ポリフェノールの機能発現に関わる分子標的

Polyphenol Functions and Molecular Targets

隈元 拓馬

パリ第6大学, 国立保健医学研究所,
フランス国立科学研究センター,
ヴィジョン研究所

モロー通 17,
75012, パリ, フランス

Takuma KUMAMOTO
Sorbonne Universités, UPMC Univ
Paris 06, INSERM U968, CNRS
UMR 7210, Institut de la Vision
17 rue Moreau,
75012, Paris, France

久永 絢美

国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
果樹茶業研究部門カンキツ研究領域
〒424-0292
静岡県静岡市清水区興津中町 485-6

Ayami HISANAGA
Division of Citrus Research,
Institute of Fruit tree and Tea
Science, National Agriculture and
Food Research Organization
485-6 Okitsucho, Shimizu,
Shizuoka 424-0292, Japan

侯 徳興

国立大学法人 鹿児島大学農学部
食料生命科学科
食品機能科学講座
食品分子機能学研究室

〒890-0065
鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24

De-Xing HOU
Department of Food Science and
Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima,
890-0065, Japan

論文要旨: ポリフェノールは、多くの植物性食品に存在し、様々な健康維持機能を持つ化合物である。これまで、ポリフェノールの機能性発現は、主にその抗酸化機能によるものだと考えられてきた。しかし、ポリフェノールはインビトロで強い抗酸化機能を示すが、生体内での濃度は極めて低く、抗酸化剤としての働きが限定的である。近年、一部のポリフェノールまたはその代謝産物は、生体機能を制御する細胞内信号伝達系にある重要なプロテインキナーゼ活性を修飾していることが多く報告されている。その中の一部は、これらのプロテインキナーゼと直接結合し、そのリン酸化状態に影響し、下流の細胞信号伝達経路および遺伝子発現を制御することで多彩な機能発現に寄与している。本総説は、ポリフェノールの機能発現における標的分子同定のアプローチ及び最近の進展について、我々の研究グループの結果を踏まえながらまとめたものである。

Abstract: Polyphenols are abundant phytochemicals in many plant diet, and reveal many benefits to human health, of which, the antioxidant activities have been considered as a major role. Although polyphenols show higher antioxidant activities *in vitro*, their bioavailability are very low. Thus, the antioxidant activities *in vivo* are limited. Recent studies revealed that some of polyphenols or their metabolites could modulate some protein kinases locating in the cellular signaling cascades, and could directly bind to the protein kinases and modulate their activations. These modulations by polyphenols finally regulate signaling transductions and the expressions of many downstream genes. In this review, we summarize the recent results on the molecular targets of polyphenols based on the interactions of polyphenols and the target proteins.

Key words: polyphenol functions, molecular targets, protein kinases, interactions

1 はじめに

ポリフェノールは、多くの植物性食品に存在し、がんや心血管疾患、神経変性疾患等の予防効果をはじめ、様々な健康維持機能が報告されている^{1, 2)}。ポリフェノールの機能性発現は、これまでそれ自身が持つ化学構造的性質により、直接的な抗酸化能力を、または生体物質として細胞内解毒・レッドクス系を活性化することで間接的な抗酸化機能を発揮するものだと考えられてきた³⁾。しかし、このような抗酸化機能だけでは、ポリフェノールの多彩な機能性発現を完全に説明することができない。例えば、ポリフェノールの生体吸収率は一般栄養素より顕著に低く、それ自身またはその代謝産物の血液や組織での濃度がナノモルレベルで極めて低いのに対し、生体内の抗酸化剤であるビタミンCやビタミンEの濃度は、マイクロモルレベルまで達している^{4, 5)}。このように、ポリフェノールはインビトロで強い抗酸化機能を有するが、生体内での濃度は極めて低く、抗酸化剤としての直接的な働きがビタミンCやビタミンEに比べて限定的である。近年の研究では、一部のポリフェノールは、多くの生体機能を制御する細胞内信号伝達系にある重要なプロテインキナーゼ活性を修飾していることが報告されている^{6, 7)}。ポリフェノールまたはその代謝産物は、プ

2 分子標的の解析手法

近年、ケミカルバイオロジー手法を用いて生体高分子を狙った分子標的薬の研究が進んでいるが、ポリフェノールの化学性質を勘案すると、生体分子標的への特異性が薬ほど強くないと考えられる。このような「程々」の分子間結合特性を検出するのが今までの手法では困難であった。最近では、我々のグループを含め、複数の手法で多方面からポリフェノールと生体タンパク質との相互作用を検出できるようになった。その主な手法(Fig. 1)としては、1) ポリフェノールとタンパク質の直接的結合の検出、2) ポリフェノールとタンパク質の結合親和力の算出、3) ポリフェノールとタンパク質の分子結合モデルの作成による結合部位の推定、などがある。我々

Fig. 1 ポリフェノールの標的分子の同定における解析手法（巻頭カラー写真参照）

は、このような手法を組み合わせながら、ポリフェノールの生体標的分子の探索と同定を試みてきた。

2・1 ポリフェノールとタンパク質の直接的結合の検出

従来タンパク質、核酸、多糖類等の研究でカップリング剤として用いられていた臭化シアン (CNBr) 活性化型セファロース 4B ビーズ^{8, 9)} は、近年ポリフェノールともカップリングすることが明らかとなり、これを用いてポリフェノールとタンパク質間の相互結合を検出するプルダウンアッセイ法が確立された¹⁰⁾。プルダウンアッセイ法では、①カップリングバッファー中でセファロース 4B ビーズとポリフェノールをカップリングし、②カップリングしたポリフェノール-セファロース 4B ビーズと細胞のライセートまたは精製タンパク質を反応バッファー中で結合させ、③ポリフェノール-セファロース 4B ビーズと結合しなかったタンパク質を洗浄で除去した後、④特異的抗体を用いたウェスタンブロット法によりポリフェノール-セファロース 4B ビーズに結合したタンパク質を検出することができる (Fig. 1a)。

