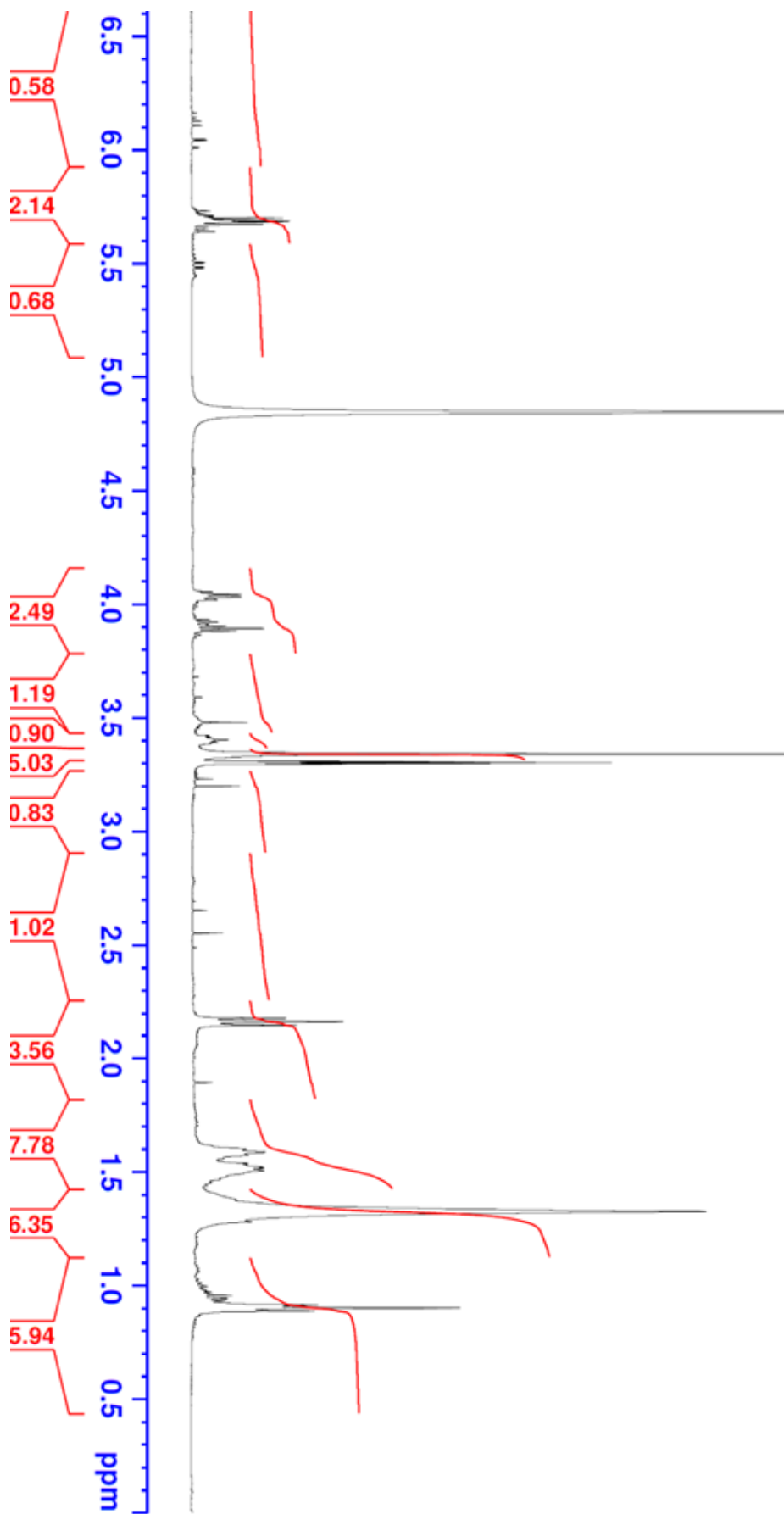


Figure 1S ^1H -NMR spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD_3OD).

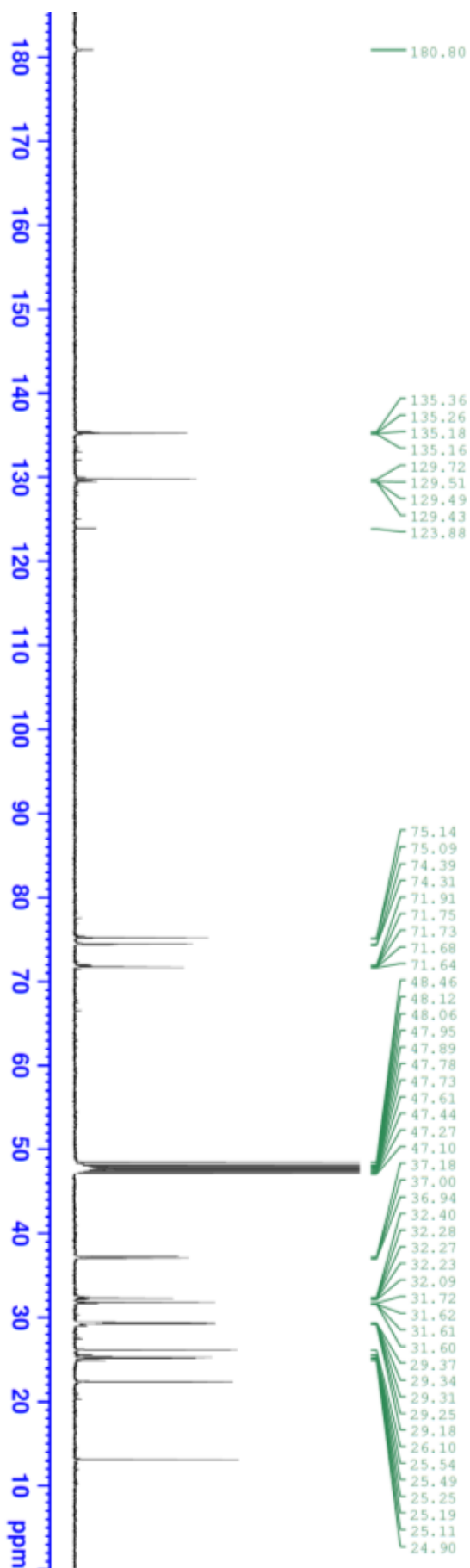


Figure 2S ^{13}C -NMR spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD_3OD).

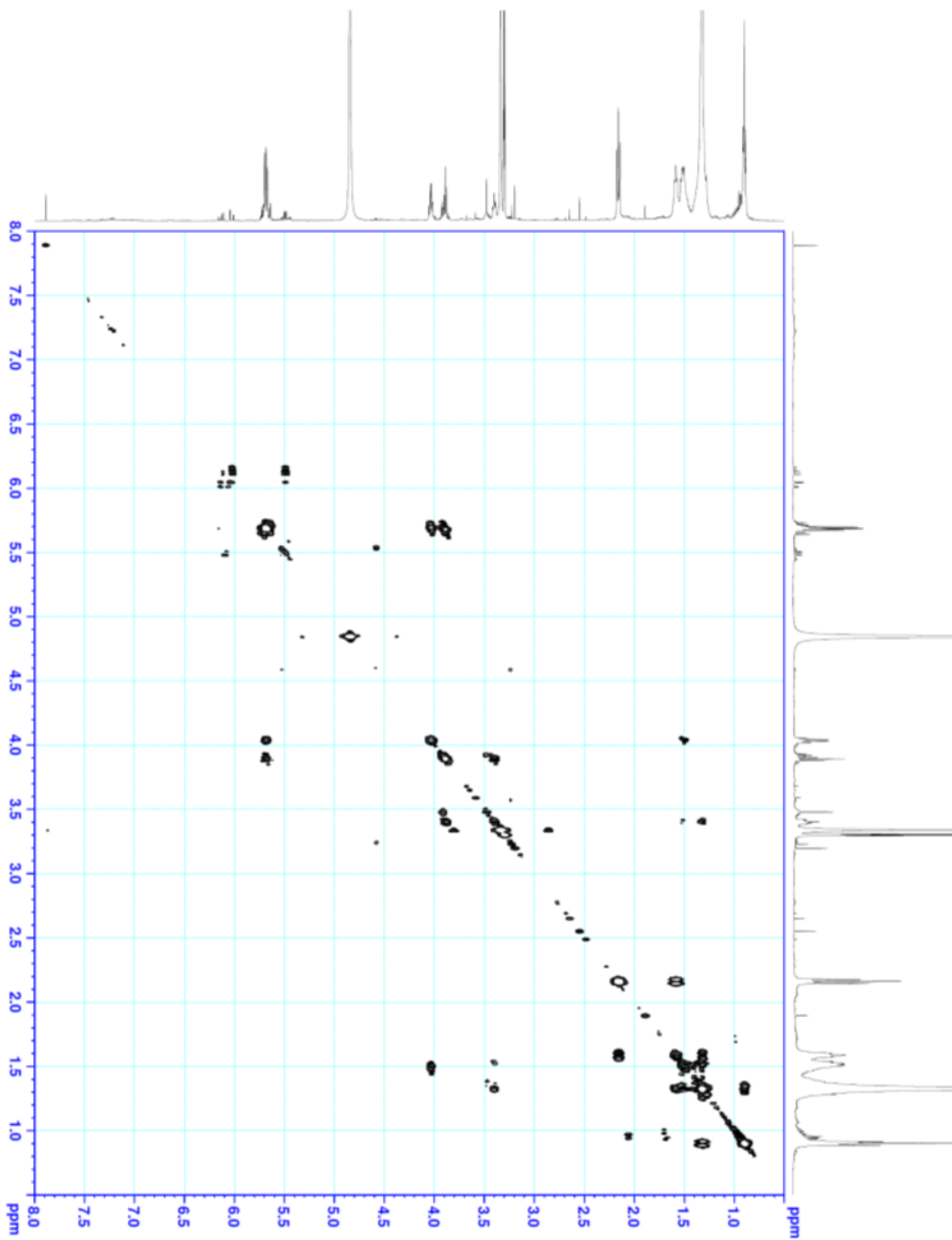
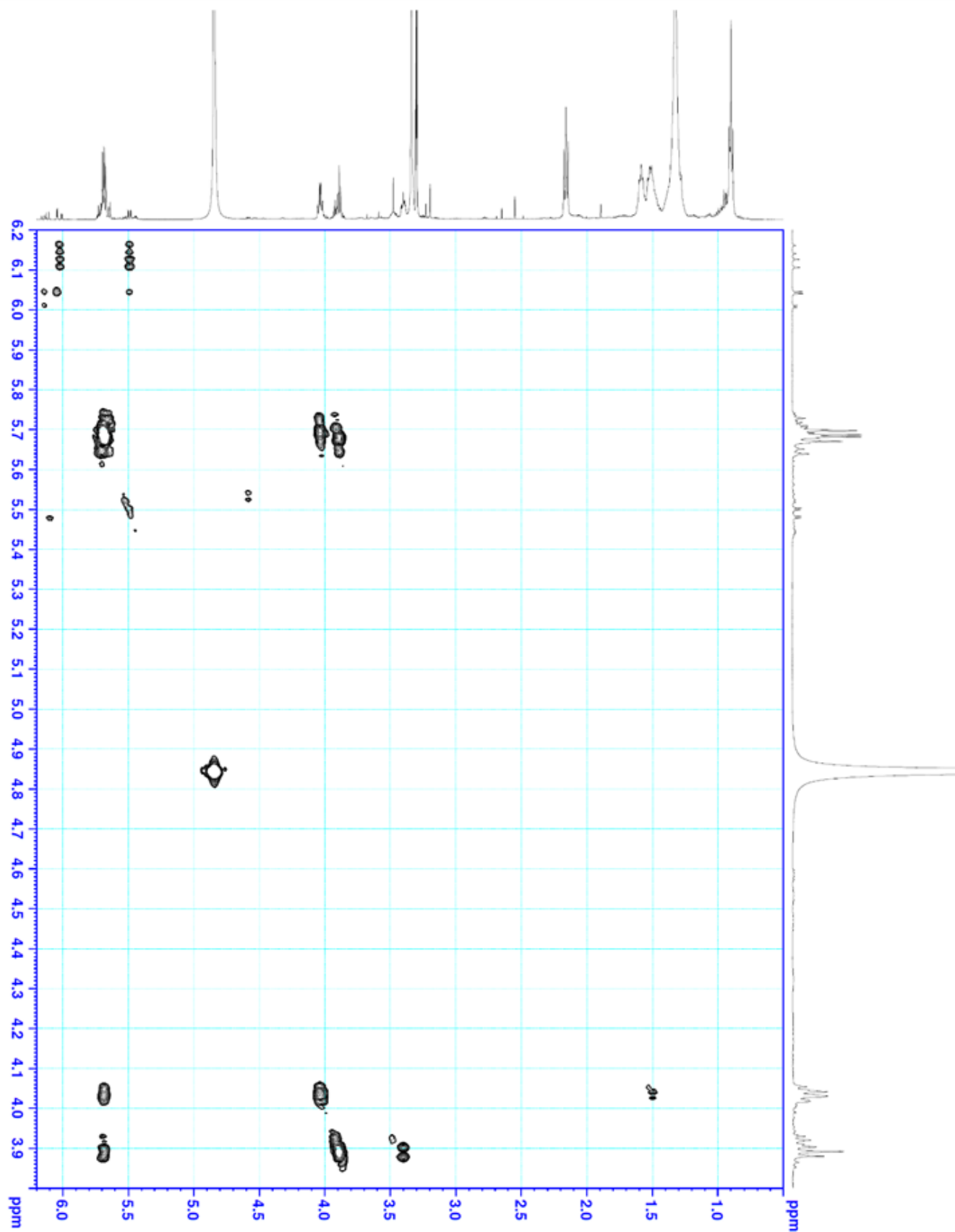


Figure 3S H-H COSY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).



4S H-H COSY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).

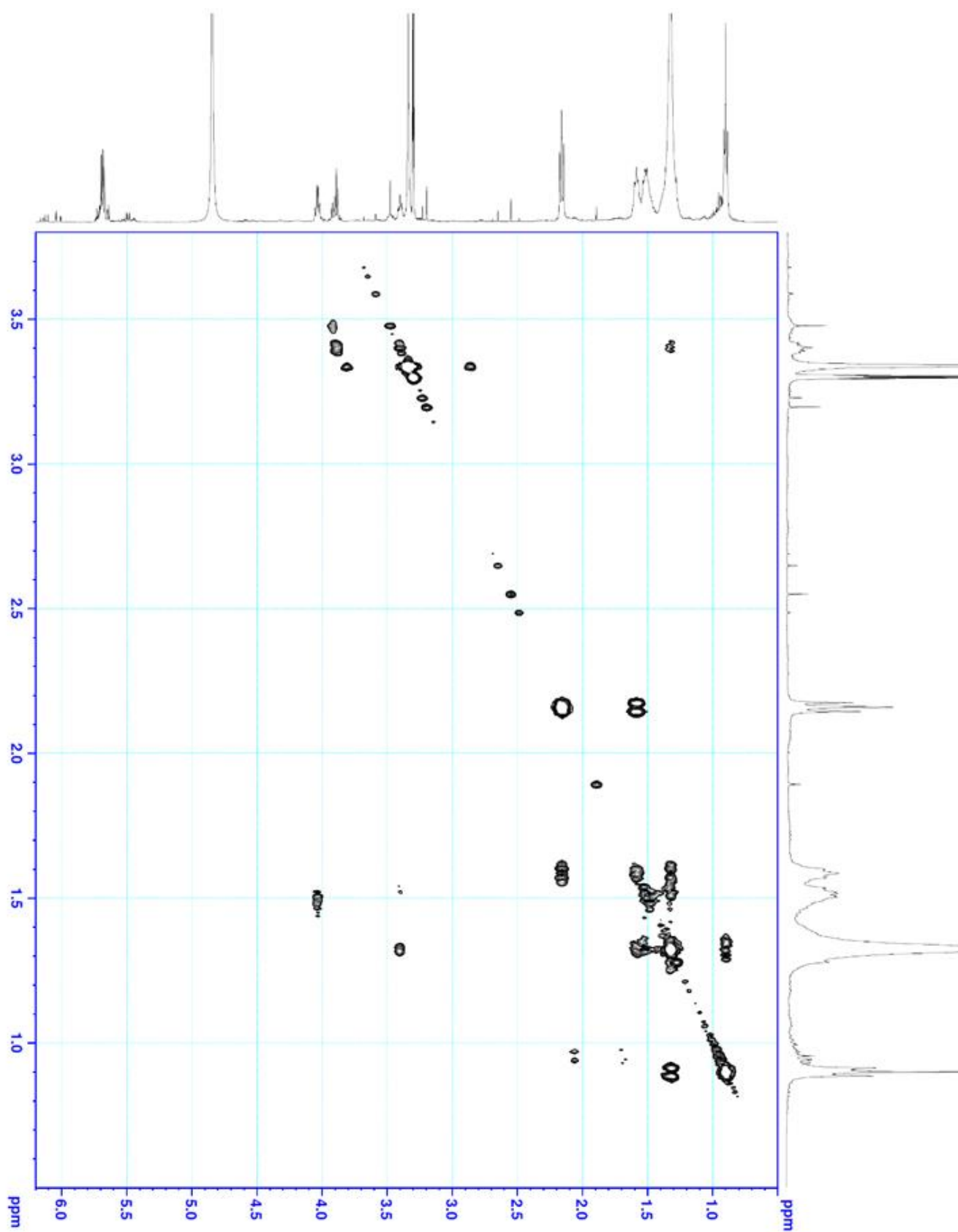


Figure S5: ¹H-¹H COSY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).

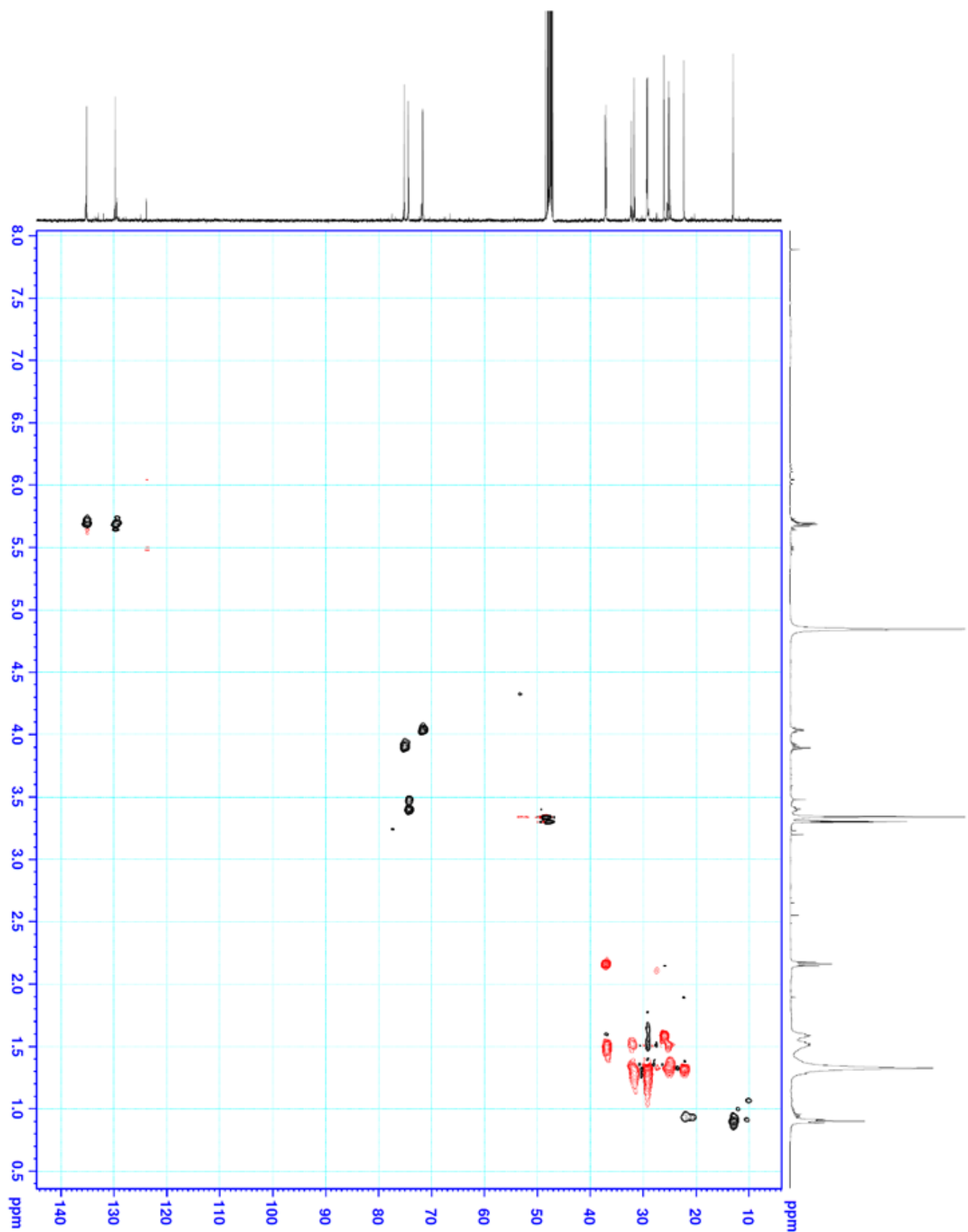


Figure 6S HSQC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).

