

キサントシン酸化によるルミノールの化学発光

小渕 浩嗣*・岡添 陽子*・秋丸 国広*・枝重 圭祐**
片岡 真一***・小林 純郎****・佐藤 英介*****・内海 耕慥*

(高知医科大学・*生物学教室, **附属動物実験施設, ***泌尿器科学教室,
****新居浜基礎医学研究所, *****日本学術振興会特別研究員)

Luminol Chemiluminescence by Xanthine Oxidation

Hirotsugu KOBUCHI*, Yoko OKAZOE*, Kunihiro AKIMARU*,
Keisuke EDASHIGE**, Shinichi KATAOKA***, Sumio KOBAYASHI****,
Eisuke F. SATO***** and Kozo UTSUMI*

*Department of Medical Biology, **Institute for Experimental Animals and ***Department of Urology, Kochi Medical School, Kochi 783, Japan, ****Niihama Medical Research Institute, Niihama 792, Japan and *****JSPS Fellowships for Japanese Junior

Abstract. Since reactive oxygen species have been postulated to underlie the pathogenesis of various diseases, measurement of luminol chemiluminescence (LCL) has recently been used to quantitate active oxygen production. However, the precise mechanism of LCL and active oxygen species which react with luminol have not been elucidated. Oxidation of xanthine by xanthine oxidase (X-XO system) is one of the main superoxide generating reactions *in vivo*, in which the superoxide is changed to several reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide, hypochlorite, singlet oxygen and hydroxy radicals by enzymatic or nonenzymatic reactions.

In this experiment, we clarified the fact that LCL by X-XO system is mainly dependent on uric acid-inhibitable hydroxy radicals which are produced from superoxide radicals and hydrogen peroxide by chemical reaction.

緒 言

多くの生物は常に大気中の酸素を呼吸し、その酸素によって色々な酸化還元反応を営み、エネルギー獲得をはじめ多くの重要な働きを行っている。しかし、同時にこれらの反応過程にお

いて酸素を1電子還元したスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)¹⁾を生成し、それが初期反応となり酵素的、あるいは非酵素的反応により H_2O_2 , OCI^- , $\cdot OH$, 1O_2 等の他の反応性に富む活性酸素を生成する²⁾。それらの活性酸素の生体に及ぼす影響は大きく、通常は生体防護をはじめ代謝調節に心要な役割を果たすが、時として疾患の原因ともなる³⁾。この $O_2^{\cdot-}$ 生成反応の内、好中球の NADPH oxidase による生成⁴⁾や、色々な組織におけるキサンチン (X) -キサンチン酸化酵素 (XO) による $O_2^{\cdot-}$ 生成⁵⁾は生体内で最も広く認められる反応として注目されている。したがって、これらに関する研究は膨大な数にのぼり、かなり詳細に解析が進められてきた。そして、活性酸素が種々の疾患の原因となることを証明する事実が次々と報告され、その疾患との関係が詳しく解析されている³⁾。なかでもルミノールによる化学発光 (LCL)⁶⁾は、測定方法が比較的容易である事と、その化学発光 (CL) が色々な活性酸素分子種を反映することから、LCL は好んで使用されている。しかし、この CL がどの分子種の活性酸素を反映しているかについての研究は必ずしも十分でなく、その詳細な解析が待たれている。このような理由から、本研究では $O_2^{\cdot-}$ 生成反応としてよく研究され、しかも比較的単純な系である XO による X 酸化系 (X-XO 系) により、この LCL について、特にその活性酸素分子種との関係を中心に解析を試みた。

