

バクテリオルベリンの抗酸化作用に関する基礎研究

井出 博・齋藤 剛*・寺東 宏明

(広島大学理学部, 広島大学アイソトープセンター)

1. 緒 言

地球上に初めて現れた生物は、紫外線の届かない海中に生息し酸素を必要としない嫌気性生物であった。その後、光合成により酸素を放出する生物が発生し、長い時間をかけて大気中に酸素が蓄積されていった。やがてオゾン層が形成され紫外線が地表に届かなくなると生物圏が拡大され、好気性生物が出現した。エネルギー変換という観点から見ると、酸素を電子受容体とする酸素呼吸は嫌気的な発酵に比べ格段に効率のよいシステムである。しかし、酸素は生体内の種々の代謝過程で活性酸素（スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素等）となり細胞成分を非特異的に酸化し、生体に対し強い毒性を示すという両刃の剣の側面をもっている^{1,2)}。このような活性酸素による障害を抑制するために生物は活性酸素を消去無毒化する機構を進化の過程で獲得した。

細胞内における活性酸素の消去無毒化には、酵素反応によるものと非酵素的な低分子抗酸化物質によるものがある。前者は、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素であり、後者は、グルタチオン、アスコルビン酸 (ビタミンC)、トコフェロール (ビタミンE)、ユビキノンなどである^{1,2)}。活性酸素に対する非酵素的な生体防御機構において、不飽和脂質の一つであり長鎖ポリエン構造を有するカロテノイドも細胞を保護する重要な役割を担っていることが明らかとなっている³⁾。カロ

テノイドは細菌、植物、動物に広く分布し、単独あるいは他の抗酸化物質と共同して生体を防御している。特にビタミンAの前駆体である β -カロテンの活性酸素補足効果、抗酸化活性、抗腫瘍作用については多数の研究報告があり^{4,5)}、さらに最近では機能性食品開発への応用が注目されている。また、酸素原子を含むカロテノイドであるキサントフィル類の活性酸素補足効果、抗酸化活性効果についても検討されており、酸素原子を含まないカロテノイドに比べ高い効果があることが示されている^{6,7)}。

当研究グループでは、高い放射線・紫外線抵抗性を示す細菌 *Rubrobacter radiotolerans*, *Deinococcus radiodurans*, *Halobacterium salinarum* がカロテノイド系色素を含むことに注目し、これらの色素が遺伝物質であるDNAや細胞膜の酸化的損傷を直接あるいは間接的に防御することにより放射線・紫外線耐性を示すと推測した⁸⁻¹⁰⁾。本研究では、上記細菌の高度な抗酸化システムの解析を目的として、カロテノイド色素の化学構造の同定と生体防御機構について検討した。

2. *Deinococcus radiodurans* 由来カロテノイドの精製と同定

2.1 目 的

D. radiodurans は赤色色素を含む高度放射線耐性細菌であり、その放射線耐性機構を明らかにするために多くの研究が行われている^{11,12)}。色素

をもたない *D. radiodurans* の突然変異株は野生株に比べ Fenton 反応で発生するヒドロキシルラジカルに感受性である¹³⁾。放射線も水の放射線分解により主要な活性種としてヒドロキシルラジカルを発生することから、この細菌の放射線耐性にも色素の存在が関与していることが示唆される。しかし、*D. radiodurans* 由来の色素の構造はこれまでに報告されていないため、本研究では、*D. radiodurans* の主要色素を精製し、構造を同定した。

2.2 実験方法

D. radiodurans は TGY 培地中 37°C で培養し、定常期に達した細胞を集菌した。得られた菌体をエタノールで抽出後、等量のエーテルと混合した。15% NaCl 水溶液を加え分離した有機相を乾燥濃縮し、色素をベンゼンに溶解した。一部の試料を TLC 分析した。残りの全量をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した。含量の最も多い色素成分を、さらに逆相 HPLC で精製した。得られた色素の構造は、紫外可視吸収、一次元・二次元 NMR、高分解能質量分析、CD スペクトル分析により同定した。色素の TLC 分析はシリカゲル薄相プレートで行い、試料はアセトン/ベンゼン溶媒により展開した。

