

天然物由来の Nrf2 活性化因子

守谷 智恵, 川上 賀代子, 坪井 誠二*

就実大学 薬学部 生化学研究室

Nrf2 activators from natural products

Chie Moritani, Kayoko Kawakami, Seiji Tsuboi*

Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 15 November 2018; accepted 17 December 2018)

Abstract: Oxidative stress is thought to be related to the progression of diseases including cancer, neurodegenerative disorders, and diabetes. Maintenance of the intracellular redox balance by decreasing oxidative stress through antioxidative molecules and enzymes may be important in the prevention of these pathological conditions. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) has been recognized as the master regulator of the antioxidant response. It modulates the expression of the genes encoding antioxidative and phase II detoxifying enzymes in response to oxidative stress. Recent studies have shown that many bioactive compounds from natural products (i.e., phytochemicals) can activate the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-Nrf2 pathway. Studies have also demonstrated the cytoprotective and other beneficial effects of the bioactive compounds in various pathological conditions related to oxidative stress. In this review, we describe the molecular mechanism of the Keap1-Nrf2 pathway and its activation by selected key compounds. We also introduce our findings of the antioxidative activity associated with the rice-derived protein hydrolysates.

Keywords: antioxidants; natural products; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; phytochemical; rice-derived peptides

1. はじめに

活性酸素種は、生体内のエネルギー代謝や病原微生物の感染防御過程などにおいて発生する。このように発生した活性酸素種は、抗酸化物質や抗酸化酵素の働きにより除かれるが、生体内の酸化・抗酸化のバランスがくずれ活性酸素種による

障害が大きくなると、いわゆる酸化ストレスという状態になる。十分に除くことのできなかつた活性酸素種は、脂質、核酸、タンパク質などの生体分子の酸化損傷を引き起こし生体の機能を損なわせ、老化、がん、神経変性疾患、動脈硬化、糖尿病などのさまざまな疾患の原因や増悪化に関

与することが示されている^{1,4)}。

酸化ストレスによる障害から生体を防御し、酸化・抗酸化のバランスを保つために、生体内で抗酸化物質や抗酸化酵素が重要な働きをしている。野菜や果実に含まれるビタミンC、Eなどは、活性酸素種やラジカルと直接反応することで抗酸化作用を示す。植物二次代謝物であるファイトケミカルは多彩な生理機能を示すが、中でも抗酸化作用が注目されている。抗酸化作用成分を含む野菜や果実の多量の摂取が、酸化ストレスが関与する疾患予防に効果があることは疫学的に示されている^{5,6)}。近年、ビタミン類やファイトケミカルが示す活性酸素種やラジカル消去による直接的な抗酸化作用に加えて、生体内の抗酸化酵素の発現を誘導することや生体内で合成される抗酸化物質であるグルタチオン量を増やすことによる間接的な抗酸化作用が注目されている。酸化ストレスに応答し、抗酸化酵素群を誘導するシステムとして Keap1-Nrf2 経路が知られている⁷⁾。本来、生体にある Keap1-Nrf2 経路を活性化することは、酸化ストレスに対する生体防御能を増強することにつながる。このような期待から、Keap1-Nrf2 経路を活性化する天然物に関する論文が数多く報告されている⁸⁾。本稿では、Keap1-Nrf2 経路を概説し、この経路を活性化する天然物由来の物質について述べる。また、最近我々が明らかにしたペプチド性の活性化因子についても紹介する。

2. Keap1-Nrf2 経路

転写因子である Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) は、当初グロビン遺伝子発現制御領域中の NF-E2 結合配列に結合する因子として単離された^{9,10)}。その後 Itoh らによって、NF-E2 結合配列と抗酸化剤応答配列 (anti-oxidant responsive element, ARE) との類似性から、Nrf2 が small Maf とヘテロ二量体を形成して ARE に結合することで、異物代謝酵素群遺伝子の発現制御を行うことが示され、酸化ストレス防御におけ

