

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04725

研究課題名（和文）植物性食品成分が制御する生体分子群の同定と機能発現解明

研究課題名（英文）Identification of biomolecules controlled by food ingredients and elucidation of their functions

研究代表者

中村 俊之（Nakamura, Toshiyuki）

岡山大学・環境生命科学研究所・助教

研究者番号：90706988

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000円

研究成果の概要（和文）：ベンジルイソチオシアネート（BITC）と生体分子の相互作用を検討した。その結果、BITCとエタノールアミンとの付加体が認められた。これは、生体膜の構成脂質であるフォスファチジルエタノールアミンとBITCが反応し、速やかにホスホリパーゼにより切断されたと考えられた。また、BITCのいくつかのタンパク質への修飾が確認できた。その一つのタンパク質の活性を確認したところ、BITCによる修飾と相関が認められ、BITCの直接的な相互作用がそのタンパク質の機能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では食品成分のひとつであるBITCと生体分子の相互作用を示した。食品成分は生体分子と相互作用することにより効果を発揮すると考えられるが、どの生体分子と相互作用して効果を示しているのか未だ十分に明らかではない。そのため、食品機能獲得の個人差や、生活習慣や疾病の有無などによる悪影響への懸念は推測の域を出ない。本研究成果は、このような個人差や悪影響のない個々人に適した食品の選択が可能になり、食品機能の安心安全な獲得に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the interaction of benzyl isothiocyanate (BITC) with biomolecules. BITC modified ethanolamine was detected from cultured cells after treatment of BITC. It was suggested that phosphatidylethanolamine modified with BITC was degraded by phosphatases. In addition, some proteins were modified with BITC. A correlation was found between the activity and BITC modification in one of the modified proteins, suggesting that BITC directly regulated the protein activity via the modification.

研究分野：食品機能学

キーワード：食品機能 イソチオシアネート ポリフェノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食生活の乱れ、喫煙、飲酒や運動不足などに伴う生活習慣病患者が増加し続ける中、食品の三次機能(生体調節機能)が注目されており、生活習慣病予防・改善をサポートする機能性食品やサプリメントが多く販売されている。食品成分の機能性は様々な視点から研究が進められており、例えば、茶カテキンやタマネギに含まれるケルセチンは、脂肪を燃焼する酵素群を活性化することで抗肥満効果が期待されている。また、生活習慣病の中で死亡原因 No.1 である「がん」に対しては、キャベツやブロッコリーなどのアブラナ科の植物に含まれるイソチオシアネート類が有効であると考えられている。このように、日常的に摂取する「食品」での疾病予防・改善への期待は高まっている。

一方で、これら植物性食品成分は必ずしも生体に有効に働くわけではなく、生活習慣や疾病の有無などにより悪影響を及ぼすことが示唆されている。代表的な例として 1990 年代に行われた大規模なヒト介入試験があり、この試験では、肺がんのリスクを軽減すると考えられていた β -カロテンが、喫煙者では肺がんの罹患率をむしろ上昇させてしまうことが報告された。しかしながら、このような悪影響の原因はいずれも推測の域を出ない。その原因として、食品成分の機能性発現メカニズムの解明が十分ではないことが挙げられる。すなわち、摂取した食品成分がどのようにして生体に「有効性」をもたらしているのか医薬品のように明確ではなく、同時に、「悪影響」の発現メカニズムも不明確であることが原因の一つであると考えられる。食品成分の有効性は、主に生体分子との相互作用が引き金となっていることが示唆されており、例えば、イソチオシアネート類によるがん予防メカニズムの一つは、Keap1 タンパク質との結合を介した第二相解毒酵素群の誘導であると考えられている。しかしながら、多くの食品成分はどのような経路を辿って直接的または間接的に機能性を発現しているのか十分に明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では摂取した食品成分がどのようにして生体に好影響または悪影響を示すのか明確にすることを旨とし、特異モノクローナル抗体を用いた免疫化学的解析と質量分析計を用いた分析化学的解析により食品成分と相互作用する生体分子の同定を試みる。また、食品成分と相互作用する生体分子の食品成分処理による機能変化を評価する。

