

報告番号 ^{*} 甲 第 2028号

主論文の要旨

題名

CHEMICAL STUDIES ON THE SPECIFIC OXIDATION OF
FOOD AND BIOLOGICAL MATERIALS BY ACTIVE OXYGENS
(活性酸素による食品・生体成分の特異的)
酸化に関する化学的研究)

氏名 KOJI UCHIDA

主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

内田 浩二

食品・生体成分の劣化あるいは老化における活性酸素の関与については、すでに疑う余地のないものとなっている。中でも、スーパーオキシド (O_2^-) やヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) などの分子状酸素の酵素的・非酵素的還元により生成される酸素ラジカル種は、食品・生体系において容易に生成されることや極めて高い反応性をもつことなどから、活発に研究が進められている。特に $\cdot OH$ は最も酸化活性が強く、芳香環への付加あるいは水素の引き抜きなどの反応を誘導し、核酸、糖類、あるいはタンパク質などの食品・生体高分子の酸化的劣化を引き起こすことが知られているが、その作用機作については不明な点が多い。 $\cdot OH$ は鉄あるいは銅イオンなどの金属触媒による H_2O_2 の分解により生成する系 (Fenton system) が一般的によく知られ、アスコルビン酸-金属イオン系も広義のフェントン試薬と考えられる。この金属イオン存在下におけるアスコルビン酸酸化系は、代表的な O_2^- あるいは $\cdot OH$ の生成系として知られ、近年では生体内での酵素的酸化機構 (cytochrome P-450) のモデル系としても広く用いられている。本研究は、フリーラジカル生成系として、一貫してこのアスコルビン酸-金属イオン系を用い、糖類やタンパク質などの食品や生体系を通じて最も重要な構成成分への化学作用について詳細な検討を行ったものである。(第 I 章)

1. 酸素ラジカルによる多糖の酸化

糖類は $\cdot OH$ の捕捉剤として用いられるなど、一般的にフリーラジカル反応に対して鋭敏である。そこで、アスコルビン酸酸化系において生成される酸素ラジカルと多糖との反応について主にゲル濾過を用いて調べると同時に、糖類のもつ物理化学的性質と酸素ラジカルに対する反応性との関連についての検討を行った。反応は、0.04% 多糖 (mol. wt. $>10^5$)、2 mM アスコルビン酸、及び $10 \mu M$ Cu(II) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、室温で行った。

その結果、アスコルビン酸-銅イオン系において生成される活性種は多糖に対して著しい反応性を示すと共に、低分子オリゴ糖 (mol. wt. 10^3-10^4) の生

成を促進した。この反応は、カタラーゼ、及び $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤により効果的に抑制されたことから、反応活性種は $\cdot\text{OH}$ と推定された。一方、多糖の重合度やグリコシド結合の種類などが、この系における多糖と $\cdot\text{OH}$ との反応性に影響していると考えられ、分子量 10^4 以上で急速に反応性が上昇すること、及び 1,4-結合多糖 (amylose) よりも 1,6-結合多糖 (dextran) の方が反応性が高いことなどを明らかにした。これらはいずれも触媒として用いた Cu(II) との親和性の差異に基づくものと推測され、重合度の大きな多糖や、1,6-結合糖などは比較的 Cu(II) との親和性に優れているものと考えられた。(第 II 章)

2. フェントン試薬による 1,4- 及び 1,6-結合二糖類の酸化

第 II 章におけるグリコシド結合と $\cdot\text{OH}$ との関連性について更に化学的知見を得る目的で、二糖類を用いたモデル実験を行った。二糖類としては、主に maltose (α -1,4) 及び isomaltose (α -1,6) を用い、 $\cdot\text{OH}$ 生成系として本研究ではフェントン試薬 [H_2O_2 - Cu(II)] を使用した。反応は、1 mM 糖、10 mM H_2O_2 、及び 50 μM Cu(II) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中、室温にて行い、酸化生成物の定量及び同定は、alditol acetate 及び TMS 誘導体の GLC、GLC-MS 分析により行った。

その結果、いずれの誘導体分析においても isomaltose の方が反応性が高く、maltose では約 20% の分解であったのに対し、isomaltose では 40% 近くもの分解がみられた。この傾向は、 β -二糖類である cellobiose (β -1,4) や gentiobiose (β -1,6) の場合においても明らかであった。こうした 1,6-糖の高い反応性は、1,6-グリコシド結合の特性 (free rotation) に由来するものと考えられ、これらの特性が金属イオン [Cu(II)] との親和性増大に寄与するものと推測された。また、GLC-MS 分析において二糖類の TMS 誘導体に特有のフラグメンテーションを見出し、全ての酸化二糖類の構造を明らかにした。(第 III 章)。

3. 酸素ラジカルによるタンパク質の特異的酸化

糖類のラジカル分解においては、触媒として用いた金属イオンと糖との相互作用が重要な因子と考えられたが、金属イオンとの親和性という点では、糖よ

りもタンパク質の方が優れているものと推測された。そこで、牛血清アルブミン (BSA) を用い、金属イオンを触媒とした酸素ラジカル生成系がタンパク質に対してどの様に作用するかという点について化学的検討を行った。

反応は、0.04% BSA、2 mM アスコルビン酸、及び 10 μ M Cu(II) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中室温において行った。その結果、ゲル濾過及びゲル電気泳動などにより BSA の高い反応性と共に、顕著な低分子化が観察された。また、タンパク質の酸加水分解物のアミノ酸分析では、ヒスチジン残基の選択的損傷が明らかになり、またアルカリ加水分解物の HPLC 分析では、トリプトファンの顕著な減少が確認された。従来より ヒスチジンのイミダゾール環は、Cu(II) などの金属イオンに対してキレート能を有することが知られていることから、低分子のペプチドを用い、ヒスチジンの反応性と金属イオンに対するキレート能との関連性について更に検討した。

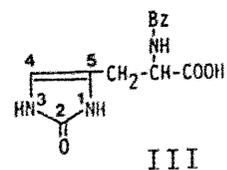
その結果、glycyl-glycyl-L-histidine や poly-L-histidine などのペプチドにおけるヒスチジン残基の選択的損傷を確認した。また、 13 C-NMR を用いて Cu(II) と glycyl-glycyl-L-histidine との相互作用について検討した結果、イミダゾール環に由来するシグナルにのみ明瞭な変化がみられた。この結果は、糖類、タンパク質を通じて基質-金属間の親和性とラジカル反応との関連性を裏付ける間接的証拠であると考えられた。(第 IV 章)

4. 酸素ラジカルによるヒスチジン誘導体の酸化

前章におけるタンパク質中ヒスチジン残基の選択的損傷をさらに化学的に明らかにするため、基質として N-benzoylhistidine を選び、酸化生成物の同定及び生成機構の解明を試みた。

反応は 1 mM N-benzoylhistidine、5 mM アスコルビン酸、及び 50 μ M Cu(II) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中室温で行った。その結果、24 時間後にはおよそ 90% 近くもの基質 (N-benzoylhistidine) の減少がみられると同時に、主生成物としてオキソイミダゾール化合物 (III)

の生成が確認された。この反応は、カタラーゼ、EDTA、及びSH-化合物により抑制された。また、Cu(II) 以外の重金属イオンではそれほど効果がみられなかったこと



から、この反応はCu(II)に極めて特徴的な反応であることが推測された。

一方、その他の反応生成物について HPLC による分取後、NMR 及び FAB-MS による解析を行い、最終的に主生成物である III を含め 8 種類の酸化生成物を同定した。これらのうち、6 種類はイミダゾール環の酸素酸化に由来するものであった。反応は、 $\cdot\text{OH}$ によるイミダゾール環 C-2 位への付加により開始され、ジオキセタンあるいはエポキシ中間体などを経て、N-benzoylaspartic acid などのイミダゾール環開裂化合物を生成するものと推測した。本研究において、ヒスチジンの酸化生成物としては新しいタイプの化合物の生成を確認すると同時に、アスコルビン酸-銅イオン系のフリーラジカル生成系としての新しい機能を初めて明らかにした。(第 V 章)

5. 考察

本研究における、糖類の重合度や結合の種類による反応性の相違 (第 II、III章)、あるいはタンパク質中ヒスチジン残基の選択的酸化 (第 IV、V 章) などの興味ある結果は、水溶液中において銅イオンが示す他成分との親和性という特性により解釈しうるものと考えられた。特に、第 IV 章におけるヒスチジン含有ペプチド-Cu(II)複合体の ^{13}C -NMR により、こうした現象の一部は証明されたものとする。しかしながら、反応機構の全容解明には至っておらず、今後の課題といえる。

一方、タンパク質の生体内代謝において cytochrome P-450 などの酸化酵素系によるヒスチジンの特異的酸化が起きていることが報告されるなど、こうした生化学的立場における現象と本研究でのモデル反応とのつながりに関心がもたれる。また、実際の食品・生体系において本研究でみられたような化学反応が生じているかどうかは不明であるが、アスコルビン酸や銅イオンなどの濃度あるいは反応条件 (pH7.2、室温) などはこうした可能性を十分に支持するものである。また、本研究において活性酸素生成系として着目したアスコルビン酸酸化系により、極めて特異な反応を見いだすことが可能となり、他の食品・生体成分 (特にヒスチジン) の新たな機能を開拓する上での重要な手がかりとなるものと考えられる。(第 VI 章)