

アスコルビン酸によるDNA切断に対する二三のラジカル補捉剤の影響

藤木, 博明
明治製菓株式会社

富田, 純史
久留米大学医学部公衆衛生学教室

野中, 美智子
九州大学農学部食糧化学教室

篠原, 和毅
九州大学農学部食糧化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/22282>

出版情報 : 九州大学農学部学芸雑誌. 36 (1), pp.19-24, 1981-08. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



アスコルビン酸による DNA 切断に対する 二三のラジカル捕捉剤の影響

藤木 博明*・富田 純史**・野中美智子
篠原 和毅・村上 浩紀・大村 浩久***

九州大学農学部食糧化学教室

(1981年4月28日 受理)

Effect of Some Radical Scavengers on DNA Breakage by Ascorbic Acid

HIROAKI FUJIKI, YOSHIFUMI TOMITA, MICHIKO NONAKA,
KAZUKI SHINOHARA, HIROKI MURAKAMI
and HIROHISA OMURA***

Food Chemistry Laboratory, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

アスコルビン酸 (AsA) をはじめ種々のレダクトン類が DNA 切断能を持っていることは、それらの抗腫瘍性 (村上・山藤, 1968, 1969 a, b; 中村・山藤, 1968; 篠原ら, 1979; Yamafuji and Murakami, 1968; Yamafuji *et al.*, 1970, 1971, 1972; Omura *et al.*, 1974; 富田ら, 1974), 抗ウイルス性 (Murata *et al.*, 1971, 1972; Murata and Kitagawa, 1973) あるいは突然変異誘起作用 (Stich *et al.*, 1976; Omura *et al.*, 1978; Shinohara *et al.*, 1980) などに関連して注目される。その作用機構は十分には解明されていないが、DNA 切断に酸素が必要であることや、とくに Cu^{2+} によつてその活性が顕著に高められることなどから、その有力なものとして AsA の自動酸化にともなつて生成するフリーラジカルの関与が推定される。事実、Murata and Kitagawa (1973) は AsA のウイルス失活作用も抗腫瘍効果に関するわれわれの主張と同様にその DNA 切断作用に基づくことを推定し、かつその作用が数種のラジカル捕捉剤によつて失われることを示している。

AsA の自動酸化は分子状酸素 (O_2) によつて自動

酸化されてデヒドロアスコルビン酸となり同時に過酸化水素 (H_2O_2) を生じる。この自動酸化はフリーラジカル連鎖反応によるものであつて、中間体として H_2O_2 のほかにモノデヒドロアスコルビン酸ラジカル ($\text{AH}\cdot$), スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$), 一重項酸素分子 ($^1\text{O}_2$), ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$), ヒドロペルオキシラジカル ($\cdot\text{OOH}$) などが生成され、銅、鉄などの遷移金属がこの反応を触媒、促進するといわれている。このようなラジカル種には特異的な捕捉剤が知られており、これによつて反応に関与するラジカルの種類も推定することができる。そこでわれわれは AsA の DNA 切断機構を解明する一環として、AsA による DNA 切断作用を二三のラジカル捕捉剤とともに測定しそれらの影響の有無を検討した。

材料および方法

1. 試薬

2-アミノエチルイソチオウロニウム・ブロミド (2-aminoethylisothiuronium Br·HBr, AET) は次のようにして合成した。再結したチオ尿素 7.61 g を 40 ml の加熱したイソプロピルアルコールに加え 500 ml 容フラスコ中で 5 分間還流して完全に溶解する。

* 現在 明治製菓株式会社

** 現在 久留米大学医学部公衆衛生学教室

*** 別刷請求先 (Reprint request should be addressed to this author)

次に再結した 2-ブロモエチルアミン (2-bromoethylamine·HBr) 20.5 g を加えて加熱還流を続ける。数分で完全に溶解し、約 10 分後にははげしく沸騰しながら結晶を析出しはじめる。反応液をさらに 20 分間加熱した後、生成した AET を濾集し、速やかにイソプロピルアルコール、ついで酢酸エチルで洗滌し減圧乾燥した。収率 80 % 以上、元素分析 (実測 C 12.92, H 3.92, N 15.01; 計算 C 12.87, H 3.60, N 15.01) および融点 (実測 187~191°C, 文献 193~194°C) などにより確認した。

