

Apigenin の抗酸化活性に及ぼす配糖体の影響

戸泉 文江 横山 祥子

Effects of Glycosides on the Antioxidant Activity of Apigenin

Fumie TOIZUMI Shoko YOKOYAMA

Abstract

The antioxidant effects of apigenin without glycoside (APG), apigenin 7-glucoside (APG-Glu) and apigenin 7-gentiobioside (APG-Glu-Glu) on phosphatidylcholine peroxidation were investigated using atomic force microscopy (AFM), and the effects of glycosides on the antioxidant activities of APG were discussed. The Langmuir-Blodgett film of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-phosphatidylcholine (PLPC) was used as a model biological membrane for AFM. The AFM images clearly indicated that APG glycosides inhibited PLPC peroxidation and that the APG glycoside had a more potent antioxidant effect than APG without glycoside. It is suggested that the antioxidant effect on lipid peroxidation depends on the distribution and orientation of the antioxidant in the lipid membrane.

Key words : antioxidant, apigenin, apigenin glycosides, atomic force microscopy

キーワード : 抗酸化剤 アピゲニン アピゲニン配糖体 原子間力顕微鏡法

緒言

生体は内因性および外因性の酸化ストレスにさらされており、生体内でのフリーラジカル消去能に支障をきたすことで生体膜の過酸化が起こり、¹⁾それが動脈硬化^{2,3)}やガン^{4,6)}の発症に関与しているのではないかと考えられている。Asai and Oikawa³⁾は、動脈硬化を起こしたホスファチジルコリン(PC)の過酸化変性を報告している。一方、抗酸化剤を生活習慣病の予防薬として使えないかという研究も行われてきている。⁷⁾

フラボン誘導体はラジカル消去能があることが知られている。⁸⁻¹⁰⁾フラボン誘導体の抗酸化活性に関する多くの研究は、配糖体をもっていないアグリコンが使われている。我々は前報¹¹⁾で、テイカカズラ *Trachelospermum asiaticum* から単離したフラボン配糖体である Apigenin 7-gentiobioside (APG-Glu-Glu)

の抗酸化作用を生体膜モデルを使って研究し、報告した。また、その中で、生体モデル膜を使って、膜に対する抗酸化化合物の効果を原子間力顕微鏡法 (AFM) で観察する方法からは、膜中への抗酸化化合物の配向性によっても抗酸化力に違いが出ることを明らかにした。

本研究では、天然由来の抗酸化化合物の抗酸化活性に及ぼす配糖体の影響を調べるために、APG-Glu-Glu のアグリコンである APG と、配糖体が1つ付いた APG-Glu、配糖体が2つ付いた APG-Glu-Glu を用いて実験を行った。

実験

1. 試料

APG-Glu-Glu, APG-Glu, APG は、テイカカズラ *Trachelospermum asiaticum* の葉から、先の報告¹¹⁾

に基づいて抽出、単離したものをを用いた。APG-Glu-Glu, APG-Glu, APG の構造式を Chart 1 に示す。

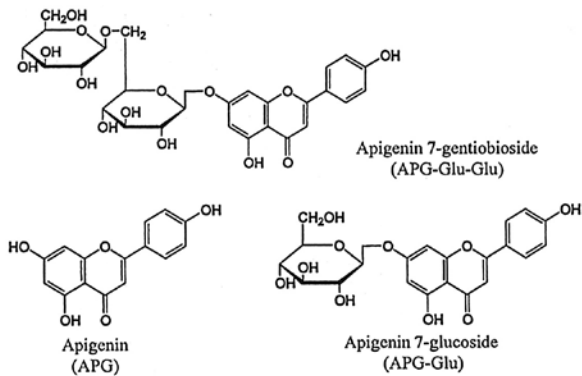


Chart 1 APG, APG-Glu, APG-Glu-Glu
の構造式

パルミトイル-2-リノレオイル-3-ホスファチジルコリン (PLPC) はシグマ社製の特級品、アスコルビン酸ナトリウムおよび $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は和光ケミカルス製の特級品を用いた。水はスーパー Q システムの純水を用いた。

2. LB 膜の作製

PLPC をクロロホルム/メタノール (7:3) 混液に溶かして 1mM 溶液とし、これを 25°C の水をはったトラフ上に展開して 10 分間静置し、気液界面で PLPC の単分子膜を形成させた。表面圧測定機 (協和界面科学製 HBM-A) で、膜圧 30mN/m まで圧縮した後、垂直浸漬法でマイカ基板の上に LB 膜として採取した。APG-Glu, APG-Glu, APG を取り込ませた PLPC 膜は、PLPC とそれぞれ 3 種の試料をクロロホルム/メタノール (7:3) 混液に溶解させた溶液を気液界面に展開することで得た。

