水素結合における構造物性と機能

ビタミンEの再生反応におけるトンネル効果

愛媛大学理学部 長岡伸一, 西奥義憲, 小原敬士, 向井和男

Shin-ichi NAGAOKA, Yoshinori NISHIOKU, Keishi OHARA and Kazuo MUKAI:
Tunneling Effect in Regeneration Reactions of Vitamin E

Since a vitamin E radical produced by the antioxidant reaction of vitamin E causes damage to vital functions, ubiquinol and vitamin C regenerate a vitamin E molecule from a vitamin E radical *in vivo*. The kinetic studies of the regeneration reactions have been carried out in solutions by means of stopped-flow spectroscopy. Substantial deuterium kinetic-isotope-effects on the second-order rate constants have been observed in both the reactions of ubiquinol and vitamin C. Furthermore, a deviation from a linear relationship in the Arrhenius plot has been observed in the reaction of ubiquinol. These results suggest that the tunneling effect plays an important role in the regeneration reactions in various tissues and mitochondria.

1. はじめに

図1は、いろいろなホ乳類の寿命と体重あたりの酸素消費速度をプロットしたグラフである。¹⁾ 秦の始皇帝以来の人類の究極の望みの一つである不老長寿は、縦軸が無限大になるところにある。図1からわかるように、寿命は酸素消費量に反比例する。酸素は生存上必要不可欠な分子であるが、その反面、副作用を持っていて、老化を促進して寿命を縮めているのである。そこで、老化とは生きている証であると考えることができる。なぜなら、酸素消費量を少なくしていったゼロに到達した時点で、すなわち死んでしまっただけで初めて、永遠の命と若さが得られることが図1からわかるからである。

図1 いろいろなホ乳類の寿命と体重あたりの酸素消費速度のプロット。¹⁾ (Plot of lifetime vs rate of oxygen consumption per unit body weight in various mammalian species¹⁾).

なぜ、このようなことになるのであろうか？最近の研究のおかげで、酸素が脂質と反応して脂質過酸化ラジカル ($\text{LOO}\cdot$) が生じることが老化の原因の一つであることが分かってきた。しかし、生体内にはこうして生じた $\text{LOO}\cdot$ を消し去り、できるだけ老化を防ぐための機構が備わっている。これがビタミンE (Vit E) の抗酸化反応と呼ばれるものである。実際に Vit E が老化を防ぐために重要な働きをしていることは、血漿中の Vit E 濃度と寿命が比例することなどからわかる。¹⁾ このような老化に関連した脂質過酸化反応や抗酸化反応に関係する反応の機構を研究し、それを分子レベルで解明することは、学術的には言うに及ばず、高齢化社会を迎えつつある今日、社会的にもまさに現下の急務である。

図2は、生体膜における $\text{LOO}\cdot$ の生成と Vit E の抗酸化反応のスキームを表したものである。²⁾⁻⁴⁾ 生体膜の脂質分子 (図2の円と2本線で表示した分子) は、熱、光、金属、ラジカルなどによって脂質ラジカル ($\text{L}\cdot$) となるが、 $\text{L}\cdot$ は酸素分子 (O_2) と反応して $\text{LOO}\cdot$ を生じる。Vit E はこうして生じた $\text{LOO}\cdot$ と反応して脂質過酸化物質 (LOOH) を生成して、自分自身はビタミンEラジカル ($\text{Vit E}\cdot$) となる。

これまでに述べてきたことは、老化を防ぐなど、Vit E が生体にとって都合がよいことばかりであった。しかし、はじめに述べたように、生体にとって必要不可欠な酸素でさえ生体に副作用があって老化を促進している。Vit E にも当然のように副反応があり、抗酸化反応で生じる $\text{Vit E}\cdot$ が酸化促進反応を起こすために生体に害を及ぼす。⁵⁾⁻⁸⁾ こうした副反応を起こさないようにするために、 $\text{Vit E}\cdot$ は、生体膜内でユビキノール (UQH_2) と反

図2 生体膜における $\text{LOO}\cdot$ の生成とVit Eの抗酸化反応と再生反応のスキーム。(Scheme of $\text{LOO}\cdot$ production and of antioxidant and regeneration reactions of Vit E in cell membrane) .

