

# ココア主要成分テオブロミンの 新たな生理作用

中尾 洋一

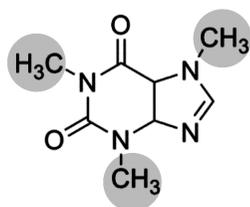
(早稲田大学 先進理工学部化学・生命化学科教授)

はじめに

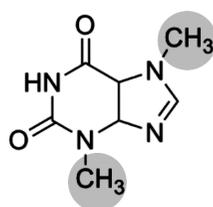
ココアはカカオ豆の発酵・焙煎により製造され、世界中で飲料として広く親しまれている。また、ココアに多く含まれるエピカテキンをはじめとするカカオポリフェノールは、活性酸素を抑制するとともに末梢血管を拡張させることで動脈硬化や高血圧、血栓の予防効果があるなど、ココアの機能性成分への関心が高まりつつある。

カカオマス100g中には約4gのポリフェノール類が含まれているが、その他の主要な成分としてキサンチン誘導体であるテオブロミン（約2g）がカフェイン（183mg）の約10倍量含まれている<sup>1)</sup>。キサンチン誘導体には多様な生理活性が知られており、カフェインにはアデノシン受容体に拮抗することで生じる覚醒作用や強心作用、利尿作用等の生理活性が、医薬品として用いられるテオフィリンには強い気管支拡張作用<sup>2)</sup>が報告されている。カフェインやテオフィリンと同様、キサンチン誘導体成分であるテオブロミンにも類似の生理作用が期待されるが、ヒトではカフェインと同様の利尿作用以外に顕著な生理活性についての報告はない。

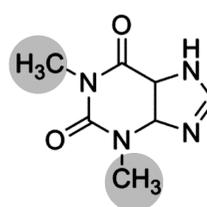
このような背景下、ココアの主要成分であるテオブロミンの生理活性を探索すれば、ココアの新たな機能性の発見や、健康および医療への寄与につながると考えた。本研究では従来の生理活性評価法では浮かび上がってこなかったテオブロミンの未知の生理機能を新たに見出すために、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるヒストン修飾に与える影響と神経分化に与える影響を指標として、テオブロミンの生理活性評価を行った。ここでは我々が新たに見出したテオブロミンの生理機能について述べる。



