

豆類や穀物に含まれる天然変性タンパク質の  
蓄積を予防する成分の探索

熊本大学大学院 生命科学研究部附属  
グローバル天然物科学研究センター

貞廣 優作

生体内に存在するタンパク質の中で特定の構造をとらないタンパク質は、「天然変性タンパク質」と呼ばれている。そして、天然変性タンパク質の蓄積および凝集は、神経変性疾患や糖尿病、循環器疾患など様々な疾患に関連する<sup>1,2)</sup>。細胞内において、天然変性タンパク質は円筒状の酵素複合体である 20S プロテアソームの内部に存在する触媒部位で分解される。しかし、20S プロテアソームの多くは内部に通じるゲートが閉じているため、タンパク質は触媒部位に接近することができない<sup>3)</sup>。また、老化により 20S プロテアソームの酵素活性は低下し、天然変性タンパク質の蓄積を引き起こす。そのため、20S プロテアソームの活性化は、天然変性タンパク質の蓄積により生じる疾患の治療や予防に大きく貢献すると考えられる。20S プロテアソームの活性化物質は合成化合物からの探索が中心であり、天然物からの報告は植物由来の ursolic acid<sup>4)</sup>や oleuropein<sup>5)</sup>に限られていた。最近、我々は植物由来の化合物ライブラリから 20S プロテアソームを活性化する化合物を探索し、キョウチクトウ科の植物であるインドジャボクが産生するアルカロイド reserpine やその合成誘導体である syrosingopine が強い 20S プロテアソーム活性化作用を示すことを報告した(図 1)<sup>6)</sup>。

このような背景から、植物資源には未知の 20S プロテアソーム活性化物質が存在し、我々の生活に身近な穀物や豆類にも、天然変性タンパク質に関連する疾患の予防に有望な化合物を含む食品が存在する可能性があると考えた。そこで本研究では、新たな 20S プロテアソーム活性化物質を穀物や豆類などから探索するため、有機溶媒により含有成分を抽出して作成した天然物エキスをを用いて、20S プロテアソーム活性化試験を実施した。さらに、活性化作用を示したエキスに対して、超高速液体クロマトグラフィー・高分解能タンデム質量分析 (UPLC-HRMS/MS) を用いて成分を分析し、エキス中に含まれる 20S プロテアソーム活性化物質の特定を試みた。

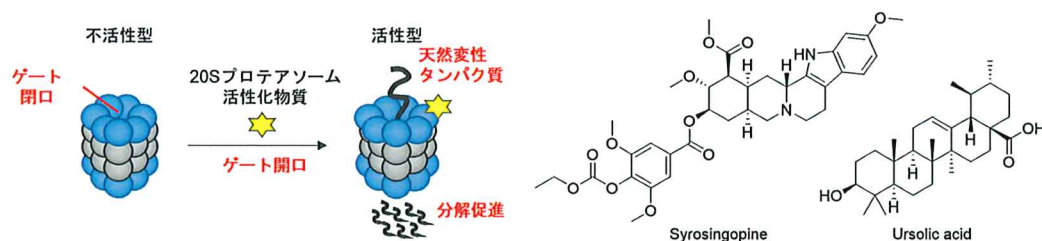


図 1. 化合物による 20S プロテアソーム活性化機構と 20S プロテアソーム活性化作用が報告された植物由来の化合物と誘導体。

## <実験方法>

### サンプル調製

市販されている豆類および穀物として大豆（音更大袖振大豆、北海道産）および青えんどう豆（マロファットピース、英国産）を使用して 20S プロテアソーム活性化試験用のサンプルを準備した。それぞれの基材 15g を粉碎後、脱脂のため *n*-hexane を加えて攪拌し、*n*-hexane 抽出物を廃棄した。脱脂後の基材を乾燥後、70% EtOH-H<sub>2</sub>O を加えて抽出した。溶媒留去後、酢酸エチルと水で液々分配し、酢酸エチル画分と水画分（W 画分）を得た。酢酸エチル画分は溶媒留去後、*n*-hexane と 90% MeOH-H<sub>2</sub>O で液々分配し、*n*-hexane 画分（H 画分）と 90%MeOH-H<sub>2</sub>O 画分（M 画分）を得た。H 画分および M 画分は 5 mg/mL の DMSO 溶液として調製し、水画分は 10 mg/mL の水溶液として調製した。

