デオキシリボ核酸 (DNA) に対するアントラキノン誘導体の
光力学作用 : DNA 鎖の切断¹⁾

岡野定輔, 堀江 孝, 大野純子
東北大学薬学部²⁾

The Photodynamic Action of Anthraquinone Derivatives on Deoxyribonucleic
Acid (DNA) : Scission of the DNA Chain¹⁾

TEISUKE OKANO, TAKASHI HORIE, and JUNKO OHNO
Pharmaceutical Institute, Tohoku University²⁾

(Received January 5, 1978)

Examinations were made on the photodynamic action of anthraquinone derivatives on calf thymus DNA and also on the mechanism involved in this reaction. When the aqueous mixture of DNA and anthraquinone derivatives was irradiated by light above 290 nm, melting point and viscosity of DNA decreased in the order of 2-anthraquinone-sulfonate, 2-anthraquinonecarboxylic acid, and 1-anthraquinonesulfonate. Such effect was not seen in 1,5- and 1,8-anthraquinonedisulfonate. The degree of the photodynamic action of anthraquinones on DNA paralleled the quantity of hydrogen peroxide produced by the photoirradiation of aqueous solution of anthraquinone derivatives. Results of the "i-assay" and sucrose density gradient centrifugation experiments indicated that scission of the DNA chain took place by the photodynamic action of anthraquinone derivatives. Examination of the reaction mechanism revealed that hydroxy radical produced in the aqueous solution of anthraquinone derivatives during photoirradiation played an important role in the photosensitization reaction of DNA.

Keywords—anthraquinone derivative; photodynamic action; photosensitization; DNA; scission of DNA chain; viscosity; hydroxy radical; radical scavenger; sucrose density gradient centrifugation

アントラキノン誘導体の中には変異原性,³⁾ 癌原性^{4,5)} などの生物活性を示す化合物があることが知られている。一方, ある種のアントラキノン誘導体は光照射下にピリミジン二量体を単量体に分解⁶⁾ することや, 光照射下で *Proteus vulgaris* の増殖を阻止⁷⁾ することも知られている。光照射下に示されるアントラキノン誘導体のこれらの挙動は誘導体の他物質 (ピリミジン二量体, 菌体成分) に対する光力学作用に由来することを推測させる。本研究において著者等は, アントラキノン誘導体の生物活性作用の分子的機構に関する情報を得る目的で, 系統的にそろえた5種のアントラキノン誘導体について, DNA に対する光力学作用を検討するとともに, その機構を解析した。アントラキノン誘導体と DNA の混合溶液を光照射したときに生起する DNA の諸性質の変化 (粘性変化, 加熱処理時の物性変化, 密度パターンの変化) を観測することを主な手段として検討した結果, アントラキノン誘導体の光力学作用によって DNA 分子鎖の切断が生起することを明らかにすることが出来た。また反応液中に生成する過酸化水素 (以下 H_2O_2 と略記) の挙動, 反応に対する光照射および脱ガスの影響, 添加物質の影響などの面から光力学作用機構を解析した結果, この光力学作用にはアントラキノン誘導体水溶液の光照射

- 1) 本報は「N-ヘテロ芳香族の電子的性状」第64報である。第63報: T. Okano, T. Horie, M. Iwaizumi, N. Motohashi, *Gann*, **69**, 109 (1978).
- 2) Location: Aobayama, Sendai, 980, Japan.
- 3) G. Zetterberg, G. Swanbeck, *Acta Dermatoven.* (Stockholm), **51**, 45 (1971).
- 4) N. Takizawa, *Gann*, **34**, 158 (1940).
- 5) S. Ito, *Gann*, **35**, 182 (1941).
- 6) E. Ben-Hur, I. Rosenthal, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 163 (1970).
- 7) H. Berg, H.E. Jacob, *Z. Naturforsch.*, **17**, 306 (1962).

