

焼酎蒸留粕の有効利用に関する研究 -ビタミン B₆の抗酸化活性-



農学部応用生物科学科 西山和夫

要旨

焼酎蒸留粕を有効利用するために蒸留粕中の成分の中で酵母や麹菌が合成するビタミン B₆化合物の抗酸化活性について検討した。

クマリン-3-カルボン酸(3-CCA)を標的化合物として *in vitro* におけるホモシステインと二価銅による酸化反応に対する4種類のビタミン B₆化合物の影響を検討した結果、3-CCAの水酸化を抑制することが明らかになった。また、ホモシステインと二価銅による3-CCAの水酸化に、過酸化水素が大きく関与していることが明らかになった。さらに過酸化水素と二価銅による3-CCAの水酸化に対するビタミン B₆化合物の抑制活性が認められた。バソクプロインの一価銅に対する発色作用を用いて、二価銅とビタミン B₆化合物の相互作用を検討した。その結果、ピリドキサミンに強い発色抑制が認められ、ピリドキサミンは銅イオンとの相互作用が強いことが明らかになった。今後は、ホモシステインと二価銅による3-CCAの水酸化に対する一重項酸素捕捉剤の抑制活性を調べ、さらにホモシステインと二価銅による培養細胞の傷害に対するビタミン B₆化合物の影響を検討する必要がある。

1. はじめに

これまで焼酎蒸留粕は廃棄物として海洋投棄されたり焼却されたりしていたが、ロンドン条約により海洋投棄は禁止され、焼却もコストが高いことが問題となっている。焼酎蒸留粕には原料由来の成分以外に酵母や麹菌が作り出すビタミン類等、種々の有効成分が多量に含まれている。これまでこれらの有効成分を利用するために焼酎蒸留粕を原料とした家畜の飼料が開発されており、高い評価を受けている。

焼酎蒸留粕中には種々のビタミン類が含まれているが、近年、B群ビタミンの一種であるビタミン B₆はこれまで知られていたビタミンとしての作用に加えて、抗酸化活性を示すことが報告されており、注目を集めている。ビタミン B₆は焼酎の原料に含まれているだけでなく、焼酎の製造に使用される麹菌や酵母によって大量に合成される。本研究では焼酎蒸留粕のヒトへの利用を目指してビタミン B₆の抗酸化活性の検討を行った。

現在、日本人の死因は、第1位が悪性新生物(がん)、続いて第2位に心臓病(心疾患)、第3位が脳血管疾患となっており、これらの病気は三大生活習慣病と呼ばれている。なかでも、2位、3位の心疾患、脳血管疾患は「動脈硬化性疾患」とも呼ばれ、両者を合わせると1位のがんと同等の死亡率を示す。動脈硬化になる危険因子として、高血圧、高脂血症(高コレステロール血症)、糖尿病、喫煙、肥満、遺伝、加齢などが

知られている。しかし、心筋梗塞を起こした人のうち約 80%の血中コレステロール濃度が正常だったこと、また、アテローム性動脈硬化症を引き起こす血管壁の損傷と血中ホモシステイン濃度との間に相関性があることが報告されて以来、動脈硬化の新たな危険因子としてホモシステインが注目されている。

ホモシステインはメチオニン代謝の中間産物で、イオウをもった還元性のアミノ酸であり、酸素の存在下における酸化反応にともなって活性酸素種が発生し、この活性酸素が血管内皮障害や血小板凝集を促進して動脈硬化を引き起こすと考えられている。また、ホモシステインの代謝過程において、メチオニンの転換にはビタミン B₁₂ と葉酸が、システインの生成にはビタミン B₆ が関与している。従って、これらのビタミン B 群が不足すると、血中ホモシステイン濃度は上昇する。そのため、動脈硬化が起こり、動脈硬化性疾患を引き起こす。アメリカ人の女性を対象に調査をしたところ、ビタミン B₆ と葉酸を多量に摂取している人は、摂取していない人と比べて冠動脈疾患のリスクが約半分に減少するという報告がなされており、これにより、これらのビタミン B 群を十分に摂取することで動脈硬化を予防できる可能性が示された。

これまで、高濃度の血中ホモシステインによる動脈硬化の発症にはホモシステインのみが関与していると考えられていた。しかし、ビタミン B₆ の新たな機能として抗酸化活性があること、また、ホモシステインのみを与えたラットとビタミン B₆ 欠乏食とホモシステインを与えたラットの血中ホモシステイン濃度が同等であったにも関わらず、ビタミン B₆ 欠乏食とホモシステインを与えたラットの方が極めて短期間で動脈硬化を発症していたという報告より、高濃度の血中ホモシステインによる動脈硬化の発症にはホモシステインだけでなく、ビタミン B₆ の濃度低下に伴う抗酸化活性の低下も関与していることが示唆された。

