

岩野 英知

酪農学園大学 獣医学部 獣医生化学教室

平成17年度若手研究補助金

研究開発テーマ

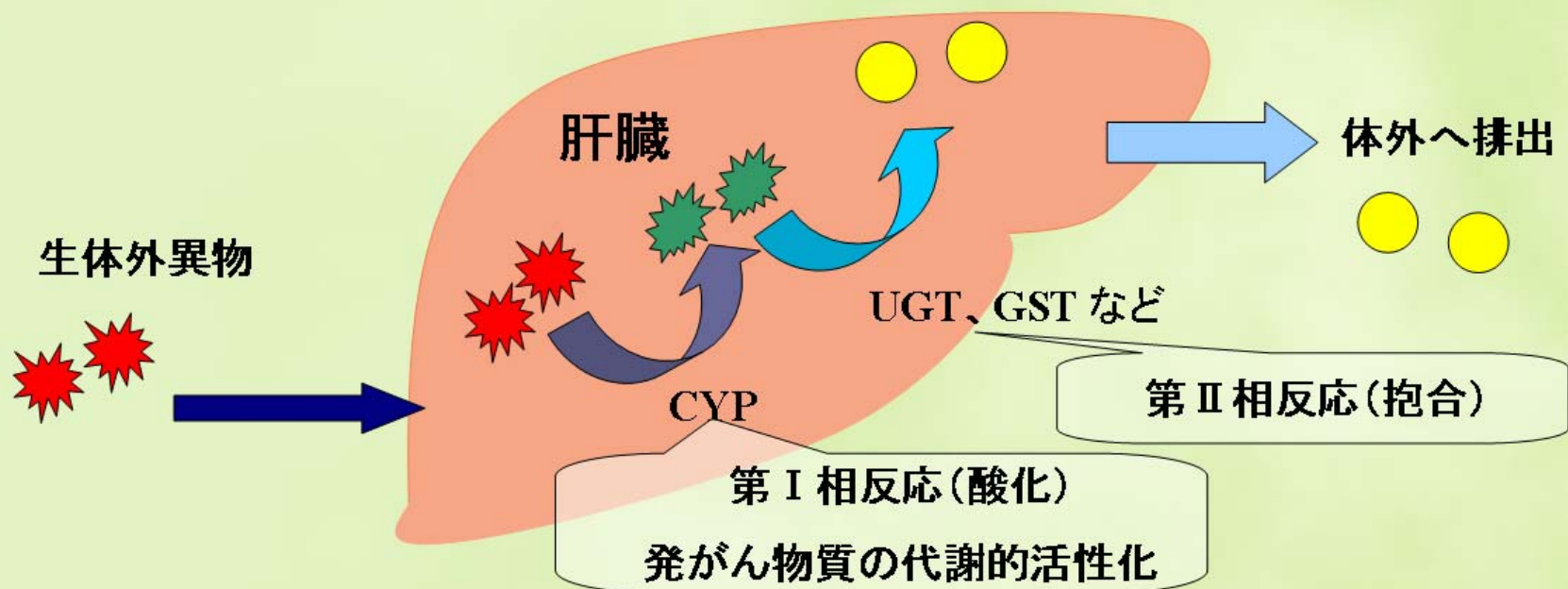
植物中の脂溶性物質による薬物代謝機能の亢進作用について

1) Sulforaphaneにより転写活性化されるUGT分子種の同定

背景

- ✳ 生体は、常に様々な生体外異物（発癌物質、環境ホルモン）に暴露され続けている。
- ✳ 現在の社会状況において、発がん物質や環境ホルモンを完全に排除する事は不可能である。

そこで、生体が持っている防御機構を高めることが重要となってくる。



現在、植物中に含まれる脂溶性物質（フラボノイド）にその効果が期待されている。

Sulforaphane (SFN)とは

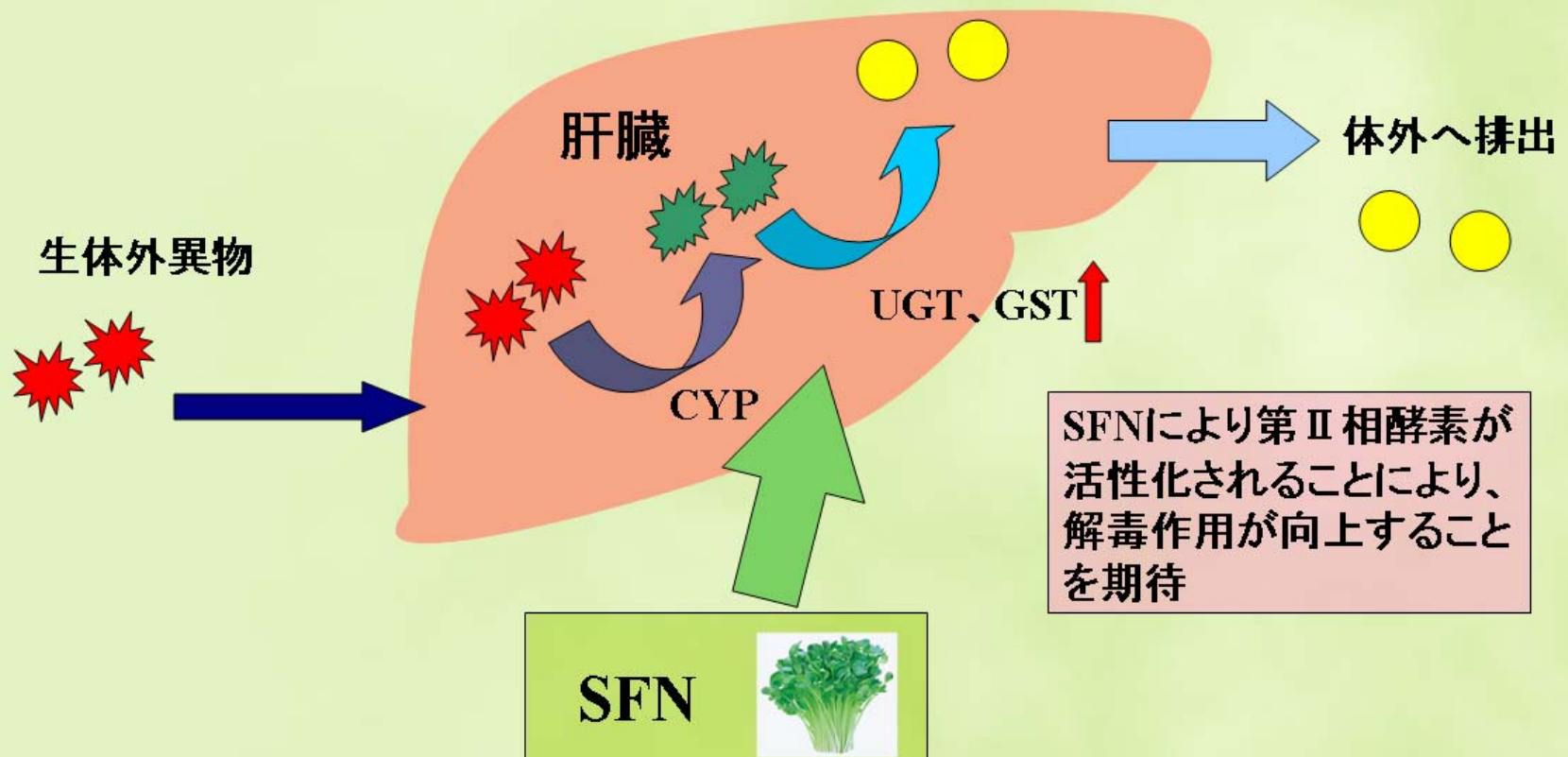
- ・植物に含まれる脂溶性物質(フラボノイド)の一種
- ・ブロッコリーをはじめ、キャベツ、カリフラワー、かいわれ大根などのアブラナ科の野菜にだけ含まれるグルコシノレート (Isothiocyanate)という成分。

