

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580164

研究課題名(和文) 分子シャペロンを介した食品成分の生体調節機構

研究課題名(英文) Regulation of physiological functions with food factors via molecular chaperones

研究代表者

村上 明 (Murakami, Akira)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10271412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：ファイトケミカルは種々の生理機能性を示すが、その作用機構については不明な点が多い。以前に我々は、zerumboneの標的分子の1つをKeap1と同定した。しかし同時に、無数のoff-targetタンパク質群も存在することが判明した。そこで本研究ではこの非特異的なタンパク質への結合に着目し、その意義についての解析を進めた。その結果、zerumboneは細胞タンパク質を変性させるが、それが適度である場合は、結果として分子シャペロンを誘導し、オートファジーなどの異常タンパク質分解系を活性化することを見出した。適度なタンパク質ストレスが機能性に寄与することを示したのは本研究が初めてである。

研究成果の概要(英文)：Although phytochemicals have been reported to exhibit various physiological functions, their underlying mechanisms remain to be fully elucidated. We previously identified Keap1 as a target molecule of zerumbone, a major component of Zingiber zerumbet. Concomitantly, however, we also observed numerous binding proteins when cells were exposed to this phytochemical. Thus this study focused on the role(s) of non-specific protein binding in its bioactivities. Interestingly, zerumbone-induced proteo-stress up-regulated the expressions of molecular chaperones and increased autophagy for degradation of abnormal proteins. This is the first study that showed phytochemical-induced proteo-stress has significant and unique roles in their bioactivities.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：zerumbone heat shock protein proteasome autophagy hormesis stress target molecule molecular chaperone

1. 研究開始当初の背景

食品機能性に関する研究の進展は目覚ましく、基礎から応用に至るまで様々な研究成果が報告されている。その一方で、特定保健用食品の市場規模が 2007 年をピークに減少の一途を辿っている。また過剰摂取による副作用の問題等もあり、実際の応用面に関しては種々の問題を抱えているのが現状である。

こうした背景には、作用メカニズムに関する本質的な知見が欠落しているという事実が関連して異物ことは明らかである。薬剤と異なり、食品成分は一般的に多機能性であり、ある一つの分子機構や標的分子が同定されたとしても、他の作用機構の可能性は検討されないことが非常に多い。

2. 研究の目的

上記した背景に着眼し、本研究では食品因子とタンパク質などの生体分子との相互作用に関して、「非特異的な結合」に焦点を絞り、より本質的な作用機構の解明を試みた。このようなアプローチにより、薬剤とは異なる作用性や特徴が浮き彫りにできると考えたからである。

具体的には、東南アジア産ショウガ科植物であるハナショウガ (*Zingiber zerumbet* Smith) 根茎の主成分である zerumbone を用いて、その結合タンパク質の解析を行った。本物質はセスキテルペンの 1 種であり、筆者らはこれまでに、その抗炎症あるいは発がん予防作用を報告している^{1,2)}。

また、zerumbone は炎症関連酵素である cyclooxygenase-2 の発現を mRNA の安定化段階で阻害すること³⁾、および生体防御遺伝子の鍵転写因子である Nrf2 を活性化すること⁴⁾などを見出しているが、標的分子に関する知見は得られていない。

そこで本研究では、標的分子を探索することで細胞内タンパク質への結合特異性を明らかにし、zerumbone の、引いては食品因子の作用機構の新たな特徴を究明することを目的とした。

参考文献

- 1) Murakami A, *et al.*, Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *Int J Cancer*. 2004;110(4):481-90.
- 2) Murakami A, *et al.*, Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the alpha,beta-unsaturated carbonyl group is a prerequisite. *Carcinogenesis*. 2002;23(5):795-802.
- 3) Murakami A, *et al.*, Zingiberaceous and citrus constituents, 1'-acetoxychavicol acetate, zerumbone, auraptene, and nobiletin, suppress lipopolysaccharide-induced

cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 murine macrophages through different modes of action. *J Nutr*. 2005;135(12 Suppl):2987S-2992S.

- 4) Shin JW, *et al.*, Zerumbone induces heme oxygenase-1 expression in mouse skin and cultured murine epidermal cells through activation of Nrf2. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Jun;4(6):860-70.

