

機関番号：13801
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580126
 研究課題名 (和文) 生体内におけるカロテノイドとペルオキシナイトライトの反応機構の解明研究
 研究課題名 (英文) Studies on Reaction Mechanism of Carotenoids and Peroxynitrite In Vivo
 研究代表者
 衛藤 英男 (ETOH HIDEO)
 静岡大学・農学部・教授
 研究者番号：10076747

研究成果の概要 (和文) : スーパーオキシドと一酸化窒素で生成するペルオキシナイトライトは生体内の強力な酸化剤であり、DNA の開裂、タンパク質のニトロ化や水酸化、脂質の過酸化を起こす。本研究では、ルテイン、カプサンチンおよびフコキサンチンとペルオキシナイトライトの反応を *in vitro* で行った。その結果、それぞれのカロテノイドがニトロ化され、その構造がカロテノイドによって異なることを明らかにした。さらに、タンパク質のモデルのチロシンを用いた実験で、これらのカロテノイドがニトロ化を阻害することも明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Peroxynitrite, the reaction product of superoxide and nitric oxide, is a powerful oxidant *in vivo*. Peroxynitrite is known to induce DNA strand scission, protein modification by nitration and hydroxylation and lipid peroxidation in LDL. The *in vitro* reactivity of lutein, capsanthin and fucoxanthin toward peroxynitrite was investigated, and the reaction products produced by scavenging with peroxynitrite were analyzed. Nitro-carotenoids were isolated from the reaction of these carotenoids with peroxynitrite. These carotenoids inhibited the nitration of tyrosin by peroxynitrite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：食品化学
 科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学
 キーワード：食品化学

1. 研究開始当初の背景

活性酸素のうち、ペルオキシナイトライトは強い発ガン作用を持ち、食品成分との反応によるこの消去などの研究が現在緊急を要している課題である。カロテノイドによる活性窒素種との生体内反応機構の解明は、国内に限らず海外においても研究が望まれているが、不安定であり、また、純品の入手が難しいことから、生化学的分析の研究が多く、有

機化学的な研究はほとんどないのが現状である。一方、日本では、世界に先駆けてアスタキサンチンの生物活性に関する研究が行われていて、多くのデータの蓄積もあるので、このような化学的研究の進展が望まれている。平成17年11月には、アスタキサンチン研究会が発足し、今年度は第4回が開催された。そこでは、カロテノイド類のペルオキシナイトライトの消去機構が話題となってい

る。しかしながら、国内国外にもそれに取り組む研究者はいなかった。研究代表者はこのペルオキシナイトライトの反応機構の解明研究に取り組んだ。アスタキサンチンおよびβ-カロテンは、発ガンの機構と考えられているDNAやタンパク質のニトロ化を、カロテノイド自身がニトロ化することによって、ペルオキシナイトライトと反応していることを明らかにしている。

2. 研究の目的

活性酸素の中で一酸化窒素(NO)とスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)から生成する反応性活性窒素種ペルオキシナイトライト(OONO⁻)は、非常に反応性が高く発ガン性に関係しており、この生体内における反応が注目されている。生体内で発生する活性酸素と反応する物質として、水系で作用する抗酸化剤はアスコルビン酸であり、細胞膜やリポタンパクなどの脂質中で効果のある重要な抗酸化成分はカロテノイドとトコフェロールであるが低酸素分圧の細胞内ではカロテノイドの方が優れている。カロテノイドは、自然界に約600種類以上の存在が知られているが、これを生合成できるのは植物と微生物のみであり、人を含む動物はその能力を持っていないため、食物から摂取する必要がある。カロテノイドは、特に一重項酸素に対して強力な消去活性を有しており、その中でもアスタキサンチンは消去能が高い。一方、カロテノイドの生体内でのペルオキシナイトライトとの反応についてはまだ解明されていなかった。申請者らは、リコピン、アスタキサンチンおよびβ-カロテンのペルオキシナイトライトの生体内反応を化学的に解明し報告した。その中で、アスタキサンチンおよびβ-カロテンは自らがニトロ化されることでペルオキシナイトライトを取り込むことを明らかにした。(Nitration reaction of astaxanthin and β-ionone by peroxy nitrite, *Tetrahedron Lett.*, 47, 3637-3640(2006).) ドイツでの国際会議、4th International Congress on Pigments in Food, October 9-12, 2006, Stuttgart-Hohenheim, Germany でこの研究内容が注目され、ショートトークに選ばれ、また、ポスター賞(Nitroastaxanthin from Astaxanthin with Peroxynitrite)を受賞した。この研究は、カロテノイド類とペルオキシナイトライトの反応、特に、ニトロ化がカロテノイドの構造のどの部分に関係しているかを明らかにし、生体内でのカロテノイドの役割の解明の基礎的な情報を提供することにある。

