

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580157

研究課題名（和文）リン酸化情報ハブに着目した機能性食品・栄養成分の
作用メカニズムの解析研究課題名（英文）Studies on the mechanism of functional food components at molecular
basis focusing on phosphorylation hub protein.

研究代表者

関 泰一郎 (SEKI TAIICHIRO)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20187834

研究成果の概要（和文）：

野菜や果物を多く摂取することによりがんをはじめとしたいくつかの疾患のリスクが低減する。本研究では、食用植物由来の抗がん作用物質の作用機構を明らかにする目的で、細胞内の様々なストレスを受容して、そのストレスをタンパク質のリン酸化を介した情報へと変換するリン酸化情報ハブタンパク質に着目した。Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) はストレス応答キナーゼ SAPK/JNK の上流に位置し、ストレス刺激をリン酸化シグナルに変換する MAPKK キナーゼの一種である。ASK1 は細胞内では thioredoxin (Trx) と結合して不活性化されているが、酸化ストレスにより Trx のシステイン残基が酸化されると Trx が ASK1 から解離し、活性化する。ガーリック由来の抗がん作用物質 diallyl trisulfide は、Trx 分子内にジスルフィド結合を形成して ASK1 から解離させて ASK1 を活性化し、シグナルソームの形成を介してアポトーシスを誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Consumption of a certain amount of vegetables and fruits negatively correlates with the incidence of life-style related diseases including cancer. To clarify the anti-cancer effect of phytochemicals derived from vegetables and fruits at molecular basis, we focused on phosphorylation-hub protein which converts various intracellular stimuli into the phosphorylation signals. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), a typical phosphorylation hub protein locating at the up-stream of stress-responsible kinase, SAPK/JNK, converts the intracellular stimuli to phosphorylation signals; ASK1 is also a sort of MAPKK. In the quiescent cells, intracellular ASK1 binds with thioredoxin (Trx) to inactivate its biological activity; oxidation of cysteine residues in Trx causes the activation of ASK1. In this study, we demonstrated for the first time that garlic derived anti-cancer compound, diallyl trisulfide, formed disulfide bond between cysteine residues in Trx molecule, followed by activation of ASK1 and formation of so-called signalsome in leukemic cells. This oxidative modification by diallyl trisulfide of the cysteine residues is a causative of apoptosis in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：食品機能

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病の増加にともない、食品や栄養成分の機能に関する研究が活発に展開されている。わが国においても、申請者が所属する日本農芸化学会の 2008 年度大会では、39 の講演会場のうち 10 会場が食品・栄養関係の講演であり、また、24 シンポジウムのうち 6 つのシンポジウムが食品・栄養関係で占めるなど、基礎から応用研究を含めた食品・栄養研究の学問領域が拡大してきている。食品由来の機能性成分に関しては、安全性をはじめその有効性が国家レベルで慎重に議論されている。一方、食品やその成分の機能性発現のメカニズムに関しては、未だ成分と効果を結びつけた研究が多く、本質的な機能性発現メカニズムに言及した研究は少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、上述の状況を踏まえて、食用植物由来機能性成分の抗がん作用にかかわる分子メカニズムを明確にする。最新の食用植物由来機能性成分の抗がん作用に関する総説 (*Planta Med.* 2008 Jul 31, *Cancer Lett.* 2008 Oct 8;申請当時の最新) では、これらの成分による ROS 産生以降の down stream の作用メカニズムは明らかにされていないと記述されている。また、実際のところ ROS の関与に関しても不明確な部分が多い。そこで本研究では、未だ解明されていない ROS 産生以降アポトーシス誘導シグナル以前の細胞内情報伝達システムを明らかにする。特に、細胞内の様々なストレスを受容して、そのストレスをタンパク質のリン酸化を介した情報へと変換するリン酸化情報ハブタンパク質に着目して機能性成分の作用起点を明確にする。さらに、これらのハブタンパク質の機能制御にかかわる因子と機能性植物成分との相互作用、シグナル伝達について分子細胞レベルで明らかにする。特にここでは、我々がすでに強力な抗がん作用を見出しているガーリック由来 diallyl trisulfide (DAST) の作用について追究した成績を報告する。

3. 研究の方法

(1) DATS がヒト単球性白血病細胞株 U937 の増殖および活性酸素種産生に及ぼす影響

① Sulfide類がU937の増殖に及ぼす影響

U937 を 2×10^5 cells/ml で播種し、24 時間前培養後、各種 sulfide 類を終濃度 0-100 μM となるように添加した。さらに 24 時間培養し、生細胞数を血球計算盤でカウントした。

