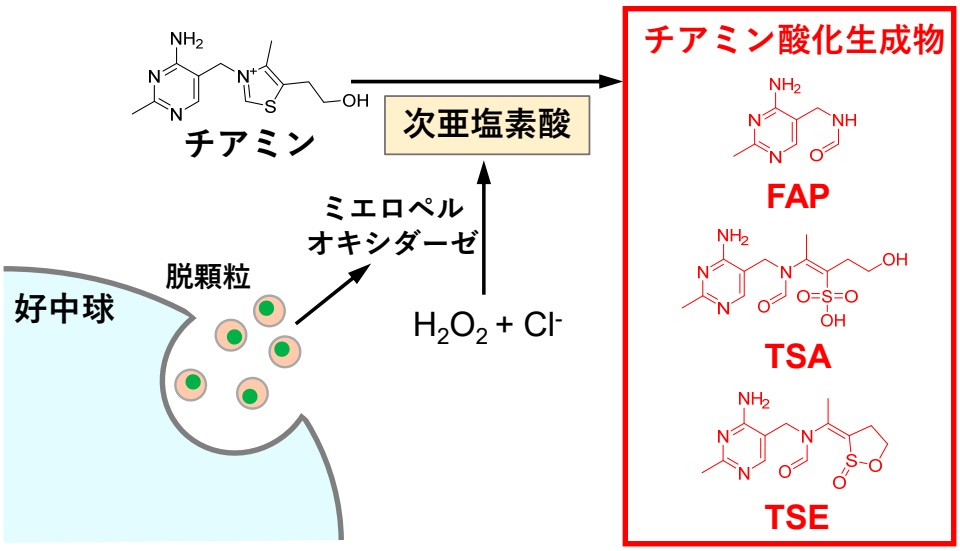
12　ビタミンB1由来酸化生成物の解析とその生理作用の解明	柴田　貴広

【目的】ビタミン B1（チアミン）は様々な食品中に豊富に含まれている水溶性ビタミンの一種である。生体内においてピロリン酸化されたビタミン B1 は補酵素として作用し、糖代謝や分岐鎖アミノ酸などの代謝において重要な働きを示すことが知られている。このような機能に加えて、ビタミン B1 は一重項酸素といった活性酸素種に対するスカベンジャー活性などの抗酸化性を有することが報告されている。このことはビタミン B1 自身が酸化的な代謝を受けやすいということを意味している。しかしながらビタミン B1 の酸化反応過程や酸化生成物に関する解析はほとんどなされておらず、チアミンジスルフィドやチオクロームなどのごく限られたビタミン B1 酸化生成物しか報告されていない。また生体内におけるビタミン B1 酸化物の生成や、その生理作用に関する報告は全くなされていない。そこで本研究では、ビタミン B1 に由来する酸化的代謝産物を同定し、その生理作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】チアミンを様々な酸化剤により処理したのち、質量分析装置により解析した。酸化生成物については、単離、精製し、各種機器分析によりその化学構造を同定した。同定された酸化生成物について、質量分析装置による高感度検出定量法を確立した。この定量法を用いて、ホルボールエステルにより活性化したヒト好中球様細胞の培養上清中のチアミン酸化物の定量を行った。また、リポ多糖の投与による炎症誘導モデルマウスの肺組織におけるチアミン酸化物を定量的に解析した。
【結果】チアミンと次亜塩素酸を反応させることにより、新たに生成される三つのピークを検出した。これらの生成物の化学構造を解析した結果、formylaminopyrimidine（FAP）、thiamine sulfonic acid（TSA）、thiamine sulfinic ester（TSE）であることが判明した。それぞれの安定同位体標識物を内部標準物質とした定量法により、好中球様に分化させた HL60 細胞の培養上清において、ホルボールエステル処理により 3 種の酸化生成物が増加することがわかった。またこれらの酸化生成物はミエロペルオキシダーゼ依存的に生成されることも確認された。さらに、リポ多糖を投与したマウスの肺組織において、ミエロペルオキシダーゼの発現上昇とともに、FAP および TSE が増加することを見出した。これらの結果から、ビタミン B1 は生体内において、次亜塩素酸により酸化的代謝物へと変換されうることが示唆された。

