金属イオンと活性酸素の関与する DNA と多糖の損傷反応†

森田 潤 司, 佐 藤 郁 夫*, 柏 村 直 樹**

(同志社女子大学家政学部, *チッソ株式会社水俣本部開発研究所, **三重大学生物資源学部)

はじめに

タンパク質や脂質の損傷に加えて, DNA や多糖も金属イオンの存在下, 活性酸素により構造や機能がさまざまな損傷を受ける. その研究の歴史は古く, DNA は放射線による損傷の研究が多く, 多糖はデンプンやムコ多糖の解重合がよく研究されている.

本稿では, この 10 年間にとくに発展してきた活性酸素研究の知見に基づいて, 金属イオンの関与に重点を置きながら, DNA とヒアルロン酸の研究例について最近の報告を簡単にレビューしたい.

1. 金属イオンと活性酸素が関与する DNA 損傷

活性酸素は DNA に損傷を与える^(1,2). すなわちキサンチン酸化酵素系, KO_2 , H_2O_2 などと共存させると, 糖部分やリン酸基の攻撃による鎖切断が起こる(文献 2, 表 1). 活性酸素に引き起こされる損傷の種類としては, 鎖切断の他, 核酸の塩基の修飾^(1,3), 塩基欠失部位(apurinic/apyrimidinic site)の生成⁽⁴⁾, DNA-DNA 架橋形成⁽⁵⁾, DNA-タンパク質架橋形成(主としてチミン, シトシンと脂肪族, 芳香族アミノ酸間)⁽⁶⁾などが知られている. 損傷塩基は不安定で N-グリコシド結合が切れて, 塩基欠失部位が生じる. ある種の塩基損傷はアルカリ処理やホットビペリジン処理で塩基欠失部位を生じる. 糖部分の損傷もアルカリ処理で鎖切断が生じる. こうした活性酸素による DNA 損傷反応には金属イオンが関与しているが, それぞれの損傷の割合はまだ不明である.

多くの還元剤(チオール⁽⁷⁾, アスコルビン酸⁽⁸⁾, 還元糖^(9~11))⁽²⁾は鎖切断をはじめとするさまざまな DNA 損傷を引き起こすが, これは系に混在するあるいは添加された遷移金属イオンが関与して反応性の高い活性酸素が生成するためと考えられる. プレオマイシンなど, 活性酸素生成を介して DNA に作用する制ガン性物質も補助因子として遷移金属イオンを必要とする^(12~14).

活性酸素のうち, $\text{O}_2^{\cdot -}$ や H_2O_2 は直接 DNA とは反応しないことが知られており^(15,16), DNA 損傷の反応分子種は DNA に結合した低原子価遷移金属イオンによる H_2O_2 の一電子還元で生成する $\cdot\text{OH}$ である(式 1-3)^(15~19).

($\text{M}^{n+} = \text{Fe(III)}, \text{Cu(II)}$ など)

ここで H_2O_2 は系外からの添加をはじめ, $\text{O}_2^{\cdot -}$ の不均化反応や還元剤の酸素酸化反応で生成する. 式 1~3 の反応で Fe イオンの触媒によるものは Fenton 反応として知られている.

Fe イオンは酸化的ストレスで細胞内貯蔵部位からの遊離が指摘されており, 式 1, 2 の生体触媒として可能性が高い⁽¹⁹⁾.

研究上の興味を中心の 1 つは活性酸素種による DNA 損傷は共存する金属イオンの種類によって違いがあるか, また反応分子種は本当に $\cdot\text{OH}$ かということである. 次に各種金属イオンの関与する DNA 鎖切断を中心に述べる.

高濃度 (mM オーダー) の Fe(III) や Cu(II) 自身も DNA 鎖切断を引き起こすが, 塩基特異性は認められない^(20,21). しかし, H_2O_2 と共存させると, 低濃度 (数 10 μM) の Fe(II) でも DNA 損傷が起こる. Fe(II)- H_2O_2 系の場合, DNA 鎖切断点に塩基特異性はみられ

† Metal Ion-Mediated Damage to DNA and Polysaccharides by Active Oxygen Species. Junji MORITA, Ikuko SATO* and Naoki KASHIMURA** (Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Kyoto 602; *Chisso Co., ** Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu 514, Mie)

ないが⁽²²⁾、鎖切断に至る前に、ホットビペリジン処理に不安定な構造が DNA 中に生成するようである⁽²²⁾。

Fe(II) は DNA⁽²³⁾ あるいはヌクレオチド⁽²⁴⁾ とコンプレックスを形成⁽²⁵⁾ して H₂O₂ と反応し、反応性の高い・OH を生成することが知られている (式 2)。

