

植物性食品由来の生体防御活性化合物とその作用機構に関する研究

中村宜督 (岡山大学 大学院自然科学研究科)

yossan@cc.okayama-u.ac.jp

食品による生活習慣病予防を目指し、新規抗酸化性素材を野菜や果物といった植物性食品に起源を求め、その探索・開発研究を幅広く行ってきた。具体的には、新たに構築した細胞・動物実験系を用いて、「解毒酵素や活性酸素産生酵素の調節により生体防御応答を活性化する物質」という新たな範疇の抗酸化物質を単離・評価し、それらの作用機構を生体成分との反応性を中心に解析するとともに、生体内での有効性についても言及してきた。

はじめに

野菜の摂取と健康状態に関する疫学的研究は数多く、がんや虚血性心疾患など様々な疾患リスクの低減だけでなく、通常健康状態に関しても野菜の有効・有用性が示唆されている。その一方で、食生活の欧米化から、肉・魚介類消費の順調な伸びに対し、野菜消費量が減少の一途を辿っている。特に、若年齢層での減少が顕著であり、生活習慣病の若年齢化との相関から、社会問題として注目を浴びている。また、健康情報の氾濫とサプリメント市場の急激な成長により、サプリメントを利用しておけば食生活はないがしろにしても構わないという風潮に歯止めがかからない。野菜の摂取を推奨していくためには、健康と野菜摂取との関連を科学的かつ体系的に解明することが今一度必要であり、農林水産省の野菜消費改善に関する対策事業においても、野菜の機能性に注目した研究・調査は、長年にわたって継続した最重要課題となっている。野菜中の機能性成分の性質や分布を正確に理解できれば、より健全な「日本型食生活」への回帰を目指した野菜の消費拡大の一助となることはいうまでもない。

食品機能の基盤的研究のなかで、最も体系的に進んでいる研究分野として、がん予防研究が挙げられる¹⁾。発がん物質の排除と発がん抑制物質の摂取が「がんの化学予防」の基本戦略であるが、多数の疫学・動物実験の成果から、野菜や果物などの摂取が予防に有効であるといわれて久しい。特に、1990年代に米国で「デザイナーフーズ」計画がスタートしたことをきっかけとしたこれまでの研究は、がん予防だけでなく、その他の疾病をターゲットとした食品機能研究の進展に大きく寄与してきた。その一方で、 β -カロテンのヒト介入試験での不成功から、食品成分による疾病予防法確立への道は決して平坦なものではないことも浮彫りとなった。現在、食品によるがん予防研究は、ヒトにおける有効性をどのように評価して行くかが共通課題となっている。また、これまで有効とされてきた素材の再評価、品種改良などによる有効成分(活性及び含量)の増強素材の開発、より偏りの少ない食事・栄養指導など、網羅すべき課題の広がりにより、食品化学分野は新展開の局面を迎えている。このような背景を考慮に入れ、演者は野菜など植物性食品成分の日常的な摂取によるがん予防を究極的な目標としながら、生体防御賦活作用を持つ植物性食品成分に関する研究を進めてきた。これらに加えて、産業廃棄物として処分されている未利用資源の有効利用を視野に入れ、ゴマ脱脂粕や野生種柑橘類などの嗜好性改善や機能性の向上に関する研究を行い^{2,3)}、新規機能性素材開発に関する基礎的な知見を得ているが、紙面等の都合で割愛させて頂く。

イソチオシアネートによる生体防御活性化

近年、注目しているイソチオシアネート(ITC)類は、疫学的研究などから現在最もがん予防効果の期待される食品成分である。辛子油という名で古くから知られる ITC 類は、特異な官能基(-N=C=S)を有する化合物の総称で、アブラナ科植物の組織を磨砕した時に生ずる刺激性の強い香味性成分であり、時にはその強い風味はヒトの食欲を増進させるものである。ITC 類は、特にアブラナ科植物を中心に普遍的に含まれているが、側鎖の違う百数十もの類縁体が報告されており⁴⁾、黒マスタード、ワサビに多く含まれる allyl ITC、ブロッコリーの sulforaphane、などが

