



銅一過酸化水素系でのヒドロキシラジカル生成反応
と該系における微生物の挙動

メタデータ	言語: jpn 出版者: 日本医学館 公開日: 2007-12-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中島, 暉, 植田, 勇人, 熊田, 高之, 荒殿, 保幸, Kumada, Takayuki, Aratono, Yasuyuki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/989

銅-過酸化水素系でのヒドロキシラジカル生成反応と 該系における微生物の挙動

中島 暉¹⁾, 植田 勇人²⁾, 熊田 高之³⁾, 荒殿 保幸³⁾

¹⁾宮崎医大化学, ²⁾宮崎医大精神医学, ³⁾日本原研先端基礎研究センター

Generation of hydroxyl radical in Cu(II)-H₂O₂ system and behavior of microorganisms in the system.

Akira Nakajima¹⁾, Yuto Ueda²⁾, Takayuki Kumada³⁾, Yasuyuki Aratono³⁾

¹⁾ Department of Chemistry, ²⁾ Department of Psychiatry, Miyazaki Medical College, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan, ³⁾ Advanced Science Research Center, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai 319-1195, Japan.

Behavior of microorganisms in Cu(II)-H₂O₂ system were examined using DMPO as spin traps. In lower Cu(II)-H₂O₂-DMPO system (1 mM Cu), DMPO-OH derived from hydroxyl radical-trapping was mainly observed. However, in higher Cu(II)-H₂O₂-DMPO system (4 mM Cu), most of DMPO-OH was derived from the nucleophilic addition of water molecule. Neutron irradiation of Cu(II) ion did not affect the DMPO-OH formation. Stable Cu(II) complex of phthalocyanin, which could produce ⁶⁴Cu recoil atoms by neutron irradiation, did not generate DMPO-OH in Cu(II)-H₂O₂-DMPO system. Thus, the effects of microbial cells on hydroxyl radical generation were examined in lower Cu(II)-H₂O₂-DMPO system. ESR signal intensity of DMPO-OH in the system was heavily decreased by the addition of microbial cells. Its decrease effects were far larger than that in UV irradiated-H₂O₂-DMPO system. The microbial cells having higher ability to sorb copper showed relatively smaller ID₅₀ values indicating the microbial amounts which decreased the signal intensities of DMPO-OH to half of those in non-microbial. These results suggested that the generation of hydroxyl radical would be concerned with the strength of coupling between Cu(II) ion and microbial cells.

hydroxy radical, copper ion, hydrogen peroxide, microorganisms,
Arthrobacter nicotianae, copper biosorption, DMPO

緒言

銅は、生体において必須元素であると同時に毒性元素でもある。[Cu, Zn-SOD]-スーパーオキシド、銅ペプチド錯体-スーパーオキシドなどの系でヒドロキシルラジカルを生成することが報告されており^{1,2)}、これがDNA切断、リン脂質過酸化などを経て、生体に障害を引き起こすものと考えられる。また、抗酸化能が高いとされている茶カテキンでも、Cu(II)イオン存在下で、ヒドロキシルラジカルを生成することが報告されている³⁾。一方、筆者らは、これまでに、微生物が銅イオンに対して高い親和性を示すこと、微生物中銅の大部分が細胞表面タンパク質のアミノ酸残基に結合していることを見出した⁴⁾。この銅イオン親和性がヒドロキシルラジカル消長に及ぼす影響を調べることは、銅イオンと生体系の相互作用の解析の手がかりになると考えられる。本報告では、2価銅を含むヒドロキシルラジカル生成系(Cu(II)-H₂O₂系)での微生物の挙動について検討した。

