

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580125

研究課題名（和文） ビタミンEによる脂質アルキルラジカル捕捉反応の解析

研究課題名（英文） Analysis of lipid-alkyl radical scavenging reactions of vitamin E

研究代表者

山内 亮 (YAMAUCHI RYO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50126760

研究成果の概要（和文）：ビタミンEの生体内脂質過酸化抑制作用を明らかにする目的で、脂質アルキルラジカル捕捉反応を解析した。まず、ヒト血漿脂質を構成するコレステロールエステルとリン脂質由来のアルキルラジカルとビタミンEとの反応生成物として付加体を分離してそれらの構造を決定した。さらに、ビタミンE付加体の高感度分析法として、高速液体クロマトグラフィーで分離した後、還元カラムを通して蛍光検出する方法を開発した。本分析法を使用して、LDLモデル溶液の脂質過酸化反応に対するビタミンEの作用を検討し、低酸素条件下で脂質アルキルラジカルを捕捉した付加体の生成を確認した。

研究成果の概要（英文）： Formation of alkyl radicals of unsaturated lipids is the first step of lipid peroxidation. We have studied the lipid-alkyl radical scavenging reactions of vitamin E (α -tocopherol, α -TH). When cholesteryl linoleate (ChL) hydroperoxides were reacted with α -TH at 100°C, two addition products were obtained as 6-*O*-epoxyChL- α -TH and 6-*O*-ChL- α -TH. Iron-catalyzed reaction of phosphatidylcholine (PC) hydroperoxides with α -TH under nitrogen gave the addition products, 6-*O*-epoxyPC- α -TH. A sensitive method using a high-performance liquid chromatography with post-column reduction using platinum as the catalyst followed by fluorescence detection has been developed for the quantification of the addition products of α -TH during the peroxidation of an emulsion of ChL and PC. The addition products of α -TH with alkyl and peroxy radicals were detected when the emulsion was peroxidized. The results indicate that α -TH may react with lipid-alkyl radicals under oxygen-insufficient conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：食品素材化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ビタミンE、 α -トコフェロール、脂質過酸化、フリーラジカル

1. 研究開始当初の背景

脂質過酸化反応の開始は、脂質分子からの

水素の引き抜きによって生じる脂質アルキルラジカルの生成である。脂質アルキルラジ

カルは酸素分子と素早く反応して脂質ペルオキシラジカルとなり脂質過酸化が進行する。ビタミンE (α -トコフェロール、 α -TH) は、フリーラジカル捕捉剤として生体内脂質過酸化反応の抑制に大きく関与しており、その作用機構は、主に脂質ペルオキシラジカルへの水素原子の供与と、その結果生じた α -TH ラジカルが脂質ペルオキシラジカルと付加体を形成して安定化することによる(図1)。一方、 α -TH は脂質アルキルラジカルとも反応することが知られており、酸素分圧の低い細胞内では脂質アルキルラジカルを捕捉して抗酸化作用を発揮している可能性が高い。しかし、生体における α -TH の脂質アルキルラジカル捕捉作用は未だ不明である。

我々は、リノール酸メチルあるいはリン脂質リポソームを用いて α -TH のペルオキシラジカル捕捉反応を詳細に解析し、 α -TH 脂質ペルオキシラジカル付加体の確認から、モデル系では1分子の α -TH が2分子の脂質ペルオキシラジカルを捕捉できることを明らかにした。また、生体内で α -TH 脂質ペルオキシラジカル付加体を検出するための高感度分析法を確立し、酸化ストレスモデル動物中の α -TH 脂質ペルオキシラジカル付加体を調べたが、わずかにしか検出できなかった。さらに、脂質ヒドロペルオキシドの分解過程で生ずるアルデヒド類がビタミンEによって捕捉されることを期待したが、その反応性はそれほど高くなかった。そこで、生体内抗酸化剤としてのビタミンEの残された可能性は、脂質過酸化の初発反応で生ずる脂質アルキルラジカルの捕捉であると考えた。

