

***p*-ヒドロキシアセトフェノンの酵母増殖阻害回復機構の解明**

根 來 宗 孝<sup>1)</sup>, 湯 浅 正 洋<sup>2)</sup>, 澤 村 弘 美<sup>3)</sup>, 渡 邊 敏 明<sup>1)</sup>  
 ( <sup>1)</sup>大阪青山大学健康科学部健康栄養学科\*, <sup>2)</sup>神戸大学大学院人間発達環境学研究科\*\*,  
<sup>3)</sup>美作大学生活科学部食物学科\*\*\*)

(受付 2023年8月30日, 受理 2023年10月5日)

**The clarified mechanism on regenerative effect of *p*-hydroxyacetophenone induced anti-fungal activity in *Saccharomyces cerevisiae***

Munetaka NEGORO<sup>1)</sup>, Masahiro YUASA<sup>2)</sup> Hiromi SAWAMURA<sup>3)</sup>, Toshiaki WATANABE<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Health and Nutrition, Faculty of Health Science, Osaka Aoyama University

<sup>2)</sup>Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

<sup>3)</sup>Department of Food Science, Faculty of Human Life Sciences, Mimasaka University

Key words: *p*-hydroxyacetophenone, NADP<sup>+</sup>, regenerative effect, *S. cerevisiae*

**Summary**

Plants are an important source of anti-inflammatory and antioxidant compounds. The antifungal action of *p*-hydroxyacetophenone (*p*-HAP) was reported in the manuscript investigating the antifungal activity of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxyacetophenone isolated from Ezomurasaki azalea leaves and taken up as a related compound. Further, when producing bioethanol using yeast, *p*-HAP exhibits growth inhibitory effects due to the *p*-HAP contained in raw materials such as wheat, which reduces the amount of ethanol produced. However, the pharmacological action of *p*-HAP on yeast has not been clarified in detail, so we attempted to examine it in this study. We extracted and identified three proteins using *p*-HAP-sepharose affinity chromatography. Among these three, we focused on NADPH dehydrogenase in particular and examined the effect of supplementation of NADP<sup>+</sup>. As a result of this study, we found that NADP<sup>+</sup> was effective in restoring the growth of the yeast. Assuming that the 15mM *p*-HAP as the NADP<sup>+</sup> non-addition group was 100%, the effects were 136% (2.5mM NADP<sup>+</sup>, 15mM *p*-HAP addition group), 107% (1.25mM NADP<sup>+</sup>, 15mM *p*-HAP addition group) and 102% (0.63 mM NADP<sup>+</sup>, 15 mM *p*-HAP added group) at 12 hours. At 25.5 hours, it was also elevated to 143% (2.5 mM NADP<sup>+</sup>, 15 mM *p*-HAP added group), 113% (1.25 mM NADP<sup>+</sup>, 15 mM *p*-HAP added group), and 104% (0.63 mM NADP<sup>+</sup>, 15 mM *p*-HAP added group) in a concentration dependent manner. Moreover, significant differences ( $p < 0.01$  or  $p < 0.05$ ) were confirmed in the 2.5 mM NADP<sup>+</sup>, 15 mM *p*-HAP addition group from the 15 mM *p*-HAP addition group at all measurement times. Therefore, it is expected that the supplementary addition of NADP<sup>+</sup> would partially recover the growth of the *p*-HAP-added group in the yeast.

植物は、抗炎症化合物や抗酸化化合物の重要な供給源である。最近、マルバフジバカマ (*Ageratina altissima*) の地上部から3,5-ジプレニル-4-ヒドロキシアセトフェノンが単離され、抗炎症活性や抗酸化活性を有することが報告されている<sup>1)</sup>。また、サトウキビ (*Saccharum officinarum* L.) には、抗酸化活性や抗コリンエステラーゼを示す *p*-ヒドロキシアセトフェノン (*p*-HAP) が含まれる。この

