

サリチル酸誘導体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 salicylate derivatives

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

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

Summary

5-Aminosalicylate (mesalazine) and 4-aminosalicylate (PAS) are used for treatment of ulcerative colitis and for tuberculosis, respectively. Biological effects of these compounds were analyzed in relation to the generation of reactive oxygen species. 5-Aminosalicylate/iron complex inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress. The inactivation required cyanide, an inhibitor of Cu/Zn SOD and cytochrome c oxidase, indicating that this compound can generate superoxide anion radical as a principal product. 5-Aminosalicylate stimulated the autooxidation of Fe^{2+} suggesting that this compound promoted the activation of dioxygen molecule by reduced iron. Salicylate and 4-aminosalicylate were ineffective on aconitase activity and did not stimulate the autooxidation. Cellular damage by 5-aminosalicylate can be partially explained by its transition metal complex-mediated generation of reactive oxygen species.

5-アミノサリチル酸 (メサラジン Fig. 1) は潰瘍性大腸炎に対して使用される薬剤であり¹⁾, 抗炎症作用を持つと考えられる一方で, 細胞毒性, 特にDNA損傷に由来すると考えられる抗ガン効果も報告されている²⁾。5-アミノサリチル酸の異性体4-アミノサリチル酸 (PAS Fig. 1) は抗結核剤として用いられる³⁾。今回, サリチル酸誘導体の細胞毒性発現において活性酸素の関与を考え, これら化合物の活性酸素生成能を金属イオンに対する反応性との関連において検討した。

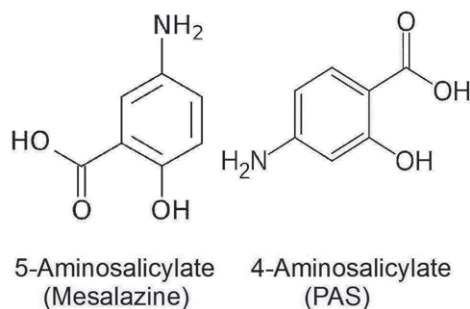


Fig. 1 Structure of salicylate derivatives.

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はオリエンタル酵母, サリチル酸, 4-アミ

ノサリチル酸, 5-アミノサリチル酸は和光純薬, ジピコリン酸, ネオクプロイン (2,8-ジメチル-1,10-フェナントロリン塩酸塩) は片山化学, パソフェナンスロリンジスルホン酸, トリス (Trizma base) はシグマ, NADP はロシュ・ダイアグノスティックス, DPPH (2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル) はカルピオケムの製品をそれぞれ用いた。

低分子物質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 分間加熱後, 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。これによって酵母は低分子の物質に対する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⁴⁾。酵母 1 g を 1 ml と仮定し, 以後この懸濁液を酵母 200 mg/ml として計算した。

アコニターゼ活性測定資料の調製—上記の透過性パン酵母懸濁液 50 μl を 50 μM FeSO_4 , Fig. 5-7 に示した各濃度の化合物, 1 mM KCN (Cu/ZnSOD⁵⁾, シトクロムオキシダーゼを阻害⁶⁾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°C にて 5 分または 10 分間加熱後, 800 \times 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

*所在地: 愛知県長久手市岩作雁又1-1 (〒480-1195)

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。このとき各資料を同時に3本調製して活性の平均値と標準偏差を算出し、Dunnett 検定によって対照との有意差を判定した。

アコニターゼ活性の測定 - 上記の酵母懸濁液 5 μ l を 5 mM クエン酸, 0.25 mM NADP, 4 mM $MgCl_2$, 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 UV1600 (シマヅ) を用いて 340 nm の吸光度増加を 2 分間測定した。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 $FeSO_4$ と Fig. 4 に示した各濃度の化合物を含む 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 を経時的に採取し 96 穴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 0.05 ml と反応させた後に 535 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー SpectraMax M5 (モレキュラーデバイス社) にて測定した⁷⁾。

還元力の測定 - 0.1 mM $CuSO_4$, 0.5 mM ネオクプロイン, 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) と Fig. 1 に示した各濃度の化合物を最終容量が 0.25 ml となるよう 96 穴マイクロプレート上で混合し 456 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー SpectraMax M5 (モレキュラーデバイス社) にて測定した。

ラジカル吸収能 - 安定なラジカル DPPH 0.2 mM と Fig. 2 に示した各濃度の化合物を 100% エタノール中で混合して室温に 10 分放置した後, その 0.25 ml を 96 穴マイクロプレートに移し, 516 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー SpectraMax M5 (モレキュラーデバイス社) にて測定した。

