

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450165

研究課題名(和文)食品機能性成分の動脈硬化症予防作用と、ライブイメージングによる作用点の解析

研究課題名(英文) The study about intracellular target proteins of food factors and prevention of arteriosclerosis

研究代表者

深尾 友美 (Fukao, Tomomi)

お茶の水女子大学・基幹研究院・研究院研究員

研究者番号：20470172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化は、動脈壁における脂質の蓄積によって起こる慢性炎症性疾患であり、過剰に惹起される炎症の抑制が予防と治療に重要である。我々はガーリック香気成分diallyl trisulfide (DATS)などの食品機能性成分が動脈硬化症の発症や進展を予防すると考え、DATSの生体内標的分子の同定と生理活性発現機構の解析を行った。その結果、DATS標的分子として4つのタンパク質を新たに見出し、いくつかの食品成分については同条件でそれが起きないことを明らかにした。DATSは標的タンパク質のジスルフィド結合形成を促進し、それにより生理機能を発現すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Some sulfur-containing compounds in foods have known to change and/or protein disulfide bond(s) by the oxidative modification of cysteine residues of intracellular specific protein(s). In this study, to understand the molecular mechanisms of physiological effects by diallyl trisulfide (DATS) and the other sulfur-containing compounds, intracellular target proteins contributing to the expression of physiological function by DATS were explored by the detection of the protein disulfide bond formation with the based on Redox two-dimensional-PAGE (Redox 2D-PAGE). As a result, four proteins as intracellular target proteins of DATS were detected with Redox 2D-PAGE and identified by LC-MS/MS, successfully. The disulfide bonds should be formed within these proteins by treatment of DATS, and the conformations of these proteins were changed. These specific and chemical reaction caused by DATS were thought to be the expression of physiological functions of DATS.

研究分野：食品機能性化学

キーワード：ガーリック 食品機能性成分

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

我が国の死因の第一位は悪性新生物であるが、続く第二位、第三位には心疾患、脳血管疾患といゆる「動脈硬化性疾患」が並ぶ。両者を合計すると第一位に迫る死亡率を示し、高齢化社会にあつては動脈硬化の予防は重要な課題である。動脈硬化は動脈壁における脂質の蓄積が引き金となって生じる慢性炎症性疾患で、その初期には全身の免疫担当細胞である単球の血管外への遊走と血管内膜への浸潤、マクロファージへの分化、泡沫化など免疫担当細胞によるドラスティックな変化が起こる。

一方、ガーリックは古くから薬用効果を期待して食されてきた歴史がある。申請者らを含む国内外の研究グループは機能性成分としてガーリックの加熱調理により生じるオイル状の化合物 diallyl trisulfide (DATS, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{-SSS-CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) を報告した。DATS は、薬剤誘導性肝炎モデルの抑制、カラギーナン誘発炎症モデルの抑制、マクロファージ様細胞の過剰炎症の抑制など、とりわけ抗炎症に関わる効果を示す。このことは、DATS の摂取が動脈硬化を予防することを示唆するが、研究開始当初までに報告はない。

2. 研究の目的

申請者はガーリック香気成分 diallyl trisulfide (DATS) やショウガ辛味成分 6-shogaol などの食品機能性成分が示す抗炎症作用により、動脈硬化症の発症や進展を予防すると考えた。そこでこれらの食品成分を例に挙げ、動脈硬化症の新規予防・治療法の開発とその応用を目的として、食品機能性成分が動物に及ぼす影響や、生体内標的分子の同定と生理活性発現機構の解析を行う下記の研究を立案した。これにより DATS をはじめとした機能性含硫成分の生理機能発現メカニズムの理解に繋げようと考えた。