AsA その他の試薬類はいずれも市販特級品、DNA は常法通り SDS-フェノール法により仔牛胸腺から調製したものを用いた。

2. 粘度測定

適宜の濃度に **AsA** その他の試薬を加えた DNA (100 µg/ml) 溶液をオストワルド粘度計中 37°C に保温し経時的に相対粘度を測定した。

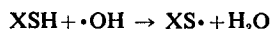
3. ショ糖濃度勾配遠心分離

50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7) に溶かした 50 µg/ml DNA, 0.5 mM **AsA**, 50 µM CuSO_4 , 50 µM AET 混液を 37°C 4 時間反応させたのち SSC に対し一晚冷所で透析した。この反応液 0.2 ml をあらかじめ冷却しておいた 5%—20% 中性ショ糖濃度勾配 (pH 6.8) 上に静かに重層し、Beckman L 型超遠心分離機、SW 50-1 スウィングローターを用い、30,000 r. p. m. 4 時間遠心分離を行なった。遠心分離したのち、従来はセルの底に穴をあけて 4 滴ずつ分取し、一定量の水を加えて 260 nm の吸光度を測定してその沈降パターンを求めてきたが、今回は次のようにマイクロフローセルを用いて紫外吸収を連続的に測定しそのパターンを記録した。50% ショ糖溶液槽につないだ注射針をニトロセルローズ遠沈チューブの底部に注意深くさし込み、直ちに針とチューブとの間にグリースを塗布して空気が入ることおよびショ糖溶液が漏れることを防ぐ。次にポンプで 50% ショ糖溶液を静かに送り込みながらチューブの上部からショ糖濃度勾配溶液をとり出し、マイクロフローセルを通過させて紫外吸収を記録計で連続的に図示した。この方法はショ糖濃度勾配溶液と送り込んだ 50% ショ糖溶液との境界があまり明確ではなく、またごくまれには操作中にショ糖の小結晶と思われるものが詰まることも起こるといった難点もあるが、短時間にしかも自動的に沈降パターンを測定することが可能であり、しかも従来の分画法と、その沈降パターンにはほとんど差はなかった。

結果および考察

1. AET

AET は自動酸化をうけにくい化学的に安定な塩であつて電離性放射線に対して化学的に保護する作用があるといわれている。そのラジカル種に対する特異性は明確ではないが、たとえば次のような反応によつてラジカルを捕捉すると考えられる。



AET の影響をまず粘度法で測定した。**AsA** + Cu^{2+} 系に AET を加えると DNA を沈澱析出するので **AsA** 単独系について試験した。Fig. 1 に示すように、1 mM **AsA** 単独では僅かに粘度の低下が見られるに過ぎなかったが、これに 0.1 mM AET を加えた場合その効率は抑えられる傾向が認められた。

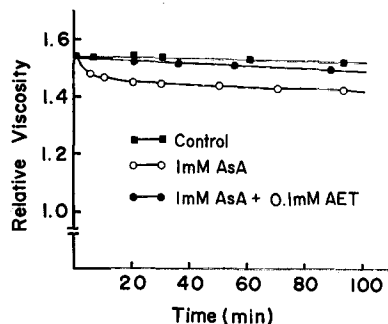


Fig. 1. Effect of 2-aminoethylisothiouromium bromide (AET) on the relative viscosity of DNA solution treated by **AsA**. Relative viscosity was estimated by incubating the reaction mixture at 37°C in an Ostwald's viscometer. Because some precipitate was formed by addition of AET when Cu^{2+} was also contained in the reaction mixture, the relative viscosity was estimated only in the absence of Cu^{2+} . Reaction mixture: ■—■ 100 µg/ml DNA in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0; ○—○ 100 µg/ml DNA and 1 mM **AsA** in the same buffer; ●—● 100 µg/ml DNA, 1 mM **AsA** and 0.1 mM AET in the same buffer.

