

機関番号：24303

研究種目：若手研究（スタートアップ）→ 研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890223

研究課題名（和文）フラボノイド結合蛋白の同定と、
分子基盤に基づいた癌予防法の基礎的研究研究課題名（英文）Identification of flavonoids-binding proteins, and basic research of
cancer prevention based on molecular mechanisms

研究代表者

飯泉 陽介 (IIZUMI YOSUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20533178

研究成果の概要（和文）：

食品に含まれているフラボノイドの中には、癌予防効果が期待されているものが存在する。本研究では、代表的な4種のフラボノイドに結合する蛋白を、ナノ磁性ビーズと質量分析計を用いて同定した。それらの結合蛋白の中には、癌細胞の増殖に関与する蛋白が見受けられた。さらに、アピゲニン結合蛋白 ABP1 が、癌細胞の細胞周期を G2 期で制御する蛋白であることを見出し、アピゲニンが ABP1 を阻害することで、癌細胞の増殖を抑制していることが明らかになった。本研究成果は、フラボノイドによる癌の増殖抑制を直接の標的蛋白から説明しうる初めての発見である。

研究成果の概要（英文）：

A number of flavonoids in food are believed to have cancer chemopreventive activity. This research identified flavonoids-binding proteins by utilizing nano-magnetic beads and MALDI-TOF MS. Moreover, it was clarified that apigenin-binding protein 1 (ABP1) regulated the G2 phase of the cell cycle, and apigenin inhibited the proliferation of HT-29 cells by inhibiting ABP1. This achievement is the first evidence that explains the cancer chemopreventive activity of flavonoids from flavonoids-binding proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：癌予防、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ケミカルバイオロジー、ナノ磁性ビーズ、フラボノイド、アピゲニン、癌予防、標的分子、作用機序、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

食品などに含まれているフラボノイドの中には、ゲニステインやケルセチンのように癌予防効果が見出されているものが存在す

る。しかし、これらのフラボノイドがどのような蛋白に直接結合して活性を制御し、癌予防効果を引き起こしているか未だ明らかではない。そこで、ナノ磁性ビーズを用いた薬

剤結合蛋白探索法を応用して、フラボノイドが直接結合する蛋白を探索し、その結合蛋白の機能解析を通して、癌予防効果の詳細な分子機構を明らかにしていくことにした。

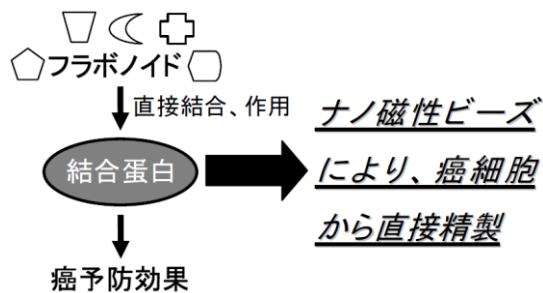


図1. ナノ磁性ビーズを用いたフラボノイド結合蛋白の発見

2. 研究の目的

本研究では、フラボノイドが直接結合する蛋白を同定し、フラボノイドによる癌予防効果の詳細な分子機構を明らかにする。このことにより、明確な分子機構に基づいた癌予防法、即ち「分子標的癌予防法」の開発が可能となる。また、癌予防に役立つ新規細胞内分子機構も明らかになり、より有効で強力な癌予防物質の発見も可能となる。さらに、結合蛋白の発現量や SNPs 情報に基づいた癌のテーラーメイド予防も可能となる。

3. 研究の方法

(1) ナノ磁性ビーズへのフラボノイドの固定化と、フラボノイド結合蛋白の精製

ナノ磁性ビーズとフラボノイドであるケルセチン、ゲニス테인、アピゲニン、ルテオリンそれぞれを混合し、ナノ磁性ビーズに対してフラボノイドを固定化した。そして、各種フラボノイド固定化ビーズと、大腸癌細胞株 HT-29 の細胞抽出液を混合し、各種フラボノイドに結合する蛋白を精製して、SDS-PAGE、銀染色を行うことで、結合蛋白を検出した。