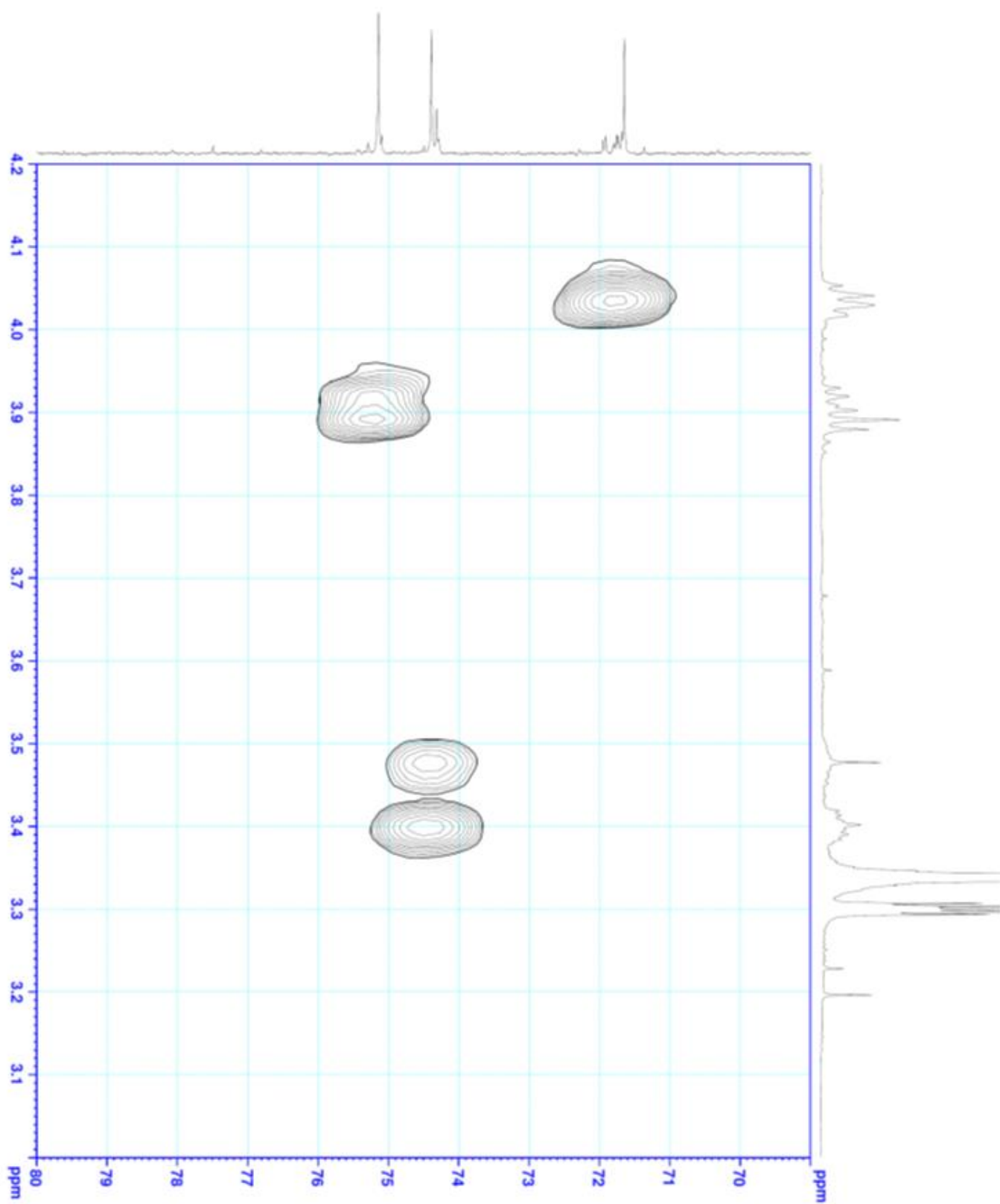
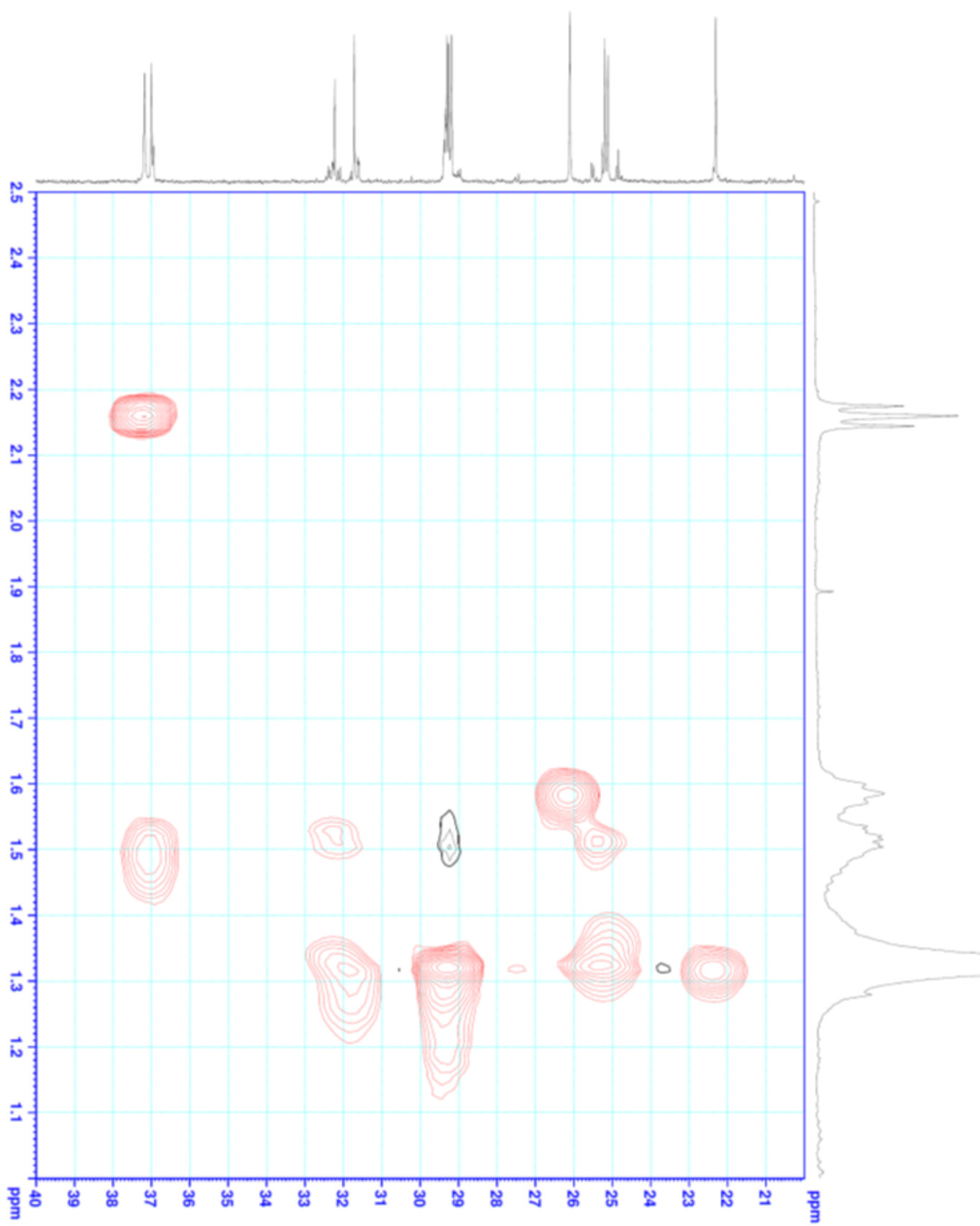


Figure 7S HSQC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD_3OD).



8S HSQC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD_3OD).

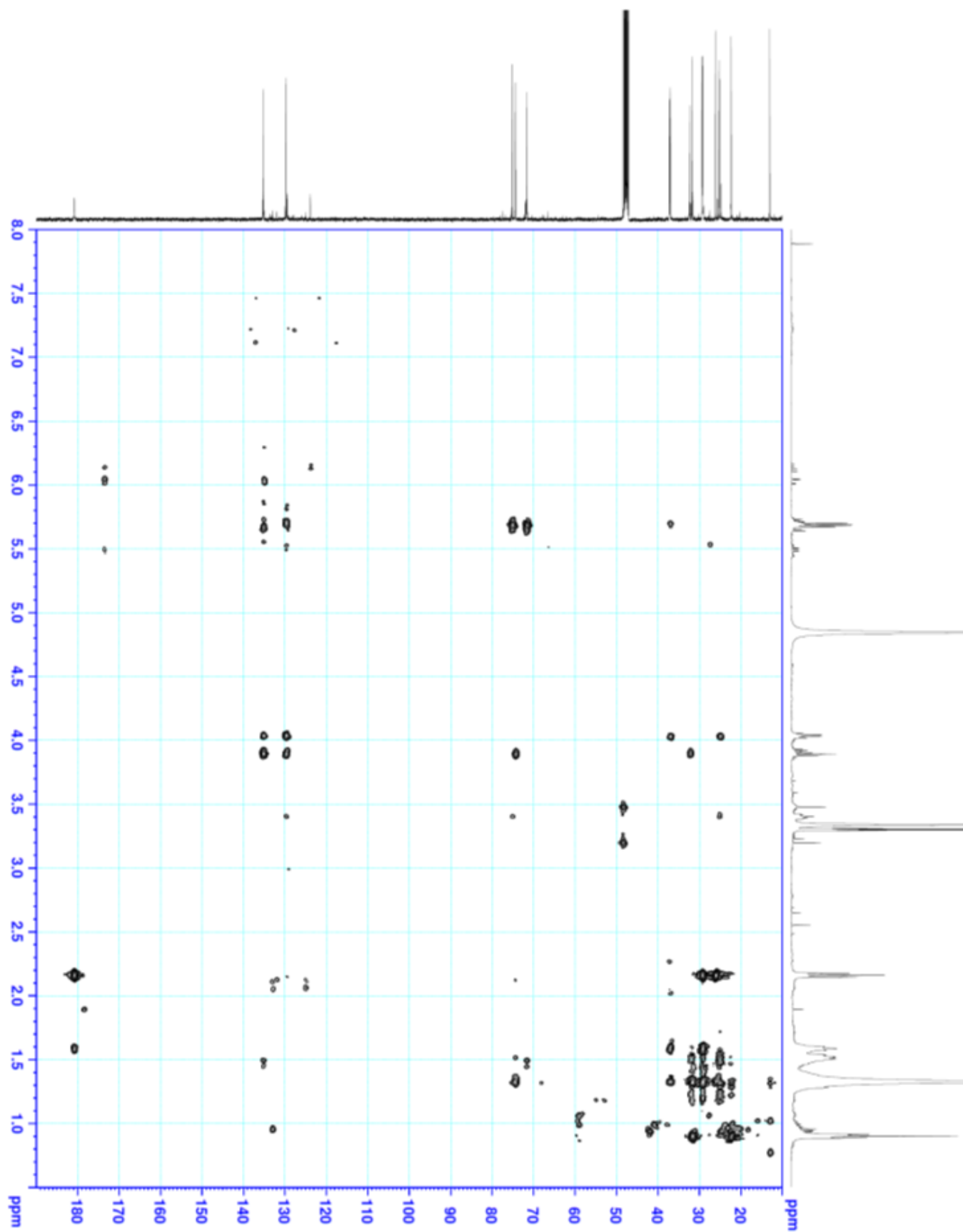
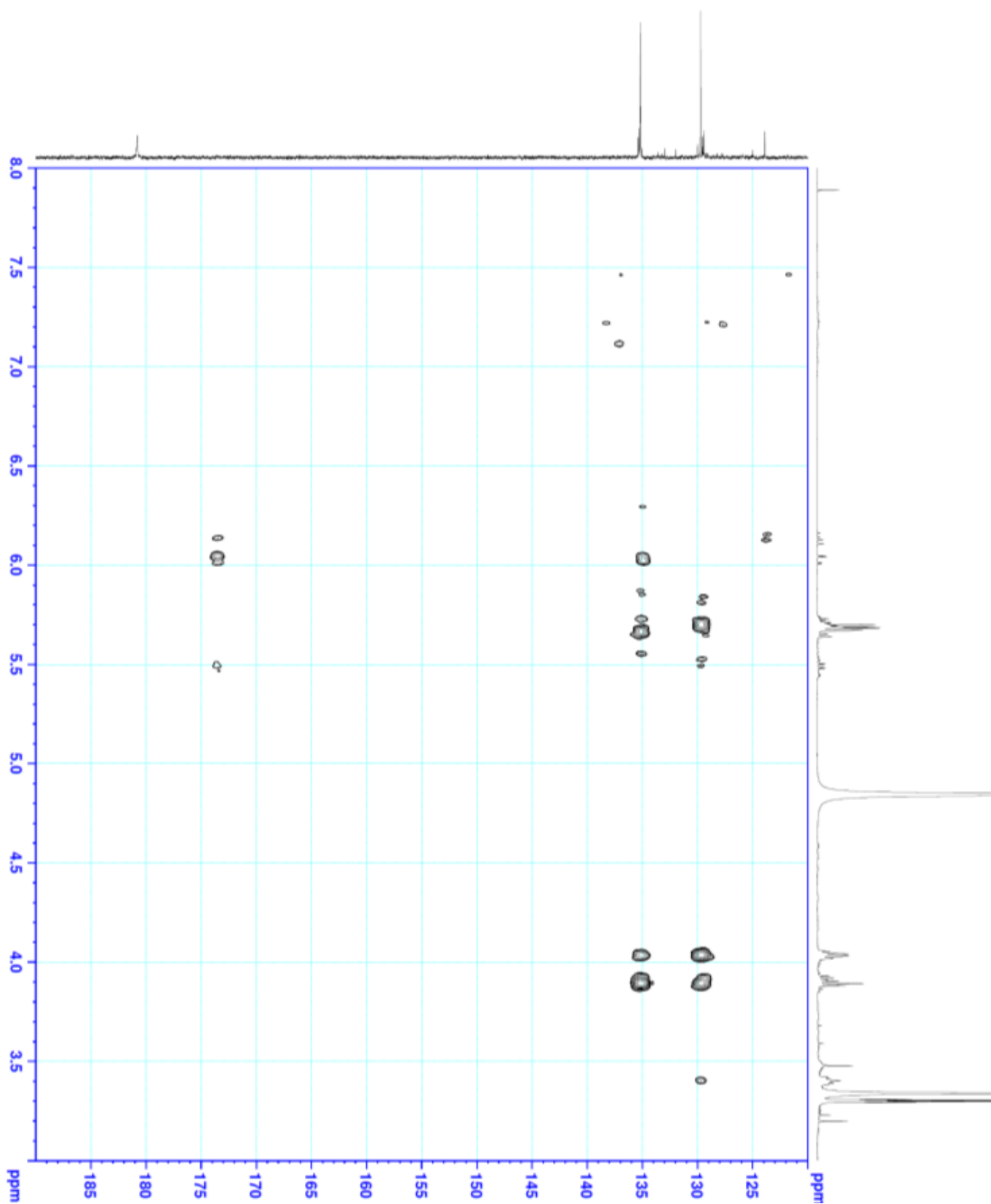


Figure S9S HMBC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).



10S HMBC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD_3OD).

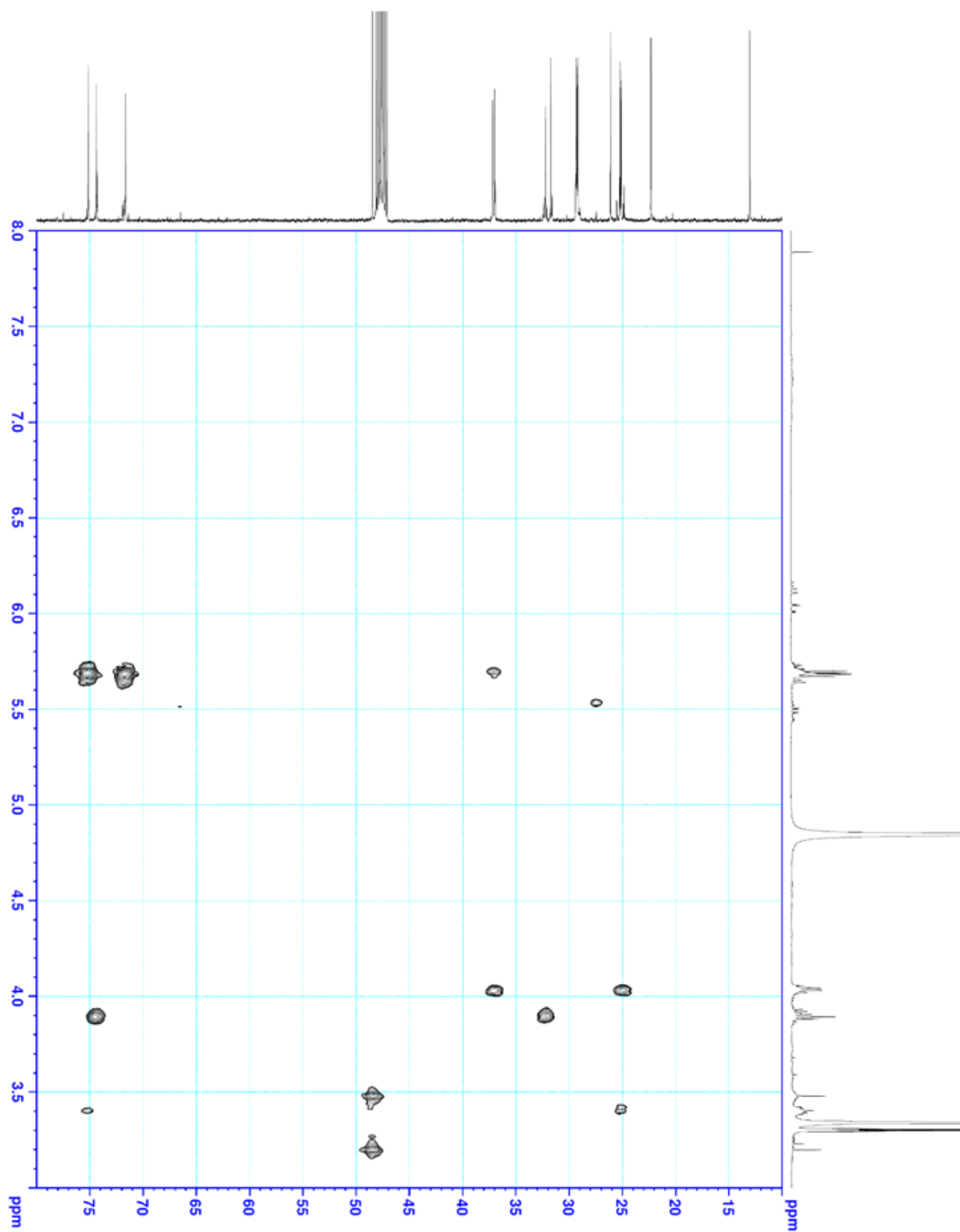
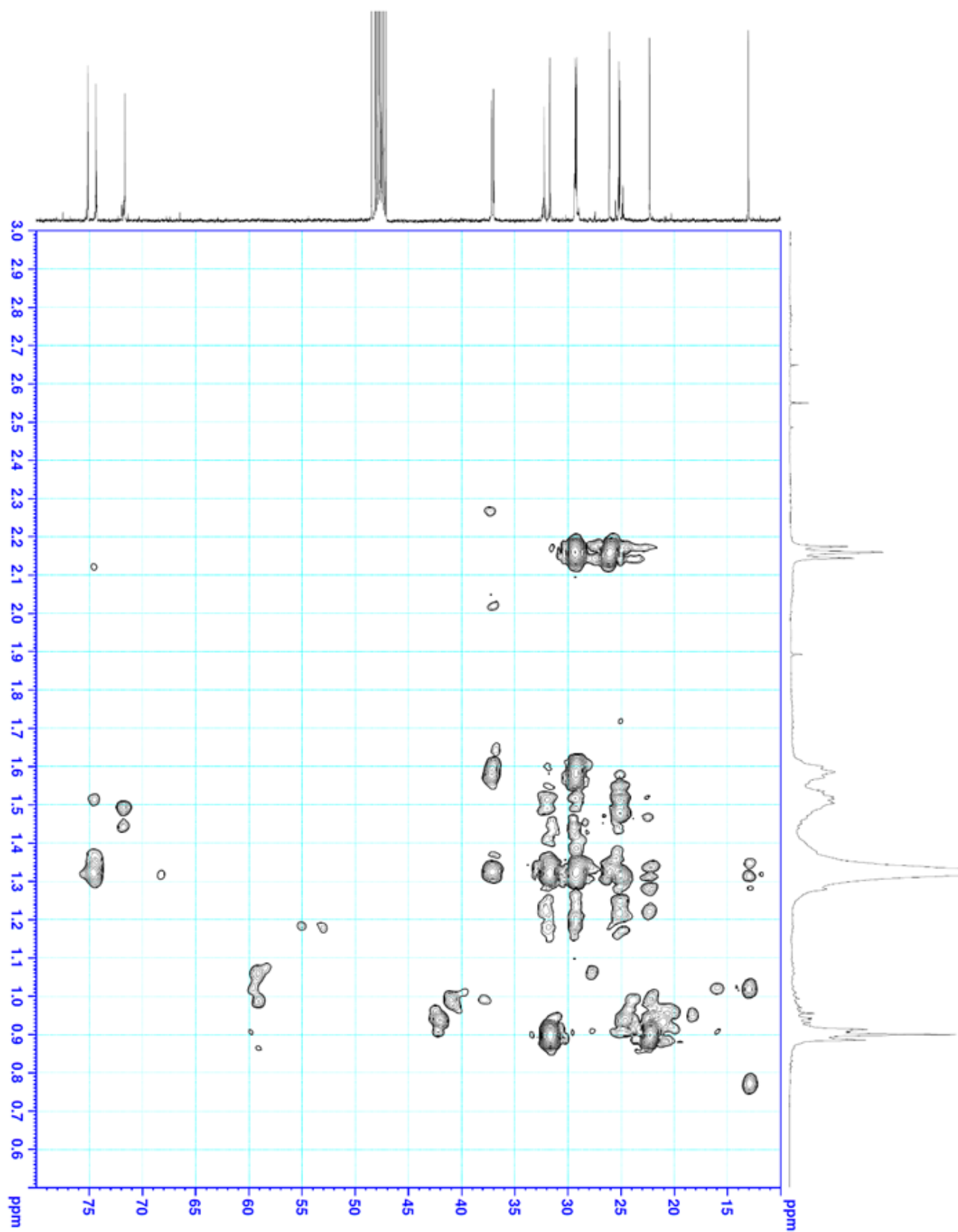


Figure 11S HMBC spectrum of (9*S*, 12*S*, 13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).



12S HMBC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).

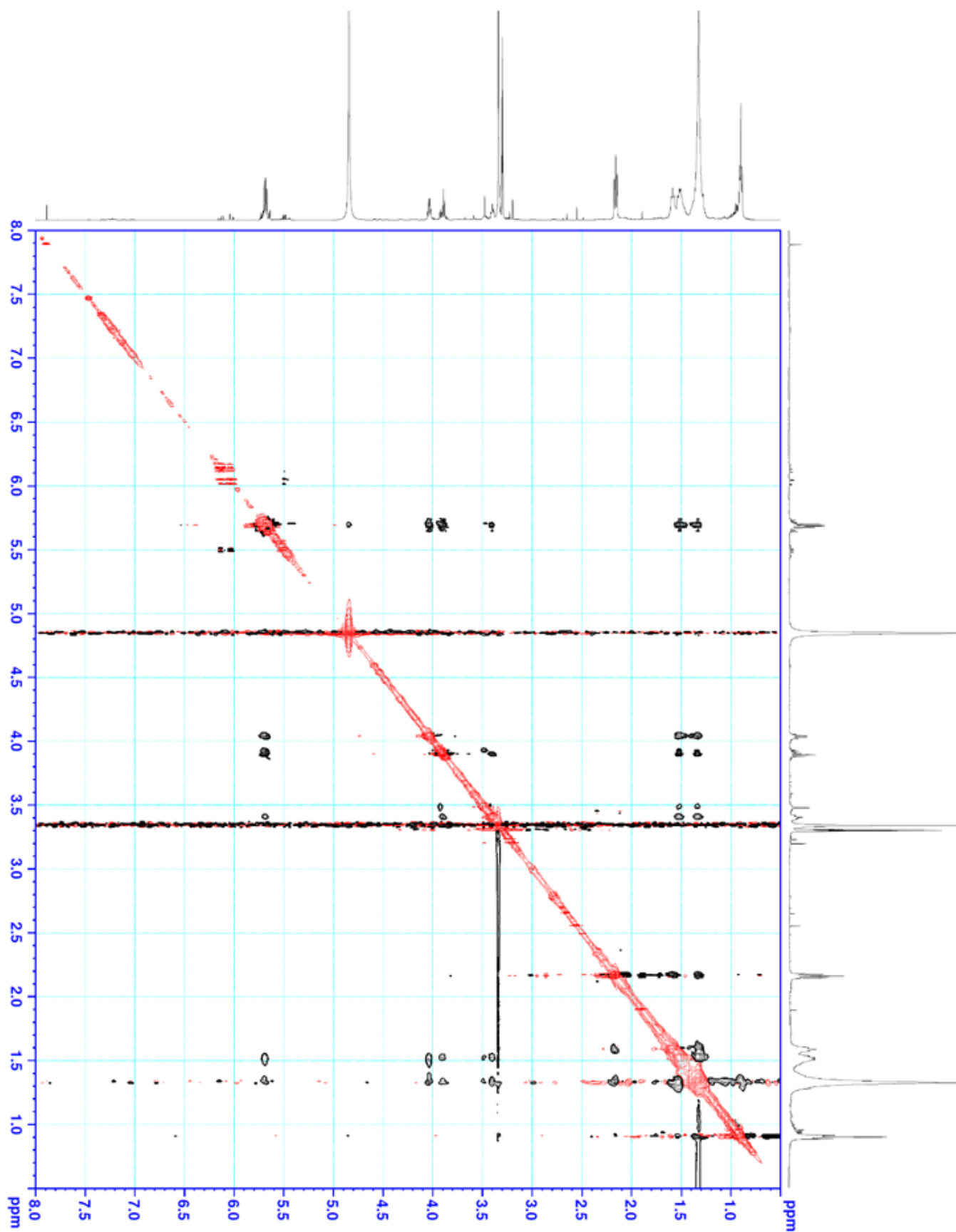


Figure 14S NOESY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).

