

<平成20年度>

## ウコン由来クルクミンは本当に生体内で抗酸化能を持つのか

新井 秀明

(東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系)

### 1. 緒 言

酸化ストレスはさまざまな疾患と関連が深く、特に、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、糖尿病など、加齢・老化に関連した疾患と密接に関係している。生体における酸化ストレスを制御することは、これら老化関連疾患の予防法を開発する上で極めて重要である。特に、食物由来の成分によって酸化ストレスを制御することは非常に現実的な手段となることが期待できる。ウコンに含まれるクルクミンおよびその代謝物・類似物質は試験管内で抗酸化作用を示すが<sup>1~5)</sup>、実際に生体内で同様の作用を持つのかは明らかとなっていない。ウコンは歴史上、極めて長期間にわたって食用・薬用に用いられてきており安全性が高いと考えられ、実用上の期待が非常に高いと言える。

我々の研究グループでは、加齢にともなって起こる老化という現象のメカニズムに関する研究を行ってきた。一連の研究の過程で、加齢にともなって肝臓で特異的に減少するタンパク質として加齢指標タンパク質30 (Senescence Marker Protein 30; SMP30) を発見した<sup>6)</sup>。SMP30の機能は長い間不明であったが、2006年になってこのタンパク質がビタミンC (VC) の生合成に関与するグルコノラクトナーゼ (gluconolactonase; GNL) であることを発見した。このSMP30/GNLの遺伝子を破壊したマウス (SMP30/GNLノックアウトマウス) は体内でVCを合成することがで

きず、食餌・飲水からVCを与えなければ壊血病により致死となる<sup>7)</sup>。VCは強力な抗酸化作用を持つ水溶性のビタミンであり、実際にSMP30/GNLノックアウトマウスの脳では酸化ストレスの上昇が見られる<sup>8)</sup>。また、このマウスの脳スライスを用いた実験からは、VCの欠乏状態では脳において、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) のひとつであるスーパーオキシドの上昇が見られる。このスーパーオキシドの上昇は、マウスにVCを補給していた場合には観察されない<sup>9)</sup>。さらに重要なことには、VCの欠乏条件下においても脳内のスーパーオキシドディスムターゼなど抗酸化系の酵素は誘導されないため、酸化ストレスの上昇を補完する抗酸化系酵素の関与を無視できる。以上のことから、SMP30/GNLノックアウトマウスは、VCの補給の有無により生体、特に脳での酸化ストレスを制御できる非常に有用なモデル動物であると言える<sup>9)</sup>。

本研究では、SMP30/GNLノックアウトマウスを用いて、VC欠乏による酸化ストレスの負荷時にクルクミンが抗酸化作用を示すか否かを検討した。実験では、脳スライスを用いてLucigeninを用いたスーパーオキシドの検出をリアルタイムバイオラジオグラフィ法により行った<sup>10,11)</sup>。本研究ではクルクミン添加食による飼育を行ったマウスの脳のスライスを用いて実験を行ったため、クルクミンの抗酸化能をより生体内に近い状態で検討できると考えられる。

## 2. 材料および方法

### 2.1 動物

SMP30/GNL ノックアウトマウスは東京都健康長寿医療センター研究所の動物施設において SPF 環境下で飼育した。体重は 10 日ごとに測定した。

### 2.2 飼育試料

通常食として VC を含まない CL-2 (日本クレア) を用いた。クルクミン添加飼料として、1000 ppm (0.1 %) のクルクミン (和光純薬) を CL-2 をベースとして混合、再ペレット化したものを用いた (日本クレア)。コントロール飼料およびクルクミン添加飼料は 30 KGy のガンマ線滅菌により滅菌した。

### 2.3 実験群

全ての動物は、SMP30/GNL ノックアウトマウスのメスを用いた。生後 4 週間で離乳し、その後 6 週間以下の 4 条件で飼育した。各群の個体数は全て 6 匹である。

①飼育水に 1.5 g/l の VC を添加する。通常食 (CL-2) を与える。「VC (+) 通常食」群。

②飼育水に VC を添加しない。通常食 (CL-2) を与える。「VC (-) 通常食」群。

③飼育水に 1.5 g/l の VC を添加する。クルクミン添加食 (CL-2 + 1000 ppm クルクミン) を与える。「VC (+) クルクミン」群。

④飼育水に VC を添加しない。クルクミン添加食 (CL-2 + 1000 ppm クルクミン) を与える。「VC (-) クルクミン」群。

上記の VC の条件で、脳内の VC 量は、VC (+) 群では野生型マウスと同程度の濃度となり、VC (-) 群では顕著に減少することが分かっている<sup>9)</sup>。

