岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

クェルセチンを中心とするフラボノイドのラジカル補捉反応とその反応機構

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2008-03-12
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 大橋, 英雄
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/615

はしがき

高齢化時代を迎えた我が国では動脈硬化、痴呆、ガンなどの疾病に対する予防に強い関心がもたれている。このような疾病の発症には日常の食生活の有様が密接に関係しているとされ、予防には多くの免疫学調査結果もあって、緑黄色野菜や果物の摂取が有効であるとされている[1]。このことに関してフレンチパラドックス(French paradox)という興味深い事項がある[2]。この事項とは、欧米先進諸国において高い頻度で見られる動脈硬化による死亡と多量の脂肪摂取との間に正の相関があると認められているにもかかわらず、フランスの国民には動脈硬化性疾患による死亡の少ないことをさしている。このことの理由として、フランス国で大量に消費されているワインをあげ、この中に含まれているポリフェノールの効用が指摘されている[3]。これと同様の効用として、我が国では広く常飲されている緑茶に含まれるポリフェノール化合物であるカテキンなどの効用をあげている。事実、これらポリフェノール類はヒトの体内で上記のような疾病発症の原因になる活性酸素やラジカルを除去するのに機能しているとの具体的な知見の集積が進んでいる[1-7]。

さて、活性酸素種(Reactive oxygen species(ＲＯＳ))やフリーラジカルは生体内の酸化障害を誘引する引き金化合物であるが、その中でも、重要であると考えられているのはスーパーオキシド(O_2-)、ヒドロキシラジカル(・OH)、アルコキシラジカル(RO・)などである。これらは生体内で次のような反応機構で発生すると説明されている[1, 8]。

酸素はまず酵素作用などによってスーパーオキシドや過酸化水素になるが、これらは速やかにヒドロキシラジカルに変換される(Fig. 1)。このヒドロキシラジカルは非常に反応性が高く、酵素、ＤＮＡ、脂質などの生体分子を攻撃してダメージを与える。また、生体膜を構成している脂質分子がヒドロキシラジカルの攻撃を受けると、非常に安定で、かつ反応性が高いアルコキシラジカルへと変わり、これも生体分子にダメージを与える[1, 8]。したがって、酸化障害の中心的な役割をになうのは脂質の過酸化物であるということができる。これを生成する反応には酵素的と非酵素的なものとが考えられるが、特に非酵素的なフリーラジカル連鎖反応(自動酸化)が一連の毒性発現に大きく関与している。この自動酸化反応は連鎖開始反応、連鎖成長反応および連鎖停止反応の三段階から成り、これらは次に示す(1)～(6)式で示すことができる。

連鎖開始反応 (Initiation)

$$LH \rightarrow L\cdot + H\cdot \qquad (1)$$

連鎖成長反応 (Propagation)

$$L\cdot + O2 \rightarrow LOO\cdot \qquad (2)$$

$$LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot \qquad (3)$$

連鎖停止反応 (Termination)

$$LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL + O2 \qquad (4)$$

$$L\cdot + L\cdot \rightarrow LL \qquad (5)$$

$$L\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL \qquad (6)$$

この連鎖的な脂質過酸化反応では活性酸素やラジカルといった引き金化合物(X)によって脂肪酸(LH)から水素を引き抜かれ、脂質ラジカル(L・)を生じることで反応が開始される[反応(1)]。生成した脂質ラジカルは酸素分子と容易に反応し、脂質ペルオキシラジカル(LOO・)を生じる[反応(2)]。そして、LOO・は別の脂肪酸から水素原子を引き抜いて脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を蓄積する[反応(3)]。ここで新たに生成したL・は上記の反応(2)及び(3)を行う。このように酸素存在下では1つの活性種(X)による脂肪酸からの水素引き抜きがいくつもの有害なLOOHを形成するので、これらの反応を遮断する化合物の存在が期待される。こうした能力を有する化合物が抗酸化性化合物、すなはち抗酸化剤である。自動酸化では活性種(X)を消去することが重要である。このような働きをする抗酸化剤を予防型抗酸化剤という。また、生じたフリーラジカルを捕捉してラジカル連鎖反応を断ち切ることも重要である[8,9]。こうした働きをするものをラジカル捕捉型または連鎖停止型の抗酸化剤という。

抗酸化剤を必要としている分野はいろいろとあり、食品加工分野もその一つである。ここでは食品中の脂質酸化を防止するために抗酸化剤が恒常的に用いられている。この添加は脂肪性食品の品質維持上効果的であると理解されている。しかし、これまで広く用いられてきた合成抗酸化剤の*tert*-ブチルヒドキシアニソール(ＢＨＡ)やジ-*tert*-ブチルヒドロキシトルエン(ＢＨＴ)は優れた効果を示すが、これらの連続摂取による発ガンや毒性発現が問題視されている[10,11]。そこで、天然起源の安全性の高い抗酸化物質に切り替えたいとの期待が高まり、天然起源のD,L-α-トコフェロール(ビタミンＥ)、L-アスコルビン酸(ビタミンＣ)、カロチノイドなどがすでに利用されている。これらについては抗酸化反応機構解明始め、いろいろな立場から広く研究されている。これとは別に、優れた抗酸化剤を植物界に求める動きも相変わらず盛んである[12,13]。報告者も植物資源の化学的有効利用を推進する立場からこの問題について検討している。

