

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19078

研究課題名（和文）スプライシング阻害活性をモデルとした食品化合物の迅速探索・評価法の開発と応用展開

研究課題名（英文）Establishment and application of a rapid screening and evaluation method for functional food components with splicing inhibitory activity.

研究代表者

増田 誠司（Masuda, Seiji）

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：20260614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：食品成分からの機能性の研究において、迅速な解析手法の開発が望まれている。本研究は、食品中の活性化合物をリード化合物として活性化合物を迅速に探索する試みであり、mRNAプロセッシングの阻害活性を指標として迅速探索系の評価を行った。これまでに見出した活性化合物の類縁体を解析すると、いずれも活性を確認した。この結果から既知の食品成分由来活性化合物をリード化合物として探索する方法は、精製による化合物単離に比べてはるかに早く活性化合物を取得することができると考えられ、本手法の有効性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の機能性に関する研究は年々盛んになっており、特定保健用食品（トクホ）や機能性表示食品が登場している。超高齢社会を迎えた日本では食品成分に高い機能性を求める社会状況が定着しており、今後これまでにない機能性を持つ食品が期待されている。本研究の成果は、食品分野において、構造活性相関を用いて効果的な活性化合物を系統的に類縁体から探索する試みが有効であることを示し、食品分野における機能性化合物の探索に新たな概念を導入することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the research on the functional food components, there is a demand for the development of rapid analysis methods. This study represents an attempt to rapidly explore active compounds using previously found compounds in food as lead compounds. In this study, we conducted an evaluation of a rapid screening system using inhibition activity of mRNA processing as an indicator.

Analysis of analogs of the active compound identified so far confirmed their activity. From these results, the method of searching for active compounds derived from known food components as lead compounds can acquire active compounds much more quickly compared to compound isolation by purification, demonstrating the effectiveness of this approach.

研究分野：食品分子生物学

キーワード：迅速探索 構造活性相関 mRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品の機能性に関する研究は年々盛んになっており、特定保健用食品（トクホ）や機能性表示食品が登場している。超高齢社会を迎えた日本では食品成分に高い機能性を求める社会状況が定着しており、今後これまでにない機能性を持つ食品が期待されている。ただ食品成分からの機能性の研究は、時間のかかる古典的な手法が今でも主流であり、迅速な解析手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

最近の研究から、食品由来化合物には様々な抗がん作用を持つ物質が含まれている可能性が示されている。また、不適切なスプライシングを阻害することが、がんの新しい治療戦略として提示されている。がんの治療戦略において、これまで効果の強い薬剤を中心に研究されてきたが、食品由来化合物については、多くの活性化合物は中～高程度の活性であることが推定され、そのような化合物についても作用メカニズムを解明しようとする動きが出てきている。最近では、mRNA スプライシングを制御するフラボノイドが生体内で腫瘍の進行を抑制することがわかり、がんの発生や進行を防ぐために有効成分を含む食品を毎日摂取することの可能性を提供している。

本研究は、食品中の活性化合物をリード化合物として mRNA 成熟阻害活性を持つ活性化合物を迅速に探索する試みを行った。そのために幅広い強さの活性化合物について構造と活性に関する情報ライブラリを整備し、その情報に基づき候補化合物を推定し、候補化合物の機能性を評価するリバーススクリーニング手法を用いて探索を効率化する解析法について評価することを目的とする。食品分野において、構造活性相関を用いて効果的な活性化合物を系統的に類縁体から探索する試みは広がっておらず、本研究は食品分野に新たな概念を導入することが期待される。

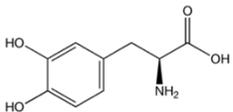
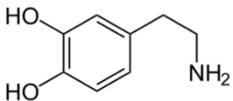
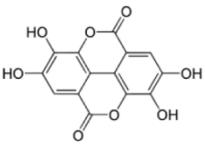
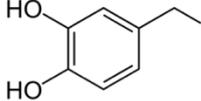
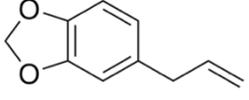
3. 研究の方法

