

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05877

研究課題名(和文) 生体内物質光増感による一重項酸素の生成抑制

研究課題名(英文) Suppression of singlet oxygen generation of endogenous photosensitizers

研究代表者

菊地 あづさ (Kikuchi, Azusa)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30452048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内物質の光増感作用により生成する一重項酸素の抑制メカニズムについて解明し、生体内での一重項酸素の生成を抑制する方法を明らかにした。パルスレーザー励起後の一重項酸素由来の近赤外発光time profile測定結果の定量的な解釈から、ビタミンB₂、C、E各誘導体はリポフラビン光増感一重項酸素の生成を抑制することが明らかとなった。また、RFの励起状態のビタミン誘導体による消光速度定数を速度論的に議論した結果、ビタミン誘導体が主にRFの励起三重項状態を消光することにより、一重項酸素の生成抑制が起きていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究はすでに光増感物質から発生した一重項酸素の消去に有効な抗酸化物質の開拓が中心に行われてきた。一重項酸素は体内で発生すれば、その高い酸化力により直ちに酸化反応が進行し、細胞の損傷といったダメージを引き起こす。このため、生体内物質が一重項酸素の光増感剤として作用した場合、生成した一重項酸素を速やかに消去するとともに、一重項酸素の発生そのものを抑制することが重要である。生体中および食品中の光増感作用による一重項酸素の発生そのものを抑制することは、一重項酸素による脂質酸化反応の抑制を可能にし、脂質酸化物による生体毒性の低減や心疾患予防といった重要な課題を解決につながる。

研究成果の概要(英文)：Riboflavin (RF), a water-soluble vitamin B₂, is an endogenous singlet oxygen photosensitizer in human skin and eye. Time profiles of the near-infrared phosphorescence of singlet oxygen generated by RF have been measured in the absence and presence of L-ascorbic acid (AA, vitamin C), 3-O-ethyl-L-ascorbic acid (3-EtAA) and Trolox (TX, a water-soluble analogue of vitamin E) in phosphate buffer (pH 7.4). These substances suppress the RF-photosensitized singlet oxygen generation. For example, the quantum yield of singlet oxygen generation is decreased to a third by adding AA or TX. The bimolecular rate constants for quenching of the excited singlet and triplet states of RF by AA, 3-EtAA and TX have been determined through measurements of fluorescence and transient absorption. These measurements suggest that the observed suppression is due to the quenching of the excited singlet and triplet states of RF by AA, 3-EtAA and TX.

研究分野：光物理化学

キーワード：生体内光増感分子 一重項酸素 生成抑制 抗酸化機能 ビタミン類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品の品質劣化防止や貯蔵、保存の面からより効果的な酸化防止の手段が求められている。食品の酸化には活性酸素種(ヒドロキシルラジカル、オゾン、一重項酸素、スーパーオキシドアニオンラジカルなど)が関わっていることが知られており、特に脂質過酸化に関係する活性酸素種は DNA の損傷や突然変異、細胞のがん化、老化に深く関与することが報告されている ([1]W. Bäuml, Singlet oxygen in the skin, in: S. Nonell, C. Florsh (Eds.), Singlet Oxygen: Application in Biosciences and Nanosciences, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2016, vol. 2, pp. 205–226.)。従来の研究はすでに光増感物質から発生した一重項酸素の除去に有効な抗酸化物質の開拓が中心に行われてきた。一重項酸素は体内で発生すれば、その高い酸化力により直ちに酸化反応が進行し、細胞の損傷といったダメージを引き起こす。このため、生体内物質が一重項酸素の光増感剤として作用した場合、生成した一重項酸素を速やかに消去するとともに、一重項酸素の発生そのものを抑制することが重要である。本研究では生体中および食品中の光増感作用による一重項酸素の発生そのものを抑制することは、一重項酸素による脂質酸化反応の抑制を可能にし、脂質酸化物による生体毒性の低減や心疾患予防といった重要な課題を解決すると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、生体内物質の光増感作用により生成する一重項酸素の抑制メカニズムについて解明し、生体内での一重項酸素の生成を抑制する方法を明らかにすることを目的とする。一重項酸素の生成そのものの抑制はリノール酸の一重項酸素酸化に代表される脂質の酸化を抑制できることから食品科学の進展が望める。リボフラビン(RF, ビタミン B₂, Figure 1) は生体内に存在し、広く食品添加物に利用されていることから、RF 光増感作用による一重項酸素の生成抑制は重要な課題であると考えた。本研究では、ビタミン誘導体が RF 共存下において一重項酸素生成の抑制剤として機能するメカニズムを実験的に解明し、一重項酸素の生成抑制方法を明らかにすることを目的とした。

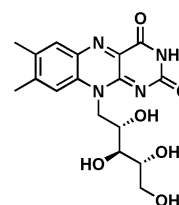


Figure 1. Molecule structure of riboflavin.

