総合論文

活性酸素種スーパーオキシドの生成と消去

—活性酸素増産剤と人工スーパーオキシドディスムターゼの開発—

長 野 哲 雄*

Enhancers of Superoxide Generation *in vivo* and Novel Superoxide Dismutase Mimics.

Tetsuo NAGANO*

The review describes about the compounds which can enhance the generation of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in the biological systems and about the novel metal complexes which can have superoxide dismutase activity *in vivo*. Some compounds are readily reduced by one or two electron(s) to produce their reduced forms. When these reduced forms can react with dioxygen, the compounds often have the potential to increase the production(s) of $O_2^{\cdot-}$ and/or H_2O_2 in living cells. The review shows that hypervalent heteropentale-nes, 3,4-diaza-1,6,6a-trithiapentalenes (TTP) and 1,6-dioxa-6a-thia-2,5-diazapentalenes (HEP), are capable of this in studies with electrochemical reactions and *Escherichia coli*, respectively. The hypervalent structures may be essential for enhancement of $O_2^{\cdot-}$ and/or H_2O_2 generation in living cells. The review also shows that novel metal complexes, Fe(II)-tetrakis *N,N,N',N'*-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (Fe-TPEN) and Fe(III)-tris [*N*-(2-pyridylmethyl)-2-aminoethyl] amine (Fe-TPAA) act as potent superoxide dismutase mimics *in vivo*. The iron complexes appear to have the possibility of being applied therapeutically.

1. はじめに

酸素は現在の地球表面の大気層の20.9%を占め、生体の物質代謝やエネルギー獲得にとって欠くことのできない重要な物質である。生体は酸素分子を電子伝達系における最終の電子受容体として利用することにより高効率のエネルギー生産を可能としており、さらに酸素添加反応によりホルモンなど生理活性物質の生合成や薬物の解毒を行うなど、酸素を利用する代謝系を得ることにより進化してきた。また白血球の貪食時にも酸素消費が爆発的におこり、活性酸素を多量に生成することが知られている。このように好氣的生物は過去から現在に至るまで酸素により様々な恩恵がもたらされてきた。

しかし一方、酸素は生体にとって有害な作用を及ぼす

毒物でもある。酸素毒性は生体内で基底状態の三重項酸素分子(3O_2)から生成する活性酸素種により引き起こされと考えられている。活性酸素種として、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)、一重項酸素(1O_2)の四種が知られている¹⁾。 $O_2^{\cdot-}$ は 1O_2 を除く他の活性種の上流に位置しており^{*1)}、この点から生体における $O_2^{\cdot-}$ の生成と消去をコントロールすることは金属酸素錯体を含む各種活性酸素種の生成制御にもつながる。 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 の反応性の詳細は別書にゆずり¹⁾、本稿では $O_2^{\cdot-}$ の反応性について以下若干述べてみたい。

$O_2^{\cdot-}$ は一個の対電子をもつアニオンラジカル種で、O-O間の核間距離は1.28~1.35 Å、O-Oの結合解離エネルギーは約90 Kcal/molでありいずれも 3O_2 と H_2O_2 の中間にある。

* 東京大学薬学部薬品代謝化学教室 ()

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo ()

*1) $O_2^{\cdot-}$ から 1O_2 が生成するか否かも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)

Fig. 1 Chemical reactivities of superoxide.

また $O_2^{\cdot -}$ は 250 nm に $\epsilon=2300$ 程度の最大吸収をもち²⁾, 特徴的な ESR スペクトル [$g_{\perp}=2.008$, $g_{\parallel}=2.083$ (CH_3CN , 77 K)] を示すことが知られている³⁾。 $O_2^{\cdot -}$ の反応性⁴⁻⁶⁾ (図 1) を大別すると, アニオンとしての反応では

(i) 求核反応^{7,8)} $\sim O_2^{\cdot -}$ はアルキルハライドに対する求核置換反応やカルボニル基に対する求核付加反応を引き起こす。

(ii) 塩基触媒反応^{9,10)} $\sim O_2^{\cdot -}$ の pK_a は 4.88 であり水溶液中では弱い塩基としても働き有機基質から脱プロトンを引き起こし, アニオンを生成するとともにそれ自身は $HO_2\cdot$ となる。

またラジカルとしての反応では

(iii) 水素原子引き抜き反応³⁾ $\sim O_2^{\cdot -}$ はフルオレンなど水素供与性の高い基質から水素原子を引き抜く。

(iv) 一電子還元反応¹¹⁻¹⁴⁾ $\sim$ 種々の基質に対して $O_2^{\cdot -}$ は一電子還元剤として働きシトクローム c, ニトロブルーテトラゾリウム, 金属イオンの還元など, その反応例は多い。

(v) 一電子酸化反応¹⁵⁻¹⁷⁾ $\sim O_2^{\cdot -}$ の反応としては特殊であるがエビネフリン, アスコルビン酸など電子供与性の高い基質に対しては酸化剤として働く。 $O_2^{\cdot -}$ の水中での標準酸化還元電位は -0.16 V (vs. NHE) で有機溶媒中では DMF: -0.44 V, DMSO: -0.5 V, ピリジン: -0.65 V, CH_3CN : -0.8 V と低くなり $O_2^{\cdot -}$ は有機溶媒中では水中に比べて強い還元性を示し, 水中ではより酸化性をしめすようになる。

