＜平成18年度＞

新奇標的分子に着目したニンニクの抗がん作用機序の解明と香辛料成分の機能評価

関 泰一郎・細野 崇・細野（深尾） 友美・稲田 薫・田中 理江
飯塚 裕司・嶌本 麻衣子・有賀 豊彦
（日本大学生物資源科学部）

1. 緒 言

ニンニクは古来より食用に供されてきた。ニンニクは他の植物に比べて硫黄含量が高く，通常これらの硫黄は *S*-allyl cysteine などのアミノ酸として貯蔵されている。調理などによるニンニク組織の損傷により，*S*-allyl cysteine と異なる細胞に局在するアリイナーゼが作用してアリシンが生成する。さらにこれらの分子が非酵素的に反応し，ニンニク特有の香気成分であるアリルスルフィド類を生成する[1,2]。

ニンニクやタマネギなどの *Allium* 属植物や十字架植物のがん予防効果について疫学研究が実施されており，これらの植物の摂取はある種のがんの罹患率を低下させると評価されている。また，多くの動物モデル，*in vitro* での研究結果から生体内での発がん物質の代謝活性化の抑制，解毒・排泄促進による遺伝子毒性の低減，突然変異の予防，がん細胞の細胞周期の停止とアポトーシス誘導などが含硫成分の抗がん作用メカニズムであると考えられる[2]。

ニンニクのホモジネートを水蒸気蒸留して得られるニンニクオイルを各種株化がん細胞に添加して培養すると，細胞増殖は抑制され，未熟な血液腫瘍細胞では成熟細胞への分化やアポトーシスが誘導される。ヒト大腸がん細胞を用いてアリルスルフィドの細胞増殖抑制効果について調べたところ，diallyl trisulfide（DATS）の効果がもっとも強力で，分子中に硫黄を３つ有することが重要であった。詳細な分子細胞生物学的解析によりDATS は大腸がん細胞の細胞周期を M 期で停止させ，カスパーゼ-3 の活性化を介してアポトーシスを誘導することが明らかになった。DATS は細胞骨格タンパク質 β-チューブリン分子中の特定のシステイン残基（Cys_{12} と Cys_{354}）のチオール基を酸化的に *S*-allyl 修飾し，チューブリンの機能を阻害することが考えられた[3,4]。

本研究では，これらの知見に基づいて，DATS の標的分子の一つであるチューブリンに着目し，タマネギ中に見出される dipropyl trisulfide（DPTS）をはじめ，各種アルキル，アルケニル基を有するトリスルフィドを調製し，これらのスルフィドの構造と機能の関係について明らかにしようとした。

2. 実験材料および方法

2.1 スルフィドの調製

９種類のアルキル，アルケニルトリスルフィド（dimethyl trisulfide, diethyl trisulfide, DPTS, dibutyl trisulfide, dipentyl trisulfide, DATS, dibutenyl trisulfide, dipentenyl trisulfide, allyl methyl trisulfide）は Milligan らの方法を改良した方法により合成後，Inertsil ODS-3 カラム（GL Science）を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製し，純度99％以上の標品を実験に供した（**図 1**）。

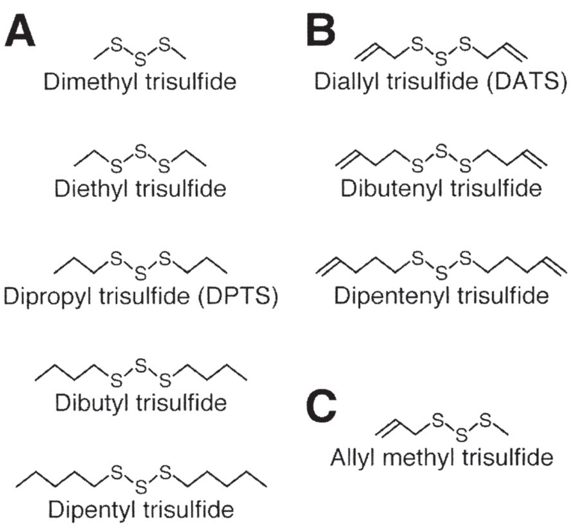


図1　本研究で使用したアルキル，アルケニルスルフィドの構造
A, アルキルトリスルフィド；B, アルケニルトリスルフィド；C, アルキル，アルケニル混合型トリスルフィド

