

D. 考察

紫外線照射によって発生した活性酸素やフリーラジカルは遺伝子や脂質などの生体高分子に対して酸化損傷反応を誘発する。また、環境化学物質や医薬品の中には紫外線照射によって励起されると酸素を活性化して生体高分子を損傷することがある。従って、紫外線による健康影響の予防する為には、紫外線照射によって発生する活性酸素やフリーラジカルを消去することが必要である。本研究では天然抗酸化剤のラジカル消去活性に注目し、予防目的として積極的に利用が可能な化合物へと天然抗酸化剤を誘導化することを検討した。今年度は葡萄果皮に含まれているレスベラトロールの生活習慣病予防に有効な多様な薬理活性、および遺伝毒性に着目し、抗酸化活性の増強と遺伝毒性の軽減を目的として 4'位のオルト位にメチル基を導入したレスベラトロール誘導体を合成した。レスベラトロールはスチルベン構造のオレフィン部分で構造を A 環と B 環の二つのベンゼン誘導体に分けることができる。今回は A 環としてレスベラトロール骨格の 3,5-ジヒドロキシ誘導体およびそのメチル体を合成し、B 環としては 4-ヒドロキシ誘導体とその 3-メチル体および 3,5-ジメチル体を合成し、それぞれを Wittig-Honer 反応によって反応させることによって、レスベラトロールと 5 種類のメチル誘導体を合成することに成功した。

これらの化合物のガルビノキシルラジカルに対する抗酸化活性を解析した。これら誘導体の抗酸化能はメチル基の付加位置と数によって異なるが、3'位

のメチル誘導体 **2** はレスベラトロールの 14 倍のラジカル消去能を示すなど、いずれの誘導体もメチル基の超共役作用によってレスベラトロールよりも強い抗酸化能を示し、メチル基の導入は抗酸化活性の増強に有効であることがわかった。

カテキンおよびケルセチンのガルビノキシルラジカルに対する k_{HT} は、それぞれ $3.9 \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と $4.7 \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であることからレスベラトロールのメチル誘導体の抗酸化力は代表的な天然抗酸化剤よりも強力であり、特に化合物 **5** はカテキンのラジカル消去能の増強を目的として合成した平面型カテキン ($k_{\text{HT}} = 1.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) よりも強力なラジカル消去能を示すことから非常に優れた抗酸化剤であることがわかった。

レスベラトロールの 4'位の水酸基の位置異性体である 3,5,3'-トリヒドロキシスチルベンは遺伝毒性が大きく低下する。しかしながら抗酸化能も殆ど消失してしまうことから、毒性軽減の為にはレスベラトロールの水酸基の付加位置を維持した形での誘導化が必要である。今回合成した化合物 **2** ~ **6** は 4'位の水酸基のオルト位にメチル基が導入されている為、4'位の水酸基の DNA や毒性発現に関係しているレセプター分子との相互作用が弱くなることによって毒性が軽減されることが予測される。特に化合物 **3** と **5** は毒性発現にも関係している 4'位水酸基がオルト位 (3'-および 5'-) のメチル基に挟まれていることから、安全な優れた抗酸化剤であることが予測された。今後は遺伝子発現パターンを解析する

ことによって遺伝子レベルでの評価をおこない、毒性軽減を目的とした修飾法としてメチル誘導化の有効性について検討する予定である。

E. 結論

レスベラトロールの毒性軽減と抗酸化能の増強を目的とした誘導化を行った。誘導化法としてはビタミンEの構造を参考にして水酸基のオルト位へのメチル基の導入を検討し、Wittig-Honer 反応によってメチルレスベラトロールを新規に5種類合成した。抗酸化能を解析した結果、レスベラトロールの4'位水酸基のオルト位にメチル基を導入すると抗酸化能が飛躍的に増強することがわかった。特に4,3',5'-トリメチルレスベラトロールの抗酸化活性は非常に強力であり、本化合物は毒性発現にも関係している4'位水酸基がオルト位(3'-および5'-)のメチル基に挟まれていることから、安全な優れた抗酸化剤であることが予測された。

以上、レスベラトロールはメチル基の導入によって抗酸化活性と毒性を軽減できることが可能であり、紫外線による健康影響の予防物質としての利用が期待された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S.

Fukuzumi, and N. Ikota, Electron-Transfer Mechanism in Radical-Scavenging Reactions by a Vitamin E Model in a Protic Medium, *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 626 – 629 (2005).

2) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Fuikuhara, H. Kanazawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, T. Ozawa, and N. Ikota, Water-accelerated radical-scavenging reaction of (+)-catechin in an aprotic medium, *ITE Lett. Batt. New Tech. Med.*, **5**, 585 - 588 (2004).

3) M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata and S. Kawanishi, Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 1750 – 1756 (2004).

4) N. Sera, H. Tokiwa, H. Utsumi, S. Sasaki, K. Fukuhara, N. Miyata, Association between Chemical properties and oxidative damage due to nitrophenanthrenes and their related compounds in primary rat hepatocytes, *Polycycl. Aromat. Comp.*, **24**, 487 – 500 (2004)

5) I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota, EPR study on stable magnesium complexes of phenoxyl radicals derived from a vitamin E model and its deuterated derivatives, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 1741-1744(2004).

6) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, A planar catechin analogue having a more negative oxidation potential than (+)-catechin as an electron-transfer antioxidant against a peroxy radical, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 26-31(2004).

7) A. Matsuoka, C. Lundin, F. Johansson, M.

Sahlin, K. Fukuhara, B-M Sjoberg, D. Jenssen, A. Onfelt, Correlation of sister chromatid exchange formation through homologous recombination with ribonucleotide reductase inhibition. *Mutat. Res.* **547**, 101-107(2004).

2. 学会発表

- 1) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 川島知憲, 袴田 航, 増田 雄, 奥 忠武, 金澤秀子, 浦野四郎, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏、天然フラボノイドの立体構造固定による抗酸化作用の増強、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)
- 2) 川村義彦、石井明子、川崎ナナ、浦野四郎、川西 徹、奥田晴宏、福原 潔、平面型カテキンの細胞増殖阻害作用、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)
- 3) 中西郁夫, 川島知憲, 栗丸晴子, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、カテキンによるラジカル消去反応は水によって加速される、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)
- 4) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、塩基存在下におけるビタミンE類縁体のラジカル消去反応、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)
- 5) 中西郁夫, 栗丸晴子, 川島知憲, 大久保 敬, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、分子内にピリジン骨格を有するビタミンE誘導体の合成とラジカル消去活性、日本化学会第 85 春季年会, 神奈川大学(2005, 3)