### 2.4 リアルタイムバイオラジオグラフィー

脳スライスを用いた Lucigenin によるスーパー

オキシドの検出は先行研究にしたがって行った<sup>9~11)</sup>。マウスをジエチルエーテルで麻酔後、迅速に脳を取り出した。氷冷下でビブラトーム (Microslicer DTK-3000W ; Dosaka EM, Kyoto, Japan) により 300  $\mu$ m 厚のスライスを作成した。線条体部分を含むスライスおよび海馬部分を含むスライスをチャンバー内 (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose) に固定した。スライスの入ったチャンバーをバッファー中で 45 分間プレインキュベーションした後、2 mM lucigenin を含むバッファー 50 ml に移した。最初 120 分間は 100% の O<sub>2</sub> ガスをバッファー中にバブリングし酸素で飽和させた。その後、100% の N<sub>2</sub> ガスに切り替え 15 分間低酸素状態にした。さらにその後、再び 100% の O<sub>2</sub> ガスに切り替え再酸素化状態にした。イメージは 15 分ごとに積算し合計 17 フレームのイメージを得た。9 フレーム目が低酸素状態となる。

Lucigenin による蛍光は photon-counting camera (Intensified CCD camera C-2400-35 ; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) により検出し、イメージコントローラー (ARGUS-20; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) によりデータをプロセッシングした。シグナル強度は AQUACOSMOS (Hamamatsu Photonics K. K., Hamamatsu, Japan) により定量化した。

9 フレーム目が低酸素状態であり、7, 8 フレームのシグナル強度の平均値を “baseline”, 10, 11, 12 フレームのシグナル強度の平均値を “reoxygenation” としてデータ処理を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 体重の変化

VC の投与群では、クルクミンの添加・不添加

によらず飼育日数とともに体重が増加した。一方、VC の非投与群では離乳 2 週後から体重の減少が見られた。VC の非投与群ではクルクミンの投与により体重の減少が抑制された (図 1)。離乳 6 週時では、通常食飼育では VC (+) と VC (-) で体重に有意な差が観察されたが、クルクミンの投与群では有意な差がなかった (図 2)。このことは、VC の欠乏により引き起こされる体重の減少に対して、クルクミンはこの減少を抑制する効果があることを示している。

3.2 スーパーオキシドの量の変化

リアルタイムバイオラジオグラフィーによるイメージングの典型例を図 3 に示す。一過性の低酸素状態の後、再酸素化を行うと図 3 に見られるように急激にスーパーオキシドの生成量が上昇した。このスーパーオキシドの増加は、再酸素化後 15-30 分でピークに達し、その後基底状態へと減少していった (図 4)。このときの低酸素状態の直前の 2 フレームを baseline と定義し、低酸素直後の 3 フレームを reoxygenation と定義してデータの解析を行った (図 4)。

