

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658118

研究課題名(和文)ミトコンドリア品質管理機構を標的とする食品成分の新機能探索

研究課題名(英文)Screening of food factors that target the quality control system of mitochondria

研究代表者

河合 慶親(KAWAI, Yoshichika)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：50380027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア品質管理に重要なオートファジーに作用する食品成分を見出すことを目的とした。HeLaにおいてp62発現を指標としたスクリーニングを実施したところ、ルテオリン誘導体の顕著なオートファジー誘導活性を見出した。一方、マクロファージJ774.1においては、ケルセチンなどフラボノール類において顕著なp62遺伝子発現促進が認められたが、ルテオリン誘導体の効果は認められなかった。よって、食品成分のオートファジー誘導活性は細胞株によって異なることが示された。J774.1では転写因子Nrf2を介してp62発現を亢進することで、サイトカインIL-1のオートファジー分解に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We screened the food factors that enhance the autophagic degradation leading to mitochondrial quality control. In HeLa cells, luteolin and the derivatives significantly enhanced the autophagic degradation of p62, an adaptor protein of autophagy. In contrast, in J774.1 macrophages, the mRNA expression of p62 was significantly enhanced upon treatment with flavonols such as quercetin, whereas no effects were observed upon treatment with luteolin derivatives. These results strongly suggest that the activities of polyphenols for autophagy induction are dependent on cell types. It was also found that p62 mRNA expression was enhanced through the activation of Nrf2, a transcription factor. Furthermore, the pretreatment of J774.1 with flavonols resulted in the decrease in both intracellular and extracellular IL-1beta, an autophagy substrate. These results suggest that autophagy induction by polyphenols might be good strategy for the quality control of intracellular proteins and organelles.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：オートファジー ポリフェノール フラボノイド ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内の主要な活性酸素生成の場であるという観点から、抗酸化物質の作用が注目されてきたが、ミトコンドリアと低分子食品成分との相互作用およびその生理的意義を生化学的に評価した研究はほとんどされておらず、老化・疾病に繋がるミトコンドリア機能障害に対する食品成分の作用を探索する重要性を着想した。ミトコンドリアは生命活動に必須な小器官である一方、その機能障害は広範囲の疾病との関与が示唆されている。特に、オートファジー(自己食)によるミトコンドリアの品質管理の重要性が近年指摘されており、オートファジー不全とパーキンソン病との密接な関連が示唆されるなど、生体内の恒常性・健康維持に極めて重要であると考えられる。

近年のオートファジー研究の急速な進展から、老化・疾病におけるオートファジーの重要性が明らかになってきているが、食品成分の標的としてのオートファジーの位置付けは未知の研究領域である。ミトコンドリアはこれまで活性酸素生成の場であることや、アポトーシスの実行に関わることから、「抗酸化物質」「アポトーシス制御物質」の観点からは多くの検討がされてきた。しかし、ミトコンドリア品質管理(恒常性維持)という観点や、食品成分自身のミトコンドリアとの相互作用機構については殆ど検討例がなく、食品のような外因性因子によるミトコンドリアへの積極的介入の生理的意義も不明である。すなわち、オートファジーやミトコンドリア機能に焦点を当てた食品成分の探索、及びその重要性の検討を試みることは、極めて斬新かつチャレンジ性に富む研究課題と考えられた。以上のような背景から、疾病予防・抗老化作用を目指した新規機能性食品としてのオートファジー促進物質の探索とその意義を検討するべく本研究を着想した。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎えた現代において、生活習慣病や老化の予防戦略として新たな機能性食品の開発が期待されている。様々な生理作用を標的とした機能性食品の基礎研究が進む中、ミトコンドリア機能やオートファジーに焦点を絞った検討例は現在のところ極めて少ない。本研究では、様々な疾病・老化の過程に関与するオートファジーを作用点とする食品成分を探索し、さらにその作用機構を検討することで新たな機能性食品としての可能性を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞でのオートファジー評価系の確立

本研究では、オートファジー研究に広く用いられているヒト子宮頸がん上皮細胞(HeLa)及びマウスマクロファージ様細胞株(J774.1)を用いた。GFP-LC3 や GFP-mit(ミトコンドリア標識)ベクター、Atg7 ノックアウト MEF 細胞は協同研究者の Toren Finkel 博士(米国国立衛生研)より提供を受けた。また、Atg5 ノックアウト MEF 細胞については、東京大学の水島昇博士の許諾を得て、理研細胞バンクより入手した。そこで、GFP-LC3 あるいは GFP-mit 安定発現 HeLa の構築を行い、96 穴プレートでの蛍光検出によるハイスループット評価系の確立を試みた。また、Atg7 あるいは Atg5 ノックアウト MEF 細胞を用いた解析も実施した。

