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

II. ミエロペルオキシダーゼによる発癌性 マイコトキシンの酸化分解

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12月17日〕

抄録: 発癌性マイコトキシンとして知られている アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ がミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によって効果的に酸化分解された。

質量分析の結果からミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によって酸化されたアフラトキシン B₁ の酸化生成物の化学構造はアフラトキシン B₁ 分子に酸素 1 原子が導入された構造が予想され、この反応は次式のように要約される。

緒 言

ミエロペルオキシダーゼは過酸化水素とハロゲンイオンの存在で殺菌効果及び有機物の酸化能を持つことが知られている¹⁻⁴⁾。Allen ら⁵⁻⁷⁾、Rosen & Klebanoff³⁾は、ペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系による殺菌作用や有機物の酸化作用は、この系で生成する一重項酸素 (¹O₂) によるものであると次のようないくつかの実験事実から提唱した。

即ち彼らは、(1) ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系による有機物の酸化反応過程に

おいて化学発光が観測され、(2) ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によって、¹O₂ の Scavenger として知られている 2,5-ジフェニルフランが酸化され、その生成物が cis-ジベンゾイルエチレンであること、(3) 2,5-ジフェニルフランの酸化反応が溶媒中の重水 (D₂O) 濃度の増加に伴って増強される (¹O₂ は D₂O 中では安定) ことを根拠として挙げている。

一方、Held & Hurst⁸⁾はミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系による酸化反応は、この系で生成する次亜塩素酸 (HOCl) に起因すると報告している。

Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect by the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system,
II. Oxidative destruction of the carcinogenetic mycotoxin by the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system.
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)

図1 アフラトキシン B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 の化学構造

このようにミエロペルオキシダーゼ系による殺菌効果や有機物の酸化反応の機構は物理化学的にも興味ある問題である。また、ミエロペルオキシダーゼ系が生体防御機構として働く場合、単に病原体微生物を殺滅するだけなのか、また病原体微生物の産生する代謝物(毒素等)をも生体異物として認識し分解代謝しているのかということも興味のある問題である。これらの問題に関連して、今回我々は、強力な発癌性を持つマイコトキシンとして知られているアフラトキシンがミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素及び塩素イオンによって酸化分解される事実を発見し、その反応生成物の化学構造に関して検討したので報告する。

実験に使ったアフラトキシン B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 の化学構造は図1に示してある。

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) は豚末梢白血球から精製した標品(蛋白質部分に対するヘム部分の

吸光度の比は1.0)を用いた⁹⁾。ミエロペルオキシダーゼの濃度は430nmでのミリモル分子吸光係数を95として計算した¹⁰⁾。アフラトキシン B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 は Makor Chemicals 社(イスラエル)の製品を使った。アフラトキシン B_1 の濃度は363nmでのミリモル分子吸光係数を21.8として求めた。この実験に用いた重水 (D_2O) は Merck 社製であった。

ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素一塩素系で酸化されたアフラトキシン B_1 の酸化生成物の質量分析のための試料は次のように調製された。アフラトキシン B_1 10mg と NaCl 10mg を N, N-ジメチルホルムアミド0.5ml に溶解し、それに酢酸緩衝液 (25mM, pH5.0) 9.5ml を加えて攪拌後、3.6 μ M ミエロペルオキシダーゼ50 μ l を加え、更に1M H_2O_2 25 μ l を2~3分の間隔で5回に分けて加え、攪拌しながら1時間反応させた後、凍結乾燥された。この凍結乾燥試料が直接導入法による質量分析(Japan Electron Optics Laboratory,

model JMS-D 300) に供された。

分光スペクトルの観測は日立自記分光光度計(124又はEPS-3T)又は島津自記分光光度計(MPS-5000)を用いて行った。セル中の反応液量は2.5mlで測定温度は25°Cであった。

結 果

発癌性マイコトキシン的一种であるアフラトキシン B_1 がミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素、塩素イオンによって効果的に酸化される事実が分光学的に観測された(図2)。この反応にはミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素、塩素イオンの存在が必須条件であった。また、このミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素イオン系によってアフラトキシン B_2 , G_1 及び G_2 も B_1 同様に酸化された。この反応系によるアフラトキシン B_1 の酸化反応の至適 pH は5.0付近にあった(図3)。