- 6) 中西郁夫, 川島知憲, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、ビタミンE類縁体によるラジカル消去反応に対する塩基触媒作用、第 16 回ビタミンE研究会, 山口(2005, 1)
- 7) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 川村義彦, 小原美紀, 松村友博, 川島知憲, 金澤秀子, 斎藤慎一, 浦野四郎, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏、生活習慣病の予防および治療物質としての平面型カテキン誘導体の可能性、第 19 回日本フリーラジカル学会関東支部会, 共立女子大(2004, 12)
- 8) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、抗酸化剤のラジカル消去反応における塩基触媒作用、第 19 回日本フリーラジカル学会関東支部会, 共立女子大(2004, 12)
- 9) I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota, and T. Ozawa. ESR Study on Stable Magnesium Complexes of the Phenoxy Radical Derived from a Vitamin E Model and Its Deuterated Derivatives. 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, Novemer 17-21 (2004)
- 10) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, H. Okuda, T. Ozawa, S. Fukuzumi, K. Fukuhara, and N. Ikota. Solvent Effect on the Mechanism of Radical-Scavenging Reactions of a Vitamin E Analogue. 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, Novemer 17-21 (2004)

- 11) I. Nakanishi, N. Ikota, T. Kawashima, H. Yakumaru, H. Kanazawa, H. Okuda, Kazunori A., T. Ozawa, and K. Fukuhara. Radical-Scavenging Activities of Lipophilic Planar Catechin Derivatives, 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, November 17-21 (2004)
- 12) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保 敬, 飯塚優子, 稲見圭子, 望月正隆, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏、フェノール性抗酸化剤のラジカル消去機構、第 33 回日本環境変異原学会、第 18 回日本動物実験代替法学会合同大会、長崎 (2004, 11)
- 13) 福原 潔, 中西郁夫, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, Sidney M. Hecht、N-オキシド化合物からの活性酸素生成機構の解析、第 37 回酸化反応討論会、大阪 (2004, 11)
- 14) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 薬丸晴子, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏、小澤俊彦, 福住俊一、伊古田暢夫、フェノール性抗酸化剤の酸化反応に対する溶媒効果、第 37 回酸化反応討論会、大阪 (2004, 11)
- 15) 福原 潔, 中西郁夫, 川島知憲, 金澤秀子, 小澤俊彦、伊古田暢夫、奥田晴宏、平面型カテキン誘導体の抗酸化能の解析、第 43 回電子スピンスイェンス学会年会、東京 (2004, 11)
- 16) 福原 潔、中西郁夫、袴田 航、川島知憲、今井耕平、金澤秀子、浦野四朗、小澤俊彦、伊古田暢夫、奥田晴宏、がん予防を目的とした天然カテキンの誘導化、第 11 回日本がん予防研究会、東京 (2004, 7)
- 17) 福原 潔、中西郁夫、袴田 航、川島知憲、今井耕平、金澤秀子、浦野四朗、小澤俊彦、宮田直樹、伊古田暢夫、奥田晴宏、脂溶性平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化能、第 26 回日本フリーラジカル学会、山形 (2004, 6)
- 18) 福原 潔、中西郁夫、小澤俊彦、伊古田暢夫、宮田直樹、奥田晴宏、Sydney M. Hecht、N-オキシドの化学- 嫌氣的条件下でのヒドロキシルラジカルの生成と DNA 切断活性-、第 26 回日本フリーラジカル学会、山形 (2004, 6)
- 19) 中西郁夫, 川島知憲, 宇都義浩, 大久保 敬, 薬丸晴子, 田草川光子, 金澤秀子, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 永沢秀子, 福住俊一, 堀 均, 伊古田暢夫、アルテピリン C によるラジカル消去反応の速度論的解析、第 26 回日本フリーラジカル学会、山形 (2004, 6)
- 8) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota. Electron-Transfer Mechanism in Radical-Scavenging Reactions by a Vitamin E Model in a Protic Medium. *Org. Biomol. Chem.*, 3, 626 – 629 (2005).
- 9) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Fukuhara, H. Kanazawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, T. Ozawa, and N. Ikota, Water-accelerated radical-scavenging reaction of (+)-catechin in an aprotic medium. *ITE Lett. Batt. New Tech. Med.*, 5, 585 - 588 (2004).
- 10) I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota, EPR study on stable magnesium complexes of phenoxy radicals derived from a vitamin E model and its deuterated derivatives. *Bull.*

Chem. Soc. Jpn., **77**, 1741-1744(2004).

11) I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara. A planar catechin analogue having a more negative oxidation potential than (+)-catechin as an electron-transfer antioxidant against a peroxy radical. *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 26-31(2004).

12) Okada E., Komazawa Y., Kurihara. M., Inoue H., Miyata N., Okuda H., Tsuchiya T., and Yamakoshi Y., Synthesis of C60 derivatives for photoaffinity labeling. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 527-529 (2004).

2. 学会発表

20) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 川島知憲, 袴田 航, 増田 雄, 奥 忠武, 金澤秀子, 浦野四郎, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏、天然フラボノイドの立体構造固定による抗酸化作用の増強、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)

21) 川村義彦、石井明子、川崎ナナ、浦野四郎、川西 徹、奥田晴宏、福原 潔、平面型カテキンの細胞増殖阻害作用、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)

22) 中西郁夫, 川島知憲, 薬丸晴子, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、カテキンによるラジカル消去反応は水によって加速される、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)

23) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、塩基存在下におけるビタミンE類縁体のラジカル消去反

応、日本薬学会第 125 年会, 東京臨海副都心(2005, 3)

24) 中西郁夫, 薬丸晴子, 川島知憲, 大久保 敬, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、分子内にピリジン骨格を有するビタミンE誘導体の合成とラジカル消去活性、日本化学会第 85 春季年会, 神奈川大学(2005, 3)

25) 中西郁夫, 川島知憲, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、ビタミンE類縁体によるラジカル消去反応に対する塩基触媒作用、第 16 回ビタミンE研究会, 山口(2005, 1)

26) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 川村義彦, 小原美紀, 松村友博, 川島知憲, 金澤秀子, 斎藤慎一, 浦野四郎, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏、生活習慣病の予防および治療物質としての平面型カテキン誘導体の可能性、第 19 回日本フリーラジカル学会関東支部会, 共立女子大(2004, 12)

27) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 福原 潔, 金澤秀子, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫、抗酸化剤のラジカル消去反応における塩基触媒作用、第 19 回日本フリーラジカル学会関東支部会, 共立女子大(2004, 12)

28) I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota, and T. Ozawa. ESR Study on Stable Magnesium Complexes of the Phenoxy Radicals Derived from a Vitamin E Model and Its Deuterated Derivatives. 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM). St. Thomas, US Virgin Islands, November 17-21 (2004)

