

# キサンチンオキシダーゼ反応で発生する スーパーオキシドと過酸化水素のオキシグラフ による定量的解析

岡山大学医学部癌研生化学（指導：小田琢三教授）

茂 原 嗣 也

（昭和58年9月7日受稿）

**Key words：**キサンチンオキシダーゼ

Kinetics

スーパーオキシド

オキシグラフ

過酸化水素

## 結 言

酸素電極法は非常に速い酸素消費を測定するのに好都合な装置で、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を調べるのに広く用いられてきた<sup>1,2)</sup>。またこの方法は酸化酵素反応を調べるためにも用いられることが知られている<sup>3)</sup>。キサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応は非常に速い反応であり、この動態を調べるためには分光光度計による尿酸の生成を測定する方法<sup>4)</sup>、stopped flow 装置で尿酸の生成を測定する方法<sup>5)</sup>、フェリシアニドを電子受容体とした方法<sup>6,7,8)</sup>などが広く用いられている。私共は酸素電極法を用いてキサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応の定量的解析を行った結果、酸素電極法によって従来の方法より簡単かつ正確にキサンチンオキシダーゼの $K_m$  値を求めることができることがわかった。この方法はキサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応で酸素が消費される速度から求めるもので、これから得られたキサンチンオキシダーゼの酸素に対する $K_m$  値は $2.1 \times 10^{-5} M$ であった。また、この方法では消費される酸素量だけでなく、生成される酸素量も測定できる。Fridovich<sup>9)</sup>によって発見されたスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) はスーパーオキシドを消去し過酸化水素にする酵素と考えられており、

生成した過酸化水素は、カタラーゼの添加によって酸素を生成するので、酸素電極法で測定することができる。また、Fridovich<sup>9)</sup>はスーパーオキシドの受容体としてチトクローム c を用いたが、このチトクローム c をキサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応系にあらかじめ添加しておけば生成したスーパーオキシドの量が測定される。その後にカタラーゼを添加して酸素生成を測定すれば過酸化水素の生成量が測定できる。本研究においてはこれらの反応を利用してキサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応におけるスーパーオキシドと過酸化水素の発生を解析した。

## 材 料 と 方 法

### 1. 材料

キサンチンオキシダーゼ (EC. 1.2.3.2)、カタラーゼ (EC. 1.11.1.6)、およびチトクローム c は Boehringer 社より購入した。スーパーオキシドジスムターゼ (EC. 1.15.1.1) は Sigma 社より、また、キサンチンは片山化学工業社より購入し使用した。

### 2. 実験方法

#### 1) 溶存酸素測定法

キサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応  
(以下キサンチンオキシダーゼ反応と略す) に

における酸素消費はガルバニ型電極を 3 ml の恒温反応容器に挿入し、反応液をスターラーで攪拌しながら測定した。反応液はできるだけ *in vivo* に近い状態で測定する目的で、0.2M 蔗糖、10 mM リン酸緩衝液、pH 7.4、10mM KCl、5mM  $MgCl_2$ 、0.1%BSA を用いこの反応液をあらかじめ 25℃ の恒温槽中で保温して空気を振盪し、溶存酸素を平衡化して、25℃ 恒温還流保温した 3 ml の反応容器に注入し、反応を進めた。溶存酸素量は空气中、25℃ における酸素平衡濃度を 245  $\mu M$  として算出して用いた。外気との接触を防ぐ目的で直径 1 mm の孔のある外栓を施し、添加物はハミルトンのマイクロシリンジでこの孔を通して添加した。

2) キサンチンオキシダーゼ反応における、添加キサンチン量と酸素消費量、および酸素消費速度の関係

添加するキサンチンの量を変化させて、一定量のキサンチンオキシダーゼ存在下での酸素消費量を測定した。オキシグラフが安定した後に、キサンチンを添加し、次いでキサンチンオキシダーゼ 0.4Unit (1 mg 蛋白質量) を反応容器に加えて、反応を開始した。この反応はキサンチンが消費されると止まるが、溶存酸素がなくなるまでキサンチンの添加を繰り返した。また、この反応は非常に速い反応であるので酸素消費量、および酸素消費速度は記録紙の掃引速度を 10 cm/分として記録した。