る重要性が明らかとなってきた⁷⁾。

酸化ストレスのない状態では Nrf2 は Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) に補足され細胞内にとどめられている。Keap1 は Cullin3 とユビキチン結合酵素複合体を形成し、ユビキチンリガーゼとして働き、Nrf2 をユビキチン化する。その結果、Nrf2 はプロテアソームによって分解される。このように非ストレス下においては、Nrf2 は Keap1 により修飾を受けて分解されており、Keap1 は負の制御因子として機能している¹¹⁾。

一方、活性酸素や親電子物質などに曝された状態、すなわち酸化ストレス下において Nrf2 は安定化する。Keap1 は高反応性のシステイン残基をもち、親電子化合物などにより修飾を受けると高次構造が変化し Nrf2 との相互作用が抑制され、Nrf2 のユビキチン化が減弱する。その結果、Nrf2 は安定化して核内へ移行し、標的遺伝子群の転写を活性化する¹²⁾。このように Keap1 はストレスセンサーとして機能している。また Keap1 非依存的な Nrf2 の活性化経路も知られており、Nrf2 のリン酸化の関与が示されている。細胞種や刺激により異なるが、プロテインキナーゼ C (PKC)、PI 3-キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase: ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ) /Akt 経路、MAP キナーゼ (mitogen-activated kinase: マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) 経路などの関与が示されている^{13,14)}。

3. Nrf2 により制御される遺伝子発現

Nrf2 は、様々な抗酸化酵素群や解毒代謝酵素群の発現を誘導する。例えば、グルタチオン合成に関わる γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) やグルタチオン合成酵素、抗酸化物質であるビリルビン産生に関与するヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1)、異物代謝酵素である NAD(P)H キノン還元酵素 (NQO1)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、更に抱合体の排出に関わる MDR1 などが知られている¹⁵⁾。また近年、酸化ストレス防御以外にも、ペントースリン酸経路に関わる酵素

の発現誘導や炎症性サイトカインの発現抑制など多様な標的遺伝子をもつことも明らかとなっている^{16,17)}。

4. Nrf2 を活性化する天然物由来成分

以上の様に, Keap1-Nrf2 経路は酸化ストレス防御において中心的役割を果たしている. 天然物由来の Nrf2 活性化因子については数多くの研究がなされているが, 以下に例を挙げて, Nrf2 活性化に関する知見を中心に紹介する (図 1).

1) クルクミン

ターメリックなどに含まれる黄色のポリフェノール化合物である. がん, 神経変性疾患, 糖尿病, 心疾患, 炎症性腸疾患など様々な病気に対する有効性が報告されている¹⁸⁾. クルクミンと Nrf2 の関係については, マウスへのクルクミンの経口単回投与により肝臓で 664, 小腸において 154 の Nrf2 標的遺伝子の発現が誘導されることが示されている¹⁹⁾. クルクミンは分子内に 2 つの α, β 不飽和カルボニル基を有している. そのためチオール基のような求核基を有する化合物と反応 (マイ

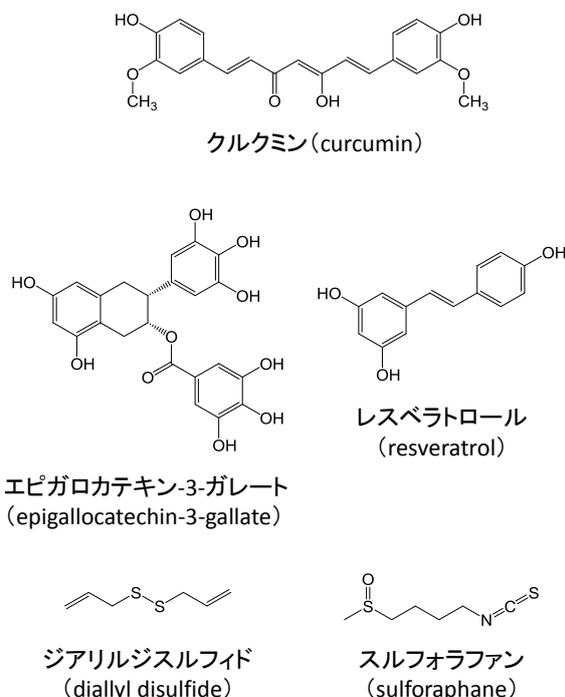


図 1 Nrf2 を活性化する天然物由来成分

ケル付加反応) する可能性があり, Keap1 のシステイン残基を修飾することで Nrf2 を活性化する可能性が指摘されている^{8,20)}. クルクミン以外に親電子性を有するケルセチン, クマリン類, フラボノイド, テルペノイドなどにおいても, 同様のメカニズムによる Nrf2 の活性化が示唆されている²⁰⁾. 適度なストレスが生体防御機構を活性化するこの様な作用は, ファイトケミカルのホルミシス効果ととらえられている.

