

## 銅含有メタロチオネインによる活性酸素種産生反応とDNA切断活性

中山明弘<sup>1)</sup>, 蛭沼利江子<sup>1)</sup>, 榎本秀一<sup>1)</sup>, 桜井 弘<sup>2)</sup>( <sup>1)</sup>理化学研究所・加速器基盤研究部\*, <sup>2)</sup>京都薬科大学・代謝分析学教室\*\*)**Reactivity to Reactive Oxygen Species, DNA-binding Activity, and DNA-cleaving Activity of Various Metal Containing Metallothionein I and II**Akihiro NAKAYAMA<sup>1)</sup>, Rieko HIRUNUMA<sup>1)</sup>, Shuichi ENOMOTO<sup>1)</sup>, and Hiromu SAKURAI<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Cyclotron center, RIKEN,<sup>2)</sup>Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

We previously reported that copper-containing metallothionein (MT) -I and MT-II react with superoxide anion radicals ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) and generate hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) in the different manner and the  $\cdot\text{OH}$  generation causes the development of hepatoma in the livers of Long-Evans rats with Cinnamon-like coat color (LEC rats) and human. Then, we investigated whether the other metal containing MT-I and MT-II (Zn- Cd-, Hg-, and Ag-MT-I and MT-II) react with reactive oxygen species (ROS). In addition, we investigated whether the metal containing MTs cleave DNA as an index of cellular damage. During the investigation, Cu containing MT binds to and cleaves DNA via generating  $\cdot\text{OH}$  by the contiguity site of DNA. Thus, we concluded that Cu-MT is one of the strong carcinogens.

銅は酸化還元反応に富み、様々な酵素の活性中心として生体にとって必須な微量元素であるが、その反応性の高さゆえに過剰に存在すると、生体に有害な反応を引き起こすことが知られている<sup>1)</sup>。生体内で過剰となった銅は金属結合性タンパク質であるメタロチオネイン (MT) を誘導し、Cu-MTとしてMTに取り込まれた形で存在している<sup>2)</sup>。MTにはMT-IからMT-IVまでの4種のイソタンパク質が知られており、このうちMT-IとMT-IIの二つのイソタンパク質が全身に広く分布し、それぞれ重金属元素の解毒および恒常性維持に働き、さらに活性酸素種の消去作用を有していることが知られている<sup>2)</sup>。しかし、銅を多く含むMTは過酸化水素と反応してヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) を産生することから、Cu-MTは細胞傷害性を有すると考えられる<sup>3,4)</sup>。そこで、種々の金属を含むMTの生体に与える傷害性を検討するため、Cu, Zn, Cd, AgおよびHgを含むMT-IおよびMT-IIの活性酸素種に対する反応性およびDNA切断活性を検討した。

**【実験方法】**

MTに含まれる金属を1M HClで除去し、還元剤 (TCEP) 共存下で各種金属に置換した。スーパーオキシドアニオン ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) および過酸化水素に対するMTの反応性の評価にはelectron spin resonance (ESR) スピントラップ法を用いた。 $\cdot\text{O}_2^-$ はヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (HPX-XO) 系を用いて発生させた。また、MTと $\cdot\text{O}_2^-$ の反応においてはESRスピントラップ法とともに、nitroblue tetrazolium (NBT) 法でも評価を行った。NBTは $\cdot\text{O}_2^-$ と反応し、不溶性のホルマザン (紫色) を生成する。したがって、 $\cdot\text{O}_2^-$ を消去する物質を共存させておくとホルマザンの生成が阻害されるため、ホルマザンの生成量を測定することによりその物質の $\cdot\text{O}_2^-$ 消去活性を測定することができる。さら

\*所在地：埼玉県和光市広沢2-1 (〒351-0198)

\*\*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

に、MTの変異原性を評価するために、DNA切断活性を0.8%アガロースゲル電気泳動法にて評価した。

### 【結果と考察】

Cu, Zn, Cd, HgおよびAgを含むMTと過酸化水素との反応性においてはCu-MTにのみ活性が見られ、経時的に $\cdot\text{OH}$ 由来のDMPO-OHのシグナルの増加が観察された (Fig. 1)。また、この反応においてはMT-IとMT-IIの分子種間で相違は見られなかった。本結果はこれまでの報告<sup>3-5)</sup>と一致しており、Fenton-like反応により $\cdot\text{OH}$ が産生していると考えられた。

MTの $\cdot\text{O}_2^-$ に対する反応性においてもCu-MTのみが $\cdot\text{O}_2^-$ と反応することが見いだされた (Fig. 2)。Cu-MT以外の

