

第 60 回放射線化学討論会

抗酸化剤 MG-Rutin の放射線防護効果：パルスラジオリシス法によるラジカル捕捉と化学回復の観測

東京大学 Hao Yu*, 山下 真一, 上坂 充

1 はじめに

放射線による DNA 変異の誘発は直接作用と間接作用に分類される。直接作用では放射線のエネルギーを DNA が直接受け取り、DNA は電離または励起され、初期損傷が形成される。一方、間接作用では放射線のエネルギーを水が受け取ることで分解し、水分解で生じた OH ラジカル ($\cdot\text{OH}$) が DNA を酸化することで初期損傷が形成される。いずれの場合も DNA 上にできた初期損傷はまだ安定ではなく、次第に修復不可能な損傷として固定され、鎖切断や塩基損傷などの安定な DNA 変異となり、突然変異や細胞死などの放射線障害として顕在化する。

抗酸化剤は酸化ストレスを低減できる薬剤の総称であり、生体内で代謝により日々生成される活性酸素種を捕捉することができる。活性酸素種のうち $\cdot\text{OH}$ 、スーパーオキシドラジカルアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) は水の放射線分解でも生じる。抗酸化剤は水の放射線分解で生じる $\cdot\text{OH}$ も捕捉できるため、放射線防護剤としても効果的と期待されている。しかし、抗酸化剤の体内濃度は DNA などの生体分子と比べて低く、捕捉能は $\cdot\text{OH}$ を除去しきれないほど高くない。むしろ一度 $\cdot\text{OH}$ によって酸化されてしまった DNA をゆっくりと還元して回復する作用がより重要と指摘されている^{1,2)}。本研究では DNA 塩基の中でもっとも酸化されやすいグアニ

ンのヌクレオチドであるデオキシグアノシンーリン酸 (dGMP) を用い、dGMP が $\cdot\text{OH}$ により酸化される初期損傷形成過程 (Fig. 1 の Step 1) と、その後ゆっくりと抗酸化剤に還元される化学回復過程 (Fig. 1 の Step 2) とを、パルスラジオリシス法により観測することを目的としている。

代表的な抗酸化剤であるフラボノイドを糖転移したフラボノイドを本研究では用いた。糖転移とは、グルコシル基を脱水縮合により導入する技術のことである。天然フラボノイドは疎水性が高く、水に溶けにくい。生体への投与を考えると水溶性は高い方がよく、近年、糖転移技術によってフラボノイドの水溶性が飛躍的 ($\sim 10^4$ 倍) に向上されている。しかし、放射線防護における糖転移の影響はまだ調べられていない。

2 実験

東京大学東海村キャンパスの電子線加速器施設 LINAC において、35 MeV の電子線パルス (パルス幅 10 ns) を用いたパルスラジオリシスを実施した。パルスあたりの吸収線量はチオシアン線量計で測定

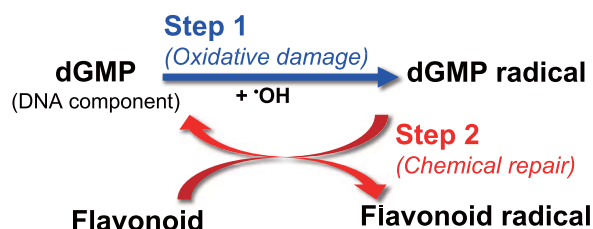


Figure 1. A schematic of chemical repair of oxidized dGMP by a flavonoid (MG-Rutin) observed by pulse radiolysis.

