

細胞内におけるトコフェロールの還元能と抗酸化作用

村上 恵子, 伊藤 正江, 吉野 昌孝

(愛知医大・医・生化*)

Role of Reducing Activity in the Antioxidant Action of Tocopherol

Keiko MURAKAMI, Masae ITOH and Masataka YOSHINO

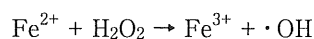
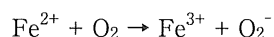
Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine, Nagakute, Aichi 480-1195, Japan

Antioxidant properties of tocopherol (Vitamin E) were analyzed in relation to its reducing activity. Tocopherol reduced ferric to ferrous ion but did not produce reactive oxygen species. Effect of tocopherol on the NADPH-generating system was examined under the *in situ* conditions of permeabilized yeast cells. NADP-isocitrate dehydrogenase, an NADPH-generating enzyme in mitochondria, was protected by tocopherol from the iron-mediated inactivation. Glutathione reductase, the regenerating reaction of reduced glutathione, was potently inhibited by cuprous ion; however, addition of tocopherol caused little or no inhibition by copper of the enzyme.

Tocopherol may act as an antioxidant under the polar conditions, and can protect mitochondrial function against metal-induced oxidative damage.

ビタミンE (トコフェロール) の欠乏は心筋の障害, 膵β細胞の障害を伴う脊髄小脳変性, フリードライヒ失調症と呼ばれる疾患を来すことが知られている¹⁾。この疾患ではミトコンドリアに3価鉄の蓄積と活性酸素の発生によって過酸化脂質が生じるため, 細胞の機能が障害されると推測されている。ビタミンEは脂質過酸化物生成に対して強い抑制効果を持つことから, その欠乏は上記の酸化傷害を引き起こすものと推測される。

ミトコンドリア内における鉄イオンはフェリチンと結合して存在し²⁾, フェリチン/鉄は反応性が低く無害であると考えられる。一方ミトコンドリアはヘム合成のために高濃度の還元鉄を必要としており, この還元鉄は酸素または過酸化水素と反応してスーパーオキシド, ヒドロキシルラジカルを生成する可能性がある。その結果3価鉄が生じる³⁾。



したがって鉄の蓄積による害とは2価→3価の反応で生じる活性酸素の害であると推測される。ビタミンEの作用は従来細胞膜などの脂溶性環境における脂質過酸化物生成の抑制作用が主体と考えられて来たが, 今回は膜ではなく水溶液中での遷移金属イオンあるいは酸素との相互作用を中心にビタミンEの作用を検討し, この物質が活性酸素の生成を抑制する機能を持つことを明らかにした。

なおα-トコフェロールは細胞内で主としてミトコンドリアに局在する。その含量は通常タンパク1 mgあたり0.05 (肝臓) - 0.1 (骨格筋) ナノモルであるが, 負荷によって最高0.2 (骨格筋) - 0.4 (肝臓) ナノモルに上昇し, これによってスーパーオキシドの産生を減少させ得るとの報告がなされている⁴⁾。このことから溶液として0.1 mM程度にはなり得ると考え, 以下の実験ではその前後の濃度を用いた (方法参照)。

*所在地: 愛知県愛知郡長久手町岩作 (〒480-1195)

方 法

Cu⁺の定量—10 mM トリス塩酸 (pH7.1) 中で0.06 mM 硫酸銅, 1 mM 塩酸ネオクプロインと各濃度の化合物を反応させ、450 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。

Fe²⁺の自動酸化—10 mM トリス塩酸 (pH7.1), 0.06–0.12 mMの硫酸第一鉄と各化合物を混合し37℃に加温した。溶液0.2 mlを各時間毎に1 mM パソフェナンスローリンジスルホン酸0.1 mlとマイクロプレート上で混合し540 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。

ラジカル消去能—安定なラジカルである0.1 mM 1,1'-ジフェニル-2-ピクリル-ヒドラジル (DPPH) と各濃度の化合物をエタノール中で混合し30分後に520 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。

透過性酵母の調製—市販のパン酵母を4倍量の0.5 M ソルビトールを含む0.25 M リン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁し2.5倍量のトルエンを加えて40–45℃にて30秒間加温した後、遠心して上清を除き4倍量の0.5 M ソルビトールを含む0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.1) に懸濁した。

