

AMPデアミナーゼの酸化傷害を利用したポリフェノール化合物 の抗酸化作用の解析

村上 恵子, 森 稔高, 永田 真裕子, 伊藤 正江, 吉野 昌孝
(愛知医大・生化)

Application of Copper catalyzed Oxidative Inactivation of AMP Deaminase to Analysis of Antioxidant Action of Polyphenolic Compounds

Keiko Murakami, Toshitaka Mori, Mayuko Nagata,
Masae Itoh and Masataka Yoshino

Department of Biochemistry, Aichi Medical University

Metal-catalyzed oxidative inactivation of AMP deaminase was applied to the structure-activity relationship studies of antioxidants in permeabilized yeast cells. AMP deaminase was readily inactivated by hydrogen peroxide plus reduced copper, and the inactivation may be due to the hydroxyl radical generated through the Fenton reaction at the copper-binding sites of the enzyme. Flavonol and flavone with both 2,3-double bond and 4-carbonyl group showed a protective effect on the copper-mediated inactivation of AMP deaminase. Baicalein representative of flavone without hydroxyl group at 3-position showed the most potent protective effect on the AMP deaminase. Flavonols, which has hydroxyl group at 3-position, also protected AMP deaminase to a lesser extent, but glycosylation of 3-hydroxyl group of flavonol nullified this protection. Flavanone and flavanol with saturated 2,3-bond and isoflavone with phenol group at 3-position showed little or no protection of the enzyme.

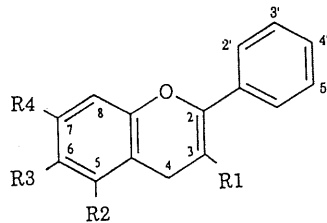
Protective effect of flavonoids on the oxidative inactivation of AMP deaminase was closely correlated with the inhibition of the formation of thiobarbituric acid-reactive substances as an index of lipid peroxidation. Antioxidant action of flavonoid is mainly depends on the 2,3-carbon-carbon double bond in conjugation with a 4-oxo group, which participates in the scavenging oxygen radicals and in the chelation of transition metals. This method may be useful for evaluating the antioxidant action of biological materials.

活性酸素, 特に過酸化水素と鉄または銅イオンとの反応 (フェントン反応) によって生じるヒドロキシラジカルは脂質, DNA あるいはタンパクを損傷することにより種々の疾患の原因になることが知

られている^{1,2,3)}。植物由来のポリフェノール、フラボノイドは活性酸素消去機能を持ち、食物からのこれらの物質の摂取は活性酸素毒性に対する防御因子の一つであると推測される^{4,5)}。

抗酸化力の測定には過酸化脂質の生成阻止、DNA に対する保護などがよく用いられているが、タンパク質に対する傷害を測定する方法は少ない。しかし酵素活性の変化は測定が容易で定量化しやすい損傷の指標であり、抗酸化作用の評価への応用が十分に可能なものと考えられる。先に我々はトルエン処理によって透過性を増加させたパン酵母を用いて AMP デアミナーゼのフェントン反応による失活を報告した⁶⁾。今回は本酵素の失活を指標としてポリフェノール、特にフラボノイド系化合物の抗酸化力を評価し、作用機構と構造活性相関の解析を試みたので報告する。フラボノイドはその構造からフラボノール、フラボン、イソフラボン、フラバノール、フラバノンに分類されるが、その構造を表1に示す。

Table 1. Structure of Flavonoids



		C-ring									
	2,3-bond	C4	Name	R1	R2	R3	R4	2'	3'	4'	5'
Flavonol	double	C=O	Quercetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
			Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H
			Myricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
			Fisetin	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H
			Morin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Flavone	double	C=O	Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H
			Acacetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	H
Isoflavone	double	C=O	Genistein	Phenol	OH	H	OH
			Daidzein	Phenol	H	H	OH
Flavanol	saturated	CH ₂	Catechin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Flavanone	saturated	C=O	Taxifolin	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
			Hesperetin	H	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃	H

材料と方法

1. 酵母細胞の透過性処理 — 市販のパン酵母にトルエンを加えて40-45℃に加温することによって透過性を増加させ *in situ* (細胞そのまま) の条件で酵素活性を測定できる酵母細胞を得た⁷⁾。

