

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05913

研究課題名(和文)ケミカルストレスを引き金とする食品機能性成分の新規作用機構の解明

研究課題名(英文) Novel mechanisms underlying biofunctions of food factors induced by chemical stress

研究代表者

村上 明 (Murakami, Akira)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：10271412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：茶カテキンの主成分であるEGCGの中性脂肪(TG)分解機構について解析した。TGを蓄積させた分化ヒト肝臓細胞Huh7にEGCGを添加すると濃度および時間依存的なTG分解作用を示した。次いで、EGCGが酸化ストレスおよびタンパク質ストレスを誘導すること、さらに抗酸化酵素、解毒酵素や分子シャペロンの顕著なmRNA誘導が起ることを確認した。さらに、EGCG添加後に培地中グルコース濃度の低下、さらには細胞内ATPレベルの低下が観察されたことから、EGCGのケミカルストレスに対抗するための防御機構の活性化が細胞内外のエネルギー消費を促している可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑茶カテキンなどの食品成分が抗肥満作用を示すことは一般的にも知られているがその作用機構の詳細は全く不明である。本研究では、緑茶カテキンがヒトにとっては異物であることから薬物や毒物の摂取と同様に防御機構を活性化すること、およびそのにより消費された細胞内エネルギーを補填するために中性脂肪が分解するという全く新しいメカニズムの作用機構の可能性を提示した。すなわち、こうした物質が「体に良い」から脂肪燃焼作用を示すのではなく「適度に体に悪い」からこそ機能性を示すというこれまでの概念をくつがえす研究成果であると捉えている。同時にこうした物質の過剰摂取が副作用や害作用を示すことに警鐘を鳴らすものである。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of triglyceride (TG) decomposition by EGCG, which is the main component of tea catechin, was analyzed. Addition of EGCG to differentiated human liver cells Huh7 that accumulated TG showed a concentration- and time-dependent TG-degrading effect. I then confirmed that EGCG induces oxidative and protein stresses, as well as significant mRNA induction of antioxidant enzymes, detoxifying enzymes and molecular chaperones. Furthermore, since a decrease in glucose concentration in the medium and a decrease in intracellular ATP level were observed after the addition of EGCG, activation of the defense mechanism to counter the chemical stress of EGCG promoted energy consumption inside and outside the cell.

研究分野：食品機能学

キーワード：緑茶カテキン 脂肪分解 ストレス 抗酸化酵素 薬物代謝酵素 分子シャペロン 熱ショックタンパク質 ホルミシス

1. 研究開始当初の背景

ポリフェノール類などには脂肪燃焼効果を示す例が多いが、作用機構に関する知見は断片的である。たとえば、脂肪を分解する酵素リパーゼの活性化作用やβ酸化系に関与する酵素の発現調節作用などの知見に留まっている。すなわち、これらは時系列的に「下流」に位置するイベントであり、こうした下流のシグナルを動かす「スイッチ」である標的分子や引き金となる現象に関して、ほとんど明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

ポリフェノールは異物であるが故に薬物と同様な解毒・代謝作用を受ける。また、これまでの研究において、本来、抗酸化物質であるポリフェノールは、実験条件によってはかえって酸化を促進する逆作用も知られている。こうした防御機構を活性化・維持するためには細胞内エネルギーであるATPが使用されるはずである。一方、培養細胞系におけるエネルギー源としては培地中のグルコースや細胞内に蓄積されているトリグリセリド(TG)である。従って、細胞にポリフェノールを投与した場合、実験条件によってはエネルギー枯渇が起こり、それが引き金となってTG分解が促進されるはずである。そこで本研究では、EGCGがもたらすストレス負荷特性を明らかにし、それに対する細胞の防御機構を解析すること、さらには培地中グルコースや細胞内TGおよびATP量を解析することで「ケミカルストレス」による脂肪分解機構の究明を目的とした。