Baseline ではクルクミンの有無に関わらず、

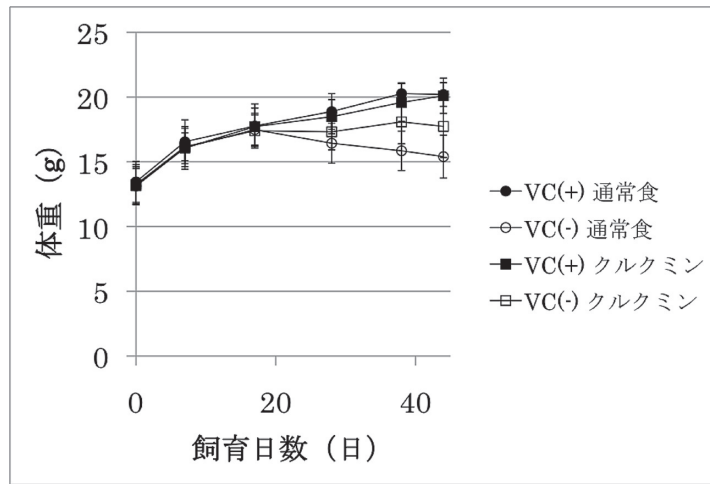


図 1 体重の変化  
VC (+) : VC 投与群, VC (-) : VC 非投与群

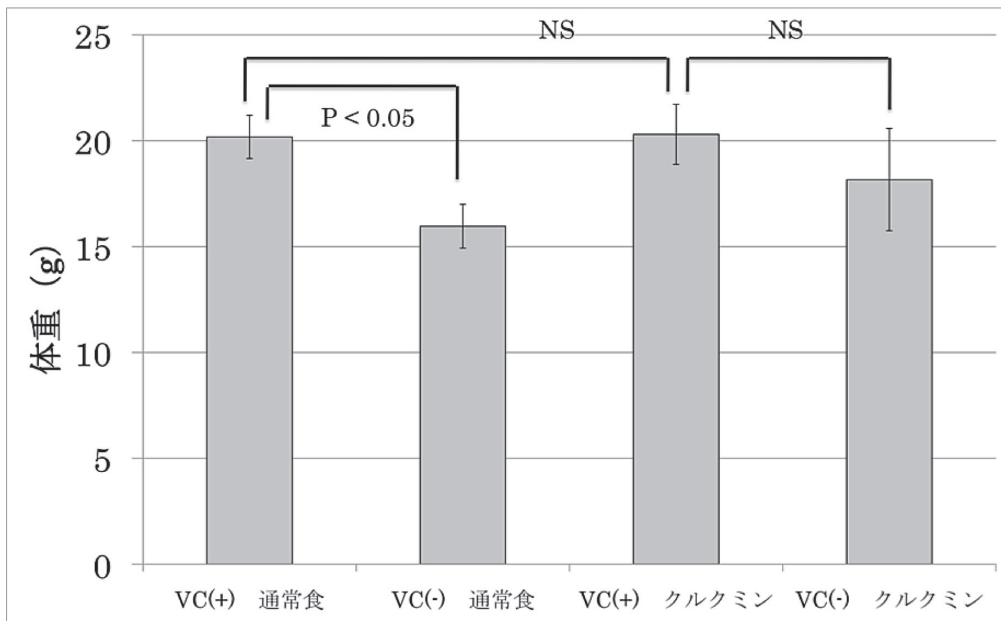


図 2 飼育 6 週間後の体重  
データは平均値 ± 標準偏差を表す。NS : 有意差なし。

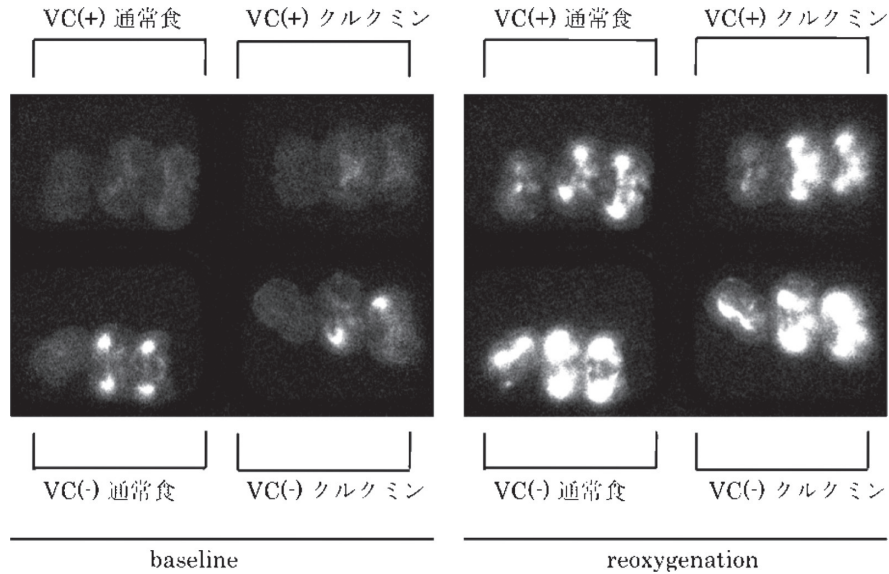


図3 リアルタイムバイオラジオグラフィーによるスーパーオキシドの検出  
各群には、線条体を含むスライス1枚と海馬を含むスライス2枚（左から右）合計3枚のスライスがのっている。

