

in vivo O_2^- モニタリング及び SOD 活性評価 に関する電気化学的研究

Electrochemical Studies on in vivo O_2^- Monitoring and Assay of SOD Activity

- 研究代表者 東京工業大学大学院総合理工学研究科助教授 大坂 武男
Assoc. Prof. Takeo Ohsaka; Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering,
Tokyo Institute of Technology
- 共同研究者 東京工業大学大学院総合理工学研究科教授 徳田 耕一
Prof. Koichi Tokuda; Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo
Institute of Technology
- Korea 大学化学科教授 Chi-Woo Lee
Prof. Chi-Woo Lee; Department of Chemistry, Korea University
- 成蹊大学工学部化学科教授 加藤 明良
Prof. Akira Katoh; Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Seikei University
- 東京工業大学大学院総合理工学研究科助手 岡島 武義
Assoc. Takeyoshi Okajima; Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering,
Tokyo Institute of Technology
- 東京工業大学大学院総合理工学研究科助手 北村 房男
Assoc. Fusao Kitamura; Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering,
Tokyo Institute of Technology

The present study has been undertaken to establish novel ideas for developing a molecularly modified electrode (MME) system which allows the electrogeneration, detection and reaction control of superoxide ion (O_2^-). Based on a self-assembling of surface-active molecules, the MME systems, which are applicable to in vivo system, have been successfully developed to electrogenerate O_2^- by one-electron reduction of O_2 in aqueous media. The water-induced dismutation of O_2^- in organic media has been elucidated using a pulse electrolysis stopped-flow UV-vis spectroscopy. The electrogenerated O_2^- -driven chemiluminescence system has been proposed as a novel O_2^- detection system. The direct and indirect electrode reactions of SOD enzyme have been realized using redox mediators and promoter-modified electrodes. A theory for hydrodynamic chronocoulometry has been developed and successfully applied for simultaneous determination of diffusion coefficients and concentrations of O_2^- (and O_2) without previous knowledge of either from a single experiment. The peculiar reactions of O_2^- with physiologically important substances have been studied, especially from a viewpoint of its detection and reaction control. The fabricated MME systems have been characterized on a molecular level.

研究目的

スーパーオキシドイオン (O_2^-) やヒドロキシルラジカルなどのいわゆる活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) は、殺菌作用、免疫作用、情報伝達、発がん-制がん作用、老化現象、各種疾患などの生命現象の根幹に深く関係し、生体内において極めて重要な化学種であり、その生体作用の分子レベルでの解明は重要な課題として残されている。ROS の酸化ストレスとその防御機構及び ROS の様々な生命現象との係わりを解明するためには、新たな原理に基づいた ROS の生成・検出・反応制御システムの確立が不可欠である。

そこで、本研究では、電子移動や化学反応に対して特異的な「場効果」を有する反応場を、電極界面の特異な分子修飾によって創成できるとの発想に基づいて、ROS の “primary species” である O_2^- の電解生成と反応制御を可能にする分子修飾電極システムの構築及び SOD (スーパーオキシドジスムターゼ) 活性の新しい評価法の確立を目的とし、そのための基礎研究を推進した。

研究経過

水溶液系での O_2^- の電解生成と反応解析のための分子修飾電極の構築

キノリンのメチル及びフェニル誘導体界面活性分子 (2-, 4-, 6-, 7-及び8-メチルキノリン, 2-フェニルキノリン, 5, 6-ベンゾキノリンなど) を含むアリカリ性水溶液中に、水銀吊り下げ電極 (HMDE) を浸すと電極表面上に “quasi-liquid” な疎水性マトリックス層 (厚さ10 Å 以下) が形成され、しかも酸素を溶解させ電解還元を行うと O_2 の O_2^- への1電子還元反応が起こることを見出し、その確証実験を行った。電極上界面活性分子のマトリックス構造が電極電位とともに変化することを *in situ* FTIR 法、電気二重層容量の測定及び *in situ* EQCM 法により明らかにした。 O_2^- の電解生成効率とその安定性 (不均化反応のしにくさ) 及び O_2 の1電子還元を引き続いて起こる、水が関与したさらなる還元 ($O_2^- + H_2O + e^- \rightarrow HO_2^- + OH^-$) の起こりやすさは、界面活性剤の濃度、キノリン環へのメチル基やフェニル基の導入位置、電極電位、pH などに著しく依存することを見出し、 O_2^- 生成及び反応解析のための分子修飾電極システムを構築する上で必要な基礎データを集積することができた。さらに、チオール分子を金電極上に自己集合組織化した分子修飾電極による O_2^- の電解生成に成功した。これは、*in vivo* 系にも適用可能な初めての O_2^- 生成電極システムである。

