

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19406003

研究課題名 (和文) ベトナム特有の南方薬に含まれる生理活性成分シーズの探索

研究課題名 (英文) Exploration of bioactive compounds from traditional medicinal plants in Vietnam

研究代表者

金保 安則 (KANAHO YASUNORI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：00214437

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、ベトナムにおいて生薬として用いられている植物である *Garcinia vilersiana* に着目し、当該抽出物が転写因子 Nrf2 を活性化する効力を有するか否かを検討した。その結果、RAW264.7 細胞において、*Garcinia vilersiana* の樹皮由来抽出物は Nrf2 を活性化し、抗酸化応答配列 (ARE) への結合活性及び ARE の転写活性化レベルを増加させた。さらに、Nrf2 の活性化に伴い、下流の抗酸化タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現が誘導された。これらの結果は、*Garcinia vilersiana* 抽出物の薬効が、Nrf2/HO-1 経路の活性化を介した生体防御能の上昇に起因している可能性を示唆している。

研究成果の概要 (英文)：

*Garcinia vilersiana* is medium size tree and commonly used for traditional medicinal purposes in Vietnam. In this study, we investigated the ability of *Garcinia vilersiana* extract to activate transcription factor Nrf2 in RAW264.7 cells. We found that *Garcinia vilersiana* bark extract activates Nrf2, leading to increase in antioxidant response element (ARE) binding activity and transcriptional activation of ARE. *Garcinia vilersiana* bark extract was also found to induce heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression, suggesting that the drug action of *Garcinia vilersiana* may be attributable to activation of Nrf2-HO-1 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ベトナム, *Garcinia vilersiana*, Nrf2, Heme oxygenase-1

## 1. 研究開始当初の背景

医療に用いられてきた植物由来成分は、多

くの人体への適用を経てその効果を実証された貴重な医薬品素材である。しかしながら、

天然薬物として今日用いられているものでも有効成分の不明なものが多くあり、有効成分が化学的に明らかにされたと思われるものでも、薬効との関連性が未解決であるなど、天然薬物の正しい評価の確立が不十分である場合が多い。また、未開拓の天然薬物資源に着目すると、そこには新規医薬品及び機能性食品の開発される可能性が大いに開けている。現在使用されている医薬品にも植物由来成分やそれをリード化合物として半合成して開発されたものも多くあり、植物由来成分はリード化合物資源として有用である。特に東南アジア等の熱帯地域では植物資源が豊富であるにもかかわらず、天然薬物の研究は地域の技術的背景のためあまり進んでおらず、そのような地域に植生する植物は新たな医薬品及び機能性食品資源として期待されている。

近年、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファンや、ブドウやワインに含まれるレスベラトロールのような植物由来成分を用いた Nrf2 活性化剤の研究が盛んに行われており、親電子性物質や活性酸素種 (ROS) による傷害を防ぐ試みがなされている。このことは、環境化学物質の解毒には Nrf2 の活性化が重要であり、低毒性でより効率良く Nrf2 を活性化する成分を含む植物は、医薬品や機能性食品に応用できる可能性を示している。

## 2. 研究の目的

本研究では、ベトナムの Ho Chi Minh City National University との共同協力により、ベトナムに植生する植物 *Garcinia vilersiana* に着目した。*Garcinia vilersiana* はオトギリソウ科フクギ属に属する 15 m 程の樹木であり、ベトナムをはじめインドシナ半島各地に植生している。樹皮は緑がかった黄色であり、内側には黄色の樹液を含んでいる。この植物の樹皮は捻挫や傷の炎症部位にあてる等、薬用植物としての利用がなされていることから、この植物には生体防御に関わる薬効成分が含まれている可能性がある。しかしながら、その詳細は明らかではない。本研究では、「*Garcinia vilersiana* の樹皮には Nrf2 活性化成分が含まれている」との仮説を基に、炎症部位に集積するマクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いて、*Garcinia vilersiana* 抽出物の Nrf2 活性化能を解析することを第一の目的とした。更に、環境汚染化学物質のモデルとしてヒ素に着目し、*Garcinia vilersiana* 抽出物の処置によって 3 価の無機ヒ素の細胞毒性が軽減されるか否か明らかにすることを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究で使用した植物由来サンプルは Ho

Chi Minh City National University にて *Garcinia vilersiana* の樹皮を石油エーテルで 48 時間、ソックスレー抽出器を用いて抽出したものであり、これを実験に使用した。