3. 研究の方法

主な研究方法を以下に示した。

分化Huh7細胞(脂肪を蓄積することが知られる)を用いて、EGCGがTGを分解するか否かを検討した。TG量の蓄積は市販の実験キットを使用した。

EGCGがリパーゼを活性化するか否かを検討した。ここでは脂肪細胞特異的リパーゼ(ATGL)とホルモン感受性リパーゼ(HSL)に着眼し、それぞれの発現量をウエスタンブロット法で評価した。またATGLについては活性化型であるリン酸化体も検出した。

EGCGが培地中グルコース濃度や細胞内へのグルコースの取り込みに対してどのように影響するかを検討した。これらは既報の方法を用いた。

EGCGが細胞内ATP量を変動させるか否かについて、市販キット(蛍光試薬でATPを半定量)を用いて解析した。

EGCGが細胞へ酸化ストレスを与えるか否かについて、市販の活性酸素検出プローブであるDCFH-DAを用いて検討した。

EGCGが細胞タンパク質を不溶化するか否かについて、通常の溶解バッファーおよび2%SDSを添加した不溶性タンパク質抽出用の溶解バッファーで細胞を処理し、それぞれの比を算出することでEGCGのタンパク質ストレス負荷作用を検討した。

ATP量の減少はAMPの増加を介してAMP依存性キナーゼ(AMPK)の活性化をもたらすことが知られている。そこでEGCGで細胞を処理し、AMPKおよび活性化型のリン酸化AMPKレベルをウエスタンブロット法で解析した。

EGCG処理した細胞における防御遺伝子の活性化を評価するために、抗酸化酵素、解毒酵素、分子シャペロンのmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法で定量した。

4. 研究成果

【結果】

EGCGはHuh7細胞における脂肪を分解した

Huh7細胞をコンフルエント培養し、DMEM中(10%FBS)で4日間培養することで脂肪を蓄積させた。EGCG(100 μM)は、溶媒として用いたジメチルスルホキシド(DMSO)と比較して32時間で顕著な脂肪分解効果を示したが、40時間と48時間では顕著な細胞毒性を示した。したがって、EGCGは処理条件によって有意なTG分解作用を示すことが判明した。

EGCGは酸化ストレスとタンパク質ストレスを誘発した

続いて、EGCG の *o*-キノン誘導体が自動酸化によって活性酸素 (ROS) を生成することが知られているため、EGCG が分化 Huh7 細胞に対して酸化促進活性を示すかどうかを調べた。Huh7 細胞を EGCG (100 μ M) または H₂O₂ (200 μ M) で 30 分または 60 分間処理すると ROS 産生が著しく増加した。

変性タンパク質は、それらの疎水性領域を露出させて、タンパク質疎水性相互作用により、不溶性タンパク質凝集体の形成につながる可能性がある。したがって変性タンパク質およびそれらの凝集体は本質的に低い水溶性を示す。そこで本研究では、EGCG が不溶性タンパク質の増加を誘導するかどうかを調べるために、界面活性の異なる 2 種類の細胞溶解バッファーを使用した。分化 Huh7 細胞を EGCG (100 μ M) で 3 時間処理すると、DMSO 処理細胞と比較して、可溶性タンパク質が 45% 減少し、不溶性タンパク質が 140% 大幅に増加した。このことから EGCG がタンパク質変性ストレス作用を持つことが示唆された。

EGCG は防御遺伝子の mRNA 発現を増加させた

続いて、EGCG 処理した分化 Huh7 細胞におけるストレス防御酵素およびタンパク質の mRNA 発現レベルを、リアルタイム RT-PCR で定量した。抗酸化酵素に関しては、EGCG (100 μ M) は、6 時間後で HO-1、12 時間で NQO-1 の mRNA 発現を有意に増加させた。また、6 時間で GPx は増加傾向、カタラーゼは有意な変化はなかった。また、EGCG は 6 時間後で SULT1A1 の発現を顕著に増加させたが、SULT2A1 に変化はなかった。また、UGT1A1 と COMT の両方も 12 時間後で発現増加した。誘導型 HSP90 として知られる HSP90 α の発現は、EGCG によって 12 時間後で約 5 倍に著しく増加したが、HSP40、HSP70、および HSP90 β (構成型 HSP90) の発現量は変化しなかった。