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作用及び有機物の酸化反応は 1O_2 によるとする Allen ら⁵⁻⁷⁾, Rosen & Klebanoff³⁾の報告と次亜塩素酸によるとする Held & Hurst⁸⁾の報告がある。我々の結果では、アフラトキシン B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 はいずれも次亜塩素酸によっても酸化され、それらの酸化生成物の分光スペクトルはミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系で酸化された生成物の分光スペクトルとそれぞれほぼ一致した。 1O_2 は H_2O 中では H_2O の消光効果によって速やかに基底状態の三重項酸素(3O_2)に戻るが D_2O 中では安定であることが知られている。従って、 1O_2 の関与する反応であるならば、その反応系の H_2O を D_2O で置換すると、その反応系中の 1O_2 は保護されるので、 1O_2 による反応は増強されると考えられる。しかしながら、ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によるアフラトキシン B_1 の酸化反応速度は反応液中の D_2O 濃度の増加に伴って、むしろ減少した(図4)。更にこの D_2O による阻害効果は次亜塩素酸によるアフラトキシン B_1 の酸化反応においても観測された(図4)。

以上の実験結果から、ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によるアフラトキシンの酸化反応は Held & Hurst⁸⁾が報告した如くミエロ

図2 ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系で酸化されたアフラトキシン B_1 の吸収スペクトル

スペクトル a (反応液 a) は 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中におけるアフラトキシン B_1 (29.3 μ M) の紫外スペクトル。スペクトル b は 0.1mM H_2O_2 , 40mM NaCl 及び 95nM ミエロペルオキシダーゼを反応液 a に添加10分後のスペクトル

図3 ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によるアフラトキシンの酸化反応速度に対する pH の影響

(縦軸) 29.3 μ M アフラトキシン B_1 , 0.1mM H_2O_2 , 40mM NaCl を各々の pH の 0.1M 緩衝液に加え、最後に 95nM ミエロペルオキシダーゼを添加し反応を開始した。285nm における吸光度増加の初速度。pH 7.8 の緩衝液はリン酸緩衝液でそれ以外は酢酸緩衝液

図 4 ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系及び次亜塩素酸によるアフラトキシン B₁ の酸化反応速度に対するアイソトープ (重水濃度) 効果

(—○—) 29.3 μM アフラトキシン B₁, 0.1 mM H₂O₂, 40 mM NaCl 及び 95 nM ミエロペルオキシダーゼによるアフラトキシン B₁ の酸化反応速度 (縦軸, 左)。 (—●—) 29.3 nM アフラトキシン B₁ の 0.44 mM 次亜塩素酸 (塩素濃度) による酸化反応速度 (縦軸, 右)。 285 nm での吸光度増加の初速度。 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)。 横軸は重水量 (%)

ペルオキシダーゼ, 過酸化水素, 塩素イオンから生成した次亜塩素酸によって起こされていると結論される。観測された D₂O による阻害効果は DOCl の反応性と D⁺ イオンによる反応液中の pH の変化に起因していると考えられる。

ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によるアフラトキシン B₁ の酸化生成物の質量分析を行った。その結果, 酸化生成物中に質量数 312 及び 326 の 2 種類の化合物が検出された (図 5)。質量数 312 の化合物は未反応のアフラトキシン B₁ (分子量 312) と考えられる。当然のことながら, 質量数 326 の物質は ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系で酸化される前のアフラトキシン B₁ の試料中には検出されなかったので, この物質は酵素系によって酸化されたアフラトキシン B₁ の酸化生成物であると考えられる。この質量分析値は, アフラトキシン B₁ 分子に 1 原子の酸素が添加され, 2 原子の水素を失った酸化生成物の構造を考えるとその収支がよく説明される。

図 5 ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によるアフラトキシン B₁ の酸化生成物の質量スペクトル
実験条件は材料及び方法の項参照

考 察

多形核白血球のライソゾームに存在する ミエロペルオキシダーゼはホルミルヘム 1 個と非ヘム鉄 1 個を補欠分子族として含む酵素でペルオキシダーゼとしては特異な存在である⁹⁾。

ミエロペルオキシダーゼの生理的役割としては殺菌作用が考えられている。Agner¹¹⁾はミエロペルオキシダーゼの触媒によって, 過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸が生じ, この次亜塩素酸が殺菌や有機物の酸化反応に関与すると報告している。また, ミエロペルオキシダーゼの過酸化水素化合物¹²⁾及びハロゲン化合物¹³⁾はそれぞれ別個に分光学的に観測されている。