そこで、本研究では、二価銅によるホモシステインの酸化反応および酸化反応で生成する活性酸素に対してビタミン B₆ 化合物がどのような影響を及ぼすかについて検討した。今回使用したビタミン B₆ 化合物は、ピリドキシン (PN)、ピリドキサル (PL)、ピリドキサルリン酸 (PLP)、ピリドキサミン (PM) の 4 種類である。また、酸化反応の標的化合物として、ヒドロキシラジカルのような活性酸素種により水酸化を受けると、蛍光物質である 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸 (7-OH-3-CCA、励起波長：400nm、蛍光波長：450nm) になるクマリン-3-カルボン酸 (3-CCA) を用いた。

2. 実験方法

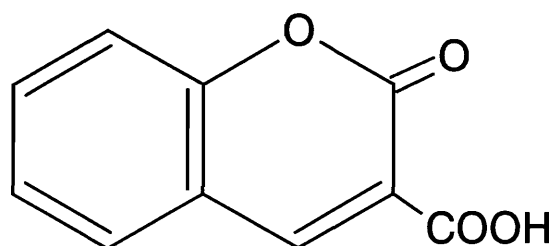
1) ホモシステインと二価銅による 3-CCA に対するホモシステイン濃度と反応時間の影響

ホモシステインと二価銅は相互作用が強いことが報告されており、培養細胞を使った実験にも多く用いられている。そこで本章では、まず *in vitro* におけるホモシステインと二価銅による 3-CCA の水酸化を明らかにし、その酸化に対するビタミン B₆ 化合物の影響を調べるための条件を検討した。

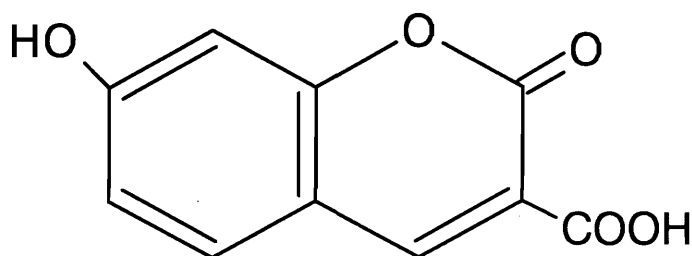
反応液組成及び反応

	容量	終濃度
250mM リン酸 buffer (pH7.4)	0.2ml	50mM
H ₂ O	0.5ml	
0.5mM 3-CCA 溶液	0.1ml	50 μM
0.1mM CuSO ₄ 溶液	0.1ml	10 μM
Hcy 溶液	0.1ml	10,20,50,100 μM
全量	1.0ml	

上記の反応液組成に従って試験管に調製し、37℃で5、60、120 分間インキュベートした。インキュベート後、蛍光光度計 (RF-1500、島津製作所) で測定した。



クマリン-3-カルボン酸



7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸

図1 3-CCA 水酸化の反応機構

3-CCA はヒドロキシルラジカルのような活性酸素種により水酸化を受けると、蛍光物質である 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸 (励起波長: 400nm、蛍光波長:

450nm) になり、これを測定することで 3-CCA の水酸化を確認することができる。

2) ホモシステインと二価銅による 3-CCA の水酸化反応に対する抑制作用
反応液組成及び反応

	容量	終濃度
250mM リン酸 buffer (pH7.4)	0.2ml	50mM
H ₂ O	0.4ml	
0.5mM 3-CCA 溶液	0.1ml	50 μ M
サンプル溶液	0.1ml	
0.1mM CuSO ₄ 溶液	0.1ml	10 μ M
0.1mM Hcy 溶液	0.1ml	10 μ M
全量	1.0ml	

上記の反応液組成に従って試験管に調製し、37°Cで 120 分間インキュベートした。インキュベート後、蛍光光度計 (RF-1500、島津製作所) で測定した。

次式により、各サンプルの 3-CCA 水酸化に対する抑制率を求めた。

$$\text{抑制率(\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A : ブランクの蛍光強度

B : サンプル溶液を加えた時の蛍光強度

3) 過酸化水素と二価銅による 3-CCA の水酸化反応に対する抑制作用

	容量	終濃度
250mM リン酸 buffer (pH7.4)	0.2ml	50mM
H ₂ O	0.4ml	
0.5mM 3-CCA 溶液	0.1ml	50 μ M
サンプル溶液	0.1ml	
0.1mM CuSO ₄ 溶液	0.1ml	10 μ M
10mM H ₂ O ₂ 溶液	0.1ml	1mM
全量	1.0ml	

上記の反応液組成に従って試験管に調製し、37°Cで 5 分間インキュベートした。インキュベート後、蛍光光度計 (RF-1500、島津製作所) で測定した。

次式により、各サンプルの 3-CCA 水酸化に対する抑制率を求めた。

$$\text{抑制率(\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A : ブランクの蛍光強度

B : サンプル溶液を加えた時の蛍光強度

4) 銅イオンとビタミン B₆ の相互作用

下記の反応液組成に従って試験管に調製した。なお、CuSO₄ 溶液を添加後、15 秒後に H₂O₂ 溶液をさらに 10 秒後にバソクプロイン溶液を添加した。調製して 20 秒後に分光光度計 (UV-1200、島津製作所) で測定した。バソクプロインは一価銅と特異的に反応し、橙黄色に発色し ($\lambda_{\max}=485\text{nm}$)、これを測定することで二価銅との相互作用を確認することができる。次式により、各サンプルのバソクプロイン発色抑制率を求めた。

$$\text{発色抑制率(\%)} = (A - B) / A \times 100$$

A : ブランクの吸光度

B : サンプル溶液を加えた時の吸光度

	容量	終濃度
250mM リン酸 buffer (pH7.4)	0.2ml	50mM
H ₂ O	0.4ml	
0.5、1 mM サンプル溶液	0.1ml	50、100 μ M
0.5mM CuSO ₄ 溶液	0.1ml	50 μ M
10mM H ₂ O ₂ 溶液	0.1ml	1mM
1mM バソクプロイン溶液	0.1ml	100 μ M
全量	1.0ml	

3. 結果と考察

1) ホモシステインと二価銅による 3-CCA に対するホモシステイン濃度と反応時間の影響

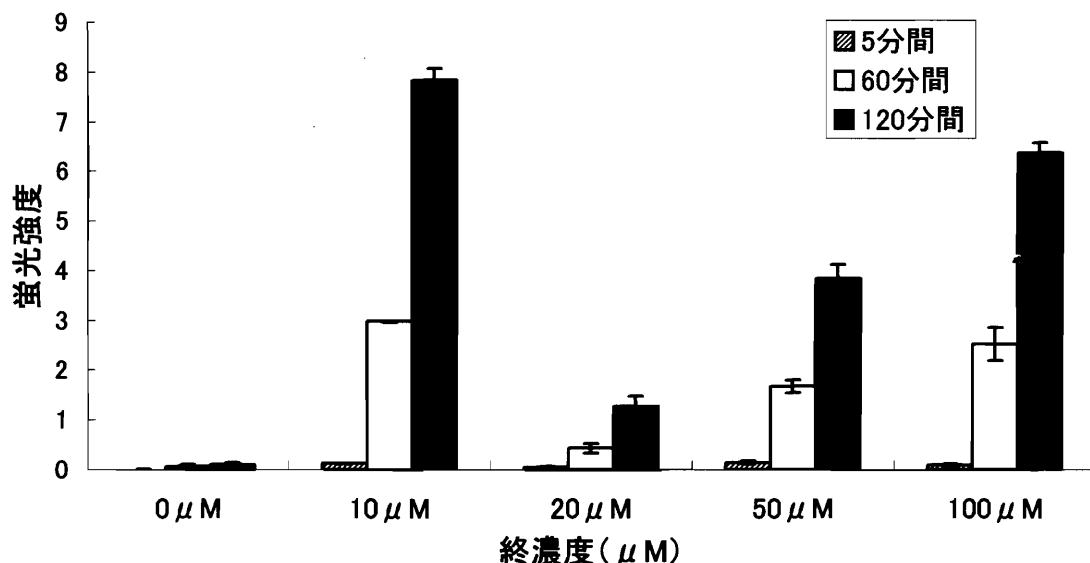


図2 Hcy/Cu²⁺による 3-CCA 水酸化に対する Hcy 濃度と時間の影響 (n = 2)

