

柑橘類フラボノイド配糖体による血管内皮細胞増殖の分子機構に関する研究

笹沼 いづみ^{*1}, 吉澤 翠和乃^{*2}

Molecular mechanisms of vascular endothelial cell proliferation by flavonoid glycosides in citrus

Izumi SASANUMA and Miwano YOSHIZAWA

Flavonoids are major active nutraceutical ingredients in citrus. The flavonoid glucosides were screened for their effect on cell proliferation of vascular endothelial cells. The glucosides of Satsuma mandarin stimulated cell proliferation and production of exogenous beta-glucosidase. The results suggest that the glucosides could have cell-proliferative activities in vascular endothelial cells, and the molecular mechanism of the proliferation might involve structural changes in the glucoside binding to its receptor.

KEYWORDS: β -Glucosidase, Vascular Endothelial Cell, Flavonoids.

1. 緒言

β -グルコシダーゼ (EC3.2.1.21) はアリル、またはアルキル β -グルコシドとセロビオオースのグルコシド結合を加水分解する酵素であり、生物界に広く分布している。従って、本酵素の基質は天然に多数存在し、ポリフェノール配糖体を基質とした場合、生じるアグリコンは薬理効果を示すことが報告されている¹⁾。ポリフェノール的一种であるフラボノイド類は、柑橘類に豊富に含まれ、みかんにヘスペリジンとナリルチン、グレープフルーツにはナリンジンとネオヘスペリジンが含まれる。これらのアグリコンは抗腫瘍作用、骨芽細胞活性化、毛細血管強化作用、抗炎症作用を示すことが報告されている¹⁾。本研究では、血管内皮細胞の生産する β -グルコシダーゼについて、柑橘類フラボノイド配糖体が本酵素によって分解されることにより誘導される薬理作用について検討を行った。

2. 材料及び方法

供試細胞:血管内皮細胞 Cell No. RF/6A 135。
供試柑橘類:ミカン、オレンジ、レモン、ユズ、グレープフルーツ。柑橘類の成分抽出:EtOH または蒸留水で抽出した。抽出物の分析:可視紫外吸収スペクトル測定により分析を行った。血管内皮細胞の培地:(1)基本培地:RPMI に10%の濃度になるようにFBSを加えた。(2)柑橘類抽出物添加培養用培地:添加物はDMSOに溶解し、柑橘類抽出物は 1.22×10^{-5} [g/ml]で、ヘスペリジンは 1.25×10^{-5} [g/ml]の濃度で基本培地に添加した。細胞数測定:MTT法で生細胞数の測定を行った。酵素液の調製:細胞培養液を遠心分離し、上清を細胞外酵素、沈殿を細胞内酵素とした。 β -グルコシダーゼ活性の測定:Salicinを基質とし、測定した。SDS-PAGE:Laemmli法により行った。

*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: sasaki@oyama-ct.ac.jp

*2 明治製菓ファルマ(Meiji Seika Pharma co., Ltd.)

3. 結果及び考察

3.1 柑橘類抽出物成分の可視・紫外吸収スペクトルの測定

柑橘類5種の乾燥果皮を蒸留水、またはEtOHにより抽出し、可視・紫外吸収スペクトルを測定した。(図1)フラボノイド含量が高いものは水抽出物ではオレンジ、レモン、EtOH抽出物ではユズであった。グレープフルーツのみかんは両抽出物でフラボノイド含量が高いことが認められた。フラボノイド類のアグリコンは大部分のものが難水溶性であることから、水抽出できたフラボノイド類は配糖体の形で存在していることが考えられる。また、EtOHで抽出されるフラボノイドは難水溶性配糖体であるか、または、アグリコンであると推定した。各柑橘類に含まれるフラボノイドはその吸収波長と溶解度から、オレンジはアピゲニン配糖体、レモンはディオスミン、ユズはヘスペリジン、グレープフルーツはケルセチン配糖体、みかんはヘスペリジンが主要なフラボノイドであると推察された²⁾。

