

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580176

研究課題名(和文)アントシアニンの細胞標的分子の同定：MAPキナーゼとの直接結合の解明

研究課題名(英文)Clarification of the molecular targets for bioactive anthocyanins: MAP kinase as direct targets

研究代表者

侯 徳興(Hou, De-Xing)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：90305160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：アントシアニンは赤や紫色の食材に含まれているポリフェノール類化合物であり、抗酸化をはじめ多くの機能性を有し、機能性食品因子として大きく注目されている。本研究は、ケミカルバイオロジーの手法より、食材から精製された代表的なアントシアニンが細胞癌化・炎症に深く関わるMAPキナーゼ類に対する直接結合力や親和力を明らかにした。さらに、細胞癌化モデルや動物炎症モデルにおいては、活性アントシアニンがMAPキナーゼ標的分子の過剰活性を抑制することで、細胞癌化防止およびマウス炎症性足腫の緩和等の機能性発揮した。これらの研究知見が、アントシアニンの健康維持機能に分子レベルで科学的な根拠を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Although anthocyanin glycosides are major forms distributed in many plant foods and promised as chemopreventive source, molecular mechanisms remain unclear. This study aims to identify the molecular targets of bioactive anthocyanins using chemical biology methodologies. The results showed that bioactive anthocyanins had defined potential of affinity and binding to MAP kinases in the order of MEK > ERK > B-Raf without ATP-competitive manner. Therefore, bioactive anthocyanins suppressed the activation of these MAP kinase to prevent cell transformation and inflammation in mouse paw edema induced by carcinogens. On the other hand, the specific and inhibitory effects were weaker than that by the specific inhibitors of MAP kinases. These findings provide the molecular evidence for understanding the chemopreventive effects of bioactive anthocyanins.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：アントシアニン 細胞標的分子 MAPキナーゼ 親和力 直接結合能 結合モデル構築 細胞癌化抑制能 炎症抑制能

### 1. 研究開始当初の背景

アントシアニンは、赤色や紫色を呈する黒米、黒豆、ブルーベリー、シソ、ナスに含まれるポリフェノール性化合物である。抗酸化をはじめ多くの機能性を有し、機能性食品因子として大きく注目されている。しかし、アントシアニンがどのような細胞タンパク質を標的分子として作用し、機能性を発揮するか明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、ケミカルバイオロジーの手法より、食材から精製された代表的なアントシアニンが細胞癌化・炎症に深く関わる MAP キナーゼ類に対する直接結合力や親和力を明らかにする。さらに、細胞癌化モデルや動物炎症モデルを用いてアントシアニンによる MAP キナーゼ標的分子の活性阻害および機能性を分子レベルで解明する。

### 3. 研究の方法

研究材料は、Delphinidin(Dp)アグリコン、結合糖を1つ持つ Delphinidin 3-sambubioside (Dp3-Sam) および2つ持つ Delphinidin 3-lathyroside-5-glucoside (Dp3-Lat-5-Glu)を用いた。

研究方法はケミカルバイオロジーの視点から下記の3つの方法より行った。

1) 分子カップリングおよび免疫化学手法を用いて、アントシアニンと MAP キナーゼの直接結合を検出した。具体的には、ビーズにアントシアニンをカップリングさせた後、細胞タンパク質を添加し、反応結合を行った。洗浄後、SDS-PAGE で分離し、MAP キナーゼ抗体によるウェスタンブロット解析を行った。

2) 低分子化合物とタンパク質の結合を検出できる水晶発振子マイクロバランス法 (QCM) を用いてアントシアニンと標的 MAP キナーゼ (B-Raf, MEK, ERK)の親和力を解析した。具体的には、精製 MAP キナーゼをセンサーチップに固定し、反応チャンバーにつけて各種アントシアニンをそれぞれ添加した。時間系列により結合解離定数を求めた。

3) 低分子化合物とタンパク質の結合を解析する分子モデリング手法を用いてアントシアと MAP キナーゼの結合モデルを構築した。具体的には、タンパクデータバンク (PDB)

から MEK1, ERK2 等のタンパク質立体構造を取り寄せ、低分子化合物とタンパク質の結合をシミュレーションするソフトウェア (MOE) でアントシアニンの化学構造を MEK1, ERK2 等のタンパク質立体構造にドッキングさせた。得られたパラメーターによるアントシアと MAP キナーゼの結合モデルを構築した。

