

肝組織に対する酸化ストレスの影響：銅または鉄イオンと過酸化水素からのフリーラジカルによる肝クロマチンの損傷

田 和 理 市, 桜 井 弘

(京都薬科大学・代謝分析学教室)

Oxidative Stress on Liver Tissue: Damage in Liver Chromatin by Oxygen Free Radicals Generated from Reaction of Hydrogen Peroxide with Copper or Iron Ions

Riichi Tawa and Hiromu Sakurai

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

We examined the susceptibility of liver chromatin of mice at prenatally 16-days (fetus) and postnatally 19~23-weeks (adult) for hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$). DNA strand breakages in both fetal and adult liver nuclei by $\text{Cu(II)}-\text{H}_2\text{O}_2$ system were shown to be more extensive than that by $\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}_2$ system under the same experimental conditions. DNA damage in nuclei also showed higher rate and extent in fetal liver than that of adult, especially for oxidation by $\text{Cu(II)}-\text{H}_2\text{O}_2$ system. The reduced glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC) and ascorbic acid (ASC) showed the promotive effects on DNA damages by $\cdot\text{OH}$, whereas cysteine (CYS) showed the antioxidative effect. In fetal liver, 5-methylcytosine (5mC) contents in chromatin were less than that of adult, suggesting the active chromatin structure in fetal liver nuclei. The increase of DNA damage by $\cdot\text{OH}$ in fetal liver nuclei which accompanied the expansion of chromatin, indicated the importance of chromatin compaction for the oxygen free radical injury. The results also suggested that Cu(II) and Fe(III) ions act at different nuclei loci, and that Cu(II) ion binds to unmethylated sites on DNA constructing the nuclear matrix.

生体の代謝過程において、細胞内に過酸化水素 (H_2O_2) やスーパーオキシドラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$), さらに反応性にとむヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) などの活性酸素種が生成することが知られている¹⁻²⁾。これらの活性酸素種は、主として細胞内の核内DNAを攻撃して損傷する³⁾。真核生物のクロマチン構造は均一な状態になく、種々のコンフォメーションを持っている。“ほぐれた”状態、すなわち、ヒストンタンパク質から乖離したDNAをもつクロマチンは、活性酸素種、なかでも $\cdot\text{OH}$ による攻撃を受けやすい。特に、クロマチンの転写活性領域やDNA複製領域は、 $\cdot\text{OH}$ により強く損傷を受ける⁴⁾。最近、

ほ乳動物の胎仔晩期～出生期における酸素ストレスが、細胞内 DNA を損傷することが報告された⁵⁾。もともと細胞内には抗酸化システムが備わっているが、この時期のスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼあるいはグルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化作用に働く酵素の活性はインバランス状態にあり、細胞内に H_2O_2 が蓄積しやすいと言われている。しかし、生体はこれらの活性酸素による組織の DNA 損傷にうまく対処しうる防御メカニズムを持っていると考えられるが、詳細は不明である。

本研究では、核内金属である銅および鉄に着目して、これらの金属イオンを介して Fenton 反応により H_2O_2 から生じる $\cdot OH$ による組織の損傷について、マウスの肝クロマチンを用いて検討した。また、 $\cdot OH$ によるクロマチン損傷に対する細胞内還元物質の影響および DNA のメチル化との関連性について考察した。

実験方法

C57BL/6N マウスの胎仔 (16日齢) とアダルト (雌) (19～23週齢) の肝組織から核を単離した。10mM リン酸緩衝液 (pH7.4) において、核 ($120 \mu g$ DNA) に $25 \mu g$ の $Cu(II)$ あるいは $Fe(III)$ イオンと $2.8mM H_2O_2$ を加えて $37^\circ C$ 、1 時間反応し、核 DNA をフェノール抽出法により単離した。 $\cdot OH$ による核の損傷を DNA のアガロースゲル電気泳動法により解析した。核から単離した DNA に種々の濃度の還元型 (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG)、システイン (CYS)、N-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (ASC) および核抽出液を添加したものの $\cdot OH$ による DNA 切断についても、同様に解析した。クロマチンを MN アーゼ (Micrococcal nuclease) により分画し、各画分の DNA を熱変性後、ヌクレアーゼ P1 による消化とアルカリホスファターゼによる脱リン酸によりヌクレオシドに加水分解した後、 $5mC$ を HPLC 法により測定した。

