

質量分析法を駆使した、組織でのポリフェノール蓄積挙動の解明に関する研究

安部, 知純

<https://hdl.handle.net/2324/7182534>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



質量分析法を駆使した、組織での
ポリフェノール蓄積挙動の解明に関する研究

九州大学大学院生物資源環境科学府 生命機能科学専攻
食料化学工学教育コース 食品分析学分野

安部 知純

2024

目次

第1章 諸論	6
第2章 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析イメージング法を駆使した、フラボノイド代謝物のダイズ種子中での産生挙動	28
第1節 緒言	28
第2節 材料および方法	31
第2.1項 材料	31
第2.2項 麹菌感作発芽ダイズの調製	31
第2.3項 ダイズ中フラボノイド代謝物の測定	32
第2.4項 マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング分析	32
第2.5項 統計処理	33
第3節 結果および考察	35
第3.1項 イソフラボン類とその代謝物の同定と定量	35
第3.2項 麹菌感作ダイズでのフラボノイド代謝物の分布解析	42
第3.3項 麹生菌・麹死菌処理ダイズを用いたフラボノイド代謝物の産生誘導機構	49
第4節 小括	55
第3章 エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析法を駆使した、フラボノイド代謝物のラットでの生体利用性	58
第1節 緒言	58
第2節 材料および方法	60

第 2.1 項	材料	60
第 2.2 項	ラット投与試験	60
第 2.3 項	血液測定	61
第 2.4 項	臓器測定	61
第 2.5 項	エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析	62
第 3 節	結果および考察	63
第 3.1 項	フラボノイド代謝物分析法の妥当性評価	63
第 3.2 項	血中でのフラボノイド代謝物の吸収挙動	65
第 3.3 項	臓器中でのフラボノイド代謝物の蓄積挙動	72
第 4 節	小括	81
第 4 章	総括	83
謝辞		89
参考文献		90

Abbreviations

1,5-DAN, 1,5-diaminonaphthalene	HMPA, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)
3,9-DPO, 3,9-dihydroxypterocarpan 6a-monooxygenase	propionic acid
9-AA, 9-aminoacridine	HMPA-GlcA, HMPA monoglucuronide
<i>A. oryzae</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	HMPA-S, HMPA monosulfate
ACN, acetonitrile	HPLC, high performance liquid chromatography
ADME, absorption, distribution, metabolism, and excretion	I2'H, isoflavone 2'-hydroxylase
AUC, area under the curve	IAA, <i>trans</i> -3-indoleacrylic acid
B.W., body weight	ITO, indium tin oxide
CA, caffeic acid	LC-ESI-TOF/MS, liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry
CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid	LOD, limit of detection
DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid	LOQ, limit of quantification
DHCA, 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid	MALDI-MSI, matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry imaging
DMCA, 3,4-dimethoxycinnamic acid	MCT, monocarboxylate transporter
EIC, extracted ion chromatogram	MeOH, methanol
EtOH, ethanol	MS, mass spectrometry
FA, formic acid	N.D., no detection
FL, fluorescence spectroscopy	OAT, organic anion transporter
G2DT, glycinol 2-dimethylallyltransferase	PAL, phenylalanine ammonia-lyase
G4DT, glycinol 4-dimethylallyltransferase	PRR, pattern recognition receptor
GS, glyceollin synthase	

RT, retention time

SD, standard deviation

TCA, trichloroacetic acid

THAP, 2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate

TMS, tetramethylsilane

tr, trace

UPLC-PDA, ultraperformance liquid

chromatography-photodiode array

UV-VIS, ultraviolet-visible spectroscopy

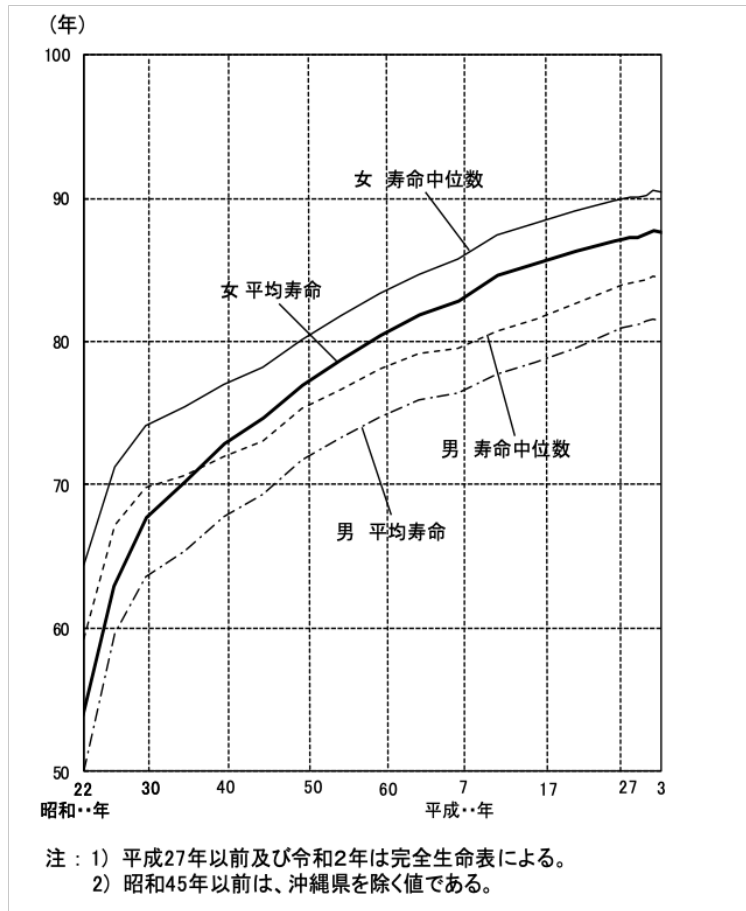
第 1 章 諸論

令和 4 年の日本総人口に占める 65 歳以上の人口は 29%に達し、令和 19 年には 3 人に 1 人が 65 歳以上になると予想されている（令和 5 年版高齢社会白書、内閣府：https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2023/zenbun/05pdf_index.html、令和 5 年 10 月 30 日閲覧）。日本の平均寿命は 2021 年には戦後（1947 年、昭和 22 年）から約 30 歳延伸し（男性 81 歳、女性 87 歳；厚生労働省）（**Figure 1-1A**）、生物学的寿命は今後も延伸を続けると予想されるが、健康寿命（「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」と定義）との間には 2019 年時点で男性が約 9 年、女性が約 12 年の差が見られ、約 10 年間は薬剤治療や介護が必要となる（厚生労働省令和元年度「健康寿命の令和元年値について」<https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000872952.pdf>、令和 5 年 10 月 30 日閲覧）（**Figure 1-1B**）。平均寿命の延伸に伴い、社会保障予算は増加を続け、2023 年の給付費総額は 130 兆円（国内総生産の 23.5%）となった（我が国社会保障制度の構成と概況、厚生労働省：<https://www.mhlw.go.jp/content/12600000/001144715.pdf>、令和 5 年 10 月 30 日閲覧）。高齢人口増に伴う社会保険予算の急増は、現役世代への負担軽減および社会機能維持のための喫緊の課題であり、健康寿命の延伸はその解決に有効であると考えられる。健康寿命の延伸には、生活習慣病の予防が最重要であり、日常的に摂取可能な健康機能性食品の需要は今後も拡大を続けると考えられる。

食品には 1 次（栄養機能）、2 次（感覚・嗜好機能）、3 次（生体調節機能）機能がある。食品の一般成分である糖質（炭水化物）・タンパク質・脂質は主に 1 次および 2 次機能を担う。食品の 3 次機能と呼ばれる栄養成分の生体調節性や健康機能性は、脚気・ペラグラ・壊血病を対象とした栄養疫学研究におけ

るビタミン類の発見が端となっている[1]。ビタミン欠乏を対象とした疫学研究の過程で、Szent Györgyi らは 1936 年にカンキツに含まれるフラボンとフラボノール（当時はビタミン P とされた）に血管保護機能があることを報告している[2]。その後、世界保健機構（WHO）が実施した MONICA project（1987）では、フランスにおける虚血性心疾患の死亡率が、他の欧米国（スイス、USA、イギリス）と比較して、その食事中脂質量（虚血性心疾患を原因とする死亡率と正の相関を示す）が同程度であるにもかかわらず、顕著に低いことを示した[3]。この特徴的な統計結果は「フレンチ・パラドックス」として注目され、後にワインに含まれるポリフェノール（特にレスベラトロール）の抗酸化能が評価されたことによって [4,5]、ポリフェノールの生体調節性や健康機能性が脚光を浴びる契機となった。2023 年現在、ポリフェノールは日本消費者庁管轄の特定保健用食品（トクホ）の関与成分として 135 件[全 1058 件中、消費者庁特定保健用食品許可（承認）品目一覧、https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_for_specified_health_uses/令和 5 年 12 月 22 日]の登録があり、機能性食品成分として今後も期待の高い食品成分となっている。

(A)



(B)

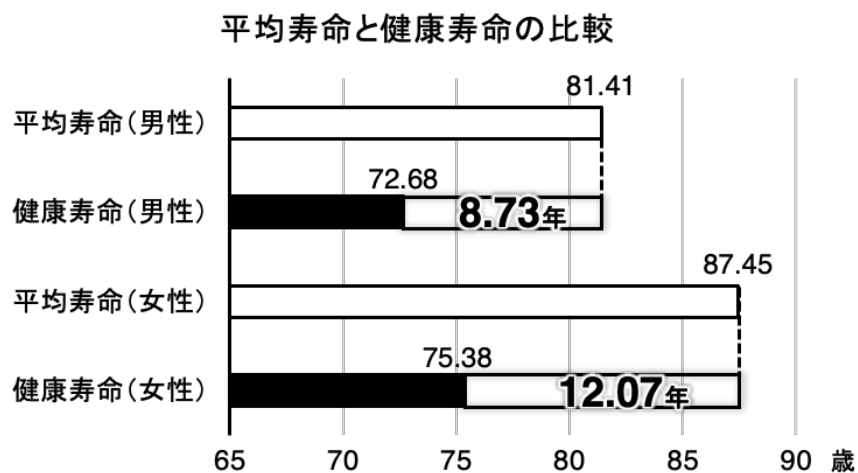


Figure 1-1 日本人の平均寿命と健康寿命

(A) 日本人の平均寿命の遷移 (厚生労働省令和3年簡易生命表より抜粋) (B) 日本人の平均寿命と健康寿命の比較 (厚生労働省令和元年度「健康寿命の令和元年値について」資料参考：<https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000872952.pdf>、令和5年10月30日閲覧)

植物が産生する非栄養性の生理活性物質はフィトケミカルと呼ばれ、（ポリ）フェノールや有機硫黄化合物、テルペノイドなどが含まれる（**Table 1-1**）[6,7]。ポリフェノールは、広義には、複数のフェノール性水酸基を有する化合物と定義される。モノフェノール環を有するフェノール酸類から、重合度の高いタンニン類（>30,000 Da）に至るまで、現在 8,000 種以上のフェノール性化合物が発見されている。ポリフェノールは骨格特徴をもとに Harbone によって 10 種類に分類されている（**Table 1-2**）[8]。このうち、フラボノイド類は自然界に 5,000 種以上が確認されている主要ポリフェノールであり、さらに 13 種類のサブクラスに分類される（**Table 1-3**）。フラボノイド類を含むポリフェノールの健康機能性として、抗がん作用[9]、抗炎症作用[10]、抗肥満作用[11]、抗糖尿病作用[12]、血圧上昇抑制作用[13]などが報告されている。これらのポリフェノールの健康機能に関する知見は、ポリフェノールの抗酸化性を作用発現の中心とするものが多く、ポリフェノールが標的細胞や組織へ到達することを前提としている。その一方で、カテコール基を有するポリフェノールが体内で薬物代謝（第 I/II 相代謝）を受けることもよく知られている[14]。薬物代謝を受けたポリフェノールは、小腸や肝臓において抱合基が付加され水酸基（OH）が保護されるため、抗酸化作用が減弱すると推察される。他方、抱合体として生理作用を示す報告もあり（**Table 1-4**）、ポリフェノールは多様な生理作用を有する機能体として認識できる。また、経口摂取したポリフェノールは大腸で腸内細菌によって代謝分解を受け、新たな機能体、例えば酪酸などの低分子有機酸を産生することが知られており、これら代謝物がポリフェノール摂取後に見られる健康機能の作用本体と推察される。したがって、生体内におけるポリフェノールの吸収と代謝挙動を把握することは、ポリフェノールによる生理作用機構の解明に必要不可欠といえる。

Table 1-1 フィトケミカルの例[6,7]

フィトケミカル	化学分子種	フィトケミカル	化学分子種
carotenoids		glucosinolates	
	cryptoxanthin		glucobrassicin
	fucoxanthin		glucocalyxin
	lutein		glucocapparin
	lycopene		glucoiberin
	xanthophylls		gluconapoleiferin
	zeaxanthin		gluconasturtiin
	α -carotene		glucoraphanin
	β -carotene		glucosinalbin
polyphenols			glucotropaeolin
	acetophenones		neoglucobrassicin
	anthraquinones		progoitrin
	benzoquinones		sinigrin
	chromones	allium compounds	
	coumarins		isoalliin
	flavonoids		methiin
	hydroxycinnamic acids		propiin
	hydroxybenzoic acids		
	lignans, neolignans	lectins	
	lignins		concanavalin A
	naphtoquinones		peanut agglutinin
	phenols		ricin
	phenylacetic acids		wheat germ agglutinin
	phenylpropenes		
	stilbenes	terpenes	
	xanthones		calotropin
	tannins		caulerpenyne
polyacetylenes			cinerin I
	falcarindiol		farnesane
	falcarinol		geraniol
	oenanthetol		squalane
	panaxydiol		strigol

Table 1-1 (続き)

フィトケミカル	化学分子種	フィトケミカル	化学分子種
isoprenoids	limonene myrcene pinene	alkaloids	ajmaline berberine caffeine camptothecin cocaine codeine hyoscyamine irinotecan morphine nicotine noscapine oxycodone oxymorphone papaverine
phytosterols	campestanol campesterol sitostanol sitosterol stigmasterol stigmasterol		
polysaccharides	amylopectin amylose arabinogalactans arabinoxylans cellulose gums hemicellulose inulin methyl cellulose mucilages oligofructans oligosaccharide pectins polydextrose polyfructose resistant starch	capsaicinoids	capsaicin dihydrocapsaicin homocapsaicin nonivamide
		betalains	betaxanthins indicaxanthin miraxanthin portulaxanthin vulgaxanthin
saponins	dammarane oleanane tirucallane		

Table 1-2 骨格構造に基づくポリフェノールの分類[8]

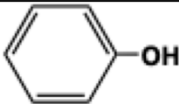
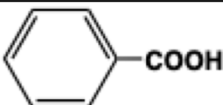
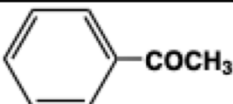
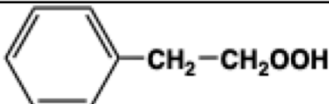
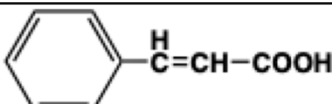
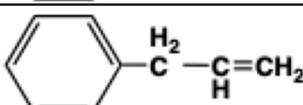
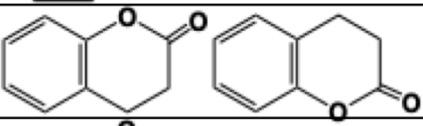
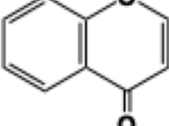
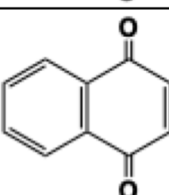
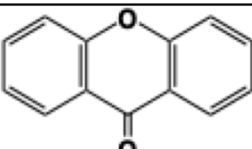
基本骨格	分類	骨格構造
C ₆	phenols	
	benzoquinones	
C ₆ -C ₁	phenolic acids	
C ₆ -C ₂	acetophenones	
	phenylacetic acids	
C ₆ -C ₃	hydroxycinnamic acids	
	phenylpropenes	
	coumarins, isocoumarins	
	chromones	
	naphtoquinones	
C ₆ -C ₁ -C ₆	xanthenes	

Table 1-2 (続き)

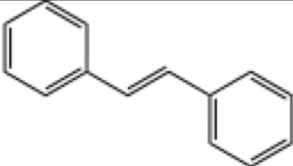
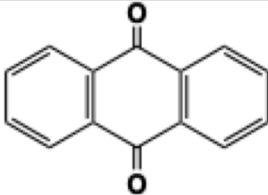
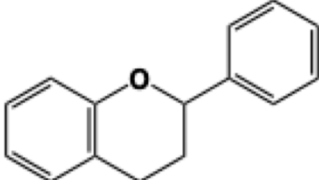
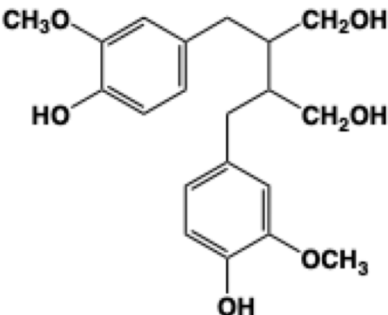
基本骨格	分類	骨格構造
C ₆ -C ₂ -C ₆	stilbenes	
	anthraquinones	
C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoids	
(C ₆ -C ₃) ₂	lignans, neolignans	
(C ₆ -C ₃) _n	lignins	

Table 1-3 骨格構造に基づくフラボノイド類の分類[8]

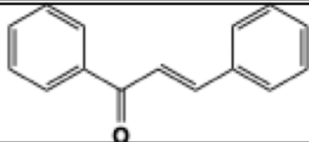
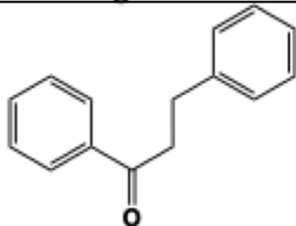
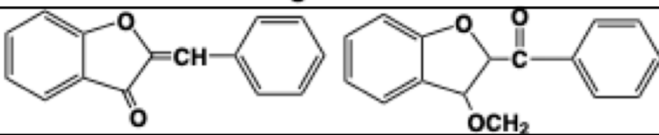
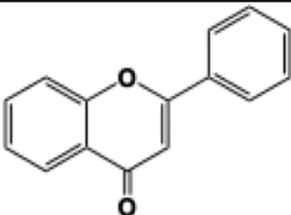
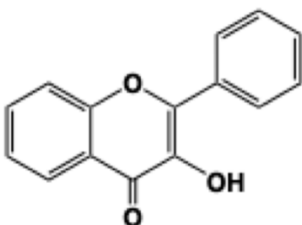
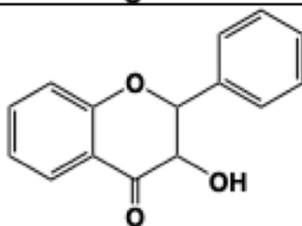
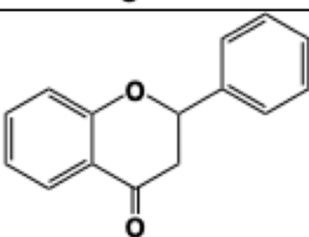
フラボノイド類	基本骨格
chalcones	
dihydrochalcones	
aurones	
flavones	
flavonols	
dihydroflavonols	
flavanones	

Table 1-3 (続き)

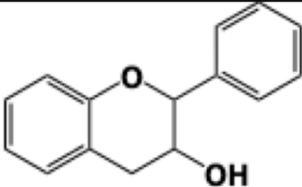
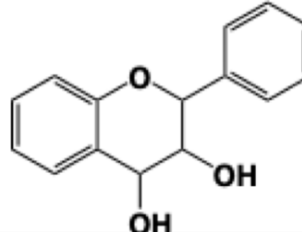
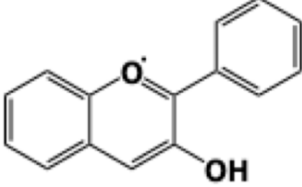
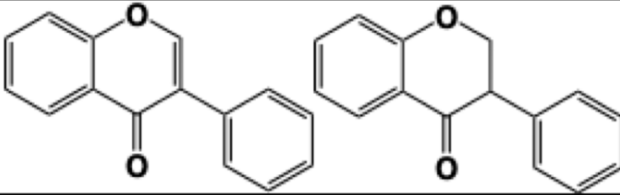
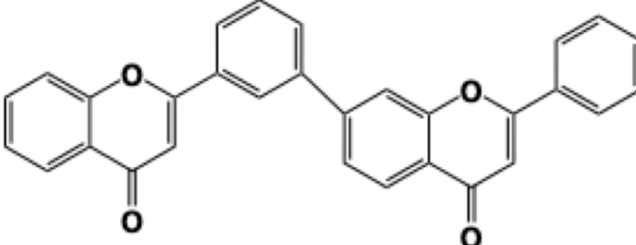
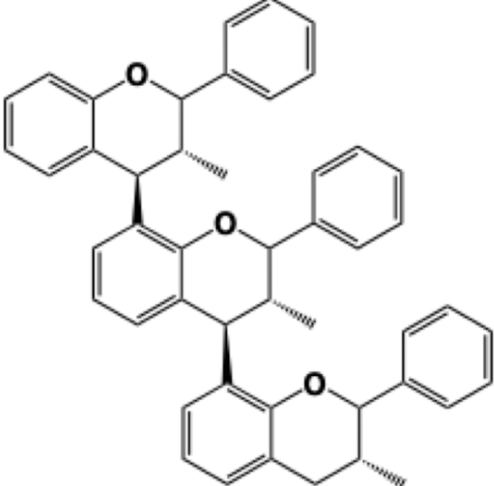
フラボノイド類	基本骨格
flavanols	
flavandiols or leucoanthocyanidins	
anthocyanidins	
isoflavonoids	
biflavonoids	
proanthocyanidins or condensed tannins	

Table 1-4 これまでに報告されているポリフェノール抱合体の生理作用

ポリフェノール抱合体	濃度	モデル	効果	参考文献
3'- and 4'- <i>O</i> -methyl epicatechin	10 μ M	HUVEC	NADPH oxidase 阻害	[15]
3'- <i>O</i> -methylgallic acid	10–100 μ M	Caco-2 cells	細胞死誘導	[16]
4'- <i>O</i> -methylgallic acid	5, 10 μ g/mL	HUVEC	抗炎症	[17]
apigenin glucuronide	12.5–100 μ M	RAW 264.7 cells	抗炎症	[18]
apigenin-7'- <i>O</i> -glucuronide	25–100 μ g/mL	RAW 264.7 cells	LDL 取り込み抑制	[19]
epicatechin sulfates (A-ring and B-ring conjugation)	1–300 mM	RAW 264.7 cells	抗炎症	[20]
quercetin-4'- <i>O</i> -sulfate	50, 100 μ M	MCF-7 cells	増殖抑制	[21]
3'- <i>O</i> -sulfate-epicatechin		Caco-2 cells		
3'- <i>O</i> -methyl-epicatechin		BxPC-3 cells		
4'- <i>O</i> -methyl-epicatechin				
ferulic acid-4'- <i>O</i> -sulfate	3–30 μ M	血管 (mice)	血管弛緩誘導	[22]
hydroxytyrosol acetate sulfate	2.5–10 μ M	SH-SY5Y cells	神経細胞保護	[23]
hydroxytyrosol sulfate		LUHMES cells		
hydroxytyrosol glucuronide	1 μ M	Caco-2 cells	抗炎症	[24]
hydroxytyrosol sulfate				
tyrosol glucuronide				
tyrosol sulfate				
isovanillic acid-3'- <i>O</i> -sulfate	30 μ M	LHCN-M2 myoblasts	糖取り込み促進	[25]
luteolin glucuronides	40 μ M	RAW 264.7 cells	抗炎症	[26]
luteolin sulfate				
quercetin glucuronides	2.5–10 μ M	NCI-H209 cells	細胞増殖抑制	[27]

Table 1-4 (続き)

ポリフェノール抱合体	濃度	モデル	効果	参考文献
quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	50–200 µg/mL	C ₃ H ₁₀ T _{1/2} cells	褐色脂肪細胞化誘導	[28]
quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	10–50 µM	3T3 cells	細胞内 ROS 抑制	[29]
quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	10, 100 µM	RASMC	血管収縮抑制	[30]
quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	10, 100 µM	VSMC	細胞遊走・増殖抑制	[31]
quercetin 3- <i>O</i> -glucuronide	50 mg/kg/day	C57BL/6J mice	抗認知症	[32]
	20 µM	SH-SY5Y cells		
quercetin-3'-sulfate	10 µM	血管 (pig)	血管弛緩誘導	[33]
quercetin-3'-sulfate	25–100 µM	MCF-7 cells	抗がん	[34]
quercetin-3-glucuronide				
		MCF-7 cells		
resveratrol disulfate	1–350 µM	MDA-MB-231 cells	抗腫瘍	[35]
		ZR-75-1 cells		
		Caco-2 cells		
resveratrol disulfate	1–100 µM	HCT-116 cells	細胞増殖抑制	[36]
resveratrol glucuronide		CCL-228 cells		
		HT-29 cells		
resveratrol disulfate	17–144 µM	MCF-7 cells	抗がん	[37]
resveratrol glucuronide				
		SW480 cells		
resveratrol sulfate	30, 60 µM	SW620 cells	細胞増殖抑制	[38]
urolithin A glucuronide	15 µM	HAEC	抗炎症	[39]
urolithin B glucuronide				
urolithin B glucuronide	1 µM	rat cardiomyocytes and fibroblasts	細胞増殖抑制	[40]

植物体で非栄養性物質として産生されるフィトケミカルに対して、植物が害虫からの攻撃や環境ストレス（温度、光）に曝された際に、新規に産生が誘導される化合物はフィトアレキシンと呼ばれる[41]。フィトアレキシンは主にテルペンあるいはフラボノイド骨格を有し、イネのフィトアレキシンとして報告されている sakuranetin はその一例である[42]。その他の植物（トウモロコシやアブラナ科植物）でも様々なフィトアレキシンが発見されているが[43]、ダイズではフィトアレキシンとしてグリセオリン類が産生される。グリセオリン類はダイズイソフラボン daidzein から生じるプレニル化体であり、脂質代謝改善[44]や抗糖尿病作用[45]のような生体調節機能を有する生理活性物質である。しかしながら、ダイズ中のグリセオリン類の存在量は僅かであるため、さまざまに産生量の増大が試みられている（**Table 1-5**）。グリセオリン類の産生促進の手法として wounding（種皮への裂傷）や菌体感作（*Phytophthora megasperma* f. sp. など）が用いられているが[46–53]、食品加工に広く利用される麹菌類（*Aspergillus* (A.) *oryzae*, *A. sojae*）によってもグリセオリン類の産生が促進されることが報告され[46,54–57]、今後の展開が期待される。本産生促進において、グリセオリン類の生合成に関与する酵素の報告はあるものの[58]、菌体感作によるグリセオリン類の産生促進機構は不明のままである。

