

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580205

研究課題名(和文) 栄養素・食品成分からDNA合成酵素分子種阻害物質の探索と新規な健康機能性の解析

研究課題名(英文) Screening of DNA polymerase species selective inhibitors from nutrients and food components, and analysis of novel healthy functions

研究代表者

水品 善之(MIZUSHINA, Yoshiyuki)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：20307705

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)： 栄養素や食品成分は、これまでに様々な生理活性が知られているが、新規な生理活性としてDNAを合成する酵素『DNA合成酵素、DNAポリメラーゼ(pol)』の分子種に対する選択的阻害活性に注目した。in vitroの簡便なpol阻害活性測定法を確立して、本阻害物質を単離・精製し、化学構造を決定した。具体的には、大豆から哺乳類pol阻害物質であるセラブロシドとステロイド配糖体、マンゴスチン果皮からDNA複製型pol阻害物質であるβ-mangostinなどであった。pol阻害物質には抗炎症・抗アレルギー作用、DNA複製型pol阻害物質には抗がん作用を見いだした。

研究成果の概要(英文)： Some nutrients and food components are known to have various healthy functions. In this study, I established the in vitro screening method of mammalian DNA polymerase (pol) inhibitors, and screened them from nutrients and food components. Especially, I found a cerebroside (glucosyl ceramide, N-{1-[(2S)-D-Glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxyheptadeca-3,7-dien-1-yl}-2-hydroxyhexadecanamide) and a steroidal glycoside (eleutheroside A) as mammalian pol lambda specific inhibitors from soybean (*Glycine max* L.), and beta-mangostin as a DNA replicative pols inhibitor from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). These inhibitors of pol lambda and DNA replicative pols were related to anti-inflammatory effect and anticancer effect, respectively.

研究分野：食品機能学

キーワード：健康機能性食品 DNA合成酵素 酵素阻害剤 抗炎症作用 抗がん作用 マイクロアレイ解析 ノックダウン解析 作用機序

1. 研究開始当初の背景

先進国である日本は医療技術の発達に伴って高齢化が顕著に進んでいる。高齢化人口が健康的であることは、生活の質(QOL)の保障だけでなく、医療費の削減にもつながる。このような健康維持の手段として、毎日摂取している栄養素や食品成分に注目した。食品の三次機能に注目した栄養素・食品で病気を予防・治療するという「医食同源」の発想である。

2. 研究の目的

栄養素や食品成分(非栄養素)は、これまでに様々な生理活性が見いだされているが、新規な生理活性として遺伝子の本体であるDNAを合成する酵素『DNA合成酵素、DNAポリメラーゼ(pol)』の分子種に対する選択的阻害活性に注目した。pol阻害活性に基づいた新規な健康機能性とその作用機序を見いだすことを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類 pol の精製

ヒトをはじめとする高等真核生物には15種類のpol分子種が存在するが、世界中の一流pol研究者との共同研究により、遺伝子工学的手法(大腸菌や昆虫細胞の遺伝子組換え体を用いたのpolタンパク質の発現・精製)や生化学的手法(抗pol抗体カラムを用いたの精製)を駆使することで、活性を有する精製されたpol分子種・11種類の大量安定供給に成功した(図1)。

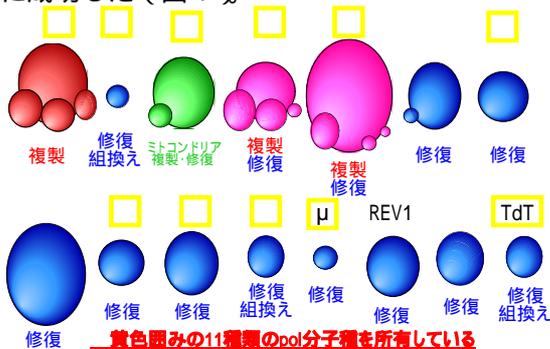


図1: 哺乳類の pol 分子種 (15 種類)

