

キサントレン酸の抗酸化作用：脂質過酸化反応の抑制と NADP-イソクエン酸脱水素酵素失活の防御

村上 恵子, 牧野 登志子, 羽根田 みや子, 吉野 昌孝
(愛知医大・医・生化*)

Antioxidant action of xanthurenic acid : Inhibition of lipid peroxidation and protection for NADP-isocitrate dehydrogenase

Keiko MURAKAMI, Toshiko MAKINO, Miyako HANEDA and Masataka YOSHINO

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

Summary

Vitamin B6 deficiency increases the lipid peroxidation and the synthesis of xanthurenic acid from tryptophan. Antioxidant properties of xanthurenic acid were examined in relation to the coordination of transition metals. Xanthurenic acid inhibited the formation of thiobarbituric acid-reactive substances as a marker of iron-mediated lipid peroxidation, and copper-dependent oxidation of low density lipoprotein. NADP-isocitrate dehydrogenase and malic enzyme, principal NADPH-generating enzymes for antioxidant defense system, was inactivated by reduced iron, and xanthurenic acid protected the enzyme from this inactivation. Xanthurenic acid may participate in the enhanced regeneration of reduced glutathione by stimulating NADPH supply. Xanthurenic acid further enhanced the autooxidation of Fe^{2+} ion. Other tryptophan metabolites such as kynurenic acid and quinaldic acid did not inhibit the lipid peroxidation and the inactivation of NADP-isocitrate dehydrogenase, and showed little or no effect on the Fe^{2+} autooxidation. Antioxidant properties of xanthurenic acid are related to the metal-chelating activity and probably to the enhanced oxidation of reduced transition metals as prooxidant.

キサントレン酸はトリプトファンの代謝産物の一つでありビタミンB6欠乏動物の尿中に多量に出現する。トリプトファンの主要代謝経路はキヌレニナーゼの反応を経てアラニンとアセチルCoA, またはニコチン酸に変化するものである。しかしB6欠乏時にはB6酵素でありサイトゾールに分布するキヌレニナーゼが著しく低下する一方, 同じB6酵素であってもサイトゾールとミトコンドリアに分布するキヌレニンアミノトランスフェラーゼの活性低下は比較的軽度であるためキサントレン酸に代謝されると推定されている¹⁾。

一方, B6欠乏動物は脂質過酸化を亢進し²⁾, その原因としてグルタミン酸の減少による還元型グルタチオンの減少があげられている³⁾。

今回はB6欠乏状態で増加する代謝産物, 特にキサントレン酸の生理機能を解析し, キサントレン酸が抗酸化作用物質としてはたらくことからB6欠乏による脂質過酸化亢進に対する緩衝系として作用している可能性について検討した。

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作 (〒480-1195)

材料と方法

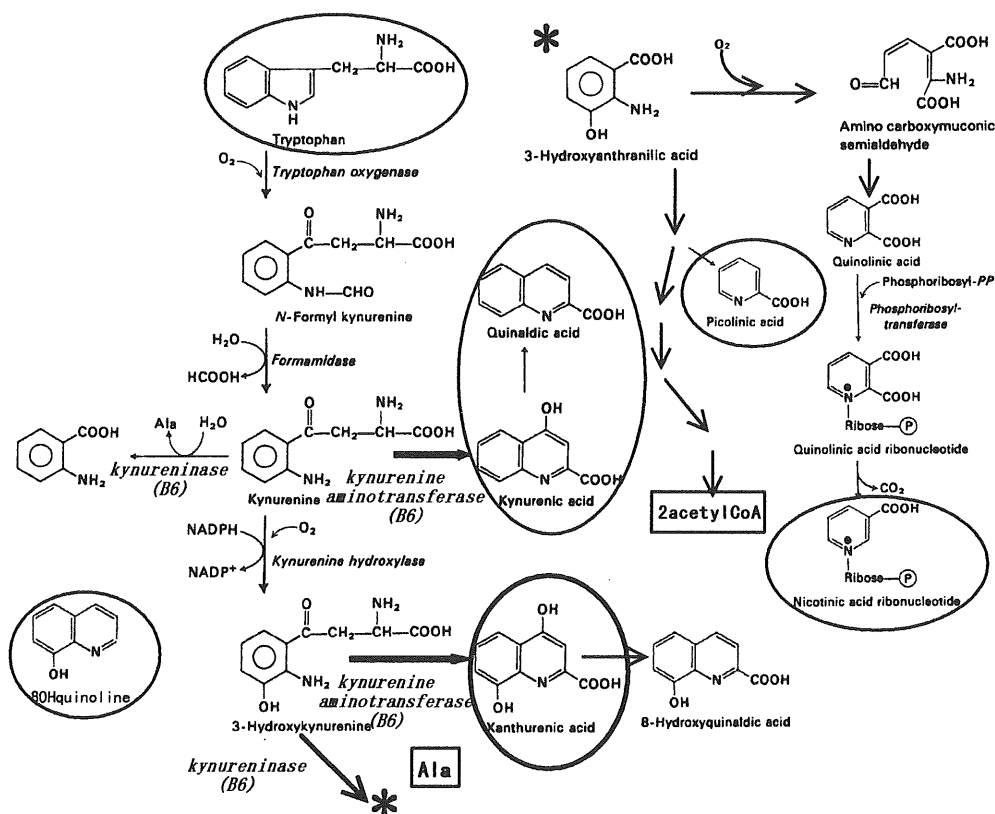
脂質過酸化：ラット肝ミクロソームを用い鉄/アスコルビン酸を加えて、生じたチオバルビツール酸反応物質 535nm の吸光度測定により定量した⁴⁾。

ヒト low density lipoprotein (LDL) 酸化の判定：市販の LDL (シグマ) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に 2 μM の銅イオンを加えて 234 nm の吸光度を経時的に測定した。

NADP-イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) とリンゴ酸酵素 (malic enzyme：リンゴ酸 + NADP \rightarrow ピルビン酸 + NADPH) の活性測定：NADPH の 340nm における吸光度増加速度によった。

Fe^{2+} の定量：パソフェナンスロリン-2-スルホン酸によってキレートし 540nm の吸光度を測定した。

ラジカル吸収能の測定：安定なラジカルである diphenylpicrylhydrazil (DPPH) の 540nm における吸光度減少を用いた。



結果

キサントレン酸は鉄-アスコルビン酸によるミクロソーム膜成分の脂質過酸化生成を抑制した (Fig. 1)。キサントレン酸の 50% 阻害濃度は 50 μM の鉄イオンに対して約 25 μM であった。この濃度はカテキンと同程度であり、フラボノール類よりは高い⁵⁾が、ジピコリン酸よりは低かった⁶⁾。キヌレン酸はまったく効果がなかった。

銅イオンによるヒト LDL 酸化に対するキサントレン酸の効果を Fig. 2 に示す。キサントレン酸はラグタイムの延長と酸化速度低下の両方の効果があった。特に強い抑制効果ではなかったが、フラボノイドと異なり酸化を促進することはなかった⁷⁾。キヌレン酸、キナルジン酸はまったく効果がなく 8-ヒドロキシキノリンはキサントレン酸より強い抑制効果を示した。

過酸化水素を処理するグルタチオンペルオキシダーゼは還元型グルタチオンを基質としており、グルタチオンの還元には NADPH を必要とする。ミトコンドリアにおいて NADPH を供給する酵素は NADP-イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) のみであるが、この酵素は 2 価鉄イオンによって不活性化されるという性質を持つ⁸⁾。これは NAD-ICDH にも

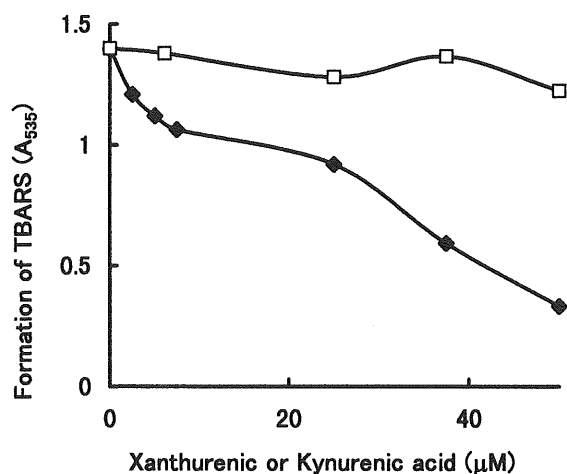


Fig. 1 Effect of xanthurenic acid and kynurenic acid on the iron-mediated lipid peroxidation of rat liver microsomes. Lipid peroxidation was induced by $10 \mu\text{M}$ FeCl_3 , 0.5 mM ascorbic acid and 0.2 mg/mL microsomal fraction in the presence and absence of xanthurenic acid or kynurenic acid. The mixture was incubated at 37°C for 10 min, and the reaction was stopped by addition of 100% trichloroacetic acid. Lipid peroxides produced were expressed as the thiobarbituric acid-reactive substances⁴⁾. \blacklozenge , xanthurenic acid; \square , kynurenic acid.

