

ピリジンカルボン酸遷移金属複合体による活性酸素の生成

村上 恵子, 羽根田 みや子, 細川 好孝, 吉野 昌孝[‡]

(愛知医大・医・生化^{*}, 現・金城学院大[‡])

Prooxidant Action of Pyridine Carboxylic Acid: Transition Metal-dependent Generation of Reactive Oxygen Species

Keiko MURAKAMI, Miyako HANEDA, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,

Nagakute, Aichi 480-1195, Japan

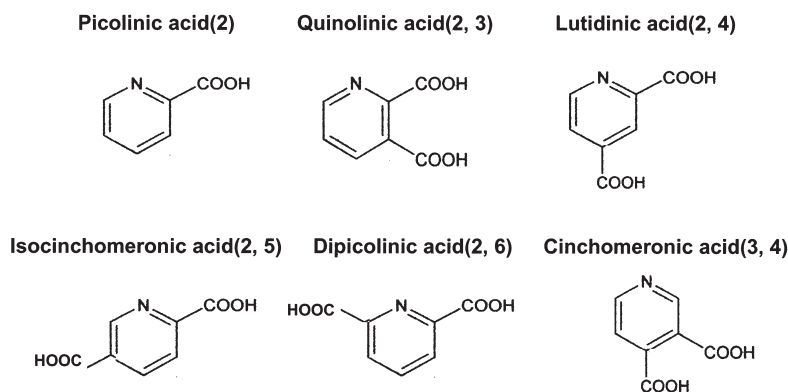
Summary

1. Pyridine compounds with 2-carboxylic group produced reactive oxygen species in the presence of transition metals, iron and copper. Aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress was inactivated markedly by dipicolinic acid (pyridine 2, 6-dicarboxylic acid) and less potently by picolinic acid (pyridine 2-carboxylic acid) in the presence of ferrous sulfate. The inactivation was dependent on KCN, an inhibitor of Cu/Zn-SOD, suggesting that pyridine carboxylate/iron complexes can generate superoxide radical as a principal product. Introduction of carboxylic groups to 3, 4 or 5 in the pyridine ring decreased the inactivating effect. 2. Aconitase was also inactivated by copper/ascorbate complex, particularly in the presence of pyridine 2, 4-dicarboxylic acid (lutidinic acid). The inactivation was dependent on sodium azide, an inhibitor of catalase, suggesting that Cu/ascorbate produces hydrogen peroxide. 3. Dipicolinic acid and lutidinic acid at lower concentrations enhanced the Cu/ascorbate-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA, indicating generation of hydroxyl radical. Prooxidant action of pyridine carboxylic acids may explain the bactericidal or apoptotic action of these compounds reported previously.

ピリジン環にカルボキシル基のついた化合物には、モノカルボン酸として2-カルボキシルのピコリン酸、3のニコチン酸、4のイソニコチン酸、ジカルボン酸のキノリン酸(2, 3)、シンコメロン酸(3, 4)、イソシンコメロン酸(2, 5)、ルチジン酸(2, 4)、ジピコリン酸(2, 6)の他3, 5のジニコチン酸と呼ぶべきものも存在する。これらの化合物はすべて天然に存在し¹⁾、特にピコリン酸はトリプトファンの代謝産物であり、またジピコリン酸は枯草菌、納豆菌などバチルス属の細菌によって大量に合成される²⁻³⁾。したがってこれらの化合物は食品として摂取されるが、その機能は明らかではない。ピコリン酸誘導体には抗菌作用、抗腫瘍作用が知られており^{4, 5)}、またこれらのピリジンカルボン酸が、金属イオンの強力なキレーターとしての機能をもつ^{6, 7)}ことに着目して、遷移金属イオンとの複合体の活性酸素生成能を検討し、従来報告されているピリジンカルボン酸の作用の解明を試みた。パン酵母アコニターゼの失活とDNA中の8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンの生成を活性酸素生成の指標とした。

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21 (〒464-0847)

[‡] Present address : Department of Food and Nutritional Environment, Kinjo Gakuin University



Scheme 1 Structure of pyridine carboxylic acids.

材料と方法

1. 試薬, 実験材料

ピリジンカルボン酸-東京化成。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ルスルホン酸-シグマアルドリッチ。NADP-ロシュ。

2. 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⁸⁾。

3. 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50 μ M FeSO₄あるいは5 μ M CuSO₄, 0.5 mMアスコルビン酸とともに37°C, 10分間保温する。この時各種のピリジンカルボン酸とともに1 mM KCN (Cu/Zn SODを阻害) あるいは0.5 mMアジ化ナトリウム (カタラーゼを阻害) を加えた。保温後800 \times 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。

4. 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。

5. 二価鉄イオンの自動酸化

0.1 mMのFeSO₄を0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 中で37°Cに加温し, 各時間毎にマイクロプレート上でバソフェナンスロリンジルスルホン酸と反応させて, 540 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した⁹⁾。

6. 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の定量

ピリジンカルボン酸, 0.1 mMアスコルビン酸と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¹⁰⁾。

結 果

1. ピリジンカルボン酸/鉄によるアコニターゼの失活

二価鉄, 0.2 mMピコリン酸存在下でアコニターゼの失活が見られた (Fig. 1A)。失活にはCu/ZnSODを阻害するKCNの添加が必須であった。カタラーゼを阻害するアジ化ナトリウムの影響はほとんどなかった。このことからピコ

リン酸/鉄は酸素の一電子還元を促進するが、二電子還元はしないものと推測された。

ピコリン酸および2とそれ以外の位置にカルボキシル基を持つピリジンジカルボン酸のアコニターゼに対する効果を比較・検討した (Fig. 1B)。ピリジンカルボン酸の0.2 mMを添加した時の失活効果は2, 6ジカルボン酸のジピコリン酸が最も強く、ジピコリン酸 (2, 6) >ピコリン酸 (2) >キノリン酸 (2, 3) = ルチジン酸 (2, 4) >イソシンコメロン酸 (2, 5) の順に効力が低下した。

2. 二価鉄イオンの自動酸化に対するピリジンカルボン酸の効果

ジピコリン酸 (2, 6) は二価鉄イオンの酸化を強力に促進した (Fig. 2)。ピコリン酸 (2) とキノリン酸 (2, 3) はわずかに酸化を促進したが、ルチジン酸 (2, 4) とイソシンコメロン酸 (2, 5) はまったく効果がなく、アコニターゼの失活に対する効果とほぼ同じ傾向を示した。

3. アスコルビン酸/銅によるアコニターゼの失活に対するピリジンカルボン酸の効果

次に1価の銅イオンによる活性酸素生成に対するピリジンカルボン酸化合物の効果を検討した。2価の銅イオンをアスコルビン酸によって還元し、酸素分子を還元することによって活性酸素生成を開始した。この場合アコニターゼの失活にはカタラーゼを阻害するアジ化ナトリウムが必須であることから、生じる活性酸素は主に過酸化水素と推測された。銅/アスコルビン酸の失活効果に対して0.5 mMピリジンカルボン酸の添加効果をFig. 3に示す。キノリン酸 (2, 3) が保護効果 (過酸化水素生成阻止効果) を持つのに対して、メタの位置にカルボキシル基を持つ2, 4のジカルボン酸 (ルチジン酸) は酵素の失活を促進し、銅/アスコルビン酸による過酸化水素生成を加速することが示唆された。シンコメロン酸 (3, 4) はアコニターゼの活性に対して効果がなかった。

