

<平成22年度助成>

## ウコンの肝保護作用の分子基盤解明

小嶋 聡 一

((独)理化学研究所基幹研究所・分子リガンド生物研究チーム)

### 【要約】

二日酔い対策、肝機能保護成分として“ウコン”が市場を賑わしているが、その有効成分とされているクルクミンがどのように働くから肝臓に良いのか?という、病態形成機構に立脚した科学的な作用分子機構は不明なところがある。

本研究では、ウコンの肝保護作用について、これまでの研究実績に基づき、

(1)“TGF- $\beta$ 活性化反応を介する肝硬変促進機構”、ならびに

(2)“トランスグルタミナーゼを介する肝障害誘導機構”

の各ステップに及ぼすクルクミンの影響を調べた。

その結果、クルクミンは、(1)については、影響を与えないことがわかった。これに対して、(2)については、エタノール肝障害時に誘導されるトランスグルタミナーゼ依存肝細胞死のキープポイントである肝細胞におけるトランスグルタミナーゼの核局在を抑制することを示唆する結果を得た。トランスグルタミナーゼ核局在の分子機構はよくわかっていなかったため、その機構を研究したところ、

- トランスグルタミナーゼは細胞質と核の間をシャトリングしていること、
- 抗癌剤の一種である非環式レチノイド処理により肝癌細胞に誘導されるトランスグルタミナーゼの核局在は、トランスグルタミナーゼの核外移行を司る核外移行キャリアタンパク質であるエクスポーチン1の発現が非環式レチノイド刺激により抑制されるために起こること、
- これに対して、エタノールや遊離脂肪酸処理による肝細胞におけるトランスグルタミナーゼの核局在は、核外移行シグナルを欠損したショートフォームトランスグルタミナーゼ(TG2-S)の産生がエタノールや遊離脂肪酸処理によって誘導されることによること

がわかった。現在、このエタノールや遊離脂肪酸によるTG2-S誘導に与えるクルクミンの影響を調べているところである。

キーワード：肝障害、トランスグルタミナーゼ、核局在、TGF- $\beta$ 、クルクミン

### 序 論：

二日酔い対策、肝機能保護成分として“ウコン”(ハウス食品ほか)が市場を賑わしているが、その有効成分とされているクルクミンがどのように働くから肝臓に良いのかという、病態形成機構に立脚した科学的な作用分子機構には不明な点が残っている。

報告者は、肝線維化因子 TGF- $\beta$  の活性化反応に働くプロテアーゼ<sup>1)</sup>とプロテアーゼにより切断される TGF- $\beta$  プロペプチド latency associated protein (LAP) 中の配列を同定し<sup>2)</sup>、TGF- $\beta$  活性

化反応の副生成物である LAP 断片の切断面を認識する抗体(LAP断片をサロゲートマーカーとして TGF- $\beta$  活性化反応が起こったことを間接的に検出する抗体)<sup>2)</sup>や、LAPのプロテアーゼ切断配列に結合することによりプロテアーゼ依存 TGF- $\beta$  活性化反応を阻害する抗体<sup>3)</sup>を作製した。一方、アルコール性脂肪性肝炎(ASH)ならびに非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態形成過程で、タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼが細胞の核に局在し、転写因子 Sp1 を架橋不活性化する結果、肝細胞の生存に必須な肝細胞増殖因子 HGF の受容体 c-Met の発現が低下し、肝細胞が

死に至るといふ新しい肝細胞死経路を解明し<sup>4,5)</sup>、架橋された Sp1 を特異的に認識する抗体を作製した<sup>4)</sup>。

本研究では、ウコンの肝保護作用の作用機序を明らかにする目的で

- (1) “TGF- $\beta$  活性化反応を介する肝硬変促進機構”、ならびに
- (2) “トランスグルタミナーゼを介する肝障害誘導機構”

に及ぼす影響を検討した。これまでの研究成果に基づき、(1)(2)の各ステップに及ぼすウコンの活性成分であるクルクミンの影響を、培養肝星細胞ならびに肝細胞を用いて調べた。

## 方 法：

### 材 料

クルクミンは Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO) より購入した。シスタミンとアミノグアジニンは、Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO) より購入した。ビオチン化ペンチルアミン (5-(biotinamido) pentylamine: 5BAPA) 5BAPA; EZ-Link Pentylamine-Biotin は、Pierce 社より購入した。TRITC-Streptavidin は、Jackson ImmunoResearch Laboratories 社より購入した。非環式レチノイドは興和株式会社より供与いただいた。スプライソスタチン A ならびにその不活性化体のアセチル化スプライソスタチン A は理化学研究所の吉田稔先生から供与いただいた<sup>6)</sup>。

抗 TG2 モノクローナル抗体 (TGase II, Ab-1) は Lab Vision (Fremont, CA) から購入した。ラミン B ならびにグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) に対する抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) と Chemicon International (Temecula, CA) からそれぞれ購入した。

### GFP タグ付 TG2 変異体のコンストラクション

GFP (Green fluorescent protein) タグ付きフルサイズ TG2 (TG2 Full) と D ドメイン欠損変異体 (TG2  $\Delta$ D) の発現ベクターは、TG2 の哺乳類細胞用発現ベクターである TG2-pSG5 ベクターを鋳型として PCR により作製し、GFP 融合タンパク質用ベクターの pEGFP-C1 ベクター (Clontech Laboratories, Inc.; CA) にクローニングした。

### L59 LAP 断片の作製と ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)

N 末端に L59 を有する LAP 断片 (L59 LAP 断片) を特異的に認識する抗体、ならびに本抗体と抗 LAP  $\beta$  1 抗体 (R&D Systems, MAB2463) とを組み合わせた L59 LAP 断片定量用のサンドイッチ ELISA は、文献 2 に叙述したように作製した。細胞培養とトランスフェクション

ヒト肝細胞株の Hc 細胞は、Applied Cell Biology Research Institute (Kirkland, WA) から購入し、10% ウシ胎児血清 (Equitech-Bio, Inc., Kerrville, TX) と 1% 抗生物質 (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO) を含むダルベッコ改変培地 (DMEM) で培養した。

Hc 細胞のアルコール / アセトアルデヒド、遊離脂肪酸 (80 mM オレイン酸 / パルミチン酸 / ステアリン酸 / リノレン酸の混合物) による処理は以前の論文に叙述したように行った<sup>5)</sup>。トランスフェクションは UNIFECTOR リポフェクション試薬 (B-Bridge International, Inc.; CA) を用いて行った。

### 試験管内 TG2 活性の測定

96 プレートにコートしたジメチルカゼインに TG2 を含む検体とビオチン化ペンチルアミン (5-(biotinamido) pentylamine: 5BAPA) とを添加、37°C で 1 時間インキュベーションし、TG2 の作用でカゼインのグルタミン残基に架橋・取り込まれたビオチン化ペンチルアミンの量を、アルカリフォスファターゼ標識抗ビオチン抗体 (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO) とその基質である p-

ニトロフェニルリン酸 (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO) との組み合わせにより 405nm の吸光度から定量した。

#### 細胞内 TG2 活性の測定

カバーガラス入りの 24 穴培養プレートにまいた Hc 細胞を 0.5% 50mM ビオチン化ペンチルアミン, 1.5 $\mu$ l 200mM アミノグアニジン (Sigma; アミノキシダーゼ阻害剤)、並びに検体 (0.1 ~ 1mM アセトアルデヒド、1mM シスタミン、0.1 $\mu$ M クルクミン) 入りの培地中で一晩インキュベーションした後に 10% ホルマリン、室温 10 分で固定化、0.2% トリトン X-100/, 室温 10 分で浸透化、2.5% BSA と室温で 1 時間インキュベーションしてブロッキングした。各操作の間は PBS で 3 回ずつ洗浄した。PBS-0.1% Tween 20 に溶かした TRITC 標識ストレプトアビジン (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:500) と室温で 1 時間インキュベーションした後に PBS-0.1% Tween 20 で洗浄した。最後に PBS に溶かしたヘキスト 33258 (Calbiochem- Novabiochem, 1:5,000) とインキュベーションし核を染色した。カバーガラスをスライドグラス上に写し、TRITC (赤) で検出される *In-situ* TG2 活性、並びにヘキスト 33258 で検出される核の量を In Cell Analyzer 2000 (GE ヘルスケア) を用いて撮像、In Cell Analyzer 2000 の解析ソフトを用いてサイトゾルの TG2 活性と細胞核の TG2 活性を定量した。サイトゾル/核画分の調製とウエスタンブロット