EGCG は細胞内 ATP レベルを低下させた

ストレス防御システムの活性化は本質的に細胞内 ATP レベルに依存している。細胞のエネルギー状態に対する EGCG の影響に関して、細胞内 ATP の量、細胞培養培地中のグルコース濃度、およびグルコース取り込みを測定することによって検討した。EGCG (100 μ M) で処理すると、5 分と 15 分の両方で細胞内 ATP のレベルが大幅に低下した。しかし、興味深いことに、60 分で通常レベルにまで回復したが、DMSO 処理細胞では 120 分を通して有意な変化を示さなかった。培地中グルコース濃度に関しては、DMSO 処理によっても 60 分と 120 分で有意に低下したが、EGCG は 30-120 分において、より顕著な低下作用を示した。さらに、EGCG は 2-deoxyglucose-6-phosphate (2DG6P) の取り込みを 5~30 分で増加させる傾向にあり、60 分および 120 分では有意差を示したが、DMSO 処理細胞では 2DG6P の有意な取り込みは観察されなかった。

EGCG は ATGL と AMPK を活性化した

分化 Huh7 細胞を EGCG (100 μ M) で 12 時間処理すると、ATGL の mRNA 発現が約 7 倍に著しく増加した (HSL は変化なし)。続いて、ATGL と AMPK の活性化に対する EGCG の効果を調べた。後者は、脂肪分解を含む多様な恒常性反応に参与するエネル

ギーセンサーである。分化 Huh7 細胞を EGCG (100 μ M) で 24 時間処理すると、DMSO 処理細胞と比較して ATGL タンパク質とそのリン酸化型の両方の発現量が著しく増加した。同様に、EGCG は AMPK タンパク質とそのリン酸化型の両方を 6 時間で増加させた。一方、ポジティブコントロールとして使用された AMPK 活性化因子である AICAR は、活性化されたリン酸化 AMPK を著しく増加させたが、不活性な AMPK タンパク質量に有意な変化はなかった。

【考察】

EGCG は、AMPK の活性化を介して、ヒト肝細胞癌 HepG2 細胞における蓄積 TG 量を減少させることが報告されている[1]。本研究でも同様に、ROS 産生および TG 量の減少効果が判明した。また、EGCG は 3T3-L1 脂肪細胞の ROS 産生を用量依存性的および時間依存的に増加させるとの報告[2]があるが、本研究の結果はこれを支持するものである。緑茶カテキンは自動酸化によって *o*-キノンの対応物に変換されてスーパーオキシドを生成し、次に SOD によって H₂O₂ に代謝される。スーパーオキシド自体は細胞膜に浸透できないため、EGCG で生成された H₂O₂ やその代謝産物が細胞内で機能分子の活性に何らかの影響を与える可能性があるが現在のところは不明である。

一方、細胞タンパク質の機能は、EGCG との共有結合により低下すると推察される [3]。本研究では、EGCG が可溶性細胞タンパク質を減少させ、不溶性細胞タンパク質を増加させたため、本物質がタンパク質ストレスも誘発する可能性があることを最初に示唆したものである。EGCG の *o*-キノンの対応物は、細胞内タンパク質のシステイニルチオール残基に結合することが示されているため[3]、タンパク質ストレスの誘導に何らかの役割を果たすかも知れない。

