

オリーブ葉由来ヒドロキシチロソール蛍光化誘導物を用いた細胞内動態解析法について

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	小林,謙一 茂木,裕暉 高橋,明日香 相澤,有美 鈴木,司 山本,祐司
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	42巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 23-28
発行年月	2016年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



オリーブ葉由来ヒドロキシチロソール蛍光化誘導物 を用いた細胞内動態解析法について

小林 謙一^{*§}・茂木 裕暉^{*}・高橋明日香^{*}
相澤 有美^{*}・鈴木 司^{*}・山本 祐司^{*}

* 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Intracellular Kinetic Analysis Using Fluorescence Labeling Olive Leaf Polyphenol

KOBAYASHI Ken-Ichi^{*§}, MOGI Yuki^{*}, TAKAHASHI Asuka^{*},
AIZAWA Yumi^{*}, SUZUKI Tsukasa^{*} and YAMAMOTO Yuji^{*}

* Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

The aim of this study was to establish a novel method to assess the function of food components using fluorescently labeling strategies. In this report, we focused on olive polyphenol hydroxytyrosol (HT) as a target of fluorescent labelling. HT, one of the major polyphenols present in olive leaf and oil, is known to possess a high antioxidant and anticancer capacity. HT was conjugated with FITC to the phenolic hydroxyl group (FITC-HT). Caco-2 cells were cultured on glass bottom dishes, and then incubated with 500 μ m of FITC-HT for 24 hours and subsequently incubated with LysoTracker Red (Lysosome marker) or MitoTracker Red (Mitochondria marker) with Hoechst 33342 (Nuclei marker). Thereafter, using KEYENCE BZ-X700 Series All-in-one Fluorescence Microscope, the imaging data was acquired. As a result, FITC-HT was detected in the lysosome but not in the mitochondria and nuclei of Caco-2. And, FITC and fluorescein were not detected in the Caco-2 cells, suggested this imaging data of FITC-HT is dependent on the formula of HT. Thereafter, we concluded that cellular imaging using fluorescent labeled food compounds is a powerful tool to analyze the effect of functional food constituents.

(Received Aug. 26, 2015 ; Accepted Dec. 18, 2015)

Key words : polyphenol, hydroxytyrosol, olive, intracellular kinetic analysis

ポリフェノール ヒドロキシチロソール オリーブ 細胞内動態解析

近年、薬物成分の細胞内での挙動を「動的」に追跡する技術の開発が、生命科学および薬物動態の分野で精力的に進められている。その中で、薬物を蛍光標識化して、細胞内や生体内での動きをイメージングする技術に注目が集まっている。その中で、近年注目を集めている観察法の1つに、Corelative light and electron microscopy (CLEM) 法がある¹⁾。CLEM法とは、同一の細胞を光学(蛍光)顕微鏡と電子顕微鏡の2種類の顕微鏡で観察して、最終的には重ね合わせた像を得て解析する方法である。しかし、CLEM法は、操作過程が複雑で、かつコストがかかる方法であった。私たちは、操作方法を簡便化し、かつ可能な限り道具を自作することで低コスト化し

たCLEM法を確立した²⁾。また、抗癌剤であるシスプラチンを蛍光物質で標識し、この方法に供した結果、リソソームに蛍光標識されたシスプラチンがリソソームに取り込まれている画像を得ることに成功した。さらに、三次元電子顕微鏡画像(トモグラフィー)画像の取得を行い、シスプラチンが取り込まれたリソソームの膜構造およびその近傍の細胞内小器官の膜構造の立体的イメージングに成功した²⁾。したがって、シスプラチンの細胞内での作用点を明らかにするとともに、この方法が薬理効果の有効な解析方法であることを示してきた。

