

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K14046

研究課題名(和文) 食用キク科植物のカルシウムシグナル阻害作用に関与する成分の探索と機能性の解明

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of Ca<sup>2+</sup>-signaling inhibitors derived from edible Asteraceae plants

研究代表者

上杉 祥太 (Shota, Uesugi)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主任研究員

研究者番号：30795901

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)：本研究課題では、食用キク科植物を対象として、新たに見出したカルシウムシグナル阻害成分の探索と作用機序の解明に取り組んだ。いずれも山菜である、フキノトウから1化合物、モミジガサから2化合物を単離同定した。このうち、フキノトウ由来のbakkenolide Bが、ヒトT細胞株Jurkatにおいて、アトピー性皮膚炎等に関わるinterleukin-2の産生を抑制することを明らかにした。さらに、フキノトウ、モミジガサ、ボウナの3種のキク科山菜を対象に、個体ごとの成分分析を実施した結果、含まれる成分に質的・量的な差異が存在することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で対象とした「山菜」は、重要な伝統食資源であり、和食文化や地域文化・地域産業において重要な役割を担っているが、その健康機能性については未解明な部分が多い。本研究により、このような学術的知見が乏しい現状にある山菜について、新たな機能性成分が見出された。またこの知見は、機能性素材としての有用性を示すものであり、山菜の高付加価値化に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed identification and functional analysis of Ca<sup>2+</sup>-signaling inhibitor derived from edible Asteraceae plants. Three compounds were isolated from *Petasites japonicus* and *Cacalia delphiniifolia*. Bakkenolide B isolated from *Petasites japonicus* inhibited production of interleukin-2, a cytokine which is involved in atopic dermatitis, in human T cell line Jurkat. Additionally, the individual component analysis of *Petasites japonicus*, *Cacalia delphiniifolia*, and *Cacalia hastata* clarified the qualitative and quantitative diversity of their main components.

研究分野：食品機能学

キーワード：キク科植物 カルシウムシグナル interleukin-2 アレルギー 作用機序

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は「遺伝子変異酵母株」を利用して、機能性成分の探索に取り組んできた。食品産業でも広く利用されている酵母は、ヒトと多くの生命機能が保存されている。相同性が特に高いCa<sup>2+</sup>シグナル伝達系 (Shitamukai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000) や DNA 損傷チェックポイント (Tsuchiya *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010) などの遺伝子変異酵母は、特定の条件下で正常な増殖ができず、ヒトの病気を模倣した状態となる。よって、その生育を回復させる物質は、ヒトの病態に対しても有益な効果が期待できる。

Ca<sup>2+</sup>は、生命にとって重要な因子であるが、アトピー性皮膚炎や花粉症等に関わる calcineurin や、2 型糖尿病等に関わる GSK-3 $\beta$  等を活性化し、患者数が多く QOL を低下させる疾患の一因ともなる。これまで遺伝子変異酵母株を用い、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質として久慈産琥珀由来の新規抗アレルギー物質 kujigamberol (Kimura *et al.*, *Fitoterapia*, 2012) などを見出し、動物レベルでの有効性も示された。そこで、独自の食材抽出物 (岩手県の農林水産物 215 種) から、さらなる Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質を探索したところ、キク科山菜のフキノトウとモミジガサに活性を見出した。岩手県ではそれぞれ「ばっけ」、「しどけ」と呼ばれ、春を告げる山菜として親しまれている。一方でモミジガサは、新藤らの抗酸化物質 cacalol (Shindo *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004) と、申請者らの抗がん物質 EDBD (Nishikawa *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008 など) 以外に、機能性成分の報告が無い。2015 年ノーベル医学・生理学賞の抗マラリア薬アルテミシニンのように、キク科植物由来の物質は特有の骨格を持つものが多く、化学的にも興味深い (八百板, *薬学雑誌*, 2012)。以上のように、食用キク科植物は健康維持に役立つ成分の探索源として有望であるが、未開拓な部分が多く、新たな知見の収集は学術的・社会的に意義があると考えられたため、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究では、「食経験のあるキク科植物は、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害作用を活かした機能性素材として、健康維持に貢献し得るか」という問いの解決を目指し、本申請研究では、①フキノトウとモミジガサに含まれる Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質を単離同定し、②ヒト由来細胞株における作用を検証する。さらに、③食用キク科植物間における機能性成分の比較を行うことで、キク科植物の機能性素材としての応用に向けた基礎的データの集積を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質の単離同定

