スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) の反応
——酸素毒性発現機構解明へのアプローチ——

長野哲雄, 広部雅昭
東京大学薬学部薬品代謝化学教室

The Reactivity of Superoxide ($O_2^{\cdot-}$)
—Approach to Elucidation of Oxygen Toxicity Mechanism—

TETSUO NAGANO and MASAOKI HIROBE
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Superoxide ($O_2^{\cdot-}$) appears to play an important role in various biological processes, such as inflammation, carcinogenesis, radiation-induced damage, aging, phagocytosis and enzyme reactions. $O_2^{\cdot-}$ has been considered to have diverse but not vigorous reactivities compared with other active oxygen species, but has been reported to exert deleterious effects on living cells. Thus, the mechanism of the biological effects of $O_2^{\cdot-}$ has been of great interest.

The review reports that $O_2^{\cdot-}$ reacts with some compounds such as acyl halides, polyhalides, or CO_2 to form peroxy intermediates, which have more vigorous reactivities than $O_2^{\cdot-}$ alone. The peroxy intermediates can oxidize olefins or sulfides to the corresponding epoxides or sulfoxides in good yields. The phosphates, also, enhance the reactivity of $O_2^{\cdot-}$ as shown in the base-release reaction from nucleosides induced by $O_2^{\cdot-}$ and the phosphates. These reactions should be important for consideration of the $O_2^{\cdot-}$ toxicity. The reaction mechanisms have been examined in detail using $K^{18}O_2$ and cyclic voltammetry. Furthermore, synergism between $O_2^{\cdot-}$ and CCl_4 has been found in the biological system. Thus, CCl_4 toxicity on *Escherichia coli* is exacerbated by $O_2^{\cdot-}$. The results obtained should contribute not only to the development of $O_2^{\cdot-}$ for use in organic oxidations, but also to the elucidation of the oxidative reactivity of $O_2^{\cdot-}$ in biological systems.

Keywords—superoxide; active oxygen species; peroxy radical; oxidation; epoxide; acyl halide; carbon tetrachloride; carbon dioxide; hepatotoxicity; DNA damage

1. はじめに

基底状態酸素分子の一電子還元体であるスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) は活性酸素の一種であり常時普遍的に生体内に生成することが知られている。 $O_2^{\cdot-}$ が発癌, 炎症, 脳虚血, 糖尿病, パーキンソン病, 川崎病, 放射線障害などの疾患あるいは老化に関与していることが報告され,¹⁻⁹⁾ これらの観点から $O_2^{\cdot-}$ の反応性が注目されている。生体内に $O_2^{\cdot-}$ が過剰に生ずると, 生体にあるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD),¹⁰⁾ カタラーゼなどの活性酸素の消去系だけでは $O_2^{\cdot-}$ 及び $O_2^{\cdot-}$ から生ずる活性酸素種を処理しきれなくなり, 生体の重要な構成

成分であるタンパク質, 脂質, 核酸に障害を与え, 疾病をひき起こすと考えられている。¹⁻⁹⁾ $O_2^{\cdot-}$ 生成の制御¹¹⁾ が酸素障害から生体を防御する鍵となっている。^{6,8)}

$O_2^{\cdot-}$ の反応性の特徴は多様さにあり, アニオン種, ラジカル種, 酸化種, 更に還元種としても作用する。¹²⁾ 非プロトン性溶媒中では $O_2^{\cdot-}$ はかなり安定に存在し不均化速度は遅く, アニオン種として求核剤, H原子を引き抜くラジカル剤としての活性もある。しかしながら, 水溶液中においては一電子酸化種, 還元種としての作用が強く, ラジカル性あるいはアニオン性はあまり認められない。そして容易に不均化反応を起こし O_2 と H_2O_2 に

分解する。⁶⁴⁾ このように $O_2^{\cdot -}$ は非プロトン性溶媒中では多種多様で高い反応性を示すが、水溶液中では“スーパー”な反応性を示さないと考えられており、¹³⁾ そのため生体における酸素毒性発現の最終活性種は $O_2^{\cdot -}$ 自身ではなく $O_2^{\cdot -}$ から派生する他の活性酸素種 $\cdot OH$, H_2O_2 , 1O_2 であろうとされてきた。 H_2O_2 は $O_2^{\cdot -}$ の不均化反応により $\cdot OH$ は鉄触媒ハーバーワイス反応により生成し、¹⁴⁾ これらはいずれも $O_2^{\cdot -}$ に比べ強い酸化活性を有している。¹⁵⁾

しかしながら、最近 $O_2^{\cdot -}$ 自身も細胞内で酸素障害の活性本体として作用することが明らかにされた。¹⁶⁾ $O_2^{\cdot -}$ はジスルフィド開裂交換反応、¹⁷⁻¹⁹⁾ チオウラシルのウラシルへの変換²⁰⁾ など生体に対し障害を引き起こすことも示された。更に $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 あるいは $\cdot OH$ の DNA に与える障害には質的違いがあり、²¹⁾ 温和な反応性を有し他の活性酸素生成への単なる中間体とみなされてきた $O_2^{\cdot -}$ が独自の作用機構で遺伝子に障害を与えると報告されている。Birnboim ら²²⁾ は、 $O_2^{\cdot -}$ と $\cdot OH$ による DNA 鎖切断様式の違いを検討しており、 $O_2^{\cdot -}$ による障害は修復されにくいことを明らかにした。*in vitro* ではそれ程激しい反応性を示さない $O_2^{\cdot -}$ が細胞レベルでは障害誘発の最終酸化種として働く。この違いはどこから生じるのであろうか？

$O_2^{\cdot -}$ の反応性については、今から5年程前 Fridovich と Sawyer の間で論争があった。Sawyer は化学者の立場から $O_2^{\cdot -}$ 自身は生体にとって“無毒”であると主張した。¹³⁾ 一方、SOD の発見者として知られる Fridovich は²³⁾ $O_2^{\cdot -}$ が“スーパー”な反応性を有し酸素毒性を引き起こす本体であると反論した。⁶⁵⁾ 今回、筆者は本稿でこの問題点解決に1つの手掛りとなる、ひいては生体における酸素毒性発現機構解明の一助となるかもしれない $O_2^{\cdot -}$ の反応について述べる。具体的には、 $O_2^{\cdot -}$ それ自体では Sawyer の主張するようにそれ程高い酸化活性を有していないことが筆者らの検討結果からも明らかとなったが、その反応系に酸ハライド、ポリハロゲン化物、リン酸エステル、二酸化炭素など ($O_2^{\cdot -}$ の活性化因子) が存在すると、より活性な酸化能を有するパーオキシアニオン、パーオキシラジカルを生じ、 $O_2^{\cdot -}$ だけではみられない各種酸化反応をひき起こすことがわかった。これは、 $O_2^{\cdot -}$ が $\cdot OH$ などの前駆体としての役目だけではなく、ある種の化合物、官能基の存在下で酸素毒性を発現する活性種になることを示している。 $O_2^{\cdot -}$ からより活性な酸素種を生成させる化合物のなかには生体内に存在するリン酸エステル、二酸化炭素もあり、現在ブレオマイシン、マイトマイシンCなどの制癌作用あるいは炎症部