4) 細胞癌化モデルや動物炎症モデルを用いてアントシアニンによる MAP キナーゼ活性の阻害および機能性を検証した。具体的には、マウス新生児皮膚細胞 (JB6) を発癌剤 TPA により癌化させ、アントシアニンによる癌化クロームの抑制および MAP キナーゼの活性化抑制を調べた。動物炎症モデルでは、マウスに炎症誘発剤 LPS を注射し、炎症性足腫を誘発すると同時に、アントシアニンの投与による炎症性足腫の緩和効果を調べた。

### 4. 研究成果

#### 1) アントシアニンとMAPキナーゼとの直接結合の解析

まず、3つのアントシアニンをビーズにカップリングさせた後、JB6細胞から得られた細胞タンパク質を添加し、直接結合実験を行った。MEK1と結合したアントシアニンは図1に示している。Dp およびDp3-Sam をカップリングさせたビーズにはMEK1が検出されたが、Dp3-Lat-5-Gluには検出されなかった。よって、Dp およびDp3-SamがMEK1と結合していると考えられた。

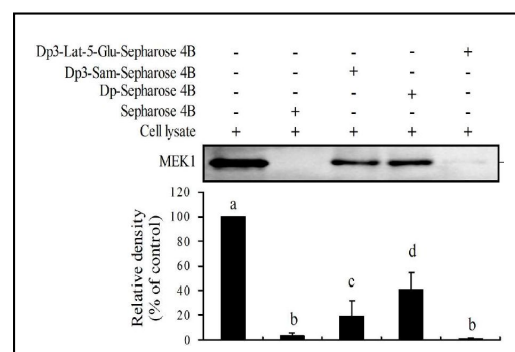


図1、アントシアニンとMEK1の結合解析

つぎに、DpおよびDp3-SamとMEK1の上下流のMAPキナーゼ(B-Raf, ERK)との結合能を同じ手法で調べた。図2に示しているように、Dp およびDp3-Sam をカップリングさせたビーズには上記の3つのMAPキナーゼが検出されたが、それぞれの結合能はMEK1>ERK1/2>B-Rafの順であった。

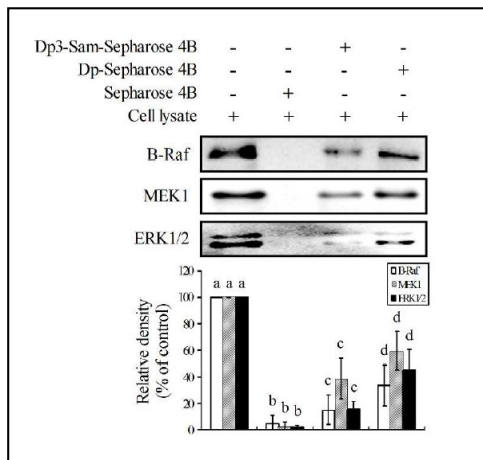


図2、アントシアニンとMEK1, ERK1/2, B-Rafの結合解析

## 2) アントシアニンと MAP キナーゼの親和力について

Dp および Dp3-SamはMEK1, ERK1/2, B-Rafとの直接結合能を示したので、つぎに、その親和力について水晶発振子マイクロバランス法(QCM)により解析した。まず、Raf, MEK1, ERK1/2 をそれぞれセンサーチップに固定し、反応チャンパーに各種アントシアニンを添加した。時間系列により結合解離定数を求めた。その結果は、図3に示している。結合解離定数が大きいほど親和性が低いので、よって MAPキナーゼ間のアントシアニンとの親和力は、MEK1 > ERK2 > B-RAFの順であり、