次亜塩素酸によるチアミン酸化物の生成



12. ビタミン B1 由来酸化生成物の解析とその生理作用の解明

柴田　貴広

名古屋大学 大学院生命農学研究科 応用生命科学専攻 食品機能化学研究室

Key words：ビタミン B1，活性酸素種，酸化ストレス，炎症

緒　言

ビタミン B1（チアミン）は様々な食品中に豊富に含まれている水溶性ビタミンの一種である。生体内においてピロリン酸化されたビタミン B1 は補酵素として作用し、糖代謝や分岐鎖アミノ酸などの代謝において重要な働きを示すことが知られている。体内で利用されたビタミン B1 やその誘導体だけでなく、過剰量のビタミン B1 も尿中に速やかに排泄されるため、ビタミン B1 の過剰摂取による障害は現在までに報告されていない。その一方で、ビタミン B1 不足は多くの疾病が引き起こされることが知られており、脚気やウェルニッケ脳症などが代表的な欠乏症として挙げられる。このように生体において必須な栄養素であるビタミン B1 は、もうひとつの機能として、一重項酸素といった活性酸素種に対するスカベンジャー活性や脂質の酸化を抑制するなどの抗酸化性を有することが報告されている［1，2］。このことは、ビタミン B1 自身が酸化的な代謝を受けやすいということを意味している。しかしながらこれらの論文では、その酸化反応過程や酸化生成物に関する解析はほとんどなされておらず、チアミンジスルフィドやチオクロームなどのごく限られたビタミン B1 酸化生成物しか報告されていない。また、生体内におけるビタミン B1 酸化物の生成や、その生理作用に関する報告は全くなされていない。そこで本研究では、ビタミン B1 に由来する酸化的代謝産物を同定し、その生理作用を明らかにすることを目的とした。本研究により、次亜塩素酸により生成される 3 種類のビタミン B1 酸化生成物を同定するとともに、培養細胞や動物臓器中におけるビタミン B1 酸化物の生成を明らかにした［3］。

方法および結果

1.　ビタミン B1 酸化生成物の化学構造解析

ビタミン B1 の酸化生成物を探索するために、リン酸緩衝液（pH 7.4）中で様々な酸化剤とチアミンを反応させた。酸化剤としては、過酸化水素、次亜塩素酸、Fe^{2+}／アスコルビン酸、一重項酸素発生試薬（endoperoxide 試薬）、2,2'-azobis（2-methylpropionamidine）dihydrochloride（AAPH）を用いた。37℃で 24 時間インキュベーション後、エレクトロスプレーイオン化法を用いた液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法（LC-ESI-MS/MS）により解析した。この時、チアミンがピリミジン環構造を有するフラグメントイオン *m/z* 122 を特徴的に生成するということを利用し、プレカーサーイオンスキャンにより検出した。その結果、Fe^{2+}／アスコルビン酸による酸化系、一重項酸素産生系、AAPH による酸化反応においては、ピーク A のみがマイナーな生成物として検出された。また過酸化水素との反応においては、チアミンジスルフィド体（TSST）およびピーク B が検出された。今回試験した酸化系の中で、次亜塩素酸による酸化が最も顕著であり、ピーク A およびピーク B に加えて、ピーク C を主要な生成物として検出した（図 1）。そこでチアミンと次亜塩素酸の反応に着目し、これらの酸化物についての構造決定を行った。ピーク A、B、C、の 3 種類の生成物を HPLC により分取・精製し、高分解能質量分析計および核磁気共鳴装置により解析を行った。その結果、ピーク A は formylaminopyrimidine（FAP）、ピーク B は thiamine sulfonic acid（TSA）、そしてピーク C は thiamine sulfinic ester（TSE）であることが判明した（図 2）。