位などで活性酸素と生体の反応が注目されており、ここに示す反応例は生体における酸素毒性発現のメカニズムを分子レベルで解明する糸口になると期待される。

以下、4種の活性化因子存在下での $O_2^{\cdot -}$ の反応を詳述する。

2. $O_2^{\cdot -}$ と酸ハライドの反応

1) 酸ハライド存在下、 $O_2^{\cdot -}$ によるエポキシ化反応^{24,25)} $O_2^{\cdot -}$ が酸ハライドと反応してジアシルパーオキシドを生成する際に²⁶⁾ 中間体として過酸状態を経由するであろうと考え、各種基質をこの反応系に加え酸化反応を試みた。ベンゼンあるいは *n*-ヘキサンを溶媒とし、 KO_2 -18-クラウン-6-エーテルに酸ハライドとしてホスゲンダイマー (クロロギ酸トリクロロメチルエステル) を用いた反応系に、オレフィン、縮合芳香環を加えると対応するエポキシ体が好収率で得られた (Chart 1, Fig. 1)。クロロギ酸トリクロロメチルエステルは反応液中容易に2分子のホスゲンを生成することが知られている。この反応でフェナンスレン、ピレンが一段階でエポキシ化された。求電子のエポキシ化を行う *m*-クロ過安息香酸ではほとんど反応しない *p*-ニトロあるいは *p*-クロロトランススチルベンも本反応ではすみやかにエポキシ化され、ノルボルネン、シクロヘキセン等のオレフィンも高収率で酸化された。

α -ナフトキノリンでは *N*-オキシド体は全く生成せず、エポキシ体のみが生成物として得られた。本反応は KO_2 のかわりに電解還元により生成した $O_2^{\cdot -17)$ を用いても反応は進行する。 Na_2O_2 , *tert*-BuOOH, $H_2O_2 + KOH$, $KO_2 + H_2O$ の酸化系を用いた場合は全く進行しない。 KO_2 をホスゲンダイマー ($COCl_2$)₂ に対して8 (= $KO_2 / (COCl_2)_2$) 以上の割合で加えた時、収率は最大となった (Fig. 2)。酸ハライドとしてベンゾイルクロライドを用いた場合は、2 (= KO_2 / C_6H_5COCl) 以上の時収率は最大となった。このことはホスゲンダイマー1分子に対して8分子の $O_2^{\cdot -}$ 、つまりホスゲン1分子に対して4分子の $O_2^{\cdot -}$ が反応して過酸アニオン [$-OO-C(O)-OO-$] を生成、ベンゾイルクロライドの場合は2分子の $O_2^{\cdot -}$ が反応して $C_6H_5C(O)OO-$ を生成することを示している。これらの過酸アニオンが本反応の活性種であり、オレフィンを求核的に攻撃して、エポキシ化を引き起こすと考えられる。ホスゲンダイマーのかわりに各種酸ハライ

Chart 1

Fig. 1. Oxidation Reactions by $\text{KO}_2\text{-(COCl}_2)_2$ System Fig. 2. Correlation between Ratio of $\text{KO}_2/(\text{COCl}_2)_2$ and Yield of *trans*-Stilbene Oxide in the Epoxidation of *trans*-Stilbene

ド、酸無水物存在下でトランススチルベンを基質に用いて検討を行った結果、オキザリクロライド、チオエステルではいずれも反応は進行しないが、ベンゾイルクロライド、ベンゼンスルホニルクロライドなどの酸ハライドではオキンド体が得られた。しかしながら収率的にはホスゲンダイマーが最も良い $\text{O}_2^{\cdot-}$ の活性化剤であった。ベリレンのケイ光発光からオキザリクロライドと $\text{O}_2^{\cdot-}$ の反応によるジオキセタンの生成が推測されている。

2) 他の基質の酸化反応²⁷⁾ KO_2 -18-クラウン-6-エ

ーテル-ホスゲンダイマーの系はオレフィンのエポキシ化反応だけではなく、他に(i)ベンジル位のメチレンからケトンへの酸化反応、(ii)三重結合のジケトン体への酸化反応、(iii)エーテル結合の開裂反応もひきおこす。ベンジル位のメチレンからケトンへの酸化反応はオレフィンのエポキシ化の場合とは異なり $\text{KO}_2/(\text{COCl}_2)_2=4$ の時収率は最高に達し、その比を更に上げて収率は変化しなかった。このことは本反応においてはホスゲン1分子に2分子の $\text{O}_2^{\cdot-}$ が反応して $\cdot\text{OOC(O)OO}\cdot$ が生成し、これが活性種として働いていると考えられる。各基質の収率はテトラリンからテトラロン(34%)、フルオレンからフルオレノン(88%)、キサントンからキサントン(68%)である。又、三重結合の酸化反応例としては、フェニルアセチレンからベンジルが、エーテル結合の開裂反応例としては、ベンジルフェニルエーテルからベンズアルデヒド、フェノールが生成した。

3) K^{18}O_2 による反応機構の検討

金属カリウム、*tert*-ブタノール、ベンゾヒドロール、更に $^{18}\text{O}_2$ から調製した K^{18}O_2 を用いて反応機構を検討した。本法²⁸⁾により調製した KO_2 は市販品に比べ純度が高く99.5%である。 KO_2 に含まれる K^{18}O_2 と K^{16}O_2 の割合はレーザーラマンスペクトルの結果から78:22と決定した(Fig. 3)。この KO_2 を用いてベンゾイルクロライド存在下でのスチレンのエポキシ化及びテトラリンの酸化における ^{18}O の取り込み率を求めた。エポキシ化反応を $^{16}\text{O}_2$ 気流下、空気下、Ar 気流下で行った結果、反応系中の $^{16}\text{O}_2$ 濃度に関係なく生成物に取り込まれた酸素原子はすべて $\text{O}_2^{\cdot-}$ 由来のOであった。また、テトラリンの酸化反応においては Table I に示すように ^{18}O のテトラロンへの取り込みは反応系中の $^{16}\text{O}_2$ 濃度の影響を

Fig. 3. Raman Spectrum of $K^{18}O_2$ and $K^{16}O_2$ TABLE I. % Incorporation of ^{18}O into Tetralone in the Oxidation of Tetralin by $K^{18}O-C_6H_5COCl$ System

Reaction condition	% Incorporation of ^{18}O and ^{16}O into tetralone	
	^{18}O	^{16}O
Under Ar	99	1
Under Air	63	37
Under $^{16}O_2$	15	85

% Incorporation was corrected by $K^{18}O$ % content (78%) of KO_2 .

