

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580177

研究課題名(和文)脂質由来リガンドによる細胞応答と食品成分による制御

研究課題名(英文)Regulation of inflammatory responses by food-derived compounds

研究代表者

柴田 貴広 (Shibata, Takahiro)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：80447838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Toll-like receptor (TLR) は、炎症性疾患などに関与している重要な分子である。本研究では、キャベツなどの野菜抽出物に強いTLR阻害活性を見出し、その活性成分としてイベリンと呼ばれる化合物を同定した。またその作用機構を解析した結果、TLRに直接結合することにより二量体化を阻害していることが明らかとなった。以上の結果から、TLR二量体化のステップが抗炎症活性食品成分の標的となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptors (TLRs) have been implicated in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases. In this study, based on an extensive screening of vegetable extracts for TLR-inhibiting activity, we found cabbage extracts to be the richest sources of a TLR signaling inhibitor. We performed activity-guiding separation of the principal inhibitors and identified iberin from the cabbage. In addition, it was revealed that iberin specifically acted on the dimerization step of TLRs in the TLR signaling pathway. Moreover, we developed a novel probe combining an isothiocyanate-reactive group and an alkyne functionality for click chemistry and detected the probe bound to the TLRs in living cells, suggesting that iberin disrupts dimerization of the TLRs via covalent binding. These findings establish the TLR dimerization step as a target of food-derived anti-inflammatory compounds.

研究分野：食品生化学

キーワード：自然免疫 Toll様受容体 食品成分 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1)

食品中における脂質やタンパク質の酸化劣化は、単に風味を低下させるのみならず、毒性の高い酸化物の産生を伴うことから、食品の安全性や健全性の面からも極めて重要な問題である。一方で、このような酸化的活性種は、我々の生体の中においても生成されることが示唆されており、生活習慣病や老化などにおいても広く関与する可能性が示唆されている。

(2)

複雑な化学反応を伴って生成される酸化脂質や酸化タンパク質は、様々な化学構造を有することから、細胞膜上の受容体を活性化し、炎症反応などの細胞応答を引き起こすものと考えられる。近年、生体異物や酸化物を認識するいくつかの受容体が発見され、その生理的重要性が認識されている。なかでも、異物認識に関与する toll-like receptor (TLR) と呼ばれる受容体は、自然免疫の分子実体としてその重要性が示唆されており、2011年のノーベル医学・生理学賞の受賞研究としてさらに注目が集まっている。こうした点から、内因性あるいは外因性の酸化生成物による受容体を介した炎症誘導機構の解析は、様々な疾病の発症機構を明らかにするうえで極めて重要な研究分野であると考えられる。さらに、こうしたリガンド依存的な炎症応答を制御する食品成分は、疾病の予防の観点からも有用であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、自然免疫の分子実体である TLR に注目し、その活性を制御する内因性および外因性分子の探索とその作用機構の解明を目的としている。特に、酸化変性タンパク質による炎症誘導や、食品成分による炎症抑制活性の評価とその作用機構の解明を通して、食による生活習慣病予防に貢献する基盤的研究を展開する。様々な食品成分の中でも、日常的に摂取可能な野菜類に注目し、それらの抽出物に含まれる TLR 阻害物質を同定し、その分子レベルでの作用メカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 自然免疫受容体 TLR に対するリガンド活性評価系の確立

自然免疫に関与する TLR 受容体の中でも、細胞膜上に局在し変性タンパク質やリポ多糖を認識する TLR2 および TLR4 に注目し、これらの受容体の活性化を指標としたリガンド活性の評価系を確立した。具体的には、TLR シグナルの下流に位置する転写因子

NF- κ B のレポーター遺伝子を、TLR 発現ベクターとともに、HEK293 細胞に導入し、安定発現細胞を樹立した。この時、より簡便でハイスループットなアッセイ系とするために、分泌型のレポーター遺伝子を用いた。また、TLR を発現しているマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に対して NF- κ B レポーター遺伝子の安定発現株も合わせて作製した。

