とぴっくす

抗酸化物質エダラボンによる活性酸素除去および DNA 酸化損傷の化学的修復

日本原子力研究開発機構　端 邦樹*
中国科学技術大学　林 銘章
量子科学技術研究開発機構　横谷 明徳, 藤井 健太郎
東京大学　山下 真一
大阪大学　室屋 裕佐
日本アイソトープ協会　勝村 庸介

Reactivity of edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), which is known to show high antioxidative properties, with oxidative species, such as hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) and azide radical ($N_3^{\bullet}$), was investigated by a pulse radiolysis experiment, and generation behavior of edaravone radicals produced through these reactions were observed. It was shown that OH-adducts are produced by the reaction with $^{\bullet}OH$ in contrast to the other oxidative radicals, which react with edaravone by an electron transfer reaction. Chemical repair properties of edaravone against DNA lesions produced by reactions of DNA with oxidative species were also investigated by a pulse radiolysis experiment with deoxyguanosine monophosphate (dGMP) and a γ-radiolysis experiment with plasmid DNA solutions. It was observed that edaravone reduced dGMP radicals just after produced in a dilute aqueous solution. As a result of the experiment with plasmid DNA solutions, it was also found that edaravone inhibited some base lesions more effectively than single strand breaks. These results show that edaravone may protect living system from oxidative stress, such as radiation, by not only scavenging oxidative species but also reducing precursors of DNA leisons.

Keywords: antioxidant, edaravone, reactive oxygen species, chemical repair, DNA damage

Reactivity of an antioxidant, edaravone, with reactive oxygen species and its chemical repair properties against oxidative damage on DNA
Kuniki Hata* (*Japan Atomic Energy Agency*), Mingzhang Lin (*University of Science and Technology of China*), Akinari Yokoya and Kentaro Fujii (*National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology*), Shinichi Yamashita (*The University of Tokyo*), Yusa Muroya (*Osaka University*), Yosuke Katsumura (*Japan Radioisotope Association*),
〒319–1195 茨城県那珂郡東海村白方 2–4
TEL: 029–282–5767, FAX: 029–282–5406,
E-mail: hata.kuniki@jaea.go.jp

1　背景

ほとんどの生物にとって酸素は生存に不可欠な物質だが，生体内で酸素が変化して生じる活性酸素（ROS：Reactive Oxygen Species）はその酸化力の高さから生体に有害な影響を与えることが知られている．ROS は $O_2^{\bullet-}$（スーパーオキシドアニオンラジカル），$^{\bullet}OH$（ヒドロキシルラジカル），H_2O_2（過酸化水素），$^1O_2$（一重項酸素）等に分類される．これらの物質は細胞内の代謝の過程で絶えず発生しており，様々な疾患に関与している．ROS は水の放射線分解でも発生し，放射線による DNA 損傷の間接作用の原因となっている．

抗酸化物質（antioxidant）は ROS が関与する様々な影響を防ぐ目的で使用される物質の総称であり，様々な産業で利用されている．ROS の毒性から生体を防御する目的でも使用されており，食品の健康成分としても知られている．代表的なものにフラボノイド等のポリフェノールやビタミン C として知られるアスコルビン酸等が挙げられる．これらの抗酸化物質は，ROS を水素引抜反応又は電子移動反応によって還元するこ

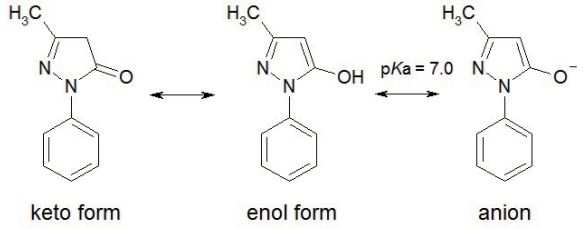

Figure 1. Chemical structures of edaravone in water[6].

