

氏名(本国籍)	斉藤史恵 (愛知県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	農博甲第553号		
学位授与年月日	平成22年9月10日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	脂質過酸化反応におけるアルデヒド生成物とビタミンEの作用に関する研究		
審査委員会	主査	岐阜大学 准教授	岩本 悟 志
	副査	岐阜大学 教授	山内 亮
	副査	静岡大学 准教授	河合 真 吾

論 文 の 内 容 の 要 旨

本学位論文は、脂質過酸化二次生成物である α, β -不飽和アルデヒドの反応性に着目して、脂質過酸化反応におけるアルデヒド生成物の作用とビタミンEによる捕捉反応を検討し、最も反応性の高い4-オキソ-2-ノネナル(ONE)による脂質過酸化促進作用と γ -トコフェロール(γ -TH)による捕捉機構について明らかにしたものである。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

親油性 α, β -不飽和アルデヒドは脂質中に生成することから、その場の脂質過酸化に対して何らかの影響を及ぼす可能性がある。そこで、本学位論文では、リノール酸メチル(MeL)の自動酸化反応に対する各種アルデヒドの作用について、検討が行なわれた。その結果、ONEはMeL自動酸化を著しく促進させたが、4-ヒドロキシ-2-ノネナルや他の飽和アルデヒド(ノナナル、オクタナル、ヘキサナル)には、MeLの自動酸化に対してほとんど影響を与えないことが確認された。さらに、ONEの自動酸化促進作用についても、検討が行なわれた。まず、内在性ヒドロペルオキシド(LOOH)と遷移金属イオンをMeLから除去して、MeL自動酸化に対するONEの効果が調べられた。この場合、ONE単独ではMeLの自動酸化は促進されず、脂溶性鉄錯体であるFe(III)-AAの共存によって始めて酸化が促進されることが明らかになった。以上の結果から、ONEの脂質過酸化促進作用は遷移金属イオンを介したものであることが示された。また本研究においては、ONEはFe³⁺を還元してFe²⁺とすることができ、しかも生成したFe²⁺はONEと脂溶性の錯体を形成することが明らかになった。従って、ONEは脂質中の遷移金属イオンを還元型にして錯体を形成し、その結果生じたONE-還元型金属錯体が脂質過酸化開始の原因となるフリーラジカル生成に関わるもとの推定がなされた。

次に、反応性の最も高い ONE とビタミン E との反応について検討が行なわれた。生体膜脂質には脂溶性抗酸化剤として TH が存在しているので、生体膜中で生成された α, β -不飽和アルデヒドは TH によって捕捉される可能性が考えられるが、その反応性については不明であった。したがって、本研究では、ONE と TH との反応が検討された。具体的には、ONE をアセトニトリルに溶かし塩酸存在下 37°C で TH と反応させたところ、 γ -や δ -TH は ONE と反応し、HPLC 分析によって反応生成物ピークが検出された。そこで、 γ -TH と ONE との反応生成物について、分取 HPLC によって反応生成物 1~3 が分離され、化合物 1~3 を構造解析が行なわれた結果、いずれも γ -TH の 5 位に ONE の 5 位が結合したものが確認された。また、その生成機構は、ONE が酸の存在下で閉環してフラン環中間体となり、これが γ -TH の 5 位に結合して化合物 1 となるものであり、さらに反応の進行とともに開環構造の化合物 2 へと変化し、2 にもう 1 分子の ONE が結合して化合物 3 になることが示された。これらの反応生成物は、MeL に ONE と γ -TH を溶かして酸性リン脂質存在下で反応させた場合にも確認できたことから、 γ -TH による ONE 捕捉反応は脂質中でも起こるものと考えられる。

本研究では、脂質過酸化反応で生じた ONE は微量の遷移金属イオンを介して脂質過酸化をさらに促進することが初めて明らかにされた。また、 γ -TH はその抗酸化作用によって ONE の生成を抑制できるが、すでに生成した ONE に対してもこれを捕捉して不活性化できることも明らかにされた。