(2) pol 阻害活性測定方法

基質として鋳型 DNA である合成 DNA の poly(dA)/oligo(dT)<sub>18</sub> および放射性標識ヌクレオチドである [<sup>3</sup>H]-dTTP を用いて、Pol によって鋳型 DNA に取り込まれた [<sup>3</sup>H]-dTTP の放射活性を定量した。その阻害活性は、酵素と被検物質(栄養素や食品成分)のプレ・インキュベーションによる活性の減少を測定した(図2) [1, 2]。

(3) 食品素材から pol 分子種阻害物質の単離・精製と構造決定

各種食品素材やその不可食部(廃棄物)をエタノールで抽出してから、pol 阻害活性を指標にして、シリカゲルカラムクロマトグラ

フィー、HPLC など各種クロマトグラフィーを駆使することにより活性成分を完全精製した。そして、NMR, MS, IR, CD などの機器分析により化学構造を決定した。

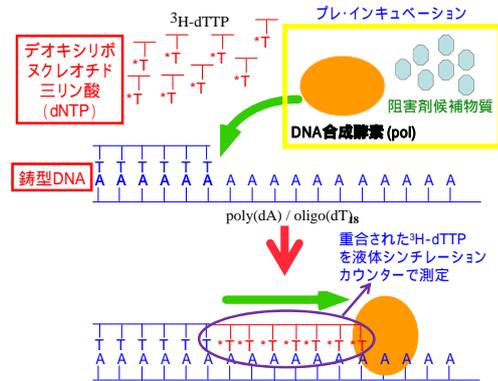


図2: pol 阻害活性測定の方法

(4) 見いだした食品由来の pol 分子種阻害物質の健康機能性調査

ヒトがん細胞増殖抑制活性試験: ヒト由来各種がん細胞株に対する増殖抑制活性は、WST-1 法により実施した。フローサイトメーターを使用して細胞周期を解析した。細胞内のカパーゼ活性測定や DAPI 染色した細胞核の形態観察からアポトーシス誘導の有無を解析した。

抗炎症活性試験: ICR 系マウスの耳介へ起炎剤として TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を塗布して炎症(浮腫)を誘発させ、そのマウス耳介へ pol 分子種阻害物質を塗布して、7 時間後の耳介重量変化を計測した。

抗アレルギー活性試験(即時型皮膚反応モデル、PCA 反応): 抗 DNP IgE 抗体をマウス両耳の耳介内側に皮内投与して受動感作させてから被検物質を経口投与した。48 時間後に TNP-BSA および 0.5% エバンスブルーを含有する生理的食塩液を尾静脈より投与して IgE 介在性の I 型アレルギー反応を誘発した。30 分後にマウスを屠殺し両耳の耳介を採取してエバンスブルーを抽出、この漏出色素量を吸光度 620nm で定量した。

(5) 見いだした食品由来の pol 分子種阻害物質による健康機能の作用機序解析

pol 分子種阻害物質を細胞培養系へ添加した後、細胞から mRNA を回収してマイクロアレイ解析した。pol 分子種阻害物質の添加の有無による炎症・アレルギー関連因子(タンパク質)の発現量の差異を比較・解析することで、代謝経路の変化から作用機序(メカニズム)を考察した。

pol 分子種阻害物質の代わりに、その pol 分子種の siRNA を培養細胞へ添加することで pol タンパク質の発現を抑制させて、炎症関連因子の発現量の差異を比較した。

4. 研究成果

(1) 大豆から見いだした哺乳類 pol 特異的

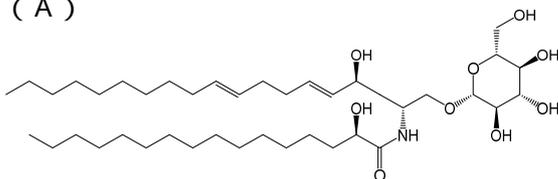
## 阻害物質

大豆から pol 阻害物質の単離・精製：大豆のエタノール抽出物に pol 阻害活性を見いだしたので、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて pol 阻害活性物質 2 つを完全精製し、化学構造を解析した。その結果、セレプロシド (N-{1-[(*D*-Glucopyranosyloxy)methyl]-2-hydroxyheptadeca-3,7-dien-1-yl}-2-hydroxyhexadecanamide) (図 3 A) およびステロイド配糖体 (Eleutheroside A) (図 3 B) であった。これらは、ともにヒト pol を阻害するが、その他の哺乳類 pol 分子種は阻害しなかったことから、pol 特異的阻害物質と言える。