一方 Fe(III)-EDTA とキサンチン酸化酵素系 (O₂⁻ 生成系) と DNA とを反応させても、塩基修飾が起こり、鎖切断へと至る。塩基修飾反応はグアニンのイミダゾール環が開裂した 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine と 8-hydroxyguanine が主産物で、アデニンのイミダゾール環が開裂した 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine と cytosine glycol の生成が続く⁽¹⁶⁾。O₂⁻ 生成系を H₂O₂ に置き換えても同様の塩基修飾が起こる⁽¹⁶⁾。

Gutteridge ら⁽²⁶⁾ は式 4～6 の反応で・OH が生成し、SOD による阻害から式 3 のように O₂⁻ が関与すると考えている。

式 4～6 の反応は他のキレート剤でも触媒されるが、ニトロロ三酢酸の鉄キレート化合物 (Fe(III)-NTA) が最も活性が高く⁽¹⁶⁾、発ガン性、細胞毒性とかかわっている可能性が強い⁽²⁶⁾。

Fe(III) キレート化合物と H₂O₂ の反応で・OH が生成するかどうかは議論もあるが、Kawanishi ら^(27,28) も切断点の塩基配列に特異性が認められないことからリン酸基と塩基を・OH が攻撃するとしている。クリプト・OH⁽²⁹⁾ や Fe(IV) あるいは FeO²⁺⁽³⁰⁾ の可能性も考えられる。

H₂O₂-Cu(II) 系では、比較的高濃度 (10 μMCu(II)-1 mM H₂O₂) の場合 DNA 中のポリ G 塩基配列部分にホットビペリジン処理に不安定な損傷を与える⁽³¹⁾。Cu(I) も H₂O₂-Cu(II) 系と同じ損傷を与えるが効率は悪い⁽³¹⁾。低濃度 (20 μMCu(II)-0.4 mM H₂O₂) で DNA 切断点の塩基配列特異性をみると G>T>C>A である^(28,32)。ESR スピントラッピング法で・OH が検出されており、また ¹O₂ の生成も推測されている⁽³²⁾。プリン塩基の 5' 側に隣接するピリミジン塩基および G にホットビペリジ

ン処理に不安定な損傷が起こるという報告もある⁽²²⁾。反応種は遊離の・OH との考えもあるが⁽³¹⁾、KI⁽²²⁾ や NaN₃, DABCO⁽³²⁾ でグアニン塩基以外の損傷が抑えられることから Cu(II)-OOH^(32,33)、あるいは Cu(III)⁽⁸⁾ の関与も考えられる。

銅キレート化合物の中では、Cu(II)-1,10-phenanthroline が還元剤存在下、DNA を損傷することがよく研究されているが^(13,18,34,35)、レダクトンやチオール DNA 損傷作用も Cu(II) を特異的に必要とする。

ニッケルはヒトに必須だが、アレルギー性皮膚炎、喘息、発ガンをもたらす。Ni(II) は DNA と結合して、H₂O₂ との反応で C, T, G、とくに C に特異的にホットビペリジン処理不安定な損傷を与える⁽³⁶⁾。ESR で・OH が検出されているが、¹O₂ 阻害剤、・OH 捕捉剤の効果は種類によって異なり、DNA との反応種は Ni(II)-O₂ 錯体の可能性もある⁽³⁶⁾。Co(II) でも Cu(II) や Ni(II) と類似の反応がみられる⁽²⁸⁾。

Cr(VI) の発ガン性、変異原性が知られているが、Cr(VI) と H₂O₂ との共存下で、すべての塩基で切断が起こるが、ホットビペリジン処理不安定な損傷は G で顕著にみられる。これは ¹O₂ によるものであろう⁽³⁷⁾。・OH および ¹O₂ の生成が ESR で確認されている⁽³⁷⁾。Cr(VI) とグルタチオン、シトクロム P-450 を共存させても DNA 鎖切断や DNA 架橋形成が導かれる⁽³⁸⁾。

無機ヒ素の発ガン性が報告されているが、亜ヒ酸、ヒ酸の主代謝産物である亜ヒ酸ジメチルのパーオキシラジカル (CH₃)₂AsOO・ が DNA を損傷する⁽³⁹⁾。

金属種により、またキレート剤を用いる場合、その配位子により生成するラジカルあるいは DNA との結合部位が異なり、その結果損傷部位が異なってくると予想される⁽²⁵⁾。DNA との結合では DNA 中のアシディックドメインの存在が興味深い⁽⁴⁰⁾。