3. 過酸化の条件

ヒドロキシラジカルを、 Fe^{2+} とアスコルビン酸を反応させることで発生させた。¹²⁾ すなわち、0.2 mM のアスコルビン酸ナトリウムと 1 μM の FeCl_2 を含む水溶液に、LB 膜として採取した PLPC 膜および APG-Glu-Glu, APG-Glu, APG を含んだ PLPC 膜を 5 分間浸すことで、膜をヒドロキシラジカルに暴露し、膜に酸化ストレスを与えた。マイカ基板の上に採取した PLPC 膜は、PLPC の極性基側がマイカ基板の上に吸着している、アルキル基が外側に位置しているので、ヒドロキシラジカルはアルキル基側から攻撃していることになる。これまでの実験^{8, 11)} では、気液界面で LB 膜を作製する際に、下層水側からヒドロキシラジカルを発生

させていたが、これは PLPC の極性基側から攻撃していることになるので、今回、実験方法を変更することで、PLPC の二重結合を含むアルキル鎖の過酸化がより起りやすくなっている。

4. AFM 測定

JEOL 製の原子間力顕微鏡 JSPM-5200 を使って、膜の表面状態を観察した。AFM の探針には、金でコーティングされたシリコン製の CSC38 マイクロカンチレバー (バネ定数 0.08 N/m, 長さ 250 μm , 厚さ 1.0 μm) を使用した。AFM の観察は、空气中でコンタクトモードで行った。

結果と考察

1. PLPC 膜の酸化

最初に、酸化されていない PLPC 膜の AFM 画像を Fig. 1 に示す。

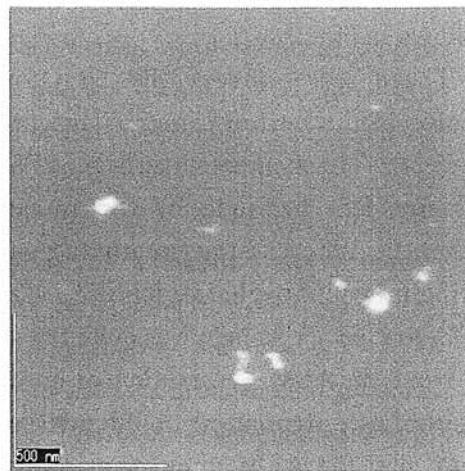


Fig. 1 酸化されていない PLPC 膜の AFM 画像

酸化されていない PLPC 膜の表面は、平坦ではなく、アルキル鎖の二重結合に由来するオウトツが見られる。(画像中で明るい色の部分は高さが高いことを表している。)

次に、酸化させた PLPC 膜の AFM 画像を Fig. 2 に示す。

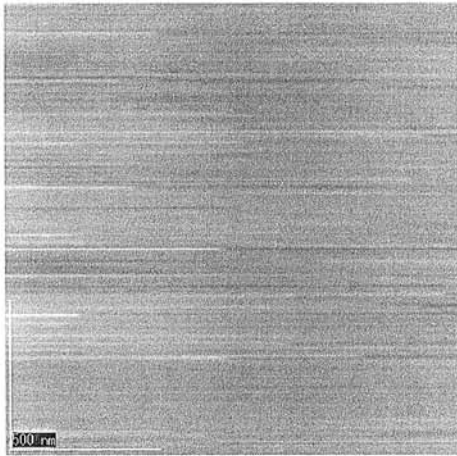


Fig. 2 酸化された PLPC 膜の AFM 画像

酸化された PLPC 膜の画像は、酸化されていない PLPC 膜のものとは明らかに異なっている。酸化された膜では、明るいスポットが見られない。PLPC が酸化されてできる PLPC のヒドロ過酸化物 (PLPC-OOH) から、さらに二次生成物であるアルキル鎖のより短いカルボニル化合物³⁾が、ラジカル連鎖反応で生成される。Fig. 2 の画像は、このような現象に基づいているものと考えられる。さらに、フリーラジカル連鎖反応によって過酸化が進み、過酸化された膜が弱くなり、それによって酸化された膜の表面に AFM プロブによる引っ掻き傷も見られた。

2. APG, APG-Glu, APG-Glu-Glu の抗酸化効果

PLPC 膜に APG, APG-Glu, APG-Glu-Glu をそれぞれモル分率で 0.2 添加して作製した PLPC 膜に酸化ストレスを与え、AFM で膜の表面状態を観察し、抗酸化効果に及ぼすアピゲニンアグリコンと配糖体の影響と調べた。まず、配糖体をもたない APG を PLPC 膜に取り込ませた膜に酸化ストレスを与えた後の膜面の状態を Fig. 3 に示す。



Fig. 3 APG を含む PLPC 膜の酸化ストレス下の AFM 画像

膜面にスジ状のキズが観察され、これは PLPC 膜が過酸化を受けた状態の画像 (Fig. 2) に近いものであった。このことから、配糖体をもたないアグリコン部分だけの APG は、膜に対する抗酸化効果がほとんどないことが示唆される。