また、EGCG は HO-1 と NQO-1 の mRNA 発現量を増加させたが、これは以前の報告と一致している[4,5]。HO-1 はヘムをビリベルジン、一酸化炭素 (CO) および Fe²⁺ に分解し、ビリベルジンはさらにビリルビンに変換されることで抗酸化性を示す [6]。したがって、HO-1 の活性化は EGCG によって生成される ROS に対する抗酸化能を増幅すると考えられる。さらに、NQO-1 は細胞内のキノ化合物の解毒に効果的であるため、EGCG によるその発現上昇は、*o*-キノ化合物による毒性低下に貢献する可能性がある。EGCG は SULT1A1、UGT1A1、COMT の mRNA 発現を増加させた一方で、SULT2A1 には変化がなかった。SULT2A1 はアルコール性水酸基を選択的に硫酸化するため、EGCG が SULT2A1 に変化を与えなかったことは合理的と考えられる[7]。一方、本研究では、EGCG が HSP90 α の発現も増加することを示したが、HSP90 は変性タンパク質に結合して正常な構造へ修復する分子シャペロンの機能がある [8]。また、熱ストレス条件下で、EGCG は HSP16.2 発現を増加させることで線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の寿命を延ばすことが報告されている[9]。したがって、HSP90 α の発現増加は、EGCG によるタンパク質ストレスを軽減するための適応応答と推察される。

EGCG は分化 Huh7 細胞の細胞内 ATP のレベルを下げた後、それを通常レベルに戻

した。ATP供給の可能な経路の1つは、細胞培養培地からのグルコース取り込みである。EGCGはL6筋管の細胞膜へのグルコーストランスポーター4の細胞膜移行とグルコースの取り込みを有意に増加させた[10]。同様に本研究では、EGCGが培地中のグルコース濃度を時間依存的に減少させ、グルコースの取り込みを有意に増加させた。したがって、エネルギー飢餓にตอบสนองして培地からのグルコース取り込みの促進によってATPが生成された可能性がある。また、培地中のグルコースは、120分間のEGCG処理によってほぼ枯渇したが、エネルギーが不足すると、AMPKはグルコースの取り込み量を増加させるだけでなく、ATP生成のためのβ酸化を促進することも知られている。本研究では、EGCGはATGL活性化によって脂肪分解を促進し、培地中のグルコースの枯渇に続いてTGが加水分解されてATPを生成した可能性があることを示した。EGCGはマウスのAMPKの活性化を介してATGLとHSLを活性化しTGを減少させることが報告されており、本仮説を支持している[11]。

本研究で提示した脂肪分解メカニズムは、ホルミシスの概念と関連している。ホルミシスは、ストレスレベルの増加に対して細胞が二相性の応答を示す適応メカニズムである[12]。環境ストレス刺激に暴露されると、そのようなストレス適応システムは、生存のために強化される可能性がある。しかし、ストレス強度が細胞の適応能力を超えると、生体分子の損傷や細胞死が起こる。これは、EGCGが32時間で細胞内TGのレベルを低下させ、分化したHuh7細胞では有意な細胞毒性を示さなかったのに対し、40時間後には明らかに細胞毒性を示した結果と一致する。

これらの細胞実験結果と同様に、高用量(1%)の緑茶ポリフェノール(GTP)を含む餌は、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)による肝臓と腎臓の機能低下を悪化させる[13]。しなしながら、これとは対照的に、低用量および中用量(それぞれ0.01%および0.1%)のGTPは、DSS誘発性肝毒性および大腸炎を有意に改善した。

