

# ショウガ成分誘導体の抗酸化作用と遺伝子発現誘導作用

同志社大学工学部（前・東京大学先端科学技術研究センター）

野口 範子

Ginger is the rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe, a plant cultivated in tropical and subtropical countries. Ginger extract contains many kinds of constituents, such as gingerol, shogaol, and gingediol, responsible for the pungent taste of ginger and has been known to possess a variety of pharmaceutical effects. The present study was conducted to evaluate antioxidant activities of some of ginger constituents and their synthetic derivatives (thirteen compounds) and to find out novel functions of these compounds in cell. All phenolic compounds inhibited lipid peroxidation of methyl linoleate and low density lipoprotein (LDL). A hydrophilic group at the end of side chain decreased antioxidant activity in LDL. The compounds with longer side chain showed stronger antioxidant activity. A global study of gene expression using DNA microarray in endothelial cell exposed to ginger-related compounds revealed that compounds having  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl, eg. shogaol, strongly induced expression of genes which were regulated by Keap-1/Nrf2/ARE pathway. The side chain effects on gene expression was not as large as observed in antioxidant activity. Nrf2-regulated genes encode cytoprotective proteins against oxidative stress, which may explain a part of pharmaceutical effects of ginger extract.

## 1. 緒言

ショウガはインドや東南アジア原産の宿根草で、古来より漢方の多くの処方に配合されている。ショウガには「生姜」と「乾姜」があり、それぞれ薬効に違いがあるとされ、使い分けられている。日本では古くから、調味や薬味として親しまれているが、日本で用いられている「生姜」は厳密には「乾生姜」に相当する。本稿ではこれらすべてを含めショウガと総称することとする。

ショウガには解毒や解熱作用があり、頭痛や咳、痰、鼻づまりなど風邪の諸症状を緩和したり、胃痛、腹痛、嘔気を鎮めるなど多岐にわたる効能が知られ、薬理作用について詳細な研究がされている<sup>1)</sup>。さらに、肌の美白作用もあるとされコスメトロジーの分野においても非常に興味深い食材料である。ショウガの成分としては、精油や辛味成分が知られている。精油は食品や化粧品の香料としてよく用いられている。辛味成分としては gingerol 類、shogaol 類がある。本研究は後者の成分である gingerol 類、shogaol 類とその誘導体の抗酸化作用と血管内皮細胞に対する作用を明らかにすることを目的としておこなった。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

本研究に用いたショウガ成分の誘導体の化学構造式を



Activity of Shogaol Derivatives as Antioxidant and Gene Expression Regulator

Noriko Noguchi

RCAST, University of Tokyo  
(Faculty of Engineering, Doshisha University)

Fig. 1 に示した。これらの化合物は東亜合成株式会社より供与された。ヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) と培養液は Clonetics 社から購入した。DNA マイクロアレイ用の GeneChip, Human Genome Focus Array は Affymetrics 社から購入した。その他の試薬は和光純薬から購入した。

### 2.2 抗酸化作用の評価

ショウガ成分の誘導体の脂質酸化に対する抗酸化作用について、リノール酸メチルのアセトニトリル均一溶液中、リン脂質のリボソーム膜、そしてリポタンパク質の酸化に対して評価をおこなった。低比重リポタンパク質 (LDL) の精製、分析および解析は研究室の常法に従った<sup>2)</sup>。

### 2.3 内皮細胞における遺伝子発現の解析

HUVEC ( $1 \times 10^5$  cells) に対して、エタノールに溶解したカルボン酸型ショウガオール ([8]-Shogaol-COOH)、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol そして [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol を終濃度 5  $\mu$ M になるように添加し、6 時間後に細胞から RNA を回収して DNA マイクロアレイに供した<sup>3)</sup>。

### 2.4 Real-time PCR

ショウガ誘導体によって大きく誘導された遺伝子について、Real-Time PCR を用いて再現性の確認を行った。また、DNA マイクロアレイで検討した化合物以外のショウガ誘導体について、遺伝子誘導能を調べるために用いた<sup>4)</sup>。

### 2.5 Western blot

ショウガ誘導体を添加 6 時間後の細胞を溶解し、電気泳動をおこなった後、転写因子 Nrf2 に対する抗体 (Sant Cruz 社) を用いて Western blot を行った<sup>4)</sup>。