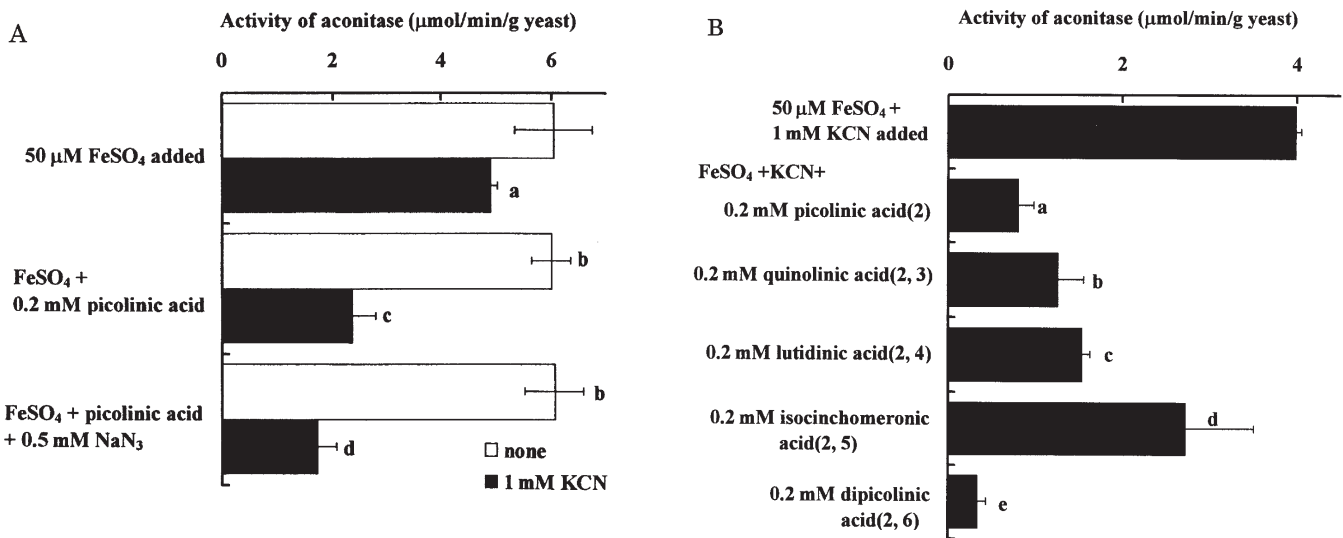


Fig. 1 Effect of pyridine 2-carboxylate derivatives on the activity of aconitase in baker's yeast. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁸⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/mL) were mixed with 50 μM FeSO₄, 0.2 mM pyridine 2-carboxylate compounds and 0.5 mM NaN₃ in the absence and presence of 1 mM KCN in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37°C for 10 min, cells were collected by centrifugation at 800 × g for 5 min and suspended in 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. Effect of picolinic acid and FeSO₄ on the activity of aconitase in the absence and presence of KCN. a, *p* < 0.01 vs none; b, NS vs none; c, *p* < 0.001 vs KCN only; d, NS vs picolinic acid plus KCN. B. Effect of pyridine 2-carboxylates on the activity of aconitase in the presence of FeSO₄ and KCN. Pyridine 2-carboxylate compounds added were picolinic acid, quinolinic acid, lutidinic acid, isochinomeronic acid and dipicolinic acid. a, *p* < 0.001 vs none; b, *p* < 0.05 vs picolinic acid; c, NS vs quinolinic acid; d, *p* < 0.05 vs lutidinic acid; e, *p* < 0.01 vs picolinic acid.