RAW264.7 細胞の細胞毒性は MTT 法にて評価した。*Garcinia vilersiana* 抽出物の Nrf2 活性化能の解析には、Nrf2 のウエスタンブロットを用いた。また、抗酸化応答配列 (ARE) への結合活性をゲルシフト法、ARE の転写活性化をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

## 4. 研究成果

本研究により、ベトナムに植生する植物 *Garcinia vilersiana* の樹皮由来の抽出物が、RAW264.7 細胞において転写因子 Nrf2 を活性化して ARE の転写活性を増強させ、下流の抗酸化タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を誘導する機能を有することを明らかにした。このことは、ベトナムにおいて生薬として用いられている *Garcinia vilersiana* 抽出物の薬効が、Nrf2/HO-1 経路の活性化を介した生体防御能の上昇に起因している可能性を示唆している。

まず、本抽出物の RAW264.7 細胞に対する細胞毒性を検討したところ、24 時間曝露の条件での LD<sub>50</sub> の値は 4.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。他の植物由来の抽出物を用いた毒性試験と比較した場合、生薬として用いられている植物 *Melilotus suaveolens* Ledeb の抽出物を、RAW264.7 細胞に 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 24 時間処理しても細胞死は観察されていない。また、インドやアフリカで民間薬として使用されている *Hibiscus cannabinus* (ケナフ) の抽出物においても、0-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度域では細胞死は全く生じないことが報告されている。これらのことから、本研究にて使用した *Garcinia vilersiana* の樹皮抽出物は、他の生薬として用いられている植物の抽出物よりも強い細胞毒性を有することが示唆された。

次に、*Garcinia vilersiana* の樹皮抽出物の曝露によって Nrf2 が活性化されるか否かを検討した。その結果、本抽出物による顕著な細胞死が生じない低濃度 (1.25-2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の曝露条件において、Nrf2 の核への蓄積、ARE の結合活性の増加、ならびに ARE の転写活性化の上昇が観察された。このことから、*Garcinia vilersiana* 抽出物は転写因子 Nrf2 を活性化させる機能を有することが示唆された。Nrf2 が活性化される主な原因は、Keap1 のシステイン残基が親電子性物質や ROS と反応することで Keap1 の構造変化を引き起こし、Nrf2 の分解が抑制されることに起因している。例えば、ブロッコリースプラウトの含有成分スルフォラファンは Keap1 のシステイン残基と反応し、Cu13 と Keap1 の結合

を減弱させることで Nrf2 を活性化させることが報告されている。したがって、本抽出物中には、Keap1 のシステイン残基と反応する性質を有した化学物質が含まれている可能性が考えられた。

