

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02150

研究課題名(和文)機能性食品成分の腸管シグナル制御を介した作用機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Study of the mechanism of functional food ingredients through the control of intestinal signals

研究代表者

井上 順 (INOUE, Jun)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70323962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ブロッコリー由来の成分であるスルフォラファンの投与により、抗肥満効果や脂肪肝効果が発揮されることを明らかにした。肥満モデルマウスに0.1%のスルフォラファンを与えたときの腸内細菌叢への影響を解析した(高脂肪食)。その結果、スルフォラファンの摂取により腸内細菌叢の変化が認められ、スルフォラファンは腸内細菌叢の変化を通じてその効果を発揮していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品成分が生体に良い作用をもたらすことは広く知られているが、その作用機構については不明な点が多い。本研究ではブロッコリー由来成分であるスルフォラファンの摂取がマウス生体での腸内細菌叢の変化を引き起こすと共に、抗肥満作用を発揮することを示した。本研究の成果により食品成分の作用点に関する新たな知見を得ることができ、今後の食品機能研究の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：I have demonstrated that administration of sulforaphane, which is a component derived from broccoli, exerts anti-obesity and anti-fatty liver effects. I analyzed the effect on the intestinal flora when 0.1% sulforaphane was fed to obese model mice (high-fat diet). As a result, changes in the intestinal flora were observed by ingestion of sulforaphane, suggesting that sulforaphane exerts its effect through changes in the intestinal flora.

研究分野：食品生化学

キーワード：抗肥満 スルフォラファン ブロッコリー 腸内細菌叢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品成分がさまざまな生理作用に影響を与えることが広く知られているが、その作用機構については不明な点が多く残されている。これらの作用機構の正確な理解は、食品による生体機能改善に向けた利用に大きく寄与することが期待される。

研究代表者は抗メタボリックシンドローム作用を有する食品成分の探索を行い、複数の成分の同定に成功している。現在、それぞれの食品成分の作用機構の分子レベルでの解明を目指して研究を進めている。

近年、腸内細菌が宿主の健康に関与する可能性が指摘されており、肥満等の状態において腸内細菌叢が変化することが報告されている。これらの知見を背景として、食品の摂取による腸内細菌叢の変化が、食品の生理作用への影響に関与することが想定されている。

2. 研究の目的

肥満や脂肪肝を抑制する食品成分(ポリフェノール類など)は多く知られており、動物での表現型や標的臓器由来の培養細胞を用いた解析から、その作用メカニズムの解明が行われている。本研究は機能性食品成分の作用機構の解明を目的としている。具体的には、生体が食品成分を認識する仕組みを明らかにし、そのシグナルをどのように全身へ伝えるのかを解明する。また、食品成分による腸内細菌叢の構成に与える影響について検討する。生体の食品成分への応答機構の理解を深めることで、高機能性食品創出への基盤を形成すること、さらには食品成分の作用点の新たな学術的仮説を検証・証明することが最終的な目標である。本研究では、研究代表者がこれまでにその生理作用を明らかにしてきたスルフォラファンを対象として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) スルフォラファンによる SREBP 活性抑制機構の解明

研究代表者はこれまでに、脂質代謝を包括的に制御する転写因子である SREBP の活性を抑制する食品由来成分としてスルフォラファンを見出した。本研究では、肝がん由来細胞株である Huh-7 細胞を用いて、スルフォラファンによる SREBP 抑制機構の解明を目指した。具体的にはスルフォラファン処理によって、SREBP タンパク質量が変化するか、またその変動がユビキチン-プロテアソーム系によるかについて検討した。さらにスルフォラファンへの応答に必要な SREBP の領域について検討を行った。

(2) スルフォラファン処理によりタンパク質分解の目印となるポリユビキチン化が促進する候補因子の探索

スルフォラファン処理は、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を促進することをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、TR-TUBE 法および質量分析法を用いてスルフォラファン処理によりポリユビキチン化が促進するタンパク質の同定を目指した。

(3) スルフォラファン結合因子の同定

スルフォラファンは特徴的な官能基としてイソチシアネート基をもち、親電子性を有する。この性質により Keap1-Nrf2 経路の活性化を引き起こすことが知られている。スルフォラファンの多岐にわたる生理作用を考慮すると、Keap1-Nrf2 や上記の SREBP 経路以外にも標的とする分子が存在することが想定される。本研究ではスルフォラファンビーズを作製し、新規なスルフォラファン結合タンパク質の同定を行った。これによりスルフォラファンの直接の標的因子を同定し、スルフォラファンの生理機能の分子レベルでの理解を深めることを目指した。

