

## 食品成分の標的タンパク質の同定とそれに基づく機能性発現メカニズムに関する研究



信州大学農学部農学生命科学科 三 谷 墨 一

## はじめに

食品中には、肥満症や2型糖尿病、高血圧症などの生活習慣病に対して予防・改善効果を持つものが多く存在する。食品中の化合物が生体内で機能性を発揮する際には、生体分子との相互作用が必要不可欠であるものの、食品成分と標的分子との相互作用については不明な点が多く残っている。我々は、食品成分の機能性発現メカニズムを標的分子とくに標的タンパク質の同定を介して解明することに取り組んでいる。これまでに、ポリフェノール化合物や植物性アルカロイドの機能性を標的タンパク質との相互作用から明らかにしてきたので、その研究概要を下記に示す。

## 1. 医薬品の機能を向上する食品成分の標的タンパク質の同定

ブドウ果皮に豊富に含まれるポリフェノールのレスベラトロール (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene) は、乳がんの治療薬として使用される抗がん剤 (doxorubicin: DOX) の抗がん活性を増強する効果が報告されている。しかしながら、その機能性発現メカニズムは明らかではなかった。そこで、レスベラトロールの標的タンパク質を同定することで、抗がん活性の増強に関わる詳細な分子メカニズムの解明に取り組んだ。レスベラトロールを固定化した親和性担体を用いて乳がん細胞中から相互作用するタンパク質をアフィニティ精製した結果、carbonyl reductase 1 (CBR1) を同定した。CBR1は生体異物の還元酵素であり、DOXを抗がん活性の低い doxorubicinol へと代謝する。レスベラトロールはCBR1と結合することで、DOXの代謝を阻害し、DOXの抗がん活性を維持することが判明した。CBR1の阻害に対するレスベラトロールの構造活性相関を解析した結果、CBR1の阻害にはレスベラトロールの3,5位のヒドロキシ基が必須であることを明らかにした(図1)。また、がん細胞の生育環境は、低酸素環境 (1% O<sub>2</sub>) とされる。低酸素環境下ではDOXの抗がん活性が低下するとされ、その原因として低酸素誘導因子1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) を介したCBR1の発現量の増加を見出した。低酸素下におけるレスベラトロールの効果を検討

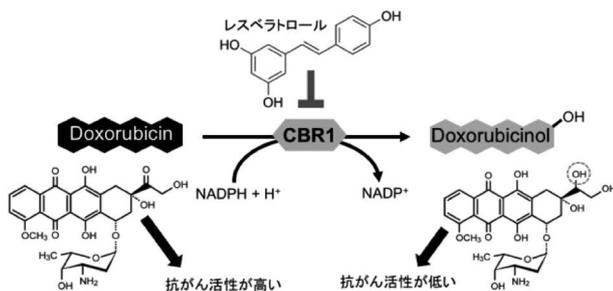


図1. 食品成分と抗がん剤との相乗的作用機構。レスベラトロールはCBR1に結合することで doxorubicinol への代謝を阻害し、doxorubicin の高い抗がん活性を維持するのに寄与する。

した結果、レスベラトロールは、HIF-1 $\alpha$ のタンパク質分解を促すことでCBR1の発現増加を抑制し、DOXの抗がん活性を維持した。低酸素下での解析から、レスベラトロールはCBR1だけでなくHIF-1 $\alpha$ とも相互作用することが示唆された。

## 2. 組織特異性を持つ食品成分の機能性

食品成分には、対象とする組織によって機能が異なることが往々にして存在する。その1つとして見出したのがカカオの苦味成分であるテオブロミン (3,7-dimethylxanthine) である。ヒト介入試験においてカカオ製品の摂取量と体脂肪率には負の相関がある。テオブロミンを高含有するカカオ抽出物を摂取した動物モデルにおいても、内臓脂肪重量の増加が抑制された。そこで、内臓脂肪組織に対するテオブロミンの機能性発現メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、テオブロミンの標的タンパク質として細胞膜に局在するGタンパク質共役型受容体のアデノシン受容体A1 (A1AR) を見出した。A1ARは内臓脂肪組織で高発現しており、リガンドであるアデノシンと結合することで細胞内cAMPの合成を増加し、脂質形成を促す。テオブロミンは、アンタゴニストとしてA1ARと相互作用することで、細胞内cAMP量を低下し、脂質形成に関わる転写因子C/EBP $\beta$ のタンパク質分解を誘導することを明らかにした。