2. AMP デアミナーゼ活性の測定—0.5 mg のトルエン処理した酵母細胞に反応液 (10mM AMP, 1mM ATP, 100mM KCl, 2mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM 2-オキソグルタル酸, 0.1mM NADH, 0.1mg/ml グルタミン酸脱水素酵素を含む) 1ml を加え, 分光光度計で単位時間当たりの 340nm における吸光度の減少を測定した。
3. 活性酸素による AMP デアミナーゼの失活—10mg/ml のトルエン処理した酵母に 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.1), 9mM H₂O₂, 10mM アスコルビン酸, 0.01mM CuSO₄, 0.1mM アジ化ナトリウムを加えて 37°C で 10 分間インキュベートした後 3000 回転で 5 分遠心分離した。沈澱した酵母を 40-50mg/ml になるように 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し, 酵素活性測定に用いた。
4. ミクロソームの脂質過酸化はチオバルピツール酸によってマロンジアルデヒドを測定する方法によった⁸⁾。

結 果

AMP デアミナーゼは銅, 過酸化水素, アスコルビン酸の添加によって著明に失活したがフラボノイド系化合物であるバйкаレイン, ケルセチンの 0.1mM の添加によって保護された (図 1)。コントロール活性 (銅, 過酸化水素無添加) を A, 銅 / 過酸化水素によって減少した活性を B, フラボノイドによって保護された時の活性を C として $(C-B) / (A-B)$ の値を保護指数 (protection index) とした。各化合物の保護指数を図 2 に示す。フラボノイド化合物の中ではフラボン (バйкаレイン, アカセチン) が最も有効であり, 一部のフラボノール (ケルセチン, ミリセチン, フィセチン) がこれに続いた。フラバノール

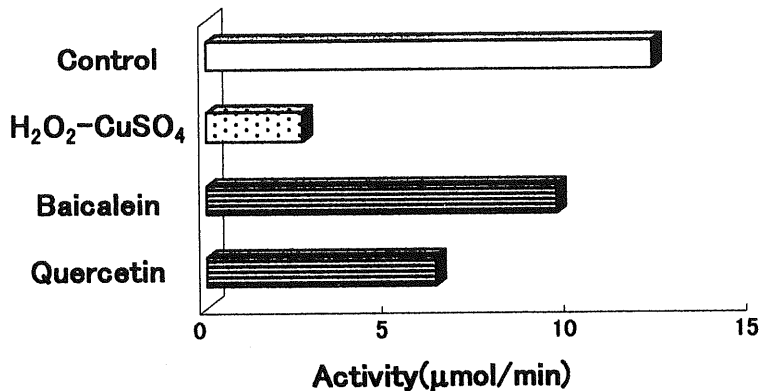


Fig. 1. *In situ* effect of copper on the activity of yeast AMP deaminase in the presence of hydrogen peroxide and ascorbic acid. Permeabilized yeast cells (10mg/ml) were incubated at 37°C with 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.1) containing 10 μM CuSO₄, 10mM ascorbic acid, 9mM hydrogen peroxide, 0.1mM sodium azide, and additives. After incubation for 10min, yeast cells were collected by centrifugation and used for determining AMP deaminase activity. Control, no treatment; H₂O₂-CuSO₄, treated with hydrogen peroxide plus 10 μM CuSO₄; Baicalein and quercetin at 0.1mM were included in the mixture.

