

システイン存在下 MgO に固定化した鉄プロトポルフィリンの TEMPOL 還元反応における溶存酸素濃度の影響

野田 博行 (山形大学 学術研究院, hironoda@yz.yamagata-u.ac.jp)

An effect of the concentration of oxygen on the reduction of TEMPOL caused by hydroxo(protoporphyrinato) iron (III) adsorbed on MgO in the presence of cysteine

Hiroyuki Noda (Academic Assembly, Yamagata University, Japan)

要約

本研究では、システイン水溶液中のMgOに固定化した鉄プロトポルフィリン(Heme/MgO/Cys)の4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシド (TEMPOL) 還元反応と系内の酸素濃度との関係について検討した。TEMPOLの3本線の2本目の信号強度を還元反応プローブ、その超微細構造 (hfs) の先鋭化を酸素濃度プローブ、のデュアルプローブとして用いた。その結果、Heme/MgO/CysによるTEMPOLと酸素の還元反応、酸素濃度変化を同時に検出することができた。TEMPOL還元の経時変化では、170 s 付近に変極点がみられた。hfsの先鋭化からTEMPOL還元における変極点付近の酸素濃度は約 $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ であることが明らかとなった。Heme/MgO/Cysを肝臓の解毒酵素であるチトクロームP450による還元反応のモデルとして考えた場合、この濃度は肝細胞内の酸素濃度に近い値であることから、肝細胞内のチトクロームP450によりTEMPOLが還元される反応でも類似の現象が起こっていると考えられる。

キーワード

heme/MgO, reduction of TEMPOL, oxygen concentration, cysteine, oxygen probe

1. 緒言

これまでに著者らは、クロロフィルやヘマトポルフィリンなどの光増感剤が不均一系を形成すると、溶液中のような均一系とは異なり、酸素の多電子還元反応や酵素反応の制御ができること明らかにしてきた (Noda et al., 1994; 1997; 1999)。

ヘマチン (Heme) は第五配位子として水酸基をもつ最も単純な構造の鉄 (III) プロトポルフィリンである。鉄プロトポルフィリンは蛋白質と複合体を形成することにより、赤血球中のヘモグロビンやカタラーゼ、チトクローム類などになり多様な機能を発現する。これらの機能発現に重要な役割を果たしているのは第五、第六配位子と蛋白質複合体形成による反応場の違いである。もし、人工的にヘマチンの反応場が制御できれば多様な機能を一つの分子で発現させることができるので工学的応用の観点から興味深い。そこで、著者らは、ヘマチン (Heme) を酸化粉末に吸着させて固定化すると、溶液中のような均一系とは異なる反応性を示すことを明らかにした (Noda et al., 1999; 2004)。

また、著者は、システイン水溶液中のMgOに固定化したヘマチン (Heme/MgO/Cys) が、亜硝酸還元作用を示し、チオール化学構造により反応性が異なることを明らかにした (Noda, 2019)。

本研究では、Heme/MgO/CysがTEMPOLを還元することに着目し、TEMPOLの超微細構造 (hfs) の先鋭化を酸素濃度プローブとして用い、反応系内の酸素濃度との関係について検討した。

2. 実験

ヘマチン (Heme, 牛血液製)、4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシド (TEMPOL)、特級L-システイン (Cys) 塩酸塩一水和物、MgO (99.9%, $0.01 \mu\text{m}$) は和光純薬製を用いた。これ以外の試薬は市販特級あるいは一級を用いた。

ヘマチンを吸着させたMgO (Heme/MgO) は水に懸濁したMgOに、 1 mmol dm^{-3} ヘマチン水溶液 (アルカリに溶解したヘマチンをリン酸緩衝溶液でpH調整) を滴下、遠心洗浄して調製した。酸素濃度は、没食子酸-MgO系 (没食子酸はアルカリ条件で酸素を消費) を用い没食子酸の濃度を変えることにより制御した。

ESR スペクトルはJEOL製RE-2Xにより、変調幅0.02 mT、室温で測定した。酸素吸収速度は、セントラル科学製クラーク型酸素電極 (オキシグラフ8型) を用いて測定した (Noda et al., 1999)。

3. 結果と考察

3.1 Heme/MgO/Cys の TEMPOL 還元挙動

図1に、Heme/MgO/Cys および Heme/Cys におけるTEMPOLのESR信号の経時変化を示す。Heme/MgO/CysのTEMPOL還元速度は、170 sを境に急速に増大した。これは、Heme/MgO/Cysが酸素還元反応も同時に起こすことから (Noda et al., 1999)、反応系内の酸素濃度低下が影響していると考えられる。一方、Heme/Cysでは還元速度の変化は観測されなかった。図1のHeme/MgO/Cysの結果および既報の結果 (Noda et al., 1999) から、初期段階ではHeme/MgO/Cysは酸素とTEMPOLが同時に反応していると考えられる。以上のことから、反応の進行に伴う溶存酸素濃度の低下と共にTEMPOLの還元反応速度が増大したのと考えられる。

