

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02145

研究課題名（和文）機能性食品成分の腸管における標的分子の同定と腸内細菌叢への作用の解析

研究課題名（英文）Identification of target molecules of functional food ingredients in the intestinal tract and analysis of their effects on the intestinal microflora

研究代表者

井上 順（Inoue, Jun）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70323962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：スルフォラファンが転写因子SREBPの活性を抑制する分子機構について解明を行った。スルフォラファンはプロテアソーム経路を介した前駆体SREBPの分解を促進することに加え、SCAP、HSP27、Keap1-Nrf2経路など、SREBPやスルフォラファンが関与することが知られている因子に非依存的に作用することを明らかにした。

スルフォラファンビーズを作製・解析を行い、複数の候補因子を見出した。脱パルミトイル化酵素APT2について解析を行い、スルフォラファンがAPT2の56番目のシステイン残基と結合すること、その結合がAPT2自身のパルミトイル化を減弱させ、細胞膜への局在を低下させることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な食品成分が生理作用を発揮することは広く知られているが、その作用機構については不明な点が多く残されている。これらの作用機構の正確な理解は、食品による生体機能改善に向けた利用に大きく貢献することが期待される。

本研究では、これまでに申請者がその生理作用について明らかにしてきたスルフォラファン（SFN）に着目して検討を行った。具体的には、SFNが転写因子SREBP活性を抑制するメカニズムの解明およびSFAの直接の標的因子の同定を行った。直接の標的因子の発見は、その成分がどのようなメカニズムで作用するかについて、分子レベルでの理解を深めることに繋がる。

研究成果の概要（英文）：I investigated the molecular mechanism by which sulforaphane suppresses the activity of the transcription factor SREBP. I found that sulforaphane promotes degradation of the precursor SREBP via the proteasome pathway and that sulforaphane acts independently on factors known to be involved in SREBP and sulforaphane, such as SCAP, HSP27, and the Keap1-Nrf2 pathway.

Sulforaphane beads were prepared and analyzed, and several candidate factors were found. Analysis of the depalmitoylase APT2 showed that sulforaphane binds to the 56th cysteine residue of APT2 and that this binding attenuates the palmitoylation of APT2 itself, reducing its localization at the plasma membrane.

研究分野：食品生化学

キーワード：抗肥満 スルフォラファン パルミトイル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な食品成分が生理作用を発揮することは広く知られているが、その作用機構については不明な点が多く残されている。これらの作用機構の正確な理解は、食品による生体機能改善に向けた利用に大きく貢献することが期待される。

研究代表者は転写因子の活性制御を指標として、抗メタボリックシンドローム作用を有する食品成分の探索を行い、これまでに複数の成分の同定に成功している。現在、それらの食品成分がどのような機構で転写因子の活性を制御するのかについて研究を行っている。

2. 研究の目的

肥満や脂肪肝を抑制する食品成分は多く知られており、動物での表現型や標的臓器由来の培養細胞を用いた解析から、その作用メカニズムの解析が行われている。本研究では、これまでに申請者がその生理作用について明らかにしてきたスルフォラファン (SFN) に着目して検討を行った。具体的には、SFN が転写因子 SREBP 活性を抑制するメカニズムの解明および SFA の直接の標的因子の同定を行った。直接の標的因子の発見は、その成分がどのようなメカニズムで作用するかについて、分子レベルでの理解を深めることに繋がる。

3. 研究の方法

(1) SFN による SREBP 活性抑制機構の解明

研究代表者はこれまでに、脂質代謝を包括的に制御する転写因子である SREBP の活性を抑制する食品由来成分として SFN を見出し、SFN 処理が前駆体 SREBP タンパク質のユビキチン-プロテアソーム経路による分解を促進することを明らかにしている。また、その分解には SREBP の C 末端側が必須であることを明らかにしている。本研究では、SFN による SREBP 前駆体タンパク質の分解に①SCAP、②HSP27、③Keap1-Nrf2 経路が関与するかについて解析を行った。