その他の Nrf2 活性化機構として, 腎上皮細胞におけるクルクミンによる HO-1 の発現誘導において, p38 MAP キナーゼのリン酸化が誘導されることや p38 MAP キナーゼ阻害剤により Nrf2 の活性化が抑制されることから, p38 MAP キナーゼ経路の関与が示されている²¹⁾. 膵臓 β 細胞 (MIN6 細胞) におけるクルクミンやその類似化合物であるデメトキシクルクミンによる HO-1 発現誘導においては, 主に PI3K/Akt 経路が, 一部に PKC δ の関与が示されており, クルクミンによる Nrf2 活性化は細胞により異なることが指摘されている²²⁾.

2) カテキン

カテキンは, エピカテキン, エピガロカテキン, エピカテキンガレート, エピガロカテキンガレート (EGCG) など様々な種類が知られているフラボノイド系のポリフェノールである. 中でも EGCG は緑茶中に含まれる主要なカテキンであり, 抗酸化作用を始め, がん, 糖尿病, 肥満, 動脈硬化, 感染症などに対する予防効果が明らかとなっている²³⁾. 血管内皮細胞における EGCG による HO-1 の発現誘導や, 乳がん上皮細胞における EGCG の抗酸化酵素群の発現誘導および Nrf2 の核移行において, PI3K/Akt 経路および ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2 経路の関与が示されている^{24,25)}. その他の機構として, EGCG 自己酸化により生成した活性酸素や酸化により生成したキノン体が直接 Keap1 を修飾することによる Nrf2 の活性化が示されている²⁶⁾.

更に、EGCG を過剰に投与した場合に、EGCG キノン体のグルタチオン抱合体が尿中に排泄されることから、その結果生じる細胞内グルタチオンレベルの低下により酸化ストレスが誘導され、キナーゼの活性化を介し Nrf2 が活性化されるという機構が示唆されている^{26, 27)}。

3) レスベラトロール

レスベラトロールは、がん、炎症、心血管疾患、糖尿病、肥満、老化などに対する保護作用が報告され、近年注目されているポリフェノールである²⁸⁾。ブドウや赤ワインなどに含まれており、「赤ワインの摂取量が多いフランスでは、動物性脂肪の摂取が多いにもかかわらず、心疾患による死亡リスクが低い」といういわゆる「フレンチパラドックス」に關与する物質として注目を集めた²⁹⁾。SIRT-1 (sirtuin 1) を介したグルコース代謝の制御、ミトコンドリアの新生や機能の改善、HMG-CoA還元酵素阻害作用、LDL 受容体発現抑制による脂質過酸化の抑制など、レスベラトロールの多彩な作用が示されている³⁰⁾。抗酸化に関しては、ヒト肺上皮細胞において、細胞内グルタチオン量上昇や Nrf2 の核移行を誘導すること、ヒト表皮角化細胞において抗酸化酵素の発現誘導や Nrf2 の核移行を誘導することが報告されている^{31, 32)}。Nrf2 の活性化メカニズムについては、PC12 細胞における HO-1 発現誘導や Nrf2 の ARE 配列への結合において、ERK1/2 および Akt の関与が示されている³³⁾。また、レスベラトロールのオートファジー誘導に關する研究から慢性骨髄性白血病細胞である K562 において、レスベラトロールがオートファジーの基質である p62 の発現を誘導することが報告されている³⁴⁾。p62 はリン酸化を受けることにより Keap1 と結合することで Keap1 は不活化し、その結果 Nrf2 を安定化することから³⁵⁾、Nrf2 の活性化に p62 の発現誘導が關与する可能性もある。