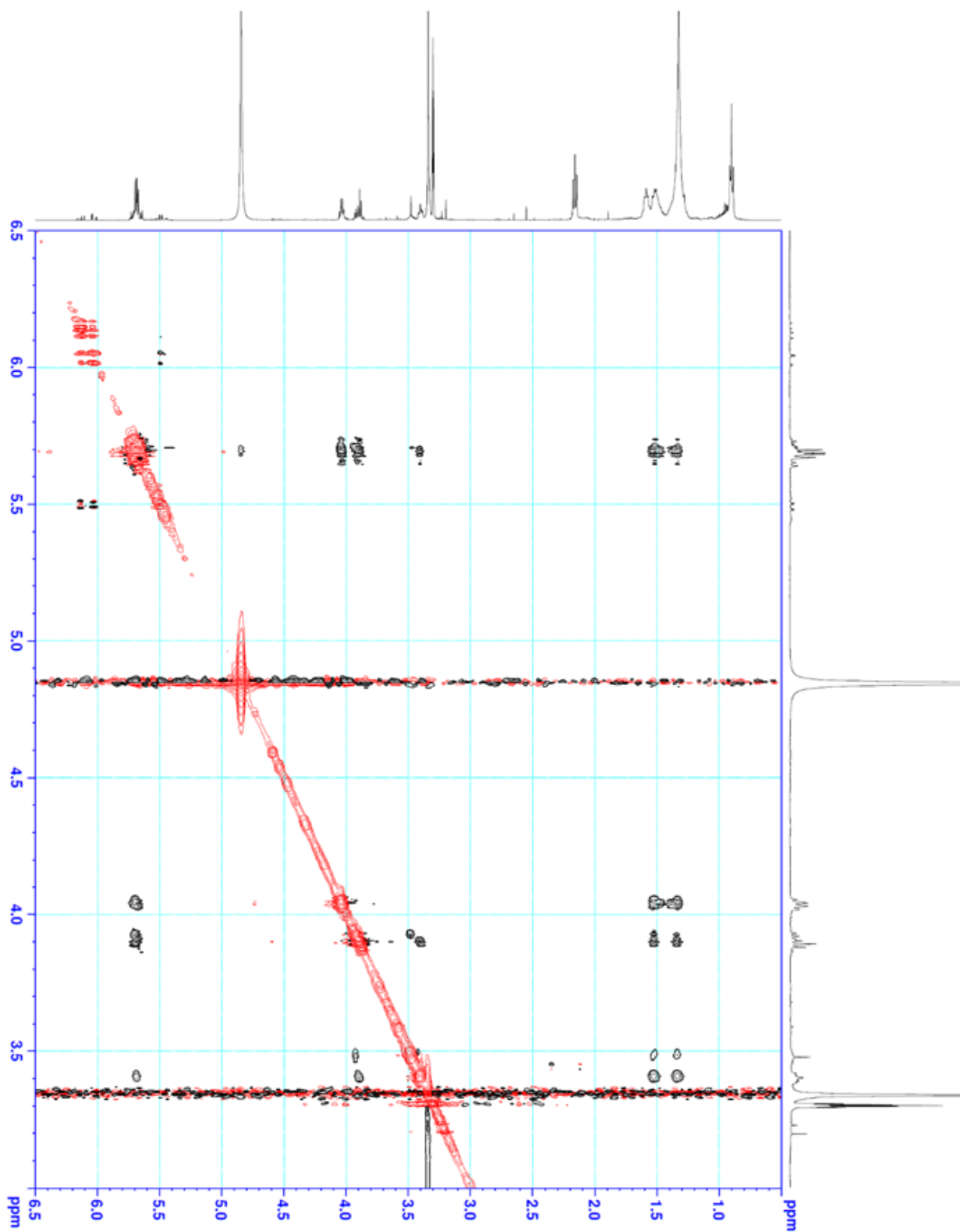
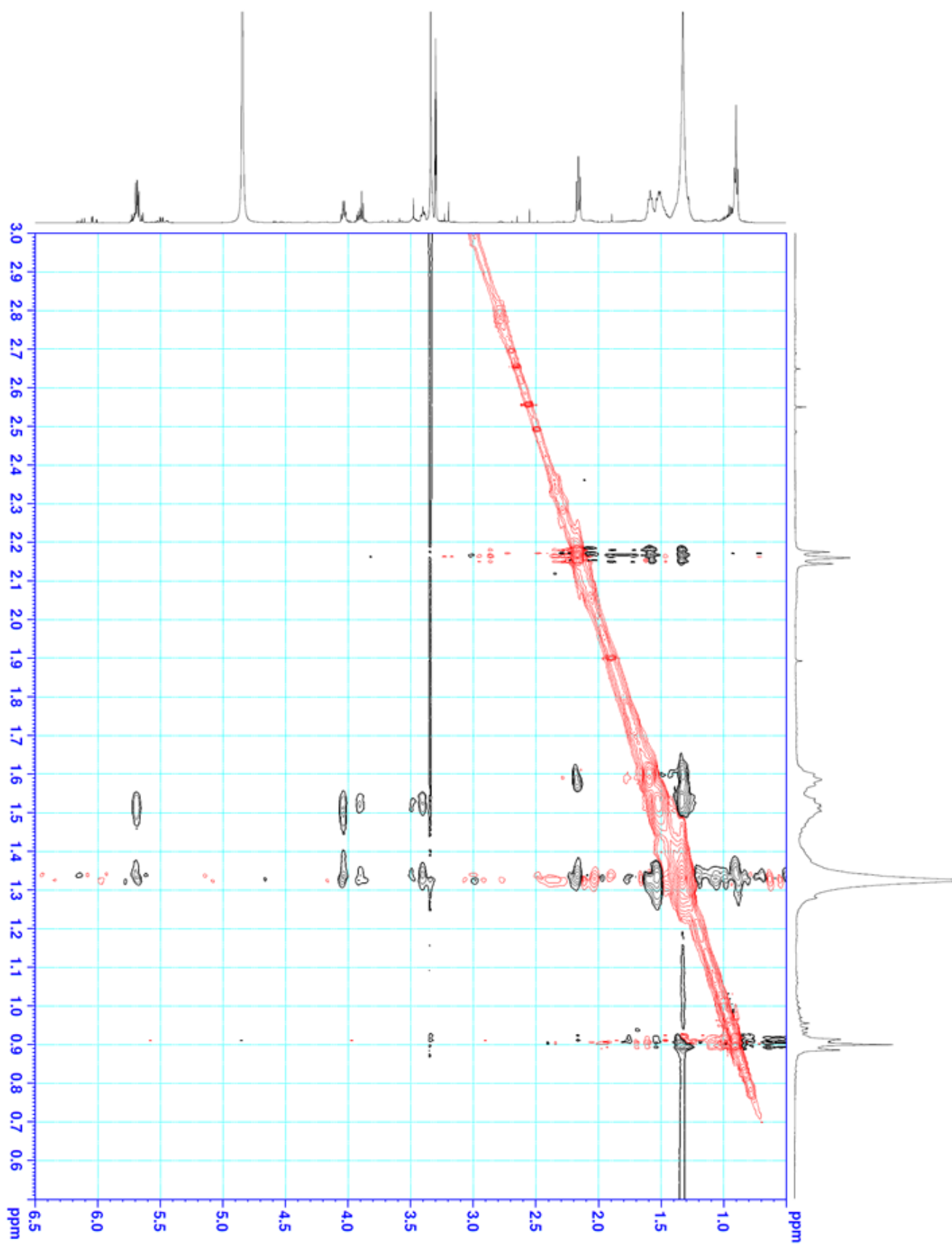


Figure 1. ¹⁵S NOESY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid (500 MHz, CD₃OD).



16S NOESY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid

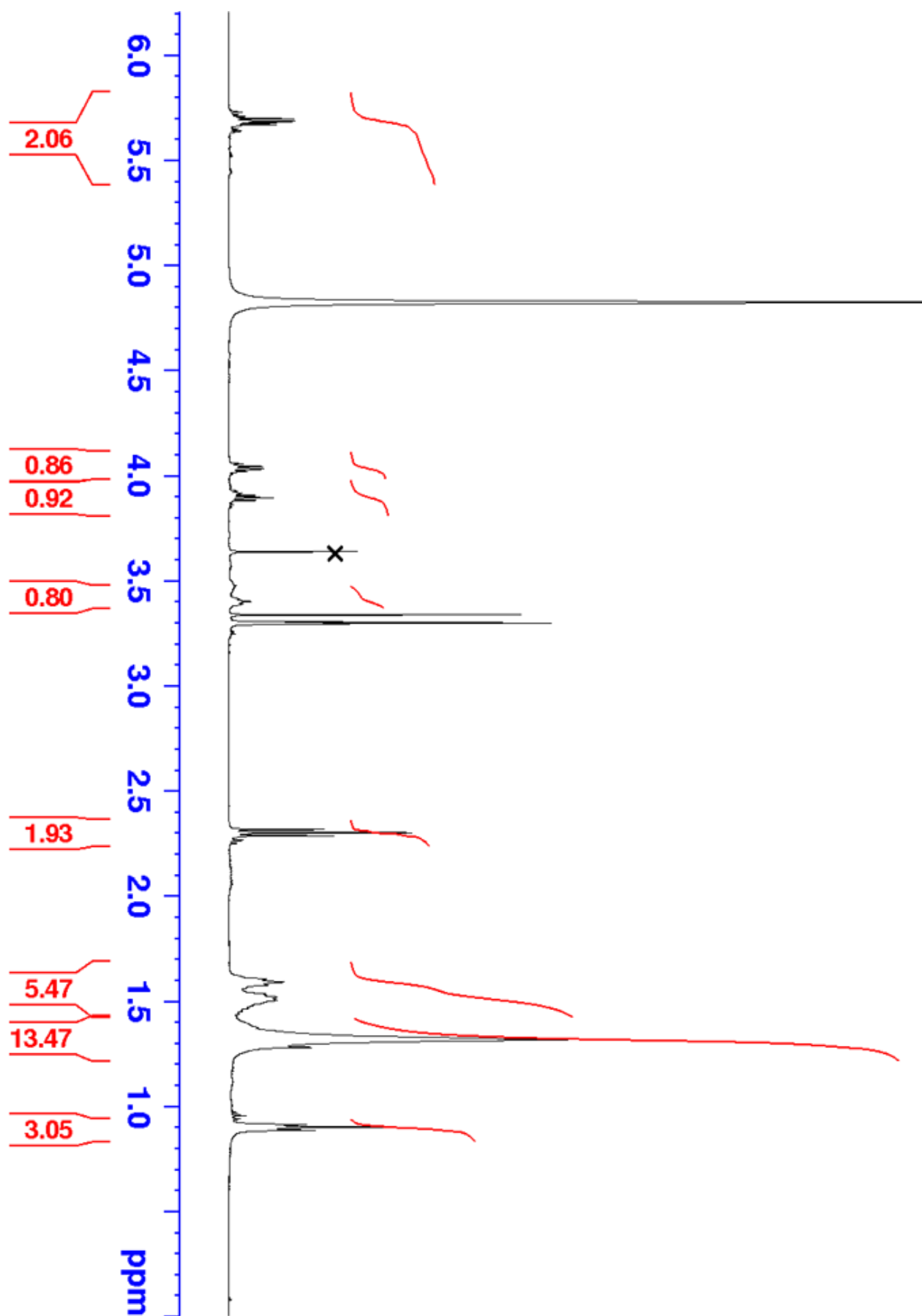


Fig. 17S ^1H -NMR spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD_3OD).

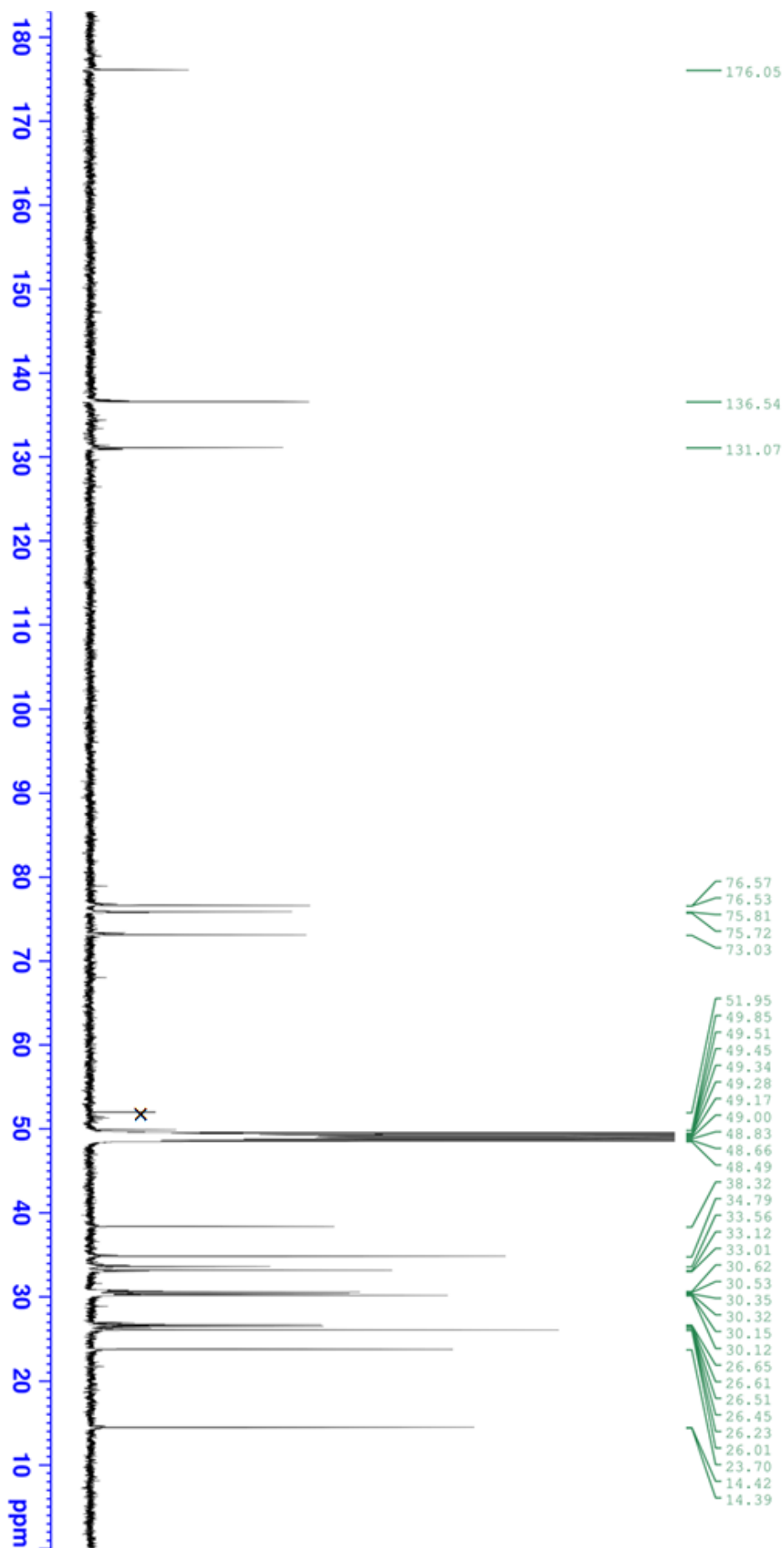


Figure 18S ^{13}C -NMR spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD_3OD).

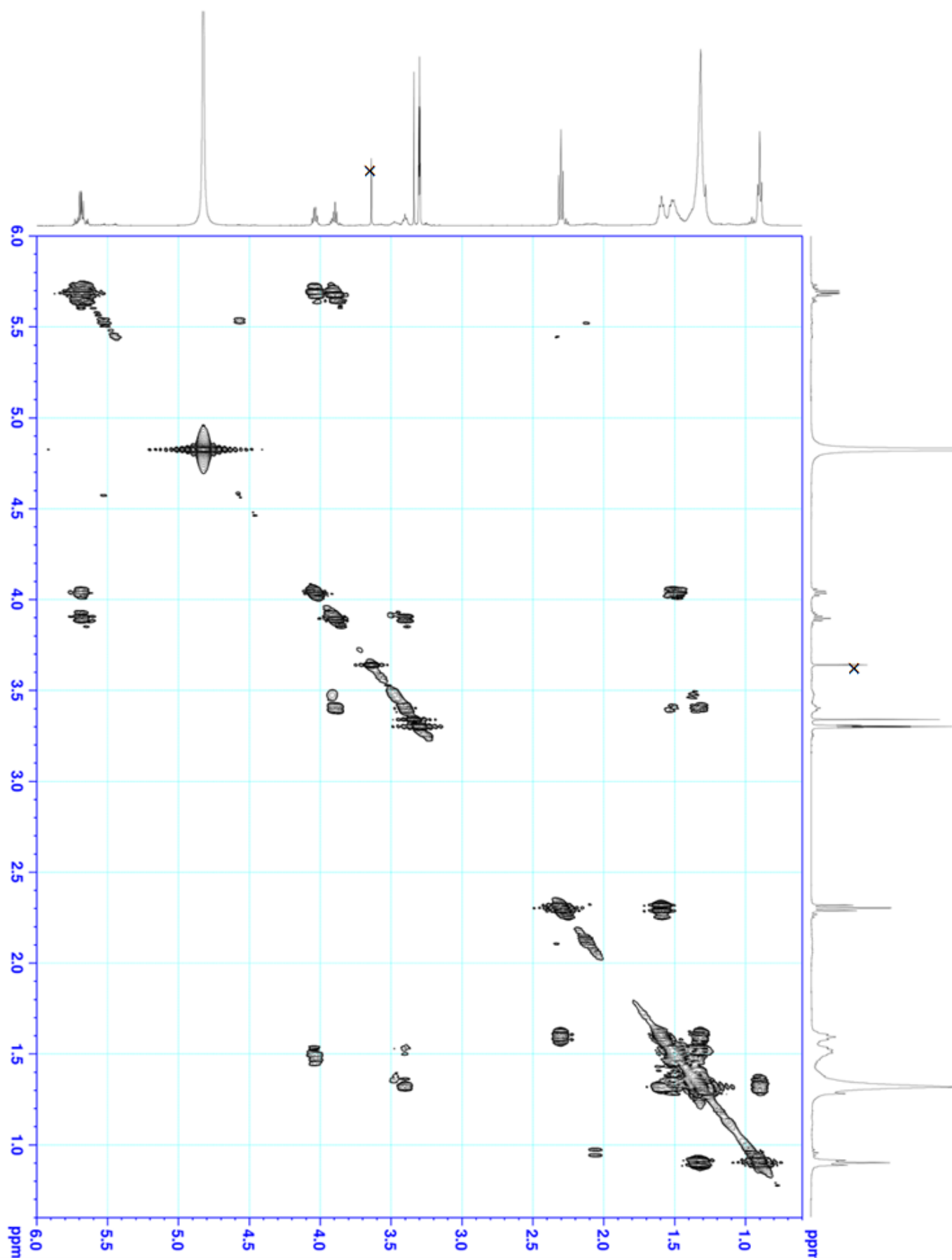
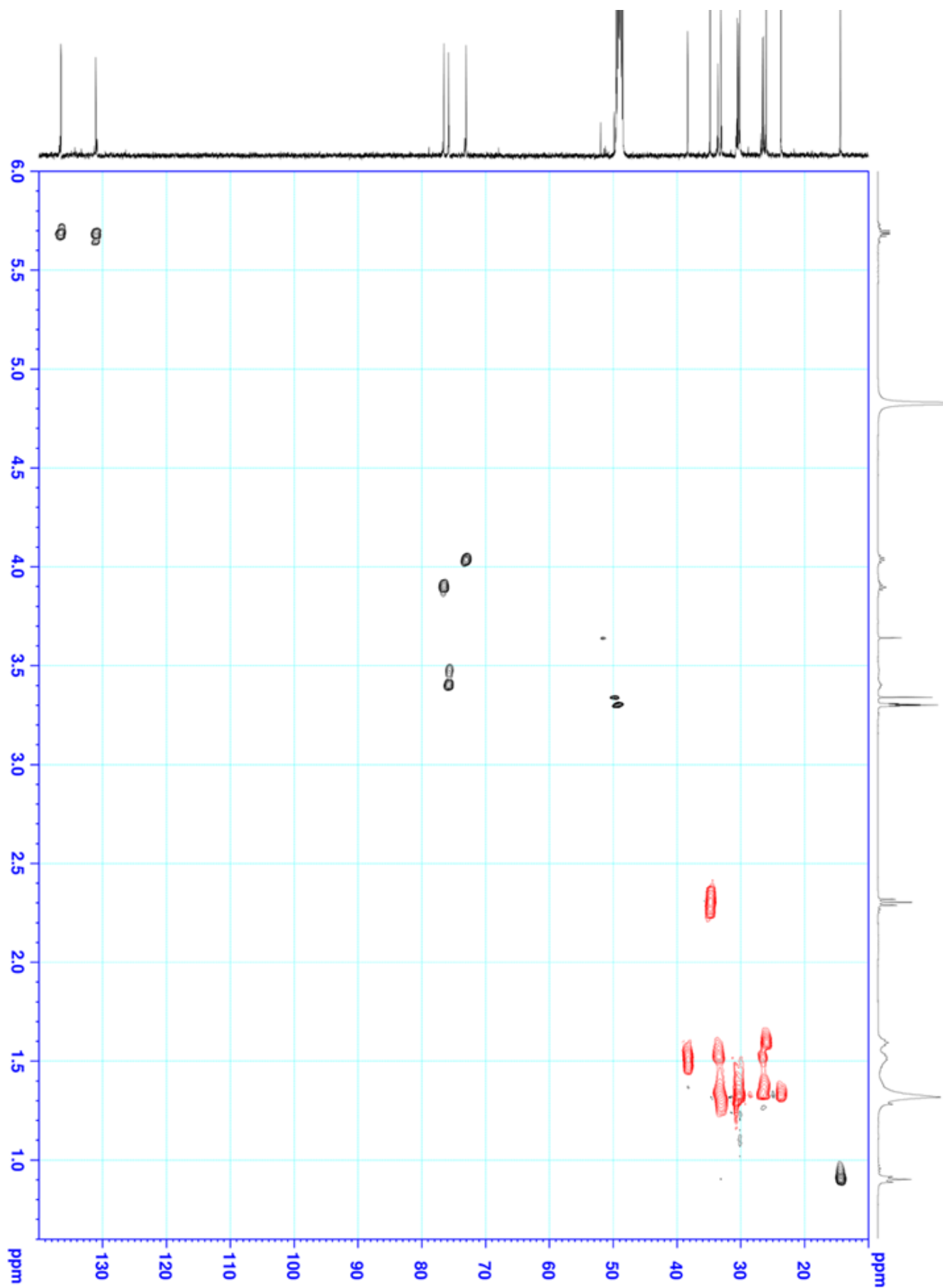


Figure 19S. ^1H - ^1H COSY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD_3OD).



2D HSQC spectrum of (9*S*, 12*S*, 13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD₃OD).

