

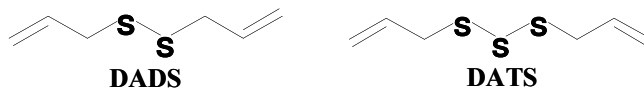
お茶の水女子大学・大学院
人間文化創成科学研究科・
ライフサイエンス専攻・准教授
博士（農学）
森光 康次郎

平成4年 名古屋大学大学院農学研究科
博士後期課程修了（同博士号取得）
平成4年 静岡県立大学食品栄養学科・助手
平成8年 名古屋大学農学部・助手
平成11年 お茶の水女子大学・助教授
平成19年 お茶の水女子大学・准教授
（現職）

ニンニク加熱調理・加工時に生成するポリスルフィド類の生理 機能的二面性の解析

はじめに

ネギ属野菜（ニンニク、タマネギなど）の有用な生理機能として、抗菌活性や血小板凝集阻害活性、発がん抑制効果などがすでに知られている。その機能性成分として、含硫成分が重要な役割を担っていると考えられている。ニンニクの生理機能性は他のネギ属野菜に比べて高く、特にニンニクの加熱調理や加工により二次的に生成するジアリルジスルフィド（DADS）とジアリルトリスルフィド（DATS）がニンニクの主要な含硫成分である。これらポリスルフィド類はニンニクの示す生理機能への寄与度が高い。



一方で、ある種の動物（イヌなど）にネギ属野菜を摂取させると貧血性溶血や消化器官の組織変性などの病変が短時間で起こり、時として死に至ることが知られている。近年の研究から、これらの毒性（負の生理機能）の一端が脂溶性ポリスルフィド類に起因していると報告されている。

また、ネギ属野菜のポリスルフィド類は調理（切断）により初めてネギ属野菜から生成してくる含硫成分であり、微量のDADSはニンニクの好ましい加熱香りそのものである。加熱操作が進むにつれ、硫黄数が3つのDATS、そしてさらに硫黄数が多いポリスルフィド類へと変化していく。*In vitro*における正負双方の生理機能は、DADSよりもDATSの方が強いことが報告されているが、硫黄数が増えるに従って好ましい香りからはほど遠いものへと変化していく。この硫黄数の違いと生理機能性の差については不明な点が多く、特に、*in vivo*ではDADSもDATS同様に生理機能性を示しており、*in vitro*のデータと異なっている。

本研究の目的

これまで、加熱ニンニクの代表的なポリスルフィド類である DADS と DATS に焦点をあて、相反する生理機能が同一化合物でなぜ起こるのか化学的および生化学的に解明を試みてきた。特に、DATS による正の機能性としては発がん抑制効果に関与すると考えられている第二相解毒酵素誘導活性を、負の生理機能としては細胞毒性や DNA 鎖切断活性を指標に研究を進めてきた。その結果、DATS は細胞内で polysulfide-thiol pathway を経た活性酸素生成を誘発し、細胞内レドックスポテンシャルを変化させていることを明らかにした (図 1)。

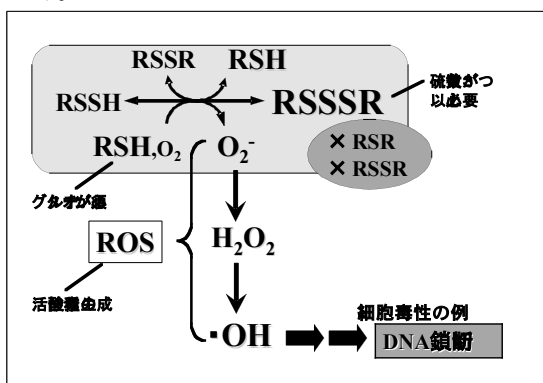


図 1. ポリスルフィド類とグルタチオンの反応 (polysulfide-thiol pathway)

一方、*in vivo* における発がん抑制作用の報告が多い DADS は、DATS のような強い細胞内活性酸素の生成を示さず、異なる誘導機構の存在が示唆された。そこで本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* における DADS の第二相解毒酵素誘導活性を検討すると共に、活性の経時的な変化や代謝物の分析を行ってその誘導機構を明らかにすることを目的とした。

研究方法及び結果

ジスルフィド類の第二相解毒酵素誘導活性 (*in vitro*)

ラット肝上皮由来 RL34 細胞を用い、代表的な第二相解毒酵素である glutathione *S*-transferase (GST) と quinone reductase (QR) の誘導活性を、DADS 及び側鎖の異なる dipropyl disulfide (DPDS) と dimethyl disulfide (DMDS) について測定した。その結果、DADS にのみ有意に高い QR 誘導活性が認められ、誘導活性にはジスルフィド構造よりもアリル基の寄与度が高いことが示唆された (図 2)。

