

Metabolism of 3-Hydroxykynurenine in Human Erythrocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7997

ヒト赤血球における3-ヒドロキシキヌレニンの代謝反応機構

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

山口 順 道

(昭和62年12月15日受付)

トリプトファン代謝中間体である3-ヒドロキシキヌレニンをヒト赤血球浮遊液に加え、pH 7.0, 37°Cでインキュベートしたところ、赤血球中のメトヘモグロビンが増加した。このヘモグロビンの酸化反応に共役して、3-ヒドロキシキヌレニンは茶褐色の物質に変化した。この物質は3-ヒドロキシキヌレニンが2分子縮合したキサントマチンであることが、紫外・可視吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどによる分析から同定された。精製したオキシヘモグロビンと3-ヒドロキシキヌレニンを反応させるとヘモグロビンはメトヘモグロビンに酸化され3-ヒドロキシキヌレニンはキサントマチンに縮合されたことから、3-ヒドロキシキヌレニンのキサントマチンへの2分子縮合反応はヘモグロビンの酸化反応と共役して起こることが示された。またメトヘモグロビンを含有する赤血球浮遊液に3-ヒドロキシキヌレニンを加えて同様条件でインキュベートしたところ、赤血球内のメトヘモグロビンは還元され、3-ヒドロキシキヌレニンは縮合してキサントマチンに変化した。精製したメトヘモグロビンでも同じくキサントマチンが生成された。このようなキサントマチンの生成は嫌氣的条件下ではみられなかった。以上の結果はヒト赤血球内での3-ヒドロキシキヌレニンのキサントマチンへの代謝はヘモグロビンの酸化還元反応に共役して起こることを、またその反応には酸素の存在が必要であることを示している。

Key words ヒト赤血球, ヘモグロビン, 3-ヒドロキシキヌレニン, キサントマチン

ヒト赤血球中のヘモグロビンの生理的役割は酸素の運搬である。ヘモグロビンの酸素結合作用については多くの研究がなされておりその構造と機能については詳しくわかっている^{1)~3)}。しかしながらヘモグロビンが薬物あるいは生理的化合物を代謝するという点については、これまでほとんど報告されていなかった。従来よりアニリンのような薬物はチトクローム P₄₅₀によって代謝されることが知られているが⁴⁾⁵⁾、ヒト赤血球においてもアニリンが水酸化されることを Tomoda ら⁶⁾は見い出した。Mieyal ら⁷⁾はヘモグロビンが、このアニリン水酸化活性を持っていることを報告している。筆者は、ヒト赤血球内のヘモグロビンが薬物の代謝を行うという観点から、赤血球におけるトリプトファンの代謝中間体である3-ヒドロキシキヌレニン (3-hydroxykynurenine, 3-HKN) との反応を詳しく調べた。その結果、3-HKN は赤血球内ヘモグロ

ビンと反応し、ヘモグロビンを酸化あるいは還元すると同時に自らは2分子縮合してキサントマチンという化合物に変換されることを見いだした。3-HKN はヒト体内では通常肝臓および腎臓でキヌレニナーゼによって代謝され、3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-hydroxyanthranilic acid, 3-HAA) になるか、トランスアミナーゼで代謝されてキサントレン酸 (xanthurenic acid) になると考えられている。本研究では3-HKN と赤血球およびヘモグロビンとの反応を、種々の条件下で調べその反応機構について検討した。

材料および方法

I. 材 料

1. 試薬

3-HKN は和光純薬 (東京) 製を用いた。ビス・トリ

Abbreviations: ACD, acid citrate dextrose; deoxyHb, deoxyhemoglobin; 3-HAA, 3-hydroxyanthranilic acid; HbCO, carboxyhemoglobin; 3-HKN, 3-hydroxykynurenine; Ht, hematocrit; HPLC, high performance liquid chromatography; metHb, methemoglobin;

ス [bis (2-hydroxyethyl) imino-tris (hydroxy-methyl)methane] はシグマ社 (米国) より, Sephadex G-25 (fine grade または coarse grade) と CM-Sephadex C-50 は, ファルマシア社 (スウェーデン) より購入した。等電点電気泳動用平板ゲルはアンフォラインポリアクリルアミドゲルプレート (pH 3.5~9.5) (ファルマシア-LKB 社, スウェーデン) を使用した。スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) はマイルスラボラトリー社 (米国), カタラーゼはペーリンガー社 (西独) より得た。

2. 赤血球およびヘモグロビンの調製

日本赤十字センター金沢支部より得た採血後 2~3 日を経たヒト ACD (acid citrate dextrose) 保存血液を実験に用いた。これを遠心分離 (3,000 rpm, 15 分) したのち血漿と顆粒層を減圧吸引にて除去した。そこへ約 4 倍容量の氷冷 0.9% 塩化ナトリウム溶液を加えて洗浄したのち, 遠心分離 (3,000 rpm, 15 分) によって上清を除いた。この操作を 4 回繰り返して洗浄ヒト赤血球を得た。このようにして得た赤血球をクレブス・リンガー液 [10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.8% NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂] に浮遊して実験に用いた。

赤血球中のヘモグロビンの酸化は井田の方法⁸⁾に従い亜硝酸ナトリウムを用いた。

精製ヘモグロビンは次の方法で得た⁹⁾。洗浄赤血球にイオン交換水を約 5 倍容量加えて溶血し, 遠心分離 (10,000 rpm, 30 分) しゴーストを除き粗ヘモグロビン溶液を得た。得られたヘモグロビン溶液を Sephadex G-25 (fine grade, 10 mM リン酸緩衝液, pH 6.3 で平衡化) カラムでゲルろ過した。つづいて CM-Sephadex C-50 カラム (10 mM リン酸緩衝液, pH 6.3 で平衡化) を用いて精製した⁹⁾。メトヘモグロビンは精製ヘモグロビンにヘム濃度の 4 倍量のフェリシアン化カリウムを加えて得た⁹⁾。ヘモグロビンの実験では緩衝液は 0.1 M NaCl を含む 0.05 M ビス・トリス塩酸 (pH 7.0) 溶液を用いた。

3. 3-HKN およびキサントマチンの調製

3-HKN を少量の 1 N 塩酸溶液で溶かし, ついで 0.1~0.5 N 水酸化ナトリウム溶液で pH を中性に戻した。クレブス・リンガー液または 0.05 M ビス・トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈して 15 mM に調整した。キサントマチンは Butenandt らの方法¹⁰⁾に従って

合成した。また 3-HKN のモル吸光係数は, $\epsilon_{370\text{nm}} = 4,240$ (0.02 M リン酸緩衝液, pH 7.3)¹¹⁾を, キサントマチンについては $\epsilon_{440\text{nm}} = 13,200$ (0.15 M リン酸緩衝液, pH 7.0)¹²⁾を用いた。

II. 赤血球と 3-HKN との反応条件および反応生成物の分離

1. 赤血球と 3-HKN との反応

洗浄赤血球はヘマトクリット (hematocrit, Ht) を 15~20% となるようにクレブス・リンガー液に浮遊した。3-HKN 溶液 (最終濃度 3 mM) を加えたのち pH 7.0, 37°C で反応させた。

2. 反応生成物の分離・分析

一定時間毎に反応溶液の一部 (0.5~1.0 ml) を取り凍結融解で溶血したのち, 遠心 (10,000 rpm, 5 分) し赤血球膜を除いた。上清 (0.2~0.5 ml) を 20~100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-25 (fine grade, 0.5×10 cm) カラムにかけてヘモグロビン分画と 3-HKN および反応生成物分画を分取した。得られたヘモグロビン溶液を等電点電気泳動し, それを二波長 TLC スキャナー (島津 GS-900) でゲルスキャンニング (630 nm) してオキシヘモグロビン, 部分酸化型ヘモグロビン, メトヘモグロビンの割合を求めた⁸⁾。

3-HKN の反応生成物については可視吸収スペクトル (360~500 nm) を測定し経時的にその変化を追跡した。またその分画に 1% アスコルビン酸を加えて還元し同様に可視吸収スペクトル (360~550 nm) を調べた。

上記の反応をアザイド (azide, NaN₃, 最終濃度 5 mM) または一酸化炭素 (carbon monoxide, CO) ガス存在下で行いこれらの反応への影響を調べた。

III. 赤血球による 3-HKN の代謝産物の同定方法

1. 反応生成物の精製

前述と同様の方法で得られた反応生成物を含む溶液に最終濃度が 1% になるようにアスコルビン酸ナトリウムを加えると赤紫色の結晶が析出した。この溶液を遠心分離 (10,000 rpm, 15 分) し結晶を沈澱させ回収した。0.1 N 塩酸溶液で洗い再び遠心分離で回収する洗浄操作を数回繰り返した。これにより未反応の 3-HKN とリン酸を除くことが出来る。得られた還元物質をメタノール塩酸から再結晶¹⁰⁾して反応生成物を得た。

2. 赤外吸収スペクトル

oxyHb or HbO₂, oxyhemoglobin; Q, quinone form of 3-hydroxykynurenine; RBC, red blood cell; SQ, semiquinone form of 3-hydroxykynurenine; SOD, superoxide dismutase; TLC, thin layer chromatography; UV, ultraviolet; v, volume; XT, xanthommatin.

