

学位論文要旨	
氏名	隈元 拓馬
題目	ミリセチンの細胞癌化予防作用とその標的分子の研究 (Cell Transformation Inhibition and Molecular Targets by Myricetin)
<p>細胞の発癌過程は主にイニシエーション・プロモーション・プログレッションの3段階からなり、プロモーション段階は長期間、繰り返し連続的に起こる反応である。そのため、細胞がん化を抑制する化合物は細胞がん化予防に有効と考えられる。食品機能性成分中のポリフェノールが細胞がん化抑制に関与することが報告されているが、その標的分子及び分子メカニズムはまだ不明である。</p> <p>ミリセチンはフラボノールの1種で、タマネギやベリー、ブドウなどに多く含まれており、これまでに抗酸化をはじめ多くの生理機能が報告されている。本学位論文は10数種類の食品成分の細胞がん化抑制効果を検討し、ミリセチンが強力にEGF及びTPA誘導性の細胞がん化を抑制することを見出した。さらにその作用標的分子の同定及び分子メカニズムの解析を行った。</p> <p>プロテインキナーゼ(PK)のリン酸化を測定した結果、ミリセチンはEGF誘導性のJAK1を抑制したが、JAK2及び上流のEGFRリン酸化を抑制しなかった。また、ミリセチンはTPA誘導性のAktのリン酸化及び酵素活性も抑制した。結合実験よりミリセチンは直接的にJAK1、PI3Kα、Akt及びMEK1/ERKに結合し、さらにPI3KαとAktでは、ATP競合阻害的な結合を示した。分子モデリングの結果、ミリセチンはPI3KαとAktのATP部位・アクチベーションループ及びERKのアクチベーションループに結合した。以上の結果より、ミリセチンはJAK1、PI3Kα、Akt及びMEK1/ERKを標的分子としていることが示唆された。これらの標的分子により制御される細胞信号伝達系について解析した結果、①ミリセチンは、EGF誘導性の転写因子STAT3の転写・DNA結合活性を抑制した。また、JAK1の特異的阻害剤を用いた実験より、JAK1/STAT3信号伝達系が細胞がん化に重要であることを証明した。以上の結果より、ミリセチンはJAK1のキナーゼドメインに結合することにより、EGF誘導性の細胞がん化を抑制することが示唆された。②ミリセチンは、TPA誘導性の転写因子AP-1の転写・DNA結合活性を抑制した。さらに、Akt/AP-1信号伝達系標的分子であるcyclin D1のRNA・タンパク質発現を抑制し、細胞周期の促進も抑制した。以上の結果より、ミリセチンはPI3Kα及びAktのATP部位に競合的に結合することにより、TPA誘導性の細胞がん化を抑制することが示唆された。</p> <p>以上の研究は、ミリセチンの細胞がん化予防作用を細胞分子レベルで明らかにし、食品成分による細胞がん化予防作用に新たな知見を提供するものである。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Takuma Kumamoto

題 目

Cell Transformation Inhibition and Molecular Targets by Myricetin
(ミリセチンの細胞癌化予防作用とその標的分子の研究)

Carcinogenesis can be divided into three steps: initiation, promotion and progression. Tumor promotion comprises the selective clonally expansion of initiated cells and subsequently cell transformation occurs after pre-neoplastic cell for a long time. Polyphenols have been reported to interact with cell transformation, however, carcinogenesis-related molecular targets and mechanisms of bioactive dietary compounds are little known.

Myricetin (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavone), one of the major flavonols in onions, berries and grapes, has been reported to have various biological effects, such as antioxidant. In this study, colony assay revealed that myricetin strongly inhibited epidermal growth factor (EGF)- or 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cell transformation. To further elucidate the chemopreventive effects of myricetin, the signal transduction pathway and molecular targets by myricetin were investigated.

