

Study on the Mechanism of Suppression of Lipid Peroxidation by Saccharides*

(Received October 12, 2007)

Kazuyuki Oku^{1,**}

¹*Glycoscience Institute, Research Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.*
 (675-1, Fujisaki, Okayama 702-8006, Japan)

Abstract: The mechanism of the suppression of lipid peroxidation by saccharides was investigated. Trehalose effectively inhibited the heat- or radical-induced peroxidation of unsaturated fatty acid (UFA). Several other saccharides, such as sucrose, maltose and neotrehalose, showed negligible effect on the peroxidation, but maltitol's effectiveness was second to that of trehalose. Maltitol inhibited the peroxidation of UFA by its radical-scavenging effect. Thus, among the sugars studied so far, trehalose is a unique antioxidant whose reaction mechanism has not been clarified. We started this study with the hypothesis that trehalose interacts directly with oxidation-sensitive parts of UFA and consequently protects it from the autoxidation. NMR experiments performed, including ¹H-¹H NOESY measurements, indicated that trehalose selectively interacts with the *cis*-olefin proton pair in the above UFA with 1 : 1 stoichiometry, and the C-3 (C-3') and C-6' (C-6) sites of the sugar are responsible for the interaction. Similar interactions were not observed for the mixtures of the UFA and other saccharides. Quantum chemical study indicates that the OH-3 and OH-6 groups of trehalose bind to the olefin double bonds through OH⋯π and CH⋯O types of hydrogen bonds, respectively. Furthermore, the activation energies were calculated for the hydrogen abstraction reactions from the activated methylene group of heptadiene by a methyl radical. The activation energy drastically increased to *ca.* 30 kcal mol⁻¹ on the complexation with trehalose. These results strongly support the antioxidant mechanism deduced in the previous study and indicate that the formation of unique multiple hydrogen bonds between trehalose and *cis*-olefin bonds is a rather general event, not confined to the case of UFA. This is the first study to elucidate the antioxidant function of trehalose and maltitol.

Key words: trehalose, maltitol, lipid peroxidation, multiple hydrogen bonds interactions, radical-scavenging effect

糖質の脂質変敗抑制作用メカニズムに関する研究*

奥 和之^{1,**}

¹株式会社林原生物化学研究所研究センター糖質研究部門 (702-8006 岡山市藤崎 675-1)

食用油脂や脂質を多く含む食品は、空気中で加熱や光照射されると、油脂の酸化変敗により変敗臭あるいは戻り臭と呼ばれる特有の刺激臭を生じ、これが食品加工時や保存時の風味の劣化や品質の低下をもたらす原因となっている¹⁾。不飽和脂肪酸の多い油脂ほど変敗臭や戻り臭が生じやすく、臭いも強い。不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸よりも劣化しやすいのは不飽和結合をもつためであり、不飽和結合の数が多い高度不飽和脂肪酸はきわめて酸化が速い²⁾。また、変敗の進んだ油脂類は、栄養的に劣るばかりではなく、程度が著しいものは毒性を呈する³⁻⁵⁾。

油脂の酸化に及ぼす糖質添加の影響について、山口らは五炭糖や六炭糖の単糖類は酸化を促進するのに対し、これらの単糖から構成される二糖以上のオリゴ糖は、弱い抗酸化性を有すると報告している⁶⁾。また、ソルビトールやマルチトールなどの糖アルコールには、顕著な抗酸化力が認められており、その作用は、系に生じたラジカルの捕捉作

用または金属キレートによるラジカル自体の生成抑制作用によるとされる^{7,8)}。しかし、これらの作用確認はいずれも定性的なものであり、その作用を網羅的に比較したデータはない。また、糖質の脂質酸化抑制作用に関する作用機構についても不明な点が多い。

本研究では、糖質の不飽和脂肪酸に対する酸化抑制作用(脂質変敗抑制作用)について、食品中の脂質酸化モデルにおける作用の実証とその量比的解析を行い、糖質の作用機構を考察した⁹⁻¹¹⁾。また、非還元性二糖のトレハロースによる脂質酸化抑制は、トレハロースが反応部位(あるいはその近傍)に結合し、酸化反応の遷移状態が影響を受けることにより引き起こされるものと考え、トレハロースによる脂質酸化抑制作用機構を分子レベルで明らかにするため、トレハロースと脂肪酸との相互作用をNMR実験により調べた¹²⁾。さらに、量子化学的手法によるシミュレーションを行い、トレハロースの脂質酸化抑制作用機構を解明した^{12,13)}。

*平成19年度日本応用糖質科学会奨励賞受賞講演

** Corresponding author (Tel. +81-86-276-3142, Fax. +81-86-276-8670, E-mail: okukaz@hayashibara.co.jp)

1. 食品モデル試験における糖質による脂質酸化抑制作用の実証と作用機構解析

脂質の酸化反応は、二重結合（不飽和結合）が2個以上ある高度不飽和脂肪酸で起こりやすく、複雑な反応経路を経て多くの脂質過酸化物質（過酸化脂質、アルデヒドなど）を生成する¹⁴。そのうち不飽和脂肪酸から脂肪酸ヒドロペルオキシド（過酸化脂肪酸）を生成する酸化初期反応と、ヒドロペルオキシドの分解、アルデヒドなどの酸化二次生成物を生成する酸化二次反応とに大別される^{15,16}。本研究では、酸化反応が速やかに進行する加熱分解モデル⁹、酸化初期反応および酸化二次反応を観察する自動酸化モデル¹⁰および、酸化初期反応を詳細に観察できるラジカル酸化モデル¹¹の三つの食品脂質酸化モデルを構築し、糖質による脂質酸化抑制作用メカニズムを検討した。

まず、食品中の脂質への作用を検討するため、セルロースをマトリクスとして、不飽和脂肪酸を水溶液中に分散させる系を用いて、糖質による不飽和脂肪酸加熱分解抑制作用と脂質変敗臭（揮発性アルデヒド）抑制作用を調べた⁹。試験した糖質のうち、トレハロースおよびマルチトールに不飽和脂肪酸加熱分解抑制作用が認められた（Fig. 1）。また、リノール酸の加熱分解と揮発性アルデヒド（2,4-デカジエナル）生成に及ぼすトレハロース添加量の影響について検討したところ、リノール酸残存量はトレハロース添加量に依存して増加し、2,4-デカジエナル量は減少し

