

## 尿酸、キノリン環化合物 / 遷移金属複合体による活性酸素生成

村上 恵子, 吉野 昌孝

(一宮研伸大・看護\*)

(受付 2021年8月31日, 受理 2021年10月6日)

## Uric Acid, Quinoline Compounds/Transition Metal Complex-dependent Generation of Reactive Oxygen Species

Keiko MURAKAMI, Masataka YOSHINO

Ichinomiya Kenshin College of Nursing

## Summary

Prooxidant properties of uric acid and xanthurenic acid as quinoline compound were analyzed. Production of reactive oxygen species was evidenced by the inactivation of aconitase, the most sensitive enzyme to oxidative stress in permeabilized yeast cells. Uric acid and xanthurenic acid produced reactive oxygen species in the presence of iron (ferrous) ion. The inactivation required sodium azide the inhibitor of catalase and KCN the inhibitor of Cu,Zn-SOD and cytochrome c oxidase, suggesting that the superoxide radical produced from these compounds/transition metal complex is responsible for the inactivation of aconitase. Uric acid showed a potent reducing activity of copper (cupric) ion, and further scavenging activity of DPPH radical, and xanthurenic acid showed reducing activity lower than uric acid. Uric acid and xanthurenic acid may produce periferferyl ion and causing continuous generation superoxide anion by redox cycling. Toxicity of these compounds may be related to their prooxidant activities.

プリン塩基の酸化によって生じた尿酸, トリプトファン  
の代謝産物でキノリン環をもつ8-キノリノール化合物の  
キサントレン酸は共に抗酸化活性をもつが, 同時に活性酸  
素・酸化障害との関連を示し, 多くの病態と関連する<sup>1-3)</sup>。  
いずれも強力な遷移金属結合能をもつが, 結合には環上の  
窒素原子(プリン環の7位, キノリン環の1位)と環(プ  
リン環の6位, キノリン環の8位)につく水酸基の酸素原  
子が関与している(Fig.1)。この共通構造に基づき両化合  
物と遷移金属との複合体による活性酸素生成を見出し, 結  
果から両者の病態生理機能との関連を考察した。

## 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(NADP-ICDH)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  
クテリルヒドラジル)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, キサントレン酸, アジ  
化ナトリウム, シアン化カリウム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)の製品をそれぞれ用いた。

膜透過性パン酵母の調製—酵母5倍懸濁液(0.4Mソルビ  
トール, 0.2Mリン酸カリウムpH7.4を含む)に, 酵母の  
25倍量トルエンを加えて45°Cで2.5分間加温後, 遠心分離  
によって酵母を回収し, 4倍量の0.2M Tris-HCl緩衝液(pH  
7.1)に懸濁した。これによって酵母は透過性を増し酵素活  
性を細胞そのまま(in situ)で測定できるようになる<sup>4)</sup>。

アコニターゼの失活—透過性パン酵母10mg/mLを各  
濃度の化合物と共に40mM Tris-HCl(pH7.1)中で37°C  
にて10分間加温した後遠心して回収し, 4倍量の0.2M  
Tris-HCl(pH7.1)に懸濁した。

アコニターゼ活性の測定—5mMクエン酸, 0.25mM  
NADP, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 10unit/mL NADP-ICDH, 1mg/  
mLパン酵母, 0.1M Tris-HCl(pH7.8)存在下に340nm  
の吸光度増加を記録して算出した。