2・2 ポリフェノールとタンパク質の結合親和力の算出

ポリフェノールには複数のタンパク質と結合する可能性があり、これらの候補標的分子との結合親和力を比較する必要がある。低分子化合物とタンパク質の相互作用を解析する代表的な手法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、等温滴定型熱測定 (ITC) 法、及び水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法などが知られている。SPR 法はセンサーチップ上の質量変化を SPR により生じる反射光の消失角度の変化として検出することで物質間の結合特異性や結合親和性を解析する手法である。結合速度定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、解離定数 ($KD = k_d/k_a$) を算出することができ、一度に得られる情報の多さなどから、分子間相互作用の解析で長年にわたり利用されている¹¹⁾。ITC 法は分子間で結合が起きた際に生じる発熱または吸熱の熱変化を直接測定することで、分子間の相互作用を定量的に検出する手法で、熱をプローブとしているため、蛍光標識などによる化学的修飾や物理的固定化などを必要とせず、天然に近い環境下で分子間相互作用を解析することができる¹²⁾。また、相互作用の解離定数 (KD)、結合比 (n)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) を求め、物質の構造変化や結合数、種類を予測することで分子間相互作用の機序を解明することも可能である。QCM 法は水晶発振子という極薄い板状の水晶板に金属薄膜を取り付けた電極に交流電圧を与え、一定周波数で振動する性質を利用した手法である。水晶発振子の周波数変化を検出することで、電極上での物質の質量変化を計測し、物質間の結合強度を調べることができる¹³⁾。具体的には、①水

晶発振子を利用したセンサーチップに目的のタンパク質を固定し、②ポリフェノールの濃度を変えながら結合バッファーに添加し、③ポリフェノールが結合する際の振動周波数の変化を測定することで、結合解離定数 (k_a)、解離速度定数 (k_d)、解離定数 (KD) を算出する (Fig. 1b)¹⁰⁾。このように SPR, ITC 及び QCM 法では、ポリフェノールとタンパク質間の親和性を示す解離定数を求めることができる。解離定数が小さいほど親和性は高くなるため、ポリフェノールとタンパク質間の結合特異性を示すのにも有用である。また、これらの手法は非標識状態の分子で相互作用を調べるので、より天然に近い状態での結合を解析できるという利点がある。

2・3 *In silico* シミュレーションによるポリフェノールとタンパク質の結合部位の推定

細胞内信号伝達系の活性化を阻害剤が抑制する時、リン酸化に伴うタンパク質立体構造変化の阻止、ATP 結合領域に結合することによる ATP 結合の阻止、受容体の多量体化やリガンド結合の阻止、上流のタンパク質結合ドメインに相補的に働くことによる活性化阻止など、多くの抑制パターンが考えられる。ポリフェノールと標的分子の結合様式を把握することは、その抑制機構を正しく認識する上で非常に重要な点である。その結合を把握する手段として、ポリフェノール-タンパク質複合体の X 線結晶構造解析や NMR 構造解析があげられる。しかしながら、ポリフェノールとタンパク質が結合した状態での結晶を得るのは、高度な技術および特殊な機器が必要となるので簡便な方法とは言い難い。一方で、多くのタンパク質の X 線結晶構造解析や NMR 構造解析のデータは Protein Data Bank (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/>) に蓄積され、無料で利用することができる。これらの情報を基に、*In silico* シミュレーションによるタンパク質と低分子化合物間の相互作用が分析できる 3 次元ファーマコフォアモデル解析ソフトが開発され、ドラッグデザイン等を目的として広く用いられている¹⁴⁾。その一つである Molecular Operating Environment (MOE) は、低分子から高分子まで多様な分子モデルを構築することができ、タンパク質と低分子化合物の相互作用の検討、リガンドデザインなどに多用されている。我々はポリフェノールとタンパク質の結合部位推定に MOE を用いている。その解析手順 (Fig. 1c) は、① PDB から目的のタンパク質の結晶構造をダウンロードし、結晶構造中の結晶水やタンパク質の構造に関連のない分子を削除する。②タンパク質に水素原子の付加及び位置の最適化をして立体構造を安定化させ、ポリフェノールとタンパク質の結合をドッキングするのに適した力場 (MMFF94x) に設定し、リガンド結合部位の候補

を目的のタンパク質上に検出する。③候補部位とポリフェノール間のドッキングシミュレーションを行い、計算されたデータに従って、ポリフェノールとタンパク質の分子モデルを作成する。

このようにして MOE で構築された分子モデルは、ブルダウンアッセイや結合親和力解析で検証したポリフェノール-タンパク質複合体の結合部位を推定したものである。

3 ポリフェノールの分子標的

細胞における細胞信号伝達系は、タンパク質間でリン酸化・分解・結合などを起こすことにより細胞外環境を細胞内に伝え、環境に応じた細胞内反応を示すために必要となる生体内反応である。細胞外環境因子は、まず細胞膜上の受容体で感知され、その受容体に対応した下流の細胞信号伝達系タンパク質が反応し、最終的に標的となる特定の転写因子を制御することで外部刺激に応じる遺伝子の発現を導く。主な受容体としては上皮成長因子