抗炎症活性：これら 2 つの pol 特異的阻害物質は、TPA で誘導したマウス耳介炎症に対する抗炎症活性を示した。

pol 特異的阻害物質の大豆中の分布：薄層クロマトグラフィーによる分析から、これら 2 物質は大豆の煮汁に存在しており、煮た後の大豆 (水煮大豆) には本物質は無く、大豆加工品としては「蒸し大豆」に含有していた。従って、本物質による抗炎症効果を狙うのであれば、蒸し大豆を摂取するのが良いことが分かった。また、本物質を含有する大豆の煮汁は、抗炎症食品としての有効利用が示唆された。

(A)



(B)

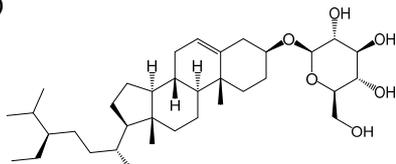


図 3：大豆由来の pol 特異的阻害活性物質 (A：セレプロシド、B：ステロイド配糖体)

## (2) 酒米の米糠から見いだした哺乳類 pol 阻害物質

酒米の米糠 (ぬか) から pol 阻害物質の単離・精製：日本酒製造の副産物 (食品産業廃棄物) である酒米 (品種：白鶴錦) の米糠 (ぬか) に pol 阻害活性があったので、活性成分を単離・精製して、構造解析した結果、*o*-オリザノール的一种であるフェルラ酸シクロアルテニル (図 4) であった。本物質は哺乳類 pol のうち pol を最も強く阻害した。米糠 3 種類、<1>赤糠 (精米歩合 89~100% 位まで出てくる糠)、<2>中白 (同 81~88%)、<3>上白 (同 75~80%) のうち、<1>赤糠が本物質を最も高含有していた。

抗炎症活性：本物質は TPA で誘導した炎症に対する抗炎症活性を示した。これより、酒米の米糠、特に赤糠を原料とする抗炎症化粧品開発が期待できる。

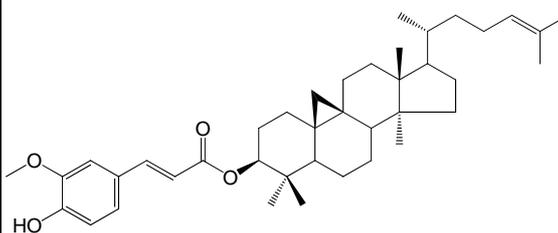


図 4：米糠由来の pol 阻害活性物質 (フェルラ酸シクロアルテニル)

## (3) マンゴスチン果皮から見いだした DNA 複製型 pol 阻害物質

マンゴスチン果皮から pol 阻害物質の単離・精製：南国のフルーツであるマンゴスチン (*Garcinia mangostana*) の不可食部である果皮のエタノール抽出物に pol 阻害活性があったので、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて複数の活性物質を精製した。化学構造解析の結果、これらは全てキサントン骨格を有しており、pol 阻害活性は *o*-mangostin (図 5) が最も強かった。本物質は、哺乳類 pol 群のうち DNA 複製型の pol を最も強く阻害した。

ヒトがん細胞への影響：本物質は、ヒト子宮がん細胞 (HeLa cells) の増殖を抑制した。また、細胞周期を DNA 合成期である S 期で停止させたことから、DNA 複製型 pol 阻害活性に起因すると示唆された。さらに、本物質はヒト子宮がん細胞の細胞内カスパーゼ-3 活性を上昇させて、細胞核を破壊・矮小化させたことから、アポトーシスを誘導することが分かった。これより、マンゴスチン果皮のがん対策健康食品としての開発が期待できる。

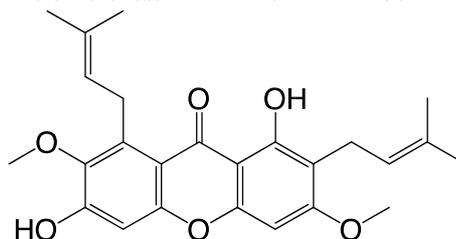


図 5：マンゴスチン果皮の DNA 複製型 pol 群阻害物質 (*o*-mangostin)

