

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15467

研究課題名（和文）核外ヒストンを標的とした食品成分の活性発現機構の解明

研究課題名（英文）Novel functionality of food components via protein modification and binding to extranuclear histones

研究代表者

板倉 正典（Itakura, Masanori）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：70803162

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）：本研究は、様々な疾病に対し生体防衛的に働くと考えられるが、その作用機序が明確ではないビタミンCやポリフェノール類などの抗酸化性食品成分を対象として、タンパク質修飾を介した機能性に着目した解析を実施した。その結果、抗酸化性食品成分によって修飾を受けたタンパク質が(1)プラスミノゲン受容体として細胞膜上に発現するヒストンH2Bに結合することで、プラスミノゲンの活性化を抑制し抗炎症作用を示すこと、(2)ヒストンと結合し凝集体を形成することで、ヒストン誘発性細胞傷害を軽減することが明らかとなった。以上の結果より、抗酸化性食品成分によるタンパク質修飾を介した新たな機能性発現機構の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンCやポリフェノールなどの抗酸化性食品成分は明確な健康機能性を示す一方で、易代謝性の特徴を持つものが多く、抗酸化性などの既知の作用機序だけでは機能性を十分に説明することは難しい。本研究では、「食品によるタンパク質修飾を介した機能性」という、これまでに報告されているメカニズムとは全く異なった食品の機能性発現機構を証明するに至った。本研究成果は、「食の機能性」にさらなる科学的根拠を与えただけでなく、疾病や老化に対する新たな予防法開発につながる可能性があり、学術的・社会的意義のあるものだと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the novel functionality of anti-oxidative food components, such as vitamin C and polyphenols, we investigated their function via protein modification and binding to histones. In our study, we found that (1) proteins modified with anti-oxidative food components bind to membrane-localized histone H2B and inhibit its activity as a plasminogen receptor, resulting in the anti-inflammatory effect, (2) modified proteins form co-aggregates with histones, which attenuate histone-induced cytotoxicity. These results indicated novel functionality of food components via protein modification and binding to extranuclear histones.

研究分野：食品科学

キーワード：タンパク質修飾 ヒストン ビタミンC ポリフェノール 食品成分 抗炎症 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン C やポリフェノール類のような食品成分の中には、抗炎症作用や抗がん作用、心血管系疾患の予防効果を示すものが数多く知られている。その主要な作用メカニズムは、食品成分自体の抗酸化性や、細胞膜受容体のリガンドとして働くことによるサイトカイン産生能に起因すると考えられている。一方で、体内ビタミン C 量は経口投与後すぐに飽和状態に達し排泄されることや、ポリフェノール類の吸収率の低さを考えると、食品成分の直接的な作用以外のメカニズムの存在が示唆される。近年、ポリフェノールなどの抗酸化性物質がタンパク質を修飾することで、タンパク質の機能性を変化させることが報告されており、日々の食事によって生成する食品修飾タンパク質が健康維持に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

研究代表者はこれまでに食品成分修飾によるタンパク質の機能性変化を解析する中で、ビタミン C や数種のポリフェノール類による食品修飾体(タンパク質およびアミノ酸)がヒストンとの結合能を獲得することを明らかにしている。ヒストンは核内だけでなく核外でも機能を持ち、炎症誘導に関与することおよび細胞障害性を示すことが報告されている。さらに近年、核外ヒストンが粥状硬化症や自己免疫疾患などの慢性炎症性疾患のメディエーターとして働くことが明らかとされた。しかし、これらが日常的にどのように制御されているかについては不明な点が多く残されている。そこで研究代表者は「食品成分によって生成された修飾体が核外ヒストンに結合することで、抗炎症・生体保護作用を示す」という新たな仮説を打ち立てた。

2. 研究の目的

本研究は、様々な疾病に対し生体防衛的に働くと考えられるが、その作用機序が明確ではないビタミン C やポリフェノール類を対象として、これら食品成分の新たな活性発現機構の解明を目的とした。具体的には、(1)食品修飾タンパク質・アミノ酸によるヒストンへの結合を介した抗炎症作用および生体保護作用を明らかにし、慢性炎症性疾患に対する予防効果を実証すること(2)食品成分のスクリーニングを行い、タンパク質もしくはアミノ酸にヒストン結合活性を付与する食品成分群を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞膜ヒストンを標的とした酸化ビタミン C 修飾タンパク質の作用を、タンパク質レベル、細胞レベル、マウス個体レベルにおいて固相结合試験、フローサイトメトリー、免疫染色、および細胞浸潤アッセイ等により評価した。