*p*-HAP を含むサトウキビ由来の非糖成分を拘束負荷マウスに経口投与すると、血清中へのコルチコステロン分泌と血清および肝臓の抗酸化活性低下の双方を抑制することが報告されている<sup>2)</sup>。他にもアセトフェノン類縁物質の研究は現在も継続的に実施されており、エゾムラサキツツジ葉から単離された2',6'-ジヒドロキシ-4'-メトキシアセトフェノンとその関連化合物の抗真菌活性を調べた報告の中

\*所在地：大阪府箕面市新稲2-11-1 (〒562-8580)

\*\*所在地：神戸市灘区鶴甲3-11 (〒657-8501)

\*\*\*所在地：岡山県津山市北園町50 (〒708-8511)

連絡先：E-mail：m-negoro@osaka-aoyama.ac.jp (根來)

で *p*-HAP の抗真菌作用についても取り上げられている<sup>3)</sup>。さらに *p*-HAP は、酵母を用いてバイオエタノールを生産する際、原料となる麦などに *p*-HAP が含まれているため増殖阻害効果を示し、エタノールの生産量を減少させることが問題となっている<sup>4)</sup>。しかしながら、*p*-HAP の酵母に及ぼす薬理作用については、詳細が明らかになっていないため本研究において検討を試みた。

## 実験方法

### 1. 酵母および培養

酵母（やまぐち・桜酵母 *S. cerevisiae* 山口県産業技術センター所有株<sup>5)</sup>）は栄養培地 [ 1% peptone および 10% glucose 含有 YM 培地 (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract) ] (以下 Y-1 培地と略) で培養した。*p*-ヒドロキシアセトフェノン (富士フィルム和光純薬株式会社, 東京) (*p*-HAP) は最終濃度が 3.75 mM から 30 mM の範囲で用いた。NADP<sup>+</sup> (富士フィルム和光純薬株式会社, 東京) は最終濃度が 0.63 mM から 2.5 mM の範囲で用いた。酵母の増殖は、マイクロプレートリーダーのカイネティック測定プログラムを用いて室温で OD 600 nm の吸光度を経時的に測定した。

### 2. *p*-HAP 親和性タンパク質の同定

Y-1 培地で 24 時間培養した湿酵母 615 g を回収し、タンパク質の抽出を行った。回収した酵母を水で懸濁し 1L に定容し、0.46 g 2-Mercaptoethanol, 0.46 g Sodium Azide, 及び 13.8 g Toluene を加え、25℃ で 1 時間攪拌した。次に、3.7 M Ammonium Sulfate を 150 mL 加え、6M の NaOH を用いて、pH 7.5 に調整し、さらに 25℃ で 4 時間攪拌した。その後、10,000 g で 10 分間遠心分離を行い、上澄みを回収後 70% の硫酸沈殿・10,000 g × 10 分間遠心分離により酵母由来タンパク質試料を得た。この試料に対し、*p*-HAP アフィニティークラムを用いて親和性タンパク質の精製を行った。*p*-HAP アフィニティークラムは Epoxy-activated Sepharose 6 B と *p*-HAP を反応させた *p*-HAP-Sepharose beads をカラム<sup>6,7)</sup>に充填し作製した。アフィニティークラムを 50 mM NaCl -20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化し、緩衝溶液に溶解した試料をカラムに導入した。その後、カラムの 10 倍容の緩衝溶液で洗浄し、10 mM *p*-HAP を含む緩衝溶液 5 倍容で *p*-HAP 親和性タンパク質の溶出を行った。得られたタンパク質を遠心濃縮し、*p*-HAP 親和性タンパク質を回収した。精製した *p*-HAP 親和性タンパク質を 12.5% SDS-PAGE によって分離し、クマシーブリリアントブルーで染色した。その後、PMF (Peptide Mass Fingerprinting) 法のサンプル調製プロトコルに従い、切り出した染色済みのタンパク質を含むゲルをリジルエンドペプチダーゼにより内部消化後ペプチド断片を抽出・回収した。その試料を MALDI-TOF/MS 法を用いて抽出ペプチド断片の質量を測定 (マトリッ