2.2　細胞培養

ヒト大腸がん細胞HT-29は10%ウシ胎児血清を添加したMcCoy's 5A培地を用いて37℃, 5% CO_2/95%気下で継代培養した。実験には10%ウシ胎児血清添加McCoy's 5A培地で48時間前培養したHT-29を用いた。各種スルフィドはジメチルスルフォキシド（DMSO）中に5 mMになるように溶解し，終濃度が10 μMになるように培養系に添加し，0.2% DMSOを添加した培養系を対照とした。

2.3　細胞周期の測定

各種スルフィドがHT-29の細胞周期に及ぼす影響は，フローサイトメトリーにより解析した。スルフィド存在下で培養した細胞は氷冷したphosphate buffered saline（PBS）で2回洗浄後，トリプシンを用いて培養器から回収した。回収した細胞は70%エタノール中で－20℃で18時間冷却して固定した。PBSで2回洗浄後500 μg/mL RNaseA，25 μg/mL propidium iodideを添加して室温で20分静置した。細胞周期はFACS Cant（BD Bioscience），FlowJo software（Tree Star）により解析した。

2.4　チューブリンの蛍光免疫染色による観察

HT-29はI型コラーゲンをコートしたスライドグラス上で48時間前培養し，その後終濃度10μMのDATSとともに12時間培養した。スライドグラスを2回PBSで洗浄後，アセトン：メタノール（1：1）で2分間，室温で固定した。PBSで洗浄後，抗β-チューブリンモノクローナル抗体（TUB2.1, Sigma-Aldrich）と30分間，さらにAlexaFluo488標識ヤギ抗マウスIgG抗体（Invitrogen）と30分間反応させ，共焦点レーザー顕微鏡（FLUOVIEW FV300, OLYMPUS）を用いて観察した。

3.　結果と考察

これまでに著者らはニンニクの香気成分であるDATSがヒト大腸がん細胞の増殖を強力に抑制すること，アポトーシスを誘導すること，この原因としてチューブリン分子中の特定のシステイン残基の酸化的修飾による機能異常の関与の可能性を明らかにしてきた[3,4]。

本研究では，ニンニクに見出されるDATSに加えて，タマネギに見出されるDPTSをはじめ，側鎖の異なる9種類のアルキル，アルケニルトリスルフィドを調製し，構造と機能の関係について検討した（**図1**）[5]。

細胞増殖の抑制については，これまでの知見に基づき細胞周期を指標に検討を行った（**図1A**）。10 μMの各種アルキル，アルケニルスルフィドを添加して12時間培養後FACSにより細胞周期の分布を解析した。被検試料非添加のVechicle群では，G_1期47%，S期44%，G_2/M期13%であった（結果は示していない）。Dimethyl trisulfide, diethyl trisulfide, DPTS, dibutyl trisulfide, dipentyl trisulfideなどのアルキルトリスルフィドは細胞周期の分布にはほとんど影響を及ぼさず，13－16%の細胞がG_2/M期に存在した。一方，dipentenyl trisulfide，DATS，dibutenyl

trisulfide などのアルケニルトリスルフィドは，細胞周期の分布に影響し，G_2/M 期の細胞が顕著に増加した。分子内にアルキル基，アルケニル基の両者を有する非対称の分子 allyl methyl trisulfide は G_2/M 期の細胞の分布には影響を及ぼさなかった（**図 2**）。

