

## キノリン・キノロン化合物によるアコニターゼの失活と活性酸素生成機構

村上 恵子, 吉野 昌孝

(一宮研伸大学看護学部\*)

(受付 2018年8月31日, 受理 2018年9月25日)

## Quinoline and Quinolone-dependent Generation of Reactive Oxygen Species and the Inactivation of Aconitase

Keiko MURAKAMI, Masataka YOSHINO

Ichinomiya Kenshin College of Nursing, Ichinomiya\*

## Summary

Biological activity of quinoline and quinolone compounds was analyzed in relation to the generation of reactive oxygen species. Prooxidant properties of quinoline compounds including 8-hydroxyquinoline and its halogenated derivative, clioquinol that is known to induce SMON (subacute myelo-optico-neuropathy), and the quinolone compound, levofloxacin known as an antifungal agent were analyzed. 8-hydroxyquinoline (8-OHQ) and levofloxacin/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 superoxide anion radical may be responsible for the inactivation of aconitase. Stimulating effect of 8-OHQ and levofloxacin on the autooxidation of  $Fe^{2+}$  suggests that these compounds promoted the reduction of dioxygen molecule by ferrous ion. Clioquinol/iron complex also inactivated aconitase in the presence of cyanide, but clioquinol maintained the iron at reduced state without stimulation of the  $Fe^{2+}$  autooxidation, suggesting that clioquinol can generate ferryl ion ( $Fe^{2+}-O$ ), a strong reactive oxygen, resulting in the oxidative inactivation of aconitase.

キノリン誘導体, とくに8-ヒドロキシキノリン化合物は生理活性物質, さらに薬剤として利用されているものも多い。8-ヒドロキシキノリン (8-OHQ) の代表はトリプトファン代謝産物のキサントレン酸である。8-OHQ とその誘導体キサントレン酸は鉄の酸化に伴って活性酸素を生成することを以前に報告した<sup>1)</sup>。8-OHQ にハロゲンが導入された化合物のキノホルム (クリオキノール) (Fig. 1) は抗真菌作用, 抗原虫作用をもつ薬剤として開発されたが, その副作用としてスモン (SMON, subacute myelo-optico-neuropathy 亜急性脊髄視神経症) の原因物質として有名となった。スモンの原因としてクリオキノールと鉄の錯体が脂質過酸化を引き起こすなど活性酸素種がスモン発症と関連することが推測されている<sup>2)</sup>。今回, クリオキノール/鉄複合体の効果を8OHQ, キサントレン酸と比較し, クリオキノール・鉄複合体が活性酸素を生成することを明らかにするとともにこの複合体は通常の酸素一電子還元による活性酸素生成とは異なる機序によって活性酸素を生成し, 酵母アコニターゼを失活させることを見出した。キノロン化合物のレボフロキサシンによる活性酸素生成につい

ても合わせて報告する。

## 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 (東京), トリス (Trizma

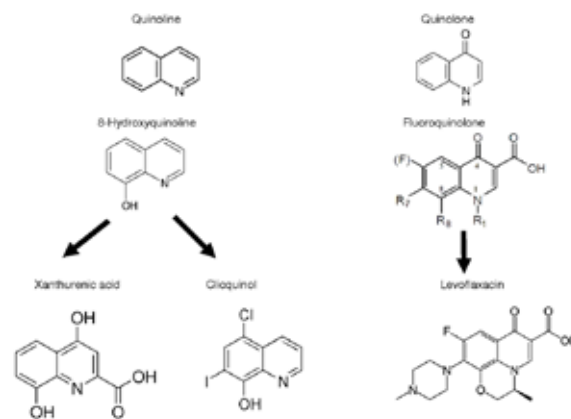


Fig. 1 Structures of quinoline, and quinolone compounds.

\*所在地: 愛知県一宮市常願通5-4-1 (〒491-0063)

base), パソフェナンスローリンニスルホン酸, クリオキノールはシグマアルドリッチジャパン (東京), キサンツレン酸, 8-OHQ, クエン酸は和光純薬, 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。

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<sup>3)</sup>。

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  $\mu$ l を 50  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, Figs. 2-4 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 10-15 分加温後, 800  $\times$  g にて 5 分間遠心し, 沈殿した酵母を 40  $\mu$ 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。

アコニターゼ活性の測定 - 上記の酵母懸濁液 5  $\mu$ l を 5 mM クエン酸, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 としして反応速度を算出した。

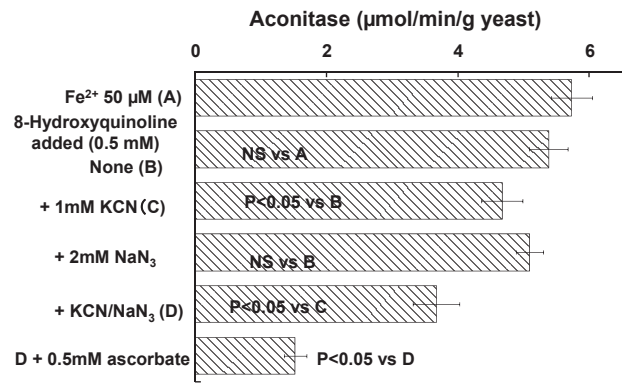
Dunnett 検定 - JMP5.IJ (SAS institute inc) を用いて各試料と対照の有意差を判定した。

二価鉄イオンの自動酸化 - 0.1 mM FeSO<sub>4</sub> と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 パソフェナンスローリンジスルホン酸 0.1 ml と反応させて, 535 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>4)</sup>。

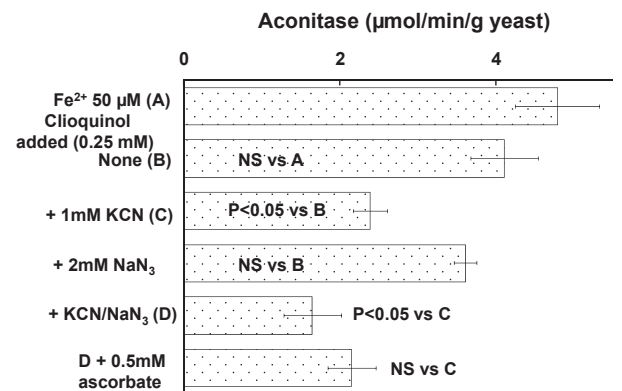
## 結果

8-OHQ の酵母アコニターゼに対する効果を Fig. 2 に示す。8-OHQ はシアン, アザイド存在下にアコニターゼを失活させたがその効果は弱かった。アスコルビン酸は失活効果を増強した。クリオキノールの効果を Fig. 3 に示した。クリオキノールはシアン存在下にアコニターゼを失活させた。アザイドによる相乗効果は著明でなく, アスコルビン酸は失活を増強しなかった。

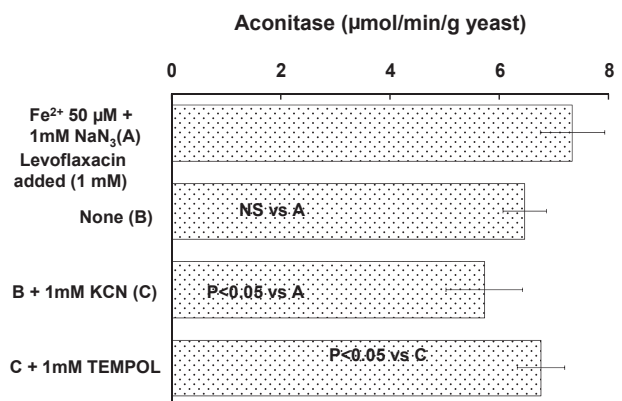
レボフロキサシンは Fig. 4 に示すようにアザイド/シアン存在下でアコニターゼを失活させ, その効果はスーパーオキシドを吸収する TEMPOL によって解除された ( $p < 0.05$ )。



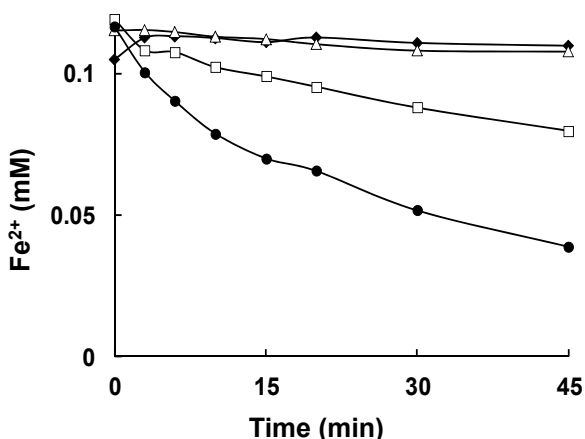
**Fig. 2** Effect of 8-OHQ/Fe complex on the activity of aconitase in baker's yeast. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) prepared according to the method reported previously<sup>4)</sup> were mixed with each compound in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1) After incubation at 37°C for 15 min, cells were collected 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<sub>2</sub>, 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).



