

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16212

研究課題名(和文) TRPA1受容体の食事性リガンド受容機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of mechanism of dietary ligands-TRPA1 interactions

研究代表者

中村 俊之 (NAKAMURA, Toshiyuki)

岡山大学・環境生命科学研究科・助教

研究者番号：90706988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：TRPA1(Transient Receptor Potential Ankyrin 1)受容体と食品成分の相互作用を検討した。その結果、ケンフェロールやミリセチンなど数種類の新規TRPA1受容体アゴニストを見出した。また、代表的なフラボノイドであるケルセチンの配糖体および代謝物を用いてTRPA1受容体との相互作用を確認したところ、メチル化されたケルセチンがTRPA1受容体を活性化することが明らかとなった。そこで、相互作用部位の同定を目指し、抗フラボノイド抗体の作製を試みた。その結果、一部のフェノール性化合物を認識する新規モノクローナル抗体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the interaction between TRPA1 and food compounds. We indicated some novel agonists of TRPA1 such as Kaempferol and Myricetin. In addition, the agonistic activities of several major quercetin glycosides and metabolites towards TRPA1 were also evaluated. Methylated quercetin activated TRPA1 receptor. To identify the site of interaction of these flavonoids and TRPA1, we attempted to prepare the monoclonal antibodies to flavonoids. We developed a novel monoclonal antibody using dihydroxyphenylacetic acid as an immunogen.

研究分野：食品機能学

キーワード：フラボノイド イソチオシアネート TRPA1

1. 研究開始当初の背景

TRP (Transient Receptor Potential) 受容体は、生体膜貫通型のイオンチャネルファミリーであり、温度を感知するホモログが9種類存在する。その中でも、TRPV1 (Vanilloid type 1) と TRPA1 (Ankyrin type 1) は、温度での活性化に加え、食品成分により活性化することが知られており、例えば、TRPV1 はトウガラシの辛味成分であるカプサイシンにより活性化し、TRPA1 はわさびやカラシの辛味成分であるアリルイソチオシアネートにより活性化する。これら受容体の活性化により、交感神経が興奮し、副腎髄質からのアドレナリン分泌が促進されることで、エネルギー代謝が亢進する。すなわち、体熱産生が促進され、肥満予防につながることを期待される (Iwasaki et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008; Life Sci. 2009)。一方で、どちらの受容体も痛みに関与することが報告されており、酸による活性化に加え、TRPV1 は熱 (>43℃)、TRPA1 は冷感 (<17℃) により活性化し痛みを惹起する。さらに、TRPA1 は、炎症性メディエーターや細胞内 pH のアルカリ化によっても痛みを示すことから、TRPV1 よりも多様な痛みに関与する可能性が考えられる。

TRP 受容体を活性化する食品成分として、カプサイシンやアリルイソチオシアネート以外にも、コショウの成分であるピペリンやシナモンの香り成分であるシナナムアルデヒドなど多数報告されている。活性化成分の構造において、TRPV1 のリガンドの多くは、相関性を有しており、バニリル基とその類似構造が活性に寄与することが報告されている。一方、TRPA1 の活性化には、細胞内ドメインである「アンキリンリピート」を構成するシステイン残基への酸化修飾を介した立体構造変化の関与が示唆されており、共通の部分構造を持たない多様な有機化合物がリガンド活性を示す。実際に、変異 TRPA1 受容体を用いた研究により、アリルイソチオシアネートやシナナムアルデヒドによる受容体の活性化は、アンキリンリピート内のシステイン残基への求電子反応であることが示されている (Macpherson et al., Nature 2007; Redmond et al., PeerJ 2014)。一方、システイン残基への求電子性を示さない物質も報告されており、例えば、メントールによる

TRPA1 活性化には膜貫通領域の関与が示唆されている (Xiao et al., J Neurosci. 2008)。また、アリルイソチオシアネートにおいては、システイン残基以外にリジン残基との反応が受容体の活性化に関与することが報告されている (Hinman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006)。その他にも、エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの脂肪酸や、いくつかのポリフェノール類によっても TRPA1 受容体が活性化されることが示されているが、これらの詳細な結合様式に関する報告はない。このように、食品成分による TRPA1 受容体への作用機構は広く研究されているものの、未だ不明な部分が多い。そこで、TRPA1 受容体の多彩なリガンドに対する受容機構を検討するに至った。

2. 研究の目的

食品成分による生理機能発現は、食品成分と受容体との分子間相互作用により惹起されると考えられる。そのため、リガンド結合部位の解明は、受容体を制御する上で重要な知見となる。加えて、リガンドの構造活性相関の把握により、結合に必須の分子構造を理解することが可能となる。しかしながら、多くの食品成分の TRPA1 受容体への作用機構は未だ十分に解明されていない。TRPA1 受容体の活性化機構を理解することができれば、肥満症の予防に加え、炎症性の痛みの緩和に繋がる可能性がある。そこで本研究では、TRPA1 受容体と食品成分の結合を解析することで、受容体の機能性発現機構を分子レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) TRPA1 受容体と相互作用するフラボノイド類の探索

