

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012 ～ 2012

課題番号：24658122

研究課題名（和文）

植物成分グルタチオン抱合体の機能性解析と応用

研究課題名（英文） Functional analysis and application of glutathiolated plant products

研究代表者

内田 浩二 (UCHIDA KOJI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40203533

研究成果の概要（和文）：本研究では、Toll 様受容体シグナリングの抑制物質として、植物野菜抽出物のうち、キャベツに強い抑制活性を見だし、さらに活性物質の単離・精製を進めた結果、イソチオシアネート化合物として 3-(methylsulfinyl)propyl isothiocyanate（イベリン）を同定した。さらに、イベリンのグルタチオンおよびタンパク質チオール基との反応性、および抱合体の機能について検討した。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the Toll-like receptor (TLR) signaling inhibitory potential of food-derived small molecules. Based on an extensive screening of *Brassica* vegetable extracts for the TLR-inhibitory activity, we found cabbage as the richest source and identified 3-(methylsulfinyl)propyl isothiocyanate (iberin), an analogue of sulforaphane isolated from broccoli, as one of the major TLR inhibitor in cabbage. We also studied glutathiolation and protein reactivity of iberin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：イソチオシアネート、イベリン、抗炎症性、自然炎症、Toll 様受容体、グルタチオン、グルタチオン化、抱合体、

1. 研究開始当初の背景

グルタチオン抱合体形成（グルタチオン化）は、生物が有する代謝メカニズムの一種であり、低分子化合物を抱合形成により修飾する反応である。例えば、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンのイソチオシアネート基にチオメチル基（CH₃S-）を導入した化合物（スルフォラメート）に強い解毒酵素誘導活性が報告されている（Gerhäuser C. et al., (1997) *Cancer Res.* 57, 272-278）。しかし、この化合物自体も有機合成化学的手法で作られたものであり、機能性食品への用途からはほど遠いことから、今回、グルタチオン化の有用性を検証することで、機能性食品生体素材としての利用が可能になることが

期待できる。

2. 研究の目的

グルタチオン抱合体を形成する低分子化合物のうち、アブラナ科植物に含まれるイソチオシアネート化合物は、イソチオシアネート基（N=C=S）の炭素原子の電子不足からチオール化合物（システインやグルタチオンなど）による抱合反応を受けやすい。申請者らは、これまでに、ワサビイソチオシアネートである 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate のメルカプトエタノールとのチオール抱合体が、もとのイソチオシアネートと解毒酵素誘導などの機能性を同レベルに維持し、またシステインとの交換反応に

より、グルタチオン化イソチオシアネートを化学量論的に生成することなどを見出している。さらに、グルタチオン化イソチオシアネートが、タンパク質のシステイン残基とも反応することを明らかにし、標的タンパク質の解析にも成功している。本研究では、Toll様受容体シグナリングの抑制物質としてキャベツからイソチオシアネート化合物イベリンを単離・同定し、イベリンのグルタチオンおよびタンパク質チオール基との反応性、および抱合体の機能について検討した。

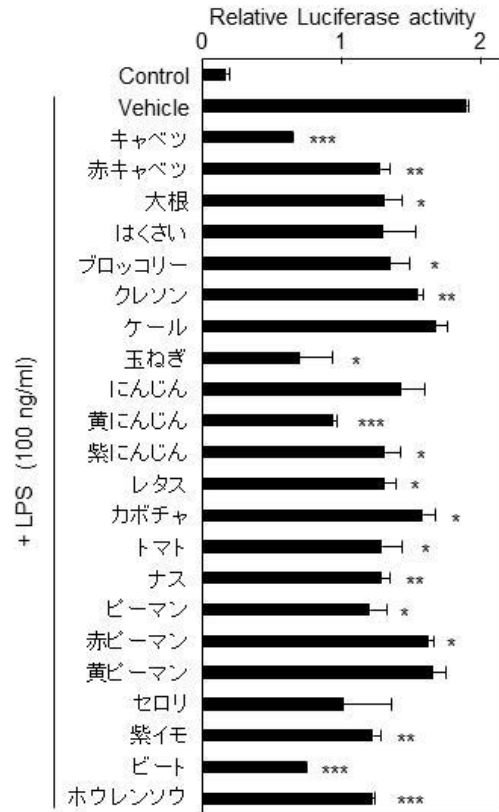
3. 研究の方法

ヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞に、TLR2 遺伝子および NF- κ B プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子が導入されたレポーター遺伝子 (pNF- κ B-MetLuc2) をトランスフェクションすることにより TLR2 安定発現株を作製した。また、HEK293 細胞に TLR4 遺伝子および MD-2 遺伝子、さらにルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入することにより TLR4 安定発現株を作製した。これらの TLR 安定発現株を用いて TLR2 および TLR4 のシグナル経路を抑制する野菜抽出物、野菜成分のスクリーニングを行った。

