

膜中で、フリーラジカルが関与する疾病の抑制に非常に有用であることが示唆された。

2-4) 塩基性条件下におけるプロオキシダント効果

我々は、以前、天然カテキンのジアニオンが分子状酸素を電子移動還元することでスーパーオキシドアニオンを生成することを報告した。そこで平面型カテキンについても、塩基性条件下、アセトニトリル(MeCN)中で、分子状酸素 (O_2) への電子移動反応の解析を行った。

2-4-1) 塩基性条件下での平面型カテキンジアニオンの生成

嫌気性条件下、25℃で、tetra-*n*-butylammonium hydroxide (Bu_4NOH)とメタノールとの反応により生成するメトキシドアニオン(MeO^-)を、平面型カテキン($1H_2$)のアセトニトリル(MeCN)溶液に加えると、**Figure 5**に示すように、 $1H_2$ に由来する 281 nm の吸収は 299 nm にシフトした。



天然カテキンに 1 当量の MeO^- を加えると、もっとも pK_a 値が低い B 環 3' 位の OH 基で脱プロトン化が起こる。従って、この場合にも **Scheme 1** に示すような平面型カテキンアニオン $1H^-$ が生成していると考えられる。

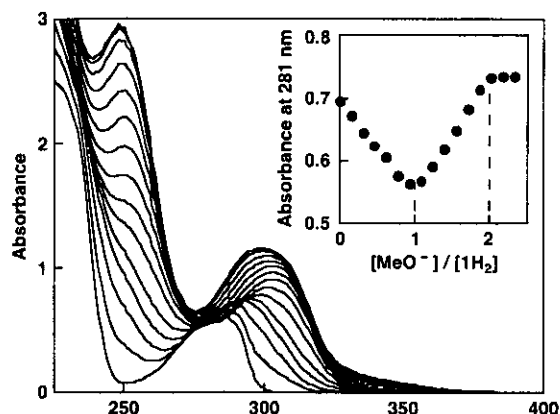
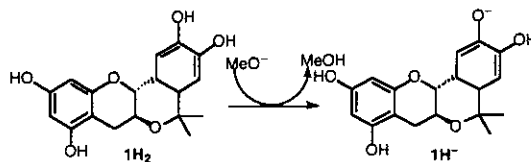


Figure 5. Spectral change upon addition of MeO^- (3.0×10^{-4} M) to a deaerated MeCN solution of $1H_2$ (1.5×10^{-4} M) at 298 K. Inset: plot of the absorbance change at 281 nm against $[MeO^-]/[1H_2]$.

Scheme 1

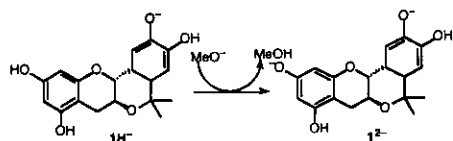


実際、281 nm の吸光度変化を MeO^- と $1H_2$ の濃度の比($[MeO^-]/[1H_2]$)でプロットすると、**Figure 5** の inset のようになり、 $1H_2$ と MeO^- がまず 1:1 で反応していることがわかった。

次に、 $1H_2$ と MeO^- との反応で得られた平面型カテキンアニオン $1H^-$ に、さらに MeO^- を加えると、299 nm の吸収の増大にともない 340 nm 付近のスペクトルの増大が観測された(**Figure 5**)。340 nm の吸収の増大は、 $1H_2$ と 2 当量の MeO^- との反応でも、天然カテキンの場合と同様に、A 環 7 位の OH 基で脱プロトン化が起こった 1^{2-} のようなカテキンジアニオンが生成してい

ることを示している(Scheme 2)。

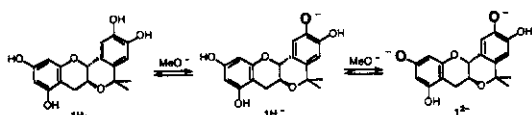
Scheme 2



得られた平面型カテキンジアニオン 1^{2-} は、嫌気性条件下では安定に存在する。この反応系に、さらに MeO^- を加えてもこれ以上のスペクトル変化は観測されなかった。このことから、嫌気性条件下、MeCN 中、過剰の MeO^- 存在下において、平面型カテキン 1H_2 は、ジアニオン 1^{2-} として存在することがわかった。

以上まとめると、平面型カテキン 1H_2 は、嫌気性条件下、MeCN 中、2 当量の MeO^- と反応し、平面型カテキンジアニオン 1^{2-} になる(Scheme 3)。得られた 1^{2-} は、天然カテキンジアニオンと同様に、レゾルシノールに特徴的な 340 nm 付近の吸収は嫌気性条件下では安定である。

Scheme 3



2-4-2) 平面型カテキンジアニオンと分子状酸素との反応

先に述べたように、平面型カテキンジアニオン 1^{2-} は、MeCN 中、嫌気性

条件下では安定であるが、この溶液に分子状酸素(O_2)を導入すると、Figure 6 に示すような 485 と 630 nm の吸収の増大が観測された。

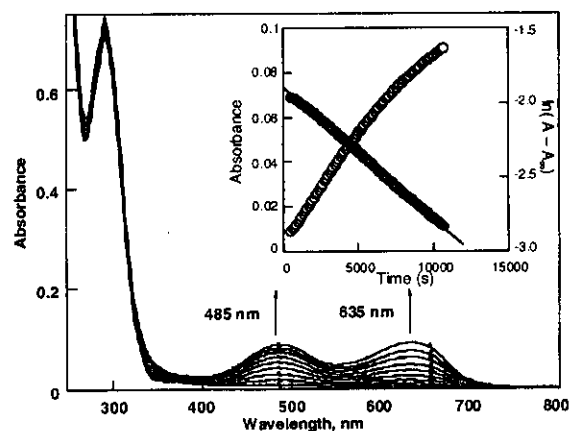
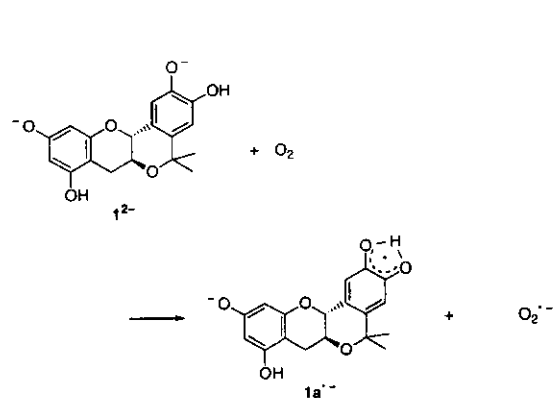


Figure 6. Spectral change observed in the reaction of 1^{2-} (1.5×10^{-4} M) with O_2 (1.3×10^{-2} M) in MeCN at 298 K (interval: 600 s). Inset: first order plot based on the absorption change at 428 nm.

