

タイロンによる活性酸素生成の促進と抑制

村上 恵子, 細川 好孝, 吉野 昌孝

(愛知医大・医・生化*)

Tiron/metal-dependent generation and scavenging of reactive oxygen species

Keiko MURAKAMI, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO

Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine

Summary

Biological effect of tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid disodium), a water soluble compound used for the determination of iron and titanium, was analyzed in relation to the generation and scavenging of reactive oxygen species (ROS). Tiron reduced cupric ion and scavenged DPPH, stable radical. Tiron/iron or tiron/copper complex inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress. The inactivation required sodium azide, inhibitor of catalase, suggesting that these complexes can generate hydrogen peroxide (H_2O_2) as a principal product. Ascorbate protected aconitase from the inactivation, whereas ascorbate/copper complex generated H_2O_2 . Cellular damage by tiron can be explained by its transition metal complex-mediated generation of ROS.

タイロン (4,5ジヒドロキシ-1,3-ベンゼンジスルホン酸二ナトリウム) は金属イオンのうち主に鉄とチタンの定量に用いられる水に可溶性化合物である (Fig. 1)。培養細胞に対して活性酸素特にスーパーオキシドの生成を抑制するツールとして用いられる¹⁻⁴⁾ 一方で細胞毒性を示す例として HL60 (ヒト前骨髄性白血病) 細胞に対して高濃度のタイロンは DNA 断片化とアポトーシスを誘導することが報告されている⁵⁾。またオートファジーへの関連も示されている⁶⁾。今回はタイロンの細胞毒性発現の解明を目的として、遷移金属存在下においてタイロンによる、活性酸素生成の促進と抑制機構を透過性パン酵母のアコニターゼ活性を指標に検討した。

実験方法

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 (東京), タイロン,

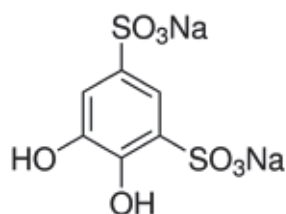


Fig. 1 Structure of tiron

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 (大阪), トリス (Trizma base), DPPH (2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル) はシグマアルドリッチジャパン (東京), NADP はロシュ・ダイアグノスティックス (東京) の製品をそれぞれ用いた。

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) と各濃度のタイロンまたはアスコルビン酸を最終容量が 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ジャパン, 東京) にて測定した。

ラジカル吸収能 — 安定なラジカル DPPH 0.2 mM と各濃度のタイロンまたはアスコルビン酸を 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 にて測定した。

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。43–45°C で 1 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。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⁷⁾。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

*所在地: 愛知県長久手市岩作雁又1-1 (〒480-1195)

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 μ l を 50 μ M FeSO₄, Figs. 4-6 に示した各濃度の化合物, 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 3 分または 10 分間加温後, 800 \times g にて 5 分間遠心し, 沈殿した酵母を 40 μ l 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。このとき各試料を同時に 3 本調製して活性の平均値と標準偏差を算出した。

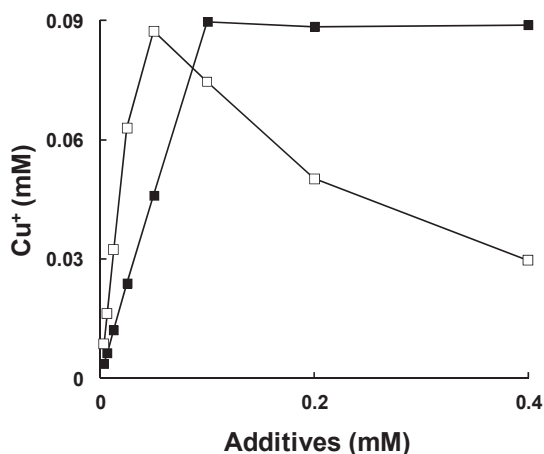


Fig. 2 Effect of tiron and ascorbate on the reduction of copper ion. Reaction mixture of 0.25 ml contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.15 mM CuSO₄, various concentrations of tiron or ascorbate, and 0.5 mM neocuproine-HCl. The mixture was incubated at room temperature, and the absorbance at 456 nm was recorded. □, tiron; ■, ascorbate added.

Dunnet 検定 — JMP5.IJ (SAS institute inc) を用いて各試料と対照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 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 UV1600 (島津製作所, 京都) 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 としして反応速度を算出した。

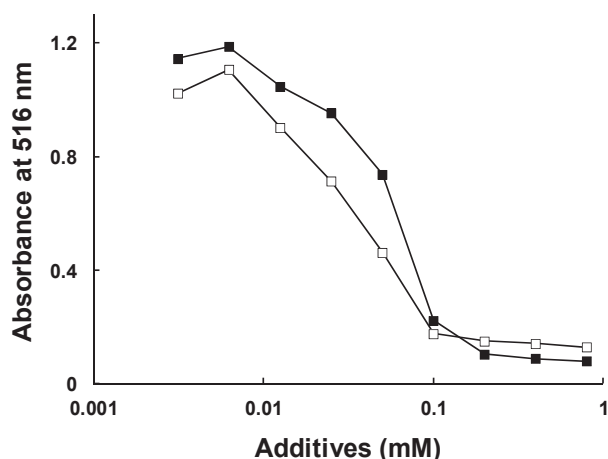


Fig. 3 Scavenging activity of tiron and ascorbate on the DPPH radical. Tiron or ascorbate of various concentrations was incubated with 0.2 mM DPPH in a total volume of 1 ml ethanol for 30 min. Change in the absorbance at 516 nm was recorded. □, tiron; ■, ascorbate; added.

