

Metabolism of 3-hydroxyanthranilic acid and its Coupling with Oxidoreductive Reaction of Hemoglobin 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/2297/7937

ヒト赤血球における 3-ヒドロキシアントラニル酸の代謝とそれに共役したヘモグロビンの酸化還元反応

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

白 沢 栄 一

(昭和62年2月13日受付)

トリプトファン代謝物質である3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAT)はヒト赤血球で速やかに代謝され、その最終代謝産物は、スペクトロフォトメリー、ペーパークロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーによる分析からシンナバリン酸(CBA)と同定された。一方、3-HATにより、赤血球中のオキシヘモグロビンは半酸化型ヘモグロビンおよびメトヘモグロビンに酸化された。その代謝速度がCBA生成と同様に非常に速いことから、3-HATの代謝と赤血球中のヘモグロビンの酸化還元反応が共役していることが示唆された。さらに、3-HATがオキシあるいはメトヘモグロビンのいずれによっても代謝されること、また、オキシあるいはメトヘモグロビンがこの化合物により各々酸化および還元を受けることが明らかとなり、3-HATとヘモグロビンの一見矛盾した共役反応が示された。なお、デオキシヘモグロビンは3-HATにより酸化されなかった。オキシヘモグロビンの3-HATによる酸化反応はイノシトール-6-リン酸(P_6 -inositol)はあるいはスーパーオキシドデスムターゼ(SOD)により促進され、カタラーゼにより抑制された。また、3-HATは好氣的、嫌氣的ないずれの条件のもとでもメトヘモグロビンを還元したが、好氣的条件下での反応がより速いことが示された。この3-HATによるメトヘモグロビンの還元反応は P_6 -inositolによって促進されたが、SODによる反応の促進は好氣的条件下においてもわずかであった。これらの結果をもとに、赤血球での3-HATの一見矛盾した代謝反応とヘモグロビンの酸化還元反応の機序について考察した。そして、糖尿病あるいは膀胱癌患者においてトリプトファン代謝物質が増加するとの報告を踏まえ、ここに示したヘモグロビン酸化還元反応に共役した3-HATの赤血球内代謝の病理学的意義を推論した。

Key words hemoglobin, tryptophan metabolite, 3-hydroxyanthranilic acid, oxidoreductive reaction, erythrocytes

トリプトファンおよびその代謝物質は肝、脳などを代表とする多くの臓器、組織で代謝される。このトリプトファンの主要代謝物の一つである3-ヒドロキシアントラニル酸(3-hydroxyanthranilic acid, 3-HAT)はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の前駆体になるなど重要な生理活性物質であるが、その主要代謝経路として、これらの臓器においてまず α -アミノ- β -カルボキシムコン酸- ϵ -セミアルデヒド(α -amino- β -carboxymuconic- ϵ -semialdehyde)へ変換されることがよく知られている¹⁾。また一方

において、この3-HATは、 Mn^{++} の存在下で、ヘムタンパク質であるカタラーゼあるいはヘモグロビンによりシンナバリン酸(cinnabarinic acid, CBA)に変換されることが報告されている²⁾³⁾。しかし、このCBAへの代謝経路は現在のところ十分に分かっておらず、その生理的意義も明らかにされていない。

一方、ヘモグロビンを酸化する多くの物質が知られているが、トリプトファン等のアミノ酸およびその代謝物によるオキシ-あるいはメトヘモグロビンの酸化還元については、現在のところまだよく分かっていない

Abbreviations: 3-HAT, 3-hydroxyanthranilic acid; CBA, cinnabarinic acid; P_6 -inositol, *myo*-inositol hexakisphosphate; SOD, superoxide dismutase; ACD, acid citrate dextrose; TLC, thin layer chromatography; oxyHb, oxyhemoglobine; metHb, methemoglobin.

い、Westphalらは3-HATがオキシヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化化する事を報告したり、また、Godaらは5-ヒドロキシアントラニル酸 (5-hydroxyanthranilic acid) がメトヘモグロビンを還元することを示したり⁹⁾。しかし、これらの研究では、この詳細な反応様式を充分明らかにすることはできず、いままお、トリプトファン代謝物質とヘモグロビンの酸化還元反応は不明な点が多い。

著者は、本研究において、3-HATをヒト赤血球とともにインキュベートした時、その細胞内で共役した3-HATのCBAへの代謝とヘモグロビンの酸化および還元反応が生ずることを初めて明らかにした。さらに、この結果をもとに、この3-HATによるヘモグロビンの酸化および還元という一見矛盾した反応の詳細を明らかにすることを目的として、種々条件下でのヘモグロビンの酸化還元反応を調べた。この結果から、赤血球におけるトリプトファン代謝とヘモグロビンの酸化還元反応の機序について考察を加え、その生理的意義を論じた。

材料および方法

1. 材 料

ビス-トリス [2-(bis-(2-hydroxyethyl) amino)-2-(hydroxymethyl)-propane-1,3-diol] およびイノシトール-6-リン酸 (*myo*-inositol hexakisphosphate, P_6 -inositol) は、シグマ社 (St. Louis, Missouri, 米国) 製を、トリプトファン、3-HAT、3-ヒドロキシキヌレニン、キヌレニン、アントラニル酸などのトリプトファン代謝物は和光純薬 (東京) 製を使用した。カタラーゼはバーリンガー社 (Mannheim, 西ドイツ) 製を、スーパーオキシサイドデスマターゼ (superoxide dismutase, SOD) はマイルスラポラトリー社 (Indiana, 米国) 製を使用した。CBAはButenandtらの方法⁸⁾により合成したものをを使用した。

赤血球中ヘモグロビンのメトヘモグロビンへの変換はすでにTomodaらにより報告されている方法⁷⁾に準じて行った。また、分離精製ヘモグロビン溶液はTomodaらの方法⁸⁾で調製した。

反応溶液として、赤血球の反応ではクレブス-リンゲル溶液を、ヘモグロビンの反応では、0.05 M トリス 0.1 M NaCl 緩衝液 (pH 7.0) を使用した。トリプトファン代謝物は0.1 M NaOH 溶液に溶解した後、0.1 M HCl で中和し使用した。

