

鉄イオンおよび鉄錯体による DNA 鎖切断

張 清敏・池田正五・小田琢三

岡山理科大学理学部生物化学科

(1990年9月30日 受理)

緒言

微量元素は、生体内で重要な生理的役割を担っていることが古くから注目されていた。そのうち鉄、銅などは体に必須な微量の栄養素として認識されていた。近年、種類の微量元素に関する研究が進につれて必須微量元素についての知見が大幅に増加している。さらに酵素作用における微量元素の役割などをはじめとして様々な生理的機能についての研究も進展している。同時に鉄などの微量元素の細胞毒性あるいは発癌性も重視されている。鉄は、成人体内に4～5 g含まれているが、大部分は蛋白質と結合しており、イオンとして存在しているのは非常に少ない。ヘム鉄蛋白質と分子状酸素の相互作用は呼吸や物質代謝過程の中で最も重要な反応である。鉄は不足時、貧血の原因となるが、逆に鉄を取りすぎた場合は、体内に過剰の鉄の蓄積がみられる。その場合、鉄はしばしば肝、膵臓、下垂体、副腎、甲状腺および心筋に主としてヘムシデリンとして沈着し、これら臓器の機能障害を起こす。長期にわたる肝の鉄沈着は肝硬変症を生じ、しばしば肝癌発生の原因となる¹⁾。

Nitrilotriacetic acid (NTA) は金属のキレート試薬であり、発癌性やプロモーションの作用を持っていることが報告されている^{2,3)}。Fe³⁺-NTA 錯体を長期間ラットに注射すると、ヒトの過鉄症に相当する病変を生ずることが判明し、さらに腎癌を高率に発生することが認められた⁴⁾。また NTA による発癌性は、生体内で鉄錯体を形成することによると考えられている。発癌物質は多くの場合、複雑な発癌過程の最初の反応として、直接その化合物が、または間接的にその代謝産物が DNA に傷害を与えることが知られている。抗癌性抗生物質であるブレオマイシン (Bleomycin) による DNA 鎖の切断の原因は Fe³⁺ (あるいは Fe²⁺) と過酸化水素 (H₂O₂) の反応により生じたスーパーオキシド (O₂⁻) とヒドロシラジカル (・OH) などの活性酸素によると考えられている⁵⁾。Fe³⁺-NTA と H₂O₂ から生成する・OH をスピントラップ剤を用いて電子スピン共鳴スペクトル法 (ESR) で検討した結果、Fe³⁺-NTA が H₂O₂ からの・OH 生成に最もよい触媒作用を示した^{6,7)}。また Fe³⁺-NTA は H₂O₂ 存在のもとで DNA 損傷をもたらすが、他のアミノカルボルの鉄キレートでは DNA 損傷は認められなかった⁷⁾。従って、Fe³⁺-NTA による発癌機構の解明は活性酸素系による発癌モデルとして重要視されている。

本研究では、鉄等の微量元素による発癌機構の解明の前段階として、鉄イオンおよび鉄錯体 Fe^{3+} -NTA による DNA 鎖の切断の *in vitro* での解析を閉鎖環状プラスミド DNA のコンフォメーションの変化を電気泳動的に調べることにより、容易にしかも鋭敏に測定することができた。本研究ではさらに Fe^{3+} -NTA による DNA 鎖切断における活性酸素の関与についても考察した。

材料と方法

1. pUC19 DNA の作成

プラスミド pUC19 は大腸菌 HB101で増幅し、アルカリ法により抽出精製した⁹⁾。本実験で用いた pUC19 DNA は I 型 (閉鎖環状) を少なくとも80%以上含む試料である。

2. Fe^{3+} -NTA の調製

Fe^{3+} -NTA の調製は、以下の様に行った⁹⁾。 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ を0.5N HCl に溶かし、0.1M とした。この溶液16mlに、70mlの蒸留水に1.128 g の nitrilotriacetic acid disodium salt (Na_2 -NTA) を溶解した水溶液を混ぜよく攪拌した後に、 NaHCO_3 粉末を少量ずつ添加して pH 7.0 に調製した。最終濃度が0.5mg Fe^{3+} /ml (10^{-2} M) になるように希釈した後、遮光して4℃に保存した。