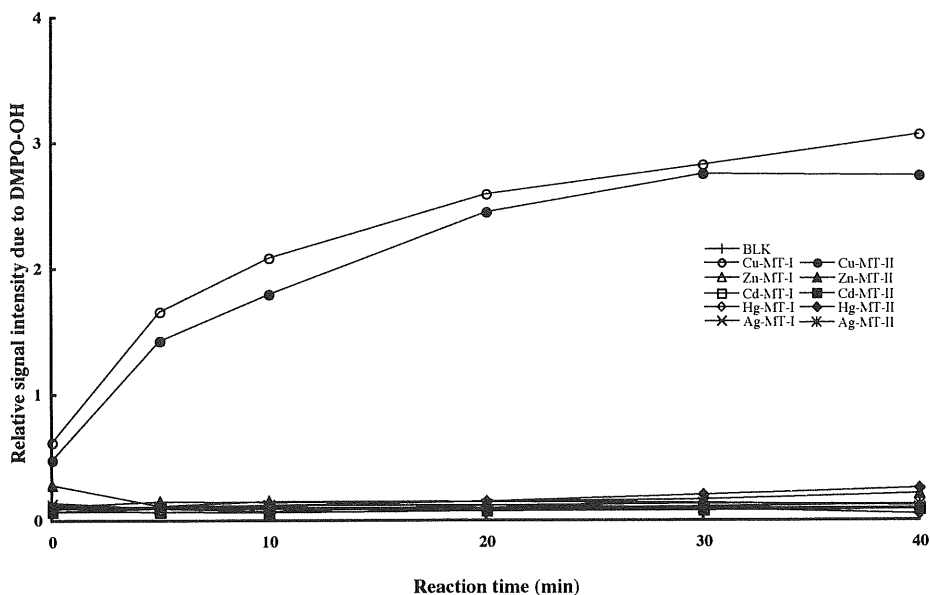


Fig. 1 Time-dependent  $\cdot\text{OH}$  generations in the systems of various forms of MTs (225  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (225  $\mu\text{M}$ ) at room temperature.

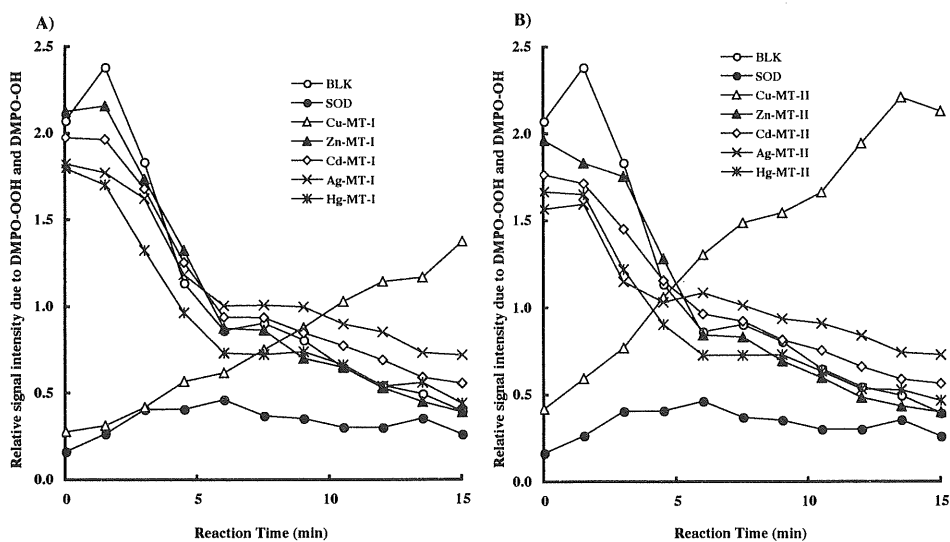
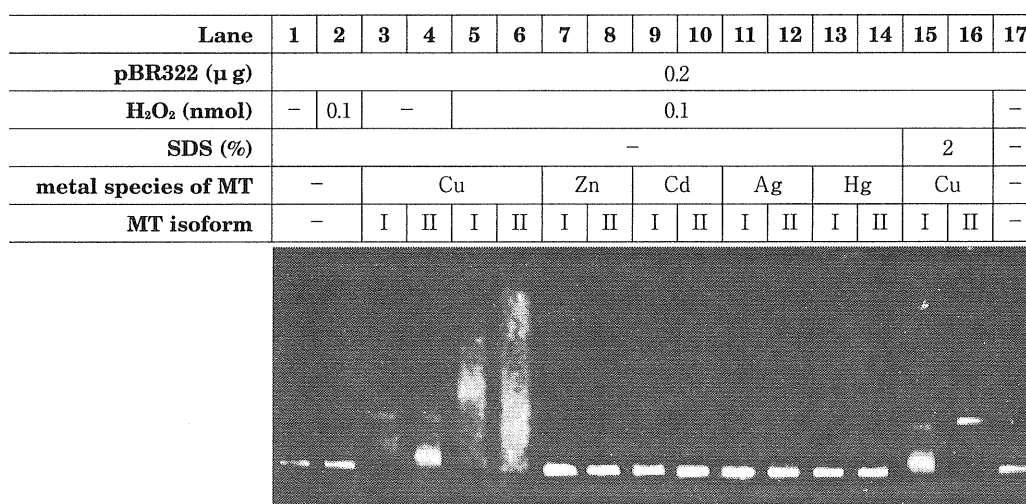


Fig. 2 Time-dependent generations of  $\cdot\text{O}_2^-$  and  $\cdot\text{OH}$  in the reactions of MTs ((A) MT-I, (B) MT-II) and a hypoxanthine-xanthine oxidase system at room temperature. Concentrations of MTs and SOD were 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 10 U/mL, respectively.