次に、配糖体を 1 つもつ APG-Glu を PLPC 膜に取り込ませた膜に酸化ストレスを与えた後の膜面の状態を Fig. 4 に示す。

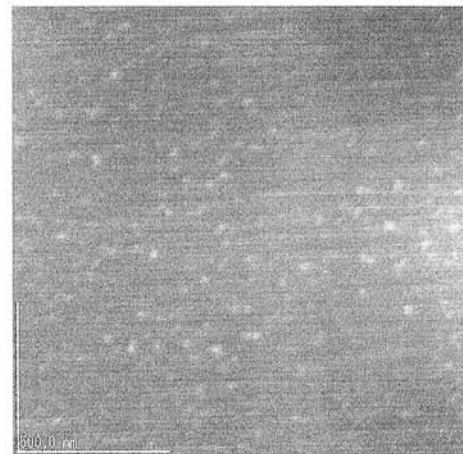


Fig. 4 APG-Glu を含む PLPC 膜の酸化ストレス下の AFM 画像

膜面は酸化されていない PLPC 膜に見られるスポットと、膜中に存在している APG-Glu がスポットとして観察される。この膜面の状態は、酸化されていない PLPC 膜に近い状態であり、APG-Glu の抗酸化効果が示されている。

次に、APG-Glu-Glu の効果を調べた AFM 画像を Fig. 5 に示す。

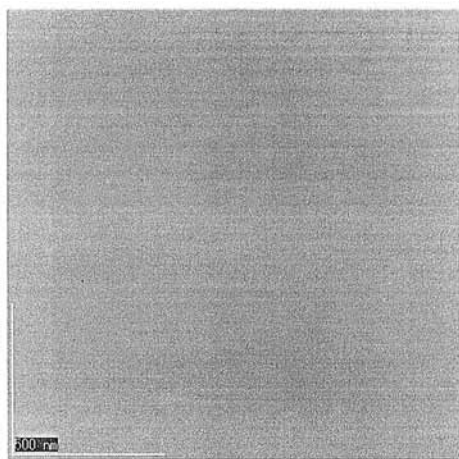


Fig. 5 APG-Glu-Glu を含む PLPC 膜の酸化ストレス下の AFM 画像

Fig. 5 は、膜面のキズは観察されず、抗酸化効果はあるものの、Fig. 4 の APG-Glu と比べると、酸化されていない PLPC 膜に見られるスポットが観察されない。これらのことから、膜の過酸化に対する抗酸化化合物の活性の強さは、APG-Glu > APG-Glu-Glu > APG であることが示された。APG-Glu-Glu は親水性が強く、PLPC 膜の極性基側に配向したために、PLPC 二重結合部分の過酸化抑制効果がそれほど出なかったものと思われる。また、APG は疎水性が強く、膜の hydrocarbon 鎖中に配向したために、膜の外側から攻撃してくるヒドロキシラジカルをうまく捕捉できなかったのではないかと考えられた。配糖体をもつことで、抗酸化化合物の膜中への配向状態や親和性などが異なり、これらのことが膜の過酸化に対する抗酸化効果に影響を与えることが示唆された。

参考文献

- 1) Emster L.: Biochemical physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1271: 195-204, 1995.
- 2) Davis B., Koster G.: Electrospray ionization mass spectrometry identifies substrates and products of lipoprotein-associated phospholipase A2 for oxidized human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 283: 6428-6437, 2008.
- 3) Asai A., Oikawa S.: Oxidative modification of phosphatidylcholine in atherosclerotic. *Oleoscience* 11: 419-424, 2011.
- 4) Cerutti P. A.: Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381, 1985.
- 5) Yano T., Ichikawa T.: The effect of glycerol and 4-nitroquinoline-1-oxide on active oxygen in sub-cellular fractions of lung tissue. *Biochem. Pharmacol.* 43: 2658-2660, 1992.
- 6) Yano T., Ishikawa G., Ichikawa T.: Is vitamin E a useful agent to protect against oxy radical-promoted lung tumorigenesis in ddY mice? *Carcinogenesis*. 14: 1133-1136, 1993.
- 7) Singh V. W.: Antioxidants. *J. Nutr.* 122: 760-765, 1991.
- 8) Yokoyama S., Takeda T., Takahashi H., Ohta Y., Park S. H., Nishikawa T., Abe M.: Lipid peroxidation and the antioxidant effects of 3,5,7,4'-tetrahydroxy-2'-methoxy flavone; direct observation by atomic force microscopy. *J. Oleo Sci.* 51: 63-67, 2002.
- 9) Dubber M. J., Kanfer I.: High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonoids in Ginkgo biloba and oral dosage forms. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 7: 303-309, 2004.
- 10) Nakajima N., Kawashima N.: Effect of Saji (Sea buckthorn) on the inhibition of growth activity in U937 cells. *Mater. Technol.* 29: 202-209, 2011.
- 11) Toizumi F., Sakushima A., Ohtsuka I., Yokoyama S.: Peroxidation of phosphatidylcholine membrane and the antioxidant effects of apigenin 7-gentiobioside from *Trachelospermum asiaticum* var. *intermedium*. *Mater. Technol.* 30: 1-5, 2012.
- 12) Melin A. M., Peuchant E., Perromat A., Clerc M.: In vitro influence of ascorbate on lipid peroxidation in rat testis and heart microsomes. *Mol. Cell. Biochem.* 169: 171-176, 1997.