The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

Environ. Mutagen Res., 22 : 155 - 162(2000)

シンポジウム

化学物質による活性酸素の生成と消去

福原　潔，宮田　直樹

国立医薬品食品衛生研究所　〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1

Electrochemical studies of quinone and nitroarene in generation and quenching of superoxide

Kiyoshi Fukuhara and Naoki Miyata

National Institute of Health Sciences
Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

Summary

Quinones are common in several natural products and endogeneous biochemicals or generated through metabolism of aromatic hydrocarbons. Some quinones are potent redox active compounds which can undergo enzymatic redox cycling with their corresponding semiquinone anion radicals and as a result generate superoxide anion radicals.
In this paper, we review the catalytic activity of quinones and nitroarenes, as mediators in the reductive activation of molecular oxygen and in the oxidative quenching of superoxide, examined by electrochemical method.

Keywords：quinone, nitroarene, superoxide, electrochemistry

緒　　言

酸素障害は反応性の高い酸素の還元分子種(スーパーオキシド，過酸化水素，ヒドロキシルラジカル)あるいは励起分子種(一重項酸素)等の活性酸素が核酸，脂質，蛋白質などの生体高分子を特異的に酸化することによってもたらされ，発がん，炎症，心疾患等の多くの疾患や老化の要因にも関与していることが報告されている．通常，活性化したマクロファージ，白血球，細胞内顆粒，酸化酵素等によって発生した活性酸素は，生体における防御機構の一つとして重要な役割をはたしている．また，生体は活性酸素の生成抑制機構や活性酸素に対する消去機能が働いており，過剰の活性酸素による酸素障害を防いでいる．しかし，過労やストレス等で活性酸素の生成抑制と消去機能が充分に機能しないとき，あるいは，外因性の化学物質が活性酸素の生成を促進するとき，活性酸素は細胞成分を酸化し，酸素障害を与える．

活性酸素を生成する化学物質には，キノン系環境化学物質や芳香族炭化水素のキノン代謝物(Bolton et al., 2000)，アドリアマイシンやストリプトニグリン等のキノン系制がん剤(Doroshow and Davis, 1986)，ブレオマイシン(Hecht, 1995)やビタミンK(Kim et al., 1996)等が知られている．このうちキノン系化合物によって生じる酸素障害は，キノン類が一電子還元酵素によって生成するセミキノンアニオンラジカルが酸素分子を還元的に活性化して生成するスーパーオキシドが引き金となる(O'Brien, 1991)．スーパーオキシドはさらに酵素的またはHaber-Weiss反応によって，より反応性の高い過酸化水素やヒドロキシルラジカル等の活性酸素種を生成し，成人病を引き起こす原因の一つにこれらの活性酸素種による生体高分子の酸化的修飾反応が考えられている．特にこれらの活性酸素種による核酸に対する酸化的損傷反応は細胞の突然変異を誘発し，がん化のための主な要因の一つであることが明らかとなっている．環境化

受付：2000年8月11日　受理：2000年8月12日
©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された．
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

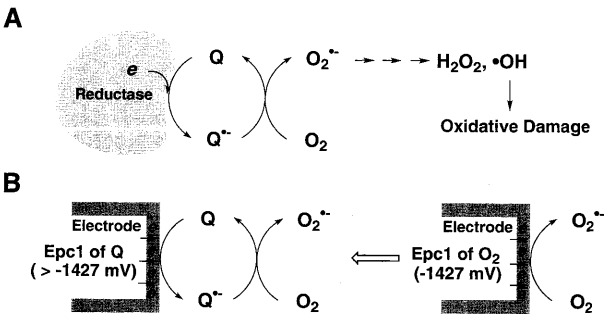

Fig. 1 Generation of superoxide catalyzed by quinone in biological (A) and electrochemical (B) systems

学物質として特にその変異原性と発がん性が注目されているニトロアレーンも，近年，ニトロ基の代謝活性化反応の過程でスーパーオキシドが生成することが報告されている(Mason et al. 1975)．すなわち，ニトロアレーンの還元代謝活性化反応は，好気的条件下ではニトロアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応が進行してスーパーオキシドが生成することが予測されている．

われわれは，活性酸素生成の重要なステップと考えられる酸素の一電子還元によるスーパーオキシドの生成反応に注目し，キノンおよびニトロアレーンと酸素分子との間の電子移動反応についてサイクリックボルタンメトリー法(CV法)，ディファレンシャルパルスボルタンメトリー法(DPV法)，ポテンシャルステップクロノクーロメトリー法(PSCC法)等の電気化学的手法による解析を試みた．本稿ではキノンおよびニトロアレーンのアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応(スーパーオキシドの生成)と，スーパーオキシドからニトロアレーンおよびキノンへの一電子移動反応(スーパーオキシドの消去)の電気化学的解析法の確立および本方法によって得られたこれらの化合物の酸化還元特性とスーパーオキシド発生能および消去能との相関について述べる．