現在知られているその効果

- ・抗癌作用: 癌細胞をアポトーシスに導く
- ・解毒作用: 代謝機構の第二相酵素の調節系に影響を与える。
- ・抗酸化作用: ARE配列(ARE: Antioxidant Response Element)に作用し、老化を予防する。

本実験の目的

- ✳ SFNにより転写活性化されるUGT分子種を同定することにより、その代謝基質について考察し、SFNの生体への影響を確認する。
- ✳ 分子種の転写メカニズムを明らかにすることにより、他の分子種でのSFNによる影響の可能性を調べる。



実験

HepG2を用いたSulforaphane投与実験



Control

DEMSO 0.2%



Sulforaphane 40 μ M

DEMSO 0.2%

細胞: HepG2 (ヒトの肝癌の細胞)

5×10^6 個を6cmシャーレに播き、2日間培養後、投与

37°C CO₂ 5%で2、4、6時間培養後、回収



UGT1A、UGT2B、CYP、GST各分子種についてRT-PCRでスクリーニング

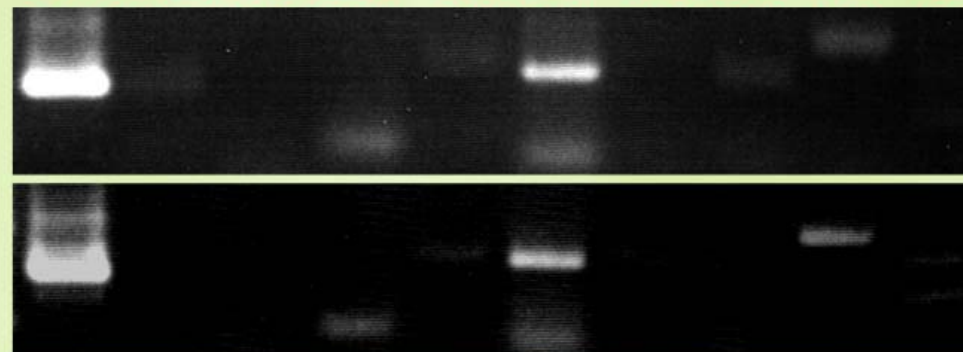
結果 1 RT-PCR

CYP群

Control

SFN

1A1 1A2 2A6 2B6 2C8 2C9 2C10 2D6 2E1 3A4



UGT1A family

Control

SFN

1A1 1A3 1A4 1A5 1A6 1A7 1A8 1A9 1A10



UGT2B family

Control

SFN

2B4 2B7 2B10 2B11 2B15 2B17 2B28



GST群

Control

SFN

A1 P1 M1 T1

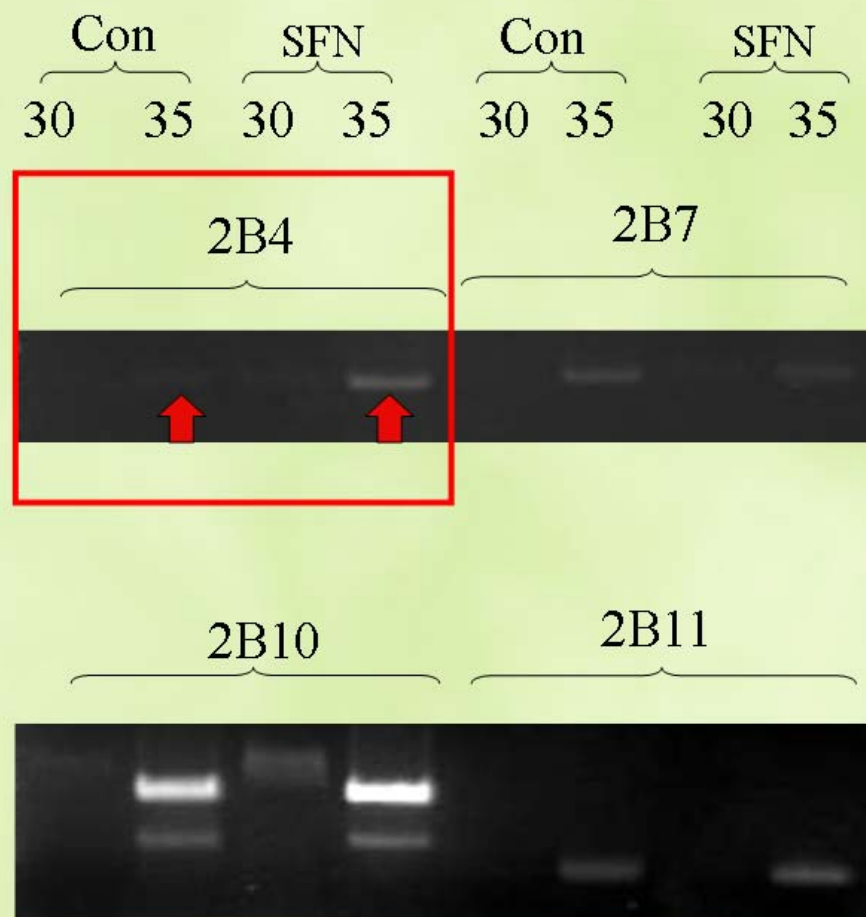


UGT2B familyで差が認められた

✿ 結果2

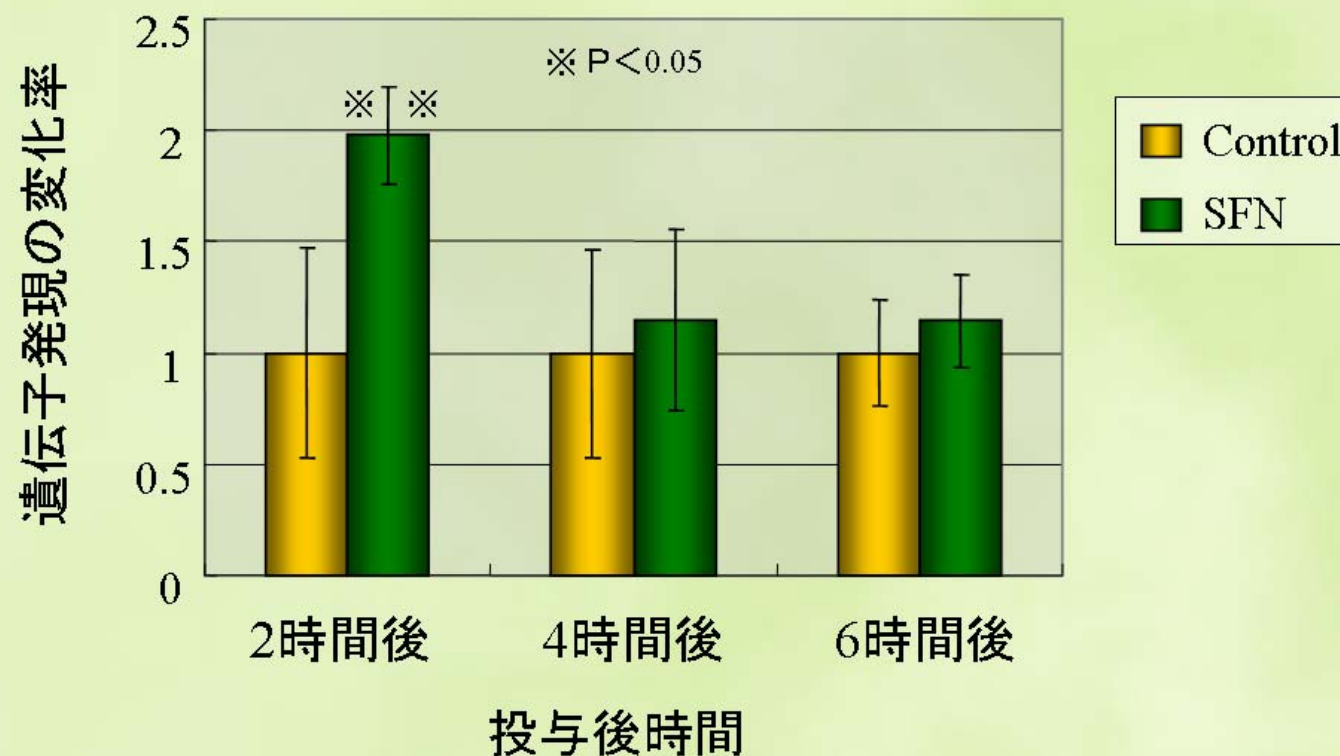
SFN投与細胞で
UGT2BをPCR

35サイクルと30
サイクルで比較



✿ UGT2B4で顕著な変化 ✿

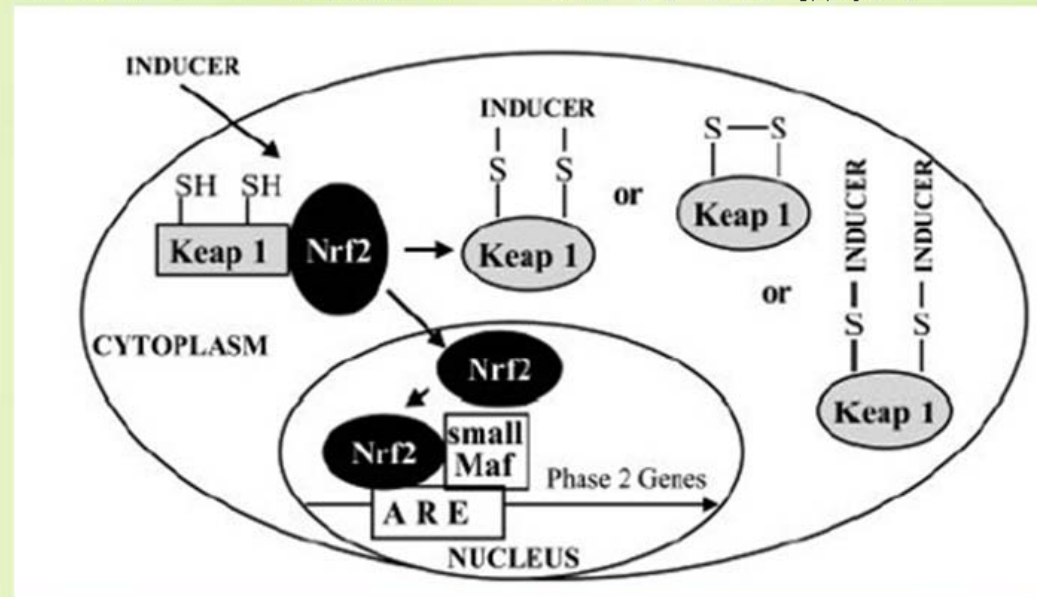
✿ 結果3 SFN投与によるUGT2B4 mRNAのreal-time PCRを用いた発現率の変化



✿ 2時間投与群で、UGT2B4 mRNA発現量の有意な増加(2倍)が認められた。

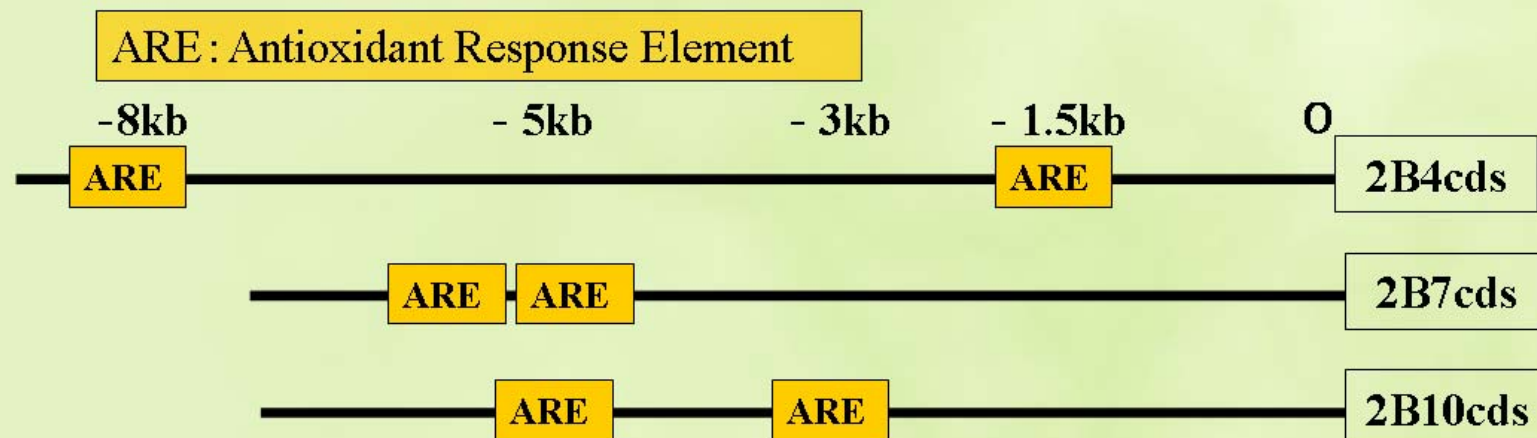


✿ SFNのARE配列への作用機序

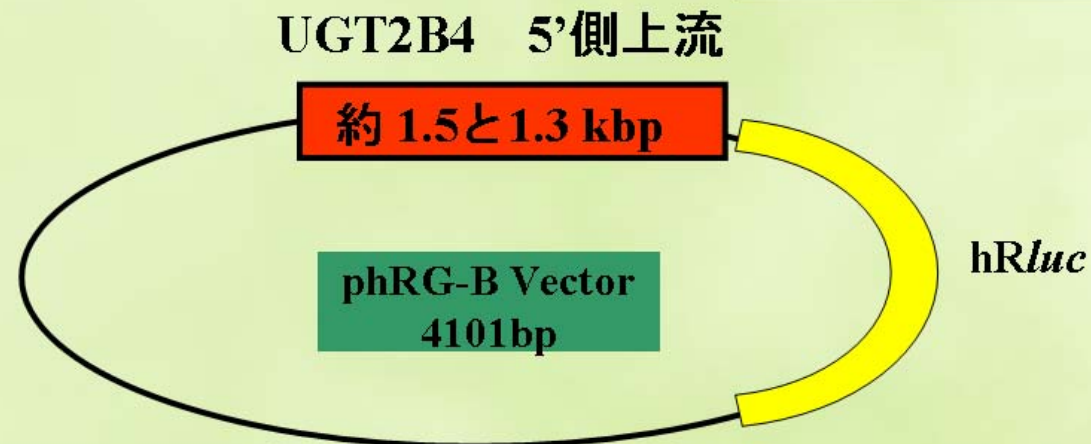
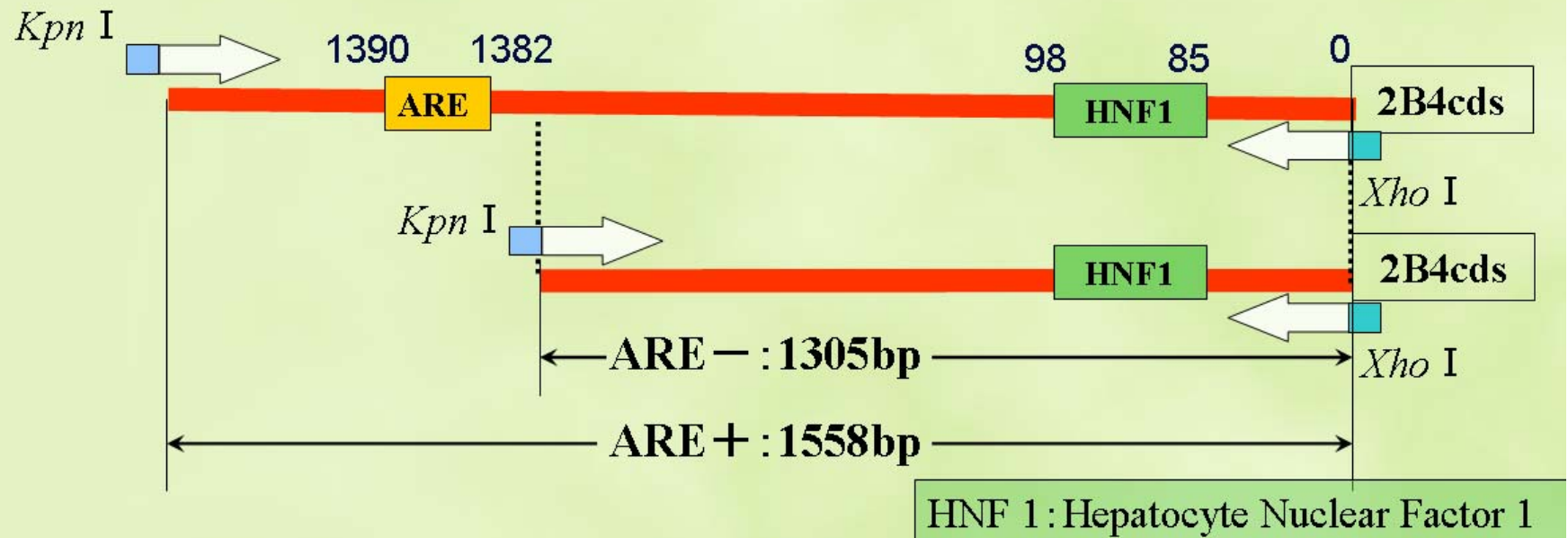


Dinkova-Kostova AT, 2002 ..
Proc Natl Acad Sci USA.
 99(18): 11908-13.

SFNはNrf2の制御因子であるKeap1をNrf2からはずすことがわかっている。これによりNrf2は核内に移行しARE配列に結合し、その下流の配列の転写を活性化させる。