3) キサンチンオキシダーゼ反応で生成される尿酸の測定

反応液は Krebs-Ringer bicarbonate を用いた。基質であるキサンチンの濃度を 0.0067mM から 0.1mM まで変化させて、25℃ 恒温槽中でキサンチンオキシダーゼ反応を 10 分間進行させた後に日立 EPS-3 T 分光光度計を用いて比色することにより生成される尿酸を 3 ml の系で測定した。尿酸の生成量は 293nm での分子吸光係数を  $1.25 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  として算出した。(293nm におけるキサンチンの分子吸光係数は  $0.18 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  であり、反応後の残余キサンチンによる吸光度は無視できる。)

4) スーパーオキシドの測定

キサンチンオキシダーゼ反応により生成され

るスーパーオキシドはチトクローム c の還元により分光光度計を用いて 550nm で測定した。反応液は Krebs-Ringer bicarbonate を用い、総量 3 ml の系で反応させた。チトクローム c は終末 0.2mM となるように、またキサンチンは 0.0067 mM から 0.1mM まで変化させて添加しておいた。これにキサンチンオキシダーゼ (0.4Unit) を加えて反応を開始し分光光度計で記録した。キサンチンオキシダーゼは 3 ml キュベット中に添加し、すばやくガラス棒で攪拌し、上蓋を閉めた。本実験に使用したチトクローム c の分子吸光係数はアスコルビン酸による完全還元から求めた。チトクローム c の分子吸光係数は  $19.1 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$  であるので、生成したスーパーオキシド量の測定にはこの値を用いて算出した。

## 結 果

1. キサンチンオキシダーゼ反応における添加キサンチン量と酸素消費量および酸素消費速度との関係

キサンチンの濃度を 0.0067, 0.0133, 0.0333, 0.0432, 0.0665, 0.1333mM とそれぞれ変化させて添加し、キサンチンオキシダーゼ 0.4Unit をこの 3 ml の系に加えて反応をそれぞれ開始した。添加と共に酸素消費相が出現しキサンチンの消費によりオキシグラフは定常化することを図 1 に示した。またこのオキシグラフから得られる添加キサンチン量と酸素消費量の関係を図 2 に示した。添加キサンチン量と酸素消費量は極めてよく一致しており、キサンチンと酸素分子が反応中に等モルで消費されていることが示された。それぞれのキサンチンの濃度における酸素消費速度をオキシグラフより求め、逆数プロットを描き図 3 に示した。このグラフから、このキサンチンオキシダーゼの酸素に対する  $K_m$  値は  $2.1 \times 10^{-5} M$  であることがわかった。

2. キサンチンオキシダーゼ反応により生成される尿酸の測定

添加したキサンチン量と生成された尿酸量の関係を図 4 に示した。この結果、添加されたキサンチンの濃度と生成された尿酸濃度はほぼ同量であり、ほとんど尿酸に代謝されたことが示された。また図 2 に示したように酸素消費量

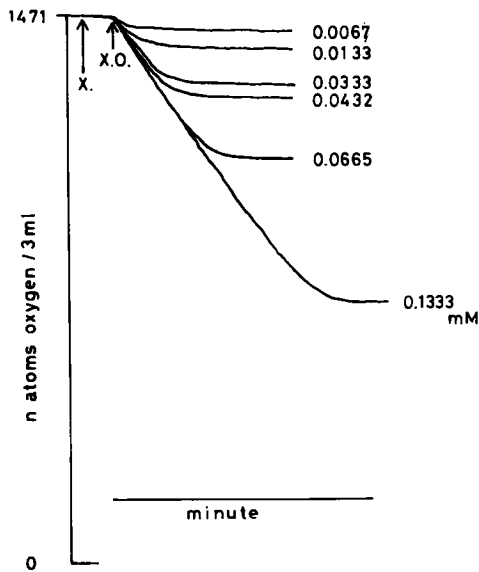


図1：添加キサンチン量と酸素消費量のオキシグラフ

キサンチン(X)の濃度を0.0067, 0.0133, 0.0333, 0.0432, 0.0665, 0.1333mMとそれぞれ変化させたときのオキシグラフを示した。キサンチンオキシダーゼ(X.O.)添加後、酸素消費相が直ぐ出現し、キサンチンの消費後にオキシグラフは定常化する。オキシグラフの記録速度は10cm/分とした。

