

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580132
研究課題名（和文）：食物由来フラボノイドによる新しい生理機能としてのレドックス制御機構
研究課題名（英文）：Redox regulation as a novel physiological function by food-derived flavonoids.
研究代表者：
佐藤 英世（SATO HIDEYO）
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：60235380

研究成果の概要：本研究では、食品由来のフラボノイド類が、老化やいくつかの病態に関与すると考えられる生体レドックスバランスの維持にどのような影響を及ぼすか調べた。その結果、いくつかのフラボノイドは、シスチン・グルタミン酸トランスポーターの働きを介して細胞内外のレドックスを還元方向にシフトさせることがわかった。また、この効果を現すフラボノイドには、構造的な共通性があることが示唆された。一方、このトランスポーターの個体レベルでの働きには、生体にとって有利になる場合と不利になる場合があることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品、遺伝子、レドックス、フラボノイド、シスチン、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

最近、ポリフェノールに代表される食品由来の抗酸化物質が注目されている。特にフラボノイドなどのラジカルスカベンジャー能を持つ成分は、酸化ストレスが関与する疾病の発症や進展に対して抑制効果があると期待されている。これらの抗酸化物質は、直接、活性酸素を消去するため一定量の摂取が必要であ

ると考えられる。一方、これまでの研究から、フラボノイドの中には、活性酸素や異物の消去に中心的な役割を担う抗酸化系酵素の発現制御に影響を与えるものがあることが分かってきた。

血漿中には、SH基を有する種々の低分子化合物が存在し、アルブミンなどのタンパク質と結合したり、あるいは、遊離

の状態が存在している。中性アミノ酸の一種であるシステイン(還元型)と、それが二分子ジスルフィド結合したシスチン(酸化型)は、血漿中に存在する遊離のSH基化合物では主要な化合物である。最近、血漿中のシスチンとシステインの存在量比で表される酸化還元状態(レドックスバランス)が、種々の病態や遺伝子発現制御、また加齢において重要な役割を担うことが明らかとなってきた。このようなことから、血漿レドックスバランスの酸化方向へのシフトは、老化の原因の一つとして寄与している可能性が考えられている。また、癌、神経変性疾患、糖尿病など酸化ストレスが関与するとされる疾患の発生や進展に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかし、食品由来成分、特に抗酸化物質として機能するフラボノイドが生体レドックスバランスの維持にどのような影響を及ぼすか知られていなかった。また、レドックスバランスの維持が、これらの疾患の発症・進展や老化にどのように関係するか明らかになっていなかった。

哺乳類細胞形質膜に発現するアミノ酸トランスポーターの一つであるシスチン・グルタミン酸トランスポーターは、内在性抗酸化物質として中心的な役割を担うグルタチオンの合成や細胞外のレドックスバランスを維持するのに必須の分子であることが知られている。また、このトランスポーターは、酸化ストレスなど種々の刺激によって強く誘導されることから、生体防御系の一つとして機能していると考えられている。研究代表者らは、これまで、このトランスポーターの細胞レベルでの機能と発現制御機構について詳細な研究を行ってきた。また、初

めてこのトランスポーターの遺伝子cDNAをクローニングし、xCTと命名した分子がトランスポーターの本体であることを明らかにした。個体レベルでの発現を調べたところ、xCTは、脳及び胸腺・脾臓・リンパ節などの免疫系組織に特異的に発現していることがわかった。このトランスポーターは、グルタミン酸も基質とすることから、脳におけるグルタミン酸濃度の制御に関わる可能性が考えられた。一方、免疫系細胞は、レドックスバランスの変化に対する感受性が高いことから、免疫組織におけるこのトランスポーターの発現は、免疫系細胞の機能に何らかの影響を与えていることが推定された。個体レベルでの機能解析を進めるために、研究代表者らは、xCT遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスは、見かけ上正常に発育し、生殖能力も備えていた。しかし、このマウス由来の細胞は、通常培養条件下では生存できず、明らかに酸化ストレス感受性が高まっていた。また、興味深いことに、このマウスの血漿は、レドックスバランスが酸化方向にシフトしていることが示された。

腎臓では、b⁰⁺系と呼ばれるシスチンの再吸収系を司るアミノ酸トランスポーターが発現している。このトランスポーターによって尿細管中のシスチンが再吸収され、細胞内でシステインに還元された後、中性アミノ酸トランスポーターを介して血中に戻されることが、血中のシスチン・システインによるレドックスバランスを維持する主要な機構と考えられていた。しかし、xCT遺伝子欠損マウスが明らかな血漿レドックスインバランスを示したことから、シスチン・グルタミン酸トランスポーターも血漿レドックスの維持に部分的に寄与していると考えられ

た。研究代表者らは、xCT の発現制御機構を研究している過程で、ケルセチンやルテオリンのようなフラボノイドが、Nrf2/Keap1 系の活性化によって xCT を強く誘導することを見出した。

