

# 白金ナノ粒子の電子伝達系複合体 I 様活性の解析

学生証番号：56540

細胞応答化学分野

彦坂 圭介

## <序論>

近年、ナノ粒子化した金属がいくつかの酸化還元反応を触媒するという報告がなされ、金属ナノ粒子を生体へ応用しようとする試みがなされている。我々の研究室では、白金ナノ粒子 (CP-Pt) が活性酸素種を除去することを証明してきたが [1]、白金の触媒能力を利用して活性酸素種の除去のみならずこれまでに証明されていない性質を解明し、利用することで生体への応用の可能性が広がると考えられる。本研究では、活性酸素種の主要な発生源の1つであるミトコンドリアにおける電子伝達系複合体 I の一部の機能を CP-Pt が有することを検討した。電子伝達系複合体 I は、NADH-ubiquinone oxidoreductase と呼ばれ、NADH を酸化しその電子を ubiquinone に渡すことで ubiquinone を還元する酵素である。この反応において NADH は  $\text{NAD}^+$  に酸化され、ubiquinone は ubiquinol に還元される。複合体 I を阻害し活性酸素種を過剰に発生させ、ATP 生産を低下させることが疾患の発症や悪化に関わってくる病気が存在し、それらの治療法につながればと考えている。

## <方法と結果>

### 1. NADH の酸化

終濃度  $100 \mu\text{M}$  NADH と  $50 \mu\text{M}$  CP-Pt を室温で図 1 に示す時間反応させた後に、NADH に特有な  $340 \text{ nm}$  の波長を計測し、モル吸光係数 ( $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) を利用して NADH の濃度に変換した (図 1 A)。NADH の酸化が CP-Pt の白金成分により引き起こされるのであり、保護剤成分 ( $10 \text{ mM}$  クエン酸 +  $0.60 \text{ mg/ml}$  ペクチン) によって酸化されるのではない事を確かめるために、保護剤成分のみを  $100 \mu\text{M}$  NADH と反応させた (図 1 C)。さらに NADH 自体の分解速度を見るために  $100 \mu\text{M}$  NADH のみの時間経過による変化を調べた (図 1 B)。n = 5。

### 2. $\text{CoQ}_1$ の還元

酸化型の  $\text{CoQ}_1$  は、 $5 \text{ mM}$  の原液を終濃度  $0.25 \text{ mM}$  となる様に取り、そのまま HPLC に注入したものを酸化型  $\text{CoQ}_1$  とした (図 2 A)。酸化型の  $\text{CoQ}_1$  の測定には  $275 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。還元型の  $\text{CoQ}_1$  は  $4 \text{ mM}$  sodium borohydrite を加えて還元したものを HPLC に注入した (図 2 B)。還元型の測定には  $290 \text{ nm}$  の吸光度を測定した。 $0.25 \text{ mM}$   $\text{CoQ}_1$  と  $0.25 \text{ mM}$  CP-Pt を室温で 1 時間反応させた後に HPLC に注入すると還元型の  $\text{CoQ}_1$  のピークと同じ保持時間でピークが表れた (図 2 C)。酸化剤として用いられる  $4 \text{ mM}$  ferricyanide の存在下で同様に  $0.25 \text{ mM}$   $\text{CoQ}_1$  と  $0.25 \text{ mM}$  CP-Pt を室温で 1 時間反応させると還元型の  $\text{CoQ}_1$  のピークは観察されなかった (図 2 D)。

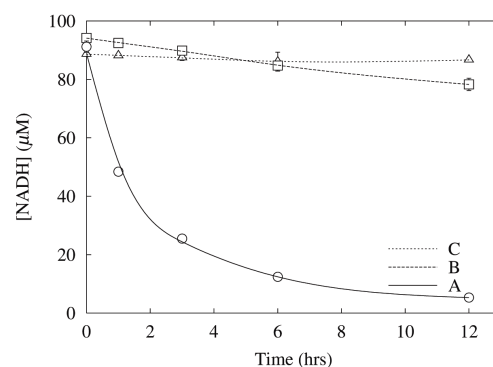


図 1 (A) ○  $100 \mu\text{M}$  NADH +  $50 \mu\text{M}$  CP-Pt  
(B) □  $100 \mu\text{M}$  NADH のみ  
(C) △  $100 \mu\text{M}$  NADH + 保護剤成分