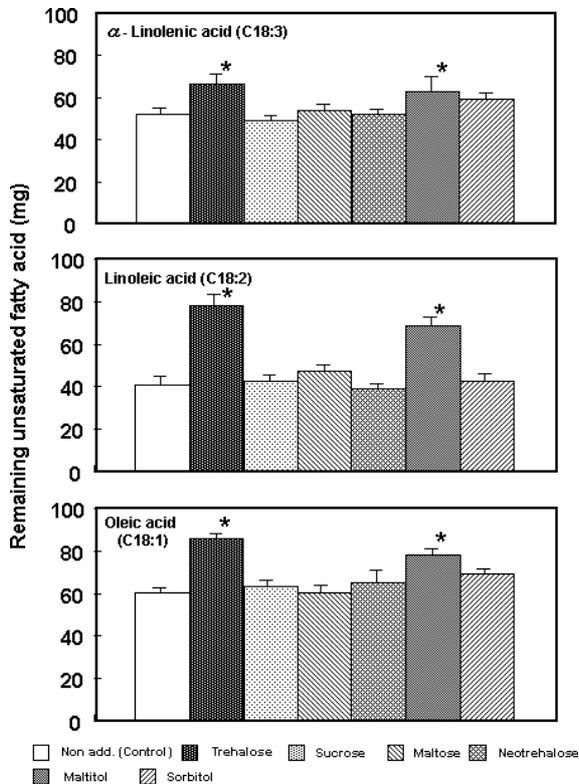


Fig. 1. Effect of saccharides on the remaining of unsaturated fatty acids by boiling.⁹

Mixture containing 100 mg of unsaturated fatty acid, 0.5 g of cellulose powder, 1 mL of 5% saccharide solution and 0.25 mL of 0.6 M phosphate buffer (pH 6.0) were boiled for 1 h. The each unsaturated fatty acid content was measured by gas chromatography. Values are mean \pm SD. * $p < 0.01$ as compared with control (non add.).

た。さらに、残存リノール酸量とトレハロース添加量を比較したところ、リノール酸：トレハロース（モル比）1：1～1：2で作用していた（Fig. 2）。また、オレイン酸（不飽和結合1）、 α -リノレン酸（不飽和結合3）では、トレハロースと残存脂肪酸（無添加系を差し引いたもの）比が、オレイン酸：トレハロース=1：1、 α -リノレン酸：トレハロース=1：2.7となり、その作用量は、不飽和結合数とほぼ一致することがわかった。このような作用は、マルチトールや他の糖質では観測されなかった。

次に、トレハロースおよびマルチトールの不飽和脂肪酸加熱分解抑制の作用機構を明らかにするため、水/エタノール系を適用し、糖質と不飽和脂肪酸とをともに溶解させる系を用いて、脂質酸化により生成する過酸化脂質への影響（酸化初期反応）および過酸化脂質の分解によるアルデヒド生成（酸化二次反応）に与える影響を調べた¹⁰。その結果、トレハロース、マルチトールともに不飽和脂肪酸からのヒドロペルオキシド（過酸化脂肪酸）生成を顕著に抑制したが、ヒドロペルオキシドの分解によるアルデヒド生成反応は抑制しなかった。以上の結果から、トレハロースおよびマルチトールは、脂質酸化初期反応（脂肪酸からのヒドロペルオキシド生成反応）を抑制すると推察した。

マルチトールなどの糖アルコールの抗酸化作用は、生成したラジカルの捕捉作用、または鉄イオンや銅イオンと錯体を形成してラジカルの発生自体を抑える金属封鎖反応（シネルギスト）によるとされている^{7,8}。加熱分解モデルや自動酸化モデルでは、 Fe^{2+} や Cu^{2+} などの金属イオンを使用していないため、マルチトールによる脂質酸化抑制作用は、系に生じたラジカルの捕捉によるものと推定される。トレハロースには Ca^{2+} や Mg^{2+} などのミネラルと相互作用することは報告されているが^{17,18}、ラジカル捕捉作用は報告されていない。

そこで、各種糖質のAAPH（2,2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）・二塩酸塩、水溶性ラジカル発生剤）により生成したヒドロキシラジカルの捕捉作用をESR（電子スピン共鳴）法により検討したところ、糖アルコールであるマンニトール、ソルビトールおよびマルチトールに比較的強い

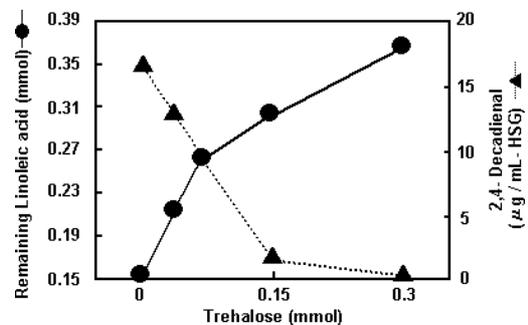
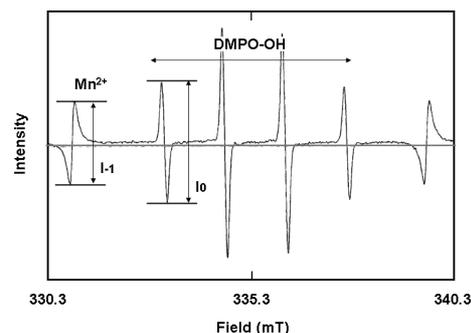


Fig. 2. Effect of the concentration of trehalose on the remaining of linoleic acid and 2,4-decadienal concentration by boiling.⁹

Mixture containing 100 mg of linoleic acid (C 18:2), 0 to 100 mg of trehalose, 0.5 g of cellulose powder and 0.25 mL of 0.6 M phosphate buffer (pH 6.0) were boiled for 1 h. The remaining linoleic acid content and 2,4-decadienal concentration (headspace gas) were measured by gas chromatography.

Table 1. Effect of saccharides on the hydroxylradical (OH radical) induced by AAPH.

| Saccharide | I_0/L_1 | (%) |
|-----------------------|-----------|-----|
| Non add. (Control) | 1.265 | 100 |
| Trehalose | 0.865 | 68 |
| Neotrehalose | 1.240 | 98 |
| Kojibiose | 0.834 | 66 |
| Nigerose | 0.836 | 66 |
| Maltose | 0.786 | 62 |
| Isomaltose | 0.872 | 69 |
| Sucrose | 1.252 | 99 |
| Maltitol | 0.431 | 40 |
| Mannitol | 0.502 | 34 |
| Sorbitol | 0.452 | 36 |



ESR spectra of DMPO adduct OH radical

Mixture containing 50 μ L of 100 mM AAPH, 50 μ L of 180 mM DMPO, 50 μ L of 0.5 M saccharide solution and 50 μ L of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) were heated at 37°C for 3 min. Each value was the average of two replicate measurements.

