

パラコート毒性の機構とアスコルビン酸誘導体による抑制

田中 英彦¹⁾

(平成 22 年 11 月 30 日受理)

Mechanism of Paraquat Cytotoxicity and Its Inhibition
by Amphiphilic Ascorbate DerivativesHidehiko TANAKA¹⁾

(Received November 30, 2010)

Abstract

Paraquat (PQ) is an effective and widely used herbicide. However, there have been numerous fatalities, mainly caused by accidental or voluntary ingestion. The molecular mechanism of PQ toxicity is based on redox cycling and intracellular oxidative stress induced by PQ radical. Glutathione (GSH) dependent PQ radical scavenger (GPS) was found in pig liver and was identified as ferritin by using an amino acid sequence analyzer and MALDI TOF-MS. Ferritin is a cytoplasmic iron storage protein. Ferrous ion release from ferritin and the lipid peroxidation of microsome stimulated by PQ radical were inhibited by the addition of GSH in NADPH cytochrome P450 reductase system. On the other hand, the lipid peroxidation of liposome induced by Fe²⁺ ion released from ferritin was accelerated by the addition of GSH in the xanthine-xanthine oxidase system. GSH recovered the activity of xanthine oxidase inactivated by H₂O₂. Ascorbic acid (AsA) plays an important role in antioxidant activity. The hydrophilicity of AsA prevents the permeation into the membrane. Amphiphilic AsA derivatives (acetylasorbic acid; ACA, propionylascorbic acid; PRA, butyrylasorbic acid; BUA, hexanylasorbic acid; HEA) were synthesized by the reaction of AsA and vinyl compounds under catalysis of lipase. Amphiphilic AsA derivatives dispersed in erythrocyte membrane prevented the lipid peroxidation induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) which is a water-soluble radical initiator. Additionally, amphiphilic AsA derivatives effectively prevented the PQ toxicity by the scavenging PQ radical in NG 108 cells.

¹⁾ 福岡大学理学部化学科, 〒 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180, Japan

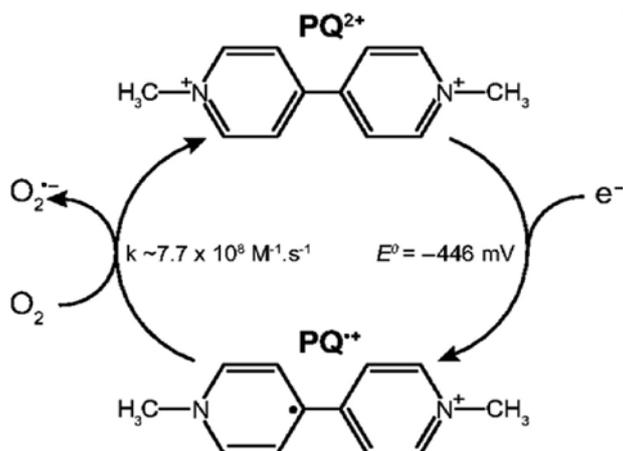


図1 パラコートの構造と酸化還元サイクル³⁾

1. はじめに

パラコート (paraquat ; PQ) は古くから酸化還元試薬メチルビオローゲン (methylviologen) として生化学領域で使用されてきた¹⁻³⁾ (図1). 1954年, イギリスのインペリアルケミカルインダストリー社により PQ の除草効果が見出され, 今日まで世界中で大量に使用されている⁴⁾.

PQ の除草効果は次のような機構によるものと考えられている⁵⁾ (図2). 散布された PQ は葉内部に侵入し葉緑体に達し, 光化学系 I から電子を1個受け取り PQ ラジカルとなる. PQ ラジカルが O₂ を1電子還元した後に生じるスーパーオキシドアニオン (O₂^{•-}) が葉緑体を攻撃する. このため, 光合成が盛んな植物や葉に光を受ける時間が長いほど除草効果は大きく, 散布後1~3日で枯れ始める. 土壤に落下した PQ は陽イオンとして土壤粒子に強く吸着し, 不活性となる. このため, PQ は根から吸収されないの, 雑草を枯殺した直後に作物の種子を蒔いても害を受けないという利点がある⁶⁾.

PQ は土壤に結合していると, 微生物分解も光分解も受けない. 特に強く吸着した場合は無期限に土壤に残留する. 年間の PQ の消失は約10%であり, 半減期は6.6年と見積もられている. しかし, PQ の土壤への吸着と安定性は土壤が酸性になるに従って低下する (図3). この為, 酸性雨等による環境汚染は PQ による河川や地下水の汚染を導く可能性がある.