酵素の失活—40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.1), 10 mg/ml 透過性酵母と各化合物を含む溶液を37℃にて加温した。5–10分後、クエン酸を2 mMになるように加えて氷冷し、3000 rpmで5分遠心して沈殿した酵母を4倍量の0.5 M ソルビトールを含む0.5 M トリス塩酸 (pH7.1) に懸濁した。

アコニターゼの活性—50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.1), 1 mg/ml 透過性酵母, 5 mM クエン酸, 0.25 mM NADP, 4 mM 塩化マグネシウムと35 mU/ml NADP-イソクエン酸脱水素酵素を含む溶液1 mlを37℃に加温しNADPHの340 nmの吸光度増加を分光光度計にて経時的に記録した。

NADP-イソクエン酸脱水素酵素 (NADP-ICDH) の活性—50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.1), 1 mg/ml 透過性酵母, 0.25 mM イソクエン酸, 0.25 mM NADP, 4 mM 塩化マグネシウムを含む溶液1 mlを37℃に加温しNADPHの340 nmの吸光度増加を分光光度計にて経時的に記録した。

グルタチオン還元酵素の測定—50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.1), 1 mg/ml 透過性酵母, 0.25 mM NADP, 0.5 mM 酸化型グルタチオン, 4 mM 塩化マグネシウム, 0.2 mM 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と0.25 mM イソクエン酸または0.5 mM グルコース6-リン酸を含む溶液1 mlを37℃に加温し、還元型グルタチオンと反応して生じた5-チオ2-ニトロ安息香酸の412 nmの吸光度増加を分光光度計にて経時的に記録した。

試薬その他—一次の製品を用いた。パン酵母, NADP-ICDH (オリエンタル酵母), α -トコフェロール (シグマ), プチルハイドロキノン (アルドリッチ), NADP (ロッシュ), アスコルビン酸, DTNB (カーク)。

α -トコフェロール (分子量431) は5 μ lを1 mlのジメチルスルフォキシド (DMSO) と混合し超音波処理によって均一にしたものを10 mMとした。実験に用いたトリリス塩酸緩衝液中 (50–200倍に希釈) では懸濁液であって溶液とは言えない。しかし銅イオンの還元 (Fig. 1) に用いた濃度の範囲では定量的に反応した。

プチルハイドロキノンは50 mMのDMSO溶液を調製し200倍に希釈して0.25 mMとした。この状態で外見上は透明であった。

結 果

トコフェロールは脂溶性側鎖を持つハイドロキノンの誘導体と考えられる。以下の実験では α -トコフェロールの性質をユビキノンに似たプチルハイドロキノンと比較した。また鉄の還元が主な作用であるアスコルビン酸も比較と対象とした。

α -トコフェロールは銅イオンに対して強い還元力を示した (Fig. 1A)。また安定なラジカルDPPHと高い反応性を示した (Fig. 1B)。

α -トコフェロールはポリフェノールのケルセチンやピロガロールと異なり2価鉄に対して酸化を促進することはない (Fig. 2A)。キレート鉄は中性溶液中でも酸化されやすくなるが α -トコフェロールはイソクエン酸による鉄の酸化促進を抑制した (Fig. 2B)。アスコルビン酸, プチルハイドロキノンは同様の効果を示した。

