

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680052

研究課題名（和文） 食品因子イソチオシアネートの生物化学的特徴を利用した機能性発現機構解析

研究課題名（英文） Chemical biology approach for investigating molecular mechanisms of isothiocyanates-inducing bioactivities

研究代表者

三好 規之 (MIYOSHI NORIYUKI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：70438191

研究成果の概要（和文）：

食品因子イソチオシアネート類 (ITCs) のがん予防活性においては、生体との相互作用、特にタンパク質への結合が重要であることが示唆されているが、その詳細な分子機構は不明である。本研究では ITCs 結合分子網羅的同定法を開発し、培養細胞を用いた検討より ITCs が結合するタンパク質・ペプチド・細胞内遊離アミノ酸を同定することに成功した。本研究より、ITCs のがん予防メカニズムの解明や、関連する生体内バイオマーカーなどを明らかにできる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Thiocarbamylation by electrophilic dietary isothiocyanates (ITCs) is necessary in order for them to exert cancer chemopreventive activities. In this study, we developed a novel method to identify ITCs-targeted molecules using two well-studied ITCs, benzyl ITC (BITC) and phenethyl ITC (PEITC). The principle of this method is based on identifying a pattern of difference between BITC and PEITC, since they show similar chemical and biological behaviors. For the method validation, dithiothreitol-reduced bovine insulin having free thiols as a model molecule was incubated with either BITC or PEITC, and then digested with endoprotease Glu-C. The generated peptides were analyzed by UPLC-TOF/MS and LC-Q-TOF/MS. Three peptides, NYCN, FVNQHLCGSHLVE and ALYLVCGE, were identified to be bound with BITC or PEITC on their cysteine residues. Each set of peptides bound with either BITC or PEITC showed retention times ( $RT_{BITC} < RT_{PEITC}$ ) by reverse-phase column chromatography with a difference of molecular mass ( $\Delta 14.01565$ ). On the basis of these findings, computational mathematical schemes were constructed to extract sets of MS ions satisfying the above criteria. Application of the developed method to an extract of ITCs-treated human colon cancer HCT 116 cells, thiocarbamylation of cysteine residues of glutathione and the N-terminal proline residues of PMFIVNTNVPR from macrophage migration inhibitory factor were successfully identified as the intracellular targets of ITCs. Moreover, the method also detected the thiocarbamoylated conjugates of ITCs with intracellular free cysteine and lysine. This novel developed method should be useful for identifying new target molecules which bind with cancer chemopreventive ITCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	17,500,000	5,250,000	22,750,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

## 1. 研究開始当初の背景

Isothiocyanates (ITCs)は、キャベツやブロッコリーなどアブラナ科植物などに豊富に含まれている含硫化合物である。ITCsのがん予防に関する疫学研究を精査すると、遺伝子多型や人種差、性差、生活習慣によって効果にバラつきはあるものの、ITCsの積極的な摂取により特に肺・大腸での発がんリスクを低減させるということに対して一定のコンセンサスは得られているようである。このようなことから、ITCsは最も重要度の高いがん予防食品因子の一つであると考えられている。

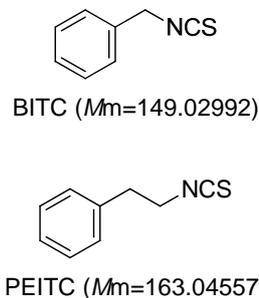
我々の研究グループではこれまでに ITCs によるがん予防効果の分子機序を明らかにする目的でマウス皮膚発がんモデル系を用いた *in vivo* での発がん予防活性の評価や、がん及び正常培養細胞を用いた *in vitro* 系での発がん予防分子メカニズムの解析を行い基礎的データの蓄積を行ってきた。その中で特に、がん予防活性成分探索のため解毒酵素誘導活性を指標に野菜・果物のスクリーニングを行った結果、パパイヤ果実抽出画分に最も強い活性が認められ benzyl ITC (BITC) を活性成分として同定し、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系で細胞内レドックス制御による解毒酵素誘導分子機構を明らかにした。また BITC の細胞死誘導活性に関して、細胞周期制御に密接に関連したアポトーシス誘導機構、がん細胞選択的細胞死誘導活性、BITC 濃度依存的な細胞死様式 (アポトーシス vs ネクローシス) 制御機構についても新しい知見を報告してきた。

