

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25年5月11日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500761

研究課題名（和文） β -カロテンの経口摂取によるウイルス感染症対策を志向する基礎研究研究課題名（英文） Fundamental research for the countermeasure against viral infectious disease by oral intake of β -carotene.

研究代表者

山西 倫太郎（YAMANISHI RINTARO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：30253206

研究成果の概要（和文）：

免疫細胞内のグルタチオン（GSH）は、免疫力に影響する。本研究では、マクロファージ培養細胞 RAW264 を用いて、カロテノイドが GSH 合成に関わる酵素 GCL 特性に及ぼす影響に着目した。GCL の mRNA およびタンパク質の量は、培地中の β -カロテン量・添加時間と相関した。GCL 活性の特異的阻害剤・翻訳阻害剤・転写阻害剤を用いた実験により、 β -カロテン等のある種のカロテノイドは、mRNA 転写を上方調節することにより GCL タンパク質の新規合成を亢進し、細胞内 GSH 量を増加させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The intracellular level of reduced glutathione (GSH) in immune cells has influences on the immunity. In the present study, we focused on the effect of carotenoids such as β -carotene on the properties of glutamate-cysteine-ligase (GCL) which is involved in GSH synthesis. Experiments with a GCL specific inhibitor, a translation inhibitor, and a transcription inhibitor revealed that certain carotenoids including β -carotene induce *de novo* synthesis of GCL accompanied with the up-regulation of transcription, which resulted in the enhancement of the intracellular GSH level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、食品免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 科学的な背景：人類は様々な病原体とのせめぎ合いを繰り返してきた。現代社会に出現してきた抗生物質耐性菌、ならびに SARS・新型インフルエンザなどの新興感染症ウイルスに抵抗するためには、個々人の免疫力を高めておく必要がある。ところで、 β -カロテンやその他のカロテノイドが免疫機

能に影響を及ぼしたとする研究報告が、これまでに数多く存在する。しかし、ビタミンA前駆物質としての作用以外、つまりカロテノイドとしての作用についての定まった見解はない。そして、免疫細胞に対する β -カロテンの作用メカニズムも明らかではなかった。

(2) 研究代表者らの準備状況：研究代表者は、

「β-カロテン添加食を摂取したマウスでは、アレルギーを起こす IgE 抗体の産生が低下する (*Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 2176-2182, 2003)。」・「抗原刺激に応答する脾細胞 IL-12 分泌は増強され、1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 優位になる (*Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 3042-3045, 2006)。」という結果を得てきた。また、ヒトでも「血清 β-カロテン濃度とアトピー性皮膚炎罹患率が逆相関する」ことを学会報告した (平成 20 年 日本栄養・食糧学会大会、埼玉)。これらは、β-カロテンの摂取が生体の適応免疫系に影響を及ぼしていることを示している。

さらに、より詳細な分析のため、IL-12 を分泌する抗原提示細胞の一種であるマクロファージに着目し、そのマウス培養細胞 RAW264 の培地への β-カロテン添加の影響について検討したところ、「β-カロテンは細胞膜脂質の過酸化を誘導するが、一方で細胞質内の抗酸化性を向上させる (*Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 2112-2120, 2006)。」という結果を得た。

そして近年では、「マウスにおける β-カロテンの摂取・蓄積は、脾臓細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 濃度増大をもたらす、Cys-カテプシンの活性亢進をもたらす (*Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1595-1660, 2008)。」こと、さらに「RAW264 細胞実験系において、β-クリプトキサンチンは β-カロテンと同様の効果を持つものの、細胞膜への蓄積性の違いのため、ルテインには効果がない (*Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1396-1405, 2009)。」ことも見出した。

(3) 関連する国内外の研究との関連性：本研究で測定する成分である GSH については、それが生体の機能維持・調節に重要であることがこれまでの多くの研究において示されてきた。

特に、抗原提示細胞内の GSH の量ならびに酸化還元状態が、生体内の免疫状態の指標である Th1/Th2 バランスに影響することが明らかとなってきた (Y. Murata et al., *Int. Immunol.* **14**, 201-212, 2002)。

本研究により、β-カロテンが抗原提示細胞に対して GSH 産生を誘導する物質であることがメカニズムの解明により裏付けられれば、科学的根拠を持って β-カロテンの利用について考えることができる。

2. 研究の目的

これまでの研究成果より、研究代表者は、免疫系に対する β-カロテンの作用について、独自の仮説を立てるに至った。即ち『β-カロテンは細胞膜に蓄積し、細胞質内の GSH 量を増大させる。マクロファージ等の抗原提示