カフェイン



テオブロミン



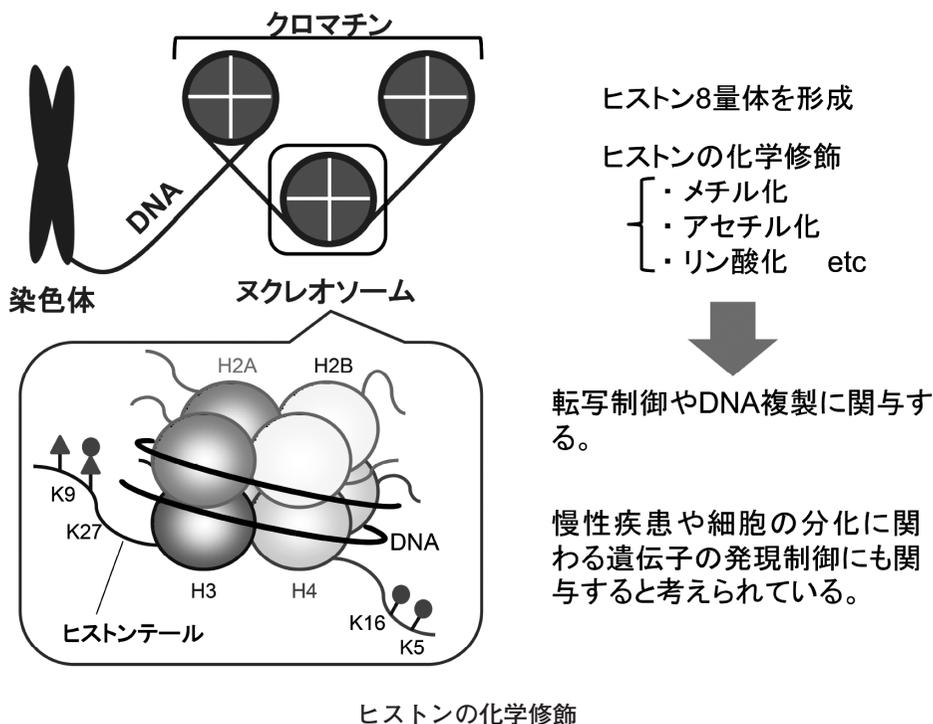
テオフィリン

キサンチン誘導体の構造

## ヒストン修飾調節活性試験

ヒストンは、DNAが巻き付いている8量体のタンパク質であり、ヒストンタンパク質を構成するアミノ酸はリン酸化やアセチル化、メチル化等の化学修飾を受ける。ヒストンタンパク質がこれらの修飾を受けることで、転写の活性化や抑制などの遺伝子発現調節が行われることが知られてい

る。すなわちヒストン修飾のレベルを変化させることで、「遺伝子発現のスイッチ」のオン・オフが切り替えられる。またヒストン修飾の調節は、がんなどの慢性疾患や細胞分化にも深く関わっているため<sup>3,4)</sup>、慢性疾患に対する予防効果の評価指標としても適用可能と考えた。本研究では、ヒストンタンパク質中のリシン残基のアセチル化およびメチル化に着目し、ヒストン修飾特異的なモノクローナル抗体を用いたセルベースヒストン修飾調節活性試験法<sup>5)</sup>により、カフェインおよびテオブロミンのヒストン修飾調節活性の評価を行った。



ヒト子宮頸がん由来細胞株であるHeLa細胞に対して、カフェインおよびテオブロミンのDMSO（ジメチルスルホキシド）溶液を添加し、DMSOのみを添加したものをコントロールとした。細胞を24時間培養後に培地交換を行い、ついで再びサンプル添加を行ってさらに24時間培養した。各ヒストン修飾に対する蛍光モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、得られた蛍光顕微鏡像をもとにCellProfiler software<sup>6)</sup>により各蛍光強度を算出してヒストン修飾レベルを解析した。その結果、カフェイン（150  $\mu$ M）添加時にH3K27me3（ヒストンH3の27番目リジン残基におけるトリメチル化）修飾レベルの抑制活性が認められた。一方、テオブロミンには同様の活性は認められなかった。

#### 神経幹細胞を用いた分化調節活性試験

神経幹細胞は成人脳内の海馬や側脳室に存在し、生涯にわたりニューロンやアストロサイトなどを脳組織に供給し続ける。以前は一度損傷を受けると再生不可能と考えられていた中枢神経系についても、神経幹細胞がニューロンやアストロサイトなどの神経細胞へと分化することで損傷した中枢神経の自己修復にかかわることが明らかになってきた<sup>7)</sup>。神経細胞への分化過程では多くの「遺

伝子発現のスイッチ」が適切なタイミングで切り替わることで、神経幹細胞から神経細胞への分化過程が厳密に制御されている。

一方で、神経幹細胞の分化異常は、アルツハイマー病など、様々な神経疾患の発症に関わることが報告されている<sup>8)</sup>。また、正常なアストロサイト数の減少は、ストレスへの脆弱性や、うつ症状を引き起こすという報告もある<sup>9)</sup>。そのため、神経幹細胞の分化に影響を与える化合物を発見することができれば神経疾患の予防や治療につながると考えた。特にそのような作用を有する食品成分を日々摂取することで、弱いながらも持続的な作用を通して疾患の予防が期待できる。

そこで、ニューロンに分化すると緑、アストロサイトに分化すると赤く光るように遺伝子組換えを行った神経幹細胞を用いて神経細胞分化調節活性試験を行い、以下に述べるようにサンプルの活性評価を行った。まず、72時間未分化維持培養を行った神経幹細胞にサンプルを添加し、さらに96時間分化誘導を行った。蛍光顕微鏡を用いてニューロンおよびアストロサイトの分化率をコントロール（DMSOのみ）と比較したところ、カフェインおよびテオブロミンそれぞれを単独投与したものには活性はみられなかったが、カフェインおよびテオブロミンを1:1の混合比（各150 $\mu$ M）にて添加するとニューロンの分化が抑制された（図1）。

