

カロテノイドによるペルオキシナイトライト(活性窒素種)の消去に関する化学的研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2012-03-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坪井, 誠 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.14945/00006521">https://doi.org/10.14945/00006521</a>

静岡大学 博士論文

カロテノイドによる  
ペルオキシナイトライト（活性窒素種）  
の消去に関する化学的研究

2011 年 1 月

大学院自然科学系教育部  
バイオサイエンス専攻

坪井 誠

**THESIS**  
**Chemical studies on peroxynitrite**  
**(an active nitrogen species)**  
**scavenging by carotenoids**

**Makoto Tsuboi**

Educational Division of Science and Technology

Major in Bioscience

Shizuoka University

January 2011

# 目次

## 緒論

1. はじめに 1
2. ペルオキシナイトライト(活性窒素種)について 5
3. カロテノイド類の抗酸化作用について 8
4. カロテノイドとペルオキシナイトライトの反応について 9

## 本研究の目的 17

## 本論

### 第 I 章 ルテインとペルオキシナイトライトの反応について 20

1. 実験材料 20
2. ペルオキシナイトライト (peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>) の合成 21
3. ルテインとペルオキシナイトライトの反応 22
4. 反応生成物の単離と構造決定 25
  - 4-1. 14-*s-cis*-15-Nitrolutein (1) 28
  - 4-2. 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein (2) 28
  - 4-3. Lutein-6H-1,2-oxazine (3) 31
5. 考察 34

### 第 II 章 カプサンチンとペルオキシナイトライトの反応について 40

1. 実験材料 40
2. カプサンチンとペルオキシナイトライトの反応 41
3. 反応生成物の単離と構造決定 41
  - 3-1. 14'-*s-cis*-15'-Nitrocapsanthin (4) 44
  - 3-2. 12-Nitrocapsanthin (5) 44
4. 考察 46

第Ⅲ章 フコキサンチンとペルオキシナイトライトの反応について	48
1. 実験材料	48
2. フコキサンチンとペルオキシナイトライトの反応	49
3. 反応生成物の単離と構造決定	49
3-1. 14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin(6)	52
3-2. 11-cis-11-Nitrofucoxanthin(7)	52
4. 考察	54
第Ⅳ章 カロテノイドによる活性窒素種に起因する炎症予防に関する考察	56
実験の部	58
1. 試薬と機器	58
2. 実験方法と機器データ	62
2-1. ONOO <sup>-</sup> の合成	62
2-2. ルテイン	62
2-3. カプサンチン	66
2-3. フコキサンチン	68
要約	70
謝辞	76
参考文献	77

## 緒論

### 1. はじめに

カロテノイドは動植物界を通じて広範囲に分布する黄色、橙色ないし紅色の色素である。陽春の訪れを告げる山花から錦秋を飾る紅葉や黄葉、カラフルな昆虫から食卓を彩るエビやカニまで・・・、カロテノイドが作り出した色彩が人々の生活をどれほど豊かにしてきたのだろう。

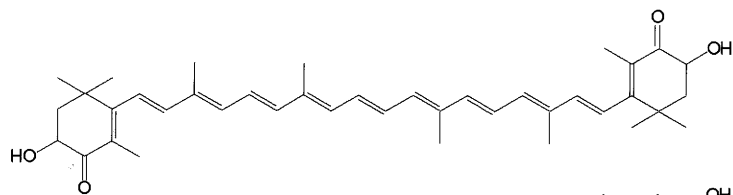
これらの色素を生合成できるのは植物と微生物のみである。興味深いことに、ヒトを含む動物は自らカロテノイドを生合成する能力は持っていないが、食物由来の様々なカロテノイドを蓄積している。ヒトが食事中から摂取するカロテノイドは約40種を超える程度であるが、ヒト血漿中にはそのうち13種類のカロテノイドやその代謝産物が存在することが知られている<sup>1)</sup> (Fig. 1)。

血漿のカロテノイド濃度が高い人は、ガンや虚血性心疾患などにかかりにくいという報告がなされている。これらの疾患は、生体内で形成された化学的反応性の高いフリーラジカルや活性酸素が組織や細胞に酸化障害を引き起こすことが、主な障害のひとつとして考えられていることから<sup>2)</sup>、カロテノイドが生体内で抗酸化作用を示し様々な疾患や老化を予防すると考えられるようになってきた<sup>3-5)</sup>。事実、カロテノイドは活性酸素である一重項酸素に対し、優れた消去活性を示す<sup>6)</sup> (Table 1)。

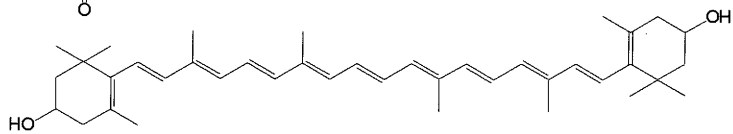
カロテノイドの中でも近年注目を集めているのがルテイン (lutein)、カプサンチン (capsanthin)、フコキサンチン (fucoxanthin) などの両端に異なる環状構造をもったキサントフィル類である。

ルテインは両端の環構造に水酸基を持ち、両端の環構造にある二重結合の位置が異なる特異な構造を有し、 $\beta$ -カロテンと化学的な性質が大きく異なる。その抗酸化作用は非常に優れた能力を持ち<sup>7,8)</sup>、抗

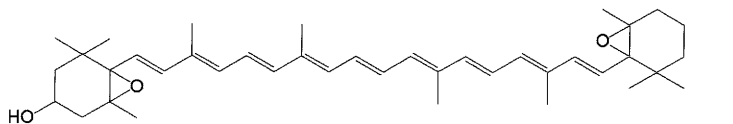
## Xanthophyll



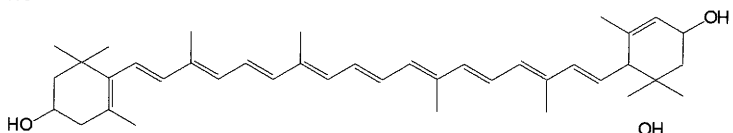
Astaxanthin



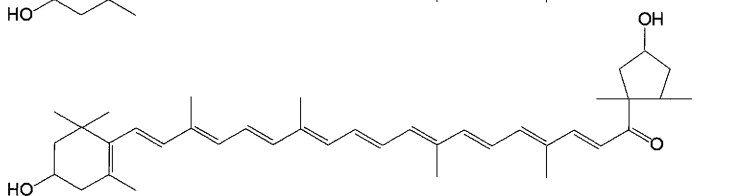
Zeaxanthin



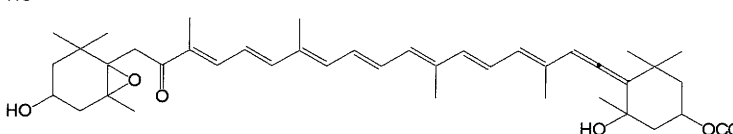
Violaxanthin



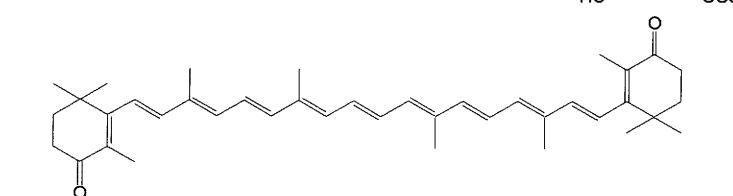
Lutein



Capsanthin

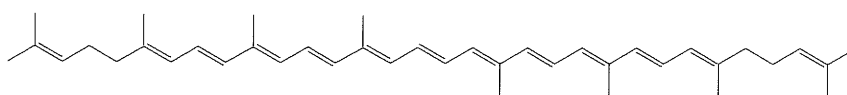


Fucoxanthin

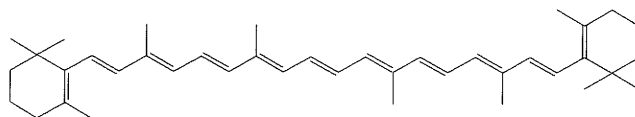


Canthaxanthin

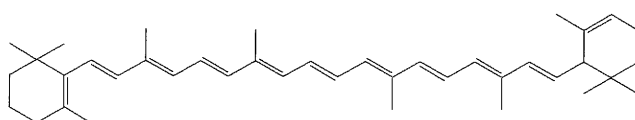
## Carotene



Lycopene



$\beta$ -Carotene



$\alpha$ -Carotene

Fig. 1. Structures of Some Carotenoids.

Table 1. Singlet Oxygen Quenching Abilities of Carotenoids and Related Compounds.

compound	$k_q$ ( $10^6\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ )
Lycopene	31000
$\nu$ -Carotene	25000
Astaxanthin	24000
Canthaxanthin	21000
$\alpha$ -Carotene	19000
$\beta$ -Carotene	14000
Bixin	14000
Zeaxanthin	10000
Lutein	8000
Cryptoxanthin	6000
Bilirubin	3200
Biliverdin	2300
Bilirubin ditaurate	1200
Crocin	1100
$\alpha$ -Tocopherol	280
$\beta$ -Tocopherol	270
Cysteine	236
$\nu$ -Tocopherol	230
$\delta$ -Tocopherol	160
Lipoate	130
Coenzyme A	89
Glutathione	41
Dihydrolipoate	5

$k_q$ : singlet oxygen quenching constant.



脂質過酸化ではビタミン E の約 300 倍の活性を示した報告がある<sup>9)</sup>。ルテインは一重項酸素消去能という点において、リコペン (lycopene) には数倍劣るが、眼における酸化傷害に対する防御機構をゼアキサントニン (zeaxanthin) と共に担っている。眼の水晶体と黄斑部にはカロテノイド (carotenoid) の中でもルテインとゼアキサントニンしか存在していないため、眼の加齢黄斑変性 (Age-related Macular Degeneration: AMD) といった疾患を予防する上で必要不可欠なものと考えられる。特にルテインはゼアキサントニンに変換されるという報告もあり<sup>10)</sup>、生体にとってその存在は重要である。またルテインは他のカロテノイドと同様に様々な部位に存在し、抗腫瘍作用、糖尿病、がん・免疫等に対する様々な生理活性が報告されている。

カプサンチンはパプリカ (*Capsium annuum*.) に多く含まれるカロテノイドで、キサントフィル類の一種である赤色色素であり、パプリカの成熟に伴う赤色の発現に深く関与している。両端の環状構造が六員環と五員環で左右非対称であり、ポリエン構造の途中にケト基を持つというカロテノイドの中でも特異な構造を有し、 $\beta$ -カロテンと化学的な性質が大きく異なる。抗酸化能は非常に優れており、リコペンと同等の抗酸化力を持つという報告もある。カプサンチンは体内では主に血中で LDL などに存在して脂質の過酸化や酸化障害に伴う様々な疾患の予防に関与しており、生体にとってその存在は重要である。また、カプサンチンは他のカロテノイドと同様の高い抗酸化能、一重項酸素消去能から抗癌活性、抗動脈硬化作用など様々な活性をもつことが報告されている<sup>11)</sup>。

フコキサントニンとは両端の環状構造に水酸基を持つ他に、アレン基やエポキシ基を持ち、他のカロテノイドとは大きく異なる構造である。フコキサントニンには抗酸化作用の他に、様々な機能が報告されている。1つ目には癌細胞のアポトーシスを誘導すること<sup>12)</sup>、2つ目には白色脂肪細胞におけるミトコンドリア脱共役タンパク質である UCP-1 を

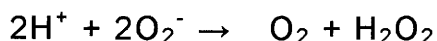
発現する事により脂肪細胞を分解すること<sup>13)</sup>、3つ目には血糖値の増大にかかわるアディポサイトカインの分泌抑制とグルコースの代謝促進作用<sup>13)</sup>などが報告されている。これによって抗癌活性、抗肥満作用、抗糖尿病作用など優れた機能を有している。

これまでの報告においてもカロテノイドは数々の生理活性を示し、自然の彩として人々を楽しませる他、人々の健康維持に対する有用性が期待される。これらのカロテノイドの研究は、本研究による新たな展開も含めて、今後さらに広がっていくと思われる。

## 2. ペルオキシナイトライト（活性窒素種）について

生体内において、一酸化窒素（NO）は細胞間情報伝達物質として平滑筋弛緩作用など多くの生理作用に関与しているが、スーパーオキシド（ $O_2^-$ ）と反応するとペルオキシナイトライト（ $ONOO^-$ ）となる。 $ONOO^-$ は脂質の過酸化やタンパク質のニトロ化、DNAの開裂やLDLの過酸化など様々な生体傷害を引き起こすと考えられている<sup>14)</sup>。特にLDLの過酸化は動脈硬化を引き起こす重要な要因と考えられており、これを防ぐことは動脈硬化性疾患の予防につながる<sup>3)</sup>。

一般に、 $O_2^-$ が中性域の溶液中で生成した場合、これは自然に不均化反応により $O_2$ と $H_2O_2$ に変換されるが、その際の二次反応定数は、環境中のpHに大きく影響される。つまり、 $O_2^-$ のpKaであるpH4.8の酸性下で最も速く $k=8 \times 10^7 M^{-1} sec^{-1}$ であり、生理的な中性条件下では $\sim 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ 程度であることが報告されている。



また、中性の水溶液中での $1 \mu M \sim 20 \mu M$ 程度の $O_2^-$ の寿命は50 m sec～数 secであるという。炎症巣などで $O_2^-$ が過剰に生成している組織において、もし、 $O_2^-$ が液相に放出され、その系に $O_2^-$ の消去系

が全く存在しないと仮定した場合でも、生体内での寿命は、1 sec 以下の比較的短いものであると考えられる。一方、 $O_2^-$  の不均化反応を触媒する消去酵素である SOD が、 $O_2^-$  産生系に存在した場合、SOD の  $O_2^-$  を不均化する反応速度定数は、 $1.9 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$  であるので、生体内の生理的 SOD 濃度が  $10^{-5} M$  であるとする、 $O_2^-$  の自然の消失速度の 1 万倍以上の速度になり、 $O_2^-$  生成系に外来性の SOD を投与した場合、 $O_2^-$  はさらに速やかに消去されることになる。しかしながら、 $O_2^-$  が、細胞内や細胞膜（不飽和脂肪酸を含む）などの  $O_2^-$  の標的分子の近傍に過剰に生成した場合や、 $O_2^-$  の消去系（SOD など）が相対的に不足している環境においては、 $O_2^-$  の寿命が長くなり、その毒性発現はより明瞭になるものと思われる。

一方、NO は  $O_2^-$  とほぼ拡散律速に近い速度（速度定数： $6.7 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ ）ですみやかに反応し、反応性の高い ONOO<sup>-</sup> が生じる。SOD の  $O_2^-$  の消去速度は、NO と  $O_2^-$  の反応速度よりやや劣る程度である。

ONOO<sup>-</sup> の pKa は 6.8 であるので、やや酸性側の生理的 pH 域では ONOO<sup>-</sup> はプロトン化され、ONOOH（peroxynitrous acid）の生成を経て、最終的には硝酸（イオン）になる。



Koppenol は、ONOO<sup>-</sup> 生成以後の反応過程で、特に ONOOH が HNO<sub>3</sub> へと変換する間に、反応性の高い中間体が生じ、これがチオール化合物などの酸化をもたらすことを指摘している。しかしながら、この ONOO<sup>-</sup>（ONOOH）の反応性は、HO<sup>•</sup> などに比べ劣っている。例えば、ONOO<sup>-</sup>（ONOOH）の L-cysteine の酸化速度定数は、 $\sim 10^4 M^{-1} sec^{-1}$  程度<sup>13)</sup> で、HO<sup>•</sup> のそれより  $10^5$  オーダー低い。一方で、ONOO<sup>-</sup> はその他の活性酸素やフリーラジカルとは異なった多様な生物活性を有している。すなわち、ONOO<sup>-</sup> は、生体内においてタンパクのチロシン残基をニトロ化

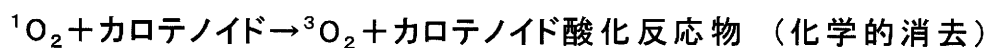
したり<sup>15)</sup>、過酸化脂質反応を促進させたり<sup>16)</sup>、アコニターゼやミトコンドリアの電子伝達系を障害し、細胞のエネルギー代謝を損ない、細胞障害やアポトーシスをもたらすことが明らかにされている。また、ミトコンドリアの活性酸素消去能に障害を与えることで神経障害を誘起すると考えられている。アルツハイマー病の起因仮説の一つに酸化ストレスが考えられ、ONOO<sup>-</sup>によりチロシンがニトロ化されて3-nitrotyrosineができる。Apo E-deficient mice (アルツハイマー病モデルマウス)の脳では3-nitrotyrosineが増加していること<sup>17)</sup>、またアルツハイマー病の脳では、神経原線維変化を呈した神経細胞に3-nitrotyrosineの存在が証明されていることなど<sup>5)</sup>、ONOO<sup>-</sup>はアルツハイマー病の原因物質とも考えられている。ONOO<sup>-</sup>によるチロシン残基のニトロ化反応は、タンパク-リン酸化などの細胞内シグナル伝達を障害する可能性<sup>18)</sup>も指摘されている。さらに、最近、ONOO<sup>-</sup>が生体内に豊富に存在する二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)と反応することにより、その反応性が増強するということが報告され、ONOO<sup>-</sup>生成の生物学的意義が近年益々注目をあびている<sup>19)</sup>。

その他にも、ONOO<sup>-</sup>は細胞外マトリックスの改変において重要な役割を担っているmatrix metalloproteinase (MMP)やプロスタグランディン合成系の酵素であるcyclooxygenase (COX)を活性化することにより、宿主の炎症反応を増強することが指摘されている<sup>20,21)</sup>。従って、活性窒素種のNOやONOO<sup>-</sup>は炎症反応のメディエーターとしても機能しているといえる。しかし、ONOO<sup>-</sup>は、炎症に関わる数々の酵素やタンパク質のチロシン残基などをニトロ化し、炎症反応を弱める可能性もあり、様々なタンパク質のニトロ化をによる炎症等の生体反応に対する影響が考えられる。ONOO<sup>-</sup>による炎症反応に対する障害が、重要な疾病などに関連すると思われ、ONOO<sup>-</sup>消去活性を持つ物質の重要性の理解は、今後の研究によって大きく認められることになるであろう。

### 3. カロテノイド類の抗酸化作用について

カロテノイドは現在までに、650種以上が単離されている<sup>1)</sup>。しかし、これらの色素の生合成は植物と微生物に見られ、ヒトを含む動物は自らカロテノイドを生合成する能力は持っていない。ヒトを含む霊長類はカロテノイドを吸収して体内へ蓄積するが、他の哺乳類ではカロテノイドを体内に蓄積できない種が多い<sup>2)</sup>。ヒトの健康にとってカロテノイドは、ビタミンと同等な健康維持のための成分と考えられる。ヒト血漿中には13種類のカロテノイドやその代謝産物が存在する<sup>3)</sup>。血漿のカロテノイド濃度が高いとガンや虚血性心疾患などにかかりにくく、これらの疾患は、生体内で形成された化学的反応性の高いフリーラジカルや活性酸素が組織や細胞に酸化障害を引き起こすことが障害のひとつとして考えられることから、カロテノイドが生体内で抗酸化作用を示し様々な疾患や老化を予防すると考えられるようになってきた<sup>4-8)</sup>。

カロテノイドによる一重項酸素の消去は、カロテノイドへのエネルギー移動によって基底状態の三重項酸素に戻る物理的な過程と、化学反応による過程がある<sup>22)</sup>。



物理的消去では、一重項酸素のエネルギー移動で励起三重項状態となったカロテノイドは、長鎖共役ポリエン構造により励起エネルギーを外部環境に放出して元の基底状態に戻る<sup>23)</sup>。その結果、カロテノイドは一重項酸素と化学反応する前に約1000分子の一重項酸素を消去する。その後化学的消去反応によりカロテノイドのペルオキシド反応物などが生成し<sup>24)</sup>、一重項酸素を消去する。また、カロテノイドのペルオキシラジカル補足は3つの反応機構が考えられてい

る<sup>25,26)</sup>。カロテノイドとペルオキシラジカルとの付加反応物の生成<sup>27)</sup>、カロテノイドの水素供与による過酸化物の生成<sup>28)</sup>、カロテノイドから電子移動によるペルオキシアニオンの生成である<sup>29)</sup>。それぞれの反応に関与したカロテノイドはエポキシドや環状エーテルなどの反応物となってペルオキシラジカルを補足する<sup>22,25)</sup>。

カロテノイド+LOO·→LOO-カロテノイド (付加反応)

カロテノイド+LOO·→カロテノイド·+LOOH (水素供与)

カロテノイド+LOO·→カロテノイド·<sup>+</sup>+LOO<sup>-</sup> (電子移動)

$\beta$ -カロテンやアスタキサンチン、リコペンなどは、脂質二重構造からなる生体膜の構成脂肪酸の脂質過酸化を抑制することで膜の変形能を保持し、受容体や輸送体、イオンチャンネル、さらにはシグナル伝達といった重要な生命活動の維持に役立っている<sup>9)</sup>。当研究室にてカロテノイド類の活性窒素種である ONOO<sup>-</sup> 消去活性物の研究までは、カロテノイドのペルオキシナイトライト消去物に関する研究はほとんど認められなかった。すでに、 $\beta$ -カロテンとアスタキサンチンが、ニトロカロテノイドを形成することで得られる ONOO<sup>-</sup> 消去化合物が当研究グループにより示されている。本研究では、左右非対称のカロテノイドについてペルオキシナイトライト消去により得られる化合物を初めて示し、ONOO<sup>-</sup> 消去活性を認めた。

#### 4. カロテノイドとペルオキシナイトライトの反応について

カロテノイドは人の体内では、生合成できず、その必要量を食物から摂取している。そして小腸より吸収されたカロテノイドは、カイロミクロン、VLDL に運ばれ肝臓、脂肪組織、心臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、甲状腺、精巣、卵巣等を集積することが知られている。血漿中では LDL・HDL に存在しており、カロテノイドの極性により、存在比

や分布は異なっていることが知られている。

ONOO<sup>-</sup>と LDL の反応において、LDL に含まれる脂溶性抗酸化剤である  $\alpha$ -トコフェロールが酸化により消費された後、カロテノイドが酸化抑制に働くことが報告されている<sup>30)</sup>。カロテノイドは LDL において極性の低い中心部に存在しており、比較的外側に存在する  $\alpha$ -トコフェロールが先に消費されるものと考えられる。LDL においては  $\alpha$ -トコフェロールが ONOO<sup>-</sup>に曝露された際には有効なスカベンジャーであると考えられる<sup>31)</sup>が、LDL 中の  $\alpha$ -トコフェロールは ONOO<sup>-</sup>により  $\alpha$ -トコフェロキノンに不可逆的に酸化され、アスコルビン酸により再生されることは無い (Fig. 2)<sup>32)</sup>。したがって、LDL の過酸化を抑制する事が出来なくなるおそれがある。トコフェロールが消費し尽くされた後に反応するのはおそらくカロテノイドであろう。そこでのカロテノイドによる ONOO<sup>-</sup>消去反応は非常に重要となる。またそれは LDL だけにとどまらず、その他の生体膜にも言えることである。カロテノイドに ONOO<sup>-</sup>消去活性があるか、またどのように消去するかといったところは興味深いところである。近年、ONOO<sup>-</sup>とカロテノイドの反応に関する報告がされている。

Kikugawa らは、分光学的研究により  $\beta$ -カロテンと NO<sub>2</sub>、ONOOH の反応についての報告している<sup>33)</sup>。 $\beta$ -カロテンは NO<sub>2</sub> に対しては高い反応性を示し、NO<sub>2</sub> を捕捉したことを示唆している。ONOO<sup>-</sup>に対しても反応性を示したが、NO に対しては全く活性を示さなかった。Koppenol らは、ゼアキサンチンと ONOO<sup>-</sup>の反応について報告している<sup>34)</sup>。ホスファチジルコリンにより調製したゼアキサンチン含有リポソームを用いて、ペルオキシナイトライトとの反応を検討している。UV スペクトルの短時間の経時変化を測定したところ、ゼアキサンチンは速やかに反応し、はじめ異性化した後、開裂した反応生成物ができるであろうと報告している。消去反応メカニズムは、反応の UV スペクトルからのみの推測にすぎず、反応生成物に関する報告は無かった。Pannala

らは、LDL 中で ONOO<sup>-</sup>に対するリコピンと β-カロテンの反応性をその消費量で比較し、リコピンの方がより反応性が高いことを報告している<sup>35)</sup>。Scheidegger らは、ゼアキサンチンについて ONOO<sup>-</sup>との反応物について予測しているが、反応生成物に対する報告はない<sup>36)</sup>。反応性に関するデータのみの報告が多い中、Yokota らはリコピンと ONOO<sup>-</sup>の反応生成物を解析し、消去反応に関して報告している<sup>37)</sup>。リコピンは ONOO<sup>-</sup>と直接反応し、ジオキセタン構造を経て二重結合の開裂および二次的反応を起こす系と、ONOO<sup>-</sup>が硝酸へと異性化する際に放出されるエネルギーを吸収する系の、2つの消去系を提案している (Fig. 3)。この結果、リコピンの二重結合部位の異性化が起こっている。Yoshioka らは β-カロテンの ONOO<sup>-</sup>反応物としてニトロ化カロテンを報告している<sup>38)</sup>。さらに、Maoka らは、カプサンチンなどのパプリカカロテノイドが ONOO<sup>-</sup>と酸化窒素による発がん性を抑制したことを報告した<sup>39)</sup>。この結果は、カロテノイドによる窒素反応物種の消去の結果であると考えられる。従って、カロテノイドによって消去される ONOO<sup>-</sup>消去メカニズムを明確化するために、本研究室では ONOO<sup>-</sup>とカロテノイドの反応を研究した<sup>40-42)</sup>。また、Suzuki らによりレチノールでは、アルコール末端部位の反応で、過酸化物を経て末端がニトロ化された化合物を得ている<sup>43)</sup>。(Table 2)



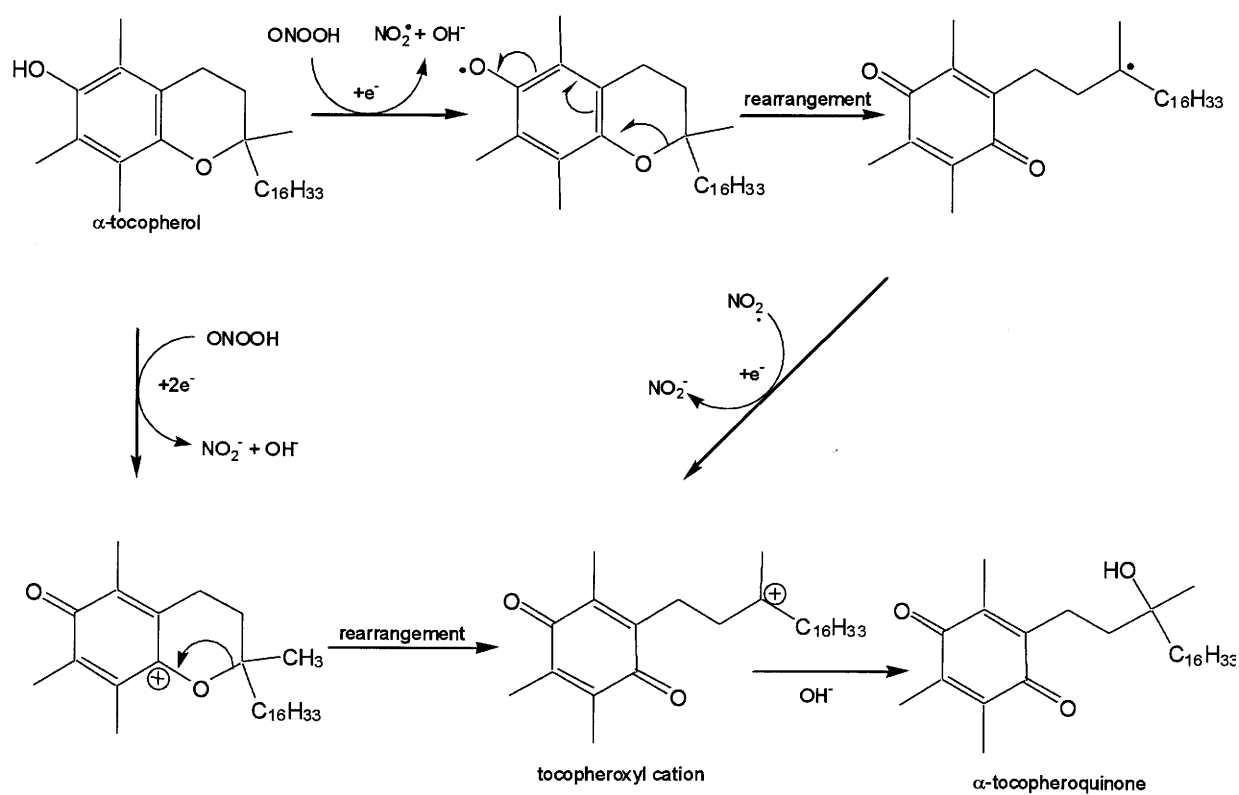


Fig. 2. Two-Electron Oxidation of  $\alpha$ -Tocopherol by Peroxynitrite to Form  $\alpha$ -Tocopheroquinone.

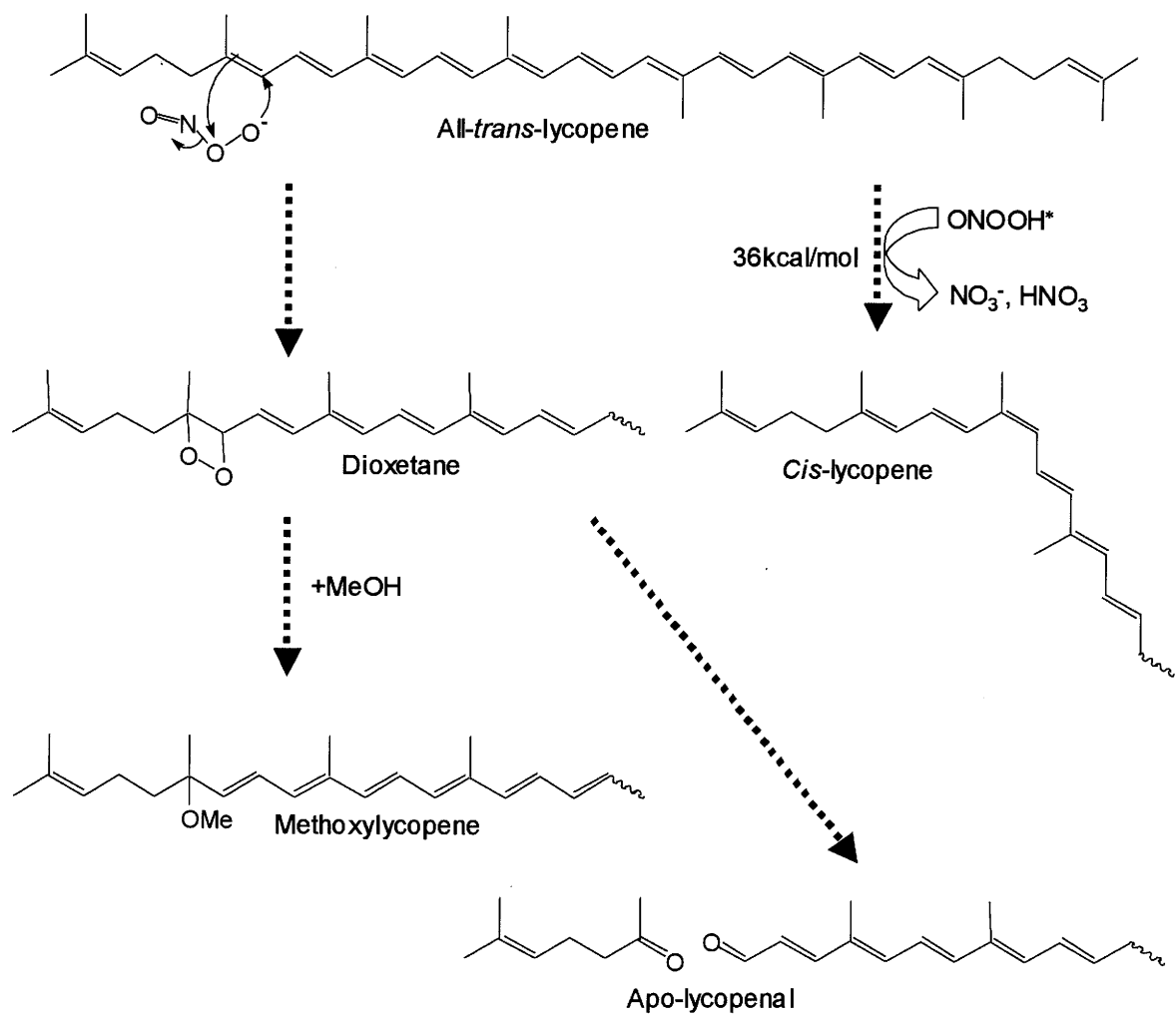


Fig. 3. Peroxynitrite Reaction Pathway with Lycopene Reported by Yokota *et al.*

Table 2. Research of Carotenoids and Peroxynitrite.

年	研究者	活性窒素種	反応物	内容・反応生成物
1997	Kikugawaら	NO <sub>2</sub> ONOO <sup>-</sup>	$\beta$ -carotene	ニトロ化合物が得られたと UV変化で予測 反応生成物の無し
1998	Koppenolら	ONOO <sup>-</sup>	Zeaxanthin	リポソーム中の変化を UVスペクトルで観測 反応生成物の無し
1998	Pannalaら	ONOO <sup>-</sup>	Lycopene $\beta$ -carotene	ONOO <sup>-</sup> に対するリコピンと $\beta$ -カロテンの反応性 反応生成物の提示無し
1998	Scheideggerら	ONOO <sup>-</sup>	Zeaxanthin	反応物の予測 反応生成物の提示無し
2004	Yokotaら*	ONOO <sup>-</sup>	Lycopene	二重結合の開裂などと、ONOO <sup>-</sup> 消費エネルギーの吸収 2つの消去系を提案
2006	Maokaら	ONOO <sup>-</sup>	Carotenoids Paprika	ONOO <sup>-</sup> の発がん性を抑制 反応生成物の提示無し
2006	Yoshiokaら*	ONOO <sup>-</sup>	$\beta$ -carotene	ニトロ化カロテンの構造
2006	Yoshiokaら*	ONOO <sup>-</sup>	$\beta$ -carotene Astaxanthin	ニトロ化カロテンの構造 ニトロ化アスタキサンチンの構造
2007	Suzukiら*	ONOO <sup>-</sup>	Retinol	末端ニトロ化合物
2008	Hyayakawara*	ONOO <sup>-</sup>	Astaxanthin	ニトロ化アスタキサンチンの構造
2010	Tsuboiら*	ONOO <sup>-</sup>	Lutein	ニトロ化ルテインと ルテインオキサジン体の構造

\* 当研究グループによる報告を示す。

我々のこれまでの研究で、左右対称構造をもつ $\beta$ -カロテンなどについてニトロ化カロテノイドを新規に得ている。これはカロテノイドによる ONOO<sup>-</sup>消去活性がカロテノイドのニトロ化により消去することを示した最初の報告である。本研究は左右非対称のカロテノイドであるルテインとカプサンチンおよびフコキサンチンなどの ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化生成物の構造を示した最初の報告である。また、カロテノイドと ONOO<sup>-</sup>の反応でオキサジン化合物の生成を示したのも初めてである。

この様に ONOO<sup>-</sup>との反応物が得られることが、ONOO<sup>-</sup>消去活性に結びつくことは、p-クマール酸やペラルゴニジンのような芳香族化合物が、それ自身のニトロ化によってチロシンなどの生体内アミノ酸のニトロ化を防いでいるとの報告で理解される<sup>8,9)</sup>。本研究の結果もまた、カロテノイドがニトロカロテノイドおよびオキサジンカロテノイドを生成することで生体成分の ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化を抑制する可能性を示唆している (Fig. 4)。実際、チロシンにルテインの添加でニトロチロシンの生成が阻害された。カプサンチンなどのパプリカカロテノイドは ONOO<sup>-</sup>や NO をイニシエーターとする発ガンを抑制する事や<sup>3)</sup>いくつかのカロテノイドがスーパーオキシドや NO の細胞内での発生を阻害することが報告されている<sup>10)</sup>。それゆえ、カロテノイドは活性窒素種によって誘導される病気のリスクを下げる力を有していると考えられる。

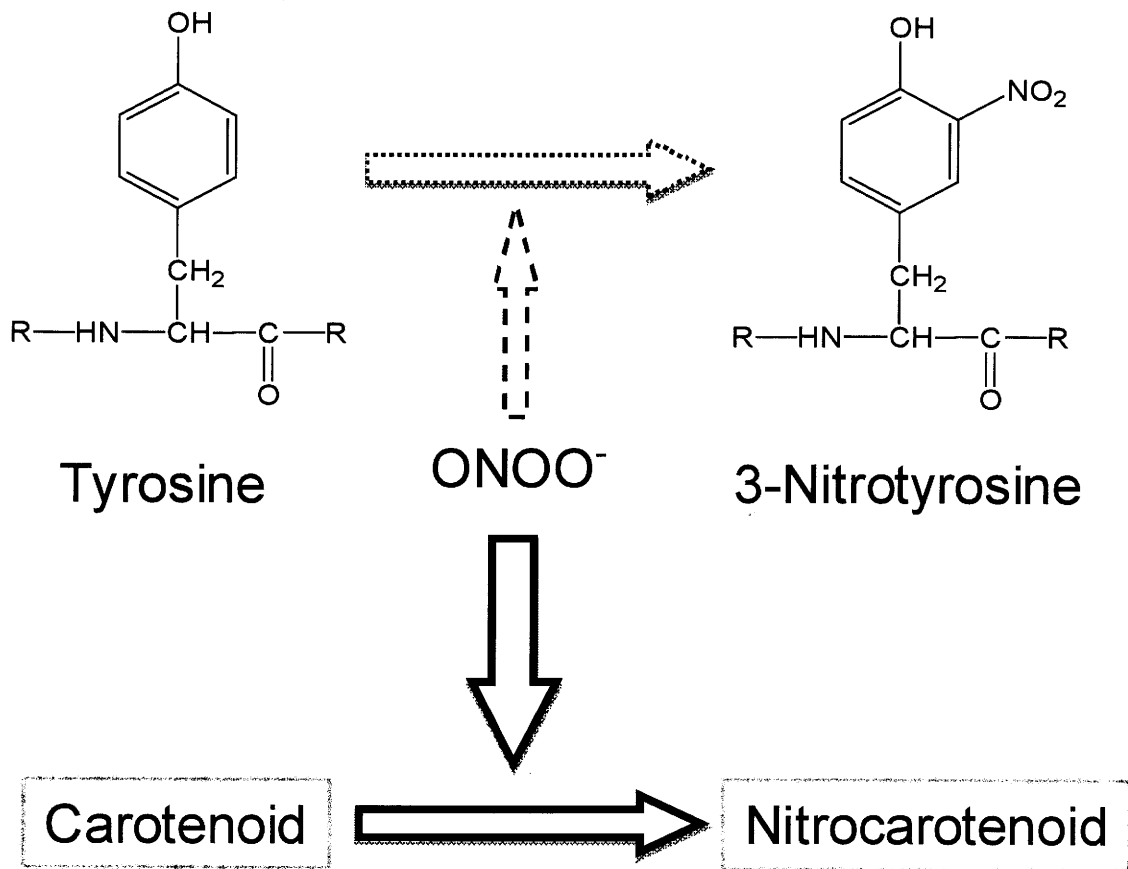


Fig. 4. Estimated Nitration Mechanism of Peroxynitrite Scavenging by Carotenoids.

## 本研究の目的

カロテノイドは一重項酸素に対する強力な消去活性と脂質の連鎖的過酸化阻害活性を持つ。一方、他の活性酸素種の消去活性はほとんどない。また、活性窒素種との反応性や消去活性に関する研究もほとんどないことから、本研究は、特に生体内への障害が指摘されているペルオキシナイトライト ( $\text{ONOO}^-$ ) 消去活性に関する知見を得ることを目的とした。

本研究室の吉岡はニトロ化反応がカロテノイドラジカルカチオンの生成を経由するプロセスを提案している。リコピンにおいては確認されなかったが  $\beta$ -カロテン、アスタキサンチンではニトロ体の生成が確認された。共役二重結合の長さがニトロ体の生成に関わることが考えられる。リコピン、 $\beta$ -カロテン、アスタキサンチンはそれぞれ 11 の共役二重結合を持つが、 $\beta$ -カロテン、アスタキサンチンは末端の二重結合がイオン環に含まれ共役への寄与が弱い。つまり直鎖の共役二重結合が 9 と短いことでニトロ体の生成が起きることが予想できた。この際、共役二重結合が短く、末端にイオン環を持たないカロテノイドにおいてもニトロ体が生成されると考えられる。今までルテインのように非対称構造をもつカロテノイドの反応生成物に関する報告は存在せず、ニトロ体の生成に関わる条件についても不明な点が多い。そこで本研究では非対称の構造とニトロ化に関する  $\text{ONOO}^-$  反応の知見を得ることを目的とした。

$\text{ONOO}^-$  は、反応性の高い活性窒素種の一つで、生体内でスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) と一酸化窒素 ( $\text{NO}\cdot$ ) の反応により生成する。 $\text{ONOO}^-$  は強力な酸化剤で、生体内で遊離のチロシンやタンパク質のチロシン残基をニトロ化する、さらに LDL の酸化や DNA の損傷など種々の酸化傷害を誘発する<sup>14)</sup>。また、アルツハイマー病の脳では、神経原線維変化を呈した神経細胞に  $\text{ONOO}^-$  によりチロシンがニトロ化されてできる 3-nitrotyrosine の存在が証明されていることなどから<sup>5,17)</sup>、 $\text{ONOO}^-$  はアルツハイマー病の原因物質とも考えられている。その他にも、 $\text{ONOO}^-$  は細胞外マトリックスの改変において重要な役割を担っている MMP やプロスタグランジン合成系の酵素である COX を活性化することにより、宿主の炎症反応を増強することが

指摘されている<sup>20,21)</sup>。従って、NO や ONOO<sup>-</sup> は炎症反応のメディエーターとしても機能している。これらの ONOO<sup>-</sup>による生体障害を除去できる可能性がカロテノイド類に見られることから、生体防御に関する知見としても本研究は有意義である。

本研究では、左右非対称のカロテノイドとして、ルテインが ONOO<sup>-</sup>との反応によって得られる生成物を解明すると共に、さらに左右非対称のカロテノイドとして、カプサンチンおよびフコキサンチンについても検討する。つまり、左右の異なる環状構造や活性基をもつカロテノイドについて(Fig. 5)、ONOO<sup>-</sup>との反応性について検討した。左右非対称のカロテノイドによる ONOO<sup>-</sup>消去活性により、ONOO<sup>-</sup>によるタンパク質のニトロ化反応によって発生する細胞障害や神経障害の他、広義の炎症反応に対する改善に、左右非対称のカロテノイドの果たす役割を明らかにするとともに、構造の異なる物質の消去活性への影響とカロテノイドの ONOO<sup>-</sup>消去活性メカニズムについて分子軌道法による反応メカニズムについて議論し、カロテノイドの反応性を分子レベルで明らかにすることと、新たな ONOO<sup>-</sup>消去物質研究につながる成果を得ることも目的とした。

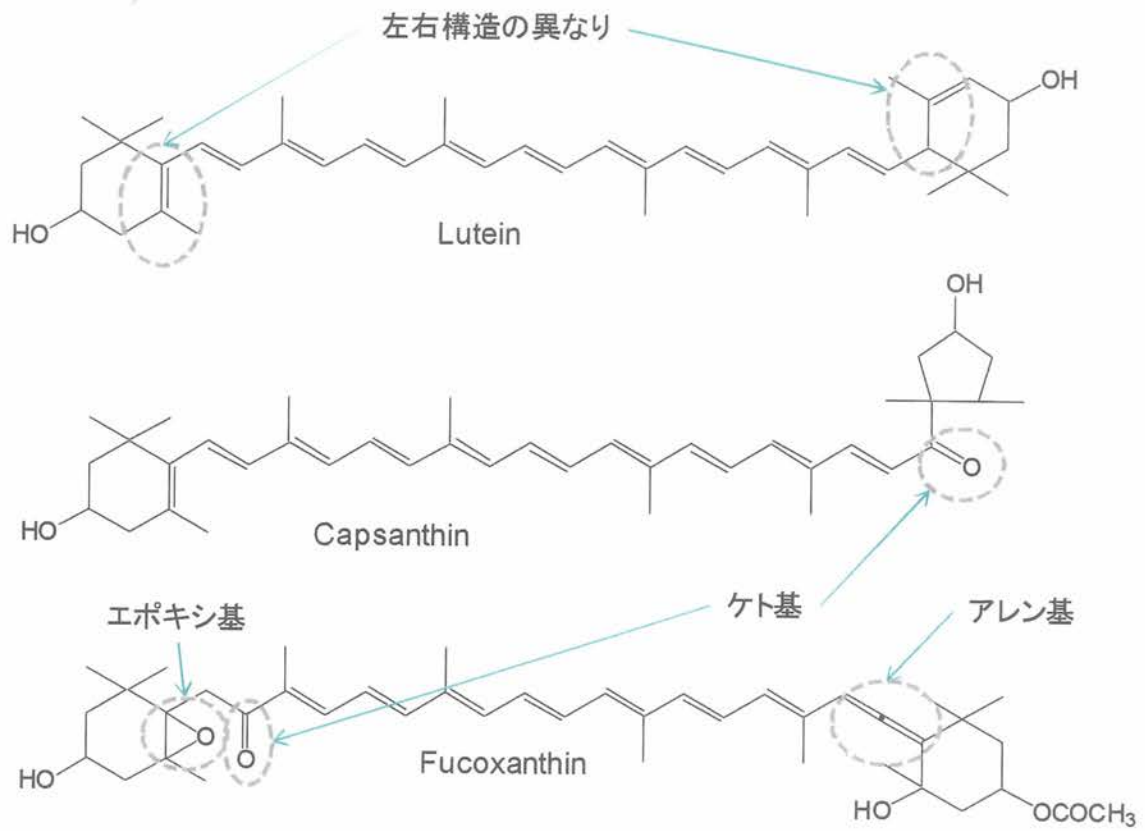


Fig. 5. Asymmetric Structures of Lutein, Capsanthin and Fucoxanthin.