結果と考察

$\cdot O_2^-$ と H_2O_2 の細胞毒性は、Fenton 反応から産生される $\cdot OH$ に基づくことが知られている⁶⁻⁸⁾。 $Fe(III)$ イオンおよび $Cu(II)$ イオンは、Fenton 反応を介して $\cdot O_2^-$ と H_2O_2 から $\cdot OH$ を生成する。胎仔およびアダルトのマウス肝クロマチンの $\cdot OH$ に対する感受性を比較するために、 $25 \mu M Cu(II)$ イオンまたは $25 \mu M Fe(III)$ イオン存在下で核を $2.8mM H_2O_2$ と $10mM$ リン酸緩衝液 (pH7.4) 中で $37^\circ C$ 、1 時間反応したのち DNA を抽出して、アガロースゲル電気泳動法により解析した。Fig. 1 に示されるように、胎仔マウスの肝クロマチンは、アダルトのものよりも $\cdot OH$ による損傷が大きかった。特に、 $Cu(II)/H_2O_2$ 系による DNA 損傷が $Fe(III)/H_2O_2$ 系よりも強く見られた⁹⁻¹¹⁾。また、 $100 \mu M$ の ASC は、 $Cu(II)/H_2O_2$ 系による胎仔核の損傷を僅かながら抑制したが、 $Fe(III)/H_2O_2$ 系では、逆に損傷が増強された。このことは、Dizdaroglu 等が、ラットの肝クロマチンを ASC 共存下で $Fe(III)/H_2O_2$ 系で処理した場合に、 $\cdot OH$ による修飾塩基の生成が増強されることを観察した結果と一致する¹²⁾。また、 $\cdot OH$ に対するスカベンジャーとしての $100 \mu M$ DMSO は、 $Fe(III)/H_2O_2$ 系による損傷に対して抑制を示したが、 $Cu(II)/H_2O_2$ 系に対しては示さなかった。これは、 $Cu(II)$ イオンがクロマチンタンパク質と結合することにより、DNA の近傍で $\cdot OH$ が生成すると同時にすみやかに DNA と反応してしまうことによるものと考

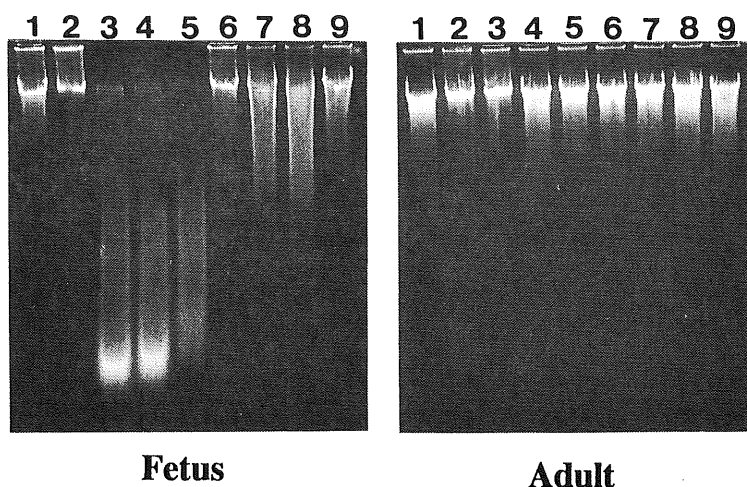


Fig. 1 Electrophoretic mobility of $\cdot\text{OH}$ -induced DNA fragments in isolated liver nuclei of fetal (16-days) and adult mice (19~23-weeks).

1: No treatment; 2: $25\ \mu\text{M}$ Cu (II); 3: $25\ \mu\text{M}$ Cu (II) + 2.8mM H_2O_2 ; 4: $25\ \mu\text{M}$ Cu (II) + 2.8mM H_2O_2 + $100\ \mu\text{M}$ ascorbic acid; 5: $25\ \mu\text{M}$ Cu (II) + 2.8mM H_2O_2 + $100\ \mu\text{M}$ ascorbic acid + $100\ \mu\text{M}$ DMSO; 6: $25\ \mu\text{M}$ Fe (III); 7: $25\ \mu\text{M}$ Fe (III) + 2.8mM H_2O_2 ; 8: $25\ \mu\text{M}$ Fe (III) + 2.8mM H_2O_2 + $100\ \mu\text{M}$ ascorbic acid; 9: $25\ \mu\text{M}$ Fe (III) + 2.8mM H_2O_2 + $100\ \mu\text{M}$ ascorbic acid + $100\ \mu\text{M}$ DMSO.