1．スーパーオキシド生成反応の解析

1）CV法，およびDPV法による解析

アントラキノン誘導体による細胞障害は活性酸素によって引き起こされる．すなわちアントラキノンはcytochromeP450 reductase等の還元酵素によって一電子還元を受けてアントラキノンアニオンラジカルが生成する．酸素はアントラキノンアニオンラジカルによって一電子還元されてスーパーオキシドが生成し，この酸素への一電子移動反応が細胞障害の引き金となる(Doroshow, 1983)．そこでアントラキノンによる酸素の触媒的還元活性化反応を電気化学的に解析することを試みた(Fig. 1)．測定は，0.1Mの過塩素酸テトラエチルアンモニウムを支持電解質としたDMF溶液中，白金作用電極，針状白金対極，および非水溶媒用銀参照電極を

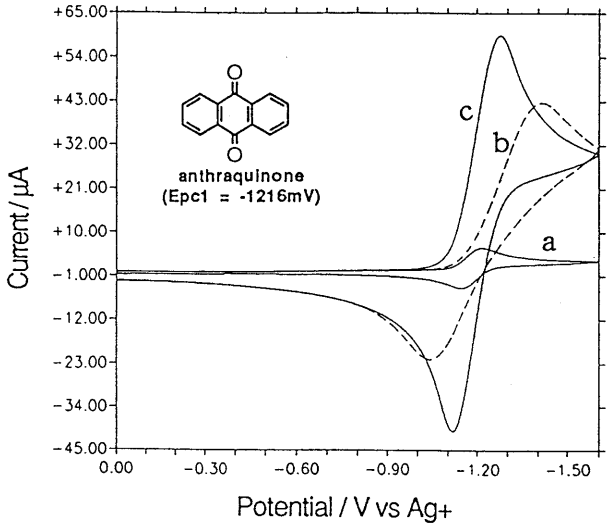

Fig. 2 CV of 0.1 mmol dm^{-3} anthraquinone under argon (a), saturated O_2 (b) or anthraquinone under saturated O_2 (c) in DMF solutions (1 ml) containing 0.1 mol dm^{-3} NEt_4ClO_4 at a Pt electrode (diameter 1.6 mm) with a scan rate of 100 mV s^{-1} at 25℃. The potentials are vs. Ag/Ag^+ (0.01 mol dm^{-3}) $AgNO_3$ in 0.1 mol dm^{-3} NBu_4ClO_4 in MeCN

用いて行った(Fig. 2)．酸素(約4.5mM飽和酸素濃度)は-1427mVで一電子還元(Epc1)されてスーパーオキシドが生成し，逆に-1038mVでスーパーオキシドは酸素へ一電子酸化(Epa1)される．一方，アントラキノンの1mM溶液は嫌気的条件下では-1216mVで一電子還元(Epc1)されてアニオンラジカルが生成し，このアニオンラジカルは-1155mVで一電子酸化(Epa1)されてアントラキノンを再生する．このアントラキノン溶液中に酸素を飽和させて酸化還元電位を測定すると酸素の還元電位はEpc1 =-1257mV，またスーパーオキシドの酸化電位はEpa1 =-1108mVとなり，アントラキノン非存在下と比べ酸素の還元電位はプラス側に152mVシフトし，またスーパーオキシドの酸化電位は，70mVマイナス側にシフトしていることが示された．酸素の還元電位のプラス側へのシフトは，アントラキノンアニオンラジカルと酸素が酸化還元サイクルを形成していることを示す．すなわち，1) アントラキノンは酸素より還元されやすいため，電極表面上でアントラキノンが先に還元され，2)生成したアニオンラジカルは溶存酸素存在下，酸素への電子移動反応が進行して，スーパーオキシドの発生とアントラキノンの再生が起き，3)再生したアントラキノンは再度還元される．1) - 3)の酸化還元サイクルが繰り返されることによって酸素の還元電位はアントラキノンの還元電位の近くにシフトし，還元電流は増加する．以上，アントラキノンによるスーパーオキシドの触媒的な生成反応が電気化学的手法(CV法)によって再現された．この結果は，キノンによるスーパーオキシドの触媒的な生成反応が電気化学的手法によって解析可能である