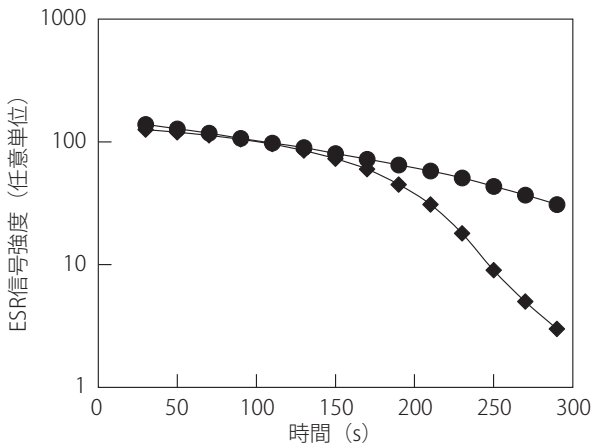


図1：システイン存在下Hemeにより引き起こされるTEMPOLのESR信号強度(h)の経時変化

注：黒丸, Heme/Cys；黒四角, Heme/MgO/Cys; TEMPOL濃度, 0.1 mmol dm^{-3} ; Heme濃度, $45 \mu\text{mol dm}^{-3}$; システイン濃度, 45 mmol dm^{-3} 。

図2は、Heme/MgO/Cysの酸素消費速度のTEMPOL濃度依存性である。TEMPOL濃度 0.1 mmol dm^{-3} まで酸素消費速度が1/2に低下し、これ以上では飽和した。そこで、Heme/MgO/Cys還元挙動はTEMPOL濃度を 0.1 mmol dm^{-3} として検討した。

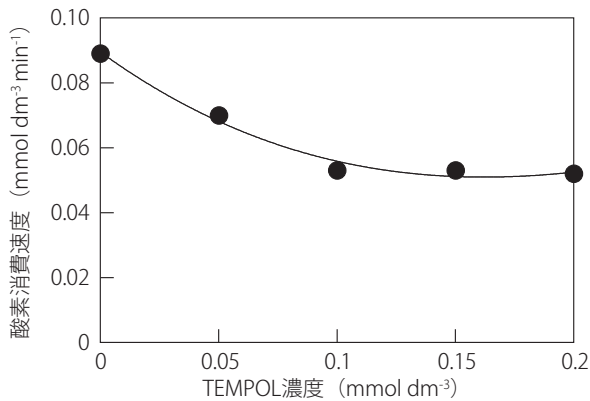


図2：Heme/MgO/Cysの酸素還元反応速度のTEMPOL濃度依存性

注：Heme濃度, $45 \mu\text{mol dm}^{-3}$; TEMPOL濃度, 0.1 mmol dm^{-3} ; システイン濃度, 45 mmol dm^{-3} 。

図3に、対照とTEMPOL濃度 0.1 mmol dm^{-3} における酸素消費速度のLineweaver-Burkプロットを示す。 $1/[S]$ がゼロで2直線が交差していることから、TEMPOLはHeme/MgO/Cys複合体に対し、酸素と競争的に反応する拮抗阻害剤として働くことが明らかとなった。

3.2 Heme/MgO/CysのTEMPOL還元と酸素濃度との関係

図4に、溶存酸素濃度の違いによるTEMPOLのESRスペクトル(三本線の真中)のhfsの変化を示す。この結果から、TEMPOLのhfsは溶存酸素濃度の低下とともに先鋭化することが明らかとなった。

