

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19780094
 研究課題名（和文） 食品由来の神経分化促進因子の探索
 研究課題名（英文） Identification of food-derived neurotrophic factors
 研究代表者 柴田貴広（SHIBATA TAKAHIRO）
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
 研究者番号：80447838

研究成果の概要：

本研究では、神経栄養因子である NGF の作用を代替・増強する食品成分の探索とその作用機構の分子レベルでの解明を目的として研究を行ってきた。神経分化のモデル細胞である PC12 細胞を用いたスクリーニングの結果、アブラナ科野菜の中でも特にワサビ抽出物に強い活性を見出した。さらにその活性成分について各種クロマトグラフィーを用いて単離・精製を行い、NGF 増強活性を有する成分として 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート(6-HITC)を同定した。さらにその作用機構について詳細な解析を行った結果、6-HITC は NGF 受容体を負に制御する脱リン酸化酵素 PTP1B の活性を低下させることによりその活性を発現することが示唆された。さらにその PTP1B の不活性化には、6-HITC による細胞内酸化ストレスの亢進が関与している可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

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：神経細胞、神経栄養因子、食品成分、分化、神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

平均寿命世界一となった日本は、同時に高齢社会に突入し、さまざまな生活習慣病や老人介護が大きな社会問題にまで発展している。単に長命ということだけでなく、Quality of

Life (QOL) を視野に入れた長命のあり方が求められるようになっている。特に、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患や認知症などは QOL を著しく低下させることから、その予防や治療に向けたさ

さまざまな研究がなされている。その中でも、神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) に代表される神経栄養因子は、神経細胞の分化促進や生存維持作用を有することから、神経回路を保全・修復し、高次神経機能を再生させる作用が期待されている。しかしながら、神経栄養因子はタンパク質であるため標的部位へのターゲティングが困難であることから、神経栄養因子に代わるものとして、神経栄養因子様作用を有する低分子化合物の探索や合成が試みられている。

一方で、老化などに伴う神経変性疾患や認知症などの予防の観点から、日常的に摂取する食品から活性物質を見出すことが重要であると考えられる。しかしながら、神経分化誘導促進作用を有する食品成分に関する研究は少なく、特にその作用機構にまで踏み込んだ研究は極めて少ないというのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、神経栄養因子の作用を代替・増強する化合物を特に食品に含まれている成分から見出し、その機能性化合物の作用機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。特に、培養細胞を用いた高感度評価系を確立し、それを利用した食品由来の活性成分の探索を行い、その作用機構を分子レベルで解明するという点に重心を置いた。そして科学的根拠に基づいた機能性食品の創出につながるような基盤的研究の展開を目的とした。

3. 研究の方法

NGF 増強活性の高感度評価法には、ラット副腎髄質褐色細胞腫である PC12 細胞を用いた。この細胞は NGF の受容体である TrkA が発現していることが知られており、NGF に応答して神経突起を伸張させ神経細胞様に分化することから、神経細胞の分化に関する研究に広く用いられている細胞株である。この細胞に、それ自身では有意な突起伸長活性を示さない低濃度での NGF と評価するサンプルとを細胞に投与し 2-3 日後に突起伸長の程度を評価した。スクリーニングには多くの野菜類の酢酸エチル抽出物を用いた。活性成分については、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーにより単離・精製した。生成した化合物は NMR により構造決定を行った。

活性成分の作用機構解析については、主に NGF とその受容体である TrkA を中心としたシグナル伝達機構に焦点を当てて、生化学および分子生物学的手法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

平成 19 年度は、ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞を用いた NGF 増強作用を評価するアッセイ系の構築を行った。この系を用いて、様々な野菜や茶類、果実類について評価を行ったところ、アブラナ科に属する野菜類に強い活性を見出した。なかでも沢ワサビに強い活性が認められた。そこで、ワサビの酢酸エチル抽出物について、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる粗精製ののち、高速液体クロマトグラフィーによる精製、そして NMR による化学構造解析を行ったところ、6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-HITC) がその活性本体であることを突き止めた。実際 6-HITC を PC12 細胞に投与すると NGF の作用を濃度依存的に増強することが確認された。

平成 20 年度は、6-HITC の作用機構解明を目的とした生化学・細胞生物学的手法を用いて研究を進めた。6-HITC は PC12 細胞に対して、NGF の作用を増強することから、NGF の受容体である TrkA に対する影響について検討を行った。その結果、TrkA のチロシンリン酸化を持続・増強することが明らかとなった。このことから、6-HITC は TrkA の脱リン酸化酵素に作用している可能性が考えられたので、次に TrkA の脱リン酸化酵素の探索を行った。いくつかのプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) の遺伝子を細胞に導入しその影響を検討したところ、細胞質型 PTP である PTP1B が TrkA の脱リン酸化に関与している可能性が示唆された。実際、PTP1B 特異的な阻害剤や siRNA により TrkA のリン酸化が亢進すること、substrate-trapping 法により PTP1B が TrkA と相互作用することが確認された。また、6-HITC により細胞内酸化ストレスが亢進し、その結果 PTP1B の活性が低下する可能性が示唆された。

