

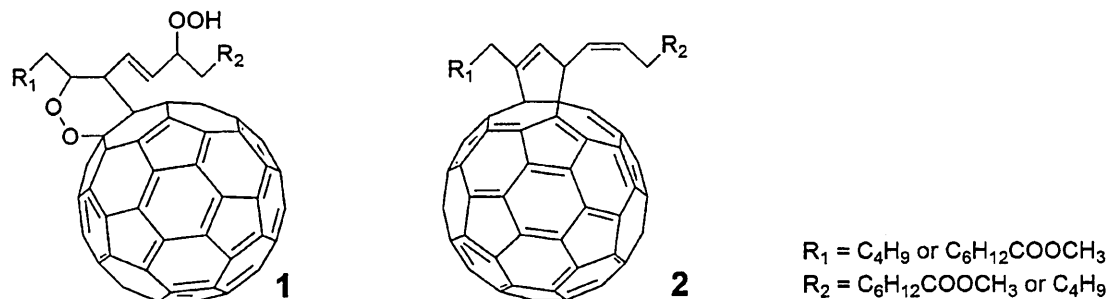
氏 名 (本国籍)	門 脇 章 夫 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第580号
学 位 授 与 年 月 日	平成24年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	脂質過酸化反応に対するフラレーンの作用機構に関する研究
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 岩 本 悟 志 副査 岐阜大学 教 授 山 内 亮 副査 静岡大学 教 授 河 合 真 吾

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

フラレーンは炭素原子のみで構成される球状クラスター分子の総称であり、炭素原子 60 個の  $C_{60}$  や 70 個の  $C_{70}$  などがある。フラレーンは比較的高い電子親和力を有しており、そのために脂質過酸化反応に対して効果的な抗酸化剤となりうることが示されている。しかし、フラレーンによる脂質過酸化抑制機構の詳細は未だ不明である。本学位論文は、リノール酸メチル (MeL) の自動酸化反応抑制時に生じるフラレーン  $C_{60}$  反応生成物の解析から抗酸化機構を明らかにするとともに、反応速度論的解析からフラレーンの抗酸化作用を評価したものである。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

まず本学位論文では、バルク状態の MeL にフラレーン  $C_{60}$  を 0.1 mol% 添加して 60℃ で自動酸化させ、 $C_{60}$  反応生成物を分離して構造解析が行われた。逆相 HPLC で、 $C_{60}$  反応生成物としてピーク 1 と 2 が検出されたのでこれらを分離して化合物 1 と 2 が得られた。化合物 1 はさらに順相 HPLC で化合物 1a-1d に分離された。これらの化合物の構造を詳細に解析した結果、化合物 1 はフラレーン  $C_{60}$  分子に MeL 由来のペルオキシラジカルが付加したものであり、1a と 1b は  $C_{60}$  に MeL-13-OOH の 9-ペルオキシ-10-アルキルラジカルが付加した立体異性体、1c と 1d は  $C_{60}$  に MeL-9-OOH の 12-アルキル-13-ペルオキシラジカルが付加した立体異性体であると決定された。また、化合物 2 はフラレーン  $C_{60}$  に MeL 由来の 9,11-ジアルキルあるいは 11,13-ジアルキルラジカルが付加した混合物であると決定された。0.1 mol%  $C_{60}$  を含む MeL を空気との接触面積が異なる 2 つの条件下 60℃ で自動酸化させたところ、空気との接触が十分な場合には、 $C_{60}$  反応生成物としてまず 2 の生成が認められ、その後 1 が出現した。一方、空気との接触が不十分な条件では、2 の生成割合が上昇した。以上の結果より、フラレーン  $C_{60}$  は脂質ペルオキシラジカルや脂質アルキルラジカルを捕捉して化合

物 1 や 2 を形成することが明らかにされた。さらに、主たる  $C_{60}$  反応生成物は化合物 2 であったことより、 $C_{60}$  による抗酸化作用は連鎖開始反応で生じた脂質アルキルラジカルを速やかに捕捉することによるものであると結論づけられた。



次に、MeL の過酸化反応におけるフラレーンの抑制作用について反応速度から解析が行われた。なお、フラレーンの比較対照として脂溶性抗酸化剤である $\alpha$ -トコフェロールが用いられた。MeL トルエン溶液にフラレーン  $C_{60}$  および  $C_{70}$  あるいは $\alpha$ -トコフェロールを加え、ラジカル反応開始剤 (AMVN) を添加して  $37^\circ\text{C}$  で過酸化反応を開始させ MeL 過酸化反応の反応速度パラメーターとして、連鎖開始反応速度  $R_i$ 、連鎖成長反応速度  $R_p$ 、自動酸化難易度、動力学的連鎖長  $kcl$  が算出された。その結果、フラレーン  $C_{60}$  あるいは  $C_{70}$  の添加は、MeL の連鎖成長反応速度  $R_p$  を有意に低下させることが明らかとなった。また、 $\alpha$ -トコフェロールによる酸化抑制期間から連鎖開始反応速度  $R_i$  を求め、自動酸化難易度と動力学的連鎖長  $kcl$  を算出したところ、これらの値もフラレーン添加によって有意に低下することが確認された。これら反応速度パラメーターの低下作用は  $C_{70}$  と比較して  $C_{60}$  がより効果的であった。一方、フラレーン  $C_{60}$  あるいは  $C_{70}$  と AMVN 由来のペルオキシラジカルとの反応速度を求めたところ、それらの反応速度は MeL がペルオキシラジカルと反応する速度の 10 倍あるいは 6 倍程度の値であり、 $\alpha$ -トコフェロールとペルオキシラジカルとの反応速度に比べて低いものであった。