このスペクトル変化から、 1^{2-} は O_2 によって酸化され、平面型カテキンラジカルアニオン($1\text{a}^{\cdot-}$)とスーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\cdot-}$)が生成していることが考えられる。



次に、平面型カテキンラジカルアニオン($1a^{\bullet-}$)の構造を解析する為に、 O_2 存在下、 1^{2-} の MeCN 溶液の電子スピン共鳴(ESR: Electron Spin Resonance)スペクトルを測定した。その結果、**Figure 7a** に示すように、2.0048 に g 値をもつ ESR シグナルが観測された。

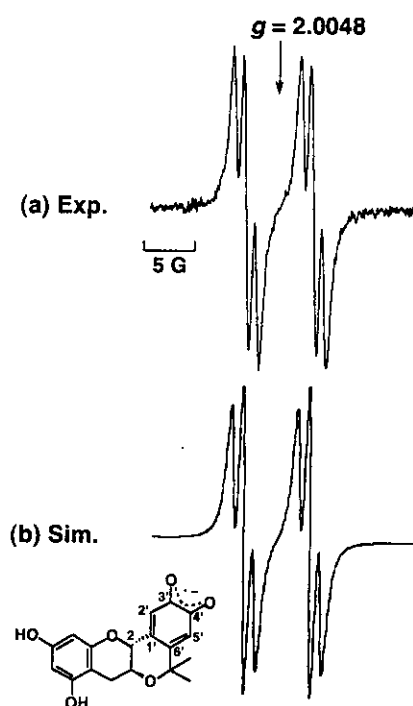


Figure 7. (a) ESR spectrum of $1^{\bullet-}$ generated in the reaction of 1^{2-} (3.4×10^{-3} M) with O_2 (1.3×10^{-2} M) in MeCN at 298 K. (b) Computer simulation spectrum with $g = 2.0048$, $a(H^{1'}) = 6.64$ G, $a(H^{2'}) = 1.10$ G, $a(H^{5'}) = 1.10$ G, $DH_{msl} = 0.6$ G. The calculated hfs values of $1^{\bullet-}$ using the ADF method are $a(H^{1'}) = 6.6$ G, $a(H^{2'}) = 3.9$ G, $a(H^{5'}) = 3.5$ G.

観測された ESR スペクトル(**Figure 7a**)は、3 つの異なるプロトンによる超微細結合定数(6.64, 1.10, and 1.10 G)でコンピュータシュミレーションすることができた(**Figure 7b**)。

天然カテキンラジカルアニオンの場合と同様に、平面型カテキンラジカル

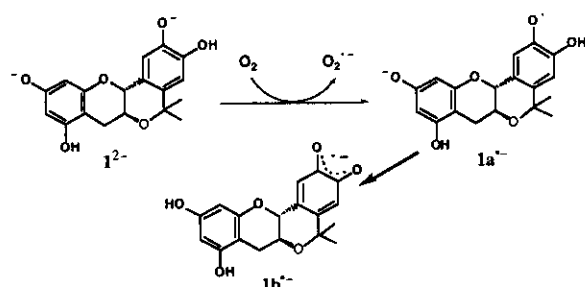
Table 2. Heats of formation (ΔH_f) of $1^{\bullet-}$ calculated by the PM3 method.

$1^{\bullet-}$	ΔH_f , kcal mol $^{-1}$
	-230.5
	-220.7
	-221.6
	-215.4
	-216.3
	-219.9

アニオンの PM3 分子軌道計算を行って平面型カテキンラジカルアニオンの生成熱を計算すると、Table 2 に示すようにセミキノンラジカルアニオン型のラジカルアニオンが最も安定であることがわかった。

以上の結果から、平面型カテキンジアニオン 1^{2-} は、 O_2 によって電子移動酸化されカテキンラジカルアニオン $1a^{\cdot-}$ に変わり、生成した $1a^{\cdot-}$ の B 環上の OH 基から A 環上のフェノレートアニオンへの分子内プロトン移動によってセミキノンラジカルアニオン型の $1b^{\cdot-}$ が生成していると考えられる (Scheme 4)。

Scheme 4



ADF (Amsterdam Density Functional) 法を用いた密度汎関数計算の結果から、コンピューターシミュレーションにより得られた超微細結合定数を Figure 7b に示すように帰属した (Figure 8)。天然カテキンに比べ、2 位のプロトンによる超微細結合定数が大きくなっているのは、平面型カテキンの分子の平面性により、B 環の π 電子軌道と 2 位のプロトンの s 軌道が超共役により重なり合って、不対電子が 2 位のプロトンにまで非局在化しているためと考えられる。

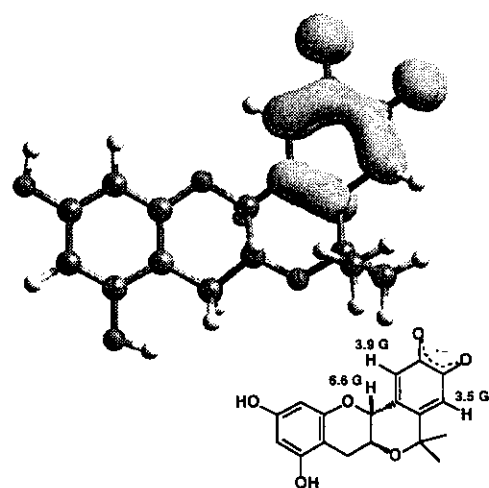


Figure 8. Spin density distribution and calculated hyperfine splitting constants of $1b^{\cdot-}$ by using the ADF method.

2-4-3) 平面型カテキンジアニオンによるスーパーオキシドアニオンの生成

平面型カテキンジアニオン 1^{2-} と O_2 との反応で、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) が生成していることを直接確認するために、この反応系を 77 K の低温条件下で凍結させ、その ESR スペクトルを測定した。その結果、Figure 9 に示すように、 $O_2^{\cdot-}$ に特徴的な 2.070 に g 値をもつブロードな ESR シグナルを直接観測することができ、平面型カテキンジアニオン 1^{2-} と O_2 との反応で $O_2^{\cdot-}$ が実際に生成していることを直接確認することができた。一方、2.050 に g 値をもつ ESR シグナル (Figure 9) は、 HO_2^{\cdot} によるものと考えられるが、この反応系でどのようにして HO_2^{\cdot} が生成したかは現在検討中である。

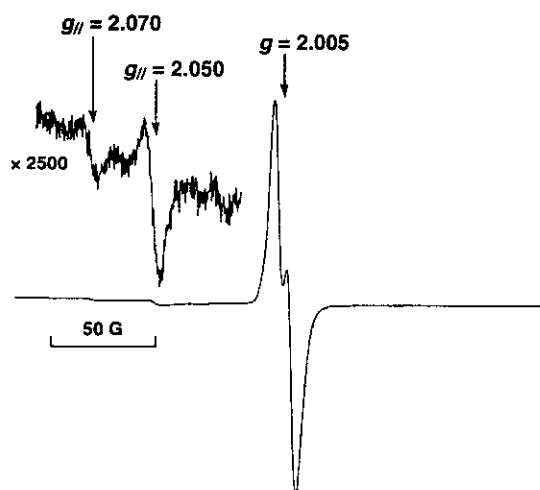


Figure 9. ESR spectrum of $\text{O}_2^{\bullet-}$ generated in the reaction of 1^{2-} ($3.4 \times 10^{-3} \text{ M}$) with O_2 ($1.3 \times 10^{-2} \text{ M}$) in MeCN at 298 K and measured at 77 K.

