

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580189

研究課題名(和文)食品キサントフィルの代謝変換と光酸化ストレス制御機能の解析

研究課題名(英文) Metabolic conversion of dietary xanthophylls and their actions on oxidative stress induced by light irradiation

研究代表者

長尾 昭彦 (NAGAO, Akihiko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品素材科学研究領域・上席研究員

研究者番号：40353958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝臓代謝反応系を用いキサントフィルの酸化的代謝を解析した。末端基3位の水酸基が補酵素NAD依存的に脱水素され、3-oxo 末端基をもつ中間体を経て3-oxo 末端基もつケトカロテノイドへ変換されることを見いだした。中間体は非常に不安定で大部分が酸化分解することからキサントフィルの分解代謝反応であることが示唆された。細胞内に集積したカロテノイドの光安定性は分子構造によって著しく異なることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Oxidative metabolism of dietary xanthophylls was elucidated by analyzing the metabolic activity of mouse liver. The 3-hydroxy beta-end group of xanthophylls was converted to 3-oxo epsilon-end group, via an intermediate having 3-oxo beta-end group, which was produced by dehydrogenation dependent on a coenzyme NAD. This metabolic reaction might be involved in eliminating xanthophylls from the tissues, because of the intermediate was extremely unstable. Stability of carotenoids accumulated in cultured cells exposed to blue-light irradiation was found to be quite different among carotenoids with diverse structures.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：キサントフィル 安定性 抗炎症 ルテイン ゼアキサントキサンチン - クリプトキサントキサンチン 酸化的代謝 NO産生 光酸化

1. 研究開始当初の背景

食品中には約 40 種類もの多様なカロテノイドが含まれ生活習慣病予防に寄与していると考えられている。特に、ヒト血漿の主要なキサントフィル(含酸素カロテノイド)であるルテイン/ゼアキサントフィルは、霊長類の網膜黄斑に特異的に集積していることから、網膜における光障害の抑制や視覚の改善に寄与していると考えられ、加齢黄斑変性予防の観点から注目されている。これらのキサントフィルを機能性食品成分として効率的かつ安全に利用するためには、その吸収・体内動態及び機能発現機構を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類におけるキサントフィルの代謝活性を調べるため、マウス肝臓ホモジネートを用いた *in vitro* 代謝反応系を用い、種々のキサントフィルに対する代謝活性を解析する。

(2) キサントフィル代謝産物の生物活性を解析し、キサントフィルの生物活性に代謝変換が関与している可能性を調べる。

(3) キサントフィルの光酸化ストレス抑制機能に関わる特性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) キサントフィルとマウス肝臓ホモジネートを補酵素 NAD 存在下、37℃ で数時間インキュベーションし、生成した反応産物を TLC や HPLC により分離精製した。単離した反応産物について、高分解能 MS, NMR, CD スペクトル等から構造を解析した。

(2) ルテインエステルを与えたマウスの肝臓よりルテイン代謝産物を精製し、マウス肝臓ホモジネート代謝系を用いて *in vitro* で調製した代謝産物と比較した。

(3) ヒトにおけるキサントフィルの酸化的代謝を調べるため、健康人の血漿抽出物をニトリルカラムを用いた順相 HPLC で分析した。

(4) キサントフィル及びその酸化的代謝産物の生物活性の相違を調べるため、マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞による NO 産生に対する影響を解析した。

(5) ルテイン及びその酸化的代謝産物のラジカル捕捉活性を、均一溶媒系でのリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制効果から評価した。

(6) 網膜におけるキサントフィルの光酸化ストレス抑制機構を調べるため、ARPE-19 ヒト網膜色素細胞にカロテノイドを集積させ、青色光に暴露させた。細胞毒性、生存率、細胞内カロテノイド残存量等からキサント

フィルの特性を評価した。

4. 研究成果

(1) ルテイン, β -クリプトキサンチン, ゼアキサントフィル, ラクチュカキサントフィル等から種々の反応産物が生成することを見いだした。そこで、ルテインの反応産物について詳細に調べたところ、反応の進行に伴い集積する反応産物 A と反応途上で極大濃度に達した後減少に転じる反応産物 B を見いだした。反応産物 A を単離し、NMR と高分解質量分析から 3'-hydroxy- β -caroten-3-one と同定した。さらにキラルカラムによって二成分に分離され、それらの CD スペクトルから、3'位と6'位の絶対配置が R、6位は R と S のジアステレオマー混合物であることが分かった。すなわち、ルテインの末端基の立体配置は保持されていたが、新たな不斉点である6位には立体選択性はなかった。反応中間体と考えられる反応産物 B は 3'-hydroxy- β -caroten-3-one と同定され、キラルカラムによって単一ピークを与え光学的に単一で、3'位と6'位の絶対配置は R であり、ルテインの末端基の立体配置を保持していた。