### マウス肝臓由来のプロテアソーム粗抽出液の調製

4 匹のヌードマウスから摘出した肝臓を proteasome lysis buffer（20 mM HEPES (pH7.5), 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 10% (v/v) グリセロール）中でホモジナイズ後、氷上で 5 分間インキュベーションした。不織布でろ過後、ろ液を 10,000×g、4℃の条件で 5 分間遠心後、上清を回収した。次に、上清を 105,000×g、4℃の条件で 20 分間超遠心し、上清を回収した。続いて、上清を 300,000×g、4℃の条件で 1 時間超遠心し、上清を廃棄後、沈殿物を proteasome stock buffer（20 mM HEPES (pH7.5), 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 50% (v/v) グリセロール）に再溶解し、プロテアソーム粗抽出液を合計 800 μL 得た。

### プロテアソーム活性化試験

プロテアソームの活性化は 20S プロテアソームのβ5 サブユニットのキモトリプシン様活性により分解されることで蛍光を発する基質 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA（3120-v, Peptide Institute, Inc.）を使用した酵素活性化試験により評価した（図 2）。プロテアソーム粗抽出液をアッセイバッファー（50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 1 M NaCl）により 4000 倍に希釈したプロテアソーム溶液 5 μL を黒色平底 384 穴マイクロプレートへ分注後、100 μg/mL に調製した H、M 各画分および 200 μg/mL に調製した W 各画分を 5 μL 添加し、37℃で 20 分間インキュベーションした。その後、20 μM に調製した発光基質（Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-

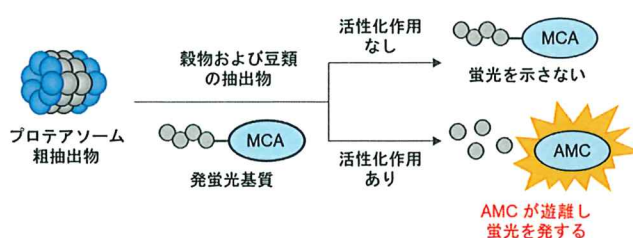


図 2. プロテアソーム活性化試験の概要。

MCA) を 10  $\mu$ L 添加し、プレートリーダー (Cytation, Biotek) を使用して 37°C の温度下で 5 分ごとに 1 時間、蛍光量を測定した。相対分解速度は各画分で処理した際の分解速度をネガティブコントロール (DMSO で処理) の分解速度で相対化することで算出した。

#### UPLC-HRMS/MS 分析および Molecular Networking (MN) 解析

Waters Acquity UPLC と Waters Xevo G2-XS QToF 質量分析計を接続した UPLC-HRMS/MS を使用して分析した。0.1 mg/mL の DMSO 溶液として調製した M 画分のうち 1  $\mu$ L を、55°C に加温した Waters Acquity UPLC BEH C18 カラム (1.7  $\mu$ m、2.1 $\times$ 100 mm) を用いて流速 0.8 mg/mL の条件でリニアグラジエント溶出 (5–100% MeCN–H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCOOH (0–5 分)、100% MeCN containing 0.1% HCOOH (5–6 分)、) により分析した。MS/MS スペクトルは DDA (Data-Dependent Acquisition) 法により測定した。測定結果を Waters2mzML-1.2.0 (<https://github.com/AnP311/Waters2mzML>) を用いて mzML 形式のファイルに変換し、MZmine 4.6.1 を使用して検出された成分のピークリストを構築した<sup>7)</sup>。ピークリストを GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) のプラットフォームにアップロードし、GNPS の推奨条件で MN 解析をした<sup>8)</sup>。