食品成分の生体調節機能と安全性への関心が高まるにつれ、食品成分の吸収（absorption）・分布（distribution）・代謝（metabolism）・排泄（excretion）、すなわち ADME 挙動の解明が希求されている。しかしながら、その把握には、複雑な生体サンプル中に存在する微量代謝物を測定する必要があるため、より高い感度と特異性をもった分析法が必要とされる。質量分析法（mass spectrometry, MS）は化合物の精密質量（と電荷）に基づく検出法のため、紫外・可視分光分析法（UV-VIS）や蛍光分光分析法（FL）などの従来法と比較して感度が高く（検

出力：MS、 $\sim$ fmol/L；UV-VIS、 $\sim$ μ mol/L；FL、 $\sim$ pmol/L[59])、かつ化学構造に対する選択性の高い検出が可能である。質量分析計はイオン化部－分離部－検出部から構成され、イオン化部で生成された化合物イオンを分離部で質量/電荷比 (m/z) に基づいて分離し、検出する。化合物のイオン化特性や検討目的に見合ったイオン化部と分離部の組み合わせを選択することで、網羅性の高い化合物の検出が可能である。このような特長から、MS は複数成分から成る複雑な生体サンプル中ポリフェノールの分析に適している。例えば、Oesterle ら[60]はヒトの尿中ポリフェノール代謝物の同定ならびに定量にタンデム MS (MS/MS) を、また、Liu ら[61]は (-)-epicatechin から生じる微生物代謝物の同定に triple 四重極 (Q) /MS と飛行時間型質量分析法 (TOF/MS) を活用している。とりわけ、TOF/MS は、質量分析部に導入された全てのイオンについて、精密質量数に基づく分離と検出が可能であることから、代謝物の予測や推定に適しているとされる。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を接続した LC-TOF/MS は、経口投与後のポリフェノールの生体内代謝挙動の評価に対して適用されている[62]。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング法 (MALDI-MSI) は、レーザー照射で生じるマトリックス剤とのエネルギー授受によって化合物をイオン化するため、固体試料中の標的化合物を直接分析可能であることから、LC 分析では失われてしまう試料中化合物の三次元情報を提供することができる (Figure 1-2)。この特長から得られる標的化合物の組織内局在は、その組織内での機能の推察に極めて重要な情報となる。例えば、部位によって機能が異なる脳組織を MALDI-MSI に供することで、食品由来ペプチドが記憶系に作用する可能性や[63]、脳内の脂質分布から病態が理解できる可能性[64]などが明らかとなっている。しかし、MALDI 分析では、ポリフェノールのような中性分子種に対するイオン化効率が低く、検出感度の点で問題があった。そこで、新たなマト

リックス剤の登場 (*trans*-3-indoleacrylic acid (IAA) [65]、1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN) [66]、nifedipine [67]など) によってその解決が図られ、これによって、生体や植物体組織におけるポリフェノールの分布評価も可能となっている (Table 1-6)。一例として、Nguyen ら[68]は、MALDI-MSI を使用して腸管組織における難吸収性フラボノイド theaflavin の吸収挙動を可視化した。その結果、腸管組織上層部に theaflavin 由来ピークが認められ、排出系トランスポーターの阻害によりその蓄積が顕著になったことから、theaflavin は腸管組織へ取り込まれた後に管腔へ排出されることが示され、非吸収性フラボノイドの生体内機能発現に重要な示唆を与える知見が得られている。また、Dare ら[69]は bilberry (European blue berry, *Vaccinium myrtillus* L.) 中に含まれる一次代謝物 (糖類やアミノ酸) と二次代謝物 (ポリフェノール) を MALDI-MSI で可視化した。その結果、26 種類のフラボノイド類の検出に成功し、成熟過程における一次代謝物から二次代謝物の産生および蓄積プロファイルを明らかにしている。

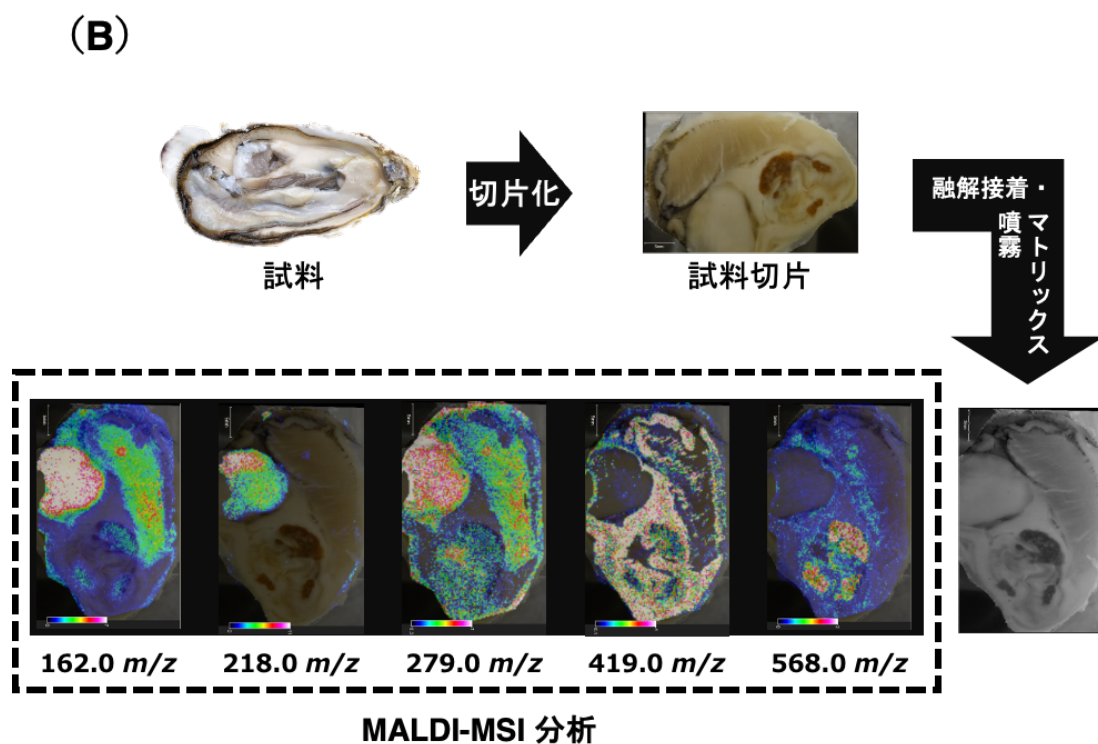
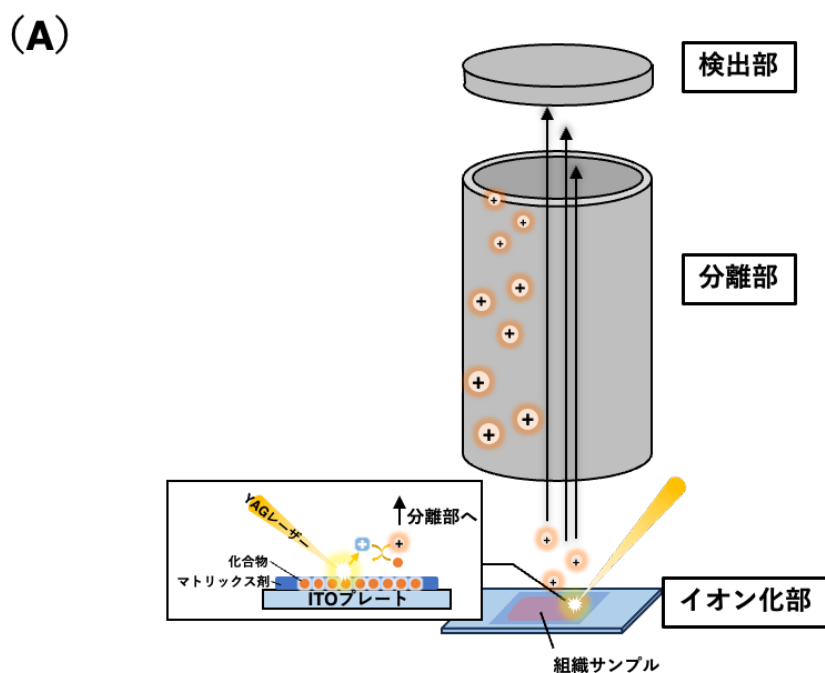


Figure 1-2 MALDI-TOF/MSI 分析装置とその分析例

(Tanaka M., *Kagaku to Seibutsu*, 2023;61(1): 23–31 参照[70])

(A) MALDI-TOF/MSI 分析装置の概略図 (B) 食品サンプルへの MALDI-MSI 適用例 (牡蠣切片の調製と分析結果)

Table 1-5 菌体感作によるダイズ中でのグリセオリン類産生の例

化合物	植物	刺激	菌体名	参考文献
glyceollin I glyceollin II glyceollin III	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. var. Pioneer 95B41	elicitation	<i>Aspergillus sojae</i> (SRRC 1125), <i>Aspergillus oryzae</i> (SRRC 302), <i>Aspergillus niger</i> (SRRC 60), <i>Aspergillus flavus</i> (SRRC 13) <i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>sojae</i> race 1	[71]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	elicitation	<i>Aspergillus oryzae</i> (Lu brewing 3042)	[72]
glyceollin I glyceollin II glyceollin III	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. var. Aga No. 3	elicitation	<i>Aspergillus sojae</i>	[54]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Asgrow 5902	wounding elicitation	<i>Aspergillus sojae</i> (SRRC 1125)	[55]
glyceollin I	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Altona	elicitation	<i>Aspergillus oryzae</i>	[56]
glyceollin I	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> Drechs. f. sp. <i>glycinea</i> (Kuan and Erwin) races 1 and 3	[46]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	ethylene elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> Drechs. f. sp. <i>glycinea</i> races 1 and 3	[57]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	wounding elicitation light	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i>	[73]

Table 1-5 (続き)

化合物	植物	刺激	菌体名	参考文献
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i> race 1 and 3	[74]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	wounding elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i> race 1 and 3	[47]
glyceollin I	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	wounding elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i>	[75]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	temperature elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> f. sp. <i>glycinea</i>	[48]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>sojae</i>	[49]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoy 63	wounding elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>sojae</i> race 1	[76]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	elicitation	<i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>sojae</i> race 4 and 6	[77]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. Harosoys or Williams	wounding elicitation	<i>Phytophthora sojae</i>	[50]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. cv. William	wounding elicitation lactofen	<i>Phytophthora sojae</i>	[78]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	wounding elicitation	<i>Phytophthora sojae</i> (Kauf. and Gerde.)	[51]

Table 1-5 (続き)

化合物	植物	刺激	菌体名	参考文献
glyceollin I glyceollin II glyceollin III glyceollin IV glyceollin V/VI	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	elicitation	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oryzae</i> (LU 581)	[79]
glyceollins	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	priming elicitation	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	[52]
glyceollin I glyceollin II glyceollin IV glyceollin VI	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	light wounding	<i>Rhizopus oryzae</i>	[53]
glyceollin I glyceollin II glyceollin III	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	elicitation	<i>Trichoderma reesei</i> (NRRL 3653), <i>Aureobasidium pullulans</i> (NRRL 58522), <i>Neurospora crassa</i> (NRRL 2332), <i>Fusarium venenatum</i> (NRRL 26139), <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> (NRRL 2710), <i>Paecilomyces variotii</i> (NRRL1115), <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>	[80]

Table 1-6 組織内ポリフェノールの MALDI-MSI 適用例

測定対象組織	測定化合物	マトリックス剤	参考文献
生体サンプル			
小腸 (rat)	(-)-epicatechin-3- <i>O</i> -gallate metabolites theaflavin-3'- <i>O</i> -gallate metabolites	nifedipine	[68]
小腸 (rat)	anthocyanins metabolites	DHB	[81]
眼球 (mouse)	anthocyanins	DHB	[82]
腎臓 (mouse)	scutellarin metabolites	ferulic acid, CHCA, THAP, DHB, CA	[83]
肝臓、腎臓、脾臓 (mouse)	daidzein	DHB	[84]
植物サンプル			
bilberry (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	flavonoids	THAP	[69]
leaf (<i>Cannabis sativa</i>)	apigenin, kaempferol, luteolin, quercetin	1,5-DAN	[85]
grape berries	anthocyanins	DHB	[86]
rangpur lime (<i>Citrus sinensis</i>)	hesperidin, rutin	CHCA, DHB	[87]
rice (<i>Oryza sativa</i>)	anthocyanins	DHB	[88]
ripe strawberry fruit	kaempferol, quercetin, ellagic acid	1,5-DAN	[89]
ripe strawberry fruit	ellagitannins	1,5-DAN	[90]
wolfberry fruit	<i>p</i> -coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, kaempferol, quercetin, isorhamnetin, isoquercetin	9-AA	[91]

9-AA, 9-aminoacridine ; CA, caffeic acid ; CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid ; 1,5-DAN, 1,5-diaminonaphthalene ; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid ; THAP, 2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate

以上の背景を鑑み、本研究では、イソフラボン類由来プレニル化代謝物であるグリセオリン類と、フラボノイド類 (hesperidin、curcumin など) 由来腸内細菌代謝産物としてのフェノール酸を対象に MS を駆使して様々な生体利用性に関する検討を行った。グリセオリン類は、複数の健康機能性に加え、前駆体イソフラボン類と比較して生体利用性が高いことから[92,93]、新規のダイズ由来機能性成分として期待される。しかしながら、そのダイズ中存在量は僅かであるため[94]、産生量の増大が望まれ、そのための産生促進機構の解明が求められる。また、フラボノイド類にはさまざまな健康機能が報告されてきた一方で、その作用本体は明らかでない。例えば、hesperidin は血圧上昇を抑制することが知られ[95]、血管内皮細胞に作用することで TRPV1/MasR/eNOS 経路を介して、積極的な血管弛緩を誘導する[96,97]。しかしながら、hesperidin は腸内細菌によって、アグリコンやさらに低分子化合物まで代謝分解を受けて吸収されるとの報告があり[98]、その代謝産物の体内利用性の解明が望まれる。

そこで、第2章では麴菌 (*A. oryzae*) 感作を施した発芽ダイズにおけるグリセオリン類の産生挙動について MALDI-MSI を用いて評価した。その結果、グリセオリン類の産生促進はダイズ表面への麴菌接触をトリガーとして誘発され、麴菌の接触領域に限定して生じることが明らかとなった。

第3章では hesperidin をはじめとする複数のフラボノイド類の腸内細菌代謝産物である 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid (HMPA) について、経口摂取後の体内吸収と臓器蓄積を LC-TOF/MS にて評価した。その結果、HMPA は経口摂取後速やかに吸収・代謝され、抱合体として優勢的に循環系臓器に分布・蓄積することが明らかとなった。

本研究によって明らかとなったグリセオリン類の局所産生は、ダイズにおけるグリセオリン類の産生機構の解明にさらなる知見を与え、また、HMPA の吸収・代謝・臓器蓄積挙動は、数千種存在するポリフェノール (Table 1-2、1-3)

の機能が、その代謝物によって理解できる可能性を与える知見といえ、今後のポリフェノール科学におけるエポックメイキングとなる成果と考える。

第2章 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析イメージング法を駆使した、フラボノイド代謝物のダイズ種子中での産生挙動

第1節 緒言

ポリフェノールは植物体において産生されるフィトケミカル的一种で、抗菌作用を示す。さらに、植物は外界からのストレスに曝された際に、遺伝子や酵素発現を変化させ、フィトアレキシンと呼ばれる抗菌性の化合物を新規に合成するが、植物種あるいは外的刺激の種類によって、その種類や特徴は様々である[99-101]。ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) は、ポリフェノールの一種であるイソフラボン類 (特に daidzin、genistin、glycitin およびそのアグリコン) に富み、環境あるいは微生物からのストレスに応答してイソフラボン類から様々なフィトアレキシン類 (例えば coumestrol、C-methyl or 4-prenyl coumestrol、isotrifolol、glycinol、glyceocarpin、glyceollidins、glyceollins、glyceofurans) を産生する[79,102,103] (Figure 2-1)。とりわけ、イソフラボン daidzein のプレニル化体であるグリセオリン類は、脂質代謝改善[44]や糖取り込み促進[45]、再発乳がんの増殖抑制[56]が報告されている新規のダイズ由来生理活性物質であり、さらに、Sprague-Dawley 系ラットにおいて前駆体イソフラボンと比較して高い生体利用率を示すことが明らかになっている (glyceollin I、 $C_{\max}$: 1.9 ± 0.6 nmol/mL-plasma、 AUC_{0-8h} : 8.5 ± 0.7 nmol·h/mL、吸収率 : >13.4%-dose ; daidzein、 $C_{\max}$: 0.11 ± 0.03 nmol/mL-plasma、 AUC_{0-8h} : 0.6 ± 0.1 nmol·h/mL、吸収率 : > 0.21%-dose) [92,93]。しかしながら、ストレス暴露のない通常ダイズでのグリセオリン類の存在量は極めて少ない (< 0.05 mg/g-seed) [94]。そのため、含有量増大のための試みが行われており、菌体感作刺激が有効な手法の一つであることが示されている (Table 1-5)。また、グリセオリン類の産生に関与する代謝酵素反応に

については多数報告があり[52,104–106]、isoflavone 2'-hydroxylase (I2'H)、3,9-dihydroxypterocarpan 6a-monooxygenase (3,9-DPO)、glycinol 4-dimethylallyltransferase (G4DT)、glycinol 2-dimethylallyltransferase (G2DT)、glyceollin synthase (GS) などが同定されている (**Figure 2-1**)。しかしながら、菌体感作刺激を受けたダイズにおけるグリセオリン類の産生領域およびその挙動については明らかでない。そこで本章では、MALDI-MSI を駆使し、*A. oryzae* 感作させた発芽ダイズにおけるグリセオリン類の産生挙動について可視化解析し、グリセオリン類高産生ダイズを作製するための知見を得ることを目的として、検討を行った。

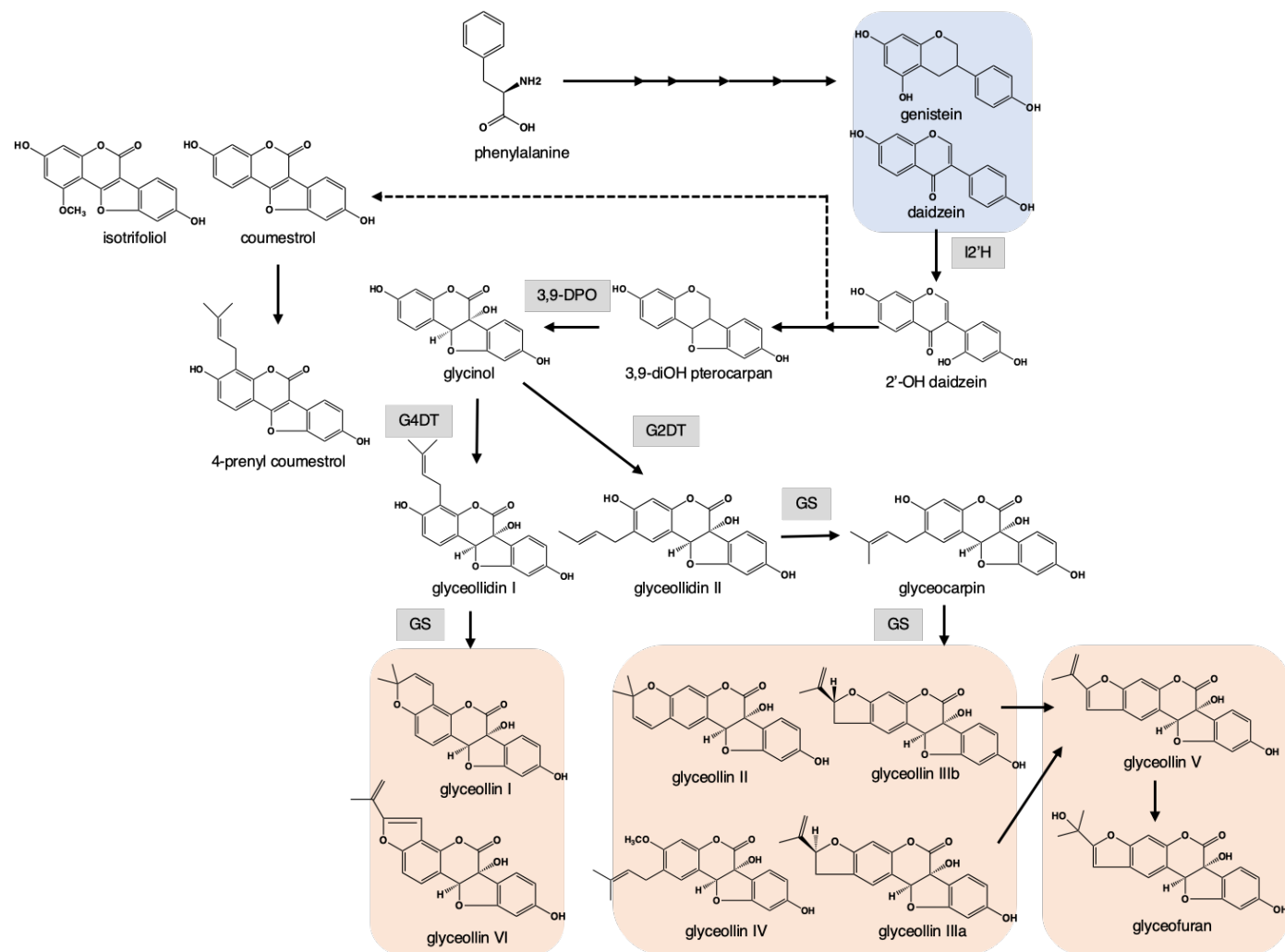


Figure 2-1 グリセオリン類の生合成経路[58,79,105]

I2'H: isoflavone 2'-hydroxylase、3,9-DPO: 3,9-dihydroxypterocarpan 6a-monooxygenase、G4DT: glycinol 4-dimethylallyltransferase、G2DT: glycinol 2-dimethylallyltransferase、GS: glyceollin synthase

第 2 節 材料および方法

第 2.1 項 材料

ダイズ種子 (*Glycine max* (L.) Merr., Yukipirika) は (株) 果実堂 (熊本) から恵与されたものを使用した。Daidzein およびグリセオリン類 (glyceollin I, III) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入し、glyceollin II は発芽ダイズから分取し、同定したものを用いた (**Table 2-1**)。Ultrapformance liquid chromatography-photodiode array (UPLC-PDA) 分析で使用したアセトニトリル (ACN) と酢酸は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から、biochanin A (内標準) は LKT Laboratories Inc. (MN, USA) から購入した。さらに、MALDI-MSI でマトリックス剤として使用した 1,5-DAN および phytic acid は東京化成工業株式会社 (東京) から、nifedipine は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入し、麴菌 (*A. oryzae* AOL139) は秋田今野商店 (秋田) から購入した。その他、使用した試薬は全て分析用特級であり追加精製は行っていない。

第 2.2 項 麴菌感作発芽ダイズの調製

ダイズは発芽後、既報[56]に基づいて麴菌 (*A. oryzae*) で感作を行った。ダイズ 180 g を遠沈管に入れ、発芽機 (SU Technology、熊本) で培養し (20% O₂、0.023% CO₂、28°C)、3 日間 1 時間おきに散水した。その後、発芽した種子を *A. oryzae* 非感作群、(活性) *A. oryzae* 感作群、不活性 *A. oryzae* 感作群の 3 群に無作為に分類した (いずれの群も $n = 6$)。発芽 3 日目に、*A. oryzae* を発芽種子に感作させ (0.05 g-*A. oryzae*/g-seed)、さらに 3 日間 28°C で培養した。各感作日 (発芽後 4 日目から 6 日目) においてサンプルを回収し、試験まで -80°C で保存した (**Figure 2-2**)。不活性 *A. oryzae* 処理群には加熱処理 (121°C、20 min) を施した *A. oryzae* を使用し、上記と同様の感作条件で処理した。

第 2.3 項 ダイズ中フラボノイド代謝物の測定

感作処理後に保存していたダイズ種子（根なし）を凍結乾燥し、粉碎した。得られた粉末サンプル（100 mg）に 1 mL 抽出溶液 [70% エタノール (EtOH)、内標準として biochanin A を含む（終濃度：25 µg/mL）] を加え静置した（15 h、25°C）。遠心分離後（3,000 × g、10 min、25°C）、上清を回収し、UPLC-PDA 分析（Prominence、（株）島津製作所、京都）に供した。種子中に含まれるフィトアレキシン量は内標準法により算出した。分析に用いた UPLC-PDA 条件は下記の通りである：分離カラム、ACQUITY UPLC BEH RP18 column（I.D. 2.1 × 150 mm、1.7 µm；Waters、MA、USA）；溶離液、（A） 0.1%（w/v） 酢酸（B） ACN/0.1%（w/v） 酢酸；分離プログラム、0–100%B（30 min）；流速、0.3 mL/min；カラムオーブン、35 °C；モニター波長、280 nm。

第 2.4 項 マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング分析

冷凍保存したダイズ種子および根をそれぞれドライアイスで凍結させ、種子表面に対して垂直、根は伸長方向に対して水平に Cryomicrotome（CM1100 Leica；Leica、Wetzlar、Germany）を使用して切片（厚み 12 µm）を作製した。作製した切片は indium tin oxide (ITO) コートガラススライド（Bruker Daltonics、Bremen、Germany）に融解接着させ、窒素ガスで乾燥させた後に ImagePrep（Bruker Daltonics）を使用して、マトリックス剤（nifedipine あるいは 1,5-DAN（10 mg/mL-70%ACN）5 µmol/mL phytic acid 添加）を組織切片全体に噴霧した。噴霧条件は以下の通りである：spray power、20%；modulation、20%；spraying time、1.5 s；incubation time、10 s；drying time、60 s；spraying for 45 cycles。上記で作製したダイズ切片の MALDI-MSI には SmartBeam III レーザー搭載の MALDI Autoflex III 質量分析計（Bruker Daltonics）を

使用し、測定対象化合物は daidzein ($[M-H]^- = 253.0 \text{ m/z}$) および glyceollins I/II/III ($[M-H]^- = 337.1 \text{ m/z}$) とした。測定に使用した MS 条件は以下の通りである：ion source 1、20.00 kV；ion source 2、18.80 kV；lens voltage、7.50 kV；gain、12.00；laser frequency、200 Hz；laser power、80%；off set、60%；range、20%；laser focus range、100%；value、6%；data range、100–1300 m/z ；spatial resolution、100 μm 。得られた MS スペクトルは Bruker FlexAnalysis software (ver. 3.3、Bruker Daltonics) を用いて解析した。また、イメージング分析には Bruker FlexImaging software (ver. 2.1、Bruker Daltonics) を用い、ピーク範囲は $\pm 0.2 \text{ m/z}$ とした。