(vi) 不均化反応¹⁸⁾ (式 1) $\sim O_2^{\cdot -}$ に特徴的な反応でありプロティックな溶媒中でおこりやすく, 生体では本稿の主題の一つであるスーパーオキシド不均化酵素 (Superoxide dismutase: SOD) により触媒され, $O_2^{\cdot -}$ の消去反応となっている。

以上 $O_2^{\cdot -}$ の反応性は非常に多種多様である。しかしながら, $O_2^{\cdot -}$ のラジカルとしての性質は通常の有機ラジカルと大きく異なり反応活性は高くない。さらにアプロ

ティックな溶媒中では強い求核活性を示すが水溶液中ではその活性は弱い。筆者らはこのように温和な反応性を有する $O_2^{\cdot -}$ がいかにして細胞成分に障害を与え¹⁹⁻²²⁾ 酸素毒性を発現するか²³⁾ について種々検討を行ってきた。この点に関しての詳細は拙著の総説¹⁰⁾ を参照していただきたいが, 簡単に要約すると, それ自体穏やかな反応性を有する $O_2^{\cdot -}$ もある種の化合物 (具体的には酸ハライド²³⁻²⁵⁾, ポリハロゲン化合物²⁶⁻²⁹⁾, CO_2 ²⁴⁾, リン酸エステル^{30,31)} など) と反応することにより二次的に酸化活性の高いパーオキシ中間体を生成すること, そしてこれら活性中間体が強い毒性を発現すること, を明らかにしてきた。 $^{18}O_2^{\cdot -}$ をもちいてパーオキシ中間体生成機構も解明してきた。

本稿においては①生体に多様な作用を発現する $O_2^{\cdot -}$ を細胞内で触媒的に増産する化合物すなわち活性酸素増産剤の開発, および② $O_2^{\cdot -}$ を触媒的に消去する人工 SOD とよぶべき鉄錯体の開発, この二点に関する筆者らの最近の知見を以下に述べる。

2. 活性酸素増産剤^{32,33)}

活性酸素種は生命あるものにとって両刃の剣であり薬にも毒にもなりうるものである。例えば癌細胞などに特異的に活性酸素種を発生させることができれば有用な制癌剤となりうるわけで, プレオマイシンはこの代表的例である³⁴⁾。プレオマイシンはその活性部位に鉄金属を持ち活性発現に酸素を必要とし, さらに DNA の核酸塩基への特異性を発現するジチアゾール環を有している。その最終的反応活性種に関しては未だ議論の余地はあるが, 金属-酸素錯体であることは間違いなく広義の活性酸素種と言える。このような活性酸素増産剤が種々開発されれば有用な生理活性物質の創製につながる。従来知られている活性酸素増産剤は表 1 に示すように 3 種に大別できる。これら化合物は抗菌剤, 抗癌剤, 除草剤としての作用を示すが, いずれも細胞内で還元をうけアニオンラジカル種あるいは還元型金属錯体となりこれらが酸素分子と反応し活性酸素種を生じ酸化活性を発現する。例えば, 農薬パラコートは雑草に散布されると葉緑体において陽光下, 光化学系 I により一電子還元されパラコートカチオンラジカルを生じる。このラジカルと酸素

*2) $O_2^{\cdot -}$ の反応性に関する Fridovich と Sawyer の論争については: 長野 哲雄, 化学と工業, 39, 795 (1986)

*3) submitted for publication, H. Yamamoto, T. Nagano, M. Hirobe, *J. Am. Chem. Soc.*, "Mechanism of Oxidation Reactions by Superoxide: Superoxide acts as nucleophile and one electron reductant"

*4) H. Yamamoto, T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, in press "The Reactivity of Superoxide: A Potent Oxidant Generated in situ from Superoxide and CO_2 "

明らかにする目的で、次により水溶性の高い化合物を用いて検討した結果を述べる。

2.2. 1,6-ジオキサ-6a-チア-2,5-ジアザペンタレン (HEP) 化合物の活性酸素増産能 筆者らの研究と前後して Camilleri ら⁴⁵⁻⁴⁹⁾によりパラコート様作用機序を持ち mammalian の細胞にたいして毒性の少ない化合物として HEP 化合物が開発された。この化合物は除草効果を有し、 $O_2^{\cdot -}$ の生成が示唆された。筆者らはハイパーバレントなヘテロペンタレンである HEP 化合物 (図3) の活性酸素増産能について大腸菌を用いて細胞レベルで検討した。HEP 化合物の酸化還元に対する挙動は TTP 化合物とほぼ同様で、0～1.5 V において可逆的一電子酸化還元波を与える。電位は HEP-1, 2, 3, 4 の順に高くなりパラコートの電位 (−0.455 V vs. NHE) と近い⁴⁵⁾。また酸素存在下、これら化合物も酸化波の消失が見られ

Fig. 3 1,6-Dioxo-6a-thia-2,5-diazapentalene.

Fig. 4 Effects of HEP-3 and 4 on growth of *E. coli* in GM (A, C) medium and YE (B, D) medium.