2.3 結果と考察

D. radiodurans から抽出した色素の TLC 分析の結果、*D. radiodurans* には 5 種類以上の色素が含まれることが示された。さらに、Carr-Price テストにより、分離されたすべての色素はカロテノイドであることが明らかとなった。TLC プレートから個々のカロテノイドを抽出し、可視吸収極大 (480-495nm) からその相対量を求めたところ、主要なカロテノイドは 1 つであり全カロテノイドの約 70% を占めることが明らかとなった。これをカロテノイド 1 とした。

逆相 HPLC で精製した 1 の分子式を高分解能

質量分析により決定したところ、 $C_{40}H_{54}O_3$ が得られた。 1H 、 ^{13}C -NMR および DEPT スペクトルからは、1 は炭素数 40 の化合物であり、それぞれメチル基 (残基数 10)、メチレン基 (2)、メチン基 (18)、四級炭素 (9)、カルボニル基 (1) を含むことが示された。さらに、1 のトリメチルシリル誘導体の分子量は 726 であり、分子内に 2 つの水酸基を含むことが示された。長鎖ポリエンの末端構造は、 3C - 1H COSY および HMBC スペクトルより同定した。HMBC スペクトルで観測された CH 相関と両末端構造を図 1A,B に示す。

以上の分析データに基づき決定された 1 の構造を図 1C に示す。不斉炭素 C2 の絶対配置 (R) は CD スペクトルより同定した。1 の可視吸収極大 (480nm, アセトン中) は 13 の共役二重結合からなる発色団の構造ともよく一致している。

同定された 1 は、これまでに報告されていない構造の新規カロテノイド化合物であり、バクテリオラディオデュリン (bacterioradiodurin) と命名した。カロテノイドの抗酸化機構の中で、フリーラジカルに対する補足能は分子内に含まれるカルボニル基や水酸基の数に依存することが示唆されている⁷⁾。また、一重項酸素消去能はポリエンの共役二重結合数に相関がある¹⁴⁾。この点で、

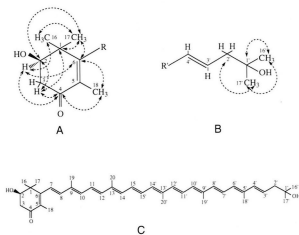


図 1 *D. radiodurans* 由来カロテノイド (バクテリオラディオデュリン) の構造。A,B: HMBC スペクトル分析による CH 相関と末端構造, C: バクテリオラディオデュリンの構造

D. radiodurans の主要カロテノイドであるバクテリオリディオデュリンは、分子内に2つの水酸基、1つのカルボニル基、13の共役二重結合を含み、高いフリーラジカル補足能と一重項酸素消去能をもつと予想される。したがって、バクテリオリディオデュリンは、放射線により発生する種々の活性酸素を効率よく消去無毒化することにより、本細菌の高い放射線耐性に寄与しているものと考えられる。

3. *Halobacterium salinarium* の生体防御におけるバクテリオルペリンの役割

3.1 目的

H. salinarium は塩湖や塩田に生息する高度好塩性細菌である¹⁵⁾。本細菌は高い好塩性の外に、膜色素としてカロテノイド系色素（バクテリオルペリン）を含むのが特徴である。*H. salinarium* のバクテリオルペリンの構造は、高度放射線耐性細菌 *R. radiotolerance* のものと同一であることから⁸⁾、*H. salinarium* においてもバクテリオルペリンが種々の環境ストレスに対し防御的な役割を果たしていることが予想される。本研究では、*H. salinarium* のバクテリオルペリン欠失株を単離し、酸化ストレスおよび他のストレスに対する野生株と変異株の感受性を比較検討した。

3.2 実験方法

H. salinarium は CM 培地中37°Cで培養した。*H. salinarium* のバクテリオルペリン欠失株は、野生株を N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) で処理することにより単離した。酸化ストレスおよび他のストレス（紫外線、マイトマイシン C）に対する耐性を調べるために、集菌した対数増殖期の細胞を20% NaCl を含むリン酸緩衝液 (67 mM, pH 6.8) に懸濁し、過酸化水素、⁶⁰Co γ -線照射、紫外線照射、マイトマイシン C 処理を行った。これを CM アガープ