アントシアニン間のMAPキナーゼとの親和力は、Dp > Dp3-Samの順であった。

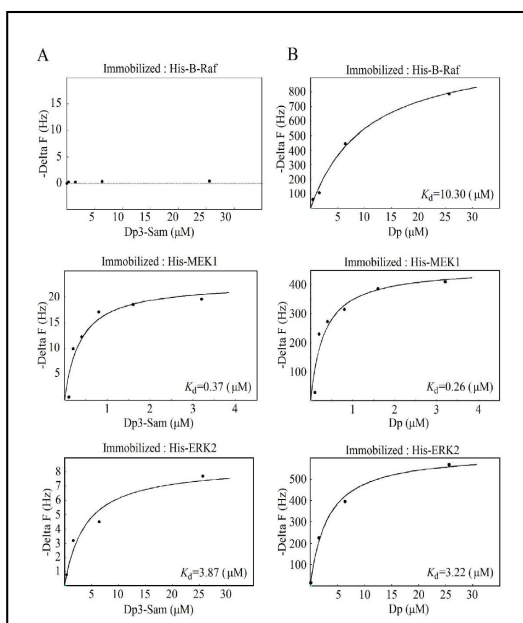


図3、アントシアニンとMEK1, ERK2, B-Rafの結合解離定数

## 3) アントシアニンとMAPキナーゼの結合モデルの構築。

低分子とタンパク質の結合を解析するソフトウェア(MOE)を用いて活性アントシアニンとMEK1, ERK1/2の結合部位をシミュレーションした結果、活性アントシアニンがMEK1やERKのATPポケット以外の部位と結合していた。また、酸性、中性、アルカリ性溶液中に異なる構造のアントシアニンもすべてMEK1やERK1/2のATPポケット以外の部位と結合していた。よって、アントシアニンがATPと非競合的にMEK1やERK1/2と結合し、その活性を阻害すると考えられる。

## 4) 細胞癌化モデルや動物炎症モデルによるMAPキナーゼを標的分子としたアントシアニンの機能性解析

上記のようなケミカルバイオロジーの手法でアントシアニンがMAPキナーゼを標的分子として作用することを明らかにした。そこで、細胞癌化モデルや動物炎症モデルを用いてその機能性を解析した。その結果、アントシアニンはMEK1やERK1/2の活性を阻害することで(図4)JB6細胞発癌モデルにおいて細胞癌化を抑制した(図5)。また、マウス炎症性足腫モデルでは、血中炎症性因子の低下および足腫の緩和効果(図6)が認められた。

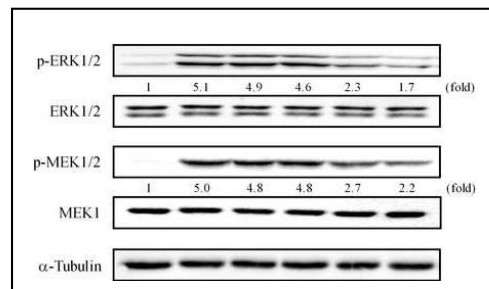


図4、Dp3-SamによるMEK1, ERK1/2のリン酸化の抑制

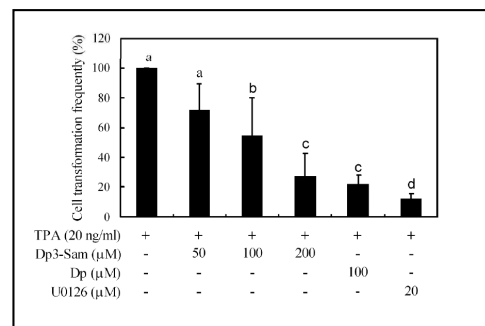


図5、アントシアニンによるJB6細胞の癌化抑制

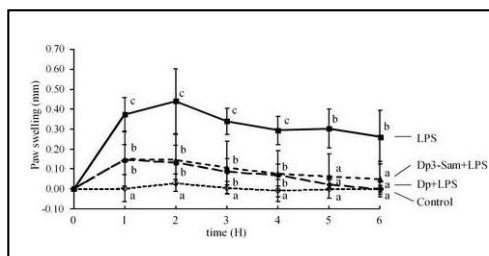


図6、アントシアニンによるマウス炎症性足腫の緩和効果

以上のように本研究は、ケミカルバイオロジーの手法より食材から精製された代表的なアントシアニンがMAPキナーゼに親和性や直接結合力を示し、その過剰活性による細胞癌化や炎症性足腫を抑制することを明らかにした。また、その親和力及び結合力は、MAPキナーゼ特異阻害剤より弱く、日常のアントシアニン摂取が薬の様な効果ではなく、健康維持作用を有すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Zar PPK, Moroshita A, Hashimoto F, Sakao K, Fujii M, Wada K, Hou DX<sup>\*</sup>: Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of loquat (*Eriobotrya japonica*) tea. *J. Functional Foods*. 査読有, 6, 2014, 523-533.

