

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18580125
研究課題名 (和文) 細胞癌化抑制能を有するアントシアニンの細胞シグナル伝達経路の解明
研究課題名 (英文) Signaling pathways for the inhibition of cell transformation by anthocyanins
研究代表者 侯 徳興 (HOU DE-XING) 鹿児島大学・農学部・准教授 研究者番号：90305160

研究成果の概要： アントシアニンは抗酸化作用を始め多くの生体調節機能が報告されているが、その分子作用機構には不明の点が多い。本研究は分子生物学的手法および遺伝子網羅的な解析手法を用いてアントシアニンによる細胞癌化の信号伝達経路、標的分子および下流の遺伝子の発現制御を解析した。その結果、アントシアニンが少なくともプロテインキナーゼMEK1と直接的に結合し、MAPKの伝達経路を抑制し、細胞炎症・癌化を制御することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アントシアニン、細胞がん化、シグナル伝達、標的分子、分子機構

1. 研究開始当初の背景

アントシアニンは抗酸化・抗腫瘍作用を始め多くの生体調節機能が試験管内や動物実験で報告されている。しかし、分子レベルでの機能解析が少なく、その作用機構については不明の部

分が多い。申請者らは、これまで世界に先駆けてアントシアニンの新規機能を細胞・遺伝子レベルで見いだしてきたが、細胞外のアントシアニンがどのように細胞核内の遺伝子に影響を与えて調節機能を果たしているか、いわゆるアントシアニンの細胞シグナル伝達系に関しては不明の

点が残っている。

2. 研究の目的

したがって本研究はアントシアニンの細胞がん化予防能を分子レベルで明らかにするため、1)アントシアニンの細胞癌化に関わる細胞内のシグナル経路； 2)アントシアニンと結合する標的タンパク質； 3)細胞炎症・癌化に関わる遺伝子の発現等の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞内のシグナル経路の解析： 細胞膜受容体との結合は、蛍光標識のリガンドを用いてフロサイトによる解析を行った。リン酸化抗体を用いて免疫プロット法によるプロテインキナーゼの活性化を検出した。

(2) アントシアニンと結合する標的タンパク質の探求： アントシアニンをビーズに固定し、結合タンパク質の検索を行った。得られた候補タンパク質をさらに電極に固定し、アントシアニンとの親和力を測定した。

(3) 細胞炎症・癌化に関わる遺伝子の発現： DNA マイクロアレイを用いてアントシアニンによる細胞炎症・癌化に関わる遺伝子の発現制御を解析した。

4. 研究成果

(1) **アントシアニンの細胞内のシグナル経路**： まず細胞炎症・癌化に関わる細胞膜受容体 TLR4 への作用を解析した。アグリコンではデルフィニジン(Dp)、グリコサイドでは、デルフィニジン-3-サンブビオサイド(Dp3-Sam)を実験材料として用いた。その

結果、Dp と Dp3-Sam とも TLR4 と直接的な結合が認められず、細胞内に入る可能性が示唆された。これらの結果を踏まえて細胞癌化に関わる細胞内のシグナル伝達分子を解析した。アントシアニンが MAPK の信号伝達経路を制御することを明らかにした。特に、Dp は Dp3-Sam より強い抑制活性を示した。

(2) **アントシアニンと結合する標的タンパク質の同定**： アントシアニンによる MAPK 経路を制御する分子を同定するため、MAPK の分子とアントシアニンとの結合を解析した。その結果、Dp と Dp3-Sam とも上流のプロテインキナーゼ MEK1 と結合することをビーズ法と親和力解析法により明らかにした。特に、Dp は Dp3-Sam より MEK1 と強い親和力を示した。

(3) **細胞炎症・癌化に関わる遺伝子の発現**： DNA マイクロアレイを用いてアントシアニンによる細胞炎症・癌化に関わる遺伝子の発現制御を解析した。その結果、アントシアニンがリポ多糖による誘発された多くのサイトカイン、インターロイキン、インターフェロンの遺伝子発現を抑制したことが明らかとなった。

このように、アントシアニンが少なくともプロテインキナーゼ MEK1 と結合し、MAPK の信号伝達経路を抑制し、細胞炎症・癌化を制御することが明らかとなった。

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 10 件)