Table 2. Effect of saccharides on the AAPH-induced radical oxidation of unsaturated fatty acids.⁽¹¹⁾

| Sample | Concn. (mM) | Linoleic acid (LA) | | | α -Linolenic acid (LNA) | | |
|-----------------------|-------------|--------------------|----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|------------------|
| | | Remaining (mg/mL) | HPOD (mg/g LA) | TBARS (mg/g LA) | Remaining (mg/mL) | HPOD (mg/g LNA) | TBARS (mg/g LNA) |
| Non add. (Control) | | 0.10 | 279.4 | 263.3 | 0.04 | 251.4 | 242.5 |
| Trehalose | 29.2 | 1.32 | 126.5 | 204.1 | 0.48 | 125.8 | 141.3 |
| Neotrehalose | 29.2 | 0.36 | 281.3 | 334.5 | 0.08 | 251.3 | 243.4 |
| Kojibiose | 29.2 | 0.28 | 312.5 | 241.3 | 0.16 | 249.8 | 244.3 |
| Nigerose | 29.2 | 0.32 | 321.4 | 238.9 | 0.12 | 250.9 | 245.1 |
| Maltose | 29.2 | 0.40 | 311.1 | 233.3 | 0.12 | 250.9 | 243.6 |
| Isomaltose | 29.2 | 0.44 | 309.5 | 234.6 | 0.12 | 250.1 | 242.1 |
| Sucrose | 29.2 | 0.44 | 289.1 | 307.4 | 0.08 | 257.9 | 255.9 |
| Sorbitol | 29.2 | 0.80 | 211.3 | 206.5 | 0.36 | 192.3 | 231.0 |
| Maltitol | 29.2 | 0.84 | 208.8 | 166.1 | 0.32 | 140.5 | 233.9 |
| BHT | 1.82 | 2.16 | 74.1 | 60.1 | 0.72 | 88.3 | 120.1 |
| α -Tocopherol | 0.92 | 1.20 | 180.3 | 224.5 | 0.44 | 120.2 | 124.5 |

Mixture containing 10 mL of 70 mM unsaturated fatty acid/EtOH solution, 5 mL of 146 mM saccharide solution, 10 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and 1 mL of 500 mM AAPH solution were preserved at 40°C for 24 h. Each value was the average of two replicate measurements.

ラジカル捕捉作用が確認された。一方、トレハロースなど α -グルコ二糖のラジカル捕捉作用は弱かった (Table 1)。

次に、トレハロースと不飽和脂肪酸が直接作用するモデル系を用いて、AAPHによる脂質ラジカル酸化に及ぼす糖質添加の影響を調べた⁽¹¹⁾。特に、脂質酸化抑制を示すトレハロース、マルチトールの特異性の検討、量比的解析を行い、トレハロース、マルチトールの作用機構を考察した。各糖質を添加した場合の反応24時間後の脂肪酸残存量、HPOD生成量およびTBARS生成量をTable 2に示した。

その結果、トレハロース、マルチトールおよびソルビトールに不飽和脂肪酸のラジカル酸化抑制作用が認められた。トレハロースと同等のラジカル捕捉作用を示した α -グルコ二糖 (コジビオース、ニゲロース、マルトースおよびイソマルトース) では、脂質のラジカル酸化抑制作用はみられなかった。トレハロースの構造異性体であるネオトレハロース (α,β -トレハロース) にも酸化抑制作用がみられなかった。

また、反応24時間後の脂肪酸残存量とトレハロース添加量について調べたところ、リノール (不飽和結合2):トレハロース=1:2、 α -リノレン酸 (不飽和結合3):トレハロース=1:3となり、いずれも不飽和結合数と一致した。

これらの結果は、加熱分解抑制試験の結果 (Fig. 2) と一致しており、不飽和脂肪酸の二重結合一つに対し、1分子のトレハロースが作用していることが示唆された。一方、マルチトールやソルビトールでは、脂肪酸残存量と添加量に関する規則性はみられなかった。

次に、トレハロースの一方のグルコース残基が α -グルコシル化されたトレハロース誘導体 (α -グルコシルトレハロース) を用いて脂質ラジカル酸化抑制試験を行い、トレハロースの作用部位を調べた⁽¹¹⁾。トレハロースの3位または6位がグルコシル化されたニゲロシルグルコシドおよびイソマルトシルグルコシド添加により、AAPHによるラジカル酸化抑制作用がトレハロースの約1/2に低下し、脂質酸化抑制に作用するトレハロース部位が、トレハロースの3位水酸基と6位水酸基であることが示唆された。

以上の結果から、トレハロースによる脂肪酸のラジカル酸化抑制作用は、AAPHにより生成したラジカルに対する作用ではなく、トレハロースの脂肪酸への直接的な作用、すなわち反応部位あるいはその近傍に結合し、酸化反応の活性化エネルギーを上昇させることによる作用と考えられる。また、その作用は、トレハロースの α,α -1,1結合に特有の作用であることが示唆された。一方、ソルビトールや

マルチトールによる脂質酸化抑制作用について、その作用メカニズムはトレハロースの作用とは異なり、試験系に発生したラジカルに対する作用（捕捉作用）によるものと考えられた。

2. NMRによるトレハロースと不飽和脂肪酸との相互作用解析

トレハロースの酸化抑制作用は、不飽和脂肪酸を用いた酸化モデル試験結果から、不飽和結合一つに対し1分子のトレハロースが作用していること、作用部位はトレハロース3位水酸基/6位水酸基であることが示唆された⁹⁻¹¹。また、他の糖質（スクロース、マルトース、ネオトレハロースなど）には酸化抑制作用がみられなかった。一方、マルチトールはトレハロースと同等の脂質酸化抑制作用を示したが、これはラジカル捕捉作用による酸化初期反応の抑制によるものと考えられた。このように、トレハロースによる脂質酸化抑制反応は、この糖に特有の作用であり、トレハロースが脂質に結合し、酸化反応の遷移状態が影響を受けることにより引き起こされるものと推測された。

トレハロースと不飽和脂肪酸との特異的相互作用の存在を実証するため、トレハロースと、構造の異なる数種の脂肪酸との混合液の¹H-および¹³C-NMRによるスピン-格子緩和時間 (T_1 緩和時間) の測定および¹H-¹H NOESY 解析を行った¹²。

トレハロースとリノール酸 (*cis* 二重結合 2 個) 混合物の¹H-NMR の結果、トレハロース共存によりオレフィンプロトンシグナルが広幅化していることが観測された

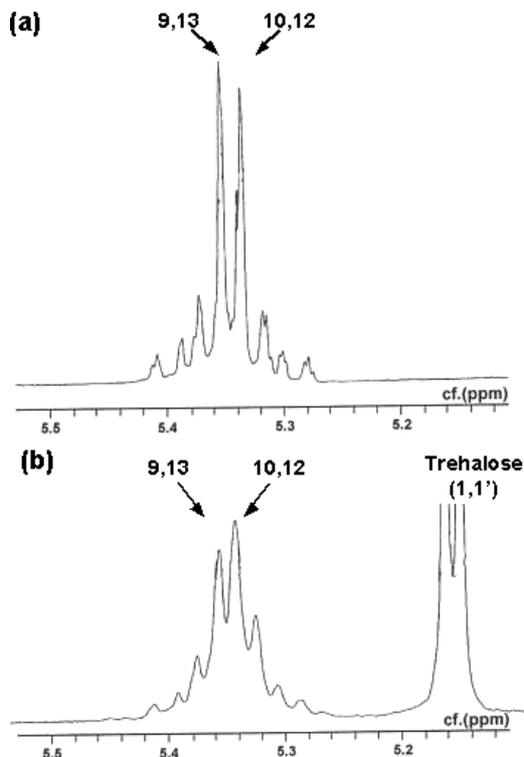


Fig. 3. ¹H-NMR spectra of linoleic acid olefine protons (H-9, 10, 12 and 13).¹²⁾

(a) without trehalose, (b) with trehalose (trehalose:linoleic acid=2:1).