II. 赤血球での3-HATの反応

日本赤十字社から供与されたヒトACD保存血 (採血後3日) を7倍の氷冷生理食塩水で4回遠心洗浄し、ヘマトクリット10%になるよう赤血球をリンゲル溶

液に浮遊した。この血球浮遊液に、最終濃度3 mMの3-HAT溶液を加え、pH 7.0, 37°Cで2時間反応させた。反応後、1 mlの反応液を3回凍結融解することにより溶血した。この溶血液を、予め10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したSephadex G-25 (fine grade) カラムによりヘモグロビン画分およびヘモグロビンを含まない画分に分離した。

III. 分離精製したヘモグロビンでの3-HATの反応

3-HAT (最終濃度500 μ M) をオキシあるいはメトヘモグロビン溶液 (最終濃度、ヘム量として100 μ M) に加え、好氣的あるいは嫌氣的な条件下、25°Cで反応させた。嫌氣的な反応は空気をQガス (ヘリウム: イソブタン; 99.05: 0.95) で置換したツンベルグ型石英セル中で行った。反应用量は2.2 mlで行い、トリプトファン代謝物の最終濃度は2.3 mMであった。使用した P_6 -inositol, カタラーゼ, SODの濃度は各々1 mM, 29 units, 1300 unitsであった。なお、3-HATの光による分解を防ぐため反応はすべて遮光下で行った。反応終了後、赤血球での場合と同様に、反応液をSephadex G-25 (fine grade) カラムによりヘモグロビン画分およびヘモグロビンを含まない画分に分離した。

IV. ヘモグロビンの測定および同定

反応中あるいは反応後のヘモグロビンの酸化、還元はヘモグロビン画分のスペクトロフォトメリーによる450~650 nmの範囲での吸光度を測定することにより行った。また、既にTomodaらにより報告されている方法⁹⁾で、平板等電点電気泳動 (LKB PAG プレート, pH 3.5~9.5) による分析を行った。

V. トリプトファン代謝物の同定と測定

反応後のトリプトファン代謝物の同定はヘモグロビンを含まない画分のシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) およびペーパークロマトグラフィーにより行った。展開溶媒はブタノール/酢酸/蒸留水, 4:1:1 (vol) であった。CBAの測定はスペクトロフォトメリーにより行い、350~550 nmでの吸光度を測定した。

成 績

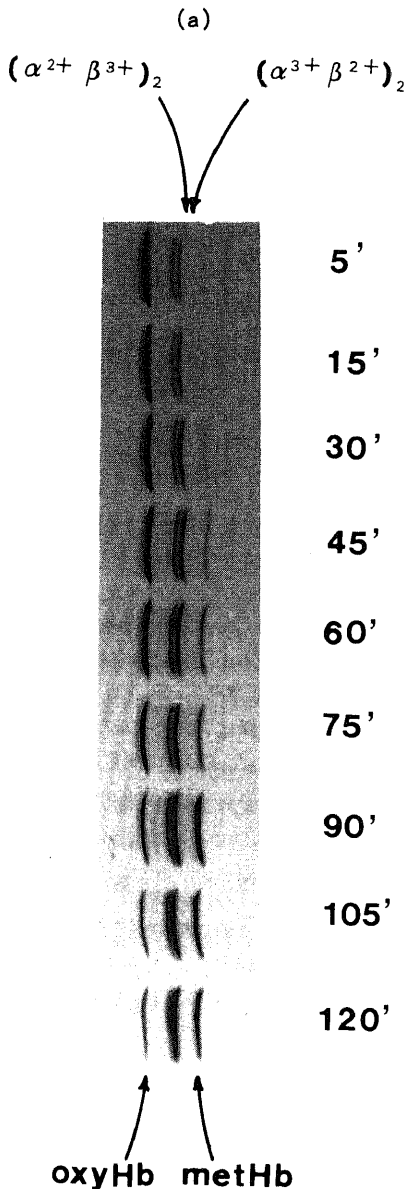
I. 3-HATによる赤血球中ヘモグロビンの酸化

ヒト赤血球を3-HATとともに37°Cで反応した時、血球内ヘモグロビンは直ちに半分酸化型ヘモグロビン [$(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$ あるいは $(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$] およびメトヘモグロビンに酸化された。図1(a)に3-HATと反応後の反応溶血液中ヘモグロビン画分の等電点電気泳動像を示した。図に示すように、4本の泳動パターンが認められた。この泳動パターンは各々オキシヘモグロビン, $(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$ およびメトヘモグロビンを示

す。図1 (b)にこのゲルスキャンニングの結果を示した。この結果に示すように、時間と共にオキシヘモグロビンは半分酸化型ヘモグロビンに変化し、その後、メトヘモグロビンに変換された。しかし、このオキシヘモグロビンからの半分酸化型ヘモグロビンとメトヘモグロビンの生成は反応開始直後の速い反応の後（反応60分後）、平衡を保つことが示された。

II. ヒト赤血球での3-HATの代謝と反応産物の同定

ヒト赤血球において、3-HATが代謝されるか否か



を調べるため、ヒト赤血球と3-HATをインキュベートした。図2 (a)にはこの反応溶血液のヘモグロビンを含まない画分の吸収スペクトル(440~500 nm)の経時的な変化を示した。また、合成CBAの吸収波長⁹⁾である455 nmでの吸光度の経時変化を図2 (b)に図示した。455 nmでの吸光度は時間とともに増加し、CBAが生成されたことが示唆された。また、この結果から、CBA生成反応は図1に示したヘモグロビンに共役した反応であることが示唆された。このCBAの生成は非常に速く、pH 7, 37°Cでの糖代謝におけるグルコースの代謝速度(赤血球では約200 nmol/ml)に匹敵した。

図3にこの反応代謝産物のTLCによる同定の結果を示した。反応溶血液のヘモグロビンを含まない画分標品を合成CBA、アントラニル酸、3-ヒドロキシヌレニンおよびキヌレニンと共に展開した。標品中の反応産物のRf値は合成CBAのそれと一致した。また、ペーパークロマトグラフィーにおいても同様の結果を得た。これらの結果から、ヒト赤血球内で、3-HATがCBAに代謝されることが明らかとなった。