キャベツからの TLR 抑制物質の単離は HPLC を用いて行い、同定は核磁気共鳴装置やマスマスペクトロメトリーなど種々の機器分析により行った。

4. 研究成果

(1) キャベツからの TLR 抑制物質の単離同定
作製した TLR2 および TLR4 安定発現株に、23 種類の野菜搾汁液のヘキササン抽出画分および酢酸エチル抽出画分を 100 mg/ml となるように 30 分間投与した後、Pam₃CSK₄あるいは LPS を 100 ng/ml となるように投与した。24 時間後にルシフェラーゼアッセイにより NF- κ B の活性化を評価した結果、ヘキササン抽出物においては、どの野菜においても有意な NF- κ B 活性化抑制は確認されなかった。一方、酢酸エチル抽出物においては、いくつかの野菜において強い NF- κ B 活性化抑制が確認されたが、この中でも、キャベツ抽出物に最も強い抑制活性が確認された (図 1)。



*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs vehicle)

図 1. 野菜酢酸エチル抽出物による TLR4 阻害活性の評価

次に、キャベツ抽出物に含まれる TLR シグナル抑制物質を同定するため、キャベツ抽出物を HPLC により 4 分毎に分画し、それぞれの画分を TLR2 および TLR4 安定発現株に 30 分間投与した。その後 TLR リガンド刺激を行い、ルシフェラーゼアッセイにより NF- κ B の活性化を評価したところ、保持時間 16-20 分の画分において TLR2、4 いずれにおいても強い抑制活性が確認された。さらに、保持時間 16-20 分付近に現れる化合物を HPLC によりピーク毎に分画し、各ピークを同様に細胞に投与、リガンド刺激を行い、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、保持時間 15 分付近にみられる 6 番目のピークに強い TLR 抑制活性があることが明らかとなった (図 2)。

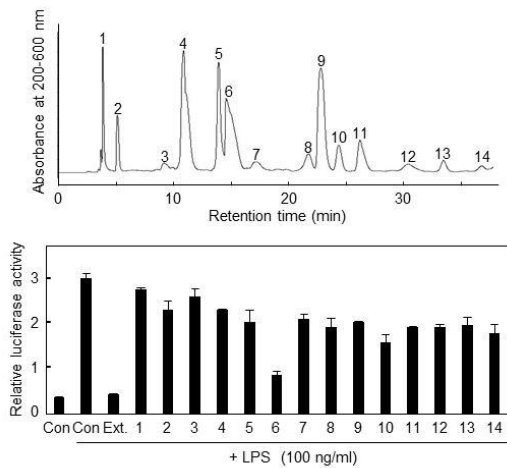


図2. キャベツ酢酸エチル抽出物の HPLC 分析と TLR4 阻害活性の評価

そこで、TLR シグナル抑制活性の見られたピークを HPLC により単離精製し、MS、NMR および IR スペクトルを用いて構造解析を行った。まず、LC-MS による分析の結果、ポジティブイオンモードにおいて質量電荷比 164 のピークが確認されたことから活性物質の分子量は 163 であることが明らかとなった (図 3)。

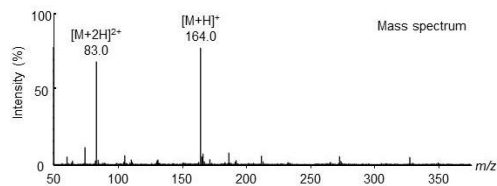


図3. TLR シグナル抑制活性物質の LC-MS 分析

さらに、高分解能 MS (High-MS) を用いてより詳細な分析を行った結果、質量電荷比は 164.01983、活性物質の分子式は $C_5H_9NOS_2$ であることが明らかとなった。また、LC-MS/MS 分析において、分子イオンピーク 164 に対し、質量電荷比が 59 減少した質量電荷比 105 のフラグメントイオンが確認されたこと (図 4) および IR スペクトルにおいて 2091 cm^{-1} および 2180 cm^{-1} 付近に強い吸収が見られたこと (図 5) から、分子内にイソチオシアネート基を有する化合物であることが示唆された。

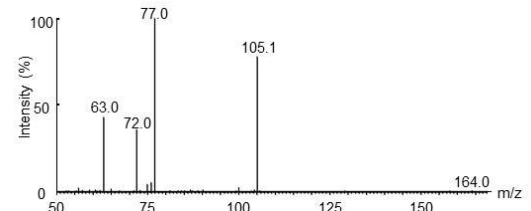


図4. TLR シグナル抑制活性物質の LC-MS/MS 分析

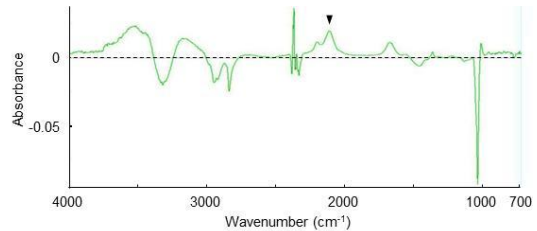


図5. TLR シグナル抑制活性物質の IR スペクトル

また、IR スペクトルにおいて、 1017 cm^{-1} および 1047 cm^{-1} に吸収が見られることからスルホキシド基の存在も示唆された。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定結果から、分子内に 4 種類のプロトンが存在することが示唆された (図 6)。

