

## 亜鉛イオンによる活性酸素生成と消去の調節

村 上 恵 子, 細 川 好 孝, 吉 野 昌 孝

(愛知医大・医・生化\*)

### Effect of zinc ion on generation and scavenging reaction of reactive oxygen species

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine

Nagakute, Aichi 480-1195, Japan

#### Summary

Zinc is an essential metal but toxic to baker's yeast at high concentration. In this report, the effect of zinc on the enzymes that generate or scavenge reactive oxygen species was analyzed. Zinc ion potently inhibited glucose 6-phosphate dehydrogenase, NADP dependent isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase, whereas slightly activated NADPH: quinone oxidoreductase, which generates superoxide anion and hydrogen peroxide. Toxicity of zinc on yeast can be principally explained by the reactive oxygen species increased due to the inhibition of glutathione reductase.

亜鉛は生物に必須の金属イオンで大型動物における遊離イオンとしてマグネシウム、カルシウムの次に多く含まれている。亜鉛イオンは酵素や転写因子などのタンパクに結合しているが、遊離イオンとしての働きは主にカルシウムチャンネルの抑制と考えられる<sup>1,2)</sup>。一方酵母細胞では高濃度の亜鉛が毒性を示しその機構には活性酸素が関与すると報告されている<sup>3)</sup>が、亜鉛イオンと活性酸素に関わる酵素の活性の関係はあまり知られてない。今回は *in situ* の条件でパン酵母における活性酸素処理系酵素（グルタチオンレダクターゼ、グルコース 6-リン酸脱水素酵素、NADP 依存性イソクエン酸脱水素酵素、NADP 依存性グルタミン酸脱水素酵素）と活性酸素を生成する NAD(P)H: キノンオキシレダクターゼに対する亜鉛の効果を検討したので報告する。

#### 材料と方法

試薬、実験材料 — パン酵母、NADP 依存性イソクエン酸脱水素酵素はオリエンタル酵母、クエン酸、グルタミン酸、メナジオンは和光純薬、塩化亜鉛、ジチオビスニトロ安息香酸 (DTNB) は片山化学、酸化型グルタチオン (GSSG)、イソクエン酸、スベルミン、トリス (Trizma base) はシグマ、NADP、グルコース 6-リン酸はロシュ・ダイアグノスティックスの製品をそれぞれ用いた。

低分子物質透過性パン酵母の調製 — 市販のパン酵母

1 g を 0.5 M ソルビトールを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 4 ml に懸濁し、2.5 ml のトルエンを加えた。45°C で 2.5 分間加温後、遠心分離によって上清を除き、0.5 M ソルビトールを含む 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 4 ml に懸濁した。これによって酵母は低分子の物質に対する透過性を増しアコニターゼ活性を細胞そのまま (*in situ*) で測定できるようになる<sup>4)</sup>。酵母 1 g を 1 ml と仮定し、以後この懸濁液を酵母 200 mg/ml として計算した。

グルタチオンレダクターゼ (GR) の測定 — 酵母懸濁液 5  $\mu$ l を 0.15 mM NADPH (または 0.15 mM NADP/0.5 mM グルコース 6-リン酸)、0.1–0.5 mM 酸化型グルタチオン、4 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM DTNB (SH 修飾試薬) を含む 0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.8) 1 ml に加えて混合し、412 nm の吸光度増加を 30 秒間測定して反応速度を算出した。

グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)、NADP イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) の測定 — 酵母懸濁液 5  $\mu$ l を 0.2–0.5 mM NADP、4 mM MgCl<sub>2</sub> と 0.2–0.5 mM のグルコース 6-リン酸あるいはイソクエン酸を含む 0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.8) 1 ml に加えて混合し、340 nm の吸光度増加を 30 秒間測定して反応速度を算出した。

グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の測定 — 酵母懸濁液 5  $\mu$ l を 0.5 mM NADP と 10–20 mM グルタミン酸を含

\*所在地：愛知県長久手市岩作雁又1-1 (〒480-1195)

