

「ノンスペワールド備忘録」

村上 明

「生体タンパク質への非特異的な結合がファイトケミカルの機能性に関与する」という研究成果に至った背景や経緯、そして裏話について、自分の記憶喪失に備えて気の向くままに綴ってみました（長文、約 10K 字）。

バックグラウンド

今回の成果に関連した、最も古い出来事は何かと顧みると、大学時代の講義で「タンニンで皮を革へ鞣（なめ）す時、タンニンは皮中のコラーゲンにランダムに結合する」という話を聞いた経験にたどり着く。

その後、例えば「[フラボノイドがプロテインキナーゼCの ATP 結合部位に結合する](#)」という文献を研究室のセミナーで紹介をしたこともあるが、「どこまで特異的なんだろうか？」という疑問を解消することはできなかった。

一方、自分の研究が天然物化学という分野でスタートしたという背景も重要だ。食品機能性の研究が盛んになり、学会で「ポリフェノールが健康に良い」という話を聞いても、天然物化学の基礎知識に照らし合わせて「たまたまそんな機能があるのかも知れないが、本来は植物が環境適応のために生合成している物質だ」と認識していた。

このような背景が「ファイトケミカルは動物にとっては異物。だからストレス応答を誘導しても不思議ではない」という考えを押し進める上での基盤となっていたことは間違いないだろう。

化合物から生物へ

修士課程の頃、生理活性物質の「物取り屋」であった私がバイオアッセイ系にも興味を持ち始め、自分の見つけた化合物がどんなメカニズムで効いているのかを解明できれば良いなあ、と漠然と思っていた。

しかし、当時は新しい研究分野に踏み込む気概も実力もなく、共同研究先から届く「効いた、効かない」という表面的な結果に一喜一憂するだけだった。効いても効かなくても自分のおかげ（せい）ではなく、基本的に試料の力量に左右されるという現実には物取り屋

のモチベーションを少し下げているように思う。

しかしその後、大東肇先生（京都大学名誉教授）のご厚意によって、複数の他大学で色々とアッセイ法を習得する機会を得ることができた。培養細胞やマウスを使った実験を自分の手で行うことで生物への距離が縮まったのは素直に嬉しかったし、頭の固い指導教員であれば、こうした大きな方向性の変化は難しかったであろう。

さらに1993年、中村宜督君（現岡山大学）が配属してから研究室は一気に活性化し、発がんプロモーターの炎症惹起作用に対する食品因子の抑制機構を分子レベルで評価することが可能となった。また、田中卓二先生（現東海細胞研究所）との共同研究で、多様な動物発がん試験系での評価や組織学的解析に関するデータを得ることができたことも非常に有難かった。

こうして、「自分たちでユニークな化合物を見つけ、自分たちでその生理作用を評価する。メカニズムに解析については、浅学でも、自分たちの手できることは何でもやる。無理なことは共同研究でお願いします」という基本的なシステムができあがった。

近大へ移ってからも、小清水弘一教授（京都大学名誉教授）に「何でも興味のあることをやりなさい」という温かいお言葉と自由な研究環境を与えて頂き、解析に必要な分子生物学的手法を積極的に取り入れた。

その結果、それぞれの化合物によって作用機構が異なることを目の当たりにし、また、「およその作用点」が見えたことは自分にとっては画期的で面白く、そんな研究を10年以上続けた。

しかし、こうして「メカニズムの概要」がわかった反面、「最初に相互作用する標的」は依然として不明だった。その知見の重要性は重々承知していたが、プライマリーターゲットを見つけることなんて誰にもできないだろう、と高をくくっていた。

緑茶カテキンの衝撃

しかし、転機は突然、外からやってきた。今でもはっきり覚えているが、食品総合研究所で農水省の研究プロジェクトの班会議があり、その懇親会でのことだった（2002年だったと思う）。

懇意にしていた立花宏文君（九大）が興奮した様子で「カテキンの受容体を見つけた！」

とあちこちで言い放っていた。カテキンなんて単純な構造だし、正直なところ半信半疑だったが、彼らの研究成果は [2004年のNat Struc Mol Biol](#) に掲載され、世界中の食品研究者に衝撃を与えた。本当に驚いたし彼の力量に舌を巻いたものだ。今から約10年前のことである。