細胞においても細胞質の酸化還元状態を還元側に導くため、活性酸素種 (ROS) の攻撃に弱い Cys-カテプシンの活性を保護する効果を持つ。Cys-カテプシン活性は、適応免疫の要である抗原呈示と相関するので、β-カロテンの影響下では同細胞による IL-12 の産生量が増大し、このサイトカインによって誘導される Th1 優位な免疫応答をもたらすため、Th2 により導かれる IgE 抗体産生は抑制される。』というものである。

本研究では、上記の仮説の最重要ポイントである「β-カロテンによるマクロファージ等抗原提示細胞内の GSH 量増加メカニズムの解明」を主目的とした。

3. 研究の方法

細胞内 GSH を増加するには、グルタチオンジスルフィド (GSSG) からの還元かアミノ酸からの新規合成の二通りが考えられる。β-カロテンの作用については、その量的な関係他から後者であると考えられた。また、後者である場合は、その反応の律速酵素であるグルタミン酸システインリガーゼ (GCL) の量が鍵であると考えられた。これらについて、証明するために、β-カロテンが GCL 発現量に及ぼす影響を検討すると共に、各種阻害剤を用いて β-カロテンの作用点を解析する研究を行った。

(1) β-カロテンが GCL の mRNA 量ならびにタンパク質量に及ぼす影響

① β-カロテンが GCL mRNA 発現ならびに同タンパク質産生に及ぼす影響を測定し、用量依存性や経時変化について比較した。

(2) β-カロテンの GSH 増加作用における GCL 活性の関与

① GCL の活性を阻害する薬剤ブチオニンスルフォキシミン (BSO) 存在下で、β-カロテンが細胞内 GSH 量に及ぼす影響について検討した。

② 同様の条件下で、β-カロテンが GCL タンパク質産生に及ぼす影響について検討した。

(3) β-カロテンの GSH 増加作用における GCL 翻訳 (: mRNA→タンパク質)・転写 (: DNA→mRNA) の関与

① タンパク質から mRNA への翻訳を阻害する薬剤シクロヘキシミド (CHX)、または DNA から mRNA への転写を阻害する薬剤アクチノマイシン D (Act D) 存在下で、β-カロテンが細胞内 GSH 量に及ぼす影響について検討した。

② ①と同様の条件下で、β-カロテンが GCL の mRNA 及びタンパク質産生に及ぼす影響について検討した。

(4) その他のカロテノイドの作用
 ①β-クリプトキサンチンやルテインが GCL のタンパク質産生に及ぼす影響について、検討した。また、CHX や Act D 存在下においても、同様の検討を行った。

なお、当初はマウスを用いた摂食実験も計画していたが、諸事情により割愛し、計画調書に alternative な選択として記載した培養細胞実験を行った。

4. 研究成果

(1) β-カロテンが GCL の mRNA 量ならびにタンパク質量に及ぼす影響

β-カロテン添加後 GCL の触媒サブユニット (GCLc) と調節サブユニット (GCLm) は共にその mRNA 量が増大した。そして、GCLc の mRNA 量は 3 時間後に、GCLm の mRNA 量は 6 時間後にピークとなった。二つのサブユニット間では、GCLc よりも GCLm の誘導が顕著であった (以上 Fig. 1-a)。

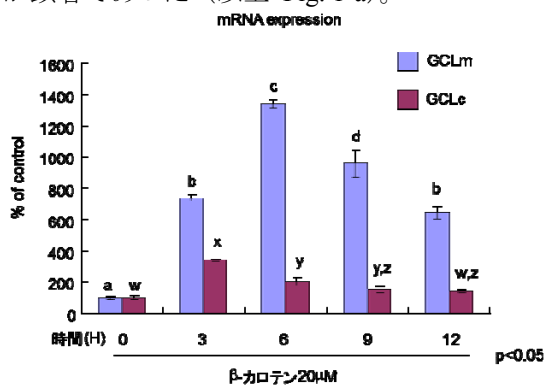


Fig. 1-a β-カロテン20μMでのGCL mRNA発現の経時変化

β-カロテン添加濃度に依存して GCLc と GCLm は共にその mRNA 量が増大した。二つのサブユニット間では、GCLc よりも GCLm の誘導の方が顕著であった (以上 Fig. 1-b)。