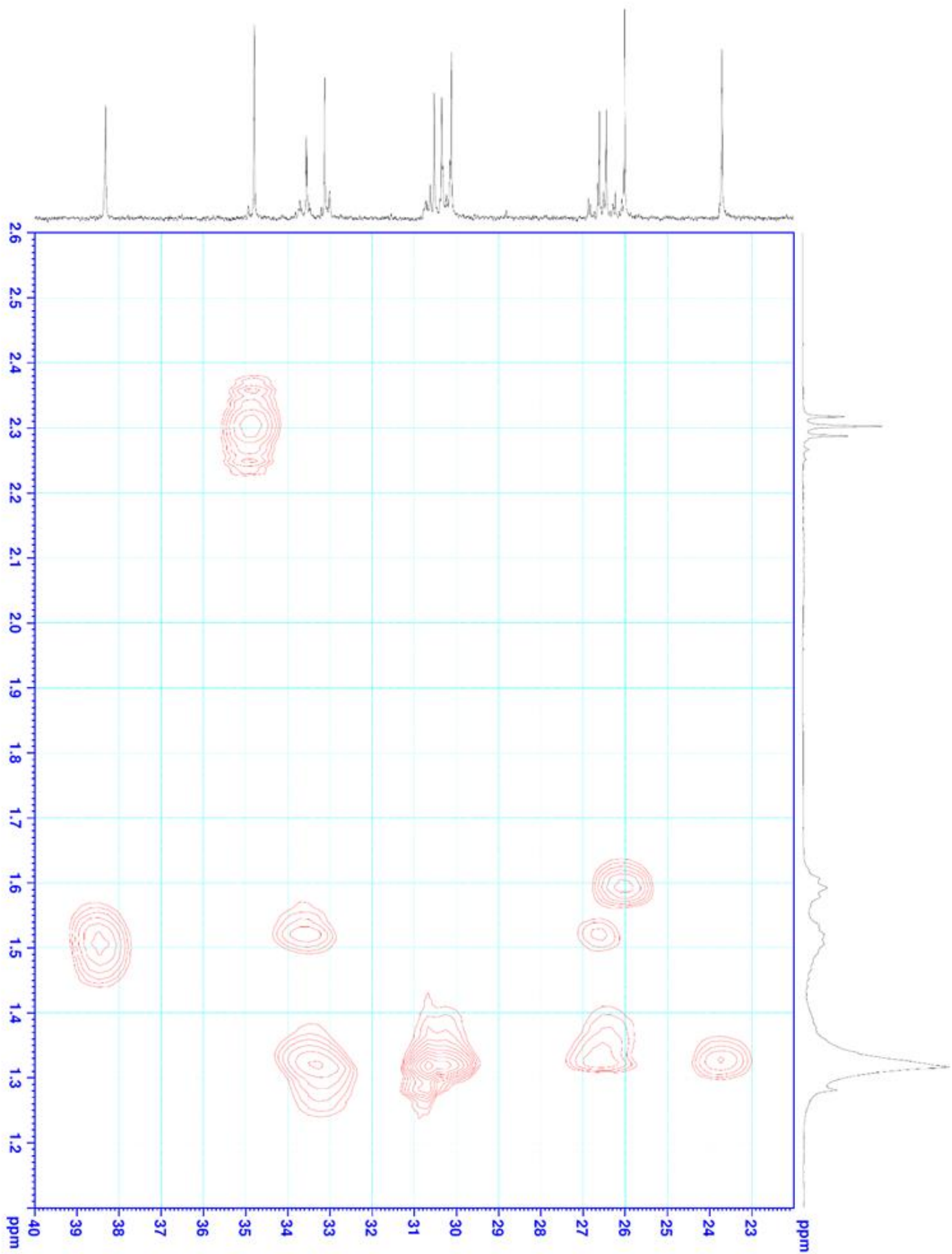
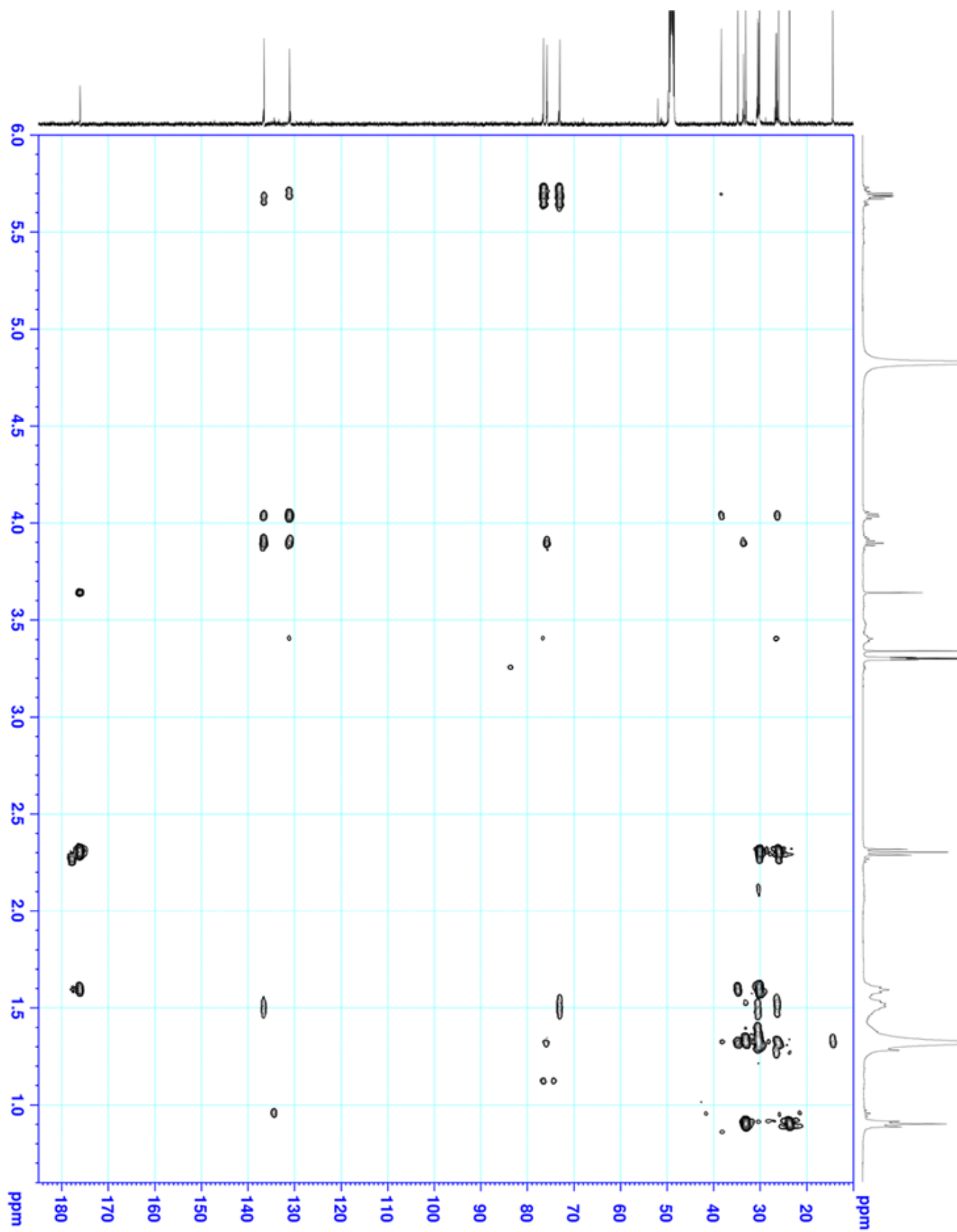
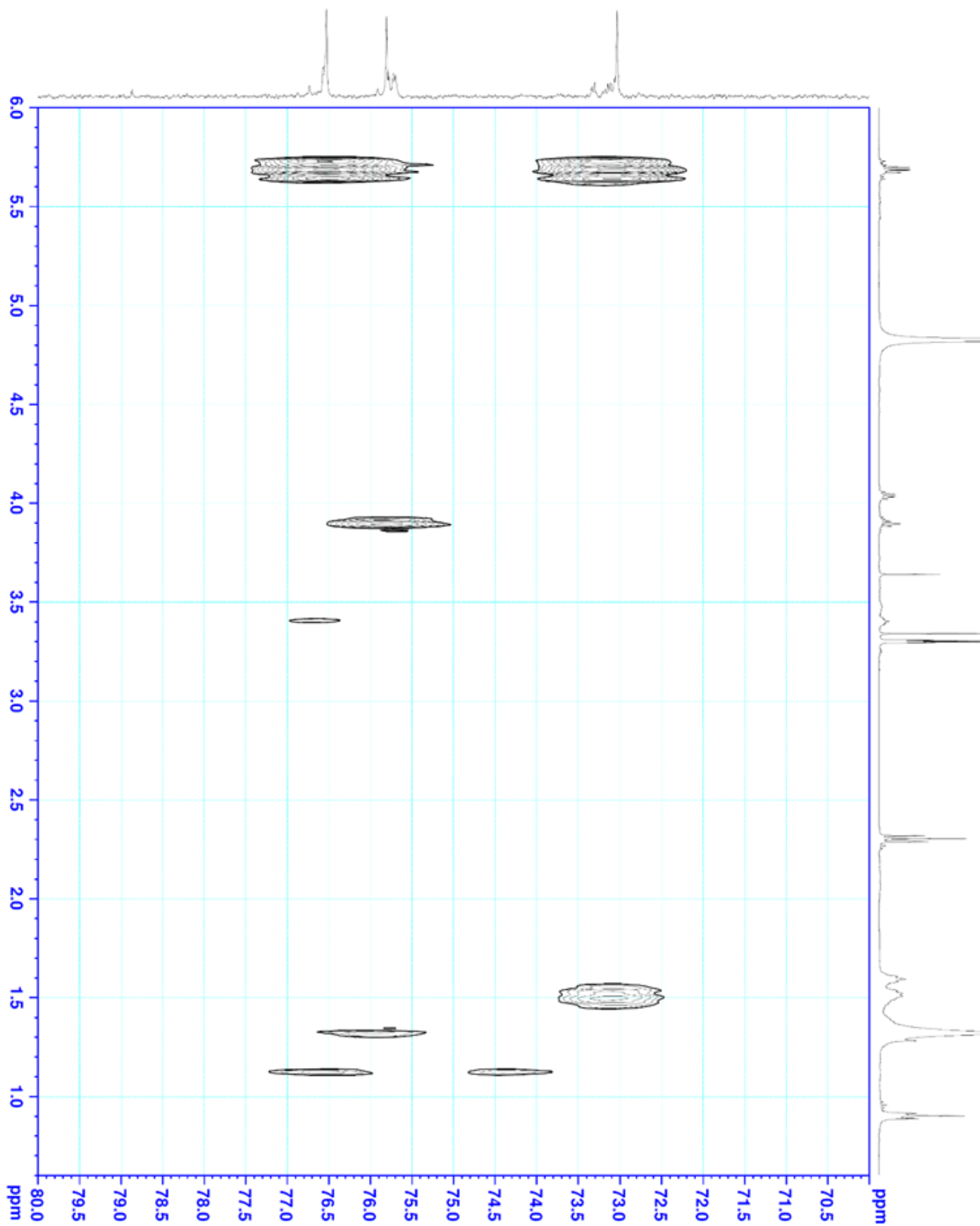


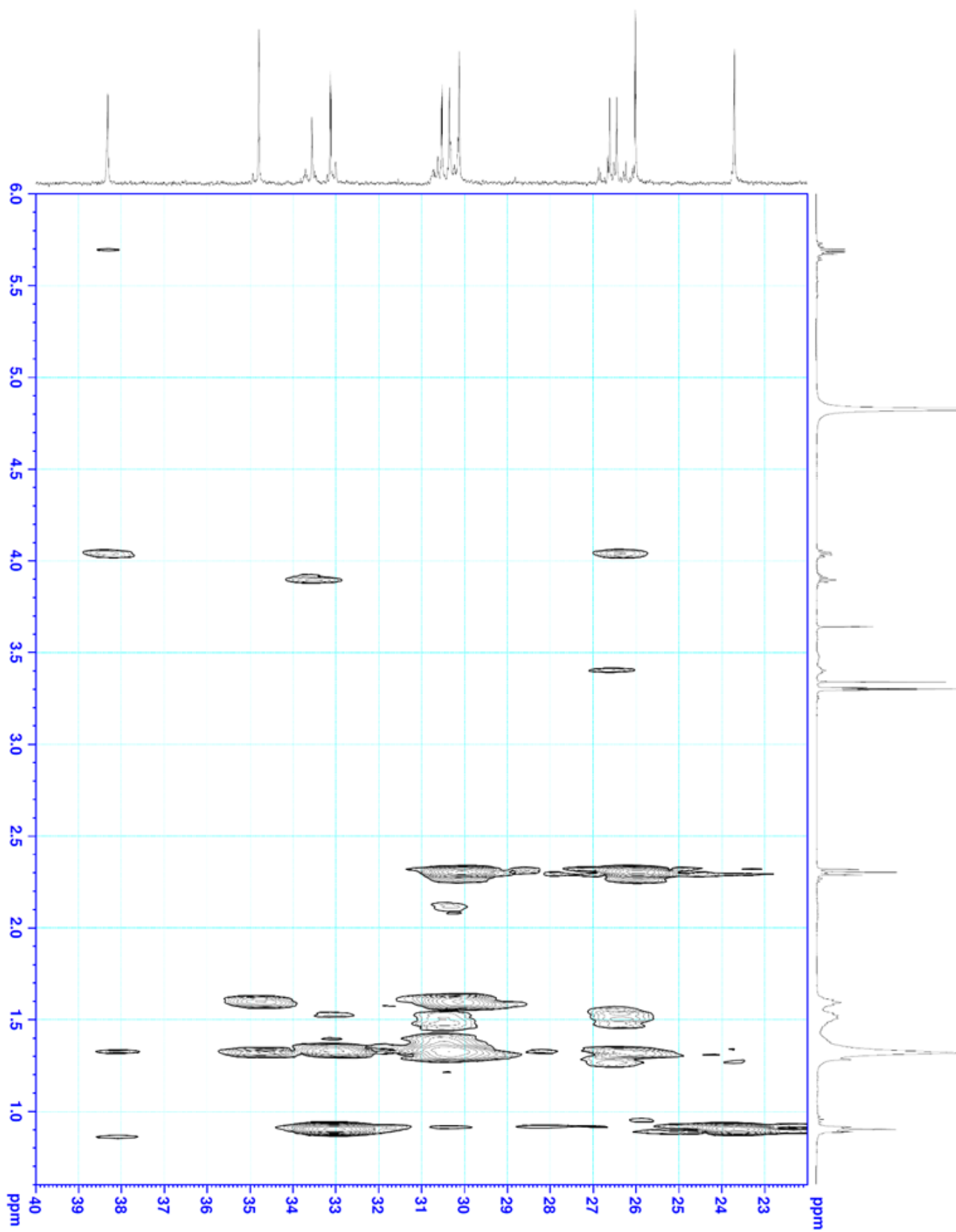
Figure 1. ²¹S HSQC spectrum of (9*S*, 12*S*, 13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD₃OD).



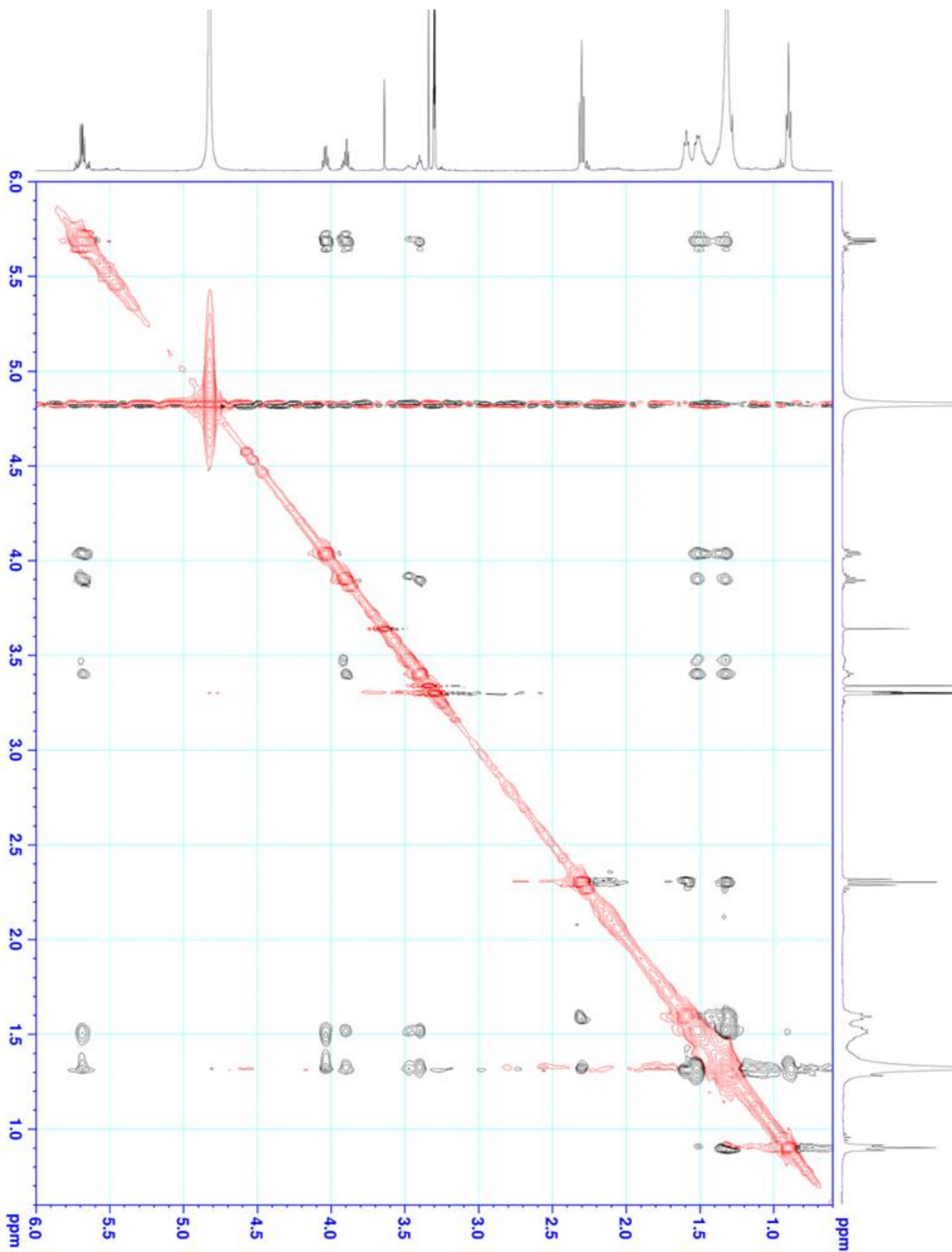
2D HMBC spectrum of (9*S*, 12*S*, 13*S*)-(10*E*)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD₃OD).



2D ^{13}C - ^{13}C HMBC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD_3OD).



24S HMBC spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD₃OD).



2D NOESY spectrum of (9S, 12S, 13S)-(10E)-9,12,13-trihydroxyoctadecenoic acid ammonium salt (500 MHz, CD₃OD).

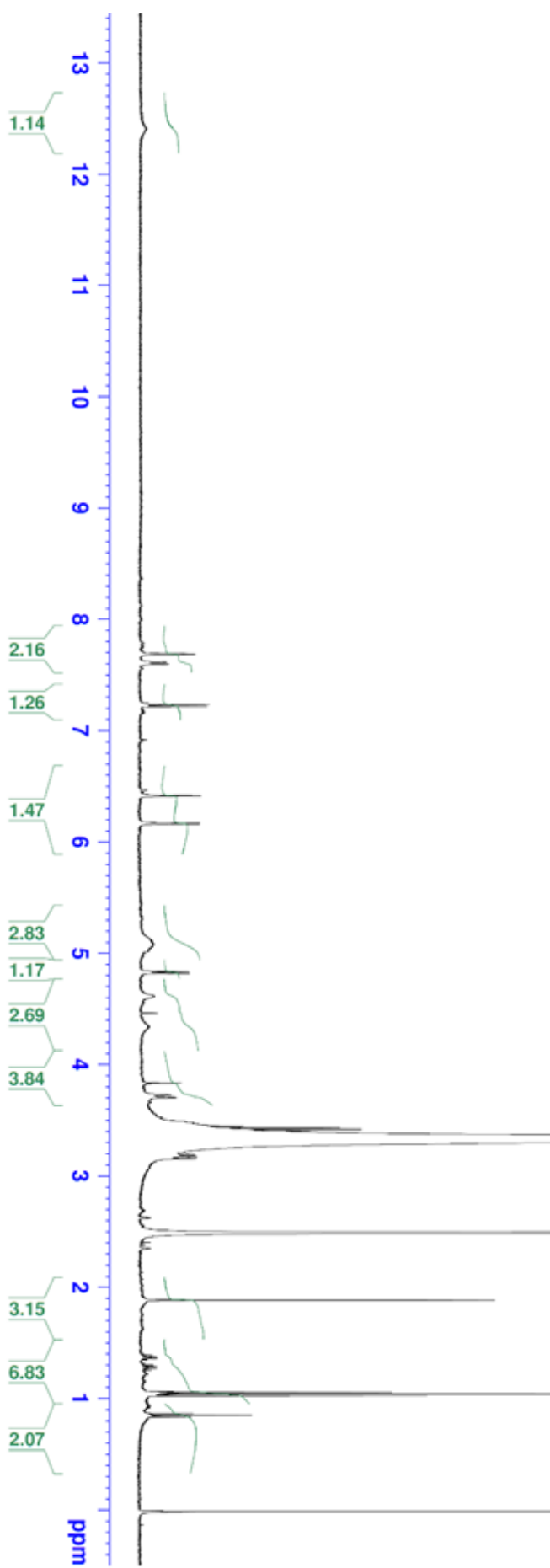
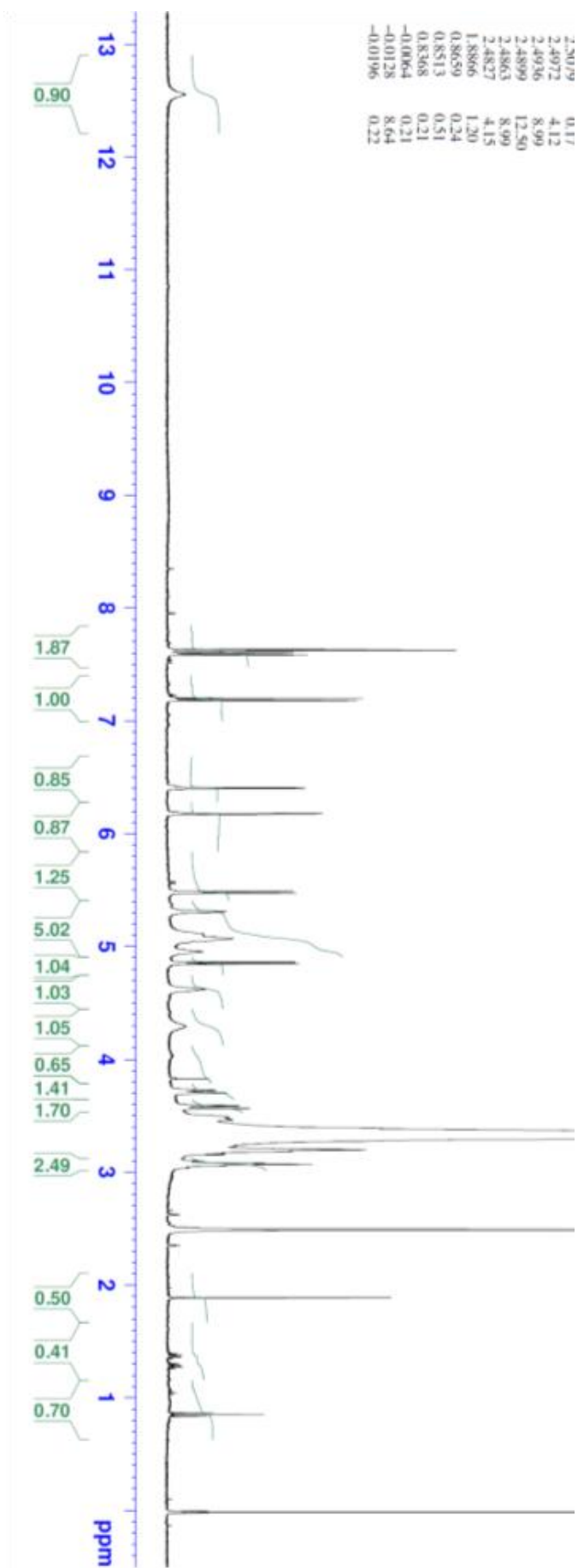
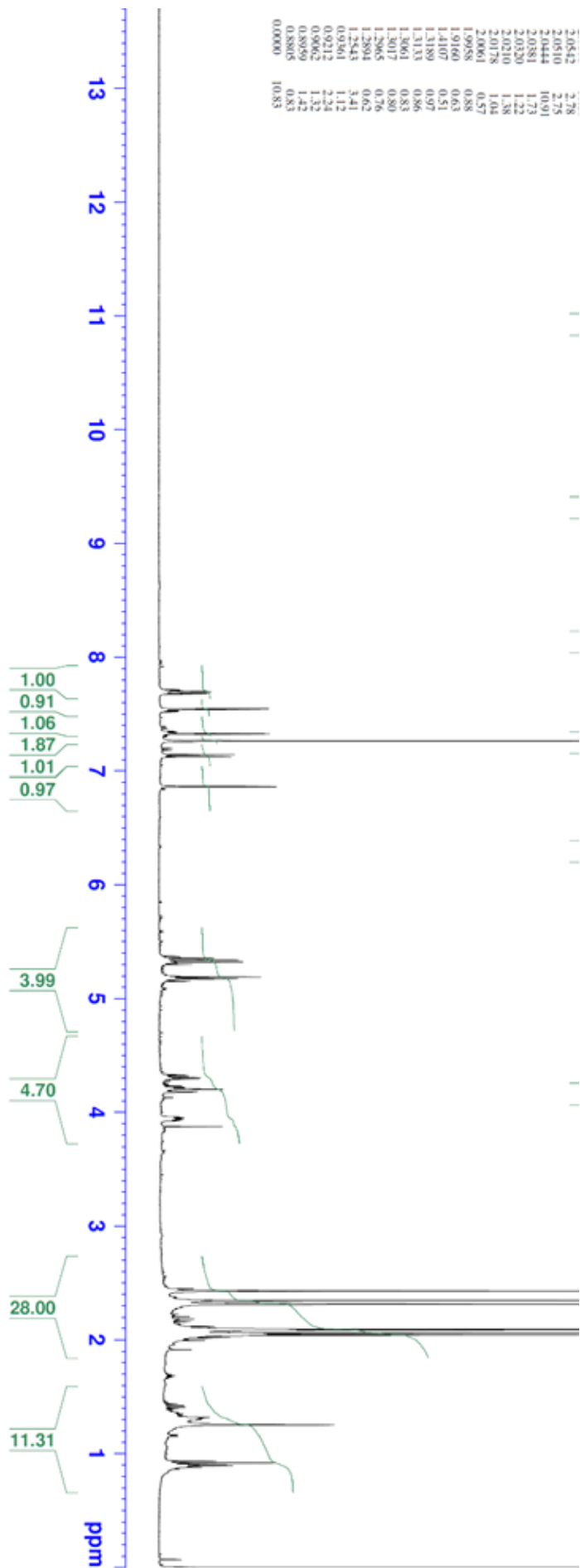


Figure 26S ^1H -NMR spectrum of quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



☒ 27S ¹H-NMR spectrum of quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, DMSO-*d*₆).