O_2^- の検出反応

金電極表面にシステインを Au-S 結合で固定し、次にシステインのカルボキシル基とチトクローム c のリジン残基のアミノ基との反応により酸アミド結合を生成し、チトクローム c 固定金電極を作製した。これを用いて水溶液中での O_2^- の電気化学的検出に成功した。すなわち、 O_2^- によって還元されたチトクローム c (Fe^{2+}) を電気化学的に酸化し、そのときの酸化電流値を測定して O_2^- の濃度を評価することができた。電極に固定した酵素と電極との間の直接電子移動反応の実現及びそれを利用した O_2^- の電気化学検出法は、 O_2^- の *in vivo*, *in situ* 検出素子開発の観点から大変注目される。

NBT(ニトロブルーテトラゾニウム)類縁体(2-benzothiazolyl-3-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)-5-[4-(2-sulfoethylcarbonyl)phenyl]-2H-tetrazolium など) は、 O_2^- で還元されて水溶性のホルマザンを生成し、 O_2^- の新しい定量検出色素として期待できることを明らかにした。

O_2^- による生物発光のモデル解析

ウミホタルルシフェリン誘導体 MCLA と O_2^- との特異反応による化学発光現象を *in situ* 電気化学発光分光測定法で検討した結果、 O_2 の O_2^- への電解還元によって、MCLA そのもののレドックス応答が著しく変化し同時に発光すること (470 nm)、そして O_2^- の電解生成量と発光量との間には定量関係が成り立つことを見出した。また、脂溶性の O_2^- スカベンジャーの存在下では、発光量はその濃度に依存し、この発光現象を抗酸化能の評価に利用できることを明らかにした。

O_2^- ジスムテーションの分光電気化学法による解明

生体系での O_2^- の反応場モデルとして、疎水的非プロトン性有機溶媒中で電解生成した O_2^- のジスムテーション (不均化反応) を電気化学法及びパルス電解・ストップフロー分光法で解明した。ダブルポテンシャルステップ・クロノアンペロメトリーによる実験結果とそのシミュレーション解析から、AN, DMSO, DMF などの有機溶媒中における微量の水による O_2^- の不均化反応は、(1) $O_2^- + H_2O \rightarrow HO_2^- + OH^-$, (2) $O_2^- + HO_2^- \rightarrow HO_2^- + O_2$ に従うことを明らかにした。反応 (1) は、 O_2^- のプロトン付加反応(平衡)、また反応 (2) は O_2^- による HO_2^- (ヒドロペルオキシラジカル) の還元反応であり、全体の反応は、 $2O_2^- + H_2O \rightarrow HO_2^- + OH^- + O_2$ (O_2^- ジスムテーション) で表される。反応速度定数は、AN > DMF > DMSO の順で小さくなり、これは O_2^- と H_2O の各溶媒中での溶媒和の違いに基づくこ

とを明らかにした。

O₂の電極触媒還元によるH₂O₂の生成

異なるアルキル鎖長 (n) を持つ一連の対称型アルキルビオロゲン (C_nV²⁺C_n, n = 1~12) による水溶液中での溶存酸素の電極触媒還元反応を速度論的に調べた。レドックス電位 (E°) は n が大きいほど正電位にシフトし、酸化体(還元体)の安定性は n が大きくなるほど減少(増大)することがわかった。これらのビオロゲンは O₂ の H₂O₂ への還元を著しく触媒し、反応速度定数 (k) と (E°) との間には線形自由エネルギー関係が成り立つことを見出した。

レドックス活性サイトとして、1,4-ジアジン環を有する FAD 補酵素類縁体高分子化合物 (ポリ (o-フェニレンジアミン), ポリ (2,3-ジアミノナフタレン) など) で化学修飾した電極は O₂ の H₂O₂ への還元反応を著しく電極触媒し、生体内での FAD 還元体による O₂ の活性化と関連して興味深い。

SODの直接及び間接電極反応の実現

O₂⁻ の O₂ と H₂O₂ への不均化反応を特異的に高選択的に触媒する SOD 及び両親媒性のポリエチレンオキシド (PEO) で化学修飾した PEO-SOD の間接電極反応を、溶存レドックスメディエータとしてメチルビオロゲンやキノン化合物を用いて実現した。また、“レドックスプロモーター”としてアミノ酸 (システインを含む) で化学修飾した金電極を用いて、SOD の“直接”電極反応をはじめて実現し、O₂⁻ の電気化学検出及び SOD 活性の電気化学評価を可能にする新たな基礎概念を確立した。

