

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	大西 康太
論文題目	Hormetic Effects of Zerumbone in Proteostasis (タンパク質恒常性維持におけるゼルンボンのホルミシス効果)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、機能性食品が注目を浴びているが、その科学的研究は未だ発展途上にある。特に、食品成分と生体内分子との化学的相互作用に基づいた作用機構については、研究例がほとんどない。本研究では、発がん抑制活性を有するテルペノイドであるゼルンボン (東南アジア産ハナショウガ由来) に着目し、その生体内標的分子の同定とその生理的意義の解明を試みた。本物質の生理活性が α,β-不飽和カルボニル構造に由来することから、この求電子性官能基に対する生体タンパク質の求核付加反応を想定した。本論文の主な内容は以下の通りである。</p> <p>第 1 章では、ゼルンボンを固定化したセファロースビーズを調製し、RAW264.7 マウスマクロファージの抽出液に対する結合試験を行った。その結果、炎症関連遺伝子の発現制御に関わる RNA 結合タンパク質である HuR や、解毒酵素の転写制御因子である Keap1 などとの結合を認めた。同時に、ゼルンボンが細胞内タンパク質のチオール基によって求核付加を受けることが強く示唆された。</p> <p>第 2 章では、ゼルンボンのビオチン標識体及びチオール付加体構造を特異的に認識する抗体を調製し、培養状態の RAW264.7 における結合タンパク質の検出を試みた。その結果、予想に反して、きわめて多くのゼルンボン修飾タンパク質が検出された。また、ゼルンボンで処理した RAW264.7 を本抗体により免疫染色したところ、ゼルンボン付加体に特定の細胞内小器官などにおける局在性は認められなかった。以上の結果から、ゼルンボンと細胞内タンパク質との相互作用には、選択性の低い非特異的な共有結合が関与することを明らかにした。</p> <p>一般に、細胞内に生じた変性タンパク質は、まず、構成型分子シャペロンである heat shock protein 90 (HSP90) により認識され、修復を受ける。これに伴い、HSP90 の共役因子である転写因子 heat shock factor 1 (HSF1) が活性化し、誘導型分子シャペロンの転写が開始される (熱ショック応答)。ゼルンボンで処理した Hepal1c7 マウス肝臓がん細胞の抽出液に対して、抗 HSP90 抗体による免疫沈降を行ったところ、ゼルンボン修飾タンパク質と HSP90 との相互作用が認められた。また、本物質は、転写因子 HSF1 の活性化を促進し、誘導型分子シャペロンである HSP70 の発現を誘導した。</p> <p>一方で、実験動物に対するゼルンボンの作用を評価したところ、線虫 <i>C. elegans</i> 及び SD ラットにおいて複数の HSP に対する誘導活性を認めた。また、Hepal1c7 及び <i>C. elegans</i> をゼルンボンで処理することにより、熱ストレスに対する耐性が強化された。以上の結果から、ゼルンボンが、非特異的タンパク質修飾を介して熱ショック応答を誘導することで、タンパク質品質管理機構が活性化することを明らかにした。</p>			

過剰に変性したタンパク質は、細胞内においてユビキチン標識を受けた後、凝集する。このような異常タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系及びオートファジーからなるタンパク質分解系により分解されることが知られている。そこで第 3 章では、まず、ゼルンボンのタンパク質変性を評価した。Hepal1c7 をゼルンボンで処理したところ、変性タンパク質選択的ユビキチンリガーゼである CHIP 依存的に、細胞内ユビキチン化タンパク質が増加した。また、分子ローター色素を用いて細胞内凝集タンパク質を染色した結果、ゼルンボンで処理した細胞において顕著な陽性染色を認めた。以上の結果から、ゼルンボンがタンパク質に対して変性ストレスを与える可能性が示唆された。

続いて、ゼルンボンがタンパク質分解系を活性化する可能性を検証した。Hepal1c7 をゼルンボンで処理することにより、プロテアソームのキモトリプシン様活性が増強するとともに、オートファジーのマーカー分子である LC3-II の発現が増加した。さらに、オートファジー誘導機構の一部として、オートファジー促進遺伝子 p62 の誘導活性を見いだした。内因性の過酸化脂質分解物であるヒドロキシノネナールは、細胞内タンパク質を修飾し、細胞死を誘導するが、ゼルンボンを前処理した細胞においては、これらの細胞毒性が有意に緩和された。興味深いことに、本細胞保護作用は、p62 のノックダウンによりほぼ完全に消失した。以上の結果から、ゼルンボンはタンパク質修復系及び分解系からなるタンパク質品質管理機構を包括的に活性化させることが判明した。

ゼルンボンによるタンパク質品質管理機構の活性化作用は、タンパク質ストレスに対する適応応答（ホルミシス）と捉えることができる。近年、タンパク質品質管理機構は、炎症や発がんなどの様々な生体反応に関係することが報告されており、ゼルンボンの有する種々の生理活性発現機構の一端を担っている可能性が考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

高齢化社会を迎えた現在、機能性食品が各方面で注目を浴びているが、その科学研究はあまり進んでいない。特に、食品成分と生体内タンパク質との相互作用を化学的に研究した例はきわめて少ない。本研究では、発がん抑制活性を有するセスキテルペンであるゼルンボン（東南アジア産ハナショウガ由来）が、細胞内タンパク質に対して非選択的に付加することを見だし、さらに、このようなタンパク質ストレスに対する適応応答として、タンパク質品質管理機構が活性化することを明らかにした。評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. ゼルンボンが、その活性発現に必須な構造である α,β -不飽和カルボニル基を介して、タンパク質のチオール基と共有結合することを明らかにした。また、RAW264.7 マウスマクロファージの抽出液を用いた結合試験により、炎症反応に関与する RNA 結合タンパク質である HuR や解毒酵素の発現を制御する Keap1 とゼルンボンとの結合を見いだした。
2. Hepalcl7 マウス肝臓がん細胞において、ゼルンボンが細胞内タンパク質に非選択的に付加することを見いだした。また、これらの修飾タンパク質が HSP90 により認識され、熱ショック応答を誘導することで、誘導型分子シャペロンの発現が増加することを明らかにした。さらに、ゼルンボンで処理することにより、細胞の熱耐性が強化されたことから、ゼルンボンのタンパク質品質管理機構に対する活性化作用が強く示唆された。一方、同様の活性が、実験動物（線虫及びラット）においても認められた。
3. ゼルンボンで処理した Hepalcl7 において、細胞内タンパク質のユビキチン化及び凝集を認めた。一方で、ゼルンボンのタンパク質分解系に対する活性化能も明らかにした。また、オートファジー誘導機構の一部として、オートファジー促進遺伝子 p62 の発現誘導作用を見だし、ゼルンボンが、p62 の誘導を介して脂質過酸化物によるタンパク質毒性を緩和することを証明した。

以上のように、本論文は、ゼルンボンが非特異的な化学反応を介して細胞内タンパク質にストレスを与え、これに対する適応応答としてタンパク質品質管理機構を活性化させることを初めて示した。このようなタンパク質恒常性維持におけるホルミシス効果は、他の食品機能成分によっても共通して誘導される可能性が示唆されることから、天然物化学、食品機能学、タンパク質化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 25 年 2 月 12 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。