

ロトン移動により ($1b^{\cdot-}$) が生成することを示す。酸素過剰の条件では、カテキンアニオンラジカル ($1b^{\cdot-}$) の生成を示す 430 nm の UV 吸収の増大が擬一次反応となり、擬一次反応速度定数 (k_{obs}) が、酸素濃度の上昇とともに直線的に上昇した (Figure 6)。このようにして得られた直線の傾きから、カテキンのジアニオンから酸素への電子移動速度を、 $5.8 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ と算出した。この比較的遅い反応速度は、この反応が吸熱反応であり、生成したカテキンアニオンラジカル ($1a^{\cdot-}$) は、早い水素移動反応によりカテキンアニオンラジカル ($1b^{\cdot-}$) になることを示す。

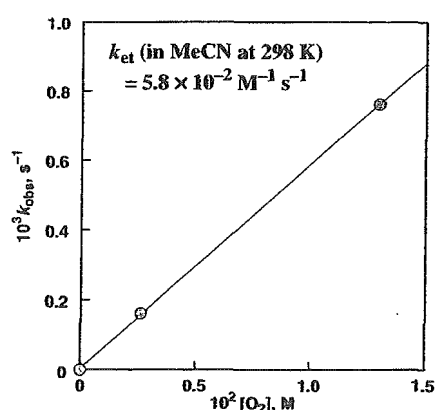
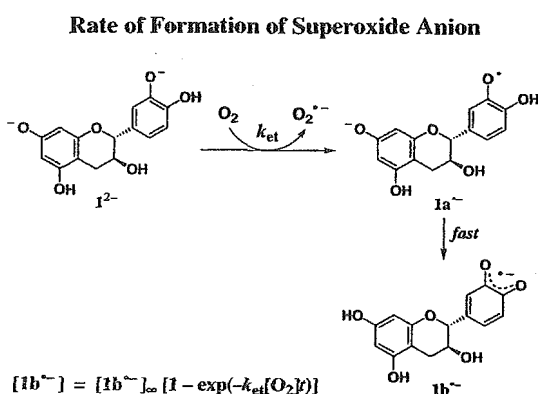


Figure 6 Plot of k_{obs} vs $[O_2]$ in the reaction of 1^{2-} ($1.3 \times 10^{-4} \text{ M}$) with O_2 in MeCN at 298 K.

C. 結論, 考察

本年度は、活性酸素種を発生する化学物質として、抗酸化剤としても知られるフェノール類、環境汚染物質であるニトロアレーン類、さらには、キノン類や C_{60} フラーレンなどを用いて総合的な研究を行った。その結果、

①フェノール構造を有する抗酸化剤フラボノイド類からの活性酸素種の発生を明らかにする目的で、カテキンをモデル化合物として用いて研究を行い、カテキンジアニオンと酸素が反応する事により、活性酸素種の一つスーパーオキシドが生成することを ESR により明らかにするとともに、反応機構ならびに発生の反応速度を明らかにした。これらの結果は、最近注目されているフラボノイドによる酸化的 DNA 障害に対応するものであり、抗酸化剤として注目されているフラボノイドも条件によっては活性酸素発生剤として働き、ヒトに対する毒性を発現する可能性を示す (発表論文#)。

②同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、すでに我々が銅イオン存在下活性酸素種を発生することを明らかにしているが、今回はじめて、染色体異常誘発試験により変異誘発を確認することに成功し、さらにレスベラトロール誘導体について構造と活性との相関を明らかにした (論文発表#)。また、未発表データであるが、レスベラトロールおよび、その誘導体の DNA 損傷の塩基特異性も明らかにしており、その結果も、レスベラトロールのような抗酸化剤による DNA 損傷が銅イオン存在下での活性酸素種、具体的には、銅イオン-水酸化ラジカル複合体であることを示す。

③環境汚染物質であるニトロアレーン

類の活性酸素毒性については、今回新たに、ベンツピレンの6位ニトロ体のようなニトロアレーン類が、その構造因子に起因して光照射下で活性酸素種の一つNOを発生することを明らかにした。また、このようにして発生させたNOによりDNAが損傷を受けることも実証した（論文発表1, 3, 7）。NOは、含窒素活性酸素種として知られ、それ自身の活性は低いものの、酸素と反応してスーパーオキシドと反応して生成するONOO⁻は、水酸ラジカルを発生する強い活性酸素種である。今回の実験結果は、ニトロアレーン類の新たな活性酸素種毒性の可能性を示したものであり、今後、この分野での研究を集中して行う必要がある。

④前年度からひき続いて行っているC₆₀フラレーンを用いた研究では、フラレーンからの活性酸素種の生成速度と発生した活性酸素種によるDNA損傷を明らかにすることに成功した（論文発表4, 8, 12）。

以上のように、本研究では、化学物質が、どのような条件で、どのような活性酸素種を、どのような機構で、どれだけ発生するか、を解析することに焦点を絞り研究を行った。結果として、フェノール類、キノン類（分担研究者福原の報告書参照）、ニトロアレーン類、フラレーン類などが、pH、光、金属イオンなどの存在条件により、どのような活性酸素種がどのようにして、どれだけ発生するかを明らかにすることができた。これらの結果は、これらの化学物質の活性酸素毒性を評価するための重要な知見であり、定量的評価にも寄与すると考える。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oxidative DNA Damage by a Metabolite of Carcinogenic 1-Nitropyrene, Shiho Ohnishi, Mariko Murata, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata and Shosuke Kawanishi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **280**, 48-52 (2001).
- 2) Computational study on conformation of oligopeptides prepared from alpha, alpha-disubstituted amino acids, Kurihara, M., Tanaka, M., Oba, M., Suemune, H., Miyata, N., *Peptides* 2000, 427-428 (2001).
- 3) Photochemical Generation of Nitric Oxide from 6-Nitrobenzo[a]pyrene, Kiyoshi Fukuhara, Masaaki Kurihara and Naoki Miyata, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8662-8666 (2001).
- 4) DNA Cleavage via Electron Transfer from NADH to Molecular Oxygen Photoinduced by β -Cyclodextrin-Bicapped C60 Ikuo Nakanishi, Shunichi Fukuzumi, Toshifumi Konishi, Kei Ohkubo, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito, and Naoki Miyata, *Fullerenes 2001 Volume 11: Electrochemistry and Photochemistry*, ed by S. Fukuzumi, F. D'Souza, and D. M. Guldi, The Electrochemical Society, Pennington, NJ (2001), pp. 138-151.
- 5) カテキンの抗酸化作用機構：半経験的分子軌道法による解析，栗原正明，近藤一成，鈴木 隆，豊田正武，宮田直樹，*磁気共鳴と医学*，**12**，114-117 (2001)
- 6) Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line, A. Matsuoka, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara, and N. Miyata, *Mutation Research*, **494**, 107-113 (2001).
- 7) Micronucleus induction and chromosomal aberration of 1- and 3-nitroazabenz[a]pyrene and their N-oxide, Nibuyuki Sera, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, and Hiroshi Tokiwa, *Mutagenesis*, **16**(3), 183-187 (2001).
- 8) DNA Damage Caused by Photosensitizers, (in Japanese), Ikuo Nakanishi, and Naoki Miyata, *Environ. Mutagen Res.*, **23**, 57-63 (2001).
- 9) Superoxide Anion Generation via Electron-transfer Oxidation of Catechin Dianion by Molecular Oxygen in an Aprotic Medium, Ikuo Nakanishi, Kiyoshi Fukuhara, Kei Okubo, Tomokazu Shimada, Hisao Kansui,

Masaaki Kurihara, Shiro Urano, Shunichi Fukuzumi and Naoki Miyata, *Chem. Lett.*, 1152-1153, 2001.