3. 研究の方法

(1) イソチオシアネートによる脂質修飾

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に 0-50 μM のベンジルイソチオシアネート (BITC) を 24 時間処理し、細胞培養液を LC-MS/MS (Xevo TQD, Waters または API3000, AB Sciex) で分析した。加えて、10 μM の BITC を 0-48 時間処理し、BITC 付加体の経時的な変化を検討した。次に、卵黄レシチンとホスファチジルエタノールアミン (PE) を用いて作製したリポソームに BITC を 20 時間処理した。反応しなかった BITC はスピニングにより取り除いた。RAW264.7 細胞に BITC 処理したリポソームを 2 時間処理後、培地を交換し、培養液中の BITC とエタノールアミン (EA) の付加体を LC-MS/MS で経時的に分析した。

(2) イソチオシアネートによるタンパク質修飾

RAW264.7 細胞に 0-25 μM の BITC を 24 時間処理し、細胞溶解液を電気泳動および Western blotting に供した。電気泳動後のタンパク質の一部は、バンドを切り出し、プロテアーゼで切断してできたペプチドを MALDI-TOF-MS 分析に供し、Mascot データベース検索により同定を試みた。加えて、BITC 処理した培養細胞の溶解液と特異モノクローナル抗体を反応させることで免疫沈降を行なった。それにより得られたサンプルを電気泳動および Western blotting に供し、生体タンパク質に対する抗体で検出を行なった。さらに BITC 処理した細胞溶解液を用いて、BITC が修飾するタンパク質とその上流に存在するタンパク質の活性を評価した。

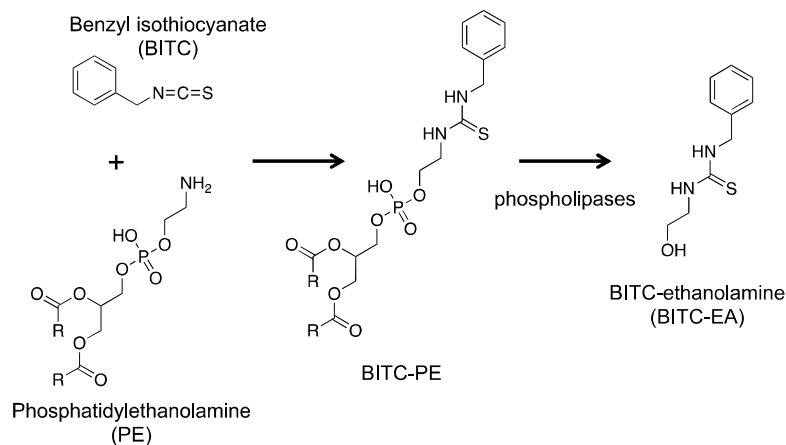
(3) 機能性発現に寄与する部分構造評価

相互作用・機能発現に必要な部分構造探索を目的とし、BITC の主な抱合体として知られる glutathione (GSH) 抱合体と N-acetyl-cysteine (NAC) 抱合体を合成した。RAW264.7 細胞に 0-25 μM の BITC または BITC 抱合体を 24 時間処理し、細胞中 DNA を電気泳動に供した。加えて、0-10 μM の BITC とその抱合体を処理した細胞の溶解液を電気泳動および Western blotting に供し、Caspase-3 の活性を評価した。さらに、BITC の細胞内への取り込み量を評価するため、BITC または抱合体を RAW264.7 細胞に処理後、細胞溶解液に 1,2-benzenedithiol を処理し、365 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