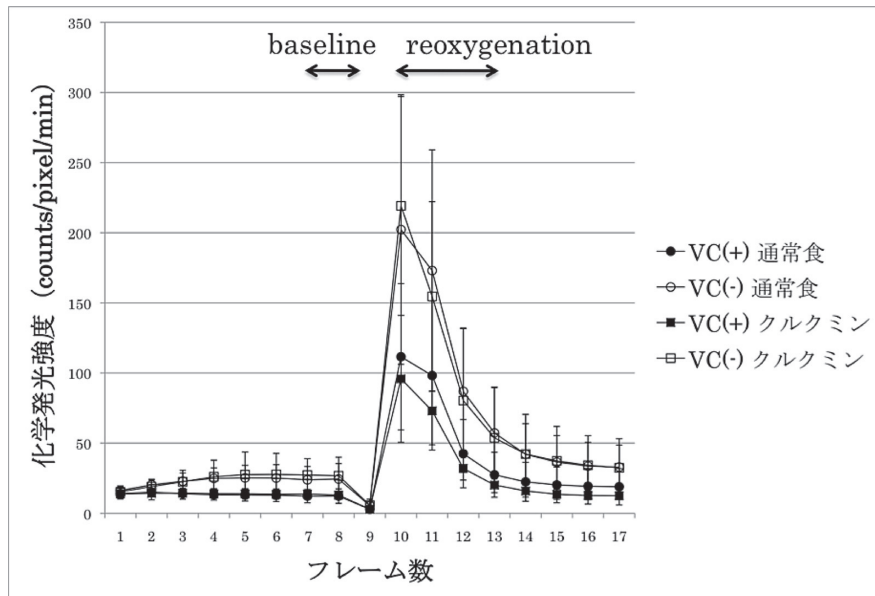


図4 虚血・再環流モデルにおけるスーパーオキシドの変化  
データは平均値±標準偏差を表す。

VC 欠乏群でシグナルが強かった。一方で、VC 欠乏群においては、クルクミンはシグナルの強度に影響を与えなかった（図5）。同様に、reoxygenation において、クルクミンの非投与群では VC の欠乏はシグナルを増加させる傾向があり ( $p = 0.053$ )、クルクミンの投与群では VC の欠乏はシグナルを有意に増加させた。一方で VC 欠乏群においては、クルクミンはシグナルの強度に影響を与えなかった（図6）。これらの結果は、クルクミンは VC 欠乏による脳内のスーパーオキ

シドの生成量の増加を抑制する効果は持たないことを意味する。

クルクミンおよびその代謝物・類似物質は試験管内では明確な抗酸化作用を示す<sup>1~5)</sup>。また、このような直接的な（化学物質としての）抗酸化作用に加えて、内在性の酵素・タンパク質に作用して間接的に、抗酸化作用・細胞保護作用をもたらすことが分かってきている<sup>12)</sup>。これらの知見に反して、本実験では、VC の欠乏によるスーパーオキシドの生成量の増加に対してクルクミンは影