Fig. 4. Proposed Oxidation Mechanism by $KO_2-C_6H_5COCl$ System

大きく受けた。以上の結果と1), 2)で得られた実験結果を考え合わせると, Fig. 4に示す反応機構が推定される。すなわち酸ハライドに対して O_2^- が求核的に攻撃しハライドアニオンと置換し $^{18}O_2^-$ 自身がパーオキシラジカルにとりこまれる。テトラリンの酸化においてはこのラジカル種が基質からH・を引き抜き, 生じたテトラリンラジカルに酸素が付加したものと思われる。Ar

気流下では $^{18}O_2^-$ から生じた $^{18}O_2$ が付加し, 溶液中の溶存 $^{16}O_2$ 酸素濃度が増すにつれて $^{18}O_2$ の取り込み率が上昇する。一方, エポキシ化反応においては, パーオキシラジカル体は更に他の O_2^- により一電子還元されパーオキシアニオンとなり, この反応種により求核的にスチレンが酸化されるため, 取り込まれた酸素は反応系中の $^{16}O_2$ 濃度に関係なくすべて ^{18}O ということになる。

3. O_2^- とポリハロゲン化物の反応^{29,30)} (ポリハロゲン化物による肝障害誘因機構)

四塩化炭素 (CCl_4) は肝臓障害を誘因する化合物として知られており, 肝障害を有する実験動物作製の際によく用いられる。³¹⁻³³⁾ CCl_4 は肝臓中である種のラジカルを生成し, それが脂質過酸化のイニシエーターとなり, その結果肝毒性を発現すると考えられている。しかしながら, ラジカル種及びその生成機構, 更には生体内での反応性についてはほとんど検討されていない。唯一, Packer らによる $CCl_3OO\cdot$ とアスコルビン酸, チロシンなどの一電子移動反応を可視スペクトルで調べた報告がある。³⁴⁾ 本章では CCl_4 と O_2^- から $CCl_3OO\cdot$ の生成^{35,36)} 並びにその化学的反応性, 大腸菌を用いた生体系での $CCl_3OO\cdot$ の毒性発現について述べる。

1) CCl_4 存在下, O_2^- による基質酸化反応 アセトニトリル中, CCl_4 存在下 KO_2 による各種オレフィンの酸化反応を検討した結果, 主生成物としてエポキシ体が, 副生成物として二重結合の酸化開裂体が得られ, CCl_4 非存在下では反応は進行せずいずれも原料回収であった (Fig. 5)。シススチルベンからは主生成物として C-C 結合の反転したトランススチルベンオキシドが得られ反応中間体にラジカルの生成が予想される。電子密度のより高いオレフィンを有する α -あるいは β -メチルスチレンはスチレンにくらべ収率は高く, 反応もすみやかに進行した。 α , β 不飽和ケトンほとんど酸化されず本反応が親電子的であることが示唆される。この点, 1章で述べた酸ハライドによるエポキシ化とは異なる。環状オレフィンであるシクロヘキセンは, 直鎖状オレフィンより高収率でエポキシ化が進行し, それとともにアリル位の酸化されたシクロヘキセノンも生成した。フェナンスレン, ピレンなどの縮合芳香環も一段階でエポキシ体に酸化される。オレフィンの酸化反応以外にもベンジル位の酸化, 酸化的脱アミノ化とシッフ塩基の形成, N-脱アルキル化, アミド結合の開裂, O-脱アルキル化, スルフィドの酸化などの反応が進行した。代表例を Fig. 5 に示した。酸化的脱アミノ化はコラーゲンモデルとして興味深い反応である。 CCl_4 投与による肝硬変

Fig. 5. Oxidation Reactions by $\text{KO}_2\text{-CCl}_4$ System

では肝臓のコラーゲンの増加がおこり組織に繊維化が進行し、この繊維化にはコラーゲン中のリジン残基の酸化的脱アミノ化と Schiff 塩基の形成が関与している。³⁷⁾ これらの反応は CCl_4 による肝障害の発現機構を考える上で重要である。

2) 種々のポリハロゲン化物存在下、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ による酸化反応 CCl_4 以外に肝障害をおこすことが知られているポリハロゲン化物として CBrCl_3 , CHCl_3 があるが、その毒性の強度は $\text{CBrCl}_3 > \text{CCl}_4 > \text{CHCl}_3$ の順である。 CH_2Cl_2 は肝障害を誘因しない。筆者らはこれらポリハ

ロゲン化物存在下、 $O_2^{\cdot -}$ によるトランススチルベン（トランススチルベンオキシド）の収率：72%） $> CCl_4$ （62%） $> CHCl_3$ （27%） $> CH_2Cl_2$ （0%）の順に効果的であり、ポリハロゲン化物の肝障害及び脂質過酸化をひきおこす作用と良い相関がみられた。ポリハロゲン化物の結合解離エネルギーの強さは $C-Br < C-Cl < C-H$ であり、上記の結果は $O_2^{\cdot -}$ との反応の容易さに起因しており、後述のサイクリックポーラログラムの結果からも支持される。トリクロロメチル基を有する $PhCCl_3$, CCl_3CCl_3 , CF_3CCl_3 も CCl_4 と同様、 $O_2^{\cdot -}$ による酸化能を著しく高めた。この他に肝障害をひきおこすことが知られているトリクロルエチレン $CCl_2=CHCl$ や吸入麻酔薬であるハロタン $CF_3CHBrCl$ も高い効果を有することが明らかとなった。

3) 本酸化反応機構 (i) サイクリックポーラログラフによる検討—— $O_2^{\cdot -}$ を比較的純粋な形で生成するのに酸素分子の電解還元法がある。溶媒として非プロトン性極性溶媒（DMF, CH_3CN など）、支持電解質として四級アンモニウム塩（ Et_4NClO_4 など）、電極として白金などが用いられる。この反応は可逆であり、一電子還元により生成した $O_2^{\cdot -}$ は再酸化され O_2 に戻る（Fig. 6）。 $O_2^{\cdot -}$ と CCl_4 の反応を調べる目的で、 O_2 のサイクリックポーラログラムにおける還元及び再酸化に与える CCl_4 の効果を検討した。Fig. 6 に示すように CCl_4 の濃度依存的に還元波は増大し、一方再酸化波は減少する。前者は $O_2^{\cdot -}$ から O_2 を生成し O_2 濃度がみ

かけ上高くなっていることに由来し、後者は生成した $O_2^{\cdot -}$ が CCl_4 と反応し、濃度的に減少したためと考えられる。更に種々のポリハライド存在下で検討した結果、 $CBrCl_3 > CCl_4 > CHCl_3 > CH_2Cl_2$ の順に再酸化の波高が減少し、 $CBrCl_3$ が $O_2^{\cdot -}$ と最も反応しやすいことを示している。特に、肝障害の報告のない CH_2Cl_2 は O_2 の還元波、再酸化波に全く影響を与えず、 $O_2^{\cdot -}$ とは反応しないことがわかる。上記の結果はポリハライドによる生体構成成分に対する pro-oxidant activity と良い相関がある。

(ii) スチレンの置換基効果—— α -メチルスチレンはスチレンに比べ、より容易に酸化された。またパラ位置置換スチレンについて置換基効果を検討した結果、ハメットの σ^+p 値と反応性の間に相関が認められた。このことは本反応が親電子の活性種によるものであることを示唆する。

(iii) DABCO の添加効果——DABCO（1,4-ジアザビシクロ-[2,2,2]-オクタン）は $CCl_3OO\cdot$ を一電子還元して CCl_3OO^- にする。³⁸⁾ DABCO を本酸化反応溶液に加えるとその添加量に依存して反応阻害がみられた。これは本反応の活性種が $CCl_3OO\cdot$ であり DABCO により還元され CCl_3OO^- になることにより反応が阻害されたものと考えられる。

(iv) $K^{18}O_2$ による検討—— $^{18}O_2$ を用いて調製した $K^{18}O_2$ を使用して、種々の酸素濃度雰囲気下スチレンのエポキシ化、スルフィドの酸化反応を行い ^{18}O の基質

Fig. 6. Effect of CCl_4 on Cyclic Voltamogram of O_2

Fig. 7. Proposed Oxidation Mechanism by KO_2 - CCl_4 System

へのとり込み率を検討した。Ar 気流下では、両反応とも100%の ^{18}O のとり込みがみられたが、空气中、 $^{16}\text{O}_2$ 気流下と溶媒中の溶存 $^{16}\text{O}_2$ 濃度が増すに従って ^{18}O のとり込み率が減少し、溶存酸素由来の ^{16}O のとり込み率が増加した。

以上の知見から Fig. 7 に示す反応機構を推定した。 O_2^- は CCl_4 を一電子還元することにより $\cdot\text{CCl}_3$ と Cl^- を生成する。すなわち還元的脱離反応をひきおこす。 O_2 気流下や空气中での反応では溶存酸素 $^{16}\text{O}_2$ 又は K^{18}O_2 由来の $^{18}\text{O}_2$ が $\cdot\text{CCl}_3$ に付加し、 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ を生成する。一方 Ar 気流下では生成した $\cdot\text{CCl}_3$ に K^{18}O_2 由来の $^{18}\text{O}_2$ のみが付加し基質には ^{18}O が100%とりこまれる。 O_2^- と CCl_4 との反応は、還元的脱離、 O_2 分子付加の2段階を経て、最終的活性種である $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ を生成すると考えられる。 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ は、親電子的反応性を有しオレフィンに付加してラジカル中間体を生成する。この中間体を経由してエポキシ体になる。本反応の活性種 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ の生成は O_2^- から CCl_4 への一電子移動過程が律速であり、酸化還元電位が O_2^- より高い場合、反応は容易に進行すると推測される。しかしながら CCl_4 の酸化還元電位は -1.3 V (vs. SCE) であり、 O_2^- の電位 -0.9 V (vs. SCE) に比べ低く、 O_2^- から CCl_4 への単純な電子の受け渡しは考えにくい。更にかさ高い塩素原子のため、 O_2^- が直接炭素原子を攻撃し求核的に反応する可能性も少ないと思われ、おそらく O_2^- は CCl_4 と反応する際に O_2^- の π^* 軌道と塩素原子の空の d 軌道が重なった中間体を生成し、一電子還元すると考えられる。生じた $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ は電子吸引性のトリクロロメチル基の寄与で親電子的活性ラジカル種であり前記の如く O_2^- のみでは進行しない種々の酸化反応をひきおこす。

ここに示してきた O_2^- とポリハロゲン化物から活性酸化種の生成する反応が細胞内でもおこりうるか否かに関しては、 O_2^- の生体内での挙動及びポリハロゲン化物の肝障害誘因機構とも関係して生物学上興味深いと思われる。次章では、大腸菌を用いて生体内における O_2^- と CCl_4 の反応性について検討した結果を述べる。

4) パラコート存在下、大腸菌に及ぼすポリハロゲン化物の効果^{39,40)} 除草剤として用いられるパラコート (PQ^{2+}) は細胞内で NADPH を還元剤として、細胞質中のダイフォラーゼによりあるいは非酵素的に還元され準安定なカチオンラジカル (PQ^+) を生成する。この PQ^+ は O_2 と速やかに反応し O_2^- を生成し、酸素毒性を発現する。

この O_2^- 増産剤である PQ^{2+} 存在下に大腸菌を培養すると大腸菌はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) やカタラーゼを誘導することにより PQ^{2+} をメディエーターとして生成する活性酸素種 O_2^- , H_2O_2 に対抗する。⁴¹⁾ すなわち生体防御機構が働く。SOD は O_2^- を H_2O_2 と O_2 に不均化することにより O_2^- を除去する。カタラーゼは H_2O_2 を H_2O と O_2 に分解する。

Fig. 8. Effects of Paraquat and/or CCl_4 on Growth of *E. coli* in TSY Media

TABLE II. Effects of Paraquat and/or CCl_4 on Superoxide Dismutase and Catalase Activities in *E. coli*

Run	Paraquat (mM)	CCl_4 (mM)	Generation time (min)	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)
1	0	0	42	43	6
2	10	0	63	108	11
3	0	30	43	59	5
4	10	30	126	158	11
5	0	60	58	58	6
6	10	60	207	n. d. ^{a)}	n. d.

Cells were grown for 22 h at 37 °C in aerobic TSY media with the indicated additive(s), harvested, extracted, and assayed for superoxide dismutase, catalase and protein.

a) Not detected.

10 mM PQ^{2+} 存在下大腸菌を培養するとその増殖は少し抑制されたがそれほど顕著な効果はない (Fig. 8). これは大腸菌の細胞内で O_2^- 及び H_2O_2 をひき金として酵素 SOD, カタラーゼが誘導され活性酸素による毒性を抑制した結果である. Fig. 8 の 4, 6, 7 に示すように本系に CCl_4 を添加することにより増殖は阻害され, 100 mM CCl_4 では全く生育しなかった. CCl_4 のみにおいては若干の time lag はあるが最終的菌の生育度はかわらなかった. また本実験を嫌気的条件下で行うと, PQ^{2+} , CCl_4 を共存させても大腸菌の生育に何ら影響を与えなかった. これはこれらの障害が酸素依存であることを示している. 更に SOD, カタラーゼ等の酵素活性及び電気泳動の結果から PQ^{2+} 存在下 Mn-SOD の誘導がみられ, CCl_4 はこの誘導を阻害しなかった (Table II). また CBrCl_3 , CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 による効果も検討した結果, $\text{CBrCl}_3 > \text{CCl}_4 > \text{CHCl}_3 > \text{CH}_2\text{Cl}_2$ の順に毒性を発現し, 先に述べた肝毒性の強度とよい一致を示した. これらのことは本毒性が PQ^{2+} により増産された O_2^- と CCl_4 から生じたラジカル種 $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ により発

現したと考えられ, このラジカルは高い反応性を有するため, 微量に生成するだけで菌の増殖を阻害し, 誘導された SOD, カタラーゼでは十分防御できなかったものと思われる (Fig. 9). 金属イオン Mn (II) は PQ^{2+} による Mn-SOD の誘導を増強する. そこで Mn (II) 存在下で CCl_4 , PQ^{2+} の毒性発現を検討した結果, 予想通りこれらの大腸菌増殖阻害能を抑制した.

