核酸を切断する糖質誘導体

柏村直樹*・森田潤司**

Nucleic Acid Cleavage Activity of Some Carbohydrate Derivatives.

Naoki KASHIMURA* and Junji MORITA**

Recent studies on the nucleic acid-cleaving reaction and *in vitro* virus-inactivating action of 1,2-enediol reductones and some reducing carbohydrate derivatives are reviewed. After a brief discussion on the mechanism of oxygen radical formation from 1,2-enediols, works on the autoxidation of reducing sugars are reviewed, followed by the demonstration of examples of nucleic acid cleavages by reductones, sugar phosphates, aldopentoses, pyranosiduloses and synthetic and natural oxidized polysaccharides. *In vitro* inactivation of viruses by ascorbic acid, triose reductone, aldopentoses and partially substituted reducing sugars including some new types of synthetic polysaccharides in the presence or absence of Cu^{2+} are discussed. A table of compounds with DNA cleaving ability and recent reviews on nucleic acid breakage by oxygen radicals are included with 138 cited literatures.

1. はじめに

最近、核酸損傷物質、特に核酸を切断する化合物の研究が盛んに行われている。研究の目的は、切断反応の特徴を明らかにし、他の核酸損傷物質、例えば、化学修飾剤（アルキル化剤や酸化剤など）や核酸とコンプレックスを形成する物質（インターカレート剤や金属類）の作用と比較して化学物質の発ガン、制ガン、変異原性あるいはウイルス不活化などの作用機構を探ろうとすることにある。

ポリヌクレオチド鎖の切断を起こす化学種は、ホスホジエステル結合に直接作用するもの以外に、核酸の他の部分と反応して最終的に切断をおこす場合を含めると非常に多い。その中で、放射線による遺伝子の損傷とも関連し最も研究の多い物質は、活性酸素種を生成して核酸を損傷する一群であり、その核酸切断能が実験的に証明されているものを挙げると表1のようになる。これらの物質はいずれも酸素分子に対する反応性、親和性をも

ち、過酸化物質、キノン、SH 化合物、レダクトンなどの比較的簡単な自動酸化性物質から、抗生物質、酵素などの生物起原の複雑な天然物や種々の合成リガンドの金属錯体までありバラエティに富んでいる。制ガン剤が多いのも特徴で、特にキノン系物質とブレオマイシンの研究の進展は著しく、本誌にも総説が報告されている^{66,67)}。

表1のレダクトンおよび糖類は、その水溶液中の還元力や食品の褐変現象と関連のある分解反応について古くから研究されてきたが、核酸損傷反応の詳しい研究は比較的少ない。

本稿では、1,2-エンジオールレダクトンと還元性糖類の核酸切断反応および切断の結果ひきおこされる生物活性の損傷例としてウイルスの *in vitro* 不活化をとりあげ、最近の研究を紹介する。

レダクトンや糖類は、一般にキノン系物質等と異なり細胞毒性がなく、生体内で種々の生物活性を有する。また、糖質は、本特集号で述べられるように、合成反応や種々の機能の分子設計において、多様性や特異性を示す。

* 三重大学農学部 ()

* Laboratory of Pesticide Chemistry, Department of Agricultural Chemistry, Mie University ()

**同志社女子大学家政学部 ()

**Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science, Doshisha Women's College of Liberal Arts ()

Table 1 Agents with nucleic acid-cleaving ability*.

agents**	agents**
1. Enzymes xanthine-xanthine oxidase ^{1,2)}	6. Carbohydrates aldoses, ketoses ³⁷⁾ sugar phosphates ^{37,38)} pyranosiduloses ³⁹⁾ 2-amino-2-deoxy-D-glucose ³⁷⁾ 1-amino-1-deoxy-D-fructose ⁴⁰⁾ oxidized natural polysaccharides ⁴¹⁾ oxidized synthetic polysaccharides ⁴¹⁾ sugar oximes ⁴²⁾
2. Peroxides potassium superoxide (KO ₂) ³⁾ hydrogen peroxide ⁴⁻⁶⁾ lipid peroxide ⁷⁾	7. Peptide antibiotics neocarzinostatin ^{43,44)} macromomycin ⁴⁵⁾ auromomycin ^{44,45)}
3. Quinones streptonigrin and related compounds ^{8,9)} mitomycins ¹⁰⁻¹³⁾ anthracyclines (adriamycin, daunomycin, aclacinomycins) ¹⁴⁻¹⁶⁾ saframycins ¹⁷⁾ menadione ¹⁸⁾ hydroquinone ¹⁹⁾ 2-tert-butyl-p-quinone ²⁰⁾	8. Metal complexes bleomycins bleomycin ^{46,47)} phleomycin ^{44,48)} talsomycin ^{44,48)} distamycin-EDTA-Fe (II) ⁴⁹⁾ methidiumpropyl-EDTA-Fe (II) ^{50,51)} penta-N-methylpyrrolicarboxamide-EDTA-Fe(II) ⁵²⁾ Glu-P-porphyrin-Fe (II) ⁵³⁾ hemin ⁵⁴⁾ acridine-hemin ⁵⁵⁾ synthetic metalloporphyrins ⁵⁶⁾ 1,10-phenanthroline-Cu (I) ⁵⁷⁻⁵⁹⁾
4. SH compounds dithiothreitol ^{21,22)} 2-mercaptoethanol ^{19,21,22)} glutathione ^{19,23)} L-cysteine ^{19,22,24)} thioglycolic acid ²²⁾	9. Others ferrous chloride ^{19,60)} sodium bisulfite ⁶¹⁾ hydroxylamine ⁴⁾ hydroxurea ⁶²⁾ D-cycloserine ⁶³⁾ benz(α)pyrene ⁶⁴⁾ NADH ^{21,65)}
5. Reductones L-ascorbic acid ^{1,21,25-27)} erythorbic acid ²⁸⁾ dehydroascorbic acid ^{27,28)} 2,3-diketo-L-gulonic acid ^{27,29)} L-xylosone ²⁹⁾ 5-methyl-3,4-dihydroxytetron ³⁰⁾ triose reductone ^{29,30-32)} triose reductone 2-phosphate ³¹⁾ L-ascorbic acid 3-phosphate ²⁸⁾ scorbamic acid ³³⁾ polyphenols (pyrocatechol, etc.) ³⁴⁾ catecholamines (epinephrine, etc.) ^{35,36)} lignins ³⁴⁾	

* Only selected references are cited.