次にショ糖濃度勾配遠心分離法により追及したが、Fig. 2 から明らかなように、同様に AET は **AsA** の DNA 切断効果をほとんど完全に抑制することが認められた。

2. エチルアルコール

AsA に Cu^{2+} を加えた作用系におけるラジカル捕捉剤の影響も試験するため、次にエチルアルコールを用いて測定した。これは次式に従い主として $\cdot\text{OH}$ を

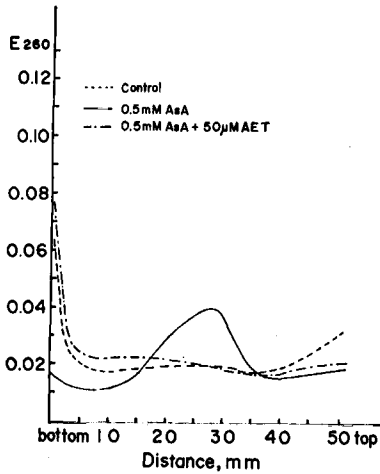
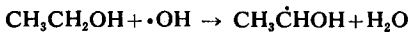


Fig. 2. Effect of 2-aminoethylisothiuronium bromide (AET) on the sedimentation pattern of DNA treated by AsA. Reaction mixture was incubated at 37°C for 4 hrs and dialysed against 1×SSC over night in cold. A 0.2 ml-aliquot of the dialysed solution was put on the top of the neutral linear gradient sucrose solution from 5% to 20% and centrifuged at 30,000 r.p.m. for 4 hrs using a Beckman centrifuge type L with a horizontal swing rotor type 50-1. After centrifugation, the sample was continuously introduced into a microflow cell by injecting 50% sucrose solution carefully from the bottom of the tube with a peristalt pump for microtube (Tokyo Rikaki Co.). Then, the absorbance was recorded automatically by estimating at 260 nm with a spectrophotometer. Reaction mixture: ---- 50 μg/ml DNA in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7; — 50 μg/ml DNA and 0.5 mM AsA in the same buffer; - - - 50 μg/ml DNA, 0.5 mM AsA and 50 μM AET in the same buffer.

捕捉するものと思われるものである。



Cu^{2+} の共存により DNA に対する AsA の粘度低下能は著しく顕著であるので作用条件を緩和して AsA 濃度を 0.2 mM とし 40 μM Cu^{2+} とともに反応させ、0.1 ないし 0.5% エチルアルコールの影響を求めた。その結果、濃度に応じて粘度の低下作用が低くなることが観察された (Fig. 3)。

また AsA の DNA 切断作用も Cu^{2+} の共存にかかわらずエチルアルコールによつて阻害されることは Fig. 4 から明らかである。その効果は比較的僅少であるが、少なくともアルコール濃度 5% においてショ糖濃度勾配遠心分離法によつて検出された。

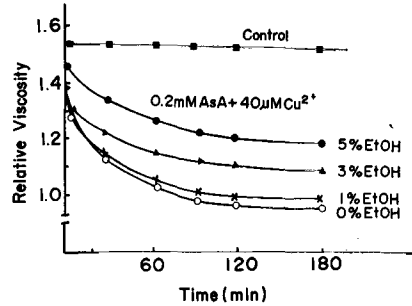


Fig. 3. Effect of ethyl alcohol on the relative viscosity of DNA solution treated by AsA and Cu^{2+} . The same as in Fig. 1. However, because the reduction of the relative viscosity by AsA was accelerated with Cu^{2+} , 0.2 mM AsA and 40 μM Cu^{2+} were employed.