## 本論

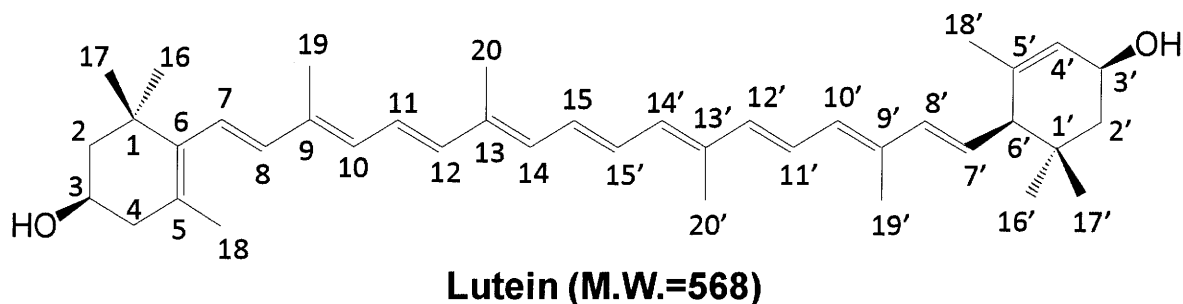
### 第 I 章 ルテインとペルオキシナイトライトの反応について

ルテインは、ホウレン草やブロッコリーなどの緑黄色野菜に多く含まれているカロテノイドであり、一般的に食品としては用いることがない。マリーゴールドは非常に多くのルテインを含み、サプリメントとしての利用が行われている。ルテインは両端の環構造に水酸基を二つ持ち、自然界では脂肪酸のエステル体として存在する。ルテインは、両端の環構造に二重結合の位置が異なる特異な構造を有し、 $\beta$ -カロテンと化学的な性質が大きく異なる。その抗酸化作用は非常に優れた能力を持ち<sup>7,8)</sup>、抗脂質過酸化ではビタミンEの約300倍の活性を示したとの報告がある<sup>9)</sup>。ルテインは眼における酸化傷害に対する防御機構をゼアキサンチンと共に担っている。またルテインはゼアキサンチンに変換されるという報告もあり<sup>10)</sup>、ルテインは特に目にとって重要な存在である。サプリメントとして摂取するルテインの加齢黄斑変性症(AMD)との関係が調べられており<sup>44,45)</sup>、AMDのリスク回避や改善にルテイン及びゼアキサンチンが有効であり<sup>46,47)</sup>白内障改善の可能性も指摘されている<sup>48)</sup>。眼の水晶体と黄斑部にはカロテノイドの中でもルテインとゼアキサンチンしか存在していないため、眼のAMDといった疾患を予防する上で必要不可欠なものである。我々は、左右非対称構造を持つルテインについて、ONOO<sup>-</sup>との反応生成物に関する報告が存在しないことから、ルテインの新たな反応生成物を得るため、ONOO<sup>-</sup>との反応物を調査した。

#### 1. 実験材料

持田製薬株式会社より提供して頂いたマリーゴールド花卉のヘキサン抽出物をアセトンに溶解させ、15%水酸化カリウムメタノール溶液を添加し、恒温槽にて37°Cで1時間反応させた。その後反応液に飽和食塩

水を加え、石油エーテルにて抽出し、濃縮物を得た。この濃縮物をジクロロメタンに溶解し、ヘキサン添加により再結晶することでルテインを精製し、実験材料とした。



## 2. ペルオキシナイトライト (peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>) の合成

生体内において、一酸化窒素 (NO) は細胞間情報伝達物質として平滑筋弛緩作用など多くの生理作用に関与しているが、スーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) と反応するとペルオキシナイトライト (peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>) を生成する。NOとO<sub>2</sub><sup>-</sup>の両者はともに反応性の低いフリーラジカルであるが、共存すると非常に早く反応し、ONOO<sup>-</sup>を生成する。この反応は、SOD (superoxide dismutase) による O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去反応の3倍ほど早く起こることが知られている。生体において、O<sub>2</sub><sup>-</sup>が産生されている部位では、NOも同様に産生されているため、ONOO<sup>-</sup>が生成している可能性は高い。ONOO<sup>-</sup>の生理的条件下での半減期は1秒以下であり、様々な反応種を生成し、酸化反応を引き起こすことが報告されている。ONOO<sup>-</sup>は脂質過酸化、タンパク質のニトロ化、DNAの開裂、LDLの過酸化など様々な生体傷害を引き起こすと考えられている。

氷冷した 0.7 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 0.6 M HCl 水溶液に、氷冷した 0.6 M NaNO<sub>2</sub> 水溶液をそれぞれ三角フラスコに準備する。氷冷した 1.5 M NaOH 水溶液を吸引瓶に入れ、吸引しながら漏斗上で準備した 2 液を反応させた。反応後は黄色を呈した。この溶液を -20℃ で数時間凍らせると上層に黄色い ONOO<sup>-</sup> の薄い層が形成される (Fig. 6)。ONOO<sup>-</sup> の濃度は UV 302 nm で測

定した (1.2 M NaOH 中で  $\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 。

### 3. ルテインとペルオキシナイトライドの反応

ルテイン(All-trans-lutein) 400 mg を THF 50 ml に溶解させ、TFA 800  $\mu$  l を添加した。この溶液に対し、50 mM ONOO<sup>-</sup>溶液 3 ml を添加し、速やかに攪拌し反応した。

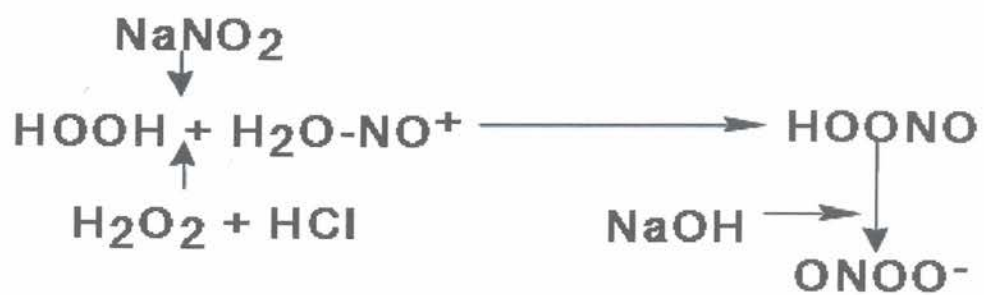
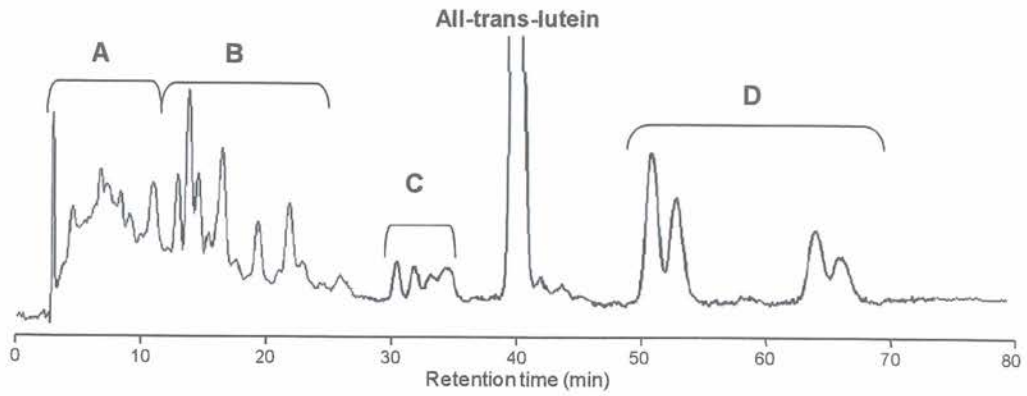


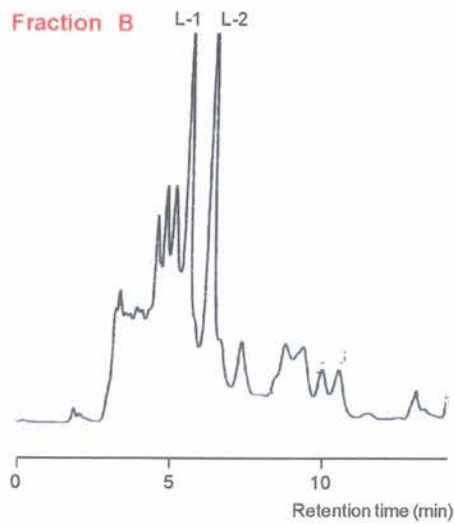
Fig. 6. Formation of Peroxyntirite

- A: 酸化的開裂を起こしたと示唆される化合物
- B, C : 共役系が減少していない化合物
- D: 異性化した化合物



Column: Develosil C30-UG-5 f4.6x250 mm, Flow rate: 1 ml/min,  
 Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 90:10, Detector: 447 nm

Fig. 7. HPLC analysis of Peroxynitrite Reaction Products with Lutein.



Column: Develosil C30-UG-5 f4.6x250 mm, Flow rate: 1 ml/min,  
 Mobile phase: MeOH: MTBT: H<sub>2</sub>O = 81:15:4, Detector: 420 nm

Fig. 8. HPLC analysis of Fraction B.

#### 4. 反応生成物の単離と構造決定

ルテインと  $\text{ONOO}^-$  の反応後、反応液に飽和食塩水を加え、ジクロロメタンにて抽出した。無水硫酸ナトリウムにて脱水し、減圧濃縮後、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC に供し、フラクション A、B、C を分取した。次に、逆相 HPLC に供し、フラクション B より、化合物 1 (L-1) 14-*s-cis*-15-Nitrolutein (1) と化合物 2 (L-2) 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein (2) を単離した。14-*s-cis*-15-nitrolutein (L-1) と 14'-*s-cis*-15'-nitrolutein (L-2) は主要な  $\text{ONOO}^-$  反応物として 1 : 1 の割合で生成した (Fig. 8)。フラクション C より化合物 3 (L-3) Lutein-6H-1,2-oxazine (3) を単離し、化合物 1 ~ 3 を各種機器分析に供した。

反応物であるオールトランスルテインは  $\text{ONOO}^-$  によりシス-トランスの異性化とともに、ニトロ化化合物の生成が考えられた (Fig. 9)。

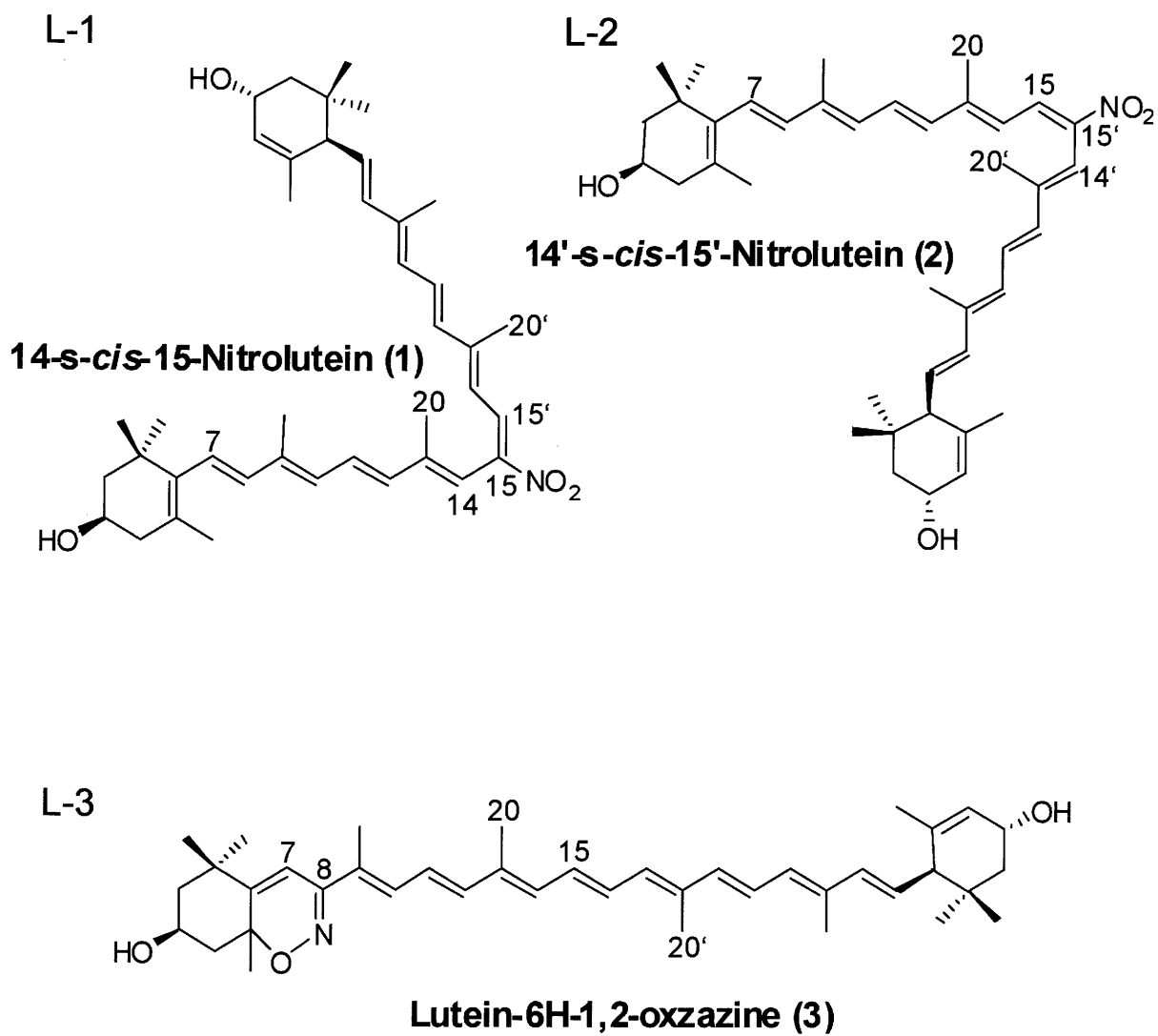
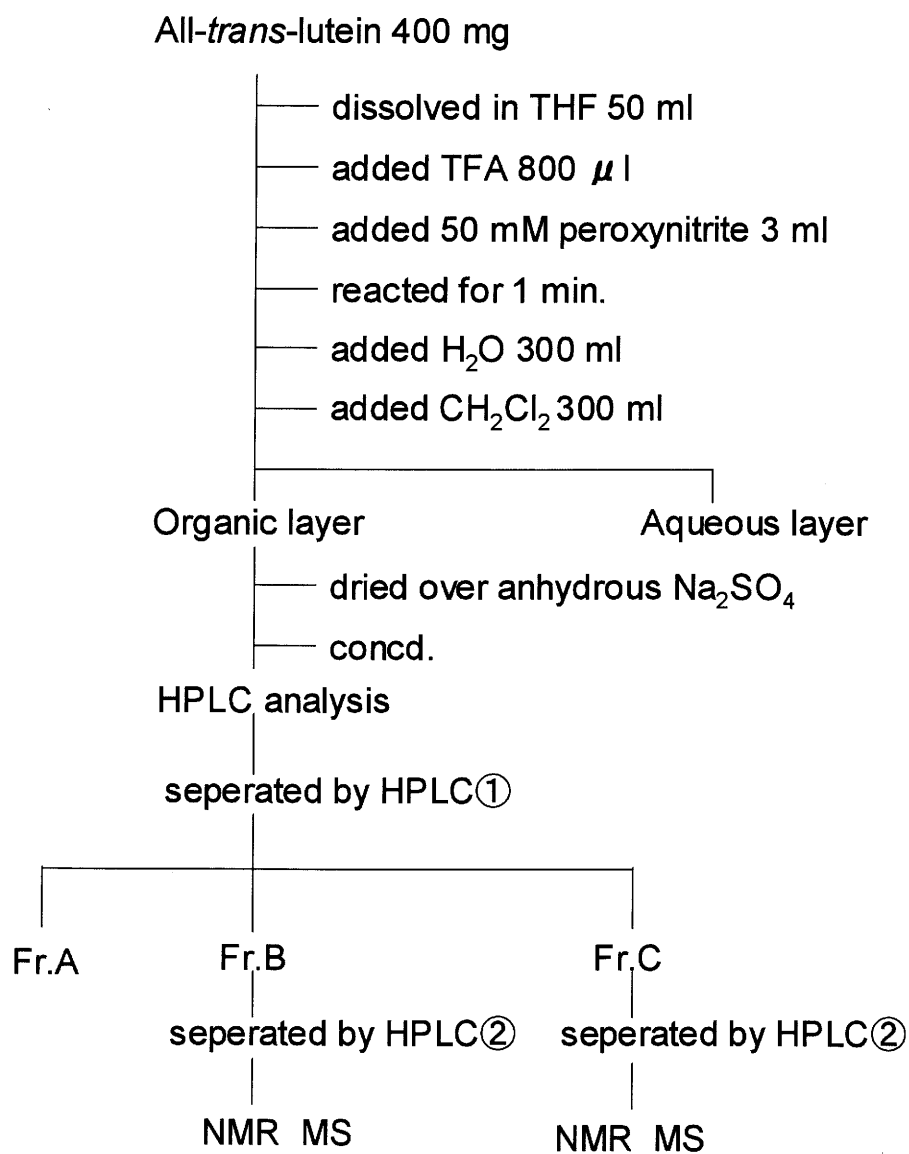


Fig. 9. Structures of Nitrolutein.



- ① seperated by HPLC  
(Develosil C30-UG-5  $\Phi$ 20 x 250 mm MeCN:H<sub>2</sub>O=92:8)
- ② seperated by HPLC  
(Develosil C30-UG-5  $\Phi$ 4.6 x 250 mm MeCN:H<sub>2</sub>O=90:10)

Scheme 1. Procedure for Reaction of Lutein  
with Peroxynitrite and Separation.



#### 4-1. 14-*s-cis*-15-Nitrolutein (1)

化合物 1 (L-1) は、UV スペクトルによる吸収極大を 322 nm と 465 nm に示した。また、この化合物の分子量は HRFAB-MS によって分子量 613.4139 及びその分子式は  $C_{40}H_{55}O_4N$  であることが判った。このことから、ルテインのニトロ化合物が得られたと考えられた。 $^1H$ -NMR スペクトル、 $^{13}C$ -NMR スペクトルを測定し、解析した。15 位のプロトンのシグナルが確認できず、15' 位のプロトン 8.05 ppm カップリング乗数 12.0 Hz (ヘルツ) でダブルットにシグナルが確認できることから 14' -15' 結合は *s-trans* 配位であり、15 位がニトロ基に置換され、20 位のメチルプロトンと 14' 位プロトンの相関がみられることから 15-15' 位の二重結合はシス配位であることが判った。また、 $^{13}C$ -NMR により 15 位のシグナルが 145.8 ppm に低磁場にシフトしている事や 14 位、14' 位が 118.9 ppm と 125.6 ppm に高磁場にシフトしている事、14 位、14' 位のプロトンのシグナルが 6.19 ppm と 5.86 ppm に高磁場にシフトしている事などから 15' 位ニトロ基の付加を支持した。また、これは他のカロテノイドのケミカルシフトの変化とも一致することから、L-1 は 14-*s-cis*-15-Nitrolutein であると決定した(Fig. 10)。

#### 4-2. 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein (2)

化合物 2 (L-2) は、UV スペクトルによる吸収極大を 343 nm, 447nm に示した。また、この化合物の分子量は HRFAB-MS によって分子量 613.4139 及びその分子式は  $C_{40}H_{55}O_4N$  であることが判った。このことから、ルテインのニトロ化合物が得られたと考えられた。 $^1H$ -NMR スペクトル、 $^{13}C$ -NMR スペクトルを測定し、解析した。15' 位のプロトンのシグナルが確認できず、15 位のプロトン 8.06 ppm カップリング乗数 12.0 Hz でダブルットにシグナルが確認できることから 14-15 結合は *s-trans* 配位であり、15 位がニトロ基に置換され、20' 位のメチルプロトンと 14 位プロトンの相関がみられることから 15-15' 位の二重結合はシス配位であ

ることが判った。NOESY 測定では 16 位と 17 位のメチルプロトンと 7 位プロトンの相関、19 位メチルプロトンと 7 位プロトン及び 11 位プロトンの相関、20 位メチルプロトンと 11 位及び 15 位プロトンの相関、16 位と 17 位のメチルプロトンと 7 位プロトンの相関、19 位メチルプロトンと 7 位及び 11 位プロトンの相関、20 位メチルプロトンと 14 位及び 11 位プロトンの相関が見られた。また、 $^{13}\text{C}$ -NMR により 15 位のシグナルが 145.8 ppm に低磁場にシフトしている事や 14 位、14' 位が 125.8 ppm と 119.0 ppm に高磁場にシフトしている事、14 位、14' 位のプロトンのシグナルが 5.96 ppm と 6.30 ppm に高磁場にシフトしている事などから 15 位ニトロ基の付加を支持した。また、これは他のカロテノイドのケミカルシフトの変化とも一致する。以上のことから、L-2 は 14'-s-cis-15'-Nitrolutein であると決定した(Fig. 10)。

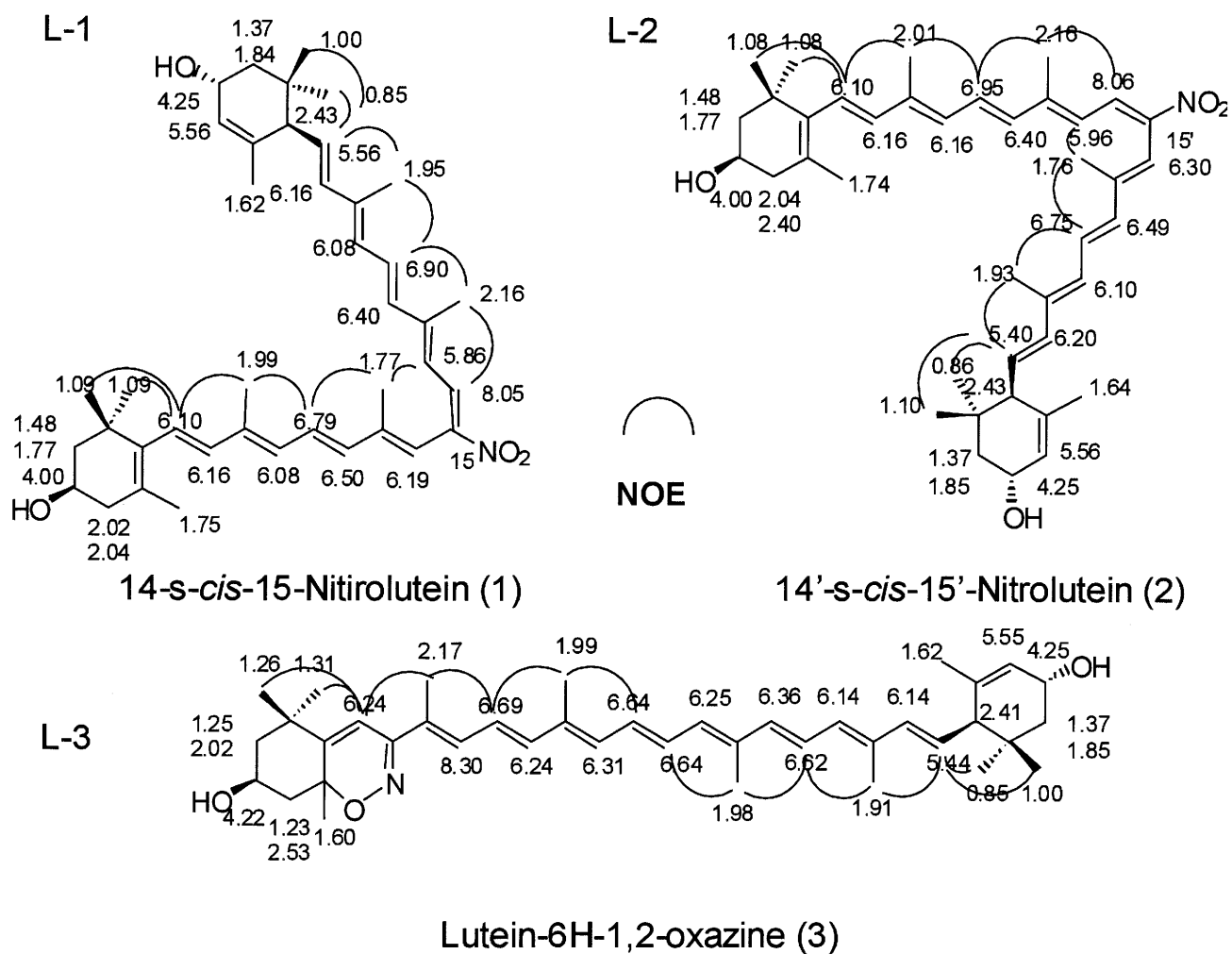


Fig. 10. Structures of Nitroluteins (1 and 2) and Lutein Oxazine (3) and their  $^1\text{H}$  NMR data ( $\delta$  in  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4-3. Lutein-6H-1,2-oxazine (3)

化合物 3 (L-3) は、1.5mg 得られ、UV スペクトルによる吸収極大を 430、457 および 486 nm を示した。このことから、他のニトロ化体とは異なる化合物が得られたと考えられる。

L-3 をピリジン中で室温化、無水酢酸を用いてアセチル化した。このアセチル体のマススペクトル分析を行うと、FAB MS  $m/z$  681 を示した。この化合物の分子量は HRFAB-MS によって分子量 597.4173 及びその分子式は  $C_{40}H_{55}O_3N$  であることが判り、分子量から NO 付加化合物であると考えられた。 $^{13}C$ -NMR スペクトルでは、5 位、6 位、7 位と 8 位炭素のシグナルはルテインと異なっていたことから、この領域に NO の付加反応が起こっていると考えられた。 $^1H$ -NMR スペクトルデータより 8 位のプロトンのシグナルが確認できずニトロ化が 8 位に起こったと推察した。7 位のプロトンは 6.24 ppm にシングレットのピークを示し、ケミカルシフトから二重結合プロトンであり、8 位のプロトンの消滅により 8 位プロトンとのカップリングが無くなっていると考えられた。5 位の炭素は 4 級炭素（デカップリングをしない場合にもシングルスペクトル）となり 80.1 ppm のケミカルシフト値を示し、何らかの酸素基が結合したと考えられた。また、HMBC スペクトルは 16 位と 17 位のメチルプロトンから 6 位炭素、18 位メチルプロトンから 5 位及び 6 位炭素、19 位メチルプロトンから 8 位、9 位及び 10 位の炭素に cross peaks を示したことから、C5-C6=C7-C8 構造をもつ六員環オキサジンと推察できた。一方、8 位の炭素も 4 級炭素でありの 142.6 ppm に低磁場にシフトしていることから、窒素が二重結合していることを想像させた。これらのスペクトルデータから -O-C5-C6=C7-C8=N- の部分構造が考えられた。ここまでの事実と、高分解能 MS (HRMS) データから、酸素は単結合（シングルボンド）によって窒素と結合している計算となり。オキサジン六員環構造を有すると考えられる。残っている構造的特徴は 16 位と 17 位のメチルプロトンと 7 位プロトンの相関、19 位メチルプロトンと 7 位プロトン及び

11 位プロトンの相関、20 位メチルプロトンと 11 位及び 15 位プロトンの相関、16 位と 17 位のメチルプロトンと 7 位プロトンの相関、19 位メチルプロトンと 7 位及び 11 位プロトンの相関、20 位メチルプロトンと 11 位及び 15 位プロトンの相関など NOESY 相互作用により構造のつながりを立証できた(Fig.11)。その他のケミカルシフトやカップリング乗数などの NMR データから、L-3 は、**Lutein-6H-1,2-oxazine** と決定した(Fig. 10)。

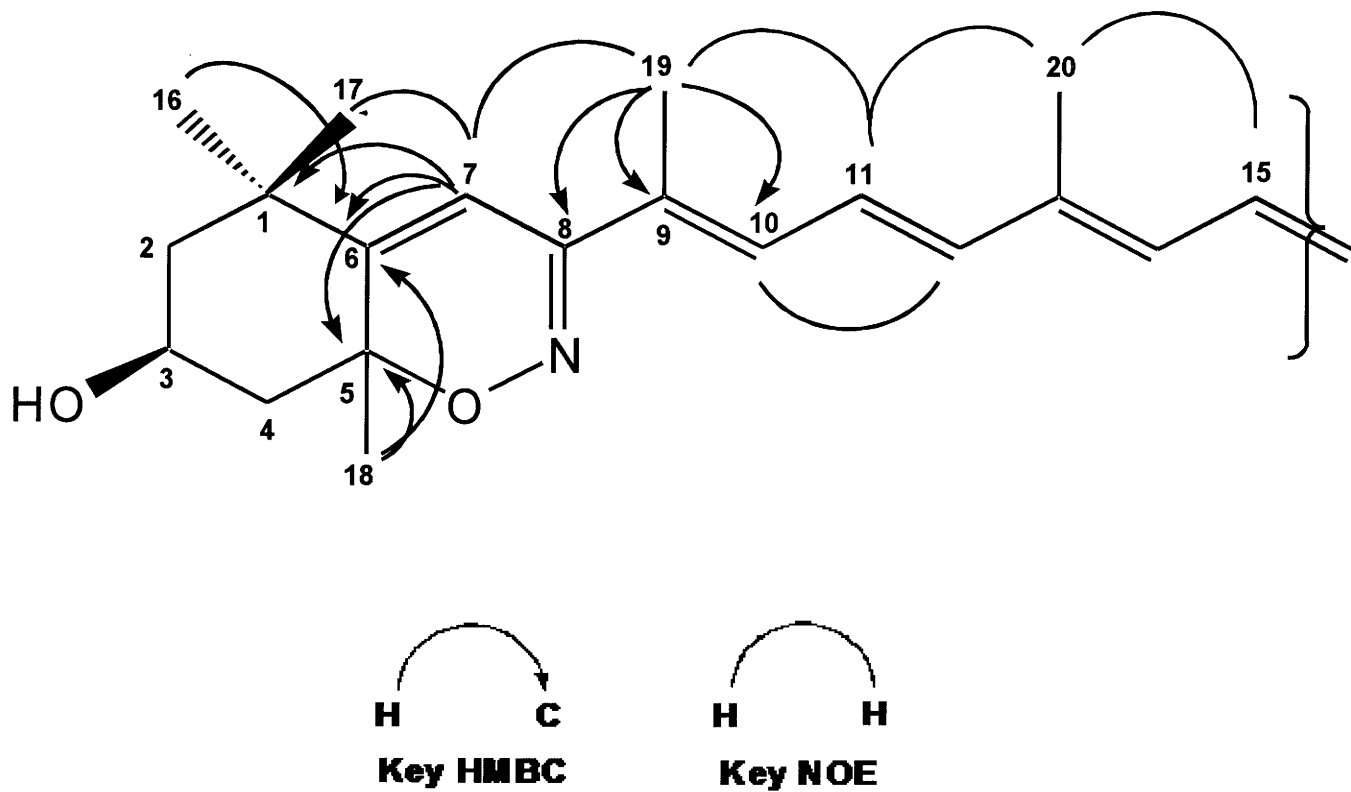


Fig. 11. Structures of Lutein Oxazine (3) and their NMR data ( $\delta$  in  $\text{CDCl}_3$ ).

## 5. 考察

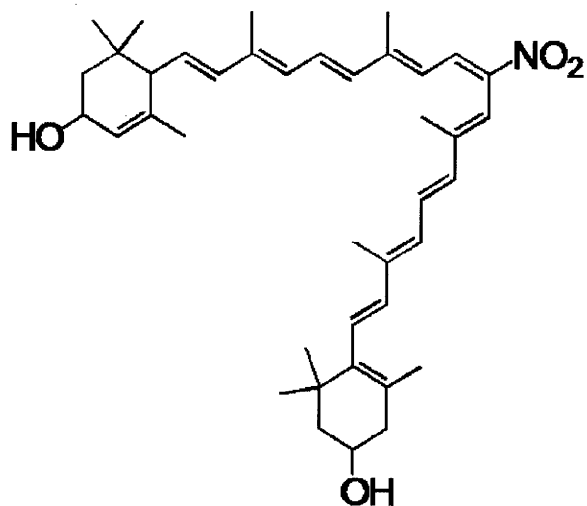
ルテインと  $\text{ONOO}^-$  の反応において新規生成物であるオキサジン化合物が得られた (L-3 : Lutein-6H-1,2-oxazine)。このオキサジン化合物はルテインと  $\text{ONOO}^-$  の反応で得られた初めての反応物である。本研究室において、各種カロテノイドの  $\text{ONOO}^-$  との反応生成物について研究を続けてきたが、環状構造におけるニトロ化生成物 (オキサジン) は初めての化合物である。この反応は、 $\text{ONOO}^-$  によりルテインの 8 位にラジカルが生じ、この時発生する二酸化窒素ラジカル ( $\cdot\text{NO}_2$ ) が 8 位の炭素にアタックすることでルテインの 8-ニトロ体が生成する。しかし、8-ニトロ体はより安定な化合物へ変化し、5 位のメチレン炭素にニトロ基の酸素がアタックし閉鎖、酸素脱離が起こり、オキサジン-ルテインが生成したと考えられる。このルテイン-オキサジン化合物はルテインの 8 位にニトロ化した化合物の二次反応物と考えられた。また、ルテインの  $\text{ONOO}^-$  によるニトロ化反応物として 2 成分を検出した。L-1 と L-2 はルテインの主要な  $\text{ONOO}^-$  反応物として 1 : 1 の割合で生成している。このニトロ化体は 14-*s-cis*-15-Nitrolutein (L-1) と 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein (L-2) であり、隣接の 20 位 (20' 位) のメチル基と立体的に異なる方向からニトロ化反応が起こったと考えられる化合物である。共役二重結合中央部を中心に  $\text{ONOO}^-$  によるニトロ化ルテインが生成した。このニトロ化は、ニトロ基の大きさのため、主にポリエン鎖への妨害が少ない位置で起こったと考えられた。しかし、ニトロ化の主要生成物である 14-*s-cis*-15-Nitrolutein と 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein は Table 3 に見られるように生成物として安定な化合物が得られていない。ルテインラジカルとしては 15 位ラジカルでは 14-*s-cis* で 15-15' の二重結合がシス配位である場合と 15' 位ラジカルでは 14'-*s-cis* 配位で 15-15' の二重結合がシス配位である場合がエネルギー的に安定であることから、Table 4 に示した 2 種のコンフォメーションのラジカルルテインとニトロラジカルがより多く反応した結果 14-*s-cis*-15-Nitrolutein と 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein が主要生成物として得

られたと考えられた。共役二重結合部分のラジカル化は位置による存在率の違いはあるかもしれないが、ランダムに起こっており、より安定なラジカル体を経て、ニトロラジカルとの反応物であるニトロルテインを生成する反応機構が考えられた(Fig.12)。ルテインなどのカロテノイドの ONOO<sup>-</sup> 消去反応は、ルテインのラジカルカチオンの生成のために 1 分子の ONOO<sup>-</sup> が消費され、さらに異性化エネルギーとして 1 分子の ONOO<sup>-</sup> が消費される。ニトロラジカル発生のために 1 分子の ONOO<sup>-</sup> が消費され、このニトロラジカルが安定なシス化したルテインラジカルと反応すると考えられた(Fig.12)。Fig.12 の反応機構により、ルテインによる ONOO<sup>-</sup> 消去メカニズムが解明できた。この反応機構の結果、ルテインなどのカロテノイドは中央部の共役二重結合部分で ONOO<sup>-</sup> によるラジカル化を受け、ONOO<sup>-</sup> により生成するニトロラジカル( $\cdot\text{NO}_2$ ) とラジカル反応の結果、ONOO<sup>-</sup> 消去活性を示していることが判ってきた。ONOO<sup>-</sup> はルテインに対してニトロ基のラジカル付加反応を起こすことが判明した。

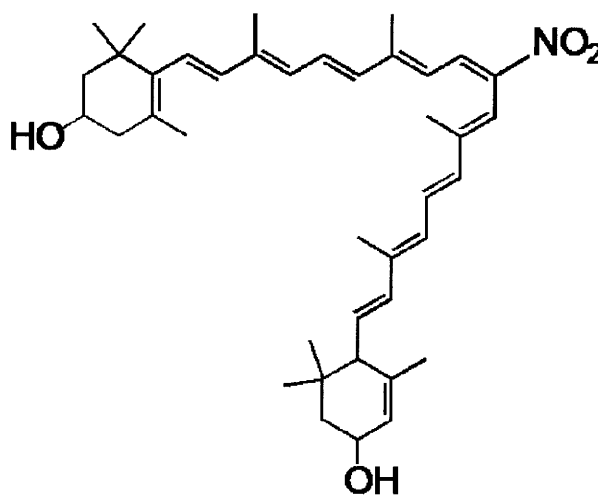


Table 3. Molecular Orbital Method of Nitrolutein.

14-s-cis-15-Nitrolutein



14'-s-cis-15'-Nitrolutein



Nitro-lutein

cis doublebond				trans doublebond					
ニトロ位置	C14-C15	C15=C15'	C15'-C14'	ニトロ位置	C14-C15	C15=C15'	C15'-C14'		
C15	trans	cis	trans	C15	trans	trans	trans		
	0.0000kJ/mol				30.1486kJ/mol				
	s-cis	cis	trans		s-cis	trans	trans		
14-s-cis-15-Nitrolutein			27.9356kJ/mol			86.7910kJ/mol			
56.9620kJ/mol			72.7893kJ/mol			C15'	trans	trans	s-cis
trans			cis	s-cis	trans		trans		
13.6917kJ/mol			30.2652kJ/mol						
C15'	s-cis	cis	trans	C15'	s-cis	trans	trans		
	81.3098kJ/mol				85.8617kJ/mol				
	trans	cis	s-cis		trans	trans	s-cis		
14'-s-cis-15'-Nitrolutein			55.0512kJ/mol			27.9887kJ/mol			

14-s-trans-14'-s-trans-15-cis-Nitroluteinを規準とした相対エネルギー

計算条件 使用プログラム:非経験的  
分子軌道法計算プログラムGaussian09  
基底関数:6-31G(d)計算温度:絶対零度

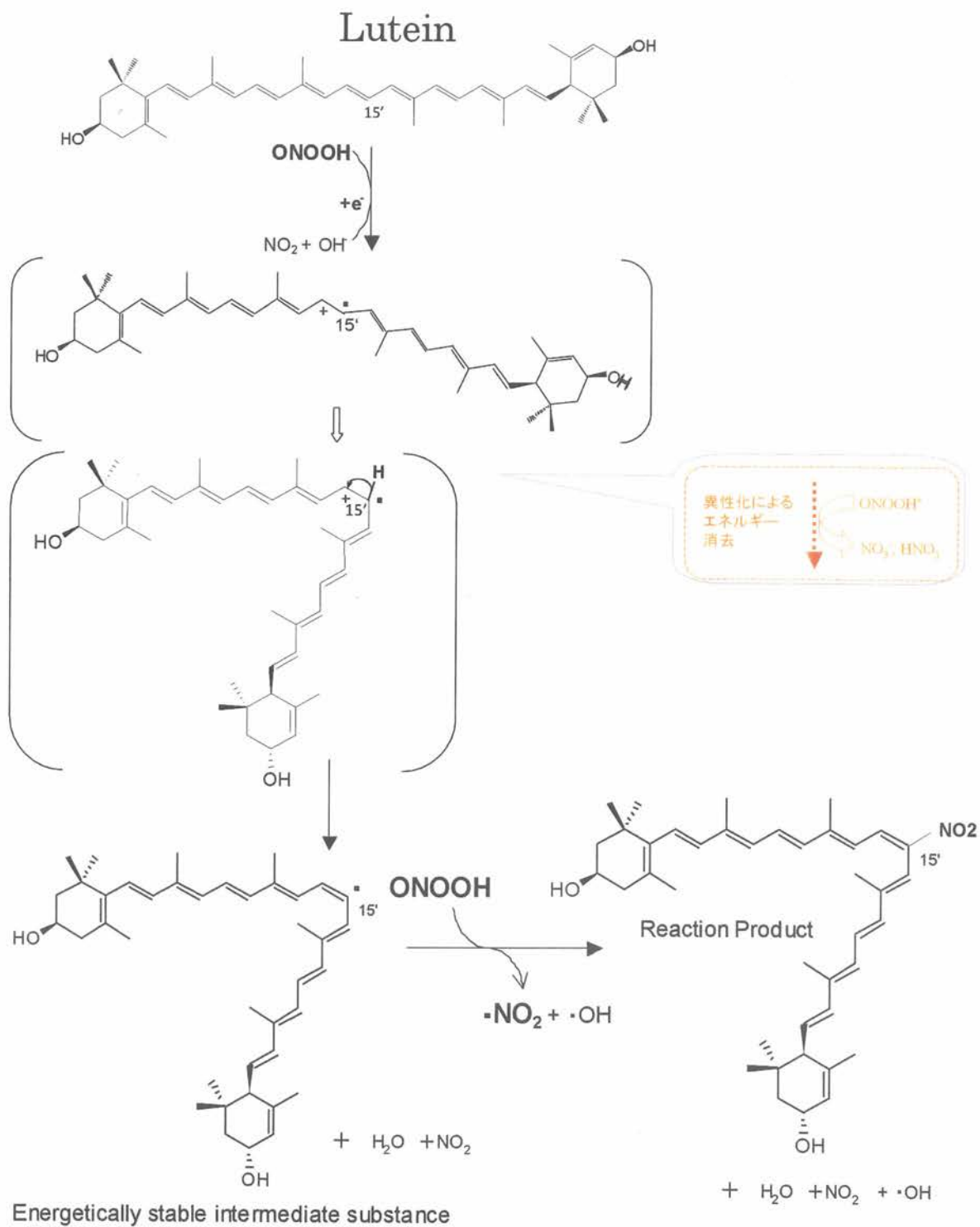
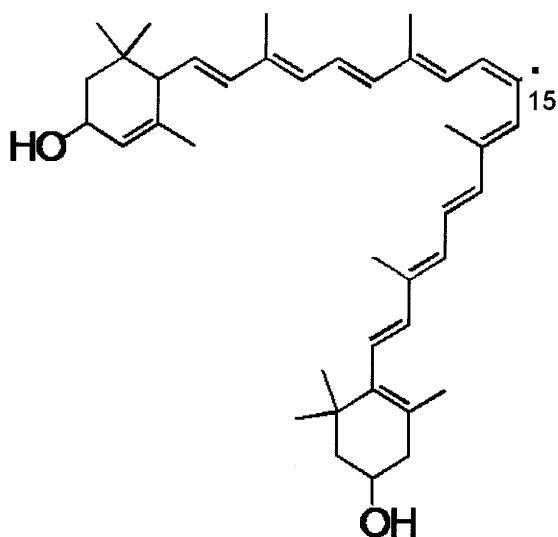


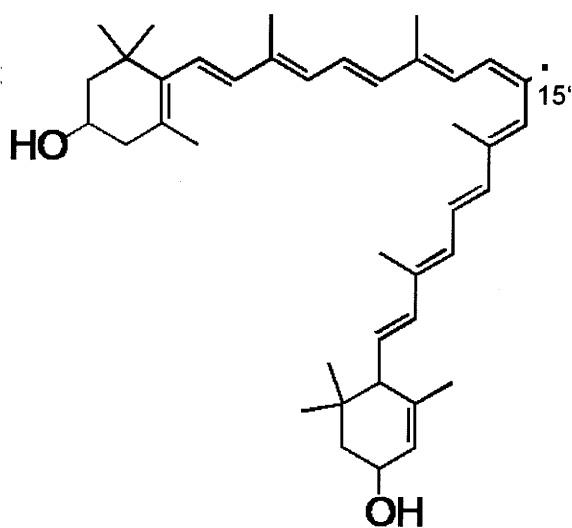
Fig. 12. Peroxynitrite Reaction Pathway with Lutein.

Table 4. Molecular Orbital Method of Lutein Radical.

14-*s-cis*-15-*cis*-Lutein Radical



14'-*s-cis*-15'-*cis*-Lutein Radical



Lutein Radical

cis doublebond				trans doublebond			
ラジカル位置	C14-C15	C15=C15'	C15'-C14'	ラジカル位置	C14-C15	C15=C15'	C15'-C14'
C15	trans	cis	trans	trans	trans	trans	trans
	13.0068kJ/mol			7.2341kJ/mol			
	s-cis	cis	trans	s-cis	trans	trans	
C15'	14- <i>s-cis</i> -15- <i>cis</i> -lutein radical			16.7883kJ/mol			
	0.0000kJ/mol			20.1243kJ/mol			
	trans	cis	s-cis	trans	trans	s-cis	
C15'	25.3258kJ/mol			7.2803kJ/mol			
	trans	cis	trans	s-cis	trans	trans	
	13.0317kJ/mol			20.1654kJ/mol			
C15'	s-cis	cis	trans	trans	trans	s-cis	
	25.3671kJ/mol			16.8375kJ/mol			
	trans	cis	s-cis	14'- <i>s-cis</i> -15'- <i>cis</i> -lutein radical			
0.0508kJ/mol							

14-*s-cis*-15-*cis*-Lutein Radical を規準とした相対エネルギー

この研究で、ルテインの ONOO<sup>-</sup> 消去活性がルテインのニトロ化により達成されることが判った。また、ルテインは、ONOO<sup>-</sup> 消去の結果オキサジン化合物となり、安定な消去活性を示す物質であると考えられた。従って、カロテノイドには活性窒素種によって誘発される疾患のリスクを低下させるのではないか。この証明のためには、疾病の ONOO<sup>-</sup> 原因説がより確かに説明される結果を待たなければならない。今後、ONOO<sup>-</sup> の発生と疾病の関連に関する研究が進み、ONOO<sup>-</sup> の消去と疾病リスクの因果関係がより明らかとなり、ルテインなどのカロテノイドによる疾病リスク回避の機構が解明されることを期待したい。

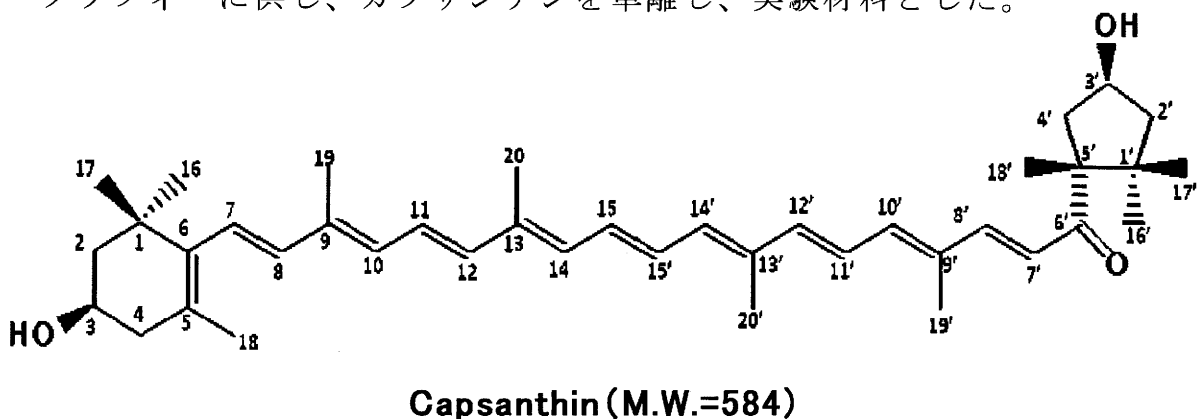
ONOO<sup>-</sup> 消去活性成分の構築では、ニトロ化によりオキサジンの様な生成物を作る化合物の設計も可能であろう。

## 第II章 カプサンチンとペルオキシナイトライトの反応について

カプサンチンは、パプリカの他、赤ピーマンや赤唐辛子に含まれているカロテノイドで、キサントフィル類の一種である赤色色素である。両端の環状構造が六員環と五員環で左右非対称であり、ポリエン構造の途中にケト基を持つというカロテノイドの中でも特異な構造を有する。抗酸化能は非常に優れており、リコピンと同等の抗酸化力を持つという報告もある。カプサンチンは発ガン予防<sup>49)</sup> やHDL-コレステロールの血中値を上昇させる<sup>50)</sup> などの効果もあると言われており、食品素材の成分として広く用いられている物質である。また、予防医学の領域においても注目されている。我々は、左右非対称構造を持つカプサンチンについてONOO<sup>-</sup>との反応生成物に関する報告は存在しないことから、カプサンチンの新たな反応生成物を得るため、ONOO<sup>-</sup>との反応物を調査した。

### 1. 実験材料

本研究では、東京化成工業株式会社より購入したパプリカ抽出物をアセトンに溶解させ、15%水酸化カリウムメタノール溶液を添加し、恒温槽にて37°Cで1時間反応させた。その後反応液に飽和食塩水を加え、石油エーテルにて抽出した。この反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、カプサンチンを単離し、実験材料とした。

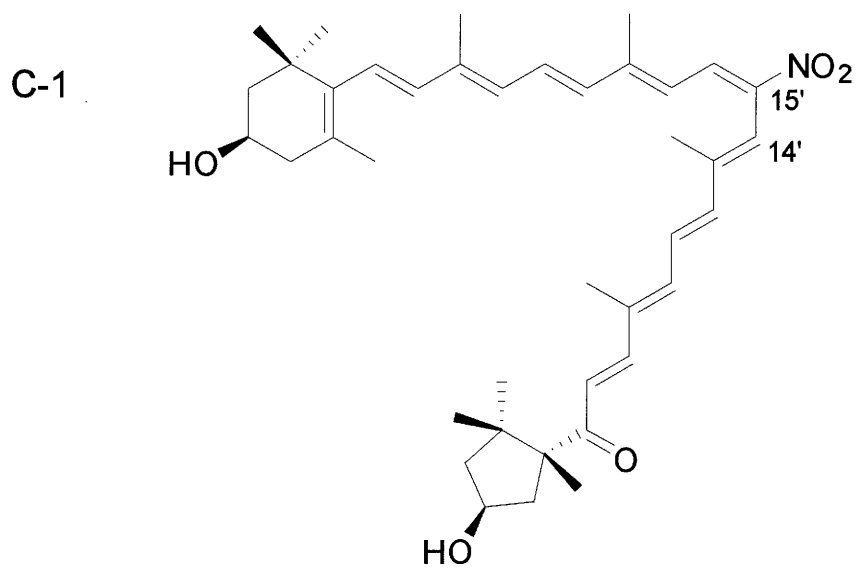


## 2. カプサンチンとペルオキシナイトライトの反応

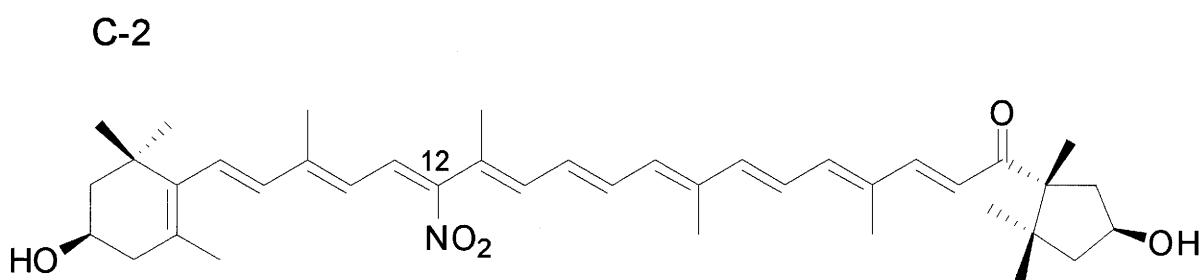
カプサンチン (All-trans-capsanthin) 20 mg を THF 5 ml に溶解させ、TFA 100  $\mu$  l を添加した。この溶液に対し、50 mM ONOO<sup>-</sup> 溶液 3 ml を添加し、速やかに攪拌し反応した。

## 3. ペルオキシナイトライト反応物の単離と構造決定

カプサンチンと ONOO<sup>-</sup>の反応後、反応液に飽和食塩水を加え、クロロホルムにて抽出した。有機層は無水硫酸ナトリウムにて脱水し、減圧濃縮し、HPLC で分析したのちシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC に供し、ニトロカプサンチンを含むフラクションを得た。次に、逆相 HPLC に供し、化合物 4 (C-1) 14'-*s-cis*-15'-Nitrocapsanthin (**4**) と化合物 5 (C-2) 12-Nitrocapsanthin (**5**) を単離し(Fig. 13)、各種機器分析に供した。



**14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin (4)**



**12-Nitrocapsanthin (5)**

**Fig. 13. Structures of Nitrocapsanthin.**



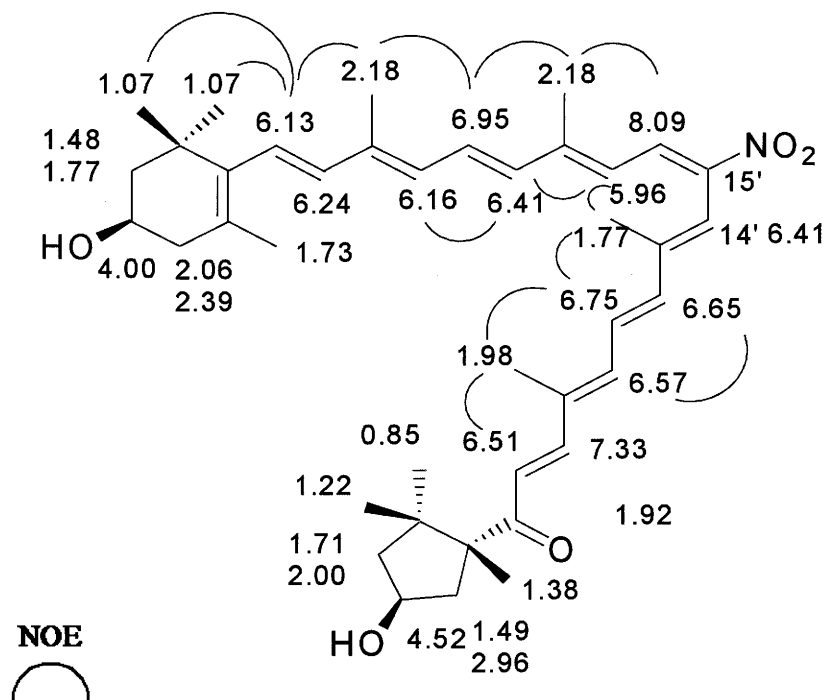


### 3-1. 14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin (4)

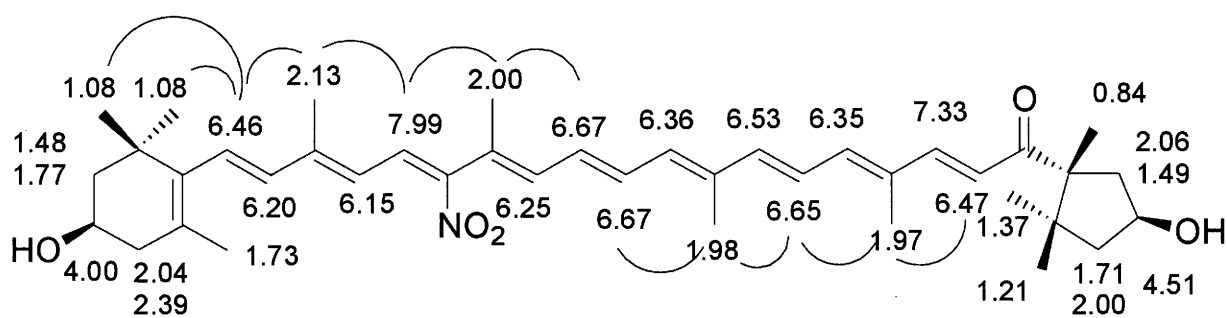
化合物 4 (C-1) は、可視・紫外分光スペクトルによる吸収極大を 363 nm と 482 nm に示した。また、この化合物の分子量は HRFAB-MS によって分子量 629.4099 及びその分子式は  $C_{40}H_{55}O_5N$  であることが判った。分子量からカプサンチンのニトロ化合物であると考えられた。 $^1H$ -NMR スペクトル、 $^{13}C$ -NMR スペクトルを測定し、解析した。 $^{13}C$ -NMR により 15' 位のシグナルが 145.1 ppm に低磁場にシフトしている事や  $^1H$ -NMR により 15' 位のプロトンのシグナルが確認できず、15 位のプロトンが 8.09 ppm に低磁場シフトし、14 位のプロトン 5.96 ppm とのカップリングが見られる。14 位と 15 位のプロトンが、カップリング乗数 12.0 Hz でそれぞれダブルットにシグナルが確認できることから 15' 位がニトロ基に置換され、20' 位のメチルプロトンと 14 位プロトンの相関がみられることから 15-15' 位の二重結合はシス配位であることが判った。NOESY 測定では 16 位と 17 位のメチルプロトンと 7 位プロトンの相関、19 位メチルプロトンと 7 位プロトン及び 11 位プロトンの相関、20 位メチルプロトンと 11 位及び 15 位プロトンの相関、19' 位メチルプロトンと 7' 位及び 11' 位プロトンの相関、20' 位メチルプロトンと 14 位及び 11' 位プロトンの相関が見られた。ルテインの結果などを総合して、C-1 は 14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin (4) であると決定した(Fig.14)。

### 3-2. 12-Nitrocapsanthin (5)

主生成物 C-2 の分子量は HRFAB-MS によって分子量 629.4081 及びその分子式は  $C_{40}H_{55}O_5N$  であることが判った。本物質は C-1 のニトロ基の位置異性体と考えられる。また、Fig. 14 (化合物 5) に示したような NOE 相関と 12 位のプロトンが観測されず、 $^{13}C$ -NMR により 12 位のシグナルが 152.4 ppm に低磁場にシフトしている事、 $^1H$ -NMR により 11 位のプロトンのケミカルシフトと 10 位プロトンとのカップリングから 12-Nitrocapsanthin (5) の構造を決定した。



14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin (4)



12-Nitrocapsanthin (5)

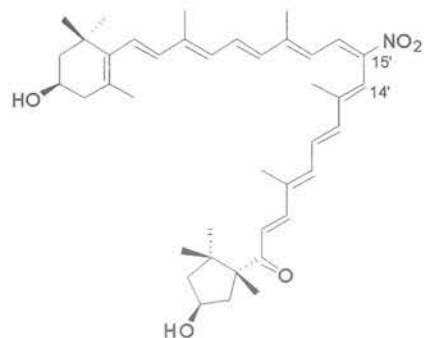
Fig. 14. Structures of Nitrocapsanthins (4 and 5).  
and their  $^1\text{H}$  NMR data ( $\delta$  in  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4. 考察

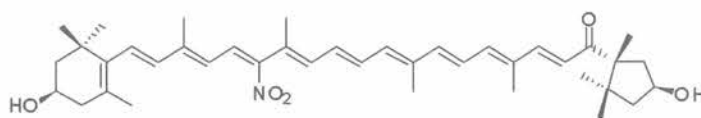
ニトロ化の生成物として C-1 及び C-2 が主に得られた。このことは、共役二重結合中央部を中心に ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化カプサンチンが生成した。このニトロ化は、ニトロ基の大きさのため、主にポリエン鎖への妨害がない、12 位または 15 位で起こったと考えられた。このニトロ化は立体障害の少ない側にニトロ化されたニトロカロテノイドが得られている。このことは、分子の立体障害が少ない側に位置するニトロラジカルがカプサンチンのラジカル炭素近傍に存在し、ラジカル反応が起っていると考えられた。また、ルテインでの結果から、二重結合がシス化した状態で安定なラジカル体となった場合は、シス体に異性化した位置にニトロ化した化合物が得られる。このようにラジカルカロテノイドにニトロラジカルがアタックし、結果としてニトロ化カロテノイドを生成したと考えられる。カプサンチンでは、14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin (4) と 12-Nitrocapsanthin (5) が得られた。また、分子軌道法 (Table 5) によりニトロ化体のエネルギー的に安定な構造物は、必ずしも優位に得られない。ニトロカプサンチンの生成は、ニトロカプサンチンの分子軌道法結果からも、ラジカルカロテノイドとニトロラジカルによる反応を支持している。共役二重結合部分のラジカル化状態は、存在率の違いはあるかもしれないが、ランダムに起こっており、メチル基の立体障害がない側にニトロラジカルが存在した場合、ラジカルカプサンチンの立体障害の少ない位置からのニトロ化アタック、カプサンチンのラジカル位置の確率により、ニトロ化カロテノイドが生成するのであろう。12 位にニトロ化したカプサンチンでは、立体障害の少ない側からそのままニトロ化されたトランス体のままのニトロカプサンチンが得られている。

Table 5. Molecular Orbital Method of Nitrocapsanthin.

	<i>trans</i>		<i>Cis</i>	
	<i>s-trans</i>	<i>s-cis</i>	<i>s-trans</i>	<i>s-cis</i>
Nitro-15	21.98	16.10	6.54	1.18
Nitro-15'	22.06	16.10	6.35	0.00
Nitro-14	19.99	24.39	20.17	21.52
Nitro-14'	22.67	26.73	22.46	23.45
Nitro-12	18.94	16.16	2.00	1.62
Nitro-12'	24.66	23.39	8.59	8.53
Nitro-11	35.43	32.96	17.56	15.01
Nitro-11'	38.12	37.23	21.42	19.26
Nitro-10	18.40	21.42	18.63	19.81
Nitro-10'	30.04	33.91	24.92	27.27
Nitro-8	15.21	18.27	17.14	11.64
Nitro-8'	39.97	42.80	35.60	35.61
Nitro-7	14.87	17.33	6.63	6.70
Nitro-7'	52.84	59.52	53.57	61.64



14'-s-cis-15'-Nitrocapsanthin (4)



12-Nitrocapsanthin (5)

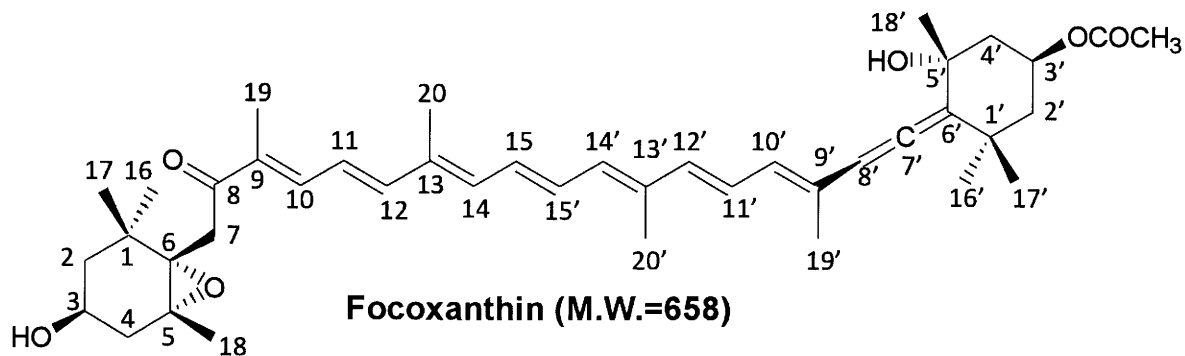
計算条件 使用プログラム: 非経験的  
分子軌道法計算プログラムGaussian09  
基底関数: 6-31G(d)計算温度: 絶対零度

### 第三章 フコキサンチンとペルオキシナイトライトの反応について

フコキサンチンは、日本などで古くから食べられている昆布やワカメ、ヒジキなどの褐藻類に含まれる赤褐色のカロテノイド色素である。日本は、生活習慣病の発生率が低く、欧米に比べワカメ、コンブ等の食習慣が豊富である。この食習慣が健康や長寿に寄与していると考えられ、世界中の研究者によって海藻中の有効成分の研究が行われている。その有効性を示す一つの物質がフコキサンチンと考えられている。フコキサンチンは Maeda らの研究で、褐色脂肪細胞に特異的に存在するタンパク質である UCP1 (uncoupling protein 1) の発現を白色脂肪細胞において促すことで、脂肪組織における脂肪の燃焼を助ける作用が認められている<sup>51, 52)</sup>。フコキサンチンは、長寿やダイエットなどで注目されている物質である。生体障害に起因すると言われている ONOO<sup>-</sup>の消去に対して、フコキサンチンがどのような作用が認められるか確認するためこの研究を行った。我々は、左右非対称構造を持つフコキサンチンについて ONOO<sup>-</sup>との反応生成物に関する報告は存在しないことから、フコキサンチンの新たな反応生成物を得るため、ONOO<sup>-</sup>との反応物を調査した。

#### 1. 実験材料

北海道大学、細川雅史准教授より提供して頂いたワカメの溶媒抽出物を HPLC にて精製したフコキサンチンを実験材料とした。



## 2. フコキサンチンとペルオキシナイトライドの反応

フコキサンチン (All-trans-fucoxanthin) 68.4 mg を THF 6.84 ml に溶解させ、TFA 96  $\mu$ l を添加した。この溶液に対し、50 mM ONOO<sup>-</sup> 溶液 965  $\mu$ l を添加し、速やかに攪拌し反応した。

## 3. 反応生成物の単離と構造決定

フコキサンチンと ONOO<sup>-</sup> の反応後、反応液に飽和食塩水を加え、クロロホルムにて抽出した。有機層は無水硫酸ナトリウムにて脱水し、減圧濃縮し、HPLC で分析したのちシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC に供し、ニトロフコキサンチンを含むフラクションを得た。さらに、分取用逆相 HPLC に供し、化合物 6 (F-1) 14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin (6) 及び化合物 7 (F-2) 11-cis-11-Nitrofucoxanthin (7) を主成分として単離し、各種機器分析に供した。

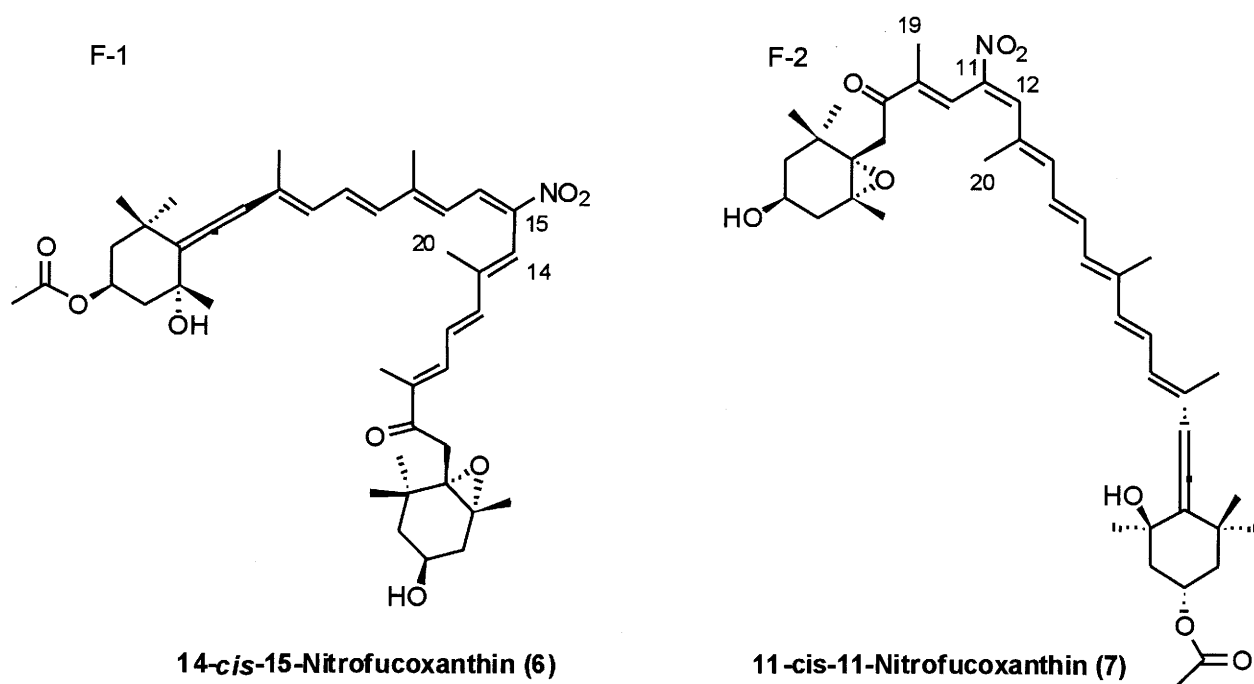
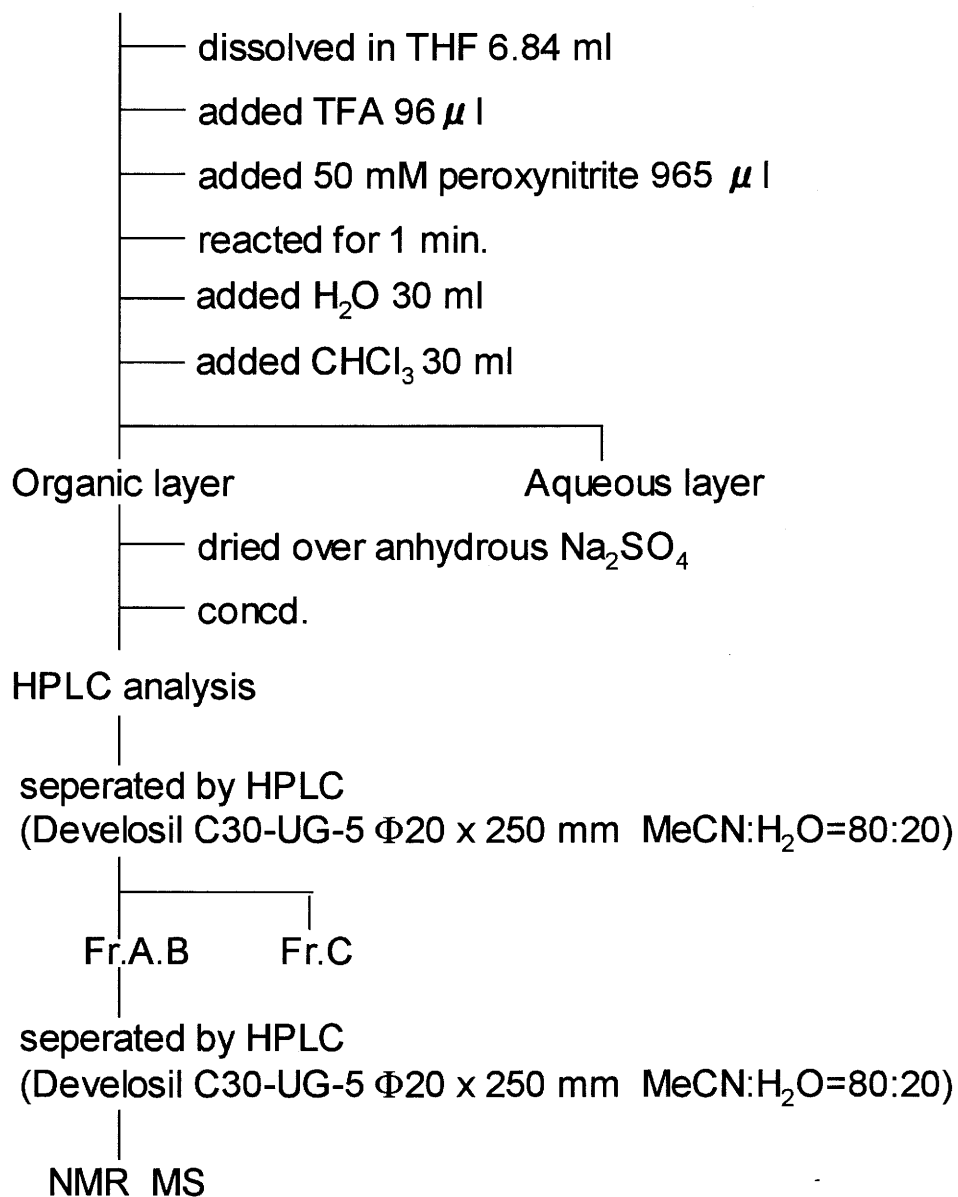


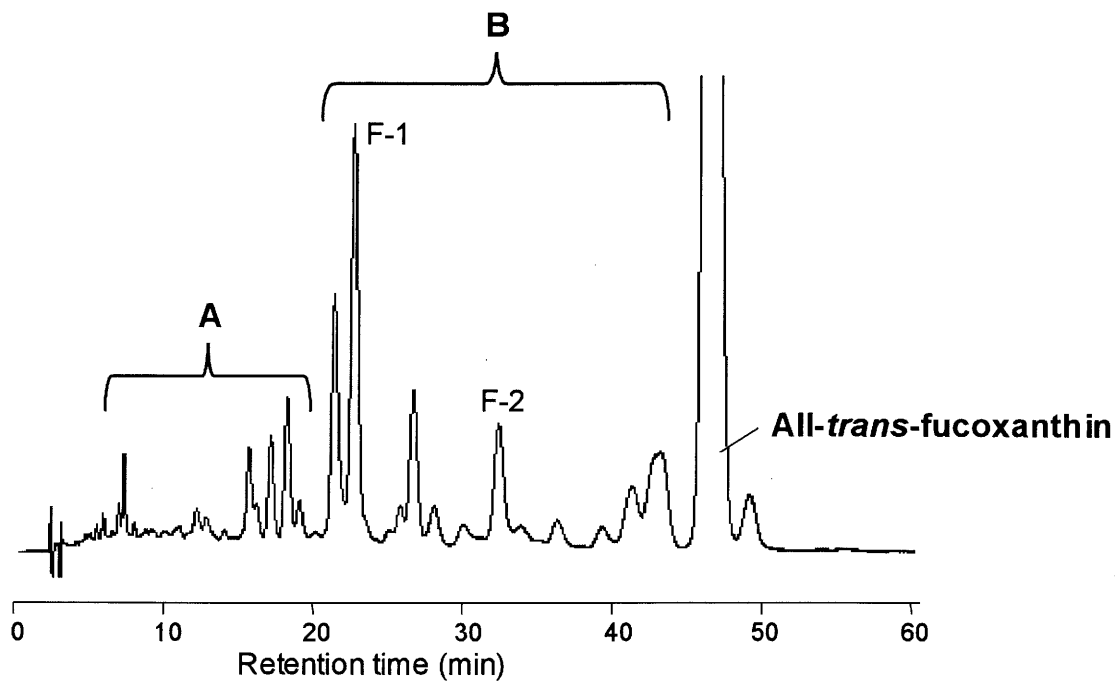
Fig. 15. Structures of Nitrofucoxanthin.

All-*trans*-fucoxanthin 68.4 mg



Scheme 3. Procedure for Reaction of Fucoxanthin with Peroxyxynitrite and Separation.

A: 酸化の開裂を起こしたと示唆される化合物  
B: 共役系が減少していない化合物



Column: Develosil C30-UG-5 f4.6x250 mm Flow rate: 1 ml/min  
Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 77:23 Detector: 450 nm

Fig. 16. HPLC Analysis of Peroxynitrite Reaction Products with Fucoxanthin.



### 3-1. 14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin (6)

化合物 6 (F-1) は、UV スペクトルによる吸収極大を 346 nm と 456 nm にブロードな吸収を示した。この化合物の分子量は HRFAB-MS によってその分子式は  $C_{42}H_{58}O_8N$  であることが判った。フコキサンチンは分子式  $C_{42}H_{58}O_6$  であり分子量 658.91 であることから、フコキサンチンのニトロ化合物が得られた。15 位のプロトンのシグナルが確認できないことから 15 位のプロトンがニトロ基に置換されていると考えた。ニトロ基の置換位置はカプサンチンの場合と同様メチンから 4 級炭素に変わった炭素シグナルを HMBC などにより帰属する事により 15 位炭素であることが明らかになった。15' 位のプロトンと 14' 位のプロトンが 12.0 Hz でカップリングしていることから、14'-s-trans である。NOE 相関においてフコキサンチンと比較して 20 位と 15 位の相関以外の違いが見られないことから 15 位の二重結合がシス体 (15-cis) であり 14-s-cis 構造であると推定した。さらに NOESY による NOE 相関から Fig.17 に示す立体構造を決定した。

### 3-2. 11-cis-11-Nitrofucoxanthin (7)

化合物 7 (F-2) は、UV スペクトルによる吸収極大を 346 nm と 456 nm にブロードな吸収を示した。しかし、フコキサンチンは 350-550 nm の波長域を吸収し、448 nm 付近に吸収極大を示すため、UV だけではニトロ体を予測できなかった。この化合物の分子量は HRFAB-MS によってその分子式は  $C_{42}H_{58}O_8N$  であることが判った。フコキサンチンは分子式  $C_{42}H_{58}O_6$  であり分子量 658.91 であることから、フコキサンチンのニトロ化合物が得られたと考えられた。11 位のプロトンのシグナルが確認できないことから 11 位のプロトンがニトロ基に置換されている事が分かった。UV スペクトル分析において 334 nm に特徴的な吸収波長を有する事から、ポリエン構造のいずれかがシス化していると考えられた。NOE 相関において 20 位と 10 位の相関が見られたために 11-cis 構造を推定した。さらに NOESY による NOE 相関から Fig.17 に示す立体構造を決定した。

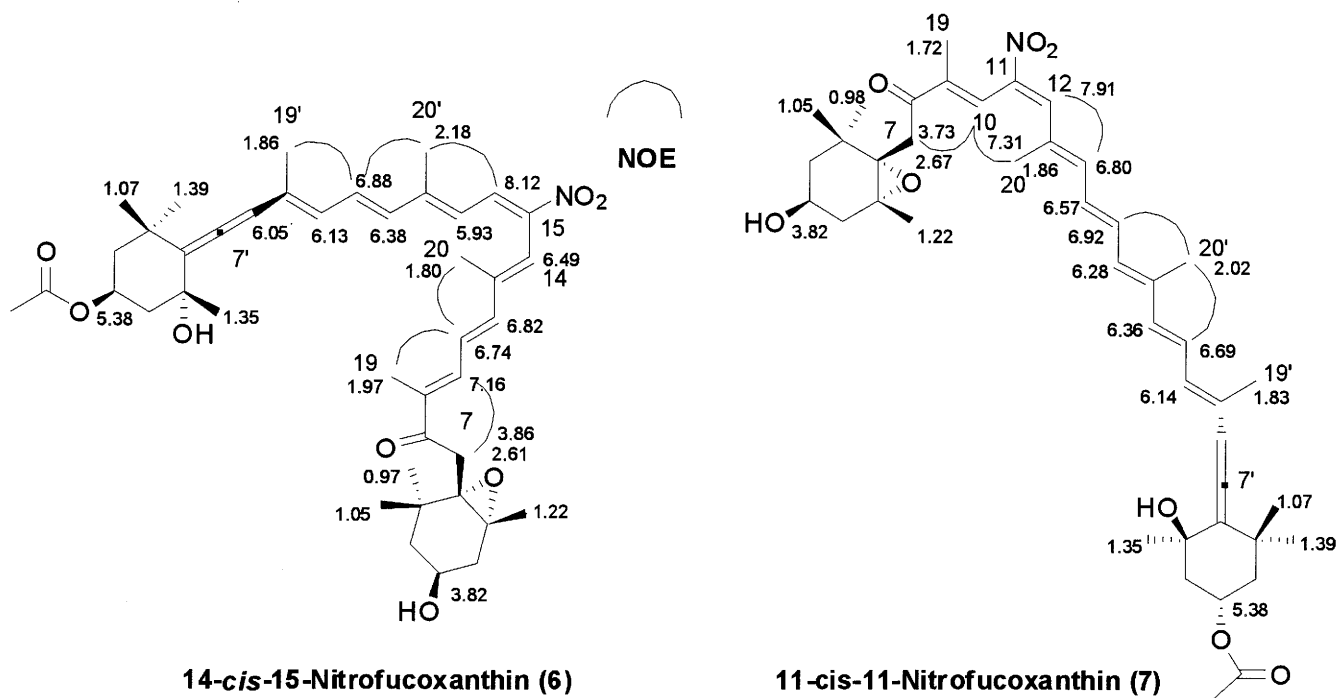


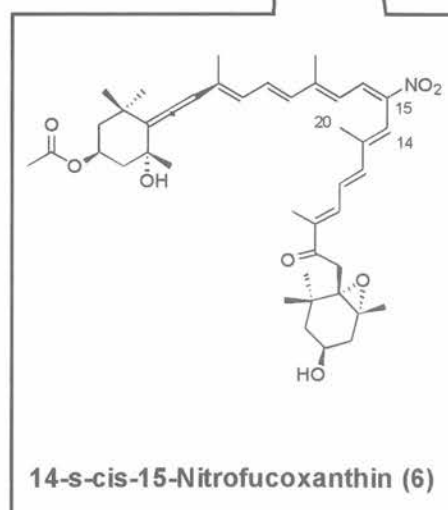
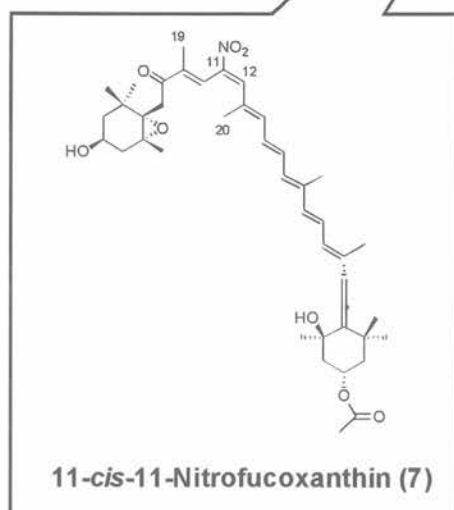
Fig. 17. Structures of Nitrofucoxanthin and their  $^1\text{H}$  NMR data ( $\delta$  in  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4. 考察

フコキサンチンでは、14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin (6) と 11-cis-11-Nitrofucoxanthin (7) が得られた。共役二重結合部分のラジカル化は位置による存在率の違いはあるかもしれないが、ランダムに起こっており、ラジカルの安定構造とニトラジカルのカロテノイドラジカルのラジカル位への接近が可能な場合により多くの反応物を得ると考えられる。11位のニトロ化は、11位の二重結合がシス化した配位にラジカル存在したことで、メチル基の立体障害が少なくなり、ニトラジカルのアタックにより、シス体のニトロ化カロテノイドを生成したと考えられる。このニトロ化は、ニトロ基の大きさのため、主にポリエン鎖への妨害がないか、異性かして立体障害が少なくなった11位または15位で起こったと考えられた。11位へのニトロ化は、11位の二重結合が異性化ラジカルとなった後、ニトラジカルが19位のメチル基側より11位のラジカルに結合し、11-シス体となったと考えられる。この結果、11位が異性化する前に、19位側の11位へのニトロ基などの反応は考えにくく、カロテノイドラジカルが生成した後、ニトラジカルが反応することを支持している。このニトロ化フコキサンチンは、立体配置的には必ずしも安定なコンフォメーションを持った化合物は得られない(Table 6)。

Table 6. Molecular Orbital Method of Nitrofucoxanthin.

	<i>trans</i>		<i>cis</i>	
	<i>s-trans</i>	<i>s-cis</i>	<i>s-trans</i>	<i>s-cis</i>
Nitro-15	21.35	15.55	5.71	26.77
Nitro-15'	23.79	18.96	8.44	32.35
Nitro-14	24.17	28.24	23.18	24.20
Nitro-14'	18.91	23.55	19.19	21.04
Nitro-12	28.48	29.04	13.88	13.68
Nitro-12'	17.47	14.47	0.00	0.40
Nitro-11	37.06	39.45	21.76	103.08
Nitro-11'	34.04	30.54	17.30	1907.48
Nitro-10	39.21	32.00	29.94	38.10
Nitro-10'	15.94	17.81	17.19	17.72



計算条件                    使用プログラム: 非経験的  
 分子軌道法計算プログラムGaussian09  
 基底関数: 6-31G(d) 計算温度: 絶対零度

## 第IV章 カロテノイドによる活性窒素種に起因する炎症予防に関する考察

活性窒素種であるペルオキシナイトライト( $\text{ONOO}^-$ : 活性窒素種)や一酸化窒素( $\cdot\text{NO}$ )などは強い酸化物質であり、生物学上のいくつかの障害を起こす可能性を持っている。 $\text{ONOO}^-$ は、DNA切断を引き起こす物質として知られ、ニトロ化によるタンパク質変性およびLDL (low-density lipoprotein: リポタンパク)のヒドロキシル化と脂質の過酸化を引き起こすことで知られている。また、全身性炎症反応症候群(SIRS: systemic inflammatory response syndrome)は、外傷、手術、広範囲熱傷、ショックなどで炎症性サイトカインの産生が高まると出現する<sup>53)</sup>。このようなSIRS病態において、活性酸素種が過剰産生され、炎症やアポトーシスが進行することが確認されている<sup>54-56)</sup>。重症な場合は、様々な臓器で抗酸化分子が低下しているばかりか、活性酸素種の産生自体が亢進していることが検証されている<sup>57-59)</sup>。また、活性酸素はNF- $\kappa$ B (タンパク複合体)やAP-1などを活性化し、サイトカイン産生や接着因子の発現を誘導する<sup>60-62)</sup>。血管平滑筋細胞で産生されたスーパーオキシドは<sup>63)</sup>、血管拡張のためのサイトカインとして放出したNOを消費し、 $\text{ONOO}^-$ となって細胞毒性などを示すと考えられている。このNOの減少は、内皮依存性血管反応を減弱させ、血圧上昇につながり、さらに動脈硬化を促進する可能性が示唆されている。また、NOを減少させる結果、NF- $\kappa$ Bなどの転写因子を活性化しサイトカインの産生や接着因子の発現を誘導することにより血管の炎症を促進する。その他にも、 $\text{ONOO}^-$ は細胞外マトリックスの改変において重要な役割を担っているmatrix metalloproteinase (MMP)やプロスタグランジン合成系の酵素であるcyclooxygenase (COX)活性化することにより、宿主の炎症反応を増強することが指摘されている。従って、NOや $\text{ONOO}^-$ は炎症反応のメディエータとして機能しているといえる。 $\text{ONOO}^-$ の直接の作用としては、数々の酵素やタンパク質のチロシン残基などをニトロ化し、酵素活性や生理機能を弱めることによる炎症反応への影響が考えられる。酵素やタンパク質のニトロ化をカロテノイド自身がニトロ化されることで遮断し、生体内の炎症反応を抑制できると考えられる。炎症反応

で重要なメディエータである NF- $\kappa$ B は、広義の炎症反応で機能する転写因子（サイトカイン）である。その活性は I $\kappa$ B（タンパク質）との会合と分解により制御されている。NF- $\kappa$ B の活性化は IKK  $\beta$ （酵素）が I $\kappa$ B  $\alpha$ （タンパク質）の N 末端をリン酸化して分解を誘導する機構と、IKK  $\alpha$ （酵素）が p100（タンパク質）をリン酸化して分解を誘導する機構が知られており、ユビキチンリガーゼ（酵素）である  $\beta$ -TrCP がリン酸化された I $\kappa$ B に直接に会合してユビキチン化を引き起こすことにより分解を誘導し、NF- $\kappa$ B が活性化される。これら炎症発現のメカニズムは多くのタンパク質や酵素により制御されている。この炎症発現メカニズムの中のタンパク質や酵素が ONOO<sup>-</sup>によりニトロ化されることで、炎症反応への様々な影響が考えられる。実例として、アスタキサンチンでは、カラゲニンによる炎症反応の抑制<sup>64)</sup>や乳腺炎の治療への効果<sup>65)</sup>の報告がある。また、アスタキサンチンが NF- $\kappa$ B 活性化の抑制と IKK 活性抑制、I $\kappa$ B  $\alpha$ I 分解抑制することが報告されている<sup>66)</sup>。これらの研究が進み、炎症発現に対する ONOO<sup>-</sup>影響が今後明らかとなってくると思われる。また、人を死に至らせるような全身性炎症反応症候群から考察しても、ONOO<sup>-</sup>による多臓器不全（組織酵素利用障害）時のミトコンドリアやペルオキシソームの酸素利用障害なども ONOO<sup>-</sup>の関与が考えられ、今後の生体内での機構解明の進展で、ONOO<sup>-</sup>消去物（カロテノイド）の大きな可能性が示されることが期待される。

## 実験の部

### 1. 試薬と機器

本研究に使用した溶媒は、抽出操作は市販一級溶媒、その他は市販特級溶媒を使用した。HPLCには大量分取クロマトグラム用アセトニトリルを用いた。ONOO<sup>-</sup> (peroxynitrite) の合成は市販特級溶媒を使用した。ONOO<sup>-</sup> の反応において市販有機合成用 THF を用いた。

実験に使用した機器と器具は下記の通りである。

NMR: JEOL LAMBADA 500 NMR spectrometer

MS: JEOL JMS-DX 303 MASS spectrometer

UV: JASCO U best-30

IR: JASCO FT/IR-400

シリカゲル: 和光純薬工業株式会社、Wako C-300

### ルテイン反応生成物の分析条件

Pump: JASCO PU-980

3-Line degasser: JASCO DG-980-50

Column oven: Sugai U-620

Detector: JASCO MD-910

Column: Develosil C30-UG-5  $\phi$  4.6x250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 90:10

Flow rate: 1 ml/min

Temp: 30°C

Detector: 447nm

#### ルテイン反応生成物分取条件

Pump: JASCO PU-986

3-Line degasser: JASCO DG-980-50

Column oven: JASCO CO-965

Detector: JASCO UV-970

Column: Develosil C30-UG-5  $\phi$  20x250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 92:8

Flow rate: 10 ml/min

Temp: 32°C

Detector: 447nm

#### カプサンチン反応生成物の分析条件

Pump: Waters 600 Pump

4-Line degasser: Waters In-Line Degasser AF

Column oven: Waters Column Heater module

Detector: Waters 2996 Photodiode Array Detector

Column: Develosil ODS  $\phi$  4.6×250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 75:25

Flow rate: 1.0 ml/min

Temp: 40°C

Detector: 460nm



### カプサンチン反応生成物分取条件

Pump: JASCO PU-986

3-Line degasser: JASCO DG-980-50

Column oven: JASCO CO-965

Detector: JASCO UV-970

Column: Develosil ODS  $\phi$  20 $\times$ 250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 75:25

Flow rate: 10.0 ml/min

Temp: 40°C

Detector: 460nm

### フコキサンチン反応生成物分析条件

Pump: JASCO PU-980

3-Line degasser: JASCO DG-980-50

Column oven: Sugai U-620

Detector: JASCO MD-910

Column: Develosil C30-UG-5  $\phi$  4.6 $\times$ 250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 77:23

Flow rate: 1 ml/min

Temp: 30°C

Detector: 450nm

フコキサンチン反応生成物分取条件

Pump: JASCO PU-986

3-Line degasser: JASCO DG-980-50

Column oven: JASCO CO-965

Detector: JASCO UV-970

Column: Develosil C30-UG-5  $\phi$  20x250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 80:20

Flow rate: 10 ml/min

Temp: 32°C

Detector: 450nm

フコキサンチン分取条件

Pump: JASCO PU-986

3-Line degasser: JASCO DG-980-50

Column oven: JASCO CO-965

Detector: JASCO UV-970

Column: Develosil C30-UG-5  $\phi$  20x250 mm

Mobile phase: MeCN: H<sub>2</sub>O = 90:10

Flow rate: 10 ml/min

Temp: 32°C

Detector: 450nm

## 2. 実験方法と機器データ

### 2-1. ONOO<sup>-</sup>の合成

氷冷した 0.7 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 0.6 M HCl 水溶液 300 ml, 氷冷した 0.6 M NaNO<sub>2</sub> 水溶液 300 ml をそれぞれ三角フラスコに準備した。氷冷した 1.5 M NaOH 水溶液 600 ml を吸引瓶に入れ、吸引しながら漏斗上で準備した 2 液を反応させた。この溶液を -20°C で数時間凍らせると上層に黄色い ONOO<sup>-</sup> の薄い層が形成される。ONOO<sup>-</sup> は 1.2 M NaOH 水溶液中、-20 °C で保存した。

ONOO<sup>-</sup> の濃度は UV 302 nm で測定した。(1.2 M NaOH 中で  $\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

### 2-2. ルテイン

ルテイン(All-trans-lutein) 400 mg を THF 50 ml に溶解させ (最終濃度 5.7 mM)、TFA 800  $\mu$ l を添加した。この溶液に対し、50 mM ONOO<sup>-</sup> 溶液 3 ml を添加し、速やかに攪拌し、1 分間反応させた。ルテインと ONOO<sup>-</sup> の反応物に飽和食塩水を加え、ジクロロメタンにて抽出した。減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC と逆相 HPLC に供し、フラクション化合物 1 (L-1) 14-*s-cis*-15-Nitrolutein (1)、化合物 2 (L-2) 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein (2)、化合物 3 (L-3) Lutein-6H-1,2-oxazine (3) を単離し、各種機器分析に供した。

#### L-1. (14-*s-cis*-15-Nitrolutein) (1)

UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (Et<sub>2</sub>O) nm 322, 465.

HR-FAB MS 613.4139 (M<sup>+</sup>, calcd for C<sub>40</sub>H<sub>55</sub>O<sub>4</sub>N, 613.4131).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  0.85 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.00 (H<sub>3</sub>-17', s), 1.09 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.09 (H<sub>3</sub>-17, s), 1.37 (H-2' $\alpha$ , dd, J = 14.0, 7.0), 1.48 (H-2 $\alpha$ , dd, J = 12.0, 11.0), 1.62 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.75 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.77 (H<sub>3</sub>-20, s), 1.77 (H-2 $\beta$ , ddd, J =

12.0, 4.0, 1.5), 1.84 (H-2'  $\beta$ , dd, J = 14.0, 6.0), 1.95 (H<sub>3</sub>-19', s), 1.99 (H<sub>3</sub>-19, s), 2.04 (H-4 $\alpha$ , dd, J = 18.0, 10.0), 2.16 (H<sub>3</sub>-20', s), 2.40 (H-4 $\beta$ , ddd, J = 18.0, 6.0, 1.5), 2.43 (H-6', d, J = 10.0), 4.00 (H-3, m), 4.25 (H-3', m), 5.56 (H-4', s), 5.56 (H-7', dd, J = 15.0, 10.0), 5.86 (H-14', d, J = 11.0), 6.08 (H-10, d, 11.5), 6.08 (H-10', d, J = 11.0), 6.10 (H-7, d, J = 16.0), 6.16 (H-8, d, J = 16.0), 6.16 (H-8', d, J = 15.0), 6.19 (H-14, s), 6.40 (H-12', d, J = 15.0), 6.50 (H-12, d, J = 15.0), 6.79 (H-11, dd, J = 15.0, 11.5), 6.90 (H-11', dd, J = 15.0, 11.0), 8.05 (H-15', d, J = 12.0).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  13.1 (C-19), 13.3 (C-19'), 13.6 (C-20'), 15.3 (C-20), 20.5 (C-17), 22.9 (C-18, 18'), 24.3 (C-17'), 28.7 (C-16), 29.5 (C-16'), 34.0 (C-1'), 37.1 (C-1), 42.6 (C-4), 44.6 (C-2'), 48.4 (C-2), 54.9 (C-6'), 65.0 (C-3), 65.9 (C-3'), 118.9 (C-14), 124.6 (C-4'), 125.6 (C-14'), 126.8 (C-5, 7), 127.9 (C-11), 130.0 (C-10'), 130.4 (C-11', 15'), 131.1 (C-7'), 131.2 (C-10), 135.7 (C-12), 136.1 (C-9', 12'), 137.6 (C-5', 6, 8'), 138.1 (C-9), 138.2 (C-8), 142.8 (C-13), 145.8 (C-15), 149.1 (C-13').

#### L-2. (14'-s-cis-15'-Nitrolutein) (2)

UV-vis  $\lambda_{\max}$  (Et<sub>2</sub>O) nm 343, 447.

HR-FAB MS 613.4139 (M<sup>+</sup>, calcd for C<sub>40</sub>H<sub>55</sub>O<sub>4</sub>N, 613.4131).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  0.86 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.10 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.08 (H<sub>3</sub>-16 and 17, 2s), 1.37 (H-2' $\alpha$ , dd, J = 14.0, 7.0), 1.48 (H-2 $\alpha$ , dd, J = 12.0, 11.0), 1.64 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.74 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.76 (H<sub>3</sub>-20', s), 1.77 (H-2 $\beta$ , ddd, J = 12.0, 4.0, 1.5), 1.85 (H-2'  $\beta$ , dd, J = 14.0, 6.0), 1.93 (H<sub>3</sub>-19', s), 2.01 (H<sub>3</sub>-19, s), 2.04 (H-4 $\alpha$ , dd, J = 18.0, 10.0), 2.16 (H<sub>3</sub>-20, s), 2.40 (H-4 $\beta$ , ddd, J = 18.0, 6.0, 1.5), 2.43 (H-6', d, J = 10.0), 4.00 (H-3, m), 4.25 (H-3', m), 5.40 (H-7', dd, J = 15.0, 10.0), 5.56 (H-4', s), 5.96 (H-14, d, J = 12.0), 6.10 (H-10', d, J = 11.0), 6.10 (H-7, d, J = 16.0), 6.16 (H-8, d, J = 16.0), 6.16 (H-10, d, J = 11.5), 6.20 (H-8', d, J = 15.0), 6.30 (H-14', s), 6.40 (H-12, d, J = 15.0), 6.49 (H-12',

d, J = 15.0), 6.75 (H-11', dd, J = 15.0, 11.0), 6.95 (H-11, dd, J = 15.0, 11.5), 8.06 (H-15, d, J = 12.0).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 13.2 (C-19, 19'), 13.6 (C-20), 15.3 (C-20'), 20.5 (C-17), 21.6 (C-18), 22.9 (C-18'), 24.3 (C-17'), 28.7 (C-16), 29.5 (C-16'), 34.0 (C-1'), 37.1 (C-1), 42.6 (C-4), 44.6 (C-2'), 48.4 (C-2), 54.9 (C-6'), 65.0 (C-3), 65.9 (C-3'), 119.0 (C-14'), 124.6 (C-4'), 125.8 (C-14), 126.8 (C-5, 7), 127.8 (C-11', 12'), 130.1 (C-7', 10'), 130.2 (C-10), 130.4 (C-11, 15), 136.1 (C-9, 12), 137.6 (C-5', 6, 8'), 138.0 (C-8), 138.1 (C-9'), 142.8 (C-13'), 145.8 (C-15'), 149.1 (C-13).

### L-3. (Lutein-6H-1,2-oxazine) (3)

UV-vis λ<sub>max</sub> (Et<sub>2</sub>O) nm 430, 457, 486.

HR-FAB MS 597.4173 (M<sup>+</sup>, calcd for C<sub>40</sub>H<sub>55</sub>O<sub>3</sub>N, 597.4182).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 0.85 (H<sub>3</sub>-17', s), 1.00 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.23 (H-4α, dd, J = 13.0, 4.0), 1.25 (H-2α, overlapped), 1.26 (H<sub>3</sub>-17, s), 1.31 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.37 (H-2'α, dd, J = 13.0, 7.0), 1.60 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.62 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.85 (H-2'β, dd, J = 13.0, 6.0), 1.91 (H<sub>3</sub>-19', s), 1.98 (H<sub>3</sub>-20', s), 1.99 (H<sub>3</sub>-20, s), 2.02 (H-2β, ddd, J = 13.0, 4.0, 2.0), 2.17 (H<sub>3</sub>-19, s), 2.41 (H-6', d, J = 10.0), 2.53 (H-4β, ddd, J = 13.0, 4.0, 2.0), 4.22 (H-3, m), 4.25 (H-3', m), 5.44 (H-7', dd, J = 15.5, 10.0), 5.55 (H-4', br s), 6.14 (H-8', d, J = 15.5), 6.14 (H-10', d, J = 11.0), 6.24 (H-7, s), 6.24 (H-12, d, J = 15.0), 6.25 (H-14', d, J = 11.0), 6.31 (H-14, d, J = 11.0), 6.36 (H-12', d, J = 15.0), 6.62 (H-11', dd, J = 15.0, 11.0), 6.64 (H-15, m), 6.64 (H-15', m), 6.69 (H-11, dd, J = 15.0, 11.0), 8.30 (H-10, d, J = 11.0).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 12.7 (C-20), 12.8 (C-20'), 13.1 (C-19'), 15.1 (C-19), 22.9 (C-18'), 23.4 (C-18), 24.2 (C-17'), 26.5 (C-17), 29.4 (C-16), 29.5 (C-16'), 34.0 (C-1'), 34.8 (C-1), 44.6 (C-2'), 45.9 (C-4), 51.4 (C-2), 54.9 (C-6'), 65.6 (C-3), 65.9 (C-30), 80.1 (C-5), 116.1 (C-7), 124.5 (C-4'),

125.1 (C-11'), 128.3 (C-9), 128.8 (C-7'), 129.8 (C-15), 129.9 (C-11), 130.7 (C-15'), 130.8 (C-10'), 132.4 (C-12), 132.5 (C-13, 13'), 134.1 (C-10), 134.5 (C-14), 135.3 (C-9'), 137.1 (C-12', 14'), 137.7 (C-8'), 138.0 (C-5'), 142.6 (C-8), 156.3 (C-6);

ピリジン中で無水酢酸と1時間室温で反応し、ジアセチル体を得た。この化合物の分子量はFAB MSで $m/z$  681を示した。

### 2-3. カプサンチン

カプサンチン (All-trans-capsanthin) 20 mg を THF 5 ml に溶解させ、TFA 100  $\mu$ l を添加した。この溶液に対し、50 mM ONOO<sup>-</sup> 溶液 3 ml を添加し、速やかに攪拌し 3 分間反応した。この反応を 20 回行い、カプサンチンを反応させた。カプサンチンと ONOO<sup>-</sup>の反応物に飽和食塩水を加え、ジクロロメタンにて抽出した。減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC に供し、フラクション化合物 4 (C-1) 14-*s-cis*-15-Nitrocapsanthin (4) と化合物 5 (C-2) 12-Nitrocapsanthin (5) を単離し、各種機器分析に供した。

#### C-1. (14'-*s-cis*-15'-Nitrocapsanthin) (4)

UV-vis  $\lambda$  max (Et<sub>2</sub>O) nm 346, 456.

HR FAB MS calc for C<sub>40</sub>H<sub>55</sub>O<sub>5</sub>N, 629.4081 [M<sup>+</sup>] found 629.4056.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  0.85 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.07 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.07 (H<sub>3</sub>-17, s), 1.22 (H<sub>3</sub>-17', s), 1.38 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.48 (H-2 $\beta$ , dd, 12.0, 12.0), 1.49 (H-4' $\beta$ , over lapped), 1.71 (H-2' $\beta$ , over lapped), 1.73 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.77 (H-2 $\alpha$ , over lapped), 1.77 (H<sub>3</sub>-20', s), 1.98 (H<sub>3</sub>-19', s), 2.00 (H-2' $\alpha$ , over lapped), 2.02 (H<sub>3</sub>-19, s), 2.06 (H-4 $\beta$ , dd,  $J$ =17.0, 9.0), 2.18 (H<sub>3</sub>-20, s), 2.39 (H-4 $\alpha$ , dd,  $J$ =17.0, 6.0), 2.96 (H-4' $\alpha$ , dd,  $J$ =15.0, 8.0), 4.00 (H-3, m), 4.52 (H-3', m), 5.96 (H-14, d,  $J$ =12.0), 6.13 (H-7, d,  $J$ =16.0), 6.16 (H-10, d,  $J$ =10.0), 6.24 (H-8, d,  $J$ =16.0), 6.41 (H-12, d,  $J$ =15.0), 6.41 (H-14', s), 6.51 (H-7', d,  $J$ =15.0), 6.57 (H-10', d,  $J$ =11.0), 6.65 (H-12', d,  $J$ =15.0), 6.75 (H-11', dd,  $J$ =15.0, 11.0), 6.95 (H-11, dd,  $J$ =15.0, 11.0), 7.33 (H-8', d,  $J$ =15.0), 8.09 (H-15, d,  $J$ =12.0).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz)  $\delta$  13.0 (C-19'), 13.7 (C-19), 14.1 (C-20), 15.2 (C-20'), 21.2 (C-18'), 21.6 (C-18), 25.1 (C-16'), 25.8 (C-17'), 28.7 (C-16), 30.2 (C-17), 37.1 (C-1), 42.5 (C-4), 44.0 (C-1'), 45.2 (C-4'), 48.3 (C-2), 50.8 (C-2'), 59.0 (C-5'), 64.9 (C-3), 70.3 (C-3'), 121.4 (C-14'), 122.0 (C-7'),

125.4 (C-14), 126.9 (C-5, 7), 128.1 (C-8), 130.3 (C-15), 130.7 (C-11), 130.9 (C-10), 136.0 (C-12), 137.5 (C-6), 138.0 (C-11'), 139.2 (C-9), 139.8 (C-12'), 140.1 (C-9'), 142.1 (C-13'), 145.1 (C-15'), 146.4 (C-8'), 149.9 (C-13), 203.0 (C-6').

NOESY correlations between CH<sub>3</sub>-16/17 and H-7, CH<sub>3</sub>-19 and H-7/11, CH<sub>3</sub>-20 and H-11/15, H-10 and H-12, H-12 and H-14, CH<sub>3</sub>-16'/17' and H-7', CH<sub>3</sub>-19' and H-7'/11', and CH<sub>3</sub>-20' and H-14/11', H-8' and H-10'.

### C-2. (12-Nitrocapsanthin) (5)

UV-vis  $\lambda_{\max}$ , 346, 456.

HR FAB MS calc for C<sub>40</sub>H<sub>55</sub>O<sub>5</sub>N, 629.4081 [M<sup>+</sup>] found 629.4056.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz)  $\delta$  0.85 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.08 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.08 (H<sub>3</sub>-17, s), 1.21 (H<sub>3</sub>-17', s), 1.37 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.48 (H-2 $\beta$ , dd,  $J$ =12.0, 12.0), 1.49 (H-4' $\beta$ , overlapped), 1.71 (H-2' $\beta$ , m), 1.74 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.77 (H<sub>3</sub>-2 $\alpha$ , overlapped), 1.97 (H-19', s), 1.98 (H-20', s), 2.00 (H<sub>3</sub>-20, s), 2.00 (H-2' $\alpha$ , m), 2.04 (H-4 $\beta$ , dd,  $J$ =17.0, 9.0), 2.96 (H-4' $\alpha$ , m), 2.13 (H<sub>3</sub>-19, s), 2.39 (H-4 $\alpha$ , dd,  $J$ =17.0, 6.0), 4.00 (H-3, m), 4.51 (H-3', m), 6.15 (H-10, d,  $J$ =11.0), 6.20 (H-8, d,  $J$ =15.0), 6.25 (H-14, d,  $J$ =11.0), 6.36 (H-14', d,  $J$ =11.0), 6.46 (H-7, d,  $J$ =15.0), 6.47 (H-7', d,  $J$ =15.0), 6.53 (H-10', d,  $J$ =11.0), 6.55 (H-12', d,  $J$ =15.0), 6.65 (H-11', dd,  $J$ =15.0, 11.0), 6.67 (H-15, m), 6.67 (H-15', m), 7.33 (H-8', d,  $J$ =15.0), 7.99 (H-11, d,  $J$ =10.0).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz)  $\delta$  12.9 (C-19'), 12.8 (C-20'), 13.5 (C-19), 16.4 (C-20), 21.2 (C-18'), 21.7 (C-18), 25.8 (C-16'), 25.1 (C-17'), 28.8 (C-16), 30.2 (C-17), 37.1 (C-1), 42.6 (C-4), 44.0 (C-1'), 45.3 (C-4'), 48.3 (C-2), 50.8 (C-2'), 59.0 (C-5'), 64.8 (C-3), 70.3 (C-3'), 136.0 (C-14), 121.3 (C-7'), 127.4 (C-5), 132.3 (C-7), 129.4 (C-11), 137.7 (C-8), 124.0 (C-10), 152.4 (C-12), 137.6 (C-6), 148.6 (C-9), 134.3 (C-9'), 141.4 (C-12'), 137.2 (C-13'), 128.4 (C-13), 129.8 (C-15'), 146.7 (C-8'), 132.0 (C-15), 202.9 (C-6').



## 2-4. フコキサンチン

フコキサンチン (All-trans-fucoxanthin) 68.4 mg を THF 6.84 ml に溶解させ、TFA 96  $\mu$ l を添加した。この溶液に対し、50 mM ONOO<sup>-</sup> 溶液 965  $\mu$ l を添加し、速やかに 1 分間攪拌し反応させた。フコキサンチンと ONOO<sup>-</sup>の反応液に飽和食塩水を加え、クロロホルムにて抽出した。減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC に供し、フラクション化合物 6 (F-1) 14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin (6) 及び化合物 7 (F-2) 11-cis-11-Nitrofucoxanthin (7) を主成分として単離し、各種機器分析に供した。

### F-1. (14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin) (6)

UV-vis  $\lambda_{\max}$ , 451; MS ( [M+H]<sup>+</sup> ) /704.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz)  $\delta$  0.97 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.05 (H<sub>3</sub>-17, s), 1.07 (H<sub>3</sub>-17', s), 1.22 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.35 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.39 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.80 (H<sub>3</sub>-20, s), 1.86 (H<sub>3</sub>-19', s), 1.97 (H<sub>3</sub>-19, s), 2.18 (H<sub>3</sub>-20', s), 2.61 (H-7 $\alpha$ , d,  $J$ =18.0), 3.82 (H-3, m), 3.67 (H-7 $\beta$ , s), 5.38 (H-3', m), 5.93 (H-14', d,  $J$ =12.0), 6.05 (H-8', s), 6.13 (H-10', d,  $J$ =11.0), 6.38 (H-12', d,  $J$ =15.0), 6.49 (H-14, s), 6.74 (H-11, dd,  $J$ =15.0, 11.0), 6.82 (H-12, d,  $J$ =15.0), 6.88 (H-11', dd,  $J$ =15.0, 11.0), 7.16 (H-10, d,  $J$ =11.0), 8.12 (H-15', d,  $J$ =12.0).

### F-2. (11-cis-11-Nitrofucoxanthin) (7)

UV-vis  $\lambda_{\max}$ , 451; MS ( [M+H]<sup>+</sup> ) /704

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz)  $\delta$  0.98 (H<sub>3</sub>-16, s), 1.05 (H<sub>3</sub>-17, s), 1.07 (H<sub>3</sub>-17', s), 1.22 (H<sub>3</sub>-18, s), 1.35 (H<sub>3</sub>-18', s), 1.39 (H<sub>3</sub>-16', s), 1.72 (H<sub>3</sub>-19, s), 1.83 (H<sub>3</sub>-19', s), 1.86 (H<sub>3</sub>-20, s), 2.02 (H<sub>3</sub>-20', s), 2.67 (H-7 $\alpha$ , d,  $J$ =18.0), 3.73 (H-7 $\beta$ , d,  $J$ =18.0), 3.82 (H-3, m), 5.38 (H-3', m), 6.06 (H-8', s), 6.14 (H-10', d,  $J$ =11.0), 6.28 (H-14', d,  $J$ =11.0), 6.36 (H-12', d,  $J$ =15.0), 6.57 (H-15, dd,  $J$ =14.0, 11.0), 6.69 (H-11', dd,  $J$ =15.0, 11.0), 6.80 (H-14, d,  $J$ =11.0), 6.92

(H-15', dd,  $J=14.0, 11.0$ ), 7.31 (H-10, s), 7.91 (H-12, s).