(4) 腸内細菌叢の変化に着目した検討

肥満モデルマウスにスルフォラファンを摂取させ、「体重変化」と「腸内細菌叢変化」を継時的に解析し、スルフォラファンによる抗肥満効果における腸内細菌叢の変化の寄与について検討を行った。具体的には、マウスに高脂肪食を7週間与え肥満状態にした後、3群に分け、高脂肪食、SFaNを0.03%もしくは0.1%(w/w)含む高脂肪食のいずれかを8週間与えた。飼育期間中は肥満の指標として経時的に体重を測定し、腸内細菌叢のゲノムDNAを抽出するため糞を回収した。15週の飼育後、肝臓、脂肪組織、盲腸内容を摘出し、血液を採取して各種パラメーターを測定した。

4. 研究成果

(1) スルフォラファンによる SREBP 活性抑制機構の解明

100 μ M スルフォラファンで3時間処理したときの、内因性 SREBP-1 タンパク質量についてウエスタンブロットにより解析を行った。その結果、スルフォラファン処理により前駆体 SREBP-1 のタンパク質量の減少が観察された。プロテアソーム阻害剤である MG132 の同時処理により、スルフォラファンによる SREBP-1 前駆体タンパク質量の減少が見られなくなったこ

とから、スルフォラファン処理はユビキチン-プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP を分解している可能性が示された。

次に、SREBP-1a 発現プラスミドを Huh-7 細胞へ導入し、外因性 SREBP-1 へのスルフォラファンの作用について検討を行った。その結果、スルフォラファン処理は、内因性の場合と同様に、外因性の前駆体 SREBP-1a のタンパク質分解を促進することが示された。各種欠失体発現プラスミドを作製・検討を行ったところ、SREBP-1a の C 末端側を欠失した変異体ではスルフォラファンによる分解が減弱したことから、スルフォラファンは SREBP-1 の C 末端側に作用していることが示された。これまでに SREBP の N 末端側（成熟体）はユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けることが示されているが、C 末端側がプロテアソームによる分解を受けることを示した報告はなく、本研究を通じて SREBP 活性の新たな制御機構の解明につながることを期待される。

さらにスルフォラファン処理は内因性前駆体 SREBP-2 タンパク質の発現量も低下させた。SREBP-1 と SREBP-2 は C 末端側は相同性が比較的低く、どの領域がスルフォラファンによる分解に関与しているのかについて、今後検討を行う予定である。

(2) スルフォラファン処理によりタンパク質分解の目印となるポリユビキチン化が促進する候補因子の探索

TR-TUBE 法を用いてスルフォラファン処理によってポリユビキチン化が促進する因子の探索を行ったところ、複数の候補因子の同定に成功した。そのうちの二つの候補因子の発現プラスミドを作製し、Huh-7 細胞に導入して解析を行った。その結果、両因子共にスルフォラファン処理によりポリユビキチン化が促進され、スルフォラファン処理によってポリユビキチン化が促進する新規因子の同定に成功した。一方で、一つの因子はスルフォラファンによるタンパク質分解が観察されたが、もう一方はスルフォラファン処理によるタンパク質分解の促進は観察されず、今後、このポリユビキチン化がどのような作用をもつのか検討を行う予定である。

(3) スルフォラファン結合因子の同定

スルフォラファンのイソチオシアネート基と相互作用する因子の同定を目指し、スルホニル基側のアルキン誘導体を作製し、クリックケミストリーによりスルフォラファンビーズを作製した。Huh-7 細胞を 6 種類の界面活性剤で可溶化し、スルフォラファンビーズとコンタクトさせた。結合たんぱく質を濃縮後に質量分析に供し、候補因子を多数得た。その内およそ 50 種類について発現プラスミドを作製し、スルフォラファンビーズとの結合の有無を検討したところ、およそ半数の因子について結合が観察された。これらの結果から、スルフォラファンと結合する新規なタンパク質の同定に成功したといえる。今後、この結合がそれぞれの因子の機能に影響を及ぼすかどうかに着目して検討を行う予定である。