次に，上記実験で用いた 10 μM スルフィドの影響について，タイムコース実験を実施した。Dipentyl trisulfide, DATS, dibutenyl trisulfide などのアルケニルトリスルフィドによる細胞周期の抑制効果は，24 時間までの実験時間内で大きく異なった。DATS による G_2/M 期の増加は，8 ～ 12 時間で最大効果を示し，以降減少した。Dipentyl trisulfide, dibutenyl trisulfide により増加した G_2/M 期は処理後 16 時間でピークを示し，その後僅かに減少した。G_2/M 期の減少，すなわち細胞周期の回復はスルフィドの効果が可逆的であること，細胞内にスルフィドをクリアランスするメカニズムがあることを示している。一方，dimethyl trisulfide, diethyl trisulfide, DPTS, dibutyl trisulfide, dipentenyl trisulfide などのアルキルトリスルフィドは 24 時間までの測定では

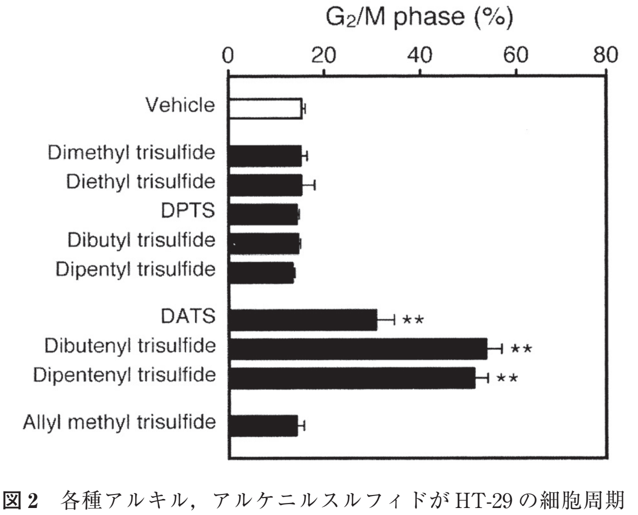


図 2　各種アルキル，アルケニルスルフィドが HT-29 の細胞周期に及ぼす影響
各種スルフィドが細胞増殖に及ぼす影響について，G_2/M 期の細胞の割合を指標に検討を行った。10 μM のスルフィド存在下で 12 時間培養した HT-29 の細胞周期の分布についてフローサイトメトリーにより検討を行った。データは 3 回の異なる実験の平均 ± S.E. を示す。$^{**}P < 0.01$ *vs.* vehicle

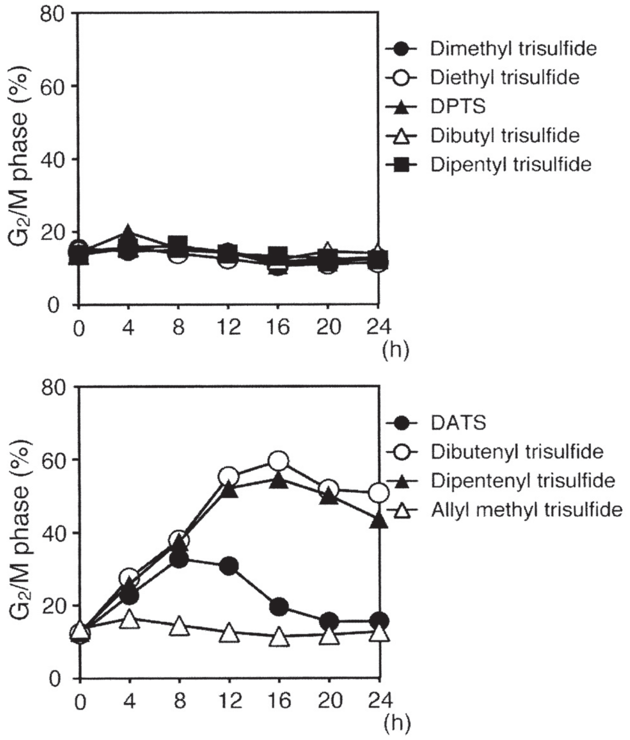
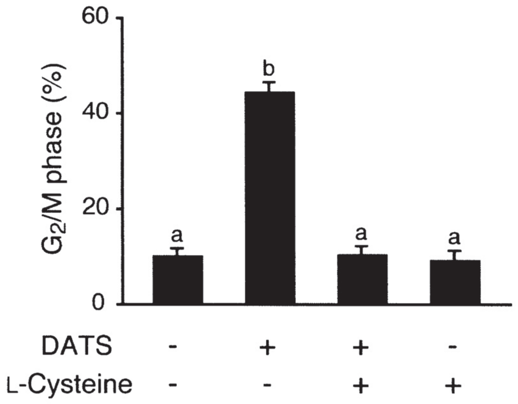


