

## 〔研究ノート〕

# ペルオキシナイトライトとヒト組換え銅・亜鉛-SOD の 反応における炭酸水素イオンの影響

松本 孝・山倉文幸・池田啓一・川崎広明

The Effect of Bicarbonate Ion on the Reaction of Peroxynitrite with  
Human Recombinant Cu,Zn-Superoxide Dismutase

Takashi MATSUMOTO, Fumiyuki YAMAKURA,  
Keiichi IKEDA and Hiroaki KAWASAKI

Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ , PON), a potent oxidizing and nitrating species, rapidly reacts with bicarbonate to form  $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$  adduct which can also participate in the oxidation and nitration processes, thus redirecting the primary reactivity of PON. Bicarbonate significantly enhanced PON-mediated nitration of aromatic residues of amino acids, but it partially inhibited the oxidation of thiol residues of enzymes<sup>1)</sup>.

In the present study, we investigated the effect of bicarbonate on the reaction of PON and purified human recombinant Cu,Zn-SOD. In the presence of 25 mM bicarbonate, the enzyme activity of 2.3 mM PON-treated Cu,Zn-SOD was reduced to 75%, whereas the enzyme activity remained at 94% in its absence. At pH 6, the intensity of fluorescence emission of PON-treated Cu,Zn-SOD at 350 nm decrease remarkably in the presence of 25 mM bicarbonate, but at pH 7, 8 and 9, the intensity of the fluorescence emission decreased, similarly independent of the presence or absence of bicarbonate. The absorption spectra of those enzymes treated with 2.3 mM PON at pH 7.4 with or without bicarbonate showed almost the same visible spectra.

We concluded that in the presence of 2.3 mM PON at pH 7.4, bicarbonate has no significant effect for the modification of tryptophan residue in human Cu,Zn-SOD. However, PON may inactivate the enzyme by modifying a certain amino acid residue(s).

*Key words:* Cu,Zn-SOD (銅・亜鉛-SOD), peroxynitrite (過酸化亜硝酸), bicarbonate ion (炭酸水素イオン)

## 1. 緒 言

ペルオキシナイトライト (PON) は一酸化窒素 (NO) とスーパーオキシドラジカル ( $\text{O}_2^-$ ) が反応して生じる酸化・ニトロ化作用の強い物質で、酵素の不活性化や脂質の過酸化に関わっていることが知られている<sup>2)~4)</sup>。

NO や  $\text{O}_2^-$  は本来、生体内で生産され、生命維持や生理作用上、重要な役割を演じているが、一方で

$\text{O}_2^-$  は活性酸素種として老化や癌化にも関連している。恒常的にあるいは誘導的に生じた NO が、 $\text{O}_2^-$  と共存すると、 $\text{O}_2^-$  より更に反応性の高い PON を生じ、生体分子の酸化、過酸化やニトロ化の促進を引き起こす。この酸化、ニトロ化反応で、生体内に存在する濃度の炭酸水素イオンにより PON がニトロソペルオキシカーボネイトイオン ( $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$ ) に変化し、PON 単独の時とは異なりニトロ化の促進はみられるが、チオール酸化抑制を引き起こ

す<sup>1)</sup>といわれている。

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は生体内で発生した  $O_2^-$  の酸化作用を防ぐ抗酸化酵素で、ヒトには3種類のアイソザイムがある。そのひとつであるマンガンを含む SOD (Mn-SOD) は PON により失活することが報告されている<sup>4)~6)</sup>。一方、銅と亜鉛を含む SOD (Cu,Zn-SOD) も Mn-SOD ほど顕著ではないが PON 処理によりその酵素活性が阻害される報告がなされている<sup>7)~8)</sup>が、PON 単独あるいは炭酸水素イオン存在下での酸化、ニトロ化反応に関する影響の研究は十分ではない。

そこで今回は炭酸水素イオン存在下および非存在下での Cu,Zn-SOD に対する PON の影響について検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 試薬と試料

ペルオキシナイトライト溶液は (株) 同仁化学研究所製、ウシミルクのキサントキシダーゼとウマ心臓のシトクローム *c* は和光純薬工業 (株) 製、大腸菌に発現させたヒト組換え Cu,Zn-SOD は高純度に精製したものを日本化薬 (株) から供与を受け、そこに含まれる3つのアイソマーのうち最も塩基性の等電点 ( $pI=5.14$ ) をもつアイソマーを分離・精製し試料タンパク質とした<sup>8)</sup>。その他の試薬は市販の高純度のものを用いた。

### 2-2. 分析方法

炭酸水素イオンの存在、非存在下での試料の PON 処理は既報の方法<sup>8)</sup>で、特に断りのない限り PON の最終濃度が 2.3 mM になるよう添加し反応させた。SOD の酵素活性測定法は McCord & Fridovich の方法<sup>9)</sup>に従い測定した。吸収スペクトルは日立 U-3210 型自記分光光度計、蛍光強度は励起光波長を 290 nm、蛍光波長を 350 nm に設定し日立 650-60 型分光蛍光光度計を用いて測定した。試料中の金属分析は日立 Z-9000 型原子吸光光度計で測定した。

