

海洋カロテノイドの一種であるフコキサンチンおよびその代謝物のラジカル捕捉活性および一重項酸素消去活性

カロテノイド類が疾病予防効果を示す理由の一つは、カロテノイド類が抗酸化活性を有するためであると言われている。海洋カロテノイド類の一種であるフコキサンチンおよびその代謝物であるフコキサンチノールとハロシンチアキサンチンに関しては、これまでにいくつかの生物学的作用が報告されている。ここでは、これら 3 種類のカロテノイドの抗酸化活性を、ラジカル捕捉能および一重項酸素消去能として *in vitro* で評価した。フコキサンチンおよびフコキサンチノールの 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルラジカル捕捉活性はハロシンチアキサンチンの同活性よりも高く、フコキサンチン、フコキサンチノールおよびハロシンチアキサンチンの 50% 捕捉有効濃度 (EC_{50}) はそれぞれ $164.60 \mu\text{M}$ 、 $153.78 \mu\text{M}$ および $826.39 \mu\text{M}$ であった。一方、2,2'-アジノビス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸ラジカル捕捉活性は、フコキサンチノール (EC_{50} 、 $2.49 \mu\text{M}$) の方がフコキサンチン (EC_{50} 、 $8.94 \mu\text{M}$) よりも高かった。化学発光法により測定したヒドロキシルラジカル捕捉活性に関しては、フコキサンチンの捕捉活性は、フコキサンチノール、ハロシンチアキサンチンおよび α -トコフェロールの捕捉活性よりそれぞれ 7.9 倍、16.3 倍および 13.5 倍高かった。ヒドロキシルラジカル捕捉活性を電子スピン共鳴 (ESR) 法により評価した場合にも、類似した傾向が見られた。スーパーオキシド・ラジカル捕捉活性の ESR 分析においても、フコキサンチンが、他の 2 種類の供試カロテノイドよりも優れた捕捉活性を有することが示された。フコキサンチン、フコキサンチノールおよびハロシンチアキサンチンの 3 種類のカロテノイドの一重項酸素消去能は、 β -カロテンの一重項酸素消去能よりも低く、フコキサンチン、フコキサンチノール、ハロシンチアキサンチンおよび β -カロテンの消去速度定数 ($k_{Q1} \times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) はそれぞれ、1.19、1.81、0.80 および 12.78 であった。フコキサンチンおよびフコキサンチノールのラジカル捕捉活性がハロシンチアキサンチンよりも高い理由は、フコキサンチンおよびフコキサンチノールにアレン構造が存在するためであると考えられる。

緒言

カロテノイドの重要な特性の一つは抗酸化剤として作用できることであり、そのため細胞および組織をフリーラジカルや一重項酸素による有害な影響から保護することができる。体内で正常な好氣的代謝により生成されるフリーラジカルおよび一重項酸素は非常に反応性が高い (1)。これらの酸化剤は、タンパク質、DNA または脂質等、生細胞中の様々な化合物と反応してそれらに構造的な変化を引き起こし、多くの疾患の原因となる可能性があるが、カロテノイドは、酸化剤により引き起こされる疾患および加齢に対する保護に重要であることが見出されている (2、3)。多くのカロテノイド、特に β -カロテンの抗酸化特性がこれまでに証明されている (4)。カロテノイド類の抗酸化作用メカニズムには、その一重項酸素消去能およびフリーラジカル捕捉能が寄与している (5、6)。

主要な海洋カロテノイドの一つであるフコキサンチン (図 1a) は、食用ワカメに含まれている。フコキサンチンは、海洋生物体内において他のカロテノイドに代謝されることが知られている (7)。例えば、フコキサンチンは、ホヤ (*Halocynthia roretzi*) の体内においてフコキサンチノール (図 1b) およびハロシンチアキサンチン (図 1c) へと代謝される (8)。さらに、Sugawara らは、ヒト由来 Caco-2 細胞およびマウス小腸細胞による吸収過程においても、フコキサンチンがフコキサンチノールに代謝されることを示している (9)。これらの海洋カロテノイドは、有益な生物学的効果を及ぼすことが知られている。フコキサンチンは、抗がん (10~12)、抗高血圧 (13)、抗炎症 (14) および抗肥満 (15、16) 効果を有することが示されている。ホヤ (*H. roretzi*) から単離されたフコキサンチノールおよびハロシンチアキサンチンに関しては、両者が HL-60 ヒト白血病細胞、MCF-7 ヒト乳がん細胞および Caco-2 ヒト結腸がん細胞の成長を阻害することが見出されている (17)。

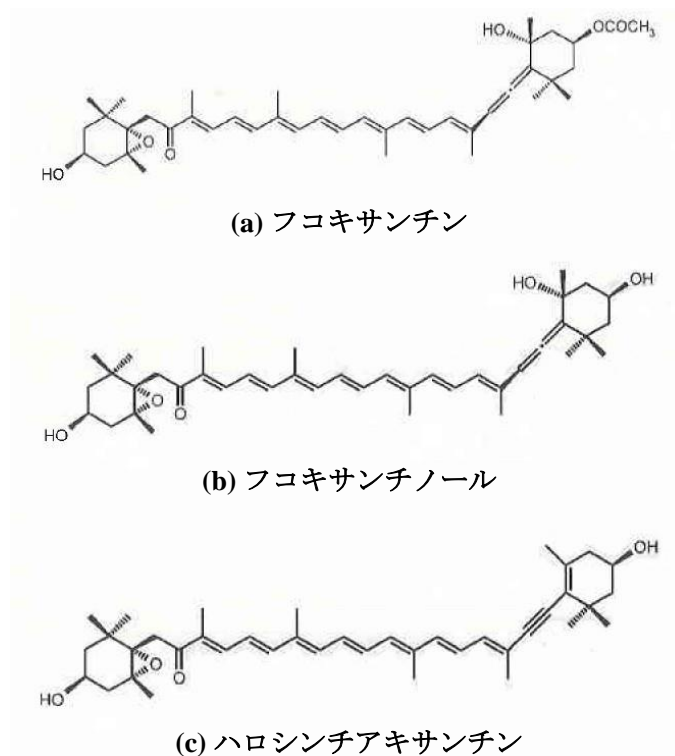


図 1. カロテノイドの構造

フコキサンチンの抗酸化活性に関しては、珪藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) から単離されたフコキサンチンの、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) 捕捉活性が報告されている (18)。有機ラジカル DPPH、12-ドキシルステアリン酸 (12DS)、およびニトロベンゼンへのリノール酸のラジカル付加物 (NB-L) に対する、ワカメ (*Hijikia fusiformis*) 由来フコキサンチンの消去能に関して、電子スピン共鳴 (ESR) 法を使用した研究が行われている (19)。同研究では、フコキサンチンの存在下において、DPPH、NB-L および 12-DS ラジカルの ESR シグナルがそれぞれ 28%、57%、および 66% 低下していることが示されている。Yan らは、数種類の異なる食用海藻由来の有機抽出物の強い DPPH ラジカル捕捉活性を報告しており、フコキサンチンが活性化化合物であるとしている (20)。

カロテノイドの生物学的活性の多くが活性酸素種の捕捉能に関連していることから、本研究においては、フコキサンチン、フコキサンチノールおよびハロシンチアキサンチンの、異なるラジカル種に対する捕捉活性、ならびに一重項酸素消去能を調べた。

材料および方法

化学物質。 DPPH、2,2'-アジノビス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS)、ヒポキサンチン (HPX)、スーパーオキシド・ジスムターゼ (SOD)、アロプリノール、4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシド (TEMPOL)、1,3-ジフェニルイソベンゾフラン (DPIBF) およびルミノールは、シグマアルドリッチ社 (米国ミズーリ州セントルイス) から購入した。キサンチンオキシダーゼ (牛乳由来 XOD) および 5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキシド (DMPO) は、ラボテック株式会社 (東京) から購入した。その他の試薬はすべて分析グレードのものをを使用した。

カロテノイド調製。 フコキサンチンは、褐藻 (*Undaria pinnatifida*) から、以前に報告した方法により単離した (12)。フコキサンチノールは、フコキサンチンからリパーゼによる加水分解により調製した (16)。ハロシンチアキサンチンは、ホヤ (*Halocynthia roretzi*) から、文献に記載さ

れている方法により単離した (17)。単離されたカロテノイドの純度は HPLC 分析により確認した。

DPPH ラジカル捕捉活性。 DPPH ラジカル捕捉活性は、Duan らの方法 (21) により測定した。サンプルのメタノール溶液 2.0 mL を、0.16 mM の DPPH のメタノール溶液 2.0 mL と混合し、暗所において 37°C で 30 分間インキュベーションを行った。インキュベーション後に、517 nm における吸光度を測定し、以下の式により捕捉活性を算出した。

$$\text{Scavenging (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

ABTS ラジカル捕捉活性。 ABTS ラジカル溶液は、5 mL の調製済み ABTS 溶液を 100 mL の酢酸バッファー (0.05 M, pH 4.5) および 5 ユニットのペルオキシダーゼと混合し、37°C で 15 時間インキュベーションすることにより調製した。ABTS ラジカル溶液の脱色は、ABTS 溶液 1.9 mL を 0.1 mL のサンプルと混合し、37°C で 1 時間インキュベーションすることにより開始させた。インキュベーションの開始時および完了時に、734 nm における吸光度を測定した。捕捉活性は以下の式により算出した。

$$\text{Scavenging (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

ヒドロキシルラジカル捕捉活性。 ヒドロキシルラジカルは Fenton システムにより生成させ、捕捉活性は、ATTO Lumines-cencer 2300R (アトー株式会社、東京) を使用した発光測定法 (22) により測定した。反応混合物には、全容量 100 μ L 中に、 H_2O_2 (2 mM)、 FeSO_4 (0.1 mM)、ルミノール (0.8 mM) およびサンプルのアセトニトリル溶液が含まれていた。コントロール混合物においては、サンプルの代わりにアセトニトリルが使用された。 H_2O_2 以外のすべての試薬を含む 96 ウェルのマイクロプレートを、装置内で 37°C において 5 分間インキュベーションし、 H_2O_2 の自動添加により反応を開始した。反応開始から 30 分間、発光を毎分測定した。全期間を通じた合計発光度を使用して、以下の式により捕捉率を算出した。

$$\text{捕捉率 (\%)} = 100 - \frac{(100 \times \text{サンプルの発光度})}{\text{コントロールの発光度}}$$

ヒドロキシルラジカル捕捉の ESR 分析。 さらに、Niwano らにより報告されている方法 (23) を使用して、カロテノイドのヒドロキシルラジカル捕捉活性も、カロテノイドの存在下および非存在下における DMPO-OH (DMPO とヒドロキシルラジカルとのスピン付加物) の ESR 分析によって評価した。反応混合物は、0.1 M リン酸バッファー (PB) 中に溶解した 2 mM の過酸化水素を 50 μ L、純水中に溶解した 89 mM の DMPO を 50 μ L、サンプルのアセトニトリル溶液または溶媒のみをそれぞれ 50 μ L、および純水中に溶解した 0.2 mM の FeSO_4 を 50 μ L 含んでいた。反応混合物を試験管内で混合し、ESR スペクトル用のセルに移し、 FeSO_4 添加の 113 秒後に DMPO-OH スピン付加物を定量した。シグナル強度は、DMPO-OH スピン付加物の 2 番目のピークの高さから評価した。ESR の測定条件は (JES-FA-100、JEOL、東京)、磁場掃引 330.50~340.50 mT、共鳴周波数 100 kHz、変調磁場幅 0.1 mT、増幅率 250、掃引時間 2 分間、時定数 0.1 秒、マイクロ波周波数 9.420 GHz、マイクロ波出力 4 mW であった。

スーパーオキシド・ラジカル捕捉活性。 HPX-XOD 反応系からのスーパーオキシドアニオンの捕捉を、DMPO-OOH スピン付加物の ESR 測定により評価した (24)。試験管内に、0.1 M の PB 中に溶解した 2 mM の HPX 溶液を 50 μ L、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の異なる濃度のカロテノイド溶液または DMSO のみを 50 μ L、DMSO を 30 μ L、純水中に溶解した 4.45 M の DMPO 溶液を 20 μ L、0.1 M の PB 中に溶解した 0.4 U/mL の XOD 溶液を 50 μ L 加えて混合した。各混合物を ESR スペクトル用のセルに移し、XOD 添加の 97 秒後に DMPO-OOH スピン付加物を定量した。シグナル強度は、DMPO-OOH スピン付加物の 1 番目のピークの高さから評価した。ESR の測定条件は、磁場掃引 330.50~340.50 mT、共鳴周波数 100 kHz、変調磁場幅 0.07 mT、増幅率 200、掃引

時間 2 分間、時定数 0.1 秒、マイクロ波周波数 9.420 GHz、マイクロ波出力 4 mW であった。二重逆数プロットによりフコキサンチンの動態解析を行う実験においては、異なる濃度の DMPO を反応系に加えた。異なる濃度のフコキサンチンの代わりに、スーパーオキシド捕捉剤として異なる濃度の SOD、または XOD 阻害剤として異なる濃度のアロプリノールを反応系に加えた。DMPO-OOH のスピン濃度は、以前に報告した方法 (23, 25) により同定した。すなわち、DMPO-OOH スペクトルの二重積分 (DMPO-OOH スペクトルの面積) を、同一の条件下で測定した TEMPOL スタンダード (20 μ M) の二重積分と比較して、DMPO-OOH 付加物の濃度を推定した。

一重項酸素消去活性。一重項酸素は、ペルオキシダーゼ、過酸化水素およびハライドシステムにより生成させ (26)、一重項酸素による DPIBF の酸化を 420 nm で測定した。酢酸バッファー (pH 4.5, 50 mM) 中の反応混合物には、1 ユニットのペルオキシダーゼ、0.25 mM の臭化カリウム、0.25 mM の H_2O_2 、0.05% の Triton X-100 で可溶化した 0.1 mM の DPBIF および適切な溶媒中のカロテノイドが含まれていた。反応混合物を含む、温度制御されたキュベット中に 37°C で H_2O_2 を添加することにより反応を開始し、420 nm における吸光度の低下を 30 秒間隔で 5 分間記録した。カロテノイドの存在下および非存在下における吸光度の低下から、消去率を算出した。消去速度定数 (k_Q) は、Young らの方法 (27) により同定した。コントロールおよび各濃度のカロテノイドに関して、DPBIF の吸光度を酸化時間に対してプロットし、コントロールの傾き (S_0) およびカロテノイドの傾き (S_S) を同定した。 S_0/S_S 値をカロテノイド濃度に対してプロットし、各カロテノイドに関する回帰直線の傾き (S_C) を同定した。速度定数 (k_Q) は以下の式より同定した。

$$S_C = 1 + (k_Q/k_d)$$

ここで k_d は、水媒体中における 1O_2 から 3O_2 への自然崩壊の速度定数 ($2.5 \times 10^5 s^{-1}$) である (28)。

統計解析。カロテノイド間のラジカル捕捉能および一重項酸素消去能の差を、STATISTICA ソフトウェアを使用して、ANOVA および Duncan の多重範囲検定により統計学的に評価した (29)。

結果および考察

安定なフリーラジカルである DPPH ラジカルの消去能の測定は、抗酸化活性の評価のために一般的に使用される主要な方法の一つである。この方法は、エタノール中の DPPH が水素供与性の抗酸化剤の存在下で減少することに基づいているが、この DPPH の減少は、水素供与性の抗酸化剤との反応により非ラジカル体である DPPH-H が形成されることに起因している (30)。今回試験を行った 3 種類のカロテノイドの DPPH 捕捉活性を図 2 に示す。これら 3 種類のカロテノイドの DPPH ラジカル捕捉活性に関しては、直線的な用量反応関係が示され、ハロシンチアキサンチンの捕捉活性は、フコキサンチンおよびフコキサンチノールの捕捉活性よりも低かった。これら 3 種類のカロテノイド間および各カロテノイドの異なる濃度間において、捕捉活性には有意差 ($p < 0.05$) が観察された。しかし、これら 2 種類のカロテノイドの捕捉活性は α -トコフェロールの捕捉活性よりも低かった。捕捉活性が濃度に直線的に依存することから、直線回帰式を使用して 50% 捕捉有効濃度 (EC_{50}) を求めた。ハロシンチアキサンチンの EC_{50} は有意に ($p < 0.05$) 異なっていたが、フコキサンチンおよびフコキサンチノールに関しては、 EC_{50} は類似していた ($p > 0.05$)。 EC_{50} 値から、フコキサンチンおよびフコキサンチノールの捕捉活性は α -トコフェロールの捕捉活性よりそれぞれ 2.6 倍および 2.4 倍低く、ハロシンチアキサンチンの捕捉活性は α -トコフェロールの捕捉活性より 12.9 倍低いことが示された。Nishino は、ESR 法を使用して、0.5 mM のフコキサンチンが 28% の DPPH ラジカルを捕捉することを見出している (19)。フコキサンチンは、好気性条件下よりも嫌気性条件下において、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、ゼアキサンチンおよびルテイン等の他のカロテノイドよりも強力な DPPH ラジカル捕捉剤であるが、その活性は常に α -トコフェロールよりも低いことが見出されている (18)。

ABTS ラジカル捕捉アッセイは、化合物の抗酸化能を同定するために広く使用されている間接法の一つである (31)。抗酸化剤が存在しない状態では ABTS ラジカルは比較的安定であるが、水

素原子供与体と反応すると非色型の ABTS に変換される。フコキサンチノールの ABTS ラジカル捕捉活性は、フコキサンチンおよびハロシンチアキサンチンの捕捉活性より高く、しかも α -トコフェロールの捕捉活性よりも高いことが示された (図 3)。しかし、フコキサンチン、フコキサンチノールおよび α -トコフェロール間の EC_{50} 値の差はわずかであった ($p > 0.05$)。回帰式から算出された EC_{50} 値によると、ABTS ラジカル捕捉試験に供されたサンプルの捕捉能は、高いものから、フコキサンチノール、 α -トコフェロール、フコキサンチン、ハロシンチアキサンチンの順であった。カルボニル基や水酸基等の官能基の存在が、カロテノイドの ABTS ラジカル捕捉活性を低下させることが報告されている (32)。しかし、フコキサンチンおよびハロシンチアキサンチンに二つの水酸基が存在している一方で、フコキサンチノールには三つの水酸基が存在しているにもかかわらず、その ABTS ラジカル捕捉活性はフコキサンチンおよびハロシンチアキサンチンの捕捉活性より高くなっている。フコキサンチノールおよびフコキサンチンにおけるアレン結合の存在が、ハロシンチアキサンチンと比較してこれらがより高い捕捉活性を示す原因となっている可能性がある。さらに、フコキサンチンの ABTS ラジカル捕捉活性がフコキサンチノールの活性よりも低いのは、フコキサンチンにアセチル基が存在することに起因する可能性がある。

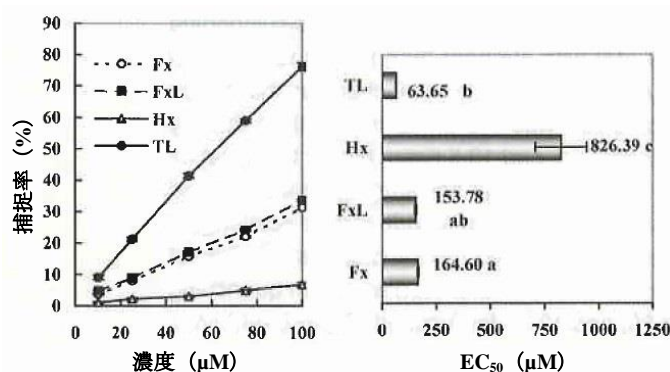


図 2. カロテノイドおよび α -トコフェロールの DPPH ラジカル捕捉活性。フコキサンチン (Fx) ; フコキサンチノール (FxL) ; ハロシンチアキサンチン (Hx) ; α -トコフェロール (TL; 平均 \pm 標準偏差; $n=4$)。異なる上付き文字を有する棒グラフは有意差を示す ($p < 0.05$)。

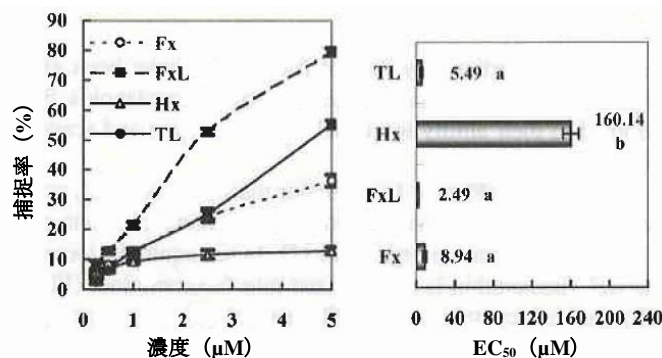


図 3. カロテノイドおよび α -トコフェロールの ABTS ラジカル捕捉活性。フコキサンチン (Fx) ; フコキサンチノール (FxL) ; ハロシンチアキサンチン (Hx) ; α -トコフェロール (TL; 平均 \pm 標準偏差; $n=4$)。異なる上付き文字を有する棒グラフは有意差を示す ($p < 0.05$)。

Fenton 反応システムによりヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) を生成させ、これらのラジカルのカロテノイドによる捕捉を、化学発光法および ESR 法により評価した。化学発光法により測定されたヒドロキシルラジカル捕捉活性からは (図 4)、フコキサンチンが最も高い活性を有し、フコキサンチノールがそれに次ぐ高い活性を有することが示されていた。フコキサンチンは、わずか 0.10 mg/mL の濃度においても $46.72 \pm 3.11\%$ の捕捉活性を示し、同濃度においてフコキサンチノールの活性は $38.33 \pm 3.67\%$ 、ハロシンチアキサンチンの活性は $18.57 \pm 1.92\%$ 、 α -トコフェロールの活性は $25.49 \pm 4.30\%$ であった。既知のヒドロキシルラジカル捕捉剤である DMSO は常に 95% を超える捕捉活性を示した。試験を行ったすべての濃度において、3 種類のカロテノイドの捕捉活性間に

は有意差が存在した ($p < 0.05$)。捕捉率と濃度に関する直線回帰式から算出した EC_{50} 値からは、フコキサンチンの捕捉活性が、フコキサンチノール、ハロシンチアキサンチンおよび α -トコフェロールの捕捉活性よりもそれぞれ、7.9 倍、16.3 倍および 13.5 倍高いことが示された。

ヒドロキシルラジカル捕捉解析のための ESR 法においては、Fenton システムにより生成されたヒドロキシルラジカルがスピントラップ剤である DMPO によりトラップされ、その結果生じる DMPO-OH[•] スピン付加物のシグナル強度が測定された (図 5a)。カロテノイドの活性を評価するために、異なる 2 段階の濃度のカロテノイドの存在下および非存在下において DMPO-OH[•] スピン付加物のシグナル強度を測定した。スピントラップされたラジカルのシグナル強度が、供試化合物の存在下において低下すれば、捕捉活性が存在することが示される。ここで観察されたラジカル捕捉の傾向は、化学発光法において観察された傾向と類似していた。DMPO-OH[•] スピン付加物のシグナル強度は、2.5 mg/mL の濃度のフコキサンチンが存在する場合に、同濃度のフコキサンチノールおよび α -トコフェロールが存在する場合よりも大きく低下していた (コントロールのシグナル強度のそれぞれ、56.6%、81.7%および 92.5%)。このように、フコキサンチンが存在する場合にシグナル強度の低下がより大きいことから、フコキサンチンがより高い捕捉活性を有することが示されている。フコキサンチン、フコキサンチノールおよび α -トコフェロールの、2.5 mg/mL 濃度における捕捉活性は、それぞれ 43.4%、18.3%および 7.5%であった (図 5b)。ハロシンチアキサンチンはシグナル強度の低下を全く示さず、このことから捕捉活性が存在しないことが示された。ESR 法において観察された捕捉率は、化学発光法により得られた捕捉率よりも低かった。これら 2 種類の方法間のこのような差は、ゼアキサンチンおよびルテインのヒドロキシルラジカル捕捉活性をこれら 2 種類の方法で分析した場合にも観察されている (33)。使用された化学系により、[•]OH 生成に基づく異なる活性酸素種が生成され、化学発光測定に影響を与える可能性があることが指摘されている (33)。

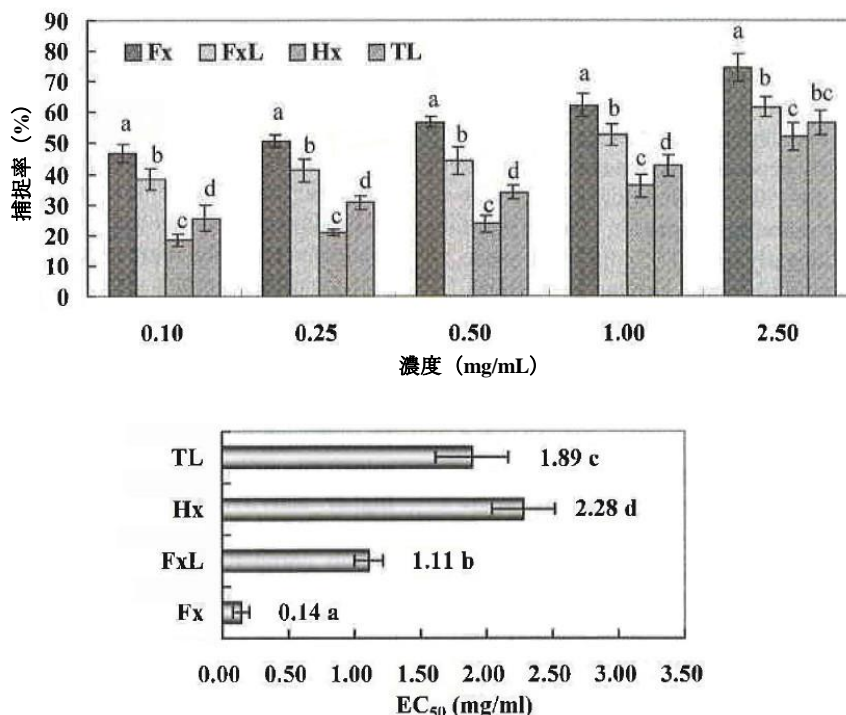


図 4. 化学発光法により測定したカロテノイドおよび α -トコフェロールのヒドロキシルラジカル捕捉活性。フコキサンチン (Fx) ; フコキサンチノール (FxL) ; ハロシンチアキサンチン (Hx) ; α -トコフェロール (TL ; 平均 \pm 標準偏差 ; $n = 4$)。各濃度に関して、異なる上付き文字を有する棒グラフは有意差を示す ($p < 0.05$)。

カロテノイドのスーパーオキシドアニオン捕捉能を、ESR 法により測定した。スーパーオキシドアニオンを、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (HPX-XOD) 系により酵素的に生成させ、

生成されたラジカルを DMPO でトラップし、生じた DMPO-OOH^{*} のシグナル強度 (図 6a) を、カロテノイドの存在下および非存在下において測定した。HPX-XOD 系では、常に^{*}OH ラジカルも生成されるため、^{*}OH ラジカルの捕捉剤として DMSO を使用した (34, 35)。ハロシンチアキサンチンはシグナル強度の低下を全く示さなかったが、2.5 mg/mL のフコキサンチンの存在下におけるシグナル強度 (コントロールの 62.6%) は、フコキサンチノール存在下のシグナル強度 (コントロールの 74.8%) よりも低く、 α -トコフェロール存在下のシグナル強度 (コントロールの 59.8%) と極めて類似しており、このことからフコキサンチンの高いスーパーオキシド捕捉活性が示された。フコキサンチン、フコキサンチノールおよび α -トコフェロールの、2.5 mg/mL 濃度での存在下におけるシグナル強度の低下は、それぞれ 37.4%、21.2% および 40.2% であった (図 6b)。

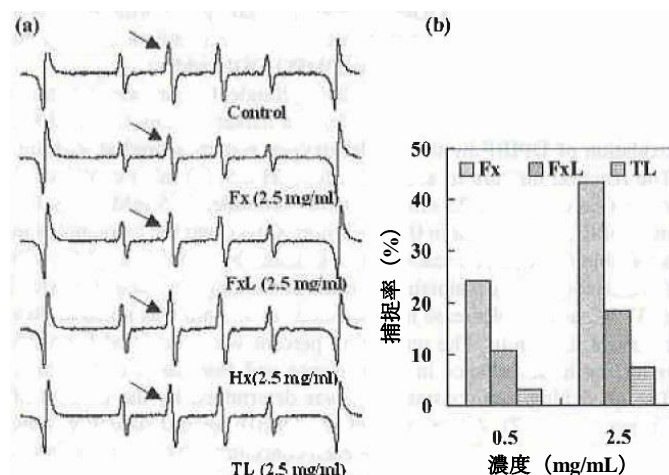


図 5. フコキサンチン (Fx) ; フコキサンチノール (FxL) ; ハロシンチアキサンチン (Hx) ; α -トコフェロール (TL) に関する、DMPO-OH^{*} スピン付加物の典型的な ESR スペクトルおよびヒドロキシルラジカル捕捉活性。

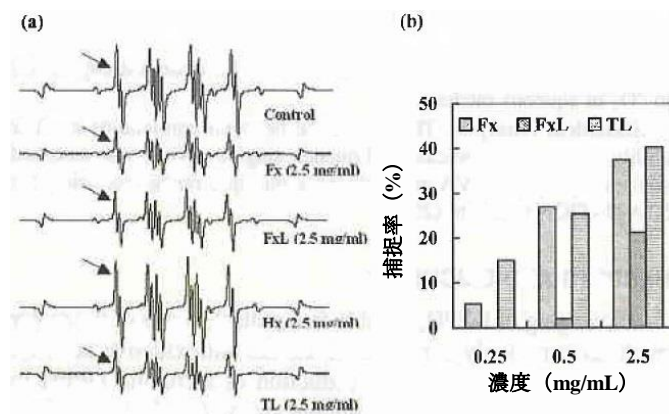


図 6. フコキサンチン (Fx) ; フコキサンチノール (FxL) ; ハロシンチアキサンチン (Hx) ; α -トコフェロール (TL) に関する、DMPO-OOH スピン付加物の典型的な ESR スペクトルおよびスーパーオキシド・ラジカル捕捉活性。

DMPO-OOH^{*} のシグナル強度は、化合物が HPX-XOD 系の酵素活性を阻害した場合にも低下する (36)。捕捉または阻害に起因する DMPO-OOH^{*} のシグナル強度の低下の試験を行うためには、捕捉剤または阻害剤と活性酸素の間の競合反応を使用することが推奨されている (23, 37)。フコキサンチンが DMPO-OOH のシグナル強度の大きな低下を示すことから、この低下がラジカルの捕捉によるものであるか、あるいは HPX-XOD の酵素反応の阻害によるものであるかを確認するために、以前に報告されている方法により、DMPO とフコキサンチンまたはリファレンス剤の間の競合反応性を評価した (23)。リファレンス剤には、スーパーオキシド捕捉剤として SOD を、

酵素阻害剤として薬剤のアロプリノールを使用した。SOD、アロプリノールおよびフコキシサンチンに関する二重逆数プロットを図7に示す。二重逆数プロットの直線性および交差パターンから、SODがDMPOの競合的阻害剤として作用していることが示されている(図7a)。一方、二重逆数プロットからは、アロプリノールによるDMPO-OOH形成の阻害は、DMPOに関して非競合的であることが示されている(図7b)。フコキシサンチンに関しては(図7c)、フコキシサンチン存在下におけるDMPO-OOHのシグナル強度の低下は、主としてラジカルの直接的な捕捉に起因している。しかし、交差点がx軸の負の方向にわずかにずれていることから、カロテノイドが酵素系に影響を与えているとも考えられる。

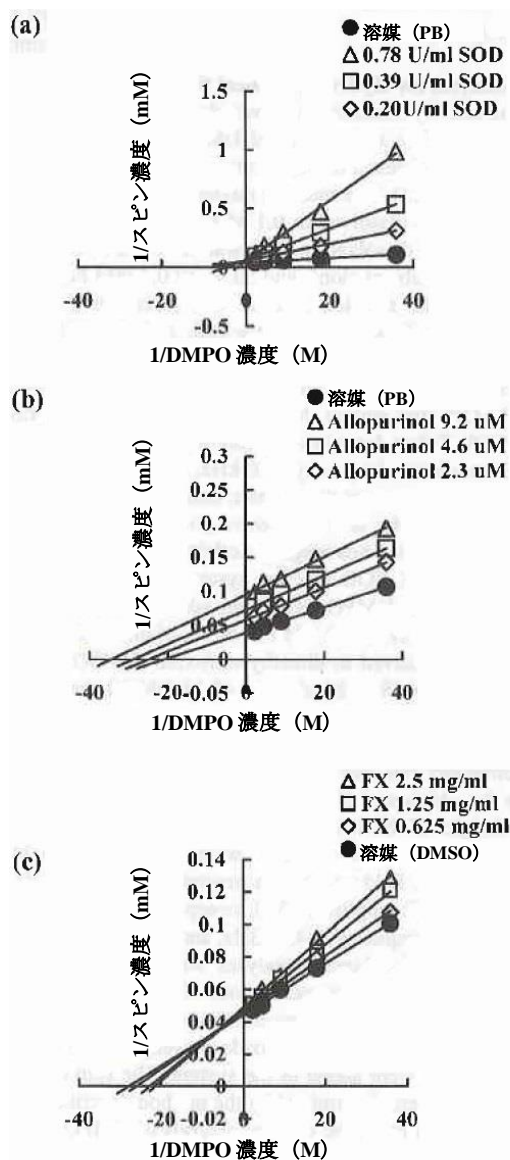


図7. 異なる一定濃度の (a) SOD (b) アロプリノールおよび (c) フコキシサンチンに関する、DMPO-OOH形成のDMPO濃度に対する二重逆数プロット。

3種類のカロテノイドの一重項酸素消去活性を、β-カロテンおよびα-トコフェロールの一重項酸素消去活性と比較した(図8)。β-カロテンは、0.5 μMという低濃度においても有意に高い($p < 0.05$)消去活性(62.5%)を示した。フコキシサンチノールは、フコキシサンチンおよびハロシサンチンよりも比較的高い消去活性を示した。消去速度定数(k_Q)は、 S_0/S_S 値の濃度に対するプロットの傾きから同定した(図9)。β-カロテンの速度定数は、フコキシサンチンおよびその代謝物の速度定数よりも極めて高かった(表1)。しかし、フコキシサンチンとその代謝物の間の消去速度の差はわずかであった($p < 0.05$)。β-カロテンの一重項酸素消去速度は、フコキシサンチン、フコキ

サンチノール、ハロシチアキサンチンおよび α -トコフェロールの一重項酸素消去速度よりもそれぞれ 10.7 倍、7.1 倍、16.0 倍および 26.2 倍速かった。

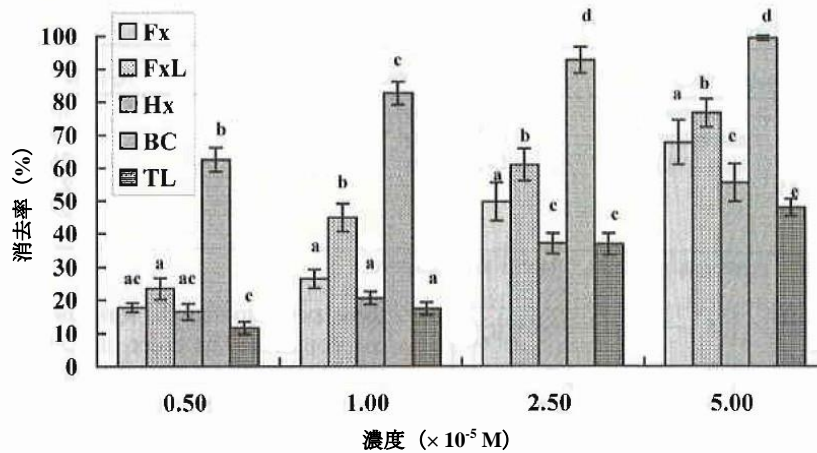


図 8. カロテノイドおよび α -トコフェロールの一重項酸素消去活性。フコキサンチン (Fx) ; フコキサンチノール (FxL) ; ハロシチアキサンチン (Hx) ; β -カロテン (BC) ; α -トコフェロール (TL) ; 平均 \pm 標準偏差 ; $n=4$)。各濃度に関して、異なる上付き文字を有する棒グラフは有意差を示す ($p < 0.05$)。

表 1. カロテノイド類の一重項酸素消去速度定数 ^a (k_Q)

カロテノイド	二重結合	官能基	$k_Q (\times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	相対 k_Q^b
フコキサンチン	10 (アレン結合 $\times 1$)	OH $\times 2$; エポキシ $\times 1$; カルボニル $\times 1$; アセチル $\times 1$	1.19 ab	2.4
フコキサンチノール	10 (アレン結合 $\times 1$)	OH $\times 3$; エポキシ $\times 1$; カルボニル $\times 1$	1.81 a	3.7
ハロシチアキサンチン	10 (三重結合)	OH $\times 2$; エポキシ $\times 1$; カルボニル $\times 1$	0.80 ab	1.6
β -カロテン	11		12.78 c	26.2
α -トコフェロール			0.49 b	1.0

^a 異なるアルファベットが付された k_Q 値には有意差がある ($p < 0.05$)。

^b α -トコフェロールに対する相対値

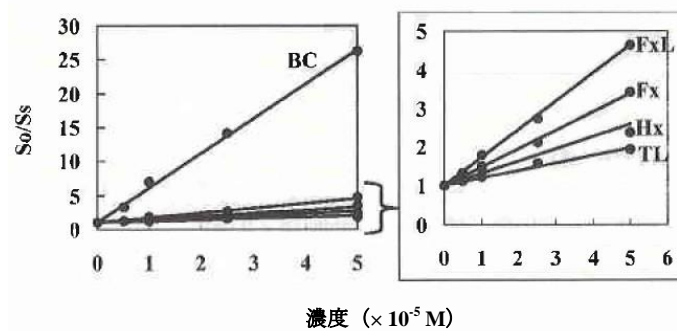


図 9. S_0/S_s 値の、フコキサンチン (Fx) 、フコキサンチノール (FxL) 、ハロシチアキサンチン (Hx) 、 β -カロテン (BC) および α -トコフェロール (TL) の濃度に対するプロット。

カロテノイドの一重項酸素消去活性は、共役二重結合の数に影響される (38)。カロテノイド類に関して報告されている値は、実験条件により異なる。二重結合を 13 カ所を含むアスタキサンチンおよびスピリロキサンチンは、 β -カロテンよりも高い一重項酸素消去活性を示すことが見出されている (6)。しかし、同研究において、フコキサンチンと β -カロテンの間に一重項酸素消去活性の大きな差は観察されておらず、共役ケト基の存在が消去速度を高める一方で、水酸基、エポキシ基およびメトキシ基の存在はさほど大きな影響を与えないと結論付けられている。フコキサ

ンチンとその2種類の代謝物には共役ケト基が存在しているが、その影響は β -カロテンと同等ではなかった。これらのカロテノイドの消去活性が低いのは、水酸基およびエポキシ基の存在と、二重結合の数がより少ないことに起因する可能性がある。これら3種類のカロテノイドのうち、フコキサンチンとフコキサンチノールはいずれもアレン結合を含み、ハロシンチアキサンチンよりも高い消去活性を示していた。

カロテノイドの抗酸化活性はその構造に関連している(39)。二重結合の数および官能基の存在が、異なるラジカル種とカロテノイドの相互作用に影響を及ぼす(40)。カロテノイドとラジカルとの間の反応は、カロテノイドのみならずラジカルの性質にも依存することが観察されている(41)。ラジカルの性質により、捕捉の作用機序には、電子供与によるカロテノイドラジカルカチオンの形成、またはカロテノイドとラジカルの付加物の形成等がある(41)。また、異なるカロテノイドの分解産物には、異なる酸化および抗酸化効果があるという報告もある(42)。今回試験を行った3種類のカロテノイドにおいては、フコキサンチンおよびフコキサンチノールがハロシンチアキサンチンよりも高いラジカル捕捉活性および一重項酸素消去活性を示した。フコキサンチンおよびフコキサンチノールの2種類のカロテノイドの捕捉活性は、 α -トコフェロールの捕捉活性よりも高いか、ほぼ同等であった。各カロテノイドの捕捉活性の高さの順は、異なるラジカルに対して類似しており、高いものからフコキサンチン、フコキサンチノール、ハロシンチアキサンチンの順であったが、ABTSラジカルは例外であり、フコキサンチノールがフコキサンチンよりも高い活性を示した。しかし、フコキサンチンとフコキサンチノールの間で、ラジカル捕捉活性および一重項酸素消去活性のいずれにおいても有意な差は示されなかった。これら3種類のカロテノイドにおける主要な構造的差は、フコキサンチンとフコキサンチノールにおけるアレン結合の存在と、フコキサンチンの末端環におけるアセチル基の存在である。従って、アレン結合の存在がフコキサンチンおよびフコキサンチノールの高い抗酸化活性に関与している可能性がある。これらのカロテノイドによるラジカル捕捉の作用機序および速度をさらに詳細に検討することにより、これらの構造が抗酸化活性に果たす役割が明らかになると考えられる。ハロシンチアキサンチンは極めて低い捕捉活性しか示さなかったが、ハロシンチアキサンチンが刺激された白血球において最も高いフリーラジカル生成抑制効果を示すことが報告されている(43)。カロテノイドのラジカルとの反応は、特に生体系においては酸素圧等の因子にも影響され、酸化挙動へのシフトが生じる場合がある(44)。このため、カロテノイドの*in vitro*での抗酸化活性を、*in vivo*実験によっても確認することが必要である。

本研究の結果から、海藻カロテノイドであるフコキサンチンおよびその代謝物であるフコキサンチノールが、 α -トコフェロールと同程度の抗酸化活性を示すことが示された。フコキサンチンのもう一つの代謝物であるハロシンチアキサンチンは、比較的低い抗酸化活性を示した。フコキサンチンおよびフコキサンチノールにおけるアレン結合の存在、およびフコキサンチンにおけるアセチル基の存在が高い抗酸化活性の要因であると推測される。