

ジピコリン酸による銅イオン依存性酸化傷害の防御機構

村 上 恵 子, 羽根田 みや子, 吉 野 昌 孝

(愛知医大・医・生化*)

Protective Effect of Dipicolinic Acid on Copper-dependent Oxidative Damage

Keiko MURAKAMI, Miyako HANEDA and Masataka YOSHINO

*Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,
Nagakute, Aichi 480-1195, Japan*

Protective effects of dipicolinic acid (pyridine 2,6-dicarboxylic acid) on copper-dependent LDL oxidation and DNA strand breaks were analyzed in relation to the inhibition of the copper reduction. Dipicolinic acid inhibited the copper-mediated oxidation of low density lipoprotein, whereas other pyridine carboxylates showed only a little protective action. Dipicolinic acid further exhibited the copper-dependent DNA strand breaks. Dipicolinic acid showed a potent inhibitory activity against copper reduction by LDL itself and gallic acid. Protection by dipicolinic acid against copper-dependent injuries of LDL and DNA can be explained by the inhibition of copper reduction, that is the formation of cuprous ion the prooxidant.

ジピコリン酸（ピリジン2,6-二カルボン酸-図参照）はバチルス属のバクテリアが産生するピリジン化合物であり納豆菌（*Bacillus natto*）を利用する発酵食品である納豆に多く含まれている。納豆には機能性食品としての特徴が多く指摘されており、そのうちの一つは血栓予防効果である。血栓の成因には動脈硬化の存在が最も深く関与しており動脈硬化発生の大きな要因は血中LDL（low density lipoprotein）に含まれるエステル化コレステロールの酸化である。酸化されたLDLはマクロファージに貪食され血管に沈着して血管壁を損傷する¹⁾。したがってLDL酸化の抑制は動脈硬化の発症を予防し血栓の防止に有効と推定される。

我々は先にジピコリン酸による脂質過酸化の阻害、酵素活性の保護を報告し、その効果は金属イオン（ Cu^+ , Fe^{2+} ）による活性酸素発生を阻止することによると推測した²⁾。今回はLDLとDNAの酸化傷害に対する銅イオンとピリジン化合物の効果をさらに検討したので報告する。

方 法

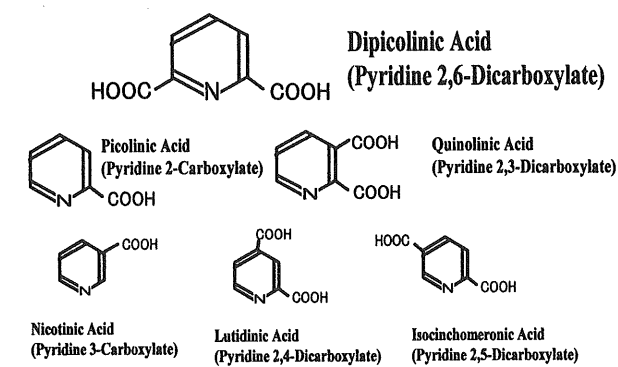
ヒト Low density lipoprotein (LDL) の酸化-ヒトLDL (Sigma製品) 0.025mg/mlを0.15M NaCl, 10mM potassium phosphate buffer (pH7.4), 1.5-2 μ M CuSO_4 存在下に37℃でインキュベートし234nmの吸光度を経時的に測定した。

DNAの切断-pBR322 プラスミドDNA0.5 μ gに0.1mM CuCl_2 , 0.1mM gallate（没食子酸=2,3,4三ヒドロキシ安息香酸）を加え、37℃で1時間インキュベートした後アガロースゲルにて泳動し、supercoil型, open circular型, linear型を分離することにより、DNA鎖の切断を定量化した³⁾。

