



Title	キノンによる酸化ストレスと防御機構：ラット脳，肝細胞下画分のデータを中心に
Author(s)	中村, 正雄
Citation	電子科学研究, 1, 75-76
Issue Date	1993
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24286
Type	departmental bulletin paper
File Information	1_P75-76.pdf



キノンによる酸化ストレスと防御機構 (ラット脳, 肝細胞下画分のデータを中心に)

超分子分光研究分野 中村正雄

キノンによる肝毒性は、酵素によるキノンの1電子還元を経た酸素ラジカル生成に起因する。肝細胞でキノンは主に NADPH-P-450 還元酵素で1電子還元されセミキノンラジカルとなり酸素と反応し $O_2\cdot^-$ を生成する。一方 DT-ジアホラーゼはキノンを2電子還元し、酸素ラジカルの生成を抑制する。従ってキノンの肝毒性発現を解明するには、局在した個所のそれぞれの活性を明らかにする必要がある。細胞下画分の相対的な酵素活性を算定してみると、肝細胞レベルでは細胞表面膜がキノン肝毒性の防御にあたると結論される。

目 的

生体に生じる還元酸素種生成(H_2O_2 , $O_2\cdot^-$)に基づく酸化ストレスと種々の疾病, 発癌, 老化との関連が強く示唆されている。これは還元酸素種生成により開始するラジカル連鎖反応で、この結果、生体膜, 酵素, 核酸が酸化修飾を受ける。これに対して生体は多重な防御機構①抗酸化物(ビタミンCやEなど)②抗酸化酵素(SOD, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ, DT-ジアホラーゼ, etc)を持ち、活性酸素種の消去と障害の抑制と修復を行う。ここではキノン(2-メチル-1,4-ナフトキノン)による肝毒性発現とこれに対する防御の仕組みを述べる。キノンによる肝毒性は、酵素によるキノンの1電子還元を経た酸素ラジカル生成に起因する。肝細胞でキノンは主に NADPH-P-450 還元酵素で1電子還元されセミキノンラジカルとなり酸素と反応し $O_2\cdot^-$ を生成する。その結果、細胞表面のブレブの形成や、細胞内の情報伝達能の消失を経て細胞死に至ることが知られている。一方 DT-ジアホラーゼはキノンを2電子還元し、酸素ラジカルの生成を抑制する。従ってキノンの肝毒性発現を解明するには、局在した個所のそれぞれの活性を明らかにする必要がある。

方 法

ラット遊離肝細胞から常法によりサイトゾル, ミク

ロソーム, 形質膜を調製した。得られた画分は標識酵素活性で検討した。ラット脳ミクロソームは灌流脳から細胞分画法で得た。酵素活性は2波長法で測定した。DT-ジアホラーゼ活性はジクマロールによる阻害から算定した。メナジオン(MK)の還元を介した酸素ラジカル生成はDMPOをスピントラップ剤としESRで観測した。

結果と考察

ラット肝の NADPH-MK 還元活性(比活性)はサイトゾル>ミクロソーム>形質膜画分の順で、 $10\mu M$ ジクマロールによる阻害率はそれぞれ 92%, 65%, 70% であり、細胞下画分の MK 還元活性は主として DT-ジアホラーゼで触媒される(Table I)。MK を介した $O_2\cdot^-$ の生成は形質膜画分ではミクロソームの 1/10 で NADPH-cyt.c 還元活性の比と一致した。NADH-MK 還元反応中の $O_2\cdot^-$ 生成はミクロソームで NADPH の 1/2, 形質膜画分では観測されない。従って、ミクロソームに結合した NADH-b₅ 還元酵素も MK の 1電子還元を介して $O_2\cdot^-$ を生成することが明らかである。いずれの $O_2\cdot^-$ 生成も DT-ジアホラーゼの阻害剤で影響を受けず、MK を介したラジカル生成は本酵素によらないことを示している。脳のサイトゾル, ミクロソームでも NADPH-, NADH-MK 還元活性に占める DT-ジアホラーゼ活性の割合は肝のそれらと同じで、キノンの毒性に対する十分なジアホラー

ゼによる防御能力を示している。脳のミクロソームでは明らかに NADH-MK 系での $O_2 \cdot$ 生成が NADPH-MK 系での生成を上回り、肝ミクロソームの電子伝達経路との差を示しているとみられる。以上から肝細胞レベルでは細胞表面膜の DT-ジアホラーゼがまずキノンの肝毒性の防御にあたることが示唆された。

Table I Effect of Dicoumarol upon the NAD (P) H-Menadione Reductase Reactions by Subcellular Fractions.

Subcellular Fractions	Electron Donor	MAD (P) H-Menadione Reductase Activity		Activity Remaining (%)
		-	+10 μ M Dicoumarol	
(n mol/mg protein. min)				
Cytosol	NADPH	135	11	8.1
	NADH	125	8.1	6.4
Microsomes	NADPH	13.1	4.6	35
	NADH	10.4	3.5	34
Plasma Membranes	NADPH	5.3	1.6	30
	NADH	4.1	1.2	29