PQ はヒトや哺乳類に対しても強い毒性を示す. 日本では, PQ は1965年に『グラモキソン』という商

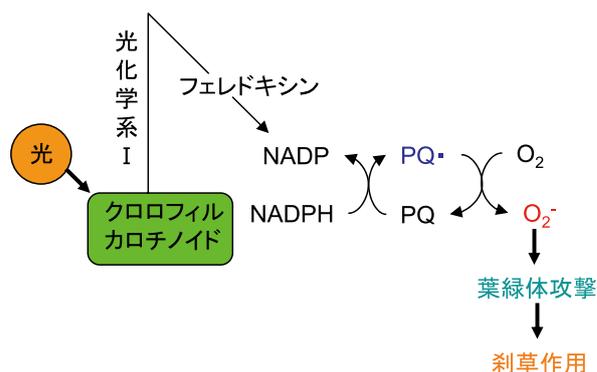


図2 パラコートの除草作用の機構⁵⁾

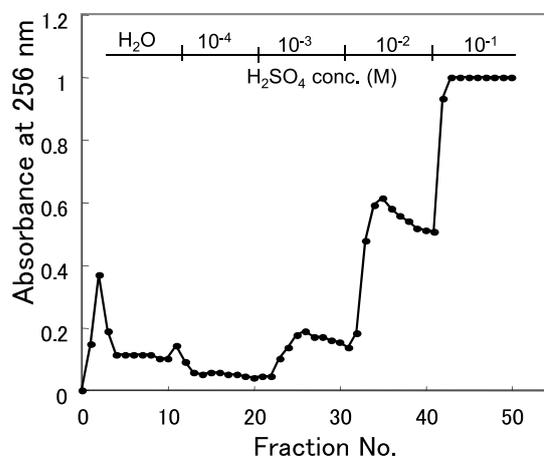


図3 粘度に吸着したパラコートの酸による溶出

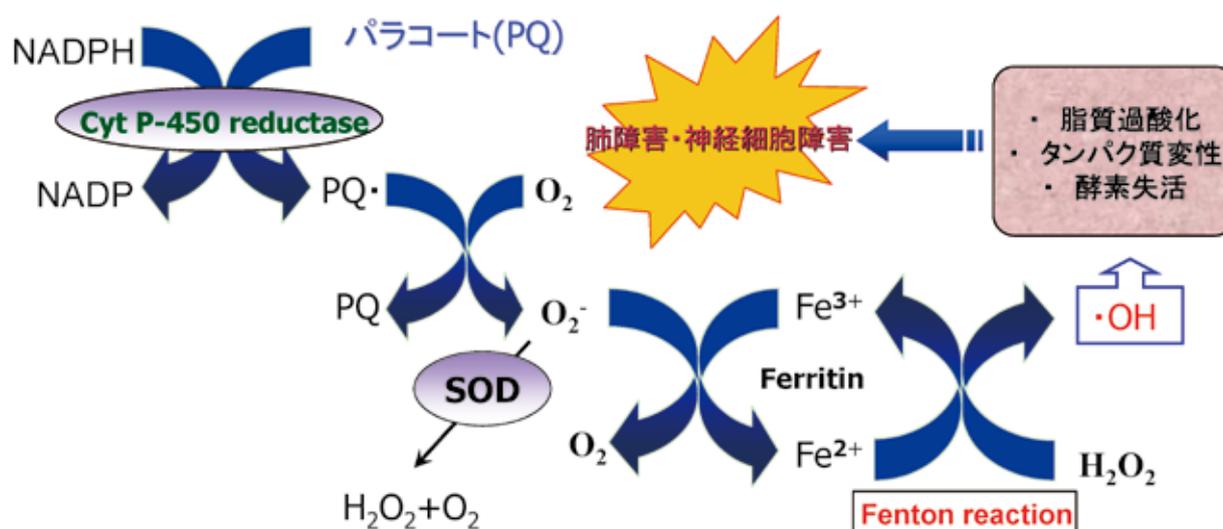


図4 パラコートの細胞毒性機構^{7,8)}

品名で発売された、『グラモキソン』は24% PQ 水溶液であったため、PQ 中毒事故が年とともに増加し、1985年頃ピークに達した。その後は、PQ 濃度を徐々に下げ、現在はPQ5%、ジクワット7%を含む『リブボックスL』として販売されている。しかし、2000年においても、農薬による中毒事故の30%以上はPQよると報告されている。

PQの致死量は成人では2~4gで、5%溶液であれば40~80mlと言われている。中毒症状は直後に激しい嘔吐、消化器官粘膜の糜爛と潰瘍が起こる。2~3日後、肝不全、腎不全、心原性ショックが急速に進行する。1~2週間後に間質性肺炎、肺線維症で死亡する。致死率は80%以上であり、治療法として、胃や腸の洗浄、血液吸着副腎皮質ステロイドの投与等が行われているが、有効な治療法が無いのが現状である。

PQ中毒機構としてマイクロソーム説^{7,8)}とミトコンドリア説⁹⁾がある。マイクロソーム説は広く受け入れられており、次の様に考えられている(図4)。細胞膜に結合したポリアミン受容体から細胞内に取り込まれたPQはマイクロソームの薬物代謝系に入り、NADPHとマイクロソームに結合したNADPH Cyt P450還元酵素によりPQは一電子還元されてPQラジカルとなる⁴⁾。PQラジカルはO₂を還元してO₂^{·-}を生じ、自らは元のPQに戻る。生成したO₂^{·-}およびこれより産生する活性酸素種(ROS)がPQ毒性の本体と考えられている。

O₂^{·-}やPQラジカルはフェリチン内に貯蔵されているFe³⁺イオンをFe²⁺イオンに還元し、フェリチンからのFe²⁺イオンの遊離を促進する。遊離したFe²⁺イ

オンはO₂^{·-}の不均化により生じるH₂O₂とFenton反応を起こし、ROSの中で最も反応生が高いヒドロキシルラジカル(·OH)が生じる。その結果、脂質過酸化や酵素の失活が起こり細胞毒性を示す。

一方、ミトコンドリア説はPQがミトコンドリア外膜に結合した後、NADHによりPQラジカルに還元され、マイクロソーム系と同様に·OHを生成してミトコンドリア外膜を障害すると考えられている。この様に、マイクロソーム説とミトコンドリア説はPQ毒性の出発点はPQラジカルの生成にあるという共通の機構が考えられている。また、PQラジカル自身がPQ毒性に重要であるという報告も有る¹⁰⁾。このため、還元剤によるPQラジカルの消去は有効な治療手段として様々な試みられてきたが、未だ成功していない¹¹⁾。

我々の研究室では、ブタ肝臓中にグルタチオン(GSH)に依存してPQラジカルを消去する物質を見出し、フェリチンであると同定した。また、生体内での強い還元剤であるアスコルビン酸(AsA)の両親媒性誘導体を合成し、そのPQラジカル消去による毒性抑制作用を調べたので報告する。

2. グルタチオン依存性パラコートラジカル消去物質の同定

図5に従ってマウス肝臓あるいはブタ肝臓からマイクロソームを分画した。窒素バブリングによりマイクロソームとPQを含む混合液から溶存酸素を除去した後、NADPHを加え直ちにPQラジカルの電子スピン共鳴(ESR)測定を行った^{12,13)}(図6)。PQラジカルのESRシグナル強度は時間と共に増大した。この反

応系に生体内の還元物質である GSH または AsA を加えたところ、AsA は PQ ラジカルを強く還元したが、GSH はほとんど還元しなかった。次に、上清②

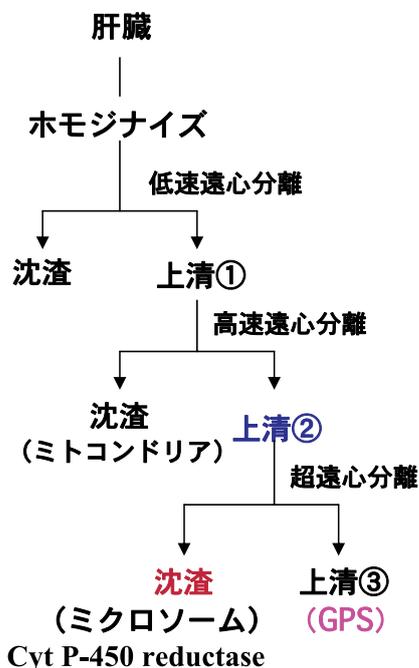


図5 グルタチオン依存性パラコートラジカル消去物質 (GPS) の分画

と PQ を含む混合液を調製し、同様の操作を行ったところ、GSH 添加により PQ ラジカル生成が大きく減少した (図6)。このことから、上清②には GSH に依存して PQ ラジカルを還元する物質 (Glutathione dependent paraquat radical scavenger; GPS) が含まれていると考えた。

