



Preventive Factors in Food against Oxidative damage of DNA

榊原, 啓之

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2008-11-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2587

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002587>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【211】

氏名・(本籍) 榊原 啓之 (大阪府)

博士の専攻分野の名称 博士 (学術)

学位記番号 博い第384号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

**Preventive Factors in Food against Oxidative Damage of
DNA**

(DNAの酸化的損傷を予防する食品因子)

審査委員

主査 教授 金沢 和樹

教授 尼川 大作

教授 長谷川 信

教授 大野 隆

がんなどの生活習慣病は遺伝子の酸化的損傷によって起こるので、抗酸化成分はその損傷を抑え、病気を予防すると考えられる。本研究では、食生活と生活習慣病予防の観点から、日常食品中の抗酸化成分を検索し、遺伝子の損傷よりも速く活性酸素を消去できる強い抗酸化能を有する食品成分を同定・定量した。またその成分の体内での有効性を調べ、食生活によるがん予防の可能性を追求した。

熱帯地方の植物は、日射が強く高温の環境下に生育するために、抗酸化成分を多く含むと考えた。さまざまな熱帯植物の抗酸化活性を調べた結果、とくにバナナに強い活性があり、それがドーパミンであることを明らかにした。ドーパミンはオルトジオール(カテコール)構造の単純なポリフェノールであるが、その強い抗酸化能はカテコール構造によることを知った(第2章、論文業績-[1])。

重要な課題は、これらの成分が遺伝子の損傷よりも速く抗酸化能を発揮できるかである。従来の抗酸化測定法はいずれも、生体内に存在しない人工のラジカルを用いる、非水系での測定法である、系が複雑なので結果を誤る、などの問題点があった。生体内にもっとも多い活性酸素種は分子状酸素ラジカルであり、特にミトコンドリアの電子伝達系で多量に生じることが知られている。また、遺伝子の酸化的損傷に対する抗酸化能を評価するには、標的を遺伝子の塩基とするのが適切である。これらを考慮して新規の評価系を確立した。酸素ラジカルを化学量論的に生成することが証明されている2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH)を用い、標的をその酸化産物が酸化的ストレスの体内マーカーとされている2'-deoxyguanosine (2'-dG)とした。この系では、経時的かつ定量的に一つの産物を生じた。機器分析で8位にヒドロペルオキシル基が付加した8-hydroperoxy-2'-dG (8-OOHdG)と同定し、加水分解処理で確認した。本物質はこれまでに報告がない新規の物質である。この8-OOHdGの生成を阻害する率で食事成分の抗酸化能を評価できた。本手法は疎水性・親水性のいずれの成分にも適用でき、極めて簡便であり、さらに従来法よりも精度高い比較が可能であった(第3章、発表業績-[1],[2],[4]、論文業績-[4]、特許-[1])。

この開発した手法を用いて、遺伝子の損傷よりも速く活性酸素を消去できる食品成分を検索し、その活性と化学構造との相関を解析した。カテコール構造の成分が強い活性を示した。OH基がもう一つ多いガラート類も活性を示した。従って、抗酸化活性は、セミキノン構造を介して発揮されると推測した。(第3章、発表業績-[4],[9]、論文業績-[4]、特許-[1])。

その体内での有効性を議論するには、食用植物中の抗酸化成分の含量を知ることが重要である。従来の分析法では食品に含まれるすべてのポリフェノール類を同時に定量できない、また加水分解法を用いているため測定値に誤差がある、などの問題点があった。そこで、食品中の全抗酸化成分の簡易同定・定量法を確立した。その手法で、国内で一般に多く消費されている植物性食品を分析すると、タマネギ、ゴボウ、黒豆皮、緑茶、ブルーベリーが強い抗酸化活性を示した。活性成分は、ケルセチン配糖体、クロロゲン酸、プロトカテキン酸、カテキン類、アントシアニン類等のポリフェノール類であり、特にカテコール構造の成分が強かった。そして、日常の食品には、全般的にフラボノイド類や単純ポリフェノール類が多く含まれていた(表)(第4章、発表業績-[5],[6],[8],[10]、論文業績-[2],[5])。

表 食事抗酸化成分の種類と豊富に含む食品

食事抗酸化成分	一例	食品
単純ポリフェノール類	クロロゲン酸、コーヒー酸、フェルラ酸、没食子酸	ほとんど全ての食品(特に根菜類)
フラボン類	アピゲニン、ルテオリン配糖体	香草類、柑橘類(パセリ、セロリ、レモンなど)
フラボノール類	ケルセチン、ケンフェロール配糖体	葉野菜全般、果物、茶類
イソフラボン類	ダイゼイン配糖体	大豆
フラバノン類	ナリンゲニン、ヘスペレチン配糖体	柑橘類
カテキン類	エピカテキン、エピガロカテキンガラート	茶類、ココア
アントシアニン類	アントシアニン配糖体	紅紫色の野菜・果物
アンスラキノン類	エモジン、クリソファノール、レイン	薬草(ダイオウなど)

ところで、このような食事成分が有効な効果を示すためには、細胞内のDNAの近くに存在しなければならない。食事成分が体内に吸収され、細胞内に到達し、そして有効な活性を示すか否か、つまり生物学的有効性を明らかにする必要がある。まず体内濃度を知るために、カテキン類を豊富に含む緑茶をラットに常飲させ、その血中濃度を測定した。濃度はnmol/Lレベルと低く、上で測定した抗酸化能を示す濃度には至らなかった。また文献でのフラボノイド類の生体内濃度も同様に低い。しかし疫学研究では、緑茶を常飲する人に大腸がん、胃がん、動脈硬化症などの生活習慣病が極めて少ないことが明らかにされている。従って、体内での抗酸化能には異なる因子が関与していると考えた。ヒト体内にはアスコルビン酸が30~90 $\mu\text{mol/L}$ のレベルで存在する。そこで、アスコルビン酸との共存系で抗酸化能を測定した。酸素ラジカルを、まずアスコルビン酸が消去する。アスコルビン酸が消去されるとエピガロカテキンガレートが抗酸化活性を示し、次にケルセチンなどが作用する。抗酸化活性が強い順に作用するが、複数の成分が共存した場合、アスコルビン酸単独よりも著しく2'-dGの酸化的損傷開始を延長し、その遅延時間はそれぞれ単独の場合の時間の和にほぼ等しかった。つまり、いずれの抗酸化成分も単独では遺伝子の損傷を防がないが、生体内でアスコルビン酸と共存すると、その効果は相加的になり、遺伝子の酸化的損傷を予防できると考えた。そこで細胞内での効果を検討した。HepG2細胞に酸素ラジカル発生剤AAPHを添加すると、経時的に2'-dGの酸化産物8-hydroxy-2'-dG (8-OHdG)が生じた。この生成は、あらかじめ細胞を食事抗酸化成分で処理すると顕著に抑制された。従って、食事成分は細胞内に取り込まれ、遺伝子の近くに存在し、その酸化的損傷を未然に防ぐことができると考えた。また、本題から逸れるが興味深い事実を知った。一般的に8-OHdGが体内マーカーとされているが、8-OOHdGはその前駆体である可能性が高かった(第5章、発表業績-[4],[9],[11]、論文業績-[6])。

以上より、抗酸化ポリフェノール成分を豊富に含む食品(表)を日常摂取することは、がんなどの生活習慣病の予防に効果があると考えられる。特に、カテキン類とアスコルビン酸を同時に、豊富に含む緑茶の常飲は効果的である。また、ヒト体内には0.1 mMに近い濃度でアスコルビン酸が存在する。アスコルビン酸はトコフェロールなどの他の抗酸化因子とカップリングして生体の酸化的ストレスを抑え、血中で再生される。抗酸化ポリフェノール成分はこのアスコルビン酸の作用を補助すると思われる。疫学研究の、野菜摂取量が多いヒトは冠動脈心疾患や一部のがんのリスクが低いという結果は、本研究で解明した機構に基づいていると推測する。

論文審査の結果の要旨

氏名	榊原啓之		
論文題目	Preventive Factors in Food against Oxidative Damage of DNA		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	金沢 和樹
	副査	教授	尼川 大作
	副査	教授	長谷川 信
	副査	教授	大野 隆
要 旨			
<p>がんなどの生活習慣病は遺伝子の酸化的損傷によっておこる。また生活スタイルと密接に関係しているので、生活習慣病予防には日常食品に含まれる抗酸化成分が重要な因子となる。本研究は、日本人が多く消費する食品を対象に、抗酸化成分の活性評価法と同定・定量法を確立し、さらに食生活による生活習慣病予防の可能性を分子化学的に追求している。</p> <p>第一章は序論で、研究の焦点を絞るために、遺伝子の酸化的損傷とそれを抑える抗酸化成分の作用機構がどこまで明らかになっており、何が残された疑問点であるのかを、疫学研究の情報などを整理している。そして解明すべき点は、食品成分は体内に取り込まれても濃度は低いので低濃度でも抗酸化能を示す化学構造を明らかにすること、抗酸化成分が遺伝子損傷を抑えるのを評価する適切な手法を確立すること、日常食品に含まれる抗酸化成分の種類と含量を明らかにすること、さらにこれらの食事抗酸化成分が有効な活性を体内で示すのか否</p>			

かの生物学的有効性を明らかにすることであると、この順に各章をまとめている。

第二章ではまず活性の強い抗酸化成分を検索している。その検索は特異な仮説に基づいている。熱帯産の植物は高温と強い日射下で生育しているため、過酸化傷害を防ぐために強い活性成分を含んでいるはずという仮説である。そして様々な熱帯植物を検索し、とくにバナナが強い抗酸化成分を含んでいることを見出している。その成分は既知物質のドーパミンであったが、含有量が特異的に多く、皮部で 80-560 mg/100 g、可食部で 2.5-10 mg/100 g であることを明らかにしている。この報告はアメリカ化学会でトピックスとして取り扱われた。

