

アスコルビン酸とメナジオンの相互作用によるレドックス制御

村上 恵子, 細川 好孝, 吉野 昌孝

(愛知医大・医・生化*)

Redox Control by Interaction of Ascorbate and Menadione

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

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

Summary

Menadione, a naphthoquinone compound with vitamin K activity in animal, shows cellular toxicity, which may be ascribed to the reactive oxygen species. This work analyzed the menadione-dependent generation of reactive oxygen species in yeast. Menadione inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress, in the presence of reducing reagent such as ascorbate or NADH and NADPH. No requirement of azide, an inhibitor of catalase, for the inactivation of aconitase by menadione with NADPH indicates that superoxide anion radical produced plays a principal role for the inactivation. Ascorbate stimulated the inactivation of aconitase by menadione with NADPH or NADH in the presence of azide, suggesting the generation of hydrogen peroxide. Menadione-dependent generation of reactive oxygen species can be explained by the NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1-mediated reduction of menadione to quinol form, which participates in the production of reactive oxygen species in yeast. Possible role of ascorbate and glutathione in the reduction of menadione was also discussed.

メナジオンはビタミン K 骨格構造を有するナフトキノン化合物であり、動物体内ではビタミン K 前駆体として機能する¹⁾。一方、種々の細胞毒性を示し、酵母細胞に対しては寿命の短縮などの毒性とともに逆に延長を引き起こす報告も知られている²⁾。この作用には毒性においてもあるいは軽いストレスによる寿命延長においても活性酸素の関与が想定されており、アスコルビン酸による毒性効果の増強が知られているとともに、この効果はガン細胞に対しても有効であることから化学療法としての応用も考えられている^{3,4)}。今回、メナジオンによる活性酸素生成機構を対象としてアスコルビン酸、及びグルタチオンの増強・抑制効果を解析・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はオリエンタル酵母, メナジオン, エタノールは和光純薬, アスコルビン酸, 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), N-アセチルシステインは片山化学, 酸化型グルタチオン, トリス (Trizma base) はシグマ, 還元型グルタチオン, NAD,

NADP, グルコース 6-リン酸はロシュ・ダイアグノスティックスの製品をそれぞれ用いた。還元型グルタチオン, N-アセチルシステインは毎回新しい溶液を作成し, 同じ濃度のトリスを加えて pH を中性に合わせた。

還元力の測定—0.1 mM CuSO₄, 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。

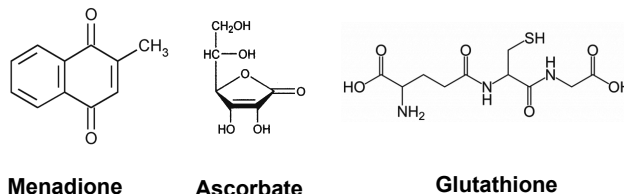


Fig. 1 Structures of menadione, ascorbate and reduced glutathione.

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

*所在地: 愛知県長久手市岩作雁又1-1 (〒480-1195)

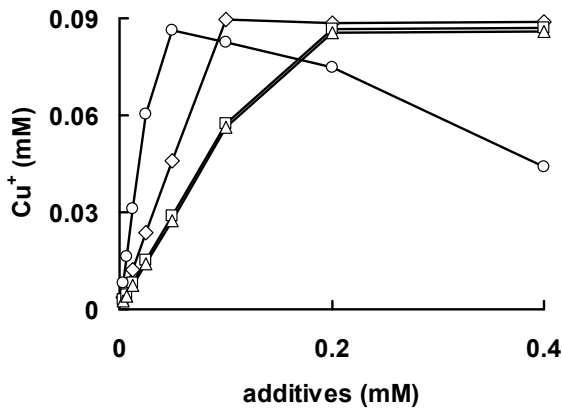


Fig. 2 Reduction of Cu^{2+} by ascorbate and sulfhydryl compounds. Each compound was mixed with 0.15 mM CuSO_4 , 0.5 mM neocuproin-HCl and 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) on microplate. Absorbance at 456 nm was measured by platerreader. \diamond , ascorbate; \circ , Dithiothreitol; \square , reduced glutathione; \triangle , N-acetylcysteine added.