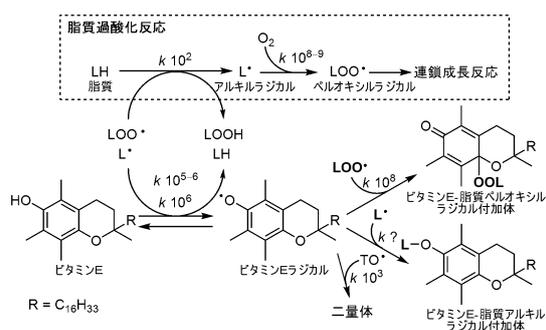


図1. 脂質過酸化反応とビタミンEによるフリーラジカル捕捉反応 (k は反応速度定数の値を示す)

2. 研究の目的

α -TH はフリーラジカル捕捉剤として、脂質過酸化を抑制する。しかし生体内脂質過酸化反応に対する α -TH の抗酸化作用は未だ不明な点が多い。一般に、 α -TH は脂質ペルオキシラジカルを捕捉することが知られているが、アルキルラジカルへの水素供与はペルオキシラジカルへの水素供与と同程度の速度であることから、脂質アルキルラジカルを

捕捉している可能性は高い。しかも、生体組織中の酸素濃度は大気下の数パーセントであり、脂質過酸化の初発反応で生成した脂質アルキルラジカルは酸素分子と反応する前に α -TH によって効果的に捕捉されることが予想される。すでに、低酸素分圧条件下で α -TH とリノール酸メチルを自動酸化させると、反応生成物として α -TH の6位水酸基にリノール酸メチル由来のアルキルラジカルが結合した付加体(6-*o*-脂質- α -TH)が生成することが報告されている。そこで本研究では、 α -TH と脂質アルキルラジカルとの反応生成物に着目して、生体膜主要構成脂質であるリン脂質あるいは血漿主要脂質であるコレステロールエステル由来のアルキルラジカルと α -TH との反応生成物の分離と構造解析、さらには反応生成物の高感度分析による、 α -TH の生体内抗酸化剤としての新たな作用機構を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料

α -TH及びリノール酸コレステロールエステル(ChL)は、市販品を精製して使用した。ChLヒドロペルオキシド(ChL-OOH)は、1% α -TH存在下でChLを自動酸化させて調製した。1-パルミトイル-2-リノレオイル-3-*sn*-ホスファチジルコリン(PLPC)は、既報に従って合成した。PLPC-13(*S*)-ヒドロペルオキシド(13-PLPC-OOH)は、PLPCの大豆リポキシゲナーゼ酸化によって調製した。

(2) α -TH と ChL-OOH との反応

ChL-OOH (2.46 g)と α -TH (0.31 g)を試験管に入れ、100°Cで4時間反応させた。反応終了後、試料はエタノールに溶かしてHPLC分析した。HPLCで検出された反応生成物は、逆相HPLCで分取し、化合物1と2を得た。

(3) α -TH と 13-PLPC-OOH との反応

13-PLPC-OOH (656 mg)と α -TH (90 mg)をイソオクタン(200 ml)に溶かし、触媒としてFe(III)アセチルアセトネート(70 mg)を加えて窒素気流下37°Cで24時間反応させた。反応終了後、試料はEDTA溶液で洗浄し、HPLCで分析した。HPLCで検出された反応生成物は、逆相HPLCで分取し、化合物3を得た。

(4) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

HPLCは、シリカゲルODSカラムを用いて、種々の溶媒条件で実施した。化合物の検出は、紫外線検出器、あるいは分離後の溶出液を還元カラムで処理した場合には蛍光検出器を使用した。また、島津LCMS-QP8000 α を使用して、溶出ピークのエレクトロスプレーイオン化マスペクトル(ESIMS)を測定した。

(5) 機器分析

プロトン核磁気共鳴スペクトル(¹H-NMR)の測定は、日本電子FT-NMR ECA-600 (600 MHz)を用いた。紫外可視吸収スペクトル(UV-vis)は日立U-2810、蛍光スペクトルは日本分光FP-6200STをそれぞれ使用して測定した。

4. 研究成果

(1) α-TH と ChL-OOH との反応生成物

ChL-OOH と α-TH を試験管に入れて 100℃で 6 時間加熱した。反応終了後、逆相 HPLC で分析したところ、反応生成物としてピーク 1 と 2 を検出した (図 2)。

