

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450156

研究課題名(和文) プロテオホルミシスを介したファイトケミカルの生理機能調節機構

研究課題名(英文) Mechanisms underlying physiological functions of phytochemicals via proteo-hormesis

研究代表者

村上 明 (Murakami, Akira)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：10271412

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)：ポリフェノールに代表される植物由来の健康成分はファイトケミカルと呼ばれている。これらは抗肥満作用や抗がん作用など様々な生理機能性を示すことが見出されているがその作用メカニズムには不明な点が多い。本研究課題では、「ファイトケミカルが細胞のタンパク質へ負荷をかけるがそれが適度な場合はタンパク質品質管理機構が活性化し、結果的に抗炎症作用の発現に繋がる」という全く新しい作用メカニズムを初めて示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Phytochemical, including polyphenols, have been shown to exhibit various physiological functions. For instance, there is ample evidence that phytochemicals have anti-obesity and anti-cancer effects in cellular and rodent models while the mechanisms underlying those functions are still unclear. In this study, a novel and unique mechanism has been found, i.e., several phytochemicals may exhibit proteo-stress properties towards cellular proteins, which may activate protein quality control systems and thereby showing anti-inflammatory functions in a cellular model.

研究分野：食品機能学

キーワード：ファイトケミカル 作用機構 抗炎症作用 適応応答 ゼルンボン クルクミン ホルミシス ストレス

1. 研究開始当初の背景

ポリフェノールに代表されるファイトケミカル (phytochemical) は、植物の二次代謝産物である。これまでの多くの研究でこれらの化合物は、抗肥満作用、抗がん作用、抗高血圧作用など多彩な生理作用を持つことが細胞実験や動物実験で報告されてきた。

しかし、その作用機構に関しては、これらの疾病発症機構に関連する遺伝子の発現調節、あるいはその上流に位置する転写因子やタンパク質リン酸化酵素群の活性制御など間接的な知見が多い。また、近年ではケミカルバイオロジー的な実験手法が開発され、標的分子もいくつか同定されているが作用機構の包括的な理解が充分であるとは言えないのが現状である。

こうした背景下、著者らは最近、ファイトケミカルのユニークな作用機構の存在を提唱しつつある。東南アジア産ショウガ科植物のゼルンポンはセスキテルペンの1種であり、顕著な抗炎症および抗発がん作用を有する¹⁾。本物質の標的分子を探索したところ、生体防御系の活性化に必要な Nrf2 の制御因子である Keap1 を同定した。その一方で、ゼルンポンは細胞タンパク質に対して非特異的に結合することで、「タンパク質ストレス (proteo-stress)」を与えることが判明した。さらに興味深いことに、proteo-stress が適度な範囲に収まっている場合は、それに対する適応応答であるタンパク質品質管理機構 [protein quality control system, PQC システム: heat shock protein (HSP) や autophagy の誘導など] の活性化が起こることを見出した²⁾。こうした proteo-stress を介した、ファイトケミカルの新しい作用機構を筆者らはプロテオホルミシス (proteo-hormesis) と呼ぶことを提唱している。

2. 研究の目的

近年、PQC システムの維持や活性化が肥満やがんなどの生活習慣病の予防や老化の遅延に寄与する可能性が注目されている³⁾。重要なことに、ゼルンポンは proteo-stress を細胞に負荷することで HSP40/HSP70 や autophagy を誘導する^{2,4)}。従って、ゼルンポンの生理機能性発現機構に proteo-stress やそれに起因する PQC システムの活性化が関与する可能性が想定できる。

また、ゼルンポン以外のファイトケミカルが proteo-stress を示すか否か、あるいは実験動物に経口投与した際の消化管粘膜での proteo-stress 誘導性の有無については不明である。さらに、一般的にはストレスに対する防御能は加齢と共に減弱するが、ファイトケミカルによる PQC システムの活性化と加齢との相関性についてはほとんど知見がない。