結果と考察

5-アミノサリチル酸は銅イオンに対してアスコルビン酸と同程度の還元力 (Fig. 2) を, DPPH に対してはアスコルビン酸以上に強いラジカル吸収能 (Fig. 3) を示した。4-アミノサリチル酸とサリチル酸にはほとんど効果は見られなかった (Fig. 2, 3)。この結果は 5-アミノサリチル酸の薬理作用抗炎症作用を説明する基礎 (炎症の原因となる免疫細胞由来のラジカルを消去) と考えられる。

二価鉄イオンの自動酸化に対して 5-アミノサリチル酸は強力な促進作用を示したが, サリチル酸, 4-アミノサリチル酸には酸化促進は認められなかった (Fig. 4)。

アコニターゼは活性酸素に対して最も感受性の高い酵素であり活性酸素のセンサーとして利用できる^{8,9)}。5-アミノサリチル酸は鉄/シアン存在下でパン酵母アコニターゼを失活させ, 活性酸素の生成を示唆した。この効果を以前に報告したデフェリプロン¹⁰⁾, 及びジピコリン酸¹¹⁾と比較した。両者とも鉄酸化促進作用を持ち, かつアコニターゼを失活させるが, 5-アミノサリチル酸の作用はデフェ

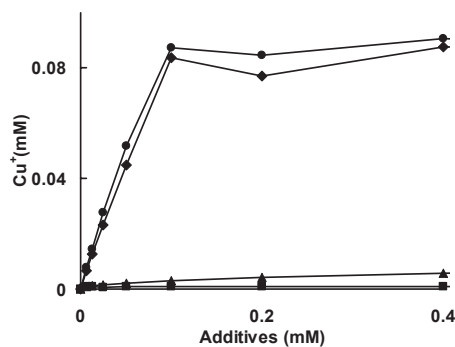


Fig. 2 Reduction of Cu^{2+} by ascorbate and salicylate derivatives. Each compound was mixed with 0.15 mM $CuSO_4$, 0.5 mM neocuproin-HCl and 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) on microplate. Absorbance at 456 nm was measured by plate reader. \blacklozenge , ascorbate; \blacktriangle , 4-aminosalicylate; \blacksquare , salicylate; \bullet , 5-aminosalicylate added.

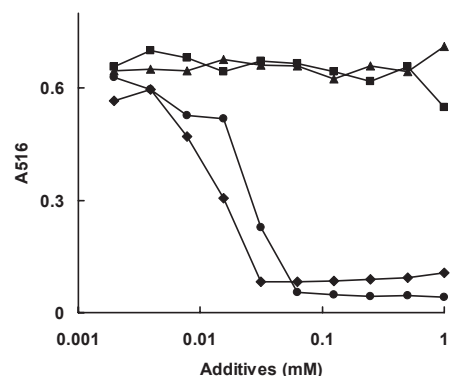


Fig. 3 Scavenging of DPPH radical by ascorbate and salicylate derivatives. Each compound was mixed with 0.2 mM DPPH in 100% ethanol. Absorbance at 516 nm was measured. \blacklozenge , 5-aminosalicylate; \blacktriangle , salicylate; \blacksquare , 4-aminosalicylate; \bullet , ascorbate added.

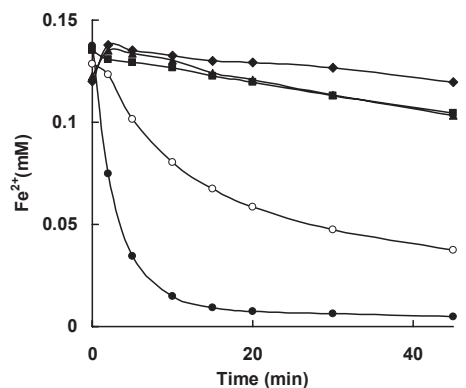


Fig. 4 Effect of salicylate derivatives and dipicolinic acid on the autooxidation of Fe^{2+} . $FeSO_4$ of 0.1 mM was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.05 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 535 nm was measured. \blacklozenge , no addition; \blacktriangle , 0.2 mM salicylate; \blacksquare , 0.2 mM 4-aminosalicylate; \circ , 0.2 mM dipicolinic acid; \bullet , 0.2 mM 5-aminosalicylate added.