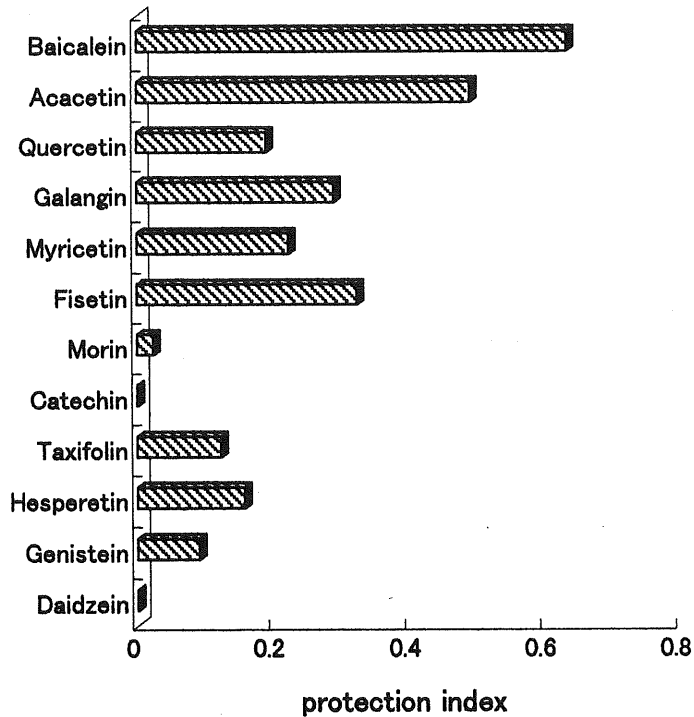


Fig. 2. Protection by flavonoids of the AMP deaminase against copper-mediated oxidative inactivation. Experimental conditions were similar to those of Fig. 1. Flavonoids at 0.1mM were included in the inactivation mixture. Protection index was calculated from $([\text{Activity treated with copper / hydrogen peroxide in the presence of flavonoid}] - [\text{Activity treated with copper / hydrogen peroxide in the absence of flavonoid}]) / ([\text{Activity without copper / hydrogen peroxide}] - [\text{Activity treated with copper / hydrogen peroxide in the absence of flavonoid}])$.

ル、フラバノン、イソフラボンは保護効果を示さなかった。

多くのフラボノイドは過酸化脂質生成阻止効果を示した。各フラボノイドのチオバルビツール酸反応物質生成の50%阻止濃度を図3に示す。フラボン、フラボノールの他にフラバノールも若干の阻止効果を示した。

AMPデアミナーゼに対する保護効果と過酸化脂質生成阻止効果との相関係数は0.523であった(図4)。

AMPデアミナーゼに対する50%有効濃度は最も効果の強いバイカレインで50 μ Mであり脂質過酸化阻止に必要な濃度より、高い値を示した(図5)。

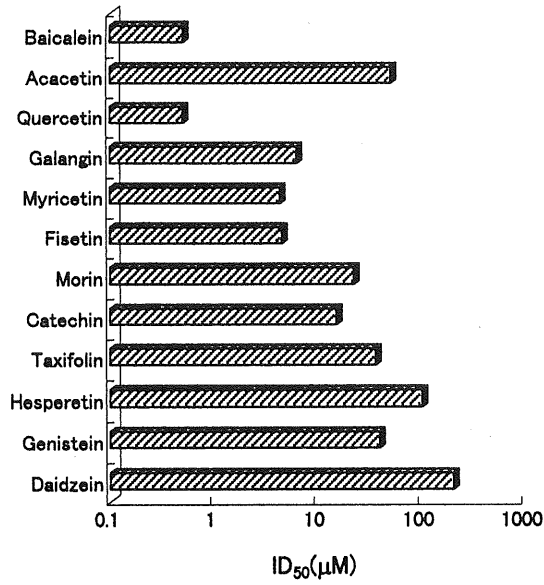


Fig. 3. Effect of flavonoids on the formation of thiobarbituric acid-reactive substances. Inhibition of lipid peroxidation by flavonoid was expressed as the ID₅₀ values, the concentrations (μM) required for the 50% inhibition of the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS).

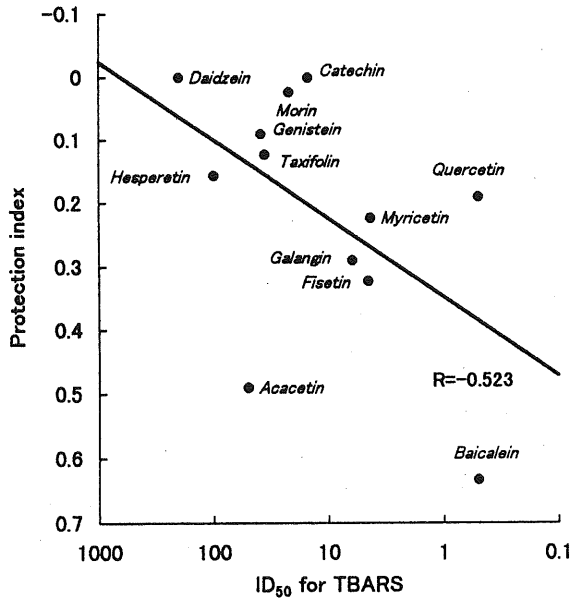


Fig. 4. A relationship between the protective effect of flavonoids on the inactivation of AMP deaminase and the inhibition of the formation of thiobarbituric acid-reactive substances. Protection of AMP deaminase by flavonoids are taken from Fig. 2. ID₅₀ values for thiobarbituric acid-reactive substances are taken from Fig. 3.