(2) MALDI-TOF MS によるフラボノイド結合蛋白の同定

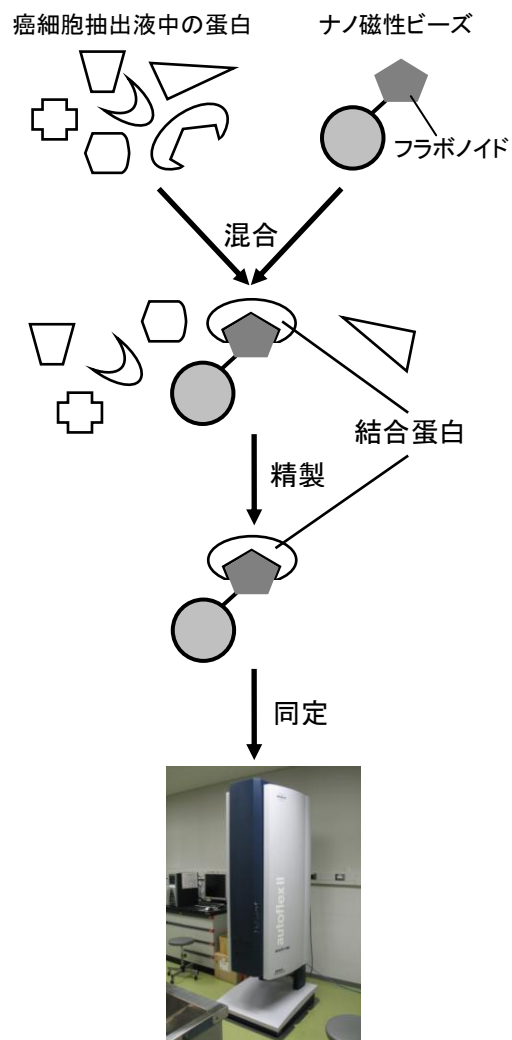
(1)で見出されたフラボノイド結合蛋白を大量に精製し、MALDI-TOF MS を用いたペプチド・マス・フィンガープリンティング法により、結合蛋白を同定した。

(3) アピゲニン結合蛋白の機能解析

機能が報告されていなかったアピゲニン結合蛋白 ABPI (Apigenin-binding protein 1) に対する siRNA を HT-29 細胞に導入し、細胞増殖と細胞周期への影響を解析した。また、細胞周期を制御している蛋白群の変化を、ウエスタンブロットにより解析した。

(4) アピゲニンによる癌細胞増殖抑制作用と結合蛋白の関係の精査

HT-29 細胞に対してアピゲニンを添加し、増殖抑制効果と細胞周期への影響を解析した。また、細胞周期を制御している蛋白群の変化を、ウエスタンブロットにより解析し、(3)で確認された蛋白の変化と比較した。



質量分析計 (MALDI-TOF MS)

図2. ナノ磁性ビーズを用いたフラボノイド結合蛋白の精製と同定

4. 研究成果

(1)フラボノイド結合蛋白の精製と同定

ナノ磁性ビーズに対して、フラボノイドであるケルセチン、ゲニスチン、アピゲニン、ルテオリンをそれぞれ固定化した。そして、これらのフラボノイド固定化ビーズを用いて、大腸癌細胞株 HT-29 の細胞抽出液より、複数のフラボノイド結合蛋白を精製することができた。それらのフラボノイド結合蛋白を MALDI-TOF MS を用いたペプチド・マス・フィンガープリンティング法により、同定することに成功した。結合蛋白のいくつかは、癌細胞の増殖や細胞死に関与することが報告されている蛋白であった。これらの結合蛋白を介して、それぞれのフラボノイドが、癌予防効果を発揮している可能性が考えられた。現在、これらの結合蛋白とフラボノイドとの関係を詳細に解析している。