興味あることに、BITC によるがん予防の中心的役割を担っていると考えられているこれらの活性は、比較的限られた濃度域でのみ特定の生理活性が発現する。限定的な濃度域でのみ解毒酵素が誘導され、それ以上の濃度になると細胞周期が停止する。またそれ以上の濃度になると細胞周期停止活性は弱まりアポトーシスが誘導される。さらにそれ以上の濃度ではネクローシスが誘導される。個々の生理活性発現機構解析は部分的ではあるが詳細に検討されているが、このような ITCs が誘導する様々な生理活性を体系的に捕らえた報告はこれまでに無い。Mi らの研究グループが放射性同位体標識した phenylethyl ITC (PEITC) と sulforafane (SFN) を用いた興味深い解析結果を報告している。この報告の中で、1) ITCs の細胞内での primary target はグルタチオンであり、グルタチオン化 ITCs の生成量のピークは培養細胞への曝露後 0.5 時間以内であり曝露 1-2 時間後に検出限界以下

までに減少する。2) 核酸付加体の生成量は検出限界以下であった。3) 一方、培養細胞への ITCs 曝露後 0.5 時間から検出されるタンパク質付加物は、反応時間依存的に増加する。4) ITCs 付加タンパク質は曝露濃度依存的にも増加する。5) 主要な ITCs 標的蛋白質として tubulin が同定された。このことから、特に 4) の濃度依存的な ITCs 付加タンパク質の蓄積は tubulin 以外の様々な標的タンパク質への付加反応を示唆しており、標的タンパク質の高感度な特異的検出が可能になれば前述の ITCs の濃度依存的かつ濃度限定的な様々な生理活性発現メカニズムを説明できる可能性がある。また、我々のこれまでの研究においても、BITC が誘導するアポトーシスに感受性の高い G<sub>2</sub>/M 期にある細胞は、曝露後わずか 3 時間で顕著なアポトーシス誘導が認められている。Mi らの報告と併せると、ITCs が誘導・活性化するダイナミックな細胞内情報伝達経路の引き金を引く標的分子の捕獲が、ITCs のがん予防メカニズムを解く鍵になる。しかしながら、細胞内で過剰発現させた特定のタンパク質を除いては tubulin 以外の内因性標的タンパク質が同定されたという報告はない。

## 2. 研究の目的

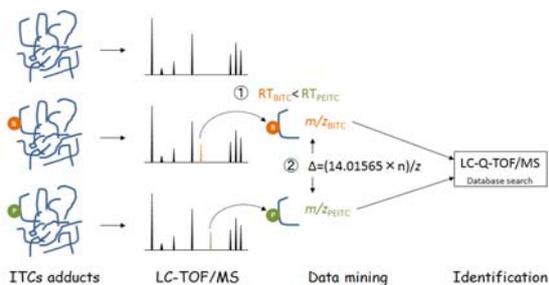
BITC と PEITC、SFN などは細胞内への蓄積量の違いなどが理由で生理活性を示す濃度に差があるが、同様の標的分子、メカニズムで生理活性を発現させていると考えられている。特に BITC と PEITC は側鎖のアルキル鎖の長さが“1”異なる分子 (メチレン基 1 つ分) であり (図 1)、それぞれの付加体 (1 分子付加) は質量数で 14.01565 の差が生じる。



【図 1】 BITC と PEITC の化学構造式  
Mm: monoisotopic mass

この規則性を目印にペプチドの網羅的一斉分析を行い、修飾ペプチドを抽出する。さらに、抽出されたペプチドの MS/MS 解析より修飾部位および標的タンパク質の同定を行

う。同定された標的タンパク質については、ITCs による付加反応によるタンパク質機能への影響を生化学的、分子生物学的、細胞生物学的手法を用い詳細を明らかにすることにより、ITCs の生理活性発現メカニズムを解明する (図 2)。



【図 2】ITCs 結合分子探索法

近年の食品の機能性に関する研究分野において、特定の成分による標的を明らかにすることにより、より詳細な食品成分の“効き目”のメカニズムを明らかにし、疾病に対するより効果的な予防戦略を提唱することが求められつつある。本研究では、BITC と PEITC の生理活性および化学構造上の特徴を利用し標的分子の探索を行うものであり、従来の手法では明らかにすることができなかった ITCs が誘導する生理活性発現分子機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ITCs 結合分子探索法の確立