Nuclei ($120\ \mu\text{g}$ DNA) were reacted in 10mM phosphate buffer ($\text{pH}7.4$) at 37°C for 1 h.

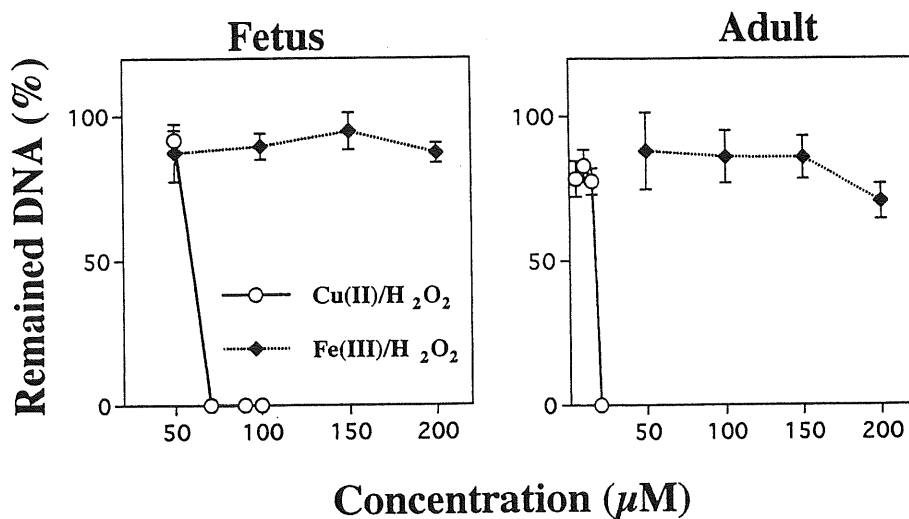


Fig. 2 Concentration effect of Cu (II) and Fe (III) ions on double-strand breaks in native liver DNA of fetal and adult mice.

Native DNA ($0.25\ \mu\text{g}$) was reacted with Cu (II) or Fe (III) ion in the presence of 1mM H_2O_2 in 50mM phosphate buffer ($\text{pH}7.4$) at 37°C for 1 h.

えられる¹²⁾。Fig. 2は、胎仔とアダルトの核から単離したDNAをCu(II)/H₂O₂系あるいはFe(III)/H₂O₂系で直接反応させた場合のDNA切断を比較したものである。核の場合とは逆に、胎仔よりもアダルトのDNAの方がCu(II)/H₂O₂系に対して高感受性を示した。

生体は、出生時における高酸素ストレスに対してGSH、GSSG、NACおよびCYSなどの細胞内抗酸化物質によって防御している¹³⁾。胎仔～出生仔～アダルトの成長過程のラットやマウスの肝では、GSH/GSSGの比率が大きく変化することが知られている^{14,15)}。また、HiguchiとMatsukawaは、C6グリオーマ細胞を用いた実験で、GSHが欠乏するとFenton反応を介して生成する・OHにより、DNA切断が生じることを報告している¹⁶⁾。本実験においてもFig. 1で見られた胎仔とアダルトの肝組織核のCu(II)イオンとFe(III)イオンによるクロマチン損傷の違いが、胎仔とアダルトの肝細胞内のGSH、NACおよびCYSなどのSH化合物の濃度の違いに基づくものなのかどうか、DNAに種々の濃度を添加して電気泳動法によりDNA切断を見た(Fig. 3)。GSH、NACおよびCYSは、胎仔、アダルトのいずれの核に対しても酸化促進的に働き、特にアダルトのCu(II)/H₂O₂系による反応に対して顕著であった。しかし、全体的に見れば、胎仔とアダルト、あるいはCu(II)/H₂O₂系とFe(III)/H₂O₂系において大きな相違は見られない。一方、ASCの添加によるDNA切断の促進作用は、いずれの場合も大きかった。