以上を踏まえ、本研究では下記の課題に取り組むことを目的とした。

(1) ゼルンポンの抗炎症機構における

proteo-stress の役割の解明

- (2) マウス消化管におけるファイトケミカルの proteo-stress 誘導活性の検討
- (3) 線虫の世代と HSP 誘導能の相関についての検証

3. 研究の方法

(1) ゼルンポンの抗炎症機構における

proteo-stress の役割の解明

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に、熱ショック (42°C, 1 hr) やゼルンポン処理による proteo-stress を与えた。Proteo-stress 誘導活性については、タンパク質凝集体の生成を評価できるフィルタートラップ法を用いて行った。RAW264.7 細胞をリポ多糖で処理し、炎症マーカーとして、一酸化窒素 (NO) 産生量をグリース法で、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS)、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、インターロイキン (IL)-1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF)- α の発現はリアルタイム RT-PCR (mRNA) およびウエスタンブロット (WB) 法で評価した。Proteo-stress の重要性を示すため、RAW264.7 を予め N-アセチル-L-システイン (NAC、タンパク質のシステイン残基との結合を競合阻害することが想定できる) あるいは、フェニル酪酸 (PBA、分子シャペロンの1種で proteo-stress 緩和作用がある) で処理し、NO 産生に対する影響を検討した。さらに、PQC システムの鍵転写因子である熱ショック因子 1 (HSF1) の活性化はその核内移行を WB 方で検討した。また、HSF1 の重要性を示すため、特異的 siRNA を用いてその発現を低下させ、その際のゼルンポンの抗炎症作用を評価した。

(2) マウス消化管におけるファイトケミカルの proteo-stress 誘導活性の検討

(i) *in vitro* 実験

雄性 ICR マウス (6 週齢) の小腸粘膜を回収し、20 mg タンパク質/ml PBS になるよう調製した。クルクミン (CUR), (-)-エピガロカテキン-3-ガラート (EGCG), ファルカリノール (FAL), リスベラトロール (RES), ウルソール酸 (UA), ゼルンポン (ZER), シンナムアルデヒド (CIN), ジアリルトリスルフィド (DATS), エラゲ酸 (EA), α -フムレン (HUM), フェネチルイソチオシアネート (PEITC), ケルセチン (QUE) は最終濃度 1 mM で添加し、37°C で 6 hr 加温した。試料から界面活性の弱いバッファーで抽出し得られたタンパク質溶液を可溶画分 (soluble fraction, SF) とし、不溶性画分 (insoluble fraction, IF) を再度抽出し、それぞれの画分のタンパク質量を行い、IF/SF 比をタンパク質変性の指標とした。

(ii) *in vivo* 実験

雄性 ICR マウス (6 週齢) に CUR, DATS, PEITC, RSV、および ZER を 10 mg/kg 体重の要領で胃内強制投与し、3 hr 後、胃、小腸 (上部と下部に二分した) および大腸粘膜を回収した。粘膜タンパク質は (i) と同様な方法

で IF と SF に分画し、それぞれにおけるハウスキーピングタンパク質 (α -tubulin, β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) の存在量の比較により proteo-stress 活性を評価した。

(3) 線虫の世代と HSP 誘導能の相関についての検証

(i) 基本操作：線虫 (野生体 N2) および餌として用いた大腸菌 (OP50 株) は、松本晋也博士 (京都女子大学家政学部) よりご供与頂いた。線虫の植え継ぎは 5 日に一回程度行い、顕微鏡で見ながら、新しいプレートにピッカーで成虫を 4 匹移した。

(ii) 同調培養：成虫が存在するプレートから S-basal で線虫を回収し遠心後、上清をパスツールピペットで除き約 0.5 ml の懸濁液を残した。ここに 5 ml の S-basal を添加した。NaClO 50 μ L、水 450 μ L、10N NaOH 100 μ L を混合し、遠沈管に加え、振とう機を用いて 10 min 転倒混和させた。その後、線虫が溶解しているのを確認してから 1,500 rpm で 1 min 遠心し、上清を除いた。洗浄後、残りの S-basal 中に浮遊した卵を、20 で一晩静置して孵化させた。この時、孵化した L1 幼虫が窒息しないように、遠沈管は横向きにして置いた。孵化した L1 幼虫を、餌を塗布した 100 mm ディッシュに移し、この日を Day 1 とした。

