

## 金属イオンを介したピリミジン及びピラジンカルボン酸誘導体 による活性酸素生成機構

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 pyrimidine and pyrazine carboxylate derivatives

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

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

#### Summary

Pyrimidine base is a constituent of nucleotides and pyrazine is a component of food and antibiotics. Biological effects of these compounds were analyzed in relation to the generation of reactive oxygen species. Pyrazine 2-carboxylate, pyrazine 2,3-dicarboxylate and orotic acid/iron complex inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress. The inactivation was dependent on cyanide, an inhibitor of Cu/Zn SOD, indicating that these compounds can generate superoxide anion radical as a principal product. Pyrimidine and pyrazine carboxylate compounds were less effective than pyridine carboxylates on aconitase. Orotic acid, a pyrimidine carboxylate derivative stimulated the autooxidation of  $Fe^{2+}$  suggesting that this compound promoted the activation of dioxygen molecule by reduced iron. Pyrazine carboxylates did not stimulate the autooxidation, suggesting that these compounds produce perferryl ion. Injuries of tissue by pyrazine compounds can be partially explained by their transition metal complex-mediated generation of reactive oxygen species.

ピリジンカルボン酸 / 鉄複合体は活性酸素の生成源となり、多様な生物活性を發揮する<sup>1)</sup>。ピリジン化合物の中でもジピコリン酸とピコリン酸は鉄、シアン存在下で活性酸素を生成しパン酵母アコニターゼを失活させた。ピリジンはNが一個の六員環であるが、Nを2個含む六員環化合物にピリミジンとピラジンがある。ピリミジンはヌクレオチドを構成する塩基としてあらゆる生物に存在し、ピラジンは多くの食品中に分布する<sup>2)</sup>ほか、抗生物質その他の薬剤としても利用されている。今回はピリミジン誘導体として合成系の中間体であるオロット酸、ピラジン誘導体としてピラジン2カルボン酸とピラジン2,3ジカルボン酸の活性酸素生成能を検討しピリジン誘導体と比較した。

#### 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。ピコリン酸、ピラジンカルボン酸、オロット酸、ピラジンジカルボン酸—和光純薬。ジピコリン酸—片山化学。NADP—ロシュ・ダイアグノスティックス。

透過性パン酵母の調製—市販のパン酵母1gを0.5Mソルビトールを含む0.2Mリン酸緩衝液(pH7.4)4mlに懸濁し、2.5mlのトルエンを加えた。43℃で2.5分間加温後、遠心分離によって上清を除き、0.5Mソルビトールを含む50mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.1)4mlに懸濁した(以後この懸濁液を酵母200mg/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<sup>2)</sup>。

アコニターゼの失活—上記の透過性パン酵母懸濁液50μlを50μM  $FeSO_4$ 、各濃度のピリジンまたはジアジン化合物、1mM アジ化ナトリウム(カタラーゼを阻害)あるいは1mM KCN(Cu/ZnSOD、シトクロムオキシダーゼを阻害)を含む40mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.1)0.95mlに加えて酵母の濃度を10mg/mlとし37℃にて10分間加温後、800×gにて5分間遠心し、沈殿した酵母を40μl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5μlを5mMクエン酸、0.25mM NADP、4mM  $MgCl_2$ 、10mU/ml NADP-イソクエン酸脱水素酵素を含む0.1Mトリス・塩酸

\*所在地：愛知県長久手市岩作雁又1-1 (〒480-1195)