Radioprotection mechanism of an antioxidant MG-Rutin: Observation of radical scavenging and chemical repair by pulse radiolysis
Hao Yu*, Shinichi YAMASHITA and Mitsuru UESAKA (*The University of Tokyo*),
〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-5841-2917, E-mail: yu@nuclear.jp

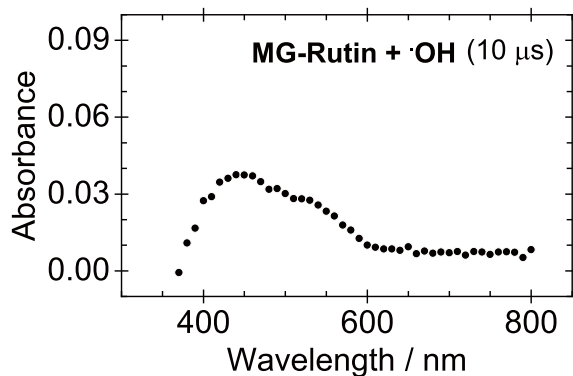


Figure 2. A transient absorption spectrum of reaction intermediate produced in the reaction between MG-Rutin and $\cdot\text{OH}$ observed at 10 μs after the electron pulse.

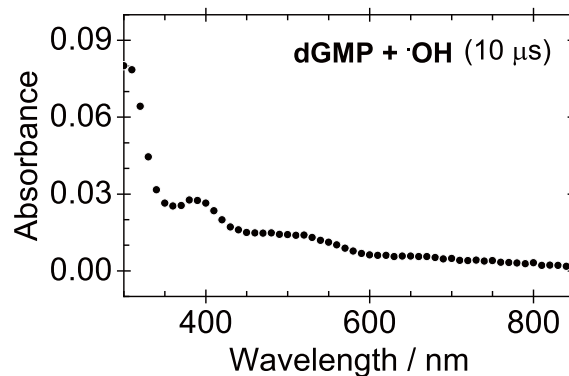


Figure 3. A transient absorption spectrum of reaction intermediate produced in the reaction between dGMP and $\cdot\text{OH}$ observed at 10 μs after the electron pulse.

し, 5 Gy–70 Gy の範囲で制御した. 抗酸化剤としては MG-Rutin (天然フラボノイドである Rutin にグルコシル基が 1 個導入されたもの) を, DNA のユニット分子としては dGMP を用いた. MG-Rutin と $\cdot\text{OH}$ の反応メカニズムを調べる際には N_3^\bullet も比較のため用いた. N_3^\bullet はアジ化物アニオン (N_3^-) の添加により, $\text{N}_3^- + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{N}_3^\bullet + \text{OH}^-$ なる反応で生成させた. また, $\cdot\text{OH}$ と MG-Rutin の反応速度定数の評価では競争相手としてエタノールまたは I $^-$ を利用した.

3 結果と議論

3.1 MG-Rutin と $\cdot\text{OH}$ の反応

まず, MG-Rutin と $\cdot\text{OH}$ の反応における過渡吸収スペクトルを観察した (Fig. 2). 複数のピーク (400 nm および 550 nm など) が 400 nm–800 nm の範囲に確認された. $\cdot\text{OH}$ は付加反応, 電子引抜反応, 水素引抜反応, と複数の反応を起こす可能性があり, 複数のピークはこれらに対応していると考えられる. いずれの反応が起きているか検討するため, 電子引抜き型の酸化性ラジカルとして知られる N_3^\bullet と MG-Rutin との反応も観察した. 誌面の都合上, このデータは掲載しないが, N_3^\bullet との反応では 400 nm のピークのみ確認された. この 400 nm のピークは MG-Rutin のカチオンラジカルと考えられる. さらに, このピークは時間とともに長波長側 (440 nm) にシフトし, MG-Rutin のカチオンラジカルからプロトンが外れ, 中性ラジカルが生じたと予想された. 現在, pH を変えてこの点を確認している.

3.2 dGMP をモデルとして用いた化学回復の観察

次に, 化学回復について調べるため, DNA と $\cdot\text{OH}$ の反応の模擬として dGMP と $\cdot\text{OH}$ との反応を観察した. Figure 3 に 10 μs におけるデータを示す. 450 nm, 530 nm, 680 nm 付近にピークがあるものの, 全体的にブロードな吸収となっていることがわかる.