3. DNA 切断反応

DNA の切断反応は特に記さない限り以下の標準反応混液を用いて行った。100mM Tris-HCl (pH 8.2), 10 μg /ml pUC19 DNA, 図に示した濃度の FeCl_2 または Fe^{3+} -NTA, および 10mM H_2O_2 または 10mM dithiothreitol (DTT)。これらを含む反応液50 μl を10ml容のガラス試験管に入れパラフィルムで蓋をした後、37℃で、毎分120回の振動をしながら、30分間行った。

4. 電気泳動

上記反応終了後、直ちに遠心 (1000rpm, 3分) して6 \times sampling solution (2.5% bromophenol blue, 2.5% xylene cyanol, 30%グリセリンを含む) を10 μl を加え、そのうち12 μl を1.0%アガロースゲルで電気泳動した。アガロースゲルの作成および電気泳動緩衝液として TBE (0.089M Tris, 0.089M ホウ酸, 0.002M EDTA を含む) を用いた。電気泳動はミュージック (アドバンス社) を用いて、室温, 50V で行った。電気泳動後 DNA を0.5 μg /ml エチジウムブロミドで40分間染色し、長波長紫外線 (360nm) 照射でゲルの蛍光バンドを観察し、ポラロイドフィルムで写真撮影した。写真プリント上のバンドの濃さをデシトメーター (島津理化機器株式会社製, 二波長フライングスポットスキャナCS-9000) で測定して、各レーンにおける I 型, II 型, III 型プラスミド DNA の相対量を求めた。

結果

用いた pUC19 の DNA は先に述べたごとく、I 型（閉鎖環状）が80~90%、II 型（開環状）が10~20%で、III 型（線状）はない。I 型に一本鎖切断が起こると II 型となり、I 型および II 型に二本鎖切断が1か所起こると III 型となる。従って、I 型の減少と II 型の増加は一本鎖切断を示し、I 型または II 型減少と III 型の増加は二本鎖切断を示し、さらに III 型の減少はより高度な二本鎖切断を示す。I, II, III 型のそれぞれのエチジウムブロミド染色による蛍光の増減はそれぞれの DNA 量の増減に比例する¹⁰⁾。

1. FeCl₂ による pUC19 DNA の切断

まず強い DNA 切断を起こすことが既に知られている二価鉄 (FeCl₂) を用いて実験系の確立を行った。

(1) FeCl₂ のみによる DNA 鎖切断作用 (図1)

標準反応条件下で、 2×10^{-4} M 以下の FeCl₂ 濃度では DNA 鎖切断が起こらなかった。 2×10^{-4} M 以上では、I 型および II 型がだんだん減少した。 8×10^{-4} M でほとんどの DNA が消失した。これは一本鎖切断と二本鎖切断が同時に進行していることを示す。

(2) FeCl₂ の DNA 切断におよぼす DTT の影響 (図2)

10mM DTT を含む標準反応条件下で、 10^{-4} M 以上の FeCl₂ 濃度では I 型がだんだん減少消失した。一方 II 型は 10^{-4} M から増加し、 4×10^{-4} M で全 DNA の70%にまでになる。しかし 6×10^{-4} M 以上では I 型とともに II 型も完全に消失した。これは初めに一本鎖切断、続いて二本鎖切断が起こることを示す。