## 2.6 LDL 受容体欠損マウスへのショウガ成分投与

[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol、そして天然の [8]-Shogaol を 2% コレステロール負荷した基本食餌に 5% 重量で添加し、自発的摂取で 4 週間与えた。大動脈弁から腹部大動脈までを取り出し、ホルマリン固定後、オイルレッド染色を行った。

## 3. 結果

### 3.1 リノール酸メチルの酸化に対する抑制作用

生姜には [6]-gingerol や [8]-gingerol が多く含まれるが、乾燥度の増加や精製の過程で脱水がおこるとそれぞれに対応する [6]-shogaol や [8]-shogaol が 10 : 1 で回収されるようになる (Fig. 1)。本研究ではこれらの天然ショウガ成分の誘導体 3 種、[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol そして [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol を合成し、これらのリノール酸メチルのアセトニトリル均一溶液中におけるラジカル酸化に対する抗酸化作用の評価を行なった。ラジカル捕捉型抗

酸化物質の代表のひとつである  $\alpha$ -トコフェロールを対照とした。リノール酸メチルはラジカル開始剤から放出されるラジカルにより酸化し、234nm に吸収をもつ酸化生成物を与える (Fig. 2, none)。 $\alpha$ -トコフェロールはその高いラジカル捕捉能によって酸化を効率よく抑制し、 $\alpha$ -トコフェロールが消費されると抗酸化物がないときと同じ酸化速度にもどる。これに対して、3 種類のショウガ成分誘導体は酸化を抑制するがその抑制能は小さかった。また、3 種間に酸化抑制作用に大きな差は認められなかった。

### 3.2 LDL の酸化に対する抑制作用

酸化 LDL は動脈硬化の主要な危険因子である。LDL の脂溶性ラジカル開始剤による酸化に対する 3 種ショウガ成分誘導体の抗酸化作用を調べた。均一溶液中での脂質酸化とは異なり、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol と [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol は強い抗酸化作用を示した (Fig. 3)。これに対して、[8]-Shogaol-COOH も酸化を抑制したが、その作用は他の

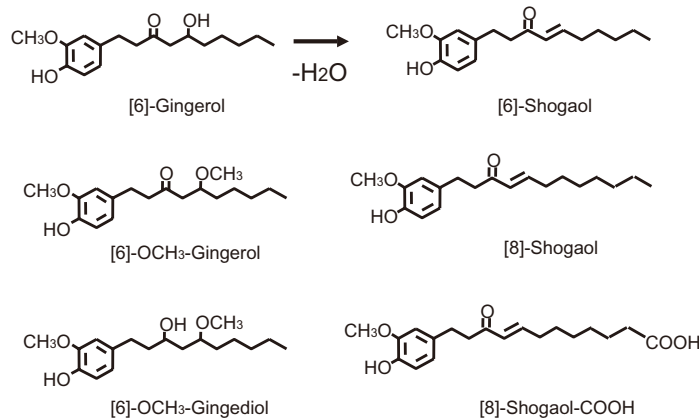


Fig.1 Chemical structure of constituents in ginger extract and their synthetic derivatives

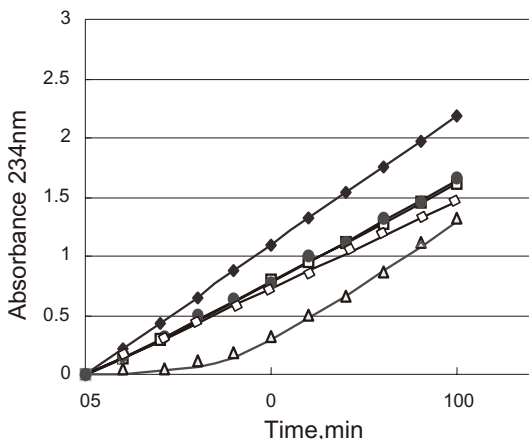


Fig.2 Antioxidant effect of [8]-Shogaol-COOH, [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol, and [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol on oxidation of methyl linoleate. Increase in absorption at 234 nm in the oxidation of methyl linoleate (15mM) induced by 0.5mM AMVN in acetonitrile at 37 °C .  
 ◆ : control; △ : 1  $\mu$ M  $\alpha$ tocopherol; ◇ : 5  $\mu$ M [8]-Shogaol-COOH;  
 ● : 5  $\mu$ M [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol; □ : 5  $\mu$ M [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol

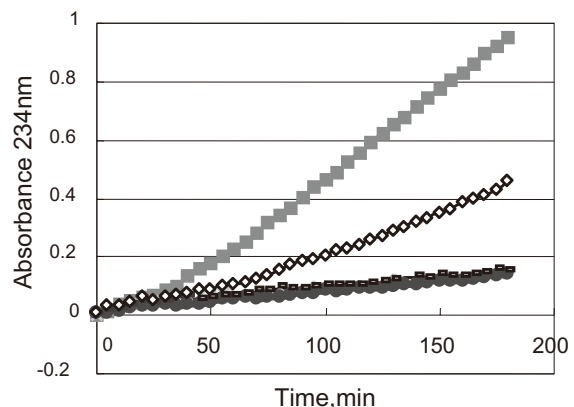


Fig.3 Antioxidant effect of [8]-Shogaol-COOH, [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol, and [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol on LDL oxidation. Increase in absorption at 234nm in the oxidation of LDL (0.1 mg/ml) induced by 0.4mM AMVN in PBS (pH7.4) at 37 °C .  
 ■ : control; ◇ : 5  $\mu$ M [8]-Shogaol-COOH; ● : 5  $\mu$ M [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol; □ : 5  $\mu$ M [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol

2種よりも劣っていた。[8]-Shogaol-COOHと[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediolおよび[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolとの化学構造の違いは側鎖にある。そこで、Fig. 4Aに示すようにGingediolの側鎖に修飾を加えた化合物を合成し、側鎖の化学構造のちがいがLDLの酸化に対する抑制効果に及ぼす影響を検討した。その結果、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolの側鎖末端に-OH基をつけると([6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol-OH)、抗酸化効果が大きく低下することがわかった(Fig. 4B)。しかし、同じく末端に-OH基をもつが炭素鎖の長さをのばすと([8]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol-OH)、抗酸化効果は[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol-OHよりも優れ、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolに近づいた。

フェノール性の抗酸化物の抗酸化活性部位は、通常フェノール基(ベンゼン冠の-OH基)にあるが、ショウガ成分誘導体についてこの点を確認するためにPhenyl-[8]-Shogaol-COOHを合成し、LDLの酸化に対する抑制作用を調べた(Fig. 5A)。Phenyl-[8]-Shogaol-COOHはLDLの酸化をほとんどまったく抑制しなかった(Fig. 5B)。

### 3.3 血管内皮細胞の遺伝子発現誘導に及ぼす化学構造

ショウガ成分の誘導体の血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析するために、ヒト遺伝子約一万個に対するプローブを搭載したGeneChipを用いて[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediolそして[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolによる遺伝子発現誘導を調べた(Table 1)。その結果、非常に興味深いことに、[8]-Shogaol-COOHのみが遺伝子発現を大きく誘導することがわかった。[8]-Shogaol-COOHによって誘導される遺伝子の上位は、

転写因子Nrf2によって制御されることが知られている遺伝子によって占められていた。これらの遺伝子発現に[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediolや[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolは全く影響を及ぼさなかった。

GeneChipで得られた結果についてその再現性をreal time PCRによって確認するとともに、Fig. 6Aに示した他の誘導体を用いて比較することにより、遺伝子発現を決定する化学構造を求めた。もっとも強く誘導されたhemeoxygenase-1(HO-1)は、[8]-Shogaol-COOHによって誘導されるが[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolでは誘導されないことがreal time PCRによる解析においても確認された(Fig. 6B)。[8]-Shogaol-COOHと[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediolまたは[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerolの化学構造上の違いは、[8]-Shogaol-COOHの側鎖にあるα,β-不飽和カルボニルであることに着目し、この部分がKeto型、そしてEnol型の化合物を用いてHO-1の誘導能を調べた(Fig. 6B)。Keto型およびEnol型shogaolはいずれもHO-1の誘導をおこなさなかった。抗酸化能に影響を与えた側鎖末端の修飾基やフェノール基のHO-1誘導能に及ぼす影響について検討をおこなったところ(Fig. 6C)、[8]-Shogaol-COOHの末端のカルボキシル基に換わって、ヒドロキシル基(-OH)をもつ[8]-Shogaol-OHのHO-1誘導能は[8]-Shogaol-COOHと差はなかったが、エステル基をもつ[8]-Shogaol-CooEtはHO-1を誘導するもののその誘導能は[8]-Shogaol-COOHに比べて小さかった。抗酸化能がまったくないPhenyl-[8]-Shogaol-COOHはHO-1誘導能をもつがその作用は[8]-Shogaol-COOHに比較して小さかった。また、比較のために天然のショウガ成分