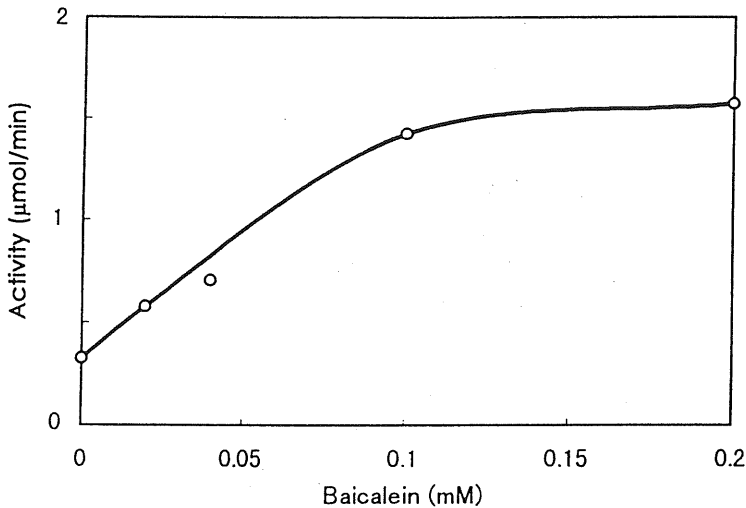


Fig. 5. Effect of concentrations of baicalein on the copper-catalyzed oxidative inactivation of AMP deaminase in permeabilized yeast cells. Toluene yeast cells were incubated with the buffer containing CuSO_4 / H_2O_2 / ascorbic acid as described in the legend to Fig. 1 except that the concentration of baicalein was varied.

考 察

AMPデアミナーゼに対して保護効果を持つフラボンとフラボノールに共通の構造は4の位置のカルボニル基, 2,3の位置の二重結合の共役ジエンである。イソフラボンは保護効果を持たないことから, 3の位置にイソフラボンのようにベンゼン環の大きな残基の導入は保護効果に対して抑制的に働くものと考えられた。このことは強い保護作用をもつケルセチンの3の位置に糖が結合したルチンが保護効果を全く持たないことから推測された。過酸化水素による酵母AMPデアミナーゼの失活には還元型の銅イオンが必須であり, 銅触媒型のフェントン反応によって生成したヒドロキシルラジカルによる失活であると考えられる。抗酸化物質のAMPデアミナーゼに対する保護作用とは銅を結合してフェントン反応を阻止することであると推測される⁶⁾。フラボンとフラボノールの一部の抗酸化作用は他のフラボノイド化合物よりも銅に対する親和性が強いことによると推定される。

鉄/アスコルビン酸による脂質過酸化の阻止には抗酸化物質と鉄との結合が必要である^{5,9)}。多くのフラボノイドが脂質過酸化に対してより強い効果を示すのは2価鉄のラジカル発生能が1価銅に比べて弱いためかとも考えられる。しかし酵母AMPデアミナーゼに対して強力な保護効果を示したヒスチジン, システインは脂質過酸化阻止効果を持たなかった。この場合には鉄はイオン化傾向が銅より強くアミノ酸にはキレートされないものと思われる。

酵素活性の保護についても, 保護物質の効果は保護される酵素の種類により, その酸化傷害の種類によって異なることが確認されている。いわゆる「抗酸化物質」は複数の条件で検討される必要があり, 酵母AMPデアミナーゼの活性変化はそのうちのひとつとして有用であると考えられる。

References

- 1 . Comporti, M, (1985) Lab. Invest. 53 : 599-623.
- 2 . Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) Methods Enzymol. 186 : 1-85.
- 3 . Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) Biochem. J. 219 : 1-14.
- 4 . Ratty, A.K. and Das, N.P. (1988) Biochem. Med. Metabolic Biol. 39 : 69-79.
- 5 . Morel, I., Lescoast, G., Cillard, P. and Cillard, J. (1994) Methods Enzymol. 234 : 437-443.
- 6 . Murakami, K., Onoda, Y., Kimura, J. and Yoshino, M. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int. 42 : 1063-1069.
- 7 . Murakami, K., Nagura, H. and Yoshino, M. (1980) Anal. Biochem. 105 : 407-413.
- 8 . Draper, H.H. and Hadley, M. (1990) Methods Enzymol. 186 : 421-431.
- 9 . Yoshino, M. and Murakami, K. (1998) Anal. Biochem. 257 : 40-44.