Allen ら⁵⁻⁷⁾, Rosen & Klebanoff³⁾はミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系による殺菌作用や有機物の酸化反応は過酸化水素と次亜塩素酸との反応で生成する ¹O₂ によって起こされると報告した。Allen ら⁵⁻⁷⁾の ¹O₂ とした根拠は化学発光の観測で, Rosen & Klebanoff³⁾の根拠は ¹O₂ との反応性の高い化学物質, 例えば 2,5-ジフェニルフランなどによる ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—ハロゲン系によって酸化される物質との拮抗阻害効果の観察結果である。ミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—ハロゲン系で酸化された 2,5-ジフェニルフランの生成物は cis-ジベンゾイルエチレンであることが知られている (図 6 B)。

図 6 ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素一塩素系によるアフラトキシン B₁ と 2,5-ジフェニルフランの酸化反応機構。(A) 及び (B) の点線で囲まれたフラン部分が酸化される。

一方, Held & Hurst⁸⁾は過酸化水素, 塩素イオン及び次亜塩素酸の存在における2,5-ジメチルフランの酸化反応速度の pH 依存性の動学的解析及び2,5-ジメチルフランが次亜塩素酸のみでも酸化される事実から, ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素一ハロゲン系による酸化反応の場合, 2,5-ジフェニルフランなどによる阻害実験によって, この系中における $^1\text{O}_2$ の存在を議論することはできないと結論し, Rosen & Klebanoff³⁾に反論している。しかし, この Held & Hurst⁸⁾による反論は, Rosen & Klebanoff³⁾の $^1\text{O}_2$ を証明するための方法論に対するものであり, 過酸化水素と次亜塩素酸との反応で $^1\text{O}_2$ が生成する事実そのものに対して反論しているものではない。

ミエロペルオキシダーゼ系によるアフラトキシン B₁ の酸化反応と同様の反応が次亜塩素酸のみによっても起るし, $^1\text{O}_2$ の存在を裏づけるような D₂O による反応の活性化も観測されず, むしろ阻害がみられたことから, ミエロペルオキシダー

ゼー過酸化水素一塩素系によるアフラトキシン B₁ の酸化反応は Agner¹¹⁾によって報告されたミエロペルオキシダーゼ, 過酸化水素, 塩素イオンによって生成される次亜塩素酸に起因すると考えられる。

質量分析で得た結果からミエロペルオキシダーゼ系によるアフラトキシン B₁ の酸化反応は水素 2 原子の脱水素反応を伴った一原子酸素添加反応と考えられる。またアフラトキシン B₁ は一種のフラン体であるので, アフラトキシン B₁ が酸化される部位は 2,5-ジフェニルフランと共通性があるフラン部分と予想された。結果として考えられるミエロペルオキシダーゼー過酸化水素一塩素系によるアフラトキシン B₁ の酸化反応機構を図 6 A に示した。

このミエロペルオキシダーゼ系によるアフラトキシン B₁ の酸化反応機構は, アフラトキシン B₁ が肝においてチトクローム P-450 系¹⁴⁾によって水酸化物 (アフラトキシン M₁) として代謝される機

構とは本質的に異なっているように思われる。即ち、チトクローム P-450系は毒物を単に水酸化することによって親水性を高め、排泄を容易にする機構と考えられるに対して、ミエロペルオキシダーゼ系による代謝機構は毒物を直接的に酸化分解することによって無毒化しているものと考えられる。事実、チトクローム P-450系による代謝物であるアフラトキシン M_1 はアフラトキシン B_1 ほどは強くはないが発癌性が残っている¹⁵⁾。