クス支援イオン化-飛行時間型質量分析計 アプライドバイオシステムズ社 Voyager-DE TM PRO V888630-UE1, 東京) 後、その測定データをアミノ酸配列データベースと照合し、*p*-HAP 親和性タンパク質の同定を行った<sup>8)</sup>。

### 3. 統計処理

コントロール培地を含め、測定 0 時間の吸光度の平均値で補正を行った。これらの測定値の群間比較は、統計アプリケーション (Statcel 4: オーエムエス出版, 東京都) を用いた、一元配置分散分析と、Scheffe による多重比較検定により実施した。

## 結果と考察

*p*-HAP (Fig. 1) の抗真菌作用については、エゾムラサキツツジ葉から単離された 2,6'-ジヒドロキシ 4'-メトキシアセトフェノンとその関連化合物の抗真菌活性を調べた報告の中で取り上げられている。しかしながらその抗菌活性と化学構造との相関について、共通するアセチル基の存在は示されているものの、抗菌活性の発現メカニズムの詳細はこれまでに解明されていない。そこで本研究では *p*-HAP に抗真菌作用を示す酵母を用いて、*p*-HAP 親和性タンパク質を同定することにより抗真菌作用の作用点を明らかにするための検討を行った。

電気泳動法により分離した酵母由来 *p*-HAP 親和性タンパク質を図 2 (Fig. 2, lane 2) に示す。レーン 1 は分子量マーカーである。*p*-HAP 親和性タンパク質として 44kDa, 36kDa, 34kDa, 25kDa, 22kDa の 5 本のバンドが認められ、この中で明瞭な 44kDa, 25kDa, 22kDa の 3 種類について PMF 法によるタンパク質の同定を試みたところ 44kDa は NADPH dehydrogenase (Table 1, Fig. 3), 25kDa は Heat shock protein 31 (HSP31) (Table 2, Fig. 4), 22kDa は Nicotinamidase (Table 3, Fig. 5) であることをそれぞれ確認した。Hsp31 は、シャペロン活性を持つストレス誘導性ホモ二量体タンパク質であることが報告されている<sup>9)</sup>。従って酵母に *p*-HAP を添加すると Hsp31 シャペロン活性による細胞保護効果に影響を与える可能性が示唆された。出芽酵母において、ニコチンアミドを脱アミノ化する酵素である Nicotinamidase の発現増

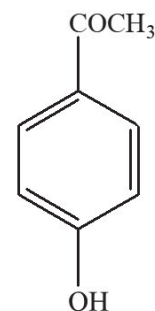
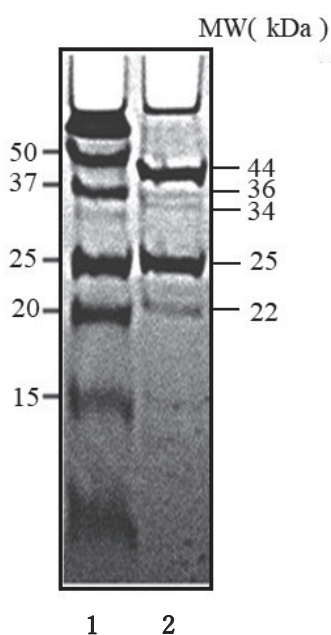


Fig. 1. The chemical structure of *p*-hydroxyacetophenone.