レートに播種し、37°Cでインキュベート後コロニー数を計測した。

3.3 結果と考察

図 2A,B に過酸化水素処理および γ -線照射照射した *H. salinarium* の生存率曲線を示す。過酸化水素、 γ -線いずれに対してもバクテリオルペリン欠失株は野生株に比べ感受性が高かった。 γ -線の生物作用は、主として細胞内に含まれる水の放射線分解により発生する種々の活性酸素種（ヒドロキシルラジカル、過酸化水素など）由来することが知られている¹⁶⁾。したがって、野生株と変異株の過酸化水素および γ -線に対する感受性の差は、活性酸素種に対しバクテリオルペリンが防御的に働き、細胞内の遺伝物質 DNA や膜成分の酸化的障害を抑制していることを示唆する。また、バクテリオルペリン欠失株は紫外線に対しても野生株より感受性が高く（図 2C）、バクテリオルペリンが *H. salinarium* の紫外線耐性にも関与していることが示された。*H. salinarium* が、塩田や塩湖など強い紫外線環境下で生息すること

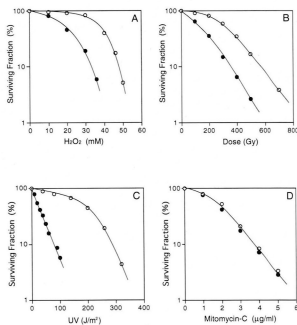


図 2 *H. salinarium* 野生株とバクテリオルペリン欠失株の過酸化水素、 γ -線、紫外線、マイトマイシン C に対する抵抗性。○: 野生株, ●: バクテリオルペリン欠失株。A: 過酸化水素, B: γ -線, C: 紫外線, D: マイトマイシン C

を考慮すると、バクテリオルペリンが酸化ストレスのみならず環境紫外線に対する生体防御機能も合わせてもっているものと考えられる。紫外線の細胞致死効果は主として DNA 中のピリミジンダイマー形成に由来することから¹⁷⁾、バクテリオルペリンはピリミジンダイマー生成を抑制しているものと予想される。

一方、マイトマイシン C に対しては野生株と欠失株の間で感受性に差は認められなかった (図 2D)。マイトマイシン C は DNA のアルキル化・DNA 鎖間のクロスリンク形成により細胞死を誘発する¹⁷⁾。したがって、バクテリオルペリンは酸化ストレスや紫外線ストレスに対しては防護作用を示すが、アルキル化ストレスに対しては防護効果が無いことが示された。

4. 放射線耐性を示す細菌由来カロテノイドの生体防御機構

4.1 目的

放射線耐性を示す *R. radiotolerans*, *D. radiodurans*, *H. salinarium* のカロテノイド [バクテリオルペリン (*R. radiotolerans*, *H. salinarium*), バクテリオラディオデュリン (*D. radiodurans*)] は、水の放射線分解により生成する活性酸素を効率よく消去無毒化することによって、細胞内分子の酸化障害を防いでいると考えられる。本研究では、遺伝物質である DNA の酸化障害に注目し、放射線による核酸塩基チミンの放射線分解および DNA の鎖切断に対するバクテリオルペリンとバクテリオラディオデュリンの防護効果を検討した。

4.2 実験方法

バクテリオルペリン⁸⁾およびバクテリオラディオデュリン (2 参照) は、それぞれ *H. salinarium* および *D. radiodurans* より抽出し、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC により精製し

た。チミンの放射線反応は、[2-¹⁴C] チミン (0.5 mM), SDS (1 mM), 抗酸化剤 (0.1 mM) を含むリン酸緩衝液 (1 mM) に N₂O を飽和させ、⁶⁰Co γ -線を照射して行った。抗酸化剤としては、システイン、 β -カロチン、バクテリオルペリン、バクテリオラディオデュリンを用いた。照射試料を 2 次元 TLC 分離しチミンスポットの放射活性を測定することによりチミンの分解量を定量した¹⁰⁾。DNA 鎖切断に対する影響は、子牛胸腺 DNA (40 μ g/ml), バクテリオルペリン (0.01 mM), Brij (0.29 mM) を含むリン酸緩衝液 (10 mM, pH7.0) に⁶⁰Co γ -線を照射して検討した。照射試料は、0.7% 中性およびアルカリ性アガロース電気泳動により分析した¹⁸⁾。

