

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

抗酸化物質エダラボンによる化学的放射線防護作用の研究  
- 水分解ラジカル捕捉と DNA 損傷前駆体の化学回復 -

氏名 端 邦樹

(本文)

### 序論

体内では絶えず活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) と呼ばれる酸化性活性種が発生しており、がんや脳梗塞、心疾患などの原因物質として知られる。ヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、スーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2\cdot^-$ )、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) などが代表的な ROS として挙げられる。ROS による酸化損傷を防ぐ物質として抗酸化物質が知られており、ROS 発生の抑制、ROS の除去、ROS によって受けた損傷部位の化学的な修復などを行う。

ROS の 1 つである  $\cdot\text{OH}$  は、生体内の水の放射線分解によっても発生し、DNA の放射線誘起損傷の原因の 1 つとなっている。多くの抗酸化物質は ROS による酸化損傷を抑制するため、近年放射線防護剤としての利用も検討されている。抗酸化物質の作用から類推される放射線防護作用は、ROS の除去と損傷部位 (特に DNA) の化学的な修復 (化学回復) であると考えられている。

エダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は抗酸化作用を示す薬剤であり、脳梗塞時に発生する ROS の抑制や過酸化ラジカル連鎖反応の阻害などを行う。また、Anzai らによるマウスへの X 線照射実験において、エダラボンの高い放射線防護効果が示されており、放射線防護剤としての利用も期待されている。

過去の研究に基づいて提案されてきたエダラボンの抗酸化反応メカニズムを図 1 に示す。アルカリ条件下の反応性が高く、エダラボンアニオン ( $\text{pK}_a = 7$ ) が酸化性ラジカルと反応し、電子移動反応によるエダラボンラジカルが発生する。エダラボンラジカルは最終的には安定な化合物にいたる。この反応メカニズムは過酸化ラジカルとの反応などから推測されてきた。しかし、放射線環境下で発生する  $\cdot\text{OH}$  や DNA ラジカルとの反応 (化学回復) については、これまでほとんど報告がない。また、エダラボンの放射線防護効果が知られている一方で、低濃度条件ではエダラボンは放射線増感剤として作用するという報告も Sasano らによってなされている。このような背景から、エダラボンの放射線防護剤としての利用に先立ち、放射線環境下におけるエダラボンの振る舞いを理解する必要がある。

本研究は、「放射線環境下で想定されるエダラボンの反応を調べ、そこで得られる知見から、エダラボンが放射線防護剤として有効に機能するのかどうかを検証する」ことを目的とし、以下の 2 点に着目して実験を行う。

#### ① エダラボンの水分解活性種捕捉作用

$\cdot\text{OH}$  などの水分解活性種との反応を観測し、反応性や反応メカニズムを調べる。

#### ② エダラボンの化学回復作用

DNA のモノマーである dGMP のラジカルをエダラボンが還元する作用や、DNA 上に発生した損傷前駆体へのエダラボンの化学回復作用を検出する。

得られた結果と過去の報告との類似点や相違点を考察し、エダラボンの放射線防護剤としての有用性や注意点などを議論する。

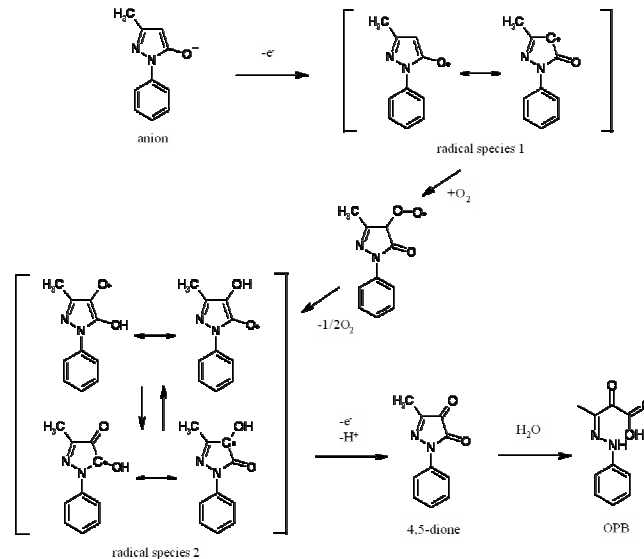


図1 従来調べられてきたエダラボンの抗酸化反応メカニズム

### エダラボンと放射線水分解活性種との反応

エダラボンの水分解活性種捕捉作用の測定をパルスラジオリシス法により行った。電子線パルスエダラボン水溶液に照射し、照射直後に生じる水分解ラジカルとエダラボンとの反応を、試料溶液の光吸収の変化から、観測した。

