

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14403

研究課題名(和文)新規VE同族体の探索と機能性解明研究

研究課題名(英文) Search for new VE homolog and elucidation of its functionalities

研究代表者

別府 史章 (Beppu, Fumiaki)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：10707540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンE(VE)の分子構造による生理機能性の違いを明らかにするために、希少な同族体である  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコモノエノール(T1)、トコジエノール(T2)を用いた機能解析を行った。まず始めに、(1)それぞれのT1、T2の調製を各種T3に部分水素添加することで簡便に調製可能であることを示した。これにより、(2)LC-MS/MSを用いたこれらVE同族体の分析手法を確立し、(3)糖尿病モデルマウスを用いて、T1およびT2による血糖値改善効果を明らかにするとともに、VE同族体の代謝特性についての新たな知見を得た。培養細胞系による機能解析により構造に起因する炎症抑制効果の違いが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、天然中の存在量がわずかなT1やT2の標準物質が部分水素添加法を用いることで簡便に調製可能であることを示すと同時に、in vivoおよびin vitro実験の結果よりフィテル側鎖構造による代謝特性と機能の違いを明らかにした。本研究の成果は、VEの健康機能研究において側鎖構造と生理活性作用の関連性解明に大きく貢献する基盤的な知見といえる。希少な同族体を用いて未解明の生理機能やそれに係る構造活性相関や作用機構を明らかにすることで、新しい機能性食品素材の開発や肥満関連疾患の新たな予防・治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the difference in physiological function of vitamin E homologs depending on its structure, we aimed to chemically generate  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -tocomonoenol (T1), tocodienol (T2) and compared the function in in vitro and in vivo study. We showed that  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -T1 and T2 can be easily prepared by partial hydrogenation with the corresponding T3, and an analytical method for these minor homologs using LC-MS/MS was established. In diabetic model KK-Ay mice, the protective effect of dietary T1 and T2 on hyperglycemia was observed. We also investigated the effects of minor homologs using various cell models such as cancer and inflammatory macrophage cells. Our results from in vivo and in vitro experiment suggested a difference in the metabolic properties and function due to the side chain structure, providing new insights to nutritional and physiological properties of VE compounds.

研究分野：脂質栄養化学

キーワード：vitamin E tocopherol tocomonoenol tocodienol tocotrienol 海洋性ビタミンE 糖尿病 抗炎症効果

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂溶性の栄養素であるビタミンE (VE) は、クロマン環とフィチル側鎖で構成され、8種類の主要な同族体 ( $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコフェロール(Toc)、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコトリエノール(T3)) が広く認識されている。いずれも優れた抗酸化作用を有し、特に天然物中に最も多く存在する  $\alpha$ -Toc は医薬品や化粧品、食品への応用が広がっている。一方、最近 10 年から 20 年の間に、 $\alpha$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -体のクロマン環をもつトコモノエノール(T1)やトコジエノール(T2)が陸上植物から発見されている (図 1)。また、海洋生物からは側鎖末端部 (12' -13' 位) に二重結合を有する Marine-derived tocopherol (MDT) が発見された。最近の研究では、主要な 8 種の同族体がそれぞれ特有の機能性を発揮することが示されており、これらマイナーな同族体の生理的な存在意義や機能性は学術的にも興味深い。また、化学構造に起因する生理活性作用を明らかにすることは、各々の VE 同族体を各種疾病の予防や治療、用途に合わせた効果的な応用へ展開するために有用である。