- 29) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, H. Okuda, T. Ozawa, S. Fukuzumi, K. Fukuhara, and N. Ikota, Solvent Effect on the Mechanism of Radical-Scavenging Reactions of a Vitamin E Analogue, 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, Novemer 17-21 (2004)
- 30) I. Nakanishi, N. Ikota, T. Kawashima, H. Yakumaru, H. Kanazawa, H. Okuda, Kazunori A., T. Ozawa, and K. Fukuhara, Radical-Scavenging Activities of Lipophilic Planar Catechin Derivatives, 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), St. Thomas, US Virgin Islands, Novemer 17-21 (2004)
- 31) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保 敬, 飯塚優子, 稲見圭子, 望月正隆, 福住俊一, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, フェノール性抗酸化剤のラジカル消去機構、第 33 回日本環境変異原学会、第 18 回日本動物実験代替法学会合同大会, 長崎 (2004, 11)
- 32) 福原 潔, 中西郁夫, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, Sidney M. Hecht、N-オキシド化合物からの活性酸素生成機構の解析、第 37 回酸化反応討論会, 大阪 (2004, 11)
- 33) 中西郁夫, 川島知憲, 大久保 敬, 薬丸晴子, 金澤秀子, 福原 潔, 奥田晴宏, 小澤俊彦, 福住俊一, 伊古田暢夫, フェノール性抗酸化剤の酸化反応に対する溶媒効果、第 37 回酸化反応討論会, 大阪 (2004, 11)
- 34) 福原 潔, 中西郁夫, 川島知憲, 金澤秀子, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 平面型カテキン誘導体の抗酸化能の解析、第 43 回電子スピンスイェンス学会年会, 東京 (2004, 11)
- 35) 福原 潔, 中西郁夫, 袴田 航, 川島知憲, 今井耕平, 金澤秀子, 浦野四朗, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, がん予防を目的とした天然カテキンの誘導化、第 11 回日本がん予防研究会, 東京 (2004, 7)
- 36) 福原 潔, 中西郁夫, 袴田 航, 川島知憲, 今井耕平, 金澤秀子, 浦野四朗, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏, 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成と抗酸化能、第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形 (2004, 6)
- 37) 福原 潔, 中西郁夫, 小澤俊彦, 伊古田暢夫, 宮田直樹, 奥田晴宏, Sydney M. Hecht、N-オキシドの化学- 嫌氣的条件下でのヒドロキシルラジカルの生成と DNA 切断活性-、第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形 (2004, 6)
- 38) 中西郁夫, 川島知憲, 宇都義浩, 大久保 敬, 薬丸晴子, 田草川光子, 金澤秀子, 奥田晴宏, 福原 潔, 小澤俊彦, 永沢秀子, 福住俊一, 堀 均, 伊古田暢夫, アルテピリンCによるラジカル消去反応の速度論的解析、第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形 (2004, 6)

H. 知的財産権の出願・登録状況 登録および登録予定共になし。

分担研究報告書

分担研究課題：紫外線による遺伝毒性と老化促進機構の解明とその予防

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 本研究事業では、分子遺伝学的手法、細胞工学的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。本年度は、紫外線照射により、光発がんを引き起こす環境化学物質（農薬に用いられているメルカプトベンゾチアゾール）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。また、昨年度、本研究事業で紫外線による健康への悪影響の予防を目的とし、光増感反応による DNA 損傷に対する新しい防護法を開発した。今年度は紫外線による遺伝毒性の解析結果を基に、紫外線の有効利用の観点から、光線力学療法に応用可能な光増感剤の探索も合わせて行った。

A. 研究目的

近年の急速な環境破壊、特にオゾン層の破壊によって生じる過剰な紫外線の被曝により、発がんや光過敏症などの疾病の増加が懸念される。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)。平成 14 年度では、薬草などに存在するキサントン類およびビタミン類の葉酸、医薬品として用いられているメトトレキサートの光分解生成物は、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を明らかにした。また、平成 15 年度では、化粧品や食品添加物、抗菌剤として使用されている酸化チタン、医薬品として用いられているベルベリン、色素分子のローダミン類による DNA 損傷性とその機構について解明を行った。さらに、紫外線による健康への悪影響の予防を目的とし、光増感反応による DNA 損傷に対するキサントン誘導体を用いた新しい防護法を開発した。本 16 年度は、農薬に用いられているメルカプトベンゾチアゾールが、紫外線 (UVA) 照射により、DNA

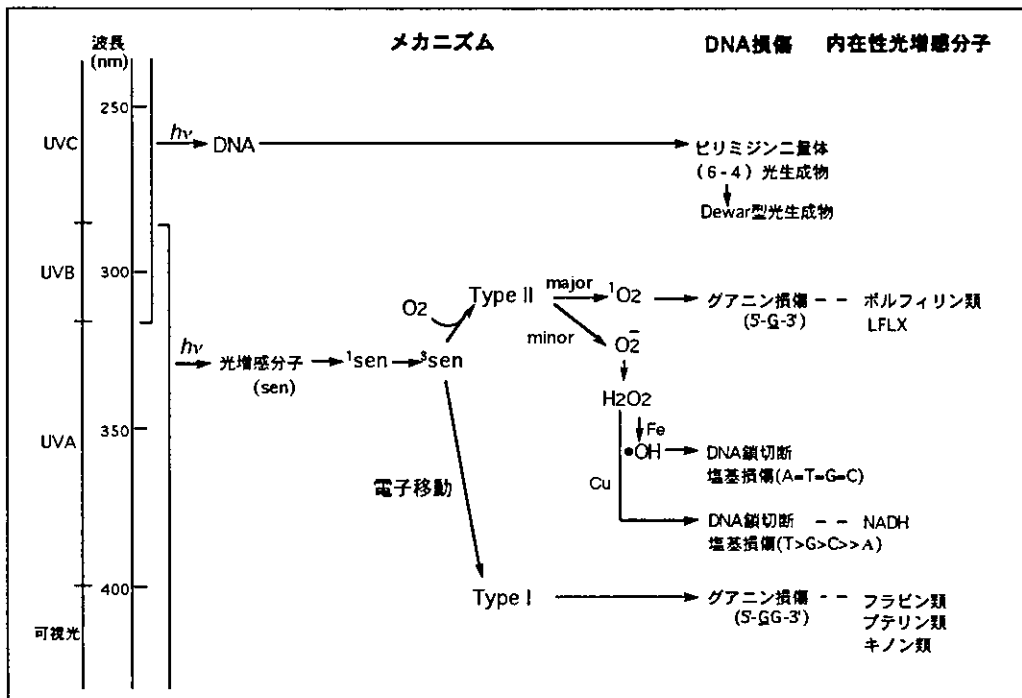


図1 太陽紫外線によるDNA損傷機構

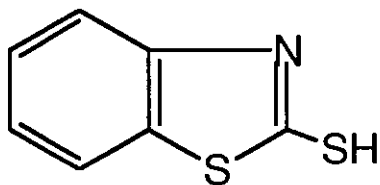


図2 2-メルカプトベンゾチアゾールの構造式

付加体を形成するという全く新しい機構を明らかにした。加えて、ポルフィリン類やアルカロイド類の光増感反応によるDNA損傷機構を解明し、光線力学療法への応用の可能性を検討した。

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 ($\lambda_{\text{max}}=365 \text{ nm}$) 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itomーターで定量化し解析した。さらに、酸化的DNA損傷の指標のひとつである 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。