とで，ROS による物質の酸化を抑制する．抗酸化物質は，このように ROS を直接除去する働きを示す一方で，ROS によって酸化された物質を還元する働きも示す．よく知られたものとして，脂質過酸化ラジカルの連鎖反応を阻害する働きがある[1]．細胞膜などを構成する脂質（LH）が ROS によって酸化された後に酸素と結合し，生じた脂質過酸化ラジカル（$LOO^{\bullet}$）が近隣の脂質を酸化することで脂質の過酸化が繰り返される．抗酸化物質は脂質過酸化ラジカルと反応し，これを還元することでその連鎖反応の進行を阻害する．また， DNA の酸化損傷に対する防護効果も期待されており，酸化損傷の初期の段階で生じる DNA 上のラジカルを還元反応によって化学的に修復する働き（chemical repair あるいは fast repair と呼ばれる）が注目されている[2,3]．

筆者らはこれまでにエダラボン（3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one）(Fig. 1) という抗酸化物質について，その抗酸化作用の要である酸化性物質との反応性に関する研究を行ってきた．エダラボンは急性脳梗塞における脳虚血時およびその後血流が再開通した時に発生する ROS を除去する目的で使用される脳保護剤である．ROS との高い反応性から放射線防護効果についても期待され，研究が行われている[4,5]．本稿では，筆者らがこれまでに明らかにしてきたエダラボンと酸化性ラジカルとの反応性について報告し，さらにエダラボンの化学的修復作用について調べた研究成果について述べる．これらの研究を通して明らかにされた，放射線等の酸化ストレスに対するエダラボンの基本的な抗酸化作用について紹介したい．

2 エダラボンと酸化性ラジカルとの反応

Figure 1 に示したように，エダラボンは水に溶解してケト-エノール互変異性を示す．また，pK_a は 7.0 であるため，アルカリ性水溶液中ではアニオンの形をとる．過酸化ラジカルとの反応を観測した既往の研究によって，エダラボンの抗酸化作用は主にアニオン型による電子移動反応によるものであると考えられてきた[7]．本研究では，水の放射線分解によって発生する主要なラジカルである $^{\bullet}OH$ との反応について詳細に調べるため，パルスラジオリシス法を用いて直接的な観測を行った．

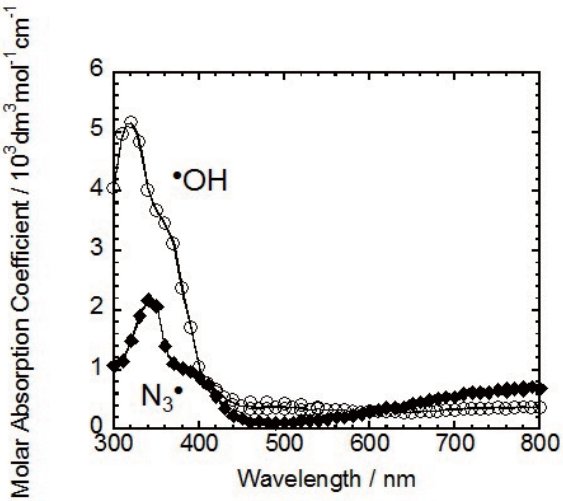

Figure 2. Transitent absorption spectra obtained at 1.5 μs after irradiation of an electron pulse to N_2O-saturated edaravone solutions. Open symbols are the result of a solution containing 1×10^{-3} mol dm^{-3} edaravone, and closed symbols are the result of a solution containing 1×10^{-3} mol dm^{3} edaravone and 5×10^{-2} mol dm^{-3} NaN_3. The pH of the solutions is 9.2[8].