材料と方法

1. シトクローム c (Cyt. c), 尿酸 (UA), スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) はシグマ社のものを、またキサンチン酸化酵素 (XO) はベーリンガー社のものを使用した。カゼインはコダック社のニュートロース (nutrose) を、またルミノールをはじめ他の試薬はナカライテスク株式会社の特級試薬を使用した。
2. 酸素消費：反応液の溶存酸素はクラーク型オキシメーターによりセミクロード系の反応槽において $37^\circ C$ にて連続的に測定した。
3. $O_2^{\cdot-}$ 生成： $37^\circ C$ における SOD で阻害される Cyt. c 還元量より連続的に測定した⁷⁾。
4. LCL： $37^\circ C$ にて反応液に $20-100 \mu M$ ルミノールを添加し、マグネティックスターラーで攪拌しながら Ca^{++} analyzer (Jasco CAF-100, Aequorin モード) にて連続的に測定した^{2,6)}。
5. 反応液は主として $1 \text{ mM } CaCl_2$, 10 mM グルコースを含むクレブス-リンガー-ホスフェート緩衝液 (KRP) を、また必要に応じて 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 液を使用した。
6. 好中球：モルモット腹腔内に、生理的食塩水に溶解した体重の $1/10$ 量の 2% カゼインを投与し、16時間後腹腔より浸出液を採取し、KRP にて2回洗滌して実験に供した²⁾。

結果と考察

1. X-XO 反応による LCL と $O_2^{\cdot-}$ 生成および酸素消費

$37^\circ C$ の KRP 溶液中 XO による X の酸化に伴い、 $O_2^{\cdot-}$ が生成される。この反応は、図 1 に示す

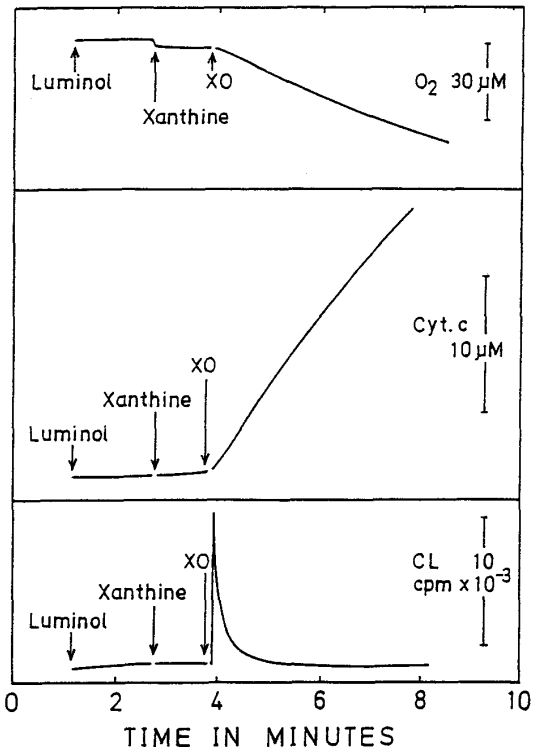


Fig.1. Oxygen uptake, superoxide generation and luminol chemiluminescence of xanthine-xanthine oxidase system.

Oxidation of xanthine (X) by xanthine oxidase (XO) was carried out in KRP solution (pH 7.4) containing 100 μ M luminol, 40 μ M cytochrome c (Cyt. c), and 0.2 mM X at 37°C. The reaction was started by addition of XO (25 unit/ml). Superoxide generation was detected by the rate of Cyt. c reduction, and oxygen consumption was measured by oxygen electrode. Luminol chemiluminescence (LCL) was measured by Ca^{++} -analyzer (Jasco CAF-100, Aequorin mode).

