

海洋性カロテノイドの酸化ストレス応答シグナルNrf2-AREシグナルを介したHO-1活性化による酸化ストレス軽減

国立沖縄工業高等専門学校生物資源工学科

平良 淳誠

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) binds to antioxidant response element (ARE) induce antioxidant and phase II detoxification enzymes, such as heme oxygenase-1 (HO-1) and glutathione s-transferase under oxidative stress due to chemicals and exposed to UV-irradiation. Fucoxanthin (FX) and its gastrointestinal metabolite fucoxanthinol (FXOH) are marine carotenoid from edible brown algae, such as *Undaria pinnatifida*, *Hijikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. In this study, the activation of compounds on Nrf2-ARE signaling in RAW 264.7 macrophage cells was examined using reporter assay. The compounds induced in low concentrations (2.5–10 μM) and the western blot analysis showed to Nrf2 transfer into nuclear, resulted in expression of HO-1 protein due to binding to ARE. Interestingly, apoptotic cells with caspase 3/7 activity in the presence of the compounds also activated the Nrf2-ARE signaling with HO-1 protein expression, which indicated anti-apoptotic activity for cell survival. In addition, the activity of FXOH was higher than that of FX as well as antioxidant action and anti-inflammatory effects will be bioavailable compound in a biological system.

1. 緒言

皮膚は紫外線や乾燥など、環境ストレスを受けやすい組織である。その環境ストレスの一つに、皮膚内で過剰に生じた活性酸素や窒素ラジカルによる酸化ストレスがある。皮膚の酸化ストレスは、細胞に障害を与えて生理機能の損失、皮膚組織の構造変化を引き起こし、皮膚のしみ、シワの要因をつくる。従来の研究では、抗酸化剤による酸化ストレス軽減を目的に行われ、植物抽出エキスやその活性成分による活性酸素消去作用を有する抗酸化剤の化粧品への開発が行われてきた¹⁻⁴⁾。生体には酸化ストレスに対する防御機構として、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキン等の抗酸化酵素がある。最近の研究で、Nrf2-Keap1 制御系による環境応答の制御機構転写因子Nrf2が、酸化ストレスに応答し、抗酸化応答配列(ARE)を介して一群の抗酸化及び薬剤耐性の遺伝子発現を活性化する酸化ストレス監視機構として働くことが明らかになった⁵⁾。皮膚においては、UVAによる皮膚障害の予防に、Nrf2-Keap1 制御系の応答によるNrf2が重要な役割を担っていることが、明らかとなった⁶⁾。

本研究では、著者がこれまでの研究で食歴のある安全性の高い植物から見出した抗酸化物質について、Nrf2-Keap1 制御系を指標に酸化ストレス軽減作用の評価を行い、有用な酸化ストレス軽減物質の検索を試みた。その

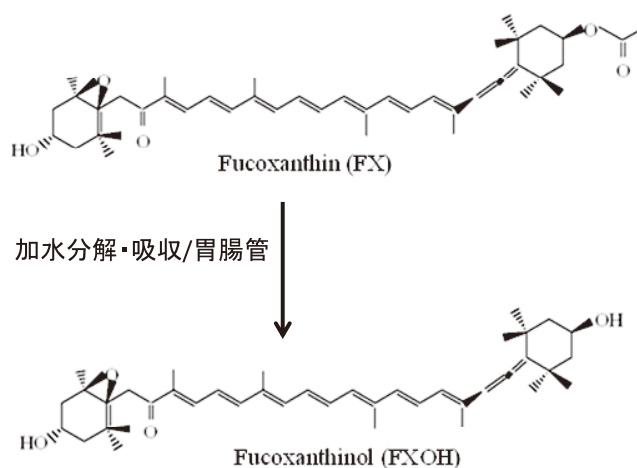


図1 Fucoxanthin (FX)とその代謝体 fucoxanthinol (FXOH)の化学構造

結果、モズクやワカメなどの褐藻類に含まれる海洋性カロテノイドのFucoxanthin (FX)とその胃腸管代謝物のFucoxanthinol (FXOH) (図1)⁷⁾にNrf2-AREシグナルを介したヘムオキシゲナーゼ1 (heme oxygenase-1: HO-1)の活性化作用による酸化ストレス軽減作用を明らかにした。評価物質のFXは化粧品素材として活用されている。本研究の結果は、今回評価した代謝体FXOHはFXよりも活性が高く作用機序が明確なことから、FXOHまたはFXとの併用による機能性化粧品の開発も期待できることを示唆した。