28S ^1H -NMR spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

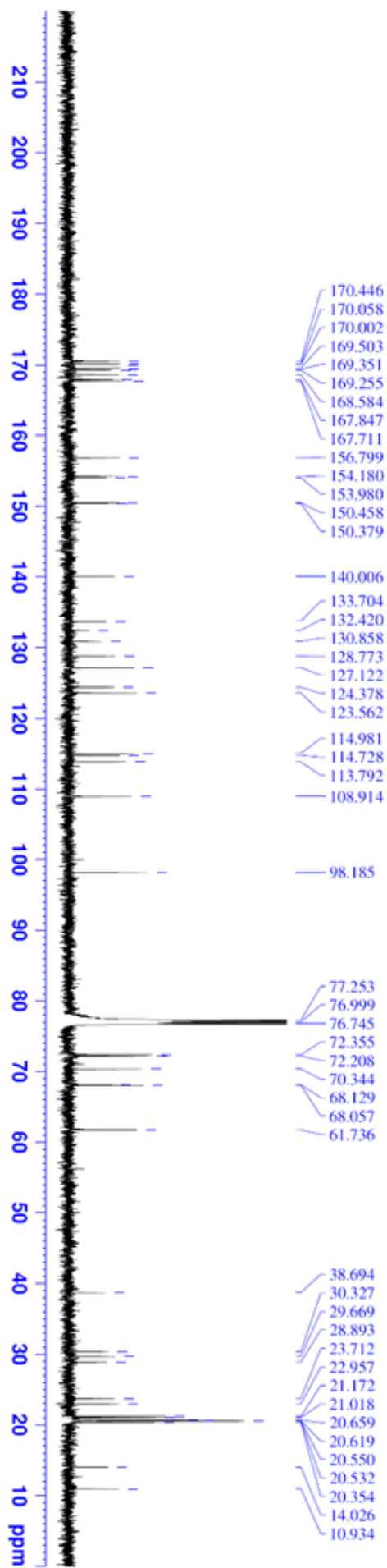


Figure S29S ^{13}C -NMR spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

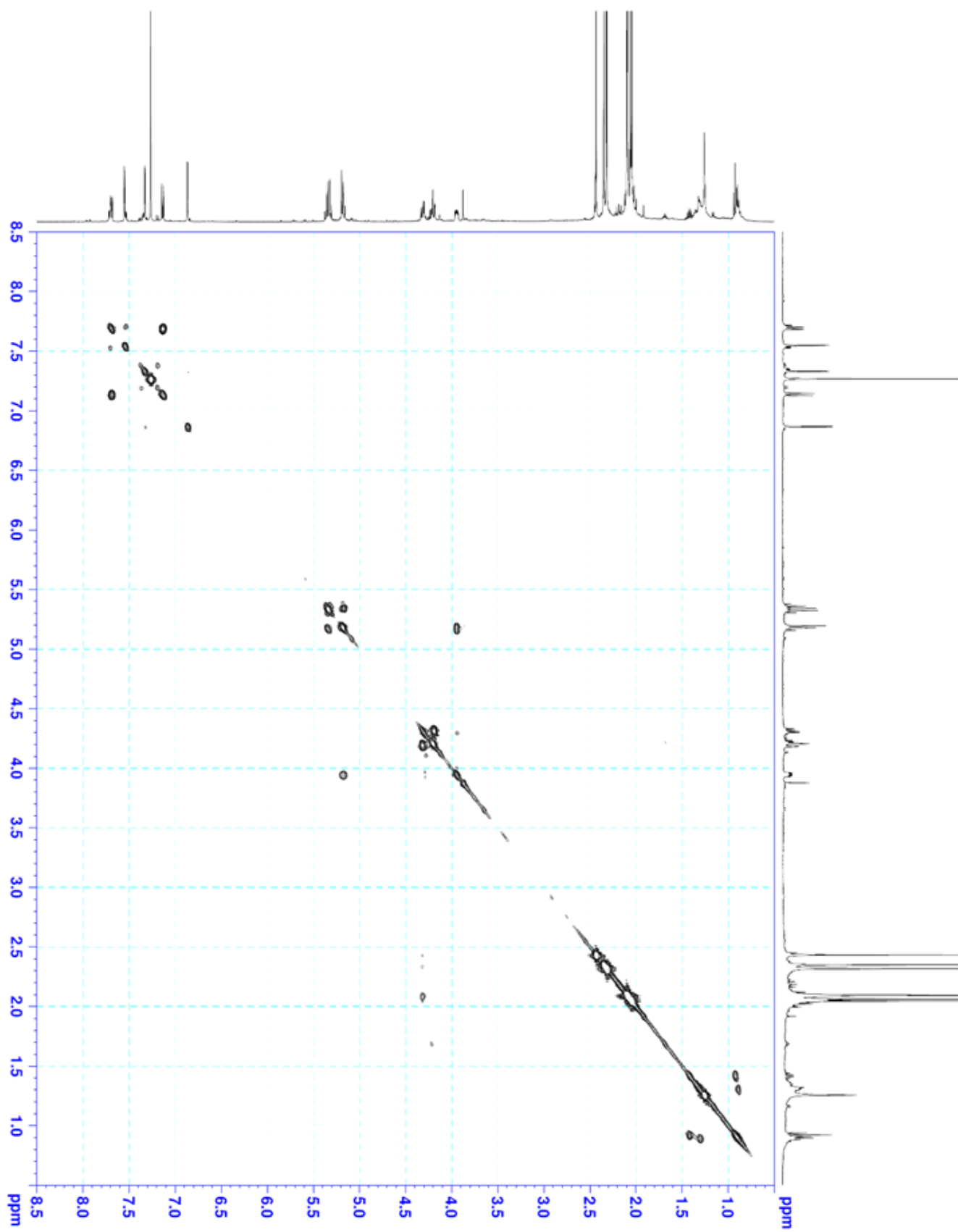
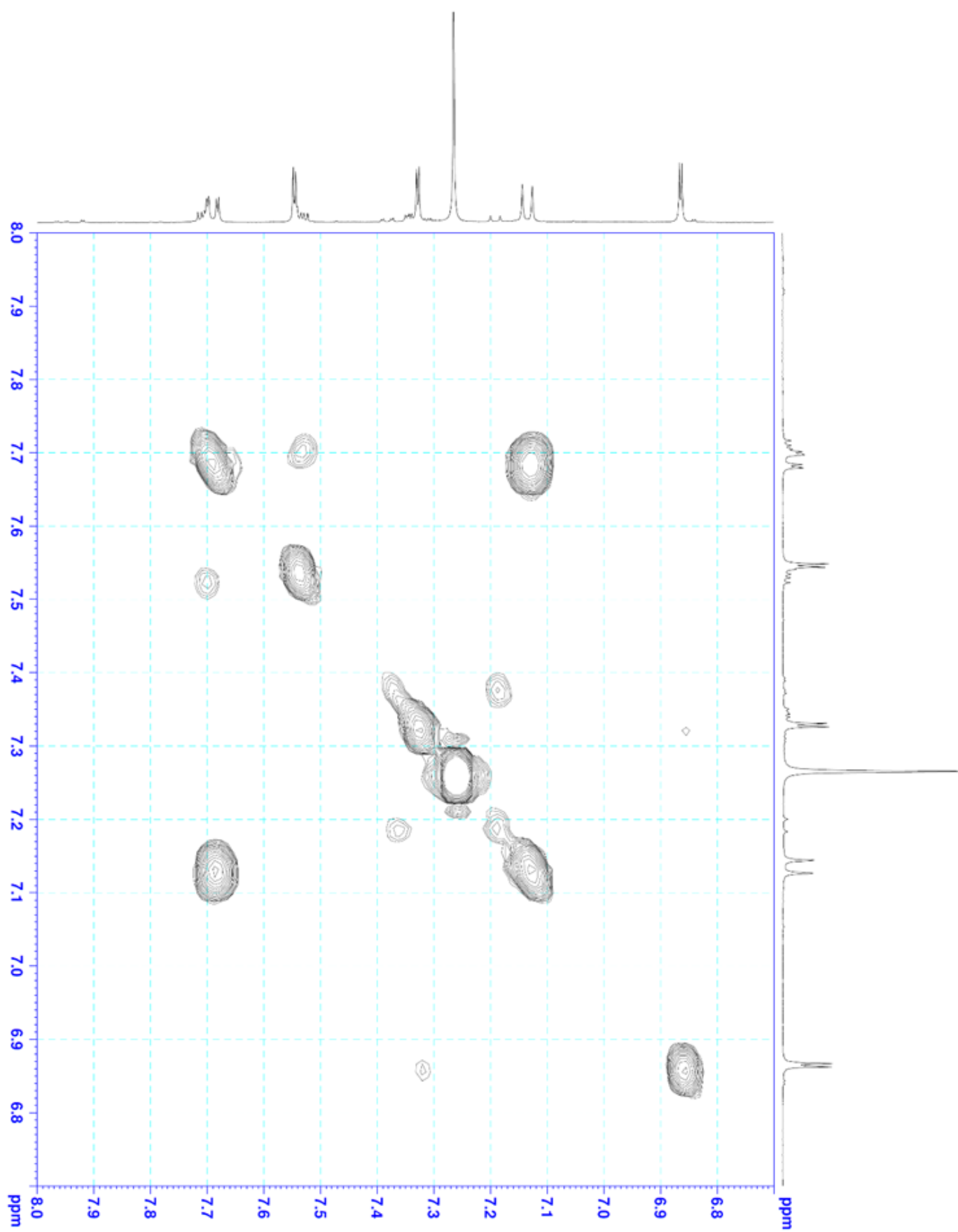


図30S H-H COSY spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



31S H-H COSY spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

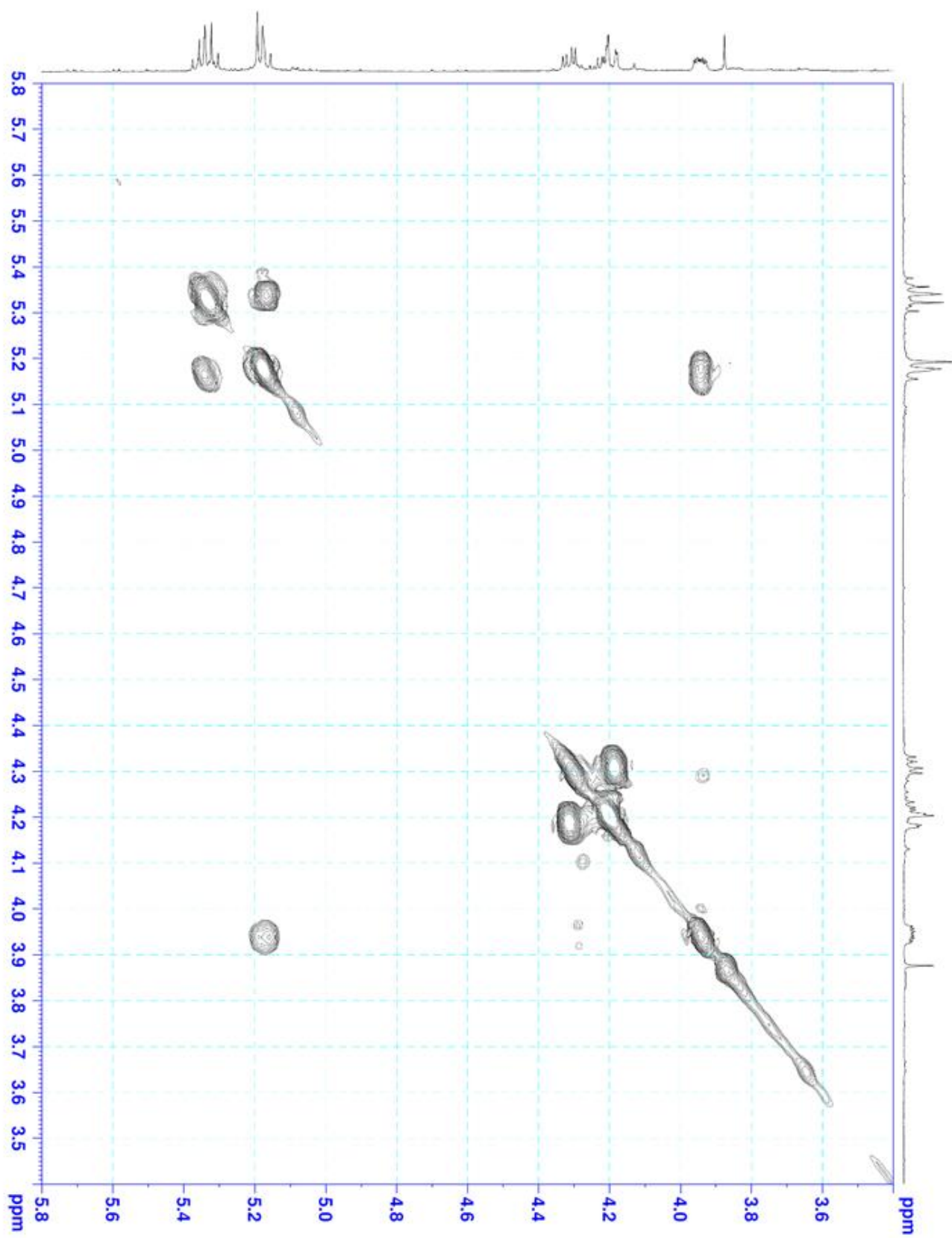


Figure 1. ^{32}S H-H COSY spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

