

## アミノフェノール／遷移金属イオン複合体による活性酸素生成と構造特異性

村上 恵子, 吉野 昌孝

(一宮研伸大・看護\*)

(受付 2020年8月31日, 受理 2020年10月7日)

## Aminophenol/Transition Metal Complex-dependent Generation of Reactive Oxygen Species and its Structural Specificity

Keiko MURAKAMI, Masataka YOSHINO

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

## Summary

Prooxidant properties of aminophenol compounds including 2-(*o*-), 4-(*p*-) and 3-(*m*-) isomers were analyzed. Aminophenol compounds/transition metal-dependent production of reactive oxygen species was evidenced by the inactivation of aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress in permeabilized yeast cells. Aminophenol compounds of 2-, and 4-isomers produced reactive oxygen species in the presence of copper (cupric) ion. The inactivation required sodium azide the inhibitor of catalase, suggesting that the superoxide radical produced from the 2- and 4-aminophenol/transition metal complex is responsible for the inactivation of aconitase. However, 3-aminophenol compound showed no inactivating effect on the aconitase, and 3-isomer did not produce the reactive oxygen species. Aminophenols of 2- and 4-isomers showed a potent reducing activity of copper (cupric) ion, and further scavenging activity of DPPH radical, but 3-aminophenol showed only a little effect. Reducing activity of aminophenols may produce periferfryl ion and causing continuous generation superoxide anion by redox cycling. Acetaminophen showed no prooxidant activity, but 4-aminophenol the constituent of this drug could produce reactive oxygen species in the presence of transition metals. Side effect of excess acetaminophen may be related to the prooxidant activity of aminophenol/metal complex.

アミノフェノールは3種の異性体 (*ortho*-, *para*-, *meta*-) をもち、医薬、各種染料の合成中間体として用いられている。異性体の中、4-アミノフェノール (*p*-aminophenol) を骨格としてもつメサラジン (5-aminosalicylate) は抗炎症・抗ガン作用をもつ薬剤として利用されている<sup>1)</sup>。同骨格をもつ解熱鎮痛薬のアセトアミノフェン (4-acetamidophenol, paracetamol) は過剰投与による腎臓毒性が知られている<sup>2)</sup>が、投与後代謝されて4-アミノフェノールを生成する。一方、異性体の3-アミノフェノール (*m*-aminophenol) は抗結核薬、PAS (4-aminosalicylate) の骨格構造を構成している。今回、これらの薬剤の生理機能の解析を目的として、基本骨格であるアミノフェノールによる活性酸素生成を見出し、その構造特異性を解析した。

## 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 (東京)、トリス (Trizma base)、DPPH (2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル)、パソフェナントロリン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、アスコルビン酸は富士フィルム和光純薬 (大阪)、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) はカーク (名古屋)、NADP はロシュ・ダイアグノスティックス (東京)、3種のアミノフェノールとアセトアミノフェン (Fig.1) は東京化成 (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>。

\*所在地: 愛知県一宮市常願通5-4-1 (〒491-0063)

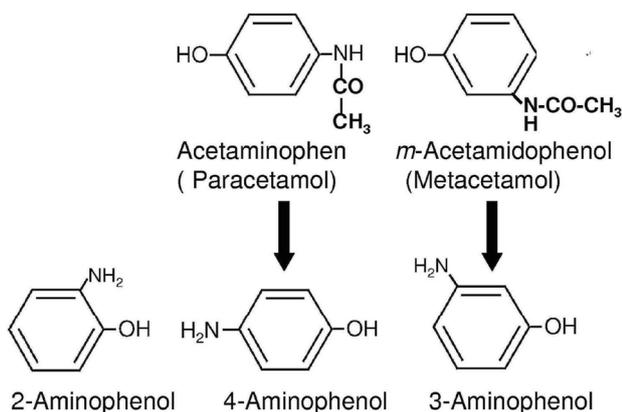


Fig. 1 Structure of aminophenol compounds

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  $\mu$ l を 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 分加熱後, 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 として反応速度を算出した。

還元力の測定—0.1 mM CuSO<sub>4</sub>, 0.5 mM ネオクプロイン, 10 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) と各濃度のアミノフェノール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 と各濃度のアミノフェノール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。

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 バソフェナントロリンスルホン酸 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>。