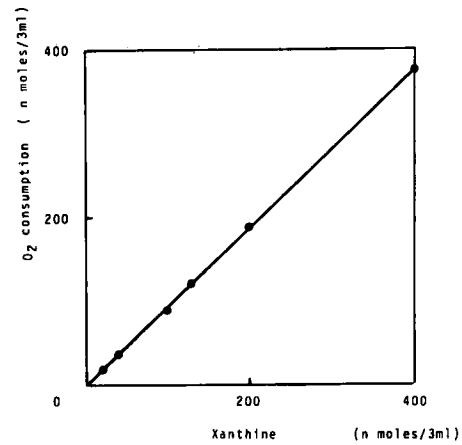


図2：添加キサンチン量と酸素消費量の関係

添加したキサンチン量と酸素消費量とが、ほとんど一致していることを示した。これからキサンチンオキシダーゼ反応中にそれぞれ等モルで反応している。

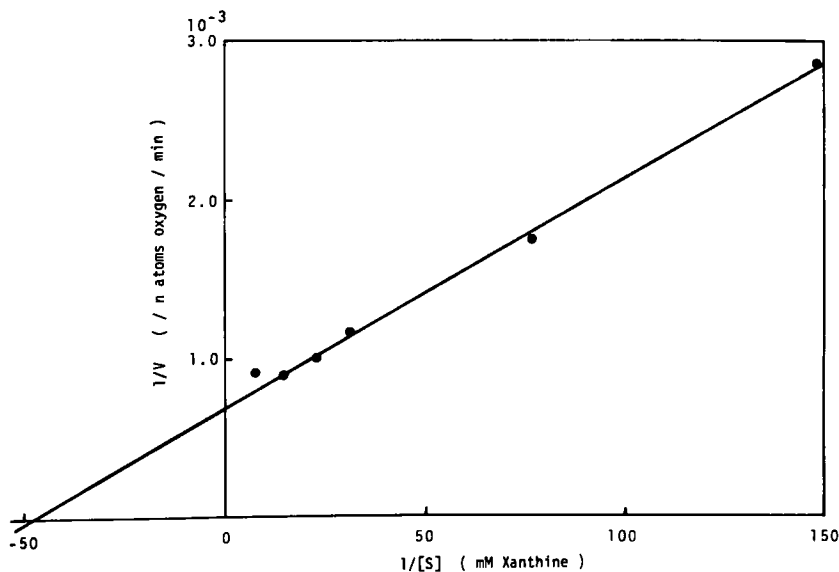


図3：オキシグラフで求めたキサンチンオキシダーゼ反応の逆数プロット

オキシグラフより  $1/V$  および  $1/[S]$  を求め、これからキサンチンオキシダーゼ反応の逆数プロットを描いた。このグラフからキサンチンオキシダーゼの酸素に対する  $K_m$  値は  $2.1 \times 10^{-5} M$  であった。

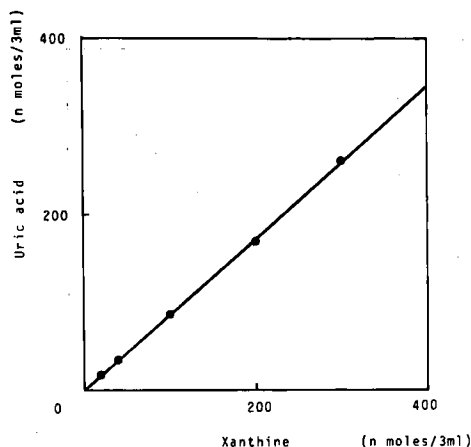


図4：添加したキサンチン量と生成した尿酸量の関係

添加したキサンチン量と生成した尿酸量との関係を293nmにおける尿酸の分子吸光係数を $1.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ として分光学的に測定し示した。添加キサンチン量と尿酸生成量は、比例関係にはあるが、添加キサンチン量と酸素消費量の比例関係よりは劣る。

と比較してみると酸素消費量を指標としたときの方が尿酸を指標としたときより、より添加キサンチン量に一致していることがわかった。キサンチンオキシダーゼ反応でスーパーオキシドが生成されるので、次にスーパーオキシドの受容体としてチトクロームcを用いることにより、pH7.4の反応液中で発生するスーパーオキシド量を測定した。