著名である (Fig. 1)。

我々の研究グループでは数年前に、ITC 類の一つである benzyl ITC (BITC) を、強力な第 2 相解毒酵素誘導物質としてパイナップル果実から単離し、ITC 類の持つ強力で多彩な生理活性に魅了された。究極発がん物質の無毒化や内因性抗酸化作用に重要な役割を果たす、この第 2 相解毒酵素系 (GST: glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase, etc.) を介した生体防御応答の活性化は、疫学的研究からもヒトのがん予防への関与が示唆されている。ITC 類を含めた解毒酵素誘導物質の作用メカニズムは、これまでにはほぼその全容が明らかになりつつある。その詳細は成書に譲る⁵⁾が、最近の知見をまとめると、解毒酵素誘導物質は、解毒酵素遺伝子発現抑制因子である Keap1 の特定のシステイン残基と直接、或いは活性酸素を介して反応することで、立体構造を大きく変化させ、転写因子 Nrf2 との解離を促進する、Nrf2 タンパク質の発現を転写レベルで上昇させる、Nrf2 のプロテアソーム系による分解を抑制する、などの機構が示唆されている。以上のように、解毒酵素誘導による生体防御応答の活性化機構が明らかにされ、この機構を活性化する食品成分はがん予防戦略を考える上で極めて重要なターゲットの一つであるとの認識が深まっている。このような背景から我々の研究グループでは、細胞スクリーニングから選出した高感受性正常肝由来細胞株 RL34 を用いて、GST 誘導活性の短期評価法を開発し、強力な GST 誘導物質を植物性食品などから複数同定してきた。これらの成果は、東南アジア産ハーブ、果物類が解毒酵素誘導物質の有望なソースであること、GST 誘導物質を予め投与しておいた細胞や動物では、酸化ストレスに対する抵抗性が上昇することなどを明らかにしており (Fig. 2)、これまではラジカル消去物質が中心であった抗酸化素材研究に新たな方向性を与えるものと考えている。その一方で最近、我々の研究グループでは新たな生体内抗酸化経路の関与を示唆する実験結果を得た。

BITC は白血球の NADPH oxidase に依存した活性酸素の産生を有意に阻害し、電子伝達を担う NADPH oxidase 構成蛋白質 gp91^{PHOX} に対する BITC の求電子的な修飾が酵素活性阻害のメカニズムであることが示唆された。また、BITC は炎症惹起により一過的に集積した白血球の消失を促進すること、この消失にはアポトーシス誘導が関与していることも観察した。これをきっかけに現在、ITC 類が誘導する細胞生理学的応答の分子機構に関する研究を本格的に展開している。

従来は抗酸化物質ラジカル消去型が中心であったが、解毒酵素誘導物質は、活性酸素フリーラジカルを捕捉・還元し、転写活性化を介して抗酸化酵素遺伝子の発現を促進し、抗酸化酵素発現量を増加させることで、活性酸素を分解・消去する。このように、解毒酵素誘導物質は、従来の抗酸化物質とは異なる作用機序を持つ。