第 2.5 項 統計処理

統計処理には GraphPad Prism software (GraphPad、La Jolla、CA、USA) を使用した。多群間比較には $p < 0.05$ の有意水準で Tukey–Kramer’s t -test を実施した。なお、結果は全て平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示している。

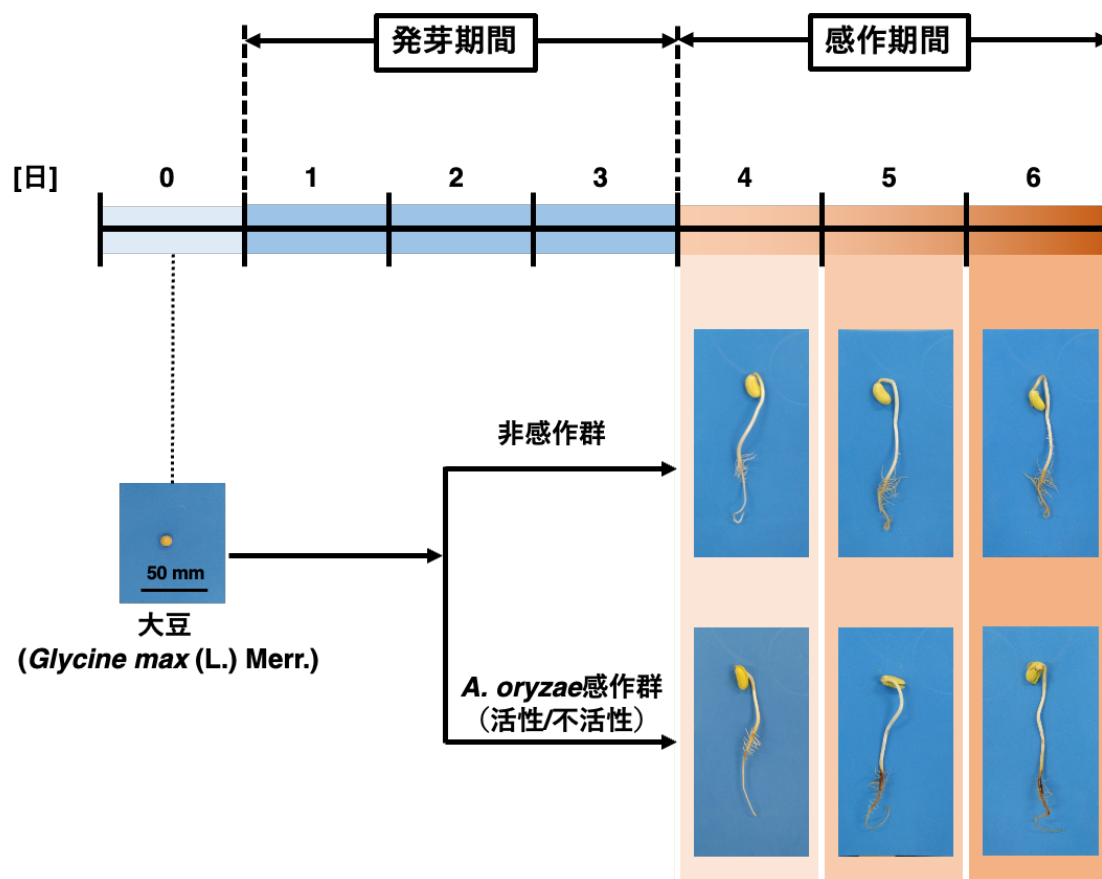


Figure 2-2 ダイズの感作スケジュールとダイズ形態観察

培養器（SU Technology、28℃）で発芽させたダイズ種子をランダムに *A. oryzae* 非感作/感作群に分け、感作群には 0.05 g *A. oryzae*/g-seed を種子表面に塗布した。各感作日におけるダイズ形態を図に示す（なお、感作群は活性 *A. oryzae* で感作したダイズのみを示した）。

第3節 結果および考察

第3.1項 イソフラボン類とその代謝物の同定と定量

A. oryzae を感作させた (28°C、3 日間) 発芽ダイズにおけるイソフラボン類関連代謝物の産生量を評価した。*A. oryzae* を感作させたダイズ種子抽出液を UPLC-PDA ($\lambda=280$ nm) 分析に供し、クロマトグラムを得た (**Figure 2-3**)。検出された各ピークは、それぞれ daidzin (RT: 5.2 min)、genistin (RT: 6.3 min)、malonyldaidzin (RT: 6.7 min)、malonylgenistin (RT: 7.9 min)、daidzein (RT: 9.0 min)、glyceollin III (RT: 11.7 min)、glyceollin I (RT: 12.1 min) および内標準物質 biochanin A (RT: 14.4 min) であると推定された。11.9 min に認められた未知のピークを同定するため、LC-ESI-TOF/MS (microTOF II (Bruker Daltonics)、negative mode) 分析に供したところ、 $[M-H]^- = 337.1074$ m/z のイオンが検出され、精密質量から、その化学組成は $C_{20}H_{18}O$ であった。さらに、 1H -NMR/ ^{13}C -NMR 分析に供した結果、得られた化学シフト値と文献値[107]との比較から、本ピークは glyceollin II であると同定された (**Table 2-1**、**Figure 2-4**)。また、UPLC-PDA 分析の結果、*A. oryzae* 非感作ダイズ抽出液では *A. oryzae* 感作ダイズと共通するイソフラボン類 (daidzin、genistin、malonyldaidzin、malonylgenistin、daidzein) 由来のピークが確認されたが、グリセオリン類由来のピークは確認されなかった。したがって、グリセオリン類の産生は *A. oryzae* 感作によって誘発されたことが示された。なお、本研究の *A. oryzae* 感作ダイズでは、その他の glyceollin IV, V, VI[103,106]は検出されなかったことから、それらの産生量が僅かであると推定された。

UPLC-PDA 分析をもとに、感作 1 日目 (発芽 4 日目) から 3 日目 (発芽 6 日目) までのダイズ中イソフラボン類およびグリセオリン類 (mg/g-seed) を定量した (**Table 2-2**)。*A. oryzae* 感作ダイズでは、感作日数に応じてグリセオリン類 (glyceollin I, II, III) の量が増大し、特に glyceollin I 量は 3 日間の感作によって約

30 倍に増加した（発芽 3 日目、 0.03 ± 0.01 mg/g-seed；発芽 6 日目、 0.96 ± 0.1 mg/g-seed）。一方で、非感作ダイズではグリセオリン類はほとんど検出されず（発芽 6 日目、 <0.02 mg/g-seed）、*A. oryzae* 感作がグリセオリン類の産生誘導因子として働いていることを確認した。先行研究において、Zhang ら[92]は 1 mg/kg-B.W. glyceollin I の経口投与で、血中濃度が最大 1.9 nmol/mL-plasma に達すると報告しているが[92]、これは *A. oryzae* 感作ダイズ 1 g（乾燥重量）の摂取で達成しうるレベルであることがわかる。また、イソフラボン類の糖付加体 malonyldaidzin、malonylgenistin は *A. oryzae* 非感作/感作で変化は認められなかったものの、グリセオリン類の前駆体である daidzin、genistin、daidzein 量は *A. oryzae* 感作によって増大していた（Table 2-2）。フラボノイド類の産生は phenylalanine $\rightarrow$ *t*-cinnamate $\rightarrow$ *p*-coumarate $\rightarrow$ *p*-coumaroyl CoA の代謝が起点である。これまでに、ダイズ表皮への裂傷や菌体感作による、この初期代謝の関与酵素である phenylalanine ammonia-lyase (PAL) の活性化、ならびにその遺伝子 (*GmPAL2.1*) 発現量の上昇が明らかになっている[73,108]。このことから、*A. oryzae* 感作されたダイズでは、フラボノイド類の初期代謝が活性化され、イソフラボン類の産生が増大し、その結果、グリセオリン類の産生増大につながったのではと考えられる。また、glyceollin IV, V, VI は検出されなかったが、既報[58]においても glyceollin I が主要なグリセオリン類であると報告されていることから、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) では G2DT よりも G4DT の活性が高いことが推察される。あるいは、PAL およびその下流の *p*-coumaroyl CoA ligase はダイズ表皮への裂傷でも活性化する[73]ことから、裂傷と菌体感作を組み合わせることで今回検出できなかったグリセオリン類の産生も確認される可能性がある。以上の結果から、発芽ダイズへの *A. oryzae* 感作はダイズ種子でのグリセオリン類の産生を促進するが、これはフラボノイド類の初期代謝に関連する酵素が活性化され、前駆体イソフラボン類の産生量が増大するためである可能性が示された。ただし、こ

れら知見はダイズ種子全体の総差であり、胚実等のダイズ種子内での分布は不明のままである。

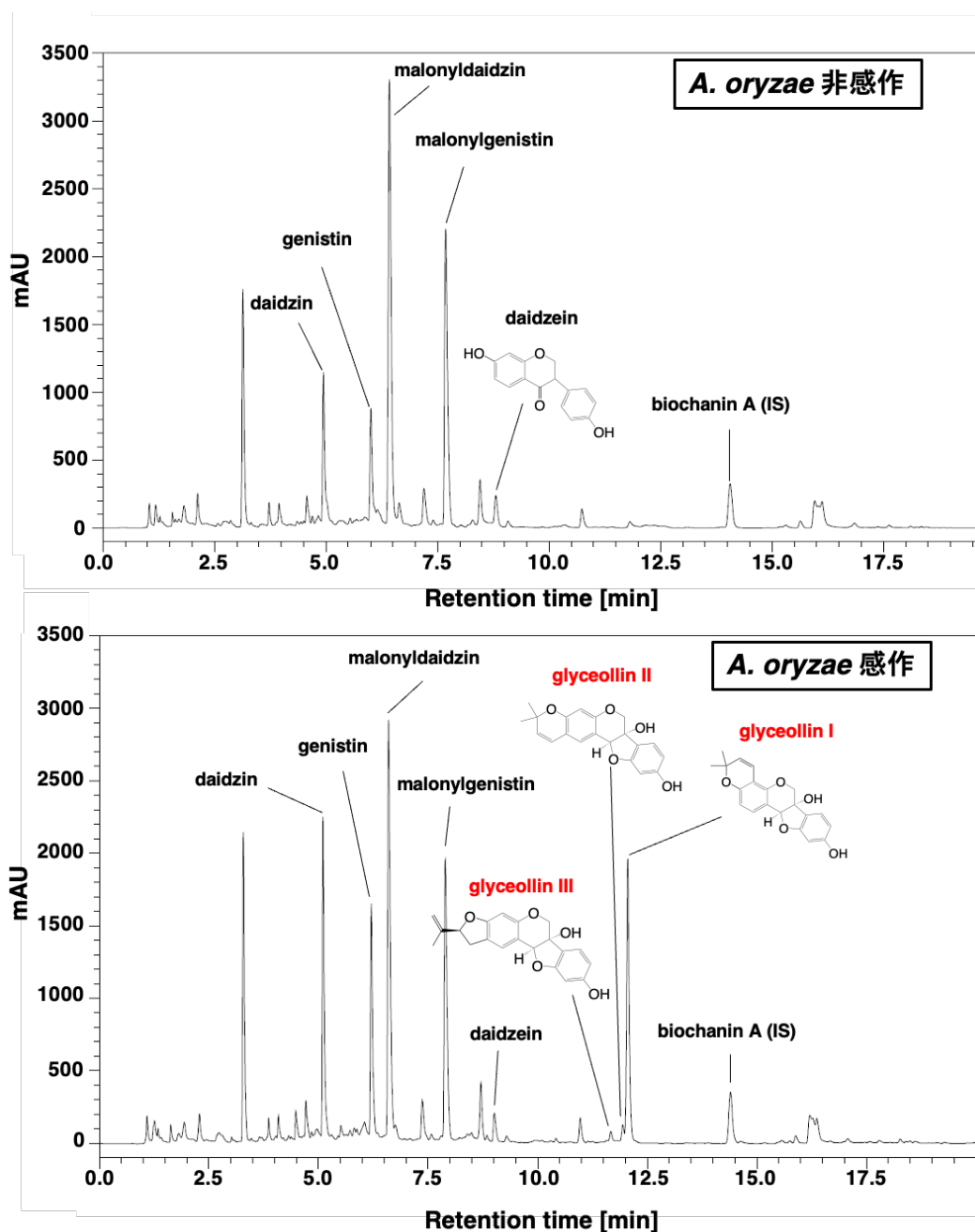


Figure 2-3 *A. oryzae* 非感作/感作ダイズ抽出液の UPLC-PDA ($\lambda=280$ nm) 分析クロマトグラム

ダイズ種子凍結粉末の 70%EtOH 抽出液を UPLC-PDA で分析した：分離カラム、ACQUITY UPLC BEH RP18 column (I.D. 2.1×150 mm、 $1.7 \mu\text{m}$ ；Waters、MA、USA)；溶離液、(A) 0.1% (w/v) 酢酸 (B) ACN/0.1% (w/v) 酢酸；分離プログラム、0–100%B (30 min)；流速、0.3 mL/min；カラムオープン、 35°C ；モニター波長、280 nm。IS：内標準

Table 2-1 glyceollin II の $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR 測定結果

位置 ^a	δ_{C}		δ_{H} (<i>J</i> value, Hz)	
	実測値 (ppm)	文献値 ^b (ppm)	実測値 (ppm)	文献値 (ppm)
1	<i>N.D.</i>	129.9	7.14 (<i>s</i>)	7.14 (<i>s</i>)
2	117.2	117.3		
3	155.2	155.3		
4	104.8	104.9	6.21 (<i>s</i>)	6.21 (<i>s</i>)
6	70.6	70.7		
6a	76.7	76.8	4.05 (<i>d</i> , 11.3)	4.04 (<i>d</i> , 11.3)
6b	121.3	121.4	4.13 (<i>d</i> , 11.5)	4.13 (<i>d</i> , 11.3)
7	125.2	125.3	7.20 (<i>d</i> , 8.2)	7.21 (<i>d</i> , 7.9)
8	109.0	109.1	Not resolved	6.43 (<i>dd</i> , 8.1 and 2.1)
9	160.7	160.8	8.45 (<i>s</i>)	8.46 (<i>s</i>)
10	98.7	98.8	6.25 (<i>d</i> , 1.8)	6.25 (<i>d</i> , 2.3)
10a	161.9	162.0		
11a	85.7	85.8	5.24 (<i>s</i>)	5.25 (<i>s</i>)
11b	114.5	114.6		
12	122.3	122.4		
13	129.8	130.0	5.65 (<i>d</i> , 10.1)	5.65 (<i>d</i> , 9.8)
14	<i>N.D.</i>	77.3	Not resolved	6.41 (<i>d</i> , 9.8)
15	28.3	28.4	1.37 (<i>s</i>)	1.39 (<i>s</i>)
16	<i>N.D.</i>	28.4	1.36 (<i>s</i>)	1.37 (<i>s</i>)

測定条件：HPLC-PDA で RT: 11.9 min に該当するピークを分取し、acetone- d_6 (基準物質として TMS) で溶解したものを ^1H -NMR および ^{13}C NMR に供した [ECS-400 spectrometer (JEOL、東京)；共鳴周波数、400 MHz；試料温度、25°C；spinner、15 Hz；scan、16 (^1H) 20000 (^{13}C)；relaxation delay、15 s (^1H) 2 s (^{13}C)]。

^a glyceollin II の炭素の位置番号 (Figure 2-4 参照)

^b Ciesielski P, Metz P. *Nature Communications*. 2020;11:3091.[107]、*N.D.*：no detection

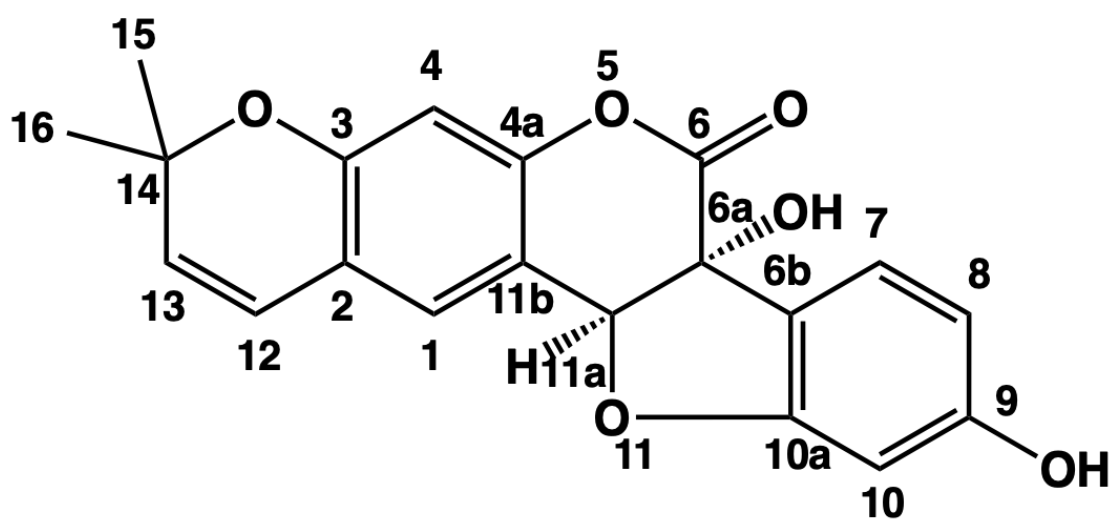


Figure 2-4 glyceollin II の化学構造

Table 2-2 UPLC-PDA によるイソフラボン類およびグリセオリン類のダイズ含有量の定量結果

化合物種	含有量 (mg/g-seed)			
	<i>A. oryzae</i> 感作群			非感作群
	発芽 4 日目 (感作 1 日目)	発芽 5 日目 (感作 2 日目)	発芽 6 日目 (感作 3 日目)	発芽 6 日目
malonyldaidzin	1.30 ± 0.09^b	1.60 ± 0.24^a	1.61 ± 0.05^a	1.62 ± 0.05^a
malonylgenistin	1.03 ± 0.06^b	1.16 ± 0.13^{ab}	1.19 ± 0.05^{ab}	1.25 ± 0.02^a
daidzin	0.71 ± 0.05^a	0.83 ± 0.13^a	0.82 ± 0.03^a	0.47 ± 0.05^b
genistin	0.66 ± 0.04^a	0.75 ± 0.10^a	0.79 ± 0.06^a	0.31 ± 0.03^b
daidzein	0.24 ± 0.02^b	0.30 ± 0.03^a	0.36 ± 0.02^a	0.15 ± 0.02^c
glyceollin I	0.32 ± 0.06^b	0.83 ± 0.04^a	0.96 ± 0.12^a	0.02 ± 0.01^c
glyceollin II	0.01 ± 0.00^c	0.03 ± 0.00^b	0.05 ± 0.01^a	<i>tr</i> ^d
glyceollin III	0.01 ± 0.00^{bc}	0.02 ± 0.00^{ab}	0.03 ± 0.01^a	0.01 ± 0.00^c

すべての値は平均値 $\pm$ SD ($n = 4$) で示した。*tr* : trace (≤ 0.005 mg/g-seed)。各化合物種について群間で統計的に有意な違いが認められたものには異なる文字を付した ($p < 0.05$ by Tukey-Kramer's *t*-test)

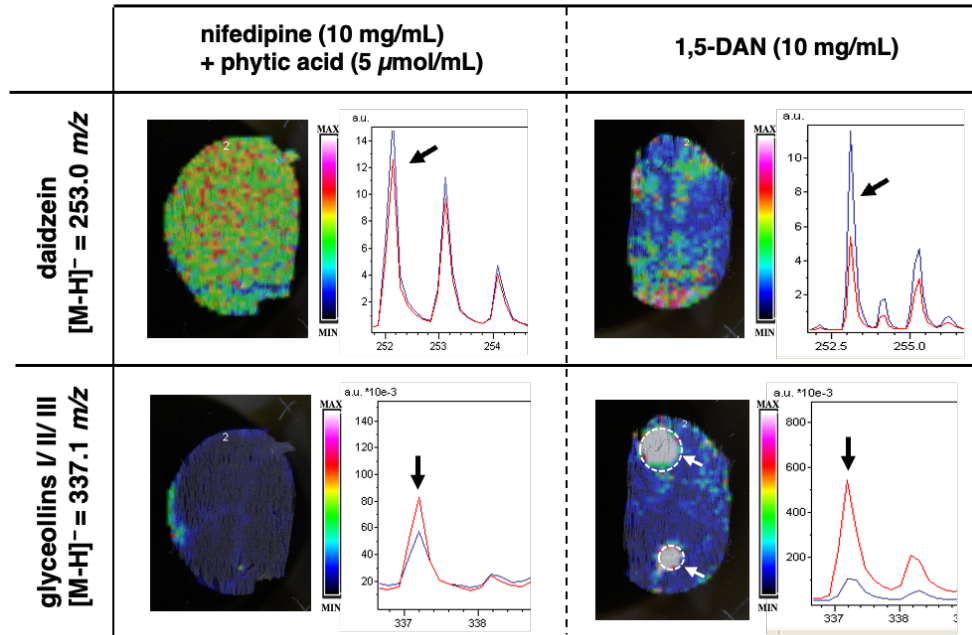
第 3.2 項 麴菌感作ダイズでのフラボノイド代謝物の分布解析

ダイズ切片に存在するイソフラボン類とグリセオリン類の分布について MALDI-MSI で解明するため、まず、分析に用いる高感度マトリックス剤の検討を実施した。先行論文[67]においてポリフェノールの MALDI-MSI の検出感度が良好であった 1,5-DAN (10 mg/mL) と nifedipine (10 mg/mL) 、および添加混合によってマトリックス剤の均質化と感度向上が期待できる phytic acid (5 μ mol/mL) [109]を使用し、前項 3.1 においてグリセオリン類の産生促進が確認されている *A. oryzae* を感作させた発芽ダイズ（栽培 5 日目（感作 2 日目））の MALDI-MSI を実施した。なお、本分析装置には他の分離部を接続していないため、同一質量数である glyceollin I, II, III の個別検出はできず、同じ m/z 値で検出されている（glyceollin I, II, III : $[M-H]^- = 337.1 m/z$ ）。その結果、いずれのマトリックス剤においてもイソフラボン daidzein と glyceollins I/II/III が検出されたが、1,5-DAN 使用時には nifedipine 使用時と比較してグリセオリン類の種子内局在が鮮明に可視化されることが判明した（**Figure 2-5A 左図**）。さらに、*A. oryzae* 非感作/感作発芽ダイズにおける標的分子ピークの強度を比較したところ、1,5-DAN 使用時には nifedipine 使用時と比較して *A. oryzae* 感作によるピーク強度の変化が顕著に認められた（**Figure 2-5A 右図**）。Nguyen ら[67]の報告によると、nifedipine はフラボノイド類の A 環に位置する水酸基からプロトンを引き抜きやすい特性を有する。グリセオリン類はイソフラボン daidzein の A 環にプレニル基が導入された化合物であり、水酸基が消失している。このことから、nifedipine によるグリセオリン類からのプロトンの引き抜き効果は弱く、イオン化効率が低いと推察された。以上から、*A. oryzae* 感作によるイソフラボン daidzein と glyceollins I/II/III の組織蓄積分布の変化がより明瞭に可視化されることを期待して、ダイズ中グリセオリン類の産生挙動の MALDI-MSI には 1,5-DAN をマトリックス剤として採用することとした。なお、1,5-DAN への phytic acid (5 μ mol/mL)

添加を試みたが、混合によって白濁沈殿が生じたため、本研究のマトリックス剤としては 1,5-DAN (10 mg/mL-70%ACN) のみを採用した。

(A)

マトリックス剤



(B)

hypocotyl (胚軸)

plumule (幼芽)

cotyledon (子葉)

radicle (幼根)

seed coat (種皮)



Figure 2-5 MALDI-MSI 用マトリックス剤の検討

(A) *A. oryzae* 感作ダイズ (栽培 5 日目 (感作 2 日目)) 切片に各種マトリックス剤 [nifedipine (10 mg/mL) + phytic acid (5 μ mol/mL)、1,5-DAN (10 mg/mL)] を噴霧し、MALDI-MSI に供した: mass range、0–1000 m/z; gain factor、10.5; spatial resolution、400 μ m. (左: 感作ダイズの MALDI-MSI 画像、右: *A. oryzae* 非感作 (青)/感作 (赤) ダイズの標的分子イオン強度比較) (B) ダイズ種子の主要構造とその範囲

次いで、発芽ダイズ (*A. oryzae* 非感作/感作) の種子と根を MALDI-MSI に供し、daidzein とグリセオリン類 (glyceollin I, II, III) の分布情報を得た (**Figure 2-6、2-7**)。MALDI-MSI の結果、発芽ダイズ (*A. oryzae* 非感作/感作) 種子切片の daidzein 由来シグナルは種子全体で検出された一方で、glyceollins I/II/III 由来シグナルは *A. oryzae* 感作ダイズの種子表面で限定的に検出され、子葉部も含めその他の部分では検出されなかった (**Figure 2-6**)。発芽ダイズの根の MALDI-MSI の結果、種子と同様に、daidzein は根全体で、glyceollins I/II/III は *A. oryzae* 感作ダイズの根の表面のみで検出された (**Figure 2-7**)。本結果より、発芽ダイズ全体に存在するイソフラボン (daidzein) は、*A. oryzae* が付着した表面で限定的にグリセオリン類へと変換されていることが示唆された。ブドウ (*Vitis vinifera* var. *Optima*) やエンドウマメ (*Pisum sativum* L.) のような植物はそれぞれフィトアレキシン類である resveratrol[110]や pisatin [111]を産生し、病原菌から植物本体を保護している。したがって、ダイズ中のグリセオリン類に見られた局所的な分布は *A. oryzae* の侵食からの自己保護の結果であると推察できる。実際、疫病菌である *Phytophthora megasperma* var. *sojae* や *Phytophthora capsici* で感作したダイズの胚軸部分にグリセオリン類が蓄積し、菌の増殖を制御することが報告されている[76,112]。前項 3.1 の結果から、グリセオリン類の産生促進には PAL の活性化によるイソフラボン類の産生増大が関与する可能性があり、その遺伝子は子葉や葉の部分に多く発現している[108]。実際に、マトリックス剤の検討試験において、1,5-DAN を使用した MALDI-MSI では子葉と幼芽へのグリセオリン類の蓄積が認められた (**Figure 2-5**)。また、グリセオリン類は発芽後の根全体には分布していなかったことから (**Figure 2-7**)、種子で産生されたグリセオリン類はほとんど根には移行しないと考えられる。さらに、PAL の活性化によってダイズ全体のイソフラボン類の産生が促進されたと仮定すると、表皮に限定したグリセオリン類の産生は、イソフラボン daidzein からグリセオリン類への代