最近, PQ^{2+} による細胞障害は生体膜が標的となっているという報告がなされた.⁴²⁾ また Fridovich らにより大腸菌の増殖阻害と致死に及ぼす効果ではその障害部位が異なることが見出された.⁴³⁾ PQ^{2+} は大腸菌ではおそらくペリプラズムに存在し, 大腸菌内膜の呼吸鎖から電子を漏出させ O_2^- を発生させるものと考えられる. CCl_4 は脂溶性化合物であり細胞中の脂溶性画分に溶解込み, PQ^{2+} が存在する近傍の大腸菌内膜に入り, PQ^{2+} により発生した O_2^- と反応し細胞成分に障害を与えるのであろう. $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ と生体成分との反応例としては Willson らによる放射線照射を用いたリゾチームやリボスクレアーゼの不活化の報告⁴⁴⁾ がある. 彼らは $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ が O_2^- や $\cdot\text{OH}$ より高い反応性を示しリゾチームのトリプトファン残基, リボスクレアーゼのメチオニン及びシステイン残基を攻撃すると報告している. 又, 同様の系でバクテリオファージ T_2 の不活化に対しても $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ は O_2^- より効果のあることが示された.

CCl_4 は肝障害誘因物質であるがその障害の本体は $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ であろう. この $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ の生成に関しては 2つの機構が提出されている. 1つは肝臓中のシトクローム P-450 で還元的に CCl_4 から Cl^- が脱離し $\cdot\text{CCl}_3$ を生じ, 続いて O_2 が付加する説.^{45,46)} これは各臓器における P-450 の分布と CCl_4 による脂質過酸化の程度に相関がみられること, P-450 を添加した場合 CCl_4 による脂質過酸化が促進されることから考えられたが, 一方では CCl_4 による脂質過酸化が P-450 の阻害剤であ

Fig. 9. Proposed Mechanism of *E. coli* Cell Damage by O_2^- and CCl_4

る CO で抑制されないなど,⁴⁷⁾ 矛盾する点も多い. 他方の説は CCl_4 と O_2^- の反応により生成するというものである. 肝臓は他の臓器に比べ O_2^- の生成が盛んな部位である. ミトコンドリアではユビキノンの自動酸化, NADH-デヒドロゲナーゼから, ミクロゾームではシトクローム b_5 の自動酸化, NADPH-シトクローム P-450 レダクターゼ, シトクローム P-450 等から O_2^- が生じている. このようにして生じた O_2^- と CCl_4 が反応して組織障害をひきおこすと考えられる. 筆者らの示した結果はこの説を支持する.

4. O_2^- とリン酸エステルの反応 (核酸塩基遊離反応)^{48,49)}

次に O_2^- と反応して O_2^- 自身より活性な反応種を生成する例としてリン酸エステルを取りあげる.

発癌, 制癌の両面から活性酸素種による遺伝子損傷に関する研究が盛んに行われている. 核酸の損傷を大別するとリン酸エステル鎖の切断, 糖の酸化的開裂, 核酸塩基の遊離, 核酸塩基の修飾となる. 制癌剤ブレオマイシンによる DNA 鎖切断は, 糖の酸化的開裂や核酸塩基の遊離を伴って起こるとされており, $\cdot\text{OH}$ あるいは鉄-酸素錯体によるデオキシリボース C-4' 位の水素原子の引き抜き, 糖ラジカルの生成, 糖過酸化物の生成などの過程を経て進行していると考えられる. 核酸塩基の修飾としては, チミン塩基の水酸化, グアニン塩基の水酸化が知られている. 詳細は拙著を参照されたい.⁸⁾

いずれも最終的反応活性種は, 鉄触媒ハーバーワイス反応により生成した $\cdot\text{OH}$ あるいは鉄-酸素錯体であろうと推定されている. しかしながら最近 Birnboim ら²²⁾ により O_2^- 自身が細胞内の DNA 鎖切断を引き起こし得ること, 更に O_2^- 自身が細胞毒性を発現しうることが報告され,^{16,21)} O_2^- と核酸の反応を分子レベルで解析することに注目が集まるようになってきた. 筆者らはヌクレオチドのリン酸エステル基が O_2^- による核酸塩基の遊離を促進することを見出した. この反応について以下述べる.

DMSO 溶媒中, 基質であるヌクレオチドに KO_2 を加え 28–33°C, 24 時間攪拌すると, 各ヌクレオチドから対応する核酸塩基が遊離生成する (Chart 2, Table III).

TABLE III. Base-Release Reaction of 3'- or 5'-Nucleotides or Nucleosides with Superoxide

Substrate	3'-Nucleotide			
	3'-AMP	3'-GMP	3'-CMP	3'-UMP
Product	A	G	C	U
Yield(%)	80	24	17	29

Substrate	5'-Nucleotide			
	5'-AMP	5'-GMP	5'-CMP	5'-UMP
Product	A	G	C	U
Yield(%)	55	13	27	21

Substrate	Nucleoside			
	Adenosine	Guanosine	Cytidine	Uridine
Product	A	G	C	U
Yield(%)	14	3	7	9

3'-AMP, adenosine-3'-monophosphate; 3'-GMP, guanosine-3'-monophosphate; 3'-CMP, cytidine-3'-monophosphate; 3'-UMP, uridine-3'-monophosphate; 5'-AMP, adenosine-5'-monophosphate; 5'-GMP, guanosine-5'-monophosphate; 5'-CMP, cytidine-5'-monophosphate; 5'-UMP, uridine-5'-monophosphate; A, adenine; G, guanine; C, cytosine; U, uracil.

3'-あるいは 5'-AMP からはアデニンが高収率で生成した. N-C グリコシド結合の開裂のしやすさは, $\text{AMP} > \text{CMP} > \text{UMP} > \text{GMP}$ の順となり, プリン, ピリミジン骨格に無関係であった. 一方, ヌクレオチドを基質とした場合収率は Table III に示すようにヌクレオチドに比べ極端に低下しており, リン酸エステルが反応に関与していることが示唆される. また, 糖部がリボース, デオキシリボースどちらにおいても反応は促進される. 特に 5'-dAMP では 73% の高収率でアデニンが生成した. また, チミン塩基が TMP から得られ, リン酸エステル基関与の本反応がすべての核酸塩基についてみられた. ここに示したリン酸エステル基による反応増強効果は O_2^- がリン酸エステルと反応してリン酸パーオキシラジカルを生成することによるもので, これが塩基の遊離を促進していると考えられる. このことは活性酸素による核酸損傷を考える上で重要な知見であり, この効果がリン酸エステルのかわりにトシル基すなわち 5'-トシルアデノシンを基質に用いた場合にアデニン生成が 29% とそれ程大きな効果が見られないことからリン酸エステルに特異的の反応と思われる. 更にアデノシン-5'-二リン酸 (ADP) でも好収率で反応が進行した. 2'-AMP から 60% の収率でアデニンが得られ, 2'-AMP, 3'-AMP, 5'-AMP いずれからでもリン酸エステル基を有しないアデノシンに比