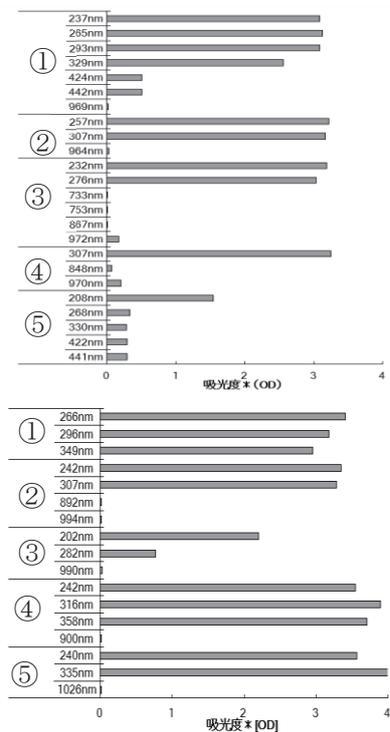


図1 柑橘類果皮の水(上段)およびエタノール(下段)抽出物の可視・紫外吸収スペクトルの測定。①みかん、②グレープフルーツ、③ユズ、④未熟果新鮮のEtOH抽出物、⑤熟果乾燥、⑥熟果新鮮、⑦未熟果乾燥、⑧未熟果新鮮の水抽出物。

3.2 供試みかんの状態によるフラボノイド含有量の変化

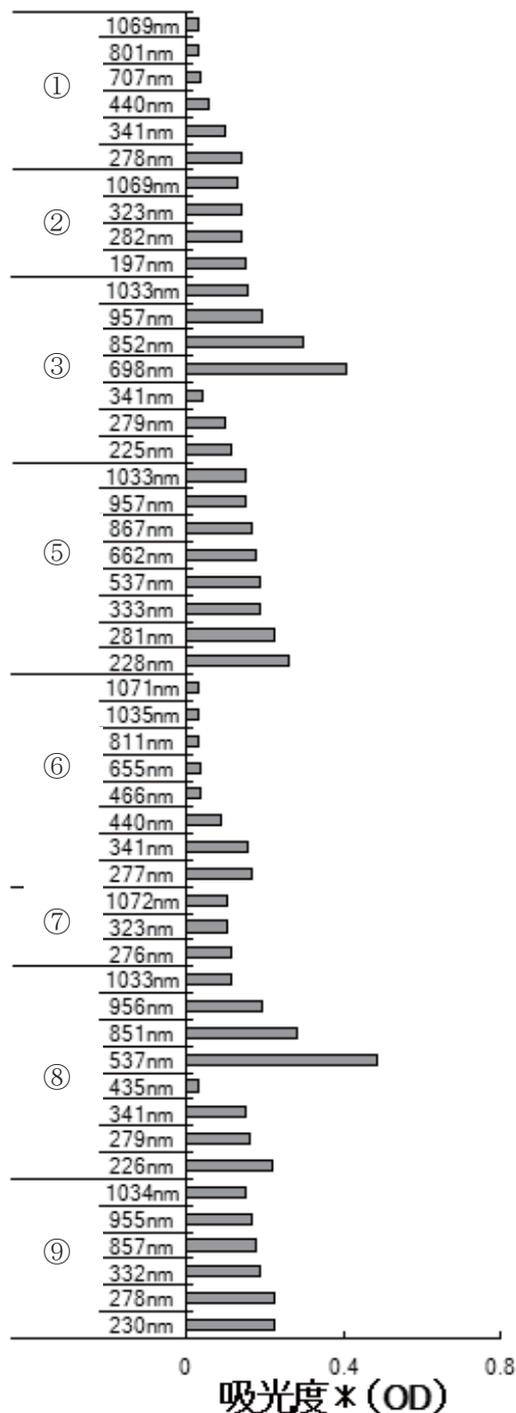


図2 みかん果皮抽出物の可視・紫外吸収スペクトル測定。①熟果乾燥、②熟果新鮮、③未熟果乾燥、④未熟果新鮮のEtOH抽出物、⑤熟果乾燥、⑥熟果新鮮、⑦未熟果乾燥、⑧未熟果新鮮の水抽出物。

前報の結果では、温州みかん(以下みかん)抽出物がヒトの細胞増殖を促進した。よって、みかんからのフラボノイドの抽出を試みた。(図2)

EtOH抽出物のフラボノイド量は、新鮮未熟果果皮で最も高く、熟果果皮は乾燥と新鮮との間に差はほとんど認められなかった。ヘスペリジンを示す290nm、329nm付近の吸収に注目すると、新鮮未熟果果皮水抽出物が最も高い吸収を示すことから、未熟果果皮にはヘスペリジンが配糖体で含まれているものと考えられた。未熟果果皮のヘスペリジンは新鮮であれば水またはEtOH抽出物に豊富に含まれるが、乾燥果皮ではEtOH抽出物中の量が減少した。従って、乾燥果皮では、疎水性を示すヘスペリジンが減少した可能性が示唆された。

3.3 未熟果果皮水抽出物の血管内皮細胞増殖に及ぼす影響

DMSOを添加した培養と比較すると、未熟果果皮水抽出物を加えた培養では細胞の増殖率に変化がなく、ヘスペリジンを加えた培養で細胞の減少が認められた。(図3)

