

## 肝組織における内在性金属とキレート剤との相互作用によるアポトーシス誘起

田 和 理 市, 米 田 政 憲, 畚 野 純, 桜 井 弘  
(京都薬科大学・代謝分析学教室\*)

### Apoptosis Induction by Complex Formation with Intracellular Metal in Liver

Riichi TAWA, Masanori YONEDA, Jun FUGONO and Hiromu SAKURAI

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University*

Apoptosis induction in mouse liver nuclei by treatments of 1,10-phenanthroline (PHEN) and its derivatives was examined. The rate constants for  $\cdot\text{OH}$  generation from the reactions of Cu(II)-PHEN and its derivatives with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) or ascorbate (ASC) were determined by using N,N-dimethyl-p-nitrosoaniline (p-NDA) bleaching reaction, which were the order as followed : BATC (2,9-dimethyl-4,7-diphenylphenanthroline) > NEC (2,9-dimethylphenanthroline) > BATP (4,7-diphenylphenanthroline) >> PHEN. On the other hand, Cu(II)-PHEN- $\text{H}_2\text{O}_2$  was the most effective for DNA cleaving activity among the Cu(II) complexes. The CD spectra showed that DNA structure changes from B- to C-form and then C- to A-form by association with the Cu(II)-PHEN complex. The ESR spectra also suggested that the Cu(II)-PHEN complex is  $\text{CuN}_4$  type with the distorted tetrahedral structure.

生体中に広く存在する銅は、クロマチン構成において必要となる金属元素である<sup>1)</sup>。生体組織中の還元性物質である過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) は、細胞核内に入ってDNAと反応することが知られている<sup>2)</sup>。また、細胞内で生成した1価銅の錯体はDNAと結合した後、 $\text{H}_2\text{O}_2$ により酸化されてヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) を生成し、DNAを損傷する<sup>3)</sup>。ラットの肝組織から単離した核に1,10-フェナンスロリン (PHEN) を作用させると、 $\cdot\text{OH}$ 生成によると考えられるアポトーシスが誘起されることが報告されている<sup>4)</sup>。

本研究においては、肝組織における内在性金属の一つである銅とPHENとの錯体の生成によるアポトーシス誘起が、フェントン反応を介した $\cdot\text{OH}$ の生成、あるいは、錯体構造に依存したDNAとの相互作用のいずれに強く依存するかについて検討した。

---

\* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

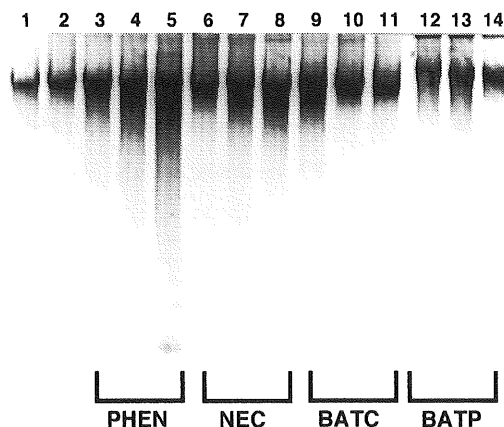
## 実験方法

アポトーシスの誘起反応は、反応緩衝液 (0.3M sucrose, 25mM KCl, 25mM HEPES, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM EGTA, pH 7.0) 中で、C57BL/6Nマウス (19-23週齢, 雌) の肝組織核  $5 \times 10^6$  に対して、PHEN, 2,9-dimethylphenanthroline (NEC), 4,7-diphenylphenanthroline (BATP) および 2,9-dimethyl-4,7-diphenylphenanthroline (BATC) を加えて反応 (36°C, 1時間) した後、DNAをフェノール法により抽出精製したもの的一定量 (10 $\mu$ g) を1.5%アガロースゲル電気泳動法により解析した<sup>5)</sup>。フェントン反応による $\cdot$ OHの生成速度は、100 $\mu$ M塩化第二銅を含む5mMリン酸緩衝液 (pH7.4), 500 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>あるいはアスコルビン酸 (ASC) およびキレート剤を含む溶液とを混合し、生成する $\cdot$ OHとN, N-dimethyl-*p*-nitrosoaniline (p-NDA) との反応をストップ・フロー法 (RA-401, Otsuka Electronics) により測定 (445nm) した<sup>6)</sup>。Cu(II)イオンとPHENおよびその誘導体との錯体の吸収スペクトルは、分光光度法 (MultiSpec-1500, Shimadzu) により測定した。円二色性 (CD) スペクトルはJ-720WI (JASCO) により測定し、ESRスペクトルはJES-RE1X (JEOL) を用いて解析した。