** Some agents require metal ions or reducing agents as cofactors.

従って、その核酸切断作用を検討し、あるいは、その作用を各種の糖質に付与する研究は新しい興味あるテーマと考えられる。なお、本稿に関連の深い核酸切断反応に関する最近の総説を末尾に挙げた。

2. レダクトンおよび還元性糖類の核酸切断作用

2.1. 1,2-エンジオールの自動酸化と酸素ラジカル

酸素分子(³O₂)の還元または励起によって生成する活性酸素種、すなわち、スーパーオキシド(superoxide, O₂⁻), 過酸化水素(H₂O₂), 水酸ラジカル(・OH)および一重項酸素(¹O₂)(式1)が、生体成分、特に脂質^{68,69)}、多糖⁷⁰⁾、蛋白質⁷¹⁾および核酸の損傷をひきおこすことが、過去20年間の酸素毒性に関する多くの研究から明らかとなった。

活性酸素種の反応機構や医学、生物学における応用の研究は、最近の成書や国際シンポジウム記録にみられるように、ますます多様な進展をみせている⁷²⁻⁷⁴⁾。

化学物質による活性酸素種の生成は、酸素および基質の活性化という二つの方法があり、いずれの場合も、遷移金属、塩基、光などの触媒作用を受けやすいのが特徴である⁷⁵⁾。また、上記4種の化学種は、(式2~6)によって互に変換され、生体成分や有機化合物に対してもそれぞれ、反応特異性を有する^{76,77)}。したがって、生成源の化学構造とその環境によって、生成ラジカルの種類、濃度、生成速度は異なってくる。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ は、(式2, 3, 5, 6)によって他の活性酸素種を生ずるので最も重要であり、表1の化合物で、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成が確かめられているものも多い⁷⁶⁾。

表1の核酸切断反応をひきおこす物質のなかで、レダクトンと糖類は α -ヒドロキシカルボニル化合物に属し、その中性および塩基性条件下での自動酸化は、1,2-エンジオールアニオンを経由するものと考えられている⁷⁵⁾。L-アスコルビン酸(1)は最もよく研究されているレダクトンの1つで、酸素酸化の中間体としてアスコルビン酸ラジカルが確認され^{78,79)}、酵素的または非酵素的に、デヒドロアスコルビン酸(2)と H_2O_2 が生成する反応が詳しく調べられている⁸⁰⁻⁸²⁾。

一方、還元糖の自動酸化は、糖が水溶液中で種々の異性体(分子内ヘミアセタールおよびアノマー)として存在するため複雑で、今なお研究が続けられているが⁸³⁾、たとえば、Nef⁸⁴⁾やIsbellら⁸⁵⁾は、多くの実験結果からアルドースの酸素酸化に対して、シュードアサイクリック型(3,4)および1,2-エンジオールアニオン(5)を経る機構を提唱している。

エンジオールアニオンを経て進行する糖の分解反応は

酸素の関与しないものとして、3-デオキシシソンの生成⁸⁶⁾や逆アルドール縮合⁸⁷⁾によるC-C結合の解裂反応などが知られており、これらの反応も進行すれば、糖の酸素酸化生成物はさらに複雑となる。また、糖類からレダクトンが生成する反応、たとえば、還元糖からトリオースレダクトンの生成⁸⁸⁾、グリコシルアミンやアマドリ転位生成物からのアミノヘキソースレダクトンの生成^{89,90)}やセルロース⁹¹⁾およびピラノシドウロース⁹²⁾の分解によるレダクチン酸の生成等も報告されている。

本稿では詳しく触れないが、エノレートやカルバニオンの自動酸化反応は、酸素の一電子還元におけるスピン禁制過程を含んでおり、反応機構の検討が続いている⁹³⁾。たとえば、西長ら⁹⁴⁾は、オキシゲナーゼモデルのフェノレート酸化反応に対して一重項電荷移動錯体を経る新しい機作を提出しており、Isbellら⁹⁵⁾は糖のエンジオール酸化でジラジカル機構を考えている。カルバニオン酸素酸化はオキシダーゼの反応機構でも重要と考えられており⁹⁶⁾、糖質の酸化では、リブロース1,5-ジリン酸カルボキシラーゼの反応中間体であるリブロース1,5-ジリン酸2,3-エンジオールの酸素酸化反応が見出されている⁹⁷⁾(式9)。

エンジオールの酸素酸化では各種活性酸素が生成するが、その検出は $\text{O}_2^{\cdot-}$ について行われることが多い。検出反応は^{74,76,98)}、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)のホルマザンへの還元(A_{560})やチトクロームcの還元(A_{550})を分光学的に追跡し、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の確認にスーパーオキシドジスムターゼ(SOD, (式2))を触媒する⁷²⁻⁷⁴⁾によ

る阻害が利用される。その他の酸素ラジカルの検出, 確認はカタラーゼや種々の特異的あるいは非特異的捕捉剤が用いられる^{74, 76)}。

2.2 レダクトンによる核酸切断反応 レダクトンとりわけアスコルビン酸による核酸切断は古くから知られていた。一般に切断作用の検出には, 核酸の分子量低下と構造, 形態の変化を観察して行われる。

Conway²⁵⁾は, 1950年代に, アスコルビン酸-過酸化水素系が子ウシ胸線 DNA 溶液の粘度を低下させることを見出した。Berneis²⁶⁾はアスコルビン酸-酸素系で, Yamafuji²⁷⁾はアスコルビン酸-Cu²⁺系で, 同様のことを認めた。Bode²¹⁾はファージλ 2本鎖 DNA がアスコルビン酸によって1本鎖切断を受けることをショ糖濃度勾配遠心法で明らかにした。

Pouwels⁶⁵⁾もφX174複製型 DNA (Form I DNA) がアスコルビン酸で1本鎖切断を受けて Form II DNA へ変化するを見た。プラスミドやある種のウイルス DNA たとえば SV 40 DNA, ファージ PM2 DNA, ファージ φX174 複製型 DNA はらせん構造をもつ2本鎖閉環 DNA がさらにねじれてスーパーコイルと呼ばれる高次構造を保持している (Form I) (図1)。酸素ラジカルなどの反応で, 2本鎖のどちらかが1個所でも切れ目 (1本鎖切断) が入ると, スーパーコイル構造が解かれて開環 DNA (Form II) へと変換する。また, 1個所で2本鎖切断が入ると直鎖状 DNA (Form III) となる。これらの Form I, Form II, Form III はショ糖濃度勾配遠心法, エチジウムブロミド存在下の塩化セシウム平衡遠心法やアガロースゲル電気泳動法で分離定量することができる。Form II にさらに数多くの1本鎖切断が加わる際, その1つが偶然にある1本鎖切断の近傍の相補鎖上で起っても Form III へ変換する。この Form III と先の2本鎖切断で生じた Form III は, 中性条件では区別できないが, アルカリ条件下で区別できる。

Form I を基質にして DNA 切断による Form II, Form III への転換をみる方法は, DNA 分子当たりたった1つの切断でも検出可能で, 他の DNA を用いる方法よりはるかに鋭敏で容易である。Vinograd¹⁹⁾が還元剤による DNA 切断作用の検出に用い, その後多用されている。

Low^{1, 9)}は, Form I から Form II, Form III への変換で, エチジウムブロミドの結合量変化に伴うケイ光量の増大を測定することで DNA 切断作用を検出する方法を開発している。