赤外分光光度計 (日本分光 IR-810) で還元型の反応生成物の赤外吸収スペクトル (KBr 法) を測定した。

3. 紫外・可視吸収スペクトル

0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) および 5 N 塩酸溶液中での紫外・可視吸収スペクトル (200~600 nm) の測定は高感度分光光度計 (ユニオン技研 SM-401) で行った。

4. 高速液体クロマトグラフィー

ゲルろ過にてヘモグロビンを除いた反応液をアスコルビン酸で還元後, 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC, 東ソー-HLC-803D) で分析した。カラムは東ソーの ODS-120T, モニターは東ソーの UV-8 Model II を使用した。

5. 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography, TLC) により 3-HKN の反応生成物の同定を行った。プレートは AVICEL SF (フナコシ) を使用し展開溶媒はコリジン/0.2 M $K_2HPO_4 = 2 : 3$ (v/v) を用いた。

IV. 3-HKN と精製ヘモグロビンとの反応条件

3-HKN による精製ヘモグロビンの酸化および還元を調べるため, 精製ヘモグロビン溶液 (メトヘモグロビンまたはオキシヘモグロビン, 最終ヘム濃度 100 μ M) に 3-HKN 溶液 (最終濃度 1 mM) を加え嫌気相下 (Q ガス: ヘリウム/イソブタン=99.05:0.95) または好気相下で 25°C で反応させた。嫌気相では石英セル付きツンベルグ管を使用した。反応は 450~650 nm でのヘモグロビンの吸収スペクトルの変化により追跡した。この場合カタラーゼ (最終濃度 29 units), SOD (最終濃度 1300 units) 等を加えてそれらの影響も調べた。

V. 精製ヘモグロビンによる 3-HKN の反応生成物の分析

ヘモグロビン (オキシヘモグロビンあるいはメトヘモグロビン, 最終ヘム濃度 630 μ M) 溶液に, 3-HKN 溶液 (最終濃度 2.4 mM) を加えて pH 7.0, 37°C で反応させた。反応開始後一定時間毎に試料 (0.2 ml) を取った。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-25 (fine grade) カラムでヘモグロビンと反応生成物を分離し, 360~500 nm で反応生成物の吸収スペクトルの変化を調べてその生成量を検討した。さらにアスコルビン酸で還元型にしたのち, 360~550 nm での吸収スペクトルの変化を調べた。

精製オキシヘモグロビンの濃度と反応産物の生成量との関係を, 3-HKN の最終濃度は 2.3 mM とし, ヘモグロビンの濃度 (ヘム濃度) は 1~800 μ M の範囲で

調べた。反応は pH 7.0, 37°C で 4 時間行った。

精製オキシヘモグロビンの酸化の経時的変化と反応産物の生成量の経時的変化との関係については次の条件下で行った。3-HKN (最終濃度は 2.4 mM) とオキシヘモグロビン (最終濃度は 183 μ M) とを, pH 7.0, 37°C で反応させた。ヘモグロビンの酸化は 630 nm の吸光度の変化で経時的に追跡し, 反応産物の生成量は同一時間に反応液より一定量をサンプリングしゲルろ

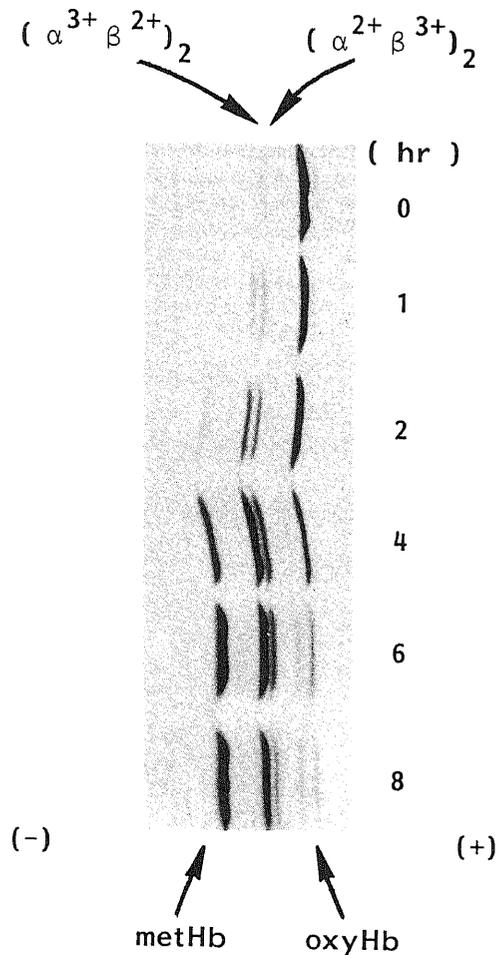


Fig. 1. Isoelectric-focusing patterns of hemoglobins which were obtained during incubation of erythrocytes with 3-HKN.

Suspensions of erythrocytes with 3-HKN were taken out at indicated intervals (0, 1, 2, 4, 6 and 8 hours). After freezing and thawing of the cell suspensions, the lysates were passed through a column of Sephadex G-25 (fine grade) equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. Isoelectric focusing of hemoglobin solutions was performed on PAG plate (pH 3.5~9.5).

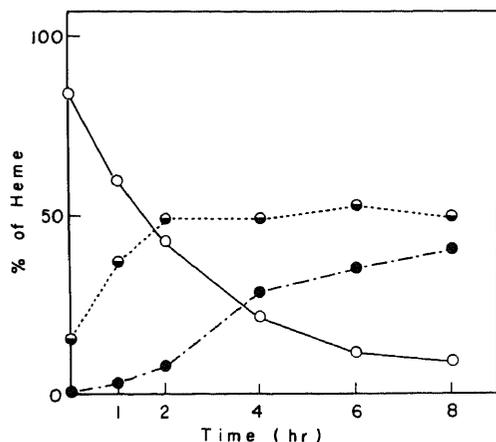


Fig. 2. Fractional changes in oxyhemoglobin [$(\alpha^{2+} \beta^{2+})_2$], half-oxidized hemoglobins [$(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2 + (\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$] and methemoglobin [$(\alpha^{3+} \beta^{3+})_2$] during incubation of erythrocytes with 3-HKN. The isoelectric-focusing patterns in Fig. 1 were analyzed by gel-scanning at 630 nm, and the heme contents (%) of each component (oxyHb, half-oxidized Hb and metHb) to total heme were calculated. ○, oxyhemoglobin; ●, methemoglobin; ●, half-oxidized hemoglobins.

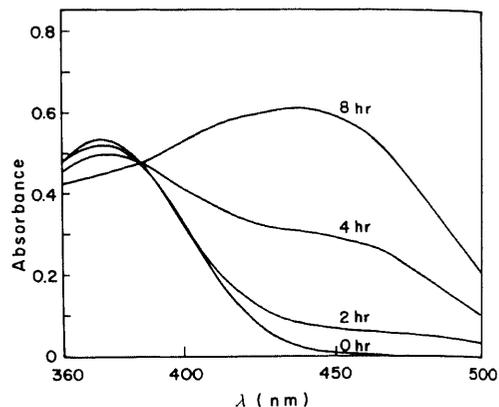


Fig. 3. Changes in absorption spectrum of the reaction product obtained during incubation of erythrocytes with 3-HKN. Human erythrocytes were incubated with 3-HKN at 37°C, pH 7.0. 3-HKN and its metabolite were separated from hemoglobin by gel filtration. The absorption spectra of the reaction product were measured in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) between 360 nm and 500 nm.