によって生成するヒドロキシラジカル ($\dot{\text{O}}\text{H}$) が重要な役割を演ずることを明らかにすることが出来た。

実 験 の 部

試料 アントラキノン誘導体は市販品を水から再結晶して用いた (元素分析値等, Table I 参照). 高重合のコウシ胸腺 DNA は Sigma 社 (St. Louis) から購入した. 本品のリン1原子あたりの分子吸光係数 (ϵ (P)) は 5380 (260 nm) であった. 2-Mercaptoethylamine は半井化学の製品, 牛肝臓起源のカタラーゼは Miles 社 (Erkhardt) の製品を用いた. EDTA および過酸化水素水 (30% (w/v)), ヨウ化カリウムその他の無機試薬は市販の特級試薬を使用した. 水は新鮮な再蒸留水を用いた.

溶液 特に断わらないかぎり, 溶媒には 1/15M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いた. DNA 溶液は 1.0 mg/ml 濃度の母液をつくり, 適宜緩衝液で希釈して用いた. 熱変性 DNA をつくるには, DNA 溶液を沸とう水浴中で 15 分間加熱後, 氷で急冷した. 全ての溶液はスペクトル測定前には遮光した.

光照射 リコーロータリー光化学反応装置 RH 400-10 W 型を用いた. H_2O_2 生成量の測定実験の場合の他は, 光源 (リコー高圧水銀灯 UVL-400 HA 型 (400 W)) から 7.5 cm の距離に置いた試料溶液 (25° 恒温槽中) を照射した. このさい照射光は試料に至るまでに 2 枚のバイレックスガラスを通り, この間に 290 nm より短波長の光は実際上完全にカットされた. なおバイレックスガラスを通しての照射光の放射強度は 365 nm で最大 (距離 1 m で $94.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) であった. H_2O_2 生成量測定実験では, 光源にウシオ電機社高圧水銀灯 UM-102 型 (100 W) を用い, 東芝化成工業社の色ガラスフィルター UV-39 (390 nm 以下の光をカット) をとおして, 8.3 cm の距離から試料溶液を照射した.

脱ガス 試料溶液を入れた容器を真空ライン装置に連結して吸引し, 10^{-5} mmHg 以下に減圧して脱ガスした.

H_2O_2 の定量 約 20° の室温で, 柳本ポーログラフ PA-102 型により, 作用極に滴水銀電極, 参照極に飽和カロメル電極を用いて定量⁸⁾ した. 試料溶液はあらかじめ十分に N_2 ガスで置換した.

粘性の測定 ウペローデ型粘土計 ($k=0.005$) を用い, $25^\circ \pm 0.01^\circ$ の恒温槽中で溶媒および DNA を含む溶液の粘性率を測定して還元粘度 (η_{sp}/c) を求めた. また各種濃度の溶液の η_{sp}/c 値を無限希釈に外挿して極限粘度数 ($[\eta]$) を得た.

加熱処理時の DNA の物性測定 (a) 可逆的熱処理——日立自記分光光度計 EPS-3T 型に, 付属の恒温セルホルダーを装着して, 各温度の DNA 溶液について 260 nm で吸光度を測定し, 25° の吸光度に対する相対吸光度と温度との関係曲線から DNA の融解温度 (T_m) を求めた.

(b) 不可逆的熱処理 (“i-assay” 法⁹⁾)——DNA を含む溶液を 25° から 90° までの間の一定温度に 15 min 加熱後氷で急冷, 液温を 25° に再平衡させたのち η_{sp}/c を測定し, η_{sp}/c と加熱温度との関係曲線を作成した. 式 $f_t = (\eta_{25^\circ} - \eta_t) / \Delta\eta_{\max}$ ¹⁰⁾ で f_t が最大値の 1/2 になる温度として $T_{1/2,t}$ 値を得た (式中 η_{25° は 25° に 15 min 加熱し, 氷冷後 25° に再平衡させた溶液の η_{sp}/c , η_t は 25° より高温に 15 min 加熱, 氷冷, 25° に再平衡させた溶液の η_{sp}/c , $\Delta\eta_{\max}$ は加熱温度 25° の η_{sp}/c 値と 90° のそれとの差である).

