

論文内容の要旨

論文題目：野菜由来成分による薬物代謝関連転写因子の活性化に関する研究

氏名：吉田 和敬

指導教員：内田 浩二

背景と目的

野菜の主要な生体調節作用の1つとして生体異物の解毒作用があり、それには多くの薬物代謝関連転写因子が関わっている。その中で、aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、薬物代謝の調節に深く関連するとともに、免疫調節など、他の生体調節機能にも深く関わっており、生体防御やホメオスタシスの維持において重要な役割を果たしている転写因子である。AhRのリガンドとしては、ダイオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) などの毒性物質が古くから知られており、それらの毒性発現に関与するとされてきた。一方で近年は、食品由来の天然リガンドも多く報告されてきており、それらのリガンドにより生体に有益な作用をもたらすことも分かってきた。AhRの天然リガンドとして、野菜に含まれるフラボノイドやインドール化合物などがある。そのため、野菜由来の成分によるAhRの活性化を評価することで、野菜成分による新たな生体調節機能の発見や、生体調節機能の新たなメカニズムの発見に繋がることが期待される。そこで本研究は、野菜由来の成分がAhRを初めとした薬物代謝関連転写因子に与える影響を明らかにすることを目的とした。

第一章 ブロッコリースプラウトの熱水抽出物がラット肝臓の薬物代謝に及ぼす影響

第一章では、薬物代謝に影響を与える成分を豊富に含むブロッコリースプラウトを対象とし、その熱水抽出物 (BSEx) が肝臓の薬物代謝に与える影響を動物試験により解析した。BSExの摂取がラット肝臓の遺伝子発現に与える影響を詳細に解析するため、DNAマイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。BSExの濃縮物を混餌し、7週齢雄のWistarラットに10日間投与後、肝臓より抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、BSExは、cytochrome P450 (*Cyp*) や glutathione S-transferase (*Gst*) など、薬物代謝に関連する遺伝子群の発現を亢進することが見出された。また、薬物代謝に関連するシグナルとして、転写因子である AhR や Nrf2 を介したシグナルの関与が示唆された。

続いて、BSExによる肝臓での解毒作用を評価するため、薬物性肝障害に与える影響について評価を行った。上記と同様の方法でBSExをラットに10日間摂取させ、その後アセトアミノフェン（APAP）を経口投与し、肝障害を誘導した。その結果、BSExの摂取は、APAPにより誘導される肝障害を抑制することが示された。さらに、BSExを摂取した群では、摂取しなかった群と比較して肝臓中のグルタチオン濃度やGST活性が高い値を示しており、マイクロアレイ解析により明らかにされた遺伝子発現変化との関連が認められた。

BSExは、これまでにブロッコリースプラウトの作用メカニズムとして知られていたNrf2だけでは無く、AhRを介して肝臓での薬物代謝を亢進していることが示唆された。一方、ブロッコリースプラウト中のAhR活性化物質であると考えられるインドール化合物やフラボノイドは野菜に広く含まれる成分であるため、他の野菜もAhRを活性化する可能性があると考えられた。そこで第二章では、AhRを活性化する野菜素材や成分を効率的に探索するため、AhR依存的転写活性の評価系を確立することとした。

第二章 AhR依存的転写活性評価系の確立

野菜素材や野菜の成分によるAhR活性化作用を詳細に解析するため、AhR依存的転写活性の評価系の確立を行った。ヒト肝臓がん由来細胞であるHepG2細胞に、AhR発現プラスミドベクターと、ルシフェラーゼ遺伝子上流にAhRの応答配列であるxenobiotic responsive element (XRE)をタンデムに3つ並べたAhR応答プラスミドベクター（pGL3-XRE）を共トランスフェクションし、AhR応答性安定HepG2細胞株を樹立した。この細胞株は、既知のAhRリガンドに対して応答し、ルシフェラーゼ活性を亢進した。さらに、AhRリガンドによるルシフェラーゼ活性の亢進と、AhRの標的遺伝子である薬物代謝関連遺伝子の発現量変化との間に有意な相関関係が確認された。以上のことから、AhR応答性安定HepG2細胞株は、AhRを活性化する成分を探索するのに有用な系であると考えられた。

第三章では、本章で確立したAhR応答性安定HepG2細胞株を用いて、種々の野菜の抽出物がAhR依存的転写活性に与える影響を評価するとともに、その活性成分の同定を行った。