Yamafuji²⁷⁾らは, DNA 粘度低下, ショ糖濃度勾配遠心法を用いて多くのレダクトン類の Cu²⁺共存下 DNA 切断作用を報告している。表1に示したように, アスコルビン酸または光学異性体のエリスロルビン酸 (6)²⁸⁾, それらの酸化物であるデヒドロアスコルビン酸 (2)^{27, 28)}, 2,3-ジケト-L-グルコン酸 (7)^{27, 29)}, L-キシロソ (8)²⁹⁾, 5-メチル-3,4-ジヒドロキシテロン (9)³⁰⁾ など, 食品の

褐変の中間体とされているものが多い。さらに最も簡単なレダクトンであるトリオースレダクトン (10)^{29, 30, 32)} やトリオースレダクトン 2-リン酸³¹⁾, アスコルビン酸 3-リン酸²⁸⁾, スコルバミン酸 (11)³³⁾ などの DNA 切断作用の報告がある。

ピロカテコール (12) など *o*-および *p*-ジヒドロキシ基をもつポリフェノール類³⁴⁾, エピネフリン (13)^{35, 36)} などカテコールアミン類も DNA 切断活性を示す。

レダクトンの DNA 切断作用は, 酸素依存性を示し, 過酸化水素や Cu²⁺により促進されるので, レダクトンの自動酸化で生ずる酸素ラジカルが DNA 切断に関与していると推定されているが, 関与する分子種は2.5で述べ

Fig. 1 Strand scissions of supercoiled DNA.

Table 2 Rates of reduction of NBT and cytochrome c by some reducing carbohydrates in buffered aqueous solutions at 25^{°105)}

Compounds	NBT reduction* ($\Delta A_{560} \times 10^2$ /min·M)	cytochrome c** ($\Delta A_{550} \times 10^2$ /min·M)
scyllo-inosose (14)	2,500	556
D-erythrose (15)	780	214
dihydroxyacetone (16)	830	118
D-ribose 5-phosphate (17)	9.0	26.6
3-O-methyl-D-xylose (18)	22.0	1.5
D-ribose (19)	3.4	1.1
3-O-methyl-D-glucose (20)	4.0	0.5
D-glucose (21)	0.54	t
2,3-di-O-methyl-D-glucose (22)	t	t
2-O-methyl-D-xylose (23)	t	t
2-deoxy-D-erythro-pentose (24)	t	t

* 0.015 M carbonate buffer (pH 10.4); NBT, 5×10^{-5} M** 0.1 M phosphate buffer (pH 8.2); cytochrome c, 10^{-5} M
t: not detectable**Table 3** Relative rates of reduction of NBT and cytochrome c by aldopentoses in buffered aqueous solutions at 25^{°103, 105)}

aldopentoses	NBT reduction (ΔA_{560} /min)	cytochrome c reduction (ΔA_{550} /min)
D-ribose (19)	3.4	2.0
D-lyxose (25)	1.1	1.4
D-xylose (26)	1.0	1.0
D-arabinose (27)	0.3	0.8

るように明らかでない。なお、レダクトンの多くは DNA のみならず RNA も切断することが報告されている⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。

2.3. 還元性糖誘導体の NBT 還元力 種々の還元性糖類の NBT およびチトクローム c の還元力を pH 7~11 の緩衝液中 (室温) で測定すると、レダクトンよりはるかに弱いが、還元力を示す (表 2, 3)^{39, 102-105)}。また、還元性糖リン酸エステルの NBT (pH 10.4) 還元力は、グルコース 6-リン酸 (28) < フルクトース 1,6-ジリン酸 (29) < フルクトース 6-リン酸 (30) < リボース 5-リン酸 (17) < 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース 6-リン酸 (31) の順に大きくなった¹⁰²⁾。さらに、ジカルボニル糖のメチル α -D-リボ-ヘキソピラノシド-3-ウロース誘導体 (32, 33, 34) も高い還元力を示した³⁹⁾。これらの反応は、SOD によって阻害され、核酸切断能やウイ

ルス不活能に相関することなどから、エンジオレートの自動酸化により酸素ラジカル ($O_2^{\cdot-}$ など) が生成していると推定されている。

これらの結果は、糖類や α -ヒドロキシカルボニル化合物のエンジオールの自動酸化速度ないし、酸素の一電子還元反応が、水溶液中の遊離カルボニル基の含量やカルボニル基の周辺の構造 (環構造の種類、立体配置、置換基の有無や置換基の立体効果や誘起効果) の影響を受けることを示している。表 2 から、14, 15, 16 のようなヘミアセタール環状構造をとり得ないヒドロキシアルデヒドまたはヒドロキシケトンおよびジカルボニル糖が大きな還元力を示し、置換基を有する還元糖、17, 18, 20 などは、未置換のアルドース (19, 21, 25~27) より大きな還元力を有し、さらに、C-2 位が置換、またはデオキシとなった糖 (22~24) は、還元力を示さないことがわかる。置換基や立体配置の効果は未だ説明されていない。表 3 のペントースの反応性の傾向は、Gleason ら¹⁰⁶⁾ の酸素酸化速度や Isbell ら⁸⁵⁾ のエノール化の速度と一致する。糖のリン酸エステルは通常の還元性糖よりカルボニル型の含量が多いとされているので¹⁰⁷⁾、上述の糖リン酸エステルの高い還元力は、エンジオール含量が多いためと考えられるが、リン酸イオンの存在が、糖の変旋光¹⁰⁷⁾、アミノカルボニル反応¹⁰⁸⁾、DNA 切断反応^{38, 41, 109)}、マクロファージの $O_2^{\cdot-}$ 産生⁷⁴⁾ を促進する例が知られており、自動酸化の段階における加速効果も示唆される。

NBT やチトクローム c 還元反応では、多量の Cu^{2+} は $O_2^{\cdot-}$ と反応するため拮抗的に反応を阻害するが、 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ M の Cu^{2+} は促進することがヒドロキシアミン¹¹⁰⁾や糖の系¹⁰⁵⁾ でわかっている。

アマドリ転位生成物 (1-アミノ-1-デオキシ-ケトース) は、エノール型のエナミノールがレダクトンの反応性を示すが^{80, 89)}、 $O_2^{\cdot-}$ など酸素ラジカルの生成などについては報告がない。

還元性を示す多糖誘導体としては、ケト多糖^{111, 112)}の他に新しいタイプの合成多糖として含リン酸ポリグルコース (35)¹¹³⁾、ヘミアセタール水酸基を有する合成グリカン (36)¹¹⁴⁾、ペンダントとして還元性単糖残基を有する合成高分子 (37)¹¹⁵⁾ などが挙げられる。これら

Table 4 Induction of strand breaks in ϕ X174 Form I DNA by some reducing carbohydrates³⁷⁾.

