

ポリフェノール化合物のプロオキシダント作用 フラボノイドによるLDL酸化の促進

村上 恵子, 吉野 昌孝
(愛知医大・医・生化学*)

Prooxidant Action of Polyphenolic Compounds: Stimulation of Low Density Lipoprotein by Flavonoids

Keiko MURAKAMI and Masataka YOSHINO

*Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,
Nagakute, Aichi 480-1195, Japan*

The naturally occurring flavonoids stimulated oxidation of human low densitylipoprotein in the presence of copper ion. Flavonoids with two hydroxyl groups in the B ring such as flavanol, flavanone and flavonol showed a potent oxidative activity on LDL. However, LDL oxidation did not enhanced by flavone and flavonol without hydroxyl groups in the B ring. Ptotocatechuic acid and chlorogenic acid, the catechol compounds with two hydroxyl groups, also showed a potent LDL oxidation activity. Stimulation by flavonoids of LDL oxidation was well correlated with the copper reducing potential.

Addition of superoxide dismutase protected LDL from the copper-dependent oxidation by flavonoids, indicating that superoxide radical formed through the reduction of oxygen by cuprous ion may participate in the oxidation of LDL.

生体における活性酸素は膜脂質, 蛋白, DNAを傷害し虚血・再還流傷害を含む多くの疾患の発生に関与している¹⁾。特にLDLの酸化は動脈硬化の誘引として重視される²⁾。フラボノイド類を含む植物由来のポリフェノールは活性酸素と反応して毒性を消去するはたらきを持つことが知られている^{3), 4)}。しかし一方で細胞毒性や変異原性を示すポリフェノールも存在し, この場合には活性酸素発生を促進するプロオキシダントとしてはたらくと推測されている^{5), 6)}。

今回は精製されたヒトLDLを用いて銅による酸化に対するフラボノイドの効果と構造との関係を検討した。

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

材料と方法

ヒト LDLの酸化

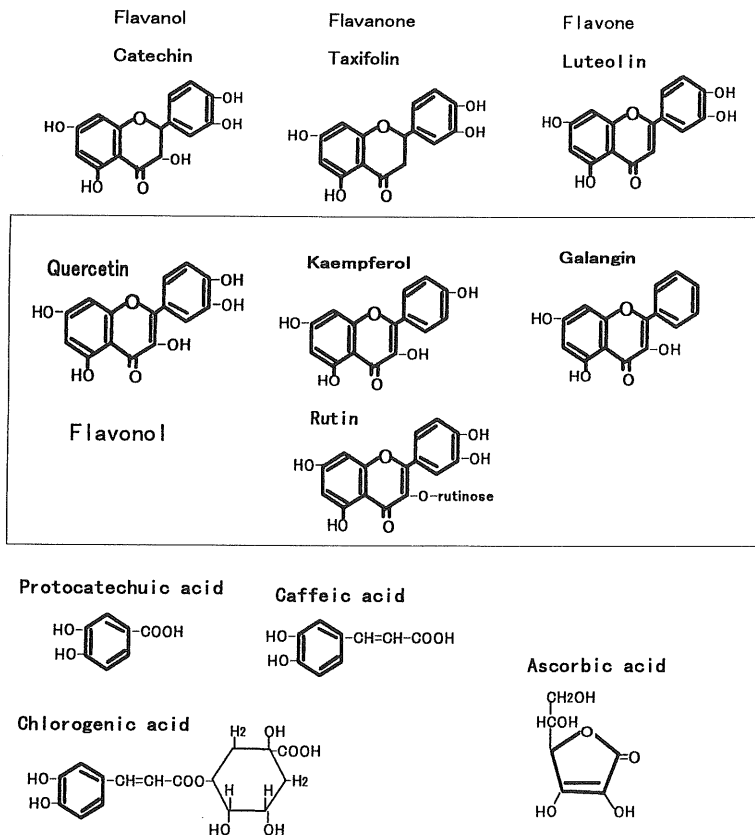
シグマの lipoprotein, low density (5.0-6.5 mg/ml protein) を 0.15M NaCl を含む 10mM リン酸カリウム (pH7.4, 重金属イオン除去のために chelex100 0.5g/ml を添加) により 200倍に希釈し, 1.5 μM の硫酸銅を加えて 234nm の吸光度を経時的に測定した。ここから酸化速度を算出し最高値を propagation rate とした。

銅の還元

一価の銅イオンをバソクプロイン2スルホン酸によって発色させ 492nm の吸光度を測定した。

結 果

実験に用いたフラボノイドの構造を scheme 1 に示した。B環に2個のOH基を持つフラボノイドのうちフラバノール (カテキン), フラバノン (タキシフォリン), フラボノール (ケルセチン, ルチン) は LDL の酸化を強く促進した (Fig. 1-A)。フラボン (ルテオリン) と B環のOHを持たないフラバノール (ガランギン) は強い酸化促進を示さなかった (Fig. 1-B)。



Scheme 1

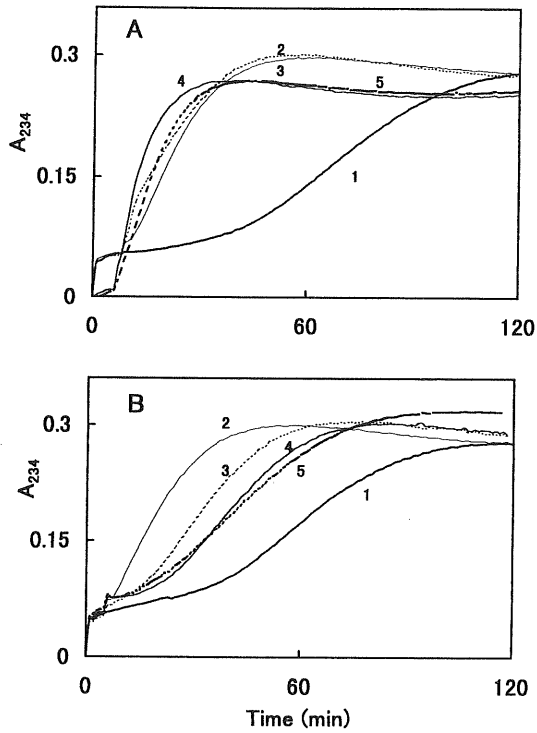


Fig. 1 Effect of flavonoids on copper-mediated oxidation of human LDL. LDL was incubated at 37°C at a concentration of 0.03mg/ml in potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.15M NaCl, 1.5 μM CuSO₄ and 0.5 μM flavonoids in a total volume of 1ml. Oxidation of LDL was monitored at 234 nm to follow the formation of conjugated dienes. A. Line 1, no addition; Line 2, catechin added; Line 3, quercetin added; Line 4, rutin added; Line 5, taxifolin added. B. Line 1, no addition; Line 2, quercetin added; Line 3, kaempferol added; Line 4, galangin added; Line 5, luteolin added. Flavonoids used were kept at 0.5 μM.

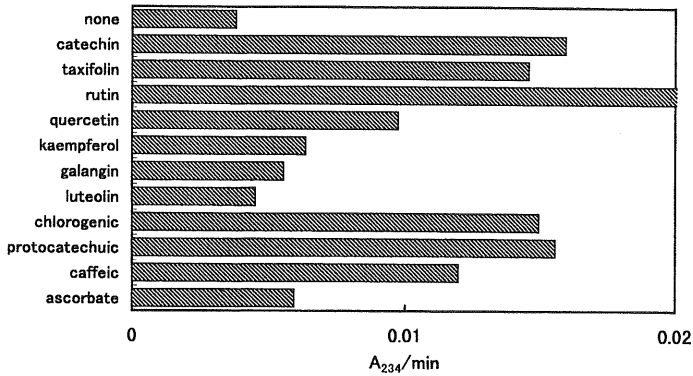


Fig. 2 Effect of polyphenol compounds on the propagation rate of copper-mediated LDL oxidation. Propagation rate was calculated from the maximal rate of oxidation presented in the data of Fig. 1.