NII-Electronic Library Service

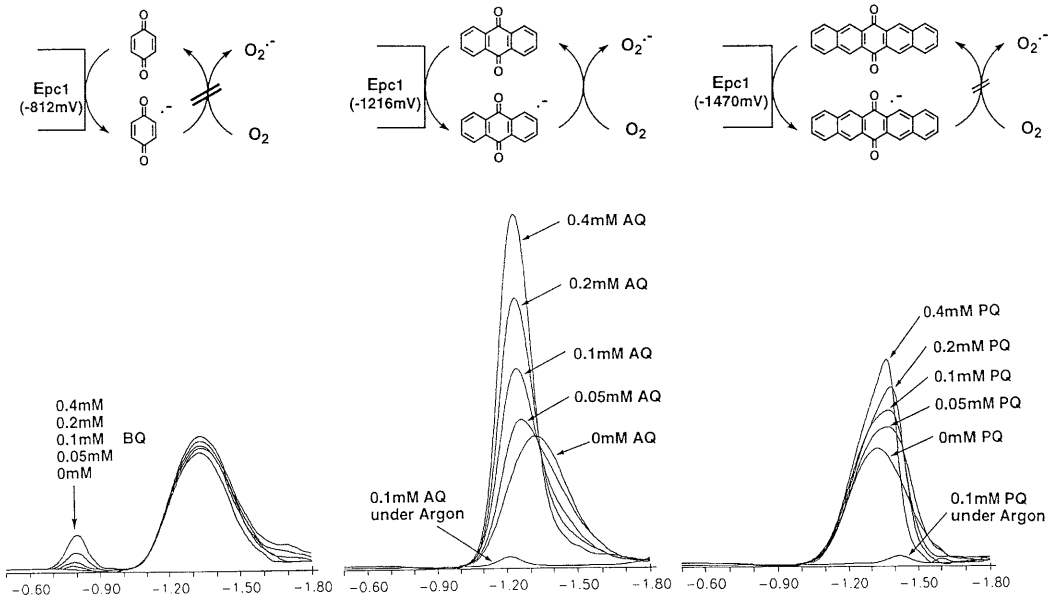

Fig. 3 DPV of p-benzoquinone (BQ), anthraquinone (AQ) or 6, 13-pentacenequinone (PQ) under saturated O_2. The conditions is as follows ; 0 mV init E, -1800 mV final E, 20 mV/s scan rate, 50 mV pulse amp, 50 ms pulse width, 200 mV pulse period, 5 s quiet T

ことを示している．

CV法は酸化還元過程でバックグランド電流(容量性電流)を生じるため，酸素の酸化還元に伴い，CV曲線のベースラインは大きく変化する．DPV法は電位を順次ステップアップして電流応答をサンプリングする方法であり，CV法で問題となる酸化還元反応過程に生じるバックグランド電流の影響を受けない．そのため，DPV法で観測される電流曲線の変化はキノンによるスーパーオキシドの生成のみを直接反映することが考えられる．そこで，スーパーオキシドの生成反応をDPV法で測定し，還元電位の異なるキノン化合物について電子移動反応に伴うスーパーオキシドの生成反応の比較を行った(Fig. 3)．CV法で酸素への電子移動反応が観測されたアントラキノンの場合，DPV法においてもアントラキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応に伴う酸素の還元電位のプラスへのシフトと酸化還元サイクルに伴う還元電流量の増加がみられた．また，アントラキノン濃度が0.05－0.2mMの範囲では酸素飽和条件下，還元電流量が比例して増加していることから，アントラキノンはこの濃度範囲では飽和酸素と一定の酸化還元サイクルでスーパーオキシドを生成していることが示された．一方，アントラキノンよりも一電子還元されやすいベンゾキノン(Epc1＝-812mV)や一電子還元され難い6, 13-ペンタセンキノン(Epc1＝-1415mV)では還元電流量の増加がほとんどみられないことから，これらのキノン体はスーパーオキシドの発生を触媒していないことが示された．以上，DPV法によってキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応によるスーパーオキシド発生の解析を行った結果，アントラキノンは酸化還元サイクルによってスーパーオキシドを発生するのに対して，一電子還元電位の異なるベンゾキノンや6, 13-ペンタセンキノンのアニオンラジカルからは酸素への電子移動反応が起こらないことが明らかとなった．

2) PSCC法による解析

種々のキノンと酸素との間の電子移動反応の行きやすさを比較するためには，電子移動反応の数値化が必要である．PSCC法は，電位をある値から第2の値にステップしたときに得られる電気量(Q)の経時変化(クーロメトリー)を調べる方法であり，電極反応の速度論的パラメータの解析に有効な手法である．そこでPSCC法を用いて，キノンアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応によって生じる酸化還元サイクルの回数(ターンオーバー数)を数値化し，キノン化合物のスーパーオキシド発生能を明らかにした．また，同様の実験をニトロアレーンについても行い，キノンと比較した．測定はCV法やDPV法と同様の条件で行った．初期電位は0mVに設定し，ついで電位をそれぞれの化合物の一電子還元電位(Epc1)に，250m秒間ステップした時の，還元電気量の経時変化(Q vs t)を測定した．還元電気量の対時間プロット曲線(クロノクーログラム)は，Ansonプロット(Q vs $t^{1/2}$)表示法により直線プロットへと変換した後，この直線プロットの勾配($\mu C / msec^{1/2}$)を求めた．実験は，嫌気的条件下および化合物非存在下でも行い，これらの勾配値から化合物のスーパーオキシド生成量とターンオーバー数で表わした触媒能を算出した．まず，アントラキノンのスーパーオキシド生成能をPSCC法によって解析した(Fig. 4)．アントラキノンの一電子還元