#### <結果および考察>

##### 20S プロテアソーム活性化試験

大豆や青えんどう豆の 70% EtOH–H<sub>2</sub>O 抽出物から調製したそれぞれの H 画分、M 画分および W 画分についてプロテアソーム活性化作用を調べた結果、青えんどう豆はいずれの画分においてもプロテアソーム活性化作用を示さなかった。一方、大豆の H 画分および M 画分でプロテアソームを処理すると基質の分解速度が 2.9 および 2.2 倍になったことから、大豆の H および M 画分は 20S プロテアソーム活性化物質を含むと考えた (図 3)。ここで、大豆や青えんどう以外の食用の植物資源についても同様の手順で画分を調製し、プロテアソーム活性化試験をした結果、ほぼすべての H 画分において活性化作用が認められた。H 画分は脂肪酸などの成分を多く含有しており、脂肪酸は界面活性作用を示す。20S プロテアソームは低濃度のドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤により活性化されることが報告されていることから<sup>9)</sup>、H 画分の活性化作用は脂肪酸等に由来すると推定し、成分探索の対象から外した。一方、M 画分における活性化作用は一部のサンプルに限られたことから普遍的な成分による活性化作用ではないと考え、大豆の M 画分に含まれる活性化物質を調べるため、UPLC-HRMS/MS により M 画分を分析した。

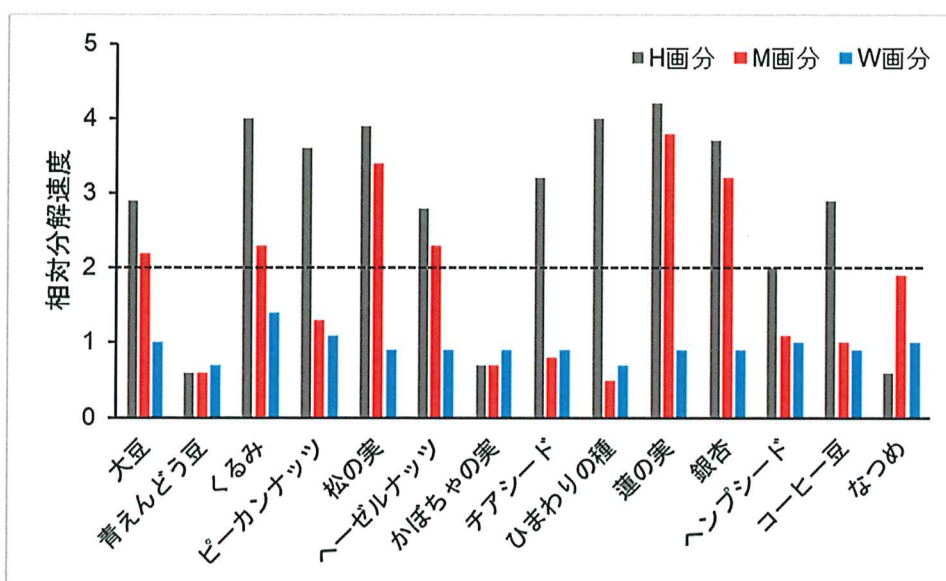


図 3. 20S プロテアソーム活性化試験の結果。相対分解速度は各サンプルでプロテアソームを処理した際の基質の分解速度をネガティブコントロール (DMSO) で処理した際の分解速度で相対化して算出した。また、独立した 2 回の試験の結果を平均した。H 画分および M 画分の終濃度は 25  $\mu\text{g/mL}$ 、W 画分の終濃度は 50  $\mu\text{g/mL}$  となるように調製した。

#### UPLC-HRMS/MS による大豆 90%MeOH-H<sub>2</sub>O 画分の分析

20S プロテアソーム活性化作用を示した大豆の M 画分を UPLC-HRMS/MS により分析して含有成分を調べたところ、1.3 分から 2.4 分にかけて強い UV 吸収を示すピークが検出された (図 4A)。MS スペクトルを解析した結果、それぞれ  $m/z$  417.1195 (1.4 分)、 $m/z$  433.1143 (1.6 分)、 $m/z$  255.0648 (2.0 分) および  $m/z$  271.0603 (2.2 分) のイオンピークが検出され (図 4B)、さらに UV スペクトルの極大吸収を調べた結果、それぞれ genistin、daidzin、genistein および daidzein と推定した (図 4C)。また、UV 吸収を示さない成分について調べるため Molecular Networking (MN) 解析を行った。MN 解析は骨格が類似した化合物は MS/MS スペクトルが類似することを利用して、MS/MS スペクトルが類似した化合物をグループ化するメタボロミクス解析手法である<sup>8)</sup>。MN 解析の結果、UV 吸収から存在が示唆された genistein および daidzein から構成されるアグリコンのクラスターの存在が認められた (図 5)。また、M 画分には保持時間 4 分以降に多くの成分が検出されたことから疎水性の化合物が多く含まれることが分かり、赤で示した成分の MS/MS スペクトルは MS/MS のデータベースと照合することで、脂肪酸の MS/MS スペクトルと高い類似度を示した。イオン強度から M 画分に多く含まれることが示唆された  $m/z$  575 の成分は MS/MS スペクトルのデータベースや化合物データベースと照合をしたが同定には至らなかった。