方法

微生物菌株(東京大学分子細胞生物学研究所IAMカルチャーコレクション)を3日間培養し、得られた菌体を生理食塩水で洗浄した後、以後の実験に用いた。用いた培地は、肉エキス 3 g/l、ペプトン 5 g/l、塩化ナトリウム 5 g/lである。銅は硝酸塩を用い、日本原子力研究所 JRR-4 炉 T-パイプ(中性子束 5.7×10^{13} n/cm²sec)で10分間照射して中性子放射化銅を得た。スピントラップ剤DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)は、ラボテック社製のものを用いた。微生物菌体懸濁液に、過酸化水素(100 mM)、DMPO(100 mM)を加え、生成したDMPO-OHを日本電子製JEOL JES TE-100型分光器でESR計測した。ESR測定条件は、共鳴周波数 9.43 GHz、外部磁場 334.5 mT、磁場掃引幅 ± 5 mT、磁場変調周波数 100 kHz、磁場変調幅 0.1 mT、マイクロ波出力 8 mWである。また、微生物菌体懸濁液に、過酸化水素(10 mM)、DMPO(10 mM)を加え、Radical Research社製光ファイバー式UV照射装置(RUVF-203S, 200 W Hg-Xe lamp)で波長 365 nmの紫外線を2秒間照射し、1分後に生じたDMPO-OHをESR計測した。

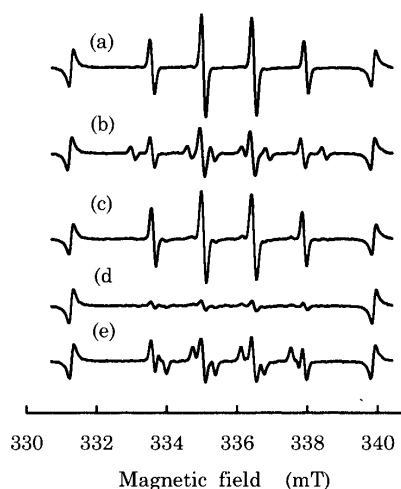


Fig. 1. ESR spectra of aminoxyl radicals observed in Cu(II)-H₂O₂-DMPO system.

1-4 mM Cu(II), 100 mM DMPO, 100 mM H₂O₂ were mixed for 10 min. (a) Cu(II) 1 mM; (b) Cu(II) 1 mM, DMSO 20 %; (c) Cu(II) 4 mM, DMSO 20 %; (d) Cu(II) 1 mM, MeOH 20 %; (e) Cu(II) 4 mM, MeOH 20 %.

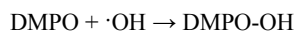
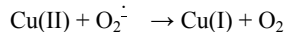
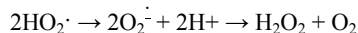
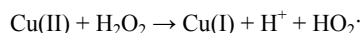
結果・考察

1. Cu(II)-H₂O₂-DMPO系におけるアミノキシルラジカル生成反応

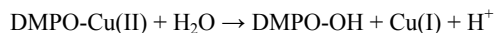
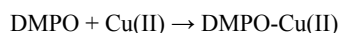
Cu(II)-H₂O₂-DMPO系において、DMPO-OHは、ヒドロキシルラジカルのスピントラップ反応だけでなく、水分子の求核付加反応によっても生成することが報告されている⁵⁾。そこで、まず、該系での反応を解析した。Cu(NO₃)₂ (1 mM)、DMPO (100 mM)、H₂O₂ (100 mM)を混合すると、DMPO-OHのESR信号が観測され、時間とともに減衰した(Fig. 1)。この系に(CH₃)₂SO (DMSO)を加えると、DMPO-OHの信号はおおよそ1/2に減少し、DMPO-CH₃の信号が現れた。Cu(II)の濃度を4 mMにすると、DMPO-OHはそれほど減少せず、DMSOを加えてもDMPO-CH₃は現れなかった。1 mM Cu(II)系にCH₃OH (MeOH)を加えると、DMPO-OHの信号は極めて小さくなった。4 mM Cu(II)系にMeOHを加えると、DMPO-OHはおおよそ1/2に減少し、求核付加反応により生成したDMPO-OCH₃の信号が現れた。C₂H₅OH (EtOH)を加えた場合も同様な結果が得られた。観測され

たアミノキシルラジカルの hfs を Table 1 に示す。これらの系では、以下のような反応が起こっているものと考えられる。

(1) 1 mM Cu (II)系 (ラジカル反応)⁵⁾



(2) 4 mM Cu (II)系 (求核付加反応)



これらの結果から、低濃度 Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系(1 mM Cu)では、主にヒドロキシルラジカルとの反応により DMPO-OH が生成するが、高濃度 Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系(4 mM Cu)では、生成した DMPO-OH の大部分は、求核付加反応によるものであることがわかった。Hanna らは、H₂¹⁷O を用いた実験で同様の結果を得ている⁵⁾。

Table 1. Hyperfine coupling constants of the aminoxyl radicals observed in Cu(II)-H₂O₂-DMPO systems.