3. 研究の方法

(1) 分子プローブの調製

Biotin 標識化 zerumbone (BioZER)

Zerumbone (100 mg) を 50%CH₃CN 水溶液に溶解し、1 等量の *N*-bromo succinimide (89.9 mg) を添加し、1 分間攪拌した。析出した 7-bromo-zerumbone の白色粉末を蒸留水で洗浄し、真空乾燥させた。次いで、biotin (123.6 mg) を 2N NaOH 水溶液 (254 μL) に溶解し、乾固させた。dimethylformamide (10 μL) で溶解した後、7-bromo-zerumbone (100 mg) を添加し、16 時間室温で攪拌した。分取 TLC により BioZER を精製した。

Zerumbone 付加体抗体 (Anti-ZER Ab)

Zerumbone (1 g) を CH₃CN (100 mL) に溶解し、2 N HCl 水溶液 (100 mL) を添加した。次に *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, 300 mg) を添加し、72 時間室温で攪拌し、分取 TLC 及び分取 HPLC により精製した。本化合物を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 及び *N*-hydroxysuccinimide (NHS) で keyhole limpet hemocyanin (KLH) に結合させた後、10 日間隔で ICR マウスに免疫を行った。尾部採血により血清を得た後、MelonTM Gel IgG Spin Purification Kit を用いて IgG を精製し、競合 ELISA 法により抗体価を評価した。

(2) 生体防御分子の発現解析

mRNA およびタンパク質発現は、それぞれリアルタイム RT-PCR および Western blot (WB) 法で解析した。

(3) Pull-down アッセイ

100 mm dish に RAW 264.7 細胞を 6x10⁶ cell / 9 ml の密度で培養し、12 時間前培養した。培地を完全に除去し、PBS で洗浄後、BioZER (20 μM) を添加し、30 分間培養した。その後、PBS で洗浄し、lysis buffer (300 μL) を添加した。Lysate を回収後、使用するまで -20°C で保存した。得られた lysate (1313 μg protein) に対して、50% avidin 固定化 agarose slurry in PBS (200 μL) を添加し、4°C で一晩振盪した。PBS を用いて洗浄した後、0.09 N NaOH 水溶液 100 μL を添加し、室温で 1 時間振盪することにより BioZER 結合タンパク質を溶出した。得られた試料は WB で解析した。

4. 研究成果

(1) 結合タンパク質の検出

Zerumbone の構造活性相関に関する以前の研究成果から、COX-2 の抑制及び Nrf2 依存の遺伝子の誘導活性にはその α,β-不飽和カルボニル構造が重要であることが判明していた。そこで、求電子性に富むこの官能基がタ

ンパク質 cysteine 残基のチオール基と共有結合する可能性を想定し (図 1)、結合タンパク質の解析を試みた。

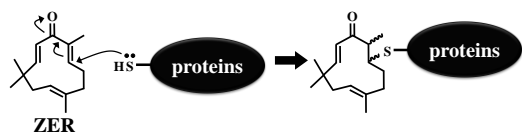


図 1 Zerumbone (ZER) と cysteine チオール基との反応

BioZER と Anti-ZER Ab を調製し、RAW264.7 マクロファージにおける結合タンパク質の検出を試みた。その結果、非常に興味深いことに、数多くの共有結合性タンパク質が検出された (図 2)。また、zerumbone で 30 分間の前処理した細胞を本抗体により免疫染色したところ、付加体に関して特定の局在性は認められず、核内を含む細胞内全体に広く分布していることが明らかとなった (図 3)。以上から、zerumbone と生体タンパク質との相互作用には、選択性の低い非特異的な共有結合が関与することを明らかにした。

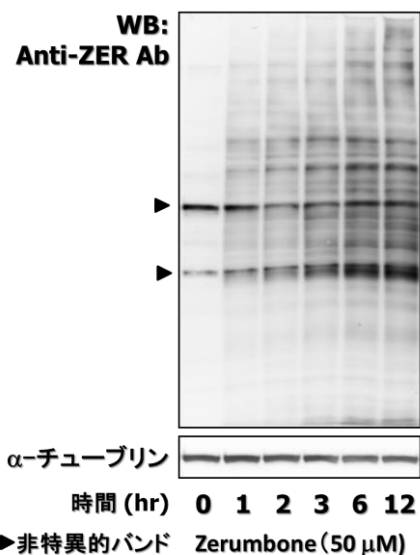


図 2 Zerumbone 付加タンパク質の生成

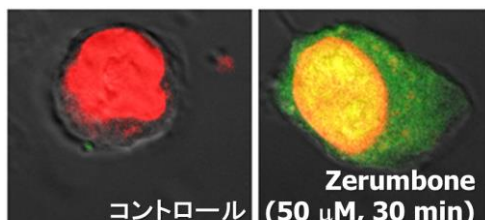


図 3 Zerumbone 付加タンパク質の細胞内分布 (赤: 核、緑: 付加タンパク質)