その他の金属では、活性酸素とのかかわりは不明だが、Al(III) や Al(OH)²⁺ の DNA とのコンプレックス形成もアルツハイマー症とのかかわりで注目してよいだろう⁽⁴¹⁾。

遷移金属の DNA 損傷への関与機構については式 1～式 6 の反応触媒の他に thymine hydroperoxide など塩基過酸化物の崩壊を触媒し、その結果生成するラジカルが近傍の塩基を損傷するという事も考えられる⁽⁴²⁾。

活性酸素の 1 つ ¹O₂ の発生にも金属イオンが関与する⁽⁴³⁾。¹O₂ による DNA 損傷は G に特異的なようにみえ

るが、触媒によって一本鎖あるいは二本鎖 DNA に特異的になる⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾。

金属の DNA 損傷作用研究で注意しなければならないことはリン酸基の存在や緩衝液によって、反応が促進されたり⁽⁴⁷⁾、損傷部位やラジカル種が影響を受けることである。また、*in vitro* での損傷部位および頻度と *in vivo* での突然変異部位の違いも Loeb らによって指摘されており、今後生体内での反応性を検討するには実験条件を十分検討する必要があるだろう。Stadtman の Mn イオンがカーボネート緩衝液中で O_2^- と反応して $\cdot OH$ を生成するという指摘も重要と思われる⁽⁴⁸⁾。

関連した研究として、金属と DNA に親和力のある化合物とを組み合わせ、塩基選択的 DNA 切断剤を化学合成する分子設計が試みられている⁽⁴⁴⁾。合成制限酵素、DNA のフットプリント作成、部位特異的な変異への応用など今後重要な課題となるであろう。

2. 金属イオンと活性酸素の関与するヒアルロン酸の解重合

ヒアルロン酸は β -D-グルクロン酸が *N*-アセチル- β -D-グルコサミンと β -1, 3 結合した二糖を基本単位として直鎖状に β -1, 4 結合した酸性ムコ多糖である。分子量は自然界に存在するもので数十万から数百万、なかには一千万におよぶものもあるといわれている。

このムコ多糖は、保湿性、粘性に優れているため医薬品、化粧品に多く用いられている。とくに近年微生物発酵により安価で多量に生産可能となつてからは、その使用量が飛躍的に伸びてきている。ヒアルロン酸の粘性は、その高分子量に起因しており、この解重合の研究は粘度低下による関節炎の *in vivo*, *in vitro* での研究としても興味のある分野である。

さて、このようなヒアルロン酸も前述の DNA 同様に活性酸素による損傷、とくに糖鎖切断を受ける。これまでの *in vitro* でのラジカル分解の用いられている活性酸素生成源は、 $\cdot OH$: 放射線, Fenton 試薬, 還元剤-金属イオン; O_2^- : キサンチン酸化酵素, KO_2 , O_2^- 生成細胞; 1O_2 : 光増感剤などがある⁽⁴⁹⁾。

活性酸素によるヒアルロン酸の解重合が最初に報告されたのは 1941 年であるが、その後、現在まで前述の各種ラジカル源、標品、ラジカル促進剤、ラジカル阻害剤の影響が調べられており、その主なものは、柏村によってまとめられている⁽⁴⁹⁾。

金属イオンと活性酸素の関与するヒアルロン酸の解重

合反応は、1960 年代 Pigman らによって研究された。とくに 1966 年の報告では、約 20 種の金属塩について検討がなされた⁽⁵⁰⁾。金属イオン関与の解重合の場合、DNA の場合と同じく、式 2 で生成した $\cdot OH$ が主な役割を果たすと考えられている。使用される金属種は、Fe, Cu がほとんどであるが、使用金属種、塩の形、濃度、用いる緩衝液および添加される還元剤によっても活性酸素発生の効果は大きく影響される⁽⁴⁹⁻⁵⁴⁾。生体内に存在する ADP をキレート剤として用いた研究も報告されている⁽⁵⁵⁾。

ヒアルロン酸の切断機構について、Scott⁽⁵⁶⁾ や Gilbert⁽⁵⁷⁾ は glycuronan 系多糖が解重合されやすいことを認め、C-5 位の水素が $\cdot OH$ によって引き抜かれ、生成した糖ラジカルを経て直接的なグリコシド結合の解裂が起こるとしている。C-5 糖ラジカルは ESR で確認されている⁽⁵⁷⁾。