(Fig. 3). 同様の変化は、二重結合に隣接したプロトンでも確認した。このように原子核が相互作用を受けると、その核の運動性が低下し、シグナルの広幅化や緩和時間の変化が観測される¹⁹。リノール酸プロトンの緩和時間に及ぼすトレハロースの用量依存性について調べたところ、リノール酸：トレハロース比 (モル比) が 1:2 まではトレハロース添加量に依存して¹H- T_1 値が減少したが、1:2 でプラトーに達した (Fig. 4)。このような作用点は、オレイン酸 (*cis* 二重結合 1 個) では脂肪酸：トレハロース比が 1:1、 α -リノレン酸 (*cis* 二重結合 3 個) では 1:3 となり、酸化モデル試験の結果と一致した。以上の結果は、トレハロースが *cis* 二重結合一つに対し 1 分子結合し、 T_1 緩和時間の低下は複合体形成による分子運動低下により生じると解釈される。

さらに、トレハロースと *cis* 型不飽和脂肪酸との相互作用の存在に対し確証を得るため、トレハロースとリノール酸混合液 (モル比 2:1) の¹H-¹H NOESY 解析を行った (Fig. 5)¹²。この二次元スペクトルには、対角信号 (COSY) と相関信号 (NOE) が現れる。右上から対角線上にみられるスポットは、対応している¹H核同士のCOSYを示し、それ以外は異なる¹H核間のNOEである。図から明らかとなり、リノール酸オレフィンプロトン (H-9,10,12,13; 5.3-5.4 ppm) とトレハロース6位 (または6'位) メチンプロトン間にNOEが観測され、トレハロースが、*cis* 型二重結合に空間的に接近して、複合体を形成していることが証明された。

また、トレハロースの作用部位について、トレハロース炭素に帰属される¹³C- T_1 値を測定し比較検討したところ、*cis* 型二重結合を有する脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸) を共存させた場合にのみトレハロース3,3'位および6,6'位のメチン炭素の¹³C- T_1 値が顕著に減少した¹²。また、トレハロース3,3'位および6,6'位メチン炭素の化学シフト値は、脂肪酸共存によりそれぞれ0.2-0.3 ppm, 0.1-0.2 ppm 低磁場側にシフトし、トレハロース3,3'位および6,6'位が *cis* 型二重結合との相互作用に関与していることが示唆された。

一方、マルトースやイソマルトースなどの α -グルコ二糖、トレハロースの構造異性体であるネオトレハロースお

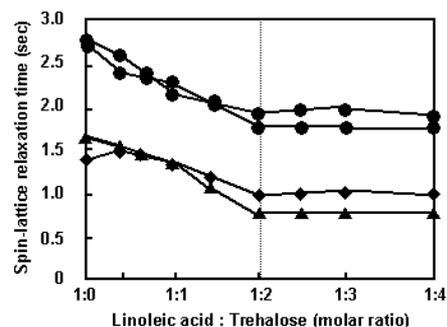


Fig. 4. Effect of molar ratio of trehalose to linoleic acid on the relaxation time of the olefine and the adjacent methylene protons.¹²⁾

●: H-9, 10, 12, 13 (olefine protons), ▲: H-11, ◆: H-8, 14.

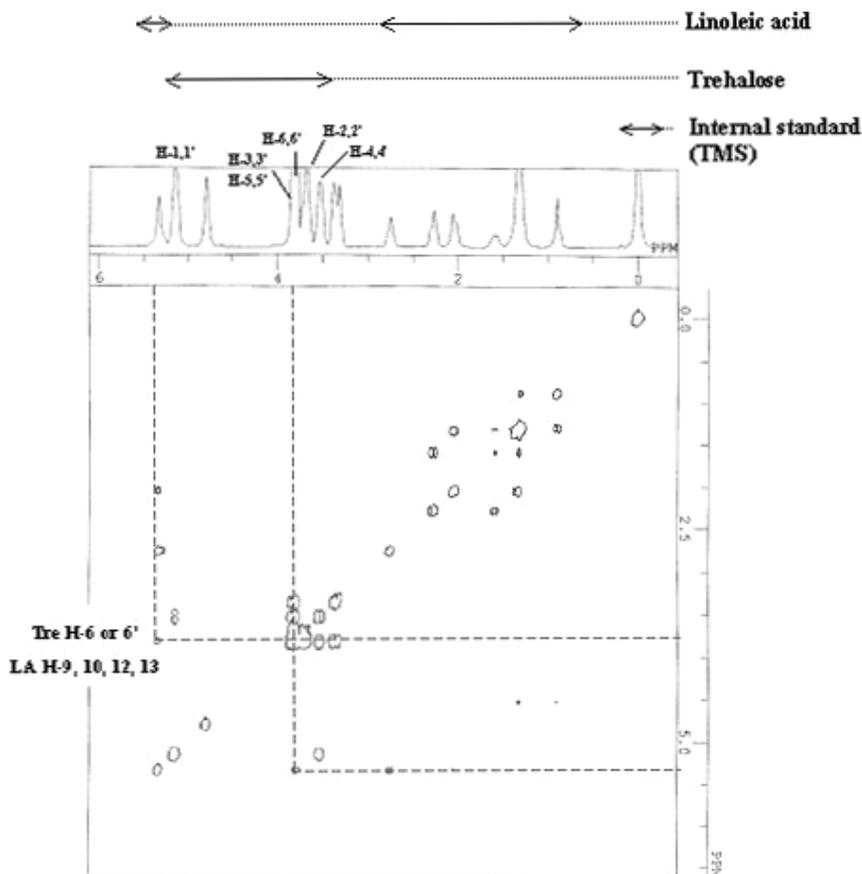


Fig. 5. ^1H - ^1H NOESY spectrum of a mixture of trehalose and linoleic acid (molar ratio=2:1).¹²⁾

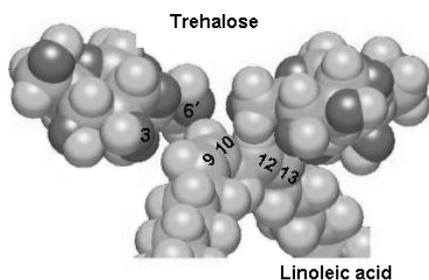


Fig. 6. Plausible model of the interaction between trehalose and linoleic acid.