2-4-4) 平面型カテキンによるスーパーオキシドアニオン生成の速度論

Figure 6 に示すカテキンセミキノンラジカルアニオン $1b^{\bullet-}$ に由来する 485 nm の吸光度の増加は、 O_2 の濃度が 1^{2-} の濃度の 10 倍以上の条件下 ($[\text{O}_2] \gg 10[1b^{\bullet-}]$) では、 $1b^{\bullet-}$ の濃度 ($[1b^{\bullet-}]$) に対して擬一次速度式に従った(eq 8)。

$$d[1b^{\bullet-}]/dt = k_{\text{obs}}[1b^{\bullet-}] \quad (\text{eq 8})$$

ここで、 k_{obs} は擬一次速度定数である。**Eq 8** の両辺を積分すると、**eq 9** が得られる。

$$\ln([1b^{\bullet-}]/[1b^{\bullet-}]_0) = k_{\text{obs}}t \quad (\text{eq 9})$$

ここで、 $[1b^{\bullet-}]_0$ は $t = 0$ のときの $1b^{\bullet-}$ の濃度である。

一方、 $t = 0, t, \infty$ の 430 nm の吸光度をそれぞれ A_0, A, A_{∞} とすると、 $1b^{\bullet-}$ の濃度と吸光度の間には **eq 10** の関係が成り立ち、**eq 8** と **eq 10** から、**eq 11** が得られる。

$$[1b^{\bullet-}]/[1b^{\bullet-}]_0 = (A_{\infty} - A)/(A_{\infty} - A_0) \quad (\text{eq 10})$$

$$\ln(A_{\infty} - A) = k_{\text{obs}}t - \ln(A_{\infty} - A_0) \quad (\text{eq 11})$$

Eq 11 は、 $\ln(A_{\infty} - A)$ を時間 t に対してプロットすると直線が得られ、その傾きから擬一次速度定数 k_{obs} が求められることを示している。実際、 $\ln(A_{\infty} - A)$ を時間 t に対してプロットすると直線が得られ、この傾きから k_{obs} を決定した。得られた k_{obs} は **Figure 10** に示すように O_2 の濃度の増加に比例して増加した。

このことから、 k_{obs} と 1^{2-} から O_2 への電子移動速度定数 (k_{et}) との間には **eq 12** の関係が成り立つ。

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{et}}[\text{O}_2] \quad (\text{eq 12})$$

よって、全体の反応速度は **eq 13** で表され、 1^{2-} と O_2 のそれぞれの濃度に対して 1 次反応、全体で 2 次反応であることがわかった。

$$\text{Rate} = -d[1^{2-}]/dt = d[1b^{\bullet-}]/dt = k_{\text{et}}[1^{2-}][\text{O}_2] \quad (\text{eq 13}) \quad (4)$$

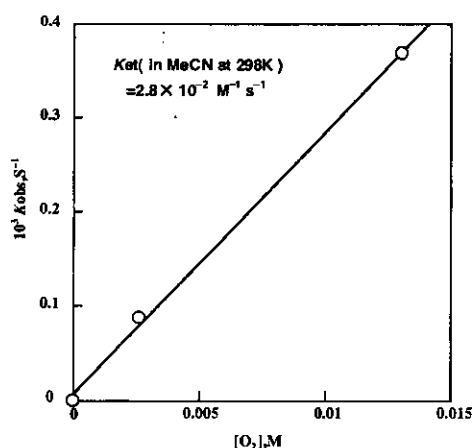


Figure 10. Plot of k_{obs} vs $[\text{O}_2]$ in the electron-transfer oxidation of 1^{2-} by O_2 in MeCN at 298 K. The 1st-order plots for determination of k_{obs} values at each O_2 concentration are shown in Figure S1 and S2.

Figure 10 の直線の傾きから、 k_{et} を求めると、 $2.8 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となった。得られた k_{et} 値は比較的小さいことから、天然カテキンの場合と同様に、 $1\text{a}^{\bullet-}$ を生成する 1^{2-} から O_2 への電子移動過程は吸熱過程で反応全体の律速段階となっており、後続の $1\text{b}^{\bullet-}$ が生成する分子内のプロトン移動は非常に速く、発熱過程となっていることがわかった。また、平面型カテキンに対して得られた k_{et} 値は、天然カテキンの場合 ($5.8 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) より約 2 倍小さいことがわかった。

D. 考察

活性酸素などのラジカルが癌や心臓病をはじめ様々な疾患発症の原因と

なることが明らかになるにつれて、生活環境化学物質の毒性の発現にラジカルの関与が注目されるようになってきた。また、芳香族化合物からのラジカルの発生機構についても多くの報告があり、キノン代謝物は代表的な活性酸素発生化合物として明らかになっている。一方、通常は活性酸素を発生しない化合物でも微量金属イオンが存在することによって大量に活性酸素を発生して遺伝傷害を引き起こす化合物も明らかになり、生体内での化学物質の毒性発現には様々な因子について検討をすることが必要である。近年の地球環境の悪化で特に人への影響が問題視されているオゾンホール拡大は生態系のバランスを崩すのみでなく、大量の紫外線照射量の増加によって皮膚癌を高頻度に誘発することが懸念されている。紫外線照射量の増加は化学物質の毒性にも影響を与えることが予測される。たとえば、芳香族化合物の中には光照射によって励起されると酸素へのエネルギー移動によって一重項酸素を発生して細胞毒性を示すことがある。

本研究では環境汚染物質として大気中に高濃度に存在するニトロアレーンの毒性への光照射の影響について検討した。ベンツピレンはディーゼル排ガス中に含まれている NO_x と反応するとニトロ化反応が進行して、モノニトロ体 (1-, 3-, および 6-ニトロ体) とジニトロ体 (1,6-, および 3,6-ジニトロ体) が生成する。このうちモノニトロ体について光照射の影響を検討してみたところ 1-, および 3-ニトロ体は光に安定である一方、6-ニトロ体は光照射すると分解反応が進行して一酸化窒

素 (NO) を発生することが明らかとなった。血管の内皮由来弛緩因子として血管内皮機能を調節している NO は、遺伝子傷害の原因や、アミノ酸と反応してタンパクの機能障害を引き起こすことが報告されている。また、スーパーオキシドと反応するとペルオキシナイトライトというより強力な酸化力や毒性を持つラジカルが生成する。さらに、ミトコンドリアの電子伝達系を傷害してスーパーオキシドの産生を増加させる。このように、NO は血管内皮由来弛緩因子として生体内では重要な機能を担う一方で、過剰発生すると NO を引き金とする活性酸素毒性を示すことが予測される。ニトロアレーンはニトロ基が還元代謝を受けて活性化した後、DNA と反応して遺伝子変異を誘発し毒性を発現する。ベンツピレンの 1-、および 3-ニトロ体とジニトロ体はこのニトロ基の還元代謝活性化によって強力な変異原性を発現する。しかし、6-ニトロベンツピレンはベンツピレンのニトロ体のうち大気中に最も高濃度に存在するにもかかわらず、生体内では還元代謝を受け難く、Ames 法等の簡便な変異原性試験では毒性を評価することができなかった。本研究で 6-ニトロベンツピレンが光照射によって NO を発生したことは、ニトロアレーンの生体影響を評価する上で、今後は NO 発生を伴う新たな毒性発現機構についても検討する必要性が明らかとなった。