一方、本抽出物の曝露によって Nrf2/HO-1 経路が活性化された条件において、無機ヒ素の細胞毒性を検討したが、毒性の軽減効果は見られなかった。このことから、*Garcinia vilersiana* 抽出物は RAW264.7 細胞において無機ヒ素に対する防御作用を示さないことが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Suzuki A., Arikawa C., Kuwahara Y., Itoh K., Watanabe M., Watanabe H., Suzuki T., Funakoshi Y., Hasegawa H., Kanaho Y.. The scaffold protein JIP3 functions as a downstream effector of the small GTPase ARF6 to regulate neurite morphogenesis of cortical neurons. *FEBS Kett.* in press (2010) (査読有り)
2. Nishida M., Suda R., Nagamatsu Y., Tanabe S., Onohara N., Nakaya M., Kanaho Y., Shibata T., Uchida K., Sumimoto H., Sato Y., Kurose H. Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 15268-15277 (2010) (査読有り)
3. Kanaho Y., Funakoshi Y., Hasegawa H. Phospholipase D signaling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 898-904 (2009) (査読有り)
4. Nishikimi A., Fukuhara H., Su W., Hongu T., Takasuga S., Mihara H., Cao Q., Sanematsu F., Kanai M., Hasegawa H., Tanaka Y., Shibasaki M., Kanaho Y., Sasaki T., Frohman M.A., Fukui Y. Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* **324**, 384-387 (2009) (査読有り)
5. Maehama T., Tanaka M., Nishina H., Murakami M., Kanaho Y., Hanada K. RalA functions as an indispensable signal mediator for nutrient sensing system. *J. Biol. Chem.* **283**, 35053-35059 (2008) (査読有り)
6. Wang Y., Chen X., Lian L., Tang T., Stalker T.J., Sasaki T., Kanaho Y., Brass L.F., Choi J.K., Hartwig J.H., Abrams C.S. Loss of PIP5KI $\beta$  demonstrates that PIP5KI isoform-specific PIP<sub>2</sub> synthesis is required for IP<sub>3</sub> formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 14064-16069 (2008) (査読有り)
7. Wang Y., Litvinov R.I., Chen X., Bach T.L., Lian L., Petrich B.G., Monkley S.J., Kanaho Y., Critchley D.R., Sasaki T., Birnbaum M.J., Weisel J.W., Hartwig J., Abrams C.S. Loss of PIP5KI $\gamma$ , unlike other PIP5KI isoforms, impairs the integrity of the membrane cytoskeleton in murine megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* **118**, 812-819 (2008) (査読有り)
8. Nakano-Kobayashi A., Yamazaki M., Unoki T., Hongu T., Murata C., Taguchi R., Katada T., Frohman M.A., Yokozeki T., Kanaho Y. Role of activation of PIP5K $\gamma$ 661 by AP-2 complex in synaptic vesicle endocytosis. *EMBO J.* **26**, 1105-1116 (2007) (査読有り)
9. Nishio M., Watanabe K., Sasaki J., Taya C., Takasuga S., Iizuka R., Balla T., Yamazaki M., Watanabe H., Itoh R., Kuroda S., Horie Y., Forster I., Mak T.S., Yonekawa H., Penninger J.M., Kanaho Y., Suzuki A., Sasaki T. Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P(3) phosphatase SHIP1. *Nat. Cell Biol.* **9**, 36-44 (2007) (査読有り)

[学会発表] (計 30 件)

1. T. Higuchi, T. Sato, H. Hasegawa, Y. Funakoshi, Y. Kanaho: Isozyme specific activation of PIP5K by ARF6. The 6<sup>th</sup> Japan-Korea Conference in Cellular Signaling for Young Scientists. 2009.11.25. 長崎
2. R. Okada, H. Hasegawa, M. Furuya, Y. Funakoshi, Y. Kanaho: The role of PIP5K in wound healing. The 6<sup>th</sup> Japan-Korea Conference in Cellular Signaling for Young Scientists. 2009.11.25. 長崎
3. Y. Funakoshi, T. Higuchi, T. Sato, H. Hasegawa, Y. Kanaho: Novel activation mechanism of PIP5Kc by the small GTPase ARF6. The 6<sup>th</sup> Japan-Korea Conference in Cellular Signaling for Young Scientists. 2009.11.24. 長崎
4. T. Hongu, Y. Funakoshi, H. Hasegawa, Y. Kanaho: Involvement of small GTPase Arf6 in angiogenesis. 2009.11.18-19. 筑波
5. A. Suzuki, C. Arikawa, Y. Kuwahara, Y. Funakoshi, Y. Kanaho, H. Hasegawa: Regulation of morphology by the small GTPase Arf6 is mediated by the interaction