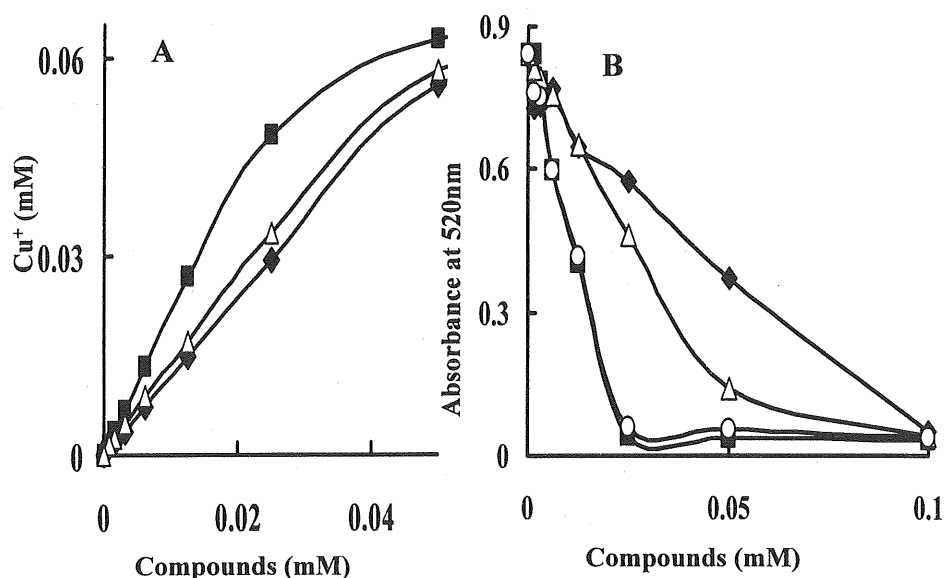


Fig. 1 A: Reduction of Cu^{2+} ion by polyphenolic compounds. Each compound was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH7.1) containing 0.06 mM CuSO_4 , 1mM neocuproine-HCl, and the absorbance at 450 nm was measured by microplate reader. $\blacklozenge$, ascorbate; $\triangle$, t-butylhydroquinone; $\blacksquare$, α -tocopherol.

B: Radical scavenging ability of polyphenolic compounds. Compounds were mixed at each concentration with 0.1 mM DPPH in 100% ethanol. After incubation for 30 min at room temperature, absorbance at 520 nm was measured by microplate reader. $\blacklozenge$, ascorbate; $\triangle$, t-butylhydroquinone; $\blacksquare$, α -tocopherol; $\circ$, pyrogallol.

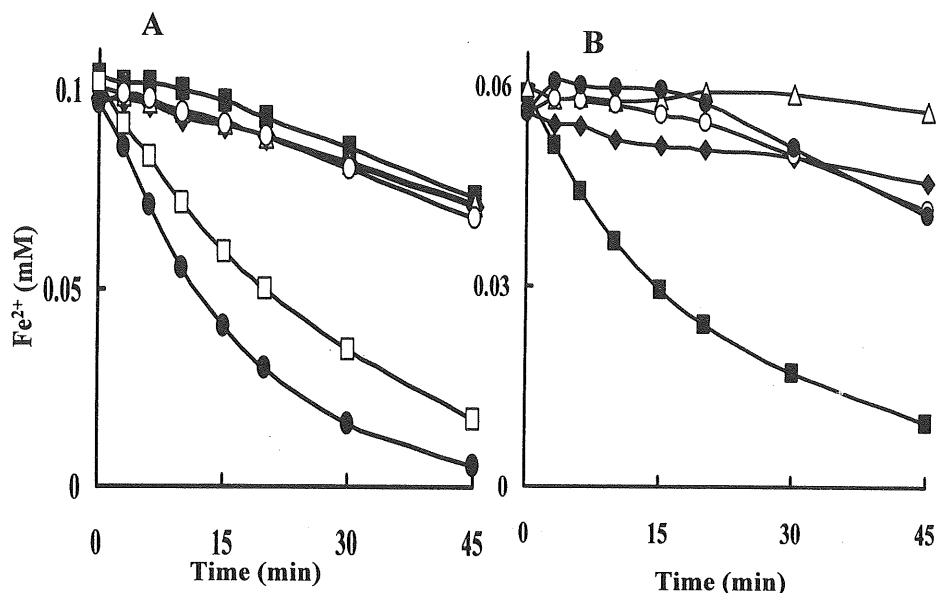


Fig. 2 Effect of polyphenolic compounds on the autooxidation of Fe^{2+} ion. Reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH7.1), 0.12 mM (A) or 0.06 mM (B) FeSO_4 and each compound was incubated at 37°C. Aliquot of 0.2 ml was mixed with 0.1 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at the indicated, and the absorbance at 540 nm was measured by microplate reader.

A: $\blacklozenge$, no addition; $\triangle$, 0.05 mM α -tocopherol; $\circ$, 0.05 mM t-butylhydroquinone; $\blacksquare$, 0.05 mM ascorbate; $\square$, 0.05 mM pyrogallol; $\bullet$, 0.01 mM quercetin.

B: $\blacklozenge$, no addition; $\blacksquare$, 0.1 mM isocitrate; $\circ$, isocitrate plus 0.05 mM α -tocopherol; $\bullet$, isocitrate plus 0.05 mM t-butylhydroquinone; $\triangle$, isocitrate plus 0.05 mM ascorbate.

キレート鉄に還元性物質が作用すると酸素あるいは過酸化水素を反応して活性酸素を発生することが知られている³⁾。TCAサイクルの酵素アコニターゼは $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ の活性中心を持ち、スーパーオキシドに対して特に感受性が高い⁵⁾。ここではパン酵母アコニターゼに対する失活効果を指標に還元物質とキレート鉄による活性酸素生成能を検討した (Fig. 3)。強い還元力を持つアスコルビン酸はEDTA/鉄 (Fig. 3A) あるいはヘマチン (Fig. 3B) と反応して活性酸素を発生しアコニターゼを失活させた。EDTA/鉄はアスコルビン酸をすみやかに酸化するため、活性酸素生成反応を10分間持続させるには0.5 mM以上の濃度が必要であった。逆にヘマチンとの反応は遅く十分な効果を得るのにさらに高い濃度を必要とした。ブチルヒドロキノン はヘム鉄とよく反応して酵素を失活させた。一方 α -トコフェロールはEDTA/鉄とは反応せず (A), ヘマチンとの反応による活性酸素の生成も少ない (B) ことが示された。

ミトコンドリアには過酸化水素処理システムとしてグルタチオンペルオキシダーゼ/グルタチオン還元酵素が存在する。NADP-ICDHはグルタチオン還元のためのNADPHを供給するミトコンドリアで唯一のNADP酵素である。本酵素は鉄によって不活性化されるという特異的な性質を持つ⁶⁾。 α -トコフェロールは鉄によるICDHの不活性化に対して若干の保護効果を示した (Fig. 4A)。また過酸化水素/鉄のフェントン反応によって酵素を失活させることはなかった (Fig. 4B)。アスコルビン酸は強いフェントン反応を示した。

酸化型グルタチオンとNADPを用いて酵母による還元型グルタチオンの生成を測定した。Fig. 5AはNADP-ICDHによってNADPHを供給した場合を示す。 Fe^{2+} はグルタチオンの還元を阻害しトコフェロールは若干阻害を解除した。Fig. 5Bはグルコース6リン酸/グルコース6リン酸脱水素酵素を用いてグルタチオン還元酵素を完全に活性化した状態を示す。グルタチオン還元酵素は Cu^{+} によって強力に阻害されるが、特にアスコルビン酸によって還元された時、特に強い阻害を示した。 α -トコフェロールは銅イオンを還元するにもかかわらず、本酵素を阻害しなかった。