7.4) 4 ml に懸濁し, 2.5 ml のトルエンを加えた。45°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) 0.04 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⁵⁾。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 Figs. 3-7 に示した各濃度の化合物, 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 分間加温後, 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 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 2-6 回分のデータから活性の平均値と標準偏差を算出し, Dunnet 検定によって有意差を判定した。

アコニターゼ活性の測定—上記の酵母懸濁液 5 μl 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, 島津製作所) 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。

結果

メナジオンは水酸基をもたないナフトキノン化合物である。ある物質が活性酸素の生成源として働くためには酸素分子を還元するための水酸基が必要である⁶⁾。したがってメナジオンが活性酸素を生成するためには還元されてキノール型に変化する必要がある。今回, 対象とした還元性物質の還元力を銅の還元によって測定した (Fig. 2)。

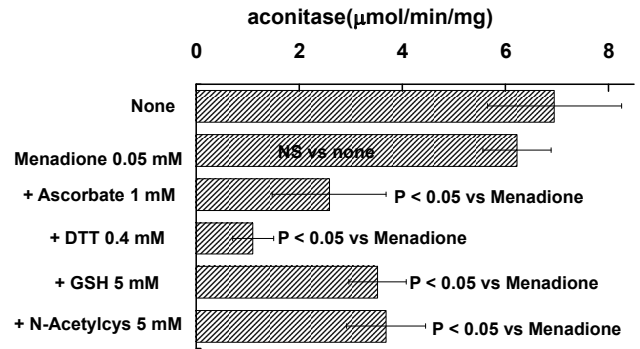


Fig. 3 Effect of menadione and reducing reagents on the activity of aconitase in the presence of NaN_3 . Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁵⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) were mixed with 1 mM NaN_3 and each compound in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37°C for 5 min, cells were collected by centrifugation at 800 \times 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 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. Error bars indicate Mean \pm SD (n = 3 or 6).

DTT が銅と 1 : 2, アスコルビン酸がほぼ 1 : 1 に結合するのに対しグルタチオンと N アセチルシステインは 1 : 0.6 程度の結合力を示した。これらの還元力を持つ物質はメナジオン 0.05 mM とカタラーゼを阻害する⁷⁾ アジ化ナトリウム 1 mM の存在下においてパン酵母のアコニターゼを失活させた (Fig. 3)。メナジオンのみの添加によってはアコニターゼは殆ど影響を受けなかった。この時アジ化ナトリウム無添加では還元物質は全く効果がないことを先に報告した⁸⁾。

0.02 mM メナジオン存在下においてアコニターゼ活性に対する NADP の効果を検討した (Fig. 4)。グルコース 6-リン酸の添加によって NADPH を供給したのみではアコニターゼは影響を受けず, 酵素の失活にはマグネシウムイ

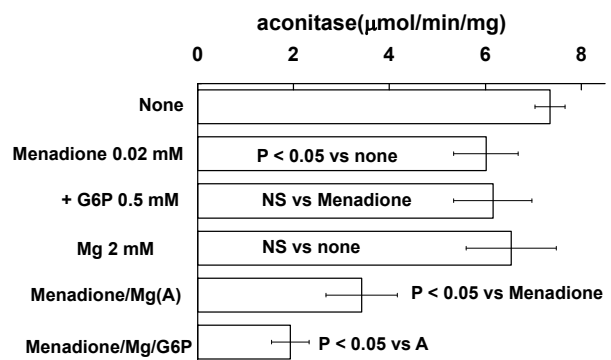


Fig. 4 Effect of menadione and NADP on the activity of aconitase in the presence of NaN_3 and NADP. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 3 except that incubation mixture contained 1 mM NaN_3 and 0.02 mM NADP. Error bars indicate Mean \pm SD (n = 6).