(2) ルテインエステルを給餌したマウス肝臓に見いだされる 3'-hydroxy- β -caroten-3-one を単離し、上記と同様に絶対配置を解析した結果、上記反応産物 A と一致したことから、*in vitro* の反応産物とマウス肝臓に蓄積した代謝産物は同一であることが明らかとなった。これらの結果から、マウス肝臓はルテインの末端基の3位の水酸基を酸化し、さらに5位の二重結合の移動を引き起こす代謝活性をもつことが明らかとなった。

(3) ルテインの酸化的代謝反応の中間体として考えられる 3'-hydroxy- β -caroten-3-one について、3'-hydroxy- β -caroten-3-one への異性化の反応収支を検討したところ、この中間体は著しく不安定で、一部のみが異性化し、大部分は消失することを見いだした。ルテインからの反応収支も低く、かなりのルテインが消失した。酸化分解によって消失した可能性が高く、ルテイン末端基の水酸基の酸化的代謝はルテインの消失動態に関わる重要な因子となっていることが示唆された。

(4) マウス肝臓は末端基の水酸基の酸化活性に加えて、活性が弱い末端基の水酸基も酸化する活性をもつことを見いだした。すなわち、ルテインを 3'-hydroxy- β -caroten-3-one へ酸化し、さらにその末端基の水酸基を酸化し、 β -carotene-3,3'-dione を生成した。マウスにおけるルテインの酸化的代謝経路を図 - 1 にまとめた。

(5) β-クリプトキサンチンを基質としたとき、ルテインの酸化と同様に、中間体と考えられる β-caroten-3-one が反応初期に生成し、β-caroten-3'-one が最終産物として得られた。また、ゼアキサンチンを基質としたときには、二つのβ末端基の一つが酸化された 3-hydroxy-β-caroten-3'-one 及び二つのβ末端基が酸化された β-carotene-3,3'-dione が生成することを見いだした。ヒト血漿に見いだされる 3-hydroxy-β-caroten-3'-one と β-carotene-3,3'-dione がゼアキサンチンの酸化によって生成することが示唆された。

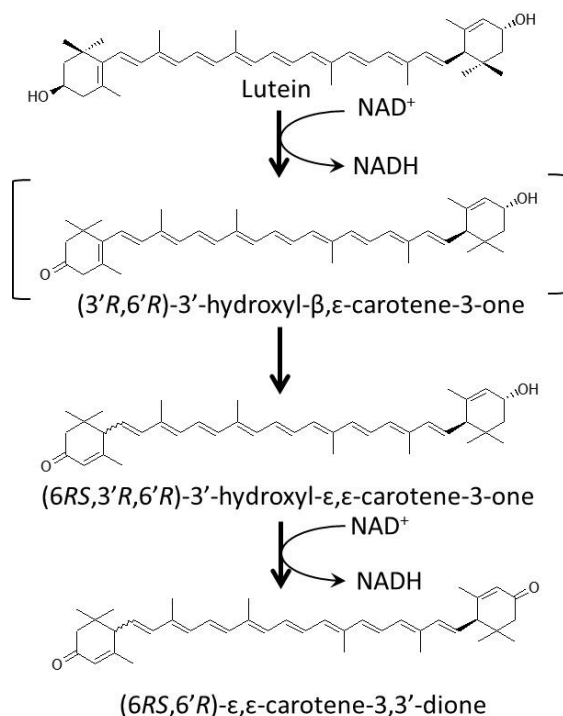


図-1 マウスにおけるルテインの酸化的代謝

(6) ヒト血漿には上記したルテインの酸化産物が存在することが 1990 年代に明らかにされていたがその生成機構は不明であった。本研究でのマウス肝臓代謝活性の結果から β-クリプトキサンチンから β,ε-caroten-3'-one が生成すると推定された。しかし、ヒト血漿で存在するかどうかは知られていなかった。そこで、健康人の血漿について分析すると β-クリプトキサンチンに対して約 1/6 程度の β,ε-caroten-3'-one が存在することを初めて見いだした。したがって、マウス肝臓のキサントフィルの酸化的代謝と同様な代謝がヒトでも起きているものと考えられた。

(7) 不飽和カルボニル化合物は種々の生物活性を示すことが報告され、生体系での活性酸素生成を抑制することが示唆されている。上記したキサントフィルの酸化的代謝産物はすべて、不飽和カルボニル構造を