Modeling was carried out by WinMOPAC ver.3.0.¹²⁾

よびスクロース共存ではこのような変化はみられなかった。さらに、トレハロースと同等の脂質酸化抑制作用を示したマルチトールやソルビトールでも緩和時間変化やNOEは観測されなかった。不飽和脂肪酸以外のモデル物質として、低分子ジエン類を用いた場合でも同様の結果となった¹³⁾。以上の結果から、トレハロースのみが特異的に脂質二重結合に作用していることが示唆された。

そこで、NMRの結果をもとに、トレハロースと脂肪酸との相互作用について、コンピュータ計算による分子モデルを構築した (Fig. 6)。

cis 型二重結合を二つもつリノール酸を用いて、この *cis* 型二重結合に、トレハロース 2 分子が立体障害を伴わずに結合できるか否かを検討した。半経験的分子軌道計算を用いた簡単な分子モデリングにより、いずれの糖分子も 6 (6′)-OH および 3′(3)-OH を介して脂肪酸の *cis* 型二重結合に接近し、トレハロース/リノール酸 2 : 1 複合体の形成が

可能であることが判明した¹²⁾。

3. 量子化学計算によるトレハロースの脂質変敗抑制作用機構解析

NMR 実験の情報は、確かにトレハロースと *cis* 型二重結合をもつ不飽和脂肪酸との複合体形成を支持しているが、その原子レベルでの構造と脂質酸化抑制作用との関連は実験のみではわからない。そこで、トレハロースと不飽和脂肪酸との相互作用 (複合体の構造、安定化エネルギーおよび電子構造解析) を *ab initio* 分子軌道計算と密度汎関数理論 (density functional theory ; DFT) 計算を用いて評価した^{12,13)}。また、脂質の酸化初期反応における分子モデルを構築し、トレハロースとの相互作用が脂質酸化抑制作用に及ぼす影響を定量的に解析した¹³⁾。

まず、*cis* 型二重結合の最も簡単なモデルとして、2-ブテンを取り上げ、トレハロースと 2-ブテン間にどのような結合が形成されるかを検討した。その結果、トレハロース 6 位 (または 6 位) OH 基が二重結合の π 電子に $\text{OH}\cdots\pi$ 型の水素結合を形成した構造がより安定なものとして得られた。このとき CH 基には、もう一方のグルコース残基の 3 位 OH 基が $\text{CH}\cdots\text{O}$ 型の水素結合した多重水素結合モデルが得られた (Fig. 7)。そのときの安定化エネルギーは $-5.28 \text{ kcal mol}^{-1}$ (B3LYP/6-311++G**//B3LYP/6-31G**計算) であった。ここで得られた複合体の安定化エネルギーは、 $\text{OH}\cdots\text{O}$ 型や $\text{NH}\cdots\text{O}$ 型水素結合など通常の極性基間の水素結合エネルギー ($7-8 \text{ kcal mol}^{-1}$, 文献 20)

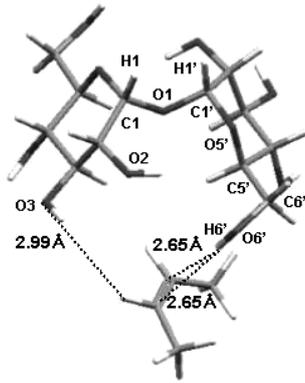


Fig. 7. The optimized structures of trehalose/2-butene complex obtained from the HF/6-31 G** calculation.¹²⁾

For the isolated trehalose, the torsion angles around the O5'-C5'-C6'-O6' and C5'-C6'-O6'-H6' bonds were -30.6° and -47.2° , respectively. The values of these torsion angles were changed upon complexation with 2-butene: namely the O5'-C5'-C6'-O6' and C5'-C6'-O6'-H6' torsion angles were 67.8° and 91.5° , respectively.

に比べると小さいが、常温での分子の熱運動エネルギー kT ($0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, k ; ボルツマン定数, T ; 300 K) と比べて十分大きく、複合体の安定化の主要因子と考えてよい。近年、タンパク質の構造論において、高次構造を解析すると、側鎖間の水素結合や非極性相互作用, CH/n 相互作用や CH/ π 相互作用などがネットワークを作り、構造をフレキシブルに保っていることがわかっている²¹⁻²⁹⁾。また、Peason のハード・ソフト概念によると、OH 基や NH 基はハードな酸 (HA), CH 基はソフトな酸 (SA), O 原子や N 原子上の孤立電子対はハードな塩基 (HB), 芳香環や不飽和結合の π 電子はソフトな塩基 (SB) に分類される³⁰⁾。水素結合で電子を与えるのは、酸素や窒素原子上にある孤立電子対である。したがって水素結合をハードな酸とハードな塩基の相互作用とすると、他に 3 通りの相互作用, HA-SB (XH/ π 相互作用), SA-HB (CH/n 相互作用), SA-HB (CH/ π 相互作用) が存在する。また、水素結合と CH/ π 相互作用, OH/ π 相互作用と CH/ π 相互作用の協同効果などを指摘した報告がある。このような現象からも、糖 OH 基

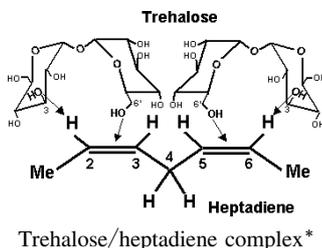
グループ (上記では HA に分類) が *cis* 型二重結合 (SB) に OH/ π 型の水素結合を形成することが十分に予測される。

次に、不飽和脂肪酸のリノール酸 (不飽和結合 2) のモデルとして 2,5-ヘプタジエンを用いトレハロースとの相互作用構造を調べたところ、トレハロース 2 分子とヘプタジエン 1 分子が、分子間複合体を形成することがわかった。その作用部位は、トレハロース 3 位 (または 3' 位) および 6' 位 (または 6 位) OH 基であり、*cis* 型二重結合との多重水素結合 (CH \cdots O 型, OH $\cdots\pi$ 型水素結合) によることが明らかになった。そこで、トレハロース/ヘプタジエン複合体について、複合体形成に伴うヘプタジエン炭素の電荷分布を調べた。ヘプタジエンのオレフィン部にトレハロース 3 位および 6' 位 OH 基が CH \cdots O 型および OH $\cdots\pi$ 型の水素結合することにより、オレフィン C-3, C-5 炭素および C-2, C-6 炭素上で電子密度が増加し、それに対応して活性メチレン炭素 C-4 の電子密度が低下した (Table 3)。以上の結果は次のように解釈される。ヘプタジエン (リノール酸) は、*cis* 型二重結合二つに挟まれたメチレン基 (活性メチレン基) をもつ構造を有しており、この活性メチレン炭素に電荷が局在して不安定な構造をとっている。これにトレハロースが CH \cdots O および OH $\cdots\pi$ 型の多重水素結合することにより、この活性メチレン炭素の電荷を非局在化して活性メチレン基を安定化するとともに、ラジカルなどによる化学反応性そのものを低下させていると考えられる。

次に、脂質のラジカル酸化系のシミュレーションモデルとして、メチルラジカルによるヘプタジエン活性メチレン水素の引き抜き反応モデルを構築し、水素引き抜き反応 (酸化開始反応) の活性化エネルギーを求めた¹³⁾。ヘプタジエン活性メチレン水素の C-H 延長線上にメチルラジカルを配位し、この CH $_2 \rightleftharpoons \cdot$ CH $_3$ 間の距離を変化させることにより遷移状態の構造を求めた。反応前の生成エネルギーと遷移状態の生成エネルギー差を水素引き抜き反応の活性化

Table 3. Electron densities on the heptadiene carbon atoms.¹³⁾

| | Mulliken charge | | | | | | |
|------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | C 1 | C 2 | C 3 | C 4 | C 5 | C 6 | C 7 |
| | RHF/6-31 G** | | | | | | |
| Heptadiene | -0.358 | -0.128 | -0.119 | -0.277 | -0.119 | -0.128 | -0.359 |
| Complex* | -0.382 | -0.182 | -0.176 | -0.209 | -0.177 | -0.182 | -0.377 |
| | B 3 LYP/6-31 G** | | | | | | |
| Heptadiene | -0.352 | -0.134 | -0.112 | -0.276 | -0.112 | -0.134 | -0.352 |
| Complex* | -0.367 | -0.174 | -0.197 | -0.205 | -0.197 | -0.175 | -0.365 |



We examined the charge distribution on the heptadiene molecule and the results are summarized, where electron densities were calculated by Mulliken population analysis.