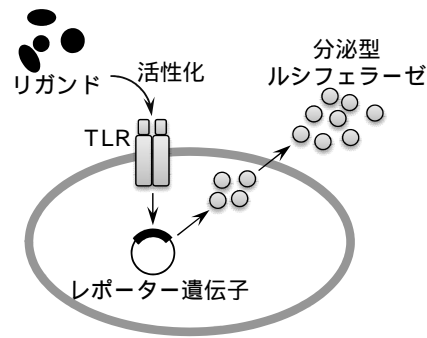


図1 ルシフェラーゼアッセイによる TLR 活性評価法

(2) 受容体-リガンド相互作用や炎症応答を抑制する食品成分の探索と作用機構の解明

ルシフェラーゼアッセイを利用した TLR 活性評価法を用いて、TLR 阻害活性を有する食品成分の探索を行った。野菜の酢酸エチル抽出物を調製し、これを細胞に前投与したのち、TLR リガンドを処理し、24 時間後に培地を回収し、ルシフェラーゼアッセイを行った。活性の見られた野菜抽出物に関して、HPLC による単離精製、さらに NMR や質量分析装置などの各種機器分析により、その化学構造を決定した。

(3) TLR 阻害活性を有する食品成分の作用機構の解明

活性の認められた化合物に関して、TLR シグナル伝達経路のどの部分に作用しているのかを検討した。特に、TLR シグナル伝達経路の第一段階である TLR の二量体化を中心に検討を行った。また、活性成分の標的タンパク質の探索のため、クリックケミストリーを用いた検討を行った。

4. 研究成果

(1) TLR リガンドアッセイ系の確立

HEK293 細胞に、TLR4 および NF- κ B のレポーター遺伝子を導入し、安定発現細胞を取得した。得られたクローンのうち、LPS に高い応答を示す細胞を選抜した。この安定発現細胞は、LPS の濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇することを確認した。同様に、TLR2 安定発現細胞およびレポーター遺伝子を安定発現させた RAW264.7 細胞も樹立することに成功した。

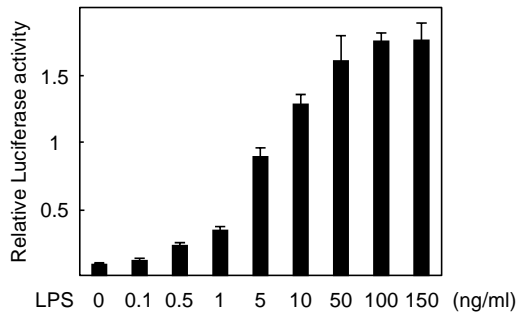


図 2 LPS 濃度依存的なルシフェラーゼ活性の上昇

(2) 野菜抽出物による TLR 阻害活性の評価

様々な野菜の酢酸エチル抽出物について、TLR 阻害活性を評価した。その結果、キャベツ、タマネギ、ビートなどに強い阻害活性が認められた。このうち、日常的に摂取しているキャベツおよびタマネギに注目して以降の研究を行うこととした。

キャベツおよびタマネギ抽出物を逆相 HPLC により分画し、TLR 阻害活性を指標に活性物質の単離・精製を行った。キャベツより得られた活性物質について、NMR および質量分析装置による化学構造解析を行った結果、イソチオシアネート化合物であるイベリンを同定した。

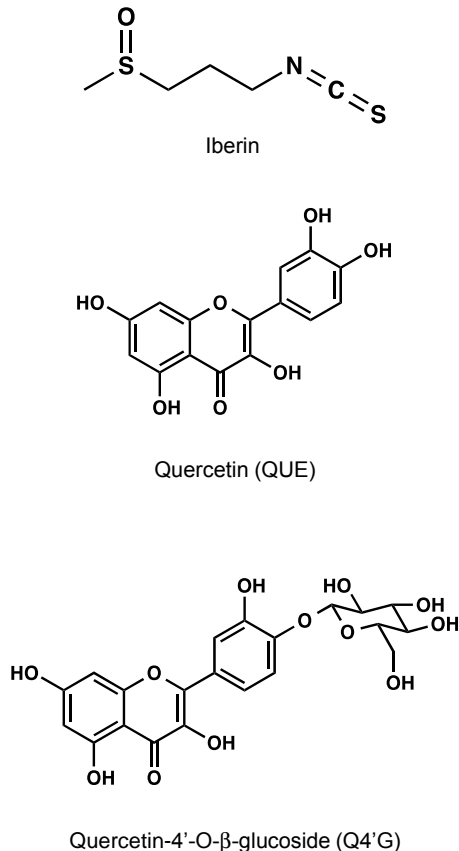


図 3 TLR シグナル阻害活性を有する食品成分であるイベリン(上)、ケルセチン(中)、ケルセチン配糖体(下)の化学構造

また、タマネギより単離した2種類の活性物質についても同様に化学構造解析を行った結果、主要なポリフェノール的一种であるケルセチンおよびその配糖体であるケルセチン 4'-グルコシドであることが判明した。