(2) 食品成分のスクリーニング

申請者が既に所持していたポリフェノールを中心とした機能性成分ライブラリーを本研究費により拡充した。様々なクラスのポリフェノール類について、類縁体も含め計 55 種類を整備し、構造活性相関性の検討を可能とした。これら食品成分を 25 あるいは 50 μ M となるよう DMEM 培地に添加し、細胞とのインキュベーションを実施した。

(3) ミトコンドリア機能の評価

ミトコンドリアは酸素消費に伴う活性酸素生成の場であることから、恒常的に酸化ストレスに曝され、その機能は減退するものと考えられる。そこで、ミトコンドリア特異的活性酸素($O_2^{\cdot-}$)プローブである MitoSox や過酸化水素特異的なミトコンドリア局在性蛍光タンパク質発現ベクター(Hyper-mit)などを用いて、ミトコンドリアにおける活性酸素産生の評価を試みた。

一方で、オートファジーは傷害されたミトコンドリアの分解を担い細胞内を健全なミトコンドリア状態に保つ上で重要である。そこで、オートファジー促進性物質の有効性を評価するために、スクリーニングから選抜された物質について、ミトコンドリア機能の評価を行いその有効性を検討した。ミトコンドリア膜電位プローブ(JC-1 など)による蛍光定量法を用いてのミトコンドリア機能評価を実施した。分子機構の解析は、オートファジー制御因子である mTOR や各種 Atg タンパク質群、アダプタータンパクである p62 などについて、ウェスタンブロットで評価することで、当該食品成分の作用標的経路を同定する。

(4) 食品成分の細胞内局在性の検討

申請者は細胞内から高速液体クロマトグラフィーにより食品成分の蓄積を評

価することを可能にしている (Kawai et al., *J. Biol. Chem.* 283, 9424-9434, 2008)。そこで、細胞ライセートあるいは細胞分画試料を用いて、食品成分の細胞内蓄積性について解析を実施した。特に、ミトコンドリア外膜特異的磁気ビーズを用いて食品成分を投与した細胞から高純度のミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアへの成分の蓄積性を直接分析する試みは新規性の高いものである。本課題において選抜されたオートファジー促進性候補物質について、ミトコンドリアへの分布について評価を試みた。ミトコンドリア単離やクロマトグラフィーに懸かる物品・試薬の費用について本研究費を使用した。

(5) 動物レベルでのオートファジー評価

本研究で選抜されたオートファジー促進性物質について、マウスを用いた個体レベルの評価を行うことを本研究の最終目標とした。申請者は、食品成分の生体利用性(吸収性と代謝性)について迅速に評価する分析系を有していることから、候補物質についての体内動態・存在形態を理解すると同時に、各組織(血球、肝臓、腎臓、筋肉、脳など代謝や酸素消費に重要な組織)におけるオートファジーレベルの測定と組織から単離したミトコンドリアの機能評価を行うことで、食品成分によるオートファジー促進によるミトコンドリア品質管理の意義を解析する。

4. 研究成果

(1) p62 分解を促進するポリフェノール

様々な疾病や老化の過程に関与することが近年示唆されているオートファジーとミトコンドリア品質管理を作用点とする食品成分を探索し、その作用機構を検討することを目的として、23-24 年度にかけて培養細胞 (HeLa) を用いたオートファジー評価系の検討と作用機構の解析を試みた。当初、GFP-LC3 や GFP-mit 過剰発現 HeLa 細胞を構築し、96 穴プレートにおける蛍光測定法について検討を実施したが、オートファジー誘導における差を正確に測定することはできなかった。そこで、LC3 や p62 などのタンパク質についてウェスタンブロット法により培養細胞抽出液からこれらのマーカーを評価することとした。ウェスタンブロット法では多検体同時評価が困難であったため、24 年度からはイムノスロットブロット (ISB) 法を応用し、48 検体の p62 発現を一斉に評価することが可能となった。本方法を用いてポリフェノール化合物 47 種類のオートファジー誘導活性評価を行ったところ、ルテオリンおよびその細胞内代謝物でもある 3'-メチル化ルテオリンがより強力なオートファジー誘導活性を有することが明らかとなった。これらルテオリン関連化合物の作用機構を検討したところ、mTOR 複合体を顕著に阻害することが明らかとなり、その上流キナーゼである Akt リン酸化がルテオリン化合物の標的である