紫外線による生体影響は、ラジカルの発生を伴って皮膚癌などの毒性を発現する。今回、明らかとなった光照射下におけるニトロアレーンからの

NO の発生は、紫外線における毒性に、NO 発生が引き金となる様々な活性酸素傷害についても検討することが必要であることが予測された。これは紫外線照射が原因となる健康被害を防止する為には、発生する活性酸素などのラジカルを効率良く消去することが有効であると考えられる。活性酸素の消去を薬理作用とした医薬品としては、エダラボンが急性期の脳梗塞の治療薬として唯一認可されている。しかしながら、その副作用も近年問題となっており、副作用の少ない抗酸化剤の開発が望まれている。

本研究では天然抗酸化剤として代表的なカテキンの分子構造を平面に固定した平面型カテキンを新規に合成してラジカル消去能とプロオキシダント効果について解析した。平面型カテキンのラジカル消去能を酸素ラジカルとして galvinoxyl radical を用いて解析した結果、平面型カテキンのラジカル消去作用はカテキンと比べて飛躍的に増加し、強力なラジカル消去能を有するケルセチンよりも強力であることが明らかとなった。また、カテキンはアルカリ条件下、酸素を一電子還元してスーパーオキシドを発生するが、同様の条件下、平面型カテキンからのスーパーオキシドの生成速度はカテキンの約 1/2 であることがわかった。さらにヒドロキシルラジカルによる酸化的 DNA 切断反応に対する作用を検討した結果、カテキンやケルセチンは切断活性が増強する（プロオキシダント効果）のに対して、平面型カテキンは濃度依存的に抑制した。ケルセチンは強力なラジカル消去能を有している一方

で、プロオキシダント効果がかなり強く、それが毒性の発現に関係していると考えられる。従って、新規に合成した平面型カテキンがケルセチン以上のラジカル消去能に加えて、プロオキシダント効果がみられず、またスーパーオキシドの生成能がカテキンよりも弱いことは、強力なラジカル消去能とともに副作用が少ない非常に優れた抗酸化剤であることが明らかとなった。今後は平面型カテキンの抗酸化効果について細胞および動物レベルで検討する。また、細胞内における活性酸素傷害に対して抗酸化力を十分発揮させるために、細胞膜透過性が向上した平面型カテキン誘導体についても検討する予定である。

E. 結論

環境化学物質として代表的なニトロアレーンについて光照射における分解反応の解析を行った。その結果、ベンツピレンの 6-ニトロ体は光照射によって NO を発生して DNA を強力に切断することが明らかとなった。環境化学物質としてのニトロアレーンからの NO の発生は本研究結果が初めての報告例であり、紫外線照射における健康影響を適切に評価するためには、今後は環境化学物質への光照射によって発生する NO を引き金とするラジカル毒性についても十分に検討する必要性が示された。

本研究ではさらに紫外線照射による健康影響の予防に利用が可能な優れた抗酸化剤の開発を目的として、天然型カテキンの分子構造を平面に固定した平面型カテキンを新規に合成した。平

面型カテキンは天然型カテキンと比べて非常に強力なラジカル消去能を示した。また、プロオキシダント効果やスーパーオキシド生成能が弱いことから毒性の少ない優れた抗酸化剤であることがわかった。

E. 論文発表

- 1) I. Nakanishi, Y. Uto, K. Ohkubo, K. Miyazaki, H. Yakumaru, S. Urano, H. Okuda, J. Ueda, T. Ozawa, K. Fukuhara, S. Fukuzumi, H. Nagasawa, H. Hori, N. Ikota, Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism, *Org. Biomol. Chem.*, in press.
- 2) K. Saeki, T. Matsuda, T. Kato, K. Yamada, T. Mizutani, S. Matsui, K. Fukuhara, and N. Miyata, Activation of the Human Ah Receptor by Aza-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Halogenated Derivatives, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, in press.
- 3) K. Fukuhara, I. Nakanishi, T. Shimada, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, N. Ikota, T. Ozawa, H. Okuda, N. Miyata, and S. Fukuzumi, A Planar Catechin Analogue as a Promising Antioxidant with Reduced Prooxidant Activity, *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 81-86(2003).
- 4) A. Matsuoka, K. Takeshita, A. Furuta, M. Ozaki, K. Fukuhara and Naoki Miyata: The 4' hydroxy group is responsible for the in vitro

- cytogenetic activity of resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene), *Mutation Res.*, 521, 29-35 (2002).
- 5) I. Nakanishi, K. Miyazaki, T. Shimada, K. Ohkubo, S. Urano, N. Ikota, T. Ozawa, S. Fukuzumi, K. Fukuhara, Effects of metal ions distinguishing between one-step hydrogen- and electron-transfer mechanisms for the radical-scavenging reaction of (+)-catechin, *J. Phys. Chem. A*, 106(46), 11123-11126 (2002).
- 6) K. Fukuhara, Y. Naito, Y. Sato, I. Nakanishi, N. Miyata, Generation of oxygen radicals and DNA-cleaving ability in quinone/NADH system, *Magnetic Resonance in Medicine*, **13**, 139 – 142 (2002).
- 7) I. Nakanishi, K. Fukuhara, T. Shimada, K. Ohkubo, Y. Iizuka, K. Inami, M. Mochizuki, S. Urano, S. Itoh, N. Miyata, and S. Fukuzumi, Effects of magnesium ion on kinetic stability and spin distribution of phenoxyl radical derived from a vitamin E analogues: mechanistic insight into antioxidative hydrogen transfer reaction of vitamin E, *J. Chem. Soc. Perkin 2* 1520-1524 (2002).
- 8) K. Fukuhara, I. Nakanishi, H. Kansui, E. Sugiyama, M. Kimura, T. Shimada, S. Urano, K. Yamaguchi, and N. Miyata, Enhanced radical-scavenging activity of a planar catechin analogue, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (21), 5952-5953 (2002).