## 結果と考察

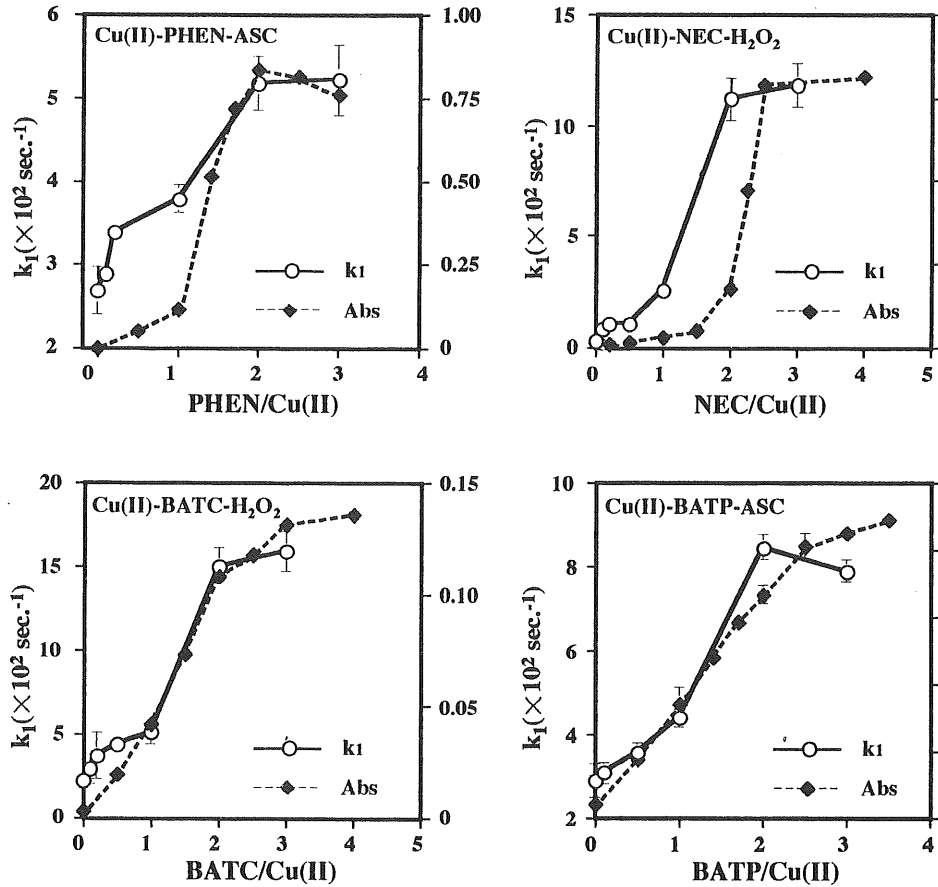
核にPHENおよびその誘導体を反応させると、PHENに対してのみDNAの断片化が見られ、逆に、BATCにおいてはDNA切断の抑制が生じた (Fig. 1)。

濃度依存的なH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>あるいはASCの共存下での $\cdot$ OHの生成速度は、錯体濃度に比例して大きくなり、



**Fig. 1** Analysis by 1.5% agarose gel electrophoresis for presence of DNA laddering. The mouse liver nuclei ( $5 \times 10^6$ ) were incubated with PHEN, NEC, BATC and BATP in the medium (0.3M sucrose, 25mM KCl, 25mM HEPES, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 5mM EGTA, pH 7.0) at 36°C for 1h. 1: No treatment; 2: Ethanol 4.5%; 3: PHEN 0.5mM; 4: PHEN 1.0mM; 5: PHEN 1.5mM; 6: NEC 0.5mM; 7: NEC 1.0mM; 8: NEC 1.5mM; 9: BATC 0.5mM; 10: BATC 1.0mM; 11: BATC 1.5mM; 12: BATP 0.5mM; 13: BATP 1.0mM; 14: BATP 1.5mM.