サイトゾル/核画分の調製とウエスタンブロットは以前の論文の叙述したように行った<sup>4,5,7)</sup>。TG2 抗体は 1:1,000、ラミン B 抗体は 1:10,000、GAPDH 抗体は 1:10,000 に希釈して用いた。

#### 背景と結果：

##### (1) クルクミンは TGF- $\beta$ 活性化反応には影響しない

慢性肝炎、慢性膵炎、腎炎、肺線維症、増殖性

網膜症、心筋梗塞、嚢胞性線維症、強皮症などに伴う各種組織の線維症、硬化性疾患は、コラーゲンを主とする細胞外基質 (extracellular matrix : ECM) の組織への過剰な蓄積によって起こる。肝線維症は、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染、アルコールの過剰摂取、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、自己免疫性肝炎などを原因として引き起こされ、肝硬変や肝がんへ進展しうる病態である。これら線維化の反応は、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  によって強力に誘導される<sup>8)</sup>。

TGF- $\beta$  は、細胞の生存、アポトーシス、分化、遊走、接着や、血管新生、上皮・間葉転換 (EMT) など、数多くの生理的・病理的現象に深く関わる多機能性サイトカインである。正常な組織修復過程では、TGF- $\beta$  の産生は一過性でほどなく停止するが、障害刺激が繰返されると TGF- $\beta$  は持続的に産生されるようになり、組織線維症を引き起こす<sup>8)</sup>。

TGF- $\beta$  は高分子潜在型複合体として産生された後に標的細胞周囲で活性化反応を経て活性型 TGF- $\beta$  となる。TGF- $\beta$  1 の場合、390 アミノ酸からなる前駆体ポリペプチドの R<sup>278</sup>-A<sup>279</sup> 間が furin 様プロテアーゼにより切断されると、112 アミノ酸からなる C 末ポリペプチドが 2 か所の S-S 結合により 2 量体を形成し、活性型 TGF- $\beta$  1 となる<sup>9)</sup>。一方、Latency associated protein (LAP) と呼ばれる N 末プロペプチドも S-S 結合により 2 量体となり、R<sup>278</sup>-A<sup>279</sup> 間切断後に疎水結合により TGF- $\beta$  1 分子と会合し、受容体に結合できない潜在型複合体を形成する。トロンボスポンジンやインテグリン、セリンプロテアーゼ、MMP 等によって、LAP と活性型 TGF- $\beta$  の会合が損なわれることにより、潜在型複合体から活性型 TGF- $\beta$  が遊離する (これを TGF- $\beta$  の活性化という) (図 1)<sup>10)</sup>。

活性型 TGF- $\beta$  が細胞表面の TGF- $\beta$  II 型受容体に結合すると、I 型受容体と会合して、TGF-

$\beta 2$  量体 1 分子に対し I 型受容体 / II 型受容体 2 分子ずつからなるヘテロ 4 量体を形成し、I 型受容体がリン酸化される<sup>11)</sup>。リン酸化された I 型受容体は細胞内タンパク質である Smad3 の C 末端をリン酸化する。Smad3 は、Smad2、Smad4 とともに 3 量体を形成した後、核内へ移行し、コラーゲンをはじめとする ECM タンパク質の転写を活性化することにより組織線維症を進行させる。活性化型 TGF- $\beta$  は肝星細胞を線維芽細胞様に形質転換 (肝星細胞の活性化) させる働きを持っている。連続的な TGF- $\beta$  刺激により、肝星細胞の ECM の産生及び ECM 分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) の阻害因子である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) -1、-2 の分泌が促進されるのに加え、MMP の分泌が抑制されることにより線維症が進行する<sup>12)</sup>。さらに、活性化された肝星細胞ではオートクラインにより、より多くの TGF- $\beta$  の産生や分泌が引き起こされる<sup>8)</sup>。

TGF- $\beta$  活性化反応には、トロンボスポンジンやインテグリンなどの細胞接着分子が、それぞれ LAP の<sup>54</sup>LSKL<sup>57</sup> や<sup>244</sup>RGD<sup>246</sup> に結合し立体構造が変化することにより引き起こされる接着型活性化反応<sup>13)</sup>と、セリンプロテアーゼ、MMP 等のプロテアーゼによる LAP 切断を介する活性化反応がある。報告者らは肝線維化動物モデルにセリンプロテアーゼ阻害剤 (camostat mesilate) を投与すると線維症が抑制されることから、プラスミン (PLN) や血漿カリクレイン (PLK) による切断活性化が肝線維症に関与することを見出した<sup>1,15)</sup>。さらに、PLN は TGF- $\beta$  1 LAP の 56 番目のリシンと 57 番目のロイシン (K<sup>56</sup>-L<sup>57</sup>) の間を、PLK は 58 番目のアルギニンと 59 番目のロイシン (R<sup>58</sup>-L<sup>59</sup>) の間を切断することを明らかにした<sup>2)</sup>。

昨年、潜在型 TGF- $\beta$  1 分子の結晶構造が解かれ、LAP の<sup>46</sup>IEAIRGQILSKL<sup>57</sup> の  $\alpha$  ヘリックス構造と 59 番目のロイシンが疎水結合による TGF- $\beta$  1 との会合に重要であることが報告された<sup>16)</sup>。

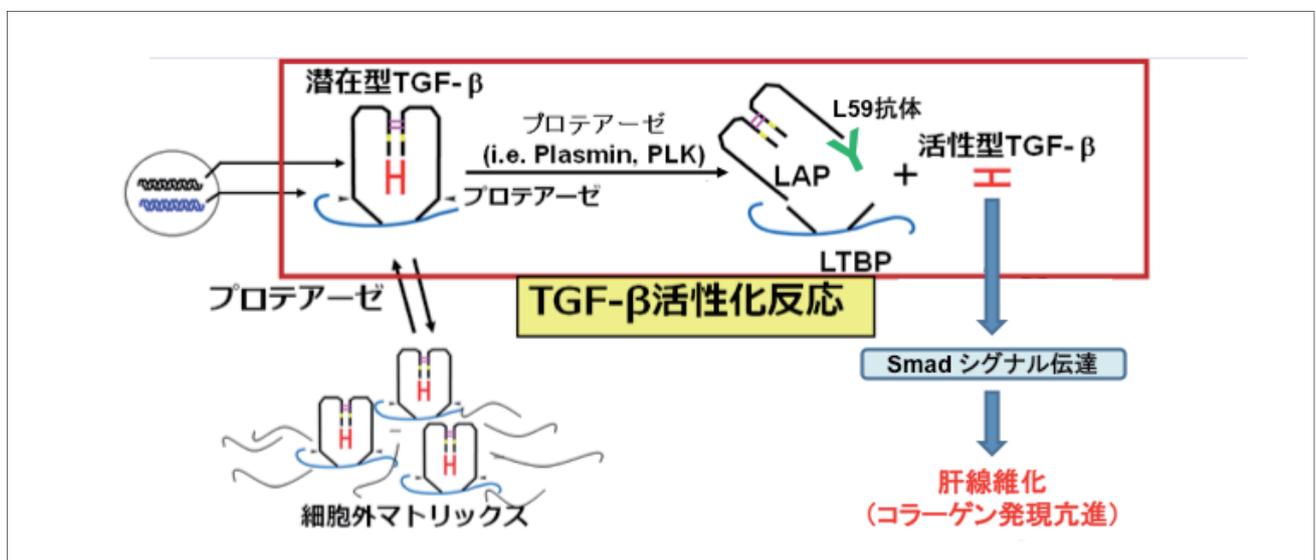


図 1 プロテアーゼ依存 TGF- $\beta$  活性化反応

最も強力な線維形成促進能を持つサイトカインである TGF- $\beta$  は、黒色の遺伝子からコードされるプロペプチド LAP (Latency associated protein) + 活性型 TGF- $\beta$  (赤い部分) が 2 量体を形成した後、青色の遺伝子からコードされる LTBP (Latent TGF- $\beta$  binding protein) と S-S 結合した潜在型高分子複合体 (いわゆる潜在型 TGF- $\beta$ ) として産生される。LTBP はマトリックスタンパク質の fibrillin の仲間なので、潜在型 TGF- $\beta$  複合体は LTBP を介して細胞外マトリックス (ECM) にブールされている。刺激を受けると、肝星細胞表面に存在する血漿カリクレイン (Plasma kallikrein: PLK) によって、活性型 TGF- $\beta$  を保持するのに大事な働きをしている LAP 中の L59 と R58 の間が切断されるために、複合体から活性型 TGF- $\beta$  が遊離、すなわち活性化され、Ser/Thr キナーゼ型受容体に結合し、Smad リン酸化シグナルを介して、コラーゲンをはじめとする標的遺伝子の発現を異常促進させることにより肝線維化が進行する。L59 抗体は、活性化の過程で生成する L59 を N 末に持つ LAP 断片を特異的に検出するため、L59 LAP 断片を PLK 依存 TGF- $\beta$  活性化反応のサロゲートマーカーとして用いる肝線維化活動度の測定・診断に有用である。(文献 2 より一部改変)