そこで、図7に従って GPS の精製を行い、TOF-MS による分子量測定と一次構造を調べた。分子量測定の結果はウマ脾臓フェリチンの分子量 20,061 Da に対し GPS は 20,096 Da とほぼ等しい値を示した。また、一次構造の結果はブタフェリチンと同じアミノ酸配列であった (図8)。これらの結果から、GPS はブタフェリチンであると同定した。

フェリチンは生体組織に広く分布する鉄貯蔵タンパク質で、鉄は Fe^{3+} イオンとして貯蔵されている。フェリチンはフェロオキシダーゼにより Fe^{2+} イオンを Fe^{3+} イオンに酸化してフェリチン殻内に取り込むため、酸化障害の防御に働く^{14,15)}。しかし、フェリチンの Fe^{3+} イオンは O_2^- や PQ ラジカルによって Fe^{2+} イオンに還元され非生理的に放出される。このため、PQ 毒性は PQ ラジカルによるフェリチン鉄の遊離が重要である¹⁶⁾。

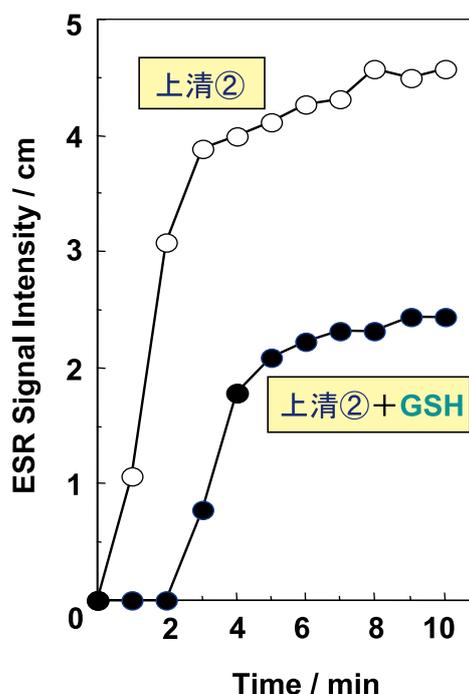
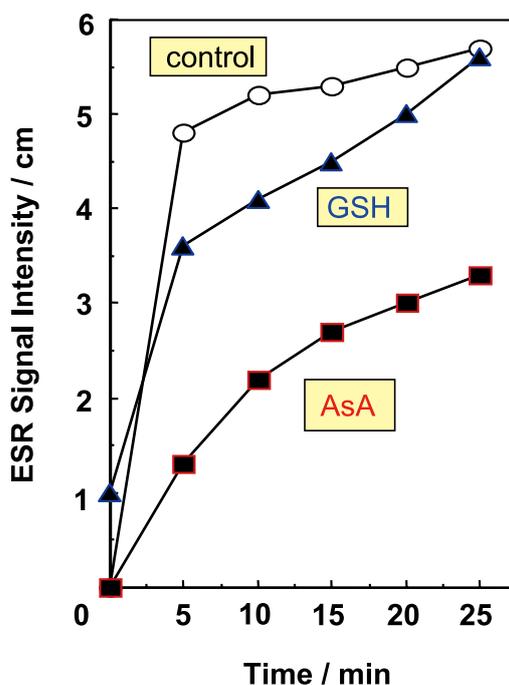


図6 GPS の発見

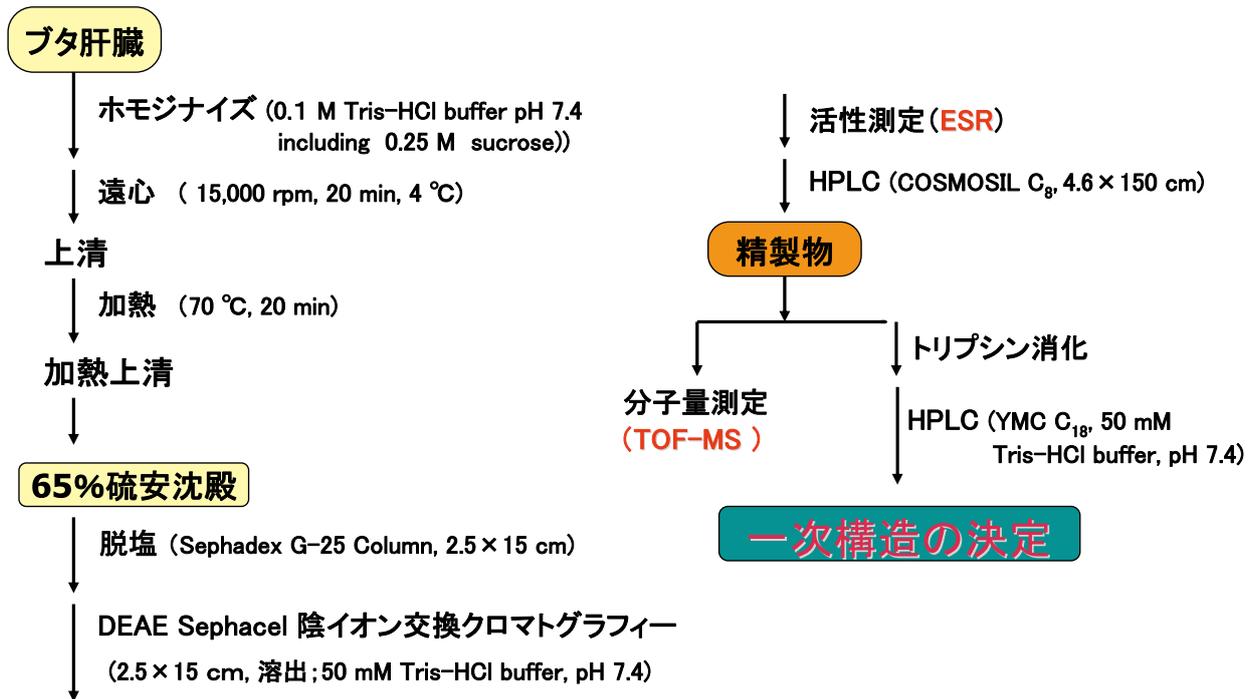


図7 GPSの精製

61
 ヒトフェリチン GYERLLKMQNQRRGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSA
120
 ウマフェリチン GAERLLKMQNQRRGRALFQDLQKPSQDEWGTTLDAMKAAIVLEKSLNQALLDLHALGSA
 GPS GSERLLKMQNQRRGRALFQDVQKPSQDEWGKTQDAMEAALHLEKGLNQALVDLHALGSA

121
 ヒトフェリチン RTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLRKLGPEAGLGEYLFERLTLKHD
174
 ウマフェリチン QADPHLCDFLESHFLDEEVKLIKMGDHLTNIQRLVGSQAGLGEYLFERLTLKHD
 GPS RADPHLCDFLENHFLDEEVKLIKMGDHLTNLRRLSGPQAGLGEYLFERLTLKHD