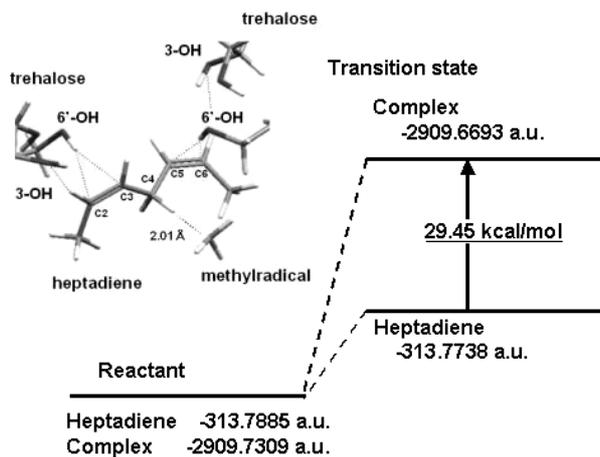


Fig. 8. The structures of transition state and energy diagram of the trehalose/heptadiene 2:1 complex in the methyl radical-induced reaction ($\text{CH}_2 \rightleftharpoons \cdot\text{CH}_3$ distance of 2.01 Å) obtained from the UB 3 LYP/6-31 G** calculations.¹³⁾

The structures of the trehalose molecules are truncated. The values of the C 2-C 3-C 4-C 5 and C 6-C 5-O 4-C 3 torsion angles deviated from the planar trans structure: namely the C 2-C 3-C 4-C 5 and C 6-C 5-O 4-C 3 torsion angles were 157.93° and 150.44°, respectively.

エネルギーとして求め、トレハロース共存の影響を調べた。その結果、ヘプタジエン単体、トレハロースとの複合体いずれも、活性メチレン水素とメチルラジカル炭素間距離 ($\text{CH}_2 \rightleftharpoons \cdot\text{CH}_3$) が 2.01 Å で遷移状態の構造を示した (Fig. 8)。このとき、ヘプタジエン炭素の二面角 C 2-C 3-C 4-C 5, C 6-C 5-C 4-C 3 は、180°, 180° から 157.93°, 150.44° にそれぞれ変化した。活性メチレン水素引き抜き反応に対するエネルギーダイアグラムを Fig. 8 に示した。

ヘプタジエン単体での活性化エネルギー値は、9.22 kcal mol⁻¹ (UB 3 LYP/6-31 G**計算) となり、実際の酸化反応系に近いモデルであることが判明した。一方、トレハロースとの錯体形成により 29.45 kcal mol⁻¹ (UB 3 LYP/6-31 G**計算) の活性化エネルギー増大が認められた。このエネルギー増大は Arrhenius の反応速度論によると 10⁹ 倍以上の速度低下に相当する。すなわち、トレハロースとの錯体形成は、脂質酸化初期反応を速度論的に抑制することがわかった。

このように、トレハロースと不飽和結合との相互作用が、脂質酸化抑制作用に寄与していることが、電子構造論およびエネルギー論の双方から証明された。

最後に、トレハロースの構造とエネルギー論的観点からトレハロースの優位性を考察する。他の糖質と比較した場合、脂質酸化モデル実験や NMR 実験から、トレハロース以外の糖質が不飽和脂肪酸の酸化部位と直接相互作用することを示すデータは得られなかった⁹⁻¹³⁾。トレハロース (α , α -1,1 結合) とその構造異性体であるネオトレハロース (α , β -1,1 結合) を比較すると、構造上大差がないように思えるが、両者では、グルコシド結合の二面角 (ϕ , ψ) 回りのコンホメーションエネルギー曲面に大きな違いがある。トレハロースはグルコシド結合の二面角 ϕ , ψ に対し、エネ

ルギー極小を 1 点のみもつものに対し、ネオトレハロースや α -1,4 結合のマルトースなどでは、複数個のエネルギー極小が存在する^{31,32)}。言い換えると、トレハロースは単一のコンホメーションを維持するが、ネオトレハロースやマルトースのグルコシド結合は回転しながら多様な構造を取り得る。したがって、たとえネオトレハロースやマルトースと *cis* 型二重結合との間で複合体が形成されたとしても、糖のコンホメーション変化により、その複合体はすぐに壊れてしまう。トレハロースと *cis* 型二重結合との相互作用は、文献 31) のグルコシド結合のコンホメーションエネルギーマップから明らかのように、一度形成されるとグルコシド結合の回転が束縛されるため、比較的安定に複合体構造が保持される。すなわち、トレハロースの形成する複合体の安定性は、エントロピー効果に起因すると考えられる。また、トレハロース 2 含水結晶の X 線解析³³⁾ やトレハロース水溶液の NMR 解析³⁴⁾、およびコンピューターシミュレーション³⁵⁾ によると、トレハロースの水酸基は、マルトースやスクロースのように分子内水素結合を形成しない。よって、トレハロースの水酸基は、水素結合を他分子に求めようとする傾向が強く、そのため分子間相互作用に適合しやすいと考えられる³⁶⁻³⁸⁾。

以上をまとめると、トレハロース特有の α , α -1,1 グルコシド結合と水酸基のエカトリアル配向がこの相互作用発現のための必須条件になっていると結論できる。

4. おわりに

脂質の酸化は、それを含む食品の風味劣化や品質低下をもたらすだけではなく、生じた過酸化物質や揮発性アルデヒドなどの分解物や重合物を介して、健康や環境に重大な悪影響を及ぼす³⁻⁵⁾。また、過酸化物質は、生体内の膜リン脂質を酸化するとともに、遺伝子 DNA にも損傷を与える³⁹⁾。また、脂質過酸化物質から生成する不飽和アルデヒドは、リジンなど塩基性アミノ酸残基と強く反応し、タンパク質を修飾、変性することが知られている⁴⁰⁾。

脂質の酸化防止を目的に、種々の合成酸化防止剤 (BHT など) が開発されてきたが、近年、安全性などの問題点から、天然酸化防止剤が注目されている。ビタミン C (アスコルビン酸) やビタミン E (α -トコフェロール)、カテキンなどのポリフェノール類が食品中の酸化防止剤として有名であるが、これらは、自身が酸化されることによって抗酸化的に働いている。しかし、ある一定濃度を過ぎると、自身がラジカル化し酸化を促進することが知られており、過剰摂取時の安全性に問題がある^{41,42)}。したがって、天然糖質であるトレハロースやマルチトールが、脂質の酸化抑制作用やアルデヒド生成抑制作用を有することは、この観点からも有意義である。