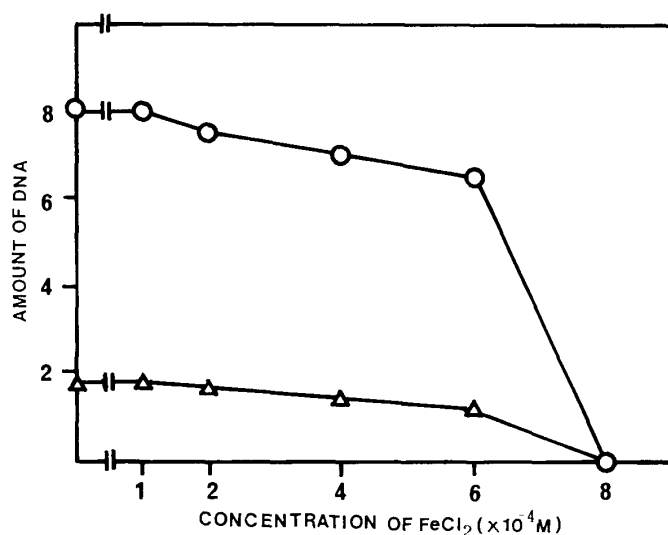


図1. FeCl₂ による DNA 鎖切断

材料と方法で述べたようにして pUC19 DNA を図に示した濃度の FeCl₂ で処理し、それぞれの反応液中の I 型、II 型、および III 型 DNA の割合を調べた。

○—I 型, △—II 型 DNA

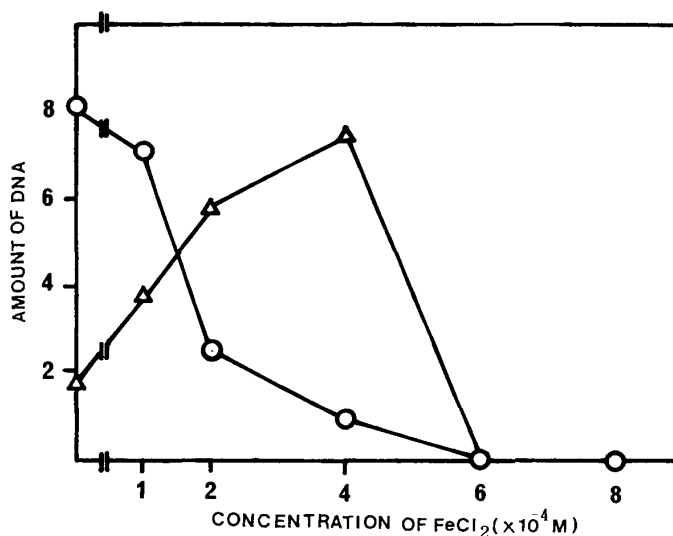


図2. FeCl₂ の DNA 切断に及ぼす DTT の影響
 材料と方法で述べたようにして pUC19 DNA を10mM DTT と図に示した濃度の FeCl₂ で処理し、それぞれの反応液中の I 型, II 型, および III 型 DNA の割合を調べた。
 ○—I 型, △—II 型 DNA

2. Fe³⁺-NTA による pUC19 DNA の切断

(1) Fe³⁺-NTA による DNA 鎖切断作用

標準反応条件下で 10⁻³M~10⁻⁵M の Fe³⁺-NTA による DNA 切断を行ったが、ほとんど DNA の切断は起こらなかった。さらに同条件で 6 時間処理したが、DNA の I 型または II 型にほとんど変化は見られなかった。

(2) Fe³⁺-NTA の DNA 切断に及ぼす DTT の影響 (図3)