PLN や PLK による K<sup>56</sup>-L<sup>57</sup> や R<sup>58</sup>-L<sup>59</sup> の切断により、 $\alpha$ ヘリックス立体構造が変化し、疎水結合が失われ潜在型複合体から活性型 TGF- $\beta$ 1 が遊離するものと予想される。

報告者らはセリンプロテアーゼ阻害剤のメシル酸カモスタットが線維化抑制に有効であることを報告した<sup>15)</sup>。さらに、TGF- $\beta$ 1 LAP の R<sup>58</sup>-L<sup>59</sup> 切断により生じる R58 を C 末に持つ N 末側 LAP 断片 (R58 LAP 断片) と L59 を N 末に持つ C 末側 LAP 断片 (L59 LAP 断片) を認識する 2 種の特異抗体 (R58、L59 抗体) を作製し、これらの抗体を用いた肝線維症診断法を開発した<sup>2)</sup>。この方法を用いて、クルクミンが TGF- $\beta$ 1 活性化反応に及ぼす影響を調べたところ、メシル酸カモスタットが用量依存的に L59 LAP 断片の生成を阻害するのに対して、クルクミンは、阻害効果を示さず、むしろ非生理的な高濃度では、15%ほど TGF- $\beta$ 1 活性化反応を高める結果を得た (図 2)。

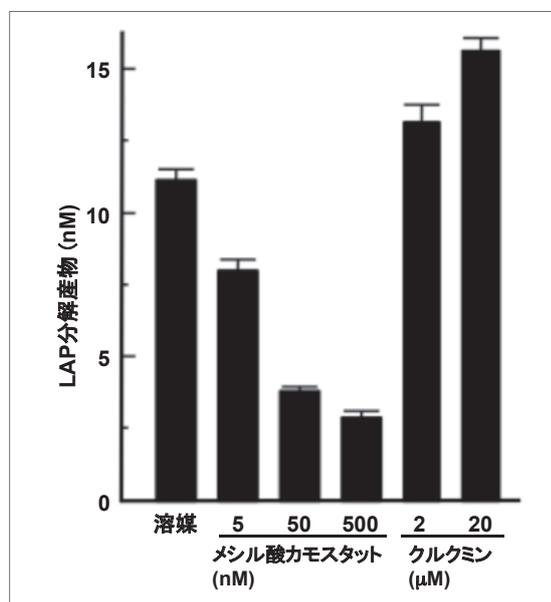


図 2 クルクミンが PLK 依存 TGF- $\beta$  活性化反応に及ぼす影響  
組換え TGF- $\beta$ 1 LAP と PLK を反応させる際に PLK の阻害剤であるメシル酸カモスタット (終濃度 5, 50, 500 nM) もしくはクルクミン (終濃度 2, 20  $\mu$ M) を添加し、活性化反応の結果生成する L59 LAP 断片を L59 抗体を用いた ELISA にて定量した。

## (2) クルクミンはトランスグルタミナーゼの核局在を抑制する

アルコール過剰摂取は全世界で年間 200 万人の

死亡原因となっている。脂肪肝の状態から、肝細胞死、炎症、線維化を伴う肝障害、肝硬変、肝癌と移行する。その分子機構として、活性酸素の上昇や多数のシグナル伝達の変化が報告されているが、肝細胞死の分子機構は未だ不明な点が多い。肝細胞にアルコールを処理すると、タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ (TG2) の活性が上昇することが報告されていたが<sup>17)</sup>、この酵素がどのように細胞死を引き起こすのかについては分かっていなかった。

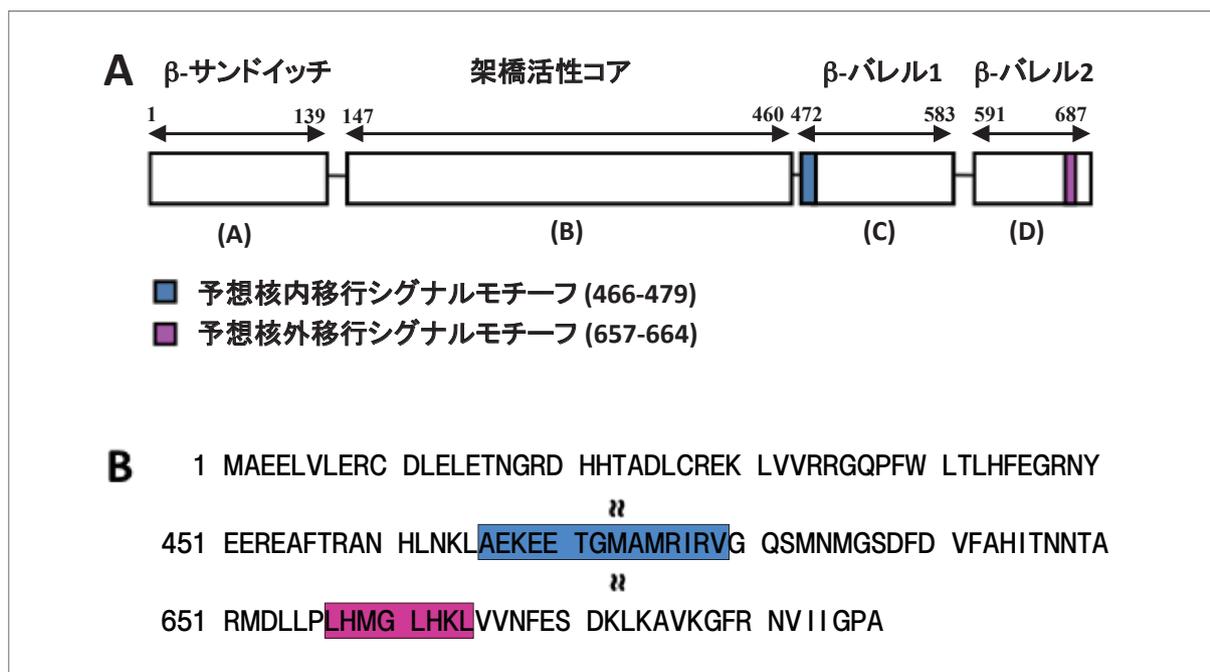
TG2 は、タンパク質の Gln-Lys 残基間に共有結合を形成する翻訳後架橋修飾酵素群のうち一番ユビキタスに発現するメンバーである<sup>18)</sup>。ヒトでは 9 種類の TG 遺伝子が同定されている。Ca<sup>2+</sup> 結合部位や活性中心部位など一次配列上相同領域を有しているが、それぞれ独自の組織発現パターンを示す。この酵素群が多様な基質分子内、分子間で架橋反応を行うことにより、基質タンパクは新しい機能を得て生理的に働いたり、機能を失い病気の原因となっている。Lys 残基の代わりに 1 級アミンが Gln 残基に架橋されるポリアミン修飾反応や、水分子が反応することによって起こる Gln 残基の脱アミド反応を通して多様な生物活性を発現することが知られている<sup>18)</sup>。例えば、欧米に多いセリアック病は、小麦に含まれる植物性タンパクのグルテンの一分画であるグリアジン由来ペプチドが、十二指腸粘膜下組織内で TG2 により脱アミノ化され、抗原となり、自己抗体が産生されることが原因となっている<sup>18)</sup>。古くから細胞死に組織トランスグルタミナーゼ (TG2) が関わっていることが報告されてきた<sup>19)</sup>。TG2 は生体構造の構築や安定化を行う一方、細胞の増殖・分化、アポトーシスに働き、多様な生命現象、さらには動脈硬化、肝疾患、脳神経変性疾患など、様々な病態形成に深く関係している。肝臓では、マロリーデンクボディーの形成への関与が報告されていた<sup>20)</sup>。

TG2は $\beta$ サンドウィッチ、コアドメイン(架橋活性部位)、2つの $\beta$ バレル(樽状)ドメインからなり、活性中心のCys<sup>277</sup>, His<sup>335</sup>, Asp<sup>358</sup>が空間的に近い配置をとり、架橋反応を司る<sup>21)</sup>(**図3**)。TG2は架橋活性以外にもGTPase活性(Gタンパク複合体の構成成分であるG $\alpha_n$ として働く)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性やリン酸化活性、インテグリン細胞接着活性など数多くの活性を有する多機能酵素である。通常の低濃度(10~20nM)Ca<sup>2+</sup>存在下ではGTPase活性を示すが、細胞が障害を受けて高濃度(700~800nM)Ca<sup>2+</sup>存在下になると、Ca<sup>2+</sup>が $\beta$ バレル1に結合することにより立体構造が変化し、 $\beta$ バレル1の一部が外れ、架橋結合活性の活性中心が露出し、架橋酵素として働くようになると言われている。