謝変換に関わる下流酵素の局所的な発現誘導、あるいは局所的な活性化によるものであると考えられる。また、根の MALDI-MSI 画像から、グリセオリン類は根の先端部分で集中して産生されているようである (**Figure 2-7**)。植物の根は抗菌物質の産生と放出に重要な役割を担っており[113]、根の先端には根と土壌の摩擦を軽減し根の伸長を補助するための境界細胞 (border cells) が存在する。フィトアレキシンは境界細胞から産生され、さらに、病原菌の侵入によって境界細胞の産生が促進されることが報告されている[113]。したがって、今回認められたダイズ根でのグリセオリン類の産生はこの境界細胞で生じている可能性が示唆され、その産生量は根の境界細胞の数に依存するのかもしれない。グリセオリン類の代謝合成に関連する酵素についての報告は多いものの[52,104–106]、ダイズでのその発現挙動や活性化についての知見はなく、これらについてさらなる解明が求められる。以上の結果から、*A. oryzae* 感作によって、ダイズでのグリセオリン類の産生が誘導されるが、その産生は菌体の接触領域に限定され、イソフラボン類からグリセオリン類への代謝合成に関連する酵素の局所的な発現誘導や活性化に由来する可能性が示された。

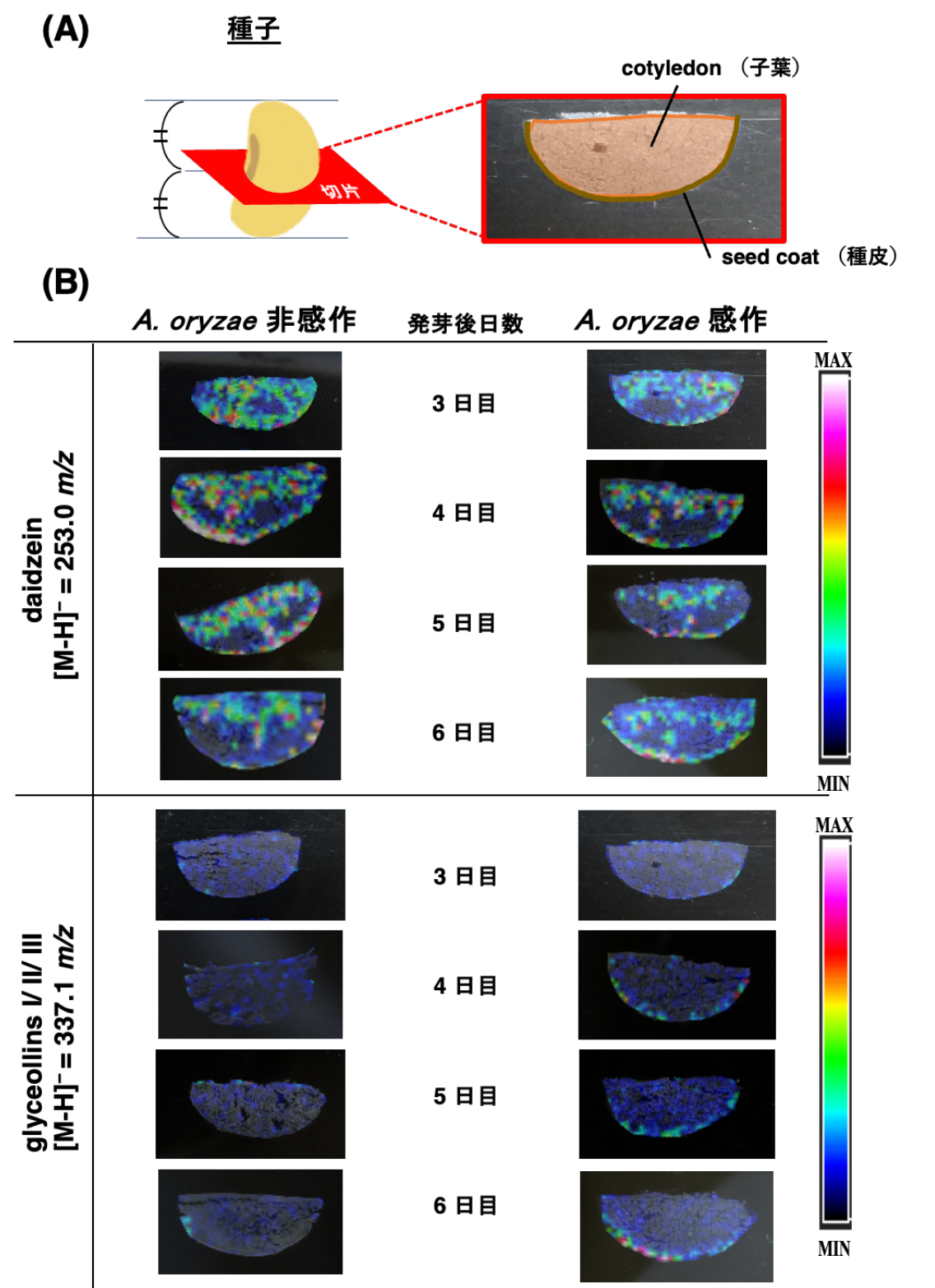


Figure 2-6 ダイズ種子切片中のイソフラボン daidzein およびグリセオリン類 (glyceollins I/II/III) の MALDI-MSI 分析結果

(A) *A. oryzae* 非感作/感作ダイズでの発芽後 3–6 日目種子切片の調製方法および (B) MALDI-MSI 画像

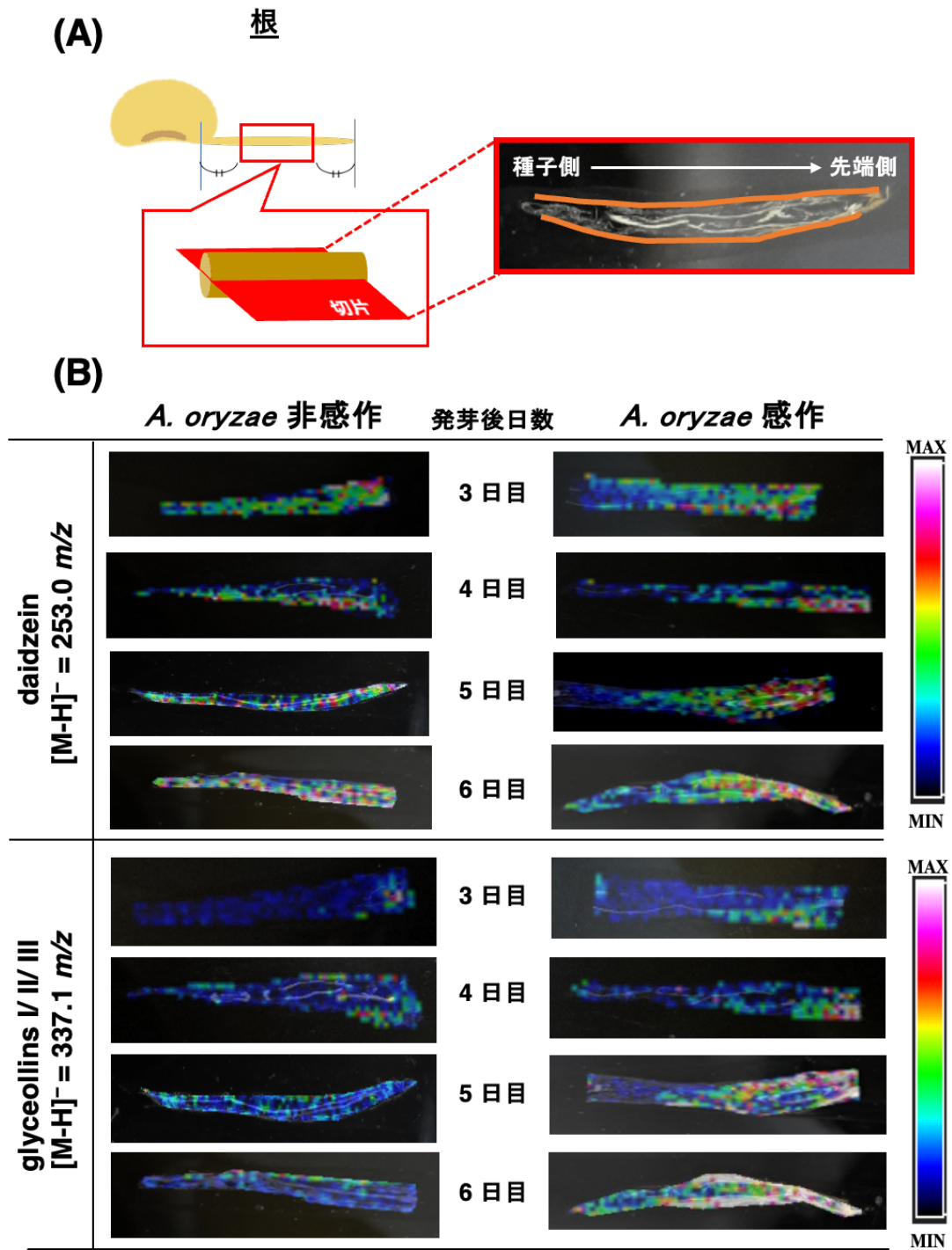


Figure 2-7 ダイズ根切片中のイソフラボン daidzein およびグリセオリン類 (glyceollins I/II/III) の MALDI-MSI 分析結果

(A) *A. oryzae* 非感作/感作ダイズでの発芽後 3–6 日目根切片の調製方法および
(B) MALDI-MSI 画像

第 3.3 項 麴生菌・麴死菌処理ダイズを用いたフラボノイド代謝物の産生誘導機構

前項 3.1、3.2 までの UPLC-PDA ならびに MALDI-MSI の結果、*A. oryzae* 感作によって発芽ダイズのグリセオリン類の含量が増大すること、さらに、ダイズ種子および根の表皮で局所的にイソフラボン daidzein からグリセオリン類への代謝変換が促進されることが示された。この産生誘導にはダイズ中グリセオリン類の合成に関連する代謝酵素の活性化や発現増大が関与する可能性が考えられたが、ダイズがどのようにして *A. oryzae* 感作刺激を認識するかについては明らかでない。そこで、グリセオリン類の産生促進における *A. oryzae* の菌増殖活動の関与を評価するため、加熱処理によって不活化した *A. oryzae*（不活性 *A. oryzae*）を、活性 *A. oryzae* と同様の感作スケジュール（Figure 2-2）で発芽ダイズに塗布した。

活性/不活性 *A. oryzae* で処理した発芽ダイズ種子（発芽 6 日目）の UPLC-PDA による各化合物の定量と、MALDI-MSI による各化合物のダイズ組織内分布の可視化を行った（Figure 2-8、2-9）。定量分析の結果、活性/不活性 *A. oryzae* のいずれの処理でもダイズ中グリセオリン類の量が、非感作ダイズと比較して有意に増大することが明らかとなった（e.g., glyceollin I 量：非感作ダイズ、 0.02 ± 0.01 mg/g-seed；活性 *A. oryzae* 感作ダイズ、 0.96 ± 0.12 mg/g-seed；不活性 *A. oryzae* 処理ダイズ、 0.19 ± 0.04 mg/g-seed、 $p < 0.05$ 、Figure 2-8）。ただし、活性 *A. oryzae* 感作ダイズでは不活性 *A. oryzae* 処理ダイズよりも顕著に高いグリセオリン類の産生が認められたことから（活性 *A. oryzae* 感作ダイズ、1.04 mg-glyceollins/g-seed；不活性 *A. oryzae* 処理ダイズ、0.20 mg-glyceollins/g-seed）（Figure 2-8）、*A. oryzae* の増殖による総菌体量の増大あるいは *A. oryzae* が産生する代謝関連因子や代謝酵素もグリセオリン類の産生促進に関与する可能性がある。実際に防御反応誘導因子（エリシター）になりうる菌の産生分子として、米の主要

な病原体 *Magnaporthe oryzae* が産生するペプチドである MoHrip1[114]や MoHrip2[115]が報告されている。

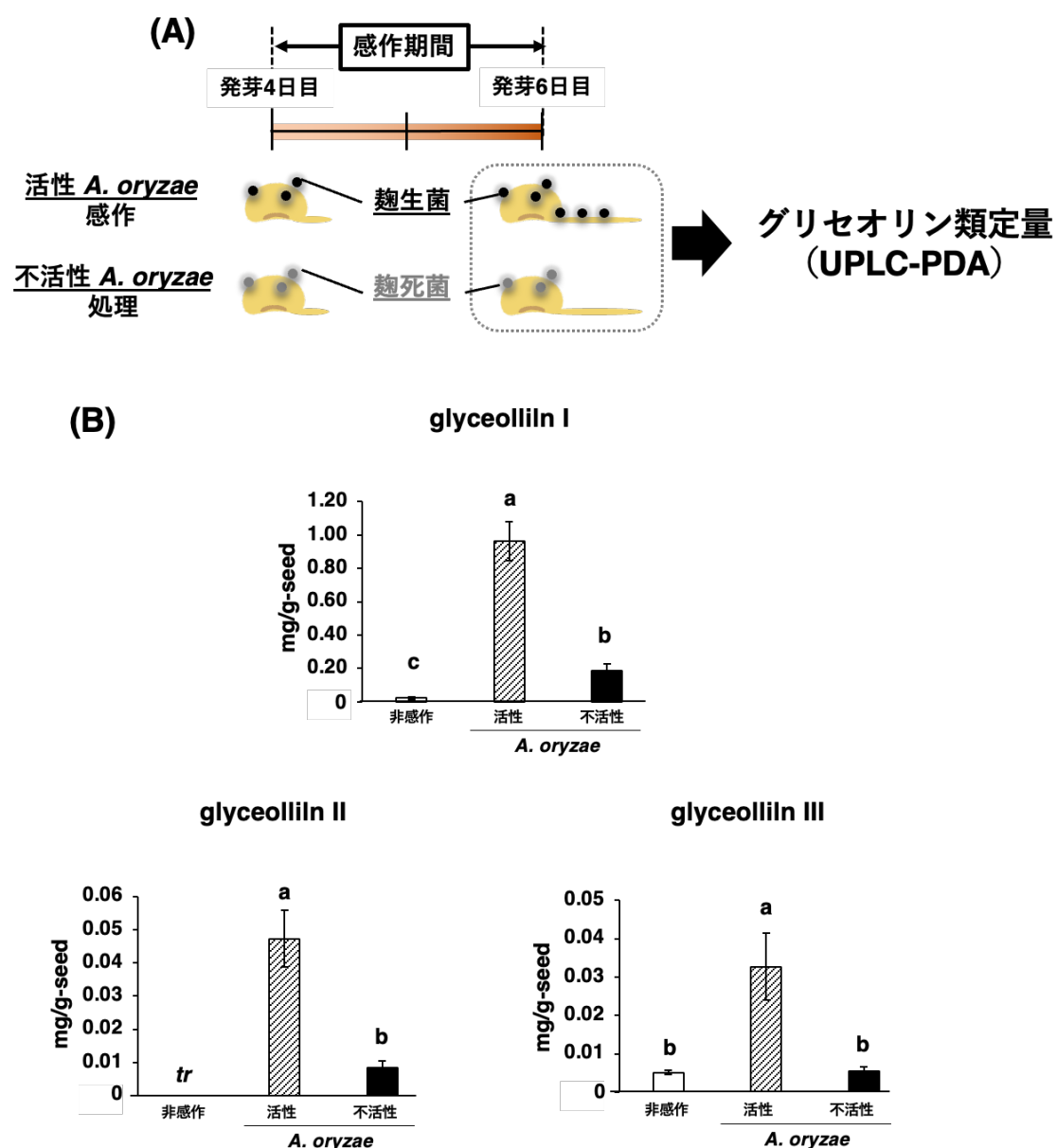


Figure 2-8 麴生菌（活性 *A. oryzae*）感作および麴死菌（不活性 *A. oryzae*）処理した発芽ダイズにおける各種グリセオリン類の UPLC-PDA 定量分析結果

(A) 発芽ダイズの麴生菌感作/麴死菌処理と分析スケジュールおよび (B) UPLC-PDA 定量分析結果；すべての値は平均値 $\pm$ SD ($n=4$) で示している。tr：trace (≤ 0.005 mg/g-seed)。各化合物について群間で統計的に有意な違いが認められたものには異なる文字を付した ($p < 0.05$ by Tukey-Kramer's t -test)。

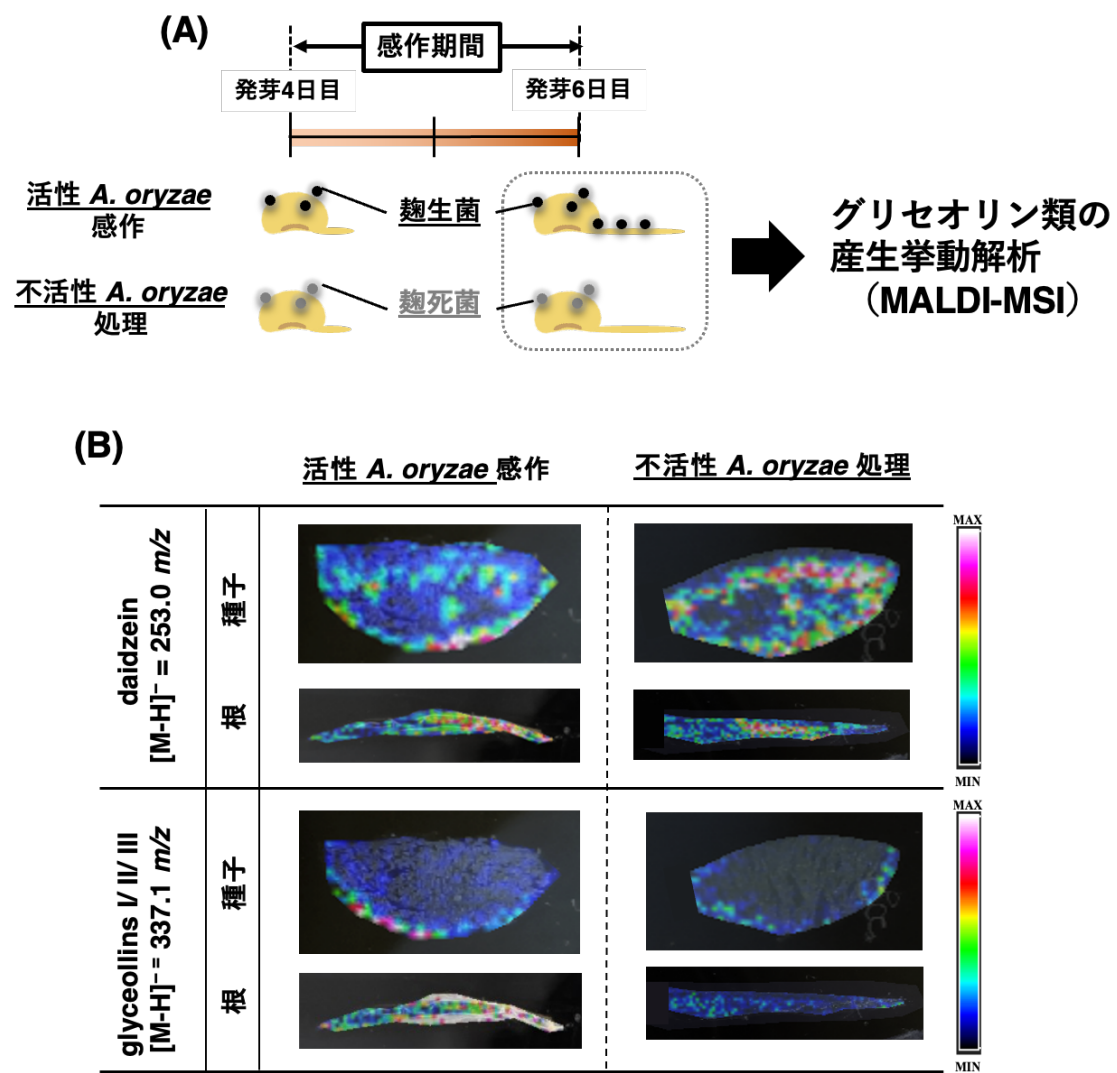


Figure 2-9 麴生菌（活性 *A. oryzae*）感作および麴死菌（不活性 *A. oryzae*）処理した発芽ダイズの MALDI-MSI 結果
 (A) 発芽ダイズの麴生菌感作/麴死菌処理と分析スケジュールおよび (B) MALDI-MSI 画像

次いで、活性/不活性 *A. oryzae* で処理したダイズ（発芽 6 日目）の切片を MALDI-MSI に供した。その結果、グリセオリン類は、活性 *A. oryzae* 感作ダイズと同様に不活性 *A. oryzae* 処理ダイズの種子表面に局在していた一方で、不活性 *A. oryzae* 処理ダイズの根では検出されなかった（**Figure 2-9**）。このことから、イソフラボン daidzein からグリセオリン類への代謝変換は *A. oryzae* 自体のダイズ表面への接触によって誘導されると推察された。不活性 *A. oryzae* 処理した根でグリセオリン類の分布が認められなかったのは *A. oryzae* の増殖能が失われ、延伸後の根の先端まで付着されなかったためであると考えられる。**Figure 2-8** に示したように、活性/不活性 *A. oryzae* 処理では、ダイズ種子全体のグリセオリン類の産生量に顕著な差が認められた。しかしながら、MALDI-MSI の結果、いずれの菌体処理においてもグリセオリン類の産生部位はダイズ表皮に限定されたため、グリセオリン類の産生誘導に「菌体接触領域」が重要であることは確かなようである。植物は pattern recognition receptor (PRR) を介して菌体を認識し、免疫応答シグナルを活性化させる[116]。Kaku らは病原菌に対するコメの生理学的防御反応は、菌体の細胞壁の構成成分であるキチン多糖類がコメの細胞膜へ結合することに起因すると報告している[117]。同報告で新規に同定された受容体 (chitin oligosaccharide elicitor-binding protein) は細胞内の jasmonic acid の産生、あるいはイオンチャネルの開口に関与し、その結果として細胞内シグナルが活性化され、コメ中のフィトアレキシン産生が誘導される。他方、ダイズに発現する PRR についての知見は少ないものの、chitin[118]あるいは β -1,3-glucan[119,120]結合性の受容体発現は確認されており、菌体細胞壁由来のグルカンでグリセオリン類の産生が増大することが示されている[121]。Mithöfer ら[122]によると、 β -glucan はダイズ細胞内の Ca^{2+} 濃度を一時的に上昇させ、ダイズの防御機構を促進するようである。以上の結果から、*A. oryzae* の菌体壁を構成する多糖類がダイズ表面の受容体に結合し、認識されることで、ダイズの防御機

構が働き、その対抗策としてグリセオリン類の産生が促進されることが示唆された。

第4節 小括

本章では、MALDI-MSI を活用して、*A. oryzae* 感作された発芽ダイズにおけるイソフラボン類からグリセオリン類への代謝挙動の可視化ならびに、その産生促進機構の解明を試みた。

まず、*A. oryzae* 非感作/感作ダイズ中のイソフラボン類とグリセオリン類を UPLC-PDA で定量した。その結果、*A. oryzae* 感作ダイズでは、非感作ダイズと比較してイソフラボン類ならびにグリセオリン類 (glyceollin I, II, III) の量が有意に増加していた。次いで、切片化した発芽ダイズサンプルを MALDI-MSI に供し、前駆体イソフラボン daidzein および glyceollins I/II/III の可視化を試みた。その結果、イソフラボン daidzein はダイズ種子および根の全体に分布していた一方で、glyceollins I/II/III は *A. oryzae* 感作ダイズの種子および根の表面にのみ局所的に分布していた。熱処理で不活化した *A. oryzae* を用いた処理ダイズでも、活性 *A. oryzae* 感作ダイズと同様に種子表面に局在した glyceollins I/II/III 産生が認められたことから、イソフラボン daidzein からグリセオリン類への代謝変換には、ダイズ表面への *A. oryzae* 接触が重要であり、その産生部位は菌体接触領域に限られることが判明した。

コメあるいはダイズでのフィトアレキシン産生機構に関する既報に基づき、ダイズでの局所的な（ダイズ種子および根表面）グリセオリン類の産生機構について考察した。**Figure 2-10** に示したように、ダイズは表皮に発現している chitin および β -glucan 結合性の受容体を介して菌体壁の構成多糖を認識し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して、コメと同様に細胞内の MAPK カスケードを活性化させ、グリセオリン類産生に係る代謝系酵素の発現あるいは活性調節を誘導すると考えられた。または、菌体が産生・分泌する化学分子による未知のグリセオリン産生誘導経路が存在する可能性も示唆される。

以上から、発芽ダイズに *A. oryzae* を感作させると、ダイズは表皮に発現している受容体を介した菌体壁接触の認識あるいは菌体由来の化学分子による刺激をトリガーとして、イソフラボン類とグリセオリン類の産生を誘導するが、グリセオリン類の産生に関わる代謝酵素はダイズ種子（あるいは根）の表面付近でのみ発現あるいは活性化している可能性が示された。

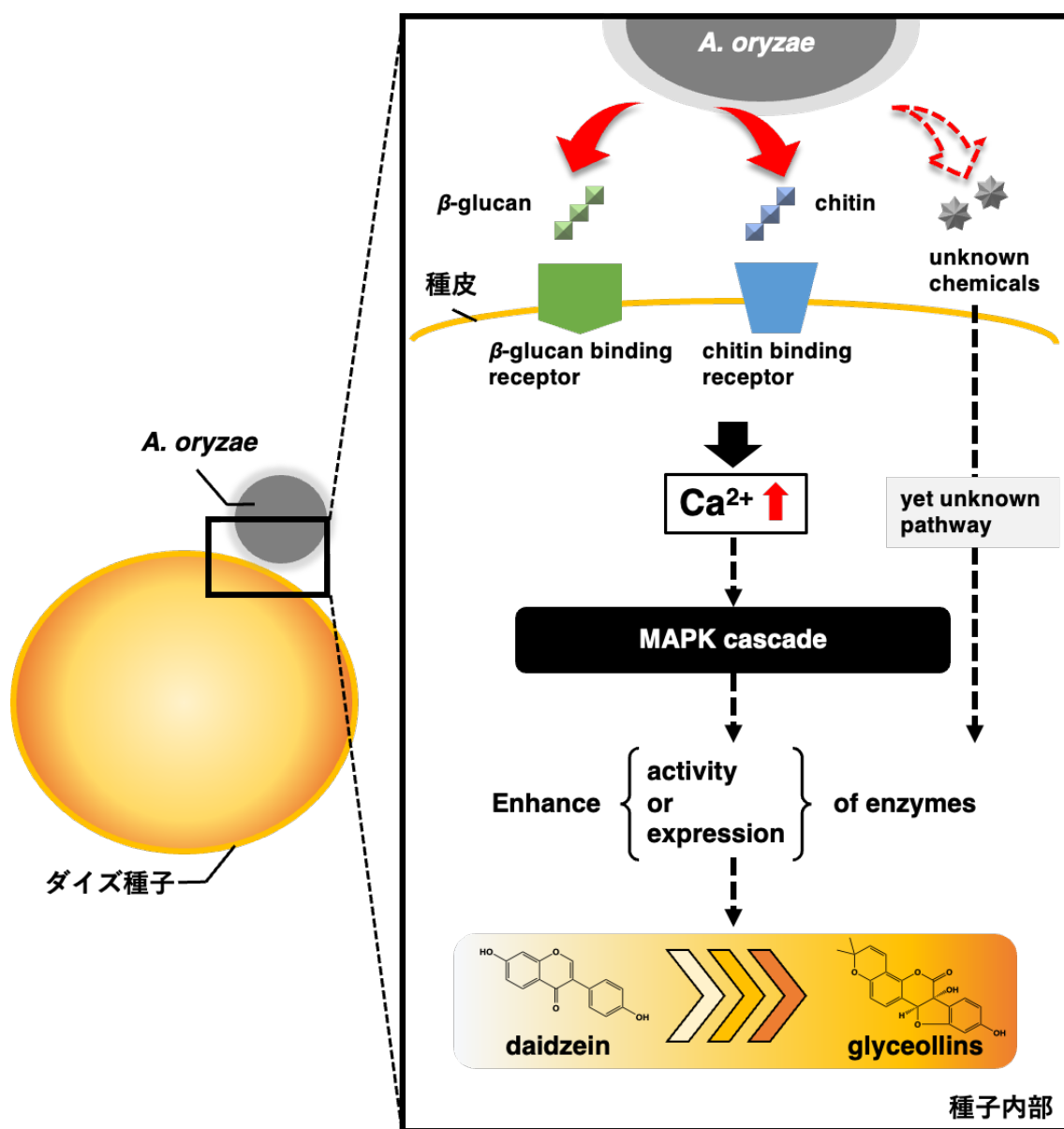


Figure 2-10 麴菌 (*A. oryzae*) 感作による発芽ダイズ内でのグリセオリン類産生機構 (推定)

