

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14888

研究課題名（和文）癌転移を阻害するメチルケルセチンの作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism on the effect of methylquercetin inhibiting cancer metastasis.

研究代表者

山内 恒生（Yamauchi, Kosei）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：10805427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：合成したフラボノイドプローブを用いたプルダウンアッセイにより、MMP-1が quercetin誘導体の標的タンパク質の一つであることが示唆された。表面プラズモン共鳴（SPR）解析では、quercetin誘導体とリコンビナントMMP-1触媒ドメインの相互作用は濃度依存的であることが確認された。1H-15N HSQC NMR解析を行った結果quercetin誘導体はMMP-1の金属イオン付近と相互作用していることが示された。これらの結果から、quercetin誘導体は金属イオン付近に結合することでMMP-1の活性を阻害し、がん細胞の遊走を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドの生理機能は多岐に渡り、その有用性を示す報告は近年加速度的に増加している。そのため作用機序の解明や合成法、代謝過程などフラボノイドの動物細胞における影響について研究が行われ、年間1万報を超える関連論文が投稿されている。しかし、機能性成分として報告され続けているフラボノイド類の、直接的な作用機序は殆ど明らかにされておらず、その標的タンパク質の探索は世界的な競争になっている。本研究で、代表的なフラボノイドのひとつであるquercetin及びその誘導体の標的タンパク質及び、作用様式をNMR法を用いて初めて明らかにし、フラボノイドの活性メカニズムの一端を明らかにする事に成功した。

研究成果の概要（英文）：Pull-down assays using the synthesized flavonoid probes suggested that MMP-1 was one of the target proteins of the quercetin derivative. Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis confirmed that the interaction between the quercetin derivative and the recombinant MMP-1 catalytic domain was concentration-dependent. 1H-15N HSQC NMR analysis showed that the quercetin derivative interacts with the metal ion vicinity of MMP-1. These results suggested that quercetin derivatives inhibited the activity of MMP-1 and suppressed the migration of cancer cells by binding near metal ions.

研究分野：天然物化学

キーワード：フラボノイド 癌転移 quercetin MMP-1

1. 研究開始当初の背景

抗酸化活性、抗炎症、抗ウイルス、抗がん、抗骨粗鬆症など、動物細胞におけるフラボノイドの生理機能は多岐に渡り、その有用性を示す報告は近年加速度的に増加している。そのため作用機序の解明や合成法、代謝過程などフラボノイドの動物細胞における影響について研究が行われ、年間1万報を超える関連論文が投稿されている。しかし、機能性成分として報告され続けているフラボノイド類の、直接的な作用メカニズムは殆ど明らかにされておらず、フラボノイドの標的タンパク質の探索は世界的な競争になっている。

がんは、細胞の異常増殖と転移を特徴とする疾病である。がんの進行の内「転移」は、がん細胞が移動することによって、がんが発生した場所から体のさまざまな部位に広がっていく段階である。そのため転移の抑制はがんの治療において重要であり、これまでに細胞運動の促進に関連する遺伝子、酵素、リガンド、細胞内シグナルがいくつか報告されている。

フラボノイドは、植物に含まれる二次代謝物の一種で、C6-3-6 骨格を有する。フラボノイドの薬効については多くの研究がなされており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用など幅広い生理作用を示すことが報告されている。quercetin には、抗酸化作用、メラニン生成抑制作用、抗腫瘍作用など、さまざまな生理活性があることが多くの研究で示されている。さらに、いくつかのタンパク質が quercetin の標的となることが報告されている。以前の研究で、quercetin はマウスの体内で転移を抑制することも報告されている。また、quercetin の誘導体である 3-O-methylquercetin(3MQ)が皮膚がん、及び卵巣がん細胞において quercetin よりも強力な抗遊走および抗浸潤活性を示すことが明らかにされている。しかし、quercetin 及びその誘導体の抗遊走、抗浸潤、抗転移活性の分子機構は、20年以上にわたって解明されていない。そこで、本研究では、quercetin 誘導体の標的タンパク質を、プルダウンアッセイを用いて調査し、quercetin 誘導体との作用機序を NMR や SPR 法(表面プラズモン共鳴法)を用いて調査した。