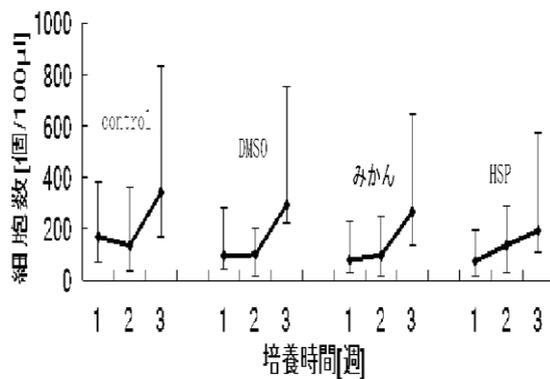


図3 添加培養における血管内皮細胞の細胞数経時的変化。左から基本培地で培養(control)、DMSO(DMSO)、未熟果果皮水抽出物(みかん)、ヘスペリジン(HSP)を添加後培養したもの。

ヘスペリジンはフラバノン配糖体であり、このフラバノンはTGF-β受容体の活性を制御するという報告がある¹⁾。また、血管新生においてTGF-βシグナルは血管内皮細胞の分化転換を誘導することが知られている¹⁾。よって、ヘスペリジンで細胞数が減少したのは、分化転換が誘導されたためと考えられた。みかん抽出物については、ヘスペリジン含量が少ないために効果が認められなかった、または、ヘスペリジンや水溶性のヘスペレ

チン7-グルコシドが分解され、アグリコンが生成したためにTGF-β受容体に作用しなくなったと推察された。

3.4 柑橘抽出物添加培養で生産されるタンパク質のSDS-PAGEパターン

DMSO、みかん抽出物、ヘスペリジンを添加した培養の細胞内には、66kDaのバンドが認められた。細胞外には、みかん抽出物で60kDaと66kDa、ヘスペリジンで66kDaのバンドがみられた。(図4)

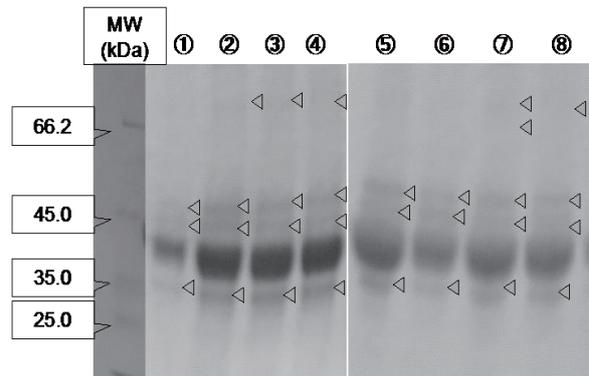


図4 柑橘抽出物添加培養のタンパク質のSDS-PAGEパターン。①基本培地、②DMSO、③未熟果果皮水抽出物、④ヘスペリジンの添加培養の細胞内タンパク質。⑤基本培地、⑥DMSO、⑦未熟果果皮水抽出物、⑧ヘスペリジン添加培養の細胞外タンパク質。培養は2週間行った。

このことから、みかん抽出物およびヘスペリジンによって、細胞外にタンパク質が分泌されたと考えられた。また、みかん抽出物添加培養では、ヘスペリジン添加培養では見られないタンパク質が細胞外に分泌されることが推定された。よって、これらの抽出物で誘導される細胞増殖調節は異なる調節系で行われることが推察された。

3.5 血管内皮細胞のβ-グルコシダーゼ生産における未熟果果皮水抽出物の影響

ヘスペリジンを添加した培養では、培養後期で細胞内にβ-グルコシダーゼ活性を維持し、(図5-A)みかん未熟果果皮水抽出物を添加した培養では、培養後期で細胞外に本酵素の活性が高くなることとみとめられた。(図5-B)