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 7 件)

- 1) Kusano, Y., Horie, S., Shibata, T., Satsu, H., Shimizu, M., Hitomi, E., Nishida, M., Kurose, H., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M., and Uchida, K. Keap1 regulates the constitutive expression of GST A1 during differentiation of Caco-2 cells. *Biochemistry* **47**, 6169-6177.

- (2008) 査読有
- 2) Ishino, K., Shibata, T., Ishii, T., Liu, Y. T., Toyokuni, S., Zhu, X., Sayre, L. M., and Uchida, K. Protein N-Acylation: H₂O₂-Mediated Covalent Modification of Protein by Lipid Peroxidation-Derived Saturated Aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1261-1270. (2008) 査読有
 - 3) Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., and Mori, Y. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* **2**, 287-298 (2008) 査読有
 - 4) Shibata T., Nakahara H, Kita N, Matsubara Y, Han C, Morimitsu Y, Iwamoto N, Kumagai Y, Nishida M, Kurose H, Aoki N, Ojika M, Uchida K. A food-derived synergist of NGF signaling: Identification of protein tyrosine phosphatase 1B as a key regulator of NGF receptor-initiated signal transduction. *J. Neurochem.* **107**, 1248–1260. (2008) 査読有
 - 5) Toyoda, K., Nagae, R., Akagwa, M., Ishino, K., Shibata, T., Ito, S., Shibata, N., Yamamoto, T., Kobayashi, M., Takasaki, Y., Matsuda, T., & Uchida, K. Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal: An endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *J. Biol. Chem.* **282**, 25769-78. (2007) 査読有
 - 6) Kanayama, M., Yamaguchi, S., Shibata, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Nagai, R., Arai, H., Takahashi, K., & Uchida, K. Identification of a serum component that regulates cyclooxygenase-2 gene expression in cooperation with 4-hydroxy-2-nonenal. *J. Biol. Chem.* **282**, 24166-74. (2007) 査読有
 - 7) Mizutani, N., Sakurai, T., Shibata, T., Uchida, K., Fujita, J., Kawashima, R., Kawamura, Y. I., Toyama-Sorimachi, N., Imai, T., & Dohi, T. Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J. Immunol.* **179**, 7478-7487. (2007) 査読有
- [学会発表] (計 5 件)
- 1) Shibata, T., Shimozu, Y., Ishino, K., Wakita, C., Shibata, N., Kobayashi, M., Zhu, X., Sayre, LM., Uchida, K. : Immunochemical detection of a long-lived 4-ketoamide-type 4-oxo-2-nonenal-lysine adduct. The International Symposium on Lipid Peroxidation 2008. (Karuzawa) 2008.10.16
 - 2) 柴田貴広、中原寛子、喜多なるみ、松原唯、森光康次郎、岩本典子、熊谷嘉人、青木直人、小鹿一、内田浩二：イソチオシアネートによるレドックス制御を介した神経細胞分化促進機構の解析。第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会 (京都) 2008 年 6 月 19 日
 - 3) 柴田貴広、中原寛子、喜多なるみ、松原唯、森光康次郎、熊谷嘉人、青木直人、小鹿一、内田浩二：イソチオシアネート化合物による脱リン酸化酵素の制御と神経細胞分化誘導。自然科学研究機構基礎生物学研究所研究会“リン酸化シグナルの統合的解明を目指して”(岡崎) 2008 年 4 月 19 日

- 4) Shibata, T., Ishino, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Zhu, X., Sayre, L.M., Uchida, K. :
The 4-oxo-2-nonenal-derived ketoamide adduct as a novel biomarker of oxidative stress. International Symposium “Biomarkers of Oxidative Stress in Health and Diseases” (Osaka) 2008.1.18
- 5) 柴田貴広、内田浩二：新規脂質過酸化物質 4-オキシ-2-ノネナールの化学と生物。日本過酸化脂質・フリーラジカル学会（名古屋）2007年6月8日

〔図書〕（計 1 件）

- 1) 内田浩二、柴田貴広、喜多なるみ、松原唯 “NGF 作用増強因子：食べ物による神経細胞機能改善は可能か？” 栄養学研究の最前線（日本栄養食糧学会監修）（株）建帛社、139-150. (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田貴広 (SHIBATA TAKAHIRO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：80447838