2. 実験

2.1. 細胞培養

RAW264.7細胞の培養

RAW264.7細胞はDMEM培地(10%牛胎児血清、500 U/ml ペニシリン、500 μg/ml ストレプトマイシン)で、37



Marine carotenoid reduces oxidative stress due to HO-1 expression through Nrf2-ARE signaling

Junsei Taira

Okinawa National College of Technology,
Department of Bioresource Technology

℃のCO₂ インキュベータ (5% CO₂) で培養した。

2. 2. Nrf2-ARE シグナルのレポーターアッセイ

RAW264.7 細胞のみ及び試験化合物添加の細胞を、12-well のマクロプレート (5×10⁵ cells/ml) で 24 時間培養した。試験化合物は最終濃度が 2.5、5、10 μM になるように添加した。培養細胞に FuGENE 6 を用いてプラスミド pGL4.37 [luc2P/ARE/Hygro] をトランスフェクションした。培養 24 時間後に PBS で 2 回洗浄した細胞を 100 μl の lysis バッファーで可溶化した。この可溶性細胞 (50 μl) に ルシフェリン (50 μl) を添加して、発光強度をマクロプレートのリーダーで測定した。また同試料のタンパク定量は BCA 法 (Thermo Fisher Scientific, Inc., IL) で行い、タンパク量当たりの比活性として示した。

2. 3. 細胞毒性試験

試験化合物の細胞毒性は MTT 法で測定した。レポーターアッセイで調製した培養細胞に、0.05% MTT 試薬を 500 μl 添加して、CO₂ インキュベータで 3 時間培養した。培養後に上清を完全に除去し、50 μl の DMSO でミトコンドリアによる MTT 還元物のホルマザンを抽出して、その UV 吸収波長 540 nm と対照波長 655 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (model 680XR, BIO-RAD) で測定した。細胞生存率は、試験化合物未処理の細胞生存 100% に対する各試験化合物処理の細胞生存率を算出した。

2. 4. ウェスタンブロット分析

レポーターアッセイと同様に処理した培養細胞は、PBS で洗浄後に lysis バッファーで溶解して遠心 (13800g, 5min) を行い、SDS (4–12% SDS-polyacrylamide, Invitrogen) ゲルを用いて電気泳を行った。泳動後のゲルはニトロセルロース膜 (iBlot Gel Transfer Mini, Invitrogen) に転写した (iBlot Gel Transfer Device, Invitrogen)。転写膜は immunodetection system (Invitrogen) を用いてマニュアル手順により処理した後に、ウサギポリクローナルの HO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 及び Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) のマウスモノクローナル抗体と、各々反応させて二次抗体処理で検出した各タンパクの質蛍光強度を、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) 装置を用いて検出、定量した。

2. 5. カスパーゼ活性試験

カスパーゼ活性は、ルシフェリンをもつ基質 Z-DEVD を添加して ATP 存在下で、室温で反応させる。反応後にルシフェラーゼを添加して活性化カスパーゼ 3/7 で切断された基質から発光する発光強度を測定した。本試験では、レポーターアッセイで調製した培養細胞懸濁液 50 μl に、同

量の Caspase-Glo 3/7 Assay kit 試薬 (Promega) を添加して、そのマイクロプレートリーダー (GLOMAX MULTI Detection system, Promega) で発光強度を測定した。

2. 6. 統計処理

実験データは標準偏差 ±SD で示し、有意差は t-検定で行った。

3. 結果

3. 1. Nrf2-ARE シグナルのレポーターアッセイ

図 2 に、試験化合物存在下での Nrf2-ARE シグナル活性試験の結果を示した。FX と FXOH によるシグナル活性が、有意に濃度依存で示された。また、FXOH の活性は FX に比べて高かった。この結果から、両化合物の Nrf2-ARE シグナルによる転写因子 Nrf2 による抗酸化酵素群の発現が示唆された。