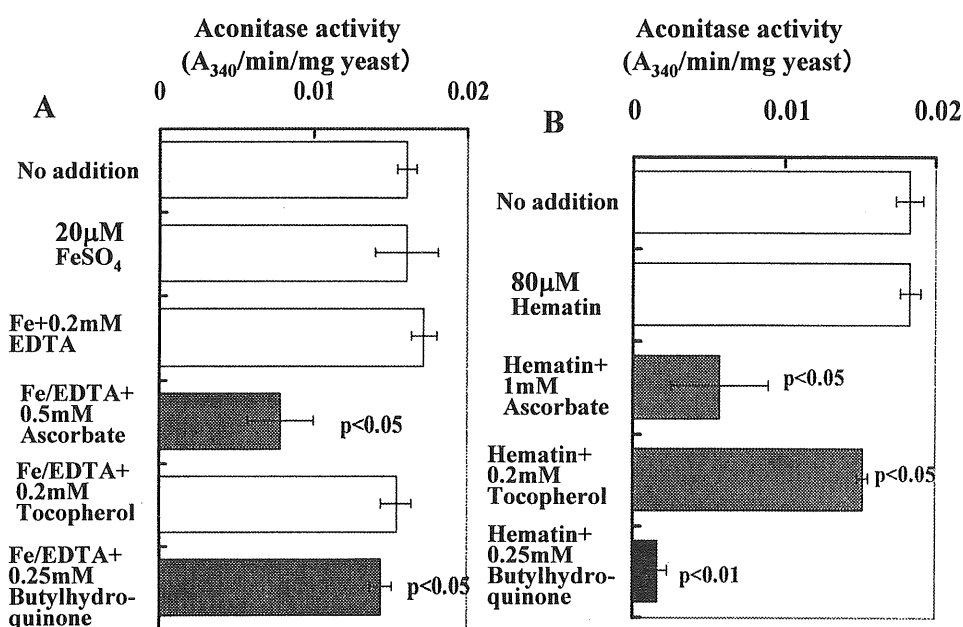


Fig. 3 Effect of polyphenolic compounds and Fe/EDTA complex (A) and hematin (B) on the activity of yeast aconitase. Permeabilized yeast cells of 10 mg/ml were incubated with the indicated compounds at 37°C for 10 min. After centrifugation at 700 $\times g$ for 5 min, the supernatants were removed and the cells were suspended in 0.04 ml of 50 mM Tris-HCl (pH7.1) containing 0.5 mM sorbitol. Five μl of yeast suspension was mixed with 1ml of solution containing 50 mM Tris-HCl (pH7.1), 5 mM citrate, 0.25 mM NADP, 4 mM MgCl_2 and 35 mU/ml NADP-ICDH, and the increase in the absorbance at 340 nm was measured.

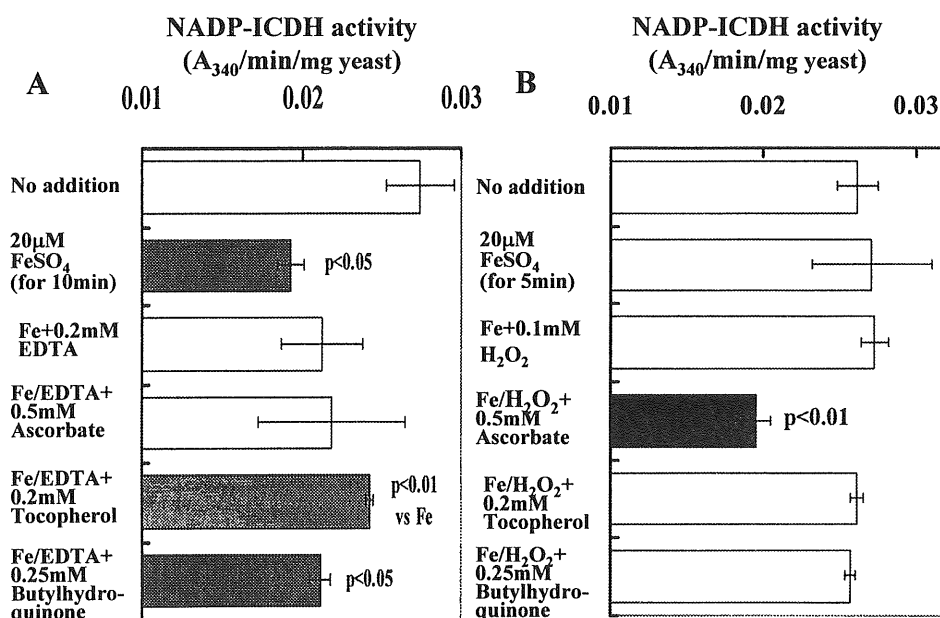


Fig. 4 Effect of polyphenolic compounds and Fe²⁺ (A) and Fe²⁺/H₂O₂ (B) on yeast NADP-ICDH. Experimental procedures were similar to those described in Fig. 3. NADP-ICDH activity was determined in the mixture of 0.25 mM isocitrate, 0.25 mM NADP and 4 mM MgCl₂.

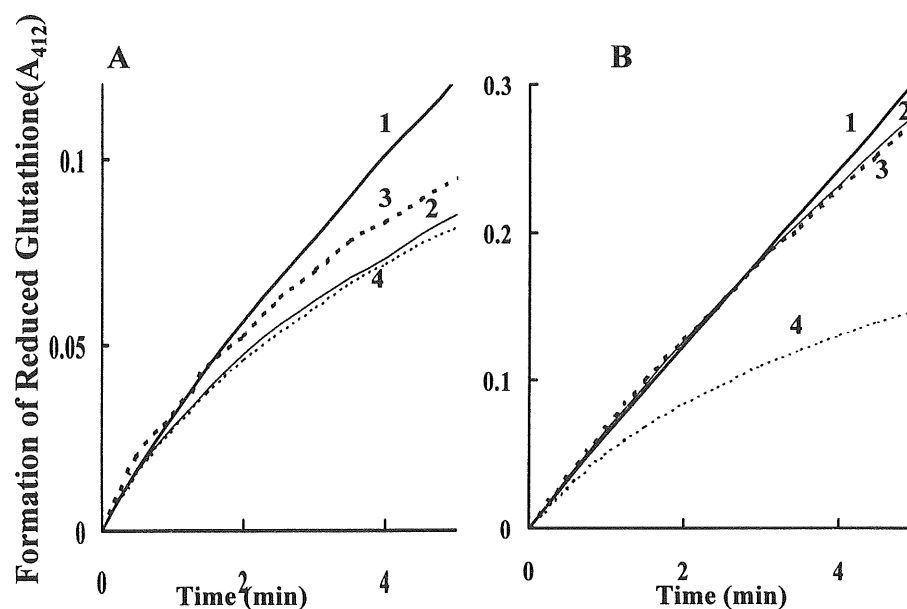
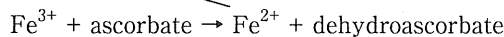
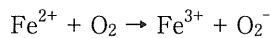