(iii) 運動性の測定：マイクロチューブから線虫の懸濁液 (200 μ L) を 96 ウェルプレートへ移し、1 min 間の運動性を顕微鏡で計測した。線虫が体を半分折り返した状態を 1 bend としてカウントした。

(iv) RT-PCR：線虫を S-basal で回収し、1.5 mL チューブへと移した。軽く遠心し出来るだけ上清を取り除き、1 min ホモジナイズした。ここに TRIzol (750 μ L) を加え、total RNA を回収した。内部標準には Y45F10D を用い、各 primer 配列は以下の通りである。

Y45F10D (F: GTCGCTTCAAATCAGTTCAGC, R: GTTCTTGTC AAGTGATCCGACA), HSP16.1 (F:

GTCACCTTACC ACTATTTCCGTC CAGCTCA ACGTTC, R: CAACGGGCGCTTGCTGAATTGGAATAGATCTTCC), HSP16.2 (F:

CTGCAGAATCTCTCCATCTGAGTC, R: AGATTCGAAGCAACTGCACC), HSP16.41 (F: ATTGGGGAGATTGTAAATGATG, R:

GCGTTTCAAGTATCCATGTTCC), HSP70 (F: GAAAGGTTGAGATCCTCGCC, R:

CATCGAAACGTCGTC CAATC)。また PCR は以下の温度設定で行った：95°C-15 sec/60°C-30 sec/72°C-30 sec。

4. 研究成果

(1) ゼルンボンの抗炎症機構における proteo-stress の役割の解明

まず、RAW264.7 マクロファージを熱処理

(43°C, 0, 15, 30 min) あるいはゼルンボン処理 (0, 50 μ M, 12 hr) したところ、前者ではユビキチン (Ub) 化タンパク質、後者ではそれに加えてゼルンボン付加体を含むタンパク質凝集体の量が増加することをフィルターアッセイで確認できた。

次に、細胞を NAC あるいは PBA で前処理し、その後、ゼルンボンを加えた際の Ub 化凝集タンパク質の発現量や LPS による COX-2/iNOS の発現抑制作用を評価した。その結果、NAC の前処理では Ub 化凝集タンパク質が顕著に減少し、またその際のゼルンボンの抗炎症作用 (COX-2/iNOS の発現抑制作用) はほぼ完全にキャンセルされた。また、PBA の前処理でも NAC ほど明確ではないものの Ub 化タンパク質やゼルンボン付加体を含む凝集体の生成は抑制され、また抗炎症作用も一部減弱した。この結果から、ゼルンボンによる proteo-stress 作用がその抗炎症作用の一部寄与していることが強く示唆された。

次に、PQC 機構の鍵転写因子である HSF1 に着目し、その核内移行を WB 法で評価したところ、ゼルンボンは陽性対照として用いたゲルダナマイシンと同様に核内移行を促進し、同時に HSF1 の標的分子である HSP70 の発現量も増加させた。さらに、HSF1 の発現量を siRNA によって低下させた細胞では、ゼルンボンの有する iNOS と IL-1 β の発現抑制作用が減弱した。

従って、ゼルンボンは熱ショックと同様に proteo-stress を介して HSF1 を活性化させ HSP などの PQC 分子の発現量を増加させ、またこれが抗炎症作用に関与するというユニークな作用機構が提唱できた。

(2) マウス消化管におけるファイトケミカルの proteo-stress 誘導活性の検討

CUR では、小腸上部における α -tubulin、 β -actin および GAPDH のタンパク質量が、PEITC でも α -tubulin と β -actin の存在量が SF で有意に減少していた。一方、IF に関して、各タンパク質量はコントロール群と有意な差異はなかった。これらのファイトケミカルがタンパク質の de novo 合成を阻害することで SF における存在量を低下させた可能性は否定できないが、処理時間が 3 hr であることを考慮しても、粘膜タンパク質を変性させることによって、autophagy や ubiquitin-proteasome 系の活性化による異常タンパク質の分解系を活性化した可能性もあり非常に興味深い結果であると思われる。