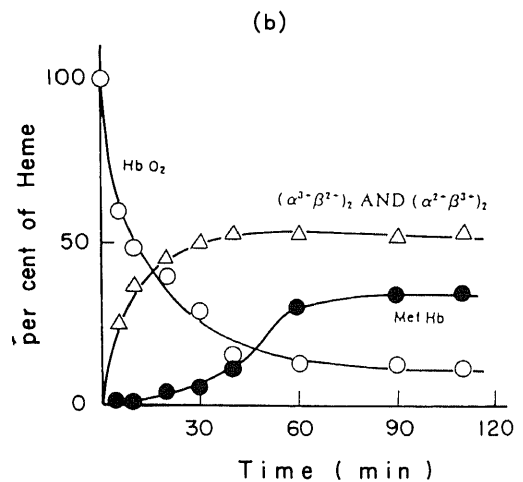


Fig. 1. Analysis of isoelectric-focusing patterns of hemoglobins which were obtained during incubation of erythrocytes with 3-HAT.

(a) Time course of isoelectric-focusing patterns of hemoglobins. (b) Fractional changes in oxyhemoglobin (oxyHb) during incubation of erythrocytes with 3-HAT. The isoelectric-focusing patterns were analysed by gel-scanning at 630 nm, and the heme contents (%) of each of the components [oxyhemoglobin, $(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2 + (\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$ and methemoglobin (metHb)] were estimated. The results were plotted against time. \circ , oxyhemoglobin; \triangle , $(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2 + (\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$; \bullet , methemoglobin.

III. 赤血球における種々の反応条件下での3-HATの代謝

赤血球での3-HATからCBAへの反応について更に詳しい性質を調べるため、赤血球内の様々な条件下でのCBAの産生を測定した。その結果を図4に示す。COガスにより、オキシヘモグロビンをカルボキシヘモグロビンに酸化した赤血球では、3-HATからの

CBA生成速度は明らかに抑制された。しかし、KCNあるいはNaN₃はほとんど影響を示さなかった。さらに、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに変換した赤血

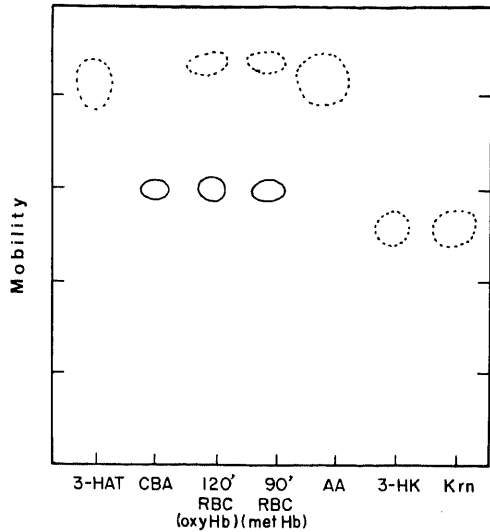
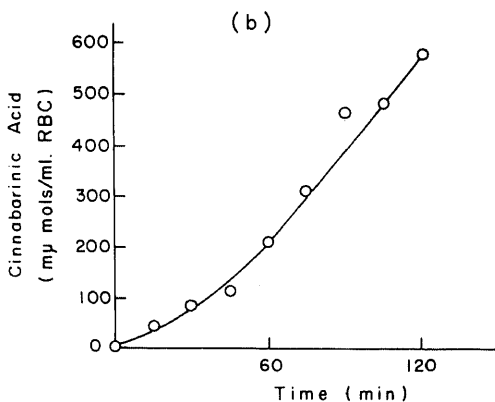
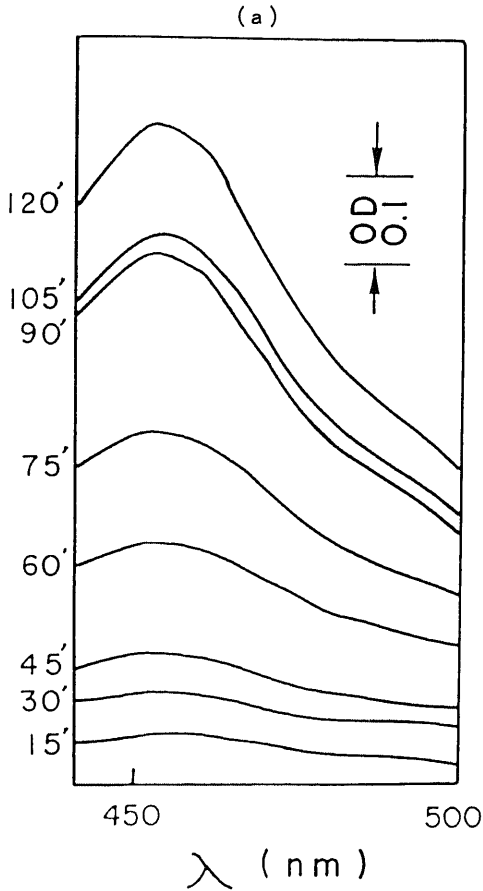


Fig. 3. TLC of the samples obtained after incubation of erythrocytes [with oxy- (oxyHb) or methemoglobin (metHb)] with 3-HAT.

After incubation of erythrocytes (which contain ferrous or ferric hemoglobin inside) with 3-HAT, the samples were removed after 90 (90' RBC) and 120 min (120' RBC). Then they were lysed, and passed through a column of Sephadex G-25 (fine grade). The orange-coloured portion of the effluent was put on the silica gel, and TLC was performed with authentic 3-HAT, cinnabaric acid (CBA), 3-hydroxykynurenine (3-HK), anthranilic acid (AA) and kynurenine (Krn) for comparison. The solvent was butanol/acetic acid/water (4:1:1, by vol).

Fig. 2. Time course of cinnabaric acid formation during incubation of erythrocytes with 3-HAT.