## (4) 見いだした哺乳類 pol 阻害物質による抗炎症作用解析

マイクロアレイ解析：哺乳類 pol 阻害物質である「クルクミン」とビタミン K<sub>3</sub> 誘導体である「ナフトキノン」を用いて、マウス・マクロファージである RAW264.7 細胞におけるマイクロアレイ解析を実施した。<1>pol 阻害剤無添加のコントロール群、<2>リポ多糖 (LPS) で炎症刺激を与えた群、<3>pol 阻害剤を添加した群、<4>LPS + pol 阻害剤を添加した群、以上の 4 群について、24 時間培養後の細胞を回収、mRNA を抽出した。炎症シグナルやアレルギーシグナルに関連する因子 (タンパク質) 20 種類の mRNA 発現量を各群間で比較した結果、pol の発現量は、

<2>で亢進し、<3>,<4>で減少した。この pol 発現量変化の傾向は、炎症マーカーである TNF- (Tumor Necrosis Factor- )と NF- B (nuclear factor- B) 炎症酸化メディエーターである iNOS (inducible nitric oxide synthase) 炎症脂質メディエーターである PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>) の発現量と正の相関を示した。これより、pol 阻害活性に基づいた抗炎症の作用機序が示唆された。

RNA 干渉 (RNAi): RAW264.7 細胞を用いて、RNA 干渉によって pol の mRNA 発現量をノックダウンさせることによる炎症マーカーの TNF- および炎症シグナルの下流にある NF- B の mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR で解析した。その結果、RNA 干渉により pol の mRNA 発現が 70% ノックダウンされると、細胞増殖には全く影響しないが、TNF- および NF- B の産生 (mRNA 量) がそれぞれ 35%、30% 抑制されることを見いだした。これは、のマイクロアレイの結果と同じ傾向であり、低分子化合物である pol 阻害物質は、pol 活性だけでなく pol の発現も抑制することによって、抗炎症作用が発揮されると考えられる。

#### <引用文献>

- [1] Y.Mizushima et al. The inhibitory action of fatty acids on DNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336, 509-521, 1997.
- [2] Y.Mizushima et al. Fatty acids selectively inhibit eukaryotic DNA polymerase activities in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 1308, 256-262, 1996.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 9 件)

S.Ikeoka, T.Nakahara, H.Iwahashi, \*Y.Mizushima. The establishment of an assay to measure DNA polymerase-catalyzed repair of UVB-induced DNA damage in skin cells and screening of DNA polymerase enhancers from medicinal plants. *Int. J. Mol. Sci.*, in press. (査読有)  
DOI: 10.3390/ijms17050667  
T.Onodera, Y.Takenaka, S.Kozaki, T.Tanahashi, \*Y.Mizushima. Screening of mammalian DNA polymerase and topoisomerase inhibitors from *Garcinia mangostana* L. and analysis of human cancer cell proliferation and apoptosis. *Int. J. Oncol.*, 48, 1145-1154, 2016. (査読有)  
DOI: 10.3892/ijo.2016.3321  
T.Onodera, I.Kuriyama, Y.Sakamoto, M.Kawamura, K.Kuramochi, K.Tsubaki A.Tabata, H.Nagamune, \*Y.Mizushima. *Arch. Biochem. Biophys.*, 573, 100-110,

2015. (査読有)

DOI: 10.1016/j.abb.2015.02.032

\*Y.Mizushima, Y.Ogawa, T.Onodera, I.Kuriyama, Y.Sakamoto, S.Nishikori, S.Kamisuki, F.Sugawara. Inhibition of mammalian DNA polymerases and the suppression of inflammatory and allergic responses by tyrosol from used activated charcoal waste generated during sake production. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 7779-7786, 2014. (査読有)

DOI: 10.1021/jf502095p

\*Y.Mizushima, T.Onodera, I.Kuriyama, H.Nakayama, K.Sugimoto, E.Lee. Screening of mammalian DNA polymerase inhibitors from rosemary leaves and analysis of the anti-inflammatory and antiallergic effects of the isolated compounds. *Food Sci. Technol. Res.*, 20, 829-840, 2014. (査読有)

