

平成 31 年 4 月 11 日現在

機関番号：47407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00895

研究課題名(和文)食品由来フィトケミカルによるヒストン修飾制御を介した細胞機能調節機構の総括的解析

研究課題名(英文) Effects of phytochemicals in food on regulation of cell functions via histone modification

研究代表者

菊池 秀彦 (Kikuchi, Hidehiko)

尚絅大学短期大学部・その他部局等・教授

研究者番号：10301384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物が生産するフィトケミカルは多彩な生物活性を有し、食品機能の観点からも大きな注目を集めている。本研究では、フィトケミカルのうち、カルコン類、スチルベノイド及びフラボノイドについて白血球活性酸素産生能への影響を調査した。ヒト単芽球様株細胞U937を分化誘導剤であるレチノイン酸で処理する際に、これらのフィトケミカルを添加して48時間インキュベートした後に、活性酸素産生能を指標としてその効果を見積もった。その結果、レスベラトロール(スチルベノイド)やブテイン(カルコノイド)等に強力な活性酸素産生能を惹起する効果があることを確認した。逆に、フラボノイドについてはこれを強く阻害する作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フィトケミカルによる白血球機能、特に活性酸素産生能活性の修飾効果については体系的な解析が為されていない。本研究課題では、スチルベノイド、カルコノイドやフラボノイド等、種々のフィトケミカルを用いて白血球活性酸素産生能に及ぼす影響を解析することにより、多くの有意義なデータを蓄積することができた。今回得られたデータは、フィトケミカルを利用した機能性食品や薬品等の開発のための基礎データとして重要と思われる。

研究成果の概要(英文)： I examined the effects of various phytochemicals such as stilbenoids, chalconoid and flavonoids on the induction of the superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)-generating system in U937 cells by all-trans retinoic acid (RA). This system consists of the membrane bound cytochrome b558 composed of gp91-phox and p22-phox proteins, and cytosolic proteins p40-, p47- and p67-phox. Resveratrol (one of the stilbenoids) and butein (one of the chalconoids) strongly enhanced the RA-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generating activity via up-regulation of gp91-phox gene expression in U937 cells. In contrast, flavonoids inhibited the RA-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generating system in U937 cells. On the other hand, I revealed that positions and numbers of hydroxyl groups in hydroxychalcones are involved in cytotoxicity against U937 cells.

Data obtained in this study showed that various phytochemicals can modify the cell functions of leukocytes such as the O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generating system and proliferation.

研究分野：分子栄養学

キーワード：フィトケミカル ヒストン エピジェネティクス 活性酸素 白血球 U937 細胞分化 細胞毒性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

フィトケミカルは植物に含まれる低分子有機化合物であり、多彩な生物学的機能を有する。フィトケミカルはまた、ヒトの細胞にも大きな影響を及ぼすことが知られ、食品機能や薬理的観点から注目され、世界中で活発な研究が為されている。しかし、フィトケミカルが白血球機能、特に活性酸素産生系などに及ぼす影響について、これまで散発的な研究報告はあったが、体系的に行われた研究は皆無であった。

#### 2. 研究の目的

本研究課題では、フィトケミカルが白血球の活性酸素産生系や増殖に及ぼす影響について網羅的に解析して、データの集積および分子機構の解明を行うことを主な目的とした。得られた研究結果は、免疫賦活剤や免疫抑制剤、白血病治療薬及び抗がん剤開発等に有益な情報として活用されることが期待できる。

#### 3. 研究の方法

フィトケミカルの活性酸素産生系への影響の解析には、ヒト単芽球用株細胞 U937 の *in vitro* differentiation system を利用した。U937 細胞はビタミン A の一種である all-trans retinoic acid によってマクロファージ様細胞へと分化する。この際に、培地中に種々のフィトケミカル (約 80 種) を添加することによりもたらされる活性酸素産生能誘導への影響を分析した。活性酸素 (スーパーオキシド) 産生はルミノメーターで測定し、活性酸素産生系を構成するタンパク質因子の発現は半定量性 RT-PCR 法やイムノブロット法で解析した。さらに、遺伝子発現への影響についてはクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) で解析した。また、活性酸素産生系他に、細胞増殖への影響 (細胞障害作用) についても調べた。