(a) Absorption spectra of the samples obtained by the reaction of erythrocytes with 3-HAT. The erythrocytes were incubated with 3-HAT at 37°C for 2h. The samples were taken out at intervals for analysis. The hemolysates were passed through a column (0.8 cm × 10 cm) of Sephadex G-25 (fine grade). The orange-coloured portions of the effluent were collected and measured spectrophotometrically between 440 and 500 nm. (b) Production of cinnabaric acid during the incubation of erythrocytes with 3-HAT. The amounts of cinnabaric acid were calculated from A₄₅₅ shown in (a) ($\epsilon_{455}^{mM} = 23^6$) and were plotted against time.

球においても、図3に示すようにCBAの生成が認められ、その速度が著しく促進されることが示された。そして、この反応はKCNにより明らかに抑制された。

IV. 分離精製されたヘモグロビンによる3-HATの代謝

図5にオキシ-あるいはメトヘモグロビンと3-HATを好氣的に反応させた後、反応液をSephadex G-25カラムで分離した時のヘモグロビンを含まない画分の440~500 nmの吸収スペクトルを示した。CBAの吸収を示す455 nmにピークをもつ吸収が示され、CBAが産生されたことが示唆された。

この3-HATからCBAへの変換はメトヘモグロビンとの反応の方がオキシヘモグロビンとの反応より2倍高いことが示唆された。なお、この反応産物がCBAであることは、赤血球の場合と同様、TLCおよびペーパークロマトグラフィーにより確認された。

V. 種々条件下での3-HATによるオキシ-, デオキシ-およびメトヘモグロビンの酸化還元

分離精製ヘモグロビンで3-HATの代謝に共役する

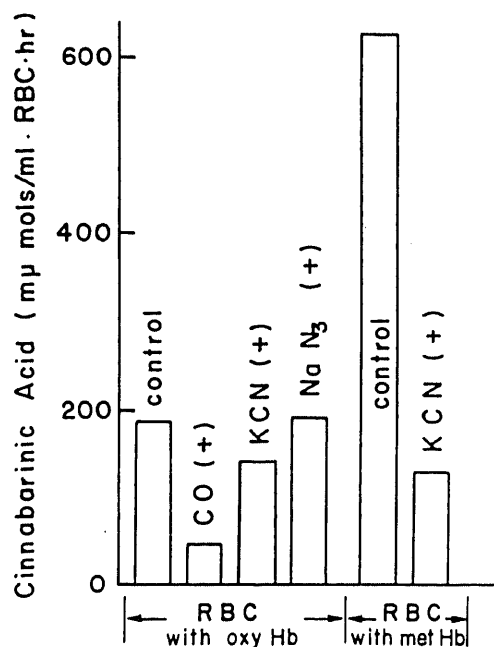


Fig. 4. Rates of formation of cinnabaric acid by human erythrocytes under various conditions.

The erythrocytes [RBC; with oxy- (oxyHb) or methemoglobin (metHb)] were incubated at 37°C for 2 h with 3-HAT, after the addition of KCN or NaN₃ or bubbling with CO. Then the rates of formation of cinnabaric acid were determined by monitoring the changes in A₄₅₅ as described in the legend to Fig. 2.

ヘモグロビンの酸化および還元反応を検討した。測定は反応液のヘモグロビン画分の吸収スペクトルにおける各々のヘモグロビンの吸光度より行った。

表1に3-HATによるオキシ-およびデオキシヘモグロビンの酸化について、その結果を示した。好氣的な条件下でのヘモグロビンの酸化(すなわち、オキシヘモグロビンの自動酸化)は進行し、P_i-inositolの添加で促進した。3-HATがヘモグロビン溶液に加えられた時、オキシヘモグロビンの酸化は非常に速く進行した。

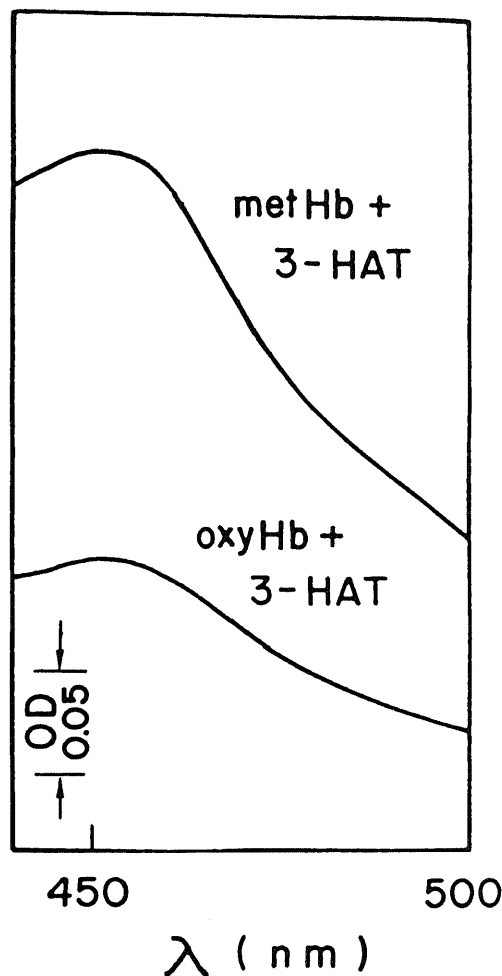


Fig. 5. Absorption spectra of the samples obtained by the reaction of oxyhemoglobin or methemoglobin with 3-HAT.

After oxy- or methemoglobin was allowed to react with 3-HAT at 25°C for 90 min, the reaction mixture was passed through a column of Sephadex G-25 (fine grade). The orange-coloured portion of the effluent was collected and measured spectrophotometrically between 440 and 500 nm.

