

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：43601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700893
 研究課題名(和文) イソチオシアナート由来チオヒダントインの抗酸化活性および生体内変化に関する研究
 研究課題名(英文) Antioxidative activity and biotransformation of thiohyantoin derived from isothiocyanates and amino acids
 研究代表者
 高橋 朝歌 (TAKAHASHI ASAKA)
 長野県短期大学・生活科学科・助手
 研究者番号：90290113

研究成果の概要(和文)：本研究は、食品成分であるチオヒダントインの抗酸化性ならびに調理加工への応用、生体内での動態解析をふまえたチオヒダントインの安定性を解明することを目的とした。測定原理の異なる3つの系で抗酸化試験を行った結果、チオヒダントインは抗酸化活性を有することが明らかになり、アミノ酸の側鎖構造に由来する部分構造により抗酸化性のメカニズムが異なることが示唆された。また、チオヒダントインは、酸性から弱アルカリ性で安定であり、高温、金属イオンの共存下でも比較的安定であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the food functions of 3,5-disubstituted 2-thiohydantoin, which were prepared by the reaction of allyl isothiocyanate(AITC), 3-butenyl isothiocyanate(3BITC), and 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(MTBITC) with various amino acids, their antioxidative activity was examined. The antioxidative activities of thiohydantoin were evaluated on the basis of several lipid peroxidation model systems and ABTS scavenging property. It appears that the antioxidative activity of the thiohydantoin examined depends on the substituents at position 5 rather than at position 3. Further, thiohydantoin were more stable in the acidic and weakly alkaline pH, it is relatively stable at the high temperature or the coexistence of metal ions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学（食生活学）

キーワード：チオヒダントイン，抗酸化活性，安定性

1. 研究開始当初の背景

日本国内での生産量・消費量の面から主要な野菜であるアブラナ科野菜（ダイコン，キャベツ，ワサビなど）に特有の成分であるグルコシノレートは，細胞が破壊されると酵素ミロシナーゼの作用によってイソチオシアナートと呼ばれる辛味成分に変換される。イソチオシアナートは，近年抗菌性や発がん抑制効果などの様々な生理機能を持つことが明らかになり，従来のフレーバー物質としての利用に加え，機能性成分としての利用が注目されている。

一方，イソチオシアナートは分子内に

-NCS 基を持つことから，化学的にきわめて反応性が高く，水やアルコール，アミン，SH化合物などと容易に反応して付加化合物を形成する物質であることも知られている。このことから，多様の成分が共存する食品を実際に調理・加工する際にはイソチオシアナートが様々な反応を起こしていることが推測される。申請者は，人が実際にイソチオシアナートを摂取する段階を考えたときには，イソチオシアナート自身の機能性だけでなく，他の食品成分との相互反応を含めてその生理活性を明らかにすることが重要であると考え，イソチオシアナートの食品成分との反

応性に着目した研究を行ってきた。そして、ダイコンイソチオシアナートの水存在下における分解反応生成物の構造と反応機構の解析を行い、イソチオシアナートだけでなくその分解生成物にも抗菌性や抗変異原性があることを見出した。

この検討を踏まえ、現在はイソチオシアナートの検討を踏まえ、現在はイソチオシアナートとアミノ酸との反応性に焦点をあてて、反応生成物であるチオヒダントインの構造解析と様々な生理活性の検討を行っている。これまでの研究で、イソチオシアナートはアミノ酸の共存下において弱酸性からアルカリ領域でチオヒダントインに変換されること、アリルイソチオシアナートが香料として添加されている加工食品中にチオヒダントインが生成すること、チオヒダントインは、抗変異原性を有し、その作用機構は変異原の代謝活性化の抑制、究極変異原の不活化の2つによるものであること、抗変異原性の強さや作用機構は、アミノ酸の側鎖に由来する部分の構造により異なることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

以上のような背景をもとに、申請者は、食品成分であるチオヒダントインの生理活性、特にこれまで検討されてこなかった抗酸化性に焦点を当てて化学構造と活性との関連および抗酸化機構について明らかにするとともに、チオヒダントインの生体内における変化を解明することを目的とし、本研究を計画した。本研究では、これまでに得た知見をもとに、これまで検討されていなかったチオヒダントインの抗酸化性を化学構造の面から明らかにすることに加え、抗酸化機構の解明、さらに体内動態に関する検討を行う。これらの知見は、チオヒダントインの食品成分としての有用性を明らかにするうえで重要であるだけでなく、生体機能性成分であるイソチオシアナートの食品中あるいは生体内における動態解析にとっても意義あるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)チオヒダントインの調製

食品に含まれるイソチオシアナートとして、アリルイソチオシアナート(AITC)、ダイコンの主辛味成分である4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアナート(MTBITC)、ノザワナやカブに多く含まれる3-ブテニルイソチオシアナート(3BITC)を用い、既報に従ってアミノ酸と反応させチオヒダントインを調製した。得られたチオヒダントインは、HPLC-MS、IR、NMR分析などの機器分析を行い、構造を確認した。

(2)各種pH条件下におけるチオヒダントイ

ンの安定性

この試験では、ATH-a.a 19種、3BTH-a.a 13種を用いた。DMSOに溶解したチオヒダントイン(2 mg/mL) 50 μ L と pH 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 に調整した緩衝液 (pH1:KCl-HCl バッファー, pH3~8:MacIlvaine バッファー, pH9~11:ホウ酸バッファー) 4950 μ L を混合し、4 $^{\circ}$ Cで静置し、経時的に一部を取ってマイクロプレートリーダー(日立SH-1200Lab)で270 nmの吸光度を分析して残存量を求めた。(3)各種温度条件下におけるチオヒダントインの安定性

この試験では、ATH-a.a 19種、3BTH-a.a 13種を用いた。DMSOに溶解したチオヒダントイン(2 mg/mL) 50 μ L と pH 5 に調整したMacIlvaine バッファー4950 μ L を混合し、25, 36, 50, 75, 100 $^{\circ}$ Cで静置し、経時的に一部を取ってマイクロプレートリーダーで270 nmの吸光度を分析して残存量を求めた。(4)紫外線照射に対するチオヒダントインの安定性

この試験では、ATH-a.a 19種、3BTH-a.a 13種を用いた。DMSOに溶解したチオヒダントイン(25 μ mol/mL) 10 μ L と pH 5 に調整したMacIlvaine バッファー990 μ L を混合し、96穴マイクロプレートに分注し、殺菌灯(15W)下40 cmのところのところに置いた。経時的にマイクロプレートリーダーで270 nmの吸光度を分析して残存量を求めた。

(5)金属イオン共存下におけるチオヒダントインの安定性

この試験では、ATH-a.a 19種を用いた。DMSOに溶解したチオヒダントイン(25 μ mol/mL) 50 μ L と各種金属イオン水溶液(ZnCl₂, KCl, CaCl₂, MgCl₂, AlCl₃:最終濃度3 mM, NaCl:最終濃度300 mM) 4950 μ L を混合し、バイアルに分注して25 $^{\circ}$ Cの暗所で静置した。経時的にマイクロプレートリーダーで270 nmの吸光度を分析して残存量を求めた。(6)ABTSラジカル消去活性試験

この試験では、ATH-a.a 19種、3BTH-a.a 13種、MTBTH-a.a 11種を用いた。7 mM ABTS と 140 mM ペルオキシ2硫酸カリウムの混合液から調製したABTS溶液200 μ L と、DMSOに溶解したチオヒダントイン2 μ L(最終濃度250 μ Mから2倍希釈で8段階)を混合し、90秒反応させた後直ちにマイクロプレートリーダーにて734 nmの吸光度を測定した。(7) β カロテン退色法による抗酸化性の測定

β -カロテン溶液(1mg/mLクロロホルム)、リノール酸溶液(0.9g/5mLクロロホルム)、Tween 40溶液(1g/5mLクロロホルム)を作成した。それぞれ0.25mL, 0.1mL, 0.25mLをフラスコに採取してクロロホルムを留去後、50 $^{\circ}$ Cの蒸留水22.5 mLと50 $^{\circ}$ Cの0.2Mのリン酸緩衝液(pH6.8) 2.5 mLを添加して、リノール酸・ β -カロテン溶液を調製した。チオヒ

ダントインはストック溶液を 80%エタノールで段階的に希釈し、96 穴マイクロプレートに 8 μ L ずつ分注した。ここに先に調製したリノール酸・ β -カロテン溶液 200 μ L を加え攪拌後、50°C のアルミブロックヒーター上で保温し、10 分ごとに 470nm の吸光度を測定した。試料溶液のかわりに蒸留水を加えた場合をコントロールとして、抗酸化活性を以下のとおり算出した。

抗酸化活性

$$=[(As(60)-Ac(60))/(Ac(0)-Ac(60))]\times 100$$

As(60):60 分後における試料溶液の吸光度

Ac(0), Ac(60):開始時又は 60 分後におけるコントロールの吸光度

(8)ウサギ赤血球膜ゴーストを用いた抗酸化試験

①赤血球膜ゴーストの作製

ウサギ保存血液 100ml に、10mM リン酸 (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) / 152 mM NaCl (pH7.4) 緩衝液 (等張液) を 100ml 加え、1,500 \times g で 30 分間遠心分離する。上清を除き、沈殿を等張液で三回洗浄した。得られた沈殿に 10mM リン酸バッファー (pH7.4) 緩衝液 (低張液) 100ml 加え、4°C で 30 分間放置した後、20,000 \times g で遠心分離し、上清を除いて沈殿を低張液で洗浄することを繰り返し、赤血球膜ゴースト懸濁液を得た。

②たんぱく質量法

①で得られた赤血球膜ゴーストのたんぱく質量は、市販たんぱく定量キット (Dojindo proteostain) を用いて、Bradford 法による定量を行った。

③脂質過酸化試験

小試験管で、たんぱく質量を 0.5mg/mL に調製した赤血球膜ゴースト液 450 μ L, DMSO に溶解したチオヒダントイン溶液 25 μ L を混合し、24 mM t-ブチルヒドロペルオキシド 25 μ L を加えて 37°C で 20 分反応させた。20%トリクロロ酢酸 500 μ L と 0.67%チオバルビツール酸 1 mL を加えて反応停止させ、100°C で 10 分加熱した後、2,590 \times g で遠沈し、上清の吸光度 (535 nm) を測定した。

4. 研究成果

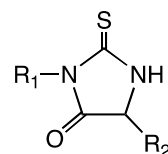
(1)チオヒダントインの調製

AITC, 3BITC, MTBITC と各種アミノ酸から調製したチオヒダントイン (ATH, 3BTH, MTBTH, 構造を下に示した) は機器分析で構造を確認した。チオヒダントインの基本骨格は図 1 の通りである。

以下のチオヒダントインをそれぞれの試験に用いた。

ATH (19 種) : Asp, Glu, Asn, Gln, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met, Tyr, Trp, His, Arg, Lys, Thr, Ser, Pro

3BTH (13 種) : Asp, Glu, Asn, Gln, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr, Trp



MTBTH (11 種) : Asp, Glu, Gly, Ala, Ile, Tyr, Met, Val, Leu, Phe, Trp

図 1 チオヒダントインの構造

R₁ : イソチオシアナートの側鎖構造 (ATH は CH₂=CHCH₂-, 3BTH は CH₂=CHCH₂CH₂-, MTBTH は CH₃SCH=CHCH₂CH₂-)

R₂ : アミノ酸の側鎖構造 (Gly なら -H, Ala なら -CH₃ など)

(2) 各種 pH 条件下におけるチオヒダントインの安定性

DMSO に溶解したチオヒダントインの各種 pH の緩衝液中における安定性を検討した。ATH 19 種, 3BTH 13 種を用いて、4°C で静置して経時的に 270 nm の吸光度を測定し、0 時間を 100% として残存率を求めた。

ATH, 3BTH とともに、酸性~中性領域 (pH1~7) では極めて安定であり、168 時間経過後も 90% 以上が残存していた。pH8 においては、3BTH は 120 時間後も 90% 以上が残存していたが、ATH-Tyr, Glu, Leu, Gln, Pro, Arg, Thr, Ser においては経時的に分解し、120 時間後の残存率は 25~60% であった。ATH-Thr, Ser については、酸性~中性領域にでも分解が進み、いずれの pH においても 120 時間後の残存率は 60% 以下であった。

3BTH-Phe, 3BTH-Trp はいずれの pH でも 24 時間後の残存率が 50~80% に低下し、144 時間後には残存率が 30% 程度になり、経時的に分解することが示された。そのほかの 3BTH は、酸性~弱アルカリ領域 (pH1~8) において極めて安定であった。pH10, 11 のアルカリ領域においては、ATH, 3BTH とともに反応開始直後に 50~60% 程度まで残存率が低下し、24 時間後にはほとんど残存していなかった。図 2 には、ATH-Ala の結果を示した。

比較のできる Tyr, Glu, Leu, Gln 由来のチオヒダントインについて見てみると、中性~弱アルカリ性での安定性は 3BTH > ATH で、R₁ の疎水性の高いほうがより安定であることが示唆された。また、アミノ酸の側鎖構造に由来する R₂ により残存率に違いが見られるものの、チオヒダントインは酸性~中性領域においては安定していることが明らかになった。

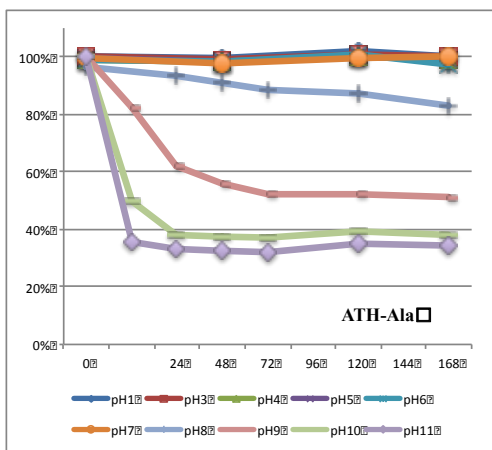


図2 各種 pH 条件下における ATH-Ala の残存率変化

(2) 各種温度条件下におけるチオヒダントインの安定性

(1)の結果より、いずれのチオヒダントインも安定であった pH5 の緩衝液を用いて DMSO に溶解したチオヒダントインを 25, 36, 50, 75, 100°C で静置した。ATH-a.a 19 種, 3BTH-a.a 13 種を用い、0 時間を 100% として残存率を求めた結果、25, 36°C では、ATH-Lys, Ser, Thr を除く ATH はきわめて安定で、168 時間後も残存率にほとんど変化がなかった。高温になるに従っていずれの ATH も残存率の低下が早まったが、100°C、24 時間後でも 30~80% が残存しており、高温条件下でも安定であることが明らかになった。ATH-Lys, Ser, Thr は、25°C 以上の温度で速やかに分解し、高温になるほど不安定であることが示された。図 3 には、ATH-Ala の結果を示した。

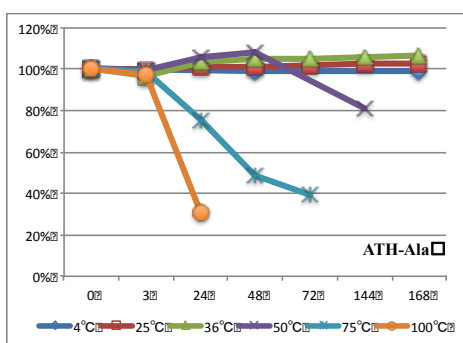


図3 各種温度条件下における ATH-Ala の残存率変化

3BTH についても ATH と同様に、25, 36°C ではきわめて安定で、168 時間後も残存率にほとんど変化がなかった一方、50, 75, 100°C と高温になるに従って残存率の低下が早まった。高温条件下 (50, 75, 100°C) での安定性は、Asp, Glu, Gly, Asn, Gln, Ala, Leu, Tyr, Met, Trp で 3BTH > ATH となり、イソチオン

アナートに由来する R₁ の疎水性の高いほうがより安定であることが示唆された。一方で、Val や Ile は 3BTH < ATH となる温度もあり、この点については、さらなる検討が必要であると考えられた。

(3) 紫外線照射に対するチオヒダントインの安定性

pH5 の緩衝液と混合したチオヒダントイン溶液を殺菌灯 (15W) 下 40 cm のところに静置し、経時的に 270 nm の吸光度を測定し、0 時間を 100% として残存率を求めた。反応は室温下で行った。ATH-a.a 19 種, 3BTH-a.a 13 種を用いた結果、ATH と 3BTH に同様の傾向が見られた。すなわち、チオヒダントインは紫外線照射において速やかに分解し、照射 1 時間後の残存率は 30~60%、3 時間後にはほぼすべて分解した。Tyr と Trp に由来するチオヒダントインはほかのチオヒダントインに比べて紫外線に対して安定で、Trp 由来のチオヒダントインは照射 3 時間後の残存率が 70~80%、Tyr 由来のチオヒダントインは照射 3 時間後の残存率が 30~40% であった。これらの結果から、紫外線照射に対する影響は、イソチオンアナートの側鎖構造に由来する R₁ よりもアミノ酸の側鎖構造に由来する R₂ の影響が大きいことが示唆された。

(5) 金属イオン共存下におけるチオヒダントインの安定性

ATH-a.a 19 種を用いて、各種金属イオン (Zn²⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺) に対する影響を検討した。金属イオンの最終濃度は 3 mM (Na⁺のみ 300 mM) とし、反応は 25°C の暗所で行った。金属イオンを含まない蒸留水中では、(2) で述べたように Lys, Ser, Thr を除くチオヒダントインはきわめて安定で、168 時間後も残存率にほとんど変化はなかった。ATH-Asp, Glu, Gly, Asn, Gln, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr は、6 種の金属イオンの共存下において 168 時間反応後も残存率に変化は見られず、金属イオンの影響はないことが示された。ATH-Trp (図 4) は、Zn²⁺, K⁺, Mg²⁺ が共存していても残存率に変化は見られなかったが、Ca²⁺, Al³⁺ の共存下において、168 時間後の残存率が 80% 程度になった。食品中あるいは生体内を想定して最終濃度を 300 mM とした Na⁺ 共存下においては、168 時間後の残存率が 55% となり、金属イオンの種類によって分解が促進されることが示された。ATH-Ser (図 5) は、Zn²⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 共存の影響はほとんど見られず、これらの金属イオンが共存しないときと同様に経時的に分解したが、Al³⁺ の共存下 144 時間後の残存率は 46% で、蒸留水中で反応させたとき (17%) よりも残存率の低下を抑制した。これと同様に、ATH-Thr は Al³⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 共存下で、ATH-Lys は Zn²⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ 共存下でそれぞれ残存率の低下が抑制され、一部のチ

オヒダントインは金属イオンの共存により分解が抑制されることが示された。

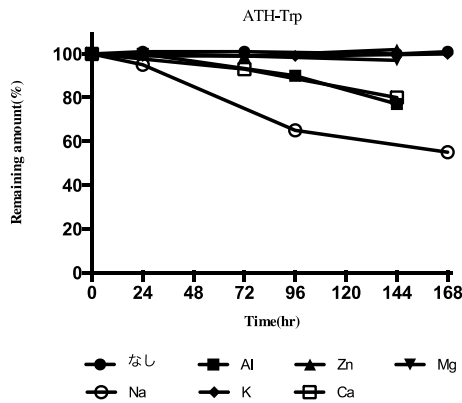


図4 金属イオン共存下におけるATH-Trpの残存率変化

(6) ABTS ラジカル消去活性試験

ATH-a.a 19種, 3BTH-a.a 13種, MTBTH-a.a 11種を用いて, ABTS ラジカル消去活性試験を行った(表1)。Gly, Glu, Tyr, Trp, Ser, Hisから調製したチオヒダントインに強いラジカル消去活性が認められた(IC_{50} : 8~42 μ M)。特に, Tyr に由来するチオヒダントインはTrolox に匹敵するラジカル消去活性を示した。Gly, Glu はイソチオシアナートに由来する R_1 が変わっても活性の強さに変化はなかったが, Tyr, Trp, Phe, Ile, Leu, Val の活性の強さは $ATH > 3BTH > MTBTH$ となり, R_1 の疎水性により抗酸化性が異なることが示唆された。

(7) β カロテン退色法による抗酸化性の測定

リノール酸過酸化物による β カロテンの退色を利用した方法で, ATH-a.a 19種の抗酸化能を測定した。図8では, グラフが長いほど抗酸化性が高いことを示す。ように, ATH-Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Lys, Thr にリノール酸過酸化物に対する抗酸化活性が認められた。特に Phe, Ile に強い活性が見られた。Ser, His, Arg 由来の ATH には活性がほとんど見られなかった。

(8) ウサギ赤血球膜ゴーストを用いた抗酸化試験

生体膜モデルとして, ウサギ赤血球膜ゴーストを用いてATH19種の抗酸化試験を行った。図9は, コントロール(蒸留水)の過酸化度を100%としたチオヒダントインの抗酸化性を示したものであり, グラフが短いほど抗酸化性が高いことを示す。ATH-Asn, Gln, Leu, Tyr に濃度依存的な過酸化抑制作用が認められた。特にATH-Tyrは, α トコフェロールに匹敵する抗酸化活性を示した。一方, ATH-Pro, Glu は逆に酸化を促進する結果となった。図にないこのほかのATH 13種については, 脂質過酸化を抑制する作用は認められ

なかった。

表1 チオヒダントインのABTS ラジカル消去活性 (IC_{50} , μ M)

	ATH	3BTH	MTBTH
Asp	>250	>250	88.52
Glu	36.48	35.35	42.72
Asn	67.85	73.07	-
Gln	100.3	125.3	-
Gly	37.83	37.5	37.99
Ala	166.3	>250	87.02
Val	>250	>250	69.69
Leu	115.6	104.7	38.66
Ile	>250	>250	147.6
Phe	207.4	107	75.85
Trp	45.02	27.35	23.31
Tyr	13.75	13.51	8.031
Pro	>250	-	-
Met	80.31	103	69.55
Thr	211.7	-	-
Ser	44.31	-	-
His	43.17	-	-
Arg	91.73	-	-
Lys	>250	-	-
Trolox		10.82	

- : 試験せず

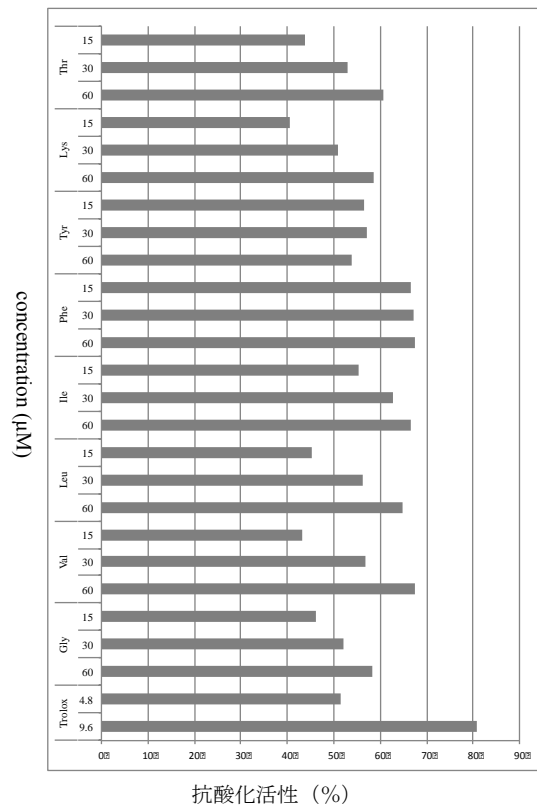


図5 β カロテン退色法によるチオヒダントインの抗酸化性

以上, 本研究では食品成分に由来するチオヒダントインの安定性ならびに抗酸化活性について検討した。チオヒダントインは, 紫外線に対する安定性は低いものの, 酸性から弱アルカリ性の広い pH 条件において安定で