報告者らは、野生型マウスとTG2遺伝子欠損マウスから単離した肝細胞をアルコール処理したところ、野生型の肝細胞では細胞死が誘導されたが、TG2遺伝子欠損マウスでは細胞死が誘導されないことを見出し、その分子機構を解析した。アルコール処理により肝細胞において発現が変化する

る遺伝子を網羅的に調べたところ、肝細胞増殖因子受容体c-Metの発現が顕著に低下していることが分かった。c-Metは肝細胞の生存シグナルに大変重要な役割を担っており<sup>22)</sup>、その遺伝子発現は転写因子Sp1により調節されている<sup>23)</sup>。そこで、Sp1がTG2により影響(修飾)を受けるかどうかについて調べたところ、Sp1はTG2の作用で架橋され、高分子量の不活性型Sp1を産生した。この機能を失ったSp1架橋体を特異的に認識する抗体を作製し、同抗体を用いて、アルコール処理した肝細胞ではTG2の活性上昇や核局在が起こると共に、Sp1架橋体が生成し、Sp1の活性喪失と相関してc-Metの発現が低下し、肝細胞が死に至ることを見出した(**図4**)<sup>4)</sup>。この細胞死経路はカスパーゼ阻害剤のzDEVDで抑制されないことから、カスパーゼ非依存経路であると考えられた。

劇症肝炎モデルマウスおよびアルコール性脂肪性肝炎モデルマウスの肝組織、さらにアルコール性脂肪性肝炎患者の肝組織では、正常肝組織と比してTG2が細胞核に発現し、Sp1架橋体の生成が検出され(**図4**右下写真)、TG2阻害剤を投与



**図3** TG2のドメイン構造と予想される核内移行シグナル、核外移行シグナル配列  
 タンパク質架橋酵素TG2を構成する4つのドメイン構造と予想される核内移行シグナル(Nuclear localization signal: NLS)、核外移行シグナル(Nuclear exporting signal: NES)の場所(A)とそのアミノ酸配列(B)。(文献27より一部改変)

したマウスや、TG2遺伝子欠損マウスでは、肝障害になりにくいという結果を得た<sup>4)</sup>。これらの結果は細胞レベルで見られた一連の現象が、生体内でも起こっていることを示唆する結果である。

肝保護作用が報告されているクルクミンがTG2を介する肝障害誘導機構に与える影響を調べるために、まずクルクミンが直接TG2架橋活性に与える影響を調べたところ、EDTA (TG2が活性発現するのに必須のカルシウムをキレートする) 存在下における値をベースとして、既存のTG2阻害剤であるシスタミンが終濃度100 $\mu$ MでTG2活性を約70%阻害したのに対し、クルクミンは、終濃度2 $\mu$ M、20 $\mu$ Mという高濃度においても架橋活性に影響を与えなかった(図5A)。ちなみに、同時に実施した理研天然化合物バンクからのTG2活性抑制剤の化合物スクリーニング

でヒットしてきた(1E,4E)-1,5-Diphenyl-penta-1,4-dien-3-oneは、終濃度20 $\mu$ Mで約70%のTG2活性阻害を示した(図5B)。

次にクルクミンが培養肝細胞のTG2活性に与える影響を調べた。ヒト肝細胞株Hc細胞を終濃度0.1~1mMのアセトアルデヒドで一晩処理した後に、肝細胞のTG2活性をサイトゾルと核に分けて定量したところ、すでに報告したようにアルコール/アセトアルデヒド処理によりTG2のde novo合成が亢進するため<sup>4)</sup>、両画分においてアセトアルデヒド濃度依存的に架橋活性の上昇がみられた(図6A, サイトゾル; 図6B, 核)。面白いことに、このとき終濃度0.1 $\mu$ Mのクルクミンを共存させておくと、サイトゾルのTG2活性は一定量増加する(図6A)のに対して、核ではほぼ同量のTG2活性の減少が観察され(図6B)、クルク

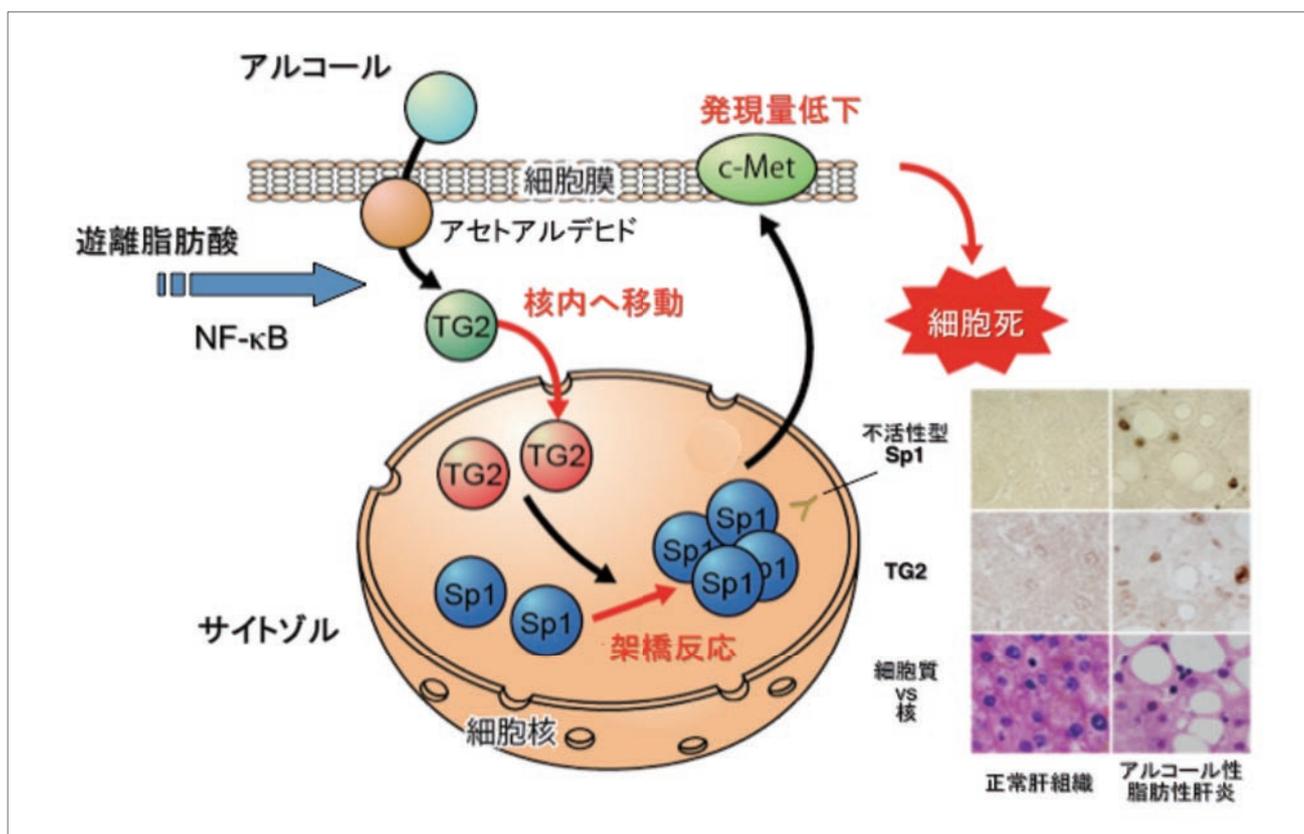


図4 核内TG2を介する肝細胞死

肝細胞が過剰のアルコール刺激や遊離脂肪酸刺激を受けると、通常細胞質に存在するTG2が核内に局在し、転写因子Sp1を架橋不活性化することにより肝細胞が生存するのに必須の肝細胞増殖因子 HGFの受容体である c-Metの発現量が低下し、細胞死に至る。架橋不活性化された Sp1を特異的に検出する抗体やTG2に対する抗体を用いると、アルコール性脂肪性肝炎 (Alcoholic Steatohepatitis: ASH) の患者肝臓の核において架橋不活性化 Sp1やTG2の誘導を検出することができる。正常な肝臓ではこれらの生成はみられない(右下挿入写真)。(文献7より一部改変)