② DATSがU937の活性酸素種産生に及ぼす影響

U937 を 2×10^5 cells/ml で播種し、24 時間前培養を行った。H₂DCF-DA を終濃度 25 μM となるように添加し 30 分後、DATS を終濃度 20 μM , 50 μM となるように添加し活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の発生を Flow cytometry により解析した。

③ DATSによるアポトーシスの抗酸化剤による抑制

U937 は 2×10^5 cells/ml で播種し前培養後、還元型 glutathione, N-acetylcysteine, n-propyl gallate をそれぞれ終濃度 50, 100 μM となるように添加した。30 分後、DATS を終濃度 25 μM となるように添加した。さらに 24 時間培養し生細胞数を血球計算盤でカウントした。

(2) DATS が細胞内 thioredoxin (Trx) に及ぼす影響

ヒト白血病細胞株 U937 を 2×10^5 cells/ml で播種し 24 時間前培養後、DATS を終濃度 20 μM となるように添加し、1 時間後に細胞を回収し、細胞の lysate を調製した。この lysate について redox western blotting, urea PAGE を行い Trx のシステイン残基の修飾について検討を行った。さらに LC-MS/MS 解析により Trx の修飾部位を特定した。

(3) DATS が ASK1 シグナルソームに及ぼす影響

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) はストレス応答キナーゼ SAPK/JNK の上流に位置し、ストレス刺激をリン酸化シグナルに変換する MAPKK キナーゼの一種である。ASK1 は細胞内では Trx と結合して不活性化されているが、酸化ストレスにより Trx のシステイン残基が酸化されると Trx が ASK1 から解離し、ASK1 は 2000 kDa 以上の複合体を形成し活性化する。上記(2)の結果から DATS は Trx を酸化することが示唆された。そこで DATS により ASK1 が活性化されるか検討を行った。

ヒト単球性白血病細胞株 U937 を 2×10^5 cells/ml で播種し前培養後、DATS を終濃度 20 μM となるように添加し、1 時間後に細胞を回収した。細胞の lysate は Superose 6 10/300 GL column を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、得られた画分を western blotting に供して ASK1 の分子量の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) DATS がヒト単球性白血病細胞株 U937 の

増殖および活性酸素種産生に及ぼす影響

Diallyl monosulfide, diallyl disulfideはU937の増殖に影響を及ぼさなかった。これに対し、DATSは低濃度においても顕著に増殖を抑制した。また、DATS処理によりROSの産生が見られた。DATSによるアポトーシスに対して、チオール型還元剤 glutathione, N-acetylcysteineでは抑制したのに対し、非チオール型還元剤 *n*-propyl gallateでは抑制しなかった。このことから、DATSによって誘導されるU937のアポトーシスは、ROSよりDATSによるチオール基との反応が重要であることが示唆された。

(2) DATSが細胞内 thioredoxin (Trx) に及ぼす影響

DATSはU937細胞内のTrx分子中の遊離のSH基5ヶ所の内2ヶ所を修飾し、1対の分子内ジスルフィド結合を形成していた。またLC-MS/MS解析の結果から、Cys32とCys35の間でS-S結合を形成し、酸化型Trxが生成されることが示唆された。これらの結果からDATSは細胞内のレドックス制御機構に影響を与えることが明らかになった。

(3) DATSがASK1シグナルソームに及ぼす影響

DATS処理によりASK1のバンドが高分子側にシフトし、ASK1の高分子量化が確認された。この結果からASK1がシグナルソームを形成していることが示唆された。現在、DATSによるASK1の活性化、シグナル伝達経路に及ぼす影響について詳細なメカニズムを検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Seki T, Hosono T, Suda S, Kimura K, Ariga T. Anticancer Property of Allyl Sulfides Derived from Garlic (*Allium sativum* L.). *J Food Drug Anal.* 2012 in press. 査読有
- ② Iitsuka Y, Tanaka Y, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T. Relationship between lipophilicity and inhibitory activity against cancer cell growth of 9 kinds of alk(en)yl trisulfides with different side -chains. *Oncology Research.* 2010; 19: 575- 82. 査読有
- ③ Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T. Diallyl trisulfide protects rats from carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Nutr.* 2009; 139(12):2252-6. 査読有
- ④ Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, Origuchi K, Matsufuji H, Seki T, Ariga T. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73 (9): 1948-55. 査読有

- ⑤ Koizumi K, Iwasaki Y, Narukawa M, Iitsuka Y, Fukao T, Seki T, Ariga T, Watanabe T. Diallyl sulfides in garlic activate both TRPA1 and TRPV1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(3):545-8. 査読有

〔学会発表〕(計12件)