10) Efficient and versatile synthesis of novel 2 α -substituted 1- α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analogues and their docking to vitamin D receptors. Suhara, Y. Nihei, K. I., Kurihara, M., Kittaka, A., Yamaguchi, K., Fujishima, T., Konno, K., Miyata, N., Takayama, H. *J Org Chem*, **66**(26), 8760-71 (2001).

11) Synthesis and biological evaluation of all A-ring stereoisomers of 5,6-trans-2-methyl-1,25-dihydroxyvitamin D(3) and their 20-epimers: possible binding modes of potent A-ring analogues to vitamin D receptor, Fujishima, T., Konno, K., Nakagawa, K., Tanaka, M., Okano, T., Kurihara, M., Miyata, N., Takayama, H. *Chem Biol*, **8**(11), 1011-24 (2001)

12) DNA Cleavage via Superoxide Anion Formed in Photoinduced Electron Transfer from NADH to gamma-Cyclodextrin-Bicapped C60 in an Oxygen-Saturated Aqueous Solution, Ikuo Nakanishi, Shunichi Fukuzumi, Toshifumi Konishi, Kei Ohkubo, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito and Naoki Miyata, *J. Phys. Chem. B*, 106, 2327-2380 (2002).

2. 主要な学会発表

1) キノンによる活性酸素生成とDNA損傷反応、福原 潔、内藤有紀、佐藤由紀子、中西郁夫、宮田直樹、第23回磁気共鳴医学会・第5回SFRR Japan合同学会、2001. 5.

2) Kinetics for Generation of Active Oxygen Species by Photoirradiation of Water-Soluble Fullerenes, Ikuo Nakanishi, Kei Okubo, Toshifumi Konishi, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito, Shunichi Fukuzumi and Naoki Miyata, The 21th Fullerene General Symposium, July 25-27, 2001, Tsukuba.

3) Structure-activity relationships among resveratrol and its analogues in cytogenetic activity, A. Matsuoka, A. Furuta, M. Ozaki, K. Takeshita, K. Fukuhara, and N. Miyata, 8th International Conference on Environmental Mutagens, 2001. 10, Shizuoka, Japan.

4) Structural basis for DNA cleaving-activity of Resveratrol, K. Fukuhara, I. Nakanishi, M. Nagakawa, and N. Miyata, 8th International Conference on Environmental Mutagens Nara Satellite Meeting, 2001. 10, Nara, Japan.

5) Superoxide Anion Generation via Electron-Transfer

Oxidation of Catechin Dianion by Molecular Oxygen in an Aprotic Media, I. Nakanishi, K. Fukuhara, T. Shimada, S. Fukuzumi, and N. Miyata, 8th International Conference on Environmental Mutagens Nara Satellite Meeting, Oct, 2001, Nara, Japan.

6) カテキンジアニオンの酸化による活性酸素生成機構、中西郁夫、福原 潔、島田知一、大久保敬、栗原正明、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、第34回酸化反応討論会、2001. 11.

7) キノン/NADHによる活性酸素生成機構の解析、福原 潔、中西郁夫、内藤有紀、佐藤由紀子、島田知一、浦野四郎、宮田直樹、第34回酸化反応討論会、2001. 11.

8) 塩素で置換した新規ビタミンE類縁体の抗酸化活性に及ぼす置換基の効果、飯塚優子、稲見圭子、中西郁夫、福原 潔、宮田直樹、望月正隆、第34回酸化反応討論会、2001. 11.

9) 水酸ラジカルのHPLCによる間接定量法について、阿部芳廣、李 林香、宮田直樹、日本分析化学会第50年会(熊本)、発表要旨集 p298、2001.11.

10) 塩基性条件下におけるカテキンからの活性酸素生成、島田知一、中西郁夫、福原 潔、大久保敬、栗原正明、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、第16回生体フリーラジカル研究会、2001. 12.

11) レスベラトロールによる酸化障害の解析ーフェノール性水酸基からの活性酸素の生成ー、福原 潔、中西郁夫、島田知一、永川真希、浦野四郎、宮田直樹、第16回生体フリーラジカル研究会、2001. 12.

12) 塩素置換新規ビタミンE類縁体の抗酸化活性に及ぼす置換基効果、飯塚優子、稲見圭子、中西郁夫、福原 潔、宮田直樹、望月正隆、日本薬学会第122年会、2002. 3.

13) フラボノイド類からの活性酸素生成機構、中西郁夫、福原 潔、大久保敬、島田知一、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、日本薬学会第122年会、2002. 3.

14) ビタミンE類縁体ラジカルの金属イオンによる安定化とキャラクタリゼーション、中西郁夫、福原 潔、大久保敬、飯塚優子、稲見圭子、望月正隆、島田知一、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、日本薬学会第122年会、2002. 3.

15) 光活性型NOドナー：6-ニトロベンツ[a]ピレンからのNOの生成、福原 潔、栗原正明、宮田直樹、日本薬学会第122年会、2002. 3.

16) ビタミンE類縁体ラジカルの安定性に及ぼ

す金属イオンの効果、中西郁夫、福原 潔、島田知一、大久保敬、浦野四郎、飯塚優子、稲見圭子、望月正隆、福住俊一、宮田直樹、日本化学会第81春年会、2002. 3.

17) カテキン類による活性酸素生成とラジカル中間体のキャラクタリゼーション、中西郁夫、福原 潔、島田知一、大久保敬、浦野四郎、栗原正明、福住俊一、宮田直樹、日本化学会第81春年会、2002. 3.

18) 平面型カテキン誘導体の活性酸素消去能、福原 潔、中西郁夫、島田知一、木村光宏、杉山悦子、寒水壽郎、山口健太郎、浦野四郎、宮田直樹、日本化学会第81春年会、2002. 3.

19) テレフタル酸の水酸化反応を利用した水酸ラジカルの定量－Fenton 反応の追跡、李 林香、阿部芳廣、服部研之、宮田直樹、鈴木廣志、日本薬学会第122年会（幕張）、2002.3.

E. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

研究課題：化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究

分担研究課題：キノン構造を有する化合物の活性酸素毒性の評価

分担研究者 福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

化学物質からの活性酸素の生成機構と生成量を明らかにして、酸素毒性の予測に資する構造活性相関について研究を行った。医薬品や生活環境化学物質の生体における代表的な酸化代謝物であるキノンをモデル化合物として、NADH 存在下における活性酸素生成機構を解析し、酸化還元特性と活性酸素生成量との相関について検討した。その結果、NADH からキノンへ電子移動の結果生成するキノンラジカルアニオンと NAD ラジカルが活性酸素生成に関与していることが明らかとなった。また、活性酸素の生成量はキノンの酸化還元特性と相関し、一電子還元され易いキノンは活性酸素生成量が多く DNA 切断活性が高いことが示された。この結果は、化学物質の活性酸素毒性の予測に利用できる。

A. 研究目的

医薬品や生活関連化学物質、環境化学物質など、膨大な化学物質の酸素毒性を明らかにする為には、化学物質の量、コスト、時間等、様々な制約を受ける。その為、健康危機の観点から化学物質の人への影響の評価には、化学構造からの毒性の一次予測が要求される。医薬等に見られるキノン構造は、生活関連物質や環境化学物質の生体内での主要な代謝物の構造としても知られている。キノン構造を有する化合物は、生体では活性酸素を

発生することによって生理作用を示したり毒性を発現する。しかし、キノンの活性酸素生成能はキノン構造の違いによって大きく異なり、また活性酸素生成機構についても不明な点が多い。本研究ではキノンの酸素毒性の予測に資することを目的として、種々のキノンを用いて NADH 存在下による DNA 切断活性と活性酸素生成機構を明らかにした。またキノンの活性酸素生成機構に基づいた酸素毒性の予測を行う為に、還元特性と活性酸素生成についての相関を検討した。

B. 研究方法、研究結果

1. DNA 損傷反応

キノンの NADH 存在下での DNA 損傷能を pBR322DNA を用いて調べた。その結果、ベンゾキノンのクロル体はクロル基の数が増える程、DNA 側鎖の損傷反応が進行し、テトラクロル体（クロラニル）は非常に強力に DNA を切断した。また、ナフトキノンやアントラキノンのクロル体についても同様の蛍光がみられた。さらに、DNA の酸化的損傷能

の指標として 8-oxodG の生成量を比較したところ、DNA 切断活性とほぼ同様の傾向がみられ、大量に 8-oxodG を生成するキノンは強力な DNA 切断活性を示した。この結果は、キノンによる DNA 切断は、酸化的に進行していることを示しており、NADH による一電子還元反応によってラジカルアニオンが生成しやすいキノンほど DNA に対する酸化的損傷能が強いことが示唆された。

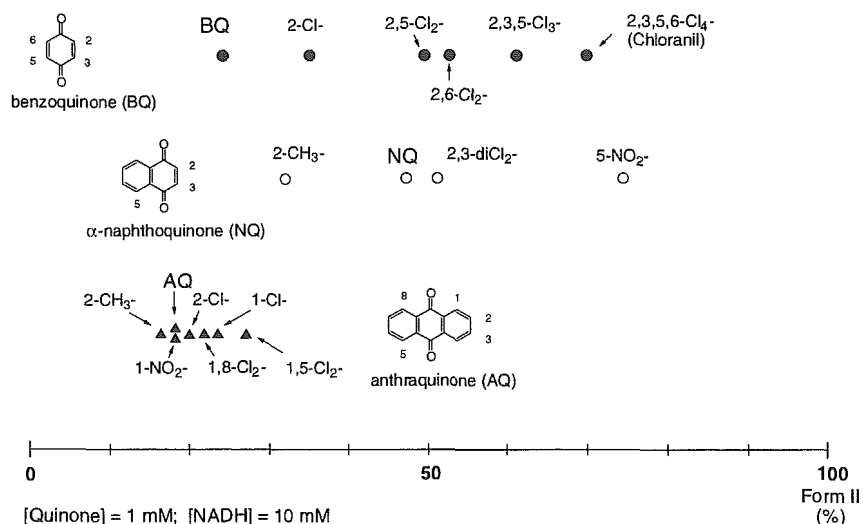


Fig. Effect of Substituents on DNA-Cleaving Activities of Quinones

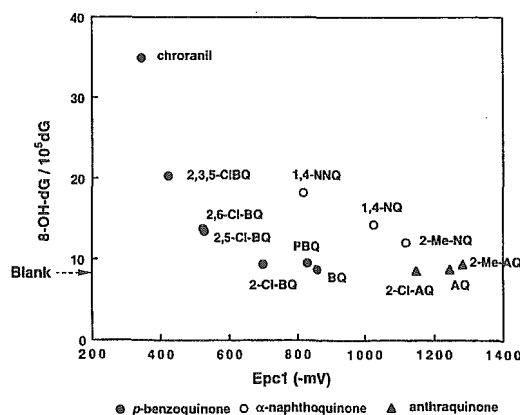
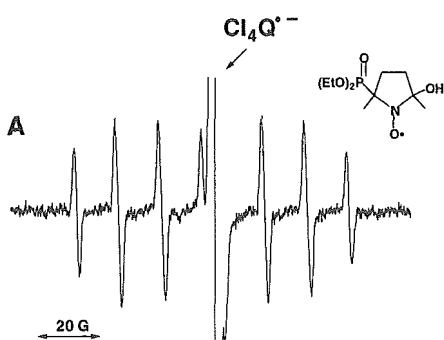


Fig. Correlation between reduction potentials and 8-OH-deoxyguanosine levels of p-benzoquinone (BQ), α-naphthoquinone (NQ), and anthraquinone (AQ) derivatives.

Detection of $\cdot\text{OH}$



Effects of Additives on $\cdot\text{OH}$ Formation

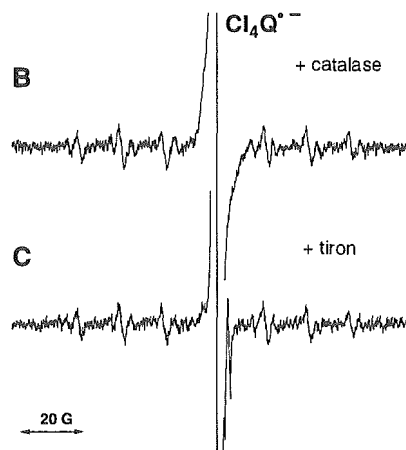


Fig. ESR spectra obtained with chloranil(Cl_4Q) and NADH in the presence of DEPMPO.

A, ESR spectrum of the incubation (30 min) contained Cl_4Q (20 μM), NADH (20 μM), and DEPMPO (20 mM) in the phosphate buffer (pH 7.2). B and C, same as A except in the presence of catalase(4000units/ml, B) and tiron(10mM, C).

