

学 位 論 文 題 名

Studies on DNA damage caused by metal-binding melanin having superoxide dismutase like activity

（スーパーオキシドディスムターゼ様活性を有する
金属結合メラニンによる DNA 損傷に関する研究）

学位論文内容の要旨

メラニンは菌類から哺乳類までの広い範囲に存在する黒色、赤褐色あるいは黄色の色素であり、その構造は5,6-ヒドロキシインドールが無秩序に高分子構造をとっているものである。このうち、ヒトの皮膚や毛髪中に存在するユーメラニンは、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)様活性を有することが古くから知られており、その生理学的役割は、紫外線等に対する生体防御を担っていると考えられている。このユーメラニンの合成経路は銅依存性酵素であるチロシナーゼによるドーパの酸化により引き起こされる。悪性黒色腫はこのチロシナーゼの活性異常が原因で起こると考えられており、その細胞内では通常と比べ高い濃度で銅の存在が確認されている。

一方、脳内の黒質緻密層に多く存在しているニューロメラニンは、その合成経路がユーメラニンと異なり、黒質細胞で産生されたドーパミンが自動酸化することにより非酵素的に生成される。このニューロメラニンの生理学的役割は明確にされておらず、SOD様活性を有しているのか否かについても明らかにされていない。このように、脳内のニューロメラニンに関しては不明な点が多く残っている。近年、このニューロメラニンに重金属が結合していることが報告され、パーキンソン病患者の黒質細胞での鉄の異常蓄積との関連性が議論されている。これら合成経路の異なるメラニンに於いて、結合する重金属の種類によって様々な障害の起こりうる可能性が考えられた。しかし、メラニンに結合している重金属種の差によるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)除去作用及びDNA損傷能の違いに関する研究はこれまで行われていない。

そこで、本研究では金属と結合していないニューロメラニン(ドーパミンメラニン)及び、銅、亜鉛、鉄等の重金属と結合したニューロメラニン(金属結合メラニン)を合成し、それら金属結合メラニンによるドーパミン存在下でのDNA損傷能を調べると共に、これまでメラニンの生理学的役割とされてきたスーパーオキシドディスムターゼ様活性との関連性を併せて検討した。

金属と結合していないドーパミンメラニンの合成は、5 mMドーパミン溶液（50 mM Tris pH7.4）を72時間攪拌することにより得られた。また、金属結合メラニンの合成は、10 mMドーパミン溶液中に10 mM 塩化鉄(III)、10 mM 硫酸銅(II)及び10 mM 塩化亜鉛(II)の各溶液を添加し、同様に24時間攪拌することにより得られた。未反応の重金属は濾過後、塩酸で洗浄することにより取り除いた。調製した金属と結合していないドーパミンメ

ラニン及び金属結合メラニンが赤外吸収スペクトル法により同定した。金属と結合していないドーパミンメラニン及び金属結合メラニンの溶液化は、5 M水酸化ナトリウム溶液により溶解した後、それぞれのメラニン溶液を2 Mリン酸溶液でpH 7.8 に調製した。金属結合メラニン中に存在する結合金属量は原子吸光分析装置により測定した。また、金属結合メラニン溶液にキレート剤を添加することによりメラニン濃度一定の状態では金属量だけを変化させた。金属結合メラニン及び金属と結合していないドーパミンメラニンによるDNA損傷能は、結合メラニンあるいは等濃度のドーパミンメラニンと共に37℃で1時間反応させ、アガロース電気泳動法により検討した。SOD様活性はBeauchampら(1971)の方法に基づき、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により発生した O_2^- が、ニトロブルーテトラゾリウムを還元することによりフォルマザンになることを利用して測定した。

その結果、金属と結合していないドーパミンメラニン及び金属結合メラニンが、SOD様活性を有することが明らかとなった。この結果より、反応速度論的解析を行った結果、SODと金属結合メラニンの O_2^- の消去能を比較した場合、金属結合メラニン中で一番SOD様活性の高かったCu-メラニンはSODに比べて約1/10000程度の活性を有していた。

金属結合メラニン中に結合する金属種あるいは、金属量の変化に対するSOD様活性の変化は、Cu-メラニン及びFe-メラニンは金属と結合していないドーパミンメラニンの O_2^- の消去能に比べ高いことが示された。この活性はCu-メラニン及びFe-メラニン中に存在する結合重金属量に比例して増加することが明らかになった。なお、Zn-メラニンの O_2^- の消去能はZn含有量に関係なく一定であったことより、Zn-メラニンの O_2^- の消去能は金属と結合していないドーパミンメラニンそのものに依存していると考えられた。

一方、ドーパミン存在下での金属結合メラニンによるDNA損傷能は、Cu-メラニン及びFe-メラニンに於いて確認された。しかし、Zn-メラニン及びドーパミンメラニンではDNA損傷が認められなかった。更にFe-メラニンでは、ドーパミン存在下に比べ過酸化水素存在下の方がより強いDNA損傷能を示した。特に、Cu-メラニンでは10 μ Mと低濃度のドーパミンからDNA損傷を起こし、またFe-メラニンでは、1000 μ Mと高濃度にドーパミンを添加したときのみDNA損傷が確認された。更にFe-メラニンでは、ドーパミン存在下より過酸化水素存在下の方がより強いDNA損傷能を示した。これらのDNA損傷はカタラーゼ、アジ化ナトリウム、マンニトールにより抑制されたことから、過酸化水素由来の $\cdot OH$ もしくは $\cdot OH$ に類似したラジカル種あるいは一重項酸素が関与していることが明らかになった。また、SODによりDNA損傷が抑制されなかったことから O_2^- による直接的なDNA損傷はないことが示された。