報告者の抗酸化に関する研究はカバノキ科樹木、アサダ(*Ostrya japonica*)のアサダニン類(ショウガ科植物ウコン(*Curcuma longa*)のクルクミンと同じジアリルヘプタノイド)の抗酸化能評価実験に始まる。[14] この実験でトリデオキシアサダニン・他がα-トコフェロールを凌ぎ、クルクミンに匹敵する抗酸化能を持つことを明らかにした。さらにこの結果から、用材生産用樹木資源としては評価の低いカバノキ科樹木が成分利用の点で高い可能性を秘めていると考察した。その後、抗酸化能評価試験は対象を80種類以上に及ぶ多彩な樹木フェノール性成分へと広げて続行した。その結果、フラボノイド、スチルベノイドなどに属する成分中にに強い抗酸化活性を示すものが多数あることを発見した。[15] また、一連の検討から、抗酸化成分中には急速に多数のラジカルを捕捉するものと、ラジカル捕捉のスピードは緩やかであるが、時間をかけて多数のラジカルを捕捉するものなどのあることを明らかにした。その後、抗酸化能評価研究は通常の分光学的方法だけでなく、ストップドフロー法も採用し

て調べることとなり、天然性フェノール性成分群の抗酸化能の強さはこれらが保有する水酸基数と相関関係にあるというような単純なことでないことも明らかにした。最終的には、フラボノールのクエルセチンやフラバノンのエリオジクチオールの優れた抗酸化能に注目することになった。

報告者はクエルセチンが植物界に広く分布しているので、これに注目することは植物資源の有効利用を志向している報告者本来の研究姿勢に合致していると考えた。そこで、クエルセチンの水酸基ごとの抗酸化能発現貢献度を明らかにするため、クエルセチンの部分メチル誘導体類を調製し、それらを人工ラジカル、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(ＤＰＰＨ)と反応させ、ラジカル捕捉能発現の強さは隣接した$C_{3',4'}$-ジヒドロキシル基≫C_3位ヒドロキシル基〉C_7位ヒドロキシル基〉C_4ヒドロキシル基〉C_3ヒドロキシル基≧C_5位ヒドロキシル基の順であることを確かめた[16]。さらに、研究はクエルセチンの抗酸化活性の発現において寄与度の高いC_3位水酸基（フラボノールとして特徴を示す官能基）から始まる抗酸化反応機構の解明へと進んだ。この目的に合致したモデル化合物、5,7,3'4'-テトラメチルクエルセチン(TetraＭＱ)を調製し、これを反応性の異なる２種の合成ラジカル開始剤、反応性の高い2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチルヴァレロニトリル(ＡＭＶＮ)と反応性の低い2,2'-アゾビス-イソブチロニトリル(ＡＩＢＮ)、と反応させ、得られる反応生成物の化学構造を明らかにするとともに、それらの生成量からフラボノールのラジカル捕捉反応機構解明をめざした[17,18]。その結果、TetraＭＱのラジカル捕捉の初期段階の反応経路(途中で二つに分岐する)を提案した。しかも、ラジカル開始剤によって反応生成物の種類とそれらの生成量が違うこと、すなはち、抗酸化化合物はラジカルの反応性の強弱によってラジカル捕捉機能発現の様相が違うことを具体的に示した。

本研究では、クエルセチンの抗酸化能発現において最も貢献度の大きい$C_{3',4'}$-ジヒドロキシル基から始まるラジカル捕捉反応機構を解明すること、非常に優れたラジカル捕捉能を示す２種のフラボノイド、フラボノールのクエルセチンやフラバノンのエリオジクチオールのラジカル捕捉反応の実態に迫ることの２課題について実験し、考察した。前者の検討では3,5,7-トリメチルクエルセチン(TriＭＱ)と2,2'-アゾビス-イソブチロニトリル(ＡＩＢＮ)とを反応させて得られる反応生成物とそれらの生成量から$C_{3',4'}$-ジヒドロキシル基から始まるラジカル捕捉反応機構を明らかにすることにした。また、後者の検討ではラジカル捕捉において反応性の違うクエルセチンとエリオジクチオールを反応性の違う合成ラジカル、ＤＰＰＨとガルビノキシルと、異なったpH、溶媒、温度条件下で反応させてラジカル捕捉反応の実態に迫ることにした。