ことが示唆された。一方、ケミカルプローブとしてケルセチンを出発としたビオチン化フラボノイド誘導体を化学合成し、これをブルダウンアッセイに応用することで、フラボノイド類の細胞内相互作用タンパク質の評価が可能となった。二次元電気泳動を用いた検討から、本プローブに特異的に作用する細胞内タンパク質の存在が示唆された。現在、MALDI-TOF 型質量分析法により、相互作用タンパク質の同定を進めている。

(2) 転写因子を介してオートファジーを促進する食品成分

オートファジーの生化学的評価において、LC3 や p62 などをウェスタンブロット法により評価する方法が一般的である。これらはオートファゴソーム構成因子であり、オートファジー分解の程度によってタンパク質量に変化が認められる。しかし、遺伝子発現レベルでの変化を伴う場合、これらタンパク質量の変化をもってオートファジーの程度を理解することは困難となる。様々な細胞株について検討を行ったところ、マクロファージ細胞 (J774.1) においては、HeLa で認められたようなフラボノイド類による p62 分解促進効果が認められず、逆に p62 タンパク量が増加する傾向が認められた。そこで、p62 をはじめとする各種オートファジー関連遺伝子について、RT-PCR 法を用いて発現量を解析した。その結果、ケルセチンをはじめとするフラボノール類において顕著な p62 遺伝子発現促進作用が認められた。興味深いことに、HeLa において顕著な p62 分解を誘導したルテオリン関連化合物は J774.1 において p62 発現量に影響を与えなかった。このように、食品成分によるオートファジー誘導活性においては、用いる細胞株によって結果が大きく異なることが明らかとなった。

近年、p62 遺伝子は転写因子 Nrf2 の標的遺伝子であることが報告された。そこで、フラボノール類による p62 発現誘導メカニズムについて検討を試みたところ、p62 誘導性フラボノールはいずれも Nrf2 の核移行を顕著に促進した。よって、これらフラボノール類は転写因子 Nrf2 の活性化を介して、p62 遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。

さらに、オートファジーアダプタータンパク質である p62 の増加が、オートファジー促進に貢献するかどうかを明らかにするために、最近になってオートファジー分解基質であると報告された炎症性サイトカイン IL-1 量について検討を行った。J774.1 に対してリポ多糖 (LPS) で炎症誘導したのち、細胞内 (pro-IL-1) および細胞外 IL-1 を測定したところ、いずれにおいてもフラボノール前処理によって有意な抑制効果が認められた。本実験において、IL-1 mRNA 発現量に変化は認められなかったことから、フラボノール前処理による p62 発現誘導が、IL-1 タンパク質のオートファジー分解に貢献し

た可能性が強く示唆された。このように、オートファジー関連因子の遺伝子発現を誘導することにより、オートファジーを誘導する食品成分の存在を明らかにすることが出来た。現在、Nrf2 以外の転写因子によって制御されるオートファジー関連遺伝子の発現についても解析を進めている。

(3) オートファジー誘導とミトコンドリア機能

本課題では、オートファジー誘導によるミトコンドリア品質管理を目指したが、HeLa や J774.1 において認められたポリフェノール類によるオートファジー誘導は、ミトコンドリア機能(膜電位や活性酸素産生)に顕著な影響を及ぼさなかった。このことは、これらポリフェノール類によるオートファジーが「非選択的」なものであることを示唆している。今後、ミトコンドリア選択的なオートファジー(マイトファジー)のような選択的オートファジーを促進する食品成分についても検討が必要である。また、ミトコンドリア機能障害に伴って細胞から培地中へ放出される乳酸量が増加することが知られており、本研究においては LC-MS/MS を用いて培地中乳酸量を簡便かつ高感度に測定することを可能とした。実際に、HeLa 細胞において各種ミトコンドリア阻害剤処理による有意な乳酸分泌の増加を確認した。そこで、各種ポリフェノール類で処理した培養液中の乳酸量を測定したが、やはり有意な増減は確認できなかった。

一方、マイトファジーを誘導する低分子化合物について食品成分以外にも各種阻害剤も含めて探索したところ、FCCP や CCCP といったプロトンイオノフォアに共通して、ミトコンドリア膜電位の低下に伴う顕著なオートファジー誘導活性が認められた。よって、プロトンイオノフォア様の活性を示す食品成分はマイトファジーを誘導する可能性が考えられた。そこで現在、これらプロトンイオノフォアのオートファジー誘導機構について詳細な検討を進めている。