2. 研究の目的

申請者はすでに位置選択的にビーズを導入した 5 種のフラボノイドプローブの合成に成功しており、導入するビーズの位置により得られるタンパク質が大きく異なることを明らかにしている。本研究はこのフラボノイドプローブを用いて 3MQ の標的タンパク質を特定すると共に、標的タンパク質と 3MQ の作用様式を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

フラボノイドプローブを用いてプルダウンアッセイを行い、quercetin 誘導体と結合するタンパク質を沈殿させて回収した。タンパク質を電気泳動で分離、単離し、MALDI-TOFMS 解析およびデータベースとの照合により、タンパク質の同定を試みた。その内のひとつが、がん転移に関与する MMP-1 であった。大腸菌への遺伝子導入により、MMP-1 の過剰発現を行い、Quercetin や quercetin 誘導体を用いて MMP-1 活性試験及び、SPR による分子間相互作用解析を行った。さらに、¹⁵N 標識 MMP-1 の発現、精製を行った。これを用いて NMR 法による quercetin 誘導体との相互作用様式の調査を行う事で、quercetin 及び 3MQ のがん細

胞遊走阻害機構の解明を試みた。

4. 研究成果

これまでの研究で、フラボノイドの特定の水酸基にキャリアビーズを結合させ、標的タンパク質を決定するプルダウン法に用いるフラボノイドプローブの新しい合成法を開発した。本プローブを用いて quercetin 誘導体の標的タンパク質を明らかにし、その作用様式をタンパク質の NMR 測定により明らかにした。

合成したフラボノイドプローブを用いたプルダウンアッセイにより、MMP-1 が quercetin 誘導体の標的タンパク質の一つであることが示唆された。quercetin 誘導体と MMP-1 の結合様式を SPR および HSQC 分析により検討した。SPR 解析では、quercetin 誘導体とリコンビナント MMP-1 触媒ドメインの相互作用は濃度依存的であることが確認された。また、結合の強さを示す K_d 値を算出したところ、3MQ は quercetin よりも強力に MMP-1 と結合していることが明らかとなった。MMP-1 阻害活性及び、がん細胞遊走阻害活性が quercetin よりも 3MQ の方が強いことから、この SPR の結果はこれらの結果を支持した。 ^{15}N 標識した MMP-1 触媒ドメインを用いた ^1H - ^{15}N HSQC NMR 解析を行い、3MQ の添加により NMR シグナルの変化が大きい箇所から順に紫、赤、黄色、灰色と色付けた(図 1)。その結果 3MQ は Zn^{2+} イオンだけでなく、 Ca^{2+} イオンも含むすべての金属イオン付近と相互作用していることが示された。これらの結果から、quercetin 誘導体は金属イオン付近に結合することで MMP-1 の活性を阻害し、がん細胞の遊走を抑制していることが示唆された(図 2)。