た。細胞レベルの実験として、図4に大腸菌の増殖に与える HEP 化合物の阻害効果を示した (代表例として HEP-3, 4)。HEP 化合物は好氣的条件下で大腸菌の増殖を濃度依存的に阻害したが、この効果は嫌氣的条件下ではみられず、HEP 化合物の大腸菌に対する作用は酸素依存である。さらにこの増殖阻害は栄養の乏しい人工培地 (GM 培地) では低濃度で発現し [図4 (A), (C)], イースト抽出液などを含んだ栄養に富んだ培地 (YE 培地) では高い濃度まで抵抗性を示した [図4 (B), (D)]。増殖阻害効果の強さは HEP-4 > HEP-3 > HEP-2 > HEP-1 となり電位とよい相関がある。細胞内で $O_2^{\cdot -}$ を増産して作用を発現しているとするれば $O_2^{\cdot -}$ 不均化酵素である SOD, また H_2O_2 分解酵素カタラーゼ (CAT) の生合成を増し酵素誘導がおこなうことが考えられる⁵⁰⁻⁵⁵⁾。HEP 化合物存在下で培養した大腸菌の SOD 活性, CAT 活性の結果は表3に示してある。人工培地 (GM 培地) で生育した場合、両酵素の比活性ともほとんど変化なく、富栄養培地 (YE 培地) ではそれぞれ大きく誘導されていることがわかる。その誘導能の強さは HEP-4 > HEP-3 > HEP-2 > HEP-1 の順である。また大腸菌の呼吸鎖における HEP 化合物の酸素消費 (シアン耐性呼吸) を酸素電極で調べた結果も図5に示すごとく HEP-4 > HEP-3 > HEP-2 > HEP-1 の順となり大腸菌に対する HEP の毒性と酸素消費の間に良い相関があった。

以上、HEP 化合物が大腸菌に対して毒性を示しその毒性が SOD や CAT の誘導とまたシアン耐性呼吸における酸素消費速度と、さらに HEP の酸化還元電位と相関のあることが示された。HEP 化合物は大腸菌細胞内で触媒的に $O_2^{\cdot -}$ を増産し、一方大腸菌は栄養に富んだ培地

Fig. 5 Effects of HEP-1, 2, 3, 4 on the rates of cyanide-resistant respiration in *E. coli*.

Table 3(A) Induction of catalase (CAT).

Medium	Conc. (mM)	units/mg protein			
		HEP-1	HEP-2	HEP-3	HEP-4
GM	0	5	3	4	n.d.
	0.005		3	3	n.d.
	0.01		3	6	n.d.
	0.1	6			
	0.2	10			
YE	0	12	6	5	2
	0.1	11	6	33	4
	0.2	16	15	42	8
	0.4	18	46	49	36
	0.6	24	48	65	n.d.
	1.0	48	79	89	n.d.

Table 3(B) Induction of superoxide dismutase (SOD).

Medium	Conc. (mM)	units/mg protein			
		HEP-1	HEP-2	HEP-3	HEP-4
GM	0	8	6	7	n.d.
	0.005		9	8	n.d.
	0.01		9	10	n.d.
	0.1	7			
	0.2	15			
YE	0	26	24	29	26
	0.1	24	30	32	42
	0.2	30	30	54	54
	0.4	31	33	56	69
	0.6	29	41	65	n.d.
	1.0	30	71	95	n.d.

n.d., not determined.

中では $O_2^{\cdot -}$ や $O_2^{\cdot +}$ の不均化で生成する H_2O_2 を消去する SOD や CAT を誘導してその毒性を抑えていると考えられる。HEP 化合物の酸化還元電位は大腸菌の呼吸鎖における電子の伝達を阻害し電子の漏出を引き起こすのにちょうどよいと考えられる。容易に還元されるものほど強い作用をしめすことから、HEP-4 は電位的に良く適合し強い細胞毒性を示したものと考えられる。

前節の TTP 化合物においても述べたように HEP 化合物も構造的に非常に大きな特徴がある。ペンタレン環部は平面であり O-S-O の 3 原子はほぼ直線的に結合し、ハイパーバレント結合を形成している。中心の S 原子がハイパーバレントであると考えられている。結合距離は各原子のファンデルワールス半径の和よりも短く共有結

合より長く、通常の結合よりも弱い σ 型の結合が存在していると考えられる。

2.3. 分子軌道法計算による考察 HEP-1 については Paul らにより 1970 年 X 線結晶解析がなされ⁵⁶⁾ O-S-O 結合が直線であること、O-S 結合は通常の単結合より長くファンデルワールス半径の和よりも短いことが報告されている。筆者らは *ab initio* による分子軌道法計算を行う上から HEP-2, HEP-3, HEP-4 についても X 線結晶解析を行った。その結果いずれの化合物もペンタレン環はほぼ平面であり O-S-O 結合も HEP-1 と同様に直線であった。図 6 は HEP-4 の ORTEP 図でありペンタレン面に垂直な方向と平行な方向から見たものである。スルホンの SO_2 結合は HEP-1 のジメチル基の結合とほぼ同

Fig. 6

Fig. 7

じ方向であった。またスルホキシドの S-O 結合はスルホンの 2 つの O のうち図 6 での O4 にあたる位置に存在した。HEP 化合物を *ab initio* 分子軌道計算を行った結果、HEP 化合物の LUMO レベルは HEP-1, 2, 3, 4 の順に低く、HEP 化合物の還元されやすさと相関があった。各原子上の電荷分布 (図 7) の結果は O-S-O が特徴的ハイパーバレント結合であることを示している。また各化合物の LUMO はペンタレン平面に垂直な軌道の寄与が大きいことがわかった。MNDO 分子軌道計算から HEP 化合物の一電子還元体であるアニオンラジカル種はペンタレンの環結合部位 C=S に電荷の片寄りがみられ、また HOMO は母化合物の LUMO と軌道の寄与が同じであった。TTP 化合物においても LUMO レベルに対してはペンタレン平面に垂直な軌道の寄与が一番大きく、いずれのペンタレンも O-S-O, S-S-S の中心が正、両端が負に帯電している結果が得られた。3 原子間の分極は TTP より HEP の方が大きく、またアニオンラジカル種では HEP は C=S 結合を中心にチャージがひろがっているのに対して、TTP は S-S-S の 3 原子にのみ局在化