申請者は、6年前からカロテノイド類とペルオキシナイトライトの反応に関する化学的研究を行っている。2つの文献および総説

((1) Nitration reaction of astaxanthin and β-ionone by peroxy nitrite, *Tetrahedron Lett.*, 47, 3637-3640(2006). (2) Quenching of peroxy nitrite by lycopene in vitro, *Chemistry Letters*, 33(1), 80-81(2004). (3) 生体における抗酸化機構—ペルオキシナイトライトの消去機構を中心に—, *Food & Food Ingredients Journal of Japan*, 208(8), 601-614(2003)) をすでに報告しているが、リコピン、アスタキサンチンおよびβ-カロテンを用いたペルオキシナイトライトの反応機構の解明研究によって、これらのカロテノイドは3つの機構によっていることを明らかにした。1つ目は、カロテノイドの9位および13位のシス化によるペルオキシナイトライトのエネルギー消去、2つ目は、カロテノイドがペルオキシナイトライトによって直接酸化されペルオキシドとなり、開裂してカロテナルとなる経路、3つ目は、カロテノイドがペルオキシナイトライトと反応し、ニトロ化する反応過程である。この中で、ニトロ化経路は、申請者が発見したもので、カロテノイド類もポリフェノール類と同様にペルオキシナイトライト反応してニトロ化されることを見出したことは注目すべきことである。これをさらに他のキサントフィル類(ルテイン、カプサンチン等)に広げ構造と反応の関係を明らかにする。

アスタキサンチンは、エビ、カニ、サケ、イクラなど水産生物に広く存在する色素である。近年、アスタキサンチンの強力な抗酸化作用・抗脂質過酸化作用が注目され、将来生活習慣病になりうる予備軍のメタボリックシンドロームに対する効果的な健康補助食品素材としての利用が注目されている。しかしながら、その生体内での化学的な抗酸化機構は明らかにされていない。申請者らはここに着目し、カロテノイド(リコピン、アスタキサンチンおよびβ-カロテン)のペルオキシナイトライト消去機構の解明に取り組んできた。その結果、アスタキサンチンおよびβ-カロテンがニトロ化されることでペルオキシナイトライトと反応する機構を発見した。

アスタキサンチンとペルオキシナイトライトの反応機構は、リコピンでの反応と共通点もあるが、それぞれのカロテノイドによって異なる反応機構があることが分かった。特に、アスタキサンチンは日本にとって重要な食品供給源である海産資源からの素材であることから、その抗酸化機構の解明は、アスタキサンチンの機能性食品素材としての世界的な需要に貢献でき、商業的に考えても緊急性を有している重要な研究課題である。この結果を踏まえ、生体内でペルオキシナイトライトの消去機構を明らかにする研究は新規

性、独創性があり、緊急に解決する課題と確信している。化学的解明研究は国内、国外を通してなされてない。

3. 研究の方法

申請者は、活性酸素類の中で一酸化窒素 (NO) とスーパーオキシドアニオン (O_2^-) から生成するペルオキシナイトライト ($ONOO^-$) が、非常に反応性に富み強く発ガンに関係していることからカロテノイド類による反応を検討した。一重項酸素消去能の強いアスタキサンチンおよびβ-カロテンについて検討し、次の3つの経路によって消去していることを明らかにした。① シス化によるペルオキシナイトライトの持つエネルギーの消去。② 直接反応し、ペルオキシドを生成し、その酸化開裂した生成物の生成。③ ニトロ化することによってペルオキシナイトライトを消去する機構である。その中でも、カロテノイドのニトロ化機構は、これまで報告されているポリフェノールなどの機構と同じであり、その分解機構の解明が急がれるテーマである。まず、初年度は、リコピン、アスタキサンチン、β-カロテンに加えて、ルテインおよびカプサンチンとペルオキシナイトライトの反応機構を完全に解明することを行う。