受容体 (EGFR), G タンパク質共役型受容体 (GPCR), インスリン受容体, サイトカイン受容体, Toll 様受容体 (TLR4 など), 細胞死受容体 (Fas, TNF α R) などが知られている。その下流には, MAPK 経路, NF- κ B 経路, PI3K-Akt 経路, JAK-STAT 経路, アポトーシス経路, AMPK 経路, mTOR 経路など多数の経路が存在し, それらは上下の関係のみならず, 別経路とのクロストークも多い。これらの経路を介して転写因子 (AP-1, NF- κ B, STAT, CREB, Myc, Rb など) を活性化することで目的遺伝子の発現を制御している。ポリフェノールは, これらのタンパク質のリン酸化や分解を制御することで, 細胞信号伝達系を制御することが多く報告されており^{10, 15, 16)}, 本章は, これまでに報告されているポリフェノールの直接的な分子標的に関する研究例をまとめて紹介する (Table 1)。

3・1 フラボノール類の分子標的

フラボノール類は果物や野菜の中に広く存在しており, 高い抗酸化作用や抗変異作用など多くの生理機能に

Table 1 ポリフェノールの分子標的

Group	Polyphenol	Direct binding protein*
Flavonols	Myricetin	JAK1 ¹⁷ , STAT3 ¹⁷ , PI3K ^{18, 19} , Akt ²⁰ , Raf ²¹ , MEK1 ²² , MKK4 ²³ , Fyn ²⁴ , GLP-1R ²⁵
	Quercetin	Raf-1 ²⁶ , MEK1 ^{26, 27} , ERK1/2 ²⁷ , SEK1 ²⁷ , JNK1/2 ²⁷ , RSK2 ²⁸ , PI3K ^{19, 29}
	Rutin	EGFR ³⁰
	Isorhamnetin	MEK1 ^{28, 31} , PI3K-p110 ³¹
	8-Prenylquercetin	SEK1 ²⁷ , JNK1/2 ²⁷ , MEK1 ²⁷ , ERK1/2 ²⁷
	Kaempferol	RSK2 ^{32, 33} , MSK1 ³² , Src ³⁴ , PI3K-p85 ³⁵
	5-Deoxykaempferol	PI3K-p85 ³⁶ , Src ³⁶ , RSK2 ³⁶
	Fisetin	CDK6 ³⁷
Flavones	Luteolin	PKC ϵ ³⁸ , Src ³⁸
Flavanonols	Taxifolin	EGFR ³⁹ , PI3K-p110 ³⁹ , Src (<i>in vitro</i> only) ³⁹
Flavanols	(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	67LR ⁴⁰ , IGF-1R ⁴¹ , Notch ⁴² , GRP78 ⁴³ , ZAP-70 ⁴⁴ , Fyn ⁴⁵ , HSP90 ⁴⁶ , G3BP1 ⁴⁷ , miR-33a/-122 ⁶⁶
	Theasinensin A	MEK1 ⁴⁸ , ERK2 ⁴⁸
	Procyanidin B2	MEK1 ⁴⁹ , MKK4 ⁵⁰
Anthocyanins	Delphinidin	PI3K-p110 ⁵¹ , Raf-1 ⁵² , B-Raf ⁵³ , MEK1 ^{52, 53} , ERK1/2 ⁵³ , Fyn ⁵⁴ , Er α ⁵⁵ , MAPKK4 ⁵¹
	Cyanidin	Raf-1 ⁵⁶ , MKK4 ⁵⁶ , MEK1 ⁵⁶
	Delphinidin 3-sambubioside (Dp3-sam)	(p-) MEK1 ⁵³ , (p-) B-Raf ⁵³ , (p-) ERK1/2 ⁵³
Isoflavones	7,3',4'-Trihydroxyisoflavone (7,3',4'-THIF)	PI3K-p110 ⁵⁸ , CDK2/4 ⁵⁸
Isoflavandiols	Equol	MEK1 ⁵⁷
Stilbenes	Resveratrol	COX-2 ⁵⁹ , MEK1 ⁶⁰ , LTA $_4$ H ⁶¹ , PPAR α ⁶⁸ , PPAR γ ⁶² , mTOR ⁶³ , miR-33a/-122 ⁶⁶
	Piceatannol	JAK1 ¹⁷
Phenolic acids	Caffeic acid	Fyn ⁶⁴
	[6]-Gingerol	LTA $_4$ H ⁶⁵

* 上付数字は, 参考論文の番号である。

関連し、同定されている標的分子化合物も多く存在している。その中で、B環に水酸基を有するケンフェロール(4'位)、クエルセチン(3', 4'位)、ミリセチン(3', 4', 5'位)は、基本骨格が同じで水酸基の数だけが異なるため、水酸基の数による生物活性や標的分子の比較に適している。例えば、正常細胞をがん細胞へと突然変異させる細胞形質転換への抑制効果は、水酸基の多い順に抑制効果が強い(ミリセチン>クエルセチン>ケンフェロール)。