C. 研究結果と考察

I. 紫外線照射による光増感物質を介

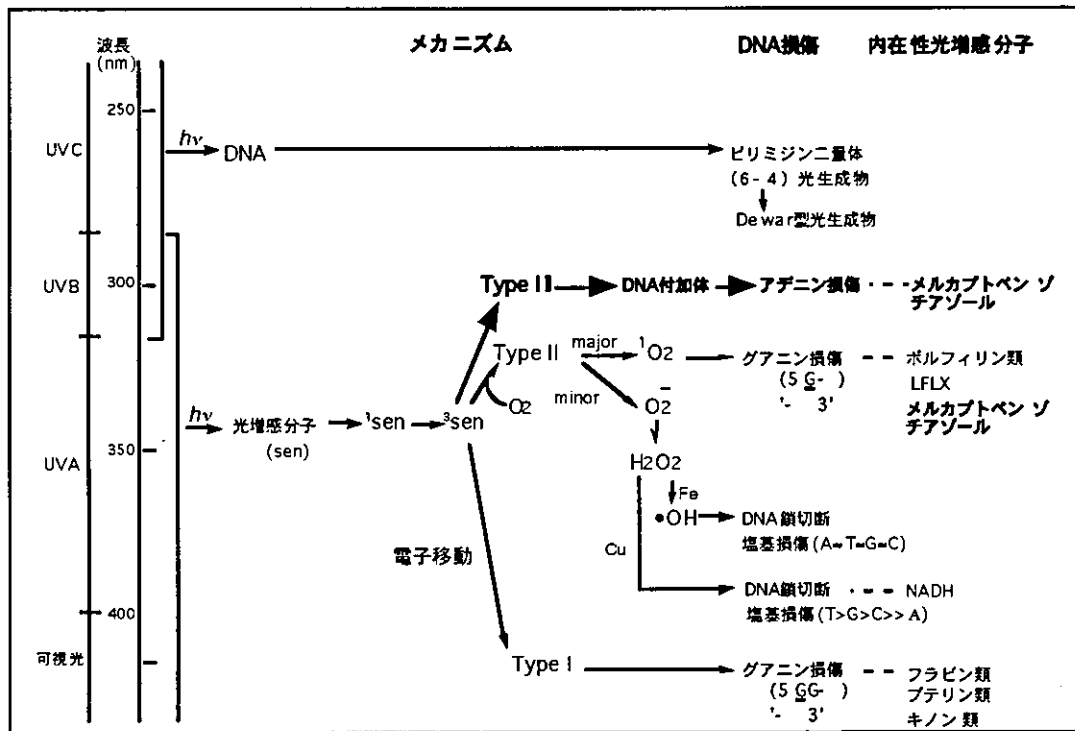


図3 メルカプトベンゾチアゾールによる DNA 損傷機構

した DNA 損傷

(1) メルカプトベンゾチアゾールによる塩基配列特異的 DNA 損傷

メルカプトベンゾチアゾール (図2) はポストハーベストとして用いられている。また、ゴムの加硫過程の促進剤としても使用されている。National Toxicology Program は、動物実験においてメルカプトベンゾチアゾールがラットやマウスに腫瘍を引き起こすことを報告している。しかし、その発がん機構は未だ不明である。本研究では、太陽紫外線に注目し、特に UVA 照射におけるメルカプトベンゾチアゾールによる塩基配列特異的 DNA 損傷とその機構を検討した。

その結果、UVA 照射下においてメルカプトベンゾチアゾールは、一本鎖

DNA において、濃度依存的に DNA を損傷した。この損傷はピペリジン処理により増強されたことから、DNA 鎖の切断とともに塩基の損傷も起こることが明らかになった。さらに、UVA 照射下メルカプトベンゾチアゾールによる損傷は Dabco などにより一部抑制されたことから活性種として一重項酸素が関わっている事が示唆された。DNA 損傷の塩基特異性は、グアニンとアデニンが損傷された。飛行時間型質量分析計 (MALDI TOF-mass) を用いて解析した結果、メルカプトベンゾチアゾールとアデニンの付加体が検出された。これらの結果から、グアニンは一重項酸素により、また、アデニンは付加体形成により損傷されることが示唆された。今まで、光増感剤による DNA 損傷機構

として電子移動を介する Type I と活性酸素の生成を介する Type II が報告されていたが、本研究において付加体形成という新しい経路 (Type III) が存在することが明らかになった (図 3)。

I I. 光線力学的療法 (PDT) に有用な光増感物質の探索

光増感反応による DNA 損傷は、光発がんや光毒性の原因であるばかりでなく光線力学的療法の原理にも応用できる。暗所で無害かつ光照射下では光増感反応により生体高分子を損傷する薬剤 (光増感剤) を用いた光線力学的療法 (PDT) が研究され、臨床でも使用されつつある。PDT は静脈注射された光増感剤が腫瘍組織に集積している時間帯に光照射し、光増感反応による活性酸素生成などを介した光毒性でがん細胞を死滅させる治療法である。本研究では PDT に有用な光増感物質の探索を行った。

(1) ポルフィリン類による DNA 損傷機構

ポルフィリン類はその可視域での強力な吸収スペクトルと、がん細胞に蓄積しやすい性質から、PDT への応用が期待されている。本研究では UVA 照射下、がん細胞に蓄積しやすい 5, 10, 15, 20-Tetrakis (N-Methyl-4-Pyridyl)-21, 23H-porphyrin Tetra-tosylate (TMPyP) (図 4) による DNA 損傷機構を解析した。TMPyP は UVA 照射により照射量に依存して DNA を損傷した。DNA 損傷はピペリジン処理により増強されることから DNA 鎖切断に加

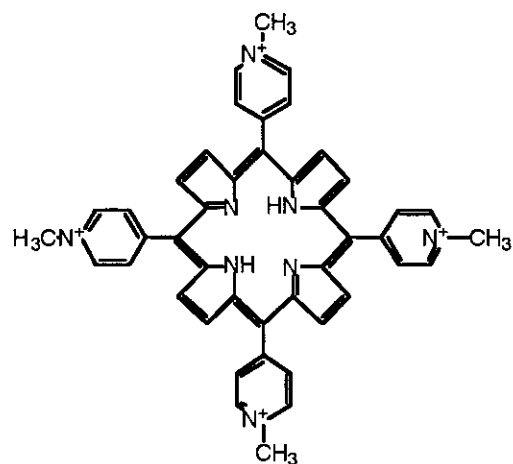


図 4. TMPyP の構造式

えて塩基の損傷も起こることが明らかになった。酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxodG の生成は TMPyP の濃度に依存して増加した。1 本鎖 DNA 用いたときの方が 2 本鎖 DNA を用いたときより DNA 損傷が強かった。DNA 損傷の塩基特異性を解析した結果、すべてのグアニンが損傷された。4-oxo-TEMPO をスピントラップ剤として使い ESR を測定した結果、UVA 照射により TMPyP から一重項酸素が生成していることが明らかになった。以上の結果から、TMPyP は UVA 照射により一重項酸素を生成し酸化的に DNA を損傷することが明らかになった。従って、DNA を PDT のターゲットにした場合、TMPyP は有効な光増感剤として利用できる可能性が示された。

(2) DNA 結合性アルカロイドの光増感反応によるグアニン特異的酸化損傷
パルマチンおよびベルベリン (図 5) 共に calf thymus DNA を添加する