Aminoxyl radical	Reaction conditions	hfs (mT)		
		a(N)	a(βH)	a(γH)
DMPO-OH	(a)	1.49	1.49	
DMPO-CH ₃	(b)	1.60	2.29	
DMPO-CH ₂ OH	(c)	1.57	2.24	
DMPO-OCH ₃	(d)	1.45	0.96	0.13
DMPO-CH(OH)CH ₃	(e)	1.58	2.20	
DMPO-OCH ₂ CH ₃	(f)	1.45	0.94	0.14

(a) 1 mM Cu in water, (b) 1 mM Cu in 20 % DMSO, (c) 1 mM Cu in 20 % MeOH, (d) 4 mM Cu in 20 % MeOH, (e) 1 mM Cu in 20 % EtOH, (f) 4 mM Cu, 20 % EtOH.

生体に及ぼすヒドロキシルラジカルと放射線の複合効果を検証するための予備試験として、中性子照射し生成した ⁶⁴Cu (1345.5 KeV, 半減期 12.8 時間)を含む Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系について同様の実験を行ったが、非照射 Cu(II)との間に差異は認められなかった。ホットアトム効果による γ線強度の増加が期待される Cu(II)-フタロシアニンについても実験を行ったが⁶⁾、該錯体は安定であり、Cu(II)の還元反応が起こらず、

DMPO-OH の信号は観測されなかった。

2. Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系での DMPO-OH ラジカル生成に及ぼす微生物菌体の影響

上述の結果から、主にヒドロキシルラジカル由来の DMPO-OH ラジカルが生成すると考えられる低濃度 Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系(1 mM Cu)に微生物菌体を加えると、DMPO-OH の ESR 信号強度は急速に減少した(Fig. 2)。この減少効果は、微生物の種類によって異なるが、いずれも卵製アルブミンよりは小さかった。一方、UV 照射-H₂O₂-DMPO 系における DMPO-OH の ESR 信号強度の減少の度合いは Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系に比べて小さかった(Fig. 3)。これは、Cu(II)-H₂O₂-DMPO 系での減少が、微生物菌体によるヒドロキシルラジカルの直接的消去でないことを示唆している。同様な結果は、ウラン-過酸化水素-微生物系でも見出されている⁷⁾。また、Table 2 に示したように、微生物菌体による銅集積量が大きいものほど DMPO-OH 量が 1/2 になる菌体量 (ID₅₀) が小さくなる傾向が認められた。これは、Cu(II)と微生物菌体の結合作用により、ラジカル反応、求核付加反応が阻害されたことによると考えられる(Fig. 4)。

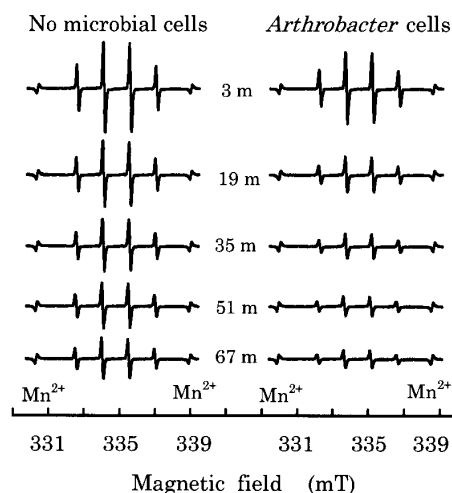


Fig. 2. Effect of *Arthrobacter* cells on DMPO-OH signal in Cu(II)-H₂O₂-DMPO system.

1 mM Cu(II), 100 mM DMPO, 100 mM H₂O₂, and 0.2 mg/ml of *Arthrobacter* cells were mixed.