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

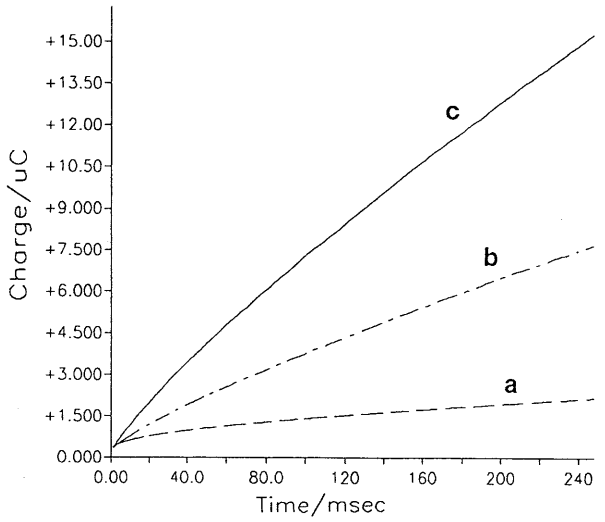

Fig. 4 PSCC of 0.1 mmol dm^{-3} anthraquinone under argon (a), saturated O_2 (b) or anthraquinone under saturated O_2 (c). The potentials are stepped from 0 to -1216 mV (Epc1 of anthraquinone) for 250 ms. Other conditions are as in Fig. 1

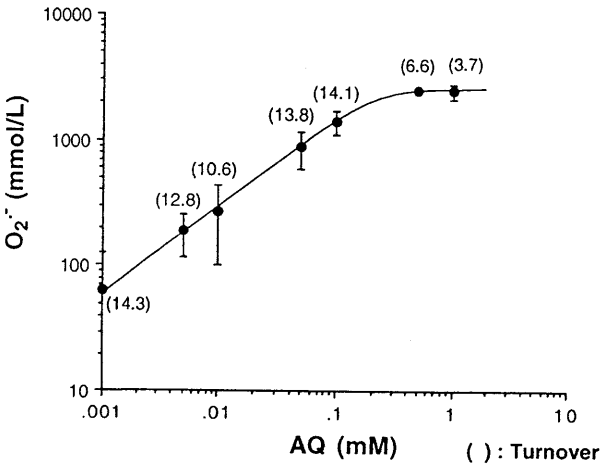

Fig. 5 Effect of anthraquinone concentration on the catalysing formation of superoxide. Each point represents the mean value of three runs, and the error bars indicate the standard deviation. Turnover numbers are givin in parentheses for each concentration

電位(Epc 1)は-1216 mVであるため，この電位条件下でPSCC法を行った．その結果，酸素飽和条件下，アントラキノン0.1 mM溶液で測定された電気量($[S + O_2] = 0.755 \mu C/msec^{1/2}$)は，嫌気的条件下($[S] = 0.018 \mu C/msec^{1/2}$)およびアントラキノン非存在下($[O_2] = 0.480 \mu C/msec^{1/2}$)での電気量をはるかに上回ることが示され，アントラキノンアニオンラジカルは酸素分子と酸化還元サイクルを繰り返してスーパーオキシドの発生を触媒していることが示された．さらにAnsonプロット変換で求めた電流量からスーパーオキシドの発生量は1400 mmol dm^{-3}，ターンオーバー数は14.1であることが明らかとなった．次にアントラキノン濃度を変えて同様の実験を行った(Fig. 5)．その結果，0.001 mM－0.1 mMの濃度範囲ではスーパーオキシドの生成量は化合物濃度に比例し，一定のターンオーバー数によってスーパーオキシドの生成を触媒していることが示され，アントラキノンの触媒能はこの濃度範囲では計測可能であることが明らかとなった．

以上，PSCC法によりアントラキノンのスーパーオキシド生成能を数値化することが可能になった．そこで種々のキノンやニトロアレーンのスーパーオキシド生成能を明らかにし，さらに化合物の酸化電位(Epa 1)との相関についても検討した(Table 1)．その結果，-1000 mVから-1300 mVに酸化電位(Epa 1)を有するキノンやニトロアレーンでは，アニオンラジカルから酸素分子への電子移動に伴う電気量の増加($[S + O_2] > [S] + [O_2]$)がみられ，スーパーオキシドが触媒的に発生していることが示された．特に，Epa 1が小さい化合物ほどスーパーオキシドを発生しやすく，Epa 1が酸素分子のEpc 1(-1437 mV)に近い時，触媒作用が最も強くなり効率よくスーパーオキシドを発生した．一方，Epa 1が-1000 mVよりも大きい化合物では，アニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応は進行しなかった．キノンの中では5, 12-ナフタセンキノンが最高のターンオーバー数29.7を示し，ニトロアレーンの中では1-ニトロピレンのターンオーバー数16.2が最高であった．また，同程度のEpa 1を持つキノンとニトロアレーンを比較すると，ニトロアレーンの電子移動能はキノンの約60％であった．