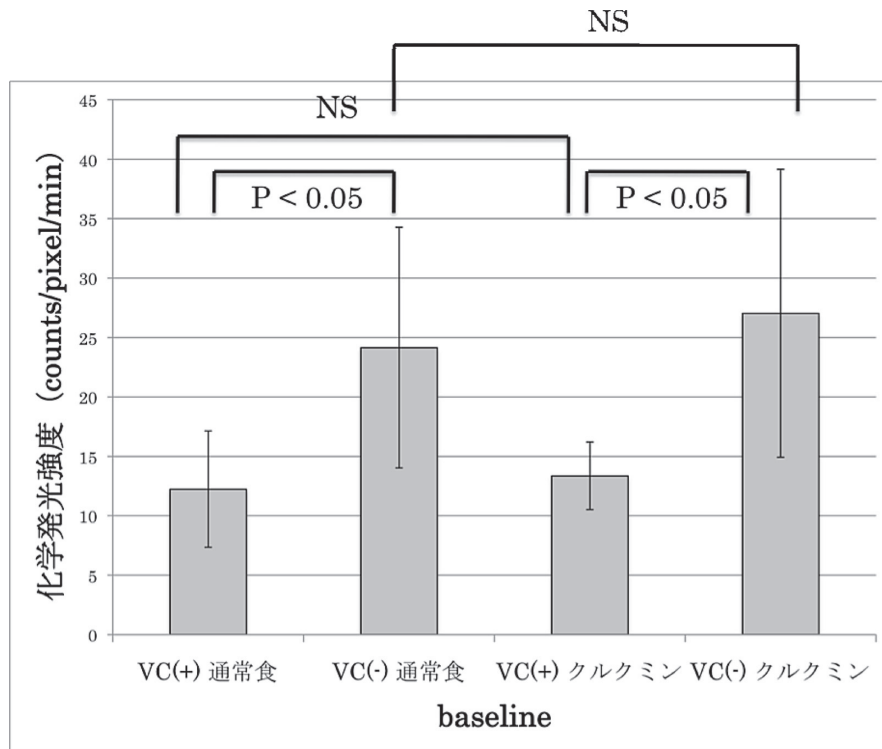


図5 Baseline におけるスーパーオキシドの量  
データは平均値±標準偏差を表す。NS：有意差なし。

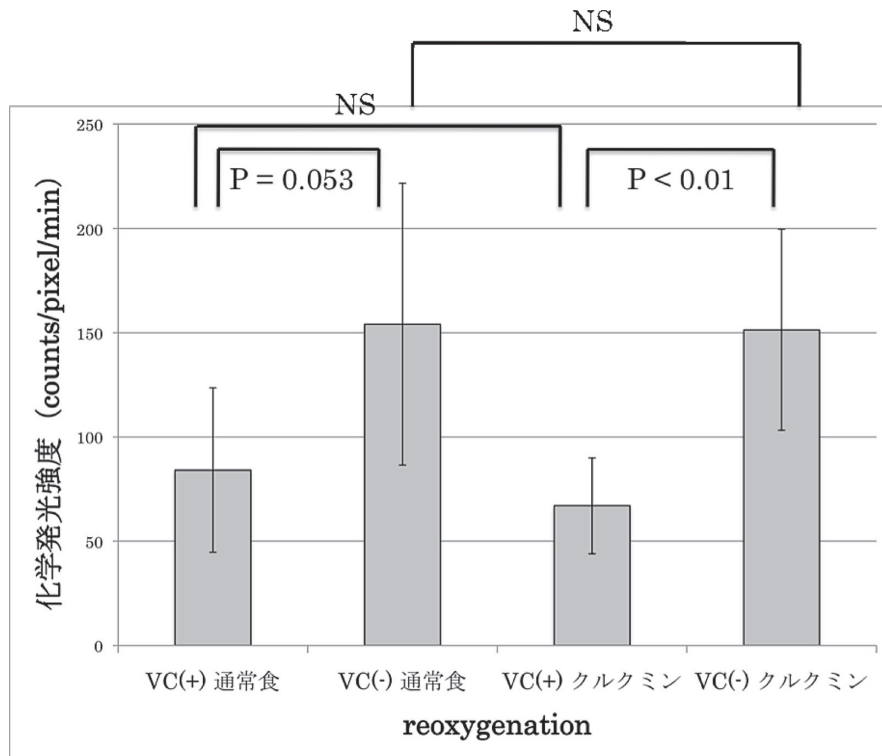


図6 Reoxygenation におけるスーパーオキシドの量  
データは平均値±標準偏差を表す。NS：有意差なし。

響を与えない結果が得られた。この理由のひとつとして、本実験での投与条件では標的器官である脳に十分量のクルクミンが到達・存在していない可能性が考えられる。しかしながら、先行研究に

おいては、本実験で用いたのと同じレベルの投与量・投与方法を用いて、アルツハイマー病モデルマウスの脳内の酸化ストレスがクルクミンにより低減されたことが報告されている<sup>13)</sup>。クルクミ

ンをエサに混合して投与する実験方法は多くの先行研究で行われている方法であり、また添加する濃度も本実験で用いた濃度と同レベルである。また、クルクミンは脳血管関門を通過して脳内に達することが報告されている<sup>14)</sup>。したがって、本実験で行った、クルクミンをエサに添加する方法でも脳内にはクルクミンが存在していると考えられる。

以上の結果から、次の二つの可能性が考えられる。ひとつは、クルクミンは試験管内では抗酸化作用を示すけれども、より生体に近い状態では実は抗酸化作用を持たないということである。もうひとつは、VC 欠乏状態というのは実験条件としては厳しすぎるため、クルクミンの効果が検出できなかったことが考えられる。VC は非常に強力な抗酸化物質であり、本実験でも明らかとなったように、脳での ROS の除去に極めて重要な役割を果たしていることが推測される。本実験で用いた VC 欠乏状態では、脳内の VC 濃度を非常に低下させてしまうことが我々の研究グループの研究から分かっている<sup>9)</sup>。このような条件は、脳内の環境としては極めて過酷な条件である。このことにより、クルクミンの効果は、仮にあったとしても、VC 欠乏という条件下では検出できなかったのではないかと考えられる。

一方で、クルクミンは、VC 欠乏による体重減少を抑制する効果を示した。このことは、VC とクルクミンはなんらかの関連性を持つことを示唆している。クルクミンは、体重というレベルでは VC 欠乏というデフェクトを補完しているようである。予備的な実験からは、この体重減少抑制という減少は一部には食欲の調節を介している可能性を示唆する結果が得られている。これに関してはさらなる検討が必要である。