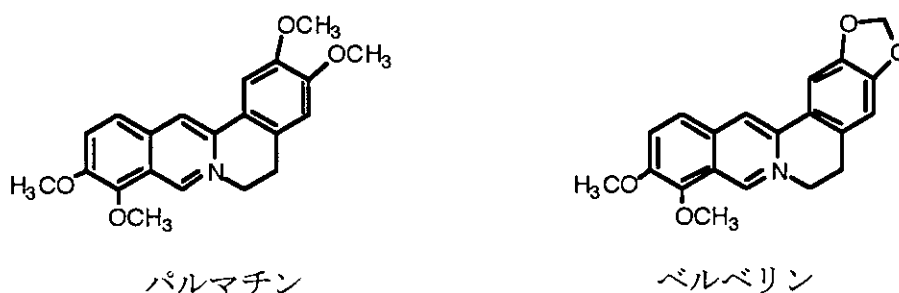


図5. パルマチンおよびベルベリンの構造式

と蛍光の著しい増強が観測され、DNAとの強い相互作用が認められた。パルマチンおよびベルベリンは照射により濃度依存的にDNAを損傷した。光増感反応後にDNAをピペリジン処理すると、全てのグアニンの部位が特に高い頻度で切断された。Type I 光増感剤のリボフラビンと比較すると、この場合には5'-GG、5'-GGGの下線のGが特異的に損傷され、アルカロイドによる場合とは明らかに異なっていた。Fpg処理後に電気泳動を行った場合にも同様のDNA切断が観測された。Fpgは8-oxodGを認識する塩基除去修復酵素であるため、光増感反応による8-oxodGの生成が考えられる。HPLCで8-oxodGの生成が確認され、その生成量は2本鎖DNAに比べ、1本鎖DNAで著しく増大した。DNA損傷は、窒素下または一重項酸素の消去剤（メチオナル、アジ化ナトリウム）の添加により抑制された。これらの結果は、Type II 機構（一重項酸素生成）によるグアニンの損傷を示している。以上の結果から、パルマチンおよびベルベリンはDNAと強い親和性をもち、DNA鎖に結合した

状態で光化学的な一重項酸素生成を介したメカニズムによりGを特異的に酸化損傷することが考えられる。

D. 結論

本研究結果から、メルカプトベンゾチアゾールやTMPyP、ベルベリン、パルマチンは、紫外線照射によりDNAを塩基配列特異的に損傷することが明らかとなった。特にメルカプトベンゾチアゾールは、今まで知られていなかったUVA照射による付加体形成という新しい機構でDNAを損傷することが解明された。また、ポルフィリン類やアルカロイド類には光線力学的療法に有用な光増感剤が存在することが示された。

光増感物質の存在下、過剰な紫外線の被曝は、一重項酸素などの活性酸素を生成し人体に悪影響を及ぼす可能性が示された。一方で、光線力学的療法に効率よく応用できる光増感物質の存在が示されたことから、紫外線の有効利用も今後の課題である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

論文発表

- 1: K. Hirakawa, M. Yoshida, A. Nagatsu, H. Mizukami, V. Rana, M. Rawat, S. Oikawa, and S. Kawanishi. Chemopreventive Action of Xanthone Derivatives on Photosensitized DNA Damage. *Photochem. Photobiol.* 2005 (in press).
- 2: A. Furukawa, Y. Hiraku, S. Oikawa, C. Luxford, M.J. Davies, and S. Kawanishi. Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone. *Biochem. J.* 2005 (in press).
- 3: H. Mizutani, S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, M. Kojima, and S. Kawanishi. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 76, 1439-1453 (2005).
- 4: X. Ding, Y. Hiraku, N. Ma, T. Kato, K. Saito, M. Nagahama, R. Semba, K. Kuribayashi, and S. Kawanishi. Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease. *Cancer Sci.* 96, 157-163 (2005).
- 5: T. Iwamoto, Y. Hiraku, M. Kojima, and S. Kawanishi. Amplification of C1027-induced DNA cleavage and apoptosis by a quinacrine-netropsin hybrid molecule in tumor cell lines. *Arch Biochem. Biophys.* 434, 232-240 (2005).
- 6: M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1750-1756 (2004).
- 7: K. Sakano, Y. Inagaki, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi. Copper-mediated oxidative DNA damage induced by eugenol: possible involvement of O-demethylation. *Mutat. Res.* 565, 35-44 (2004).
- 8: K. Midorikawa, T. Uchida, Y. Okamoto, C. Toda, Y. Sakai, K. Ueda, Y. Hiraku, M. Murata, S. Kawanishi, and N. Kojima. Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage. *Chem. Biol. Interact.* 150, 271-281 (2004).
- 9: K. Seike, M. Murata, K. Hirakawa, Y. Deyashiki, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by benz[a]anthracene dihydrodiols in the presence of dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1445-1451 (2004).
- 10: S. Pinlaor, Y. Hiraku, N. Ma, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripa, P. Sithithaworn, and S. Kawanishi. Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*: a model of inflammation-mediated carcinogenesis. *Nitric Oxide.* 11, 175-183 (2004).
- 11: Y. Hiraku, A. Sekine, H. Nabeshi, K. Midorikawa, M. Murata, Y. Kumagai, and S. Kawanishi. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. *Cancer Lett.* 215, 141-150 (2004).
- 12: K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by a melatonin metabolite, 6-hydroxymelatonin, via a unique non-o-

- quinone type of redox cycle. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1869-1878 (2004).
- 13: S. Kawanishi, and Y. Hiraku. Amplification of anticancer drug-induced DNA damage and apoptosis by DNA-binding compounds. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* 4, 415-419 (2004). Review.
- 14: K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, and S. Kawanishi. Mechanism of metal-mediated DNA damage induced by a metabolite of carcinogenic acetamide. *Chem. Biol. Interact.* 149, 52-59 (2004).
- 15: M. Murata, T. Suzuki, K. Midorikawa, S. Oikawa, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 793-802 (2004).
- 16: K. Hirakawa, M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa, and S. Kawanishi. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.* 38, 439-447 (2004).
- 17: S. Kawanishi, and S. Oikawa. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 278-284 (2004).
- 18: N. Ma, Y. Adachi, Y. Hiraku, N. Horiki, S. Horiike, I. Imoto, S. Pinlaor, M. Murata, R. Semba, and S. Kawanishi. Accumulation of 8-nitroguanine in human gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 319, 506-510 (2004).
- 19: T. Iwamoto, Y. Hiraku, S. Oikawa, H. Mizutani, M. Kojima, and S. Kawanishi. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Sci.* 95, 454-458 (2004).
- 20: T. Kato, R. Uchikawa, M. Yamada, N. Arizono, S. Oikawa, S. Kawanishi, A. Nishio, H. Nakase, K. Kuribayashi. Environmental pollutant tributyltin promotes Th2 polarization and exacerbates airway inflammation. *Eur J Immunol.* 34, 1312-1321 (2004).
- 21: S. Pinlaor, N. Ma, Y. Hiraku, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripa, P. Sithithaworn, and S. Kawanishi. Repeated infection with *Opisthorchis viverrini* induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis.* 25, 1535-1542 (2004).
- 22: H. Kobayashi, S. Oikawa, K. Hirakawa, and S. Kawanishi. Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. *Mutat Res.* 558, 111-120 (2004).
- 23: M. Murata, and S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 316, 123-128 (2004).
- 24: M. Murata, K. Midorikawa, M. Koh, K. Umezawa, and S. Kawanishi. Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry.* 43, 2569-2577 (2004).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
登録および登録予定共になし。