また、テオブロミンの摂取は、内臓脂肪の組織重量の低下だけでなく、皮下脂肪組織の表現型を変化することも見出した。通常、脂肪細胞は脂質を蓄積する働きを持つが、ミトコンドリアでのATP合成を脱共役する uncoupling protein 1 (UCP1) が高発現すると、脂質代謝を亢進する表現型へと変化する。テオブロミンは、皮下脂肪組織においてUCP1の発現を誘導することで、脂肪細胞の小型化を促すことが判明した。テオブロミンによるUCP1の発現誘導メカニズムの解析を進めたところ、

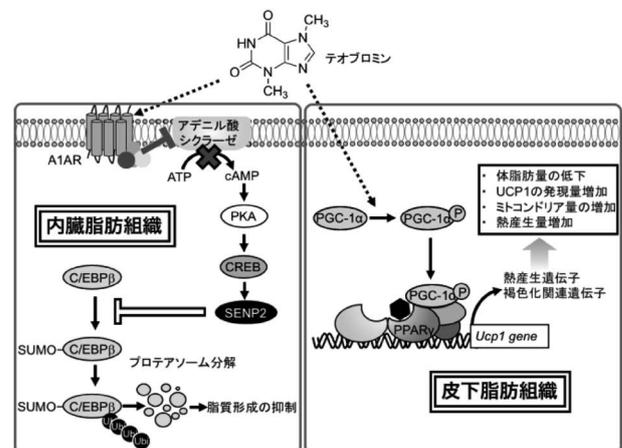


図2. 内臓脂肪組織と皮下脂肪組織での食品成分の標的タンパク質の違い。テオブロミンは内臓脂肪組織ではアデノシン受容体A1と相互作用し、皮下脂肪細胞ではPGC-1 $\alpha$ に影響を及ぼす。

A1ARは関係せず、核内受容体のPPAR $\gamma$ が関与することを明らかにした(図2)。テオブロミンは、PPAR $\gamma$ のリガンドとして機能はしないものの、PPAR $\gamma$ とその転写共役因子であるPGC-1 $\alpha$ の相互作用を亢進することで、UCP1の遺伝子発現を誘導することを見出した。これら一連の研究により、食品成分の機能性は、対象とする組織や細胞の種類により異なり、それが標的タンパク質の発現パターンに依存することを提示した。

### 3. 同一細胞内でも複数の標的タンパク質を持つ食品成分

同じ細胞に対しても食品成分が結合するタンパク質によって機能が異なることがある。大豆イソフラボンのゲニステイン(4',5,7-trihydroxyisoflavone)は、未分化の脂肪前駆細胞に作用することで脂質形成を抑制するが、分化後の脂肪細胞では同様の効果を示さない。そこで、ゲニステインの標的タンパク質は細胞の分化状態によって異なるのではないかと仮説を立てた。脂肪細胞におけるゲニステインの標的分子の同定に取り組んだ結果、標的タンパク質としてadenine nucleotide translocator 2 (ANT2)とprohibitin 1 (PHB1)を同定した。ANT2はミトコンドリアに局在し、細胞質のADPをミトコンドリアマトリックスへと運び、ADPから合成されたATPを再度細胞質へ輸送する機能を持つ。ゲニステインは脂肪前駆細胞のANT2と結合することでADP輸送を阻害し、ATP合成量を低下した。そして、ATP合成量の低下により脂肪細胞への分化と脂質形成は抑制された。以上の結果から、ゲニステインによる脂質形成の抑制の作用点として、ANT2の関を明らかにした。

その一方、ゲニステインは分化した脂肪細胞においては、細胞膜に局在するPHB1に結合することで、脂質形成の抑制とは全く異なる機能性を発現することも見出した。分子動力学シミュレーションの結果から、PHB1は細胞膜上で3量体を形成していることが推測され、ゲニステインとの結合にはアミノ酸残基72番目と74番目のアルギニンが重要であることが判明した(図3)。細胞膜上のPHB1はゲニステインと結合することで細胞内MAPKシグナルカスケードを活性化し、NAD<sup>+</sup>合成経路の律速酵素であるニコチンアミドホスホリボシル基転移酵素(NAMPT)の発現量と細胞内NAD<sup>+</sup>レベルを増加した。NAD<sup>+</sup>は、ATP合成やDNA修復、タンパク質の翻訳後修飾反応の基質として働く。NAMPTの阻害による脂肪組織のNAD<sup>+</sup>量の減少は、食後高血糖の惹起と関連することが報告されており、それには糖質代謝改善ホルモンであるアディポネクチンの発現低下が関与するとされている。ゲニステインによるNAD<sup>+</sup>量の増加は、PPAR $\gamma$ の脱アセチル化を促すことでアディポネクチンの発現を誘導した。さらに、高脂肪食にゲニステインを混合した餌を摂取した野生型マウスでは、アディポネクチンの発現量の増加とともに食後高血糖が緩和された。その一方でNamptのヘテロノックアウトマウスでは、ゲニステインによる食後高血糖の緩和効果は消失した。以上の結果から、ゲニステインは、脂肪組織でも脂肪前駆細胞と分化した脂肪細胞で別々の標的タンパク質へと結合することで、異なる機能性を発現し、これがゲニステインの持つ複数の機能性を説明する根拠の一端であることを明らかにした(図4)。