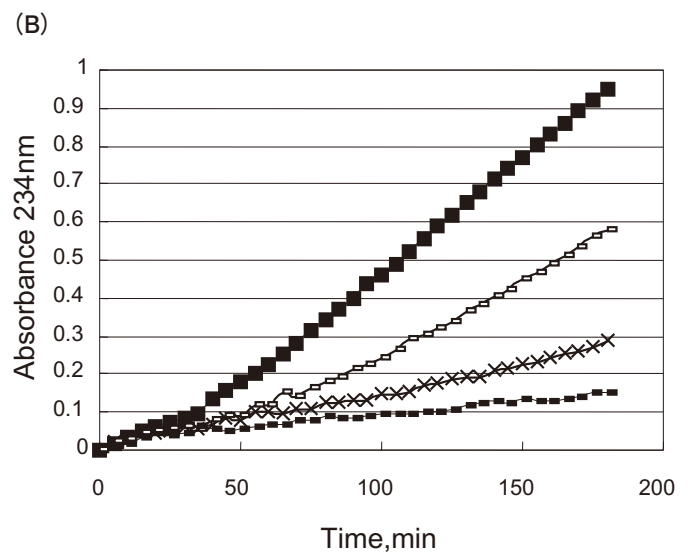
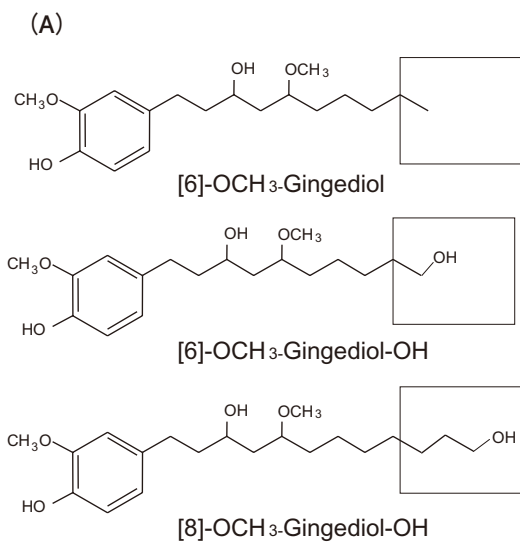


Fig.4 Effects of side chain on LDL oxidation  
(A) Chemical structure of compounds studied.

(B) Increase in absorption at 234 nm in the oxidation of LDL (0.1 mg/ml) induced by 0.4 mM AMVN in PBS (pH7.4) at 37 °C .

■ :control; ■ :5 μM [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol; □ : 5μM: [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol-OH; X: 5μM [8]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol-OH

である [6]-Shogaol や [8]-Shogaol の HO-1 誘導作用を分析したところ、[8]-Shogaol は [8]-Shogaol-COOH とほぼ同等の誘導を示したが、[6]-Shogaol の誘導能は小さかった。

### 3.4 LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化巣形成に対するショウガ成分の影響

今回の投与期間（4週間）ではいずれの化合物も顕著な動脈硬化抑制作用を示さなかった。投与期間を延長するなど、実験方法を再検討する必要があると考えられた。

## 4. 考察

ショウガには古くから様々な効果をもつ成分が含まれていることが知られていたが、その作用メカニズムに関しては明らかでない部分も多かった。本研究では、ショウガの成分のなかで shogaol や gingerol がフェノール基をもつこ

とに注目し、これらのラジカル捕捉型抗酸化物質としての作用について研究を行なった。天然の化合物に加え、化学構造の一部がわずかに異なる種々の誘導体を合成し、その作用を比較検討することにより、抗酸化作用に影響を与える分子内構造を特定することができた。