第3章 エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析法を駆使した、フラボノイド代謝物のラットでの生体利用性

第1節 緒言

1936年にその血管保護機能が発見されて以降、ポリフェノール、とりわけフラボノイド類の健康機能性に関しての研究が精力的に行われている。社会的要因による健康意識の高まりは、機能性食品の需要を高め、その関与成分としてのフラボノイド類の期待は高い。これまでに、フラボノイド類には抗がん作用[9]や抗炎症作用[123]をはじめとする様々な健康機能性が報告されているが、その一方で、体内利用性は低いことが報告されている[124–127]。これまでに報告されているフラボノイド類による健康機能は、標的組織への到達を前提としているが、フラボノイド類は腸管上皮に発現するP糖タンパク質や多剤排出トランスポーターに認識されて管腔内へと排出されやすい[128,129]。さらに①小腸や肝臓での薬物代謝や、②大腸での腸内細菌による代謝分解を受けるため、経口摂取したそのままの形で組織あるいは臓器に到達することは困難であると推察される。実際に、血圧上昇抑制効果が報告されている hesperidin では、経口摂取後の血液中に、代謝体（抱合体）が多く含まれていることが示されている[130]。このような背景から、フラボノイド類の体内における作用本体については不明なままであり、標的組織での局所的な抱合基の脱離[131,132]や代謝体（抱合体）の生理活性（Table 1-4）などが明らかにされつつある。また、フラボノイド類の腸内細菌代謝分解物にも腸管の炎症抑制[133]や血管弛緩誘導[134]などの生体調節機能があることが報告されている。Gasparotti ら[135]が、ベリー果実の摂取後に腸内細菌代謝で産生される23種のフェノール化合物をWistar系ラットに経口投与し、その後の臓器中動態を評価した結果、経口投与した代謝物が脳、肝臓、腎臓へ移行することを報告している。このことから、経口

摂取後に全身系で認められるフラボノイド類の健康機能発現に、大腸で産生された腸内細菌代謝産物が関与する可能性も大いに考えられる。3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid (HMPA) は curcumin や cyanidin など複数の生理活性フラボノイド類から共通して産生される腸内細菌代謝産物である[136]。例えば、curcumin は *Escherichia coli* 由来の CurA (NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase) によって代謝され dihydrocurcumin → tetrahydrocurcumin → hexahydrocurcumin を経て HMPA を産生し[137]、cyanidin 高含有ベリー抽出液からの HMPA 産生には *Enterobacter cancerogenus*、*Bifidobacterium dentium* および *Dorea longicatena* による代謝が関与しているようである[138]。また、主にコーヒー由来フラボノイド類の代謝過程で産生される ferulic acid は[139]、*Weissella* 属や *Lactobacillus* 属によって還元され HMPA を産生することが報告されている[140,141]。先行研究において、HMPA の糖代謝改善作用[142]や抗肥満作用[143]が明らかとなっており、大腸で産生された後、体内へ取り込まれ、フラボノイド類の健康機能に寄与している可能性は高い。そこで本章では、LC-TOF/MS を駆使して HMPA の体内動態（吸収・代謝・蓄積）を明示し、生理活性フラボノイド類の活性発現に対する寄与因子についての学術的知見の集約を図った。

第2節 材料および方法

第2.1項 材料

HMPA は東京化成工業株式会社（東京）より購入し、dihydroferulic acid 4-*O*- β -glucuronide (HMPA-GlcA) 並びに dihydroferulic acid 4-*O*-sulfate sodium salt (HMPA-S) は Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada) より購入した。さらに、3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (DHCA) および 3,4-dimethoxycinnamic acid (DMCA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、MS グレードの蒸留水、メタノール (MeOH)、ACN およびギ酸 (FA) は Merck (Darmstadt, Germany) より購入した。その他、使用した試薬は全て分析用特級であり追加精製は行っていない。

第2.2項 ラット投与試験

18 匹の雄性 Sprague-Dawley 系ラット（7 週齢、平均体重 260 ± 29 g (232 – 308 g)）を Charles River Laboratories (SPF/VAF Crj、神奈川) より購入し、CRF-1 飼料（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）で 1 週間飼育後、無作為に 6 群（投与後 0、0.25、1、2、6、24 h 屠殺）に分類、16 時間の絶食の後、HMPA [10 mg/kg-body weight (B.W.)、1 mL 生理食塩水に溶解] を経口投与した。投与後各タイムポイントにおいて、セボフルラン（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪）で経口麻酔し、胸部大動脈から全血採血した。100 mL リン酸緩衝液 (PBS、pH 7.4: 137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L Na_2HPO_4 、1.8 mmol/L KH_2PO_4 ；2 mmol/L EDTA-2Na 含有) で全身を灌流後、ラットから主要臓器（肝臓、心臓、肺、ヒラメ筋、胸部大動脈血管、腎臓）を回収した。循環血液を EDTA-2Na を添加したチューブに回収し、遠心分離 ($3,500 \times g$ 、15 min、4 °C) によって血漿を得た。得られた血漿と臓器は液体窒素を用いて即時に凍結させ、分析まで -30 °C で保存した。全ての動物実

験は「動物の愛護及び管理に関する法律（第 105 号 1973 年、環境省）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（第 88 号 2006 年、環境省）」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（第 71 号 2006 年、文部科学省）」、「九州大学動物実験規則」及び「九州大学動物実験規則実施細則」を遵守し実施した。本動物実験計画およびプロトコルは九州大学動物実験委員会によって確認され、承認を受けた（承認番号 A20-095）。

第 2.3 項 血液測定

血漿中からの HMPA および HMPA 代謝物の抽出は従来法[144]に変更を加えて実施した。血漿 10 μ L を 100 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.0）10 μ L と混合し、1 nmol/mL DMCA 溶液 50 μ L（内標準、終濃度 1 nmol/mL）を加えた。さらに、4%トリクロロ酢酸（TCA）100 μ L を添加し、十分に攪拌後、遠心分離（10,000 $\times$ g、20 min、4 $^{\circ}$ C）した。得られた上清を Waters Sep-Pak C18 カラム（Waters Co.、MA、USA）に負荷し、50% ACN/0.1%FA で溶出した。

第 2.4 項 臓器測定

臓器中からの HMPA および HMPA 代謝物の抽出は従来法[93]に変更を加えて実施した。凍結乾燥機（FDU-1000、東京理化器械株式会社、東京）を使用して凍結サンプルを乾固し、BioMasher II（株式会社ニッピ、東京）で粉碎した。粉末サンプル 25 mg に 50% MeOH/0.1%FA 1 mL と 1 nmol/mL DMCA 溶液 100 μ L（内標準、終濃度 1 nmol/mL）を添加し混合溶液とした。この混合溶液を Polytron homogenizer（Kinematica AG、Luzern、Switzerland）でホモジナイズし（20,000 rpm、30 s $\times$ 3）、次いで Branson Digital Sonifier SFX 250（Branson Ultrasonics、Emerson Japan Co.、神奈川）を使用して氷上にて超音波処理（output control：3、10 s $\times$ 3）を

行った。遠心分離後 ($14,000 \times g$, 15 min, 25°C)、得られた上清を Amicon Ultra-15 遠心フィルター (0.5 mL : cutoff, 3K) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) で限外濾過 ($14,000 \times g$, 15 min, 25°C) し、濾液を回収した。

第 2.5 項 エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析

分離には Agilent 1200 Series Gradient HPLC システム (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を使用した。分離条件は以下の通りである：分離カラム、COSMOSIL C₁₈-AR-II column (I.D. 2.0×150 mm, $4.6 \mu\text{m}$ ；ナカライテスク (株)、京都)；溶離液、(A) 0.1% (v/v) FA (B) ACN/0.1% (v/v) FA；分離プログラム、0–5 min 0%B：5–25 min 0–100%B：25–35 min 100%B：35–45 min 100–0%B：45–50 min 0%B；流速、0.2 mL/min；カラムオーブン、 40°C 。検出には micrOTOF-II 質量分析計 (Bruker Daltonics) を使用した TOF/MS を採用した [ESI (エレクトロスプレーイオン化)、negative mode]。主な測定対象として、HMPA、HMPA-S、HMPA-GlcA および DMCA (内標準) をそれぞれ $195.0653\ m/z$ 、 $275.0231\ m/z$ 、 $371.0973\ m/z$ 、 $207.2106\ m/z$ ([M–H][–]として) で検出した。測定に使用した MS 条件は以下の通りである：nebulizer pressure、1.6 bar；dry gas、nitrogen；dry gas flow、8.0 L/min；drying temperature、 200°C ；capillary voltage、3800 V；data range、100–1000 m/z 。質量値校正には 10 mmol/L ギ酸ナトリウム (50% ACN 溶解) を使用し、得られたスペクトルデータの解析には Bruker Data Analysis software (version 4.0, Bruker Daltonics) を使用した。

第3節 結果および考察

第3.1項 フラボノイド代謝物分析法の妥当性評価

まず、HMPA およびその代謝物の定量のための各種条件を最適化した。定量には操作過程での損失等を考慮して、内標準法を採用した。HMPA と化学構造が類似し、かつ、HMPA の代謝によって生じないと考えられる DMCA を内標準として使用し (**Figure 3-1**)、標的化合物それぞれの標準品で作成した検量線を用いて血液および臓器サンプル中の化合物濃度を LC-ESI-TOF/MS で定量した。標準品を使用して作成した各化合物の検量線の濃度範囲、直線性と限界値は次の通りであった：HMPA、 $y = 19.664x - 0.024$ (0.005–1.0 nmol/mL ; $r^2 = 0.981$; 検出限界 (LOD)、1 pmol/mL ; 定量下限 (LOQ)、4 pmol/mL) ; HMPA-S、 $y = 104.31x - 2.983$ (0.005–1.0 nmol/mL ; $r^2 = 0.985$; LOD、1 pmol/mL ; LOQ、4 pmol/mL) ; HMPA-GlcA、 $y = 34.348x + 0.907$ (0.01–1.0 nmol/mL ; $r^2 = 0.939$; LOD、5 pmol/mL ; LOQ、16 pmol/mL)、なお、検量線の x 軸は化合物の濃度 (nmol/mL) を、y 軸は内標準物質 (DMCA) のピーク面積に対する化合物のピーク面積比を採用した。また、本検量線はラットのブランク血漿に標的化合物と内標準物質の標準品をスパイクして作成し、マトリックスの影響を排除した[145]。構築した分析法の正確さ (accuracy) は 106 –120% (HMPA、106% ; HMPA-S、120% ; HMPA-GlcA、115%) ($n = 4$)、分析法の精度 (coefficient of variation) は 4 –13% (HMPA、13% ; HMPA-S、4% ; HMPA-GlcA、10%) ($n = 4$) であり、信頼性のある定量法であることを確認した。

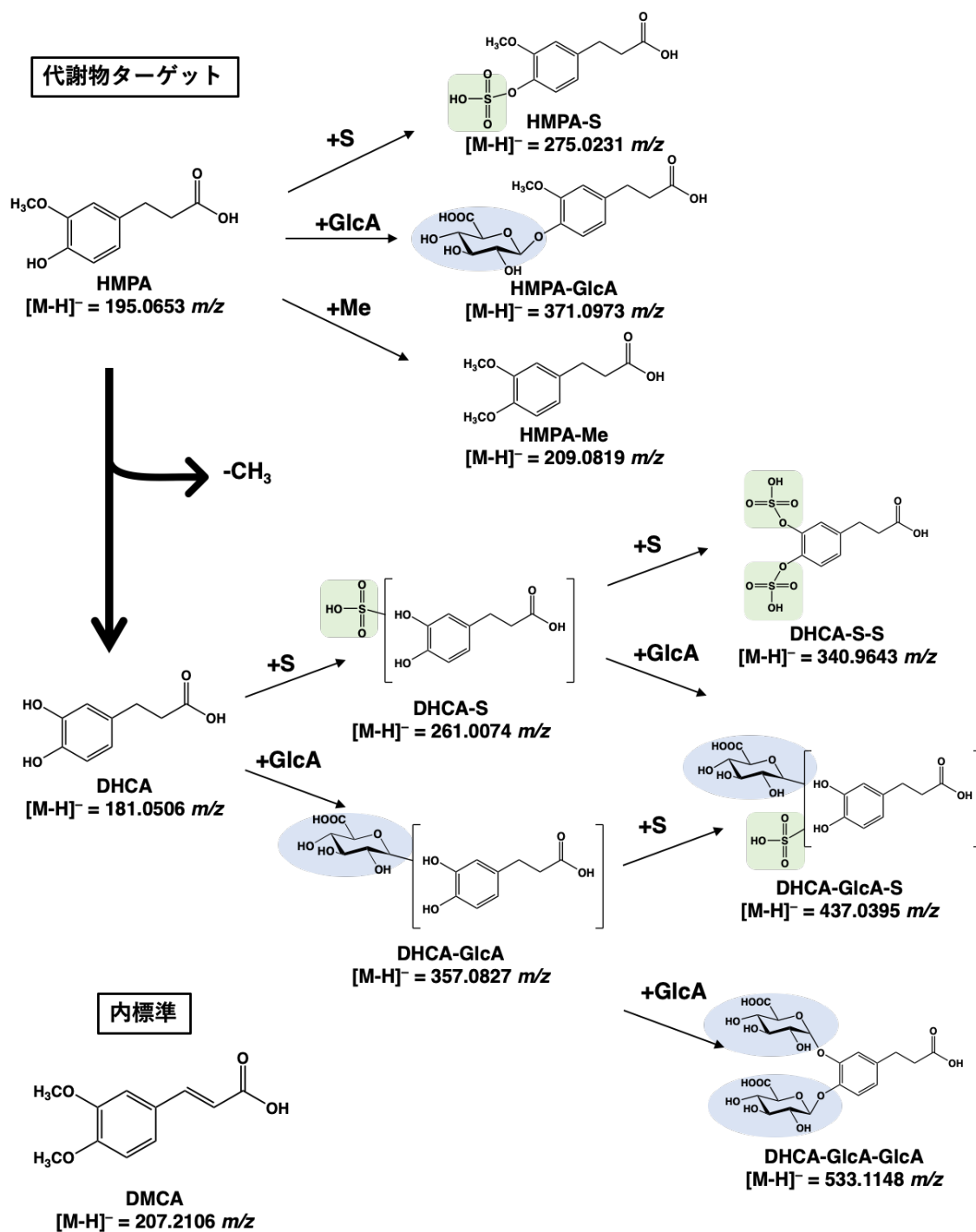


Figure 3-1 HMPA と予測される代謝物、および内標準 DMCA の化学構造
 S：硫酸抱合（緑色）、GlcA：グルクロン酸抱合（青色）、Me：メチル基付加

第 3.2 項 血中でのフラボノイド代謝物の吸収挙動

体内吸収後の HMPA の血中動態を明らかにするため、HMPA (10 mg/kg-B.W.) を経口投与して 0–24 h 後の循環血を採血した。まず、HMPA の構造類似体である ferulic acid での先行研究[146]をもとに、 $T_{\max}$ と推定される経口投与後 15 min の循環血を用いて、HMPA 由来代謝物の同定を試みた。**Figure 3-1** に示した代謝物の m/z 値 ($[M-H]^-$ として) をもとに extracted ion chromatogram (EIC) 検出によるスクリーニングを行ったところ、HMPA-S と HMPA-GlcA の二つの HMPA 代謝物のみが検出された。HMPA のメチル化体、ならびに HMPA の脱メチル体である DHCA とその代謝物 (DHCA-S、DHCA-GlcA、DHCA-S-S、DHCA-GlcA-GlcA、DHCA-S-GlcA)、さらに HMPA のメチル基転移体は検出されず (**Figure 3-2**)、HMPA は小腸ならびに肝臓において脱メチル/メチル化反応をほとんど受けないことが判明した。そこで、HMPA および HMPA-S と HMPA-GlcA についてのターゲット分析を実施し、血中動態について検討を行った。その結果、全てのターゲットは投与後 6 時間まで血漿中から検出され、投与後 24 時間の血漿ではいずれのピークも消失した (**Figure 3-3A、B**)。このことから、HMPA およびその抱合体は経口投与後 6 時間までは安定に血中に存在していると推定された。HMPA-S ならびに HMPA-GlcA はいずれも HMPA と同様に経口投与後速やかに ($T_{\max}=15$ min) 血中から検出されたため、HMPA の代謝速度は極めて早いことが示唆された。

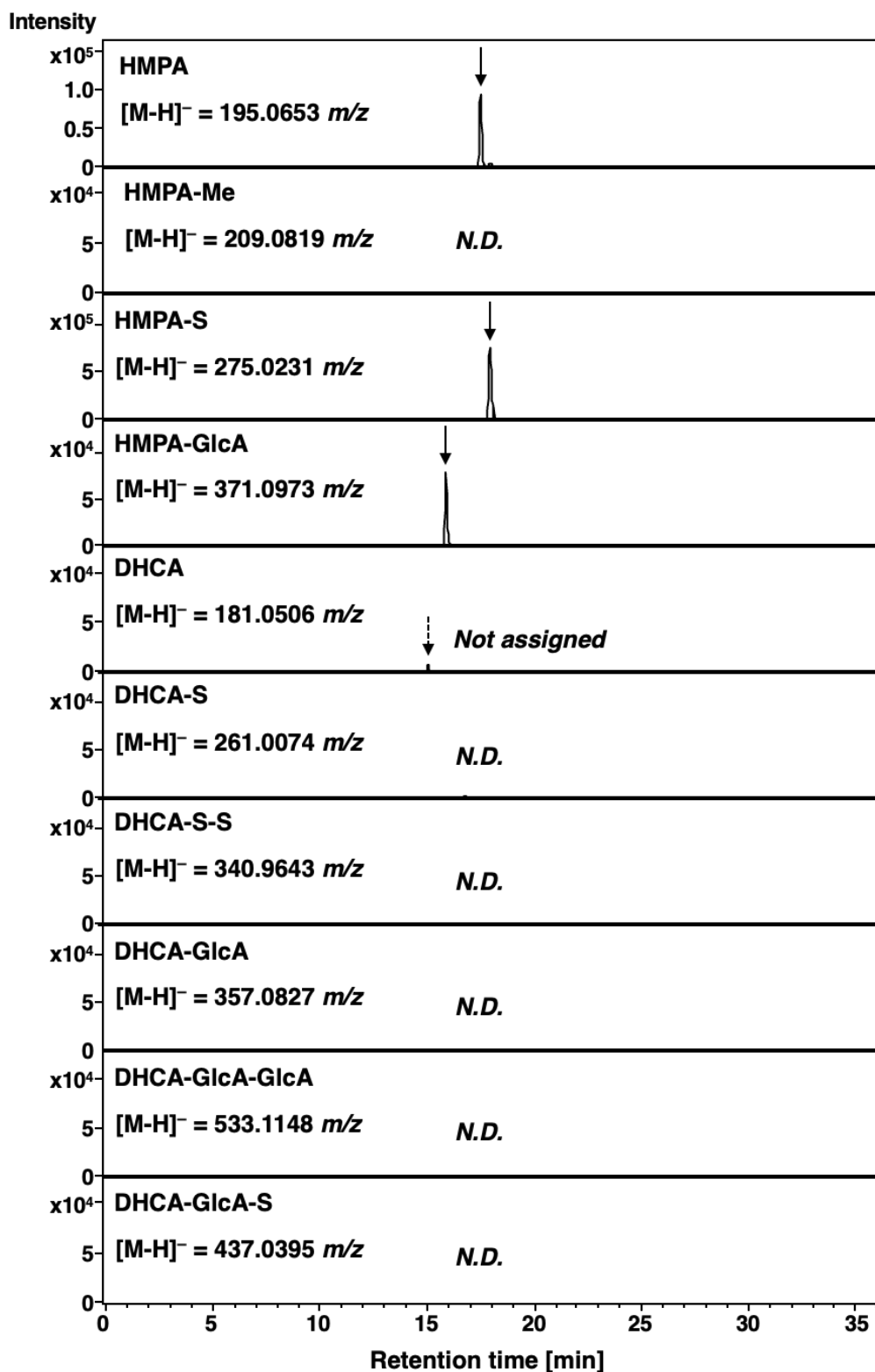


Figure 3-2 HMPA 予測代謝物の EIC スクリーニング結果（HMPA 経口投与後 15 min 血漿）

N.D. : no detection

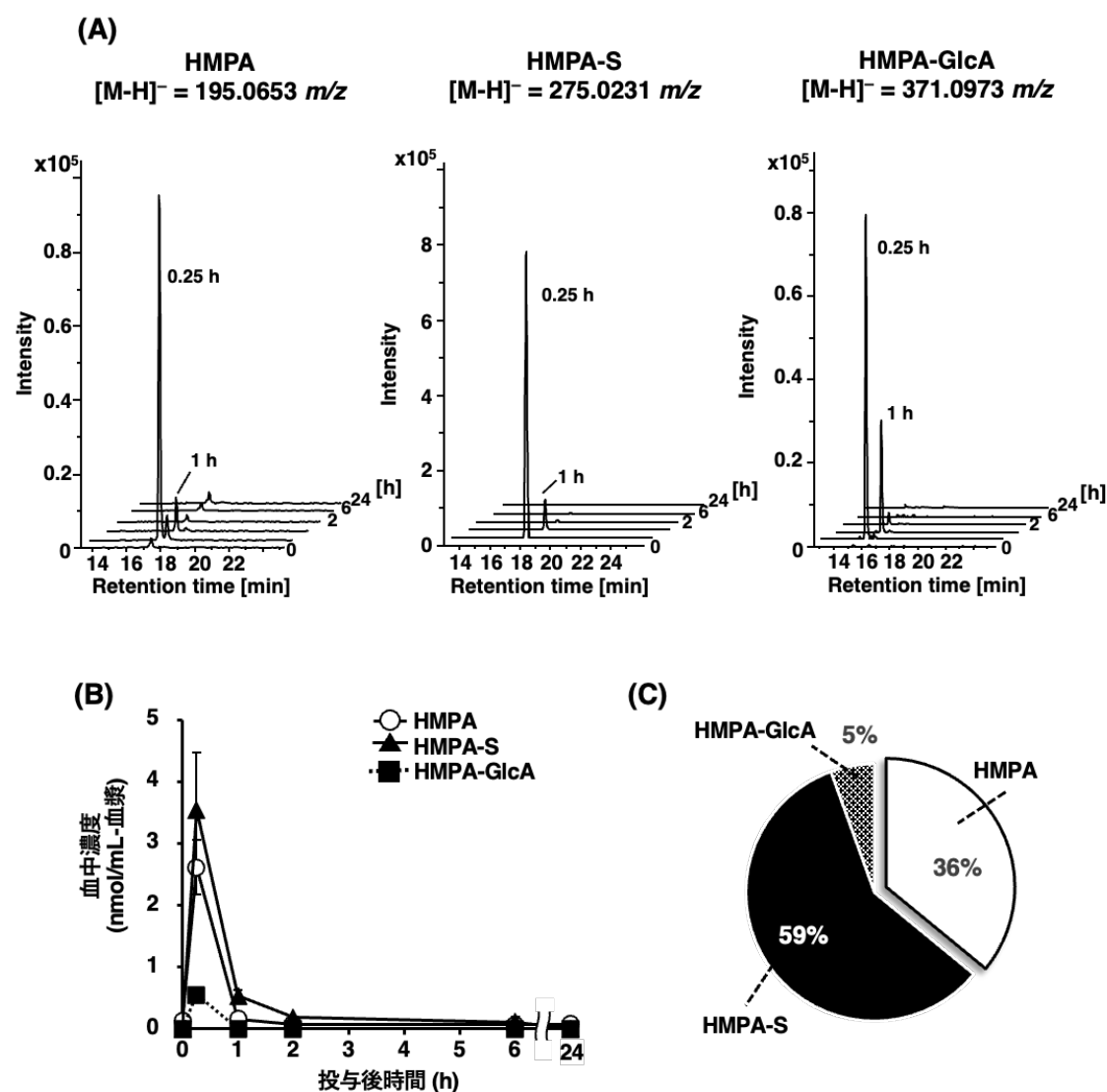


Figure 3-3 Sprague-Dawley 系ラットにおける HMPA およびその代謝物（HMPA-S、HMPA-GlcA）の血中動態（HMPA 10 mg/kg-B.W. 経口投与後）

（A）HMPA 経口投与後の各代謝物の経時的クロマトグラム （B）HMPA 経口投与後の各代謝物の投与後時間-血中濃度グラフ （C）各代謝物の血中存在割合（AUC_{0-6 h}）