(2) タンパク質品質管理機構の活性化

次に、zerumbone がタンパク質品質管理機構 (分子シャペロンの誘導や異常タンパク質分解系の活性化) に対する影響を検討した。

マウス肝臓がん細胞 Hepal1c7 を zerumbone で処理し、継時的に HSP40/70/90 タンパク質発現を解析したところ、それぞれの HSP に対して時間依存的な発がん増加が認められた (図 4)。

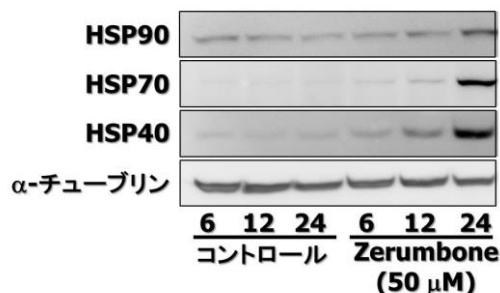


図 4 Zerumbone による HSP タンパク質の増加

次にプロテアソームにおける主要プロテアーゼの 1 種であるキモトリプシンの活性 (図 5 A) とオートファジーにおける分解小器官オートファゴソーム形成の指標である LC3-II のタンパク質発現 (図 5 B) を検討した。その結果、zerumbone は双方の異常タンパク質分解系を共に活性化することが示唆された。

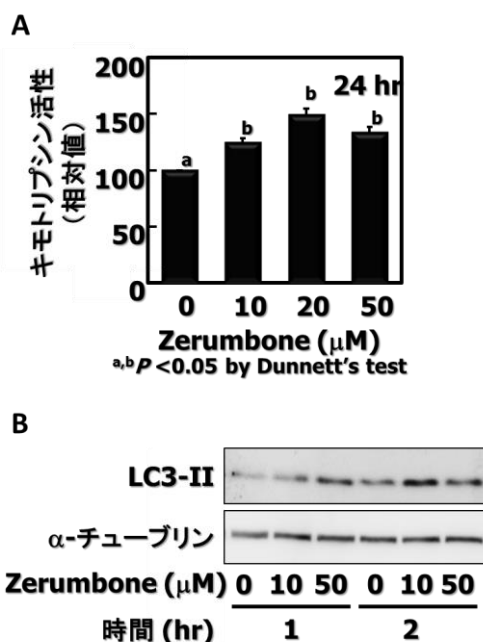


図 5 Zerumbone による異常タンパク質分解系の活性化 (A: キモトリプシン活性、B: LC3-II の発現)

次に、HSP の誘導分子機構について解析した。まず、zerumbone 結合タンパク質は HSP90 によって認識されることが示唆された。これに続き、転写因子 HSF1 (heat shock factor 1) のリン酸化の活性化が起こり、最終的に HSP40 や HSP70 などの誘導型 HSP の遺伝子発現が増加する機構が提示できた (図 6)。