[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol そして [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol の3種のショウガ成分誘導体は均一溶液中における脂質酸化に対してはほとんど同じ抗酸化作用を示した。これは均一溶液中では側鎖のちがいによる化合物の動きに差がないためと考えられる。

これに対し、LDLの酸化においては側鎖の影響が強く現れた。側鎖の末端に親水性の高いカルボキシル基をもつ [8]-Shogaol-COOH は [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol や [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingerol よりも抗酸化作用は劣ることが明らかとなったが、これは脂質と蛋白質の球状複合体である LDL 内へ

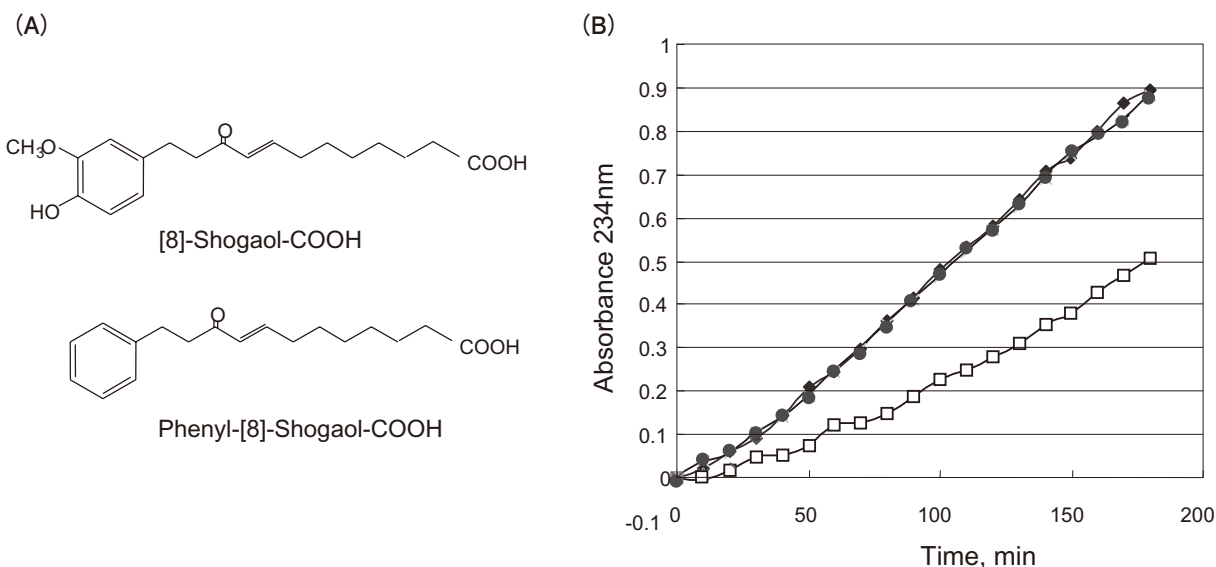


Fig.5 Effects of phenol group on LDL oxidation

(A) Chemical structure of compounds studied.

(B) Increase in absorption at 234nm in the oxidation of LDL (0.1 mg/ml) induced by 0.4mM AMVN in PBS (pH7.4) at 37°C.

◆ :control; □ : 5 μM [8]-Shogaol-COOH; ● : 5 μM Phenyl-[8]-Shogaol-COOH

Table1 Gene expression in endothelial cell induced by shogaol derivatives

Gene Name		none	Shogaol-COOH	OCH <sub>3</sub> -Gingediol	OCH <sub>3</sub> -Gingerol
hemeoxygenase 1	HO-1	161	1959	188	178
tripartite motif-containing 16	TRIM16	123	681	152	120
sequestosome 1	SQSTM1	61	219	73	75
glutamate-cysteinylgase, modifier subunit	GCLM	223	753	283	213
solute carrier family7, member 11	SLC7A11	608	1635	726	642
solute carrier family 3, member 2	SLC3A2	229	466	256	254

の侵入、分布が親水性の高いカルボキシルによって妨げられたためと考えられる<sup>5)</sup>。この効果は側鎖中央部がまったく同じで末端のヒドロキシル基の有無のみが異なる [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol と [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol-OH の比較により明確に示されたといえる (Fig. 4)。LDL の抗酸化作用に影響を与えるのは側鎖末端だけではなく、側鎖の炭素鎖の