ごとく、一定時間内は Cyt. c の還元で示される O_2^- 生成や、それに共役した酸素消費は比較的直線的に進行した (図1)。

しかし LCL は一過性で、反応直後に強い発光が認められた後、急激に消光する。この反応は

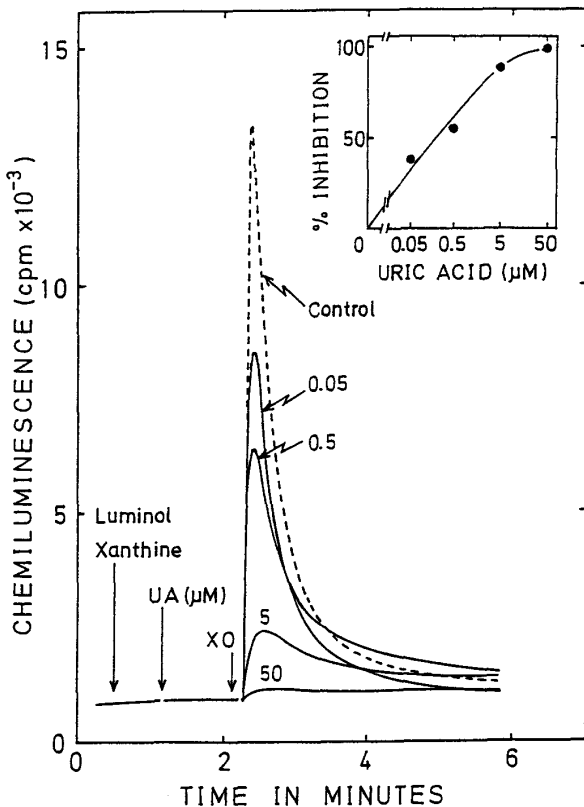


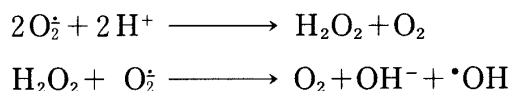
Fig.2. Inhibitory effect of uric acid on X-XO system induced LCL.

The LCL was strongly inhibited by a low concentration of uric acid. All the experimental conditions were the same as described in Fig. 1. The inserted figure shows the dose dependent inhibition of X-XO dependent LCL by uric acid.

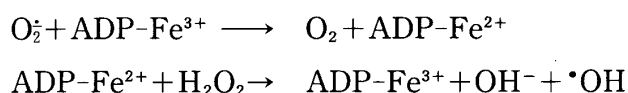
SOD 存在下には全く認められず、 O_2^- 生成に依存した反応であることは明らかであるが、 O_2^- そのものによるものでないことも示唆される。すなわち、 O_2^- の非酵素的ディスミューテーション反応による H_2O_2 や、更にその H_2O_2 と O_2^- との反応による $\cdot OH$ 生成に依存する発光である可能性が大きい²⁾。しかも X 酸化反応に伴い $\cdot OH$ の強いクエンチャーである尿酸⁹⁾が生成されることから、この生成される尿酸によって LCL が速やかに消光される可能性が大きい。この可能性を証明するため、X-XO 系による LCL に対する尿酸、マンニトール、ジメチルスルホキシド (DMSO) の影響について検討した。その結果は図 2 に示すようであり、尿酸の添加によって濃度依存的にこの LCL は消光された。またマンニトールや DMSO によってもこの LCL が阻害された。このことは X-XO 系による LCL が $\cdot OH$ に依存していることをより明らかにしたものと考えられる (図 2)。ここで尿酸は H_2O_2 測定のためのスコポレチンの蛍光変化を阻害し、同じように尿酸が活性酸素による LCL の反応をも阻害している可能性も否定できない。

2. X-XO 系に依存した LCL の Fe^{3+} による増大

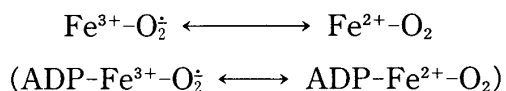
O_2^- 生成に伴うその他の活性酸分子種の生成は色々な反応によると考えられている。なかでも X-XO 系に見られる LCL に関与する可能性のある $\cdot OH$ の生成は次の様な反応によると考えられている⁹⁾。すなわち、