従来、糖質は適合溶質として、核酸や生体膜などの生体成分を、熱、乾燥、凍結、浸透圧、などの水ストレスから防御する作用を有していることが提唱されてきた⁴³⁻⁵²⁾。本研究は、トレハロースやマルチトールの機能に酸化抑制と

いう新しい機能を加えた。トレハロースが不飽和脂肪酸やジエン類の *cis* 型二重結合と特異的な相互作用をすることを示す本研究の結果は、他の溶質にも適用できるのか、適用できるとすればその溶質の性質や反応性にどのような影響を与えるのか興味深い。たとえば、*cis* 型-C=C-二重結合は、ベンゼン環の局所構造であるとみなすことができる。それゆえ、トレハロースは OH $\cdots\pi$ および CH \cdots O 型水素結合を通して芳香族側鎖に結合し⁵¹⁾、タンパク質間の疎水性相互作用に影響を与えることが期待される。

以上のように、本研究の成果は、糖質の「Cross Protection 効果—さまざまなストレスに対する交差保護作用—」研究に新たな 1 ページを加えたといえる。

このたびの日本応用糖質学会の名誉ある奨励賞受賞にあたり、竹田靖史会長はじめ役員の方、ご推薦賜りました井川佳子中国・四国支部長、ならびに選考委員の方々に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に関し、懇切なるご指導とご助言を賜りました東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター櫻井実教授に感謝申し上げます。

本研究は、株式会社林原生物化学研究所天瀬研究所（現研究センター糖質研究部門）で行われたものであり、本研究に関し終始一貫してご指導・ご教授いただきました辻阪好夫博士、株式会社林原常務取締役栗本雅司博士、株式会社林原生物化学研究所常務取締役福田恵温博士に深く感謝申し上げます。また、株式会社林原生物化学研究所研究センター糖質研究部門主管研究員茶園博人博士をはじめとする同研究所の所員の皆様に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 太田静行：油脂などの自動酸化。「油脂食品の劣化とその防止」, 幸書房, 東京, pp. 8-33 (1985).
- 2) E. Niki: Lipid peroxidation and its inhibition: overview and perspectives. *J. Oleo Sci.*, **50**, 313-320 (2001).
- 3) 太田静行：油脂酸化生成物の毒性。「油脂食品の劣化とその防止」, 幸書房, 東京, p. 323-342 (1985).
- 4) M. Oarada, E. Ito, K. Terao, T. Fujimoto and T. Kaneda: The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissues in mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **960**, 229-235 (1988).
- 5) M. Oarada, T. Majima, T. Fujimoto and T. Kaneda: The effect of dietary oils on immunocompetent cell in mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **1012**, 156-160 (1989).
- 6) 山口直彦：食品構成成分の酸化安定性に及ぼす影響。油化学, **25**, 249-256 (1976).
- 7) 山口直彦, 大島克巳, 村瀬 誠：糖アルコールの油脂の酸化安定性に及ぼす影響について。日食工誌, **21**, 131-135 (1974).
- 8) 太田静行：食品中の油脂の劣化に影響する諸因子。「油脂食品の劣化とその防止」, 幸書房, 東京, pp. 87-90 (1985).
- 9) 奥 和之, 茶園博人, 福田恵温, 栗本雅司：不飽和脂肪酸の加熱分解に及ぼすトレハロースの影響。日食工誌, **46**, 749-753 (1999).
- 10) 奥 和之, 黒瀬真弓, 久保田倫夫, 福田恵温, 栗本雅司, 辻阪好夫, 櫻井 実：水/エタノール系における不飽和脂肪酸の酸化に及ぼすトレハロースの影響。日食工誌, **50**, 133-137 (2003).
- 11) K. Oku, M. Kurose, H. Chaen, S. Fukuda, Y. Tsujisaka and M.

- Sakurai: Suppressive effect of trehalose on radical oxidation of unsaturated fatty acids. *J. Appl. Glycosci.*, **52**, 381-385 (2005).
- 12) K. Oku, H. Watanabe, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka, M. Komori, Y. Inoue and M. Sakurai: NMR and quantum chemical study on the OH $\cdots\pi$ and CH \cdots O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: Implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12739-12748 (2003).
- 13) K. Oku, M. Kurose, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka, A. Okabe and M. Sakurai: Combined NMR and quantum chemical studies on the interaction between trehalose and dienes relevant to the antioxidant function of trehalose. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 3032-3040 (2005).
- 14) 山本順寛：脂質酸化反応の新展開。オレオサイエンス, **1**, 503-508 (2001).
- 15) E. Niki: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, **44**, 227-253 (1987).
- 16) 二木鋭雄：「活性酸素」, 二木鋭雄, 島崎弘幸編, 医歯薬出版, 東京, p. 2 (1987).
- 17) 奥 和之, 澤谷郁夫, 杉本純夫, 神戸三幸, 竹内 叶, 村井佐恵, 黒瀬真弓, 久保田倫夫, 福田恵温：トレハロースの機能特性。応用糖質科学, **49**, 351-357 (2002).
- 18) K. Oku, M. Kurose, M. Kubota, S. Fukuda, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka and M. Sakurai: Interaction between trehalose and alkaline-earth metal ions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 7-12 (2005).
- 19) T.C. Farrar and E.D. Becker: *Pulse and Fourier Transform NMR, Introduction to Theory and Methods*, Academic Press, New York, ch. 4 (1971).
- 20) R. Vargas, J. Garza, R.A. Friesner, H. Stern, B.P. Hay and D. A. Dixon: Strength of the N-H \cdots O=C and C-H \cdots O=C bonds in formamide and *N*-methylacetamide dimmers. *J. Phys. Chem. A*, **105**, 4963-4968 (2001).
- 21) S.S. Xantheas and T.H. Dunning: *Ab initio* studies of cyclic water clusters (H₂O)_n, n=1-6. I. Optimal structures and vibrational spectra. *J. Chem. Phys.*, **99**, 8774-8792 (1993).
- 22) S.S. Xantheas: *Ab initio* studies of cyclic water clusters (H₂O)_n, n=1-6. III. Comparison of density functional with MP2 results. *J. Chem. Phys.*, **102**, 4505-4517 (1995).
- 23) R. Vargas, J. Garza, D.A. Dixon and B.P. Hay: Conformational analysis of *N,N,N',N'*-tetramethylsuccinamide: the role of C-H \cdots O hydrogen bonds. *J. Phys. Chem. A*, **104**, 5115-5121 (2000).
- 24) P. Hobza, J. Šponer, E. Cubero, M. Orozco and F.J. Luque: C-H \cdots O contacts in the adenine \cdots uracil Watson-Crick and uracil \cdots uracil nucleic acid base pairs: nonempirical *ab initio* study with inclusion of electron correlation effects. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 6286-6292 (2000).
- 25) R. Vargas, J. Garza, D.A. Dixon and B.P. Hay: How strong is the C ^{α} -H \cdots O=C hydrogen bond? *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4750-4775 (2000).
- 26) F.M. Raymo, M.D. Bartberger, K.N. Houk and J.F. Stoddart: The magnitude of [C-H \cdots O] hydrogen bonding in molecular and supramolecular assemblies. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 9264-9267 (2001).
- 27) R.D. Bach, C. Thorpe and O. Dmitrenko: C-H \cdots carboxylate oxygen hydrogen bonding in substrate activation by Acyl-CoA dehydrogenases: synergy between the H-bonds. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 4325-4335 (2002).
- 28) P. Tarakeshwar, H.S. Choi, S.J. Lee, J.Y. Lee, K.S. Kim, T.-K. Ha, J.H. Jang, J.G. Lee and H.A. Lee: A theoretical investigation of the nature of the π -H interaction in ethene-H₂O, benzene-H₂O, and benzene-(H₂O)₂. *J. Chem. Phys.*, **111**, 5838-5850 (1999).
- 29) P. Tarakeshwar, K.S. Kim and B. Brutschy: Interaction of the water dimer with π -systems: A theoretical investigation of structures, energies, and vibrational frequencies. *J. Chem. Phys.*, **112**, 1769-1781 (2000).
- 30) R.G. Pearson: Acid and bases. *Science*, **151**, 172-177 (1966).
- 31) A.D. French, G.P. Johnson, A.-M. Kelterer, M.K. Dowd and C. J. Cramer: Quantum mechanics studies of the intrinsic conformation of trehalose., *J. Phys. Chem. A*, **106**, 4988-4997 (2002).
- 32) M.K. Dowd, P.J. Reilly and A.D. French: Conformational