4.3 結果と考察

図 3 に種々の抗酸化剤存在下におけるチミンの分解量と照射線量の関係を示す。この実験では、抗酸化剤のヒドロキシルラジカルに対する捕捉効果を検討するため、反応は N₂O 飽和条件下で行った ($e^-_{aq} + N_2O \rightarrow N_2 + OH + OH^-$)¹⁶⁾。添加した抗酸化剤 (システイン、 β -カロチン、バクテリオルペリン、バクテリオラディオデュリン) は

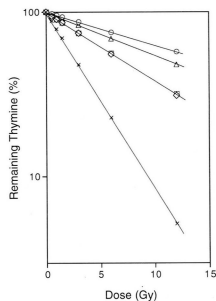


図 3 抗酸化剤存在下におけるチミンの放射線分解。×: 抗酸化剤なし, ◇: システイン, □: β -カロチン, △: バクテリオラディオデュリン, ○: バクテリオルペリン

いずれもチミンの分解を抑制したが、バクテリオルベリンとバクテリオラディオデュリンはシステインや β -カロチンに比べ特に高い抑制効果を示した。また、バクテリオルベリンとバクテリオラディオデュリンのポリエン構造に由来する紫外可視部の吸収は、照射線量とともに減少した。この結果は、一般によく知られた抗酸化剤である β -カロチンやシステインに比べバクテリオルベリンやバクテリオラディオデュリンが効率よくヒドロキシルラジカルを捕捉し、高い防御効果があることを示している。

図4にバクテリオルベリン存在下および非存在下におけるDNA二重鎖切断の分析結果を示す。DNA二重鎖切断は中性アガロース電気泳動により分析した。バクテリオルベリン存在下では非存在下に比べ二重鎖切断によるDNAの低分子化が抑制された。また、照射DNAのアルカリ性アガロースゲル電気泳動分析の結果から、DNA一本鎖切断もバクテリオルベリンにより抑制されることが明らかとなった。DNA鎖切断の主な原因はヒドロキシルラジカルによるデオキシリボースの損傷であることから¹⁶⁾、得られた結果はバクテリオルベリンが放射線により発生したヒドロキシルラジカルを捕捉し、DNA鎖切断を抑制していることを示す。

以上に示したチミン分解およびDNA鎖切断に

対するバクテリオルベリンやバクテリオラディオデュリン添加効果から、これらのカロテノイドは効率よくヒドロキシルラジカルを捕捉しDNAの酸化分解を抑制することが明らかとなった。また、本研究では示していないが、バクテリオルベリンやバクテリオラディオデュリンはDNAと同様に膜成分の酸化分解も抑制すると考えられる。

5. 結 語

本研究の結果から、高い放射線耐性を示す *R. radiotolerans*, *D. radiodurans*, *H. salinarum* に含まれるカロテノイド (バクテリオルベリン, バクテリオラディオデュリン) は高い抗酸化作用を示し、これらの細菌のDNAなど細胞内分子の酸化的損傷を効率よく抑制することにより生体防御に関わっていることが明らかとなった。