次に, dGMP よりも $\cdot\text{OH}$ 捕捉能が十分低くなるよう, MG-Rutin を微量だけ添加した. 具体的には dGMP 濃度を 1.5 mM, MG ルチン濃度を 50 μM –100 μM とした. $\cdot\text{OH}$ はまず dGMP と反応し, 400 nm–600 nm にブロードな吸収が見られ, その後 50 μs 程度で新たなピークが 440 nm 前後に確認でき, MG-Rutin の添加濃度を高くすると, このピークの出現も早くなった. これは一度 $\cdot\text{OH}$ に酸化された dGMP が MG-Rutin から水素を引き抜くことで自身は還元され, 結果として化学反応により初期損傷から回復したと言える. この事象は代表的な抗酸化剤の一つであるアスコルビン酸などでも報告されているが^{3,4)}, 今回 MG-Rutin で観測された過渡吸収スペクトルの形状変化は非常に明瞭なものであった. また, この化学回復に対応する反応の速度定数は $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度であった.

3.3 反応速度定数評価

MG-Rutin と $\cdot\text{OH}$ の反応の速度定数も評価した. Figure 2 からわかるように, この反応の生成物は十分な吸収を持つ. そこでまずエタノールを競争相手として用いた. エタノールと $\cdot\text{OH}$ の反応で生じる生成物は 300 nm–850 nm に吸収を持たない. そこで, エタ

ノールと MG-Rutin の割合を変え、440 nm の吸光度の変化を観測した。しかし、時間とともにピーク位置が変わるため、この方法では反応速度定数を精度よく評価することは難しかった。

そこで、次にヨウ素アニオン (I^-) を競争相手として用い、 I^- と $\cdot OH$ の反応で生じる I_2^- の吸収を 740 nm で観測した。Figure 2 からわかるように、MG-Rutin と $\cdot OH$ の反応の生成物もこの位置に若干の吸収を持つため、観測される吸光度は以下の形で表される。

$$Abs. = \varepsilon_{MG-Rutin}[\cdot OH]_{MG-Rutin}l + \varepsilon_{I^-}[\cdot OH]_{I^-}l \quad (1)$$

ここで Abs. は吸光度、 $[\cdot OH]_{MG-Rutin}$ と $[\cdot OH]_{I^-}$ はそれぞれ MG-Rutin と I^- に捕捉される $\cdot OH$ の濃度、 $\varepsilon_{MG-Rutin}$ と ε_{I^-} はそれぞれ MG-Rutin と I^- が $\cdot OH$ と反応した際の生成物のモル吸光係数、 l は光路長である。さらに、 I^- だけ (MG-Rutin なし) の試料で観測される吸光度を $Abs_{.0}$ とおくと、次の式が得られる。

$$\frac{Abs.}{Abs_{.0}} = \frac{\varepsilon_{MG-Rutin}[\cdot OH]_{MG-Rutin} + \varepsilon_{I^-}[\cdot OH]_{I^-}}{\varepsilon_{I^-}([\cdot OH]_{MG-Rutin} + [\cdot OH]_{I^-})} \quad (2)$$

ここで捕捉能の比が捕捉される $\cdot OH$ の比になるので、次の関係が成り立つ。

$$\frac{[\cdot OH]_{MG-Rutin}}{[\cdot OH]_{I^-}} = \frac{k_{MG-Rutin}[MG-Rutin]}{k_{I^-}[I^-]} \quad (3)$$

ここで $k_{MG-Rutin}$ と k_{I^-} はそれぞれ MG-Rutin と I^- が $\cdot OH$ と反応する際の速度定数、 $[MG-Rutin]$ と $[I^-]$ はそれぞれ MG-Rutin と I^- の濃度である。これを用いて整理すると、次の関係式が得られる。

$$\frac{Abs.}{Abs_{.0}} = \frac{1 + \alpha\beta \frac{[MG-Rutin]}{[I^-]}}{1 + \beta \frac{[MG-Rutin]}{[I^-]}} \quad (4)$$