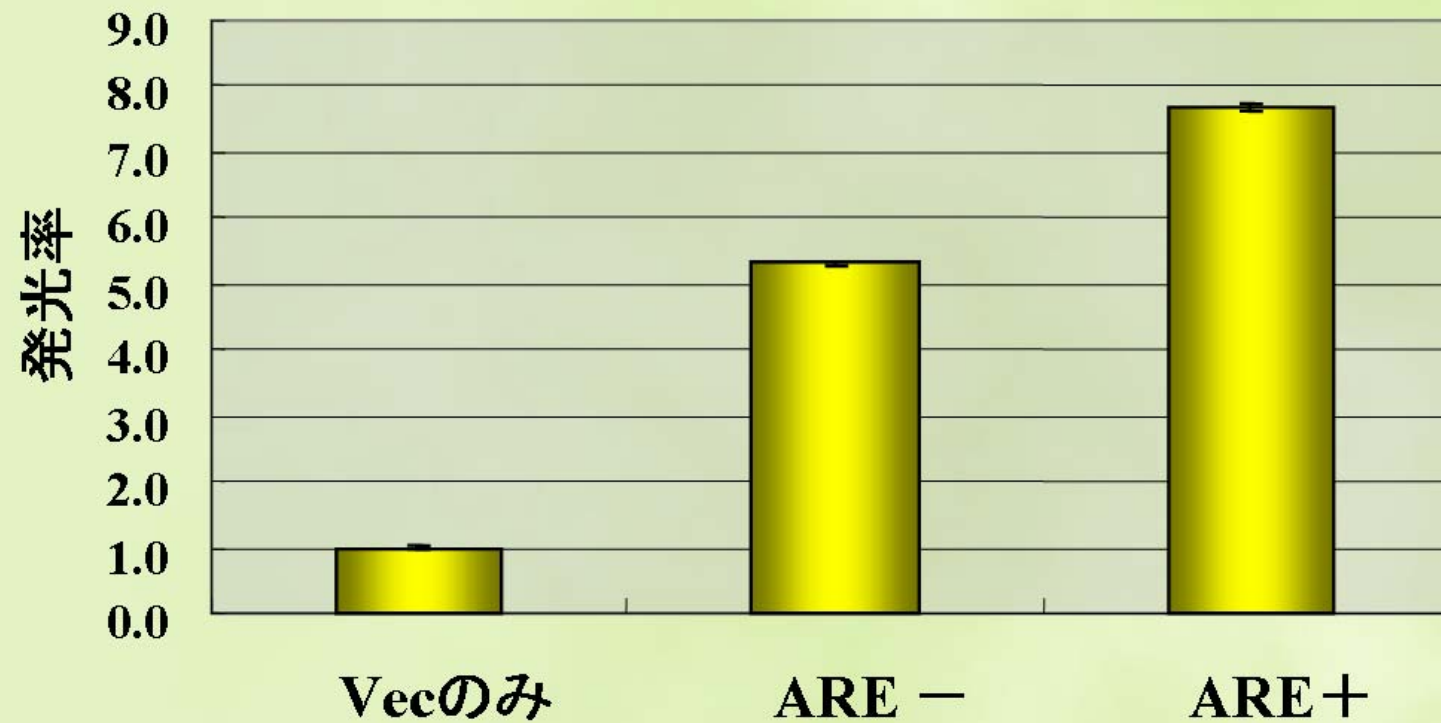


★ ルシフェラーゼアッセイに使用したプラスミドの構築



hRluc: Renilla (ウミシイタケ) Luciferase 酵素の遺伝子を示す。
ARE+とARE-をクローニングサイトのKpn I、Xho I サイトに挿入した

✿ 結果4 (ルシフェラーゼアッセイ)

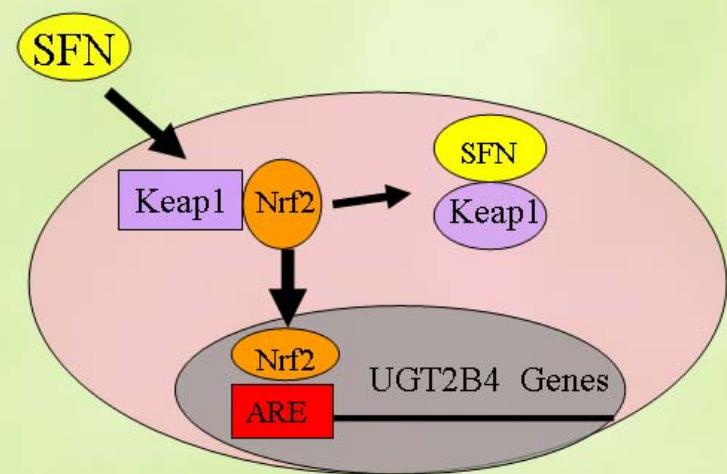


✿ ARE+配列の発光量がARE-配列の発光量の1.5倍であった。✿

✿ 考察

- ・SFNによりUGT2B4 mRNAの発現量の増加が認められた。
- ・ARE配列がSFNによる転写活性化に関与している可能性が示唆された。
- ・UGT2B7、2B10においてもARE配列が確認できた。

- ↓
- ・UGT2B4の代謝基質として、
hyodeoxycholic acid、Androsterone
やカテコールエストロゲンなどの内因
性ホルモンが知られている。
- ↓