そこで、この方法論を薬物動態の解析手法のみならず、食品成分の細胞内動態を追跡することを通して、機能的

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: k4kobaya@nodai.ac.jp

食品成分の新規の評価法として応用できると考えた。しかし、そのような試みは、ほとんどなされていないのが現状である。

オリーブ (*Olea europea*) は、古来より地中海世界の食生活の中心的な食品素材として利用されてきた。しかし、利用されるのはもっぱら実の部分であり、葉部はほとんど利用されることがなかった。近年、このオリーブ葉が、食品素材として注目を集めている。それは、オリーブ葉の抽出エキスを、血糖降下作用³⁾、抗高血圧作用⁴⁾、抗酸化作用⁵⁾など生体における機能性が報告され始めてきたからである。KOBAYASHIらは、爆砕オリーブ葉粉末に、脂質の吸収および胆汁酸の再吸収促進作用があることを見出している^{6),7)}。また、オリーブ葉由来ポリフェノールであるオレウロペインが発見され、それが機能性の本体であると考えられている。実際にオレウロペインが、褐色脂肪細胞における熱産生を亢進させる機能を有することも明らかとなっている⁸⁾。また、近年、オレウロペインそのものが細胞内へ取り込まれることはなく、代謝産物であるヒドロキシチロソール (HT) が取り込まれることによって、機能を発揮しているとの報告もある⁹⁾。一方、多くのポリフェノール類が、大腸癌細胞の抗癌様作用が最近多く報告されたことから、オリーブ葉ポリフェノールにも類似の効果を有するものとの報告もある^{10)~12)}。しかし、HTが細胞内のどこで作用するのかについての構造学的知見については不明である。

そこで本研究では、蛍光標識技術を用いた食品成分の新たな機能評価法を構築する一環として、オリーブ葉ポリフェノールであるHTの蛍光標識化に着手するとともに、その細胞内での動的イメージングを行った。

実験材料および方法

1. HTの蛍光標識化

HTは、オレウロペインの代謝産物であり、オレウロペインと同等それ以上の機能活性を有するということが、化学構造が単純でありフェノール系水酸基に対する蛍光標識が容易であると考えた。そこで、HTのアルコール性水酸基をフルオロセインイソシアネート (FITC) で標識したFITC-HTの作製に着手した (Fig. 1)。

反応容器に2-(3,4-Dihydroxyphenyl) ethyl alcohol (図1の01) 202 mg (1.31 mmol) およびFluorescein 5-isothiocyanate (図1の02) 522 mg (1.34 mmol) を入れ、*N,N*-ジメチルホルムアミド4.3 mlに溶解させた。この反応溶液を120℃で1時間攪拌した後、室温まで放冷し、

酢酸エチル30 mlおよび1 mol/l 塩酸30 mlで分液した。有機層を飽和食塩水20 mlで3回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下濃縮することで粗生物を得た。その粗生物を酢酸エチル 3 mlおよび塩化メチレン 3 mlを用いて再沈殿し、橙色粉末を得た。これをカラムクロマトグラフィー (シリカゲル30 g, 塩化メチレン:酢酸エチル=0:100 to 50:50, 2%酢酸含有, 2回) で精製し、橙色粉末を得た (図1の03)。その後、この橙色粉末をNMR (JEOL 270MHz) およびLC/MS (Waters 2695, ZQ, 2996, column Inertsil ODS-3 (4.6 × 75 mm)) に供し、構造および純度を確認した。

2. FITC-HTの蛍光顕微鏡を用いた細胞内動的イメージング

ヒト大腸癌モデル培養細胞であるCaco-2細胞をスライドガラス付き3.5 cmディッシュに6 × 10⁴細胞を播種し、70%コンフルエントになるまで培養した。その後、Caco-2細胞にFITC-HTを500 μMの濃度になるように処理して24時間反応させた。その後、リソソームマーカー (LysoTracker Red) もしくはミトコンドリアマーカー (MitoTracker Red) と30分間反応させた。その後、核マーカー (Hoechst 33342) で30分間反応後、生細胞イメージング装置 (KEYENCE BZ-X 700) を用いて、6時間のイメージングムービーを取得した。