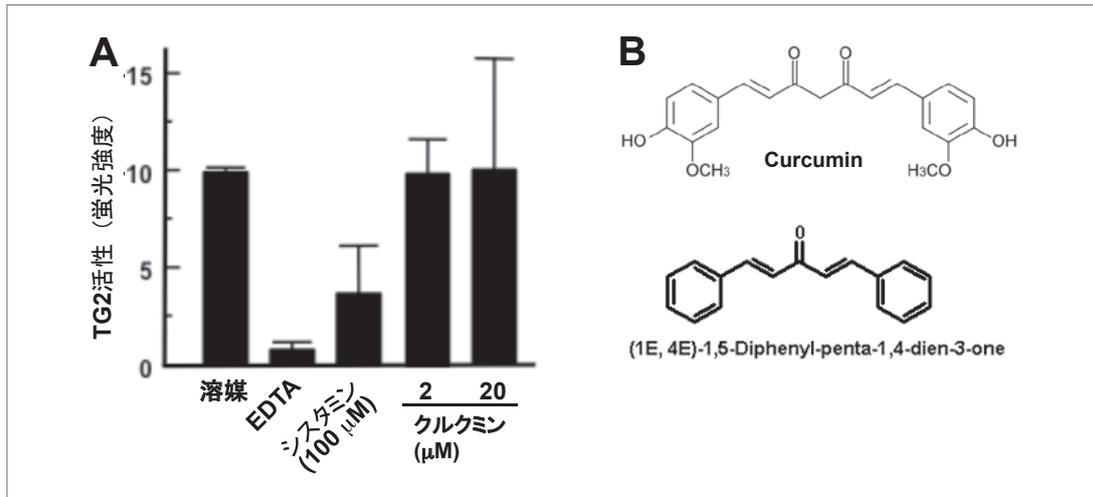


図5 クルクミンが試験管内 TG2 活性に与える影響

- (A) 96穴プレートを用いて500mM EDTA, 100μMシスタミン, 2もしくは20μMクルクミン存在下でTG2活性を測定し、結果を吸光度の変化に換算してプロットした。  
 (B) 実験に用いたクルクミンと(1E,4E)-1,5-Diphenyl-penta-1,4-dien-3-oneの化学構造。

ミンがTG2依存肝障害の鍵となるTG2の核局在、すなわちアルコール/アセトアルデヒド処理により引き起こされるTG2のサイトゾルから核への移行を阻害するらしいことが示唆された。これに対して、シスタミン(終濃度1μM)は、両画分において強力にTG2活性を阻害した(図6A・B)。クルクミンによる核TG2活性の減少効果の濃度変化を調べたところ、終濃度1μMまでは濃度依存的に核TG2活性を減少させるが、それ以上の高濃度では再び濃度依存的に核TG2活性を上昇させ、終濃度5μMでほぼ元のレベルに戻ってしまうことが観察された(図6C)。終濃度1μM以上のクルクミン処理では、細胞数の減少がみられることから、この一旦押さえられた核TG2活性が1μM以上のクルクミンで再び上昇する理由は、高濃度クルクミンによる細胞毒性の結果であることが予想された。クルクミンのヒト血中濃度は、30 mg/kg 体重とかなり多めのクルクミンを投与した場合でも、Cmax 1.8 ng/ml (≒ 0.0048 μM) であると報告されており<sup>24)</sup>、実際に終濃度1 μM 以上の高濃度になることは考えられない。したがって、生理的な濃度では、クルクミンは、大変弱いながらアルコール/アセトアルデヒド処理により引き起こされるTG2の核局在を抑えるこ

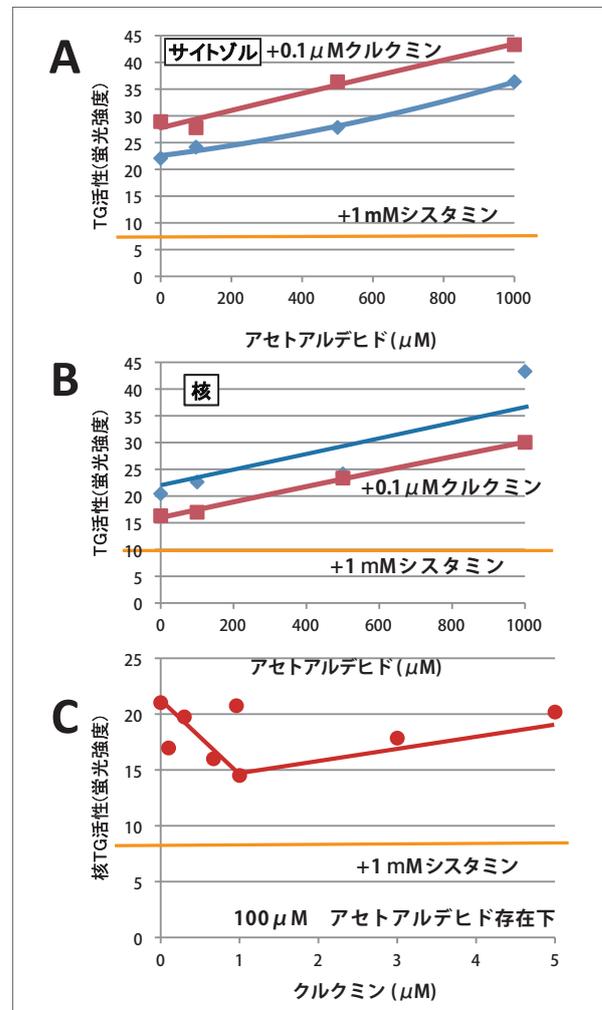


図6 クルクミンが細胞内TG2活性に与える影響

- (A)(B) 96穴プレートにまいたHc細胞を0~1mMアセトアルデヒドで処理した。このとき0.1μMクルクミンを処理した細胞と1mMシスタミンで処理した細胞も用意した。処理後に実験方法に記載したプロトコールに従い細胞内TG2活性をサイトゾル(A)と核(B)に分けて定量した。  
 (C) 0~5μMクルクミンもしくは1mMシスタミン存在下で100μMアセトアルデヒドでHc細胞を処理後に実験方法に記載したプロトコールに従い核TG2活性を定量した。

とで肝細胞障害を引き起こす核 TG2 活性を抑える方向に働いているものと予想された。

### (3) アルコール処理により引き起こされる TG2 の核局在誘導機構

クルクミンの肝保護作用の 1 つの標的であることが示唆された TG2 核局在の分子機構はよくわかっていなかったため、同機構を研究した。まず、TG2 を構成する 4 つのドメインを 1 つずつ欠損する GFP ラベル TG2 変異体を作製して肝細胞癌細胞株 JHH に強制発現し、同細胞に TG2 の核局在とそれによる Sp1 架橋不活性化に基づく細胞死を誘導する非環式レチノイド<sup>25)</sup> を作用させ、どのドメインに核内移行シグナル (いわゆる NLS: Nuclear localization signal) が存在しているかを調べた。その結果、今まで予想されていた D ドメイン<sup>26)</sup> ではなく、C ドメインに TG2 の NLS が存在していることがわかった。同様な方法を用いて NLS 配列を絞り込んだところ、現在までに 466A ~ 479V の 14 アミノ酸に NLS が存在していることを見出した。さらにこの核内移行の輸送

タンパク質としてはインポーチン $\alpha$ が働いていることもわかった。また、同時に D ドメインを欠損する TG2 は、非環式レチノイドで処理しなくとも TG2 が核に局在する (図 7A) ことから詳しく調べたところ、D ドメインに核外移行シグナル (いわゆる NES: Nuclear exporting signal) が存在し、定常状態では TG2 はサイトゾルと核の間をシャトリングしており、何かの刺激でこのバランスがくずれると TG2 が核に溜まる、すなわち核に局在することがわかった (図 7B)。非環式レチノイド処理した JHH 細胞では、核外移行の輸送タンパク質として働くエクスポートイン1の発現量が減少しており、したがって、非環式レチノイド処理を続けると、エクスポートイン1の発現量低下に従い徐々に TG2 が核に局在することがわかった<sup>27)</sup>。この現象は肝細胞癌細胞株のみで観察され、正常肝細胞株である Hc 細胞に非環式レチノイドを処理しても同様な変化は見られなかった。