(1) 試薬

3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-L-アラニン(L-DOPA)、3,4-ジヒドロキシフェネチルアミン塩酸塩(ドーパミン)、エラグ酸、サフロールは富士フィルム和光純薬株式会社、4-エチルカテコールは富士フィルムワコーケミカルのものをそれぞれ使用した。

それぞれのサンプルはジメチルスルホキシド(DMSO、Nacalai Tesque)に溶解させて細胞に添加した。使用したサンプルの構造式を Table1 に示す。

Table1. 研究に用いた化合物の名称、分子量、構造

| | | | |
|-------------------|---|----------------------|---|
| L-DOPA (197.2) |  | ドーパミン (153.2) |  |
| エラグ酸 (302.2) |  | 4エチルカテコール (138.2) |  |
| サフロール (162.2) |  | | |

()内は化合物の分子量を示している

(2) 細胞培養

U2OS(ヒト骨肉腫細胞)の培養には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、Wako)に6%ウシ胎児血清(FBS、Hyclone)を添加した培地と Nunc 細胞培養ディッシュ(Thermo Fisher)を用いた。37°C、CO₂ 5%、湿度 100%の条件下のインキュベーターで培養し、3~4日に一度継代を行った。

(3) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)

100%エタノールで滅菌したカバーガラスを入れた 12 well プレートに細胞を 4×10⁴cells/mL になるように播種して 24 時間培養した。各サンプルをアッセイに適した濃度に培地に溶解した。500 μL のアッセイ溶液を細胞培養に用いていた培地と交換した後、24 時間培養した。細胞をリ

ン酸緩衝生理食塩水 (PBS+) (1×PBS(-), 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) で洗浄した後、10%ホルムアルデヒド/PBS(+)で20分間固定を行い、更に0.1% TritonX100/PBS(+)で10分間細胞膜透過化処理を行った。次に1×PBS(-)で3回洗浄して、2×standard sodium citrate (SSC)で5分間の緩衝液置換を3回行った。次に、42°Cのチャンバーでoligo hybridization buffer (Ambion)を用いて1時間プレハイブリダイゼーションし、その後oligo hybridization bufferで希釈した10pM Alexa Flour 594-labeled oligo-dT45 probe (Mocelular Probes)とともに一晩ハイブリダイズした。翌日、42°Cで2×SSCで20分、0.5×SSCで10分、0.1×SSCで10分洗浄した。0.01% 4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI)/PBS(-)で10分間核を対比染色した後、1×PBS(-)で洗浄を2回行った。退色防止のためにSlowFade AntifadeKit (Invitrogen)で処理しカバーガラスをエナメルで封入した後、蛍光顕微鏡 Zeiss Axiopian2 (Carl Zeiss)を用いて画像を撮影した。ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (バージョン1.53a)を用いて画像の定量化を行い、Cell profiler (バージョン3.8.1)を用いて核と全 poly(A)⁺RNA シグナルの強度比を計算した。

4. 研究成果

これまでに mRNA 成熟阻害活性を持つ化合物をスクリーニングしたところ、化合物の構造に類似性のあることが明らかになった。それらの中で高い阻害活性が見られた化合物は、芳香環の *o* 位に 2 つの置換基 (ヒドロキシ基またはメトキシ基) と不飽和結合がある鎖状構造が存在した。そこでこの構造を持つ化合物は mRNA 成熟阻害活性を持つ可能性が考えられた。このため、いくつかの化合物の構造活性相関を検証し、類似化合物が持つ活性について評価することとした。

まず、mRNA の成熟阻害活性においてカテコール環構造を持つ化合物が重要である可能性が考えられたため、カテコール環構造を持つ化合物として L-DOPA、ドーパミン、エラグ酸、4-エチルカテコール、サフロールを選択し、これらの化合物の活性を RNA-FISH 法で評価した。活性の評価には RNA-FISH 法を用いた poly(A)⁺RNA の核内蓄積率を用いて評価した。poly(A)⁺RNA は主として mRNA に由来することから、poly(A)⁺RNA が核内に蓄積することは、スプライシングを含めた成熟過程 (核内プロセッシング) が阻害されていることを示している。そこで poly(A)⁺RNA の核への局在は mRNA 成熟阻害の度合いをよく表す指標として採用した。ネガティブコントロールとして DMSO を、ポジティブコントロールとしてよく知られているスプライシング阻害剤である Gex1A を用いた (図1)。