リプロンより強く ($p < 0.05$), ジピコリン酸より弱かった ($p < 0.05$)。サリチル酸, 4-アミノサリチル酸は全く失活効果を示さなかった (Fig. 5)

5-アミノサリチル酸によるアコニターゼ失活は時間依存性 (Fig. 6), かつ用量依存性 (Fig. 7) であった。なお

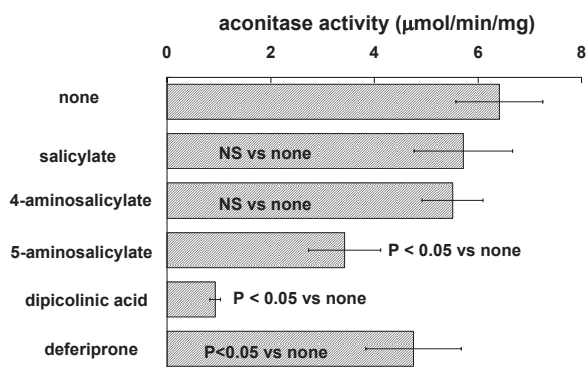


Fig. 5 Effect of dipicolinic acid deferiprone and salicylate compound/Fe complexes on the activity of aconitase in the presence of KCN. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁴⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with 50 μM FeSO₄, 1mM KCN and each compound at the concentration of 0.4 mM 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. 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. Error bars indicate Mean ± SD (n = 3).

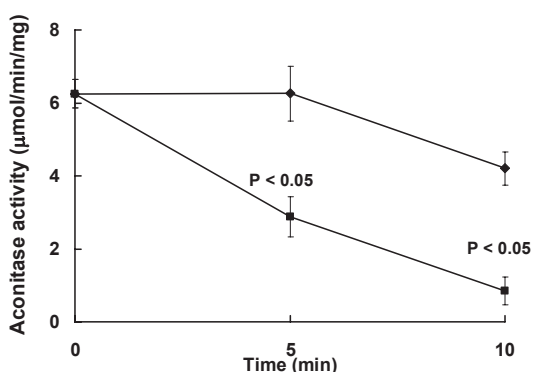


Fig. 6 Time dependent inactivation of aconitase by 5-aminosalicylate/Fe complex in the presence of KCN. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 5 except incubation time. ◆, No addition; ■, 1 mM 5-aminosalicylate added.

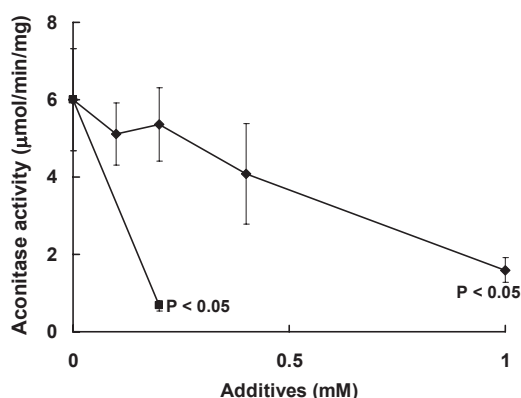


Fig. 7 Dose dependent inactivating effect of 5-aminosalicylate in the presence of 50 μM FeSO₄ and 1 mM KCN. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 5. ◆, 5-aminosalicylate; ■, dipicolinic acid.

この失活効果は鉄/シアン存在下に特異的であり、鉄/アジ化ナトリウムあるいは銅/アジ化ナトリウム存在下では見られなかった（データは示していない）。

5-アミノサリチル酸/鉄複合体によるパン酵母アコニターゼの失活は Cu/ZnSOD, シトクロム c オキシダーゼを阻害する KCN によって促進され、カタラーゼを阻害するアジ化ナトリウム¹²⁾ の添加によっては起きないことから、この化合物による失活にはスーパーオキシドラジカルの生成が関与するものと推測された。薬剤としてのメサラジン (5-アミノサリチル酸) の抗炎症効果はこの化合物自体がラジカル吸収能を持つことに由来すると考えられるが、その一方でメサラジンの副作用あるいは抗がん効果は鉄との共存により生成する活性酸素に由来する酸化傷害である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Miles AM, Grisham MB (1994) Antioxidant properties of aminosaliclates. *Methods Enzymol* 234: 555-572
- 2) Noble E, Jansen L, Dierickx PJ (1997) Comparative cytotoxicity of 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and related compounds in different cell lines. *Cell Biol Toxicol* 13: 445-451
- 3) Dawson JJY, Devadatta S, Wallace F, Radhakrishna S, Ramakrishnan CV, Somasundaram PR, Stott H, Tripathy SP, Velu S (1966) A 5-year study of patients with pulmonary tuberculosis in a concurrent comparison of home and sanatorium treatment for one year with isoniazid plus PAS. *Bull World Health Organ* 34: 533-551
- 4) 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
- 5) Crapo JD, McCord JM, Fridovich I (1978) Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol* 53: 382-93
- 6) Egekeze JO, Oehme FW. (1980) Cyanides and their toxicity: A literature review. *Vet Q* 2: 104-114
- 7) Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40-44
- 8) Gardner PR, Fridovich I (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J Biol Chem* 267: 8757-8763
- 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, 細川好孝, 吉野昌孝 (2011) ヒドロキシケトン化合物による活性酸素の生成. *微量栄養素研究* 28 : 32-34
- 11) 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
- 12) Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. *Archiv Biochem Biophys* 41: 462-474