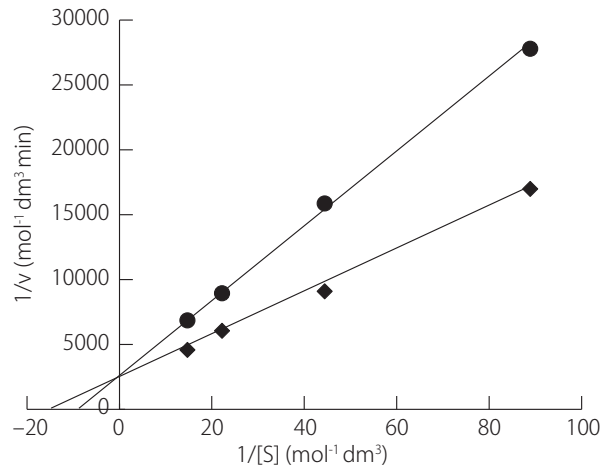


図3：酸素消費速度の逆数(1/v)とシステイン濃度の逆数(1/[S])のLineweaver-Burkプロット

注：黒丸, TEMPOL (0.1 mmol dm^{-3}); 黒四角, 対照。

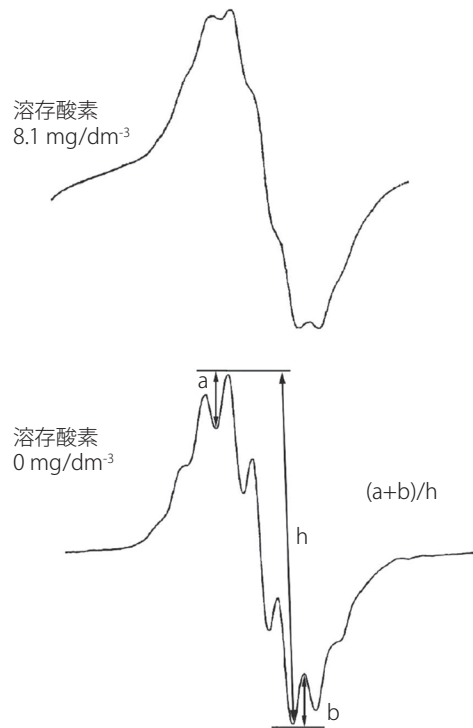


図4：酸素存在下, 非存在下におけるTEMPOLのESRスペクトル

注：TEMPOL濃度, 0.1 mmol dm^{-3} ; 変調幅, 0.02 mT 。

図5に、TEMPOLの信号強度hと溶存酸素濃度の関係を示す。この結果から、酸素濃度の増加とともにTEMPOLの信号強度hは10%ほど低下した。しかし、反応系内が低酸素状態になり信号強度が約10%程度増大しても、対数表示である図1のTEMPOL還元パターンにはほとんど影響を及ぼさないと考えられる。

図4に示した(a+b)/hの値から酸素濃度に対する検量線を求め(Subczynski et al., 1985; Glockner et al., 1989; Hu et al., 1992)、得られた検量線を図6に示す。この結果から、(a+b)/

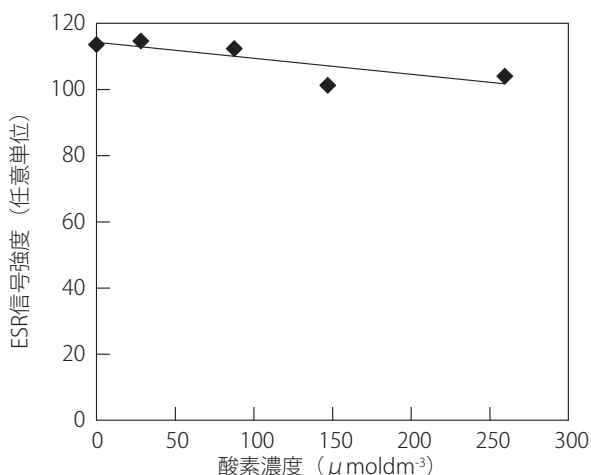


図5：TEMPOLのESR信号強度(h)の酸素濃度依存性
注：TEMPOL濃度, 0.1 mmol dm⁻³。

hの値と溶存酸素濃度の間には直線関係があることが明らかとなった。得られた回帰式 ($y = -1108.4x + 319.36$) を用いて Heme/MgO/Cysの反応系内の溶存酸素濃度を算出した。図1と同一反応における酸素濃度変化を図7に示す。反応系内の酸素濃度は、反応の進行とともに単調に減少した。この結果から、TEMPOL還元における変極点付近(170s)の酸素濃度は約 $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ であることが明らかとなった。この濃度は、肝細胞内の酸素濃度 ($6.4 \mu\text{mol dm}^{-3}$) に近い値である(中野他, 1988)。したがって、Heme/MgO/Cys系をP450による還元反応のモデルとして考えた場合、肝細胞内のP450によりTEMPOLが還元される反応でも類似の現象が起こっていると考えられる。一方、Heme/Cysでは、酸素濃度の変化はみられなかった。したがって、Heme/CysではTEMPOLとのみ反応していると考えられる。この結果は、図1の結果と一致している。