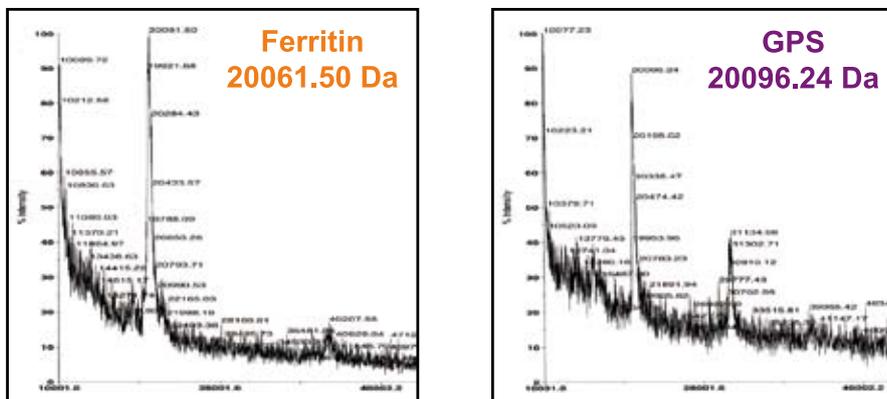


図8 GPSの一次構造と分子量

3. グルタチオンとフェリチンによるパラコートラジカル消去反応

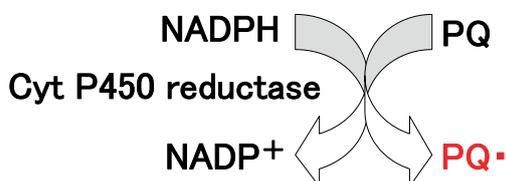
PQ ラジカル発生系として、NADPH cytochrome P450 reductase (NADPH-P450) 系とキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (xanthine-xanthine oxidase; X-XOD) 系を用いた^{17,18)} (図9)。XODの阻害剤であるアロプリノールやタングステンによりPQ毒性が抑制される¹⁹⁾ ことから、PQ毒性におけるXODの関与に関する多くの報告がある²⁰⁾。

フェリチンは濃度依存的にPQラジカルを消去したのに対し、Fe³⁺イオンを含まないアポフェリチンの場合、GSHを加えてもPQラジカルは消去されなかった。

GSHとフェリチンによるPQラジカル消去をX-XOD系とNADPH-P450系と比較したところ、X-XOD系ではフェリチン単独に比べGSHとフェリチン混合系はPQラジカル消去が抑制された。これに対し、NADPH-P450系では、GSHとフェリチン混合系はPQラジカルを完全に消去した (図10)。

PQラジカルがフェリチン内のFe³⁺イオンを還元

1. NADPH-P450系(生理的)



2. Xanthine-XOD系(非生理的)



図9 実験に用いたパラコートラジカル発生系

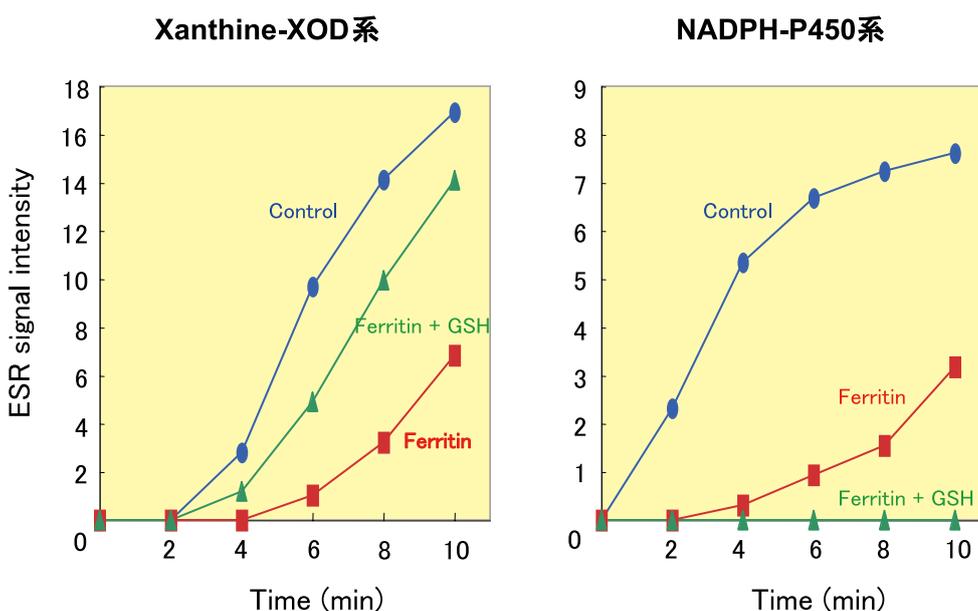


図10 フェリチンとグルタチオンによるパラコートラジカル消去

し、フェリチンから Fe^{2+} イオンを遊離する事は既に述べた。遊離した Fe^{2+} イオンをバソフェナントロンとの錯体形成により測定した。X-XOD系とNADPH-P450系について、好氣的条件下と嫌氣的条件下におけるフェリチン鉄の遊離に対するGSHの影響を調べた(図11)。X-XOD系の場合、好氣的条件、

嫌氣的条件の両方でGSH添加によりフェリチンからの鉄の遊離が増加した。一方、NADPH-P450系では、好氣的条件下と、嫌氣的条件下共にGSH添加により鉄の遊離が抑制され、特に好氣的条件下では高濃度のGSHにより著しい抑制作用が見られた。

次に、PQラジカルによる脂質過酸化に対するGSH

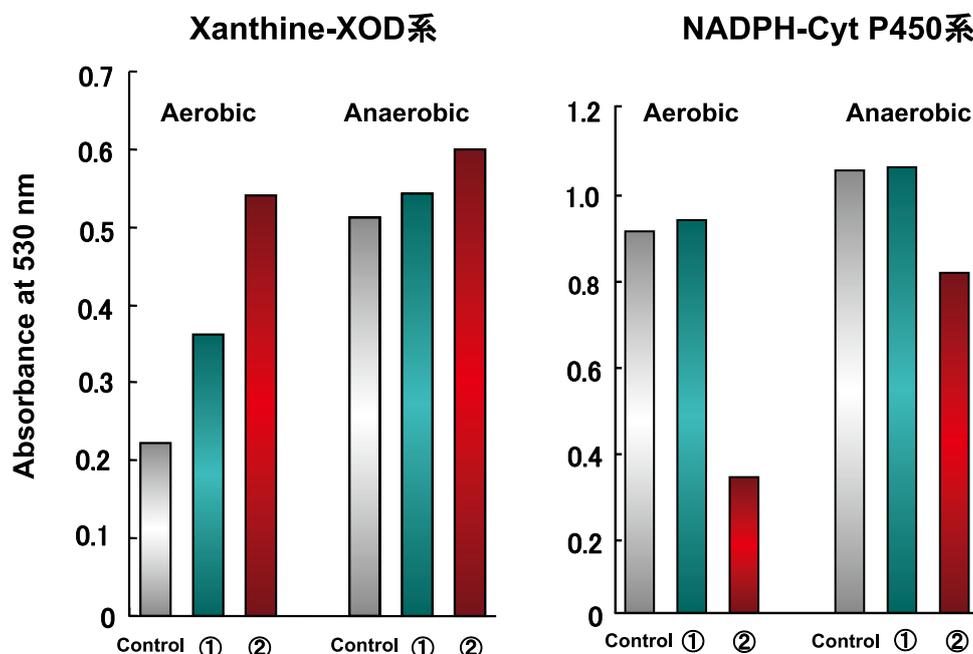


図11 パラコートラジカルによるフェリチン鉄遊離に対するグルタチオンの影響
① 1.25 mM GSH, ② 2.5 mM GSH

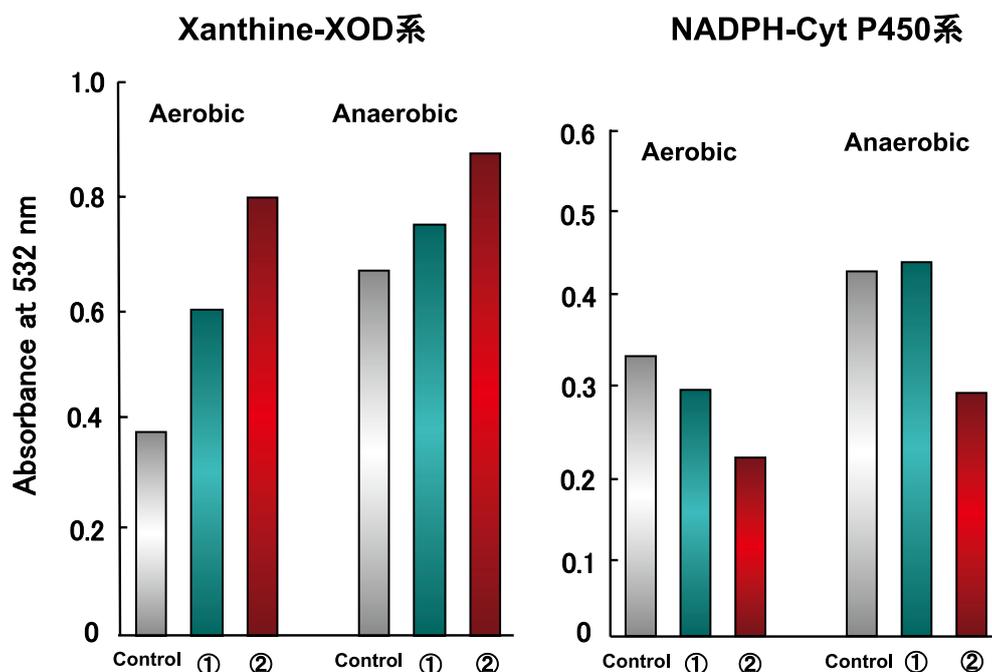


図12 パラコートラジカルによる脂質過酸化に対するグルタチオンの影響
① 1.25 mM GSH, ② 2.5 mM GSH

の影響を NADPH-P450 系ではミクロソームを、X-XOD 系ではホスファチジルコリンリポソーム膜を用いて、チオバルビツール酸反応により調べた (図 12)。X-XOD 系では、好氣的条件と嫌氣的条件下において、GSH 添加により脂質過酸化が促進した。NADPH-P450 系の場合、GSH 濃度に従って、脂質過酸化は抑制された。脂質過酸化に置ける Fe^{2+} の影響

は大きく、フェリチン鉄の遊離と脂質過酸化における GSH の影響は一致した。

H_2O_2 による XOD 活性阻害は知られている²¹⁾。そこで、XOD と H_2O_2 を混合し、窒素バブリングにより溶存酸素を除去した後、PQ ラジカル生成を吸光光度法により調べた。 H_2O_2 の添加により、PQ ラジカルはほとんど生成しなかった。しかし、GSH を加えた