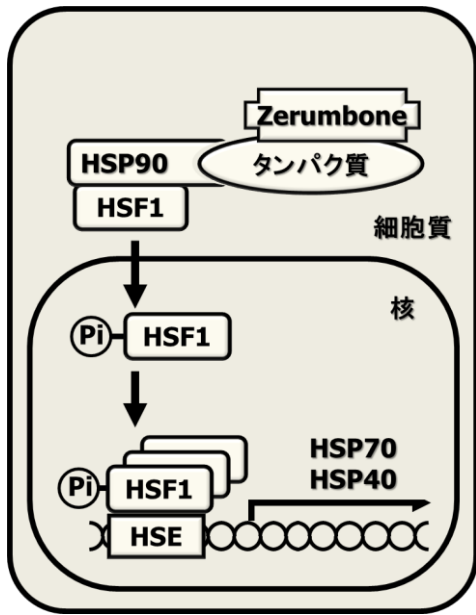


図6 ZerumboneによるHSP誘導分子機構

(3) 熱ストレス耐性の賦与

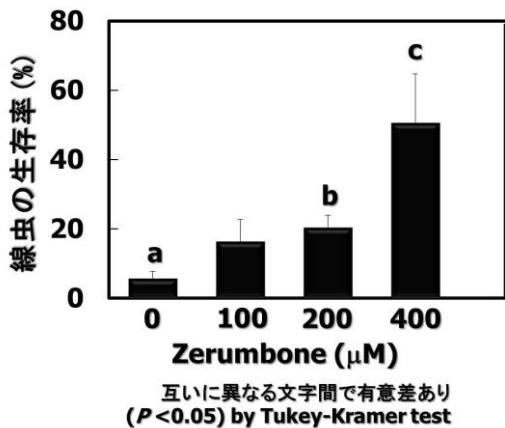


図7 線虫に対する熱耐性の賦与

次に、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を使った熱ストレス耐性試験を行った。様々な濃度の zerumbone で線虫の前処理を3日間行った後、zerumbone を含まない培地において20°C (通常の飼育温度) で飼育した。その後、37°C で1時間の熱ショックを与えたところ、無処理のコントロール群では生存率は10%以下であった。それに対して、zerumbone の前処理群では濃度依存的に生存率が増加した。また、このような熱保護効果はマイルドな熱処理 (33°C, 1時間) でも認められた (データ示さず)。線虫における HSP-3, HSP-16.1, HSP-16.2, HSP-16.41, HSP-70 の mRNA 発現についてリアルタイム RT-PCR 法で解析したところ、zerumbone はマイルドな熱処理と同様、HSP-16.41 の発現を顕著に増加させることが判明した。以上から、zerumbone は HSP-16.41 の発現を増加させることによって熱ストレス耐性を賦与することが強く示唆された。

(4) タンパク質ストレス耐性の賦与

次に、zerumbone と同様、生体タンパク質へ付加することで毒性を示すことが知られている過酸化脂質分解物 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) に対する作用を検討した。まず HNE 付加タンパク質に対する、市販の抗体を用いて、付加反応に対する影響を評価した。その結果、zerumbone で6時間前処理し、その後、18時間は zerumbone を含まない培地で培養後、HNE で1時間処理したところ、HNE によるタンパク質付加反応はほぼ完全に阻止された (図8A)。また、細胞毒性に関しては HNE で処理した場合には50%にまで生存率が低下していたが、zerumbone の前処理では100%近くにまで増加し、HNE の毒性を顕著に緩和する保護作用が認められた。

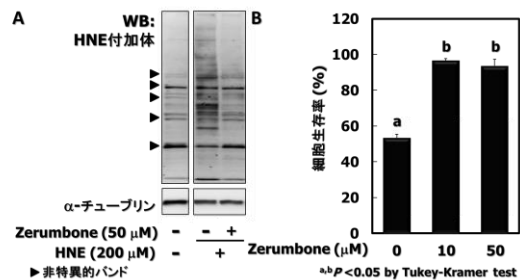


図8 HNEによるタンパク質付加 (A) と細胞毒性 (B) に対する zerumbone の効果

(5) 他の食品因子の HSP70 誘導作用

最後に、上記した生理活性が zerumbone に特異的なのか否かを検討するため食品因子の HSP70 mRNA 発現作用を広くスクリーニングした。その結果、栄養素 (糖類、アミノ酸、ビタミン、ミネラル類総計16種類) のうち顕著な誘導作用を示したのは all-trans retinoic acid と ZnCl₂ のみであった (データ示さず)。それに対して、ファイトケミカル (植物二次代謝産物で様々な機能性を示すことが知られている) を試験したところ高い頻度で誘導活性が検出された (図9)。特にテルペノイドの活性が高く、ヒト血清中に存在するカロテノイドにも誘導傾向が認められた。

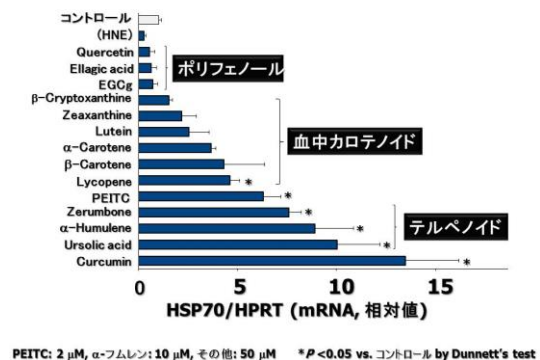


図9 食品成分の HSP70 mRNA 誘導活性スクリーニング

これらのうち、curcumin、zerumbone、phenethyl isothiocyanate (PEITC) は求電子性物

質であり特に高い活性を示した。また、テルペノイドは一般的に分子疎水性が高いことから、本特性と求電子性を有するファイトケミカルの HSP70 誘導能が高いことが示唆された。一方、(4) でタンパク質付加物質として用いた HNE の HSP70 誘導活性はほとんど不活性であった。この原因としては、HNE の分子量が比較的小さく、また付加構造には水酸基が存在するため、zerumbone などと比較した場合に疎水性が低く、付加タンパク質が変性タンパク質と認識されにくいためと推察できる。