2. キノン/NADH からの活性酸素の生成

クロラニルからの活性酸素の生成をスピントラップ剤として DEPMPO を用いて NADH 存在下、ESR で解析した。その結果、クロラニルのラジカルアニオン ($\text{Cl}_4\text{Q}^{\cdot-}$) のシグナルに加えて、ヒドロキシルラジカルの DEPMPO 付加体が観測された。ヒドロキシルラジカル付加体のシグナルは、スーパーオキシド消去剤 (tiron) とカタラーゼで減少することから、ヒドロキシルラジカルはスーパーオキシドを経由して生成していることがわかった。この結果より、キノン/NADH による DNA 損傷反応はスーパーオキシドを経由したヒドロキシルラジカルによって進行することが予測された。

3. キノン/NADH によるスーパーオキシド生成機構

嫌気的条件下、NADH によるクロラニルの UV 吸収の変化を解析した。その結果、クロラニルに NADH を添加すると 454nm にクロラニルのラジカルアニオン由来のピークが観測された。また、

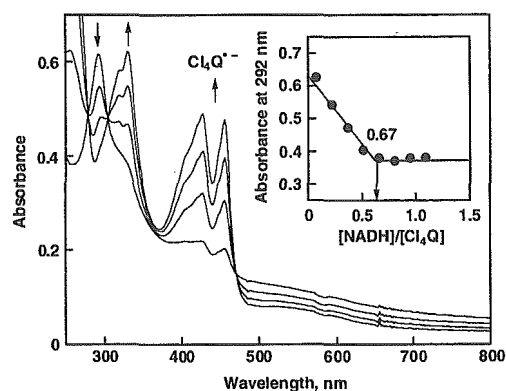
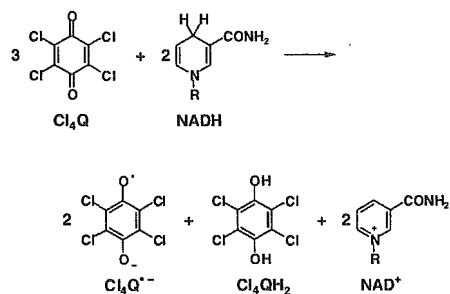


Fig. Spectral changes upon addition of NADH (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mM) to a deaerated MeCN solution of Cl_4Q (0.1 mM) at 298 K. Inset: plot of absorbance at 292 nm vs $[\text{NADH}]/[\text{Cl}_4\text{Q}]$.

クロラニルの 292nm の吸光度変化を $[\text{NADH}]/[\text{クロラニル}]$ でプロットしたところ、NADH とは 3:2 の割合で反応していることが明らかとなった。一方、クロラニルラジカルアニオンは好氣的条件下では時間の経過とともに減少し、そ

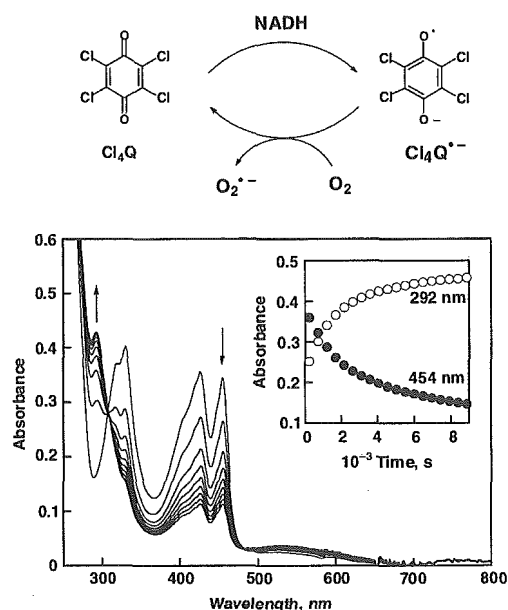


Fig. Spectral changes observed in the reaction of $\text{Cl}_4\text{Q}^{\bullet-}$ with O_2 in MeCN-phosphate buffer (50 mM; pH 7.4) (1:5 v/v) (interval: 1200 s). Inset: time course changes of the absorption bands at 292 and 454 nm.

れと同時にクロラニル由来の 292nm のピークの増加がみられた。この結果は、スーパーオキシドがクロラニルのラジカルアニオンからの酸素への電子移動反応によって生成していることを示している。また、この電子移動反応は比較的遅い ($t^{1/2}=5\text{h}$)ことも明らかとなった。一方、嫌氣的条件下、NADH 添加直後のクロラニルラジカルの生成量は好氣的条件下の 2 倍であることが UV および ESR により明らかとなった。この結果は、NADH がクロラニルを還元した後、生成する NAD ラジカルは、嫌氣的条件下ではさらにクロラニルを還元するのに対して、好氣的条件下では瞬時に酸素を還元してスーパーオキシドを発生していることが示している。以上の結果より、クロラニル/NADH による活性酸素反応は、NADH がクロラニルを一電子還元して生成するクロラニルラジカルアニオンが酸素を一電子還元して生成するスー

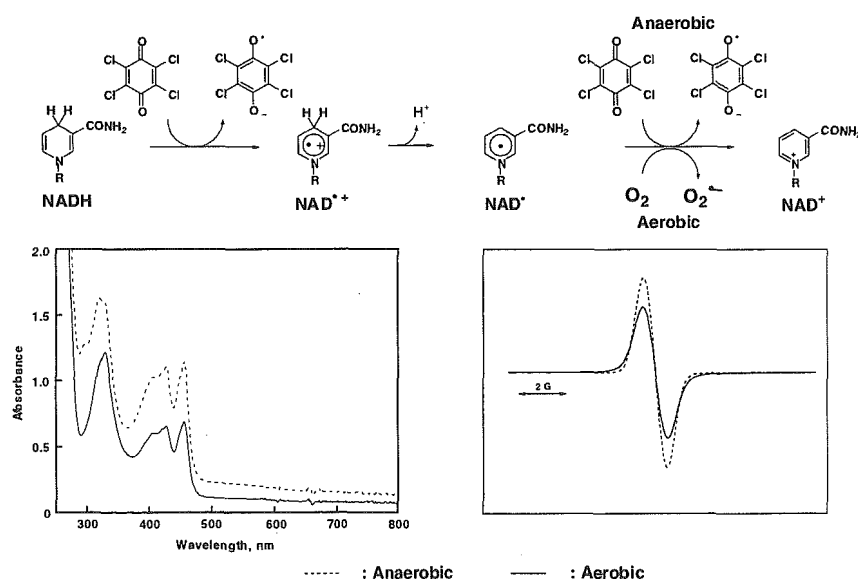


Fig. UV and ESR spectra of $\text{Cl}_4\text{Q}^{\bullet-}$ generated by Cl_4Q and NADH under aerobic and anaerobic condition.