10mM DTT を含む標準反応条件下で 10⁻⁵M 以下の Fe³⁺-NTA 濃度ではほとんど

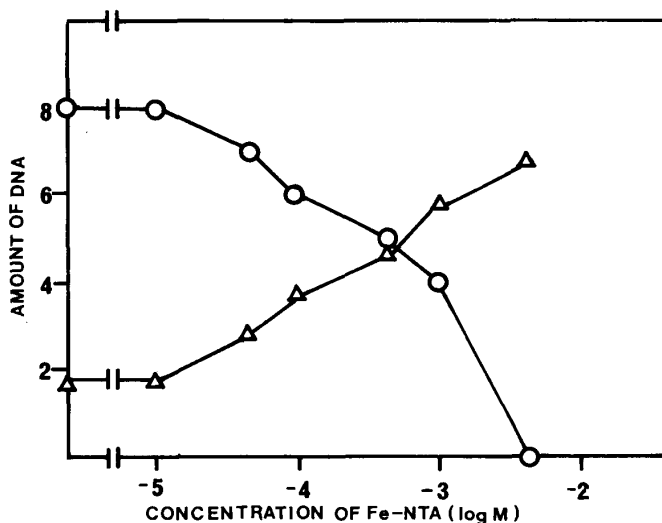


図3. Fe³⁺-NTA の DNA 切断に及ぼす DTT の影響
 材料と方法で述べたようにして pUC19 DNA を10mM DTT と図に示した濃度の Fe³⁺-NTA で処理し、それぞれの反応液中の I 型, II 型, および III 型 DNA の割合を調べた。
 ○—I 型, △—II 型 DNA

DNA鎖切断が起こらないが、 10^{-5}M 以上になると、I型がだんだん減少し、II型がだんだん増加し、典型的な一本鎖切断を示した。

(3) Fe^{3+} -NTA のDNA切断に及ぼす H_2O_2 の影響 (図4, 5)

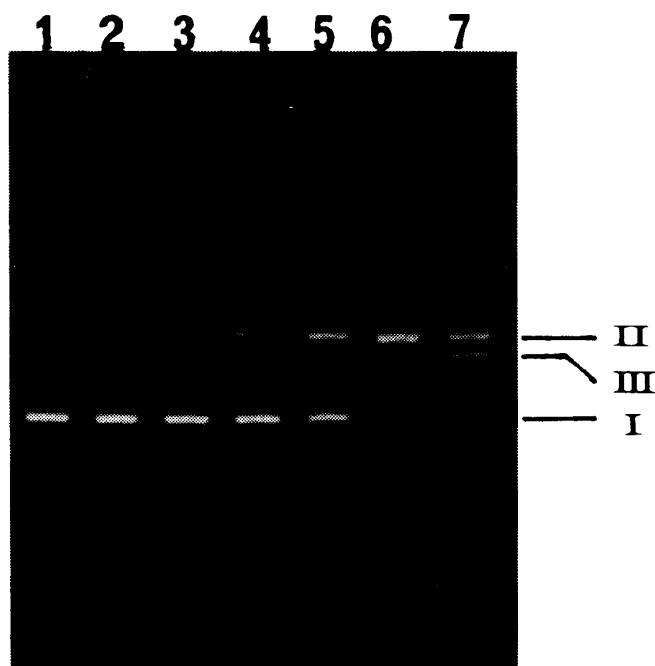


図4. Fe^{3+} -NTA のDNA切断に及ぼす H_2O_2 の影響
材料と方法で述べたようにしてpUC19 DNA を H_2O_2 および下記に示した濃度の Fe^{3+} -NTA で処理し、電気泳動した。レーン1, 0; レーン2, $1 \times 10^{-5}\text{M}$; レーン3, $5 \times 10^{-5}\text{M}$, レーン4, $1 \times 10^{-4}\text{M}$; レーン5, $5 \times 10^{-4}\text{M}$; レーン6, $1 \times 10^{-3}\text{M}$; レーン7, $5 \times 10^{-3}\text{M}$