(1) ペルオキシナイトライトの合成：氷冷した 0.7M H_2O_2 を含む 0.6M TFA 溶液 300mL、氷冷した 0.6M $NaNO_2$ 3300mL を三角フラスコに入れ、各フラスコを T 字ガラス管を連結する。氷冷した 1.5M $NaOH$ 600mL を吸引瓶に入れ、T 字ガラス管を連結し、吸引する。反応液は黄色を呈す。この溶液を $-20^\circ C$ で数時間凍らせる。上層の黄色の $ONOO^-$ の薄い層が形成する。凍結濃縮した溶液に二酸化マンガンを加え、余剰の H_2O_2 を除去する。濃度は、UV302nm で測定する。(1.2M $NaOH$ 中で $\epsilon_{302nm}=1670\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) $ONOO^-$ は、1M $NaOH$ 溶液中で $-20^\circ C$ で保存する。

(2) カロテノイドとペルオキシナイトライトの反応：各カロテノイド 1mg/mL (1.87mM) を含む THF 溶液 1mL に、最終濃度 $1 \times 10^{-2}\%$ となるように $2 \times 10^{-2}\%$ THA/THF 溶液 1mL を添加し、50 μM ペルオキシナイトライト溶液 40 μL 添加し反応させる。この反応液をエバポレーターで濃縮し、クロロホルムなどの有機溶媒で抽出後、HPLC で分析する。反応生成物は、分取 HPLC によって分離・精製する。それぞれを各種機器分析によって構造を推定し、分子軌道法を用いた安定な構造を計算し、推定構造の立体構造が正しいことを確認する。

ニトロ化することでペルオキシナイトライトと反応する機構は、研究分担者との共同研究によって、世界に先駆けて発見したもので

ある。研究分担者は、天然物化学者でカロテノイドの専門家である。不安定なカロテノイドの取り扱い、精製法など長年にわたり、天然物から新規カロテノイド類を単離・構造決定しているため、この研究テーマの研究分担者として欠かすことの出来ない研究者である。最近では、生体内でのアスタキサンチンの挙動の研究も医学部と共同研究で行っている。

二年目からは、ニトロ化されたカロテノイド類の安定性と分解していく過程を明らかにしていく。アスタキサンチンはニトロ化することによってペルオキシナイトライトの毒性をなくし、さらにこのニトロアスタキサンチンはシス化しているため、容易に体外に排出されると考えられる。生成したニトロアスタキサンチン類のさらなる酸化分解について研究し、生体内での代謝についての基礎的なデータを得ることを行う。

4. 研究成果

ペルオキシナイトライトは、マクロファージや好中球により産生される強力な酸化物質で、DNA 切断を引き起こす物質として知られ、ニトロ化によるタンパク質変性および LDL (low-density lipoprotein) のヒドロキシル化と脂質の過酸化を引き起こすことで酸化障害を起こすことが知られている。すでに、β-カロチンとアスタキサンチンが、ニトロカロチノイドを形成することで $ONOO^-$ からの二酸化窒素ラジカルを捕らえることができることを、当研究グループにより示している。本研究では、ルテイン、カプサンチンおよびフコキサンチンと $ONOO^-$ の反応について研究し、新たな $ONOO^-$ 反応物を得た。

(1) ルテインと $ONOO^-$ の反応において、14-s-cis-15-Nitrolutein と 14'-s-cis-15'-Nitrolutein および新規な構造の Lutein-6H-1,2-oxazine が得られた。オキサジン化合物は、カロテノイドと $ONOO^-$ の反応での生成は初めてである。オキサジン (3) の生成メカニズムは不明確であるが、8-ニトロルテインを経て形成されると考えられた。反応は、環状構造に近い8位のオレフィン炭素にラジカルを生じさせる、ここに二酸化窒素ラジカル ($\cdot NO_2$) が反応し、ニトロ化ルテインとなった後、閉環し Lutein-6H-1,2-oxazine (3) が生成したと考えられた。また、8位のニトロ体は不安定でありオキサジン化合物となったため、8-ニトロルテインは検出されなかったと考えられる。