パーオキシドと、NADH ラジカルカチオンの脱プロトン化で成する NAD ラジカルが酸素を還元して生成するスーパーオキシドによって引き起こされることが明らかとなった。また、クロラニルラジカルアニオン由来のスーパーオキシドの生成は比較的ゆっくり進行するのに対して、NAD ラジカル由来のスーパーオキシドは NADH がクロラニルを還元後、瞬時に進行することがわかった。

4. 構造活性相関

DEPMPO をスピントラップ剤として用いて、ベンゾキノンのクロル誘導体からの活性酸素生成量の経時変化を ESR で測定した。その結果、NADH 添加直後に NAD ラジカルに由来するまとまった活性酸素の生成がみられた後、時間の

経過とともにキノンラジカルアニオンに由来する活性酸素量の増加が観測された。また、キノンからの活性酸素生成量はクロル基の数の増加とともに増え、クロル基の数が増えて一電子還元され易いキノンは大量の活性酸素を発生することが示された。この結果は、DNA に対する酸化損傷能の強さと相関し、化学的に還元され易いキノンが活性酸素毒性が強いことを示している。

C. 結論・考察

本研究では化学物質からの酸素毒性の予測法の開発を目指して、キノンからの活性酸素生成機構を明らかにし、さらに構造活性相関について検討を行った。その結果、1) 一電子還元され易いキノンは活性酸素生成能が高く、DNA に対し

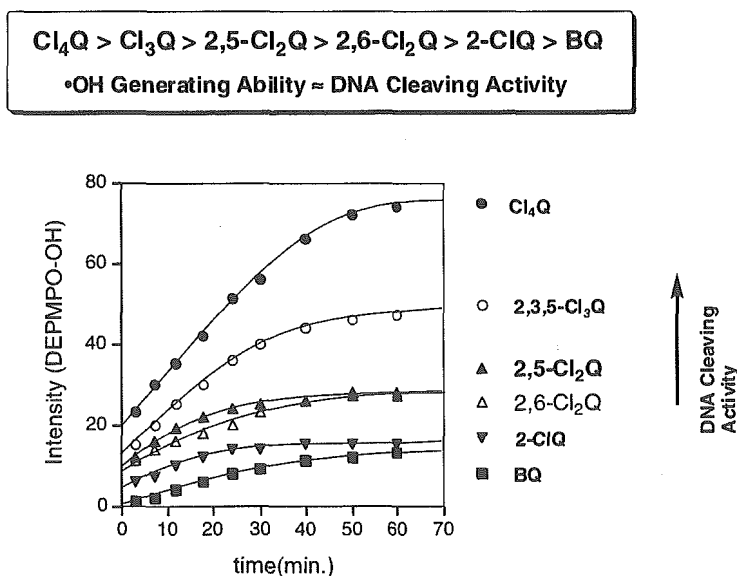


Fig. Time course of DEPMPO-OH signals generated by quinones and NADH. ESR spectra of DEPMPO-OH were monitored after addition of NADH (20 μM) to quinones (20 μM) in the presence of DEPMPO (20mM).

て強力な酸化損傷的反応が進行した。

2) キノン/NADH による活性酸素の生成は、非常に速い time scale で進行する NAD ラジカルによる酸素の還元と、比較的ゆるやかに進行するセミキノンラジカルアニオン由来のメカニズムで進行した。3) 両方の反応はキノンの一電子還元電位と関連し、還元され易いキノンは大量に活性酸素を発生した。以上、キノンによる活性酸素生成機構を明らかにし、化学的根拠に基づく酸素毒性の予測が可能であることを明らかにした。本研究で得られた成果は、厚生行政における健康危機管理に有用であり、今後は、酸素毒性に関する様々な構造化学的因子を解析して、毒性予測の評価法の精緻化を目指してゆく。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanishi, K. Fukuhara, K. Ohkubo, T. Shimada, H. Kansui, M. Kurihara, S. Urano, S. Fukuzumi, and N. Miyata, Superoxide anion generation via electron-transfer oxidation of catechin dianion by molecular oxygen in an aprotic medium, *Chem. Lett.* 1152-1153(2001).
- 2) K. Fukuhara, M. Kurihara, and N. Miyata, Photochemical generation of nitric oxide from 6-nitrobenzo[a]pyrene, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 8662-8666(2001).

- 3) N. Sera, K. Fukuhara, N. Miyata, and H. Tokiwa, Micronucleus induction and chromosomal aberration of 1- and 3-nitroazabenz[a]pyrene and their N-oxides, *Mutagenesis*, 16, 183-187(2001).
- 4) A. Matsuoka, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara, and N. Miyata, Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line, *Mutation Research*, 494, 107-113(2001).
- 5) K. Kondo, M. Kurihara, and K. Fukuhara, Mechanism of antioxidant effect of catechins, *Methods in Enzymology*, 335, 203-217(2001).
- 6) S. Ohnishi, M. Murata, K. Fukuhara, N. Miyata, and S. Kawanishi, Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic 1-nitropyrene, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 280, 48-52, (2001).

2. 学会発表

- 1) キノンによる活性酸素生成と DNA 損傷反応、福原 潔、内藤有紀、佐藤由紀子、中西郁夫、宮田直樹、第 23 回磁気共鳴医学会・第 5 回 SFRR Japan 合同学会、2001. 5.
- 2) Structure-activity relationships among resveratrol and its analogues in cytogenetic activity, A. Matsuoka, A. Furuta, M. Ozaki, K. Takeshita, K. Fukuhara, and N. Miyata, 8th International Conference on Environmental Mutagens, 2001. 10, Shizuoka, Japan.

3) Structural basis for DNA cleaving-activity of Resveratrol, K. Fukuhara, I. Nakanishi, M. Nagakawa, and N. Miyata, 8th International Conference on Environmental Mutagens Nara Satellite Meeting, 2001. 10, Nara, Japan.

4) Superoxide Anion Generation via Electron-Transfer Oxidation of Catechin Dianion by Molecular Oxygen in an Aprotic Media, I. Nakanishi, K. Fukuhara, T. Shimada, S. Fukuzumi, and N. Miyata, 8th International Conference on Environmental Mutagens Nara Satellite Meeting, Oct, 2001, Nara, Japan.

5) カテキンジアニオンの酸化による活性酸素生成機構、中西郁夫、福原 潔、島田知一、大久保敬、栗原正明、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、第 34 回酸化反応討論会、2001. 11.

6) キノン/NADH による活性酸素生成機構の解析、福原 潔、中西郁夫、内藤有紀、佐藤由紀子、島田知一、浦野四郎、宮田直樹、第 34 回酸化反応討論会、2001. 11.

7) 塩素で置換した新規ビタミン E 類縁体の抗酸化活性に及ぼす置換基の効果、飯塚優子、稲見圭子、中西郁夫、福原 潔、宮田直樹、望月正隆、第 34 回酸化反応討論会、2001. 11.

8) 塩基性条件下におけるカテキンからの活性酸素生成、島田知一、中西郁夫、福原 潔、大久保敬、栗原正明、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、第 16 回生体フリーラジカル研究会、2001. 12.

9) レスベラトロールによる酸化障害の解析 - フェノール性水酸基からの活性酸素の生成 -、福原 潔、中西郁夫、島田知一、永川真希、浦野四郎、宮田直樹、第 16 回生体フリーラジカル研究会、2001. 12.

10) 塩素置換新規ビタミン E 類縁体の抗酸化活性に及ぼす置換基効果、飯塚優子、稲見圭子、中西郁夫、福原 潔、宮田直樹、望月正隆、日本薬学会第 122 年会、2002. 3.

11) フラボノイド類からの活性酸素生成機構、中西郁夫、福原 潔、大久保敬、島田知一、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、日本薬学会第 122 年会、2002. 3.

12) ビタミン E 類縁体ラジカルの金属イオンによる安定化とキャラクタリゼーション、中西郁夫、福原 潔、大久保敬、飯塚優子、稲見圭子、望月正隆、島田知一、浦野四郎、福住俊一、宮田直樹、日本薬学会第 122 年会、2002. 3.