または ADP- Fe^{3+} 存在下にはこの反応は次式の様で、より $\cdot OH$ の生成が起りやすいと考えられる。



ここで ADP- Fe^{3+} は O_2^- との反応において



の平衡状態にあり¹²⁾、これらと H_2O_2 との反応による $\cdot OH$ 生成の可能性も考えられている¹³⁾。

しかし、これらの反応は実際には微量の金属例えば Fe^{3+} の存在によって次の式に示されるような、Fenton 型の Haber-Weiss 反応によるものと考えられる様になった。すなわち、最近では殆どの $\cdot OH$ 生成は Fenton 型の Haber-Weiss 反応により鉄イオンのような触媒下でのみ生成の促進のあることが報告されている^{10,11)}。すなわち、

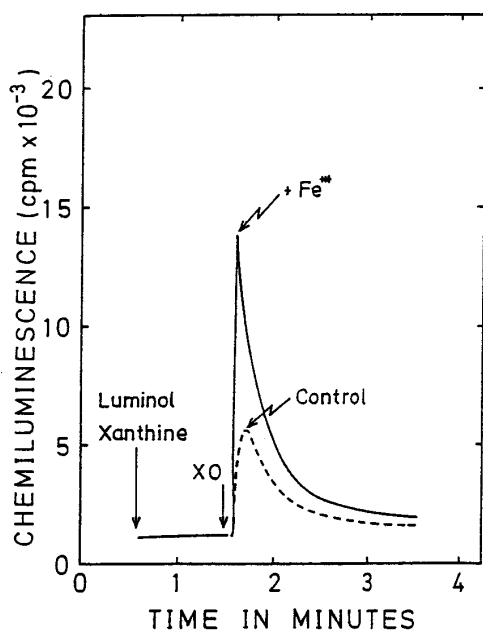
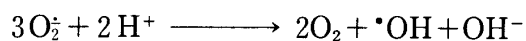
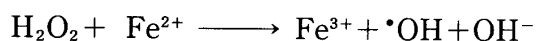
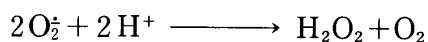
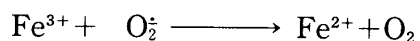


Fig.3. Effect of Fe^{3+} on LCL of X-XO system. Experimental conditions were the same as described in Fig. 1 except for the presence of $1 \mu\text{M}$ Fe^{3+} .

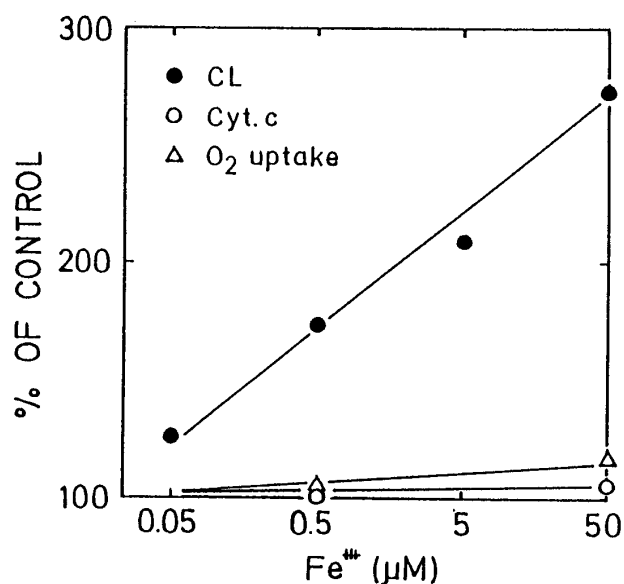


Fig.4. Dose dependent stimulation by Fe^{3+} of X-XO dependent LCL.

Experimental conditions were the same as described in the Figs. 1 and 3. The LCL was increased by addition of Fe^{3+} in concentration dependent manner. But no stimulative effects were observed on the superoxide generation and oxygen consumption of the X-XO system.