応したり, ^{9), 10)} 生体膜と水相の界面においてビタミンC (Vit C) と反応したりして, ^{11) -15)} Vit Eに再生されて無害となる(図2) .

Vit Eの再生反応は, 結局のところ, UQH_2 やVit CからVit E $\cdot$ へのプロトン(水素原子)移動反応である.

プロトン移動反応は, 最も単純な化学反応であり, 正確な測定と定量的理論解析に適していて, それ自体興味深いとともに, 量子力学的なダイナミクスを追求できる系として興味を持たれている. また, プロトン移動反応は, 化学や生物学の領域で重要な役割を果たすことが知られるとともに, 多くの応用面も持っている.^{6) -18)}

本稿では, 反応1と2のメカニズムを明らかにするために筆者らが行ったストップフロー分光法を用いた研究について述べる. 我々は, UQH_2 としてユビキノール-10 (UQ_{10}H_2), Vit E $\cdot$ のモデルとして安定な5,7-ジイソプロピルトコフェロキシルラジカル ($\text{di-iPr-Toc}\cdot$)を用いた. 本研究で用いた分子の構造を図3に示す.

2. 構造的側面

Vit Eが生体に対して先に述べたような生理作用を示す理由を分子構造の側面から考察するのは, 興味深いことである. 図3を一見すると, 生体膜中に存在するVit Eや UQ_{10}H_2 に長い側鎖があることに気づかれるであろう. これは, 生体膜中でこれらの分子が安定に存在するために必要であると考えられている.

Burtonらは, Vit Eの抗酸化活性が

-

メトキシフェノールより遙かに大きい理由は, 芳香環上における π 電子と複素環の酸素原子上の π 電子との間の π 共役が大きいと考えた.¹⁹⁾実際に我々は, MNDO分子軌道計算とストップフロー分光法を用いて, この π 共役が大きいよう

図3 Vit E, UQ_{10}H_2 , Vit C, $\text{di-iPr-Toc}\cdot$ の分子構造.(Molecular structures of Vit E, UQ_{10}H_2 , Vit C and $\text{di-iPr-Toc}\cdot$) .

な分子構造をしている5員環の複素環を持つVit E関連分子の抗酸化活性は, 通常の6員環の複素環を持つVit Eよりも大きいことを示した.²⁰⁾ それでは, 通常の6員環の複素環を持つVit Eの範囲内ではどうであろうか? 我々は, X線結晶構造解析, ESR, ENDOR, *ab initio*分子軌道計算などとストップフロー分光法を用いて, π 共役よりも置換基の電子供与性の効果が重要な働きを示すことを示唆した.^{21) -23)} Vit Eの高い抗酸化活性は, 以上のように構造的側面から考えると, 芳香環上における π 電子と複素環の酸素原子上の π 電子との間の π 共役と置換基の電子供与性の効果との両方に起因すると考えられる. 本稿の主題である UQH_2 やVit CによるVit Eの再生反応(反応1と2)においても, π 共役の程度と電子供与性などの置換基効果は, 大きな影響を与えているに違いない.

3. ストップフロー分光法による反応実験

ストップフロー分光法²⁴⁾の装置の概略を図4に示す. ストップフロー分光法は, 2種の溶液を効率よく急速に混合した後, 液の流れを止め, 測定セル内で進行する吸収変化を応答の速い光電子増倍管で検出し, >0.5 msの時間分解能で反応中間体の生成や消失の速度定数を求めようとするものである. ラピッドスキャン装置を用いると, 分光器を高速掃引して時間分解吸収スペクトルを測定することもできる. 実験は, 溶液中の UQ_{10}H_2 やVit Cの濃度が $\text{di-iPr-Toc}\cdot$ の濃度より十分大きい擬一次反応条件の下で行われた.