3. FITCおよびフルオロセインの細胞内取り込みおよび局在性の検討

Caco-2細胞を4 wellチャンバープレートに1 wellあたり1.0 × 10⁵細胞を播種し、70%コンフルエントになるまで培養した。その後、Caco-2細胞にFITCもしくはフルオロセインを500 μMの濃度になるように処理して24時間反応させた。その後、リソソームマーカー (LysoTracker Red) もしくはミトコンドリアマーカー (MitoTracker Red) と30分間反応させた。その後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、透過処理後、核マーカー (Hoechst 33342) で5分間反応させ、封入した。そして、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FV1200) を用いて観察した。

実験結果

1. HTの蛍光標識化

HTの蛍光標識化を行った結果、図1-03の粗生物689 mgを得て、その後の精製で橙色粉末662 mgを得た。その後のカラムクロマトグラフィーによる精製で最終的に図1-03の橙色粉末114 mgを得た。収率は16%であった。こ

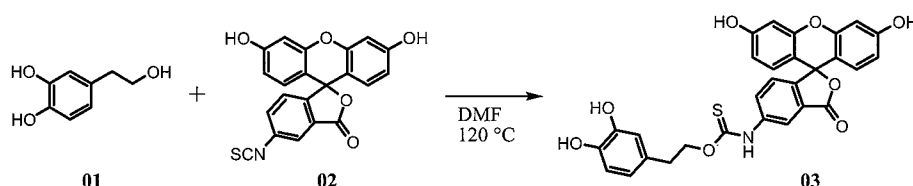


Fig. 1 ヒドロキシチロソールのFITC標識化

の橙色粉末をNMR (JEOL 270MHz) およびLC/MS (Waters 2695, ZQ, 2996, column Inertsil ODS-3 (4.6×75mm)) に供し、構造および純度を確認した。

NMRおよびLC/MSで化学構造を確認した。(データは示さず)。

2. FITC-HTの蛍光顕微鏡を用いた細胞内動的イメージング

Caco-2 細胞をFITC-HTと反応させ、細胞内への取り込みと挙動を動的に追跡したイメージング結果をFig. 2とFig. 3に示した。

生細胞の形態を観察可能な位相差画像をFig. 2-(a) とFig. 3-(a) に示した。また、FITC-HTの蛍光画像をFig. 2-(b) とFig. 3-(b) に示した。そして、リソソームマーカーであるLysoTrackerの蛍光画像をFig. 2-(c)、ミトコンドリアマーカーであるMitotrackerの蛍光画像をFig. 3-(c) に示した。また、核マーカーであるHoechst 33342の蛍光画像をFig. 2-(d) とFig. 3-(d) に示した。位相差画像、FITC-HT、そしてリソソームマーカー、核マーカーを重ね合わせた画像をFig. 2-(e) に示した。位相差画像、FITC-HT、そしてミトコンドリアマーカー、核マーカーを重ね合わせた画像をFig. 3-(e) に示した。その後、6時間継続的にイメージング画像を取得し、重ね合わせたタイムラプス画像をFig. 2-(f) からFig. 2-(l)、Fig. 3-(f) からFig. 3-(l) に示した。

その結果、FITC-HTは細胞内に存在していたことから、細胞内に取り込まれることを確認した。また、細胞内局在性を検討した結果、FITC-HTは、リソソームマ

ーカー (Fig. 2-(e)) と一部共局在が認められたのに対し、ミトコンドリアマーカー (Fig. 3-(e)) と核マーカー (Fig. 2-(e)、3-(e)) との共局在は認められなかった。加えて、6時間の生細胞イメージング画像の取得も成功し、FITC-HTが蛍光強度を失うことなく、蛍光画像を取得できることを証明した (Fig. 2-(e) ~ (l)、Fig. 2-(e) ~ (l))。

3. FITCもしくはフルオロセインの細胞内への取り込みの評価

FITC-HTの細胞内取り込みがHTの構造に依存したものであるかどうかを、FITCおよびフルオロセインを用いて検討した結果をFig. 4に示した。FITCは、わずかに細胞内に取り込まれるものの、FITC-HTに比べるとごくわずかなものであった。フルオロセインに関しては、細胞内に取り込まれることはなかった。