4) スルフォラファン

スルフォラファンはイソチオシアネートの一種で、ブロッコリーやキャベツなどのアブラナ科の植物に含まれる。がんや神経変性疾患、糖尿病などの慢性疾患などのリスクを低下させる物質として多くの報告がなされている³⁶⁾。スルフォラファンは Keap1 のチオール基、特に Cys151 に直接結合することで Nrf2 の核移行を促進することが示されている³⁷⁾。HepG2 細胞における Nrf2 の活性化では、スルフォラファンは ERK1/2 を活性化する一方で、p38 MAP キナーゼの活性を阻害する。更に p38 MAP キナーゼの過剰発現によりスルフォラファンによる Nrf2 の核移行が抑制されること、*in vitro* の実験から p38 MAP キナーゼによる Nrf2 のリン酸化が Nrf2 と Keap1 の相互作用を促進することから、スルフォラファンは p38 MAP キナーゼを活性化し、Nrf2 を負に制御することが示されている³⁸⁾。その他、JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase)、PKC を介して Nrf2 を正に、Akt、GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) を介して Nrf2 を負に制御することが報告されている³⁹⁾。また、細胞内でスルフォラファンはグルタチオンと結合する結果、細胞内グルタチオンレベルの低下を導く⁴⁰⁾。親電子性を示すカテキンやクルクミンと同様に、細胞内でグルタチオンと結合することにより誘導されるグルタチオンレベルの低下が細胞内の酸化ストレスを誘発し、Nrf2 を活性化している可能性も考えられる。

5) ジアリルスルフィド

ジアリルスルフィドは、ニンニクやタマネギなどのネギ属植物に含まれる脂溶性のチオエステルで、ジアリルスルフィド、ジアリルジスルフィド、ジアリルトリスルフィドなどがある。疫学的研究および動物実験により、ジアリルスルフィドを多く含むニンニクの摂取による抗血栓作用や抗がん作用が報告されている⁴¹⁾。HepG2 細胞において、ジアリルトリスルフィドが Nrf2 を介し NQO1 および HO-1 の発現誘導を導くこと、その

