

論文の内容の要旨

論文題目 新しいビタミンEの発見とその機能に関する研究

氏名 藤沢 章雄

生体内でビタミンEなどの抗酸化物質や各種抗酸化酵素は、生体膜やリポ蛋白質の酸化防御に重要な役割を果たしている。酸素濃度の低い生体中に比べ、大気下で生存しなければならない魚類などの卵は、さらに可視光や紫外線の影響でより強い酸化ストレスに曝されていると考えられる。そのような酸化的環境下で孵化するまでの長期間生存するために、魚卵はより優れた抗酸化システムを有している可能性が高い。

このような認識のもとに魚卵を2-プロパノールでその脂溶性成分を抽出し、電気化学検出器付き逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて新規抗酸化剤を検索した。その結果、サケなどの北洋魚の卵からビタミンE類の中で最も抗酸化活性の高い α -トコフェロール (Fig. 1) のイソプレノイド側鎖の末端に二重結合が導入された新しいビタミンE誘導体、Marine-derived tocopherol (MDT, Fig. 1)を見出した。

様々な魚の卵や体組織中のビタミンEレベルを測定した結果 (Table 1.) , MDTはサケ, マス, スケトウダラ, チョウザメといった寒冷海洋域の魚類で高いMDT含有率 (%MDT) を示し, トビウオなどでは低かった。またグレートバリアリーフで捕獲されたCoral trout, Mangrove jack, Red-throat sweetlip, そしてBlue-tailed cod などの亜熱帯海系魚類ではMDTはほとんど検出されなかった。しかし南極海に生息する魚類では高い値を示し (Table 2.) , MDTは地球規模で寒冷水域の魚類に局在していることが示された。

またMDTを含まない市販の餌で飼育された養殖のサクラマスと天然サクラマスの体組織中のMDT含有率を比較したところ (Table 3.) , 天然サクラマスに比べ養殖サクラマスは非常に小さい値を示した。また天然サクラマスなどの生息する海域の植物および動物プランクトン (Table 3.) では高いMDT含有率を示したことから、天然の魚類は食物連鎖の過程でMDTを体内に取り込んでいると考えられる。

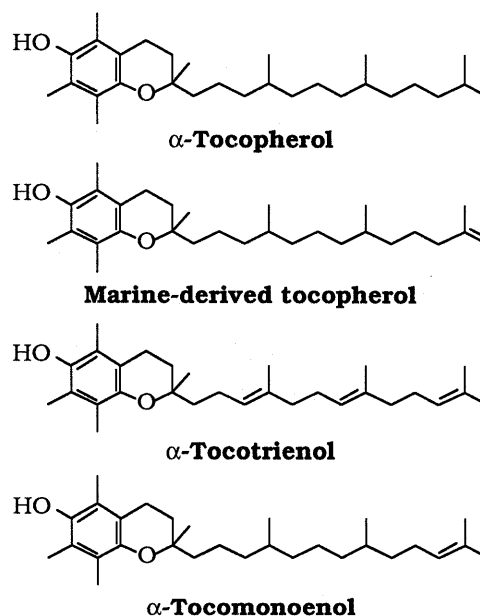


Fig. 1 Chemical structures of the α -forms vitamin E

	α -Toc ^a	MDT ^a	%MDT ^b	γ -Toc ^a
Chum Salmon				
muscle (n=4)	6.7	1.7	20.2	0.1
eggs (n=1)	144	35.8	19.9	1.4
gonad (n=2)	91.7	20.6	18.3	0.0
spleen (n=3)	26.7	3.3	11.0	0.0
liver (n=1)	402	33.3	7.6	0.0
Eggs (n=1)				
Sturgeon	14.1	4.6	24.7	0.2
Sockeye salmon	227	37.7	14.2	4.0
Walleye pollack	40.6	6.2	13.2	0.1
Pacific herring	2.5	0.2	7.4	0.0
Pacific cod	41.0	3.1	7.0	0.1
Flyingfish	3.3	0.2	5.0	0.1
Muscle tissue (n=1)				
Coral trout	5.02	0.13	2.5	0.00
Mangrove jack	3.45	0.04	1.0	0.00
Red-throat sweetlip	3.01	0.01	0.5	0.03
Blue-tailed cod	4.30	0.01	0.3	0.00

	α -Toc ^a	MDT ^a	%MDT ^b	γ -Toc ^a
Chaenocephalus aceratus (n=3)				
Liver (n=1)	29.7	4.7	14.1	0.00
Eggs	42.4	10.3	19.5	0.00
Pectoral	24.4	2.7	10.8	0.00
Spleen	73.5	9.2	11.6	0.00
White muscle	10.0	1.4	11.9	0.00
Champscephalus gunnari (n=6)				
Liver	77.3	21.7	22.3	0.00
Eggs	68.6	13.7	16.2	0.00
Pectoral	43.7	8.1	15.6	0.00
Spleen	109.1	19.6	15.3	0.00
White muscle	17.6	3.7	17.3	0.00
Notothenia (=Gobonotothen) gibberifrons (n=3)				
Liver	385.4	31.3	7.7	0.00
Eggs	78.6	4.8	5.6	0.00
Pectoral	41.3	2.5	5.7	0.00
Spleen (n=1)	120.4	5.4	4.7	0.00
White muscle	14.4	0.9	5.8	0.00

^a nmol/g wet tissue. ^b %MDT = 100 x MDT/(MDT + α -Toc). ^a nmol/g wet tissue. ^b %MDT = 100 x MDT/(MDT + α -Toc).

	α -Toc ^a	MDT ^a	%MDT ^b	γ -Toc ^a
Cultured masu salmon				
muscle (n=4)	60.4	0.3	0.4	1.5
eggs (n=3)	280	0.9	0.3	4.5
gonad (n=2)	508	0.5	0.1	1.7
spleen (n=3)	240	0.5	0.2	2.5
liver (n=1)	1040	1.2	0.1	13.5
Native masu salmon				
muscle (n=4)	39.3	5.2	12.3	0.0
eggs (n=3)	352	35.1	9.1	0.0
gonad (n=2)	207	16.5	7.5	0.0
spleen (n=3)	349	31.1	8.0	0.0
liver (n=1)	555	38.3	6.4	0.0
Phytoplankton	0.64	0.17	21.0	0.0
Zooplankton	4.60	0.54	10.5	0.0
Commercial feed for masu salmon	16.2	Trace	<0.1	14.9

^a nmol/g wet tissue. ^b %MDT = 100 x MDT/(MDT + α -Toc).

α -トコフェロールはラジカル捕捉型の優れた脂溶性抗酸化剤であり、生体にとって必要不可欠な化合物である。MDTは α -トコフェロールと全く同じクロマン環構造を持つので、ラジカルに対する水素供与能は全く同じであると考えられる。そこで37℃、大気下で大豆ホスファチジルコリンのリポソーム溶液をアゾ化合物2,2-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)でラジカル的に酸化し、MDTもしくは α -トコフェロールによる酸化抑制効果を検討したところ、MDTは α -トコフェロールと同様に大豆ホスファチジルコリンの酸化を抑制した (Fig. 2a)。次にメタノール均一溶液中で両者を共存させ、その減少速度を比較したが両者は全く同じ速度で減少した (Fig. 2b)。したがってこれら

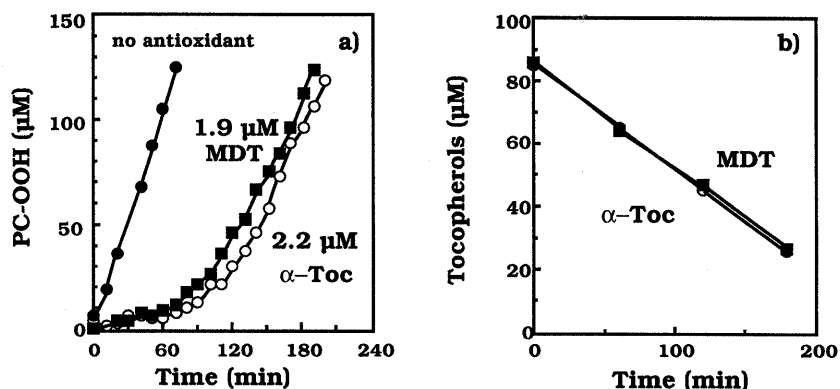


Fig. 2 Inhibition of PC liposome oxidation by 1.9μM MDT or 2.2μM α -tocopherol (a), and consumption of both tocopherols in methanol (b), induced by 1.0mM AMVN at 37℃

の条件では両者は全く同じ抗酸化活性を示し、それは両者の水素供与能を直接反映していることが示唆された。

一方、寒冷水域での魚類の生息条件を考慮し、氷浴上で増感剤にベンゾフェノンを用いた光酸化系でMDTの抗酸化活性を検討した。まずコレステロールを50%含有する大豆ホスファチジルコリンのリポソーム溶液中でホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの生成速度を比較したが、MDTが α -トコフェロールよりもヒドロペルオキシド生成速度を有意に抑制することが確認できた (Fig. 3)。

次にMDTと α -トコフェロールを様々な溶液中で共存させ、両者が競争的にラジカルと反応する減少速度の比から反応速度定数の比 (k'/k) を算出した (Scheme 1.)。すると大豆ホスファチジルコリンのメタノール均一溶液中ではMDTと α -トコフェロールの減少速度は同一であり、 $k'/k=1.00$ であったのに対し、魚油中ではMDTが α -トコフェロールよりも速やかに減少し、 $k'/k=1.39$ となった。さらに大豆ホスファチジルコリンのリポソーム溶液中では両者の減少速度は同一 ($k'/k=1.00$) であったのに対し、コレステロールを50%添加し膜の流動性を下げた大豆ホスファチジルコリンのリポソーム溶液では、 $k'/k=1.07$ となった。

MDTと α -トコフェロールは水素供与能を決定するクロマン環構造が全く同じであるため、ペルオキシラジカルに対する水素供与能は全く同一であると考えられる。そこでこれらと全く同じクロマン環構造を持ち、イソプレノイド側鎖に二重結合が3つ導入された α -トコトリエノール (Fig. 1) を、MDTの場合と同様にリポソーム膜中で α -トコフェロールと共存させて酸化し、その減少速度から抗酸化活性を比較したところ、コレステロールを50%含有するリポソーム溶液中で α -トコフェロールよりも1.17倍速い反応速度定数比 ($k'/k=1.17$) を持つことが分かった。

低温では魚油やコレステロール含有リポソームは系の流動性が低くなると考えられ、そのような反応環境ではイソプレノイド鎖に二重結合を導入されたMDTの方が機動性が優れ、ラジカルとの相互作用がしやすいものと考えられる。これは、流動性の高いメタノール均一溶液やコレステロールを含有しないリポソームでMDTと α -トコフェロールの抗酸化活性に差がないこと ($k'/k=1.00$)、また二重結合をさらに導入した α -トコトリエノールでは α -トコフェロールに対する抗酸化活性比がMDTのそれよりも大きいことから強く示唆される。

一方、魚油およびコレステロール含有リポソーム溶液中では、MDTと α -トコフェロールの競争反応から求められた k'/k の値は、それらビタミンEの酸化速度に依存し、これが低いほど大きい値となった (Fig. 4)。この現象は、反応が完全に反応分子の拡散律速となり反応速度定数比が分子の拡散分布確率の比となる分子拡散モデルを考えることにより説明された。このモデルではビタミンEはラジカルと反応するために距離 d を拡散しながら移動し、その距離はラジカル濃度 C_r の逆数の1/3次に比例する (Eq. 1)。このときビタミンEの拡散係数を D とすると、時間 τ の間に距離 d を拡散する確率 P は以下の式 (Eq. 2) で表される。

$$d \propto C_r^{-1/3} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$P = 1 - \text{Erfc}(d/\sqrt{4D\tau}) \quad (\text{Eq. 2})$$

したがってMDTの拡散係数 D' と α -トコフェロールの拡散係数 D を用いて拡散分布確率の比を求めると以下のようになる (Eq. 3)。

$$k'/k = \frac{1 - \text{Erfc}(d/\sqrt{4D'\tau})}{1 - \text{Erfc}(d/\sqrt{4D\tau})} \quad (\text{Eq. 3})$$

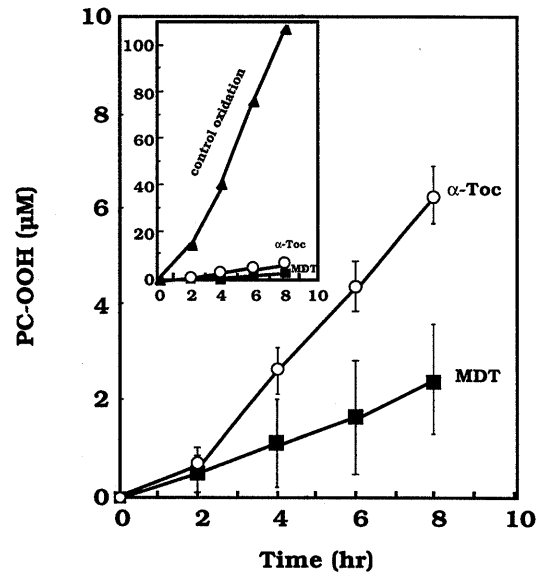
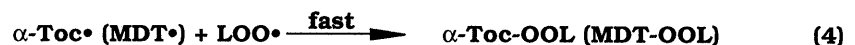
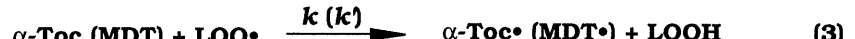
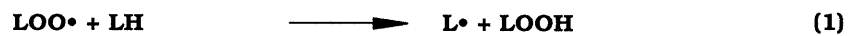


Fig. 3 MDT inhibits significantly PC liposome oxidation than does α -Tocopherol during benzophenone-induced photooxidation at 0°C



$$k'/k = \ln([\text{MDT}]/[\text{MDT}]_0) / \ln([\alpha\text{-Toc}]/[\alpha\text{-Toc}]_0) \quad (5)$$

Scheme 1.

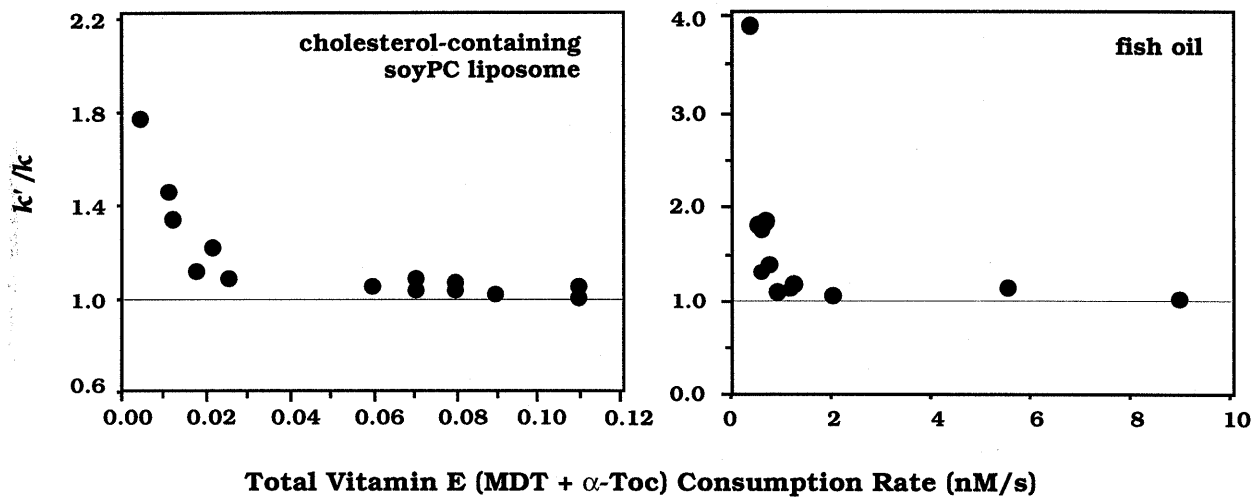


Fig. 4 Dependence in the reactivities of MDT and α -Tocopherol as k'/k ratios on the vitamin E consumption rate during the benzophenone-sensitized photooxidation of 5mM soy PC multilamellar liposomes containing 5mM cholesterol, and of neat fish oil, at 0 °C

ここでMDTの拡散係数 D' が α -トコフェロールの拡散係数 D よりもわずかでも優れていれば、ラジカル濃度が低くなるにつれ反応速度定数比(k'/k)が大きくなることが示される (Fig. 5). ビタミンEの酸化速度はラジカル濃度に対し1次に比例するので、得られた結果は実験結果を良く反映している. これらのことからMDTの優れた抗酸化活性はイソプレノイド側鎖に二重結合を導入することにより分子の拡散能が優れるためと考えられる. また同時に生体中での酸化速度がさほど大きくないことを考えると、実際の生体中ではMDTが α -トコフェロールよりも非常に優れた抗酸化活性を発揮している可能性が示唆される.