ITCs 結合モデル分子としてウシインスリンを用い、分析法の確立と評価を行った。ウシインスリン (0.5 mg/ml) を 5 mM dithiothreitol で 1 時間還元処理を行い DMSO (コントロール) あるいは 100  $\mu$ M の BITC、PEITC とそれぞれインキュベートした。TCA 沈殿法により未反応の ITCs を除去し、Glu-C protease (V8 protease) で消化 (酢酸アンモニウム、pH 6.0、25°C、2 時間) し、V8 protease 自己消化サンプルとブランクサンプル (5% アセトニトリル) を加えた 5 サンプルを triplicate で UPLC-TOF/MS 分析を行った。分析条件は、UPLC (Acquity<sup>TM</sup>, Waters)、TOF/MS (Micromass LCT Premier<sup>TM</sup> XE mass spectrometer, Waters) を用い、カラムは Acquity UPLC<sup>TM</sup> BEH C18 column (1.7  $\mu$ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., Waters)、カラムオーブンは 40°C、移動相 A は 0.1% 蟻酸を含む超純水、移動相 B は 0.1% 蟻酸を含むアセトニトリルを用い、流速 0.4 ml/min で 0-5 分 (A : B = 95 : 5%)、25-30 分 (A : B = 20 : 80%) のリニアグラジェント方式で分離を行った。イオン源は ESI のポジティブモード、検出器は以下の条件で行った (capillary voltage at 3000 V, sample cone

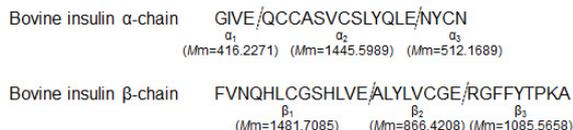
voltage at 30 V, desolvation gas flow at 800 l/hr, cone gas flow at 50 l/hr, source temperature at 100°C, desolvation temperature at 350°C, mass range  $m/z$  100–1500)。また lock spray による MS 軸補正にはレファレンスとして leucine-enkephalin ( $m/z$  556.2771) を用いた。UPLC-TOF/MS 分析によって得られた MS イオンピークは MarkerLynx ソフトウェア (Waters) によって以下の条件でピーク検出を行った (mass tolerance = 0.05 Da; apex track peak parameters: peak width at 5% height (seconds) = auto, peak-to-peak baseline noise = auto, apply smoothing = Yes; collection parameters: intensity threshold (counts) = 50, mass window = 0.05, retention time window = 0.1, noise elimination level = 4, deisotope data = Yes)。検出された MS イオンピークのうち、BITC および PEITC 処理群で特異的に検出された MS イオンピークを Mass Profiler Professional ソフトウェア (Agilent Technology) を用いて抽出した。抽出された BITC および PEITC 処理群特異的 MS イオンピークは、Microsoft Excel の関数式を組み合わせ作成した ITC-binding molecules extraction program (IMEP) に供し、BITC と PEITC の相対質量数差 (14.01565) を有する MS イオンペアを BITC および PEITC 処理群特異的 MS イオンピークの中からそれぞれ抽出した。抽出された MS イオンピークペアについてはそれぞれの保持時間 (RT) が  $RT_{BITC} < RT_{PEITC}$  の条件を満たしているかを確認し、これらの条件を満たした MS イオンピークペアについては LC-Q-TOF/MS 分析を行い、ITCs ペプチドの同定を行った。LC-Q-TOF/MS の分析条件は、HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Technology)、Q-TOF/MS (Agilent 6510, Agilent Technology) を用い、カラムは XBridge<sup>TM</sup> BEH 130 C18 NanoEase<sup>TM</sup> column (3.5  $\mu$ m, 100 mm $\times$ 300  $\mu$ m i.d., Waters) カラムオーブンは 40°C、移動相 A は 0.1% 蟻酸を含む超純水、移動相 B は 0.1% 蟻酸を含むアセトニトリルを用い、流速 7  $\mu$ l/min で 0-5 分 (A : B = 95 : 5%)、65-75 分 (A : B = 20 : 80%) のリニアグラジェント方式で分離を行った。イオン源は ESI のポジティブモード、検出器は以下の条件で行った (V cap voltage at 3500 V, drying gas temperature 325°C, drying gas flow at 5 l/min, nebulizer at 30 psig, fragmentor at 150 V, skimmer at 65 V, mass range  $m/z$  300–3000 for MS analyses、 $m/z$  50–3000 for MS/MS analyses)。コリジョンエネルギーは標的アミノ酸配列によって調節し、タンパク質の同定には MASCOT online database searching algorithm (Matrix Science, Boston, MA) を用いた。