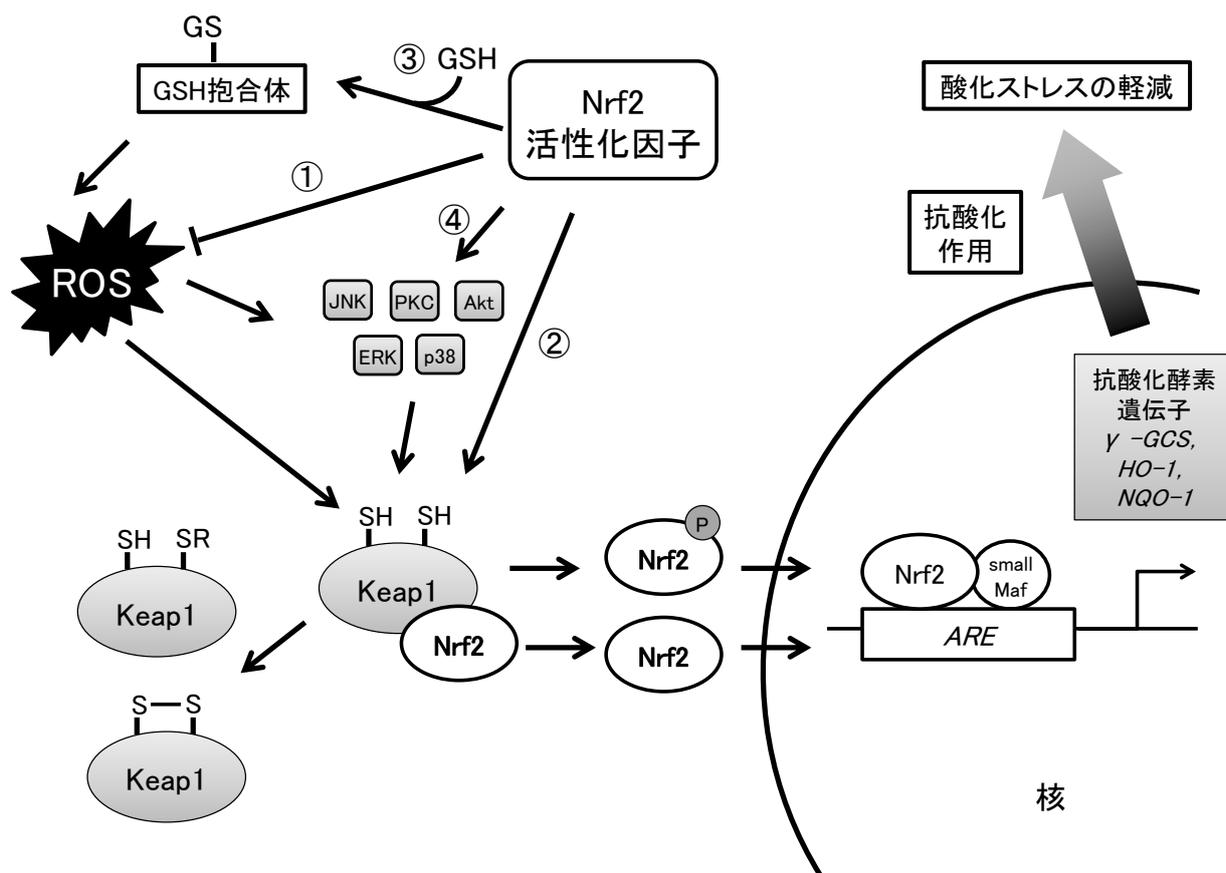


図2 今回取り上げた天然物の抗酸化作用メカニズムの模式図

①活性酸素 (ROS) 消去による直接的な抗酸化作用. Keap1-Nrf2 経路を介した抗酸化作用においては、②親電子性をもつクルクミン、スルフォラファンなどによる Keap1 修飾を介した Nrf2 の活性化、③スルフォラファンや EGCG の代謝物がグルタチオン (GSH) 抱合体を形成することにより誘導された酸化ストレスによる Nrf2 の活性化、④キナーゼによる Nrf2 リン酸化を介する Nrf2 の活性化 (関与するキナーゼについては、活性化因子等により異なる) といったメカニズムが示されている。

過程に MAP キナーゼの ERK1/2, JNK, p38 が関与することが示されている⁴²⁾. また、ジアリルスルフィド処理により、細胞内の活性酸素レベルが処理後一過的に上昇するが、N-アセチルシステイン (NAC) 処理によりコントロールレベルにまで抑制されること、NAC 処理により Nrf2 核移行や ERK のリン酸化が抑制されることから、ジアリルスルフィドより生成される活性酸素が Nrf2 の活性化を誘導することが示唆されている⁴³⁾.

6) 米由来ペプチド

大豆, 卵, 乳, ホエイなどのタンパク質の加水

分解物において、ラジカル消去活性、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性、プロオキシダント作用を示す金属に対するキレート効果など直接的な抗酸化作用をもつペプチドが数多く同定されている⁴⁴⁾. 一方で、Nrf2 経路を介して抗酸化作用を示すペプチドとしては、卵由来のペプチドが Caco-2 および HT-29 細胞において γ -GCS, HO-1, NQO1 および Nrf2 の発現の誘導を示すことが明らかにされているが、報告例は少ない⁴⁵⁾. 近年我々の研究室において、米ぬかタンパク質加水分解物にグルタチオン上昇作用や γ -GCS, HO-1, NQO1 などの抗酸化酵素の発現誘導作用が

あること、その過程で Nrf2 の核移行が促進されることを明らかにした⁴⁶⁾。更に白米タンパクや酒粕の加水分解物にもグルタチオン上昇作用があること、グルタチオンの枯渇が問題となるアセトアミノフェン誘導性肝障害を抑制することを明らかにしてきた^{47,48)}。以上のことから、米に由来するペプチドが Nrf2 の活性化を介して、酸化ストレスによる細胞や生体の傷害に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。また、最近、過酸化水素による酵素活性低下に対する抑制効果を指標に、白米ペプチドから活性ペプチドを2種類同定した。そのうちの18アミノ酸残基からなるペプチドが細胞内グルタチオン量を上昇させることから⁴⁹⁾、Nrf2 活性化作用を有することが期待される。米に由来するタンパク質の加水分解物や同定したペプチドが、細胞外から作用するのかあるいは細胞内に取り込まれ効果を示すのか、Keap1 依存性あるいは非依存性に Nrf2 を活性化するのかなど、作用メカニズムについて現在解析を進めているところである。

