

アロエ成分のアントラキノン化合物による活性酸素種の生成

村 上 恵 子¹⁾, 坪 内 涼 子¹⁾, 細 川 好 孝¹⁾, 吉 野 昌 孝²⁾,(¹⁾愛知医大・医・生化*, ²⁾金城学院大・食環境**)

Generation of Reactive Oxygen Species by Anthraquinone Compounds

Keiko MURAKAMI¹⁾, Ryoko TSUBOUCHI²⁾, Yoshitaka HOSOKAWA¹⁾ and Masataka YOSHINO²⁾¹⁾Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,²⁾Department of Food and Nutritional Environment, Kinjo Gakuin University

Summary

Prooxidant action of aloe-emodin the principal anthraquinone compound in Aloe vera was analyzed in permeabilized yeast cells. Aloe-emodin inactivated aconitase, the most sensitive enzyme to reactive oxygen species (ROS), in the presence of NADPH or NADH, implying that reduction of oxygen molecule was initiated by the aloe-emodin-reducing enzyme (s) with NAD (P) H as the coenzymes. Requirement of KCN, an inhibitor of cytochrome c oxidase suggests that principal reactive oxygen species produced by aloe-emodin is superoxide. Aloe-emodin may cause cellular toxicity induced by mitochondrial oxidative damage through the inactivation of aconitase, a key enzyme of mitochondrial energy production.

アロエはアフリカを原産地とし紀元前から医薬品として知られていた。とくにヨーロッパにおいて広く用いられている。この植物は健胃作用や緩下作用、抗菌作用、抗炎症作用などをもつことが知られているが、その作用機序は明らかでない¹⁾。アロエに多く含まれる成分としてアロエエモジン、アロインなどのアントラキノン化合物であり、これらは下剤として用いられるが²⁾、近年培養細胞に対して、細胞死の誘導^{3,4)}あるいは増殖阻止効果を持つ⁵⁾ことも報告されている。アントラキノン化合物には変異原性⁶⁾や発ガン性⁷⁾があるとされるものが報告される一方で、変異原性化合物の作用を抑制する⁸⁾という報告もあり、抗ガン剤としても用いられる。抗ガン剤の代表は放線菌由来のアドリマイシンである。いずれの場合もしばしばレドックスサイクルを介した活性酸素生成の関与が示唆されている⁹⁾。われわれは今回アロエエモジンとアロインの活性酸素生成能をパン酵母のアコニターゼ失活を指標として検討した。

実験方法

1. 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-オリエンタル酵母。アロエエモジン, エモジン-シグマ, アロイン-東京化成, NAD, NADP-ロッシュ。

2. 透過性パン酵母の調製

市販のパン酵母を4倍量の0.5 M ソルビトールを含む0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、緩衝液と等量のトルエンを加えた。43℃で2分間加温後、遠心分離によって上清を除き、4倍量の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¹⁰⁾。

3. アコニターゼの失活

10 mg/mL の透過性パン酵母をアントラキノン, ナフトキノロンあるいはフラビン化合物とともに50 mM トリス・塩酸緩衝液中で5分間加温後、800 × *g* にて5分間遠心し、沈殿した酵母を4倍量の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。

4. 活性酸素を処理する酵素の阻害

カタラーゼに対してアジ化ナトリウム, スーパーオキシドアニオンラジカルを処理するCu/ZnSOD, シトクロムcオキシダーゼに対してはシアン化カリウムを添加した。

5. NADH, NADPH の生成

NADHの供給にはエタノールと酵母自身のアルコール脱

*所在地: 愛知県愛知郡長久手町岩作雁又 21 (〒480-1195)

**所在地: 名古屋市守山区大森二丁目 1723 (〒463-8521)

水素酵素, NADPHの供給にはグルコース-6-リン酸 (G6P) とパン酵母のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) プラス 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6PGDH) を利用した。

6. アコニターゼ活性の測定

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, トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4), 1 mg/mL パン酵母存在下に 340 nm の吸光度増加を測定して算出した。

結 果

キノンの細胞毒性は還元されたキノール型によって発現することからアロエエモジンの還元反応を検討した。G6P/NADP を基質としてアロエエモジンに対する NADPH の効果をナフトキノンのメナジオンと比較した (Fig. 1)。メナジオンは 0.02 mM で, シアンなしでもアコニターゼを失活させ, その効果はシアンのみでなくアジ化ナトリウムによっても増強された。アロエエモジンは 0.1 mM シアン存在下で失活効果を示したがカタラーゼを阻害するアジ化

