

SEAP リポーターアッセイを用いた 糖尿病合併症に対する予防効果の評価手法*

前田 穰**、山口 佑子***、小浜 恵子**、岸 敦****

アルドースレダクターゼ（AR aldose reductase）は糖尿病合併症の発症に関与しており、AR 遺伝子の発現を抑制することで、糖尿病合併症に対する予防効果が期待される。今回は SEAP リポーターアッセイを用いた、AR 遺伝子に対する発現抑制能についての評価手法を検討した。この手法を用いて 5 種類の食品抽出物の評価を行った結果、ゴボウ及びシソ抽出物に高い発現抑制能が認められ、糖尿病合併症に対する予防効果が示唆された。

キーワード：糖尿病、アルドースレダクターゼ、SEAP、リポーターアッセイ

Technique to evaluation of preventive effect in diabetes-complications using SEAP reporter assay

MAEDA Yutaka, YAMAGUCHI Yuko, KOHAMA Keiko and KISHI Atsushi

Aldose reductase(AR) is one of the cause in diabetes-complications. Suppression of this gene expression may prevent the diabetes-complications. In this study, technique to evaluation of suppression of AR gene expression were investigated using SEAP reporter assay. Examined 5 food-extract, *Arctium lappa*(Burdock) and *Perilla frutescens*(Shiso) were determined high suppression ability. Our results suggest that Burdock and Shiso may prevent diabetes-complications.

key words : diabetes, Aldose reductase, SEAP, reporter assay

1 緒 言

糖尿病は高血糖状態が持続する病気であり、神経障害、腎臓障害、視力障害等といった多くの合併症を伴う。我々は糖尿病合併症の進行を緩和する食品の検索に取り組んで来ており、前報において糖化タンパク質（AGE）生成抑制能¹⁾、アルドースレダクターゼ（AR）活性阻害能²⁾の測定による食品抽出物の評価結果について報告している。

糖尿病を発病し高血糖状態が続くと、AR により細胞内のソルビトールが増加し、浸透圧上昇等による神経障害等が引き起こされると考えられている。また、ソルビトールはポリオール経路を経てジカルボニル化合物となるが、ジカルボニル化合物は腎臓障害、視力障害の原因となる AGE の前駆体である。

このように糖尿病合併症の発症、重篤化には AR が関与しており、AR 遺伝子の発現を抑制する食品の摂取により、糖尿病合併症の予防もしくは進行緩和に繋がるものと予想される。本報告では、AR 遺伝子の発現を抑制する食品抽出物の検索を目的とした評価手法の検討とそれを用いて行った食品抽出物の評価について述べる。

2 実験方法

2-1 AR プロモーター導入細胞の作出

ARプロモーターは浸透圧応答性を有し、その配列も明らかにされている。Daoudalらの報告³⁾を参考にしてプライマーを設計し、mouse (ICR) liver genomic DNA（Seegene社製）を鋳型としてPCRを行い、AR遺伝子 5'末端上流域を取得した(mARf3:1147bp)。pSEAP2Basicベクター(Clontech社)のマルチクローニングサイト (SEAP: secreted form of human placental alkaline phosphatase 遺伝子上流) にmARf3 を挿入し、更にマーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を導入したプラスミド①を構築した(図1)。プラスミド①をCV-1 (アフリカミドリザル腎臓由来細胞) に常法により導入した。CV-1 は(財)ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから購入したものを扱い、1mg/mlジェネティシン (G418 GIBCO社) を含む培地で選択培養を行い、ARプロモーター導入細胞①を得た。また、対照としてプラスミド①からARプロモーターを除いたプラスミド②を同様に導入し、ARプロモーター非導入細胞②を得た。