生体内において 20S プロテアソームのゲートの開口は 19S 複合体のようなプロテアソーム活性化因子によって制御されている。特に、19S 複合体の Rpt サブユニットの C 末端側に存在する疎水性アミノ酸—チロシン—その他アミノ酸からなる共通配列 (HbYX 配列) が重要であり、HbYX 配列が 20S プロテアソームの $\alpha$ サブユニット間の空間に挿入されることでゲートの開口が誘導される。低分子化合物による 20S プロテアソームの活性化においても部分構造にフェノールやレゾルシノール、ガロイル基のような部分構造を持つ化合物が 20S プロテアソーム活性化作用を示す傾向にあることから、M 画分の分析時に検出された genistin、daidzin、genistein および daidzein のようなフラボノイドが活性化作用を示す可能性があると考えた。一方で、M 画分には疎水性の成分が多く含まれており、一部の成分については MS/MS スペクトルの類似度から脂肪酸であることが示唆されたことから、M 画分の 20S プロテアソーム活性化作用は、脂肪酸による界面活性作用の可能性も考えられる。今後は、M 画分に含まれる 20S プロテアソーム活性化物質を同定するため、成分探索を継続する。

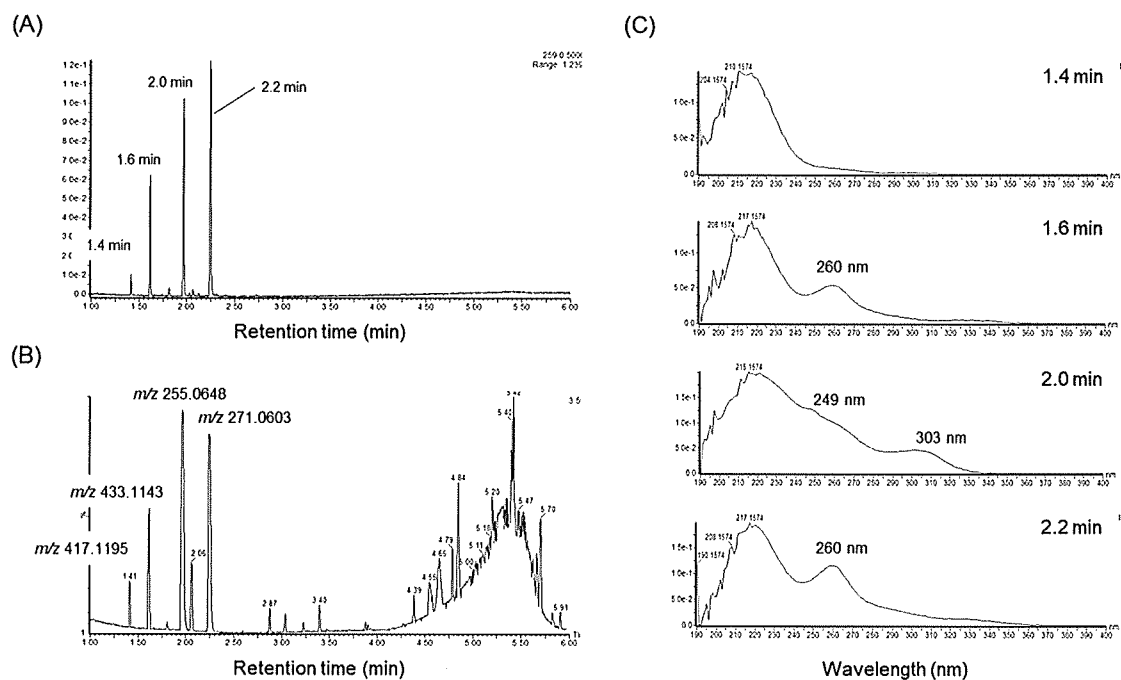


図 4. 大豆の M 画分の UPLC-HRMS/MS 分析。(A) 259 nm の UV クロマトグラム。(B) ベースピークイオンクロマトグラム。(C) 1.4、1.6、2.0 および 2.2 分に検出された成分の UV スペクトル。

