

Nrf2遺伝子を標的にした大豆サポニンの抗酸化ストレス作用と アミノ酸の相乗効果

片山 茂*・黒岩 史・中村宗一郎

信州大学農学部

Synergistic Effect of Amino Acids on Antioxidative Stress Activity of Soyasaponins

Shigeru KATAYAMA, Fumi KUROIWA and Soichiro NAKAMURA

Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University, Nagano 399-4598

ABSTRACT

Excessive generation of reactive oxygen species (ROS) has a deleterious effect on human health since they can damage cell structure involved in the cellular lipids, membranes, proteins, and DNA. Many environmental factors including food intake can lead to increased resistance to oxidative tissue injury. Soybeans have long been recognized as an excellent source of high-quality protein and potent bioactive compounds such as saponins and isoflavone. The objective of this study is to evaluate the antioxidative stress activity of soyasaponins (Soyhealth SA) and the synergistic effect of amino acids in *in vitro* assay using human hepatoma cell lines, HepG2. The cells were stimulated with 1 mM tert-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) for 3 h. The inhibition of *t*-BOOH-induced cellular ROS generation and of malondialdehyde (MDA) formation in HepG2 cells was observed in the pretreatment with soyasaponin for 20 h. We also observed that mRNA expression of the catalytic and modulatory subunits of glutamate cysteine ligase (GCLc and GCLm), the rate-limiting enzymes for *de novo* GSH synthesis, including as well as GSH synthetase was up-regulated by the treatment with soyasaponin. On the other hand, the synergistic effect of amino acid was observed in the addition of Met and Val. The simultaneous addition of Met or Val with soyasaponin exhibited marked increases in the mRNA expression of GSH synthesis-related enzymes. These results indicated that soyasaponin exhibited the oxidative stress modulating effect in HepG2 cells and its effect was enhanced when combined with the particular amino acid. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 169-174, 2010.

Key words : soyasaponin, amino acids, GSH, oxidative stress, Nrf2

*〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304

超高齢社会を迎える我が国において健全な健康長寿の実現は重要な問題である。老化にともなって引き起こされる正常細胞の機能低下は、酸化ストレスによる細胞障害が深く関与している。酸化ストレスとは、生体内での活性酸素種（ROS, reactive oxygen species）と抗酸化システムのバランスが崩れ、有害な過酸化物質やラジカルが体内に蓄積する状態のことである。それゆえ、生体の抗酸化防御機構を高いレベルで維持することが健康維持・老化防止に重要と考えられる。酸化ストレスからの防御システムとして、抗酸化酵素や異物代謝系酵素などの一連の酸化ストレス応答系酵素群の働きが挙げられる。多くの抗酸化たん白質の遺伝子発現は転写因子nuclear factor-E2-related factor 2（Nrf2）によって制御される^{1,2)}。代表的なNrf2活性化物質としては、ウコンに含まれるcurcuminやプロコリナーに含まれるsulforaphaneなどが知られている³⁾。大豆にはサポニンやイソフラボンなど、その効果が期待される成分が多く含まれているにも関わらず、Nrf2活性化に関する研究はほとんどおこなわれていない。そこで本研究では、ヒト培養肝細胞HepG2を用いて、Nrf2により制御される生体防御システムの活性化を指標として、大豆サポニンの抗酸化ストレス作用について検討した。さらに、アミノ酸を同時添加による大豆サポニンとの相乗効果についても検討した。

方 法

HepG2細胞の培養および酸化ストレス誘発

ヒト肝細胞モデルとしてヒト肝臓がん由来細胞株HepG2細胞を用いた。HepG2細胞は10%牛胎児血清（FBS）を含むD-MEM/F-12（Dulbecco's modified Eagle's medium with nutrient mixture F-12 Ham）培地で37℃、5% CO₂インキュベーター内で3～4日間培養後、細胞数を2.5×10⁵ cells/mLになるように調整した。本培養として、D-MEM/F-12培地に試料を添加して20時間培養した。続いて、PBSで洗浄してD-MEM/F-12培地に置換した後、*tert*-butyl hydroperoxide（*t*-BOOH）を終濃度1 mMで添加して3時間培養することで酸化ストレスを誘発した。試料にはソイヘルスSA（不二財団より恵与）および各種アミノ酸をD-MEM/F-12培地に溶解したものをを用いた。また、コントロール群にはD-MEM/F-12を添加した。

細胞内ROSの測定

細胞内ROSの測定として、非蛍光のH₂DCFDA（2', 7'-dichlorofluorescein diacetate）がROSで酸化される

と蛍光を発することから、その蛍光を測定することによって生成されたROS量を求めた。本培養終了30分前にH₂DCFDA溶液（終濃度1 μM）を添加して培養後、*t*-BOOH処理を90分間おこなった。PBSで細胞を回収し、細胞懸濁液を蛍光光度計（Jasco, FP-6200）で励起波長485 nm、蛍光波長530 nmにおける蛍光強度を測定した。

細胞内MDAおよびGSHの測定

細胞内MDAの測定はJaneroら⁴⁾の方法を参考にして測定した。細胞内GSHの測定はAllenら⁵⁾の方法を参考にして測定した。

RT-PCR

培養終了後、培地を除去してRNAiso Plu（TaKaRa）によりTotal RNAを抽出した。さらに、PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit（TaKaRa）を用いてcDNAを合成した。cDNAとプライマーならびにPrimeSTAR Max Premix（TaKaRa）を用いてmRNA発現量をRT-PCR法により半定量した。mRNAの発現量は、β-actinまたはGAPDHのmRNA量との比を算出することにより補正した。

ウェスタンブロット解析

培養終了後、培地を除去してRIPA lysis buffer（Santa Cruz）によりCell lysateを回収した。電気泳動後、メンブレンにたん白質を転写し、一次抗体に抗Nrf2抗体および抗β-actin抗体（Santa Cruz）を用い、二次抗体にはHRP標識抗ウサギIgG抗体を用い、検出はWestern Blotting Substrate（Pierce）を用いた化学発光法にておこなった。

結果と考察

細胞に酸化ストレスを惹起させる試薬として*t*-BOOHを使用した。*t*-BOOH（終濃度：1 mM）をHepG2細胞に3時間暴露させると、細胞内ROSの顕著な増加が認められた（Fig. 1）。その際、大豆サポニンで20時間前処理することにより、*t*-BOOH添加によって引き起こされるROS産生は有意に抑制された。MDAは脂質過酸化反応における二次生成物の一つであり、酸化ストレスの指標として用いられる。そこで、細胞内MDA量を測定したところ、*t*-BOOH添加によってMDA量は増加したが、大豆サンプル前処理により有意に低下した（Fig. 2）。これらの結果は、大豆サポニンをあらかじめ添加することで、*t*-BOOHによる酸化ストレスを軽減できることを示している。

次に、大豆サポニンによるストレス軽減作用はHepG2細胞の抗酸化能が亢進した結果ではないかと考

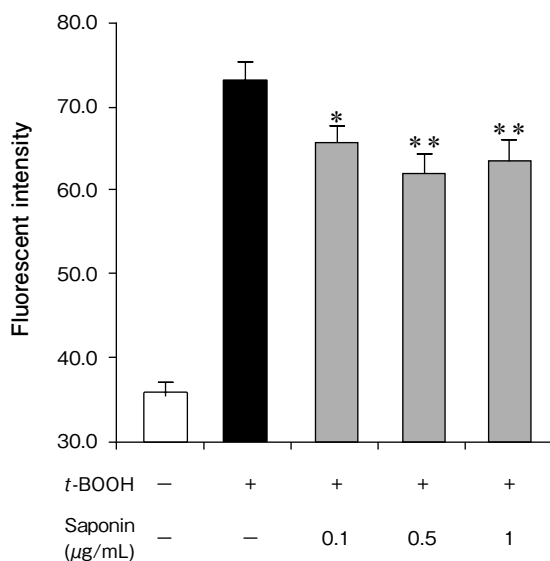


Fig. 1. Effect of soyasaponin on intracellular reactive oxygen species (ROS) generation. HepG2 cells were treated with the noted concentrations of soyasaponin for 20 h, then the cultures were washed with PBS and 1 mM *t*-BOOH was added to all the cultures except controls, and intracellular ROS production was evaluated at 90 min and expressed as fluorescence units. Values are means \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01 compared with *t*-BOOH-treated cell.

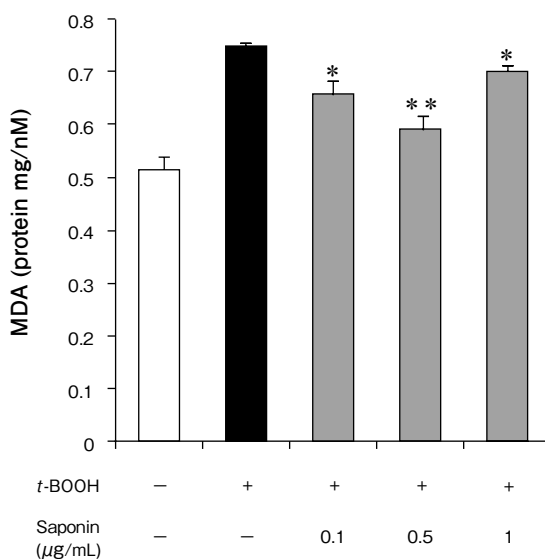


Fig. 2. Effect of soyasaponin on intracellular concentration of malondialdehyde (MDA). HepG2 cells were treated with the noted concentrations of soyasaponin for 20 h, then the cultures were washed with PBS and 1 mM *t*-BOOH was added to all the cultures except controls for 3 h. Values are means \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01 compared with *t*-BOOH-treated cell.

え、転写因子Nrf2により制御される抗酸化酵素群の遺伝子発現量を測定した (Fig. 3). その結果、多くの抗酸化酵素群の遺伝子発現亢進が認められた。特に、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) および Mn superoxide dismutase (SOD) の発現が有意に向上した。G6PDは、NADPHの合成および還元型GSH濃度の維持に貢献する酵素であり、SODはsuperoxide radical (O_2^-) の消去酵素として知られている。すなわち、大豆サポニンの酸化ストレス軽減作用はこれらの抗酸化酵素の活性亢進によって生じたものと考えられた。

次に、アミノ酸との相乗効果について、*t*-BOOH添加後の細胞内ROS量を指標として検討した。その結果、Fig. 4に示すように、Cys, Met, Trp, Val, およびLeuにおいて、大豆サポニンとの相乗効果が認められた。特に、Cys, MetおよびValは大豆サポニン単独の添加よりも有意にROSを抑制した。さらに、酸化ストレスの指標としてMDA量を測定したところ、MetおよびValを大豆サポニンと同時に添加することで顕著なMDA産生抑制効果が認められた (Fig. 5)。

Nrf2制御下の抗酸化酵素群の発現量を測定したところ、Met, ValともにGSH synthetase, Glutamate cysteine ligase, catalytic subunit (GCLC) の著しい発現亢進が認められた (Fig. 6)。これらの酵素は、ともにGSH合成関連酵素であることから、大豆サポニンとMetおよびValによる相乗効果は、GSH合成系を活性化させることでGSHレベルを増加させ、その結果、優れた酸化ストレス軽減作用が発揮されると考えられた。そこで細胞内GSH量を測定したところ、MetおよびVal単独の添加ではコントロール群と比較して変化しなかったが、大豆サポニン添加によって有意な上昇が認められた (Fig. 7)。さらに、Nrf2活性化をウエスタンブロット解析により検討したところ、その発現亢進が確認できた (Fig. 8)。以上の結果から、大豆サポニン単独の添加、および大豆サポニンとMet, Valの同時添加は、Nrf2活性化を誘導し、GSH合成関連酵素や抗酸化酵素の発現亢進によって優れた酸化ストレス作用を発揮することが示された。なお、これらの相乗効果に関する詳細な分子機構については今後の検討課題である。

以上のように、大豆サポニン¹⁾はNrf2活性化を介して酸化ストレス防御遺伝子群の発現を誘導させることで、酸化ストレスから生体を防御する働きがあることが示された。また、アミノ酸との相乗効果として、MetおよびValを大豆サポニンと同時に添加するこ

とでGSH合成経路の活性化を促進することが示された。GSHは生体内の強力な酸化防止剤であることから、GSH生成を促す大豆サポニンおよびアミノ酸は老化や疾病予防に働くアンチエイジング素材として期待できるものと考えられる。

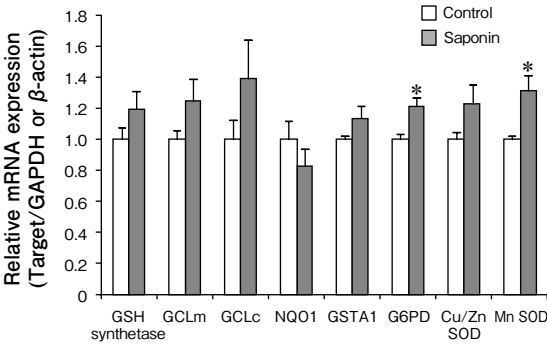


Fig. 3. Effect of soyasaponin, Met and Val on mRNA expression. HepG2 cells were treated with 0.5 μ g/mL soyasaponin, 2 mM Met and Val for 20 h. mRNA levels were evaluated by RT-PCR. The bands were quantified using a Scion Image software. Values are means \pm SD. * p < 0.05 compared with control.

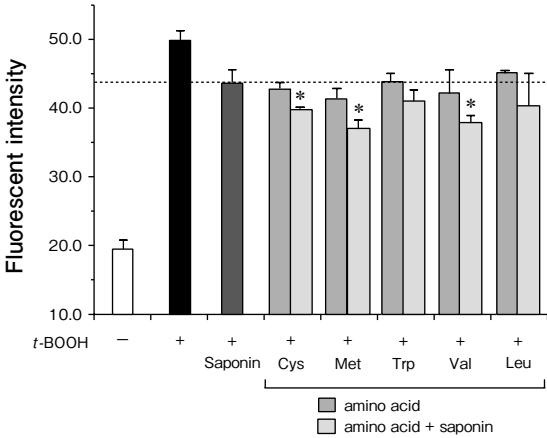


Fig. 4. Synergistic effect of amino acids and soyasaponin on intracellular ROS generation. HepG2 cells were treated with 2 mM amino acids and 0.5 μ g/mL soyasaponin for 20 h, then the cultures were washed with PBS and 1 mM *t*-BOOH was added to all the cultures except controls, and intracellular ROS production was evaluated at 90 min and expressed as fluorescence units. Values are means \pm SD. * p < 0.05 compared with saponin-treated cell.

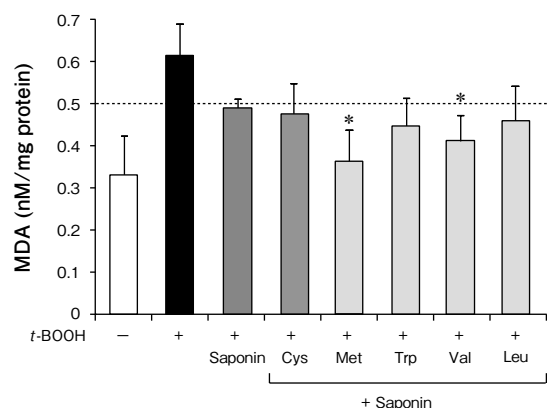


Fig. 5. Synergistic effect of amino acids and soyasaponin on intracellular MDA generation. HepG2 cells were treated with 2 mM amino acid and 0.5 μ g/mL soy saponin for 20 h, then the cultures were washed with PBS and 1 mM *t*-BOOH was added to all the cultures except controls for 3 h. Values are means \pm SD. * p < 0.05 compared with saponin-treated cell.

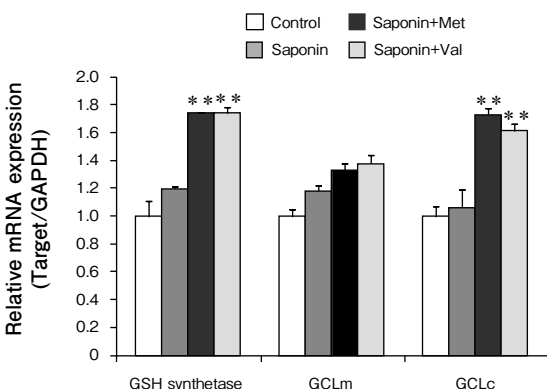


Fig. 6. Effect of soyasaponin, Met and Val on mRNA expression. HepG2 cells were treated with 0.5 μ g/mL soyasaponin, 2 mM Met and Val for 20 h. mRNA levels were evaluated by RT-PCR. The bands were quantified using a Scion Image software. Values are means \pm SD. ** p < 0.01 compared with saponin-treated cell.