HMPA、HMPA-S、HMPA-GlcA の血中動態を **Table 3-1** および **Figure 3-3B** にまとめて示した。HMPA、HMPA-S、HMPA-GlcA について、最大血中濃度 ($C_{\max}$ [nmol/mL-plasma]) はそれぞれ 2.6 ± 0.4 、 3.6 ± 0.9 、 0.55 ± 0.09 であり、HMPA と HMPA-S が主体であった。LHCN-M2 myoblasts を 6 nmol/mL HMPA-S 30 min で処理すると、インスリン受容体/PI3K/ Akt/ GLUT4 が活性化され、グルコース取り込みが促進されることが報告されている[25]。このことから、今回得られた HMPA ならびにその代謝物の血中存在量 (0.55–3.6 nmol/mL) は十分に機能発現が期待できる濃度レベルにあるといえる。さらに、経口投与後 6 時間までの血漿中化合物濃度 (nmol/mL) –投与後時間 (h) グラフの曲線下面積 (AUC) を比較すると、各代謝物が血液中に占める割合はそれぞれ HMPA-S (59%、 $AUC_{0-6h} : 2.9 \pm 0.6 \text{ nmol} \cdot \text{h/mL-plasma}$) > HMPA (36%、 $AUC_{0-6h} : 1.8 \pm 0.3 \text{ nmol} \cdot \text{h/mL-plasma}$) > HMPA-GlcA (5%、 $AUC_{0-6h} : 0.28 \pm 0.05 \text{ nmol} \cdot \text{h/mL-plasma}$) の順であった (**Table 3-2**、**Figure 3-3C**)。したがって、HMPA は経口投与後、その大部分 (95%) は HMPA もしくは HMPA-S として存在していることが示された。本挙動は、ferulic acid の吸収プロファイルと一致する ($C_{\max}$ of intact form、1.7 nmol/mL; sulfated form、2.7 nmol/mL; glucuronidated form、0.87 nmol/mL at a dose of 5.15 mg/kg-B.W.) [147]結果であったことから、フェノール酸類は硫酸抱合体化の代謝反応が主体であると考察される。また、これまでの報告によると、単位投与量あたりのポリフェノールの血中吸収量は数 nmol から数 $\mu\text{mol} \cdot \text{h/mL}$ であるとされる[62]。したがって、HMPA の単位投与量あたり血中吸収量 ($0.50 \text{ nmol} \cdot \text{h/mL/mg-dose}$ 、**Table 3-2**) は caffeic acid ($0.17\text{--}3.9 \text{ nmol} \cdot \text{h/mL/mg-dose}$) や ferulic acid ($0.01\text{--}1.3 \text{ nmol} \cdot \text{h/mL/mg-dose}$) などのフェノール酸類に匹敵し[62,148]、HMPA はフェノール酸類の中でも標準的な吸収能を示すことがわかる。先行研究では、ferulic acid は胃や小腸でのモノカルボン酸トランスポーター (MCTs) を介して吸収されると報告されている[149,150]。フラボノイド類の摂取後に産生さ

れる HMPA の $T_{\max}$ (5–6 h) と比較して、本研究で得られた HMPA の血中 $T_{\max}$ (15 min) は非常に短いことから、詳細な吸収経路は不明であるが、経口投与した HMPA は大腸よりも早い段階、つまり ferulic acid と同様に胃や小腸経路で吸収される可能性が高い。本試験で得られた血中での代謝物を含む HMPA の総吸収率を算出したところ (Table 3-2)、10 mg/kg-B.W. (13,274 nmol/260g-平均体重) 投与時において吸収率は 0.62% (総吸収量、 82.5 ± 14.3 nmol ; HMPA、 31.5 ± 5.8 nmol ; HMPA-S、 46.3 ± 10.7 nmol ; HMPA-GlcA、 4.7 ± 1.0 nmol) であった。なお、吸収率の算出は O'Neill[151]と Bijsterbosch[152]らの報告に基づいた (吸収率 [%] = $(\ln 2 \times \text{AUC} [\text{mol} \cdot \text{h} / \text{mL or g}] \times \text{分子量} [\text{g/mol}] \times \text{血漿 (臓器) 重量} [\text{mL or g}]) / (T_{1/2} [\text{h}] \times \text{投与量} [\text{g}]) ; \text{全血漿量} [\text{mL}] = 0.0291 \times \text{体重} [\text{g}] + 2.54$)。HMPA は腸内細菌代謝によって産生されるため[153]、その産生量は個々人の腸内細菌叢に依存する。さらに、ポリフェノールの構造の違いによって、その代謝速度は異なると考えられるため、ポリフェノール摂取後の HMPA の生体利用性についてはさらなる解明が必要と考えられる。

Table 3-1 Sprague-Dawley 系ラットにおける各臓器への HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の蓄積動態 (HMPA 10 mg/kg-B.W. 経口投与後) ^a

臓器	時間 (h)	HMPA	HMPA-S	HMPA-GlcA
血漿 (nmol/mL-plasma)	0	<i>N.D.</i> ^b	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	2.6 ± 0.4	3.6 ± 0.9	0.55 ± 0.09
	1	0.18 ± 0.04	0.51 ± 0.10	<i>N.D.</i>
	2	0.33 ± 0.45	0.14 ± 0.08	<i>N.D.</i>
	6	0.08 ± 0.05	0.08 ± 0.08	<i>N.D.</i>
	24	<i>tr</i> ^c	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
肝臓 (nmol/g-tissue)	0	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	1.6 ± 0.9	1.8 ± 0.9	0.14 ± 0.13
	1	0.19 ± 0.24	0.19 ± 0.14	0.03 ± 0.02
	2	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.03	<i>tr</i>
	6	0.02 ± 0.03	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
心臓 (nmol/g-tissue)	0	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	0.78 ± 0.10	0.30 ± 0.09	<i>tr</i>
	1	0.08 ± 0.06	0.06 ± 0.00	<i>tr</i>
	2	<i>tr</i>	0.02 ± 0.02	<i>N.D.</i>
	6	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>N.D.</i>
	24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
肺 (nmol/g-tissue)	0	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	0.29 ± 0.06	0.80 ± 0.18	0.02 ± 0.01
	1	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.16	<i>tr</i>
	2	<i>N.D.</i>	0.07 ± 0.03	<i>tr</i>
	6	<i>N.D.</i>	0.02 ± 0.01	<i>N.D.</i>
	24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>

Table 3-1 (続き)

臓器	時間 (h)	HMPA	HMPA-S	HMPA-GlcA
ヒラメ筋 (nmol/g-tissue)	0	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	0.96 ± 0.03	0.33 ± 0.09	0.03 ± 0.02
	1	0.06 ± 0.04	0.03 ± 0.02	<i>tr</i>
	2	<i>tr</i>	0.03 ± 0.02	<i>N.D.</i>
	6	<i>tr</i>	0.02 ± 0.01	<i>N.D.</i>
	24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
胸部大動脈血管 (nmol/g-tissue)	0	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	0.92 ± 0.34	0.62 ± 0.35	0.03 ± 0.02
	1	0.38 ± 0.48	0.10 ± 0.09	0.02 ± 0.02
	2	<i>tr</i>	0.04 ± 0.03	<i>tr</i>
	6	<i>tr</i>	0.01 ± 0.02	<i>N.D.</i>
	24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
腎臓 (nmol/g-tissue)	0	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>
	0.25	9.6 ± 1.9	6.1 ± 2.6	0.62 ± 0.23
	1	0.60 ± 0.54	2.2 ± 1.2	0.04 ± 0.01
	2	0.03 ± 0.01	0.14 ± 0.02	<i>tr</i>
	6	0.02 ± 0.02	0.07 ± 0.07	<i>N.D.</i>
	24	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>

^a すべての値は平均値 ± SD ($n = 3$) で示している。^b *N.D.* : no detection ^c *tr* : trace
(< LOQ : 4 pmol/mL for HMPA and HMPA-S ; 16 pmol/mL for HMPA-GlcA)

第 3.3 項 臓器中でのフラボノイド代謝物の蓄積挙動

HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の臓器移行挙動を明らかにするため、Sprague-Dawley 系ラットへの経口投与後、標的臓器 (肝臓、心臓、肺、ヒラメ筋、血管、腎臓) を摘出し、LC-TOF/MS にて臓器蓄積を明らかにした。その結果、HMPA および HMPA 抱合体 (HMPA-S、HMPA-GlcA) は血液と同様に経口投与後 15 min において全ての標的臓器内から検出された (**Figure 3-4**)。特に、標的臓器のうち腎臓で最大の MS ピークが認められ、その後速やかに消失した ($T_{1/2} < 30$ min、**Figure 3-5**) ことから、他のモノフェノール酸類 (caffeic acid、ferulic acid、*p*-coumaric acid) と同様に尿中排出が優先していると推察された[154]。また、経口投与後 6 時間には HMPA 代謝物はほぼ全ての標的臓器から消失し、24 時間後には全く検出されなかった (**Table 3-1**、**Figure 3-5**)。このことは、HMPA は長期間体内に残留しないため毒性が低く、また、日常的な摂取が重要であることを示している。HMPA の経口投与後 6 時間までの臓器中 AUC_{0-6h} (**Table 3-2**) は腎臓 > 肝臓 > 血管 > 心臓 > ヒラメ筋 > 肺の順であり、HMPA 抱合体も同様の挙動であった (**Figure 3-6A**)。ただし、HMPA-S は HMPA-GlcA と比較して臓器蓄積されやすいことが判明し、とりわけ肺への蓄積に顕著な差が認められた。ポリフェノール抱合体の肺への作用を評価した報告はなく (**Table 1-4**)、抱合基由来の取り込み特性の違いも含め、検討が必要であると考えられる。また、この HMPA の各組織への分布・蓄積挙動は、ferulic acid[155]や resveratrol[156]と類似する結果であった。次いで、臓器中 HMPA およびその抱合体の蓄積量を算出した結果、HMPA 抱合体は未抱合体と同程度のレベルで肝臓や心臓、肺、腎臓に蓄積することが判明した (HMPA、 38.0 ± 13.8 nmol ; HMPA-S、 36.2 ± 6.3 nmol ; HMPA-GlcA、 2.7 ± 1.6 nmol) (**Table 3-2**)。このことから、HMPA は抱合体としても各臓器で機能を発現する可能性が示唆される。ポリフェノール抱合体の動物組織での機能発現の一例として、ferulic

acid の硫酸抱合体 (ferulic acid-4-*O*-sulfate) が可溶性 guanylate cyclase を活性化させてマウスの血管弛緩を誘導すること [22]、quercetin のグルクロン酸抱合体 (quercetin-3-glucuronide) が海馬でのアミロイド β の蓄積と Tau のリン酸化を抑制し、アルツハイマー型マウスの認知機能を改善させること [32]などが報告されている。HMPA は ferulic acid と同様に MCTs を介して取り込まれる可能性が高いが [157]、MCTs の透過性は LogP 値に依存するため [158]、HMPA 抱合体の MCTs との親和性は高くはなく、HMPA とは異なる輸送体を介して取り込まれると考えられる (LogP:HMPA、1.4 ; HMPA-S、0.16 ; HMPA-GlcA、-0.45)。Wong らは有機アニオントランスポーター (OAT) 1 と OAT3 がフラボノイド抱合体 (硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体) の取り込みに関与する可能性を示し [159]、さらに OAT4 が HMPA-S およびその類似化合物の (グルクロン酸抱合体ではなく) 硫酸抱合体特異的に透過に関与することを明らかにしている [160]。Patel らもまた、resveratrol-3-sulfate が OATP1B3 を介して細胞内へ取り込まれることを報告している [131]。これらの報告を考慮すると、硫酸抱合体は OATs を介した取り込み、あるいは排出が生じている可能性が高いと考えられる。また、分子ドッキングシミュレーションによって、phloridzin のグルクロン酸抱合体は未抱合体以上に SGLT1/2 と良好な結合性を示すことが報告され [161]、糖類の輸送体が抱合基を認識して HMPA 抱合体の取り込みに関与する可能性も期待される。細胞内で合成された抱合体が細胞外へ排出される経路は様々明らかになりつつある一方で、細胞外に存在する抱合体を細胞内へ取り込む経路については未だ不明な点が多いようである [162]。Table 1-4 に示したように、ポリフェノール抱合体の生理活性が複数明らかになり、体内でのポリフェノールの作用本体として期待が高いものの、ポリフェノール抱合体が臓器内部へ到達していることを確認した報告は少ない [62]。ゆえに本検討結果は、*in vivo* でのポリフェノール抱合体の生理作用を裏付ける重要な知見であるといえる。血液サンプルと同様に、O'Neill

らの報告[151]をもとに標的臓器中の HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の蓄積量を算出したところ、HMPA は総蓄積量 38.0 ± 13.8 nmol (肝臓、 13.9 ± 8.8 nmol；心臓、 0.98 ± 0.40 nmol；肺、 0.28 ± 0.06 nmol；腎臓、 22.9 ± 5.1 nmol) HMPA-S は総蓄積量 36.2 ± 6.3 nmol (肝臓、 15.5 ± 7.8 nmol；心臓、 0.61 ± 0.24 nmol；肺、 0.97 ± 0.52 nmol；腎臓、 19.2 ± 3.8 nmol)、HMPA-GlcA は総蓄積量 2.7 ± 1.6 nmol (肝臓、 1.2 ± 1.1 nmol；心臓、 0.02 ± 0.00 nmol；肺、 0.02 ± 0.01 nmol；腎臓、 1.5 ± 0.6 nmol) であった (**Table 3-2**、**Figure 3-6B**)。これらは経口投与量 (10 mg/kg-B.W.、13,274 nmol/260 g-平均体重) の 0.58% に相当する。前項 3.2 で算出した血中含量を加味すると、HMPA 10 mg/kg-B.W. (13,274 nmol/260 g-平均体重) を経口投与した場合、HMPA の総吸収量は投与量の >1.2% (Sprague-Dawley 系ラットでの総量、 159.5 ± 11.8 nmol；血漿中の総量、 82.5 ± 14.3 nmol；標的臓器 (血管、筋肉を除く) 中の総量、 77.0 ± 11.8 nmol) であると算出される。この吸収率はモノフェノール酸類である caffeic acid (0.1% [163]) や ferulic acid (1.4% [164])、chlorogenic acid (0.05% [165]) と同程度である。なお、吸収量算出の際、その総重量の把握が困難であることから血管および筋肉は除外したが、HMPA およびその代謝物は、他の標的臓器の中でも当該臓器に比較的蓄積しやすい (**Table 3-2**)。ラットの総筋肉重量は体重の 45% に相当するという Horbach らの報告[166]を考慮すると HMPA およびその代謝物の臓器蓄積量値は今回の算出値よりも高いと期待できる (筋肉中の総量、181 nmol (HMPA、115.5 nmol；HMPA-S、61.9 nmol；HMPA-GlcA、3.5 nmol)；HMPA 総吸収率 (筋肉を含む)、 $\geq 2.6\%$)。また、既報においても HMPA によるグルコース取り込み促進効果[142]や糖代謝改善効果[167]が認められていることから、HMPA およびその代謝物の筋肉組織における糖代謝制御への関与が期待される。既報の HMPA による健康機能 (抗糖尿病作用[142]や抗肥満作用[143]、神経保護作用[168]など) を考慮すると、本研究で明らかとなった HMPA 代謝物の吸収・代謝・

組織蓄積動態は、各臓器局所的な HMPA の生理機能発現を示唆する結果であり、さらなる検討が求められる。

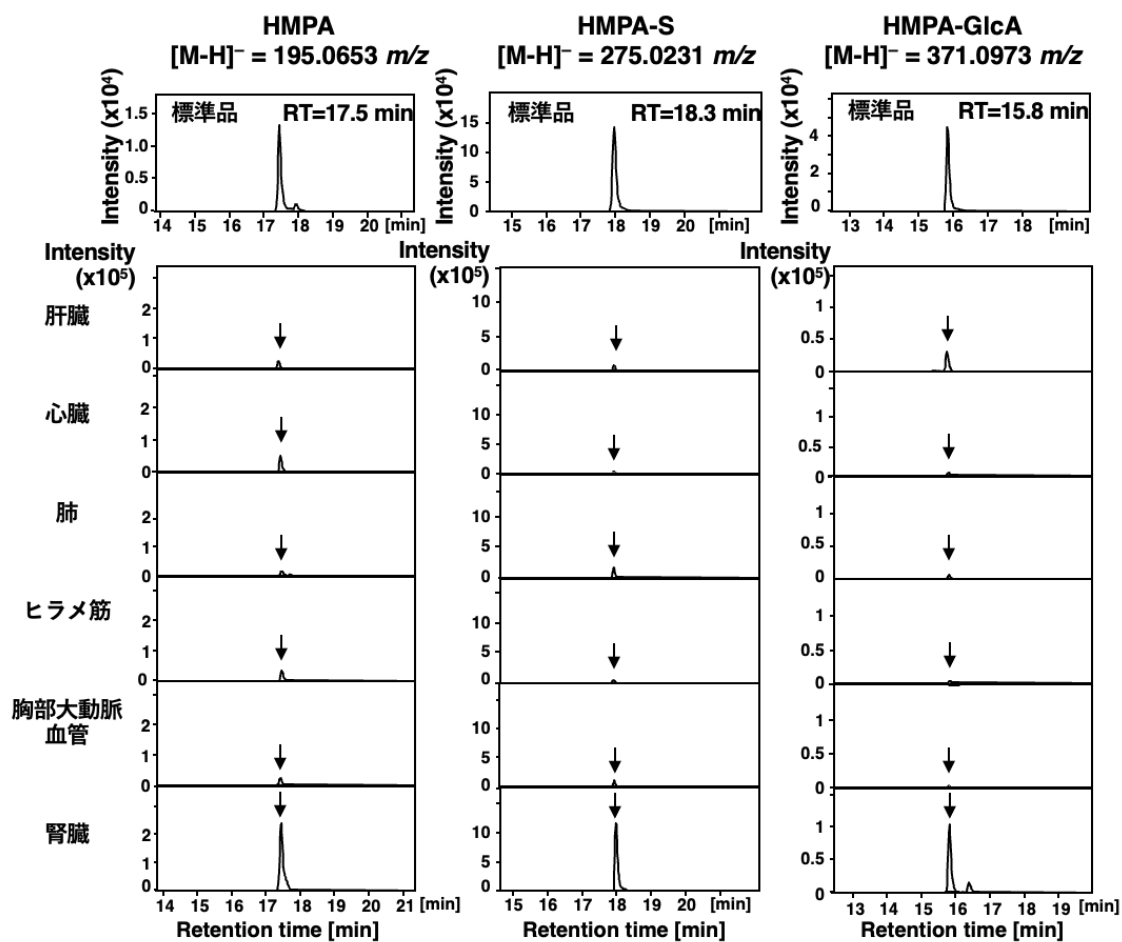


Figure 3-4 標的臓器中 HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の LC-TOF/MS クロマトグラム (HMPA10 mg/kg-B.W. 経口投与後 15 min)

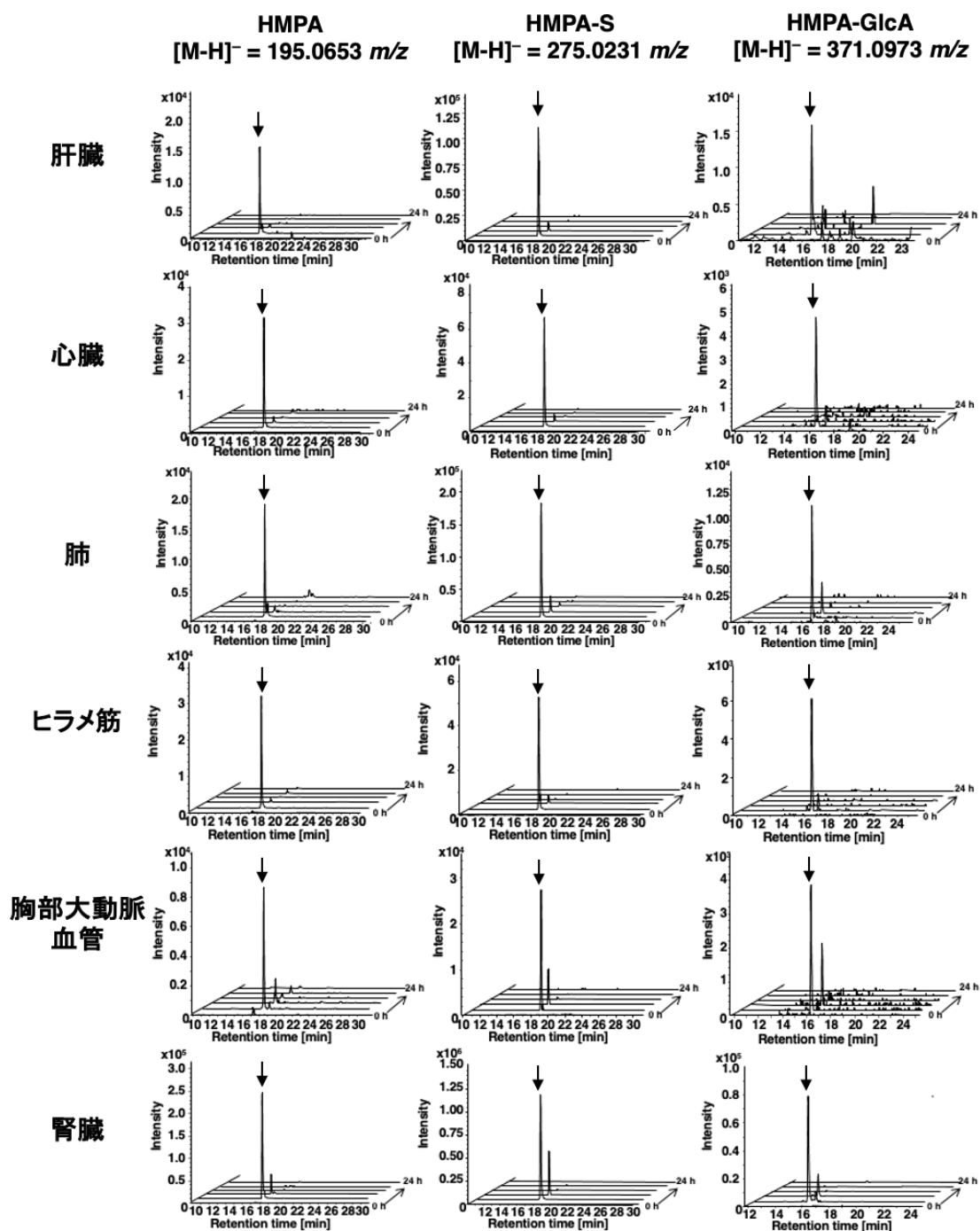


Figure 3-5 標的臓器における HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の経時 LC-TOF/MS クロマトグラム (HMPA10 mg/kg-B.W. 経口投与後 0, 0.25, 1, 2, 6, 24 h)

Table 3-2 Sprague-Dawley 系ラットにおける HMPA およびその代謝物（HMPA-S、HMPA-GlcA）の体内動態パラメーター ^a

		$C_{\max}$ nmol/mL-plasma or g-tissue	$T_{\max}$ h	$T_{1/2}$ h	AUC_{0-6h} nmol·h /mL-plasma or g-tissue	総蓄積量 nmol	吸収率 ^c %
HMPA							
	血漿 ^b	2.6 ± 0.4	0.25	0.40 ± 0.01	1.8 ± 0.3	31.5 ± 5.8	
	肝臓	1.6 ± 0.9	0.25	0.41 ± 0.04	1.0 ± 0.8	13.9 ± 8.8	
	心臓	0.78 ± 0.10	0.25	0.42 ± 0.03	0.65 ± 0.31	0.98 ± 0.40	
	肺	0.29 ± 0.06	0.25	0.44 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.28 ± 0.06	
	ヒラメ筋	0.96 ± 0.03	0.25	0.40 ± 0.02	0.57 ± 0.06	—	
	胸部大動脈血管	0.92 ± 0.34	0.25	0.43 ± 0.05	0.82 ± 0.48	—	
	腎臓	9.6 ± 1.9	0.25	0.40 ± 0.02	5.5 ± 1.5	22.9 ± 5.1	
	合計					69.5 ± 13.8	0.52 ± 0.10
HMPA-S							
	血漿	3.6 ± 0.9	0.25	0.44 ± 0.01	2.9 ± 0.6	46.3 ± 10.7	
	肝臓	1.8 ± 0.9	0.25	0.46 ± 0.10	1.2 ± 0.4	15.5 ± 7.8	
	心臓	0.30 ± 0.09	0.25	0.47 ± 0.03	0.43 ± 0.15	0.61 ± 0.24	
	肺	0.80 ± 0.18	0.25	0.92 ± 0.67	0.83 ± 0.16	0.97 ± 0.52	
	ヒラメ筋	0.33 ± 0.09	0.25	0.41 ± 0.02	0.31 ± 0.10	—	
	胸部大動脈血管	0.62 ± 0.35	0.25	0.66 ± 0.38	0.52 ± 0.26	—	
	腎臓	6.1 ± 2.6	0.25	0.47 ± 0.03	5.4 ± 1.2	19.2 ± 3.8	
	合計					82.5 ± 6.3	0.62 ± 0.05

Table 3-2 (続き)

	$C_{\max}$ nmol/mL-plasma or g-tissue	$T_{\max}$ h	$T_{1/2}$ h	AUC_{0-6h} nmol·h /mL-plasma or g-tissue	総蓄積量 nmol	吸収率 ^c %
HMPA-GlcA						
血漿	0.55 ± 0.09	0.25	0.42 ± 0.02	0.28 ± 0.05	4.7 ± 1.0	
肝臓	0.14 ± 0.13	0.25	0.58 ± 0.17	0.10 ± 0.07	1.2 ± 1.1	
心臓	0.01 ± 0.01	0.25	0.38 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	
肺	0.02 ± 0.01	0.25	0.53 ± 0.14	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	
ヒラメ筋	0.03 ± 0.02	0.25	0.38 ± 0.00	0.02 ± 0.01	—	
胸部大動脈血管	0.03 ± 0.02	0.25	0.66 ± 0.32	0.03 ± 0.01	—	
腎臓	0.62 ± 0.23	0.25	0.41 ± 0.02	0.37 ± 0.13	1.5 ± 0.6	
合計					7.4 ± 1.6	0.06 ± 0.01
HMPA と HMPA 抱合体 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の総蓄積量および総吸収率					159.5 ± 11.8	1.2 ± 0.1

^a すべての値は平均値 ± SD ($n = 3$) で示している。^b 全血漿量は Bijsterbosch ら[152]の式を参考に算出した (10.106 mL/260 g-平均体重)。^c 吸収率 (%) は HMPA の経口投与量に基づき、HMPA モル当量として算出した (10 mg/kg-B.W.、13,274 nmol/260 g-平均体重)。