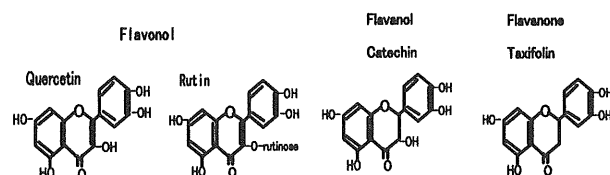
銅イオンの還元-0.05mM CuSO_4 をgallateまたはLDLと混合し、生じた Cu^+ をBathocuproine disulfonateと反応させて483または492nmの吸光度を測定した。

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作（480-1195）

Pyridine Compounds



Flavonoids



Scheme 1

結 果

5 μ Mのジピコリン酸は銅イオンによるLDLの酸化に対して酸化速度 (propagation rate) を低下させる効果を示した。他のピリジン化合物は銅イオン添加から酸化開始までの時間 (lag phase) を延長したが酸化速度に対しては大きな効果を示さなかった (Fig. 1A)。

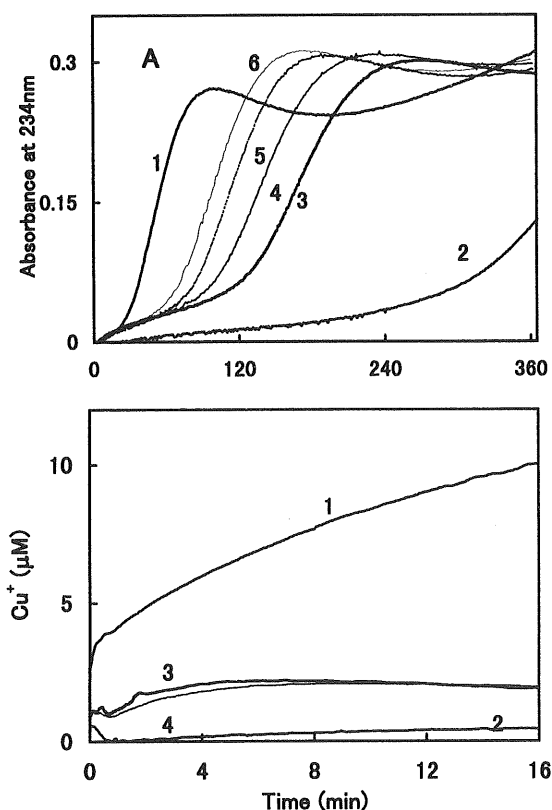


Fig.1 A. Effect of pyridine compounds on copper-mediated oxidation of human LDL. LDL was incubated at 37°C at a concentration of 25 μ g/ml in potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.15M NaCl, and 5 μ M pyridine compounds in a total volume of 1ml. The reaction was started by addition of 2 μ M CuSO₄ and oxidation of LDL was monitored at 234nm by the formation of conjugated dienes. Line 1, no additon; Line 2, dipicolinic acid; Line 3, picolinic acid; Line 4, quinolinic acid; Line 5, lutidinic acid; Line 6, isocinchomeronic acid added. B. Effect of pyridine compounds on the reduction of copper ion by human LDL. LDL was incubated in the same buffer as in A containing 0.1mM pyridine compounds and 0.5mM bathocuproine disulfonate. The reaction was started by addition of 50 μ M CuSO₄. Concentration of Cu⁺ was determined by measuring the absorbance at 483nm, the peak of absorption spectra in bathocuproine-Cu⁺ complex. Additives of lines 1 to 4 were similar to those described in A.

