

食品成分と内因性分子による生活習慣病の促進メカニズムと予防に関する生物化学分析



静岡県立大学食品栄養科学部栄養生命科学科 助教 三好規之

はじめに

豊かな食生活は、運動・睡眠と等しく健康維持に重要な生活習慣病予防戦略であり、生体制御異常を正常化する様々な食品栄養成分の作用メカニズム解析は、人類の健康増進・QOLの向上・健康長寿へと繋がる研究分野の重要な一翼を担っている。一方で、生体の恒常性維持機構の破綻は、生活習慣病をはじめとする様々な疾患の要因となるため、生物個体、組織、細胞の生理病理的变化を解析することは、疾患の予防と促進メカニズムを理解する上で非常に重要である。筆者らは、恒常性維持機構に関連する病態に依存した内因性分子の変化と食品成分による予防メカニズムに関する研究を展開してきた。以下にその概要を紹介する。

1. がん予防食品因子イソチオシアネート類の生理活性発現機構解析

イソチオシアネート (isothiocyanate; ITC) 類は、キャベツやブロッコリーなどアブラナ科植物などに豊富に含まれている含硫化合物である。ITC類のがん予防に関する疫学研究および動物実験を精査すると、遺伝子多型や人種差、性差、生活習慣によって効果にバラつきはあるものの、ITC類あるいはITC類含有食品の摂取により特に肺・胃・大腸などでの発がんリスクを低減させるということに対して一定のコンセンサスは得られているようである。我々はこれまでに、最も強い生物活性を示すITCの一つである benzyl ITC (BITC) を用い、がん予防における細胞増殖抑制の役割およびその詳細な誘導分子機構について解析を行ってきた。その結果、BITCは細胞周期に依存した細胞死誘導活性を示すこと、特にG₂/M期にある細胞がBITCの細胞死シグナルに対して感受性が高いことをフローサイトメトリーおよび同調培養法を用いた詳細な解析より明らかにした。また、がん抑制遺伝子p53が野生型の大腸組織由来線維芽細胞CCD-18Coを用いた解析より、休止期(G₀期)にあるCCD-18Co細胞はBITCの細胞毒性に対して抵抗性を示すこと、さらにBITCの細胞毒性に対してp53が負のレギュレーターとして作用していることを明らかにし、BITCの増殖性がん細胞に対する選択的細胞毒性発現メカニズムを提唱している。ITC類によるがんの化学予防メカニズムについては、がん細胞

増殖抑制以外にも、第I相および第II相解毒酵素の活性・発現制御、抗炎症活性、ヒストン脱アセチル化酵素阻害など多彩な生理活性の関与が示唆されており(図1)、我々は最近、ITC類が誘導するこれらのダイナミックな細胞内情報伝達経路の引き金を制御する標的タンパク質を詳細に解析する目的で、ITC類付加タンパク質の新規分析法を確立した(図2)。本分析法では、最もよく研究されているITC類のうちBITC(M_w=149.02992)とphenethyl ITC (PEITC, M_w=163.04557)が同様の標的分子・メカニズムで生理活性を発現させていることと、BITCとPEITCの相対質量が側鎖のメチレン基1分子に相当する14.01565異なることを利用し、BITCおよびPEITC付加タンパク質(ペプチド)を含む試料のLC-MS、MS/MS解析から、ITC類結合タンパク質と結合部位を同定する。そのため、従来のプロテオミクス解析法で採用されてきたITC類のプローブ化(ビオチン化やRI標識)や抗ITC抗体の調製、さらにサンプルの電気泳動も必要としないことから、ITC付加物を安定に検出同定することが可能である。本分析法を、ITC類を曝露した培養細胞の分析に応用し、ITC付加タンパク質を同定することに成功し、さらに遊離アミノ酸(Cys, Lys)やトリペプチド(グルタチオン)などへの低分子化合物へのITC付加物も同時に検出・同定することが可能であることが確認された。現在、本分析法を応用し、ITC類が示す多彩な生理活性の引き金となる鍵分子の同定について引き続き検討を行っている。