2. 研究の目的

これまで抗酸化物質として活性酸素種を直接消去する作用が注目されていたフラボノイドなどの食品由来ポリフェノールには、シスチン・グルタミン酸トランスポーターを介した血漿や組織のレドックス制御というこれまでに知られていない機能を有する可能性が推定された。本研究では、(1)食品由来フラボノイドが生体レドックス状態にどのような影響を及ぼすか、(2)食品由来フラボノイドによるレドックスバランスの制御は、シスチン・グルタミン酸トランスポーターを介するものか、あるいは腎臓に発現している b^0+ 系のような他のアミノ酸トランスポーターなど別の機構によるものか、(3)生体レドックスバランスを維持することは生理学的・病理学的にどのような意義があるのか、を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

マウス臍臓ランゲルハンス島 β 細胞由来細胞株 β TC3 細胞、マウス腹腔滲出マクロファージ、マウス胚性繊維芽細胞、ラットグリオーマ由来細胞株 C6 細胞を主に用いた。また、シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子 (xCT) 欠損マウスは、研究代表者らが 2005 年に作製したマウスを用いた。グルタチオンの測定は、酵素リ

サイクル法または、モノプロモビマンと反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。細胞内システインも HPLC により測定した。シスチンの取り込み活性は、 ^{14}C 標識シスチンを用いて、単位時間当たりに細胞内に取り込まれるシスチン量を初速度として求めた。なお、本研究で行われた動物実験は、山形大学動物実験委員会に申請し承認された後、実施された。

4. 研究成果

代表的なフラボノイドの一つであるケルセチンを用い、これを培養細胞に添加した時の GSH の動態について検討した。その結果、ケルセチンがマウス臍臓 β 細胞由来の細胞株 β TC3 細胞において xc-系を構成するタンパク質である xCT 及び GSH 合成の律速酵素である γ -GCS の発現を濃度依存的に誘導し、グルタチオンを上昇させることが示された。そこで、ケルセチンに構造の類似する種々のフラボノイドが GSH とシスチンの取り込み活性にどのような影響があるか調べた。その結果、ラムネチン、イソラムネチン、ルテオリン、フィセチンを添加するとケルセチンと同様に β TC3 細胞の GSH は有意に上昇した。一方、アピゲニン、タキシホリン、ケンフェロール、モリン、ミリセチン、ケルセタゲチン、イソケルシトリンを添加しても、GSH の上昇は認められなかった。また GSH を上昇させるフラボノイドは全てシスチンの取り込み活性を誘導したことから、これらのフラボノイドによる GSH の上昇は xc-系の活性誘導によるものであると考えられた。次に、その作用機序を解明するために転写因子の一つである Nrf2 遺伝子ノックアウトマウス胚由来繊維芽細胞にフラボノイドを

添加したところ、野生型のマウス胚由来繊維芽細胞では細胞内 GSH レベルとシスチン取り込み活性の上昇が見られた。一方、Nrf2 遺伝子ノックアウトのマウス胚由来繊維芽細胞では細胞内 GSH レベルとシスチン取り込み活性の上昇が見られなかった。また、 γ -GCS の発現誘導を解析したところ、野生型ではフラボノイドの添加により γ -GCS の誘導が見られたが、Nrf2 遺伝子ノックアウトでは、その誘導は見られなかった。以上の結果からフラボノイドには、GSH やシスチンの取り込み活性を上昇させるものがあること、そのようなフラボノイドは 4 位のカルボニル基と共役した C 環の 2 位と 3 位に二重結合、B 環の 3' 位と 4' 位にカテコール構造もしくは類似構造を共通して有すること、そして、これらの構造を有したフラボノイドは、Nrf2 を介した転写制御系によって xCT と γ -GCS を誘導し、そのことによって細胞内 GSH レベルを上昇させることが示された。このことより抗酸化物質として機能していると考えられたフラボノイドの中には、抗酸化系に関わるタンパク質の遺伝子発現を制御することによって、生体内における抗酸化システムの働きに寄与するものがあることが明らかになった。

次に xCT により形成されるレドックスバランスの生理学的意義について、xCT 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。まず、レドックスバランスの変化が、生体の諸機能にどのように影響を与えるかを調べるために、免疫系細胞のサイトカイン等の産生能について解析を行った。その結果、xCT 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにおいて、野生型に比べて一酸化窒素産生能が低下することがわかった。しかし、IL-1 等のサイトカイン産生能には有意差