するなどヘテロペンタレンとして若干異なる点もある。このように分子軌道計算による考察を行うことにより、今後よりよい活性酸素増産剤として働き得るヘテロペンタレン類の設計が可能となるであろう。

3. 人工スーパーオキシディスムターゼ^{57,58)}

SOD ははじめウシ赤血球から機能不明の銅タンパク質として単離された。そして 1969 年 Fridovich らによりその機能があきらかにされた⁵⁹⁾。現在までに SOD はその活性中心金属の種類によって Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD の 3 種に大別される。Cu, Zn-SOD は動植物、ほとんどの真核細胞に見いだされ一般に細菌や藍藻などの原核細胞にはない。それに対し Fe-SOD は多くの原核細胞に存在し真核細胞には一部の例外を除いて存在しない。Mn-SOD は真核細胞のミトコンドリア中と、原核細胞に存在することが知られている。

多くの疾患に活性酸素の関与が示唆されており、 $O_2^{\cdot -}$ を消去する化合物は非常に有効な治療薬となりうるものと考えられる。その点から SOD そのものあるいは修飾 SOD を炎症などの疾患の治療薬に応用する試みもなされているが⁶⁰⁾、(i) 高分子タンパクであるため細胞膜を通過できないこと、(ii) 血中半減期が短いこと、(iii) 抗原となりうること、(iv) タンパク質としての不安定さなどの理由からはかばかしい結果は得られていない。そこで低分子で細胞膜を通過しやすい SOD 活性をもつ各種金属錯体に期待が集まっている。現在まで native SOD に倣い Cu 錯体、Mn 錯体、Fe 錯体を中心に検討が行われている^{61,62)}。Cu 錯体としては Sorenson らによる Cu (salicylate)₂⁶³⁻⁶⁵⁾、Cu (DIPS)₂ あるいは木村らによる

Table 4 SOD Mimics.

Cu Complex	Mn Complex	Fe Complex
Cu (salicylate) ₂ 反応速度定数は $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Mn-desferal 葉緑体でバラコート毒性阻害	Fe-citrate native Cu, Zn-SOD の 0.03 % 活性
Cu(DIPS) ₂ 反応速度定数は $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 抗炎症作用, 抗腫瘍作用あり	NBT 法で native SOD の 0.1 % 活性	lipid peroxidation 阻害する
Cu-amino acid (s) cyt.c 還元で native SOD の 3~5% 活性	Mn-NTA $k_{\text{cat}} = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下	Fe-EDTA $k_{\text{cat}} = \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で低活性
Cu-aqua		
Cu ₁₄ [(d-penicillamine) ₁₂ Cl] 反応速度定数は $0.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$		
Cu (o-phenanthroline) $k_{\text{cat}} = (5.1 \pm 0.9) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 200 \mu \text{ M}$ H_2O_2 と反応し $\cdot\text{OH}$ を生じる。		
Cu-cimetidine $\text{IC}_{50} = 0.4 \mu \text{ M}$		
Cu-polyamine 最も活性の高い錯体で $\text{IC}_{50} = 60 \mu \text{ M}$ 構造活性相関あり		

DIPS : Diisopropylsalicylate, EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid, NTA : Nitrilotriacetic acid.

Cu-cimetidine⁶²⁾, Cu-polyamine⁶¹⁾ がよく知られている。特に Cu-cimetidine は $\text{O}_2^{\cdot -}$ 不均化反応触媒活性の指標である IC_{50} ($\text{O}_2^{\cdot -}$ による cyt. c の還元を 50% 阻害する SOD mimics の濃度) は非常に良い値を示している。しかしながらいずれの SOD mimics も *in vivo* でたしか効果をもっているという報告はない。その理由として Cu 錯体においては *in vitro* では高い活性を有し, Cu の水和イオンですら $\text{O}_2^{\cdot -}$ の不均化反応速度定数が $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ とほとんど酵素に近い活性を有しているにもかかわらず, 細胞内では容易に分解不活化することにある。Mn-錯体においては最近 Fridovich⁶⁶⁻⁶⁸⁾ らにより Mn-desferal 錯体が *in vivo* においても有効な SOD 作用を発現することを見いだされているが, Mn 金属はそれ自体神経毒になりうるもので, 治療薬への応用は難しいと思われる。既に報告されている SOD mimics について表 4 にまとめた。

筆者らは SOD mimics として研究例の少ない鉄錯体に注目し検討を行った。今回はそのなかでも *in vitro* で $\text{O}_2^{\cdot -}$ 不均化能が非常に高くかつ *in vivo* においても SOD 作用を有する Fe(II)-tetrakis-N,N,N',N'-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (Fe-TPEN)⁶⁹⁾, Fe(III)-tris[N-(2-pyridylmethyl)-2-aminoethyl]-amine (Fe-TPAA) 錯体について論述する。配位子 TPEN, TPAA の合成法は図 8 に示した。TPEN はエチレンジアミンと 2-ピコリ

Fig. 8 Syntheses of Fe-TPEN and Fe-TPAA.