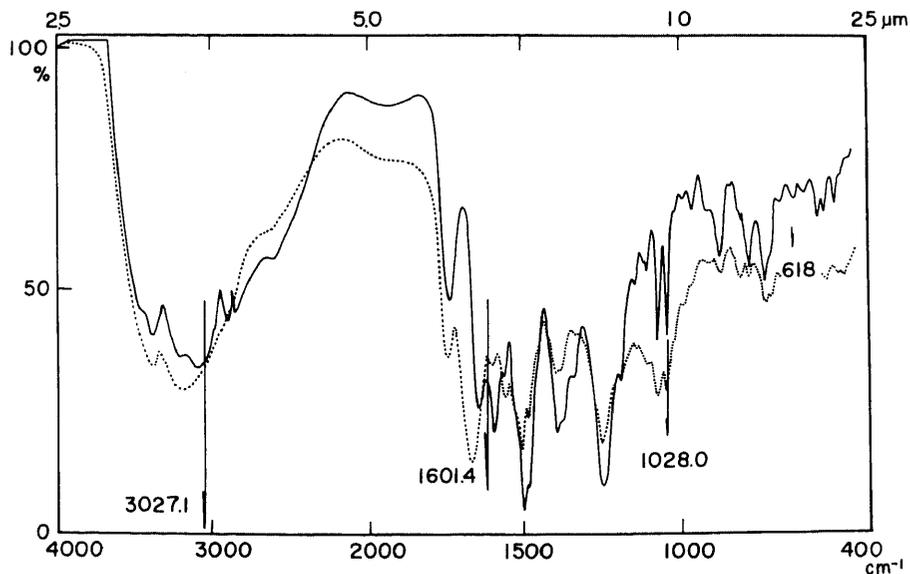


Fig. 4. Infrared spectra of authentic hydroxanthommatin and 3-HKN metabolite reduced with ascorbic acid.

Hydroxanthommatin was synthesized by the method of Butenandt et al¹⁰. The 3-HKN metabolite in human erythrocytes was obtained according to the same method as described in the legend to Fig. 1 and was purified by recrystallization¹⁰. —, authentic hydroxanthommatin; ···, 3-HKN metabolite.

過でヘモグロビンを分離除去後、360~500 nm の吸収スペクトルを測定して調べた。

成 績

I. 赤血球と 3-HKN との反応

図 1 にヒト赤血球と 3-HKN との反応で得られたヘモグロビンの等電点電気泳動パターンを示した。この泳動パターンから見ると、赤血球内のヘモグロビンは 3-HKN によって酸化され $(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$ や $(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$ のような半酸化型ヘモグロビンに、さらに完全酸化型ヘモグロビン $(\alpha^{3+} \beta^{3+})_2$ であるメトヘモグロビンへと変化していくことが分かった。図 2 はこの電気泳動パターンをゲルスキャンで分析しヘモグロビンの酸化の度合の時間的経過を示したものである。反応開始と共にオキシヘモグロビンは減少しそれと同時に部分酸化型ヘモグロビンが増加した。反応開始後 2 時間たった頃からメトヘモグロビンが増加し始めたが部分酸化型ヘモグロビンは一定となった。このことはオキシヘモグロビンが部分酸化型ヘモグロビンを経てメトヘモグロビンになっていることを示している。このような 3-HKN によるヘモグロビンの酸化作用についてはこれまで知られていなかった。一方、3-HKN と赤血球との反応溶液を Sephadex G-25 カラムに通すと、ヘモグロビン分画と異なるところに茶褐色の物質が得られる。この分画の時間的変化を可視吸収スペクトル (360~500 nm) で調べた (図 3)。反応開始時の 3-HKN のスペクトルは、時間と共に 440 nm 付近に肩を持つものに変化し、8 時間後には 440 nm に明かなピークを示すものに変化した。

II. 反応生成物の同定

図 4 は再結晶により精製して得られた還元型の反応生成物の赤外吸収スペクトルである。このスペクトルは Butenandt らの報告しているヒドロキシサントマチンの赤外吸収スペクトル¹⁰⁾¹³⁾とよく一致した。この結果、ヒト赤血球における 3-HKN の代謝物は 3-HKN が 2 分子縮合したキサントマチンであると考えられる。還元型の反応生成物を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) および 5 N 塩酸溶液に溶解し、しばらく空気下で放置して置くと酸化型になるので、この試料について紫外・可視吸収スペクトルを測定した。図 5 に示すように、この反応生成物の紫外・可視吸収スペクトルは合成キサントマチンの紫外・可視吸収スペクトル¹⁴⁾と一致した。

さらに、HPLC による反応生成物の分離パターンを検討した (図 6)。ヒト赤血球と 3-HKN を反応させて一定時間ごとに得た溶液をゲルろ過して 3-HKN の反応生成物を得た。反応生成物に 1% アスコルビン酸を

加え還元型にした後 HPLC によって分析した。その結果、反応後 3 時間めと 5 時間めに得たサンプルでは HPLC パターンに新しいピークが現れ、しかも時間とともにその量は増加した。その HPLC の保持時間 (retention time) は合成ヒドロキシサントマチンを HPLC にかけて得られた保持時間と一致した。この結果からもヒト赤血球における 3-HKN の代謝物質はキサントマチンであると考えられる。また TLC でも 3-HKN 代謝産物、合成キサントマチンの Rf 値はともに 0.25 と一致する結果が得られた (図 7)。

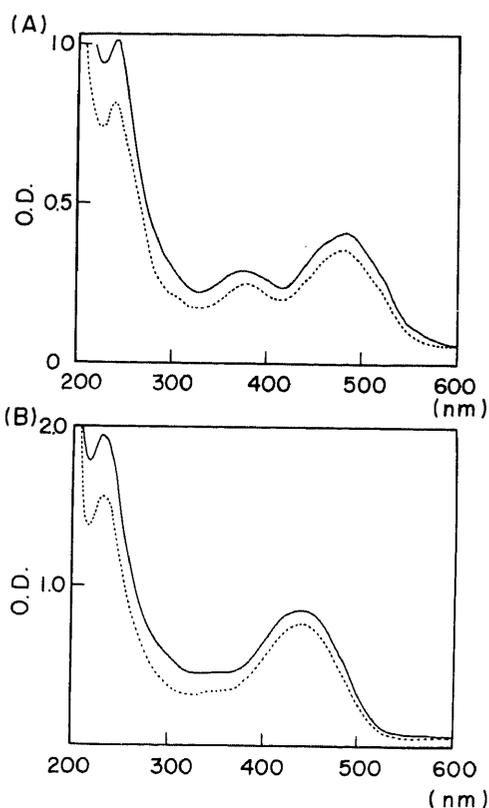


Fig. 5. UV and visible spectra of 3-HKN metabolite in erythrocytes and of authentic xanthommatin.

Authentic xanthommatin and 3-HKN metabolite were obtained as described in the legend to Fig. 4. (A), absorption spectra of 3-HKN metabolite and authentic xanthommatin in 5 N HCl solution. The dotted line shows 3-HKN metabolite. The solid line shows authentic xanthommatin.

(B), absorption spectra of 3-HKN metabolite and authentic xanthommatin in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.0. The dotted line shows 3-HKN metabolite. The solid line shows authentic xanthommatin.