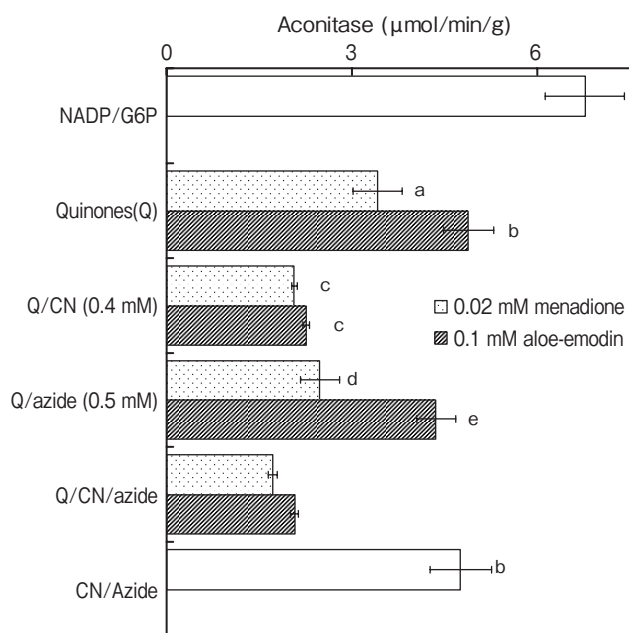


Fig. 1 Effect of aloe-emodin and menadione on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of NADPH. Yeast cells were permeabilized according to the method reported previously⁸⁾. Permeabilized yeast cells (10 mg/mL) were mixed with 0.05 mM NADP, 0.5 mM G6P, 2 mM MgCl₂ and 0.1 mM aloe-emodin or 0.02 mM menadione in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1). After incubation at 37 °C for 5 min, cells were collected by centrifugation at 800 × *g* for 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, and the 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 in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8). The increase in the absorbance at 340 nm was recorded. a, *p* < 0.001 vs none; b, *p* < 0.01 vs none; c, *p* < 0.001 vs Q; d, *p* < 0.01 vs Q; e, NS vs Q.

ナトリウムにはまったく効果がなかった。したがってこの場合過酸化水素を生成しないと推定される。アジ化ナトリウムあるいはシアン単独では有意の失活はみられなかった。またアジ化ナトリウムとシアンの同時添加は若干の失活を引き起こしたが, アロエエモジンまたはメナジオン添加による失活に比して有意に小さかった。

次に NADPH 存在下でのアロエエモジンの効果をメナジオン, フラビンと比較した (Fig. 2)。メナジオンの効果がとくに強くこの還元酵素は本来ナフトキノンを基質にす

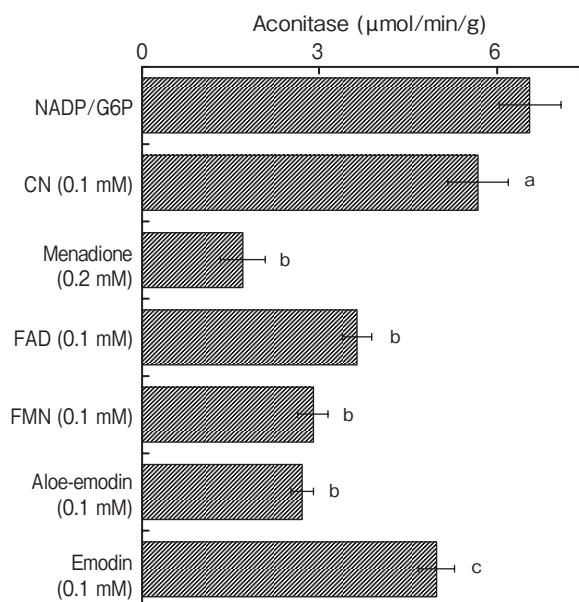


Fig. 2 Effect of menadione, flavine compounds and anthraquinones on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of NADPH. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 1 except that yeast cells were incubated for 10 min. a, NS vs none; b, *p* < 0.001 vs CN; c, *p* < 0.05 vs CN.