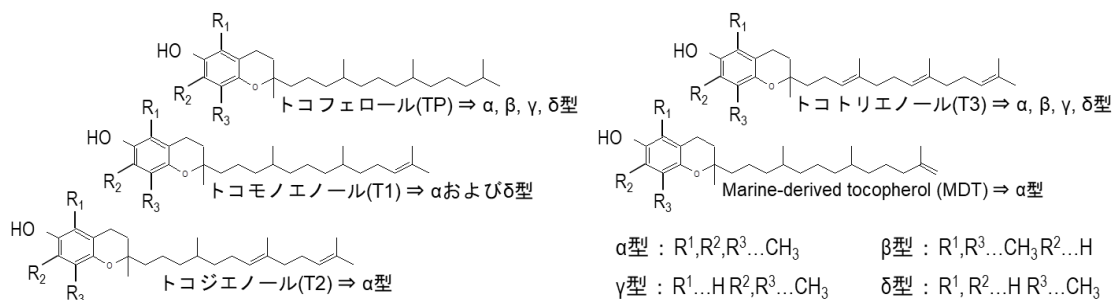


図 1 主要な VE 同族体と天然物に含まれる希少同族体の構造

### 2. 研究の目的

本研究は VE 同族体の分子構造による生理機能性の違いを検討するために、陸上植物や海洋生物などの天然物に見出されている希少 VE 同族体に注目し、これらの肥満/糖尿病に対する予防効果を培養細胞系および病態モデル動物を用いて評価することを目的とした。そのために、研究実施項目として (1) 化学的手法を用いた希少 VE 調製方法の検討、(2) 各種 VE 同族体の分析手法の確立、(3) *in vitro* および *in vivo* 試験による各種 VE 同族体の機能性解析を挙げた。当初、天然物に含まれる未知 VE 同族体を、特に海洋性植物プランクトンに注目して探索することを目的の一つにしていたが、研究代表者の異動により予定していた研究協力者からのサンプル提供を受けることが困難となった。そのため、希少同族体を得る手段として化学的手法による調製に一本化し、その方法確立に注力することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 希少な同族体として、 $\alpha$ 体の T1 および T2 がパーム油から、 $\gamma$ 体の T1 がカボチャ種子から、さらには  $\delta$ 体の T1 がキウイフルーツの種子などから発見されている。これら 7' -8' 位および 11' -12' 位に二重結合を持つ同族体を調製するために、T3 を反応基質にした水素添加技術の応用を試みた。まずは反応の可否を  $\alpha$ -T3 を用いて検討した。反応の効率を示す指標として、反応前後の  $\alpha$ -T3 量の変化量から減少率を算出した。また、水素添加により新たに生じた化合物については、LC-MS/MS を用いた分析により構造を推定した。

(2)  $\alpha$ 体だけでなく、 $\gamma$ および  $\delta$ 体の T1、T2 を分析可能にするために、LC-MS/MS による multiple reaction monitoring (MRM) モードを使った分析方法を検討した。試験には T3 混合物を水素添加し、得られた生成物を用いた。先行研究により  $\alpha$ 体、 $\gamma$ 体、 $\delta$ 体の Toc および T3 はそれぞれの分子イオンに加えクロマン環構造に起因する  $m/z$  163、149、135 のプロダクトイオンがそれぞれ生成することが報告されている。これら MRM トランジションを用いて分析条件を決定した。なお、 $\alpha$ 体の定量はそれぞれ分離精製した  $\alpha$ -T1 および T2 を用いて検量線を作成し、 $\gamma$ 体および  $\delta$ 体については  $\gamma$ -および  $\delta$ -Toc を用いて作成した検量線を適用し T1、T2 量を算出した。

(3)-① 培養細胞系を用いた機能性評価では、 $\alpha$ -Toc および T3 に T1、T2、さらに海洋生物由来 MDT を加えた  $\alpha$ 体の同族体 5 種を用いて側鎖構造の違いに注目した比較を行った。細胞はヒト結腸癌細胞 Caco-2、前立腺癌細胞 LNCap、乳癌細胞 MCF-7 を用いて、各種癌細胞の増殖に対する抑制効果、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いてリポポリサッカライド (LPS) 刺激誘導性の炎症に対する抑制効果について検討した。

