

博士学位論文要約

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

申請者 櫻井康博

好気性生物は、酸素分子を水に 4 電子-4 プロトン還元する過程で ATP (アデノシン三リン酸) を生合成することで生命維持に必須のエネルギーを獲得している。酸素分子の還元過程では、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) のように高い酸化反応性を有する化学種が副産し、これらは活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) と総称される。ROS が関与するタンパク、核酸および脂質等の無秩序な酸化反応は様々な炎症およびガン化等発症の遠因と考えられている。生体系には ROS を無毒化するための防御系として、 $O_2^{\cdot-}$ に対する SOD (superoxide dismutase)、 H_2O_2 に対するカタラーゼ (catalase) およびビタミン E および C 等の多彩な低分子量物質が抗酸化反応と総称される反応系で重要な役割を果たしている。近年、ROS と生体関連物質の酸化還元反応が細胞のストレス応答を左右する細胞内情報伝達機構に寄与することが見出され、なかでも常磁性種の ROS である $\cdot OH$ と $O_2^{\cdot-}$ と生体関連物質の反応機構に関する研究の重要性が生化学から化学の広い学問領域で再認識されている。

これまでに、 $\cdot OH$ と生体関連物質の反応機構はパルスラジオリシス法等によって詳細に研究され、多数の糖類およびアミノ酸の二次反応速度定数はデータベース化されている。しかし、 $O_2^{\cdot-}$ と生体関連物質の反応解析にはパルスラジオリシス法や化学発光法などが応用されているが、いずれもが有効な研究手法となり得ないため、その研究例は $\cdot OH$ に比べて極めて限定的である。このような $\cdot OH$ および $O_2^{\cdot-}$ を区別して定量的に計測できる分光測定法として spin-trapping ESR (ST-ESR) 法がある。ESR 法は $\cdot OH$ および $O_2^{\cdot-}$ 等の常磁性種を計測対象とするが、両者共に短寿命化学種であるため ESR 信号の直接的な検出は不可能である。そして、 $\cdot OH$ および $O_2^{\cdot-}$ 等の短寿命な常磁性種を安定なニトロキシドラジカルに変換して ESR スペクトルを記録し、そのパラメータから短寿命ラジカルの同定と定量を実現する方法論がスピントラッピング (spin-trapping; ST) 法である。五員環ニトロン系分子である DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) を応用した ST-ESR 法は、 $\cdot OH$ および $O_2^{\cdot-}$ を区別して ESR 検出できる特徴を有している。また、DMPO と両ラジカル種の二次反応速度定数が既知であるため、この ST-ESR 法は生体関連物質と $\cdot OH$ および $O_2^{\cdot-}$ の二次反応速度定数の評価に応用されている。本研究では、生体関連物質と $\cdot OH$ および $O_2^{\cdot-}$ の反応速度定数の解析を主な研究目的とし、ST-ESR 法に最適な装置開発と測定条件の最適化および解析法の確立を目指して、次に述べるような段階的な研究を展開した。

装置開発では、本法の測定対象である DMPO に $\cdot OH$ あるいは $O_2^{\cdot-}$ が付加したラジカル種 (DMPO/OH あるいは DMPO/ O_2) の定量的検出を実現するために、フローインジェクション (flow-injection; FI) 法を ESR 測定に応用した。そして、FI-ESR 装置の流通

系内に導入した光照射セルによる光反応で $\cdot\text{OH}$ および $\text{O}_2\cdot$ を定量的に生成する反応系を構築した。具体的には、前者の $\cdot\text{OH}$ は過酸化水素の紫外線分解反応、後者の $\text{O}_2\cdot$ は溶存酸素のリボフラビン (riboflavin; Rf) の光還元反応によって生成した。次に、パルスラジオリシス法による研究例が豊富な $\cdot\text{OH}$ ラジカルを研究対象として、ST-ESR 法による生体関連物質と $\cdot\text{OH}$ の二次反応速度定数の解析法を検討した。ST-ESR 法では競争反応の取り扱いによって被検物質の速度定数 (k_s) が次式で求められる。ここで、 k_1 は DMPO と $\cdot\text{OH}$ の二次反応速度定数 ($2.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、 $[\text{DMPO}]_0$ は DMPO 初濃度および DMPO/OH の濃度がコントロールの 50 %に減少する被検物質の濃度 (ID_{50} , median infective dose) である。

$$k_s = k_1[\text{DMPO}]_0 / \text{ID}_{50}$$

本研究では、被検物質濃度に依存して減少する DMPO/OH の濃度変化 (抗酸化曲線) を非線形最小自乗法で解析して ID_{50} 値を解析し、得られた値と DMPO の初濃度の直線関係から k_s を解析した。この手法で求めた Gly、マニトール、4-hydroxycinnamic acid (4CA) を含む 17 種類の生体関連物質の k_s 値はパルスラジオリシス法と解析結果と良好に一致したことから、本研究で提案した k_s 値の解析法の妥当性と信頼性が支持された。

さらに、上述の研究結果を基盤として生体関連物質と $\text{O}_2\cdot$ の二次反応速度定数の解析を継続した。そして、光照射セルの上流に接続した小型ミキサーによって Rf および EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid) を DMPO と被検物質に混合し、定常的に DMPO/ O_2 の ESR 信号が観測できる新規の FI-ESR 装置を構築した。本装置で観測した CA (caffeic acid)、RTN (rutin) および TRX (trolox) の抗酸化曲線から解析した k_s 値は、パルスラジオリシス法による解析値と良好な一致が認められた。本 FI-ESR 系を応用することで、4CA のように k_s 値が $10^2 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ 程度で $\text{O}_2\cdot$ との反応速度が遅い生体関連物質の反応速度が評価できることを証明した。本研究は、ST-ESR 法と FI-ESR 装置を組み合わせることで、様々な生体関連物質と $\cdot\text{OH}$ あるいは $\text{O}_2\cdot$ の二次反応速度定数が正確に解析できることを世界に先駆けて実証し、両ラジカルと生体関連物質の反応速度における構造活性相関研究に新たな方法論を提供した。

以上の FI-ESR 法の数値論的な研究成果を基盤とする応用研究として、HPLC 装置のカラム下流で $\text{O}_2\cdot$ の検出に必要な ST-ESR 試薬を混合し、カラム溶出成分の $\text{O}_2\cdot$ 消去活性をオンライン評価する HPLC-ESR 装置を開発した。本装置ではカラム溶出成分と $\text{O}_2\cdot$ の反応によって DMPO/ O_2 濃度が減少する抗酸化反応によって ESR クロマトグラムを記録する。濃度既知の 3 種類の抗酸化物質 (CA, 4CA および GA (gallic acid)) を含む混合溶液について得た ESR クロマトグラムのピーク面積強度は、それぞれの k_s の文献値と溶出濃度に依存することを実験的に証明した。本システムは、青果物あるいは飲料の含有成分に含まれる優れた $\text{O}_2\cdot$ 消去活性物質の探索に有効な手法であり、近年、抗酸化物質の探索が注目されている食品科学の分野に新しい分析法を提供した。