ヒト TRPA1 受容体を発現させた HEK293T 細胞を用いて、カルシウムイメージング法により行った。フラボノイド類は、代表的なフラボノイドであるケルセチンとその類縁体、フラボン類、イソフラボン類を用いた。加えて、ケルセチンの配糖体および代謝物も同様に検討を行った。蛍光試薬 Fluo-4 を取り込ませた細胞にフラボノイド類を処理し、Ex: 485 nm/Em: 525 nm の蛍光強度を測定することで受容体の活性化を評価した。

(2) 抗フラボノイド抗体の作製

ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) と Keyhole limpet hemocyanin (KLH) または Bovine serum albumin (BSA) をカルボジイミド法を用いて結合させ抗原を調製した。抗体作製には、DOPAC を結合させた KLH を Balb/c マウスの腹腔内に抗体価が上昇するまで免疫した。抗体価の確認は、DOPAC 結合 BSA を用いて ELISA 法により行った。十分な抗体価が得られた後に、ポリエチレングリコールによる細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製した。

4. 研究成果

(1) TRPA1 受容体と相互作用するフラボノイド類の探索

代表的なフラボノイドであるケルセチンとその類縁体を用いて、TRPA1 の活性化を検討した。その結果、検討した全てのフラボノイドアグリコンで濃度依存的に TRPA1 の活性化が認められた。活性化の強度は B 環の水酸基の数に依存する傾向にあり、myricetin (3, 4, 5-OH) < quercetin (3, 4-OH) = kaempferol (4-OH) < galangin (non-OH) であった。この蛍光強度の増加が、TRPA1 受容体の活性化であることを証明するために、TRPA1 受容体のアンタゴニストである HC-030031 との共処理、および TRPA1 受容体を導入していない HEK293T を用いて同様の検討を行った。その結果、フラボノイド類の処理による蛍光強度の増加は認められなかった。さらに、フラボン類およびイソフラボン類と TRPA1 受容体の相互作用を検討した。その結果、これら食品成分処理によっても TRPA1 受容体の活性化が確認できた。

フラボノイドの多くは、植物中では配糖体、生体内では代謝物として存在している。そこで、ケルセチンの配糖体および代謝物を用いて TRPA1 受容体との相互作用を確認した。その結果、ケルセチンにグルコース (単糖) が結合した Q3G およびルチノース (二糖) が結合した Rutin は TRPA1 を活性化しなかった。また、ケルセチンの主要代謝物であるグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体においても、TRPA1 を活性化することはなかった。一方で、メチル化されたケルセチンは、ケルセチンアグリコンと同程度、TRPA1 受容体を活性化した。

以上の結果から、フラボノイド類による

TRPA1 受容体の活性化は、フラボノイド類の極性に依存しており、アリルイソチオシアネートやシナムアルデヒド同様、アンキリンリピート内のシステイン残基との相互作用により惹起されることが示唆された。

(2) 抗フラボノイド抗体の作製およびフラボノイドと生体分子の相互作用の検討

得られた新規モノクローナル抗体の特異性解析を行ったところ、DOPAC 結合 BSA と抗体濃度依存的に反応が確認できた。さらに、低分子化合物との交差性を競争 ELISA 法を用いて検討したところ、一部のフェノール性化合物を認識することが示唆された。そこで、DOPAC を培養細胞に処理し、SDS-PAGE および Western Blotting を行い、相互作用分子の探索を行った。しかしながら、得られた抗体では相互作用分子を検出することができなかった。一方で、ABC 法を用いた検討ではいくつかの陽性バンドを検出することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

Sayaka Nakashima, Zhe Liu, Yuya Yamaguchi, Shunya Saiki, Shintaro Munemasa, Toshiyuki Nakamura, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura. A novel tag-free probe for targeting molecules interacting with a flavonoid catabolite. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 査読有, 7, 240-245, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.06.020
Toshiyuki Nakamura, Noriyuki Miyoshi, Takeshi Ishii, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro and Tatsuo Watanabe. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by quercetin and its analogs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 80(5), 949-954, 2016. DOI: 10.1080/09168451.2015.1132148

[学会発表] (計3件)

中村 俊之. 食品成分の相互作用と代謝と局在と機能性. フードサイエンスフォーラム. 平成 28 年 9 月 8-9 日. 岡山・美作市.

Toshiyuki Nakamura, Noriyuki Miyoshi, Takeshi Ishii, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro and Tatsuo Watanabe. Quercetin and its analogues activates TRPA1.

International Conference on Food Factors (ICoFF). 22 - 25 November. Soul, Korea. 2015.

Toshiyuki Nakamura, Noriyuki Miyoshi, Takeshi Ishii, Shinichi Ikushiro, Tatsuo Watanabe. Modulation of TRPA1 activity by flavonoids. International Symposium on Dietary Antioxidants and Oxidative Stress in Health 2015, 30 - 31 August. 2015. Awaji, Hyogo.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku01_5.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 俊之 (NAKAMURA, Toshiyuki)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教

研究者番号：90706988