DNA の密度パターンの測定 内径 13 mm の遠心管中で, 緩衝液 (pH 7.0) またはアルカリ性溶液 (NaCl (0.7M)-NaOH(0.3M)-EDTA(0.001M) 混合溶液) に 5.0—20% (w/v) のショ糖溶液を加えて直線密度勾配溶液 11.0 ml を調製. この液の上層に DNA 200 μg を含む試料溶液 0.4 ml を積層して, Beckman L5-65 型超遠心機 (ローターは Beckman SWTi 41 型) により 5°, 40000 rpm で 10 hr 遠心. 遠心終了後遠心管の底部にキャピラリー管を挿入して, Varioperpex peristaltic pump 12000 型 (LKB 社) を用いて吸引, 下層から順次 0.37 ml ずつを分画. 各分画液に, はじめに用いたと同じ緩衝液またはアルカリ性溶液を混合して, Gilford 240 型分光光度計 (セルの光路長 1 cm) を用いて 260 nm の吸光度を測定した.

結 果

I. 化合物の性質

Fig. 1 に本研究で用いた 5 種のアントラキノン誘導体の紫外および可視吸収スペクトルを示す. 図には使用した DNA の吸収スペクトルをあわせて示した. Table I に, 以下の記述において用いるアントラキノン誘導体の化合物番号, 誘導体の元素分析値, および主な吸収帯の吸収極大 ($\lambda_{\max}$) の位置と分子吸光係数 (ϵ) を示す. Fig. 1 および Table I から明らかとなおり, 5 種の誘導体はいずれも 257—259 nm 付近の π - π^* 遷移にもとづく強い吸収帯のほか, 324—336 nm 付近に吸収を示した (モノ置換体 I, II, V はこの他に 276—280 nm 付近にも吸収帯を示した). このことから, 本研究の光照射実験条件下 (DNA 分子の励起を回避するため, 290 nm 以

8) H. Berg, H.E. Jacob, *Photochem. Photobiol.*, **4**, 55 (1965).

9) K. Hamaguchi, E.P. Geidushek, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1329 (1962).

10) J.S. Bellin, C.A. Yankus, *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 363 (1966).

下の光を遮断)でアントラキノン誘導体の励起に寄与するのは主として長波長側 (324—336 nm 付近) の吸収帯に対応した波長域の照射光であることが明らかである。なお、遮光下にアントラキノン誘導体と DNA を混合してもスペクトル系に変化は認められず、したがって基底状態で両者間に直接的な相互作用はないと考えられる。

II. T_m の変化

Fig. 2 に、「実験の部」記載の条件で II-DNA 混合溶液を各時間 (0, 60, 120 分) 光照射したのち溶液を加熱

Fig. 1. Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Anthraquinone Derivatives at pH 7.0

Compound numbers as in Table I.

TABLE I. Analytical and Spectral Data of the Anthraquinone Derivatives Used in This Study

Compound	No.	Formula	Elemental analysis (%)				$\lambda_{\max}$ nm (ϵ) ^{a)}
			Calcd.		Found		
			C	H	C	H	
Sodium 1-anthraquinonesulfonate	I	C ₁₄ H ₇ O ₅ SNa	54.19	2.27	53.69	2.66	257(35300), 277(8800) (s), 329(3500)
Sodium 2-anthraquinonesulfonate	II	C ₁₄ H ₇ O ₅ SNa · H ₂ O	51.21	2.74	51.06	2.98	257(44500), 276(13500), 330(4700)
Sodium 1,5-anthraquinonedisulfonate	III	C ₁₄ H ₆ O ₈ S ₂ Na ₂	40.78	1.47	40.57	1.57	259(36000), 325(3200)
Potassium 1,8-anthraquinonedisulfonate	IV	C ₁₄ H ₆ O ₈ S ₂ K ₂	37.83	1.56	37.14	1.61	259(28800), 324(2600)
2-Anthraquinone-carboxylic acid ^{b)}	V	C ₁₅ H ₈ O ₄	71.43	3.20	71.37	3.10	259(48000), 280(13500) (s), 336(5400)

^{a)} (s) denotes shoulder. ^{b)} mp 298°.