DOI: 10.3136/fstr.20.829

M.Kawamura, I.Kuriyama, S.Maruo, \*K.Kuramochi, K.Tsubaki, H.Yoshida, \*Y.Mizushima. Anti-tumor effects of novel 5-O-acyl plumbagins based on the inhibition of mammalian DNA replicative polymerase activity. *Plos One*, 9, e88736 (14 pages), 2014. (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0088736

\*Y.Mizushima, \*I.Kuriyama, H.Yoshida. Inhibition of DNA polymerase and associated inflammatory activities of extracts from steamed germinated soybeans. *Food Funct.*, 5, 696-704, 2014. (査読有)

DOI: 10.1039/c3fo60650c

\*Y.Mizushima, I.Kuriyama, T.Nakahara, Y.Kawashima, H.Yoshida. Inhibitory effects of -mangostin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase, and human cancer cell proliferation. *Food Chem. Toxicol.*, 59, 793-800, 2013. (査読有)

DOI: 10.1016/j.fct.2013.06.027

K.Shiomi, I.Kuriyama, H.Yoshida, \*Y.Mizushima. Inhibitory effects of myricetin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell proliferation. *Food Chem.*, 139, 910-918, 2013. (査読有)

DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.01.009.

\*Y.Mizushima, I.Kuriyama, A.Yamazaki, T.Akashi, H.Yoshida. Cycloartenyl trans-ferulate, a component of the bran byproduct of sake-brewing rice, inhibits mammalian DNA polymerase and suppresses inflammation. *Food Chem.*, 141, 1000-1007, 2013. (査読有)

DOI: 10.1016/j.foodchem

H.Akasaka, R.Sasaki, K.Yoshida,

I.Takayama, T.Yamaguchi, H.Yoshida, \*Y.Mizushina. Monogalactosyl diacylglycerol, a replicative DNA polymerase inhibitor, from spinach enhances the anti-cell proliferation effect of gemcitabine in human pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 2517-2525, 2013. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.004  
M.Mitoshi, I.Kuriyama, H.Nakayama, H.Miyazato, K.Sugimoto, Y.Kobayashi, T.Jippo, K.Kanazawa, H.Yoshida, \*Y.Mizushina. Effects of essential oils from herbal plants and citrus fruits on DNA polymerase inhibitory, cancer cell growth inhibitory, antiallergic, and antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 11343-11350, 2012. (査読有)  
DOI: 10.1021/jf303377f

\*Y.Mizushina, Y.Takahashi, Y.Sato, Y.Yamaguchi, T.Takeuchi, I.Kuriyama, F.Sugawara, H.Yoshida. Inhibition of DNA polymerase by glucosyl compounds from soybean (*Glycine max* L.) and their associated inflammatory activity. *Food Chem.*, 132, 2046-2053, 2012. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.12.046

[学会発表](計90件)

平林正大, 小野寺威文, 竹仲由希子, 神前祥子, 棚橋孝雄, 片山 茂, 中村宗一郎, 水品善之. マンゴスチン (*Garcinia mangostana*) から単離したキサントン類の DNA 代謝系酵素阻害活性とヒトがん細胞への影響. 日本食品科学工学会第 62 回大会, 京都, 2015 年 8 月 27 日~29 日.

水品善之. 加工食品製造工程で生じる廃棄物(食品副産物)からの健康機能性成分の探索研究. はりま産学交流会 創造例会 2014, 姫路, 2014 年 9 月 19 日.

水品善之, 赤坂浩亮, 吉田賢史, 高山いずみ, 吉田弘美, 佐々木良平. ホウレン草糖脂質 MGDG と抗がん剤ゲムシタピンのヒト膵臓がん細胞増殖抑制活性と抗腫瘍活性の相乗効果. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 川崎, 2014 年 3 月 27 日~30 日【トピック賞を受賞(公益社団法人 日本農芸化学会)】.