第三章では新規の抗酸化能評価法を開発している。遺伝子の酸化的損傷を抗酸化成分がどの程度抑えるかを評価するためには、標的は遺伝子であり、酸化剤の活性酸素は細胞内に存在するものでなければならない。従来の手法では標的も活性酸素も生体内に存在しないものを用いている。また、フェントン反応などの補足因子を必要とする複雑な系であり、正しい評価が困難であった。さらに脂溶性・水溶性のいずれか一方の抗酸化成分しか測定できなかった。申請者は、標的として塩基の一つの 2'-デオキシグアノシン (2'-dG) を、活性酸素発生剤として 2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) を用いている。AAPH は化学量論的にスーパーオキシドアニオンを発生するが、これは細胞のミトコンドリアで産生している活性酸素である。この系の産物は新規物質であり、申請者は 8-ヒドロペルオキシ-2'-dG (8-OHdG) と同定している。さらに本産物は、現在ヒトの酸化的ストレスのマーカーとされている 8-OHdG の前駆体である可能性を含んでいた。この系に食品成分を添加し、8-OHdG の量を測定することで、その生成抑制率から抗酸化能を評価できる。しかも 2'-dG が酸化されるよりも早く活性酸素を捕獲できるか否かが評価できるので遺伝子の酸化的損傷抑制効果の適切な評

価法である。また、極めて簡便であり、測定は15分ほどである。さらに脂溶性と水溶性の両方の抗酸化成分に適用できる。本手法は大きな注目を浴び、特許申請中である。

本手法で百種近くの成分を測定し、申請者は、抗酸化効果はオルトージオール構造のものが強く、その作用機構はセミキノン体を介したラジカル捕獲であると結論している。

そこで第四章ではオルトージオール構造の抗酸化成分が日常食品中にどの程度分布しているかを調べている。この分析も適切な手法が報告されていないので、申請者は新たな手法を開発している。試料を液体窒素下粉碎して90%メタノールで抽出したものをグラジエントを用いたHPLCで分析する方法だが、単純ポリフェノール類、カテキン類、フラボノイド配糖体類、アントシアニン類、フラボン・フラボノールアグリコン類、カルコン類の順で検出でき、自然界に存在する約40万種といわれるほぼすべてのポリフェノールを同時に分析できる。溶出位置でポリフェノールの種類を同定し、フォトダイオードアレイのスペクトルから骨格構造を同定し、個々の成分に特異的な最大吸収波長で定量する。そして、これらのデータでライブラリーを作成し、試料を一度HPLCに供すれば種類と含有量が解析できるようにしている。この方法で約百種の食品を分析し、詳細な同定・定量結果を記載している。根菜類はクロロゲン酸などの単純ポリフェノール類を含み、葉野菜類はフラボノイド配糖体が主な抗酸化成分、柑橘類はフラバノンとその配糖体、大豆は特異的にイソフラボンを含み、香草類はフラボノイドアグリコンを、そして茶には特異的にカテキン類が多いとまとめている。

第五章では、食品抗酸化成分が実際にヒトで有効か否かをモデル系で分析し、疫学研究報告と比較議論している。ラットに抗酸化成分を含む

食品を与えるとその血中濃度は上がるが、三章で測定した遺伝子損傷を抑える有効濃度には至らなかった。しかし生体にはアスコルビン酸が存在する。そこでアスコルビン酸と共存させると、食事抗酸化成分は相加的にアスコルビン酸の抗酸化能を補助し、8-OHdGの生成を遅延させた。この点を確認するために細胞を用いている。HepG2細胞にAAPHを作用させると速やかに8-OHdGの産生がはじまるが、ここに食事抗酸化成分を血中存在濃度で与えると顕著に抑制した。これらの結果は2つのことを明らかにしている。食事抗酸化成分は一部しか体内に吸収されないが、血中に取り込まれた成分は細胞膜を通過して細胞内に取り込まれる。さらに、遺伝子の近くに接近することができ、その損傷を抑えることができる。

第六章のまとめでは、ヒト体内には0.1 mMに近い濃度でアスコルビン酸が存在し、トコフェロールなどの他の抗酸化因子とカップリングして生体の酸化的ストレスを抑えるが、血中で再生される。食事抗酸化成分はこのアスコルビン酸の作用を補助する。疫学研究の、野菜摂取量が多いヒトは冠動脈心疾患や一部のがんのリスクが低いという結果は、本研究で解明した機構に基づいているのだろうと申請者は考察している。

以上のように、本研究は、食事因子が遺伝子の酸化的損傷を抑えて生活習慣病を予防することを明確な論理に基づいて分子化学的に解明し、さらに新しい抗酸化能評価法と食品中の抗酸化成分分析法を開発し、また食品成分分析の貴重な資料を提供しているので、極めて価値ある集積と認める。

よって、学位申請者の榊原啓之は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。