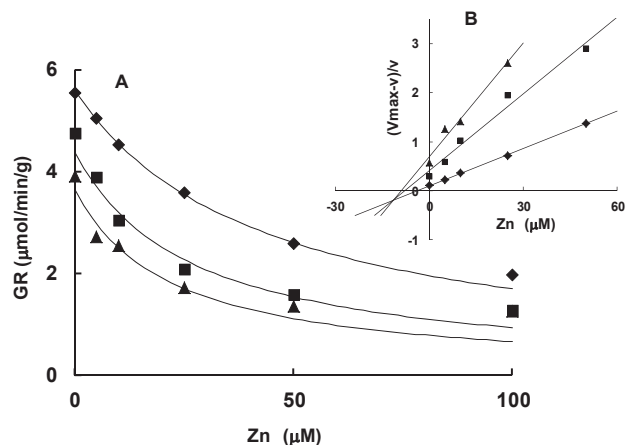
む 50 mM ヒドラジングリシン緩衝液 (pH 9.1) 1 ml に加えて混合し、340 nm の吸光度増加を 30 秒間測定して反応速度を算出した。

**アコニターゼ活性測定試料の調製** — 上記の透過性パン酵母懸濁液 50  $\mu$ l を 20  $\mu$ M メナジオン、20  $\mu$ M NADP、1 mM アジ化ナトリウム、0.5 mM G6P または 20 mM グルタミン酸と 1 mM スペルミンまたは 0.2–0.5 mM の亜鉛イオンを含む 40 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 0.95 ml に加えて酵母の濃度を 10 mg/ml とし 37°C にて 5 分間加温後、800  $\times$  g にて 5 分間遠心し、沈殿した酵母を 40  $\mu$ l の 0.5 M ソルビトールを含む 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) に懸濁した。これをアコニターゼ活性の測定に用いた。このとき各資料を同時に 3 本調製して活性の平均値と標準偏差を算出し、Dunnet 検定によって有意差を判定した。

**アコニターゼ活性の測定** — 上記の酵母懸濁液 5  $\mu$ l を 5 mM クエン酸、0.25 mM NADP、4 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mU/ml NADP-イソクエン酸脱水素酵素を含む 0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.8) 1 ml に加えて混合し、分光光度計 (UV1600, 島津製作所) を用いて 340 nm の吸光度増加を 2 分間測定した。この時の酵母濃度を 1 mg/ml として反応速度を算出した。

## 結果

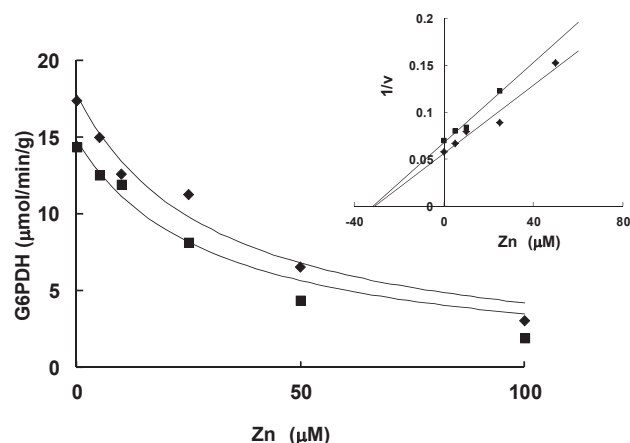
亜鉛イオンは GR を阻害した (Fig. 1)。GSSG 濃度を変化させた場合の Dixon プロットは第二象限で交差し、拮



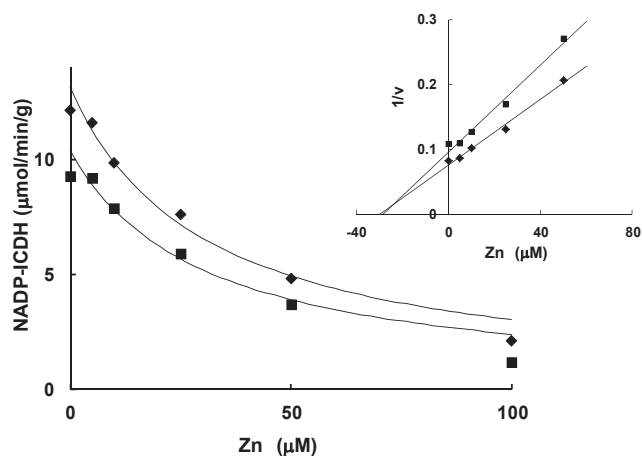
**Fig. 1** Effect of zinc on the activity of glutathione reductase (GR) in permeabilized yeast cells. Baker's yeast cells were permeabilized according to the method reported previously<sup>4</sup>. Enzyme activity was determined spectrophotometrically by the increase in the absorbance at 412 nm for 30 seconds at 37°C. Reaction mixture of 1 mL contained permeabilized yeast cells (1 mg/mL), 0.15 mM NADPH, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTNB and various concentrations of oxidized glutathione (GSSG) in the presence of ZnCl<sub>2</sub> and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8). A. Inhibition of GR by Zn. B. Quotient velocity plot<sup>5</sup>. The values of (Vmax-v)/v were plotted against Zn concentrations. ◆, 0.5 mM GSSG; ■, 0.2 mM GSSG; ▲, 0.1 mM GSSG.

抗阻害かあるいは混合型であるかの区別が困難であった (data not shown) ため、Quotient velocity plot により解析した<sup>5</sup>). このプロットから混合型阻害であることが確認され、第三象限の交点より K<sub>i</sub> は 11.4  $\mu$ M, K<sub>i</sub>' (EIS の解離定数) は 61  $\mu$ M と算出された。

亜鉛イオンは NADPH 供給酵素である G6PDH, NADP-ICDH に対して阻害作用を示した (Figs. 2, 3)。Dixon プロットより G6PDH 及び ICDH に対する亜鉛イオンの阻害作用は基質 G6P, イソクエン酸に対して非拮抗阻害であり K<sub>i</sub> はそれぞれ 31.3  $\pm$  0.5  $\mu$ M (G6PDH), 29.4  $\pm$  1  $\mu$ M (ICDH) と算出された。GDH は亜鉛によって阻



**Fig. 2** Effect of zinc on the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase in permeabilized yeast cells. Reaction mixture of 1 mL contained yeast cells (1 mg/ml), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8) 0.2 mM NADP and 0.5 or 0.2 mM glucose 6-phosphate (G6P). Increase in the absorbance at 340 nm was recorded for 30 seconds at 37°C. ◆, 0.5 mM G6P; ■, 0.2 mM G6P.

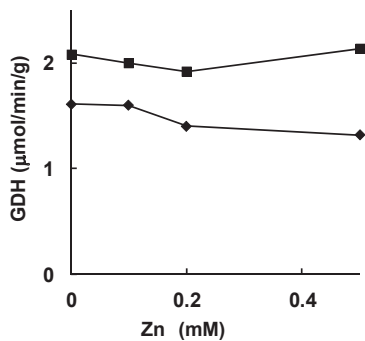


**Fig. 3** Effect of zinc on the activity of NADP-isocitrate dehydrogenase in permeabilized yeast cells. Experimental conditions were similar to those described in the legend to Fig. 2 except that the concentration of NADP was 0.5 mM and substrate was isocitrate (IC). ◆, 0.4 mM IC; ■, 0.2 mM IC.

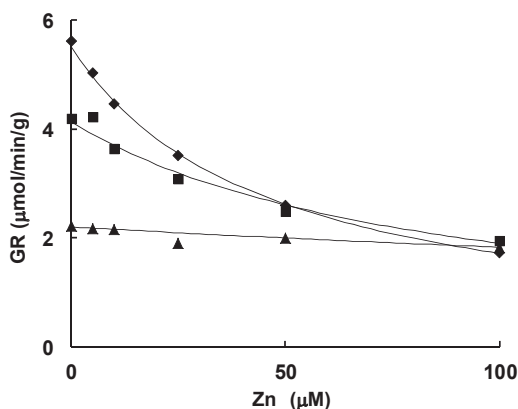
害されなかった (Fig. 4)。

NADPH 供給源としてグルコース 6-リン酸を用いた場合、亜鉛による GR の阻害は NADPH 存在時とほぼ同様の効果が得られ、この時 (酸化型グルタチオン濃度 0.5 mM) の 50% 阻害濃度は 45.3  $\mu$ M であった (Fig. 5)。イソクエン酸を用いた時の阻害は G6P より弱く (50% 阻害濃度 85.3  $\mu$ M)、グルタミン酸を用いた時には GR は亜鉛によってほとんど阻害されなかった (50% 阻害濃度 490  $\mu$ M)。