銅の還元—ネオクプロインによる450nmの発色により  
Cu<sup>+</sup>を定量した。

ラジカル消去能—安定なラジカルDPPHの520nmの吸  
光度減少により測定した。

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。

\*所在地: 愛知県一宮市常願通5-4-1 (〒491-0063) Ichinomiya, Aichi 491-0063 Japan

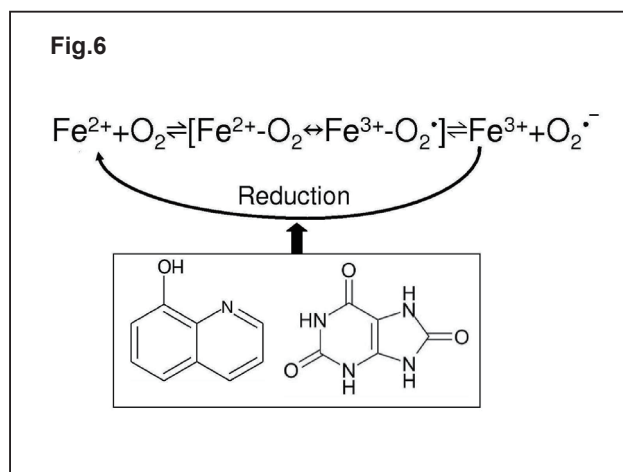
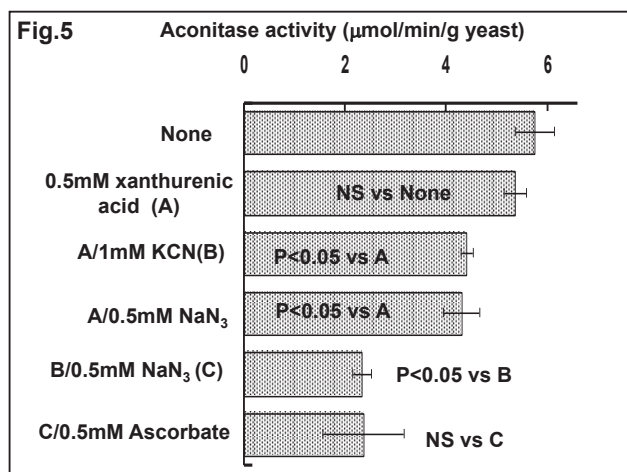
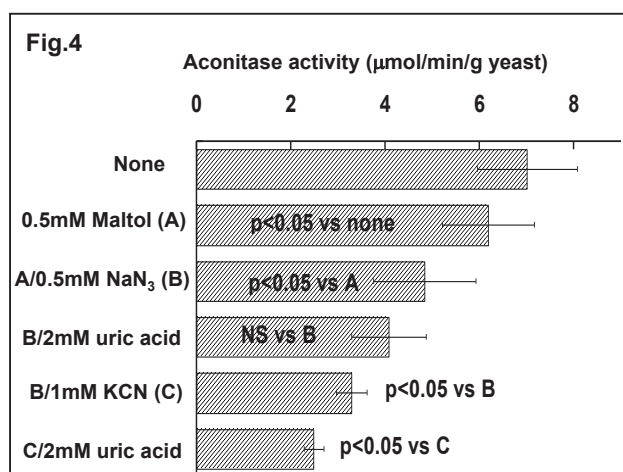
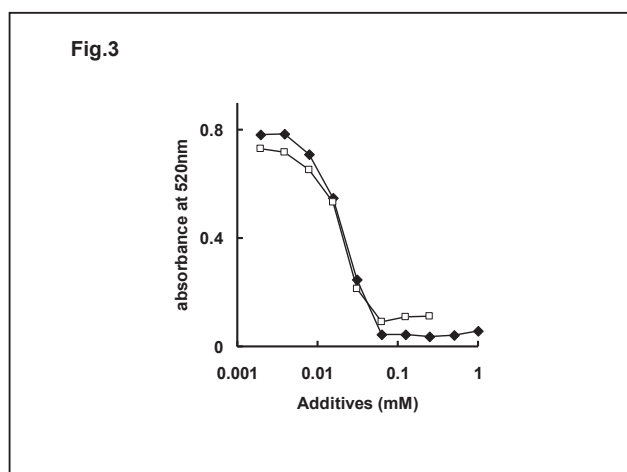
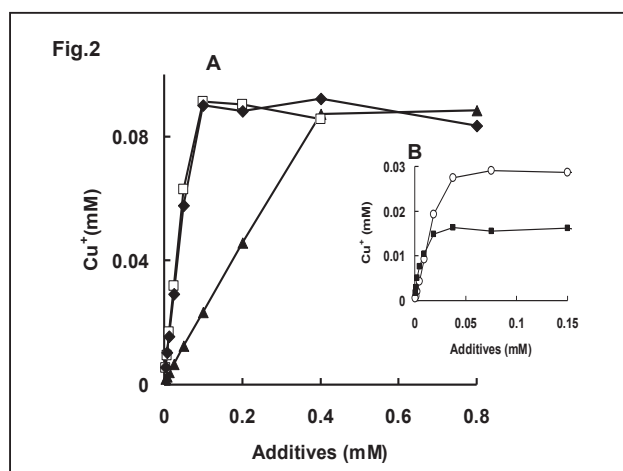
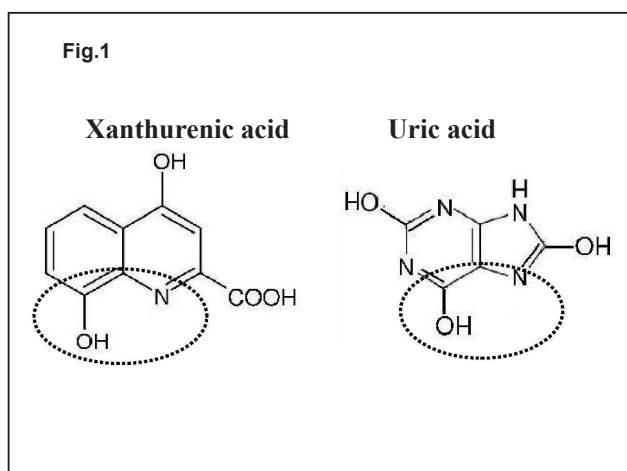