SFNを摂取することで、体内のホルモン環境を整え、健康に良い影響を与える可能性が示唆された。

岩野 英知

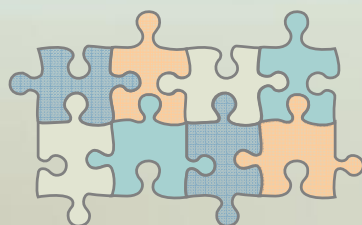
酪農学園大学 獣医学部 獣医生化学教室

平成17年度若手研究補助金

研究開発テーマ

植物中の脂溶性物質による薬物代謝機能の亢進作用について

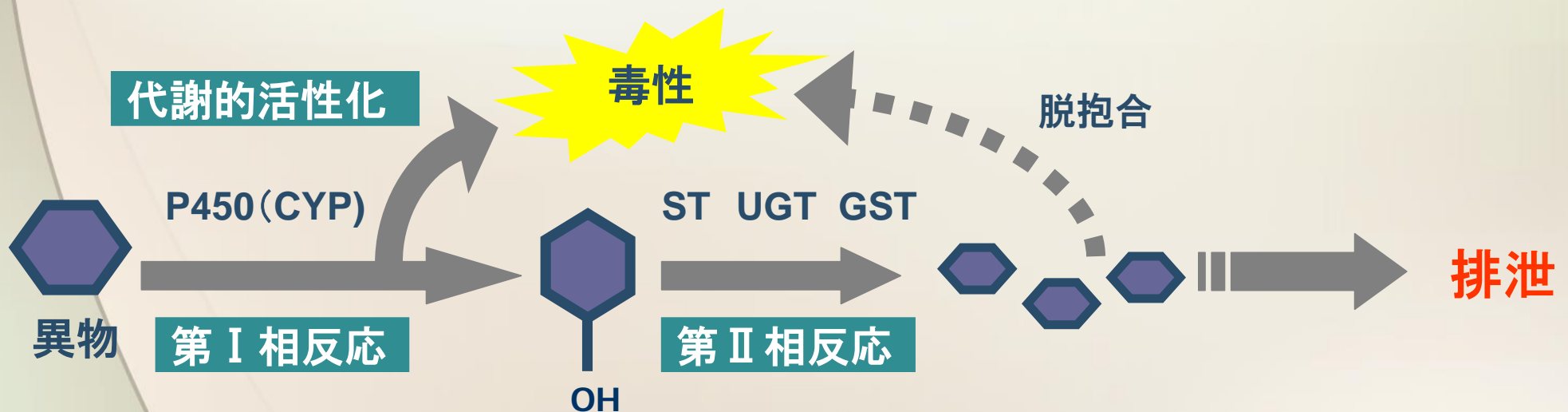
2)オイゲノールにより誘導を受ける薬物代謝酵素分子種の同定





薬物の生体内動態

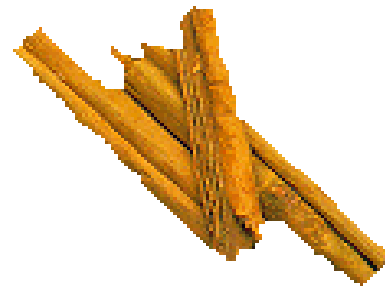
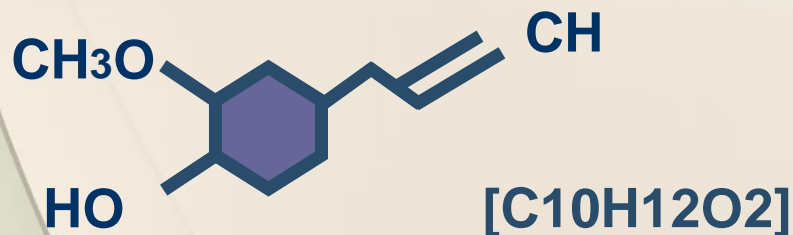
- 生体内に侵入した種々の異物は、酸化・還元・加水分解などの**第Ⅰ相反応**をうけて水酸基、アミノ基、カルボキシル基が付加した親水性の排泄され易い物質に変化する
- 生成した代謝物の一部は体外に排泄されるが、さらに硫酸抱合、グルクロン酸抱合、グルタチオン抱合などの**第Ⅱ相反応**を経て、さらに排泄されやすい構造へと変化する





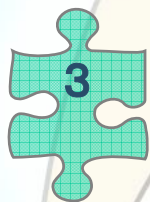
Eugenol

- ・ 芳香族の液体
- ・ シナモン、ナツメグ、クローブなどのスパイスに含まれる匂い成分
- ・ COX-2活性阻害によるプロスタグランジン（PG）の生合成阻害
- ・ アポトーシス誘導による悪性黒色細胞腫の成長抑制
- ・ 抗炎症作用、抗癌作用、抗酸化作用、
抗変異原性をもつ成分



シナモン





オイゲノールの効用 -当研究室で報告されたこと-

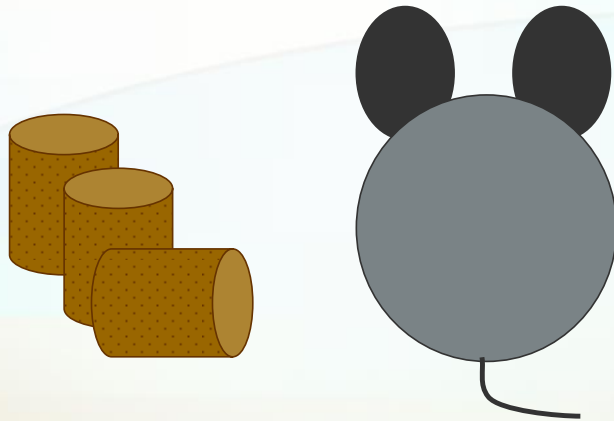


- 第 I 相反応におけるP450量の減少
- 第 II 相反応におけるUGT活性の増加

しかし、薬物代謝酵素の分子種の同定までは成されておらず、オイゲノールの詳細な有効性については明らかにされていない



実験方法



ラット(8週齢)に
5% Eugenol 入りの餌を4週間投与



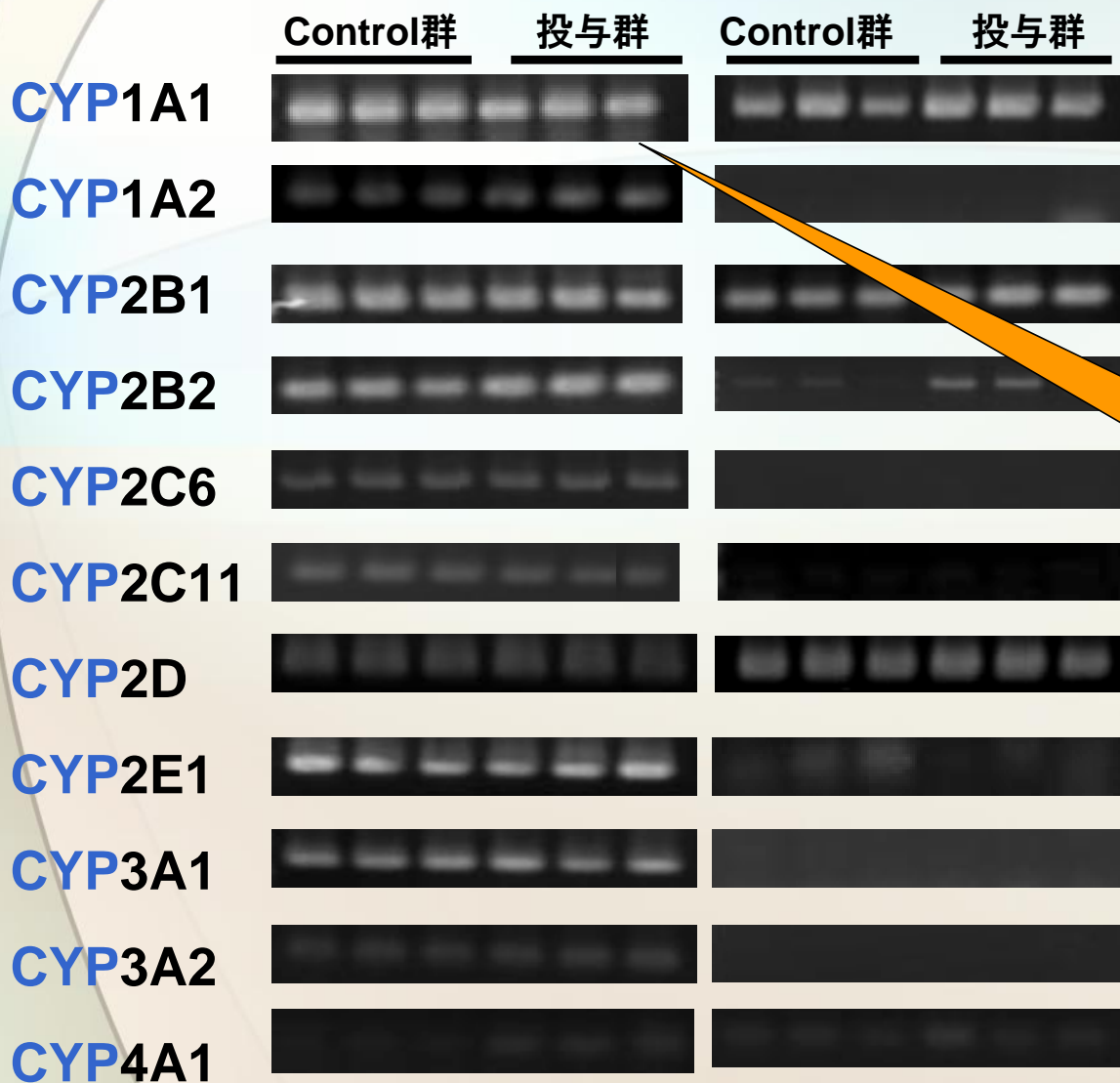
肝臓・小腸において誘導されるCYP・UGT分子種

- ① RT-PCR により mRNA 発現レベルで解析
- ② ウェスタンブロットにより蛋白発現レベルで解析
- ③ real-time PCRによる定量的分析



