

活性酸素, フリーラジカルによる生体膜傷害の防止に関する研究

東京大学先端科学技術研究センター

二 木 銳 雄

There is now an increasing number of experimental and epidemiological evidence which indicates that the oxidations of biological molecules and membranes induced by active oxygens and free radicals are involved in a variety of pathological events, cancer and even aging processes. The aerobic organisms are protected against these oxidative stress by an array of defense systems with different functions. Among others, the radical-scavenging antioxidants play an important role to inhibit a chain initiation and break the chain propagation. This study has been performed aiming at elucidating the dynamics and mechanism of action of various natural and synthetic radical-scavenging antioxidants, especially the effect of reaction medium on them. A number of aminophenols, chromanols and related compounds have been studied in homogeneous solution, micelle, liposomal membranes and in *ex vivo* systems. The antioxidant activities of various natural and synthetic carbazoles were studied in the oxidations of methyl linoleate in homogeneous solution and soybean phosphatidylcholine liposomes in aqueous dispersions induced by free radicals. Carazostatin, 1-heptyl-3-hydroxy-2-methyl carbazole, which was isolated from a culture of *Streptomyces Chromofuscus* was found to be a strong antioxidant in both oxidation systems. It was also found that the physical factors such as location and mobility of antioxidant in the microenvironment as well as chemical reactivity toward radicals are important in determining the overall antioxidant potency.

1. 緒 言

活性酸素種やフリーラジカルによって誘起される生体分子や生体膜の酸化的傷害が、種々の疾病、癌、老化とも関わることが明らかになりつつある。それに伴い、生体が持つこれら酸化的傷害に対する防御システムが興味を持たれている¹⁾。生体は活性酸素種やフリーラジカルの生成を抑える予防的抗酸化物、ラジカルを捕捉安定化する抗酸化物、さらには修復、再生酵素を有している。本研究ではラジカル捕捉型抗酸化物について、特に種々のフェノール、クロマノール、カルバゾールおよび類縁化合物の抗酸化活性、ビタミンE(α -トコフェロール)の膜における抗酸化作用のダイナ

ミックスについて検討した。

2. 実 験

2.1 試 薬

酸化反応では、生体脂質のモデルとして高度不飽和脂肪酸エステル¹の一種であるリノール酸メチル(MeLH)、およびリン脂質¹の一種である大豆ホスファチジルコリン(soyPC)をそれぞれ常法により精製した後、基質として用いた。抗酸化物は市販のものをそのまま用いた。使用した化合物を図1に示す。連鎖開始剤としては市販の脂溶性アゾ化合物2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(AMVN)と、水溶性アゾ化合物2,2'-ア

A Study on the Inhibition of Oxidative Damage of Biological Membranes Induced by Active Oxygens and Free Radicals

Etsuo Niki

ゾビス(2-アミジノプロパン)ジヒドロクロリド (AAPH)を用いた。

スピラベル剤として、シグマ社製のステアリン酸のドキシル誘導体(NS)を用いた。ラベル剤はベンゼン溶液を丸底フラスコにとり、ベンゼンを減圧下除去してフラスコ壁に薄膜とし、そこへリポソームサスペンションを添加、インキュベートして取り込ませた。

2.2 実験操作

2.2.1 均一溶液系における酸化反応実験

MeLH453mM, AMVN0.20mMに各種抗酸化物を5 μ M加えた均一溶液を37°C大気下で反応し、酸化により生成するリノール酸メチルの共役ジエンヒドロペルオキシドをHPLC-UVで分析した。分析条件は、カラム LC18 (Supelco), Eluent MeOH/H₂O 95/5(v/v)で分離し、UV 234nmで測定した。

2.2.2 ミセル系における酸化反応実験

MeLH 143mM, AAPH 5mMを加えたSDSミセルに抗酸化物を5 μ M加え、37°C, 大気下で反応を行ない、MeLH酸化過程における酸素吸収速度をO₂モニターを用いて測定し、酸化速度を求めた。

2.2.3 リポソーム膜系における酸化反応実験

soy PC 5mM, AMVN 1mMのリポソーム膜を作製し、37°C, 大気下で酸化反応を行ない、酸化により生成する共役ジエンヒドロペルオキシドをHPLC-UVで定量した。分析は、Supelco社製のシリカカラムを用い、Eluent MeOH/40 mM phosphate 90/10(v/v)で分離し、UV234 nmで測定した。

2.2.4 ESR 測定

スピラベル剤の減少はそのESR吸収強度の変化を測定することにより行なった。ESRスペクトルの測定は、水溶液用石英偏平セルと温度可変装置付キャビティを使用し、日本電子(株)製、X-バンド, FE-1Xを用いて行なった。