- with a novel down stream effector, JIP3. International Symposium on Cellular Signaling ~principles and functions~. 2009.11.18-19. 筑波
6. Y. Kanaho: Activation mechanism and physiological function of PIP5K $\gamma$  in neurons. The 10<sup>th</sup> International Molecular Biology and Biotechnology Workshop. 2009.11.13. Taipei, Taiwan
  7. 本宮綱記、船越祐司、長谷川潤、金保安則：血管形成における低分子量 GTP 結合蛋白質 ARF6 の関与. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24. 神戸
  8. 鈴木篤史、有川千尋、桑原裕二、船越祐司、長谷川潤、金保安則：低分子量 G 蛋白質 Arf6 による神経突起分枝制御機構. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24. 神戸
  9. 周森、船越祐司、長谷川潤、金保安則：低分子量 G 蛋白質 ARF6 による肝細胞遊走制御機構の解析. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24. 神戸
  10. 長谷川潤、杉本里香、山下美鈴、野口純子、岡田理沙、鶴木隆光、船越祐司、馬場忠、金保安則：ホスファチジルイノシトールホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼは精子形成に不可欠である. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.24. 神戸
  11. 金保安則、樋口珠美、渡辺宏子、小林裕一、佐藤隆信、長谷川潤、船越祐司：ARF6 は PIP5K をアイソザイム依存的に活性化する. 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.23. 神戸
  12. Y. Kanaho: Regulation of PIP5K isozymes by ARF6. The 15<sup>th</sup> International Symposium on Regulation of Enzyme Activity and Synthesis. 2009.9.28. Bologna, Italy
  13. 鈴木篤史、桑原裕二、船越祐司、長谷川潤、金保安則：シグナル伝達足場タンパク質 JIP3 は Arf6 の下流因子として神経細胞の形態形成を制御する. 平成 21 年度特定領域「G 蛋白質シグナル」研究 班会議, 2009.9.10. 千葉
  14. 本宮綱記、船越祐司、長谷川潤、金保安則：血管形成における低分子量 GTP 結合蛋白質 ARF6 の機能. 第 6 回日本病理学会カンファレンス, 2009.7.31.-8.1. 筑波
  15. 長谷川潤、杉本里香、山下美鈴、野口純子、岡田理沙、鶴木隆光、船越祐司、馬場忠、金保安則：ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ $\alpha$ 、 $\beta$ は精子形成に不可欠である. 第 6 回日本病理学会カンファレンス, 2009.7.31.-8.1. 筑波
  16. 本宮綱記、長谷川潤、金保安則：血管形成における低分子量 GTP 結合蛋白質 ARF6 の関与. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009.6.6. 名古屋
  17. 鶴木隆光、松田信爾、船越祐司、長谷川潤、柚崎通介、金保安則：リン脂質キナーゼ PIP5K $\gamma$ 661 と AP-2 複合体の結合はポストシナプス可塑性を制御する. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009.6.6. 名古屋
  18. 長谷川潤、杉本里香、山下美鈴、野口純子、岡田理沙、鶴木隆光、船越祐司、馬場忠、金保安則：ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼの精子形成への関与. 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009.6.5-6. 名古屋
  19. Y. Kanaho, T. Hongu, Y. Funakoshi, H. Hasegawa: Physiological function of the small GTPase ARF6. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008.12.9. 神戸
  20. 本宮綱記、長谷川潤、金保安則：血管形成における低分子量 G 蛋白質 ARF6 の関与. 第 60 回日本細胞生物学会大会, 2008.7.1. 横浜
  21. Y. Kanaho: Activation mechanisms and physiological functions of the lipid kinase PIP5K. International Symposium of Organization for the Support and Development of Strategic Initiatives, University of Tsukuba. "New Frontier for Lipid and Energy Metabolism". 2008.2.18. Tsukuba, Japan
  22. Y. Kanaho: Novel activation mechanism and physiological function of PIP 5-kinase  $\gamma$ 661. 48th International Symposium on Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues. 2007. 9.24-25. Bologna, Italy (Invited)
  23. T. Hongu, T. Suzuki, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: Role of small GTPase ARF6 in embryonic angiogenesis. 2007 International Symposium on "G-protein Signaling". 2007. 7.28. 東京
  24. C. Arikawa, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: The scaffold protein JLP as a novel partner protein of the small GTPase ARF6. 2007 International Symposium on "G-protein Signaling". 2007. 7.28. 東京
  25. Y. Kanaho: Regulation membrane dynamics by the small GTPase ARF6. 2007 International Symposium on "G-protein Signaling". 2007. 7.28. 東京 (Invited)
  26. T. Hongu, T. Suzuki, T. Yokozeki, and Y. Kanaho: Role of small GTPase in Embryonic angiogenesis. The 5<sup>th</sup> Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists. 2007.7.9. Gyeongju, Republic of Korea

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: Arf6 遺伝子機能喪失動物及びその利用方法

発明者: 金保 安則

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-050431

出願年月日: 平成 22 年 3 月 8 日

国内外の別: 国内

2. 名称: GTP 結合型 ARF6 タンパク質の測定方法及びその用途

発明者: 金保 安則

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-063109

出願年月日: 平成 22 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/kanaholab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金保 安則 (KANAHO YASUNORI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 00214437

(2) 研究分担者

熊谷 嘉人 (KUMAGAI YOSHITO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 00250100

(H20→H21: 連携研究者)

永田 恭介 (NAGATA KYOSUKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 40180492

(H20→H21: 連携研究者)

大根田 修 (OHNEDA OSAMU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 30311872

(H20→H21: 連携研究者)

加藤 光保 (KATO MITSUYASU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 20194855

(H20→H21: 連携研究者)