別添 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 16 年度

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, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, and N. Ikota	Electron-Transfer Mechanism in Radical-Scavenging Reactions by a Vitamin E Model in a Protic Medium	<i>Org. Biomol. Chem</i>	3	626 - 629	2005
I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Fukuhara, H. Kanazawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, T. Ozawa, and N. Ikota	Water-accelerated radical-scavenging reaction of (+)-catechin in an aprotic medium	<i>ITE Lett. Batt. New Tech. Med</i>	5	585 - 588	2004
M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata and S. Kawanishi,	Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase	<i>Chem. Res. Toxicol.</i>	17	1750 - 1756	2004
N. Sera, H. Tokiwa, H. Utsumi, S. Sasaki, K. Fukuhara, N. Miyata	Association between Chemical properties and oxidative damage due to nitrophenanthrenes and their related compounds in primary rat hepatocytes, <i>Polycycl. Aromat. Comp</i>	<i>Polycycl. Aromat. Comp</i>	24	487 - 500	2004
I. Nakanishi, S. Matsumoto, K. Ohkubo, K. Fukuhara, H. Okuda, K. Inami, M. Mochizuki, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi, N. Ikota	EPR study on stable magnesium complexes of phenoxyl radicals derived from a vitamin E model and its deuterated derivatives	<i>Bull. Chem. Soc. Jpn</i>	77	1741 - 1744	2004
I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara	A planar catechin analogue having a more negative oxidation potential than (+)-catechin as an electron-transfer antioxidant against a peroxy radical	<i>Chem. Res. Toxicol</i>	17	26 - 31	2004
A. Matsuoka, C. Lundin, F. Johansson, M. Sahlin, K. Fukuhara, B-M Sjoberg, D. Jenssen, A. Onfelt	Correlation of sister chromatid exchange formation through homologous recombination with ribonucleotide reductase inhibition	<i>Mutat. Res</i>	547	101 - 107	2004
K. Hirakawa, M. Yoshida, A. Nagatsu, H. Mizukami, V. Rana, M. Rawat, S. Oikawa, and S. Kawanishi.	Chemopreventive Action of Xanthone Derivatives on Photosensitized DNA Damage.	<i>Photochem. Photobiol.</i>			in press
A. Furukawa, Y. Hiraku, S. Oikawa, C. Luxford, M.J. Davies, and S. Kawanishi.	Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone.	<i>Biochem. J.</i>			in press
H. Mizutani, S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, M. Kojima, and S. Kawanishi.	Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide.	<i>Life Sci.</i>	76,	1439-1453	2005

X. Ding, Y. Hiraku, N. Ma, T. Kato, K. Saito, M. Nagahama, R. Semba, K. Kuribayashi, and <u>S. Kawanishi</u> .	Inducible nitric oxide synthase-dependent DNA damage in mouse model of inflammatory bowel disease.	<i>Cancer Sci.</i>	96	157-163	2005
T. Iwamoto, Y. Hiraku, M. Kojima, and <u>S. Kawanishi</u> .	Amplification of C1027-induced DNA cleavage and apoptosis by a quinacrine-netropsin hybrid molecule in tumor cell lines.	<i>Arch Biochem. Biophys.</i>	434	232-240	2005
M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata, and <u>S. Kawanishi</u> .	Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase.	<i>Chem. Res. Toxicol.</i>	17	1750-1756	2004
K. Sakano, Y. Inagaki, S. Oikawa, Y. Hiraku, and <u>S. Kawanishi</u> .	Copper-mediated oxidative DNA damage induced by eugenol: possible involvement of O-demethylation.	<i>Mutat. Res.</i>	565	35-44	2004
K. Midorikawa, T. Uchida, Y. Okamoto, C. Toda, Y. Sakai, K. Ueda, Y. Hiraku, M. Murata, <u>S. Kawanishi</u> , and N. Kojima.	Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage.	<i>Chem. Biol. Interact.</i>	150	271-281	2004
K. Seike, M. Murata, K. Hirakawa, Y. Deyashiki, and <u>S. Kawanishi</u> .	Oxidative DNA damage induced by benz[a]anthracene dihydrodiols in the presence of dihydrodiol dehydrogenase.	<i>Chem. Res. Toxicol.</i>	17	1445-1451	2004
S. Pinlaor, Y. Hiraku, N. Ma, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripa, P. Sithithaworn, and <u>S. Kawanishi</u> .	Mechanism of NO-mediated oxidative and nitrative DNA damage in hamsters infected with <i>Opisthorchis viverrini</i> : a model of inflammation-mediated carcinogenesis.	<i>Nitric Oxide</i>	11	175-183	2004
Y. Hiraku, A. Sekine, H. Nabeshi, K. Midorikawa, M. Murata, Y. Kumagai, and <u>S. Kawanishi</u> .	Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation.	<i>Cancer Lett.</i>	215	141-150	2004
K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, and <u>S. Kawanishi</u> .	Oxidative DNA damage induced by a melatonin metabolite, 6-hydroxymelatonin, via a unique non-o-quinone type of redox cycle.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	68	1869-1878	2004
<u>S. Kawanishi</u> , and Y. Hiraku.	Amplification of anticancer drug-induced DNA damage and apoptosis by DNA-binding compounds.	<i>Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.</i>	4	415-419	2004
K. Sakano, S. Oikawa, Y. Hiraku, and <u>S. Kawanishi</u> .	Mechanism of metal-mediated DNA damage induced by a metabolite of carcinogenic acetamide.	<i>Chem. Biol. Interact.</i>	149	52-59	2004
M. Murata, T. Suzuki, K. Midorikawa, S. Oikawa, and <u>S. Kawanishi</u> .	Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide.	<i>Free Radic. Biol. Med.</i>	37	793-802	2004
: K. Hirakawa, M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa, and <u>S. Kawanishi</u> .	Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide.	<i>Free Radic. Res.</i>	38	439-447	2004
<u>S. Kawanishi</u> , and S. Oikawa.	Mechanism of telomere shortening by oxidative stress.	<i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i>	1019	278-284	2004