3. 2. Nrf2-ARE シグナル活性化に伴う HO-1 タンパク発現

図 3 に、化合物による Nrf2-ARE シグナル伝達における HO-1 タンパク発現の結果を示した。HO-1 タンパクは、FX と FXOH 存在下で顕著な発現を示した (図 3A)。このタンパク発現量を図 3B に示した。HO-1 タンパクは化合物の濃度に依存して有意に発現した。これらの結果から、FX と FXOH は Nrf2-ARE シグナルを活性化させて HO-1 タンパク発現をすることで、酸化ストレスを軽減させていることが示された。FX と FXOH の HO-1 タンパク発現は、Nrf2-ARE シグナル活性試験の結果と同様に、FXOH の存在下で高かった。

3. 3. 核内の Nrf2

化合物存在下で、Nrf2-ARE シグナルにおける Nrf2 の核

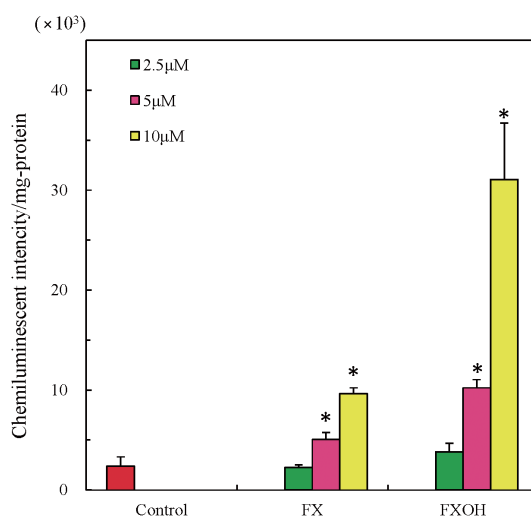


図 2 FX と FXOH の Nrf2-ARE シグナル活性
*control に対する有意差、 $p < 0.01$

内への移行を調べた。図3に、細胞質及び核内のNrf2タンパク発現とその発現量を示した。細胞質に多く存在するNrf2は、シグナル活性に伴い核内に移動していることが示された(図4A)。また、FXOHがFXに比べて核内に移動したNrf2タンパク量も多く(図4B)、この結果は、Nrf2-AREシグナルにおける活性及びHO-1タンパク発現の結果とも相関していた。

3. 4. 化合物の細胞毒性

試験濃度における化合物の細胞毒性の結果を図5に示した。10μMの化合物処理で細胞毒性が認められた。また、両化合物とも、細胞毒性を示した濃度においてもNrf2-AREシグナルの活性を示した(図3)。

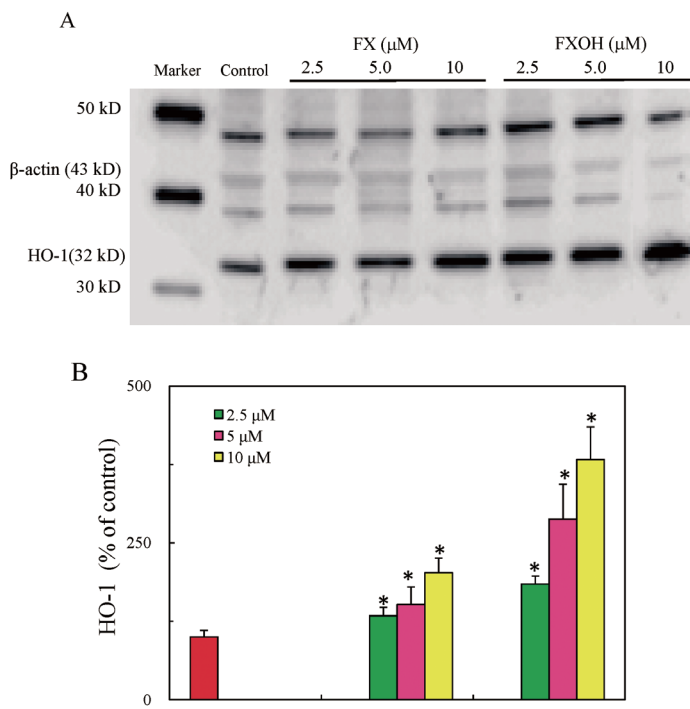


図3 Nrf2-AREシグナル活性化に伴うHO-1タンパク発現
 A: FXとFXOH存在下でのHO-1タンパク発現
 B: AにおけるHO-1タンパク発現量
 *controlに対する有意差、 $p < 0.05$