では、アルコール性脂肪性肝炎 (いわゆる ASH)、すなわちアルコール刺激した正常肝細胞

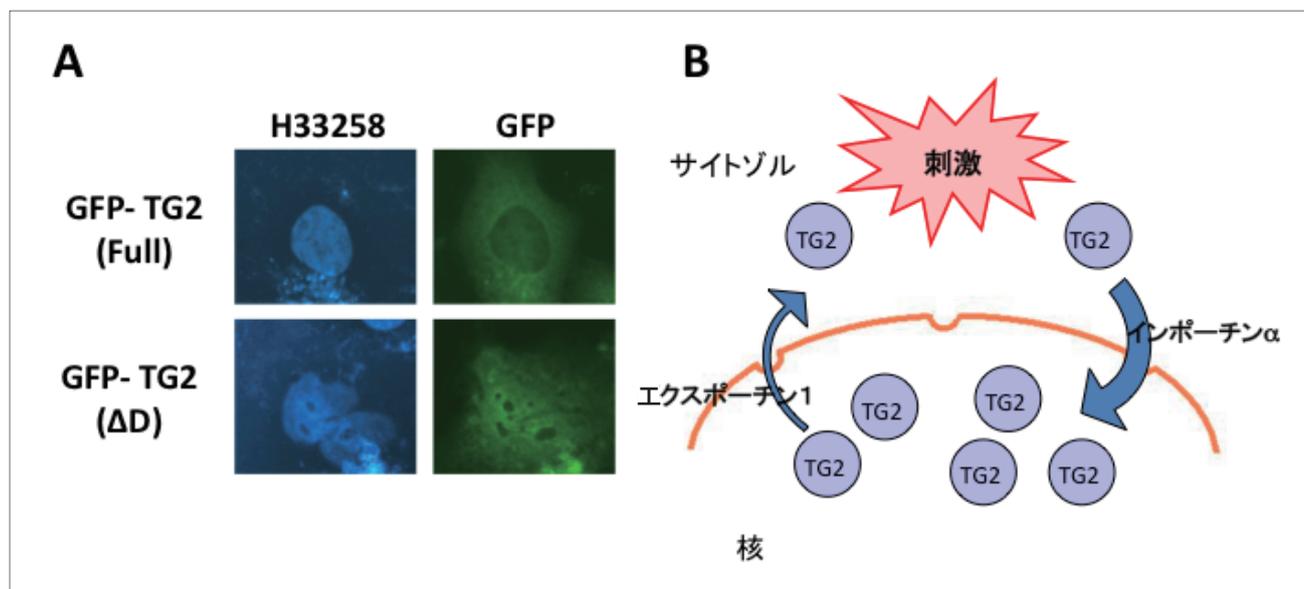


図 7 TG2 の核外移行の発見とシャトリング

- (A) Hc 細胞に GFP 標識したフルサイズの TG2 (GFP-TG2 Full) もしくは D ドメイン欠損 TG2 ミュータント (GFP-TG2  $\Delta$ D) を強制発現させた後にヘキスト 33258 によって核染色をし、蛍光顕微鏡下でヘキスト 33258 (H33258; 青色) による核と GFP (緑色) による TG2 細胞内局在を観察した。
- (B) TG2 のサイトゾル-核間シャトリング模式図  
これまで通常サイトゾルに存在し刺激を受けたときのみ核に移行すると考えられていた TG2 が、実はサイトゾル-核間をシャトリングしており、刺激を受けてそのバランスがくずれると核に局在することがわかった。(文献 7 より一部改変)

で見られるTG2核局在の機構はどうだろうか？  
 答えはやはりノーであった。アルコール/アセトアルデヒド処理 Hc 細胞ではエクスポーチン1発現量は変化していなかった。さらに、非アルコール性脂肪性肝炎(いわゆる NASH)、すなわち遊離脂肪酸処理した正常肝細胞でもエクスポーチン1発現量は変化していなかった。ASHはレチノイドシグナルを介して、また NASHは小胞体ストレスのPERK経路と下流のNF- $\kappa$ Bを介して、それぞれTG2の核内局在を誘導することを明らかにしていたが(図8)<sup>5)</sup>、TG2核局在の詳しい分子機構はわかっていなかったため、いろいろと検討を重ねた。

その結果、遊離脂肪酸処理 Hc 細胞では、細胞核に特異的に55 kDの短いTG2(TG2-S)が誘導される(正確には若干存在していた量が増える)ことに気が付いた(図9)。サイトゾル画分と核

画分とを混ぜて37℃で1時間インキュベーションしてもフルサイズTG2(TG2-L)とTG2-Sの比が変わらないことから、核でTG2-Lが分解されてTG2-Sが生成するのではなく、最初から短いフォームが産生されたものと考えられた。TG2-Sはアルツハイマー病の患者脳の神経細胞で見出されており<sup>28)</sup>、アルコール処理したHc細胞でも生成するが、非環式レチノイド処理したHc細胞では生成しないことがわかった(図10)。さらに、スプライシング阻害剤のスプライソスタチンA(SSA)によりTG2-Sの生成が抑えられることから、TG2-Sは、オルタナティブスプライシングにより生成してくるらしいことがわかった(図11)。TG2-Sは、Cドメインの一部とDドメインを欠損しており、したがってNLSは持っているがNESは持っておらず、一方架橋活性ドメインはフルサイズと同様有しているため、生成すると核の中に

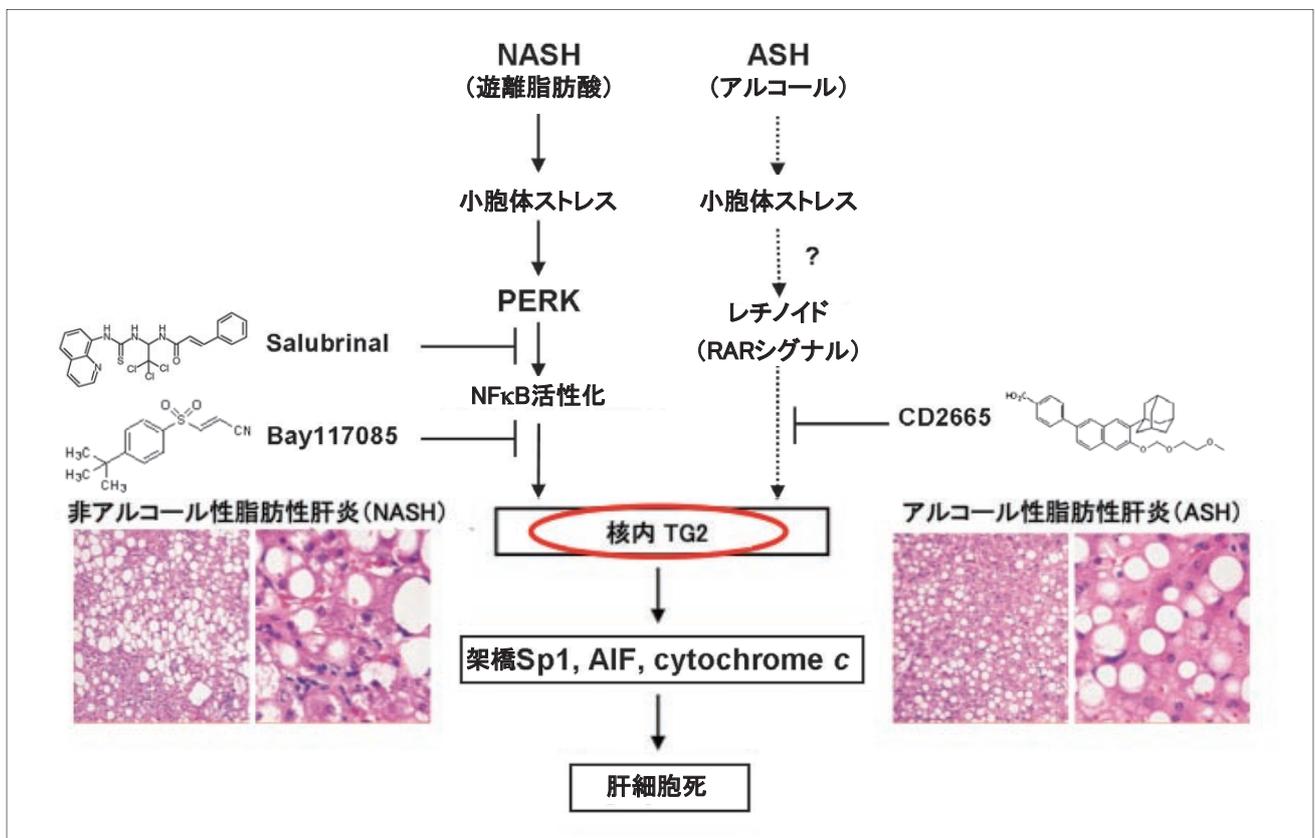


図8 アルコール性脂肪性肝炎(ASH)と非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)における核TG2を介する肝細胞死誘導経路

ASHではレチノイドシグナル、NASHでは小胞体ストレスのPERK経路を介して核TG2が誘導され、Sp1の架橋不活性化を介して肝細胞死を引き起こす。したがって、ASHではレチノイドアンタゴニストのCD2665が、NASHではPERK経路阻害剤のsalubrinalや下流のNF- $\kappa$ B阻害剤のBay117085が、それぞれの経路において核TG2の誘導を阻害する。(文献7より一部改変)

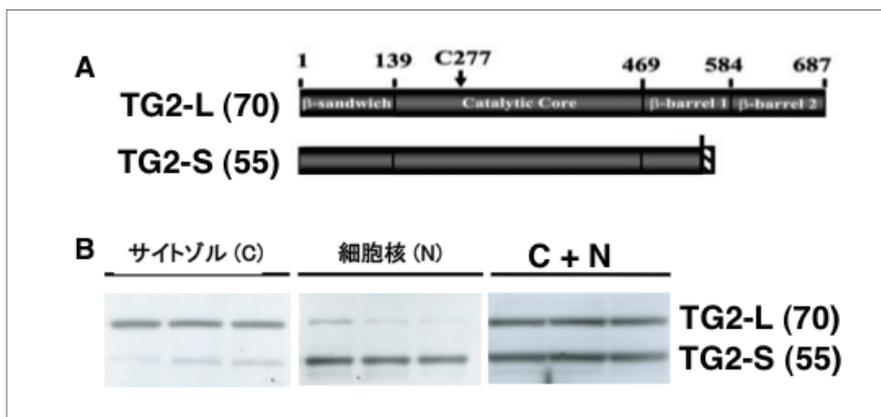


図9 肝細胞におけるショートフォーム TG2 (TG2-S) の生成

(A) フルサイズ TG2 (TG2-L) とショートフォーム TG2 (TG2-S) の模式図  
 (B) Hc 細胞 3 ディッシュを遊離脂肪酸で 18 時間処理後、サイトゾル画分 (C) と核画分 (N) を調製し、電気泳動後 TG2 抗体でウエスタンブロットを行った。さらに両画分を混ぜ 37℃ で 1 時間インキュベーションした後に同様のウエスタンブロットを行った (C+N)。

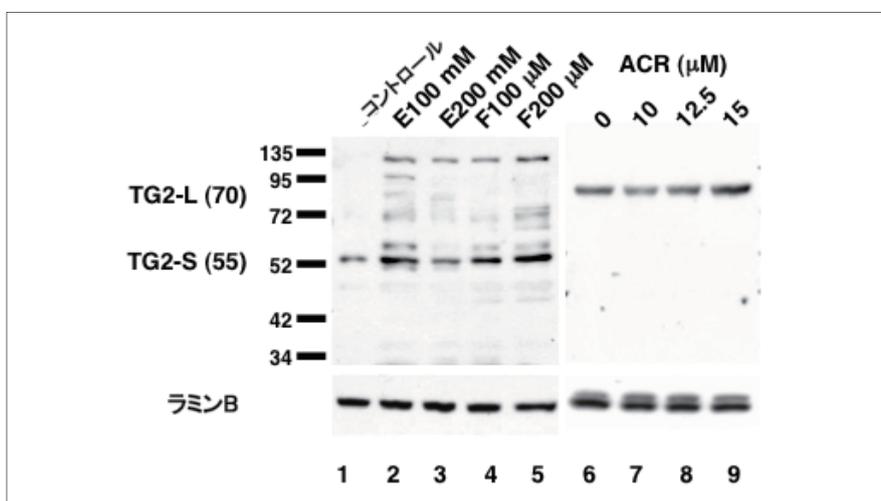


図10 TG2-S はエタノール処理、遊離脂肪酸処理で誘導されるが、非環式レチノイド処理では誘導されない

0-200mM エタノール (E, レーン 1-3), 100-200 $\mu$ M 遊離脂肪酸 (F, レーン 4 と 5), 0-15 $\mu$ M 非環式レチノイド (溶媒, 0.1%エタノール) (ACR, レーン 6-9) で 18 時間処理した Hc 細胞から核画分を調製し、ウエスタンブロットにより TG2 (TG2-L と TG2-S の両方) ならびに核画分の内部標準としてラミン B を半定量した。

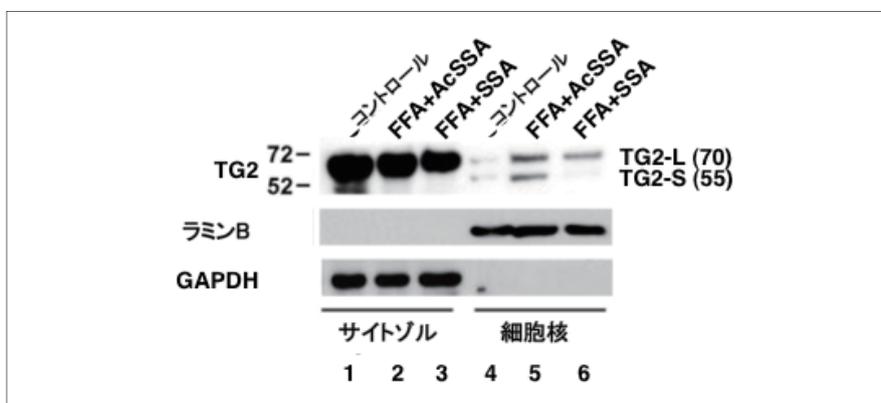


図11 TG2-S はオルタナティブスプライシングの結果生成するらしい

Hc 細胞をスプライシング阻害剤のスプライソスタチン A (SSA) もしくはその不活性化体のアセチル化スプライソスタチン A (AcSSA) の存在下で 100 $\mu$ M 遊離脂肪酸で 18 時間処理した後に細胞のサイトゾル画分 (レーン 1-3) ならびに核画分 (レーン 4-6) を調製し、TG2 (TG2-L と TG2-S の両方) と核画分の内部標準としてラミン B をサイトゾル画分の内部標準として GAPDH をウエスタンブロットにより半定量した。

入ることができても核から外にでることできないために核に溜まっていく、すなわち核に局在し、Sp1を架橋不活性化して肝障害を引き起こすらしいことがわかってきた(図12)。現在、エタノールや遊離脂肪酸によるTG2-S誘導に与えるクルクミンの影響を調べているところである。

### 考 察：

肝疾患の基礎は炎症反応である。行き過ぎた炎症反応、もしくは長期にわたる炎症反応が起こると、本来生体防御のために働く因子が、逆に病気を引き起こしてしまう。様々な原因(アルコール、ウイルス、自己免疫反応など)によって肝臓に炎症が起こると、肝臓のマクロファージである

クッパー細胞をはじめとする炎症細胞が活性化され、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインが産生される。炎症性サイトカインが肝星細胞に働くとTGF- $\beta$ の産生を誘起し、肝星細胞を活性化してコラーゲン線維の過剰産生を引き起こすと同時に肝細胞の再生機能を抑え、その結果、障害で傷ついた肝臓が回復できない状況でコラーゲンを始めとするECMタンパク質が肝臓内に蓄積し、肝硬変になっていく<sup>1)</sup>。一方、肝障害時に起こる肝細胞死では、細胞核においてタンパク質架橋酵素TG2が暴れ出し、肝細胞が生きていく上で大事な転写因子Sp1をガチガチに糊付けして働けなくしてしまうために肝障害が引き起こされる<sup>4)</sup>。