Fig. 10. Effect of Phosphates or Sugars on Adenine-Release Reaction of Adenosine by Superoxide

べ高収率でアデニンが遊離生成し、リン酸エステル基の置換位置は促進効果に本質的には影響しないことがわかる。

リン酸エステルが $O_2^{\cdot -}$ と直接反応しているか否か、ポリハロゲン化合物の場合と同様サイクリックボルタメトリーを用いて検討した。酸素の可逆的なサイクリックボルタモグラムは dAMP (2'-デオキシアデノシン-5'-リン酸) 存在下で、還元波は増大し再酸化波は減少した。一方 dA (2'-デオキシアデノシン) を加えても酸素のボルタモグラムには何ら影響がないことから、リン酸エステルと $O_2^{\cdot -}$ が実際に反応し得ることが示された。

このリン酸エステルによる核酸塩基遊離の促進効果について、添加されたリン酸エステル類も有効に機能するか否かを検討するため、分子内にリン酸基を有しないアデノシンを基質として、(C₆H₅O)₃PO、リボース-5-リン酸 (R-5-P)、5'-GMP 等を反応溶液中に添加した。その結果、5'-GMP、5'-CMP、5'-UMP、リボース-5-リン酸、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) を反応溶液に加えた場合、リン酸エステル基を有しないグアノシン、リボース、グルコースの添加、あるいは無添加の反応収率と比較して反応が促進された (Fig. 10)。特に 5'-GMP は基質の 1/20 量でも顕著な効果を示し反応後 5'-GMP の大部分は回収され、触媒的に反応を促進することがわかった。また、グルコース-6-リン酸を用いた場合は 71% の高収率であった。糖のリン酸モノエステルはリン酸トリフェニル、リン酸トリメチル、リン酸トリエステル体に比べ効

率よく遊離反応を進行させた。これはリン酸のプロトンによって $O_2^{\cdot -}$ が不均化して反応をひきおこしたとも考えられるが、これは Fig. 10 に示す如くリン酸モノエステル (リン酸エチル)、リン酸ジエステル (リン酸ジフェニル) が反応収率に何らの影響も与えないことから否定される。また、反応系中に微量の KOH、K₂O₂ が存在するが対照実験からこれらの反応種では核酸塩基の遊離はひきおこさないことがわかった。以上のように、糖のリン酸モノエステルに反応の促進効果が認められたが、これらのエステル類が生体内に存在することを考えあわせると興味深い結果と思われる。

一方、柏村ら⁵⁰⁾ により還元糖であるアルドース、ケトース及びそれらのリン酸エステルが Cu²⁺ 存在下、DNA 鎖切断やバクテリオファージの不活化を起こすことが報告されている。上記の反応も糖リン酸エステルの還元力による可能性も考えられる。しかしながら、核酸塩基とグリコシド結合を有し還元糖ではない 5'-GMP が核酸塩基の遊離を促進することは、Cu²⁺-還元糖による系とは異なることを示している。促進機構を解明するため、更に各種リン酸エステル類を検討した結果、グリセロールリン酸が効果的であることが明らかとなった (Table IV)。特にグリセロール-2-リン酸には著しい促進効果が認められた。Table IV に示すように O-ホスホリルエタノールアミンでも同様の効果があり、いずれもリン酸基の近傍に水酸基やアミノ基を有する化合物が有効である。これは、先に示した 3',5'-サイクリック

TABLE IV. Effects of β -Glycerophosphoric Acid and *O*-Phosphorylethanolamine on Adenine-Release Reaction of Adenosine by Superoxide

Additive	β -Glycerophosphoric acid	<i>O</i> -Phosphorylethanolamine	None
Adenine yield (%)	71	48	14
Adenosine recovery (%)	20	33	78

Condition: adenosine 0.2 mmol, additive 0.1 mmol, KO_2 2 mmol, solvent (DMSO) 10 ml, reaction temp. 30°C, reaction time 24 h.

AMP, 3',5'-サイクリック GMP では促進効果が認められなかった実験結果とも一致する. おそらく $\text{O}_2^{\cdot -}$ はリンを攻撃し, パーオキシラジカル, 更にこれが一電子還元されたパーオキシアニオンを生成すると思われる. これらの反応活性種は隣接する水酸基, アミノ基により安定化され, 基質に作用し核酸塩基を遊離するものと考えられる. このようにある種の“活性化因子”の存在によって $\text{O}_2^{\cdot -}$ の反応性が高められる例として, 現在まで以下の報告がある.

(i) 筆者らの酸ハライドと $\text{O}_2^{\cdot -}$ の反応の報告をうけて, 金らによりチオール, ジスルフィド, スルホニルクロライド等の有機硫黄化合物存在下での反応が報告された. これは $\text{O}_2^{\cdot -}$ とこれらイオウ化合物から生じたアニオン種, $\text{RSO}_2^{\cdot -}$, $\text{RS}(\text{O})\text{OO}^{\cdot -}$, $\text{RS}(\text{O})_2\text{OO}^{\cdot -}$ によりスルホキシド, ホスフィン, α , β -不飽和ケトンの酸化をひき起こす.⁵¹⁻⁵⁵⁾

(ii) 大饒らによるアルキルハライドを活性化因子とする反応.⁵⁶⁾ これは, $\text{O}_2^{\cdot -}$ とアルキルハライドから生じた $\text{ROO}^{\cdot -}$ がスルフィリミンを酸化するものである.

(iii) 草林ら⁵⁷⁾ はジエチルクロロホスフェートの存在下 $\text{O}_2^{\cdot -}$ がオレフィンやスルホキシドを酸化してエポキシ体, スルホン体をそれぞれ生成することを報告しており, $\text{O}_2^{\cdot -}$ とジエチルクロロホスフェートから生成するリン酸パーオキシラジカルあるいはリン酸パーオキシアニオンが活性種であるとしている.

(iv) Baizer ら⁵⁸⁾ による活性メチレン存在下での反応. 活性メチレンのプロトンが $\text{O}_2^{\cdot -}$ により引き抜かれ酸素 O_2 が付加してパーオキシアニオンが生成し, α , β -不飽和ケトンがエポキシ化される報告もある.

このように“活性化因子”存在下での $\text{O}_2^{\cdot -}$ の反応はいくつか知られているが, より生体に近い系である水系を用いた反応例は未だ報告されていない. 筆者らは糖リン酸エステル類が生体内に存在するものであることを考

え, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 関与の酸素障害機構に対する1つの可能性を示すため緩衝液中での反応を検討した.