以上の結果からCu-メラニン及びFe-メラニンは、それぞれの重金属が結合することにより金属と結合していないドーパミンメラニンと比べ O_2^- の消去能が上昇するにも関わらず、ドーパミン存在下で O_2^- 以外のラジカルを放出してより強いDNA損傷を示すことが明らかになった。近年、悪性黒色腫細胞中の銅の蓄積及びパーキンソン病の黒質細胞での鉄の異常蓄積等が報告されているが、これらの報告と本研究の結果を合わせて考えると、生合成されたニューロメラニンがこれら銅または鉄と結合することにより、この細胞内でDNA損傷を引き起こすことが予想され、この疾病の病因となりうる可能性が示唆された。またユーメラニンに於いては、蓄積した銅がユーメラニンと結合することから、悪性黒色腫の病因のひとつとなり得るのではないかと考えられた。

本研究の成果は、パーキンソン病あるいは悪性黒色腫の発現機序の解明に貢献するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 正 剛

副 査 教 授 岩 熊 敏 夫

副 査 教 授 田 村 守 (電子科学研究所)

副 査 助 教 授 新 岡 正

学 位 論 文 題 名

Studies on DNA damage caused by metal-binding melanin having superoxide dismutase like activity

(スーパーオキシドディスムターゼ様活性を有する
金属結合メラニンによる DNA 損傷に関する研究)

生体内にはメラニンとして、主としてニューロメラニン、ユーメラニン及びフェオメラニンが存在する。ユーメラニンとフェオメラニンは、人では皮膚や毛髪中に存在し、スーパーオキシドアニオン除去作用(スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)様活性)を有していることが知られており、紫外線等に対する生体防御を担っていると考えられている。一方、ニューロメラニンは、脳内の黒質緻密層に多く存在しているが、その生理学的役割は明確にされていない。近年、このニューロメラニンに重金属が結合していることが報告され、パーキンソン病患者の黒質細胞での鉄の異常蓄積との関連性が議論されている。これらのメラニンが、結合する重金属の種類によって様々な生体影響を有する可能性が考えられるが、メラニンに結合している重金属種の差によるSOD様活性及び、DNA損傷能に関する研究はこれまで行われていない。本研究は、ニューロメラニン(ドーパミンメラニン)及び、Cu, Fe, Znの重金属と結合したニューロメラニン(金属結合メラニン)を合成し、これまでユーメラニンとフェオメラニンの生理学的役割とされてきたSOD様活性がニューロメラニンにも存在するのか否か、また、結合する各重金属種によって活性がどのように変化するのかを調べるとともに、それら金属結合メラニンによるドーパミン存在下でのDNA損傷能を検討したものである。

本論文は、導入部とそれに続く3章から構成されている。導入部ではメラニンの一般的特徴を概説している。第1章では合成したドーパミンメラニン及び金属結合メラニンの化学的特性について赤外線吸収スペクトル分光法及び紫外線吸収スペクトル分光法を用いて検討している。金属と結合したドーパミンメラニンについては、金属結合部位を明らかにし、また、金属種の異なる場合の結合状態の違いについて、Fe-メラニン中のFeイオンのみが3価で結

合していることをはじめて明らかにしている。

第2章では、反応速度論的解析結果を述べている。すなわち、これまで報告がなかったNBTによる反応速度論的解析法に取り組み、これを初めて確立することにより、従来問題となっていた酵素反応を阻害する系においても簡便な方法で第2次反応速度定数を求めることが可能となることを示している。この方法を用いてドーパミンメラニン及び金属結合メラニンのSOD様活性を検討した結果、ドーパミンメラニン及び金属結合メラニンのSOD様活性に関して、Cu-メラニン及びFe-メラニンではドーパミンメラニンの O_2^- 消去能に比べ、より高くなることを明らかにしている。また、この活性はCu-メラニン及びFe-メラニン中に存在する金属量に依存して直線的に増加することを示している。なお、Zn-メラニンの O_2^- 消去能はZn含有量に関係なく一定であったことより、Zn-メラニンの O_2^- 消去能はメラニンそのものに依存していることを明らかにしている。

第3章では、Cu、Fe、Znの重金属と結合した金属結合メラニンによるドーパミン存在下でのDNA損傷能について述べている。すなわち、ドーパミン存在下でCu-メラニン及びFe-メラニンによってDNA損傷が生じ、一方、Zn-メラニン及びドーパミンメラニンではDNA損傷が認められないことを明らかにしている。特に、Cu-メラニンではドーパミン濃度が $10\mu M$ という低濃度の場合でもDNA損傷を起こし、またFe-メラニンでは、 $1000\mu M$ と高濃度のドーパミンを添加した場合にDNA損傷が生ずることを明らかにしている。更にFe-メラニンでは、ドーパミン存在下ではDNA損傷を起こさない条件である低濃度のFe含有量における過酸化水素存在下でDNA損傷能が引き起こされることを明らかにしている。これらのDNA損傷はカタラーゼ、アジ化ナトリウム、マンニトールにより抑制されたことから、過酸化水素あるいは一重項酸素由来の $\cdot OH$ もしくは $\cdot OH$ に類似したラジカル種の関与が示唆されることを述べている。また、SODによりDNA損傷が抑制されなかったことから O_2^- による直接的DNA損傷はないと推察されることを述べている。

これを要するに、Cu-メラニン及びFe-メラニンは、それぞれの重金属が結合することによりドーパミンメラニン単体と比べ高い O_2^- 消去能を獲得するにも関わらず、ドーパミン存在下でより強いDNA損傷を引き起こすことを明らかにしている。

これらの研究成果は、パーキンソン病発症機序の解明の一助となるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程に於ける研鑽や取得単位なども併せ、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。