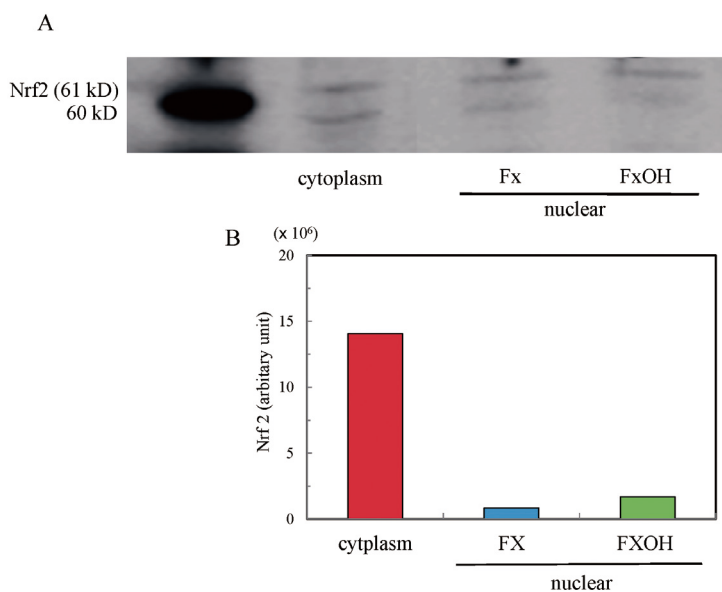


図4 FXとFXOH存在下の転写因子Nrf2核内移動
 A: FX(10μM)とFXOH(10μM)存在下の転写因子Nrf2の核内移動
 B: AにおけるNrf2の核内タンパク量

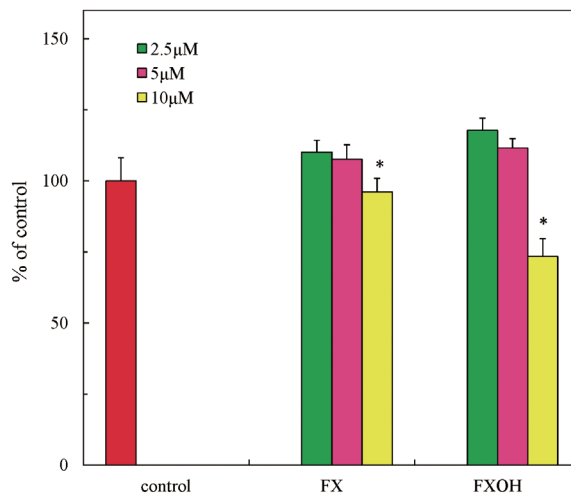


図5 Nrf2-AREシグナルにおける化合物の細胞毒性
 *controlに対する有意差、 $p < 0.01$

3.5. カスパーゼ活性

試験濃度における化合物のカスパーゼの3と7の同時活性 (caspase 3/7 活性) の結果を、図6に示した。化合物による細胞死を認めた濃度で、アポトーシスに伴う caspase 3/7 活性の上昇を認めた。従って、化合物による細胞死はアポトーシスによることが判明した。