Compounds	0.1 mM CuCl ₂	Mass fraction of DNA			
		Form I	Form II	Form III	others
D-erythrose (15)	—	14.9	82.0	0.8	2.3
	+	0	54.1	43.2	2.7
D-ribose (19)	—	86.0	12.6	0.4	1.0
	+	12.2	77.4	0.2	10.2
D-glucose (21)	—	86.4	11.6	0.5	1.5
	+	79.1	19.6	0.3	1.0
D-fructose (38)	—	80.3	17.4	0.5	1.8
	+	34.7	62.0	0.4	2.8
D-fructose 6-phosphate (30)	—	34.7	62.8	0.8	1.7
	+	0	53.8	42.8	3.4
2-amino-2-deoxy-D-glucose (39)	—	44.9	53.5	0.3	1.3
	+	0	95.7	1.3	3.0
2-deoxy-D-erythro-pentose (24)	—	87.4	10.2	0.4	2.0
	+	43.2	53.3	0.8	2.7
2-deoxy-D-arabino-hexose (40)	—	82.5	14.6	0.5	2.4
	+	66.8	31.2	0.6	1.4
inositol (41)	—	84.6	13.9	0.3	1.2
	+	85.2	13.1	0.4	1.3
D-mannitol (42)	—	91.4	7.0	0.4	1.2
	+	86.6	11.7	0.4	1.3

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of ϕ X174 Form I DNA treated with some reducing sugar phosphates³⁷⁾. ϕ X174 Form I DNA was reacted with 40 mM sugar phosphates at 37 °C for 3 hr in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) in the presence (lanes 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15) or absence of 0.1 mM CuCl₂. 1, drug-free control; 2, 3, D-fructose 6-phosphate; 4, 5, D-fructose 1, 6-diphosphate; 6, 7, 2-amino-2-deoxy-D-glucose 6-phosphate; 8, 9, D-glucose 6-phosphate; 10, 11, D-glucose 1-phosphate; 12, 13, D-mannose 6-phosphate; 14, 15, D-ribose 5-phosphate.

は NBT 還元力も有し^{41,105)}, 37 については, 同じ構造の単糖よりも大きな還元力が認められる¹¹⁶⁾. 高分子中のエンジオールの自動酸化の例あるいはレドックスポリマ

ーの高分子効果¹¹⁷⁾の例として興味深い。

2.4. 還元性糖誘導体の核酸切断作用 上述のように各種還元性糖類は NBT やチトクローム c 還元力を持

ち、 O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ を生成することが示唆された。次にこれら糖類の DNA 切断作用の例を示す。

まず、 $\phi X174$ 複製型 DNA (Form I) を用いて、2 本鎖 DNA に対する作用を調べたところ³⁷⁾、糖リン酸エステルが、1 本鎖切断を起こし、Form II に転換することがわかった (図 2, 表 4)。特に 17, 30, 31 のようにペントース、ケトース、アミノ糖のリン酸エステルは Cu^{2+} 非存在下でも DNA 切断作用を示し、 Cu^{2+} 添加で反応は著しく促進される (図 2)。アルドヘキソースの 6-リン酸エステルは、 Cu^{2+} 共存下ではじめて DNA 切断作用を示した (図 2)。非リン酸化糖では 15 と 39 が特に強い切断能を示した (表 4)。糖アルコール (41, 42, 表 4) やグルコース 1-リン酸 (図 2) のように還元性カルボニル基がないか、ブロックされているものは、 Cu^{2+} 共存下でも切断作用は示さない。アスコルビン酸 3-リン酸、トリオースレダクトン 2-リン酸のようにレダクトンのエンジオール構造をブロックした場合も、自動酸化力はもちろん、DNA 切断能が著しく低下することが報告されている^{28, 31)}。

なお、糖リン酸エステルについては 1 本鎖 DNA にも作用して、これを切断することが確かめられている³⁸⁾。

ピラノシドウロース (32, 33, 34) も NBT 還元力と相関した核酸切断能を示す³⁹⁾。図 3 は子ウシ胸腺 DNA の切断分解を示したもので、 Cu^{2+} 存在下 DNA のエチジウ

Fig. 3 Decrease of fluorescence intensity of DNA-ethidium bromide complex as a function of the concentration of glycosidulose used for the reaction with DNA³⁹⁾.

ムプロミド複合体のケイ光強度の減少を測定したものである。これらのジカルボニル糖の切断能は糖リン酸エステルよりも強い。

図 4 は含リン酸合成多糖、ポリガラクトースの $\phi X174$ 環状 1 本鎖 DNA に対する切断作用と Cu^{2+} による促進効果を示す⁴¹⁾。ポリガラクトースのみの処理で、コントロールに比べて、直鎖状 DNA や断片化した DNA が、また Cu^{2+} 存在下ではさらに低分子化した断片が観察される。

このように、各種の還元性糖類が $10^{-2} \sim 10^{-3}$ M の濃度で 25~37 °C, pH 7~8, 数時間の反応で各種の核酸を切断することがわかってきた。その切断能は 2.3 で述べた NBT 還元力と強い相関関係がある。

2.5. レダクトンおよび還元性糖類による DNA 切断機構 還元性糖類の DNA 切断作用も、2.2 で述べたレダクトンの場合と同様、金属キレート剤 EDTA で阻

Fig. 4 Alkaline sucrose gradient sedimentation analysis of $\phi X174$ single-stranded DNA treated with polygalactose⁴¹⁾. ^{14}C -Labeled $\phi X174$ single-stranded, closed-circular DNA (cc) was converted to linear DNA (l) and further fragmented DNA by treatment with polygalactose. (a), 5 mg/ml polygalactose; (b), (a) + 0.1 mM $CuCl_2$; (c), drug-free control.

害され、遷移金属イオンとりわけ Cu^{2+} により促進される³⁷⁻³⁹⁾。この結果は酸素ラジカルの DNA 切断作用への関与を推測させるものであるが、実際反応は、カタラーゼによりほぼ完全に阻害される。SOD や $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤では部分的な阻害がみられる。1,4-ジアザピシクロ [2.2.2] オクタンなど $^1\text{O}_2$ 捕捉剤でも阻害される³⁷⁾。これらの反応の諸性質は、レダクトン³²⁾ や 1,10-フェナントロリン⁵⁹⁾ またマイトマイシン C などキノン系物質の場合^{12, 13, 15, 118)} と類似しており、ブレオマイシンなど Fe^{2+} で促進されるグループとは反応条件の違いにもよるがやや異なっている^{46, 48, 109, 119)}。

放射線照射^{6, 120)} やキサンチン-キサンチン酸化酵素系^{1, 2)} などによる DNA 切断で、 $\cdot\text{OH}$ が最も反応性が高く DNA 切断を直接引き起こす分子種だとされている。 Cu^{2+} 共存下での各種化合物の DNA 切断の場合、Lown らのグループ^{1, 9-11, 14)} は $\cdot\text{OH}$ が DNA 切断に関与すると報告しているが、他の報告では $\cdot\text{OH}$ の関与ははっきり証明できない^{12, 13, 15, 32, 59, 118)}。この違いは Cu^{2+} の役割と合わせて解明されねばならない。

