

ヒドロキシケトン化合物による活性酸素生成

村上 恵子, 細川 好孝, 吉野 昌孝

(愛知医大・医・生化*)

Generation of reactive oxygen species by hydroxyketone compounds

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

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

Summary

Deferiprone (3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridone), a hydroxyketone compound with pyridine ring, is a water soluble, orally active iron chelator used for the therapy of Friedreich's ataxia and β -thalassemia. Toxic effect of deferiprone was analyzed in relation to the generation of reactive oxygen species. 1. Deferiprone/iron complex inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress. The inactivation was dependent on sodium azide, an inhibitor of catalase, indicating that deferiprone/iron complex can generate hydrogen peroxide as a principal product. Deferiprone was more effective on aconitase than maltol or kojic acid, hydroxyketone compounds with pyrane ring. 2. Deferiprone, maltol and kojic acid stimulated the autooxidation of Fe^{2+} suggesting that these compounds promote the activation of dioxygen molecule by reduced iron. When chelating agents are used for iron storage disease, attention should be paid to the transition metal-complex mediated generation of reactive oxygen species.

複素環であるピラン環, 及びピリジン環をもつヒドロキシケトン化合物は強力な鉄キレート能をもつ。そのうちピラン環のマルトール鉄複合体が活性酸素を生成し, アポトーシスを誘導することを以前に報告した^{1,2)}。ピラン化合物と類似した性質をもつピリジン環のヒドロキシケトンであるデフェリプロン (3-ヒドロキシ-1,2-ジメチル-4-ピリドン) はその鉄キレート作用が地中海貧血, フリードライヒ失調症などの治療に応用されているが, その副作用として補助因子に鉄をもつアコニターゼを失活させることが報告されている³⁾。一方, デフェリプロンを投与されたヒトでは血中の EPR シグナルが増強し, フリーラジカルを生じていると考えられること⁴⁾ もフェントン反応によりヒドロキシルラジカルを生じること⁵⁾ も報告された。我々は今回デフェリプロンの作用を検討し, アコニターゼの失活は

鉄の除去によるものではなく, マルトールと同様の活性酸素生成によることを明らかにした。

材料と方法

試薬, 実験材料

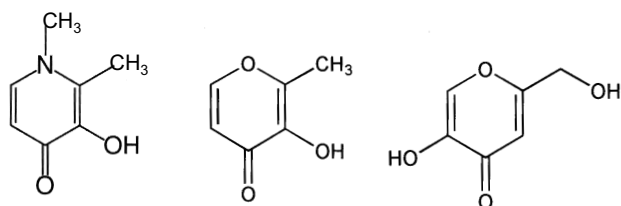
パン酵母, NADP 依存性イソクエン酸脱水素酵素-オリエンタル酵母。デフェリプロン-和光純薬。マルトール, コウジ酸-カーク。NADP-ロシュ。

透過性パン酵母の調製

市販のパン酵母 1 g を 0.5 M ソルビトールを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 4 ml に懸濁し, 2.5 ml のトルエンを加えた。43°C で 2.5 分間加温後, 遠心分離によって上清を除き, 0.5 M ソルビトールを含む 50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 4 ml に懸濁した (以後この懸濁液を酵母 200 mg/ml とする)。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⁵⁾。

アコニターゼの失活

上記の透過性パン酵母懸濁液 50 μl を 50 μM FeSO_4 , 各濃度のヒドロキシケトン化合物, 1 mM アジ化ナトリウム



Deferiprone

Maltol

Kojic acid

Fig. 1 Hydroxyketone compounds with pyridine or pyrane ring

*所在地: 愛知県長久手市岩作雁又1番地1 (〒480-1195)

(カタラーゼを阻害)あるいは1 mM KCN (Cu/ZnSOD, シトクロムオキシダーゼを阻害)を含む40 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 0.95 mlに加えて酵母の濃度を10 mg/mlとし37℃にて10分間加熱後、800×gにて5分間遠心し、沈殿した酵母を40 μlの0.5 M ソルビトールを含む50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) に懸濁した。これをアコニターゼ活性の測定に用いた。

アコニターゼ活性の測定

上記の酵母懸濁液5 μlを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を含む0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.8) 1 mlに加えて混合し、分光光度計を用いて340 nmの吸光度増加を2分間測定しこの時の酵母濃度を1 mg/mlとして反応速度を算出した。

二価鉄イオンの自動酸化

0.1 mMのFeSO₄と各濃度のヒドロキシケトン化合物を含む10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml中で37℃に加熱し、この溶液0.2 mlを各時間毎にマイクロプレート上で1 mM バソフェナンスロリンジスルホン酸0.1 ml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⁶⁾。

結果

パン酵母アコニターゼに対するデフェリプロンの効果をFig. 2に示す。デフェリプロン単独でもそこへアジ化ナト

リウムまたは2価鉄を加えてもアコニターゼの活性にはまったく影響がなく、鉄とアジ化ナトリウムの両方に加えた時のみアコニターゼは失活したことからデフェリプロン鉄複合体が過酸化水素を生成してアコニターゼを失活させた結論できる。デフェリプロンによる失活はシアン添加による影響を受けなかった (data not shown)。比較のため2.5 mM マルトールとコウジ酸の失活効果も示す。これらの化合物は2 mM以上の高濃度に加え、かつ1 mMシアン化カリウムの存在下でのみ効果があった。マルトールとコウジ酸はほとんど同程度の失活効果を示した。以前1 mM以下の低濃度マルトールによる活性酸素生成とアコニターゼの失活を報告したが^{1,2)}、コウジ酸も2 mM以上

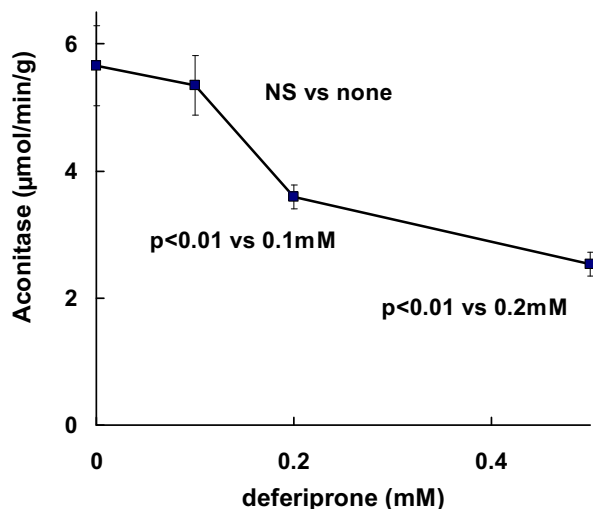


Fig. 3 Effect of various concentrations of deferiprone on the activity of aconitase in baker's yeast. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 2

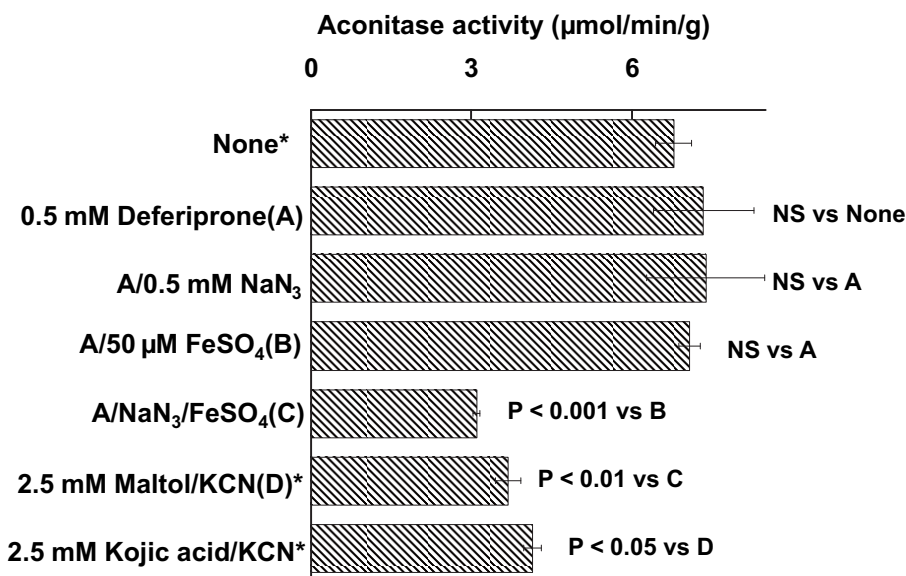


Fig. 2 Effect of deferiprone, maltol and kojic acid on the activity of aconitase in baker's yeast. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously³⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with compounds indicated in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37℃ 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. *, 50 μM FeSO₄ and 0.5 mM NaN₃ added.