### 3. DT-diaphorase による CoQ<sub>1</sub> の還元

CoQ 還元酵素の一つとして有名な DT-diaphorase を使用し、CoQ 還元酵素が阻害された状態における CP-Pt の作用を検証した。0.25 mM CoQ<sub>1</sub> と 2 mM NADH を含む HEPES/OH 緩衝液 pH 7.5 に 0.12 units の DT-diaphorase を加えることで反応を開始し、37°C で 15 分間反応させた (図 3 Control)。次に、DT-diaphorase の阻害剤の一つである 0.5 mM erythrosine B を Control の条件に加えて、同じように反応させると還元された CoQ<sub>1</sub> は Control の約 2.3% にまで落ち込み、ほぼ完全に DT-diaphorase が阻害された (図 3 Ery)。0.5 mM erythrosine B によって阻害された条件に 0.25 mM CP-Pt を加えて同条件で反応させると還元型 CoQ<sub>1</sub> は Control の約 31% まで回復した (図 3 Ery + CP-Pt)。

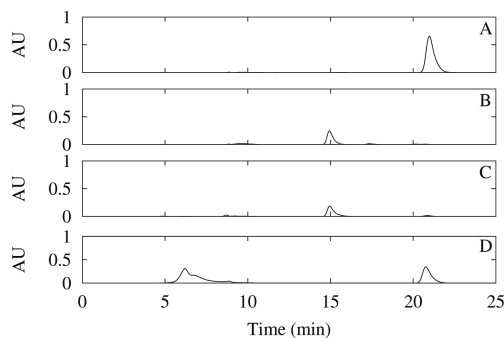


図 2 (A) 酸化型 CoQ<sub>1</sub> (B) 還元型 CoQ<sub>1</sub>  
(C) 0.25 mM CoQ<sub>1</sub> + 0.25 mM CP-Pt  
(D) C + 4 mM ferricyanide

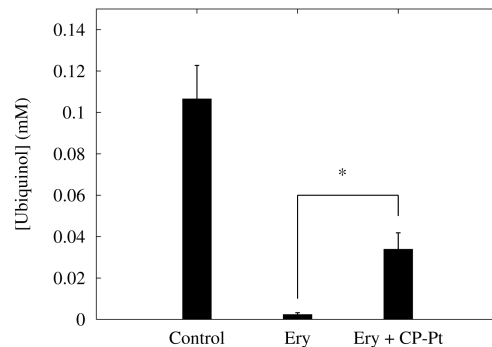


図 3 (Control) 0.25 mM + 2 mM NADH +  
0.12units DT-diaphorase  
(Ery) Control + 0.5 mM erythrosine B  
(Ery + CP-Pt) Ery + 0.25 mM CP-Pt

### <考察と展望>

CP-Pt により NADH が酸化され、CoQ<sub>1</sub> が還元されることが分かった。また、CoQ<sub>1</sub> の還元酵素が阻害されている状態でも非酵素的に CoQ<sub>1</sub> を還元する可能性がある。つまり、電子伝達系複合体 I の活性が低下する病気において CoQ<sub>1</sub> を還元することを目的とした CP-Pt の応用が期待できる。また、マトリックス内で NADH を酸化することで TCA 回路の代謝回転を増加させることができるかも知れない。NADH と CoQ<sub>1</sub> と CP-Pt の三者が共存する際には、還元型 CoQ<sub>1</sub> は減少した。これは還元型 CoQ<sub>1</sub> が酸化型 CoQ<sub>1</sub> に酸化されることでピークが減少したと考えられる。つまり還元型 CoQ<sub>1</sub> が何かを還元し、自身が酸化されたと考えるのが無難である。そこで NAD<sup>+</sup> を還元して NADH に変換したと考えたが、NADH と CoQ<sub>1</sub> と CP-Pt の三者が共存する時の NADH 量は CP-Pt によって NADH 酸化された時の NADH 量と差は見られなかった。つまり、NAD<sup>+</sup> が還元されて NADH に変換されたのではない。HPLC の図から 340 nm の吸光度に関わる dihydronicotinamide の n-π\* 遷移の変化ではなく、他の構造を還元したのではないかと考えられる。CP-Pt をミトコンドリアの電子伝達系に運ぶことを考えた際は、NADH または NAD<sup>+</sup> と還元型 CoQ<sub>1</sub> が直接反応することは考えにくい。今回証明した CP-Pt の能力が、実際に CP-Pt を電子伝達系に運ぶことで ATP 生産や細胞レベルでどのような変化が表れるか検討したい。

1. Kajita M, Hikosaka K, Iitsuka M, Kanayama A, Toshima N, Miyamoto Y, Platinum nanoparticle is useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. Free Radic Res, 2007 (in press).