

エタノール誘導ラット肝ミクロゾームによる基質酸化反応と 活性酸素種との相関

林 聖子, 安井裕之, 桜井 弘

(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Relationship between the reactive oxygen species and substrate oxygenation in ethanol-induced rat liver microsomes

Seiko HAYASHI, Hiroyuki YASUI, and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Cytochrome P450 is a group of enzymes that are responsible for the biotransformation of numerous endogenous and exogenous compounds. However, the precise process of dioxygen activation involved in P450-dependent substrate oxygenations has not been established. Previously, we reported that singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) played an important role in microsomal P450-dependent oxygenation. In order to confirm the $^1\text{O}_2$ involvement, we investigated further the relationship between the formation of reactive oxygen species (ROS) and a substrate oxygenation in the ethanol-induced rat liver microsomal P450.

Cytochrome P450は第I相薬物代謝反応の中心的役割を果たすヘム鉄タンパク質・モノオキシゲナーゼであり、種々の生体反応に関与している。しかし、P450反応サイクル中で生成される反応中間体の寿命が非常に短いため、酸素分子が活性化されて基質に取り込まれるメカニズムは未だに解明されていない。P450反応中の活性中間体として高原子価鉄オキソ錯体が提案されているが¹⁾、活性酸素種 (ROS) に注目した研究は極めて少ない。これまでに我々がいくつかの基質を用いてミクロゾーム反応を調べた結果、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) がP450反応に関与しているという可能性が示された^{2, 3)}。本研究ではethanolにより誘導されるCYP2E1の特異的基質である*p*-nitrophenolの水酸化反応とROSとの関連性について検討した。

【方 法】

1. ミクロゾーム調製

6週齢Wistar系雄性ラットに15% (v/v) ethanolを3週間自由摂取させた。それらのラットから肝臓を摘出し、超遠心分画法によりミクロゾームを得た。総タンパク質量、総P450量およびCYP2E1量はそれぞれLowry法⁴⁾、CO差スペクトル法⁵⁾およびELISA⁶⁾により定量した。

2. *p*-Nitrophenol水酸化反応

CYP2E1の特異的基質である*p*-nitrophenolからその代謝物である4-nitrocatecholへの水酸化反応を測定した^{7, 8)}。ラット肝ミクロゾーム、NADPH、*p*-nitrophenolおよび種々の活性酸素消去剤、鉄キレート剤、P450阻害剤 (Table 1) を混合し、水酸化活性を評価した。

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

Table 1 ROS scavengers, a ferric chelator and P450 inhibitor used in the experiment

• O ₂ ⁻ scavenger	SOD
• OH scavenger	Ethanol, DMSO, Mannitol
H ₂ O ₂ scavenger	Catalase
¹ O ₂ quencher	β-Carotene, NaN ₃
Ferric chelator	Deferoxamine
P450 inhibitor	SKF525A

3. ESR spin-trapping

マイクロゾーム系およびHP (hematoporphyrin)-UVA系から発生するラジカル種のESRスペクトルを室温で測定した。¹O₂のトラップ剤としてTMPD (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone), また, スーパーオキシドアニオンラジカル (•O₂⁻) およびヒドロキシルラジカル (•OH) のトラップ剤としてDMPO (5,5'-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) を用いた⁹⁻¹²⁾。なお, ミクロゾーム系とはマイクロゾームとNADPHの混合液を37℃で10分間反応させた系であり, HP-UVA系とはHP溶液にUVAを照射すると¹O₂を産生する化学発生系のことである。

4. 基質結合差スペクトル

ラット肝マイクロゾームに*p*-nitrophenolを添加し, 300-600 nmにおける紫外-可視スペクトルを測定した。*p*-Nitrophenolを添加したマイクロゾームのスペクトルからマイクロゾームのみのスペクトルを差し引いて基質結合差スペクトルとした¹³⁾。

【結果と考察】

CYP2E1反応にどのようなROSが関与しているかを知るため, *p*-nitrophenol水酸化活性を調べた。SOD, catalaseおよびmannitolを添加した時, 水酸化活性に影響は見られなかった。しかし, 鉄キレート剤のdeferoxamineおよびP450阻害剤のSKF525Aを添加すると, 反応は抑制された。また, ¹O₂クエンチャーのβ-caroteneやNaN₃を添加すると, 濃度依存的に水酸化反応を抑制した。*p*-Nitrophenolと同様にCYP2E1の基質であるethanolおよびDMSOを添加した時も同様に, 濃度依存的に反応は抑制された。(Fig. 1)

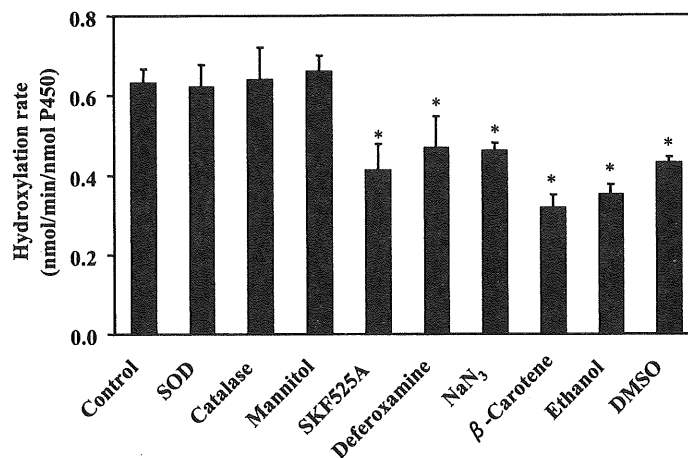


Fig. 1 Effect of ROS scavengers, a P450 inhibitor, and an iron chelator on the hydroxylation of *p*-nitrophenol in rat liver microsomes. The reaction mixtures contained 1.3 nmol/mL P450, 0.1 mM *p*-nitrophenol, 1 mM NADPH, and various substances in a final volume of 0.5 mL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at 37°C for 10 min. Concentrations: SOD: 5000 units/mL, catalase: 5000 units/mL, mannitol: 1 mM, SKF525A: 0.05 mM, deferoxamine: 20 mM, NaN₃: 0.5 mM, β-carotene: 1 mM, ethanol: 0.86 mM, DMSO: 0.71 mM. Significance: **p* < 0.01 vs. the control.

p-Nitrophenol水酸化速度と $^1\text{O}_2$ シグナル強度の減少率との間に相関関係があるかどうかをESRスピントラップ法を用いて評価した。*p*-Nitrophenol, β -caroteneおよびSKF525Aをミクロゾーム系に添加すると、濃度依存的に $^1\text{O}_2$ のシグナル強度は低下した。一方、*p*-nitrophenolおよび β -caroteneをHP-UVA系に添加すると、 $^1\text{O}_2$ シグナル強度は低下したが、SKF525Aを添加してもシグナル強度に変化は見られなかった。(Fig. 2) また、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ はトラップされなかった。これらの結果は、CYP2E1反応には $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ ではなく、 $^1\text{O}_2$ が関与していることを示している。