(3)-② 食餌に由来する希少 VE の機能性を評価するために、すでに  $\alpha$ -Toc や T3 混合物などで報告されている糖・脂質代謝改善効果に注目し、本研究では肥満/糖尿病モデル KK-Ay マウスによる経口投与試験を行った。 $\alpha$ -Toc あるいは T3 混合物に加え、T3 混合物を水添反応して得た HT3 の機能性を比較評価した。雄性 4 週齢マウスを 1 週間馴致飼育した後に、それぞれの VE を添加

した飼料で4週間飼育し、体重、血糖値、血中脂質パラメータへの影響を調べた。飼育終了時はイソフルランによる麻酔下、採血後に安楽死させ、各組織を採取した。なお、本研究における動物実験は動物実験規則に基づき、動物愛護に十分配慮したうえで行われた。得られた組織から脂質を抽出し、各組織への希少 VE 同族体の移行量を HPLC-MS/MS により分析した。

#### 4. 研究成果

(1) T3 を水素添加反応の基質に用いて T1、T2 の調製が可能かどうかを、まずは  $\alpha$ -T3 を用いて検討した。パラジウムを触媒に用いて 25°C、72 時間、水素添加反応に供し、反応物を HPLC-MS/MS で分析すると、 $\alpha$ -T1 と T2 の生成を示唆するクロマトグラムおよびプロダクトイオンスペクトルが得られた。さらに、生成した  $\alpha$ -T1 および T2 を HPLC 分取し、それぞれの検量線を使った定量分析を可能にした。これを用いて、25°C および 50°C 反応中の時間依存的な  $\alpha$ -T3 量の減少量、T1 および T2 生成量を測定した。結果、25°C 反応系では 72 時間後に T3 は 30% 程度の残存率を示し、総 VE 量の約 65% を  $\alpha$ -T2 が、10% 程度を T1 が占めた。一方、50°C 反応系では水添反応が速やかに進行し 12 時間後に  $\alpha$ -T3 が総 VE 量の 20%、T1 が 20%、T2 が 60% を占めた。この結果より、各種 T3 を基質にすることで T1 や T2 を簡便に調製可能であることが示された。さらに反応温度や時間により生成物の組成をコントロール可能であることから、水素添加法は非常に有効な方法と言える。

(2)  $\alpha$ -、 $\gamma$ -、ならびに  $\delta$ -T3 がそれぞれ約 19%、37%、15% 含まれる T3 混合物を 25°C、72 時間、水添反応させ、得られた水添 T3 混合物 (HT3) を HPLC 分析に供した。結果、各々の T1 および T2 を含むと推察されるクロマトグラムが得られた (図 2)。次いで  $\alpha$  体をもとに設定した LC-MS/MS の MRM 検出条件を用いることで、HT3 に含まれる  $\gamma$  体および  $\delta$  体の T1、T2 がそれぞれ検出可能になった。一方、 $\gamma$ -、 $\delta$ -Toc を使って作成した検量線をもとにした測定の結果では、 $\alpha$  体や  $\gamma$  体に比べて  $\delta$  体の T1、T2 生成効率が低かった。より効率的に希少同族体を生成するために、クロマン環タイプに合わせた反応条件の検討が必要である。

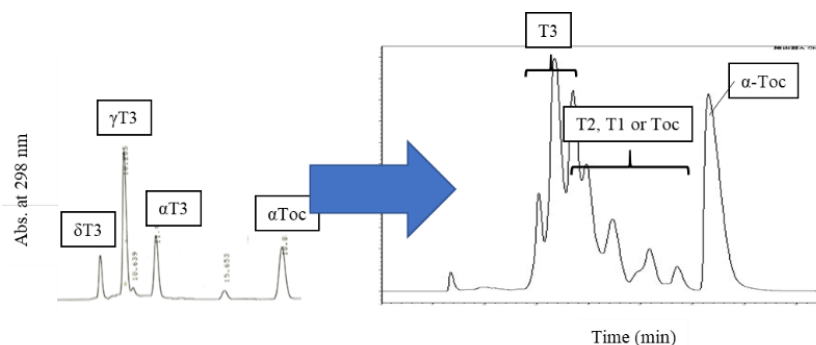


図 2 水素添加反応後の HPLC クロマトグラム

これまで、T1 や T2 といった希少な VE 同族体は天然物中の含量が少なく単離精製して標準試料を得ることが非常に困難であった。本研究における (1) および (2) の成果は、これら希少な同族体の標準試料調製を可能にするものであり、VE の定量分析や機能解析研究の新たな展開につながるかと期待できる。