(2) SFN ビーズの作製と SFN 結合因子の同定

SFN は特徴的な官能基としてイソチオシアネート基をもち、親電子性を有する。この性質により Keap1-Nrf2 経路の活性化を引き起こすことが知られている。SFA の多岐にわたる生理作用を考慮すると、Keap1-Nrf2 や上記の SREBP 経路以外にも標的となる分子が存在することが想定される。本研究では SFN ビーズを作製し、新規な SFN 結合タンパク質の同定を行った。

(3) SFN 結合因子 APT2 に関する解析

SFN 結合因子として同定した APT2 について、SFN との結合様式や APT2 の機能におよぼす影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) SFN による SREBP 活性抑制機構の解明

①SFN による SREBP 前駆体タンパク質の分解への SCAP の関与の解析

SFN 処理による SREBP 前駆体タンパク質の分解に SCAP が関与するかについて検討を行った。SREBP は SCAP と複合体を形成して小胞体膜に局在しており、SCAP の欠損は前駆体 SREBP タンパク質の分解が促進することが報告されている。また、我々は HSP90 の阻害が SCAP タンパク質の分解促進を介して、前駆体 SREBP タンパク質を不安定化させることを明らかにしている。

Huh-7 細胞を 100 μM SFN で 6 時間処理したところ、SCAP タンパク質の発現量の減少が観察された (図 1)。そこで次に、SCAP 欠損 CHO 細胞株 (SRD-13A 細胞株) を用いて SFN の効果を検討した。親株である CHO-7 細胞では 100 μM SFN の 6 時間処理により SCAP および SREBP-1 前駆体タンパク質の発現低下が観察された (図 2 左)。SCAP 欠損株である SRD-13A 細胞ではこれまでの報告の通り、前駆体 SREBP-1 タンパク質の発現が低下しており、100 μM SFN の 6 時間処理によってさらなる低下が観察された (図 2 右)。これらの結果より、SFN による SREBP-1 前駆体タンパク質の分解促進には SCAP 依存的経路に加えて、SCAP 非依存的経路が存在することが示された。

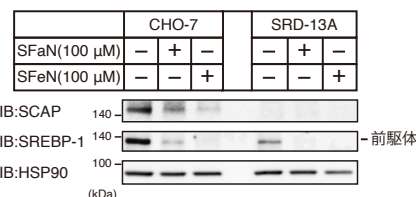
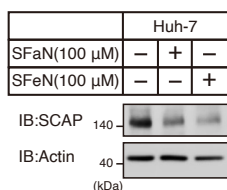


図 1. SFN 処理による SCAP タンパク質発現量の変化

図 2. SCAP 欠損細胞株における SFN の前駆体 SREBP-1 におよぼす影響

②SFNによるSREBP前駆体タンパク質の分解へのHSP27の関与の解析

SFNはHSP27の発現上昇を介してプロテアソーム活性を促進させることが報告されている。そこで次に、SFN処理によるSREBP-1前駆体タンパク質の分解にHSP27が関与するかどうかについて検討した。Huh-7細胞を100 μM SFNで24時間処理したところ、HSP27 mRNAレベルが1.8倍に有意に上昇した。siRNAを用いてHSP27をノックダウンさせた条件においてもSFNによるSREBP-1前駆体タンパク質の低下が観察されたことから(図3)、HSP27発現上昇はSFNによるSREBP-1前駆体タンパク質分解の促進には関与しないことが示された。