13) 光活性型 NO ドナー：6-ニトロベンツ[a]ピレンからの NO の生成、福原 潔、栗原正明、宮田直樹、日本薬学会第 122 年会、2002. 3.

14) ピリジン N-オキシド誘導体ラジカルアニオンの反応性、中西郁夫、丹野雅幸、福原 潔、大久保敬、福住俊一、末吉祥子、日本化学会第 81 春年会、2002. 3.

15) ビタミン E 類縁体ラジカルの安定性に及ぼす金属イオンの効果、中西郁夫、福原 潔、島田知一、大久保敬、浦野四郎、飯塚優子、稲見圭子、望月正隆、福住俊一、宮田直樹、日本化学会第 81 春年会、2002. 3.

16) カテキン類による活性酸素生成とラジカル中間体のキャラクタリゼーション、中西郁夫、福原 潔、島田知一、大久保敬、浦野四郎、栗原正明、福住俊一、宮田直樹、日本化学会第 81 春年会、2002. 3.

17) 平面型カテキン誘導体の活性酸素消去能、福原 潔、中西郁夫、島田知一、木村光宏、杉山悦子、寒水壽郎、山口健太郎、浦野四郎、宮田直樹、日本化学会

第 81 春年会、2002. 3.

E. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

研究課題：化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究

分担研究課題：新規な高感度活性酸素種検出試薬の開発

分担研究者 長野哲雄
東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究要旨 今年度は、高感度かつ特異的一重項酸素検出プローブの開発を行った。一重項酸素は活性酸素種の一つであるが、特異な物性から他の活性酸素種とは明らかに異なる反応種である。特に生体内でこの一重項酸素が生成しているかについてはまだ議論のあるところで、この点から高感度一重項酸素検出蛍光プローブの開発が求められていた。今年度、我々の研究グループは一重項酸素をバイオイメーjingすることが可能なプローブ DPAX および DMAX の開発に成功した。その概要について報告する。

A. 研究目的

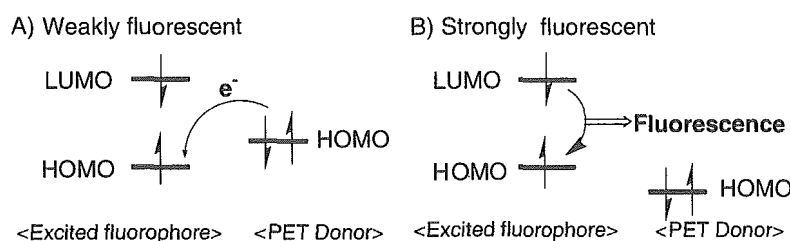
一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は活性酸素の一種である。 $^1\text{O}_2$ はユニークな反応性から NO と同様に生体内で重要な役割を担っている分子ではないかと注目されている。しかしこれまで生理的条件下、 $^1\text{O}_2$ を特異的かつ高感度に検出する方法はなかった。最近、我々の研究室の梅澤は $^1\text{O}_2$ の蛍光プローブ DPAX 類を開発する事に成功した。DPAX 類は $^1\text{O}_2$ との反応により蛍光化合物 (DPAX-EP) に変換する新しいタイプの $^1\text{O}_2$ 蛍光検出プローブで、このような検出法を原理するプローブは世界で始めてである。他の活性酸素種とは全く反応しないなど非常に高い特異性を有しており、実用的観点から有望なプローブである。しかしながら、DPAX 類は生理的条件下 $^1\text{O}_2$ を検出するには十分な感度とは言えない欠点を持っていた。そこで我々は更に、イメージングなど生体内からの $^1\text{O}_2$ の検出を目的とした超高感度な $^1\text{O}_2$ プローブの開発を目指した。初めに不明であった DPAX 類と $^1\text{O}_2$ との反応により蛍光を発するようになる蛍光発光機構の解明を行ない、得られた知見に基づいてプローブの合理的な分子設計を行うことにした。

B. 方法・結果

【fluorescein 誘導体の蛍光 OFF/ON 機構の解明】

DPAX 類は fluorescein 骨格を分子内に有するがほぼ無蛍光であり、 $^1\text{O}_2$ と反応して endoperoxide 体になることで初めて強い蛍光を有する特性を持つ。しかし、これまでこの蛍光の OFF/ON 機構については不明であった。我々は DPAX 類では、diphenylanthracene 部から xanthene 部への分子内での光誘起電子移動

(Photo-induced Electron Transfer, PET) により消光が起こるとの仮説を立て (Scheme 1)、この考えの妥当性を分子軌道計算及び縮合芳香環を持つ fluorescein の誘導体を合成することにより検証した。PET ドナーの HOMO レベルが異なる化合物として、fluorescein の phenyl 基を anthryl 基に変換した AX、naphthyl 基に



Scheme 1 PETの概念図

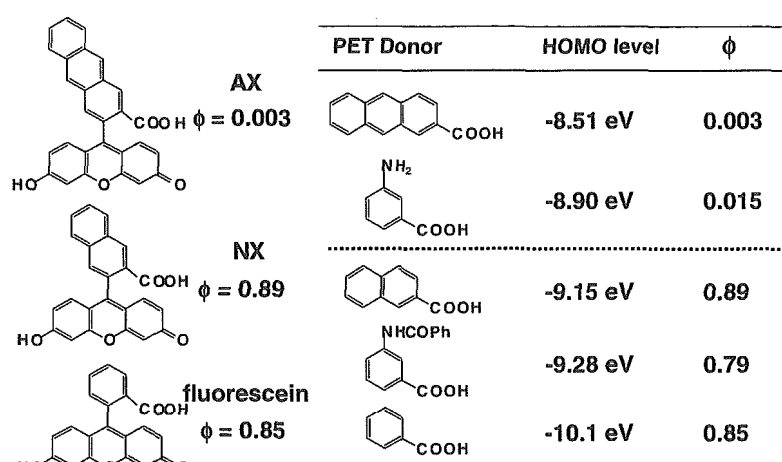


Fig. 1 PET ドナーのHOMOレベルと fluorescein誘導体の蛍光量子収率

変換した NX をそれぞれ合成し、量子収率の測定をした。その結果、NX は強い蛍光をもつが、芳香環が一つ多い AX はほとんど蛍光を持たないことが明らかとなった。DPAX 類や他の fluorescein 誘導体においても HOMO レベルの計算結果と蛍光量子収率は非常によい相関を持ち、-9 eV 付近の HOMO レベルを境として蛍光の OFF/ON を説明することが可能であった (Fig. 1)。以上の結果から fluorescein 類における蛍光の OFF/ON が PET 機構に基づいていることが示された。

【蛍光プローブのデザイン・合成】

DPAX 類より感度の向上した蛍光プローブの開発を目指し、既述した PET 原理を応用した $^1\text{O}_2$ 検出プローブとして Fig. 2 に示す DMAX 類をデザイン、合成した。DMAX 類は $^1\text{O}_2$ と反応するトラップ部分の構造が $^1\text{O}_2$ との反応速度定数が非常に大きい dimethylantracene (DMA) であり、感度の増加が期待できる。PM3 計算によると、DMA-2- CO_2H は anthracene-2- CO_2H よりも HOMO レベルが高く、 $^1\text{O}_2$