ピーク 1 は ESIMS で *m/z* 1116 に [M + Na]⁺ が検出されたことより、α-TH と ChL アルコキシルラジカルとの付加体であると推定した。一方、ピーク 2 は、*m/z* 1100 に [M + Na]⁺ が検出されたことより、α-TH と ChL アルキルラジカルとの付加体であると推定した。そこで、これらの化合物ピークを分取して、それぞれの構造解析を行った。

化合物 1 は、UV-vis 分析で 289 nm (ε 2350, 2-PrOH) に α-TH のクロマン環に基づく吸収が認められた。さらに、¹H-NMR スペクトル (溶媒 CDCl₃) 測定して、検出されたそれぞれのプロトンシグナルを帰属した (表 1)。その結果、化合物 1 は、ChL-OOH の熱分解で生じた ChL アルコキシルラジカルが分子内二重結合に付加してエポキシ ChL アルキルラジカルとなり、それが α-TH の 6 位に付加した 4 つの異性体 (1a-1d) であると決定した (図 3)。

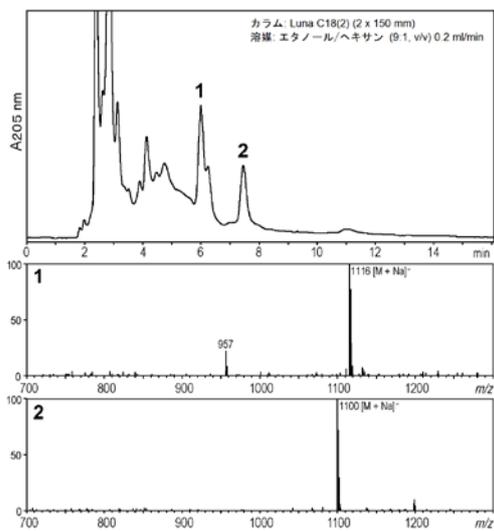


図 2. ChL-OOH と α-TH の 100℃における反応生成物の HPLC-ESIMS

化合物 2 は、UV-vis 分析で 226 nm (ε 26900, 2-PrOH) に共役ジエンに基づく吸収と 289 nm (ε 2940, 2-PrOH) に α-TH のクロマン環に基づく吸収がそれぞれ認められた。さらに、¹H-NMR スペクトル (CDCl₃) を測定して、検出されたそれぞれのプロトンシグナルを帰属した (表 2)。

その結果、化合物 2 は、ChL-OOH の熱分解で生じた ChL アルキルラジカルが α-TH の 6 位に直接付加して生成した 4 つの異性体 (2a-2d) であると決定した (図 4)。

表 1. 化合物 1 の ¹H-NMR 化学シフト値 (CDCl₃)

Chemical shift (δ)	Assignment
0.68 (s, 3H)	H-18 (cholesteryl)
0.84 (d, J = 6.9 Hz, 6H)	H-26, -27 (cholesteryl)
0.84-0.90 (m, 15H)	H-18 (TODD), H-4'a, -8'a, -12'a, -13 (α-tocopheryl)
0.91 (d, J = 6.4 Hz, 3H)	H-21 (cholesteryl)
1.02 (s, 3H)	H-19 (cholesteryl)
1.04-2.16 (m, 71H)	
1.21 and 1.22 (s, 3H)	H-2a (α-tocopheryl)
2.06 (s, 6H)	H-5a, -7a (α-tocopheryl)
2.10 (s, 3H)	H-8b (α-tocopheryl)
2.26 (t, J = 7.3 Hz, 2H)	H-2 (TEODE)
2.31 (d, J = 7.3 Hz, 2H)	H-4 (cholesteryl)
2.54 (t, J = 6.6 Hz, 2H)	H-4 (α-tocopheryl)
2.65 (m, 3/4H)	H-13 (9-TE-10-ODE or 11-TE-9-ODE) or H-9 (13-TE-11-ODE or 11-TE-12-ODE)
2.79 (m, 1/4H)	H-13 (11-TE-9-ODE) or H-9 (11-TE-12-ODE)
2.92 (m, 1/4H)	H-12 (11-TE-9-ODE) or H-10 (11-TE-12-ODE)
3.03 (m, 3/4H)	H-12 (9-TE-10-ODE or 11-TE-9-ODE) or H-10 (13-TE-11-ODE or 11-TE-12-ODE)
3.80 (m, 1/4H)	H-11 (11-TE-9-ODE or 11-TE-12-ODE)
3.87 (m, 1/4H)	H-11 (11-TE-9-ODE or 11-TE-12-ODE)
4.02 (m, 1/2H)	H-9 (9-TE-10-ODE) or H-13 (13-TE-11-ODE)
4.61 (m, 1H)	H-3 (cholesteryl)
5.07 (dd, J = 7.3, 15.2 Hz, 1/4H)	H-11 (9-TE-10-ODE or 13-TE-11-ODE)
5.20 (dd, J = 7.3, 15.0 Hz, 1/4H)	H-11 (9-TE-10-ODE or 13-TE-11-ODE)
5.37 (d, J = 5.0 Hz, 1H)	H-6 (cholesteryl)
5.53 (m, 1/2H)	H-9 (11-TE-9-ODE) or H-13 (11-TE-12-ODE)
5.61 (m, 1/2H)	H-10 (11-TE-9-ODE) or H-12 (11-TE-12-ODE)
5.89 (dd, J = 8.2, 15.1 Hz, 1/4H)	H-10 (9-TE-10-ODE) or H-12 (13-TE-11-ODE)
5.90 (dd, J = 8.2, 15.1 Hz, 1/4H)	H-10 (9-TE-10-ODE) or H-12 (13-TE-11-ODE)