考 察

本研究では、蛍光標識技術を用いた食品成分の新たな機能評価法を構築する目的で、オリーブ葉ポリフェノールの一種であるHTのFITCによる蛍光標識化に着手し、その蛍光標識化合物の細胞内局在性の検討を行った。HTは、蛍光標識化が容易であることに加え、ほかの低分子のポリフェノールでも類似の構造を有していることから、評価法の構築する点ではHTが蛍光標識化にふさわしい分子種であると考えた。また、HTが細胞内に取り込まれ、機能を発揮すると考えられているので、オリーブの機能性を検討するうえでも、蛍光標識化する分子として

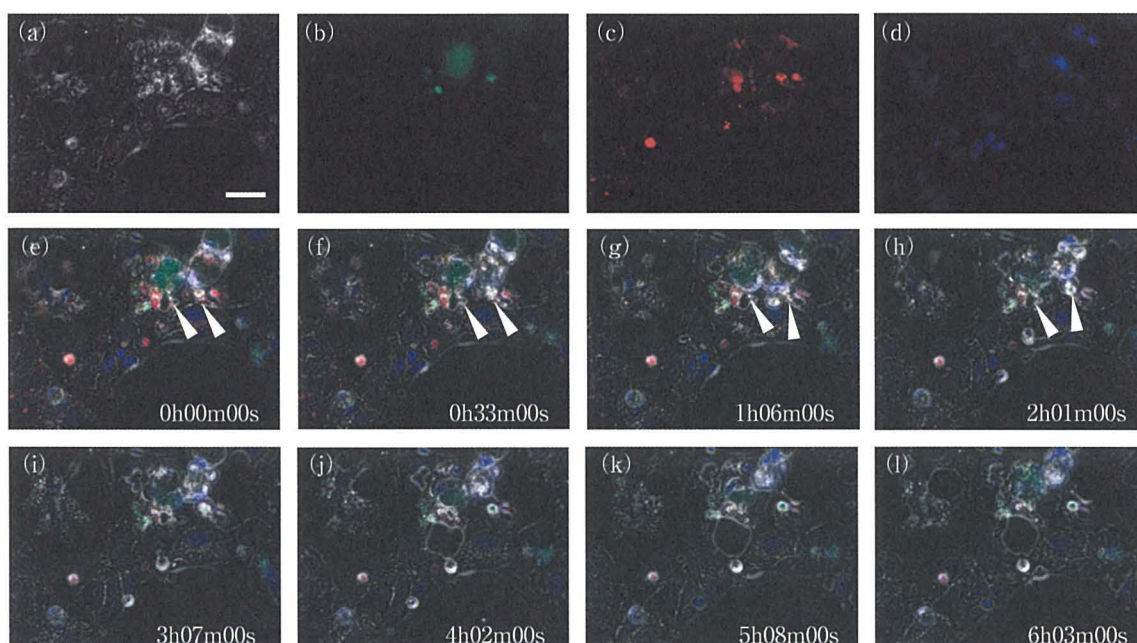


Fig. 2 FITC-HTのCaco-2 細胞内におけるリソソームへの局在性の検討と動的イメージング

Caco-2 細胞をFITC-HTで処理した後に、リソソームマーカー (LysoTracker) および核マーカー (Hoechst33342) で30分間反応後、生細胞イメージング装置 (KEYENCE BZ-X700) を用いて、6時間イメージングムービーを取得した。