と反応し DMA-EP-2-CO₂H になると naphthalene-2-CO₂H 程度まで HOMO レベルが低下することから、DPAX 類と同様の蛍光の OFF/ON が可能であると考えた。合成した DMAX 類の蛍光特性を測定したところ、計算結果からの予想どおり DMAX 自身はほとんど蛍光を持たないが、¹O₂ と反応して DMAX-EP となることで蛍光量子収率が約 50 倍に増加することが明らかとなった。

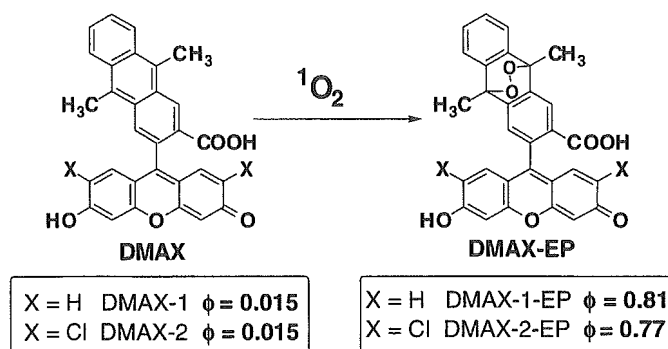


Fig. 2 DMAX類と¹O₂の反応

【一重項酸素の検出】

DMAX-1 による ¹O₂ の検出及び DPAX-1 との感度の比較を行った。DMAX-1 の中性バッファー水溶液に、熱的に分解して ¹O₂ を生成する化合物である EP-1 (37 °C での半減期は約 25 分) を添加すると蛍光が増大した (Fig. 3)。蛍光は EP-1 の濃度依存的に増大し、DMAX-1 は中性条件下 ¹O₂ を定量的に検出できることが明らかとなった。蛍光増加初速度の比較により DMAX-1 の感度は DPAX-1 のその 5.3 倍に増加した。また蛍光増加初速度、EP-1、¹O₂ の半減期などを用いて ¹O₂ との反応速度

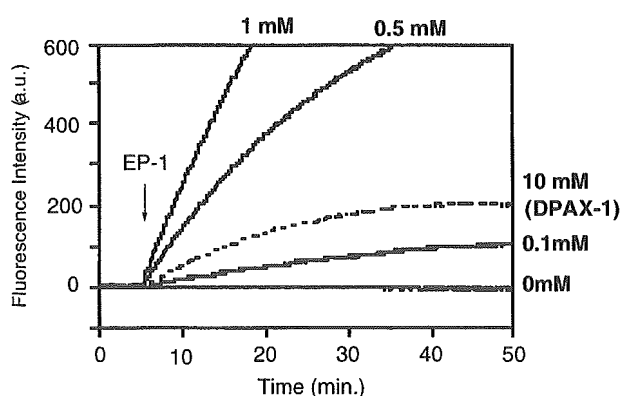


Fig. 3 DMAX-1と¹O₂との反応による蛍光強度の経時変化 (Ex. 491 nm, Em. 520 nm)

定数を算出したところそれぞれ、 $7.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (DMAX-1), $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (DPAX-1) となり、DMAX-1 の反応速度定数は、DPAX-1 に比べて約 70 倍に増加することが明らかとなった。以上の結果から、DMAX 類は、非常に感度の良い優れた $^1\text{O}_2$ 検出蛍光プローブであることが示された。そこで DMAX-2 を好中球などの細胞系に適応し、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ 検出を行った。好中球では PMA 刺激により Medium の蛍光強度の増加が観察され、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ の検出に初めて成功した。

C. 考察

fluorescein 誘導体の消光機構が、PET に基づくことを示した。次に、この消光機構に基づき、高感度 $^1\text{O}_2$ 検出蛍光プローブ DMAX 類の開発を行った。DMAX 類は DPAX 類に比べて感度が 53 倍、 $^1\text{O}_2$ との反応速度は約 70 倍に増加し、非常に高感度なプローブであることが示された。さらに DMAX 類を用いて生理的条件下の好中球からの $^1\text{O}_2$ 検出に初めて成功した。このような蛍光プローブは一重項酸素の生理的意義を探る上から非常に有用であり、その応用性が期待される。今後、マクロファージや好中球を用いて DMAX-2 による $^1\text{O}_2$ のイメージングも試みる予定である。

D. 研究発表

"Hydrophobic Modifications at 1-Phosphate of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Analogues Enhance Receptor Binding" WakaNakanishi, Kazuya Kikuchi, Takanari Inoue, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino and Tetsuo Nagano, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, in press.

"Orthogonality of Calcium Concentration and Ability of 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) to Detect NO" Noriyuki Suzuki, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, **J. Biol. Chem.**, 277, 47-49 (2002).

"Design and Synthesis of an Enzyme-Cleavable Sensor Molecule for Phosphodiesterase Activity Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer" Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Shigeru Sakamoto, Kentaro Yamaguchi and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, in press.

"Bioimaging of Nitric Oxide" Tetsuo Nagano and Tetsuhiko Yoshimura, **Chemical Reviews**, in press.

"Gi and Go as a redox sensor" Motohiro Nishida, Kevin L. Schey, Shuichi Takagahara, Kenji Kontani, Toshiaki Katada, Yasuteru Urano, Tetsuo Nagano, Taku Nagao and Hitoshi Kurose, **J. Biol. Chem.**, in press.

"Impurity Profiling of Ephedrine in Methamphetamine by High-Performance Liquid

Chromatography" Yukiko Makino, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, **J. Chromatography A**, in press.

"Selective Sensing of Zinc Ion with A Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent" Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, **J. Chem. Soc., Perkin Transaction 2**, 1840-1843 (2001).

"Rational Design of Fluorescein-based Fluorescence Probes. -Mechanism-based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen-" Kumi Tanaka, Tetsuo Miura, Naoki Umezawa, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 123, 2530-2536 (2001).

"Small Molecule-based Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor" Takanari Inoue, Kazuya Kikuchi, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino and Tetsuo Nagano, **Chemistry and Biology**, 8, 9-15 (2001).

"Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer System with Coumarin Donor Included in beta-Cyclodextrin" Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuturu Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Analytical Chemistry**, 73, 939-942 (2001).

"Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki Hirotani, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, **Analytical Chemistry**, 73, 1967-1973 (2001).

"Visualization of Oxygen Concentration-dependent Production of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Slices during Aglycemia" Hirotatsu Kojima, Mihoko Hirata, Yoshihisa Kudo, Kazuya Kikuchi and Tetsuo Nagano, **J. Neurochem.**, 76, 1404-1410 (2001).