3. 研究の方法

本研究の一重項酸素検出法はパルス励起により一重項酸素固有の近赤外発光を検出する物理的な直接測定であり、抗酸化物質による一重項酸素の生成抑制能および消光速度定数を精度よく求められる点に特色がある。

RF リン酸緩衝溶液に、各ビタミン誘導体を加えて、パルスレーザー励起後の一重項酸素由来の近赤外発光 time profile 測定を行った。この time profile 測定結果を定量的に解釈するためにシミュレーションを行った。その結果から、RF 光増感反応により生成する一重項酸素の消光能および一重項酸素の生成そのものの抑制能、すなわち、生成した一重項酸素の速やかな消去および一重項酸素生成そのものの抑制が生じているかについて、速度論的に議論した。さらに、この一重項酸素生成抑制能のメカニズム解明のため、光増感一重項酸素生成の前段階である、RF の励起一重項状態および励起三重項状態に対するビタミン類の影響を調べた。励起一重項状態は蛍光スペクトル測定、蛍光寿命測定により、励起三重項状態は過渡吸収測定により検討した。

4. 研究成果

本研究課題ではパルスレーザー励起後の一重項酸素由来の近赤外発光 time profile 測定結果の定量的な解釈から、各ビタミン誘導体は RF 光増感一重項酸素の生成を抑制することが明らかとなった。

RF は水溶性であるため、溶媒には生体内の環境を想定した pH 7.4 のリン酸緩衝溶液を用いた。ビタミン C 誘導体として、L-ascorbic acid (AA) およびアスコルビン酸誘導体である 3-O-ethyl-L-ascorbic acid (3-EtAA) を用いた。3-EtAA は化粧品に美白成分として含有されている。ビタミン E 誘導体としては Trolox (TX) を用いた。

RF 光増感反応により生成する一重項酸素の近赤外発光 (1274 nm) 時間分解スペクトルを Figure 2 に示す。RF リン酸緩衝溶液に、各ビタミン誘導体を加えて、パルスレーザー励起後の一重項酸素由来の近赤外発光 time profile 測定を行った。この time profile 測定結果を定量的に解釈するためにシミュレーションを行った。その結果から、RF 光増感反応により生成する一重項酸素の消光能および一重項酸素の生成そのものの抑制能、すなわち、生成した一重項酸素の速やかな消去および一重項酸素生成そのものの抑制が生じているかについて、速度論的に議論した。

Figure 3 に TX を添加した時の一重項酸素の近赤外発光 time profile とシミュレーションによるフィッティング曲線を示す。TX の添加濃度増加にともない、パルスレーザー励起後の一重項酸素の近赤外発光最大強度の減少が観測され、シミュレーションによる定量的な解釈から、 0.4 mmol dm^{-3} TX 存在下で、一重項酸素生成量子収量 ϕ_{Δ} が TX を添加していないときと比較して $1/3$ に減少することが判明し、TX による一重項酸素の生成抑制が認められた。同時に一重項酸素の寿命の減少が見られ、TX による一重項酸素消光速度定数 Δk_q は $4.4 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ と算出された。

次に、一重項酸素生成抑制能のメカニズム解明のため、蛍光寿命測定により RF の励起一重項状態に対するビタミン誘導体の影響を調べた。TX 添加濃度を变化させたときの RF の蛍光寿命の変化から、TX による RF の励起一重項状態の消光速度定数 k_q は、 $5.4 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ と算出された。

同様に、過渡吸収測定により RF の励起三重項状態に対するビタミン誘導体の影響を調べた。Figure 4 に TX 添加濃度を变化させたときの RF の過渡吸収減衰曲線の変化を示す。TX 添加濃度の増加に伴い、RF 過渡吸収寿命が短くなるのが分かり、この過渡吸収寿命から TX による RF の励起三重項状態の消光速度定数 3k_q は、 $1.6 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ と算出された。他のビタミン誘導体、AA および 3-EtAA についても一重項酸素の生成抑制効果がみられた。RF の励起状態に対する消光速度定数および一重項酸素に対する消光速度定数を Table 1 にまとめた。これらの結果から、RF の励起状態の各ビタミン誘導体による消光速度定数を速度論的に議論した結果、各ビタミン誘導体が主に RF の励起三重項状態を消光することにより、一重項酸素の生成抑制が起きていることを明らかにした。

Table 1. Rate constants for quenching of excited singlet (1k_q in $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) and triplet (3k_q in $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) states of RF and for quenching of singlet oxygen (Δk_q in $10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$) by quenchers.

quencher	1k_q	3k_q	Δk_q
AA	4.0	1.6	1.8
3-EtAA	2.2	1.2	0.27
TX	5.4	1.6	4.4

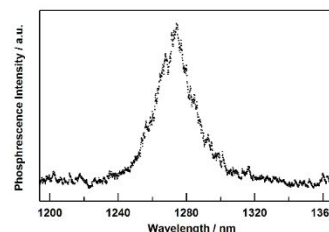


Figure 2. Time-resolved phosphorescence spectrum of singlet oxygen generated by excitation of riboflavin (RF) in air-saturated phosphate buffer (pH 7.4) at 298 K. The sampling times were set at 2-7 μs after the 355 nm YAG laser pulse.