このような理由から、X-XO系によるLCLに対する Fe^{3+} や ADP-Fe^{3+} の作用について検討した。図3はその結果を示す。すなわち、X-XO系によるLCLは添加 Fe^{3+} の濃度に依存してその強度が増大された。勿論添加 Fe^{3+} の作用はLCLの増大作用にのみ認められ、酸素消費や O_2 生成には全く影響がなく、この Fe^{3+} の作用が先に述べた反応式における $\cdot\text{OH}$ に依存したLCL増大を反映し、X-XO系による O_2 生成やそれに共役した酸素消費には影響を与えないことが確認された(図4)。これに反し、前述のADPと Fe^{3+} の両物質の添加に伴う ADP-Fe^{3+} によると予想された反応では、予期に反しLCLの増大は認められず、かえってADPは Fe^{3+} によるLCLの増大作用を阻害した(データには示していない)。このADP作用機序についてはなお明らかでない。

3. X-XOによるLCLのバナデートによる増大

先の実験はX酸化に見られるLCLのかなりの部分が $\cdot\text{OH}$ に依存していることを示唆する。また先の研究で特に好中球におけるFMLPによるLCLがバナデートにより増大することを報告した²⁾。ここではバナデートの作用を更に明らかにすることと、 $\cdot\text{OH}$ の生成がバナデートにより増大されるか否かを明らかにする目的で、X-XO系によるLCLに対するバナデート添加効果について検討した。その結果、図5に示す如く、バナデートの作用は Fe^{3+} のLCL増大作用と同様に、その濃度に依存してLCLが増大され、そのLCLも尿酸により阻害された(図5、

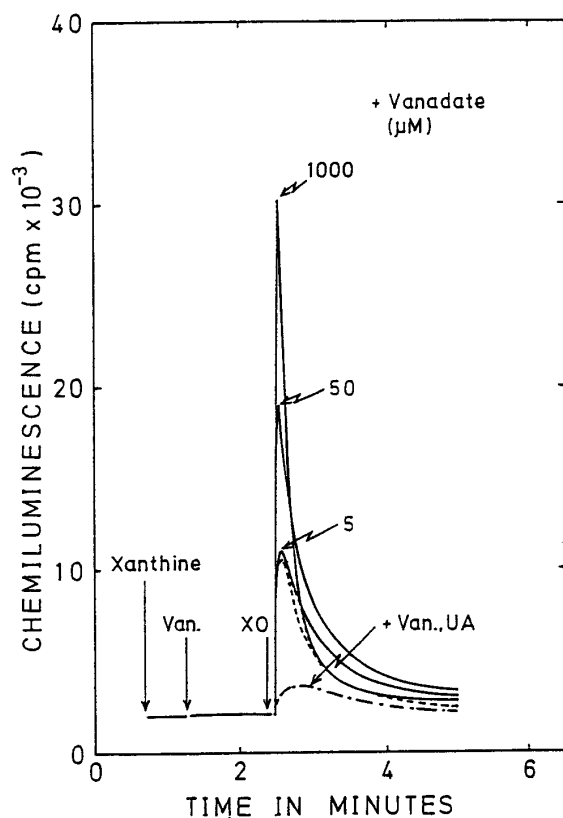


Fig.5. Effect of vanadate on the LCL of X-XO system.

Experimental conditions were the same as described in the Fig. 1, except for the presence of vanadate in the medium. The vanadate stimulated LCL was also inhibited by $50 \mu\text{M}$ uric acid.

6)。しかし、バナデートはCyt. c還元で示される O_2^- 生成に対しては返って阻害的に作用し、X酸化反応はむしろ阻害される傾向にあった。このことはバナデートが Fe^{3+} 同様に、 O_2^- との反応によりバナヂールに還元され、そのバナヂールは H_2O_2 との反応で $\cdot OH$ を生成する可能性を示唆する(図6)。