ミリセチンは、JAK-STAT経路のJAK1とSTAT3¹⁷⁾、PI3K-Akt経路のPI3K^{18, 19)}とAkt²⁰⁾、MAPK経路のRaf²¹⁾、MEK1²²⁾、MKK4²³⁾、他にもFyn²⁴⁾といった細胞信号伝達系のタンパク質と直接結合することが知られている。具体的には、上皮増殖因子(EGF)誘導性の細胞形質転換に重要な細胞内信号伝達系であるEGFR(受容体)→JAK1(キナーゼ)→STAT3(転写因子)経路において、ミリセチンはEGFRには結合せず、JAK1及びSTAT3に直接結合することが明らかになっている。なかでもJAK1への結合作用の方がSTAT3よりも強く、その触媒領域に結合することから、ミリセチンは細胞内でまずJAK1に結合し触媒領域を制御することで活性を抑制し、下流のSTAT3の活性も抑えていると考えられる。JAK1の特異的阻害剤として知られているピセアタンノールを用いて同様の実験を行った結果、驚くべきことにミリセチンはピセアタンノールよりも強い活性を持つことが示された。さらに、上記の*in silico*シミュレーションで得られた分子結合モデルから、ミリセチンがATP結合競合阻害分子として、PI3K¹⁹⁾、Akt²⁰⁾、MKK4²³⁾及びFyn²⁴⁾の活性を制御することが明らかとなり、また近年ではミリセチンが2型糖尿病に重要な役割を示すグルカゴン様ペプチド受容体への直接結合・抑制効果も報告されている²⁵⁾。

クエルセチンは、生理機能がよく研究されている食品由来化合物の一つであり、Raf-1²⁶⁾、MEK1^{26, 27)}、ERK1/2²⁷⁾、SEK1²⁷⁾、JNK1/2²⁷⁾、RSK2²⁸⁾、及びPI3K^{19, 29)}が分子標的として知られている。興味深いことに、クエルセチンはPI3Kの特異的阻害剤であるLY294002と同じATP結合領域に結合し、PI3Kに結合する際の解離定数を比較するとほぼ同等であることが示されている(クエルセチン=0.28 μ M, LY294002=0.21 μ M)。そこで、分子結合モデルで結合様式を比較すると、クエルセチンはLY294002を反転したように結合することから、標的タンパク質への結合様式のわずかな違いで抑制効果が変わることが示唆された¹⁹⁾。また、クエルセチンの3位の酸素に β -ルチノースが結合した配糖体であるルチンが、ATP競合阻害的にEGFRに結合して下流のCOX-2発

現を抑制することや³⁰⁾、クエルセチンの3'位の酸素にメチル基が結合したイソラムネチンが、ATP競合阻害的にMEK1とPI3Kに結合してEGF誘導性の細胞形質転換を抑制することも報告されている³¹⁾。さらに、本研究室においては、クエルセチンの誘導体である8-プレニルクエルセチン(8-PQ)の抗炎症作用機構を解析し、8-PQが細胞膜上受容体であるTLR4とは競合せずに細胞膜内に取り込まれて、MAPKsのSEK1、JNK1/2、MEK1、ERK1/2と直接的結合し、それらのリン酸化を抑制することを明らかにした²⁷⁾。また、8-PQがクエルセチンよりも強い抗炎症作用を示すのは、それらの細胞吸収率の差によるものであると考えられることも示唆された。

ケンフェロールにも抗がん作用があることは報告されており、がん細胞で高い活性が見られるRSK2やMSK1に直接結合しATP結合活性阻害を起こすことが知られている^{32, 33)}。またSrcとも直接結合しATP結合活性阻害を起こすことで、COX-2発現を抑制する³⁴⁾。さらにPI3K-p85サブユニットに結合し、下流のAktの活性も抑制する³⁵⁾。ケンフェロールの5'位の水酸基が水素に置換された5-deoxykaempferolは、PI3K-p85サブユニット及びSrc、RSK2へ結合し、UVB誘導性のCOX-2やVEGFの発現を抑えて皮膚ガンの変異を抑制するが、分子標的間の結合比較はわかっていない³⁶⁾。PI3Kは3種類全てのフラボノールが結合するので、フラボノール構造に共通する重要な分子標的の一つであることが言える。

同じフラボノールでもさらにフィセチンは細胞周期や細胞死などに関与するCDK6に対し、既知のCDK特異的阻害剤と同様に、ヒンジ領域に水素結合し活性を抑制する³⁷⁾。このようにポリフェノール化合物の中でも、フラボノール系化合物はもっとも分子標的が同定されているグループである。

3・2 フラボン類の分子標的

フラボン類は、野菜やハーブに多く含まれており、高い抗酸化作用を有している。代表的な化合物であるルテオリンは、PKC ϵ やSrcとATP競合的に結合することで、下流のMAPKsやAktシグナル活性を抑制し、UVB誘導性のがん誘導を抑制する³⁸⁾。

3・3 フラバノノール類の分子標的

フラバノノール類は、代表的な化合物としてジヒドロクエルセチンとして知られるタキシフォリンがあり、抗酸化や抗炎症効果に加え、心疾患予防効果などが報告されている。タキシフォリンは受容体の一つであるEGFRやPI3K-p110サブユニットにATP競合的に結合する³⁹⁾。活性抑制効果としては、PI3KよりEGFRに対して強く

