©2020 筑波大学生物学類

香辛料由来の各種成分がもつ抗酸化能についてのゼブラフィッシュを用いた検討

渡邉　朝美（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】

「酸化ストレス」とは、生体内で酸化・還元のバランスが崩れて酸化に傾いた状態のことをいう。この状態ではタンパク質や脂質、DNA などの分子が損傷を受けるため、がんや神経変性疾患、または炎症性疾患などの様々な生活習慣病に繋がる可能性がある[1]。少子高齢化時代における保険財政の問題と相まって、上記の疾患発症を未然に防ぐ効果的な予防法開発が求められている。その一つとして、近年、生活習慣病発症・進行の予防に抗酸化力をもつ食品摂取が推奨され、その有効成分についての研究が急速に進んでいる。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、酸化ストレス応答性転写因子の NF-E2 p45-related factor 2 (Nrf2)を介した強力な抗酸化能が認められている[2]。そのため基礎研究に頻用されるだけでなく、サプリメントとしても実用化されている。香辛料由来成分のクルクミンやケルセチンなどについても、Nrf2 経路を介した抗酸化応答が働いていると報告された例は数多くある[3]。しかしこうした研究のほとんどは培養細胞を用いたものであり、動物個体における抗酸化力を評価比較したものはあまり多くなく、そのため作用機序を遺伝学的に解析したものは非常に少ない。

この状況を打破するために、私が所属する研究室では、食品有効成分の解析モデル動物としてゼブラフィッシュの活用を試みている[4-6]。最近、食品有効成分の抗酸化能を評価するアッセイ系をゼブラフィッシュ稚魚と 24 穴プレートを用いて確立し、香辛料由来の有効成分 10 種の動物個体における抗酸化能の比較評価に成功した（遠藤ら、未発表）。この解析では過酸化水素と亜ヒ酸という 2 種の酸化ストレス剤を用いたが、興味深いことにこの両者に対して効果のある有効成分種が異なっていた。

このことは各種食品成分毎に抗酸化能の特異性があることを示唆しており、酸化ストレス剤の種類を増やした解析を行う価値があると考えられた。そこで本研究では、新たな酸化ストレス剤として除草剤として利用されるパラコートと鎮痛剤成分として著名なアセトアミノフェンを活用し、これらに対する香辛料由来成分 10 種の保護的な効果を評価することを目的とした。

【方法】

生存率解析

第 1 段階では、最適な酸化ストレス剤（パラコート及びアセトアミノフェン）濃度を効果が既知であるスルフォラファンを活用して検討した。受精後 3.5 日で 40 µM スルフォラファンを前処理した群と未処理の群を準備し、次に 12 時間後に酸化ストレス剤を 48 時間曝露し生存率を 12 時間毎に測定した。パラコート及びアセトアミノフェンの濃度はそれぞれ 3～7 mM、13～17 mM の範囲で調べた。スルフォラファン処理群と未処理群の生存率を比較することで、スルフォラファンの抗酸化活性が優位に検出できる酸化ストレス剤の最適濃度を決定した。

第 2 段階では香辛料由来の各種有効成分の最適濃度を決定した。有効成分としては、イソオイゲノール、オイゲノール、カプサイシン、カルノシン酸、6−ギンゲロール、クルクミン、ケルセチン、ジアリルトリスルフィド、シンナムアルデヒド、6-(メチルスルフィニル)ヘキシルイソチオシアネートの 10 種を用いた。受精後 3.5 日の稚魚に対して各成分を 1～125 µM の範囲で 5 倍毎に振った濃度で 12 時間曝露させ、その後第 1 段階で決定した濃度の酸化ストレス剤を 48 時間曝露させ、生存率の向上を 12 時間毎に解析した。効果があった成分についてはより詳細に最適濃度を調べた。

第 3 段階では、Nrf2 ホモ変異体を用いて Nrf2 依存性を、第 2 段階において効果があると判断された成分のみで調べた。なお、酸化ストレス剤の濃度は第 1 段階で決定した濃度で、香辛料由来成分の濃度は第 2 段階で最適と判断された濃度を用いた。

ゼブラフィッシュ

第 1、第 2 段階では野生型 AB 系統を交配させて得られた稚魚を用いた。これらの稚魚は受精後 3.5 日の段階で 24 穴プレートの 1 つの穴に 8 匹ずつ移し替えた。薬剤を処理する際には、残った水をできる限り抜いてから薬剤を 400 µl 入れ、それを抜いてから再度新しい薬剤を 500 µl 入れることとした。第 3 段階では Nrf2 ホモ変異体成魚[4]を交配させて得られた稚魚を用い、AB 系統と同様の方法で実験をした。

【結果・考察】

発表会当日に紹介予定である。

【参考文献】

1) Ruth *et al.* Nitrative and oxidative stress in toxicology and disease, *Toxicol. Sci.*, 112:4-16, 2009
2) Thimmulappa *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray, *Cancer Res.*, 62:5196–5203, 2002
3) Qin & Hou. Multiple regulations of Keap1/Nrf2 system by dietary phytochemicals, *Mol. Nutr. Food Res.,* 60:1731-1755, 2016
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
6) Mukaigasa *et al.* Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115:2758-2763, 2018