Fig. 5 Effect of α -tocopherol and ascorbate on the reduction of glutathione in the presence of Fe²⁺/isocitrate (A) and Cu⁺/glucose 6-phosphate (B). Permeabilized yeast cells of 1 mg/ml were suspended in the solution containing 50 mM Tris-HCl (pH7.1), 0.2 mM NADP, 0.5 mM oxidized glutathione, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM DTNB and 0.2 mM isocitrate (A) or 0.5 mM glucose 6-phosphate (B), and the absorbance at 412 nm was recorded by spectrophotometer. A: Line 1, no addition; Line 2, 0.02 mM FeSO₄; Line 3, 0.02 mM FeSO₄ plus 0.2 mM α -tocopherol; Line 4, 0.02 mM FeSO₄ plus 0.5 mM ascorbate. B: Conditions were similar to those in A except that 0.02 mM FeSO₄ was replaced by 1 μ M CuSO₄.

考 察

トコフェロールは膜構造に組み込まれて脂質過酸化を抑制する，すなわち脂質ラジカル生成の連鎖反応を止めるという作用を有する。しかしこの物質はこの作用のみではなく水溶性の環境においても抗酸化能を持つことが明らかとなった。

一般に強い還元力を持つ物質は3価鉄を還元することによって活性酸素を生じることが多い (redox cycling)。



細胞内で鉄を還元するアスコルビン酸はキレート鉄と反応して活性酸素を発生することが示されている。またアスコルビン酸は銅イオンを還元してグルタチオン還元酵素を阻害した。還元物質としてアスコルビン酸を用いることはミトコンドリアにとって不利であると考えられる。

一方トコフェロールは強い還元力を持ち2価鉄を安定に保つにもかかわらず redox cycling による活性酸素発生能は弱く，ヘム鉄とはほとんど反応しない。またNADP-ICDHの2価鉄による阻害，グルタチオン還元酵素の1価銅による阻害を解除することによってグルタチオンの還元を促進する。

冒頭に記したフリードライヒ失調症では，心筋においてミトコンドリアの呼吸能が傷害され，その原因は主としてアコニターゼの活性低下であることが示されている⁷⁾。2価鉄は活性酸素を発生し，またNADPHを供給するNADP-ICDHを阻害することによって活性酸素の処理を障害すると考えられる。トコフェロールはここに示した特殊な性質によってミトコンドリアを活性酸素障害から保護していると推測された。

References

- 1) Braunwald,E., A.S.Fauci, D.L.Kasper, S.L.Hauser, D.L.Longo and J.L.Jameson (2001) Harrison's Principles of Internal Medicine, McgrawHill, New York: pp. 2410.
- 2) Leve,S., B.Corsi, M.Bosiso, R.Invernizzi, A.Volz, D.Sanford, P.Arosio and J.Drysdale (2001) J.Biol.Chem. 276, 24437.
- 3) Lass, A. and R.S. Sohal (2000) FASEB J. 14, 87.
- 4) 八木国夫, 中野稔, 二木鋭雄, 島崎弘幸 (1987) 活性酸素, 医歯薬出版, 東京: pp. 33.
- 5) Gardner,P.R. and I. Fridovich (1992) J.Biol.Chem. 267, 8757.
- 6) Sounder,S. and R.F.Colman (1993) J.Biol.Chem. 268, 5264.
- 7) Rötig,A., P.de Lonlay, D.Chretien, F.Foury, M.Koenig, D.sidi, A.Munnich and P.Rustin (1997) Nature Genetics, 17, 215.