

テトラヒメナを用いたミトコンドリア膜電位測定法による
ポリフェノールの化学構造とミトコンドリア活性化の関係の研究

相澤 圭治, 小澤 哲夫, 沼田 治 (筑波大学生命環境科学研究科)

Study on the relationship between mitochondrial activation and chemical structure of
polyphenols using mitochondrial membrane potential in *Tetrahymena cells*

Keiji AIZAWA, Tetsuo OZAWA and Osamu NUMATA
(Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

SUMMARY

To study the relationship between mitochondrial activation and the chemical structure of polyphenols, we investigated the effects of galloyl residues on mitochondrial activation, using a method that measures mitochondrial membrane potential in *Tetrahymena* cells. Catechins with one galloyl residue, such as epicatechin gallate and epigallocatechin gallate, activated mitochondria more than catechins without galloyl residues, such as epicatechin and epigallocatechin. In addition, theaflavin-3,3'-O-digallate has higher activity than theaflavin and theaflavin-3,3'-O-monogallate. These results suggest that the number of galloyl residues in polyphenols is important in mitochondrial activation.

【目的】我々は、テトラヒメナとローダミン123を用いたミトコンドリア膜電位測定法を用いて、ミトコンドリア活性化能がある発酵茶高分子ポリフェノールの分離に成功し、これをMAF (Mitochondrial activation factors)と名付けた。MAFはテトラヒメナ細胞や培養筋細胞 (C2C12) のATP 産生量と酸素消費量を上昇させる。また、II型糖尿病モデルマウスにMAFを経口摂取させると、血糖値の減少と脂肪肝の発症の抑制が観察された。これらの現象は、MAFによるミトコンドリアの活性化によって、糖代謝と脂肪代謝が亢進した結果であると考えられる。

熱分解クロマトグラフィーにより調べたところ、MAFはB環-B環とB環-C環の間で結合したフラバン-3-オール骨格とフラバン-3-オール-ガレートを持つ高分子ポリフェノールであり、分子量は9,000から18,000である。MAFの構造上の特徴はプロシアニジン構造とB環-B環結合、ガロイル (没食子酸) 残基を持っていることである。これらの構造がMAFのミトコンドリア活性化に関係あるのではないかと考え、構造が明らかになっている既知のポリフェノールのミトコンドリア活性化能と化学構造との関連をテトラヒメナを用いたミトコンドリア膜電位測定法を用いて調べた。

【材料と方法】テトラヒメナはPYD 培地 (1% Proteose Peptone No.3., 0.5% Yeast Extract, 0.87% D-Glucose) で、震盪培養することにより細胞数密度を 1.0×10^4 cells/ml に揃え、15 ml チューブに分注する。各種ポリフェノールは5% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、特定の濃度になるように各チューブに加え、テトラヒメナを12時間震盪培養する。細胞とポリフェノールとの処理を止めるために、NKC 溶液 (0.2% NaCl, 0.008% KCl, 0.012% CaCl₂) で細胞を洗う。再び細胞数を揃えた後、ミトコンドリア膜電位依存的に蛍光強度を増すローダミン123を細胞に45分間作用させ、ミトコンドリアを染色する。染色が終わったものをNKC 溶液で二回洗い、NKC 溶液で細胞数密度を 4.5×10^4 cells/ml に揃えた後、これを2つに分け、片方をミトコンドリアの呼吸機能を停止させるアジ化ナトリウムで処理する。96穴プレートにそれぞれ100 μ l ずつ分注し、マルチマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定する。サンプル処理細胞 (アジ化ナトリウム未処理) の蛍光強度からサンプル処理細胞 (アジ化ナトリウム処理) の蛍光強度を引いたものを、サンプル処理細胞のミトコンドリアの蛍光強度の測定値とする。溶媒である

DMSO のみを加えたものとポリフェノールを作用させたものの蛍光強度を比較して、ミトコンドリアの膜電位上昇を測定し、ミトコンドリアの活性化を評価する。

【結果と考察】テトラヒメナを用いたバイオアッセイ法により、各種ポリフェノールの持つ特徴的な化学構造とミトコンドリアの活性化の関係性について調べた。

MAF には特徴的な化学構造が3つ存在する。フラボノイドのB 環同士が結合して出来るヘキサヒドロジフェニル基とフラバン-3-オール骨格が酸化重合してできたプロシアニジン構造、そして没食子酸がエステル結合によって結びついたガロイル基である。

まず、ガロイル基に注目して実験を行った結果、没食子酸、及び没食子酸がエチル化したエチルガレートにおいてミトコンドリア活性化能が見られた。また、カテキン類においても、ガロイル基を持つエピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートに活性化能が見られた。ガロイル基を二つ結合させたヘキサヒドロジフェニル基を持つエチルガレートダイマーには、エチルガレートよりも高い活性化能が見られた。そして、テアフラビン類においても、二つのガロイル基を持つ *Theaflavin-3,3'-O-digallate* に高い活性化能が見られた。

また、ガロイル基を外したMAF にも活性化能が見られたが、ガロイル基を外していないMAF と比べるとその活性化能は弱いものであった。

以上の研究結果から、ガロイル基にミトコンドリアの膜電位を上昇させる作用があることが分かった。今後は、まだミトコンドリア活性化能を調べていないポリフェノールの活性化能を調べ、そのポリフェノールの構造とミトコンドリア活性の関係性について調べていきたいと考えている。

【文献】

- 1) Fujihara, T. (2007) Studies on High-molecular-weight polyphenols from fermented tea. A Dissertation of the Graduate School of Life and Environmental Sciences in the University of Tsukuba.
- 2) Fujihara, T., Nakagawa, A., Ozawa, T., and Numata, O. (2007) High-molecular-weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (3). 711-719.