本研究では、フラレーンは脂質過酸化の初発段階で生成するアルキルラジカルを効果的に捕捉できることが明らかにされた。一方、脂質過酸化連鎖反応で生成するペルオキシラジカルとの反応性は $\alpha$ -トコフェロールに比べて低いものであったが、フラレーンは分子内に多数の反応部位を有するために複数のフリーラジカルを捕捉することができるので、長期間にわたって脂質過酸化反応を抑制する可能性が示された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本学位論文は、フラレーン分子の抗酸化作用に着目して、脂質過酸化反応におけるフラレーン生成物から抗酸化機構を解析するとともに、反応速度論的解析から抗酸化能を評価したものである。本研究で得られた知見は以下のとおりである。

まず、リノール酸メチル(MeL)の自動酸化反応抑制時に生じるフラレーン  $C_{60}$  反応生成物からフラレーンの抗酸化機構を検討した。バルク状態の MeL にフラレーン  $C_{60}$  を 0.1 mol% となるように溶解して大気下  $60^\circ\text{C}$  で自動酸化させた。反応生成物を逆相 HPLC で分析したところ、生成物と思われるピーク 1 と 2 が検出された。そこ

で、これらのピークを分離して化合物 1 と 2 を得た。さらに、化合物 1 は順相 HPLC によって、4 ピーク(1a-1d)に分離された。これらの化合物の構造を NMR や MS 等で解析した結果、化合物 1 はフラレーン C<sub>60</sub> 分子に MeL 由来のペルオキシラジカルが付加したものであり、1a と 1b は C<sub>60</sub> に MeL-13-OOH の 9-ペルオキシ-10-アルキルラジカルが付加した立体異性体、1c と 1d は C<sub>60</sub> に MeL-9-OOH の 12-アルキル-13-ペルオキシラジカルが付加した立体異性体であると決定した。また、化合物 2 はフラレーン C<sub>60</sub> に MeL 由来の 9,11-ジアルキルあるいは 11,13-ジアルキルラジカルが付加した混合物であった。MeL に 0.1 mol% C<sub>60</sub> を加え、空気との接触面積が異なる 2 つの条件下 60℃ で自動酸化させたところ、空気との接触が十分な場合には、C<sub>60</sub> 反応生成物としてまず 2 の生成が認められ、その後 1 が出現した。一方、空気との接触が不十分な条件では、2 の生成割合が上昇した。以上の結果より、フラレーン C<sub>60</sub> は脂質ペルオキシラジカルや脂質アルキルラジカルを捕捉して化合物 1 や 2 を形成することを明らかにした。さらに、主たる C<sub>60</sub> 反応生成物は化合物 2 であったことより、C<sub>60</sub> による抗酸化作用は連鎖開始反応で生じた脂質アルキルラジカルを速やかに捕捉することによるものと結論した。

次に、MeL の過酸化反応におけるフラレーンの抑制作用を反応速度から解析した。MeL トルエン溶液にフラレーン C<sub>60</sub> および C<sub>70</sub> あるいは  $\alpha$ -トコフェロールを加え、ラジカル反応開始剤 (AMVN) を添加して 37℃ で過酸化反応を開始させた。MeL 過酸化の反応速度パラメーターとして、連鎖開始反応速度  $R_i$ 、連鎖成長反応速度  $R_p$ 、自動酸化難易度、および動力学的連鎖長  $kcl$  を算出した。その結果、フラレーン C<sub>60</sub> あるいは C<sub>70</sub> の添加は、MeL の連鎖成長反応速度  $R_p$  を有意に低下させた。また、 $\alpha$ -トコフェロールによる酸化抑制期間から連鎖開始反応速度  $R_i$  を求め、自動酸化難易度と動力学的連鎖長  $kcl$  を算出したところ、これらの値もフラレーン添加によって有意に低下した。これら反応速度パラメーターのフラレーンによる低下作用は C<sub>70</sub> と比較して C<sub>60</sub> がより効果的であった。一方、C<sub>60</sub> あるいは C<sub>70</sub> と AMVN 由来のペルオキシラジカルとの反応速度を求めたところ、それらの反応速度は MeL がペルオキシラジカルと反応する速度の 10 倍あるいは 6 倍程度の値であり、 $\alpha$ -トコフェロールとペルオキシラジカルとの反応速度に比べて低いものであった。しかし、分子内に多数の反応部位を有しているフラレーンは複数のフリーラジカルを捕捉することが可能であるために、より長期にわたって脂質過酸化反応を抑制する可能性が示された。

以上について慎重に審議した結果、得られた知見は学術的に価値のあるものと判断され、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文は以下のとおりである。

1. Kadowaki, A., Iwamoto, S., & Yamauchi, R.: Reaction products of [60]fullerene during the autoxidation of methyl linoleate in bulk phase. *Chem. Phys. Lipids*, 165, 178-185, (2012).
2. Kadowaki, A., Iwamoto, S., & Yamauchi, R.: The Antioxidative Effect of Fullerenes during the Peroxidation of Methyl Linoleate in Toluene. . *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76(1), 110739-1-3, (2012).