#### 4. 研究成果

調査した約 80 種のフィトケミカルのうち、レスベラトロール (スチルベノイドの一種) やブテイン (カルコノイドの一種) に強い活性酸素産生能増強効果が認められた。これら二種類のフィトケミカルは何れも活性酸素産生系の key factor である gp91-phox (Nox2) の遺伝子発現を増強することによって活性産生能を惹起していることが明らかとなった。ChIP アッセイの結果、レスベラトロールやブテインは gp91-phox 遺伝子のプロモーター領域周辺のヒストン H3 の Lys-9 及び Lys-14 残基のアセチル化の亢進をもたらししていることも示された。以上から、レスベラトロール及びブテインは gp91-phox 遺伝子の発現を亢進することにより、活性酸素産生能を増強する効果を示すことが明らかとなった。また、カルコン類の細胞毒性には、水酸基の数及び位置が重要な役割を担っていることも明らかにした。

本研究課題で得られたデータは、フィトケミカルが白血球の活性酸素産生系の活性や細胞毒性等に及ぼす影響について、世界で初めて体系的に行われた研究の成果である。当初予想していたよりも、フィトケミカルの種類によって多種多様な修飾効果 (例えば、同じカルコノイド系フィトケミカルであっても、水酸基の位置の数が違うことにより、真逆の生理活性を示すことなど) が示されており、その分子機構も含めてより深い解析が必要になる。そして、その結果はフィトケミカルの有効利用に大いに貢献することが期待できる。

現在、その他のフィトケミカルについて得られたデータを整理・解析中であり、その中には多くの活性酸素産生系抑制効果を示す結果も含まれている。今後も解析を進め、随時発表していきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Hidehiko Kikuchi, Futoshi Kuribayashi, Masami Nakayama and Tatsuo Nakayama (2018) Gene targeting techniques reveal that histone acetyltransferase GCN5 has various inherent physiological functions in chicken DT40 cells (review article), Current Topics in Biochemical Research, 19:13-23. (査読有)

[http://www.researchtrends.net/tia/article\\_pdf.asp?in=0&vn=19&tid=40&aid=6224](http://www.researchtrends.net/tia/article_pdf.asp?in=0&vn=19&tid=40&aid=6224)

2. Hidehiko Kikuchi, Futoshi Kuribayashi and Harishkumar Madhyastha (2018) Positions and numbers of hydroxyl groups in hydroxychalcone derivatives are involved in cytotoxicity against human monoblastic U937 cells, Fundamental Toxicological Sciences, 5:149-152.

(査読有)

<https://doi.org/10.2131/fts.5.149>

3. Hidehiko Kikuchi (2018) Enzymatic preparation of 0-β-D-galactopyranosyl-(1,6)-2-amino-2-deoxy-D-gluconic acid by transgalactosylation catalyzed by *Aspergillus oryzae* β-D-galactosidase, *Journal of Association of Food Science Education in Japan*, 9: 9-12. (査読有)

4. Hidehiko Kikuchi, Hitomi Mimuro and Futoshi Kuribayashi (2018) Resveratrol strongly enhances the retinoic acid-induced superoxide generating activity via up-regulation of gp91-phox gene expression in U937 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495:1195-1200. (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.161>

5. Hidehiko Kikuchi, Futoshi Kuribayashi, Hitomi Mimuro and Shinobu Imajoh-Ohmi (2016) GCN5-deficiency remarkably enhances the sensitivity of B cells in response to 4-nitroquinoline 1-oxide, *Fundamental Toxicological Sciences*, 3: 137-142. (査読有)

<https://doi.org/10.2131/fts.3.137>

[学会発表] (計 3件)

1. 菊池秀彦、レスベラトロールは gp91-phox 遺伝子の発現増強を介して U937 細胞のレチノイン酸誘導性スーパーオキシド産生能を強力に惹起する、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

2. 菊池秀彦、ヒストンアセチル化酵素 PCAF は未熟 B 細胞での Bcl-6 と Pax5 の遺伝子発現制御に関与する、生命科学系学会合同年次大会、2017 年

3. 菊池秀彦、免疫グロブリン重鎖の遺伝子発現は GCN5 と PCAF によって制御されている、日本エピジェネティクス研究会第 10 回年会、2016 年

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://kikuchi-biolchem.jimdo.com>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：栗林太

ローマ字氏名：Kuribayashi Futoshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。