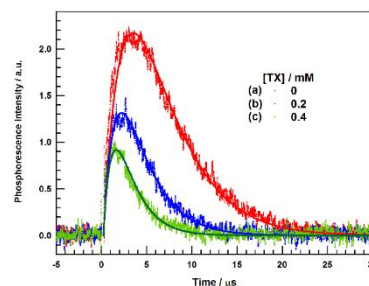


Figure 3. Time profiles of phosphorescence intensity of singlet oxygen, generated by excitation of RF (0.1 mmol dm^{-3}) in the (a) absence of TX (red), (b) presence of TX (0.2 mmol dm^{-3}) and (c) presence of TX (0.4 mmol dm^{-3}) in air-saturated phosphate buffer (pH 6.8) at 298 K. Computer-simulated time profiles (solid line).

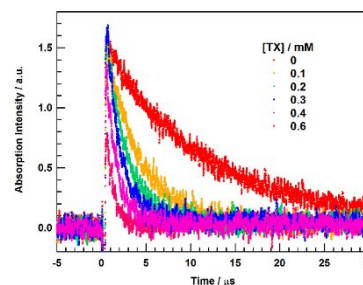


Figure 4. Transient absorption decay curves of RF with 355 nm YAG laser pulse at 298 K. The absorption intensity was monitored at 690 nm by changing the concentration of TX.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitasaka Shogo, Yagi Mikio, Kikuchi Azusa	4. 巻 19
2. 論文標題 Suppression of menthyl anthranilate (UV-A sunscreen)-sensitized singlet oxygen generation by Trolox and alpha-tocopherol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES	6. 最初と最後の頁 913, 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0pp00023j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuta Shamoto, Ryohei Shimizu, Mikio Yagi, Nozomi Oguchi-Fujiyama, Jasmin Kang, Azusa Kikuchi	4. 巻 51
2. 論文標題 Short-lived and Nonphosphorescent Triplet state of Mexoryl SX, a UV-A Sunscreen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 567, 580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00723-020-01198-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shogo Kitasaka, Mikio Yagi, Azusa Kikuchi	4. 巻 19
2. 論文標題 Suppression of menthyl anthranilate (UV-A sunscreen)-sensitized singlet oxygen generation by Trolox and a-tocopherol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1,7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0PP00023J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirabe Fukuchi, Mikio Yagi, Nozomi Oguchi-Fujiyama, Jasmin Kang, Azusa Kikuchi	4. 巻 18
2. 論文標題 A novel characteristic of salicylate UV absorbers: suppression of diethylhexyl 2,6-naphthalate (Corapan TQ)-photosensitized singlet oxygen generation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1556, 1564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9pp00104b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島 賢也・八木 幹雄・菊地 あづさ
2. 発表標題 リボフラビン光増感一重項酸素生成に対するアミノ酸の 生成抑制効果
3. 学会等名 光化学討論会2020 (Web討論会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口 真・八木 幹雄・菊地 あづさ
2. 発表標題 サリチル酸誘導体によるリボフラビン光増感一重項酸素 生成抑制
3. 学会等名 光化学討論会2020 (Web討論会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松原航那・八木幹雄・菊地あづさ
2. 発表標題 プリン類による生体内光増感分子リボフラビンからの一重項酸素生成抑制
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会 (Zoomミーティング)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地 あづさ・清水 良平・八木 幹雄
2. 発表標題 生体内光増感分子リボフラビンからの一重項酸素生成抑制
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原 航那・清水 良平・八木 幹雄・菊地 あづさ
2. 発表標題 生体内分子リボフラビン光増感一重項酸素生成抑制
3. 学会等名 光化学討論会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouna Matsubara, Yagi Mikio, Kikuchi Azusa
2. 発表標題 Quenching and Suppression of Riboflavin-Photosensitized Singlet Oxygen Generation by Purines
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Higuchi, Mikio Yagi, Azusa Kikuchi
2. 発表標題 Quenching and Suppression of Riboflavin-Photosensitized Singlet Oxygen Generation by Salicylic Acid Derivatives
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenya Kojima, Mikio Yagi, Azusa Kikuchi
2. 発表標題 Suppression of Riboflavin-Photosensitized Singlet Oxygen Generation by Amino Acids
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiya Iikubo, Mikio Yagi, Azusa Kikuchi
2. 発表標題 Quenching and Suppression of Ergosterol (Provitamin D2) -Photosensitized Singlet Oxygen Generation by Vitamin E and its Analog
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shotaro Toyokawa・Mikio Yagi・Azusa Kikuchi
2. 発表標題 Quenching and Suppression of Pyridoxal 5'-Phosphate (Active Form of Vitamin B6)-Sensitized Singlet Oxygen Generation by Vitamin Analogs
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 MATSUBARA Kouna, HAYASHI Takumi, MOKUSHI Keito, YAGI Mikio, KIKUCHI Azusa
2. 発表標題 Suppression mechanisms of Singlet Oxygen Generation of Endogenous Photosensitizers
3. 学会等名 光化学討論会2021 (Zoomミーティング)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------