はじめに、水の放射線分解の主生成物の1つである水和電子との反応を観測した。反応性はpHに依存して変化した。中性条件下の反応速度定数は $(2.4 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と得られ、エダラボンアニオンラジカルの発生が示唆された。

次に、 $\cdot\text{OH}$  との反応を観測した。観測されたエダラボンラジカルの吸収スペクトルは320 nmに吸収ピークを持ち、この反応の速度定数は $(8.5 \pm 0.4) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と評価された。吸収スペクトルと反応速度定数のpH依存性は小さかった。 $\cdot\text{OH}$  との反応が従来報告されてきた反応メカニズムに従うのであれば、速度定数等がpH依存性を示すはずである。エダラボンと $\cdot\text{OH}$  との反応が従来推測されてきたものと異なるのかどうかということを確認するために、他の酸化性ラジカル ( $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ ,  $\text{N}_3\cdot$ ,  $\text{Br}_2\cdot$ ,  $\text{SO}_4\cdot$ ) とエダラボンとの反応を観測した。これらの酸化性ラジカルとの反応は電子移動反応であると考えられる。得られたエダラボンラジカルの吸収スペクトルは345 - 350 nmに吸収ピークを示した。このエダラボンラジカルは $\cdot\text{OH}$  との反応によって得られるエダラボンラジカルとは異なるものであることが示された (図2)。これにより、エダラボンと $\cdot\text{OH}$  との反応はOH付加反応であると推察された。

エダラボンのOH付加サイトを明らかにするために、エダラボン誘導体を用いた比較実験を行った。エダラボンのフェニル基をピリジル基で置換した誘導体 1,3-dimethyl-2-pyrazolin-5-one と $\cdot\text{OH}$  との反応により観測された吸収スペクトルは、 $\text{N}_3\cdot$ との反応により観測された吸収スペクトルとよく一致した。これにより、エダラボンのフェニル基が主なOH付加サイトであると示された。他の誘導体と $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{N}_3\cdot$ との反応の吸収スペクトルの形状からもエダラボンのフェニル基へのOH付加反応が強く示唆された。

量子化学計算により、最も起こりうる OH 付加サイトの推測を行った。最も安定化する反応として、フェニル基のオルト位への OH 付加反応が示唆された。

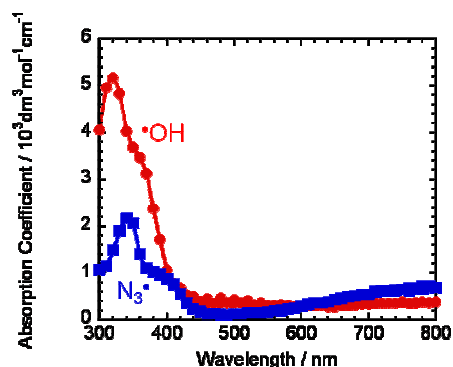


図2 エダラボンと酸化性ラジカルとの反応によって発生するエダラボンラジカルの吸収スペクトル  
● : •OHとの反応、■ : N<sub>3</sub>•との反応

### 抗酸化物質による dGMP ラジカルの還元

エダラボンの化学回復作用の測定のモデル実験として、エダラボンによる dGMP に発生するラジカル (dGMP<sup>•</sup>) の還元反応の測定を行った。(還元後、もとの dGMP が還元されることを示す実験ではないので、ここでは「回復」という言葉の使用を避ける。) 実験にはパルスラジオリシス法を利用した。dGMP とエダラボンの濃度差を調整して、•OH が dGMP と選択的に反応する系を作成し、dGMP<sup>•</sup> とエダラボンとの反応による吸収スペクトルの変化を観測した。dGMP<sup>•</sup> の減衰速度はエダラボンの濃度に依存して速くなった。また、350 nm 付近に吸収ピークを持つエダラボンラジカルの発生が示唆され、電子移動反応によってエダラボンが dGMP<sup>•</sup> を還元しているものと考えられた。dGMP<sup>•</sup> とエダラボンとの反応速度定数は  $4.1 - 4.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と評価され、比較のために行ったアスコルビン酸による dGMP<sup>•</sup> の還元反応の速度定数とほぼ同じであった。エダラボンがアスコルビン酸と同様、DNA 損傷前駆体に対する化学回復剤としても有効に機能するということが期待された。