結果

— 肝臓・小腸各CYP分子種の半定量的RT-PCR —



肝臓

小腸

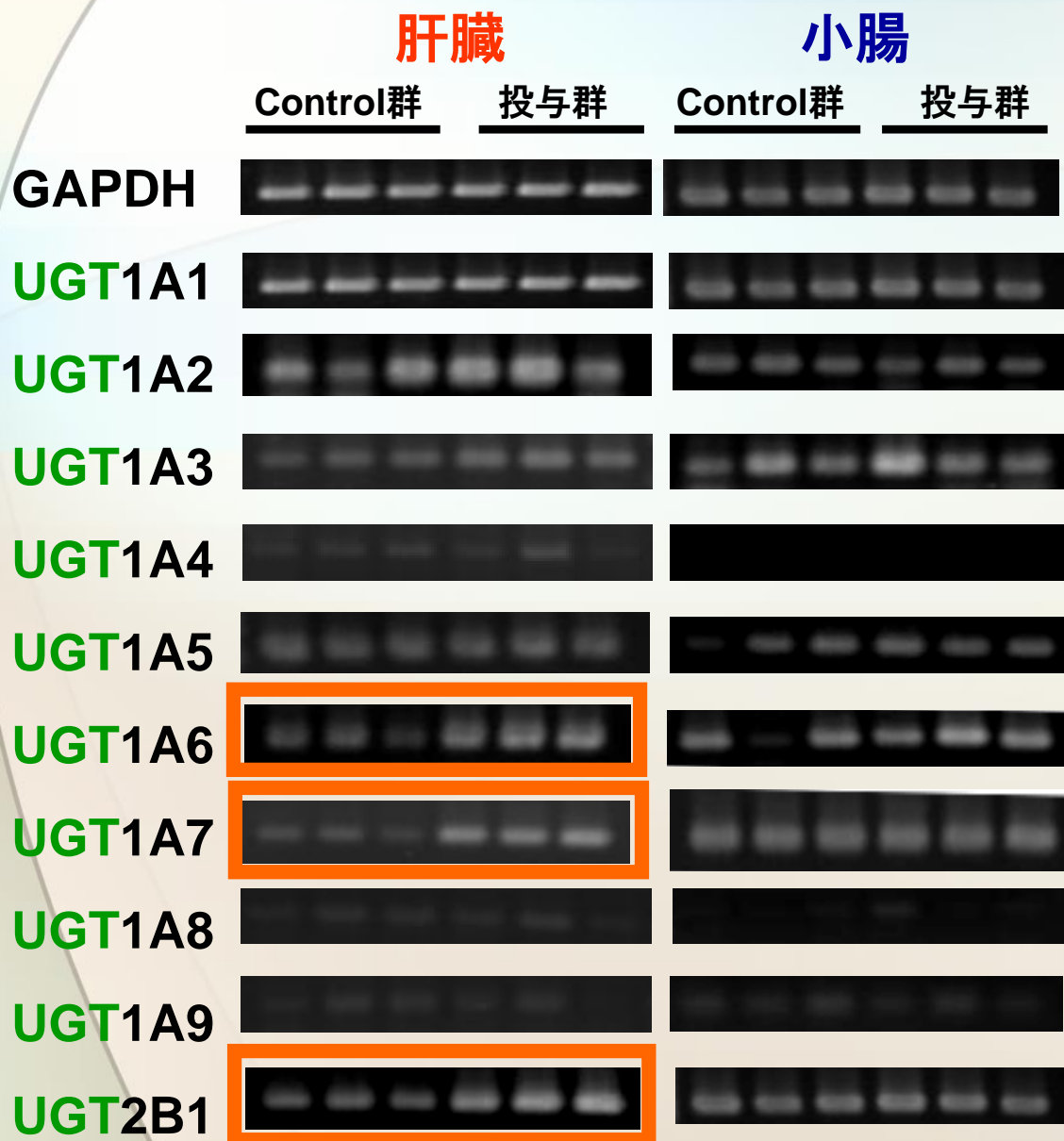
肝CYP1A1





結果

— 肝臓・小腸各UGT分子種の半定量的RT-PCR —



* Western blotting *

肝UGT1A6



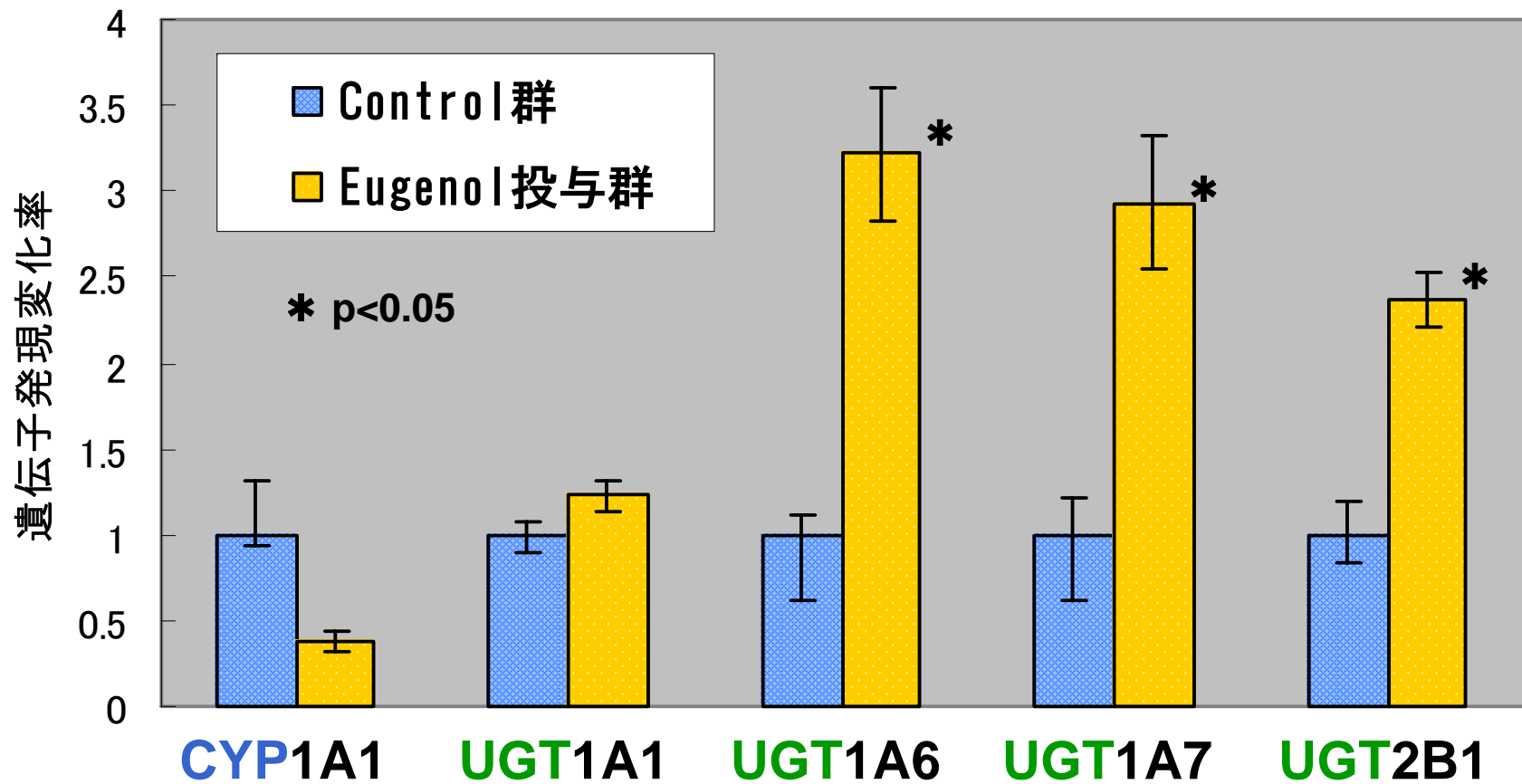
肝UGT2B1





結果

— real-time PCR による定量的比較 ① —