F. 紹介記事

A safer antioxidant? *Science News*, **163**, 141 (2003)

分担研究報告書

紫外線による老化と遺伝毒性の解析

分担研究者 川西 正祐 三重大学医学部 衛生学講座 教授

研究要旨 紫外線量の増加に伴う生活環境の変化によって今後重篤な健康影響が懸念されるため、本研究事業では、分子遺伝学的手法、細胞工学的手法および物理化学的手法を駆使することによって、紫外線照射における健康影響の評価を行っている。平成 14 年度は、紫外線照射により、光発がんや光アレルギー性疾患等に関連すると思われる食品や医薬品、ビタミン類などの生活関連物質（キサントン類、葉酸、メトトレキサート）が生体内高分子（DNA 等）を酸化的に損傷する機構を明らかにした。

A. 研究目的

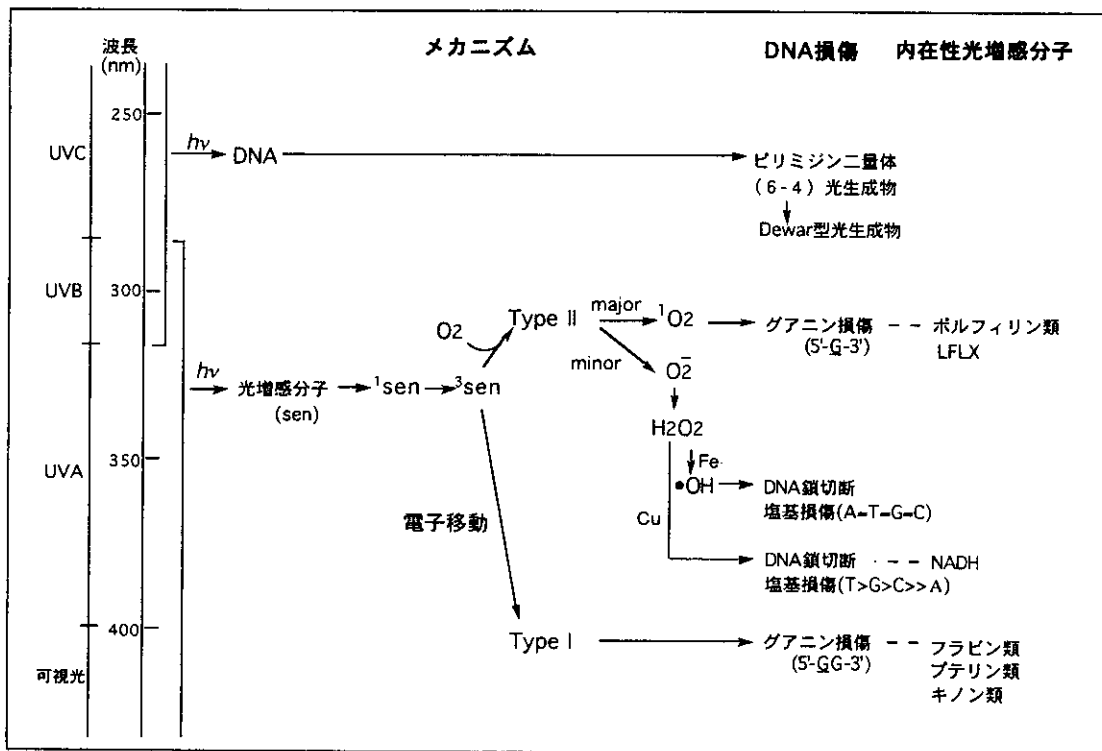
太陽紫外線による皮膚がんの発症には、DNA が吸収する UVB (280~320 nm) のみならず DNA に直接吸収されない UVA (320~400 nm) の寄与も報告されている。UVA による発がんには、細胞内に多数存在する色素分子の光増感作用を介した DNA 損傷が関与していると考えられる。光増感剤として働く物質には、内因性の物質の他、食物や医薬品等として摂取される外因性の物質も考えられる。DNA 損傷のメカニズムには、光誘起電子移動反応を介する機構 (Type I) および活性酸素（主に一重項酸素）生成を介する機構 (Type II) が良く知られている。これまで我々は、様々な光増感剤を用いた実験から、Type I では、連続した G (5'-GG の下線の G) が特異的に損傷され、Type II の一重項酸素生成では全ての G が損傷されることを明らかにしてきた (図 1)。この G の連続配列特異的な酸化は、GG の π - π スタックによる 5'-GG への

HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) の局在化とその準位の上昇で、5'-GG が高い電子ドナー性をもつ (Sugiyama H., Saito I. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7063) ことから説明できる。一方、光増感剤の DNA 損傷能力の理論的な評価は確立していない。光増感剤の DNA 損傷能力を簡単に予測することができれば、色素分子のリスク評価や太陽紫外線からの生体防御において重要な知見となり得る。

B. 研究方法

DNA 損傷機構や損傷の塩基特異性の解析は、ヒトがん原遺伝子 c-Ha-ras-1 及びがん抑制遺伝子 p53 や p16 から変異のホットスポットを含む 100~400 bp の断片をサブクローニングすることにより行った。これらのヒトがん関連遺伝子の DNA 断片の 5'末端を ^{32}P で標識し、各種光増感物質とともにリン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で UVA

図1 太陽紫外線による DNA 損傷のメカニズム



($\lambda_{\max}=365\text{ nm}$) を照射した後に電気泳動を行ない、DNA 損傷性を検討した。DNA 損傷の塩基配列特異性の解析には Maxam-Gilbert 法を応用し、オートラジオグラムをレーザーデンストメーターで定量化し解析した。さらに、酸化的 DNA 損傷のひとつである 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) の定量は電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) を用いて行った。化学物質の平衡構造および HOMO エネルギーは、HF/6-31G*法による分子軌道計算で求めた。

C. 研究結果

1) キサントン類による DNA 損傷機構

本研究では、薬草などに存在するキ

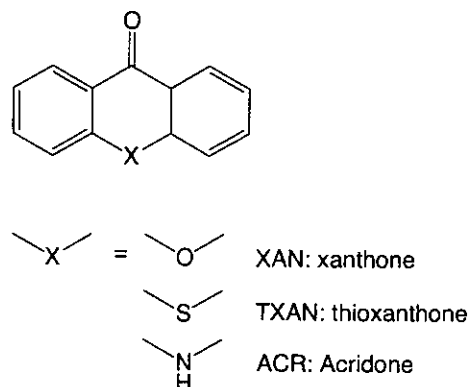


図2 薬草などに存在するキサントン類

サントン類 (図2) を外因性光増感剤の一つとして用い、UVA による DNA 損傷性やその塩基配列特異性の解明を行なった。さらに、分子軌道法計算により、これらの分子の HOMO エネルギーを計算し、DNA 損傷能力との相関を解析した。

実験には、 ^{32}P で標識したヒトが

ん関連遺伝子の DNA 断片を用いた。 ^{32}P -DNA とキサントンをリン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で、UVA ($\lambda_{\text{max}}=365\text{ nm}$) を 6 J/cm^2 照射した後に電気泳動を行ない、DNA 損傷性を検討した。また、Maxam-Gilbert 法の併用で DNA 損傷の塩基配列特異性を解析した。