位相差画像、(b) FITC-HT (緑) 画像、(c) LysoTracker (赤) 画像、(d) Hoechst33342 (青) 画像

(e) ~ (l) 重ね合わせ画像のタイムラプス画像 黄色矢尻: FITC-HTがリソソームに取り込まれた部分、スケールバー: 50μm

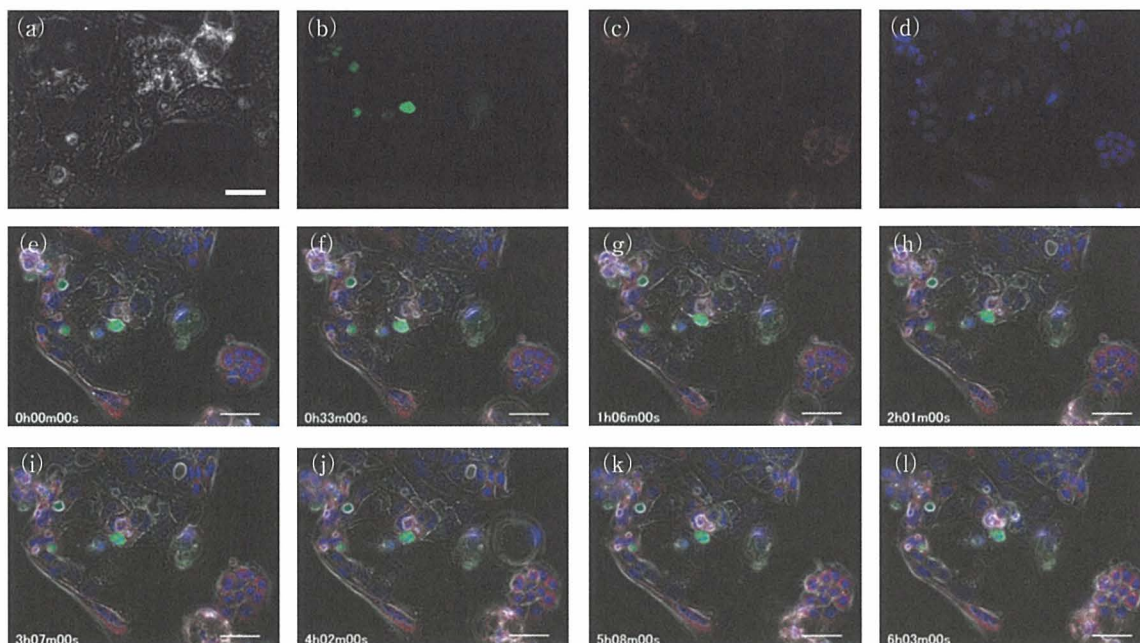


Fig. 3 FITC-HTのCaco-2細胞内におけるミトコンドリアへの局在性の検討と動的イメージング

Caco-2細胞をFITC-HTで処理した後に、ミトコンドリアマーカー (MitoTracker) および核マーカー (Hoechst33342) で30分間反応後、生細胞イメージング装置 (KEYENCE BZ-X700) を用いて、6時間イメージングムービーを取得した。位相差画像, (b) FITC-HT (緑) 画像, (c) MitoTracker (赤) 画像, (d) Hoechst33342 (青) 画像 (e) - (l) 重ね合わせ画像のタイムラプス画像 スケールバー: 50 μ m