抑制効果がみられる。

3・4 フラバノール類の分子標的

フラバノール類は、お茶に多く含まれるカテキン類がよく知られており、特に緑茶に多く含まれている(一)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) は、強力な抗酸化活性や腫瘍抑制作用など、多くの生理作用が報告されている。その標的分子の一つとして、基底膜の主要成分ラミニンに結合する細胞膜タンパクであり悪性度の高いがん細胞に高頻度に発現する 67KDa ラミニンレセプター (67LR) が同定された⁴⁰⁾。その結合部位は 67LR のアミノ酸残基 161-170 番目であり、これはラミニン結合部位 (173-178) やプリオン結合部位 (161-179) と関連し、その抑制作用が結合阻害活性からくるものであることが示唆される。EGCG はこのように細胞の表面に結合することが多く、腫瘍形成に働く IGF-IR⁴¹⁾ や最近では Notch 受容体との結合も報告されている⁴²⁾。他にも分子標的として報告されている GRP78⁴³⁾ は小胞体に常在する分子シャペロンで、近年 IGF-IR との相互作用も報告されている他、ZAP-70⁴⁴⁾ や Fyn⁴⁵⁾、HSP90⁴⁶⁾、G3BP1⁴⁷⁾ との結合も報告されている。

お茶の加工をする際、発酵が進むことでカテキンの重合体が形成されることが知られており、特にウーロン茶に多く含まれる重合体として5種類のテアシネンシン (A, B, C, D, E) がある。その中でもテアシネンシン A は最も強い炎症抑制効果をもつ。近年、当研究室では COX-2 を強く抑制するテアシネンシン A の分子標的としてその上流の MAPKs である、MEK1 と ERK1/2 を同定した⁴⁸⁾。QCM 法により結合解離定数を比較したところ ERK2 の方がより強く結合することから、ERK2 がテアシネンシン A の最初の分子標的となっていると考えられる。また2量体のカテキンであるプロシアニン B2 は、ココアやチョコレート・赤ワイン・フルーツジュースなどの食品加工物に多く含まれ、抗酸化作用や抗腫瘍形成、DNA 損傷の予防効果などが知られている。その分子標的としてはテアシネンシン A と同じく、MEK1⁴⁹⁾ や MKK4⁵⁰⁾ が知られている。

3・5 アントシアニン類の分子標的

アントシアニン類は、強い水溶性色素をもつフラボノイドの一種で正電荷を持ち、果実や花などを中心に植物界に広く存在しており、抗酸化作用の強い食品成分として知られている。その一種であるデルフィニジンは PI3K-p110⁵¹⁾ を始め、Raf1⁵²⁾、B-Raf⁵³⁾、MEK1^{52, 53)}、ERK1/2⁵³⁾、MAPKK4⁵¹⁾ 及び Fyn⁵⁴⁾ の他、ER α 受容体⁵⁵⁾ への結合も知られている。近年、当研究室ではデルフィニジンに1つもしくは2つ配糖体のついた化合物 (Dp3-Sam 及び Dp3-Lat-5-Glu) との構造比較解析を行った。

MEK1 との直接結合作用を比較した結果、デルフィニジン及び Dp3-Sam は MEK1 と直接結合するが Dp3-Lat-5-Glu は結合しないことがわかった。このことからデルフィニジンにおいては、配糖体の数が標的分子との結合(力)には関連しないことが示された⁵³⁾。デルフィニジンよりも B 環の水酸基が一つ少ないシアニジンは、Raf、MKK4、MEK1⁵⁶⁾ との結合が明らかになっている。

3・6 イソフラボン類とその代謝産物の分子標的

イソフラボン類は、大豆などのマメ科の植物に多く含まれており、代表的な化合物としてゲニステインやダイゼインが知られている。ゲニステインは、ATP と競合的に作用し、EGFR の活性阻害することにより、MAPK や PI3K を制御することが知られている¹⁵⁾。ダイゼインの代謝産物であるエクオールは、抗酸化作用や抗がん作用においてダイゼインよりも強い活性を持つことがわかっており、TPA 及び EGF 誘導性の細胞形質転換を抑制し、分子標的としては MEK1 が報告されている⁵⁷⁾。MEK1 とは ATP 競合阻害はしないが、N 末側の MEK1 と強く結合しており、これは MEK1 特異的阻害剤 PD184351 の結合様式と非常に似ている。またダイゼインの別の代謝産物の 7, 3', 4'-THIF は、PI3K と CDK2/4 に ATP 非競合的に結合し、それらの活性を抑制することで、下流の Akt 経路の抑制、最終的に cell cycle の進行を G1 期で止める。しかしながら、PI3K と CDK のどちらにより強く結合するかはわかっていない⁵⁸⁾。

3・7 スチルベノイドポリフェノールの分子標的

スチルベノイドポリフェノールの一種であるレスベラトロール (RSVL) は、ブドウや赤ワインに存在しており、腫瘍形成を抑制することによる抗がん作用が知られている。他に2つのアナログ、RSVL2 と 3 が知られている。RSVL と RSVL2 には高い COX-2 発現抑制、PGE2 抑制、突然変異形成抑制効果が示され、RSVL3 にはほとんどない。大きな違いは水酸基の付加 (RSVL、RSVL2) かメトキシ基 (RSVL3) の付加かによるが、これらの生理活性には水酸基が重要であるように示唆される。また COX-2 への直接結合も RSVL と RSVL2 のみにみられる⁵⁹⁾。とくに RSVL2 は、RSVL の 10 倍以上の抗形質転換作用が知られており、RSVL には結合しないが RSVL2 にのみ分子標的として MEK1 が同定されている⁶⁰⁾。RSVL の多く含まれる赤ワイン抽出液では高い MEK1/ERK2 抑制効果がみられるが、これは RSVL ではなく RSVL2 の関与が高いことが示唆される。さらに亜鉛酵素の一つである LTA4H にも RSVL は直接結合・抑制し、腫瘍成長抑制を示す⁶¹⁾。他にも RSVL の分子標的として、PPAR γ のリガンド結合領域⁶²⁾ や mTOR が報告されている⁶³⁾。よく知られたアナログの一つで