"Overexpression of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Protects Against Radiation-Induced Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line, HLE" Shigeatsu Motoori, Hideyuki J. Majima, Masaaki Ebara, Hirotoshi Kato, Futoshi Hirai, Shizuko Kakinuma, Chizuru Yamaguchi, Toshihiko Ozawa, Tetsuo Nagano, Hirohiko Tsujii and Hiromitsu Saisho, **Cancer Research**, 61, 5382-5388 (2001).

"Selective Inhibition of Human Inducible Nitric Oxide Synthase by S-alkyl-L-isothiocitrulline-containing Dipeptides" Jung-Min Park, Tsunehiko Higuchi, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Hiroyuki Hori, Takeshi Nishino, Junken Aoki, Keizo Inoue and Tetsuo Nagano, **British Journal of Pharmacology**, 132, 1876-1881 (2001).

"Synthesis of 5,10,15,20-tetrakis(4-tert-butyl-2,6-dicarboxyphenyl) porphyrin: A Versatile

Bis-faced Porphyrin Synthone for D₄-symmetric Chiral Porphyrin" Hiroshi Nakagawa, Tetsuo Nagano and Tsunehiko Higuchi, **Organic Letters**, 3, 1805-1807 (2001).

"高感度一重項酸素蛍光プローブの開発" 浦野泰照、長野哲雄、**医学のあゆみ**、別冊 "酸化ストレス" pp. 131-134 (2001)

"バイオイメーjingのための新規 Zn²⁺蛍光プローブ" 菊地和也、平野智也、長野哲雄、**化学と生物**, 39, 549-553 (2001)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

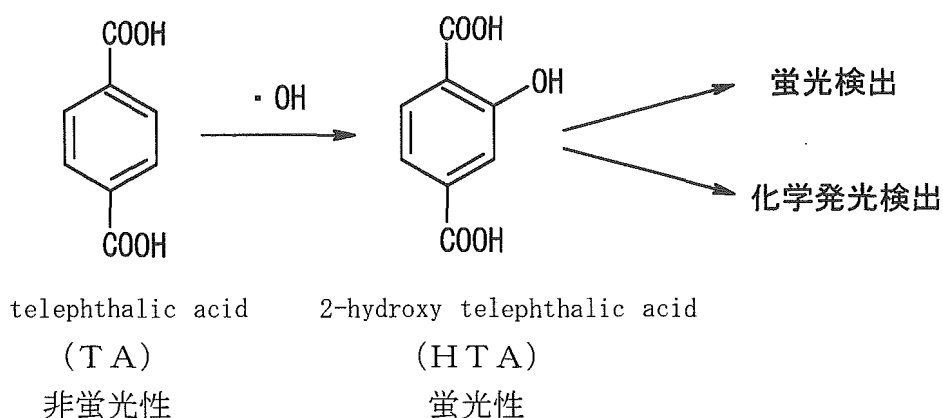
研究課題：化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究

分担研究課題：活性酸素種の高感度定量的評価手法の開発

分担研究者 阿部 芳廣
共立薬科大学 基礎実験薬学講座 教授

研究要旨

ヒドロキシラジカル（水酸ラジカル）のHPLC-蛍光検出法ならびに化学発光検出法による新しい定量法を確立することを目的として研究を行った。テレフタル酸は蛍光性を有しない化合物であるが、これが水酸ラジカルと反応すると、蛍光性を有する2-ヒドロキシ体を与える。今年度は、1）水酸ラジカルのHPLCによる定量法を確立した。2）これにより、Fenton 反応で生じる水酸ラジカルの定量を行ない、Fe(II)と過酸化水素との化学量論的に2：1で反応することを確認した。3）2-ヒドロキシテレフタル酸は、化学発光検出法によっても検出可能であることがわかり、蛍光検出法よりもさらに高感度の検出ができる可能性を示した。4）二価の鉄を含む水溶液中で、過酸化水素がなくてもテレフタル酸の水酸化反応が進行することを昨年度報告したが、この反応が、溶存酸素が鉄により還元され、活性化された結果生じることを明らかにした。



図－1 テレフタル酸による水酸ラジカルの捕捉と検出

A. 研究目的

1. テレフタル酸を用いたOHラジカルのHPLCによる定量法の確立

HPLC法による水酸ラジカルの新しい定量法を開発する。

テレフタル酸（TA）は次のような利点をもつ。

B. 研究方法

1. 対称性がよく、モノ水酸化により単一の生成物（HTA）を与える。

2. TA自体は蛍光性を有しないが、HTAは蛍光性である。
3. 自然の状態で生体内に存在する成分とは考えられない。
4. 従来HPLC法による水酸ラジカルの検出あるいは定量に使われてきたサリチル酸が、主に3種の生成物を与えるのに比べて、有利である。

本年度はTAを利用したHPLCによる水酸ラジカルの定量法の確立を期した。

1) 実験方法

水：

実験に使用した水は、超純水（ミリQ）を、減圧下に脱気し、空気をアルゴン置換したものを使用した。

2-ヒドロキシテレフタル酸：

水酸化体の標品となる2-ヒドロキシテレフタル酸（HTA）は、2-ブロモテレフタル酸から報文[1]に従い、合成した。

[1] L. Field and P.R. Engelhardt, J. Org. Chem., 35, 3647-3655 (1970).

HPLCの条件：

カラムはODS（4.6mmφ×25cm）を使用し、溶離液として、200mMリン酸2水素カリウム-2%KC1水溶液を用いて、流速1ml/minで分析した。装置は日本分光製HPLCシステム980シリーズを用い、検出器には蛍光検出器（Ex309nm、Em420nm、日本分光FP-1520S）とUV検出器（285nm、日本分光UV-970）記録

およびピーク面積の算出にはクロマトパックC-R6A（島津）を用いた。試料注入量は20μlである。

2) 測定法

水酸ラジカルを発生すると思われる試料溶液2容に対し、5mMのTAを17容、リン酸緩衝液あるいは純粋1容を混合し、1分後にHPLCに注入する。

Fenton 反応：

Fenton 反応は、10mM硫酸アンモニウム鉄(II) 0.1ml、5mMテレフタル酸2ナトリウム溶液1.7ml、リン酸緩衝液（pH7.4）0.1mlを加え、最後に10mM過酸化水素溶液を0.1ml加えて、攪拌し1分後にHPLCに注入した。

1) 検量線

TAから生じるHTAの量は極めて微量なので、用いたTAを内部標準物質として利用し、UV検出器で得られるTAの面積とHTAの面積比をとって検量線を作成した。検量線はHTAの濃度範囲20nM～1μMで良好な直線性が得られた（図-2）。

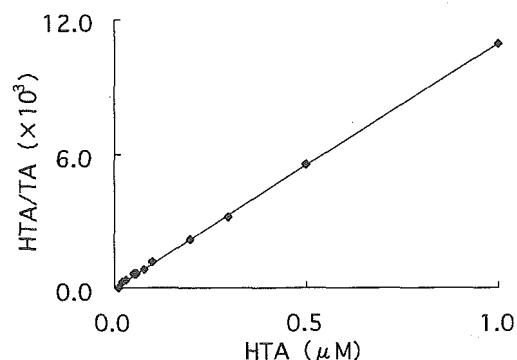


図-2 HTAの検量線。