さらに、この酸化反応も P_6 -inositol で促進された。嫌気的な状況下では、ヘモグロビンの酸化は起こらなかった。すなわち、デオキシヘモグロビンでは、3-HAT による反応は起こらなかった。

表2に、好気的あるいは嫌気的な条件での3-HATによるメトヘモグロビンの還元について示した。いずれの条件においても、3-HATはメトヘモグロビンを還元し、この反応は P_6 -inositol で促進した。しかし、この反応は好気的な条件より、嫌気的な方がより反応は緩慢であった。

さらに、3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化反応について、図6(a)には3-HATの濃度依存性を、(b)にはヘモグロビン濃度の影響を示した。オキシヘモグロビンは3-HATの濃度に依存し酸化された。この結果から、3-HATのヘモグロビン酸化反応の反応定数をオキシヘモグロビンのテトラマーとしての分子量をもとに算出したところ、 P_6 -inositolの非存在下は $71M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ であり、存在下では $420M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。

IV. トリプトファン代謝物によるオキシ-あるいはメトヘモグロビンの酸化還元反応におよぼす酸素ラジカル除去酵素の影響

3-HATのオキシ-あるいはメトヘモグロビンの反応に対する酸素ラジカル除去酵素、すなわちカタラーゼおよびSODの影響を検討した。

図7にカタラーゼあるいはSODの3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化におよぼす影響を578 nmの吸収を測定することにより検討した結果を示す。SODの添加により酸化反応は非常に促進した。しかし、カタラーゼでは、この反応は抑制された。また、SODとともにカタラーゼを加えた場合にも反応の抑制が認められた。

一方、3-HATによるメトヘモグロビンの還元に対するカタラーゼあるいはSODの影響についても検討し、図8にその結果を示した。SODは3-HATのメトヘモグロビンの還元をやや抑制したがその程度はわずかであった。また、カタラーゼはまったく影響をおよぼさなかった。

Table 1. Rates of oxy- and deoxyhemoglobin with 3-HAT under various conditions

		Autoxidation rates of hemoglobin (-3-HAT) ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Oxidation rates of hemoglobin (+3-HAT) ($\mu\text{M}/\text{min}$)
(+) Oxygen	(-) P_6 -inositol	0.044	0.52
	(+) P_6 -inositol	0.175	3.9
(-) Oxygen	(-) P_6 -inositol	0	0
	(+) P_6 -inositol	0	0

The reaction mixture contained oxy- or deoxyhemoglobin ($100\mu\text{M}$ in heme), $500\mu\text{M}$ 3-HAT. The concentration of P_6 -inositol use was 1mM . The values represent the oxidation rates of oxy- (+oxygen) and deoxy hemoglobin (-oxygen) with 3-HAT in the presence (+) or absence (-) of P_6 -inositol. The oxidation rates were calculated by dividing the OD change at $578\text{nm}/\text{min}$ with the difference in millimolar extinction of oxy- and methemoglobin at 578nm ¹⁹.

Table 2. Rates of reduction of methemoglobin with 3-HAT under aerobic and anaerobic conditions

		Reduction rates of hemoglobin ($\mu\text{M}/\text{min}$)
(+) Oxygen	(-) P_6 -inositol	1.75
	(+) P_6 -inositol	10.5
(-) Oxygen	(-) P_6 -inositol	0.52
	(+) P_6 -inositol	2.2

The reaction mixture contained oxy- or deoxyhemoglobin ($100\mu\text{M}$ in heme), $500\mu\text{M}$ 3-HAT. The experiments were performed under aerobic and anaerobic condition as described in legend to Table 1.

考 察

本研究において、トリプトファン代謝物である3-HATが赤血球内ヘモグロビンと反応し代謝されることが見いだされた。また、この反応に伴いオキシヘモグロビンが酸化され、メトヘモグロビンが還元されるという一見矛盾した現象が見い出された。さらにこの現象を解明するため、分離精製したヘモグロビンでの

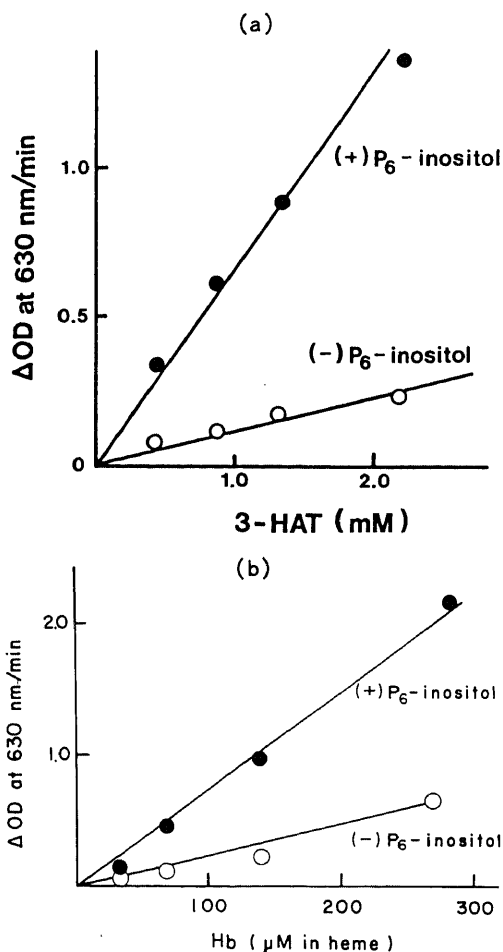


Fig. 6. Effects of hemoglobin or 3-HAT concentrations on oxidation rates oxyhemoglobin with 3-HAT.

The changes in absorbance at 630 nm were measured after the addition of 3-HAT to oxyhemoglobin solution. The reaction was performed at 25°C in the dark. (a) Experiment with various concentration of 3-HAT. The concentrations of oxyhemoglobin were 100 μM in heme. (b) Experiments with various concentrations of oxyhemoglobin. The concentrations of 3-HAT were 500 μM .