水品善之, 大畑仁美. 大豆の加工による成分変化と DNA 合成酵素阻害活性に基づいた抗炎症活性の変化. 第 60 回日本栄養改善学会学術総会, 神戸, 2013 年 9 月 12 日~14 日.

Yoshiyuki Mizushina, Sayaka Itoh, Isoko Kuriyama, Hiromi Yoshida. Effects of alpha-mangostin and its related compounds on the mammalian DNA polymerase inhibition and its based

bioactivities. World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress, 佐世保, 2012 年 9 月 30 日~10 月 4 日【ポスター賞を受賞(公益社団法人 日本油化学会)】.

[図書](計10件)

栢野新市, 水品善之, 小西洋太郎. 栄養科学イラストレイテッド・食品学 (食品の分類と特性、加工を学ぶ). 羊土社 (ISBN:978-4-7581-0880-5), 全 P213, 2016 年 2 月発刊.

\*Y.Mizushina, I.Kuriyama. Cedar (*Cryptomeria japonica*) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavour and Safety* (ISBN: 9780124166417), Elsevier (Ed. Victor R. Preedy), pp317-324, Chapter 36, 2016.

水品善之, 菊崎泰枝, 小西洋太郎. 栄養科学イラストレイテッド・食品学 (食品の成分と機能を学ぶ). 羊土社 (ISBN: 978-4-7581-0879-9), 全 P205, 2015 年 11 月発刊.

S.Shiratake, T.Onodera, Y.Sakamoto, T.Nakahara, H.Iwahashi, \*Y.Mizushina. Screening for suppression of inflammatory responses against UVB-induced DNA damage in skin cells based on natural plant extract enhances DNA repair-related polymerase activity. *DNA Repair* (ISBN 978-953-51-4186-0), InTech (Ed. Clark Chen), pp445-462, Chapter 16, 2015.

\*Y.Mizushina, I.Kuriyama, T.Takeuchi, F.Sugawara, H.Yoshida. Effects of carotenoids on mammalian DNA polymerase inhibition and anti-inflammation. *Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefits* (ISBN: 978-1-62808-622-5), Nova Science Publishers (Ed. Masayoshi Yamaguchi), pp297-318, Chapter 15, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計4件)

名称: DNA 合成酵素阻害剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、及びこれらに含有される化合物の製造方法

発明者: 水品善之、木村明博、小野寺威文  
権利者: 学校法人神戸学院

種類: 特許

番号: 特願 2014-166652

出願年月日: 2014 年 8 月 19 日

国内外の別: 国内

名称: DNA 合成酵素阻害剤

発明者: 水品善之、栗山磯子、吉田弘美、倉持幸司、河村萌

権利者: 学校法人神戸学院、倉持幸司

種類: 特許

番号: 特願 2013-189451(特開 2015-054842)

出願年月日: 2013 年 9 月 12 日

国内外の別：国内  
名称：モノガラクトシルジアシルグリセロール又はその薬学的に許容し得る塩を有効成分として含む医薬組成物又は食品組成物  
発明者：水品善之、吉田弘美、佐々木良平  
権利者：学校法人神戸学院、国立大学法人神戸大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2013/69220  
出願年月日：2013年7月12日  
国内外の別：国外

取得状況（計2件）  
名称：DNA合成酵素の阻害剤  
発明者：水品善之、山下貴稔、吉田弘美、渡辺健市  
権利者：(株)J-オイルミルズ、学校法人神戸学院  
種類：特許  
番号：特許 第5663731号  
取得年月日：2014年12月19日  
出願年月日：2010年3月31日  
国内外の別：国内  
名称：DNAポリメラーゼを用いた核酸合成法及び1分子シーケンス法  
発明者：平野研、馬場嘉信、石川満、水品善之、西本尚弘  
権利者：(独)産業技術総合研究所、(株)島津製作所  
種類：特許  
番号：特許 第5220596号  
取得年月日：2013年3月15日  
出願年月日：2006年5月24日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水品 善之 (MIZUSHINA, Yoshiyuki)  
信州大学・学術研究院農学系・教授  
研究者番号：20307705

### (2) 研究分担者

入野 康宏 (IRINO, Yasuhiro)  
神戸大学・医学研究科・助教  
研究者番号：10415565