The results showed that myricetin inhibited EGF-induced phosphorylation of JAK1, but not JAK2 and EGFR. Myricetin also inhibited TPA-induced Akt phosphorylation and kinase activation. Binding data revealed that myricetin targeted JAK1, PI3K α , Akt and MEK1/ERK. Moreover, myricetin bound to PI3K α and Akt in ATP-binding site competitive with ATP. Molecular modeling revealed that myricetin bound to ATP-binding site and activation-loop of PI3K α and Akt, and activation-loop of ERK. These data suggest that myricetin targets JAK1, PI3K α , Akt and MEK1/ERK. To clarify intracellular signaling of molecular targets, the action of JAK1/STAT3 and Akt/AP-1 signaling by myricetin were further investigated. The results revealed that 1) myricetin inhibited EGF-induced phosphorylation, transcriptional and DNA-binding activities of STAT3. Furthermore, JAK1/STAT3 signaling is proved to be involved in EGF-induced cell transformation by JAK1 specific inhibitor, piceatannol. These data suggest that myricetin targets JAK1 molecule to inhibit JAK1-mediated STAT3 activation and cell transformation; 2) Myricetin inhibited TPA-induced transcriptional and DNA-binding activities of AP-1. Cyclin D1 is one of the important target genes of Akt/AP-1 signaling and associated with cell transformation. Myricetin suppressed the expression of cyclin D1 mRNA and protein, subsequently arresting TPA-induced cell cycle progression. These data suggest that myricetin targets the ATP-binding site of PI3K α and Akt to arrest PI3K α /Akt-mediated cell cycle and inhibit cell transformation.

These findings will give new insights into understanding cancer chemopreventive function of myricetin at molecular level.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	隈元 拓馬
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
	副査 佐 賀 大学 教授 柳田 晃良
	副査 琉 球 大学 教授 安田 正昭
	副査 琉 球 大学 教授 屋 宏典
審査協力者	
題 目	Cell Transformation Inhibition and Molecular Targets by Myricetin (ミリセチンの細胞癌化予防作用とその標的分子の研究)
<p>細胞の発癌過程は主にイニシエーション、プロモーションおよびプログレッションの3段階からなり、特にプロモーション段階は長期間にわたり連続的に起こる反応である。そのため、細胞癌化を抑制する化合物は細胞癌化予防に有効と考えられる。食品機能性成分中のポリフェノールが細胞癌化抑制に関与することが報告されているが、その標的分子および分子メカニズムはまだ不明である。</p> <p>ミリセチンはフラボノールの1種で、タマネギやベリー、ブドウなどに多く含まれており、これまでに抗酸化をはじめ多くの生理機能が報告されている。本学位論文は10数種類の食品成分の細胞癌化抑制効果を検討し、ミリセチンがEGFおよびTPA誘導性の細胞癌化を強く抑制することを見出した。さらにその作用標的分子の同定および分子メカニズムの解析を行った。</p>	

プロテインキナーゼ (PK) のリン酸化を測定した結果、ミリセチンは EGF 誘導性の JAK1 を抑制したが、JAK2 および上流の EGFR リン酸化を抑制しなかった。また、ミリセチンは TPA 誘導性の Akt のリン酸化および酵素活性も抑制した。結合実験よりミリセチンは直接的に JAK1、PI3K α 、Akt および MEK1/ERK に結合し、さらに PI3K α と Akt では、ATP 競合阻害的な結合を示した。分子モデリングの結果、ミリセチンは PI3K α と Akt の ATP 結合部位および ERK のアクチベーションループに結合した。以上の結果より、ミリセチンは JAK1、PI3K α 、Akt および MEK1/ERK を標的分子としていることが示唆された。これらの標的分子により制御される細胞信号伝達系について解析した結果、①ミリセチンは、EGF 誘導性の転写因子 STAT3 の転写および DNA 結合活性を抑制した。また、JAK1 の特異的阻害剤を用いた実験より、JAK1/STAT3 信号伝達系が細胞癌化に重要であることを証明した。以上の結果より、ミリセチンは JAK1 のキナーゼドメインに結合することにより、EGF 誘導性の細胞癌化を抑制することが示唆された。②ミリセチンは、TPA 誘導性の転写因子 AP-1 の転写および DNA 結合活性を抑制した。さらに、Akt/AP-1 信号伝達系標的分子である cyclin D1 の RNA およびタンパク質発現を抑制し、細胞周期の促進も抑制した。以上の結果より、ミリセチンは PI3K α および Akt の ATP 結合部位に競合的に結合することにより、TPA 誘導性の細胞癌化を抑制することが示唆された。

