

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

磁気共鳴と医学 (2000.03) 11巻:131~134.

肝炎発症前のLECラット肝でも,銅メタロチオネイン(Cu(I)8-MTs)は抗酸化的に働く

宍戸直美, 中山憲司, 高澤啓, 大山徹, 中村正雄

## 肝炎発症前の LEC ラット肝でも、銅メタロチオネイン (Cu(I)<sub>8</sub>-MTs) は抗酸化的に働く

穴戸直美<sup>1)</sup>, 中山憲司<sup>2),3)</sup>, 高澤啓<sup>3)</sup>, 大山徹<sup>2),4)</sup>, 中村正雄<sup>1)</sup>

1 旭川医科大学・化学, 2 北海道立衛生研究所, 3 北海道大学・電子科学研究所, 4 現 東京農業大

### Antioxidative Property Remains in Cu(I)-MT and Cytosol Fraction from LEC Rat Liver just before Hepatitis.

*Naomi Shishido<sup>1)</sup>, Kenji Nakayama<sup>2)</sup>, Akira Takasawa<sup>3)</sup>, Tohru Ohyama<sup>2),4)</sup>, Masao Nakamura<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup>Department of Chemistry, Asahikawa Medical College, Nishikagura 4-5-3-11, Asahikawa 078-8510; <sup>2)</sup>Hokkaido Institute of Public Health, N-19 W-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819; <sup>3)</sup>Division of Biophysics, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0812; <sup>4)</sup>now Tokyo university of agriculture, Abashiri 099-2493, Japan

Titration of cytosol fraction and Cu(I)<sub>8</sub>-MT from Long-Evans Cinnamon (LEC) rat liver 13 weeks after birth with CuCl<sub>2</sub> was observed by ESR spectroscopy. The result indicates that Cu(I)<sub>8</sub>-MT were able to reduce further 2 gram atoms of cupric ions per mole MT as bound form. Hg<sup>2+</sup>-induced hydroxyl radical generation from Cu-loaded MT was demonstrated by ESR using the spin trap, 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). The intensity of DMPO-OH signal from Cu-loaded MT was increased with the increase of bound copper. Hydroxyl radical generation through the reaction of Cu(I)<sub>8</sub>-MT with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was inhibited in the presence of GSH. Cytosol fraction shows no ESR signal due to cupric ions and has an ability to reduce further 2 mM cupric ions. Cu<sup>2+</sup>-catalyzed oxidation of DNA was strongly inhibited in the presence of Cd,Zn-MT or GSH. From these results, we can conclude that Cu(I)-MT and cytosol fraction from LEC rat liver just before hepatitis still act as antioxidants and the combined presence of both MT and GSH can afford full protection from Cu<sup>2+</sup>-dependent oxidative damage to biomolecules in LEC rat liver.

#### KEY WORDS

ESR, Glutathione, Hepatitis, LEC Rat, Reactive Oxygen Species, Wilson's Disease

## 【緒言】

Long Evans Cinnamon (LEC) rat は、ヒト Wilson 病と同様に銅 ATPase7B の異常を持つ(1)ため、肝などの組織に銅を異常蓄積するとされている。このとき、肝炎発症の前後に関わらず、銅の殆どが metallothionein (MTs)に結合している(2)。

MTs は銅を含めた重金属を無毒化し、また活性酸素種を消去すると考えられている(3)。一方、銅は Fenton 反応を触媒するが、その酸化還元反応の活性は、結合状態や価数によって大きく変化すると考えられる。これまでに Sakurai らは銅を結合した MTs に過酸化水素を作用させた際の Fenton 反応の効率を(4)、Oikawa らは銅を結合した MTs が過酸化水素なしで DNA を酸化する機構を(5)、それぞれ銅/MTs 結合比と共に示している。我々は銅を結合した MTs から 1 価の銅が遊離すると過酸化水素なしで活性酸素種生成に至ることを示した(6)。

今回は、銅を結合した MTs を肝炎直前の LEC rat 肝から精製して、

- ① さらに銅を結合して反応性を抑えることが出来るか、
  - ② 活性酸素種を消去することが出来るか、
- を検討し、LEC rat の肝炎・肝癌発症への銅の関与の有無を考察した。

## 【方法】

## 1. 試料・試薬

13 週齡 LEC rat から cytosol 画分を調製し、更にこれを熱処理後 FPLC により MTs を得た。試料はいずれも 0.1M Tris-HCl (pH 8.1 または 8.6) 溶液として得た。