試料水溶液を満たした高純度石英セルにパルス幅 10 ns の電子線を照射し，発生するラジカルとエダラボンとの反応を紫外可視分光法により観測した．パルスラジオリシス法での詳細な測定体系および試料の条件については参考文献[6,8] を参照されたい．測定の対象とした酸化性ラジカルは $^{\bullet}OH$，$N_3^{\bullet}$，$SO_4^{\bullet-}$，$Br_2^{\bullet-}$ である．$N_3^{\bullet}$ 以下 3 種類のラジカルは $^{\bullet}OH$ との比較のために用いており，いずれも強い酸化性を示す．$^{\bullet}OH$ は水溶液に N_2O ガスを飽和させてから照射することで選択的に得ることができる[9]．一方，$N_3^{\bullet}$，$Br_2^{\bullet-}$ は，予め NaN_3 又は NaBr を水溶液に添加してから N_2O ガスを飽和することにより，$^{\bullet}OH$ と N_3^- 又は Br^- との反応から得られる．$SO_4^{\bullet-}$ を得るには $K_2S_2O_8$ およびターシャリーブタノールを添加した水溶液を Ar ガスで飽和す

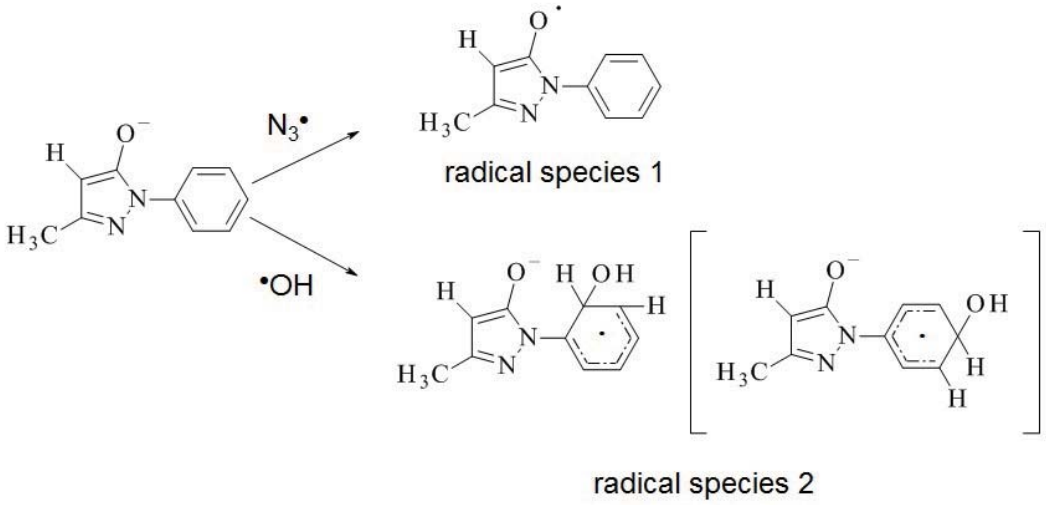

Figure 3.　Possible reactions of edaravone with oxidative radicals[8].

る．これらのラジカルを発生させる詳細な化学反応については参考文献[10] に整理されている．

•OH と $N_3^{\bullet}$ の結果について，電子線照射後 1.5 μs 経過時の過渡吸収スペクトル（正確には非照射時の吸収スペクトルとの差分）を Fig. 2 に示す[8]．いずれの実験でも照射直後に短寿命（数十 μs）の物質の生成が観測された．これらは酸化性ラジカルによってエダラボンが酸化されることで発生したエダラボンラジカルであると考えられた．•OH 以外の酸化性ラジカルとの反応で生じたエダラボンラジカルの吸収スペクトルはすべて同様の形状を示し，345 nm にピークを持ち 700–800 nm にも緩やかなピークを持つものであった．また，$N_3^{\bullet}$ との反応速度について pH 依存性を調べたところ，反応速度は高 pH のときほど高くなった．そのため，これらの酸化性ラジカルとの反応は従来考えられてきたアニオン型による電子移動反応であると推測された．一方，•OH との反応では，他の酸化性ラジカルとの反応で得られたエダラボンラジカルのスペクトルとは異なり，320 nm に強いピークを持つスペクトルが得られた．さらに，•OH との反応の速度定数は pH によらず一定であった（$(8.5\pm0.4)\times10^9$ dm^3 mol^{-1} s^{-1}）．このことから，•OH との反応は他の酸化性ラジカルとの反応とは異った反応，つまりアニオン型による電子移動反応以外の反応であると考えられた．置換基の異なる数種類の誘導体を用いて同様の測定を行ったところ，エダラボンのフェニル基をメチル基で置換した 1,3-dimethyl-2-pyrazolin-5-one の結果からは •OH と $N_3^{\bullet}$ とで同じ過渡吸収スペクトルが得られた．このことから，エダラボンの •OH 捕捉反応はフェニル基への付加反応が主たるものであると推察された．想定されるエダラボンのラジカル捕捉反応を Fig. 3 に示す[8]．