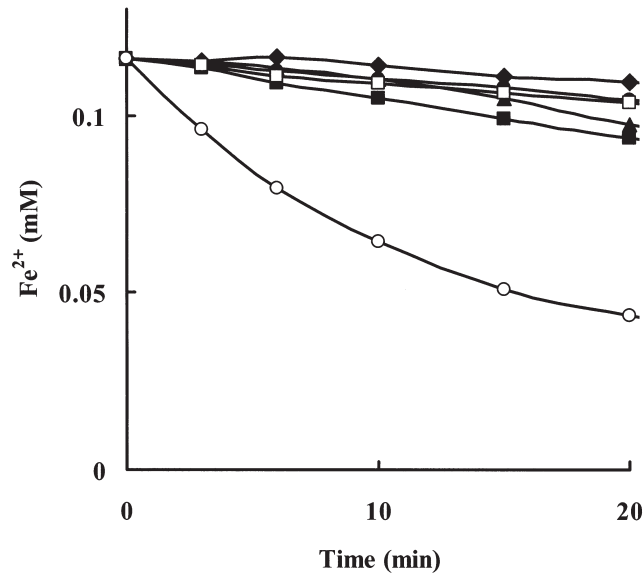


Fig. 2 Effect of pyridine 2-carboxylates on the autooxidation of Fe²⁺. FeSO₄ of 0.1 mM was incubated with additives in 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 37°C. Aliquot of 0.2 mL was mixed with 0.1 mL of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 540 nm was recorded by microplate reader. ◆, no addition ; ■, 0.2 mM picolinic acid (2); ▲, 0.2 mM quinolinic acid (2, 3); ●, 0.2 mM lutidinic acid (2, 4); □, 0.2 mM isocinchomeric acid (2, 5); ○, 0.2 mM dipicolinic acid (2, 6).

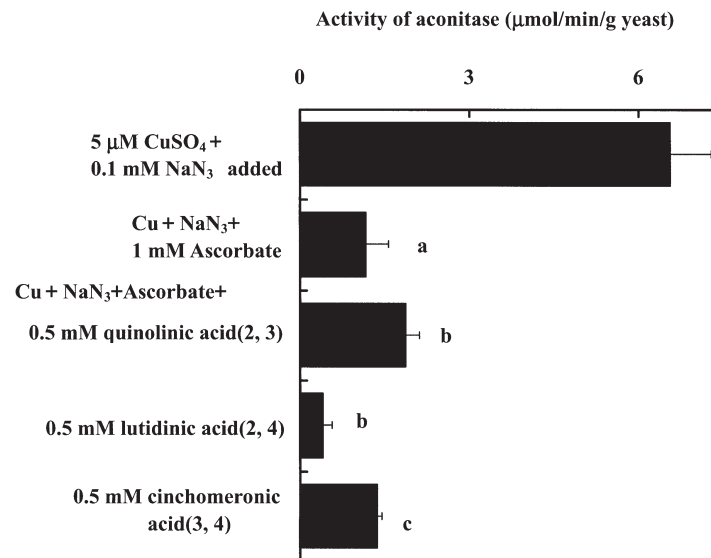


Fig. 3 Effect of pyridine dicarboxylates and Cu/ascorbate on the activity of aconitase in baker's yeast. Permeabilized yeast cells (10 mg/mL) were mixed with 0.5 mM pyridine compounds, 5 μM CuSO₄, 1 mM ascorbate and 0.1 mM NaN₃ in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). Cells were collected after incubation for 3 min at 37°C. a, $p < 0.001$ vs Cu/NaN₃; b, $p < 0.001$ vs Cu/NaN₃/ascorbate; c, NS vs Cu/NaN₃/ascorbate.

4. アスコルビン酸/銅依存性8-OHdG生成に対するピリジンカルボン酸の効果

さらにヒドロキシルラジカルに特異的な反応である、DNA中の8-OHdGの生成に対するピリジンカルボン酸の効果を検討した (Fig. 4)。仔牛胸腺DNAを0.1 mM CuCl₂/0.1 mMアスコルビン酸存在下で処理した時に生成した8-OHdGの量を100としてパーセンテージで示す。ルチジン酸 (2, 4) とジピコリン酸 (2, 6) は0.1 mM以下の濃度で8-OHdGの産生を促進した。

