

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34444

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658184

研究課題名(和文)水産物由来カロテノイドの酵素的非対称解裂とその産物の生体調整機能発現作用機構

研究課題名(英文)Enzymatic asymmetric cleavage of aquatic products-derived carotenoids and the bio-modulating mechanism of the enzymolysis products

研究代表者

平田 孝(HIRATA, Takashi)

四條畷学園大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：40273495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：水産物由来カロテノイドがβ-カロテン-9', 10'-モノオキシゲナーゼ(CMO2)によって代謝されるのではないかと考え、これを検証するため、(1)マウスの肝臓ホモジネートを用いた検討、(2)組み換えCMO2を用いた検討、(3)CMO2発現細胞を用いた検討を行った。しかし、マウス肝臓ホモジネート中に活性を見出すことはできなかった。酵素活性を有するCMO2リコンビナントタンパク質を作成することができなかった。またヒト乳癌細胞株であるMDA-MB-231はCMO2を発現していることが知られていたため、in situでの酵素活性の測定を試みたが、CMO2代謝産物の細胞内での蓄積は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：CMO2, betaCarotene 9, 10 monooxygenase, exhibits wide substrate specificity, and it can metabolize xanthophyll as well as beta-carotene. We investigated whether CMO2 could cleave aquatic products derived carotenoids through evaluating CMO2 activity in mouse liver homogenate, the activity of recombinant CMO2, and CMO2 activity using CMO2 expressing cultured cells. We, however, could not detect the CMO2 activity in mouse liver homogenate. Although recombinant human CMO2 was produced by Baculotechnologies Company Limited, enzymatically active CMO2 was not obtained. According to a previous report, MDA MB 231, human breast cancer cell line, expresses CMO2, and then, we used this cell line in order to evaluate the CMO2 activity. We could detect no CMO2 metabolites accumulated in carotenoid treated MDA MB 231.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：酵素分解 機能性 カロテノイド

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドは、自然界におよそ 750 種類存在する脂溶性の色素であり、植物によるその生産量は年間 1 億トンを超えるといわれている。また、私たちの食事にもおよそ 60 種類のカロテノイドを見出すことができ、食品成分としても重要である。その化学構造は $C_{40}H_{56}$ の β -カロテンを基本骨格とし、様々な官能基（アレン構造やアセチレン構造など）を有することが知られている。特に水産物由来のカロテノイドには、特徴的な化学構造を有するものが多く、近年、食品機能性成分として注目を集めている。そのため、水産物由来カロテノイドの機能性について、これまでに数多くの研究が進められてきた。研究代表者らも、褐藻由来フコキサンチンの血管新生抑制作用や抗シワ作用 (*J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9805–9810, 2006; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 757–760, 2011) 渦鞭毛藻由来ペリジニンのガン細胞に対するアポトーシス誘導作用 (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1069–1072, 2007) 緑藻由来シフォナキサンチンのマスト細胞脱顆粒抑制作用や脂肪分化抑制作用 (*J. Oleo Sci.*, **63**, 291–294, 2014) などを見出ししている。これらの機能性のそれぞれについて、水産物由来カロテノイドによる遺伝子発現の変化や細胞内シグナル伝達の変化などの作用メカニズムを報告してきているが、カロテノイドの直接の作用点については、未だ解明できていない。カロテノイドの基本骨格である β -カロテンは、 β -カロテン-15, 15'-モノオキシゲナーゼ (CMO1) によってレチナールへと代謝され、レチナールがさらに代謝されて生成するレチノイン酸が、核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) やレチノイド X 受容体 (RXR) と結合することにより、様々な遺伝子発現を調節する。そこで水産物由来カロテノイドについても β -カロテンと同様に、その代謝産物が RAR や RXR のリガンドとなるのではないかと考えた。

カロテノイドの代謝酵素としては CMO1 と CMO2 の 2 種類が知られている (図 1)。CMO1 は基質特異性が高く、キサントフィル類はほとんど代謝しない。一方 CMO2 は、 β -カロテンだけではなく、ルテインやゼアキサンチンなどのキサントフィルをも基質とすることが報告されている。そのため、体内に吸収された水産物由来カロテノイドは CMO1 ではなく、CMO2 によって代謝されるのではないかと考えた。

プロビタミン A 活性を持たない水産物由来カロテノイドの、哺乳動物における代謝反応については、水酸基の酸化などのカロテノイド骨格を維持したままでの代謝経路が報告されている (*Drug Metab. Dispos.*, **32**,