3　エダラボンの化学的修復作用

エダラボンの化学的修復作用について調べるため，DNA モノマーの 1 つであるデオキシグアノシン一リン酸（dGMP：deoxyguanosine monophosphate）の水溶液を用いたパルスラジオリシス実験を実施した[6]．パルスラジオリシス法により，ROS による酸化で生じた dGMP ラジカル（dGMP•）と抗酸化物質との反応を，過渡吸収スペクトルの変化として観測できる[3]．ここでは，•OH を選択的に発生させるため，照射前に試料に N_2O ガスを飽和させた．2×10^{-3} mol dm^{-3} の dGMP と 1×10^{-4} mol dm^{-3} のエダラボンの混合水溶液に電子線を照射した時の 1 μs 後と 80 μs 後の過渡吸収スペクトルを Fig. 4(a) に示す．比較のため，代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸で同様の測定を行った結果も示す（Fig. 4(b)）．いずれの場合も 1 μs 後に 300 nm 以下にピークを持つ dGMP ラジカルのブロードな吸収が観測された．Figure 4 (b) では，dGMP ラジカルの減衰に伴い 360 nm にピークを持つアスコルビン酸ラジカルの吸収が観測された．一方，エダラボンを用いた実験では，dGMP ラジカルの減衰が見られたものの，350 nm 付近の吸光度は測定した

時間スケールでは変化しなかった．電子移動反応で生じるエダラボンラジカルのモル吸光係数は 345 nm で $(2.60 \pm 0.10) \times 10^3$ dm^3 mol^{-1} cm^{-1} であり[10]，これは dGMP ラジカルの 350 nm 付近のモル吸光係数とほぼ同じである．dGMP ラジカルからエダラボンラジカルへの変化が起こっているため，見かけ上 350 nm 付近の吸光度が変化していないものと考えられた．dGMP ラジカルの減衰挙動から測定されるエダラボン，アスコルビン酸それぞれの dGMP ラジカルとの反応速度定数はともに 4×10^8 dm^3 mol^{-1} s^{-1} 程度であった．ポリフェノールの一種であるルチンやケルセチンと dGMP ラジカルとの反応速度定数はそれぞれ 3.05×10^8 dm^3 mol^{-1} s^{-1}，1.31×10^8 dm^3 mol^{-1} s^{-1} と報告されている[2]．エダラボンはこれら代表的な抗酸化物質と同等以上の反応性を示すことがわかった．

モノマーではなく，実際の二本鎖 DNA を対象とした化学的修復作用の評価も行われている．Anderson らは，フラボノイドを添加したプラスミド DNA 水溶液にガンマ線を照射し，照射によって生じる DNA 損傷の収率を測定することで，フラボノイドによる化学的修復作用を調べている[11]．実験に用いられたプラスミド DNA は環状の二本鎖 DNA であり，スーパーコイルと呼ばれるねじれ構造をとっている．この DNA は一本鎖切断（SSB：Single Strand Break）を生じるとねじれが緩和され，さらに二本鎖切断（DSB：Double Strand Break）を生じると直鎖状 DNA となる．これらの形状の違いは電気泳動法によって容易に分離することができるため，DNA の損傷量の評価にしばしば利用されている．Anderson らは，試料水溶液中のトリス塩酸バッファの濃度をフラボノイドの量に応じて変化させることにより，全ての試料の •OH 捕捉能を一定としたうえで，フラボノイド濃度を変化させて照射を行っている．その結果，高いフラボノイド濃度の条件でより多くの DNA 損傷が抑制され，これはフラボノイドの化学的修復作用によるものと推測された．