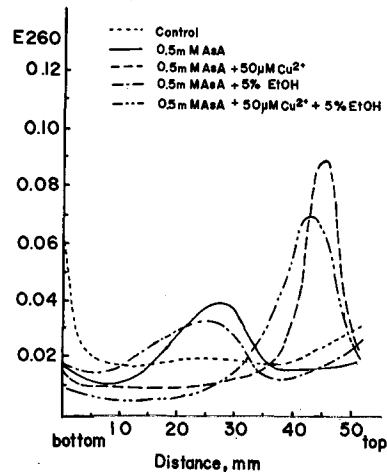


Fig. 4. Effect of ethyl alcohol on the sedimentation pattern of DNA treated by AsA or AsA and Cu^{2+} . The same as in Fig. 2.

3. ギ酸ナトリウム

ギ酸ナトリウムも $\cdot\text{OH}$ の捕捉剤であつて次式に従つて $\cdot\text{OH}$ を捕捉すると考えられる。

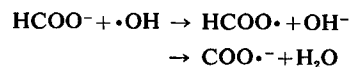


Fig. 5 に 0.5 mM AsA 単独, Fig. 6 に 0.5 mM AsA + 50 μM Cu^{2+} 系による DNA 切断に対するギ酸ナトリウムの影響を示す。

ギ酸ナトリウムの効果は弱く、AET が 50 μM でほとんど完全に DNA 切断を阻止したのに対し、5 mM ないし 50 mM の高濃度においてその作用が認

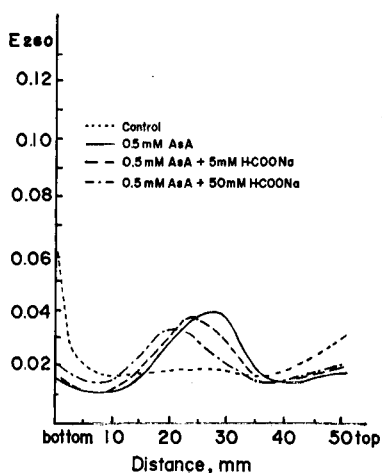


Fig. 5. Effect of sodium formate on the sedimentation pattern of DNA treated by AsA. The same as in Fig. 2.

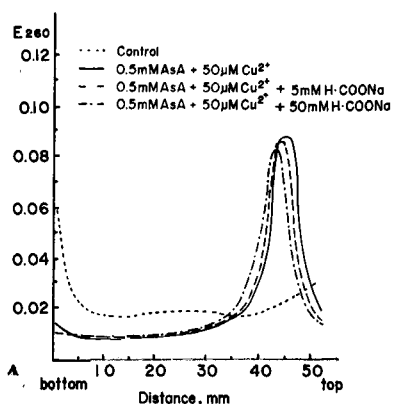
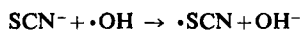


Fig. 6. Effect of sodium formate on the sedimentation pattern of DNA treated by AsA and Cu^{2+} . The same as in Fig. 2.

められるに過ぎなかつた。しかも $\text{AsA} + \text{Cu}^{2+}$ 系での切断に対する影響は AsA 単独によるものに対する場合よりも微弱であつた。

4. チオシアン酸カリウム

またチオシアン酸カリウムも次式に従つて作用する・OH 捕捉剤であるといわれている。



しかしこれも DNA 切断作用に対する抑制効果は Fig. 7 に示すようにほとんど認められなかつた。

5. 亜酸化窒素

一方亜酸化窒素は水と電子の捕捉剤として知られており、次式のように捕捉されるとされる。この水と電子はパルス放射線分解によつてその存在が実証され

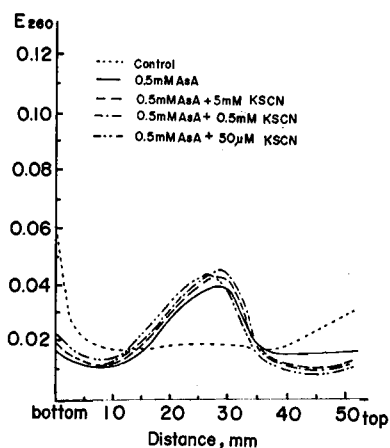
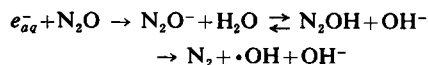


Fig. 7. Effect of potassium thiocyanate on the sedimentation pattern of DNA treated by AsA or AsA and Cu^{2+} . The same as in Fig. 2.