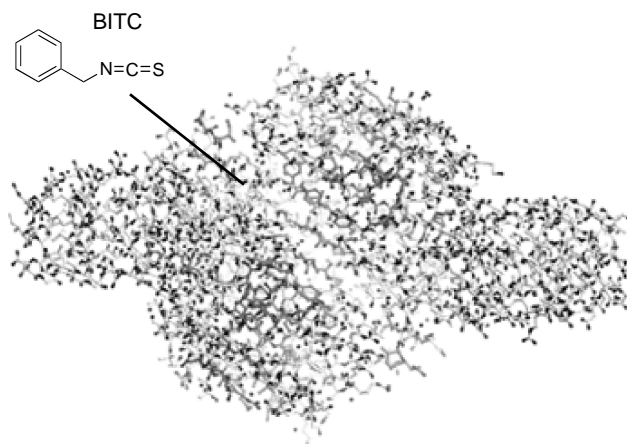
(1) イソチオシアネートによる脂質修飾

RAW264.7 細胞に BITC を処理した結果、BITC 処理濃度依存的に BITC-EA 付加体が培養液中から検出された。また、その付加体は BITC 処理 2 時間後には培養液中から検出され、時間依存的に付加体量は増加した。次に、BITC 処理したリポソームを培養細胞に添加しリポソームを取り込ませた後、培養液中の BITC-EA 付加体の検出を試みた。その結果、培養時間依存的に BITC-EA 付加体が検出された。これらの結果から、BITC は処理後速やかに PE と付加体を形成し、細胞内に存在するホスホリパーゼがその付加体に作用することで、BITC-EA 付加体として培養液中に放出されることが示唆された。



(2) イソチオシアネートによるタンパク質修飾

BITC 処理した培養細胞の溶解液を Western blotting 後、特異抗体によりイソチオシアネート修飾タンパク質を検出したところ、いくつかの陽性バンドが検出できた。その陽性バンドの一部は、Actin や GAPDH といった既知のイソチオシアネート標的タンパク質であることが示唆された。さらに、タンパク質バンドを電気泳動ゲルから切り出し、プロテアーゼによるゲル内消化後、MALDI-TOF-MS 分析を行った。Mascot データベース検索を行なったところ、特定のタンパク質である可能性が示唆されたが、タンパク質の同定にまでは至らなかった。そこで、特異抗体での免疫沈降により BITC 修飾タンパク質を回収後、電気泳動および Western blotting に供し、そのタンパク質に対する抗体を用いて検出を試みた。その結果、Mascot データベース検索により示唆されたタンパク質が BITC に修飾されていることがわかった。次に、BITC 処理による BITC 修飾タンパク質の活性を評価した。その結果、修飾と活性に相関が認められ、BITC の直接的な修飾がそのタンパク質の機能を制御している可能性が示唆された。加えて、BITC 修飾タンパク質の上流にある分子の活性評価を行なったところ、一部の上流分子の活性変化が BITC 処理時間依存的に認められた。このことから、BITC 修飾タンパク質の活性変化は、BITC が直接修飾することに加え、上流分子からのシグナル伝達による機能制御の可能性が示唆された。