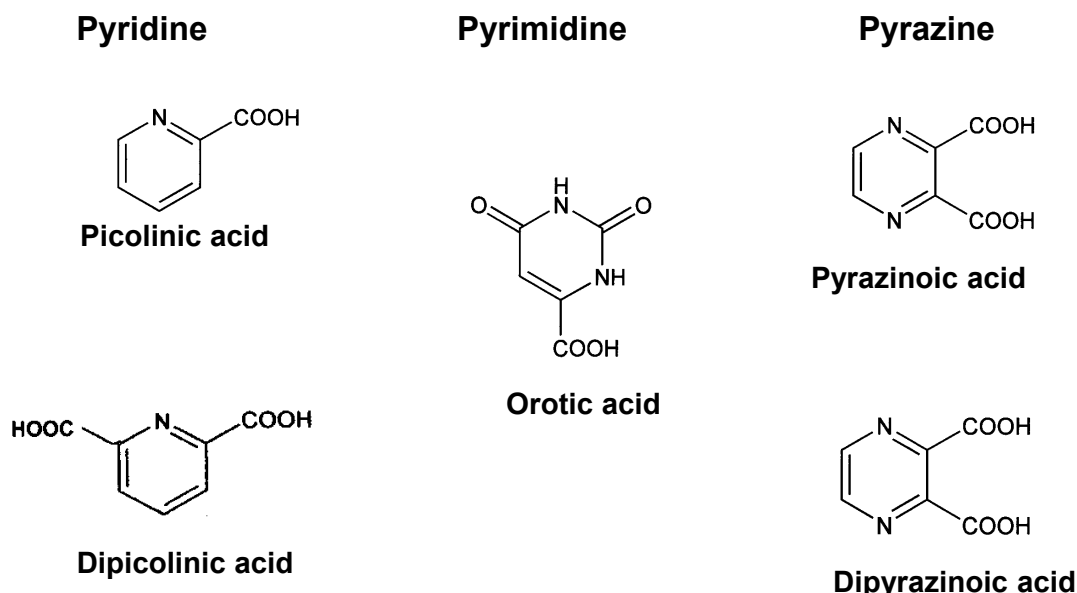


Fig. 1 Pyridine and diazine carboxylate derivatives used in this report

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  $\text{FeSO}_4$  と各濃度のピリジン、ジアジン化合物を含む 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml 中で 37°C に加温し、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 パソフェナンスロリンジルスルホン酸 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<sup>5)</sup>。

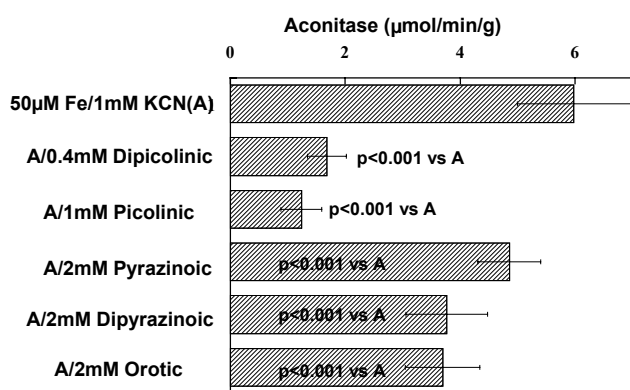


Fig. 2 Effect of dipicolinic acid, picolinic acid, pyrazine 2-carboxylate, pyrazine 2,3-dicarboxylate and orotic acid on the activity of aconitase in baker's yeast. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously<sup>2)</sup>. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with 50 µM  $\text{FeSO}_4$ , 1 mM KCN and each compound 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  $\text{MgCl}_2$ , 10 mU/ml of NADP-isocitrate dehydrogenase and 1 mg/ml of yeast. The increase in the absorbance at 340 nm was recorded.

## 結果

ピリジン、ジアジン化合物のアコニターゼに対する失活効果を Fig. 1 に示す。ピラジンとピリミジンは 2 mM は  $\text{FeSO}_4$  50 µM と KCN 1 mM 存在下にパン酵母アコニターゼを失活させた。この効果は統計的に有意ではあったが、ピリジンカルボン酸に比較すると弱かった。またジアジン誘導体の失活効果にはアジ化ナトリウムが全く無効であった (Fig. 2)。シアンは必須だった (Fig. 3)。ピラジン誘導体はジピコリン酸の失活効果に全く影響しなかった (Fig. 4)。

活性酸素を生成する化合物は鉄の自動酸化を促進する傾向を有する。オロト酸は 0.4 mM の濃度で KCN と同程度の酸化促進を示した。しかしピラジンカルボン酸は多少とも鉄の酸化を抑制した (Fig. 5)。

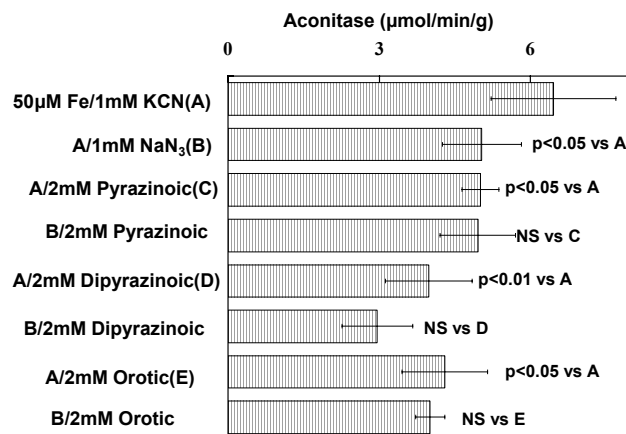


Fig. 3 Effect of  $\text{NaN}_3$  on the inactivating effect of pyrazine or pyrimidine carboxylate of aconitase in baker's yeast. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 2.

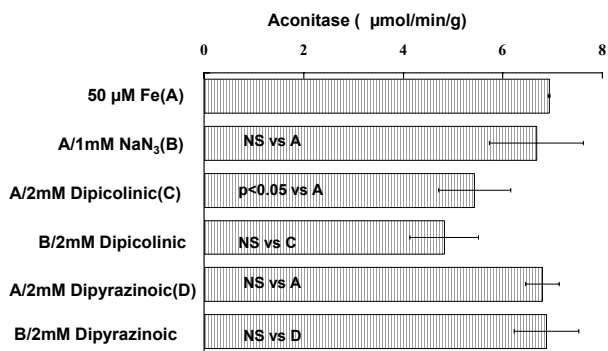


Fig. 4 Effect of dipicolinic acid and pyrazine dicarboxylate on the activity of aconitase in baker's yeast in the absence of KCN. Experimental conditions were similar to those described in Fig.2 except that yeast cells were mixed with 50 µM FeSO<sub>4</sub> and each compound without KCN.

