

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成19年度～平成20年度

課題番号：19510067

研究課題名（和文）酸化傷害に対する内在性防御物質としての尿酸の役割

研究課題名（英文） Antioxidative activity of uric acid in Drosophila

研究代表者 根岸 友恵

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80116491

研究成果の概要：

痛風の原因物質として知られている尿酸であるが、抗酸化物質として重要な働きをしている。尿酸がどのような酸化ストレスに対して防御作用を示すかを調べ、生物における尿酸の存在意義とその利用価値を示すことを目的とした。ショウジョウバエの尿酸欠損株はタバコ副流煙曝露に感受性が高い。副流煙曝露時の尿酸含量を測定した結果、野生株では尿酸が、尿酸欠損株では前駆体含量は増加した。このことは酸化傷害に対する防御機構として尿酸合成が亢進している可能性を示唆するものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：尿酸、活性酸素、ショウジョウバエ、タバコ副流煙、酸化傷害

1. 研究開始当初の背景

老化や多くの疾病の要因として酸化ストレスが関わっていると言われている。酸化ストレスを与えるものとして細胞内で恒常的に発生する、あるいは何らかの要因で発生する活性酸素は、老化や発がんとの関係が深いと考えられ、その消去剤はがん予防や生活習慣病の予防薬として注目されている。地上の多くの生物がエネルギーの生産を酸素の消費に依存している状況では、生物は常に酸化ストレスに曝されており、それに対する防御

機構を有していると考えられる。酸化ストレスへの生体の対応として内在性の抗酸化剤は重要な役割を担っていると考えられ、その役割を明らかにすることは生活習慣病の予防を目的とした研究の中でも大きな位置を占めるものである。

ヒトにおいてプリン塩基の最終代謝産物である尿酸は体液に高濃度存在する。一部に蓄積すると通風等の疾病の原因となることが知られているが、一方で強力な抗酸化作用があり、生体内で有効な抗酸化剤、ラジカル消去剤として機能すると考えられている。In

in vitro の尿酸の酸化反応についてはヒドロキシラジカルや過塩素酸、パーオキシナイトライトとの反応が報告され、また共同研究者の鈴木はグルタチオンの S-ニトロ化について報告している。さらに尿酸が内在性抗酸化物質として老化による病態変化に重要な関わりを持っていることを示す報告も蓄積されてきている。

2. 研究の目的

実際に生体においてどのようなストレスに対して尿酸が効果を示しているか、尿酸と活性酸素やラジカルの反応生成物は生体に対してどのような影響を示すかについて明らかにされていない点も多い。そこで本研究ではまず、種々の酸化ストレスのどのようなものに対して尿酸が防御作用を示すかを調べた。その時、尿酸産生に関わる酵素群の発現に変化があるかどうか調べた。さらに、反応過程で産生される反応生成物は生体に何らかの影響を与えるかどうか、グルタチオンなど他の内在性抗酸化剤との役割分担はどのようになっているか、その他尿酸の作用を増強あるいは低下させる因子が存在するかどうかについて検討した。In vitro の実験によって、尿酸が一酸化窒素や細胞内抗酸化物質とどのような反応性を示すかを調べた。

3. 研究の方法

対象生物としてショウジョウバエを用いた。ショウジョウバエには既存の尿酸欠損株が存在する。野生株および変異株の 3 齢幼虫に酸化ストレスを与えた場合の (1)細胞毒性の検出ならびに生存率に対する影響、(2)尿酸含量の変化ならびに他の抗酸化物質の変化を調べた。ストレスとしては、タバコ副流煙曝露や X 線照射を用いた。尿酸欠損株が酸化ストレスに感受性が高いことはパラコート処理による生存率の低下が野生株と比較して大きいことで確認している。尿酸、尿酸前駆体の含量は幼虫ホモジネートを試料として HPLC により測定した。尿酸合成酵素の発現に変化が見られるかどうか、RT-PCR により mRNA 量の変化を調べた。他の細胞内抗酸化物質としては、(1)細胞内に比較的高濃度に含まれるグルタチオンを総グルタチオン量として測定した。(2)スーパーオキシドアニオンの影響を調べるために SOD 活性を測定した。