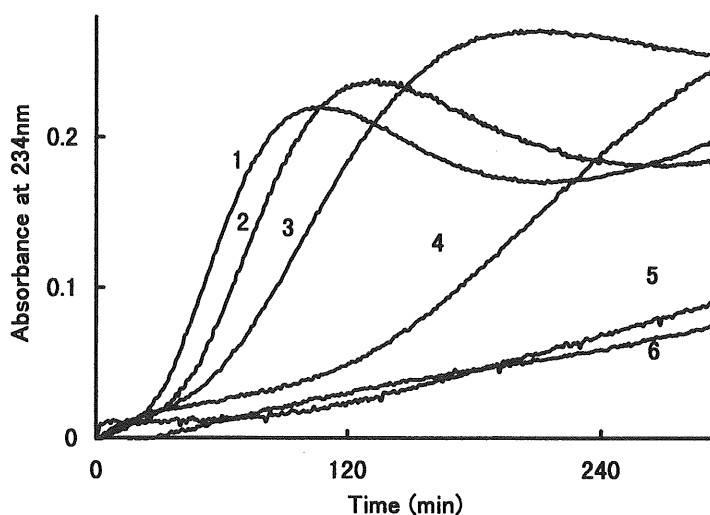


Fig. 2 Effect of xanthurenic acid and its related compounds on the copper-dependent oxidation of low density lipoprotein. LDL was diluted to the concentration of $25 \mu\text{g/mL}$ with 10 mM potassium phosphate buffer ($\text{pH } 7.4$) containing $1.5 \mu\text{M}$ EDTA and 0.15 M NaCl, and LDL oxidation was started at 37°C by adding $2 \mu\text{M}$ CuSO_4 in the absence and presence of $5 \mu\text{M}$ xanthurenic acid or quinoline compounds. The progress of oxidation was monitored spectrophotometrically equipped with a thermostatic control (37°C) and an automatically exchangeable six-positions cuvette holder, operating at 234 nm ¹⁴⁾. Curve 1, no addition; Curve 2, quinaldic acid added; Curve 3, kynurenic acid added; Curve 4, xanthurenic acid added; Curve 5, 8-hydroxyquinoline added; Curve 6, dipicolinic acid added.

サイトゾルのNADPH供給酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) にも見られない特異な性質である。キサントレン酸はNADP-ICDHの鉄による傷害を防御した (Fig. 3A)。8-ヒドロキシキノリンも同様の効果を示した。一方キヌレン酸, キナルジン酸にはまったく効果がなかった。

NADP-ICDHに対するキサントレン酸の有効濃度をFig. 3Bに示す。膜脂質過酸化の阻害より若干多少高い濃度が必要であった。サイトゾルのNADPH供給酵素であるリンゴ酸酵素 (malic enzyme) も2価鉄イオンにより不活性化された。キサントレン酸はこの酵素に対してもほぼ同様の保護効果を示した。

Fig. 4Aにキサントレン酸のラジカル能を示した。安定なラジカルであるdiphenylpicrylhydrazyl (DPPH) は0.1 mM以下のアスコルビン酸によって完全に処理された。これに対してキサントレン酸, および8-ヒドロキシキノリンは弱いラジカル吸収能を示した。

2価鉄イオンは酸素または過酸化水素を還元してラジカルを生じる。多くの抗酸化物質は鉄イオンの酸化を促進することによってラジカルの発生を防止すると推測される⁹⁾。そこで2価鉄イオンの自動酸化反応に対するキサントレン酸の効果を検討した (Fig. 4B)。50 μ Mのキサントレン酸は鉄イオンの酸化を促進した。

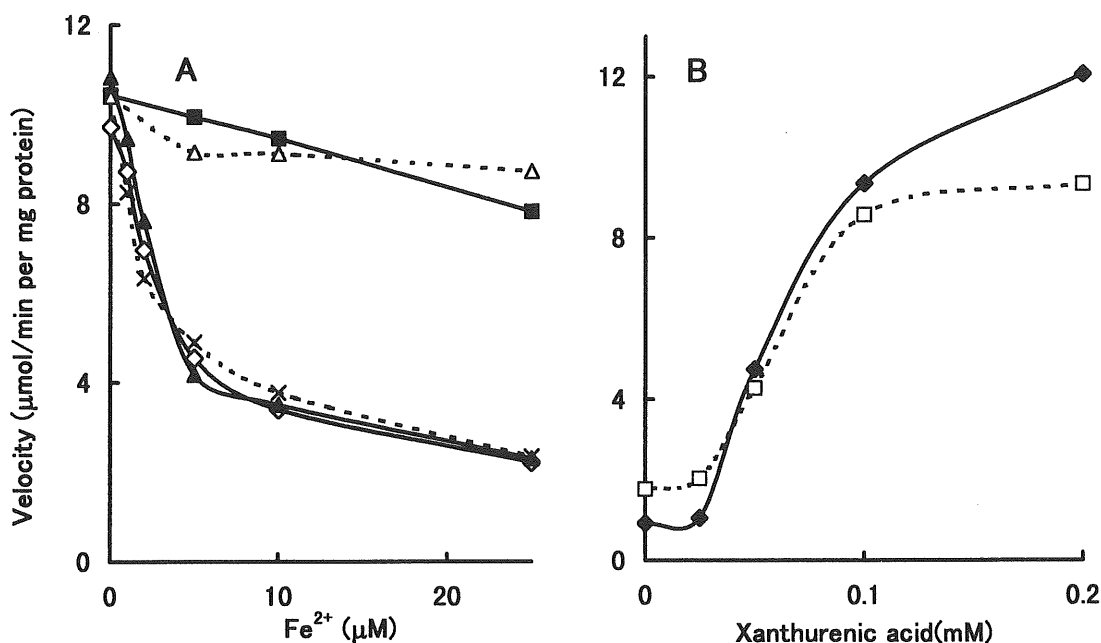


Fig. 3 Effect of xanthurenic acid on the inactivation by Fe^{2+} of NADP-isocitrate dehydrogenase and malic enzyme. A: Inactivation of NADP-isocitrate dehydrogenase by Fe^{2+} in the presence of xanthurenic acid and its related compounds. NADP-isocitrate dehydrogenase was incubated for 2.5 min with the mixture containing various concentrations of $FeSO_4$, 0.25 mM threo-Ds-isocitrate, 2.5 mM $MgCl_2$ and 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1) in the absence and presence of xanthurenic acid and its related compounds. Activity was determined by addition of 0.25 mM NADP. \diamond , no addition; \blacksquare , 0.1 mM xanthurenic acid added; \triangle , 0.1 mM 8-hydroxyquinoline added; \times , 0.1 mM quinaldic acid added; \blacktriangle , 0.1 mM kynurenic acid added. B: Effect of increasing concentrations of xanthurenic acid on the Fe^{2+} -mediated inactivation of NADP-isocitrate dehydrogenase and malic enzyme. The enzymes were inactivated by adding 20 μ M $FeSO_4$. The conditions were similar to those in A. \blacklozenge , NADP-isocitrate dehydrogenase; \square , malic enzyme.