種々の条件下での反応を行いその性質を調べた。以下にこれらの結果について、一連の反応機構を考察する。

ヒト赤血球を3-HATとともに反応させた時、血球内オキシヘモグロビンは直ちに半酸化型ヘモグロビン [$(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$ あるいは $(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$] に酸化され、引き続き、メトヘモグロビンに酸化された。しかし、この反応は反応60分以後平衡に達し、3-HATがオキシヘモグロビンによると同様メトヘモグロビンにも共役して反応する可能性が示唆された (図1)。一方、赤血球あるいは分離精製されたヘモグロビンでの3-HATの代謝産物はCBAであることが明らかとなった。この結果から、3-HATの代謝反応が、すでにそのCBAへの酵素的変換の研究で報告されている反応経過^{10,11}、すなわち、図9に示すオルトキノイミン体を中間代謝物とした酸化縮合によりCBAに変換する反応であることが示唆され、ヘモグロビンとの反応がこの過程によることが示された。また、この3-HATが分離精製されたオキシあるいはメトヘモグロビンとの反応において、そのいずれにも共役して反応しCBA生成することが示され (図5)、トリプトファン代謝物によりオキシあるいはメトヘモグロビンの酸化還元が生ずることが示唆された。なお、この3-HATのCBA

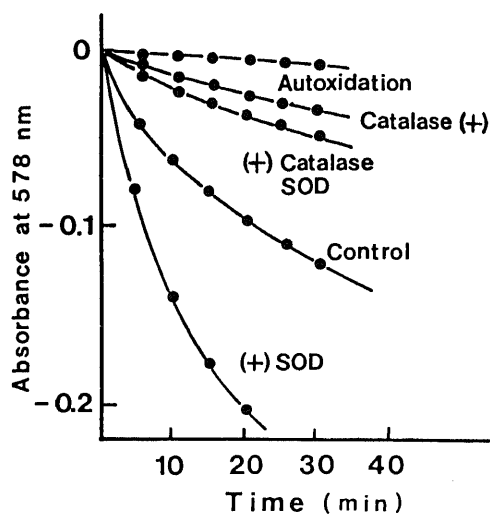


Fig. 7. Effects of superoxide dismutase and catalase on the oxidation of oxyhemoglobin with 3-HAT.

The oxidation of oxyhemoglobin with 3-HAT in the presence or absence of catalase or superoxide dismutase (SOD) was measured spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 578 nm. The reaction mixture contained oxyhemoglobin (100 μM in heme) and 500 μM 3-HAT. The control in the figure shows the experiment with 3-HAT and without enzyme.

の代謝はカタラーゼに触媒されることが知られており²⁾、赤血球内での反応もその可能性が考え得るが、強力なカタラーゼ阻害物質である KCN による反応阻害は生じなかった (図4)。

以上の結果をさらに明確にするため、トリプトファン代謝物によるヘモグロビンの酸化還元反応を調べた。好氣的条件下でオキシヘモグロビンが3-HATにより酸化を受けることが示された (反応定数 $71\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 図6)。しかし、デオキシヘモグロビンでは反応は起こらなかった (表1)。また、好氣的あるいは嫌氣的条件のいずれにおいても、メトヘモグロビンはこれらの化合物により還元された (表2)。ここに示された酸化は既に Winterbourn らにより¹²⁾報告のあるメナジオン (menadione) がオキシおよびメトヘモグロビンを各々酸化あるいは還元するが、デオキシヘモグロビンとは反応しないとの研究結果と非常に似かよった結果であった。さらに、本研究で示された3-HATのオキシヘモグロビンの酸化反応がSODにより促進し、カタラーゼにより阻害される (図7)、また、SODによりメトヘモグロビンと3-HATの反応が阻害されるという結果 (図8) もメナジオンとヘモグロビンと

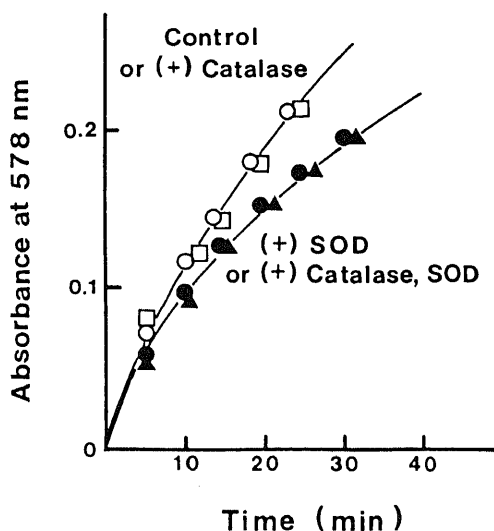
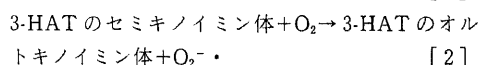
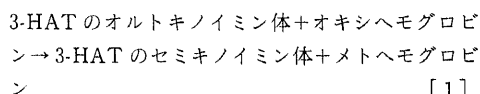


Fig. 8. Effects of superoxide dismutase and catalase on the reduction of methemoglobin with 3-HAT.

The reduction of methemoglobin with 3-HAT in the presence or absence of catalase or superoxide dismutase was measured spectrophotometrically by the increase in absorbance at 578 nm. The reaction mixture contained methemoglobin ($100\ \mu\text{M}$ in heme) and $500\ \mu\text{M}$ 3-HAT. \circ , control; \square , (+) catalase; \bullet , (+) superoxide dismutase; \blacktriangle , (+) catalase plus superoxide dismutase.

の反応に一致した結果であった。これらのことから、本研究における3-HATとヘモグロビンとの反応がメナジオンで示された反応機序とほぼ同様の機序として説明されるものと考え得る。

すなわち、まずオキシヘモグロビンの酸化反応について以下に述べる。3-HATは図9に示すように反応液中でそのオルトキノイミン体と平衡化される。このオルトキノイミン体はさらに3-HATと反応し、CBAを生成することが示された。この反応中、オキシヘモグロビンはオルトキノイミン体と以下に示すように反応し、メトヘモグロビンに酸化される。



この[2]の反応はSODにより過酸化物質が除去されると右辺に傾き、オルトキノイミン体の再生成が進行し、オキシヘモグロビンの酸化が促進する。図7に示したように、SODにより3-HATのオキシヘモグロビン酸化反応が促進したことは、ここに示した反応によることを示唆する。

一方、3-HATによるメトヘモグロビンの還元反応は以下に述べる機序が考え得る。すなわち、ヘモグロビンをメト化した赤血球において3-HATが非常に速くCBAに酸化され (図4)、また、分離ヘモグロビンの好氣的、嫌氣的いずれの反応においても3-HATによるメトヘモグロビンの還元が非常に速いことが示された。これらの結果およびメトヘモグロビンが酸素との反応性のないことから、この反応に酸素ラジカルが

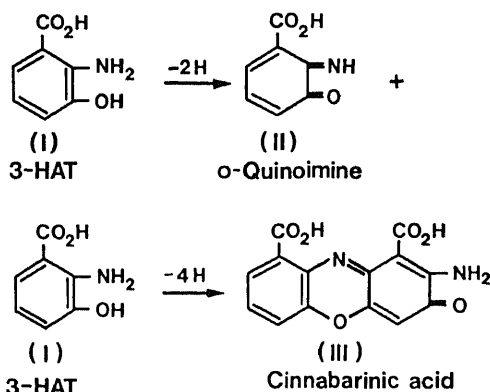


Fig. 9. The process of cinnabarinic acid formation from 3-HAT.