ミエロペルオキシダーゼの非ハロゲン要求ペルオキシダーゼ反応の基質となる物質として、グアヤコール、ジメチル-P-フェニレンジアミン、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、アスコルビン酸、トリプトファン、チロシン、セロトニン、メラトニン、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパ、ドーパミンなどが知られている¹⁶⁻¹⁷⁾。ここで興味あることは、グアヤコールの酸化反応で代表されるミエロペルオキシダーゼによる非ハロゲン要求ペルオキシダーゼ反応の至適 pH は 8.0 付近にあり、その pH 依存性がミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系によるアフラトキシン B_1 の酸化反応 (図 3) とは大幅に異なっている事実である。このことは生体内におけるミエロペルオキシダーゼ系による酸化反応においても非ハロゲン要求ペルオキシダーゼ反応とハロゲン要求ペルオキシダーゼ反応の 2 種類の反応様式が存在し、この 2 種類の反応のいずれかがその反応の場の水素イオン濃度に依存して起る可能性を示唆している。今回観測されたアフラトキシンの酸化反応から考えられることはミエロペルオキシダーゼ系による生体内における解毒作用はハロゲン要求ペルオキシダーゼ反応によると考えられる。現在のところ、非ハロゲン要求ペルオキシダーゼ反応が生体内において何等かの生理的役割を担っているか否かは不明である。

結 論

ミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素、塩素イオンによってマイコトキシンの 1 種であるアフラトキシンが効果的に酸化された。この事実は白血球においてもミエロペルオキシダーゼ—過酸化水素—塩素系が生体防御機構の 1 つとして生体に感

染した菌が産生する代謝物 (毒素等) を酸化分解している可能性を示唆している。また、ミエロペルオキシダーゼ系によるアフラトキシンの酸化反応は、ミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素、塩素イオンから生成された次亜塩素酸によって起こされるものと考えられる。

文 献

- 1) KLEBANOFF, S. J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* **95**: 2131-2138, 1968.
- 2) ZGLICZYNSKI, J. M. STELMASZYNSKA, T. DOMANSKI, J. and OSTROWSKI, W.: Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **235**: 419-424, 1971.
- 3) ROSEN, H. and KLEBANOFF, S. J.: Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol.* **252**: 4803-4810, 1977.
- 4) STELMASZYNSKA, T. and ZGLICZYNSKI, J. M.: N-(2-oxoacyl) amino acids and nitriles as final products of dipeptide chlorination mediated by the myeloperoxidase/ H_2O_2 /Cl⁻ system. *Eur. J. Biochem.* **92**: 301-308, 1978.
- 5) ALLEN, R. C. STJERNHOLM, R. L. and STEELE, R. H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state (s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**: 679-684, 1972.
- 6) 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.
- 7) ALLEN, R. C.: The role of pH in the chemiluminescent response of the myeloperoxidase-halide- H_2O_2 antimicrobial system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**: 684-691, 1975.
- 8) HELD, A. M. and HURST, J. K.: Ambiguity associated with use of singlet oxygen trapping agents in myeloperoxidase-catalyzed oxidations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 878-885,
- 9) ODAJIMA, T.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood; Nature of the prosthetic group of myeloperoxidase. *J. Biochem.* **87**: 379-391, 1980.
- 10) ODAJIMA, T. and YAMAZAKI, I.: Myelo-

- peroxidase of the leukocyte of normal blood, IV. Some physicochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 284 : 360-367, 1972.
- 11) AGNER, K. : Biological effects of hypochlorous acid formed by "MPO"-peroxidation in the presence of chloride ions. Structure and Function of Oxidation-Reduction Enzymes (edited by Åkeson, Å. and Ehrenberg, A.), 329-335, *Pergamon Press*, Oxford, 1970.
 - 12) 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.
 - 13) 小田島武志 : 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. 齒基礎誌, 22 : 53-57, 1980.
 - 14) NEBERT, D. W. and JENSEN, N. M. : The *Ah locus* : Genetic regulation of the metabolism of carcinogens, drugs, and other environmental chemicals by cytochrome P-450-mediated monooxygenases. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 6 : 401-437, 1979.
 - 15) 上野芳夫, 田代文夫 : マイコトキシンの作用機序, 細菌毒素の研究(加藤巖編集 別冊 蛋白質核酸 酵素), 313-324, 共立出版, 東京, 1976.
 - 16) ODAJIMA, T. : Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood, II. The oxidation-reduction reaction mechanism of the myeloperoxidase system. *Biochim. Biophys. Acta*, 235 : 52-60, 1971.
 - 17) ODAJIMA, T. and YAMAZAKI, I. : Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood, V. The spectral conversion of myeloperoxidase to a cytochrome oxidase like derivative. *Biochim. Biophys. Acta*, 284 : 368-374, 1972.