ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素— ハロゲン系による殺菌(解毒)作用機構

I. ミエロペルオキシダーゼとハロゲンとの反応

小 田 島 武 志

東日本学園大学歯学部 口腔生化学講座*

〔受付: 昭和54年11月5日〕

抄録: ペルオキシダーゼ—過酸化水素—ハロゲン系による殺菌(解毒)作用発現機構を解明するため, ミエロペルオキシダーゼと塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素などのハロゲンとの反応を分光学的に検討した。

ミエロペルオキシダーゼは塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素のいずれとも反応し化合物を与えることがわかった。分光滴定で得たミエロペルオキシダーゼとこれらのハロゲンとの解離定数は塩素が0.52mM, ヨウ素が5mM, フッ素と臭素がそれぞれ7mMとなり, 塩素が他に比べて約10倍ミエロペルオキシダーゼに対して親和性が強いことがわかった。この結果はミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—ハロゲン系にとって塩素が最も有効であることを示唆している。

結 言

ミエロペルオキシダーゼは多形核白血球(好中球)のライソゾームに存在するヘム鉄と非ヘム鉄を含むペルオキシダーゼ群中では珍しい酵素である¹⁾。ミエロペルオキシダーゼは過酸化水素と塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素などのハロゲンの存在で殺菌作用を示すことが報告されている²⁾。本研究の目的はミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—ハロゲン系による殺菌(解毒)作用の発現機構を明らかにすることである。

ミエロペルオキシダーゼは過酸化水素との反応で化合物I(有効酸化数+5)及びII(有効酸化数+4)と呼ばれる高い酸化状態の化合物に変換することが知られている³⁾。しかし, ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—ハロゲン系による殺菌や有機物の酸化反応中においてハロゲンがどのような役割をしているか, 塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素の内いずれかが特異的なのか, どのような機

構で反応が進むのかという点に関しては必ずしも明らかではない。従って, ミエロペルオキシダーゼと塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素との個々の反応を検討することもこの酵素系による殺菌(解毒)作用機構を知る上で価値あることである。このような観点からこれらのハロゲンとミエロペルオキシダーゼとの反応を分光学的に検討したので報告する。

材料及び方法

ミエロペルオキシダーゼ(donor: H_2O_2 Oxidoreductase, EC 1.11.1.7)は豚末梢血液の白血球から精製して用いた¹⁾。使ったミエロペルオキシダーゼの蛋白部分に対するヘム部分の吸光度比は約1.0であった。酵素濃度は430nmでのミリモル分子吸光係数を95として求めた⁴⁾。分光スペクトルは日立自記分光光度計(124又はEPS-3T型)に循環水式恒温セルホルダーを装着して一定温度(25°C)で記録した。解離定数は差スペクトル(ハロゲン—ミエロペルオキシダーゼ化合物—

Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect by the myeloperoxidase- H_2O_2 -halide system.

I. Reaction of myeloperoxidase with halide.

Takeshi ODAJIMA (Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Higashi Nippon Gakuen University, Tobetsu, Hokkaido 061-02, Japan)

* 北海道石狩郡当別町字金沢1757番地 (〒061-02)

Jap. J. oral Biol., 22: 53-57, 1980.

図1 塩素—ミエロペルオキシダーゼ化合物の吸収スペクトル

実線と破線は pH 5.0 の 0.1M 酢酸緩衝液中での 9.5 μ M 酸化型ミエロペルオキシダーゼとそれに塩化ナトリウム (終濃度 25mM) を添加したときの絶対スペクトルを示す。可視部の吸収スペクトルは 5 倍拡大。挿入図は塩素—ミエロペルオキシダーゼ化合物—酸化型ミエロペルオキシダーゼの差スペクトル (2 倍拡大) を示し、数字 1, 2, 3, 4 及び 5 は塩化ナトリウム濃度がそれぞれ 0, 0.2mM, 0.6mM, 2.2mM, 25mM のときの差スペクトルを示す。

図2 ヨウ素—ミエロペルオキシダーゼ化合物の吸収スペクトル

実線は 9.7 μ M 酸化型酵素を、破線はそれにヨウ化カリウム (終濃度 75mM) を添加したときの絶対スペクトルを示す。挿入図はその差スペクトル (2 倍拡大)。数字 1 及び 2 はヨウ化カリウム濃度が 0 と 75mM のとき。0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中。

酸化型ミエロペルオキシダーゼ) を利用した分光滴定によって求めた。

結 果

図1, 2, 3 及び 4 は pH 5.0 で観測されたミ

図3 フッ素—ミエロペルオキシダーゼ化合物の吸収スペクトル

実線及び破線はそれぞれ 7.9 μ M 酸化型酵素とそれにフッ化ナトリウム (終濃度 50mM) を添加したときの絶対スペクトル。可視部は 5 倍拡大。挿入図は 2 倍に拡大した差スペクトル。0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中。

