

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23658115

研究課題名(和文)線虫の採餌本能を利用したカロテノイド産生菌からの強力な抗酸化物質の探索法の確立

研究課題名(英文) Establishing a method to screen strong antioxidant substances from carotenoid-producing bacteria based on the feeding instinct of nematodes

研究代表者

齊藤 毅 (Saito, Takeshi)

京都大学・原子炉実験所・助教

研究者番号：10274143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な生体脂質である ω -リノレン酸、および代表的なカロテノイドである β -カロテンもしくはアスタキサンチンをベンゼンに溶解させ、調製溶液に対して γ 線照射を行った。そして、代表的な脂質酸化損傷である脂質の過酸化および酸化的分解に関して解析を行った。その結果、カロテノイドは γ 線照射による脂質の過酸化反応には影響を与えないが酸化的分解反応には有意な影響を与えること、そして強い酸化ストレスによる脂質損傷に対して条件によっては高い抗酸化活性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A typical biological lipid, ω -linolenic acid, and typical carotenoids, β -carotene or astaxanthin, were dissolved in benzene and the prepared solutions were subsequently irradiated with gamma rays. Next, the peroxidation and oxidative degradation of lipids, typical oxidative damage of lipids, were analyzed. The analysis revealed that carotenoid has no effect on the peroxidation of lipids induced by gamma irradiation; however, it has a significant effect on the oxidative degradation. Moreover, carotenoid exhibits high antioxidant activity against the lipid damage, induced by strong oxidative stress, depending on the conditions.

研究分野：放射線生物学

キーワード：カロテノイド 酸化ストレス 電離放射線 酸化的脂質損傷 抗酸化活性 生体防御活性

1. 研究開始当初の背景

近年、抗酸化能力に富む機能性食品に対する社会的関心は極めて高い。このような機能性物質を科学的根拠に基づいて探索・開発することは、社会的要請に応え、予防医学的にも重要であると考えられる。こうした期待の下、天然由来の抗酸化成分として特に注目を浴びているのが、 β -カロテンやアスタキサンチンなどのカロテノイド系色素である。

ところで、自然界には代表的な生体外酸化ストレスである放射線に対して極めて高い抵抗性を有する放射線耐性細菌と呼ばれる細菌群が存在する。研究代表者はこれまで、代表的な放射線耐性細菌 *Deinococcus radiodurans* を始めとする複数の放射線耐性細菌が産生するカロテノイドの構造を決定し、それらカロテノイドが極めて高い抗酸化能力を有することを、さらに放射線耐性細菌のカロテノイド非産生色素欠損変異株は酸化ストレスに対して高感受性となることを報告してきた。

これら細菌産生カロテノイドを始め自然界には 600 種を超えるカロテノイドが存在しているが、高い抗酸化能力を有し、かつヒトの健康増進に寄与するカロテノイドの探索にはカロテノイドの抗酸化活性、生体防御活性の分子機構を解明することが不可欠である。

2. 研究の目的

カロテノイドは脂溶性分子であり、生体内において細胞膜等の生体脂質部位に局在している。このことより強い酸化ストレスによる生体損傷に対してカロテノイドは、その周辺に存在する生体脂質の酸化損傷に影響を与えることにより、その抗酸化活性、生体防御活性を發揮すると考えられる。本研究は、強い酸化ストレスとして定量性に優れた線をを用い、代表的なカロテノイドである β -カロテンおよびアスタキサンチンが線照射による脂質酸化損傷に対してどのような影響を与えるかを解析することにより、カロテノイドの生体内における抗酸化活性、生体防御活性の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

代表的な生体脂質である α -リノレン酸をベンゼンに最終濃度 5.0×10^{-1} M となるように溶解させ、その調製溶液に対して ^{60}Co 線照射を行った。

その後、代表的な脂質酸化損傷である酸化的分解と過酸化の程度を、それぞれ脂質の酸化的分解反応によって生成するマロンジアルデヒド (malondialdehyde (MDA)) を定量する TBA (thiobarbituric acid) 比色法、および脂質の過酸化反応によって生成する共役ジエンを照射試料の *n*-ヘキサン溶液の 230–236 nm の平均吸光度測定により定量する共役ジエン法によって評価した。

さらに、 α -リノレン酸ベンゼン溶液に適当な濃度の β -カロテンもしくはアスタキサンチンを添加し、各カロテノイドが線照射による脂質の酸化的分解および過酸化にどのような影響を与えるかを、それぞれ TBA 比色法および共役ジエン法により解析した。

4. 研究成果

(1) 線照射による α -リノレン酸の酸化的分解

5.0×10^{-1} M α -リノレン酸ベンゼン溶液に対し 5–90 kGy の線を照射し、 α -リノレン酸の酸化的分解の程度を、TBA 比色法により定量した MDA 生成量を指標に解析した。図 1 に線の吸収線量と MDA 生成量との線量-効果関係を示す。

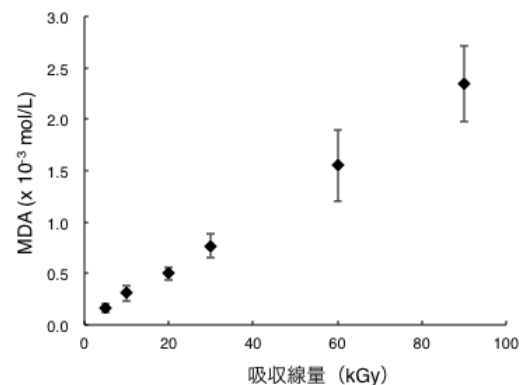


図 1. 線の吸収線量と MDA 生成量との線量-効果関係

これらの結果より、線照射によって 0–90 kGy の線量範囲において α -リノレン酸の酸化的分解の程度は線量依存的に増大することが明らかになった。

(2) 線照射による α -リノレン酸の過酸化

5.0×10^{-1} M α -リノレン酸ベンゼン溶液に対し 5–90 kGy の線を照射し、 α -リノレン酸の過酸化の程度を、照射試料の *n*-ヘキサン溶液の 230–236 nm の平均吸光度を測定することにより定量した共役ジエン生成量を指標に解析した。図 2 に線の吸収線量と共役ジエン生成量との線量-効果関係を示す。

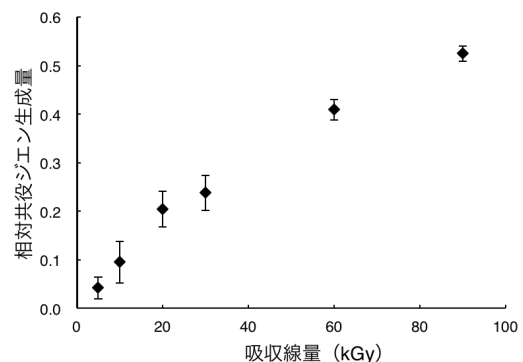


図 2. 線の吸収線量と共役ジエン生成量との線量-効果関係

これらの結果より、線照射によって0-90 kGyの線量範囲において-リノレン酸の過酸化の程度は線量依存的に増大することが明らかになった。

(3) 線照射による-リノレン酸の酸化的分解に対する-カロテンの影響

5.0×10^{-1} M α -リノレン酸ベンゼン溶液に最終濃度が 5.0×10^{-6} から 8.5×10^{-3} Mとなるように-カロテンを添加し、調製溶液に対し30 kGyの線を照射した。そして、照射試料中のMDA生成量をTBA比色法により定量することにより、線照射による α -リノレン酸の酸化的分解に対する-カロテンの影響を解析した。その結果、 8.5×10^{-3} M -カロテン添加試料におけるMDA生成量は、-カロテンを添加していないコントロール試料と比較して有意に減少した(図3)。一方、 5.0×10^{-5} 、 5.0×10^{-6} M -カロテン添加試料におけるMDA生成量はコントロール試料と比較して有意に増加した(図3)。

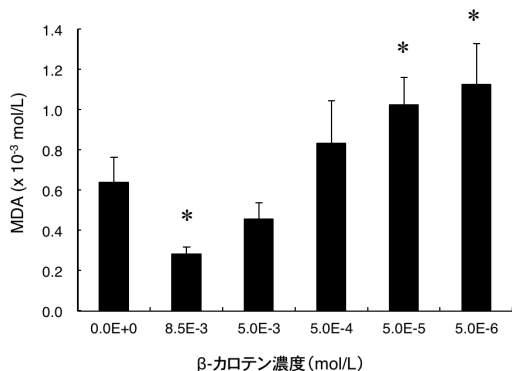


図3. 線照射による-リノレン酸の酸化的分解に対する-カロテンの影響 (* $P < 0.05$)