以上の結果は、赤血球における 3-HKN の代謝産物はキサントマチンであることを示している。

Ⅲ. 種々の条件下における赤血球と 3-HKN との反応

図 8 はアザイドおよび一酸化炭素がオキシヘモグロビン含有赤血球と 3-HKN との反応にどのように影響するか調べたものである。コントロールではキサントマチン生成に一時間程度のタイムラグ (time lag) が観察され 2 時間以降から生成が増加した。この赤血球浮遊液に予めアザイドを加えておいてもキサントマチン生成はほとんど影響されなかった。オキシヘモグロビンを含む赤血球浮遊液に一酸化炭素を吹き込んで HbCO に変換したのち好気相下で反応させて調べると、3-HKN からのキサントマチンの生成は著しく阻

害された。また HbCO 含有赤血球と 3-HKN を一酸化炭素気相下で反応させた場合は、この反応は全く起きなかった。3-HKN 自身は空気中で自動酸化されて少量ながら褐色物質に変化した。しかし、この自動酸化反応は 2 時間以降は非常に小さくなった。またデータには示さなかったがオキシヘモグロビン含有赤血球と 3-HKN との反応は嫌氣的条件下 (deoxyHb) ではほとんど進行せずキサントマチンは生成しなかった。このようにヒト赤血球における 3-HKN の代謝には酸素の存在が必要であることが分かった。

一方、メトヘモグロビン含有赤血球と 3-HKN とを反応させると、オキシヘモグロビンを含む赤血球の場合と同様キサントマチンが生成された。しかし図 9 に示されるようにメトヘモグロビン含有赤血球ではオキ

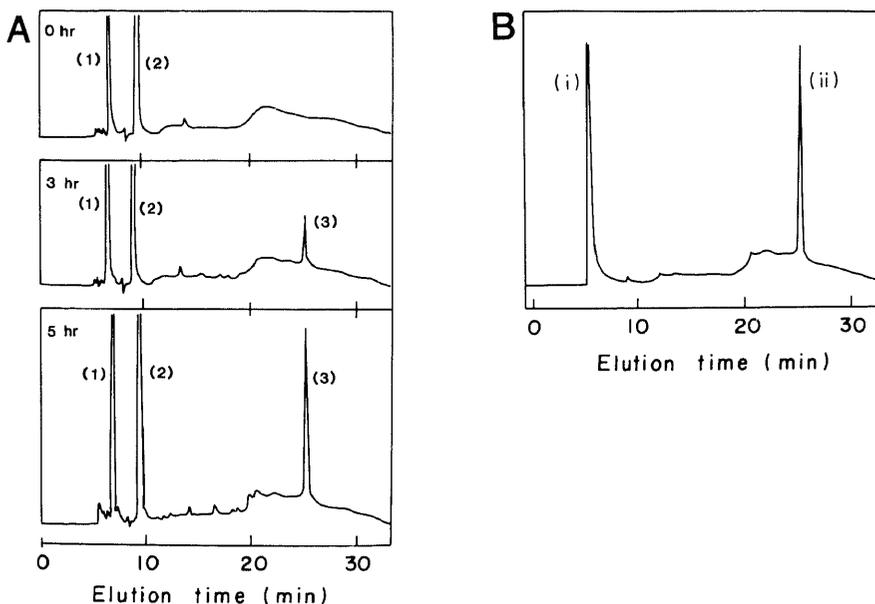


Fig. 6. Separation of 3-HKN metabolite by HPLC.

The samples containing 3-HKN and 3-HKN metabolite were obtained as described in the legend to Fig. 1. Before application on a reverse phase column (ODS-120T), samples were reduced by adding ascorbic acid. The solvent system was: phase A, 4% acetonitrile in 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 2.5), and phase B, 50% acetonitrile in 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 2.5). The gradient (percentage B in A) was discontinuously changed with time; 20% (0 min), 50% (2 min), 60% (10 min), 100% (12 min), 100% (20 min). The flow rate was maintained at 0.5 ml/min, and the absorbance was monitored at 240 nm.

A, the elution pattern at 0, 3, 5 hours. Ascorbic acid was added to the solution of 3-HKN and its metabolite which were obtained by gel filtration. Peak (1) is ascorbic acid, peak (2) is 3-HKN and peak (3) is 3-HKN metabolite.

B, the elution pattern of hydroxanthomatin which was obtained by the reduction of synthesized xanthomatin with ascorbic acid. Peak (i) is ascorbic acid and peak (ii) is hydroxanthomatin.

シヘモグロビン含有赤血球の時に比べキサントマチンの生成量は、反応開始後8時間での生成量でみると約半分であった。アザイドの存在下でメトヘモグロビン含有赤血球と3-HKNとをインキュベートするとキサントマチンの生成はさらに阻害された。

IV. 3-HKNによる精製ヘモグロビンの酸化と還元
表1, 2に好氣的及び嫌氣的条件下での3-HKNによるヘモグロビンの酸化または還元反応を示した。ヘモグロビンの酸化速度または還元速度については578 nmの吸収の増減により算出した¹⁵⁾。好氣的条件下では3-HKNはオキシヘモグロビンの酸化およびメトヘモグロビンの還元作用を有している。3-HKNによる

オキシヘモグロビンの酸化速度は $0.52 \mu\text{M}/\text{min}$ 、メトヘモグロビンの還元速度は $0.31 \mu\text{M}/\text{min}$ であった。一方、嫌氣的条件下ではメトヘモグロビンの還元反応はみられたがキサントマチンの生成はほとんど起こらず、その還元速度も $0.12 \mu\text{M}/\text{min}$ と好氣相下の1/3に減少していた。また3-HKNによるデオキシヘモグロビンの酸化反応は全く起こらなかった。

次に O_2 のスカベンジャーであるSODや H_2O_2 のスカベンジャーであるカタラーゼを予め反応液に加えて3-HKNによるヘモグロビンの酸化還元反応を調べた(図10 A, B), SODはオキシヘモグロビンの3-HKNによる酸化を促進し、メトヘモグロビンの還元を阻害した。カタラーゼはオキシヘモグロビンの酸化

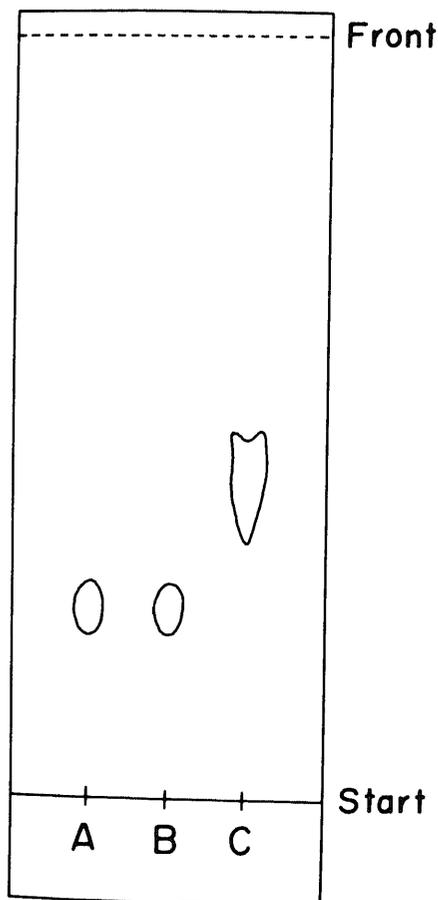


Fig. 7. TLC pattern of 3-HKN metabolite.

3-HKN metabolite and authentic xanthommatin were obtained as described in the legend to Fig. 4. Samples were spotted on a cellulose TLC plate (AVICEL SF, Funakoshi, Tokyo) and developed with collidine/0.2 M K_2HPO_4 (2:3, v/v). A, 3-HKN metabolite; B, authentic xanthommatin; C, 3-HKN.

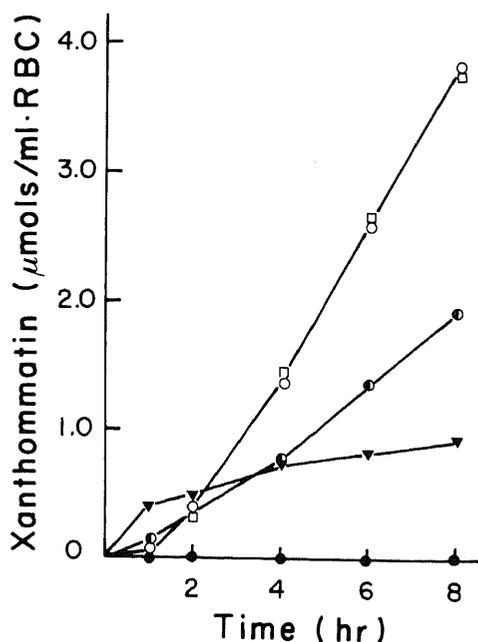


Fig. 8. Effects of NaN_3 and CO gas on xanthommatin formation in erythrocytes.