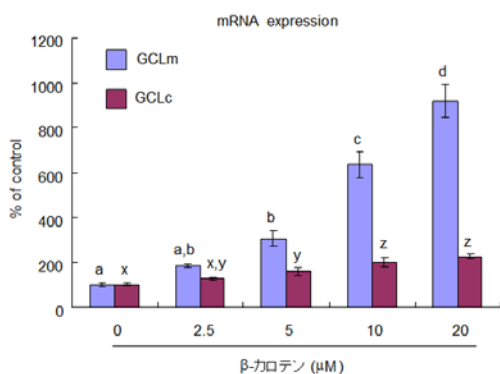


Fig. 1-b β-カロテン濃度変化による GCL mRNA 発現量

β-カロテン添加後 GCLc と GCLm は共にそのタンパク質量が増大した。そして、GCLc・GCLm とも、タンパク質量は 15 時間後にピークとなった。二つのサブユニット間では、

GCLc よりも GCLm の誘導が顕著であった (以上 Fig. 1-c)。

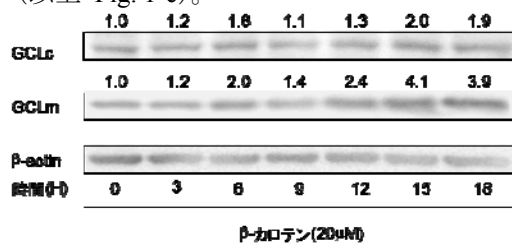


Fig. 1-c β-カロテン20μMでのGCLタンパク質発現の経時変化

β-カロテン添加濃度に依存して GCLc と GCLm は共にそのタンパク質量が増大した。二つのサブユニット間では、GCLc よりも GCLm の誘導の方が顕著であった (以上 Fig. 1-d)。

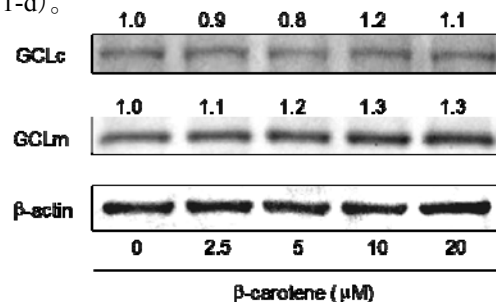


Fig. 1-d β-carotene 濃度変化によるタンパク質発現量

以上より、β-カロテンが GCL 発現を誘導していることが明白となった。しかし、GCL が、β-カロテンによる GSH 増加の主因であるとは、断言できない。そこで、次に GCL 活性を阻害した場合に、β-カロテンによる GSH 量増加効果があるのかどうかについての検討を行うこととした。

(2) β-カロテンの GSH 増加作用における GCL 活性の関与

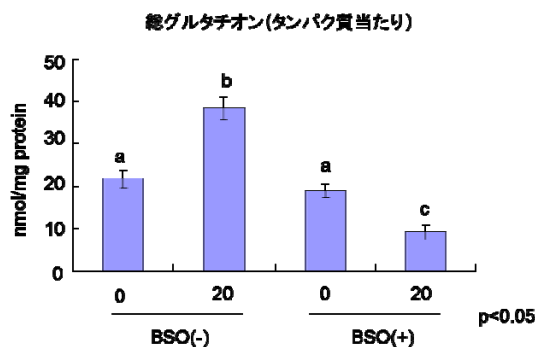


Fig. 2-a BSO存在下での細胞内グルタチオン量

GCL 特異的阻害剤 BSO 存在下では、β-カロテンによる GSH 増加効果が消失した (Fig. 2-a)。なお、この時、(1)で検出された β-カロテンによる GCL タンパク質発現誘導は阻害

されていなかった（データは省略）。

この結果より、 β -カロテンの効果は GCL 活性を介して、GSH の新規合成をもたらしたることによることが、確実となった。つまり、GSH の消費の抑制による増加ではなく、GSSG や抱合体から GSH が生じるのでもないことが明らかとなった。

ところで、 β -カロテンが GCL を介して GSH 量を増加させると考えた場合に、以下のいくつかの作用点が考えられる。

- | |
|---|
| <p>A. GCL mRNA の新生（＝転写）の亢進
 B. 存在する GCL mRNA の分解の抑制
 C. GCL タンパク質の新生（＝翻訳）の亢進
 D. 存在する GCL タンパク質の分解の抑制
 E. GCL 酵素活性の亢進</p> |
|---|

