

ヒドロキシ安息香酸／Fe 複合体による活性酸素生成機構

村上 恵子, 吉野 昌孝

(一宮研伸大学看護学部*)

(受付 2019年8月31日, 受理 2019年10月2日)

Generation of Reactive Oxygen Species by Dihydroxybenzoate/Iron Complex

Keiko MURAKAMI, Masataka YOSHINO

Ichinomiya Kenshin College of Nursing, Ichinomiya, Aichi 491-0063 Japan*

Summary

Biological activity of dihydroxybenzoates was analyzed in relation to the generation of reactive oxygen species. Prooxidant properties of *ortho*-, *para*- and *meta*- dihydroxybenzoate were analyzed. Protocatechuic acid (3,4 dihydroxybenzoate)/iron complex inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress in the presence of sodium azide, an inhibitor of catalase, indicating that hydrogen peroxide and/or superoxide may be responsible for the inactivation of aconitase. Inactivating effect of gentisic acid (2,5 dihydroxybenzoate) and 2,3-dihydroxybenzoate/iron complex required cyanide, an inhibitor of Cu/Zn SOD and cytochrome c oxidase, indicating that these compounds generates superoxide anion radical. Dihydroxybenzoates with 2,4-, 2,6- and 3,5-hydroxyl groups did not inactivate aconitase significantly in the presence of azide and cyanide. Stimulating effect of *ortho*- and *para*-dihydroxybenzoate on the autooxidation of Fe²⁺ suggests that these compounds promoted the reduction of dioxygen molecule by ferrous ion. *meta*-Dihydroxybenzoates showed little or no stimulation effect on Fe²⁺ autooxidation.

ヒドロキシ安息香酸誘導体は薬剤, およびその代謝産物として生体内で多様な活性を示し, その代表はモノヒドロキシ体のサリチル酸である。サリチル酸はアスピリンの代謝産物であるとともに, それ自体生物活性, 細胞毒性を示す^{1,2)}。一方, ジヒドロキシ安息香酸は多くの異性体を持ち, いくつかの植物に分布する天然ポリフェノールの分解産物で, 強力な鉄イオンキレート能を有する³⁾。今回は主にジヒドロキシ安息香酸／鉄イオン複合体の生理活性解析の一つとして活性酸素生成能をアコニターゼの失活を指標として検討しその構造特異性を解析した (Fig. 1)。

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 base), パソフェナンスローリンニルスルホン酸はシグマアルドリッチジャパン (東京), クエン酸は和光純薬 (大阪), NADP はロシュ・ダイアグノスティックス (東京), プロトカテキン酸その他のジヒドロキシ安息香酸 (Fig. 1) は東京化成 (大阪) の製品をそれぞれ用いた。

二価鉄イオンの自動酸化—0.1 mM FeSO₄ 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ニルスルホン酸 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⁴⁾。

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

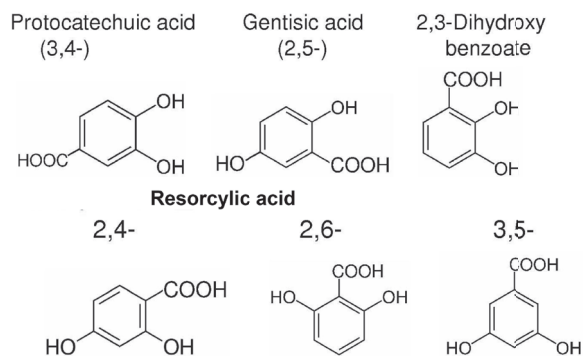


Fig. 1 Structures of dihydroxybenzoic acids

*所在地: 愛知県一宮市常願通5-4-1 (〒491-0063)

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⁵⁾。

アコニターゼ活性測定試料の調製—上記の透過性パン酵母懸濁液 50 μ l を 50 μ M FeSO₄, Figs. 2, 3 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 10-20 分加温後, 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。

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。

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。

結果

アコニターゼは活性中心の [4Fe-4S] 構造が活性酸素により破壊されることからその失活を活性酸素生成の指標とすることが可能である⁶⁾。パン酵母アコニターゼに対するジヒドロキシ安息香酸の効果をシアン/鉄プラスアジ化ナトリウム (アザイド) 存在下で Fig. 2 に示した。 *meta*-