第三章 AhR依存的転写活性を有する野菜由来成分の探索

ブロッコリースプラウトなどの23種類の野菜の熱水抽出物がAhR依存的転写活性に与える影響を評価した。その結果、ショウガ、モロヘイヤ、パセリ、ハウレンソウ、アシタバの5種類の

野菜の熱水抽出物に特に強い AhR 依存的転写活性の亢進が確認され、その活性はブロッコリースプラウトの熱水抽出物よりも強いものであった。さらに、それらの熱水抽出物から得た酢酸エチル抽出物と水抽出物について評価を行ったところ、ショウガの酢酸エチル抽出物に顕著に強い AhR 依存的転写活性の亢進が見られた。ショウガの酢酸エチル抽出物を HPLC で分析したところ、6-ショウガオールと 6-ジンゲロールがその主要成分として見出された。さらに、それぞれの成分の AhR 依存的転写活性を評価した結果、6-ショウガオールのみが AhR 依存的転写活性を亢進し、AhR の標的となる遺伝子やタンパク質の発現も亢進した。以上より、6-ショウガオールはショウガの主要な AhR 活性化物質であると考えられた。

第三章の結果より、6-ショウガオールには、AhR を介した解毒作用などの生理作用が期待された。一方で、AhR のリガンドの中には、TCDD や 3-methylcholanthrene (3MC) のように、AhR を活性化することで毒性を発揮する化合物も存在している。従って、6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性をより詳細に解析し、毒性化合物との違いを見出すことも重要であると考えられた。そこで第四章では、6-ショウガオールの AhR リガンドとしての特性を評価した。

第四章 6-ショウガオールの AhR リガンド特性の解明

6-ショウガオールおよび 3MC が AhR 依存的転写活性及び *CYP1A1* mRNA 発現量に与える影響を比較した。AhR 依存的転写活性については、6-ショウガオールと 3MC の EC₅₀ 値はそれぞれ 19.1 μ M、0.73 μ M であった。*CYP1A1* mRNA 発現量については、3MC は 1 μ M の低濃度においても 60 倍程度まで顕著に発現を亢進したが、6-ショウガオールは 25 μ M で 2 倍程度の亢進であった。以上の結果より、6-ショウガオールは 3MC などの毒性物質と比べると、AhR への親和性は低く、*CYP1A1* の遺伝子発現への影響は小さいことが明らかとなった。

続いて、6-ショウガオールの AhR 活性化メカニズムを、*in silico* によるシミュレーションにより検討した。ヒト AhR リガンド結合部位 (AhR-LBD) の立体構造は、PDB ID: 4F3LA

(CLOCK/BMAL dimer) の Per-Arnt-Sim (PAS) -B ドメインを雛型としたホモロジーモデリングにより構築した。構築した AhR-LBD の立体構造を用いて、6-ショウガオールによる AhR 活性化のメカニズムを *in silico* でのシミュレーションにより解析したところ、AhR-LBD 中の芳香族アミノ酸である His、Tyr、Phe との π - π 相互作用が関与しており、その相互作用の強さの違いがリガンド間の活性の違いに繋がっている可能性があると考えられた。一方、親電子性の高い 6-ショウガオールが、AhR-LBD 中の His や Cys などのアミノ酸残基と共有結合することで AhR

を活性化している可能性も見出され、3MCのような芳香族炭化水素とは異なる結合様式で AhR を活性化していることも考えられた。

総括

本研究では、摂取した野菜由来成分による生体への影響の新たなメカニズムの発見や、新たな生体調節機能の発見に繋げることを目的とし、薬物代謝や免疫調節など、生体防御やホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている AhR の活性化への影響を評価した。その結果、ショウガやブロッコリースプラウトを等の野菜には AhR を活性化させる作用があることを明らかにした。また、ショウガに含まれる機能性成分である 6-ショウガオールによる AhR 活性化を初めて明らかにし、そのリガンド特性の一端を解明した。

AhR は、非常に多様性に富んだリガンドと複雑な調節機構を有し、ポジティブな面とネガティブな面の二面性を有する転写因子であるため、各リガンドの特性を十分に検証する必要がある。野菜由来の成分には、本研究で見出された 6-ショウガオールを初め、AhR リガンドとなる成分が多く存在するため、そのリガンド特性を詳細に評価することは、野菜の生体内での機能を推測する上で重要であると考えられる。本研究がその一助となり、野菜の成分による AhR 活性化作用に関する理解が深まることを期待したい。