DNAのGC配列のシトシンのメチル化は、クロマチン構造に局所的な変化を与えることによりDNA

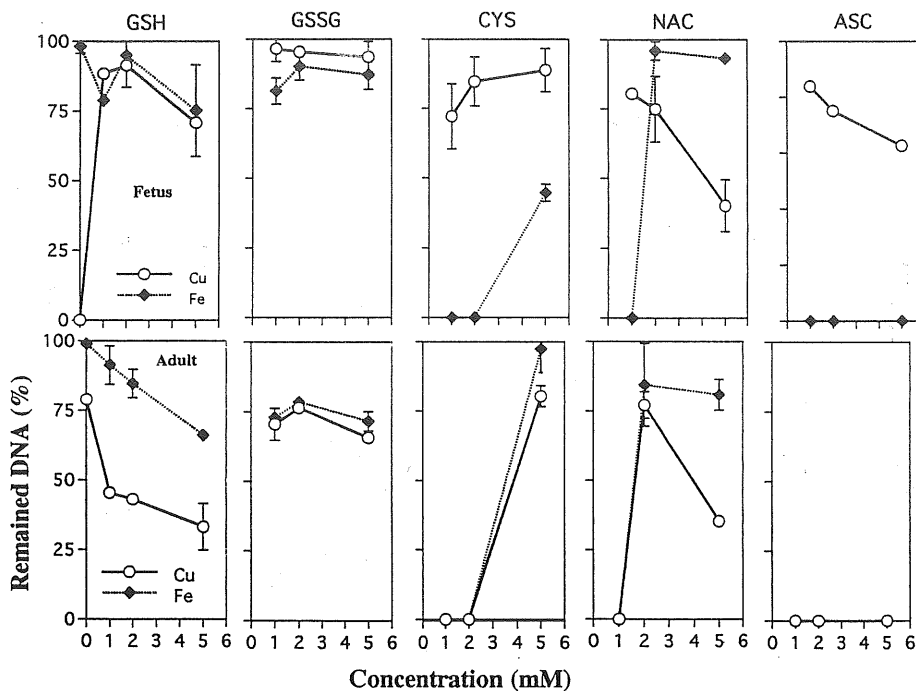


Fig. 3 Antioxidative effects of the reducing agents on $\cdot\text{OH}$ -induced double strand breaks in liver DNA of mice.

Native DNA ($0.25\ \mu\text{g}$) was reacted with $50\ \mu\text{M}$ of Cu (II) or Fe (III) ion in the presence of 1mM H₂O₂ in 50mM phosphate buffer (pH7.4) at 37°C for 1 h.

と核タンパク質との相互作用を変化して、遺伝子を転写不活性な構造にする。以前に、我々はマウスの胎仔晩期における肝組織の DNA の 5mC は14~16日齢において低メチル化状態を示し、その後出生~アダルトの過程において増加傾向を示すことを見出した^{17,18)}。胎仔とアダルトの肝組織から単離した核を、MN アーゼにより DNA のクロマチン部分からのほぐれの大きい (転写活性; S1) 画分、クロマチンに強く巻付いた (転写不活性; P) 画分およびその中間状態 (S2) 画分に分離し、各画分中の DNA の 5mC を測定した。Fig. 4 から明らかなように、いずれの画分においても胎仔の肝組織の方が 5mC 量の有意に低下していた。