Cu(II)/Ligand  $\equiv$  1/2 のとき最大となった (Fig. 2)。Cu(II)-PHEN 錯体-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系では  $\cdot$ OH の生成がほとんど認められなかった。



**Fig. 2** Compositions of the Cu(II)-complexes with PHEN and its derivatives, and the changes of the pseudo first-order rate constants ( $k_1$ ) for  $\cdot$ OH generation with increasing of the concentrations of the ligands at pH 7.4. The rate constants,  $k_1$ , were determined by monitoring at 445nm after mixing the solution A containing 10mM phosphate buffer (pH 7.4), 80 $\mu$ M p-NDA and 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbate with the solution B containing 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, 0-600 $\mu$ M ligands at 37 $^{\circ}$ C. The compositions of the Cu-complexes with the ligands were measured in 5mM phosphate buffer (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C as (a) Cu-PHEN-ascorbate : 250 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, 2.5mM ascorbate and 0-875 $\mu$ M PHEN, 435nm ; (b) Cu-NEC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 100 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, 500 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0-400 $\mu$ M NEC, 455nm ; (c) Cu-BATC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 10 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0-40 $\mu$ M BATC, 485nm ; (d) Cu-BATP-ascorbate: 250 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, 2.5mM ascorbate and 0 - 875 $\mu$ M BATP, 457nm.

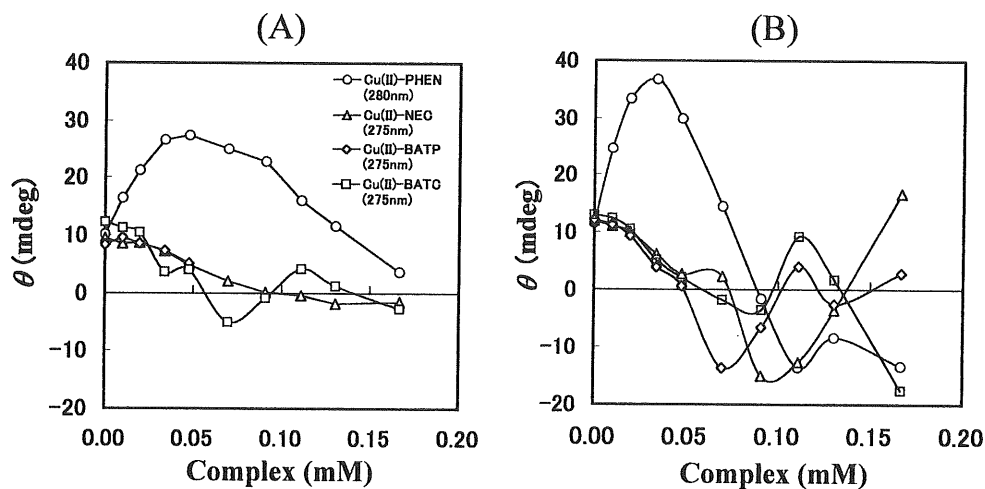
還元剤の存在下でのCu(II)-錯体によるプラスミドDNAの切断活性について検討した。この場合、Cu(II)-PHENおよびBATP錯体においてのみ活性が見られ、DNAとの相互作用において、他の錯体との違いが示唆された (Table 1)。

Cu(II)-およびCu(I)-錯体との相互作用によるDNA構造 (ラセン軸角度) の変化についてCDスペクトルから解析した。Cu(II)-PHEN錯体に対しては、還元剤の存在に関係なく、濃度増加とともに楕円率 ( $\theta$  mdeg) が増加→減少への2相性を示したが、他の錯体では、減少方向への変化しか示さなかった (Fig. 3)。

**Table 1.** Estimation of the cleavages of ColE1 DNA by PHEN, NEC, BATC and BATP in the presence of Cu (II) ion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbate

	Cleaving Activities (%)		
	Single-strand breaks	Double-strand breaks	Total
5 mM PHEN-Cu(II)-Ascorbate	0.454 ± 0.080	0.269 ± 0.080	0.723 ± 0
5 mM NEC-Cu(II)-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0
5 mM BATC-Cu(II)-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0
5 mM BATP-Cu(II)-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.036 ± 0.016	0.071 ± 0.013	0.17 ± 0.029

ColE1 DNA (0.54  $\mu$ g) was treated with 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> and 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbate in 10mM phosphate buffer (pH7.4) at 20°C for 10 min. Each value is the mean  $\pm$  S.D. for three independent experiments.