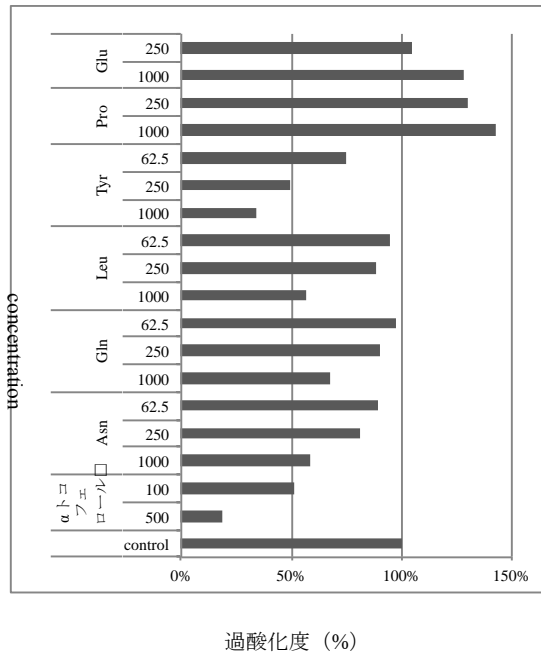


図 6 ウサギ赤血球膜ゴーストを用いた抗酸化試験

あること、36°Cまでの温和な温度だけでなく高温条件に対しても比較的安定であること、金属イオンの共存下においても安定であることが示された。また、pH や温度に対する安定性は3BTH>ATHとなり、イソチオシアナートに由来する R₁ の疎水性の高いほうがより安定であることが示唆された。

チオヒダントインの抗酸化性試験では、測定原理の異なる3つの系（ABTS ラジカル消去活性、βカロテン退色法による脂質過酸化抑制試験、ウサギ赤血球膜ゴースト）を用いて試験を行った。それぞれの系で強弱は見られるものの、チオヒダントインは抗酸化活性を有することが明らかになり、各試験で抗酸化性を示すチオヒダントインの種類は異なっていた。ATH-GluはABTSラジカル消去活性を有する一方、赤血球膜の脂質過酸化は逆に促進するチオヒダントインがある一方で、ATH-Tyrのように今回行った系すべてで抗酸化性を有するチオヒダントインもあり、抗酸化のメカニズムはアミノ酸の側鎖構造に由来するR₂により異なることが示唆された。今後イソチオシアナートに由来するR₁の違いによる抗酸化性の比較、更なるメカニズムの解明が課題であるが、これまでに得られていた知見に加え、本研究で明らかになった各種条件下での安定性、抗酸化性に関する知見は、チオヒダントインの食品成分としての有用性を示すとともに、生体機能性成分であるイソチオシアナートの食品中あるいは生体内における動態解析にとっても意義あるもの

と考えられる。また、チオヒダントインが酸性領域で安定であることは、食品の調理や加工への応用を考える上で重要な知見であると考えられる。

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1件)

松岡寛樹, 須永晃多, 宮下さとみ, 砂原由佳里, 深沢聡美, 下田未歩, 木村紀久, 高橋仁恵, 高橋朝歌, 平田大介; 塩蔵ダイコンの抗変異原性物質の同定と定量解析, 日本食品科学工学会誌, 60, pp117-124(2013)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

高橋朝歌 (TAKAHASHI ASAKA)
長野県短期大学・生活科学科・助手
研究者番号: 90290113

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

松岡寛樹 (MATSUOKA HIROKI)
高崎健康福祉大・教授
研究者番号: 20299837