筆者らもエダラボンの化学的修復作用の可能性について検討するため，プラスミド DNA 水溶液へのガンマ線照射実験を実施した[6]．Anderson らの手法は，照射下でのトリス塩酸バッファと抗酸化物質の相互作用等，十分に明らかになっていない点もあると考えられた．そこで，可能な限りシンプルな系で測定することを考え，精製した DNA を水分解ラジカルとの反応性が低いリン酸バッファで回収し，それにエダラボンを添加してガンマ線を照射した．詳細な実験条件についてはこれまでの報告を参照されたい[6,12]．照射によって生じた SSB および各種塩基除去修復酵素によって

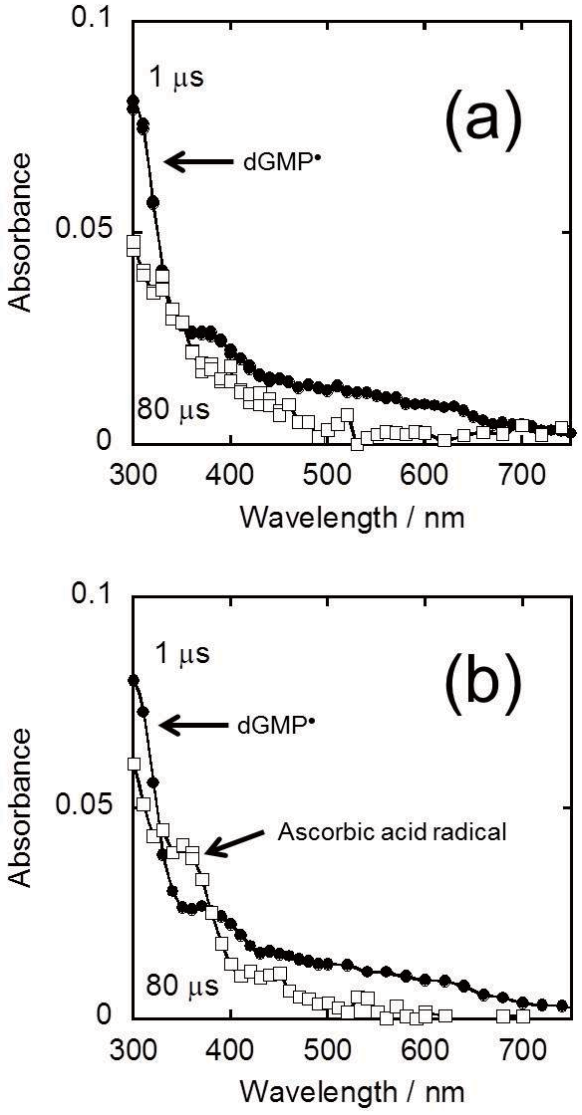

Figure 4. Transitent absorption spectra obtained at 1 μs (closed symbols) and 80 μs (open symbols) after irradiation of an electron pulse to N_2O-saturated aqueous solutions containing 2×10^{-3} mol dm^{-3} dGMP and (a) 1×10^{-4} mol dm^{-3} edaravone and (b) 1×10^{-4} mol dm^{-3} ascorbic acid[6].

検出された塩基損傷の収率をエダラボン濃度毎に取得した．この実験では 3 種類の塩基除去修復酵素を用いている．塩基除去修復酵素は特定の塩基損傷を認識して，その部分を切り離し鎖切断に変換する．それぞれの酵素に認識される塩基損傷の種類についての詳述は割愛するが，大まかに分類すると Endonuclease III（Nth）はピリミジン塩基（チミン，シトシン）の損傷等，

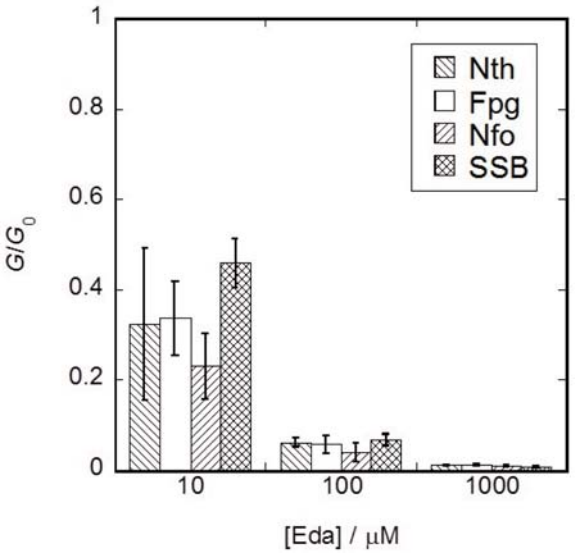

Figure 5. Ratios of the chemical yields of prompt SSBs and of Nth-, Fpg-, Nfo-sensitive sites produced on the DNA in aqueous solution containing edaravone at several concentrations (G) to the chemical yields of the DNA break and the base lesions obtained in the absence of edaravone (G_0).[6)]

Formamidopyrimidine-DNA-glycosylase（Fpg）はプリン塩基（アデニン，グアニン）の損傷等，Endonuclease IV（Nfo）は脱塩基部位（AP サイト）等に作用する．検出されたすべての損傷は，エダラボン濃度の増加に伴い抑制されたが，当然この抑制効果には化学的修復作用だけでなく，エダラボンの •OH 捕捉作用によるものも含まれている．そこで，エダラボンの化学的修復作用について調べるため，エダラボン無添加時の結果に対するエダラボン添加時の結果の比を損傷ごとに求め比較した．結果を Fig. 5 に示す[6)]．エダラボンが •OH 捕捉剤のみとして振る舞うならば，•OH と DNA との反応によって引き起こされるこれらの損傷はエダラボンの添加によって均一に抑制されるはずである．ところが，10 μmol dm^{-3} 添加の結果を見ると，エダラボン添加による損傷の抑制効果は損傷の種類によって異なっていることがわかった．とりわけ，Nfo に認識される種類の損傷が SSB よりも効果的に抑制された．前述のようにエダラボンは dGMP 上のラジカルを化学的に修復する．グアニン上の損傷は主に Fpg に認識されると考えられるが，Fpg や Nth に認識される損傷の実験結果は誤差が大きく，これらの損傷に対するエダラボンの化学的修復効果を明らかにするためには，より詳細な測定や分析を行う必要がある．いずれにしても，このように損傷毎に異なる G/G_0 の値を示すことは，塩基損傷の前駆体をエダラボンが選択的に還元している可能性を示すものであり，エダラボンによる化学的修復作用の存在を示唆している．

4　まとめ

本稿では，抗酸化作用の基礎となる酸化還元反応に基づくエダラボンの化学的な振る舞いについて紹介した．これまでの研究で，エダラボンが •OH と付加反応，それ以外のラジカルとは電子移動反応を示すことが示された．dGMP とも電子移動反応を示し，その反応速度はポリフェノールやアスコルビン酸と同等である．二本鎖 DNA に対する化学的修復作用の存在も示唆された．

実際には抗酸化物質の生体内での振る舞いは複雑であり，たとえばエダラボンはがん抑制遺伝子の働きを抑制する作用等も報告されているため[5)]，酸化性ラジカルとの反応性だけで生体への影響の大小を図ることは難しい．しかし，抗酸化作用の基本は酸化還元反応であり，反応性に関する基礎的なデータの取得，反応機構の解明は，体内での振る舞いを推察するうえでも極めて重要である．また，このような反応性に関する研究データの蓄積により，より高効率の ROS 捕捉剤の開発等への発展も期待される．

〈謝　辞〉

本研究は，東京大学 中川恵一准教授，名古屋市立大学 中川秀彦教授，元日本原子力研究開発機構 漆原あゆみ博士の御協力のもとで進められました．また，ガンマ線や電子線の照射実験に関して，東京大学 上坂充教授，上田徹氏，故広石大介氏にサポートいただきましたこと御礼申し上げます．