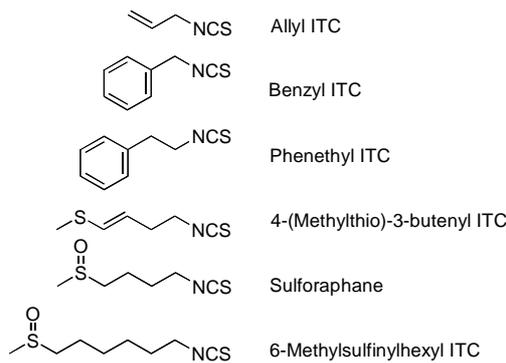


Fig. 1 植物性食品由来の isothiocyanate (ITC) 類

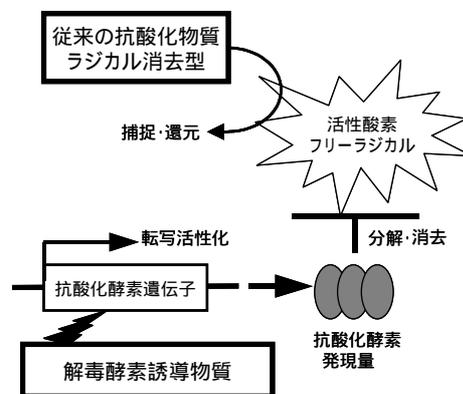


Fig. 2 解毒酵素誘導物質の生体内抗酸化作用発現機構

イソチオシアネートによるアポトーシス誘導作用

解毒酵素誘導と並んで注目されている、ITC 類の発がん抑制に関連する生理作用としてアポトーシスが挙げられる。演者らは BITC も強力なアポトーシス誘導作用を有することを見出し、その分子機構に大変興味を持った。その一方で、細胞内の BITC 濃度が高くなり過ぎると、活性酸素種の生成が起り、細胞死形式がネクローシスへと移行することも観察していた。この高濃度投与より誘導される活性酸素は、現在 ITC 類による腎臓、膀胱での臓器特異的な発がん促進作用のメカニズムとして注目されている⁶⁾。我々の研究グループではこの点を考慮に入れ、ITC 類はがん細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導できるのか、また、その特異性や細胞死形式を決定している分子は何なのか、に焦点を絞って研究をはじめた。まず、ヒト白血病細胞を用いた解析から、BITC によるアポト

シス誘導は細胞周期停止細胞(G₂/M期)からの特異的な誘導であり、この細胞周期停止とアポトーシスは連続した一連の現象であることをはじめて明らかにした。この新しい発見は、細胞の増殖状態に影響を受けたという予備的な観察結果とともに、細胞周期の進行/停止により BITC に対する感受性が変化するのではないか、細胞周期を制御する分子によって調節を受けているのではないか、という新しい作業仮説を我々に与えた。そこで、この仮説の検証を行った結果、休止細胞は BITC に抵抗性を示し、増殖性細胞のみ選択的に細胞死が誘導された(投稿中)。また、休止細胞ではがん抑制遺伝子 p53 の蓄積が著しく増加していた。この結果は、生体内において大部分の正常細胞が休止状態にあること、また p53 はがんにおいて高頻度に変異していることから、増殖性を維持しているがん細胞への選択的な細胞死誘導の可能性を示している。ITC 類のアポトーシス誘導作用に対する感受性は、p53 のみに依存している訳ではなく、glutathione 濃度や GST 活性にも影響を受けることが知られているが、本研究で示したデータは、副作用の少ないがん予防アプローチを考える上で極めて重要な知見であると考えている。

結 語

現在、ITC 類をはじめとする解毒酵素誘導物質が、少なくともがんの予防に関して、最も期待される食品成分の一つである。それゆえ、解毒酵素誘導の観点からの野菜の再評価、新規物質の探索、誘導物質高含有野菜の創成を、これからの課題として挙げておきたい。今回紹介した生理作用の発現には、ITC 類の構造的特徴である反応性の高い ITC 基が重要な役割を果たしている。その反面、細胞内に ITC 類が高濃度に存在すると非特異的の反応により、毒性が発現することも明白となっている。それゆえ、ITC 類の応用を考える上では、ITC 類(或いはそれを含む野菜)を経口摂取した際の生体内での濃度が重要となる。これまでのプロッコリーやクレソン等、野菜を摂取したヒトの研究結果からは、毒性を発現するためには通常の食事の数十倍の摂取が必要であり、非現実的であると考えられている。しかしながら、不十分な野菜の摂取を有効成分のサプリメントで補おうという観点が定着しつつあり、それらに関する代謝・体内動態を含めた毒性学的研究が立ち後れていることも事実である。ITC 類も例にもれず、高用量での臓器特異的な毒性も明らかになりつつあることから、「サプリメントがある故に普通の食生活を疎かにしても構わない」という考え方に警鐘を鳴らしながら、基礎的な研究では ITC 類の代謝物が示す細胞応答や毒性発現に関するさらなる分子機構研究を今後行っていきたいと考えている。