その結果、GG の 5'-末端側の G (5'-GG) が特異的に損傷され、この DNA 損傷は G の酸化による 8-oxodG の生成であることが示された。さらに、8-oxodG の生成量を電気化学検出器付 HPLC で定量した結果、1 本鎖 DNA よりも 2 本鎖 DNA において生成量が明らかに増加した。これらの結果は、キサントンへの光誘起電子移動によって、2 本鎖 DNA の 5'-GG の下線の G がカチオンラジカルとなり、水和反応を経て 8-oxodG が生成することを示している。8-oxodG は C ではなく A と塩基対を形成することで G-C \rightarrow T-A transversion を引き起こすことが知られている。また、8-oxodG の酸化で生成するイミダゾロンは、G-C \rightarrow C-G transversion を引き起す可能性が報告されている。

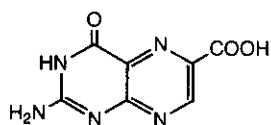
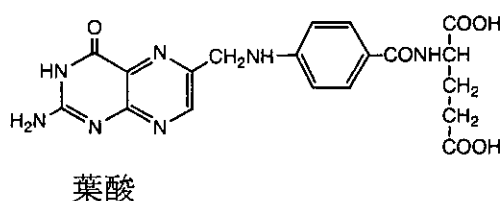
チオキサントン、アクリドンも同様のメカニズムで DNA を損傷したが、DNA 損傷の程度は、キサントン>チオキサントン>アクリドンの順であった。DNA 損傷は、これらの光増感剤への光誘起電子移動によって起こるため、光増感剤の HOMO エネルギーとの相関が考えられた。実際、分子軌道法計算で求めた HOMO エネルギーの増大に伴い、DNA 損傷の程度 (8-oxodG 生成の量子収率) は、指数関

数的に増大することが明らかになった。DNA 損傷に影響する他の要因 (項間交差効率、励起状態の寿命) を考慮しても DNA 損傷の程度は、主に HOMO エネルギーに依存していることが示された。本研究成果は、コンピュータを用いた色素分子の物性計算から、太陽紫外線による皮膚発がんのリスクを予測できる可能性を示すものである。

2) 葉酸による DNA 損傷機構

ビタミン B の一種である葉酸 (図 3) は、DNA 合成の原料となる色素分子であり、比較的多量に細胞内に存在する。また、UVA 領域に強い吸収帯をもち、皮膚細胞中においても太陽紫外線をよく吸収することも報告されている。このような性質から葉酸は、太陽紫外線の UVA による皮膚発がんに関与する内因性の光増感剤として必要な性質を備えていると考えられている。本研究では、細胞内光増感剤の一つとして葉酸に着目し、その光化学反応性と DNA 損傷性を検討した。

葉酸は容易に光分解し、プテリン-6-カルボン酸(PCA)を生成することが蛍光スペクトルと HPLC による分析から明らかとなった。 ^{32}P で標識したヒトがん関連遺伝子の DNA 断片と葉酸または PCA をリン酸緩衝液(pH 7.8)中で混合し、UVA ($\lambda_{\text{max}}=365\text{ nm}$) を照射すると、濃度依存的に DNA 損傷が引き起された。Maxam-Gilbert 法の併用で DNA 損傷の塩基配列特異性を解析したところ、葉酸および PCA は、それぞれ UVA 照射により、5'-GG, 5'-GGG 配列の下線部の G を選択的に損傷し、8-oxodG を生成する



プテリン-6-カルボン酸(PCA)

図3 ビタミン類の一種である葉酸とその光分解物

ことが明らかになった。8-oxodG 生成速度の解析から、光増感作用で DNA 損傷を引き起すのは、葉酸自身ではなく、光分解生成物の PCA であることが明らかになった。Type I のメカニズムに従い、DNA 塩基から光励起状態の PCA への電子移動と DNA 鎖のホール移動により酸化電位の低い連続した G がラジカルカチオンになることにより、水和反応を経て 8-oxodG が生成すると考えられる。8-oxodG やその関連生成物は、上述のように G-C→T-A transversion や G-C→C-G transversion を引き起す可能性があり、変異や発がんとの関与が報告されている。

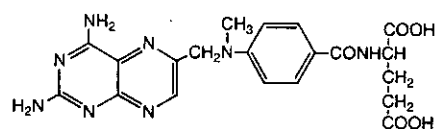
皮膚細胞中においても、葉酸は太陽紫外線の暴露で分解するため、本研究は、上記の分子機構が UVA による発がんに関与している可能性を示すものである。また、葉酸の過剰摂取が太陽紫外線の UVA による皮膚発がんのリ

スクを増大させる可能性を示している。

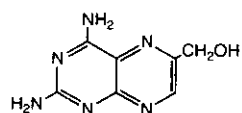
3) メトトレキサートによる DNA 損傷機構

メトトレキサート (MTX) (図4) は、葉酸の代謝拮抗剤としてがん治療に用いられているが、投与後の太陽紫外線暴露等による皮膚の炎症等の副作用が報告されている。MTX は、UVA 領域に吸収をもち、光毒性には UVA 吸収を介した光増感反応による生体高分子の損傷が関与していると考えられる。本研究では、MTX の光毒性の分子機構を標的分子に DNA を用いて検討した。

実験には、 ^{32}P で標識したヒトがん関連遺伝子の DNA 断片を用いた。 ^{32}P -DNA と MTX をリン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で、UVA (365 nm) を $6\text{ J}/\text{cm}^2$ 照射した後に電気泳動を行い、DNA 損傷性を検討した。また、Maxam-Gilbert 法を併用して DNA 損傷の塩



メトトレキサート (MTX)



2,4-ジアミノ-6-ヒドロキシメチルプテリジン (DHP)

図4 医薬品メトトレキサート (MTX) とその光分解物

基配列特異性を解析した。

葉酸と同様に、2本鎖 DNA の G の連続配列 (5'-GG および 5'-GGG) において下線部分の G が特異的に損傷されることが明らかになった。G の酸化生成物である 8-oxodG の生成量を電気化学検出器付 HPLC で定量した結果、1本鎖 DNA よりも2本鎖 DNA において生成量が著しく増加した。2本鎖 DNA 中の 5'-GG および 5'-GGG において下線部分の G が電子移動により特異的に酸化されやすいことから、UVA 照射された MTX により、光誘起電子移動を介した G の酸化が考えられる。

一方、MTX 自身は、ほとんど蛍光を発しないが、MTX への UVA 照射により蛍光性の物質が生成した。生成物は、光励起状態の MTX の分子内電子移動反応とそれに続く加水分解で生成した、2,4-ジアミノ-6-ヒドロキシメチルプテリジン (DHP) であることが HPLC と TOF-MS で確認された。DHP は、MTX と同様に DNA を損傷し、その程度は、MTX よりも著しく大きかった。HPLC で定量した DHP の生成速度と 8-oxodG 生成量の UVA 照射時間依存性のシミュレーションから MTX 自身は、DNA を損傷しないが、生成した DHP が UVA を吸収し、DNA 損傷を引き起こすことが明らかになった。本実験は、DNA を用いたものであるが、アミノ酸のトリプトファンは、G よりも Type I 機構で酸化され易く、同様のメカニズムでタンパク質の酸化的損傷が引き起こされる可能性も十分考えられる。MTX の光毒性は、光分解で生成する DHP