したときの溶液の相対的吸光度と温度の関係、および光照射時間と T_m の関係 (挿入図) を示す。図の相対吸光度曲線から、光照射時間が長いほど溶液の T_m が低下したことが明らかである。この事実は混合溶液を光照射することによって DNA の構造に、不可逆的分解⁹⁻¹¹⁾ を含む何らかの変化が生起することを指示する。なお Fig. 2 の挿入図から、光照射時間 0—90 分の範囲内で光照射時間の延長とともに T_m がほぼ直線的に減少したことが明らかである。

III. 粘性変化

アントラキノン誘導体と DNA との混合溶液を光照射し、溶液の粘性変化を経時的に観測した結果を Fig. 3 に示す。図から明らかなとおり I, II および V と DNA が関与した系では、光照射によって溶液の η_{sp}/c は $II > V > I$ の順に減少した。二置換体 (III, IV) が関与した系では粘性変化は対照のそれと有意差が無かった (Fig. 3 で、対照実験、III-DNA 系および IV-DNA 系の η_{sp}/c 値が光照射前の DNA のそれよりわずかに減少しているのが見られるが、これは照射光のうち 290—300 nm 領域の光が DNA にわずかに吸収されることと関係があると思われる)。

Table II に、アントラキノンスルホン酸 (I, II, III, IV) と DNA の混合系を 2 時間光照射したときの $[\eta]$ と、 $[\eta]$ 値から式 $[\eta] = 1.05 \times 10^{-7} M^{1.32}$ (M は分子量^{14,15)} にしたがって算定した DNA の平均分子量を示す (Table II の第 2 欄 (H_2O_2 生成量) については後述)。DNA に対して光力学作用を示した 2 種の誘導体 (I, II) が関与した系では、DNA の分子量が減少していることが注目される。

濃度と粘性変化

Fig. 4A に、II の濃度 ($[II]$) を変化した II-DNA 系を光照射したときの溶液の粘性変化を示す。図から明らかなとおり、アントラキノン誘導体の濃度が高いほど溶液の η_{sp}/c の減少の度合は大きかった。

加熱処理時の DNA の粘性変化 光照射下 II による DNA の構造的変化について、より詳しく

Fig. 2. Plots of Relative Absorbance at 260 nm of Photoirradiated Aqueous Mixtures of 2-Anthraquinonesulfonate (II) and DNA vs. Temperature

The sign $\rightleftharpoons$ indicates T_m .
Concentrations: II, $2.0 \times 10^{-5} M$; DNA, 0.05 mg/ml.
Photoirradiation time: curve a, 0 min; curve b, 60 min; curve c, 120 min.
The inserted graph shows plots of T_m vs. photoirradiation time.

Fig. 3. Time Course of Changes in Viscosity of Anthraquinone DNA Systems Photoirradiated at pH 7.0

Compound numbers as in Table I.
Concentrations: anthraquinones, $5.0 \times 10^{-5} M$; DNA, 0.5 mg/ml.
In the control experiment, sample solution contained DNA only.

- 11) P.O.P. Ts'o, G.K. Helmkamp, C. Sander, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 686 (1962).
- 12) W. Troll, S. Belman, E. Levine, *Cancer Res.*, **23**, 841 (1963).
- 13) 小野哲生, 蛋白質・核酸・酵素, **9**, 1122 (1964).
- 14) J. Einger, P. Doty, *J. Mol. Biol.*, **12**, 549 (1965).
- 15) D.M. Crothers, B.H. Zimm, *J. Mol. Biol.*, **12**, 525 (1965).