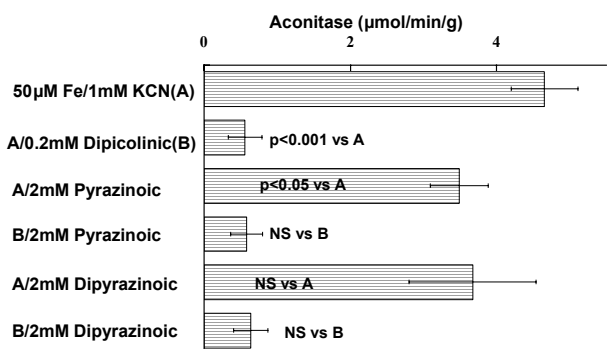


Fig. 5 Effect of pyrazine carboxylates on the inactivating effect of dipicolinic acid on aconitase in baker's yeast. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 2.

## 考 察

ピラジン、ピリミジン化合物はピリジン誘導体と同様、鉄錯体を形成して活性酸素を生成し、アコニターゼを失活させることが確認された。これらの化合物/鉄が生成する活性酸素種はアジ化ナトリウムが無効であることからスーパーオキシドアニオンラジカルであると推測される。

ジピコリン酸/2価鉄複合体は酸素分子との反応を促進してスーパーオキシドを生成し、オロト酸の効果も弱いながらこれに由来するかと考えられる。しかしピラジン化合物は2価鉄イオンの酸化を促進しないため、ペルフェリルイオン、フェリルイオンを生成して、活性酸素生成に関与するものと考えられる (Fig. 7)。

ピラジン化合物は自然界に広く分布しており、とくに食品、ワインなどに多く含まれる。ピラジンはスーパーオキシドのスカベンジャーとして働くという報告もあるが、動物レベルでは輸卵管運動の阻害作用なども報告されている<sup>4)</sup>。今回の結果はピラジン化合物の生理作用、薬理作用に関連すると考えられる。

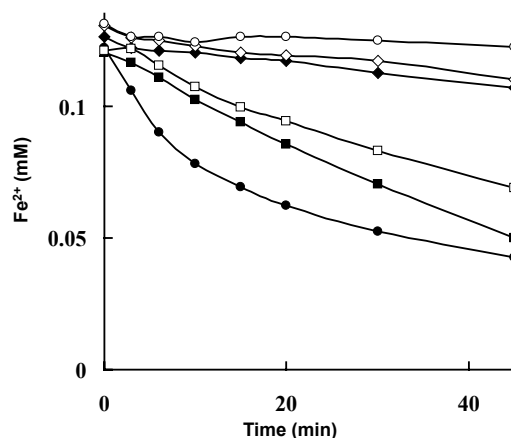
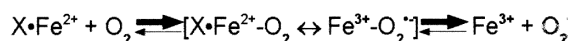
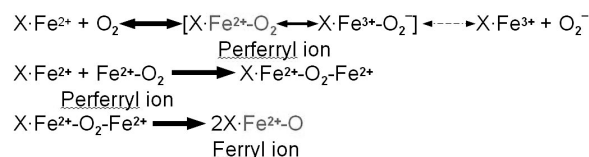


Fig. 6 Effect of pyridine, pyrazine and pyrimidine carboxylates on the autooxidation of Fe<sup>2+</sup>. FeSO<sub>4</sub> of 0.1 mM was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.1 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 540 nm was recorded by microplate reader. ◆, no addition; ◇, 0.4 mM pyrazinoic acid; ○, 0.4 mM dipyrazinoic acid; ●, 0.2 mM dipicolinic acid; □, 0.4 mM orotic acid; ■, 0.6 mM KCN added.

### 1. ROS Generation by dipicolinate or orotate/iron complex



### 2. ROS Generation by pyrazine/iron complex



Perferryl ion, Ferryl ion: potent oxidant with high electron affinities

Fig. 7 Generation of reactive oxygen species by pyridine or pyrimidine/iron and pyrazine/iron complex.

## 参考文献

- 1) 村上恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 吉野昌孝 (2007) ピリジンジカルボン酸複合体による活性酸素の生成 微量栄養素研究 24 : 49-55
- 2) Müller R, Rappert S (2010) Pyrazines: occurrence, formation and biodegradation. Appl Microbiol Biotechnol 85: 1315-1320
- 3) 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
- 4) Riveles K, Roza R, Arey J, Talbot P (2004) Pyrazine derivatives in cigarette smoke inhibit hamster oviductal functioning. Reproductive Biology and Endocrinology 2: 23-36
- 5) Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. Anal Biochem 257:40-44