は認められなかった。個体レベルでの種々の病態におけるレドックスの影響を調べるため、パラコート投与による酸化ストレス負荷実験を行った。野生型マウスおよび xCT 遺伝子欠損マウスにパラコート (45 mg/kg) を腹腔内投与し生存率を調べたところ、3 日目から xCT 遺伝子欠損マウスの生存率が野生型マウスと比べて有意に低下した。パラコートを投与すると特に肺に傷害が見られることから、パラコート投与後、経時的に肺のグルタチオンレベルを調べた。その結果、野生型マウスと比較して、xCT 遺伝子欠損マウスの肺のグルタチオンレベルは有意に低下することが明らかとなった。この時、野生型マウスの肺ではパラコート投与により xCT mRNA が誘導されることがわかった。一方、グルタチオン合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素の発現はパラコート投与によって xCT 遺伝子欠損マウス、野生型マウスともに大きな変化は認められなかった。また、パラコート投与により xCT 遺伝子欠損マウスの肺組織のシステインレベルが有意に減少したのに対し、野生型マウスではシステインレベルが維持された。組織学的にはパラコート投与によって、xCT 遺伝子欠損マウスにおいては、野生型マウスと比べて、肺の浮腫が多く認められ損傷の程度が大きいことが示唆された。これらの結果から、肺においては、パラコートによる酸化ストレス負荷により、xCT が誘導されてシスチン取り込み活性の増加が起こり、その結果、グルタチオンレベルが増加し、酸化ストレス傷害から肺を防御していると考えられた。本研究によってシスチン・グルタミン酸トランスポーターは、個体レベルにおいても酸化ストレスが生じるような条件下では、抗酸化系防御機構の一つ

として組織の保護に寄与していることが初めて示された。一方、異なる酸化ストレス負荷モデルである脳虚血再灌流モデルにおいては、xCT 遺伝子欠損マウスの方が野生型マウスに比べて梗塞による傷害部位が大きくなるという結果が得られた。これらの結果は、xCT が、酸化ストレス負荷に対し、生体防御の観点から有利に働く場合と不利に働く場合があることを示唆していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Churchman, A. T., Anwar, A. A., Li F. Y. L., Sato, H., Ishii, T., Mann, G. E., Siow, R. C. (2009) Transforming Growth Factor- β 1 elicits Nrf2-mediated antioxidant responses in aortic smooth muscle cells. *J. Cell. Mol. Med.* (in press) 査読有
- ② Massie, A., Schallier, A., Mertens, B., Vermoesen, K., Bannai, S., Sato, H., Smolders, I., and Michotte, Y. (2008) Time-dependent changes in xCT protein expression in the striatum of the hemi-Parkinson rat: use of a new polyclonal antibody. *NeuroReport* 19: 1589-1592. 査読有
- ③ 佐藤英世(2008) シスチン・グルタミン酸トランスポーターと血漿レドックスバランス 腎と透析 65, pp. 671-675. 査読無
- ④ Iuchi, Y., Kibe, N., Tsunoda, S., Okada, F., Bannai, S., Sato, H., and Fujii, J. (2008) Deficiency of the cystine-transporter gene, *xCT*, does not exacerbate the deleterious phenotypic consequences of SOD1 knockout in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 319: 125-132. 査読有
- ⑤ Igarashi, K., Mikami, T., Takahashi, Y., and Sato, H. (2008) Comparison of the preventive activity of isorhamnetin glycosides from Atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) leaves on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 856-860. 査読有
- ⑥ Banjac, A., Perisic, T., Sato, H., Seiler, A., Bannai, S., Weiss, N., Kölle, P., Tschoep, K., Issels, R. D., Daniel, P. T., Conrad, M., and Bornkamm, G. W. (2008) The cystine/cysteine cycle: a redox cycle regulating susceptibility versus resistance to cell death. *Oncogene* 27: 1618-1628. 査読有
- ⑦ Taguchi, K., Tamba, M., Bannai, S., and Sato, H. (2007) Induction of cystine/glutamate transporter in bacterial lipopolysaccharide induced endotoxemia in mice. *J. Inflammation* 4: 20-26. 査読有
- ⑧ Sakakura, Y., Sato, H., Shiiya, A., Tamba, M., Sagara, J., Matsuda, M., Okamura, N., Makino, N., and Bannai, S. (2007) Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 81: 974-982. 査読有

〔学会発表〕（計5件）

- ① 佐藤英世 シスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損マウス由来マクロファージの機能解析 第81回日本生化学会・第31回日本分子生物学会合同大会（2008年12月19日）神戸市
- ② 佐藤英世 生体におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの光と影トランスポーターワークショップin鶴岡（2008年11月16日）鶴岡市
- ③ 佐藤英世 細胞抗酸化系の一翼を担うアミノ酸トランスポーターの個体レベルでの生理機能 第61回日本酸化ストレス学会学術集会（2008年6月20日）京都市
- ④ 佐藤英世 グルタチオン合成を制御する酸化ストレス誘導性アミノ酸トランスポーターの発現制御とその欠損マウスの病態解析 山形大学実験動物セミナー第18回研究成果発表会（2007年12月19日）山形市
- ⑤ 佐藤英世 シスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現制御と機能 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（2007年11月27日）仙台市

〔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：

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~shokuei>

2/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 英世 (SATO HIDEYO)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：60235380

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし