

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号	32665
研究種目	若手研究（B）
研究期間	2011～2012
課題番号	23780145
研究課題名（和文）	食品成分の機能性を決定づけるタンパク質の探索：システイン残基の酸化修飾に着目して
研究課題名（英文）	Search for proteins that determine the food function - focusing on the oxidative modification of cysteine residues
研究代表者	
	細野 崇 (HOSONO TAKASHI)
	日本大学・生物資源科学部・助教
	研究者番号：80445741

研究成果の概要（和文）：

タンパク質システイン残基の酸化による翻訳後修飾により、さまざまなタンパク質が機能調節を受ける。本研究では、diallyl trisulfide（以下 DATS）が薬物代謝酵素 CYP2E1 の 437 番目のシステイン残基の SH 基を酸化的に修飾すること、直接的に酵素活性を阻害することを見出した。今後も、システイン残基の酸化修飾が検出されたタンパク質の機能変化を検討することにより、食品成分による新たな機能性の発見やそのメカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative modification of cysteine residues is one of the post-translational regulations in the protein function. In this study, the oxidative modification of the SH group at Cys-437 in CYP2E1 molecule was detected, and this modification was causative of the inhibition of the CYP2E1 activity by DATS. Further analyses on the function of proteins which had been oxidized by DATS, will clarify the novel functions of food components such as DATS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養生化学、食品機能、システイン、薬物代謝酵素、CYP2E1

1. 研究開始当初の背景

いくつかの食品由来成分はタンパク質のシステイン残基と共有結合し、その分子機能を調節することで生理活性を示すことが報告されている。天然物に由来する抗がん物質の研究を進める中で、我々はガーリックの香気成分である diallyl trisulfide（以下 DATS, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-\text{SSS}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ）に強いがん細胞の増殖抑制活性を見出した。DATS をヒト大腸がん細胞に添加して培養すると、細胞周期の停止による増殖抑制とアポトーシスが誘導されることを報告した(Hosono *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005, 280(50); 41487-41493,

Hosono *et al.*, *Carcinogenesis*, 2008, 29(7), 1400-1406)。さらに DATS が細胞分裂に重要なタンパク質である β -tubulin のシステイン残基を *S*-allyl 修飾することで紡錘糸の形成を阻害し、細胞分裂を阻害することを明らかにした。

食品に含まれる生理活性成分の中には、DATS と同様な性質を持ち、タンパク質のシステイン残基と反応するものが報告されている。例えば、ワサビに含まれる isothiocyanate は、DATS と同様に tubulin のシステイン残基に共有結合して細胞分裂を阻害することが報告されている(Mi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008,

283(32): 22136-22146)。また、シナモンに含まれる cinnamaldehyde は辛味受容体である TRPA1 のシステイン残基に共有結合して活性化する (Macpherson *et al.*, *Nature*, 2007, 445(7127): 541-545)。タンパク質のシステイン残基は生体内の酸化状態によってもグルタチオン化やニトロ化などの修飾を受けること、システイン残基の酸化修飾は可逆的で、形成された共有結合は元のシステイン残基に戻ることがあるために、食品成分を用いたシステイン修飾タンパク質の探索は容易ではない。

2. 研究の目的

本研究では DATS をモデル化合物として用い、システイン残基と共有結合するタンパク質を探索・同定、タンパク質機能に及ぼす影響を解析することを目的に研究を行った。さらに、DATS によるシステイン残基の酸化修飾タンパク質として見つかった薬物代謝酵素 cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 (以下 CYP2E1) について、タンパク質修飾と CYP2E1 活性の関係を中心に解析した。

3. 研究の方法

(1) DATS 修飾タンパク質の検出

ラット肝臓由来タンパク質抽出液と DATS (100 μ M) を 37°C で 1 時間インキュベーションした。反応タンパク質溶液にトリプシンを加え、さらに 37°C で 16 時間インキュベーションした。得られたペプチド断片を LC-MS/MS を用いてペプチドマスマッピングを行った。過去の実験結果から、DATS 処理による質量数の増加を考慮し、酸化修飾されたシステイン残基を含むタンパク質を網羅的に同定した。

(2) DATS が CYP2E1 活性に及ぼす影響の検討 (*in vitro*)

CYP2E1 タンパク質発現の誘導剤である isoniazid を投与したラット肝臓由来ミクロソーム画分に DATS (100 μ M) を加えた後、37°C で 1 時間インキュベーションした。その後、CYP2E1 の基質である chlorzoxazone と NADPH を加え、生成した 6-hydroxy chlorzoxazone 量から CYP2E1 活性を算出した。

(3) DATS が APAP 誘導性肝障害に及ぼす影響の検討

Wistar ラットにコーン油に溶解した DATS (500 μ mol/kg body weight/ day) ならびに対照としてコーン油を 5 日間経口投与し、DATS の最終投与 24 時間後に APAP (500 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。APAP 投与 24 時間後に心臓から全採血し、血漿中の aspartate aminotransferase (AST) と alanine

aminotransferase (ALT) を測定した。

(4) DATS が APAP とその毒性代謝産物による肝細胞死に及ぼす影響の検討

Wistar ラット由来初代培養肝細胞に DATS (100 μ M) を加えた後、APAP, あるいはその毒性代謝産物である *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (以下 NAPQI) を添加し、48 時間培養した。その後、MTT アッセイによって生細胞率を算定した。

(5) DATS が CYP2E1 活性に及ぼす影響の検討 (*in vivo*)

Wistar ラットにコーン油に溶解した DATS (500 μ mol/kg body weight/ day) ならびに対照としてコーン油を 5 日間経口投与した。DATS の最終投与 24 時間後に chlorzoxazone (50 mg/kg body weight) を腹腔内投与し、15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 分後に尾静脈から部分採血した。得られた血漿中の chlorzoxazone 濃度は HPLC を用いて測定した。

(6) DATS が APAP 薬物動態に及ぼす影響の検討

Wistar ラットにコーン油に溶解した DATS (500 μ mol/kg body weight/ day) ならびに対照としてコーン油を 5 日間経口投与し、DATS の最終投与 24 時間後に APAP (500 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。APAP 投与後、30 分、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 時間後に尾静脈から部分採血した。血漿中の APAP 濃度は HPLC を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) DATS 修飾タンパク質の検出

我々はこれまでに、DATS をラットに投与することで薬物代謝酵素 CYP2E1 の酵素活性やタンパク質発現が低下することを見出していたが、その原因は明らかではなかった (Hosono-Fukao *et al.*, *J. Nutri.*, 2252-2256, 2009)。今回の検討の結果、DATS による酸化修飾タンパク質の 1 つに CYP2E1 を見出した。CYP2E1 の酸化修飾部位は 437 番目のシステイン残基であり、ここはヘム鉄と配位したアミノ酸で、CYP2E1 による酸化酵素活性を示すために重要な部分である。したがって、DATS は Cys-437 を酸化修飾することで、直接的に CYP2E1 酵素活性を阻害することが考えられた。

(2) DATS が CYP2E1 活性に及ぼす影響の検討 (*in vitro*)

CYP2E1 タンパク質発現の誘導剤である isoniazid を投与したラット肝臓由来ミクロソーム画分に DATS (100 μ M) を加え、chlorzoxazone を基質として CYP2E1 活性を測定した。その結果、DATS 処理によって

CYP2E1 活性は約 50%に抑制された。この時、1 mM の還元型グルタチオンを共存させると、DATS による CYP2E1 の活性阻害は約 70 % となったことから、DATS による CYP2E1 の活性阻害にはシステイン残基の酸化修飾が関与することが示唆された。



図1 DATS と GSH が CYP2E1 の活性に及ぼす影響

(3) DATS が APAP 誘導性肝障害に及ぼす影響の検討

CYP2E1 は様々な薬物の代謝に関与する酵素である。解熱鎮痛薬の APAP はそのほとんどがグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け尿中に排泄されるが、ごく一部が CYP2E1 による代謝を受け、核酸やタンパク質との反応性に富む中間代謝物 NAPQI を生成する。NAPQI もグルタチオン抱合を受けて無毒化されるものの、過剰の APAP 摂取によりグルタチオンが枯渇すると、NAPQI が核酸、タンパク質と共有結合するようになり、肝障害が誘導される。DATS は直接、CYP2E1 活性を阻害したことから、APAP 誘導性肝障害を抑制できるのではないかと考え、次の実験を行った。

ラットに DATS を 5 日間連続投与した 24 時間後、APAP を投与し、急性肝障害を惹起した。APAP 投与 24 時間後の肝障害マーカーの血漿中 AST, ALT 活性は高値を示したが、DATS 投与によりその上昇は顕著に抑制された。以上の結果から、DATS は APAP 誘導性肝障害を抑制することが明らかとなった。

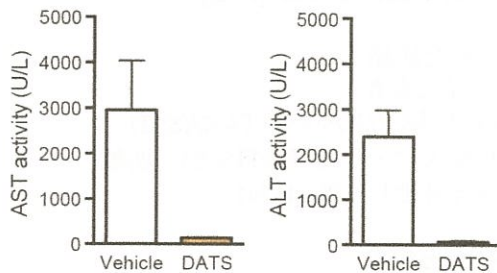


図2 DATS 投与が APAP 誘導性肝障害に及ぼす影響

(4) DATS が APAP とその毒性代謝産物による肝細胞死に及ぼす影響の検討

CYP2E1 により代謝されて生成する NAPQI が APAP の毒性代謝産物であり、それによって肝細胞が傷害される。次に我々は DATS が APAP と NAPQI による肝細胞障害を抑制で

きるか、ラット初代培養肝細胞を用いて検討した。

APAP を添加した肝細胞の生細胞率は約 50%に低下した一方、APAP と DATS の共添加群では生細胞率は約 80%まで回復した。NAPQI 添加群の生細胞率も顕著に減少したが、NAPQI と DATS の共添加群においても生細胞率は回復しなかった。DATS は NAPQI による肝細胞障害を抑制できなかったことから、DATS は CYP2E1 活性を抑制することで NAPQI の生成を抑制し、APAP 誘導性肝障害を予防することが示唆された。

(5) DATS が CYP2E1 活性に及ぼす影響の検討 (in vivo)

DATS は直接的に CYP2E1 活性を阻害すること、APAP 誘導性肝障害を抑制するが、NAPQI による肝細胞障害を抑制できないことから、CYP2E1 の活性阻害が APAP 誘導性肝障害の抑制に重要であることが明らかとなった。次に、DATS 投与によって生体内で CYP2E1 活性が阻害されるか検討した。

Chlorzoxazone は CYP2E1 特異的に代謝される薬剤であり、その血中動態を測定することで生体内での CYP2E1 活性を評価することができる。Chlorzoxazone の投与により、30 分をピークに血中濃度が上昇し、その後 150 分にかけてゆるやかに減少した。DATS を 5 日間連続投与し 24 時間後のラットに chlorzoxazone を投与すると、血中濃度が著しく上昇し、投与後 240 分においても、高値を保っていた。このことから、DATS 投与は in vivo においても CYP2E1 活性を阻害し、APAP 代謝により生じる NAPQI の生成を抑制すること、薬物の代謝に影響を及ぼすことが明らかとなった。

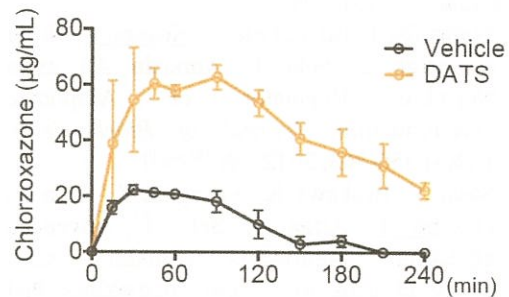


図3 DATS 投与が chlorzoxazone の血中動態に及ぼす影響

(6) DATS が APAP 薬物動態に及ぼす影響の検討

薬物間相互作用とは複数の薬剤を併用した場合に、単独の薬剤使用では見られなかった作用の増強や減弱、強い副作用の発現が見られることである。DATS 投与は CYP2E1 活性を阻害し、APAP 誘導性肝障害を抑制したが、その一方で APAP の血中滞留時間を延長し、その作用を増強する可能性が考えられた。