蛍光が認められたことから、*in vitro*において、ホモシステインと二価銅によって 3-CCA が水酸化されることが明らかになった。

また、インキュベート時間 5 分では蛍光はほとんど認められなかったが、120 分では高い値を示したことから、さらに、ホモシステイン溶液の終濃度 10 μM のときが最も高い値を示したことから、ホモシステインと二価銅による 3-CCA 水酸化に対するビタミン B₆ 化合物の影響を調べるための条件を、ホモシステイン溶液の終濃度 10 μM 、インキュベート時間 120 分とした。

2) ホモシステインと二価銅による 3-CCA の水酸化反応に対する抑制作用

ホモシステインと二価銅による 3-CCA 水酸化に対するビタミン B₆ 化合物の影響を検討した結果、ビタミン B₆ 化合物の 3-CCA 水酸化に対する抑制活性が認められ、PM、PN、PL、PLP の順で強い抑制活性を示した。

また、ビタミン B₆ 化合物の抑制活性はヒドロキシルラジカル捕捉剤よりも強いことがわかった。強力な銅キレーターであるバソクプロインは強力な抑制活性を示した。

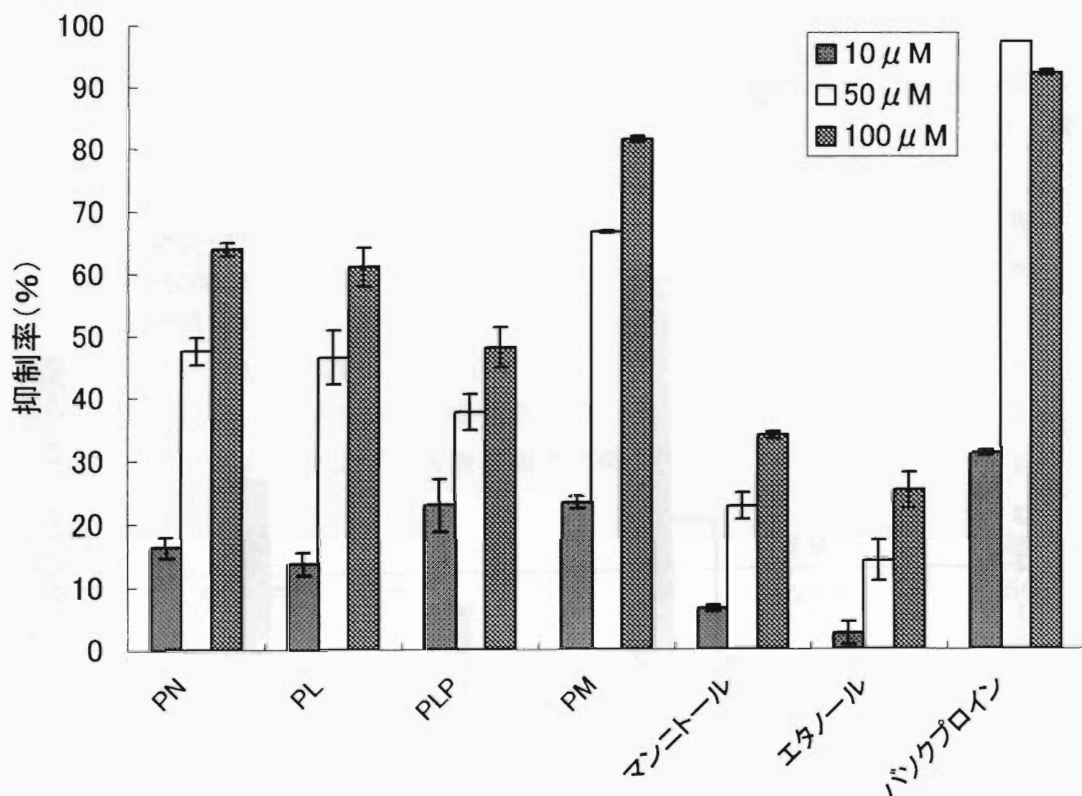


図3 Hcy/Cu²⁺による3-CCA水酸化に対する抑制活性 (n=2または3)