図4 臭素—ミエロペルオキシダーゼ化合物の吸収スペクトル

実線と破線はそれぞれ 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中での 6.9 μ M 酸化型酵素とそれに臭化カリウム (終濃度 50mM) を添加したときの絶対スペクトルを示し、挿入図はそのときの差スペクトル (2 倍拡大) を示す。

エロペルオキシダーゼの塩素、ヨウ素、フッ素、臭素化合物の吸収スペクトルである。これらのハロゲン—ミエロペルオキシダーゼ化合物は中性以上の pH 領域では観測されなかった。これらの塩素、ヨウ素、フッ素、臭素—ミエロペルオキシダーゼ化合物の吸収スペクトルは Soret 帯附近ではいずれも吸光度の減少を伴った長波長シフトがみられる点で類似していた。ヨウ素と臭素化合物の吸収スペクトルは測定した 400nm から 700nm の波長領域ではほとんど差がなかったが、塩素とフッ素化合物ではその吸収スペクトルの可視部領域

図5 ミエロペルオキシダーゼのハロゲンによる滴定曲線

(—○—) 塩化ナトリウム。9.5 μ M 酵素。447 nm

(—●—) ヨウ化カリウム。9.7 μ M 酵素。446 nm

(—△—) フッ化ナトリウム。7.9 μ M 酵素。446 nm

(—▲—) 臭化カリウム。6.9 μ M 酵素。445 nm

縦軸の ΔA はそれぞれ示した波長での差スペクトルから求めた (図1, 2, 3, 4の挿入図参照)。横軸はハロゲン濃度の対数値。0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中。

で吸収極大の差違が認められた。塩素化合物は576nmに吸収極大があり600nm附近にふくらみが認められた。フッ素化合物では550nm, 600nm, 660nmに明瞭な吸収極大が認められた。これらの吸収極大をより明確にするために図1及び3に拡大した吸収スペクトルを示してある。

図1, 2, 3及び4の挿入図は Soret 帯領域での塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素—ミエロペルオキシダーゼ化合物のそれぞれの差スペクトル (ハロゲン・ミエロペルオキシダーゼ—酸化型ミエロペルオキシダーゼ) である。この差スペクトルを利用してミエロペルオキシダーゼを塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素で分光滴定した (図1の挿入図参照)。滴定実験の結果 (図5) から得たミエロペルオキシダーゼに対する塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素の解離定数はそれぞれ0.52mM, 5 mM, 7 mM, 7 mMとなった。

図6に示したように塩素のミエロペルオキシダーゼに対する解離定数は反応溶液中の H_2O を D_2O に置換しても変化はなかった。

図6 重水濃度とミエロペルオキシダーゼに対する塩素の解離定数

縦軸は解離定数 (mM)。横軸は溶媒中の重水量 (%)。塩素—ミエロペルオキシダーゼ化合物—酸化型酵素 (447nm)。9.1 μ M ミエロペルオキシダーゼ。0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)。

考 察

ミエロペルオキシダーゼは過酸化水素とハロゲンの存在で殺菌作用及び有機物を酸化することが知られている^{2,5-7}。これらの機構を明らかにする目的でミエロペルオキシダーゼとハロゲンとの反応に関して分光学的に検討した。

観測されたミエロペルオキシダーゼの塩素, ヨウ素, フッ素, 臭素化合物 (図1, 2, 3, 4) は本酵素が触媒する殺菌 (解毒) 作用及び有機物の酸化反応の反応中間体, 即ち酵素—基質複合体と考えられる。ミエロペルオキシダーゼの塩素 (Stelmazynska & Zgliczynski)⁸ 及びフッ素化合物 (Newton ら)⁹ の吸収スペクトルの観測結果については報告がある。しかし, Stelmazynska & Zgliczynski⁸ の報告したミエロペルオキシダーゼの塩素化合物の生成過程における分光滴定の結果では, 我々の観測した等吸収点 (図1の挿入図) が認められないし, 可視部の吸収スペクトルについては観測していない。我々の観測したフッ素化合物の吸収スペクトルと Newton ら⁹ の観測したそれとは本質的な差違はない。

一方, ミエロペルオキシダーゼは過酸化水素との反応で高い酸化状態をもって2種類の化合物 I (compound I) 及び II (compound II) (正確には