以上，電気化学的手法を用いることによりキノンおよびニトロアレーンのアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応を明らかにした．-1000 mV～-1300 mVに酸化電位のあるキノンやニトロアレーンから酸素分子への電子移動は，酸化還元の電位ギャップを乗り越えて電子が移動している．この電子移動反応は酸素に特徴的な現象であり，酸素分子の還元電位(Epc 1 = -1437 mV)と酸化電位(Epa 1 = -1056 mV)との差がキノンやニトロアレーンよりも大きいことによると考える．キノンやニトロアレーンが酸素分子と酸化還元サイクルを形成してスーパーオキシドを触媒的に発生するためには，酸素の還元電位よりもプラスの電位で容易に化合物の還元反応が進行すること(ステップ1)，化合物が一電子還元後，その電位で酸素への電子移動反応がすみやかに進行すること(ステップ2)が必要である．PSCC法によって明らかにした電位ギャップを乗り越えた電子移動反応はステップ2の反応が電気化学的に進行可能であること示しており，この特徴的な電子移動反応が進行することによって，キノンやニトロアレーンは酸素分子とレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを触媒的に発生することが考えられる．

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

Table 1 Chronocoulometric data for quinone and nitroarenes in the presence or absence of oxygen : Catalytic activity of quinone and nitroarene anion radical for superoxide generation

compounds	Epc1[a] (mV vs. Ag/Ag +)	[S][b] (μC/msec$^{1/2}$)	[S + O_2][b] (μC/msec$^{1/2}$)	[O_2][b] (μC/msec$^{1/2}$)	Amount of $O_2^{\cdot -}$[c] (mmol dm^{-3})	Turnover number[d]
QUINONE						
benzoquinone	− 812	0.022	0.027	0.006	1	0
1,4-naphthoquinone	− 981	0.019	0.037	0.017	3	0
1-OH-anthraquinone	− 1052	0.018	0.048	0.030	9	0.1
menadione	− 1071	0.018	0.060	0.035	46	0.5
1-Cl-anthraquinone	− 1166	0.020	0.389	0.225	786	7.3
anthraquinone	− 1216	0.018	0.755	0.480	1400	14.1
5,12-naphthacene-quinone	− 1319	0.019	1.667	1.087	3060	29.7
NITROARENE						
4-NO_2-quinoline *N*-oxide	− 1012	0.017	0.041	0.015	43	0.5
1,3-diNO_2-naphthalene	− 1095	0.018	0.079	0.048	70	0.7
1,7-diNO_2-naphthalene	− 1134	0.019	0.198	0.107	395	3.9
3-NO_2-fluoranthene	− 1204	0.019	0.521	0.378	675	6.5
m-diNO_2-benzene	− 1227	0.018	0.560	0.400	773	7.8
1,6-diNO_2-naphthalene	− 1248	0.019	0.738	0.550	928	9.2
1-NO_2-pyrene	− 1325	0.018	1.394	1.086	1580	16.2

[a] Applied potential for PSCC experiment.

[b] The potentials were stepped from 0 mV to Epc1 of compounds. The integrations of current were measured for 250 ms with 0.1 mM substrate under argon [S], 0.1 mM substrate under saturated O_2 [S + O_2] or saturated O_2 [O_2] in DMF (1 mL) containning 0.1 mmol dm^{-3} TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6 mm), and the diffusional slops of a linear plot (charge vs $t^{1/2}$; Anson plot) were obtained. All values were substracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated O_2 in DMF are 4.5 mmol dm^{-3} and 4.7 × 10^{-5}cm^2/s.

[c] Amounts of generated superoxide = [S + O] − ([S] + [O]) × 5.45 × 1000

[d] Turnover numbers of redox cycling = ([S + O] − ([S] + [O])/[S]

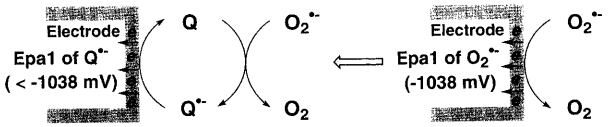

Fig. 6 Electrochemical system for superoxide quenching catalyzed by quinone

2. スーパーオキシドの消去反応の解析

スーパーオキシドからキノンやニトロアレーンへの一電子移動反応が進行するとスーパーオキシドが消去されて酸素分子が再生する．このスーパーオキシドの消去反応は，CV法によるアントラキノンと酸素分子との間の一電子移動反応過程で明らかとなった(Fig. 2)．すなわち，スーパーオキシドは-1038 mVで酸素分子への一電子酸化反応を受けるのに対して，アントラキノン1 mM溶液ではスーパーオキシドの酸化は-1110 mVで進行し，アントラキノン非存在下と比べて72 mVスーパーオキシドは酸化されやすいことが示された．また，この酸化電位における電流ピークの増加もみられた．このスーパーオキシドの一電子酸化反応性の増加は，スーパーオキシドからアントラキノンへの一電子移動反応が進行して，レドックスサイクルを形成していることが考えられる(Fig. 6)．すなわち，-1600 mVから0 mVへ電位を掃引すると，1)アントラキノンアニオンラジカルは，スーパーオキシドよりも一電子酸化されやすいため(Epa1 = -1190 mV)，アントラキノンアニオンラジカルはスーパーオキシドよりも先にアントラキノンへ酸化される，2)スーパーオキシドからアントラキノンへの一電子移動反応が進行して酸素分子が生成し，アントラキノンは再還元される，3)再還元されたアントラキノンアニオンラジカルは再度酸化され，その結果酸化電流が増加する．以上のような酸化還元サイクルを繰り返すことによってスーパーオキシドの酸化電位はアントラキノンアニオンラジカルの酸化電位の近くにシフトし，アントラキノンがスーパーオキシドの消去反応を触媒することが明らかとなった．

