

学 位 論 文 題 名

マガキ (*Crassostrea gigas*) より発見された新規抗酸化物質の
精製, 同定, 化学合成と抗酸化能に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】活性酸素の生成は好気性の生活に起因し、生体の構成成分を酸化し、細胞に障害を与える。活性酸素は、がん、動脈硬化性疾患、虚血/再灌流障害、慢性関節リウマチ、糖尿病、アルツハイマー病やパーキンソン病などの様々な疾患や老化に関与すると考えられている。食品により活性酸素を消去し、これらの疾患の発症や老化の防止に貢献する目的で、抗酸化食品の開発が活発に行われている。

マガキはウグイスガイ目イタボガキ科に属する二枚貝である。カキ由来の抗酸化物として報告されているのは、酵素性抗酸化物質としてスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、及びペルオキシレドキシシンがあり、非酵素性抗酸化物質としてはメタロチオネイン、uncoupling protein 5 (UCP5)、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、 β -カロテンがある。

今回、我々は、マガキより抗酸化物質を発見し、その化学構造を決定し、化学合成を行った。さらに、ヒト低比重リポ蛋白 (low-density lipoproteins, LDL) の酸化実験と、肝臓の株化細胞の酸化実験における当該物質の抗酸化能を観察した。

【方法と結果】

I. 抗酸化活性物質の精製

マガキの 70%エタノール抽出液を材料として、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、1-ブタノールの順で段階的に抽出し、酢酸エチル抽出画分に抗酸化活性を確認した。酢酸エチル抽出物を順相シリカゲル薄層分取クロマトグラフィーで分画し、紫外線吸収性の 11 画分を得た。各画分の抗酸化活性を測定し、低極性側から 6 番目の画分に抗酸化活性を確認した。この画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで精製して、原料の 160 mL エタノール抽出液から最終的に抗酸化活性物質 3.0 mg を得た。酢酸エチル抽出画分の第 6 画分であることから、この物質を以下、E6 と呼ぶ。

II. 抗酸化物質の同定

上述の操作で分離した E6 について、紫外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、マスマスペクトルを測定し構造解析を行った結果、E6 の構造は、3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol と推定された。

III. 抗酸化物質の化学合成

推定された E6 の構造を確認するために化学合成を行った。合成物と E6 の間での $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, ESI-MS の各種スペクトルデータが一致し、HPLC の保持時間及び薄層クロマトグラフィーの移動度が一致したことにより、E6 が 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol であることが確認された。

IV. 抗酸化能測定

1. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 値の測定

E6 の ORAC 値と、比較のために L(+)-アスコルビン酸とクロロゲン酸の ORAC 値を測定した。E6 の ORAC 値は、精製物が $1.24 \pm 0.35 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 、合成物が $1.47 \pm 0.40 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であり、L(+)-アスコルビン酸とクロロゲン酸の中間に位置し、L(+)-アスコルビン酸よりも E6 は ORAC 値が 3 倍大きかった。

2. LDL を用いた抗酸化能試験

硫酸銅にて LDL を酸化し、thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) の生成が抑制されている時間 (lag time) の抗酸化物質の添加による延長を抗酸化力の指標とした。E6 を $180 \mu\text{mol/L}$ 添加した場合の lag time は非添加のものと変わらず 0 時間だったが、 $270 \mu\text{mol/L}$ では 2 時間、 $360 \mu\text{mol/L}$ では 4 時間、 $450 \sim 540 \mu\text{mol/L}$ では 6 時間と lag time の延長が観察され、E6 は用量依存的に LDL の金属酸化を抑制した。

3. C3A 細胞を用いた抗酸化能実験

ヒト肝臓由来の株化細胞である C3A 細胞を用いて E6 の毒性試験を行った結果、E6 は $320 \mu\text{mol/L}$ まで毒性がなかったので、 $320 \mu\text{mol/L}$ までの E6 濃度で抗酸化能実験を行った。Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) で標識した細胞を 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) で酸化し、酸化 DPPP の蛍光強度を測定することにより、細胞の酸化度を観察した。酸化時間の延長に従い、低濃度 ($80 \mu\text{mol/L}$) から用量依存的に有意に酸化を抑制した。

【考察】マガキより得られた抗酸化物質、3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol、は過去に褐藻類から単離した報告がある。他にも 4 編の論文がこの物質を合成中間体として報告している。本研究は抗酸化物質としての 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol の最初の報告である。

当該物質は両親媒性で、水にも脂質にも溶解できる点は食品として利用しやすい。当該物質が用量依存的に LDL の酸化を抑制したことは、動脈硬化惹起性である酸化 LDL の生成を抑えて抗動脈硬化作用を発揮する可能性を示唆する。また、当該物質が肝臓由来の株化細胞である C3A 細胞において AAPH による DPPP の酸化を有意に抑制したことは、本物質が細胞内においても抗酸化活性を発揮できることを示唆する。以上の結果は、本物質を生体に投与した場合の抗酸化剤としての可能性を期待させる。

【結論】1. マガキ (*Crassostrea gigas*) より新規抗酸化物質を発見し、化学構造を 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol と決定し、化学合成法を確立した。

2. 当該物質の ORAC 値は、精製物が $1.24 \pm 0.35 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ 、合成物が $1.47 \pm 0.40 \mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ であり、水溶性抗酸化物質のクロロゲン酸と L(+)-アスコルビン酸の中間の抗酸化能の強さであった。

3. ヒト LDL の金属酸化に対して、当該物質は用量依存的に抗酸化能を示した。

4. C3A 細胞を用いた抗酸化能実験において、当該物質は用量依存的に抗酸化能を示し、細胞内でも抗酸化能を発揮できることが確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

マガキ (*Crassostrea gigas*) より発見された新規抗酸化物質の 精製, 同定, 化学合成と抗酸化能に関する研究

活性酸素の生成は好気性の生活に起因し, 脂質, タンパク質, 核酸の酸化を生じ, 細胞に障害を与える. 通常, 生体の酸化レベルは活性酸素産生系と抗酸化物質による消去系のバランスでほぼ一定に保たれているが, 薬物, 放射線, 虚血などの様々な要因によりこのバランスが崩れ, 活性酸素産生系へ傾くのが酸化ストレスである. この酸化ストレスの蓄積が, がん, 動脈硬化性疾患, 虚血/再灌流障害, 慢性関節リウマチ, 糖尿病, アルツハイマー病やパーキンソン病の神経障害などの様々な疾患や老化の一因であると考えられており, 体外から抗酸化作用の高い食品やサプリメントなどを意識して取ることが重要と考えられている.

マガキ(*Crassostrea gigas*)はウグイスガイ目イタボガキ科に属する二枚貝で, その生息地は日本を初めとして東アジア全域に及んでいる. 近年では, フランスやオーストラリアでもマガキが養殖されており, 世界で最も食用に供さるカキである. カキは, 栄養価が高いことから古代より食用にされてきたが, グリコーゲンやタンパク質のほか, カルシウム, 亜鉛, セレニウム, 銅, マンガンなどのミネラルを多量に含む. カキ由来の抗酸化物質として報告されているのは, 酵素性抗酸化物質としてスーパーオキシドジスムターゼ, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ, 及びペルオキシレドキシシンがあり, 非酵素性抗酸化物質としてはメタロチオネイン, uncoupling protein 5, アスコルビン酸, α -トコフェロール, β -カロテンがある.

マガキから新規の抗酸化物質を探索し, 単離, 同定, 化学合成するとともに, その抗酸化能を評価することを目的とし, 以下の事実を明らかにした.

1. マガキから新規に抗酸化物質を単離し, 構造解析の結果, 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (以下, E6)と推定し, 化学合成によって確認, 同定した.
2. 精製, 及び合成した E6 の ORAC 値を測定した結果, $1.24 \mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ 及び $1.47 \mu\text{mol TE} / \mu\text{mol}$ であった.

3. E6 は硫酸銅によるヒト LDL の酸化と、 C3A 細胞の酸化を用量依存的に抑制した。

本研究で単離した E6 は 2004 年に褐藻類より単離の報告がされているが、生体に対する効果や活性などの生物学的性状の報告はなく、初めて抗酸化活性が確認された。

各副査及び主査の質疑応答は以下の通りである。

E6 はマガキから単離するのが効率的かどうか否かの質問には、褐藻から単離したとの一報告があるが、まだ良く分かっていないと回答した。E6 の作用機序は明らかなのかの質問には E6 自身が還元作用を持っていると回答した。E6 の長期間の服用は毒性・発がん性はあるのかの質問には今後検討したいと回答した。E6 の生物学的アドバンテージは何かの質問は E6 の分子量が小さく細胞の隅々まで侵入できることと回答した。E6 を生体内に投与する際、経口投与は可能かの質問には可能と回答した。動物やヒトに投与するとき、血中の E6 の濃度は数百 $\mu\text{mol/L}$ まで達することが可能かの質問には可能と回答した。E6 の安定性はどうかの質問には熱処理しても分解しないなど安定であると回答した。実験で使用された E6 を体内に摂取する場合、マガキを何個食せば良いのかの質問には 3 mg の E6 を摂取するのはマガキ 210 個食せば良いと回答した。E6 をサプリメントや食品にするかを含めて、具体的な将来の展望はどうかの質問には動物安全性試験やヒト安全性試験をなど課題が多いが、製品化できると回答した。

この論文は、マガキから新規の抗酸化物質を単離、同定し、ヒト LDL や細胞における酸化の抑制をする等、その生物学的性状を明らかにした点で高く評価され、今後、酸化ストレスが関与していると考えられている疾病の予防や老化の抑制の一助となるという意味で期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。