

学 位 論 文 要 旨

氏 名 覃 思

題 目 Gene expression profiling and regulation mechanisms of hepatic antioxidant enzymes by chemopreventive polyphenolic compounds
(機能性ポリフェノール化合物による肝臓抗酸化酵素遺伝子の発現プロファイリングおよび制御機構に関する研究)

ポリフェノール類化合物は多くの植物性食品に含まれており、抗酸化能をはじめ多くの生体調節機能を持つことが報告されている。近年、その作用機序に関する分子レベルでの解析が進められているが、単一や数個の遺伝子をマーカーとして解析を行ったものが多く、ポリフェノール類化合物が生体に対する作用の全体像および分子機構は明らかにされていない。

本研究は、ポリフェノール類化合物の抗酸化作用機構をゲノムワイドで明らかにするため、DNA マイクロアレイなどの解析手法を用いて代表的ポリフェノール類化合物（バイカリン、ミリセチン）の肝細胞における作用を明らかにした。その結果、バイカリンやミリセチンで処理した肝細胞において発現量が2倍以上に上昇した遺伝子数の割合はそれぞれ全遺伝子数の1.04%および0.33%であり、また、発現量が2倍以上に低下した遺伝子数の割合はそれぞれ全遺伝子数の0.60%および1.08%であった。これらの遺伝子を、グループ解析により生物学プロセス、分子機能、細胞内シグナル伝達経路などの35種類に分類した。また、これら遺伝子発現の制御に関する分子機序を明らかにするため、シグナル伝達分析システムIPAを用いて、バイカリンやミリセチンによりこれらの遺伝子発現を制御する上位10個のシグナル伝達経路を明らかにした。特に、Nrf2を仲介する細胞抗酸化経路は、バイカリンやミリセチンにより著しく活性化されていることを見いだした。Nrf2は、転写因子Nrf2で抗酸化剤応答配列(ARE)を仲介し、細胞内抗酸化酵素遺伝子群の発現を統括的に制御し、細胞保護機構において重要な役割を果たす因子である。Nrf2が細胞質においてKeap1と結合し、ユビキチン-プロテアソーム機構によって分解されるため、Nrf2の安定化及び核内移行が、細胞保護機構の活性化に不可欠である。その制御分子機構を解析した結果、バイカリンやミリセチンは、Nrf2を活性化する上流のMAPキナーゼを活性化し、Nrf2のユビキチン化及び代謝分解速度を抑制した。さらに、これらの化合物がKeap1を修飾することにより、Nrf2への抑制機能を失活させた。これらの作用はNrf2の安定化及び核内移行を促進し、AREを仲介した抗酸化酵素群の遺伝子発現を促進した。さらに、Nrf2の発現抑制配列siRNAを用いて、バイカリンやミリセチンによるAREの活性化にはNrf2が必要であることを実証した。したがって、これらのポリフェノールがNrf2を安定化させることでAREを仲介した抗酸化酵素遺伝子群の発現を促進し、細胞保護機能を発揮すると考えられた。

以上の研究は、ポリフェノールであるバイカリンやミリセチンの細胞保護機能をゲノムワイドで明らかにし、その制御機構を細胞・分子レベルで解明したもので、機能性ポリフェノールによる病気の予防に新たな知見を提供するものである。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Qin Si

題 目 Gene expression profiling and regulation mechanisms of hepatic antioxidant enzymes by chemopreventive polyphenolic compounds
(機能性ポリフェノール化合物による肝臓抗酸化酵素遺伝子の発現プロファイリングおよび制御機構に関する研究)

Polyphenolic compounds occurring in many edible plants are the main part of phytochemicals and have been reported to possess multiple bioactivities on chemoprevention of human chronic diseases. Accumulated studies have suggest that consumption of polyphenol-rich vegetables are beneficial in the prevention of chronic diseases such as cancer, stroke, diabetes, neurodegenerative disease and heart disease based on laboratory studies and epidemiological investigations. The chemopreventive mechanisms by polyphenolic compounds have being investigated at molecular levels. However, most of the studies only paid attentions on limited genes or signaling pathways, which were not consistent with the multiple functions of polyphenolic compounds and the complicated pathology of human chronic diseases. Applications of omics tools in nutrigenomics and evidence-based food or traditional medicine researches will meet the requirement for fully understanding the chemopreventive mechanisms of polyphenolic compounds. Of omics, DNA microarray and pathway analysis are powerful tools to study the molecular mechanisms of polyphenolic compounds due to their priority on analyzing the effect in genome wide.

In the present study, two typical polyphenolic compounds were chosen, myricetin from food such as grape and baicalein from traditional medicine, due to their similar structures which could help analyzing the structure-activity relationship. Besides, myricetin could provide the example to apply microarray in nutrigenomic research, and baicalein could be a model for application of microarray in evidence-based traditional medicine research. Hepatocytes are the main cells for polyphenolic compounds metabolizing with the aid of drug metabolizing enzymes *in vivo*. Thus, HepG2 cells were chosen as the model for its widely used in regulation of drug metabolizing enzymes, ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion), toxicological and other basic researches.