(3) 機能性発現に寄与する部分構造評価

BITC、BITC-GSH 抱合体および BITC-NAC 抱合体を処理した細胞から抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動したところ、5 μM の BITC 処理では DNA の断片化が見られたが 10 μM 以上の BITC では断片化は見られなかった。一方、BITC の抱合体では高濃度処理時でも DNA の断片化が見られ、特に NAC 抱合体で顕著に見られた。そこで次に BITC とその付加体による Caspase-3 の活性を評価した。その結果、DNA の断片化と相関して活性型 Caspase-3 (cleaved Caspase-3) が検出された。加えて、BITC の細胞内への取り込み量を確認した結果、未抱合の BITC は処理後速やかに取り込まれ、時間とともにその量は減少した。一方、抱合体は処理後徐々に細胞内へ取り込まれた。このことから、BITC の作用は細胞内へ取り込まれて発揮していることが示唆された。また、BITC の機能性発現には、ITC の有する NCS 基だけではなく、側鎖の極性が重要な因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Afrin S, Okuma E, Tahjib-UI-Arif M, Jahan MS, Nakamura T, Nakamura Y, Munemasa S, Murata Y.	4. 巻 71
2. 論文標題 Stomatal response to isothiocyanates in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 6921-6931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa420	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Suga N, Murakami A, Arimitsu H, Nakamura T, Nakamura Y, Kato Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Luteolin suppresses 5-hydroxytryptamine elevation in stimulated RBL-2H3 cells and experimental colitis mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.20-192	査読の有無 有
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 Yang Q, Nakamura T, Seto M, Miyagawa M, Xu W, Zhu B, Munemasa S, Murata Y, Nakamura Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 A multidrug resistance-associated protein inhibitor is a potential enhancer of the benzyl isothiocyanate-induced apoptosis induction in human colorectal cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biochemical and Molecular Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbt.22791	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Nakamura T, Murata Y, Nakamura Y.	4. 巻 299
2. 論文標題 Characterization of benzyl isothiocyanate extracted from mashed green papaya by distillation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chem.	6. 最初と最後の頁 125118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2019.125118.	査読の有無 有
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 Kato Y, Kawai M, Kawai S, Okano Y, Rokkaku N, Ishisaka A, Murota K, Nakamura T, Nakamura Y, Ikushiro S.	4. 巻 67
2. 論文標題 Dynamics of the cellular metabolism of leptosperin found in manuka honey.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem.	6. 最初と最後の頁 10853-10862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b03894.	査読の有無 有
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 Nakamura T, Hirakawa M, Nakamura Y, Ishisaka A, Kitamoto N, Murakami A, Kato Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Covalent Modification of Phosphatidylethanolamine by Benzyl Isothiocyanate and the Resultant Generation of Ethanolamine Adduct as Its Metabolite.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem Res Toxicol.	6. 最初と最後の頁 638-644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.8b00331.	査読の有無 有
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 Yang Q, Miyagawa M, Liu X, Zhu B, Munemasa S, Nakamura T, Murata Y, Nakamura Y.	4. 巻 82
2. 論文標題 Methyl- α -cyclodextrin potentiates the BITC-induced anti-cancer effect through modulation of the Akt phosphorylation in human colorectal cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 2158-2167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1514249.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Liang Y, Sasaki I, Takeda Y, Zhu B, Munemasa S, Nakamura T, Murata Y, Nakamura Y.	4. 巻 82
2. 論文標題 Benzyl isothiocyanate ameliorates lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes during adipocyte differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 2130-2139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1514247.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Nakamura T, Abe-Kanoh N, Nakamura Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 Physiological relevance of covalent protein modification by dietary isothiocyanates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 11-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbr.17-91	査読の有無 有
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 Nakamura T, Kinjo C, Nakamura Y, Kato Y, Nishikawa M, Hamada M, Nakajima N, Ikushiro S, Murota K.	4. 巻 645
2. 論文標題 Lymphatic metabolites of quercetin after intestinal administration of quercetin-3-glucoside and its aglycone in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys.	6. 最初と最後の頁 126-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2018.03.024	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 中田小百合、Ying Liang、中村俊之、宗正晋太郎、村田敏行、中村宜督
2. 発表標題 ベンジルイソチオシアネートは脂肪細胞によるインスリンシグナル伝達を強化する
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 明神匠、Xu Wensi、宗正晋太郎、中村俊之、村田芳行、中村宜督
2. 発表標題 食品由来ポリフェノール類がアセトアルデヒドの皮膚表皮細胞への毒性に与える影響
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江木琴美、Li Kexin、中村俊之、加藤陽二、宗正晋太郎、村田芳行、中村宜督
2. 発表標題 リンゴポリフェノールによるタンパク質ニトロ化の抑制作用
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第58回講演会(例会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiyuki Nakamura, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 Improvement of the benzyl isothiocyanate stability in aqueous solutions.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouki Morita, Sayaka Nakashima, Toshiyuki Nakamura, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 Identification of the target proteins of quercetin glycoside catabolites as cytoprotective agent
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Myojin, Wensi Xu, Shintaro Munemasa, Toshiyuki Nakamura, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 Modulating effects of polyphenols on the acetaldehyde-induced cytotoxicity in human keratinocyte HaCaT cells
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rikito Mitsuzane, Toshiyuki Nakamura, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 The distinguishable absorption and metabolism of quercetin coexisted with other food components
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki Moriya, Toshiyuki Nakamura, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 Characterization of the monoclonal antibody to α -carboxyethyl hydroxychroman
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hongyan Wu, Miho Hirooka, Toshiyuki Nakamura, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 Difference in antioxidant capacity of rice extracts among rice categories and degree of milling and processing
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayuri Nakata, Ying Liang, Toshiyuki Nakamura, Shintaro Munemasa, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
2. 発表標題 Benzyl isothiocyanate enhances insulin signaling in adipocytes
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村俊之、村田芳行、中村宜督
2. 発表標題 青バパイヤ蒸留抽出液の生理活性および安定性の評価
3. 学会等名 日本フードファクター学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 俊之、加藤 陽二、村田 芳行、中村 宜督
2. 発表標題 イソチオシアネート-リジン付加体の薬物代謝酵素発現への影響
3. 学会等名 農芸化学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------