さらにDPV法を用いてスーパーオキシドからキノンへの電子移動反応の詳細な解析を行った(Fig. 7)．その結果2，3-ジメチルアントラキノンは，スーパーオキシドからキノン分子への一電子移動反応に伴う酸化電位のマイナスへのシフトとレドックスサイクルの形成に伴う酸化電流量の増加がみられ，2，3-ジメチルアントラキノンがスーパーオキシドの酸素分子への消去反応を触媒していることが示された．また，スーパーオキシドの酸化電流量は2，3-ジメチルアントラキノン溶液濃度(0.05 − 0.2 mM)に比例して増加していることから，こ

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

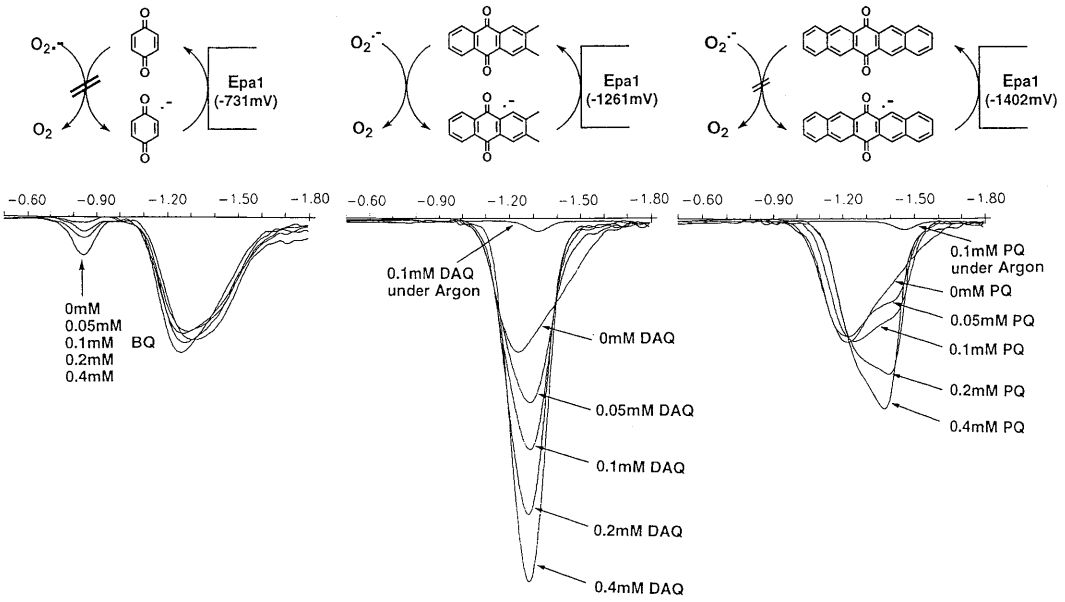

Fig. 7 DPV of p-benzoquinone (BQ), 2, 3-dimethyl anthraquinone (DAQ) or 6, 13-pentacenequinone (PQ) under saturated O_2. The conditions are as follows ; -1800 mV init E, 0 mV final E, 20 mV/s scan rate, 50 mV pulse amp, 50 ms pulse width, 200 mV pulse period, 5 s pre-excitation T

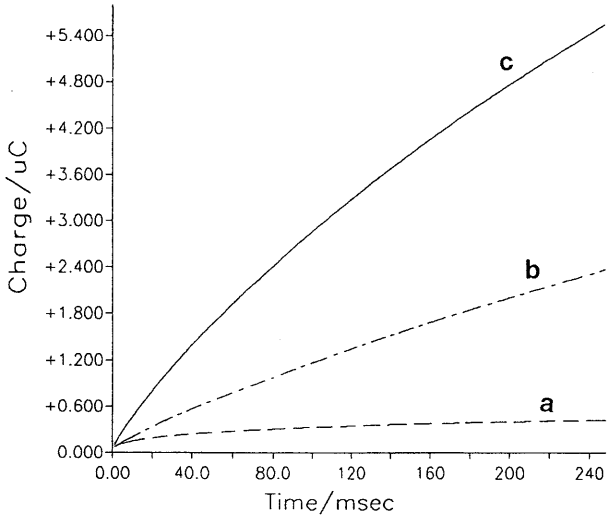

Fig. 8 PSCC of 0.1 mmol dm^{-3} 2-methylanthraquinone under argon (a), saturated O_2 (b) or anthraquinone under saturated O_2 (c). The potentials are stepped from -1437 to -1226 mV (Epa 1 of 2-methylanthraquinone) for 250 ms. Other conditions are as in Fig. 1