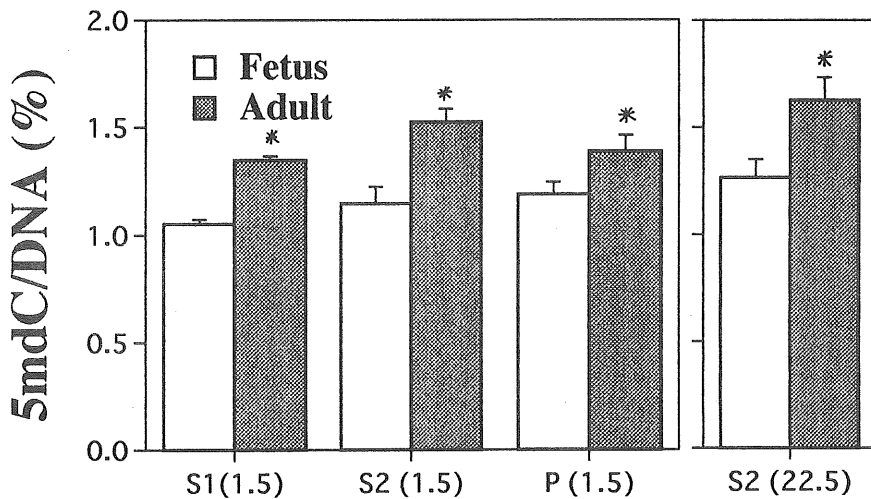


Fig. 4 5mC contents of DNA in liver nuclei fractions digested with MNase digestion. Liver nuclei were digested with 1.5 and 22.5 units/100 μ g DNA of MNase at 15°C for 15 min and fractionated by centrifugation. After treatment with nuclease P1 and alkaline phosphatase, 5mC was measured by HPLC¹⁷⁾. The results are expressed as mole% change to the total DNA. *: $p < 0.001$ significant different from the fetal DNA.

以上の実験結果から、次のように結論した。(1) Cu(II) イオンおよび Fe(III) イオンはクロマチンに対する親和性が異なること、従って(2) これらの金属イオンによる Fenton 反応から生成した $\cdot$ OH による損傷の部位特異性に違いのあること、(3) 核 (クロマチン) 内の DNA は Cu(II)/H₂O₂ 系からの $\cdot$ OH との反応において単離した DNA とは異なった性質を示すこと、(4) 胎仔とアダルトの肝クロマチンでは DNA のメチル化の違いによる DNA 構造の変化により Cu(II) イオンあるいは Fe(III) イオンとの親和性が大きく影響をうけることが明らかとなった。

文 献

- 1) Byung, P. M. (1993) : Free Radical in Aging, ed. by Byung, P. M., CRC Press, Florida: pp.57-88.
- 2) Painter, R. B. (1980) : Radiation Biology in Cancer Research, ed. by Meyn, R. E. and Whithers, H. R., Raven Press, New York: pp.59-68.

- 3) Ames, B. N. and Shigenaga, M. K. (1993) : DNA and Free Radicals, ed. by Halliwell, B. and Aruoma, O. I., Ellis Horwood, West Sussex: pp.1-18.
- 4) Chiu, S.-M., L.-Y. Xue, L. R. Friedman and N. L. Oleinick (1995) : Biochemistry, 34 : 2653.
- 5) Randerath, E., G.-D. Zhou and K. Randerath (1996) : Carcinogenesis, 17 : 2563.
- 6) Brawn, K. and I. Fridovich (1981) : Arch. Biochem. Biophys. 206 : 414.
- 7) Nassi-Calo, L., A. C. Mello Filho and R. Meneghini (1989) : Carcinogenesis 10 : 1055.
- 8) Halliwell, B. (1987) : FASEB J. 1 : 358.
- 9) Aruoma, O. I., B. Halliwell, E. Gajewski and M. Dizdaroglu (1991) : Biochem. J. 273 : 601.
- 10) Reed, C. J. and K. T. Douglas (1989) : Biochem. Biophys. Res. Commun. 162 : 1111.
- 11) Tachon, P. (1989) : Free Rad. Res. Commun. 7 : 1.
- 12) Dizdaroglu, M., G. Rao, B. Halliwell and E. Gajewski (1991) : Arch. Biochem. Biophys. 285 : 317.
- 13) Sastre, J., M. Asensi, F. Rodrigo, F. V. Pallardo, M. Vento and J. Vina (1994) : Life Sci. 54 : 2055.
- 14) Pallardo, F. V., J. Sastre, M. Asensi, F. Rodrigo, J. M. Estrela and J. Vina (1991) : Biochem. J. 274 : 891.
- 15) Randerath, E., G.-D. Zhou and K. Randerath (1996) : Carcinogenesis 17 : 2563.
- 16) Higuchi, Y. and S. Matsukawa (1998) : Free Rad. Biol. Med. 24 : 418.
- 17) Tawa, R., T. Ono, A. Kurishita, S. Okada and S. Hirose (1990) : Differentiation 45 : 44.
- 18) Tawa, R., G. Tamura, H. Sakurai, T. Ono and A. Kurishita (1994) : J. Chromatogr. B 653 : 211.