

ミモシンのプロオキシダント作用 遷移金属複合体による活性酸素種の生成

村 上 恵 子¹⁾, 羽根田 みや子¹⁾, 喬 善 楼²⁾, 細 川 好 孝¹⁾, 吉 野 昌 孝³⁾

(1)愛知医大・医・生化*, (2)現・中部大・生命医科学**, (3)金城学院大・食環境***)

Prooxidant Action of Mimosine. Metal-dependent Generation of Reactive Oxygen SpeciesKeiko MURAKAMI¹⁾, Miyako HANEDA¹⁾, Sian-Lou QIAO²⁾, Yoshitaka HOSOKAWA¹⁾ and Masataka YOSHINO³⁾¹⁾Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,²⁾Chubu University School of Medical Life Science,³⁾Kinjo-gakuen University School of Food environment**Summary**

Mimosine (3-hydroxy-4-oxo-1 (4H)-pyridinealanine), a tyrosine analogue is produced by plant *Leucaena leucocephala*. Cytotoxic effects of mimosine were analyzed in relation to the generation of reactive oxygen species. 1. Treatment of glioma C6 cells with mimosine induced cell death with DNA damage and repair processes. 2. Mimosine/iron complex inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress. The inactivation was dependent on sodium azide, an inhibitor of catalase, indicating that mimosine/iron complex can generate hydrogen peroxide as a principal product. 3. Mimosine stimulated the autooxidation of Fe²⁺ suggesting that mimosine promotes the activation of dioxygen molecule by reduced iron. 4. Mimosine enhanced the Fe/ascorbate-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA, indicating generation of hydroxyl radical. Prooxidant action of mimosine may explain the cytotoxic effects of this compound including alopecia and growth retardation reported previously.

ミモシンはギンネム属の葉と種子に多く含まれるチロシンアナログである。ギンネムは薪炭あるいは木材として、また環境の緑化、土壌の生産性維持にも効果が高いとして世界各地で栽培されている。成長が早くタンパク含量が高いため家畜、家禽の飼料としても利用されるが、ミモシンは有毒であり動物に脱毛、成長阻害、不妊、甲状腺腫などの症状を来す。ミモシンがギンネムにおいて果たす役割は詳らかでないが、食害を防ぐための自衛手段と推測される¹⁾。

動物に対するミモシンの毒性は硫酸第一鉄の添加によってある程度解除されることから鉄のキレートによる吸収阻害の可能性が示唆されていた¹⁾。事実構造の似たデフェリプロンは過剰な鉄の排泄を促進する薬剤として用いられる。しかし主な中毒症状として鉄欠乏による貧血が見られないことはミモシンの毒性が単なる吸収阻害ではないことを示す。培養細胞あるいはウイルスに対する増殖抑制の検討からミモシンはリボヌクレオチドリダクターゼの阻害²⁾、サイクリン依存性キナーゼの発現抑制³⁾、同キナーゼ阻害タ

ンパクの合成促進^{3,4)}、あるいはDNA鎖切断⁵⁾などの効果を持つことが報告された。

鉄のキレーターはしばしば鉄による酸素分子の一電子還元反応を促進してラジカルを生成する性質を持つことが明らかになっている⁶⁻⁸⁾。本研究においてはミモシンの毒性が鉄との複合体形成による活性酸素生成とそれによるDNA損傷に由来するとの仮説の下に、アコニターゼの失活による活性酸素生成の検出とDNA塩基の酸化修飾を検討した。

材料と方法**1. 試薬, 実験材料**

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。ミモシン, 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-シグマアルドリッチ。NADP-ロシュ。コメットアッセイキット-Trevigen (Gaithersburg, MD)。

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21 (〒480-1195)

**所在地：愛知県春日井市松本町1200 (〒487-8501)

***所在地：名古屋市守山区大森2-1723 (〒463-8521)

2. 細胞培養

C6 グリオーマ細胞を高濃度グルコース含有ダルベッコ修正イーグル培地に10% 高仔ウシ血清を加え、5%CO₂存在下で培養した。

アポトーシスの検出—光学顕微鏡による形態観察とコメットアッセイによった。

コメットアッセイ—細胞をトリプシン処理し生理食塩水にて洗浄後、アガロースに懸濁し、アルカリ溶液を加えて、15分間15Vにて泳動。細胞を離れた損傷DNAを蛍光顕微鏡にて観察した⁹⁾。