イベリンに関しては、LPS 投与マウスにおける炎症抑制活性の評価を行った。その結果、LPS の投与によって誘導される TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン類の発現が、イベリンの経口投与によって有意に抑制されることが明らかとなった。

(3) イベリンの作用機構の解析

TLR4 はリガンドである LPS が結合することにより二量体化し、下流のシグナルへと伝達される。そこで、免疫沈降実験により、TLR の二量体化に対するイベリンの効果について検討した。その結果、イベリンは TLR4 の二量体を顕著に阻害することが明らかとなった。

この二量体化の阻害メカニズムとして、TLR タンパク質に対するイベリンの共有結合修飾を想定した。このことを確かめるために、クリックケミストリーによる検討を行った。アルキンを結合したイベリン誘導体を細胞に投与後、クリックケミストリーによりアジド化ビオチンを付加し、プルダウンアッセイを行った。その結果、確かにイベリンが TLR に共有結合することを明らかにした。これらの結果から、イベリンなどのイソチオシアネート化合物が TLR を標的として抗炎症作用を示す可能性が示唆された。

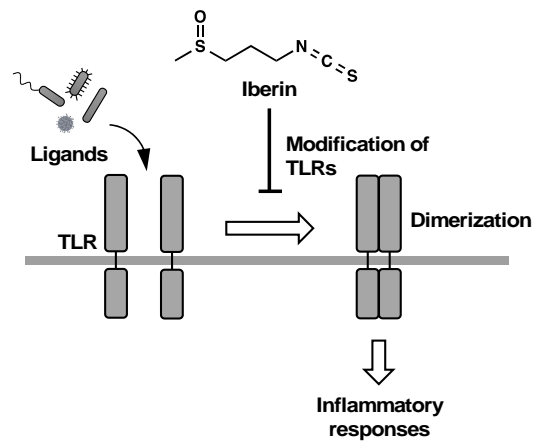


図 4 イベリンによる TLR シグナル伝達の阻害機構

本研究では、野菜抽出物より、TLR 阻害活性を有する化合物の探索を行った。なかでもキャベツより単離したイベリンは、動物実験においても炎症抑制効果が認められた。さらに、その作用メカニズムを解析した結果、TLR に直接共有結合することにより TLR の二量体化を阻害していることが示唆された。これ

らの結果から、TLRの二量体化阻害が抗炎症性を示す食品成分の作用標的となりうることを示すことができた。

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 1 件)

Shibata, T., Nakashima, F., Honda, K., Lu, Y. J., Kondo, T., Ushida, Y., Aizawa, K., Suganuma, H., Oe, S., Tanaka, H., Takahashi, T. and Uchida, K. Toll-like receptors as a target of food-derived anti-inflammatory compounds. *J. Biol. Chem.* 査読有, 289, 2014, pp. 32757-32772.
DOI: 10.1074/jbc.M114.585901

〔学会発表〕(計 5 件)

柴田 貴広、盧 育章、本多 和也、河合 慶親、内田 浩二: ニンニク抽出物に含まれるTLR阻害物質の探索. 日本農芸化学会 2013年度大会(仙台) 2013年3月

本多 和也、柴田 貴広、河合 慶親、田中 浩士、高橋 孝志、牛田 悠介、相澤 宏一、稲熊 隆博、内田 浩二: キャベツ由来イソチオシアネートのTLR抑制機構. 日本農芸化学会 2013年度大会(仙台) 2013年3月

柴田 貴広、中島 史恵、本多 和也、河合 慶親、牛田 悠介、相澤 宏一、稲熊 隆博、内田 浩二: たまねぎ抽出物に含まれるTLR抑制物質の同定と作用機序解析. 日本農芸化学会 2013年度大会(仙台) 2013年3月

中島 史恵、柴田 貴広、内田 浩二: 血清アルブミンによるコレステロール引き抜きに伴う炎症誘導. 第86回日本生化学会大会(横浜) 2013年9月

中島 史恵、柴田 貴広、内田 浩二: 炎症応答における細胞膜コレステロールの関与. 日本農芸化学会 2014年度大会(東京) 2014年3月

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 貴広 (SHIBATA, Takahiro)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 80447838

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし