

ジピコリン酸の抗酸化作用

村上 恵子, 伊藤 正江, 上田 哲郎, 森川 亮, 吉野 昌孝
(愛知医科大学, 生化学*)

Antioxidant Action of Dipicolinic Acid

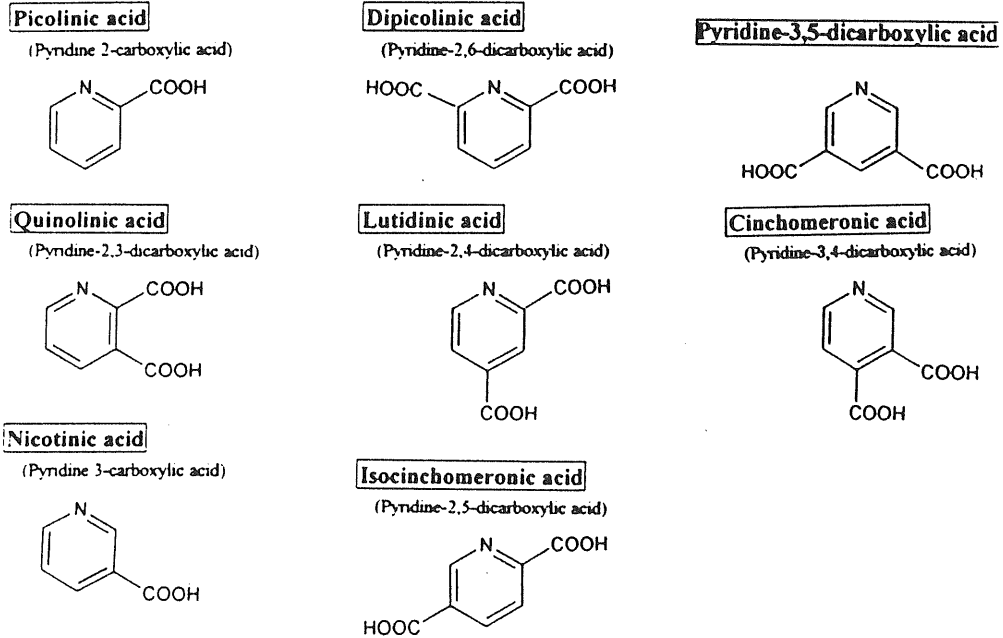
Keiko MURAKAMI, Masae ITO, Tetsuro UEDA, Ryo MORIKAWA and Masataka YOSHINO
Department of Biochemistry, Aichi Medical University, Nagakute, Aichi 480-1195, Japan

Antioxidant action of pyridine compounds was analyzed in relation to the metal coordination. Iron-mediated lipid peroxidation, determined as the formation of thiobarbituric acid-reactive substances, was inhibited by dipicolinic acid (pyridine 2,6-dicarboxylic acid), but not by other pyridine dicarboxylates including quinolinic acid, lutidinic acid, cinchomeronic acid, isocinchomeronic acid. Dipicolinic acid further protected some enzymes against copper-mediated oxidative inactivation. Copper-catalyzed formation of hydroxyl radical causing oxidative inactivation of AMP deaminase was inhibited by dipicolinic acid under the *in situ* conditions of yeast cells. Dipicolinic acid further attenuated the inhibition by copper ion of glutathione reductase. However, other pyridine dicarboxylates did not show any protective effect. Dipicolinic acid enhanced the autooxidation of Fe^{2+} ion, whereas other pyridine carboxylates rather inhibited the autooxidation of ferrous ion. Ascorbate-catalyzed production of Cu^+ ion, a potent prooxidant, from Cu^{2+} ion was completely inhibited by dipicolinic acid.

Antioxidant effect of dipicolinic acid can be explained by enhancement of the oxidation of ferrous ion, and by the inhibition of the formation of cuprous ion as a prooxidant: this may be due to the electron-deficient nature of pyridine ring with dicarboxylic acid at *ortho* position followed by binding of iron and copper ions.