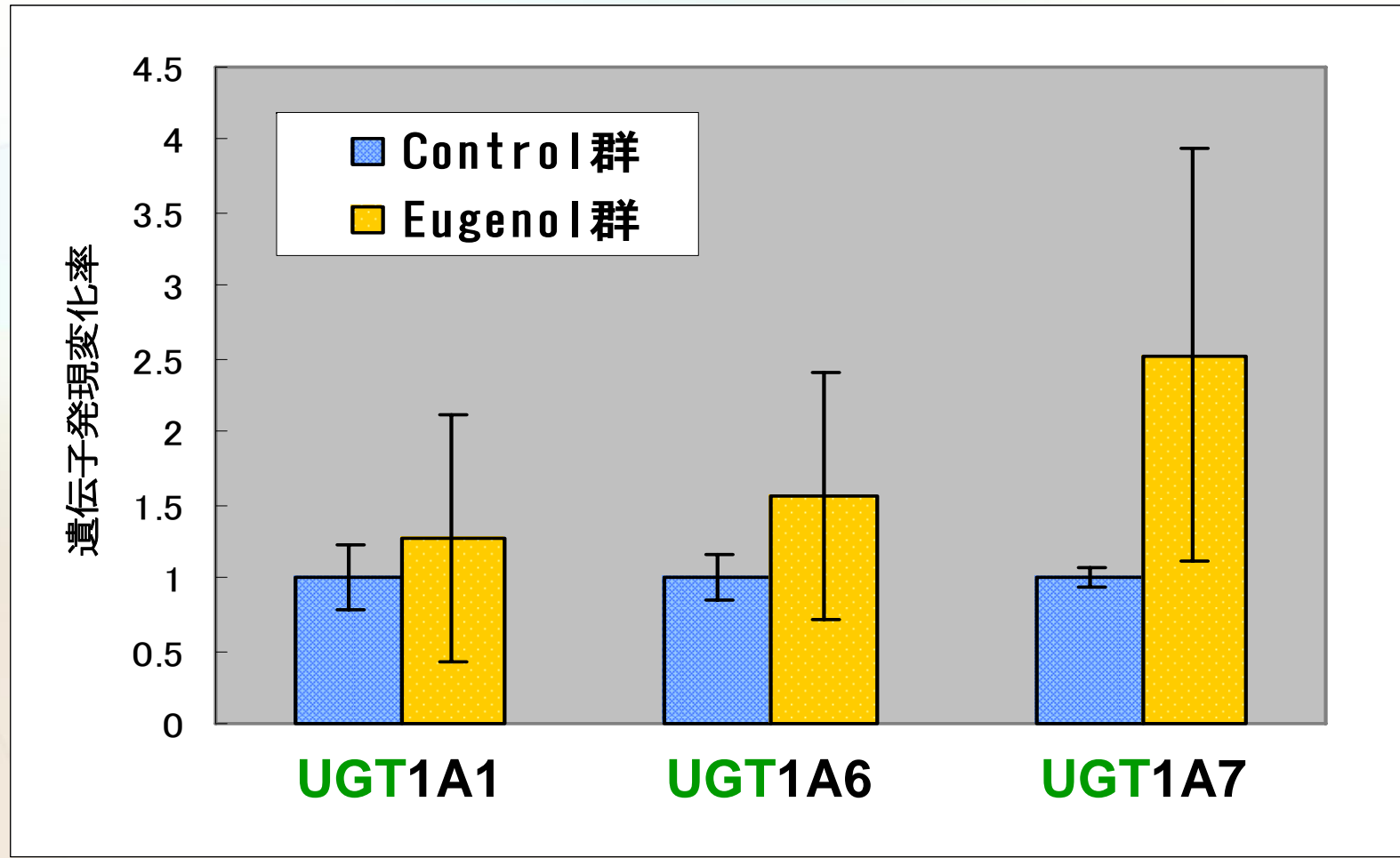


* 肝臓 *



結果

— real-time PCR による定量的比較 ②—



小腸



基質特異性

- **UGT1A6**はアセトアミノフェン、1-ナフトールなどの薬物を抱合
- **UGT1A7**はタバコに含まれるニトロソアミン、ベンツピレンなどの発癌物質を抱合
- **UGT2B1**は肝臓に最も多く存在し、内因性のホルモンや種々の環境ホルモンを抱合
- **CYP1A1**は発癌物質の代謝的活性化に関わる分子種



まとめ -オイゲノールの効用-