(3)-① VE の化学構造に起因する機能性の違いを明らかにするため、本研究では特に側鎖構造に注目し、 $\alpha$  体の Toc, T1, T2, T3、さらに MDT を用いた。T1 および T2 は上記方法により T3 から調製、また、MDT はサケ卵脂質から単離精製して得た。これらの活性の違いについて、ヒト結腸癌細胞 Caco-2、前立腺癌細胞 LNCap、乳がん細胞 MCF-7 に対する増殖抑制効果を検討した。終濃度 20  $\mu$ M で処理した結果、いずれの細胞に対しても特徴的に活性を示す同族体は見出されなかった。一方、RAW264.7 細胞における抗炎症効果を検討した実験では、いずれの同族体も抑制効果を示すが、同族体間でその効果に差があることを示唆する結果を得た。

(3)-② 本研究では、試験食として  $\alpha$ -Toc、T3 混合物、あるいは部分水素添加した T3 混合物 HT3 をそれぞれ 0.5% 含む飼料を調製した。なお、HT3 食の VE 中に含まれる  $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  体の T1 および T2 は合わせて約 35% を占め、その他 T3 が 30%、 $\alpha$  Toc が約 30% を占める。肥満糖尿病モデルである KK-Ay マウスは早期から顕著な体重増加を示し、インスリン抵抗性を伴った高血糖、脂質代謝異常を呈する。本研究においても、VE を添加しないコントロール食群の体重は飼育開始から顕著に増加した。また、HT3 および他 VE 添加群においても著しく体重が増加し、4 週間飼育の結果からは試験群間での差は認められなかった。解剖後の脂肪組織重量を比較した結果も同様であり、本研究においてはいずれの VE も体重および内臓脂肪重量に影響しなかった。一方、HT3 および T3 混合物を摂取した群ではコントロール群に比して血糖値の低下傾向を示した。また、いずれの VE 摂取群にも血清中総コレステロール量の低下、HDL-コレステロールの増加傾向が見られ、HDL コレステロール/総コレステロール比ではコントロール群と比して有意な上昇が認めら

れた。特に HT3 群でその効果が強い傾向が見られた。次に、HT3 を摂取したマウス肝臓および精巢周囲脂肪組織中の VE 含量を測定した (図 3)。結果、飼料中には  $\delta$ -Toc 以外の同族体がいずれも含まれていたが、肝臓において蓄積した VE は  $\alpha$  体がほとんどを占め、特に  $\alpha$ -Toc の蓄積が目立った。ごくわずかに  $\gamma$ -T2 が検出されたが、肝臓における  $\alpha$  トコフェロール輸送タンパクによる  $\alpha$  体の選択性が強く反映された結果であると考えられる。脂肪組織では継続的な摂取により  $\alpha$ -Toc 以外にも T3 体が蓄積されることが報告されている。本研究では、T3 体に加え、食餌由来の  $\alpha$ -T1、-T2、 $\gamma$ -T1、-T2、 $\delta$ -T2 の蓄積が明らかになった。一方、脂肪組織における蓄積量はおよそ飼料中の VE 含量を反映していたが、 $\delta$ -T1 は検出されなかった。以上、構造に起因する代謝特性を示す興味深い知見が得られた。