TABLE II. Photo-induced Hydrogen Peroxide Production in the Aqueous Solution of Anthraquinone Derivatives and Changes in Limiting Viscosity Number and Molecular Weight of DNA in the Mixed System of Anthraquinones and DNA

Compd. No.	$\text{H}_2\text{O}_2^a)$ ($\mu\text{mol/l}$)	Data for DNA in the mixed system ^{b)}	
		$[\eta]$	Mol. wt.
I	50	9.5	1.07×10^6
II	190	7.8	0.92×10^6
III	0	11.5	1.23×10^6
IV	0	11.4	1.22×10^6
V	130	—	—
Control ^{c)}	—	11.6	1.24×10^6

a) H_2O_2 produced by 1 hr photoirradiation of aqueous solutions of anthraquinone derivatives ($1.0 \times 10^{-3}\text{ M}$).

b) Data obtained by 1 hr photoirradiation of aqueous mixtures of anthraquinones ($5.0 \times 10^{-4}\text{ M}$) and DNA (0.5 mg/ml).

c) Control, without anthraquinone derivative, for the mixed system experiments.

知るために、各種時間光照射した II-DNA 混合溶液について *i*-assay 法を適用して η_{sp}/c を測定した。結果を Fig. 4B に示す。図に明らかなとおり、溶液の η_{sp}/c は *i*-assay 実験の低温加熱部においても、光照射しない対照溶液のそれより低い値を示し、低下の程度は光照射時間が長いほど大であった。この事実は、II の光力学作用によって DNA の分子量が減少したことを指示する。因みに、Fig. 4B の各時間の光照射で得られた $T_{1/2,t}$ 値はつぎのとおりである：非照射，80°；15 分照射，72°；30 分照射，66°；60 分照射，62°；120 分照射，60°。

IV. DNA の密度パターンの変化

上記においては DNA に対するアントラキノン誘導体の光力学作用を粘性変化の面から検討したが、この節ではショ糖密度勾配遠心法によって DNA の密度パターンの変化を観測した結果について述べる。中性およびアルカリ性溶液中でショ糖密度勾配遠心実験を行なった結果をそれぞれ Fig. 5A および B に示す。Fig. 5A に明らかなとおり、アントラキノン誘導体 (II) の存在下で DNA の中性溶液を光照射したとき、密度パターン曲線 (曲線 b) は、intact な DNA の密度パターン曲線 (曲線 a) より、密度が小さい側

Fig. 4. (A) Time Course of Changes in Viscosity of Photoirradiated Aqueous Mixtures of DNA and 2-Anthraquinonesulfonate (II) and (B) "*i*-assay" Profiles of the II-DNA System

Concentration of DNA in graphs A and B was 0.5 mg/ml . Concentration of II in graph A: curve a, 0 M ; curve b, $5.0 \times 10^{-4}\text{ M}$; curve c, $5.0 \times 10^{-5}\text{ M}$; curve d, $5.0 \times 10^{-6}\text{ M}$. Photoirradiation time in graph B: curve a, 0 min; curve b, 15 min; curve c, 30 min; curve d, 60 min; curve e, 120 min.

The sign $\rightleftharpoons$ indicates $T_{1/2,t}$.

Fig. 5. Comparison of Density Patterns of Treated and Untreated DNA

Graph A: DNA was centrifuged in neutral sucrose density gradient solution.

Graph B: DNA was centrifuged in alkaline sucrose density gradient solution.

Test solutions: curves a and a', 0.5 mg/ml DNA solution (unirradiated); curves b and b', mixture of 2-anthraquinonesulfonate (II, $5.0 \times 10^{-5}\text{ M}$) and DNA (0.5 mg/ml), photoirradiated in advance to centrifugation for 1 hr; curve c, 0.5 mg/ml heat-denatured DNA solution (unirradiated).

にシフトした。密度パターンのこの変化の仕方は DNA を熱変性したときの変化 (曲線 a→c の変化) の仕方とは全く異なっていた。これらの事実は、II の光力学作用によって DNA (2 本鎖) に鎖切断がおきたことを示す。このことは反応後の II-DNA 混液についてアルカリ性でショ糖密度勾配遠心を行なった結果からさらに支持される。すなわち、Fig. 5B に示されているように、反応後の II-DNA 混液を強アルカリ性にして DNA の 2 本鎖間の塩基対結合を分離したときの密度パターン (曲線 b') においても、吸光度のピークは対照 (DNA のみ) の密度パターン (曲線 a') のそれより密度が小さい側にシフトした。この事実は II の光力学作用によって、DNA を構成する 2 本のポリヌクレオチド鎖の各々に切断が起きたことを意味する。

V. 作用機構の検討

H₂O₂ の生成 Berg 等⁷⁾ は II の水溶液を光照射するときは、液中に H₂O₂ が生成することを報告している。著者等は上記のアントラキノン誘導体の DNA に対する光力学作用の機構を解明する目的で、まず光照射下における 5 種の誘導体の H₂O₂ 生成能を比較した。アントラキノン誘導体水溶液を 60 分間光照射したのち、液中に生成する H₂O₂ を定量した結果を Table II (第 2 欄) に示す。表の数値から明らかとなり、H₂O₂ 生成量は II>V>I の順に減少し、III および IV では H₂O₂ の生成は実際上認められなかった。この H₂O₂ 生成能の大小関係は、さきに述べた DNA に対する誘導体の粘性減少効果の大小関係と並行していることが注目される。なお、II の水溶液を脱ガスして光照射したときは H₂O₂ の生成は認められなかった。

H₂O₂ の効果 Fig. 6A に、H₂O₂-DNA 混合溶液 (アントラキノン誘導体不存在) を光照射したときの η_{sp}/c -時間の関係曲線を示す。図に明らかとなり、光照射下の H₂O₂-DNA 混液の粘性は時間とともに低下し、低下の程度は H₂O₂ の濃度が高いほど大であった。光照射しない H₂O₂-DNA 混液 (対照) では粘性の減少は見られなかった。Fig. 6B に、一定時間 (2 hr) 光照射した H₂O₂-DNA 混液について *i*-assay 法によって DNA の熱的变化を観測した結果を示す。図に明らかとなり、H₂O₂-DNA 混合溶液を光照射したときは、溶液の η_{sp}/c は H₂O₂ を含まない対照溶液のそれより、*i*-assay の低温加熱部において著明に低下して ($T_{1/2,i}$ 値: H₂O₂ (1×10⁻⁴M) 存在, 63°; H₂O₂ 不存在, 79°), H₂O₂ が光照射下に DNA の分子量を減少させることが明らかとなった。

H₂O₂ が光照射下に DNA に対して上記のような挙動を示すことは、前述のアントラキノン誘導体水溶液の光照射によって生成する H₂O₂ も同様の作用をもつことを強く示唆する。また光照射したときだけ H₂O₂ が DNA

の粘性を低下させたこと (Fig. 6A) は、DNA 分子を直接攻撃するのは H₂O₂ 自体ではなく、その光分解産物であることを示す。

脱ガスの影響 Fig. 7 に II-DNA 系について、脱ガスして溶存酸素を除去した状態で溶液を光照射したのち、*i*-assay 法によって DNA の熱的变化を観測した結果を、対照実験の結果とともに示す。図に明らかとなり、脱ガスした場合 (曲線 b) の II-DNA 混合溶液の η_{sp}/c 値は *i*-assay の低温加熱部において、脱ガス処理をしないで光照射した場合 (曲線 c) の値より著明に高く、曲線 b は対照実験 (非脱ガス) の場合の曲線 a と事実上一致した ($T_{1/2,i}$ 値: 曲線 a, 83°; 曲線 b, 83°; 曲線 c, 60°)。すなわち、液中の溶存酸素を除去したときは、II の DNA に対する光力学作用は全く抑制された。この事実は、光力学作用過程で分子状酸素 (O₂) が何らかの役割を果すことを指示する。