この大発見を契機として、ポリフェノールを中心とした標的タンパク質の研究が世界中で盛んに行われ、「食品因子の作用メカニズムを薬剤のように分子レベルで説明できる時代がきたのか！」と胸が躍った。

しかし、それでもなお、「ポリフェノールに特異的な受容体があるのは事実であっても、他にも色んなタンパク質と相互作用するだろう。さらにレドックス調節も重要だ。だから、それらの総和がポリフェノールの機能性発現に影響するはずだ」という考えに変わりはないかった。

始まりは2007年

私たちも後追いではあったが、池田泰隆君（当時博士課程）の活躍もあり、天然トリテルペンである [ウルソール酸の受容体がCD36](#) であること見つけて2007年に報告した。

そして同じ年、古川育代さん（当時修士課程）が今回の研究成果に関係する最初の実験をひっそり行った。そのデータは学会等でも未発表だが、ゼルンボンの標的分子を探索する上で第一歩と言えるものであった（※念のためだが、古川さんの修士論文のメインテーマは他にあり、論文2報分にもなる成果を挙げている）。

標的分子の探索方法として、セファロース担体にゼルンボンを化学的に結合させ、アフィニティークロマトで標的タンパク質を回収するという教科書的なアプローチをまず選んだ。ゼルンボン自体を結合させることは無理だったので、彼女はゲルに結合することが可能なゼルンボン誘導体の活性評価を行ったのだ。

その後、古川さんと入れ替わるように研究室へ配属してきたのが、本研究の主役である大西康太君である。そのまま研究テーマを引き継ぎ、最初の1年はひたすらゲル調製法の確立に取り組んでいた。4回生の深秋までずっと苦勞をしていたが、持ち前のセンスと粘り強さで、ついに「使える」ゲルの調製に成功した。

また、この時、彼は「積み重ね法」という独自のアイデアでリガンドの結合率を限界にまで高めた功績を上げている（詳細略・笑）。さらに、アフィニティゲルを使った研究で

は、想定通りのゲルができているのかどうかは検証されないことが多いが、その点にもこだわった。ゲル調製の試行錯誤の段階では、入江一浩先生（研究室教授）と北山隆先生（近畿大学）から化学的な視点で数多くのご助言を頂いた。

このゲルを培養細胞の溶解液とインキュベートし、結合するタンパク質を同定するにあたり、解析方法は2通りあった。1つは、電気泳動ゲルで見えるバンド（目立つバンド）を切り取り、質量分析などで同定する方法、もう1つは、「結合すると予想される」タンパク質を想定し、実際にそれが含まれているかをウエスタンブロット法で検証する方法だ。

前者は未知のターゲットが釣れるかも知れないというロマンがあるが、そのタンパク質はゼルンボンの機能性に無関係という虚しいオチも覚悟する必要がある。そして同定には特殊な研究設備が必要だ。後者は、あらかじめ機能に關与しているものを狙うので活性への關与は担保されるが、意外性のある新奇な標的は絶対に見つからない。しかし安価な方法ではある。

最新機器や大規模な研究予算がない我がラボでは当然の如く後者の道を選択し、解毒酵素の誘導に重要な Keap1 や炎症關連分子の発現に關与する HuR や TIA-1 などがセファロースゲル上のゼルンボンに共有結合するというデータが得られた。そして、大西君の学振応募の締め切りのこともあり、それ以上のデータを追加することなく、2009年、[Biosci Biotechnol Biochem](#) の [Note](#) で発表した。

ゼルンボンという物質は非常に特殊でもあるし、得られた結果もある程度予想されたことだ。また、preliminary なデータと言われても返す言葉はなく、決してインパクトの高い成果とは言えないかも知れない。しかし、色々と苦労したこともあって、自分たちにとっては非常に感慨深い出来事であった（後に、Keap1 については [Young-Joon Surh 先生ら（ソウル大）との共同研究](#) で、結合が機能性の発現にも重要であることを報告している）。