## 3. 結果と考察

### 3-1. 酵素活性と金属含有量

pH 7.4 での炭酸水素イオンの PON 処理における影響を確認するために、炭酸水素イオンの存在、非存在下での PON 処理酵素の比活性とそれぞれの試料の金属含有量 (表-1) を比較した。金属の含有量はヒト Cu,Zn-SOD の分子量を 15,805 ダルトンとして計算したものである。PON 処理酵素の比活性はいずれの場合にも Native 酵素の比活性より低下傾向を示しており、炭酸水素イオンを共存させて酵素の PON 処理をした場合は活性が 80% に低下していた。一方、酵素活性の発現に必須の金属、PON 処理酵素中の Cu および Zn の含有量は Native 酵素とほとんど差が認められなかった。この金属含有量を基に各比活性を Cu 1 g-atom あたりに換算しなおすと、Native 酵素では 3940 U/Cu、炭酸水素イオンが存在しない状態で PON 処理した酵素では 3690 U/Cu (93.7%)、炭酸水素イオンが存在する状態で PON 処理した酵素では 2970 U/Cu (75.4%) であった。

表-1 PON 処理酵素の比活性および金属含有量

	比活性 (U/mg)	Cu 含有量 (g-atom/mol)	Zn 含有量 (g-atom/mol)
Native Cu,Zn-SOD	3260±392	0.829±0.057	0.736±0.021
PON-treated SOD (- (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ))	3060±267	0.889±0.011	0.678±0.000
PON-treated SOD (+ (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ))	2620±135	0.883±0.022	0.768±0.039

### 3-2. 蛍光強度の変化

試料 (0.87 mg protein/ml) を各 pH の 0.1 mM ジエチレントリアミン五酢酸を含む 0.15 M リン酸カリウム緩衝液中に 25 mM 炭酸水素イオン存在、非存在下で調製し、最終濃度 2.5 mM になるように 0.5 mM 分の PON を 5 回に分けて添加 (PON 処理) した。添加後の各溶液の蛍光強度を図-1 に示した。なお、この強度比較は PON の分解産物による蛍光強度の消光を考慮し、酵素のみ無添加の状態と同様に PON 処理し、最後に酵素を添加したもの (Control) の蛍光強度を 100% として各試料溶液の

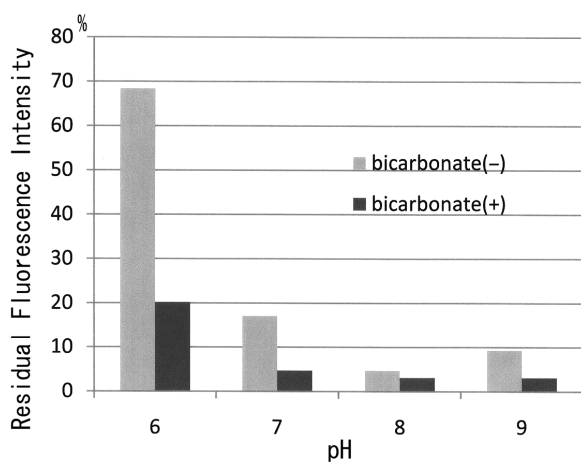


図-1 2.5 mM PON 処理による試料の残存蛍光強度

残存蛍光強度を示した。

図-1 から判るとおり、蛍光強度の消失割合は試料溶液の pH に依存し、炭酸水素イオンの存在による効果は pH 6 の場合、存在しない残存蛍光強度 68% から 20% に顕著に減少した。炭酸水素イオンの存在の有無にかかわらず pH=8 での消失割合が最も大きかった。2.5 mM PON 処理が pH=8 で行われた場合は炭酸水素イオンの存在、非存在にかかわらず、どちらもほとんど蛍光の 95% 以上を消失した。一方、炭酸水素イオンが存在する状態での蛍光強度の消失は、どの pH においても炭酸水素イオンが存在しない場合と比較して消失割合の増加を示したが、pH 7.0 以上の pH ではいずれもほとんどの蛍光が消失した。蛍光強度の減少は、Cu,Zn-SOD 中に存在する唯一のトリプトファン残基のニトロ化や酸化の程度を反映するものと推測されるので、pH 7.4 の生理的条件下で炭酸水素イオンの存在、非存在が PON 処理に及ぼす影響の有無を、各試料の可視紫外吸収スペクトルの比較で調べた。

### 3-3. PON 処理酵素の吸収スペクトル

既報の方法<sup>8)</sup>に従い 150 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で PON 処理後、10 mM リン酸カリウム緩衝液に透析した酵素溶液 (pH 7.4) の吸収スペクトルを図-2 に示した。PON 処理された酵素はともに 300 nm から 450 nm の範囲で吸光度の増加が認められ、酵素中に存在する唯一のトリプトファ