Erythrocytes containing oxyhemoglobin were incubated with 3-HKN (2.5 mM) in Krebs-Ringer's solution (Ht=11%) at 37°C , pH 7.0 after the addition of NaN_3 (5 mM) or bubbling with CO gas. The samples were taken out at indicated intervals, and subjected to the measurement of absorbance at 440 nm after gel filtration. Formation of xanthommatin ($\mu\text{mols}/\text{ml}\cdot\text{RBC}$) was calculated by using $\epsilon_{440\text{nm}} = 13,200/\text{M}/\text{cm}^{129}$. ○, control; □, + NaN_3 (5 mM); ●, erythrocytes containing HbCO (The incubation was performed under CO gas conditions); ◐, erythrocytes containing HbCO (The incubation was performed under aerobic conditions); ▼, autoxidation of 3-HKN.

Table 1. Rates of oxidation of oxy- and deoxyhemoglobin by 3-HKN

	Autoxidation rates of hemoglobin (μ M/min) (-) 3-HKN	Oxidation rates of hemoglobin (μ M/min) (+) 3-HKN
Oxyhemoglobin	0.044	0.52
Deoxyhemoglobin	0	0

The reaction mixture contained oxy- or deoxyhemoglobin (100μ M in heme) and 1 mM 3-HKN. The reactions were pursued at 25 °C. The oxidation rates by 3-HKN were calculated from the absorbance changes at 578 nm¹⁸.

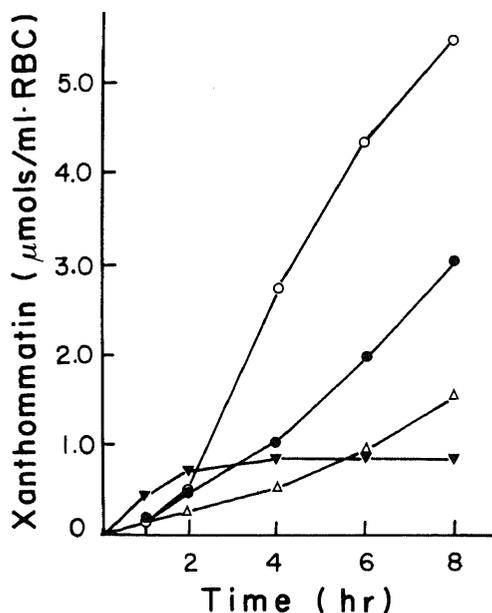


Fig. 9. Effect of NaN_3 on metabolism of 3-HKN in human erythrocytes containing metHb.

Hematocrit of erythrocyte suspensions was 17%. Concentration of 3-HKN was 2.5 mM. \circ , erythrocytes containing oxyHb (control); \bullet , erythrocytes containing metHb; \triangle , + NaN_3 (5 mM) and erythrocytes containing metHb; \blacktriangledown , autoxidation of 3-HKN.

を著しく抑えたが、メトヘモグロビンの還元は抑制しなかった。SOD とカタラーゼの両方を加えた場合オキシヘモグロビンの酸化は著しく抑えられた。

V. 精製したヘモグロビンと 3-HKN との反応

次に精製したヘモグロビンと 3-HKN との反応について調べた。反応産物は赤血球の場合と同様、キサントマチンであることが吸収スペクトル等の検索により明らかになった。図 11 にオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンと 3-HKN の反応の時間的経過を示した。赤血球との反応の場合にみられたような著しい反応開始の遅れはない。メトヘモグロビンによるキサン

Table 2. Rates of reduction of methemoglobin by 3-HKN

	Reduction rates of hemoglobin (μ M/min)
(+) Oxygen	0.31
(-) Oxygen	0.12

The reaction mixture contained methemoglobin (100μ M in heme) and 1 mM 3-HKN.

トマチンの生成量は赤血球の場合とは異なりオキシヘモグロビンと同程度であった。

3-HKN の最終濃度を 2.3 mM とし、オキシヘモグロビンの濃度を変えて (ヘム濃度にして $1 \sim 800 \mu$ M) キサントマチンの生成を調べた (図 12)。図に示される様に 6μ M 以下のヘム濃度ではそのヘム濃度に比例してキサントマチンの生成量が増加した。50 μ M 以上のヘム濃度ではキサントマチンの生成量はほぼ一定であった。

VI. ヘモグロビンの酸化量とキサントマチンの生成量との関係

オキシヘモグロビンの酸化量とキサントマチンの生成との量的関係を調べた (図 13)。図に見られるようにヘモグロビンの酸化には二つの段階がみられた。30 分までの急速に進む酸化とそれ以降に見られる緩徐な酸化である。これは 3-HKN によるヘモグロビンの酸化において、 α 鎖と β 鎖の酸化速度の差によるものと考えられる¹⁹⁾¹⁷⁾。一方、キサントマチンの生成は最初きわめて少なく、反応開始 5 分頃より生成が始まり 20 分後から急激に増加した。このようにキサントマチンの生成にはタイムラグが明らかにあり、このことは 3-HKN からすぐにキサントマチンが合成されるのではなく、いくつかの中間段階を経てキサントマチンが合成されている可能性を示唆している。

考 察

ヘモグロビンは酸素を運搬するタンパク質であるが、生体内で物質代謝にも関与しているらしいことが

近年わかってきた。Fitzpatrick ら¹⁹⁾は、プロスタグランジン的一种であるロイコトリエン A₄ が、ヘモグロビンによって5HPETE (5-hydroperoxy-icosatetraenoic acid) より合成されることを報告した。また Yamabe ら¹⁹⁾はL-ドーパがヘモグロビンによって脱炭酸されることを示した。しかしながらヘモグロビンの薬物の代謝については十分に解明されていない。一方、3-HKN や3-HAA などのトリプトファン代謝物はNADの前駆体として重要であるが、これらの物質が赤血球中でどのような変化を受けるかということについては明らかではなかった。3-HKN は通常3-HAA に代謝されるのであるが、ヒト赤血球では2分子縮合の反応でキサントマチンという褐色の物質に代謝されることが本研究で明らかになった(図4-9)。とくに赤血球内のヘモグロビンがこの反応に直接関与すること(図11)、またヘモグロビン自身は3-HKN によって酸化を受けたり還元されたりすることが示された(図10 A, B)。このような3-HKN のキサントマチンへの代謝反応は高等動物の細胞では今まで報告がなく、昆虫の眼色素の合成反応として知られている²⁰⁾

のみである。そこで今回の実験結果を基にして、3-HKN によるヘモグロビンの酸化還元反応のメカニズムと、3-HKN からいかにしてキサントマチンが生成されるかについて以下に考察する。

図1に示したように3-HKN はヒト赤血球内のヘモグロビンを酸化した。また、3-HKN は赤血球内のメトヘモグロビンの還元作用を持っていることも明らかになった。このように3-HKN は赤血球内のヘモグロビンの酸化還元作用を有するが、精製ヘモグロビンでも同様の結果が得られた(図10)。また、このようなヘモグロビンの酸化還元反応にともなって、3-HKN はキサントマチンに代謝された(図11)。この3-HKN のキサントマチンへの縮合反応については Butenandt ら²¹⁾によって図14のようなプロセスが示されている。これによると、3-HKN はまず脱水素によりキノイミンを生じ、このキノイミンが3-HKN と縮合反応を起こし、アミノ基がはずれて側鎖が環を巻きハイドロキサントマチンが生じる。さらに2原子の脱水素によりキサントマチンが出来る。

そこで、本研究の実験結果と従来の報告を考慮し、3-HKN によるヘモグロビンの酸化還元反応とそれに

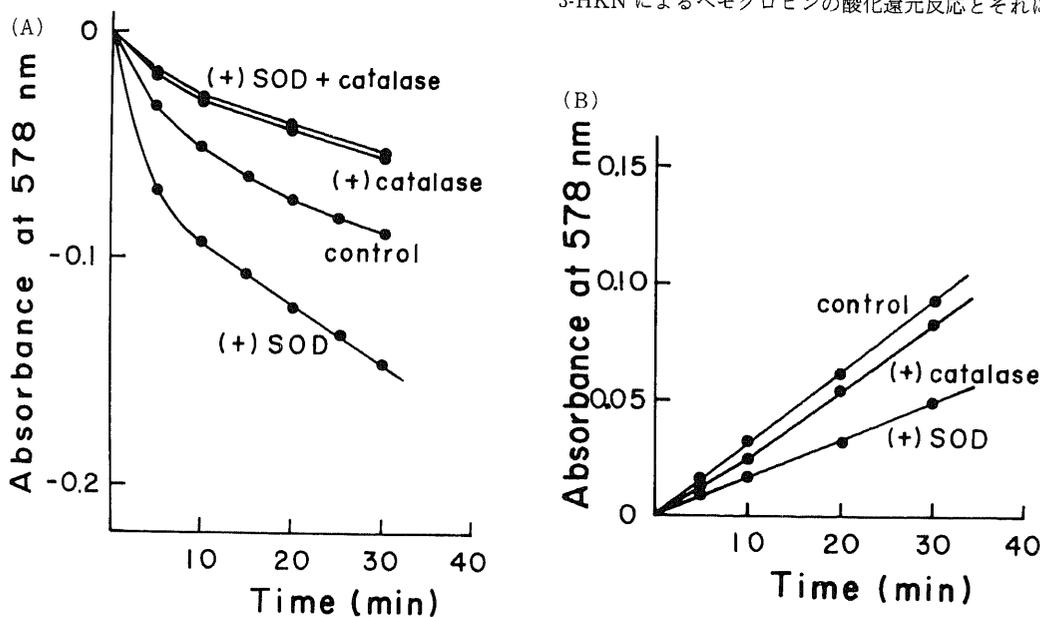


Fig. 10. Effects of SOD and catalase on the oxidation of oxyhemoglobin or the reduction of methemoglobin with 3-HKN. The oxidation and reduction rates were measured spectrophotometrically by the decrease or increase in absorbance at 578 nm¹⁹⁾, respectively. The reaction mixture contained oxy- or methemoglobin (80 μ M in heme) and 500 μ M 3-HKN. SOD and catalase were used at 1300 units and 29 units, respectively. The control in the figure shows the experiment with 3-HKN and without enzyme.

(A). Oxidation of oxyhemoglobin with 3-HKN in the presence or absence of catalase or SOD.

(B). Reduction of methemoglobin with 3-HKN in the presence or absence of catalase or SOD.

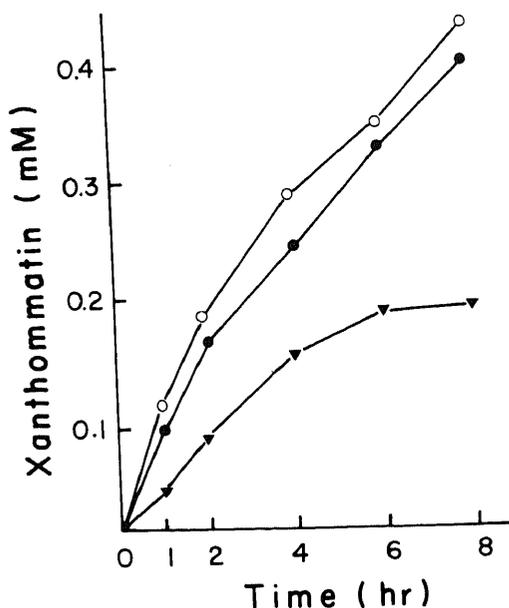


Fig. 11. Formation of xanthommatin during the reaction of oxy- or metHb with 3-HKN. Purified oxy- or metHb ($630\mu\text{M}$ in heme) was mixed with 3-HKN (2.4 mM). Xanthommatin formation was determined by the increase in absorbance at 440 nm . ○, oxyhemoglobin; ●, methemoglobin; ▼, autoxidation of 3-HKN.

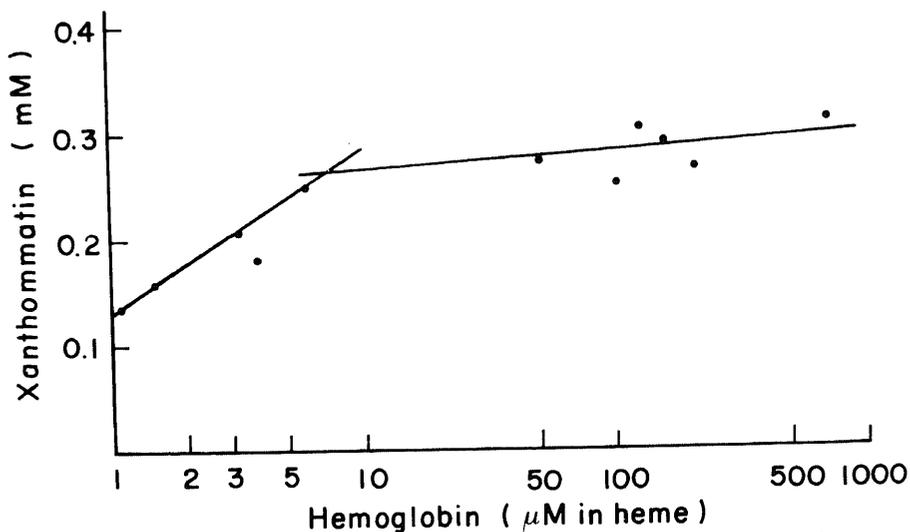
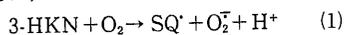


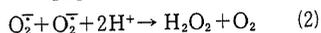
Fig. 12. Relationship between the formation of xanthommatin and concentration of hemoglobin. 3-HKN (2.3 mM) was incubated with various concentrations of oxyHb ($1\sim 800\mu\text{M}$) for 4 hours at 37°C , pH 7.0. Xanthommatin formation was determined by the increase in absorbance at 440 nm .

共役して起こる 3-HKN からキサントマチンへの代謝反応として次のようなプロセスを考えた (図 15)。

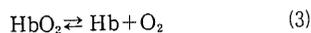
3-HKN は、ハイドロキノン化合物が一般的にそうである様に、酸素存在下では自動酸化反応によってセミキノイミンラジカル (semiquinimine radical, 3-HKN の semiquinone 型, SQ') に酸化される。この反応は、



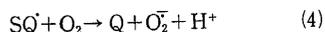
という式で表される。 O_2 の水溶液への溶解度は低い。ここに 2 価鉄のヘモグロビンが存在するとヘモグロビンに O_2 が結合して、 O_2 の溶存量は飛躍的に高まる。その結果 3-HKN は、オキシヘモグロビンより解離した O_2 と反応しセミキノイミンへと酸化される。 O_2 は一旦還元される O_2^- になるが、さらに不均化反応により H_2O_2 に変化する。



これらの反応は、



の平衡が右へずれることにより O_2 の供給を受けて次々に進行することになる。セミキノイミンは O_2 との反応性が強いので O_2 と反応してキノイミン (quinimine, 3-HKN の quinone 型, Q) にさらに酸化される。この反応は、

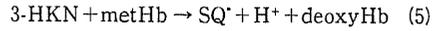


という式で表される。このようにしてオキシヘモグロ

ピンより解離した O₂ と 3-HKN が反応してキノイミンが生成し、これが 3-HKN とさらに縮合反応をすることでキサントマチンが生成されると考えられる。こ

の間オキシヘモグロビンは O₂ を解離することによりデオキシヘモグロビンになるが、O₂⁻ の不均化反応で生成された H₂O₂ と速い速度で反応しメト Hb に変化する²²⁾。このようにヘモグロビンは 3-HKN によって直接酸化されるのではなく、3-HKN と O₂ との反応に続いて生成した H₂O₂ によって酸化されると考えられる。このことは酸素が存在しない場合 3-HKN によるヘモグロビンの酸化反応が進行しないこと (表 1), そしてカタラーゼ存在下では酸化反応が非常に抑えられること, SOD 存在下で反応が促進されること (図 10), などで裏付けられる。