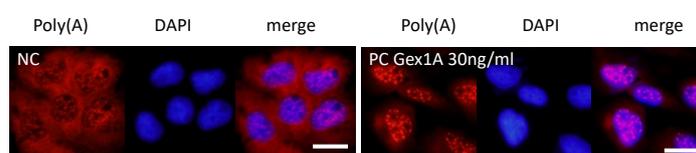


図1. mRNA 成熟阻害活性の評価

poly(A)⁺RNA は Alexa Flour 594-labeled オリゴ dT プローブで可視化した。核は DAPI で可視化した。スケールバーは 20 μm。NC: ネガティブコントロール、PC: ポジティブコントロール

4-エチルカテコールと L-DOPA、ドーパミンはカテコール環構造を有し、それぞれ側鎖の構造や長さが異なっている (表1)。5種類の化合物のうち4種類で mRNA 成熟阻害が観察された (図2)。より定量的に取り扱うために、それぞれの化合物で処理した細胞の mRNA の核内蓄積について解析した (図3)。

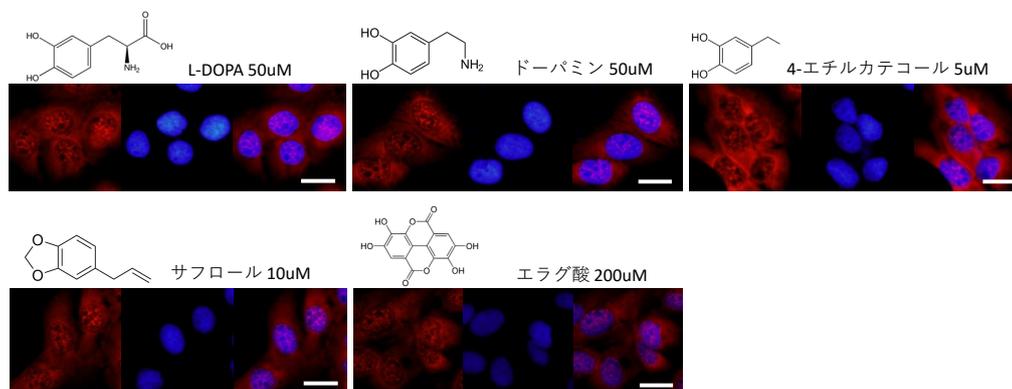


図2. カテコール構造を持つ化合物の mRNA 成熟阻害活性
図に記載の濃度での mRNA 局在の観察、スケールバーは 20 μm。

その結果、L-DOPA とドーパミンでは高濃度で添加した時に、mRNA の核内蓄積率が高くなった。これに対して、4-エチルカテコールでは濃度を上昇させても mRNA の核内蓄積率はほぼ横ばいのみであり、ネガティブコントロールとの間で有意差は観察されなかった。これはカテコール環に付加している側鎖の性質によって mRNA 成熟阻害活性が観察されない場合もあることを示していると考えられた。なおこれ以上の濃度では細胞毒性が観察されたため、mRNA 成熟阻害活性は評価できなかった。エラグ酸はその構造内にカテコール環を2つ有しており、末端の水素原子以外は完全な平面構造となっている。エラグ酸については200 μ M という高濃度でも細胞毒性は観察されなかったため、この濃度まで mRNA 成熟阻害活性を検証したところ、弱いながらも阻害活性を示していた。サフロールはカテコール環に類似した構造と、二重結合を持つ側鎖を有している。10 μ M という濃度において、比較的高い核内蓄積率を示した。これらの結果から、カテコール環と側鎖の官能基が阻害活性の強さを左右している可能性が見出された。