(1) 食品機能性成分の生体内標的分子の同定と生理活性発現機構の解析

(2) 動脈硬化モデルマウスを作成し食品機能性成分が病態発症を予防・改善するか調べる

(3) 食品機能性成分を摂取した動脈硬化モデルマウスのライプイメーシング解析

3. 研究の方法

(1) ガーリック香気成分 DATS の標的分子の同定と生理活性発現機構の解析

ガーリック香気成分 DATS が生理活性を発現するメカニズムのひとつとして、細胞内の特定のタンパク質のシステイン残基への直接的な酸化修飾により、タンパク質の立体構造の変化をもたらすと考えられる。そこで標的タンパク質への結合によるジスルフィド結合変化を検出するために、Redox

2D-PAGE 法を用いて、DATS の生理機能の発現に寄与する細胞内標的タンパク質を探索する。

ラット正常肝由来 RL-34 細胞あるいはヒト肝がん由来 HepG2 細胞をディッシュに播種し、DATS または Control として DMSO を添加した。経時的に細胞を回収し、サイトゾル画分を抽出した。得られた抽出液を非還元状態で一次元目の電気泳動を行い、同ゲルを還元剤で処理して二次元目の電気泳動を行う。ジスルフィド結合状態が変化したスポットを切り出し、LC-MS/MS とデータベースを用いたソフトウェア解析によりタンパク質を同定、標的タンパク質候補とする。Western Blot 法により、標的タンパク質候補のジスルフィド結合形成を確認した。HepG2 細胞においては細胞内総 GSH 量の経時的測定を行う。

(2) DATS 摂取が動脈硬化モデルマウスの病態発症を予防・改善するか調べる

ガーリック香気成分 DATS が動脈硬化モデル動物の病態に及ぼす影響を明らかにする。ヒト動脈硬化症を反映したモデル動物である自然発症アポ E 欠損高脂血症マウス (C57BL/6.KOR/Slc -Apoeshl) に DATS を摂取させ、DATS 摂取が動脈硬化症の病態を抑制するか調べる。

(3) DATS を摂取した動脈硬化モデルマウスのライプイメーシング

自然発症アポ E 欠損高脂血症マウスに深麻酔を施し、蛍光プローブ化した DATS および蛍光標識した単球を尾静脈から投与して生体内ライプイメーシングを行う。動脈硬化巣でみられる血管外遊走メカニズムに対する DATS 投与の影響を明らかにする。

4. 研究成果

Redox 2D-PAGE 法を用いて、DATS の生理機能の発現に寄与する細胞内標的タンパク質を探索した。細胞培養液に DATS を 20 ~ 80 μM で添加し一定時間経過後、Redox 2D-PAGE を行った。対角線外にスポットとして現れるタンパク質を LC-MS/MS 解析により同定した。その結果、DATS の標的タンパク質候補として、用いた培養細胞において HMG-CoA synthase 1 (HMGCS1) と Protein kinase, cAMP-dependent regulatory, type γ (PRKAR1A) を、HepG2 細胞において HMGCS1, PRKAR1A, Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), Glutathione reductase (GR) を同定した (図 1)。

これらのタンパク質について非還元 Western Blot を行った結果、同定されたタンパク質全てで高分子領域のバンドが増加し、複合体の形成が示唆された (図 2)。バンドは添加 5 分で最も濃く、時間の経過に従い減少

したことから、可逆的な反応であると考えられる。

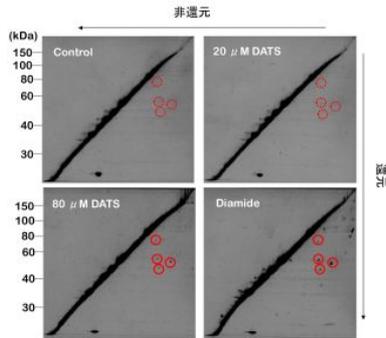


図 1. DATS を添加した細胞の Redox-2D PAGE. 還元および非還元状態で SDS-PAGE を行ったとき、ジスルフィド結合状態が変化するタンパク質は対角線上から外れる。そのスポットを4つ同定し、DATS 添加でその量が変化することを明らかにした。