また、小腸下部や大腸ではこうしたタンパク質変性作用と推察される現象は観察されなかったことから、消化管粘膜における被変性作用には差異があることが示唆された。CUR⁵⁾ や PEITC のようなイソチオシアネート類⁶⁾ は解毒代謝を受けやすく、血中濃度は極めて低いことが知られている。従って、これらの未変化体の存在量が比較的多いと思われる小腸上部においてのみタンパク質変性

作用と推察される結果が得られたことは合理的であると考えている。

次に、最も顕著な作用を示した CUR に着目し、小腸上部粘膜における HSP 類の発現を WB 法で解析した。CUR を 0, 2, 10 mg/kg 体重の用量で経口投与し上と同様に 3 hr に回収した粘膜中の HSP27/40/70 の存在量を検討したところ、SF および IF における HSP27 の存在量が CUR の用量依存的に増加していた。HSP27 を含む HSP は変性タンパク質の構造修復や変性タンパク質凝集体の分解に関与することが報告されている。また、HSP はタンパク質変性ストレスが引き金となって誘導されることも知られている。従って、CUR の経口投与によって HSP27 の発現量が増加した結果は本化合物が消化管粘膜において proteo-stress 作用を示すことを強く示唆している。

(3) 線虫の世代と HSP 誘導能の相関についての検証

線虫を同調した後、1日、4日、7日、あるいは10日培養した線虫を用意した(それぞれ、Day-1、Day-4、Day-7、Day-10 線虫をそれぞれと称する)。それぞれの世代の線虫を2群に分け、無処理群 (NT, non-treatment) では 20 で 24 h 培養した。もう一群は温和な熱処理 (33 60 min; 以後、これを熱トレーニングと称する; HT, heat training) を行い、その後 20 にて培養した (24 h)。その後、NT 及び HT 線虫に強い熱ショック (37 30 min; HS, heat shock) を与え、再び 20 に戻し、運動性を経時的に測定した。各日齢の線虫において Area Under Curve (AUC) 値を算出したところ、加齢に伴う熱耐性の減少が認められた(それぞれ +1750、+2167、+790、+512)。その一方で、Day 1 と Day 4 を比較すると、熱耐性は加齢と共に増加していき (+417)。これは、線虫は Day 4 までは細胞分裂の盛んな成長期にあるため、加齢に伴い防御機構が増強し、ストレス応答が活性化した結果ではないかと推察している。

次に、老若それぞれのモデル線虫に対し HT 処理を行い、誘導される HSP mRNA 量を検証、比較した。Day-4 及び Day-10 線虫をそれぞれ S-basal で回収し、この懸濁液を 0.5 mL ずつ 2 群に分けた。NT 群は 20 で培養した (6 h)。HT 群は HT 処理を行った後、20 にて培養した (6 h)。これを回収し、リアルタイム RT-PCR 法により HSP mRNA 量を解析した。その結果、Day-4 線虫において、各種 HSP (16.1, 16.2, 16.41) に関し、HT により 1000 倍以上の顕著な HSP mRNA の誘導が認められたが、Day-10 線虫においてこの誘導能は消失していた。この結果は、ストレス応答における HSP mRNA の誘導能が加齢に伴い低下することを示唆している。

【総括】

以上の研究成果から、ゼルンボンやクルク

ミンなどのファイトケミカルがプロテオホルミシスを介して生理作用を発現する可能性が提示できたと考えている。ファイトケミカルは元来、ヒトを始めとする動物にとっては異物 (xenobiotic) であり、こうした適応機構を誘起する現象は驚くことではないと考えている。今後は、本作用機構がどのようなファイトケミカルのどのような既知の生理作用にまでに寄与しているかを明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) Murakami A. Forum Nutr., 2009;61:193-203.
- 2) Ohnishi K, et al., PLoS One. 2013;8(3):e58641.
- 3) Jacob JA, et al., Clin Chim Acta. 2017;468:85-89.
- 4) Ohnishi K, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2013;430(2):616-22.
- 5) Sharma RA, et al., Adv Exp Med Biol. 2007;595:453-70.
- 6) Fimognari C, et al., Curr Drug Metab. 2008;9(7):668-78.