- analysis of trehalose disaccharides and analogues using MM 3. *J. Comp. Chem.*, **13**, 102-114 (1992).
- 33) T. Taga, M. Senma and K. Osaki: The crystal and molecular structure of trehalose dehydrate. *Acta Cryst.*, **B 28**, 3258-3263 (1972).
- 34) 深澤宜行:トレハロースのプロトン NMR による研究. 神奈川県工業試験場研究報告, **65**, 42-46 (1994).
- 35) 深澤宜行:水と糖質の相互作用のコンピューターシミュレーションによる解析神奈川県産業技術総合研究所研究報告, **1**, 5-8 (1995).
- 36) 櫻井 実, 井上義夫:糖の水和とトレハロースの生理機能, 生物物理, **37**, 326-330 (1997).
- 37) 櫻井 実, 浅川直紀, 井上義夫:水と特性から探るトレハロースの生体物質保護機能. 食品工業, **41**, 64-72 (1998).
- 38) 櫻井 実, 井上義夫:オリゴ糖の皮膚の耐乾燥保護作用の分子メカニズム研究—トレハロースを中心に. *Fragrance J.*, **30**, 1-7 (2002).
- 39) S. Kobayashi, K. Ueda and T. Komano: The effects of metal ions on the DNA damage induced by hydrogen peroxide. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 69-76 (1990).
- 40) K. Uchida, M. Kanematsu, Y. Morimitsu, T. Osawa, N. Noguchi and E. Niki: Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low-density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16058-16066 (1998).
- 41) Z.L. Liu, Z.X. Han, P. Chen and Y.C. Liu: Stopped-flow ESR study on the reactivity of vitamin E, vitamin C and its lipophilic derivatives towards Fremy's salt in micellar systems. *Chem. Phys. Lipids*, **56**, 73-80 (1990).
- 42) N. Dan, X.L. Li, B.L. Zhao T.M. Zhang and W.J. Xin: Scavenging effects of probimane on active oxygen free radicals by electron spin resonance. *Zhongguo Yac Li Xue Bao*, **10**, 443-447 (1989).
- 43) 櫻井 実:トレハロースによる生体材料の凍結・凍結乾燥保存のメカニズム. 低温生物工学会誌, **47**, 19-25 (2001).
- 44) J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter and C.A. Wistrom: Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, **242**, 1-10 (1987).
- 45) J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter, A.S. Rudolph, C.A. Wistrom, B.J. Spargo and T.J. Anchordoguy: Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 367-384 (1988).
- 46) J.H. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe and T.J. Anchordoguy: Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, **27**, 219-231 (1990).
- 47) S. Fujii, K. Obuchi, H. Iwahashi, T. Fujii and Y. Komatsu: Saccharides that protect yeast against hydrostatic pressure stress correlated to the mean number of equatorial OH groups. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 476-478 (1996).
- 48) T. Hanamura, N. Asakawa, Y. Inoue and M. Sakurai: A solid-state ³¹P-NMR study of the interaction between trehalose and DPPC bilayer. *Chem. Lett.*, **8**, 713-714 (1998).
- 49) M. Babincova and T. Hianik: Acoustical investigation of the liposome-saccharide interaction. *Acta Biochim. Pol.*, **40**, 483-486 (1993).
- 50) 櫻井 実:トレハロースによる生体材料の凍結乾燥保存. 冷凍, **79**, 40-44 (2004).

- 51) 古木隆生, 櫻井 実, 水と特性及び相転移挙動から探るトレハロースの生体物質保護機能. 低温生物工学会誌, **51**, 1-11 (2005).
- 52) 奥 和之, 黒瀬真弓, 茶園博人, 福田恵温, 岡部篤俊, 櫻井 実:トレハロースとベンゼン化合物の相互作用. 低温生物工学会誌, **51**, 141-145 (2005).

糖質の脂質変敗抑制作用メカニズムに関する研究

奥 和之¹

¹ 株式会社林原生物化学研究所研究センター糖質研究部門
(702-8006 岡山市藤崎 675-1)

糖質の脂質変敗抑制作用のメカニズムについて検討した。トレハロースは不飽和脂肪酸の加熱およびラジカルによる過酸化反応を顕著に抑制した。他の糖質(スクロース, マルトースおよびネオトレハロース)では抑制効果はみられなかったが, マルチトールでトレハロースに次ぐ抑制作用が確認された。マルチトールは, ラジカル捕捉作用により不飽和脂肪酸の酸化反応を抑制することがわかった。一方, トレハロースによる脂質変敗抑制は, トレハロースが不飽和脂肪酸の酸化反応部位に結合し, 酸化反応の遷移状態が影響を受けることにより引き起こされると示唆された。NMR 解析の結果, トレハロースが不飽和脂肪酸の *cis* 型不飽和結合に 1:1 の割合で選択的に作用することがわかった。トレハロースの作用部位は C-3(C-3') 位および C-6'(C-6) 位であった。このような相互作用は, 他の糖質では観測されなかった。量子化学的手法を用いた理論解析の結果, トレハロース 3 位 OH 基および 6' 位 OH 基と *cis* 型不飽和結合とが OH $\cdots\pi$ 型および CH \cdots O 型水素結合した錯体構造が得られた。さらに, 脂質の酸化初期反応のシミュレーションモデルとしてメチルラジカルによるヘプタジエン活性メチレン水素の引き抜き反応モデルを構築し, 水素引き抜き反応の活性化エネルギーを求めたところ, トレハロースとの錯体形成により, 約 30 kcal mol⁻¹ のエネルギー増大が観測された。以上の結果から, トレハロースに特有な不飽和結合との相互作用が, 脂質変敗抑制作用に関与していることが示唆された。本研究において, トレハロースおよびマルチトールの脂質変敗抑制について, 分子レベルでの作用メカニズムをはじめて明らかにした。