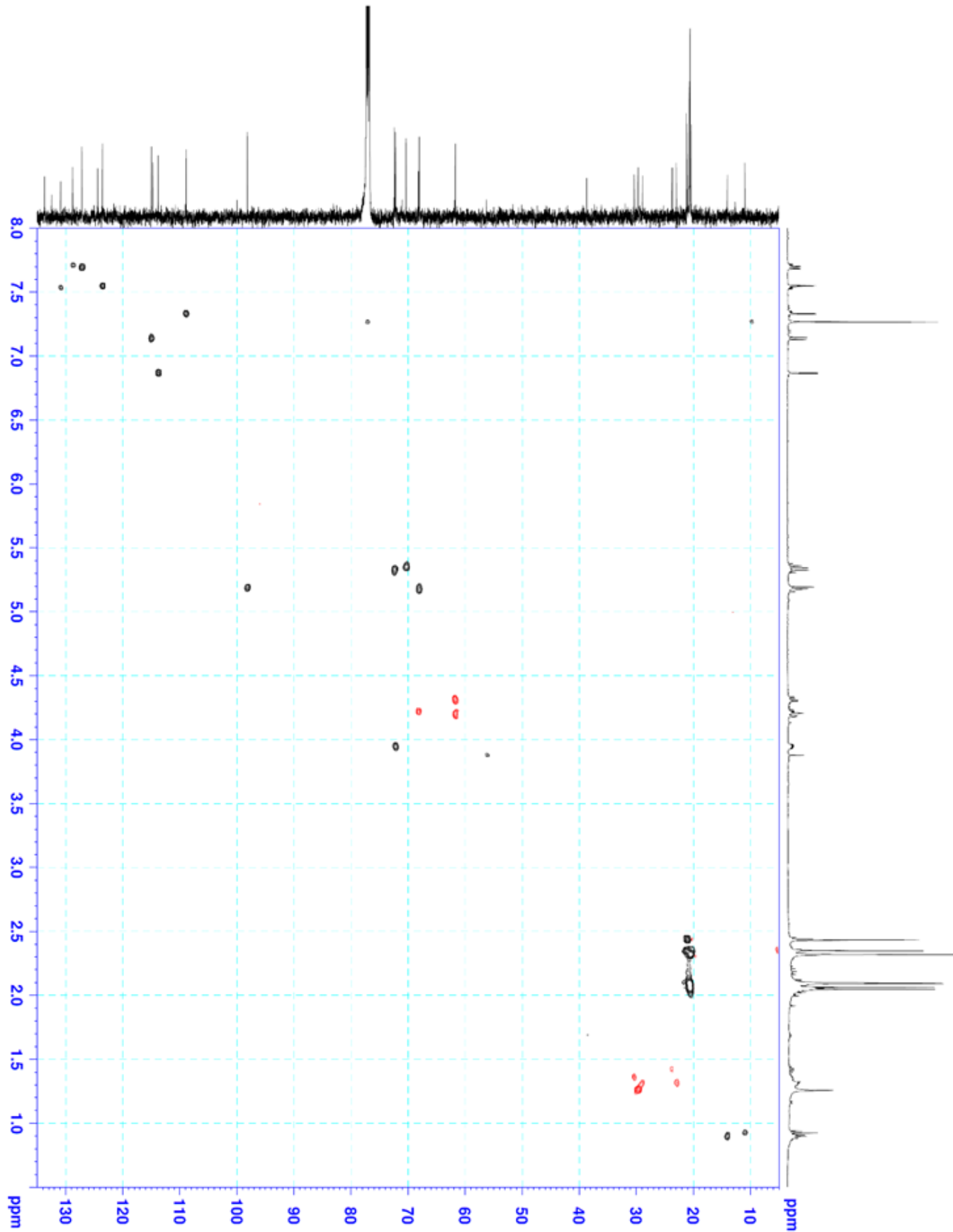


Figure 33S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

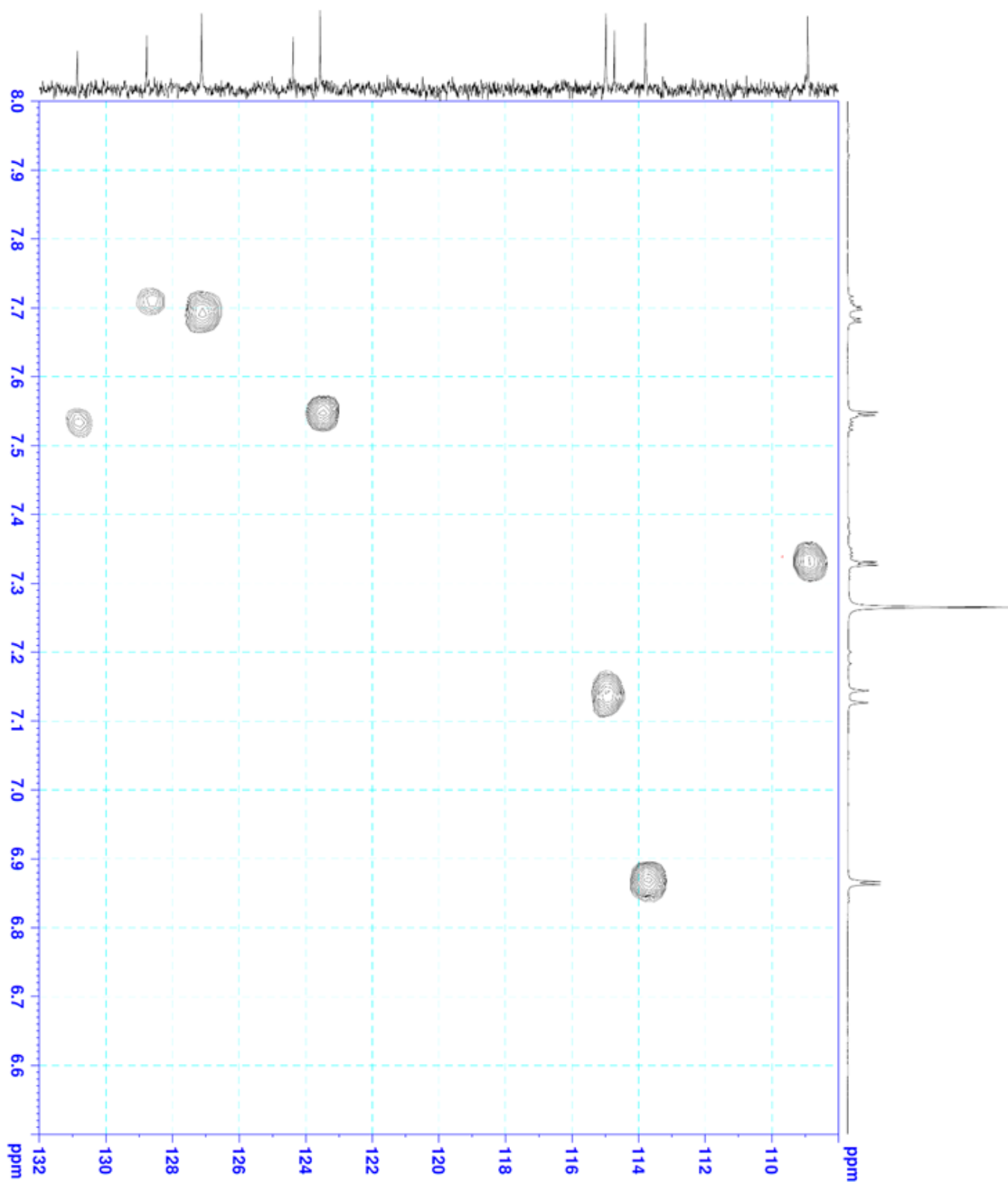


Figure 1: ^{34}S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

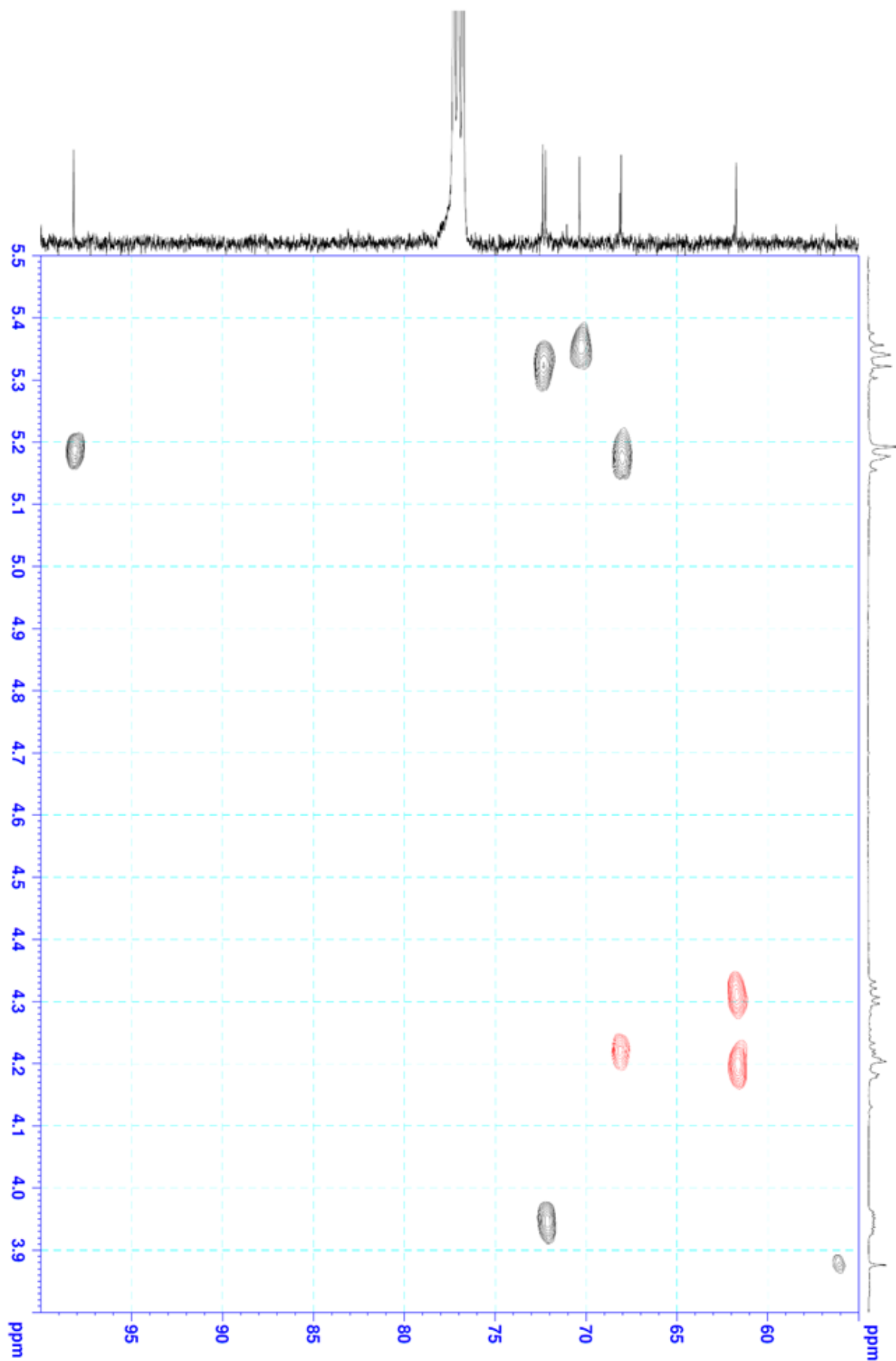
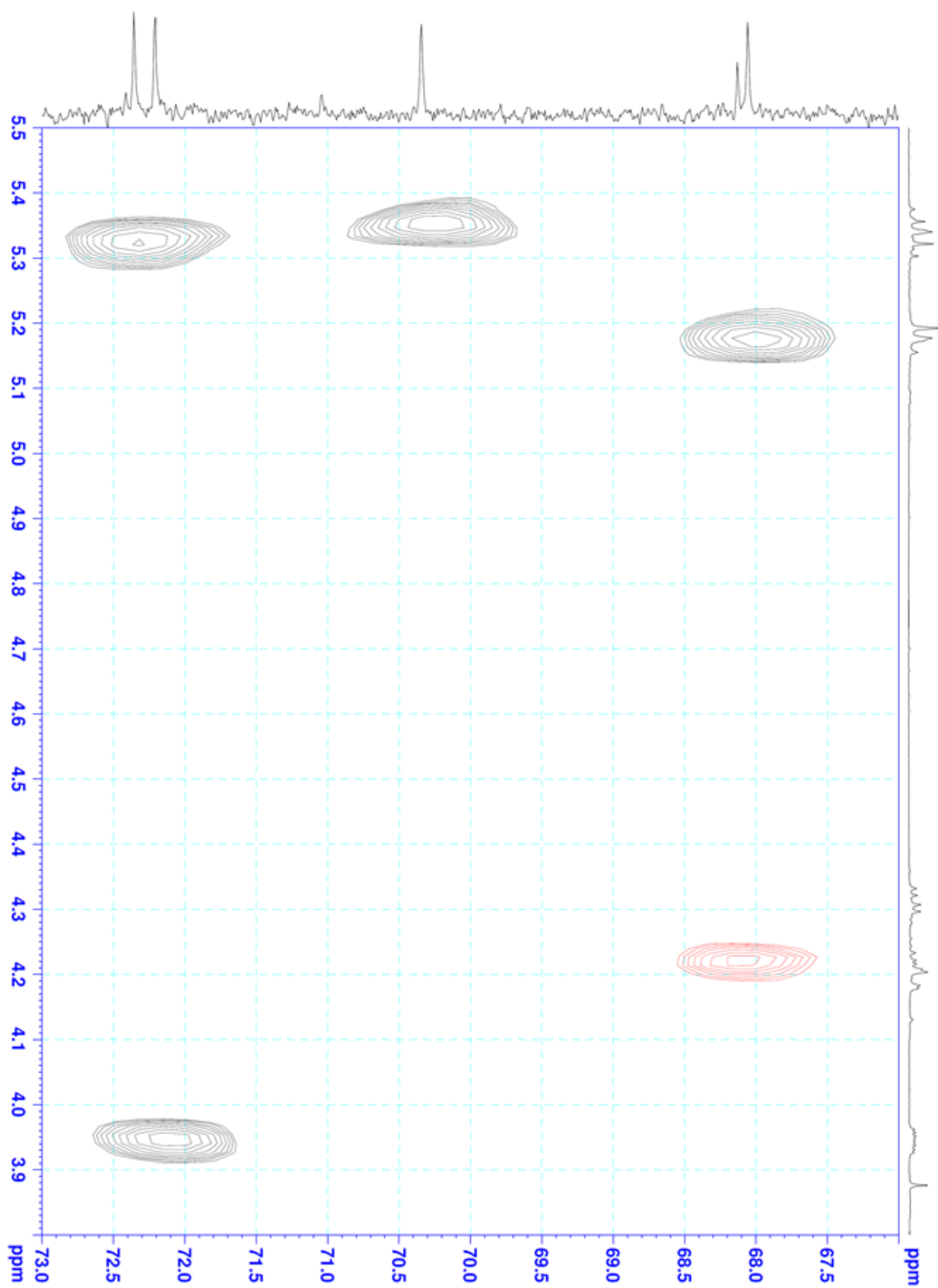
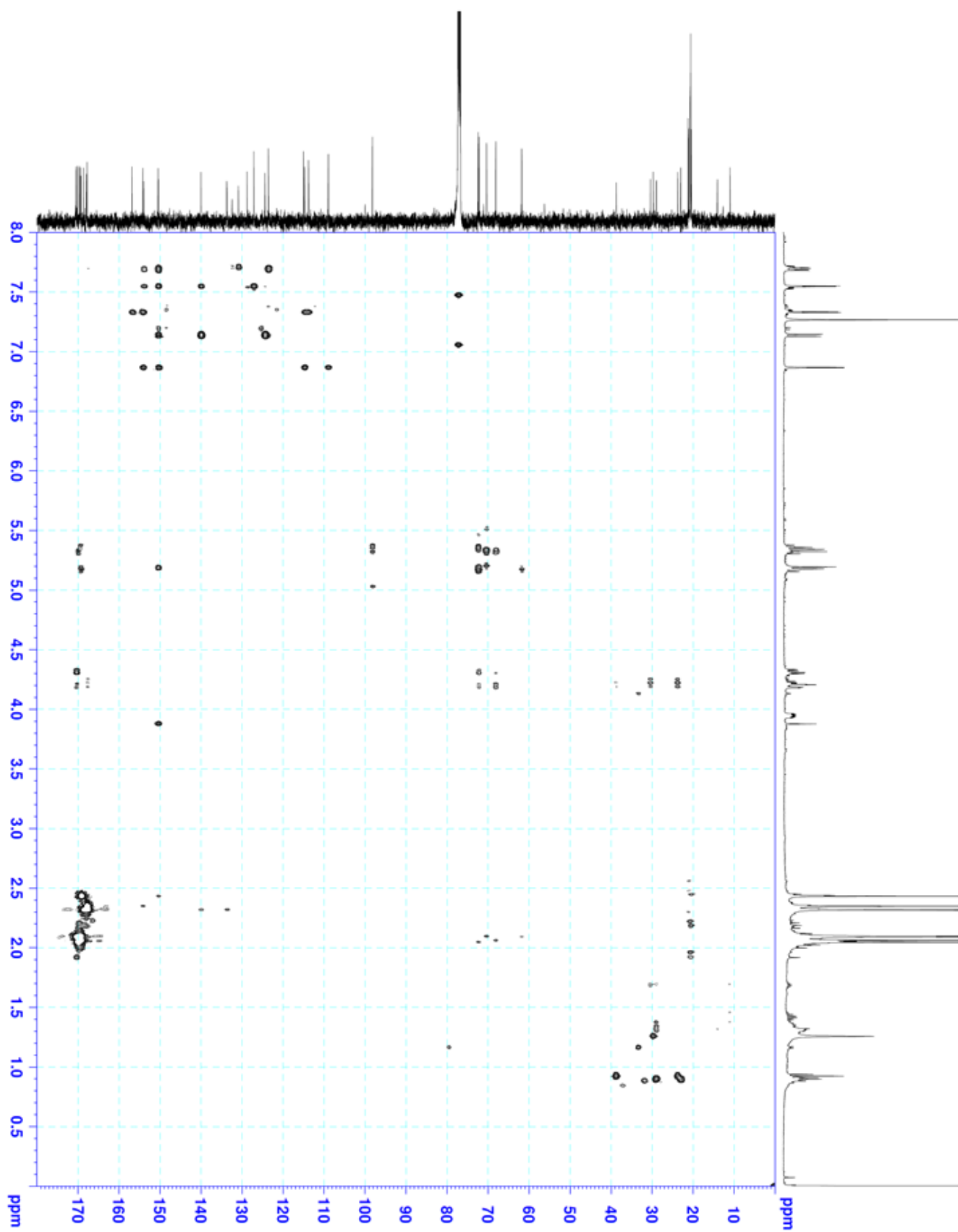


Figure 1: ^{35}S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).



36S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



37S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

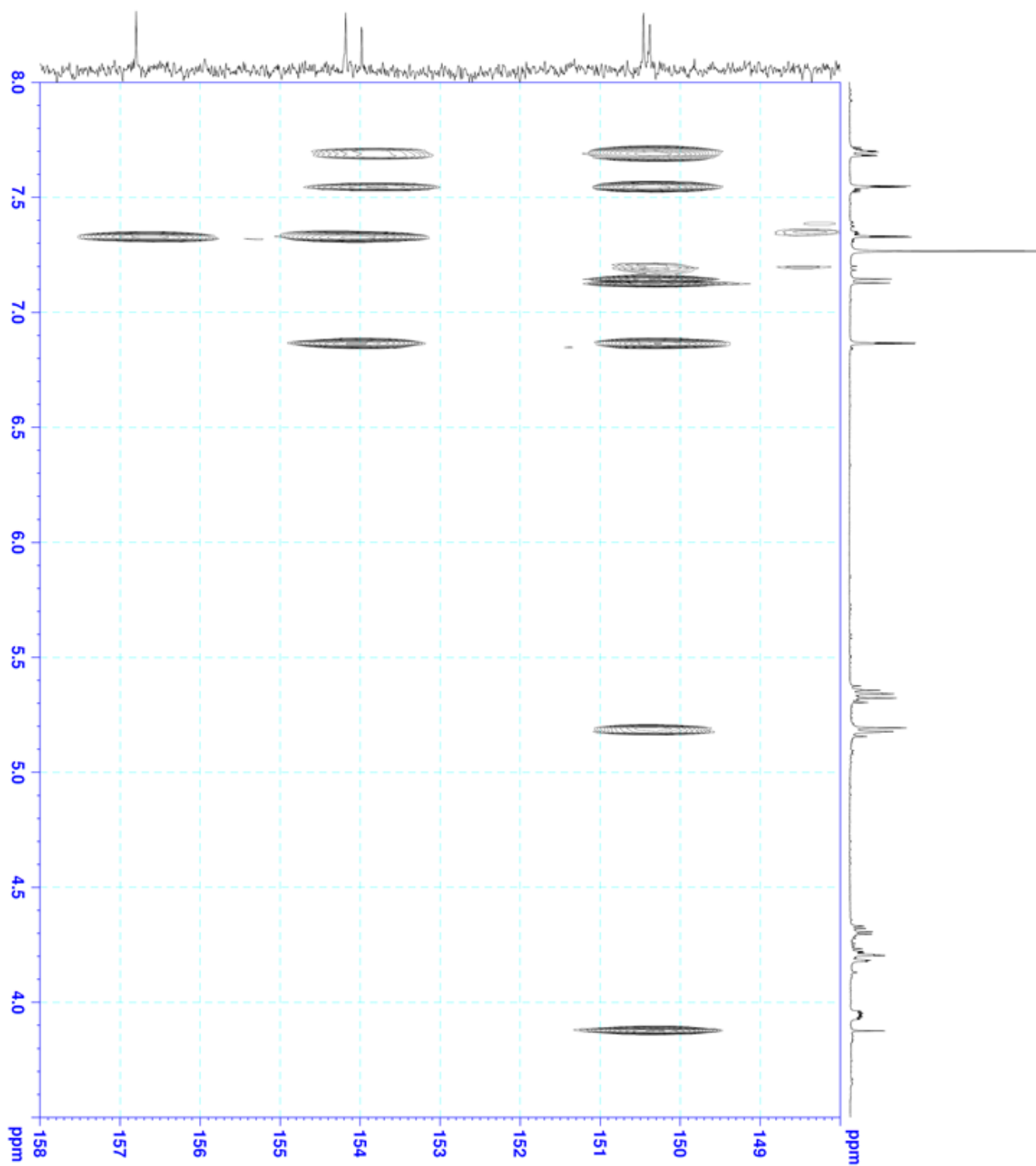


Figure S28S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

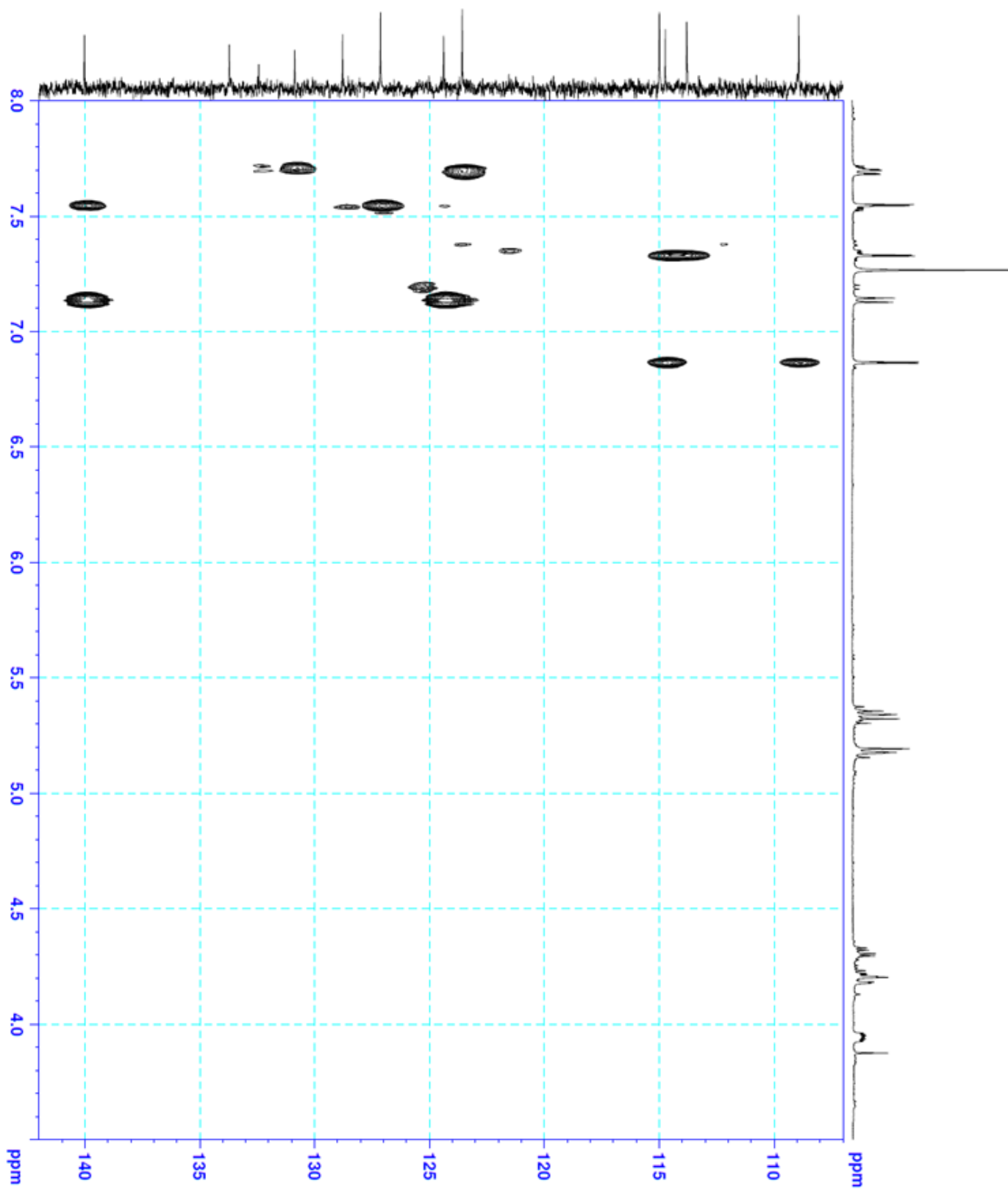
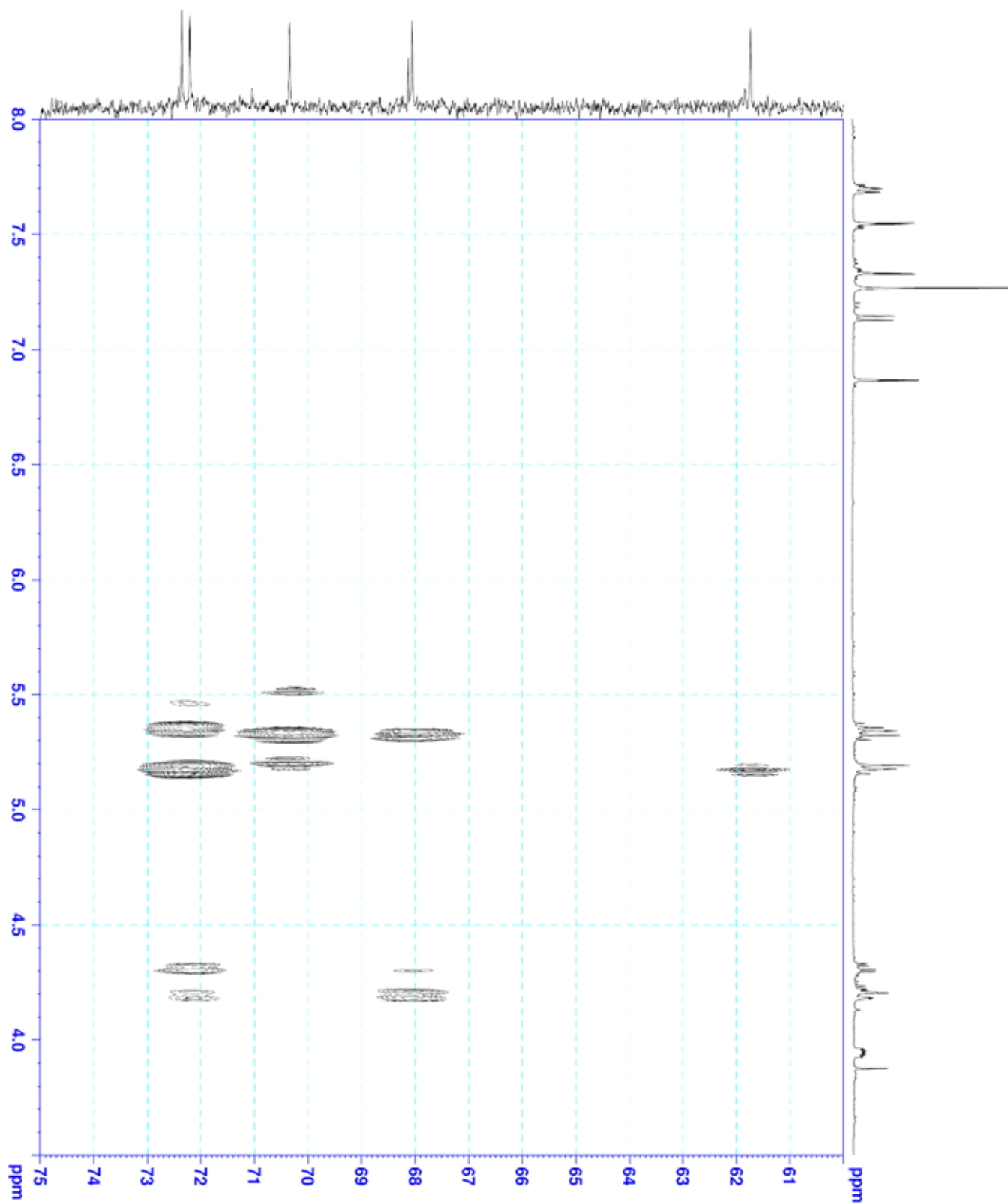


Figure S39S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



40S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

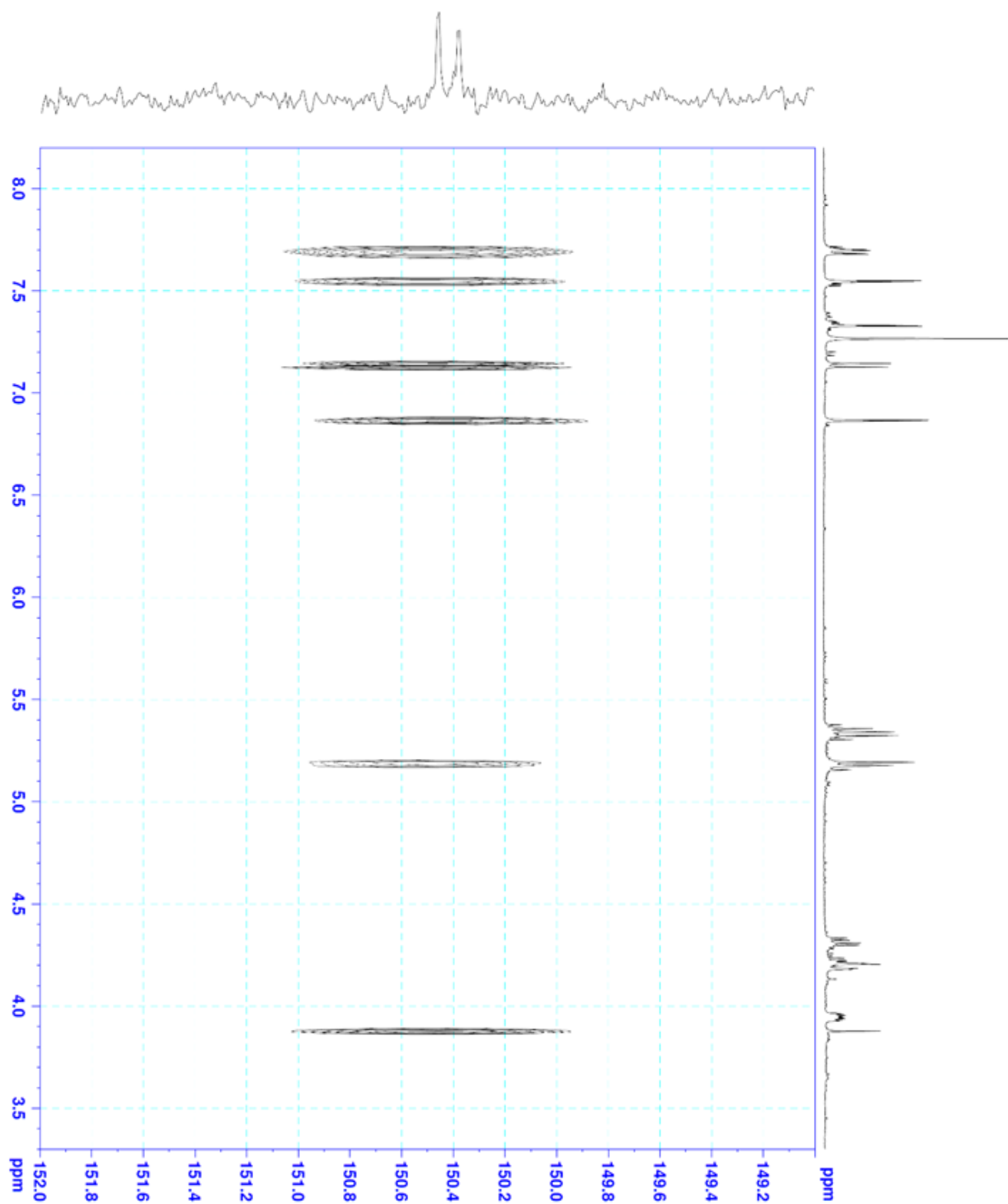
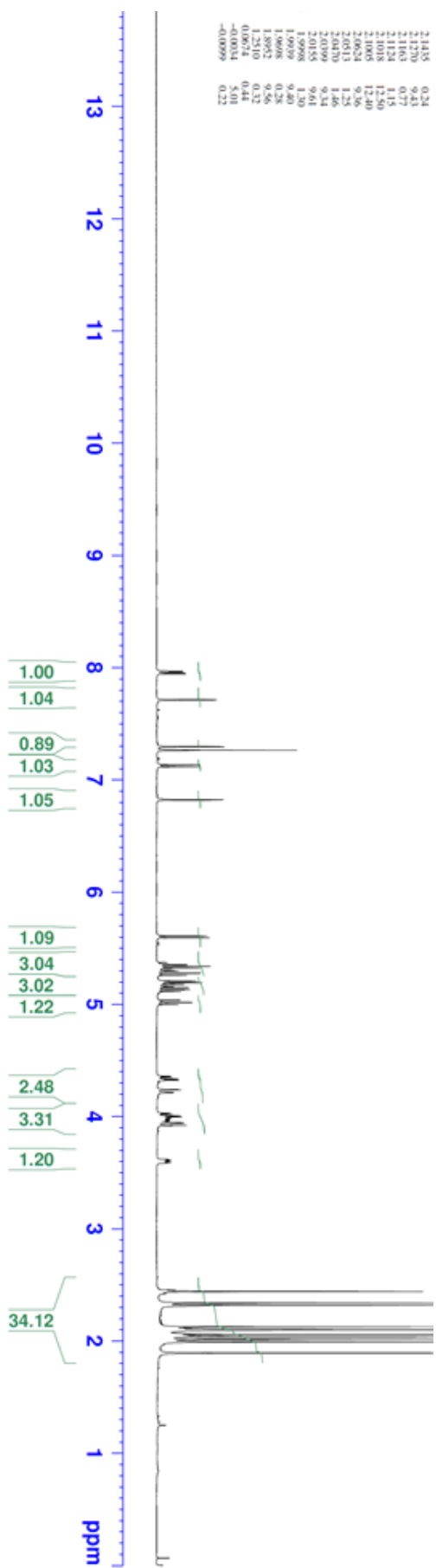


Figure 41S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-4'-O-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