たものであり、水中における寿命は $\text{H}\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ にくらべてかなり長く、非常に還元性に富んでいるといわれている。



AsA ないし $\text{AsA} + \text{Cu}^{2+}$ 系による DNA 切断に対する亜酸化窒素の影響を同様に試験し Fig. 8 に示す。亜酸化窒素は気体であるのであらかじめ飽和させた蒸留水を実験に用いたが、この場合亜酸化窒素の溶解度 (20°C 1 気圧で 1 l 亜酸化窒素は 1.5 l の水に溶解) から概算して反応液中の終濃度 3 M とした。この条件において亜酸化窒素も 5% エチルアルコール (Fig. 4) とほぼ同程度の効果を示すことが認められた。

これらの結果は少なくとも AsA ないし $\text{AsA} + \text{Cu}^{2+}$ 系による DNA の切断にフリーラジカルが関与していることを示す。この場合、0.5 mM AsA での DNA 切断は 50 μM AET により完全に抑制された。それに対して 50 mM 硝酸ナトリウムや 5% エチルアルコールによつてある程度の抑制効果は認められたが 50 μM AET の効果には及ばなかつた。また Cu^{2+} を加えた 0.5 mM $\text{AsA} + 50 \mu\text{M}$ Cu^{2+} 系により DNA の切断は著しく強められたが、これに対する硝酸ナトリウムの阻害効果は 5 mM~50 mM で AsA 単独による DNA 切断に対するものと同等もしくはやや低く、5% エチルアルコールでは同等ないしやや高いと思われる程度に過ぎなかつた。さらに 50 μM ないし 5 mM チオシアン酸カリウムではほとんど効果は認め

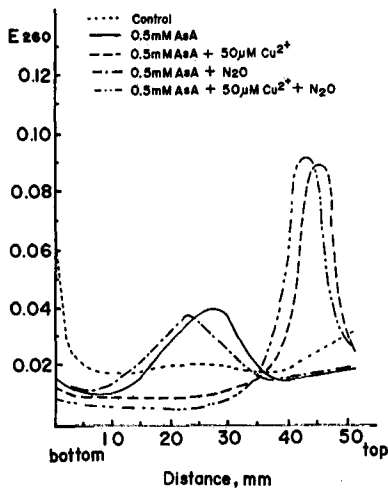


Fig. 8. Effect of nitrous oxide on the sedimentation pattern of DNA treated by AsA or AsA and Cu^{2+} . The same as in Fig. 2. N_2O gas was passed through H_2O to saturation and employed for the examination. Concentration of N_2O in the reaction mixture was roughly adjusted to be 3 M on the basis of its solubility.

られなかつた。ギ酸ナトリウムやエチルアルコールないしチオシアン酸カリウムは $\cdot\text{OH}$ に対し特異性があるのに対し AET の特性は明白でなく単にフリーラジカルに関与するといわれていることから、AsA による DNA 切断には $\cdot\text{OH}$ の関与が考えられるが必ずしも主体ではなく他のラジカル種も推定される。しかし、これらのラジカルが反応中間体であるのかあるいは DNA 鎖に直接作用しているのか、さらに後者であれば DNA 切断における塩基特異性はどのように理解されるかなどの問題も解明を要すると思われる。

要 約

AsA ないし $\text{AsA} + \text{Cu}^{2+}$ 系による DNA 切断に対する二三のラジカル捕捉剤の影響をショ糖濃度勾配遠心分離法または粘度法により検討した。その結果、チオシアン酸カリウムではほとんど効果はなかつたが AET のほか比較的到高濃度のギ酸ナトリウム、エチルアルコール、亜酸化窒素などによつて DNA 切断は阻害されることを認め、AsA による DNA 切断にはフリーラジカルが関与していることを示した。