低温に伴い生体膜などは流動性が低下するが、それに対する応答として、生体は不飽和化酵素の働きにより膜構成脂質に二重結合を導入する. しかしそれによりビスアリル水素が増えた脂質はより酸化されやすくなり、また低温により液体中の溶存酸素濃度も増加するので生体は酸化的ダメージをより受けやすくなる.

α -トコフェロールのイソプレノイド鎖の末端に二重結合を持つことにより分子の機動性が増加し拡散能に優れるMDTはそのような低温、低流動性、低ラジカル濃度といった条件下でより優れた抗酸化能を発揮し、生体を効率よく酸化から防御すると考えられる.

ビタミンEにはこれまでに9種類の同族体が確認されており、MDTは10番目に単離されたビタミンEとなる. 陸上ではビタミンEは高等植物の葉緑体で、 α -トコフェロールを最終生成物として与えるように生合成され、またその生合成経路には大まかに分けるとトコフェロール経路とトコトリエノール経路の2種類がある. したがって α -トコフェロールの前駆体は γ -トコフェロールもしくは α -トコトリエノールとなり、1995年にパーム油から単離された α -トコモモノエノール (Fig. 1) は α -トコトリエノールから α -トコフェロールに水素化される途中の不完全な中間体と考えられる (Fig. 6).

一方、海洋性生物、特に植物プランクトンから α -トコトリエノールやその他のトコトリエノール類が検出されなかったことから、海洋性

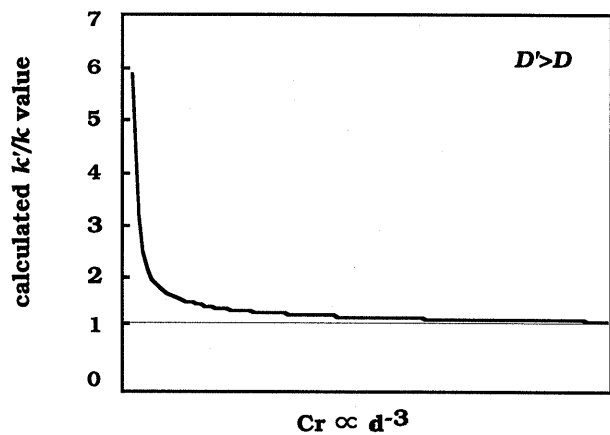


Fig. 5 The theoretical curve of k'/k value against radical concentration (Cr) calculated by the equation 3.

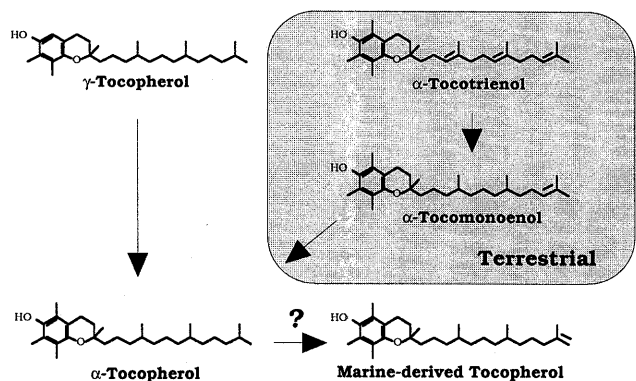


Fig. 6 Supposed biosynthetic pathway of MDT in marine organism adapted to cold environment.

生物にはトコトリエノールの生合成経路が無いと考えられる。

イソプレノイド鎖に二重結合を数多く持つほど拡散能が大きくなり、低温、低流動性、低ラジカル濃度環境下での抗酸化活性が大きくなることが示されたが、海洋生物にはトコトリエノールの生合成経路を欠いており、その代替としてMDTは低温環境に適合するために作り出されたと考えられる。このことからMDTの持つ生理的意義のひとつが明らかになったと考えている。さらにMDTの合成経路として、植物プランクトンの葉緑体中で、低温により活性化された不飽和化酵素の働きにより α -トコフェロールから合成される (Fig. 6) と考えられるが今後の検討が待たれる。