内山ら⁽⁵⁸⁾は、リン酸緩衝液中 $FeSO_4$ 添加で生じた解重合ヒアルロン酸の還元および非還元末端を分析し、ウロン酸残基の炭素骨格の解裂による糖鎖切断ばかりでなく、ヘキシサミン残基の C-1 位の酸化による糖鎖切断も解重合に関与していることを示している。

その他に活性酸素発生には言及していないが DNA 同様ヒアルロン酸と Cu^{2+} とのコンプレックス形成の報告もあり^(58,59)。このコンプレックスの活性酸素発生との関連も今後興味あるところである。

おわりに

以上概観してきたように、DNA・多糖の活性酸素による損傷研究は、損傷部位の特定、金属イオンや活性酸素の種類の差による比較研究、*in vitro* でのモデルの多様化が進んでいる。DNA についての今後の課題には、分子設計された基質を用いた研究、および *in vivo* での $Cu(II)$ の関与する系の検討、核酸アミノ基のグリケーションとそれによる活性酸素生成の影響の検討がある⁽⁶⁰⁾。多糖については、タンパク質や脂質が共存し、生化学的により重要でより複雑な系での検討が期待される^(61,62)。

本稿を終えるにあたり、研究助成をいただいた呉羽化学株式会社、三和澱粉株式会社に深謝いたします。

(1) L. H. Breimer: *Mol. Carcinogenesis*, **3**, 188 (1990).

(2) 柏村直樹, 森田潤司: 有機合成化学協会誌,

- 42, 523 (1984).
- (3) S. Steenken : *Chem. Rev.*, **89**, 503 (1989).
- (4) M. Ulrich and U. Hagan : *Int. J. Radiat. Biol.*, **19**, 507 (1971).
- (5) S. A. Lesko, J.-L. Drocourt and S.-U. Yang : *Biochemistry*, **21**, 5010 (1982).
- (6) E. Gajewski and M. Dizdaroglu : *Biochemistry*, **29**, 977 (1990).
- (7) C. J. Reed and K. T. Douglas : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 111 (1989).
- (8) R. Stoewe and W. A. Prütz : *Free Radical Biol. Medicine*, **3**, 97 (1987); S. Kobayashi, K. Ueda, J. Morita, H. Sakai and T. Komano : *Biochim. Biophys. Acta*, **949**, 143 (1988).
- (9) J. Morita, K. Ueda, S. Nanjou and T. Komano : *Nucleic Acids Res.*, **13**, 449 (1985).
- (10) S. Nanjou, S. Fujii, J. Morita, K. Ueda and T. Komano : *Biochim. Biophys. Acta*, **866**, 44 (1986).
- (11) 森田潤司 : 農化, **62**, 1749 (1988).
- (12) D. P. Mack, B. L. Iverson and P. B. Derivan : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7572 (1988).
- (13) J. Stubbe and J. W. Kozarich : *Chem. Rev.*, **87**, 1107 (1987).
- (14) 杉浦幸雄 : 化学, **38**, 689 (1983).
- (15) O. I. Aruoma, B. Halliwell and M. Dizdaroglu : *J. Biol. Chem.*, **264**, 13024 (1989).
- (16) O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. Gajewski and M. Dizdaroglu : *J. Biol. Chem.*, **264**, 20509 (1989).
- (17) B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge : *Biochem. J.*, **219**, 1 (1984).
- (18) S. Goldstein and G. Czapski : *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2244 (1986); G. Czapski and S. Goldstein : *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **18**, 21 (1987).
- (19) J. A. Imlay and S. Linn : *Science*, **240**, 1302 (1988).
- (20) A. D. D'Andrea and W. A. Haseltine : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3608 (1978).
- (21) W. D. Henner, S. M. Grunberg and W. A. Haseltine : *J. Biol. Chem.*, **257**, 11750 (1982).
- (22) S. Kobayashi, K. Ueda and T. Komano : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 69 (1990).
- (23) R. A. Floyd : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 1209 (1981).
- (24) J. D. Rush, Z. Maskos and W. H. Koppenol : *FEBS Lett.*, **261**, 121 (1990).
- (25) H. Pezzano and F. Podo : *Chem. Rev.*, **80**, 365 (1980).
- (26) S. Inoue and S. Kawanishi : *Cancer Res.*, **47**, 6522 (1987).
- (27) J. M. C. Gutteridge, L. Maidt and L. Poyer : *Biochem. J.*, **269**, 169 (1990).
- (28) S. Kawanishi, S. Inoue and K. Yamamoto : *Biol. Tr. Elem. Res.*, **21**, 367 (1989); 川西正祐, 井上純子 : 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 2838 (1988).
- (29) R. J. Youngman and E. F. Elstner : *FEBS Lett.*, **129**, 265 (1981).
- (30) C. C. Winterbourn : *Free Rad. Biol. Med.*, **3**, 33 (1987).
- (31) J.-L. Sagripanti and K. H. Kraemer : *J. Biol. Chem.*, **264**, 1729 (1989).
- (32) K. Yamamoto and S. Kawanishi : *J. Biol. Chem.*, **264**, 15435 (1989).
- (33) M. Masarwa, H. Cohen, D. Meyerstein, D. L. Hickman, A. Bakac and J. H. Epstein : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4295 (1988).
- (34) D. S. Sigman : *Acc. Chem. Res.*, **19**, 180 (1986).
- (35) M. Dizdaroglu, O. I. Aruoma and B. Halliwell : *Biochemistry*, **29**, 8447 (1990).
- (36) S. Kawanishi, S. Inoue and K. Yamamoto : *Carcinogenesis*, **10**, 2231 (1989).
- (37) S. Kawanishi, S. Inoue and S. Sano : *J. Biol. Chem.*, **261**, 5952 (1986).
- (38) D. Y. Cupo and K. E. Wetterhahn : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 6755 (1985).
- (39) K. Yamanaka, M. Hoshino, M. Okamoto, R. Sawamura, A. Hasegawa and S. Okada : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 58 (1990).
- (40) G. Lamm and G. R. Pack : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 9033 (1990).
- (41) S. Tofigh and K. Frenkel : *Free Rad. Biol. Med.*, **7**, 131 (1989).
- (42) S. J. Karlik, G. L. Eichhorn, P. N. Lewis and D. R. Crapper : *Biochemistry*, **19**, 5991 (1980).
- (43) A. Singh : *Photochem. Photobiol.*, **28**, 429 (1978).
- (44) H. Wefers, P. Di Mascio, H.-P. Do-Thi, D. Schulte-Frohlinde and H. Sies : *Basic Life Sci.*, **49**, 473 (1988).
- (45) S. Kawanishi, S. Inoue, S. Sano and H. Aiba : *J. Biol. Chem.*, **261**, 6090 (1986).
- (46) J. J. Schneider, S. Price, L. Maidt, J. M. C. Gutteridge and R. A. Floyd : *Nucleic Acids Res.*, **18**, 631 (1990).
- (47) H. Yamane, N. Yada, E. Katori, T. Mashino, T. Nagano and M. Hirobe : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 1104 (1987).
- (48) M. B. Yim, B. S. Berlett, P. B. Chock and E. R. Stadtman : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 394 (1990).
- (49) 柏村直樹 : 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 3116 (1988).
- (50) G. Matsumura, A. Herp and W. Pigman :