4. 結言

システイン水溶液中のMgOに固定化した鉄プロトポルフィ

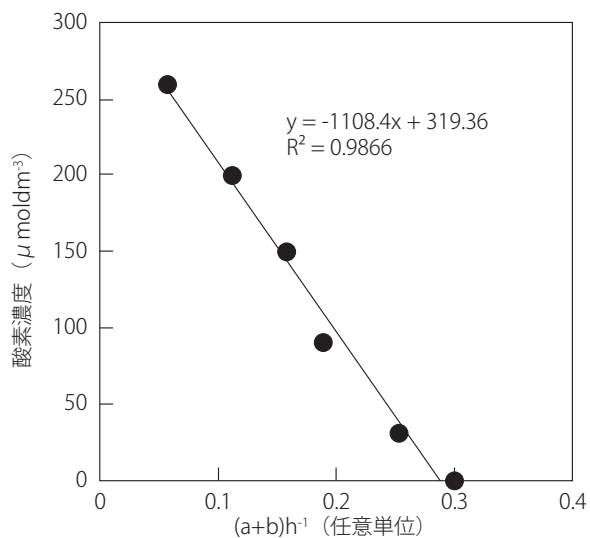


図6：(a+b)/hの値と酸素濃度の関係
注：TEMPOL濃度, 0.1 mmol dm⁻³。

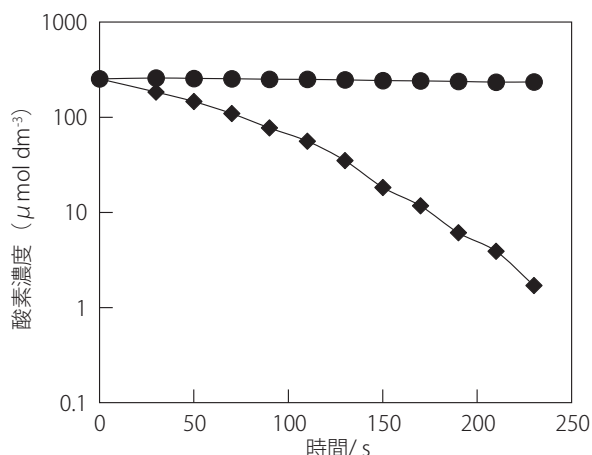


図7：Heme/MgO/CysとTEMPOLの反応における酸素濃度の経時変化

注：黒丸, Heme/Cys；黒四角, Heme/MgO/Cys；TEMPOL濃度, 0.1 mmol dm⁻³；Heme濃度, $45 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ；システイン濃度, 45mmol dm^{-3} 。

リン (Heme/MgO/Cys) の4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシド (TEMPOL) 還元反応と酸素濃度との関係について検討した。TEMPOLを還元反応プローブと酸素濃度プローブのデュアルプローブとして用いた結果、Heme/MgO/CysのTEMPOLと酸素の還元反応と酸素濃度変化を同時に検出することができた。TEMPOLの還元では、170 s付近に変極点がみられた。TEMPOL還元における変極点付近の酸素濃度は約 $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ であることが明らかとなった。この濃度は、肝細胞内の酸素濃度に近い値であることから、Heme/MgO/CysをチトクロームP450による還元反応のモデルとして考えた場合、肝細胞内のチトクロームP450によりTEMPOLが還元される反応でも類似の現象が起こっていると考えられる。

引用文献

- Glockner, J. F., Swartz, H. M., and Pals, M. A. (1989). Oxygen gradients in CHO cells: Measurement and characterization by electron spin resonance. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 140, 505-511.
- Hu, H., Sosnovsky, G., and Swartz, H. M. (1992). Simultaneous measurements of the intra- and extra-cellular oxygen concentration in viable cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1112, 161-166.
- 中野稔・浅田浩二・大柳善彦 (1988). 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構—. 共立出版, 203.
- Noda, H., Oikawa, K., Ohya-Nishiguchi, H., and Kamada, H. (1994). Detection of hydroxyl radical from photoexcited chlorophylls on magnesium oxide powder in aqueous media using the ESR spin trapping technique. *Chemistry Letters*, 1949-1952.
- Noda, H., Ohya-Nishiguchi, H., and Kamada, H. (1997). Mechanism for the production and reaction of active-oxygen species from photoexcited hematoporphyrin adsorbed on a

-
- biological heterogeneous system. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 70, 405-412.
- Noda, H., Ohya-Nishiguchi, H., and Kamada, H. (1999). Artificial control of enzyme reactions by the photoexcitation of hematoporphyrin adsorbed on living yeast cells. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 72, 1307-1311.
- Noda, H., Ohya, H., and Kamada, H. (1999). Efficient oxygen consumption by hydroxo (protoporphyrinato)iron(III) adsorbed on magnesium oxide powder in the presence of cysteine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 72, No. 11, 2463-2468.
- Noda, H., Ohya, H., and Kamada, H. (2004). Efficient formation of a nitrosyl(protoporphyrinato)iron(II) complex on magnesium oxide powder. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 77, No. 9, 1635-1638.
- Noda, H. (2019). Conformational effect of thiol-compounds on the formation of a nitrosyl(protoporphyrinato)iron(II) complex adsorbed on a basic oxide of magnesium oxide powder with the nitrite ion. *Studies in Science and Technology*, Vol. 8, 49-52.
- Subczynski, W. K. and Kusumi, A. (1985). Detection of oxygen consumption during very early stages of lipid peroxidation by ESR nitroxide spin probe method. *Biochimica et Biophysica Acta*, 821, 259-263.

(受稿：2020年5月16日 受理：2020年6月1日)