図 3　各種アルキル，アルケニルスルフィドが HT-29 の細胞周期に及ぼす影響
各種アルキル（上図）アルケニル（下図）スルフィドが細胞周期の進行に及ぼす影響について，処理後 24 時間まで経時的に測定し，G_2/M 期の細胞の割合を表示した。データは 3 回の異なる実験の平均値を示す。

細胞周期にほとんど影響を及ぼさなかった（**図 3**）。著者らはこれまでに DATS による細胞周期の阻害が紡錘糸形成の障害によること，DATS が β-チューブリン分子のシステイン残基を酸化的に修飾することにより脱重合を促進することを明らかにしている。そこで，DATS 処理細胞で微小管構造に異常があるか，また，システインの共処理により細胞周期の阻害や微小管構造の異常がキャンセルされるか検討した。その結果，L-cysteine の処理により細胞周期の阻害はキャンセルされた（**図 4**）。また，微小管の形態に関しては，control 細胞では，細胞質に張り巡らされたチューブリンのネットワーク形成が観察されるが，DATS の処理によりチューブリンのネットワークの崩壊が観察された。さらに L-cysteine の処理によりこれらのチューブリンのネットワークの崩壊は阻止された（**図 4**）。これらの結果は，アルケニルトリスルフィドがチューブリンのシス



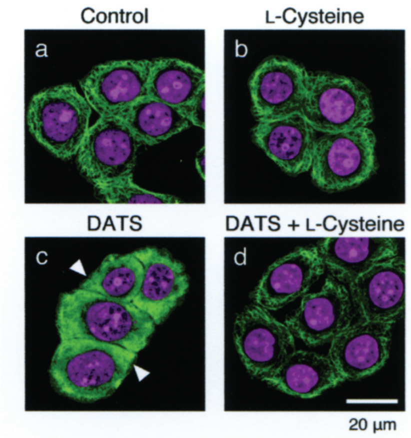


図 4　DATS による細胞周期の阻害と微小管の破壊に及ぼすシステインの影響
HT-29 細胞を 2 mM L-cysteine を含む培養液で 2 時間前培養後，10μM DATS を添加，非添加でさらに 12 時間培養し，細胞周期の分布をフローサイトメトリーで解析した（左図）。データは異なる 3 回の実験の平均値 ± S.E. を示し，異なるアルファベットは統計的な有意差を示す（$P < 0.01$, Tukey-Kramer's multiple comparison test）。また，これらの細胞の微小管の構造について抗 β- チューブリンモノクローナル抗体を用いて染色した（右図緑）。細胞核は propidium iodide で対比染色した（マゼンダ）。矢頭は異常な微小管構造を指す。

テイン残基を修飾することを引き金として細胞周期を阻害することを強く示唆している。

Z-ajoene, *S*-allyl mercaptocysteine などのアルケニル構造を有する他の硫黄化合物も微小管構造に影響を及ぼす[6, 7]。トリスルフィドの側鎖の構造については，allyl methyl trisulfide がほとんど影響を及ぼさないことから，アルケニル基を 2 つ有することが細胞周期の阻害やチューブリンのネットワークの崩壊に重要であることが明らかになった。