MTはMTを含まない対照 (BLK) とほぼ同様の結果を示し、反応開始直後においては $\cdot\text{O}_2^-$ 由来のDMPO-OOHのシグナルが検出され、経時的にDMPO-OHのシグナルへとシグナル形を変えながら減衰していった。なお、DMPO-OOHは時間とともにDMPO-OHへと内部転換することが知られているため、上記の結果はDMPO-OOHの減衰と考えられた。しかし、Cu-MTにおいては反応開始直後からDMPO-OOHのシグナルは観測されず、経時的にDMPO-OHのシグナルの増加が見られた。この結果はCu-MTは $\cdot\text{O}_2^-$ を消去し、 $\cdot\text{OH}$ を産生することを示唆している。分子種間での相違を検討するために、Cu-MT-IとCu-MT-IIの濃度を変化させた結果、Cu-MT-IよりCu-MT-IIの方が強い活性を持っていることが明らかとなった。さらに、NBT法により反応性を検討すると、Cu-MTにのみ $\cdot\text{O}_2^-$ 消去活性が認められ、Cu-MT-IおよびCu-MT-IIの50%有効濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) はそれぞれ $7.55 \mu\text{g}/\text{mL}$ および $4.72 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、NBT法においてもESRスピントラップ法と同様の結果が得られた。以上のことから、Cu-MTは $\cdot\text{O}_2^-$ を消去し、 $\cdot\text{OH}$ を産生する活性を有し、その活性はMT-IよりMT-IIの方が強いことが明らかとなった。これまでの知見より、肝癌や前立腺癌など癌の種類により、MT-IとMT-IIの誘導比が異なることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。したがって、MTの分子種の違いによる反応性の相違は、癌の発症機序の解明や病変部位における活性酸素種や金属が引き起こす反応を調べる上で重要な知見であると考えられた。

次に、MTのDNA切断活性をアガロースゲル電気泳動法で評価した結果、Cu-MTのみにDNA切断活性が認められた (Fig. 3)。さらに、Cu-MTにおいては、ゲル上方へのスメアが見られ、界面活性剤であるSDSを加えるとスメアが消え、切断されたDNAのバンドが検出されたことから、Cu-MTはDNAと複合体を形成し、DNAを切断している可能性が見いだされた。癌組織においてMTは核に集積する<sup>7)</sup>、癌組織では活性酸素種が増加している<sup>8)</sup>という報告を併せて考えると、以下のように考察できる。細胞内に銅が蓄積した結果、Cu-MTが誘導され、さらにCu-MTは核に移行する。核に移行したCu-MTはDNAと複合体を形成し、DNAのすぐ近傍で $\cdot\text{OH}$ を産生することでDNAを切断すると考えられる。したがって、Cu-MTは変異原性を有しており、その変異原性はCu-MT-IよりCu-MT-IIの方が強いと考えられた。



**Fig. 3** Agarose gel electrophoresis of pBR322 after the reaction with MTs and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Lanes 1 and 17: pBR322, lane 2: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lanes 3 and 4: pBR322 + Cu-MT-I or Cu-MT-II, lanes 5 and 6: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Cu-MT-I or Cu-MT-II, lanes 7 and 8: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Zn-MT-I or Zn-MT-II, lanes 9 and 10: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Cd-MT-I or Cd-MT-II, lanes 11 and 12: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Ag-MT-I or Ag-MT-II, lanes 13 and 14: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + Hg-MT-I or Hg-MT-II, lanes 15 and 16: pBR322 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + SDS + Cu-MT-I or Cu-MT-II, respectively.

以上のように、本研究の結果は、生体内における活性酸素種や金属元素の引き起こす反応を理解する上で重要な知見であり、癌の発症機序の解明、治療法あるいは診断法の確立に重要な知見を与えたと考えられた。

#### 【参考文献】

1. Trautwein A.X. (1997): Bioinorganic Chemistry. Wiley-Vch Verlag GmbH.
2. Kägi J.H.R. (1991) Methods Enzymol. 205: 613.
3. Sakurai H., Nakajima K., Kamada H., Sato H., Otaki N., Kimura M., Kawano K. and Hagino T. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 192: 893.
4. Nakayama A., Nishiguchi M. and Sakurai H. (2002) Biomed. Res. Trace Elem. 13: 78.
5. Oikawa S., Kurasaki M., Kojima Y. and Kawanishi, S. (1995) Biochemistry, 34: 8763.
6. Jin R., Bay B.H., Chow V.T. and Tan P.H. (2001) Breast Cancer Res. Treat. 66: 265.
7. Tashiro-Itho T, Ichida T, Matsuda Y, Sugiyama M, Tanaka T and Ishikawa T. (1997) Liver, 17: 300.
8. Liaw K.Y., Lee P.H., Wu F.C., Tsai J.S. and Lin-Shiau S.Y. (1997) Am. J. Gastroenterol. 92: 2260.