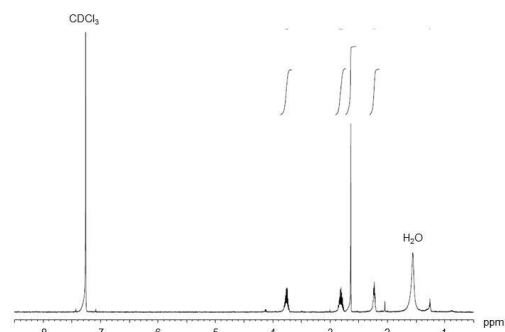


図6. TLR シグナル抑制活性物質の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

そのうち、化学シフト 2.61 ppm のシグナルは積分値が 3 であること、カップリングが見られないことから隣接水素をもたないメチル基由来のプロトンであると考えられた。また、化学シフト $2.77\text{--}2.79\text{ ppm}$ 、 $2.19\text{--}2.21\text{ ppm}$ 、 $3.72\text{--}3.74\text{ ppm}$ のプロトンは積分値が 2 であることからいずれもメチレン基由来のプロトンであり、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ の相関からそれらは互いにこの順で隣接していることが明らかとなった (図 7)。

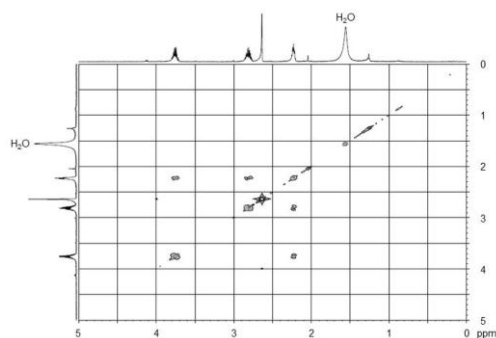


図 7. TLR シグナル抑制活性物質の ^1H - ^1H COSY スペクトル

以上の情報から、分子内に $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ を有すると考えられ、活性物質の構造として 3-(methylsulfinyl)propyl isothiocyanate (イベリン) であることが想定された。実際、イベリン標品との ^1H -NMR による比較を行ったところ、同一のスペクトルが得られた。また、得られた NMR スペクトルは、過去の文献値とも完全に一致することから、活性物質をイベリンと同定した。

(2) チオール化イベリンの TLR 抑制作用

イソチオシアネート基の炭素原子はその電子不足状態から、チオール基のような求核性官能基と反応することが知られている。そこで、イベリンとチオール化合物との反応性についての解析を行った。まずイベリン 1 mM と *N*-アセチルシステイン (NAC) 1 mM を PBS 中 37 °C、1 時間反応させ HPLC および LC-MS 分析を行った。その結果、イベリンと NAC との反応により新たなピークが生成することが確認され、LC-MS 分析の結果から、保持時間 26 分付近のピークがイベリンと NAC の反応物であることが示唆された。しかしながら、NAC とイベリンの分子量が同一であったため、解析が困難であった。そこで、NAC の代わりに還元型グルタチオン (GSH) 1 mM をイベリン 1 mM と反応させ、LC-MS 分析を行った。その結果、イベリンと GSH の反応物と思われるピークが検出された (Peak B) (図 8)。なお、ピーク C についてはイベリンのみを PBS 中でインキュベートしても生成することから、イベリン由来のものであると考えられた。

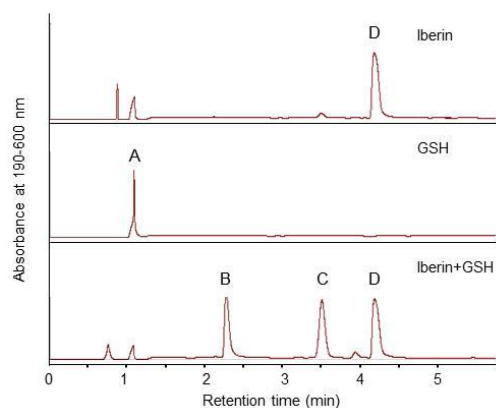


図 8. イベリン-GSH 反応液の HPLC 分析

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 2 件)

1. Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B. A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., and Akaike, T. (2012) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 714-724. 査読有り
10.1038/nchembio.1018
2. Uchida, K. (2013) Redox-derived damage-associated molecular patterns: Ligand function of lipid peroxidation adducts. *Redox Biol.* **1**, 94-96. 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.005>

[学会発表] (計 1 件)

1. 内田浩二、炎症消散作用を示す機能性食品、日本食品科学工学会 産官学交流シンポジウム、平成 24 年 12 月 18 日、東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田浩二 (UCHIDA KOJI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：40203533

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：