ノンスペワールドを目の当たりに

こうして2008年、大西君は[フードサイエンスフォーラム](#)で早々に学会デビューを果たし、上記のデータを発表した。しかし、会場にいた研究室OBの川畑球一君（当時徳島大学PD）から、「細胞の溶解液を使った実験では基本的にタンパク質のコンフォメーションが維持されないのだから、真の標的とは言えないのでは？」という、（良い意味で）批判的なコメントを食らった。

この問題をクリアするため、次にゼルンボンのビオチン標識体と特異的抗体の作製を試

みた。前者は容易に化学合成できたが、後者については寺尾純二先生（徳島大学）のラボで研修を受けさせて頂いて調製した。実際に現場で手を動かしている河合慶親君（現名古屋大）が留学中だったので、当時、修士課程だった石坂朱里さん（現くらしき作陽大）に抗体作成のノウハウを教えてもらった。

こうして手に入れた 2 種の分子プローブは非常に使い勝手も良く、その後の研究は飛躍的に進展した。しかし、実際に目の当たりにしたのは、ゼルンボンが非常に多くのタンパク質と結合するという事実だった。同じ研究科に所属する木岡紀幸先生のご協力で行った共焦点レーザー顕微鏡による解析では、ゼルンボン付加体の細胞内分布が核を含む全体であるという事実を突き付けられ、この物質に特異的な結合タンパク質があるという可能性は低いものとなった。

しかし、このような逆境の中でも、特異的なターゲットが存在する可能性は捨てきれなかった。そこで、中山勉先生（静岡県大）のラボで、石井剛志君（同助教）や森大気君（現長寿医療研究センター）らのお世話になり、MALDI-TOF MS によって結合タンパク質の網羅的解析を行った。

初めての先端分析機器による解析、ということで興奮して結合タンパク質のリストに目を通した。すると、あまり嬉しくない解糖系酵素や細胞骨格タンパク質の名前もズラリと並んでいたが、L-プラスチンという見慣れないタンパク質に目が留まった。

既知情報を調べて見ると機能に不明な点多かったが、炎症反応への関与を示唆する文献が見つかり、「もしかすると、コイツがゼルンボンの真の標的なんじゃないか！」と、胸躍る日々が続いた。しかし悲しいかな、L-プラスチンの発現量を変化させてもゼルンボンの機能性には一向に変化がなく、「くっ付くだけ」という結論に至った。興奮した分、二人共かなり落胆した。

次は GAPDH に着目した。最近の研究で、解糖系酵素としてだけでなく、シグナル伝達分子として多機能性を示すことが注目されていたからだ。また、本酵素には反応性の高いチオール基があるので、Keap1 と同様に特異的な標的の匂いもした。さらに、平凡な酵素がゼルンボンの機能に関係しているのならむしろインパクトが高いのではないか、そうであって欲しいという色気もかなり出ていた。

ちょうど同じ時期に、池田雄樹君（当時修士課程）が[炎症関連酵素シクロオキシゲナーゼ-2 の発現制御における GAPDH の機能に関する研究](#)をテーマにしていたので実験自体はスムーズに進んだ。しかし、悔しいことにまたもやネガティブな結果だった。

他にも標的候補は残っていたが、明らかに大西君のモチベーションは落ちていた。

Keap1 はさておき、ゼルンボンには他に特定の標的分子がなく、タンパク質にランダムに結合するという事実はもう揺るぎようがないように思えた。この状況では、「Keap1 への結合だけが大事で、後はせいぜい副作用にしかならないノイズである」という結論にして本研究の幕を引くことも十分にあり得た。

実際に、「食品成分だし、こんなもんだろう」と目の前のデータを冷静に受け入れることもできていた。こんなに単純な化合物がタンパク質に対して選択的に結合することはまずないだろう、とある程度最初から想定もしていた（でも、やってみないとわからない！）。Keap1 の関与が実証できただけでも、標的分子の研究に挑戦した価値があったもんだ、という納得の仕方も可能だった。

2009 年春、大西君の学振申請書には「ゼルンボンの新規標的分子を見出すことで新たな生命現象を解明したい」との内容が盛り込まれていた。しかし実際には、二人ともその自信は全くなく、目の前には暗い道しか見えなかった。