### おわりに

これまでの研究成果によって、食品が持つ生体調節機能を分子レベルで説明するためには、標的分子の同定が重要であるこ

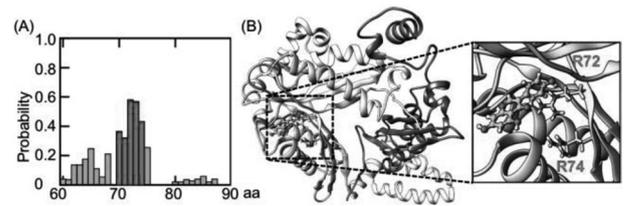


図3. ゲニステインとPHB1との結合部位の解析。(A) PHB1のアミノ酸配列からの結合予測。(B) 細胞膜上に配置したPHB1の立体構造からの結合予測。

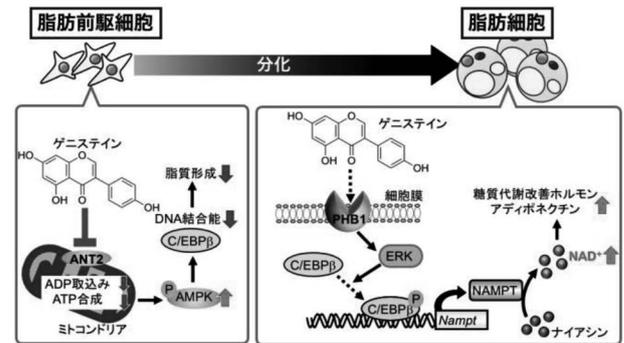


図4. 細胞の分化段階において標的タンパク質が異なる食品成分。ゲニステインは脂肪前駆細胞に置いて、ミトコンドリアタンパク質と結合し、分化後の脂肪細胞では細胞膜タンパク質と結合することで、細胞内で異なる機能性を発揮する。

とが再認識された。特に組織ごとや作用するタイミングによって食品成分が異なる機能性を発揮する理由として、標的分子の発現パターンの違いに起因することが明確となってきた。また、生活習慣病の予防に資する標的タンパク質の発見は、それを対象とすることで食品中から新たな機能性成分を探索することや、医薬品のスクリーニングへと展開できる。今後も生活習慣病の予防効果を持つ食品成分の標的分子をタンパク質だけでなく核酸や脂質の点からも同定を試みていきたい。

謝辞 本研究は、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻食品代謝栄養学グループ、神戸大学大学院農学研究科応用生命科学講座生物機能開発化学分野、信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所、信州大学農学部農学生命科学科食品化学研究室・食品機能学研究室で行ったものです。研究者、そして大学人としての道を導いていただいた山地亮一先生(現大阪公立大学教授)、原田直樹先生(現大阪公立大学准教授)、学生時代より研究の面白みを説いて頂いた中野長久先生(大阪府立大学名誉教授)、乾博先生(現大手前大学教授)には心より感謝申し上げます。また、ポスドク時代から現在まで、本研究の機会を与えていただきました芦田均先生(神戸大学大学院教授)、中村宗一郎先生(現信州大学学長)、片山茂先生(信州大学教授)に深く感謝いたします。共同研究者として多大なご協力を頂いた山下陽子先生(神戸大学)、東村泰希先生(石川県立大学)、吉岡泰淳先生(静岡県立大学)をはじめ、本研究の遂行に関わり支援していただいた信州大学農学部の先生方々、研究室の院修了生、卒業生、ならびに現院生、学部学生諸氏に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長の西川俊夫先生に深く御礼申し上げます。