

ロスマリン酸のプロオキシダント作用—遷移金属イオンの還元を介した活性酸素生成

村上 恵子, 羽根田 みや子, 吉野 昌孝
(愛知医大・医・生化*)

Prooxidant action of Rosmarinic acid: Role of Transition Metals in the formation of Reactive Oxygen Species

MURAKAMI, K., HANEDA, M. and YOSHINO, M.

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

Rosmarinic acid is found as a secondary metabolite in medicinal plants such as rosemary and salvia, which is widely used as a culinary herb, especially in Mediterranean dishes, and is also used as a fragrant additive in soaps and other cosmetics. Prooxidant action of rosmarinic acid and its constituent caffeic acid was analyzed in relation to the role of transition metal. Rosmarinic acid and caffeic acid stimulated the copper-dependent oxidation of low density lipoprotein (LDL) by reducing lag phase and increasing propagation rate. Autooxidation of ferrous ion was completely inhibited, and further cupric ion was effectively reduced to cuprous ion by these compounds. Treatment of DNA from plasmid pBR322 and calf thymus with rosmarinic acid and caffeic acid plus copper caused strand scission and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. Rosmarinic acid and caffeic acid-mediated oxidation of LDL and the formation of DNA base adduct with strand scission can be explained by the reduction of transition metals causing the generation of reactive oxygen species through the interaction with oxygen molecule. DNA base adduct was also accounted for by the production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide from dismutation of superoxide radical. Anti-microbial and apoptosis-inducing effects of rosmarinic acid may be ascribed to the metal-dependent generation of reactive oxygen species.

ロスマリン酸はシソ科 (レモンバーム, セージ, ローズマリー, タイム等), ムラサキ科 (コンフリー等) の植物に多く含まれるポリフェノールの1種であり, ハーブ, スパイスなどに利用されているほか, 粘膜保護, 消炎, 抗酸化, 抗菌, 抗ウイルスなどの薬理作用を持つことが知られている¹⁾。これらの効果のうち抗菌, 抗ウイルス効果にはロスマリン酸のポリフェノール構造に由来する活性酸素生成の関与が予測される。今回はロスマリン酸が遷移金属存在下において, 活性酸素生成能を示すことを明らかにした。そのメカニズムは遷移金属イオンに対する強い還元作用に関連すると推測される。

材料と方法

試薬, 実験材料として以下のものを用いた。

ロスマリン酸—ケイマンケミカル。プロトカテキュ酸, カフェー酸, L-アスコルビン酸, ネオクプロイン—カーク。pBR322DNA—タカラ。パン酵母, NADP依存性イソクエン酸脱水素酵素—オリエンタル酵母。ヒト低密度リポタンパク (LDL)—Athens Research & Technology。仔牛胸腺DNA, DNase, エンドヌクレアーゼ, アルカリフォスファター

*所在地: 愛知郡長久手町岩作雁又21 (〒480-1195)

ゼ、パソフェナンスローリンジスルホン酸, Tris, TEMPOL-シグマアルドリッチ。NADP-ロッシュ。

透過性パン酵母の調製-市販のパン酵母を4倍量の0.5Mソルビトールを含む0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、緩衝液と等量のトルエンを加えた。43℃で2分間加温後、遠心分離によって上清を除き、4倍量の0.5Mソルビトールを含む50mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁した。これによって酵母は透過性を増しアコニターゼ活性を細胞そのまま (*in situ*) で測定できるようになる²⁾。

以下1-4の実験は金属イオン存在下におけるロスマリン酸その他ポリフェノールの活性酸素生成能を測定するために行ったものである。アコニターゼ (EC 4.2.1.3) は $[4Fe-4S]^{2+}$ の活性中心を持ちスーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素に対しても感受性が高い。DNAはヒドロキシラジカルによって断片化し、グアニン塩基がヒドロキシル化される。LDL中の不飽和脂肪酸は銅イオン存在下で酸化されやすい。