9-TE-10-ODE: 9-O-α-tocopheryl-11,12-epoxy-10-octadecenoyl
 11-TE-9-ODE: 11-O-α-tocopheryl-11,12-epoxy-9-octadecenoyl
 11-TE-12-ODE: 11-O-α-tocopheryl-9,10-epoxy-12-octadecenoyl
 13-TE-11-ODE: 13-O-α-tocopheryl-9,10-epoxy-11-octadecenoyl

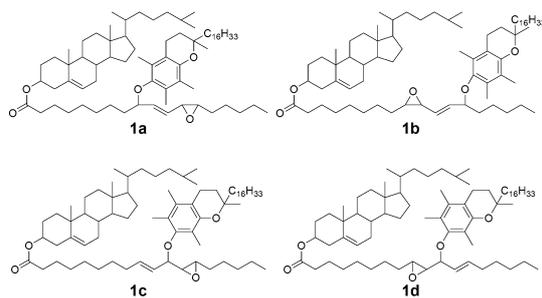


図 3. 化合物 1 (T-epoxyChL) の構造

表 2. 化合物 2 の ¹H-NMR 化学シフト値 (CDCl₃)

Chemical shift (δ)	Assignment
0.68 (s, 3H)	H-18 (cholesteryl)
0.84 (d, J = 6.9 Hz, 6H)	H-26, -27 (cholesteryl)
0.84-0.90 (m, 15H)	H-18 (TODD), H-4'a, -8'a, -12'a, -13 (α-tocopheryl)
0.91 (d, J = 6.4 Hz, 3H)	H-21 (cholesteryl)
1.02 (s, 3H)	H-19 (cholesteryl)
1.04-2.12 (m, 71H)	
1.21 and 1.22 (s, 3H)	H-2a (α-tocopheryl)
2.06 (s, 6H)	H-5a, -7a (α-tocopheryl)
2.11 (s, 3H)	H-8b (α-tocopheryl)
2.26 (t, J = 7.8 Hz, 2H)	H-2 (TODD)
2.31 (d, J = 7.8 Hz, 2H)	H-4 (cholesteryl)
2.53 (t, J = 6.6 Hz, 2H)	H-4 (α-tocopheryl)
3.99 (m, 3/4H)	H-9 (9-TODD) or H-13 (E,E-13-TODD)
4.05 (m, 1/4H)	H-13 (Z,E-13-TODD)
4.61 (m, 1H)	H-3 (cholesteryl)
5.36 (m, 1/2H)	H-13 (Z,E-9-TODD) or H-9 (Z,E-13-TODD)
5.37 (d, J = 4.6 Hz, 1H)	H-6 (cholesteryl)
5.56 (m, 1H)	H-10, -13 (E,E-9-TODD) or H-9, -12 (E,E-13-TODD)
5.65 (m, 1/2H)	H-10 (E,Z-9-TODD) or H-12 (Z,E-13-TODD)
5.84 (m, 1/2H)	H-12 (E,E-9-TODD) or H-10 (E,E-13-TODD)
5.92 (m, 1/2H)	H-12 (E,Z-9-TODD) or H-10 (Z,E-13-TODD)
5.96 (m, 1/2H)	H-11 (E,E-9-TODD or E,E-13-TODD)
6.14 (m, 1/2H)	H-11 (E,Z-9-TODD or Z,E-13-TODD)