## ヒト大腸がん細胞を用いた ITC 類結合分子の探索

ヒト大腸がん由来 HCT116 は American Type Culture Collection から購入し、10% FBS/50 units/ml penicillin/ 50 µg/ml streptomycin を含む DMEM 培地を用い 5% CO<sub>2</sub> の 37°C インキュベーターで培養・維持した。HCT116 細胞に DMSO (コントロール) あるいは 20 µM の BITC、PEITC をそれぞれ曝露し 4 時間後細胞を回収した。回収した細胞を酢酸アンモニウム (pH 6.0) に懸濁し、凍結融解法により可溶性画分を抽出し、10 µg/ml トリプシンで 2 時間消化した。アセトニトリルで除タンパクを行ったサンプルを 5%アセトニトリルに溶解し、上述の ITC 類結合分子探索法に供した。

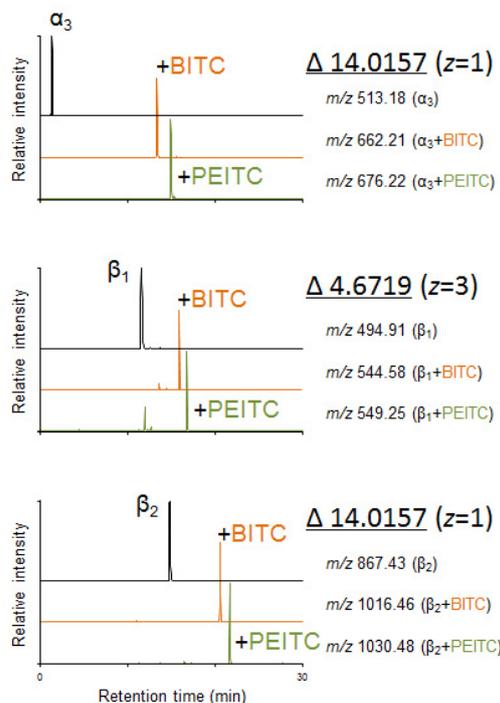
### 4. 研究成果

本研究ではまず分析法の評価を行う目的でモデルペプチドとしてウシインスリン (図 3) を用い検討した。100 µM BITC、PEITC あ



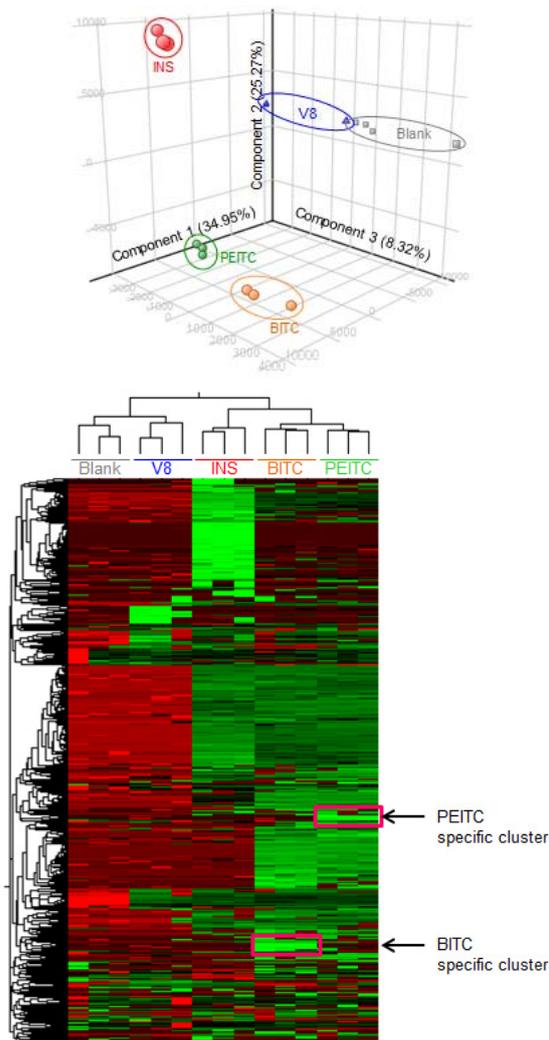
【図 3】ウシインスリンのアミノ酸配列

るいは DMSO (コントロール) 処理したウシインスリンを V8 protease で消化し、V8 protease 自己消化サンプルとブランクサンプル (5%アセトニトリル) を加えた 5 サンプルを triplicate で UPLC-TOF/MS 分析を行った。イオンクロマトグラム抽出により、インスリン  $\alpha$  鎖 C 末端ペプチド ( $\alpha_3$ ) と  $\beta$  鎖の 2 つのペプチド ( $\beta_1$ 、 $\beta_2$ ) に ITCs が 1 分子付加した  $m/z$  に相当する分子のピークが検出され (図 4)、MS/MS 分析より、これらのペプチドのシステイン残基への ITCs 付加であることが確認された。さらに本分析条件 (逆相 HPLC) 下では BITC 付加体は PEITC 付加体よりも早く溶出されることが分かった (図 4)。次に、未知サンプルからの ITCs 付加分子の同定を想定し、インスリンを用いた分析で得られた 6262 の MS イオンピークを用い、ブラインドで以下の検討を行った。まず、6262 の MS イオンピークの主成分分析およびクラスタ解析より、BITC および PEITC 処理サン