研究成果及び今後の課題と発展

本研究によって、水溶液系での O₂⁻ の in situ 電解生成及び反応解析のための電極システムを構築する上で必要なデータを集積することができた。また、生体模倣環境での O₂⁻ の生成、ジスムテーション及び生体関連物質との反応の解明、非水溶媒中での O₂/O₂⁻ レドックス対の電極反応の速度論的解析、SOD の直接及び間接電極反応の実現、O₂⁻ のような不安定化学種の濃度と拡散係数の同時独立評価のための Hydrodynamic Chronocoulometry の確立、O₂⁻ の反応解析のためのパルス電解ストップフロー分光法の確立、さらには O₂⁻ とウミホタルルシフェリン類縁体との特異反応に基づく生物発光モデルの実現及び in situ 分光電気化学 O₂⁻ 検出法の確立等を行った。これらの一連の成果は、O₂⁻ の in vivo モニタリング・コントロールシステムを将来実現するための先導的基礎となるものと確信している。このよう

なシステムの実現のためには、in vivo 系における関連データのさらなる蓄積が必要である。

謝 辞

本研究の遂行に当たって、多大のご援助を賜った日産科学振興財団に深く感謝いたします。

発表論文リスト

- 1) T.Ohsaka, F.Matsumoto, F.Kitamura and K.Tokuda: One- and Two- Electron Reduction of Molecular Oxygen Based on Electrode Surface Modification in Alkaline Aqueous Media; *Denki Kagaku*, **61**, 763 (1993).
- 2) T.Ohsaka, M.Tsushima and K.Tokuda: Reaction Entropies for O₂/O₂⁻ Redox Couple in Aprotic Solvents; *Bioelectrochem. & Bioenergetics*, **31**, 289(1993).
- 3) 大坂武男, 対馬 学, 徳田耕一: 電解生成したスーパーオキシドイオンの不均化反応に関する分光学的研究; *J. Deuterium Sci.*, **3**, No.1. 47(1993).
- 4) 松本 太, 岡島武義, 徳田耕一, 大坂武男: H₂O 及び D₂O 中でのスーパーオキシドイオンのジスムテーション; *J. Deuterium Sci.*, **3**, No.2. 31(1993).
- 5) T.Ohsaka, K.Tanaka and K.Tokuda: Electrocatalysis of Poly(thionine)- modified Electrodes for Oxidation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, No.3, 222(1993).
- 6) K.Tanaka, K.Tokuda and T.Ohsaka: An Excellent Electrocatalysis of Poly- (phenosafranine)- modified Electrode for Oxidation of Reduced β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, No. 23, 1770(1993).
- 7) K.Tanaka, S.Ikeda, N.Oyama, K.Tokuda and T. Ohsaka: Preparation of Poly(thionine)- modified Electrode and Its Application to an Electrochemical Detector for the Flow- Injection Analysis of NADH; *Anal. Sci.*, **9**, 783(1993).
- 8) F.Kitamura, T.Ohsaka and K.Tokuda: Adsorption Behavior of Viologen Derivatives on Hanging Mercury Electrode Surfaces; *J.Electroanal. Chem.*, **347**, 371(1993).
- 9) T.Okajima, H.Sakurai, N.Oyama, K.Tokuda and T. Ohsaka: Electrical Equivalent Circuit Parameters for Montmorillonite Clay Film- Coated Quartz