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。

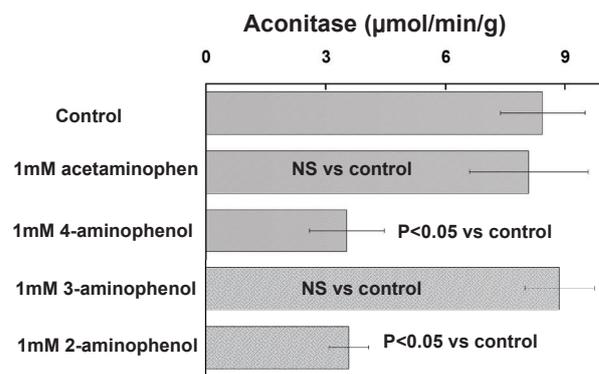
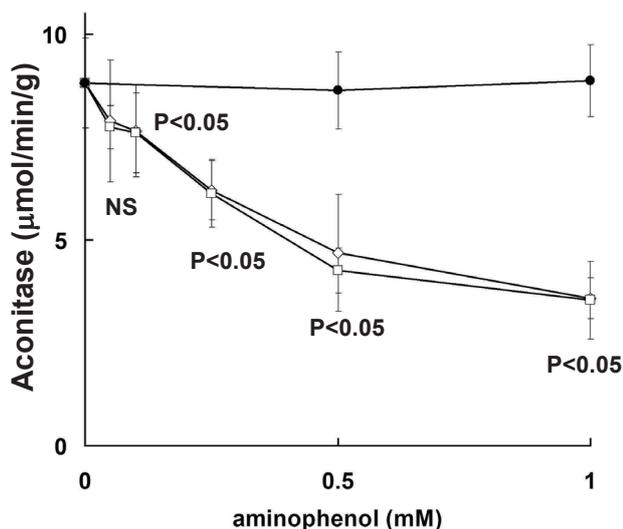


Fig. 2 Effects of aminophenols and acetaminophen on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of Cu/NaN<sub>3</sub>. Mixtures containing each aminophenol and acetaminophen, 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> and 1 mM NaN<sub>3</sub> in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1) were preincubated at 37°C for 5 min. Permeabilized yeast cells prepared according to the method reported previously<sup>3)</sup> were added at the concentrations of 10 mg/ml. 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<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. Data represent mean  $\pm$  SD of three different determinations.

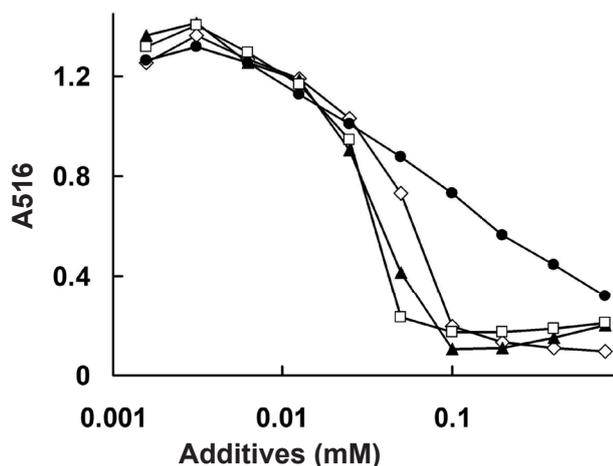
## 結果

アセトアミノフェン, 及びアミノフェノール化合物の活性酸素生成能を検討した。銅イオン/アジ化ナトリウム存在下で 37°C, 5 分間のブレインキュベーションによりアコニターゼの失活を指標として活性酸素の生成を調べた。アセトアミノフェン自体はアコニターゼを失活させなかった。2-, 4-アミノフェノールはアコニターゼを失活させたが, 3-アミノフェノールは失活効果を示さなかった (Fig. 2)。失活の濃度依存性を Fig. 3 に示した。アミノフェノール/遷移金属によるアコニターゼの失活はアジ化ナトリウム添加が必須条件であるが, アジ化ナトリウム自体は阻害作用を示さない。コントロールのアコニターゼ活性はアジ化ナトリウム添加・無添加の両条件で差を認めなかった。アジ化ナトリウムはカタラーゼの阻害剤として働く<sup>5)</sup>ため, アジ化ナトリウム存在下でのアコニターゼ失活はスーパーオキシド, あるいは過酸化水素のいずれかによるアコニターゼの失活を示唆しているが, アコニターゼ失活に対するスーパーオキシドの速度定数は  $3 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> であるのに対して, 過酸化水素は  $10^3$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> であること<sup>6,7)</sup>に基づけば, アコニターゼの失活はスーパーオキシドの生成によるものと推測される。