各化合物の酸化促進を propagation rate に対する効果として Fig. 2 にまとめて表示した。ベンゼン環に2個のOH基（カテコール構造）を持ったプロトカテキン酸，クロロゲン酸も酸化促進効果を示した。これらの酸化促進効果は一部，銅に対する還元力と一致した（Fig. 3）。しかし酸化促進のないルテオリンも強い還元力を示した。

銅によるLDL酸化はSODの添加により抑制される（Fig. 4）ことから O_2^- によって促進されると推測

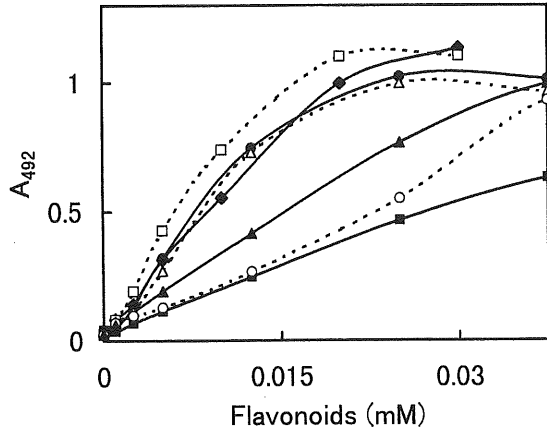


Fig. 3 Reduction of copper ion by flavonoids.

Copper reduction was followed by determining the Cu^+ ion concentration with bathocuproine disulfonate. The samples of 0.3 ml contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.1), 0.1 mM $CuSO_4$, various concentrations of flavonoids and 0.5 mM bathocuproine disulfonate. The mixture was incubated at room temperature and the absorbance at 492 nm was measured. \blacklozenge , catechin; \bullet , quercetin; \blacktriangle , taxifolin; \square , luteolin; \blacktriangle , rutin; \circ , kaempferol; \blacksquare , galangin.

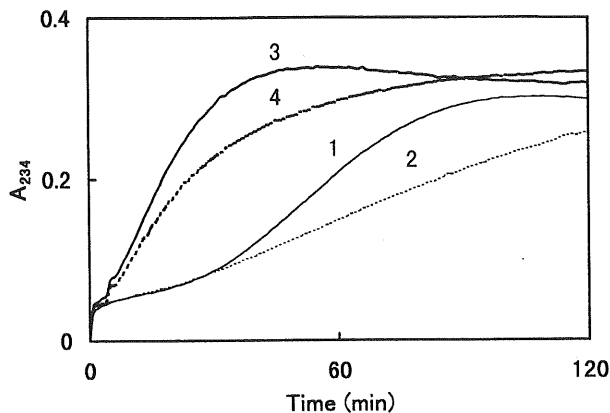


Fig. 4 Effect of superoxide dismutase (SOD) on copper-mediated oxidation of human LDL. Experimental conditions are similar to those presented in Fig.1. Line 1, no addition; Line 2, 25 $\mu g/ml$ SOD added; Line 3, 0.5 μM quercetin added; Line 4, quercetin plus 25 $\mu g/ml$ SOD added.

された。

SODは銅によるカテキンの褐変（可視部吸収の増加 - Fig. 5-A）とケルセチンの退色（可視部吸収の紫外部への移行 - Fig.5-B）を促進した。一方ルテオリンは銅の添加によってほとんど吸収の変化を示さなかった（Fig.5-C）。

