

## 抗酸化物質の作用機構解明への化学計算の利用

栗原正明\*・近藤一成・福原 潔・豊田正武・宮田直樹

## Computational Study on Antioxidation Mechanisms of Catechins.

Masaaki Kurihara<sup>#</sup>, Kazunari Kondo, Kiyoshi Fukuhara, Masatake Toyoda and Naoki Miyata

All C-H and O-H bond dissociation enthalpies (BDE's) in catechins ((-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin) were calculated by semi-empirical molecular orbital calculation using the SPARTAN program. The BDE's of benzyl hydrogens (C-2 position in catechins) were found to be quite low. This suggests that abstraction of benzyl hydrogen is a crucial step for antioxidative activity. This is corroborated by the reported results of LC/MS and spectrophotometric analysis of reaction intermediates from catechins treated with AAPH.

Keywords: semi-empirical molecular orbital calculation, bond dissociation enthalpy, antioxidant, catechin

## はじめに

フラボノイドに代表されるポリフェノール類は植物界に広く分布している。その中で茶 (*Camellia sinensis*) に含まれるカテキン類は、発がん抑制<sup>1)</sup>、抗アレルギー作用<sup>2)</sup>など数多くの生物活性が報告されて注目されている。その作用は主にカテキンの抗酸化作用に基づくものと考えられている。この抗酸化作用は、抗酸化物質が酸素ラジカルを一電

子還元し消去することにより発揮される。通常、抗酸化物質のフェノール性水酸基が反応部位となる。したがって、フェノール性水酸基の数が多く、高い一電子還元能を有するものが優れた抗酸化物質であると考えられてきた。しかしながら、この考え方は、カテキンには当てはまらないことがわかってきた。実際、カテキンの一成分である (-)-epicatechin はフラボノイドの quercetin より還元能が低いにも関わらず、その抗酸化作用はより強く、より長く持続する。これは、カテキンの場合には抗酸化作用に関わる反応部位がフェノール性水酸基以外にも存在することを示唆している。これまで抗酸化作用に関する数多くの報告が存在するものの、その作用機構、反応機構に関する報告はほとんどなく、唯一カテコール部分が反応して自身は  $\alpha$ -キノンとなると推測されているのみである。(Fig. 2) ポリフェノール類の生物活性発現にはその酸化体も関与していることが十分考えられる。したがって、種々の生物活性機構を理解するうえで抗酸化作用機構を明らかにすることは不可欠である。今回、複雑なカテキン類のラジカル消去のメカニズムを明らかにするため、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin について化学計算を用いることを検討した。

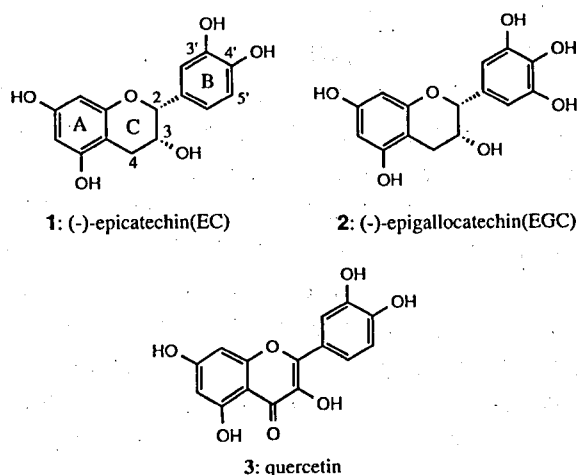


Fig.1

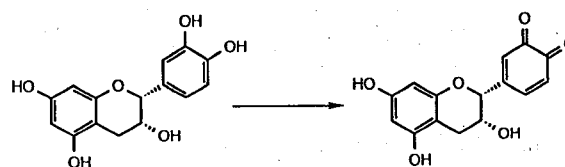


Fig.2

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Masaaki Kurihara; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.224; Fax: 03-3707-6950; E-mail: masaaki@nihs.go.jp

## 計算方法

カテキン類の (-)-epicatechin 1, (-)-epigallocatechin 2 の全ての C-H, O-H の Bond Dissociation Enthalpy (BDE)<sup>3)</sup> を求めた (Fig. 3). 計算方法の手順を Fig. 4 に示した.