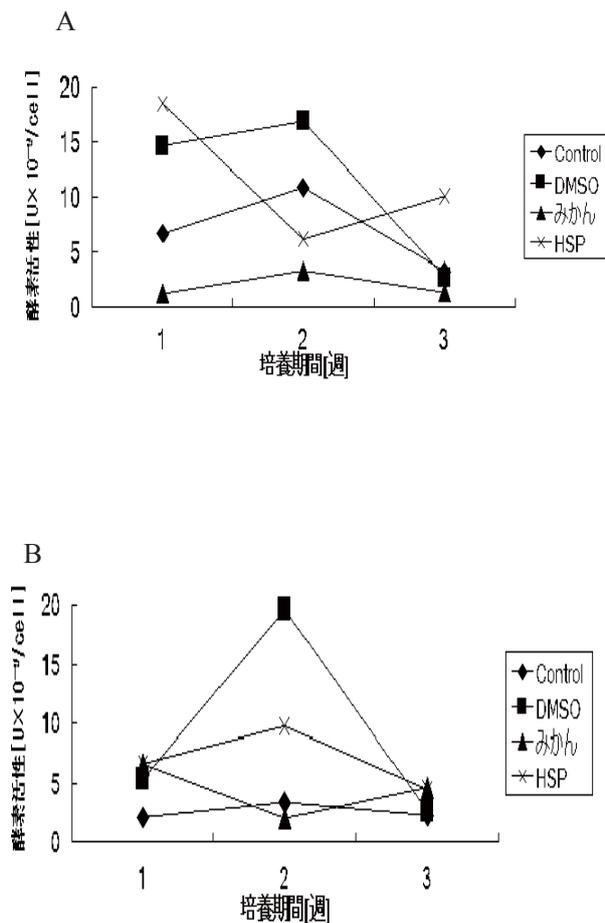


図5 細胞での β -グルコシダーゼ生産経時的変化。A:細胞内、B:細胞外の酵素活性。

これらの結果から、ヘスペリジンを添加した場合は β -グルコシダーゼは細胞外に生産された後、細胞内にとどまり、みかん未熟果果皮水抽出物を添加した場合は細胞内に生産された後、細胞外に分泌されると考えられた。

配糖体は細胞膜透過性が乏しいため、細胞表面にある受容体に結合するか、生理的に不活性である。フラボノイド配糖体を分解する β -グルコシダーゼは通常、細胞の細胞質にみとめられるが³⁾、これが細胞外に分泌されれば、細胞外に存在するフラボノイド配糖体を分解してアグリコンを遊離させることができる。アグリコンは細胞内の受容体に作用することが可能である。

よって、ヘスペリジン添加培養では、ヘスペリジンは細胞外の基底レベルの β -グルコシダーゼ活性では分解されず、TGF- β のような細胞表面の受容体に作用すると推定された。

みかん未熟果果皮水抽出物は、その溶解度と吸収波長から²⁾、水溶性のヘスペリジン（ヘスペレ

チン7-グルコシド)が含まれる可能性が示唆された。ヘスペレチン7-グルコシドはヘスペリジンと比較して分解され易いので、基底レベルの細胞外 β -グルコシダーゼに分解されアグリコンを生成させることが可能である。アグリコンは細胞内の受容体と作用する可能性がある。フラボノイドの細胞内受容体にはエストロゲン受容体がある¹⁾。

上述のように、血管内皮細胞の生産する細胞外 β -グルコシダーゼによって、分解されないフラボノイド配糖体では細胞表面の受容体、分解されるものは細胞内の受容体に結合して、細胞の増殖を調節することが示唆された。

4. まとめ

柑橘類果皮は様々な種類のフラボノイドを含有し、そのフラボノイドの種類によって、動物細胞への生理活性が異なることが考えられた。みかん果皮に含まれるフラボノイドの種類はヘスペリジンであり、このヘスペリジンは糖部分の構造により、水に対する溶解度が異なる3種類のフラボノイド、ジグリコシドのヘスペリジン、モノグルコシドのヘスペレチン7-グルコシド、アグリコンのヘスペレチンとして存在する²⁾。この溶解度が最も高いヘスペレチン7-グルコシドのみかん未熟果果皮に多く含まれることが推定された。

みかんに含まれるヘスペリジンは、細胞表面の受容体に作用し、ヘスペレチン7-グルコシドは β -グルコシダーゼの作用によりヘスペレチンを生じ細胞内の受容体に作用することが推察された。このように、温州みかんに含まれるフラボノイド配糖体は、同じアグリコンを構造に持つものでも、糖部分の構造によって、作用する受容体が異なる可能性が示唆された。

柑橘類に含まれるフラボノイド配糖体は、糖の構造により、細胞増殖に対する分子機構が異なることが示唆された。そして、 β -グルコシダーゼがこの分子機構のモジュレーター因子として働くことが推察された。

参考文献

- 1) E.Grotewold: The Science of Flavonoids, Springer Science+Business Media, LLC, USA, pp.213-257 (2008)
- 2) 野方洋一: 近畿中国四国農業研究センター研究報告第5号, pp.19-84 (2005)
- 3) J.G.Berrin, M. Czjzek, P. A. Kroon, W. R. Mclachlan, A. Puigserver, G. Williamson, N. Juge: Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic β -glucosidase, Biochem. J., 373, 41-48 (2003)

【受理年月日 2015年 9月18日】