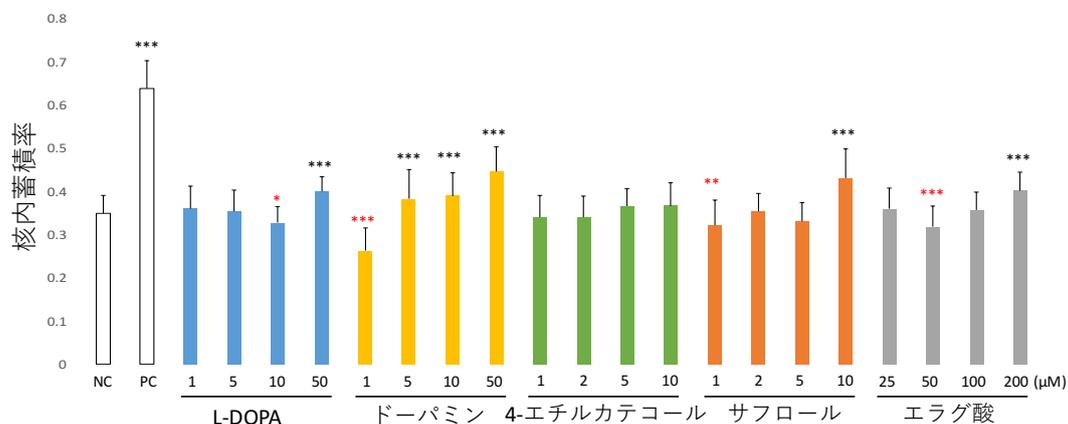


図3. 化合物の mRNA 核内蓄積

mRNA の核内分布割合を解析した。細胞全体と核のシグナル強度は ImageJ を用いて定量化した ($n \geq 50$)。棒グラフは平均値を、エラーバーは標準偏差を表している。統計解析は One-way ANOVA 分散分析に続いて Dunnett の多重比較によって行なった。*** $P < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ は NC と比較して有意差がある。

今回の研究から、カテコール環構造を持つ化合物については、十分な長さの側鎖を持つ化合物の場合、比較的低濃度から mRNA 阻害活性を示すことが示唆された。また、エラグ酸のように構造の自由度の低い化合物は、阻害活性を示しにくい可能性が示唆された。これは構造が固定されているために、スプライシング因子と相互作用するためのスポットに入りにくいことが原因ではないかと考えられる。逆に、4-エチルカテコールのように側鎖が短い化合物は様々な結合ポケットに入り込んでしまうことで、mRNA 阻害活性については有効な活性を表しにくいと考えられた。しかし、4-エチルカテコールとドーパミンの側鎖の長さの違いはアミノ基1つの差であることや4-エチルカテコールでは細胞毒性によって10 μ M までしか検証できていないことなどから更なる検証が必要と考えられた。