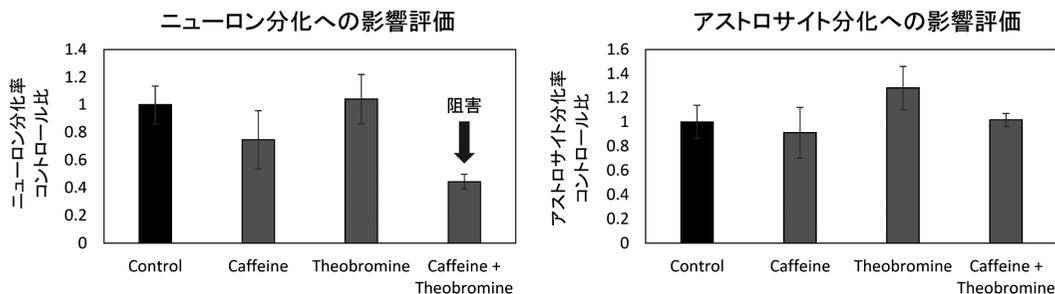


図1 カフェインおよびテオブロミンの単独もしくは混合（1:1）添加によるNSCのニューロンおよびアストロサイト分化への影響評価. 150 $\mu$ M, n=2, means  $\pm$  S.D.

## RNAシーケンスの手法を用いた遺伝子発現変化の網羅的解析

すでに述べたように、カフェインにはヒストン修飾への影響が見られたもののテオブロミンには同様の作用は認められなかった。一方、カフェインおよびテオブロミンともに単独では神経細胞分化への影響は認められなかったが、これらを1:1で混合したものはニューロンへの分化を抑制した。このようにカフェインとテオブロミンは互いによく似た構造であるにもかかわらず、その生理機能が異なっている。しかし、両者を混合することにより、相互的な作用によって新たな生理機能が発現する可能性が浮かび上がってきた。

そこでこの相互作用をより詳細に解析するため、カフェイン、テオブロミンおよび両者の混合物を神経幹細胞に投与した際の遺伝子発現の変化を、RNAシーケンスの手法によって解析した。RNAシーケンスは、細胞のRNAを抽出後、各遺伝子の発現量を網羅的に解析する手法であり、得られたデータのクラスタリング解析を行うことによって、ひとつひとつの遺伝子発現を解析する従来の研究手法では難しい遺伝子発現プロファイル変化の解析が可能となる。

まず、72時間未分化維持培養を行った神経幹細胞にサンプルを添加し、さらに96時間分化誘導を

行った。その後細胞のRNA抽出を行い、コントロールおよび各サンプル添加時の遺伝子発現を比較した。その結果、カフェイン (150 $\mu$ M)、テオブロミン (150 $\mu$ M)、カフェイン/テオブロミン=1:1 (各150 $\mu$ M) 添加時において、コントロールと比較し、2倍以上発現量の変化が認められた遺伝子が多数存在した (図2)。カフェインおよびテオブロミンを単独添加した際と比較すると、興味深いことに両者を混合し添加した際により多くの遺伝子の発現量が新たに変化した (229遺伝子、図2)。発現量に変化した遺伝子について、非階層クラスタリング解析を行った結果、カフェインおよびテオブロミンの混合投与 (1:1) を行った細胞群において、神経系の発達やニューロン新生の制御等、神経分化に関わる遺伝子の発現変化が多く認められた。以上の結果より、カフェインおよびテオブロミンの両者を主要成分として含むココアの特徴的な機能として、神経の分化・発達に影響する可能性が示唆された。