謝 辞

本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学研究室、および岡山大学大学院自然科学研究科食品生物化学研究室において行われたものであり、その間、終始ご指導ご鞭撻を賜りました大澤俊彦先生、内田浩二先生(名古屋大学)、および多田幹郎先生(岡山大学)に深く感謝いたします。本課題は実に多くの先生方や学生・卒業生に支えられており、謝意を表したい方は多数居られますが、紙面の都合上、学生時代の恩師である大東肇先生および村上明先生(京都大学大学院農学研究科)に深く感謝いたします。最後になりましたが、本賞に推薦くださいました日本農芸化学会会長の上野川修一先生および関連の諸先生方に感謝いたします。

引用文献

1. 大澤俊彦編 (2005) がん予防食品開発の新展開、シーエムシー出版、東京.
2. Miyake, Y., Fukumoto, S., Okada, M., Sakaida, K., Nakamura, Y. and Osawa, T. (2005) Antioxidative catechol lignans converted from sesamin and sesaminol triglucoside by culturing with *Aspergillus*. *J. Agric. Food Chem.* 53:22-27.
3. Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H. and Osawa, T. (2003) Dihydrochalcones: Evaluation as novel radical-scavenging antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 51:3309-3312.

4. Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
5. 内田浩二・森光康次郎 (2004) 食品による解毒酵素の誘導とがん予防. 食品成分のはたらき、朝倉書店、東京、pp.46-58.
6. Akagi, K., M. Sano, K. Ogawa, M. Hirose, H. Goshima and T. Shirai (2003) Involvement of toxicity as an early event in urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats, *Toxicol. Pathol.*, 31, 388-396.

業績リスト

1. Nakamura, Y., Yoshida, C., Murakami, A., Ohigashi, H., Osawa, T. and Uchida, K. (2004) Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, activates phase II drug metabolizing enzymes. *FEBS Lett.* 572:245-250.
2. Miyoshi, N., Takabayashi, S., Osawa, T. and Nakamura, Y. (2004) Benzyl isothiocyanate inhibits excessive superoxide generation in inflammatory leukocytes: Implication for prevention against inflammation-related carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25:567-575.
3. Miyoshi, N., Uchida, K., Osawa, T. and Nakamura, Y. (2004) A link between benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrest and apoptosis: Involvement of mitogen-activated protein kinases in the Bcl-2 phosphorylation. *Cancer Res.* 64:2134-2142.
4. Nakamura, Y., Kumagai, T., Yoshida, C., Naito, Y., Miyamoto, M., Ohigashi, H., Osawa, T. and Uchida, K. (2003) Pivotal role of electrophilicity in glutathione S-transferase induction by tert-butylhydroquinone. *Biochemistry* 42:4300-4309.
5. Nakamura, Y., Kawakami, M., Yoshihiro, A., Miyoshi, N., Ohigashi, H., Kawai, K., Osawa, T. and Uchida, K. (2002) Involvement of the mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:8492-8499.
6. Nakamura, Y., Feng, Q., Kumagai, T., Torikai, K., Ohigashi, H., Osawa, T., Noguchi, N., Niki, E. and Uchida, K. (2002) Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant: Implication for inflammation-associated carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* 277:2687-2694.
7. Nakamura, Y., Ohigashi, H., Masuda, S., Murakami, A., Morimitsu, Y., Kawamoto, Y., Osawa, T., Imagawa, M. and Uchida, K. (2000) Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzyl isothiocyanate: Correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.* 60:219-225.
8. Nakamura, Y. (2003) Isothiocyanates as Inducers of Phase II Drug-metabolizing Enzyme. *Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention*. ACS symposium series 851, ACS, Washington D.C., pp. 358-368.
9. 中村宜督 (2004) イソチオシアネートによるがん予防の可能性:細胞増殖の選択的制御とその分子機構. *Environ. Mutagen Res.* 26:251-256.
10. 中村宜督 (2005) がん抑制におけるアポトーシスの意義. がん予防食品開発の新展開、シーエムシー出版、東京、pp. 31-51.

Biodefense Activators from Plant Foods and Their Underlying Molecular Mechanisms

Yoshimasa Nakamura (Okayama University, Graduate School of Natural Science and Technology)

yossan@cc.okayama-u.ac.jp