添加物質の影響 Table III に、II-DNA 系に各種の物質を添加して 1 時間光照射したとき

Fig. 6. (A) Time Course of Changes in Viscosity of DNA Photoirradiated in the Presence of Hydrogen Peroxide and (B) *i*-assay Profiles of Photoirradiated and Non-irradiated Hydrogen Peroxide-DNA Systems

Concentration of DNA (in graphs A and B): 0.5 mg/ml.
Concentration of H₂O₂ in (A): curve a, 1.0×10⁻⁴ M; curve b, 5.0×10⁻⁵ M; curve c, 1.0×10⁻⁵ M; curve d (control experiment without irradiation), 1.0×10⁻⁴ M.
Concentration of H₂O₂ in (B) (for curves a and b): 1.0×10⁻⁴ M.
Curves a and b in graph B show the results obtained with non-irradiated and irradiated (120 min) H₂O₂-DNA mixture, respectively.

The sign $\Leftarrow$ indicates $T_{1/2,i}$.

TABLE III. Effects of Added Substances on the Photodynamic Action of 2-Anthraquinonesulfonate (II) on DNA

Substance added		II ^{a)}	$\eta_{sp}/c^{b)}$
Name	Concn.		
None	—	Present	15.3
None	—	Absent	19.4
Catalase	1658 units/ml	Present	19.8
KI	5.0×10^{-3} M	Present	20.1
2-Mercaptoethylamine	1.0×10^{-1} M	Present	19.8

a) 5.0×10^{-4} M, when present.

b) Data obtained by 1 hr photoirradiation of aqueous solutions containing 0.5 mg/ml of DNA.

の、溶液の η_{sp}/c 値を示す。表から明らかとなり、カタラーゼを添加して液中に生成する H_2O_2 を分解したときも、また $\dot{O}H$ ラジカルの捕捉剤¹⁶⁾ として知られているヨウ化カリウムまたは 2-mercaptoethylamine を添加したときも η_{sp}/c 値は II が存在しないときの対照実験値と有意差がなく、II の光力学作用は実験条件でほとんど完全に抑制された。これらの事実は、 H_2O_2 の光分解産物が DNA の粘性減少に寄与する（前記）ことと考えあわせて、 H_2O_2 の光分解によって生成する $\dot{O}H$ ラジカルが直接的に DNA 分子を攻撃することを指示するものと考えられる。

考 察

芳香族化合物の DNA に対する光力学作用としては、各種色素（メチレンブルー¹⁷⁻²⁰⁾ アクリジン誘導体^{21,22)} フルオレセン誘導体²³⁾、フラビン類（ルミクローム²⁴⁻²⁶⁾ リボフラビン²⁷⁾）、芳香族炭化水素²⁸⁾ キノリン N-オキンド類²⁹⁾ およびベンゾフェノン³⁰⁾）などが光照射下に DNA を損傷することが知られている。

本研究において著者等は、光照射下にアントラキノ誘導体が DNA 鎖を切断する事実を明らかにするとともに、その機構を解析した。すでに述べたように、実験結果は誘導体の DNA に対する光力学作用には、反応系中

Fig. 7. Influence of Degassing on the Photodynamic Action of 2-Anthraquinonesulfonate (II) on DNA

Solutions were photoirradiated for 2 hr. Plots were obtained by the "i-assay" method. The sign $\rightleftharpoons$ indicates $T_{1/2, i}$.

Concentrations: II, 5.0×10^{-4} M; DNA, 0.5 mg/ml.

Curves: a, control (DNA only); b, II-DNA system, degassed;

c, II-DNA system, undegassed.

The sign $\rightleftharpoons$ indicates $T_{1/2, i}$.