3.1 UQH_2

UQH_2 は, ミトコンドリアの呼吸作用において電子を運ぶ役目をしているユビキノン²⁵⁾の還元型であり, いろいろな生体組織やミトコンドリア中に比較的高濃度で存在している.^{26), 27)} UQH_2 は, Vit Eを再生したり,^{9), 10)} 脂質過酸化ラジカルを消し去る作用があると考えられている.^{28) -32)}

溶液中に UQ_{10}H_2 が存在しないと, $\text{di-iPr-Toc}\cdot$ は安定であり, エタノール溶液中では424 nmに吸収ピークを示すが, 反応1で UQ_{10}H_2 を加えると $\text{di-iPr-Toc}\cdot$ の吸収ピーク

図4 ストップフロー分光法.²⁴⁾ (Stopped-flow spectroscopy²⁴⁾).

図5 35 °Cでの反応1の途中における di-iPr-Toc $\cdot$ の吸収スペクトルの変化. 矢印は時間とともに減少する吸光度を示す. (a) エタノール- d_0 中の $UQ_{10}H_2$ の実験. スペクトルは35 ms 間隔で測定された. $UQ_{10}H_2$ と di-iPr-Toc $\cdot$ の初期濃度は, それぞれ 3.49×10^{-4} M と 2.30×10^{-5} M である. (b) エタノール- d_1 中の $UQ_{10}D_2$ の実験. スペクトルは400 ms 間隔で測定された. $UQ_{10}D_2$ と di-iPr-Toc $\cdot$ の初期濃度は, それぞれ 3.58×10^{-4} M と 2.30×10^{-5} M である. (Change in absorption spectrum of di-iPr-Toc $\cdot$ by reaction 1 at 35 °C. The arrow indicates a decrease in absorbance with time. (a) $UQ_{10}H_2$ in ethanol- d_0 . The spectra were recorded at 35 ms intervals. The initial concentrations of $UQ_{10}H_2$ and di-iPr-Toc were 3.49×10^{-4} M and 2.30×10^{-5} M, respectively. (b) $UQ_{10}D_2$ in ethanol- d_1 . The spectra were recorded at 400 ms intervals. The initial concentrations of $UQ_{10}D_2$ and di-iPr-Toc were 3.58×10^{-4} M and 2.30×10^{-5} M, respectively.)

は, 急速に消失する. 図5は, エタノール中 35 °Cでの反応1の途中における吸収スペクトルの変化をラピッドスキャン装置で観測したものである. 反応が進行するにしたがって, di-iPr-Toc $\cdot$ の 424 nm の吸収が減少しているのがわかる. こうした吸収の減少の測定から反応1の擬一次反応速度定数 (k_{obsd}) を求めることができる. k_{obsd} は, $UQ_{10}H_2$

図6 エタノール- d_0 (エタノール- d_1) 中 25 °Cにおける反応1の k_{obsd} と $[UQ_{10}H_2]$ ($[UQ_{10}D_2]$) のプロット. (Plot of k_{obsd} vs $[UQ_{10}H_2]$ ($[UQ_{10}D_2]$) in reaction 1 in ethanol- d_0 (ethanol- d_1) at 25 °C).

の濃度 ($[UQ_{10}H_2]$) と一次の関係があるので (図6), 反応速度は, 次のように書き表すことができる.

$$\begin{aligned} -d[\text{di-iPr-Toc}\cdot]/dt \\ = k_{obsd} [\text{di-iPr-Toc}\cdot] = k_1 [UQ_{10}H_2][\text{di-iPr-Toc}\cdot] \end{aligned} \quad (2)$$

ここで, k_1 は, 反応1の2次反応速度定数である. k_1 は, k_{obsd} と $[UQ_{10}H_2]$ のプロットの傾きから求めることができる. 同様の実験をエタノール- d_1 中において反応1で移動するプロトン (水素原子) を重水素化した $UQ_{10}D_2$ でも行った (図6).