ケミカルシフトの変化
purple 0.08ppm <
red 0.04-0.08ppm
yellow 0.03-0.04 ppm
grey 0.03ppm >

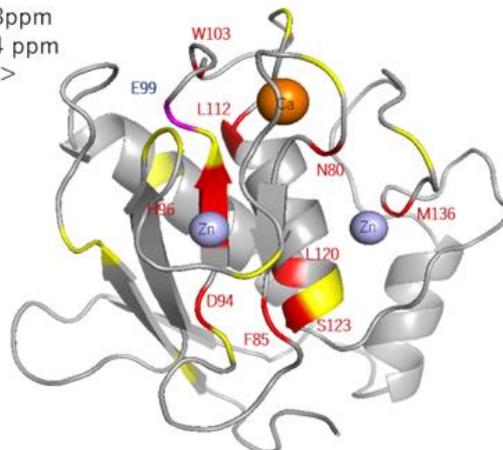


図1 3MQのMMP-1への結合箇所

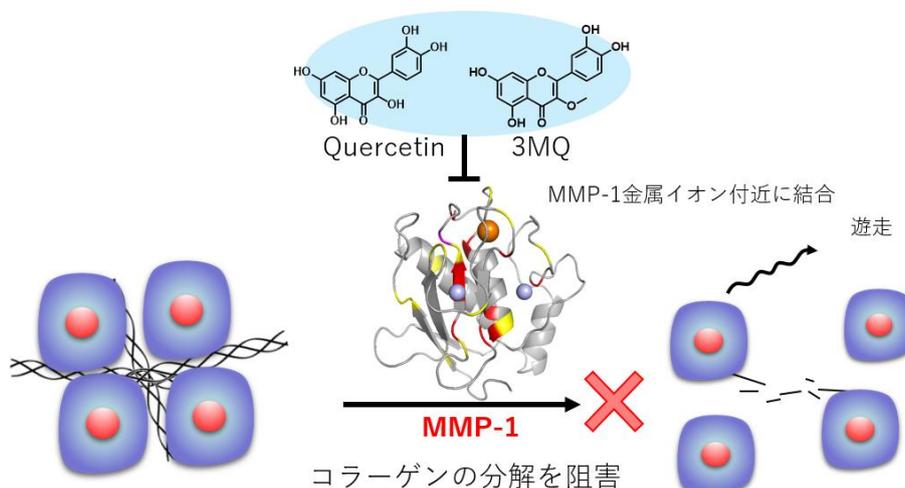


図2 3MQのがん細胞遊走阻害機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamauchi Kosei, Soyano Mayu, Kobayashi Miho, Kamatari Yuji O., Mitsunaga Tohru	4. 巻 416
2. 論文標題 Protein aggregation model to explain the bioactivity of condensed tannins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 135870 ~ 135870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2023.135870	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 Egra Saat, Kuspradini Harlinda, Kusuma Irawan Wijaya, Batubara Irmanida, Imra, Nurjannah Nurjannah, Wahyuni Ety, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 24
2. 論文標題 Potential of prospective medicinal plants of Rhizophoraceae from North Kalimantan, Indonesia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biodiversitas Journal of Biological Diversity	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.13057/biodiv/d240303	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 該当する
1. 著者名 Tsuchiya Ayaka, Kobayashi Miho, Kamatari Yuji O., Mitsunaga Tohru, Yamauchi Kosei	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of flavonoid probes and the binding mode of the target protein and quercetin derivatives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116854 ~ 116854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116854	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 Sakamoto Kotaro, Watanabe Chiharu, Masutani Teruaki, Hirasawa Asuka, Wakamatsu Kanae, Iddamalgoda Arunasiri, Kakumu Yuya, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 45
2. 論文標題 <i>Arnica montana</i> L. extract containing <sc>6</sc> methacryloylhelenalin and <sc>6</sc> isobutyrylhelenalin accelerates growth and differentiation of human subcutaneous preadipocytes and leads volumizing of skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cosmetic Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ics.12815	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 Takayama Satoru, Kawanishi Miho, Yamauchi Kosei, Tokumitsu Daiki, Kojima Hiroyuki, Masutani Teruaki, Iddamalgoda Arunasiri, Mitsunaga Tohru, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 Ellagitannins from <i>Rosa roxburghii</i> suppress poly(I:C)-induced IL-8 production in human keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 623 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-021-01509-x	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 Kakumu Yuya, Nguyen Thi Minh Tu, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 12
2. 論文標題 New benzoic acid and caffeoyl derivatives with anti-inflammatory activities isolated from leaves of <i>Illex kaushue</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2021.1939334	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 該当する