ここで α と β はフィッティングパラメータで、以下の式を満たす。

$$\alpha = \frac{\varepsilon_{MG-Rutin}}{\varepsilon_{I^-}}, \quad \beta = \frac{k_{MG-Rutin}}{k_{I^-}} \quad (5)$$

フィッティングで β が得られ、 k_{I^-} は既知なので、 $k_{MG-Rutin}$ を求められる。この結果、MG-Rutin と $\cdot OH$ の反応速度定数は $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と得られた。さらに、糖転移していない Rutin と $\cdot OH$ の反応についても同様に速度定数を評価し、 $(1.4 \pm 0.5) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ が得られた。つまり、糖鎖の導入による速度定数の変化は明瞭には確認されなかった。

4 現在の取り組みと今後の展開

長鎖 DNA としてプラスミド DNA を用い、安定な DNA 変異を定量することで、より生体内での DNA に近い状態での抗酸化剤による放射線防護メカニズムを調べている。プラスミド DNA に生じた安定な変異 (一本鎖切断 (SSB), 二本鎖切断 (DSB), 塩基損傷など) 電気泳動法により検出および定量できる⁵⁾。プラスミド DNA は通常、閉環状の超らせん構造 (super coil または closed circular) と呼ばれる絡み合った状態になっているが、SSB が生じると絡みの解けた開環構造 (open circular) に、DSB が生じると直鎖構造 (linear) に、それぞれ形状が大きく変化する。このため、ゲル中で印加した際の移動度も異なるようになり、電気泳動で容易に分離できる。定量の精度および感度も高い。さらに、塩基損傷も塩基除去修復酵素 (Nfo, Nth, Fpg) の基質特異性に応じて SSB に変換することで検出できる。プラスミド DNA は大腸菌 *E. Coli* JM109 を培養して準備している。一般的な DNA 抽出のプロトコルではイソプロパノールやエタノールを用い、その後の冷凍保存では Tris-EDTA バッファを使用する。しかし、これらの物質は $\cdot OH$ と高い反応性を持ち、微量の抗酸化剤の添加効果を調べるためには十分に除去する必要がある。そこで、現在は抽出したプラスミド DNA からこれらの物質を透析によって除去する手法の確立に取り組んでいる。

〈謝 辞〉

なお、本研究は東京大学原子力専攻の共同利用研究課題 (29L-01) と量研放医研の HIMAC 共同利用研究課題 (16J419) の一環として実施している。パルスラジオリシス実験においては東大原子力専攻ライナック管理部の上田徹氏に支援いただいた。プラスミド DNA の利用など、今後の展開については量研・東海量子ビームの横谷明德博士、藤井健太郎博士に助言をいただいている。関係者各位に感謝いたします。また、本研究の一部は本研究は JSPS 科研費 基盤研究 A (17H01071) の助成を受けている。

〈参 考 文 献〉

- 1) K. Hata, A. Urushibara, S. Yamashita, N. Shikazono, A. Yokoya, Y. Katsumura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 434 (2013) 341–345.
- 2) 端邦樹, 林銘章, 横谷明德, 藤井健太郎, 山下真一,

- 室屋裕佐, 勝村庸介, 放射線化学, 103 (2017) 29–34. (2001) 1189–1193.
- 3) P. O'Neill, Radiat. Res., 96 (1983) 198–210. 5) A. Yokoya, S. M. T. Cunniffe, P. O'Neill, J. Am. Chem. Soc., 124 (2002) 8859–8866.
- 4) R. F. Anderson, L. J. Fisher, Y. Hara, T. Harris, W. B. Mak, L. D. Melton, J. E. Packer, Carcinogenesis, 22