Fig. 1 Structure of xanthurenic acid and uric acid

Fig. 2 Reduction of copper ion by uric acid, xanthurenic acid and ascorbate.

Reaction mixture of 0.25 mL contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 mM (A) or 0.03 mM (B)  $\text{CuSO}_4$ , various concentrations of compounds and 0.5 mM neocuproine-HCl. The mixture was incubated at room temperature, and the absorbance at 450 nm was recorded. A  $\blacklozenge$ , ascorbate;  $\square$ , uric acid;  $\blacktriangle$ , cysteine. B  $\circ$ , ascorbate;  $\blacksquare$ , xanthurenic acid.

Fig. 3 Scavenging activity of uric acid and ascorbate on the DPPH radical.

Uric acid 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 520 nm was recorded.  $\blacklozenge$ , ascorbate;  $\square$ , uric acid.

Fig. 4 Effects of uric acid and maltol on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$ .

Permeabilized yeast cells prepared according to the method reported previously<sup>4)</sup> were added to mixtures containing each compound and 50 mM  $\text{FeSO}_4$  in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1) at the concentrations of 10 mg/mL. After incubation at 37  $^\circ\text{C}$  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 coupling with NADP-isocitrate dehydrogenase. Reaction mixture contained 5 mM citrate, 0.25 mM NADP, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mU/mL of NADP-isocitrate dehydrogenase and 1 mg/mL of yeast. The increase in the absorbance at 340 nm was recorded. Data represent mean  $\pm$  SD of five or six different determinations.

Fig. 5 Effect of xanthurenic acid on the activity of aconitase.

Experimental conditions were similar to those described in Fig. 4.

Fig. 6 Mechanism of the generation of superoxide radical by quinoline compound and uric acid.