2. オゾン酸化コレステロール secosterol類の新規同定・生成機構・細胞毒性

動脈硬化症や神経変性疾患の病変部位で高濃度に検出されている3β-hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al(secosterol-A)と、secosterol-Aがアルドール反応で転換した3β-hydroxy-5β-hydroxy-B-norcholestane-6β-carboxaldehyde(secosterol-B)(図3)は分子内にアルデヒド基を有する酸化コレステロールであり、酸化ストレスが重要な役割を果たしている慢性炎症を伴う生活習慣病において重要な役割を果たしていることが示唆されている。我々は、LC-MS/MSを用いたsecosterolの高感度定量分析法を確立し、secosterolの詳細な生物化学分析を可能なものとした。本分析法は、secosterolを分子カチオンである2-hydrazino-1-methylpyridineにより誘導体化し、同位体標識secosterolを用いた内部標準法により、生体試料中のsecosterolをatto moleレベルで検出・定量することができる。本分析法を応用し、エステル型コレステロールの酸化物であるエステル型secosterolを健康人LDL画分より新規に検出・同定することにも成功している(図3)。さらに、secosterolおよびエステル型secosterol、またsecosterolのアルデヒド基が酸化されたsecosterol代謝物などは、いずれも非常に強力な細胞毒性を示すことを見出している。ヒト骨髄性白血病HL-60細胞に対するsecosterolの細胞毒性は曝露後72時間まで濃度依存的であ

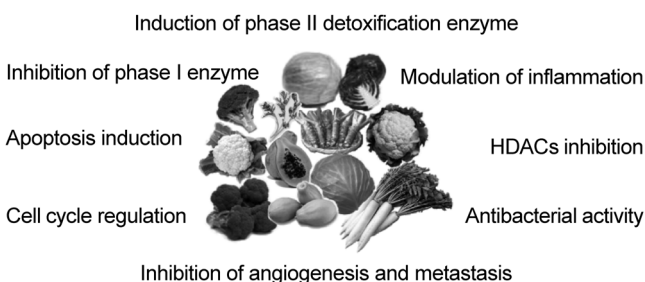


図1 イソチオシアネート類含有植物性食品と生物活性

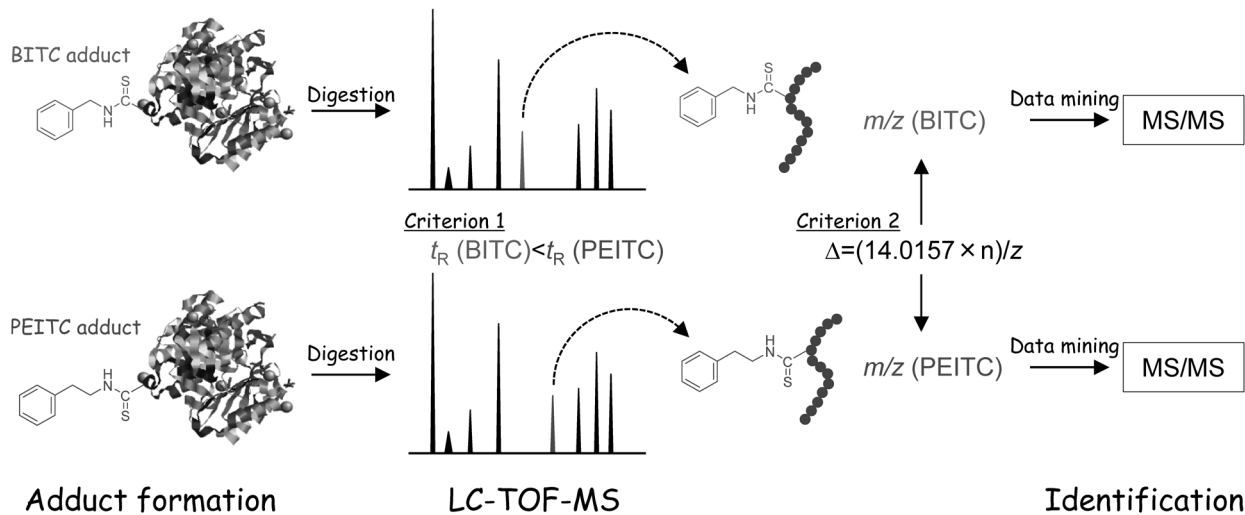


図2 イソチオシアネート付加体分析法の概略図

Benzyl isothiocyanate (BITC; $M_m = 149.0299$) と phenethyl isothiocyanate (PEITC; $M_m = 163.0456$) が付加したタンパク質を消化酵素で処理後LC-TOF-MS分析を行う。分析データの中から、BITCとPEITCの極性(条件1)と質量差(条件2)に依存した条件を満たすMSイオンピークペアを抽出し、対象のMSイオンピークのMS/MS分析より、ITC標的タンパク質と結合部位を同定する。