- Radiation Res.*, **28**, 735 (1966).
- (51) M. J. Harris, A. Herp and W. Pigman : *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 7570 (1972).
- (52) H. J. Hartmann, A. Gartner, and U. Weser : in "Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology, and Medicine," ed. by G. Rotilio, Elsevier, 1986, p. 56.
- (53) H. Uchiyama, Y. Dobashi, K. Ohkouchi and K. Nagasawa : *J. Biol. Chem.*, **256**, 7753 (1990).
- (54) R. M. Fink and E. Leugfelder : in "Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology, and Medicine," ed. by G. Rotilio, Elsevier, 1986, p. 60.
- (55) R. M. Fink and E. Leugfelder : *Free Rad. Res. Comms.*, **3**, 85 (1987).
- (56) J. E. Scott and M. J. Tigwell : *Carbohydr. Res.*, **28**, 53 (1973).
- (57) B. C. Gilbert, D. M. King and C. B. Thomas : *Carbohydr. Res.*, **125**, 217 (1984).
- (58) H. Sterk, M. Braun and O. Schmut : *Carbohydr. Res.*, **145**, 1 (1985).
- (59) W. Kosmus and O. Schmut : *Carbohydr. Res.*, **145**, 141 (1985).
- (60) 柏村直樹, 森田潤司 : フリーラジカルの臨床, **5**, 41 (1990).
- (61) H. Burkhardt, M. Schwingel, H. Menninger, H. W. Macartney and H. Tschesche : *Arthritis and Rheumatism*, **29**, 379 (1986).
- (62) C. R. Roberts, J. S. Mort, P. J. Roughley : *Biochem. J.*, **247**, 349 (1987).