1. Kumamoto T, Fujii M, Hou DX*: Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer Lett.* 275; 17-26

- (2009). Mar 8. 査読有
2. Chen J, Uto T, Tanigawa S, Kumamoto T, Fujii M, Hou DX*: Expression profiling of genes targeted by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in macrophages through DNA microarray. *Nutr. Cancer.* 60:43-50 (2008). 査読有
 3. Lin S, Fujii M, Hou DX*. Molecular mechanism of apoptosis induced by schizandrae-derived lignans in human leukemia HL-60 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 46 (2):590-597 (2008). 査読有
 4. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX*. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(3):797-804 (2008). 査読有
 5. Hou DX*, Masuzaki S, Hashimoto F, Uto T, Tanigawa S, Fujii M, Sakata Y: Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-activated mouse macrophages: molecular mechanisms and structure-activity relationship. *Arch. Biochem. Biophys.*, 460(1):67-74 (2007). 査読有
 7. Hou DX*, Dong Luo, Tanikawa S, Hashimoto E, Uto T, Masuzaki S, Fujii M, Sakata Y: Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF-kB pathway. *Biochem. Pharm.*, 74: 742-752 (2007). 査読有
 8. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX*: Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1

- expression by quercetin. *Free Radic. Biol. Med.*, 42(11):1690-1703 (2007). 査読有
9. Uto T, Fujii M, Hou DX*: Effects of 6-(methylsulfinyl)hexylisothiocyanate on cyclooxygenase-2 expression induced by lipopolysaccharide, interferon-gamma and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Oncol Rep.* 17:233-238 (2007). 査読有
 10. 侯 徳興: ビルベリーのアントシアニンと機能性。 *FOOD Style 21*, 10(8), 13-17 (2006). 査読無

[学会発表] (計 8 件)

1. 十合貴之、隈元拓馬、寺原典彦、藤井信、侯徳興: MEK1 を分子標的とした Dp-3-Sam による細胞形質転換の抑制。日本農芸化学会 2009 年大会シンポジウム、2009 年 3 月 26-28 日、福岡。
2. 陳 継華、藤井 信、侯 徳興: DNA マイクアレーを用いたアントシアニンの抗炎症作用の網羅的な解析。第 62 回日本栄養・食糧学会大会。2008 年 5 月 2-4 日、埼玉。
3. 侯 徳興: ブルーベリー機能性研究の最新事情。第 6 回ブルーベリー国際シンポジウム、2007 年 11 月 29 日、東京。
4. HOU DX: Bilberry anthocyanins and biological activities. 3rd International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2007). Nov 25-28, 2007, シンポジウム、京都。

5. Hou DX: Anthocyanins and Health: Chemopreventive Activities and Molecular Targets. The Satellite Symposium of ICPH2007, Nov 23-24, 2007, シンポジウム、鹿児島.
6. Hou DX: Anthocyanins-more than nature color, chemopreventive activities and molecular targets”. 10th World Congress on Advances in Oncology. Oct 12-15, 2007. シンポジウム、クレタ島、ギリシャ。
7. 佐賀 聡美、侯 徳興、山本 雅史、藤井 信、寺原 典彦：ブルーベリーアントシアニンの組成と機能性の関係について。日本農芸化学会 2007 年大会、2007 年 3 月 24-27 日、東京。
8. HOU DX: American Chemical Society 232nd National Meeting : Anthocyanins and human health: evidence from cellular investigations, Sep 11, 2006, シンポジウム、サンフランシスコ, 米国。

[図書] (計 3 件)

1. Hou DX: Chapter 24. Cancer-preventive effects and molecular actions of anthocyanins in *Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease: Food Factors and Gene Interactions*, pp251-261. Wiley Publishers (2009).
2. Hou DX: Chapter 25. Anthocyanins and Chemoprevention: Evidence from Cellular Investigations in Functional Food and Health. pp 308-320, American Chemistry Society (2008).

3. Hou DX: Chapter 5, Chemopreventive activities and molecular targets of anthocyanins in Anthocyanins as Food Factor: Recent Progress in Studies on Bioavailability and Health Promotion Effects, pp79-99, Research Signpost Press (2008).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

侯 徳興 (HOU DE-XING)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：90305160

(2) 研究分担者

藤井 信 (FUJII MAKOTO)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：70041655

橋本 文雄 (HASHIMOTO FUMIO)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：70244142