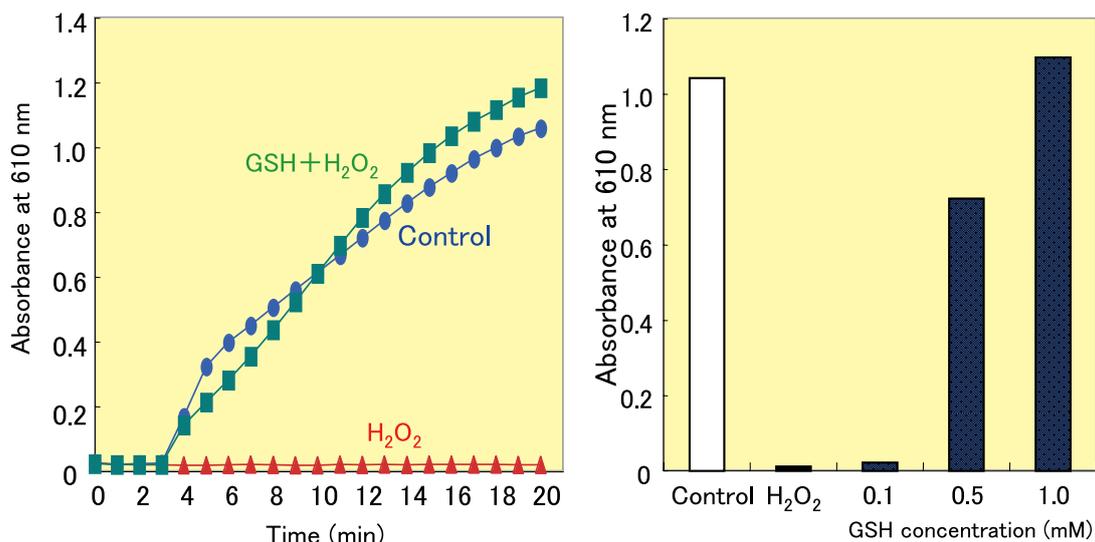


図13 H_2O_2 による XOD 活性阻害に対するグルタチオンの効果

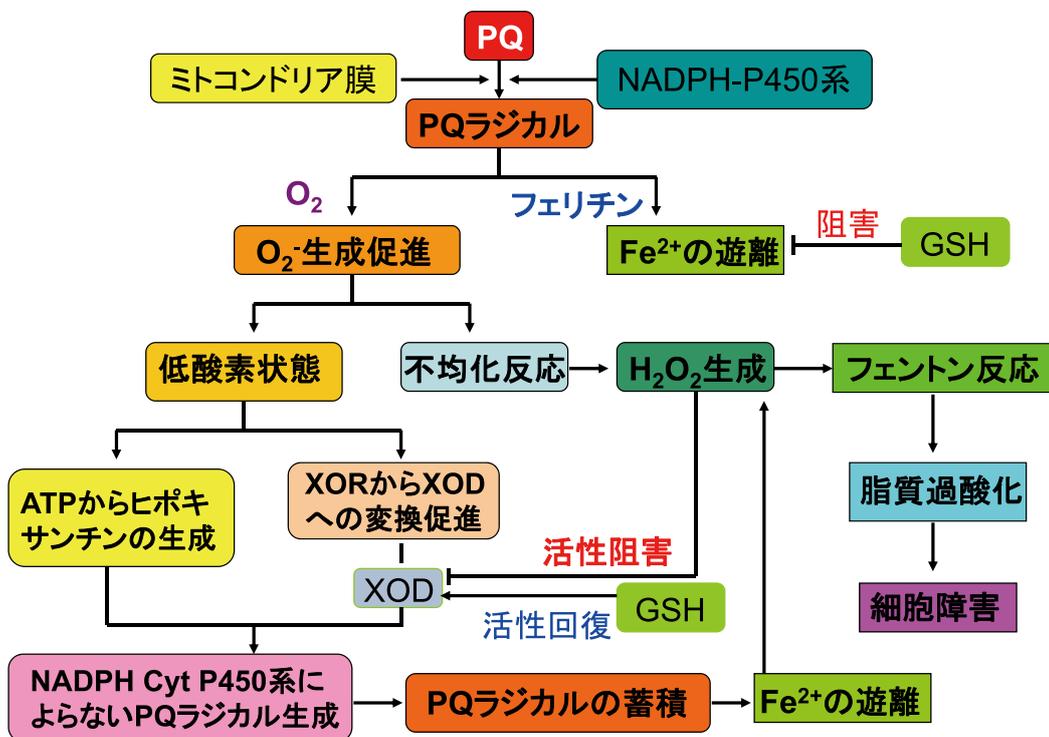


図14 提案するパラコートの細胞毒性機構とグルタチオンの作用

場合, XOD 活性は回復し, コントロールと同じ値になった. この H₂O₂ による XOD の不活性化は添加した GSH 濃度が大きくなるに従って強く抑制された (図 13).

X-XOD 系でフェリチン鉄の遊離と脂質過酸化が GSH により促進されたのは, 好氣的条件下で X-XOD により発生した O₂⁻ から不均化により生じた H₂O₂ が, XOD を不活化したが, GSH 添加により XOD 活性が回復した為と考えられる.

以上の結果をまとめると, NADPH-P450 系では, GSH は PQ ラジカルによるフェリチンからの Fe²⁺ イオンの遊離を抑制し, 酸化障害を抑制する. これに対し, X-XOD 系では, GSH は XOD を活性型に保つ為, PQ ラジカルによるフェリチンからの Fe²⁺ イオンの遊離を促進し, 酸化障害が大きくなったと考えられる.

これまでの実験で得られた結果より, PQ 毒性機構は以下の様に考えられる (図 14). 少量の PQ が体内に取り込まれた場合, NADPH-P450 系を介して PQ ラジカルが生成する. その後, PQ ラジカルによる O₂⁻ 生成やフェリチンからの Fe²⁺ イオンの遊離が起こるが, これらの反応は生体内抗酸化酵素や還元剤によって正常な状態に回復する. しかし, PQ 中毒場合, O₂⁻ 生成が促進され, 細胞は強い嫌気状態となる. また, PQ ラジカルによるフェリチンからの Fe²⁺ イオンの遊離も増大する. 低酸素状態が続くと, ATP からのヒポキサンチンへの変換とキサンチン酸化還元酵素から XOD への変換を促進する²²⁾. この為, NADPH-P450 系によらない PQ ラジカルの生成と蓄積が起

り, その結果として, 多量の O₂⁻ の酸性による酸化障害が誘発されると考えられる. このとき, GSH は O₂⁻ の不均化により生じた H₂O₂ による XOD の不活性化を抑制し, 更なる PQ ラジカルを生成する.

4. アスコルビン酸誘導体によるパラコート毒性の抑制

図 15 に示す 4 種類の両親媒性 AsA 誘導体を合成し, 各誘導体のリポソーム膜浸透性をビタミン E との相乗作用によるリポソーム膜脂質過酸化抑制作用については既に報告した²³⁾. これらの AsA 誘導体を赤血球膜に取り込ませた後, 水溶性ラジカル発生剤 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) による溶血の抑制効果を調べた (図 16). その結果, AsA 誘導体の脂溶性の大きさに従って溶血を抑制した. 赤血球ではこれらの AsA 誘導体は膜内に留まり, 膜外で生じるラジカルを消去する事が分かった.

さらに, AsA 誘導体による PQ 毒性抑制をマウス神経芽細胞腫である NG108 細胞を用いて調べた. AsA 誘導体は細胞毒性を示さず, また, 細胞内に取り込まれ分解されて細胞内 AsA が上昇する事が分かった.

PQ 処理 2 時間前に細胞に AsA 誘導体を添加する前処理と 2 時間後に添加する後処理を行い, どちらがより効果的に PQ 細胞毒性を抑制できるかを調べた (図 17). 前処理では, 3 日後の細胞生存率はコントロールの 2~3 倍となり, 最も脂溶性の大きい HEA