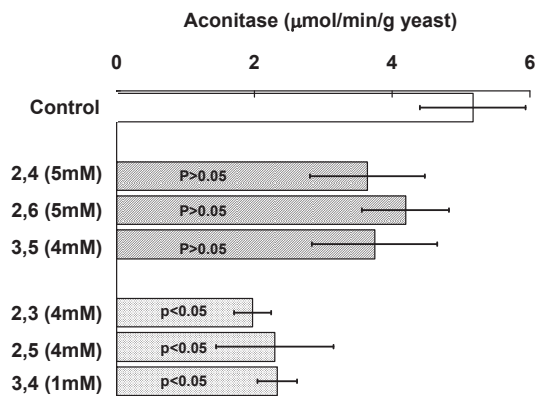


Fig. 2 Effects of dihydroxybenzoic acids on the activity of aconitase in baker's yeast. Permeabilized yeast cells (10 mg/ml) prepared according to the method reported previously⁴⁾ were mixed with each dihydroxybenzoic acid, 50 μ M FeSO₄, 1 mM NaN₃ and 1 mM KCN in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation 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 - 15).

位に水酸基を持つジヒドロキシ安息香酸の失活効果は小さかった。 *ortho*- 位に水酸基を持つ 2,3-, 3,4- と *para*- 位 2,5- のジヒドロキシ安息香酸はこの条件で強い失活効果を示した。

強い失活効果を持つ *ortho*-, *para*- 位ジヒドロキシ安息香酸/鉄複合体の鉄/アザイド存在下での効果を Fig. 3 に示した。3,4 位ジヒドロキシのプロトカテキン酸は強い失活効果を示したがその効果は Fig. 2 におけるシアン存在下と変わらなかった。同じく *ortho*- ジヒドロキシの 2,3 ジヒドロキシ安息香酸と 2,5 *para*- ジヒドロキシのゲンチジン酸のこの条件下での失活効果は Fig. 2 に比して弱く, これらによるアコニターゼの失活にはシアンが必要であることが示された。

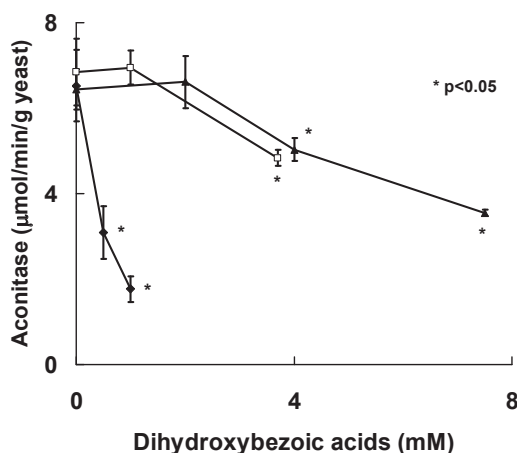


Fig. 3 Effect of *ortho*- and *para*- dihydroxybenzoic acids on the activity of aconitase in baker's yeast. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 2, except that preincubation mixtures did not contain KCN. \blacklozenge , protocatechuic acid (3, 4-); \square , 2, 3-dihydroxybenzoic acid; \blacktriangle , gentisic acid (2, 5-)

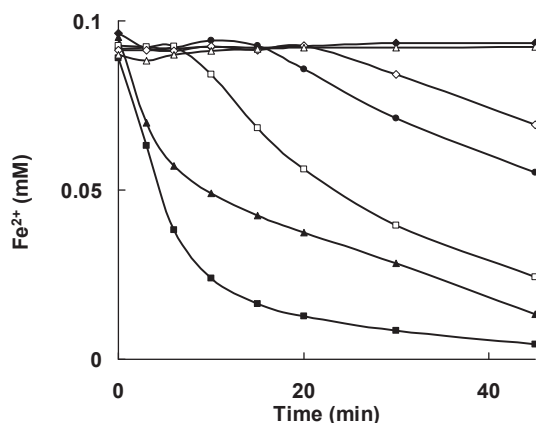


Fig. 4 Effect of dihydroxybenzoic acids on the autooxidation of Fe²⁺. FeSO₄ of 0.1 mM was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH 7.1) at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.05 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated time and the absorbance at 535 nm was recorded by microplate reader. \blacklozenge , no addition; \blacksquare , 3, 4-(0.05 mM); \blacktriangle , 2, 3-(0.1 mM); \square , 2, 5-(0.4 mM); \bullet , 2, 4-(0.4 mM); \diamond , 2, 6-(0.4 mM); Δ , 3, 5-(0.4 mM) dihydroxybenzoic acids added.