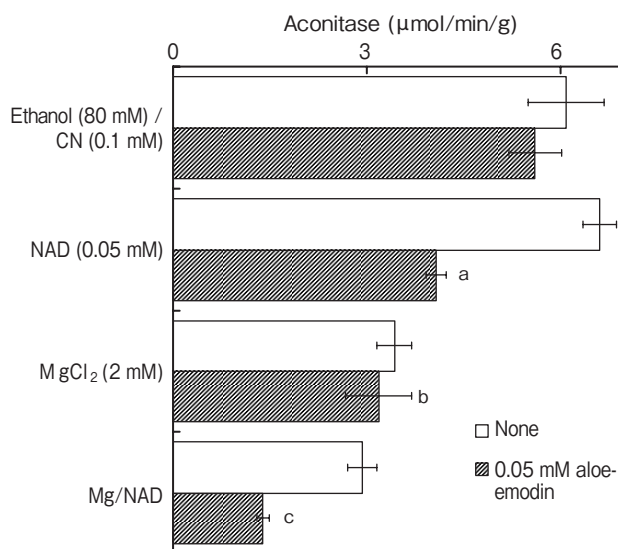


Fig. 3 Effect of aloe-emodin on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of NADH and Mg²⁺. Yeast cells were mixed with 80 mM ethanol, 0.1 mM KCN and 0.05 mM aloe-emodin in 40 mM Tris-HCl (pH 7.1) and incubated at 37 °C for 5 min. a, *p* < 0.01 vs NAD(-); b, NS vs aloe-emodin(-); c, *p* < 0.001 vs aloe-emodin/Mg.

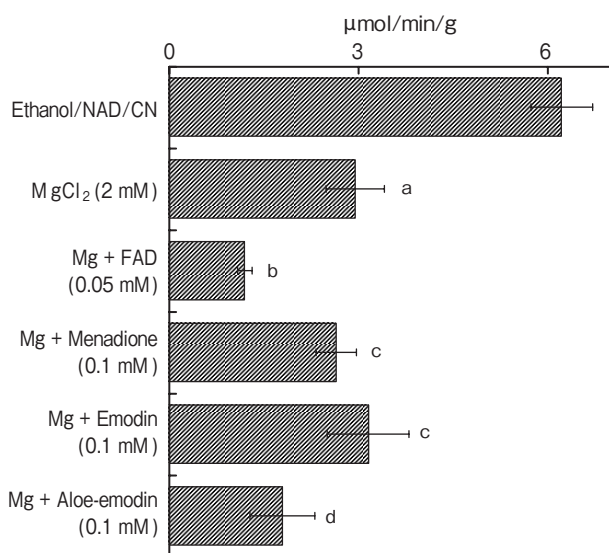


Fig. 4 Effect of menadione, flavine compounds and anthraquinones on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of NADH. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 1 except that yeast cells were incubated with 80 mM ethanol, 0.02 mM NAD and 0.1 mM KCN. a, $p < 0.01$ vs none; b, $p < 0.001$ vs Mg; c, NS vs Mg; d, $p < 0.01$ vs Mg.

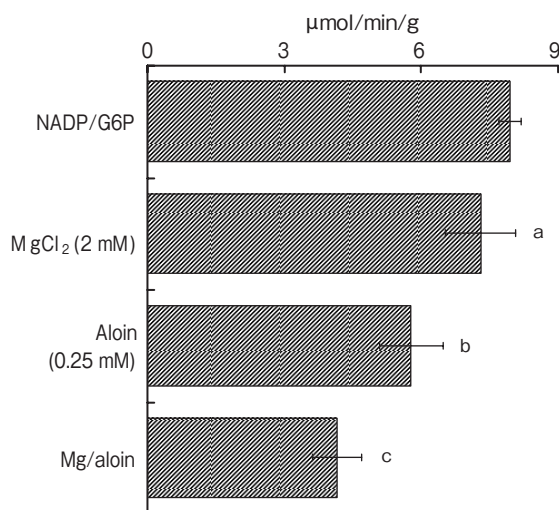


Fig. 5 Effect of aloein on the activity of aconitase in baker's yeast in the presence of NADPH. Yeast cells were incubated at 37 °C for 10 min with 0.05 mM NADP, 0.5 mM G6P and 0.1 mM KCN in the presence and absence of MgCl₂. a, NS vs none; b, $p < 0.01$ vs none; c, $p < 0.01$ vs Mg Cl₂.

るものと考えられる。フラビン化合物ではFADよりもFMNが若干強い効果が示し、アロエエモジンの効果はFMNと同程度だった。エモジンの効果は弱かった。

NADHを還元酵素の基質とした場合の効果をFig. 3, 4に示す。0.1 mMのシアンを添加した。Mg²⁺が強い失活効果を示したこと (Fig. 3) から NADH を利用する酸素活性化酵素は Mg²⁺で活性化されると推測された。アロエエモジンの効果をフラビン、メナジオンと比較する (Fig. 4) と、FADがもっとも強い効果を示した。したがって本酵素は動物のNADPHオキシダーゼに似たものではないかと推測される。メナジオンは効果が弱く、アロエエモジンはこの二