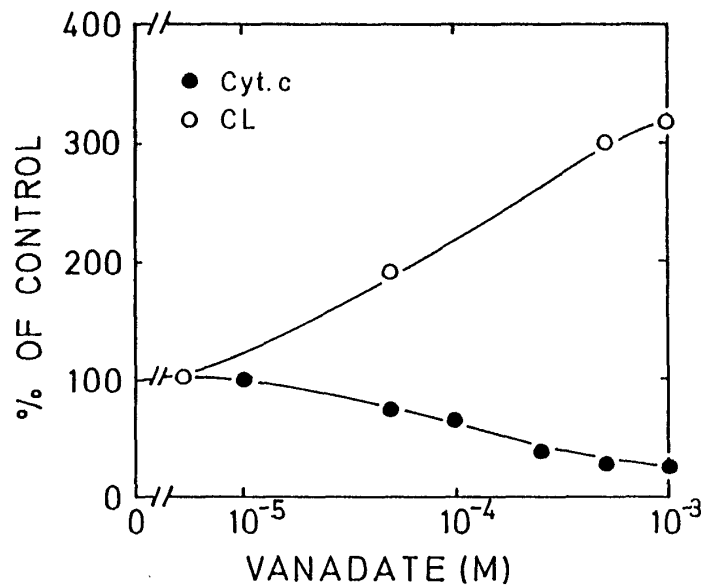


Fig.6. Effect of vanadate on the LCL and superoxide generation of X-XO system. Experimental conditions were the same as described in the Figs. 1 and 5. The LCL was increased by vanadate in concentration dependent manner, whereas superoxide generation was rather inhibited.

4. 好中球の種々刺激物によるLCLとそれに対するX-XO系の作用

以上の実験結果はX-XO系においては $\cdot OH$ の生成がかなり優先的に起きていることを示唆した。そこで好中球における種々刺激物によるLCLと、それに対するX-XO系の作用について解析した。図7 a, b, cはその結果を示す。すなわち、FMLP刺激により好中球は比較的弱いLCLを示し、しかもそのLCLはかなり速やかに消去される。X存在下において、このようなFMLP依存性のLCL反応に対するXOの添加効果について検討した。その結果、このような系においてX-XO系に依存したLCLには殆ど変化が認められないが、FMLP刺激直後にXOを添加した場合には、FMLPに依存したLCLは認められなくなった。その上、LCLが低下した時点でのLCL強度はX-XO系の添加されなかった対照よりさらに低い値を示した。すなわち、FMLPに依存したLCLがX-XO系で生成された尿酸により解消され、FMLPによるLCLの主体は $\cdot OH$ であることがより強く示唆された(図7 a)。

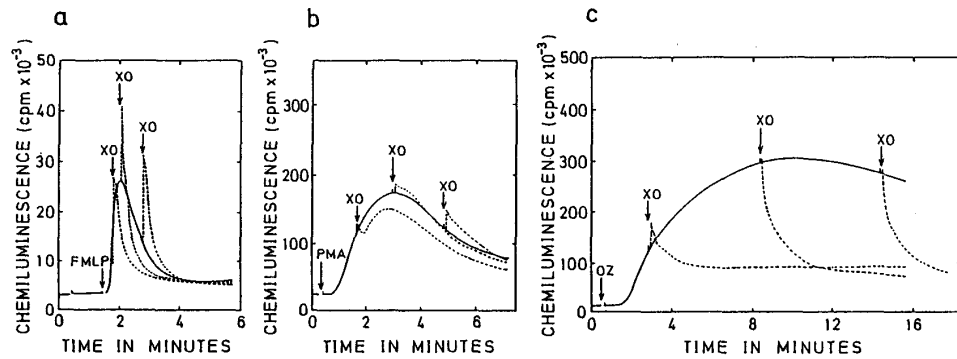


Fig.7. Effect of X-XO system on the stimulation-dependent LCL of guinea pig neutrophils. Guinea pig neutrophils (5×10^5 cells/ml) were incubated in the medium of KRP (pH 7.4) containing 10 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , 0.2 mM xanthine, 100 μM luminol at 37°C . The concentration of FMLP, PMA and OZ were 1.25×10^{-8} M, 3×10^{-9} M and 125 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Xanthine oxidase was 25 munit/ml.