(2)細胞傷害性を示す細胞外ヒストンを標的とした酸化ビタミン C 修飾タンパク質の作用を、タンパク質レベル、細胞レベル、マウス個体レベルにおいて凝集試験、免疫染色、LDH アッセイ、盲腸結紮穿孔モデルを用いた生存率評価および血中サイトカイン量測定等により評価した。

(3)ヒストン結合性を示す修飾構造の同定を目的に、ピオチンペンチルアミンをリジンモデル分子として用い、酸化ビタミン C で修飾した後に HPLC で分画し、固相结合試験により評価した。

(4)タンパク質修飾を介してヒストン結合活性を付与する食品成分のスクリーニングとして、様々なポリフェノール類を用いた修飾タンパク質を調製し、固相结合試験を実施した。さらに高いヒストン結合活性を示したポリフェノール修飾タンパク質を用いて、ヒストン誘発性細胞傷害への影響を評価した。

4. 研究成果

(1)細胞膜ヒストンへの結合を介した酸化ビタミン C 修飾タンパク質の抗炎症作用

酸化ビタミン C とウシ血清アルブミン(BSA)を3日間、37℃でインキュベートした酸化ビタミン C 修飾 BSA (oxVC-BSA) を抗酸化剤修飾タンパク質として用いた。プラスミノーゲン受容体として単球・マクロファージの細胞膜上に発現するヒストン H2B への作用を検討するため、H2B-プラスミノーゲン結合への oxVC-BSA の影響を固相结合試験および表面プラズモン共鳴法 (SPR) により評価した。その結果、oxVC-BSA が H2B-プラスミノーゲン結合を阻害することが明らかとなった。さらにプラスミノーゲン活性化への影響をプラスミンの合成発色基質 S-2251 を用いて評価したところ、ヒストン H2B もしくは単球・マクロファージ細胞株 J774A.1 の添加によって認められるプラスミン活性の上昇(プラスミノーゲン活性化)が oxVC-BSA の処置により、有意に抑制されることが明らかとなった。

細胞レベルにおける oxVC-BSA の作用を検討した。J774A.1 およびマウス腹腔由来マクロファージを用いたフローサイトメトリーおよび免疫染色の結果、oxVC-BSA の細胞表面への結合、および細胞膜ヒストン H2B との共局在が観察された。さらにこれら細胞へのプラスミノーゲンの結合は oxVC-BSA の添加によって抑制された。また三次元培養系を用いた *in vitro* 浸潤アッセイの結果、プラスミノーゲン添加による J774A.1 細胞の浸潤細胞数の増加は、未修飾 BSA 添加による変化は認められないが、oxVC-BSA 添加によって有意に抑制されることが明らかとなった。

チオグリコレート誘発性無菌性腹膜炎モデルを用いて、マウスレベルにおける oxVC-BSA の作用を検討した。BSA もしくは oxVC-BSA を連日投与(10 mg/kg, *i.v.*, 4 days)したマウスの腹腔内に 4%チオグリコレートを投与し、無菌性腹膜炎を誘導した。その後、腹腔浸潤細胞を採

取し、フローサイトメトリーにより浸潤細胞数を評価した。その結果、BSA 投与マウスと比較して、oxVC-BSA 投与マウスにおいて腹腔に浸潤した単球およびマクロファージの細胞数が有意に減少することが明らかとなった。さらに腹腔浸潤マクロファージを回収し、RNA-seq 解析に供したところ、oxVC-BSA 投与により炎症性遺伝子マーカーの減少と抗炎症性遺伝子マーカーの増加が観察された。以上の結果より、oxVC-BSA が単球・マクロファージの細胞膜上ヒストン H2B に結合することで抗炎症性の作用を示すことが示唆された。