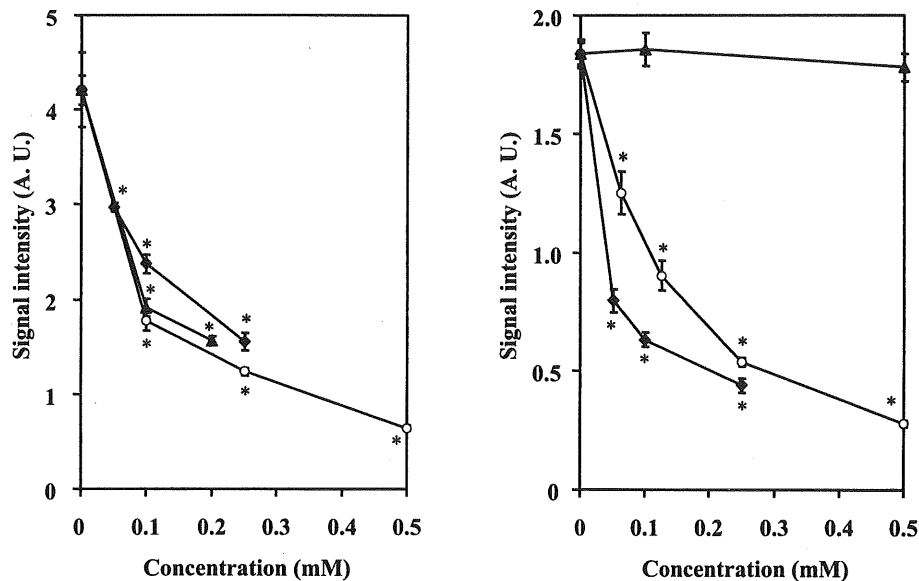


Fig. 2 Concentration-dependent scavenging effect of β -carotene (○), *p*-nitrophenol (◆), and SKF525A (▲) on both the generated $^1\text{O}_2$ in the microsomes-NADPH system (A) and chemically generated $^1\text{O}_2$ in HP-UVA system (B). (A): The reaction systems contained 1.3 nmol/mL P450, 50 mM TMPD, 1 mM NADPH, and 0-0.5 mM β -carotene, 0-0.25 mM *p*-nitrophenol, or 0-0.2 mM SKF525A in a total volume of 0.5 mL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.5 at 37°C. ESR spectra were measured at 10 min after the addition of NADPH. (B): The systems contained 62.5 μM HP, 50 mM TMPD, 0-0.5 mM β -carotene and 0-0.25 mM *p*-nitrophenol or 0-0.5 mM SKF525A in a total volume of 0.2 mL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at room temperature (22°C). ESR spectra were measured after 30 sec of UVA irradiation in the system. Significance: * $p < 0.01$ vs. the control.

p-Nitrophenolを添加した時の基質結合差スペクトルから、 $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{min}} = 380 \text{ nm}$ が得られた。このスペクトルから、*p*-nitrophenolはP450活性中心のヘム鉄部分に直接配位するタイプの基質であることがわかった。

以上の結果から、次の結論を得た。

- (1) $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ はCYP2E1芳香族水酸化反応には関与していない。
- (2) ラット肝ミクロゾームによる基質酸化反応において、 $^1\text{O}_2$ は必須の役割を果たしている。
- (3) $^1\text{O}_2$ はP450活性中心のヘム鉄周辺で発生している可能性がある。

【文 献】

- 1) Kellner D G, Hung S-C, Weiss K E, Sligar S G (2002) Kinetic characterization of compound I formation in the thermostable cytochrome P450 CYP119. J Biol Chem 277: 9641-9644.
- 2) Osada M, Ogura Y, Yasui H, Sakurai H (1999) Involvement of singlet oxygen in cytochrome P450-dependent substrate oxidations. Biochem Biophys Res Commun 263: 392-397.
- 3) Yasui H, Deo K, Ogura Y, Yoshida H, Shiraga T, Kagayama A, Sakurai H (2002) Evidence for singlet oxygen involvement in the rat and human cytochrome P450-dependent substrate oxidations. Drug Metabol

Pharmacokin 17: 416 - 426.

- 4) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 243: 265 - 275.
- 5) Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J Biol Chem 239: 2370-2378.
- 6) Paye M, Beaune P, Kremers P, Guengerich F P, Letawe-Goujon F, Gielen J (1984) Quantification of two cytochrome P-450 isoenzymes by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Biochem Biophys Res Commun 122: 137 - 142.
- 7) Reinke L A, Moyer M J (1985) *p*-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. Drug Metab Dispos 13: 548 - 552.
- 8) Koop D R (1986) Hydroxylation of *p*-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme 3a. Mol Pharmacol 29: 399 - 404.
- 9) Lion Y, Delmelle M, Van de Vorst A (1976) New method of detecting singlet oxygen production. Nature 263: 442 - 443.
- 10) Moan J, Wold E (1979) Detection of singlet oxygen production by ESR. Nature 279: 450 - 451.
- 11) Dzwigaj S, Pezerat H (1995) Singlet oxygen-trapping reaction as a method of $^1\text{O}_2$ detection: role of some reducing agents. Free Rad Res Commun 23: 106 - 115.
- 12) Ando T, Yoshikawa T, Tanigawa T, Kohno M, Yoshida N, Kondo M (1997) Quantification of singlet oxygen from hematoporphyrin derivative by electron spin resonance. Life Sci 61: 1953 - 1959.
- 13) Schenkman J B, Remmer H, Estabrook R W (1967) Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol Pharmacol 3: 113 - 123.