【図 4】ウシインスリンペプチド分析のイオン抽出クロマトグラム

ルに特異的なピークが存在することが示された (図 5)。BITC 処理群で特異的に検出された MS イオンピークは、BITC 処理群 ( $n=3$ ) とその他の群 ( $n=12$ ) の unpaired t-test ( $p < 0.01$ ) に多重検定補正 (Bonferroni family-wise error rate) を行い抽出した。PEITC 処理群特異的 MS イオンピークについても同様の操作により抽出した。その結果、それぞれ 49 と 36 の BITC および PEITC 処理群特異的 MS イオンピークが抽出された。これらの MS イオンピークを Microsoft Excel の関数式で作成した ITC-binding molecules extraction program (IMEP) に供し、ITC 結合ペプチドの抽出を行ったところ、複数の MS イオンピークペアが抽出された。それらが上述の ITCs 付加ペプチドであることが確認され、本分析法が精度良く ITCs 付加分子を同定できることが確認された。サンプルを希釈し検出限界濃度を検討したところ、本分析法は 1 ng のインスリンから ITCs 付加体を検出することが可能であり、ウエスタンブロッティング法の検出で汎用されている市販の検出試薬と同程度の検出感度であることが確認された。



【図5】ウシインスリンペプチドのUPLC-TOF/MS分析で得られたMSイオンピークの主成分分析(上)とクラスタ解析(下)

本分析法の有効性が確認されたので、培養細胞を用いたITCs結合分子の探索・同定を行った。ヒト大腸がん由来HCT116細胞へ20  $\mu$ M BITC、PEITCあるいはDMSO(コントロール)を4時間曝露し、抽出した可溶性画分を上述の分析法でITCs結合分子の探索を行った。その結果、BITCおよびPEITC処理群でそれぞれ、 $m/z$  457.1100、471.1401 ( $z=1$ )を示したMSピークについては、LC-Q-TOF/MS分析より還元型グルタチオン(Glu-Cys-Gly)のシステイン残基へのBITCおよびPEITC付加体であることが同定された。さらに、BITCおよびPEITC処理群でそれぞれ、 $m/z$  718.8513 and 723.8600 ( $z=2$ )を示したMSピークは、PMFIVNTNVPRのN末端プロリン残基にBITCおよびPEITCがそれぞれ付加したペプチドであり、ITCs結合タンパク質のひとつとしてmacrophage migration inhibitory factorが同定された。さらに、細胞内の遊離アミノ酸であるシステインとリジンへの付加物が本分析法により同定された。電気泳動などを用

いる一般的なプロテオミクス解析では、このような低分子への付加物を検出することができない。それゆえ、本分析法は、ITCs結合タンパク質を同定し、ITCsが誘導する多彩な生理活性メカニズムを解明するだけでなく、血液や組織抽出物の分析へ応用することにより、ITCsの生理活性に関連した生体内バイオマーカーなどを明らかにできる可能性がある。それゆえ今後、本研究で開発したITCs結合分子同定法を様々な試料の分析へ応用し、ITCsに関連する様々な生体調節機構を明らかにしていく必要がある。