Oikawa.					
N. Ma, Y. Adachi, Y. Hiraku, N. Horiki, S. Horiike, I. Imoto, S. Pinlaor, M. Murata, R. Semba, and S. Kawanishi.	Accumulation of 8-nitroguanine in human gastric epithelium induced by <i>Helicobacter pylori</i> infection.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	319	506-510	2004
T. Iwamoto, Y. Hiraku, S. Oikawa, H. Mizutani, M. Kojima, and S. Kawanishi.	DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect.	<i>Cancer Sci.</i>	95	454-458	2004
T. Kato, R. Uchikawa, M. Yamada, N. Arizono, S. Oikawa, S. Kawanishi, A. Nishio, H. Nakase, and K. Kuribayashi.	Environmental pollutant tributyltin promotes Th2 polarization and exacerbates airway inflammation.	<i>Eur. J. Immunol.</i>	34	1312-1321	2004
S. Pinlaor, N. Ma, Y. Hiraku, P. Yongvanit, R. Semba, S. Oikawa, M. Murata, B. Sripa, P. Sithithaworn, and S. Kawanishi.	Repeated infection with <i>Opisthorchis viverrini</i> induces accumulation of 8-nitroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine in the bile duct of hamsters via inducible nitric oxide synthase.	<i>Carcinogenesis</i>	25	1535-1542	2004
H. Kobayashi, S. Oikawa, K. Hirakawa, and S. Kawanishi.	Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate.	<i>Mutat. Res.</i>	558	111-120	2004
: M. Murata, and S. Kawanishi.	Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	316	123-128	2004
M. Murata, K. Midorikawa, M. Koh, K. Umezawa, and S. Kawanishi.	Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs.	<i>Biochemistry</i>	43	2569-2577	2004

IV. 研究成果の刊行物・別刷

平成 16 年度

Electron-transfer mechanism in radical-scavenging reactions by a vitamin E model in a protic medium

Ikuo Nakanishi,^{a,*} Tomonori Kawashima,^{a,c} Kei Ohkubo,^b Hideko Kanazawa,^c Keiko Inami,^d Masataka Mochizuki,^d Kiyoshi Fukuhara,^c Haruhiro Okuda,^c Toshihiko Ozawa,^a Shinobu Itoh,^f Shunichi Fukuzumi^{a,b} and Nobuo Ikota^{a*}

^a Redox Regulation Research Group, Research Center for Radiation Safety, National Institute of Radiological Sciences, Inage-ku, Chiba, 263-8555, Japan. E-mail: nakanishi@nirs.go.jp, Fax: +81-43-255-6819; Tel: +81-43-206-3131

^b Department of Material and Life Science, Graduate School of Engineering, Osaka University, SORST, Japan Science and Technology Agency (JST), Suita, Osaka, 565-0871, Japan

^c Department of Physical Pharmaceutical Chemistry, Kyoritsu University of Pharmacy, Minato-ku, Tokyo, 105-8512, Japan

^d Division of Organic and Bioorganic Chemistry, Kyoritsu University of Pharmacy, Minato-ku, Tokyo, 105-8512, Japan

^e Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan

^f Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka, 558-8585, Japan

Received 11th November 2004, Accepted 29th November 2004
First published as an Advance Article on the web 11th January 2005

The scavenging reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) or galvinoxyl radical (GO[•]) by a vitamin E model, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol (**III**), was significantly accelerated by the presence of Mg(ClO₄)₂ in de-aerated methanol (MeOH). Such an acceleration indicates that the radical-scavenging reaction of **III** in MeOH proceeds *via* an electron transfer from **III** to the radical, followed by a proton transfer, rather than the one-step hydrogen atom transfer which has been observed in acetonitrile (MeCN). A significant negative shift of the one-electron oxidation potential of **III** in MeOH (0.63 V vs. SCE), due to strong solvation as compared to that in MeCN (0.97 V vs. SCE), may result in change of the radical-scavenging mechanisms between protic and aprotic media.

Introduction

Recently, much attention has been paid to the mechanisms of radical-scavenging reactions of phenolic antioxidants, such as vitamin E (*α*-tocopherol) and flavonoids, with regard to the development of chemopreventive agents against oxidative stress and associated diseases. There are two mechanisms for the radical-scavenging reactions of phenolic antioxidants: a one-step hydrogen atom transfer from the phenolic OH group; and an electron transfer followed by a proton transfer.^{1–3} Metal ions are a powerful tool that can be used to distinguish between these two mechanisms, since electron-transfer reactions are known to be significantly accelerated by their presence.⁴ In fact, we have recently reported that scavenging reactions of the galvinoxyl radical (GO[•]) and the cumylperoxyl radical by (+)-catechin in aprotic media, such as acetonitrile (MeCN) and propionitrile, proceed *via* an electron transfer from (+)-catechin to the radicals (which is significantly accelerated by the presence of metal ions, such as Mg²⁺ and Se²⁺) followed by a proton transfer.^{5,6} On the other hand, no effect of Mg²⁺ on the hydrogen-transfer rate from a vitamin E model, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol (**III**), to 2,2-bis(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl radical (DOPPH[•]) or GO[•] in de-aerated MeCN has been observed, indicating that the radical-scavenging reactions of **III** in MeCN proceed *via* a one-step hydrogen atom transfer rather than *via* electron transfer.⁷ However, the effects of solvents on the mechanism of radical-scavenging reactions of phenolic antioxidants have yet to be clarified. Leopoldini *et al.* have reported that the bond dissociation enthalpies for O–H bonds and the adiabatic ionization potentials for phenolic antioxidants, calculated with use of density functional theory, do not follow the same trends in gas, water and benzene.⁸ Thus, it is of considerable importance

to investigate the effects of metal ions on radical-scavenging reactions in various solvents with different polarity.⁹

We report herein that the scavenging reactions of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) or GO[•] by the vitamin E model **III** in de-aerated methanol (MeOH) proceed *via* an electron transfer mechanism rather than *via* a one-step hydrogen atom transfer, which has been observed in de-aerated MeCN. Effects of bases on the radical-scavenging rates were also examined, to clarify whether the actual electron donor is **III** or the corresponding phenolate anion **I** in MeOH. Different mechanisms in protic and aprotic solvents are discussed based on kinetic, electrochemical, and EPR data obtained in this study, providing valuable and fundamental information about the radical-scavenging mechanism of phenolic antioxidants.

Experimental

Materials

2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-ol (**III**) was purchased from Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Japan. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) and galvinoxyl radical (GO[•]) were commercially obtained from Aldrich. Tetra-*n*-butylammonium perchlorate (Bu₄NClO₄), used as a supporting electrolyte for the electrochemical measurements, was purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japan, recrystallized from ethanol, and dried under vacuum at 313 K. Mg(ClO₄)₂ and methanol (MeOH; spectral grade) were purchased from Nacal Tesque, Inc., Japan and used as received. Pyridine and 2,6-lutidine were commercially obtained from Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Japan and purified by the standard procedure.¹⁰

Spectral and kinetic measurements

Since the phenoxyl radical of **III** (**I**[•]) generated in the reaction of **III** with radicals readily reacts with molecular oxygen (O₂), reactions were carried out under strictly de-aerated conditions. A continuous flow of Ar gas was bubbled through a MeOH solution (3.0 mL) containing DPPH[•] (4.8 × 10⁻⁵ M) and Mg(ClO₄)₂ (0.3 M) in a square quartz cuvette (10 mm id) with a glass tube neck for 10 min. Air was prevented from leaking into neck of the cuvette with a rubber septum. Typically, an aliquot of **III** (2.0 × 10⁻⁷ M), which was also in de-aerated MeOH, was added to the cuvette with a microsyringe. This led to a reaction of **III** with DPPH[•]. UV-vis spectral changes associated with the reaction were monitored using an Agilent 8453 photodiode array spectrophotometer. The rates of the DPPH[•]-scavenging reactions of **III** were determined by monitoring the absorbance change at 516 nm due to DPPH[•] ($\epsilon = 1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using a stopped-flow technique on a UNISOKU RSP-1000-02NM spectrophotometer. The pseudo-first-order rate constants (k_{app}) were determined by a least-squares curve fit using an Apple Macintosh personal computer. The first-order plots of $\ln(A/A_0)$ vs. time (A and A_0 are denoted as the absorbance at the reaction time and the final absorbance, respectively) were linear until three or more half-lives with the correlation coefficient $r > 0.999$. The reaction of **III** with GO[•] was carried out in the same manner and the rates were determined from the absorbance change at 428 nm due to GO[•] ($\epsilon = 1.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The rate constants of the reactions in the presence of base (pyridine or 2,6-lutidine) were determined in the same manner.

