

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：32415

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11081

研究課題名(和文)キサントフィルの蓄積・分解を調節する代謝機構の解明

研究課題名(英文) Xanthophyll metabolism regulating its accumulation and decomposition

研究代表者

長尾 昭彦 (Nagao, Akihiko)

十文字学園女子大学・人間生活学部・教授

研究者番号：40353958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：カロテノイド蓄積への非対称開裂代謝とキサントフィル末端基の酸化代謝の関わりを明らかにするため、これらの代謝反応の特性を解析した。マウス肝臓に発現する非対称開裂酵素の活性を界面活性剤の共存下で検出することに成功した。ゼアキサニン、ルテイン、及びラクチュカキサニンなどのキサントフィルが開裂されやすく、 β -クリプトキサニンは開裂されにくい基質であった。また、 β -カロテンに対する開裂活性は検出されなかった。したがって、マウスに発現する本酵素はルテインやゼアキサニンに特異的な開裂酵素であり、非プロビタミンAのキサントフィルの代謝と蓄積に関わる重要な因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カロテノイドの非対称開裂酵素の特性は組換え体で研究が進められてきたが、動物組織での開裂産物生成やナイテック酵素の活性についての明確な証拠は得られていなかった。本研究によって初めて肝臓に発現する酵素の活性が検出され基質特異性が明らかにされたことは、キサントフィル代謝の研究上意義深い。本酵素はキサントフィルの体内蓄積の重要な代謝上の因子と考えられたことから、この遺伝子の多型とキサントフィル蓄積の関係が今後明らかにされると、テラーメイド栄養につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：An asymmetric cleavage of carbon skeleton and oxidation of end group in carotenoid metabolism were investigated in their relation to the accumulation of carotenoids in tissues. The activity of the asymmetric cleavage enzyme expressed in the mouse liver was successfully detected only in the presence of a detergent. Zeaxanthin, lutein, and lactucaxanthin were more readily cleaved than β -cryptoxanthin, while no cleavage product of β -carotene was found. Thus, the asymmetric cleavage enzyme of mouse liver, which was found to be specific for zeaxanthin and lutein, would be an important metabolic factor controlling accumulation of non-provitamin A xanthophylls.

研究分野：食品科学

キーワード：アポカロテナル カロテノイド キサントフィル ゼアキサニン 非対称開裂 ルテイン

1. 研究開始当初の背景

食品から摂取され体内に蓄積されるカロテノイドは、そのラジカル捕捉活性や一重項酸素消去活性などの抗酸化作用により生活習慣病の予防や緩和に寄与していると考えられている。特に、ルテインやゼアキサントフェン等のキサントフィル(含酸素カロテノイド)は、霊長類の網膜黄斑に特異的に集積し青色光を減衰させるフィルターや光酸化障害を抑制する抗酸化物質として働くことから、加齢黄斑変性予防のための重要な食品成分である。このようなカロテノイドの蓄積と機能発現は、食品からの摂取、腸管吸収、輸送等に加え代謝変換に依存する。哺乳動物での代謝変換についてはプロビタミン A の分子中央での酸化開裂によるレチナールの生成が知られていたが、近年、キサントフィルにも作用する非対称開裂酵素(BCO2)の遺伝子が発見されたことにより組換え酵素の性質が明らかにされその生理的役割の研究が進められているところである。BCO2の基質特異性は広くカロテノイドのC9'-C10'位の二重結合を開裂する。しかし、組換え酵素の分子レベルの研究報告があるにもかかわらず動物組織に発現するネイティブ酵素の活性は*in vitro*では検出されておらず本来の性質は未解明のままである。また、開裂産物の組織中での存在の明確な証拠も得られていない。組織中に発現する非対称開裂酵素の性質と実際のカロテノイド代謝への関わりを明らかにする必要がある。

一方、このような開裂代謝に加えてキサントフィルの末端基の酸化的代謝が哺乳動物で起きていると考えられる。我々はマウス肝臓にはキサントフィルの3-ヒドロキシ末端基を3-オキシ末端基へ酸化する活性をもつことを明らかにしたが、この反応は不安定な中間体の非特異的分解が示唆されキサントフィルの分解に関わる可能性が考えられた。他の末端基の酸化も確認されており複数の末端基代謝経路が示唆されている。このような酸化的代謝経路に関わる酵素も特定されておらずその詳細な解明が望まれている。

ヒトでの吸収・蓄積には極めて大きな個体差が認められ、蓄積に関わる種々の遺伝子の変異が個体差の要因となっていることが最近報告されてきている。欧米ではPersonalized Nutritionに向けたカロテノイドの吸収・代謝の研究が急速に展開されており、カロテノイド、特にキサントフィルの体内蓄積に関する代謝の全容解明が期待されている。