3. 結果と考察

3.1 均一溶液系における各種抗酸化物の抗酸化活性

アセトニトリル均一溶液系における各種抗酸化物の抗酸化活性を比較したところ(図1), 天然に存在する抗酸化物である α -トコフェロール(1)が最も優れた抗酸化活性を示し、構造の類似したクロマノール類も(1), (2) > (3), (4) > (5)の順にいずれも優れた活性を示した。フェノール類に関してみると(1), (2), (3), (4) > (30), (37), (5), (20), (32), (7) > (10), (8) > (33), (34)の順になり(35), (36), (38)は抗酸化活性を示さなかった。クロマノール類 > アミノフェノール類 > インドール類 > メトキシフェノール類 > クレゾール類となることからパラ位やオルト位により強い電子供与

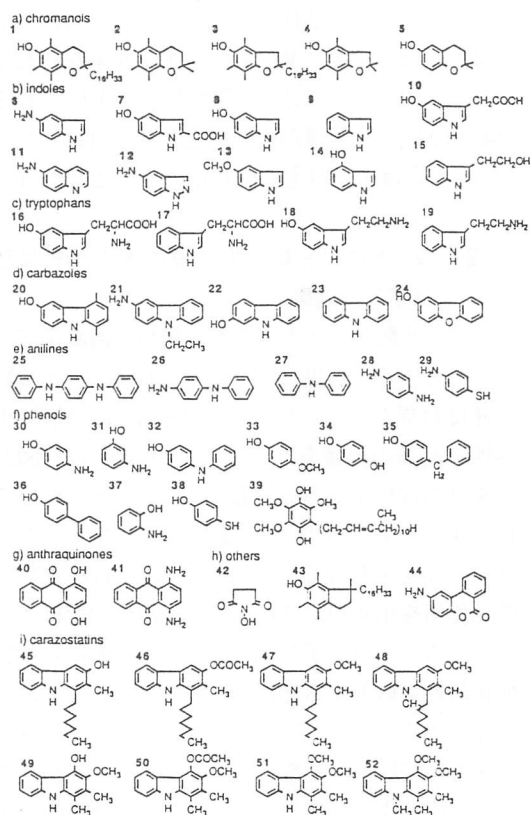


Fig.1 Antioxidants used in this study

性の置換基がくるものほど、優れた抗酸化活性を示すと考えられる。

放線菌より単離された天然化合物である(45)²¹は(1)の約半分程度の優れた活性を示し、(49)も弱い抗酸化活性を示したが、これらの誘導体である(46)、(47)、(48)、(50)、(51)、(52)はいずれも活性を示さなかった。アミノ基は(21) > (20)、(6) > (7)、(28) > (30)、(29) = (38)より、ヒドロキシル基より速くラジカルと反応できるということも推測できる。また(25)は最もすぐれた抗酸化物のひとつである(2)と同程度の、(26)も(25)には若干劣るが(28)よりも優れた活性を示すのに対し(27)は活性を示さなかった。以上のことより、水素が抜けた後のラジカルがより安定なものほど強い抗酸化活性を示すと思われる。トリプトファン類のみミセル系で測定を行なった(アセトニトリルに不溶であるため)ので定性的な評価しかできないが、(16)は活性を示したが(15)は活性を示さなかった。アミノ基、ヒドロキシル基を持たない(9)、(13)、(15)、(23)、活性基がメタ位にある(14)、(22)、(31)、環が電子欠乏となる(11)、(12)、(24)、(44)はいずれも抗酸化活性を示さなかった。

3.2 α-トコフェロール(1)の抗酸化活性に及ぼす溶媒効果

リノール酸メチルの酸化を各種均一溶媒系で行なったところ、溶媒によりリノール酸メチルの酸化速度は異なりα-トコフェロール(1)の抗酸化活性も溶媒の影響をうけることが分かった(図2)。

極性溶媒中で(1)の活性がおちることについて Pryor ら³⁾は、クロマン環酸素がクロマノキシラジカルを共鳴安定化するために、(1)が強い抗酸化作用を示すが、プロテック溶媒中ではエーテル酸素の対電子が水素結合することにより抗酸化活性が低下すると報告している。そこでエーテル酸素をもつ(1)とこれに類似しクロマン環酸素をもたない(43)とを、各々プロテックなメタノール中およびアプロテックなヘキサン中で酸化を行ない、これに対する(1)、(43)の抗酸化活

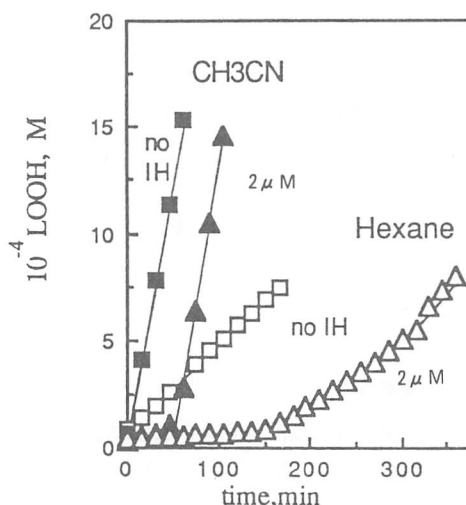


Fig.2 Rate of the oxidation with and without(1) in acetonitrile and hexane. [MeLH]=453mM;[AMVN]=0.20mM