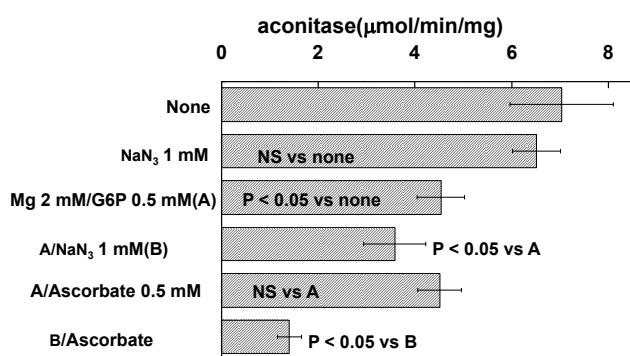


Fig. 5 Effect of NaN₃ and ascorbate on the activity of aconitase in the presence of menadione and NADPH. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 3 except that incubation mixture contained 0.01 mM menadione and 0.01 mM NADP without NaN₃. Error bars indicate Mean ± SD (n = 6-18).

オンが必須だった。マグネシウムとメナジオンの添加でも有意の失活がみられG6PによるNADPHの供給はこの失活を増強する結果となった。

NADPHに対するアスコルビン酸の効果をFig.5に示す。メナジオンによる失活効果は濃度依存的であり、0.02 mM (Fig. 4) と0.01 mM (Fig. 5) ではNADPH, アジ化ナトリウム存在下で有意の差がみられた (p < 0.05)。アスコルビン酸はアジ化ナトリウム存在下でNADPHと強い相乗効果を示し、この時過酸化水素の生成が著明に上昇することが推定された。NADPH/メナジオンによる失活はアジ化ナトリウムによる増強が著明でなく、過酸化水素よりもスーパーオキシドアニオンラジカルを主に生じることを示した。この条件 (NADPH/アスコルビン酸/アジ化ナトリウム) に対して酸化型グルタチオンが保護効果を示した (Fig. 6)。これはイーストのグルタチオンレダクターゼがNADPHを消費するためと考えられる。酸化型グルタチオンがNADPHを減少させた状態においては還元型グルタチオンに有意な保護効果が見られた。

NADとエタノールによってNADHを供給した場合に

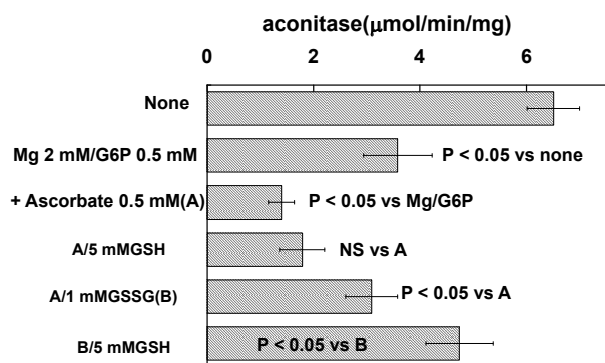


Fig. 6 Effect of glutathione and ascorbate on the activity of aconitase in the presence of menadione, NADPH and NaN₃. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 3 except that incubation mixture contained 0.01 mM menadione, 0.01 mM NADP and 1 mM NaN₃. Error bars indicate Mean ± SD (n = 6-18).

もメナジオンによってアコニターゼの失活が観察された。この時もメナジオンによる失活に対するアジ化ナトリウムの効果がアスコルビン酸の添加によって増強された (Data not shown)。

考 察

活性酸素の生成には水酸基が必須であり⁶⁾メナジオンはキノール型へ還元されて酸素分子を還元した結果、生成した活性酸素種がアコニターゼ酸化失活を引き起こすと推測される。今回示した酵母細胞によるメナジオン還元反応は過酸化水素と共にスーパーオキシドアニオンラジカルを生じる⁷⁾ことから、ハイドロキノンよりもセミキノラジカルを主に生成すると推測されること、Mg依存性であることなどの性質も持つ。この反応、即ちキノン化合物を1電子還元または2電子還元する酵素反応としていくつかのものが知られておりその代表的な反応は真核細胞一般に存在するミトコンドリアのcomplex Iである⁹⁾。酵母のComplex IはNADHと同程度にNADPHも利用することが*Candida*で報告されている¹⁰⁾のでこの活性酸素生成に対するComplex Iの関与は否定できない。しかしこの酵素反応はメナジオンに対する親和性が特に強いことからミトコンドリアに由来するNAD(P)H:quinone oxidoreductase I型の可能性が高いと推測された。本酵素は*Kluyveromyces*で存在とコードする遺伝子が確認されており*Saccharomyces*も同様の酵素を持つものと予想されている¹¹⁾。グルタチオンレダクターゼ自体もメナジオンの還元能力を持つ¹²⁾が、触媒効率としてはかなり低く、またマグネシウム依存性ではないのでこの酵素の関与は否定的である。