の濃度範囲では，飽和酸素濃度は2，3-ジメチルアントラキノンと酸化還元サイクルを形成するのに十分量存在していることが明らかとなった．一方，ベンゾキノンや6，13-ペンタセンキノンでは，2，3-ジメチルアントラキノンと同様の電子移動反応はみられなかった．

次にPSCC法を用いてキノンやニトロアレーンのスーパーオキシド消去能の数値化を試み，スーパーオキシド消去能を化学的に解析した．初期電位は0 mVに設定し，ついで電位を酸素の還元電位(-1437 mV)に10 secステップして電極表面上に十分量のスーパーオキシドと化合物のアニオンラジカルを発生させた．さらに電位をそれぞれの化合物の酸化電位(Epa 1)に250 msecステップしたときの，酸化電流量の経時変化(Q vs t)を測定した．酸化電流量の対時間プロット曲線(クロノクーログラム)は，Ansonプロット(Q vs $t^{1/2}$)表示法により直線プロットへと変換した後，この直線プロットの勾配($\mu C/msec^{1/2}$)を求めた．実験は，嫌気的条件下および化合物非存在下でも行い，これらの勾配値から化合物によって触媒されたスーパーオキシド消去量とターンオーバー数で表わした触媒能を算出した．その結果，2-メチルアントラキノンの0.1 mM溶液では(Fig. 8)，スーパーオキシドの酸素分子への一電子酸化電流量($[S + O_2] = 0.448\,\mu C/msec^{1/2}$)は，嫌気的条件下($[S] = 0.014\,\mu C/msec^{1/2}$)およびキノン非存在下($[O_2] = 0.194\,\mu C/msec^{1/2}$)での電流量をはるかに上回ることが示された．さらにAnsonプロット変換で求めた電流量より2-メチルアントラキノンのスーパーオキシド消去量は1310 mmol dm^{-3}，ターンオーバー数は16.9であることが明らかとなった．同様の方法で種々のキノンやニトロアレーンのスーパーオキシド消去能を明らかにし，一電子還元電位(Epc 1)との相関を検討した(Table 2)．その結果，-1250～-1100 mVに一電子還元電位(Epc1)を有するキノンやニトロアレーンではスーパーオキシドの一電子酸化に伴う酸化電流量の増加($[S + O_2] > [S] + [O_2]$)がみられ，スーパーオキシドが触媒的に消去されていることが示された．特に，Epc 1が大きく，スーパーオキシドの酸化電位(-1056 mV)に近いEpc 1を有する化合物ほど，触媒作用が強く効率よく

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

Table 2 Chronocoulometric data for quinone and nitroarenes in the presence or absence of oxygen : Catalytic activity of quinone and nitroarene for superoxide quenching

compounds	Epa1[a] (mV vs. Ag/Ag +)	[S][b] (μC/msec$^{1/2}$)	[S + O_2][b] (μC/msec$^{1/2}$)	[O_2][b] (μC/msec$^{1/2}$)	Amount of $O_2\cdot^-$[c] (mmol dm^{-3})	Turnover number[d]
QUINONE						
1-Cl-anthraquinone	− 1136	0.015	1.019	0.711	1600	19.6
anthraquinone	− 1190	0.016	0.679	0.357	1670	19.5
2-t-Bu-anthraquinone	− 1212	0.014	0.382	0.177	1040	14.0
2-Me-anthraquinone	− 1226	0.014	0.448	0.194	1310	16.9
2,3-diMe-anthraquinone	− 1261	0.018	0.318	0.126	947	9.7
5,12-naphthacene-quinone	− 1286	0.014	0.137	0.121	218	2.9
NITROARENE						
3-NO_2-fluoranthene	− 1155	0.018	0.670	0.342	1690	17.0
1-NO_2-pyrene	− 1289	0.019	0.183	0.083	439	4.2

[a] Applied potential for PSCC experiment

[b] $O_2^{\cdot-}$ were generated at -1437 mV (Epc 1 of O_2) for 10 s and the potentials were stepped to Epa 1 of compounds. The integrations of current were measured for 250 ms with 0.1 mM substrate under argon [S], 0.1 mM substrate under saturated O_2 [S + O_2] or saturated O_2 [O_2] in DMF (1 mL) containning 0.1 mmol dm^{-3} TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6 mm), and the diffusional slops of a linear plot (charge vs $t^{1/2}$; Anson plot) were obtained. All values were substracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated O_2 in DMF are 4.5 mmol dm^{-3} and 4.7×10^{-5} cm^2/s

[c] Amounts of depleted superoxide = [S + O] − ([S] + [O]) × 5.45 × 1000

[d] Turnover numbers of redox cycling = ([S + O] − ([S] + [O]), /[S]

スーパーオキシドを消去した．キノンの中ではアントラキノンおよびその1-クロル誘導体が最高のターンオーバー数19.6を示し，ニトロアレーンの中では3-ニトロフルオランテンがターンオーバー数17.0を示した．