I performed gene expression profiling by DNA microarray to evaluate the chemopreventive function and underlying genes targeted by myricetin and baicalein in HepG2 cells, and then I used Gene Ontology (GO) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to analyze the huge microarray data that can help better understanding the effects of these polyphenolic compounds on cell biological function in genome wide. Finally, I used real-time PCR to verify the accuracy of some genes of interests. Among total 44K gene probes, myricetin treatment up-regulated the signals of 143 gene probes (0.33% of total probes) and down-regulated signals of 476 gene probes (1.08% of total probes) by ≥ 2 -fold, baicalein treatment up-regulated the signals of 440 gene probes (1.04% of total gene probes) and down-regulated signals of 254 gene probes (0.6% of total gene probes) by ≥ 2 -fold in HepG2 cells. Gene Ontology analysis revealed that drug metabolizing enzymes were significantly disturbed by polyphenolic compounds treatment. The network pathways analyses by IPA further revealed top 10 canonical pathways were disturbed by each treatment. Of which, an Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2)-mediated ARE (antioxidant response element) pathway was involved in both baicalein- and myricetin-induced gene expressions of hepatic metabolic enzymes. The representative enzymes involved in Nrf2-ARE pathway were further confirmed at mRNA level by real time polymerase chain reaction (PCR).

To uncover the molecular mechanism underlying the activation of Nrf2-ARE pathway, I further investigated the effect at both the transcriptional level and the posttranscriptional level of Nrf2 expression by baicalein treatment in HepG2 cells. At the transcriptional level, Nrf2-related network analysis and upstream protein kinases signaling pathways data revealed that baicalein regulated the expression of Nrf2 mRNA by targeting transcription factors (such as NF- κ B and AHR) and nuclear proteins (such as c-Src and c-Jun) via phosphorylating the upstream protein kinases MEK, AKT and JNK signaling pathways. At the posttranscriptional level, molecular data revealed that baicalein activated Nrf2-ARE pathway by inhibiting Nrf2 ubiquitination and protein turnover via stimulating Keap1 modification and ubiquitination. All of these events finally increased nuclear Nrf2 accumulation, ARE binding activity and transcription activity to enhance ARE-mediated genes expressions. Furthermore, myricetin was found to exert its chemopreventive effect by the same mechanism due to its similar structure as baicalein. Additionally, treatment with Nrf2 siRNA attenuated both the baicalein-induced and myricetin-induced ARE activity and gene expressions. Based on structure-activity analysis, we found that the basic flavan structure seems to be the key component of polyphenolic compounds to activate Nrf2.

These results provided a comprehensive data for understanding the gene expression, hepatic metabolism and bioactive role of these polyphenolic compounds. The pathway network analysis and molecular data revealed that baicalein and myricetin exert their chemopreventive effects by activation of Nrf2-ARE pathway, which could not only help us to apply microarray in nutrigenomic research and evidence-based traditional medicine research for improving the human health, but also guide us to study the interactome and transcriptome of Nrf2 in the future research.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	覃 思
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 准教授 大塚 彰
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球大学 教授 和田浩二
	副査 鹿児島大学 准教授 小松正治
審査協力者	
題 目	Gene expression profiling and regulation mechanisms of hepatic antioxidant enzymes by chemopreventive polyphenolic compounds (機能性ポリフェノール化合物による肝臓抗酸化酵素遺伝子の発現プロファイリングおよび制御機構に関する研究)
<p>ポリフェノール化合物は多くの植物性食品に含まれており、抗酸化能をはじめ多くの生体調節機能性を持つことが報告されている。近年、その作用機序に関する分子レベルでの解析が進められているが、単一や数個の遺伝子をマーカーとして解析を行ったものが多く、ポリフェノール化合物の生体に対する作用の全体像および分子機構は明らかにされていない。</p> <p>本研究は、ポリフェノール化合物の抗酸化作用機構をゲノムワイドで明らかにするため、DNAマイクロアレイなどの解析手法を用いて代表的ポリフェノール類化合物（バイカリン、ミリセチン）の肝細胞における作用を明らかにした。その結果、バイカリンやミリセチンで処理した肝細胞において発現量が2倍以上に上昇した遺伝子数の割合はそれぞれ全遺伝子数の1.04%および0.33%であり、また</p>	