(2) カプサンチンおよびフコキサンチンなど末端に環状構造をもつカロテノイドでも、共役二重結合中央部を中心に $ONOO^-$ によるニトロ化カロテノイドが生成した。このニトロ化は、カロテノイドラジカルとニトロラジ

カルがラジカル反応で得られることが判った。ONOO⁻により生成するカロテノイドラジカルは、ラジカルカチオン状態から二重結合の異性化を伴って、安定なカロテノイドラジカルを生じる。このときニトロ基の大きさのため、ニトラジカルは立体障害の少ない位置にラジカルが存在するカロテノイドラジカルと反応していると考えられた。ルテインと ONOO⁻との反応により、同様にラジカルのエネルギーレベルの低い 15 位のシス体の 15 位ラジカル又は 15' 位ラジカルとニトラジカルとの反応生成物 14-s-cis-15-Nitrolutein と 14'-s-cis-15'-Nitrolutein が得られた。生成物である 14-s-cis-15-Nitrolutein と 14'-s-cis-15'-Nitrolutein はエネルギー的に安定な生成物ではなかった。このことから、ONOO⁻によるカロテノイドのニトロ化は、ラジカルを経由する反応系が支持された。カプサンチンでは、14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin と 12-Nitrocapsanthin が得られ、フコキサンチンでは、14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin と 11-cis-11-Nitrofucoxanthin が得られた。オレフィン部分のラジカル化は位置による存在率の違いはあるかもしれないが、ランダムに起こっている。しかし、ラジカルのエネルギー的に安定性の高い分子位置にラジカルの存在率が高まり、カロテノイドのラジカル位置近傍に存在できるニトラジカルがラジカル位置へ反応しニトロ化が成立していると考えられた。

これまで、β-カロチンやアスタキサンチンなどの様に左右対称の化合物について ONOO⁻反応物を示してきた。本研究では、左右非対称で様々な活性基をもつルテインや、カプサンチンおよびフコキサンチンについてどのような消去活性を示すか検討した。その結果、主要な生成物としては、カロテノイドの末端の構造に関わらず、ポリエン構造に発生するラジカルにニトラジカルが結合したニトロ化合物が得られることが判明した。この結果、カロテノイド類のペルオキシナイトライド消去活性は、カロテノイド類が共通に持つ共役ポリエン部分に依存することが判明した。今後、これら共通の化合物が生体内で障害をもたらす活性窒素種である ONOO⁻の消去活性を示し、健康の維持のために役立つ生理活性や活性窒素種の消去活性物の研究に役立つことが期待される。

今後の可能性としては、外傷、手術、広範囲熱傷、ショックなどで炎症性サイトカインの産生が高まると全身性炎症反応症候群 (SIRS : systemic inflammatory response syndrome)が見られる。このような SIRS 病態において、活性酸素種が過剰産生され、炎症やアポトーシスが進行することが確認されている。重症な場合は、様々な臓器で抗酸

化分子が低下しているばかりか、活性酸素種の産生自体が亢進している。活性酸素の増加により、一酸化窒素と反応した ONOO⁻の産生が高まり、より重症な障害をもたらすと考えられる。このような場合に、カロテノイドによる ONOO⁻消去活性が有効になるのではないか。生体内で数々の酵素やタンパク質のチロシン残基などをニトロ化し、酵素活性や生理機能を弱めることで、炎症反応及び炎症抑制に対する悪影響が考えられ、それをカロテノイド自身がニトロ化されることで ONOO⁻を消去し、その結果、生体内の過剰炎症の抑制と抗炎症反応の正常化を制御している可能性がある。今後の生体内での機構の解明が期待される。