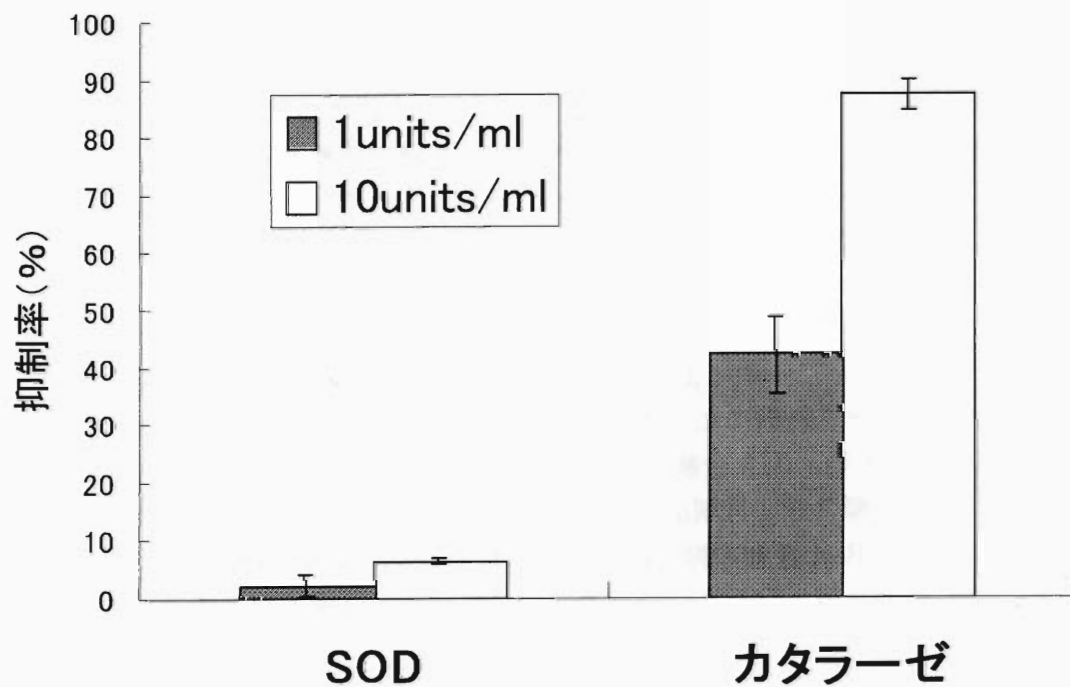


図4 SOD、カタラーゼのHcy/Cu²⁺による3-CCA水酸化に対する抑制活性 (n=2または3)

SOD は抑制活性をほとんど示さなかったのに対し、カタラーゼは強い抑制活性を示した。このことから、ホモシステインと二価銅による 3-CCA 水酸化には、過酸化水素が関与していることが示唆された。

3) 過酸化水素と二価銅による 3-CCA の水酸化反応に対する抑制作用

ホモシステインと二価銅による 3-CCA 水酸化には、過酸化水素が関与していることが示唆されたため、次に過酸化水素と二価銅による 3-CCA 水酸化に対するビタミン B₆ 化合物の影響を検討した。