5. 終わりに

食品の機能性に興味をもたれるようになり、中でも疾患や老化予防が期待できるとして抗酸化作用は注目されている。今回取り上げた天然物の抗酸化作用メカニズムの模式図を図2に示した。

天然物由来の抗酸化物質の直接的抗酸化作用と、Keap1-Nrf2 経路を介した間接的抗酸化作用を比較した興味深い報告がある。直接的抗酸化作用を示す物質と比較して、間接的抗酸化作用を示す物質の方が酸化ストレスによる細胞障害抑制効果が大きい、逆に細胞毒性の強いものも多いことが示されている⁵⁰⁾。またポリフェノールに関しては、ポリフェノール自体が酸化されやすいため高い抗酸化性をもつが、その結果生成した物質のプロオキシダント効果による傷害が指摘されている⁵¹⁾。これらはファイトケミカルで知られているホルミシス効果の例ともいえる。現在、今回取り上げた物質については、健康食品やサプリメント

ントとして利用されているものもあり、比較的安全性は高いと考えられるが、上記の様な指摘もある。我々が注目しているペプチド性の Nrf2 活性化因子は、日本人が主食としている米成分由来であり、より安全な Nrf2 活性化因子といえるのではないかと考えている。

Nrf2 活性化作用をもつ薬として、多発性硬化症の治療薬ジメチルフマル酸が認可されている。また、バルドキシロンメチルは糖尿病腎症を対象として現在臨床試験が行われている。今回取り上げた物質以外にも多くの Keap1-Nrf2 経路を活性化物質の報告があり、病態モデルでの効果が示されているものもある^{8,52)}。今後、これらの中からあるいは新たなものから、酸化ストレスが関与する疾患の予防や治療に応用される物質の開発が期待される。

引用文献

- 1) Trachootham D, Alexandre J, & Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 579–591 (2009).
- 2) Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.*, **23**, 599–622 (2002).
- 3) Lefter DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. Med.*, **109**, 315–323 (2000).
- 4) Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv. Pharmacol. Sci.*, **2011**, Article ID 572634 (2011).
- 5) Joshipura, KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer, M. J, Rimm E.B, Speizer FE, Hennekens CH, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA* **282**, 1233–1239 (1999).
- 6) Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr* **78**, 559S–569S (2003).

- 7) Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.*, **236**, 313-322 (1997).
- 8) Kumar H, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat. Prod. Rep.*, **31**, 109-139 (2014).
- 9) Moi P., Chan K., Asunis L., Cao A., Kan Y.W.: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9926-9930 (1994).
- 10) Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 4184-4193 (1995).
- 11) Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, **13**, 76-86(1999).
- 12) Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7130-7139 (2004).
- 13) Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, Mandlekar S. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab. Rev.*, **33**, 255-271 (2001).
- 14) Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, **277**, 42769-42774 (2002).
- 15) Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biol. Med.*, **36**, 1208-1213 (2004).
- 16) Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*, **22**, 66-79 (2012).
- 17) Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.*, **7**, 11624 (2016).
- 18) Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 40-59 (2009).
- 19) Shen G, Xu C, Hu R, Jain MR, Gopalkrishnan A, Nair S, Huang MT, Chan JY, Kong AN. Modulation of nuclear factor E2-related factor 2-mediated gene expression in mice liver and small intestine by cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 39-51 (2006).
- 20) Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Ilay P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 98**, 3404-3409 (200).
- 21) Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J.*, **371**, 887-895 (2003).
- 22) Pugazhenthii S, Akhovi L, Selvaraj G, Wang M, Alam J. Regulation of heme oxygenase-1 expression by demethoxy curcuminoids through Nrf2 by a PI3-kinase/Akt-mediated pathway in mouse beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **293**, E645-655 (2007).
- 23) Suzuki Y, Miyoshi N, Isemura M. Health-promoting effects of green tea. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **88**, 88-101 (2012).
- 24) Wu CC, Hsu MC, Hsieh CW, Lin JB, Lai PH, Wung BS. Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci.*, **78**, 2889-2897 (2006).
- 25) Na HK, Kim EH, Jung JH, Lee HH, Hyun JW, Surh YJ. (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cell. *Arch. Biochem. Biophys.*, **476**, 171-177 (2008).
- 26) Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 1271-1278 (2008).
- 27) Sang S, Lambert JD, Hong J, Tian S, Lee MJ, Stark RE, Ho CT, Yang CS. Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1762-9 (2005).
- 28) Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 114-23 (2015).
- 29) Renaud S, Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**, 1523-1526 (1992).
- 30) Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, **8**, E250 (2016).
- 31) Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **294**, L478-488 (2008).
- 32) Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, Fan D, Zhao D, An J, Zhou D. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur. J. Pharmacol.*, **650**, 130-137 (2011).
- 33) Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 993-1000 (2005).
- 34) Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell*, **51**, 618-631 (2013).
- 35) Puissant A1, Robert G, Fenouille N, Luciano F, Cassuto JP, Raynaud S, Auberger P. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res.*, **70**, 1042-1052 (2010).
- 36) Elbarbry F, Elrody N. Potential health benefits of sulforaphane: a review of the experimental, clinical and epidemiological evidences and underlying mechanisms. *J. Med. Plants Res.*, **5**, 473-484