ジピコリン酸はLDLによる銅イオンの還元を阻止した。ピコリン酸、キノリン酸も還元銅の生成を低下させたが完全に阻止することはなかった (Fig. 1B)。

強い還元性を持つフラボノイドはLDLの酸化を促進した (Fig. 2A)。この促進効果は銅イオン添加以前に10 μ Mのジピコリン酸を加えることによって抑制された (Fig. 2B)。

スーパーコイル状態のプラスミドDNAを用いて1価銅イオンによる酸化傷害を検討した (Fig. 3)。DNAは0.1mM gallateとCuCl₂によって切断された (lane 4) が、0.1mMのジピコリン酸はこの傷害を完全に抑制した (lane 11)。他のピリジン2-カルボン酸はDNAの切断を阻害したがスーパーコイルからオープンサークル型、リニア型への移行に対しては保護効果を示さなかった (lane 5-8)。

ジピコリン酸を含むピリジン-2-カルボン酸はgallateによる銅イオンの還元を阻止した (Fig. 4)。

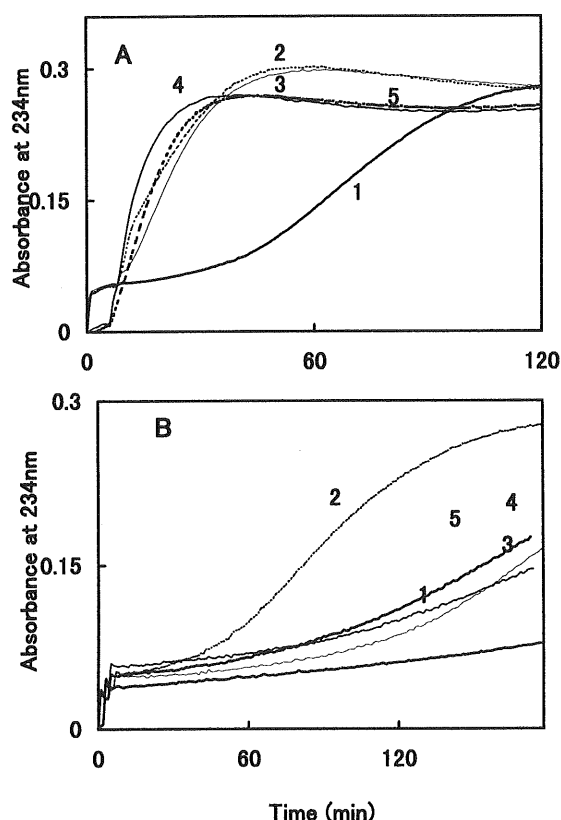


Fig.2 Activation of copper-mediated oxidation of human LDL by flavonoids (A) and its inhibition by dipicolinic acid (B). Incubation mixtures were same as those described in Fig.1A except that they contained 10 μ M dipicolinic acid in B. The reaction was started by addition of 2 μ M CuSO₄ and 0.5 μ M flavonoids were added 5minutes after Cu. Line 1, no additon; line 2, catechin; line 3, quercetin; line 4, rutin; line 5, taxifolin added.

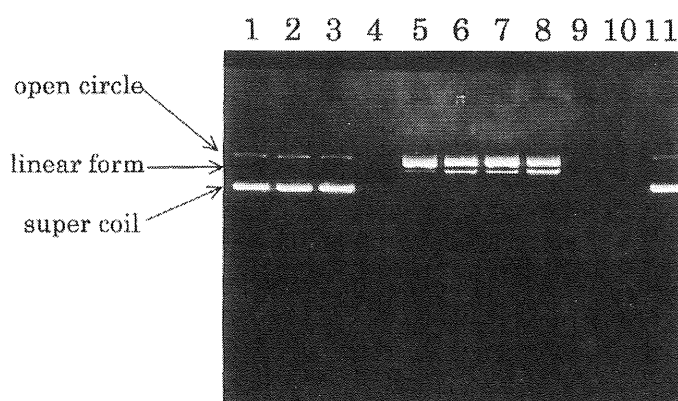


Fig3. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid DNA treated with gallate and pyridine compounds in the presence of Cu²⁺ ion. pBR322 plasmid DNA (0.5 μ g) was incubated for 1h at 37 $^{\circ}$ C in the presence of following additives: Lane 1, no addition; lane 2, 0.1mM CuCl₂; lane 3, 0.1mM Gallate; lane 4, Gallate plus CuCl₂; lane 5, Gallate/CuCl₂ plus 0.1mM picolinic acid; lane 6, Gallate/CuCl₂ plus 0.1mM quinolinic acid; lane 7, Gallate/ CuCl₂ plus 0.1mM lutidinic acid; lane 8, Gallate/CuCl₂ plus 0.1mM isocinchomeric acid; lane 9, Gallate/CuCl₂ plus 0.1mM pyridine-3,4-dicarboxylate; lane 10, Gallate/CuCl₂ plus 0.1mM pyridine-3,5-dicarboxylate; lane 11, Gallate/CuCl₂ plus 0.1mM dipicolinic acid.

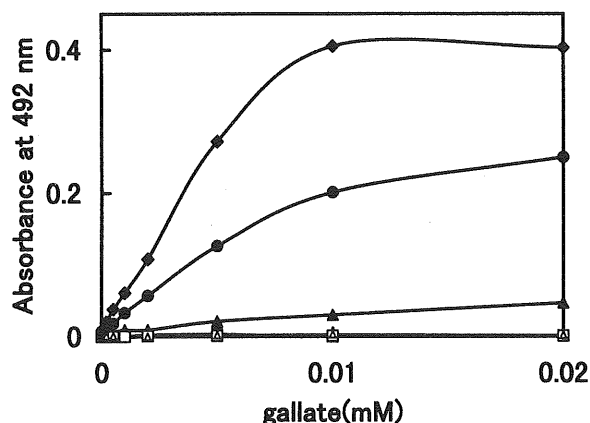
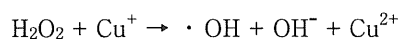
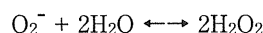


Fig.4 Effect of pyridine compounds on the reduction of Cu^{2+} by gallate. Following components were mixed at room temperature: 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.05mM CuSO_4 , 0.5mM bathophenanthroline disulfonate and additives. After mixing, gallate solution was added and absorbance at 492nm was measured. ◆, no addition; ■, dipicolinic acid; ▲, picolinic acid; □, quinolinic acid; △, lutidinic acid; ●, isocinchomeronic acid

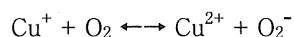
考 察

Cu/GallateによるDNAの切断はカタラーゼの添加によって防御が可能である³⁾。したがってここではフェントン反応によって生じるヒドロキシルラジカルが重要であると推測される。



ジピコリン酸のDNA傷害に対する保護効果は銅イオンの還元阻止によるものと考えられる。

一方LDLの酸化は銅イオンの添加によって急速に進行しSuperoxide dismutase (SOD) によって抑制される⁴⁾。この時の銅イオンはLDLによって還元され Cu^+ の状態で存在している。つまりここでは1価銅イオンによるスーパーオキシライドの発生が関与していると推測される。



ジピコリン酸と他のピリジン 2-カルボン酸は銅イオンの還元を阻止することによってスーパーオキシライドの発生を防止し、それによってLDL酸化を抑制すると考えられる。

血中にはSODが存在するがその活性は比較的低く、LDLの酸化抑制にはたらくには不十分であると思われる。過剰のSODも一特に還元性の強い物質が共存する場合にはLDLの酸化を完全に阻止するにいたらない⁴⁾。

還元銅の生成を阻止するジピコリン酸はSODとは別のはたらきによってLDLの酸化を抑制し、それによって動脈硬化発症の抑制及び血栓防止に効果を持つことが期待できる。

文 献

- 1) Gerrity, R.G. (1981) Am.J.Pathol. 103, 191 - 200.
- 2) Murakami, K., Ueda, T., Morikawa, R., Ito, M., Haneda, M. and Yoshino, M. (1998) Biomedical Res. 19, 205 - 208.
- 3) Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M. and Murakami, K. (1999) Mol. Genet. Metabolism 68, 468 - 472.
- 4) 村上恵子, 吉野昌孝 (2000) 微量栄養素研究 17, 97 - 102.