最初に, 分子力学計算 (Molecular Mechanics) による化合物のコンフォメーション解析 (Conformational Search) を行い, 最安定構造 (Global Minimum) を求めた. Fig. 5 に 1 および 2 の最安定コンフォマーの三次元構造を示した. その構造を初期構造とし, 半経験的分子軌道法 (Semi-empirical Molecular Orbital Calculation) により生成熱 (Heat of Formation) を求めた. その際, 水酸基から水素ラジカルを除いたラジカル種の場合, 隣接する水酸基の向きによりエネルギーが異なる場合があるので隣接する水酸基を回転

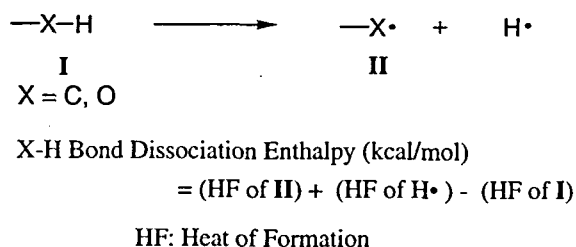


Fig.3

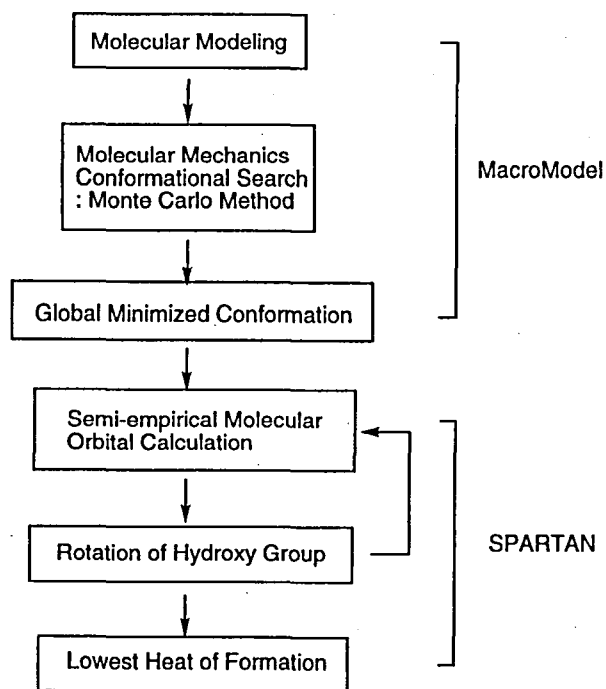


Fig.4

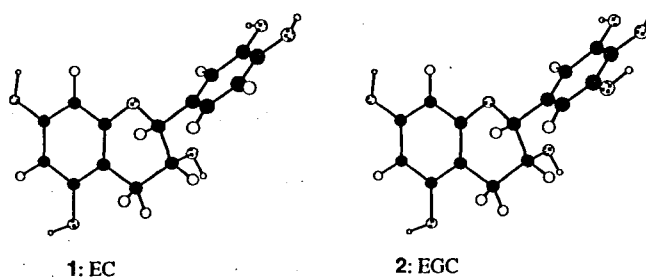


Fig.5

Conformational search:	Program	MacroModel ver. 6.5 (Schrodinger, Inc.) on SGI Indigo2, SGI O2
	Method	Conformational Search; Monte Carlo Method (2000-3000 structures were minimized) Force Field: MM2*
Semi-empirical molecular orbital calculation:	Program	SPARTAN ver. 5.0 (Wavefunction, Inc.) on SGI Indigo2, SGI O2
	Method	Geometry Optimization Hamiltonian: AM1, PM3

Fig.6

させたものも計算し, 一番低いエネルギーのものを求めた. プログラムは分子力学計算によるコンフォメーション解析には MacroModel (Schrodinger, Inc.) を, 半経験的分子軌道法は SPARTAN (Wavefunction, Inc.) を用いた. 計算の仕様に関しては Fig. 6 の条件を用いた.