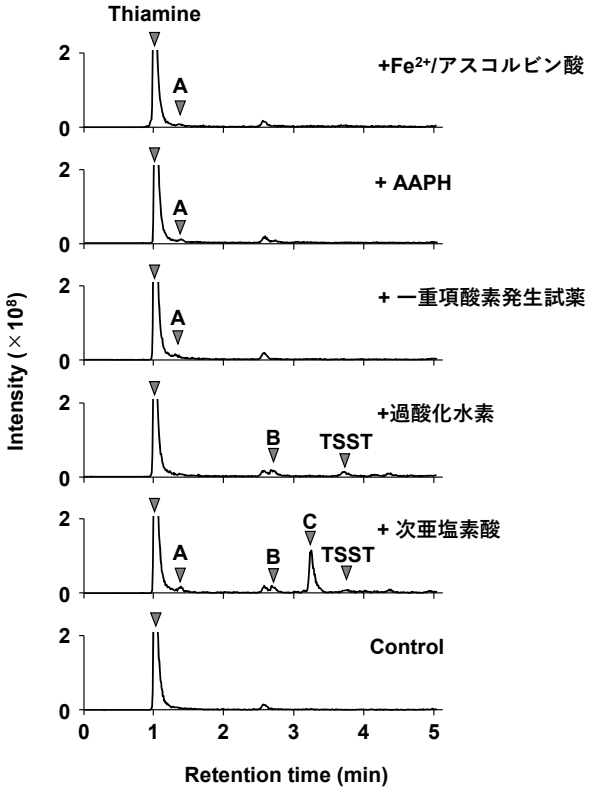


図1. チアミン酸化物のLC-MS/MS測定結果

チアミンをそれぞれの酸化剤とともにリン酸緩衝液中、37℃で24時間インキュベーションした後、LC-ESI-MS/MSにより測定した。

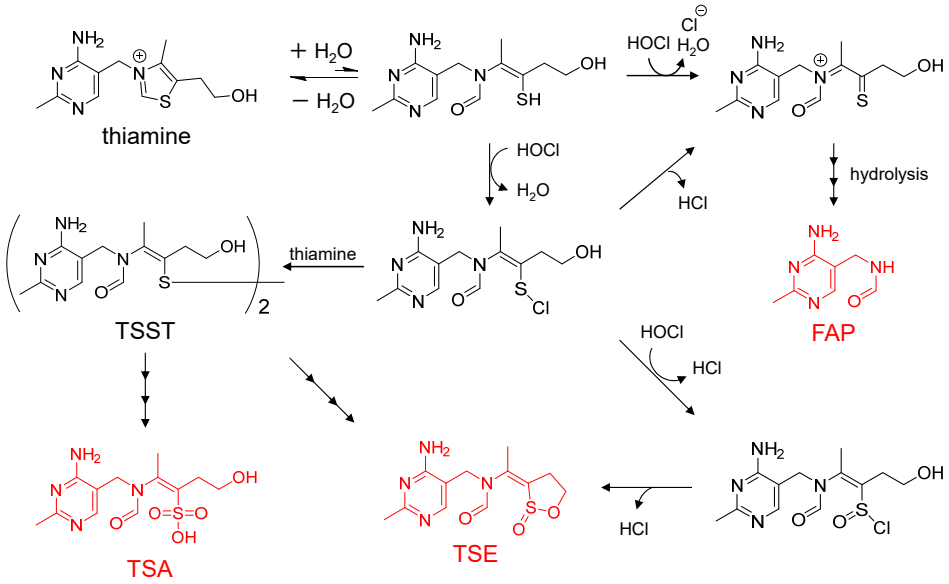


図2. チアミン酸化物の予想生成メカニズム

チアミンは中性条件ではチオール化合物に変換され、次亜塩素酸により酸化される。FAPは、チオケトンが形成した後、加水分解反応により生成される。TSAとTSEはTSSTを経由して形成される。またTSEは、塩化スルフィニル誘導体の分子内環化反応からも生成するものと予想される。

2. ビタミンB1酸化生成物の定量解析法の確立

チアミン酸化物の定量解析を行うため、LC-ESI-MS/MS と安定同位体希釈法を組み合わせた高感度かつ特異的な定量法の確立を行った。チアミンおよびその酸化物の衝突誘起解離により、*m/z* 122 の共通のプロダクトイオンが生成されることを利用し、多重反応モニタリングモードを設定した。また、チアミン酸化物の安定同位体標識物である FAP-d_3、[$^{13}C_3$]-TSA、[$^{13}C_3$]-TSE は、チアミン-d_3および[$^{13}C_3$]-チアミンから作製した。LC-ESI-MS/MS を用いてチアミンおよびチアミン酸化物とそれらの安定同位体標識物の比を測定し、検量線を作成することにより、定量を可能とした。この方法を用いて、次亜塩素酸とチアミンとの *in vitro* 反応系におけるチアミン酸化物の生成量を測定した。チアミン 1 mM と次亜塩素酸 0～250 μM をリン酸緩衝液（pH7.4）中で 37℃、24 時間反応させた後、LC-ESI-MS/MS による定量解析を行った。その結果、次亜塩素酸の濃度依存的にチアミンが減少し、それに伴って 3 種類の酸化物の生成が認められた。中でも最も多く生成されたのが FAP であり、次亜塩素酸 250 μM との反応でおよそ 85 μM 生成されることがわかった。