205–211, 2004)。しかしながら、その代謝変換に関する酵素は未だ同定されておらず、カロテノイドが有する生物活性との関わりもよくわかっていない。また、カロテノイド骨格の解裂産物については、アスタキサンチンについての報告があるのみであり (*Arch. Toxicol.*, **75**, 665–675, 2002) その生物活性との関わりも未だ不明である。したがって CMO2 による水産物由来カロテノイドの解裂反応が証明されれば、カロテノイドの生体内代謝における新しいスキームが提示されることになり、水産物由来カロテノイドの有効利用のみならず、未だ明らかになっていない CMO2 の生理的意義の解明にも大いに貢献できると予想される。

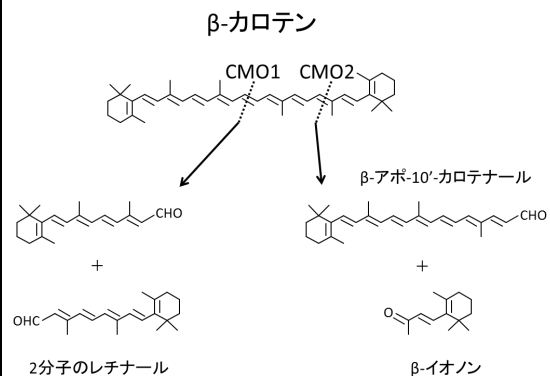


図 1 CMO1, 2 による β -カロテンの代謝

2. 研究の目的

水産物由来カロテノイドを食品機能性成分として有効に活用するためには、その作用メカニズム、特に、その作用点を明らかにすることが重要である。本研究では、CMO2 によるカロテノイドの代謝産物に注目し、水産物由来カロテノイドが、生体内で CMO2 によって代謝され、その代謝産物が RAR や RXR などの核内受容体のリガンドとなることにより機能性を発揮する、すなわち、水産物由来カロテノイドの作用点が CMO2 であるという仮説を立て、これを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

前述のように、水産物由来カロテノイドは特徴的な化学構造を有しているものが多く、その生体内での代謝変換を、他の物質の代謝変換から予測することは難しい。すなわち、個々のカロテノイドについて、個別に実験を行う必要がある。しかしながら、水産物由来カロテノイドは、生体サンプル (水産物) 内の存在量が決して多くなく、実験動物に摂

取させる量のカロテノイドを精製するためには、膨大な時間が必要となる。そこで本研究では、(1) マウス肝臓ホモジネートを用いた検討、(2) 組み換え CMO2 を用いた検討、(3) CMO2 発現細胞を用いた検討を行った。

(1) マウス肝臓ホモジネートを用いた検討

CMO2 は、小腸や肝臓、腎臓などに発現していることが報告されている (*J. Biol. Chem.*, **276**, 14110–14116, 2001)。また、水産物由来カロテノイドのひとつであるフコキサンチノールは、マウスの肝臓においてアマロウシアキサンチン A に代謝されることが報告されている (*Drug Metab. Dispos.*, **32**, 205–211, 2004)。そこで本研究では、マウス肝臓ホモジネートを用い、 β -カロテンからの β -アポ-10'-カロテナールの生成を指標として、CMO2 活性の測定を試みた。 β -アポ-10'-カロテナールの検出・定量には、HPLC-PDA システムを用いた。

また、CMO2 はミトコンドリアに局在することが報告されている (*FASEB J.*, **25**, 948–959, 2011)。そこでマウス肝臓ホモジネートからミトコンドリア画分を調製し、同様に CMO2 活性の測定を試みた。

(2) 組み換え CMO2 を用いた検討

特定の酵素による代謝変換を調べるためには、酵素の組み換えタンパク質を作成し、試験管内で基質と反応させる手法がよく用いられる。そこで本研究でも CMO2 の組み換えタンパク質を作成し、(1)と同様にカロテノイド解裂活性を測定した。

(3) CMO2 発現細胞を用いた検討

CMO2 は、いくつかのガン細胞株にも発現していることが報告されている (*Development* **139**, 2966–2977, 2012)。そこで本研究では、CMO2 の発現が確認されているガン細胞株 (MDA-MB-231 細胞) をカロテノイド含有培地で培養し、細胞内に蓄積したカロテノイドを HPLC-PDA システムを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) マウス肝臓ホモジネートを用いた検討

β -カロテンを基質とし、マウス肝臓ホモジネート中の CMO2 活性の測定を試みたが、代謝産物である β -アポ-10'-カロテナールは検出されず、すなわちマウス肝臓ホモジネート中に CMO2 活性を見出すことはできなかった。CMO2 はミトコンドリアに発現していることが報告されているため、マウス肝臓ホモジネートよりミトコンドリア画分を調製し、同様の酵素活性の測定を行ったが、