##### 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 21 件)

1. Sakai R, Yokobe S, Abe N, Miyoshi N, Murata Y, Nakamura Y. Luteolin overcomes resistance to benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells. *J. Food Drug Anal.*, (2012) *in press*
2. Suzuki Y, Miyoshi N, Isemura M. Health-promoting effects of green tea. *P. Jpn. Acad B-Phys.*, (2012) **88**, 88-101.
3. Abe N, Shimizu T, Miyoshi N, Murata Y, Nakamura Y.  $\alpha$ -Tocopherol sensitizes human leukemia HL-60 Cells to apoptosis induced by benzyl isothiocyanate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2012) **76**, 381-3.
4. Miyoshi N, Wakao Y, Tomono S, Tatemichi M, Yano T, Ohshima H. The enhancement of the oral bioavailability of  $\gamma$ -tocotrienol in mice by  $\gamma$ -cyclodextrin inclusion. *J. Nutr. Biochem.*, (2011) **22**, 1121-6.
5. Yasui K, Tanabe H, Miyoshi N, Suzuki T, Goto S, Taguchi K, Ishigami Y, Fukutomi R, Imai S, Isemura M. Effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on expression of gluconeogenesis-related genes in the mouse duodenum. *Biomed. Res.*, (2011) **32**, 313-20.
6. Tomono S, Miyoshi N, Ito M, Higashi T, Ohshima H. A highly sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantification of cholesterol ozonolysis products secosterol-A and secosterol-B after derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine. *J. Chromatogr. B*, (2011) **879**, 2802-8.
7. Yasui K, Miyoshi N, Tanabe H, Ishigami Y,

- Fukutomi R, Imai S, Isemura M. Effects of oolong tea on gene expression of gluconeogenic enzymes in mouse liver and in rat hepatoma cells. *J. Med. Food*, (2011) **14**, 930-8.
8. Miyoshi N, Nagasawa T, Mabuchi R, Yasui Y, Wakabayashi K, Tanaka T, Ohshima H. Chemoprevention of azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced mouse colon carcinogenesis by freeze-dried yam *sanyaku* and its constituent diosgenin. *Cancer Prev. Res.*, (2011) **4**, 924-34.
  9. Yasui K, Miyoshi N, Tanabe H, Ishigami Y, Fukutomi R, Imai S, Isemura M. Effects of a catechin-free fraction derived from green tea on gene expression of gluconeogenic enzymes in rat hepatoma H4IIE cells and in the mouse liver. *Biomed. Res.*, (2011) **32**, 119-25.
  10. Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products *in vitro* and *in vivo* through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J. Lipid Res.*, (2011) **52**, 87-97.
  11. Lai YL, Aoyama S, Nagai R, Miyoshi N, Ohshima H. Inhibition of L-arginine metabolizing enzymes by L-arginine-derived advanced glycation end products. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, (2010) **46**, 177-85.
  12. Nakamura Y, Miyoshi N. Electrophiles in foods: The current status of isothiocyanates and their chemical biology. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2010) **74**, 242-55.
- [学会発表] (計 43 件)
1. 三好規之、米持巧、中村宜督、大島寛史、食品成分イソチオシアネートの標的タンパク質探索法の開発、日本農芸化学会 2011、2011.3.25-28. 京都
  2. 米持巧、三好規之、中村宜督、大島寛史、大腸がん HCT116 細胞におけるがん予防成分イソチオシアネートの標的タンパク質探索、日本農芸化学会 2011、2011.3.25-28. 京都
  3. 米持巧、中村宜督、加藤陽二、大島寛史、三好規之、イソチオシアネート結合タンパク質の網羅的探索法の開発、第 20 回フードサイエンスフォーラム、2011.9.17-18. 宮崎
  4. Noriyuki Miyoshi, Takumi Yonemochi, Yoshimasa Nakamura, Hiroshi Ohshima. Development of a comprehensive analytical method for identification of isothiocyanates-binding proteins. International conference on Food Factors 2011. 2011.11.20-23. Taipei, Taiwan
  5. Takumi Yonemochi, Yoshimasa Nakamura, Hiroshi Ohshima, Noriyuki Miyoshi. Identification of target proteins responsible for chemopreventive activities of isothiocyanates in human colon cancer HCT116 cells. International conference on Food Factors 2011. 2011.11.20-23. Taipei, Taiwan
  6. 三好規之、米持巧、中村宜督、大島寛史、がん予防食品因子イソチオシアネート結合タンパク質の探索、日本農芸化学会 2012、2012.3.22-26. 京都
- [図書] (計 4 件)
1. 三好規之ら、抗ストレス食品の生化学評価、抗ストレス食品の開発と展望Ⅱ、シーエムシー出版、p.41-47、2012 年
  2. 三好規之ら、食べ物と健康の基礎実習、理工図書、2010 年
  3. Miyoshi N, et al., Inflammation Induced Carcinogenesis and Chemoprevention. Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors, WILEY-BLACKWELL, pp.145-152 (2009)
  4. 三好規之ら、がん予防と酸化ストレス、酸化ストレスの医学、診断と治療社、p.329-337、2008 年
- [その他]  
ホームページ等  
<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/cellbioc/>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
三好 規之 (MIYOSHI NORIYUKI)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教  
研究者番号：70438191