E,Z-9-TODD: 9-O-α-tocopheryl-(E,Z)-10,12-octadecadienoyl
 E,E-9-TODD: 9-O-α-tocopheryl-(E,E)-10,12-octadecadienoyl
 Z,E-13-TODD: 13-O-α-tocopheryl-(Z,E)-9,11-octadecadienoyl
 E,E-13-TODD: 13-O-α-tocopheryl-(E,E)-9,11-octadecadienoyl

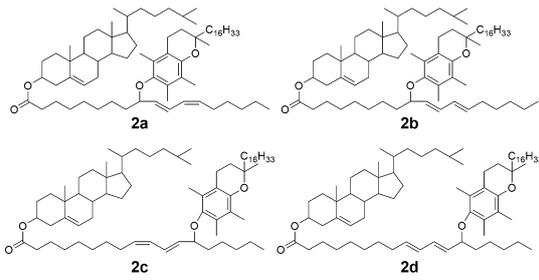


図 4. 化合物 2 (T-ChL) の構造

(2) α -TH と 13-PLPC-OOH との反応生成物

13-PLPC-OOH (656 mg) と α -TH (90 mg) をイソオクタン (200 ml) に溶かし、触媒として Fe(III) アセチルアセトネート (70 mg) を加えて窒素気流下 30°C で 24 時間反応させた。反応終了後、逆相 HPLC で分析したところ、ピーク 3 と 4 が検出された (図 5)。

ピーク 3 は ESIMS で m/z 1203 に $[M + H]^+$ が検出されたことより、 α -TH と PLPC アルコキシルラジカルとの付加体であると推定した。一方、ピーク 4 は m/z 858 の $[M + H]^+$ から、 α -TH の二量体と同定した。そこで、 α -TH と PLPC アルコキシルラジカルとの付加体と推定したピーク 3 を HPLC で分取して構造解析を行った。

化合物 3 は UV-vis 分析で 289 nm (ϵ 2380, EtOH) に α -TH のクロマン環に基づく吸収が認められた。さらに、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (CDCl_3) を測定して、検出された全てのプロトンシグナルを帰属した (表 3)。その結果、化合物 3 は 13-PLPC-OOH のレッドックス分解で生じた PLPC-13-アルコキシルラジカルが 12, 13-エポキシ PLPC アルキルラジカルとなり、それが α -TH の 6 位に付加した 2 つの異性体 (3a, 3b) であると決定した (図 6)。

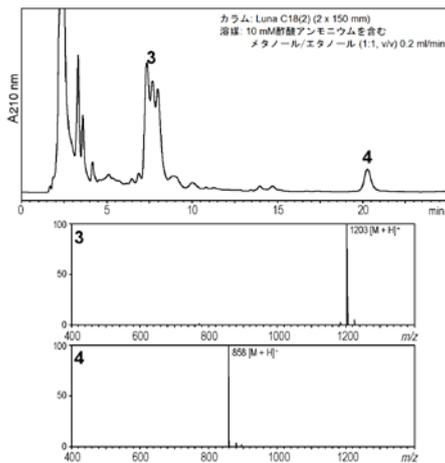


図 5. 窒素気流下における Fe(III) 触媒による 13-PLPC-OOH と α -TH との反応生成物の HPLC-ESIMS

表 3. 化合物 3 の $^1\text{H-NMR}$ 化学シフト値 (CDCl_3)