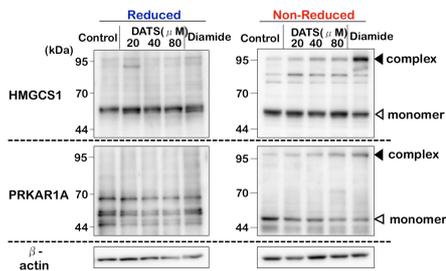


図 2. DATS を添加した細胞の還元および非還元 Western Blotting. 95kDa 付近の高分子領域のバンドが DATS 処理および酸化剤 Diamide 処理により濃くなった。それぞれ HMGCS1 と PRKAR1A のジスルフィド結合による複合体の形成と考えられる。

上記の検討で標的分子候補となった GCLC と GR は、それぞれ GSH 合成と抗酸化に関するタンパク質である。そこで細胞内の総 GSH 量の測定を行った (図 3)。その結果、DATS 添加後 1 時間から 6 時間で Control に対し細胞内総 GSH 量が増加傾向を示した。DATS は GCLC や GR に作用し、一時的に細胞内総 GSH 量を増加させることで、生体内防御の役割を担っていることが示唆された。

続いて、他の機能性含硫成分であるワサビ由来 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate、ブロッコリー由来 Sulforaphane、ショウガ由来 6-Shogaol を用いて同様の実験を行った (図 4)。DATS 処理と 6MITC, Sulforaphane, 6-Shogaol 処理を比較すると、HMGCS1,

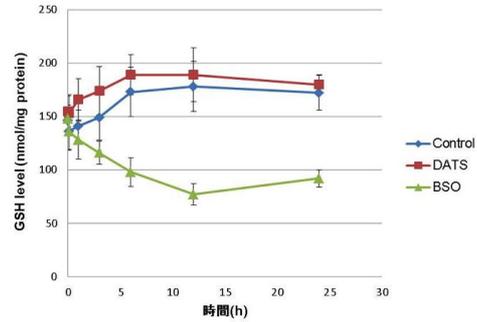


図 3. DATS を添加した細胞における細胞内 GSH 量の経時的変化

PRKAR1A に対応する位置にはスポットは見られなかった。DATS 処理で 80 kDa 付近に見られる GCLC は、他の化合物の処理においても見られるが、DATS 処理に比べてスポット強度は弱かった。その他、未同定のスポットが得られた。このように、処理する食品機能性成分によって結果が異なった。本研究では DATS 処理でジスルフィド結合形成が起こることが判明している実験条件に合わせて行ったが、他の食品機能性成分についても生理活性を示す先行研究は多数ある。これらの食品成分についてはジスルフィド結合形成変化を伴わないが、効果を示す時間や濃度が異なることが示唆された。今後、

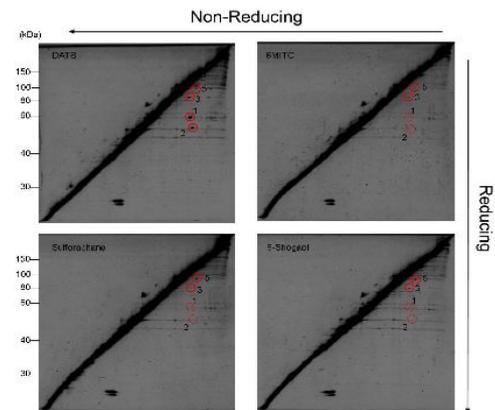


図 4. DATS および他の食品機能性成分を添加した細胞の Redox-2D PAGE.