Electrochemical measurements

The cyclic voltammetry (CV) and second-harmonic alternating current voltammetry (SHACV)¹⁶ measurements were performed on an ALS-630A electrochemical analyzer in de-aerated MeOH containing 0.10 M Bu₄NClO₄ as a supporting electrolyte. The Pt working electrode (BAS) was polished with BAS polishing alumina suspension and rinsed with acetone before use. The counter electrode was a platinum wire. The measured potentials were recorded with respect to an Ag/AgNO₃ (0.01 M) reference electrode. The $E_{1/2}$ values (vs. Ag/AgNO₃) were converted to those vs. SCE by adding 0.29 V.¹⁷ All electrochemical measurements were carried out at 298 K under 1 atm Ar.

EPR measurements

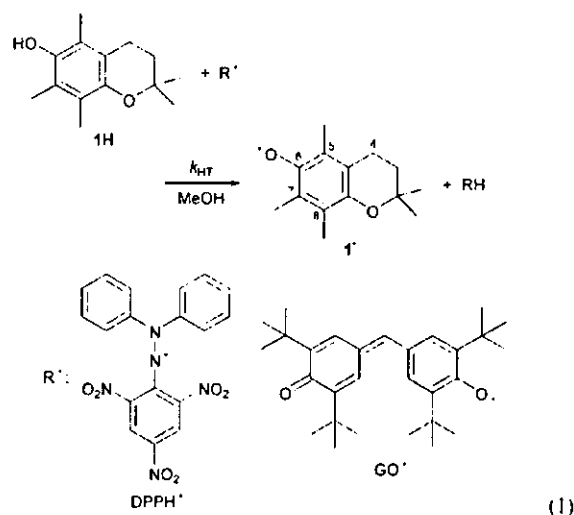
Typically, an aliquot of a stock solution of **III** (2.0 × 10⁻⁷ M) in de-aerated MeOH was added to the EPR sample tube (0.8 mm id) containing a de-aerated MeOH solution of DPPH[•] (2.0 × 10⁻⁴ M) with a microsyringe under 1 atm Ar. EPR spectra of the phenoxyl radical **I**[•] produced in the reaction between **III** and DPPH[•] were taken on a JEOL X-band spectrometer (JES-REIXE). The EPR spectra were recorded under non-saturating microwave power conditions. The magnitude of modulation was chosen to optimize the resolution and the signal-to-noise ratio of the observed spectra. The g values and the hyperfine splitting constants were calibrated with a Mn²⁺ marker. Computer simulation of the EPR spectra was carried out using Calleo ESR Version 1.2 program (Calleo Scientific Publisher) on an Apple Macintosh personal computer.

Results and discussion

Radical-scavenging reactions of the vitamin E model in de-aerated MeOH

Upon addition of **III** to a de-aerated MeOH solution of DPPH[•], the absorption band at 516 nm due to DPPH[•] disappeared immediately, accompanied by an appearance of the absorption band at 427 nm. Since the absorption band at 427 nm is diagnostic of the phenoxyl radical derived from **III** (**I**[•]) in MeOH,¹⁸ this spectral change indicates that hydrogen transfer

from the phenolic OH group of **III** to DPPH[•] takes place to produce **I**[•] (eqn. (1)). The absorption band of **I**[•] was shifted from 423 nm in MeCN to 427 nm in MeOH.^{7,8} Such a shift in the absorption band of **I**[•] may be due to a stronger solvation of **I**[•] in MeOH than in MeCN.



The rate of the DPPH[•]-scavenging reaction of **III** was measured by monitoring the decrease in absorbance at 516 nm due to DPPH[•] using a stopped-flow technique. The decay of the absorbance at 516 nm due to DPPH[•] obeyed pseudo-first-order kinetics when the concentration of **III** (**[III]**) was maintained at more than a 10-fold excess of the DPPH[•] concentration. The pseudo-first-order rate constants (k_{app}) increase with increasing **[III]**, exhibiting first-order dependence on **[III]**. From the slope of the linear plot of k_{app} vs. **[III]**, the second-order rate constant (k_{H}) was determined for the radical-scavenging reaction as $1.07 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in de-aerated MeOH at 298 K. The k_{H} value thus obtained in de-aerated MeOH is significantly larger than that determined in de-aerated MeCN ($4.35 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁷ A similar result has been reported by Litwinienko and Ingold.¹⁰ Intermolecularly hydrogen-bonded phenolic OH groups of hydrogen-bond accepting solvents, such as alcohols, are known to be essentially unreactive against radicals.¹⁹ Thus, the enhanced k_{H} value in MeOH suggested that the reaction mechanism in MeOH may be different from that in MeCN. The GO[•]-scavenging rate constant by **III** in de-aerated MeOH has also been determined in a same manner by monitoring the decrease in absorbance at 428 nm due to GO[•] as $2.54 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is slightly smaller than that in de-aerated MeCN ($3.32 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Effect of magnesium ion on the rates of radical scavenging reactions

If the radical-scavenging reactions of **III** involve an electron-transfer process as the rate-determining step, the rates of radical scavenging would be accelerated by the presence of metal ions.^{5,6} This was investigated by examining the effect of Mg(ClO₄)₂ on the radical-scavenging rates by **III** in de-aerated MeOH. When Mg(ClO₄)₂ is added to the **III**-DPPH[•] system in de-aerated MeOH, the rate of DPPH[•]-scavenging reaction by **III** was significantly accelerated. Such an acceleration was not observed for the DPPH[•]-scavenging reaction by **III** in MeCN.⁷ The k_{H} value increases linearly with increasing Mg²⁺ concentration ($[\text{Mg}^{2+}]$) as shown in Fig. 1a. A similar acceleration effect of Mg²⁺ has been observed for the GO[•]-scavenging reaction by **III** in de-aerated MeOH (Fig. 1b). Thus, the radical-scavenging reactions in de-aerated MeOH may proceed *via* an electron transfer from **III** to DPPH[•] or GO[•], which is accelerated by the presence of Mg²⁺, followed by proton transfer from **III**[•] to DPPH[•] or GO[•] as shown in Scheme 1. In such a case,