長さも重要であることがわかった。炭素数を2つ増やして炭素鎖を長くした [8]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol-OH は末端に -OH 基があるにもかかわらず抗酸化効果は [6]-OCH<sub>3</sub>-Gingediol にかなり近づいたことから明らかである。

フェノール系抗酸化物質の抗酸化活性はラジカルへのフェノール基からの電子、水素の供与であると考えられ

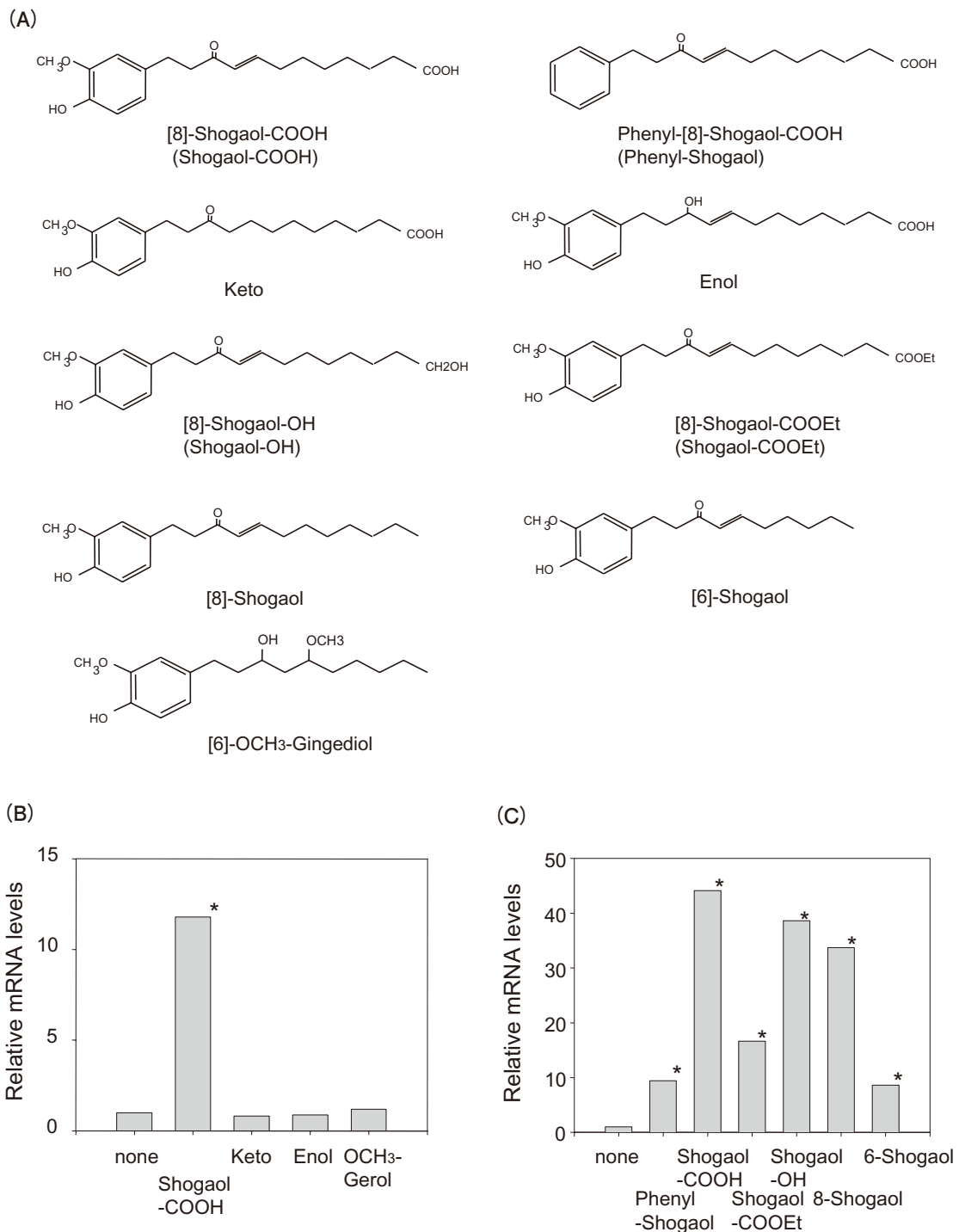


Fig.6 Induction of hemeoxygenase-1 (HO-1) by shogaol derivatives in endothelial cell.