Table 1

Effect of Dihydroxybenzoate on the Autooxidation of Fe²⁺ Ion

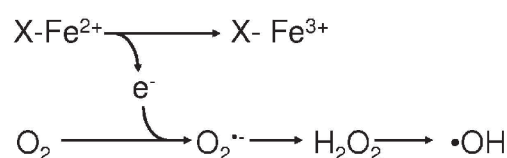
	<i>t</i> _{1/2} (min)
<i>ortho</i> -, <i>para</i> -	
3,4- (Protocatechuic acid)	4.6
2,3- (2-Pyrocatechuic acid)	10
2,5- (Gentisic acid)	22
<i>meta</i> -	
2,4- (β-Resorcylic acid)	50
2,6- (γ-Resorcylic acid)	>50
3,5- (α-Resorcylic acid)	∞

ジヒドロキシ安息香酸の二価鉄酸化反応に対する促進効果を Fig. 4 に示す。3,4 のプロトカテキン酸がもっとも強く 2,3 ジヒドロキシ安息香酸がそれに次いだ。以下 2,5 のゲンチジン酸, 2,4, 2,6- のレゾルシン酸の順に酸化を促進した。3,5- は全く酸化を促進しなかった。二価鉄酸化反応の半減期を算出して Table 1 に示した。*ortho*-, *para*- グループと *meta*- グループの間で酸化促進作用の差が明確に認められた。

考 察

アコニターゼは活性酸素に最も鋭敏に反応して失活する酵素である。アコニターゼは活性中心 [4Fe-4S] 構造の鉄の一原子が活性酸素スーパーオキシドによって除去されることにより失活する。したがってアコニターゼの失活は非常に鋭敏な活性酸素検出の指標となる⁷⁾。アザイドはカタラーゼを阻害するため⁸⁾、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失活は過酸化水素あるいはスーパーオキシドによるものと推測される。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 c 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^{9,10)}。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。

Table 1 に示したように酸化促進の強さとアコニターゼに対する失活効果はほぼ平行である。*ortho*- と *para*- の位置に水産基を持つジヒドロキシ安息香酸は 2 価鉄より 3 価鉄を優先的に結合する結果鉄の酸化を促進し酸素の一電子還元を介してスーパーオキシドや過酸化水素を生成すると考えられる。3,4 のプロトカテキン酸はアザイドの効果が著明でありシアンによる増強が認められないことから主に過酸化水素を生成し、2,3- と 2,5- のジヒドロキシ安息香酸はアザイドの効果が弱くシアンとアザイドの相乗効果が強いことから主にスーパーオキシドを生成すると推測された。



一方 *meta*- 位置のジヒドロキシ安息香酸の鉄酸化促進は弱く活性酸素傷害を起こす可能性は低いと推測された。

参考文献

- Needs CJ, Brooks PM (1985) Clinical pharmacokinetics of the salicylates. *Clinical Pharmacokinetics* 10: 164-177
- Madan RK, Levitt J (2014) A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. *J Am Acad Dermatol* 70: 788-792
- Wang J, Buss JL, Chen G, Ponka P, Pantopoulos K (2002) The prolyl 4-hydroxylase inhibitor ethyl 3,4-dihydroxybenzoate generates effective iron deficiency in cultured cells. *FEBS Lett* 529: 309-312
- Yoshino M, Murakami K (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to anti-oxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40-44
- 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
- Gardner PR, Fridovich I (1992) Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *J Biol Chem* 267: 8757-8763
- Babu BN, Brown OR (1995) Quantitative effects of redox-cycling chemicals on the oxidant-sensitive enzyme dihydroxy-acid dehydratase. *Microbios*. 82: 157-70
- Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 41: 462-474
- 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
- 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