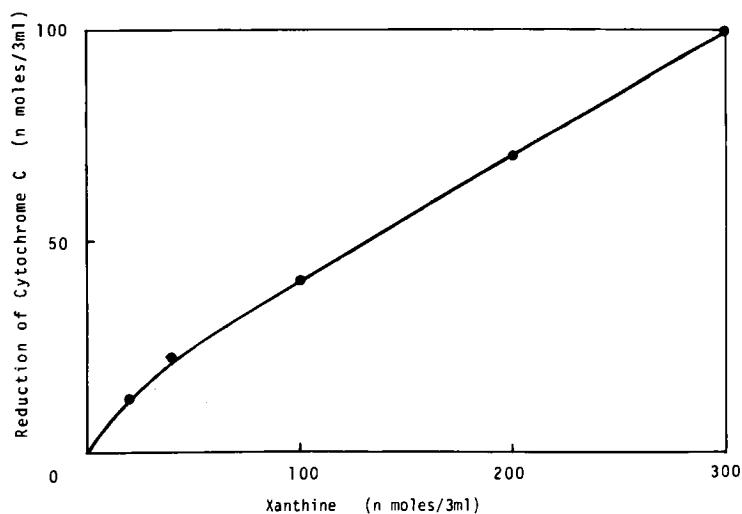


図5：キサンチンオキシダーゼ反応におけるチトクロームcの還元量

キサンチンの量を変化させたときのチトクロームcの還元量の変化は、キサンチン量が少ないときには約半量のチトクロームcが還元されたが、100~300n moles/3mlのキサンチン量のときにはおよそ3分の1しか還元されなかった。このことから、チトクロームcの還元量だけスーパーオキシドが生成されたと推定される。

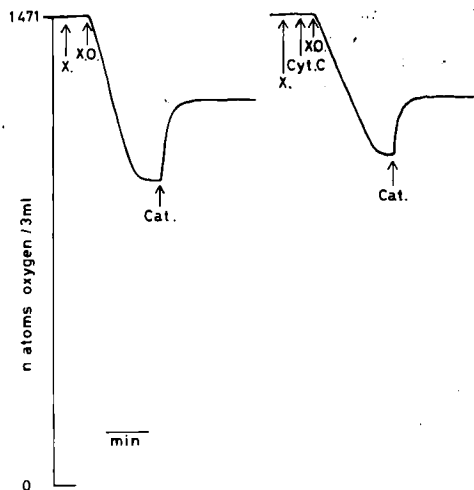


図6：キサンチンオキシダーゼ反応後のカタラーゼ添加による酸素生成

オキシグラフで反応後に生じた過酸化水素が、カタラーゼの添加により酸素を生成することを示した。反応直後（酸素消費相の終了直後）に定常相が出現するがこの30秒後にカタラーゼ（260Unit）を添加し、記録した。

またチトクロームc（0.1mM）を反応前に添加しておくと、キサンチンオキシダーゼ反応における酸素消費量がチトクロームc非存在下に較べ87%と減少している。

| Pre-added reagents | O <sub>2</sub> consumption (%) | O <sub>2</sub> generation by addition of Catalase (%) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generation estimated (%) |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| —                  | 100                            | 46                                                    | (92)                                                   |
| SOD                | 100                            | 48                                                    | (96)                                                   |
| Cytochrome C       | 87                             | 35                                                    | (70)                                                   |

表1：スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)および、チトクロームc存在下における酸素消費と、カタラーゼ添加による酸素生成量

反応前に何も添加しないでおくときの酸素消費を100%として反応後のカタラーゼ添加による酸

### 3. スーパーオキシドの生成量

チトクロームcの還元により求められたスーパーオキシドの量と添加したキサンチン量の関係を図5に示した。添加したキサンチンの量が少いときには添加したキサンチンの約半量のスーパーオキシドが発生していた。すなわち消費した酸素量と添加したキサンチンの量とは比例するので消費された酸素の半量がスーパーオキシドを生成したことになる。しかし、この系における添加キサンチン量が100~300n moles/3 ml のときは消費された酸素のおよそ3分の1がスーパーオキシドになり、チトクロームcを還元していた。次いでオキシグラフを用いて、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ(以下SODと略す)、チトクロームcなどを組

素生成量を表示した。SOD存在下では酸素消費量は変化しなかったがカタラーゼ添加で対照よりわずかであるが2%多くの酸素生成を認めた。チトクロームc存在下での酸素消費量は対照の酸素消費量の87%であり、またカタラーゼ添加により35%の酸素生成が認められた。

み合わせて添加し、酸素の動態を観察した。

4. キサンチンオキシダーゼ反応におけるカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、チトクロームc添加によるオキシグラフの影響