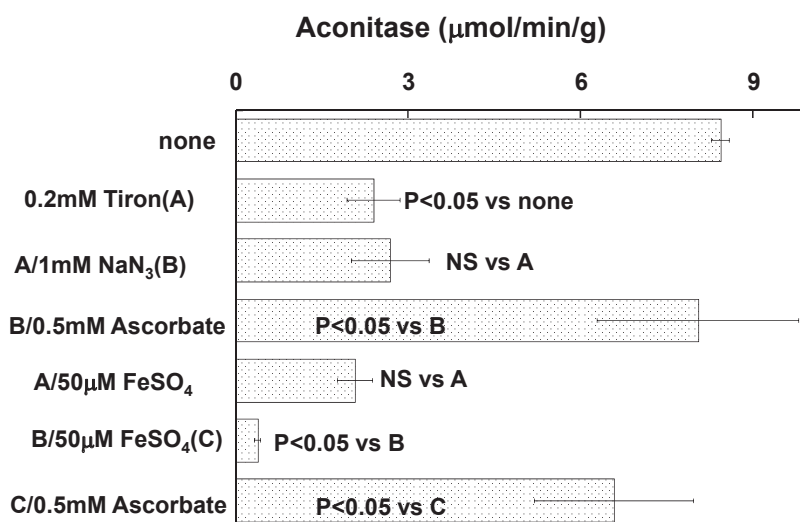


Fig. 4 Effect of tiron/Fe complex on the activity of aconitase in baker's yeast. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) prepared according to the method reported previously⁷⁾ were mixed with each compound in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37°C for 10 min, cells were collected by centrifugation at 800 \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 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 \pm SD (n = 3-6).

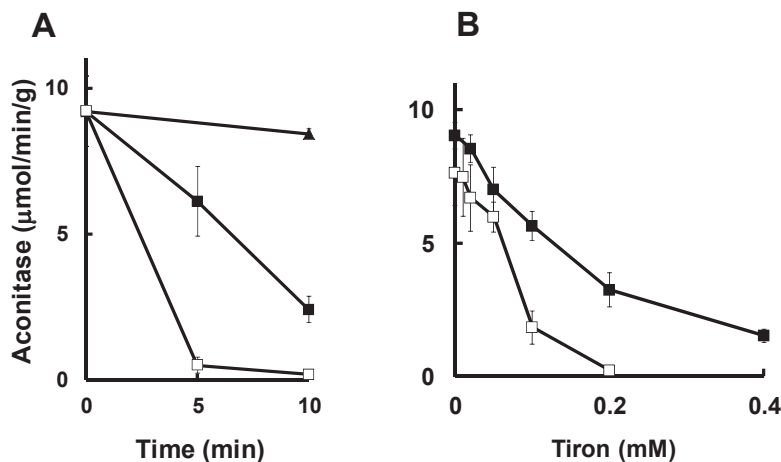


Fig. 5 A. Time dependent inactivation of aconitase by tiron in the presence of NaN_3 . Experimental conditions were similar to those described in Fig. 4 except the incubation mixtures containing 1 mM NaN_3 and incubation time. ▲, No addition; ■, 0.4 mM tiron; □, 0.4 mM tiron and 50 μM FeSO_4 added. B. Dose dependent inactivating effect of tiron in the presence or absence of FeSO_4 . Experimental conditions were similar to those described in A. ■, tiron; □, tiron and 25 μM FeSO_4 added.