の光誘起電子移動を介した生体分子の酸化によることが考えられる。

D. 結論

以上の結果から、キサントン類および、葉酸と MTX の光分解生成物は、光誘起電子移動によるラジカル生成反応を介して、DNA をはじめとする生体高分子を損傷することが明らかとなった。従って、がんやアレルギーなどの重篤な健康影響は、地球環境の悪化による紫外線量の増加が生活関連化学物質を活性化させて発症することが予測される。さらに、紫外線は発がんのみならず免疫系の異常を引き起こすことから紫外線量の増加による各種疾患の増加も懸念される。

来年度以降は、紫外線照射によるラジカル消去効果を検討することにより、紫外線を用いたがん予防へと発展させるため、キサントン誘導体やローダミン誘導体を用いて UVA と細胞内光増感剤による DNA 損傷の抑制効果を解析し、太陽紫外線発がんの化学予防法について検討する。

E. 論文発表

- 1) S. Oikawa, K. Murakami, S. Kawanishi, Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis, *Oncogene* (in press).
- 2) K. Hirakawa, K. Yoshida, S. Oikawa, S. Kawanishi, Base Oxidation at 5' Site of GG Sequence in Double-

- stranded DNA Induced by UVA in the Presence of Xanthone Analogues: Relationship between the DNA-damaging Abilities of Photosensitizers and Their HOMO Energies, *Photochem Photobiol.* (in press).
- 3) K. Hirakawa, K. Midorikawa, S. Oikawa, S. Kawanishi, Carcinogenic semicarbazide induces sequence-specific DNA damage through the generation of reactive oxygen species and the derived organic radicals, *Mutat. Res.* (in press).
 - 4) K. Hirakawa, H. Suzuki, S. Oikawa, S. Kawanishi, Sequence-specific DNA damage induced by ultraviolet A-irradiated folic acid via its photolysis product, *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 261-268 (2003).
 - 5) K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, S. Kawanishi, Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage., *Free Radic. Biol. Med.* 33, 703-714 (2002).
 - 6) S. Ohnishi, M. Murata, S. Kawanishi, DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation-associated carcinogenesis, *Cancer Lett.* 178, 37-42 (2002).
 - 7) Y. Hiraku, M. Murata, S. Kawanishi, Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay, *Biochim. Biophys. Acta.* 1570, 47-52 (2002).
 - 8) S. Kawanishi, Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa, The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis, *Free Radic. Biol. Med.* 32, 822-832 (2002). Review.
 - 9) M. Murata, S. Kawanishi, Oxidation of 5'-site guanine at GG and GGG sequences induced by a metabolite of carcinogenic heterocyclic amine PhIP in the presence of Cu(II) and NADH, *Carcinogenesis* 23, 855-860 (2002).
 - 10) H. Mizutani, S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, S. Oikawa, M. Kojima, S. Kawanishi, Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 277, 30684-30689 (2002).
 - 11) S. Ohnishi, M. Murata, S. Kawanishi, Oxidative DNA Damage Induced by a Metabolite of 2-Naphthylamine, a Smoking-related Bladder Carcinogen, *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 736-743 (2002).
 - 12) S. Homma-Takeda, Y. Hiraku, Y. Ohkuma, S. Oikawa, M. Murata, K. Ogawa, T. Iwamuro, S. Li, G.F. Sun, Y. Kumagai, N. Shimojo, S. Kawanishi, 2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite, *Free Radic. Res.* 36, 555-566 (2002).
 - 13) K. Midorikawa, K. Hirakawa, S. Kawanishi, Hydroxylation of deoxyguanosine at 5' site of GG and GGG sequences in double-stranded DNA induced by carbamoyl radicals,

- Free Radic. Res.* 36, 667-675 (2002).
- 14) S. Oikawa, Y. Hiraku, T. Fujiwara, I. Saito, S. Kawanishi, Site-specific hydroxylation at polyguanosine in double-stranded DNA by nickel(II) in the presence of SH compounds: comparison with singlet oxygen-induced DNA damage, *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1017-1022 (2002).
 - 15) K. Sakano, S. Kawanishi, Metal-mediated DNA damage induced by curcumin in the presence of human cytochrome P450 isozymes, *Arch. Biochem. Biophys.* 405, 223-230 (2002).
 - 16) M. Kawanishi, S. Tada-Oikawa, S. Kawanishi, Epstein-Barr virus BHRF1 functions downstream of Bid cleavage and upstream of mitochondrial dysfunction to inhibit TRAIL-induced apoptosis in BJAB cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 297, 682-687 (2002).
 - 17) M. Murata, Y. Yoshiki, M. Tada, S. Kawanishi, Oxidative DNA damage by a common metabolite of carcinogenic nitrofluorene and N-acetylaminofluorene, *Int J Cancer* 102, 311-317 (2002).
 - 18) S. Kawanishi, S. Oikawa, S. Inoue, K. Nishino, Distinct mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic nickel subsulfide and nickel oxides, *Environ Health Perspect.* 110, 789S-791S (2002).
 - 19) K. Hirakawa, M. Aoshima, Y. Hiraku, S. Kawanishi, Photohydrolysis of methotrexate produces pteridine, which induces poly-G-specific DNA damage through photoinduced electron transfer, *Photochem Photobiol.* 76, 467-472 (2002).
 - 20) S. Ohnishi and S. Kawanishi, Double Base Lesions of DNA by a Metabolite of Carcinogenic Benzo[a]pyrene, *Biochem Biophys Res Commun.*, 290, 778-82 (2002).
 - 21) K. Hirakawa, S. Oikawa, Y. Hiraku, I. Hirose and S. Kawanishi, Catechol and Hydroquinone Have Different Redox Properties Responsible for Their Differential DNA-damaging Ability, *Chem Res Toxicol.* , 15, 76-82 (2002).
 - 22) Y. Hiraku, S. Oikawa, S. Kawanishi, Distamycin A, a minor groove binder, changes endiyn-induced DNA cleavage sites and enhances apoptosis, *Nucleic Acids Research Supplement No.2* 95-96 (2002)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
I. Nakanishi, Y. Uto, K. Ohkubo, K. Miyazaki, H. Yakumaru, S. Urano, H. Okuda, J. Ueda, T. Ozawa, <u>K. Fukuhara</u> , S. Fukuzumi, H. Nagasawa, H. Hori, N. Ikota	Efficient radical scavenging ability of artemisinin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism	Org. Biomol. Chem.			in press
K. Saeki, T. Matsuda, T. Kato, K. Yamada, T. Mizutani, S. Matsui, <u>K. Fukuhara</u> , and N. Miyata	Activation of the Human Ah Receptor by Aza-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Halogenated Derivatives	Biol. Pharm. Bull.			in press
<u>K. Fukuhara</u> , I. Nakanishi, T. Shimada, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, N. Ikota, T. Ozawa, H. Okuda, N. Miyata, and S. Fukuzumi	A Planar Catechin Analogue as a Promising Antioxidant with Reduced Prooxidant Activity	Chem. Res. Toxicol.	16	81 - 86	2003
A. Matsuoka, K. Takeshita, A. Furuta, M. Ozaki, <u>K. Fukuhara</u> and Naoki Miyata	The 4' hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol (3,5,4'-trihydroxy- <i>trans</i> -stilbene)	Mutation Res.	521	29 - 35	2002
I. Nakanishi, K. Miyazaki, T. Shimada, K. Ohkubo, S. Urano, N. Ikota, T. Ozawa, S. Fukuzumi, <u>K. Fukuhara</u>	Effects of metal ions distinguishing between one-step hydrogen- and electron-transfer mechanisms for the radical-scavenging reaction of (+)-catechin	J. Phys. Chem. A,	106	11123-11126	2002
<u>K. Fukuhara</u> , Y. Naito, Y. Sato, I. Nakanishi, N. Miyata	Generation of oxygen radicals and DNA-cleaving ability in quinone/NADH system	Magnetic Resonance in Medicine	13	139 - 142	2002
I. Nakanishi, <u>K. Fukuhara</u> , T. Shimada, K. Ohkubo, Y. Iizuka, K. Inami, M. Mochizuki, S. Urano, S. Itoh, N. Miyata, and S. Fukuzumi	Effects of magnesium ion on kinetic stability and spin distribution of phenoxyl radical derived from a vitamin E analogues: mechanistic insight into antioxidative hydrogen transfer reaction of vitamin E	J. Chem. Soc. Perkin 2		1520 - 1524	2002
<u>K. Fukuhara</u> , I. Nakanishi, H. Kansui, E. Sugiyama, M. Kimura, T. Shimada, S. Urano, K. Yamaguchi, and N. Miyata	Enhanced radical-scavenging activity of a planar catechin analogue	J. Am. Chem. Soc.,	124	5952 - 5953	2002
S. Oikawa, K. Murakami, <u>S. Kawanishi</u>	Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis	Oncogene			in press
K. Hirakawa, K. Yoshida, S. Oikawa, <u>S. Kawanishi</u>	Base Oxidation at 5' Site of GG Sequence in Double-stranded DNA Induced by UVA in the Presence of Xanthone Analogues: Relationship between the DNA-	Photochem Photobiol.			in press

