

2P067

時間分解 EPR 法による二分子膜界面における ビタミン C の抗酸化反応機構とスピンドイナミクス

(神戸大院理¹, 東工大院理工², 静岡大院理³) ○江間文俊¹, 付哲斌², 村井久雄³

Time-resolved EPR study on the spin dynamics of the radical species generated in the antioxidant reaction of ascorbic acid at bilayer membrane interface

(Kobe Univ.¹, Tokyo Tech.², Shizuoka Univ.³) ○Fumitoshi Ema¹, Zhebin Fu², Hisao Murai³

【序論】 サプリメントやアンチエイジングの観点から、様々な物質の抗酸化能が大きく注目されている。特に、ビタミン C として知られるアスコルビン酸は高い抗酸化能を示すことが知られている。生体内における抗酸化反応の多くは膜界面で起きていると考えられ、ミセルや逆ミセルを単純な生体膜モデルとして用いた研究が行われてきた。そして、膜界面における抗酸化物質の反応性が反応場の大きさや pH に依存することが示された[1-3]。しかしながら、生体二分子膜界面における反応機構や常磁性種のダイナミクスに関しては、完全には理解されていない[3]。

生体膜はタンパク質や脂質から構成されており、主要成分はリン脂質である。また、リポソームはリン脂質分子が自己集合することにより形成される脂質二分子膜である。そのため、リポソームは実際の生体二分子膜に最も近いモデルとして用いられている。アントラキノン(AQ)誘導体は、光還元反応の前駆体として、時間分解 EPR (TR-EPR)法を利用した研究に数多く利用されている。

本研究では、生体二分子膜界面における抗酸化反応のダイナミクスを調べるため、リポソームを二分子膜モデルとして用いた。TR-EPR 法を用いることにより、二分子膜界面における AQ 誘導体とアスコルビン酸の光還元反応をリアルタイムで観測した。観測された異常スピン分極(CIDEP)スペクトルの線形や生成したラジカル種の緩和過程の解析を行った。そして、初期反応で生成したラジカル種の二分子膜界面におけるダイナミクスを明らかにし、さらに、生成ラジカルが関与した抗酸化反応に対するスピンドイナミクスの影響を考察した。

【実験】 アントラキノン-2,6-ジスルホン酸二ナトリウム(AQDS)およびアスコルビン酸ナトリウム(AscHNa)をカチオン性ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)のリポソーム溶液に溶解させて、試料溶液とした。X-バンド TR-EPR 測定は、JEOL JES-FE2XG を用いて、磁場変調をかけずに室温で行った。試料溶液は、窒素ガスバブリングにより脱酸素し、光路長 0.3 mm の石英製フラットセルを用いて流動法により測定した。Nd:YAG レーザー(Continuum, Minilite)によるナノ秒パルス光($\lambda=355$ nm, 10 Hz)を励起光に用いた。比較のため、アニオン性ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)およびカチオン性ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド(DTAB)のミセル溶液系と界面活性剤を含まない水溶液系でも実験を行った。

【結果と考察】 図1はカチオン性のDDABリポソーム溶液系のTR-EPRスペクトルを示す。低磁場側に観測されたマイクロ波の放出(Em.)を示す2本の強いピークはアスコルビン酸モノアニオンラジカル(Asc^{•-})に帰属された。また、中央から高磁場側に観測された複数の分裂ピークはアントラキノン-2,6-ジスルホン酸のセミキノンジアニオンラジカル(AQDSH^{•2-})に帰属された。このCIDEPスペクトルは、全放出型の電子スピン分極を示す三重項機構(TM)の寄与によって説明することができる。このことは、反応前駆体である励起三重項³AQDS^{2-*}のスピン分極が、生成ラジカルにそのまま引き継がれたことを示している。また、DDABリポソームの界面付近は、正電荷によりOH⁻が近づきやすいため、塩基性を示していると考えられる。そのため界面付近では、アスコルビン酸がpKa₁<4.2よりモノアニオン(AscH⁻)として存在していると考えられる。したがって、³AQDS^{2-*}のスピン緩和が起こる前に、AscH⁻からの水素引き抜き反応が起きたと結論付けられる。また、ラジカル対機構(RPM)の寄与がほとんど現れていないことは、生成した各アニオンラジカルがカチオン性の二分子膜界面に束縛されており、拡散が制限されていることを示唆している。図2はDDABリポソーム溶液系で観測されたTR-EPRスペクトルの信号強度の時間変化を示す。これより、AQDSH^{•2-}に由来する信号の減衰速度が、Asc^{•-}に由来する信号の減衰速度よりも明らかに遅いことが分かる。この結果は、スピン緩和時間がAsc^{•-}よりもAQDSH^{•2-}の方が長いことを示している。Asc^{•-}のスピン緩和時間を求めたところ、スピン-格子緩和時間(T₁)は1.6 μsであり、これは、得られたスピン-スピン緩和時間(T₂)よりも一桁大きな値となっている。当日の発表では、スピン緩和時間の解析結果と二分子膜界面におけるスピンドイナミクスについて、抗酸化反応に対する影響やミセル溶液系で得られた結果も含めて議論する。

【謝辞】 小堀康博教授(神戸大)・三浦智明助教(新潟大)に深く感謝いたします。

【参考文献】 [1] Ohara, K.; Watanabe, R.; Mizuta, Y.; Nagaoka, Y.; Mukai, K. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11527-11533. [2] Ohara, K.; Hashimoto, Y.; Hamada, C.; Nagaoka, S. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2008**, *200*, 239-245. [3] Xu, X.; Shi, L.; Liu, Y.; Ji, X-H.; Cui, Z-F. *Chi. J. Chem. Phys.* **2011**, *24*, 150-154.

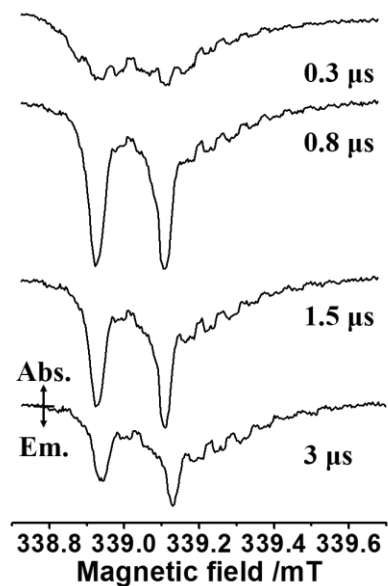


図1. AQDSとAscHNaを含むDDABリポソーム溶液のTR-EPRスペクトル。

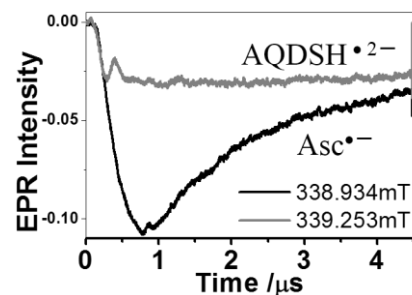


図2. TR-EPRスペクトルの信号強度の時間変化。