試料中の金属含有量を Varian Spectr AA-300 flame atomic absorption spectrophotometer\*により、また硫黄含量を Seiko Instruments Inc. SPS-4000 ICP-AES spectrometer\*により測定した。

酵素試薬など主な生化学試薬は Sigma 社より購入した。ほかの化学試薬は特級のものを使用した。

\*北海道立衛生研究所にて行われた。

## 2. 測定

2 価の銅はその ESR スペクトルを室温で測定した。

活性酸素種のうち、 $O_2^{\cdot-}$ は xanthine oxidase (XO) 系で生成させて cytochrome c (cyt.c)あるいは 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)で検出した。水酸ラジカルは 2 価鉄と過酸化水素の反応で生成させて DMPO で検出した。

SH 基の定量には 2,2'-dithiobis(5-nitrobenzoic acid) (DTNB)を用いた。

DNA の酸化は、DNA に結合した ethidium bromide の発する蛍光強度の減少率から推定した(7)。

以上の測定には、Shimadzu MPS-2000 spectrophotometer, JEOL JES-TE300 ESR spectrometer\*\*, Shimadzu RF-5300PC spectrofluorophotometer を用いた。

\*\*旭川医科大学医学部附属実験実習機器センター所有のものを使用した。

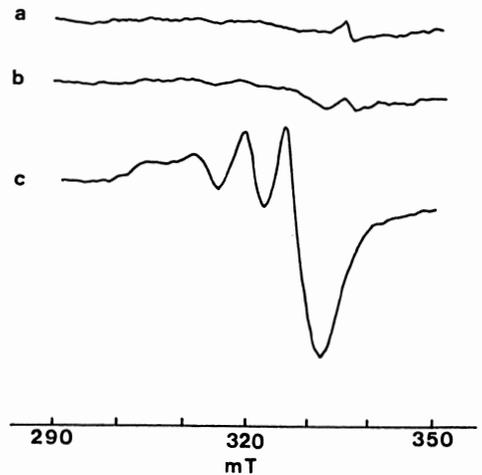


Fig. 1 ESR spectra of LEC rat liver cytosol in the absence (a) or presence (b, c) of  $CuCl_2$ .

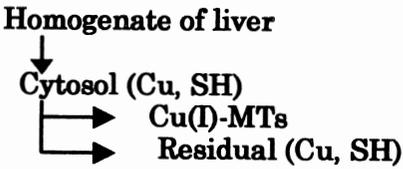
The concentrations of Cu(I)-MTs in the ESR flat cell were estimated to be ca. 150  $\mu$ M. Reactions were carried out in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.1). The concentrations of  $CuCl_2$  added were a) 0.1 mM, b) 2 mM and c) 3 mM. The conditions of measurement: modulation amplitude, 0.5 mT; microwave frequency, 9.42 GHz, microwave power, 10 mW; time constant, 3 sec.

## 【結果】

## 1. cytosol

まず、cytosol 中の Cu, MTs, GSH をそれぞれ定性・定量した(Scheme 1)。

銅(II)-Tris の特徴的な ESR signal は検出されなかった。さらに銅や水銀を添加しても、それぞれ 2mM を越えるまで銅(II)の ESR signal は現れなかった(Fig.1)。つまり、cytosol 中の銅は殆ど全て 1 価の状態、また大半は SH 基に結合して存在する。FPLC の溶出パターンから、銅の殆どは MTs に結合している(2)と予測されている。単離した cytosol 中の銅濃度は 1.3mM, GSH 量は約 2mM, MTs 量は約 0.15mM と算定された。



Scheme 1. Determination of the concentrations of Cu and SH in liver of LEC rat 13 weeks after birth.

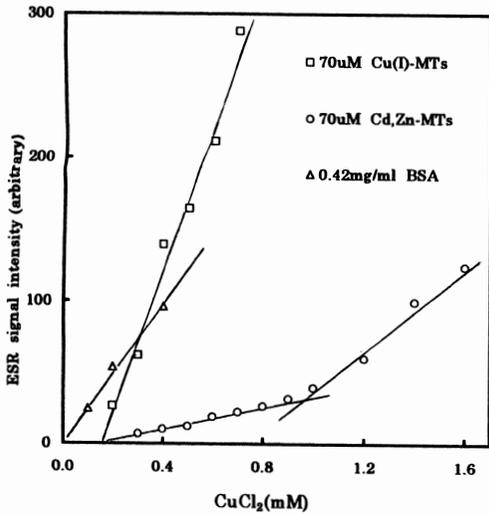


Fig. 2 Titrations of MTs and BSA with  $\text{CuCl}_2$ . Reactions were carried out in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.1). The conditions of measurement were the same as Fig. 1.