## 結果・考察

1 および 2 の BDE の計算結果を Fig. 7 (PM3) に示した. AM1, PM3 とも同様の結果を与えた. カテキンのベンジル位であり, 酸素原子と結合した C-2 位の水素の BDE は, フェノール性水酸基の O-H のそれと比較しても, 特に低いことがわかった. このことは, C-2 位からの H $\cdot$  の引き抜きが容易におこることを示す. カテキン類がラジカル種と共存したとき, フェノール性水酸基の水素に加えて, この水素引き抜きがラジカル消去の機構に重要な役割を果たすことが示唆された. さらに, パーオキシラジカルとカテキンから生成する反応中間体の LC/MS および UV スペクトルの実験結果と併せて考察することにより, カテキン類のラジカル消去のメカニズムを明らかにすることができた<sup>4)</sup>. ごく最近カテキン 2 量体であり, C-2 位のプロトンの一部欠くプロアントシアニン A-2 は superoxide に対して B-2 の半分以下の抗酸化作用しか示さないことが報告された<sup>5)</sup>. この結果はカテキンの抗酸化作用には C-2 位の水素が重要であるとする今回の結果とよく一致する.

以上のように, 化学計算の利用は, 実験結果では得られ

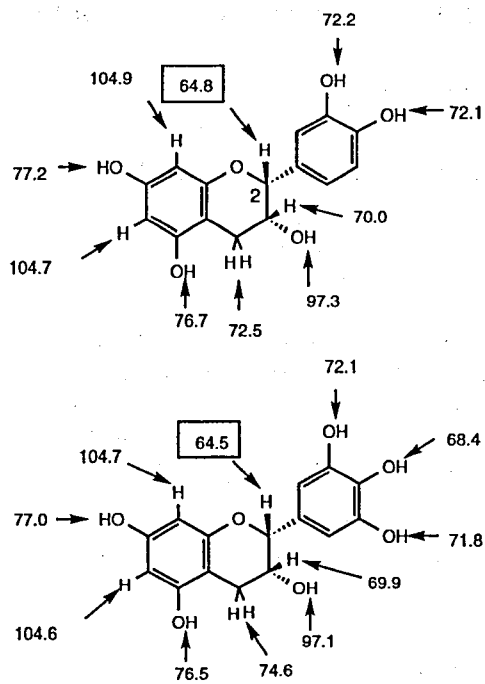


Fig.7

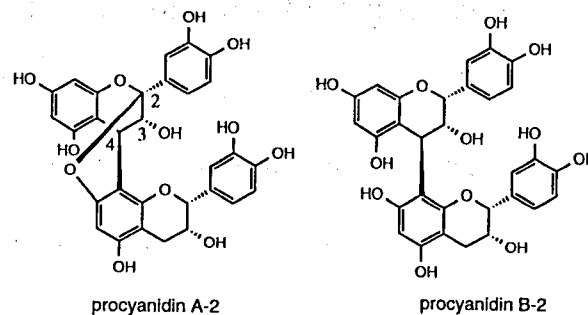


Fig.8

### 謝 辞

本研究の一部は、厚生省特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と三次元構造相関の解明」によって行った。

### 文 献

- 1) Brown, J. P. A. *Mutat. Res.*, **75**, 243-277 (1980)
- 2) Middleton, E. and Kondasmami, C.: *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1167-1179 (1992)
- 3) Van Arnum, S. D. and Stepsus, N.: *Tetrahedron Lett.*, **38**, 305-308 (1997)
- 4) Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T. and Toyoda M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 79-86 (1999)
- 5) Saint-Cricq de Gaulejac, N., Provost, C. and Vivas, N.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 425 (1999)

ない貴重な情報を与え、その結果化学物質の生物作用の機構解明に役立つことを示した。今後、他の抗酸化物質へ適用することも考えている。