発現量が2倍以上に低下した遺伝子数の割合はそれぞれ全遺伝子数 0.60%および 1.08%であった。これらの遺伝子を、グループ解析により生物学プロセス、分子機能、細胞内シグナル伝達経路などの35種類に分類した。また、これらの遺伝子発現の制御に関する分子機序を明らかにするため、シグナル伝達分析システム IPA を用いて、バイカリンやミリセチンによりこれらの遺伝子の発現を制御する上位 10個のシグナル伝達経路を明らかにした。特に、Nrf2 を仲介する細胞抗酸化経路は、バイカリンやミリセチンにより著しく活性化されていることを見いだした。Nrf2 は、転写因子で抗酸化剤応答配列 (ARE) を仲介し、細胞内抗酸化酵素などの遺伝子群の発現を統括的に制御し、細胞保護において重要な役割を果たす因子である。Nrf2 が細胞質において Keap1 と結合し、ユビキチン・プロテアソーム機構によって分解されるため、Nrf2 の安定化および核内移行が、細胞保護機構の活性化に不可欠である。その制御機構を解析した結果、バイカリンやミリセチンは、Nrf2 を活性化する上流の MAP キナーゼを活性し、Nrf2 のユビキチン化および代謝分解速度を抑制した。さらに、両者が Keap1 を修飾することにより、Nrf2 への抑制機能を失活させた。これらの作用は Nrf2 の安定化および核内移行を促進し、ARE を仲介した抗酸化酵素などの遺伝子群の発現を上昇させた。さらに、Nrf2 の発現抑制配列 siRNA を用いて、バイカリンやミリセチンによる ARE の活性化には Nrf2 が必要であることを明らかにした。従って、これらのポリフェノール化合物が Nrf2 を安定化させることで ARE を仲介した抗酸化酵素などの遺伝子群の発現を促進し、細胞保護機能を発揮すると考えられた。

以上の研究は、ポリフェノール化合物であるバイカリンやミリセチンの細胞保護機能をゲノムスケールで明らかにし、その制御機構を細胞・分子レベルで解明したもので、機能性ポリフェノール化合物による病気の予防に新たな知見を提供するものである。よって、本論文は博士(農学)の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	覃 思
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 准教授 大塚 彰
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球大学 教授 和田浩二
	副査 鹿児島大学 准教授 小松正治
審査協力者	
実施年月日	平成 2 5 年 1 月 1 1 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成 2 5 年 1 月 1 1 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士 (農学) の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	覃 思
[質問 1]	Nrf2 のリン酸化は Keap1 からの解離が必要ですか。
[回答 1]	はい、必要です。これまでの研究は、Nrf2 が Nrf2-Keap1 等の複合体から解離し、プロテインキナーゼによりリン酸化され、核内移行を経て転写活性化を引き起こすことが明らかとなっています。本研究ではプロテインキナーゼの阻害剤がバイカリンによる Nrf2 の活性化を阻害したため、Nrf2 のリン酸化は Keap1 からの解離が必要だと考えています。
[質問 2]	細胞実験に使用されたバイカリン濃度(20 μ M) は生体内でも可能ですか？
[回答 2]	バイカリンの生体内濃度についてはまだ報告がありませんので、比較できませんが、一般的に培養細胞実験に用いた活性物質の濃度は、作用機序をよりよく解析するために、生体内の濃度より高く使用されています。
[質問 3]	ポリフェノールの構造活性の関係ですが、Nrf2 活性の誘導において、どこの構造が必要ですか？
[回答 3]	本研究に用いた 2 つのポリフェノール以外に、quercetin、cyanidin、chrysin、naringenin、genistein と epicatechin 等のポリフェノール化合物も Nrf2 活性を誘導できると報告されています。これらの化合物の構造を比較すると、A 環、B 環と C 環を構成するフラバン構造が必要だと考えています。
[質問 4]	A 環、B 環と C 環はどちらが重要ですか？
[回答 4]	どちらが重要かというのは明らかではありませんが、試験管レベルでの実験結果は、特定の環より、各環にあるヒドロキシル基の数及びその位置がポリフェノール化合物の抗酸化能に強く関与しています。
[質問 5]	Nrf2 に 3 つの活性機構がありますが、どちらが重要ですか？
[回答 5]	環境刺激によって 3 つの活性機構を使い分けることがあるので、どちらが重

要かと言い難いですが、バイカリンの場合には Keap1 の修飾と Nrf2 の安定化が強く関与し、重要な活性機構だと考えています。

[質問 6] バイカリンは、どのように Keap1 を修飾しますか？

[回答 6] バイカリンにより修飾された Keap1 は、重合体として検出できましたが、修飾したアミノ酸はまだ同定できていません。抗酸化化合物がよく Keap1 の Cys 残基を修飾すると報告されているので、バイカリンも Keap1 の Cys 残基を修飾すると推定していますが、今後の確認研究が必要です。

[質問 7] CHX 実験でなぜ Keap1 の減少が認められませんでしたか？

[回答 7] Nrf2 の分解に対して 2 時間内、Keap1 の分解時間には 12 時間以上が必要だと報告されています。本研究は Nrf2 の安定性を解析するため、時間を 2 時間にしたので、Keap1 の減少が見られなかったと考えています。

[質問 8] ポリフェノールの代謝における ABC トランスポーターの作用は何ですか？

[回答 8] ABC トランスポーターがポリフェノールを基質として作用するので、バイカリン等のポリフェノールの生体利用率、組織分布および機能性修飾にも影響を及ぼすと考えられます。