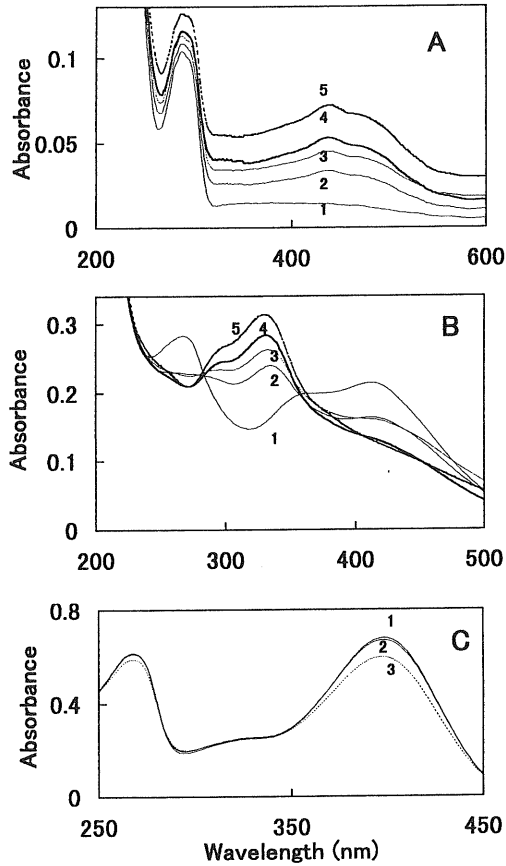
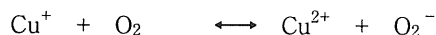
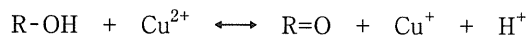


Fig. 5 Absorption spectra of flavonoids/copper complex in the absence and presence of superoxide dismutase.

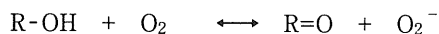
Absorption spectra of flavonoids were recorded 10 sec, 12 min, 20 min or 24 min after the addition of copper in 10mM tris-HCl buffer (pH 7.1). A. Catechin (20 μM) plus 50 μM CuSO₄. Line 1, 10 sec after the addition of copper; Lines 2 and 3, 12 min after the addition of copper in the absence and presence of 25 μg/ml SOD, respectively; Lines 4 and 5, 24 min after the addition of copper in the absence and presence of SOD, respectively. B. Quercetin (20 μM) plus 10 μM CuSO₄. Scanning conditions of lines 1 to 5 were similar to those described in A. C. Luteolin (40 μM) plus 100 μM CuSO₄. Line 1, 10 sec after the addition of copper; Lines 2 and 3, 20 min after the addition of copper in the absence and presence of 25 μg/ml SOD, respectively.

考 察

フラボノイドを含むポリフェノール化合物は銅を還元することから

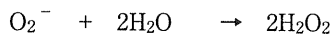


の反応により O_2^- を発生すると考えられる。この反応は結局



つまり銅を触媒とするフラボノイドの酸化であり、SODを加えて O_2^- をのぞくことによって右への反応が進行する。

SODの反応は



であるから生じた過酸化水素が Cu^+ と反応してヒドロキシラジカルを生じる。これがアポトーシス誘導や変異原性（場合によっては抗菌性）として現されるポリフェノールのプロオキシダント作用の本質であると思われる。in vitroにおけるヒトLDL酸化の促進はポリフェノール化合物のプロオキシダント効果を定量的に表現できる方法として有用と考えられる。

文 献

- 1) Halliwell, B and J.M.C. Gutteridge (1990) *Methods Enzymol.* 186 : 1-85
- 2) Steinberg, D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20963-20966
- 3) Morel, L., G. Lescoast, P. Cillard and J.Cillared (1994) *Methods Enzymol.* 234 : 437-443
- 4) Brown, J.E., H. Khodr, R.C. Hider and C.A. Rice-Evans (1998) *Biochem. J.* 330 : 1173-1178
- 5) Yamanaka, N., O. Oda, and S. Nagano (1997) *FEBS Lett.* 405 : 186-190
- 6) Yoshino, M., M. Haneda, M. Naruse and K. Murakami (1999) *Mol. Genet. Metab.* 68 : 468-472