

氏 名 : 田端 佑規
学位の種類 : 博士 (栄養学)
学位記番号 : 博甲第 9 号
学位授与年月日 : 令和 2 年 3 月 19 日
学位授与の要件 : 学位規程第 3 条第 3 項該当
論文題目 : Studies on Geranylgeranoic Acid Biosynthesized in Mammals.
「哺乳動物において生合成される内因性ゲラニルゲラノイン酸に関する研究」
論文審査委員 : 主査 准教授 駿河 和仁
副査 教授 田中 一成
副査 准教授 倉橋 拓也

哺乳動物において生合成される内因性ゲラニルゲラノイン酸に関する研究

Studies on Geranylgeranoic Acid Biosynthesized in Mammals.

長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻

田端 佑規

イソプレノイドは炭素数 5 のイソプレン単位を基本骨格にもつ有機化合物の総称である。哺乳動物において、イソプレノイドはメバロン酸(MVA)経路により生合成される。アセトアセチル CoA から合成された HMG-CoA は HMG-CoA 還元酵素により MVA へと変換される。MVA はリン酸化・脱炭酸反応を経たのち、イソペンテニルニリン酸(IPP: C₅)に代謝される。IPP とその異性体であるジメチルアリルニリン酸(DMAPP: C₅)が縮合し、ゲラニルニリン酸(GPP: C₁₀)が合成される。GPP に IPP が 1 つ縮合するとファルネシルニリン酸(FPP: C₁₅)、FPP に更にもう 1 つ IPP が縮合するとゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP: C₂₀)が合成される。FPP からはコレステロール、GGPP からはユビキノンやドリコールなどの生命活動に必須の化合物が得られる。イソプレノイドの一種であるゲラニルゲラノイン酸(GGA)は肝癌細胞死誘導能を有する化合物で、ウコン等の植物に含まれる天然の化合物である。植物だけでなく哺乳動物においても、GGA は MVA 経路由来で生合成されるのではないかと考えられる。先行研究において GGPP がラット肝臓ミクロソームの GGPPase によって脱リン酸化されアルコール体のゲラニルゲラニオール(GGOH)となること、ヒト肝癌細胞ホモジネートにより GGOH が二段階の酸化を経て GGA へと変換されることが示されている。しかしながらこれらの先行研究は無細胞系での実験であり、実際に哺乳動物細胞内において MVA 経路から GGA が生合成されるかは完全には明らかとなっていない。

そこで本研究では肝発癌抑制作用などの生物活性を有する GGA に関して

- (1)GGA 生合成に関与する酵素の解析 (特に GGOH の酸化に関与する酵素について)
- (2)GGA の発癌抑制作用以外の生物活性の検討
- (3)ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞の培養系において ¹³C-メバロノラクトン(MVL)を用いた代謝標識による GGA 生合成経路の解析

の3点に焦点を当て研究した。得られた成果の概要は以下のとおりである。

(1)哺乳動物における内因性 GGA の存在を調べるため5週齢のWistar 雄性ラットの各臓器の GGA 含量を LC/MS/MS を用いて定量した。分析した 12 の組織と血清全てから GGA が検出された。特に MVA 経路の活性の高い肝臓において高濃度で GGA が存在していた。次に先行研究で GGOH の酸化に関与が示唆されているモノアミノオキシダーゼ B(MAOB)について検討した。HuH-7 細胞に対して MAOB 阻害剤および siRNA による MAOB 遺伝子のノックダウン処理を実施すると、いずれも細胞内 GGA 量は大幅に低下した。しかし CRISPR-Cas9 系を用いて樹立した MAOB ノックアウト細胞は MAOB の mRNA およびタンパク質の発現量の有意な低下にも関わらず細胞内 GGA 量の低下は観察されなかった。そこで MAOB ノックアウト細胞に MAOB 遺伝子を導入し、再発現させた後に、MAOB siRNA を用いてノックダウンすると、ふたたび細胞内 GGA 量の低下が観察された。これらの結果は、MAOB が正常に発現しているときには細胞内 GGA 量は MAOB 感受性を示し、MAOB 遺伝子欠損時には他の酵素系が代償的に働き細胞内 GGA 量を一定に維持していることが考えられる。現在知られている GGA の生物活性である発癌抑制（前癌細胞への細胞死誘導）作用には、もう少し高濃度の GGA が必要であり、何故 MAOB 遺伝子欠損時に細胞内 GGA 濃度を MAOB 発現時と同じ濃度に維持しなければならないのかは不明である。そこで、MAOB 遺伝子欠損に伴う細胞内 GGA 濃度の低下の回避は、むしろ GGA が発癌抑制以外の細胞活動にも必須の役割を担っている可能性が考えられた。

(2)次に、発癌抑制作用以外の GGA の生物活性を探る中で、肝臓に次いで GGA 含量の高い雄性生殖器に着目した。GGA と生殖に関する先行研究として、本研究室における「マウス交配期における GGA 添加食による再生産指数(RI: 離乳仔数を交配親数で割ったもの)の向上」を観察した報告がある。GGA 添加食による RI の向上が他の系統のマウスでも有効かを調べるために C3H/HeN マウスで再現を試みた。季節を変えて実施した 3 回の交配実験を併せると交配期間中に GGA 添加食を与えられた群で、コントロール群と比較して RI は有意に増加し、GGA による再生産指数の向上が C3H/HeN マウスにおいても示された。すなわち、MAOB を介した生合成経路で合成される GGA は、発癌抑制作用ばかりではなく、おそらく生殖機能の活性化あるいは授乳仔の発達の促進などを介した再生産指数の向上という生物活性を有することが確認できた。

(3)最後に MVA 経路を介して GGA が de novo 生合成されることを示すための実験を行なった。HuH-7 細胞をプラバスタチン処理すると、細胞内 GGA は枯渇した。プラバスタチンにより MVA 合成を阻害したのちに外因的に ^{13}C -MVL を添加すると $^{13}\text{C}_{0-4}$ -GGA が検出された。また、この結果を用いて GGA 分子内の同位元素の分布を解析したところ GGA は MVA 経路下流の FPP、GGPP を経て少なくとも MVA から生合成されることが示された。

本研究においてヒトを含む哺乳動物体内で生理活性脂質である GGA が MVA 経路由来で生合成されることが示された。今後は GGA 代謝経路の上方制御の方法や、生体内で効率よく生物活性を得られる摂取方法、例えば吸収率などの検討を基にした GGA 前駆体としての摂取や他の栄養素との組み合わせなどの補充方法を探ることで GGA の有する生物活性を最大限に用いた栄養素による疾病の予防などに展開することができると考える。