2-および4-アミノフェノールは2価銅イオンに対してアスコルビン酸と同程度の還元力を示したのに対し3-アミノフェノールの還元力は弱かった (Fig. 4)。また抗酸化活性測定法として使用されている DPPH ラジカル消去活



**Fig. 3** Dose dependent effects of aminophenols on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of  $\text{Cu}/\text{NaN}_3$ . Experimental conditions were similar to those described in Fig.2. NS indicates not significant versus no addition and  $p < 0.05$  indicates significant versus no addition.  $\diamond$ , 4-aminophenol;  $\square$ , 2-aminophenol;  $\bullet$ , 3-aminophenol.



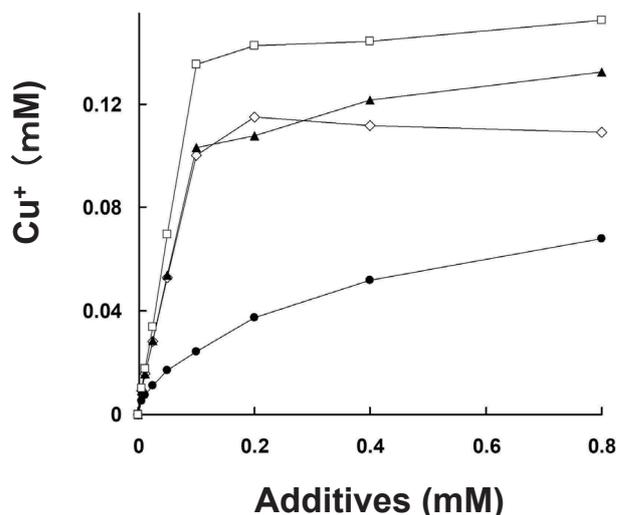
**Fig. 5** Scavenging activity of aminophenols and ascorbate on the DPPH radical. Aminophenols and ascorbate of various concentrations were incubated with 0.2 mM DPPH in a total volume of 1 ml ethanol for 30 min. Change in the absorbance at 516 nm was recorded.  $\diamond$ , ascorbate;  $\square$ , 2-aminophenol;  $\blacktriangle$ , 4-aminophenol;  $\bullet$ , 3-aminophenol added.

性をアミノフェノール化合物に応用した。2, 4 アミノフェノールのラジカル消去活性はアスコルビン酸よりもさらに強力であるのに対して、3-アミノフェノールの消去活性は一桁弱かった (Fig.5)。DPPH ラジカル消去活性は還元力の強さと同等の意味を持ち、酸化銅の還元力の測定と DPPH ラジカル消去活性はよく一致していた。

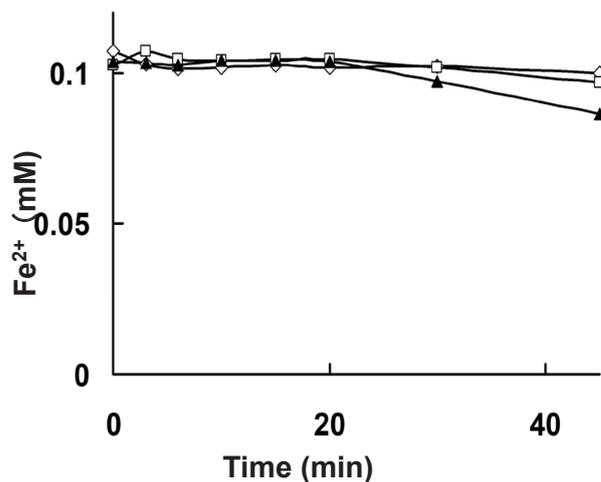
2, 4 アミノフェノールは二価鉄イオンの酸化を促進せず鉄を還元状態に保った (Fig.6)。

### 考 察

アミノフェノール化合物の中でアミノ基と水酸基を2,



**Fig. 4** Effects of aminophenols 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  $\text{CuSO}_4$ , various concentrations of compounds and 0.5 mM neocuproine-HCl. The mixture was incubated at room temperature, and the absorbance at 456 nm was recorded.  $\diamond$ , ascorbate;  $\square$ , 2-aminophenol;  $\blacktriangle$ , 4-aminophenol;  $\bullet$ , 3-aminophenol added.