今後、様々な長さの側鎖を持ったカテコール環を有する化合物を検索し、スクリーニングにかけることで、さらに構造相関について検証することが必要と考えられる。また、阻害活性の高い化合物をドッキングシミュレーションにかけることで、標的因子との結合に重要な構造を確認することも必要と考えている。本研究をさらに進め、候補となる化合物の構造ライブラリーを構築することで、食品中の有効成分の早期発見につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 鷓飼 生望、堀 史人、増田 誠司 | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 mRNAスプライシングを調節する食品とその機能性成分 | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ | 6. 最初と最後の頁 54-59 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fujita Ken-ichi, Ito Misa, Irie Midori, Harada Kotaro, Fujiwara Naoko, Ikeda Yuya, Yoshioka Hanae, Yamazaki Tomohiro, Kojima Masaki, Mikami Bunzo, Mayeda Akila, Masuda Seiji | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Structural differences between the closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, fashion distinct functional apo-complexes | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 455 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-44217-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fujita Ken-ichi, Yamazaki Tomohiro, Mayeda Akila, Masuda Seiji | 4. 巻 703 |
| 2. 論文標題 Terminal regions of UAP56 and URH49 are required for their distinct complex formation functioning to an essential role in mRNA processing and export | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 149682 - 149682 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2024.149682 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 堀 史人、鷓飼生望、増田 誠司 | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 食品成分によるmRNAスプライシング制御 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 細胞 | 6. 最初と最後の頁 926-929 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Fujiwara Naoko, Shigemoto Maki, Hirayama Mizuki, Fujita Ken-ichi, Seno Shigeto, Matsuda Hideo, Nagahama Masami, Masuda Seiji | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 MPP6 stimulates both RRP6 and DIS3 to degrade a specified subset of MTR4-sensitive substrates in the human nucleus | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 8779 ~ 8806 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac559 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Miyake Shuntaro, Masuda Seiji | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Inhibition of mitochondrial complex III or dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) triggers formation of poly(A) ⁺ RNA foci adjacent to nuclear speckles following activation of ATM (ataxia telangiectasia mutated) | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 RNA Biology | 6. 最初と最後の頁 1244 ~ 1255 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2022.2146919 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamanaka Yasutaka, Ishizuka Takaki, Fujita Ken-ichi, Fujiwara Naoko, Kurata Masashi, Masuda Seiji | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 CHERP Regulates the Alternative Splicing of pre-mRNAs in the Nucleus | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2555 ~ 2555 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052555 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ken-ichi Fujita, Takaki Ishizuka, Seiji Masuda, and Akila Mayeda |
| 2. 発表標題 CHERP and ALG-2 Regulate Calcium-Dependent Alternative Splicing via Interaction with Chromatin |
| 3. 学会等名 第101回日本生理学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀 史人、竹森 久美子、増田 誠司 |
| 2. 発表標題 HSP90阻害剤とアントラサイクリン系薬剤同時添加によりmRNAの核内蓄積の解消_ |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鶴飼 生望、竹森 久美子、増田 誠司 |
| 2. 発表標題 mRNA核外輸送受容体TAPとタンパク質輸送受容体CRM1の二つの輸送受容体によるmRNA核外輸送の生物学的意義_ |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Haruko Inose and Seiji Masuda |
| 2. 発表標題 The mRNA export receptor NXT1/NXT2 coordinate the gene localization, transcription and the mRNA export |
| 3. 学会等名 「先進ゲノム支援」拡大班会議（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 猪瀬春子、増田誠司 |
| 2. 発表標題 mRNA核外輸送受容体NXT1/NXT2による遺伝子核内配置・転写・mRNA核外輸送の多元制御_ |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 堀史人、竹森久美子、増田誠司 |
| 2. 発表標題 薬剤を用いたmRNA動的変化の影響_ |
| 3. 学会等名 第62回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鶴飼生望、竹森久美子、増田誠司 |
| 2. 発表標題 TAPとCRM1の2つの経路からなる選択的mRNA閥外輸送経路_ |
| 3. 学会等名 第62回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 増田誠司 |
| 2. 発表標題 食品成分によるmRNAスプライシングの調節 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部例会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 増田誠司 |
| 2. 発表標題 食品成分がmRNAスプライシングを調節する |
| 3. 学会等名 Visionary農芸化学100シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 増田誠司 |
| 2. 発表標題 食品成分はスプライシングを介して遺伝子発現を制御する |
| 3. 学会等名 第9回奈良まほろば産学官連携懇話会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 増田誠司 |
| 2. 発表標題 mRNAスプライシングを制御する食品化合物とその分子機構 |
| 3. 学会等名 第137回創薬科学セミナー（名古屋大学）（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 増田誠司 |
| 2. 発表標題 食品成分によるmRNAスプライシング制御 |
| 3. 学会等名 第12回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤原奈央子、藤田賢一、瀬尾茂人、増田誠司 |
| 2. 発表標題 核特異的コファクターによるヒトRNAエキソソーム複合体の活性および基質特異性の制御 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 藤田賢一、堀史人、鶴飼生望、前田明、増田誠司 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 技術情報協会 | 5. 総ページ数 411 |
| 3. 書名 「mRNAの制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用」中の「スプライシング制御 1 mRNA転写・プロセシング・核外輸送・品質管理における相互連携の重要性」 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 教員紹介 https://www.kindai.ac.jp/agriculture/research-and-education/teachers/introduce/masuda-seiji-f8e.html 教員一覧 https://research.kindai.ac.jp/profile/ja.f8e386e9f3ae8acc.html |
|--|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 後藤 剛 (Goto Tsuyoshi) (10550311) | 京都大学・農学研究科・准教授 (14301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|