**Fig. 2.** *p*-Hydroxyacetophenone-Sepharose affinity chromatography of the yeast extracted protein fraction.

加が、カロリー制限やストレスによる寿命延長効果がある<sup>10)</sup>ことも示されており、*p*-HAP添加酵母の寿命に与える影響について今後検討が必要となる。しかしながら本研究では、この中で特に酵母の酸化ストレスとプログラム細胞死を調節する役割を持つFMN オキシドレダクターゼであるNADPH dehydrogenaseの存在<sup>11)</sup>に着目し、*p*-HAP添加培地にNADP<sup>+</sup>を補充することによる酵母増殖能に与える影響を調べた。

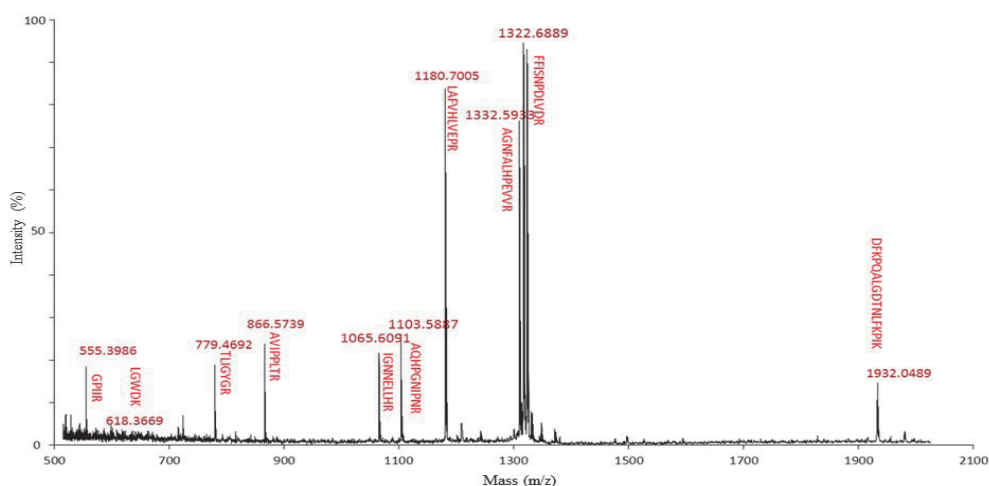
まず*p*-HAP添加による濃度依存的な酵母増殖抑制効果が確認された (Fig. 6)。その効果は*p*-HAP無添加群を100%とすると、12時間では、40.7% (30mM *p*-HAP添加群)、42.3% (15mM *p*-HAP添加群)、50.3% (7.5mM *p*-HAP添加群)、および75.2% (3.75mM *p*-HAP添加群)であった。25.5時間において、36.7% (30mM *p*-HAP添加群)、37.7% (15mM *p*-HAP添加群)、47.1% (7.5mM *p*-HAP添加群)、および89.4% (3.75mM *p*-HAP添加群)であった。そこで*p*-HAP添加による濃度依存的な酵母増殖抑制効果はNADPH dehydrogenaseが影響を受けるこ

**Table 1.** Identified mass peaks and their alignments of amino acid sequences of the NADPH dehydrogenase.

1	PFVKDFKPQ	ALGDTNLFKP	IKIGNNELH	RAVIPPLTR <sub>m</sub>	RAQHGPINPN
51	RDWAVEYYAQ	RAQRPGTLII	TEGTFPSPQS	GGYDNAPGIW	SEEQIKEWTK
101	IFKAIHENKS	FAWVQLWVLG	WAAFPDTLAR	DGLRYDSASD	NVYMNAEQEE
151	KAKKANNPQH	SITKDEIKQY	VKEYVQAAKN	SIAAGADGVE	IHSANGYLLN
201	QFLDPSNNR	TDEYGGSIEN	RARFTLEVVD	AVVDAIGPEK	VGLRLSPYGV
251	FNSMSGGAET	GIVAQYAYVL	GELERRAKAG	KRLAFVHLVE	PRVTNPFLTE
301	GEGEYNGGSN	KFAYSIWKGP	IIRAGNFALH	PEVVREEVKD	PRTLIGYGRF
351	FISNPDLVDR	LEKGLPLNKY	DRDTFYKMSA	EGYIDYPTYE	EALKLGWDKN

Measurement values (Da)	Theoretical values (Da)	Differences		Alignments of amino acid sequences
		(Da)	(ppm)	
1932.049	1932.059	-0.01	-4	DFKPQALGDTNLFKPIK
1322.689	1322.674	0.01	11	FFISNPDLVDR
1309.73	1309.701	0.	22	AGNFALHPEVVR
1180.701	1180.684	0.02	14	LAFVHLVEPR
1103.589	1103.57	0.02	17	AQHGPINPNR
1065.609	1065.58	0.03	27	IGNNELHR
866.574	866.546	0.03	32	AVIPPLTR
779.469	779.441	0.03	36	TLIGYGR
618.367	618.325	0.04	68	LGWDK
555.399	555.361	0.04	67	GPIIR



**Fig. 3.** Digested mass peaks and identified peptide sequences of the 44 kDa protein.

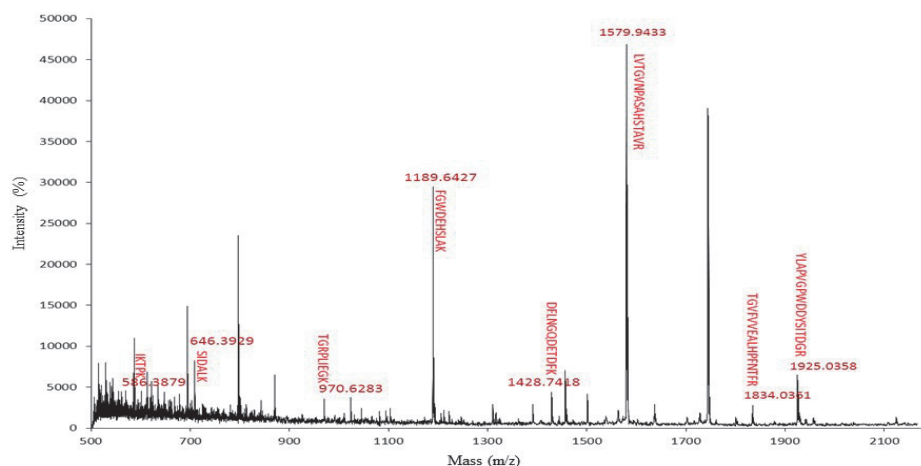
**Table 2.** Identified mass peaks and their alignments of amino acid sequences of the heat shock protein 31.

**Table 2.** Identified mass peaks and their alignments of amino acid sequences of the heat shock protein 31.

1	<u>MAPKKVLLAL</u>	TSYNDVFYSD	GAK <u>TGVFVVE</u>	<u>ALHPFNTFRK</u>	EGFEVDFVSE
51	<u>TGKFGWDEHS</u>	<u>LAKDFLNGQD</u>	<u>ETDFK</u> NKDS	FNKTLAK <u>IKT</u>	<u>PKEVNAD</u> DYQ
101	IFFASAGHGT	LFDYPKAKDL	QDIASEIYAN	GGVVAAVCHG	PAIFDGLTDK
151	<u>KTGRPLIEGK</u>	SITGFTDVGE	TILGVDSILK	AKNLATVEDV	AKKYGAK <u>YLA</u>
201	<u>PVGPWDDYSI</u>	<u>TDGRLVTGVN</u>	<u>PASAHSTAVR</u>	<u>SIDALK</u> N	

Measurement values (Da)	Theoretical values (Da)	Differences (Da)	(ppm)	Alignments of amino acid sequences
574.354	574.338	0.02	28	MAPKK
1834.036	1833.965	0.07	39	TGVFVVEALHPFNTFR
1189.643	1189.564	0.08	66	FGWDEHSLAK
1428.742	1428.628	0.11	80	DFLNGQDETD <del>FK</del>
586.388	586.392	0	-6	IKTPK
970.628	970.568	0.06	62	TGRPLIEGK
1925.036	1924.908	0.13	67	YLAPVGPWDDYSITDGR
1579.943	1579.855	0.09	56	LVTGVN <u>PASAHSTAVR</u>
646.393	646.377	0.02	24	SIDALK



**Fig. 4.** Digested mass peaks and identified peptide sequences of the 25 kDa protein.

**Table 3.** Identified mass peaks and their alignments of amino acid sequences of the nicotinamide.

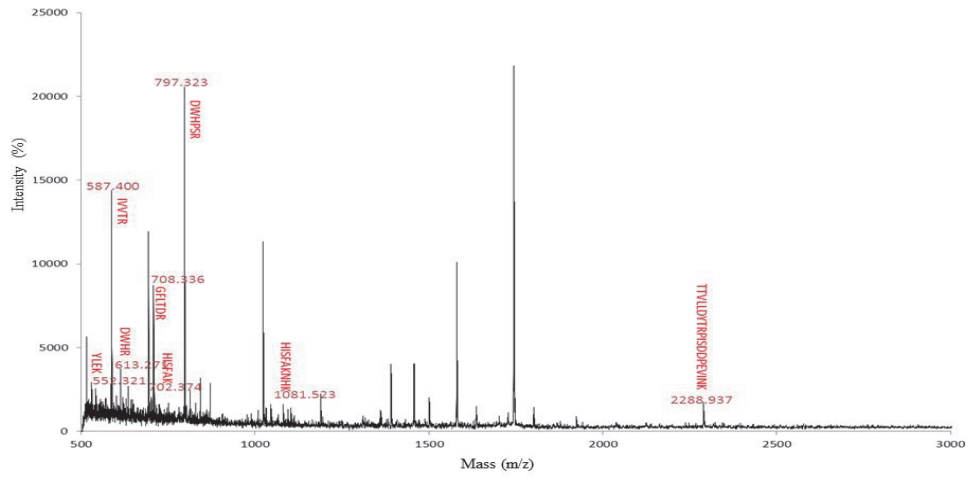
1	MKTLIVDMQ	NDFISPLGSL	TVPKGEELIN	PISDLMQDAD	<u>RDWHRIVVTR</u>
51	<u>DWHPSRHISF</u>	<u>AKNHK</u> DKEPY	STYTYHSPRP	GDDSTQEGIL	WPVHCVKNTW
101	GSQLVQIMD	QWTKHIKIV	DK <u>GFLTDR</u> EY	YSAFHIWNF	HK <u>TDMNKYLE</u>
151	<u>KHHTDEVYIV</u>	GVALEYCVKA	TAISAAELGY	<u>KTTVLLDYTR</u>	<u>PISDDPEVIN</u>
201	<u>KVKEELK</u> AHN	INVVDK			

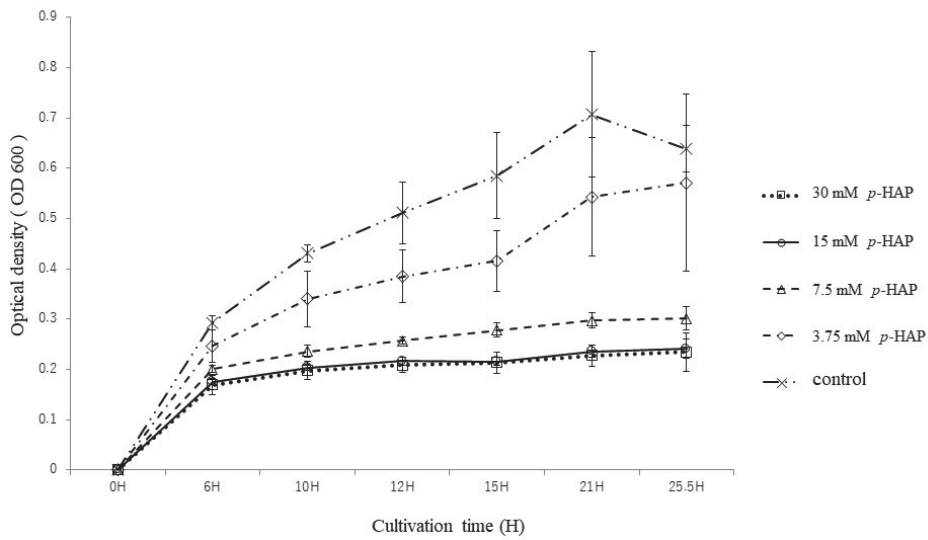
Measurement values (Da)	Theoretical values (Da)	Differences (Da)	(ppm)	Alignments of amino acid sequences
613.271	613.284	-0.01	-20	DWHR
587.4	587.388	0.01	22	IVVTR
797.323	797.369	-0.05	-57	DWHPSR
702.374	702.393	-0.02	-26	HISFAK
1081.523	1081.59	-0.07	-61	HISFAKNHK
708.336	708.368	-0.03	-43	GFLTDR
608.274	608.271	0	6	TDMNK
552.321	552.303	0.02	33	YLEK
2288.937	2289.197	-0.26	-113	TTVLLDYTRPISDDPEVINK

とが示唆されることから、NADP<sup>+</sup>の添加により酵母増殖抑制効果を改善できないのかを試みた。その結果15mM *p*-HAP 添加群に2.5mM NADP<sup>+</sup>、1.25mM NADP<sup>+</sup>、0.63mM NADP<sup>+</sup>を補助的に添加することにより濃度依存的に酵母増殖抑制から回復する効果を見出した (Fig. 7)。

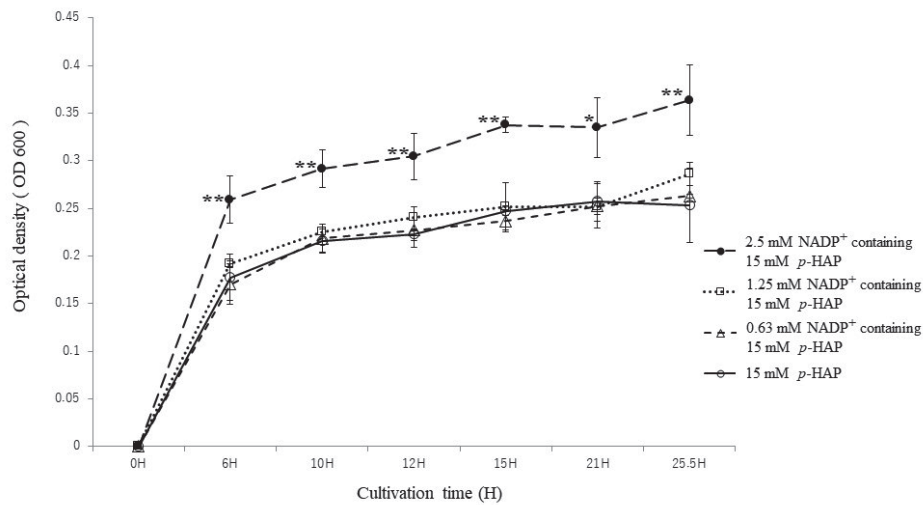
それらの効果は15mM *p*-HAP 無添加群を100%とすると、12時間では、136% (2.5mM NADP<sup>+</sup>、15mM *p*-HAP 添加群)、107% (1.25mM NADP<sup>+</sup>、15mM *p*-HAP 添加群) および102% (0.63mM NADP<sup>+</sup>、15mM *p*-HAP 添加群) であった。25.5時間においては、143% (2.5mM NADP<sup>+</sup>、



**Fig. 5.** Digested mass peaks and identified peptide sequences of the 22 kDa protein.



**Fig. 6.** Exponential growth curves for *the S. cerevisiae*. The cells were grown in Y-lmedia in the absence ( $\times$ ) and presence of four *p*-hydroxyacetophenone (*p*-HAP) concentrations (3.75mM- 30mM), respectively. Each point represents the mean of at three determinations. Error bars are SD.



**Fig. 7.** Exponential growth curves for *the S. cerevisiae*. The cells were grown in Y-lmedia in the absence ( $\circ$ ) and presence of three  $\text{NADP}^+$  concentrations (0.63mM- 2.5mM) containing 15 mM *p*-hydroxyacetophenone (*p*-HAP), respectively. Each point represents the mean of at three determinations. Error bars are SD. Significances ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , Scheffe's F test) are expressed as two asterisks or one asterisk.

15mM *p*-HAP 添加群), 113% (1.25mM NADP<sup>+</sup>, 15mM *p*-HAP 添加群) および 104% (0.63mM NADP<sup>+</sup>, 15mM *p*-HAP 添加群) であった。以上のことから 2.5mM NADP<sup>+</sup>, 15mM *p*-HAP 添加群では全ての測定時間において 15mM *p*-HAP 添加群に対する有意差 ( $p < 0.01$  または  $p < 0.05$ ) が確認できたため, NADP<sup>+</sup> の補助的添加による *p*-HAP 添加群酵母の部分的な増殖抑制回復効果が期待される。

最後にさらなる *p*-HAP 添加酵母増殖抑制状態からの回復のため, *p*-HAP 親和性タンパク質である HSP31 および Nicotinamidase にも焦点をあてることにより *p*-HAP 抗真菌作用点について解明を進めたいと考えている。

### 利益相反

本論文の発表に関して, 申告すべき COI 状態にはない。

### 文 献

- 1) Rojas-Jiménez S, Pérez-Gutiérrez MS, Sánchez-Mendoza E, Martínez-Casares RM, Campos-Xolalpa N, Valladares-Cisneros MG, Salinas-Sánchez DO (2022) Anti-inflammatory activity of 3, 5-diprenyl-4-hydroxyacetophenone isolated from *Ageratina pascuarensis*. *Int J Mol Sci* 23(23): 15012.
- 2) Kinjo Y, Takahashi M, Hirose N, Mizu M, Hou DX, Wada K (2019) Anti-stress and antioxidant effects of non centrifuged Cane Sugar, Kokuto, in restraint-stressed mice. *J Oleo Sci* 68(2): 183-191.
- 3) 青山政和, 森満範, 奥村真由己, 土居修一, 姉帯正樹 (1997) 2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシアセトフェノンとその関連化合物の抗真菌活性. 北海道立林産試験場報 11 (3) : 15-18.
- 4) Borole AP, Mielenz JR, Vishnivetskaya TA, Hamilton CY (2009) Controlling accumulation of fermentation inhibitors in biorefinery recycle water using microbial fuel cells. *Biotechnol Biofuels* 2(1): 7.
- 5) 柏木 享 (2002) 桜の花から分離した酵母による清酒の商品化. 日本醸造協会誌 97 (1) : 2-6.
- 6) Ghenbot G, Weiner H (1992) Purification of liver aldehyde dehydrogenase by *p*-hydroxyacetophenone-sepharose affinity matrix and the coelution of chloramphenicol acetyl transferase from the same matrix with recombinantly expressed aldehyde dehydrogenase. *Protein Expression and Purification* 3: 470-478.
- 7) Negoro M, Sawano M, Sawamura H, Ebara S, Watanabe T (2012) Analysis of glucose-protein interaction using *p*-hydroxyacetophenone-sepharose affinity resin. - Glucose decreases alcohol dehydrogenase activity in vitro -. *J Electrophoresis* 56: 19-26.
- 8) 田部 一史, 大塚 健三 (2004) MALDI-TOF-MS による Peptide Mass Fingerprint 解析法. 中部大学応用生物学部紀要 3 : 1-3.
- 9) Tsai CJ, Aslam K, Drendel HM, Asiago JM, Goode KM, Paul LN, Rochet JC, Hazbun TR (2015) Hsp31 is a stress response chaperone that intervenes in the protein misfolding process. *J Biol Chem* 290(41): 24816-24834.
- 10) Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423(6936): 181-185.
- 11) Odat O, Matta S, Khalil H, Kampranis SC, Pfau R, Tsihchlis PN, Makris AM (2007) Old yellow enzymes, highly homologous FMN oxidoreductases with modulating roles in oxidative stress and programmed cell death in yeast. *J Biol Chem* 282(49): 36010-36023.