2.  $\text{Cu(I)}_8$ -MTs

上記 cytosol から得た  $\text{Cu(I)}_8$ -MTs は、2 価の銅を用いて滴定実験を行っても 2 分子程度は還元した (Fig.2).

さらに、銅を添加した MTs を用いて Hg-induced Fenton reactions の有無を観測し、還元された銅は MTs の SH 基に結合している (Fig.3) という結果を得た。

3. Cu による DNA の酸化

Cu による DNA の酸化を測定した結果、酸化の度合いは過酸化水素の量や共存する SH 基の種類にも依る (dehydroliopic acid, ペニシラミンは銅による反応を好氣的条件下で寧ろ促進か) が、GSH と MTs に関しては、銅に対して過剰量の SH 基があれば DNA の酸化を抑えるといえる (Fig.4).

アスコルビン酸、5-aminolevulinic acid などの還元剤は逆に、Cu による DNA の酸化的反応を促進した。

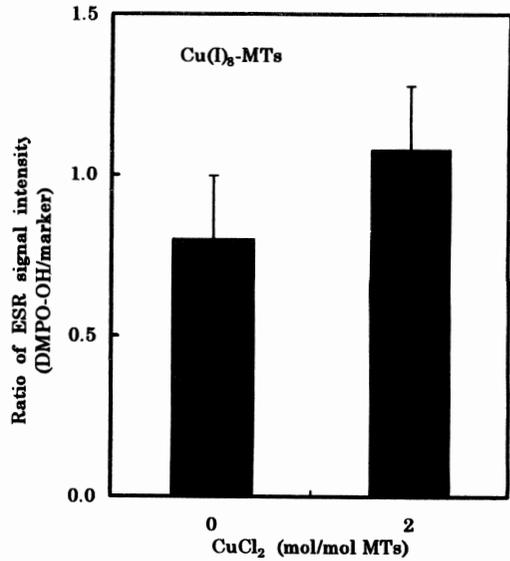


Fig. 3 Hg-induced Fenton-reaction. The concentrations in the ESR flat cell were ca.0.4 mg/ml proteins, 60 mM DMPO, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.1),  $\text{CuCl}_2$  and 0.5 mM DTPA. The spectra were recorded before and 3 min after the addition of 1.6mM  $\text{HgCl}_2$ . The conditions of measurement: modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 0.3 sec.

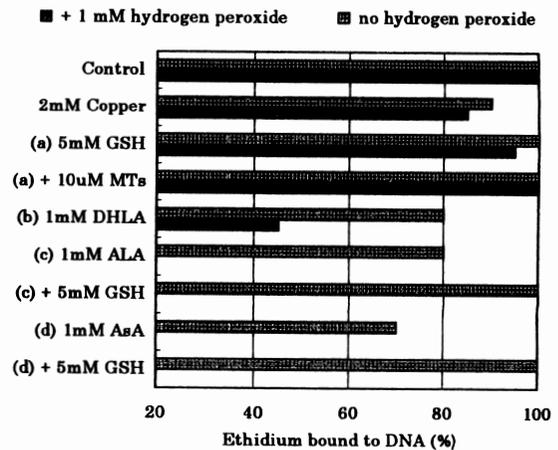


Fig. 4 Copper-induced DNA oxidation. Relative intensity of fluorescence emitted from ethidium-DNA complex was shown. Oxidations of DNA were performed in 0.1 M PBS (pH 7.4) contained 50  $\mu\text{M}$  DNA for 30 min at room temperature. Ten mM EDTA and 50  $\mu\text{M}$  ethidium bromide were then added and mixtures were immediately subjected to measurement (Ex. 510 nm, Em. 590 nm). DHLA: dehydroliopic acid; ALA: 5-aminolevulinic acid; AsA: ascorbic acid.