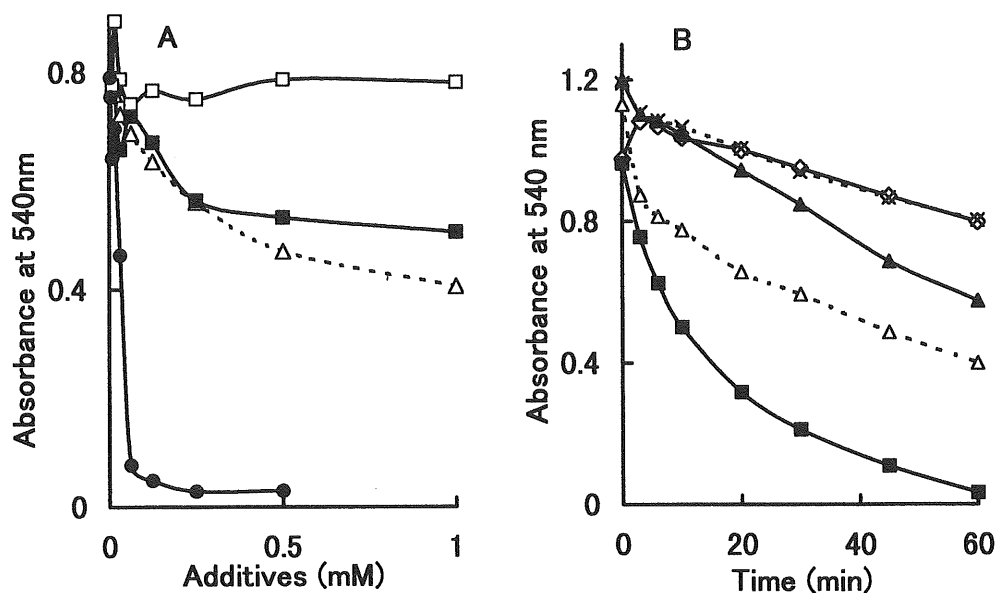


Fig. 4 Interaction of xanthurenic acid with the diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical and Fe^{2+} . A: Reaction of xanthurenic acid and its related compounds with DPPH. Each compound was mixed with 0.1 mM DPPH in ethanol after incubated for 30min at room temperature, absorbance at 540 nm was measured by microplate reader. ●, ascorbic acid; ■, xanthurenic acid; △, 8-hydroxyquinoline; □, dipicolinic acid. B: Effect of xanthurenic acid and its related compounds on the autooxidation rate of Fe^{2+} . Iron oxidation was followed by determining the concentration Fe^{2+} with bathophenanthroline disulfonate⁹⁾. The reaction was started by addition of 0.1 mM FeSO_4 to the quinoline compounds at 0.05 mM in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1). Aliquots of 0.2 mL were mixed with 0.1 mL of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at appropriated intervals, and the absorbance at 540 nm was measured. A. ◇, No addition; ■, xanthurenic acid; △, 8-hydroxyquinoline; ▲, kynurenic acid; ×, quinaldic acid.

考 察

抗酸化物質の指標としてしばしばラジカル吸収能が用いられるが、ラジカルとの反応性は還元性とほぼ並行する。還元性の強いポリフェノールには活性酸素発生能を持つものがあり¹⁰⁾、実際に酵素タンパクを損傷すること¹¹⁾、あるいは培養細胞にアポトーシスを起こすこと¹²⁾を以前に報告した。

還元性の強い物質による活性酸素の発生は遷移金属イオンが共存する時さらに顕著であり、鉄-アスコルビン酸は脂質過酸化の促進その他のラジカル発生源として用いられている⁴⁾。また血中のラジカル物質であると推測される尿酸はLDLの酸化を促進することが知られており¹³⁾、フラボノイドも同様の効果を示した⁷⁾。

一方LDLの酸化抑制に効果を示すカプサイシンは強い還元性を持たなかった¹⁴⁾。キサントレン酸の脂質酸化抑制効果もこれに近いものと思われる。関連化合物との構造の比較からキノリン環の8位にあるOH基が脂質酸化抑制に必須であることが示された。

さらにキサントレン酸は2価鉄イオンによるNADP-ICDH, malic enzymeの不活性化を阻止した。キサントレン酸は鉄イオンと強く結合し、その酸化を促進することによって2価鉄イオンによる酸素の活性化を防ぐものと推測される。

最初に記したようにキサントレン酸の過剰産生はビタミンB6欠乏時に限られる。B6欠乏ではグルタミン酸の生成が阻害されるためグルタチオンが減少し組織の抗酸化能が低下すると推測される。よってB6欠乏は脂質過酸化生成が亢進することになるが、この時同時に増加したキサントレン酸は抗酸化物質としてはたらくと同時に、グルタチオン還元酵素にNADPHを供給するNADP-ICDH, malic enzymeを保護することによって酸化傷害に対する緩衝作用を発揮していると推測され、生理的に意義を持つと考えられる。

参考文献

- 1) Ogasawara, N., Hagino, Y. and Kotake, Y. (1962) *J. Biochem.* 52: 162.
- 2) Ravichandran, V. and Selvam, R. (1990) *Biochem. Int.* 21: 599.
- 3) Cabrini, L., Bergami, R., Fiorentini, D., Marchetti, M., Landi, L. and Tolomelli, B. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 689.
- 4) Draper, H. H. and Hadley, M. (1990) *Methods Enzymol.* 186: 421.
- 5) 村上恵子, 森 稔高, 永田真裕子, 伊藤正江, 吉野昌孝 (1998) *微量元素研究* 15: 107.
- 6) Murakami, K., Ueda, T., Morikawa, R., Ito, M., Haneda, M. and Yoshino, M. (1998) *Biomed. Res.* 19: 205.
- 7) 村上恵子, 吉野昌孝 (2000) *微量元素研究* 17: 97.
- 8) Soundar, S. and Colman, R. F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 5264.
- 9) Yoshino, M. and Murakami, K. (1998) *Anal. Biochem.* 257: 40.
- 10) Marklund, S. and Marklund, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 75: 469.
- 11) Iwata, S., Murakami, K., Haneda, M. and Yoshino, M. (1999) *Biomed. Res.* 20: 81.
- 12) Htay, H. H., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K. and Yoshino, M. (2002) *Biomed. Res.* 23: 127.
- 13) Abuja, P. M. (1999) *FEBS Lett.* 446: 305.
- 14) Murakami, K., Ito, M., Htay, H. H., Tsubouchi, R. and Yoshino, M. (2001) *Biomed. Res.* 22: 15.