ジピコリン酸 (ピリジン-2,6-二カルボン酸, Scheme1 参照) はバチルス属のバクテリアが産生するピリジン化合物であり, バチルス属の納豆菌 (*Bacillus natto*) を利用する発酵食品である納豆に多く含まれている¹⁾。納豆には多くの機能性食品としての特徴が従来から指摘されているが, 血栓防止物質とし

* 所在地: 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 (〒480-1195)



Scheme 1 Structure of Pyridine Compounds

て線溶酵素であるナットウキナーゼが含まれており、経口投与でも有効であることが示されている²⁾。一方、血栓形成の過程はフィブリンが生成する前段階として LDL の酸化と血管壁の損傷が前提となる。したがって血栓予防物質には生じた繊維素を溶解する因子の他に酸化傷害を防御する物質が推定される。これらの酸化傷害は活性酸素に由来し、活性酸素の生成は鉄、銅などの金属イオンからの電子移動が引き金となる³⁾。納豆中のジピコリン酸には種々の生理活性が知られているが、作用機構としてその金属キレート能が推測されている。本研究ではジピコリン酸の新しい作用として酸化傷害を抑制するアンチオキシダントとしての機能を見出し、その機構が金属イオンとの相互作用によるものであることを明らかにした。この抗酸化作用はピリジン化合物中、ジピコリン酸に特異的であり、納豆の機能性食品としての作用の解明の基礎となる。

実験方法

脂質過酸化物の生成—ラット肝臓ミクロソームに鉄アスコルビン酸を加えて生じたマロンジアルデヒドをチオバルビツール酸反応物質として定量する方法によった⁴⁾。AMPデアミナーゼの酸化失活—トルエン処理により透過性を増したパン酵母⁵⁾に過酸化水素、銅、アスコルビン酸を加えてインキュベートした後、AMPデアミナーゼの活性を測定した。方法は生じたアンモニアをグルタミン酸脱水素酵素を用いて α -ケトグルタル酸からグルタミン酸を生成させ、この時減少する NADH の 340nm の吸光度の測定によった。

グルタチオン還元酵素-精製酵素 (オリエンタル酵母) に 0.2mM NADPH, 0.5mM 酸化型グルタチオンを加え 340nm の吸光度の減少を経時的に記録した。

鉄の自動酸化- 10mM トリスバッファー (pH 7.1) 中で硫酸第一鉄を加温し時間毎に2価鉄の濃度をバソフェナンスローリンニスルホン酸を加えて 540nm の吸光度により定量した⁶⁾。

二価銅の還元- 10mM トリスバッファー (pH 7.1), 0.05mM 硫酸銅, 0.5mM バソクプロインニスルホン酸, 1mM ピリジン化合物を混合し, そこに各濃度のアスコルビン酸を加えて生じた一価銅を 492nm の吸光度により定量した。

アスコルビン酸の酸化- 263nm の吸光度減少によった。

結 果

ジピコリン酸は 0.1mM 以上の濃度においてミクロソーム膜を用いた鉄触媒型の脂質過酸化反応を抑制した (Fig. 1)。他のピリジン化合物は全く抑制を示さなかった。

銅を触媒とする酵素タンパクの酸化失活および阻害反応に対するジピコリン酸の効果を検討した。銅/アスコルビン酸/過酸化水素の添加により, フェントン反応を介して生成したヒドロキシルラジカルによりパン酵母 AMP デアミナーゼを失活させ, この失活に対してピリジン化合物の保護効果を検討した結果を Fig. 2A に示す。ピリジン化合物の中でジピコリン酸のみが保護効果を示した。10 μ M の銅の存在に対して 0.2mM 以上のジピコリン酸が有効であった。この濃度は膜脂質過酸化 (10 μ M の三価鉄が存在) 抑制に必要な濃度とほぼ一致した。