1. アコニターゼの失活と測定-アコニターゼを失活させるには10mg/mlの透過性パン酵母を0.5mMアジ化ナトリウム (カタラーゼ阻害のため) 存在下に0.05mM $FeSO_4$ とアスコルビン酸, ロスマリン酸, カフェー酸, プロトカキユ酸を加えて37℃10分間保温した。アコニターゼの活性は5mM クエン酸, 0.25mM NADP, 4mM $MgCl_2$, 10unit/ml NADP-イソクエン酸脱水素酵素, 1mg/mlパン酵母存在下に340nmの吸光度上昇を測定して算出した。
2. プラスミドDNAの切断による活性酸素傷害の評価-pBR322DNA 0.5 μg を10mM Tris-HCl (pH 7.4) 10 μl に溶解し37℃で1時間加温後0.8%アガロースゲル上にて電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色してDNAの構造変化と断片化を観察した³⁾。
3. 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の定量-ロスマリン酸, カフェー酸存在下で仔牛胸腺DNA100 μg を37℃で1時間加温し, DNase, エンドヌクレアーゼ, アルカリホスファターゼで処理した後, HPLC-ECDによって8-OHdGとデオキシグアノシンを分析定量し, その比率を算出した³⁾。
4. 銅イオンによるヒトLDLの酸化-30 $\mu g/ml$ のLDLを0.15MNaClを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.4) 中でロスマリン酸, カフェー酸, プロトカテキユ酸を加えて37℃で加温し, 2 μM の硫酸銅を加えて酸化を開始した。以後234nmの吸光度を分光光度計にて1分毎に記録した^{4,5)}。

以下の5, 6はロスマリン酸, カフェー酸, プロトカテキユ酸の遷移金属イオンに対する還元力を調べるためのものである。還元型の遷移金属イオン (Fe^{2+} , Cu^+) は酸素の一電子還元によって活性酸素を生成する可能性がある。

5. Fe^{2+} の定量-パソフェナンスローリンジスルホン酸と反応させ, 540nmの吸光度を測定した⁶⁾。
6. Cu^+ の定量-ネオクプロインと反応させ, 450nmの吸光度を測定した⁷⁾。

結 果

アコニターゼは $[4Fe-4S]^{2+}$ で構成される活性中心を持ち, 活性酸素の作用により, このうち1個のFeを失って失活することが知られている。したがってアコニターゼの活性は活性酸素生成の指標になる⁸⁾。パン酵母は比較的高いアコニターゼ活性を持ち, トルエンで処理して透過性を増すことにより *in situ*での酵素活性を測定できるのでこの目的に適している。ロスマリン酸, カフェー酸と鉄の添加はアコニターゼを失活させることが確認された (Fig. 1)。スーパーオキシドアニオンラジカルを消去すると考えられているTEMPOL⁹⁾が若干の保護効果を示したことから, ロスマリン酸, カフェー酸/鉄は酸素の一電子還元によりスーパーオキシドアニオンラジカルを生成した結果アコニターゼを失活させたものと推測された。

Cu^+ は Fe^{2+} 以上に強力な活性酸素生成能をもつ。ここでプラスミドpBR322と仔牛胸腺のDNAを用い, 銅/ポリフェノールによって発生する活性酸素の効果を検討した (Fig. 2)。プラスミドDNAは環状構造を持ち nativeの状態ではsuper coilの形で存在しているが, 活性酸素によってopen circular formになり, 次にリン酸結合が切断されてlinear formに変化し, さらに強いラジカルによって複数のホスホジエステル結合が切断されて細かく断片化される。DNAは

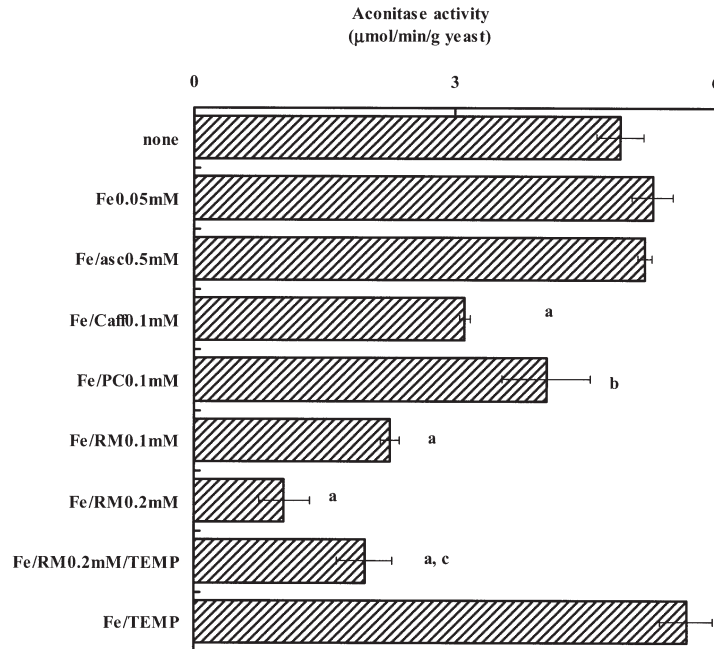


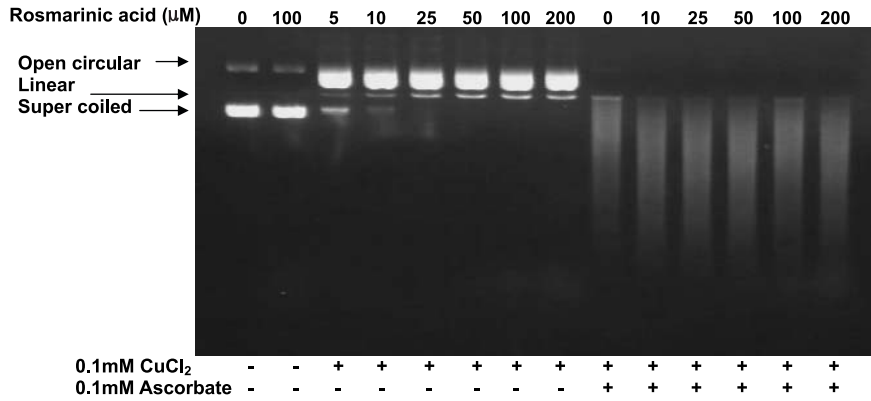
Fig. 1 Effect of rosmarinic acid and related polyphenolic compounds on the activity of aconitase in baker's yeast. Yeast cells were permeabilized by incubation with toluene at 43°C before experiment. Permeabilized yeast of 10mg/ml was mixed with 0.5mM NaN_3 , polyphenols at the indicated concentrations and 50 μM of FeSO_4 in 40mM Tris-HCl(pH7.1). After incubation at 37°C for 10min, cells were collected by centrifugation at $800 \times g$ for 5min and suspended with 50mM Tris-HCl(pH7.1) containing 0.5M sorbitol at the concentration of 200mg/ml. Aconitase activity was determined by increase in absorbance at 340nm in the presence of 5mM citrate, 0.25mM NADP, 4mM MgCl_2 , 10unit/ml of NADP-ICDH and 1mg/ml of yeast. Abbreviations: RM, rosmarinic acid; caff, caffeic acid; PC, protocatechuic acid; asc, ascorbic acid; TEMP, 1mM TEMPOL. **a**, $p < 0.001$ vs Fe; **b**, $p < 0.01$ vs Fe; **c**, $p < 0.05$ vs 0.2mM RM

ロスマリン酸と銅を加えることにより一部linear formを生じ、その量は濃度依存的に増加した(A)。アスコルビン酸/銅は0.1mMの濃度でDNAを断片化し、そこにロスマリン酸を加えることによってlinear formが完全に消滅した。さらにロスマリン酸による活性酸素生成を仔牛胸腺DNA中の塩基グアニンに対する修飾物の生成によって確認した(B)。ロスマリン酸/銅によって8ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG)が生じ、その量は濃度依存的に増加した。8-OHdGはカフェー酸を添加したときにも生じたが、同じ効果を得るにはロスマリン酸より高い濃度が必要だった。

遷移金属イオンによる酸素の一電子還元は金属イオンの酸化を伴う。持続的な活性酸素の生成には金属イオンの再還元が必要となる。ロスマリン酸、カフェー酸、プロトカテキユ酸は銅イオンを還元した (Fig. 3A)。またイソクエン酸による2価鉄イオンの酸化を阻止して鉄イオンを還元状態に保つはたらきを示した (Fig. 3B)。

Fig. 4は銅イオン依存性のLDL酸化に対するロスマリン酸の効果を示す。LDLの酸化に対する活性酸素の関与は明らかでないが¹⁰⁾、銅イオンを還元する物質はしばしば酸化を加速することが確かめられている^{4, 5)}。低濃度のロスマリン酸はinitial lagの短縮とpropagation rateの増加の両方の効果によってLDLの酸化を加速した。

A



B

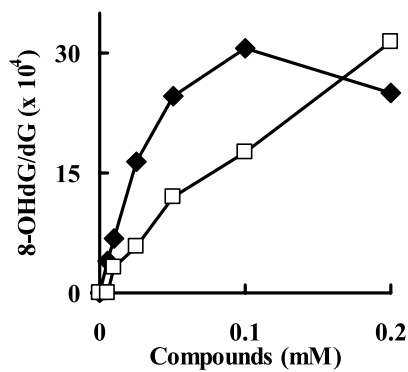


Fig. 2 Effect of Cu ion and polyphenols on DNA fragmentation and formation of 8-OHdG. (A) Fragmentation of plasmid DNA. pBR322(0.5 μ g) was incubated for 1 hour at 37°C in the presence of additives and applied on agarose gel for electrophoresis. (B) Effect of polyphenols on the copper-dependent formation of 8-OHdG. Calf thymus DNA was treated with rosmarinic acid and caffeic acid for 1hr and 8-OHdG was determined by HPLC-ECD method as described previously. \blacklozenge , rosmarinic acid; \square , caffeic acid