文 献

村上浩紀・山藤一雄 1968 リグニンの制癌作用. 九大農学芸誌, 23: 103-111

村上浩紀・山藤一雄 1969 a カテコールの制癌作用とデオキシリボ核酸に対する反応. 九大農学芸誌, 24: 13-17

村上浩紀・山藤一雄 1969 b ポリフェノール類の制癌作用. 九大農学芸誌, 24: 19-24

Murata, A. and K. Kitagawa 1973 Mechanism of inactivation of bacteriophage J1 by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 1145-1151

Murata, A., K. Kitagawa, H. Inmaru and R. Saruno 1972 Inactivation of single-stranded DNA and RNA phages by ascorbic acid and thiol reducing agents. *Agric. Biol. Chem.*, 36: 2597-2599

Murata, A., K. Kitagawa and R. Saruno 1971 Inactivation of bacteriophages by ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 35: 294-296

中村泰彦・山藤一雄 1968 アスコルビン酸酸化物の制癌作用. 九大農学芸誌, 23: 119-125

Omura, H., K. Shinohara, H. Maeda, M. Nonaka and H. Murakami 1978 Mutagenic action of triose reductone and ascorbic acid on *Salmonella typhimurium* TA 100 strain. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24: 185-194

Omura, H., Y. Tomita, Y. Nakamura and H. Murakami 1974 Antitumor potentiality of some ascorbate derivatives. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 18: 181-189

Shinohara, K., J.-H. Lee, M. Tanaka, H. Murakami and H. Omura 1980 Mutagenicity of intermediates produced in the early stage of the browning reaction of triose reductone with nucleic acid related compounds on bacterial tests. *Agric. Biol. Chem.*, 44: 1737-1743

篠原和毅・曾 耀崑・富田純史・井上 譲・尊田民喜・村上浩紀・大村浩久 1979 レダクトン類の腫瘍細胞 Sarcoma 180 の増殖に対する影響. 九大農学芸誌, 34: 59-65

Stich, H. F., J. Karim, J. Koropatnic and L. Lo 1976 Mutagenic action of ascorbic acid. *Nature*, 260: 722-724

富田純史・江藤正義・飯尾雅嘉・村上浩紀・大村浩久 1974 5-methyl-3,4-dihydroxytetronate の抗腫瘍性. 九大農学芸誌, 28: 131-137

Yamafuji, K., T. Fujii, Y. Kanegae and Y. Matsuo 1972 Action of carcinogenic tryptophan metabolites on deoxyribonucleic acid and RNA-polymerase. *Enzymologia*, 43: 73-82

Yamafuji, K. and H. Murakami 1968 Antitumor potency of lignin and pyrocatechol and their action on deoxyribonucleic acid. *Enzymologia*, 35: 139-153

Yamafuji, K., H. Murakami and M. Shinozuka 1970 Antitumor activity of Dopa, Dopamine, noradrenalin or adrenalin and their

- reaction with nucleic acids. *Z. Krebsforsch.*,
73: 195-203
- Yamafuji, K., Y. Nakamura, H. Omura, T.
Soeda and K. Gytoku 1971 Antitumour
- potency of ascorbic, dehydroascorbic or 2,3-
diketogulonic acid and their action on de-
oxyribonucleic acid. *Z. Krebsforsch.*, 76: 1-7

Summary

Effect of some radical scavengers on the breakage of DNA by ascorbic acid or ascorbic acid and Cu^{2+} was examined with sucrose density gradient centrifugation or viscometry. The degradation of DNA by ascorbic acid was distinctly inhibited by 2-aminoethylisothiuronium bromide. Even in the presence of Cu^{2+} , the breakage of DNA by ascorbic acid was impeded to some extent by ethyl alcohol, sodium formate or nitrous oxide of relatively higher concentration. However, effect was seldom observed with potassium thiocyanate. Thus, it was suggested that certain free radical might be concerned in the breakage of DNA by ascorbic acid.