これらのいずれか又は、複数に対して β -カロテンが作用している可能性があり、ここまで示したデータでは、この点は明らかではない。

そこで、翻訳阻害剤 CHX ならびに転写阻害剤 Act D を用いて、 β -カロテンの作用点を明らかにすべく実験を行った。

(3) β -カロテンの GSH 増加作用における GCL 翻訳（: mRNA→タンパク質）・mRNA 転写（: DNA→mRNA）の関与

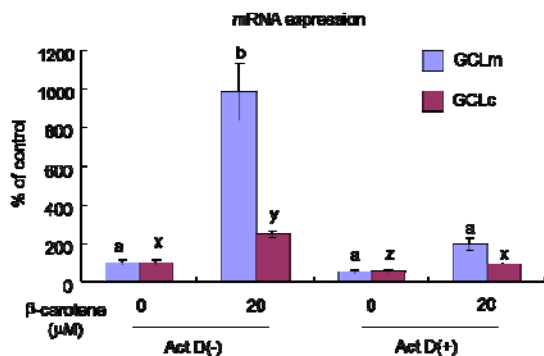


Fig. 3-a Act D 存在下での GCL mRNA 発現に対する影響

転写阻害剤 Act D 存在下では、 β -カロテンによる GCLm ならびに GCLc の mRNA 量増加は、ほぼ消失した (Fig. 3-a)。このことは、 β -カロテンによる GCL mRNA 量増加が“B. 存在する GCL mRNA の分解の抑制”の結果ではなく、“A. GCL mRNA の新生（＝転写）の亢進”の結果であることを示している。

一方、先に記した C~E のように、mRNA 量より下流の段階に対しても、 β -カロテンが作用している可能性が考えられる。そこで、次に β -カロテンによる GCL タンパク質量増加に対する、翻訳阻害剤 CHX ならびに Act D の影響について検討した。

CHX 存在下では、 β -カロテンによる GCLm タンパク質量増加は、完全に消失した

(Fig. 3-b)。このことは、 β -カロテンによる GCLm タンパク質量増加が、“D. 存在する GCL タンパク質の分解の抑制”の結果ではなく、“C. GCL タンパク質の新生（＝翻訳）の亢進”の結果であることを示している。

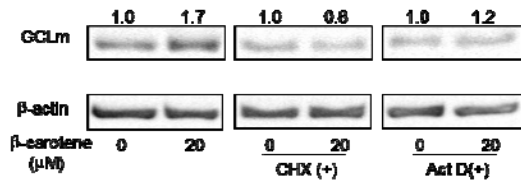


Fig. 3-b CHX, Act D 存在下での GCL タンパク質量

一方、Act D 存在下でも、 β -カロテンによる GCLm タンパク質量増加が、ほぼ消失した。このことは、 β -カロテンによる GCLm タンパク質量増加効果が、“C. GCL タンパク質の新生（＝翻訳）の亢進”そのものを作用点とするのではなく、その上流の、“A. GCL mRNA の新生（＝転写）の亢進”の影響を受けてのものであることを示している。

GCL タンパク質の増加までは、 β -カロテンによる“ A. GCL mRNA の新生（＝転写）の亢進”の影響下にあることが判明したが、E に示したように、GCL 酵素活性自体が直接 β -カロテンの作用を受けている可能性も残されている。そこで、次に、 β -カロテンによる GSH 量増加に対する CHX ならびに Act D の影響について検討した。

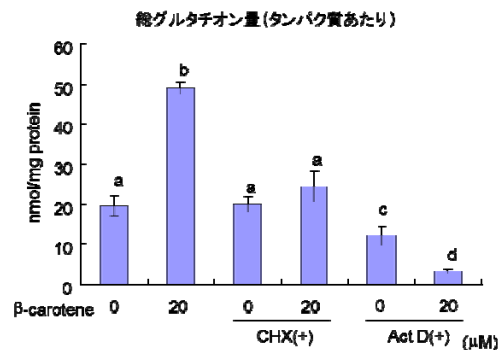


Fig. 3-c CHX, Act D 存在下での細胞内グルタチオン量 (タンパク質あたり)

CHX 存在下では、 β -カロテンによる GSH 量増加は消失した (Fig. 3-c)。このことは、 β -カロテンによる GSH 量増加の効果が、“E. 酵素活性の亢進”をもたらした結果ではなく、“C. GCL タンパク質の新生（＝翻訳）の亢進”の影響下にあることを示している。

Act D 存在下でも、 β -カロテンによる GSH 増加作用は完全に消失した。このことは、 β -カロテンによる GSH 量増加が、“E. 酵素活性の亢進”をもたらした結果ではないことを示した CHX の実験結果を支持すると同時に、やはり、“A. GCL mRNA の新生（＝転写）の亢進”の影響下にあることを示している。