4. 考 察

ワカメやモズクなどの食用の褐藻類に含まれている海洋性カロテノイドのFXとFXOHは、最近の研究で抗腫瘍活性⁸⁻⁹⁾、抗炎症作用¹⁰⁾、ラジカル消去¹¹⁾による抗酸化活性などの生理作用が明らかにされている。本研究では海洋性カロテノイドのFXとFXOHによるNrf2-AREシグナルの活性が示された。この時に転写因子のNrf2が核内に移行し、AREを活性化させて抗酸化酵素群の一つHO-1タンパクを発現することを示した。HO-1はHOのアイソフォームの一つで、ヘムをビリベルジン、一酸化炭素、遊離鉄に分解する酵素である。ビリベルジンは、ビリベルジン・リダクターゼにより、ビリルビンに分解される。ビリベルジンとビリルビンには強力な抗酸化作用があり、酸化ストレスなどによる細胞傷害を抑制する。FXとFXOHはNrf2-AREシグナルを介してHO-1を発現させてビリベルジンとビリルビンの抗酸化作用により、酸化ストレスを軽減させていることが示された。また、ビリベルジンはペルオキシラジカルと反応しビリルビンになることで、脂質過酸化反応を抑制している。先行実験ではFXとFXOHにはペルオキシラジカル消去活性も明らかにしたが、Nrf2-AREシグナル伝達の中でも、脂質過酸化反応を制御していることが推察される。これらの結果から、FXとFXOHには化合物のもつ抗酸化作用に加えて、Nrf2-Keap1制御系の調節による酸化ストレス軽減作用が明らかになった。

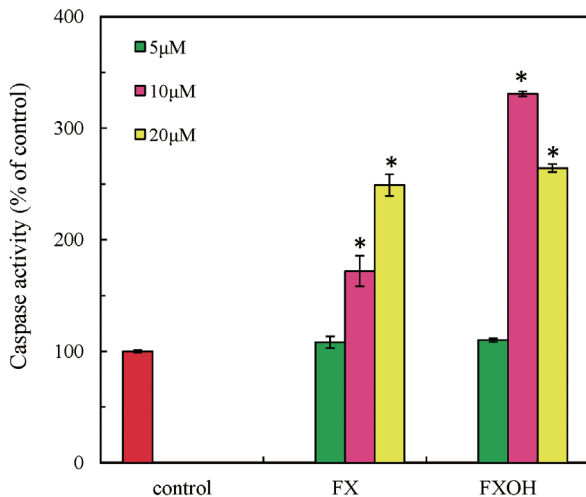


図6 Nrf2-AREシグナルにおける化合物のcaspase 3/7活性 *controlに対する有意差、 $p < 0.01$

高濃度化合物存在下のNrf2-AREシグナル活性試験で、細胞毒性(細胞死)が示された。FXはアポトーシスを誘導することが報告されている⁸⁻⁹⁾。アポトーシスはデスレセプターとミトコンドリアを介するカスパーゼ(プロテアーゼ)の活性化(カスパーゼカスケード)に伴い実行される。本研究ではカスパーゼカスケードの下流にあるカスパーゼ3と7の活性を同時に測定した。結果に示されるように、FXとその代謝体FXOHで細胞死に相関してカスパーゼ活性が認められ、化合物によるアポトーシス誘導が明確に示された。一方で、アポトーシスを誘導した濃度においても、Nrf2-AREシグナル活性は上昇し、またHO-1タンパクも発現した。HO-1タンパクには抗アポトーシス活性が報告されている¹²⁾。また、Nrf2はAREのBcl-2遺伝子発現に伴うBcl-2タンパクによるアポトーシスの抑制が報告されている¹³⁾。即ち、高濃度の化合物処理はアポトーシスを誘導したが、同時にNrf2を活性化させることで、抗アポトーシス作用による細胞生存のリクルートが行われていることが推察される。今後の研究では、化合物によるアポトーシス誘導とNrf2による抗アポトーシス関連分子の発現を明らかにしていきたい。これまでの先行研究における抗酸化活性と抗炎症作用(未発表)の結果と同様に、代謝物FXOHの活性がFXに比べて高いことから、FXの生体における活性本体はFXOHであることも示唆された。以上の結果と考察から、海洋性カロテノイドFXとFXOHの酸化ストレス応答シグナルNrf2-AREにおける作用機序を図7にまとめた。