(3) ルテインと ONOO⁻の反応を行い、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィ、分取用逆相 HPLC によりルテインの酸化体を含むフラクションを分画した。そこから3つの化合物の構造を解析するため、化合物を精製、単離し、各種機器にて分析した。そのスペクトル解析からルテインのニトロ体としてシス体配位の 15-Nitrolutein、15'-Nitrolutein を得た。また、新たな消去構造体としてニトロ化後安定な反応物に反応が進行した Lutein-6H-1,2-oxazine を得た。ルテインの ONOO⁻消去機構は、ルテインラジカルとニトロルテインの分子軌道法計算の比較により、ルテイン中央部の共役オレフィン部分で ONOO⁻によるラジカル化を受け、ルテインラジカルを経由し、ONOO⁻により生成するニトラジカル($\cdot\text{NO}_2$)とラジカル反応を起こす結果、ONOO⁻消去活性を示していることが判った。つまり、ONOO⁻はルテインの共役オレフィン部分に対してニトロ基のラジカル付加反応を起こすことが判明した。

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 Maoka, T., Tsuboi, M., Kulkarni, A., Terada, Y., Kato, K., Nakatsugawa, H., Mori, H., Inakuma, T. and Etoh, H., Nitrocarotenoid and oxazine-carotenoid, reaction products of carotenoids with peroxynitrite, Carotenoid Science, 査読有、Vol.15, 2011, 印刷中.
- ② Tsuboi, M., Etoh, H., Yomoda, Y., Kato, K., Kato, H., Kulkarni, A., Terada, Y., Maoka, T., Mori, H., and Inakuma, T.: Nitration reaction of lutein with peroxynitrite, Tetrahedron Lett., 査読有、Vol.51, 2010, 676-678.

- ③Hayakawa, T., Kulkarni, A., Terada, Y., Maoka, T., and Etoh, H.: Reaction of astaxanthin with peroxyxynitrite, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有、Vol.72, 2008, 2716-2722.

[学会発表] (計10件)

- ①衛藤英男・眞岡孝至・加藤久喜・中津川広樹・坪井 誠・寺田幸正・松本 岳・森啓信・細川雅史・宮下和夫：カロテノイドによる活性窒素種消去の検討ーカロテノイドとペルオキシナイトライトの反応物についてー、第52回天然有機化合物討論会、(2010.9.30, 静岡)。
- ② Etoh, H., Maoka, T., and Terada, Y.: Nitrocarotenoid and oxazinecarotenoid, reaction products of carotenoids with peroxyxynitrite, 6th International Congress on Pigments in Food, Proceedings of the 6th International Congress (Hungary, Budapest, June 20-24, 2010)
- ③衛藤英男・須原三加・中津川広樹・眞岡孝至・寺田幸正・鈴木里英・石倉正治：アスタキサンチンの自動酸化に関する化学的研究、第5回アスタキサンチン研究会 (2009.9.18, 東京)。
- ④衛藤英男・四方田雄哉・加藤久喜・眞岡孝至・寺田幸正・森 啓信・稲熊隆博：ルテインとペルオキシナイトライトの反応について、第23回カロテノイド研究談話会、(2009.9.16, 仙台)。
- ⑤ Yomota, Y., Kulkarni, A., Maoka, T., Terada, Y., Mori, H., Inakuma, T., and Etoh, H.: Reaction of 1,2-epoxylycopene with peroxyxynitrite, The 15th international symposium on carotenoids , Crotenoid Science, (2008.6.22-27, Okinawa, Japan).
- ⑥ Etoh, H.: Reaction of carotenoids with peroxyxynitrite, The 15th international symposium on carotenoids (Invited Lecture), Crotenoid Science, (2008.6.22-27, Okinawa, Japan).

[図書] (計2件)

- ①Maoka, T. and Etoh, H., Nutraceutical Science and Technology 10, Functional Foods of the East, 4. Some biological functions of the carotenoids in Japanese food, Edited by John Shi, CRC Press, Canada, 2010, pp.85-97.
- ②衛藤英男：「カロテノイドの科学と最新応用技術」第2編カロテノイドの機能、第4章カロテノイドによるペルオキシナイトライト消去の化学的機構、シーエムシー出版、2009年9月号、pp.132-137.

6. 研究組織

(1)研究代表者

衛藤 英男 (ETOH HIDEO)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号：10076747

(2)研究分担者

眞岡 孝至 (MAOKA TAKASHI)
(財)生産開発科学研究所・主任研究員
研究者番号：10157159

(3)連携研究者

()

研究者番号：