

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 15 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580116

研究課題名 細胞で発生する安定炭素中心ラジカルの分析およびその生理学的影響の解析

研究課題名（英文）

Analysis of stable carbon centered radicals and their physiological effects

研究代表者

安 保 充 (ABO MITSURU)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：00272443

研究成果の概要（和文）：植物根から放出されるラジカル種は、スピントラップ剤 DEPMPO および DBPMPO により捕捉、測定が可能であり、同一条件では、DEPMPO の方が DBPMPO の約 5 倍のシグナル強度が観測された。観測されたラジカル種は、その超微細結合定数( $a^H = 2.15$ ,  $a^N = 1.48$ ,  $a^P = 4.60$  mT)から炭素中心ラジカルであることを確認した。また、その信号の分解速度から、少なくとも 3 種類の半減期を持つラジカル種が観測された。ESR シグナルを指標に HPLC でピークの分離を行い、ラジカル種の構造を解析した。（解析中）

研究成果の概要（英文）：Radical species released from soybean roots were trapped by spin trapping reagents such as DEPMPO and DBPMPO. The trapped radicals were carbon-centered radicals from their hyperfine coupling constants ( $a^H = 2.15$ ,  $a^N = 1.48$ ,  $a^P = 4.60$  mT). Based on the decline rate of the signal intensity, three radical species with different half-lives were observed. The radical species were separated by HPLC and identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：活性酸素種、ラジカル、ESR

### 1. 研究開始当初の背景

生体中における活性酸素種(ROS)は、酸素を利用することで発生する毒性の高い副産物と考えられてきたが、近年はシグナル伝達物質としての役割などが明らかにされてきている。例えば、外敵の侵入に対して生体防御に利用されたり、植物根や花粉管の伸長に必要であること等が知られている。しかし、一般に ROS は反応性が高く、その寿命が短

いことから、分析化学的にはその量的変化をモニターすることは難しい。一方、ROS との反応の結果生成するラジカル種は、ROS と比較して寿命が長く、これが生体中でどのような影響を与えているかについては十分に調べられていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、活性酸素種(ROS)によって発生

する二次代謝産物であるラジカル種の化学的な構造解析、およびその生体への影響を調べるものである。炭素中心ラジカルとは、スピントラップ剤により捕捉されたラジカル種の ESR シグナルの超微細結合定数の値から炭素ラジカルであることが推定されるが、その化学構造が明らかになっていないものを指す。本研究では、材料として植物根から放出される炭素中心ラジカルを利用し、その構造、存在量、安定性、生体への影響について調べることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 使用する植物根は、発芽後 5 日水耕栽培 (1 mM 塩化カルシウム水溶液) したダイズ 1~5 個体を用い、植物根から放出されているラジカル種を、5~30 mM のスピントラップ剤 DMPPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)、DEPMPPO

(5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide)、DBPMPPO (dibutoxy-)、DPPMPPO (diphenoxy-)、POBN ( $\alpha$ -(4-pyridyl)-1-oxide)-N-t-butyl nitron) で捕捉できるか調べた。測定は、ESR 装置 (JES-FA 100) を用いて行い、市販されていないトラップ剤は必要に応じて合成した。さらに、トラップされたラジカル種の ESR 信号からラジカル種を推定し、その信号強度の経時的変化から半減期を計算した。

(2) ESR の信号を指標に、限外濾過および逆相 HPLC でラジカル種を分離分離し、TOF-MS によりその構造決定を試みた。

(3) 予想されるラジカル種の一つに、膜の成分であるリン脂質が予想されたため、ホスファチジルコリンのクロロホルム溶液を濃縮乾固し、水を加えてソニケーションすることにより、リポソームの懸濁液を作製し、さらに、Fenton 反応によって生じたヒドロキシルラジカルを、作製したリポソームを反応させ、人工的に ROS の二次代謝産物を作製し、ESR で計測した。このシグナルと、植物根から放出されているラジカル種のシグナルを比較した。

(4) 植物根から放出される炭素中心ラジカルと、生体内でラジカルスカベンジャーとして機能するアスコルビン酸やグルタチオンとの反応性を調べた。また、生体内物質として糖類、アミノ酸、脂質との反応性も調べた。