**Fig. 6** Effect of aminophenols on the autooxidation of  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{FeSO}_4$  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.  $\diamond$ , no addition;  $\square$ , 0.2 mM 4-aminophenol;  $\blacktriangle$ , 0.2 mM 2-aminophenol added.

及び4位にもつものは金属イオン存在下においてアコニターゼを失活させるのに対して、3-位のアミノフェノールはアコニターゼ失活作用を示さないことが明らかとなった。アコニターゼ失活作用はアジ化ナトリウム存在下で起こることから、スーパーオキシド、あるいは過酸化水素によると考えられるが、両者のアコニターゼに対する速度定数<sup>6,7)</sup>から、スーパーオキシドによるものと推測される。還元性物質による活性酸素生成に遷移金属とアジ化ナトリウムが必要であることは先に示した<sup>8)</sup>。

還元型遷移金属イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) からスーパーオキシドの生成経路の一つは還元型遷移金属イオンの酸化の促進に伴う酸素分子の直接の一電子還元であり、デフェリブ

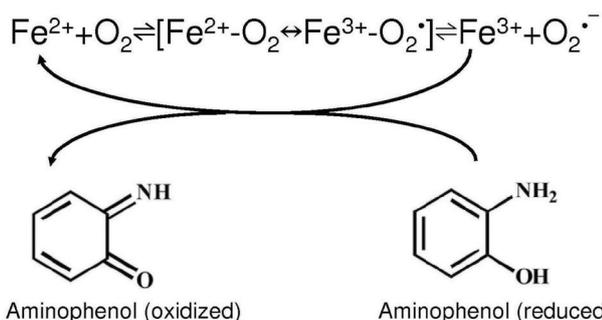


Fig. 7 Generation of superoxide anion radical by 2-aminophenol/transition metal complex

ロン, ミモシン<sup>9)</sup>, キノリン骨格をもつキサントレン酸<sup>10)</sup>などによる活性酸素生成の例を示してきた。一方今回示したように強い還元力を有する化合物の場合は Fig. 7 に示すようなメカニズムが想定される。強力な還元力により還元状態に留まった遷移金属イオンは酸素と反応して強力なプロオキシダントのペルフェリルイオン ( $[\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{O}_2 \cdot^-]$ ) を生成する。ペルフェリルイオンはアコニターゼの失活を初めとして、各種の酸化傷害を引き起こす。さらにペルフェリルイオンはスーパーオキシドを生成するが、生じた酸化型遷移金属イオンはアミノフェノールの還元力により再び還元されるため、ペルフェリルイオンからスーパーオキシドの生成が継続して行われることとなる。

アミノフェノール化合物は、アミノ基がアセチル化されたアセトアミノフェンが薬剤として多用されている物質であるが、本稿で示したようにアセトアミノフェン自体は活性酸素生成能を示さない。一方、アセトアミノフェンの過剰投与の副作用として肝毒性が知られているが、アセトアミノフェンが生体内で代謝されて生成した4-アミノフェノールの関与が推定される。一方、アセトアミノフェンの異性体である3-アセトアミドフェノール (Metacetamol) には特別な生物活性・毒性は知られていないことも3-アミノフェノールが活性酸素を生成しないことと対応する。

## 参考文献

- 1) Miles AM, Grisham MB (1994) Antioxidant properties of aminosalicylates. *Methods Enzymol.* 234: 555-572
- 2) Roland C, Blantz MD (1996) Acetaminophen: Acute and chronic effects on renal function. *Am J Kidney Diseases* 28: S3-S6
- 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) Gardner PR, Fridovich I (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* 266: 19328-19333
- 7) Jang S, Imlay JA (2007) Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J Biol Chem* 282: 929-37
- 8) 村上恵子, 細川好孝, 吉野昌孝 (2016) タイロンによる活性酸素生成の促進と抑制 *微量栄養素* 33: 31-34
- 9) Murakami K, Yoshino M (2020) Generation of reactive oxygen species by hydroxypyridone compound/iron complexes. *Redox Report* 25: 59-63
- 10) 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