発想の転換

だが幸いなことに、この停滞した状況でも大西君との議論だけは絶えなかった。いや、むしろそれまで以上に濃密な議論をしていたように思う。

「この非特異性こそが薬と違う点やなあ」

「うんうん、天然物らしい結果です。この事実から目を逸らしたくないですね」

「でも逆に、薬の場合だって、こうやって実際に結合性を検証したら、案外、オフターゲットが多いんかもね」

「そんな事やってる人、いるんですかね？」

「この大量のノイズの中に重要な結合が隠れているのかも。でも、それをどうやって洗い出せばエエんやろか？」

「逆に、結合しないタンパク質もありますね。それが大事なんかも知れませんか」

「万が一やけど、ランダムな結合が機能性に関与してたら凄いことやな」

「それが証明できたら、薬物とは違う、天然物に独自のメカニズムってことになります

ね？想像もできませんけど」

「そもそも、これだけゼルンボンが派手にくっ付いたらタンパク質の機能はどうなるんやろ？単なる毒性原因？」

「う——ん」

そんな話を繰り返していた。

しかし当時、この閉塞状況を打破する上でラッキーなことが1つあった。タンパク質の品質管理機構を研究している先生が同じ専攻におられたので、新規合成時にジャンクなタンパク質ができると小胞体ストレス応答が起こる、という程度の知識を持ち併せていたのだ。

「異常タンパク質が生成すると細胞はそれを感知して修復しようとする」。タンパク質の変性が起これば恒常性に支障が起こることは必至だし、それに対する適応応答機構が備わっていることは何の不思議もないが、それまでは全く視野にないメカニズムだった。

「じゃあ、ゼルンボンがタンパク質に付いたら小胞体ストレス応答が起きるのかな？」

ネガティブな側面しか感じ得なかった非特異的な結合に対して、初めて前向きな意義付けを試みた瞬間だった。2010年のことだった。

その後、タンパク質の構造修復システムとしては、熱ショックタンパク質（HSP）も重要であることもすぐに知り（無知だっただけ）、ターゲットをHSPに絞った。そして、熱処理によってHSPの発現量が上がるのであればゼルンボン処理によっても同じことが起こり、熱ストレス耐性が強化されるのではないかという仮説を立てた。

研究とは面白いもので、その後は想定通りのデータが順調に出た（技術的な問題で時間を食うことはあったが）。ゼルンボンのHSP誘導活性は強いものであったし、そのメカニズムも熱処理の場合とほぼ同様であった。

最大の難関と思われた、ゼルンボン結合タンパク質がHSP90に認識されるというデータも何とか取得することができ（但し、これは未だ *in vitro* でしか証明できていない）、ケミカルストレスに対するタンパク質恒常性機構の一部が明らかとなった（[BBRC](#), [PLoS ONE](#)）。

この間、新しい実験系にも踏み込んだ。大学時代の後輩である松本晋也君（京都女子大）

が長年、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を使った研究をしていたので、中畑恵利奈さん (修士課程) に扱い方を習得してもらい、熱耐性の賦与というゼルンボンの新しい機能性を提示できた。

また、池田泰隆君と、当時研修に来ていた秋山稔君 (共に大塚製薬) らの動物実験によって、経口投与したゼルンボンが、血中の付加タンパク質量や肝臓における HSP70 発現レベルを増加させることも証明できた。

以上のような、ユニークで新しい機能性がゼルンボンだけに限定されるのであれば、本研究成果の意義はさほど高くなかったかも知れない。しかし、大倉伸哉君 (当時修士課程) が行った食品成分の HSP70 誘導活性スクリーニングによって、栄養素には稀で、ある程度ファイトケミカルに特有な作用性ということが実証できた。

ケミトレ説とサプリ

ケミカルトレーニング仮説 (ケミトレ説) とは、「生体異物であるが故に誘導されるストレス応答が結果的に生体防御機能を強化し、ファイトケミカルの機能性発現に寄与する」という考え方で、私たちの造語だ。裏を返すと、これまでに知られている機能性の一部がストレス応答に起因しているのではないか、という仮説だ。