オキシグラフは2 cm/分の速度で記録した。反応容器内にキサンチン300n moles、キサンチンオキシダーゼ0.4Unitを添加しキサンチンオキシダーゼ反応を行ない、酸素消費相を経て定常相の出現した直後にカタラーゼ(260Unit)を添加した。カタラーゼ添加と同時に極めて速い

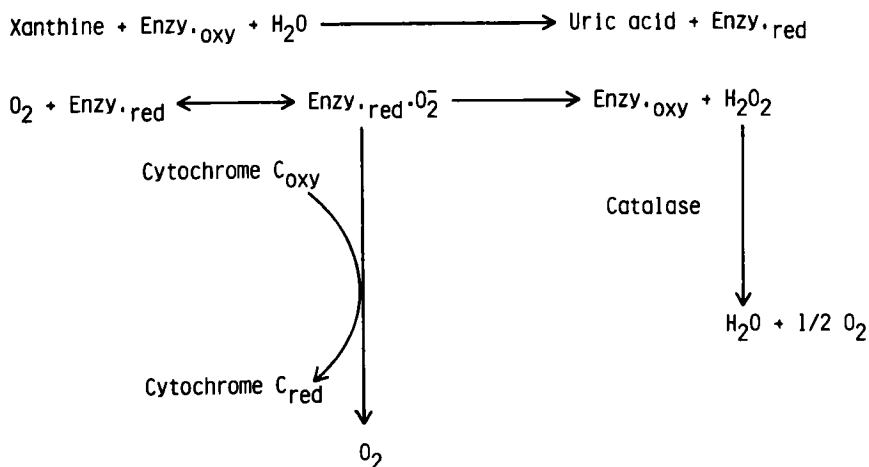


図7：キサンチンオキシダーゼ反応における酸素分子の流れ

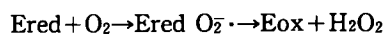
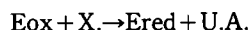
溶存酸素は還元型キサンチンオキシダーゼとの相互作用によりスーパーオキシドを生成する。チトクロームc存在下では不均化反応よりチトクロームcによる酸化反応の方がより速いために再び酸素分子を生成する。また、生成した過酸化水素はカタラーゼの添加により酸素生成を認め、これから過酸化水素生成量を推定できる。

酸素生成相が認められ、これを図6に示した。これは過酸化水素が存在していたことを示し、酸素生成量から過酸化水素の存在量が推定できる。反応前にそれぞれ SOD, およびチトクローム c を添加しておき、反応後にカタラーゼを添加し、酸素生成量を測定しオキシグラフを図6に、また酸素の動態を表1に示した。反応後のカタラーゼ添加では酸素消費量の46%の酸素生成が認められた。SOD の6 Unit を反応前に添加しておくで酸素消費量はコントロールに較べて変化はなかったが、カタラーゼ添加による酸素生成量は、SOD を加えなかったときに較べて2%多かった。SODの単位は、この3 ml の系でキサンチンオキシダーゼ反応により生成するスーパーオキシドのチトクローム c の還元が半量となるSOD量を1 Unitとして用いた。つぎにチトクローム c (0.1mM) をこの反応容器に添加しておき、キサンチンオキシダーゼ反応によりスーパーオキシドを発生させ、酸素消費相の終了後にカタラーゼを添加した。この場合の酸素消費はコントロールに較べ83%と少なく、カタラーゼ添加による酸素生成量はチトクローム c を加えないときの酸素消費量の35%であった。

## 考 察

キサンチンオキシダーゼ反応は非常に速く、Massayら<sup>5)</sup>の方法のような Stopped flow装置を利用してKm値などが測定される。この実験ではキサンチンオキシダーゼ反応で、添加キサンチンと酸素消費とがきわめて定量的によく一致して進行することを示した。また添加したキサンチン量と生成される尿酸量もほぼ一致することからオキシグラフでキサンチンオキシダーゼ反応を簡単に調べることがわかった。このとき、さらに、生成される尿酸より消費される酸素を指標とした方がよく添加したキサンチン量に一致する。したがってキサンチンオキシダーゼの酸素に対する Km 値を求めることができ、私共のオキシグラフから得た Km 値は $2.1 \times 10^{-5} \text{M}$ であった。Fridovichら<sup>10)</sup>の得た酸素に対する Km 値は $8 \times 10^{-5} \text{M}$ であり、また Olson と Massay ら<sup>5,11)</sup>の得た酸素に対する Km 値は $5.0 \sim 5.3 \times$

