

<平成 29 年度助成>

受容体を介したクルクミンの新規作用機構に関する研究

奥山 真衣・原田 直樹

(大阪府立大学 生命環境科学研究科)

1. 背景・目的

食品成分は様々な生理作用を発揮するが、多くの場合、その詳細な作用メカニズムは不明である。ウコン (*Curcuma longa*) に含まれるクルクミンは、動物レベルでの生理作用に関する多くの報告がある。糖尿病予防作用においては、複数のランダム化比較試験を統合したメタアナリシスにおいても有益性が示されている¹⁾。一方で、*in vitro* 試験においてクルクミンが疑似陽性の反応を示す可能性のある物質であると注意喚起する論文が報告され^{2,3)}、クルクミンの健康作用に関するメカニズムの詳細は混沌とした状況である。我々は、クルクミンが作用する標的分子が明確でないことが、このような議論を生じさせる 1 つの要因となっているのではないかと推測する。

ヒトに約 800 種類存在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、それぞれのリガンドと結合後にシグナル伝達を活性化することで、血糖調節を含む様々な生理作用調節に関係する。本研究では、クルクミンの生理作用発現メカニズムを解明することを目的に、クルクミンによって活性化する GPCR が存在するかスクリーニングを行った。

2. 方法

2.1. 細胞培養

HEK293FT 細胞の培養には、10% ウシ胎児血清 (FBS) および 100 units/mL ペニシリン G、100 µg/mL ストレプトマイシン硫酸塩を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。培養

は 95% air、5% CO₂、98% 湿度、37℃ のインキュベーター内で行った。細胞の継代は、PBS (-) で洗浄した後、0.25% トリプシンと 0.02% EDTA を含む PBS (-) で処理して細胞を剥がし、新鮮な培地に懸濁することにより行った。

2.2. GPCR 発現ベクターの作製

ヒト GPCR cDNA が組み込まれた entry clone (258 種類) は、国立研究開発法人 産業技術総合研究所の五島直樹先生から分与いただいた。Gateway システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて GPCR をコードする cDNA を entry clone から destination vector (pcDNA3.2/V5-DEST) にサブクローニングして、哺乳類 GPCR 発現ベクターを得た。

2.3. トランスフェクション

HEK293FT 細胞を、2% FBS を含む抗生物質を含まない DMEM 培地に懸濁し、48 well プレートに播種して 24 時間培養した。Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に、p4xCRE-TATA-Luc2P⁴⁾、p3xSRE-TATA-Luc2P または p4xCRE-3xSRE-TATA-Luc2P (p4xCRE-TATA-Luc2P ベクターの CRE サイトの下流に血清応答配列を 3 つタンデムに含む) のいずれかを 0.075 µg と 0.05 µg の pGL4.74[*hRluc*/TK] (Promega) および 0.075 µg の GPCR 発現ベクターを混合した DNA 混合液を調製し、トランスフェクション用に調製した polyethylenimine (0.4 µL) を加えた。この混合液を用いて 24 時間後トランスフェクションを行った後、クルクミンや関連化合物を添加して (DMSO 終濃度 0.1%)、さらに 4 時間培養した。

2.4. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイは、Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit (Promega) と 20/20ⁿ Luminometer (Promega) を用いて行った。firefly ルシフェラーゼ活性の値を *Renilla* ルシフェラーゼ活性の値で割った値を相対化したものを relative light units とし、グラフ化した。

2.5. 統計解析

統計解析には JMP statistical software version 8.0.1 (SAS Institute) を用いた。データの平均値は $\pm$ SD で表した。Student's t-test (2 群比較) または Tukey's test (多重比較) を用いて解析した。 $p < 0.05$ をもって統計学的有意とした。

3. 結果

GPCR を介したシグナル伝達は、GPCR が共役する $G\alpha$ サブユニットの種類によって異なる (図 1)。また、複数の経路を活性化する GPCR も存在する。そこで、クルクミンによって活性化される GPCR を探索するために、プロモーター領域に CRE と SRE

の両方のシスエレメントをもつレポーターベクターと GPCR 発現ベクターを HEK293FT 細胞に高発現させて、ルシフェラーゼレポーターアッセイによるスクリーニングを行った。そして、応答が見られた GPCR については、CRE または SRE の一方のみをもつレポーターベクターを用いて検証した。その結果、ある GPCR (curGPCR とする) の高発現下でクルクミン依存的に SRE を介したレポーター活性の上昇が認められた (図 2)。

curGPCR と既知リガンドの結合に重要であると報告されている Lys および Glu サイトを Ala に置換した変異体 curGPCR (K/A)、curGPCR (E/A) 高発現下でクルクミンを添加し、ルシフェラーゼ活性を検討した。その結果、野生型 curGPCR 高発現下で見られたクルクミンによる SRE レポーター活性の上昇は、K/A、E/A 高発現下では見られなかった (図 3)。

curGPCR の活性化に及ぼすクルクミン関連化合物活性をレポーターアッセイで評価した結果、クルクミンによる作用が最も強く、ビスデメトキシクルクミンにも活性化作用が認められた (図 4)。一方で、テトラヒドロクルクミンとフェルラ酸には活性促進作用は認められなかった。

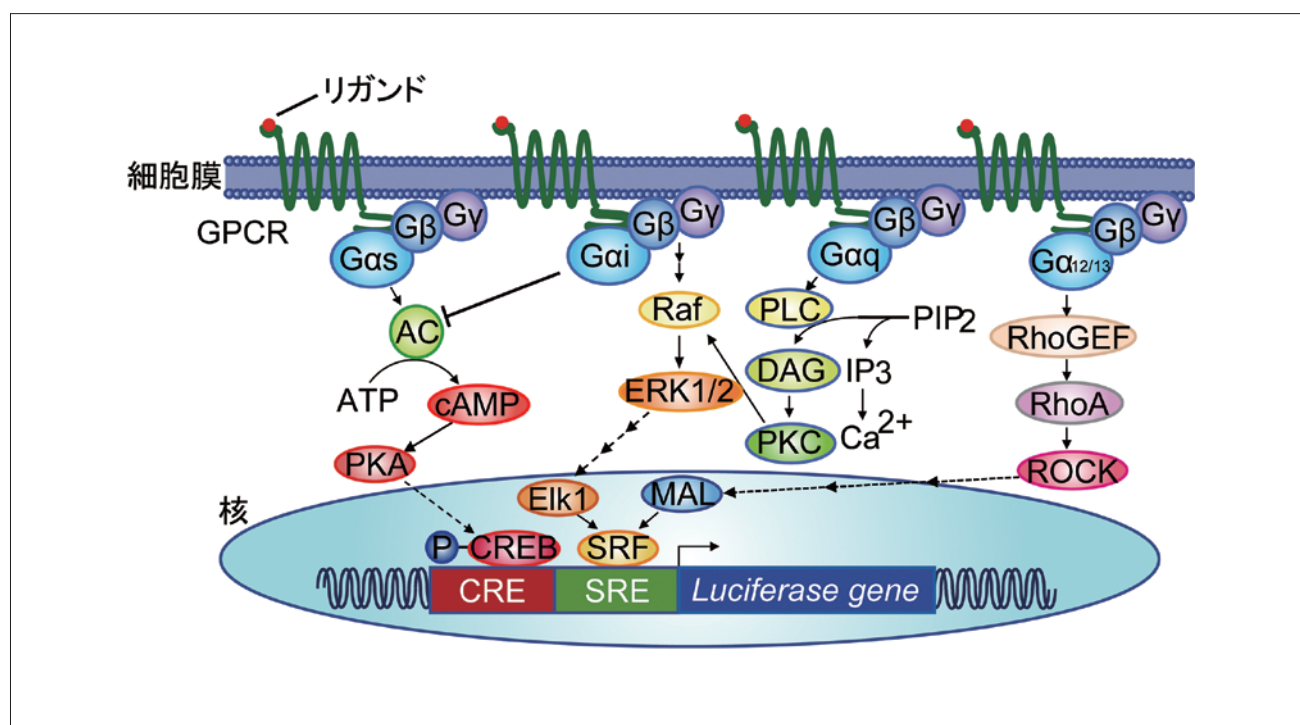


図 1 GPCR スクリーニング概要

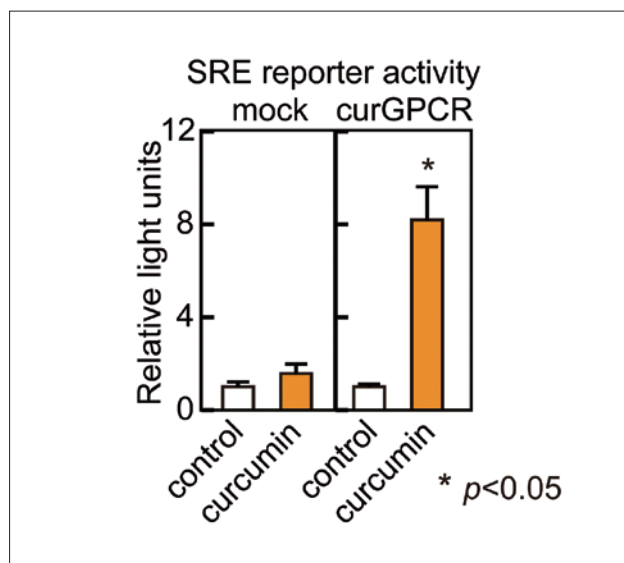


図2 curGPCR 高発現下でクルクミンが SRE レポーター活性に与える影響

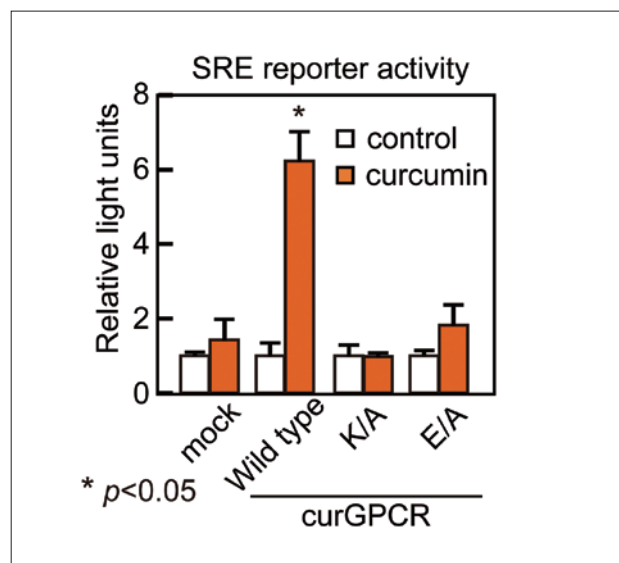


図3 GPR55 変異体高発現下でクルクミンが SRE レポーター活性に与える影響

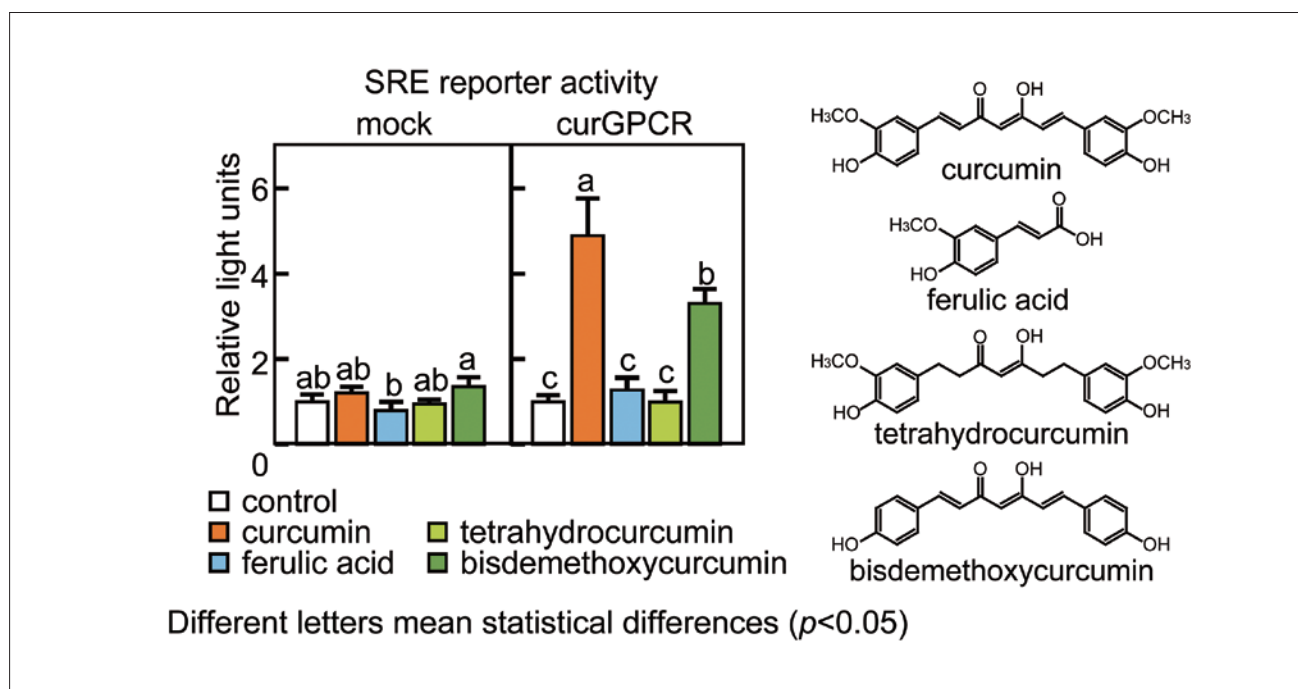


図4 クルクミン関連化合物が SRE レポーター活性に与える影響

4. 考察と今後の展望

本研究では、クルクミンが GPCR を介して生理作用を発揮するか否かを明らかにするために、GPCR を高発現させたエクスペリメンテーションスクリーニングのシステムを構築した。そして、スクリーニングによりクルクミンによって活性化される GPCR を見出し

た。curGPCR は、膵 β 細胞や腸管 L 細胞で発現して機能するという報告も存在することから、クルクミンが curGPCR を活性化することでインスリンや GLP-1 の分泌が増加して、2 型糖尿病予防作用を発揮するという機構が考えられる。既知リガンドとの相互作用に必要な curGPCR のアミノ酸を置換した場合、クルクミンは変異体 curGPCR を活性化できなかった。この結果は、クルクミンが直接 curGPCR の

リガンドとして作用する可能性を強く示唆する。また、クルクミンが生体内で代謝されて産生するフェルラ酸やテトラヒドロクルクミンは curGPCR を活性化させなかったこと、類縁体であるビスデメトキシクルクミンよりもクルクミンによる活性化作用が強かったことについては、リガンドとしての結合にケト-エノール互変異性による構造変化が関係する可能性も考えられる。

謝 辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深謝いたします。また、GPCR の cDNA が組み込まれた entry clone を分与いただきました国立研究開発法人 産業技術総合研究所の五島直樹先生に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Melo ISV, Santos AFD, Bueno NB. Curcumin or combined curcuminoids are effective in lowering the fasting blood glucose concentrations of individuals with dysglycemia: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol. Res.*, 128, 137-144, 2018.
- 2) Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The essential medicinal chemistry of curcumin. *J. Med. Chem.*, 60, 1620-1637, 2017.
- 3) Baker M. Deceptive curcumin offers cautionary tale for chemists. *Nature*, 541, 144-145, 2017.
- 4) Horiuchi H, Usami A, Shirai R, Harada N, Ikushiro S, Sakaki T, et al. S-Equol activates cAMP signaling at the plasma membrane of INS-1 pancreatic beta-cells and protects against streptozotocin-induced hyperglycemia by increasing beta-cell function in male mice. *J. Nutr.*, 147, 1631-1639, 2017.

Novel G-protein-coupled receptor mechanism underlying the action of curcumin

Mai OKUYAMA, and Naoki HARADA

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

Abstract

Curcumin, a turmeric (*Curcuma longa*) compound, exerts multiple physiological actions in humans. However, the molecular mechanisms underlying the action of curcumin remain to be elucidated. In the present study, we identified a G-protein-coupled receptor (GPCR) that is activated by curcumin. By using a luciferase reporter assay, we performed expression screening of 258 human GPCR expression vectors, following transfection of HEK293FT cells with the vectors and a luciferase reporter vector containing both cAMP-response elements and serum response elements. The cells were then stimulated with curcumin, and the resulting luciferase activity was determined. Luciferase activity was induced by curcumin when curGPCR was overexpressed, indicating that curcumin activated curGPCR. Luciferase activation involved the activation of serum response elements. In addition, curGPCR with point mutations at putative ligand-binding sites was not activated by curcumin. Curcumin activated curGPCR more strongly than bisdemetoxycurcumin. The curcumin metabolites, tetrahydrocurcumin and ferric acid did not activate curGPCR. These results strongly suggest that curcumin activates curGPCR as a ligand.