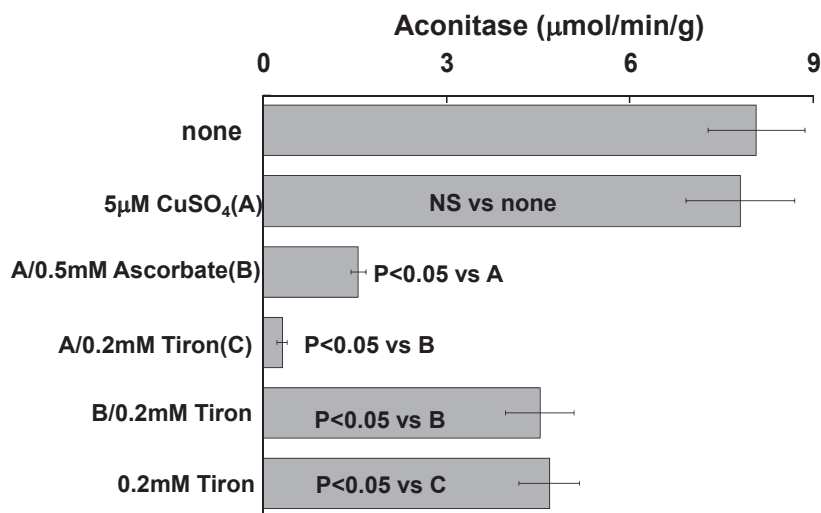


Fig. 6 Effect of tiron/Cu complex on the activity of aconitase in baker's yeast. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) prepared according to the method reported previously⁷⁾ were mixed with tiron or ascorbate and 1 mM NaN_3 in the presence or absence of CuSO_4 , and were incubated for 3 min at 37°C. Determination of the aconitase activity was similar to that of Fig. 4.

結果

タイロンは二価銅イオンに対してアスコルビン酸以上の還元力を示したがある程度濃度を上げると効果が低下した (Fig. 2)。またラジカル DPPH に対してはアスコルビン酸以上の強い反応性を示し、強力な抗酸化能を示唆した (Fig. 3)。

パン酵母アコニターゼの失活に対するタイロン/鉄の効果を Figs. 4, 5 に示す。タイロンは金属イオンの添加なしでもアコニターゼを失活させたがその効果は二価鉄イオンあるいはカタラーゼを阻害するアジ化ナトリウム⁸⁾ によって増強されなかった。アジ化ナトリウムと鉄が共存することにより強力な失活効果が得られた。アスコルビン酸は鉄の存在にかかわらずタイロンによるアコニターゼの失活を

解除した (Fig. 4)。タイロンによるアコニターゼの失活は鉄の存在にかかわらず時間依存的 (Fig. 5A) かつ濃度依存的 (Fig. 5B) であった。鉄による増強効果はある程度高濃度 (0.1 mM 以上) のタイロンを添加した場合に限られた。

遷移金属として鉄の代わりに銅イオンを用いた時のアコニターゼの失活を Fig. 6 に示す。この条件でアスコルビン酸は銅イオンの還元を介して、活性酸素を生成し、アコニターゼを失活させるが、タイロンはそれ以上に強力な失活効果を示す。が、その一方でアスコルビン酸による失活を解除した。

考 察

アコニターゼは活性酸素に対して最も鋭敏に反応して失活する。タイロン添加によるアコニターゼの失活に対してアジ化ナトリウムによる失活効果の増強がないことからタイロンは単独でスーパーオキシドを生成するものと推測される。鉄との結合が強いことからアコニターゼの活性中心にある鉄を攻撃するという可能性も考えられるが、その場合二価鉄イオンの添加はアコニターゼを保護すると予想されるにも関わらず全く効果がないことはタイロンによるアコニターゼの失活がスーパーオキシド産生によるものであることを示唆する。さらにタイロンは遷移金属存在下で過酸化水素を生成することが明らかになった。タイロンは活性酸素の消去あるいは生成阻害の機能が注目されてきた¹⁻⁴⁾ 一方で細胞毒性も報告されており、その効果は強力な鉄キレート能による鉄欠乏⁵⁾ あるいは活性酸素の生成⁶⁾ と推測されている。今回の結果はタイロンの毒性がタイロン自体あるいはタイロン/金属複合体による活性酸素生成によることを示唆すると考えられる。

参考文献

- 1) Han YH, Park WH (2009) Tiron, a ROS scavenger, protects human lung cancer Calu-6 cells against antimycin A-induced cell death. *Oncology Reports* 21: 253-261.
- 2) Karna P, Zughaier S, Pannu V, Simmons R, Narayan S, Aneja R (2010) Induction of reactive oxygen species-mediated autophagy by a novel microtubule-modulating agent. *J Biol Chem* 285: 18737-18748.
- 3) Gundala SR, Yang C, Mukkavilli R, Paranjpe R, Brahmabhatt M, Pannu V, Cheng A, Reid MD, Aneja R (2014) Hydroxychavicol, a betel leaf component, inhibits prostate cancer through ROS-driven DNA damage and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 280: 86-96.
- 4) Kladna A, Aboul-Enein HY, Kruk I (2003) Enhancing effect of melatonin on chemiluminescence accompanying decomposition of hydrogen peroxide in the presence of copper. *Free Radic Biol Med* 34: 1544-1554.
- 5) Kim JS, Cho, EW Chung HW, Kim IG (2006) Effects of Tiron, 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid, on human promyelotic HL-60 leukemia cell differentiation and death. *Toxicology* 223: 36-45.
- 6) Kumar S, Kumar A, Pathania AS, Guru SK, Jada S, Sharma PR, Bhushan S, Saxena AK, Kumar HM, Malik, F. (2013) Tiron and trolox potentiate the autophagic cell death induced by magnolol analog Ery5 by activation of Bax in HL-60 cells. *Apoptosis* 18: 605-617.
- 7) 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.
- 8) Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 41: 462-474.