〈参 考 文 献〉

1) N. A. Porter, S. E. Caldwell, A. Mills, Lipids, 30 (1995) 277.
2) C. Zhao, Y. Shi, W. Wang, W. Lin, B. Fan, Z. Jia, S. Yao, R. Zheng, Radiat. Phys. Chem., 63 (2002) 137.
3) P. O'Neill, Radiat. Res., 96 (1983) 198.
4) K. Anzai, M. Furuse, A. Yoshida, A. Matsuyama, T. Moritake, K. Tsuboi, N. Ikota, J. Radiat. Res., 45 (2004) 319.

5) N. Sasano, A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, K. Shiraishi, K. Miyagawa, H. Igaki, K. Nakagawa, J. Radiat. Res., 48 (2007) 495.
6) K. Hata, A. Urushibara, S. Yamashita, M. Lin, Y. Muroya, N. Shikazono, A. Yokoya, H. Fu, Y. Katsumura, J. Radiat. Res., 56 (2015) 59.
7) Y. Yamamoto, T. Kuwahara, K. Watanabe, K. Watanabe, Redox Rep., 2 (1996) 333.
8) K. Hata, M. Lin, Y. Katsumura, Y. Muroya, H. Fu, S. Yamashita, H. Nakagawa, J. Radiat. Res., 52 (2011) 15.
9) J. W. T. Spinks, R. J. Woods, An Introduction to Radiation Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 1990.
10) M. Lin, Y. Katsumura, K. Hata, Y. Muroya, K. Nakagawa, J. Photochem. Photobiol. B, 89 (2007) 36.
11) R. F. Anderson, C. Amarasinghe, L. J. Fisher, W. B. Mak, J. E. Packer, Free Rad. Res., 33 (2000) 91.
12) K. Hata, A. Urushibara, S. Yamashita, N. Shikazono, A. Yokoya, Y. Katsumura, Biochem. Biophys. Res. Commun., 434 (2013) 341.

〈著 者 略 歴〉

端 邦樹： 2011 年 東京大学大学院工学系研究科原子力国際専攻博士課程修了．博士（工学）．同年 日本原子力研究開発機構入社（現職）．

林 銘章： 1996 年 Universite de Paris-Sud 博士課程修了．2000 年 東京大学大学院工学系研究科博士研究員．2007 年 日本原子力研究開発機構任期付研究員．2012 年 中国科学技術大学教授（現職）．

横谷 明徳：1991 年 日本原子力研究所入所．1992 年 筑波大学大学院生物科学研究科博士（理学）取得．2000 年 英国医学研究機構（MRC）客員研究員．2004 年 日本原子力研究開発機構研究主幹．2016 年 量子科学技術研究開発機構上席研究員及び茨城大学大学院理工学研究科客員教授（現職）．専門：放射線生物物理．

藤井 健太郎： 2000 年 広島大学大学院理学研究科物性学専攻博士後期過程修了．博士（理学）．同年 日本学術振興会特別研究員．2001 年 日本原子力研究所入所．2016 年 量子科学技術研究開発機構上席研究員（現職）．専門：放射線化学，放射線生物，放射光科学，表面科学．

山下 真一： 2008 年 東京大学大学院工学系研究科博士課程修了．博士（工学）．同年 日本原子力研究開発機構博士研究員，2012 年 東京大学大学院工学系研究科特任助教，2013 年 同助教（現職）．専門：放射線化学，原子力工学．

室屋 裕佐： 2001 年 東京大学大学院工学系研究科助手．2007 年 同助教．同年 博士（工学）取得．2008 年 早稲田大学理工学術院客員講師．2012 年 大阪大学産業科学研究所特任准教授．2013 年 大阪大学産業科学研究所准教授（現職）．

勝村 庸介：1976 年 東京大学大学院工学系研究科助手．1981 年 博士（工学）取得．1984 年 東京大学大学院工学系研究科助教授．1994 年 同教授．2015 年 日本アイソトープ協会常務理事（現職）．