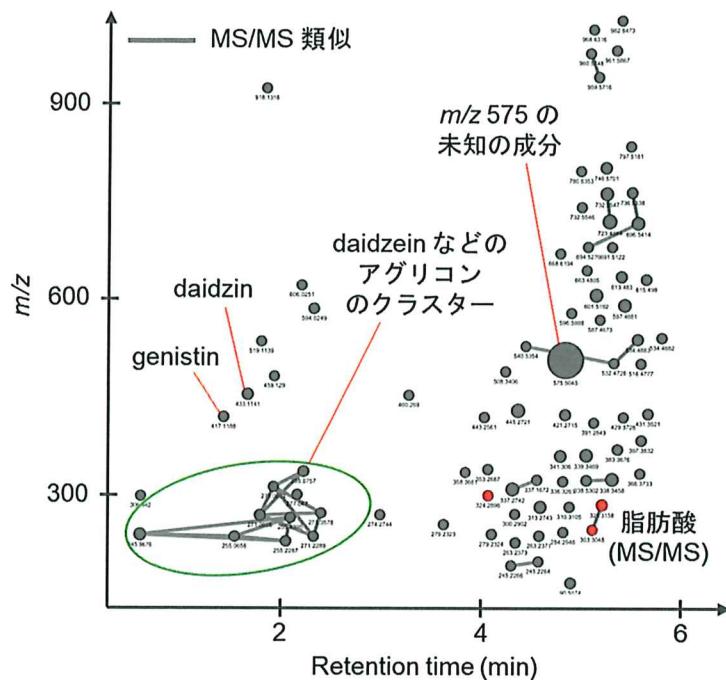


図 5. 大豆 M 画分の Molecular Networking 解析。グラフ上のノードは UPLC-HRMS/MS により検出された成分を、ノードの大きさはイオン強度を表す。MS/MS スペクトルが類似した成分はエッジで結ばれる。

#### <要約>

穀物や豆類から新たな 20S プロテアソーム活性化物質の発見を目指し、大豆および青えんどう豆の 70% EtOH-H<sub>2</sub>O 抽出物を各種溶媒で液々分配して得た画分を使用し 20S プロテアソーム活性化試験を実施した。青えんどう豆についてはいずれの画分も活性化作用を示さなかったが、大豆から調製した H 画分および M 画分は活性化作用を示した。M 画分について UPLC-HRMS/MS による成分分析の結果、M 画分には daidzein などの大豆から報告のあるフラボノイドが多く含まれることが分かった。フェノールやレゾルシノールを部分構造に持つ化合物は 20S プロテアソーム活性化作用を示す傾向にあることから、これらフラボノイドが 20S プロテアソームの活性化に関与していると推定した。今後は、M 画分に含まれ活性化物質を同定するため成分探索を継続する。

#### <謝辞>

本研究を推敲するにあたり、研究助成を賜りましたタカノ農芸化学研究財団に深く感謝いたします。

<引用文献>

1. Klaips, C. L.; Jayaraj, G. G.; Hart, F. U. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 51–63.
2. Kurtishi, A.; Rosen, B.; Patil, K. S.; Alves, G. W.; Møller, S. G. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 3676–3689.
3. Smith, D. M.; Chang, S.-C.; Park, S.; Finley, D.; Cheng, Y.; Goldberg, A. L. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 731–744.
4. Coleman, R. A.; Trader, D. J. *ACS comb. Sci.* **2018**, *20*, 269–276.
5. Katsiki, M.; Chondrogianni, N.; Chinou, I.; Rivett, A. J.; Gonos, E. S. *Rejuvenation Res.* **2007**, *10*, 157–172.
6. Sadahiro, Y.; Nishimura, S.; Hitora, Y.; Tsukamoto, S. *J. Nat. Prod.* **2024**, *87*, 554–559.
7. Schmid, R.; Heuckeroth, S.; Korf, A.; Smirnov, A.; Myers, O *et al.* *Nat. Biotechnol.* **2023**, *41*, 447–449.
8. Nothias, L. F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J *et al.* *Nat. Methods*, **2020**, *17*, 905–908.
9. Shibatani, T.; Ward, W. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *321*, 160–166.