2. 研究の目的

カロテノイド蓄積の重要な因子として非対称開裂代謝とキサントフィルの末端基の酸化代謝が考えられる。これらの代謝反応の基本的特性と組織中のカロテノイド蓄積・分解への代謝活性の関与を明らかにすることを目的とした。非対称開裂代謝については、開裂酵素の組換え体を中心に研究が進められてきたが、ネイティブ酵素の活性は検出されておらず組織中での開裂産物の存在についての明確な知見が得られていない。そこで、組織に発現する非対称開裂酵素の性質及び組織中に存在する非対称開裂産物由来の代謝産物を解析し、組織中での非対称開裂代謝の実態を明らかにする。キサントフィルの末端基の酸化的代謝として3-ヒドロキシ末端基の酸化的代謝の研究を進めてきたところであるが、末端基の酸化等の他の経路の存在が示唆されている。そこで、組織中の末端基の酸化的代謝産物を解析することによって、キサントフィルの蓄積や機能発現に関する末端基の酸化的代謝の全体像を把握する。また、ヒト血漿中のキサントフィルの非対称開裂産物と末端基代謝産物を分析し、キサントフィル蓄積と代謝能との相関性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 非対称開裂産物標準品の調製

非対称開裂活性をその生成物量で評価するためには、開裂産物標準品が必要となる。そこで、ルテインのC9'-C10'位とC9-C10位の二重結合で開裂して生成する3-Hydroxy-10'-apo-β-caroten-10'-alと3-Hydroxy-10'-apo-β-caroten-10'-alの標準品を以下の方法により調製した。ルテインを酢酸エチルに溶解し約-20℃に冷却しながらオゾンを含む空気をバブリングさせオゾン分解を行った²⁾。ルテインの約9割が消失した時点でオゾン分解を終了し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりカロテナルを含む画分を分離した。さらに、Wakopak Navi C30-5カラムを用いた逆相HPLCによって目的とするカロテナルを分離した。最後に、Inertsil CN-3カラムを用いた順相HPLCにより精製標品を得た。高分解質量分析から推定される分子式及び類似した発色団をもつカロテナルのUV-VISスペクトルとの比較により構造を確認した。

(2) BCO2活性の測定

BCO2はミトコンドリアに局在するため、マウス肝臓ホモジネートの遠心上清(600g、10分)を調製しPost-nuclear画分としてBCO2活性の測定に供した。基質として用いたカロテノイドはTween 40ミセルに予め可溶化し、メンブランフィルターで不溶物を除去し濃度を確認したのち酵素反応に供した。標準条件では、37℃、90分間反応させた。ホルムアルデヒド処理によって反応を停止すると共に開裂産物であるアルデヒドの回収率を上げた³⁾。その後、有機溶媒で開裂産物を抽出しWakopak Navi C30-5カラムを用いた逆相HPLCで分析した。開裂産物のHPLCピークは、標準品の保持時間とUV-VISスペクトルとの比較及び単離精製した開裂産物の高分解質量分析によって帰属させた。

(3) キサントフィルの末端基の酸化的代謝反応の解析

ゼアキサントチンを基質としてマウス肝臓ホモジネートの酸化活性(末端基の酸化)を利用して調製した 3-Hydroxy- β,ϵ -caroten-3-one について(3*R*,6'*R*)と(3*R*,6'*S*)のジアステレオマーを HPLC で分離・分析する条件について検討した。キラルカラム (CHIRALPAK AD-H, ダイセル社製)を用いた順相 HPLC により 2 つのピークに完全に分離することができた。分取したこれらのピークについて水素化ホウ素ナトリウムによる還元及びマウス肝臓ホモジネートによる酸化を行い、生成物を解析することによって分離された 2 つのピークの立体配置を決定した。

4. 研究成果

(1) マウス肝臓に発現する BCO2 活性を検出するためには、基質を可溶化するための界面活性剤以外に適切な界面活性剤を反応液に共存させることが必須であった。BCO2 はミトコンドリアに局在する酵素であるためそのままでは活性は検出されず、界面活性剤の共存によりミトコンドリアから遊離されて外部基質に対して作用するものと考えられた。本研究によって初めてネイティブ酵素の活性検出に成功しその性質解明へつながらるものと期待される。

(2) ルテインを基質とした場合は、C9'-C10'位と C9-C10 位の二重結合の開裂によって 3-Hydroxy-10'-apo- β -caroten-10'-al と 3-Hydroxy-10'-apo- ϵ -caroten-10'-al が生成することを明らかにした(図-1)。後者の生成量は前者の約 40%であり C9'-C10'位の方が開裂されやすく、 β -クリプトキサントチンを基質とした場合は主として C9-C10 の二重結合で開裂するなど、非対称なキサントフィルでは 2 箇所の開裂部位の反応性が異なっていることを明らかにした。ゼアキサントチンとラクチュカキサントチンからは、それぞれ、3-Hydroxy-10'-apo- β -caroten-10'-al と 3-Hydroxy-10'-apo- ϵ -caroten-10'-al が生成することを見出した。