* いわて新ブランド食品創生事業 ****商工企画室

** 食品技術部

*** 醸造技術部

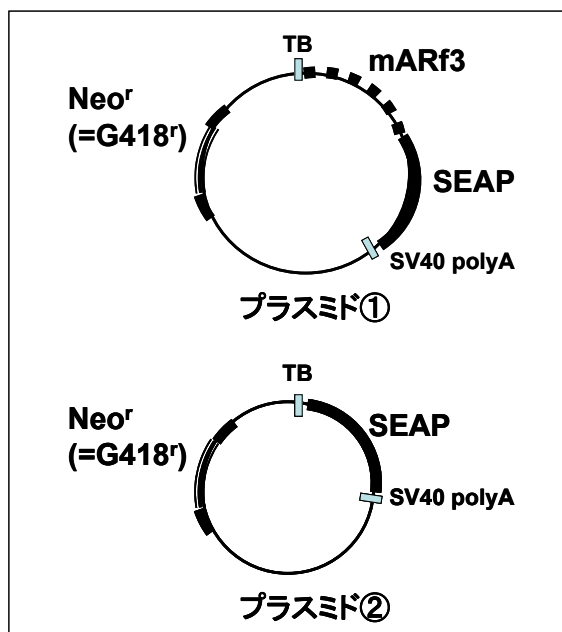


図1 プラスミドの構築

2-2 使用培地

イーグル MEM 培地「ニッスイ③」（日水製薬社）に、FBS (GIBCO 社) を 10%、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution(5000u PCs and 5mgSM/ml ナカライテスク社) を 1%、ジェネティシンを 1mg/ml 含むように加え、調製した。選択培養、増殖培養及び予備培養に用いた培地のグルコース濃度は 5mM であり、試験培養時には必要に応じてグルコース濃度を高めた。

2-3 作出した細胞の SEAP 産生能の確認

培養した細胞を培地に懸濁し、80%コンフルエント濃度となるように 24 穴培養プレートに入れ、24 時間、予備培養した。

次に、培地を除去し、グルコース濃度を 5mM、30mM、200mM に調整した培地を培養プレートに加え、試験培養を行った。試験培養開始から、24 時間後、48 時間後、72 時間後の培地を回収し、Great EscApe SEAP Detection Kit (クロンテック社) を用いて、化学発光法で SEAP 量を測定した。

2-4 食品抽出物の調整

食品(ゴボウ、シソ、ヤマブドウ、カリン、アカモク)の可食部を凍結乾燥後、粉碎し、10 倍量 (W/V) の純水で熱水抽出し、0.20 μ m のシリンジ・フィルターで濾過した。

2-5 食品抽出物の評価手法の検討

培養した細胞を培地に懸濁し、80%コンフルエント濃度となるように 24 穴培養プレートに入れ、24 時間、予備培養した。

次に、培地を除去し、グルコース濃度を 200mM に調整した培地を培養プレートに加え、G-ルチン、(-)-エピカテキン、食品抽出物を目的の濃度となるように加え、試

験培養を行った。試験培養開始から、72 時間後の培地を回収し、クロンテック製の Great EscApe SEAP Detection Kit を用い、化学発光法で SEAP 量を測定した。

3 結果および考察

3-1 作出細胞の SEAP 産生能の確認

図2に評価手法のイメージを示した。浸透圧応答領域を含む AR プロモーター遺伝子を導入した細胞を、評価対象物を含む高グルコース培地で培養した際の AR プロモーター遺伝子の活性化を比較することにより、AR 遺伝子に対する発現抑制能を評価することができる。AR プロモーター遺伝子の活性化は、レポーター遺伝子として導入した SEAP 遺伝子の発現により、培地中に放出される SEAP 量から把握することができる。