### プラスミド DNA 損傷前駆体に対する抗酸化物質の化学回復作用

DNA に対する抗酸化物質の化学回復作用はこれまであまり明確には示されていないため、はじめに測定系の確立を行い、アスコルビン酸の化学回復作用を検出した。その結果とエダラボンについて測定した結果とを比較することで、エダラボンの化学回復効果について検討した。pUC18 プラスミド DNA の希薄水溶液に抗酸化物質を添加し、 $\gamma$ 線照射した。照射により生じる一本鎖切断 (SSB) や、Nth、Fpg、Nfo の 3 種類の塩基除去修復酵素によって認識されるピリミジン塩基損傷、プリン塩基損傷、塩基脱離部位 (AP サイト) の収量 (G 値) の評価を行った。抗酸化物質無添加の系における G 値に対する抗酸化物質添加系における G 値の比率を“G (相対)”とした。測定は空気飽和系で行った。抗酸化物質が•OH 捕捉剤としてのみ作用すると仮定すると、抗酸化物質濃度に依存して、各損傷の G (相対) は等しく変化することが予測される。

アスコルビン酸について G (相対) を評価したところ、SSB の G (相対) と比較して他の損傷の G (相対) が小さくなった (図3)。酵素に認識される塩基損傷や AP サイトの前駆体に対してアスコルビン酸の化学回復効果があると考えられた。

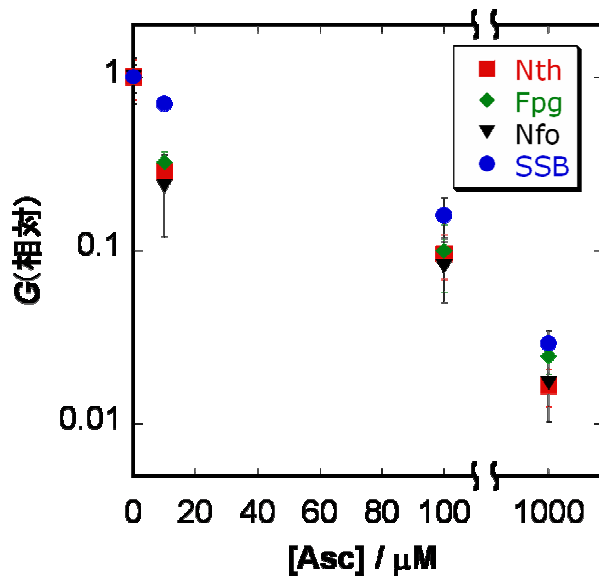


図3 4種類のDNA損傷のG(相対)のアスコルビン酸濃度依存性  
 ■ : Nthに認識された損傷、◆ : Fpgに認識された損傷、  
 ▼ : Nfoに認識された損傷、● : 照射によって発生したSSB

エダラボンについて同様に  $G$  (相対) を評価したところ、Nfo に認識される損傷を抑制する効果は見られたものの、Nth、Fpg 認識される損傷を抑制する効果はアスコルビン酸の場合と比べて小さかった。 $N_2O$  飽和系についてエダラボンの化学回復作用を測定したところ、空気飽和系の結果と比べて大きく変化したところはなく、Nfo に認識される損傷を抑制する効果のみ明確に示された。

dGMP<sup>•</sup>の還元に対する反応性は、アスコルビン酸とエダラボンとでほぼ同じであった。しかし、グアニン塩基の損傷を含むFpg 認識損傷に対するエダラボンの抑制効果は小さく、DNA に対する化学回復効果がアスコルビン酸とエダラボンとで異なった。DNA の場合は塩基が二本鎖らせん構造の内側に存在しているため、アスコルビン酸とエダラボンの DNA 内部へのアクセシビリティの違いがこの化学回復効果の違いに影響を与えているのではないかと考えている。しかし、この原因を明らかにするには、条件の異なるさらなる実験が必要である。

## 結論

本研究では、エダラボンの放射線防護作用として「水分解活性種捕捉作用」および「化学回復作用」の2点に着目した測定を行った。

水分解活性種との反応については、水和電子や $\bullet OH$  との反応性の評価や $\bullet OH$  との反応の解明を行い、これまでの報告にないエダラボンの反応初期過程のメカニズムを明らかにした。

化学回復については、抗酸化物質の化学回復効果を評価する新しい手法を確立し、その手法に基づいてアスコルビン酸とエダラボンの作用を測定した。塩基損傷に対するエダラボンの化学回復効果はアスコルビン酸の効果と比較して低く評価されたが、AP サイトなどへのエダラボンの化学回復効果は示された。

エダラボンは優れたラジカル捕捉剤ではあるが、化学回復剤としての作用は小さい。また、水分解活性種捕捉のメカニズムは従来考えられてきたものとは異なった。今後は最終生成物の同定やその安全性などを評価していく必要があると考えられる。

また、本研究では化学回復作用を検出する新しい手法を導入した。様々な抗酸化物質の化学回復効果を評価する手段として利用されていくことが期待される。