- ① Suda S, Tanaka Y, Watanabe K, Hosono T, Ogihara J, Ariga T, Seki T. Identification of novel molecular target of diallyl trisulfide in U937 cells. International Conference on Food Factors for Health Promotion(ICoFF2011). November 21, 2011, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan. 【ポスター賞受賞】
- ② Seki T, Hosono T, Hosono-Fukao T, Ariga T. Anticancer effect of sulfur-containing compounds derived from garlic. International Conference on Food Factors for Health Promotion (ICoFF2011). November 22, 2011, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan. *Invited Speaker.*
- ③ Seki T, Hosono T, Ariga T. Garlic Compounds and Their Biological Effects and Stability, Symposium for Functional Black Garlic, Food Biosciences: Promise and Challenging in the Future, 2011 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, June 8, 2011, EXCO, Daegu, Korea. *Invited Speaker.*
- ④ 細野 崇、内田真弓子、細野(深尾)友美、関 泰一郎、有賀豊彦 diallyl trisulfideによるCYP2E1活性抑制機構の解析 第26回日本香辛料研究会学術講演会(福井2011年11月19日)、講演要旨集、p24
- ⑤ 細野 崇、田中友紀、深尾友美、新藤一敏、関 泰一郎、有賀豊彦 ガーリック由来香気成分diallyl trisulfideはシステイン残基との反応を介してヒト大腸がん細胞の増殖を抑制する第65回 日本栄養・食糧学会大会(東京2011年5月14日)同要旨集、p204
- ⑥ 須田 峻、田中理江、田中友紀、細野 崇、荻原 淳、関 泰一郎、有賀豊彦 ガーリック由来香気成分Diallyl trisulfideの白血病細胞における分子標的の解明 第65回日本栄養・食糧学会大会(東京2011年5月14日)同要旨集、p203
- ⑦ 渡部和浩、須田 峻、田中友紀、細野 崇、関 泰一郎、有賀豊彦 Diallyl trisulfideによるチオレドキシンの修飾と抗がん作用について 日本農芸化学会 2011年度大会(京都)/日本農芸化学会要旨集、p217(2011年3月27日)
- ⑧ 田中友紀、須田 峻、細野 崇、関 泰一郎、有賀豊彦 Diallyl trisulfide (DATS)による白血病細胞のアポトーシス誘導について

て 日本農芸化学会 2011 年度大会(京都)
/日本農芸化学会要旨集、p217 (2011 年 3
月 27 日)

- ⑨ 田中友紀、飯塚裕司、須田 峻、細野 崇、関 泰一郎、有賀豊彦 Alk(en)yl trisulfide
の側鎖構造と大腸がん細胞株の増殖抑制
活性との関係について 第 25 回日本香辛
料研究会学術講演会 (静岡 2010 年 11 月
13 日)、講演要旨集、p27-282
- ⑩ 田中友紀、稲田 薫、関口雄亮、飯塚裕司、
寫本麻衣子、須田峻、細野崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 ヒト白血病細胞に対するガ
ーリック由来香氣成分diallyl trisulfideの抗
がん作用について 64 回日本栄養・食糧学
会大会 (徳島 2010 年 5 月 23 日) p207
- ⑪ 寫本 麻衣子、稲田 薫、田中 理江、杉原
明日香、飯塚 裕司、田中 友紀、細野 崇、関 泰一郎、有賀 豊彦 ガーリック由
来香氣成分diallyl trisulfideによる各種白血
病細胞株のアポトーシス誘導について
日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京) /
日本農芸化学会要旨集、p183 (2010 年 3
月 29 日)
- ⑫ 飯塚裕司、寫本麻衣子、田中友紀、須田 峻、
関口雄亮、細野 崇、関泰一郎、有賀豊彦
Alk(en)yl trisulfideの側鎖構造と抗がん
活性との関係について 日本農芸化学会
2010 年度大会 (東京) /日本農芸化学会要
旨集、p183 (2010 年 3 月 29 日)

[図書] (計 2 件)

- ① 関 泰一郎、細野 崇、有賀豊彦 ニンニク
の機能 スパイス・ハーブの機能性と最新応
用技術 (中谷延二監修) シー・エムシー出
版(東京), 2010, pp160-166(全 287 ページ).
- ② Seki T, Hosono T, Ariga T. Allium: Garlic
and Onion (IV. Biological Functionality of
Herbs and Spices) The Basics of Functional
Foods. DEStech Publications, Inc., Lancaster,
PA, USA. 2012 in press.

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 泰一郎 (SEKI TAIICHIRO)

日本大学生物資源科学部教授

研究者番号：20187834

(2) 研究分担者

有賀 豊彦 (ARIGA TOYOHICO)

日本大学生物資源科学部教授

研究者番号：50096757

細野 崇 (HOSONO TAKASHI)