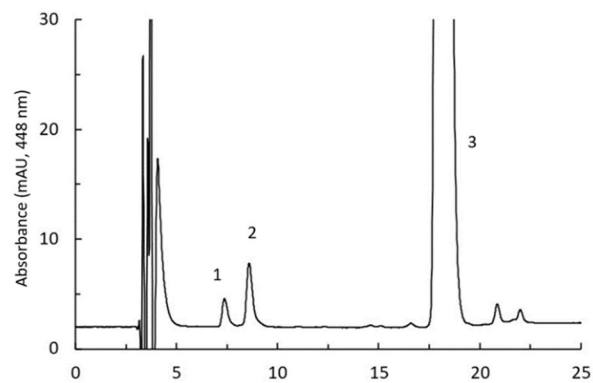


図-1 Luteinの開裂産物のHPLC分析

1, 3-Hydroxy-10'-apo- ϵ -caroten-10'-al; 2, 3-Hydroxy-10'-apo- β -caroten-10'-al; 3, Lutein

(3) 各基質からの開裂産物の生成速度は、ラクチュカキサントチン > ルテイン > ゼアキサントチン > β -クリプトキサントチンであった。組み替え体 BCO2 では β -カロテンから 10'-apo- β -caroten-10'-al が生成すると報告されていた。しかし、マウス肝臓に発現する BCO2 による 10'-apo- β -caroten-10'-al の生成は検出限界以下であり、微弱な活性があったとしても実質的には β -カロテンには作用しないものと考えられた。従来考えられてきた β -カロテン代謝への BCO2 の関与は再考する必要がある。

(4) BCO2 反応の速度は Michaelis-Menten の式に従って基質濃度に依存して増大した。Km 値は、ゼアキサントチン < ルテイン < ラクチュカキサントチン < β -クリプトキサントチンの順に大きな値となり、それぞれ、11.3、31.2、47.5、75.8 μ M であった。最大速度 (V_{max}) は、ラクチュカキサントチン > ルテイン > ゼアキサントチン > β -クリプトキサントチンであった。基質濃度が低い条件での反応速度の指標である V_{max}/K_m の値は、ルテイン、ゼアキサントチン、及びラクチュカキサントチンでほぼ同じ値であり、 β -クリプトキサントチンはその値の約 7.6%であった。Km 値は共存する界面活性剤の種類によって多少異なっていたことから、得られた値が in vivo での性質を必ずしも反映しているとは言えない。しかし、組織中の濃度は上記 Km 値よりはるかに低いため、ルテインとゼアキサントチンが同レベルで BCO2 によって分解され β -クリプトキサントチンに対する活性は極めて低いものと推定された。したがって、マウスに発現する BCO2 は、ルテインやゼアキサントチンに特異的な開裂酵素であり β -カロテンや β -クリプトキサントチンにはほとんど作用しないと考えられた。このように非プロビタミン A のキサントフィルを分解する BCO2 はキサントフィルの体内蓄積に関与する代謝因子と考えられることから、今後の研究の進展が期待される。

(5)キサントフィルの代謝産物である 3-Hydroxy- β,ϵ -caroten-3-one の二つのジアステレオマー ($3R,6'R$) と ($3R,6'S$) を HPLC で分離・分析する条件を確立した (図-2)。これにより、ルテインの末端基の酸化反応を正確に評価することができる。既存のルテインの末端基の酸化反応の分析と合わせることによって、キサントフィル末端基の二つの代謝を比較し評価することが可能となった。キサントフィルの末端基代謝の全体像を把握する上で効果的な分析法が開発された。

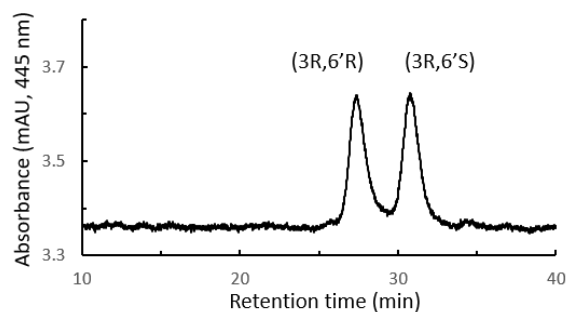


図-2 3'-hydroxy- β,ϵ -caroten-3-one 立体異性体の分離

BCO2 の酵素化学的性質に焦点をあて開裂代謝を中心に研究を進めたため、動物組織やヒト血漿に含まれるのキサントフィルの末端基代謝産物や開裂産物の解析には至らず、今後の課題として残された。

< 引用文献 >

- 1) Nagao, A. *et al. J. Lipid Res.* **56**, 449-462 (2015).
- 2) Kim, S.J. *et al. Lipids* **36**, 191-199 (2009).
- 3) Nagao, A. *et al. Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 57-63 (1996).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 長尾昭彦	4. 巻 49
2. 論文標題 カロテノイドの代謝変換と蓄積	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファインケミカル	6. 最初と最後の頁 59 - 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Akihiko Nagao	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 293 (67-78)
3. 書名 Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches(Chapter 6 Metabolism of Carotenoids in Mammals)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------