ン残基が 6-ニトロトリプトファンに変化しているものと考えられる。しかし、炭酸水素イオンの存在の有無にかかわらず吸収スペクトルからのニトロ化の程度はほとんど差が認められなかった。このことは弱塩基性条件下で残存蛍光強度が炭酸水素イオンの存在の有無にかかわらずほとんど消失している結果と一致している。ヒト Cu,Zn-SOD はそのアミノ酸組成からチロシン残基は含まず、また炭酸水素イオン存在下で PON 処理した試料のアミノ酸分析の結果<sup>8)</sup>からは、トリプトファン残基が顕著に減少しているほか、4 残基あるシステインおよび 8 残基あるヒスチジンが僅かに減少しているため、炭酸水素イオン存在下での PON 処理酵素の活性低下は、 $\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$  アダクト生成によるこれらアミノ酸残基の酸化修飾による可能性もある。以上のことから、今回のヒト組換え Cu,Zn-SOD を異なる条件下で PON 処理した酵素活性の違いは PON 処理における炭酸水素イオンの存在の有無が、酸化・ニトロ化機構を変化させ、酵素の活性の発現機構に異なる影響を与えているものと考えられる。その分子的な機構を明確にするためには、今後、各修飾酵素の LC-MS-MS などによる構造解析を進める必要がある。

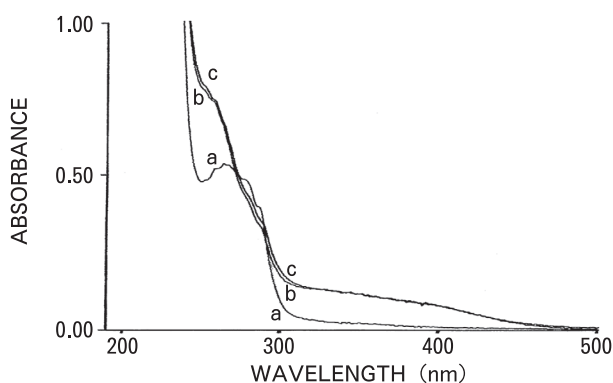


図-2 PON 未処理および処理酵素の吸収スペクトル

Cu,Zn-SOD は  $\text{HCO}_3^-$  非存在下および存在下で既報の方法 (pH 7.4) に従い最終的に 2.3 mM PON 処理を行った後、10 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4 に透析した。吸収スペクトルはいずれもタンパク質濃度を 1 mg/ml に換算して示した。

a: PON 未処理酵素, b:  $\text{HCO}_3^-$  非存在下での PON 処理酵素, c:  $\text{HCO}_3^-$  存在下での PON 処理酵素

#### 4. 要 約

PON は生体内で非酵素的に生成される、酸化・ニトロ化作用の強い物質であるが、炭酸水素イオンの存在により、アダクトを形成しその作用が芳香族アミノ酸残基のニトロ化を増強するといわれている。そこで、炭酸水素イオンの有無がSODのPON処理に及ぼす影響について検討した。

PONとCu,Zn-SODの反応における炭酸水素イオン存在の有無の影響は、生体内に近いpH7.4の条件下では酵素活性の不活性化機構に影響を与えるが、PON処理酵素の残存蛍光強度と吸収スペクトルからは大きな違いはみられなかった。以上の結果から炭酸水素イオンの有無による2.3 mM PON処理(pH7.4)による残存酵素活性の差はCu,Zn-SODに存在するトリプトファン残基の修飾の差による影響より、酵素中の他のアミノ酸の修飾の差によるものと推定される。

#### 参考文献

- 1) Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., & Radi, R., "Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations" *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 49-58 (1996)
- 2) 小中隆盛, 加柴美里, 井上正康 "Peroxynitriteの生物化学" *生化学*, **70**, 84-95 (1998)
- 3) 谷口直之, 鈴木敬一郎編 "NOの生理作用と疾患" 羊土社 (2001)
- 4) Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., Murayama, K., "Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine" *J. Biol. Chem.*, **273**, 14085-14089 (1998)
- 5) MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Thompson, J. A., "Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues." *Biochemistry*, **37**, 1613-1622 (1998)
- 6) Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., Beckman, J. S., "Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by

*superoxide dismutase*" *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 431-437 (1992)

- 7) Smith, C. D., Carson, M., van der Woerd, M., Chen, J., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S., "Crystal structure of peroxynitrite-modified bovine Cu,Zn superoxide dismutase" *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 350-355 (1992)
- 8) Yamakura, F., Matsumoto, T., Fujimura, T., Taka, H., Murayama, K., Imai, T., Uchida, K., "Modification of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxynitrite in the presence of bicarbonate" *Biochim. Biophys. Acta*, **1548**, 38-46 (2001)
- 9) McCord, J. M., and Fridovich, I., "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein" *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969)

(まつもと たかし 管理栄養学科)  
(やまくら ふみゆき 順天堂大学医療看護学部)  
(いけだ けいいち 順天堂大学スポーツ健康科学部)  
(かわさき ひろあき 順天堂大学環境医学研究所)