3. 培養細胞や生体サンプルにおけるビタミンB1酸化生成物の定量解析

培養細胞系におけるチアミン酸化物の生成を検討するため、好中球様に分化させた HL60 細胞を用いて解析した。Phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）処理により、次亜塩素酸の産生に関与するミエロペルオキシダーゼ（MPO）の発現が上昇するとともに、培養上清中に次亜塩素酸が分泌されることを確認した。チアミン 100 μM を含む無血清培地中で PMA を添加し、0～6 時間後に培養上清を回収し LC-ESI-MS/MS による定量解析を行った。その結果、PMA 刺激によってチアミンが減少し、それに伴ってチアミン酸化物の生成が認められた。さらに、MPO 阻害剤である 4-aminobenzoic hydrazide（4-ABH）処理により、チアミン酸化物の生成が有意に抑制された（図 3）。

次に、マウスに対し急性炎症と肺組織における好中球増加症を引き起こすリポ多糖（LPS）を投与することにより、チアミン酸化生成物が増加するかを検討した。8 週齢の C57BL/6N マウス（オス）に 10 mg/kg body weight の LPS を腹腔内注射することで急性肺炎症を誘導し、その 24 時間後にマウスを屠殺し肺組織を得た。肺組織における MPO の発現量およびチアミン酸化物量を測定したところ、LPS の投与により MPO の発現が上昇するとともに、FAP および TSE が有意に増加することが判明した（図 4）。

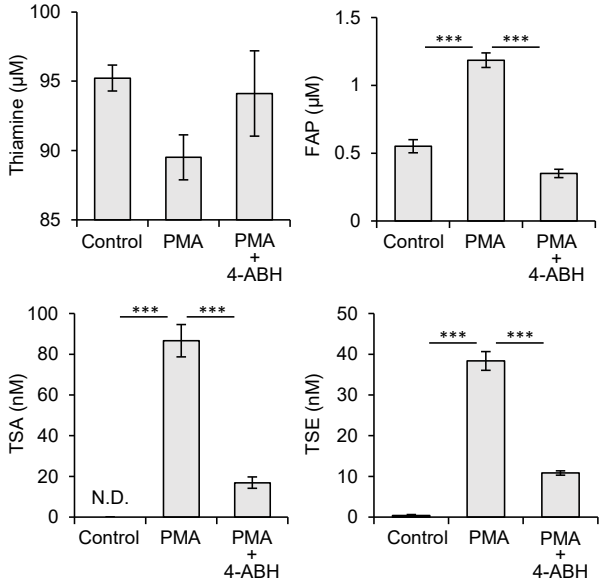


図3. 好中球様細胞におけるチアミン酸化物の生成

好中球様に分化させたHL60細胞にPMA（100 nM）およびMPO阻害剤4-ABH（100 μM）を処理した。6時間後に培養上清を回収し、質量分析装置によりチアミンおよびチアミン酸化生成物を定量した。データは3連の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

統計処理はTukey-Kramer法で行った。***p ＜0.005。N.D.：not detected。

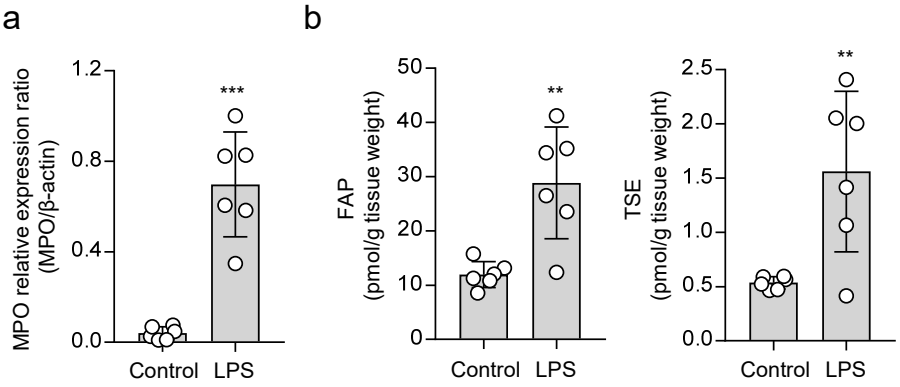


図4. LPS投与マウス肺組織におけるMPOの発現とチアミン酸化物の生成

8週齢オスC57BL/6NマウスにLPS（10 mg/kg body weight）もしくはコントロールとしてPBSを腹腔に投与した。24時間後にマウスを安楽死させた後、肺組織を摘出した。データは6連の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。統計処理はStudent's t-test法で行った。***$p<0.005$、**$p<0.001$。