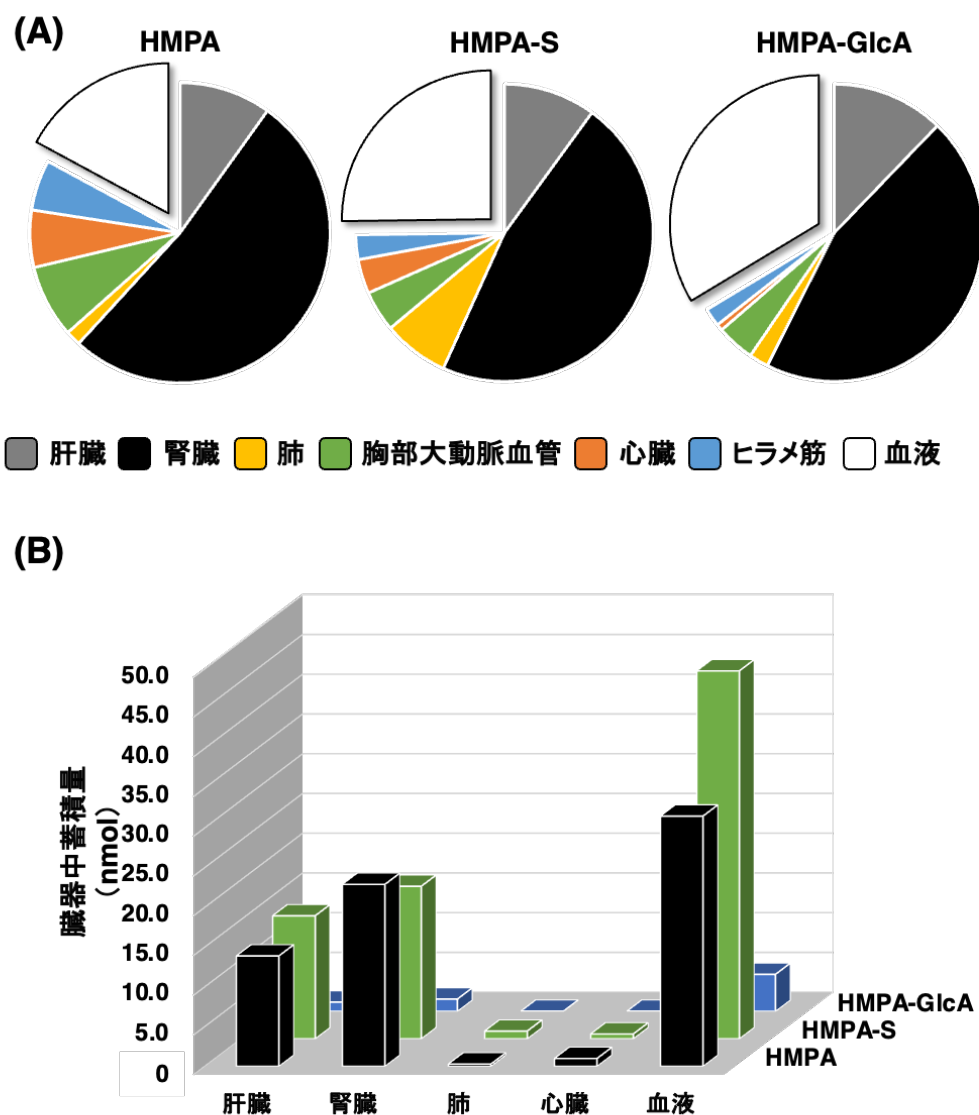


Figure 3-6 標的臓器および血液における HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の蓄積量 (HMPA10 mg/kg-B.W. 経口投与後 0-6 h)

(A) 各臓器と血液における HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) 存在比 (AUC_{0-6h} [nmol h/mL or g]) (B) 各臓器と血液における HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) の総蓄積量 (nmol)

第 4 節 小括

本章では、LC-TOF/MS を駆使して、生理活性フラボノイド類の腸内細菌代謝物である HMPA の経口投与後の体内動態（吸収、代謝、蓄積）を評価した（Figure 3-7）。

HMPA の予測代謝物スクリーニングの結果、HMPA は未抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体として体内を循環し、脱メチル/メチル化反応はほとんど生じないことが明らかとなった。次いで、HMPA 代謝物の血中濃度の経時変化を評価したところ、HMPA は未抱合体と抱合体ともに、経口投与後 15 min において最大血中濃度に達した。このことから、HMPA は経口投与後迅速に吸収および代謝されることが示され、それらの血中 AUC_{0-6 h} 値から、HMPA は抱合体として優勢的に体内を循環することが明らかとなった（HMPA、36% (1.8 ± 0.3 nmol·h/mL-plasma) ; HMPA-S、59% (2.9 ± 0.6 nmol·h/mL-plasma) ; HMPA-GlcA、5% (0.28 ± 0.05 nmol·h/mL-plasma))。また、代表的な循環系臓器中の HMPA ならびにその代謝物を測定したところ、全ての臓器から HMPA 未抱合体、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体が検出され、その臓器中動態は血中と同様であった。さらに、その臓器蓄積量は HMPA 未抱合体と抱合体が同程度（HMPA、 38.0 ± 13.8 nmol ; HMPA-S、 36.2 ± 6.3 nmol ; HMPA-GlcA、 2.7 ± 1.6 nmol）であり、経口投与量に対する HMPA の総吸収率は>1.2%であった。

以上から、HMPA は経口投与後迅速に吸収および代謝を受け、未抱合体および抱合体として広く臓器中に分布・蓄積する、体内利用性の高い化合物であることが明らかとなった。また、HMPA が抱合体として臓器に蓄積するという知見は、ポリフェノール代謝物であっても生体での機能性発現に関わっていることを示唆するものであった。

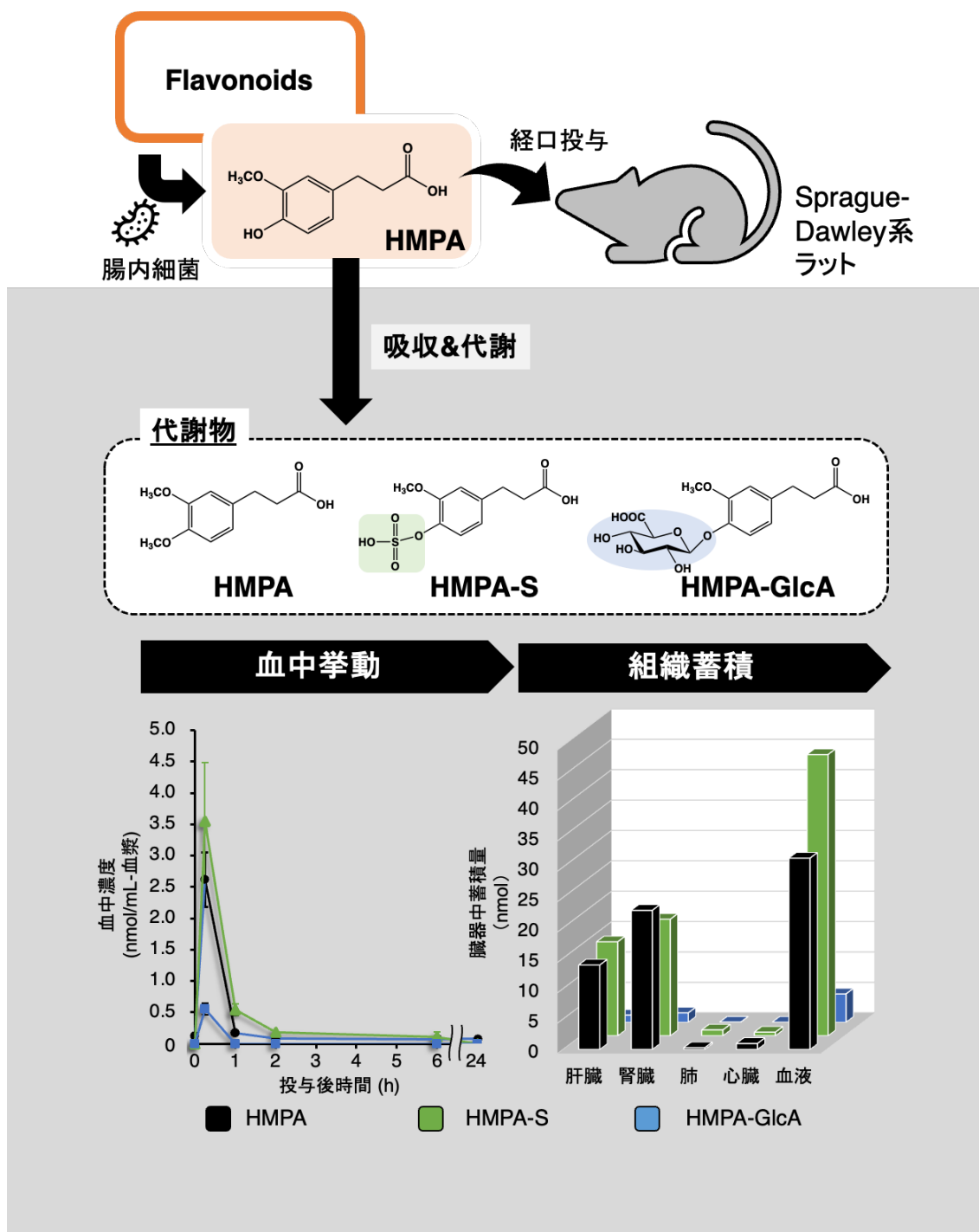


Figure 3-7 Sprague-Dawley 系ラットにおける HMPA の体内動態

第4章 総括

日本人の平均的な生物学的寿命と健康寿命の間には約 10 年の差があり、それによって社会保障予算が急増している。これは、社会構造維持のための喫緊の課題であり、健康寿命の延伸はその有効な解決法の一つと考えられる。生活習慣病の予防は健康寿命の延伸に最重要であり、日常的に摂取可能な健康機能性食品は、その有効な手段として期待される。

ポリフェノールは、135 件の特定保健用食品の関与成分として認可されている、よく知られた機能性食品成分の一つである。抗酸化作用や抗炎症作用を有し、生活習慣病（がん、糖尿病、高血圧、肥満など）の予防効果や改善効果も多数報告されている。しかしながら、ポリフェノールは体内で代謝を受けて化学構造が変化するため、その作用本体は不明なままとなっている。近年では、代謝系臓器で抱合化されたポリフェノールや、腸内細菌から代謝分解を受けたポリフェノールが、健康機能性を有することが明らかになっている。また、植物体中存在するポリフェノールが環境ストレスに曝された際に代謝産生される抗菌物質フィトアレキシンにもポリフェノールと同様に健康機能性が見出されている。これら「ポリフェノール代謝物」は食事由来ポリフェノールの健康機能関与成分として期待される。

他方、MS（質量分析法）は化合物イオンの質量（と電荷）に基づいた分離が可能な検出法である。そのため、多数の化合物種が混在するサンプルへの利用性が高く、生体サンプル中の機能性成分の分析に汎用されている。分離特性によって様々な MS が開発されているが、とりわけ、検出対象の網羅性が高い TOF/MS と、化合物の固体サンプルでの分布情報を提供できる MALDI-MSI は、ポリフェノールの生体内挙動の分析に活用例が多い。したがって、これら MS の活用は、「ポリフェノール代謝物」の生体内あるいは植物体内挙動の解明に有用であると考えられる。

以上の背景から、本研究では環境ストレス応答によって植物体で産生されるポリフェノール代謝物であるグリセオリン類と、フラボノイド類の経口摂取後に消化管と腸内細菌によって産生されるポリフェノール代謝物である HMPA を対象に、MS を駆使した組織蓄積挙動の分析化学的評価を行った。本研究の概要を以下に列記する。

第 2 章 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析イメージング法を駆使した、フラボノイド代謝物のダイズ種子中での産生挙動

グリセオリン類はダイズに含まれるフィトアレキシンの一種であり、イソフラボン daidzein のプレニル化代謝によって生じる。グリセオリン類は、乳がんの増殖抑制作用や抗糖尿病作用を示すことが報告されている有望な機能性ポリフェノール代謝物であるが、通常ダイズの含有量は極めて少ない (<0.05 mg/g-seed)。これまでに菌体感作による産生促進が試みられ、産生に関与する酵素反応については解明が進んでいる一方で、ダイズでの産生挙動には不明な点が多い。そこで、サンプル中ポリフェノールの分布情報を獲得可能な MALDI-MSI を活用し、菌体感作した発芽ダイズ組織でのグリセオリン類の産生挙動の可視化評価を行った。

ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr., Yukipirika) を発芽後 3 日目から 6 日目まで *A. oryzae* で感作し、測定サンプルとした。まず、感作前後のダイズの 70%EtOH 抽出液を UPLC-PDA 分析に供し、検出されたイソフラボン類およびグリセオリン類を内標準法 (内標準、biochanin A) によって定量した。その結果、*A. oryzae* 非感作ダイズと *A. oryzae* 感作ダイズからは共通して malonyldaidzin、malonylgenistin、daidzin、genistin、daidzein に該当するピークが検出され、*A. oryzae* 感作ダイズでは加えて glyceollin I、glyceollin II、glyceollin III に該当するピークが検出された。このことから、グリセオリン類 (glyceollin I, II, III) は *A. oryzae* 感作によって産生が促進されることが確認され、これまでに報告されている

glyceollin IV, V, VI の産生量は僅かであることが明らかとなった。さらに、*A. oryzae* 感作によってイソフラボン類の含有量が増大していたことから、グリセオリン類の産生増大には前駆体イソフラボン類の産生促進が関与する可能性が示唆された。

次いで、発芽ダイズサンプルの切片を MALDI-MSI に供し、前駆体イソフラボン daidzein ($[M-H]^- = 253.0\ m/z$) と glyceollins I/II/III ($[M-H]^- = 337.1\ m/z$) を測定した。その結果、daidzein はダイズ種子および根全体で検出された一方で、glyceollins I/II/III は *A. oryzae* 感作ダイズでのみダイズ種子および根の表面限定的に検出された。熱処理によって不活化した *A. oryzae* で処理したダイズでも、活性 *A. oryzae* 感作したダイズと同様に種子表面限定的なグリセオリン類の産生が認められたことから、イソフラボン daidzein からグリセオリン類への代謝変換は、ダイズ表面への *A. oryzae* 接触がトリガーとなり、その産生部位は菌体接触領域に限られることが判明した。また、不活性 *A. oryzae* 感作ダイズの根ではグリセオリン類の産生が認められなかったことから、種子でイソフラボン類から代謝産生されたグリセオリン類は根へ移行せず、グリセオリン類は種子と根の細胞それぞれで代謝産生されることが明らかとなった。さらに、活性/不活性 *A. oryzae* 処理間で認められた glyceollin I, II, III 産生量の差から、*A. oryzae* は菌体壁成分以外のエリシターを合成、分泌している可能性も示された。

以上をまとめると、*A. oryzae* を感作した発芽ダイズではグリセオリン類 (glyceollin I, II, III) の産生が促進されるが、それには前駆体であるイソフラボン類の産生促進が関係する可能性がある。しかしながら、daidzein は *A. oryzae* 感作ダイズの種子および根の全体で検出され、glyceollins I/II/III はその表面でのみ検出されたことから、グリセオリン類の産生に関与する下流の代謝酵素が *A. oryzae* 感作によって表皮局所的に発現あるいは活性化が促進される可能性が考えられた。さらに、不活性 *A. oryzae* 感作によっても種子の表面に限定的な glyceollins I/II/III の産生促進が認められたことから、ダイズは表皮受容体 (β -

glucan 結合性、chitin 結合性) を介して *A. oryzae* 接触を認識し、種子全体のイソフラボン産生と菌体接触領域に限定的なグリセオリン類の産生を誘導することが示唆された。

第3章 エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析法を駆使した、フラボノイド代謝物のラットでの生体利用性

HMPA はフラボノイド類 (hesperidin、curcumin、anthocyanin など) から腸内細菌によって代謝産生されるモノフェノール酸である。HMPA が抗肥満作用や糖代謝改善作用などの健康機能を示すことが報告され、前駆体フラボノイド類の健康機能にも寄与する可能性が考えられる。しかしながら、このポリフェノール代謝物の体内動態 (吸収・代謝・蓄積) は不明なままである。そこで、ポリフェノールの ADME (absorption (吸収)、distribution (分布)、metabolism (代謝)、excretion (排出)) 分析に汎用される TOF/MS を活用して、HMPA 経口投与後の臓器組織での挙動評価を行った。

8 週齢雄性 Sprague-Dawley 系ラットに 10 mg/kg-B.W. の HMPA を経口投与し、経口投与後の各タイムポイント (0、0.25、1、2、6、24 h) にて全血採血および屠殺し、全身灌流 (PBS 100 mL) 後に標的臓器 (肝臓、心臓、肺、ヒラメ筋、胸部大動脈、腎臓) を摘出した。

HMPA の経口投与後に産生される代謝物を明らかにするため、予測代謝物 (HMPA、HMPA-S、HMPA-GlcA、HMPA-Me、DHCA、DHCA-S、DHCA-GlcA、DHCA-S-S、DHCA-GlcA-GlcA、DHCA-S-GlcA) の m/z 値 ($[M-H]^-$ として) をもとにスクリーニングを行った。その結果、血漿中 ($T_{\max} = 0.25$ h) からは HMPA ($[M-H]^- = 195.0653$ m/z)、HMPA-S ($[M-H]^- = 275.0231$ m/z)、HMPA-GlcA ($[M-H]^- = 371.0973$ m/z) のみが検出された。各 HMPA 代謝物の経時的な血漿中濃度を定量したところ、それぞれの最大血中濃度およびその時間 ($C_{\max}$ [nmol/mL-plasma]、 $T_{\max}$ [h]) は HMPA-S ($C_{\max} = 3.5 \pm 0.9$ 、 $T_{\max} = 0.25$)、HMPA ($C_{\max} = 2.6$

± 0.4 、 $T_{\max}=0.25$)、HMPA-GlcA ($C_{\max}=0.55 \pm 0.09$ 、 $T_{\max}=0.25$) であった。また、 AUC_{0-6h} をもとにその血中存在比を算出した結果、HMPA-S (59%) > HMPA (36%) > HMPA-GlcA (5%) の順であった。したがって、HMPA は経口投与後迅速に吸収・代謝され、主に抱合体として体内を循環することが明らかとなった。この体内挙動は類似化合物である *ferulic acid* と一致するため、*ferulic acid* と同様に経口投与後の HMPA は胃や小腸に発現する MCTs を介して取り込まれる可能性が高いと考えられる。

臓器中の HMPA 代謝物を測定した結果、全ての標的臓器から HMPA ならびにその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) が検出された。それぞれの経時挙動を調査したところ、HMPA およびその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) は経口投与後 6 h まで臓器中に存在し、同様の臓器蓄積挙動を示すことが判明した (AUC_{0-6h} 、腎臓>肝臓>血管>心臓>ヒラメ筋>肺)。ポリフェノール抱合体が各臓器中に蓄積するという結果は、ポリフェノール抱合体由来の生理活性に関する報告 (例えば、*ferulic acid-4-O-sulfate* による血管弛緩誘導作用[22]、*quercetin-3-glucuronide* による認知改善作用[32]) を裏付ける重要な知見である。さらに、その臓器蓄積量は HMPA とその代謝物 (HMPA-S、HMPA-GlcA) が同程度 (HMPA、 38.0 ± 13.8 nmol ; HMPA-S、 36.2 ± 6.3 nmol ; HMPA-GlcA、 2.7 ± 1.6 nmol) であり、経口投与量に対する HMPA の総吸収率は>1.2%であった。

以上をまとめると、HMPA は経口投与後迅速に吸収および代謝を受け、未抱合体と抱合体 (とりわけ、硫酸抱合体) として体内を循環することが明らかになった。さらに、HMPA およびその抱合体 (HMPA-S、HMPA-GlcA) は広く循環系臓器に分布し、いずれの形態としても臓器に蓄積していたことから、抱合体としての作用発現が大いに期待できる。

以上、本研究では MS を駆使して、ポリフェノール代謝物の植物体あるいは生体における組織蓄積挙動を分析化学的側面から評価した。本研究によって明

らかとなった麴菌感作ダイズにおけるグリセオリン類の局所産生は、グリセオリン類を豊富に含む高機能ダイズ開発の指針となる知見である。また、本研究によって明らかとなった HMPA の生体利用性は、8,000 種存在するとされるポリフェノールの生体内での作用の一端が分解物である HMPA によって担われている可能性を示唆しており、ポリフェノール科学におけるエポックメイキングとなる知見が予見される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、学部4年生の配属から6年間にわたり温かく、厳しいご指導・ご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 食料化学工学講座 食品分析学分野 松井利郎 教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究成果の取りまとめにあたり、貴重なお時間を頂きご指導、ご助言を賜りました九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 システム生物工学講座 生物機能デザイン分野 古屋茂樹 教授、ならびに研究活動全般にわたって貴重なお時間とご助言、多大なるお力添えをいただきました九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 食料化学工学講座 食品分析学分野 田中充 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究遂行のための研究環境構築に格別のご配慮をいただきました東北大学未来科学技術共同研究センター 宮澤陽夫 名誉教授並びに宮澤大樹 特任准教授、食品免疫機能分析学寄附講座 宮崎義之 准教授、食品分析学研究室 里山俊哉 先生、坂野新太 助教、坂井研太 助教(現 横浜薬科大学 助教)、椛島真里さん、宮崎香織さんならびに所属学生の皆様に心より感謝申し上げます。

数多の研究技術と知識を授けていただき、ここまでの研究機会を与えて下さった大野直土さん、Li Baorui さん、Huang Shu-Wei さん、Alexia Marie Jeannine Nectoux さん、Gao Guanzhen さん、高尾和宏さん、Ye Zhang さん、ならびに本研究遂行に多大なるご助力をいただきました相馬彩乃さん、Tint Nini Tun さんに心より御礼申し上げます。また、研究生活のあらゆる側面において支えていただいた小嶋海花さん、竹下智尊さん、橋本鞠香さんに感謝いたします。

最後に、両親に代わり育て、見守り、応援してくださった祖父母と兄妹に心より感謝いたします。

参考文献

- [1] Teleki A, Hitzfeld A, Eggersdorfer M. 100 years of vitamins: the science of formulation is the key to functionality. *KONA Powder and Particle Journal*. 2013;30: 144–163.
- [2] Rusznyák ST, Szent-györgyi A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature*. 1936;138(3479): 27.
- [3] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 1992;339(8808): 1523–1526.
- [4] Frankel EN, German JB, Kinsella JE, Parks E, Kanner J. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*. 1993;341(8843): 454–457.
- [5] Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AAE, Bertelli A, Das DK. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(1): 160–169.
- [6] Kumar A, Nirmal P, Kumar M, Jose A, Tomer V, Oz E, *et al*. Major phytochemicals: recent advances in health benefits and extraction method. *Molecules*. 2023;28(2): 887.
- [7] Campos-Vega R, Oomah BD. Chemistry and classification of phytochemicals. *In: Handbook of Plant Food Phytochemicals* 2013: pp 5–48.
- [8] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998;56(11): 317–333.
- [9] Hazafa A, Rehman KU, Jahan N, Jabeen Z. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. *Nutrition and Cancer*. 2020;72(3): 386–397.

- [10] Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 2019;299: 125124.
- [11] Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, *et al.* Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014;25(1): 1–18.
- [12] Dinda B, Dinda M, Roy A, Dinda S. Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2020;120: 159–235.
- [13] Guo J, Li K, Lin Y, Liu Y. Protective effects and molecular mechanisms of tea polyphenols on cardiovascular diseases. *Frontiers in Nutrition*. 2023;10: 1202378.
- [14] Williamson G, Kay CD, Crozier A. The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: a review from a historical perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(5): 1054–1112.
- [15] Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-*O*-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;469(2): 209–219.
- [16] Forester SC, Choy YY, Waterhouse AL, Oteiza PI. The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-*O*-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Molecular Carcinogenesis*. 2014;53(6): 432–439.
- [17] Lee G, Na HJ, Namkoong S, Jeong Kwon H, Han S, Ha KS, *et al.* 4-*O*-Methylgallic acid down-regulates endothelial adhesion molecule expression by inhibiting NF- κ B-DNA-binding activity. *European Journal of Pharmacology*. 2006;551(1): 143–151.

- [18] Hu W, Wang X, Wu L, Shen T, Ji L, Zhao X, *et al.* Apigenin-7-*O*- β -D-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock. *Food & Function*. 2016;7(2): 1002–1013.
- [19] Ma Q, Zhang XM, Jiang JG, Zhu W. Apigenin-7-*O*- β -D-glucuronide inhibits modified low-density lipoprotein uptake and foam cell formation in macrophages. *Journal of Functional Foods*. 2017;35: 615–621.
- [20] González-Manzano S, Dueñas M, Surco-Laos F, Hidalgo M, González-Paramas A, Santos-Buelga C, *et al.* *In vitro* evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activities of sulphated metabolites of catechins. *CyTA - Journal of Food*. 2011;9(4): 257–264.
- [21] Delgado L, Fernandes I, González-Manzano S, de Freitas V, Mateus N, Santos-Buelga C. Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food & Function*. 2014;5(4): 797–803.
- [22] Van Rymenant E, Van Camp J, Pauwels B, Boydens C, Vanden Daele L, Beerens K, *et al.* Ferulic acid-4-*O*-sulfate rather than ferulic acid relaxes arteries and lowers blood pressure in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017;44: 44–51.
- [23] López de las Hazas MC, Godinho-Pereira J, Macià A, Almeida AF, Ventura MR, Motilva MJ, *et al.* Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: protective potential in neuronal cells. *Journal of Functional Foods*. 2018;46: 110–117.
- [24] Serreli G, Melis MP, Corona G, Deiana M. Modulation of LPS-induced nitric oxide production in intestinal cells by hydroxytyrosol and tyrosol metabolites: insight into the mechanism of action. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;125: 520–527.

- [25] Houghton MJ, Kerimi A, Mouly V, Tumova S, Williamson G. Gut microbiome catabolites as novel modulators of muscle cell glucose metabolism. *FASEB Journal*. 2019;33(2): 1887–1898.
- [26] Ha SK, Lee JA, Cho EJ, Choi I. Effects of catechol *O*-methyl transferase inhibition on anti-inflammatory activity of luteolin metabolites. *Journal of Food Science*. 2017;82(2): 545–552.
- [27] Yang JH, Hsia TC, Kuo HM, Chao PDL, Chou CC, Wei YH, *et al*. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006;34(2): 296–304.
- [28] Wang Z, Xue C, Wang X, Zeng M, Wang Z, Chen Q, *et al*. Quercetin 3-*O*-glucuronide-rich lotus leaf extract promotes a brown-fat-phenotype in C₃H₁₀T_{1/2} mesenchymal stem cells. *Food Research International*. 2023;163: 112198.
- [29] Shirai M, Yamanishi R, Moon JH, Murota K, Terao J. Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002;66(5): 1015–1021.
- [30] Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, *et al*. Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;293(5): 1458–1465.
- [31] Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Ohnishi S, Motobayashi Y, Kawazoe K, Hamano S, *et al*. Quercetin glucuronide inhibits cell migration and proliferation by platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2009;109(2): 257–264.