あるピセアタンノールは JAK1 阻害剤であるが、先述のように JAK1 に直接結合することで下流の STAT3 の転写活性を抑制する¹⁷⁾。

3・8 その他のポリフェノールの分子標的

フェノール酸は、色素以外のポリフェノール化合物であり、クロロゲン酸やエラグ酸などが含まれる。代表的な化合物として、クロロゲン酸の一種であるカフェイン酸は、果物、野菜、穀物、コーヒーなどから取れる主要な化合物であり、アルツハイマー病やパーキンソン病、糖尿病や心臓病に効果があるとされ、死亡率の抑制に関係することが示唆されている。カフェイン酸が UVB 誘導性の COX-2 発現、PGE2 発現抑制にその上流にある MAPKs の活性を抑制することがわかっているが、その直接的な分子標的はさらに上流の Src ファミリーの一つである Fyn である⁶⁴⁾。ATP 競合阻害的には働かないが、触媒領域に結合するため Fyn の活性を抑えて、下流の MAPKs の活性化を制御していると考えられる。

[6]- ジンジェロールは主要な生姜の食品成分で、抗酸化や抗炎症、抗変異活性などが報告されている。がん治療において、前述の LTA4H は魅力的な分子標的であり、大腸ガンに重要な役割を果たすと考えられ、[6]- ジンジェロールは LTA4H に直接結合することで、複数の大腸ガン細胞のがん活性を抑えることがわかっている⁶⁵⁾。

4 分子標的同定の問題点と将来展望

本総説では、ポリフェノールが機能発現する際の細胞内信号伝達系における同定された分子標的について述べてきた。前項で示したように、食品由来成分であるポリフェノールは特異的阻害剤とは異なり、特異的阻害能が弱く、標的分子が多いという“広く浅い”特徴がある。このことがポリフェノールを日常的に食物から摂取することにより、幅広い病気の予防や進行の緩和に役割を果たしているのは理解しやすい。しかしながら、ポリフェノールは生体内での吸収性が低いことや、種々の腸内細菌叢や酵素によって代謝を受けるため、ポリフェノール自身が実験系と同じように、生体内で直接的に機能発現に寄与しているとは必ずしもいえない。例えば、大豆イソフラボン的一种であるダイゼインは、生体内で腸内細菌によりエクオールや 7, 3', 4'-THIF に代謝され、これらの代謝産物が細胞信号伝達関連タンパク質と直接相互作用することで機能発現に寄与するという報告がされている^{57, 58)}。近年、体内に存在する代謝産物を網羅的に解析できるメタボローム分析手法が進んでおり、高感度で代謝産物の分子量及び含有量を知ることができ、さらに MS/MS 分析による電氣的開裂により、部分構造を実測のデータベース (MassBank: www.massbank.jp)

や化合物予測ツールから推定することができる。このように生体内で代謝されたポリフェノールの構造をメタボロームの解析手法により推定することが可能となり、さらにその複数の分子標的を同時に同定することも可能となることから、メタボローム解析は今後のポリフェノールの機能性発現と生体内標的分子との関係解明の足がかりになると期待される。また、近年遺伝子の発現を制御する新たな仕組みとして、エピジェネティックな制御及び microRNA (miRNA) の制御も注目されており、レスベラトロールや EGCG が miR-33 及び miR-122 に直接結合し、代謝調節に関与していることが報告されている⁶⁶⁾。今後もポリフェノールの機能性発現と miRNA 等の制御関係の解明にも期待したい。

文 献

- Hollman, P. C.; Katan, M. B. *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 937-942 (1999).
- Tomás-Barberán, F.A.; Andrés-Lacueva, C. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 8773-8775 (2012).
- Rice-Evans, C. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 797-807 (2001).
- Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. *Mol. Aspects Med.*, **31**, 435-445 (2010).
- Hollman, P. C. *Arch. Biochem. Biophys.*, **559**, 100-105 (2014).
- Ramos, S. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 507-526 (2008).
- Teillet, F.; Boumendje, A.; Boutonnat, J.; Ronot, X. *Med. Res. Rev.*, **28**, 715-745 (2008).
- David, G. S.; Chino, T. H.; Reisfeld, R. A. *FEBS Lett.*, **43**, 264-266 (1974).
- Kadonaga, J. T.; Tjian, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5889-5893 (1986).
- Hou, D.-X.; Kumamoto, T. *Antioxid. Redox. Signal*, **13**, 691-719 (2010).
- Karlsson, R. *J. Mol. Recognit.*, **17**, 151-161 (2004).
- Callies, O.; Hernández Daranas, A. *Nat. Prod. Rep.*, **33**, 881-904 (2016).
- Cooper, M. A.; Singleton, V. T. *J. Mol. Recognit.*, **20**, 154-184 (2007).
- Wolber, G.; Seidel, T.; Bendix, F.; Langer, T. *Drug Discov. Today*, **13**, 23-29 (2008).
- Kang, N. J.; Shin, S. H.; Lee, H. J.; Lee, K. W. *Pharmacol. Ther.*, **130**, 310-324 (2011).
- Lee, K. W.; Bode, A. M.; Dong, Z. *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 211-218 (2011).
- Kumamoto, T.; Fujii, M.; Hou, D. X. *Cancer Lett.*, **275**, 17-26 (2009).
- Jung, S. K.; Lee, K. W.; Byun, S.; Lee, E. J.; Kim, J. E.; Bode, A. M.; Dong, Z.; Lee, H. J. *Carcinogenesis*, **31**, 911-917 (2010).
- Walker, E. H.; Pacold, M. E.; Perisic, O.; Stephens, L.; Hawkins, P. T.; Wymann, M. P.; Williams, R. L. *Mol. Cell*, **6**, 909-919 (2000).
- Kumamoto, T.; Fujii, M.; Hou, D. X. *Mol. Cell. Bio-*