Cu^{2+} の役割は (i) エンジオール構造に配位して酸素を還元しやすくなる、(ii) レダクトン、還元性糖または O_2^- によって還元(式5)されて生ずる Cu^+ が Fenton 試薬様に働いて、(式4)の反応で $\cdot\text{OH}$ を生成する、(iii) DNA に作用してラジカルの攻撃を受けやすくなる、また DNA-金属-試薬複合体を形成して、酸化を促進する、などが考えられる。これらから、標的分子近傍で生成したいわゆる“endogenous”な、また“site specific”な活性酸素種のみが切断に有効であるという考え、また遊離の活性酸素種を生成することなく切断反応が進行するという考え方が生まれる^{57, 66, 121-123)}。 $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤が顕著な阻害効果を示さないこともこの考え方で説明でき興味深い、レダクトン、糖系では立証するまでに至っていない。

また、酸素ラジカルによる核酸の化学修飾も、切断反応の前段階として重要であるが¹²⁰⁾、レダクトン、還元性糖類では詳しい研究がなく、最近 Nishimura ら¹²⁴⁾ はアスコルビン酸による核酸の水酸化を報告している。

酸素ラジカルによる DNA 切断反応は、 $\cdot\text{OH}$ によるデオキシリボースの C-4 位の水素原子引き抜き、糖ラジカルの生成、糖過酸化物の生成とその分解などの過程を含んでいるとされ、放射線損傷やブレオマイシンの DNA 切断作用の機構として考えられている^{47, 79, 125, 126)}。またリボース¹²⁷⁾ やフラクトース¹²⁸⁾ のラジカル酸化分解も研究されている。しかし、レダクトンや還元性糖類の核酸切断反応における酸素ラジカルの攻撃標的部位やその塩基配

列特異性の問題は全く今後の問題として残っている。

3. レダクトン、還元性糖誘導体によるウイルスの *in vitro* 不活化作用

3.1. 核酸損傷による生物活性変化 遺伝子核酸の損傷反応の詳細な解析は、核酸が特異な一次および高次構造を有し、多くの反応部位が存在するので、困難な場合が多い。しかし、核酸におこった微少な、または特異的な損傷でも、その結果は各種生物活性の損失として現われる。このため損傷反応の生物学的な結果である形質転換能不活化、ウイルス核酸のトランスフェクション能不活化、ウイルス不活化、抗腫瘍性、変異原性などについての研究が先行している場合も多い。

in vitro でウイルスを薬剤で処理してウイルス構成成分が修飾または損傷を受けると、ウイルスの宿主細胞内での増殖能が失われる(ウイルスの不活化)。核酸や外殻蛋白質の一次構造がわかっているウイルス、さらに宿主への吸着機構、リセプターの構造、宿主内でのウイルス粒子の生合成も判明しているウイルスは、微少な遺伝子核酸の損傷反応を調べるのに最も適した系と考えられる。動物、植物、細菌ウイルスの生物活性はプラーク形成法で検出できるので、このプラーク数変化測定により化学物質のウイルス不活化作用が調べられる。

3.2. レダクトン、還元性糖誘導体によるバクテリオファージの *in vitro* 不活化 レダクトンでは、アスコルビン酸がウイルス不活化作用を示すことが、1930 年代後半から知られていた¹²⁹⁾。バクテリアウイルス(バクテリオファージ)については、1968 年以降、村田ら^{130, 131)} によって、核酸の種類や形態の異なるものについて系統的な研究がなされ、アスコルビン酸のバクテリオファージ不活化作用が普遍的であることが明らかとなった。不活化はアスコルビン酸の酸化で生ずるウイルス核酸の切断が原因である。トリオースレダクトンなど他のレダクトンなど他のレダクトン類でも不活化作用があると思われるが詳しい報告はない。

還元性糖類では(主として ϕX174 を用いて)、糖リン酸エステル^{38, 102)} アルドペントース^{103, 104)}、ピラノシドウロース³⁹⁾、合成多糖⁴¹⁾、酸化多糖⁴¹⁾、アミノ糖^{102, 132)} で、ファージ不活化作用が報告されている。

糖リン酸エステルのファージ ϕX174 不活化作用は、DNA 切断作用、NBT 還元力の強弱と同じ傾向を示す。アルドヘキソースのリン酸エステルは不活化作用を示さないが、 Cu^{2+} を共存させれば、DNA 切断作用の場合のように、活性が現われると思われる。糖リン酸エステルは、 ϕX174 に限らず、核酸の種類、形態の異なる他

のファージに対して、異なった不活化作用を示すことがわかった¹³³⁾。図5にファージ ϕ X174, QB, λ および fd の不活化の例を示す^{38, 134)}。アルドペントース^{103, 104)}やピラノシドウロース³⁹⁾も Cu^{2+} 共存下で ϕ X174 不活化作用がみられる。アルドペントースのファージ不活化能は表3の NBT 還元力 (ラジカル生成速度) と一致している^{103, 104)}。

多糖誘導体では、自動酸化性合成多糖や、36, 37 が、 ϕ X174 を不活化することが見い出されており、しかも NBT 還元力とほぼ相関することがわかっている^{41, 105, 106)}。

これらのファージ不活化作用の諸性質は、2.5.で述べた DNA 切断作用の諸性質とよく似ている。すなわち、遷移金属イオン共存下、特に Cu^{2+} 共存下で不活化作用が促進され、還元剤やキレート剤の添加で不活化作用

が阻害される。また SOD によって一部、カタラーゼによって完全に阻害される。また $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤や $^1\text{O}_2$ 捕捉剤によっても阻害がおこった。これらから、DNA 切断と同じ機構でファージ不活化が起こっているものと思われる。

Fig. 5 Phage inactivation by D-fructose 6-phosphate ¹³⁴⁾.

3.4. レダクトン、還元性糖誘導体による動物ウイルス、植物ウイルスの不活化作用 *in vivo* や *in vitro* で抗動物ウイルス、抗植物ウイルス作用を示す糖質の例としては、2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース (39)、2-デオキシ-D-ヘキソース (40)、ヌクレオシド類、酸性ムコ多糖、アルギン酸などが挙げられる^{135, 136)}。

レダクトンでは、アスコルビン酸の抗動植物ウイルス活性については詳しくは村田の総説¹⁾や成書¹³⁷⁾にゆずるが、古くからポリオ、ヘルペス、インフルエンザウイルスやタバコモザイクウイルス (TMV) についての研究がある。

これまでに挙げてきた還元性糖類では、柏村らがアルドペントース-Cu²⁺系、ピラノシドウロース-Cu²⁺系で植物ウイルス TMV に対する *in vitro* 不活化作用を *N. tabacum* の局部病斑法によって調べている^{39, 103)}。図6はアルドペントースの実験結果を示したもので、ファージ不活化や還元力と同じように、D-リボース (19) や D-リキソース (25) が D-キシロース (26) や D-アラビノース (27) より大きな不活化能を示した。遷移金属の効果はやはり Cu²⁺ のみに著しい作用が認められた。SOD やカタラーゼの効果はファージほど認められないが、ほ

Fig. 6 Inactivation of TMV by aldopentoses¹⁰³⁾.