$\text{O}_2^{\cdot -}$ は H^+ 存在下で容易に H_2O_2 と O_2 に不均化することが知られている. 特に酸性領域ではみかけの二次反応速度定数 k は $8.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり $\text{O}_2^{\cdot -}$ の $\text{p}K_a$ は4.88であるが, $\text{pH}=4.88$ 付近では $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と非常に速い. 一方, pH が高くなるにつれ反応は遅くなりアルカリ領域では $<0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ である. 反応は不均化により生ずる H_2O_2 の効果を除去するため, カタラーゼを系中に存在させ $\text{pH} 10$ で行った. 基質 AMP を含む緩衝液中に KO_2 の DMSO 溶液を添加することにより反応を開始させた. その結果 AMP からはアデニンの生成が認められたが, アデノシンを基質とした場合はアデニンの生成はみられずリン酸エステル基の効果が示された. この反応は SOD で完全に阻害され, マニトール, DABCO, NaN_3 , 不活化 SOD では全く抑制効果がなかったことから, $\text{O}_2^{\cdot -}$ による反応であることがわかる.

水系においても核酸塩基の遊離が顕著に促進されたことは, 活性酸素による遺伝子の損傷を考える上で重要であろう.

5. $\text{O}_2^{\cdot -}$ と二酸化炭素 (CO_2) の反応⁵⁹⁾

CO_2 は常温常圧で無色の気体であり, 生体においては

TABLE V. Cooxidation of Sulfides during Oxidation of Carbon Dioxide with Superoxide

Substrate	Product %	Recovery %
Ethyl methyl sulfide	Ethyl methyl sulfoxide 84 (0) ^{a)}	6 (98)
Benzyl methyl sulfide	Benzyl methyl sulfoxide 78 (0) benzaldehyde, 2 (0) benzoic acid 0 (49)	20 (41)
Dibenzyl sulfide	Dibenzyl sulfoxide 39 (0) benzaldehyde, 1 (0) benzoic acid 2 (44)	47 (15)

The reaction mixture contained 0.4 mmol of substrate, 4 mmol of KO_2 and 0.4 mmol of 18-crown-6-ether in dimethylformamide solution. Reactions were allowed to proceed for 20 h at 15–20°C under a CO_2 atmosphere.

a) Values in parentheses indicate yields in the absence of CO_2 .

炭素源として使われ、植物での炭酸同化作用により固定され、有機炭素化合物となる。本章ではこの CO_2 も O_2^- の反応性を著しく活性化することを述べる。Table V に CO_2 存在下 O_2^- によるスルフィドの酸化を示した。 CO_2 を存在させない場合の収率（カッコ内）と比較して顕著な酸化活性能が示されている。本系ではオレフィンの酸化もひきおこすが α -あるいは β -メチルスチレンがスチレンより高収率で酸化されること、スルフィドの酸化では、スルホキシド体で反応が止まることから親電子的活性種によると思われる。 K^{18}O_2 を用いた検討結果からは CCl_4 と同様パーオキシラジカルによる酸化機構を示唆している。

上に示した O_2^- と CO_2 から生じる活性種に関する反応例としては他に次のようなものがある。

(i) カーボネイト緩衝液中でキサンチンオキシダーゼにより O_2^- を発生させると弱いケイ光が検出される。これは CO_3^{2-} と O_2^- とから生じた CO_3^- がカップリングする際に生じるケイ光であると報告されている。⁶⁰⁾

(ii) 活性酸素によるルミノールの酸化及び種々の酵素の不活化に及ぼす CO_3^{2-} の効果を検討した報告がある。⁶¹⁾ O_2^- や $\cdot\text{OH}$ が CO_3^{2-} と反応して生じた CO_3^- によりルミノールの酸化が促進され、また酵素の不活化に対しても CO_3^{2-} により促進効果がみられた。これは $\cdot\text{OH}$ よりも寿命の長い CO_3^- の方が活性中心の金属を特異的に攻撃できるためとしている。

上記の反応例は O_2^- が一電子酸化剤として作用しているもので、本章で示した反応に類似したものとしては、ビタミン K_1 によるカルボキシル化反応がある。⁶²⁾ 本反応はプロトンビンのグルタミン酸残基に対するカルボキシル化で、 NADH 、ビタミン K_1 、 O_2 、 CO_2 を必要とし還元型のビタミン K_1 と O_2 から生成した O_2^- が CO_2 と反応して生ずる CO_2^- 、 CO_3^- 、 CO_4^- 、 HCO_4^- 、 $\text{C}_2\text{O}_6^{2-}$ 等がカルボキシラーゼの基質になるといわれている。このカルボキシル化反応が SOD により阻害されることにより O_2^- の関与が示された。このカルボキシル化はプロトンビンからトロニンへの変換に必須の過程であり活性化因子と O_2^- から生じた活性種が関与する反応例として重要である。

6. おわりに

酸素は人間をはじめとする好氣的生物にとって必要不可欠な気体である。効率のよいエネルギー産出は酸素をたくみに利用することによってはじめて可能となった。特にポルフィリン含有酵素にはこの例が多く例えば呼吸鎖におけるシトクローム類あるいは薬物を代謝する酵素 P-450 などは酸素をたくみに用いた好例と言えよう。⁶⁰⁾ しかしながら原始地球上に誕生した生命体にとって酸素は必ずしも好ましい物質ではなく、むしろ毒ガスであったと考えられる。しかし、その毒性化合物・酸素も46億年程前には地球上には現在の1万分の1程度の濃度しか存在していなかったであろうと推定されている。本稿で論じたスーパーオキシド、あるいは $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 H_2O_2 といった酸素から派生する活性酸素種は細胞内に発生し生体に障害を与えていたと思われる。生物の進化の過程でこれら活性酸素種に対する防御機構を獲得し、酸素の有効利用が可能となった。

それと同時にこの酸素により地球大気上にオゾン層が形成され紫外線の地表への照射をブロックした。その結果、生物の陸上での生活が可能となり、より高等な生物へと発展したと考えられている。このように酸素は生命体にとってジキルとハイドのような二面性をもった化合物で、一旦、生体の恒常性が維持できなくなった場合には毒劇物として作用する。その作用機構としてスーパーオキシド自身が、活性種として生体を攻撃する可能性を我々は示してきた。

酸素、及び活性酸素種と各種の疾病との関わりが最近注目されているが、このような活性種の反応性を知ることとは生命現象を理解する上で重要なことであり、新しい発想による創薬への道を拓くものと思われる。

謝辞 最後に、本研究は文部省科学研究費助成金の援助をいただいた。ここに深甚の謝意を表す。また、共同研究者である香取悦（現日大・薬）、荒金久美修士（現小林コーセー）、増野匡彦博士（現東大・薬）、井上英史博士（現東北大・理）、横大路清美修士（小林コーセー）、山本浩史修士、山根弘修士（現田辺製薬）の協力によりおこなわれたもので彼らの努力に深く感謝する。

引用文献及び注

- 1) L.W. Oberley (ed.), "Superoxide Dismutase," CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Vol. I, 1982, Vol. II, 1982, Vol. III, 1985.
- 2) J.V. Bannister, W.H. Bannister (eds.), "The Biology and Chemistry of Active Oxygen," Elsevier, New York, 1984.
- 3) B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (eds.), "Free Radicals in Biology and Medicine," Oxford University Press, Northern Ireland, U. S. A. 1985.