つの中間の効果を示した。エモジンはこの濃度 (0.05 mM) では効果がなかった。

さらに配糖体であるアロインの効果を検討した (Fig. 5)。NADPH存在下で明らかな失活効果を示した。またMg²⁺に活性化効果があった。

考 察

アロエの成分であるアロエエモジンとアロインによる活性酸素生成を検討した。活性酸素生成はアコニターゼの失活により評価した。アコニターゼは活性中心に [4Fe-4S] 構造をもちスーパーオキシドラジカルによって活性中心のFeが引き抜かれ、[3Fe-4S] 構造となって失活すること、あるいは過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルによって活性中心全体を失って失活することから鋭敏な活性酸素検出系として利用できる^{11,12)}。アロエエモジンとアロインは還元型補酵素存在下でスーパーオキシドを生成することが示された。この反応は過酸化水素をほとんど生じない。NADH酵素は動物の白血球などに存在するNADPHオキシダーゼに似たフラビン酵素かと思われる¹³⁾。一方、NADPH酵素は生理的機能は不明ながら主にナフトキノンを経質にすると推測される。アントラキノンのアロエエモジンはいずれの酵素の基質としても利用されることが示された。

アントラキノン誘導体であるアドリアマイシンは主にトポイソメラーゼを阻害する抗ガン剤として血液腫瘍やその他のガンに広く使われるが、副作用として重篤な心筋障害を起こすことも知られている。また最近アントラキノンを含む健康飲料による肝障害が報告された^{14,15)}。アントラキノン化合物が酵素的にラジカルを産生するとの報告は以前からあったが、その標的としては多くの場合膜タンパクあるいはDNAそのものが考えられていた。

今回示した結果はアントラキノン化合物による細胞毒性の一つは、スーパーオキシドラジカル産生によるエネルギー生成系、TCA回路の阻害にあることを示唆している。類似の例としてミトコンドリアDNAの変異によって酸化的リン酸化が障害されたことによるとと思われる神経筋疾患があげられる。フリードライヒ失調症は脊髄小脳変性疾患の一つでミトコンドリアにフェリチン/鉄が蓄積する。この疾患はフラタキシンというタンパクを欠いていることがわかっていて、最近フラタキシンは鉄タンパクのシャペロンとして働き、アコニターゼその他のタンパクへの鉄/イオウ活性中心取り込みに関与することが明らかになった^{16,17)}。

ミトコンドリアのアコニターゼは活性酸素の鋭敏な標的であり、本酵素が失活することによって、細胞の好気代謝が阻害され、細胞機能が傷害される可能性があるものと推測された。

参考文献

- 1) Vogler BK, Ernst E (1999) Aloe vera : a systematic review of its clinical effectiveness. *British J Gen Practice* 49 : 823–828.
- 2) Siegers CP, von Hertzberg-Lottin E, Otte M, Schneider B (1993) Anthranoid laxative abuse—a risk for colorectal cancer? *Gut* 34 : 1099–1101.
- 3) Kuo PL, Lin TC, Lin CC (2002) The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci* 71 : 1879–1892.
- 4) Lee HZ, Hsu SL, Liu MC, Wu CH (2001) Effects of mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol* 431 : 287–295.
- 5) Pecere Y, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palu G (2000) Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 60 : 2800–2804.
- 6) Harrington-Brock K, Parker L, Doerr C, Cimino MC, Moore MM (1991) Analysis of the genotoxicity of anthraquinone dyes in the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis* 6 : 35–46.
- 7) Patel PM, Selby PJ, Deacon J, Chilvers C, McElwain TJ (1989) Anthraquinone laxatives and human cancer : an association in one case. *Postgraduate Med J* 65 : 216–217.
- 8) Mueller SO, Schmitt M, Dekant W, Stopper H, Schlatter J, Schreier P, Lutz WK (1999) Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. *Food Chem Toxicol* 37 : 481–491.
- 9) Fisher GR, Brown JR, Patterson LH (1989) Redox cycling in MCF-8 human breast cancer cells by antitumor agents based on mitozantrone. *Free Radic Res Commun* 7 : 221–226.
- 10) 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.
- 11) Gardner PR (2002) Aconitase : sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* 349 : 9–23.
- 12) Yan LJ, Levine RL, Sohal RS (1997) Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *PNAS* 94 : 1168–1172.
- 13) Henderson LM, Chappell JB (1996) NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1273 : 87–107.
- 14) Millonig G, Stadlmann S, Vogel W (2006) Herbal hepatotoxicity : acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18 : 575–577.
- 15) Stadlbauer V, Weiss S, Payer F, Stauber RE (2008) Herbal does not at all mean innocuous : the sixth case of hepatotoxicity associated with *morinda citrifolia* (noni). *Am J Gastroenterol* 103 : 2406–2407.
- 16) Bulteau AL, Dancis A, Gareil M, Montagne JJ, Camadro JM, Lesuisse E (2007) Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic Biol Med* 42 : 1561–1570.
- 17) Goncalves S, Paupe V, Dassa EP, Rustin P (2008) Deferiprone targets aconitase : implication for Friedreich's ataxia treatment. *BMC Neurol* 8 : 20.