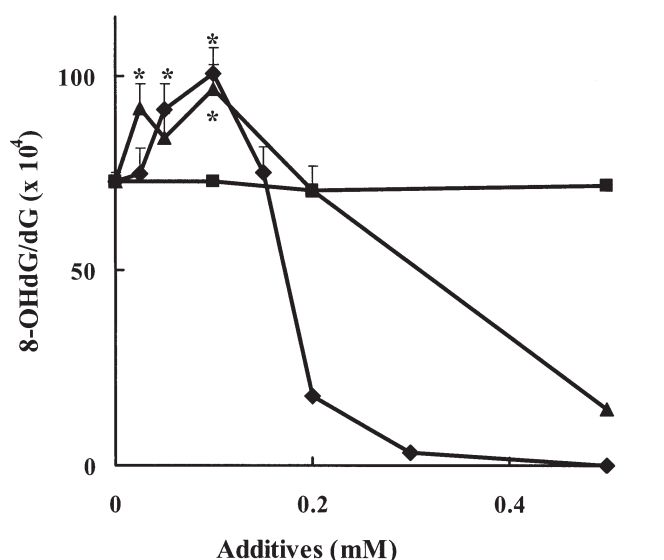


Fig. 4 Effect of pyridine dicarboxylates on the copper-dependent formation of 8-OHdG. Calf thymus DNA was treated with 0.1 mM ascorbate, 0.1 mM CuCl_2 and various concentrations of pyridine compounds for 1h and 8-OHdG was determined by HPLC-ECD method as described previously⁹). Each data are expressed as mean \pm SD with three independent determinations. Asterisks indicate significant differences between the control without additives and the pyridine dicarboxylate-added groups ($p < 0.01$). ◆, dipicolinic acid (2, 6); ▲, lutidinic acid (2, 4); ■, cinchomeronic acid (3, 4).

考 察

アコニターゼは $[4\text{Fe-4S}]$ の活性中心を持ち、活性酸素に対して最も感受性の高い酵素であり^{11, 12}、スーパーオキシドアニオンラジカルまたは過酸化水素によって失活することが知られている。しかし活性中心を失うことによる不可逆的失活が起きやすいため高い活性の精製酵素を得ることは困難である。パン酵母は比較的高いアコニターゼ活性を持ち、トルエン処理によって透過性を増した酵母のアコニターゼは安定であるため、その失活は活性酸素生成の指標として有用であることを先に報告した¹³⁻¹⁵。

ピリジン2-カルボン酸は鉄イオン存在下におけるアコニターゼの失活を促進し、その失活にCu/ZnSODを阻害するシアンが必須であるという結果から、この化合物は2価鉄による酸素の一電子還元を促進してスーパーオキシドを産生することが示された。この効果は2以外の位置へのカルボキシル基の導入により低下し、また最も強い効果を持つジピコリン酸は2価鉄の自動酸化を強力に促進することから、ピリジン2-カルボン酸は2価鉄をキレートすることによって酸素の一電子還元を特異的に促進するものと推測される。2以外の位置にカルボキシルを持つニコチン酸(3)、イソニコチン酸(4)、シンコメロン酸(3, 4)、ピリジン3, 5-ジカルボン酸はいずれもイソシンコメロン酸(2, 5)以上の失活効果を持たなかった。

一方、銅/アスコルビン酸はパン酵母アコニターゼを失活させるが、その失活にはカタラーゼを阻害するアジ化ナトリウムの存在が必須であり、この時に生じる活性酸素種は主として過酸化水素であると推測される。2, 4(ルチジン酸)はこの時の失活を促進した。一方、鉄イオン存在下では強力にアコニターゼを失活させたジピコリン酸はこの条件では逆に保護作用を示した。この違いはアスコルビン酸/銅による失活条件では銅イオンに比して100倍の濃度のジピコリン酸が加えられており、ジピコリン酸が上に示したように2価鉄イオンの強い酸化作用をもつものに対して、ルチジン酸は自動酸化に対して作用しないことに関連すると考えられる。即ちアスコルビン酸は Cu^{2+} を還元して Cu^+ とするため、酸素分子と反応すればスーパーオキシドが生成する。しかし共存する大過剰のジピコリン酸は還元銅イオンを酸化して Cu^{2+} に戻すため、スーパーオキシド生成は抑えられる。これに対しルチジン酸は還元遷移金属イオンを酸化する能力を欠くため、アスコルビン酸によって生成した Cu^+ は処理されず、酸素分子と反応することによりスーパーオキシドを