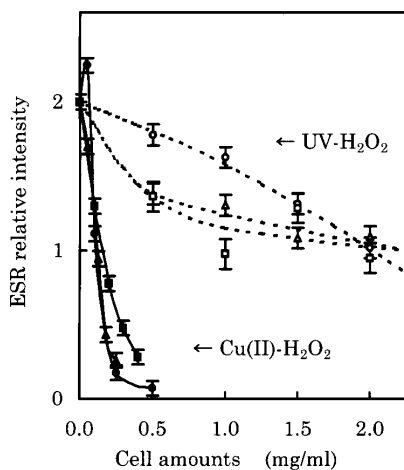


Fig. 3. Effect of microbial cells on DMPO-OH radical generated in Cu(II)-H₂O₂-DMPO and UV-H₂O₂-DMPO systems.

1 mM Cu(II), 100 mM DMPO, 100 mM H₂O₂, and 0 - 0.5 mg/ml of microbial cells were mixed. 10 mM DMPO, 10 mM H₂O₂, and 0 - 2 mg/ml of microbial cells were mixed and UV was irradiated. ●(Cu), ○(UV) *Arthrobacter*; ▲(Cu), △(UV) *Bacillus*; ■(Cu), □(UV) *Micrococcus*.

Table 2. Effect on hydroxy radical generated in Cu(II)-H₂O₂-DMPO and UV-H₂O₂-DMPO systems and copper biosorption by microbial cells.

Species	ID ₅₀ (mg/ml)		Cu sorbed (μmol/g)*
	Cu(II)	UV	
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	0.13	2.1	603
<i>Bacillus subtilis</i>	0.11	2.3	327
<i>Citrobacter freundii</i>	0.31	2.3	212
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1.2	5~6	98
<i>Escherichia coli</i>	0.27	1.7	287
<i>Micrococcus luteus</i>	0.15	2.5	529
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.17	2~3	361
<i>Zooglea ramigera</i>	0.18	2~4	362
Egg albumin	0.06	0.75	-----

Cu(II) (1 mM), microbial cells (0~2 mg/ml), DMPO (25 mM), and H₂O₂ (25 mM) were mixed, and the ESR spectrum of the mixture was measured. ID₅₀ (mg/ml) indicates the cell concentration when the ESR signal intensity of DMPO-OH is the half of that for no-microbial cells. *: see ref. 4.

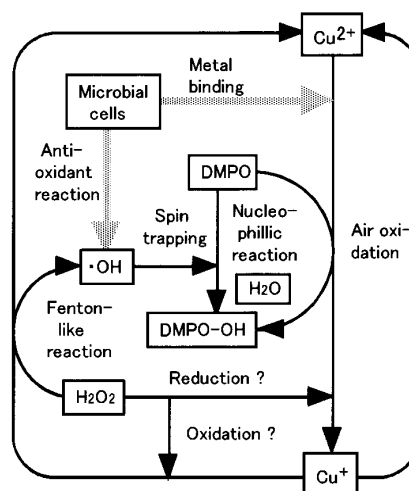


Fig. 4. Behavior of microbial cells in Cu(II)-H₂O₂-DMPO system.

謝辞

本研究は、科学研究費 基盤(B)(2), 基盤(C)(2), 日本原子力研究所 黎明研究の助成を得て行いました。関係の方々に深く感謝いたします。

文献

1. Yim, M. B., Chock, P. B., Stadtman, E. R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87 (1990) 5006-5010.
2. 小沢俊彦, 上田順市, 湯川修身, 藤原裕美子, 宮崎真紀子, 松島美一 : 磁気共鳴と医学 5 (1994) 75-78.
3. Yoshioka, H., Senba, Y., Saito, K., Kimura, T., Hayakawa, F. : Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 65 (2001) 1697-1706.
4. Nakajima, A. : Water Research, Vol. 36 (2002) 2091-2097.
5. Hanna, P. M., Mason, R. P. : Arch. Biochem. Biophys., 295 (1992) 205-213.
6. 「アイソトープ製造 35 年誌」 第 4 章 日本原子力研究所東海研究所アイソトープ部.
7. 中島暉, 植田勇人, 横山秀克, 大矢博昭, 鎌田仁 : 磁気共鳴と医学 11 (2000) 25-28.