しかし、ケミトレに関連した現象はすでに良く知られたものがある。例えば、[スルフォラファンという含硫化合物 \(ブロッコリーに含まれる\) が抗酸化・解毒酵素を誘導し、「デトックス作用」を示す](#)が、この機能性発現機構も次のようにケミトレに関係している。

スルフォラファンは細胞内のグルタチオンなどとの反応によって酸化ストレスを誘起する。だからこそ、この異物を摂取した生体は、それをいち早く体外へ排出するために解毒酵素量を増やし、また酸化損傷を最小限に留めるために抗酸化酵素のレベルを上げようとするのだ。

これがスルフォラファンによってデトックス効果が起こる真の理由であり、決して「体に良い成分だから効果がある」のではない。また、このような効果は「弱い毒」を摂取して初めて現れるものだと考えられる (そうでなく、全く無害の物質を摂取する所でデトックス作用が現れる場合があるなら教えて欲しい)。

このように、ファイトケミカルが酸化ストレスを与えることで生体の抗酸化能や解毒能が増加する現象は、[P. Talalay](#) 博士らの研究で古くから知られているが、生体に適度なタ

ンパク質ストレス (proteo-stress) を与えると、それに対する適応応答が起こることを見出したのは私たちが初めてである。

ところで、「トレーニング量」が適度である場合に、生体の防御能はファイトケミカルに暴露される前よりも強化される、という原則は負荷とメリットの収支を考える上で興味深い。例えば、ケミカルストレスに対してちょうど対処できる程度の防御機能の増加ならトレーニング効果があるとは言えないだろう (≒プラマイゼロ)。

しかし、上述したように、トレーニングの質が良ければ「防御力ボーナス」がもらえるという収支関係は非常に面白い。これはおそらく、さらなるストレスを警戒して先手、先手で防御力を高めよう、という生体の意図なのだろう。同時に、トレーニング効率の高い生物が進化の過程で優先的に生存したと想像することもできる。

ところで、ケミトレに限らず、日常生活には体や心を適度なストレスに晒すことでメリットを享受できる活動が数多くある。例えば、有酸素運動や筋肉トレーニングなどで負荷をかけると心肺能力や筋肉が強化される現象はそれに該当する (同じく、入湯や日光浴なども体へ適度な負荷をかける健康活動と表現できるだろう)。

また、「酒は百薬の長」と古くから言われるのは、異物であるアルコールが体を適度に刺激することが原因なのかも知れない。さらに、精神ストレスを適度に受けると心が強くなることは理解に難くない。

このように、私たちの生活はストレス負荷とそれに対する適応応答で満ち溢れている。

上記した背景から、2011年に[台北で開催された ICoFF](#)での講演スライドには「Life may depend on trainings」というメッセージを込めた。また、「ファイトケミカルによるトレーニングを怠れば、将来、治療が必要となるだろう」という意味を込め、ハロウィンに準えて「Train or Treat ?」というフレーズも使った (これは大西君のグッドアイデア)。

自分としては肝入りだったこの講演に関して、大会会長である L. Hwang 博士から「息子があなたの講演を聴いたけど、一番面白かったって言ってたわよ！」と聞いたときは、嬉しく、また手ごたえを感じた。

ところで、ストレス負荷が「適度・適量」を超えると何が起こるのか？これは言わずもがなであろう。この結末は、例えば運動不足の中年がいきなり激しい運動をすればどうなるか、あるいは未成年がイッキ飲みをすればどうなるか、を想像すれば容易に理解できる。

ファイトケミカルによるケミトレの場合も、摂取量が多すぎる場合は、生体防御系が破たんし害作用が露呈するのが原則と考えて良い。「ファイトケミカルは摂取量が多ければ多いほど健康に良い」という風潮が作られているのは一部の食品メーカーの責任であり、消費者の盲信を招いている（この辺りの問題は拙著「[健康一年生](#)」にも記した）。

私たちは以前から、ファイトケミカルの害作用に関する研究も積極的に行ってきた。サプリメントなどによる過剰摂取は社会問題ともなっており、害作用メカニズムも不明な点が多いからだ。