(2)アピゲニン結合蛋白 ABP1 は、癌細胞の増殖を制御している

次に、フラボノイド結合蛋白の中で、機能が報告されていないアピゲニン結合蛋白 ABP1 (Apigenin-binding protein 1) に着目し、解析を進めていった。始めに、大腸癌細胞株 HT-29 細胞において、siRNA を用いた ABP1 の発現抑制を行い、HT-29 細胞の増殖への影響を調べた。すると、ABP1 の発現抑制により、HT-29 細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析により、その増殖抑制機構として、HT-29 細胞の細胞周期が G2 期で停止していることが明らかになった。さらに、ウエスタンブロット解析により、ABP1 の発現抑制により、G2 期を制御している蛋白の発現が変動していることも明らかになった。これらの結果より、アピゲニン結合蛋白 ABP1 は、G2 期の制御に関わる蛋白の発現を調節することで、G2 期から M 期への移行に関与している蛋白であることが明らかになった。

(3)アピゲニンによる癌細胞増殖抑制作用と結合蛋白の関係の精査

アピゲニンによる癌細胞の増殖抑制作用と ABP1 の機能との関係を調べるために、アピゲニンによる増殖抑制の分子機構を精査した。すると、アピゲニンは HT-29 細胞を G2 期で停止させることで増殖を抑制し、また ABP1 が制御している G2 期制御蛋白の発現を変動させていることが明らかになった。よって、アピゲニンがアピゲニン結合蛋白 ABP1

の機能を阻害することにより、癌細胞の細胞周期を G2 期で停止させ、増殖を抑制していることが明らかになった(論文投稿準備中)。

(4)本研究成果の意義

フラボノイドがなぜ癌予防効果を有するのか、その分子機構については、ほとんど明らかになっていなかった。本研究により、アピゲニンの直接の標的分子 ABP1 が見出され、この成果はフラボノイドによる癌予防効果を直接の標的分子から説明しうる初めての成果である。また、アピゲニンによる癌細胞増殖抑制機構の解析を通して、機能が不明であった ABP1 が、細胞周期の G2 期から M 期への移行に寄与していることが見出され、基礎研究の観点からも非常にインパクトのある成果となった。今後の更なる解析により、ABP1 が癌予防において重要な蛋白であることが解明された場合、ABP1 を標的とした新規癌予防法の開発が期待できる。さらには、アピゲニンは副作用や毒性のない食品成分であることから、ABP1 を分子標的とした新規抗癌剤開発も可能になるだろう。

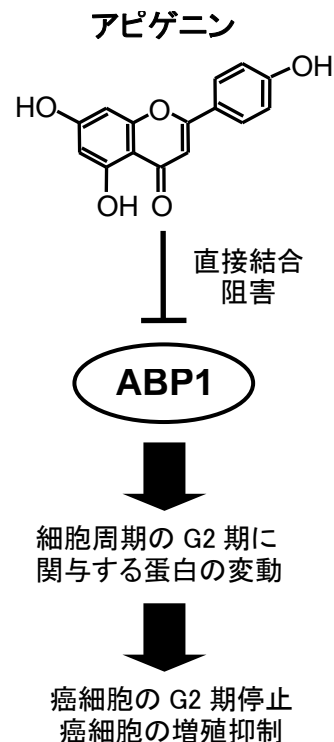


図3. アピゲニン結合蛋白 ABP1 とアピゲニンによる癌の増殖抑制の分子機構

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1件)

1. “Role of N-end rule ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 in regulating the leucine-mTOR signaling pathway.”
Kanao Kume, Yosuke Iizumi, Masashi Shimada, Yuki Ito, Tsutomu Kishi, Yuki Yamaguchi, and Hiroshi Handa. Genes to Cells, 15 (4), 339-349, 2010. 査読有

[図書] (計1件)

1. “Colloids in Biotechnology”
Edited by Monzer Fanun
CRC Press 2011, Pages 197-207
Chapter 9. Affinity Magnetic Beads for Chemical Biology and Medicine.
Yosuke Iizumi, Yasuaki Kabe, Mamoru Hatakeyama, Satoshi Sakamoto, and Hiroshi Handa.

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯泉 陽介 (IIZUMI YOSUKE)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：20533178

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし