

【トピックス】

青ジソに含まれる Nrf2-ARE 経路活性化物質の単離

久米 利明

京都大学 大学院薬学研究科 薬品作用解析学分野

キーワード：Oxidative stress, Nrf2-ARE pathway, Chalcone, Green perilla, antioxidant enzyme

1. はじめに

哺乳類を含む多くの生物は呼吸により体内に酸素を取り入れて利用することで生命を維持している。生命維持に必須である酸素は一定の割合で不安定で様々な物質と反応しやすい活性酸素種に変化する。そのため生体内では活性酸素種を消去・軽減する能力を有しているが、活性酸素種が大量に発生してそのバランスが崩れると生体内分子を攻撃する酸化ストレスに陥る。活性酸素種により攻撃を受けた生体内分子は酸化され、その機能が損なわれる。したがって、過度な酸化ストレスの抑制は健康な生命活動の維持に重要である。近年、老化や発がん、メタボリックシンドローム、動脈硬化、心筋梗塞、神経疾患など様々な疾患の病態形成の一因として酸化スト

レスが関与するという報告が蓄積されてきている [1-6]。また疫学調査により果物や野菜の摂取がこれらの疾患への予防効果が期待できることが示唆されている。本稿では、身近な野菜や果物に着目し生体内抗酸化機能の亢進に有効な新規成分の探索を行い、我々が青ジソより発見した 2,3'-dihydroxy-4,6'-dimethoxychalcone (DDC) について紹介する [7]。

2. Nrf2-ARE 経路

生体を酸化ストレスから防御するには、活性酸素種と直接反応し除去できる抗酸化物質を大量に摂取する方法と生体内の抗酸化酵素の発現を上昇させる方法が挙げられる。しかしながら、前者の抗酸化物質の生体内濃度を

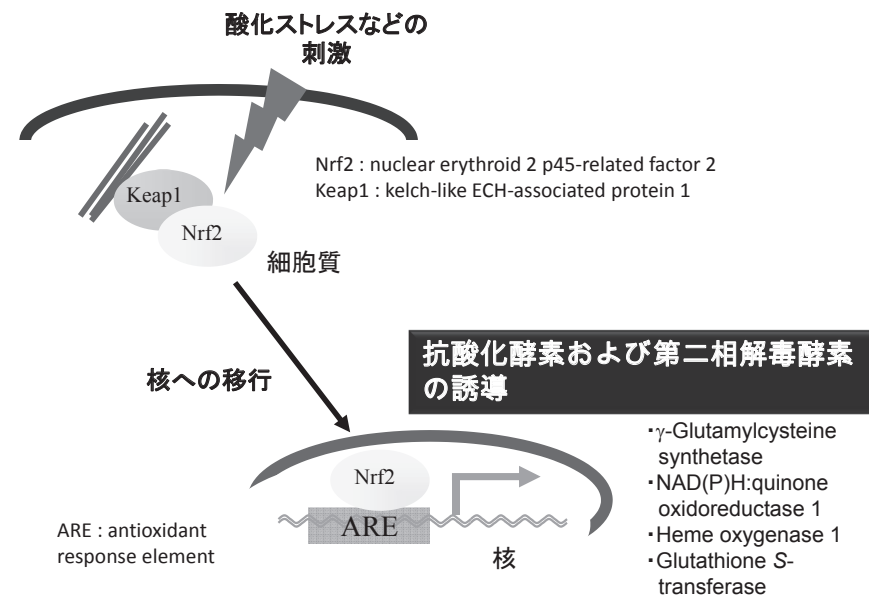


図1 Nrf2-ARE 経路

連絡先：〒 606-8501
京都市左京区吉田下阿達町 46-29
TEL：075-753-4576
FAX：075-753-4579
E-mail：tkume@pharm.kyoto-u.ac.jp

高く維持し続けることは非常に難しい。後者の抗酸化酵素を発現誘導する生体内抗酸化システムの一つとして NF-E2 related factor 2 - antioxidant response element (Nrf2-ARE) 経路が知られている (図1)。転写因子である Nrf2 は通常 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合し細胞質に留められているが、生体が

酸化ストレスを受けることにより核内に移行し遺伝子の
上流に存在する ARE 配列に結合することで、グルタチ
オンペルオキシダーゼ、ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1)、
カタラーゼなどの抗酸化酵素や NAD (P) H キノンオ
キシドレダクターゼ 1 (NQO1) などの第二相薬物代謝
酵素の発現を誘導する [8]。この Nrf2-ARE 経路を低分
子量化合物で活性化できれば、生体は酸化ストレスに対
して抵抗性を獲得した状態を維持できると考えられる。

3. 野菜・果物抽出物による Nrf2-ARE 経路活性化作用

野菜や果物の摂取により酸化ストレスが関与する疾患
に対する予防効果が期待できることが知られているの
で、身近な食品として野菜と果物に注目した。果物とし
てピーチ、りんご、ストロベリー、クランベリー、ラズ
ベリー、温州みかんを、野菜として青ジソ、モロヘイ
ヤ、春菊、セロリ、パセリ、赤ジソを選択した。これら
の野菜・果物をジエチルエーテルにより抽出し、各抽出
物の Nrf2-ARE 経路の活性化作用について PC12 細胞を
用いて検討した。その結果、クランベリー抽出物と青ジ
ソ抽出物が強力な ARE 活性の上昇を誘導したが、青ジ
ソ抽出物が最も顕著な ARE 活性化作用を発現した。同
濃度のクランベリー抽出物および青ジソ抽出物を 48 時
間 PC12 細胞に処置したところ、クランベリー抽出物は
顕著な細胞毒性を発現した。したがって、抽出物の更なる
精製は青ジソ抽出物を用いることとした。

4. 青ジソ抽出物由来 Nrf2-ARE 活性化フラクション の同定

青ジソのジエチルエーテル抽出物中から Nrf2-ARE 経
路活性化物質の単離・精製を以下の手順で行った。まず、
シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離
である。そのうち活性を有する画分を逆相 HPLC に供
した。最後に、水/アセトニトリル混合液によるアイソ
クラティック溶出を用いた HPLC を用いて分離を行い、
その後活性測定を行うことにより活性フラクションを得
た。また、ジエチルエーテルでの抽出を行った際の水相
を同じく逆相 HPLC を用いて分離した後活性測定を行っ
たが、水相には活性のあるフラクションは存在しなかつ
た。

5. 青ジソ抽出物由来 Nrf2-ARE 経路活性化物質の構 造決定

複数回の HPLC を用いて分離を行い、得られた画分
の活性を測定することで同定された活性フラクションを
薄層クロマトグラフィーに供すると単スポットとして
検出された。この分離方法によって、100 g の青ジソの
生葉から 11 mg の活性物質を得た。精密質量分析を行
い、その化学式が $C_{17}H_{16}O_5$ であることが明らかとなつた。
さらに化学構造を明らかにするために、核磁気共鳴によ
る構造解析を行ったところ、活性成分は 2,3'-dihydroxy-
4',6'-dimethoxychalcone (DDC) であることが明らかと
なつた (図 2)。DDC は熱帯に生息するバンレイシ科の
植物である *Uvaria dulcis* Dunal の葉から発見されたカ

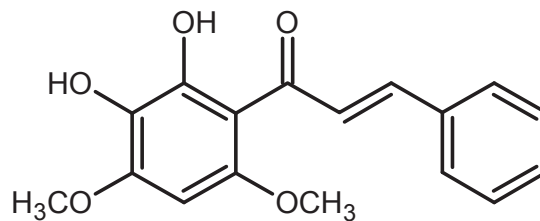


図 2 2',3'-Dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone の
化学構造

ルコンを基本骨格に持つ化合物である [9]。カルコンは
フラボノイドファミリーに属する芳香族エノンであり、
フラボンの前駆体となる。これまでに、多くのカルコ
ン誘導体が植物から発見されており [10]、抗炎症作用や
抗酸化作用などを有することが報告されている [11,12]。
しかし、青ジソに DDC が含まれるということ、および
DDC の薬理作用に関する報告はこれまでになく、我々
の報告 [7] が青ジソにおける含有と Nrf2-ARE 経路の活
性化を明らかにした初めての報告となった。

6. 合成 DDC による Nrf2-ARE 経路活性化と抗酸化 酵素の発現上昇

DDC は 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyacetophenone と
trans-cinnamoyl chloride から Friedel-Crafts 反応により
合成した [13]。化学合成した DDC は PC12 細胞におい
て ARE 活性化を誘導した。DDC による ARE 経路活性
化は濃度依存的であり、かつ 9 ~ 12 時間をピークとし
た一過性に引き起こされた。また、DDC は 30 μ M 未
満の濃度において 48 時間処置においても細胞毒性は示
さなかった。一般に ARE の活性化には Nrf2 による結
合が重要な役割を果たす。そこで DDC による ARE 活
性化における Nrf2 の関与を明らかにするために、Nrf2
の siRNA を用いて検討を行った。PC12 細胞に Nrf2 の
siRNA を処置したところ Nrf2 の発現は部分的に抑制さ
れた。さらに DDC による ARE 活性化も部分的に抑制
された。これらの結果より DDC による ARE の活性化
には Nrf2 が重要な役割を果たしており、DDC は Nrf2-
ARE 経路を活性化させることが明らかとなった。

Nrf2-ARE 経路はグルタチオン合成の律速酵素である
 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) や NQO1、
HO-1 の誘導に重要な役割を果たすことが知られている。
DDC によるこれらの酵素誘導について PC12 細胞を用
いて検討した。DDC を 24 時間処置したところ γ -GCS
のタンパク量、還元型グルタチオン量、NQO1 活性およ
び HO-1 のタンパク量が増加した。

7. 酸化ストレスによる細胞死に対する DDC による細 胞保護作用

6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) は酸化ストレス
を誘発して細胞死を誘導するためにヒト神経芽腫 SH-
SY5Y 細胞や PC12 細胞を含む多くの細胞種において広
く使用されている [14-16]。酸化ストレスに対する DDC
の作用を検討するために、PC12 細胞を用いて 6-OHDA

誘発細胞毒性に対する作用を検討した。DDC を 24 時間前処置した後に 6-OHDA を 24 時間処置し、細胞生存率を評価したところ、DDC により濃度依存的な細胞保護作用が観察された。さらに細胞内の活性酸素種量を測定したところ、DDC の前処置により 6-OHDA により誘発される細胞内の活性酸素種量の増加が有意に抑制された。

8. 終わりに

青ジソ抽出物より単離した DDC は、生体内抗酸化システムである Nrf2-ARE 経路を活性化することにより抗酸化酵素の誘導を引き起こし、生体内で生じる酸化ストレスに対し細胞保護作用を示すことが示唆された。Nrf2 ノックアウトマウスが wild-type と比較して酸化ストレスに対し脆弱であるという報告 [17,18] や、ガン細胞において Nrf2 の発現が低下しているという報告 [19,20] があることから、Nrf2-ARE 経路を介する抗酸化酵素の誘導不全は様々な疾患の増悪因子となり得ることが示唆されている。したがって、DDC のような生体内抗酸化システムを活性化するフィトケミカルの摂取は、生体内の抗酸化力を高めることで、アンチエイジング効果に加えて酸化ストレスが関与する疾患の予防や進行の緩徐化につながることを期待される。高齢化社会が急速に進行し加齢性疾患の増加がますます見込まれる我が国において、抗酸化酵素誘導による疾患予防が重要な戦略の一つとして重要になってくると考えられる。

参考文献

- 1) Diaz, M.N. et al., *N. Engl.J.Med.*, 337, 408-416 (1997)
- 2) Giasson, B.I. et al., *Free Radic.Biol.Med* 32, 1264-1275 (2002)
- 3) Klaunig, J.E. et al., *Annu. Rev.Pharmacol.Toxicol.* 44, 239-267 (2004)
- 4) Olinski, R. et al., *Acta Biochim.Pol* 54, 11-26 (2007)
- 5) Massy, Z.A. et al., *Semin. Dial* 22, 405-408 (2009)
- 6) Roberts, C.K. et al., *Life Sci.* 84, 705-712 (2009)
- 7) Izumi, Y. et al., *Free Radic.Biol.Med* 53, 669-679 (2012)
- 8) Motohashi, H. et al., *Trends Mol.Med* 10, 549-557 (2004)
- 9) Yamamoto, N. et al., *J. Biol. Chem* 282, 4364-4372 (2007)
- 10) Izumi, Y. et al., *J. Neurosci. Res.* 79, 849-860 (2005)
- 11) Yamamoto, N. et al., *J. Neurosci. Res* 88, 1934-1942 (2010)
- 12) Chantrapromma, K. et al., *Phytochemistry.* 53, 511-513 (2000)
- 13) Ichino, K. et al., *J. Nat.Prod.* 51, 906-914 (1988)
- 14) Yadav, V.R. et al., *Int Immunopharmacol.* 11, 295-309 (2011)
- 15) Hsieh, H.K. et al., *Pharm Res.* 15, 39-46 (1998)
- 16) Herencia, F. et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 8, 1169-1174 (1988)
- 17) Jakel R.J. et al., *Brain Res.* 1144, 192-201 (2007)
- 18) Chen P.C. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 2933-2938 (2009)
- 19) Xu C. et al., *Cancer Res.* 66, 293-296 (2006)
- 20) Frohlich D.A. et al., *Oncogene.* 27, 4353-4562 (2008)