(6) 考察

本研究では、zerumbone が生体タンパク質への非特異的相互作用を介して機能性に寄与するというユニークな作用機構の可能性を提示した。このように、適度なストレスが機能性につながるという概念は「Hormesis」と呼ばれている。現在までに、食品因子による hormetic な作用の例としては、sulforaphane (ブロッコリーなどに含まれる) などによる Nrf2 依存的な生体防御遺伝子の活性化が知られている¹⁾が、これも本物質が酸化ストレスを惹起するという側面に深く関連していると考えられる。

さらに、ファイトケミカルと「食用可能な異物」と捉えることによって、サプリメントなどによるその過剰摂取がもたらす副作用が起こる原因も容易に理解できると思われる。実際に筆者らは最近、マウスに対する緑茶ポリフェノールの過剰投与が大腸炎や肝臓・腎臓機能低下を引き起こし、これが生体防御系の破たん^{2,3)}に起因していることを示唆するデータ^{2,3)}を報告している。

今後は、他のファイトケミカルによる非特異的相互作用が既知の様々な機能性に関与するの否かを明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) Turpaev KT., Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(2):111-26
- 2) Kim M, et al., The modifying effects of green tea polyphenols on acute colitis and inflammation-associated colon carcinogenesis in male ICR mice. *Biofactors*, 2010;36(1):43-51.
- 3) Inoue H, et al., High-dose green tea polyphenols induce nephrotoxicity in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by down-regulation of antioxidant enzymes and heat shock proteins expressions. *Cell Stress Chaperon*, 2011;16(6):653-62.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Ohnishi K, Murakami A. (他 13 名, 15 番目), Non-specific protein modifications by a phytochemical induce heat shock response for self-defense. *PLoS ONE*, 2013;8(3):e5864. doi: 10.1371/journal.pone.0058641. 査読有

- ② Ohnishi K, Nakahata E, Irie K, Murakami A., Zerumbone, an electrophilic sesquiterpene, induces cellular proteo-stress leading to activation of ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013 11;430(2):616-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.104. 査読有
- ③ Murakami A. Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals. *J Clin Biochem Nutr*, 2013;52(3):215-27. doi: 10.3164/jcfn.12-126. 査読有
- ④ Murakami A., Ohnishi K., Target molecules of food phytochemicals: Food science bound for the next dimension. *Food Funct.*, 2012;3(5):462-76. doi: 10.1039/c2fo10274a. 査読有

[学会発表] (計 17 件)

- ① 村上 明、プロテオホルミシスを介した食品成分の機能性発現機構、日本薬学会シンポジウム (14 年 3 月 29 日、熊本)
- ② 村上 明、ファイトケミカルによる proteo-stress と hormesis、第 13 回日本抗加齢医学会総会 (13 年 6 月 30 日、横浜)
- ③ A. Murakami, Roles of non-specific interactions of phytochemicals with biological proteins in their bioactivities, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2013, Taipei, Taiwan, Nov.5-9, 2013.
- ④ A. Murakami and K. Ohnishi. Mechanisms underlying food functionality via molecular chaperones: Chemical training hypothesis, The 5th International Conference on Food Factors, Taipei, Taiwan, Nov.20-23, 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ・ホームページ
URL: <http://foodscience.rakurakuhp.net/>

- ・アウトリーチ活動
- ① 村上 明、体に良い食べ物、悪い食べ物を考える食品機能学、兵庫県立兵庫高校にて授業 (2013 年 12 月 20 日、神戸)
- ② 村上 明、食べ物の健康効果を考える食品機能学、兵庫県立兵庫高校にて授業 (2012 年 12 月 20 日、神戸)
- ③ 村上 明、第 46 回日本農芸化学会サイエンスカフェ、野菜の成分は敵か味方か? ~体に良い理由(わけ)を考えよう~ (2012 年 2 月 28 日、京都)

6. 研究組織

研究代表者
村上 明 (MURAKAMI, Akira)
京都大学大学院農学研究科・助教
研究者番号: 10271412