ルクロリドを NaOH 存在下室温で 5 日間反応させ合成した。TPEN は最近 Dojindo Lab. より市販されるようになった。TPAA の合成はトリス(2-アミノエチル)ア

ミンとピコリルアルデヒドを反応させて得られる Schiff 塩基を単離することなく NaBH_4 で還元して合成できる。Fe-TPEN 錯体はメタノール中 TPEN と FeSO_4 を反応させ錯体を形成させる。黄色の固体で 416 nm に特異的吸収を有する。Fe-TPAA 錯体も Fe-TPEN 錯体と同様にして調製し黒色の固体を得た。両錯体とも鉄：配位子 = 1：1 錯体であることは、連続変化法⁷⁰⁾により明らかになった。Fe-TPEN, Fe-TPAA 両錯体の SOD 活性を cyt. c 還元法を用いて測定した結果 IC_{50} が $0.4 \mu\text{M}$, $4.0 \mu\text{M}$ と非常に高い活性をもつ錯体であり他に例をみない。比較のため他の Fe-錯体について測定した IC_{50} 値を表 5 に示した。TPEN, TPAA を配位子とする他の金属錯体 Cu, Mn, Ni 類には顕著な活性はない。 $\text{O}_2^{\cdot -}$ の不均化反応には $\text{O}_2^{\cdot -}$ を還元して H_2O_2 にする際に H^+ を必要とする。pH が上昇すると無触媒下の不均化反応速度は低下する。しかしながら Cu, Zn-SOD の酵素活性は pH 5~10 の間で変化なく酵素反応においては H^+ は溶媒中

Table 5 IC_{50} Values for various iron complexes.

Iron Complex	IC_{50} (μM)
Fe-TPEN	0.4
Fe-TPAA	4.0
Fe-EDTA	>200
Fe-DTPA	>200
Fe-o-phen	100
Fe-EDTAD	50

EDTAD: Ethylenediamine tetra acetamide, DTPA: Diethylenetriamine penta acetic acid, EDTA: Ethylenediamine tetra acetic acid.

Fig. 9 Effects of bovine serum albumin on SOD activities of metal complexes.

Table 6 Values of catalytic rate constant of various SOD mimics.

SOD Mimic	pH	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Fe-TPEN	7.5	2.2×10^9
Fe-TPAA	7.5	0.5×10^9
SODs	7.0	2×10^9
Cu (salicylate) ₂	7.5	1.6×10^9
Cu (DIPS) ₂	7.5	2.4×10^9
Mn-NTA	6.0	2.2×10^7
Fe-EDTA	7.5	$\sim 10^6$

から取り込まれるのではなく活性部位の近傍からくることが示している。Fe-TPEN, Fe-TPAA 錯体の活性の pH 依存性をそれぞれ検討した結果, Fe-TPEN は pH の上昇により活性は著しく低下し, 一方 Fe-TPAA は pH による活性の変化はみられず Fe-TPAA の分子内 H^+ が不均化の際供給されるものと考えられ, この点 Fe-TPAA はアポタンパクに H^+ 供給源をもつ native SOD より近いモデルということになる。また前述したごとく Cu 錯体は高 SOD 活性を有するものが多いが *in vivo* においてはタンパクにより容易に不活化される (図 9)。しかしながら Fe-TPEN, Fe-TPAA はいずれもタンパクとしてウシ血清アルブミン (BSA) を添加した系においてもその活性は全く変化しない (図 9)。更に回転ディスク電極を用いて各錯体の $\text{O}_2^{\cdot -}$ の不均化反応速度定数を測定した。回転ディスク電極による測定の詳細は別書参照されたい^{71, 72)}。表 6 に示すように Fe-TPEN, Fe-TPAA は native SOD に匹敵する触媒活性を有することがわかる。以上の知見は本両錯体が現在まで知られている SOD mimics のなかでも最高の活性を有していることを示している。

これらの SOD mimics (Fe-TPEN, Fe-TPAA) の生体への応用に興味を持たれる。実験としては大腸菌をパラコートにさらすことにより細胞内に $\text{O}_2^{\cdot -}$ を発生させる系を用いた。Fe-TPEN, Fe-TPAA が *in vitro* のみならず *in vivo* でも SOD 活性を発現することができるならば $\text{O}_2^{\cdot -}$ 産生を毒性発現機構とするパラコートの大腸菌障害を抑制するにちがいない。SOD 作用を有する金属錯体 5 種 [Fe-TPEN, Fe-TPAA, Cu (salicylate)₂, Cu (DIPS)₂, Mn-desferal] のパラコートの大腸菌増殖阻害, 致死に与える効果を検討した。その結果 Cu (salicylate)₂, Cu (DIPS)₂ は全く生育阻害を抑制することなく, Mn-desferal はそれ自身で毒性を示した。一方 Fe-TPAA は濃度依存的にパラコート毒から大腸菌を救った (図 10)。

Fig. 10 Effect of Fe-TPAA on induction of *E. coli* growth by PQ.

Fig. 11 Effect of Fe-TPAA on lethality of *E. coli* by PQ.