フキノトウとモミジガサから活性物質を単離精製し、各種機器分析により同定した。その際、遺伝子変異酵母 YNS17 (*zds1 $\Delta$  erg3 $\Delta$  pdr1/3 $\Delta$* ) 株に対する活性を指標とし、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質を精製した。0.3 M CaCl<sub>2</sub> を含む YPD 培地に YNS17 株を混ぜて固めたプレートを作製して、表面にサンプルをスポットし、28°C で 3 日間培養後、サンプルの周囲に生じた生育回復活性を評価した。この活性評価を随時行いながら、メタノール抽出、液液分配、シリカゲル等の各種クロマトグラフィーを経て、HPLC にて単離した。得られた物質は、質量分析や NMR を中心とした機器分析により、構造を解析した。

### (2) Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質のヒト培養細胞株における作用の検証

アトピー性皮膚炎、花粉症などに関与する脱リン酸化酵素 calcineurin の経路について、ヒト由来の酵素と細胞株を用いて作用の検証を実施した。酵素阻害活性は、市販のヒト calcineurin アッセイキットを用いて測定した。また、Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞) を利用し、calcineurin の下流を解析した。Jurkat 細胞は、10% FBS と penicillin/streptomycin を添加した RPMI1640 培地で培養した。細胞毒性は、MTT アッセイにより測定した。Jurkat 細胞は、protein kinase C 活性化剤である PMA と Ca<sup>2+</sup>イオノフォアである ionomycin で共刺激することで、calcineurin 経路が活性化され、炎症性サイトカインである interleukin-2 (IL-2) の発現が誘導される。この条件を利用し、遺伝子発現をリアルタイム PCR、タンパク質産生量を ELISA 法で、単離した活性物質の IL-2 産生に対する抑制作用を測定した。

### (3) 食用キク科植物間の機能性成分比較

食用キク科植物のうち、フキノトウとモミジガサに加えて、ボウナ (別名: ヨブスマソウ、イヌドウナ) が岩手県と秋田県を中心に春の代表的な山菜として親しまれている。しかし、これらについては、機能性成分に関する研究が十分に行われておらず、学術的情報が不足していたため、成分の比較を行った。岩手県内で入手したサンプルを、MeOH または EtOH で個体ごとに抽出して濃度調整後、TLC を用いて簡易的に成分比較を行った。さらに、見出された特徴的な成分について、HPLC、LC-MS を用いて分析し、化合物情報を取得した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質の単離同定

岩手県内で採取したフキノトウを自然乾燥させて粉碎し、63.0 g を MeOH で抽出した。得られた MeOH 抽出物 11.34 g を水で希釈し、ヘキサンを用いた液液分配を行うことで、活性を有するヘキサン層 (1.79 g) を得た。ヘキサンと酢酸エチルを移動相としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、16 フラクションに分画した。ヘキサン：酢酸エチル = 2 : 1 で溶出された Fr.8 (228.7 mg) と Fr.9 (177.8 mg) に最も強い活性が認められた。これらのフラクションを逆相 HPLC に供し、85.5 mg の活性物質を単離することができた。

得られた活性物質を LC-MS により分析したところ、*m/z* 408.2359 のイオンが検出され、C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub> の分子式で与えられる化合物の NH<sub>4</sub> 付加イオンであると示唆された。フキノトウには、C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub> の化合物として bakkenolide B が知られることから、単離物質と市販標品の MS/MS スペクトルを比較したところ、完全に一致した。さらに、bakkenolide B の市販標品も、遺伝子変異酵母 YNS17 株に対して生育回復活性を示したことから、今回単離したフキノトウ由来の Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質を bakkenolide B と同定した。