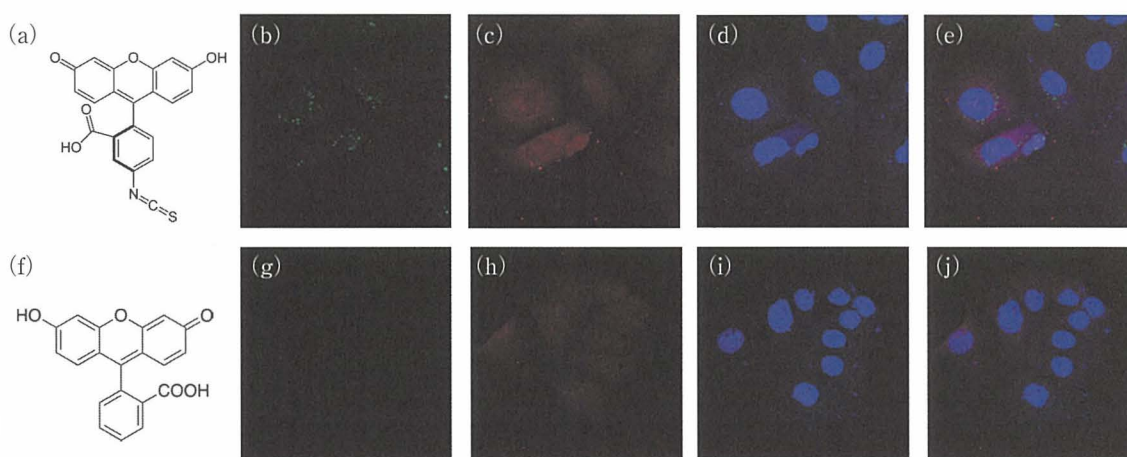


Fig. 4 FITC-HTおよびフルオロセインのCaco-2細胞への取り込み

Caco-2細胞をFITC-HTで処理した後に、リソソームマーカー (LysoTracker) で反応させ、固定した。その後に、核マーカー (Hoechst33342) で反応後、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FV1200) を用いて観察した。FITCの構造, (b) FITC-HT (緑) 画像, (c) LysoTracker (赤) 画像, (d) Hoechst33342 (青) 画像 (e) (b) - (e) の重ね合わせ画像 (f) フルオロセインの構造, (g) FITC-HT (緑) 画像, (h) LysoTracker (赤) 画像, (i) Hoechst33342 (青) 画像

HTが最適であると考えた。そこで、HTをFITCで標識することにした。その結果、高純度の標識化合物を得ることに成功した。次に、この化合物が細胞内に取り込まれるかどうかを確認した。その結果、FITC-HTがCaco-2細胞内に取り込まれるものの、核への局在は観察されなかった。HTが核に局在するという報告はないことから、本結果とHTの挙動は類似しているものと示唆された。また、細胞内へ取り込まれたFITC-HTは、細胞内

でドット状に散在していること、その小胞状部分は、一部リソソームと共局在していた。Tokyo Greenという蛍光発色団で標識したエピガロカテキンガレート (EGCG) を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における細胞内動態を検討したところ、細胞内にドット上に取り込まれるという報告があり^{[13], [14]}、本結果と類似したものであった。したがって、HTとEGCGは、細胞内で同様の動態を示す可能性があると考えた。一方

HANらは、FITCで標識したEGCGを作製 (FITC-EGCG) し、L929細胞における反応性を観察した結果、FITC-EGCGが核内に移行することを報告している¹⁵⁾。同じFITC標識化合物であっても、細胞種が異なると細胞内での局在や挙動が異なる可能性が考えられる。したがって、FITC-HTに関しても、ほかの細胞種での検討も行っていく必要がある。

またFITC-HTの細胞内の挙動が、FITCもしくはフルオロセインによるものか否かについても検討した結果、これらの分子は細胞内に取り込まれることはなかったもので、HT部分による細胞内挙動を反映しているものと判断した。

本結果が、HTの挙動と一致しているかどうかを確かめるためには、HTの抗ハプテン抗体を作製し、この抗体を用いた免疫染色を行い、整合性を取る必要があると考えるが、今後の検討課題である。

現在、機能性食品成分の細胞内動態解析は、質量顕微鏡を用いた解析が進められているが、顕微鏡自体が高額であること、解像度の問題で正確な局在を検討できないことなどの問題点がある。また、前述の機能性食品成分の低分子ハプテン抗体を作製して、細胞内動態を追跡することも可能であるが、抗体の感度の問題もありほとんど行われていない。また上記の2つの方法論は、いずれも「生きた状態」で観察することは難しい。機能性食品成分の蛍光標識化誘導物を用いた細胞内動態解析は、「生きた」状態の細胞や動物個体での動的追跡が可能であるという長所がある。実際にASAKAWAらは、蛍光標識したカテキンのポジトロン断層撮影法 (PET) による*in vivo*イメージングに成功しており、これらの技術を応用すると、FITC-HTの個体レベルでの検討も可能になるかもしれない¹⁶⁾。

本研究結果によって、機能性食品成分の作用が、細胞内のどの部分で起こるのかについて、時空間的に解析することが可能になり、食品成分の新たな機能性評価法につながるであろう。

謝 辞 本研究は、科学研究費補助金基盤研究 (C) 「CLEM法を用いた機能性食品成分の細胞内動態解析」 (研究課題番号: 25450181, 研究代表者: 小林謙一) および公益財団法人アサヒグループ学術振興財団平成24年度研究助成金助成金を受けて実施した。