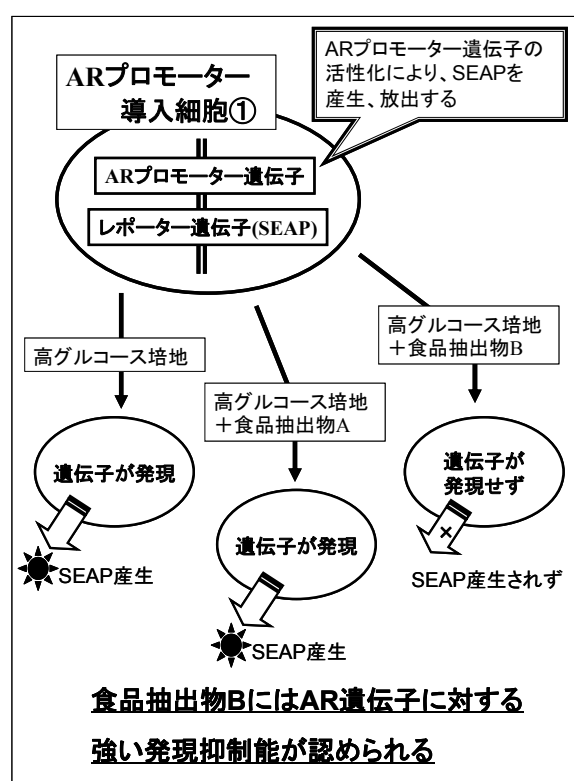


図2 評価手法のイメージ図

作出細胞の SEAP 産生量の確認結果を図3に示した。試験培地のグルコース濃度は、健常時の血糖値を反映した 5mM、糖尿病態での血糖値を反映した 30mM、極端に浸透圧を高めたものとして 200mM の3条件とした。SEAP 産生量の測定は、化学発光と蛍光発光法について予備検討を行い、G-ルチンや食品抽出物の影響が少ない化学発光法を採用した。

AR プロモーター導入細胞①の 200mM グルコース培地での SEAP 産生量は、いずれの培養時間においても高かった。AR プロモーター導入細胞の 30mM グルコース培地での SEAP 産生量はいずれの培養時間においても、200mM グルコース培地での SEAP 産生量の半分程度であった。AR プロモーター導入細胞の 5mM グルコース培地でも SEAP

産生量は、培養時間 24 時間及び 48 時間では少なかったが、培養 72 時間では急増した。

AR プロモーター非導入細胞②では、いずれのグルコース濃度、培養時間においても SEAP の産生量は少なかった。

この結果からは、AR プロモーター導入細胞①でのグルコース濃度の上昇、すなわち浸透圧の上昇への応答は明確ではなかった。48 時間までの培養では応答がみられるので、培養条件、培養時間等を再検討する必要がある。

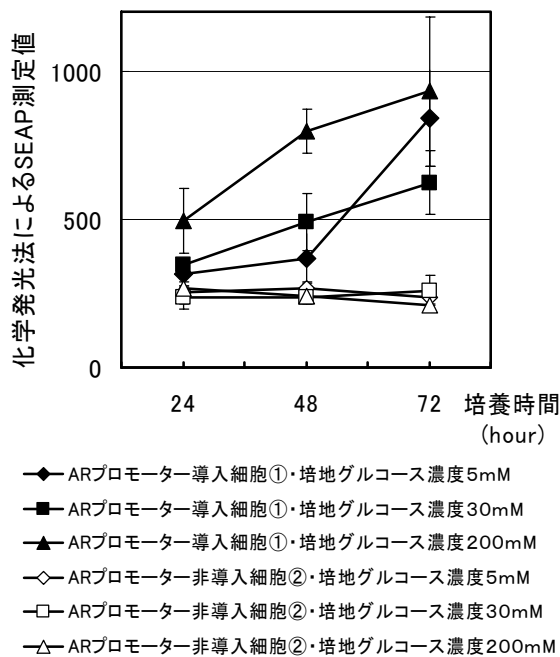


図 3 作出細胞の SEAP 産生量

3-2 AR 遺伝子に対する発現抑制能の評価手法の検討

作出された細胞を用い、試薬及び食品抽出物を対象とした試験を行い、AR 遺伝子に対する発現抑制能の評価手法を検討した。

AR の酵素活性は、フラボノイド類により抑制されることが報告されている⁴⁾。今回は G-ルチン及び (-)-エピカテキンを用い、遺伝子の発現抑制について検討した。G-ルチン、(-)-エピカテキンともに、100 μ M、10 μ M、1 μ M について検討を行った。培養時に細胞の変形、崩壊は起こらなかった。

食品抽出に対する評価は、ゴボウ、シソ、ヤマブドウ、カリン、アカモクの抽出物について行った。ゴボウについては、抽出物を 10% 含む培地で培養した際に、細胞の異常が認められなかったため、試験時の培地への添加量は 10、1、0.1% とした。シソ及びヤマブドウについては、抽出物を 10% 含む培地で培養した際に、細胞の崩壊が認められたため、試験時の培地への添加量は 1、0.1、0.01% とした。カリン及びアカモクについては、抽出物を 1% 含む培地で培養した際に、細胞の変形が認められたため、試験時の培地への添加量は 0.1、0.01、0.001% とした。