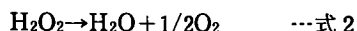
$10^{-5} \text{M}$  である。この値の違いは、標品の違いや実験条件の違いなどによるものと考えられた。例えば通常 pH 8.5 でキサンチンオキシダーゼ反応を進行させているのに際し、私共の実験では pH 7.4 の生理的条件下で行った。私共の Km 値は Olson らの Km 値より小さい値を得ておりキサンチンオキシダーゼ反応がより速くおこっていることが示された。Olson ら<sup>12)</sup>はキサンチンオキシダーゼの作用メカニズムを明らかにし下式を示した。



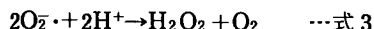
---式1

私共の方法はキサンチンとキサンチンオキシダーゼの反応から還元型キサンチンオキシダーゼが生じ、この還元型キサンチンオキシダーゼと酸素分子の反応による酸素消費をオキシグラフで測定する方法であり、尿酸の生成を指標とした測定法とは異った Km 値が得られる。このオキシグラフを利用するキサンチンオキシダーゼの Km 値を求める方法は酸素に対する Km 値であるが、簡単であり、きわめて有用な方法であると考えられた。この反応をスーパーオキシドのレベルで考察するために、スーパーオキシド生成をチトクローム c の還元より分光光度計を用いて550nmで測定し算出した。添加するキサンチンの量によりスーパーオキシド生成量は異なるが、添加キサンチンが0.1mM(300n moles / 3 ml) のときのチトクローム c の還元量は添加したキサンチンの1/3量、すなわち100n moles / 3 ml であり、これと同量のスーパーオキシドが生成されていると考えられた。一方、オキシグラフでは還元型キサンチンオキシダーゼと酸素との反応で過酸化水素が生成され、カタラーゼを添加すれば酸素分子を生成してオキシグラフで測定され、この反応で生成した過酸化水素量を推定できる。キサンチンオキシダーゼ反応後に、カタラーゼを添加するとこの反応で消費された酸素のおよそ半量(46%)の酸素生成が認められた。すなわち、生じた過酸化水素はカタラーゼにより式2に示されるように半量の酸素を生成するので、酸素消費量の92%に相当する酸素が過酸化水素を生成していたことが推定

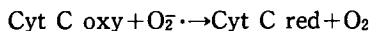
された。



次にあらかじめSODを添加していると式3の反応がスーパーオキシドの消去として速まる<sup>9)</sup>。キサンチンオキシダーゼ反応における酸素消費量はSOD非存在下との差はなかった。



この反応後のカタラーゼ添加では48%の酸素生成があり96%の酸素が過酸化水素に変化したと考えられた。したがって差の4%の過酸化水素がSODにより式3に示されるように余計に生成されたことがわかった。したがってSODは式3の反応を速めスーパーオキシドを消去していることが示された。またあらかじめチトクロームcを添加して、反応を行なうと添加していないときに比べ87%の酸素消費しか認められなかった。すなわち13%の酸素分子が式4の反応で生成したことになり、チトクロームcの還元したスーパーオキシドは13%と推定された。



---式 4

この反応後にカタラーゼを添加すると35%の酸素分子が生成したので、70%の過酸化水素が生成していたことが推定された。

したがってオキシグラフから得られるこの系で発生するスーパーオキシドの量は全体の酸素消費量の13%と分子吸光係数から求めたスーパーオキシドの発生量より少なかった。また過酸化水素生成量は70%であり、発生したスーパーオキシドは一部がチトクロームcを還元しているが、他はハイドロキシラジカル等への移行により酸素電極法で捕捉し得なかったと考えられる。

このオキシグラフから得られる酸素分子の流れを図7に示した。溶存酸素は還元型キサンチンオキシダーゼとの相互反応によりスーパーオキシドを生成する。このスーパーオキシドは酸化型チトクロームcの存在下では不均化反応 ( $10^{-5}\text{Msec}^{-1}$ ) よりチトクロームcによる酸化反応 ( $10^{-7}\text{Msec}^{-1}$ ) の方が速いために、酸化されて再び酸素分子を生成する。チトクロームcの非存在下では、速やかにスーパーオキシドは消去され過酸化水素を生成する。この過酸化水