したがって、脂肪分解および抗炎症活性を含むEGCGの有益な機能性は、限られた条件下(例えば、濃度、投与量、および投与期間)のみで発現すると考えられる。

このように、本研究は、EGCGの脂肪分解機構にホルミシスが関与することを最初に示したものである。

【参考文献】

- 1) Tian ZH, et al. PLoS ONE 2018;13:e0200508.
- 2) Wang CT, et al. Mol Nutr Food Res. 2009;53:349-360.
- 3) Ishii T, et al. Free Radic Biol Med. 2008;45:1384-1394.
- 4) Thangapandiyan S, and Miltonprabu S. Asian Pac J Reprod. 2015;4:272-287.
- 5) Na HK, and Surh YJ. Proc Amer Assoc. Cancer Res. 2005;46:1564.
- 6) Jansen T, Daiber Ad. Front Pharmacol. 2012;3:1-10.
- 7) Hashiguchi T, et al.. Pestic Sci. 2011;36:297-299.
- 8) Giodini A, Cresswell P. EMBO J. 2008;27:201-211.
- 9) Zhang L, et al. Free Radic Biol Med. 2009;46:414-421.
- 10) Ueda M, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008;377:286-290.
- 11) Fang L, et al. Front Pharmacol. 2018;9:1-9.
- 12) Csaba G., Acta Microbiol Immunol Hung. 2019;66:155-168.
- 13) Inoue H, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77:1223-1228.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoki Suihara, Akari Ishisaka, Akira Murakami	4. 巻 85
2. 論文標題 (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate at a high concentration may induce lipolysis via ATP consumption by activation of stress defense mechanisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 411-420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa056	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 Akira Murakami	4. 巻 6
2. 論文標題 Hormesis-Mediated Mechanisms Underlying Bioactivities of Phytochemicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40495-020-00235-4	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 Cindy Valentine, Kohta Ohnishi, Kazuhiro Irie, Akira Murakami	4. 巻 65
2. 論文標題 Curcumin May Induce Lipolysis via Proteo-Stress in Huh7 Human Hepatoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 91-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.19-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akira Murakami	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols via hormesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Toxicology	6. 最初と最後の頁 100337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cotox.2022.02.010	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 村上 明	4. 巻 55
2. 論文標題 ポリフェノールはなぜ効くか？	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本調理科学会誌	6. 最初と最後の頁 54-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11402/cookeryscience.55.54	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13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 榎 結衣, 杉本亮介, 丸毛 遥, 土井共生, 石坂朱里, 村上 明
2. 発表標題 フラボノイドの吸収機構における細胞外小胞の役割
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会 (第332回講演会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河口詩歩, 石坂朱里, 村上 明
2. 発表標題 ファイトケミカルの継続処理による細胞のストレス耐性の変動
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 衣織, 横田 しなの, 村留 梨花, 村上 明, 石坂 朱里
2. 発表標題 血液試料におけるquercetin 及び代謝物の定量方法
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川 絢子, 吸原慧紀, 宅和里奈, 石坂朱里, 村上 明
2. 発表標題 ATP消費作用を介したクルクミンのがん細胞死誘導機構
3. 学会等名 日本香辛料研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Furukawa, Satoki Suihara, Rina Takuwa, Akari Ishisaka, Akira Murakami
2. 発表標題 Curcumin may suppress cancer cell proliferation via ATP depletion
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Sugimoto, Akari Ishisaka, Akira Murakami
2. 発表標題 Quercetin-embedded extracellular vesicles may be released from HT29 cells
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenol and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoki Suihara, Akari Ishisaka, Akira Murakami
2. 発表標題 Possible Lipolysis Mechanisms of Catechins via ATP Consumption
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吸原 慧紀、石坂 朱里、村上 明
2. 発表標題 ATP消費作用を介した緑茶カテキンの中性脂肪分解機構
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吸原慧紀, 石坂朱里, 村上 明
2. 発表標題 ATP消費作用を介した緑茶カテキンの中性脂肪分解機構
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 杉元亮介, 丸毛 遥, 石坂朱里, 村上 明
2. 発表標題 ケルセチンの吸収機構における細胞外小胞の役割
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 村上 明
2. 発表標題 ストレス応答の視点で解釈する機能性食品成分の新奇作用機構
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部産官学連携シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Murakami
2. 発表標題 Hormesis-mediated Mechanisms of Action Underlying Bioactivities of Phytochemicals
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 明
2. 発表標題 Novel mechanisms underlying bioactivities of polyphenols via hormesis
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------