ぼ同じ傾向を示した¹⁰⁴⁾。

動物ウイルスに対する還元性糖類の作用としては、合成酸化多糖 (35) であるポリ-D-リボースがヘルペシンプレックスウイルスを不活化することがわかっている¹⁰⁵⁾。

レダクトンや糖質によるウイルス不活化実験では、これまで宿主細胞に対する毒性はほとんど認められていないが、*in vivo* の実験や、培養細胞の実験は少なく、細胞毒性については今後さらに検討されねばならない。

3.5. 活性酵素種によるウイルスの不活化機構について レダクトンや還元性糖類は、どのウイルス成分を損傷するのであろうか。糖リン酸エステルや合成多糖により不活化されたファージ ϕ X174 の外殻蛋白質に大きな損傷はないと思われる^{38, 41)}。すなわち、粒子の沈降定数、宿主大腸菌への吸着、菌体内への DNA の注入は正常に起こる。しかし、粒子より DNA を抽出して調べると DNA は不活化程度に比例して切断されていた。したがって、直接 DNA と反応させる場合と同じく、酸素ラジカルが、ウイルス粒子内に侵入して反応するか、あるいは、内部で生成したラジカル種が DNA に作用したかのいずれかが考えられる。Murata^{130, 131)}, Morita¹³³⁾, Czapski¹³⁸⁾ らは、ファージの種類によって異なった不活化率を観察している。レダクトンや還元性糖類あるいはラジカルの透過性の差によるものと考えられ、興味深い詳しくはわかっていない。

TMV や動物ウイルスの *in vitro* 不活化もいろいろな証拠から、ウイルス粒子内の核酸切断によるものと思われる。ウイルスの核酸をとりまく外殻構造は、多種多様であり、酸素ラジカルや薬剤の透過性のみならず、ラジカル捕捉効果や、薬剤の特異的吸着も予想され、今後の研究が期待される。

4. おわりに

以上述べたように、古くから研究されていた糖質の還元力の問題が最近見直されてきて、自動酸化に必要な構造、酸素ラジカルの生成とその機構が明らかとなってきた。そして、それと関連した生物活性として *in vitro* で核酸切断、ウイルス不活化も明らかとなってきた。糖質の新しい機能として、糖質抗ウイルス剤といった新しい有用な応用へ発展させるためには、さらに広範囲な研究が必要であるが、近年の分子生物学の進展とともに、核酸と相互作用する化合物の作用機構研究や分子設計、有機合成の研究は急速に進んでいる。1. で述べたように糖質の特性を利用して新しいアプローチが可能であると考えられている。

また、各種化合物や酸素ラジカルの *in vivo* での作用を考える場合には、核酸をとり巻く環境、たとえばヒストン蛋白質などの影響等も考慮に入れねばならないが、核酸-蛋白質複合体であるウイルスはそのための良いモデル系となり、新しい展開が期待される。

本総説の執筆および著者の研究の一部に対して、文部省科学研究費（一般研究 C, No. 58560081, 総合研究 A, No. 56360007）の援助があった。

（昭和 59 年 2 月 22 日受理）

〔追記〕 最近、還元糖による DNA 損傷と老化との関連性を論じた報告が発表された；R. Bucala, P. Model, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **81**, 105 (1984)。

総説

- 1) 村田 晃, アスコルビン酸のウイルス不活化作用-フリーラジカルによる核酸鎖の切断, 蛋白質核酸酵素, **20**, 593 (1975)
- 2) 大村浩久, レダクトン類に関する研究, 栄養と食糧, **31**, 9 (1978)
- 3) 西岡 一, DNA を傷つける物質, 現代化学, **95**, (2) 56 (1979)
- 4) K. Brawn, I. Fridovich, Superoxide radical and superoxide dismutase: Threat and defense, "Autoxidation in Food and Biological System" (M. G. Simic, M. Karel, ed.), p. 429 (1980), Plenum Press
- 5) 梅沢浜夫, 田中信男編, "抗生物質研究の進歩", (1980) 学会出版センター
- 6) J. W. Lown, Newer approaches to the study of the mechanisms of action of antitumor antibiotics, *Acc. Chem. Res.*, **15**, 381 (1982)
- 7) 山本 修, "放射線傷害の機構", (1982) 学会出版センター
- 8) 村上浩紀, レダクトン類による細胞内 DNA 鎖の切断に関する研究, 農化, **57**, 55 (1983)
- 9) 杉浦幸雄, 小分子による選択的 DNA 塩基認識と切断, 化学, **38**, 689 (1983)
- 10) S. M. Hecht, ed., "Bleomycin: chemical, biochemical, and biological aspects" (1979) Springer-Verlag

文 献

- 1) A. R. Morgan, R. L. Cone, T. M. Elgert, *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1139 (1976)
- 2) K. Brawn, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 414 (1981)
- 3) S. A. Lesko, R. J. Lorentzen, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry*, **19**, 3023 (1980)
- 4) H. -J. Rhaese, E. Freese, *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 476 (1968)
- 5) Y. Uchida, H. Shigematsu, K. Yamafuji, *Enzymologia*, **29**, 369 (1965)
- 6) J. J. Van Hemmen, W. J. A. Meuling, *Biochim. Biophys. Acta*, **402**, 133 (1975)
- 7) J. Morita, K. Ueda, K. Nakai, Y. Baba, T. Komano, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2977 (1983)
- 8) H. L. White, J. R. White, *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 648 (1966)
- 9) J. W. Lown, S. -K. Sim, *Can. J. Biochem.*, **54**, 446 (1976)
- 10) J. W. Lown, A. Begleiter, D. Johnson, A. R. Morgan, *ibid.*, **54**, 110 (1976)
- 11) J. W. Lown, G. Weir, *ibid.*, **56**, 296 (1978)
- 12) K. Ueda, J. Morita, T. Komano, *J. Antibiotics*, **35**, 1380 (1982)
- 13) K. Ueda, J. Morita, T. Komano, *Biochemistry*, **23**, 1634 (1984) and references cited therein.
- 14) J. W. Lown, S. -K. Sim, K. C. Majumdar, R. -Y. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 705 (1977)
- 15) A. Someya, N. Tanaka, *J. Antibiotics*, **32**, 839 (1979)
- 16) A. Tanaka, K. Sen, J. Morita, T. Komano, *ibid.*, **36**, 1242 (1983)
- 17) J. W. Lown, A. V. Joshua J. S. Lee, *Biochemistry*, **21**, 419 (1982)
- 18) J. Morita, S. Narita, T. Komano, *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 403 (1977)
- 19) J. Vinograd, J. Lebowitz, R. Radloff, R. Watson, P. Laipis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 1104 (1965)
- 20) M. Natake, K. Kawamura, G. Danno, K. Kanazawa, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1083 (1982)
- 21) V. C. Bode, *J. Mol. Biol.*, **26**, 125 (1967)
- 22) A. Murata, K. Kitagawa, *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2159 (1973)
- 23) A. Murata, K. Kitagawa, K. Otokonari, R. Saruno, *ibid.*, **37**, 1707 (1973)
- 24) H. S. Rosenkranz, S. Rosenkranz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 483 (1971)
- 25) B. E. Conway, J. A. V. Butler, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 834
- 26) K. Berneis, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 57 (1963)
- 27) K. Yamafuji, K. Nakamura, H. Omura, T. Soeda, K. Gytoku, *Z. Krebsforsch.*, **76**, 1 (1971)
- 28) H. Omura, S. Iiyama, Y. Tomita, Y. Narazaki, K. Shinohara, H. Murakami, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 237 (1975)
- 29) 中村泰彦, 佐賀女短大紀要, **3**, 11 (1968)
- 30) Y. Tomita, Y. Fukumoto, K. Shinohara, H. Omura, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **19**, 139 (1975)
- 31) 篠原和毅, 江藤正義, 曾 耀崑, 朱 光枝, 富田純史, 大村浩久, 農化, **49**, 223 (1975)
- 32) K. Shinohara, M. So, M. Nonaka, K. Nishiyama, H. Murakami, H. Omura, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*