AR 遺伝子に対する発現抑制能は 200mM グルコース培地で 72 時間の試験培養を行った際の培養液中 SEAP の量か

ら AR 遺伝子発現率を求め、評価した。AR 遺伝子発現率は式 1 により求めた。

$$\text{AR 遺伝子発現率 (\%)} = (A - C) / (B - C) \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

A : 食品抽出物等を加え、AR プロモーター導入細胞の試験培養を行った培地の SEAP 測定値

B : 食品抽出物等を加えずに AR プロモーター導入細胞の試験培養を行った培地の SEAP 測定値

C : 食品抽出物等を加えずに AR プロモーター非導入細胞の試験培養を行った培地の SEAP 測定値

なお、G-ルチン溶液、ゴボウ抽出物については、化学発光への阻害が認められたため、Alkaline Phosphatase 標準液を用いて阻害率を求め、補正した。

AR 遺伝子発現率についての結果を図 4 に示す。G-ルチン、(-)-エピカテキンについては高い値を示し、検討を行った濃度では発現抑制が認められなかった。ゴボウ、シソについては AR 遺伝子発現率が低くなり、AR 遺伝子の発現を抑制していることが示唆された。ヤマブドウ、カリン、アカモクなどポリフェノール含量の高いもので阻害がみられなかったことから、ゴボウ、シソでみられた抑制は他の成分によるものと推測している。

今回の検討から、AR 遺伝子の活性化抑制能を簡便に評価する手法を概ね構築できたので、本評価系を用いた新たな機能性素材を見出すことが期待できる。

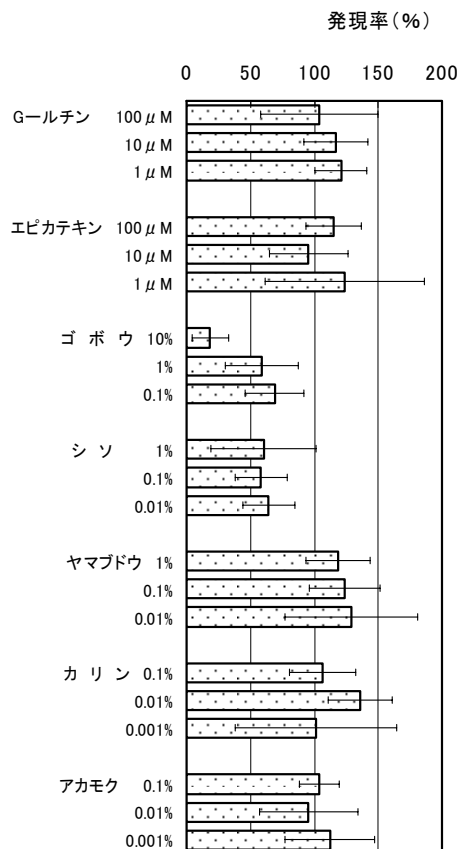


図 4 アルドースレダクターゼ遺伝子発現率

4 結 言

食品抽出物等を対象とした、アルドースレダクターゼ遺伝子の発現抑制能の評価手法として、AR 遺伝子を導入した細胞を用いた、SEAP リポーターアッセイを概ね確立することができた。

ゴボウ、シソの抽出物について、糖尿病合併症の予防効果が示唆された。

本研究を行うにあたり、ご助言を頂いた岩手大学農学部農業生命科学科食品健康科学講座、長澤孝志教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 山口 佑子、岸 敦、小浜 恵子：岩手県工業技術センター研究報告，11，15-18 (2004)
- 2) 山口 佑子、岸 敦、小浜 恵子：岩手県工業技術センター研究報告，12 (2005)
- 3) Daoudal, S. Tournaire, C. Halere, A. Veyssiere, G. and Jean, C. :J. Biol. Chem., 272, 2615-2619 (1997)
- 4) Matsuda, H. Morikawa, T. Toguchida, I. and Yoshikawa, M. :Chem. Pharm. Bull., 50(6) 788-795(2002)