尿酸と反応する活性酸素種や生体成分について、*in vitro* の実験で調べた。一酸化窒素やグルタチオン、システインなど細胞内の酸化還元状態を左右する物質との反応を、反応生成物を HPLC で分離して定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 尿酸欠損による細胞毒性、ならびに生存率に対する影響

野生株 (Oregon-R, Hikone-R, Canton-S) および尿酸欠損株 (*y v ma-l*, *ry¹*) の 3 齢幼虫をタバコ副流煙曝露し成虫への羽化率を計測して未曝露の羽化率を 100%として生存率とした。その結果、図 1 に示すように、いずれの株でも生存率の低下が見られたが、Oregon-R と Hikone-R と比較して、尿酸欠損株の生存率は有意に低下した。尿酸の欠損により、酸化ストレスへの感受性が高まったと考えられるが、野生株のうち Canton-S は尿酸欠損株とほぼ同程度の生存率低下を示し、尿酸以外にも抗酸化作用を示す重要な物質が存在することが示唆された。ここで用いた尿酸欠損株が X 線照射に対しても強い致死感受性を示すことも明らかにした (図 2)。

副流煙曝露幼虫細胞にアポトーシスが誘導されているか観察したところ、尿酸欠損株を 6 時間曝露した場合、曝露後 12 時間をピークとして弱いアポトーシス誘導が観察された。24 時間後にはアポトーシスは通常レベルまで低下したので、幼虫細胞において細胞傷害が起こるが、ここで見られたアポトーシスが直接個体の致死には関係していないと考えられる。