文 献

- 1) JAHN, K.A., BARTON, D.A., KOBAYASHI, K., RATINAC, K.R., OVERALL, R.L. and BRAET, F.: Correlative microscopy: providing new understanding in the biomedical and plant sciences. *Micron*, **43**, 565~582 (2012)
- 2) KOBAYASHI, K., CHENG, D., HUYNH, M., RATINAC, K.R., THORDARSON, P. and BRAET, F.: Imaging fluorescently labeled complexes by means of multidimensional correlative light and transmission electron microscopy: a practical approach. *Methods Cell Biol*, **111**, 1~20 (2012)
- 3) AZZAWIE, H. F. and ALHAMDANI, M. S.: Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.*, **78**, (12), 1371~7 (2006)
- 4) ZARZUELO, A., DUARTE, J., JIMÉNEZ, J., GONZÁLEZ, M. and UTRILLA, M.P.: Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med*, **57**, 417~9 (1991)
- 5) SOMOVA, L.I., SHODE, F.O., RAMNANAN, P. and NADAR, A.: Antihypertensive antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol.*, **84**, 299~305 (2003)
- 6) 小林謙一: 新しいアプローチから見た食品機能性成分の動態研究, 日本食生活学会誌, **21**, 17~23 (2010)
- 7) 小林謙一・夏川 大・尾形明日美・高田恭輔・室田友紀子・綿谷鮎子・寺本明子・牧 恒雄・山本祐司・田所忠弘: 爆砕処理オリーブ葉粉末による脂肪吸収および胆汁酸再吸収の促進効果, 日本食生活学会誌, **20**, 121~126 (2009)
- 8) OI-KANO, Y., KAWADA, T., WATANABE, T., KOYAMA, F., WATANABE, K., SENBONGI, R. and IWAI, K.: Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **54** (5), 363~70 (2008)
- 9) VISSERS, M.N., ZOCK, P.L., ROODENBURG, A.J., LEENEN, R. and KATEN, M.B.: Olive oil phenols are absorbed in humans., *J Nutr.*, **132** (3), 409~417 (2002)
- 10) RODRIGUEZ-RAMIRO, I., RAMOS, S., BRAVO, L., GOYA, L. and MARTIN, M.A.: Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem.*, **22** (12), 1186~1194 (2011)
- 11) CEREZO-GUISAD, M.I., ZUR, R., LORENZO, M.J., RISC, A., MARTIN-SERRANO, M.A., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., CUENDA, A. and CENTENO, F.: Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38 MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG. *Food. Chem. Toxicol.*, **84**, 125~132 (2015)
- 12) CARDENO, A., SANCHEZ-HIDALGO, M., ROSILLO, M.A., ALARCON DE LA LASTRA, C.: Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the

- proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 α . *Nutr Cancer.*, **65** (1), 147~156 (2013)
- 13) AIHARA, Y., YOSHIDA, A., FURUTA, T., WAKIMOTO, T., AKIZAWA, T., KONISHI, M. and KAN, T.: Regioselective synthesis of methylated epigallocatechin gallate via nitrobenzenesulfonyl (Ns) protecting group. *Bioorg Med Chem Lett.*, **19**, (15), 4171~4174 (2009)
- 14) PIYAVIRIYAKUL, S., SHIMIZU, K., ASAKAWA, T., KAN, T., SIRIPONG, P. and OKU, N.: Anti-angiogenic activity and intracellular distribution of epigallocatechin-3-gallate analogs. *Biol Pharm Bull.*, **34** (3), 396~400 (2011)
- 15) HAN, D.W., MATSUMURA, K., KIM, B. and HYON, S.H.: Time-dependent intracellular trafficking of FITC-conjugated epigallocatechin-3-O-gallate in L-929 cells. *Bioorg Med Chem.*, **16** (22), 9652~9659 (2008)
- 16) ASAKAWA, T., HIZA, A., NAKAYAMA, M., INAI, M., OYAMA, D., KOIDE, H. and KAN, T.: PET imaging of nobiletin based on a practical total synthesis. *Chem Commun (Camb)*, **47** (10), 2868~2870 (2011)
(平成27年 8 月26日受付, 平成27年12月18日受理)
-