Tanigawa S, Lee CH, Lin CS, Ku CC, Hasegawa H, Qin S, Kawahara A, Korenori Y, Miyamori K, Noguchi M, Lee LH, Lin YC, Steve Lin CL, Nakamura Y, Jin C, Yamaguchi N, Eckner R, Hou DX<sup>\*</sup>, Yokoyama KK: Jun dimerization protein 2 is a critical component of the Nrf2/MafK complex regulating the response to ROS homeostasis. *Cell Death Dis.*, 査読有, 4:e921(2013).

入角順平、十合貴之、坂尾こず枝、山本雅史、福留弘康、川口昭二、富永茂人、侯 徳興<sup>\*</sup>: ブルーベリー (*Vaccinium* spp.) の品種間におけるアントシアニン組成および抗酸化能の解析. 鹿児島大学農学部学術報告、査読無, 63, 2013, 27-38.

Korenori Y, Tanigawa S, Kumamoto T, Qin

S, Miyamori K, Nagai M and Hou DX<sup>\*</sup>: Modulation of Nrf2/Keap1 system by *Wasabi* 6-methylthiohexyl isothiocyanate in ARE-mediated *NQO1* expression. *Mol. Nutr. Food Res*, 査読有, 57(4), 2013, 854-864.

Qin S, Chen J, Tanigawa S and Hou DX<sup>\*</sup>: Microarray and pathway analysis highlight Nrf2/ARE-mediated expression profiling by polyphenolic myricetin. *Mol. Nutr. Food Res*, 査読有, 57(3), 2013, 435-446.

Hou DX<sup>\*</sup>, Kumamoto T, Ishida H and Hisanaga A: The Selectivity and impact of polyphenols-protein kinases interactions for chemoprevention. *J. Food and Drug Anal*, 査読有, 20(1)S, 2012, 366-370.

Qin S, Chen J, Tanigawa S and Hou DX<sup>\*</sup>: Gene expression profiling and pathway network analysis of hepatic metabolic enzymes targeted by baicalin. *J. Ethnopharmacol.* 査読有, 140(1), 2012, 131-140.

Chen J, Qin S, Xiao J, Tanigawa S, Uto T, Hashimoto F, Fujii M and Hou DX<sup>\*</sup>: A genome-wide microarray highlights the anti-inflammatory genes targeted by oolong tea theasinensin A in macrophages. *Nutr. Cancer*, 査読有, 63(7), 2011, 1064-1073.

〔学会発表〕(計7件)

Hou DX, Qin S, Sakao K, He X, He JH: Dynamic modulation of Nrf2/Keap1 system by polyphenols. *VI International Conference on Polyphenols and Health (VI ICPH)*, October 16-19, 2013, Buenos Aires, Argentina

Hou DX, Wu S, He X, Yano S, He JH, Zhang SR: Inhibitory effect and mechanism of blue honeysuckle on adjuvant-induced arthritis. *7th International Workshop on Anthocyanins - IWA 2013*. September 9-11, 2013, Porto, Portugal.

Hou DX, Tanigawa S, Chen JH, Qin S, You SX, Kumamoto T, Hashimoto F, He X, He

JH: Molecular basis for flavonoids: from gene expression profiling to molecule targeting. *13th Congress of the International Society for Ethnopharmacology*. September 2 - 6, 2012. Graz, Austria.

侯 徳興:「アントシアニンとアンチエイジング」。第28回臨床フリーラジカル会議 - フリーラジカルとアンチエイジング。2012年1月20 - 21日。京都。

Hou DX: The selectivity and impact of polyphenols-protein kinases interactions for chemoprevention. *International Conference of Food Factor 2011*. Taipei, Taiwan. November 20-23, 2011.

Hou DX: The impact of dietary polyphenols as protein kinase modulators. *2011 Annual Conference of International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (2011 ISNFF)*. Sapporo, Japan. November 14-17, 2011.

侯 徳興:アントシアニンから機能性「黒野菜」へ。西日本機能性食品開発研究会。2011年5月25日～27日。福岡。

〔図書〕(計1件)

Hou DX: "Molecular basis for cancer chemopreventive effects of anthocyanins" (132 pages). Lambert Academic Publishing, Germany. ISBN: 978-3-659-15016-6 (2012).

6. 研究組織

(1)研究代表者

侯 徳興 (HOU DE-XING)  
鹿児島大学・農学部・教授  
研究者番号: 90305160

(2)研究分担者

橋本 文雄 (HASHIMOTO FUMIO)  
鹿児島大学・農学部・教授  
研究者番号: 70244142