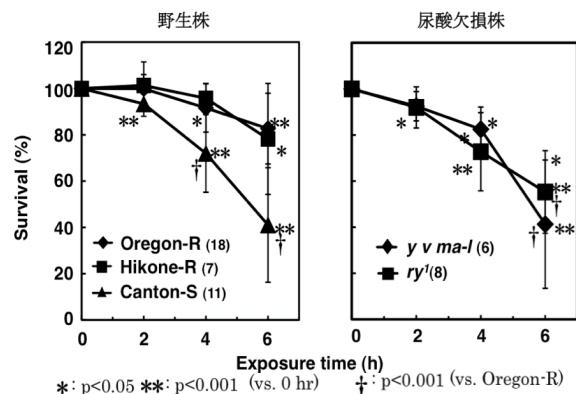


図 1. 副流煙曝露の生存率に対する影響 ()内は実験回数

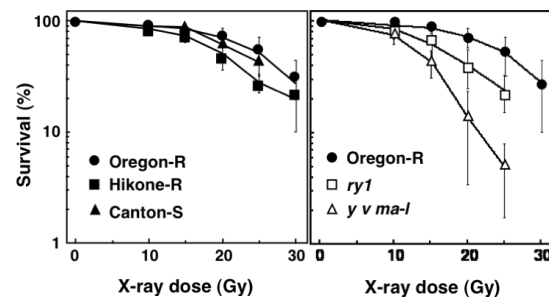


図 2. 各種ショウジョウバエ株の X 線感受性

(2) 尿酸および尿酸前駆体の含量変化

抗酸化物質として尿酸が消費されると考え、副流煙曝露時の尿酸含量の変化を調べたところ、野生株では尿酸含量が増加し、欠損

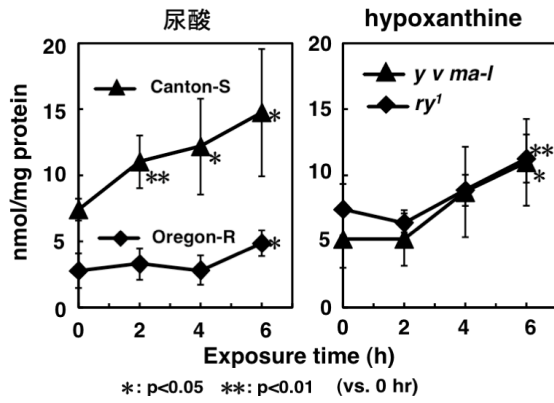


図3. 副流煙曝露による尿酸ならびにヒポキサンチン含量の変化

株では尿酸前駆体であるヒポキサンチン、キサンチンの含量が増加することが明らかになった(図3)。この実験においても、生存率の顕著な低下が見られた野生株 Canton-S では尿酸含量の増加が観察されたことから、尿酸のみが副流煙曝露というストレスに対する防御物質ではないことが裏付けられた。尿酸、ヒポキサンチンなどプリン塩基含量の増加と生存率低下には、負の相関性が見られた(図6)。副流煙曝露というストレスに対して、尿酸あるいは前駆体が増加するという事は、ストレスの防御機構として尿酸合成経路の促進がおこっている可能性が考えられる。

(3) 尿酸合成酵素キサンチンデヒドロゲナーゼの mRNA 発現量の変化

尿酸合成の促進において尿酸合成経路の最終過程で働く

xanthine dehydrogenase (XDH) の遺伝子発現が促進されているかどうか、RT-PCR を用いて

mRNA 量の変化を観察した。尿酸欠損株のうち *y v ma-1* は XDH の構造タンパク質遺伝子は保持しているためその発現についても調べた。β-アクトリン mRNA 量との相対比を図4に示した。野生株で増加の傾向は見られたが有意な変化ではなかった。酵素活性そのものの変化を検討する必要がある。

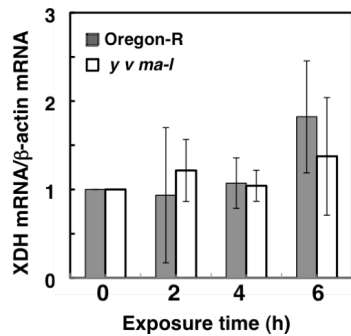


図4. 副流煙曝露による XDH mRNA 発現量

(4) グルタチオン(GSH)含量の変化

細胞内に比較的高濃度に含まれる抗酸化

物質である GSH 量に変化があるかどうか測定したところ、いずれの株でも減少が見られた。尿酸欠損株における GSH の減少は、2 株とも非曝露幼虫と比較して統計的に有意で

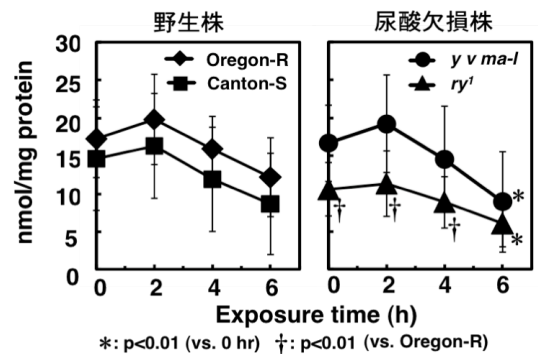


図5. 副流煙曝露によるグルタチオン含量の変化

(5) スーパーオキシドデスムターゼ(SOD)活性の変化

スーパーオキシドを過酸化水素に変換する SOD の活性は酸化ストレスの負荷によって影響を受けることが示されている。副流煙曝露によっても活性の変化が見られるか調べたが、曝露中の有意な変化は見られなかった。

(6) 尿酸と生体成分の反応

尿酸は、一酸化窒素と反応して不安定なニトロ誘導体を生成し、生体内で他の化合物のニトロソ化に影響を与えている可能性があることを示した。尿酸は酸素存在下で一酸化窒素と反応し、半減期 2 分 (pH 7.4, 37 °C) のニトロソ尿酸を生成した。このニトロソ尿酸は生理的条件下でグルタチオンなどのチオールと反応してニトロチオールを生成した。また、チオールのニトロソ化反応において、ヒト血中濃度に相当する尿酸を添加すると、ニトロソチオールの生成量を数倍増加させることを見いだした。一方、トリプトファンのニトロソ化反応において、尿酸の添加はニトロソトリプトファンの分解を促進し、ニトロソトリプトファンの生成量を著しく減少させた。これらの結果は、尿酸は、直接活性酸素と反応して活性酸素の消去に寄与しているだけでなく、生体成分のニトロソ化反応において、一部は促進し、一部は阻害するなど、一酸化窒素の体内動態を大きく変容させている可能性があることを示している。