モミジガサについては、当初は葉に活性を見出したが、活性成分が根に多く含まれることが示されたため、根からの単離精製を行った。乾燥重量 2.68 kg の粉末を MeOH で抽出し、得られた 202.8 g について酢酸エチルを用いた液液分配を行い、活性を有する酢酸エチル層 13.92 g 得た。ヘキサンと酢酸エチルを移動相としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、7 フラクションに分画した。ヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1 で溶出された Fr.1 (4153.6 mg) とヘキサン：酢酸エチル = 3 : 1 で溶出された Fr.2 (993.5 mg) について、逆相 HPLC に供し、活性物質 A を 35.7 mg、活性物質 B を 17.1 mg 単離した。質量分析と NMR を測定し、文献値との比較により両者を同定した (未発表であるため物質名は非記載)。

##### (2) Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害物質のヒト培養細胞株における作用の検証

まず、酵母の Li<sup>+</sup>感受性を用いて作用点の推定を行った結果、フキノトウ由来の bakkenolide B は、アトピー性皮膚炎や花粉症等に関与する calcineurin 経路を阻害する可能性が示された。そこで、Jurkat 細胞を用いて、ヒト由来培養細胞株に対する作用を検証した。Calcineurin 経路の最下流で産生される炎症性サイトカインである interleukin-2 (IL-2) の遺伝子発現とタンパク質産生を、bakkenolide B が抑制することを確認した。一方、calcineurin の酵素活性に対する影響を調べたが、100 μM という高濃度でわずかに阻害する程度であった。また、bakkenolide B の類縁物質である bakkenolide A と機能性を比較したところ、遺伝子変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性は bakkenolide B のみで認められ、IL-2 タンパク質産生抑制作用も bakkenolide B が IC<sub>50</sub> = 6.3 μM であるのに対し、bakkenolide A は IC<sub>50</sub> = 24.6 μM であった。これらの結果から、bakkenolide B が有するエステル側鎖が活性の増強に寄与しているものと考えられた。Bakkenolide 類に関する以上の結果は、原著論文にまとめ、修正後再投稿中である。

モミジガサ由来の活性物質 A 及び B についても、IL-2 産生を抑制する傾向が見られた。これらが IL-2 産生に影響を及ぼすという報告は無いため、今後解析を進める予定である。

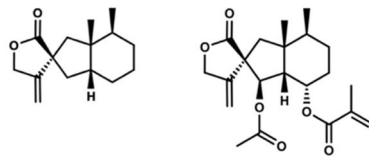


図1 Bakkenolide 類の化学構造  
(左) Bakkenolide A、(右) Bakkenolide B

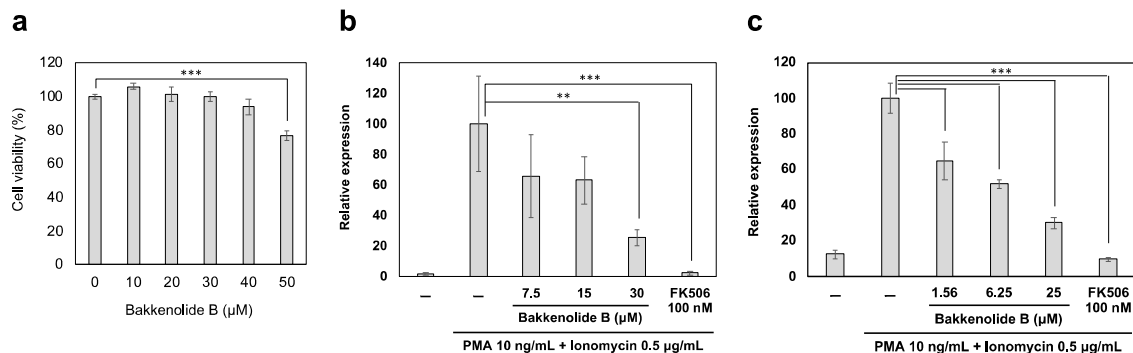


図2 Jurkat 細胞における bakkenolide B の IL-2 産生抑制作用  
(a) 細胞毒性、(b) IL-2 遺伝子発現抑制活性、(c) IL-2 タンパク質産生抑制活性