3. 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(pH7.4)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トリス・塩酸緩衝液(pH7.1)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¹⁰⁾。

4. アコニターゼの失活

10mg/mLの透過性パン酵母を50μMFeSO₄、各濃度の

ミモシン、0.5mMアジ化ナトリウム(カタラーゼを阻害)を加えて5分間加温後、800×gにて5分間遠心し、沈殿した酵母を4倍量の0.5Mソルビトールを含む50mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.1)に懸濁した。

5. アコニターゼ活性の測定

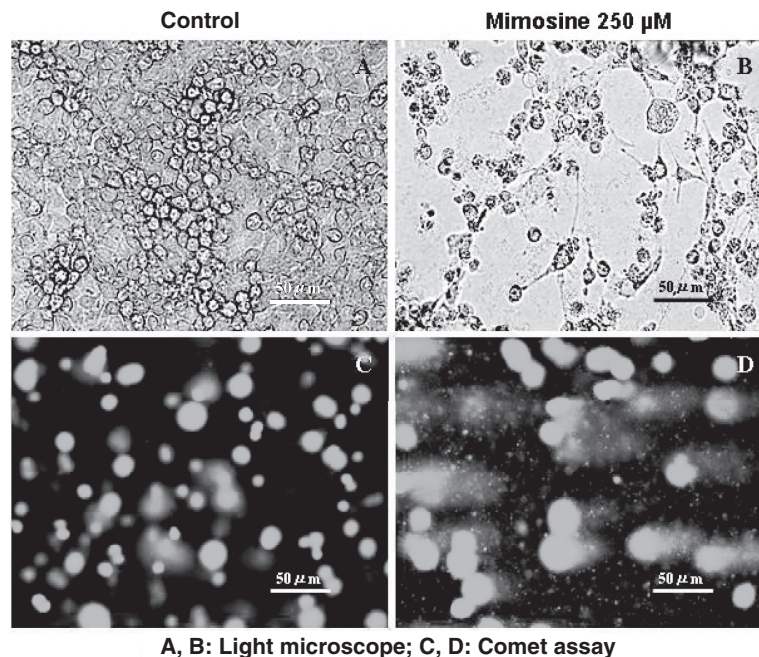
5mMクエン酸、0.25mMNADP、4mMMgCl₂、10mU/mL NADP-イソクエン酸脱水素酵素、トリス・塩酸緩衝液(pH7.4)、1mg/mLパン酵母存在下に340nmの吸光度増加を測定して算出した。

6. 二価鉄イオンの自動酸化

0.1mMのFeSO₄を10mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.0)中で37℃に加温し、各時間毎にマイクロプレート上でパソフェナンスロリンジスルホン酸と反応させて、540nmの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した¹¹⁾。

7. 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)の定量

ミモシン、0.1mMアスコルビン酸と0.1mMのFeCl₂存在下で仔牛胸腺DNA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



A, B: Light microscope; C, D: Comet assay

Fig. 1 Effects of mimosine on C6 glioma cells A, B. Light microscopic identification of apoptosis. Cells were cultured in high glucose-containing Dulbecco's modified Eagles's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and all cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. To find out apoptosis-inducing activity of mimosine, C6 glioma cells were cultured in the absence or presence of mimosine for 24 h, then observed, and photographed. C, D. Comet assay. Comet assays were performed essentially as described previously⁹⁾. Cells treated with mimosine were trypsinized and washed once with DMEM then with phosphate-buffered saline, then resuspended to a density of 3×10⁵ cells/mL. Aliquots of 50 μL of this solution were added to 500 μL Melt LMAgarose, and then plated 75 μL onto the provided glass microscope slides. The agarose was allowed to set at 4℃ for 30 min, and the slides were then immersed in lysis solution at 4℃ for 1 h to dissolve cellular proteins and lipids. After placing in alkali solution for 1 h at room temperature in the dark, the slides were immersed in 1×Tris-borate-EDTA (TBE) buffer for 5 min twice and transferred to a horizontal electrophoretic apparatus containing 1×TBE buffer for 10 min at 15 V in the dark. Slides were visualized using fluorescence microscopy (fluorescein filter). A, C: Control. B, D: 250 μM mimosine added.