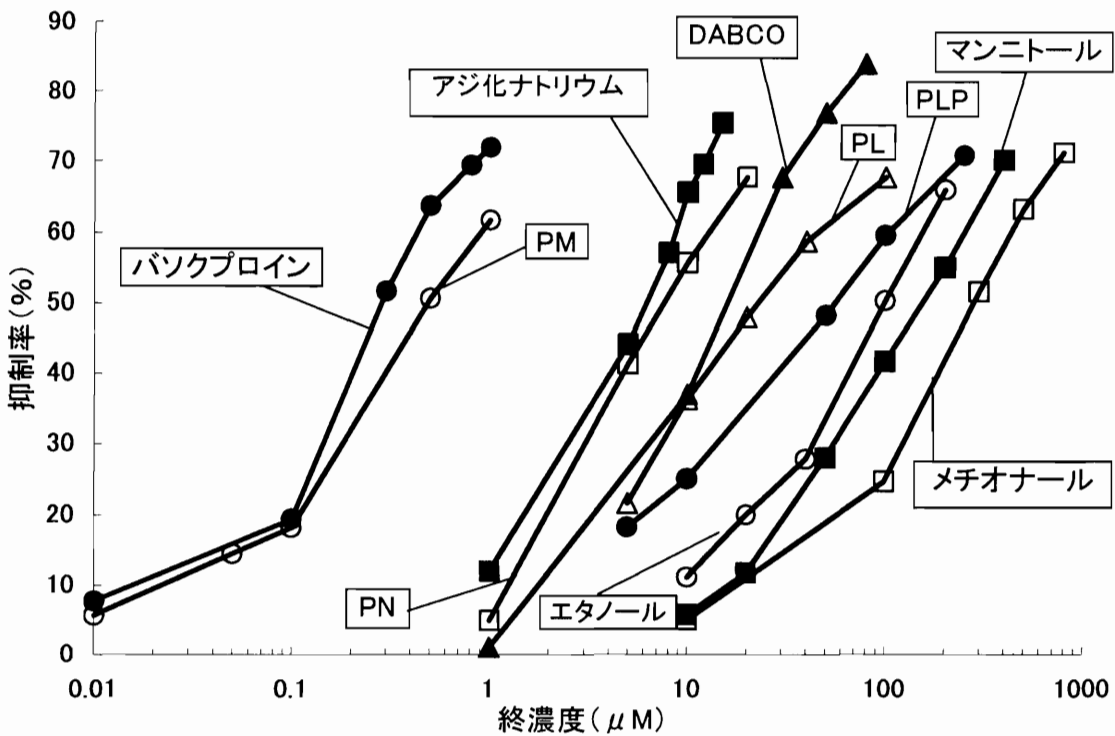


図5 H₂O₂/Cu²⁺による 3-CCA 水酸化に対する抑制活性 (n=2~5)

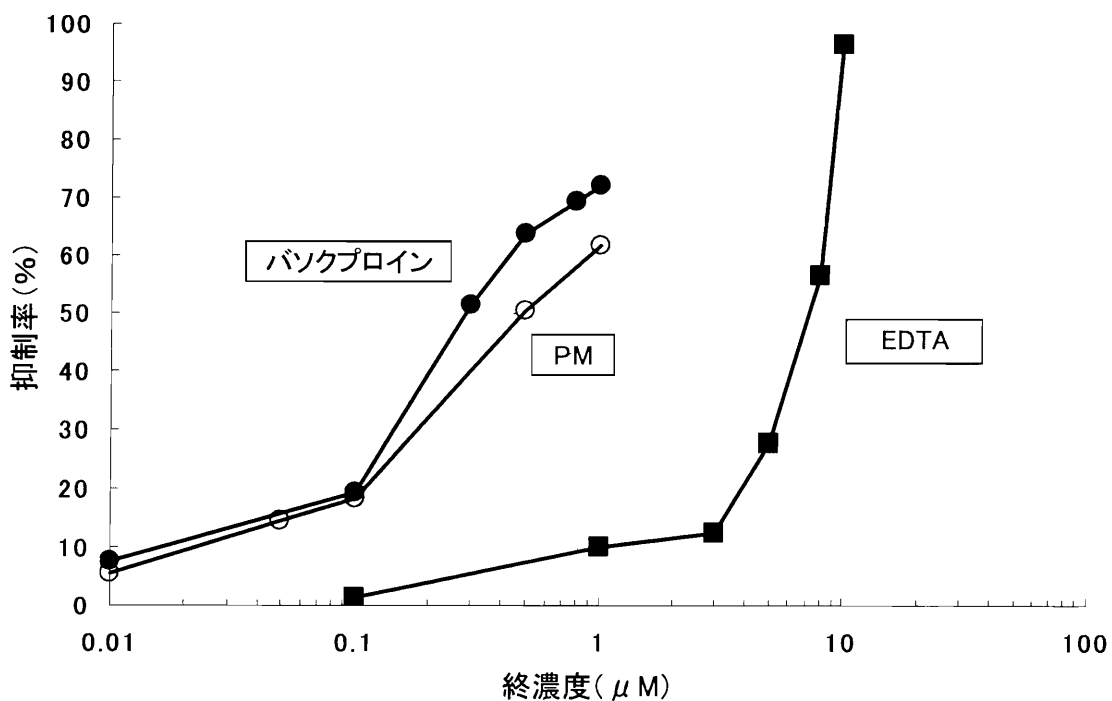


図6 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cu}^{2+}$ による3-CCA水酸化に対する抑制活性 (EDTA、 $n=4$)

表4 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cu}^{2+}$ による3-CCA水酸化に対する IC_{50}

化合物	IC_{50} (μM)
PN	7.9 ± 0.57 ($n=2$)
PL	17.3 ± 2.8 ($n=2$)
PLP	47.5 ± 3.5 ($n=4$)
PM	0.4 ± 0.03 ($n=3$)
EDTA	7.5 ± 0.2 ($n=2$)
バソクプロイン	0.26 ± 0.01 ($n=2$)
エタノール	98.9 ± 7.1 ($n=3$)
マンニトール	154 ± 5.7 ($n=2$)
アジ化ナトリウム	5.3 ± 0.4 ($n=2$)
DABCO	16.5 ± 0.5 ($n=2$)
メチオナル	284 ± 26.9 ($n=2$)

