

メナジオンによる活性酸素の生成

村上 恵子, 羽根田 みや子, 吉野 昌孝
(愛知医大・医・生化*)

Generation of Reactive Oxygen Species by Menadione

Keiko MURAKAMI, Miyako HANEDA and Masataka YOSHINO
*Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,
Nagakute, Aichi 480-1195, Japan*

Menadione, a soluble form of vitamin K, is often used as a generator of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide in cultured cells or microorganisms. In this paper we describe the menadione-mediated production of superoxide anion in permeabilized yeast. Menadione inactivated aconitase which is the most sensitive enzyme to ROS, in the presence of KCN, an inhibitor of superoxide dismutase, suggesting that menadione can produce superoxide as a principal product. Addition of reducing agent including dithiol or NADPH increased aconitase inactivation, indicating that the enhanced ROS generation depends on the enzymatic reduction of menadione. Menadione further produced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA in the presence of copper, suggesting menadione/copper-dependent formation of hydroxyl radical. Menadione may form semiquinone radical by the reaction with protein thiol residue or nucleic acid under the conditions without enzymatic reduction, followed by the formation of superoxide and further hydroxyl radical in the presence of transition metals causing DNA base damage.

ナフトキノン誘導体であるフィトキノン, メナキノン (ビタミンK) は生物界に広く分布しているが, 植物における光合成¹⁾, 動物におけるグルタミン酸残基のカルボキシル化反応²⁾ 以外の機能は明らかでない。

ビタミンK活性を持つ化合物のうちで側鎖がメチル基のみのメナジオンは比較的水に溶けやすいためしばしば過酸化水素発生源として用いられている。しかしメナジオンはケト型であり, 酸素を一電子還元によって活性化するOH基を持たない。この化合物を細胞に加えた場合の過酸化水素生成機構の詳細は不明である³⁾。また過酸化水素の生成と細胞毒性との関係も必ずしも明らかでない^{4, 5)}。

我々は今回パン酵母アコニターゼ (EC 4.2.1.3) の失活を指標として, メナジオンが主にスーパーオキシドを生成することを確認した。またDNA中の8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) 生成を指標として銅イオン存在化でヒドロキシルラジカル生成能を持つことを示した。

材料と方法

試薬, 実験材料として以下のものを用いた。

メナジオン-和光。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。仔牛胸腺DNA, DNase, エンドヌクレアーゼ, アルカリホスファターゼ, バソフェナンスロリンジスルホン酸, プランバギン-シグマアルドリッチ。NADP, Cu/ZnSOD, カタラーゼ-ロッシュ。

*所在地: 愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21 (〒480-1195)

透過性パン酵母の調製 - 市販のパン酵母を4倍量の0.5 Mソルビトールを含む0.2 M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°Cで2分間加温後、遠心分離によって上清を除き、4倍量の0.5 Mソルビトールを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.1) 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⁶⁾。

アコニターゼの失活 - アコニターゼを失活させるには10 mg/mlの透過性パン酵母をメナジオンあるいはプランバギン存在下に37°C、5-15分間保温した。この時0.5 mMアジ化ナトリウム (カタラーゼ阻害のため) または1 mMシアン化カリウム (Cu/ZnSOD阻害のため) またはその両方を加えた。保温後800 × gにて5分間遠心し、沈殿した酵母を4倍量の0.5 Mソルビトールを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.1) に懸濁した。

アコニターゼの活性測定 - 5 mM クエン酸, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl₂, 10 mU/ml NADP-イソクエン酸脱水素酵素, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 1 mg/mlパン酵母存在下に340 nmの吸光度増加を測定して算出した。

8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の定量 - メナジオンあるいはプランバギンと0.1 mMのCuCl₂存在下で仔牛胸腺DNAを37°C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⁷⁾。

結 果

アコニターゼの失活に対するアジ化ナトリウムあるいはシアン化カリウムの効果をFig. 1に示す。活性酸素生成源としてヒポキサンチン/キサンチン酸化酵素を用いた。本酵素はスーパーオキシドアニオンと過酸化水素の両方を生成する。この条件で生じる尿酸と還元型シトクロムcの量から、このシステムは6分間の加温によって約10 nmol/mlのスーパーオキシドと約20 nmol/mlの過酸化水素を生じることを確認した⁸⁾。この時、酵母アコニターゼはシアン化カリウム添加によって約30%、アジ化ナトリウム添加によって約75%、その両方の添加によって約84%失活した。この結果はシアン化カリウムによってスーパーオキシドの処理が阻害され、アジ化ナトリウムによって過酸化水素の分解が阻害されるという推測がほぼ妥当であることを示すと考えられる。

次にナフトキノンであるメナジオンとプランバギンによる活性酸素の生成を検討した (Fig. 2)。0.2 mMメナジオン (A) はそれのみでもアコニターゼに対して多少の失活効果を示し (p < 0.05), その効果はシアン化カリウムによって増

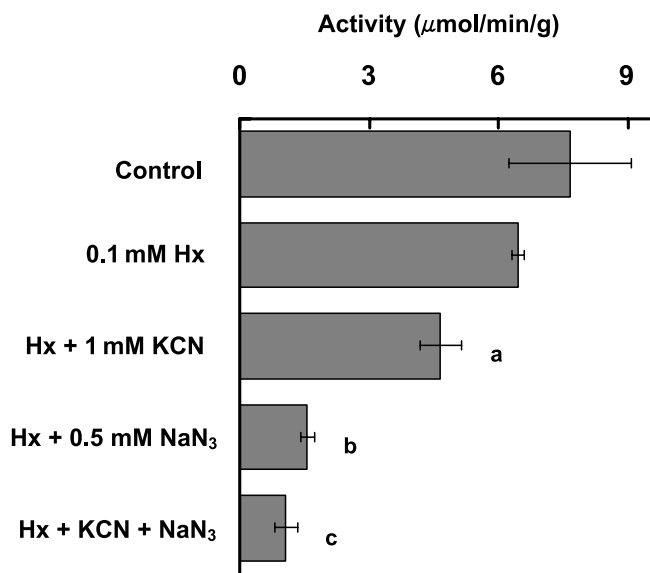


Fig. 1 Effect of reactive oxygen species (ROS) on the activity of aconitase in baker's yeast. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁶⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with 0.1 mM hypoxanthine (Hx), 0.5 mM NaN₃ and 1mM KCN in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). ROS was generated by Hx/xanthine oxidase (XOD) system and the reaction was initiated by the addition of 2 mU/ml XOD. After incubation at 37°C for 6 min, cells were collected by centrifugation at 800 × g for 5 min and suspended with 50 mM Tris-HCl (pH 7.1) containing 0.5 M sorbitol at the concentration of 200 mg/ml. Aconitase activity was determined by the coupling with NADP-isocitrate dehydrogenase, and the reaction mixture contained 5 mM citrate, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl₂, 10 mU/ml of NADP- isocitrate dehydrogenase and 1 mg/ml of yeast. The increase in the absorbance at 340 nm was recorded. **a**, p < 0.01 vs Hx; **b**, p < 0.001 vs Hx; **c**, p < 0.05 vs 0.5 mM NaN₃.