Chemical shift (δ)	Assignment
0.84-0.89 (m, 18H)	H-16 (palmitoyl), H-18 (TEODE), H-4'a, -8'a, -12'a, -13 (α -tocopheryl)
1.04-2.17 (m, 67H)	H-2a (α -tocopheryl)
1.21 and 1.22 (s, 3H)	H-3 (α -tocopheryl)
1.75 (m, 1H)	H-3 (α -tocopheryl)
1.80 (m, 1H)	H-3 (α -tocopheryl)
2.05, 2.056, 2.06 (s, 6H)	H-5a, -8a (α -tocopheryl)
2.09, 2.10, 2.11 (s, 3H)	H-7a (α -tocopheryl)
2.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H)	H-2 (palmitoyl)
2.29 (m, 2H)	H-2 (TEODE)
2.54 (m, 2H)	H-4 (α -tocopheryl)
2.61 (dt, $J = 2.1, 6.2$ Hz, 1/4H)	H-13 (9-TEODE)
2.64 (dt, $J = 2.1, 7.6$ Hz, 1/4H)	H-13 (9-TEODE)
2.78 (dt, $J = 2.0, 5.5$ Hz, 1/2H)	H-13 (11-TEODE)
2.89 (m, 1/2H)	H-12 (11-TEODE)
3.00 (m, 1/4H)	H-12 (9-TEODE)
3.03 (m, 1/4H)	H-12 (9-TEODE)
3.37 (s, 9H)	N(CH ₃) ₃ (choline)
3.80 (br.m, 2H)	H-2 (choline)
3.84 (m, 1/4H)	H-11 (11-TEODE)
3.87 (m, 1/4H)	H-11 (11-TEODE)
3.91 (m, 1H)	H-1 (glycerol)
3.96 (m, 1H)	H-1 (glycerol)
3.98-4.06 (m, 1/2H)	H-9 (9-TEODE)
4.12 (dd, $J = 4.8, 11.7$ Hz, 1H)	H-3 (glycerol)
4.31 (br.m, 2H)	H-1 (choline)
4.41 (dd, $J = 2.0, 11.6$ Hz, 1H)	H-3 (glycerol)
5.03 (dd, $J = 7.6, 15.8$ Hz, 1/4H)	H-11 (9-TEODE)
5.19 (m, 1/4H)	H-11 (9-TEODE)
5.19 (m, 1H)	H-2 (glycerol)
5.56 (m, 1/2H)	H-9 (11-TEODE)
5.65 (m, 1/2H)	H-10 (11-TEODE)
5.88 (dd, $J = 8.2, 15.5$ Hz, 1/2H)	H-10 (9-TEODE)

9-TEODE: 9-*O*- α -tocopheryl-12,13-epoxyoctadecenoyl
11-TEODE: 11-*O*- α -tocopheryl-12,13-epoxyoctadecenoyl

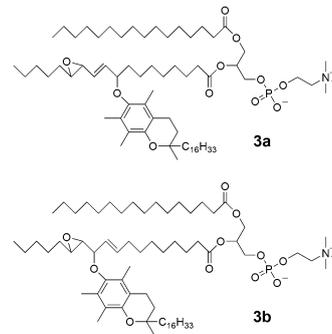


図 6. 化合物 3 (T-epoxyPLPC) の構造

(3) α -TH 脂質アルキルラジカル付加体の高感度分析

分離した α -TH 脂質アルキルラジカル付加体は、いずれも蛍光 (1: λ_{ex} 290 nm, λ_{em} 332 nm; 2: λ_{ex} 291 nm, λ_{em} 333 nm; 3: λ_{ex} 286 nm, λ_{em} 326 nm) を有していたが、その強度は α -TH の 1/25 程度と低い値であった。そこで、これらの化合物の蛍光強度を高め、高感度に検出するために、HPLC カラムで分離した溶出液を白金アルミナ (5% Pt) を詰めたカラム (4 x 50 mm) を通して還元するシステムを検討した (図 7)。

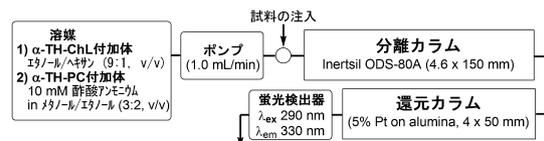


図 7. α -TH 脂質アルキルラジカル付加体分析のための HPLC システム

図 8 は、白金アルミナカラム通過処理の有無による化合物 1 の HPLC クロマトグラムを

示した。還元カラム通過処理によって、化合物 **1** の蛍光検出感度は大きく向上した。また、この化合物ピークを分取して、HPLC 分析したところ、 α -TH が検出されたことより、本分析は α -TH アルキルラジカル付加体の還元で生じた α -TH を検出したことによると結論した。