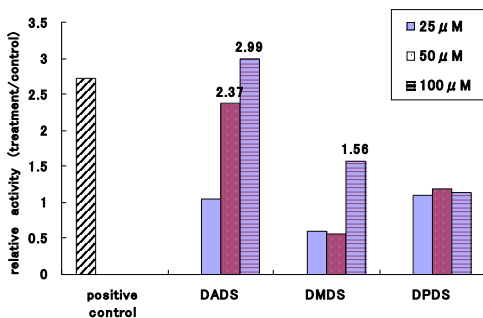


図 2. 側鎖が異なるジスルフィド間での NQO1 活性の比較

次に、DADS 処理による QR 誘導活性と GSH 量の経時的変化を測定した。QR 誘導活性は、細胞に DADS 添加後 6 時間から徐々に上昇を続け、18 時間後に最大に達した後、24 時間後にかけて若干の減少がみられた。GSH 量は DADS 添加 6 時間後に 60% 程度増加した後、18 時間後までほぼ横ばいの推移をし、24 時間後にかけて減少していく傾向がみられた。DADS の QR 誘導活性・GSH 量の経時的変化は、これまでの研究で強い誘導活性を示した DATS と同様の挙動であった。

DADS 代謝物 (*in vitro*)

ラット肝マイクロソームを用いて *in vitro* での DADS 代謝モデル実験を行った。その結果、S 原子が一つ酸化された thiosulfinate 体である **allicin** と推測される代謝物が検出された。**allicin** は求電子試薬的性質を持ち、これまでの研究でも強い第二相解毒酵素誘導能を示すことを確認している。そこで、DADS による第二相解毒酵素誘導能の本体は代謝物としての **allicin** ではないかと考え、細胞内代謝物の直接的な分析を試みたが、**allicin** は検出できなかった。次に、RL34 細胞で DADS 代謝に関わる第一相解毒酵素の発現を、入手可能な CYPs 抗体 5 種を用いて検討したが、DADS 処理により発現が変動した分子種は特に認められなかった。これらより、**allicin** が誘導活性に直接寄与する代謝物である可能性は低いと考えられた。

In vivo での DADS 代謝物と第二相解毒酵素誘導活性

ICR マウスに DADS 200 mg/kg を胃内強制投与し、投与から 1、3、5 日後に採血した後、胃・肝臓・小腸を摘出した。各臓器における DADS 代謝物と第二相解毒酵素誘導活性を検討した。各臓器のホモジネートを CH_2Cl_2 で抽出し、GC-MS に供して分析したところ、DADS は投与後 1 日目の胃でのみ検出された。胃、肝臓、血漿より DADS 代謝物と考えられる m/z 104、 m/z 120 の新たな 2 つの化合物が検出された (図 3)。文献より、これらを allyl methyl sulfoxide (AMSO)、allyl methyl sulfone (AMS O_2) と推定し、allyl methyl sulfide の酸化反応を行って調製した合成品を用いて同定した。

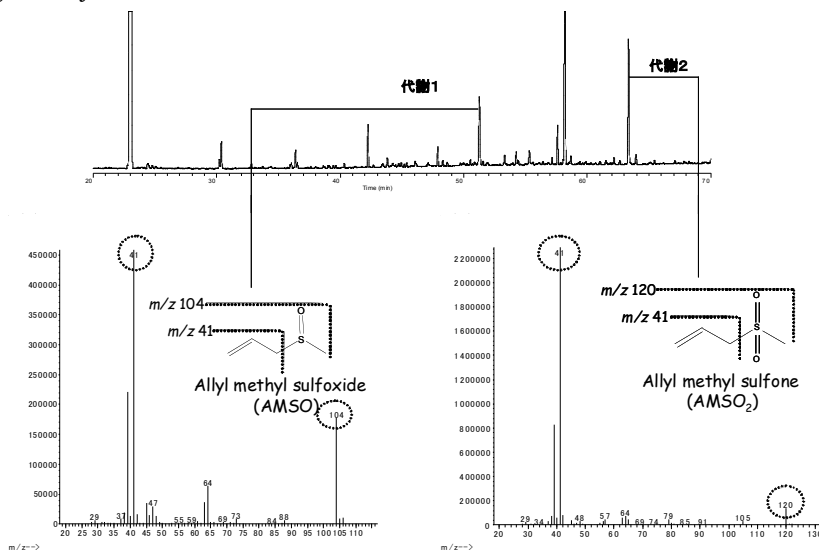


図 3. DADS 代謝物の GC-MS による同定

これらの化合物は 1～2 日のうちに消失し、3 日目以降はいずれの臓器にも DADS 代謝物は検出されな

かった。第二相解毒酵素誘導活性は、1日目の胃、肝臓で GST・QR 共に有意な誘導活性がみられた。このことより、1日目に検出された DADS 代謝物の AMSO 及び AMSO₂ が誘導活性を有する可能性を示すことができた。実際、合成した AMSO と AMSO₂ を用いて RL34 細胞でのちに GST および QR 誘導活性を調べたところ、AMSO₂ に強い QR 誘導活性を認めた。