(4) 腸内細菌叢の変化に着目した検討

0.03%および 0.1%スルフォラファン + 高脂肪食群では高脂肪食群と比較して体重の減少が観察され、0.1%群では有意な減少が確認されたことから、これまでの検討と同様にスルフォラファンによる抗肥満作用が観察された。腸内細菌叢については図 1 (門レベル)、図 2 (科レベル) に示した。高脂肪食 (HFD) の摂取により通常食群と比較して Bacteroidetes 門の減少と Firmicutes 門の増加が検出され、これまでの報告と同様の結果が得られた。0.1%スルフォラファン群では Bacteroidetes 門の増加と Firmicutes 門の減少が検出され、通常食群と同様の傾向が観察されたことから、スルフォラファン摂取により腸内細菌叢が変化し、その変化を介して作用が発揮されることが示唆された。

	Cont	HFD	HFD+SfFaN 0.03%	HFD+SfFaN 0.1%
Bacteroidetes	47.8%	43.1%	39.5%	45.9%
Firmicutes	52.2%	56.8%	60.4%	54.0%
Proteobacteria	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
Tenericutes	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%

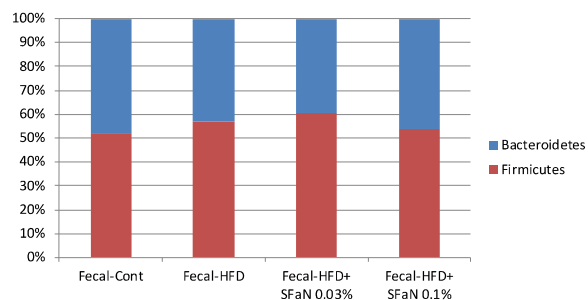
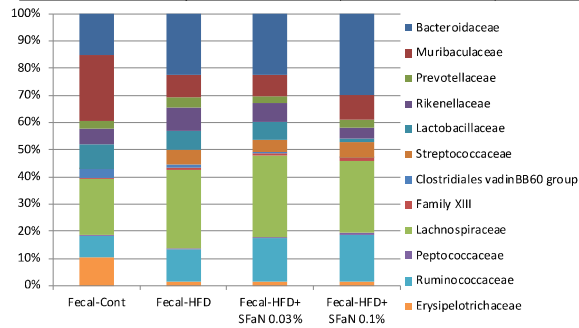


図1.スルフォラファン摂取による腸内細菌叢の変化(門レベル)

以上の結果より、スルフォラファンの生理作用について分子レベルでの解析を行い、新規な標的因子を複数見出すことに成功した。また、スルフォラファンの摂取が腸内細菌叢を変化させ、それにより抗肥満作用を発揮する可能性を示すことができた。今後、継続して検討を行うことで、スルフォラファンの生理作用を解明し、食品の機能を分子レベルで明らかにすることを目指す。

図2.スルフォラファン摂食による腸内細菌叢の変化(科レベル)

	Cont	HFD	HFD+ SFaN 0.03%	HFD+ SFaN 0.1%
Bacteroidaceae	15.2%	22.4%	22.3%	30.0%
Muribaculaceae	24.1%	8.2%	7.8%	8.9%
Prevotellaceae	2.8%	3.8%	2.2%	2.7%
Rikenellaceae	5.7%	8.7%	7.2%	4.4%
Lactobacillaceae	9.2%	6.8%	6.4%	1.2%
Streptococcaceae	0.0%	5.5%	4.5%	5.7%
Clostridiales vadinBB60 group	3.1%	0.9%	0.6%	0.0%
Family XIII	0.6%	0.8%	0.5%	1.1%
Lachnospiraceae	20.6%	28.7%	29.8%	26.5%
Peptococcaceae	0.1%	0.6%	0.6%	0.6%
Ruminococcaceae	7.8%	11.7%	15.9%	17.5%
Erysipelotrichaceae	10.7%	1.6%	1.5%	1.3%