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)

Igarashi Y, Ohnishi K, Irie K, Murakami A. Possible contribution of zerumbone-induced proteo-stress to its anti-inflammatory functions via the activation of heat shock factor 1, PLoS ONE, 2016 Aug 18;11(8):e0161282. doi: 10.1371/journal.pone.0161282. eCollection 2016.

Murakami A, Nesumi A, Maeda-Yamamoto M, Yamaguchi H, Yashima K, Miura M, Nakano T, Nekoshima K. Anthocyanin-rich tea Sunrouge up-regulates expressions of heat shock proteins in the gastrointestinal tract of ICR mice: A comparison with the conventional tea cultivar Yabukita. J Food Drug Anal., 2015, 23:407-416.

Murakami A Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents., Arch Biochem Biophys, 2014 Sep 1;557:3-10. doi: 10.1016/j.abb.2014.04.018.

〔学会発表〕(計12件)

【国際学会】(招待講演)

Akira Murakami, Non-specific interactions of zerumbone with biological proteins may be associated with its anti-inflammatory functions, The 29th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT), Nov 9th, 2016, Kobe, Japan

Akira Murakami, Curcumin may induce physiological functions via proteo-stress, The 6th International Conference on Food Factors, Nov 23rd 2015, Seoul, South Korea

Akira Murakami, Anti-inflammatory and chemopreventive activities of phytochemicals from Southeast Asian countries, Food for Health International Conference, Kagoshima, March 22nd, 2016

【国際学会】(口頭発表)

Akira Murakami, Zerumbone may suppress the expression of inducible nitric oxide synthase through proteo-stress, The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, & Therapeutic Applications of NO, May 21st 2016, Sendai.

【国際学会】(ポスター発表)

Akira Murakami, Erina Nakahata, Cindy Valentine, Kazuhiro Irie, Curcumin may induce physiological functions via proteo-stress, 12th Asian Congress of Nutrition, May 16th 2015, Yokohama.

Yoko Igarashi, Kohta Ohnishi, Kazuhiro Irie, Akira Murakami, Possible contribution of zerumbone-induced proteo-stress to its anti-inflammatory function through the activation of Heat shock factor 1, The 6th International Conference on Food Factors, Nov 23rd 2015, Seoul, South Korea

【国内学会】(招待講演)

村上 明, 野菜類の健康効果をケミカルトレーニングの視点から考える、第9回北陸バイオシンポジウム(16年11月4日、福井)

村上 明, 植物由来生理機能性成分の新しい作用機構の可能性、日本動物細胞工学会(JAACT)(2015年7月9日、仙台)

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(2014年3月29日、熊本)

村上 明, 生体タンパク質との非特異的相互作用を介した食品成分の機能性発現機構、日本食品免疫学会(2014年6月30日、東京)

【国内学会】(口頭発表)

五十嵐洋子、大西康太、入江一浩、村上 明、ハナショウガ成分 zerumbone の新しい抗炎症機構、日本香辛料研究会(2016年10月8日、滋賀)

【国内学会】(ポスター発表・全国)

村上 明, 今林健登、村川 慧、Cindy Valentine、中畑恵利奈、大西康太、入江一浩、クルクミンの、機能性発現機構におけるタンパク質ストレス作用の関与、日本農芸化学会大会(2016年3月29日、札幌)

〔図書〕(計3件)

Akira Murakami, Regulation of inflammation-associated intestinal diseases with phytochemicals. In Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects. Y Hiraku, S Kawanishi, H

Ohshima (Eds), pp.355-369, John Wiley & Sons (2014).

Akira Murakami, Anti-inflammatory and chemopreventive potentials of citrus auraptene. In Clinical Aspects of Functional Foods and Nutraceuticals. D. Ghosh, D. Bagchi, T Konishi (Eds.), pp.93-103, CRC Press (2014).

Akira Murakami, Modifying effects of polyphenols on acute colitis and inflammation-associated colon carcinogenesis. In Polyphenols in Human Health and Disease. RR. Watson, VR Preedy, S Zibadi (Eds), pp.1231-1240, Academic Press (2014).

〔その他〕
ホームページ等
<https://sftnetts.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 明 (MURAKAMI, AKIRA)

兵庫県立大学環境人間学部・教授

研究者番号 : 10271412