- chem.*, **332**, 33-41 (2009).
- 21) Jung, S. K.; Lee, K. W.; Kim, H. Y.; Oh, M. H.; Byun, S.; Lim, S. H.; Heo, Y. S.; Kang, N. J.; Bode, A. M.; Dong, Z.; Lee, H. J. *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1455-1461 (2010).
 - 22) Lee, K. W.; Kang, N. J.; Rogozin, E. A.; Kim, H. G.; Cho, Y. Y.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Surh, Y. J.; Bowden, G. T.; Dong, Z. *Carcinogenesis*, **28**, 1918-1927 (2007).
 - 23) Kim, J. E.; Kwon, J. Y.; Lee, D. E.; Kang, N. J.; Heo, Y. S.; Lee, K. W.; Lee, H. J. *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 412-421 (2009).
 - 24) Jung, S. K.; Lee, K. W.; Byun, S.; Kang, N. J.; Lim, S. H.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Bowden, G. T.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **68**, 6021-6029 (2008).
 - 25) Li, Y.; Zheng, X.; Yi, X.; Liu, C.; Kong, D.; Zhang, J.; Gong, M. *FASEB J.*, **31**, 2603-2611 (2017).
 - 26) Lee, K. W.; Kang, N. J.; Heo, Y. S.; Rogozin, E. A.; Pugliese, A.; Hwang, M. K.; Bowden, G. T.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **68**, 946-955 (2008).
 - 27) Hisanaga, A.; Mukai, R.; Sakao, K.; Terao, J.; Hou, D.-X. *Mol. Nutr. Food Res.*, **60**, 1020-1032 (2016).
 - 28) Chen, H.; Yao, K.; Nadas, J.; Bode, A. M.; Malakhova, M.; Oi, N.; Li, H.; Lubet, R. A.; Dong, Z. *PLoS One*, **7**, e38261 (2012).
 - 29) Hwang, M. K.; Song, N. R.; Kang, N. J.; Lee, K. W.; Lee, H. J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1592-1600 (2009).
 - 30) Choi, S.; Lim, T. G.; Hwang, M. K.; Kim, Y. A.; Kim, J.; Kang, N. J.; Jang, T. S.; Park, J. S.; Yeom, M. H.; Lee, K. W. *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 1468-1475 (2013).
 - 31) Kim, J. E.; Lee, D. E.; Lee, K. W.; Son, J. E.; Seo, S. K.; Li, J.; Jung, S. K.; Heo, Y. S.; Mottamal, M.; Bode, A. M.; Dong, Z.; Lee, H. J. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **4**, 582-591 (2011).
 - 32) Yao, K.; Chen, H.; Liu, K.; Langfald, A.; Yang, G.; Zhang, Y.; Yu, D. H.; Kim, M. O.; Lee, M. H.; Li, H.; Bae, K. B.; Kim, H. G.; Ma, W. Y.; Bode, A. M.; Dong, Z.; Dong, Z. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **7**, 958-967 (2014).
 - 33) Cho, Y. Y.; Yao, K.; Pugliese, A.; Malakhova, M. L.; Bode, A. M.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **69**, 4398-4406 (2009).
 - 34) Lee, K. M.; Lee, K. W.; Jung, S. K.; Lee, E. J.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Lubet, R. A.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 2042-2049 (2010).
 - 35) Lee, K. M.; Lee, D. E.; Seo, S. K.; Hwang, M. K.; Heo, Y. S.; Lee, K. W.; Lee, H. J. *Carcinogenesis*, **31**, 1338-1343 (2010).
 - 36) Lee, K. M.; Lee, K. W.; Byun, S.; Jung, S. K.; Seo, S. K.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **3**, 454-465 (2010).
 - 37) Lu, H.; Chang, D. J.; Baratte, B.; Meijer, L.; Schulze-Gahmen, U. *J. Med. Chem.*, **48**, 737-743 (2005).
 - 38) Byun, S.; Lee, K. W.; Jung, S. K.; Lee, E. J.; Hwang, M. K.; Lim, S. H.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **70**, 2415-2423 (2010).
 - 39) Oi, N.; Chen, H.; Ok Kim, M.; Lubet, R. A.; Bode, A. M.; Dong, Z. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **5**, 1103-1114 (2012).
 - 40) Tachibana, H.; Koga, K.; Fujimura, Y.; Yamada, K. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380-381 (2004).
 - 41) Li, M.; He, Z.; Ermakova, S.; Zheng, D.; Tang, F.; Cho, Y. Y.; Zhu, F.; Ma, W. Y.; Sham, Y.; Rogozin, E. A.; Bode, A. M.; Cao, Y.; Dong, Z. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **16**, 598-605 (2007).
 - 42) Wang, T.; Xiang, Z.; Wang, Y.; Li, X.; Fang, C.; Song, S.; Li, C.; Yu, H.; Wang, H.; Yan, L.; Hao, S.; Wang, X.; Sheng, J. *Front. Immunol.*, **8**, 433 (2017).
 - 43) Ermakova, S. P.; Kang, B. S.; Choi, B. Y.; Choi, H. S.; Schuster, T. F.; Ma, W. Y.; Bode, A. M.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **66**, 9260-9269 (2006).
 - 44) Shim, J. H.; Choi, H. S.; Pugliese, A.; Lee, S. Y.; Chae, J. I.; Choi, B. Y.; Bode, A. M.; Dong, Z. *J. Biol. Chem.*, **283**, 28370-28379 (2008).
 - 45) He, Z.; Tang, F.; Ermakova, S.; Li, M.; Zhao, Q.; Cho, Y. Y.; Ma, W. Y.; Choi, H. S.; Bode, A. M.; Yang, C. S.; Dong, Z. *Mol. Carcinog.*, **47**, 172-183 (2008).
 - 46) Palermo, C. M.; Westlake, C. A.; Gasiewicz, T. A. *Biochemistry*, **44**, 5041-5052 (2005).
 - 47) Shim, J. H.; Su, Z. Y.; Chae, J. I.; Kim, D. J.; Zhu, F.; Ma, W. Y.; Bode, A. M.; Yang, C. S.; Dong, Z. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **3**, 670-679 (2010).
 - 48) Hisanaga, A.; Ishida, H.; Sakao, K.; Sogo, T.; Kumamoto, T.; Hashimoto, F.; Hou, D.-X. *Food Funct.*, **5**, 1891-1897 (2014).
 - 49) Kang, N. J.; Lee, K. W.; Lee, D. E.; Rogozin, E. A.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *J. Biol. Chem.*, **283**, 20664-20673 (2008).
 - 50) Cho, E. S.; Jang, Y. J.; Kang, N. J.; Hwang, M. K.; Kim, Y. T.; Lee, K. W.; Lee, H. J. *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1319-1327 (2009).
 - 51) Kwon, J. Y.; Lee, K. W.; Kim, J. E.; Jung, S. K.; Kang, N. J.; Hwang, M. K.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Dong, Z.; Lee, H. J. *Carcinogenesis*, **30**, 1932-1940 (2009).
 - 52) Kang, N. J.; Lee, K. W.; Kwon, J. Y.; Hwang, M. K.; Rogozin, E. A.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, **1**, 522-531 (2008).
 - 53) Sogo, T.; Kumamoto, T.; Ishida, H.; Hisanaga, A.; Sakao, K.; Terahara, N.; Wada, K.; Hou, D.-X. *Planta Med.*, **81**, 26-31 (2015).
 - 54) Hwang, M. K.; Kang, N. J.; Heo, Y. S.; Lee, K. W.; Lee, H. J. *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 1213-1222 (2009).
 - 55) Chalopin, M.; Tesse, A.; Martinez, M. C.; Rognan, D.; Arnal, J. F.; Andriantsitohaina, R. *Plos One*, **5**, e8554 (2010).
 - 56) Kim, J. E.; Kwon, J. Y.; Seo, S. K.; Son, J. E.; Jung, S. K.; Min, S. Y.; Hwang, M. K.; Heo, Y. S.; Lee, K. W.; Lee, H. J. *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1473-1482 (2010).
 - 57) Kang, N. J.; Lee, K. W.; Rogozin, E. A.; Cho, Y. Y.; Heo, Y. S.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *J. Biol. Chem.*, **282**, 32856-32866 (2007).
 - 58) Lee, D. E.; Lee, K. W.; Song, N. R.; Seo, S. K.; Heo, Y. S.; Kang, N. J.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *J. Biol. Chem.*, **285**, 21458-21466 (2010).
 - 59) Zykova, T. A.; Zhu, F.; Zhai, X.; Ma, W. Y.; Ermakova, S. P.; Lee, K. W.; Bode, A. M.; Dong, Z. *Mol. Carcinog.*, **47**, 797-805 (2008).