The scheme was derived from that of Subba Rao & Vaidyanathan on the metabolism of 3-HAT to cinnabarinic acid by catalase.

関与することが考えられる。すなわち、3-HAT のオルトキノイミン体が、その 3-HAT とメトヘモグロビンの反応によって生じたオキシヘモグロビンと反応する、そして、反応 [1] および [2] に示したように、3-HAT のセミキノイミン体とスーパーオキシドが形成されるであろう。今回の結果において、SOD が 3-HAT とメトヘモグロビンの反応をわずかではあるが阻害したことから、3-HAT のセミキノイミン体と過酸化物質が好氣的条件下での 3-HAT とメトヘモグロビンの反応の一部を担っている可能性が示唆された (Sutton ら¹³⁾は、スーパーオキシドがメトヘモグロビンを還元する能力を有することを示している)。また、嫌氣的条件下では、3-HAT とメトヘモグロビンの反応はセミキノイミン体とスーパーオキシドの関与なしで直接反応することも考えられるであろう。そして、この場合は、ゆっくりではあるが完全に、メトヘモグロビンはデオキシヘモグロビンに還元されるものと思われる。

さらに、反応のある部分では、メトヘモグロビンは 3-HAT および長時間の反応により生じるヘモグロビンの変性により還元を受けることが考えられる。すなわち、3-HAT によるヘモグロビンの酸化あるいは還元反応は P_6 -inositol により著しく促進された (表 1, 2)。この反応はヘモグロビタンパク質への P_6 -inositol の結合によるオキシ-あるいはメトヘモグロビンのコンフォメーション変化¹⁴⁾¹⁵⁾で説明される。

以上、トリプトファン代謝物質によるヘモグロビンの酸化および還元という一見矛盾した反応の詳細な機序について示唆した。すでに、Westphal ら⁴⁾および Goda ら⁵⁾によりヘモグロビンの 3-HAT による酸化および 5-HAT の還元が報告されているが、本研究で示したようなヘモグロビンの酸化還元反応における 3-HAT を含むトリプトファン代謝物質の役割、あるいはその化合物の酸化還元的代謝の詳細な機序は未だ明らかにされていなかった。本研究の結果明らかとなった反応機序をまとめて図 10 に示した。

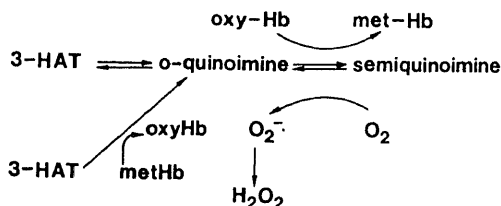


Fig. 10. The reaction between 3-HAT and hemoglobin.

The scheme shows the metabolism of 3-HAT in relation to the mechanism of oxidation and reduction of hemoglobin.

ここに示した研究結果から、トリプトファン代謝物とヘモグロビンの反応機序を明らかにすることができたが、さらに、ヒト赤血球中でこれら化合物とヘモグロビンの酸化還元反応の生じたことから、生体における病理学的意義について考えてみる。すなわち、糖尿病患者¹⁶⁾あるいは膀胱癌患者¹⁷⁾において 3-HAT を含むトリプトファン代謝物が上昇することが既に報告されており、その患者血球中にメトヘモグロビンとともに CBA が増加する可能性は十分に考え得ることであろう。そして、この CBA はミトコンドリアの組織呼吸を阻害する¹⁸⁾など生体内酸化還元反応に伴う病理に関わる代謝物質であることが知られている。赤血球における代謝反応は生体全体では非常に大きな潜在量となることを考え合わせると、この血球中のトリプトファン代謝が生理学的、病理学的に重要な意義を有するものとする。

結 論

本研究において、トリプトファン代謝物である 3-HAT が赤血球内ヘモグロビンと反応し代謝されることが見いだされた。また、この反応に伴いオキシヘモグロビンが酸化され、メトヘモグロビンが還元されるという一見矛盾した現象が見いだされた。この現象を解明するため、さらに分離精製されたヘモグロビンの種々の条件下での反応を行いその性質を調べ、以下の結論を得た。

1) ヒト赤血球あるいは分離精製されたヘモグロビンと 3-HAT を反応した時、赤血球中あるいは分離精製されたヘモグロビンで 3-HAT が CBA に代謝されることが明らかとなった。この結果から、3-HAT のヘモグロビンによる代謝反応はオルトキノイミン体を中間代謝物とした酸化縮合により CBA に変換する反応であることが示唆された。

2) ヒト赤血球で 3-HAT よりヘモグロビンの酸化還元反応が起こることが明らかとなった。さらに、このトリプトファン代謝物によるヘモグロビンの酸化還元反応を調べ、好氣的条件下でオキシヘモグロビンが 3-HAT により酸化を受ける (反応定数 $71M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) が示された。しかし、デオキシヘモグロビンでは反応は起こらなかった。また、好氣的あるいは嫌氣的条件のいずれにおいても、メトヘモグロビンはこの化合物により還元された。

3) この 3-HAT のオキシヘモグロビンの酸化反応が SOD により促進し、カタラーゼにより阻害された。また SOD により、メトヘモグロビンの 3-HAT による還元がわずかではあるが阻害された。