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¹²⁾。

結果

1. ミモシンによる細胞死の誘導

グリオーマC6細胞に対するミモシンの効果をFig. 1に示す。0.25 mM ミモシンの添加によって、光学顕微鏡レベルで細胞の変形が観察された (A, B)。またコメットアッ

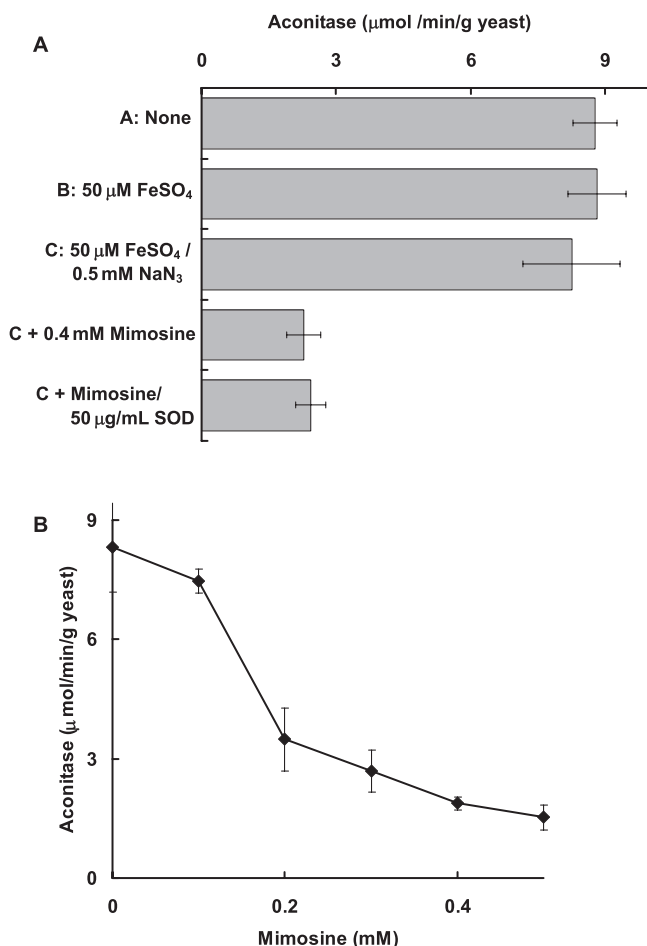


Fig. 2 Effect of mimosine/iron complex on the activity of aconitase in baker's yeast. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁸⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/mL) were mixed with 50 μM FeSO₄, various concentrations of mimosine and 0.5 mM NaN₃ in 40 mM Tris-HCl (pH 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 mimosine on the aconitase activity in the absence and presence of NaN₃ and superoxide dismutase. Concentration of mimosine was kept at 0.4 mM. B. Effect of the increasing concentrations of mimosine on the aconitase activity in the presence of 50 μM FeSO₄.

セイにより「彗星の尾」が観察された (C, D)。これは一本鎖DNAが細胞を離れて移動したものであり、DNAの損傷と修復の過程が進行していることを示している。

2. アコニターゼの失活

次にミモシンの酵母アコニターゼに対する効果を検討した。アコニターゼは、スーパーオキシドアニオンあるいは過酸化水素の存在により、4Fe-4Sの活性中心を失って失活する。パン酵母は比較的安定で高いアコニターゼ活性を持ち、トルエンで透過性を増すことによって細胞そのままでも活性を測定できるので活性酸素の検出に有用である。ミモシン/二価鉄複合体は酵母アコニターゼを失活させた (Fig. 2)。失活には鉄の他にカタラーゼを阻害するアジ化ナトリウムの添加が必須であり、さらにSODの添加によっても失活の増強を起こさないことから、生ずる活性酸素種は内在性のSODが関与して生成した過酸化水素であることが示された (A)。失活に対するミモシンの有効濃度は50 μM Fe²⁺存在下において0.2~0.3 mMであった (B)。