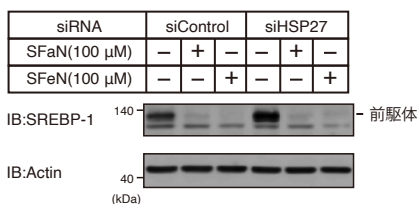


図3. HSP27ノックダウン時のSFNによる前駆体SREBP-1発現量の解析

③SFNによるSREBP前駆体タンパク質の分解へのKeap1-Nrf2経路の関与の解析

SFNはNrf2の核内移行を促進することで抗酸化酵素の発現を促進することが報告されている。そこでSFNによるSREBP-1前駆体タンパク質の分解促進にKeap1-Nrf2経路が関与しているか検討を行った。Huh-7細胞についてsiRNAを用いてNrf2をノックダウンさせ、SFNによるSREBP-1前駆体タンパク質への影響に変化が起こるかどうかについて検討した。その結果、Nrf2のノックダウン時においてもSFNによる前駆体SREBP-1タンパク質の発現低下が観察された(図4)。Nrf2のノックダウン効率はリアルタイムPCRによるmRNAの定量により検出した。これらの結果よりSFNはKeap1-Nrf2経路の活性化とは別経路でSREBP-1前駆体タンパク質の分解を促進することが示された。

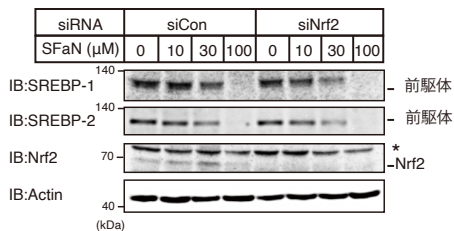


図4. Nrf2ノックダウン細胞におけるSFNの前駆体SREBP-1におよぼす影響

(2) SFN ビーズの作製とSFN結合因子の同定

SFNのイソチオシアネート基と相互作用する因子の同定を目指し、スルホニル基側のアルキル誘導体を合成し、クリックケミストリーによりSFNビーズを作製した。Huh-7細胞抽出液をSFNビーズとコンタクトさせ、結合タンパク質を濃縮後に質量分析に供し、候補因子を多数得ることができた。本報告書では、候補因子の一つであるAPT2に関して記述する。

(3) SFN結合因子APT2に関する解析

SFN結合候補因子としてacyl protein thioesterase 2 (APT2)を見出した。APT2はタンパク質の翻訳後修飾の一つであるパルミトイル化を切断する脱パルミトイル化酵素である。

APT2の発現プラスミドを作製し、SFNビーズとの結合を検討した。HEK293細胞にAPT2発現プラスミドをトランスフェクション後に細胞抽出液を回収し、SFNビーズとコンタクトさせた。プルダウンしたサンプルをウェスタンブロットに供し、APT2タンパク質のSFNビーズへの結合性について検討した。その結果、APT2タンパク質のSFNビーズへの結合が検出され、さらにこの結合はフリーのSFN添加によって減弱することから、APT2はSFNと結合していることが示された。またこの結合はアリルイソチオシアネート(イソチオシアネート基をもつ他の化合物)やタンパク質のシステイン残基を非可逆的にアルキル化するヨードアセトアミド(IAM)で処理することでこの結合が減弱することが観察された。これらの結果より、APT2はそのシステイン残基とSFNのイソチオシアネート基で結合していることが示唆された。次にAPT2の部分欠失体およびシステイン変異体を作製・検討を行ったところ、56番目のシステイン残基を介してSFNと結合していることが明らかになった。

次にSFNとの結合がAPT2タンパク質へおおよそ影響について解析を行った。APT2は膜にアンカーされていると酵素的に活性型であることが報告されている。即ち、APT2活性の変化と、その局在の変化は同意であるといえる。HEK293細胞にAPT2発現プラスミドをトランスフェクションし、細胞質画分と細胞膜画分に分離し、ウェスタンブロットによりAPT2の局在を検討した。

その結果、100 μ M SFN で 3 時間処理により APT2 の細胞膜画分が減少した。細胞膜に結合している APT2 はパルミトイル化を受けていることが報告されていることから、引き続き APT2 自身のパルミトイル化について検討を行った。その結果、100 μ M SFN で 3 時間処理により APT2 タンパク質のパルミトイル化が減弱することが示され、この減弱は SFN と結合しない 56 番目のシステイン残基変異体では観察されなかった。