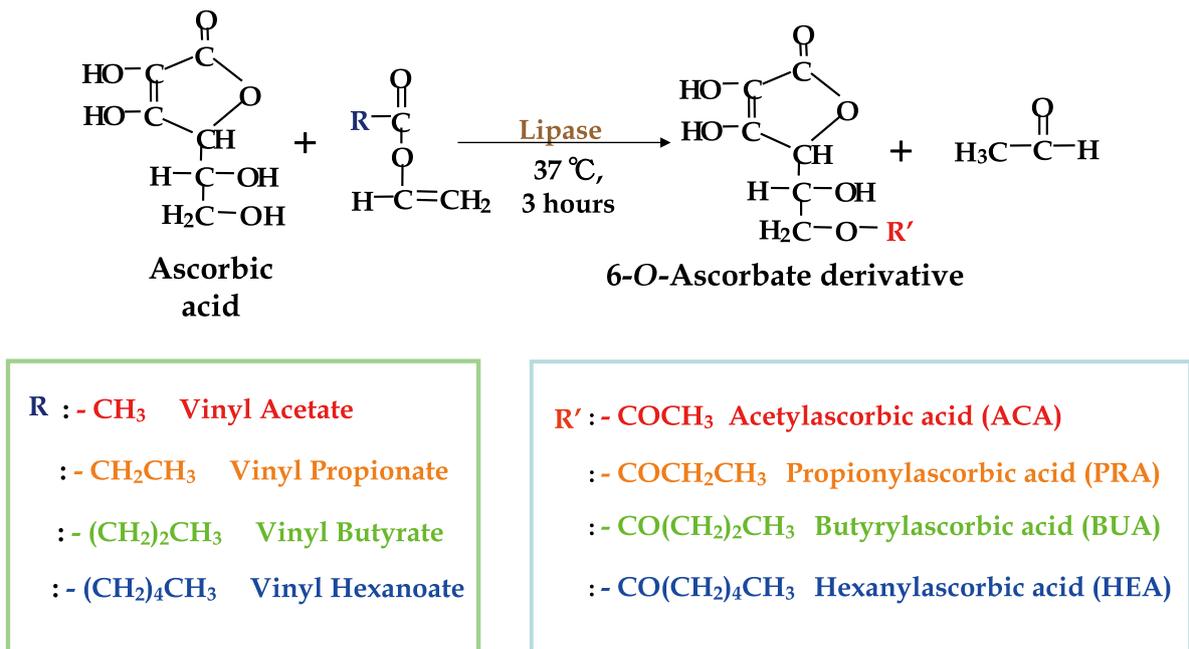


図15 両親媒性アスコルビン酸誘導体の合成

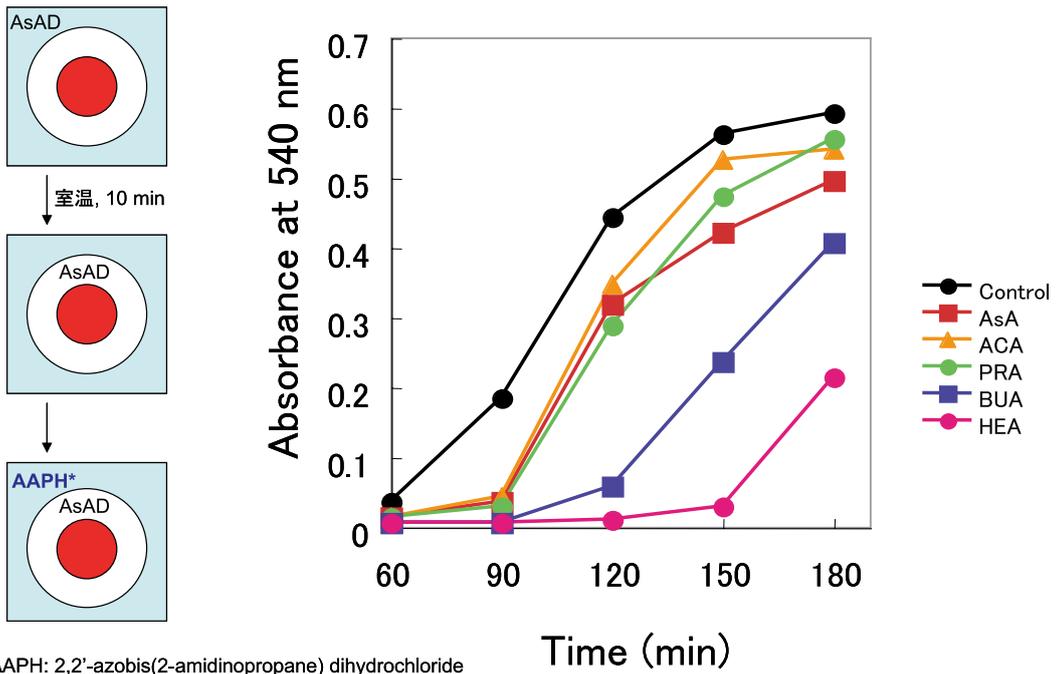


図16 両親媒性アスコルビン酸誘導体による水溶性ラジカル発生剤 AAPH による赤血球の溶血の抑制

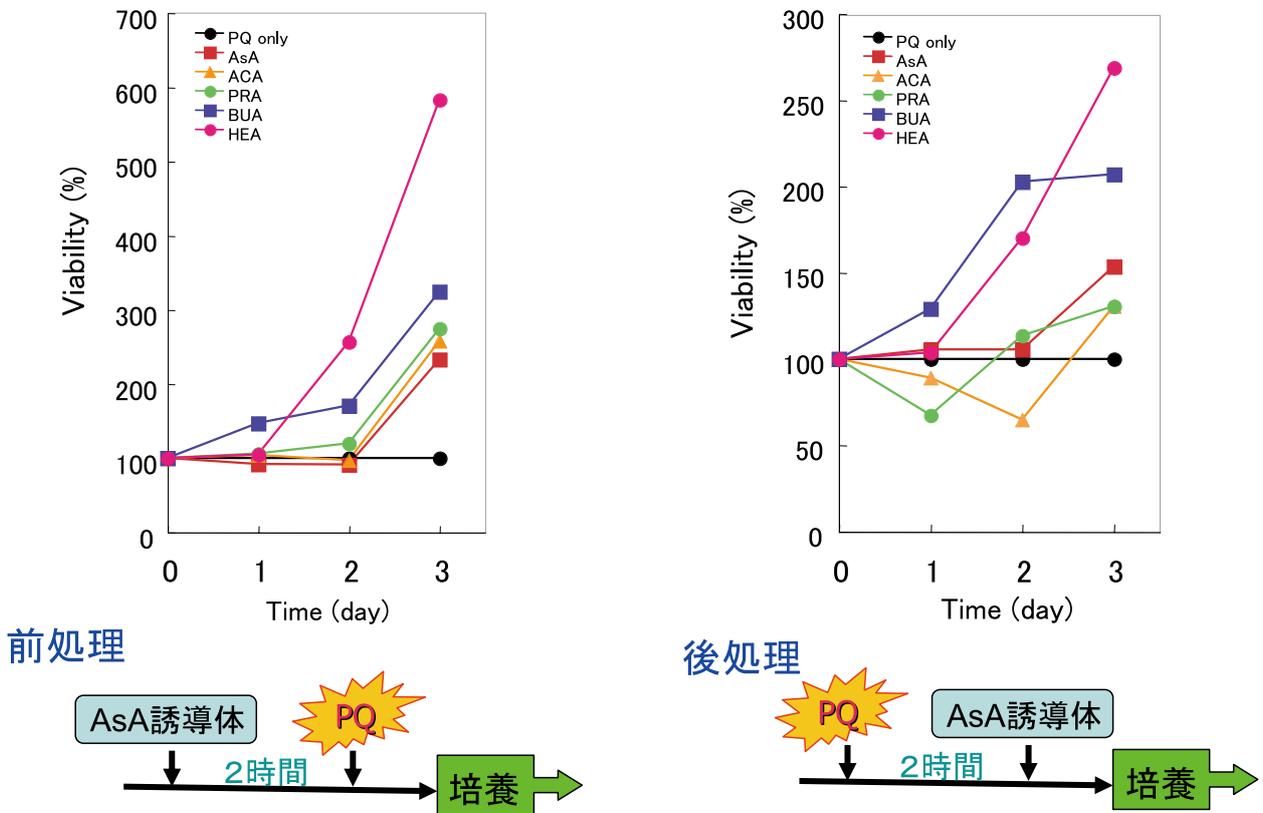


図17 両親媒性アスコルビン酸誘導体によるパラコート毒性の抑制

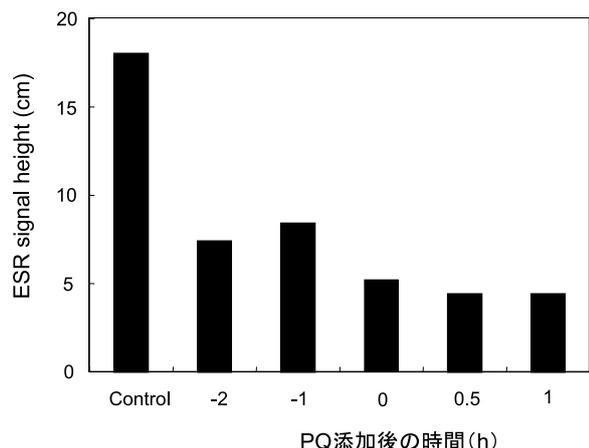


図18 細胞内パラコートラジカル生成に対するアスコルビン酸の抑制作用

は約6倍となった。一方、後処理の場合、3日後の細胞生存率は1.5~3倍と前処理に比べ低い値であった。この抑制作用とPQラジカル消去に関係があるかどうかを調べる為にAsAについて実験を行った(図18)。細胞にPQを加える1, 2時間前と30分, 1時間後にAsAを加えた場合について調べた。その結果、PQ添加前にAsA処理するよりもPQ添加後にAsA処理した方がPQラジカルの減少は大きかった。

5. まとめ

- 1) GSH依存性PQラジカル消去物質(GPS)はフェリチンであった。
- 2) 生理的条件下では、GSHとフェリチンによりPQラジカルを消去できる。GSHはフェリチンからの Fe^{2+} イオンの遊離を抑制する。一方、非生理的条件下(中毒が進行)下では、GSHはフェリチンからの Fe^{2+} イオンの遊離を促進し、脂質過酸化を起こす。
- 3) PQ毒性機構はPQラジカル生成後細胞内は低酸素状態になり、PQラジカルとフェリチンから遊離した Fe^{2+} イオンの蓄積が起るため、酸素の供給後、酸化ストレスが急速に進行して、細胞障害を起こすのではないかと考えられる。
- 4) 両親媒性AsA酸誘導体は脂溶性が大きい誘導体ほど細胞内に入り、PQラジカルを消去して酸化ストレスの進行を抑え、PQ毒性の抑制に働くと考えられる。

謝 辞

これらの実験研究は多くの卒業生によって行われたものです。GPSの生成と同定は佐々木健吉君、三坂はる奈さん、藤由香利さん、衛藤祐一郎君、鐘ヶ江麻里さんの成果です。GSHとフェリチンによるPQラジカル消去は西田奈央さん、中西恵美さん、吉田菜桜子さんの成果です。両親媒性AsA誘導体の合成は鶴丸武彦君、矢野杏子さんの成果です。両親媒性AsA誘導体の抗酸化反応は青木孝浩君、江藤幸喜君の成果です。細胞を用いたPQ毒性の抑制は柴田啓介君、今村翔君、八尋多恵子さん、米本敦史君、小山真生君、栗田辰也君の成果です。

卒業生の皆さんに心より感謝します。

参考文献

- 1) Michaelis L. and Hill E. S., *J. Gen. Physiol.*, **16**, 859-873 (1933)
- 2) Michaelis L. and Hill E. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 1481-1494 (1933)
- 3) Coheme H. M. and Murphy M. P., *J. Biol. Chem.*, **283**, 1786-1798 (2008)
- 4) Dinis-Oliveira R. J., Duarte J. A., Sanchez-Navarro A., Remiao F., Bastos L. M., Carvalho F., *Crit. Rev. Toxicol.*, **38**, 13-71 (2008)
- 5) 松中昭一, 蛋白質核酸酵素, **33**, 2790-2794 (1988)
- 6) 松中昭一, 医学のあゆみ, **142**, 143-145 (1987)