	damaging Abilities of Photosensitizers and Their HOMO Energies				
K. Hirakawa, K. Midorikawa, S. Oikawa, <u>S. Kawanishi</u>	Carcinogenic semicarbazide induces sequence-specific DNA damage through the generation of reactive oxygen species and the derived organic radicals	Mutat. Res.			in press
K. Hirakawa, H. Suzuki, S. Oikawa, <u>S. Kawanishi</u>	Sequence-specific DNA damage induced by ultraviolet A-irradiated folic acid via its photolysis product	Arch. Biochem. Biophys.	410	261 - 268	2003
K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, <u>S. Kawanishi</u>	Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage.,	Free Radic. Biol. Med.	33	703 - 714	2002
S. Ohnishi, M. Murata, <u>S. Kawanishi</u>	DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation-associated carcinogenesis	Cancer Lett.	178	37 - 42	2002
Y. Hiraku, M. Murata, <u>S. Kawanishi</u>	Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay	Biochim. Biophys. Acta.	1570	47 - 52	2002
<u>S. Kawanishi</u> , Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa	The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis	Free Radic. Biol. Med.	32	822 - 832	2002
M. Murata, <u>S. Kawanishi</u>	Oxidation of 5'-site guanine at GG and GGG sequences induced by a metabolite of carcinogenic heterocyclic amine PhIP in the presence of Cu(II) and NADH	Carcinogenesis	23	855 - 860	2002
H. Mizutani, S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, S. Oikawa, M. Kojima, <u>S. Kawanishi</u>	Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide	J. Biol. Chem.	277	30684 - 30689	2002
S. Ohnishi, M. Murata, <u>S. Kawanishi</u>	Oxidative DNA Damage Induced by a Metabolite of 2-Naphthylamine, a Smoking-related Bladder Carcinogen	Jpn. J. Cancer Res.	93	736 - 743	2002
S. Homma-Takeda, Y. Hiraku, Y. Ohkuma, S. Oikawa, M. Murata, K. Ogawa, T. Iwamuro, S. Li, GF. Sun, Y. Kumagai, N. Shimojo, <u>S. Kawanishi</u>	2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite	Free Radic. Res.	36	555 - 566	2002
K. Midorikawa, K. Hirakawa, <u>S. Kawanishi</u>	Hydroxylation of deoxyguanosine at 5' site of GG and GGG sequences in double-stranded DNA induced by carbamoyl radicals	Free Radic. Res.	36	667 - 675	2002
S. Oikawa, Y. Hiraku, T. Fujiwara, I. Saito, <u>S. Kawanishi</u>	Site-specific hydroxylation at polyguanosine in double-stranded DNA by nickel(II) in the presence of SH compounds: comparison with singlet oxygen-induced DNA damage	Chem. Res. Toxicol.	15	1017 - 1022	2002

K. Sakano, S. <u>Kawanishi</u>	Metal-mediated DNA damage induced by curcumin in the presence of human cytochrome P450 isozymes	<i>Arch. Biochem. Biophys.</i>	405	223 - 230	2002
M. Kawanishi, S. Tada-Oikawa, S. <u>Kawanishi</u>	Epstein-Barr virus BHRF1 functions downstream of Bid cleavage and upstream of mitochondrial dysfunction to inhibit TRAIL-induced apoptosis in BJAB cells	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	297	682 - 687	2002
M. Murata, Y. Yoshiki, M. Tada, S. <u>Kawanishi</u>	Oxidative DNA damage by a common metabolite of carcinogenic nitrofluorene and N-acetylaminofluorene	<i>Int J Cancer</i>	102	311 - 317	2002
S. <u>Kawanishi</u> , S.Oikawa, S. Inoue, K. Nishino	Distinct mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic nickel subsulfide and nickel oxides	<i>Environ Health Perspect.</i>	110	789S - 791S	2002
K. Hirakawa, M. Aoshima, Y. Hiraku, S. <u>Kawanishi</u>	Photohydrolysis of methotrexate produces pteridine, which induces poly-G-specific DNA damage through photoinduced electron transfer	<i>Photochem Photobiol.</i>	76	467 - 472	2002
S. Ohnishi and S. <u>Kawanishi</u>	Double Base Lesions of DNA by a Metabolite of Carcinogenic Benzo[a]pyrene	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	290	778 - 782	2002
K. Hirakawa, S. Oikawa, Y. Hiraku, I. Hirose and S. <u>Kawanishi</u>	Catechol and Hydroquinone Have Different Redox Properties Responsible for Their Differential DNA-damaging Ability	<i>Chem Res Toxicol.</i>	15	76 - 82	2002
Y. Hiraku, S. Oikawa, S. <u>Kawanishi</u>	Distamycin A, a minor groove binder, changes endyneinduced DNA cleavage sites and enhances apoptosis	<i>Nucleic Acids Reseach Supplement No.2</i>		95 - 96	2002

研究成果の刊行物・別刷