一方、3-HKN とメトヘモグロビンとの反応でもキサントマチンが生成されるが、この反応は 3-HKN とメトヘモグロビンとの直接反応で開始すると考えられる。すなわち、



のように反応は進行し、生成されたセミキノイミンはさらに前述のように O₂ と反応してキノイミンへ変化すると考えられる。このことは 3 価のヘム鉄と結合するアザイドがメトヘモグロビン含有赤血球での反応を抑えたことから支持される (図 9)。3-HKN のキノ型は図 14 の反応で 3-HKN と縮合反応を起こしてキサントマチンへ変化すると考えられる。図 15 下段に示されるように第一段階の 3-HKN との反応でメトヘモグロビンは好氣的条件下ではオキシヘモグロビンに、嫌氣的条件下ではデオキシヘモグロビンに変化する (表 1, 表 2)。嫌氣的条件下では 3-HKN よりのキサントマチンへの生成は起こらないが、それは O₂ が

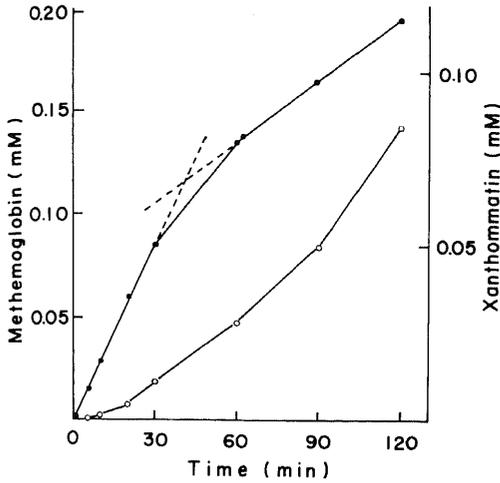


Fig. 13. Relationship between formation of xanthommatin and oxidation of hemoglobin. OxyHb (183 μM) was incubated with 3-HKN (2.4 mM) at 37°C, in 0.05 M bis-tris buffer (pH 7.0). Hemoglobin oxidation was measured from the change in absorbance of the reaction mixture at 630 nm¹⁵⁾. Xanthommatin formation was measured by the increase in absorbance at 440 nm of the samples which were separated from hemoglobin by gel filtration. ●, hemoglobin; ○, xanthommatin.

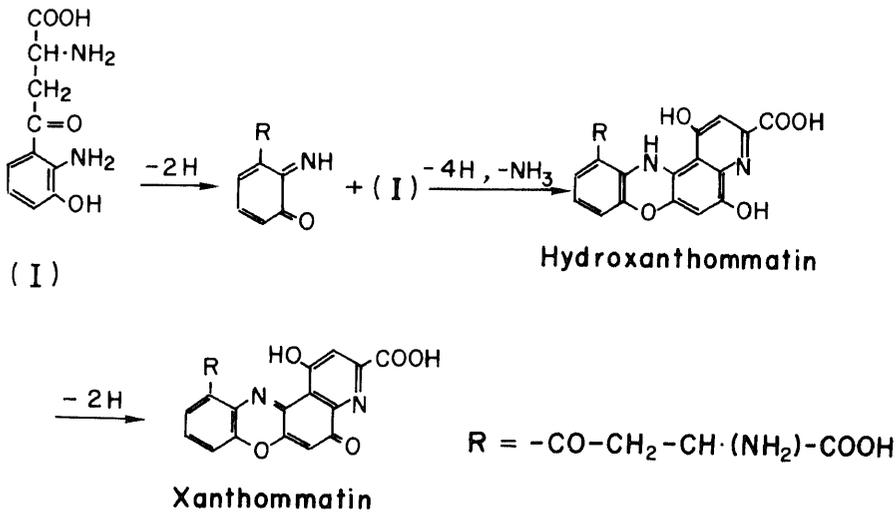


Fig. 14. Possible mechanism of xanthommatin formation from 3-hydroxy-kynurenine²¹⁾. (I) shows 3-HKN.

存在しないため(4)式の反応が進行しないことによると思われる。

図 13 で示したようにヘモグロビンの酸化される時間とキサントマチンの生成される時間には大きなずれがある。すなわち、キサントマチンの生成にはタイムラグが存在する。このことは赤血球内の反応でも同じである (図 8, 9)。このようなキサントマチン生成のタイムラグは 3-HKN よりキノイミンの生成が定常状態に達するまでの時間と考えることが出来る。また図 12 に示したようにキサントマチンの生成速度は、6 μM (ヘム濃度) 以下のオキシヘモグロビン濃度ではオキシヘモグロビンの濃度に依存して増大しているが、これはヘモグロビン濃度の増加により反応溶液中の酸素の溶存量が増えたためと考えられる。なお、ヘモグロビンの 10 μM 以上のヘム濃度の存在下では酸素濃度は 3-HKN に対して充分量存在するので、キサントマチン生成速度は一定になると考えられる (図 12)。この結果は図 15 に示したように 3-HKN がオキシヘモグロビンと直接反応するのではなく、オキシヘモグロビンより解離した酸素と反応してキサントマチンへと代謝されることを意味する。3-HKN は体内では主として肝臓、腎臓などの臓器で 3-HAA に代謝され、さらに NAD へ変化する。しかしながら、本研究で示したように 3-HKN はヒト赤血球内においてはヘモグロビンと反応してキサントマチンという褐色の色素に変化した。このキサントマチンの生理的意義は、現在のところ明らかではない。糖尿病の患者²³⁾や膀胱癌患者²⁴⁾の血液中に 3-HKN が高濃度に存在しているこ

とが知られており、これらの患者の血液中には赤血球中で 3-HKN が代謝されてキサントマチンが存在する可能性がある。また先天性代謝疾患であるヒドロキシキヌレン症は、肝臓および腎臓のキヌレナーゼ活性の欠損または低下によって起こる²⁵⁾。また Westphal ら²⁶⁾によると、便秘になると赤血球中にメトヘモグロビンが増加するが、これは腸内細菌により産生されたトリプトファン代謝物が血液中に吸収されて起こるという。そのような場合にも、血液中にキサントマチンが蓄積しているかも知れない。Heyningen²⁷⁾は、白内障患者のレンズに 3-HKN が高濃度に依存することを示した。Tomoda ら²⁸⁾は最近褐色白内障レンズの褐色物質は 3-HKN 由来のキサントマチンであろうと推測している。糖尿病白内障ではレンズが褐色に着色していることが知られているが、これは 3-HKN のキサントマチンへの代謝異常ということで説明がつくかもしれない。このように生体内における 3-HKN のキサントマチンへの代謝反応の意義については、今後種々の病態と関連して解明されると期待される。

結 論

1. ヒト赤血球浮遊液に 3-HKN を加えて、37°C, pH 7.0 でインキュベートすると 3-HKN は 2 分子縮合してキサントマチンに代謝された。この反応には赤血球内のヘモグロビンが関与しており、また酸素の存在が必須であることが明らかになった。
2. 3-HKN はオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンによってキサントマチンに代謝された。この

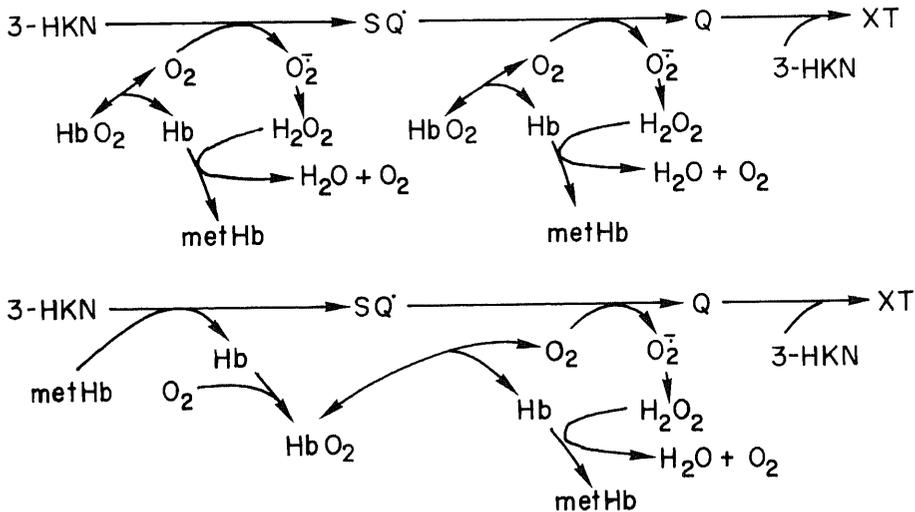


Fig. 15. Possible mechanism of the reaction between 3-HKN and hemoglobin. SQ, Q, and XT represent semiquinone form of 3-HKN, quinone form of 3-HKN and xanthommatin, respectively.