生成する結果、この条件でもプロオキシダントとしてアコニターゼを失活させることになると考えられる。

DNA中の8-OHdG生成はヒドロキシルラジカルに特異的な反応であり、この活性酸素種を検出する手段として有用である。8-OHdG産生に対する効果からピリジン2-ジカルボン酸の場合、0.1 mM以下の低濃度で銅/アスコルビン酸によるヒドロキシルラジカルの生成を促進することが示された。0.2 mM以上の濃度は逆に8-OHdG生成を抑制した。一般に金属イオン依存性の活性酸素生成はキレート化合物生成に依存することが知られている¹⁶⁾。我々は先にキノリン化合物が低濃度で8-OHdG生成を促進し、高濃度で抑制することを示し、過剰のキノリン化合物が不活性なキレート化合物を生成する例として報告した¹³⁾。ピリジンカルボン酸もキノリン化合物と同様に、添加した遷移金属よりも過剰の濃度の存在により不活性な金属錯体を形成すると推測される。

ピリジン化合物、とくにピコリン酸誘導体は抗細菌作用、抗腫瘍作用をもち、さらにマクロファージ細胞のピコリン酸によるアポトーシスが報告され、結核菌の増殖抑制などとの関連が示唆されている⁴⁾が、このアポトーシスは抗酸化物質で抑制される^{4, 5)}ことからピコリン酸自体による活性酸素生成が推測される。今回ここで示した結果はピコリン酸をはじめとするピリジンカルボン酸が細胞内に取り込まれた場合、活性酸素を生成して、アポトーシスの誘導に関与する可能性を示唆している。

参考文献

- 1) Uchida A, Yoshida T, Ogawa M, Nagasawa T (2003) Regioselective hydroxylation of quinolinic acid, lutidinic acid and isocinchomeric acid by resting cells of pyridine dicarboxylic acid-degrading microorganisms. *App Microbiol Biotechnol* 62: 337 - 341.
- 2) Dor RH, Halvorson H (1961) Mechanism of dipicolinic acid stimulation of the soluble reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase of spores. *J Bacteriol* 81: 642 - 648.
- 3) Woodruff WH, Spiro TG, Gilvarg C (1974) Raman spectroscopy *in vivo*: Evidence on the structure of dipicolinic acid in intact spore of *Bacillus megaterium*. *Biochem Biophys Res Commun* 58: 197 - 203.
- 4) Pais TF, Appelberg R (2000) Macrophage control of mycobacterial growth induced by picolinic acid is dependent on host cell apoptosis. *J Immunol* 164: 389 - 397.
- 5) Pais TF, Appelberg R (2004) Induction of Mycobacterium avium growth restriction and inhibition of phagosome-endosome interactions during macrophage activation and apoptosis induction by picolinic acid plus IFN γ . *Microbiology* 150: 1507 - 1518.
- 6) Karin H, Soldenhoff A (1987) Solvent extraction of copper (II) from chloride solutions by some pyridine carboxylate esters. *Solv Extract Ion Exchange* 5: 833 - 851.
- 7) Murakami K, Ueda T, Morikawa R, Ito M, Haneda M, Yoshino M (1998) Antioxidant effect of dipicolinic acid on the metal-catalyzed lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biomed Res* 19: 205 - 208.
- 8) 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.
- 9) Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40 - 44.
- 10) 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.
- 11) Gardner PR, Fridovich I (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J Biol Chem* 267: 8757 - 8763.
- 12) Gardner PR (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol* 349: 9 - 23.
- 13) 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.

- 14) Murakami K, Haneda M, Qiao SL, Naruse M, Yoshino M (2007) Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species. *Toxicol in vitro* 21: 613-617.
- 15) Murakami K, Haneda M, Makino T, Yoshino M (2007) Prooxidant action of furanone compounds: Implication of reactive oxygen species in the metal-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Food Chem Toxicol* 45: 1258-1262.
- 16) Welch KD, Davis TZ, Aust SD (2002) Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys* 397: 360-369.