もう1種類、化合物Ⅲ又は酸素化型酵素と呼ばれる化合物があるがペルオキシダーゼ反応の中間体ではないので省略)に変換することが知られている³⁾。従って、ミエロペルオキシダーゼは、過酸化水素とハロゲンの両基質と酵素-基質複合体を形成することになる。

ミエロペルオキシダーゼ以外の動物由来のペルオキシダーゼのハロゲン化合物の分光学的観測例としては牛乳のペルオキシダーゼ(ラクトペルオキシダーゼ)のフッ素化合物がある¹⁰⁾。ラクトペルオキシダーゼはミエロペルオキシダーゼと同様に過酸化水素によって化合物Ⅰ及びⅡを生成することが知られている¹¹⁾。

ペルオキシダーゼによるアミノ酸、タンパク質等の有機物のハロゲン化反応としては甲状腺ペルオキシダーゼによるチロキシンの生合成過程におけるチログロブリンのチロシン残基のヨウ素化が知られている¹²⁾。甲状腺ペルオキシダーゼが生理的に要求するハロゲン種は言うまでもなくヨウ素であるが、ミエロペルオキシダーゼが殺菌(解毒)作用を発現するために要求するハロゲン種は図5の結果から塩素が考えられる。

Björkstén^{13,14)}は西洋ワサビペルオキシダーゼによるヨウ素の酸化反応は次式のように進行すると結論している。

Compound I + Product (s)

結果として、ヨウ素は2電子酸化される。Stelmazynska & Zgliczynski⁸⁾はミエロペルオキシダーゼ- $\text{Cl}^- - \text{H}_2\text{O}_2$ 系においても塩素の酸化生成物は2電子酸化された Cl^+ であると考えている。

ミエロペルオキシダーゼのハロゲン結合部位は明確ではないが³⁾、ヘム鉄、ヘム側鎖(特にホルミル基)、非ヘム鉄(ミエロペルオキシダーゼは補欠分子としてホルミルヘムと非ヘム鉄を含む)、ヘム鉄周辺のアミノ酸残基のいずれかと考えられる。しかし、このハロゲン結合部位を決定するためには酵素-基質複合体の性質に関してより詳細な検討が必要である。

結 論

ミエロペルオキシダーゼの塩素、ヨウ素、フッ素、臭素化合物が分光学的に観測された。これらの化合物はミエロペルオキシダーゼが触媒する過酸化水素とハロゲンとの反応中間体であると推測される。殺菌(解毒)作用や有機物の酸化反応のためにミエロペルオキシダーゼが生理的に要求するハロゲン種は塩素の可能性が考えられる。

文 献

- 1) ODAJIMA, T.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. Nature of the prosthetic group of myeloperoxidase. *J. Biochem.* 87: 379-391, 1980.
- 2) KLEBANOFF, S. J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* 95: 2131-2138, 1968.
- 3) ODAJIMA, T. and YAMAZAKI, I.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood, I. Reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* 206: 71-77, 1970.
- 4) ODAJIMA, T. and YAMAZAKI, I.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood, IV. Some physicochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 284: 360-367, 1972.
- 5) ALLEN, R. C.: Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in the phenomenon of electronic excitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 675-683, 1975.
- 6) ALLEN, R. C.: The role of pH in the chemiluminescent response of the myeloperoxidase-halide- HOOH antimicrobial system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 684-691, 1975.
- 7) ROSEN, H. and KLEBANOFF, S. J.: Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antibacterial system. *J. Biol. Chem.* 252: 4803-4810, 1977.
- 8) STELMASZYNSKA, T. and ZGLICZYNSKI, J. M.: Myeloperoxidase of human neutrophilic granulocytes as chlorinating enzyme. *Eur. J. Biochem.* 45: 305-312, 1974.
- 9) NEWTON, N. MORELL, D. B. and CLARKE, L.: The haem prosthetic group of some animal peroxidases, II. Myeloperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 96: 476-486, 1965.
- 10) MORELL, D. B.: Derivatives and kinetics of lactoperoxidase. *Biochem. J.* 56: 683-690, 1954.

- 11) THEORELL, H. and ÅKESON. Å.: Highly purified milk peroxidase. *Arkiv. Kemi Miner. Geol.* **17B**: No. 7, 1943.
- 12) HOSOYA, T. and UI, N.: Determination and some properties of peroxidase in pig thyroid gland. *Nature.* **192**: 659-660, 1961.
- 13) BJÖRKSTEN, F.: The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of iodide. Outline of the mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* **212**: 396-406, 1970.
- 14) BJÖRKSTEN, F.: The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of iodide products formed and iodination of tyrosine by the products. *Biochim. Biophys. Acta.* **212**: 407-416, 1970.