

食品由来 Nrf2 活性化剤による酸化ストレス緩和能のゼブラフィッシュを用いた検討

遠藤 優佳 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 麻己人 (筑波大学 医学医療系)

[背景・目的]

活性酸素などによる酸化ストレスは DNA やタンパク質などの生体分子に傷害を与えるため、がんや神経変性、炎症性疾患など様々な病気の原因になる。この酸化ストレスに対し細胞は生体応答を働かせることで恒常性を維持しているが、この応答機構を担うのが NF-E2 related factor 2 (Nrf2) である。Nrf2 は、細胞に酸化ストレスが生じると抗酸化ストレスタンパク質遺伝子のプロモーターに存在する抗酸化物質応答配列に結合し、これらを発現誘導する転写因子である。発現誘導された抗酸化ストレスタンパク質が活性酸素を除去し酸化ストレスが軽減される。注目すべき点は機能性食品の有効成分の多くが Nrf2 を活性化することであり、こうした食品を摂取するだけで Nrf2 活性化による抗酸化ストレス効果が発揮され、健康維持につながる。例えば、ブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファンは、強力な Nrf2 活性化能をもつことから²⁾、国内外の食品会社等がサプリメントとして商品化するまでになっている。

私の研究室では、さまざまな化学物質の毒性と薬効、及び Nrf2 活性化能をゼブラフィッシュ *nrf2* 変異系統を用いて評価する生体システムを構築しており (図 1)³⁾、この評価システムを用い

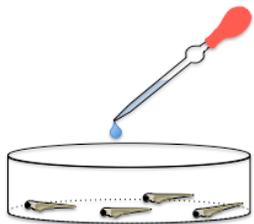


図 1 ゼブラフィッシュ評価システム
ゼブラフィッシュ稚魚は Nrf2 活性化剤などの薬剤に簡便に曝露することができるため、それらの毒性や薬効を評価することが容易である。

て上記スルフォラファンが、魚類においても Nrf2 を活性化するだけでなく、動物個体において酸化ストレス剤の毒性を緩和する活性をもつことを実証している⁴⁾。さらに Nrf2 活性化はヒ酸など重金属に対する毒性も緩和するが、スルフォラファンに関してはヒ酸に対する Nrf2 非依存的な共毒性があり、その摂取を控えるべき環境や状態もあり得ることを、ゼブラフィッシュ評価システムを用いて報告している⁵⁾。

このことは、スルフォラファンよりも優れた食品由来 Nrf2 活性化剤を探索する価値があることと、そのためにゼブラフィッシュ評価システムを活用する有効性を示している。そこで本研究ではこの評価システムの価値と有効性を実証するために、培養細胞レベルで Nrf2 活性化することが知られている機能性食品の有効成分を選出し、これらの生体における酸化ストレス緩和能を網羅的に評価することを目的とした研究を行う。

具体的には、まず酸化ストレス緩和能が期待できる物質を用いて、野生型のゼブラフィッシュ稚魚を用いた生存解析を行い、それぞれの物質が毒性を示さない濃度を決定した。次にこの濃度における当該物質の酸化ストレス緩和能をゼブラフィッシュ評価システムを活用して評価した。さらに当該物質の Nrf2 活性化能を、野生型ゼブラフィッシュ稚魚の全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション解析により測定した。酸化ストレス緩和能と Nrf2 活性

化能が見出された物質に関しては、*nrf2* 変異体ゼブラフィッシュを用いて同様の実験を行い、これらの活性が Nrf2 依存的であるかを検証した。

[方法]

ゼブラフィッシュ稚魚

野生型 AB 系統と *nrf2* 変異系統を用いた。*nrf2* ホモ変異体は胚性致死なので、*nrf2* ヘテロ変異成魚の交配により得た。

生存解析

食品由来 Nrf2 活性化剤の毒性に関しては、受精後 3.5 日の稚魚に濃度を振って 12 時間曝露し、その生存率で判定した。酸化ストレス緩和能に関しては、食品由来 Nrf2 活性化剤の 12 時間曝露後の受精後 4 日稚魚に、2 mM の過酸化水素処理を 72 時間行い、生存率を 12 時間毎に観察した。

全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション解析

Nrf2 標的遺伝子である *gstp1* の発現解析を行った。受精後 3.5 日の稚魚を各食品由来 Nrf2 活性化剤に 12 時間曝露した後、4% パラフォルムアルデヒドで固定した。ジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) で標識された *gstp1* 特異的 RNA プロブを 70°C で一晩固定稚魚の RNA とハイブリダイゼーションさせ、洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識の抗 DIG 抗体とその発色基質 BM purple を用いて、*gstp1* RNA の存在組織と量を検出した。

遺伝子型決定

生存解析や全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った後のゼブラフィッシュ稚魚のゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって *nrf2* 遺伝子に相当する部分を増幅した。その後 *nrf2* 変異体ゲノム特異的に DNA 切断する制限酵素を用いて遺伝子型を決定した。

[結果・考察]

結果及び考察は卒業研究発表会にて示す。

[引用文献]

- 1) 田口恵子, 山本雅之. 酸化ストレス防御のための生体内センサー Keap1-Nrf2 制御システム, 化学と生物, 45: 857-862, 2007
- 2) Fahey, J. W. *et al.* Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes, *Food Chem Toxicol*, 37: 973-979, 1999
- 3) 布施雄士, 小林麻己人. ゼブラフィッシュを用いた Nrf2 システムの解析: 効率的に防御能をアップする秘策, *医学のあゆみ*, 263: 528-529, 2017
- 4) Mukaigasa *et al.* Genetic Evidence of an Evolutionarily Conserved Role for Nrf2 in the Protection against Oxidative Stress. *Mol Cell Biol*, 32: 4455-4461, 2012
- 5) Fuse *et al.* Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol*, 305: 136-142, 2016