(4) 生体内におけるオートファジー誘導の可能性

フラボノイド関連化合物の in vivo におけるオートファジー誘導活性を評価するため、マウス臓器における p62 発現について検討を行ったところ、臓器によって p62 発現量に差異があることが明らかとなった。典型的なオートファジー誘導系である栄養飢餓を絶食により誘導したが、顕著な p62 の変動を観察することが出来なかった。また、フラボノイドの代謝パターンについても投与方法や投与量、あるいは投与期間によって差異があることが示唆された。これらの点を詳細に解析するため、本研究期間を平成 25 年度まで延長し、さらなる検討を実施した。

これまでに、LC-MS/MS 法によって、フラ

ボノイド投与後のマウス血漿中から各種代謝物を高感度に分析することが可能となった。また、各種グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を化学的に合成する効率の良いプロトコルを確立した。これまでの検討においては、ルテオリンやケルセチンなど in vitro においてオートファジー誘導活性の期待されたフラボノイドのマウスへの投与による in vivo におけるオートファジー促進性を観察することは出来なかった。今後、これらフラボノイドの標的臓器を明らかにし、一方で投与方法や投与量など詳細を検討することで、in vivo における有効性を明らかにしていく予定である。

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5件)

- (1) Ishisaka, A., Kawabata, K., Miki, S., Shiba, Y., Minekawa, S., Nishikawa, T., Mukai, R., Terao, J., and Kawai, Y. Mitochondrial dysfunction leads to deconjugation of quercetin glucuronides in inflammatory macrophages. *PLoS One* 8, e80843 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0080843. 査読有
- (2) Ohnishi, K., Ohkura, S., Nakahata, E., Ishisaka, A., Kawai, Y., Terao, J., Mori, T., Ishii, T., Nakayama, T., Kioka, N., Matsumoto, S., Ikeda, Y., Akiyama, M., Irie, K., and Murakami, A. Non-specific protein modifications by a phytochemical induce heat shock response for self-defense. *PLoS One* 8, e58641 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0058641. 査読有
- (3) Lee, I.H., Kawai, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Bishop, A.J., Motoyama, N., Cao, L., and Finkel, T. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science* 336, 225-228 (2012). DOI: 10.1126/science.1218395. 査読有
- (4) Takumi, H., Nakamura, H., Simizu, T., Harada, R., Kometani, T., Nadamoto, T., Mukai, R., Murota, K., Kawai, Y., and Terao, J. Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. *Food Funct.* 3, 389-398 (2012). DOI: 10.1039/c2fo10224b. 査読有
- (5) Mukai, R., Kawabata, K., Otsuka, S., Ishisaka, A., Kawai, Y., Ji, Z.S., Tsuboi, H., and Terao, J. Effect of quercetin and its glucuronide metabolite upon 6-hydroxydopamine-induced oxidative

damage in Neuro-2a cells. *Free Radic Res.*
46, 1019-28 (2012). DOI:
10.3109/10715762.2012.673720. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 河合慶親: マクロファージとの相互作用を介したポリフェノール抱合体の活性制御機構. 第67回日本栄養・食糧学会大会(名古屋) 2013年5月25日
- (2) Yoshichika Kawai: Flavonoids induce autophagic degradation: a possible mechanism for the health-beneficial effects of dietary flavonoids. 13th International Conference of Functional Food Center (FFC) シンポジウム講演 (Kyoto) 2013年5月11日
- (3) 河合慶親、川津英賢、柴田貴広、内田浩二: ミトコンドリア障害に起因するマクロファージ炎症応答機構の解析. 第85回日本生化学会大会 (博多) 2012年12月15日
- (4) 石原朋恵、寺尾純二、柴田貴広、内田浩二、河合慶親: フラボノイド類によるオートファジー誘導機構の解析. 2012年度日本農芸化学会 (京都) 2012年3月23日
- (5) 河合慶親: 炎症部位における抗酸化ポリフェノールの機能性発現機構の解析. 日本酸化ストレス学会東海支部設立シンポジウム (名古屋) 2012年2月18日
- (6) 河合慶親、柴田貴広、内田浩二、Toren Finkel: ミトコンドリア膜電位低下に伴うLC3-PE複合体生成機構の解析. 第84回日本生化学会大会 (京都) 2011年9月24日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~food/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 慶親 (KAWAI, Yoshichika)

名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号: 50380027