審 査 結 果 の 要 旨

本学位論文は、脂質過酸化二次生成物である α, β -不飽和アルデヒドの反応性に着目して、脂質過酸化反応におけるアルデヒド生成物の作用とビタミン E による捕捉反応を検討し、最も反応性の高い 4-オキソ-2-ノネナール (ONE) による脂質過酸化促進作用と γ -トコフェロール (γ -TH) による捕捉機構について明らかにしたものである。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

親油性 α, β -不飽和アルデヒドは脂質中に生成することから、その場の脂質過酸化に対して何らかの影響を及ぼす可能性がある。そこで、リノール酸メチル (MeL) の自動酸化反応に対する各種アルデヒドの作用を検討した。その結果、最も高い反応性を有する ONE は MeL 自動酸化を著しく促進させたが、4-ヒドロキシ-2-ノネナールや他の飽和アルデヒド (ノナナール, オクタナール, ヘキサナール) には、MeL の自動酸化に対してほとんど影響を与えなかった。そこで、ONE の自動酸化促進作用をさらに詳細に検討した。まず、内在性ヒドロペルオキシド (LOOH) と遷移金属イオンを除去した MeL を調製して ONE の効果を調べた。この場合、ONE 単独では MeL の自動酸化は促進されず、脂溶性鉄錯体である Fe(III)-AA の共存によって始めて酸化が促進された。以上の結果から、ONE の脂質過酸化促進作用は遷移金属イオンを介したものであることが示された。一般に、還元型の遷移金属イオンは分子状酸素と反応すると、ヒドロキシルラジカルを生成させる。また、反応系に存在する微量の LOOH は、遷移金属イオンによってレドックス分解を受け、アルコキシルラジカルやペルオキシルラジカルを生成させる。本研究において、ONE は Fe³⁺ を還元して Fe²⁺ とすることができ、しかも生成した Fe²⁺ は ONE と脂溶性の錯体を形成できた。従って、ONE は脂質中の遷移金属

イオンを還元型して錯体を形成し、その結果生じた ONE-還元型金属錯体が脂質過酸化開始の原因となるフリーラジカル生成に関わるものと推定した。

次に、反応性の最も高い ONE とビタミン E との反応について検討した。生体膜脂質には脂溶性抗酸化剤として TH が存在しているので、生体膜中で生成された α,β -不飽和アルデヒドは TH によって捕捉される可能性が考えられるが、その反応性については未だ不明である。ONE をアセトニトリルに溶かし塩酸存在下 37°C で TH と反応させたところ、 γ や δ -TH は ONE と反応し、HPLC 分析によって反応生成物ピークが検出された。そこで、 γ -TH と ONE との反応生成物について、分取 HPLC によって反応生成物 1~3 を分離した。化合物 1~3 を構造解析したところ、いずれも γ -TH の 5 位に ONE の 5 位が結合したものであった。また、その生成機構は、ONE が酸の存在下で閉環してフラン環中間体となり、これが γ -TH の 5 位に結合して化合物 1 となるものであり、さらに反応の進行とともに開環構造の化合物 2 へと変化し、2 にもう 1 分子の ONE が結合して化合物 3 になることが示された。これらの反応生成物は、MeL に ONE と γ -TH を溶かして酸性リン脂質存在下で反応させた場合にも確認できたことから、 γ -TH による ONE 捕捉反応は脂質中でも起こるものと考えられた。

本研究によって、脂質過酸化反応で生じた ONE は微量の遷移金属イオンを介して脂質過酸化をさらに促進し、一方、 γ -TH はその抗酸化作用によって ONE の生成を抑制できるが、すでに生成した ONE に対してもこれを捕捉して不活性化できることを明らかにした。

以上の論文についてについて慎重に審議した結果、得られた知見は学術的に価値のあるものと判断された。その結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文は以下のとおりである。

1. Saito, F., Iwamoto, S. & Yamauchi, R.: Reaction products of γ -tocopherol with (*E*)-4-oxo-2-nonenal in acidic acetonitrile. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(1), 168-174 (2010).
2. Saito, F., Iwamoto, S. & Yamauchi, R.: 4-Oxo-2-nonenal as a pro-oxidant during the autoxidation of methyl linoleate in bulk phase. *Food Chemistry*, in press.