5. 総 括

本研究では、モズクやワカメなどの海藻に含まれる海洋性カロテノイドのFXとその代謝物のFXOHが、Nrf2-AREシグナル伝達を介し、転写因子Nrf2による抗酸化

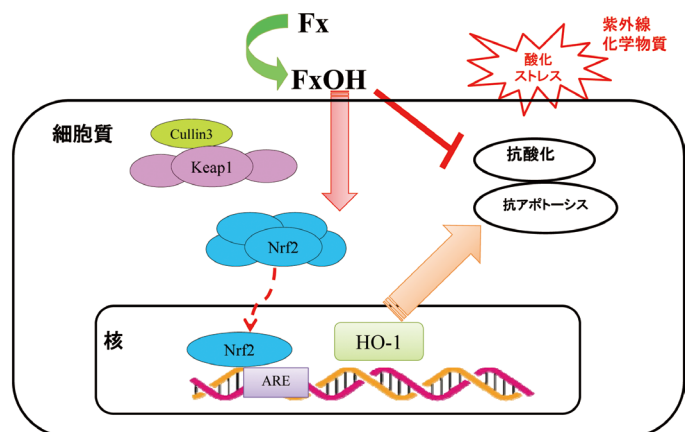


図7 海洋性カロテノイドFXと代謝体FXOHのNrf2-AREシグナルを介した抗酸化と抗アポトーシス機構

答配列 ARE との結合により抗酸化タンパク HO-1 を発現させ、酸化ストレスを軽減させていることを明らかにした。高濃度の化合物処理は、カスパーゼ 3/7 活性を伴うアポトーシス誘導をしたが、Nrf2-ARE シグナル活性も上昇した。従って、Nrf2-ARE シグナル活性に伴う HO-1 の発現による抗アポトーシス活性も示された。また、先行研究における抗酸化活性と抗炎症作用の結果と同様に、代謝物 FXOH の活性が FX に比べて高いことから、FX の生体における活性本体は FXOH であることも支持された。

(引用文献)

- 1) Taira J, Ikemoto T, Yoneya A, Hagi A, Murakami A, Makino, K.: Essential oil phenyl propanoids. Useful as ·OH scavenger? Free Rad Res Commun, 197-204, 1992.
- 2) Taira J, Ikemoto T, Yoneya A, Hagi A, Murakami A, Makino, K.: Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells, J Biochemistry, 17, 693-695, 1992.
- 3) Taira J, Ikemoto T, Mimura K, Hagi A, Murakami A, Makino K.: Effective inhibition of hydroxyl radicals by hydroxylated biphenyl compounds. Free Rad Res Commun, 71-77, 1993
- 4) Fujita S, Taira J.: Biphenyl compounds are hydroxyl radical scavengers: Their effective inhibition for UV-induced mutation in *Salmonella Typhymurium* TA102, Free Rad Biol Med, 17, 273-277, 1994.
- 5) Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, Kawachi Y, Ishii T.: Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin, Biochemical and Biophy Res Commun, 387, 109-114, 2009.
- 6) Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, Nakamura Y, Xu X, Banno T, Takahashi T, Yamamoto M, Otsuka F.: Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis, J Invest Dermatol, 124, 825-832, 2005.
- 7) Sugawara T, Baskaran V, Tsuzuki W, Nagao A.: Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice, J Nutr, 132, 946-951, 2002.
- 8) Hosokawa M, Wanezaki S, Miyaguchi K, Kurihara, H, Kohono H, Kawabata J, Kawabata J, Odashima S, Takahashi K.: Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60, Food Scie Tech Res, 5, 243-246, 1999.
- 9) Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K.: Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells, Biochim Biophys Acta, 1675, 113-119, 2004.
- 10) Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn T-H Y, Jeon Y-J.: Europ J Pharmacol, Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, 649, 369-375, 2010.
- 11) Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K.: Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites, J Agric Food Chem, 55, 8516-8522, 2007.
- 12) Busserolles J, Megias J, Terencio MC, AlcarazInt MJ.: Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway, Int J Biochem Cell Biol, 38, 1510-1517, 2006.
- 13) Niture SK, Jaiswall AK.: Nrf2 Protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis, J Biol Chem, 287, 9873-9886, 2012.