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



**Fig. 4** Effect of levofloxacin on the activity of aconitase in baker's yeast. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 2 except that samples were incubated for 10 min. Error bars indicate Mean  $\pm$  SD (n = 3 or 5).



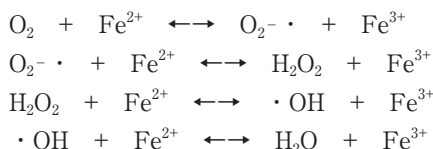
**Fig. 5** Effect of quinoline and quinolone compounds on the auto-oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{FeSO}_4$  of 0.1 mM was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.05 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 535 nm was recorded by microplate reader. ◆, no addition; △, 0.05 mM clioquinol; □, 0.05 mM 8OHQ; ●, 0.2 mM levofloxacin added.

キノリン・キノロン化合物の鉄自動酸化に対する効果を Fig. 5 に示した。8-OHQ とレボフロキサシンはともに二価鉄の酸化を促進したが、クリオキノールは酸化促進作用を全く示さなかった。

## 考 察

アジ化ナトリウム（アザイド）はカタラーゼを阻害するため<sup>5)</sup>、アザイドの添加によってアコニターゼの失活が増強すればその系は過酸化水素を主に生成すると推測される。一方スーパーオキシドはシトクロム c を還元するためシトクロムオキシダーゼと Cu, ZnSOD を阻害する KCN の添加によってアコニターゼの失活が増強されればその系は主にスーパーオキシドを生成すると推測される<sup>6,7)</sup>。KCN とアザイドが相加的に効果を表す時は KCN で阻害されない MnSOD によって生じる過酸化水素がアコニターゼの失活に関与していると推測される。

酸素の一電子還元は以下の順序で進行する。



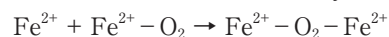
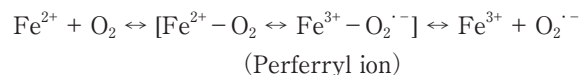
これは可逆反応なのでこの時還元性物質による二価鉄の供給がないと過酸化水素は分解されて残らない。



8-OHQ によるアコニターゼの失活がアスコルビン酸によって増強したのはアスコルビン酸による三価鉄の還元の結果、増加した二価鉄と過酸化水素の反応（Fenton 反応）

が起きたことによると考えられる。キノロン化合物であるレボフロキサシンのアコニターゼ失活効果も二価鉄の酸化による酸素の一電子還元によると考えられる。

一方クリオキノールは二価鉄を全く酸化せずしたがってアスコルビン酸の作用も受けない。これはクリオキノールが  $\text{Fe}^{2+}$  に優先的に結合する報告<sup>8)</sup> と対応しており、キノリン骨格に導入されたハロゲンの電子求引性の関与が示唆された。クリオキノールによるアコニターゼの失活は下記の機構で生じた強力な活性酸素種である Ferryl ion ( $\text{Fe}^{2+} - \text{O}$ ) の生成<sup>9)</sup> による可能性が考えられる。



クリオキノールが鉄を結合することからアコニターゼ活性中心の鉄を直接攻撃する可能性もある。しかしこの機構ではアコニターゼの失活にシアンが必須であることは説明がつかない。おそらくシアンによるシトクロムオキシダーゼの阻害がフェリルイオンによる攻撃にも何かの形で関与するものと考えられる。

## 参考文献

- 1) 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
- 2) Yagi K, Ohtsuka K, Ohishi N (1985) Lipid peroxidation caused by chinoxaline-ferric chelate in cultured neural retinal cells. *Experientia* 41: 1561-1563
- 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) Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40-44
- 5) Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 41: 462-474
- 6) Cooper CE, Brown GC (2008) The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* 40: 533-539
- 7) Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Assay of

- superoxide dismutase: Cautions relevant to the use of Cytochrome c, a Sulfonated Tetrazolium, and Cyanide. *Anal Biochem* 298: 337-342
- 8) Wang G, Hu W, Tang Q, Wang L, Sun XG, Chen Y, Yin Y, Xue F, Sun Z (2016) Effect comparison of both iron chelators on outcomes, iron deposit, and iron transporters after intracerebral hemorrhage in rats. *Mol Neurobiol* 53, 3576-3585
- 9) Qian SY, Buettner GR (1999) Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic Biol Med* 26: 1447-1456