## 要約

活性酸素種は、生体防御など生命維持に必要な生体物質であるが、生体内に過剰に存在すると数々の障害を引き起こす。活性酸素としては一重項酸素 ( $^1O_2$ )、スーパーオキシド ( $O_2^-$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) およびヒドロペルオキシド ( $-OOH$ )、過酸化水素  $HO_2H$  などの他、一酸化窒素 ( $\cdot NO$ )、二酸化窒素 ( $NO_2$ )、オゾン ( $O_3$ )、過酸化脂質などである。近年スーパーオキシドと一酸化窒素の反応生成物であるペルオキシナイトライト ( $ONOO^-$ : 活性窒素種) の存在が生体内のニトロ化反応を経て幅広く生命現象に関わりがあることが判ってきた。つまり、 $ONOO^-$  は、スーパーオキシドや一酸化窒素などとともに強い酸化物質で、生物学上の障害を起こす。 $ONOO^-$  は、マクロファージや好中球により産生される強力な酸化物質で、DNA 切断を引き起こす物質として知られ、ニトロ化によるタンパク質変性および LDL (low-density lipoprotein) のヒドロキシル化と脂質の過酸化を引き起こすことで酸化障害を起こすことが知られている。すでに、 $\beta$ -カロチンとアスタキサンチンが、ニトロカロチノイドを形成することで  $ONOO^-$  からの二酸化窒素ラジカルを捕らえることができることを、当研究グループにより示している。本研究では、ルテイン、カプサンチンおよびフコキサンチンと  $ONOO^-$  の反応について研究し、新たな  $ONOO^-$  反応物を得た。ルテインと  $ONOO^-$  の反応において、14-s-cis-15-Nitrolutein (1) と 14'-s-cis-15'-Nitrolutein (2) および新規な構造の Lutein-6H-1,2-oxazine (3) が得られた。オキサジン化合物は、カロテノイドと  $ONOO^-$  の反応での生成は初めてである。オキサジン(3)の生成メカニズムは不明確であるが、8-ニトロルテインを経て形成されると考えられた。反応は、環状構造に近い 8 位の二重結合炭素にラジカルを生じさせる、ここに二酸化窒素ラジカル ( $\cdot NO_2$ ) が反応し、ニトロ化ルテインとなった後、閉環し Lutein -6H-1,2-oxazine (3) が生成したと考えられた。また、8 位のニトロ体は不安定でありオキサジン化合物となったため、8-ニトロルテインは検出されなかったと考えられる。

また、カプサンチンおよびフコキサンチンなど末端に環状構造をもつカロテノイドでも、ポリエン構造中央部を中心に  $ONOO^-$  によるニトロ化カロテノイドが生成した。このニトロ化は、カロテノイドラジカルとニトロラジカルがラジカル反応で得られることが判った。

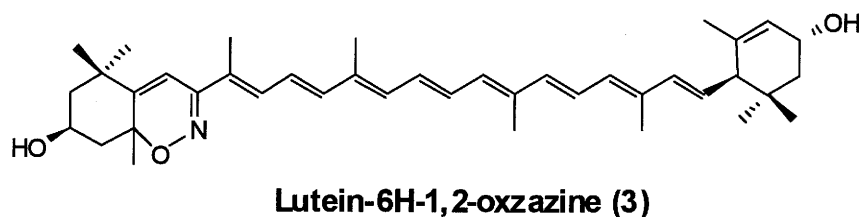
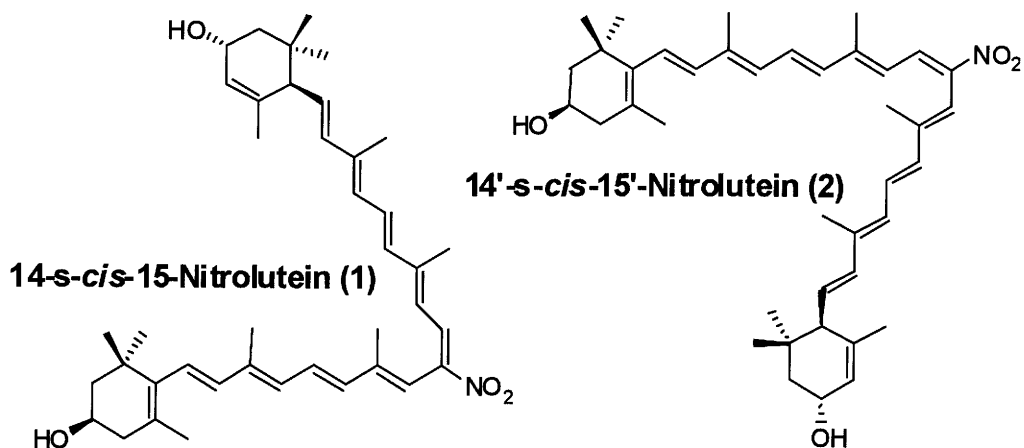
ONOO<sup>-</sup>により生成するカロテノイドラジカルは、ラジカルカチオン状態から二重結合の異性化を伴って、カロテノイドラジカルを生じる。このときニトロ基の大きさのため、ニトロラジカルは立体障害の少ない位置にラジカルが存在するカロテノイドラジカルと反応していると考えられた。ルテインと ONOO<sup>-</sup>との反応により、ラジカルのエネルギーレベルの低い 15 位の二重結合がシス体であり、15 位のラジカル体の場合と 15' 位ラジカル体の場合が同程度の安定なルテインラジカルとなり、この二種のルテインラジカルとニトロラジカルとの反応生成物として、化合物(1)と(2)が得られた。この主要生成物が 14-*s-cis*-15-Nitrolutein (1)と 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein (2)である。この生成物である 14-*s-cis*-15-Nitrolutein と 14'-*s-cis*-15'-Nitrolutein はエネルギー的に安定な生成物ではなかった。このことから、ONOO<sup>-</sup>によるカロテノイドのニトロ化は、ラジカルを経由する反応系が支持された。カプサンチンでは、14'-*s-cis*-15'-Nitrocapsanthin (4) と 12-Nitrocapsanthin (5)が得られ、フコキサンチンでは、14-*s-cis*-15-Nitrofucoxanthin(6)と 11-*cis*-11-Nitro fucoxanthin (7)が得られた。共役二重結合部分のラジカル化は位置による存在率の違いはあるかもしれないが、ランダムに起こっている。しかし、ラジカルのエネルギー的に安定性の高い分子位置にラジカルの存在率が高まり、カロテノイドのラジカル位置近傍に存在できるニトロラジカルがラジカル位置へ反応しニトロ化が成立していると考えられた。

これまで、β-カロチンやアスタキサンチンなどの様に左右対称の化合物について ONOO<sup>-</sup>反応物を示してきた。本研究では、左右非対称で様々な活性基をもつルテインや、カプサンチンおよびフコキサンチンについてどのような消去活性を示すか検討した。その結果、主要な生成物としては、カロテノイドの末端の構造に関わらず、ポリエン構造に発生するラジカルにニトロラジカルが結合したニトロ化合物が得られることが判明した。この結果、カロテノイド類のペルオキシナイトライト消去活性は、カロテノイド類が共通に持つ共役ポリエン部分に依存することが判明した。今後、これら共通の化合物が生体内で障害をもたらす活性窒素種である ONOO<sup>-</sup>の消去活性を示し、健康の維持のために役立つ生理活性や活性窒素種の消去活性物の研究に役立つことが期待される。

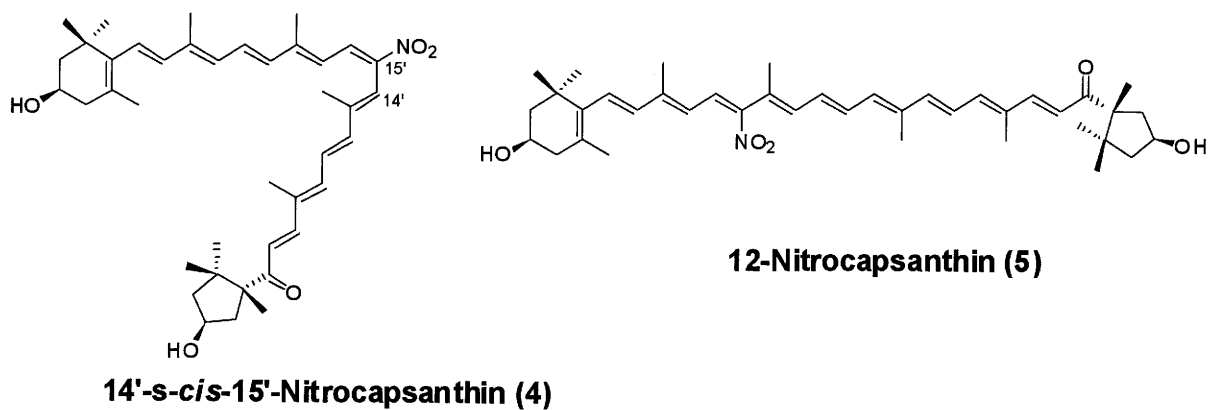
今後の可能性としては、外傷, 手術, 広範囲熱傷, ショックなどで炎症性サイトカイン

の産生が高まると SIRS が見られる。このような SIRS 病態において、活性酸素種が過剰産生され、炎症やアポトーシスが進行することが確認されている。重症な場合は、様々な臓器で抗酸化分子が低下しているばかりか、活性酸素種の産生自体が亢進している。活性酸素の増加により、一酸化窒素と反応した ONOO<sup>-</sup>の産生が高まり、より重症な障害をもたらすと考えられる。このような場合に、カロテノイドによる ONOO<sup>-</sup>消去活性が有効になるのではないかと考えられる。生体内で数々の酵素やタンパク質のチロシン残基などをニトロ化し、酵素活性や生理機能を弱めることで、炎症反応及び炎症抑制に対する悪影響が考えられ、それをカロテノイド自身がニトロ化されることで ONOO<sup>-</sup>を消去し、その結果、生体内の過剰炎症の抑制と抗炎症反応の正常化を制御している可能性がある。今後の生体内での機構の解明が期待される。

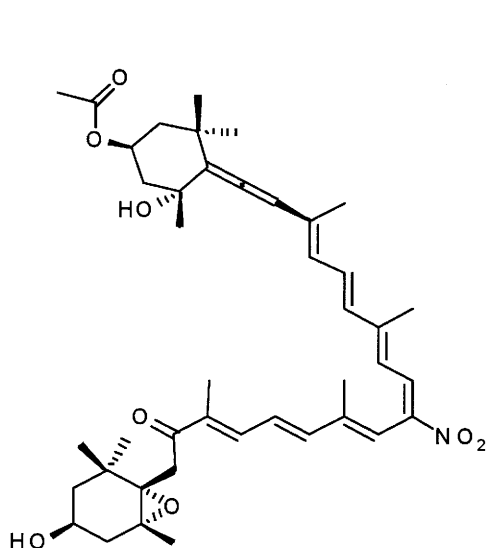
I 章では、ルテインと ONOO<sup>-</sup>の反応を行い、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC によりルテインの酸化体を含むフラクションを分画した。そこから3つの化合物の構造を解析するため、化合物を精製、単離し、各種機器にて分析した。そのスペクトル解析からルテインのニトロ体としてシス体配位の 15-Nitrolutein と 15'-Nitrolutein を得た。また、新たな消去構造体としてニトロ化後安定な反応物に反応が進行した Lutein-6H-1,2-oxazine を得た。ルテインの ONOO<sup>-</sup>消去機構は、ルテインラジカルとニトロルテインの分子軌道法計算の比較により、ルテイン中央部の共役二重結合部分で ONOO<sup>-</sup>によるラジカル化を受け、ルテインラジカルを經由し、ONOO<sup>-</sup>により生成するニトラジカル( $\cdot\text{NO}_2$ )とラジカル反応を起こす結果、ONOO<sup>-</sup>消去活性を示していることが判った。つまり、ONOO<sup>-</sup>はルテインの共役二重結合部分に対してニトロ基のラジカル付加反応を起こすことが判明した。



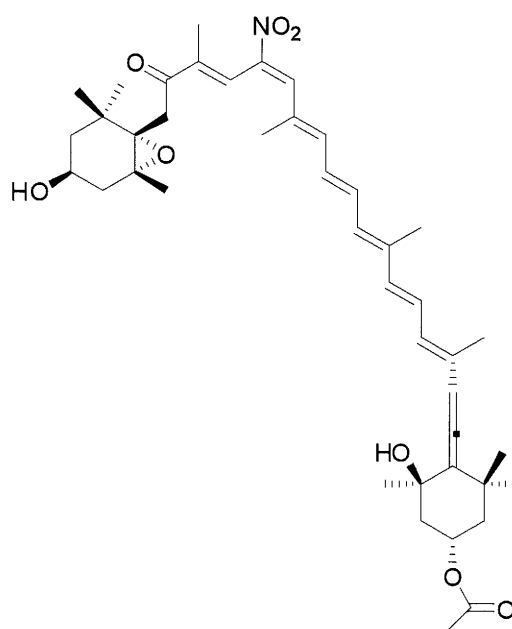
II章では、カプサンチンと ONOO<sup>-</sup>の反応を行い、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC によりカプサンチンの酸化体を含むフラクションを分画した。そこから2つの化合物の構造を解析するため、両化合物を精製、単離し、各種機器にて分析した。そのスペクトル解析からシス体配位の 15'-Nitrocapsanthin とトランス体配位の 12-Nitrocapsanthin を得た。



Ⅲ章では、フコキサンチンと  $\text{ONOO}^-$  の反応を行い、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用逆相 HPLC によりフコキサンチンの酸化体を含むフラクションを分画した。そこから2つの化合物の構造を解析するため、両化合物を精製、単離し、各種機器にて分析した。そのスペクトル解析からシス体配位の 15-Nitrofucoxanthin と 11-Nitrofucoxanthin を得た。



14-s-cis-15-Nitrofucoxanthin (6)



11-cis-11-Nitrofucoxanthin (7)

これらの研究成果において、カロテノイドと  $\text{ONOO}^-$  の反応でニトロ体を確認できたのは、我々の研究が最初であり、左右非対称カロテノイドにおけるニトロ化合物を示したのも本研究が最初である。カロテノイドにおける  $\text{ONOO}^-$  の反応でオキザジン化合物を確認したのは本研究が最初である。また、数々の活性基をもつカロテノイドの末端構造には  $\text{ONOO}^-$  との反応物が認められず、カロテノイドの末端構造による直接の影響は見られなかった。つまり、 $\text{ONOO}^-$  とカロテノイドの反応では、オキザジン化合物も含めて、共役ポリエン構造中に発生するラジカルにニトラジカルが結合した反応物が得られる。このニトロ化反応物により  $\text{ONOO}^-$  の消去が達成できていると考えられた。ルテイン、カプサンチン、フコキサンチンと  $\text{ONOO}^-$  の反応生成物の解析から、全て共

役二重結合部分にニトロ化反応を起こした化合物が得られ、同様の消去機構を持つことが明らかになった。ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化に対しカロテノイドが反応性を示すことを構造的に分子レベルで明らかにした。今回初めて単離したオキザジン化合物は、ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化の結果得られた化合物と考えられ、この新規化合物も ONOO<sup>-</sup>を捕捉した結果生成し、ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化に対しルテインが新たな反応性を示すことを構造的に分子レベルで明らかにした。

IV章では、今後 ONOO<sup>-</sup>による障害として多くの疾患や臓器不全などが考えられることから、カロテノイドによる活性窒素種に起因する炎症の予防に関する考察を行った。ONOO<sup>-</sup>によるタンパク質や酵素のニトロ化により、炎症反応の全ての過程に関わるタンパク質や酵素への影響が考えられ、ONOO<sup>-</sup>消去活性とそのメカニズム解明は、今後の医療分野にもたらされる影響は極めて大きいと考えられる。本研究によるメカニズムを利用した医療行為や研究が進展することを期待する。



## 謝辞

本研究を行うに当たり御指導下さいました静岡大学農学部衛藤英男教授に衷心より感謝いたします。また副指導教官として御助言賜りました河岸洋和教授、小林健二教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲・御審査いただきました静岡大学農学部の平井浩准教授に深謝いたします。

カロテノイドの分析、解析などに多大なる御助言を賜りました共同研究者の(財)生産開発科学研究所、眞岡孝至博士に深謝いたします。

また、サンプルの分析、分子軌道計算をしていただいた共同研究者の名城大学情報センター、寺田幸正教授、北海道大学大学院水産科学宮下和夫教授と細川雅史准教授に深謝いたします。

実験試料や多くのデータを提供していただいた、共同研究者のカゴメ株式会社総合研究所、稲熊隆博博士、松本岳氏、森啓信氏に深謝いたします。

各種機器分析の測定、御指導下さいました本学技官、八木昭仁氏に厚く御礼申しあげます。

本研究を行なうに当たり、支援していただいた研究グループのAditya Kulkarni 博士、加藤英明博士、加藤久喜氏、中津川広樹氏、四方田雄哉氏に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 呂穀; リコピンの酸化と安定化に関する研究 修士論文 平成6年度 (1994).
- 2) 坪井誠, *Fragrance Journal*, **90** (16), 99-108 (1988).
- 3) G. W. Comstock, K. J. Helzlsouer, T. L. Bush, *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 260s-264s (1991).
- 4) J. S. Bertram, A. Pung, M. Churley, T. J. Kappok IV, L. R. Willins, R. V. Coony, *Carcinogenesis*, **12**, 671-678 (1991).
- 5) 小中隆盛, 加柴美里, 井上正康, 生化学, 第70巻, 第2号, 84-95 (1998).
- 6) P. DiMascio, S. Kaiser, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 532-538 (1989).
- 7) P. Palozza, N. I. Krinsky, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **297**, 291-295 (1992).
- 8) J. Terao, *Lipids*, **24**, 659-661 (1989).
- 9) N. Simizu, M. Goto, W. Miki, *Fishes Science*, **62**, 134-137 (1996).
- 10) H. D. Martin, C. Ruck, M. Schmidt, S. Sell, S. Beutner, B. Mayer, R. Walsh, *Pure appl. Chem.*, **71**, 2253-2262 (1999).
- 11) T. Maoka, T. Maoka, K. Mochida, M. Kozuka, Y. Ito, Y. Fujiwara, K. Hashimoto, F. Enjo, M. Ogata, Y. Nobukuni, H. Tokuda, H. Nishino, *Cancer Lett.*, **172**, 103-109 (2001).
- 12) M. Hosokawa, M. Kudo, H. Maeda, H. Kohno, T. Tanaka, K. Miyashita, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1675**, 113 (2004).
- 13) 宮下和夫, 化学と生物, **46**(7), 483-489 (2008).
- 14) J. S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J. P. Crow, *Methods in Enzymology*, **233**, 229-240 (1994).
- 15) J. S. Beckman, Y. Z. Ye, P. G. Anderson, *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **375**, 81-88 (1994).
- 16) R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, *J. Biol. Chem.*, **266**, 4244-4250 (1991).
- 17) J. S. Bertram, A. Pung, M. Churley, T. J. Kappok IV, L. R. Willins and R. V. Coony, *Carcinogenesis*, **12**, 671-678, (1991).
- 18) S. K. Kong, M. B. Yim, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3377-3382 (1996).
- 19) R. M. Uppu, G. L. Squadrito, W. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 335-343 (1996).
- 20) T. Okamoto, T. Akaike, T. Nagano, *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 261-274 (1997).
- 21) L. M. Landino, B. C. Crews, M. D. Timmons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15069-15074 (1996).
- 22) 山内 亮, *Foods & Food Ingredients J.*, **215** (1), 17-23 (2010).
- 23) R. Edge, D. J. McGarvey and T. G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **41**, 189-200 (1997).
- 24) S. P. Stratton, W. H. Schaefer and D. C. Liebler, *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 542-547 (1993).
- 25) A. El-Gamey, G. M. Lowe, D. J. McGarvey, A. Mortensen, D. M. Phillip, T. G. Truscott and A. J. Young, *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 37-48 (2004).

- 26) N. I. Krinsky and K. J. Yeum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 754-760 (2003).
- 27) G. W. Burton and K. U. Ingold, *Science*, **224**, 569-573 (1984).
- 28) A. A. Woodall, S. W. M. Lee, R. J. Weesie, M. J. Jackson and G. Britton, *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 33-42 (1997).
- 29) C. A. Rice-Evans, J. Sampson, and P. M. Bramley and D. E. Holloway, *Free Radic. Res.*, **26**, 381-398 (1997).
- 30) N. Hogg, V. M. Darley-Ubmar, M. T. Wilson and S. Moncada, *FEBS letter*, **326**, 199-203 (1993).
- 31) A. S. Pannala, S. Sigh and C. Rice-Evans, *FEBS letter*, **423**, 297-301 (1998).
- 32) N. Hogg, J. Joseph and B. Kalyanaraman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 153-158 (1994).
- 33) K. kikugawa, K. Hiramoto, S. Tomiyama and Y. Asano, *FEBS letter*, **404**, 175-178 (1997).
- 34) R. Scheidegger, A. K. Dande, P. L. Bounds and W. H. Koppenol, *Nitric Oxide: Biology and chemistry*, **2**, 8-16 (1998).
- 35) A. S. Pannala, S. Sigh and C. Rice-Evans, *FEBS letter*, **423**, 297-301 (1998).
- 36) R. Scheidegger, A. K. Pande, P. L. Bounds, W. H. Koppenol, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **2**, 8-16 (1998).
- 37) T. Yokota, T. Ohtake, H. Ishikawa, T. Inakuma, Y. Ishiguro, J. Terao, A. Nagao and H. Etoh, *Chemistry Letters*, **33**, 80-81 (2004).
- 38) Ryo Yoshioka, Tsutomu Hayakawa, Kumiko Ishizuka, Aditya Kulkarni, Yukimasa Terada, Takashi Maoka, Hideo Etoh. *Tetrahedron Letters* 47:3637–3640 (2006).
- 39) T. Maoka, K. Mochida, M. Kozuka, F. Enjo, M. Kuchide, Y. Nobunari, H. Tokuda, H. Nishino, *Syokuhin Rinsyou Eiyo*, **1**, 7-14 (2006).
- 40) R. Yoshioka, T. Hayakawa, K. Ishizuka, A. Kulkarni, Y. Terada, T. Moaka, H. Etoh, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 3637-3640 (2006).
- 41) T. Hyayakawa, A. Kulkarni, Y. Terada, T. Maoka, H. Etoh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2716-2722 (2008).
- 42) M. Tsuboi, H. Etoh, Y. Yomoda, K. Kato, H. Kato, A. Kulkarni, Y. Terada, T. Maoka, H. Mori, T. Inakuma, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 676-678 (2010).
- 43) Rie Suzuki, Aditya Kulkarni, Yuya Yamoda, Hirokazu Kawagishi, Yukimasa Terada, Takashi. Maoka, Hideo Etoh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2596-2599 (2007).
- 44) Wei Wang et al. *Am J Clin Nutr*; **85**, 762–9 (2007).
- 45) Mares-Perlman et al. *Am J Epidemiol* , 153(5), 424–432 (2001).
- 46) Suzen M. Moeller et al. *Arch Ophthalmol*, **124**, 1151-1162 (2006).
- 47) Gale et al. *IOVS*, **44**(6), 2461-2465 (2003).
- 48) Delcourt et al. *IOVS*, June, **47**(6), 2329-2335 (2006)
- 49) T. Maoka, K. Mochida, M. Kozuka, F. Enjo, M. Kuchide, Y. Nobunari, H. Tokuda, H. Nishino,

- Syokuhin Rinsyou Eiyo*, **1**, 7-14 (2006).
- 50) Aizawa Koichi, Inakuma Takahiro, *British Journal of Nutrition*, 102(12), 1760-1766 (2009).
  - 51) Maeda et al. *Biochem Biophys Res Commun*, **332** (2), 392-7 (2005).
  - 52) Maeda et al. *Journal of Oleo Science*, 56(12), 615-621 (2007).
  - 53) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*; **20**, 864-74 (1992).
  - 54) Azevedo LC, Janiszewski M, Soriano FG, et al. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*; **6**, 159-64 (2006).
  - 55) Peng T, Lu X, Feng Q. *Circulation*, **111**, 1637-44 (2005).
  - 56) Gujral JS, Hinson JA, Farhood A, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287**, 243-52 (2004).
  - 57) Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, et al. *Crit Care Med*, **31**, 1048-52 (2003).
  - 58) Biasi F, Chiarpotto E, Lanfranco G, et al. *Free Radic Biol Med*, **17**, 225-33 (1994).
  - 59) Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, et al. *Lancet*, **1**, 11-4 (1986).
  - 60) 松田直之, 麻酔. **57**, 327-40 (2008).
  - 61) 松田直之, 循環制御. **25**, 276-84 (2004).
  - 62) 松田直之, 救急・集中治療, **20**, 1192-1206 (2008).
  - 63) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD et al, *Circ Res*, **74**, 1141-1148 (1994).
  - 64) Kurashige, M., Okimura, E., Inoue, M., Utsumi, K., *Physiol. Chem. Phys.*, **22**, 27-38 (1990).
  - 65) Lingnell, A., Inborr, J., *WO 99/30701*, June, 24 (1999).