以上のことから、 β -カロテンは、“A. GCL mRNA の新生 (=転写) の亢進”のみをもたらすことにより、GSH 量を増加させるのであって、B~E のポイントは関与していないと結論づけられた。

(4) その他のカロテノイドの作用

β -カロテン以外にも、多種類のカロテノイド分子が存在する。中でも、 β -クリプトキサンチンは β -カロテンと同様の効果を持つものに対して、ルテインはそのような効果を示さないことが明らかとなっている。そこで、本研究では、これら二つについて、GCL タンパク質量に及ぼす影響を検討した。

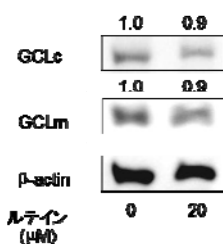


Fig.4-a ルテインがGCLタンパク質に与える影響

まず、ルテインについてであるが、GCLc と GCLm いずれのサブユニットのタンパク質量に対しても影響を及ぼさなかった (Fig. 4-a)。この結果は、ルテインには、GSH 量増加効果がないことを明らかにした過去の研究結果と符合する。

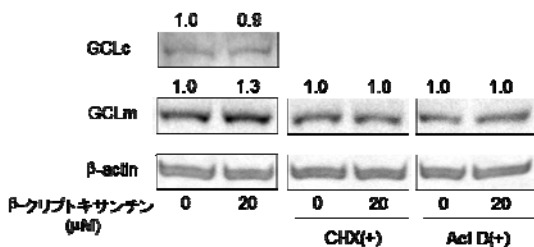


Fig.4-b β -クリプトキサンチンがGCLタンパク質に与える影響

続いて、 β -クリプトキサンチンについてであるが、GCLc タンパク質に対しては効果が検出されなかったが、GCLm タンパク質に対してはわずかに増加効果が検出された (Fig. 4-b)。この結果は、 β -クリプトキサンチンには、GSH 量増加効果があるとした過去の研究結果と符合する。また、 β -クリプトキサンチンによる GCLm タンパク質増加は、CHX や Act D に対して、 β -カロテンの場合と同様の感受性を示した。

これら二種類のカロテノイドを用いた実験結果から、GCL 産生に影響を及ぼした結果として、GSH 量増加をもたらすカロテノイドが存在する一方で、GCL 産生に影響せず GSH 量にも影響を及ぼさないカロテノイドも存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) R. Yamanishi (他 4 名、5 番目)

Ingested quercetin but not rutin increases accumulation of hepatic β -carotene in BALB/c mice., Mol. Nutr. Food Res. (査読有り)、54 巻 S2 号, 2010. pp.S261-S267, DOI:10.1002/mnfr.200900329.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 山西倫太郎、 β -カロテンによる RAW264 マウスマクロファージ細胞抗酸化性亢進のメカニズムに関する研究、日本食品免疫学会第 8 回学術集会、2012 年 10 月 16 日、ヤクルトホール (東京都)

(2) 多田紗也花・赤星哲平・山西倫太郎、カロテノイドがマウスマクロファージ様細胞 RAW264 の GSH 合成系に与える影響、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 20 日、東北大学 (宮城県)

(3) 赤星哲平・多田紗弥加・山西倫太郎、マウスマクロファージ培養細胞 RAW264 における glutamate-cysteine ligase 発現に対する β -カロテンの影響、2012 年度 日本農芸化学会大、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学 (京都府)

(4) Teppe Akaboshi・Rintaro Yamanishi、 β -Carotene enhances glutathione level in RAW264 murine macrophages by up-regulating the expression of glutamate-cysteine ligase., International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2011、2011 年 11 月 14~17 日、ロイトン札幌 (北海道)

(5) 多田紗也花・赤星哲平・山西倫太郎、カロテノイドがマウスマクロファージ様細胞 RAW264 の GSH 合成系に与える影響、第 44 回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会、2011 年 11 月 13 日、岡山県立大学 (岡山県)

(6) 赤星哲平・山西倫太郎、マウスマクロファージ培養細胞 RAW264 細胞におけるグルタチオン合成系に対する β -カロテンの影響、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学 (東京都)

(7) 山西倫太郎、カロテノイドによる免疫調節：抗原呈示細胞内のグルタチオン量と免疫機能に対する影響、第 24 回カロテノイド研究談話会、2010 年 9 月 14 日、徳島大学 (徳島県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 倫太郎 (YAMANISHI RINTARO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・准教授
研究者番号：30253206

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：