

カロテノイドの抗酸化性と食品への応用

サントリー基礎研究所 幹 渉

カロテノイドは赤～黄色、ときにタンパクと複合体を形成して青～紫色を呈し、野菜、果物、藻類、熱帯魚やマダイなど魚類の体表、カニやエビの甲殻、ウニ、スケトウダラなどの卵、サケの筋肉など自然界に幅広く存在する。カロテノイドは、植物および微生物によって生合成される。すなわち、多くの第2次代謝産物と同様にメバロン酸 (C_5) を出発物質とし、ゲラニルピロリン酸 (C_{10})、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (C_{20}) などを中間物質として生合成される。一方、動物にはこれらを生合成する酵素群が存在せず、もっぱら餌料としてあるいは他の方法で取り込み、自らに適合した形に代謝した後蓄積するのみである。化学構造からみると、カロテノイドは主として炭素数40個からなる一種のテトラテルペンで、大きくカロテン類とキサントフィル類の2つのグループに大別することができる。カロテン類は炭化水素で、最もポピュラーなものとして β -カロテンを挙げることができる。広く動植物界に分布し、これらのものの多くは中央ポリエン部の酵素的分裂によってレチノイド (ビタミンA群) に代謝される。すなわちビタミンAの前駆物質 (プロビタミンA) として重要である。一方、キサントフィル類はカロテン類に水酸基、カルボニル基など酸素を含む官能基が修飾したものの総称で、動物では主成分として普遍的に存在している。代表的なものとして、大型藻類の光合成色素として重要なルテインやフコキサンチン、魚介類の体表などに広く主成分として分布するアスタキサンチン、ツナキサンチン、ゼアキサンチンなどを挙げることができる。今回は、特に海洋生物由来のカロテノイドについて言及したい。

生理機能

海洋生物に含まれるカロテノイドに関する研究は、古くからなされており、例えばアスタキサンチンの化学構造はすでに1938年に報告されている。特徴的な色調はまず天

然物化学者や有機化学者の興味をひき、次々と化学構造が決定されていった。次いで比較生化学領域におけるカロテノイドの分布に関する研究、あるいは水産学上重要である養殖魚の体色改善に関する研究およびこれに伴う代謝や生合成に関する研究などが集約的になされてきた。一方、これらの研究はすべて単なる色素としてカロテノイドを見るのみであり、そのものの生理機能・生物活性に関してはほとんど知見がなかった。

1970年代以降になると、ようやく主として高等植物や光合成細菌の特に光合成系において、カロテノイドの生理機能に関する研究が進められるようになり、クロロフィルやタンパクと複合体を形成することによってアンテナ色素としての集光作用を有すること、あるいは遊離型で存在して光による膜破壊に対する保護作用を有することなどが解ってきた。

一方、動物においては、カロテノイドがメラニン、プテリジン類など他の色素との複合作用によって保護色形成に寄与しているのではないかとの推定はされてきたが、科学的にこれらの推定を実証するような研究例はなく、唯一 β -カロテンなどの β -レチニリデン残基を有するカロテノイドについての、プロビタミンA活性に関する研究がなされているに過ぎなかった。

1980年代以降になってカロテノイドの生理機能・生物活性研究が急速に進展し、続々と新たな知見が得られるようになってきた。これらの研究は主として以下に示す4つの領域に大別できる。すなわち、

- i) 光合成におけるエネルギー遷移機能
- ii) 腫瘍細胞増殖抑制活性
- iii) キサントフィル類のプロビタミンA活性
- iv) フリーラジカルや活性酸素の捕捉・消去活性

である。今回はこのうちiv)について言及する。

海洋生物の抗酸化防御戦略として最も重要な生物活性は、フリーラジカルおよび活性酸素の活性に起因する生体内諸物質の過酸化に対する抗酸化活性であると考えられる。これらに関する研究は、1968年にFooteらによって β -カロテンの一重項酸素消去活性が明らかにされたことあたりに端を発する。しかしこの段階では他のカロテノイドに関する知見はなかった。1983年に至って演者はアスタキサンチンの一重項酸素消去活性およびこれに伴う脂質の過酸化に対する抗酸化作用を明らかにした。本知見は、活性酸素に係わるカロテノイドの生物活性が、レチノイドに代謝された後に発現するのではなく、まったく独立したものであることを見いだした最初の例である。また、アスタキサンチンの抗酸化活性が、 β -カロテンよりも強いことも判明した。一方、ジエステル体は活性を示さず、これらの活性が遊離型でのみ発現することも併せて明らかにすることができた。次いで1984年にBurtonとIngoldにより低酸素分圧下における β -カロテンの一重項酸素及びフリーラジカルの捕捉・消去活性が物理化学的に明らかにされ、当該研究が飛躍的に発展した。

フリーラジカルの捕捉・消去活性

寺尾はリノール酸メチル溶液とラジカル発生試薬を用いてフリーラジカル連鎖反応を誘起させ、この系における各種カロテノイドのフリーラジカル捕捉活性を検討した。その結果、むしろ β -カロテンよりもカンタキサンチンやアスタキサンチンなどカルボニル基を有するカロテノイドの方が、フリーラジカル連鎖反応が引き起こす脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑制することを報告した。

演者らは鉄-プロトポルフィリンとリノール酸を用いるフリーラジカル連鎖反応系のモデルを作成し、各種カロテノイドのフリーラジカル捕捉活性を定量的に測定した。その結果、発生したラジカル種は有機フリーラジカルであり、当該ラジカル種をアスタキサンチンが最も効果的に捕捉することが判った。その活性はフリーラジカルの捕捉あるいはその連鎖反応の阻害物質として広く知られているビタミンE (α -トコフェロール)

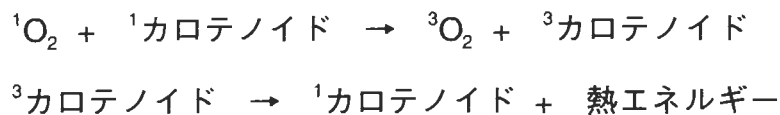
の活性と比較して100倍以上であった。そこで、代表的な海洋生物由来のカロテノイド数種についてその活性を比較検討した結果、カルボニル基や水酸基の活性に対する寄与も併せて明らかになった。これらの結果は、カロテノイド主成分として海洋動物に含有されるアスタキサンチンの生理作用と存在意義がフリーラジカルの捕捉活性であることを強く示唆し、特に魚介類の卵巣に存在する遊離のアスタキサンチンの生理機能を推定する大きな知見であると考えられる。すなわち、海洋の表層に漂う浮遊性の卵は、強い太陽光によって種々のラジカルが発生し易い状況下に存在し、成体で見られるような厚い外皮なども存在せず、何らかの化学的生体防御機構が必要であると考えられる。一方、アスタキサンチンは海洋動物の卵におけるカロテノイド主成分として存在するところから、アスタキサンチンなどのカロテノイドが防御物質として卵に移行し、蓄積されている可能性が極めて強いといえる。

さらに、内海らとの共同研究により、アスタキサンチンのフリーラジカル捕捉活性に関して、ラットを用いた生物試験を実施した。すなわち、ジアルル酸と3価鉄をラットの赤血球に作用させて脂質過酸化を引き起こし、この系におけるアスタキサンチンのラジカル連鎖反応阻害効果を検討したところ、ED₅₀は2μM以下と強い活性を示した。また、2価鉄によってラット肝臓ミトコンドリアの脂質過酸化反応を誘起し、この系におけるアスタキサンチンのラジカル連鎖反応阻害効果を検討したところ、アスタキサンチンは強い阻害活性を示し（ED₅₀=100nM以下）、その活性強度はビタミンE（α-トコフェロール）の約500倍であった。このようにカロテノイドはフリーラジカルの強い捕捉物質であるとともに、これによって引き起こされる脂質の過酸化に対しても強い抗酸化活性を示すことが明らかになった。中でもアスタキサンチンは極めて効果的な捕捉物質であることが判明した。アスタキサンチンは数多くの海洋生物にカロテノイド主成分として存在するが、その一つの生体防御物質としての存在意義としてこのようなラジカルの捕捉活性であると考えられる。

一重項酸素 消去活性

メチレンブルーを一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の発生源とし、リノール酸のエタノール溶液に各種カロテノイドを添加後、白色光を照射して $^1\text{O}_2$ 依存性の脂質過酸化を引き起こした。このモデル系におけるカロテノイドの抗酸化作用を検討したところ、アスタキサンチンは α -トコフェロールの100倍以上の強い活性を示した。また、他の海洋生物由来の遊離型カロテノイドもアスタキサンチンには及ばないもののいずれも α -トコフェロールと比較してより強い活性を示した。そこで、カロテノイドの化学構造と抗酸化活性 ($^1\text{O}_2$ 消去活性) との相関を検討したところ、分子内の水酸基やカルボニル基の存在あるいは、共役二重結合の長さが活性に寄与することが明らかになった。一方、アスタキサンチンジエステルは全く活性を示さず、カロテノイドは遊離型で初めて $^1\text{O}_2$ 消去活性を発現すると考えられた。

推定される活性発現機構を式にして示すと、



ここで、熱エネルギーは主としてカロテノイドの中央ポリエン鎖の振動および回転運動によって生じると考えられる。すなわち、カロテノイドは自ら破壊されることなく $^1\text{O}_2$ を消去することになる。

熱帯域の強い太陽光下で棲息する海洋の表層植物プランクトンなどは、クロロフィルが格好の $^1\text{O}_2$ 発生剤となり、生体膜や細胞の脂質過酸化が容易に生じる環境下にある。かかる場においてはカロテノイドが $^1\text{O}_2$ 消去剤としての役割を果たしていることが容易に推察される。一方、動物はクロロフィルを生体内にそのまま蓄積することはなくテトラピロールなどの物質に代謝するが、同海域に棲息するものは他の諸要因によって $^1\text{O}_2$ が極めて発生しやすい環境下にあるといえる。例えば海洋動物の卵では高濃度のカロテ

ノイドを蓄積する。これらの主成分がアスタキサンチン、ゼアキサンチンあるいはカンタキサンチンなど強い $^1\text{O}_2$ 消去活性を有するカロテノイドであることを考えると、これらは、植物の場合と同じような機構で $^1\text{O}_2$ などの活性酸素を消去している可能性が強い。すなわち、生体防御物質として蓄積されることを示唆するものである。

一方、陸性および海洋性微生物についてカロテノイド産生能を比較検討してみると、海洋性のものは10倍以上の菌株で生産性が認められ、特に熱帯性のものでその傾向が顕著であった。このように、動物、植物あるいは微生物においても、とくに熱帯域海洋に棲息する生物では他の環境下に棲息するものと比較してカロテノイドを生産・含有する頻度が極めて高く、これらの色素群が生体防御物質として機能していると考えられる。

最近、演者らはナフタレン誘導体のエンドペルオキシドを $^1\text{O}_2$ の発生源とし、その化学発光を化学発光検出器で直接測定する方法でカロテノイドの $^1\text{O}_2$ 消去活性を測定したのでここで述べる。本方法を用いることにより光照射を行わないで活性測定が可能となり、光による副反応を抑えることができた。すなわち、脂質の自動酸化あるいは光酸化反応、他の活性酸素種の関与を防ぐため、 $^1\text{O}_2$ の発生源として熱依存性のジメチルナフタレンエンドペルオキシドを低温で有機合成した。この過酸化物は常温では選択的に $^1\text{O}_2$ をリリースするため、室温における $^1\text{O}_2$ 依存性化学発光を化学発光検出器を用いてカウントする方法を用いて各種カロテノイドの $^1\text{O}_2$ 消去活性を定量的に測定した。

非極性溶媒 (CDCl_3)中ではアスタキサンチン、ゼアキサンチンおよび β -カロテンの間でほとんど差異は認められず、これらのカロテノイドはその極性には無関係に α -トコフェロールの数百倍にもおよぶ強い消去活性を示した。カロテノイド間の比較では水酸基あるいはカルボニル基の活性に対する寄与よりもむしろゼアキサンチン(11個)、ルテイン(10個)およびツナキサンチン(9個)の間で認められるように、共役二重結合の数に活性が比例するようであり、こちらのほうが $^1\text{O}_2$ 消去活性に大きく寄与する結果であった。すなわち、非極性溶媒中ではカロテノイドと $^1\text{O}_2$ との物理的接触の頻度はカロテノイド種によってあまり大きな差異はなく、むしろエネルギーの転換効率の方が重要であるらしい。一方、極性溶媒 ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$)中ではアスタキサンチンの活性がきわだっ

ており、 β -カロテンの約40倍であった。また、カンタキサンチンの活性も顕著であり、水酸基よりもカルボニル基の重要性が明らかになった。この結果も共役二重結合の数（カルボニル基の二重結合をカウントした場合）に重要性を支持するものである。また、西野らによって強い抗ガン活性が認められたフコキサンチンやハロシンシアキサンチンの $^1\text{O}_2$ 消去活性は弱く、抗ガン活性と $^1\text{O}_2$ 消去活性はそれぞれ独立していることが示唆された。すなわち、西野らによって確認されている抗ガン活性はカロテノイドの抗プロモーション活性（TPAクラスのプロモーターに対する）に基づくものであると考えられるが、一方、 $^1\text{O}_2$ 消去活性あるいはラジカルの捕捉活性はむしろ抗イニシエーション活性と密接な関係にあるようだ。

食品への応用

カロテノイドの食品への応用を計るとき、最も問題になるのはその水系溶媒中での活性が果たして有機溶媒中でのそれを反映しているのかどうかである。今回はそのあたりにフォーカスを当てて話を進めていきたい。