酵母には活性酸素生成に関わる酵素系として NAD(P)H : ナフトキノンオキシドレダクターゼ (NQR) が存在し<sup>6-8)</sup>、その活性は活性酸素によって鋭敏に失活する酵素アコニターゼ<sup>9-11)</sup>の活性を指標として評価できる<sup>12)</sup>。この酵素が Mg またはポリアミンで活性化されることを以前に報告した<sup>13)</sup>。NQR にする亜鉛イオンの効果を検討した。酵母と NADP, G6P を混合して NADPH を G6PDH で供



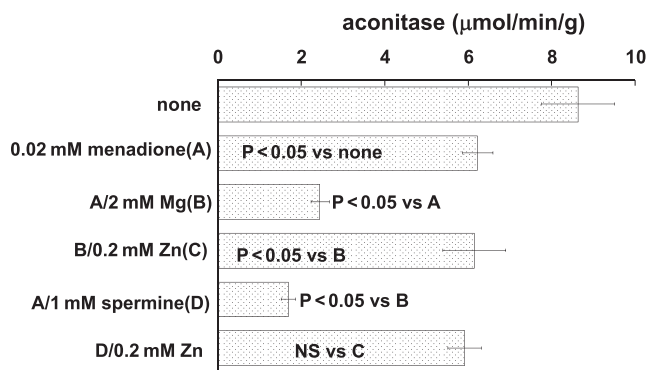
**Fig. 4** Effect of zinc on the activity of glutamate dehydrogenase in permeabilized yeast cells. Reaction mixture of 1 mL contained yeast cells, 10 or 20 mM glutamate (glu), 0.5 mM NADP and 50 mM hydrazine-glycine buffer (pH 9.1). Increase in the absorbance at 340 nm was recorded for 30 seconds at 37°C. ◆, 10 mM glu; ■, 20 mM glu.



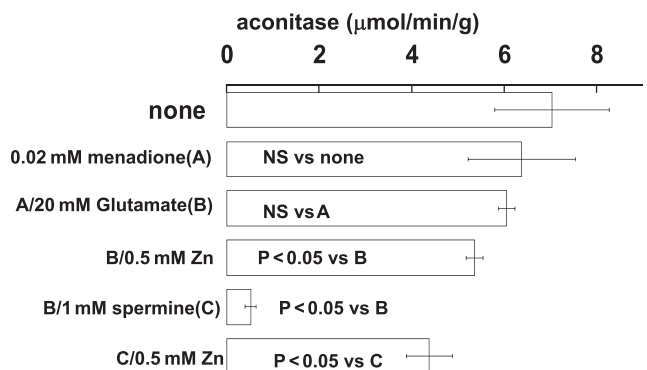
**Fig. 5** Effect of zinc on the activity of GR in permeabilized yeast cells. Reaction mixture of 1 mL contained permeabilized yeast cells (1 mg/mL), 0.15 mM NADP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM DTNB, 0.5 mM GSSG and various substrates for dehydrogenases in the presence of ZnCl<sub>2</sub> and 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8). ◆, 0.5 mM G6P; ■, 0.4 mM IC; ▲, 20 mM glutamate.

給し (Fig. 6), スーパーオキシドアニオンと過酸化水素の両方を生成させるためにメナジオンとアジ化ナトリウム (カタラーゼを阻害<sup>14)</sup>) を加えて 37°C で 5 分間加温した後アコニターゼを測定した。アコニターゼはマグネシウムとスペルミンによって失活し、亜鉛を添加して NADPH の供給を阻害すると保護された。亜鉛は NADPH の供給系を阻害することによって活性酸素の生成を阻害したと考えられる。

NADPH 供給系として亜鉛イオンにより阻害されない GDH を用いた場合を Fig. 7 に示す。酵母に NADP, グル



**Fig. 6** Effect of menadione, NADP, glucose 6-phosphate and zinc on the activity of aconitase in the presence of NaN<sub>3</sub>. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0.02 mM NADP, 0.5 mM glucose 6-phosphate and various ligands in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37°C for 5 min, cells were collected by centrifugation at 800 × g for 5 min and suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.1) containing 0.5 M sorbitol at the concentration of 200 mg/ml. Aconitase activity was determined by coupling with NADP-isocitrate dehydrogenase. Reaction mixture contained 5 mM citrate, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mU/ml of NADP-isocitrate dehydrogenase and 1 mg/ml of yeast. The increase in the absorbance at 340 nm was recorded. Mean values ± SD (n = 3) were indicated.