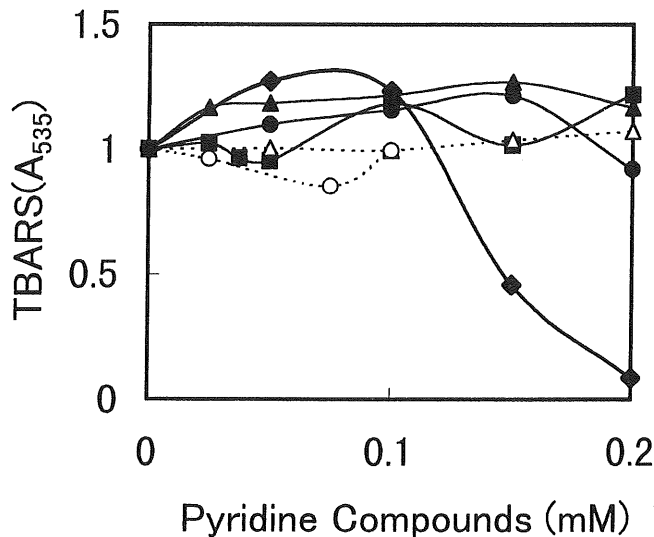


Fig. 1 Effects of pyridine compounds on the iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. Lipid peroxidation was expressed as the production of thiobarbituric acid-reactive substances, which was induced by 10 μ M FeCl₃ and 0.5mM ascorbic acid. ◆, dipicolinic acid; ■, quinolinic acid; ▲, lutidinic acid; ●, picolinic acid; △, cinchomeric acid; ○, isocinchomeric acid.

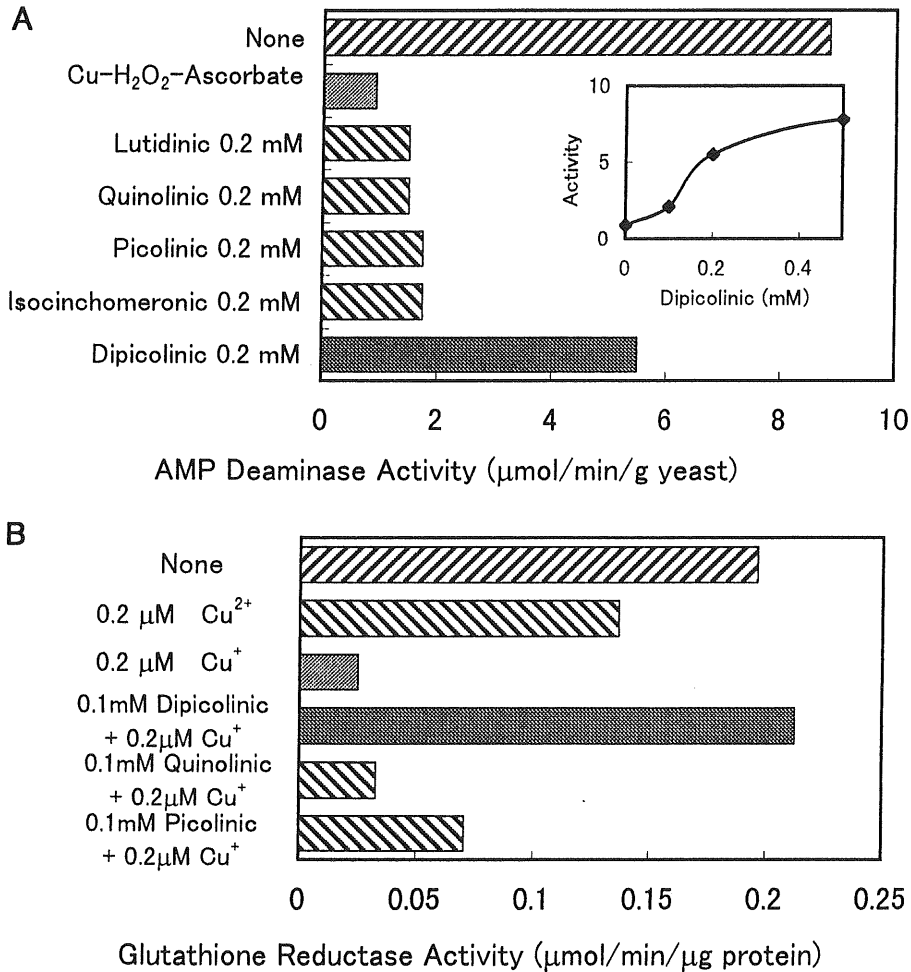


Fig. 2 Effects of pyridine compounds on the enzymes. **A.** *In situ* effects on yeast AMP deaminase. Permeabilized yeast cells (10mg/ml) were incubated at 37°C for 10 min with 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.1) containing 10µM CuSO₄, 10mM ascorbic acid, 13.5mM hydrogen peroxide, 0.1mM sodium azide, and 0.2mM pyridine compounds or citrate. Yeast cells were collected by centrifugation and used for determining AMP deaminase activity by coupling ammonium production to NADH oxidation with glutamate dehydrogenase. The reaction mixture of 1ml contained 10mM AMP, 1mM ATP, 4mM MgCl₂, 10mM 2-oxoglutarate, 0.2mM NADH, 0.2mg/ml glutamate dehydrogenase, 100mM KCl, 40mM Tris-HCl (pH 7.1), and 0.2mg/ml permeabilized yeast. Change in the absorbance at 340nm was followed. None, no hydrogen peroxide; Cu, hydrogen peroxide plus copper. Insert. Effect of increasing concentrations of dipicolinic acid. **B.** Effects on glutathione reductase from yeast. Reaction mixture contained 0.2mM NADPH, 0.5mM oxidized glutathione, 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.1µg of purified glutathione reductase, 0.2µM CuSO₄ with or without 0.5mM ascorbate and pyridine carboxylates. Activity was determined by changes in the absorbance at 340nm.