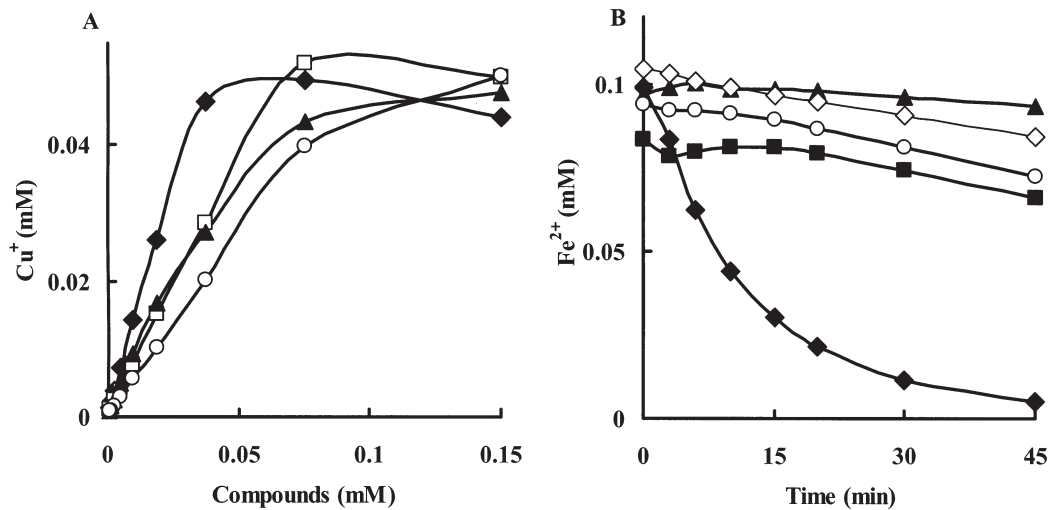


Fig. 3 Effect of rosmarinic acid and its related compounds on the reduction of transition metals. A. Reduction of Cu²⁺. CuSO₄ of 0.1mM was incubated with 0.5mM neocuproine and additives at the indicated concentrations in 10mM Tris-HCl (pH7.1) at 37°C. The concentration of Cu⁺ was determined by measuring of absorbance at 450nm by micro plate reader. \blacklozenge , rosmarinic acid; \circ , ascorbic acid; \blacktriangle , protocatechuic acid; \square , caffeic acid. B. Effect of polyphenols on the autooxidation of Fe²⁺ in the presence of isocitrate. FeSO₄ of 0.1mM was incubated with additives in 10mM Tris-HCl(pH7.1) at 37°C. Aliquot of 0.2ml was mixed with 0.1ml of 0.5mM bathophenanthroline-disulfonate and the absorbance at 540nm was recorded by micro plate rearer at the indicated time. \diamond , no addition; \blacklozenge , 0.1mM isocitrate; \blacksquare , isocitrate + 0.1mM rosmarinic acid; \circ , isocitrate + 0.1mM protocatechuic acid; \blacktriangle , isocitrate + 0.1mM caffeic acid

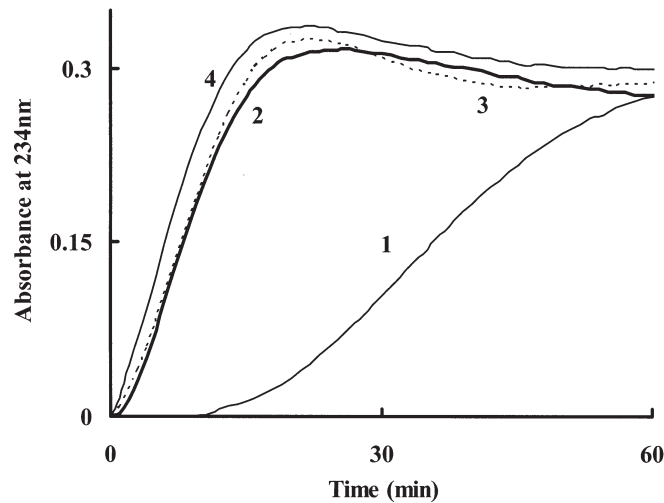


Fig. 4 Effect of polyphenols on the copper dependent oxidation of human low density lipoprotein(LDL). LDL of $30\mu\text{g/ml}$ was incubated at 37°C with additives in 10mM potassium phosphate buffer($\text{pH}7.4$) containing 0.15M NaCl. Oxidative reaction was started by the addition of $2\mu\text{M}$ CuSO_4 . Curve 1, control; Curve 2, $1\mu\text{M}$ of rosmarinic acid added; Curve 3, $2.5\mu\text{M}$ of caffeic acid added; Curve 4, $2.5\mu\text{M}$ of protocatechuic acid added