- 60) Lee, K. W.; Kang, N. J.; Rogozin, E. A.; Oh, S. M.; Heo, Y. S.; Pugliese, A.; Bode, A. M.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Int. J. Cancer*, **123**, 2487-2496 (2008).
- 61) Oi, N.; Jeong, C. H.; Nadas, J.; Cho, Y. Y.; Pugliese, A.; Bode, A. M.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **70**, 9755-9764 (2010).
- 62) Calleri, E.; Pochetti, G.; Dossou, K. S.; Laghezza, A.; Montanari, R.; Capelli, D.; Prada, E.; Loiodice, F.; Mas-solini, G.; Bernier, M.; Moaddel, R. *Chembiochem*, **15**, 1154-1160 (2014).
- 63) Park, D.; Jeong, H.; Lee, M. N.; Koh, A.; Kwon, O.; Yang, Y. R.; Noh, J.; Suh, P. G.; Park, H.; Ryu, S. H. *Sci. Rep.*, **6**, 21772 (2016).
- 64) Kang, N. J.; Lee, K. W.; Shin, B. J.; Jung, S. K.; Hwang, M. K.; Bode, A. M.; Heo, Y. S.; Lee, H. J.; Dong, Z. *Carcino-genesis*, **30**, 321-330 (2009).
- 65) Jeong, C. H.; Bode, A. M.; Pugliese, A.; Cho, Y. Y.; Kim, H. G.; Shim, J. H.; Jeon, Y. J.; Li, H.; Jiang, H.; Dong, Z. *Cancer Res.*, **69**, 5584-5591 (2009).
- 66) Baselga-Escudero, L.; Blade, C.; Ribas-Latre, A.; Casa-nova, E.; Suarez, M.; Torres, J. L.; Salvado, M. J.; Arola, L.; Arola-Arnal, A. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 882-892 (2014).