(4) 線照射による-リノレン酸の酸化的分解に対するアスタキサンチンの影響

5.0×10^{-1} M α -リノレン酸ベンゼン溶液に最終濃度が 5.0×10^{-8} から 5.0×10^{-4} Mとなるようにアスタキサンチンを添加し、調製溶液に対し30 kGyの線を照射した。そして、照射試料中のMDA生成量をTBA比色法により定量することにより、線照射による α -リノレン酸の酸化的分解に対するアスタキサンチンの影響を解析した。その結果、 5.0×10^{-4} M アスタキサンチン添加試料におけるMDA生成量は、アスタキサンチンを添加していないコントロール試料と比較して統計的には有意ではなかったが減少した(図4)。一方、 5.0×10^{-7} 、 5.0×10^{-8} M アスタキサンチン添加試料におけるMDA生成量はコントロール試料と比較して有意に増加した(図4)。

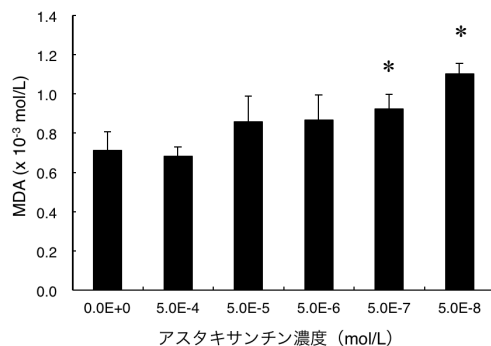


図4. 線照射による-リノレン酸の酸化的分解に対するアスタキサンチンの影響 (* $P < 0.05$)

(5) 線照射による-リノレン酸の過酸化に対する-カロテンの影響

5.0×10^{-1} M α -リノレン酸ベンゼン溶液に最終濃度が 5.0×10^{-8} から 5.0×10^{-4} Mとなるように-カロテンを添加し、調製溶液に対し30 kGyの線を照射した。その後、照射試料のn-ヘキサン溶液の230-236 nmの平均吸光度を測定し共役ジエン生成量を定量することにより、線照射による α -リノレン酸の過酸化に対する-カロテンの影響を解析した。その結果、-カロテンを添加していないコントロール試料と比較して、全ての濃度の-カロテン添加試料における共役ジエン生成量に有意な変化は認められなかった(図5)。

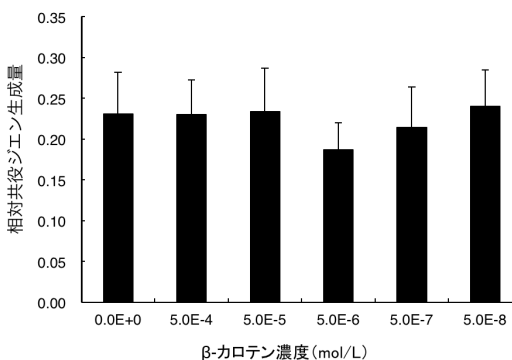


図5. 線照射による-リノレン酸の過酸化に対する-カロテンの影響

(6) 線照射による-リノレン酸の過酸化に対するアスタキサンチンの影響

5.0×10^{-1} M α -リノレン酸ベンゼン溶液に最終濃度が 5.0×10^{-8} から 5.0×10^{-4} Mとなるようにアスタキサンチンを添加し、調製溶液に対し30 kGyの線を照射した。その後、照射試料のn-ヘキサン溶液の230-236 nmの平均吸光度を測定し共役ジエン生成量を定量することにより、線照射による α -リノレン酸の過酸化に対するアスタキサンチンの影響を解析した。その結果、アスタキサンチンを添加していないコントロール試料と比較して、全ての濃度のアスタキサンチン添加試料における共役ジエン生成量に有意な変化は認められなかった(図6)。