最後に本研究を実施するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団ならびに関係各位の皆様にご心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) 八木國夫, 中野稔 活性酸素, 医歯薬出版, 1987.
- 2) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦, 活性酸素, 共立出版, 1988.
- 3) N. I. Krinsky, Pure Appl. Chem., **66**, 1003-1010, 1994.
- 4) N. I. Krinsky, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **200**, 248-254, 1992.
- 5) N. I. Krinsky, Free Rad. Biol. Med., **7**, 617-635, 1989.
- 6) B. P. Lim, A. Nagano, J. Terao, K. Tanaka, T. Suzuki, and K. Takama, Biochem. Biophys. Acta, **1126**, 178-184, 1992.
- 7) W. Miki, Pure Appl. Chem., **63**, 141-146, 1991.
- 8) T. Saito, H. Terato, and O. Yamamoto, Arch. Microbiol., **162**, 414-421, 1994.
- 9) H. R. Shahmohammadi, E. Asgarani, H. Terato, H. Ide, and O. Yamamoto, J. Radiat. Res., **38**, 37-43, 1997.
- 10) T. Saito, Y. Miyabe, H. Ide, and O. Yamamoto, Radiat. Phys. Chem., **50**, 267-269, 1997.
- 11) B. E. B. Moseley, Photochem. Photobiol. Rev., **7**, 223-

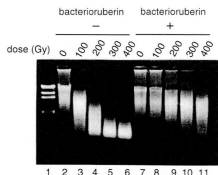


図4 アガロース電気泳動によるDNA二重鎖切断の分析。
レーン1: 分子量マーカー (A Hind III digests), レー
ン2-6: バクテリオルベリン無添加, レー
ン7-11: バクテリオルベリン添加

- 274, 1983.
- 12) K. W. Minton, *Mutat. Res.*, **363**, 1-7, 1996.
- 13) S. Kitayama, S. Asaka, and K. Totsuka, *J. Bacteriol.*, **155**, 1200-1207, 1983.
- 14) S. C. Foote, Y. C. Chang, and R. W. Denny, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5216-5218, 1970.
- 15) D. J. Kushner, *The Bacteria*, vol. 8 *Archaeobacteria* (C. R. Woese and R.S. Wolfe eds.) pp.171-214, Academic Press, Orland, 1985.
- 16) C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, New York, 1987.
- 17) E. C. Friedberg, G. C. Walker, and W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, AMS Press, Washington D.C., 1995.
- 18) J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Studies on the Antioxidation Activity of Bacterioruberin

Hiroshi Ide, Takeshi Saito* and Hiroaki Terato

(Hiroshima University, Faculty of Science and Radioisotope Center*)

Highly radioresistant bacteria such as *Rubrobacter radiotolerance*, *Deinococcus radiodurans*, and *Halobacterium salinarum* contains carotenoids that are responsible for the red color of these organisms. Considering the high resistance of these bacteria against radiation, a biological function of these carotenoids is likely to be antioxidation action against reactive oxygen species (hydroxyl radicals, hydrogen peroxide etc.) generated by radiation.

In the first part of this study, the major carotenoid was isolated from *D. radiodurans* and its structure was identified based on UV/VIS, NMR, CD, MS spectra and chemical characterization. The carotenoid (designated as bacterioradiodurin) was a new compound and accounted for 70% of the total carotenoids. Similar to bacterioruberin, the major carotenoid isolated from *R. radiotolerance* and *H. salinarum*, bacterioradiodurin had a highly conjugated polyene structure with unique end groups containing hydroxyl and keto functional groups, implying a potent antioxidation activity. In the second part, protective roles of bacterioruberin against hydrogen peroxide and hydroxyl radicals was studied using wild type and a bacterioruberin-deficient mutant of *H. salinarum*. The mutant exhibited enhanced sensitivity against γ -rays and hydrogen peroxide relative to the wild type strain, indicating that bacterioruberin in *H. salinarum* protected cells from toxic effects of reactive oxygen species. In the third part, effects of bacterioruberin and bacterioradiodurin on radiation-induced oxidative damage to thymine and DNA was investigated to elucidate the antioxidation mechanism of these carotenoids. Both carotenoids were very efficient scavengers of hydroxyl radicals so that thymine degradation and single- and double-strand breaks of DNA were significantly suppressed in the presence of bacterioruberin and bacterioradiodurin. Moreover, the hydroxyl radical-scavenging ability of bacterioruberin was much higher than the same concentration of cysteine and β -carotene.

The present results indicate bacterioruberin and bacterioradiodurin contained in the radioresistant bacteria (*R. radiotolerance*, *H. salinarum* and *D. radiodurans*) act as potent antioxidants, thereby protecting cells from toxic effects of reactive oxygen species.