- nol.*, **29**, 481 (1983)
- 33) H. Omura, Y. Tomita, H. Fujiki, K. Shinohara, H. Murakami, *ibid.*, **24**, 263 (1978)
- 34) K. Yamafuji, H. Murakami, *Enzymologia*, **35**, 139 (1968)
- 35) H. Murakami, S. Shirahata, C. Hori, H. Yoshii, K. Yamada, K. Shinohara, H. Omura, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1619 (1979)
- 36) 白畑実隆, 村上浩紀, 生体久人, 山田耕路, 篠原和毅, 大村浩久, 農化, **51**, 631 (1977)
- 37) J. Morita, T. Komano, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 11 (1983)
- 38) J. Morita, N. Kashimura, T. Komano, *ibid.*, **44**, 883 (1980)
- 39) N. Kashimura, M. Kitagawa, Z. Kumazawa, S. Koyama, I. Sato, K. Noba, *Carbohydr. Res.*, **105**, C5 (1982)
- 40) 南條 敏, 田中国介, 藤井昭治, 植田和光, 駒野 徹, 日本農芸化学会昭和59年度大会講演要旨集 p. 575 (1984)
- 41) J. Morita, N. Kashimura, T. Komano, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2971 (1980)
- 42) H. Murakami, K. Yamafuji, *Enzymologia*, **38**, 337 (1970)
- 43) T. A. Beerman, I. H. Goldberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1254 (1974)
- 44) M. Takeshita, L. S. Kappen, A. P. Grollman, M. Eisenberg, I. H. Goldberg, *Biochemistry*, **20**, 7599 (1981)
- 45) H. Suzuki, K. Miura, N. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1281 (1979)
- 46) R. Ishida, T. Takahashi, *ibid.*, **66**, 1432 (1975)
- 47) M. Takeshita, A. P. Grollman, E. Ohtsubo, H. Ohtsubo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 5983 (1978)
- 48) M. J. Sleight, *Nucleic Acids. Res.*, **3**, 891 (1976)
- 49) P. G. Schultz, J. S. Taylor, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6861 (1982)
- 50) M. W. Van Dyke, R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 5470 (1982)
- 51) R. P. Herzberg, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 313 (1982)
- 52) P. G. Shultz, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **80**, 6834 (1983)
- 53) 橋本祐一, 李 金星, 太田敏晴, 首藤紘一, 岡本敏彦, 第43回有機合成化学総合研究発表講演会要旨集 p. 98 (1983)
- 54) R. L. Aft, G. C. Mueller, *J. Biol. Chem.*, **258**, 12069 (1983)
- 55) J. W. Lown, A. V. Joshua, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 1298
- 56) R. J. Fiel, T. A. Beerman, E. H. Mark, N. Datta-Gupta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1067 (1982)
- 57) D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12269 (1979)
- 58) K. M. Downey, B. G. Que, A. G. So, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 264 (1980)
- 59) L. E. Marshall, D. R. Graham, K. A. Reich, D. S. Sigman, *Biochemistry*, **20**, 244 (1981)
- 60) A. D. D'Andrea, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **75**, 3608 (1978)
- 61) H. Hayatsu, R. C. Miller, Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 120 (1972)
- 62) 大村浩久, 井上義人, 佐藤雅子, 農化, **47**, 591 (1973)
- 63) Y. Matsuda, M. Kitahara, K. Maeda, H. Umezawa, *J. Antibiotics*, **35**, 893 (1982)
- 64) P. O. P. Ts'o, W. J. Caspary, R. J. Lorentzen, "Free Radicals in Biology" (W. A. Pryor ed.), Vol. III, p. 251 (1977), Academic Press
- 65) P. H. Pouwels, J. Van Rotterdam, J. A. Cohen, *J. Mol. Biol.*, **40**, 379 (1969)
- 66) 杉浦幸雄, 有合化, **39**, 1097 (1981)
- 67) 沖 俊一, 竹内富雄, 有合化, **40**, 2 (1982)
- 68) 松尾光芳, 嵯峨井勝, 大澤俊彦, 並木 満, 与那覇政憲, 変異原と毒性, **5**, 198 (1982)
- 69) J. F. Mead, "Free Radicals in Biology" (W. A. Pryor ed.), Vol. I, p. 51 (1976), Academic Press
- 70) A. Herp, "The Carbohydrates" (W. Pigman, D. Horton ed.), Vol. IB, p. 1276 (1980), Academic Press
- 71) 齊藤真弘, "放射線傷害の機構", (山本 修編) p. 167 (1982), 学会出版センター
- 72) W. A. Pryor ed. "Free Radicals in Biology" Vol. 1-V, (1982), Academic Press
- 73) G. Cohen, R. A. Greenwald, "Oxy Radicals and Their Scavenger Systems" Vol. I and II, (1983), Elsevier Biomedical
- 74) 大柳善彦, "スーパーオキシドと医学", (1981), 共立出版
- 75) 松浦輝男, "酸素酸化反応", p. 165 (1977) 丸善
- 76) 浅田浩二, 生化学, **48**, 226 (1976)
- 77) 松浦輝男, 化学, **35**, 423 (1980)
- 78) G. P. Laroff, R. W. Fessenden, R. H. Schuler, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 9062 (1972)
- 79) C. von Sonntag, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 7 (1980)
- 80) 野村男次, 大村浩久, "レダクトンの化学", (1969), 内田老鶴園新社
- 81) 重岡 成, ビタミン, **56**, 75 (1982)
- 82) A. E. Martell, "Autooxidation in Food and Biological Systems", (M. G. Simic, M. Karel ed.), p. 89 (1980), Plenum Press
- 83) H. Isbell, *Adv. Chem. Series*, **117**, 70 (1973)
- 84) J. U. Nef, *Liebig's Ann.*, **403**, 204 (1914)
- 85) H. S. Isbell, H. L. Frush, C. W. R. Wade, C.