素生成量はカタラーゼを添加することにより酸素生成を認め、これから過酸化水素生成量を推定できる。

このように、オキシグラフから酸素の収支を測定することは、簡単にキサンチンオキシダーゼのKm値を求めたり、スーパーオキシドや過酸化水素の発生を測定することができるよい実験系であることがわかった。

## 要 約

酸素電極法によりキサンチンオキシダーゼ反応の酸素に対するKm値、スーパーオキシドの生成量や過酸化水素の生成量などが求められることがわかった。この方法は簡単な装置でよく、また実験も易しく正確に行なえる。酸素電極法で得た私共の酸素に対するKm値は $2.1 \times 10^{-5}\text{M}$ であった。この値はstopped flow装置を用いた方法から求められたKm値とほぼ一致しており、この実験方法により簡単にキサンチンオキシダーゼ反応の動態を調べることができることを示している。そしてSODやチトクロームcの反応前添加により、スーパーオキシドの生成量および、過酸化水素の生成量が求められる。この反応系では添加キサンチン量、あるいは酸素消費量の少なくとも13%のスーパーオキシドが生成され、また70%の過酸化水素が生成されていることがわかった。このようにキサンチンオキシダーゼ反応のような速い反応において酸素電極法で調べることは簡単であり、しかもSODやチトクロームc、カタラーゼの組み合わせの工夫により簡単にスーパーオキシドや過酸化水素の生成量が調べられるよい実験系であると考えられる。

## 謝 辞

この稿を終えるに臨み、御懇意な御指導と御校閲を賜った恩師小田 琢三教授に深甚の謝意を表します。また本実験の遂行にあたり、終始懇切な御指導と御援助をいただいた癌研生化学部の諸先生方、医学部学生の中村 純君に深謝いたします。

なお、論文の要旨は、昭和57年第55回日本生化学大会において発表した。

## 文 献

1. Estabrook, R.W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. *Methods Enzymol.* **10**, 41—47, 1967.
2. Chance, B. and Williams, G.R.: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **217**, 383—393, 1955.
3. Billiar, R.B., Knappenberger, M. and Little, B.: Xanthine oxidase for calibration of the oxygen electrode apparatus. *Anal. Biochem.* **36**, 101—104, 1970.
4. Cardinaud, R.: Nucleoside deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus helveticus*. *Methods Enzymol.* **51**, 446—455, 1978.
5. Olson, J.S., Ballou, D.P., Palmer, G. and Massey, V.: The reaction of xanthine oxidase with molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* **249**, 4350—4362, 1974.
6. Woolfolk, C.A.: Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *J. Bacteriol.* **123**, 1088—1106, 1975.
7. Woolfolk, C.A. and Downard, J.S.: Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteria. *J. Bacteriol.* **130**, 1175—1191, 1977.
8. Woolfolk, C.A. and Downard, J.S.: Bacterial xanthine oxidase from *Arthrobacter S-2*: *J. Bacteriol.* **135**, 422—428, 1978.
9. McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049—6055, 1969.
10. Fridovich, I.: Competitive inhibition of xanthine oxidase by urea and guanidinium ion. *J. Biol. Chem.* **239**, 3519—3521, 1964.
11. Massey, V., Brumby, P.E., Komai, H. and Palmer, G.: Studies on milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **244**, 1682—1691, 1969.
12. Olson, J.S., Ballou, D.P., Palmer, G. and Massey, V.: The mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **249**, 4363—4382, 1974.

**Quantitative analysis by the oxygen electrode  
method of superoxide and hydrogen peroxide  
generated by xanthine oxidase reaction**

**Tsuguya SHIGEHARA**

**Department of Biochemistry, Cancer Institute,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. T. Oda)**

Oxygen consumption and generation of superoxide and hydrogen peroxide by the xanthine oxidase reaction were measured by the polarographic oxygen electrode method. This method requires only a simple apparatus, is very accurate and is easy to perform. The  $K_m$  for oxygen in the xanthine oxidase reaction measured by this method was  $2.1 \times 10^{-5} M$ , which is similar to values measured by other methods. Kinetic analyses of superoxide and hydrogen peroxide generation were made by the addition of superoxide dismutase or cytochrome c before the reaction and catalase after the reaction. More than 13% of the oxygen consumed by the addition of xanthine was found to be converted to superoxide, and 70% was converted to hydrogen peroxide in this system. This method was found to be easy to calibrate the rapid xanthine oxidase reaction and to measure the oxygen consumption and generation of superoxide and hydrogen peroxide.