## 4. 生体分子による活性酸素種の産生と消去

Cu<sup>+</sup>は容易に酸素と反応し、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、HO<sup>·</sup>を生成する。この反応は、CuCl<sub>2</sub> にアスコルビン酸などの還元剤を添加しても観察される。しかし、還元剤として MTs, GSH, dehydrolipoic acid など SH 基をもつ分子を使用すると、MTs >> GSH > dehydrolipoic acid で活性酸素種の産生が抑えられた(data not shown)。これらは、各化合物のもつ SH 基の Cu 結合力, thiyl radical の反応性により説明される。

一方、活性酸素種の消去能という観点から考えると、競争法により算定した 2 次反応速度定数から、LEC ラット肝から得た Cu(I)<sub>8</sub>-MTs は、O<sub>2</sub><sup>·-</sup> と水酸ラジカルの双方を、非常によく消去するといえる(Table 1)。cytosol においては高濃度の GSH と共存しており、MTs の SH 基が反応により酸化されても GSH により還元されると推定される。

Table 1. Second-order rate constants for the reactions of the reactants with ROS.

Reactants	Superoxide (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Hydroxyl Radicals (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Cu	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup>	-
MTs		
Cd,Zn-	10 <sup>5</sup>	- 10 <sup>12</sup>
Cu(I)-	10 <sup>6</sup>	- 10 <sup>12</sup>
Thiols		
GSH	10 <sup>3</sup>	10 <sup>10</sup>
BSA	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	10 <sup>10</sup>
Others		
Ascorbate	10 <sup>5</sup>	10 <sup>10</sup>
GSSG	< 10 <sup>3</sup>	-

Superoxide was generated in the reaction of xanthine oxidase system, and detected using cytochrome c or DMPO. Hydroxyl radicals were generated in the reaction of FeCl<sub>2</sub> with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and detected using DMPO.

## 【考察】

LEC rat cytosol, およびそれから得た Cu-MTs 中には、ESR 検出可能な銅(II)は認められなかった。これは 10, 13, 16, 30 週齢から得た各試料でも確認している(data not shown)。また、いずれの試料にも GSH が銅量に対して数倍程度残存する。

Cu(I)<sub>8</sub>-MTs による Fenton reaction は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との直接反応または Hg<sup>2+</sup> で誘起されるが、これらは GSH 添加により抑制された。Cu(I)<sub>8</sub>-MTs を長期保存すると autooxidation により Cu<sup>2+</sup> が徐々に観

られるようになるが、数回の凍結-再融解では Cu<sup>2+</sup> の生成は起こらなかった。

以上から、肝炎発症直前の LEC ラット肝でも MTs は抗酸化的に働き、また共存する GSH 量からも①遊離で触媒活性を持つ銅は存在し得ない、②Cu(I)<sub>8</sub>-MTs による Fenton 反応も起こりがたい、と考えられる。

銅の殆どは MTs に結合しており(2), free の、あるいは低分子量画分での銅の存在はないと考えられていた。しかし Koizumi らは肝炎発症前後の週齢で分子量 5,000 以下の画分に結合する銅量の顕著な増加を報告している(8)。遠心濾過法で外れるような弱い相互作用により Cu(I) が高分子に結合しているが、低分子量画分として銅を回収した場合は GSH などと結合した状態になると考えられる。実際、10 週齢では Cu(I) として SH 基に結合した状態で回収された。しかし 13, 30 週齢では Cu(II) として回収され、GSH 以外の還元性成分の週齢に伴う低下も考えられる。

結局、LEC rat における病態を支配する要因は何であるか、現在まだ結論は得られていない。局在した部位での銅と共に蓄積する鉄、ポルフィリン代謝異常が考えられる。また、Cu(I)<sub>8</sub>-MTs による ferricyanide の還元反応は市販の MTs に比べて極めて速く終了する。Zn-MTs の酸化還元電位は < -360mV と報告されており(9)、Cu(I)<sub>8</sub>-MTs の電位は更に低いと予想される。そこで Cu(I)<sub>8</sub>-MTs による異常な酸化還元反応も考えられるが、いずれも今後の検討が必要である。

## 【文献】

1. Wu, J. et al. Nature Genetics 7: 541-545 (abstract), 1994.
2. Nakayama, K. et al. Biochim. Biophys. Acta 1289: 150-158, 1996.
3. Sato, M., Bremner, I. Free Rad. Biol. Med. 14: 325-337 (review), 1993.
4. Sakurai, H. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 313-318, 1994.
5. Oikawa, S. et al. Biochemistry 34: 8763-8770, 1995.
6. Nakamura, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 231: 549-552, 1997.
7. Stoewe, R., Pruetz, W. A. Free Rad. Biol. Med. 3: 97-105, 1987.
8. Koizumi, M. et al. Free Rad. Res. 28: 441-450, 1998.
9. Maret, W., Vallee, B.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3478-3482, 1998.