図7は, $UQ_{10}H_2$ と $UQ_{10}D_2$ の k_1 のアーレニウスプロットである. 大きな重水素化効果が k_1 に見いだされる. $UQ_{10}H_2$ と $UQ_{10}D_2$ の k_1 の比は, 30 倍にも及ぶ. この値は, 準古典的な重水素化効果による比の最大値の限界^{33), 34)} を大きく越えている. さらに, アーレニウスプロットは, 直線から大きくずれている.

3.2 Vit C

$UQ_{10}H_2$ と同様な実験を Vit C についてメタノールと水の5対1混合溶媒中で行った. 通常の Vit C (Vit C (H)) と移動するプロトン (水素原子) を重水素化した Vit C (Vit C (D)) の k_2 の比は, 15 倍に達する. このような大きな重水素化効果は, Vit C 誘導体によるフェノキシラジカルや細胞中の長寿命ラジカルの消去反応でも観測

図7 k_1 のアレニウスプロット。(a) エタノール- d_0 中の UQ_{10}H_2 の実験。(b) エタノール- d_1 中の UQ_{10}D_2 の実験。(Arrhenius plot of k_1 . (a) UQ_{10}H_2 in ethanol- d_0 . (b) UQ_{10}D_2 in ethanol- d_1 .)

されている。^{35), 36)} 測定した温度範囲においては, UQ_{10}H_2 の場合のような k_2 のアレニウスプロットの直線からのずれは, 観測されなかった。Vit C (H) の場合の見かけ上の活性化エネルギーは, $11.1 \pm 0.09 \text{ kJ/mol}$, 頻度因子の常用対数は 7.11 ± 0.02 であった。Vit C (D) の場合の見かけ上の活性化エネルギーは, $29.7 \pm 0.35 \text{ kJ/mol}$, 頻度因子の常用対数は 9.30 ± 0.06 であった。反応速度の比に加えて, 活性化エネルギーや頻度因子も大きな重水素化効果を示している。こうした大きな重水素化効果は, 準古典的な効果^{33), 34)} では説明できない。

4. トンネル効果による解釈

次にトンネル効果について説明する。図8は, 反応経路に沿ったポテンシャルの概念図を示したものである。通常の熱反応は, ポテンシャル曲面の上をボールが反応物側の谷から山(遷移状態や反応中間体)を越えて, 生成物側の谷へ転がってゆくような運動(古典的ジャンプ)によって表される。途中の山が反応障壁である。トンネル効果³³⁾があれば, この頂のエネルギー(活性化エネルギー)より低いエネルギーでも, あたかもトンネルを経由して反応障壁をくぐり抜けるかのようにして反応が進行する。ただし, 反応によって動くもの(原子, イオン, 置換基など)の質量は, 小さくないといけな。反応1は, 先に述べたように, 本質的にはプロトン(水素原子)移動反応であるが, トンネル効果が働いているとするならば, 移動するプロトン(水素原子)を重水素化すると反応が遅くなるはずである。また, 低温になって古典的ジャンプの速度が遅くなれば, トンネル効果の寄与が大きくなり,

図8 反応経路に沿ったポテンシャルの概念図とトンネル効果。(Schematic potential energy curve along reaction coordinate and tunneling effect).

アレニウスプロットは直線からずれるはずである。

図7の結果は, 明らかに溶液中の反応1においてトンネル効果が重要な役割を果たすことを示している。先に述べたように, 反応1は生体内のいろいろな組織やミトコンドリアで起きている。そこで, UQH_2 が生体内でもトンネル効果を利用した反応1で Vit E を再生していると推論するのが自然であろう。また, UQ_{10}H_2 の場合と同様に, Vit C による Vit E の再生反応においてもトンネル効果が重要な役割を果たしていると考えられる。