食用植物由来の硫黄化合物は多彩な機能性を示すが，水溶性，脂溶性のさまざまな含硫化合物がそれぞれ異なる機能性を発揮すると考えられる。これらの分子の生体内での代謝など明らかにされていない点も多い。調理や加工法と生成する機能性含硫化合物の分子種，生成量，加工食品中の含有量との関係，さらには硫黄化合物の体内動態を含め機能性を評価することが重要である。今後，本研究で得られた知見に基づき，トリスルフィド化合物をリード化合物とした新規生理活性物質の創製，チューブリンをはじめとした標的分子への親和性を指標とした各種食用植物の抗がん作用の評価などへの応用が期待される。

文　献

1） Ariga T, **Seki T.** Functional Foods from Garlic and Onion, pp433-490, In: Asian Functional Foods（Editors, John Shi, Chi-Tang Ho, Fereidoon Shahidi）, CRC Press, New York, USA. 2005.

2） 関 泰一郎，有賀豊彦 ネギ属植物の生理機能性とそのメカニズム バイオサイエンスとインダストリー , 64（11）, 609-613, 2006.

3） Hosono T, Fukao T, Ogihara J, Ito Y, Shiba H, **Seki T,** Ariga T. Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. J Biol Chem. 2005 Dec 16；280（50）：41487-93.

4） **Seki T,** Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T. Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. Asia Pac J Clin Nutr 2008；17（S1）：249-252.

5） Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, Tanaka R, **Seki T,** Hasegawa I, Ariga T. Alkenyl group is responsible for the disruption of microtubule network formation in human colon cancer cell line HT-29 cells. Carcinogenesis. 2008 Jul；29（7）：1400-6.

6） Xiao D, Pinto JT, Soh JW, Deguchi A, Gundersen GG, Palazzo AF, Yoon JT, Shirin H, Weinstein IB. Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allyl mercaptocysteine（SAMC）is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH（2）-terminal kinase 1

activation. Cancer Res. 2003 Oct 15；63（20）：6825-37
7） Li M, Ciu JR, Ye Y, Min JM, Zhang LH, Wang K, Gares M, Cros J, Wright M, Leung-Tack J. Antitumor activity of Z-ajoene, a natural compound purified from garlic: antimitotic and microtubule-interaction properties. Carcinogenesis. 2002 Apr；23（4）：573-9.

Elucidation of anticancer effects of garlic, focusing on the novel target molecule

Taiichiro Seki, Takashi Hosono, Tomomi Hosono-Fukao, Kahoru Inada, Rie Tanaka, Yuji Iitsuka, Maiko Shimamoto and Toyohiko Ariga

(Department of Agricultural and Biological Chemistry, College of Bioresource Sciences, Nihon University)

Alk(en)yl trisulfides are organosulfur compounds produced by crushed garlic and other *Allium* vegetables. We found that these compounds exhibit potent anticancer effects through the reaction with microtubules, causing cell cycle arrest. Nine alk(en)yl trisulfides including dimethyl trisulfide, diethyl trisulfide, dipropyl trisulfide (DPTS), dibutyl trisulfide, dipentyl trisulfide, diallyl trisulfide (DATS), dibutenyl trisulfide, dipentenyl trisulfide and allyl methyl trisulfide were synthesized and added to cultures of HT-29 human colon cancer cells at a concentration of 10 μM. The trisulfides with alkenyl groups such as DATS, but not those with alkyl groups, induced cell cycle arrest at 12 h after the treatment. Both DATS-induced microtubule disassembly and the cell cycle arrest were cancelled by the simultaneous treatment of the cancer cells with 2 mM L-cysteine, glutathione. These results indicate that alk(en)yl trisulfide react with sulfhydryl groups in cysteine residues of cellular proteins such as microtubule proteins. Thus, the present study provides evidence that trisulfides with alkenyl groups have potent anticancer activities, at least in part, directed toward microtubules. These findings suggest that alkenyl trisulfides and their structurally related compounds may provide novel and effective anticancer agents.