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gen Seishu, Matsumoto Yu, Suzuki Tsukasa, Inoue Jun, Yamamoto Yuji	4. 巻 541
2. 論文標題 Methionine controls insulin/mammalian target of rapamycin complex 1 activity by modulating tuberous sclerosis complex 2 stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.033	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 Gen Seishu, Matsumoto Yu, Kobayashi Ken-Ichi, Suzuki Tsukasa, Inoue Jun, Yamamoto Yuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Stability of tuberous sclerosis complex 2 is controlled by methylation at R1457 and R1459	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78274-6	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 Matsumoto Eri, Matsumoto Yu, Inoue Jun, Yamamoto Yuji, Suzuki Tsukasa	4. 巻 534
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase regulates β -catenin protein synthesis by phosphorylating serine/arginine-rich splicing factor 9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 347 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.079	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 Matsumoto Eri, Akiyama Kaho, Saito Takuya, Matsumoto Yu, Kobayashi Ken-Ichi, Inoue Jun, Yamamoto Yuji, Suzuki Tsukasa	4. 巻 477
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase regulates alternative pre-mRNA splicing by phosphorylation of SRSF1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 2237 ~ 2248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190894	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 Matsumoto Yu, Ishimi Yoshiko, Suzuki Tsukasa, Kobayashi Ken-ichi, Inoue Jun, Yamamoto Yuji	4. 巻 75
2. 論文標題 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma/small heterodimer partner pathway prevents high fat diet-induced obesity and hepatic steatosis in Sprague?Dawley rats fed soybean meal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108250 ~ 108250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2019.108250	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 井上 順	4. 巻 13
2. 論文標題 機能性をもつ食品成分の探索と作用メカニズムの解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
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 Iwase Masamori, Watanabe Kyoko, Shimizu Makoto, Suzuki Tsukasa, Yamamoto Yuji, Inoue Jun, Sato Ryuichiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Chrysin reduces the activity and protein level of mature forms of sterol regulatory element-binding proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1608806	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 MARUYAMA Ryuto, SHIMIZU Makoto, HASHIDUME Tsutomu, INOUE Jun, ITOH Nobuyuki, SATO Ryuichiro	4. 巻 64
2. 論文標題 FGF21 Alleviates Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress under Physiological Conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 200 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.64.200	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 Inoue Jun, Miyata Shingo, Shimizu Makoto, Sato Ryuichiro	4. 巻 82
2. 論文標題 Isoxanthohumol stimulates ubiquitin-proteasome-dependent degradation of precursor forms of sterol regulatory element-binding proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1591 ~ 1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1478715	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 Sasaki Takashi, Kuboyama Ayane, Mita Moeko, Murata Shotaro, Shimizu Makoto, Inoue Jun, Mori Kazutoshi, Sato Ryuichiro	4. 巻 293
2. 論文標題 The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10322 ~ 10332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002733	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 Kuboyama Ayane, Sasaki Takashi, Shimizu Makoto, Inoue Jun, Sato Ryuichiro	4. 巻 82
2. 論文標題 The expression of Transmembrane Protein 100 is regulated by alterations in calcium signaling rather than endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1377 ~ 1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1464899	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9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小高 愛未、正路 健太、松谷 峰之介、志波 優、松本 雄宇、鈴木 司、山本 祐司、井上 順
2. 発表標題 スルフォラファンの肥満抑制効果に対する腸内細菌叢の変化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 舜、平口 遥香、松本 雄宇、鈴木 司、山本 祐司、井上 順
2. 発表標題 脂肪酸合成律速酵素ACC複合体構成因子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正路 健太、宮田 慎吾、鈴木 司、山本 祐司、井上 順
2. 発表標題 SFaNによる転写因子SREBP活性抑制機構の解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko Watanabe, Masamori Iwase, Makoto Shimizu, Tsukasa Suzuki, Yuji Yamamoto, Ryuichiro Sato, Jun Inoue
2. 発表標題 Chrysin reduces protein level and activity of mature forms of sterol regulatory element-binding proteins
3. 学会等名 The 9th International Conference on polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 順
2. 発表標題 機能性をもつ食品成分の探索と作用メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 / 東京 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 順
2. 発表標題 機能性をもつ食品成分の探索 ～基礎研究との両立～
3. 学会等名 栄養学若手研究者の集い 第52回サマーセミナー / 筑波 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 順、宮田 慎吾、正路 健太、鈴木 司、山本 祐司、清水 誠、佐藤 隆一郎
2. 発表標題 スルフォラファンは転写因子SREBP前駆体の分解促進を介して食事誘導性肥満や脂肪肝を改善する
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 / 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平口 遥香、小林 里奈、鈴木 司、山本 祐司、清水 誠、佐藤 隆一郎、井上 順
2. 発表標題 MIG12によるACC活性化機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 / 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 里奈、平口 遥香、菊地 瑛登、高橋 舜、鈴木 司、山本 祐司、井上 順
2. 発表標題 ACC活性化因子MIG12の新規結合タンパク質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会 / 東京
4. 発表年 2019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
研究 分担者	鎌田 春彦 (KAMADA Haruhiko) (00324509)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研 究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー (84420)	
研究 分担者	國澤 純 (KUNISAWA Jun) (80376615)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研 究所 ワクチン・アジュバント研究センター・センター長 (84420)	

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