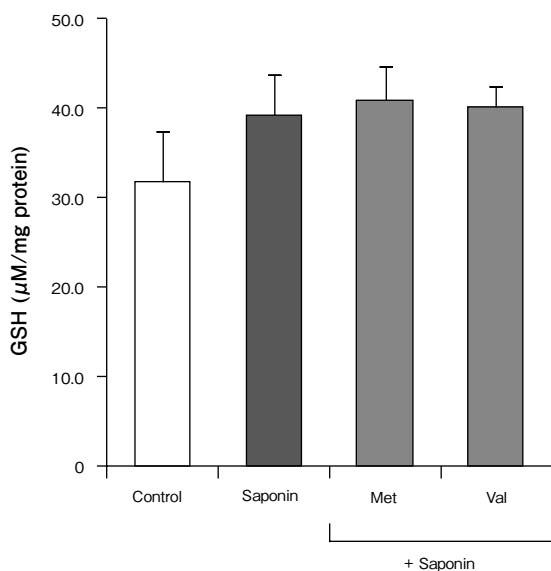


Fig. 7. Effect of soyasaponin, Met and Val on intracellular GSH concentration. HepG2 cells were treated with 0.5 μ g/mL soyasaponin, 2 mM Met and Val for 20 h. Values are means \pm SD.

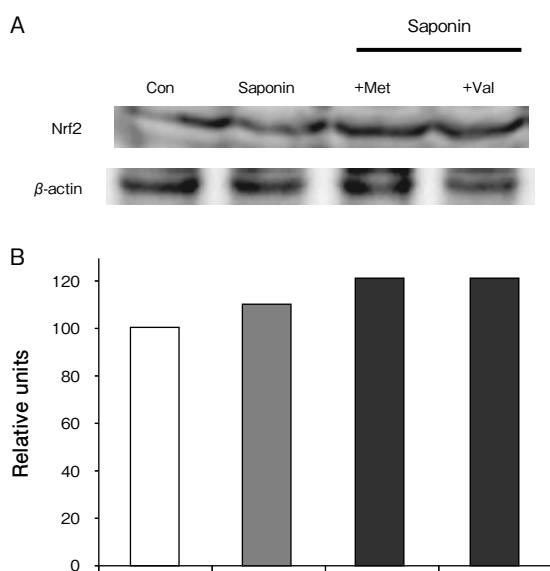


Fig. 8. Effect of soyasaponin, Met and Val on Nrf2 expression. (A) Immunoblot analysis of Nrf2 and β -actin expression. HepG2 cells were treated with 0.5 μ g/mL soyasaponin, 2 mM Met and Val for 20 h and Nrf2 expression was determined using specific antibody. (B) Values from (A) were normalized to the β -actin expression and are expressed as relative units with the control as 100.

要 約

本研究では、Nrf2によって制御される生体防御システムの活性化を指標として、大豆サポニン（ソイヘルスSA、総サポニン含量60%）の抗酸化ストレス作用についてヒト培養肝細胞HepG2を用いて検討した。さらにアミノ酸を同時に添加し、大豆サポニンとの相乗効果についても検討した。HepG2細胞に*t*-BOOHを添加すると細胞内ROSおよびMDAが有意に増加したが、大豆サポニンで前処理することによりこれらの増加は有意に抑制された。大豆サポニン処理によりGCLmやSODなどのNrf2応答遺伝子群の発現誘導が認められた。その際、アミノ酸を大豆サポニンと同時に添加することで、両者の相乗効果が認められた。なかでも、MetおよびValの効果が高く、GSH合成関連酵素群の発現誘導およびGSH含量の増加が認められた。さらに、これらの発現制御を担う転写因子Nrf2の活性化を確認した。以上の結果から、大豆サポニンには酸化ストレスに対する優れた抑制作用があり、その作用は抗酸化酵素群の発現誘導によってもたらされることが示された。また、MetやValを添加することでGSH合成経路の活性化が誘導されることが示された。

文 献

- 1) Hayes JD and McMahon M (2009): NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci*, **34**, 176-188.
- 2) Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL and Li Y (2005): Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett*, **579**, 3029-3036.
- 3) Chen C and Tony Kong AN (2004): Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Bio Med*, **36**, 1505-1516.
- 4) Janero DR (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol Med*, **9**, 515-540.
- 5) Allen S, Shea JM, Felmet T, Gadra J and Dehn PF (2001): A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. *Methods Cell Sci*, **22**, 305-312.