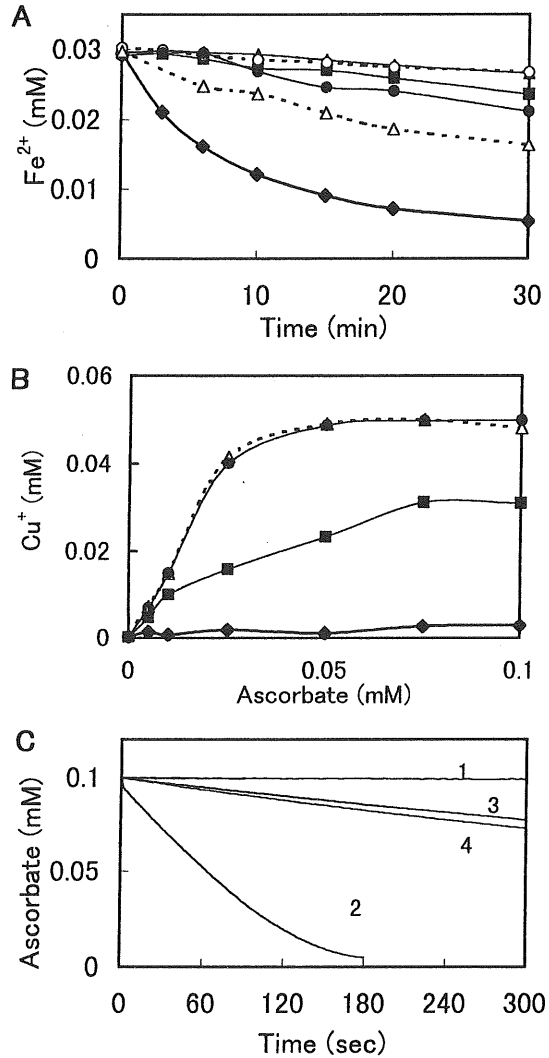


Fig. 3 Effects of pyridine compounds on the oxidation/reduction of metal cations. A. Effect on the autooxidation of ferrous ion. Iron autooxidation was followed by determining the ferrous ion concentration with the bathophenanthroline disulfonate. The samples of 2ml contained 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.05mM FeSO₄, and pyridine compounds. All incubations were carried out at 37°C. The reaction was started by addition of FeSO₄. Aliquots of 0.2ml were mixed with 0.1ml of 1mM bathophenanthroline disulfonate at appropriate intervals, and the absorbance at 540nm was measured. ○, No addition. Other symbols are identical to Fig. 1. B. Effect of pyridine compounds on the reduction of Cu²⁺ by ascorbate. Following components were mixed at room temperature: 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.05mM CuSO₄, 0.5mM bathocuproin disulfonate and additives. After mixing, ascorbate solution was added. Cu⁺ formed was determined by reading the absorbance at 492nm. Symbols are similar to A.

C. Effect of pyridine compounds on the oxidation of ascorbate by Cu²⁺. Reaction mixture of 1ml contained 10mM Tris-buffer, 0.1mM ascorbate and additives. Ascorbate concentration was determined by following the absorbance at 263nm. Line 1, None and 5 μM Cu²⁺ plus 1mM dipicolinic acid; Line 2, 5 μM Cu²⁺; Line 3, 5 μM Cu²⁺ plus 1mM quionolinic acid; Line 4, 5 μM Cu²⁺ plus 1mM picolinic acid.