Fe-TPEN も同様に毒性抑制効果を示したが、Fe-TPAA は Fe-TPEN に比べ 50 倍以上低濃度で有効であった。これら錯体が細胞内で脱金属キレーターとして作用を発現したのではないことはキレーターのみを添加した場合逆に増殖阻害をおこすことから明らかである。図 11 に示すようにパラコートの大腸菌致死作用に対しても Fe-TPAA は防御作用を示した。そしてこれら両錯体が実際に SOD として機能していることは以下の実験から確かめられた。前章でも触れたように栄養に富んだ培地中で大腸菌を生育した場合、パラコート毒に対してある程度の抵抗を示す。これは $O_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 が引金となって活性酸素消去酵素群 SOD、CAT が誘導されパラコートによる活性酸素障害から細胞を守るためである。もし Fe-TPAA が細胞内で SOD のかわりとして機能するならばパラコート毒に対し、SOD を誘導することなく大腸菌

	PQ(mM)	Fe-TPAA(mM)
1	0	0
2	0.5	0
3	0	1.0
4	0.5	0.1
5	0.5	0.3
6	0.5	0.5
7	0.5	0.5

Conditions: Incubation in YE medium at 37°C

Fig. 12 Effect of Fe-TPAA on induction of SOD by PQ.

細胞を防御するはずである。結果は図 12 に示すように Fe-TPAA の濃度に依存して SOD の誘導を抑制した。このことはとりもなおさず *in vivo* においても Fe-TPAA、Fe-TPEN は SOD として機能していることを示している。このように細胞内で SOD 作用を発現することが確かめられた金属錯体ははじめてであり、またパラコート毒性を軽減する SOD mimics は従来知られていない。炎症、虚血など活性酸素の関与する疾患への治療薬としての応用が期待される。

さらに有用な新規金属錯体開発のため Fe-TPEN、Fe-TPAA がなぜ高い SOD 活性を有しているのか考察することも重要なことと思われる。理由の第一にあげられるべきは $O_2^{\cdot -}$ に対する親和性の問題がある。ウシ赤血球 Cu, Zn-SOD は Arg 141 が正の電荷を有し $O_2^{\cdot -}$ を酵素の中心活性部位に引き付け固定するのに重要な役割をはたしている⁷³⁾。一方配位子 TPEN, TPAA は中性の配位子であり、錯体として正電荷であり $O_2^{\cdot -}$ との親和性はカルボン酸を配位子とする EDTA, DTPA の Fe 錯体とは異なる。理由の第二として酸化還元の見点からは $O_2/O_2^{\cdot -}$ の電位は $E_0' = -0.16$ V (vs. NHE), $O_2^{\cdot -}/H_2O_2$ のそれは $+0.87$ V であり、この間に酸化還元電位を持てば SOD 反応が可能となるはずである。また理由の第三として配位環境の問題として native SOD の配位子は His のイミダゾール環である。TPEN, TPAA もそれぞれ 4 個、3 個の配位可能なピリジン環を有しており π 電子の活性への寄与が予測される。金属 (Cu, Ni) 一環状ポリアミ

ンにSOD活性があることを報告している木村らも置換基ピリジン-N-オキシドがついたものに高い活性があることを報告している^{74,75)}。さらに錯体としての安定性、細胞膜の透過性も重要な点であろう。これらの考察はいまだ推測の段階にあり、今後さらに新規金属錯体を多数合成することにより反応機構も鮮明になるとと思われる。

4. おわりに

本稿では生体における活性酸素種 $O_2^{\cdot-}$ の増産と消去を作用機序とする生理活性物質の開発と応用について論じた。これらの化合物は企業、臨床医と協力しさらに臨床治験薬としての適用が検討されていくであろう⁷⁶⁻⁷⁸⁾。

一方、最近酸素分子自身が呼吸鎖の電子伝達経路を制御する報告がなされた。また酸素濃度により基質代謝経路の変換がおこなわれる知見もある⁷⁹⁾。酸素がたんに呼吸鎖末端における電子受容体として機能するだけでなくケミカルメディエーターとしての役目もあることを示唆している。単純な気体分子である酸素、それから派生する活性酸素の秩序ある制御、恒常性の維持は好氣的生物の至上命題である。21世紀の生命化学の中心課題として老化がある。この老化にも酸素の関与が示唆されている。いわゆるラジカル説である。これらの問題の解決は今後に残されているが、今回概説した生体内の活性酸素種を制御する化合物、錯体は新薬創製の面ばかりでなく、これらの研究にとっても非常に有用なものとなるであろう。

終わりに、本研究は文部省科学研究費助成金の援助をいただきました。ここに深甚の謝意を表します。研究を進めるにあたり、ご指導ご助言を賜りました東京大学薬学部広部雅昭教授に感謝致します。また分子軌道法計算をご指導いただきました東京大学薬学部板井昭子博士、片倉晋一研究員に感謝いたします。本研究は共同研究者である山本浩史博士(味の素)、高橋真木修士(花王)、平野智久修士(東大薬)の協力により行われたもので彼らの努力に深く感謝いたします。

(平成元年4月11日受理)

文 献

- 1) 活性酸素に関する1987年以前の単行本、雑誌、総説については以下の文献およびその中の引用文献を参照されたい。
- a) 長野哲雄, 広部雅昭, 蛋白質核酸酵素臨時増刊, 33, 3094 (1988)
- b) 長野哲雄, ファルマシア, 22, 350 (1986)
- c) 長野哲雄, 広部雅昭, 衛生化学, 34, 481 (1988)
- d) 広部雅昭, 長野哲雄, 医学のあゆみ, 127, 485 (1983)