a）肺組織におけるMPOの発現量。ウェスタンブロットによりMPOおよびβ-アクチンを検出した。

b）肺組織におけるFAPおよびTSEの生成量。質量分析装置により定量した。

考　察

本研究では、次亜塩素酸との反応により生成されるチアミン酸化生成物として、FAP、TSA、TSE を同定した。FAP はラット尿中から検出され、チアミン代謝物のひとつであることが報告されている［4］。また、FAP は細菌におけるチアミンの加水分解産物のひとつで、チアミン生合成のサルベージ経路の中間体である［5］。TSA については、過酸化水素による TSST の酸化により生成されるが、顕著な生理作用を有していないという報告がなされている［6, 7］。一方、TSE は有機合成に関する報告があるのみである［8］。本研究は、次亜塩素酸が関与するチアミン酸化生成物に関する最初の報告である。また予備的検討ではあるが、チアミン酸化生成物が炎症応答を促進する可能性を見出している。こうした点から、炎症下においてチアミン酸化的代謝物は好中球によって生成され、マクロファージを介して炎症反応を制御している可能性が示唆される。これまでに、チアミン代謝物はリン酸エステル誘導体に着目した研究が多くなされているものの、酸化的代謝物は *in vivo* レベルでの生成が確認されていなかったために、あまり議論されることはなかった。本研究結果は、チアミンの機能を理解する上で、酸化的代謝の重要性を示すものと考えられる。今後、チアミン酸化生成物のバイオマーカーとしての利用だけでなく、これらの生理機能について更なる解析を行うことで、チアミンの生理的意義や疾患との関連性を明らかにすることが期待される。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団および関係の皆様に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Natera J, Massad WA, García NA. Vitamin B1 as a scavenger of reactive oxygen species photogenerated by vitamin B2. Photochem Photobiol. 2011 Mar-Apr;87(2):317-23. Epub 2010 Dec 22. PMID: 21114499 DOI: 10.1111/j.1751-1097.2010.00867.x.

2) Stepuro II, Oparin AY, Stsiapura VI, Maskevich SA, Titov VY. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide. Biochemistry (Mosc). 2012 Jan;77(1):41-55. PMID: 22339632 DOI: 10.1134/S0006297912010051.

3) Sasatsuki H, Nakazaki A, Uchida K, Shibata T. Quantitative analysis of oxidized vitamin B1 metabolites generated by hypochlorous acid. Free Radic Biol Med. 2020 May 20;152:197-206. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32201347 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.010.

4) Amos WH Jr, Neal RA. Isolation and identification of 3-(2'-methyl-4'-amino-5'-pyrimidylmethyl)-4-methylthiazole-5-acetic acid (thiamine acetic acid) and 2-methyl-4-amino-5-formylaminomethylpyrimidine as metabolites of thiamine in the rat. J Biol Chem. 1970 Nov 10;245(21):5643-8. PMID: 547236379.

5) Jenkins AH, Schyns G, Potot S, Sun G, Begley TP. A new thiamin salvage pathway. Nat Chem Biol. 2007 Aug;3(8):492-7. Epub 2007 Jul 8. PMID: 17618314 DOI: 10.1038/nchembio.2007.13.

6) Utsumi I, Harada K, Tsukamoto G. Formation and identification of thiaminic acids by oxidation of thiol-type thiamines. J Vitaminol (Kyoto). 1965 Sep 10;11(3):225-33. PMID: 5859681 DOI: 10.5925/jnsv1954.11.225.

7) Utsumi I, Harada K, Kohno K, Tsukamoto G. Some biological properties of thiaminic acid analogues. J Vitaminol (Kyoto). 1965 Sep 10;11(3):248-51. PMID: 5859684 DOI: 10.5925/jnsv1954.11.248.

8) Tsukamoto G, Watanabe T, Utsumi, I. Synthesis of Hypothiaminic Esters. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1969; 42(9):2686-88. DOI: 10.1246/bcsj.42.2686