- Crystal Oscillators in Contact with Electrolyte Solutions; *Electrochim. Acta*, **38**, 747(1993).
- 10) F.Kitamura, T.Ohsaka and K.Tokuda: In situ Infrared Reflection Absorption Spectra of Heptyl Viologen Adsorbed on a Mercury Electrode Surface; *J. Electroanal. Chem.*, **353**, 323(1993).
 - 11) H.-T.Xu, F.Kitamura, T.Ohsaka and K.Tokuda: Simultaneous Determination of Dopamine and Ascorbic Acid with Poly(3-methylthiophene)/Polypyrrole Bilayer-Coated Carbon Fiber Electrodes; *Anal. Sci.*, **10**, 399(1994).
 - 12) 大坂武男,松本 太,岡島武義,徳田耕一: 水溶液中でのスーパーオキシドイオンの電解生成; *J. Deuterium Sci.*, **4**, 44(1994).
 - 13) T.Ohsaka, F.Matsumoto and K.Tokuda: An Electrochemical Approach to Dismutation of Superoxide Ion Using Biological Model System with a Hydrophobic/Hydrophilic Interfaces; *Excerpta Medica*, p.91 (1994).
 - 14) M.Tsushima, K.Tokuda and T.Ohsaka: Use of Hydrodynamic Chronocoulometry for Simultaneous Determination of Diffusion Coefficients and Concentration of Dioxygen in Various Media; *Anal. Chem.*, **66**, 4551(1994).
 - 15) F.Kitamura, T.Ohsaka and K.Tokuda: Effect of Complexation by Cyclodextrin on the Voltammetric Characteristics of Viologens Adsorbed on HMDE; *J. Electroanal. Chem.*, **368**, 281(1994).
 - 16) F.Kitamura, T.Ohsaka and K.Tokuda: FT-IRAS Study of p-Cyanobenzonate Adsorption on a Polycrystalline Gold Electrode; *Denki Kagaku*, **62**, 532(1994).
 - 17) C.-W.Lee, T.Okajima and T.Ohsaka: In Situ Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Studies of Self-Assembled Viologen Films at Gold Electrodes; *Bull. Korean Chem. Soc.*, **15**, 190(1994).
 - 18) T.Ohsaka, M.Tsushima, T.Okajima and K.Tokuda: Diffusion Coefficients of Superoxide Ion in Various Media; *Denki Kagaku*, **62**, 1300(1994).
 - 19) H.Satoh, H.Ohno, K.Tokuda and T.Ohsaka: A Study of Diffusional Behavior of Propyl Viologen in Poly(ethylene oxide) Polymer Solvents; *Electrochim. Acta*, **39**, 2261(1994).
 - 20) N.Oyama and T.Ohsaka: Coupling between Electron and Mass Transfer Kinetics in Electroactive Polymer Films - An Application of in situ Quartz Crystal Electrode(QCE)-; *Progress in Polymer Science*, **20**, 761(1995).
 - 21) T.Ohsaka, Y.Shintani, F.Matsumoto, T.Okajima and K.Tokuda: Mediated Electron-Transfer of Polyethylene Oxide-Modified Superoxide Dismutase by Methyl Viologen; *Bioelectrochem. & Bioenerg.*, **37**, 73(1995).
 - 22) F.Matsumoto, K.Tokuda and T.Ohsaka: Electrogeneration of Superoxide Ion on Thiopheno-Modified Gold Electrode in Aqueous Media; *Denki Kagaku*, **63**, 1205(1995).
 - 23) K.Tokuda, F.Kitamura, A.Kumagai and T.Ohsaka: AC Voltammetry at Microcylinder Electrodes; *J. Electroanal. Chem.*, **396**, 365(1995).
 - 24) F.Matsumoto, K.Tokuda and T.Ohsaka: Electrogeneration of Superoxide Ion at Mercury Electrodes With a Hydrophobic Adsorption Film in Aqueous Media; *Electroanalysis*, in press.
 - 25) Y.Che, M.Tsushima, F.Matsumoto, T.Okajima, K.Tokuda and T.Ohsaka: Water-Induced Disproportionation of Superoxide Ion in Aprotic Solvents; *J. Phys. Chem.*, in press.
 - 26) F.Matsumoto, K.Tokuda and T.Ohsaka: Electrogeneration of Superoxide Ion at α -Quinoline-Adsorbed Mercury Electrode in Alkaline Aqueous Solution; *J. Deuterium Sci.*, **5**, 23(1996).
 - 27) T.Okajima, K.Tokuda and T.Ohsaka: Chemiluminescence of a Cypridina Luciferin Analogue by Electrogenerated Superoxide Ion; *Bioelectrochem. & Bioenerg.*, in press.
 - 28) T.Okajima, K.Tokuda and T.Ohsaka: Chemiluminescence of a Cypridina Luciferin Analogue by Electrogenerated Superoxide Ion in the Presence of a Lipophilic Ascorbic Acid Derivative; *Denki Kagaku*, in press.
 - 29) 大坂武男,松本 太: 活性酸素種の生成・検出・反応-電気化学的アプローチによる基礎研究-, 表面, 印刷中.
 - 30) M.-K.Oh, T.Okajima, F.Kitamura, C.-W.Lee, K.Tokuda and T.Ohsaka: Electrocatalytic Reduction of Dioxygen in the Presence of N,N'-Dipentyl Viologen; *Chem. Lett.*, in press.
 - 31) H.Satoh, K.Tokuda and T.Ohsaka: Observation of Intermolecular Charge-Transfer Spectra for Propyl Viologen Dihalides in a Series of Polyether Media; *Chem. Lett.*, **51**(1996).