(2)細胞外ヒストンへの結合を介した酸化ビタミン C 修飾タンパク質の細胞保護作用

oxVC-BSA のヒストンへの作用を検討するために凝集アッセイを行った。ウシ胸腺由来ヒストン混合物およびリコンビナントヒストンと BSA もしくは oxVC-BSA を混合し、遠心分離した後に上清を可用性画分、沈殿を不溶性画分として SDS-PAGE、CBB 染色により評価したところ、oxVC-BSA の添加によってヒストン（特にヒストン H4 および H3）が凝集体を形成することが明らかとなった。さらにリコンビナントヒストン H4 を用いて、ヒストンと oxVC-BSA の混合比率を変化させた凝集アッセイを行ったところ、特定の混合比率（ヒストン:oxVC-BSA=5:1）において最も顕著な凝集体形成が認められたことから、これらの凝集様式が多価相互作用によることが示唆された。

次にヒストン誘発性細胞傷害における oxVC-BSA の作用を検討した。血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞を用いて、ヒストン処置による細胞障害性を LDH アッセイにより評価した。その結果、oxVC-BSA の共添加によりヒストン添加による細胞生存率の低下が有意に軽減された。さらに免疫細胞染色を行った結果、EA.hy926 細胞膜へのヒストン結合性が oxVC-BSA の添加によって抑制されることが明らかとなった。

最後に、マウスを用いた個体レベルの検討を実施した。ヒストンを静脈内投与することで誘導するヒストン誘発性多臓器不全モデルの生存期間は oxVC-BSA の共投与により顕著に延長されることが明らかとなった。さらに盲腸結紮穿孔 (CLP) 敗血症モデルを用いた解析を行ったところ、無処置および未修飾 BSA 投与と比較し、oxVC-BSA 投与マウスにおいて有意な生存期間の延長と血中炎症性サイトカイン (IL-6) 量の減少が観察された。以上の結果より、oxVC-BSA がヒストンと結合・凝集することでヒストン誘発性細胞傷害性を軽減し、敗血症モデルにおける病態の緩和に寄与することが明らかとなった。

(3)ヒストン結合性を示す修飾構造の同定

ビオチンペンチルアミンを酸化ビタミン C で修飾したのちに HPLC で時間分取し、各フラクションのヒストン H2B との結合性を固相結合試験により評価した。その結果、複数のフラクションにおいてヒストン H2B との結合性が認められた。さらにこれらのフラクションには最終糖化産物 (AGEs) の特徴である蛍光性を示し、抗 AGEs 抗体との交差性を示す分子が複数存在することが明らかとなった。AGEs のヒストン結合性を評価するために、様々な糖代謝物を用いてタンパク質およびビオチンペンチルアミンを修飾しヒストン結合性を評価したところ、程度に違いはあるものの全ての修飾タンパク質、アミノ酸モデルがヒストンへの結合性を示すことが明らかとなった。このことからヒストン結合性は AGEs に共通した特徴であることが示唆された。

次にヒストン結合性に関与する AGEs の特徴について検討を行った。ヒストンおよび AGEs の結合性は NaCl 濃度上昇およびヒストン N 末端テール領域の電荷的な中和 (変異導入およびリジンアセチル化) によって抑制されることが明らかとなり、AGEs とヒストン N 末端領域の静電相互作用の関与が明らかとなった。

(4) ヒストン結合活性を付与する食品成分のスクリーニング

oxVC 修飾と同様に、ポリフェノール修飾によってもタンパク質が酸化的脱アミノ化を受けることが知られている。そこで、ヒストン結合活性を付与するポリフェノールのスクリーニングを実施した。26 種類のポリフェノールを用いて BSA を修飾し、固相結合試験によりヒストン結合性を評価した。その結果、エピガロカテキンガレート (EGCG)、ピセアタンノール、モリン、ミリセチン、バイカレインなどのポリフェノール修飾によって顕著なヒストン結合活性が付与されることが明らかとなった。さらに HPLC および固相結合試験の結果、ポリフェノール修飾によるリジン残基の酸化および EGCG のタンパク質への共有結合を介したアダクト形成と重合化がヒストン結合性に関与することが明らかとなった。