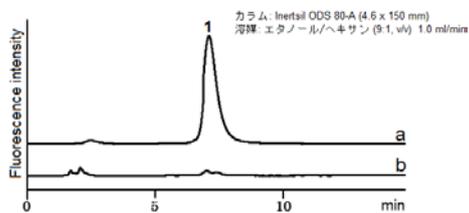


図 8. 化合物 **1** の白金アルミナカラム通過の有無による検出感度の変化
溶出液は蛍光検出(λ_{ex} 290 nm, λ_{em} 330 nm)した。a: 白金アルミナカラム通過、b: 無処理。

(4) ChL と PLPC よりなるエマルジョン溶液の脂質過酸化における α -TH の作用

ヒト血漿低密度リポタンパク (LDL) は過酸化を受けやすく、生じた酸化 LDL はアテローム性動脈硬化の原因として知られている。ヒト血漿 LDL 中には α -TH が存在し、フリーラジカルを捕捉して抗酸化作用を発揮しているものと考えられている。そこで、 α -TH の脂質アルキルラジカル捕捉作用を明らかにすることを目的に、ヒト LDL の主要構成脂質である ChL と PLPC から LDL モデルエマルジョンを調製し、 α -TH の反応生成物を検討した。

ChL、PLPC、 α -TH をクロロホルムに溶かして試験管にとり、溶媒を除去した後、適量の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 150 mM NaCl を含む) を加えてミキサーで 5 分間攪拌した。さらに氷冷下でホモジナイザーを用いて 10000 rpm で 1 分間攪拌して LDL モデルエマルジョンを作成した。本溶液における各脂質の最終濃度は、ChL 1.9 mM、PLPC 0.79 mM、 α -TH 7.9 μ M とした。LDL モデル溶液 7.5 ml をネジ付試験管にとり、窒素ガスを 1 分間流し込み、ラジカル反応開始剤である AAPH リン酸緩衝液 0.5 ml (AAPH 最終濃度 2 mM) を加え、栓をして 37°C で静置した。一方、同様の過酸化反応を大気圧下 37°C で振盪して行った。反応溶液は経時的に採取し、既知濃度の γ -TH を内部標準 (IS) として添加後、シリカゲル-NH₂ ミニカラムを通して低極性画分と極性画分とに分けた。低極性画分からは、ChL-OOH、 α -TH、 α -TH のキノン生成物、 α -TH と ChL との付加体をそれぞれ HPLC 分析した。極性画分からは、PLPC-OOH 及び α -TH と PLPC との付加体を HPLC 分析した。各試料は 3 連で測定し、平均値 \pm 標準偏差で示した。

LDL モデル溶液の過酸化反応を 37°C で静置して行った場合の反応開始時と 6 時間後の α -TH 及びキノン生成物を HPLC 分析したところ、反応 6 時間後には α -TH のピークが消失

し、キノン生成物 (5, 6-及び 2, 3-epoxy- α -TQ と α -TQ) が出現した (図 9A)。また、 α -TH と ChL との付加体を分析したところ、ChL-OOH から生ずる epoxyChL ペルオキシラジカルとの付加体 (T00-epoxyChL) と、ChL から生ずる ChL アルキルラジカルとの付加体 (T-ChL) のピークが検出された (図 9B)。一方、極性画分から、PLPC ペルオキシラジカルとの付加体 (T00-PLPC) に相当するピークが検出された (図 9C)。