## 結 果

尿酸はアスコルビン酸と同等の強力な銅イオンの還元作用 (Fig. 2 A) と DPPH ラジカル消去能 (Fig. 3) を示した。キサンツレン酸の還元力はアスコルビン酸の 60% 程度であった (Fig. 2B)。DPPH 消去能は還元力と対応することが示されており、この場合には尿酸のラジカル消去能、すなわち還元力はアスコルビン酸に匹敵することが確認された。

アコニターゼの活性中心は鉄-硫黄クラスターの構造をもち、活性酸素の攻撃を受けて、一個の鉄原子が遊離し、その活性を失う。そのため、アコニターゼ活性の測定は活性酸素の最も鋭敏なセンサーとして利用できる<sup>5)</sup>。

先に報告したようにヒドロキシケトン構造をもつマルトールは還元鉄イオンの酸化促進に対応して活性酸素 (スーパーオキシド) を生成し、アコニターゼを失活させる<sup>6)</sup>。尿酸はマルトールの失活効果をアジ化ナトリウムとシアン存在下に増強した (Fig. 4)。シアンは Cu, Zn-SOD およびシトクロム c オキシダーゼを害することから<sup>7,8)</sup> この失活はスーパーオキシドによるものと推測され、尿酸は還元鉄を供給することによってスーパーオキシド生成を増強すると推測された。マルトールが存在しない尿酸 / 鉄のみはアジ化ナトリウム、シアン存在下でアコニターゼを失活させなかった。また尿酸は強い還元力を持つアスコルビン酸あるいはアミノフェノール<sup>9)</sup> と異なり銅イオン存在下にパン酵母アコニターゼを失活させることはなかった (Data not shown)。

一方キサンツレン酸は鉄存在下に単独でパン酵母アコニターゼを失活させ、その効果はシアンおよびカタラーゼを阻害する<sup>10)</sup> アジ化ナトリウムによって増強された (Fig. 5)。このことからキサンツレン酸 / 鉄はスーパーオキシドあるいは過酸化水素を生成することが示唆された。還元力を持つアスコルビン酸はキサンツレン酸の失活効果に影響しなかった。キサンツレン酸の存在しない鉄のみはアジ化ナトリウム、シアン存在下にアコニターゼを失活させなかった (Data not shown)。

## 考 察

尿酸は強い還元力を持つが一価銅イオンによる酸素分子の還元を促進することはないと思われる。しかし二価鉄の酸化による活性酸素生成系に還元鉄を供給することにより活性酸素特にスーパーオキシドの生成を増加させる可能性があることが示唆された。尿酸による関節炎 (痛風) は尿酸結晶に対する異物反応が主であると考えられるが、その還元力による活性酸素生成が炎症を増悪させる要因になるのではないかと推測される。一方キサンツレン酸のプロオキシダント効果は強くキサンツレン酸の関連する多くの病態はこのプロオキシダント能によるところが大きいと考えられる<sup>11)</sup>。

プリン、キノリン環ともリング上の "N", "O" 原子から供与される電子により結合した遷移金属を還元し、さらに酸素を還元して活性酸素を生成することにより、プロオキシダントとして機能することが示唆された (Fig. 6)

## 参考文献

- 1) 嶺尾 郁夫 (2008) メタボリックシンドロームにおける高尿酸血症の病態意義: 歴史的経緯から最近の知見まで 痛風と核酸代謝 32: 121-132.
- 2) Kotake Y (1955) Xanthurenic acid, an abnormal metabolite of tryptophan and the diabetic symptoms caused in albino rats by its production. J Vitaminol 1:73-87.
- 3) Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Egerton M, Christofides J, Stone TW, Darlington LG (2004) Tryptophan loading induces oxidative stress. Free Radical Res 38: 1167-1171.
- 4) 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.
- 5) Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CR (1995) Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. J Biol Chem 270: 13399-13405.
- 6) Murakami K, Ishida K, Watakabe K, Tsubouchi R, Haneda M, Yoshino M (2006) Prooxidant action of maltol: Role of transition metals in the generation of reactive oxygen species and enhanced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA. Biometals 19: 253-57.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 村上 恵子, 吉野 昌孝 (2020) 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 微量栄養素 37: 24-27.
- 10) Theorell H, Ehrenberg A (1952) The reaction between catalase, azide and hydrogen peroxide. Arch Biochem Biophys 41: 462-474.
- 11) Murakami K, Haneda M, Yoshino M (2006) Prooxidant action of xanthurenic acid and quinoline com-

pounds: 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.