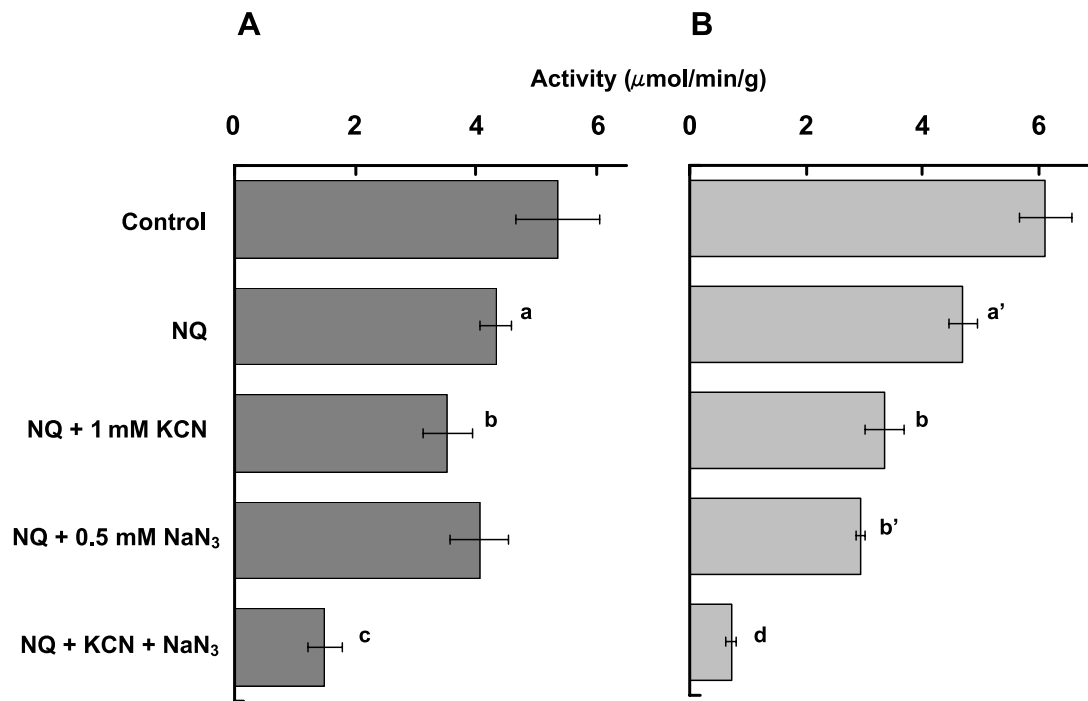


Fig. 2 Effect of naphthoquinones (NQ) on the activity of aconitase in baker's yeast. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with 0.2 mM menadione (A) or 0.1 mM plumbagin (B), 0.5 mM NaN₃ and 1 mM KCN in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). Cells were collected after incubation for 15 min (A) or 10 min (B) at 37°C. Aconitase activity was determined by the methods described in Fig. 1. **a**, $p < 0.05$ vs none; **a'**, $p < 0.01$ vs none; **b**, $p < 0.01$ vs NQ; **b'**, $p < 0.001$ vs NQ; **c**, $p < 0.01$ vs 1 mM KCN; **d**, $p < 0.001$ vs 0.5 mM NaN₃.

強された ($p < 0.01$)。アジ化ナトリウムは単独では効果がなかったが、シアン化カリウムによる失活を増強した ($p < 0.01$)。これはMnSOD (シアン化カリウムで阻害されない) によってスーパーオキシドから生じた過酸化水素の効果であると推測される。このことからメナジオンは主としてスーパーオキシドを生成するものと考えられる。一方水酸基を持つ0.1 mM プランバギン(B)は単独でも失活効果を示し ($p < 0.01$)、その効果はシアン化カリウム ($p < 0.01$) とアジ化ナトリウム ($p < 0.001$) のどちらの添加によっても増強された。さらに二つの効果は相加的であった ($p < 0.001$)。このことからプランバギンはスーパーオキシドと過酸化水素の両方を生じると考えられる。

ナフトキノンの代謝に関する酵素には不明な点が多いが、動物ではジチオールあるいはNADPHを基質とする還元酵素が知られており、カルボキシル化反応の補酵素になるのは還元型のビタミンKである。メナジオンによる活性酸素の生成と細胞内におけるメナジオンの還元の可能性を検討するため、酵母における還元酵素の存在を検討した (Fig. 3)。還元基質としてジチオスレイトール(A)とNADPH(B)を用いた。NADPHはグルコース6-リン酸とNADPから酵母のもつグルコース6-リン酸脱水素酵素によって供給した。いずれの場合もアコニターゼに対して強い失活効果を示したが、ジチオスレイトールによる還元ではスーパーオキシドと過酸化水素がほぼ同量生じると考えられる結果であるのに対し、NADPHによる還元ではシアンあるいはアジ化ナトリウムなしでも強い効果があり、アジ化ナトリウムの効果が比較的弱いことからスーパーオキシドの生成が優位であると推測された。メナジオンは細胞内で酵素的に還元されてメナジオールになり、メナジオールが主としてスーパーオキシド、一部過酸化水素を生成するものと考えられる。

先に示したようにプランバギンによる活性酸素生成は補酵素を必要としない。酸化型のプランバギンが活性酸素を生成することを確認するため、2価鉄の自動酸化に対する効果を検討した (Fig. 4)。pH 7.2のトリス緩衝液中でプランバギンは強い鉄酸化能を示し、その効果はSODまたはカタラーゼの添加によって多少抑制された。プランバギンは鉄を直接酸化すると同時にスーパーオキシドあるいは過酸化水素の生成を介しても鉄の酸化を促進していると推測される。

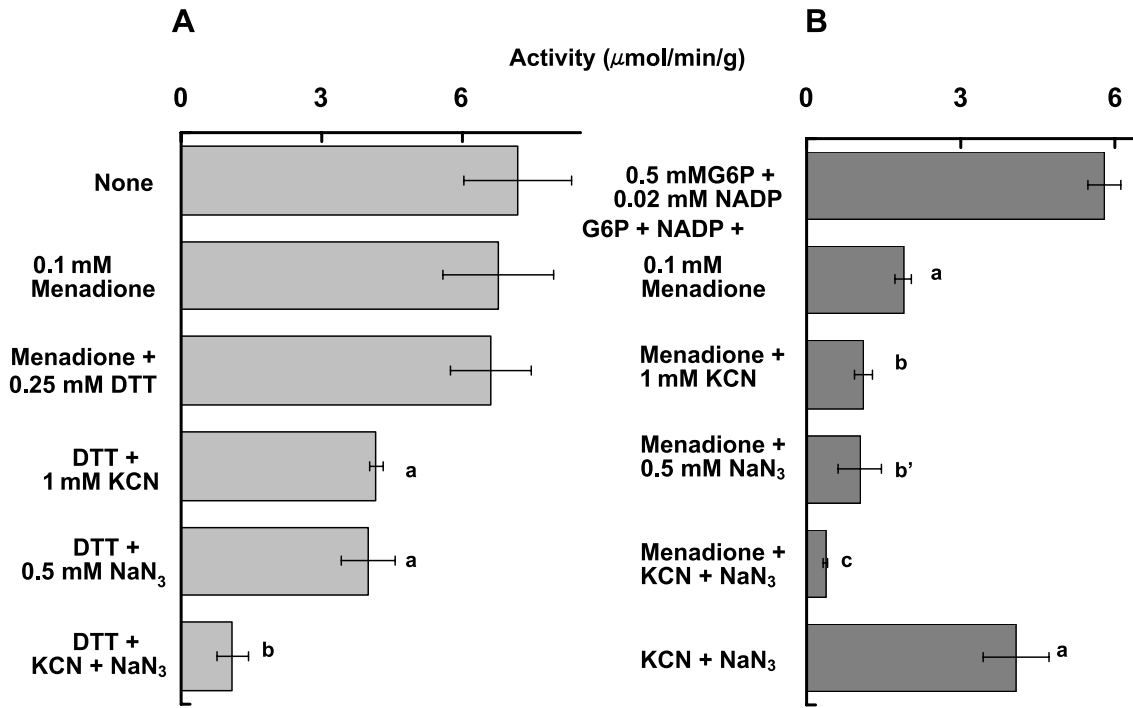


Fig. 3 Effect of menadione and reducing agents on the activity of aconitase in baker's yeast. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 2 except that 0.1 mM menadione was used and that yeast cells were incubated at 37°C for 5 min. **A.** Effect of dithiothreitol (DTT). **a**, $p < 0.01$ vs 0.25 mM DTT; **b**, $p < 0.001$ vs 0.5 mM NaN_3 . **B.** Effect of NADPH. **a**, $p < 0.001$ vs none; **b**, $p < 0.01$ vs menadione; **b'**, $p < 0.05$ vs menadione; **c**, $p < 0.001$ vs 1 mM KCN.

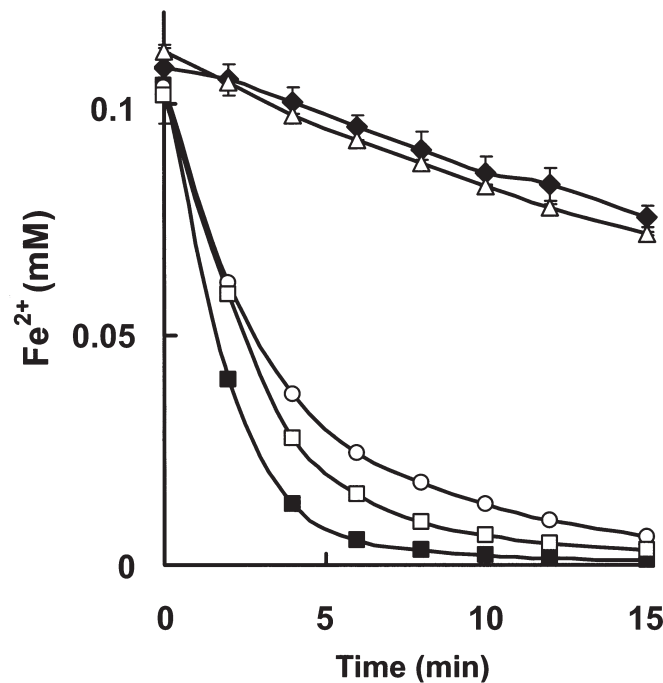


Fig. 4 Effect of naphthoquinones on the autooxidation of Fe^{2+} . FeSO_4 of 0.1 mM was incubated with additives in 10 mM Tris-HCl (pH 7.2) at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.1 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 540 nm was recorded by microplate reader. **◆**, no addition; **■**, 0.05 mM plumbagin; **○**, plumbagin plus 5 $\mu\text{g/ml}$ SOD; **□**, plumbagin plus 2.5 $\mu\text{g/ml}$ catalase; **▲**, 0.1 mM menadione.

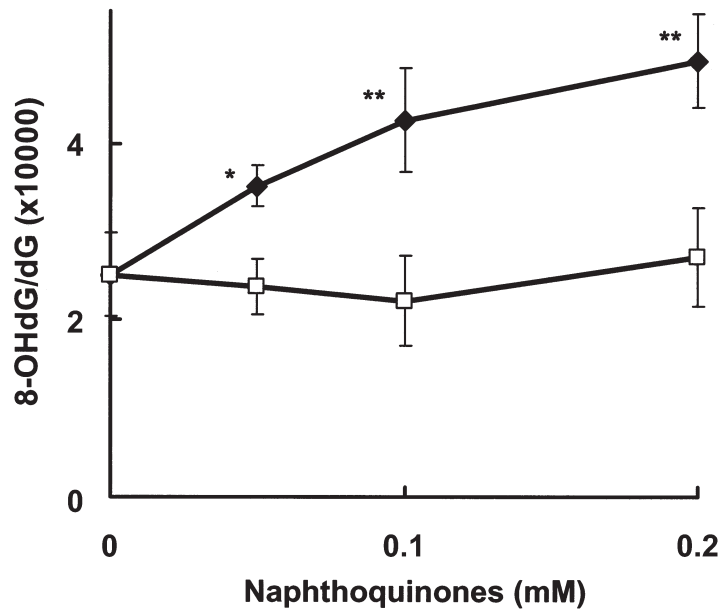


Fig. 5 Effect of naphthoquinones on the copper-dependent formation of 8-OHdG. Calf thymus DNA was treated with menadione or plumbagin for 1 hr and 8-OHdG was determined by HPLC-ECD method as described previously⁷. ◆, menadione; □, plumbagin.