### (3) 食用キク科植物間の機能性成分比較

キク科に属する山菜である、フキノトウ、モミジガサ、ボウナを対象とし、主成分の比較を行った。フキノトウについては、主成分の多様性があることを示唆する文献報告があるものの、その実態や要因が曖昧なままとなっている。モミジガサとボウナは、いずれもコウモリソウ (*Cacalia*) 属に分類されるが、含まれる成分の共通点と相違点についてはほとんど情報が無い。そこで、これらの山菜を個体ごとに抽出して分析することで、上記の未解明な点について情報を得ることとした。フキノトウの分析を行った結果、ほとんどの個体が4種の成分のいずれかを主成分として含んでいることが示唆された。これまで、フキノトウについてこのような主成分の質的差異は十分な知見が無いため、今後詳細な実態解明に取り組む。また、コウモリソウ属山菜であるモミジガサとボウナについては、TLC で判別可能な共通する主成分は存在しないことが示された。さらに、ボウナにもフキノトウと同様の主成分多様性が存在するという、新しい知見が得られた。本研究で着目した主成分は、含有量が多く、健康機能性にも寄与している可能性があるため、見出した成分特性を解明することにより機能性素材等としての高付加価値化に貢献することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shimizu E, Koshino H, Noro A, Maruyama M, Shimoda N, Uesugi S, Ohnishi M, Kimura K	4. 巻 134
2. 論文標題 Isolation of a spiro lactone norditerpenoid as a yeast Ca <sup>2+</sup> signal transduction inhibitor from Kuji amber and evaluation of its effects on PPM1A activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 290-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fitote.2019.02.027.	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 Uesugi S, Honmura Y, Nishiyama M, Kusakabe K, Tonouchi A, Yamashita T, Hashimoto M, Kimura K	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification of neomacrophorins isolated from Trichoderma sp. 1212-03 as proteasome inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	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） 10.1016/j.bmc.2019.115161.	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 Yoshida J, Okawa Y, Oyama T, Shimoda N, Uesugi S, Takagi H, Ito Y, Kimura K	4. 巻 55
2. 論文標題 Inhibition of Calcineurin and Glycogen Synthase Kinase-3 by Ricinoleic Acid Derived from Castor Oil	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 89-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lipd.12208.	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上杉祥太、箱崎真友佳、植村亜衣子、熊谷加奈子、木村賢一、山田秀俊、矢野明
2. 発表標題 モミジガサに含まれるinterleukin-2産生阻害物質
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 吉田潤、大川佑介、小山卓矢、下田希、上杉祥太、高木博史、伊藤芳明、木村賢一
2. 発表標題 ヒマシ油由来のヒドロキシ脂肪酸ricinoleic acidのcalcineurinとGSK-3 に対する阻害作用
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 矢野明、上杉祥太
2. 発表標題 食品に含まれるウイルス-受容体結合阻害成分の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第155回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上杉祥太、箱崎真友佳、菅野裕子、高橋穂乃香、工藤唯、木村賢一、山田秀俊、矢野明
2. 発表標題 フキ属山菜の化学分類規定成分bakkenolide BによるIL-2産生阻害作用
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第155回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上杉祥太、箱崎真友佳、菅野裕子、高橋穂乃香、工藤唯、木村賢一、山田秀俊、矢野明
2. 発表標題 フキ属山菜の化学系統分類規定成分bakkenolide類によるinterleukin-2産生阻害作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田潤、上杉祥太、箱崎真友佳、藤澤日土美、伊藤芳明、木村賢一
2. 発表標題 肝細胞糖産生を抑制するヒドロキシ脂肪酸ricinoleic acid類の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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
---------	---------