反応はオキシヘモグロビンの酸化反応、メトヘモグロビンの還元反応と共役していることが示された。

3. 3-HKN によるヘモグロビンの酸化還元反応及びヘモグロビンによる3-HKNの代謝には O_2 や H_2O_2 などの活性酸素が関与していると推測される。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師米山良昌教授に深謝申し上げます。さらに、本研究に多大な御教示を頂きました友田輝夫助教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究遂行に御協力、御援助を下さいました第一生化学教室員各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Perutz, M. F.: Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: Influence of structure of the globin on the heme iron. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 327-386 (1979).
- 2) Bunn, H. F. & Forget, B. G.: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects, 1st ed., p14-125, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
- 3) 今井清博: 血色素の共同作業。蛋白質核酸酵素, **32**, 529-536 (1987).
- 4) Orrenius, S.: On the mechanism of drug hydroxylation in rat liver microsomes. *J. Cell Biol.*, **26**, 713-723 (1965).
- 5) Lu, A. Y. H., Jacobson, M., Levin, W., West, S. B. & Kuntzman, R.: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. IV. Hydroxylation of aniline. *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 294-297 (1972).
- 6) Tomoda, A., Yubisui, T., Ida, M., Kawachi, N. & Yoneyama, Y.: Aniline hydroxylation in the human red cells. *Experientia*, **33**, 1276-1277 (1977).
- 7) Mieyal, J. J., Ackerman, R. S., Blumer, J. L. & Freeman, L. S.: Characterization of enzyme-like activity of human hemoglobin. Properties of the hemoglobin-P-450 reductase-coupled aniline hydroxylase system. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3436-3441 (1976).
- 8) 井田雅祥: ヒト赤血球のメトヘモグロビン還元機構に関する研究, 十全医会誌, **91**, 794-802 (1982).
- 9) Tomoda, A., Matsukawa, S., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.: Effect of inositol hexaphosphate on hemoglobin oxidation by nitrite and ferricyanide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1469-1474 (1977).
- 10) Butenandt, A., Schiedt, U. & Biekert, E.: Über ommochrome, III. Mitteilung: Synthese des Xanthommatins. *Liebigs-Ann. Chem.*, **588**, 106-116 (1954).
- 11) Dalglish, C. E.: The relation between pyridoxin and tryptophan metabolism, studied in the rat. *Biochem. J.*, **52**, 3-14 (1952).
- 12) Butenandt, A., Biekert, E., Kubler, H. & Linzen, B.: Über Ommochrome, XX. Zur Verbreitung der Ommatine im tierreich neue Methoden zu ihrer Identifizierung und quantitativen Bestimmung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **319**, 238-256 (1960).
- 13) Butenandt, A., Schiedt, U., Biekert, E. & Kornmann, P.: Über ommochrome, I. Mitteilung: Isolierung von Xanthommatin, Rhodommatin und Ommatin C aus den Schlupfsekreten von *Vanessa urticae*. *Liebigs-Ann. Chem.*, **586**, 217-226 (1954).
- 14) Butenandt, A., Biekert, E. & Linzen, B.: Über ommochrome, VII. Mitteilung, Modellversuche zur Bildung des Xanthommatin in vivo. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **305**, 284-289 (1956).
- 15) van Assendelft, O. W. & Zijlstra, W. G.: Extinction coefficients for use in equations for the spectrophotometric analysis of haemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.*, **69**, 43-48 (1975).
- 16) 友田輝夫, 米山良昌: メトヘモグロビンの生成と還元反応。蛋白質核酸酵素, **32**, 842-853 (1987).
- 17) Bunn, H. F. & Forget, B. G.: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects, 1st ed., p634-662, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
- 18) Fitzpatrick, F., Liggett, W., McGee, J., Bunting, S., Morton, D. & Samuelsson, B.: Metabolism of leukotriene A_4 by human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11403-11407 (1984).
- 19) Yamabe, H. & Lovenberg, W.: Decarboxylation of 3,4-dihydroxyphenylalanine by oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 733-739 (1972).
- 20) Butenandt, A.: Wirkstoffe des Insektenreiches. *Naturwiss.*, **46**, 461-471 (1959).
- 21) Butenandt, A., Schiedt, U., Biekert, E. & Cromartie, R. J. T.: Über Ommochrome, IV. Mitteilung: Konstitution des Xanthommatin.

Liebigs Ann. Chem., **590**, 75-90 (1954).

22) Tomoda, A. & Yoneyama, Y.: On the relationship of hemoglobin oxidation with the conformation of hemoglobin. *Experientia*, **35**, 15-16 (1979).

23) Khattab, M., Abul-Fadl, M., Khalafallah, A. & Hamza, S.: Urinary excretion of certain tryptophan metabolites in diabetics. *J. Egypt. Med. Assoc.*, **55**, 531-541 (1972).

24) Teulings, F. A. G., Peters, H. A., Hop, W. C. J., Fokkens, W., Haije, W. G., Portengen, H. & van der Werf-Messing, B.: A new aspect of the urinary excretion of tryptophan metabolites in patients with cancer of bladder. *Int. J. Cancer*, **21**,

140-146 (1978).

25) 川村正彦: ヒドロキシキヌレニン尿症. 先天性代謝病免疫病ハンドブック (山村雄一監, 荻田善一, 大浦敏明編), 第一版, 392-394 頁, 中山書店, 東京, 1982.

26) Westphal, R. G. & O'Meara, T. M.: Vitamin E and oxidative damage by tryptophan metabolites in experimental enterogenous cyanosis and anaemia. *Brit. J. Hematol.*, **26**, 543-548 (1974).

27) van Heyningen, R.: Fluorescent glucoside in the human lens. *Nature*, **230**, 393-394 (1971).

28) Tomoda, A., Yoneyama, Y., Yamaguchi, T., Kakinuma, K., Kawasaki, K. & Yonemura, D.: Spectroscopic studies of brunescant cataractous lenses. *FEBS lett.*, **219**, 472-476 (1987).

Metabolism of 3-Hydroxykynurenine in Human Erythrocytes Jundo Yamaguchi, Department of Biochemistry (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **96**, 1205—1218 (1987)

Key words: human erythrocytes, hemoglobin, 3-hydroxykynurenine, xanthommatin

Abstract

Methemoglobin was significantly increased in human erythrocytes, when the red blood cells were incubated with 3-hydroxykynurenine, a metabolite of tryptophan, at pH 7.0, 37°C. 3-hydroxykynurenine was metabolized to a brown compound in a reaction coupled with the oxidative reaction of hemoglobin. This compound was identified as xanthommatin which was a dimerized form of 3-hydroxykynurenine by various analyses such as ultraviolet and visible spectrophotometry, infrared spectrophotometry, high performance liquid chromatography and thin layer chromatography. When purified oxyhemoglobin was incubated with 3-hydroxykynurenine, hemoglobin was oxidized to methemoglobin and 3-hydroxykynurenine was dimerized to xanthommatin, showing that the metabolism of 3-hydroxykynurenine is coupled with the oxidation of hemoglobin. On the other hand, when methemoglobin-rich erythrocytes were incubated with 3-hydroxykynurenine, methemoglobin in the erythrocytes was reduced and 3-hydroxykynurenine was dimerized to xanthommatin. Purified methemoglobin was found to have a capacity of metabolizing 3-hydroxykynurenine to xanthommatin as well. However, the formation of xanthommatin did not occur under anaerobic conditions. These results suggest that the metabolism of 3-hydroxykynurenine in human erythrocytes is coupled with the oxido-reductive reactions of hemoglobin and that oxygen is indispensable for the reaction.