- 4) 大柳善彦著, 早石 修監修 “スーパーオキシドと医学,” 共立出版, 東京, 1981.
- 5) 八木国夫・中野 稔監修, 二木鋭雄・島崎弘幸編, “活性酸素—化学・生物学・医学,” 医歯薬出版(株), 東京, 1987.
- 6) H. Sies 編, 井上正康訳 “活性酸素と疾患,” 学会出版センター, 1987.
- 7) 広部雅昭, 長野哲雄, 医学のあゆみ, **127**, 485 (1983).
- 8) 長野哲雄, 広部雅昭, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 16 (1988).
- 9) 長野哲雄, 水質汚濁研究, **10**, 537 (1987).
- 10) J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 11) T. Nagano, I. Fridovich, *J. Free Radicals in Biology and Medicine*, **1**, 39 (1985).
- 12) 松浦輝男, “酸素酸化反応,” 丸善, 東京, 1977, p.301.
- 13) D.T. Sawyer, J.S. Valentine, *Acc. Chem. Res.*, **14**, 393 (1981).
- 14) M.S. Baker, J.M. Gebicki, *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 258 (1984).
- 15) T. Nagano, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 596 (1985).
- 16) W.S. Lin, F. Wong, R. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 778 (1987).
- 17) T. Nagano, K. Arakane, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 5021 (1980).
- 18) H. Inoue, T. Nagano, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 317 (1984).
- 19) H. Inoue, T. Nagano, M. Hirobe, *J. Pharmacobio-Dyn*, **10**, 19 (1987).
- 20) E. Katori, T. Nagano, T. Kunieda, M. Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3075 (1981).
- 21) A.C. Bagley, J. Krall, R.E. Lynch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3189 (1986).
- 22) H.C. Birnboim, M. Kanabus-Kaminska, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6820 (1985).
- 23) I. Fridovich, *Acc. Chem. Res.*, **15**, 200 (1982).
- 24) T. Nagano, K. Arakane, M. Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3719 (1980).
- 25) T. Nagano, K. Yokooji, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3481 (1983).
- 26) R.A. Johnson, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 331.
- 27) T. Nagano, K. Yokooji, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 965 (1984).
- 28) I. Rosenthal, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **12**, 317 (1976).
- 29) H. Yamamoto, T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 539 (1986).
- 30) T. Nagano, H. Yamamoto, M. Hirobe, “The Biological Role of Reactive Oxygen Species in Skin,” ed. by O. Hayaishi, S. Imamura, Y. Miyachi, University of Tokyo Press, Tokyo, 1987, p.241.
- 31) T.F. Slater, “Free Radicals Lipid Peroxidation and Cancer,” ed. by D.C.H. McBrien, T.F. Slater, Academic Press, London, 1982, p.243.
- 32) J.E. Packer, T.F. Slater, R.L. Willson, *Nature (London)*, **278**, 737 (1979).
- 33) B.A. Mico, L.R. Pohl, *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 596 (1983).
- 34) J.E. Packer, T.F. Slater, R.L. Willson, *Life Sci.*, **23**, 2617 (1978).
- 35) J.L. Roberts, Jr., D.T. Sawyers, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 712 (1981).
- 36) J.L. Roberts, Jr., T.S. Calderwood, D.T. Sawyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7691 (1983).
- 37) 吉田政幸, 渡部徳子, 上森まり子, 中山伸一, 化学の領域, **34**, 978 (1980).
- 38) J.E. Packer, J.S. Mahood, V.O. Mora-Arellano, T.F. Slater, R.L. Willson, B.S. Wollfenden, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 901 (1981).
- 39) H. Yamamoto, T. Nagano, M. Hirobe, *J. Biol. Chem.*, **263**, 12224 (1988).
- 40) 長野哲雄, 化学と工業, **41**, 153 (1988).
- 41) H.M. Hassan, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **254**, 10846 (1979).
- 42) R. Kohen, M. Chevion, *Biochemistry*, **27**, 2597 (1988).
- 43) J. Kitzler, I. Fridovich, *J. Free Radicals in Biology and Medicine*, **2**, 245 (1986).
- 44) R.L. Willson, “Developments in Biochemistry,” Vol. 26, ed. by J.V. Bannister, W.H. Bannister, Elsevier, New York, 1984, p.238.
- 45) L.R. Pohl, R.D. Schlick, R.J. Highet, J.W. George, *Mol. Pharmacol.*, **23**, 318 (1984).
- 46) B.A. Mico, L.R. Pohl, *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 596 (1983).
- 47) Y. Masuda, T. Murano, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 2275 (1977).
- 48) T. Nagano, H. Yamane, N. Yada, M. Hirobe, “Studies in Organic Chemistry 33, The Role of Oxygen in Chemistry and Biochemistry,” ed. by W. Ando, Y. Moro-oka, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1988, p.449.
- 49) H. Yamane, N. Yada, E. Katori, T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 1104 (1987).
- 50) 柏村直樹, 森田潤司, 有合化, **42**, 523 (1984).
- 51) S. Oae, T. Takata, Y.H. Kim, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 2712 (1981).

- 52) S. Oae, T. Takata, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3689 (1980).
- 53) S. Oae, T. Takata, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3213 (1980).
- 54) S. Oae, T. Takata, Y.H. Kim, *Tetrahedron*, **37**, 37 (1981).
- 55) Y.H. Kim, B.C. Chung, H.S. Chang, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 1079 (1985).
- 56) K. Akutagawa, N. Furukawa, S. Oae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1104 (1984).
- 57) M. Miura, M. Nojima, S. Kusabayashi, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1352 (1982).
- 58) M. Sugawara, M. Baizer, *J. Org. Chem.*, **48**, 4931 (1983).
- 59) H. Yamamoto, T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, submitted for publication in *J. Am. Chem. Soc.*, "The Reactivity of Superoxide: A Potent Oxidant Generated *in situ* from Superoxide and CO₂."
- 60) E.K. Hodgson, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 202 (1976).
- 61) A.M. Micherson, J. Maral, *Biochimie*, **65**, 95 (1983).
- 62) M.P. Esnouf, M.R. Green, H.A.O. Hill, G.R. Irvine, S.J. Walter, *Biochem. J.*, **174**, 345 (1978).
- 63) 最近人工 SOD 酵素とも呼ぶべき鉄錯体が筆者らにより開発され、臨床への応用が注目されている; T. Nagano, T. Hirano, M. Hirobe, "Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals," ed. by E. Niki, M. Kondo, T. Yoshikawa, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1988, in press; T. Nagano, T. Hirano, M. Hirobe, submitted for publication in *J. Biol. Chem.*, "SOD Mimics, Based on Iron, with Activity *in vivo*."
- 64) この際生じる O₂ 分子が励起一重項状態であるか基底三重項状態であるか重要な問題で多くの研究者により検討されている; T. Nagano, I. Fridovich, *Photochem. Photobiol.* **41**, 33 (1985).
- 65) 両者の論争の詳細は拙著を参照されたい; 長野哲雄, 化学と工業, **39**, 795 (1986).
- 66) P-450 の最終活性種が何であるかも現在興味の焦点になっている; T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1997 (1988).