- 7) Bus J. S., Cagen S. Z., Olgaard M., Gibson J. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **35**, 501-513 (1976)
- 8) Bus J. S., Gibson J. E., *Environ. Health Perspect.*, **55**, 37-46 (1984)
- 9) 平井圭一, 島田ひろき, “新ミトコンドリア学” 井上正康, 内海耕造監修, pp309-316 共立出版 (2001)
- 10) Winterbourn C. C., *Biochem. Int.*, **7**, 1-8 (1983)
- 11) Schvertzman S., Zyngier S., Schvertzman C., *Vet. Hum. Toxicol.*, **26**, 473-475 (1984)
- 12) DeGray J. A., Ramakrishna Rao D. N., Mason R. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 145-152 (1991)
- 13) Tomita M., Okuyama T., Ueki A., Watanabe H., Kawai S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1128**, 174-180 (1992)
- 14) Vile G. F., Tyrrell R. M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 14678-14681 (1993)
- 15) Rosio P., Levi S., *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 457-463 (2002)
- 16) Puntaulo S., Cederbaum A. I., *Biochem.*

- Pharmacol.*, **38**, 2911-2918 (1989)
- 17) Winterbourn C. C., *FEBS Lett.*, **128**, 339-342 (1981)
- 18) Kelner M. J., Bagnell R., Hale B., Alexander N. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 422-426 (1988)
- 19) Sasaki M., Yamagami K., Kitazawa Y., Takeyama N., Tanaka T., *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 36-40 (1995)
- 20) Kitazawa Y., Matsubara M., Takeyama N., Tanaka T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 220-224 (1991)
- 21) Terada L. S., Leff J. A., Guidot D. M., Willingham I. R., Repine J. E., *Free Radic. Biol. Med.*, **10**, 62-68 (1991)
- 22) Berry C. E., Hare J. M., *J. Physiol.*, **555**, 589-606 (2004)
- 23) 田中英彦, 福岡大学理学集報, **35**, 81-89 (2005)