**Fig. 3** The changes of circular dichroism spectra of the calf thymus DNA by addition of Cu(II)-complexes. The spectra measurements were carried out at 37°C by titrations of the Cu(II)-complex solutions consisting of CuCl<sub>2</sub> (1mM) and the ligands (3mM) in 20mM phosphate buffer (pH 7.4) plus 10mM NaCl to 0.2mM calf thymus DNA with (A) and without 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) in 20mM phosphate buffer (pH 7.4) plus 10mM NaCl.

Cu(II)-PHENおよび-BATP錯体について、種々の還元剤の共存下でのESRスペクトルを測定し、 $g$ 値およびA値を求めた (Table 2)。

**Table 2.** ESR parameters for Cu(II)-PHEN or BATP complexes with and without reductants

Complex	Reductants	$g$ -value		A-value ( $10^6\text{cm}^{-1}$ )	
		$g_0$	$g_{\parallel}$	$A_0$	$A_{\parallel}$
Cu(II)-PHEN		2.150	2.272	88.5	154.2
	Asc (0.1 mM)	2.143	2.262	128.2	156.4
	Asc (0.5 mM)	2.142	2.265	132.7	155.5
	Asc (2.0 mM)	<i>a</i>	2.261	<i>a</i>	<i>a</i>
	Cys (0.1 mM)	2.147	2.265	135.5	151.7
	Cys (0.5 mM)	2.146	2.265	133.3	151.0
	Cys (2.0 mM)	<i>a</i>	2.268	<i>a</i>	<i>a</i>
	GSH (0.1 mM)	2.147	2.271	131.4	155.6
	GSH (0.5 mM)	<i>a</i>	2.267	<i>a</i>	<i>a</i>
	GSH (2.0 mM)	<i>a</i>	2.267	<i>a</i>	<i>a</i>
	NAC (0.1 mM)	2.146	2.266	132.9	149.5
	NAC (0.5 mM)	2.145	2.264	133.4	154.1
	NAC (2.0 mM)	2.145	2.263	133.5	152.7
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.1 mM)	2.150	2.265	141.5	150.4
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM)	2.150	2.265	134.7	153.0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2.0 mM)	2.146	2.265	131.7	153.6	
Cu(II)-BATP		2.168	2.273	198.5	157.2

The solutions were consisted of 0.5 mM CuCl<sub>2</sub> and 1.0 mM ligand with and without the reductants in 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 50% ethanol. The ESR spectra were measured at room temperature (22°C) and in liquid nitrogen (77K). *a* : not determined.

以上のことから、次のように結論した。(1) Cu(II)-PHENおよび-BATP錯体は、Cu(II)-NEC、-BATC錯体よりも還元されにくい。(2) Cu(II)-PHEN錯体の結合によるDNAのラセン軸角度の変化は、他の錯体の場合と異なる<sup>7)</sup>。(3) Cu(II)-PHEN錯体は、はずんだ正四面体構造をもつ<sup>8)</sup>。したがって、肝組織における銅-PHEN錯体によるDNA断片化は、 $\cdot\text{OH}$ 生成よりもDNAと錯体との立体的な相互作用により強く影響を受けやすいと推察できる。

## 文 献

- 1) 田和理市, 桜井 弘 (1998) 微量栄養素研究 15: 41
- 2) Rodriguez, H., G.P. Holmquist and R. D' Agostino Jr. (1997) Cancer Res. 57: 2394
- 3) Kawanishi, S. (1995) Toxicology of Metals, Biological Aspects, ed. by Goyer, R.A. and M.G. Chrían, Springer-Verlag, Heidelberg: pp. 349-371
- 4) Burkitt, M.J., L. Milue, P. Nicotera and S. Orrenius (1996) Biochem. J. 313: 163

- 5) Tawa, R., Y. Kimura, J. Komura, Y. Miyamura, A. Kurishita, M.S. Sasaki, H. Sakurai and T. Ono (1998) J. Radiat. Res. 39 : 271
- 6) Tawa, R., D. Gao, M. Takami, Y. Imakura, K.H. Lee and H. Sakurai (1998) Bioorg. Med. Chem. 6 : 1003
- 7) Chan, A., R. Kilkuskil and S. Hanlon (1979) Biochemistry 18 : 84
- 8) Yokoi, H. and A.W. Addison (1977) Inorg. Chem. 16 : 1341