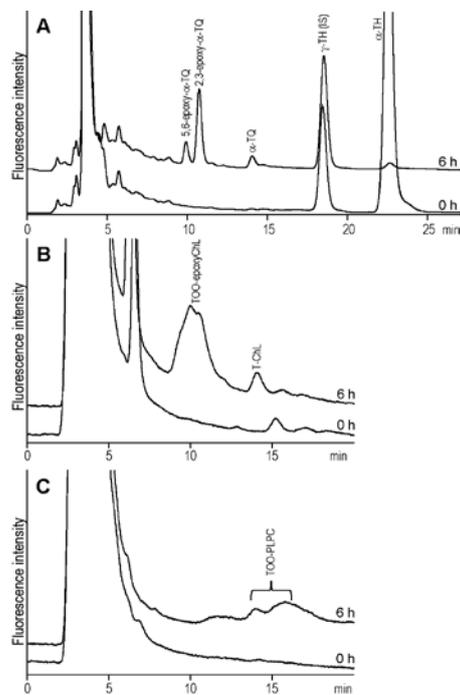


図 9. AAPH による LDL モデル溶液過酸化反応における α -TH とその生成物の HPLC
A. 低極性画分を 5 mM トリフルオロ酢酸を含むメタノール/水 (95:5, v/v) で溶出させ、亜鉛還元カラム (4.0 x 10 mm) 通過させた。B. 低極性画分をエタノール/ヘキサン (9:1, v/v) で溶出させ、白金還元カラム (4.0 x 50 mm) 通過後、蛍光検出した。C. 極性画分を 10 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノール/エタノール (3:2, v/v) で溶出させ、白金還元カラム通過後、蛍光検出した。化合物は蛍光検出 (λ_{ex} 290 nm, λ_{em} 330 nm) した。

図 10 は、AAPH によって誘導される LDL モデル溶液過酸化反応の経時変化を示した。反応系に α -TH が存在すると、脂質ヒドロペルオキシド (ChL-OOH と PLPC-OOH) の生成が抑制され、 α -TH の減少とともに反応生成物としてキノン類 (2, 3-epoxy- α -TQ, 5, 6-epoxy- α -TQ, α -TQ) と付加体 (T00-epoxyChL, T00PLPC, T-ChL) が認められた。キノン類は反応の進行とともに多量に蓄積し、反応後期には多量の T00-epoxyChL が生成した。一方、脂質アルキルラジカル捕捉生成物として少量の T-ChL が認められ、静置条件で反応を行うと振盪条件に比べてその生成量が増加した。従って、 α -TH は脂質ペルオキシラジカルを捕捉するだけでなく、酸素の供給が不十分な場合に

は脂質アルキルラジカルも捕捉できる可能性が示された。

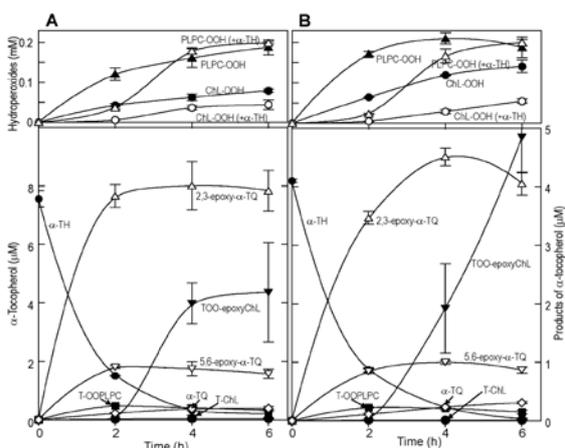


図 10. AAPH による LDL モデル溶液過酸化反応における ChL-OOH、PLPC-OOH、 α -TH および α -TH 生成物の変化

A, LDL モデル溶液 (ChL 1.9 mM, PLPC 0.79 mM, α -TH 7.9 μ M) をネジ付試験管にとり、2 mM AAPH 加えて密栓をして 37°C で静置した。B, 同様の過酸化反応を大気圧下 37°C で振盪して行った。

本研究では、 α -TH の脂質アルキルラジカル捕捉反応生成物を分離してそれらの構造を明らかにし、さらに HPLC を用いた白金カラム-蛍光検出によって高感度分析法を確立できた。しかし、生体内において α -TH が脂質アルキルラジカルを捕捉できるかどうかは未だ不明であり、今後、 α -TH アルキルラジカル捕捉反応物を生体組織で明らかにすることが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Saito, F., Iwamoto, S., Yamauchi, R., Reaction products of γ -tocopherol with (*E*)-4-oxo-2-nonenal in acidic acetonitrile. Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 74(1), 168-174, 2010.
- ② 山内 亮, 抗酸化ビタミンの脂質過酸化抑制機構. FFI Journal, 査読無, 215(1), 17-23, 2010.
- ③ Mazari, A., Iwamoto, S., Yamauchi, R., Ultraviolet A-induced peroxidation of phosphatidylcholine in unilamellar liposomes. Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 73(5), 1212-1214 (2009).

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 亮 (YAMAUCHI RYO)
 岐阜大学・応用生物科学部・教授
 研究者番号：50126760

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：