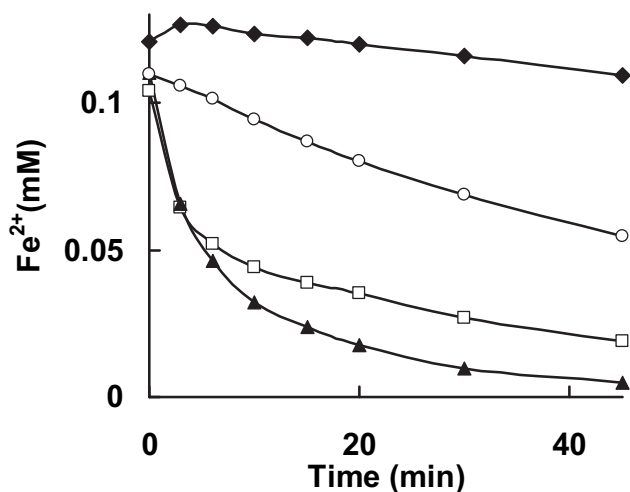


Fig. 4 Effect of deferiprone, maltol and kojic acid on the auto-oxidation of Fe^{2+} . FeSO_4 of 0.1 mM was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.1 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 540 nm was recorded by microplate reader. ◆, no addition; ○, 0.1 mM deferiprone; □, 0.2 mM maltol; ▲, 0.2 mM kojic acid; added.

の高濃度添加により活性酸素生成能を示すことが明らかになった。

デフェリプロンによるアコニターゼ失活の濃度依存性を示す (Fig. 3)。失活には 0.2 mM 以上の濃度が必要である。

ヒドロキシケトン化合物は二価鉄イオンの自動酸化を促進した (Fig. 4)。ピラン環、ピリジン環を有するヒドロキシケトン化合物が鉄イオンを結合して酸素との反応を促進することが推測された。

考 察

以上の結果からヒドロキシケトン化合物と鉄の複合体は酸素との反応性を増すことにより活性酸素を生成してアコニターゼを失活させることが示された。これらの化合物の細胞毒性は鉄との反応によって生じる活性酸素によるものと推測される。同じヒドロキシケトン化合物であってもピリジン環のデフェリプロンはピラン環のマルトールより強力な活性酸素生成能を示すことが明らかになった。

ピリジン環を持つヒドロキシケトン化合物であるデフェリプロンは強力な鉄のキレーターとして鉄の吸収を阻害する働きを持ち、従来フリードライヒ失調症や地中海貧血の治療薬に用いられている。その副作用として活性中心に鉄を持つアコニターゼの鉄を結合・除去することによって本酵素を失活させ好気代謝を抑制する可能性が報告されたが、今回の結果からデフェリプロンのアコニターゼに対する作用は鉄との複合体形成による活性酸素生成に基づくものと推測された。これらの疾患は遺伝性であり、症状の進行を阻止できても治癒は期待できない。従って治療薬剤は長期に渡って使用することになり、その場合多少でも吸収され

れば、組織に対して活性酸素による酸化障害を来す可能性を考慮する必要があると思われる。

References

- 1) 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. *Biometal* 19: 253-257
- 2) Murakami K, Ishida K, Watakabe K, Tsubouchi R, Naruse M, Yoshino M (2006) Maltol/iron mediated apoptosis in HL60 cells: Participation of reactive oxygen species (2006) *Toxicology Lett.* 161: 102-107
- 3) Goncalves S, Paupe V, Dassa EP, Rustin P (2008) Deferiprone targets aconitase: Implication of Friedreich's ataxia. *BMC Neurol.* 8: 20
- 4) Jirasomprasat T, Morales NP, Limenta LMG, Sirijaroonwong S, Yamanont P, Wilairat P, Fucharoen S, Chantharaksri U (2009) Pharmacokinetic-related pro-oxidant activity of deferiprone in β -thalassemia. *Free radical res.* 43: 485-491
- 5) Devanur LD, Neubert H, Hider RC (2008) The fenton activity of iron(III) in the presence of deferiprone. *J Pharm Sci.* 97:1454-67
- 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, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40-44