## 謝 辞

本研究を遂行する上で、多大な研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝の意を表します。また、研究遂行にご協力頂きました東京都健康長寿医療センター研究所の佐々木徹博士、近藤嘉高博士、丸山直記博士および東邦大学薬学部の石神昭人博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Zhao B., Li X., He R., Cheng S., Wenjuan X. Scavenging effects of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biochem. Biophys.* 14, 175-185 (1989).
- 2) Osawa T., Sugiyama Y., Inayoshi M., Kawakishi S. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1609-1612 (1995).
- 3) Sugiyama Y., Kawakishi S., Osawa T. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem. Pharmacol.* 52, 519-525 (1996).
- 4) Priyadarsini K. I., Maity D. K., Naik G. H., Kumar M. S., Unnikrishnan M. K., Satav J. G., Mohan H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radical Biol. Med.* 35, 475-484 (2003).
- 5) Chen W. F., Deng S. L., Zhou B., Yang L., Liu Z. L. Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups. *Free Radical Biol. Med.* 40, 526-535 (2006).
- 6) Fujita T., Uchida K., Maruyama N. Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1116, 122-128 (1992).
- 7) Kondo Y., Inai Y., Sato Y., Handa S., Kubo S., Shimokado K., Goto S., Nishikimi M., Maruyama N., Ishigami A. Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5723-5728 (2006).
- 8) Son T. G., Zou Y., Jung K. J., Yu B. P., Ishigami A., Maruyama N., Lee J. SMP30 deficiency causes increased

- oxidative stress in brain. *Mech. Ageing Dev.* 127, 451-457 (2006).
- 9) Kondo Y., Sasaki T., Sato Y., Amano A., Aizawa S., Iwama M., Handa S., Shimada N., Fukuda M., Akita M., Lee J., Jeong K. S., Maruyama N., Ishigami A. Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 291-296 (2008).
- 10) Sasaki T., Iwamoto A., Tsuboi H., Watanabe Y. Development of real-time bioradiographic system for functional and metabolic imaging in living brain tissue. *Brain Res.* 1077, 161-169 (2006).
- 11) Sasaki T., Unno K., Tahara S., Shimada A., Chiba Y., Hoshino M., Kaneko T. Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Aging Cell* 7, 459-469 (2008).
- 12) Aggarwal B. B., Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 85-94 (2008).
- 13) Lim G. P., Chu T., Yang F., Beech W., Frautschy S. A., Cole G. M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* 21, 8370-8377 (2001).
- 14) Yang F., Lim G. P., Benum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P., Kaye R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 5892-5901 (2005).

## Does curcumin derived from turmeric show antioxidative effects in living brain ?

Hideaki Arai

(Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo)

Curcumin derived from turmeric functions as antioxidant *in vitro*, whereas its relevancy *in vivo* remains obscure. Here we utilized SMP30/GNL knockout mice which have deficiency in vitamin C (VC) biosynthesis. VC is a strong water-soluble antioxidant and hence SMP30/GNL knockout mice are useful *in vivo* tool for the evaluation of the effects of oxidative stress and also the efficacy of food-derived compounds with potential antioxidative action. The mice were fed with or without curcumin in the presence or absence of VC in the drinking water. Superoxide anion levels in the live brain were measured using a real-time imaging system in which Lucigenin is the chemiluminescent probe for detecting superoxide.

The body weight of VC(-) mice was significantly less than VC(+) mice in the control diet groups. In contrast, the body weight of VC(-) mice showed no significant difference from that of VC(+) mice in the curcumin-supplemented diet groups. Thus, curcumin suppressed the body weight loss induced by the VC depletion. The superoxide-dependent chemiluminescence levels determined by ischemia-reperfusion tended to be higher ( $p=0.053$ ) in the VC(-) mice than VC(+) mice in the control diet group. Similarly, the superoxide levels were significantly higher in the VC(-) mice than VC(+) mice supplemented with curcumin. Importantly, there was no significant difference in the superoxide levels between curcumin(-) mice and curcumin(+) mice in the absence of VC. Thus, curcumin had no suppressive effect on the increase of superoxide induced by VC depletion.

As opposed to the solid evidences for the function as an antioxidant *in vitro*, curcumin actually could have less impact in the experimental settings more resembling *in vivo* situation. Alternatively, oxidative stress induced by VC depletion could have been overwhelmingly intense so that antioxidative action of curcumin, if any, might have been undetectable by the methodology employed in the present study.