図 5、6 及び表 4 より、ビタミン B₆化合物は PM、PN、PL、PLP の順で強い抗酸化活性を示すことがわかった。また、ビタミン B₆化合物はヒドロキシルラジカル捕捉剤であるエタノール、マンニトールよりも強い抑制活性を示した。バソクプロインは強力な抑制活性を示した。

ヒドロキシルラジカル捕捉剤であるエタノール、マンニトールは同等の抑制活性を示したが、ビタミン B₆化合物、キレーター及び一重項酸素捕捉剤はそれぞれ種類によって抑制活性に差があることがわかった。

ビタミン B₆化合物では、PM が最も強力な抑制活性を示し、次に強力であった PN と比べても 10 倍以上の抑制活性があることがわかった。また、PM の抑制活性は全サンプル中、最も強力な抑制活性を示したバソクプロインと同等であった。バソクプロインは強力な銅キレーターであることから、PM は二価銅との相互作用が強いことが示唆された。

代表的な金属キレーターである EDTA は、バソクプロインほど強力な抑制活性は示さなかったが、他のサンプルとは違い、狭い濃度範囲で急激に抑制活性が変化した。

一重項酸素捕捉剤では、3 種類のサンプルが示した抑制活性に大きな差が認められた。

5) ビタミン B₆化合物と二価銅の相互作用の検討

PM は二価銅との相互作用が強いことが明らかとなった。そこでバソクプロインの一価銅に対する発色作用を用いて、二価銅とビタミン B₆化合物の相互作用を検討した。

バソクプロインは一価銅と特異的に反応し、橙黄色に発色する ($\lambda_{\max}=485\text{nm}$)。そこで、ビタミン B₆化合物と二価銅を反応させ、過酸化水素を添加した後、バソクプロインを添加し、吸光度を測定することでビタミン B₆化合物と二価銅の相互作用を検討した。