(A) Chemical structure of compounds studied.

(B), (C) Relative mRNA levels of HO-1 were measured by real-time PCR. \*p<0.01

るため<sup>2)</sup>、[8]-Shogaol-COOHのベンゼン環の置換基がすべてメチル基である Phenyl-[8]-Shogaol-COOHは予想どおり LDLの酸化を全く抑制しなかった。また、[8]-Shogaol-COOHの置換基を2つの -OCH<sub>3</sub>に変えた化合物も同様に抗酸化作用をもたなかった (data not shown)。

ショウガ成分とその誘導体による内皮細胞の遺伝子発現誘導能の網羅的解析によって、転写因子の一つである Nrf2 が制御する遺伝子群が数多く誘導されることが示された<sup>4,6,7)</sup>。さらにある特定の化学構造がこの遺伝子発現を厳密に規定していることが、種々の誘導体の遺伝子発現能を比較することにより明らかとなった。その構造はショウガ成分類の側鎖にある  $\alpha$ -、 $\beta$ -不飽和カルボニルであった。

Nrf2は合成されると、細胞質に存在する蛋白質 Keap-1と結合し、Keap-1のユビキチン化酵素作用によりユビキチン化されプロテアソームによって速やかに分解される<sup>8,9)</sup>。ところが、親電子性の化合物やラジカル性の活性酸素が細胞内に増加すると Keap-1分子内の2つの -SHが酸化され、-S-S-結合が生じたり、あるいは化合物(X)自体が結合して架橋構造をとり (-S-X-S-)、Keap-1の構造変化がおこるため Nrf2は Keap-1から解離する<sup>10)</sup>。解離した Nrf2は核内に移行して遺伝子のプロモーター領域の antioxidant response element (ARE) 配列に結合し転写活性を促す。Table 1に示したショウガ成分類によって発現誘導された遺伝子はすべてそのプロモーター領域に ARE 配列があることが知られている。これらの遺伝子にコードされる蛋白質は細胞内を還元状態に保ち、酸化ストレスから細胞を防御する機能をもつ。また、解毒機構の第二相の酵素も同じく Nrf2/ARE 制御下にあることがわかっている。ショウガの効能のいくつかは  $\alpha$ -、 $\beta$ -不飽和カルボニル構造によるこれらの遺伝子誘導にその作用機序を求めると考えられる。

本研究により、ショウガ成分およびその誘導体の脂質や LDLの酸化に対する抗酸化作用に影響する化学構造と、遺伝子発現に影響する化学構造がそれぞれ明確になった。また、ショウガ成分の細胞防御に関わる新規機能が明らかになった。

#### (引用文献)

- 1) 油田正樹：現代東洋医学，8, 45-50, 1987.
- 2) Noguch N, Iwaki Y, Takahashi M, et al.: 2,3-Dihydro-

5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-tert-butylbenzofuran: Design and evaluation as a novel radical-scavenging antioxidant against lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 342, 236-243, 1997.

- 3) Takabe W, Kanai Y, Chairoungdua A, et al.: Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24,1640-1645, 2004.
- 4) Warabi E, Wada Y, Kajiwara H, et al.: Effect on endothelial cell gene expression of shear stress, oxygen concentration, and low-density lipoprotein as studied by a novel flow cell culture system. *Free Radic. Biol. Med.* 37,682-694, 2004.
- 5) Gotoh N, Noguchi N, Tsuchiya J, et al.: Inhibition of oxidation of low density lipoprotein by vitamin E and related compounds. *Free Rad. Res.*, 24, 123-134, 1996.
- 6) Hosoya T, Maruyama A, Kang M-I, et al.: Differential responses of the Nrf2-Keap1 System to laminar and oscillatory shear stress in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 280, 27244-27250, 2005.
- 7) Chen X L, Varner S E, Rao A S, et al.: Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 703-711, 2003.
- 8) McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al.: Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 21592-21600, 2003.
- 9) Itoh K, Tong K I, Yamamoto M.: Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.* 36,1208-1213, 2004
- 10) Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw W D, et al.: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101,2040-2045, 2004.