

氏名	さくらい やすひろ 櫻井 康博
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第691号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	新規に開発した流通型スピントラッピング ESR 計測装置によるヒドロキシルおよびスーパーオキシドラジカルと生体関連物質の反応機構解析
審査委員	(主査)教授 田嶋邦彦 教授 村上 章 教授 柄谷 肇 准教授 金折賢二

論文内容の要旨

本論文の主な研究目的は、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) およびスーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2\cdot^-$) の定量的な検出に特化したフローインジェクション電子スピン共鳴装置 (FI-ESR) の新規開発と、本装置を駆使した $\cdot\text{OH}$ および $\text{O}_2\cdot^-$ と生体関連物質の 2 次反応速度定数 ($^{\text{OH}}k_s$ および $^{\text{O}_2}k_s$ 値) の解析である。まず、 $\cdot\text{OH}$ を測定対象とする $^{\text{OH}}\text{FI-ESR}$ 装置によって評価した 17 種類の生体関連物質の $^{\text{OH}}k_s$ 値は高速パルスラジオリシス法 (PR 法) による報告値と良好な一致が認められたことから、 $^{\text{OH}}\text{FI-ESR}$ 法が PR 法に匹敵する精度を有する反応速度論的な計測手法であることを明らかにした。次に、 $\text{O}_2\cdot^-$ を測定対象とする $^{\text{O}_2}\text{FI-ESR}$ 装置によって評価したフェノール誘導体の 2 次反応速度定数 ($^{\text{O}_2}k_s$) は PR 法による報告値と良好に一致した。さらに、測定条件と解析法を最適化することで、本法で評価可能な $^{\text{O}_2}k_s$ 値の下限は $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ に達したことから、本法は PR 法では解析が困難であった $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性の低い生体関連物質の反応速度定数を評価できる計測法であることを示した。さらに、フェノール誘導体の酸化電位 (Ep) と $^{\text{O}_2}k_s$ 値および水酸基の pKa を比較検討することで、 $\text{O}_2\cdot^-$ とフェノール誘導体 (Aox-H) の反応では、Aox-H から $\text{O}_2\cdot^-$ への電子移動過程 (ET) が律速段階であり、続いて陽イオンラジカル ($\text{Aox-H}^+\cdot$) から O_2^{2-} へのプロトン移動 (PT) が進行する反応機構を提唱した。

さらに、混合系試料に含まれる $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性物質を探索するために、HPLC カラムの下流で溶出成分の $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性をオンライン分析する HPLC-ESR 装置を開発し、3 種類のフェノール性物質の混合溶液を標準試料として ESR クロマトグラムを観測した。ESR クロマトグラフの線形、ピーク強度および面積強度を詳細に検討することで、その線形はカラム溶出成分の $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性とその濃度に依存することを明らかにした。このような検討から、本法は多成分系の混合試料である食品や飲料に含まれる優れた $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性物質を探索するための有用な分析手法であることを示した。

本研究で新規開発した $\cdot\text{OH}$ および $\text{O}_2\cdot^-$ の定量的な検出に特化した流通型 ESR 装置 ($^{\text{OH}}\text{FI-ESR}$ 、 $^{\text{O}_2}\text{FI-ESR}$ および HPLC-ESR) は、両ラジカル種が寄与する生体内ラジカル反応の機構解析に関する重要な知見を提供するだけでなく、当該学問分野の発展に貢献することが期待できる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) およびスーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2\cdot^-$) の定量的な検出に特化したフローインジェクション電子スピン共鳴装置 (FI-ESR) を新規に開発した。 $\cdot\text{OH}$ を観測対象とする $^{\text{OH}}\text{FI-ESR}$ 装置によって、アミノ酸および糖類と $\cdot\text{OH}$ の 2 次反応速度定数 ($^{\text{OH}}k_s$) を評価する計測方法と解析方法を確立した。この手法で解析した 17 種類の生体関連物質の $^{\text{OH}}k_s$ 値は、高速パルスラジオリシス法 (PR 法) による報告値と良好に一致したことから、 $^{\text{OH}}\text{FI-ESR}$ 法が PR 法と同程度の精度を有する反応速度論的な計測手法であることを結論している。

この結果を基盤として申請者は $\text{O}_2\cdot^-$ を測定対象とする $^{\text{O}}\text{FI-ESR}$ 装置を開発し、11 種類の生体関連フェノールおよびカテコール誘導体と $\text{O}_2\cdot^-$ の 2 次反応速度定数 ($^{\text{O}}k_s$) を評価した。たとえば、本法で解析したコーヒ酸 ($(1.4 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) およびルチン ($(4.5 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) の $^{\text{O}}k_s$ 値は、PR 法による報告値と良好な一致が認められた。さらに、フェノール誘導体の酸化電位 (E_p) と $^{\text{O}}k_s$ 値および水酸基の pKa を比較検討し、 $\text{O}_2\cdot^-$ とフェノール誘導体 (Aox-H) の反応では Aox-H から $\text{O}_2\cdot^-$ への電子移動過程が律速段階であり、続く Aox-H $^{\cdot}$ から O_2^{2-} へのプロトン移動 (PT) で進行する反応機構を提唱している。

さらに、混合系試料に含まれる優れた $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性物質を探索する方法論として、HPLC カラムの下流で溶出成分の $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性をオンライン分析する HPLC-ESR 装置を開発した。3 種類のフェノール誘導体の混合溶液を標準試料として ESR クロマトグラムを観測し、その線形、ピーク強度および面積強度がカラム溶出成分の $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性および濃度に依存して変化することを明らかにした。この結果から、本法は多成分系の混合試料である食品や飲料に含まれる優れた $\text{O}_2\cdot^-$ 消去活性物質を探索するための有用な分析手法として結論している。

本博士論文の内容は、申請者を共著者とする 1 編の論文および申請者を筆頭とする 2 編の論文として既に発表された。

公表論文

1. Quantitative Spin-trapping ESR Investigation on Reaction of Hydroxyl Radical and Selected Scavengers by a Newly Developed Flow-injection ESR System, Rushiru Komatsu-Watanabe, Yasuhiro Sakurai, Chie Morimoto, Shunji Sakamoto, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, *Chemistry Letters*, **37**, 612-613 (2008)
2. Development of a Flow-injection Spin-trapping ESR System for Estimation of Second-order Rate Constants for Reactions of a Superoxide Anion Radical and Selected Phenolic Compounds, Yasuhiro Sakurai, Tomoko Yamaguchi, Akira Nakajima, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, *Chemistry Letters*, Accepted (Dec. 16, 2013)
3. Development of a HPLC-ESR Spin-trapping System for Post-column On-line Detection of Superoxide Radical Scavenging Ability of Column Eluates, Yasuhiro Sakurai, Kiyoshi Kawai, Rushiru Komatsu-Watanabe, Chie Morimoto, Shunji Sakamoto, Akira Nakajima, Kenji Kanaori, and Kunihiko Tajima, *Chemistry Letters*, **38**, 662-663 (2009)