以上の結果から、トリプトファン代謝物質によるヘ

メグロビンの酸化還元機序を明らかにし、さらに、その生理学的、病理学的意義を考察した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った米山良昌教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御援助を賜った友田禰夫助教授に深甚の謝意を表します。併せて、本研究遂行に際し、多大な御指導、御協力を賜りました金沢大学第一生化学教室の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Nishizuka, Y., Ichiyama, A. & Hayaishi, O.: Metabolism of the benzene ring of tryptophan (Mammals), p.463-491. In Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. (ed.), Methods in enzymology, Vol. 17A, Academic Press, New York, 1970.
- 2) Savage, N. & Prinz, W.: Cinnabarinatase synthase from baboon (*Papio ursinus*) liver. Identity with catalase. Biochem. J., 161, 551-554 (1977).
- 3) 石黒伊三雄, 長村洋一, 原 明: Hemoglobin による *o*-Aminophenol 誘導体から Phenoxazine 色素の生成 (第 1 報), Mn^{2+} 存在下における 3OH-anthranilic Acid より Cinnabarinic Acid への変化. 薬学雑誌, 91, 760-765 (1971).
- 4) Westphal, R. G. & O'Meara, T. M.: Vitamin E and oxidative damage by tryptophan metabolites in experimental enterogenous cyanosis and anemia. Brit. J. Haematol., 26, 543-548 (1974).
- 5) Goda, K., Ueda, T. & Kotake, Y.: Kinetic studies of the reduction of methemoglobin by 5-hydroxyanthranilic acid, tryptophanmetabolite. Biochem. Biophys. Res. Commun., 78, 1198-1203 (1977).
- 6) Butenandt, A., Keck, J. & Neubert, G.: Über Oxydationsprodukte der 3-Hydroxy-anthranilsäure. Justus Liebig's Ann. Chem., 602, 61-72 (1957).
- 7) Tomoda, A., Ida, M., Tsuji, A. & Yoneyama, Y.: Mechanism of methaemoglobin reduction by human erythrocytes. Biochem. J., 188, 535-540 (1980).
- 8) 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).
- 9) Tomoda, A., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.: Characterization of intermediate hemoglobin produced during methemoglobin reduction by ascorbic acid. J. Biol. Chem., 253, 7415-7419 (1978).
- 10) Subba, Rao, P. V., Jegannathan, N. S. & Vaidyanathan, C. S.: The conversion of 3-hydroxyanthranilic acid to cinnabarinic acid by the nuclear fraction of rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 145-149 (1964).
- 11) Subba Rao, P. V. & Vaidyanathan, C. S.: Enzymic conversion of 3-hydroxyanthranilic acid into cinnabarinic acid. Partial purification and properties of rat-liver cinnabarinatase synthase. Biochem. J., 99, 317-322 (1966).
- 12) Winterbourn, C. C., French, J. K. & Claridge, R. F. C.: The reaction of menadione with haemoglobin. Mechanism and effect of superoxide dismutase. Biochem. J., 179, 665-673 (1979).
- 13) Sutton, H. C., Roberts, P. B. & Winterbourn, C. C.: The rate of reaction of superoxide radical ion with oxyhaemoglobin and methaemoglobin. Biochem. J., 155, 503-510 (1976).
- 14) Adams, M. L. & Schuster, T. M.: Phosphate-dependent spectroscopic changes in liganded hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 525-531 (1974).
- 15) Perutz, M. F., Fersht, A. R., Simon, S. R. & Roberts, G. C. K.: Influence of globin structure on the state of the heme. II. Allosteric transitions in methemoglobin. Biochemistry, 13, 217-2186 (1974).
- 16) 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).
- 17) 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 the bladder. Int. J. Cancer, 21, 140-146 (1978).
- 18) Zollener, H.: Effects of cinnabarinic acid on mitochondrial respiration. Biochem. Pharmacol., 25, 643-648 (1976).
- 19) van Assendelft, O. W. & Zijlstra, W. G.: Extinction coefficients for use in equation for the spectrophotometric analysis of haemoglobin mixtures. Anal. Biochem., 69, 43-48 (1975).

Metabolism of 3-hydroxyanthranilic acid and its Coupling with Oxidoreductive Reaction of Hemoglobin in Human Erythrocytes Eiichi Shirasawa, Department of Biochemistry (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 96, 338—348 (1987)

Key words : hemoglobin, tryptophan metabolite, 3-hydroxyanthranilic acid, oxidoreductive reaction, erythrocytes

Abstract

3-Hydroxyanthranilic acid (3-HAT), a metabolite of tryptophan, was rapidly metabolized by human erythrocytes. The final product was determined to be cinnabarinic acid (CBA) by spectrophotometry, paper chromatography and thin layer chromatography. On the other hand, oxyhemoglobin in erythrocytes was oxidized to half-oxidized hemoglobin and methemoglobin by 3-HAT, and the oxidation rates were very high, as those of cinnabarinic acid formation, suggesting that the metabolism of 3-HAT is coupled with the oxidoreductive reaction of intracellular hemoglobin. This idea was further confirmed by the findings that 3-HAT was metabolized to CBA by oxy- or methemoglobin and that oxy- and methemoglobins were oxidized and reduced by 3-HAT respectively. The oxidation of oxyhemoglobin with 3-HAT was much accelerated in the presence of *myo*-inositol hexakisphosphate or superoxide dismutase, but was much suppressed in the presence of catalase. Deoxyhemoglobin was not oxidized by 3-HAT. The reduction of methemoglobin with 3-HAT proceeded both under aerobic and anaerobic conditions, though the rate of reduction was much faster under an aerobic condition than an anaerobic condition. The reduction of methemoglobin with 3-HAT was accelerated by *myo*-inositol hexakisphosphate, but was partially suppressed by superoxide dismutase under an aerobic condition. On the basis of these results, the paradoxical effects of 3-HAT is discussed in relation to the mechanism of oxidation and reduction of hemoglobin. The significance of the metabolism of 3-HAT and the oxidoreductive reaction of hemoglobin with 3-HAT may be associated with the pathological conditions of increased tryptophan metabolites levels in the blood of diabetic or urinary bladder cancer subjects.