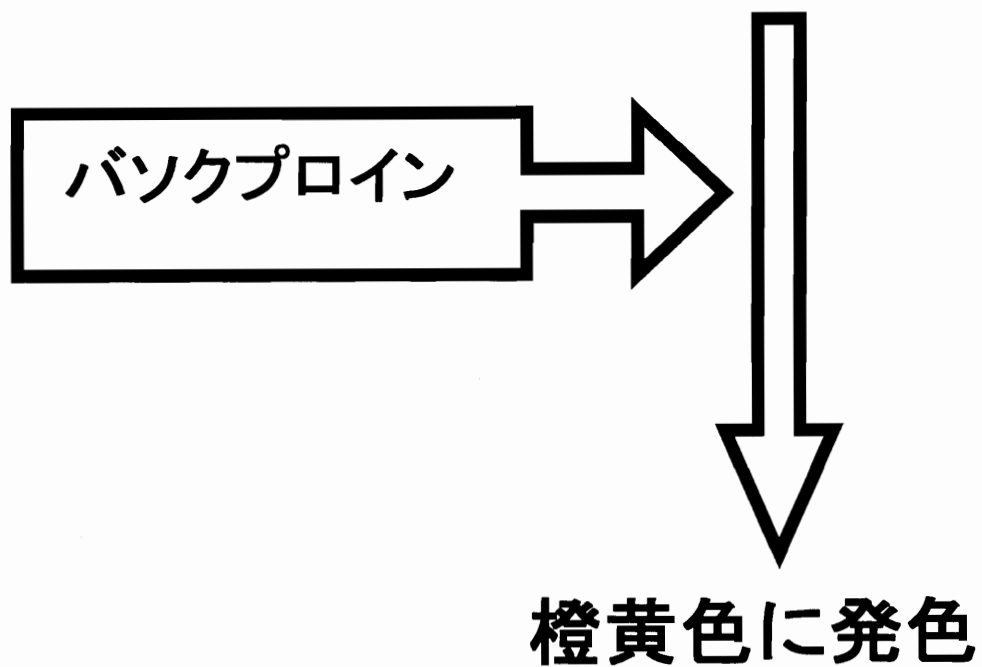


図7 バソクプロインと一価銅の発色作用

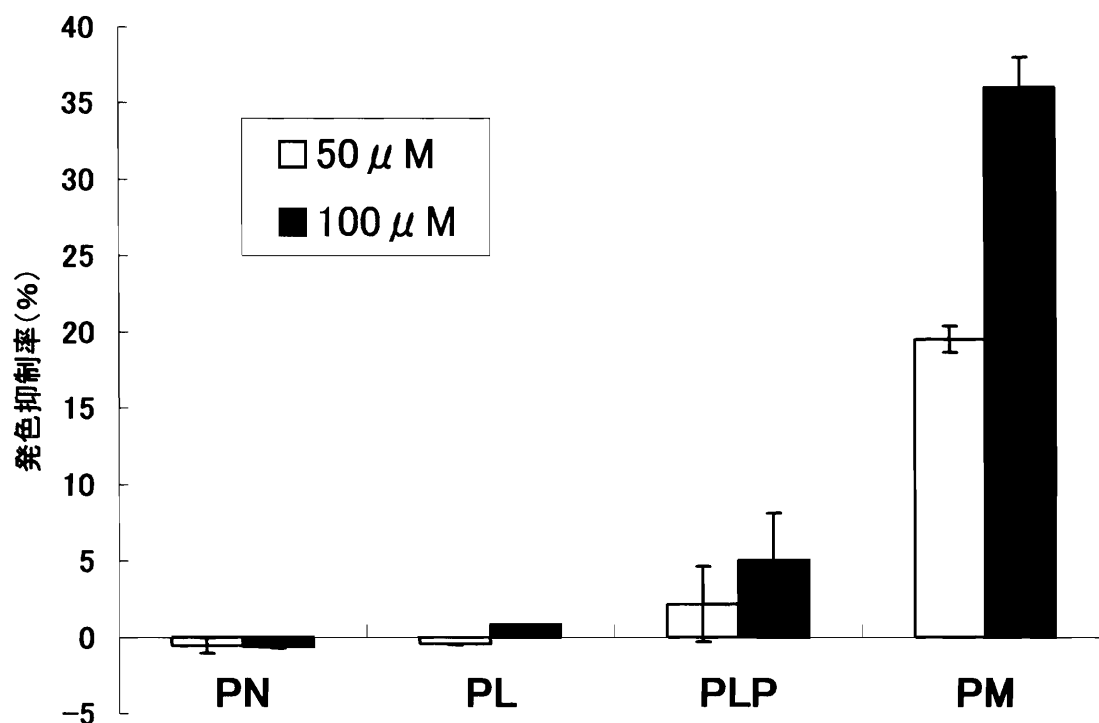


図8 Cu^{2+} とビタミン B₆化合物の相互作用 (n=2)

PM のみに強い発色抑制が認められたことにより、PM は二価銅との相互作用が強いことが明らかになった。従って、これが PM が強力な抗酸化活性を示す一要因であると示唆された。

3. 総括

焼酎蒸留粕を有効利用するために蒸留粕中の成分の中で酵母や麹菌が合成するビタミン B₆化合物の抗酸化活性について検討した。

動脈硬化の新たな危険因子としてホモシステインが注目されている。これまで、高濃度の血中ホモシステインによる動脈硬化の発症にはホモシステインのみが関与していると考えられていた。しかし、最近の研究で高濃度の血中ホモシステインによる動脈硬化の発症にはホモシステインだけでなく、ビタミン B₆の濃度低下に伴う抗酸化活性の低下も関与していることが示唆された。

そこで、本研究では、*in vitro*におけるホモシステインと二価銅による酸化反応を明らかにし、その酸化に対して4種類のビタミン B₆化合物がどのような影響を及ぼすかを検討した。

その結果、*in vitro*におけるホモシステインと二価銅による3-CCAの水酸化が明らかになった。また、ホモシステインと二価銅及び過酸化水素と二価銅による3-CCA水酸化に対するビタミン B₆化合物の抑制活性が認められた。また、PMの抑制活性は

最も強力な抑制活性を示したバソクプロインと同等であり、バソクプロインは強力な銅キレーターであることから、バソクプロインの一価銅に対する発色作用を用いて、銅とビタミン B₆化合物の相互作用を検討した。その結果、PM のみに強い発色抑制が認められ、PM は銅との相互作用が強いことが明らかになった。従って、これが PM が強力な抗酸化活性を示す一要因であると示唆された。

ホモシステインと二価銅による DNA 塩基の損傷に一重項酸素が関与しているという報告がある。また、ビタミン B₆化合物は同等の一重項酸素消去作用をもつことも報告されている。しかし、今回の研究ではビタミン B₆化合物の種類によって抑制活性に大きな差が認められたことから、ホモシステインと二価銅による 3-CCA 水酸化に一重項酸素が関与している可能性は低いと考えた。

今後は、ホモシステインと二価銅による 3-CCA 水酸化に対する一重項酸素捕捉剤の抑制活性を調べ、一重項酸素の関与を明らかにし、培養細胞に対するビタミン B₆化合物の影響を検討する必要がある。