- 16) J. Blok, W.S.D. Verhey, *Radiation Res.*, **34**, 689 (1968).
- 17) M.I. Simon, H. Van Vunakis, *J. Mol. Biol.*, **4**, 488 (1962).
- 18) E. Seaman, L. Levine, H. Van Vunakis, *Biochemistry*, **5**, 1216 (1966).
- 19) L.A. Waskell, K.S. Sastry, M.P. Gordon, *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 49 (1966).
- 20) K.S. Sastry, M.P. Gordon, *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 42 (1966).
- 21) H. Fujita, E. Saito, K. Suzuki, A. Wada, *J. Rad. Res.*, **11**, 1 (1970).
- 22) K.S. Sastry, M.P. Gordon, *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 32 (1966).
- 23) J.S. Bellin, L.I. Grossman, *Photochem. Photobiol.*, **4**, 45 (1965).
- 24) J.S. Sussenbach, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 154 (1963).
- 25) J.S. Sussenbach, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 184 (1965).
- 26) J.S. Sussenbach, W. Berends, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **16**, 263 (1964).
- 27) K. Uehara, T. Mizoguchi, Y. Okada, *J. Biochemistry*, **55**, 685 (1964).
- 28) M. Kodama, C. Nagata, *Chem.-Biol. Interactions*, **1**, 99 (1969).
- 29) C. Nagata, K. Fujii, S.S. Epstein, *Nature*, **215**, 972 (1967).
- 30) M. Charlier, C. Helene, *Photochem. Photobiol.*, **15**, 527 (1972).

に生ずる $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルが重要な役割を演ずることを示唆したが、光照射下のアントラキノン誘導体水溶液中における $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルの生成機構はつぎのように考えられる。

溶存酸素の存在でアントラキノン誘導体水溶液を光照射するときは、式 (1)–(3) のプロセスで H_2O_2 が生成し (式中 AQ はアントラキノン誘導体, AQO は AQ のハイドロキノン体),^{31,32)} H_2O_2 はさらに式 (4) のプロセスで $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルに変化すると考えられる。³³⁾

因みに DNA に対する $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルの挙動として、ベンゾフェノン³⁰⁾ の水溶液を DNA の存在で光照射するとき、三重項ベンゾフェノンと水との反応で生成する $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルが DNA の糖部分を損傷することや、DNA 溶液を放射線 (X 線, γ 線)^{34,35)} で照射するときは、水の二次生成物として生成する $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルが DNA 鎖を切断にみちびくことが知られている。

光照射下のアントラキノン誘導体水溶液中に生起する反応 (式 (1)–(4)) および DNA に対する $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルの挙動 (上記) を考慮すると、アントラキノン誘導体の DNA に対する光力学作用においては、光反応で液中に生成した $\dot{\text{O}}\text{H}$ ラジカルが直接的に DNA にはたらい分子鎖を切断にみちびくものと考えられる。本研究の実験で明らかとなった諸種の事実はこの機構によってすべて矛盾なく説明することができる。

以上、アントラキノン誘導体の DNA に対する光力学作用とその機構について検討した結果を述べた。アントラキノン誘導体が光照射下に DNA 鎖を切断するという本研究で明らかとなった事実は、誘導体の生物活性機作に関連して興味深いことと思われる。

謝辞 本研究は一部文部省科学研究費特別研究費によった。また化合物の元素分析は東北大学薬学部中央分析室において行なわれた。記して深甚の謝意を表わす。

31) D. Tresselt, *Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin*, **10**, 76 (1968).

32) A.D. Broadbent, *Chem. Commun.*, **8**, 382 (1967).

33) F. Haber, J. Weiss, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, **147**, 332 (1934).

34) N.S. Krushinskaya, M.I. Shal'nov, *Radiobiology*, **7**, 36 (1967).

35) D.S. Kapp, K.C. Smith, *Radiation Res.*, **42**, 34 (1970).