5. おわりに

これまでに見てきたように, UQ_{10}H_2 や Vit C による Vit E の再生反応において, トンネル効果が重要な役割を果たしていると考えられる。さらに, Vit E が $\text{LOO}\cdot$ を消し去る抗酸化反応,^{20), 37)-39)} リボキシゲナーゼの反応,⁴⁰⁾ Vit C と細胞中の長寿命ラジカルの反応³⁶⁾ でもトンネル効果が現れていると報告されている。微視的な量子力学的現象であるトンネル効果が巨視的な生体機能に関与していることは, 大変興味深い。生体は, 量子力学をよく知っていて, トンネル効果を使って効果的に生体膜を保護しているのかもしれない。

次に, こうした研究の今後の展望について述べよう。これまでの化学反応に関する実験的情報は, 反応によって減少していく分子の観測か, 反応によって生成する分子の観測から得られてきたにすぎない。真に化学反応を理解するためには, どのようにして分子が近づき, 衝突し, エネルギーを交換し, 結合の組み替えを行い, 最終的に反応物として離れていくかを逐次定量的に観測して, 反応機構を明らかにしなければならない。そのためには, 短いレーザーパルスで反応を開始させ, 反応途中の過渡吸収をストロボ写真のスナップショットを撮るように短いレーザーパルスで直接微視的に観測するのは, 有力な手段になりうる。今後の一層の超高速分光法の発展が望まれる。

こうした研究は, 理論計算と併用することによって, さらに効果的になる。従来の理論計算は主として分子の静

的な構造の解明に力を注いできた。しかし、最近の計算機の能力の向上によって、化学反応の軌跡の計算が可能になっている。こうした計算によって反応途中の原子核の動きを予測することができれば、化学反応の解明に大きな寄与をすることができるであろう。

最近、化学反応を追跡する実験装置の分解能や理論計算での計算時間などの研究手段における量的な面での向上が著しい。しかし、化学反応を自由に操るといふ人類の夢を実現するためには、実験理論両方における研究手段の質的な面での新展開が不可欠であろう。そうした研究手段に基づいたヒトの老化メカニズムとその制御に關してのVit Eの抗酸化反応や再生反応の分子レベルでの解明は、重要な課題として興味を持たれ続けるに違いない。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費（重点領域研究）領域番号：271「多自由度系としての原子集団および原子のトンネル現象」No. 08240231とNo. 09226229によって支援された。

文 献

- 1) R. G. Cutler: *Free Radicals in Biology VI*, edited by W. A. Pryor, p.371, Academic Press (1984).
- 2) G. W. Burton and K. U. Ingold: *Acc. Chem. Res.* **19**, 194 (1986).
- 3) E. Niki: *Chem. Phys. Lipids* **44**, 227 (1987).
- 4) 二本鋭雄：有機合成化学 **47**, 902 (1989).
- 5) J. Cillard, P. Cillard, M. Cormier and L. Girre: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 252 (1980).
- 6) K. E. Peers, D. T. Coxon and H. W-S. Chan: *J. Sci. Food Agric.* **32**, 898 (1981).
- 7) J. Terao and S. Matsushita: *Lipids* **21**, 255 (1986).
- 8) S. Nagaoka, Y. Okauchi, S. Urano, U. Nagashima and K. Mukai: *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8921 (1990).
- 9) V. Kagan, E. Serbinova and L. Packer: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 851 (1990).
- 10) K. Mukai, S. Kikuchi and S. Urano: *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 77 (1990).
- 11) J. E. Packer, T. F. Slater and R. L. Willson: *Nature* **278**, 737 (1979).
- 12) M. Scarpa, A. Rigo, M. Maiorino, F. Ursini and C. Gregolin: *Biochim. Biophys. Acta* **801**, 215 (1984).
- 13) E. Niki, T. Saito, A. Kawakami and Y. Kamiya: *J. Biol. Chem.* **259**, 4177 (1984).
- 14) K. Sato, E. Niki and H. Shimasaki: *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 402 (1990).
- 15) K. Mukai, M. Nishimura and S. Kikuchi: *J. Biol. Chem.* **266**, 274 (1991).
- 16) *Proton-Transfer Reactions*, edited by E. Caldin and V. Gold, Chapman and Hall (1975).
- 17) *Spectroscopy and Dynamics of Elementary Proton Transfer in Polyatomic Systems*, edited by P. F. Barbara, H. P. Trommsdorff, R. M. Hochstrasser and G. L. Hofacker, North-Holland, *Chem. Phys.* **136**, 153-360 (1989).
- 18) *M. Kasha Festschrift*, edited by P. F. Barbara, M. F. Nicol and M. A. El-Sayed, The American Chemical Society, *J. Phys. Chem.* **95**, 10215-10524 (1991).
- 19) G. W. Burton, T. Doba, E. J. Gabe, L. Hughes and F. L. Lee:

- J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7053 (1985).
- 20) S. Nagaoka, A. Kuranaka, H. Tsuboi, U. Nagashima and K. Mukai: *J. Phys. Chem.* **96**, 2754 (1992).
- 21) 長岡伸一, 上本裕一, 福原雅美, 石津和彦, 向井和男：磁気共鳴と医学 **2**, 196 (1991).
- 22) K. Mukai, Y. Uemoto, M. Fukuhara, S. Nagaoka and K. Ishizu: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65**, 2016 (1992).
- 23) K. Mukai, S. Ohbayashi, S. Nagaoka, T. Ozawa and N. Azuma: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **66**, 3808 (1993).
- 24) 大久保恒夫：実験化学講座11 反応と速度，第4版，日本化学会編，p. 112, 丸善 (1993).
- 25) L. Stryer: *Biochemistry*, 3rd edition, p. 402, Freeman (1988).
- 26) T. Okamoto, Y. Fukunaga, Y. Ida and T. Kishi: *J. Chromatogr.* **430**, 11 (1988).
- 27) K. Katayama, M. Takada, T. Yuzuriha, K. Abe and S. Ikenoya: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 971 (1980).
- 28) A. Mellors and A. L. Tappel: *J. Biol. Chem.* **241**, 4353 (1966).
- 29) R. Takayanagi, K. Takashige and S. Minakami: *Biochem. J.* **192**, 853 (1980).
- 30) S. Marubayashi, K. Dohi, K. Yamada and T. Kawasaki: *Biochim. Biophys. Acta* **797**, 1 (1984).
- 31) R. Stocker, V. W. Bowry and B. Frei: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1646 (1991).
- 32) D. Mohr, V. W. Bowry and R. Stocker: *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 247 (1992).
- 33) R. P. Bell: *The Tunnel Effect in Chemistry*, p.105, Chapman and Hall (1980).
- 34) H. Kwart: *Acc. Chem. Res.* **15**, 401 (1982).
- 35) M. Foti, K. U. Ingold and J. Luszyk: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9440 (1994).
- 36) T. Matsumoto, T. Miyazaki, Y. Kosugi, T. Kumada, S. Koyama, S. Kodama and M. Watanabe: *Radiat. Phys. Chem.* **49**, 547 (1997).
- 37) 倉中綾, 澤田公平, 長嶋雲兵, 長岡伸一, 向井和男：ビタミン **65**, 453 (1991).
- 38) 長岡伸一, 井上雅代, 宮崎智光, 向井和男, 長嶋雲兵：ビタミンE研究の進歩 **V**, 56 (1995).
- 39) 長岡伸一：ビタミン **70**, 413 (1996).
- 40) T. Jonsson, M. H. Glickman, S. Sun and J. P. Klinman: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10319 (1996).

プロフィール

長岡伸一 Shin-ichi NAGAOKA
愛媛大学理学部物質理学科化学系，〒790-8577
松山市文京町2-5
Department of Chemistry, Faculty of Science, Ehime University
e-mail: nagaoka@ehimegw.dpc.ehime-u.ac.jp
最終学歴：昭和58年京都大学大学院理学研究科
化学専攻博士後期課程修了
専門分野：反応化学
現在の研究テーマ：生体中のビタミンEの抗酸化
反応，酸化促進反応，再生反応におけるトンネル
効果の研究，励起状態におけるプロトン移動の研
究，内殻準位からの光イオン化によって起こるサ
イト選択的反応の研究
趣味：下手な書道