(7) まとめと考察

酸化ストレスに対する内在性抗酸化物質の対応を調べる目的で、ショウジョウバエの

尿酸欠損株を用いた実験を行った。尿酸欠損株は X 線照射に対して感受性が高かった。X 線は細胞内に活性酸素を発生し、酸化傷害を与えることが知られているので、尿酸が X 線によって発生する活性酸素の消去に働いていると考えられた。本研究では主として喫煙環境という酸化ストレスを対象とした実験を行った。タバコ副流煙には活性酸素やラジカルを産生する物質が含まれている。ショウジョウバエ幼虫を喫煙環境下に置いたところ、野生株、尿酸欠損株ともに致死作用が観察された。この致死作用は尿酸という抗酸化物質を含有しない欠損株において顕著に見られ、野生株との差は有意であった。このことから、尿酸が抗酸化物質として重要な作用をもつことが示唆された。抗酸化物質とである尿酸含量やグルタチオン含量の変化を調べたところ、期待に反して野生株では尿酸量が、欠損株では前駆体量が増加するという結果になった。また、グルタチオン量はいずれの株でも減少したが、尿酸欠損株で有意であった。生存率の変化と、プリン塩基含量は負の相関が、総グルタチオン量の変化とは正の相関が見られた。尿酸欠損株の 1 例を図 6 に示した。細胞傷害によって引き起される DNA の分解が増加の原因とも考えられたが、HPLC 分析により、他の塩基の増加は一時的にも観察されなかった。紫外線照射によって皮膚中の尿酸含量が増加するという報告もある。ここで得られた結果は、酸化ストレスに対して尿酸合成を促進するという防御機構が誘導されている可能性を示唆していると考え、尿酸合成の最終過程の酵素である xanthine dehydrogenase mRNA の発現量を RT-PCR により測定したが、発現量に有意な変化は見られなかった。しかしながら、尿酸あるいは前駆体の増加という現象が観察されることから、喫煙環境ストレスに生体が何らかの対応を示していることは明らかであるので、尿酸合成経路の他の酵素や酸化ストレスに対応する遺伝子の発現と尿酸含量の増加の関係について今後の検討する必要がある。また、尿酸欠損株では、尿酸をもたないためグルタチオンが野生株より消費されたものと考えられる。一方、野生株 Canton-S は尿酸を Oregon-R より多量に含有し、副流煙曝露による増加もより顕著であったが、生存率低下がみられている。この結果は、ストレスに対応して尿酸合成が促進されても、生存率低下を抑制できないような、抗酸化物質あるいは抗酸化機構が Canton-S において欠如している可能性がある。一方、Canton-S は X 線に対する感受性では、他の野生株と違いが見られないことや、X 線の致死作用がラジカルによる DNA 損傷と関連することなどを考え合わせると、Canton-S の致死感受性は副流煙中に含まれる化学物質によ

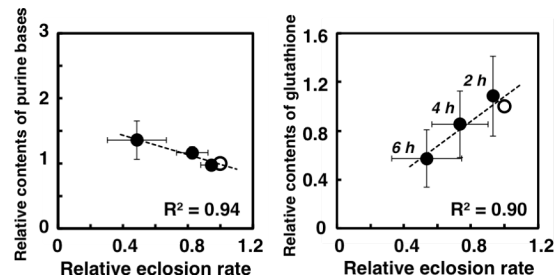


図 6. 尿酸欠損株 (ry^1) におけるプリン塩基含量並びにグルタチオン量と生存率との相関 (未曝露時の羽化率、プリン塩基量、グルタチオン量をそれぞれ 1 (○) とした時の各時間での羽化率、グルタチオン量の相対値をプロット (●))