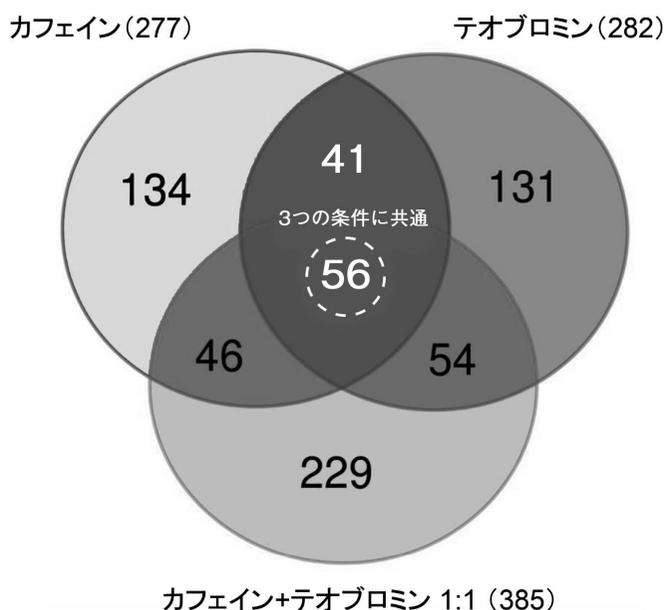


図2 カフェインおよびテオブロミンの単独もしくは混合添加によってコントロールに比べ2倍以上発現量に変化が認められた遺伝子数. 150 $\mu$ M、( )内の数字は各条件における全変動遺伝子数。

#### まとめ

カカオマスの主要な成分でありながらその機能が長年謎とされてきたテオブロミンについて、従来の生物活性試験とは異なる、「遺伝子発現のスイッチ」に対する影響を指標としてその機能を解析した。すなわち、「遺伝子発現のスイッチング機構」のひとつであるヒストンの化学修飾におよぼす影響や、「遺伝子発現のスイッチ」がダイナミックに切り替わっている神経分化の過程における影響を指標として、テオブロミンの機能解析を行った。この結果、テオブロミンとカフェインとの間でヒストンの化学修飾に対する影響の違いが認められた。一方、神経分化に対する影響においてはテオブロミンとカフェインの単独投与下では顕著な活性を示さなかったが、両者を混合投与するとニューロンの分化を抑制させることが明らかになった。さらに、網羅的遺伝子発現解析

の結果、テオブロミンとカフェインを混合投与すると神経分化に関わるものも含めて遺伝子の発現プロファイルが大きく変化することも明らかとなった。このことは、類似の構造を有するキサントシン誘導体であっても、テオブロミンとカフェインは単独ではそれぞれの生理作用が異なり、ココアのような混合状態では単独では誘起されないような生理作用が共同的な働きによって生み出されている可能性を示唆するものである。

以上のようなカフェインとテオブロミンの相互作用による生理機能発現の複雑な機構は、テオブロミンの顕著な生理機能がこれまで明らかにされてこなかった理由を示唆するとともに、カフェインを含みつつもテオブロミンを含まないコーヒーと、カフェインの10倍量の豊富なテオブロミンを含むココアの飲料としての機能性の違いや、コーヒーとココアに対する嗜好性の違い（コーヒー：大人、ココア：子供）についても深い洞察につながる手がかりになると考える。

## 謝辞

この研究は、早稲田大学中尾研究室 長島侑希氏、大塚悟史氏、新井大祐博士との共同研究によるものです。

## 引用文献

- 1) 第24回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム講演要旨集.
- 2) 栗原久、『カフェインの科学 - コーヒー・茶・チョコレートの薬理作用 -』、学会出版センター、東京.
- 3) Taiping Chen, Sharon Y. R. Dent, *Nat. Rev. Genet.*, 2014, 15, 93-106.
- 4) Anna Portela, Manel Esteller, *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28, 1057-1068.
- 5) Yoko Hayashi-Takanaka, Yuto Kina, Fumiaki Nakamura, Leontine E. Becking, Yoichi Nakao, Takahiro Nagase, Naohito Nozaki, and Hiroshi Kimura 投稿中.
- 6) Anne E. Carpenter, Thouis R. Jones, Michael R. Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A. Guertin, Joo Han Chang, Robert A. Lindquist, Jason Moffat, Polina Golland, and David M. Sabatini, *Genome Biol.*, 2006, 7, R 100.
- 7) Fred H. Gage, *Science*, 2000, 287, 1433-1438.
- 8) Chuanyu Li, Rui Zhao, Kai Gao, Zheng Wei, Michael Yaoyao Yin, Lok Ting Lau, Dehua Chui, and Albert Cheung Hoi Yu, *Curr. Alzheimer Res.*, 2011, 8, 67-80.
- 9) Grazyna Rajkowska and Craig A. Stockmeier, *Curr. Drug Targets*, 2013, 14, 1225-1236.