次に、PMA による LCL に対する X-XO 系の添加効果についても検討した。すなわち、図 7 b に示すように好中球は PMA の添加に伴い一定時間のラグ相に続く強い LCL を持続し、次第に低下する。この反応において、PMA を添加した直後に XO を添加した場合、その後の LCL 増大は若干阻害される傾向にあるが、その阻害作用は弱かった。しかし、PMA 添加後に見られる最高の LCL を示す時点やその後に XO を添加しても殆ど影響が認められなかった。このことは PMA による初期の LCL の一部は $\cdot\text{OH}$ に依存し、その後の LCL は尿酸で阻害されないその他の活性酸素に依存することを示唆し、そのことはまた尿酸添加による消光によっても証明された(データには示していない)。次に OZ 刺激により細胞の食作用と強く関係して生成される活性酸素に依存した LCL について解析した。図 7 c はその結果を示す。OZ 添加に伴い、かなり長い(約 1 分)ラグ相に続き強い LCL が認められ、その発光は極めて長時間持続する。この LCL に対して X-XO 系を添加するとき、どの反応時点においても予期に反して強い LCL のクエンチングが認められた。しかも、この OZ による CL は尿酸添加によっても全く阻害されず、この反応系での添加 X-XO 系による LCL の低下は $\cdot\text{OH}$ の関与しないことが示唆された。したがって、OZ による LCL が PMA に依存する活性酸素と分子種を異にするか、反応する区画性が両者で異なる事を示唆する。現在この OZ による LCL の反応機構はなお明らかでなく、今後の研究課題としたい。

結 論

X-XO による O_2^- 生成反応において LCL は一過性の反応を示す。この LCL は生成される O_2^- と H_2O_2 に依存した $\cdot OH$ 生成によるもので、そのことは外部から添加した尿酸による阻害や、 Fe^{3+} やバナデートによる促進作用からも明らかである。従って、一過性に反応する発光は X-XO 系により生成される O_2^- とそれに依存して生成される $\cdot OH$ によるが、その速やかな消去は生成される尿酸の強いラジカルのクエンチング作用によることが結論される。またこの X-XO 系は好中球等活性酸素生成系に添加して、そこで生成する活性酸素分子種の解析にも応用可能であることを明らかにした。

文 献

- 1) Fridovich, I. *Annual Rev. Biochem.* **44**, 147-159, 1975
- 2) 高橋龍太郎, 倉繁迪, 岡添陽子, 枝重圭祐, 土屋正彦, 友田三保, 内海耕髓, 高知医科大学一般教育紀要 **5**, 49-59, 1989
- 3) Sies, H. *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1987
- 4) Prince R.C. *TIBS* 12-March, 86-87, 1987
- 5) Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **245**, 4053-4057, 1970
- 6) Allen, R.C. *Methods in Enzymol.* **133**, 449-493, 1986
- 7) Nakagawara, S., Shibata, K., Takeshige, K. and Minakami, S. *Exp. Cell Res.* **101**, 225-234, 1976
- 8) Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6858-6862, 1981
- 9) Haber, F. and Weiss, J. *Proc. R. Soc. Edinb. Sect. A. Math. Phys. Sci.* **147**, 332-351, 1934
- 10) Halliwell, B. *FEBS Lett.* **92**, 321-326, 1978
- 11) Halliwell, B. *FEBS Lett.* **96**, 238-242, 1978
- 12) Svingen, B.A., Buege, J.A., O'Neal, F.O. and Aust, S.D. *J. Biol. Chem.* **254**, 5892-5899, 1979
- 13) Aust, S.D. and Svingen, B.A. in "Free radicals in biology" (ed. by Pryor, W.A.), Acad. Press, pp 1-28, 1982

(1990年6月29日受理)