- E. Hunter, *Carbohydr. Res.*, **9**, 163 (1969)
- 86) E. F. L. J. Anet, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **19**, 181 (1964)
- 87) W. Pigman, E. F. L. J. Anet, "The Carbohydrates" (W. Pigman, D. Horton ed.), Vol. 1A, p. 165 (1972), Academic Press
- 88) H. F. Bauer, C. Teed, *Can. J. Chem.*, **33**, 1824 (1955)
- 89) H. Paulsen, K. -W. Pflughaupt, "The Carbohydrates" (W. Pigman, D. Horton ed.), Vol. 1B, p. 881 (1980), Academic Press
- 90) F. D. Mills, J. E. Hodge, W. K. Rohwedder, L. W. Tjarks, *J. Org. Chem.*, **38**, 2512 (1973)
- 91) 松井義一, 小幡 斉, 鹿田幸治, 徳山 泰, 上野照雄, 農化, **52**, 69 (1978)
- 92) G. L. Lookhart, M. S. Feather, *Carbohydr. Res.*, **79**, 293 (1980)
- 93) J. W. Green, "The Carbohydrates", (W. Pigman, D. Horton, ed.), Vol. 1B, p. 1101 (1980), Academic Press
- 94) 西長 明, 蛋白質核酸酵素別冊, **26**, 214 (1983)
- 95) H. S. Isbell, *Carbohydr. Res.*, **49**, C 1 (1976)
- 96) D. J. Kosman, "Bioorganic Chemistry", (E. E. van Tamelen ed.), Vol. 2, p. 175 (1980), Academic Press
- 97) G. H. Lorimer, T. J. Andrews, N. T. Tolbert, *Biochemistry*, **12**, 18 (1973)
- 98) 菅野龍也, 櫻木宏親, 吉田政幸, 有合化, **37**, 335 (1979)
- 99) K. Wong, A. R. Morgan, W. Paranchych, *Can. J. Biochem.*, **52**, 950 (1974)
- 100) 飯山 悟, 村上浩紀, 久良木倫生, 大村浩久, 農化, **47**, 455 (1973)
- 101) A. Murata, M. Uike, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 347 (1976)
- 102) N. Kashimura, J. Morita, T. Komano, *Carbohydr. Res.*, **70**, C3 (1979)
- 103) N. Kashimura, I. Sato, Z. Kumazawa, H. Kuno, S. Koyama, M. Kitagawa, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2407 (1982)
- 104) 柏村直樹, 佐藤郁夫, 熊沢善三郎, 小山司朗, 酒井昭弘, 三重大学農学部学術報告, **67**, 107 (1983)
- 105) 柏村直樹, 未発表 (1984)
- 106) W. G. Gleason, R. Barker, *Can. J. Chem.*, **49**, 1425 (1971)
- 107) K. J. Schray, S. J. Benkovic, *Acc. Chem. Res.*, **11**, 136 (1978)
- 108) G. P. Ellis, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **14**, 63 (1959)
- 109) E. A. Sausville, R. W. Stein, J. Peisach, S. B. Horwitz, *Biochemistry*, **17**, 2746 (1978)
- 110) T. Takabe, M. Miyakawa, S. Nikai, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 613 (1979)
- 111) O. Theander, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **17**, 293 (1962)
- 112) 柏村直樹, 農化, **51**, R 117 (1977)
- 113) S. Hirano, N. Kashimura, N. Kosaka, K. Onodera, *Polymer*, **13**, 190 (1972)
- 114) T. Uryu, Y. Koyama, K. Matsuzaki, *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **17**, 673 (1979)
- 115) K. Kobayashi, H. Sumitomo, *Macromolecules*, **13**, 234 (1980)
- 116) 柏村直樹, 佐藤郁夫, 酒井昭弘, 熊沢善三郎, 小山司朗, 小林一清, 住友 宏, 日本農芸化学会中部支部第 87 回例会講演要旨, p. 13 (1983)
- 117) 中村宜男, 機能性高分子 (高分子学会編) p. 219 (1974)
- 118) K. Ueda, J. Morita, T. Komano, *J. Antibiotics*, **34**, 317 (1981)
- 119) J. W. Lown, S. -K. Sim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1150 (1977)
- 120) J. F. Ward, *Adv. Radiat. Biol.*, **5**, 181 (1975)
- 121) S. Shirahata, H. Murakami, H. Ikuta, K. Yamada, H. Omura, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1111 (1978)
- 122) R. A. Floyd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 1209 (1981)
- 123) G. Czapski, J. Aronovitch, A. Samuni, M. Chevion, "Oxy radicals and their scavenger systems", Vol. 1, p. 111 (1983), Elsevier Biomedical
- 124) H. Kasai, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137 (1984)
- 125) 山本 修, 放射線傷害の機構, (山本 修編) p. 191 (1982), 学会出版センター
- 126) I. Saito, T. Morii, T. Matsuura, *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **12**, 95 (1983)
- 127) 鬼頭幸男, 川岸舜朗, 並木満夫, 農化, **55**, 583 (1981)
- 128) B. C. Gilbert, D. M. King, C. B. Thomas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, **1983**, 675
- 129) C. W. Jungeblut, *J. Exptl. Med.*, **62**, 517 (1935)
- 130) A. Murata, K. Kitagawa, R. Saruno, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 294 (1971)
- 131) A. Murata, K. Kitagawa, H. Inmaru, R. Saruno, *ibid.*, **36**, 2597 (1972)
- 132) K. Ishibashi, T. Sasaki, S. Takesue, K. Watanabe, *ibid.*, **46**, 1961 (1982)
- 133) J. Morita, T. Okugawa, T. Komano, *ibid.*, **46**, 279 (1982)
- 134) 森田潤司, 未発表
- 135) 平井篤造, 高橋 壮, 四方英四郎, 都丸敬一, 植物ウイルス学 (1978), 養賢堂
- 136) Y. Becker, "Antiviral Drugs", p. 1 (1976), S. Karger
- 137) L. ポーリング, ビタミン C とかぜ (村田 晃訳) (1976), 共立出版
- 138) J. Aronovitch, A. Samuni, G. Czapski, "Oxy radicals and their scavenger systems", Vol. 1, p. 380 (1983), Elsevier Biomedical