**Fig. 7** Effect of menadione, NADP, glutamate on the activity of aconitase in the presence of NaN<sub>3</sub>. Experimental conditions were similar to those described in the legend of Fig. 3 except that glucose 6-phosphate was removed from the reaction and the mixture was incubated for 10 min.

タミン酸, メナジオン, アジ化ナトリウムを加えて37°Cで10分間加温後にアコニターゼを測定した。この時亜鉛はわずかにアコニターゼの失活を促進し, 弱いながら直接にNQRを活性化することが示唆された。しかしポリアミンによるNQRの活性化に対して亜鉛はアコニターゼを保護しポリアミンの効果を抑制する方向に作用した。

## 考 察

亜鉛イオンは活性酸素処理系酵素であるGR, NADP-ICDHを阻害してプロオキシダントとしての機能を示した。一方G6PDHを阻害して基質NADPHの供給を抑制することによりNQRによる活性酸素生成を阻害し, またNQRに対するスペルミンの活性化を解除することによりNQRを阻害した。この場合には亜鉛イオンはアンチオキシダント的に作用したといえる。しかし酵母において亜鉛は増殖期後半から取り込みが増加することが報告されている<sup>15)</sup>。したがってグルコースを利用する増殖前期には亜鉛は低濃度であるため, G6PDHを阻害することはなく, NQRに対する活性酸素生成の阻害効果は小さいと考えられる。一方呼吸に大きく依存する増殖後期から定常期にかけては亜鉛が増加する結果, 活性酸素処理系酵素 (GR, NADP-ICDH) を阻害することにより活性酸素傷害が発生する可能性が高い。遊離の亜鉛イオンは酵母の活性酸素処理系酵素を阻害する機能を介して活性酸素傷害の誘導に関与すると推測される。

## 参考文献

- 1) Chen N, Moshaver A, Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* 51: 1015-1023
- 2) Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera P-L, Wollheim CB (2003) Islet  $\beta$ -cell secretion determines glucagons release from neighbouring  $\alpha$ -cells. *Nat cell biol* 5: 330-335
- 3) Pagani MA, Casamayor A, Serrano R, Atrien S, Arino J (2007) Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Mol Microbiol* 65: 521-537
- 4) Murakami K, Nagura H, Yoshino M (1980) Permeabilization of yeast cells: Application to study on the regulation of AMP deaminase activity *in situ*. *Anal Biochem* 105: 407-413
- 5) Yoshino M, Murakami K (2009) A graphical method for determining inhibition constants. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24: 1288-1290
- 6) Ragan CI (1976) NADH ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 456: 249-290
- 7) Bruinenberg PM, van Dijken JP, Kuenen JG, Scheffers WA (1985) Oxidation of NADH and NADPH by mitochondria from the yeast *Candida utilis*. *J Gen Microbiol* 131: 1043-1051
- 8) Tarrío N, Díaz Prado S, Cerdán ME, González Siso MI (2005) The nuclear genes encoding the internal (KINDI1) and external (KINDE1) alternative NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. *Biochim Biophys Acta* 1707: 199-210
- 9) Gardner PR, Fridovich I (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J Biol Chem* 267: 8757-8763
- 10) Murakami K, Yoshino M (1997) Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress. *Biochem Mol Biol Int* 41: 481-496
- 11) Gardner PR (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* 349: 9-23
- 12) 村上恵子, 細川好孝, 吉野昌孝 (2014) アスコルビン酸とメナジオンの相互作用によるレドックス制御. *微量栄養素研究* 31: 17-20
- 13) 村上恵子, 細川好孝, 吉野昌孝 (2010) ポリアミンの細胞毒性. *微量栄養素研究* 27: 43-46
- 14) Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. *Archiv Biochem Biophys* 41: 462-474
- 15) Failla ML, Benedict CD, Weinberg ED (1976) Accumulation and storage of  $Zn^{2+}$  by *Candida utilis*. *J Gen Microbiol* 94: 23-36