3. 二価鉄の自動酸化促進

Fe²⁺は中性溶液中で安定であり還元状態に留まる。0.2 mMのミモシンは二価鉄イオンの酸化を強力に促進した (Fig. 3)。しかしその酸化は二相性であり、最初の数秒で急速に進行してその後ほぼ停止した。

4. アスコルビン酸/鉄依存性8-OHdG生成に対する効果

ミモシン/鉄複合体によるヒドロキシルラジカルの生成をDNA塩基の修飾物である8-OHdGの検出によって検討した。ミモシンは鉄/アスコルビン酸による8-OHdG生成を最大で4倍に増加させた (Fig. 4)。高濃度のミモシンの添加は8-OHdG生成を抑制する傾向を示した。

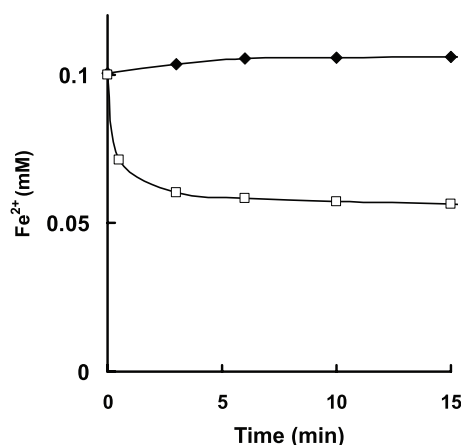


Fig. 3 Effect of mimosine on the autooxidation of Fe²⁺. FeSO₄ of 0.1 mM was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 37°C. Aliquot of 0.2 mL was mixed with 0.1 mL of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 540 nm was recorded by microplate reader. ◆, no addition; □, 0.2 mM mimosine added.

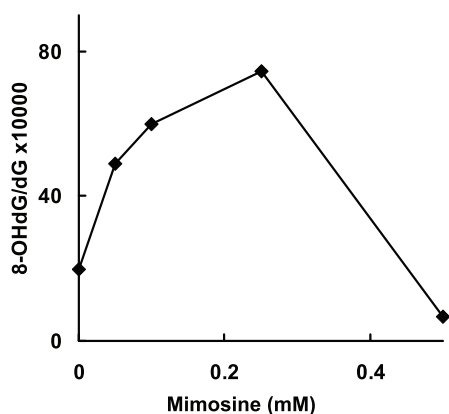


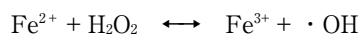
Fig. 4 Effect of mimosine on the iron-dependent formation of 8-OHdG. Calf thymus DNA was treated with 0.1 mM ascorbate, 0.1 mM FeCl₃ and various concentrations of mimosine for 1hr and 8-OHdG was determined by HPLC-ECD method as described previously¹¹. Data are expressed as mean ± SD with three independent determinations.

考 察

ミモシンは鉄の強力なキレート剤として作用し、3分子のミモシンによる1原子の鉄の錯体構造が提出されている¹³。ミモシン/Fe複合体によるアコニターゼ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り、添加SODによる失活促進効果のみられないことから、ミモシン/Feから酸素の活性化を引き金とした過酸化水素の生成によるものと推測される。ミモシンはFe²⁺と複合体を形成することにより、還元型鉄イオンの酸化を促進し、遊離した電子により酸素分子を活性化する結果、スーパーオキシドを生成する。さらにスーパーオキシドは不均化反応により過酸化水素を生成するが、この過程においては内在性のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の関与とともに、ミモシン/鉄複合体は従来報告されているいくつかのキレート複合体¹⁴と同様に不均化反応を促進するSOD様活性にも依存すると推測される。

ミモシンの細胞毒性としてのアポトーシスが白血病由来の細胞等で報告されている^{15,16}。本稿で示したグリオーマ細胞に対する毒性もアポトーシスと推測されるが、細胞レベルにおいてDNAの断片化、TUNEL法などによる解析が必要である。ミモシンによる白血病細胞のU937のアポトーシスは過酸化水素の生成によるものであると推測されている¹⁶が、今回示したミモシンによる過酸化水素の生成は従来の報告に根拠を与えるものである。

またヒドロキシルラジカルに特異的な反応である8-OHdGの生成に対する効果によりミモシンは鉄/アスコルビン酸によるヒドロキシルラジカル産生を増強することが示された。これはミモシンがFe²⁺をキレートすることによってフェントン反応