[金美慧さん](#)（当時博士課程）やポスドクとして精力的に働いてくれた[井上博文君](#)（現東京農大）らが行った緑茶ポリフェノールの研究では、実際に高用量でマウスに投与した場合は生体防御系が低下し、肝臓や腎臓の機能障害が起こる現象を見出している。

このような食品成分の害作用研究も、結局のところは、ケミトレ説（過ぎたるは及ばざるが如し）に通じるところが多く、期せずして研究の一貫性が示せたことは感慨深い。

また逆に、毒物であっても適量であれば機能性を示すケースもある。例えば、一酸化炭素（CO）の環境基準は 10 ppm 以下であり、1000 ppm を超えると窒息などが起こるが、興味深いことに [250 ppm 程度では組織損傷を緩和する](#)という機能性が現れるという事実が実験動物を使った研究で証明されている（この話題は高校生への出前授業やサイエンスカフェなどで非常に評判が良かった）。このような効果も「軽いストレスで防御機構を活性化させる」という適応メカニズムに起因しているのだ。

約 500 年前の医師・錬金術師であったパラケルススは、「すべての物質は有害である。毒でないものは存在しない。薬と毒を区別するのは適切な量である」と述べている。私たちは今、500 年も前のこの金言を再認識する必要があるのではないだろうか。

プロテオホルミシス

「適度なストレスに暴露されると生体防御能が強化する」という生物の適応応答は、1943 年に Southam と Ehrlich によってホルミシス ([hormesis](#)) と命名された（ちなみに、私が [hormesis](#) という言葉に興味を持ったきっかけは、本専攻の卒業生で現在、留学中の藤川哲兵君が「[Xenohormesis](#)」に関する[総説](#)をブログで紹介していたことなのだ）。

また、2011 年 3 月の原発事故問題で頻繁に言及された「放射線ホルミシス（radiation

hormesis)」も同族の用語である。被ばく量が低レベルであれば、それに対する防御系が強化されることで発がん率などはかえって低下する、という考え方だ（但し、その真偽については議論がある）。

さらに近年では、ミトコンドリアへのストレスによってその増生が起こり、長寿へ寄与することも報告されているが、この応答はミトホルミシス ([mitohormesis](#)) と呼ばれている。

これらを受け、私たちは、ファイトケミカルが適度な proteo-stress を与えることで、ストレス耐性を賦与する現象を「プロテオホルミシス (proteohormesis)」と呼ぶことを提唱したい。

「効く」と「知る」の食品機能学

言うまでもなく、国民の健康へ資する機能性食品を開発することは、膨張し続ける医療費の抑制には効果的であろう。実際に、一定の健康効果を示している食品もあるのかも知れない。

しかし、作用メカニズムが未だ不明確な点が多い事や、副作用の問題が後を絶たない現状では、「本当に有益な機能性食品、継続的に摂取される健康食品」の開発が難しいことも事実であろう。

機能性食品の研究に巨額の血税が使用され、また企業でもトクホの開発には何十億円も必要だと言う。投資回収できているか否かは別として、果たしてそれらに見合う、健康効果は大衆に還元されているのだろうか？

その一方で、ファイトケミカルを含む野菜や果物が健康増進や疾病予防に寄与し得ることは多くの疫学調査が支持している。従って、今回のような新しい切り口で真の作用機序を解明することは、より優れた機能性食品の開発に少なからず貢献できると信じている。

古来より摂取し続けてきたファイトケミカルという化学物質群が「なぜ動物に効くのか？」を問い続けることは「人類はなぜ野菜を食べてきたのか？」という、より壮大な謎に迫ることに繋がり、さらに、化学物質を介した動物—植物間の相互作用の理解にも貢献できよう。

従って本研究成果は、食品機能学のみならず進化生物学や化学生態学にも少なからず波

及するものと考えている。

3年前、このホームページのトップに「食品機能性の研究を通して、植物二次代謝産物と動物の相互作用を分子レベルで理解することを目的としています」という言葉を掲げた。もちろん、その全容理解への道は遠いが、今回の成果を挙げたことでまずは第一歩を踏み出せたことに手応えを感じている。

大西康太と、彼との出会いに感謝して次の課題に目を向けたいと思う。

2013年3月14日

春近い京都にて