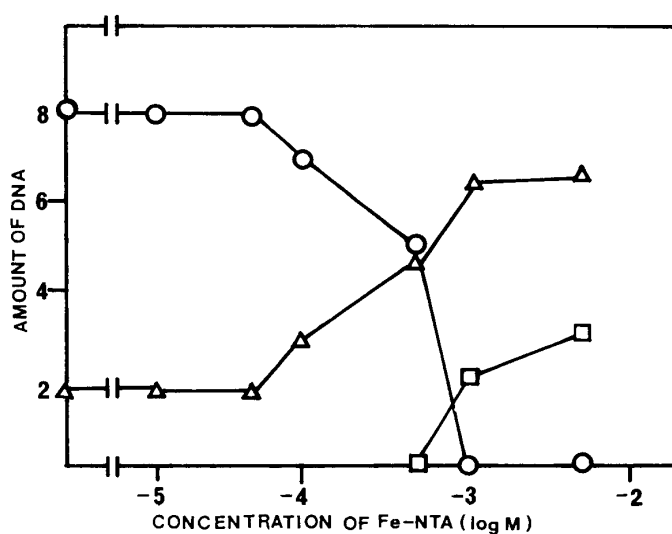


図5. Fe^{3+} -NTA のDNA切断に及ぼす H_2O_2 の影響
図4の結果からそれぞれの反応液中のI型, II型, およびIII型 DNAの割合を調べた。
○-I型, △-II型, □-III型 DNA

10mM H₂O₂ を含む標準反応条件下で 5×10^{-4} M 以下の Fe³⁺-NTA 濃度ではDNAの変化がほとんど見られないが、それ以上のFe³⁺-NTA になると、I型が急に減少し、さらにII型の増加が見られた。I型は 10^{-3} M で完全に消失したが、III型の増加が 10^{-3} M から見られた。これらは一本切断につづいて二本鎖切断が起きたことを示した。

切断反応とpH の関係についてpH 7.0~8.5の範囲で調べたが、pH が低い程切断がわずかに速く進む傾向が見られた。

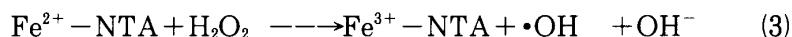
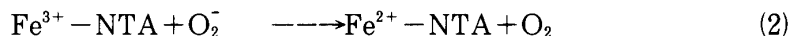
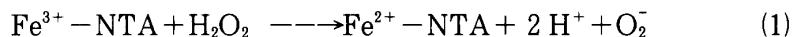
考察

鉄イオンおよび鉄錯体によるDNA 鎖の切断を、プラスミドDNA のコンフォメーションの変化を測定することにより調べたところ、次の結論を得た。

1. FeCl₂ は単独でもDNA 切断をもたらし、 8×10^{-4} M の濃度でプラスミドDNA のI型、II型は完全に消失した。さらにこの溶液に10mM DTT を添加すると、DNAの切断能力が増加し、 6×10^{-4} M の濃度でI型II型の完全消失が見られた。

2. Fe³⁺-NTA だけでは高濃度 (1×10^{-3} M)で長い時間 (6時間) 反応させてもDNA 損傷は起こらなかった。しかし10mM DTT や10mM H₂O₂ の存在下では 10^{-4} M 付近の濃度からDNA 鎖切断がおこることが見出された。両者とも Fe³⁺-NTA を増加させるとI型の減少およびII型またはIII型の増加が見られ、典型的な一本鎖DNAの切断パターンを示した。

これまでに知られているDNA 鎖切断に関する知見^{6, 7, 10} から考察すると、Fe³⁺-NTA (あるいは FeCl₂) と過酸化水素によるDNA 鎖切断をもたらす主な原因は、ヒドロキシラジカル (•OH) などの活性酸素の生成にあると考えられる。その酸化過程において、次のような反応過程で、スーパーオキシド (O₂⁻) やヒドロキシラジカル (•OH) などの活性酸素を発生すると考えられる。



まず H₂O₂ と Fe キレートとの反応で生ずる FeOH³⁺ (FeO²⁺) (フェリルラジカル) を介してスーパーオキシドを生産する (反応(1))¹⁰。そのスーパーオキシドは別の Fe³⁺-NTA を早く攻撃し、Fe²⁺-NTA を形成する (反応(2))。つづいて、Fe²⁺-NTA と H₂O₂ が反応すると Fe³⁺-NTA とヒドロキシラジカル (•OH) を生成する (反応(3))。そのヒドロキシラジカル (•OH) が DNA への反応局所において、鎖切断を起こすものと考えられる。FeCl₂ の場合は、直接に反応(3)からはじまり、H₂O₂ と反応し、ヒドロキシラジカルを生成すると考えられる。