アスコルビン酸とグルタチオンはメナジオンを直接還元して過酸化水素を生じることも可能であり、この反応は白血球細胞などで確認されている⁴⁾。この反応の生成物は過酸化水素であり⁴⁾、本研究の実験系におけるこの直接反応の可能性については今後の検討が必要である。アスコルビン酸はNADPHと協同的にはたらくことによりメナジ

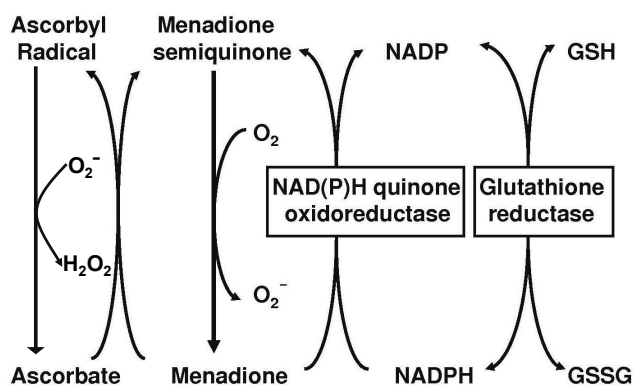


Fig. 7 Proposed mechanism of ROS generation by menadione, NADPH and ascorbate.

ンの活性酸素生成を増強し、グルタチオンは酸化型が NADPH を消費することにより、また還元型は正確な作用機序は不明ながら酸化型と協力することによってアスコルビン酸の作用を阻害するものと推測された。

参考文献

- 1) Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, Takeuchi A, Sawada N, Kamao M, Wada A, Okitsu T, Okano T. (2013) Menadione (vitamin K₃) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K₁) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K₂) in rats. *J Biol Chem.* 288: 33071-33080
- 2) Pan Y (2011) Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: A message from yeast. *Exp Gerontol* 46: 847-852
- 3) Criddle DN, Gillies S, Baumgartner-Wilson HK, Jaffer M, Chinje EC, Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Sutton R, Petersen OH (2006) Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 281: 40485-40492
- 4) Verrax J, Stockis J, Tison Taper HS, Calderon PB (2006) Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. *Biochem Pharmacol* 72: 671-680
- 5) 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
- 6) Murakami K, Haneda M, Qiao S-L, Naruse M, Yoshino M (2007) Prooxidant action of rosmarinic acid: Transition metal-dependent generation of reactive oxygen species. *Toxicol in Vitro* 21: 613-617
- 7) Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. *Archiv Biochem Biophys* 41: 462-474
- 8) 村上恵子, 羽田みや子, 吉野昌孝 (2006) メナジオンによる活性酸素の生成. *微量栄養素研究* 23: 63-68
- 9) Ragan CI (1976) NADH ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 456: 249-290
- 10) Bruinenberg PM, van Dijken JP, Kuenen JG, Schefers WA (1985) Oxidation of NADH and NADPH by mitochondria from the yeast *Candida utilis*. *J Gen Microbiol* 131: 1043-1051
- 11) Tarrío N, Díaz Prado S, Cerdán ME, González Siso MI (2005) The nuclear genes encoding the internal (KIND1) and external (KINDE1) alternative NAD(P)H: ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. *Biochim Biophys Acta* 1707: 199-210
- 12) Čénas NK, Rakauskienė GA, Kulys JJ (1989) One- and two-electron reduction of quinines by glutathione reductase. *Biochim Biophys Acta* 973: 399-404