β -アポ-10'-カロテナールの生成は確認できなかった (図 2)。また、 β -クリプトキサンチンやゼアキサンチンなどのキサントフィル類を基質とした場合でも、カロテノイドの解裂産物は検出されなかった。

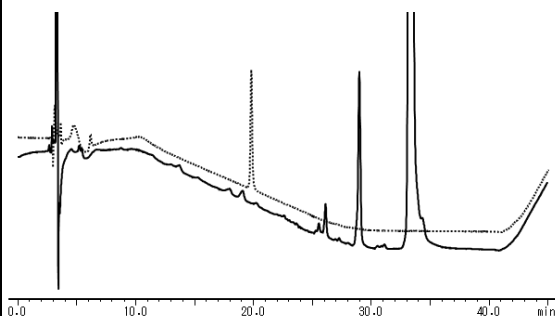


図 2 HPLC-PDA クロマトグラム

検出波長, 450 nm

破線, β -アポ-10'-カロテナール標品

実線, マウス肝臓ホモジネートのミトコンドリア画分に β -カロテンを添加し、37 で反応させた産物

(2) 組み換え CMO2 を用いた検討

パキユロテクノロジー社に、カイコ細胞 (Bm-N) を用いた CMO2 組み換えタンパク質の作成を依頼した。抗 His タグ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果から、Bm-N 細胞内に組み換えタンパク質が蓄積していることが確認され、さらに推定分子量からレーン 8 および 10 の細胞には組み換え CMO2 が発現していることが確認できた。しかしながら、これらの細胞破砕液中には CMO2 活性は認められず、酵素活性を有した組み換え CMO2 を得ることはできなかった。

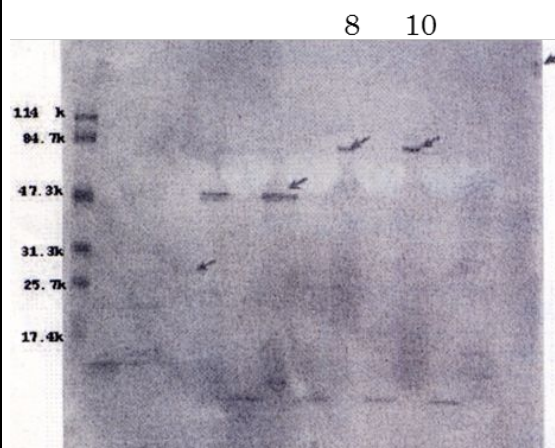


図 3 Bm-N 細胞破砕液のウェスタンブロット (anti 6×His)

(3) CMO2 発現細胞を用いた検討

リアルタイム RT-PCR を用いた検討により、ヒト乳癌由来細胞株 MDA-MB-231 内に CMO2 の mRNA 発現が確認できた。そこで、β-カロテンを添加した培地中で MDA-MB-231 細胞を培養し、一定時間後の細胞内のカロテノイド組成を HPLC-PDA を用いて解析した。その結果、細胞内に β-カロテンの蓄積が確認できたが、β-アポ-10'-カロテナルは検出されず、MDA-MB-231 細胞に CMO2 活性を見出すことはできなかった。

(4) 総括

本研究では、水産物由来カロテノイドの代謝変換とその機能性の関係を調べることを目的とし、カロテノイド代謝酵素のひとつである CMO2 の活性を、様々なサンプルを用いて測定した。しかしながら、何れのサンプル中にも CMO2 活性を見出すことができず、水産物由来カロテノイドが CMO2 の基質となり得るかどうかを調べることはできなかった。これは CMO2 の発現量が非常に少なかったことが原因と推察される。培養細胞を用いた実験により、過酸化水素処理によって CMO2 の mRNA 発現量が増加することを本研究期間中に確認しており、*in vitro* で CMO2 の活性を測定するためには、酸化ストレスなどによって CMO2 の発現量を予め上昇させる必要があると予想された。また、本研究で用いた手法では、水産物由来カロテノイドの代謝産物を得ることは難しく、カロテノイドの機能性発現に対する CMO2 の寄与を調べるためには、RNAi の手法を用いた CMO2 のノックダウン実験などを行う必要があると考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

<http://www.bioproducts.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 孝 (HIRATA, Takashi)

四條畷学園大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：40273495

(2) 研究分担者

菅原 達也 (SUGAWARA, Tatsuya)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70378818

(3) 連携研究者

なし