以上の結果より、SFN は APT2 の 56 番目のシステイン残基と結合すること、さらにその結合は APT2 自身のパルミトイル化を減弱させ、APT2 の細胞膜への局在が低下することが示された。

本研究成果は、これまで未知であった SFN の直接の標的因子を見出し、SFN の生理作用に関する作用機序について、分子機構解明の足がかりとなる知見の提示に成功した。今後、他の標的因子についても解析を行っていく。

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 Kaname Naoki, Fujimaki Takahiro, Horikoshi Shotaro, Fujimura Kaito, Kodaka Manami, Wakamori Shinnosuke, Katsuta Ryo, Ishigami Ken, Suzuki Tsukasa, Yamamoto Yuji, Inoue Jun | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Chrysin 7 <i></i> <sc>d</sc> glucopyranoside increases hepatic low density lipoprotein receptor expression through <sc>AMP</sc> activated protein kinase activation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 FEBS Open Bio | 6. 最初と最後の頁 1447 ~ 1458 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13665 | 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 Miyata Shingo, Kodaka Manami, Kikuchi Akito, Matsunaga Yuki, Shoji Kenta, Kuan Yen-Chou, Iwase Masamori, Takeda Keita, Katsuta Ryo, Ishigami Ken, Matsumoto Yu, Suzuki Tsukasa, Yamamoto Yuji, Sato Ryuichiro, Inoue Jun | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Sulforaphane suppresses the activity of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) by promoting SREBP precursor degradation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 8715 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12347-6 | 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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤枝 駿介、小高 愛未、正路 健太、石神 健、鈴木 司、山本 祐司、井上 順 |
| 2. 発表標題 スルフォラファンによる脂肪滴局在タンパク質PLIN2への作用の解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 和田 美沙希、多田 しおり、小高 愛未、藤巻 貴宏、鈴木 司、山本 祐司、井上 順 |
| 2. 発表標題 スルフォラファンによる腸内細菌叢の変化と抗肥満作用への影響 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 増尾 翼、二瓶 遥、藤巻 貴宏、島田 康彦、鈴木 司、山本 祐司、井上 順 |
| 2. 発表標題 SREBP 活性抑制能を指標とした抗肥満作用を有するブロッコリー品種の選別 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 兼行紗矢、二瓶遥、藤巻貴宏、鈴木司、山本祐司、井上順 |
| 2. 発表標題 SREBP活性を抑制する化合物のブロッコリー抽出物からの探索 |
| 3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川平 浩太郎、小高 愛未、石神 健、松井 伸祐、岩槻 健、鈴木 司、山本 祐司、井上 順 |
| 2. 発表標題 SFaNIによる前駆体SREBP分解促進作用の解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Manami Kodaka, Shingo Miyata, Yuki Matsunaga, Keita Takeda, Ryo Katsuta, Ken Ishigami, Tsukasa Suzuki, Yuji Yamamoto, Ryuichiro Sato, Jun Inoue |
| 2. 発表標題 Sulforaphane promotes Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) precursor degradation and suppresses the activity of SREBP |
| 3. 学会等名 22nd IUCS-ICN (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小高 愛未、川上 優花、吉良 早由里、松本 雄宇、鈴木 司、山本 祐司、井上 順 |
| 2. 発表標題 スルフォラファンが腸内細菌叢に及ぼす影響と肥満抑制効果の解析 |
| 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 小高 愛未、鈴木 司、山本 祐司、井上 順 |
| 2. 発表標題 スルフォラファンによってユピキチン化される新規タンパク質の探索 |
| 3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会 |
| 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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 鎌田 春彦 (Kamada Haruhiko) (00324509) | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー (84420) | |
| 研究分担者 | 石神 健 (Ishigami Ken) (70292787) | 東京農業大学・生命科学部・教授 (32658) | |
| 研究分担者 | 國澤 純 (Kunisawa Jun) (80376615) | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ヘルス・メディカル微生物研究センター・センター長 (84420) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|