本研究の考察

RL34 細胞を用いて DADS の第二相解毒酵素誘導活性 (GST と QR) を測定したところ、control の 1.5 倍という有意に高い QR 誘導活性が認められた。GST や QR の誘導的発現は、どちらも GRR に存在する ARE/EpRE を介した転写レベルによるものであることが明らかにされている。また、ヒト肝がん細胞 HepG2 を用いた実験より、DADS 及び DATS による QR 誘導活性において、Nrf2 の遊離及び核移行による ARE/EpRE 活性化が重要な役割を担っていることも示唆されている。従って、QR 誘導活性を示す DADS は、同様の機構で GST 誘導活性も示すことが推測された。しかしながら、DADS は control に対し 1.14 倍の GST 誘導活性しか示さず、有意差もなかった。DADS が RL34 細胞で QR のみを特異的に誘導した理由については、今回の結果からだけでは言及することができない。DADS が MAPK、PKC、PI3K などのシグナル伝達機構に及ぼす影響や RL34 細胞の特性についても検討を行い、考察する必要がある。また、単に DADS が誘導されてきた GST 活性を阻害しているだけなのかもしれない。

ジアリルポリスルフィド類の第二相解毒酵素誘導能について、その構造と活性の詳細な相関は未だ得られていないが、硫黄原子数やアリル基が重要な役割を持つ傾向が報告されている。今回、DADS と側鎖が異なる類縁体の DPDS 及び DMDS 間での誘導活性の比較を行ったところ、やはりアリル基を持つ DADS のみに誘導活性が認められた。ジアリル化合物は二重結合の酸化により求電子性を示すエポキシド中間体を生成し、それが第二相解毒酵素誘導に関与しているという可能性が示されている。DADS におけるこの仮説の関与を検討するためには、生成したエポキシドを加水分解する、エポキシドヒドラーゼ (EH) を添加して誘導活性の変化を検討するなど、さらに多くの研究が必要である。

マウスを用いた *in vivo* における実験では、DADS 200 mg/kg の単回投与により、投与1日後の肝臓及び胃において QR 誘導活性と GST 誘導活性が認められた。またその活性の強度は GST < QR であり、RL34 細胞における傾向と一致していた。投与後 1~5 日間の胃、肝臓、血漿中の DADS 代謝物を分析したところ、DADS は投与1日後の胃から検出されたのみで、血漿及び肝臓には存在せず、吸収後迅速に代謝されるものと考えられた。代わって DADS の代謝物と考えられる allyl methyl sulfoxide (AMSO)、allyl methyl sulfone (AMSO₂) の新たな2つの化合物が、投与1日後の胃、肝臓、血漿及び2日後の肝臓から検出された。また、各臓器におけるこれらの含有量は、GC 分析より AMSO < AMSO₂ と推測された。このうち AMSO₂ に RL34 細胞における QR 誘導活性及び GST 誘導活性が認められ、またその活性強度は GST < QR であった。よって、マウス体内での DADS による第二相解毒酵素誘導機構には、代謝物である AMSO₂ が寄与している可能性が大きいと考えられた。ただし、生体内での DADS から AMSO₂ への代謝については、吸収された DADS のうち、どのぐらいの割合が AMSO₂ へと変換され、そのうち何% がさらなる化合物へと代謝されるのかは明らかになっていない。よって、生体内で生成される AMSO₂

の濃度が第二相解毒酵素を誘導し得る濃度であるのか、さらなる検討が必要である。

おわりに

これまで、ニンニクの発がん抑制作用などの正の生理機能については多くの報告がなされている。その大半は動物や細胞を用いた研究であり、日常の摂取量と比較するとかなり高濃度である場合が多い。今回の *in vivo* 実験でも、200 mg/kg という非常に高濃度な DADS をマウスに投与した。単純にマウス 25 g、ヒト 60 kg として重量比 2400 倍で考えると、単一成分としての DADS 12 g を 1 回に摂取する計算となる。この量の DADS を生ニンニクから摂取しようと考えたと、およそ 510 片、約 2.5 kg の生ニンニクを一度に摂取しなくてはならない。これを日常の食生活で再現することはほぼ不可能である。また、DADS の示す機能性が実際にヒトの生体内においても十分起こりうると評価されるためには、摂取した化合物の体内吸収率やその他成分との相互作用の検討など、ヒト介入試験による検証が不可欠となる。よって、動物や細胞を用いた研究によって示唆された発がん抑制作用をそのままヒトに期待することはできない。

しかしながら、今回検討した DADS はニンニク中の主要な含硫化合物、つまりポリスルフィド類であり、その第二相解毒酵素誘導機構について一端の知見を得たことは、DADS のみならずニンニクそのものに期待される発がん抑制作用、さらには負の生理機能の詳細を理解する上で十分に意義があった。

謝辞

本研究課題を助成を下されました財団法人サッポロ生物科学振興財団に感謝申し上げます。また、研究助成候補者にご推薦いただきました、富永典子先生（お茶の水女子大学教授）には、この場を借りて心より御礼申し上げます。