- e) 長野哲雄, 水質汚濁研究, 10, 537 (1987)
1988年以降のものとして
- f) A. Quintanilla, "Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine" (1988) Plenum Press, New York
- g) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編集, "活性酸素-生物での生成, 消去, 作用の分子機構" 蛋白質核酸酵素, 33 (1988)
- h) 近藤元治監修, 大柳善彦, 吉川敏一編集, "フリーラジカルの臨床" Vol.3 (1988) 日本医学館
- i) 金ヶ崎士郎ら, 代謝, 25, 791 (1988)
- 2) B.H.J. Bielski, Photochem. Photobiol., 28, 645 (1978)
- 3) M. Tezuka, Y. Ohkatsu, T. Osa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 48, 1471 (1975)
- 4) A.A. Frimer, "The Chemistry of Peroxides" (S. Patai ed.) pp.429 (1983) John-Wiley and Sons Ltd., New York
- 5) D.T. Sawyer, M.J. Gibian, Tetrahedron, 35, 1471 (1979)
- 6) 菅野龍也, 桜木宏規, 吉田政幸, 有合成化, 37, 335 (1979)
- 7) R.A. Johnson, E.G. Nidy, M.V. Merritt, J. Am. Chem. Soc., 100, 7960 (1978)
- 8) J.S. Fillippo, Jr., L.J. Romano, C.-I. Chern, J.S. Valentine, J. Org. Chem., 41, 586 (1976)
- 9) D. Behar, G. Czapski, J. Rabani, L.M. Dorfman, H.A. Schwarz, J. Phys. Chem., 74, 3209 (1970)
- 10) Y.A. Ilan, G. Czapski, D. Meisel, Biochim. Biophys. Acta, 430, 209 (1976)
- 11) R. Poupko, I. Rosenthal, J. Phys. Chem., 77, 1722 (1973)
- 12) J.W. Peter, C.S. Foote, J. Am. Chem. Soc., 98, 873 (1976)
- 13) Y. Ushijima, M. Nakano, J. Appl. Biochem., 2, 138 (1980)
- 14) C. Beauchamp, I. Fridovich, Anal. Chem., 44, 276 (1971)
- 15) E. Lee-Ruff, A.B.P. Lever, J. Rigaudy, Canad. J. Chem., 54, 1837 (1976)
- 16) M. Nishikimi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 463 (1975)
- 17) G.L. Loschen, A. Azzi, C. Richter, L. Flohol, FEBS Lett., 42, 68 (1974)
- 18) D. Klug, J. Rabani, I. Fridovich, J. Biol. Chem., 247, 4839 (1972)
- 19) T. Nagano, K. Arakane, M. Hirobe, Tetrahedron Lett., 21, 5021 (1980)
- 20) H. Inoue, T. Nagano, M. Hirobe, ibid., 25, 317 (1984)
- 21) H. Inoue, T. Nagano, M. Hirobe, J. Pharmacobio-Dyn, 10, 19 (1987)
- 22) E. Katori, T. Nagano, T. Kunieda, M. Hirobe,