42S ¹H-NMR spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

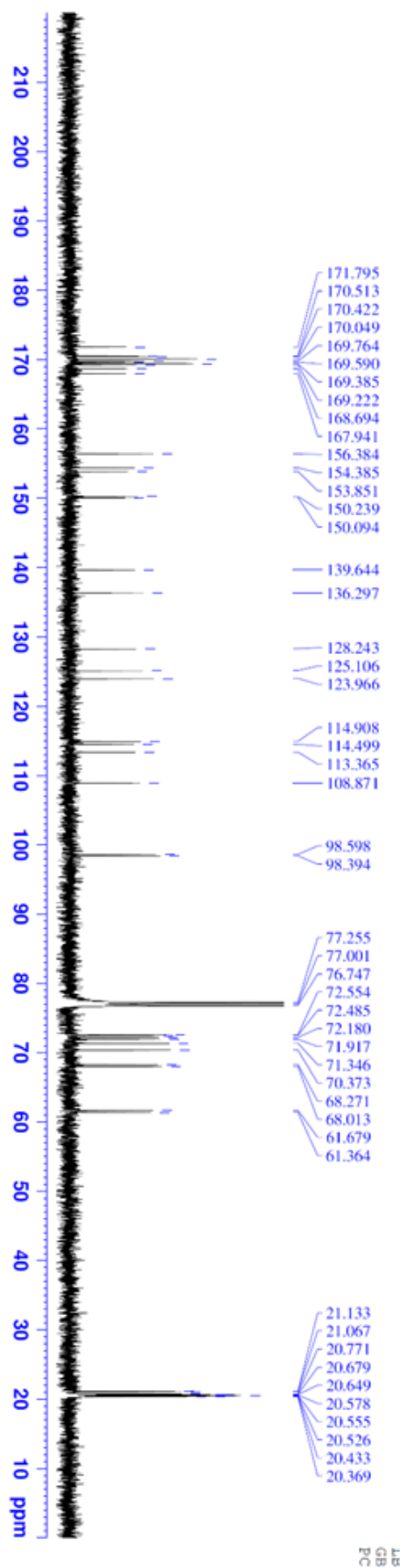
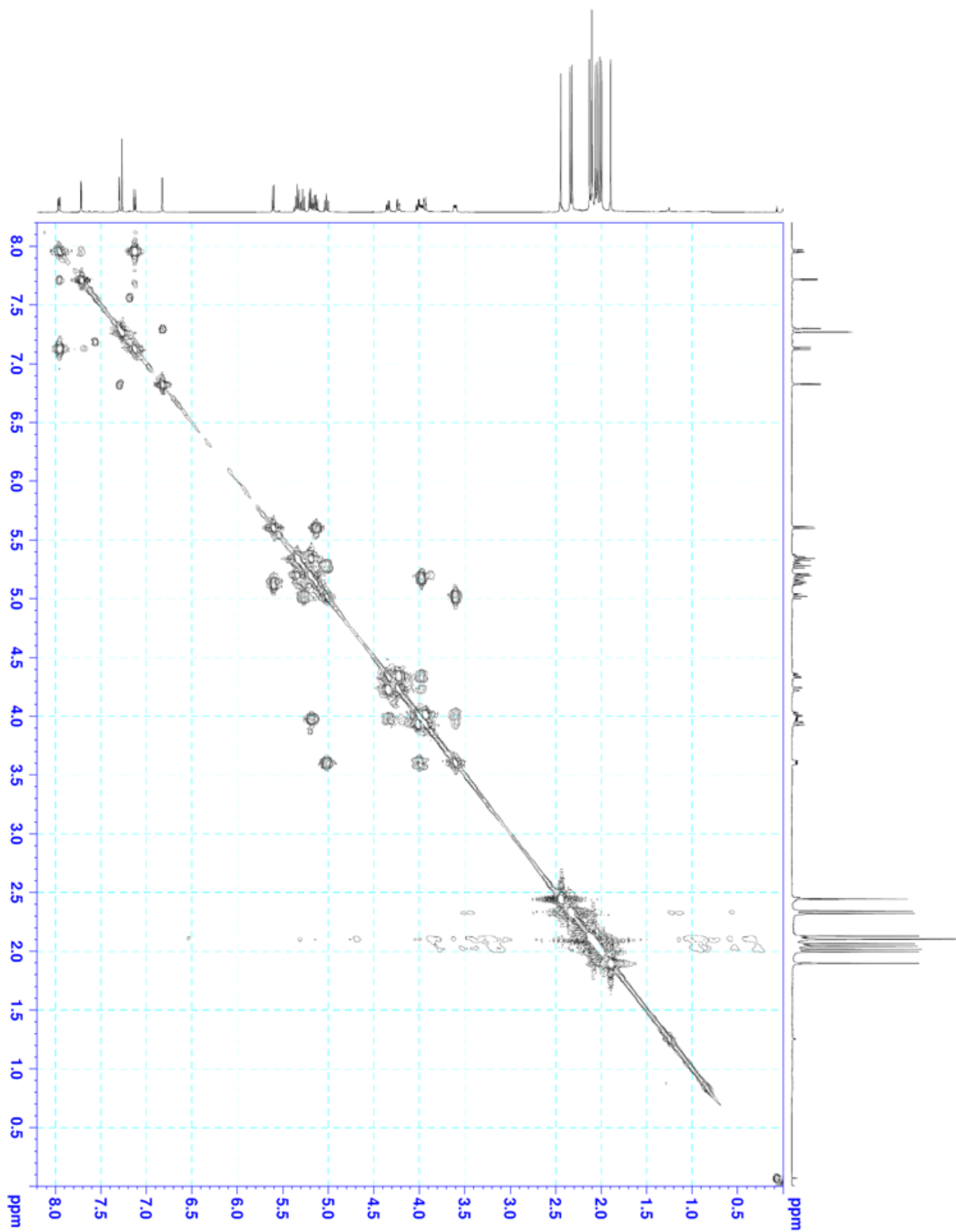
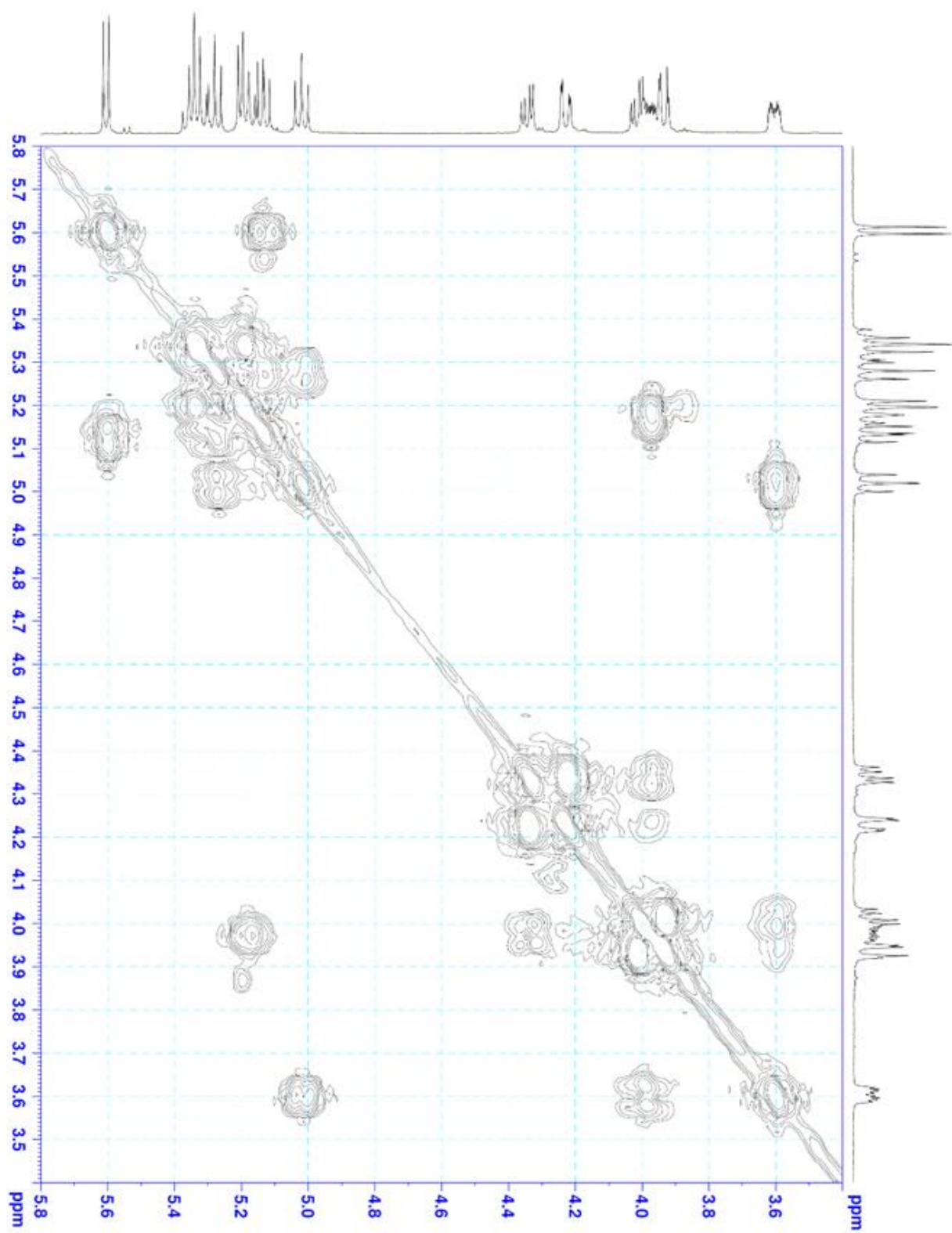


Figure 43S ^{13}C -NMR spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).



44S H-H COSY spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



45S H-H COSY spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

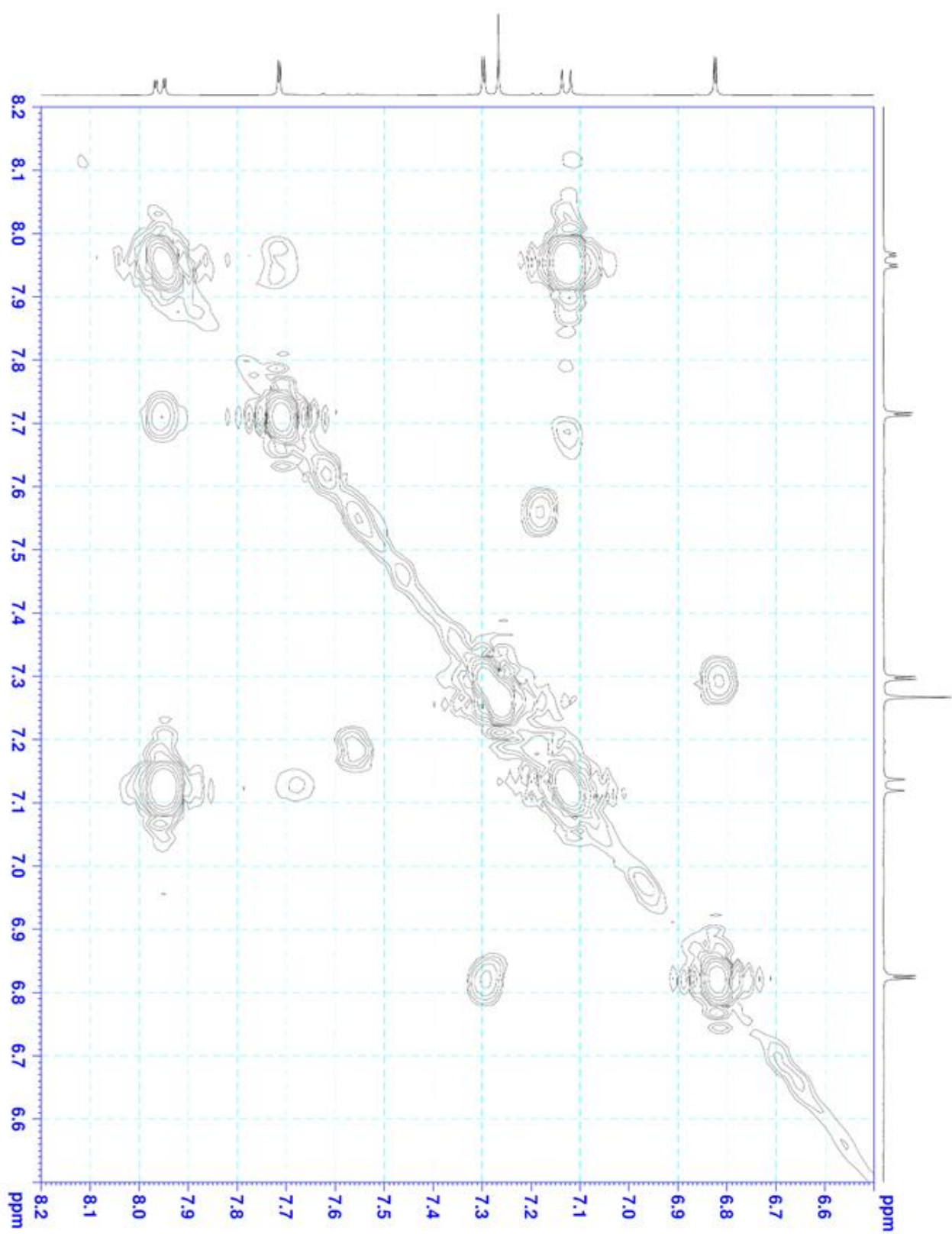


Figure 46S ^1H - ^1H COSY spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-*O*-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