今回の実験により、ラット等に対して実験的に癌を起こすことのできるFe³⁺-NTA が *in vitro* でDNA 鎖切断能があることが確証された。生体内にはFe³⁺-NTA は存在しな

いが、鉄を配位原子とする多くの化合物がある。生体内での鉄の酸化状態は結合している配位子によって、 Fe^{3+} または Fe^{2+} に固定されている場合と、 $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$ の酸化還元を繰り返している場合がある。酸素運搬体である、ヘモグロビンやミオグロビン中の鉄は Fe^{2+} 、カタラーゼやオキシターゼ中の鉄は Fe^{3+} にそれぞれ固定されているが、チトクロム中の鉄では $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$ の変化がおこる。さらに細胞中には酸素と過酸化水素もあり、生体内で活性酸素が生成するチャンスは多いはずである。正常の細胞中にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 等による活性酸素の消去機構が存在するが、生体内での活性酸素によるDNA鎖切断は否定できない。活性酸素を原因とする発癌機構の解明はさらにDNA鎖切断後のDNA修復機構との関連も重視しながら進められるきであると考えられる。

参考文献

- 1) 粟井通泰：蛋白質 核酸 酵素, 33, 2844~2854 (1988)
- 2) Alden, C. L. and Kanerva, R. L. : Food Chem. Toxicol., 20, 441~450 (1982)
- 3) Fukushima S., Kurata, Y., Tamano, S., Inoue, K. and Ito, N. : Gann, 76, 823~827 (1985)
- 4) Ebina, Y., Okada, S., Hamazaki, S., Ogino, F., Li, J. and Midorikawa, O. : J. Natl. Cancer Inst., 76, 107~113 (1986)
- 5) Kuchino, Y., Mori, F. and Kasai, H. : Nature, 327, 77~79 (1987)
- 6) 川西正祐, 井上純子：蛋白質 核酸 酵素 33, 2838~2842 (1988)
- 7) Inoue, S. and Kawanishi, S. : Cancer Res., 47, 6522~6527 (1987)
- 8) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- 9) Awai, M., Narasaki, M., Yamanoi, Y. and Seno, S. : Am. J. Pathol., 95, 663~674 (1979)
- 10) 片岡和博：岡山医学会雑誌, 93, 361~381 (1981).
- 11) 浅田浩二：活性酸素, p14, 医歯薬出版 (1987).

DNA Strand Breaks by Ferric Nitrilotriacetate.

Qingmin ZHANG, Shogo IKEDA and Takuzo ODA

*Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Okayama University of Science, 1-1 Ridaicho Okayama 700, Japan*

(Received September 30 1990)

Ferric nitrilotriacetate (Fe^{3+} -NTA) is an iron complex. Repeated injections of Fe^{3+} -NTA in experimental animals induce iron overload and injuries of several organs. Fe^{3+} -NTA is also a potent carcinogen and has been shown to cause renal cell carcinoma in the rat. In the present study, we investigated DNA strand breaks induced by Fe^{3+} -NTA *in vitro* by use of supercoiled closed circular DNA of plasmid pUC 19. The conformational change of DNA caused by a single strand or double strand DNA break was easily detected by agarose gel electrophoresis. The DNA strand breaks were not observed with Fe^{3+} -NTA alone. However in the presence of 10mM hydrogen peroxide or 10mM dithiothreitol Fe^{3+} -NTA, at more than 10^{-4}M , caused DNA cleavage. Decrease of form I DNA and increase of form II and form III DNAs were observed by raising the Fe^{3+} -NTA concentration in the reaction. The requirement of hydrogen peroxide for the cleavage of DNA by Fe^{3+} -NTA suggested that Fe^{3+} -NTA catalyzed the production of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and the radicals caused the DNA strand breaks.