そこで、DATS 投与ラットにおける APAP の血中動態について検討した。

血中の APAP 濃度は、投与後 1 時間で最大となり、その後 4 時間にかけて減少した。ラットに DATS を 5 日間連続投与した 24 時間後、APAP を投与し、経時的に血中濃度を測定したところ、APAP 単剤投与と比べて血中濃度に変化がなかった。このことから、DATS は APAP の通常の代謝（グルクロン酸抱合や硫酸抱合）には影響を及ぼさず、APAP の作用を増強する可能性は低いと考えられた。

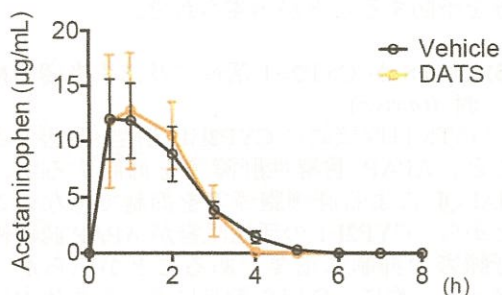


図 4 DATS 投与が APAP の血中動態に及ぼす影響

以上の結果から、DATS は様々なタンパク質のシステイン残基の酸化修飾を介して、その機能を制御することが明らかとなった。酸化修飾が検出されたタンパク質について、その機能変化を検討することで、システイン残基修飾を介した食品成分による新たな機能性の発見やそのメカニズムの解明につながる事が期待される

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 7 件)

- ① Watanabe T, Ito Y, Sato A, Hosono T, Niimi S, Ariga T, Seki T. Annexin A3 as a Negative Regulator of Adipocyte Differentiation. *Journal of Biochemistry*, 152(4) 355-363, 2012, 査読あり
- ② Sasai Y, Iwakawa K, Yanagida K, Shen Y, Hosono T, Ariga T, Seki T. Advanced glycation endproducts stimulate renal epithelial cells to release chemokines that recruit macrophages, leading to renal fibrosis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(9) 1741-1745, 2012, 査読あり
- ③ Seki T, Hosono T, Suda S, Kimura K, Ariga T. Anticancer Property of Allyl Sulfides Derived from Garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Food and Drug Analysis*, 20/ S1 309-312, 2012, 査読あり
- ④ Nishitsuji K, Hosono T, Nakamura T, Bu G, Michikawa M. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an

isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain-barrier model. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20) 17536-17542, 2011, 査読あり

- ⑤ Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, Michikawa M. Lipoprotein lipase is a novel A β -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A β in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8) 6393-6401, 2011, 査読あり
- ⑥ Shen Y, Jia JN, Honma N, Hosono T, Ariga T, Seki T. Beneficial Effects of Cinnamon on the Metabolic Syndrome, Inflammation, and Pain, and Mechanisms Underlying These Effects – A Review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(1) 27-32, 2011, 査読あり
- ⑦ Jung CG, Uhm KO, Miura Y, Hosono T, Horike H, Khanna KK, Kim MJ, Michikawa M. β -amyloid increases the expression level of ATBF1 responsible for death in cultured cortical neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 6:47, 2011, 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① 細野 崇、ガーリック香気成分 diallyl trisulfide は CYP2E1 を阻害し、アセトアミノフェン誘導肝障害を抑制する、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 26 日、名古屋大学
- ② 細野 崇、ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide はシステイン残基との反応を介してヒト大腸がん細胞の増殖を抑制する、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学

[その他]

ホームページ

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
細野 崇 (HOSONO TAKASHI)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：80445741
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者