13-143-11 酸化ストレスに対するビタミンE異性体の併用による防御効果

The protective effect by the combined use of vitamin E isomers on oxidative stress.

○前夷香織、石倉彩恵子、松下奈々恵、永田佳子、金澤秀子

共立薬科大学

Kaori Maeabisu, Saeko Ishikura, Nanae Matsusita, Yoshiko Nagata, Hideko Kanazawa,
Kyoritsu University of pharmacy.

目的

気体状の低分子ラジカルである一酸化窒素(NO)は、その多彩な生理作用によって近年注目されている生体内在性のラジカルである。NO は、水にも油や脂肪にも溶解することから、生体における細胞間の情報伝達の機能や、発生した有機ラジカルの連鎖反応の進展抑制と言った機能を有している。その一方で、多量に発生した場合には、近傍に存在する O₂や活性酸素種と反応し、より反応性の高い高次窒素酸化物を生成し、これらがニトロ化、ニトロソ化やラジカル酸化を引き起こすことにより細胞障害が起こると考えられている。このような作用を有する NO と、代表的な生体内抗酸化物質である Tocopherol(Toc)のとの相互作用を分子レベルで解明することは、NO の細胞毒性を防御する目的からも意義あることと考えられる。さらに Toc の同族体中、 γ -Tocopherol(γ -Toc)は、いくつかの新規な薬理作用が注目され、また窒素酸化物による酸化ストレスに対して α -Tocopherol(α -Toc)より高い防御能を示すこと、更に α -、 γ -Toc 共存下で両者に相互作用のあることが報告されているが、詳細は明らかにされていない。そこで、窒素酸化物による酸化ストレスに対するビタミン E(特に α -Toc や γ -Toc)の抗酸化メカニズムの詳細を明らかにするための検討を行った。そこで、本実験では α -、 γ -Toc を単独及び共存下で用いた場合における各種窒素酸化物との反応性の比較を HPLC 分析により検討を行った。

実験方法

α -, γ -Toc(2 mM、共存の場合それぞれ 1 mM)を 6 種の溶媒(CH₃CN, CH₃OH, 1,2-C₂H₄Cl₂, C₆H₁₄, C₆H₆, CH₃CN / 50 mM phosphate buffer[2/1])に溶かした溶液を調製し、Toc に対して等量の酸素存在下 NO、0.5 等量の NO₂、等量の NO⁺、NO₂⁺と反応させた。反応液を時間ごとに一定量採取し、UV 検出により HPLC 分析した。また、 γ -Toc と窒素酸化物との反応生成物で

ある 5-nitro- γ -tocopherol(5-NGT)を単離精製し、1 mM の 1,2-C₂H₄Cl₂ 溶液を調製し、等モルの NO₂ と反応させた。この 5-NGT 反応溶液を HPLC 分析し、反応性および反応生成物の同定を行った。

HPLC 分析条件

溶離液; A 液 CH₃CN/H₂O=95/5、B 液 CH₃CN/(C₂H₅)₂O=40/60、A→B linear gradient elution

UV 検出波長; 268nm, 290nm、

カラム; CAPCELL PAK C18 UG120

(4.6 mm I.D. × 250 mm)

結果および考察

Toc と窒素酸化物との反応液の HPLC 分析により、 α -Toc からは 5 種(3-Nitrite, α -TQ, Tocored, 5-FDT, Dimer)(Fig. 1)、 γ -Toc からは 3 種(γ -TQ, TR, 5-NGT)の主生成物のピークが検出できた。これらを単離、精

Fig 1. α -Toc の酸化生成物

製し、NMR、MS、IR のスペクトルデータにより構造式を確定した (Fig. 2)。

Fig. 2 γ -Toc の酸化生成物

次に、種々の窒素酸化物との反応による Toc 濃度の減少を比較した (Table 1)。

- a) 酸素存在下における NO との反応において、 α - γ -Toc 単独では、減少速度に大きな差は見られなかった。一方、両者を共存させた場合、極性溶媒では α -Toc、非極性溶媒では γ -Toc の減少が速かった。これらの結果は、二種の Toc の減少過程に相互作用があり、溶媒の極性に応じて作用の様式が変化しているためと考えられる。
- b) NO_2 との反応において、 CH_3CN 、 $1,2\text{-C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ 溶媒中、単独では γ -Toc の減少が速く、共存では、 α -Toc の減少が速かった。特に CH_3CN では反応直後より α -Toc が速やかに減少し、 α -Toc 残量が少なくなると γ -Toc が減少した。共存下では、 γ -Toc の一電子酸化反応により生成した γ -Toc ラジカルを α -Toc が還元し、 γ -Toc の酸化反応が抑制されているものと考えられる。

- c) NO_2^+ との反応では、単独共存の両方で γ -Toc の減少が速かった。 NO^+ との反応では、単独では Toc の減少に差がなく、共存では γ -Toc よりも α -Toc の減少が速くなった。

以上の結果から、単独の場合、 NO_2^+ のようなイオン性の活性種では γ の反応性が高く、それ以外では α 、 γ の速度差はさほど見られないことが分かった。また、共存させた場合、極性溶媒中では、 γ 体の酸化過程を α 体が抑制した。これは、 γ の酸化の初期段階で生成する中間体が α により還元される過程が存在すること、またその過程は両 Toc が単独で酸化を受ける速度よりも速いことを示唆している。非極性溶媒中での相互作用は、これとは逆に α の酸化過程を γ が抑制した。これらの相違が溶媒効果によるものか、あるいは溶媒の違いによる窒素酸化物の活性種の相違によるものかは現在のところ不明であり、今後の検討課題である。 γ -Toc と窒素酸化物との反応生成物である 5-NGT を単離、精製し、 NO_2 と反応させると TR が生成した。この結果から、 γ -Toc から TR が生成する経路とは別に、5-NGT から TR が生成する経路が存在することを見出した。

文献

Nagata Y*, Nishio T, Matsumoto S, Kanazawa K, Mochizuki M, Matsushima Y, Reaction of 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol, an α -tocopherol analogue, with NO in the presence of oxygen., Bioorg. Med. Chem. Lett., 10 (2000) 2709-2712.

Table.1 種々の窒素酸化物の反応による α , γ -Toc 減少速度の比較

	CH_3CN	CH_3OH	$\text{CH}_3\text{CN} + \text{buffer}$	$1,2\text{-C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$	$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$	C_6H_6
NO	単独 $\alpha = \gamma$	$\alpha = \gamma$	$\alpha = \gamma$	$\alpha > \gamma$	-	-
	混合 $\alpha > \gamma$	$\alpha > \gamma$	$\alpha > \gamma$	$\alpha < \gamma$	$\alpha < \gamma$	$\alpha < \gamma$
NO_2	単独 $\alpha < \gamma$	$\alpha = \gamma$	$\alpha = \gamma$	$\alpha < \gamma$	-	-
	混合 $\alpha > \gamma$	$\alpha = \gamma$	$\alpha = \gamma$	$\alpha > \gamma$	$\alpha < \gamma$	$\alpha < \gamma$
NO^+	単独 $\alpha = \gamma$	-	-	-	-	-
	混合 $\alpha > \gamma$	-	-	-	-	-
NO_2^+	単独 $\alpha < \gamma$	-	-	-	-	-
	混合 $\alpha < \gamma$	-	-	-	-	-