る可能性も考えられる。Canton-S の生存率低下の要因究明は、細胞内抗酸化作用における尿酸の関与について更なる知見を得られるものとする。

生体内反応を推察するため、*in vitro* での尿酸と生体成分の反応を解析した結果、一酸化窒素との反応が明らかにされた。細胞内の一酸化窒素の代謝に尿酸が関与し、生体成分のニトロソ化等の反応を促進したり、阻害する可能性が示された。これは、内在性抗酸化物質としての尿酸の二次的な反応を調べる重要性を示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Enhancement of phase II enzyme activity by purpurin resulting in suppression of MeIQx-DNA adduct formation in mice (2007) Takahashi, E., Arimoto, S., Okamoto, K., Negishi, T., *Mutat. Res.*, 626, 128-134.
2. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine increase in *Drosophila* larval DNA after irradiation with 364 nm laser-light but not X-ray (2007) Negishi, T., Kawai, K., Arakawa, R., Higashi, H., Nakamura, T., Watanabe, M., Kasai, H., Fujikawa, K., *Photochem. Photobiol.*, 83, 658-663.
3. Nitrosation of uric acid induced by nitric oxide under aerobic conditions (2007) Suzuki, T., *Nitric Oxide*, 16, 226-273.
4. Binding of MutS protein to oligonucleotides containing a methylated- or an ethylated guanine residue, and correlation with mutation frequency (2008) Taira, K., Nakamura, S., Nakano, K., Maehara, D., Okamoto, K., Arimoto, S., Loakes, D., Worth, L., Schaaper, R.M., Seio, K., Sekine, M., Negishi, K., Negishi, T., *Mutat. Res.*, 640, 107-112.