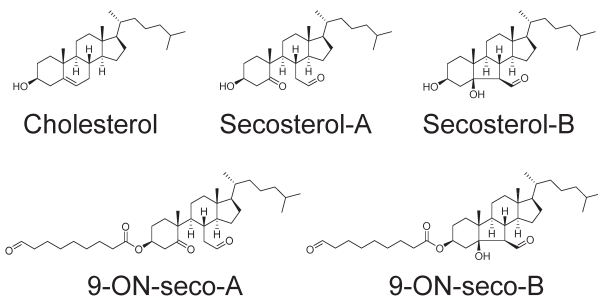


図3 Cholesterol, secosterol-A, -B および、エステル型 secosterol (9-oxonanonyl secosterol-A, -B) の化学構造

り、その IC_{50} 濃度は $1 \mu\text{M}$ 以下であった。Secosterol が誘導する細胞毒性は様々な細胞種(肺がん、血管内皮、マクロファージ、神経様分化細胞など)で認められていることから細胞種に依らない活性であり、細胞毒性を有する $5\beta,6\beta$ -epoxycholesterol など他の酸化コレステロールより強力であった。さらに secosterol は、血管内皮型、および神経型一酸化窒素合成酵素(NOS)を強く阻害したことから、一酸化窒素産生阻害を介した炎症関連疾患病態の発症および進展に関与していることが示唆された。現在までに生体内における secosterol 生成メカニズムについては完全に解明されていないが、我々は、試験管内反応および培養細胞、炎症モデル動物を用いた解析より、一重項酸素およびオゾン様活性酸素種が関与する生体内酸化ストレスレベルに依存した複数の経路を提唱している。これらの結果より、secosterol および新規に検出同定したエステル型 secosterol を含む構造類似体は生体傷害性など病態を促進させる活性を示すことが強く示唆された。今後、secosterol 類が、酸化ストレスに関連する慢性炎症疾患の病態診断・予防戦略、新薬開発やリスク評価の指標としての応用が期待される。

おわりに

本研究では、生活習慣病予防戦略および診断法確立に向けた

食品成分の機能性解析と病態に依存して生成する内因性分子の修飾物に関する分析を行った。特に、ITC類の生物活性に関する解析では、細胞応答を詳細に分析することで、ITC類による増殖性細胞への選択的な細胞死誘導活性を見だし、ITC類の新しいがん予防メカニズムの可能性を提唱することができた。また、ITC付加体や secosterol 類の分析法を新規に開発・改良することで、各分子の生成機構、生理活性発現メカニズムに新規知見を与え、生物活性を有する構造類似体を生体試料中から新規に同定することにも成功した。それゆえ今後は、生活習慣病診断に応用可能な内因性分子の分析と食品栄養成分の持つ生体調節作用に関する更なる検討を進め、人類の健康増進に資する研究・活動に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究は、静岡県立大学食品栄養科学部生化学研究室と名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学研究室で行われたものです。本研究の機会を与えて頂き、学生時代から今日まで終始ご指導ご鞭撻を賜りました大澤俊彦先生(名古屋大学名誉教授・現愛知学院大学教授)、内田浩二先生(名古屋大学教授)、中村宜督先生(名古屋大学・現岡山大学教授)、大島寛史先生(静岡県立大学教授)に深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、質量分析に関するご指導を頂きました東達也先生(静岡県立大学・現東京理科大学教授)酸化コレステロール研究の進展に多大な貢献をいただいた伴野勲博士(静岡県立大学)に深く感謝いたします。本研究は実に多くの先生方や学生・卒業生に支えられており、共同研究者の皆様の御協力により研究が進展しました。ここに深く感謝いたします。最後になりましたが、本賞にご推薦頂きました日本農芸化学会中部支部長の小鹿一先生ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。