さらに EGCG 修飾タンパク質による機能性を凝集アッセイおよび EA/hy926 細胞を用いた LDH アッセイにより評価した結果、oxVC-BSA と同様に EGCG-BSA はヒストンと凝集体を形成し、ヒストン誘発性の血管内皮細胞傷害を軽減することが明らかとなった。

(5)まとめ

本研究では、タンパク質レベル、細胞レベル、マウス個体レベルの解析により、酸化ビタミン C 修飾タンパク質が、(1)単球・マクロファージの細胞膜上ヒストンに結合することで細胞浸潤を抑制し、抗炎症性を発揮することを明らかにした。さらに(2)細胞外ヒストンに結合することで凝集体を形成し、ヒストンによる細胞傷害性を軽減することを明らかにした。また(3)これらのヒストン結合活性は AGEs に共通した特徴であり、ヒストンと AGEs の結合には静電相互作用が重要であることを明らかにした。さらに(4)ヒストン結合性は複数種類のポリフェノール修飾

によっても付与されることが明らかとなった。これらの知見により、ビタミンCやポリフェノール類のタンパク質修飾を介した新たな機能性の一端が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Itakura Masanori, Yamaguchi Kosuke, Kitazawa Roma, Lim Sei-Young, Anan Yusuke, Yoshitake Jun, Shibata Takahiro, Negishi Lumi, Sugawa Hikari, Nagai Ryoji, Uchida Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Histone functions as a cell-surface receptor for AGEs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2974 ~ 2986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30626-8	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 Yamaguchi Kosuke, Itakura Masanori, Tsukamoto Mona, Lim Sei-Young, Uchida Koji	4. 巻 298
2. 論文標題 Natural polyphenols convert proteins into histone-binding ligands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102529 ~ 102529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102529	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 板倉 正典, 内田 浩二
2. 発表標題 抗酸化性食品成分によるタンパク質自然修飾を介した生体恒常性維持機構
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板倉 正典, 内田 浩二
2. 発表標題 細胞膜ヒストンへの結合を介した最終糖化産物 (AGEs) による抗炎症作用
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉 正典, 内田 浩二
2. 発表標題 抗酸化性食品成分によるタンパク質自然修飾とヒストンを介した生体応答
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 公輔, 板倉 正典, 北澤 麗磨, 林 世映, 永田 宏次, 柴田 貴広, 赤川 貢, 内田 浩二
2. 発表標題 ポリフェノール修飾タンパク質によるヒストン結合を介した細胞保護作用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 板倉 正典, 内田 浩二
2. 発表標題 酸化型ビタミンC由来AGEsの核移行と核内ヒストンへの結合
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉 正典, 内田 浩二
2. 発表標題 酸化型ビタミンC 由来AGEsによる炎症応答制御メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 公輔, 板倉 正典, 北澤 麗磨, 林 世映, 永田 宏次, 柴田 貴広, 赤川 貢, 内田 浩二
2. 発表標題 ポリフェノール修飾タンパク質の構造解析並びにヒストンとの相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本 萌南, 山口 公輔, 板倉 正典, 内田 浩二
2. 発表標題 ポリフェノールによるヒストン凝集メカニズムと病態生理学的意義の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板倉正典、近澤未歩、佐々木栄大、内田浩二
2. 発表標題 ヒストンH2Bへの結合を介した最終糖化産物 (AGEs) によるプラスミノーゲン活性調節と炎症制御
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北澤麗磨、板倉正典、近澤未歩、佐々木栄大、内田浩二
2. 発表標題 細胞外ヒストンの細胞障害性に対する最終糖化産物(AGEs)の保護効果
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口公輔、板倉正典、近澤未歩、佐々木栄大、赤川貢、内田浩二
2. 発表標題 ポリフェノール修飾タンパク質によるヒストンH2B結合を介した抗炎症作用
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板倉正典、山口公輔、佐々木栄太、吉武淳、柴田貴広、大野礼一、永井竜児、内田浩二
2. 発表標題 酸化型ビタミンC修飾タンパク質とヒストンH2Bの相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口公輔、板倉正典、佐々木栄太、赤川貢、内田浩二
2. 発表標題 ポリフェノール修飾タンパク質によるヒストン結合を介した細胞保護作用
3. 学会等名 日本農芸化学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
---------	---------