5. Reaction of 2'-deoxycytidine with peroxyxynitride in the presence of ammonium bromide (2008) Suzuki, T., Iida, K., Uchibe, S., Inukai, M., *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 5164-5170.
 6. Influence of neighboring base sequences on the mutagenesis induced by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in yeast (2008) Yung, C.-W., Okugawa, Y., Otsuka, C., Okamoto, K., Arimoto, S., Loakes, D., Negishi, K., Negishi, T., *Mutagenesis*, 23, 509-513.
 7. Acetylation to amino group on guanosine induced by nitric oxide in acetonitrile under aerobic conditions (2009) Suzuki, T., Fukai, T., Seki, Y., Inukai, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 89-91.
 8. Formation of diazoate intermediate upon nitrous acid and nitric oxide treatment of 2'-deoxyadenosine (2009) Suzuki, T., Iwakura, K., Takashima, Y., Kasajima, N., Inukai, M., *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 788-791.
 9. Hypersensitivity of a urate-null strain of *Drosophila melanogaster* to the toxic effects of environmental cigarette smoke (2009) Hamatake, Y., Morita, A., Yuma, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Suzuki, T., Kasai, H., Kawai, K., Negishi, T., *Genes & Environment*, 31, 43-45.
 10. Formation of spiroiminodihydroantoin nucleoside from 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by nitric oxide under aerobic conditions (2009) Suzuki, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 4944-4947.
 11. Effects of uric acid on nitrosation of *N*-acetylcysteine by diethylamine NONOate and *N*-acetyl-*N*-nitrosotryptophan (2009) Suzuki, T., Naka, A., Kimura H., *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 736-739.
 12. Effects of bromide upon reaction of nucleosides with hydrogen peroxide induced by ultraviolet light (2009) Suzuki, T., Moriwaki, N., Kurokawa, K., Inukai, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 3217-3219.
- [学会発表] (計 16 件)
1. 鈴木利典、内部慎也; 臭化アンモニウム存在下でのパーオキシナイトライトとデオキシシチジンの反応 第 29 回日本フリーラジカル学会学術集会 (名古屋、H19. 6.10-11)
 2. 翁 経緯、鈴木哲矢、川上朝子 Loakes, D., 根岸和雄、根岸友恵; Nucleotide incorporation against 7,8-dihydro-8-oxoguanine is influenced by neighboring base sequences in TLS DNA polymerase reaction. 日本環境変異原学会 36 回大会・第 1 回アジア環境変異原学会 (小倉、H19. 11. 29-30)
 3. 森 恵美子、平 健太郎、藤井亜世、有元佐賀恵、岡本敬の介、根岸友恵; Involvement of MMR in *Drosophila* somatic cell mutation induced by UV. 日本環境変異原学会 36 回大会・第 1 回アジア環境変異原学会 (小倉、H19. 11. 29-30)
 4. 濱武有子、森田あゆみ、岡本敬の介、有元佐賀恵、葛西 宏、河井一明、根岸友恵; Effects of side stream cigarette smoke on the reproducibility of *Drosophila* exposed at third instar larvae. 日本環境変異原学会 36 回大会・第 1 回アジア環境変異原学会 (小倉、H19. 11. 29-30)
 5. 濱武有子、森田あゆみ、岡本敬の介、有元佐賀恵、葛西宏、河井一明、鈴木利典、根岸友恵; タバコ副流煙の生体影響 日本薬学会 128 年会 (横浜、H20. 3. 26-28)
 6. 根岸和雄、川上朝子、大塚智恵、翁 経緯、尾山 廣、根岸友恵; 酵母ポリメラーゼ η 欠損株における 8-ヒドロキシグアニンの変異誘導に対する隣接配列の影響 日本薬学会 128 年会 (横浜、H20. 3. 26-28)
 7. 中野浩太、平 健太郎、有元佐賀恵、岡本敬の介、根岸友恵; アルキル化剤の変異原性に対するミスマッチ修復の関与 日本薬学会 128 年会 (横浜、H20. 3. 26-28)
 8. 翁 経緯、奥川洋司、川上朝子、岡本敬の介、有元佐賀恵、David Loakes、根岸和雄、根岸友恵; 8-Oxo 残基の translesion synthesis における隣接塩基配列の影響 日本薬学会 128 年会 (横浜、H20. 3. 26-28)
 9. 鈴木利典、位田和也; 臭化アンモニウム存在下でのパーオキシナイトライトとデオキシシチジンの反応 日本薬学会 128 年会 (横浜、H20. 3. 26-28)
 10. 根岸友恵、東 正一、中村貴宣、渡辺正勝、葛西 宏、河井一明、翁経緯、根岸和雄; UVA レーザーによる DNA の酸化傷害 第 30 回日本光医学・光生物学会 (松江、H20. 7. 11-12)
 11. 米田香仁、塩澤明子、有元佐賀恵、岡本敬の介、根岸友恵; ヤナギマツタケに含まれる抗変異原物質の研究 第 13 回日本フードファクター学会 (東京、H20. 11. 17, 18)
 12. 根岸友恵、濱武有子、藤原大、有元佐賀恵、鈴木利典; 副流煙曝露により誘起される致死作用と尿酸含量の関係 第 37 回日本環境変異原学会 (那覇、H20. 12. 4-5)
 13. 中野浩太、高橋栄造、有元佐賀恵、岡本敬の介、根岸友恵; O⁴-alkylthymine の修復経路の解明 第 37 回日本環境変異原学会 (沖縄、H20. 12. 4-5)
 14. 藤原 大、濱武有子、岡本敬の介、有元佐賀恵、鈴木利典、根岸友恵; 副流煙曝露により誘起される致死作用と尿酸含量の関係 日本薬学会 129 年会 (京都、

H21. 3. 26-28)

15. 米田香仁、塩澤明子、岡本敬の介、有元佐賀恵、根岸友恵；ヤナギマツタケに含まれる抗変異原物質の研究 日本薬学会 129 年会（京都、H21. 3. 26-28）
16. 鈴木利典、仲 敦史、木村 悠；システインとトリプトファンのニトロソ化反応における尿酸の作用 日本薬学会 129 年会（京都、H21. 3. 26-28）

〔図書〕（計 1 件）

1. Chlorophyll against cancer. (2009) Hayatsu, H., Negishi T., Arimoto-Kobayashi, S., in "*Chemoprevention of Cancer and DNA Damage*", eds. by Knasmueller et al., Wiley-VCH, Weinheim, pp 699-708.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根岸 友恵

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80116491

(2) 研究分担者

鈴木 利典

就実大学薬学部・教授

研究者番号：90368697

(3) 研究協力者

濱武 有子

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士前期課程・大学院生

藤原 大

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士前期課程・大学院生