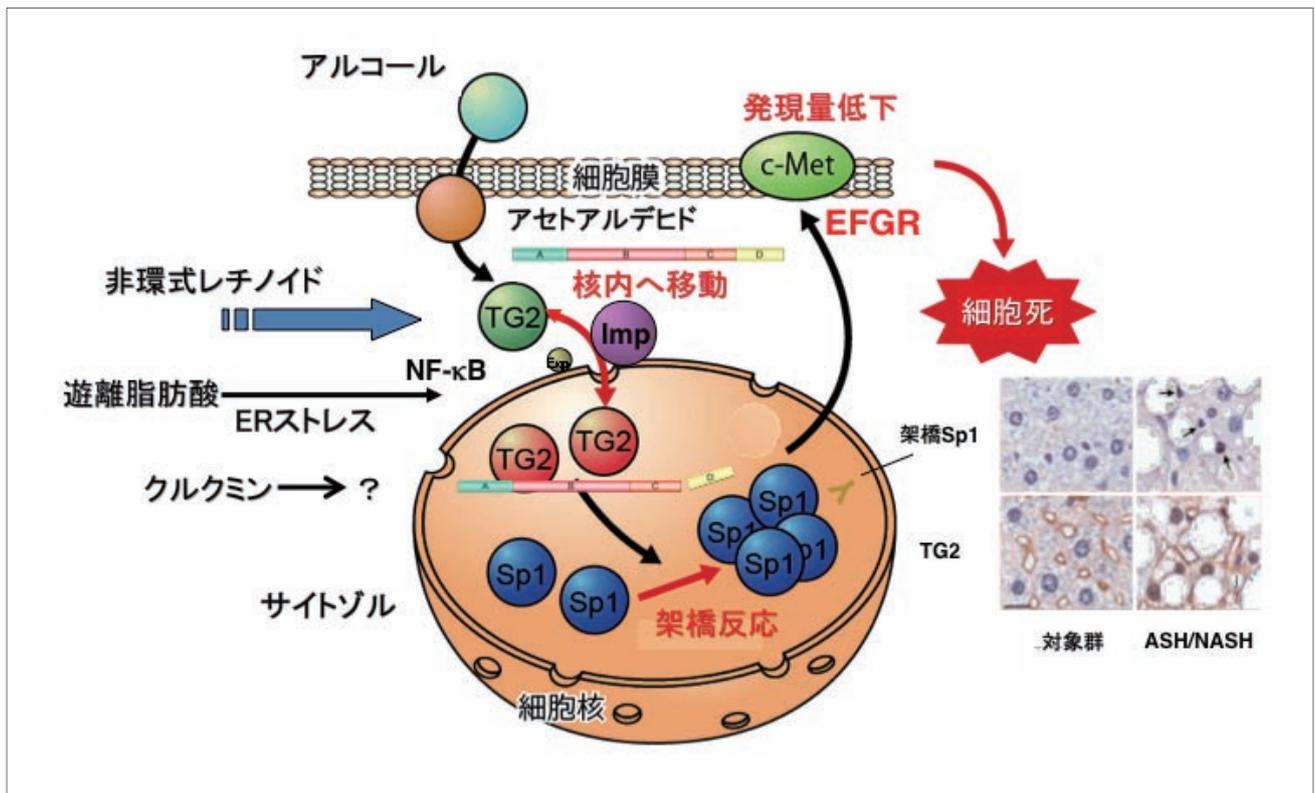


図12 アルコール/遊離脂肪酸と非環式レチノイドは異なる分子機構によりTG2の核局在を誘導し、Sp1架橋不活性化、細胞増殖因子受容体の発現量低下を引き起こして肝細胞死を招く

アルコール/アセトアルデヒドや遊離脂肪酸処理した肝細胞、ならびに非環式レチノイド処理した肝癌細胞では、TG2の核局在が誘導される。TG2はサイトゾルと核の間をシャトリングしており、非環式レチノイドが核外移行輸送タンパク質エクスポートン1の発現を抑えることでフルサイズTG2の核局在を誘導するのに対して、アルコール/アセトアルデヒドや遊離脂肪酸は核外移行シグナルを欠損したTG2-Sの産生、したがって核局在を誘導することがわかった。TG2-Sは架橋活性を有しているため、Sp1を架橋不活性化し、細胞増殖因子受容体の発現量低下を引き起こして肝細胞死を招く。架橋不活性化されたSp1を特異的に検出する抗体やTG2に対する抗体を用いると、ASHやNASHの患者肝臓の核において架橋不活性化Sp1やTG2の誘導を検出することができる。正常な肝臓ではこれらの生成はみられない(右下挿入写真)。(文献7より一部改変)

炎症性サイトカインやTG2の遺伝子発現を司る転写因子がNF- $\kappa$ Bである。クルクミンはNF- $\kappa$ Bの活性を阻害するので、肝障害や肝硬変に抑制的に働くと言われてきた<sup>29)</sup>。

今回の研究では、これに加えて、クルクミンがアルコール/アセトアルデヒドにより誘導されるTG2の核局在を抑える効果があるらしいことがわかった。さらに、アルコールはTG2-Sの生成を誘導することを見出した。クルクミンは、恐らくTG2-Sの生成を抑えているのではないかと予想され、現在、この作業仮説の証明に取り組むと共に、ウコンを始め幾つかの食品素材から、TGF- $\beta$ の生成や核TG2の働きを抑える成分の精製を試みている。

## 謝 辞

本研究は、一部(公財)浦上食品・食文化振興財団の資金提供の下に行われたものであり、この場を借りて深謝します。

## 文 献

- 1) Akita, K. et al.: *Gastroenterology* **123**: 352-364, 2002
- 2) 小嶋聡一、他「TGF- $\beta$ 活性化制御領域の切断面を認識する抗体」US 7,803,553; US 8,198,412; JP 4653660
- 3) 助永義和、他「アイソフォーム特異的TGF- $\beta$ 活性化反応を抑制する抗体」JP2011/053559
- 4) Tatsukawa, H. et al.: *Gastroenterology* **136**:1783-1795, 2009.
- 5) Kuo, T.-F. et al.: *J. Cell. Physiol.*, **227**:1130-1137, 2012.
- 6) Kaida D. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **3**: 576-583, 2007.
- 7) Kuo, T.-F. et al.: *J. Gastro. Hepatol.*, **27 (suppl 2)**: 52-57, 2012.
- 8) Border, W.A. and Noble, N.A.: *New Engl. J. Med.*, **331**: 1286-1292, 1994.
- 9) Walton, K.L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **285**: 17029-17037, 2010.
- 10) 原詳子、小嶋聡一: *医学のあゆみ* **234**: 977-982, 2010.
- 11) Groppe, J. et al.: *Mol. Cell.*, **29**: 157-168, 2008.
- 12) Hayashi, H. and Sakai, T.: *Front. Physiol.*, **3**: 12, 2012.
- 13) Ribeiro, S.M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **274**: 13586-13593, 1999.
- 14) Yang, Z. et al.: *J. Cell. Biol.*, **176**: 787-793, 2007.
- 15) Okuno, M. et al.: *Gastroenterology*, **120**: 1784-1800, 2001.
- 16) Shi, M. et al.: *Nature*, **474**: 343-351, 2011.
- 17) Wu, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **275**: 22213-22219, 2000.
- 18) Lorand, L. and Graham R.M.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**: 140-156, 2003.
- 19) Fesus, L. et al.: *FEBS Lett.*, **224**: 104-108, 1987.
- 20) Strnad, P. et al.: *Gastroenterology*, **132**: 1515-1526, 2007.
- 21) Fesus, L. and Piacentini, M.: *Trends Biochem. Sci.*, **27**: 534-539, 2002.
- 22) Huh, C.G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 4477-4482, 2004.
- 23) Liu, Y. : *Gene*, **215**: 159-169, 1998.
- 24) Sasaki, H. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* **34**: 660 - 665 (2011)
- 25) Tatsukawa, H. et al.: *Molecular Cancer* **10**:4 (11pages), 2011.
- 26) Peng, X. et al.: *FEBS. Lett.* **446**: 35-39, 1999.
- 27) Kuo, T.-F. et al.: *FEBS J.* **278**: 4756-4767, 2011.
- 28) Tee, A.E. et al.: *J. Biol. Chem.* **285**: 3561-3567, 2010.
- 29) Chen, A. and Zheng, S.: *Br. J. Pharmacol.* **153**: 557-67, 2008.

## Studies on Molecular Basis of The Hepatoprotective Effect of Turmeric

Soichi Kojima

*Molecular Ligand Biology Research Team*

*RIEN Advanced Science Institute, Japan*

Turmeric is popular by means of its ability to alleviate a hangover and its hepatoprotective functions. However, underlying molecular mechanisms based upon molecular pathogenesis, especially how an active component, curcumin works remain to be elucidated.

Here, I examined the effect of curcumin on

(1) Proteolytic activation of latent TGF- $\beta$  responsible for liver fibrosis, and  
(2) A novel liver injury axis mediated by nuclear transglutaminase (TG2),  
and found that curcumin does not affect the proteolytic activation of latent TGF- $\beta$ , whereas curcumin appears to suppress nuclear localization of TG2 in ethanol (acetaldehyde)-treated hepatic cells.

Since molecular mechanisms of nuclear localization of TG2 was unclear, we investigated it and found

- a. TG2 is shuttling between the cytosol and nucleus milieus.
- b. An anti-cancer reagent, acyclic retinoid suppresses the expression of exportin-1 serving as a carrier responsible for nuclear export of TG2, thereby allowing its accumulation in the nucleus, whereas
- c. both ethanol and free fatty acids induce formation of an alternative spliced variant of TG2, which is defect in the C-terminus D domain containing TG2's nuclear export signal, thereby allowing nuclear accumulation of the short form (TG2-S).

I am now under investigation to see the effect of curcumin on formation of the TG2-S in ethanol and free fatty acids-treated hepatic cells.