一方メナジオンは鉄に対してまったく効果を示さなかった。

アコニターゼの失活は活性酸素種のうちスーパーオキシドと過酸化水素を鋭敏に検出できるが、ヒドロキシルラジカルの存在は過酸化水素と区別できない。ヒドロキシルラジカルに特異的な反応であるDNA中の8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の生成に対するメナジオンとプランバギンの効果を検討した (Fig. 5)。メナジオンは0.1 mM CuCl₂存在下で1時間に同濃度のアスコルビン酸⁹)の5%、カフェー酸¹⁰)の10%程度にあたる8-OHdGを生成した。一方プランバギンは8-OHdGを全く生成しなかった。

考 察

メナジオンはしばしば過酸化水素を生成するとの前提で用いられるが、Fig. 2-4のデータはメナジオン自体が酸素の2電子還元によって過酸化水素を生成するとは考えられないことを示している。メナジオンが過酸化水素を生成する可能性があるのはジチオールによる還元を受けてメナジオールになった場合である。動物組織ではビタミンKの還元はジチオール依存型酵素によるものが主であるから、結果的に過剰なメナジオンは細胞内に取り込まれて還元された後に過酸化水素発生源として機能すると考えられる。

しかしメナジオンはパン酵母において還元酵素の基質が存在しない条件でも多少のスーパーオキシドを生成した。これは酵母の成分 (タンパクまたは核酸) と反応してセミキノンラジカルを生じる可能性を示唆している。セミキノンラジカルは酸素を1電子還元してスーパーオキシドを生成し、さらに不均化反応によって過酸化水素を生じ、銅イオン存在下ではヒドロキシルラジカルを生じると考えられる。

一方、水酸基を持つプランバギンは非酵素的にスーパーオキシドと過酸化水素を生成したが、銅イオン存在下で8-OHdGを生成することはなかった。ヒドロキシルラジカル生成には1価の銅イオンが必須であるが、プランバギンは強力な酸化力によって還元型の金属イオンを酸化するためヒドロキシルラジカルを生じないものと考えられる。

References

- 1) Nugent JHA (1996) Oxygenic photosynthesis. Electron transfer in photosystem I and photosystem II. *Eur J Biochem* 237: 519 - 531.
- 2) Suttie JW (1985) Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem* 54: 459 - 477.
- 3) Watanabe N, Forman HJ (2003) Autooxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch Biochem Biophys* 411: 145 - 157.
- 4) Radjendirane V, Joseph P, Lee YH, Kimura S, Klein-Szanto AJP, Gonzalez FJ, Jaiswal AK (1998) Disruption of the DT Diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J Biol Chem* 273: 7382 - 7389.
- 5) Brunmark A, Cadenas E (1989) Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic Biol Med* 7: 435 - 477.
- 6) 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.
- 7) Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K (1999) Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab* 68: 468 - 472.
- 8) Saito T, Nishino T (1989) Differences in redox and kinetic properties between NAD-dependent and O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem* 264: 10015 - 10022.
- 9) Murakami K, Haneda M, Yoshino M (2006) Prooxidant action of xanthurenic acid and quinoline compounds: role of transition metals in the generation of reactive oxygen species and enhanced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *BioMetals* 19: 429 - 435.
- 10) 村上恵子, 羽根田みや子, 吉野昌孝 (2005) ロスマリン酸のプロオキシダント作用. *微量栄養素研究* 22 : 45 - 50.