### 4. 研究成果

(1) 上記スピントラップ剤のうち、市販されていない DBPMPPO、DPPMPPO は、2-メチル-1-ピロリンを、対応する亜リン酸エステルに添加して反応させた後、MCPBA 酸化することで

調製した。

(2) 方法で述べたトラップ剤を検討した結果、DEPMPPO、DBPMPPO を用いた時のみ、ラジカル種が ESR で観測された。放出されているラジカル種が脂質など疎水性の高い化学種に由来する可能性を想定し、オクタノール-水の分配比が DEPMPPO より大きい DBPMPPO、DPPMPPO との反応性を調べた。その結果、DBPMPPO を用いてラジカル種を捕捉することは可能であったが、その信号強度は、DEPMPPO を用いた時と比較して 1/5 程度であった。

(3) 観測されたラジカル種は、その超微細結合定数から炭素中心ラジカルであることを確認した。 $(a^H = 2.15, a^N = 1.48, a^P = 4.60 \text{ mT})$  既に報告されている DEPMPPO アダクトで、類似した超微細結合定数を示すラジカル種の構造としては、 $\cdot \text{CH}(-\text{CH}_3)\text{NH}_2$  ( $a^H = 2.21, a^N = 1.49, a^P = 4.94 \text{ mT}$ )、 $\cdot \text{CH}(-\text{CH}_3)\text{NHCH}_2\text{CH}_3$  ( $a^H = 2.20, a^N = 1.49, a^P = 4.76 \text{ mT}$ )、 $\cdot \text{CH}_2\text{OH}$  ( $a^H = 2.10, a^N = 1.46, a^P = 4.90 \text{ mT}$ ) などであることから、捕捉されている炭素中心ラジカルの近傍に酸素原子や窒素原子が存在する可能性が示唆された。

(4) 炭素中心ラジカルの安定性については、ESR の信号強度の減少速度から判断して、少なくとも 3 種類の寿命を持つラジカル種が観測された。その半減期は、110、210、8200 分と計算された。また、炭素中心ラジカルの ESR 信号強度と、濃度既知の標準物質 (TEMPOL) の信号強度の比較から推定して、捕捉されているラジカルの濃度は  $\mu\text{M}$  オーダーであることがわかった。

(5) HPLC-逆相カラムを用いて成分の分離、UV 検出を試みた。ダイズ根とインキュベートした溶液を HPLC で分析したところ、トラップ剤 DEPMPPO とは異なるピークが現れた。しかしながら、ラジカルを捕捉するために加える DEPMPPO の濃度が mM オーダーであるのに対し、炭素中心ラジカルの推定濃度が  $\mu\text{M}$  オーダーであるため、HPLC のピークとしても微小なピークとなった。これらのピークの中から、スピントラップ剤に含まれるリン原子を指標に ICP-MS 測定でピーク選別を行い、ラジカルアダクトと予想されるピークを分取、ESR で測定すると同時に、MS による構造決定を試みた。(解析中)

(6) ホスファチジルコリンのリポソームを作製し、Fenton 反応を行い、DEPMPPO でラジカル種をトラップしたところ、ヒドロキシルラジカルは捕捉されず、炭素中心ラジカルが捕捉された。この溶液を逆相 HPLC にかけてラ

ジカルの信号を与えるピークを分離分画し、MSによる構造決定を試みた。(解析中)

(7) 各種生体内成分と炭素中心ラジカルとの反応性については、現在解析中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① M. Abo, H. Yonehara, and E. Yoshimura: Aluminum stress increases carbon-centered radicals in soybean roots, J. Plant Physiol., 167, 1316-1319, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① M. Abo, T. Nishiguchi, H. Yonehara, K. Sato, E. Yoshimura, Aluminum stress suppressed an extracellular reactive oxygen species from soybean roots, IUPAC2011 国際分析化学会議: ICAS2011(2011.5), 京都
- ② アルミニウムストレスとダイズ根において発生するラジカル種との関係  
安保充・西口裕貴・米原宏樹・吉村悦郎  
日本土壌肥料学会 2010 年度大会 (2010.9), 北海道

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安保 充 (ABO MITSURU)  
明治大学・農学部・准教授  
研究者番号: 00272443

(2) 研究分担者

佐藤 記一 (SATO KIICHI)  
群馬大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 50321906  
(H23→H24:連携研究者)

(3) 連携研究者

佐藤 記一 (SATO KIICHI)  
群馬大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 50321906  
(H24)