以上の研究は、ミリセチンの細胞癌化予防作用を細胞分子レベルで明らかにし、食品成分による細胞癌化予防作用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	隈元 拓馬
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
	副査 佐 賀 大学 教授 柳田 晃良
	副査 琉 球 大学 教授 安田 正昭
	副査 琉 球 大学 教授 屋 宏典
審査協力者	
実施年月日	平成21年7月23日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査および副査は、平成21年7月23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	隈元 拓馬
<p>[質問 1] ミリセチンを最終的に利用するとしたらどのような形で利用できるか？ミリセチンを食品や薬として用いる場合、濃度的・代謝的な問題が必ず出てくると思う。では、動物実験でやった場合の代謝はどのような過程を経るのか？</p> <p>[回答 1] ミリセチンの動物における代謝の報告では、肝臓で一番多く代謝され、その次に腎臓と腸管から吸収されるという報告があることから、肝臓での代謝を中心に進むのではないかと考えている。濃度の問題は今後の検討課題である。</p> <p>[質問 2] EGF レセプターの自己リン酸化が促進している。これはシグナルが強くなるのか、弱くなるのか、どちらの意味を持つのか？</p> <p>[回答 2] 自己リン酸化を促進するのは、下流のシグナルを促進することになるので抗癌作用の観点からするとマイナスです。しかし、ここでは JAK1 をターゲットとし、下流のシグナルを抑制しているので、この問題はあまり重要ではないと考えた。また、この EGF レセプターの自己リン酸化がプラスになった原因としては、EGF レセプターには多くのリン酸化サイトが存在している。このことより、EGF レセプターが活性化されるだけで様々なシグナルが伝達される。注目していただきたいのは、1045 番目のリン酸化サイトで 1045 に反応する Cbl は、ユビキチン化反応を促進するタンパク質である。これにより、EGF レセプターはリン酸化と同時に分解されていく。我々の以前のデータで、ミリセチンが EGF レセプターの Ub 化を抑制し、レセプターの分解抑えている傾向が見られた。よって、ミリセチンは EGF レセプターの分解を抑えることで、最終的にリン酸化された EGF レセプターが蓄積され、自己リン酸化が促進しているのではないかと推測されます。さらに、pull-down assay で直接的な結合が見られなかったことから、間接的にレセプターを安定化させることでリン酸化状態を保持しているのではないかと考えている。</p> <p>[質問 3] 細胞周期に関して、ミリセチンが TPA-dependent な Akt-API シグナルを抑制するということだが、ミリセチンだけでも細胞周期に影響しているということは、Akt 以外でも関与があるのか？ つまり、TPA-dependent 以外の状況でも、ミリセチンは細胞周期を制御しているのか？</p> <p>[回答 3] 実際のデータでは、そこまで調べてはいなかった。しかし、その可能性も考えられるし、cyclinD1 の発現に関しても、ミリセチンは内在性の cyclin D1 の量も抑制している</p>	

ので、TPA-independent な制御も考えられると思う。

[質問 4] 抗癌作用（細胞形質転換）において、構造の違いに関連性があるのか？

[回答 4] 他のグループの研究データより、数 10 種類の食品に関して EGF 誘導性の細胞形質転換抑制能を調べたところ、ミリセチンやケルセチンに高い細胞形質転換抑制効果がみられました。これらを比較すると細胞形質転換に関して B 環の OH 基が重要であることが示されている。

[質問 5] ミリセチンと Akt のドッキングデータから、アフィニティーの数値は出てくるのか？

[回答 5] U_dock という値が、コンピューター上で計算ができる。しかしながら、実際のアフィニティーアッセイデータと誤差が生じることもある。ドッキングのデータは 5 回行って、その平均値を載せている。

[質問 6] JAK1 のアフィニティーアッセイのデータで、値が急に下がっているのはアフィニティーが強い (Kd 値が低い) というのか？また、この方法からは、Kd 値は出せないのか？

[回答 6] このデータはミリセチン添加後の結合状態を表しているだけの図であり、Kd 値を求められないので、アフィニティーが強いということはいえない。Kd 値を求める手法は別にある。

[質問 7] これら 3 つの経路のうち、どれが一番重要だと思うか？

[回答 7] 現時点では分からないが、これからアフィニティーアッセイの手法を用いて、それぞれの Kd 値を求め、ミリセチンがどの kinase に強く結合するかを比較できれば、どの経路が最も重要であるのか明らかにすることができると考えている。

[質問 8] いろいろな細胞があるけど、どうしてこの細胞を用いたのか？

[回答 8] これまでの報告により、この JB6 細胞は細胞形質転換のモデル系として確立されているので、食品成分による細胞形質転換の抑制研究に適当であると考えている。