を促進することを示している。添加Fe濃度の3倍以上の高濃度のミモシンで認められる8-OHdG生成の抑制はミ

モシン/Fe複合体が3:1の比で生成する¹³ことによると推測される。鉄イオンは血中ではトランスフェリンに結合してFe³⁺の形で約20 μM存在する他、細胞内ではヘム、Fe-Sあるいはフェリチンに結合型したFe³⁺として存在する。生体内ではFe²⁺と酸素分子との反応によるラジカル生成が実際には起きないように制御されていると考えられる。

ミモシンを含むギンネム中毒の主な症状は動物の脱毛であり、細胞死によると推測されてきた。本研究において、ミモシンは培養細胞でDNAの損傷と切断を起こすことが確認され、さらにアコニターゼの失活を用いた活性酸素検出法からミモシン/Fe²⁺複合体が酸素分子を活性化し、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルを生成することを認めた。活性酸素は長期にわたるDNA損傷によって個体の老化あるいは細胞のガン化を来す他、多くの変性疾患に関与することが示されている¹⁷。一方では酸素ラジカルはアポトーシスの誘導によって細胞死を誘導する作用をもつ¹⁸。ミモシンは従来報告してきたキノリン誘導体⁶、マルトール⁷、ヒノキチオール⁸などと同様に活性酸素生成系として細胞毒性を発揮すると結論される。

参考文献

- 1) Ter Meulen U, Struck S, Schulke E, El-Harith EA (1979) A review on the nutritive value and toxic aspects of leucaena leucocephala. Trop Anim Prod 4: 113-126.
- 2) Dai Y, Gold B, Vishwanatha JK, Rhode SL (1994) Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase. Virology 205: 210-216.
- 3) Chang HC, Lee TH, Chuang LY, Yen MH, Hung WC (1999) Inhibitory effect of mimosine on proliferation of human lung cancer cells is mediated by multiple mechanisms. Cancer Lett 145: 1-8.
- 4) Wang G, Miskimins R, Miskimins WK (2000) Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27Kip1. Exp Cell Res 254: 64-71.
- 5) Mikhailov I, Russev G, Anachkova B (2000) Treatment of mammalian cells with mimosine generates DNA breaks. Mut Res/DNA repair 489: 299-306.
- 6) 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.
- 7) Murakami K, Ishida K, Watakabe K, Tsubouchi R, Haneda M, Yoshino M (2006) Prooxidant action of maltol: Role of transition metals in the generation of reactive oxygen species and enhanced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA. BioMet-

- als 19: 253–257.
- 8) Murakami K, Ohara Y, Haneda M, Tsubouchi R, Yoshino M (2005) Prooxidant action of hinokitiol: Hinokitiol-iron dependent generation of reactive oxygen species. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97: 392–394.
 - 9) Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Murakami K, Yoshino M (2004) Role of vanilloid receptors in the capsaicin-mediated induction of iNOS in PC12 cells. *Neurochem Res* 29: 687–693.
 - 10) 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.
 - 11) Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40–44.
 - 12) 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.
 - 13) Tsai WC, and Ling KH (1973) Study on the stability constant of some metal ion chelates of mimosine and 3,4-tetrahydropyridine. *J Chin Biochem Soc* 2: 70–86.
 - 14) Fisher AE, Lau G, Naughton DP (2005) Lipophilic ionophore complexes as superoxide dismutase mimetics. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 930–933.
 - 15) Renò F, Tontini A, Burattini S, Papa S, Falcieri E, Tarzia G (1999) Mimosine induces apoptosis in the HL60 human tumor cell line. *Apoptosis* 4: 469–477.
 - 16) Hallak M, Vazana L, Shpilberg O, Levy I, Mazar J, Nathan I (2008) A molecular mechanism for mimosine-induced apoptosis involving oxidative stress and mitochondrial activation. *Apoptosis* 13: 147–155.
 - 17) 大柳善彦, 井上正康 (2001) 活性酸素と老化制御 共立出版, 東京: pp. 80–91.
 - 18) Matés JM, Sánchez-Jiménez FM (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: Implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 157–170.