以上，電気化学的手法を用いることにより，スーパーオキシドからキノンおよびニトロアレーンへの一電子移動反応を明らかにした．スーパーオキシドの消去能はキノンおよびニトロアレーンの一電子還元電位(Epc 1)に依存し，スーパーオキシド(Epa 1 = -1056 mV)から-1100 mV～-1250 mVに還元電位(Epc 1)のあるキノンやニトロアレーンへの電子移動反応は，酸化還元の電位ギャップを乗り越えて進行している．スーパーオキシドがキノンやニトロアレーンとレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを触媒的に消去するためには，スーパーオキシドから化合物への一電子移動反応がすみやかに進行すること(ステップ1)，一電子還元された化合物の酸化反応がスーパーオキシドの酸化よりも先にマイナスの電位で容易に進行して化合物が再生すること(ステップ2)が必要である．PSCC法により明らかにした電位ギャップを乗り越えた電子移動反応はステップ1の反応が電気化学的に進行可能であることを示しており，この特徴的な電子移動反応が進行することによって，キノンやニトロアレーンはスーパーオキシドを触媒的に酸素分子へ消去することが考えられる．

結　　語

ベンツピレンに代表される環境化学物質は生体内で代謝活性化を受けた後，DNA等の生体高分子と反応することが毒性発現の引き金となる．しかし，近年，活性酸素による生体高分子の損傷反応とそれによって引き起こされる突然変異のメカニズムが明らかになるにつれて，活性酸素を産生する化学物質の変異原性および発がん性が注目されるようになってきた．例えば，ベンツピレンもその酸化代謝物としてキノン体が生成することが報告され，ベンツピレンのキノン体が活性酸素を発生して毒性を発現することも報告されている(Penning et al. 1998)．化学物質由来の活性酸素の生成反応は生体内では還元酵素による酸素の還元活性化をキノン等の化学物質が触媒していることが考えられる．われわれは同様の反応を電気化学的手法を用いることによって再現し，種々のキノンおよびニトロアレーンと酸素との間の一電子移動反応を調べ，酸化還元特性からスーパーオキシドの発生および消去反応についての解析を行った．その結果，電子移動反応が酸化還元電位のギャップを乗り越えて触媒的に進行すること，スーパーオキシドの発生および消去能は化合物に固有の一電子酸化電位(Epa 1)および一電子還元電位(Epc 1)にそれぞれ依存していること，ニトロアレーンはキノンと同様に酸素への一電子移動反応が進行してスーパーオキシドの発生および消去反応を触媒すること等を明らかにした．われわれが明らかにしたキノン等の化学物質の酸素毒性と酸化還元特性との相関は，今後，化学物質の酸素毒性を明らかにするうえでの有効な知見と考えられる．また，酸素毒性が報告されているアントラキノン誘導体が電気化学的解析結果にお

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

いてもスーパーオキシドを効率良く発生することは，われわれの手法が種々のキノン等の化学物質の酸素毒性の予測において有効であることを示唆するものである．

参考文献

Bolton, J. L., M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst and T. J. Monks (2000) Role of quinones in toxicology, Chem. Res. Toxicol., 13, 135-160.

Doroshow, J. H. (1983) Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase, Cancer Res. 43, 4543-4551.

Doroshow, J. H. and K. J. Davis (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, J. Biol. Chem., 261, 3068-3074.

Fukuhara, K., Y. Hara and N. Miyata (1994) Electron transfer from quinone and nitroarene anion radicals studied by the potential step chronocoulometry method, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 955-956.

Fukuhara, K., Y. Hara and N. Miyata (1992) Electron transfer from quinone or nitroarene to molecular oxygen, in "Oxygen Radicals", Elsevier, Amsterdam, pp. 11-14.

福原　潔，宮田直樹（1995）アニオンラジカルによる活性酸素の生成，放射線化学，38，161-165.

Hecht, S. M. (1995) Bleomycin-group antitumor agents, In : W. O. Foye (Ed), Cancer Chemotherapeutic agents, American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 369-388.

Kim, K. A., J. Y. Lee, K. S. Park, M. J. Kim and J. H. Chung (1996) Mechanism of menadione-induced cytotoxicity in rat plateles, Toxicol. Appl. Pharmacol., 138, 12-19.

Mason, R. P. and J. L. Holtzman (1975) The role of catalytic superoxide formation in the O_2 inhibition of nitroreductase, Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 1267-1274.

Miyata, N. and K. Fukuhara (1997) Generation and quenching of superoxide examined by chronocoulometric methods, Free Radicals in Clinical Medicine, 11, 44-49.

O'Brien, P. J. (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity, Chem. Biol. Interactions, 80, 1-41.

Penning, T. M., M. E. Burczynski, C-F Hung, K. D. McCoull, N. T. Palackal and L. S. Tsuruda (1998) Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation : Generation of reactive and redox active *o*-quinones, Chem. Res. Toxicol., 12, 1-18.

NII-Electronic Library Service