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 土屋綾香、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 キリンケツヤシ (<i>Daemonorops draco</i>) 果実由来竜血の成分探索と破骨細胞分化ならびに骨粗鬆症モデルマウス骨量に及ぼす効果
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹山大暁、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 マウスのストレス性脳障害改善に及ぼす杉材精油香気成分
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木真希、各務裕也、山内恒生、光永 徹、Mihn Tu Thi Nguyen
2. 発表標題 苦丁茶は成分の破骨細胞分化に及ぼす効果
3. 学会等名 日本生薬学会 第68回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多賀勇亮、光永徹、山内恒生
2. 発表標題 有色木材心材の色調変化メカニズムの解明
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第15回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内恒生、征矢野真由、小林美穂、鎌足雄司、光永 徹
2. 発表標題 縮合型タンニンのタンパク質凝集モデル
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第15回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋綾香、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 破骨細胞分化抑制活性を有するDaemonorops draco抽出物の成分探索
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第15回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内恒生、菅原由喜、征矢野真由、小林美穂、鎌足雄司、光永 徹
2. 発表標題 NMRを用いたタンニンのタンパク質凝集メカニズムの解明
3. 学会等名 日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋綾香、イルマニダバツバラ、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 破骨細胞分化抑制活性を有するDaemonorops draco抽出物の成分探索とそのメカニズム
3. 学会等名 日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Runa Fujimoto, Masahiro Kassai, Kosei Yamauchi, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Neurite outgrowth effect on PC12 cells from Piper longum fruit extracts
3. 学会等名 The 11th JCK Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maki Suzuki, Minh Tu Thi Nguyen, Kosei Yamauchi, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Structural analysis of saponins from the leaves of Ilex kaushue (Kudingcha)
3. 学会等名 The 11th JCK Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosei Yamauchi
2. 発表標題 Bioactivity and mechanism of components in medicinal plant
3. 学会等名 International Guest Lectures on Role Secondary Metabolite in Medicinal Plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takafumi Hara, Masahiro Kassai, Kosei Yamauchi, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Identification of NK cell activator from Citrus hystrix leaf extracts
3. 学会等名 The 11th JCK Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosei Yamauchi
2. 発表標題 Strategy on elucidation of bioactivity mechanism of flavonoids
3. 学会等名 Kalimantan Plant Biodiversity For The Development Of Medicines Seminar Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosei Yamauchi, Ayaka Tsuchiya, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Investigation of Bioactivity Mechanism of Flavonoids in Cancer Cells
3. 学会等名 Annual Meeting of the Korean Society of Wood Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 貴之, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 サイプレス材精油香気雰囲気下飼育によるマウスの肥満抑制 メカニズムの解明
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日置 裕介, Siaw ONWONA-AGYEMAN, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 Garcinia kola 種子抽出成分の探索と口腔疾患原因菌に対する抗菌活性
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 征矢野 真由, 山内恒生, 光永 徹
2. 発表標題 紫夏藤 (<i>Millettia reticulata</i>) 由来縮合型タンニンの構造解析とGTase阻害活性
3. 学会等名 日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 貴之, 山内恒生, 光永 徹
2. 発表標題 サイプレス材精油雰囲気下におけるマウスの肥満抑制作用とその作用機作
3. 学会等名 第65回 香料・テルペン及び精油化学に関する討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内恒生, 土屋綾香, 小林美穂, 鎌足雄司, 光永 徹
2. 発表標題 がん遊走を阻害するquercetin誘導体の標的タンパク質の探索と作用機序の解明
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第14回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋綾香, 山内恒生, 光永 徹
2. 発表標題 破骨細胞分化抑制活性を有する Daemonorops draco抽出物の成分探索
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第14回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多賀 勇亮, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 パープルハート(Peltogyne spp.) 芯材色素成分の構造と色調発現に関する研究
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会第14回学術集会
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
---------	---------