- [32] Xu M, Huang H, Mo X, Zhu Y, Chen X, Li X, *et al.* Quercetin-3-*O*-glucuronide alleviates cognitive deficit and toxicity in A β ₁₋₄₂-induced AD-like mice and SH-SY5Y cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2021;65(6): 2000660.
- [33] Suri S, Liu XH, Rayment S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, *et al.* Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *British Journal of Pharmacology*. 2010;159(3): 566–575.
- [34] Wu Q, Needs PW, Lu Y, Kroon PA, Ren D, Yang X. Different antitumor effects of quercetin, quercetin-3'-sulfate and quercetin-3-glucuronide in human breast cancer MCF-7 cells. *Food & Function*. 2018;9(3): 1736–1746.
- [35] Miksits K, Svoboda M, Kunert O, Haslinger E, Thalhammer T, Szekeres T, *et al.* Antitumor activity of resveratrol and its sulfated metabolites against human breast cancer cells. *Planta Medica*. 2009;75(11): 1227–1230.
- [36] Polycarpou E, Meira LB, Carrington S, Tyrrell E, Modjtahedi H, Carew MA. Resveratrol 3-*O*-D-glucuronide and resveratrol 4'-*O*-D-glucuronide inhibit colon cancer cell growth: evidence for a role of A3 adenosine receptors, cyclin D1 depletion, and G1 cell cycle arrest. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013;57(10): 1708–1717.
- [37] Falomir E, Lucas R, Peñalver P, Martí-Centelles R, Dupont A, Zafra-Gómez A, *et al.* Cytotoxic, antiangiogenic and antitelomerase activity of glucosyl- and acyl- resveratrol prodrugs and resveratrol sulfate metabolites. *ChemBioChem*. 2016;17(14): 1343–1348.
- [38] Aires V, Limagne E, Cotte AK, Latruffe N, Ghiringhelli F, Delmas D. Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013;57(7): 1170–1181.

- [39] Giménez-Bastida JA, González-Sarriás A, Larrosa M, Tomás-Barberán F, Espín JC, García-Conesa MT. Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF- α -induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2012;56(5): 784–796.
- [40] Sala R, Mena P, Savi M, Brighenti F, Crozier A, Miragoli M, *et al.* Urolithins at physiological concentrations affect the levels of pro-inflammatory cytokines and growth factor in cultured cardiac cells in hyperglucidic conditions. *Journal of Functional Foods*. 2015;15: 97–105.
- [41] Müller KO, Borger H. Experimentelle untersuchungen über die phytophthorainfestans-resistenz der kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft*. 1940;23: 189–231.
- [42] Kodama O, Miyakawa J, Akatsuka T, Kiyosawa S. Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*. 1992;31(11): 3807–3809.
- [43] Hasegawa M. Structural diversity of phytoalexins. *Kagaku to Seibutsu*. 2017;55(8): 547–552.
- [44] Wood CE, Boue SM, Collins-Burow BM, Rhodes L V, Register TC, Cline JM, *et al.* Glyceollin-elicited soy protein consumption induces distinct transcriptional effects as compared to standard soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(1): 81–86.
- [45] Park S, Ahn IS, Kim JH, Lee MR, Kim JS, Kim HJ. Glyceollins, one of the phytoalexins derived from soybeans under fungal stress, enhance insulin sensitivity and exert Insulinotropic actions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(3): 1551–1557.

- [46] Hahn MG, Bonhoff A, Grisebach H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiology*. 1985;77(3): 591–601.
- [47] Moesta P, Grisebach H. Investigation of the mechanism of glyceollin accumulation in soybean infected by *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1981;212(2): 462–467.
- [48] Classen D, Ward EWB. Temperature-induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: production and activity of elicitors of glyceollin. *Physiological Plant Pathology*. 1985;26(3): 289–296.
- [49] Yoshikawa M, Yamauchi K, Masago H. Biosynthesis and biodegradation of glyceollin by soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Physiological Plant Pathology*. 1979;14(2): 157–169.
- [50] Abbasi PA, Graham MY, Graham TL. Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2001;59(2): 95–105.
- [51] Graham MY, Graham TL. Wound-associated competency factors are required for the proximal cell responses of soybean to the *Phytophthora sojae* wall glucan elicitor. *Plant Physiology*. 1994;105(2): 571–578.
- [52] Kalli S, Araya-Cloutier C, Lin Y, de Bruijn WJC, Chapman J, Vincken JP. Enhanced biosynthesis of the natural antimicrobial glyceollins in soybean seedlings by priming and elicitation. *Food Chemistry*. 2020;317: 126389.
- [53] Aisyah S, Gruppen H, Madzora B, Vincken JP. Modulation of isoflavonoid composition of *Rhizopus oryzae* elicited soybean (*Glycine max*) seedlings by

- light and wounding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(36): 8657–8667.
- [54] Kim HJ, Suh HJ, Kim JH, Park S, Joo YC, Kim JS. Antioxidant activity of glyceollins derived from soybean elicited with *Aspergillus sojae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(22): 11633–11638.
- [55] Boué SM, Shih FF, Shih BY, Daigle KW, Carter-Wientjes CH, Cleveland TE. Effect of biotic elicitors on enrichment of antioxidant properties and induced isoflavones in soybean. *Journal of Food Science*. 2008;73(4): H43–H49.
- [56] Yamamoto T, Sakamoto C, Tachiwana H, Kumabe M, Matsui T, Yamashita T, *et al*. Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through *Eleanor* non-coding RNA. *Scientific Reports*. 2018;8: 15202.
- [57] Yoshikawa M, Takeuchi Y, Horino O. A mechanism for ethylene-induced disease resistance in soybean: enhanced synthesis of an elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1990;37(5): 367–376.
- [58] Nwachukwu ID, Luciano FB, Udenigwe CC. The inducible soybean glyceollin phytoalexins with multifunctional health-promoting properties. *Food Research International*. 2013;54(1): 1208–1216.
- [59] 松井利郎, 松本清. 食品分析学. 2nd ed. 培風館; 2016.
- [60] Oesterle I, Braun D, Rompel A, Warth B. Quantifying up to 90 polyphenols simultaneously in human bio-fluids by LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*. 2022;1216: 339977.
- [61] Liu C, Vervoort J, Beekmann K, Baccaro M, Kamelia L, Wesseling S, *et al*. Interindividual differences in human intestinal microbial conversion of (–)-

- epicatechin to bioactive phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(48): 14168–14181.
- [62] Matsui T. Polyphenols-absorption and occurrence in the body system. *Food Science and Technology Research*. 2022;28(1): 13–33.
- [63] Tanaka M, Dohgu S, Komabayashi G, Kiyohara H, Takata F, Kataoka Y, *et al*. Brain-transportable dipeptides across the blood-brain barrier in mice. *Scientific Reports*. 2019;9: 5769.
- [64] Mallah K, Quanico J, Trede D, Kobeissy F, Zibara K, Salzet M, *et al*. Lipid changes associated with traumatic brain injury revealed by 3D MALDI-MSI. *Analytical Chemistry*. 2018;90(17): 10568–10576.
- [65] Ohnishi-Kameyama M, Yanagida A, Kanda T, Nagata T. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1997;11(1): 31–36.
- [66] Kim YH, Fujimura Y, Hagihara T, Sasaki M, Yukihiro D, Nagao T, *et al*. *In situ* label-free imaging for visualizing the biotransformation of a bioactive polyphenol. *Scientific Reports*. 2013;3(1): 2805.
- [67] Nguyen HN, Tanaka M, Komabayashi G, Matsui T. The photobase generator nifedipine as a novel matrix for the detection of polyphenols in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2016;51(10): 938–946.
- [68] Nguyen HN, Tanaka M, Li B, Ueno T, Matsuda H, Matsui T. Novel *in situ* visualisation of rat intestinal absorption of polyphenols via matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Scientific Reports*. 2019;9: 3166.

- [69] Dare AP, Günther CS, Grey AC, Guo G, Demarais NJ, Cordiner S, *et al.* Resolving the developmental distribution patterns of polyphenols and related primary metabolites in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fruit. *Food Chemistry*. 2022;374: 131703.
- [70] Tanaka M. 食品成分の体内吸収・代謝挙動評価技術. *Kagaku to Seibutsu*. 2023;61(1): 23–31.
- [71] Boué SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland TE. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(6): 2167–2172.
- [72] Eromosele O, Bo S, Ping L. Induction of phytochemical glyceollins accumulation in soybean following treatment with biotic elicitor (*Aspergillus oryzae*). *Journal of Functional Foods*. 2013;5(3): 1039–1048.
- [73] Kimpel JA, Kosuge T. Metabolic regulation during glyceollin biosynthesis in green soybean hypocotyls. *Plant Physiology*. 1985;77(1): 1–7.
- [74] Ziegler E, Pontzen R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceollin accumulation in soybeans by an extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. *Physiological Plant Pathology*. 1982;20(3): 321–331.
- [75] Bhattacharyya MK, Ward EWB. Biosynthesis and metabolism of glyceollin I in soybean hypocotyls following wounding or inoculation with *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1987;31(3): 387–405.
- [76] Yoshikawa M, Yamauchi K, Masago H. Glyceollin: its rôle in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Physiological Plant Pathology*. 1978;12(1): 73–82.

- [77] Ward E, Lazarovits G, Stössel P, Barrie S, Unwin C. Glyceollin production associated with control of *Phytophthora* rot of soybeans by the systemic fungicide metalaxyl. *Phytopathology*. 1980;70: 738–740.
- [78] Landini S, Graham MY, Graham TL. Lactofen induces isoflavone accumulation and glyceollin elicitation competency in soybean. *Phytochemistry*. 2003;62(6): 865–874.
- [79] Simons R, Vincken JP, Roidos N, Bovee TFH, Van Iersel M, Verbruggen MA, *et al.* Increasing soy isoflavonoid content and diversity by simultaneous malting and challenging by a fungus to modulate estrogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(12): 6748–6758.
- [80] Isaac IC, Johnson TJ, Berhow M, Baldwin EL, Karki B, Woyengo T, *et al.* Evaluating the efficacy of fungal strains to stimulate glyceollin production in soybeans. *Mycological Progress*. 2017;16(3): 223–230.
- [81] Hahm TH, Tanaka M, Nguyen HN, Tsutsumi A, Aizawa K, Matsui T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-guided visualization analysis of intestinal absorption of acylated anthocyanins in Sprague-Dawley rats. *Food Chemistry*. 2021;334: 127586.
- [82] Yamada S, Zaima N, Yoshimura Y, Inaba S, Fujimori T, Sogon T, *et al.* Visualization of the distribution of anthocyanin species in mice eyeball by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2018;32(5): 380–384.
- [83] Wang T, Lee HK, Yue GGL, Chung ACK, Lau CBS, Cai Z. A novel binary matrix consisting of graphene oxide and caffeic acid for the analysis of scutellarin and its metabolites in mouse kidney by MALDI imaging. *Analyst*. 2021;146(1): 289–295.

- [84] Jiao Y, Li X, Tang Y, Peng Y, Chen G, Wang X, *et al.* Distribution and metabolism of daidzein and its benzene sulfonates *in vivo* (in mice) based on MALDI-TOF MSI. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13: 918087.
- [85] Lorensen MDBB, Hayat SY, Wellner N, Bjarnholt N, Janfelt C. Leaves of cannabis sativa and their trichomes studied by DESI and MALDI mass spectrometry imaging for their contents of cannabinoids and flavonoids. *Phytochemical Analysis*. 2023;34(3): 269–279.
- [86] Berisha A, Dold S, Guenther S, Desbenoit N, Takats Z, Spengler B, *et al.* A comprehensive high-resolution mass spectrometry approach for characterization of metabolites by combination of ambient ionization, chromatography and imaging methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2014;28(16): 1779–1791.
- [87] Soares MS, da Silva DF, Forim MR, da Silva MF das GF, Fernandes JB, Vieira PC, *et al.* Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. *Phytochemistry*. 2015;115: 161–170.
- [88] Zaima N, Yoshimura Y, Kawamura Y, Moriyama T. Distribution of lysophosphatidylcholine in the endosperm of *Oryza sativa* rice. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2014;28(13): 1515–1520.
- [89] Enomoto H. Mass spectrometry imaging of flavonols and ellagic acid glycosides in ripe strawberry fruit. *Molecules*. 2020;25(20): 4600.
- [90] Enomoto H. Unique distribution of ellagitannins in ripe strawberry fruit revealed by mass spectrometry imaging. *Current Research in Food Science*. 2021;4: 821–828.
- [91] Zhao WH, Zhang YD, Shi YP. Visualizing the spatial distribution of endogenous molecules in wolfberry fruit at different development stages by matrix-assisted

- laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Talanta*. 2021;234: 122687.
- [92] Zhang Y, Takao K, Abe C, Sasaki K, Ochiai K, Matsui T. Intestinal absorption of prenylated isoflavones, glyceollins, in Sprague-Dawley rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(31): 8205–8211.
- [93] Zhang Y, Abe C, Ochiai K, Matsui T. Tissue distribution of orally administered prenylated isoflavones, glyceollins, in Sprague-Dawley rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(50): 15165–15174.
- [94] Kraus C, Spiteller G, Mithöfer A, Ebel J. Quantification of glyceollins in non-elicited seedlings of *Glycine max* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*. 1995;40(3): 739–743.
- [95] Valls RM, Pedret A, Calderón-Pérez L, Llauradó E, Pla-Pagà L, Companys J, *et al*. Hesperidin in orange juice improves human endothelial function in subjects with elevated blood pressure and stage 1 hypertension: a randomized, controlled trial (Citrus study). *Journal of Functional Foods*. 2021;85: 104646.
- [96] Gao G, Abe C, Nectoux AM, Huang SW, Miyata Y, Tanaka K, *et al*. Anti-hypertensive effect of hesperidin and hesperidin-containing fermented mikan tea in spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Technology Research*. 2020;26(6): 779–787.
- [97] Gao G, Nakamura S, Asaba S, Miyata Y, Nakayama H, Matsui T. Hesperidin preferentially stimulates transient receptor potential vanilloid 1, leading to NO production and Mas receptor expression in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022;70(36): 11290–11300.
- [98] Pereira-Caro G, Borges G, van der Hooft J, Clifford MN, Del Rio D, Lean MEJ, *et al*. Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2014;100(5): 1378–1384.

- [99] Fliegmann J, Mithöfer A, Wanner G, Ebel J. An ancient enzyme domain hidden in the putative β -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(2): 1132–1140.
- [100] Mithofer A, Fliegmann J, Neuhaus-Url G, Schwarz H, Ebel J. The hepta- β -glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biological Chemistry*. 2000;381(8): 705–713.
- [101] Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -glucan fragments from the rice blast disease fungus *pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell*. 2000;12(5): 817–826.
- [102] Ingham JL, Keen NT, Mulheirn LJ, Lyne RL. Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean. *Phytochemistry*. 1981;20(4): 795–798.
- [103] Yuk HJ, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Jang KC, Seo WD, Kim JY, *et al*. Pterocarpan profiles for soybean leaves at different growth stages and investigation of their glycosidase inhibitions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(23): 12683–12690.
- [104] Graham TL, Graham MY. Signaling in soybean phenylpropanoid responses (dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments). *Plant Physiology*. 1996;110(4): 1123–1133.
- [105] Sukumaran A, McDowell T, Chen L, Renaud J, Dhaubhadel S. Isoflavonoid-specific prenyltransferase gene family in soybean: *GmPT01*, a pterocarpan 2-dimethylallyltransferase involved in glyceollin biosynthesis. *Plant Journal*. 2018;96(5): 966–981.

- [106] Yoneyama K, Akashi T, Aoki T. Molecular characterization of soybean pterocarpin 2-dimethylallyltransferase in glyceollin biosynthesis: local gene and whole-genome duplications of prenyltransferase genes led to the structural diversity of soybean prenylated isoflavonoids. *Plant and Cell Physiology*. 2016;57(12): 2497–2509.
- [107] Ciesielski P, Metz P. Asymmetric one-pot transformation of isoflavones to pterocarpan and its application in phytoalexin synthesis. *Nature Communications*. 2020;11(1): 3091.
- [108] Zhang C, Wang X, Zhang F, Dong L, Wu J, Cheng Q, *et al*. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. *Scientific Reports*. 2017;7(1): 7242.
- [109] Hong SM, Tanaka M, Yoshii S, Mine Y, Matsui T. Enhanced visualization of small peptides absorbed in rat small intestine by phytic-acid-aided matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2013;85(21): 10033–10039.
- [110] Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, *et al*. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*. 1993;361(6408): 153–156.
- [111] Wu Q, VanEtten HD. Introduction of plant and fungal genes into pea (*Pisum sativum* L.) hairy roots reduces their ability to produce pisatin and affects their response to a fungal pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004;17(7): 798–804.
- [112] Yoshikawa M, Onoe T, Masago H, Sagawa H. Ultrastructural *in situ* evidence for the role of glyceollin in the expression of soybean resistance to fungal infection. *Japanese Journal of Phytopathology*. 1987;53: 227–241.

- [113] Ulrike B, Enrico M. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*. 2014;19(2): 90–98.
- [114] Chen M, Zeng H, Qiu D, Guo L, Yang X, Shi H, *et al*. Purification and characterization of a novel hypersensitive response-inducing elicitor from *Magnaporthe oryzae* that triggers defense response in rice. *Plos One*. 2012;7(5): e37654.
- [115] Chen M, Zhang C, Zi Q, Qiu D, Liu W, Zeng H. A novel elicitor identified from *Magnaporthe oryzae* triggers defense responses in tobacco and rice. *Plant Cell Reports*. 2014;33(11): 1865–1879.
- [116] Cyril Z. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*. 2014;35(7): 345–351.
- [117] Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, *et al*. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(29): 11086–11091.
- [118] Day RB, Okada M, Ito Y, Tsukada K, Zaghoulani H, Shibuya N, *et al*. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiology*. 2001;126(3): 1162–1173.
- [119] Yoshikawa M, Sugimoto K. A specific binding site on soybean membranes for a phytoalexin elicitor released from fungal cell walls by α -1,3-endoglucanase. *Plant and Cell Physiology*. 1993;34(8): 1229–1237.
- [120] Yoshikawa M, Keen NT, Wang MC. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiology*. 1983;73(2): 497–506.
- [121] Graham MY, Weidner J, Wheeler K, Pelow MJ, Graham TL. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the

- Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2003;63(3): 141–149.
- [122] Mithöfer A, Ebel J, Bhagwat AA, Boller T, Neuhaus-Url G. Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta*. 1999;207(4): 566–574.
- [123] Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 2019;299: 125124.
- [124] Xu Y, Li Y, Xie J, Xie L, Mo J, Chen W. Bioavailability, absorption, and metabolism of pelargonidin-based anthocyanins using Sprague-Dawley rats and caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(28): 7841–7850.
- [125] Catterall F, King LJ, Clifford MN, Ioannides C. Bioavailability of dietary doses of ^3H -labelled tea antioxidants (+)-catechin and (–)-epicatechin in rat. *Xenobiotica*. 2003;33(7): 743–753.
- [126] Lin LC, Wang MN, Tseng TY, Sung, Tsai TH. Pharmacokinetics of (–)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(4): 1517–1524.
- [127] Banik S, Yamada K, Sato H, Onoue S. Development of poly (lipoic acid) nanoparticles with improved oral bioavailability and hepatoprotective effects of quercetin. *Molecular Pharmaceutics*. 2022;19(5): 1468–1476.
- [128] Jodoin J, Demeule M, Béliveau R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2002;1542(1): 149–159.
- [129] Kikuchi T, Hayashi A, Ikeda N, Morita O, Tasaki J. Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) is an efflux transporter of EGCG and its metabolites

- in the human small intestine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2022;107: 109071.
- [130] Nectoux AM, Abe C, Huang SW, Ohno N, Tabata J, Miyata Y, *et al.* Absorption and metabolic behavior of hesperidin (rutinosylated hesperetin) after single oral administration to Sprague-Dawley rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(35): 9812–9819.
- [131] Patel KR, Andreadi C, Britton RG, Horner-Glister E, Karmokar A, Sale S, *et al.* Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Science Translational Medicine*. 2013;5(205): 205ra133-205ra133.
- [132] Ávila-Gálvez MA, Giménez-Bastida JA, González-Sarrias A, Espín JC. Tissue deconjugation of urolithin A glucuronide to free urolithin A in systemic inflammation. *Food & Function*. 2019;10(6): 3135–3141.
- [133] Selma M V, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(15): 6485–6501.
- [134] Pourová J, Najmanová I, Vopršalová M, Migkos T, Pilařová V, Applová L, *et al.* Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries *ex vivo* and decrease blood pressure *in vivo*. *Vascular Pharmacology*. 2018;111: 36–43.
- [135] Gasperotti M, Passamonti S, Tramer F, Masuero D, Guella G, Mattivi F, *et al.* Fate of microbial metabolites of dietary polyphenols in rats: is the brain their target destination? *ACS Chemical Neuroscience*. 2015;6(8): 1341–1352.
- [136] 栢木宏之. ポリフェノール代謝物 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HMPA) の機能性. In: 田中 隆 (ed.) ポリフェノールの機能と多角的応用. シーエムシー出版 2022: pp70–78.

- [137] Makarewicz M, Drożdż I, Tarko T, Duda-Chodak A. The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants*. 2021;10(2): 188.
- [138] Bresciani L, Angelino D, Vivas EI, Kerby RL, García-Viguera C, Del Rio D, *et al.* Differential catabolism of an anthocyanin-rich elderberry extract by three gut microbiota bacterial species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(7): 1837–1843.
- [139] Aura AM. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*. 2008;7(3): 407–429.
- [140] Knockaert D, Raes K, Wille C, Struijs K, Van Camp J. Metabolism of ferulic acid during growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus collinoides*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012;92(11): 2291–2296.
- [141] Pasquale F, Marco G, Maria DA, Raffaella DC. Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(24): 7574–7582.
- [142] Croft KD, Yamashita Y, O'Donoghue H, Shirasaya D, Ward NC, Ashida H. Screening plant derived dietary phenolic compounds for bioactivity related to cardiovascular disease. *Fitoterapia*. 2018;126: 22–28.
- [143] Ohue-Kitano R, Taira S, Watanabe K, Masujima Y, Kuboshima T, Miyamoto J, *et al.* 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid produced from 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid by gut microbiota improves host metabolic condition in diet-induced obese mice. *Nutrients*. 2019;11(5): 1036.
- [144] Qiu J, Saito N, Noguchi M, Fukui K, Yoshiyama K, Matsugano K, *et al.* Absorption of 6-*O*-caffeoylsophorose and its metabolites in Sprague–Dawley rats detected by electrochemical detector–high-performance liquid

- chromatography and electrospray ionization–time-of-flight–mass spectrometry methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(11): 6299–6304.
- [145] Hanh VT, Kobayashi Y, Maebuchi M, Nakamori T, Tanaka M, Matsui T. Quantitative mass spectrometric analysis of dipeptides in protein hydrolysate by a TNBS derivatization-aided standard addition method. *Food Chemistry*. 2016;190: 345–350.
- [146] Zhang C, Ma W, Zhang Y, Wang Q, Qin C, Du S, *et al.* Pharmacokinetics, bioavailability, and tissue distribution study of angoroside C and its metabolite ferulic acid in rat using UPLC-MS/MS. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9: 1186.
- [147] Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, Berset C. Sulfated ferulic acid is the main *in vivo* metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(10): 3037–3041.
- [148] Li Y, Liu C, Zhang Y, Mi S, Wang N. Pharmacokinetics of ferulic acid and potential interactions with Honghua and clopidogrel in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;137(1): 562–567.
- [149] Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *The Journal of Nutrition*. 2004;134(11): 3083–3088.
- [150] Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(20): 7539–7543.
- [151] O'Neill ME, Thurnham DI. Intestinal absorption of β -carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal: response curves in the

- triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. *British Journal of Nutrition*. 1998;79(2): 149–159.
- [152] Bijsterbosch MK, Duursma AM, Bouma JMW, Gruber M. The plasma volume of the Wistar rat in relation to the body weight. *Experientia*. 1981;37(4): 381–382.
- [153] Renouf M, Guy P, Marmet C, Longet K, Fraering AL, Moulin J, *et al*. Plasma appearance and correlation between coffee and green tea metabolites in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(11): 1635–1640.
- [154] Kishida K, Matsumoto H. Urinary excretion rate and bioavailability of chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, and ferulic acid in non-fasted rats maintained under physiological conditions. *Heliyon*. 2019;5(10): e02708.
- [155] Chen X, Wei L, Pu X, Wang Y, Xu Y. Pharmacokinetics and tissue distribution study of 15 ingredients of *Polygonum chinense* Linn extract in rats by UHPLC–MS/MS. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(2): e4975.
- [156] El-Mohsen MA, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E, Srai SK, *et al*. Distribution of [³H] *trans*-resveratrol in rat tissues following oral administration. *British Journal of Nutrition*. 2006;96(1): 62–70.
- [157] Kobayashi S, Konishi Y. Transepithelial transport of flavanone in intestinal caco-2 cell monolayers. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;368(1): 23–29.
- [158] Horibe Y, Hosoya K, Kim KJ, Lee VH. Carrier-mediated transport of monocarboxylate drugs in the pigmented rabbit conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1998;39(8): 1436–1443.
- [159] Wong CC, Botting NP, Orfila C, Al-Maharik N, Williamson G. Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate

- cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6). *Biochemical Pharmacology*. 2011;81(7): 942–949.
- [160] Wong CC, Barron D, Orfila C, Dionisi F, Krajcsi P, Williamson G. Interaction of hydroxycinnamic acids and their conjugates with organic anion transporters and ATP-binding cassette transporters. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55(7): 979–988.
- [161] Borkar RM, Kanwal A, Raju B, Pulimamidi SS, Das AP, Agarwal SM, *et al.* A pharmacokinetic study to correlate the hypoglycemic effect of phlorizin in rats: identification of metabolites as inhibitors of sodium/glucose cotransporters. *Journal of Mass Spectrometry*. 2023;58(8): e4964.
- [162] Järvinen E, Deng F, Kiander W, Sinokki A, Kidron H, Sjöstedt N. The role of uptake and efflux transporters in the disposition of glucuronide and sulfate conjugates. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;12: 802539.
- [163] Konishi Y, Hitomi Y, Yoshida M, Yoshioka E. Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(12): 4740–4746.
- [164] Yan N, Tang Z, Xu Y, Li X, Wang Q. Pharmacokinetic study of ferulic acid following transdermal or intragastric administration in rats. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21: 169.
- [165] Qi W, Zhao T, Yang WW, Wang GH, Yu H, Zhao HX, *et al.* Comparative pharmacokinetics of chlorogenic acid after oral administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2011;1(4): 270–274.
- [166] Horbach GJ, van Leeuwen RE, Yap SH, van Bezooijen CF. Changes in fluid-phase endocytosis in the rat with age and their relation to total albumin elimination. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1986;33(3): 305–312.

- [167] 吉野 進, 川上 秀昭, 清水 隆麿, 小野 貴弘. 米ぬか発酵物含有食品の糖代謝改善作用の検証. *薬理と治療*. 2022;50(5): 791–799.
- [168] Verzelloni E, Pellacani C, Tagliazucchi D, Tagliaferri S, Calani L, Costa LG, *et al.* Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011;55(S1): S35–S43.