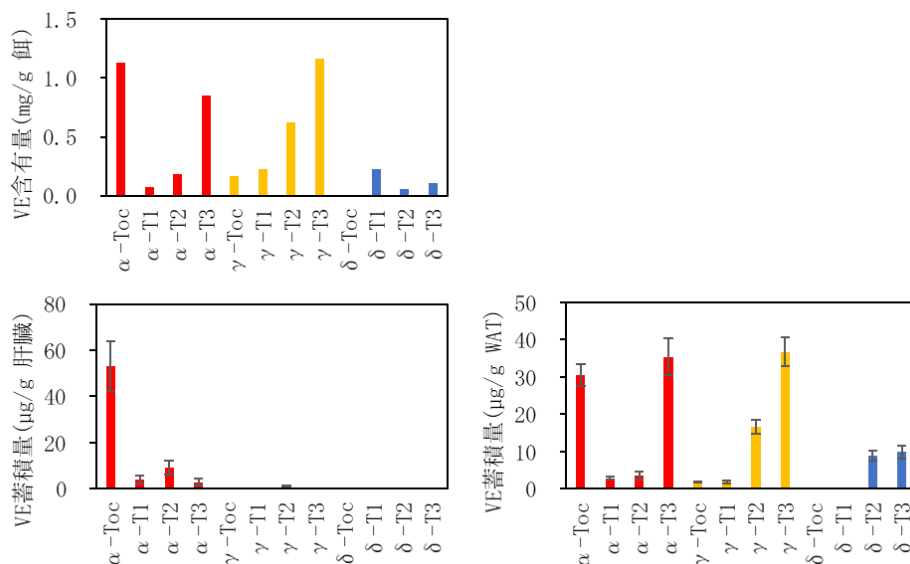


図 3 飼料、肝臓、脂肪組織中の VE 同族体含量

項目 (3) では、T3 混合物の水素添加により調製された HT3 が糖・脂質代謝改善作用を示し、糖尿病などの代謝異常に対する予防効果が期待できる結果を得た。一方、T3 混合物との効果の違いを見出すには至らず、これについてはクロマトグラフィー操作により T1 および T2 の組成割合を高めての検討が必要と考える。また、(3)-①では同族体間での抗炎症活性の違いが明らかになった。KK-Ay マウスで認められた高血糖改善効果との関連から、インスリン抵抗性に深く関わる慢性炎症に対する予防機能は非常に興味深い。それぞれの同族体の代謝特性と合わせての機能性解明が望まれる。

これまでの VE 同族体の健康機能性に関する研究では T3 と Toc の活性を比較した報告は多数あった。そうした中、本研究は天然物中に存在量がわずかな T1、T2 を簡便に調製可能な方法を示し、VE 側鎖に存在する二重結合の位置や数の影響を検討した初めての研究である。当初予定していた天然物中の同族体探索は実施できなかったが、食品産業などにおいて一般的な方法を活用した未知同族体の調製方法を示す成果は産業的にも有意義なものと考えられる。培養細胞系の実験では、海洋生物に特徴的な MDT を加え、 $\alpha$  体の同族体を横並びにすることで、Toc と T3 だけでは明確にできなかったフィチル側鎖構造に起因する細胞機能制御作用の解明を試みた。本研究で得られた成果をもとに化学構造と生理活性作用の関係性を明らかにすることで、これを基盤にした創薬のシーズ開発や新規機能性食品素材の開発へと今後の研究展開が大きく期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fumiaki Beppu, Yusuke Aida, Masahiro Kaneko, Satoshi Kasatani, Yoshinori Aoki and Naohiro Gotoh	4. 巻 86
2. 論文標題 Functional evaluation of marine-derived tocopherol, a minor homolog of vitamin E, on adipocyte differentiation and inflammation using 3T3-L1 and RAW264.7 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 415-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-020-01404-6	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 別府史章、相田祐介、金子昌弘、笠谷聡、青木由典、後藤直宏
2. 発表標題 海洋生物由来ビタミンEによる脂肪細胞への分化誘導能
3. 学会等名 第72回 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Beppu Fumiaki
2. 発表標題 Role of functional lipids in preventing obesity-related diseases -Focus on minor compounds in common marine products-
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019), the 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----