もつため、元のキサントフィルにはない生物活性が期待される。そこで、LPS 処理によって引き起こされる RAW264 マウスマクロファージ細胞による一酸化窒素 (NO) の生成に対する影響を解析した。ルテイン及びゼアキサンチンは全く NO 産生に影響しなかったが、3'-hydroxy-ε,ε-caroten-3-one、ε,ε-carotene-3,3'-dione 及び β-caroten-3'-one は濃度依存的に NO 産生を抑制した (図-2)。また、最も顕著な抑制活性を示した β-caroten-3'-one は、誘導性 NO 合成酵素の発現を抑制することを見いだした。代謝産物に特異的な、不飽和カルボニル構造が抑制活性に關与している可能性が高い。したがって、摂取したキサントフィルから代謝によって生成する酸化産物が炎症時の過剰な活性酸素生成を抑制し炎症を緩和する可能性が考えられた。

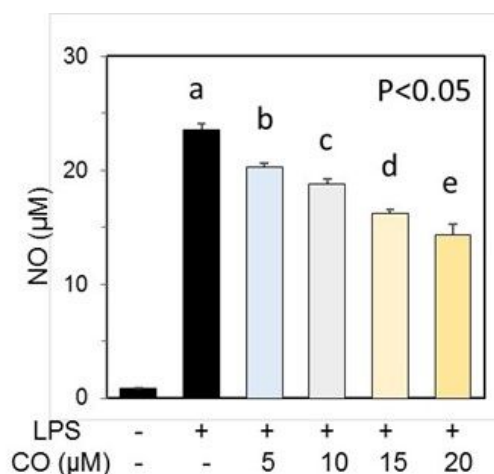


図-2 β-クリプトキサンチン代謝産物 β,ε-carotene-3'-one (CO) が RAW264 細胞による NO 産生に与える影響

(8) ルテインと 3'-hydroxy-β-caroten-3-one について、リノール酸メチルの過酸化反応系における抗酸化性を調べたところ、ラジカル捕捉活性はルテイン酸化産物の方が弱かった。酸化産物の特徴的な構造である、不飽和カルボニル構造は不安定なため条件によってはラジカル捕捉活性が弱くなると考えられた。

(9) ヒト網膜色素細胞 ARPE-19 を用いて光酸化ストレス制御機能を調べた。この細胞はルテインを集積しやすい性質をもっていたが、青色光照射による光酸化ストレスを抑制する作用を in vitro で実証することはできなかった。光酸化ストレスを乳酸脱水素酵素の漏出や生存率で評価したため、過剰なストレスに暴露された後の状態をみていたと考えられ、キサントフィルによるストレス抑制効果が適切に評価できなかったものと考えられる。今後は、軽微な光酸化ストレス条件や鋭敏なストレスマーカーによる評価等で実

験条件を改良する必要がある。一方、これらのキサントフィルの細胞内での光安定性は他のカロテノイドに比べ格段に優れていることが分かった。その理由は不明であるが、このような特性が黄斑における光障害抑制作用や青色光フィルターとしての機能に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Akihiko Nagao, Bioavailability of Dietary Carotenoids: Intestinal Absorption and Metabolism, Japan Agricultural Research Quarterly, 査読有、in press

長尾 昭彦, フコキサンチンの吸収・体内動態、Functional Food, 査読無、Vol.6、2013、pp.226-232

〔学会発表〕(計 7 件)

小竹 英一、長尾 昭彦、長谷 恵、小林 みゆき、キサントフィル酸化的代謝産物によるマウス 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化誘導抑制効果、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学(川崎市)

長尾 昭彦、小竹 奈良 英一、小林 みゆき、ヒト血漿中に検出されるキサントフィルの酸化的代謝産物、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学(川崎市)

Akihiko Nagao, Oxidative metabolism of dietary xanthophylls and their implications for bioavailability and function, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (招待講演) 2014 年 3 月 26 日、国立京都国際会館(京都市)

長尾 昭彦、眞岡 孝至、小林 みゆき、小竹 英一、小野 祐嗣、ゼアキサンチンと - クリプトキサンチンの酸化的代謝産物、第 27 回カロテノイド研究談話会、2013 年 10 月 20 日、三重大学(津市)

長尾 昭彦、眞岡 孝至、小林 みゆき、小竹 奈良 英一、小野 祐嗣、キサントフィルの酸化的代謝と生物活性、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学(仙台市)

長尾 昭彦、眞岡 孝至、富田 美恵、小林 みゆき、小竹 英一、小野 祐嗣、キサントフィルに対するマウス肝臓の代謝活性、第 26 回カロテノイド研究談話会、2012 年 9 月 14 日、函館国際ホテル(函館市)

長尾 昭彦、眞岡 孝至、小竹 英一、小野 祐嗣、亀山 眞由美、ルテインに対するマウス肝臓の代謝活性、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学(京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 昭彦 (NAGAO, Akihiko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所・食品素材科学研究領域・上席研究員

研究者番号：40353958

(2) 研究分担者

小竹 英一 (KOTAKE, Eiichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所・食品素材科学研究領域・主任研究員

研究者番号：20547236