考 察

ロスマリン酸を含む多くのポリフェノールは強い還元力とラジカル捕捉能を持つため、これまで抗酸化物質として機能すると理解されてきた。今回、ロスマリン酸が遷移金属イオンを還元すると同時に、パン酵母アコニターゼに対する失活、プラスミドDNAに対する切断とDNA中のグアニン塩基修飾物(8-OHdG)生成作用が認められ、プロオキシダントとしてはたらくことが明らかになった。還元された遷移金属イオンは酸素分子を活性化し、スーパーオキシドアニオンを生成する。スーパーオキシドアニオンは不均化反応を介して過酸化水素を生じ、さらに還元型遷移金属イオンとのFenton反応によってヒドロキシルラジカルを生成してDNAの切断とグアニン塩基の修飾を来すと考えられる。

一般に水酸基を持つ物質は還元力を有するが、遷移金属イオンを還元することは、それによって酸素を活性化しプロオキシダントとしてはたらくことを必ずしも意味しない。水酸基を一つだけ持つカプサイシン型化合物は銅を還元し、鉄を還元状態に保ったが¹¹⁾、LDLの酸化を抑制した^{11, 12)}。一方3個の水酸基を持つガレートはDNAを切断し、アコニターゼを失活させた¹³⁾。従来、抗酸化物質として知られている物質が、そのフェノール構造に由来して活性酸素を生成する例はいくつか報告されており、我々が先に示したクルクミンもこれに該当する。クルクミンは強力なアンチオキシダントであると同時にプロオキシダントとしてDNA鎖を切断し8-OHdGを生成する。この作用はクルクミンに由来する細胞傷害に関係するものと推測された¹⁴⁾。

ロスマリン酸は水酸基2つのカテコールを持つ化合物であり、他のカテコール化合物よりも強い還元力と活性酸素生成能を示した。この物質は水溶性でもあり、金属イオン、酸素と共存した場合に細胞毒性を示す可能性がある。このことからロスマリン酸の持つ抗菌、抗ウイルス作用は活性酸素生成効果に由来するものと考えられる。このプロオキシダント作用はロスマリン酸のハーブ、スパイス、機能性食品としての応用に注意を引き起こすものであるが、腸管からの吸収については詳細なデータがなく細胞、組織に対しての作用には今後の検討が必要である。

References

- 1) Petersen M, Simmonds MSJ (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121 - 125.
- 2) Murakami K, Nagura H, Yoshino M (1980) Permeabilization of yeast cells: Application to study on the regulation

of AMP deaminase activity in situ. *Anal Biochem* 105: 407 - 413.

- 3) Yoshino M, Haneda N, Naruse M, Murakami K (1999) Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Gen Metab* 68: 468 - 472.
- 4) Yamanaka N, Oda O, Nagao S (1997) Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett* 401: 230 - 234.
- 5) Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G (1999) When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. *Biochem J* 340: 143 - 152.
- 6) Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40 - 44.
- 7) Larsen ER (1974) Spectrophotometric determination of copper in fertilizer with neocuproine. *Anal Chem* 46: 1131 - 1132.
- 8) Gardner PR (2002) Aconitase: Sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* 349: 9 - 2.
- 9) Nassar T., Kadery B., Lotan C., Da'as N., Kleinman Y., Haj-Yehia A. (2002) Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 436: 111 - 118.
- 10) Burkitt MJ (2001) A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: Roles of lipid hydroperoxides, α -tocopherol, thiols and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 394: 117 - 135.
- 11) Ito M, Murakami K, Yoshino M (2005) Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol* 43: 461 - 466.
- 12) Murakami K, Ito M, Htay HH, Tsubouchi R, Yoshino M. (2001) Antioxidant effect of capsaicinoids on the metal-catalyzed lipid peroxidation. *Biomed Res* 22: 15 - 17.
- 13) Htay HH, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Yoshino M (2002) Induction of apoptosis of HL60 cells by gallic acid derivatives. *Biomed Res* 23: 127 - 134.
- 14) Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Htay HH, Tsubouchi R, Qiao SL, Li WH, Murakami K, Yokochi T. (2004) Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death. *Toxicol In Vitro* 18: 783 - 9.