LC-MS/MS によるタンパク質の同定や、タンパク質発現量の検討を進め、これらの点についても明らかにしていく必要である。

本項目では、DATS の標的候補として4つのタンパク質を新たに見出した。これは DATS がこれらのタンパク質のジスルフィド結合形成を促進し、立体構造を変化させることを示している。この立体構造の変化により生理機能が発現すると考えられる。

上述の(2), (3)の検討項目については、動物飼育に必要なスペースの制限や手技的な問題が生じ、その代替としてマウス組織を使った検討を行ったが、研究期間内には十分な成果を得られなかった。

以上、本研究により、ガーリック香気成分 DATS の標的分子を新しく見出した。しかしながら、DATS 摂取が動脈硬化モデルマウスの病態発症を予防・改善するか否かについてはじゅうぶん明らかにするに至らなかった。今後は DATS が動脈硬化症の予防作用を示すか否かに重点を置いた検討や、そのメカニズムの解析を進める必要がある。

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3件)

Suda S, Watanabe K, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T. Identification of molecular target of diallyl trisulfide in leukemic cells. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. (査読有り) 78. 2014 年. 1415-1417. doi: 10.1080/09168451.2014.921563.

Watanabe K1, Hosono T, Watanabe K, Hosono-Fukao T, Ariga T, Seki T. Diallyl trisulfide induces apoptosis in Jurkat cells by the modification of cysteine residues in thioredoxin. (査読有り) 78(8). 2014 年. 1418-1420. doi: 10.1080/09168451.2014.921564.

深尾友美、森光康次郎. 機能性含硫成分と生理機能性について. (査読なし)日本栄養士会雑誌 56(8) 2013 年. 11-13. https://www.dietitian.or.jp/jdainfo/images/mokuji_56_08.pdf

[学会発表](計11件)

深尾友美. ガーリック由来香気成分の機能性と標的タンパク質の同定. 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会、2014年8月21日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)

小俣貴子、深尾友美、細野崇、森光康次郎. ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide により細胞内ジスルフィド結合形成するタンパク質の探索. 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会、2014年8月21日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市).

小林克也、沈燕、細野(深尾)友美、細野崇、関泰一郎. シナモン熱水抽出物に

よる ACSL1 発現制御および2型糖尿病改善効果.

第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月31日、酪農学園大学(北海道・札幌市)

沈燕、小林克也、細野(深尾)友美、大嶋みづき、定村祐加子、高西真貴子、原田彩絵子、細野崇、関泰一郎. シナモン熱水抽出物は脂肪細胞での ACSL1 発現量を抑制して抗糖尿病作用を示す. 日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(東京都)

小俣貴子、深尾友美、細野崇、森光康次郎. ガーリック香気成分 diallyl trisulfide により細胞内ジスルフィド形成するタンパク質の探索. 第18回日本フードファクター学会学術集会、2013年11月9日-10日、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都)

深尾友美、西村安澄、松田悠、小俣貴子、細野崇、森光康次郎. ガーリック香気成分 diallyl trisulfide によるヒト胃癌細胞増殖抑制機構の解析第86回日本生化学会大会、2013年9月11日-13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

沈燕、小林克也、細野(深尾)友美、細野崇、関泰一郎. シナモン熱水抽出物は脂肪細胞の ACSL1 発現量を低下させてエネルギー代謝を亢進させる. 第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月25日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

細野崇、木村広慈、久保瞳美、山崎祥一、内田真弓子、細野(深尾)友美、関泰一郎. ガーリック香気成分 diallyl trisulfide は CYP2E1 を阻害し、アセトアミノフェン誘導肝障害を抑制する. 第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月26日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

細野(深尾)友美、西村安澄、細野崇、森光康次郎. ガーリック香気成分 diallyl trisulfide が示す抗がん作用のプロテオーム解析. 第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月26日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

森光康次郎、大賀智世、深尾友美、久保田紀久枝、石田正彦. 加工時に黄変しない新形質ダイコンとそのスプラウトの生理機能性について. 日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月26日、東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

木村広慈、内田真由子、久保瞳美、山崎祥一、日吉滉平、今井孝俊、渡辺師成、深尾友美、有賀豊彦、細野崇、関泰一郎. ガーリック由来 diallyl trisulfide によ

るアセトアミノフェン誘導性肝障害の抑制
日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月
26 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県・
仙台市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

深尾 友美 (HOSONO-FUKAO, Tomomi)

お茶の水女子大学・基幹研究院・研究院研
究員

研究者番号 ; 20470172