性を調べた。(1)も(43)もともにヘキサン中でメタノール中より約6倍優れた活性を示しエーテル酸素の有無による影響は見られなかった(図3)。このことから(1)の活性がプロテック溶媒中で低下するのはエーテル酸素の水素結合によるものでなく、フェノール性水素の水素結合によるものと考えられる。

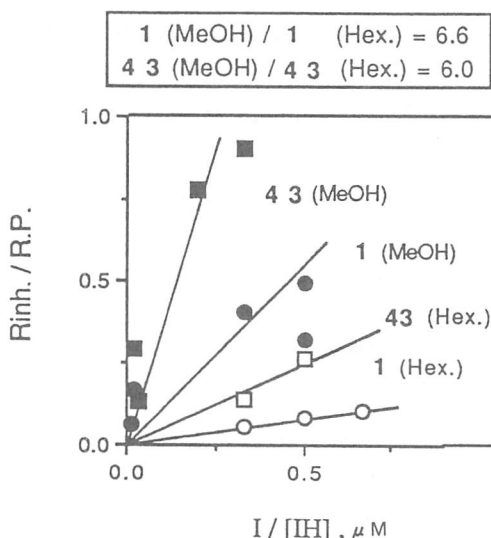


Fig.3 Solvent effect on the antioxidant activities of 1 & 43 in the oxidation of methyl linoleate

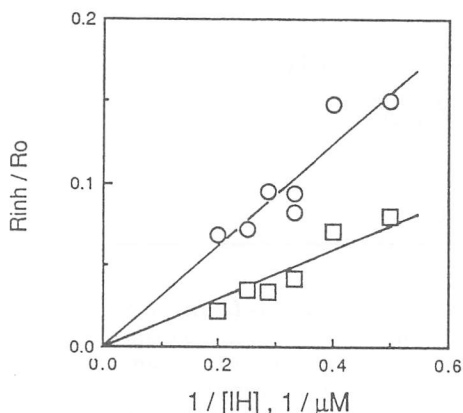


Fig.4 The relationship between R_{inh}/R_o and $1/[IH]$ in the oxidation of methyl linoleate in acetonitrile. $[AMVN]=0.20\text{mM}$; $[MeLH]=453\text{mM}$ 37°C under air

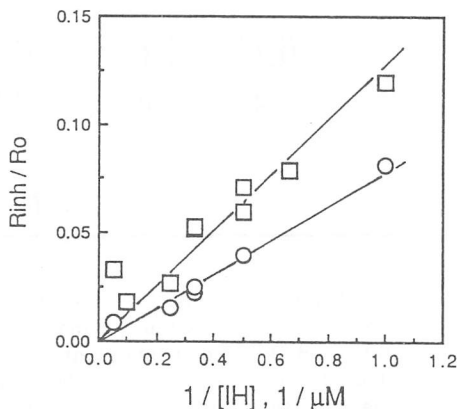


Fig.5 The relationship between R_{inh}/R_o and $1/[IH]$ in the oxidation of soybean PC liposomal membranes. $[AMVN]=1\text{mM}$; $[soyPC]=5\text{mM}$; 37°C under air

3.3 α -トコフェロールの膜中における抗酸化活性

天然化合物である(1)と(45)の抗酸化活性をリポソーム膜中で比較したところ均一溶液系では(1)の方が優れた活性を示したのに対し、リポソーム膜中では(45)の方が優れた活性を示した(図4, 5)。また(1)と類似しているが側鎖のない化合物(2)は均一溶液系では(1)と同程度の、またリポソーム膜中では(45)と同程度の優れた活性を示すことが分かった。このことから(1)はその側鎖の影響により膜中での動きが制限されていることが示唆される。

3.4 スピンラベル法によるトコフェロールの膜中での抗酸化活性の評価

スピンラベル剤であるドキシルステアリン酸には抗酸化作用があり、それ自身ラジカルと反応して消費されていく。リポソーム膜に α -トコフェロールとドキシルステアリン酸を共存させると、両者ともにラジカルを競争的に捕捉して減少して

いく。 α -トコフェロールがラジカルを捕捉する分だけ、スピンラベル剤の消費は抑えられる。大変興味深いことに、ドキシルステアリン酸の作用部位であるN-オキソドを膜の内部深くにおくほど、 α -トコフェロールはドキシルステアリン酸の消費を抑制しにくくなることが分かった。すなわち、 α -トコフェロールの活性部位であるフェノール性OH基は膜表面にあり、ラジカルが膜の内部に入るほど捕捉しにくいことが明らかとなった。

文献

1. 二木鋭雄, 活性酸素種の化学, 日本化学会編, PP. 177-190, 学会出版センター, 東京, 1990.
2. Kato, S., Kawai, H., Kawasaki, T., Toda, Y., Urata, T. and Hayaishi, Y., J. Antibiotics, 42, 1879-1881(1989).
3. Pryor, W. A., Strickland, T. and Church, D. F., J. Am. Chem. Soc., 110, 2224-2229 (1988).