- Chem. Pharm. Bull.*, 29, 3075 (1981)
- 23) T. Nagano, K. Arakane, M. Hirobe, *ibid.*, 28, 3719 (1980)
- 24) T. Nagano, K. Yokooji, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, 24, 3481 (1983)
- 25) T. Nagano, K. Yokooji, M. Hirobe, *ibid.*, 25, 965 (1984)
- 26) H. Yamamoto, T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 539 (1986)
- 27) T. Nagano, H. Yamamoto, M. Hirobe, "The Biological Role of Reactive Oxygen Species in Skin" (O. Hayaishi, S. Imamura, Y. Miyachi eds) University of Tokyo Press, Tokyo, 1987 p.241
- 28) H. Yamamoto, T. Nagano, M. Hirobe, *J. Biol. Chem.*, 263, 12224 (1988)
- 29) 長野哲雄, 化学と工業, 41, 153 (1988)
- 30) T. Nagano, H. Yamane, N. Yada, M. Hirobe, "Studies in Organic Chemistry 33, The Role of Oxygen in Chemistry and Biochemistry" (W. Ando, Y. Moro-oka, eds) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1988, p.449
- 31) H. Yamane, N. Yada, E. Katori, T. Mashino, T. Nagano, M. Hirobe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 1104 (1987)
- 32) M. Takahashi, T. Nagano, M. Hirobe, *Arch. Biochem. Biophys.*, 268, 137 (1989)
- 33) M. Takahashi, T. Nagano, M. Hirobe, First International Conference on Heteroatom Chemistry, Kobe (1987) pp.204
- 34) 杉浦幸雄, "活性酸素" 蛋白質核酸酵素, 33, 3102 (1988) and refs cited therein.
- 35) 浅田浩二, 中野稔, *ibid.*, 33, 2776 (1988)
- 36) J.I. Musher, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 8, 54 (1969)
- 37) 秋葉欣哉, 化学と工業, 40, 112 (1987)
- 38) 秋葉, 山本, 化学増刊 115「ヘテロ元素の有機化学」 3 (1988)
- 39) 秋葉欣哉, 化学, 42, 539 (1987)
- 40) 秋葉欣哉, 有合化, 42, 379 (1987)
- 41) J.-I. Derocque, M. Perrier, J. Vialle, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1968, 2062
- 42) S. Nakamura, I. Yamazaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 189, 29 (1969)
- 43) K. Sugioka, H. Nakano, T. Noguchi, J. Tsuchiya, M. Nakano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100, 1251 (1981)
- 44) F. Gerson, R. Gleiter, H. Ohya-Nishiguchi, *Helv. Chim. Acta*, 60, 1220 (1977)
- 45) P. Camilleri, J.R. Bowyer, M.T. Clark, P.O'Neill, *Biochim. Biophys. Acta*, 765, 236 (1984)
- 46) J.R. Bowyer, P. Camilleri, A. Stapleton, *FEBS Lett.*, 172, 239 (1984)
- 47) P. Camilleri, M.T. Clark, D.J. Cole-Hamilton, I.J. Gilmore, *J. Chem. Soc., Perkin II*, 1985, 833
- 48) P. Camilleri, J.R. Bowyer, R.C. Weaver, *Biochim. Biophys. Acta*, 810, 385 (1985)
- 49) P. Camilleri, J.R. Bowyer, P.H. McNeil, *Z. Naturforsch.*, 42c, 829 (1987)
- 50) H.M. Hassan, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 252, 7667 (1977)
- 51) H.M. Hassan, I. Fridovich, *ibid.*, 253, 8143 (1978)
- 52) H.M. Hassan, I. Fridovich, *ibid.*, 254, 10846 (1979)
- 53) H.M. Hassan, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, 196, 385 (1979)
- 54) H.M. Hassan, I. Fridovich, *J. Bacteriol.*, 141, 156 (1982)
- 55) H.M. Hassan, I. Fridovich, *ibid.*, 129, 1574 (1977)
- 56) E.C. Llaguno, I.C. Paul, *Tetrahedron Lett.*, 1973, 1565
- 57) T. Nagano, T. Hirano, M. Hirobe, *J. Biol. Chem.*, 264, 9243 (1989)
- 58) T. Nagano, T. Hirano, M. Hirobe, "Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals" (E. Niki, M. Kondo, T. Yoshikawa eds) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, in press
- 59) J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 244, 6049 (1969)
- 60) M.G.P. Saifer et al. "Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine" (G. Rotilio ed) Elsevier (1986)
- 61) 木村栄一, 八並敦子, 蛋白質核酸酵素別冊, 26, 177 (1983)
- 62) 木村栄一, 小池 透, 「フリーラジカルの臨床 Vol.1」 pp.79 (1979)
- 63) J.R.J. Sorenson, *J. Med. Chem.*, 19, 135 (1976)
- 64) M. Younes, E. Lengfelder, S. Zienan, U. Weser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 576 (1978)
- 65) S.R.C. Leuthanser, L.W. Oberley, T.D. Oberley, J.R.L. Sorenson, K. Ramakrishna, *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 1077 (1981)
- 66) H.D. Ravinowich, C.T. Privalle, I. Fridovich, *Free Rad. Biol. Med.*, 3, 125 (1987)
- 67) D. Darr, K.A. Zarilla, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, 258, 351 (1987)
- 68) D. Darr, S. Yanni, S.R. Pinelle, *Free Rad. Biol. Med.*, 4, 357 (1988)
- 69) G. Anderegg, F. Wenk, *Helv. Chim. Acta*, 60, 123 (1977)
- 70) 上野景平「入門キレート化学」, 南江堂 (1986)
- 71) E. Argese, B.D. Carli, E. Orsega, R. Adelio, G. Rotilio, *Anal. Biochem.*, 132, 110 (1983)
- 72) A. Rigo, G. Rotilio, "Handbook of Methods for

- Oxygen Radical Research" (R. A. Greewald ed) CRC Press Inc. pp.221 (1985)
- 73) W. E. Beyer, I. Fridovich, G. T. Mullenbach, R. Hallewell, *J. Biol. Chem.*, 262, 11182 (1987)
- 74) E. Kimura, A. Sakonaka, M. Nakamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 492 (1979)
- 75) E. Kimura, A. Yatsunami, A. Watanabe, R. Machida, T. Koike, H. Fujioka, Y. Kuramoto, M. Sumomogi, K. Kunimitsu, A. Yamashita, *ibid.*, 745, 37 (1983)
- 76) 長野哲雄, 高橋真木, 広部雅昭, 日特願 昭 62222004 (1987)
- 76) 長野哲雄, 平野智久, 広部雅昭, 日特願 昭 62222005 (1987)
- 78) 長野哲雄, 平野智久, 広部雅昭, 日特願 昭 6399322 (1988)
- 79) E. Takahara, S. Ohta, M. Hirobe, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 541 (1986)

本誌広告料金

表紙 2	1 頁	80,000 円	後付 1 頁	50,000 円
表紙 3	1 頁	60,000 円	〃 1/2 頁	30,000 円
表紙 4	1 頁 (2 色)	100,000 円	綴込 (1 枚)	100,000 円現物持込
英文目次下	1/2 頁	35,000 円		(62.1.改訂実施)

詳細は下記一手取り扱い社へご照会下さい。

(株) 共栄通信社

本社 〒104 東京都中央区銀座 8-2-1 (新田ビル) Tel. 03-572-3381 (代)
 大阪支社 〒530 大阪市北区西天満 3-6-8 (笹屋ビル) Tel. 06-362-6515 (代)