パン酵母のグルタチオン還元酵素は銅イオンにより阻害される⁷⁾。一価銅イオンは二価銅イオンよりも阻害が強く1 μ M以下で有効であった (Fig. 2B)。0.1mMのジピコリン酸はこの阻害を解除した。

還元型の遷移金属イオンはプロオキシダントとして働き、活性酸素やラジカルを生成させる機能をもつ。還元型-酸化型イオンの変換に対するジピコリン酸の作用を検討した結果をFig. 3に示す。ピリジン化合物のうちジピコリン酸のみが二価鉄の自動酸化を促進した。他のピリジン化合物は鉄イオンを還元状態に保つ傾向を示した (Fig. 3A)。一方、アスコルビン酸は強い還元力を持ち、酸化型の遷移金属イオンを還元して反応性の強い二価鉄や一価銅イオンを生じるとともに、自らは酸化される。ジピコリン酸の添加はアスコルビン酸による二価銅の還元を完全に阻止した (Fig. 3B)。この時アスコルビン酸の酸化も完全に阻止された (Fig. 3C)。

考 察

アスコルビン酸に代表される抗酸化物質 (ビタミンE, カテキン, フラボノイド等) の多くはラジカルを吸収するスカベンジャーであると同時に、金属イオンに対して還元力を持つため酸素を活性化する酸化物質にもなる可能性がある⁸⁾。還元型の二価鉄イオンは中性または弱酸性で比較的安定に存在し、酸素との反応性が低いものに対して、一価銅イオンは中性近辺でも反応性が高い。したがって強い還元性を持つ多くの抗酸化物質は銅イオンによる酸化傷害に対しては防御力を示さない⁹⁾。

本研究においてはバチルス属の細菌によって産生されるジピコリン酸が効果的なアンチオキシダントとして作用することを見出し、その機構を解析した。ジピコリン酸自体は還元力を示さず、二価鉄イオンの自動酸化反応を促進することから、ジピコリン酸の抗酸化作用はプロオキシダントである還元鉄イオンを減少させ、酸素分子との反応を阻止することによると解釈される。ジピコリン酸はオルト位置にカルボキシル基をもち、ピリジン環が高度の電子欠乏状態となり、電子求引性である事実とよく一致する。さらにジピコリン酸は銅イオンによる酸化傷害に対しても強い防御作用を示した。このことは鉄イオンの場合と同様にジピコリン酸は電子求引性に作用し、還元型銅イオンを酸化型へ変換することによって還元型銅イオンを引き金とするラジカルの生成を阻止する機構によると考えられる。この考えはジピコリン酸が、(a) 銅イオンによるグルタチオン還元酵素の阻害を解除できること、さらに (b) 銅イオンによるアスコルビン酸の酸化を完全に阻止できることから裏付けられる。

銅、カドミウムなどによるグルタチオン還元酵素の阻害・失活は活性酸素除去系を構成する抗酸化酵素の一つの傷害であり、細胞に対する酸化傷害を引き起こす引き金と考えられる⁷⁾。抗酸化酵素系であるグルタチオン還元酵素の保護はこの物質のアンチオキシダントとしての役割を示すものといえる。さらに血栓形成の前段階となるLDLの酸化には活性酸素と血中銅イオンの関与が示されている¹⁰⁾が、今回示したジピコリン酸の新しい生理機能である抗酸化作用はin vivoにおいても銅イオンとの結合によりLDLの酸化を阻止することが期待され、伝統食品としての納豆に新たな機能を与えるものである。

文 献

- 1) Woodruff, W. H., T.G. Spiro and C. Gilvarg (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58 : 197-203
- 2) Fujita, M., K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya and S. Nishimuro (1995) *Biol Pharm Bull* 18 : 1387-1391
- 3) Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge (1990) *Methods Enzymol.* 186 : 1-85
- 4) Draper, H. H. and M. Hadley (1990) *Methods Enzymol.* 186 : 421-431
- 5) Murakami, K., H. Nagura and M. Yoshino (1981) *Anal. Biochem.* 105 : 407-413
- 6) Yoshino, M. and K. Murakami (1998) *Anal. Biochem.* 257 : 40-44
- 7) Serafini, M. T., A. Romeu and L. Arola (1989) *Biochem. Int.* 18 : 793-802
- 8) Yamanaka, N., O. Oda and S. Nagao (1997) *FEBS Lett.* 401 : 230-234
- 9) Murakami, K., Y. Onoda, J. Kimura and M. Yoshino (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42, 1063-1069
- 10) Mukhopadhyay, C. K. and P.L. Fox (1998) *Biochemistry* 37 : 14222-14229