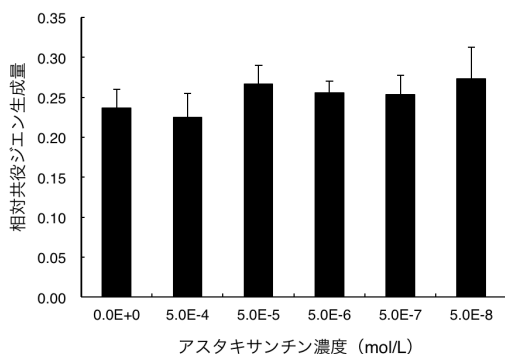


図 6. 線照射による L-リノレン酸の過酸化に対するアスタキサンチンの影響

(7) 総括

本研究により、生体脂質部位と同様の非極性分子環境下においてカロテノイドは、強い酸化ストレスによる定常的な脂質損傷過程において、脂質過酸化反応には影響を与えないが酸化的脂質分解反応には影響を与えることが明らかになった。また、カロテノイドは生体脂質に対する強い酸化的ストレスに対して条件によっては高い抗酸化活性を示すことが明らかになった。これらの結果は、カロテノイドの生体内における抗酸化活性、生体防御活性の分子機構の一端を明らかとし、高い抗酸化活性、生体防御活性を有するカロテノイドの科学的根拠に基づいた探索・開発に寄与するものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

T. Saito and N. Fujii (2014) Effects of carotenoids on damage of biological lipids induced by gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* **98**, 57–63. 査読有

DOI:

[doi:10.1016/j.radphyschem.2014.01.009](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2014.01.009)

T. Saito and N. Fujii (2014) Damage to Biological Molecules Induced by Ionizing Radiation and Biological Defense Mechanisms Provided by Radical Scavengers III. KUR Progress Report 2013, 111. 査読有

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/PUB/report/PR/ProgRep2013/Project3.pdf>

T. Saito and N. Fujii (2013) Damage to Biological Molecules Induced by Ionizing Radiation and Biological Defense Mechanisms Provided by Radical Scavengers II. KUR Progress Report 2012, 140. 査読有

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/PUB/report/PR/ProgRep2012/Project5.pdf>

T. Saito and N. Fujii (2012) Damage to Biological Molecules Induced by Ionizing Radiation and Biological Defense Mechanisms Provided by Radical Scavengers.

KUR Progress Report 2011, 186. 査読有
<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/PUB/report/PR/ProgRep2011/Project11.pdf>

〔学会発表〕(計8件)

金 仁求、齊藤 毅、藤井智彦、金本尚志、藤井紀子 (2015) ラット水晶体タンパク質に対する線照射の影響。生命の起原および進化学会第40回学術講演会, 2015年3月16日, 東京理科大学(東京都葛飾区)

金 仁求、高田 匠、齊藤 毅、藤井智彦、藤井紀子 (2014) 放射線照射による L-クリスタリン中のアミノ酸残基の酸化, 第87回日本生化学会, 2014年10月16日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

I. Kim, T. Saito, and N. Fujii (2014) Oxidation and racemization of rat lens crystallins by gamma irradiation, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, September 2, 2014, Utsunomiya, Japan (Tochigi Prefectural Culture Center)

金 仁求、高田 匠、齊藤 毅、藤井智彦、金本尚志、藤井紀子, 線照射による L-クリスタリン中のアミノ酸残基の酸化, 生命の起原および進化学会 第39回学術講演会, 2014年3月13日, 広島修道大学(広島県広島市)

齊藤 毅、藤井紀子, 放射線照射による生体脂質損傷に対するカロテノイドの影響, 生命の起原および進化学会 第38回学術講演会, 2013年3月14日, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市)

小田康祐、窪野佑輔、齊藤 毅、野田正文、的場康幸、熊谷孝則、杉山政則, カロテノイド生産性植物乳酸菌の放射線及び過酸化水素に対する耐性, 日本乳酸菌学会2012年度大会, 2012年7月12日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

齊藤 毅, 放射線耐性細菌におけるカロテノイド色素による放射線防護機構, 京都大学原子炉実験所 第46回学術講演会, 2012年2月2日, 京都大学原子炉実験所(大阪府熊取町)

齊藤 毅、藤井紀子, ガンマ線照射による脂質分解反応および過酸化反応に対するカロテノイド色素の影響, 第54回日本放射線影響学会, 2011年11月19日, 神戸商工会議所(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計1件)

齊藤 毅(2014)環境と微生物の事典. 日本微生物生態学会編 朝倉書店(分担項目113「放射線と微生物」) p207

〔その他〕

ホームページ等

<http://hlweb.rri.kyoto-u.ac.jp/fl/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 毅 (SAITO, Takeshi)

京都大学・原子炉実験所・助教

研究者番号：10274143