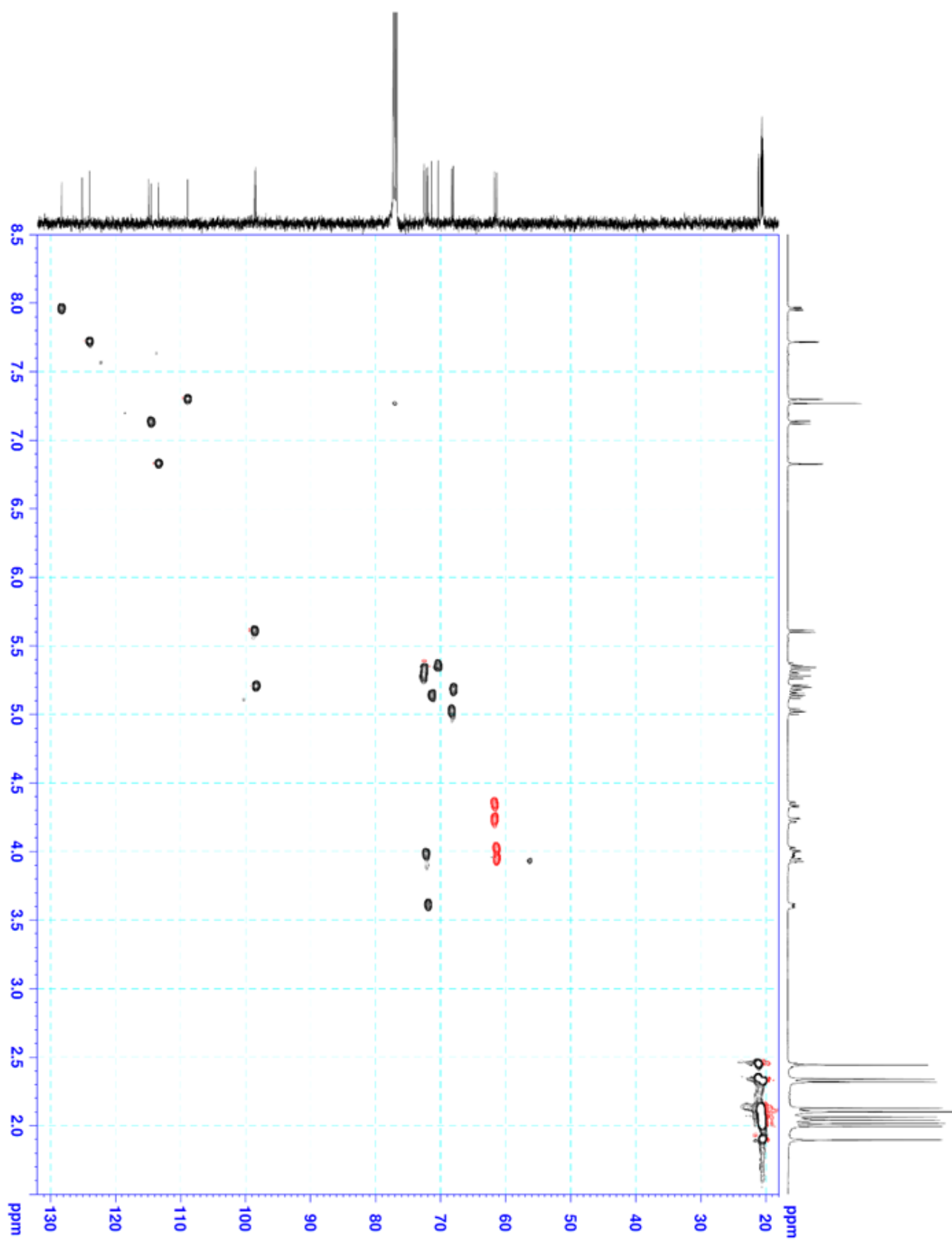


Fig. 47S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

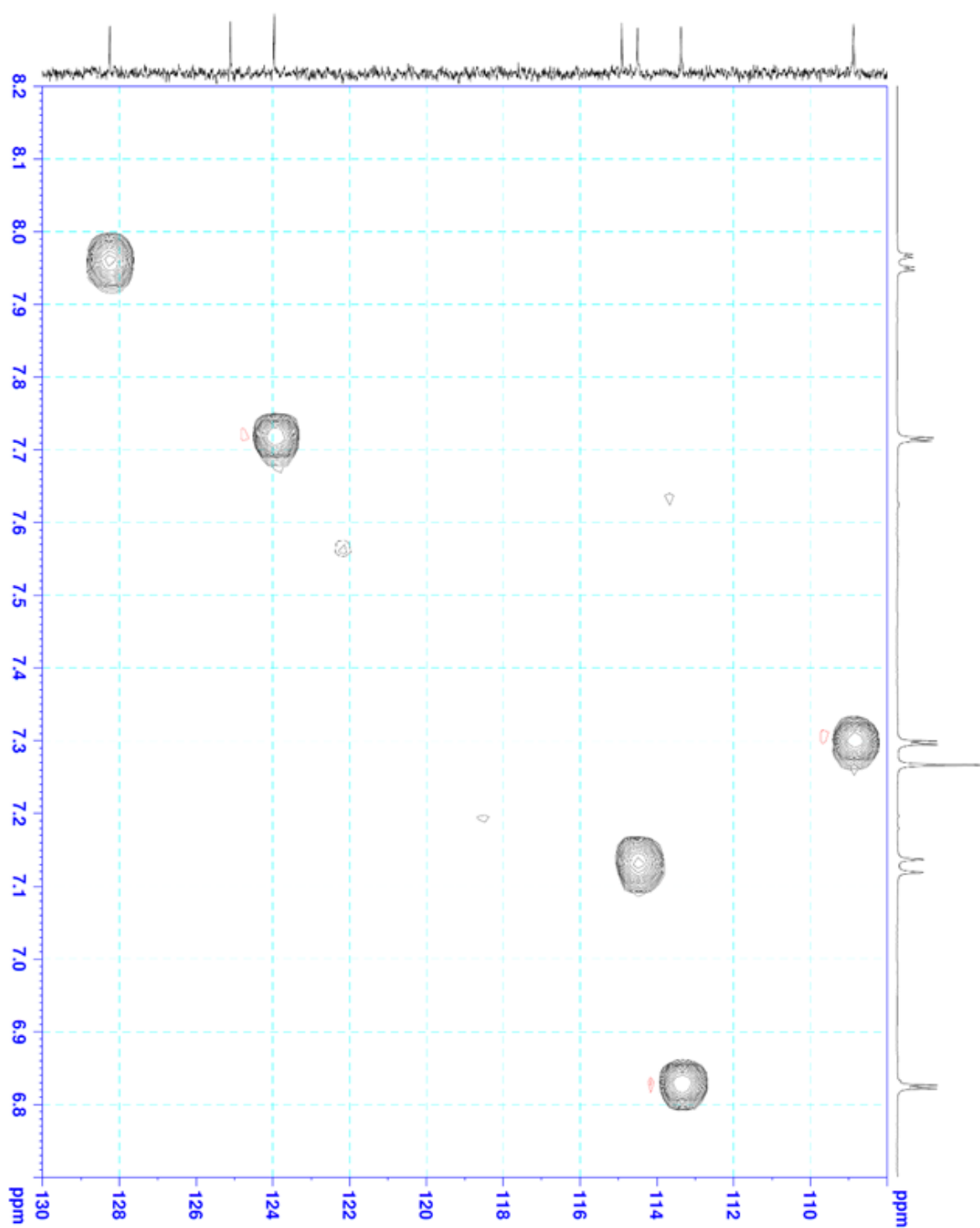


Figure 48S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

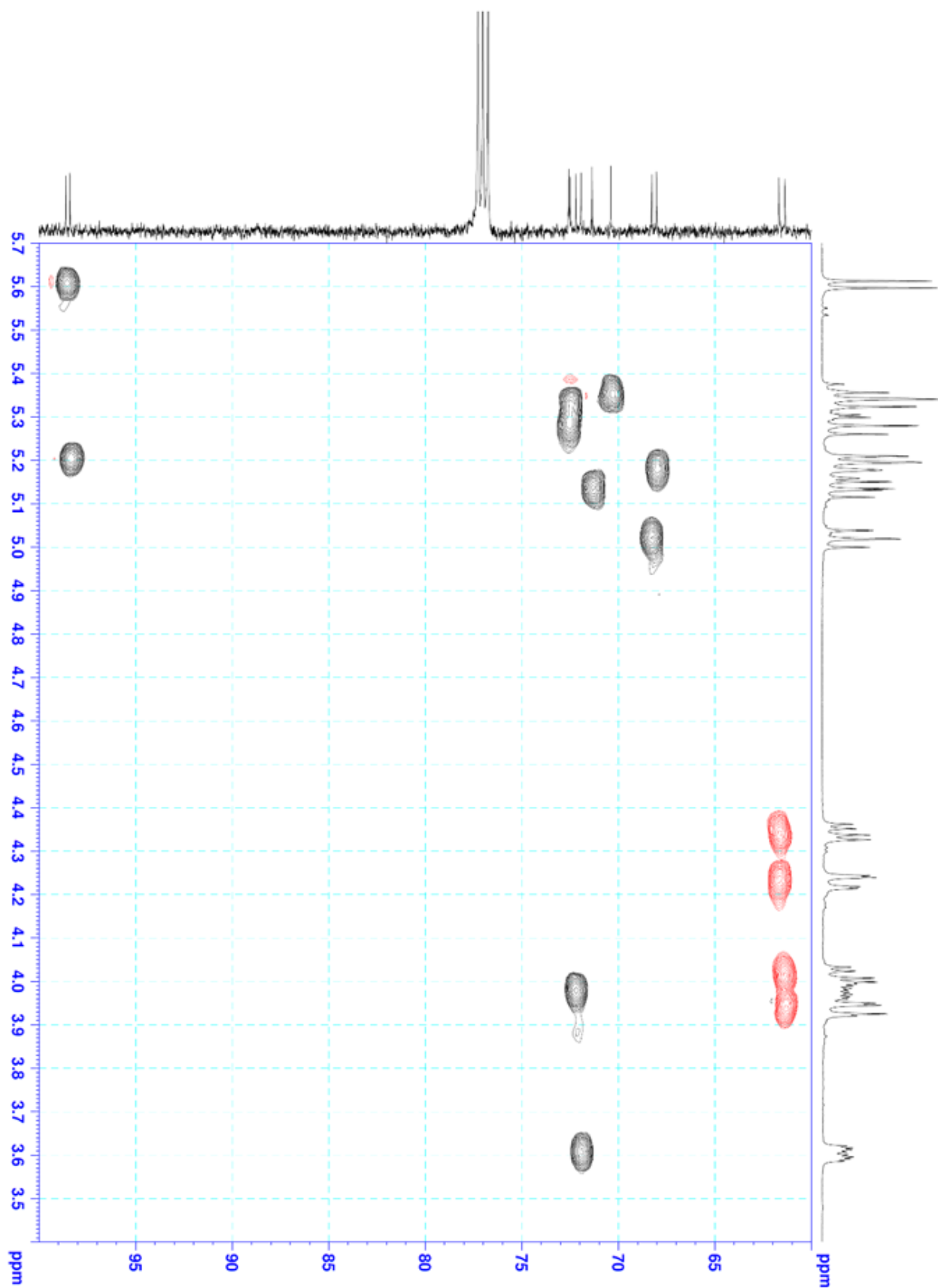
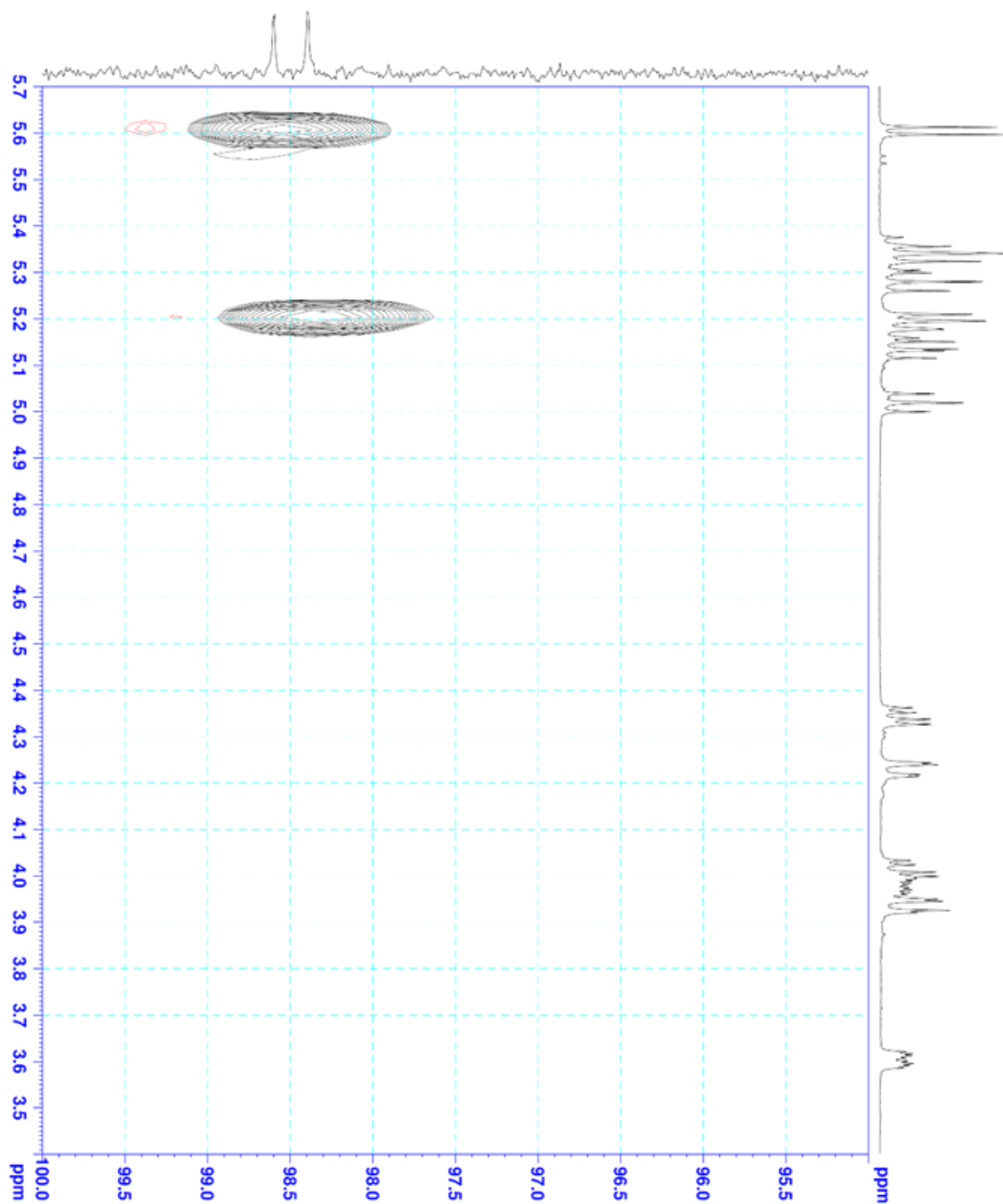
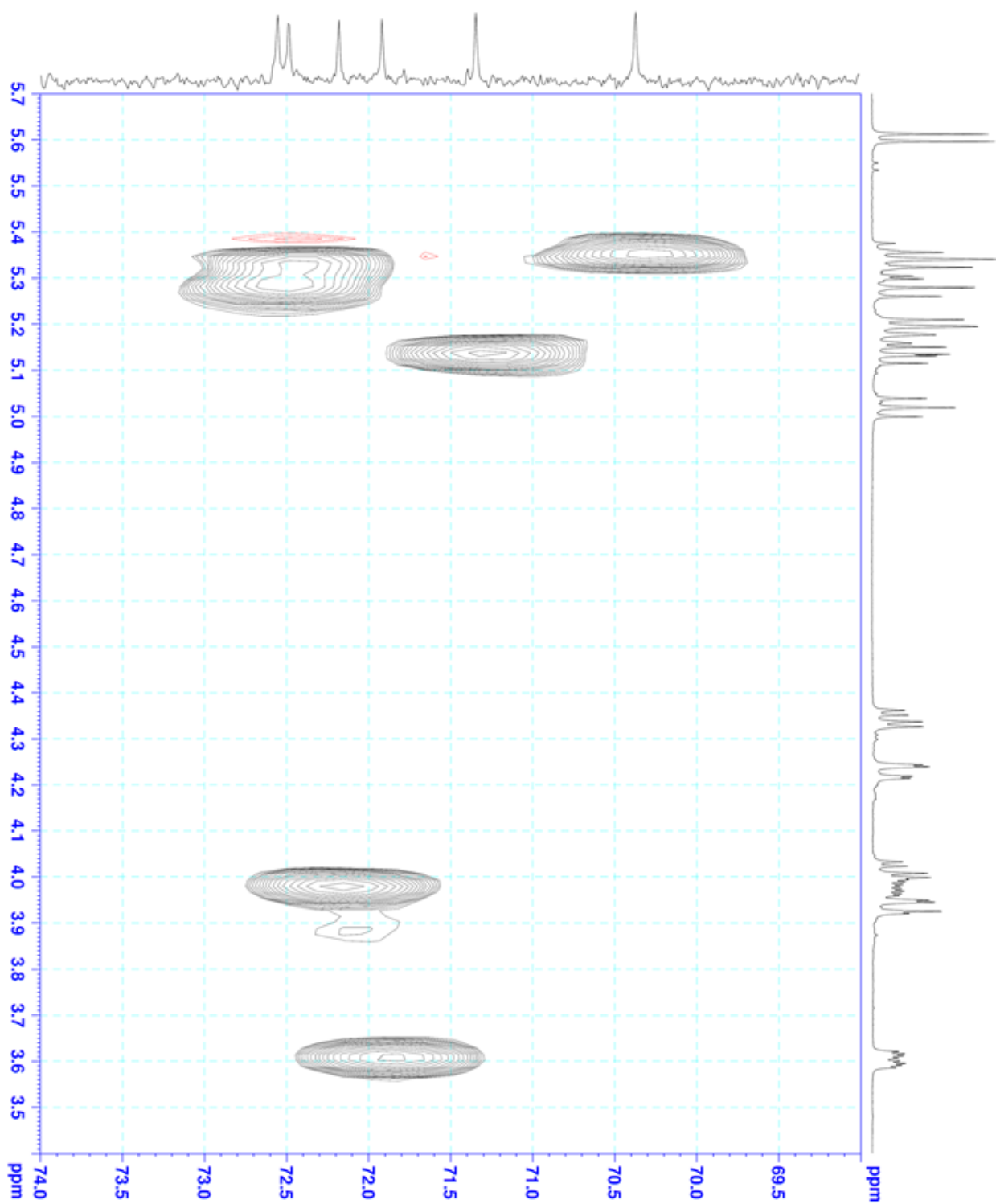


Figure 49S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).



50S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).



51S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl_3).

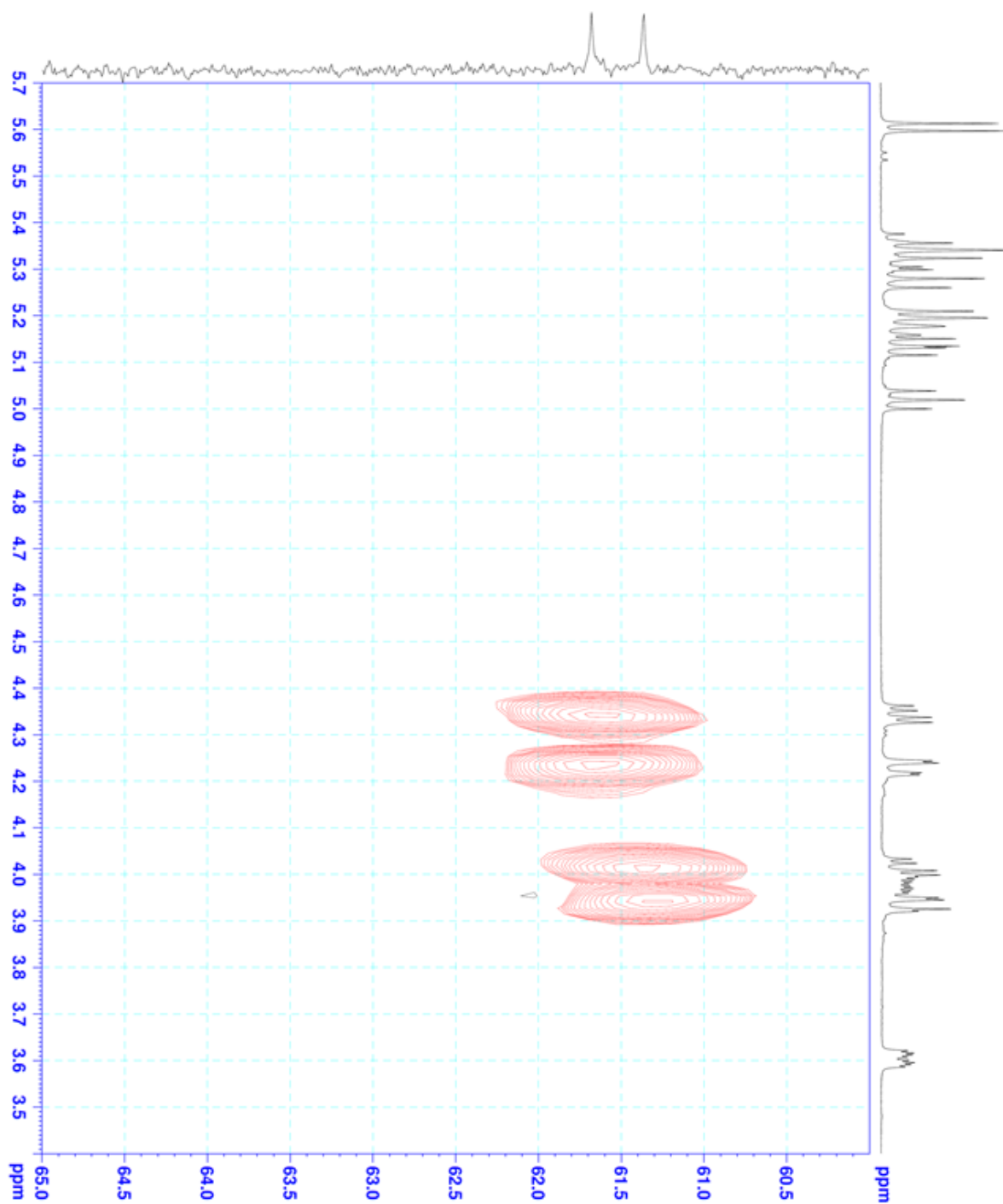
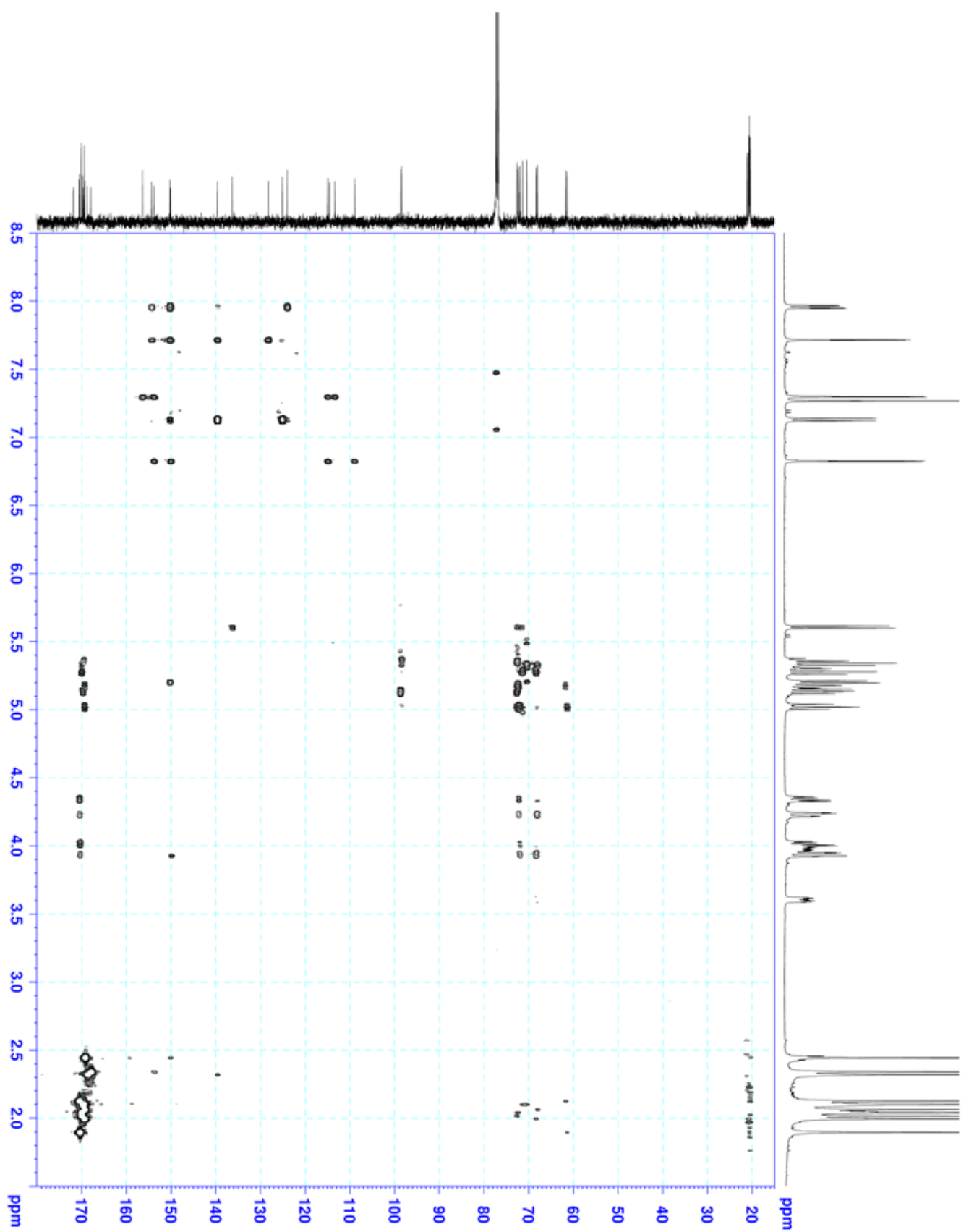


Figure 52S HSQC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



53S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

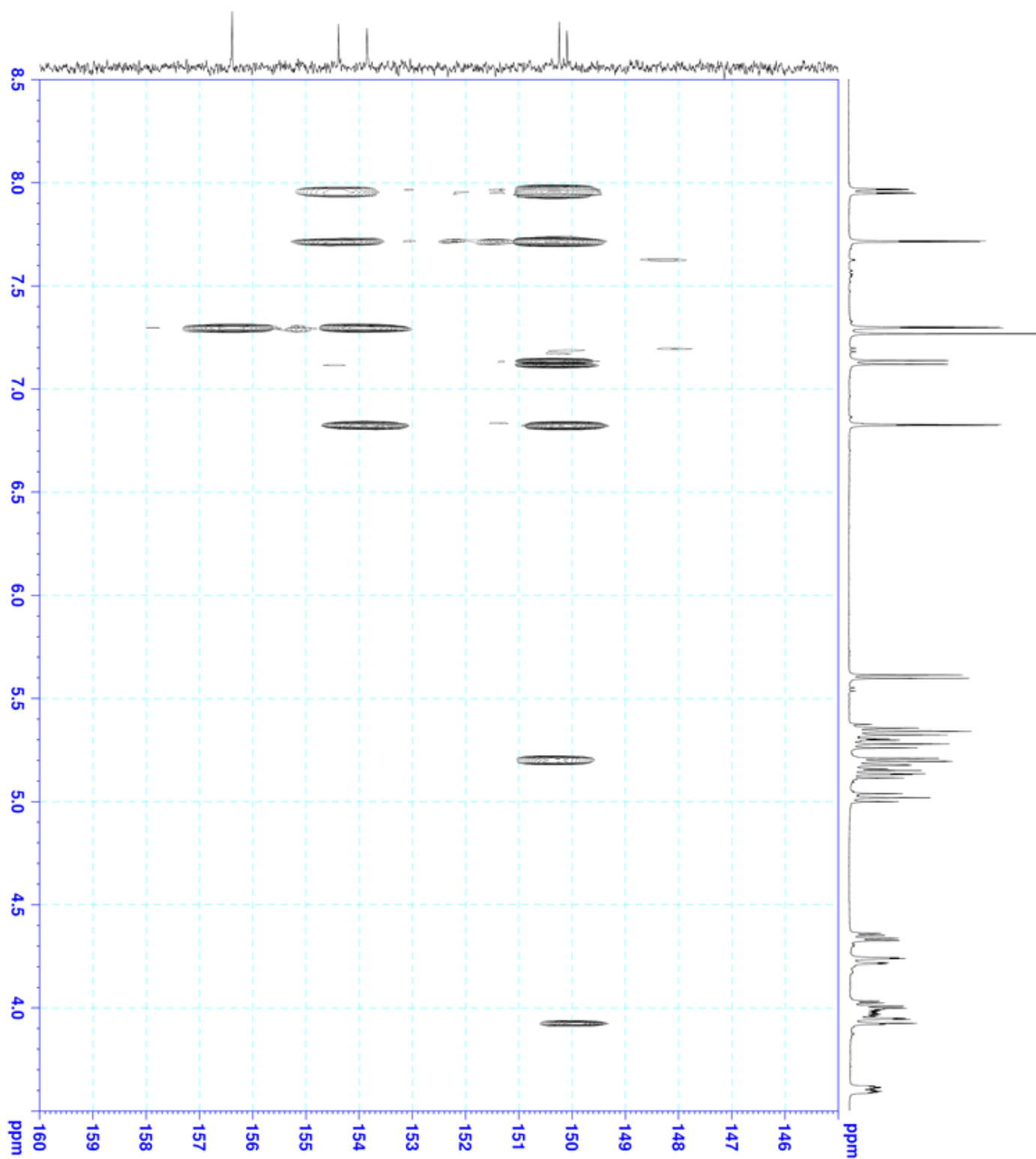


Figure S4S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

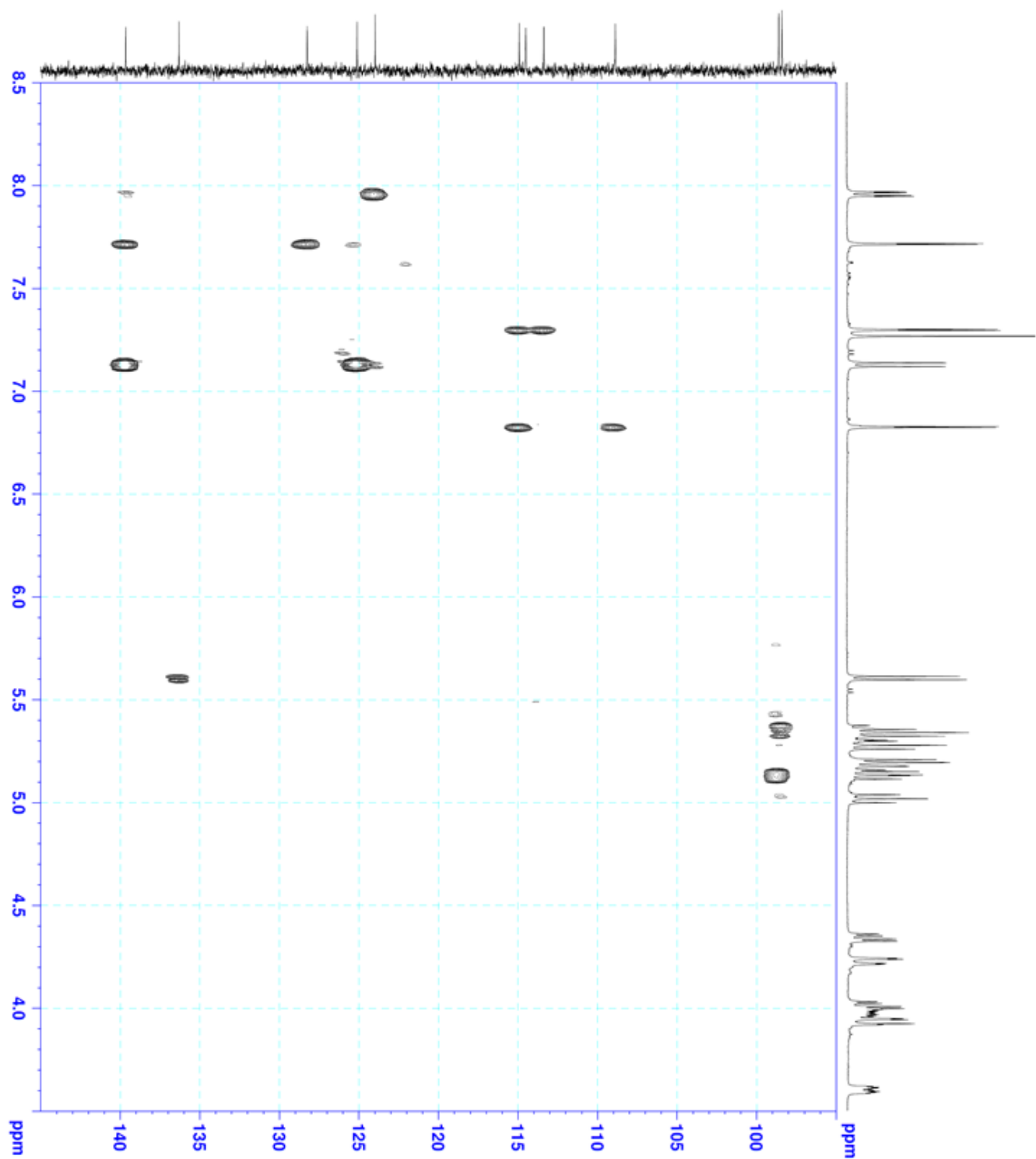


Figure S55S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).



Fig. S6S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).

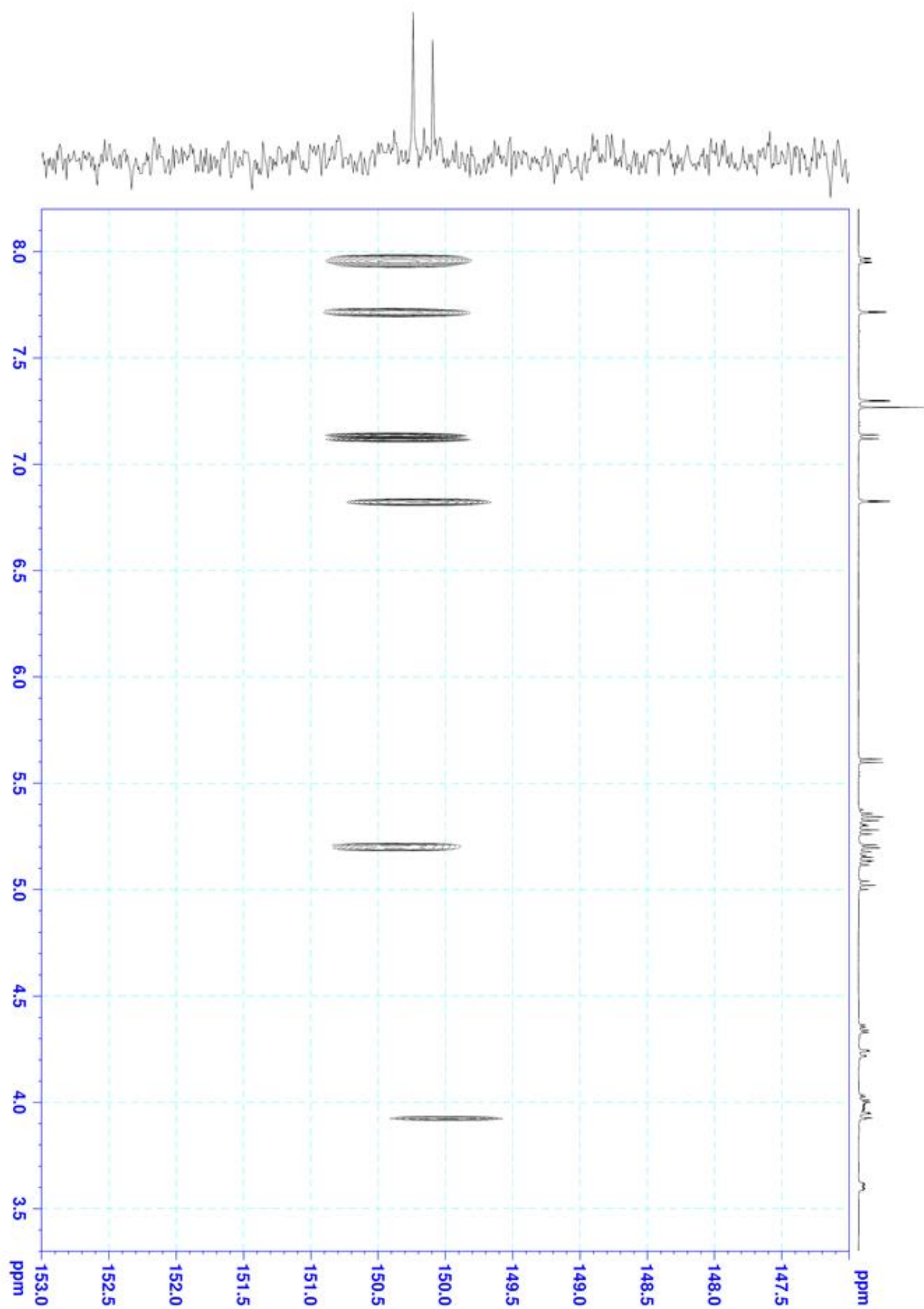


图 S7S HMBC spectrum of peractyl-quercetin-3,4'-O-di-glucoside (500 MHz, CDCl₃).