- (2011).
- 37) Takaya K, Suzuki T, Motohashi H, Onodera K, Satomi S, Kensler TW, Yamamoto M. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 817-827 (2012).
- 38) Keum YS, Yu S, Chang PP, Yuan X, Kim JH, Xu C, Han J, Agarwal A, Kong AN. Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.*, **66**, 8804-8813 (2006).
- 39) Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 1078-1089 (2013).
- 40) Zhang, Y. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* **21**, 1175-1182 (2000).
- 41) Ariga T, Seki T. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors*. **26**, 93-103 (2006).
- 42) Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair S, Li W, Kong AN. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic Biol Med.* 2004 Nov 15;37(10):1578-90.
- 43) Gong P, Hu B, Cederbaum AI. Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch. Biochem. Biophys.*, **432**, 252-60 (2004).
- 44) Samaranyaka AGP, Li-Chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J. Funct. Foods*, **3**, 229-254 (2011).
- 45) Guo Y, Zhang T, Jiang B, Miao M, Mu W. The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *J. Funct. Foods*, **7**, 719-726 (2014).
- 46) Moritani C, Kawakami K, Fujita A, Kawakami K, Hatanaka T, Tsuboi S. Anti-oxidative activity of hydrolysate from rice bran protein in HepG2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 984-991 (2017).
- 47) Kawakami K, Moritani C, Uraji M, Fujita A, Kawakami K, Hatanaka T, Suzaki E, Tsuboi S. Hepatoprotective effects of rice-derived peptides against acetaminophen-induced damage in mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **60**, 115-120 (2017).
- 48) Kawakami K, Moritani C, Uraji M, Fujita A, Kawakami K, Hatanaka T, Suzaki E, Tsuboi S. Sake lees hydrolysate protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **61**, 203-209 (2017).
- 49) Moritani C, Kawakami K, Fujita A, Kawakami K, Shimoda, H., Hatanaka T, Tsuboi S. Isolation of activating factors of serotonin *N*-acetyltransferase from rice peptides. *J. Funct. Food*, **41**, 148-154 (2018).
- 50) Joko S, Watanabe M, Fuda H, Takeda S, Furukawa T, Hui S-P, Chiba H. Comparison of chemical structures and cytoprotection abilities between direct and indirect antioxidants. *J. Funct. Food*, **35**, 245-255 (2017).
- 51) 本田 沙理, 増田 俊哉. ポリフェノール, 化学反応を基盤とする機能性物質 抗酸化反応から成分間反応まで. *化学と生物*, **53**, 442-448 (2015).
- 52) Jiménez-Osorio AS, González-Reyes S, Pedraza-Chaverri J. Natural Nrf2 activators in diabetes. *Clin Chim Acta.* **448**, 182-192 (2015).