

日本語要約
エルゴチオネインの抗酸化性に関する研究

氏名 安藤 知佳

エルゴチオネイン (EGT) は分子量 229.3 のチオヒスチジンベタインである。キノコ類、特にタモギタケには多くの EGT が含まれており、EGT の摂取源として注目されている。EGT は、菌類やマイコバクテリアなどにより生合成されるが、その他の生物が生合成するという報告例はこれまでにない。よって、動物は食事を摂ることによって EGT を摂取している。また、ヒトの赤血球、骨髄、肝臓、腎臓、角膜、水晶体などに 0.1 mM ~2 mM の濃度で蓄積していると報告されており、グルタチオン (GSH) 濃度 (5 mM~10 mM) の 1/5 程度に相当する。それゆえ、現在までに EGT の高い抗酸化性を含み生理機能が複数報告されている。しかし、*in vitro* と *in vivo* を含めて、EGT がどのような反応機序で抗酸化性を示すのかについての報告例が極めて少ない。そこで本論文では、EGT の抗酸化メカニズムについて、まず *in vitro* における過酸類など化学的酸化剤との反応生成物解析より明らかにすることを目的とした。次に、明らかとなった主たる反応生成物を指標に、*in vivo* における正常状態での EGT の吸収と代謝を含む EGT の変化について調べた。さらに、運動性酸化ストレス下での EGT の変化を、同じく主たる反応生成物を追うことにより調べた。これにより、生体内での抗酸化メカニズムについて検討することとした。

1) EGT の抗酸化メカニズムの解明 (*in vitro*)

EGT の *in vitro* における抗酸化メカニズムを解明するために、EGT と過酸化水素 (H_2O_2) の化学量論、及び酸化生成物を機器分析によって調べた。EGT: H_2O_2 = 1:0、1:1、1:2、1:3 (mM) の混合比率で 24 または 48 時間反応させ、反応液を HPLC 分析し、この反応の化学量論を求めた。その結果、EGT: H_2O_2 = 1:1 で反応させた時、EGT のピークエリア値が半減し、EGT: H_2O_2 = 1:2 で反応させた時は、EGT のピークがほぼ検出されなくなった。EGT: H_2O_2 = 1:3 では EGT のピークは検出されなかった。反応時間による結果の違いはなかった。よって、EGT 1 分子は、 H_2O_2 2 分子を還元することが示された。EGT はアスコルビン酸などの H_2O_2 と 1:1 で反応する他の食品成分と比較して、反応効率のよい還元剤として働いている可能性が考えられた。

次に、EGT の酸化生成物の探索を行った。EGT と H_2O_2 の反応液を LC-MS で分析した結果、溶出時間 (RT) = 11.2 分頃に EGT 酸化生成物候補のピークが検出された。このピークのマススペクトルを確認したところ、 m/z = 95, 154, 198 の 3 つのイオンピークが検出され、EGT の酸化生成物は分子量 198 であると予想した。さらに、酸化生成物の構造を調べるために、今回確認したピーク画分を分取し、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HSQC、HMBC にて分析した。LC-MS 分析による予想分子量と NMR 分析結果より、酸化生成物はヘルシニンであると同定した。これらの結果から、*in vitro* において下図のような EGT と H_2O_2 の反応が進行していると推定した。水溶液中で EGT 1 分子は H_2O_2 2 分子と反応し、中間体として EGT のスルフィン酸型に変化すると予想した。しかし、この反応系において EGT のスルフィン酸型反応生成物が全く検出されなかった。水溶液中における EGT のスルフィン酸型反応生成物は酸化剤存在下で不安定な物質と考え、亜硫酸基の脱離

反応により、ヘルシニンが生成したと推定した。

EGT の酸化生成物としてヘルシニンを同定したが、ヘルシニンがさらに酸化を受け抗酸化剤として働く可能性を検討するため、ヘルシニンと酸化剤を反応させて、LC-MS で酸化生成物を分析した。ヘルシニンと次亜塩素酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) を反応させたとき、ヘルシニンからの酸化生成物と予想されるピークが検出され、マスペクトル測定による分子イオンピーク $[\text{M}+\text{H}]^+$ は $m/z = 157$ であった。高分解能精密質量分析 (HRAM) の結果より、 $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}_2$ という予想分子式が求められた。また、LC-MS/MS 分析では $m/z = 157$ のプロダクトイオンとして $m/z = 58, 59$ のマスペクトルが観測された。これらはそれぞれ $[\text{N}(\text{CH}_3)_3]$ 、 $[\text{CH}_2=\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ であると考えられた。以上より、ヘルシニンの酸化生成物は下図に示したような構造であると推定した。以下、この物質を P1 とする。P1 の安定性を調べるため、 $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 濃度と反応時間を変えて実験を行った。その結果、24 時間後以降、水溶液中での P1 の減少が確認された。また過剰な $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 存在下では P1 のピークが検出されなかったことから、P1 は水溶液中で不安定、かつ過剰な $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ による酸化も受ける物質であることが明らかとなった。

2) EGT とヘルシニンの経口摂取後の体内濃度について (*in vivo*)

EGT と同様にヘルシニンも、有機カチオントランスポーター (OCTN1) の基質であるが、OCTN1 を発現させた HEK293 細胞において、ヘルシニンの輸送効率は EGT の 1/25 程度であったと報告されている。しかし、ヘルシニンをマウスに与え、その体内動態を調べた研究はない。本研究では、マウスに EGT とヘルシニンを経口摂取させ、各臓器中の EGT・ヘルシニン濃度を LC-MS で分析した。肝臓、腎臓、心臓、血漿中において、EGT を摂取した群の方が摂取していない群と比較して、EGT 濃度が高いという予想通りの結果となった。一方、ヘルシニンはどの臓器からも検出されなかった。先行研究より、EGT は投与量依存的な臓器中への蓄積が明らかになっているが、今回の結果よりヘルシニンの臓器への蓄積性はないと考えられた。EGT 濃度について、膀胱と尿中においては、どの群間においても有意な差は見られなかった。また一方、ヘルシニンは high-ヘルシニン群の尿からのみ検出された。OCTN1 は腎臓にも発現しており、EGT は腎尿細管で再吸収されると報告されている。しかし、ヘルシニンは OCTN1 による再吸収をあまり受けず、過剰に吸収したものは尿として排泄されと考えられた。糞中からは、どの群のサンプルからも EGT とヘルシニンのピークは検出されなかった。OCTN1 は小腸にも発現しているため、経口摂取した EGT とヘルシニンは小腸で吸収され、糞としての排泄量が少なかったのではないかと考えた。しかし、矛盾点として、ヘルシニン投与群の臓器からもヘルシニンは検出されていないことが挙げられる。ヘルシニンは腸管吸収されるが、体内で酸化や代謝を受け、違う物質に変化している可能性も考えられた。

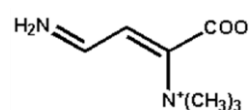
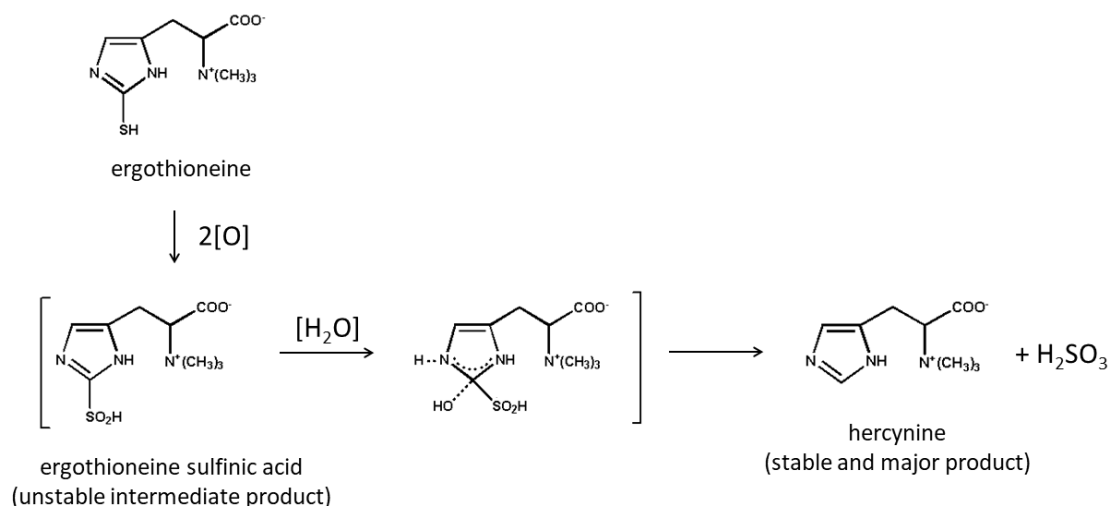
3) 運動性酸化ストレスに対する EGT の効果 (*in vivo*)

EGT を与えた群では体内で EGT が酸化を受け、ヘルシニンに変化すると予想していたが、どの臓器でもヘルシニンのピークは確認できなかった。EGT の酸化反応を観察するには、マウスに酸化ストレスを与える必要があると考え、マウスにランニングによる運動性酸化ストレスを与える実験を行った。EGT を 2 週間与えたマウスをトレッドミル装置で走らせ、走行時間の測定、筋肉の

タンパク質中の AMPK α 量と HEL 量の測定、筋肉中の EGT 濃度とヘルシニン濃度の測定を行った。その結果、EGT を摂取した群は摂取していない群と比べて走行時間が長くなる傾向が見られたが有意差はなかった。また、わずかではあるが AMPK α 量が増加した。筋肉中の EGT 濃度とヘルシニン濃度については、EGT の摂取による EGT 濃度の増加は見られたが、ヘルシニンは検出されなかった。今回の実験条件では十分な酸化ストレスがかからなかったと考え、さらに強い酸化ストレスを与えうる実験系を考案し、実施する必要がある。

本研究から得られた知見により、*in vitro* での EGT の H₂O₂ に対する抗酸化メカニズムを明らかにできた。EGT 1 分子は H₂O₂ 2 分子を還元し、主な酸化生成物としてヘルシニンに変化することを明示することができた。また、ヘルシニンは H₂O₂ よりも強い酸化剤である Ca(ClO)₂ によって、さらに酸化を受け P1 となることも明らかにした。これにより、EGT は他の食品由来の抗酸化物質と比較して、反応効率のよい抗酸化剤であること、EGT の酸化生成物は低分子にまで分解される可能性を示唆することができた。また、*in vivo* での EGT とヘルシニンの投与実験により、EGT の各臓器への高い蓄積性が確認された。また、ヘルシニンは EGT とは異なり、臓器への蓄積は見られなかった。体内で酸化や何らかの代謝を受けている可能性が考えられた。

以上より、EGT はタモギタケなどのキノコ類に多く含まれる天然由来の安全な抗酸化剤であり、生体内でメジャーな活性酸素である過酸化水素に対して反応効率のよい抗酸化剤であると考えられた。また、EGT の酸化生成物であるヘルシニンは Ca(ClO)₂ を還元することができるため、EGT を摂取することで生体内に存在する 2 種類の活性酸素を消去することができると推定した。これにより、EGT を日常的に摂取することは、酸化ストレスからの生体防御という立場において有意義であると結論づけた。



The expected chemical structure of P1